



Title	超好熱性古細菌Thermococcus kodakarensis由来N-グリカンの合成とその機能解明のための代謝取り込み型プローブ化
Author(s)	平尾, 宏太郎
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/92170">https://hdl.handle.net/11094/92170</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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

## 論文内容の要旨

氏名 (平尾 宏太郎)

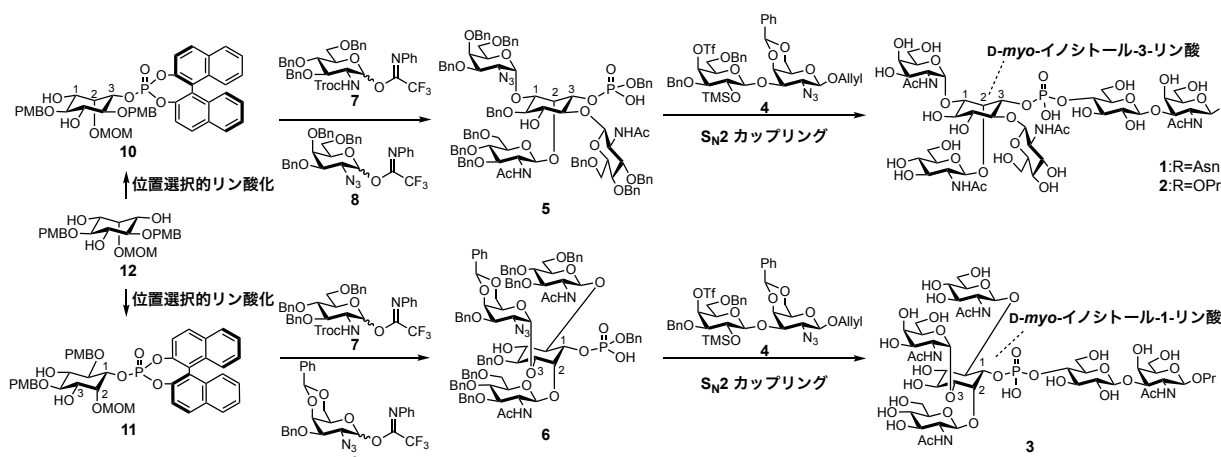
論文題名

超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 *N*-グリカンの合成とその機能解明のための代謝取り込み型プローブ化

## 論文内容の要旨

*N*結合型糖鎖 (*N*-グリカン) は、タンパク質のアスパラギン側鎖に結合した翻訳後修飾糖鎖で、普遍的に存在し、さまざまな生命現象に関与する。筆者は、超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* に着目した。 *T. kodakarensis* の *N*-グリカンは細胞膜上の単分子膜を構成する膜タンパク質に付加し、膜の安定性や耐熱性に寄与している。一方で、この *N*-グリカンが耐熱性に及ぼす影響は明らかになっていない。筆者は *N*-グリカンの耐熱性への寄与を明らかにするために、 *T. kodakarensis* の *N*-グリカンを同定し、その合成を達成した。加えて、その機能解析のための代謝取り込み型プローブの設計・合成も検討した。

筆者は *T. kodakarensis* 培養液 14.4 L から 32 mg のタンパク質画分を得た。その後、共同研究者らが、この画分から *N*-グリカンを単離し、その構造を **1** のように決定した (Figure 1)。本 *N*-グリカンは、*myo*-イノシトール骨格を持ち、リン酸ジエステル結合により糖が架橋されたユニークな構造を有することが分かった。一方で、NMR解析では、本 *N*-グリカンのイノシトールのリン酸化位置が1位もしくは3位のどちらであるかを確定できなかった。そこで、筆者は **2** および **3** を化学合成することで、その決定を試みた。まず、メソ体のイノシトール保護体 **12** に対し、位置選択的リン酸化<sup>1</sup>により、**10** および **11**<sup>2</sup> を合成した。その後、**10/11** に対し、グルコサミン **7** およびガラクトサミン **8/9** を導入することで、**5/6** を合成した。続いて、鍵構造であるリン酸エステル架橋構造の構築を検討した。徹底的な検討の結果、**5/6** のリン酸塩をクラウンエーテル存在化、Tf基を有する2糖 **4** と反応させることで、 $S_N2$ カップリングが進行し、リン酸ジエステル構造の構築に成功した。その後、保護基を除去して得られた **2/3** のNMRスペクトルを比較することで、*N*-グリカンの構造を **1** であると確定した。

Figure 1. 糖鎖 **2**, **3** の合成

続いて、C60-ドリコールを合成した<sup>3</sup> (Figure 2)。ドリコールは、長鎖イソプレン脂質であり、真核生物や古細菌の生体内において、*N*-グリカンの担体脂質として利用される。ドリコールの合成では、i) マイクロフロー系を用いた *Z* イソプレンの効率的な合成、ii) 求電子剤共存下でアニオン生成を行う簡便で再現性の良いイソプレンカップリング反応を鍵として、C60-ドリコールの合成を達成した。さらに、C60-ドリコールを用いて、*N*-グリカンの生合成に干渉するためのプローブとしてドリコールリン酸結合ガラクトサミンを合成した。

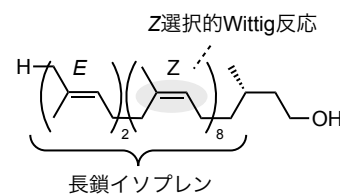


Figure 2. C-60ドリコール

(1) Murai, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4584. (2) Aiba, T.; Fukase, K.; Fujimoto, Y.; et al. *Chem, Eur, J.* **2017**, *23*, 8304. (3) Hirao, K. et al. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (17), 11549.

## 論文内容の要旨

氏名 (平尾 宏太郎)

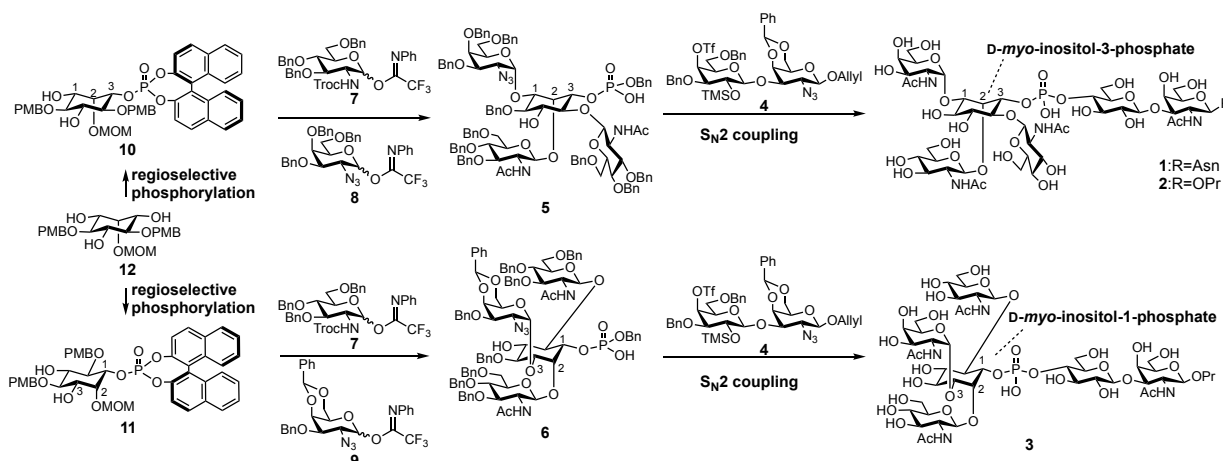
論文題名

超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 *N*-グリカンの合成とその機能解明のための代謝取り込み型プローブ化

## 論文内容の要旨

Asparagine-linked glycan (*N*-glycan) attachment is one of the most abundant posttranslational modifications. *N*-Glycans are widely present in many organisms and regulate protein functions. The target organism of my research is hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Archaeal *N*-glycans are attached to surface layer (S-layer) proteins. *N*-Glycans in thermophilic archaeon *T. kodakarensis* are considered to contribute to their heat resistance. However, the functions of archaeal *N*-glycans have not been clarified at a molecular level. To address this issue, I investigated the chemical synthesis of *N*-glycan isolated from *T. kodakarensis*. I also investigated the synthesis of the chemical probe for their functional study using metabolic incorporation.

I investigated the chemical synthesis of *N*-glycan from *T. kodakarensis* (Figure 1). Our collaborators estimated the *N*-glycan structure as **1** shown in Figure 1. The identified *N*-glycan **1** has a unique structure, which contains highly glycosylated *myo*-inositol linked with a disaccharide via a phosphodiester group. Based on NMR analyses, the phosphorylated position cannot be determined at C1 or C3 of *myo*-inositol. To clarify this point, I synthesized glycans **2** and **3**. First, I synthesized inositol-phosphates **10/11**<sup>1</sup> via regioselective phosphorylation<sup>2</sup>. With chiral-pure **10/11** in hand, glycosylations of **10/11** with **7** followed by introduction of galactosamine using **8/9** afforded **5/6**. Next, I investigated coupling between the inositol phosphate and the disaccharide. After a thorough investigation, S<sub>N</sub>2 type reaction between cesium salt of phosphoric acid **5/6** and triflate **4** successfully gave the desired coupling products. After global deprotection, I obtained the target glycans **2/3**. A comparison of the NMR data of the isolated *N*-glycan with that of synthetic glycans **2/3** confirmed the structure of the *N*-glycan as **1**.

Figure 1. Synthesis of glycan **2** and **3**

I also synthesized C60-dolichol<sup>3</sup> (Figure 2). Dolichol is polyprenol with a repeating structure of *E/Z* isoprene and is used as a carrier lipid of glycosyl donor in eukaryotic and archaeal *N*-glycan biosynthesis. I achieved the synthesis of C60-dolichol via the following key reactions: i) efficient construction of *Z* isoprene under microfluidic conditions, ii) reliable S<sub>N</sub>2 coupling of isoprene units. Furthermore, I synthesized a galactosamine-linked C60-dolichol phosphate derivative as a chemical probe for metabolic labeling of *N*-glycan of *T. kodakarensis*.

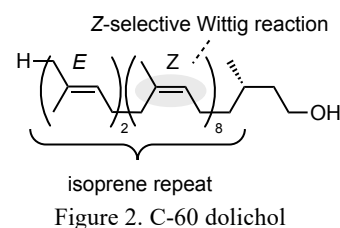


Figure 2. C-60 dolichol

(1) Aiba, T.; Fukase, K.; Fujimoto, Y.; et al. *Chem, Eur, J.* **2017**, *23*, 8304. (2) Murai, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4584. (3) Hirao, K. et al. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (17), 11549.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 平尾 宏太郎 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 深瀬 浩一
	副 査	教 授 村田 道雄
	副 査	教 授 高尾 敏文
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>平尾宏太郎氏は、糖タンパク質糖鎖の始原的な機能に迫るために、超耐熱性古細菌 <i>Thermococcus kodakarensis</i> 由来の <i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖について、その構造と合成研究を行った。一方で、<i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖生合成機構解明の端緒として、糖鎖のキャリアとして働くドリコールの合成を行った。次に、<i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖のタンパク質への導入機構の解析のために、ドリコールリン酸と単糖が結合した代謝取り込み型プローブの合成を行った。</p> <p><i>T. kodakarensis</i> 培養液から得た <i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖は、<i>myo</i>-イノシトール骨格を持ち、リン酸ジエステル結合により糖が架橋されたユニークな構造を有する。NMR 解析では、本 <i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖のイノシトールのリン酸化位置が 1 位もしくは 3 位のどちらであるかを確定できなかったため、両ジアステレオマーを合成した。メソ体であるイノシトール誘導体への位置選択的リン酸化によって、イノシトールを非対称化し、立体選択的グリコシル化、SN2 反応を利用した立体反転を伴う新規トリエステル形成を経て目的の両化合物の合成に成功した。天然より導いた <i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖と NMR スペクトルを比較することで、立体化学を含めた <i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖の構造を決定した。</p> <p>一方、長鎖イソプレレン脂質であるドリコールの合成について、i) マイクロフロー系を用いた <i>Z</i>イソプレレンの効率的な合成法と ii) 効率的イソプレレンカップリング法を鍵として、古細菌由来の炭素数 60 の C60-ドリコールの合成を達成した。</p> <p>さらに、合成した C60-ドリコールを用いて、<i>N</i>結合型糖タンパク質糖鎖の生合成系を利用して、タンパク質に糖鎖を導入するための新手法の開発に向けて、酵素基質であるドリコールリン酸結合ガラクトサミンを合成した。</p> <p>以上のように平尾氏は、困難な天然物合成を精力的に行い、上記古細菌の細胞膜タンパク質上の糖鎖構造を合成的な手法で決定した。これらは顕著な研究成果であり、学術的意義は高い。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。</p>		