

京都大学	博士 (工学)	氏名	Sun, Yedi
論文題目	Novel Functionalized Lectins Engineered by Affinity-Guided DMAP Chemistry (アフィニティ駆動型 DMAP 化学による新規機能化レクチンの創製に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Among a vast number of proteins, there are two significant and interesting groups: lectin and glycoprotein. By simple definitions, lectins are sugar-binding proteins, which were first discovered in plants and later found generally in other bioorganisms, and glycoproteins are proteins posttranslationally modified with oligosaccharide. Many profound biological events are initiated and mediated through lectin-glycoprotein interactions. To study the biological significance of glycoproteins, lectin engineering by using novel protein engineering methods undoubtedly is an attractive approach.</p> <p>In chapter 1, the invention of a novel <math>^{19}\text{F}</math>-modified lectin biosensor (<math>^{19}\text{F}</math>-biosensor) for specific detection and imaging of glycoproteins will be introduced. Construction of this novel biosensor was achieved by using the affinity-guided DMAP strategy previously invented in our lab. Exploiting the large chemical shift anisotropy property of <math>^{19}\text{F}</math> nuclei, glycoproteins detected by <math>^{19}\text{F}</math>-biosensor were signatored by broadened peaks in <math>^{19}\text{F}</math> NMR, thereby distinguishing the lectin-binding glycoproteins from non lectin-binding glycoproteins. This <math>^{19}\text{F}</math>-biosensor also successfully discerned glycoproteins from small molecule saccharides. Such signal on/off switching was further applied to glycoprotein imaging in <math>^{19}\text{F}</math> MRI.</p> <p>In chapter 2, a revolutionary protein engineering method will be introduced. Lectins were converted into “enzymes” by incorporating a catalytic DMAP group to their glycan-recognition sites. Construction of this novel lectin catalyst was accomplished in two steps. An azide handle</p>			

was first introduced to lectin by affinity-guided DMAP chemistry, followed by the attachment of a DMAP catalytic group through click-chemistry. Two types of lectin catalysts, wheat germ agglutinin (WGA) and Congerin II (CongII), were successfully constructed. Glycoproteins those bind to lectin catalyst specifically were successfully labeled upon the addition of acyl donors in test-tube. This protein engineering method could be extended to study other protein-protein interaction pairs.

In chapter 3, selective labeling of mammalian cell-surface glycoproteins by using lectin catalysts will be discussed. Despite of the importance, very few cell-surface glycoprotein-labeling methods have been reported so far. In this study, accomplishment of selective cell-surface glycoprotein-labeling was confirmed by both confocal microscopy imaging and western blot analysis. Difference in labeled glycoprotein species was observed on both 1D and 2D western blot between cell lines and applied lectin catalysts. Few representative labeled glycoproteins were identified by mass analysis and antibody detection. This novel glycoprotein labeling method is indeed powerful and greatly expected to improve our perceptions of glycome.

氏名

Sun, Yedi

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質には様々な種類が存在し、複雑な生命現象を厳密に制御している。その中で出願者は、細胞間相互作用などで中心的な役割を担う「レクチン」と「糖タンパク質」に着目して研究を行った。レクチンとは糖鎖を特異的に認識するタンパク質で、糖タンパク質は、糖鎖が翻訳後修飾されたタンパク質の総称である。細胞表層で起こる多くの重要な生理現象は、これらレクチンと糖タンパク質の相互作用を元に開始されることが知られている。本論文では新規なレクチン工学技術の開発と、これを用いた糖タンパク質の網羅的解析をおこなった。主な内容は以下の通りである。

1) 第1章では、糖タンパク質の特異的なイメージングを可能とする、 $^{19}\text{F}$ レクチンバイオセンサーの開発をおこなった。本バイオセンサーは、当研究室で開発されたタンパク質化学修飾法「アフィニティ駆動型 DMAP 法」を用いて構築された。 $^{19}\text{F}$ 核は大きな化学シフト異方性を有しており、 $^{19}\text{F}$ バイオセンサーが、糖タンパク質とレクチン間の相互作用に基づく分子量の増大により、 $^{19}\text{F}$ -NMR シグナルを顕著にブロード化することを見出した。また糖小分子で阻害するとシグナルが再び観測され、糖タンパク質—レクチン相互作用を  $^{19}\text{F}$ -MRI でオフオンイメージングすることに成功した。

2) 第2章では、有機触媒である DMAP をレクチンの糖結合部位近傍に特異的に導入する事で、人工酵素へと機能改変する革新的タンパク質工学技術を開発した。この構築はまず、「アフィニティ駆動型 DMAP 法」を用いて、レクチンの糖結合部位近傍に生体直交性の高いアジド基を導入する。さらに導入されたアジド基に、Click 反応を利用して多価 DMAP を修飾することで、目的の人工機能化レクチンが作成された。構築した DMAP 修飾レクチンを用いることで、試験管中で糖タンパク質の特異的な化学修飾に成功した。このようなタンパク質工学法は、様々なタンパク質間相互作用の同定に役立つ重要なツールを提供するものと期待される。

3) 第3章では、構築した DMAP 修飾レクチンを用いて、哺乳類細胞表層に発現する糖タンパク質の網羅的な修飾と解析をおこなった。細胞表層の糖タンパク質の解析は、量の少なさと糖鎖の複雑性から、その重要性にも関わらず解析が非常に遅れているのが現状であった。本技術を用いて、出願者は糖タンパク質とレクチンとの特異的な相互作用に基づく化学修飾をおこない、共焦点顕微鏡とウェスタンブロットティングによる網羅的な糖タンパク質の同定を試みた。その結果、細胞株やレクチンの種類に応じてラベルされる糖タンパク質が異なる事が実証され、実際に質量分析法と抗体検出法を用いて、細胞表層の糖タンパク質を同定する事に成功した。今後この新規糖タンパク質ラベル化法は、グライコーム研究における糖タンパク質同定の強力な手段となる事が期待される。

本論文は上記の通り、糖結合タンパク質であるレクチンの機能化により、解析の困難な糖タンパク質解析に有用な技術の開発を行っており、学術上、實際上寄与する所が少ない。よって本論文は博士(工学)の学位審査として価値あるものと認める。また平成25年2月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。