

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790301

研究課題名(和文)糖鎖の動態追跡を目的とする質量同位体測定に基づく高速・高感度糖鎖解析法の確立

研究課題名(英文) High-speed and high-sensitive methods of carbohydrates based on mass isotopomer analysis with the aim of monitoring glycan dynamics

研究代表者

中嶋 和紀 (Nakajima, Kazuki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：10442998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では糖鎖の動態の生物学的意義を明らかにするため、質量同位体測定に基づいた糖ヌクレオチドと糖鎖の高速・高感度解析法を確立した。13C6-グルコースで標識したUDP-GlcNAcとCMP-NeuAcの質量同位体パターンはUDP-GlcNAcの代謝経路の流れを示した。13C2-グルコサミンで標識した糖鎖の質量同位体パターンは各糖鎖の代謝回転を示した。膵臓細胞由来インスリノーマにおいてシアル酸代謝経路からシアル酸合成経路が遅いことが明らかになった。本法は細胞内における単糖の代謝動態を統合的に知るうえで有用なツールになりえる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify biological significance of glycan dynamics, we have developed a tracing method for UDP-GlcNAc synthesis and utilization, and GlcNAc utilization using 13C6-glucose and 13C2-glucosamine, respectively, followed by the analysis of mass isotopomers. Because nucleotide sugars are an important building block in glycan biosynthesis. Analysis of isotopomers of UDP-HexNAc and CMP-NeuAc, labeled with 13C6-glucose, revealed the relative contributions of metabolic pathways leading to UDP-GlcNAc synthesis and utilization. Using 13C2-glucosamine, the diversity of glycan turnover was observed in each glycan. In pancreatic insulinoma cells, the labeling efficiency of CMP-NeuAc was lower compared with that in hepatoma cells, indicating that metabolic flows are responsible for the low sialylation in the insulinoma cells. Thus, our strategy should be useful for systematically tracing each stage of cellular glycan dynamics.

研究分野：生化学

キーワード：糖鎖修飾 糖ヌクレオチド 質量分析 クロマトグラフィー グルコース代謝 シアル酸

1. 研究開始当初の背景

糖鎖付加は最も普遍的な翻訳後修飾であり、タンパク質の多くは糖鎖付加を受けて細胞表面で初めて機能する。糖鎖の機能が、単糖の代謝、糖ヌクレオチドとその輸送体、糖転移酵素、細胞表面受容体の糖鎖、さらに糖鎖の分解などの多くの要因によって協調的に調節されることが明らかになるにつれて、その調節機構の破綻が、がん、糖尿病などの病態につながることを考えられている (Taniguchi et al. (2009), *J. Biol. Chem. Reflection*, 284, 34469)。

我々は、N 型糖鎖の合成における N-アセチルグルコサミンの細胞内挙動を多面的に明らかにしてきた。UDP-GlcNAc を含む細胞内糖ヌクレオチドの一斉定量に世界で初めて成功した (Nakajima et al. (2010), *Glycobiology*, 7, 851)。細胞内における UDP-GlcNAc の濃度は N 型糖鎖の分岐を支配して糖鎖の代謝回転に影響を与える。なぜなら各 GlcNAc 転移酵素 (GnT) が酵素学的に異なる K_m 値 (GnT-III: 0.4mM, GnT-V: 11mM) を有するからである。UDP-GlcNAc が高い時には GnT-V によって高分岐糖鎖が作られるが、低い時には低分岐糖鎖が作られることが想定されている。

一例として、上皮成長因子受容体に高分岐糖鎖が付くと、受容体はガラクトース認識レクチンと強く結合して、受容体が細胞膜上に長く留まる。その結果、増殖促進シグナルが継続される (Lau et al, (2007), *Cell*, 129, 123)。一方、トランスフォーミング増殖因子受容体に低分岐糖鎖が付くと、すぐにエンドサイトosis されてしまい増殖抑制シグナルを生じる。すなわち細胞増殖促進と抑制シグナルは、UDP-GlcNAc や N 型糖鎖の分岐により制御されるが、その本質は、受容体糖鎖の代謝回転の違いによるものと考えられる。しかしながら直接的な解析法は確立されていない。

質量分析は生体分子を高感度且つ分子レベルで検出できるため、定性・定量解析や動態追跡に適用されつつある。しかし糖鎖を対象とした動的解析法はこれまでに確立されていない。本研究では UDP-GlcNAc の代謝流束 (Flux) 追跡法と、過去に報告した糖鎖の構造解析法を動態追跡に応用した新たな代謝動態追跡法を構築した。

2. 研究の目的

糖鎖が糖尿病、がん、慢性閉塞性肺疾患などの病態に深くかかわることが明らかになっているが、これまでは糖鎖の合成、あるいは分解だけに絞ったいわばスナップショット的な解析の研究が多く、動的な統合的な解析はなされてこなかった。本研究は、単糖の安定同位体で標識した糖鎖を MS により高速・高感度解析する方法を確立し、糖鎖の合成過程を代謝回転として動的に捉え、病態における糖鎖の意義を明らかにすることを目的とする。

具体的には、糖尿病などの高血糖状態に伴う N 型糖鎖の分岐にかかわる構造的変化と代謝回転を網羅的に解析するとともに、グルコース輸送にかかわる膜受容体糖鎖の代謝回転の生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では主に (A) と (B) の二つの実験系を確立した (図 1)

(A) 糖ヌクレオチドの代謝 Flux 追跡法

糖ヌクレオチドの標識には、 $^{13}C_6$ -グルコースを使用した。MS 測定で得られた各々の糖ヌクレオチドの質量同位体は、既存の解析法 (Moseley et al, *BMC Biology*, 2011) を参考にして質量同位体のピーク面積を計算した。UDP-GlcNAc の合成経路と分解経路の寄与を推定した。

(B) LC-MS による糖鎖の質量同位体測定

糖鎖の標識は $^{13}C_2$ -グルコサミンにより計時的に標識した。細胞から総タンパク質画分を調製し、PVDF 膜に Dot-blot し、その膜上で N-グリコシダーゼ消化と β 脱離により N 型糖鎖と O 型糖鎖を遊離・回収した。糖アルコール体として LC-ESI-MS 測定した。標識した時間が異なるものを準備し、各々同様に測定した。 ^{13}C -グルコサミンは糖鎖の GlcNAc、GalNAc やシアル酸に取り込まれる。例えばハイマンノース型糖鎖 (^{13}C -Man-GlcNAc₂) には 2 つの同位体を取り込まれてシグナルがシフトする。その $^{13}C_2$ -グルコサミンが取り込まれる個数とラベルされた効率を算出した。

分解速度は $^{13}\text{C}_2$ -グルコサミンで 24 時間標識後、非標識のものに置換して、ラベルされた割合が減少する速度を求めた。

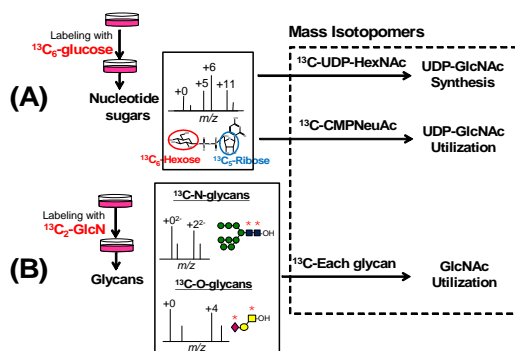


図 1：解析法の概要

(2) 複合糖質糖鎖の質量同位体測定

既存の方法に従って肝癌細胞(Hepa1-6)と膵臓β細胞インスリノーマから、総脂質画分を調製し、その後けん化したものを糖脂質画分とした。遊離ヒアルロン酸は、無血清培地で培養した培地を限外ろ過し、ヒアルロニダーゼで加水分解し2糖を得た。更にβ脱離により糖アルコール体にしてキャピラリー LC-ESI-MS/MS 測定した。

(3) 肝癌細胞と膵臓β細胞由来インスリノーマにおける比較解析

細胞内糖ヌクレオチドレベルは過去の報告(Nakajima et al. *Glycobiology*, 2010)に従って解析した。N型糖鎖は糖鎖をピリジリアミノ化後 HPLC により定量した。遊離ヒアルロン酸は市販の ELISA キットにより定量した。

4. 研究成果

(1) 糖ヌクレオチドの代謝 Flux 追跡

$^{13}\text{C}_6$ -グルコースで標識した糖ヌクレオチドの質量同位体を測定した結果を図 1 (A)に示す。UDP-Glc の糖鎖部分が標識された+6 マスシフト、ヌクレオチド部分が標識されて+5 マスシフト、その両方が標識された+11 マスシフトしたシグナルが観察された。

UDP-GlcNAc の質量同位体は、ヘキソサミ

ン経路、核酸合成経路、解糖系などの合成経路の流れを示すことがわかった。また CMP-NeuAc の結果から UDP-GlcNAc の分解経路を捉えることに成功した。

(2) 糖鎖の質量同位体測定法の確立

代謝標識した細胞から N 型糖鎖、O 型糖鎖、グルコサミノグリカン、ガングリオシド由来糖鎖を糖アルコール体としてキャピラリー LC-ESI-MS により測定した。各々の糖鎖の合成速度は $^{13}\text{C}_2$ -GlcN で標識された割合から求めた。糖鎖構造が明らかな肝癌細胞(Hepa1-6)を用いて各々の糖鎖のラベル効率を構造別プロファイルした。

—糖タンパク質糖鎖—

糖鎖の合成過程が少ないハイマンノース型糖鎖と O 型糖鎖は、複合型 N 型糖鎖に比べて高いラベル効率を示した。N 型糖鎖の分岐の程度や、シアル酸の有無においてラベル効率に違いが認められなかった。

- グルコサミノグリカンと糖脂質 -

細胞質で生合成される合成過程が特に少ないヒアルロン酸は特にラベル効率が高かった。この値はゴルジ体の中で修飾される他のグルコサミノグリカンに比べて高かった。一方、スフィンゴ糖脂質への取り込みは少なかった。

これらの結果はラベル効率が糖鎖の合成速度を反映することを示した。

—糖鎖の部分構造—

コアフコースの有無やシアル酸の結合様式 (α 2-3 結合もしくは α 2-6 結合) の影響を調べた結果、予想に反してラベル効率が異なることを見出した。特に α 2-6 で結合したシアロ糖鎖のラベル効率は高く、シアル酸の違いに伴って糖鎖の代謝動態が異なることを示唆した。またコアフコースの修飾によってラベル効率は著しく低下した。

これらの結果が糖鎖の合成過程もしくは分解過程に影響によるものかを更に検証した。コアフコース転移酵素(FUT8)欠損マウスと野生型マウスの線維化細胞を用いて比較解析をした。結果、違いは見られなかった。一方、糖鎖の分解を制御している可能性があ

るシアル酸結合タンパク質(Siglec)の過剰発現株についても比較した。結果、こちらも見られなかった。今後引き続きコアコースとシアル酸の代謝回転が示す生物学的意義について詳細が検討する予定である。

(4) 肝癌細胞と膵臓β細胞インスリノーマにおける代謝動態の比較解析

糖ヌクレオチドの解析から膵臓β細胞インスリノーマではUDP-GlcNAc分解経路すなわちCMP-NeuAc合成経路が遅いことを見出し、糖鎖の解析からシアル酸の合成速度が遅いことを明らかにした。糖鎖の定量解析の結果、インスリノーマにおいてシアル酸を含む糖タンパク質や糖脂質糖鎖の含量が少ないこと、一方、ヒアルロン酸やO-GlcNAc修飾タンパク質の発現量に差がないことがわかった。

UDP-GlcNAcの利用程度や、CMP-NeuAc輸送体やシアル酸転移酵素の発現量にも差が無かったことから、糖ヌクレオチドの代謝系が律速となって糖鎖構造に影響を及ぼしていることが明らかになった。

(5) 糖尿病条件下の膵臓β細胞株の代謝フラックス解析

膵臓β細胞インスリノーマを高血糖状態で培養し、糖ヌクレオチドと糖鎖の質量同位体を解析した。ヘキソサミン経路や解糖系のUDP-GlcNAc合成経路が亢進していることを明らかにした。これらの結果はO-GlcNAc修飾に影響を及ぼすことが示唆された。

本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ごとに糖鎖の代謝回転を明らかにできるように解析系の高感度化を予定している。一連の研究により糖鎖の代謝回転という新たな観点から糖鎖の生物学機能を知る糸口をえたいと考えている。

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7件)

Yang YR, Kim DH, Seo YK, Park D, Jang HJ, Choi SY, Lee YH, Lee GH, Nakajima K, Taniguchi N, Kim JM, Choi EJ, Moon HY, Kim IS, Choi JH, Lee H, Ryu SH, Cocco L, and Suh PG. *Oncotarget*, 2015, In press (査読有).

Okahara K, Kizuka Y, Kitazume S, Ota F, Nakajima K, Hirabayashi Y, Maekawa M, Yoshikawa T, and Taniguchi N, *Glycobiology*, 2014, 10, 926-34 (査読有).

Kurimoto A, Kitazume S, Kizuka Y, Nakajima K, Oka R, Fujinawa R, Korekane H, Yamaguchi Y, Wada Y, and Taniguchi N, *J. Biol. Chem.*, 2014, 25; 289(17):11704-14 (査読有).

Harada Y, Nakajima K, Masahara-Negishi Y, Freeze HH, Angata T, Taniguchi N, and Suzuki T, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013, 110, 48, 19366-71 (査読有).

Korekane H, Park JY, Matsumoto A, Nakajima K, Takamatsu S, Ohtsubo K, Miyamoto Y, Hanashima S, Kanekiyo K, Kitazume S, Yamaguchi Y, Matsuo I, and Taniguchi N, *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 39, 27912-26 (査読有).

Ito E, Nakajima K, Waki H, Miseki K, Shimada T, Sato TA, Kakehi K, Suzuki M, Taniguchi N, Suzuki A, *Anal. Chem.* 2013, 85, 16, 7859-65 (査読有).

Nakajima K, Ito E, Ohtsubo K, Shirato K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, Taniguchi N. *Mol. & Cell Proteomics.* 2013, 12, 9, 2468-80 (査読有).

[学会発表](計4件)

中嶋和紀、秋山央子、田中香織、谷口直之、平林義雄、双性イオイ性カラム(ZIC)-HILIC-ESI-MSによる脳内グルコース化分子の異性体定量、第33回日本糖質学会年会、2014(口頭発表)、名古屋大学 豊田講堂(愛知県、名古屋) 7月31日。

中嶋和紀、HILICによる親水性分子と疎水性分子の分析について、メルクミリポアクロマトグラフィーセミナー、2014、(招待講演) 5月15日 東京(品川) 17日大阪(大阪市)。

Nakajima K, Ito E, Ohtsubo K, Shirato K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, and

Taniguchi N. Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and O-glycans for tracing nucleotide sugar metabolisms, HUPO 2013, Pasifico (Kanagawa, Yokohama), Sep, 16 (Oral presentation)

中嶋和紀、伊藤恵実、大坪和明、白土健、高宮里奈、北爪しのぶ、安形高志、谷口直之
質量同位体測定による GlcNAc 代謝動態の追跡、第 32 回日本糖質学会年会、大阪国際交流センター(大阪府、大阪市) 8 月 6 日、2013 (口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

Nakajima K and Taniguchi N. *Glycoscience: Biology and Medicine*, 2014, 103-110 (査読無).

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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
脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：10442998

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無