



Title	Boc固相合成法と大腸菌発現法を用いたイムノグロブリンFcドメインの合成研究
Author(s)	上田, 南
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92164
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 (上 田 南)

論文題名

Boc固相合成法と大腸菌発現法を用いた
イムノグロブリンFcドメインの合成研究

論文内容の要旨

[背景]

糖鎖によって修飾された糖タンパク質は生体内で様々な重要な役割を果たしている。糖タンパク質上の糖鎖の機能解明のためには、均一な糖鎖構造を持つタンパク質が必要であるが、一般的に用いられる細胞発現法では、糖鎖構造が不均一な糖タンパク質しか得る事ができない。近年、このような問題を解決するために、糖タンパク質の化学合成が行われてきた。化学合成によって、アミノ酸数が300を超えるような大型糖タンパク質を含め、種々の糖タンパク質の合成がこれまでに達成されているが、これらはいずれも3次構造を有する単量体としてはたらく糖タンパク質であった。

本研究ではさらに複雑な構造を有する糖タンパク質として、4次構造を形成している抗体のFcフラグメントの合成に着手した(図1)。Fcフラグメントは抗体IgGの定常部位であり、215残基の糖ポリペプチド鎖が2本ジスルフィド結合を介して結合している。Fc部位は、CH3、CH4という2つドメインからなる2量体を形成している。このFcドメインは、抗体の機能を発現するために非常に重要であり、NK細胞上のFcγRIIIに結合することで、抗体依存性細胞傷害(ADCC活性)と呼ばれる抗原への攻撃を促進する。よってFcフラグメントを有する部分抗体など、創薬分野において重要な開発基盤となっている。

そこで、いまだ合成例がない、4次構造を有する均一な構造の糖タンパク質が化学的手法で合成できるか検討することにした。本研究では、Fcドメインを標的とし、大腸菌発現とBoc固相合成を組み合わせた半化学合成法をデザインし、その糖ポリペプチド鎖の合成、および、*in vitro*でのフォールディングにを検討した。

[結果]

本研究では、Fcドメインを合成するために、まず、その単量体に相当する215残基の糖ポリペプチド鎖を4つのペプチドセグメントを連結して合成することにした(図2)。Segment1、Segment2、Segment3はBoc固相合成にて調製した。糖ペプチドであるSegment3の合成においては、鶏卵より単離生成したヒトの二分枝複合型糖鎖(図1)を有するBocアスパラギン酸を利用した。127残基に及ぶSegment4は大腸菌発現法によって調製した。そして、得られた各ペプチドセグメントをNative chemical ligationにより順次結合した。

次に、得られたFc全長の糖ポリペプチド鎖に対して、段階透析法によりフォールディング操作を行なった。その結果、質量分析によりフォールディング前後で電荷数が変化していることと、分子内でジスルフィド結合を必要数形成していることを確認した。そして、非還元条件で処理したサンプルをSDS-PAGEにて解析したところ、単量体由来のバンドと多量体をわずかに形成していると思われるバンドが見られた。またSPRによって、Fcフラグメントと特異的に結合するプロテインAとの結合能を評価した。しかし、フォールディング処理したFcフラグメントには、proteinAとの結合活性がないことが確認され、今後新規なフォールディング条件が必要であることが判明した。

以上、Fcドメインのペプチド鎖が長鎖であるがために、その4次構造形成には、生体内での翻訳過程を再現するなど、これまでにない新規な方法を開発し検討する必要があることが明らかとなった。しかし、大腸菌発現とBoc固相合成法を組み合わせる方法をもちいて、アミノ酸が215残基からなり、かつヒト複合型糖鎖をもつ糖ペプチドを初めて合成することに成功した。

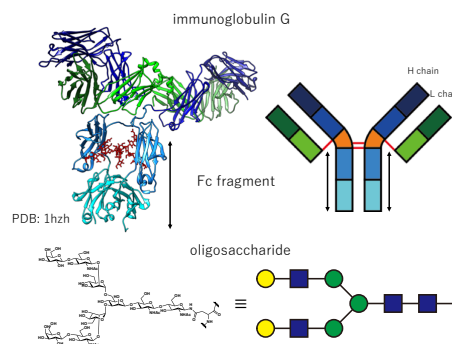


図 1 IgGの結晶構造図および模式図
Asn297が持つ糖鎖構造とその模式図

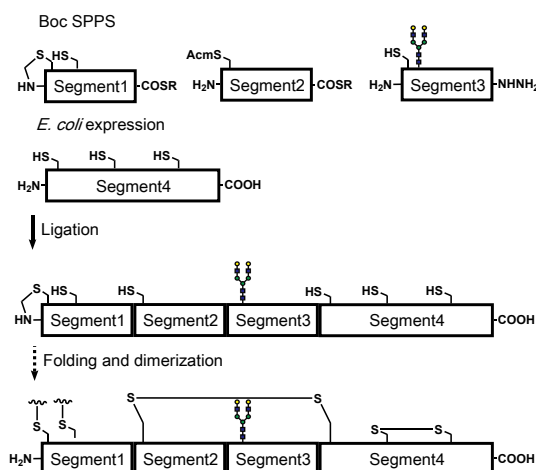


図 2 Fcフラグメントの合成ストラテジー

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (上 田 南)		
	(職)	氏 名
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

論文審査の結果の要旨

上田氏は、ヒト型抗体の Fc 部位に相当する糖ペプチド鎖の化学合成を検討し、タンパク質分子が複合化することで 4 次構造を形成するか考察した。

ヒト抗体は、重鎖と呼ばれるペプチド鎖が 2 量化し、そこに軽鎖が 2 本ジスルフィド結合を介して結合した構造をしている。ヒト抗体の幹の部位、すなわち Fc といわれる部位は、重鎖の 2 量体のみの部位に相当し、糖鎖をもつ。上田氏は、その単量体に相当する糖ペプチドをペプチド固相合成と大腸菌発現法を組み合わせアミノ酸が 200 個を超える糖ポリペプチド鎖の合成に成功した。そして、Fc 部位が 2 量化した 4 次構造の構築（フォールディング）を検討した。しかし、質量分析、電気泳動、SPR 法で解析しても目的とする Fc 部位が 2 量化した 4 次構造は確認することができなかった。

上田氏は、自身の結果ならびに、他グループが糖ペプチドを原料とする 4 次構造へのフォールディングが困難であるという報告例から、抗体のような 4 次構造をもつ糖タンパク質の合成は、これまでにない新しい手法を見出す必要があることを詳細に考察した。具体的には、糖ポリペプチドが 2 量化しながらフォールディングすることが必要で、これまでの手法のように、2 つの糖タンパク質がそれぞれ 3 次構造を形成後、2 量化する方法では 4 次構造を形成するのは困難であるという知見を見出した。このことは、今後さまざまなタンパク質複合体を合成する上で非常に有用な情報となった。

世界的にもまだ誰も成功していない糖タンパク質の 4 次構造構築はできなかったが、Fc 部位の単量体に相当する糖鎖化ポリペプチド合成したことは初めての例である。これらの結果から本博士論文は今後のタンパク質複合体の化学合成における重要な内容を記載していると認められた。

上記の成果は、糖質化学、糖鎖生物学、そしてタンパク質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。