

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659067

研究課題名（和文）腫瘍内微小環境のモニタリングを目的とした新規糖ヌクレオチド解析法の確立

研究課題名（英文）Development of novel analytical methods of nucleotide sugars with the aim of monitoring tumor microenvironment

研究代表者

中嶋 和紀（NAKAJIMA KAZUKI）

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・基幹研究所研究員

研究者番号：10442998

研究成果の概要（和文）：

腫瘍内微小環境において生じる糖代謝の異常が糖鎖機能に及ぼす影響を明らかにするため、本研究では高速液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いた細胞内糖ヌクレオチドの定量法とその合成経路の追跡法を確立した。低グルコース・低酸素曝露した癌細胞株における糖ヌクレオチドの変化を解析した結果、悪性度が高い膵臓癌細胞株において UDP-GlcNAc、UDP-Gal レベルが特徴的に減少することを見出し、その変化が細胞表面上の N 結合型糖鎖構造に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have developed two chromatographic methods for monitoring intracellular nucleotide sugars and their metabolic pathway, to clarify the physiological significance of nucleotide sugars in tumor microenvironments. We examined the changes of nucleotide sugars by glucose deprivation and hypoxic conditions in cancer cell lines, and found that specific reduction of UDP-GlcNAc and UDP-Gal in only pancreatic cancer cell lines influences cellular N-glycan structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：糖ヌクレオチド、単糖代謝、糖鎖、質量分析、クロマトグラフィー、癌、栄養飢餓

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖付加は最も普遍的な糖鎖修飾であり、細胞表面に局在するタンパク質の多くは糖鎖付加を受けて初めて完成する。糖鎖が機能を発揮するためには、特定の糖鎖構造を有することが重要であるが、糖鎖の構造は、単糖の取り込みとその代謝、糖ヌクレオチドとその輸送体、および糖転移酵素など多くの要因により協調的に制御される(Taniguchi et al. *J. Biol. Chem., Reflection*, 2009)。

糖ヌクレオチドは糖転移酵素の基質であり、その発現レベルや局在が糖鎖修飾を制御している。例えば癌の悪性化に相関するグルコサミン転移酵素-Vは、酵素学的に他の酵素に比べて高い  $K_m$  値を有するため、その活性は基質の細胞内UDP-GlcNAc濃度に依存する。しかもUDP-GlcNAc濃度はグルコースや糖ヌクレオチドなどの糖代謝により支配される(Lau et al. *Cell*, 2007)。

癌細胞では「ワーバグ効果」と呼ばれる解糖系依存的なエネルギー代謝機構が活性化することが知られている。ところが栄養血管から遠く低酸素環境下にある腫瘍中心部や悪性度が高い癌は、血流が乏しく酸素やグルコースの供給が不十分となり、嫌氣的な呼吸に依存した異なる代謝機構が存在する(Hirayama et al. *Cancer Res*, 2009)。一方、グルコースを供給している糖輸送体(GLUT)の機能発現においては糖鎖とガラクトース結合タンパク質との相互作用が重要である。糖鎖修飾の異常はGLUTの膜安定性を低下させて機能不全を引き起こすことから、糖鎖修飾の異常は更なる糖代謝異常を招くと考えられる。

腫瘍内微小環境においては癌細胞の糖代謝が異常になり低酸素誘導因子(HIF-1 $\alpha$ )が誘導されて、シアリルルイス抗原やシアリル Tn 抗原などの特徴的な糖鎖抗原が発現する。しかしながら、糖代謝異常に伴う糖鎖修飾の異常を証明した研究は、それらを仲介する糖ヌクレオチドの解析法が十分に確立されていなかったため、これまで前例が少ない。

本研究では癌微小環境における糖ヌクレオチドの変化が、細胞膜糖タンパク質(特にGLUT)などの機能不全を引き起こすという作業仮説をもとに着想した。糖代謝異常と糖ヌクレオチドの変化に焦点を当てた本研究は、これまでの糖転移酵素を中心とした糖鎖機能研究と比較して、特に独創的である。

## 2. 研究の目的

近年、癌や糖尿病などの疾患における糖鎖の役割が明らかになるにつれ、糖代謝から、糖ヌクレオチド、糖鎖生成までを統合的な観点で捉える研究の必要性が高まっている。しかし糖ヌクレオチドの解析法が十分に確立されておらず、これらの分子の連携を明らかにした研究例は殆ど無い。本研究では、糖ヌクレオチドを介した糖鎖の生理的な意義を見出すため、糖ヌクレオチドの新規解析法を確立する。さらに特異的な癌組織の微小環境における糖ヌクレオチドの変化に着目し、グルコース輸送体(GLUT)による糖の取り込みから糖ヌクレオチドへの代謝、糖鎖によるGLUTの機能制御に至るまでの機構を検討し、腫瘍内微小環境における糖鎖の生理的機能を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖ヌクレオチドの解析法の確立

#### ① HPLC による一斉定量法

細胞試料由来の糖ヌクレオチドは、エタノール沈殿して得られる画分を、更にグラファイトカーボンカラムを用いた固相抽出により精製した。疎水性が異なるオクタデシルカラムを比較して、イオンペア逆相クロマトグラフィーモードの分離条件を検討した。

#### ② LC-MS による合成経路の追跡法

方法①を質量分析計と接続するため揮発性緩衝液の使用を検討し、分離用溶媒としてトリエチルアミン酢酸緩衝液を選択した。糖ヌクレオチドはマイクロLCとエレクトロスプレーイオントラップ型質量分析計を接続したシステムにより解析した。

糖ヌクレオチドの合成経路を追跡するため、糖ヌクレオチドは予め単糖の炭素( $^{12}\text{C}$ )が数個重炭素( $^{13}\text{C}$ )に置換した $^{13}\text{C}_6$ -グルコースを培養液に加えて代謝標識した。 $^{13}\text{C}_6$ -グルコースは代謝されて、例えばUDP-GlcNAcのMSスペクトルは、UDP-GlcNAcの糖鎖部分、ヌクレオチド部分、更にN-アセチル基が標識された質量同位体を示した。我々はMoseleyらの方法(Moseley et al. *BMC Biology*, 2011)により質量同位体の各々のピーク面積を計算してUDP-GlcNAcの合成経路と分解経路を推定した。

## (2) 腫瘍内微小環境における糖ヌクレオチド変化の解析

- ① 由来組織が異なる癌細胞株を用いた解析  
今回の検討では、乳癌、膵臓癌、大腸癌由来の細胞株を用いて低グルコース・低酸素に対する変化を解析した。また(1)の②で示した方法により、 $^{13}\text{C}_6$ -グルコースで標識した後、LC-MS測定することで、その代謝経路の変化を追跡した。
  - ② マクロファージの免疫応答における糖ヌクレオチドの変化。マクロファージの細胞株(RAW)を用いて低酸素曝露に伴う糖ヌクレオチドの変化を解析した。
  - ③ In vivoにおける糖ヌクレオチドの解析  
In vivoの実験は腫瘍を移植したヌードマウスを用い、回収した大腸癌・膵臓癌組織に含まれる糖ヌクレオチドを定量した。
- (3) 腫瘍内微小環境において糖ヌクレオチドの変化が糖鎖修飾に及ぼす影響
- ① 細胞表面糖鎖の構造的変化  
細胞表面糖鎖を網羅的に解析するため、糖タンパク質のN結合型糖鎖とO結合型糖鎖を連続的に回収後、糖アルコール体としてLC-MS測定する方法を検討した。本法により、低酸素曝露に伴う糖鎖の構造的変化を解析した。
  - ② GLUTの発現と糖鎖構造の解析  
GLUTの構造はファミリー内で高度に保存されており、その細胞表面での発現は糖鎖修飾により制御される(Ohtsubo et al, *Cell*, 2005)。今回の検討では、その発現をウエスタンブロットにより確認した。またGLUTの糖鎖構造解析はGLUTを免疫沈降により回収し、糖鎖を切断・回収後、①で述べた方法により構造を解析した。
  - ③ マクロファージの免疫応答におけるUDP-GlcNAc変化の生理的意義  
マクロファージの細胞株(RAW)を用いて、低酸素曝露に伴うGlcNAc転移酵素の発現変化、レクチンブロットによる糖タンパク質糖鎖の発現パターンを解析し、その機能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 糖ヌクレオチドの解析法の確立。

① イオンペア逆相HPLC法の分離条件を最適化し、糖鎖修飾に関わる糖ヌクレオチド(UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcA, CMP-NeuAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, GDP-Man, GDP-Fuc)とヌクレオチドの一斉分離に世界で初めて成功した。本法は細胞内の主要な糖ヌクレオチドを一斉定量できることから、糖鎖修飾の全貌を知る手がかりを得ることができる(Nakajima et al, *Glycobiology*, 2010, 論文①)。

② 上記HPLC法とMSを直結して、更に安定同位体単糖により標識した糖ヌクレオチドを測定するシステムを構築した。MSスペクトルにおけるUDP-GlcNAcの質量同位体分布を継続的にモニターすることにより、ヘキソサミン経路、核酸合成経路、解糖系などのUDP-GlcNAc合成経路の流れを追跡することに成功した。またCMP-NeuAcの同位体からはUDP-GlcNAcの分解経路の流れを捉えることができた。

(Nakajima et al, *Manuscript in preparation*)

キャピラリー電気泳動-質量分析計による糖代謝物の包括的解析はメタボローム解析で威力を発揮するのに対して、我々が確立した方法は糖代謝物と糖鎖を仲介する糖ヌクレオチドの量と流れを追跡するのに有用である。

### (2) 腫瘍内微小環境における糖ヌクレオチド変化の解析

① 癌細胞中のUDP-GlcNAcは正常細胞に比べて有意に高いことを乳癌細胞株を用いて明らかにした。

② 癌組織種によって糖ヌクレオチドの低グルコースの応答は異なった。乳癌細胞株は低グルコース条件により、UDP-GalやUDP-GlcNAcが1.5-2倍、全体的に減少した。一方、悪性度が高い膵臓癌細胞株は特徴的にUDP-GlcNAcの減少、UDP-GalやUDP-Glcの約10分の1に減少していることを見出した。その原因の一つは、核酸合成経路の流れの低下によることを明らかにした(Nakajima et al, *Glycobiology*, 2010, 論文①)。

③ 膵臓β細胞株インスリノーマを用いた解析から、膵臓β細胞ではUDP-GlcNAc分解経路すなわちCMP-NeuAc合成経路が極めて遅いことを見出した。

④ マクロファージの細胞株(RAW)は、低酸素条件において UDP-GlcNAc が約 50%の減少していることを見出した。

(3) 糖ヌクレオチドの変化による糖鎖修飾に及ぼす影響

① 低酸素曝露に伴う糖鎖の構造的変化を解析した結果、N結合型糖鎖の高分岐糖鎖とポリラクタミン型糖鎖の発現量に違いを見出した。またシアリルTn抗原などのO結合型糖鎖も低酸素で増加していることを明らかにした。

② グルコースの取り込みと密接に関わるグルコース輸送体2の糖鎖変化を免疫沈降後、レクチンプロットにより発現パターンを解析し興味深い知見を得つつある。

③ マクロファージ由来の RAW を低酸素状態に曝露すると、PHA-L<sub>4</sub>のレクチンプロット解析からβ1-6GlcNAc 糖鎖含有糖タンパク質が減少することを見出した。GlcNAc 転移酵素(GnT-V)の活性も低下した。特にインテグリンβ1上のβ1-6GlcNAc 結合型糖鎖が顕著に減っており、低酸素で誘導される細胞接着能や遊走能に影響を及ぼしていることが明らかになった。

(Shirato and Nakajima et al, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 論文②)。

本研究結果から、グルコース代謝から糖ヌクレオチド、糖鎖生成の連携メカニズムを明らかにする糸口を得た。今後は GLUT などの特定の糖タンパク質糖鎖の構造や動態解析するため、引き続き、質量分析を用いたシステムを改良する。更に In Vivo でこれらの結果を評価する予定である。これらの研究により、糖ヌクレオチドを中心とした生体内での癌微小環境と細胞内糖質代謝を総合的に理解する技術基盤を確立したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Angata T, Fujinawa R, Kurimoto A, **Nakajima K**, Kato M, Takamatsu S, Korekane H, Gao CX, Ohtsubo K, Kitazume S, and Taniguchi N, Integrated approach toward the discovery of glyco-biomarkers of inflammation-related diseases, *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2012, 1, 159-169. (査読有)

② Ito E, Tominaga A, Waki H, Miseki K, Tomioka A, **Nakajima K**, Kakehi K, Suzuki M, Taniguchi N, and Suzuki A, Structural characterization of monosialo-, disialo- and trisialo-gangliosides by negative ion AP-MALDI-QIT-TOF mass spectrometry with MS(n) switching, *Neurochem Res.*, 2012, 6, 1315-1324. (査読有)

③ Shirato K, **Nakajima K**, Korekane H, Takamatsu S, Gao C, Angata T, Ohtsubo K, and Taniguchi N, Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 1, 20-25. (査読有)

④ **Nakajima K**, Kitazume S, Angata T, Fujinawa R, Ohtsubo K, Miyoshi E, and Taniguchi N, Simultaneous determination of nucleotide sugars with ion-pair reversed-phase HPLC. *Glycobiology*, 2010, 7, 865-871. (査読有)

[学会発表] (計13件)

① **Nakajima K**, Shirato K, Ohtsubo K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, and Taniguchi N, Tracing strategy of UDP-GlcNAc metabolism by mass isotopomers analysis -Specific sialic acid biosynthesis in pancreatic beta cells-, GLYCO TOKYO 2011, 和光、12月9日、2011.

② 中嶋和紀、白土健、大坪和明、高宮里奈、北爪しのぶ、安形高志、谷口直之、UDP-GlcNAc 代謝物の新規解析戦略—糖代謝異常における糖ヌクレオチドの関与— 第84回 日本生化学会大会、京都、9月23日、2011.

③ **Nakajima K**, Shirato K, Ohtsubo K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, and Taniguchi N, Novel strategy for dynamic tracing of UDP-GlcNAc metabolism, The 31st NAITO CONFERENCE on Glycan Expression and Regulation [II], 札幌、September 14, 2011 (Oral presentation).

④ **Nakajima K**, Shirato K, Ohtsubo K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, and Taniguchi N, Strategy for dynamic tracing of

UDP-GlcNAc metabolism, HUPO2011, Geneva, September 5, 2011.

⑤ **Nakajima K.**, Ohtsubo K, Takamiya R, Shirato K, Kitazume S, Angata T, and Taniguchi N, Novel analytical methods for nucleotide sugar metabolites, RIKEN Chemical Biology International Symposium, October 26, Saitama, Japan (Oral presentation).

⑥ **中嶋和紀**、大坪和明、高宮里奈、白土健、北爪しのぶ、三善英知、谷口直之  
糖ヌクレオチド代謝物の新規解析法、BMB2010、神戸、12月8日、2010(口頭発表)

⑦ Shirato K, **Nakajima K.**, Korekane H, Gao CX, Takamiya R, Takamatsu S, Angata T, Ohtsubo K, and Taniguchi N, Hypoxia reduced  $\beta$ 1,6-GlcNAc branching N-glycans via GlcNAc Cycle. BMB2010、神戸、12月9日、2010.

⑧ Ito E, **Nakajima K.**, Kakehi K, Suzuki M, Kitazume S, and Taniguchi N, Structural characterization of  $\beta$ -eliminated O-Glycans by high-sensitive CE-MS, GlycoT 2010 Tokyo 7th International Symposium on Glycosyltransferase, Tokyo, July 31, 2010.

⑨ Takamiya R, Ohtsubo K, Takamatsu S, **Nakajima K.**, Shirato K, Taniguchi N, and Angata T, Cigarette smoke extract induces bisecting GlcNAc modification in RAW264.7 murine macrophage.

⑩ Shirato K, **Nakajima K.**, Korekane H, Gao CX, Takamiya R, Takamatsu S, Angata T, Ohtsubo K, and Taniguchi N, Hypoxia reduced  $\beta$ 1,6-GlcNAc branching N-glycans via GlcNAc Cycle.

⑪ **Nakajima K.**, Ohtsubo K, Takamiya R, Shirato K, Kitazume S, Angata T, and Taniguchi N. Novel analytical methods for nucleotide sugar metabolites, GlycoT 2010 Tokyo 7th International Symposium on Glycosyltransferase, Tokyo, July 31, 2010.

⑫ **中嶋和紀**、大坪和明、高宮里奈、白土健、北爪しのぶ、三善英知、谷口直之  
糖ヌクレオチド代謝物の新規解析法、第1回日本プロテオーム学会年会、千葉、7月27日、2010(口頭発表).

⑬ **Nakajima K.**, Kitazume S, Angata T, Fujinawa R, Ohtsubo K, Miyoshi E, and Taniguchi N, Simultaneous analysis of nucleotide sugars with ion-pair reverse-phase HPLC and LC-MS on glycan cycle, International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-immunity, Cell biology and Glycobiology, Osaka, April 13, 2010 (Oral presentation).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中嶋 和紀 (NAKAJIMA KAZUKI)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・基幹研究所研究員

研究者番号：10442998

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし