知識天地

漫談後基因體時代的醣質體學

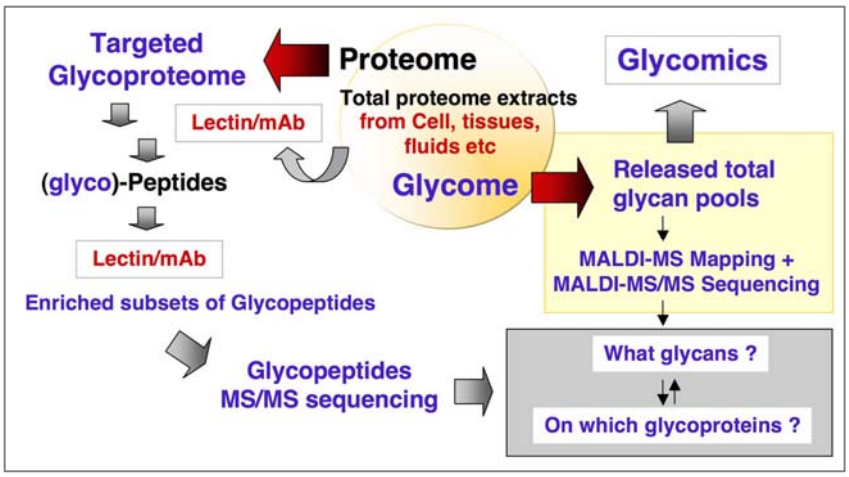
范耀云、林佳葳、邱繼輝 (生物化學研究所助理、博士生、副研究員)

人類基因體定序之完成，其眞正的涵意在於將二十一世紀生命科學的研究焦點轉移到蛋白質體學。所謂基因解碼，亦即是要去瞭解將此密碼轉譯並表現其功能的蛋白質群體彼此間的交互作用。諸多前瞻性的研究與討論甚至進一步的大膽預測：舉凡關鍵性的蛋白質功能表現與調控不外都決定在適時與適度的各種後修飾作用，包含磷酸化和醣化。醣質體學（glycomics），簡單的說，就是分析生物體在各個層次的醣化修飾全貌及其功能；而醣蛋白質體學（glycoproteomics），則著重於鑑定某特殊性醣化修飾如何選擇性的微調某一蛋白群組的功能表現。

如同生命本質，蛋白質群體是有律動而非靜態的，並需接收外來與內發之訊息傳遞，調整其運作和互動。醣化修飾在動態調控上的機動性不如磷酸化或其他一些後修飾，但其影響的層面卻更基本，尤其是在生長發育過程。正確的醣化作用決定醣蛋白的正常生合成與表達在細胞表面或分泌出去，其末端特定結構則扮演著辨識作用：就單一分泌性醣蛋白而言，促使它被運送到它該發揮效能的組織器官並影響它在血液裡循環的半衰期；就膜醣蛋白而言，整體性的表現決定一個細胞的表面特徵。如果說一個人如何因應周遭的刺激啓動連鎖反應，是先取決於他的個性及觀察力的敏銳，則一個細胞如何接收外來訊息傳遞或侵略物攻佔，往往決定於其表面的醣化修飾。正因爲不同種類的細胞在不同的生理階段皆可有不同的醣化修飾，因而可啓動不同的反應機制。當某一特定的醣化修飾在不對的時間點或是在不對的細胞種類出現時，就構成了「不正常」或錯誤的醣化修飾，此爲癌症腫瘤常有的一特色。有許多文獻指出在發育以及細胞癌化的過程中，若沒有正確的醣化作用會影響到許多重要的細胞訊息傳遞路線或是醣蛋白的合成，而導致病症或發育缺陷的結果，目前被定義爲 CDG（Congenital Disorders of Glycosylation）的病症即源自某一醣酵素基因的先天性缺陷。

醣質體學的基礎，建立在可以高效率的鑑定結構；唯有了解生物體中醣類結構的表現，才能進一步去推測其生合成的機制及重要性。醣化作用複雜性高且和基因模版相關性低，醣類合成既無法如 DNA 藉由聚合酵素鏈鎖反應大量複製，亦無法如基因轉錄或是蛋白質轉譯般，根據既有的模版進行生合成，導致一般醣蛋白結構上的複雜多樣性，常須經過一連串的樣品前處理才能得到足夠的量及純度進行分析。前處理的方向大致可分爲：一、針對不同醣類物理性質進行萃取或是分離，例如利用逆相層析法可將醣類以及蛋白質或是胜肽分離，或是二、利用可辨識醣類的抗體或蛋白凝集素（lectin）將醣蛋白或是醣鏈與其他生物分子分開；但到目前爲止，仍無一種方法可適用於所有含醣的生物體，得視物種之特性及訓練人員之經驗而定。在分析部分，早期主要是用紙層析法或是薄層層析法、液相層析法等方式分離，再搭配核磁共振儀或是快速原子撞擊質譜儀進行定性分析；近十年來，由於分析儀器的發展與突破，運用高解析度、高靈敏度的質譜儀搭配不同層析管柱，加快了定出醣鏈的組成與序列分析的時間，其中基質輔助雷射脫附搭配飛行式質譜儀（MALDI-TOF）可以有效的呈現一個細胞在醣脂質或是醣蛋白上的醣鏈分佈情形，而串連式質譜儀可進一步提供醣結構序列上的有用資訊。

本實驗室歷年來致力於如何快速有效利用質譜儀進行醣類結構之分析，我們發現若使用高能量碰撞誘導解離法進行串聯式質譜儀之分析，不僅可提供精確醣序列的資訊，更可經由一些關鍵斷片離子確定醣類分子連結的訊息[1]。在醣蛋白質體的分析技術發展上，仍以一維與二維電泳搭配不同專一性的 lectin blotting 快速得到帶有特殊醣質結構的蛋白在細胞中分佈情況爲主流，另有各式針對醣蛋白進行螢光染色的顯示法，但在醣質結構與蛋白身分確認上仍以質譜分析可得到最多資訊（見圖一）。除此之外，近幾年快速發展的技術平台還包括利用以醣結構爲主的微晶片[2]，來篩選細胞內與其有交互作用的蛋白質或是其他醣類，或利用有機化學將單醣接上不同官能基，以化學標定方式，針對特定醣類進行螢光偵測，以及協助純化分離出與此種醣類有關的作用蛋白質[3]，減少分析樣品的複雜度。



圖一

經由複雜的結構分析得到其醣質體的表現藍圖後，了解生物體中醣酵素的調節機制爲探討其功能與重要性不可缺的一環。以負責合成 N-linked 醣鏈還原端 core α6-fucosylation 的 Fut8（α1,6-fucosyltransferase）爲例，首先必須了解在此酵素正常表現的狀況下，含有 core fucosylation 修飾的醣質體與醣蛋白質體的表現圖譜，再進行分子層次的基因抑制（knockdown）或基因剔除（knockout）。研究指出當此醣酵素蛋白被消去後，除了造成醣質結構的差異性，Fut8 基因剔除的老鼠被發現有大量的 matrix metalloproteinase（MMP）表現，可能和其肺部損害有所關聯，且會抑制細胞外間質蛋白的表現，而延滯表皮細胞的分化，這些結果和 TGFβ-1 活化功能的失控有相當大的關係 [4]；而這樣的整合醣類結構、醣蛋白質體、酵素的資訊，及相關細胞及分子層次分析方式提供了一個功能性醣質體學重要的研究方向。目前較有規模的醣質體整合型研究，以美國爲主導的有 consortium for functional glycomics (CFG)（http://www.functionalglycomics.org/fg/），具有豐富的研究成果，完整的蒐集了目前有的相關實驗資料，並可提供下載，包括人類與老鼠各不同組織的 N- 和 O-glycans 結構表現圖譜，配合微陣列基因以及突變老鼠表型鑑定數據。另在醣類微陣列的部分，也已建立起大部分內在凝集素以及醣酵素的受質配體資料。

利用此整合性平台的資源，可加速解決醣生物學一些基本的問題，包含醣基因和其結構功能之間的關係。要能預測醣類結構，除了要有生合成的概念，知道哪些酵素有表現之外，還要能考慮到醣酵素彼此之間的相互關係。近期有研究團隊集合了 CFG 可運用的資源，利用 glycogene-chip 探討人類與老鼠的醣相關基因，將醣酵素、核苷醣的運送蛋白、 凝集素等等的基因做成晶片，篩出不同細胞株內的與醣相關的基因表現 [5]。在細胞的蛋白質體中，醣酵素大約只佔了 0.1%~0.00001%，但是超過 90% 的醣基因都可以在細胞或組織裡偵測到存在。醣酵素的表現會因不同細胞組織與其特定病理或生理狀態而異，低表現量加上同一種結構可由不同酵素負責生成，增加了系統性研究醣質體的困難度。配合 glycogene array 的研究，實驗結果明白的指出，負責生成主要核心醣鏈結構的酵素在幾乎所有的細胞組織都有表現，但是合成末端醣抗原的酵素則和細胞與組織種類不同有很大的不同。例如，從突變鼠的研究可得知，醣鏈末端 fucose 的加成作用，在腎臟與腦中是由特定的 FucT9 負責的 [5]。

在功能性的分析上，醣類有著本質上的困難點。若從訊息傳導的路徑來看醣類生合成的影響，所需要分析鑑定的環節包含從細胞被刺激反應，啓動訊息傳遞，影響醣酵素的表現，合成出受刺激後的醣類結構，配合蛋白質或脂質的代謝速率，將新合成醣類接到細胞表面受質上，經由所改變的醣質體特性進而影響的辨識作用和與其他細胞的互動功能。這一路下來目前仍有許多技術瓶頸待克服，就結構分析而言，除了搭配高靈敏度的分析儀器之外，陸續發展出能專一標定、純化，或是運用更精良，具高選擇性提高樣品濃度的方式來克服樣品純度與量上的問題，是所有研究蛋白質後修飾需要面對的，可望再搭配基因層次的一些大量表現或是突變，找出不同醣類扮演的不同功能，是爲後基因體時代醣質體與醣生物學的展望。

參考文獻：

1. Yu et al (2006) *Glycoconj J* **23**, 355-36;
2. Blixt et al (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17033-17038;
3. Laughlin et al (2006) *Methods Enzymol* **415**, 230-250;
4. Kondo et al (2006) *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1881-1889;
5. Comelli et al (2006) *Glycobiology* **16**, 117-131