

# 審査結果の要旨

論文題目「化学酵素法を利用した糖タンパク質の合成研究」

学位申請者 朝比奈雄也

生体内に存在するタンパク質の約半数は、糖鎖修飾を受けた糖タンパク質として存在し、細胞の増殖分化等、様々の生命現象に関与している。しかし、糖鎖が多く酵素が連続的に作用して形成される結果、天然の糖タンパク質糖鎖は高度に不均一化しており、糖鎖構造と機能との相関関係があまり明確になっていないのが現状である。本学位申請者は、この問題を解決するため、糖タンパク質の効率的な化学合成法の確立を目的として研究を行い、学位論文としてまとめている。

本学位論文の第1章では、糖タンパク質の性質、及び報告されている均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質、糖ペプチドの合成法について述べられており、その現状と問題点について議論されている。

第2章では3つのペプチドを One-Pot で効率的に縮合する連続的チオエステル法を開発し、単糖を持つ Tim-3 Ig 様ドメインを合成した結果が報告されている。従来、3つのペプチドを用いてタンパク質を合成する場合、縮合ごとに精製が必要であり、目的物の収率や合成の効率低下を招いていた。この問題点を解決するためにそこで、申請者は、芳香族チオエステルとアルキルチオエステルの反応性の差を利用し、One-Pot で3セグメントを縮合する方法を開発した。その際、リシン側鎖アミノ基の保護基として高親水性であるイソニコチルオキシカルボニル (iNoc) 基を利用することにより、側鎖アミノ基を保護したペプチドが逆相 HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) により容易に精製できることも見いだした。3セグメントを One-Pot で縮合して得られたポリペプチドを脱保護、フォールディングすることで、GlcNAc 付き Ig 様ドメインの効率的な合成を達成した。しかし、Ig 様ドメインのフォールディング効率は低く、複合型9糖を持つ Ig ドメインの量的確保を行うためには、より収率の高い合成方法を模索する必要性が見いだされた。

第3章では、均一な複合型糖鎖を有する Tim-3 Ig 様ドメインの合成が達成されている。第2章の合成で問題となったフォールディング効率の低下は、そのポリペプチドの難溶性に原因があると推定された。そこで、ペプチドの溶解性を向上させることが知られている *O*-アシルイソペプチド構造を Ig 様ドメインに導入することで、この問題を解決がしている試みられた。その結果すなわち、本来のポリペプチドと比べ、イソペプチド構造を持つポリペプチドは、本来のポリペプチドと比べ、高い溶解性を獲得し、その結果として効率よくフォールディング体を与えることが明らかとなった。最後に、得られた GlcNAc 付き Ig 様ドメインに変異型 Endo-M を用いて、糖鎖転移反応することで、均一な複合型糖鎖を有し、かつ適切な立体構造をもつ Tim-3 Ig 様ドメインの合成が収率よく達成されたされている。

第4章では前章で用いられた化学酵素法による糖タンパク質合成をさらに効率化する方法が述べられている。この方法の鍵化合物である GlcNAc を有する糖ペプチドは、従来、糖水酸基をベンジル基により保護した糖アミノ酸誘導体を用いていたため、固相合成終了後、TFA (Trifluoroacetic acid) カクテルによるペプチド側鎖保護基の脱保護と Low-TfOH による脱ベンジル化の2回の脱保護工程が必要であった。そこで本章では、糖水酸基保護基を TFA 感受性保護基に変更することで、より簡便に糖ペプチドを

得る方法の確立が試みられた。まず、TFA 感受性保護基を有する糖アミノ酸誘導体の合成ルート確立後、その誘導体の有用性について、がん転移促進因子のエムプリン部分配列 (35-69) を用いて検証された。その結果、最終脱保護は TFA カクテル処理のみで行うことが可能となり、従来にくらべより簡便で収率のよい糖ペプチド合成法が確立された。さらに得られた糖ペプチドセグメントに対して 2 章で開発された連続的チオエステル法、および 3 章で用いられた糖鎖転移反応を適用することにより、均一なアシアロ及びジシアロ複合型糖鎖を持つエムプリン第一 Ig ドメインの全合成が達成された。

糖タンパク質の化学合成法は、多数の工程を経るため収率が極めて悪い点が問題であったが、本学位論文で開発された手法により、糖タンパク質の合成過程の工程数を減らしつつ収率をあげることが可能となり、従来の方法に比べより効率的な GlcNAc を有するペプチドを TFA カクテルによる処理のみで効率的に調製し、One-Pot で効率よく糖タンパク質を得ることが可能となったの合成法が確立された。また、フォールディングが困難な難溶性ポリペプチドであっても、O-アシルイソペプチド結合を導入することにより効率のよい合成が可能であることが見出された。今後これらの方法論は、種々の糖タンパク質の大量化学合成ならびに機能解明に大きく貢献するものと期待される。

平成 26 年 1 月 11 日に行われた公聴会では、発表中に示された合成反応中の副反応の抑制、また本論文で開発された方法の更なる発展の可能性等について質疑がなされ、いずれもの確かな回答がなされたことが認められた。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 朝比奈 雄也は東海大学博士（理学）の学位を授与されるに値すると判断した。

#### 論文審査委員

主査	理学博士	稲津 敏行	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	理学博士	小島 直也	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	工学博士	長瀬 裕	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士(理学)	岩岡 道夫	理学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士(理学)	北條 裕信	大阪大学蛋白質研究所教授	