



Title	Homogeneous Glycoprotein Synthesis Utilizing Bifunctional Glycosyl α -Amino Thioacid
Author(s)	野村, 幸汰
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87830
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名	(野村幸汰)
論文題名	Homogeneous Glycoprotein Synthesis Utilizing Bifunctional Glycosyl α -Amino Thioacid (二官能性糖鎖結合型 α アミノチオアシッドを利用した糖タンパク質精密合成)

論文内容の要旨

Glycosylation is a major modification of secreted and cell surface proteins, however the resultant glycans show a considerable heterogeneity in their structures. To understand the biological functions arising from each glycoform, the preparation of homogeneous glycoproteins is essential for extensive biological experiments. To establish a more robust and rapid synthetic route of homogeneous glycoproteins, several key reactions based on α -amino thioacids have been studied. Extensive studies found that diacyl disulfide coupling (DDC) between a glycosyl asparagine thioacid **B** and a peptide thioacid **A** yielded a glycopeptide thioacid **C** (Figure 1).

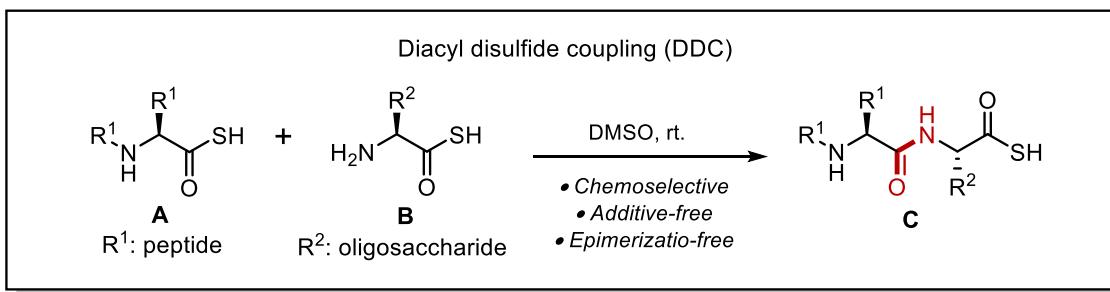


Figure 1. Reaction scheme of diacyl disulfide coupling (DDC).

This efficient coupling reaction enabled me to develop a new glycoprotein synthesis method, chemical glycan insertion strategy, which can insert glycosyl asparagine **E** between two unprotected peptides **D, F** (Figure 2). The first coupling is DDC between a peptide thioacid **D** and a glycosyl asparagine thioacid **E**. Because the resultant glycopeptide has a thioacid form at its C terminus, the thioacid capture ligation (TCL) can apply to the coupling of glycopeptide thioacid and another peptide **F** having *p*-nitropyridylsulfide (Npys) group at its N-terminus to afford the full-length glycoprotein **G**. Subsequent desulfurization of full-length glycoproteins **G** can finally yields a natural form of glycoproteins **H**.

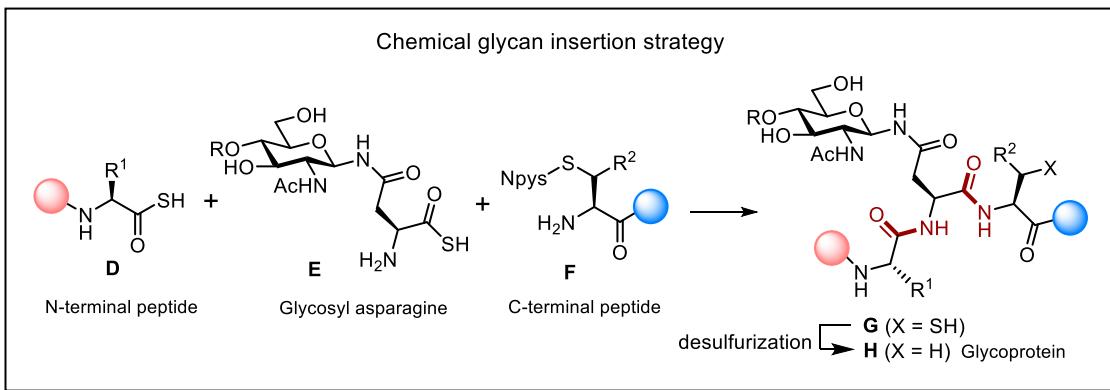


Figure 2. Chemical glycan insertion strategy for the synthesis of glycoproteins.

Applying this strategy, bioactive cytokines, interleukin 3 (IL3, **1**), CC chemokine ligand 1 (CCL1, **2**) and serine protease inhibitor kazal type 13 (SPINK13, **3**) having a biantennary sialyloligosaccharide respectively were synthesized within a few steps (Figure 3). Previous glycoprotein synthesis methods required valuable glycosyl asparagine in the early stage and subsequent multiple glycoprotein synthesis routes. However, the developed new concept can generate glycoproteins within a few steps from peptides and glycosyl asparagine thioacids.

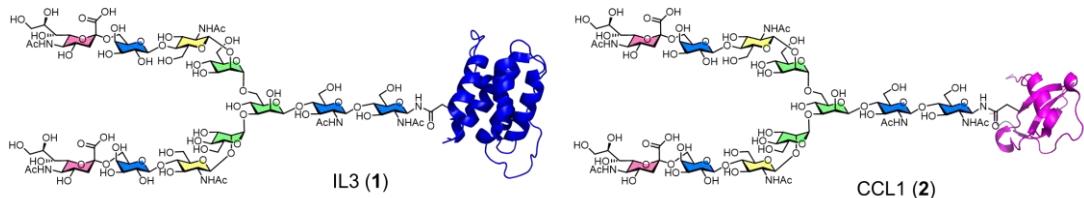


Figure 3. Synthetic examples utilizing chemical glycan insertion strategy with a bifunctional glycosyl α -amino thioacid.

In terms of the synthesis of SPINK13 **3**, DDC and TCL should be performed with the low reactive proline and bulky valine and the synthesis is therefore challenging. The first a glycosyl asparagine thioacid **4** was coupled to an N-terminal peptide prolyl thioacid **5** using DDC to afford the glycopeptide thioacid **6** in 28% yield. Then, the resultant glycopeptide thioacid **6** was coupled with C-terminal peptide having the Npys group at β -mercaptovaline **7** utilizing TCL to give a full-length glycoprotein **8** in 59% yield. After desulfurization and deprotection of Acm protecting groups convergently afforded the linear glycoprotein polypeptide **9** and stepwise dialysis folding conditions gave the desired glycoproteins folded SPINK13 **3** (Figure 4).

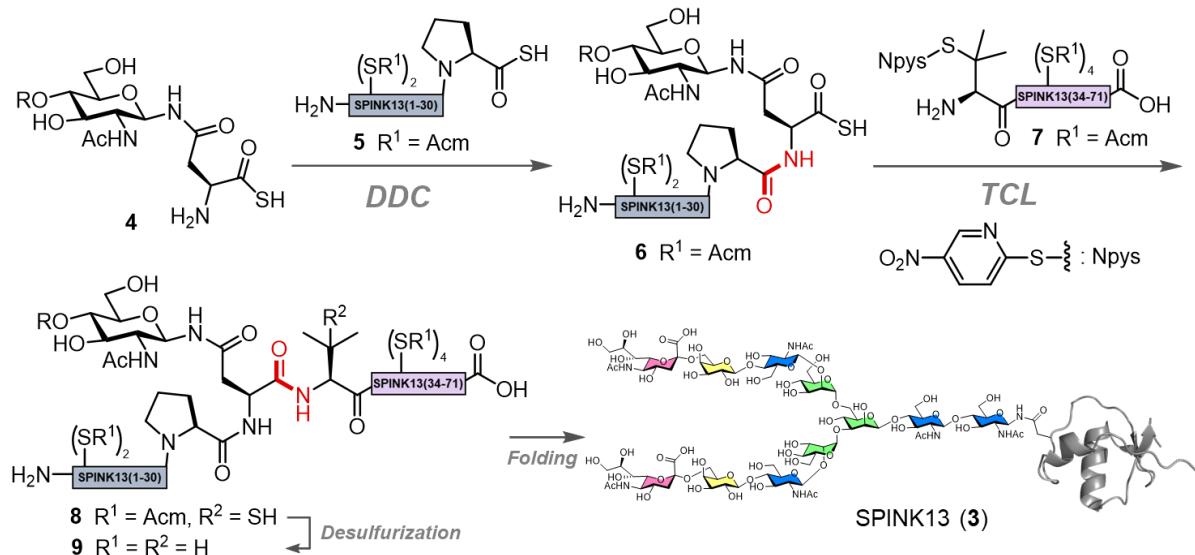


Figure 4. Synthetic scheme of serine protease inhibitor Kazal type 13 (SPINK13, **3**).

Furthermore, using homogeneous glycoproteins IL3 **1** and SPINK13 **3** synthesized by the developed strategy as chemical probes, several *in vitro* bioassays could be performed.

These achievements indicate that our new synthetic strategy of homogeneous glycoproteins can be efficiently applied to not only the synthesis of chemical probes but also the various bioassays for the elucidation of the glycan structure-bioactivity relationship.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (野村幸汰)	
	(職)
論文審査担当者	主査 教授 梶原康宏
	副査 教授 深瀬浩一
	副査 教授 北條裕信
	副査 特任教授 伊藤幸成

論文審査の結果の要旨

野村氏の博士論文「Homogeneous Glycoprotein Synthesis Utilizing Bifunctional Glycosyl α -Amino Thioacid(二官能性糖鎖結合型 α アミノチオアシッドを利用した糖タンパク質精密合成)」について審査をおこなった。

野村氏は、独自に Diacyl disulfide coupling (DCC)法によるペプチド結合形成法を見出した。この新規反応によって、ペプチドチオアシッドと、糖アスパラギンチオアシッドを反応させることで、C末端に糖鎖が結合した糖鎖ペプチドチオアシッドの合成法を確立した。この際、ペプチドチオアシッドのC末端のアミノ酸がどのような種類で実施が可能か調べるとともに、アミノ酸の不斉炭素がエピメリゼーションを起こさないことを確認した。DCCにより合成した糖鎖ペプチドチオアシッドは、そのC末端に再度チオアシッドが生成するので、このチオアシッド基を使ってペプチド鎖を延長することが可能である。ここでは、Tamらが見えていた Thioacid capture ligation (TCL)を組み合わせることにより、糖ペプチドのC末端にペプチド鎖を導入して、標的糖タンパク質全長を一気に構築する手法を開発した。そして、この合成方法を、SPINK13、CCL-1、IL-3の合成に適用し、脱保護、フォールディング過程を含めた合成に成功した。SPINK13の合成においては、結合部位が反応性の低いプロリンや、バリンであるため、反応条件を検討して収率の向上を行なった。また、得られた糖タンパク質の糖鎖の機能を調べるため、糖鎖の有無での生物活性変化も解析し、興味深い考察をした。

野村氏の新規手法は、糖タンパク質の実践的合成に適用できることを実証している。これは糖タンパク質の化学合成において革新的なものであるのみならず、さまざまな翻訳後修飾を受けたタンパク質の合成への応用が期待できる。

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。