



Title	Synthesis and activation of hydrophobic long peptides with hydrophilic glycan tags
Author(s)	Yang, Youdong
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/98713
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

Abstract of Thesis

Name (YANG Youdong)

Title

Synthesis and activation of hydrophobic long peptides with hydrophilic glycan tags

(親水性糖鎖タグを有する疎水性長鎖ペプチドの合成と活性化)

Abstract of Thesis

Synthesis of proteins with hydrophobic sequences have always been a challenge to biochemists. In chemical synthesis, hydrophobic sequences cause epimerization and incomplete conversion which severely limit synthetic efficiency; In biological synthesis, hydrophobic sequences tend to misfold and accumulate to form irreversible aggregation that could kill the cell. During chemical modifications of peptides or proteins, hydrophobic sequences also lead to low efficiency or limitation of certain protocols' application. Certain modifications such as SUMO tag or Poly amino acids tag could reduce these difficulties, but the performance of such modifications is not perfect, and it cannot cover the entire synthesis progress.

Here I demonstrate an efficient protocol for preparing expressed, hydrophobic long peptides in a status ready for further ligation. I chose the sequence of human Interferon- β as my model sequence, and I successfully performed the synthesis progress of both N and C terminal sequences. For activation into thioester form, I applied activation protocols via using bis(2-sulfanylethyl) amine (SEA), which is a latent peptide thioester form. To stabilize the hydrophobic sequences against misfolding and aggregation, I introduced a newly designed solubility tag based on oligosaccharides. The protocol is efficient, stable, and compatible with enzymatic modifications

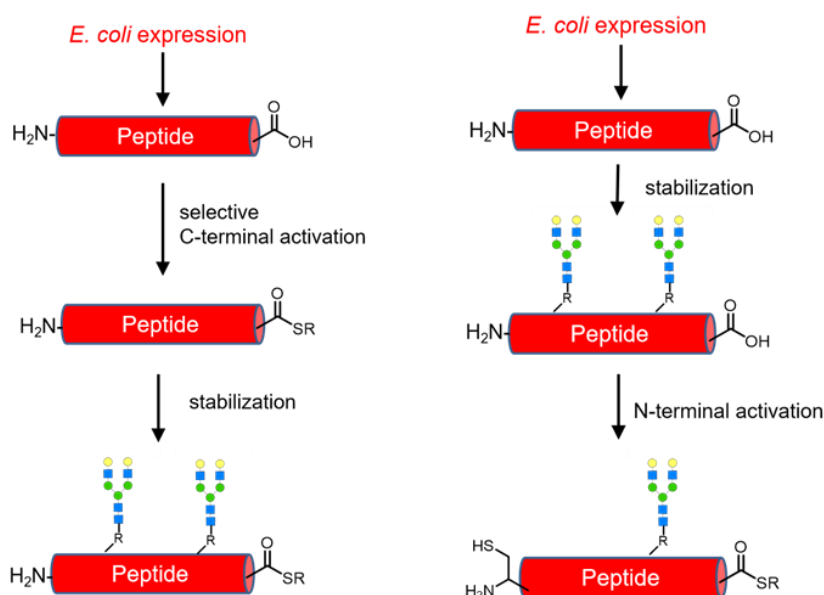


Figure 0-1: Synthesis protocol for the modification or activation of hydrophobic long peptide with hydrophilic glycan tag

As a result, via my newly established protocol, the two model sequences, peptide 10' and peptide 18' were synthesized efficiently, and stabilization was also reliable. The protocol was proved to be practical, and we hope it could have a wider range of application in the field of protein synthesis.

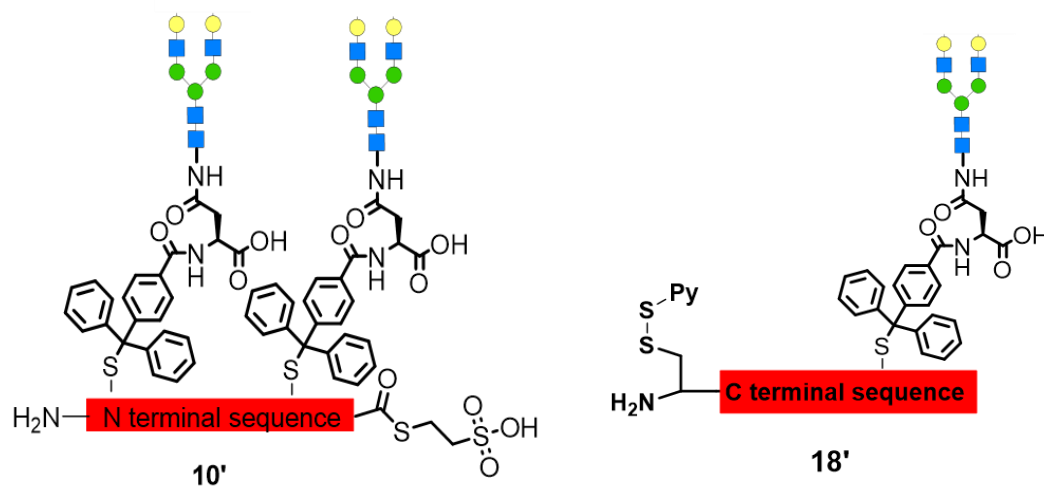


Figure 0-2: Final status of synthesized model sequence with activation and stabilization

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Youdong Yang)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	梶 原 康 宏
	副 査	教授	鈴 木 孝 禎
	副 査	教授	北 條 裕 信

論文審査の結果の要旨

令和 6 年 8 月 6 日、Youdong Yang 氏の博士論文「**Synthesis and activation of hydrophobic long peptides with hydrophilic glycan tags** (親水性糖鎖タグを有する疎水性長鎖ペプチドの合成と活性化)」について審査をおこなった。

これまで、タンパク質ならびに翻訳後修飾を受けたタンパク質を有機化学的に合成する方法が数多く報告されてきた。特にチオエステルを利用するペプチド連結法がタンパク質誘導体の合成法を大きく発展させた。また、連結反応の反応機構上ペプチド連結部位が常にシステインを必要とするという問題点があったが、 β メルカプトアミノ酸を利用し、連結後脱硫化することで天然型のアミノ酸に戻すという方法も開発された。しかし、水に難溶性のペプチドを如何に効率よく調製し、それらを連結し標的タンパク質に変換するかが未だ残された課題であった。

本博士論文では、Yang 氏は、大腸菌を利用し、水に難溶性長鎖ペプチドの調製法について述べている。まず、ペプチドを発現後、当研究室で開発されたペプチドチオエステル化法を応用したことについて述べている。この方法は、ペプチドの C 末端にシステインを導入し、酸性条件下加熱処理をするとシステイン残基の側鎖のチオール基が一つ隣のアミノ酸のカルボキシ基に攻撃しシステインチオエステルを与えするという相本らの方法を利用している。また、この条件にビスメルカプトエチレンアミンを作用させることで、80 残基からなる長鎖ペプチドのチオエステル誘導体を得ることに成功した。しかし、このペプチド鎖は非常に疎水性で、中性条件下の溶液で保存すると予想通り沈澱を生じ、それ以降有機合成の原料としては利用できないものとなった。

そこで、Yang 氏は、当研究室で利用されていた糖が 9 つ連なったヒト型の糖鎖をシステインのチオール基に導入することを検討した。その結果、糖鎖タグが導入されることで、容易に沈澱していた長鎖ペプチドのチオエステルが水溶液中で安定に存在できるようになった。本研究で、Yang 氏は、不安定な長鎖ペプチドのチオエステル誘導体を、どのようなアミノ酸配列のものであっても容易に合成する方法を、さまざまな知見を組み合わせ初めて確立した。また、この方法は、ペプチドの C 末端がチオエステルではない一般的なペプチドにも応用することに成功し、その結果、難溶性の長鎖ペプチドの N 末端側をシステインで修飾することにも成功した。

さらに、Yang 氏は、いまだ合成例がない β メルカプトトリプトファンを 4 工程で合成する方法も開発し、タンパク質合成をより容易なものにすることに貢献した。

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。