HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Significance of the Posttranslational O-glycosylations in the Protein Conformation and Function [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	早川, 瞬
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12268号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61779
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shun_Hayakawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　早川　瞬

学 位 論 文 題 名

Significance of the Posttranslational *O*-glycosylations in the Protein Conformation and Function

(タンパク質立体構造および機能に関する *O*-結合型糖鎖修飾の意義)

DNA の翻訳により発現されたタンパク質は、ゴルジ体や小胞体において糖鎖による翻訳後修飾を受ける。糖鎖は生体内において、細胞の増殖、分化、免疫、ガン細胞の転移や浸潤、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わっているため、糖鎖や糖タンパク質を標的とした、様々な疾病の治療や診断への応用研究に注目が集まっている。これまで糖鎖がタンパク質の機能や抗原性に与える影響について様々な研究が行われてきたが、その詳細については明らかになっていない部分が多い。当研究室では、不凍糖タンパク質 Thr-Ala-Ala 繰り返し配列中の Thr 残基への *O*-GalNAc 修飾がペプチド骨格の構造変化を誘起し、その結果、不凍活性を付与することが見出された。また、KL6 と呼ばれる間質性肺炎のマーカーである MUC1 では、Pro-Asp-Thr-Arg 配列の Thr 残基に修飾される糖鎖の構造によりペプチド骨格の立体構造が変化し、anti-KL6 抗体への結合能が変化することが示された。これらの結果から、糖タンパク質の機能は、糖鎖修飾が誘起するタンパク質立体構造変化に起因することが考えられる。さらに、糖タンパク質・糖ペプチドの有機化学合成および立体構造解析は、糖鎖の機能解明の手掛かりとなると同時に、ガンなどの様々な疾病の治療・診断の応用研究にも有用であることを示唆している。そこで本学位論文では、有機化学的アプローチによる糖ペプチドの合成、立体構造および機能解明を目的とした。

2 章では、ガンのマーカーとしても注目されているムチン型糖ペプチドに頻出な、連続した Thr 残基に *O*-GalNAc 修飾された Thr-Thr-Xaa 配列に着目した。TTX モチーフを含むムチンモデル糖ペプチドおよび MUC2 糖ペプチドを有機化学的に合成し、NMR により立体構造解析を行った。*O*-GalNAc 残基が、糖鎖修飾残基との水素結合および i+2 残基(Xaa)との疎水性相互作用により rigid で伸長した構造をとることが分かった。すなわち、TTX モチーフはムチンの典型的な構造モチーフであることが示された。この構造モチーフに対する自己抗体の有無を調べるために、大腸ガン患者の血清を用いて、MUC2 糖ペプチドマイクロアレイ解析を行った。その結果、Naked および Tn 抗原（GalNAcα1→）を有する MUC2 に対して、ステージ１の大腸ガン患者では自己抗体が見られ、一方でステージ４の大腸ガン患者には自己抗体の量が著しく低下していることが確認された。こ

のことから、TTX モチーフは、大腸がんの診断・治療プローブへ応用できる可能性が示唆された。

3 章では、細胞の分化にかかわる Notch タンパク質の EGF12 リガンド結合ドメインにおける *O*-fucose および *O*-glucose 型糖鎖修飾に着目した。Notch シグナルはこれらの糖鎖により調節されているだけではなく、細胞のガン化や増殖・抑制に深く関わっているため、EGF 糖ペプチドドメインの立体構造解析は Notch シグナルの機能解明およびガン治療への応用に有用であると考えられる。ヒト Notch1 EGF12 ドメインのペプチド固相合成にあたり、糖アミノ酸ビルディングブロックである Fmoc-(Ac_3Xylα1→3Ac_2Xylα1→3Ac_3Glcβ1→)Ser-OH を計 21 工程、総収率 2.1%で合成した。EGF12 糖ペプチドの 3 つのジスルフィド結合の形成において、カルシウム存在下 4 ºC で効率良くフォールディングされることが示された。これはカルシウム結合ドメインである EGF12 が低温・カルシウム存在下で 3 次構造が安定化されたためであると考えられる。NMR 測定の結果、フコース修飾およびカルシウム配位により EGF12 ペプチドのβ-sheet およびβ-hairpin 構造が安定化されることが示された。NMR 立体構造解析により、フコースの 6 位と Ile477 および Met479 に疎水性相互作用が見出された。また、Glucose 単糖ではペプチド骨格との NOE 相互作用は見られなかったが、Xyl-Xyl-Glc 三糖では非還元末端の Xyl とβ-sheet 上の Glu473 に NOE 相関が見られた。これらのフコースおよび Xyl-Xyl-Glc は”sugar bridge”を構成することにより、ペプチド立体構造を安定化するものと考えられる。合成した EGF モジュールは天然の Notch EGF ドメインと同様の構造を有していることから、EGF モジュールが Notch リガンドと結合し Notch シグナルを抑制することができると考えられる。合成 EGF モジュールをガン細胞に添加したところ、control と比較して細胞接着や細胞増殖能に影響を与えることが示された。これらの立体構造解析-ガン細胞アッセイの結果から、合成 EGF モジュールがガン治療など応用研究に活用できることが示唆された。

本学位論文で、有機化学的アプローチによる糖ペプチド立体構造および機能解析が種々の糖ペプチド・糖タンパク質に対して有用であることが示された。また、特異的な立体構造モチーフを有する合成糖ペプチドのガン治療および診断への応用が示唆された。