



Title	Semisynthetic Study of Interleukin-8 Scaffolds for the Evaluation of Glycan Functions
Author(s)	Mamahit, Primanda Yugoviandi
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91777
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

Name (Yugoviandi Primanda Mamahit)

Title

Semisynthetic Study of Interleukin-8 Scaffolds for the Evaluation of Glycan

Functions (糖鎖機能評価のためのインターロイキン8骨格の半合成法の開発)

Abstract of Thesis

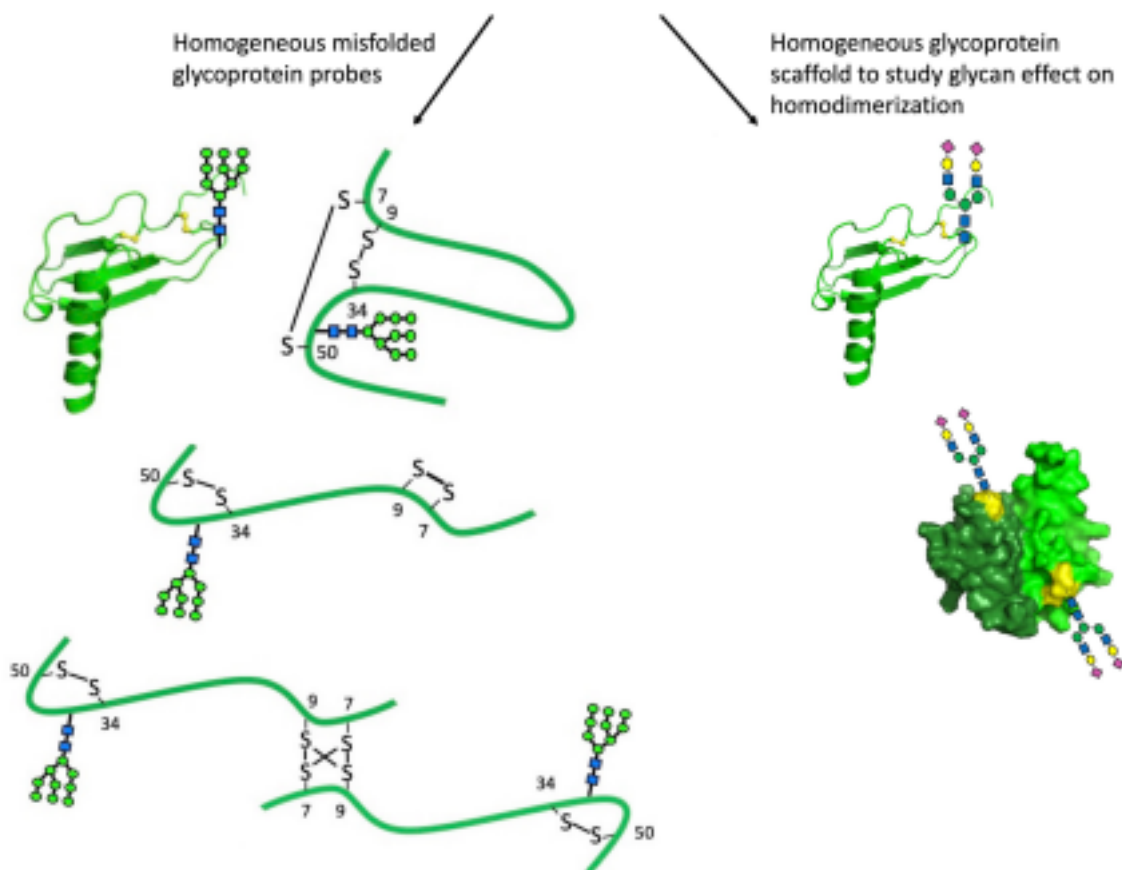
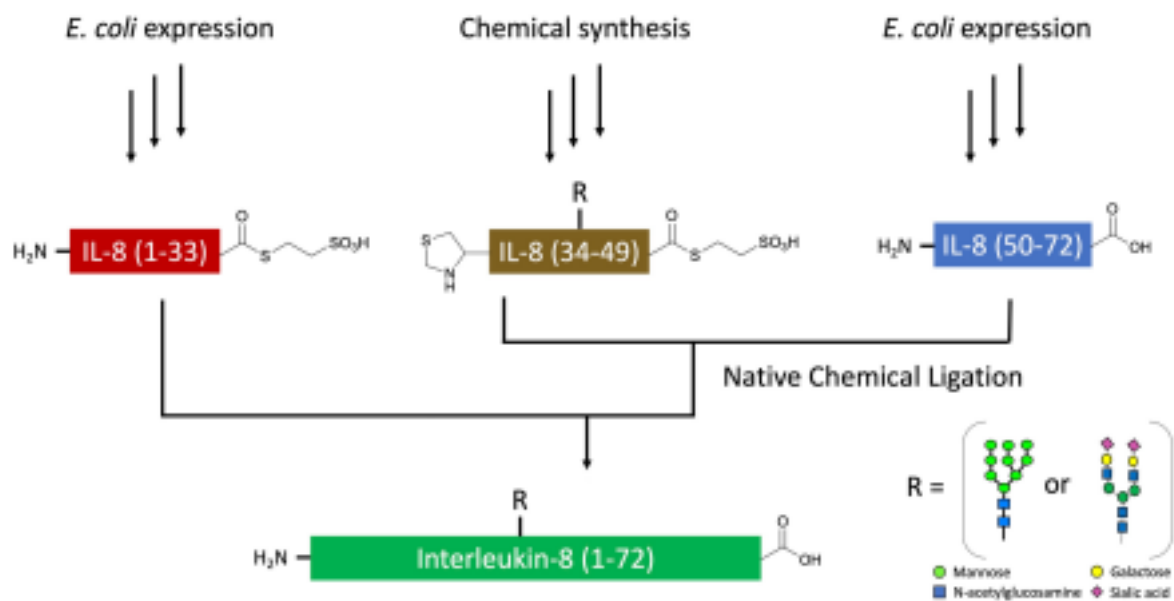
Glycosylation is a major post-translational modification (PTM) of eukaryotic proteins and is involved in numerous essential functions such as cell-cell interactions, protein folding, and immune systems. To accurately study the structure-function relationship of glycosylation at the molecular level, it is necessary to prepare glycoproteins with homogeneous glycoforms. However, conventional cell expression systems produce heterogeneous glycoforms. Total chemical synthesis of glycoproteins using solid phase peptide synthesis (SPPS) can prepare homogeneous glycoproteins, but it has several drawbacks, such as peptide size limitation of up to ~50 amino acids, low yield, and expensive starting materials. A strategy that can solve this issue is semisynthesis, which combines chemical synthesis with recombinant cell expression to reduce the number of chemical conversion steps and increase the yield.

In this thesis, we established a semisynthetic strategy to prepare two glycoforms of interleukin 8 (IL-8, CXCL8). First, we divided IL-8 into three peptide segments; the segment containing a glycan was chemically synthesized with SPPS, and the segment without a glycan was recombinantly prepared by E. coli expression. A major bottleneck for semisynthesis had been the thioester formation of unprotected recombinant peptides. To this end, we applied a novel peptide thioesterification strategy to prepare recombinant peptides thioesters for native chemical ligation (NCL) to yield the full-length glycosyl IL-8.

With semisynthesis, we could prepare IL-8 bearing a high mannose type glycan (M9-IL8) and IL-8 bearing a disialyl complex type glycan (disialo-IL8). Using M9-IL8, we could study many different folding conditions to prepare homogeneous intentionally misfolded glycoprotein probes efficiently. These probes will be useful for further studies on the glycoprotein quality control system in the endoplasmic reticulum (ER), especially regarding how cells differentiate between correctly folded and misfolded glycoproteins.

Using disialo-IL8, we could compare the homodimer formation of glycosylated vs. nonglycosylated IL-8. We could obtain preliminary data suggesting that glycosylation could promote homodimer formation. We hypothesize that the unique hydration shells around N-glycans can act as a sponge to absorb water molecules away from nearby protein surfaces and increase a glycoprotein's binding affinity potential.

In conclusion, we successfully developed a novel semisynthetic approach to efficiently prepare two glycoforms of IL-8. These homogeneous IL-8 glycoforms can be used for various biochemical assays to evaluate the structure-function relationship of glycans.



論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Yugoviandi Primanda Mamahit)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 梶原 康 宏
	副 査	教授 高尾 敏 文
	副 査	教授 北 條 裕 信

論文審査の結果の要旨

Yugoviandi Primanda Mamahit 氏の博士論文「Semisynthetic Study of Interleukin-8 Scaffolds for the Evaluation of Glycan Functions (糖鎖機能評価のためのインターロイキン 8 骨格の半合成法の開発)」について審査をおこなった。

本研究では、糖鎖と糖タンパク質シャペロン(UGGT)との相互作用、また糖鎖の水和能が糖タンパク質の複合化にどのような影響を持つかを明らかにすべく研究を進めた。モデル糖タンパク質として、36 位にハイマンノース型糖鎖をもつインターロイキン-8 (IL-8)を標的とし、大腸菌によるペプチド発現と化学法を組み合わせる半合成を検討した。IL8 のポリペプチド鎖を3つにわけて、糖鎖を持つ中央部のペプチドは固相合成により、N-末端、C-末端は大腸菌を用いた組換え法により調製した。N-末端側はペプチドチオエステルとするために、C-末端 Cys 残基として発現した後、化学的にチオエステルへと変換した。その後 2 回の Native chemical ligationを行い、フォールディング操作を経て UGGT の良い基質となるミスフォールド型の IL-8 dimerを得た。同じ糖鎖化 IL8 は 2012 年に当研究室で化学合成により得られているが、工程数が多く、さまざまな応用研究に用いるための量を確保することが課題であった。本研究において半合成ができるようになり、再現性良く糖鎖化 IL8 が得られるようになった。Mamahit 氏は、この試料をもちいて、単一構造のミスフォールド型 IL8 を得る条件検討も実施し、効率よく得ることに成功した。そして、得られたミスフォールド型糖タンパク質、特に二量化したものとシャペロン用酵素 (UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase) との複合体の構造解析など応用研究につなげることができた。また、小胞体内で繰り広げられる糖タンパク質のフォールディング時に相互作用するシャペロン等の相互作用も調べる応用等も参考例をして紹介した。いずれもミスフォールディング型糖タンパク質の半合成を確立したことで様々な研究に応用することができた。

さらに、糖タンパク質糖鎖の水和能がタンパク質の複合化に及ぼす影響について解析することも報告した。本研究では、複合型糖鎖を持つ native な IL-8 を半合成することに成功した。そして、native mass spectrometry 法を利用して解析した。その結果、IL8 が二量化する際のタンパク質界面近くに複合型糖鎖を付加させた場合、糖鎖を持たない IL8 よりも顕著に二量体化が促進することが native mass spectrometry で確認された。

上記の成果は、糖質化学、糖鎖生物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られた。