The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Efficient One-Pot Synthesis of Glycoforms of CCL1 and the Evaluation of the Hydration Area of Glycoproteins |
| Author(s) | 芝田, 大之 |
| Citation | 大阪大学, 2022, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/87825 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（　芝田　大之　） | |
|---|---|
| 論文題名 | Efficient One-Pot Synthesis of Glycoforms of CCL1 and the Evaluation of the Hydration Area of Glycoproteins<br>（糖タンパク質CCL1グリコフォームの効率的ワンポット合成と特異的水和領域の評価） |

論文内容の要旨

糖タンパク質上の糖鎖は、生体内で様々な役割を担っている。しかし糖鎖構造の不均一性から糖鎖付加の普遍的な機能はわかっていない。そこで、本研究では糖タンパク質上の糖鎖の機能とその存在意義を明らかにすることを目的とし、種々の均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質を化学合成し、その糖鎖機能を調べた。

初めに、水の凍結を阻害する不凍活性を有する不凍糖タンパク質(AFGP)の糖鎖機能に注目した。AFGPの構造は、(Ala-Thr-Ala)の繰り返し配列により構築され、Thr側鎖水酸基には、Gal-β-(1→3)-GalNAcの二糖が結合した構造を有している(Figure 1a)。AFGPの活性発現にはGalNAc残基の付加が必須であることが報告されていたが、末端のGal残基の役割はわかっていなかった。本研究ではAFGP上の末端Gal残基の立体構造が、どのように活性に影響しているのかを詳細に解明することを目指し、非天然型構造を持つ$(AT(Glc\text{-}\beta\text{-}(1\rightarrow3)\text{-}GalNAc)A)_{10}$と、天然型構造を有する$(AT(Gal\text{-}\beta\text{-}(1\rightarrow3)\text{-}GalNAc)A)_{10}$を化学合成し、これらの機能解析をおこなった。その結果、末端Gal残基からGlc残基への置換は、AFGPの立体構造を大きく変えることなく、その不凍活性のみを減少させることを明らかにした(Figure 1b)。これらの結果から、糖鎖の特異的な水和による周辺の水分子の挙動の変化が、不凍糖タンパク質の活性に影響している可能性を見出した。また、このように糖鎖の立体構造のわずかな違いで水の周辺の溶媒環境が変化するのであれば、より大型の構造をもつN-結合型糖鎖において、そのような現象が顕著に発現するのではないかと考えた。

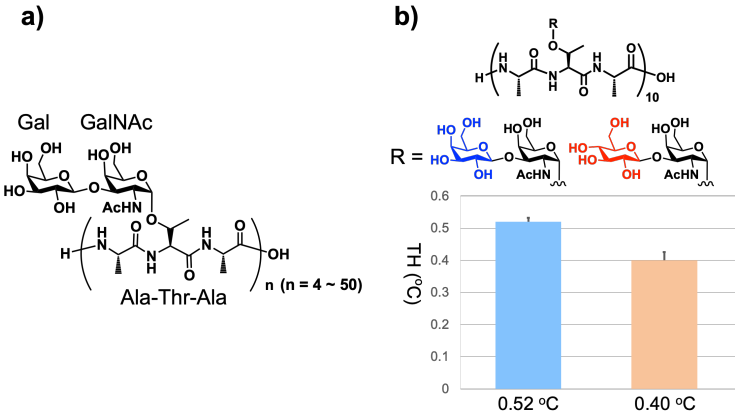


Figure 1. a) AFGPの一次構造
b) 化学合成したAFGPとその不凍活性

そこで、タンパク質上でのN-結合型糖鎖の水和環境を調べるために、ケモカイン糖タンパク質CCL1をプローブ分子として選んだ。CCL1は、1本のN結合型糖鎖をもつ糖タンパク質であり、X線結晶構造解析から糖鎖の有無によってたんぱく質の立体構造に変化がないことが、すでに明らかとなっていた。また、水和環境の分析手法として、水素重水素交換質量分析(HDX-MS)を利用することとした。一般的にHDX-MSの重水素交換パターンは、タンパク質の立体構造の違いによって変化する。糖タンパク質と糖鎖を除去したタンパク質の間で構造が同一である場合、これらタンパク質部分のHDX-MSパターンの違いは、糖鎖の影響を反映することになる。したがって、糖鎖構造が明確で、均一な構造を有する糖タンパク質を基質として利用したHDX-MSを行うことで、糖鎖と水との相互作用を評価できると考えた。

まず、本研究では種々の糖鎖構造を有するCCL1グリコフォームを簡便に化学合成するため、アミノチアゾリンを脱離基とした新規ワンポット連結反応を開発した(Figure 2)。ペプチドアミノチアゾリン体は中性緩衝液条件下で、不活性なペプチド誘導体である。そのため、NCLの際に一般的に用いられる、C-末端にチオエステルをもつペプチド誘導体との間で、位置選択的なNCLを行うことができる。一方で、ペプチドアミノチアゾリン体は、過剰量のチオールを含む緩衝溶液で処理することで、NCLに利用可能なペプチドチオエステル体へと変換できため、煩雑な作業なくペプチドの反応性を制御することができる。本合成手法では、効率的にペプチド連結を行うことができただけでなく、フォールディング反応までワンポットで実施可能であった。これを利用し、4種類のCCL1グリコフォームの合成を達成した。

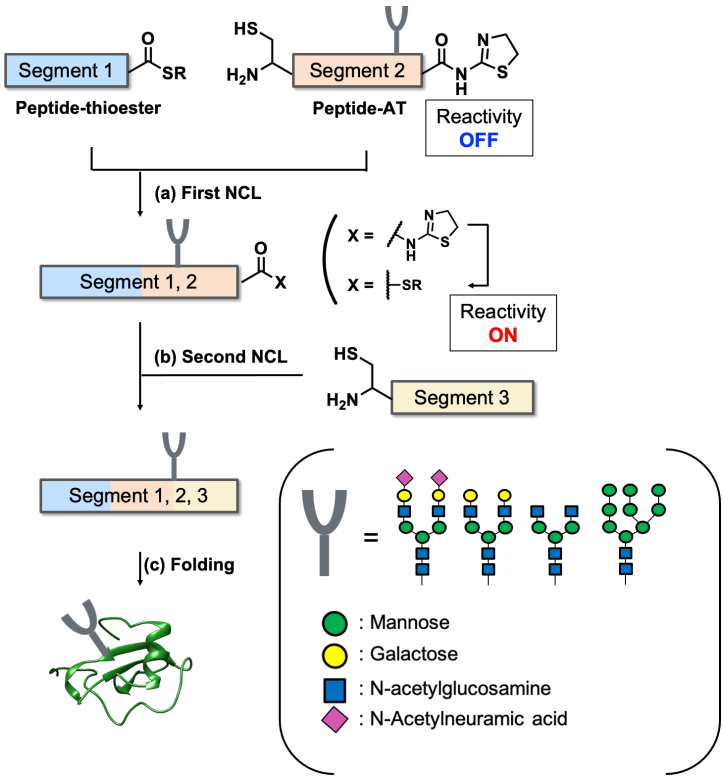


Figure 2 CCL1グリコフォーム合成の概略図

合成した種々の糖鎖構造をもつCCL1グリコフォームと、糖鎖をもたないCCL1を基質として、HDX-MS実験によるN-結合型糖鎖の水和領域の評価をおこなった。この結果、糖鎖が、タンパク質上で自由に周辺の水分子と相互作用する分子として働いている様子を、初めて実験的に観測することができた。さらにこの相互作用の様式は、糖鎖のサイズによっても変化しうることが示唆された。また、タンパク質と糖鎖の重水素化数を明確に区別するために、糖加水分解酵素であるPNGase Aを用いたHDX-MSを行なった。この結果から、糖鎖部分が多くの水を集める機能があるとともに、これによりタンパク質部分の水和状態にも影響を与うることを示唆する結果を得た。

以上のような研究結果から、糖タンパク質上の糖鎖が、水との相互作用を介してタンパク質機能を変化させる機能を備えている、というこれまでにない新しい知見得るに至った。このような機能は、単に糖タンパク質表面の水和状態を変化させるだけでなく、糖タンパク質の分子間相互作用にも影響しうる。本研究の知見は、未だ不明瞭である糖タンパク質上の糖鎖について、普遍的な機能の一端を示すものではないかと考えている。

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名　（芝田大之） | | |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | （職） | 氏　名 |
| 主 査 | 教授 | 梶原　康宏 |
| 副 査 | 教授 | 北條　裕信 |
| 副 査 | 教授 | 高尾　敏文 |

## 論文審査の結果の要旨

芝田氏の博士論文「Efficient One-Pot Synthesis of Glycoforms of CCL1 and the Evaluation of the Hydration Area of Glycoproteins（糖タンパク質CCL1グリコフォームの効率的ワンポット合成と特異的水和領域の評価）」について審査をおこなった。

これまで、タンパク質や糖鎖単独で、それらの水和機構に関する研究がなされた例はあるが、糖タンパク質に関しての報告例はない。そこで、芝田氏は、いくつかの異なる糖鎖を持つ糖タンパク質を合成し、糖鎖の違いによる水和状態の変化を解析するための研究を行なった。本論文は、糖タンパク質糖鎖の分子表面の水和殻に対する影響を調べるという糖鎖の新たな機能について調べたものである。

芝田氏は、まず、不凍活性を有する糖ペプチドを合成し、その糖鎖の水酸基根本の不斉がどのように不凍活性に影響するか調べた。　その結果、水に溶解度が低いガラクトースをもつ二糖の方が、水に溶けやすいグルコース型よりも不凍活性が高くなることを明らかにした。芝田氏は、これはガラクトース周辺の水が糖水酸基の不斉の影響で熱力学的に不安定な状態になることが原因と考察した。すなわち、水分子が、糖水酸基と安定な結合を形成しないため、動き続け、その結果、水が凍るためにはより低温になる必要があることを考察した。

芝田氏は、この糖鎖機能は、一般的な糖タンパク質でも起こり得るのではないかと考え、ケモカイン CCL-1 を例として用い、化学合成し、更にその糖鎖と水の相互作用を調べることにした。そして、芝田氏は、アミノチアゾリンを利用した新しいチオエステル等価体を開発し、3 つのセグメントをワンポットで結合する方法を開発した。そして、糖鎖には、複合型のジシアロ 11 糖、アシアロ 9 糖、アガラクト 7 糖、高マンノース型 11 糖を持つセグメントを Fmoc 法により合成し利用することで、種々の糖鎖を持つ CCL1 を得た。

得られた糖タンパク質の水和度の検証は、水素重水素交換質量分析法でおこなった。種類の異なる糖鎖をもつ糖タンパク質を、それぞれ重水中で重水素置換を行った。そして、酵素によりペプチドに切断後、質量分析により重水素に置換した領域を特定することで糖鎖の違いによるタンパク質主鎖への水和度を評価した。結果として、糖鎖が大きくなるとタンパク質主鎖における重水素置換の割合が高くなることを見出している。すなわち、糖鎖周りのペプチド鎖が他のペプチドよりも優位に重水素化されていた。さらに、芝田氏は、その糖ペプチドセグメントの重水素化率が糖鎖の有無でどの程度変化するかも別途調べ、糖鎖が特異的に水分子と相互作用していることを明らかにした。

上記の成果は、糖質化学、タンパク質化学の研究分野において非常に有用で高く評価できる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。