

## グリカン(Glycans)への安定同位体の代謝取り込み

グリカン（糖鎖）研究への安定同位体利用の可能性について

Ron Orlando, Complex Carbohydrate Research Center, Departments of Biochemistry & Molecular Biology and Chemistry, University of Georgia, Athens, GA 30602

グリコシル化は、真核細胞系の最も一般的な翻訳後のタンパク質修飾の1つです<sup>1-3</sup>。全ての哺乳類のタンパク質の60-90%が生きている間のいくつか時点でグリコシル化され<sup>1,3</sup>、そして、事実上、膜と全ての分泌タンパク質がグリコシル化<sup>2</sup>されることが推定されています。糖タンパク質グリカンが細胞-細胞の認識<sup>4-6</sup>、信号の形質導入<sup>7</sup>、炎症<sup>8</sup>と腫瘍形成<sup>9-13</sup>のような生理的なイベントでしばしば重要な役割を果たしています。タンパク質のグリコシル化の重要な生理的な役割を考えると多くの研究グループが、特定のグリカンの構造のキャラクタリゼーション、それぞれのグリカンを発現するタンパク質の同定について大きな努力を払っている。例えば、細胞がどのようにして分化するか、腫瘍細胞がどのようにして快方に向かうかなどについての構造変化の詳細な研究に大きな努力が払われています。これらの努力により、**glycomics**の新しい分野が立ち上げられました<sup>14</sup>。

質量分析は複雑な混合物を分析する迅速、高感度で信頼性が高い分析法になりました<sup>15</sup>。**Glycomic**研究は代表的にグリカンのMS分析によるグリカン全体の遊離についても含んでいます<sup>16,17</sup>。これは**glycome**の定性的なキャラクタリゼーションに有益なアプローチであるが、MSを用いた定量結果で複数の問題が起こります。例えば分析物のイオン化で競合していたり、干渉している他の合成物の存在によりイオン抑制のような現象に起因するマトリックス効果は、分析物の濃度が変わらないときでも、特定の分析物からの応答が変わることがあります。定量MS分析に干渉する他の問題は、多様な装置による反応、装置の個体差とサンプル取扱い/データ処理の間で起きる装置間の変動性、装置の応答性の変異などによる差異から生じます。相対的な定量のための異なるアプローチによる成功は、誤差の発生源に対してどれくらいうまく取り組んでいるかに依存します。

同位体標識技術の使用はこれらの定量問題を補償することができるので、いろいろな**omics**フィールドで広範囲にわたり使用が増えました。そして最も発達したのは、プロテオミクスの分野で使用される技術でしょう。良い例は、細胞培養（**SILAC**）によるアミノ酸の安定同位体標識であり、これはMSをベースにした**proteomics**のための、タンパク質に同位体標識を行うことにより正確な分析法を提供します<sup>18</sup>。

**SILAC**実験で用いる2つの細胞集団は、1つは“軽い”（天然存在）と、もう1つは“重い”（同位体濃縮された）形態の特定のアミノ酸です（例えば、非標識と<sup>13</sup>C標識のリジンとアルギニン）。同位体の重いアミノ酸が天然のアミノ酸の代わりに細胞培養に使用されると、それらは全ての新しく合成されたタンパク質に取り込まれます。

細胞増殖後には、特定のアミノ酸は、“重い”同位体に置換されます。このアプローチの長所は細胞溶解の直後に混ぜ合わせるところです。これによって、両方の細胞タイプ（重い

と軽い) からのタンパク質はサンプル取り扱い、分解、精製と分離段階の間、正確な同じ実験条件になるということです。この理由から、SILAC は相対的定量 proteomic 分析の “gold standard” としばしば見なされています<sup>19</sup>。

このノートでは、glycomic 研究のための in vivo 標識戦略がプロテオミクスで使われている SILAC アプローチに類似しているかどうかについて述べます。

この glycomic 方法論は、IDAWG (Isotopic Detection of Aminosugars With Glutamine) と呼ばれており、アミノ糖ヌクレオチドの生合成の唯一の窒素提供源であるグルタミンの側鎖をベースにしています (図 1 参照)。このように、Gln-free 培地への amide-<sup>15</sup>N 濃縮グルタミン (L-Glutamine(amide-<sup>15</sup>N,98%+), CIL Cat#NLM-557) の使用により GlcNAc, GalNAc, シアル酸を含む全てのアミノ酸への <sup>15</sup>N 標識が可能です。これは N-and O-linked glycans, glycolipids と細胞外基質多糖類アミノ糖の質量をアミノ糖について +1 Dalton 増やすことになる。このアプローチの有用性は、amide-<sup>15</sup>N-Gln とその “軽い” 化合物の両方で培養されたマウス ES 細胞のタンパク質から遊離される N-linked glycans の分析によって示すことができます。これらの実験の成功は、IDAWG 技術が細胞培養のいろいろな将来の比較 glycomic 研究に役立つと予想されます。

#### 結果

hexosamine 生合成回路における初段階と律速段階 (図 1) は、glucosamine-6-phosphate への糖分解中間の fructose-6-phosphate への転換です<sup>20</sup>。このステップの間、導入されたアミノ窒素は Gln の側鎖アミドによってのみ供給され、Glu に変換される<sup>21</sup>。Glucosamine-6-phosphate は UDP-GlcNAc の前駆体です。そして、それは順番に他の主要なアミノ糖を含む糖ヌクレオチド、UDP-GalNAc と CMP-sialic acid に至ります<sup>22,23</sup>。このように、すべての GlcNAc, GalNAc とシアル酸を含有する分子は、amide-<sup>15</sup>N-Gln による細胞培養培地のサプリメントによる同位体標識の標的になります。

最初の実験は、培養中に生長した細胞の glycans に安定同位体を取り込む方法として代謝標識を使う可能性を評価するために実行しました。これらの実験において、R1 マウス ES 細胞 (mESCs) は、標準条件を使って培養されました。グルタミンは水溶液中でグルタミン酸とアンモニアに分解するので、細胞培養培地は一般的にグルタミンなしで供給します。特に Gln を培地から減耗させる必要がないので、この製法は IDAWG 標識アプローチを単純化できます。培地は amide-<sup>15</sup>N-Gln か非標識 Gln の、標準的な濃度 (2mM) で補います。この交換だけが、IDAWG で普通の細胞培養手順との唯一の変更です。この例では、マウス ES 細胞は “重い” か “軽い” Gln で 3 日間培養され、それから、質量分析ベースの分析のために蛋白質から分離されました。

mESCs の N-linked glycans への <sup>15</sup>N の取り込みは、非標識 Gln または amide-<sup>15</sup>N-Gln (図 2A+B) のどちらかで培養された細胞から遊離された permethylated N-linked glycans の FT-MS スペクトラを比較することにより研究されました。これらのスペクトラ中で観察さ

れた大量のイオンは、単独または、二重に電荷されている高 mannose glycans (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5-9</sub>) と一致します。これらの 2 つのスペクトラの比較で、“重い” 培地で培養された細胞から得られた glycan イオンは二重に荷電されたイオンの 1m/z unit と単独で荷電されたイオンの 2m/z units によって分子量が増加すること示しました。その <sup>15</sup>N がこれらの glycans に含まれる 2 つの中心的な GlcNAc に取り込まれたならば、これは期待された結果です。そして、それは高 mannose glycans 中に窒素だけが存在していることを示唆しています。Glycan 質量のこのシフトは、<sup>14</sup>N と amide-<sup>15</sup>N 中で培養した glycans の 1005.5 と 1006.5m/z units に現れる GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub>glycan から生じて、二重に荷電された分子イオン (M+2Na)<sup>2+</sup> のより詳細な点検により、明らかに認められる、それぞれ (図 2C と D)。これらのスペクトラで、最も強いイオンは <sup>14</sup>N か 2 個の <sup>15</sup>N かどちらかで計算された monoisotopic な分子量に現れます。それにより、このグリカンの大部分が両方の可能なサイトに <sup>15</sup>N を取り込んでいることを証明しました。<sup>15</sup>N が 0 か 1 の結合をしたイオンは、標識された形で存在しますが、支配的な種は完全に標識されています。

より大きな N-linked Glycans は、GlcNAc 残基につき 1 個の <sup>15</sup>N の結合によって分子量が同様に増えました。これは 960.5 から 964.1 の領域だけが観察されている、図 2A と 2B で示されるスペクトラを拡大することによって観察できます (図 2E ,2F それぞれ <sup>14</sup>N と amide-<sup>15</sup>N Gln 培地で培養された細胞から遊離された glycans について)。この領域は GlcNAc<sub>5</sub>Man<sub>3</sub>Gal<sub>2</sub>Fuc<sub>3</sub> の組成の複合 glycan であるから、分子イオン (M+3Na)<sup>3+</sup> を示す。予測として、この glycan からの monoisotopic イオンは amide-<sup>15</sup>N Gln 中で培養された細胞から得られたとき 5Da 増加しています。その上、イオンが標識されて観測されるとしても標識は全部ではが、完全に標識された glycan が支配的な種類です。

<sup>15</sup>N スペクトルで異なる同位体間の強度の比率で実行された計算では、この glycan 中の <sup>15</sup>N の 98% が取り込まれたことを示しており、この実験に使用された glutamine の <sup>15</sup>N の濃度と等しくなっています。その他の glycans からの同位体分布についての同様な計算ではそれらの <sup>15</sup>N 取り込みは 96–98% であることを示しています。Combined、これらの例から amide-<sup>15</sup>N-Gln からの <sup>15</sup>N が N-linked glycans の GlcNAc 残基中に広くに取り込まれるようになるのは、glycans への安定同位体を導入するために、役に立つ戦略であるかもしれないことを示唆しています。

## 議論

グリカンの代謝標識は、培養により誘導または、維持できるどんな細胞の反応の経路中でもグリカンの代謝回転率のダイナミクスを評価するための多くの新しい機会を提供します。たとえば、amide-<sup>15</sup>N Gln による細胞標識で、“軽い” Gln との培地サプリメントの入れ代えにより、どんなアミノ糖を含有するグリカンの半減期の決定ができるだろうか。以前、

グリカン代謝回転率研究では、グリカン発現におけるその変化を確認するのに放射性単糖類とその後の長時間の分画作業を必要としました。

通常、これらのラジオトレーサー技術はグリカンクラスの非常に敏感な検出を考慮に入れましたが、生合成に関連した種の個々のグリカン構造、またはサブセットを追跡する分解能が欠けていました。ここで報告された安定同位体取り込み法は、グリカン代謝回転率のダイナミクスを理解するための生物学的必需品として、高分解能質量分析の分析的長所を組み合わせました。このように、IDAWG は細胞培養システムでグリカン、糖たんぱく質と糖脂質の生物学的役割を研究するための強力な定量ツールになるようです。

謝辞

この仕事は、Biomedical Glycomics のために国立衛生研究所/NCRRfunded Integrated Technology Resource (P41 RR018502)、そして、統合糖鎖工学のために Health/NCRR-funded ResearchResource (P41 RR005351) によって資金を提供されました。

図 1。グルタミンの側鎖が GlcNAc、GalNAc とシアル酸を含むすべてのアミノ糖に  $^{15}\text{N}$  アイソトープタグの導入を可能にする、糖ヌクレオチド生産のアミノ糖のための唯一の窒素源であることを証明しているヘキソサミン生合成経路。

$^{15}\text{N}$  を含んでいる化合物は、青色で示されます。

図 2。同位体で標識された N-linked Glycans。非標識-Gln (2A) か amide- $^{15}\text{N}$ -Gln (2B) のどちらかで培養された細胞から遊離される permethylated N-linked glycans の 850-2000m/z の完全な FT-MS スペクトラ。GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>7</sub> glycan の 2 つの核 GlcNAc 残基中の  $^{15}\text{N}$  取り込みにより期待された 2 Dalton の質量シフトを示すスペクトラの拡大された部分 (2C,2D) と、5 Dalton は GlcNAc<sub>5</sub>Man<sub>3</sub>Gal<sub>2</sub>Fuc<sub>3</sub> glycan の 5 個のアミノ糖への  $^{15}\text{N}$  取り込みと一致します (2E,2F)。

## REFERENCES

1. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993, 3, (2), 97–130.
2. Krueger, K. E.; Srivastava, S., Posttranslational Protein Modifications: Current Implications for Cancer Detection, Prevention, and Therapeutics. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006, 5, (10), 1799.
3. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N., On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1473, (1), 4–8.
4. Drickamer, K.; Taylor, M. E., Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem. Sci* 1998, 23, 321–324.
5. Dwek, R. A., Glycobiology: more functions for oligosaccharides. *Science* 1995, 269, (5228), 1234–5.
6. Lis, H.; Sharon, N., Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *FEBS Journal* 1993, 218, (1), 1–27.
7. Haltiwanger, R. S., Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* 2002, 12, (5), 593–8.
8. Lowe, J. B., Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15, (5), 531–8.
9. Fukuda, M., Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res* 1996, 56, (10), 2237–44.
10. Hakomori, S., Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989, 52, 257–331.
11. Lowe, J. B.; Marth, J. D., A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 2003, 72, 643–91.
12. Muramatsu, T., Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas. *Glycobiology* 1993, 3, (4), 291–6.
13. Olden, K., Adhesion molecules and inhibitors of glycosylation in cancer. *Semin Cancer Biol* 1993, 4, (5), 269–76.
14. Lubner, G. C., Glycomics: an innovative branch of science. *Boll Chim Farm* 2003, 142, (2), 50.
15. Zaia, J., Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews* 2004, 23, (3), 161–227.
16. North, S. J.; Koles, K.; Hembd, C.; Morris, H. R.; Dell, A.; Panin, V. M.; Haslam, S. M., Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconjugate Journal* 2006, 23, (5), 345–354.
17. Jang-Lee, J.; North, S. J.; Sutton-Smith, M.; Goldberg, D.; Panico, M.; Morris, H.; Haslam, S.; Dell, A., Glycomic profiling of cells and tissues by mass spectrometry: fingerprinting and sequencing methodologies. *Methods Enzymol* 2006, 415, 59–86.
18. Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, (5), 376–86.
19. Ong, S. E.; Foster, L. J.; Mann, M., Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 2003, 29, (2), 124–30.
20. McClain, D. A., Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 2002, 16, (1), 72–80.
21. Yki-Jarvinen, H.; Vogt, C.; Iozzo, P.; Pipek, R.; Daniels, M. C.; Virkamaki, A.; Makimattila, S.; Mandarino, L.; DeFronzo, R. A.; McClain, D.; Gottschalk, W. K., UDP-N-acetylglucosamine transferase and glutamine: fructose 6-phosphate amidotransferase activities in insulin-sensitive tissues. *Diabetologia* 1997, 40, (1), 76–81.
22. Kean, E. L.; Munster-Kuhnel, A. K.; Gerardy-Schahn, R., CMP-sialic acid synthetase of the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1673, (1–2), 56–65.
23. Thoden, J. B.; Wohlers, T. M.; Fridovich-Keil, J. L.; Holden, H.M., Human UDP-galactose 4-epimerase. Accommodation of UDP-N-acetylglucosamine within the active site. *J Biol Chem* 2001, 276, (18), 15131–6.