



Title	Novel folding-assisted thioesterification method for semi-synthetic study of homogeneous glycoproteins
Author(s)	Liu, Yanbo
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87833
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

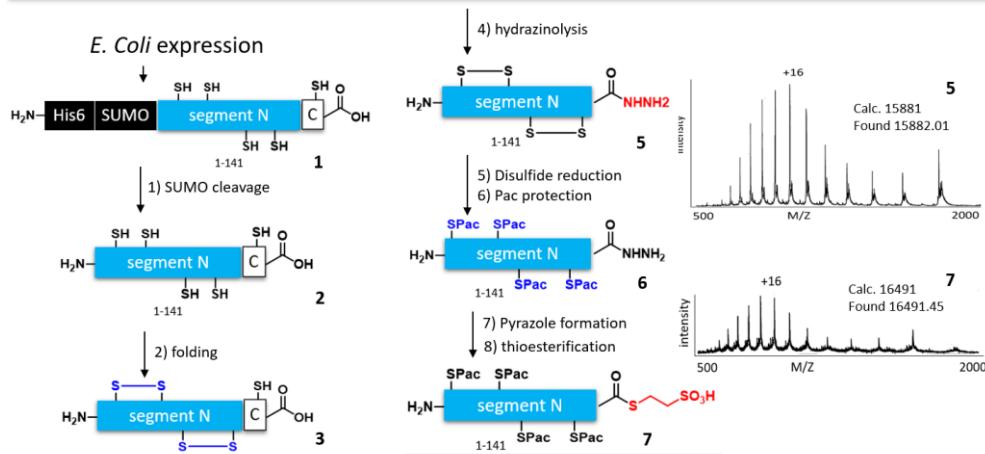
The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (Yanbo Liu)		
論文題名	<p>Novel folding-assisted thioesterification method for semi-synthetic study of homogeneous glycoproteins (フォールディングを利用した新規チオエステル化法による均質な糖タンパク質の半合成研究)</p>			
論文内容の要旨				
<p>Preparation of glycoproteins having homogeneous oligosaccharides is essential approach for understanding the glycan function at molecular level. However, current mammalian cell expression system is usually not able to yield such homogeneous form. Moreover, total chemical synthesis using solid phase peptide synthesis (SPPS) is time-consuming. Semi-synthesis combining E. coli expression and chemical synthesis appears to be an efficient method toward homogeneous glycoproteins. However, the current methods for expressed peptide thioesterification, which is essential for semi-synthesis, is sometimes incompatible toward synthesis of complex sequence.</p> <p>In this research project, we have been establishing a novel semi-synthetic strategy without using SPPS in order to obtain homogeneous glycoprotein within a few chemical conversion steps. IL-6 having N-glycan at Asn143 was chosen as target glycoprotein. In this strategy, the challenging expressed-peptide thioesterification of N-terminal segment consist of 141 residues was achieved by a newly developed folding-assisted thioesterification method. (figure 1) In this method, peptide hydrazide derivative was obtained as a versatile precursor that could be utilized for various ligation method. The glycopeptide was prepared by thioacid capture ligation using chemically synthesized asialylglycodipeptide and an expressed peptide. The final ligation step which afforded full-length glycosylated IL-6 was examined using thioester, selenoester or thioacid derivative which were prepared via folding-assisted thieosterification. (figure 2)</p>				



1) SUMO protease, 50 mM Tris-HCl, 37.5 mM NaCl, 30°C, pH=8 2)
6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, 23°C, pH=7.8, 9h 3) 3 mM NTCB, 6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, pH=8 4) 0.5% v/v hydrazine monohydrate, 1 M Gn-HCl, 33 mM Tris-HCl, 23°C, pH=10.5 5) 3 mM TCEP, 6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, pH=7 6) 20 eq. Pac-Br, DMF, 6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, pH=7.2 7) 1.5 eq. acetylacetone, 6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, 23 °C, pH=3 8) 130 mM MesNa, 6 M Gn-HCl, 0.2 M phosphate, pH=3

Figure 1 folding-assisted thioesterification

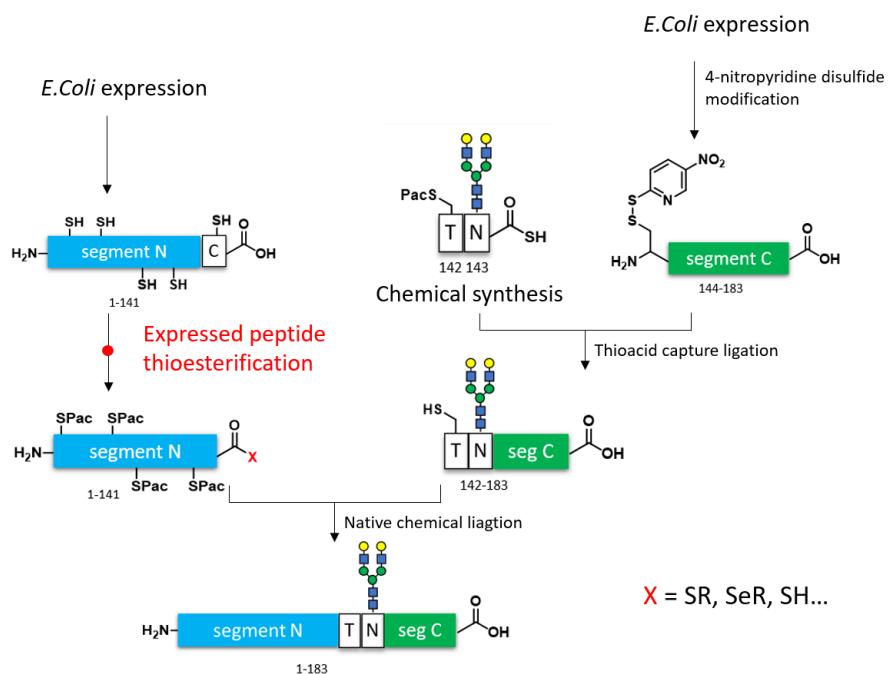


Figure 2 Semi-synthetic strategy toward N143-glycosylated IL-6 by utilizing folding-assisted thioeserification

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Yanbo Liu)		
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	鈴木 孝禎

論文審査の結果の要旨

Yanbo Liu 氏の博士論文「Novel folding-assisted thioesterification method for Semi-synthetic study of homogeneous glycoproteins(フォールディングを利用した新規チオエステル化法による均質な糖タンパク質の半合成研究)」について審査をおこなった。

Liu 氏は、均一な複合型糖鎖を持つインターロイキン-6(IL-6)の半合成研究を行った。IL-6 は二箇所(Asn44, 143)に N-結合型糖鎖を持つが、Asn44 はすでに他のグループにより合成されているため、Liu 氏は Asn143 に N-結合型糖鎖を持つ IL6 の新しい合成法の開発を目指した。

糖タンパク質を合成する場合、この IL6 に限らず、多くのインターロイキン類は疎水性が非常に高く、原料となるペプチドや糖ペプチドセグメントをいかに調製するかが重要となる。また、それらペプチドの C 末端は、ペプチド連結反応のためにチオエステルとする必要がある。Liu 氏は、IL6 の糖鎖付加部位より N 末端側の 141 番目までの長鎖ペプチドチオエステル(1-141)をいかに合成するかを課題とし、IL6 の全長合成を目指した。

本研究では、長鎖ペプチドチオエステル(1-141)を合成するために、まず 3 つのセグメントに分割して、それぞれを組換え DNA 法により調製することに成功した。各ペプチドセグメントの C 末端は研究室で確立した方法でチオエステルとした。また、糖鎖を持つ Asn143 と Thr142 を化学合成により合成し、それ以降の C 末端側のペプチドは同様に組換え法により調製することとして全体を 5 つのセグメントとして構成することとした。Liu 氏は、これらペプチドを常套手段であるペプチド固相合成を使わず合成することに成功した。しかし、糖鎖直前の N 末側のセグメントの極端な溶解性の低さから、長鎖ペプチドチオエステル(1-141)の合成のためのライゲーションが進行しなかった。

そこで N 末端側の 1-141 を発現後、チオエステルにする方法を試みた。ここでは Liu 氏は、リボソームが疎水性ペプチドをもフォールディングを促進させつつ合成する様式を模倣した方法を考案した。すなわち、長鎖ペプチドチオエステル(1-141)を *in vitro* でフォールディングさせることで、ペプチドがもつ 4 つのシステインを熱力学的に安定な 2 つの天然型様式の位置でジスルフィド化させ、かつペプチドがフォールディングした長鎖ペプチドチオエステル(1-141)を合成することに成功した。その結果、活性化のために故意に結合させていた C 末端の Cys 残基のみを選択的に化学修飾する方法をはじめて見出した。ついで化学合成した糖鎖アスパラギン、並びに、C 末端側ペプチドセグメントと結合し、目的の 143 番目の Asn に糖鎖が結合した IL-6 全長の合成に成功した。

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。