

Title	ゼブラフィッシュ胚のフコース転移酵素産物の解析
Author(s)	森口, 和信
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47705">https://hdl.handle.net/11094/47705</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	もり 森	ぐち 口	かず 和	のぶ 信
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)			
学位記番号	第 20869 号			
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科化学専攻			
学位論文名	ゼブラフィッシュ胚のフコース転移酵素産物の解析			
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 純宏			
	(副査) 教授 相本 三郎 助教授 長束 俊治			

#### 論 文 内 容 の 要 旨

以前、ゼブラフィッシュより  $\alpha$ 1-3 フコース転移酵素遺伝子である *zFT1* 及び *zFT2* がクローニングされ、これらの遺伝子産物は糖鎖抗原である Lewis x [Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc-R] 合成活性を有することが明らかとなった [Kageyama *et al. J. Biochem* **125**, 838-845 (1999)]。本論文は、*zFT1* 及び *zFT2* の最大発現期における Lewis x 含有糖鎖の検出と構造解析及び発現パターンの解析を行ったものである。

まず始めに、*zFT1* 最大発現期である受精後 18 時間の胚で認められた 2 種類の Lewis x 構造を含んだ糖鎖の構造解析を行った。受精後 18 時間の胚より、糖鎖をヒドラジン分解によりタンパク質より遊離後、高感度で検出可能なピリジルアミノ化法により蛍光標識した。ピリジルアミノ化糖鎖を調製し、3 種類の分離モードを用いた HPLC により、目的のピリジルアミノ化糖鎖の精製を行った。還元末端分析、エキソグリコシダーゼ消化、糖鎖 2 次元マップ及び質量分析により解析したところ、これらの糖鎖は非還元末端に糖鎖抗原である Lewis x を含み、全体構造は N 結合型糖鎖様の構造を示したが、還元末端が N 結合型に特徴的な N アセチルキトビオース (GlcNAc  $\beta$ 1-4GlcNAc) ではなく、エンド- $\beta$ -N アセチルグルコサミニダーゼにより消化されたと考えられる N アセチルグルコサミン (GlcNAc) 1 残基のみの遊離の糖鎖であった。そこでこれらの糖鎖のエンド- $\beta$ -N アセチルグルコサミニダーゼ消化前の糖鎖である還元末端が N アセチルキトビオース構造を持つ糖鎖と、エンド- $\beta$ -N アセチルグルコサミニダーゼ活性の検出を試みたところ、どちらも受精後 18 時間のゼブラフィッシュ胚で検出された。また *zFT2* 最大発現期の受精後 72 時間のゼブラフィッシュの幼魚においても同様に、Lewis x を含み、還元末端が N アセチルグルコサミンの遊離の糖鎖及び N アセチルキトビオース構造の N 結合型糖鎖が検出された。これらの糖鎖の発現は、*zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子の発現時期と相関があったことから、*zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子産物により生合成された糖鎖であると考えられる。またこれらの糖鎖に、負電荷を持つシアル酸が結合した糖鎖についても、特に *zFT2* 最大発現期の幼魚において多数検出された。

現在までに脊椎動物の発生段階における Lewis x の役割については、マウスの初期胚における細胞の密着化現象やニワトリの神経誘導が抗 Lewis x 抗体により阻害されるという報告など、重要な報告が多数ある。しかし、これらの報告は主として抗体またはレクチンを用いて解析しており、糖鎖の全体構造は明らかにされていない。本研究では、発生段階における *zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子産物により生合成されたと考えられる Lewis x 含有糖鎖の構造、構造の多様性及び発現時期を明らかにした。発生段階における Lewis x を含んだ糖鎖について構造面からアプローチし、網羅

的な解析を行った初めての研究であり、発生段階における Lewis x 抗原の研究において重要な結果である。

Two  $\alpha$ 1-3fucosyltransferase genes, *zFT1* and *zFT2*, have been previously cloned from zebrafish whose gene products are capable of synthesizing the Lewis x structure [Kageyama *et al. J. Biochem* **125**, 838-845 (1999)]. This thesis describes the analysis of the chemical structures and the expression pattern of the Lewis x containing oligosaccharides expressed in the zebrafish embryos at 18 hours and the juvenile zebrafish at 72 hours after fertilization corresponding to the expression stages of *zFT1* and *zFT2*, respectively.

First, the structural analysis of two Lewis x containing oligosaccharides detected previously in the zebrafish embryos at 18 hours after fertilization expressing *zFT1* maximally was performed. Oligosaccharides in zebrafish embryos at 18 hours after fertilization were cleaved from proteins with hydrazinolysis and tagged with a fluorophore, 2-aminopyridine, to enable highly sensitive detection. Pyridylamino (PA-) derivatives of the oligosaccharides were separated by three modes of HPLC to obtain two Lewis x containing oligosaccharides. The structural analysis of Lewis x containing oligosaccharides were performed with the reducing-end monosaccharide analysis, the combination of exoglycosidase digestions and 2-dimensional sugar mapping technique, and mass analysis. These oligosaccharides showed the partial structures of *N*-linked oligosaccharides in that their reducing-end portion was not a di-*N*-acetylchitobiose sequence (GlcNAc1-4GlcNAc) but a single *N*-acetylglucosamine residue (GlcNAc), suggesting the products from glycoproteins by digestion with an endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase. In fact, the Lewis x containing oligosaccharides with di-*N*-acetylchitobiose sequence (GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) in their reducing-end portion and the endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase activity were detected in embryos at 18 h after fertilization. Same Lewis x containing oligosaccharides were also detected in the juvenile zebrafish at 72 hours after fertilization. The expression stage of these oligosaccharides were correlated with those of *zFT1* and *zFT2*, suggesting that these oligosaccharides were the products of *zFT1* and *zFT2* gene products. Sialylated Lewis x containing oligosaccharides were also detected especially in the juvenile zebrafish at 72 hours after fertilization.

Many reports such as the inhibitions of the compaction in the mouse embryo and the neural induction in the chick embryos by anti-Lewis x antibody suggested the importance of Lewis x containing oligosaccharides during the embryogenesis of vertebrates. However, the whole structures of these oligosaccharides have not been reported since most of these studies were performed using antibodies or lectins. In this study, the whole structures and expression stages of Lewis x containing oligosaccharides were determined. This structural studies on Lewis x containing oligosaccharides during embryogenesis are important for the studies of Lewis x during embryogenesis.

## 論文審査の結果の要旨

本論文はゼブラフィッシュより、クローニングされた、 $\alpha$ 1-3 フコース転移酵素遺伝子である *zFT1* 及び *zFT2* の最大発現期に発現するフコース含有糖鎖の検出と構造解析を行ったものである。

まず始めに *zFT1* 最大発現期の胚で検出されていた2種類の糖鎖の構造解析を行った。これらの糖鎖を高感度で検出可能なピリジルアミノ化法により蛍光標識後、エキソグリコシダーゼ消化、糖鎖2次元マップ及び質量分析により決定した。この糖鎖は非還元末端に Lewis x 構造を含み、その構造は *N*結合型糖鎖様を示したが、還元末端が *N*-アセチルキトビオースではなく、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼにより消化されたと推定される *N*-アセチルグルコサミン1残基の遊離の糖鎖であった。そこでこれらの糖鎖の前駆体である還元末端が *N*-アセチルキトビオース構造を持つ糖鎖と、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性の検出を試みたところ、どちらもゼブラフィッシュ胚で認められた。また *zFT2* 最大発現期の胚でも同様に、Lewis x を含む遊離の糖鎖と還元末端が *N*-アセチルキト

ビオース構造を持つ *N*結合型糖鎖が検出された。これらの糖鎖の発現は、*zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子の発現時期と相関があったことから、*zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子産物により生合成された糖鎖であると考えられる。またこれらの糖鎖に、負電荷を持つシアル酸が結合した糖鎖も検出された。以上の結果は、*zFT1* 及び *zFT2* 遺伝子産物により生合成された Lewis x 含有糖鎖の役割を解明する上で重要な成果である。本論文の成果は、胚発生段階における Lewis x 構造を含んだ糖鎖に構造化学的な側面からアプローチしたものであり、今後の Lewis x 含有糖鎖の機能解析に寄与するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。