

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05846

研究課題名(和文)多糖系マイクロチューブをもたらす積層造形機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of deposition modeling mechanism responsible for bacterial microtube formation

研究代表者

武田 穰 (Takeda, Minoru)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：40247507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外にマイクロチューブを形成する水生細菌から、多糖系高分子による新たな微細造形技術の発想を得るべく研究を行った。主たる研究対象としたのは末端で伸びる種類の(積層造形型の)マイクロチューブである。従来、この種類のマイクロチューブは糖とアミノ酸からなると考えられていたが、糖質のみでの造形も可能であることを新たに見出した。また、造形には陰性と陽性の電荷の均衡が成り立つ必要のあることが示唆された。また、マイクロチューブ分解酵素の他に類を見ない特異性を示すことを確かめた。さらに、これまで知られていなかった好気性のマイクロチューブ形成細菌を排水処理施設から発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細菌による菌体外でのマイクロチューブを形成に関して研究を行い、下記の学術的成果を得た。すなわち、マイクロチューブ形成には高分子間の静電的相互作用が重要であることを明らかにした。また、マイクロチューブ分解酵素が新しい種類の酵素である可能性を示した。さらに、新規な有鞘細菌を発見した。そして、下記のような波及効果が期待される。マイクロチューブ形成細菌は排水処理の根幹を成す活性汚泥の沈降性悪化との関連が知られており、マイクロチューブ形成機構の理解は対処法を立案にあたって有意義である。ナノテクノロジーの分野では、水中での微細造形手法の開発に展開できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to get an idea of a new microfabrication technique using polysaccharide-based polymers from aquatic bacteria that form microtubes outside the cell. The target for investigation was a type of microtubes that extends at the end. This type of microtube was thought to consist of sugars and amino acids, but a new finding suggests that it is also possible to assemble a microtube with a polymer only composed of sugars. It was also suggested that a balance of negative and positive charges should be established for microtube formation. It was also confirmed that the microtubule-degrading enzyme has a unique specificity. In addition, a microtube-forming bacterium probably represents a novel taxon was found in a wastewater treatment plant.

研究分野：応用微生物学

キーワード：有鞘細菌 構造形成多糖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロチューブ(鞘)形成細菌(有鞘細菌)は水圏に広く分布し、研究開始時には表1に示す多様性が明らかになっていた。

表1. 有鞘細菌と鞘の特徴(研究着手時)

| 分類群                        | 鞘の伸長様式 | 鞘の主成分                | 鞘形成高分子 |
|----------------------------|--------|----------------------|--------|
| プロテオバクテリア門                 |        |                      |        |
| <i>Sphaerotilus</i> 属      | 付加伸長   | GlcA, GalN, Gly, Cys | 複合糖質   |
| <i>Leptothrix</i> 属        | 付加伸長   | GlcA, GalN, Gly, Cys | 複合糖質   |
| <i>Thiothrix</i> 属         | 割込伸長   | Glc, GlcN            | 塩基性多糖  |
| バクテロイデス門                   |        |                      |        |
| <i>Haliscomenobacter</i> 属 | 不明     | 単糖(予想)               | 多糖(予想) |

鞘形成機構を解明すれば水溶性高分子を素材とする水中での微細造形技術の開発に展開できると考えられる。表1の中では、付加伸長(積層造形)型の鞘形成を行う *Sphaerotilus* 属の鞘に関する研究が最も進んでいた。そこで *Sphaerotilus* 属の鞘に焦点を絞り、特にアミノ糖残基の *N*-アセチル化度に着目して積層造形機能の解明を目指すこととした。研究の進んでいる *Sphaerotilus* 属とはいえ、詳細な情報が得られているのは基準種の *S. natans* のみであった。*Sphaerotilus* 属の鞘に関するより広い情報を得ることも考慮し、*S. montanus* の鞘を主たる研究対象とすることとした。

### 2. 研究の目的

前述のように、本研究に着手した当初は *Sphaerotilus* 属(特に *S. montanus*) の鞘の構造決定と鞘形成と *N*-アセチル化度の関連解明を主たる目的としていたが、これらに加えて *Sphaerotilus* 属のゲノム情報の解析、新規鞘形成細菌の単離、および *Haliscomenobacter* 属からの鞘調製の検討も行った。このような経緯により、本研究の目的は下記の5項目となった。

- (1) *S. montanus* の鞘形成高分子の構造決定と鞘形成への静電的相互作用の関与の確認
- (2) チオペプチドグリカンリアーゼの基質特異性
- (3) *Sphaerotilus* 属細菌の鞘形成遺伝子群の予測
- (4) 微好気性鞘形成細菌の単離と分類学的諸性質の検討
- (5) *Haliscomenobacter hydrossis* の培養条件の検討

### 3. 研究の方法

- (1) *S. montanus* の鞘形成高分子の構造決定と鞘形成への静電的相互作用の関与の確認  
*S. montanus* の鞘を調製し、固体 NMR 測定を行った。また、完全加水分解後に糖組成分析およびアミノ酸組成分析を行った。酵素(チオペプチドグリカンリアーゼ)で鞘を分解することによって生じた鞘の断片を誘導体化を経て HPLC で精製し、溶液 NMR 解析で化学構造を決定した。無水酢酸で *N*-アセチル化した鞘に対しては溶液 NMR 測定を行った。
- (2) チオペプチドグリカンリアーゼの基質特異性  
調製した鞘と *N*-アセチル化を施した鞘を基質として 235 nm における吸光度および還元力をモニタリングすることによって反応速度を比較した。
- (3) *Sphaerotilus* 属細菌の鞘形成遺伝子群の予測  
*S. natans*、*S. montanus*、*S. slufidovorans*、*S. hippei* のゲノムデータを鞘形成に必須な糖転移酵素遺伝子(*sthA*)を中心に比較して保存性の高い遺伝子を特定し、多糖分泌に関わる可能性のある遺伝子についてはアミノ酸配列に基づき、立体配座予測ソフトウェアを用いて翻訳産物(タンパク質)の立体配座を計算した。
- (4) 微好気性鞘形成細菌の単離と分類学的諸性質の検討  
活性汚泥を分離源として、貧栄養の平板培地を用いて *Sphaerotilus* 属細菌特有のコロニー形状を示す株を探索した。電子顕微鏡観察、ゲノムシーケンス、脂肪酸組成分析、炭素源利用性試験などを行い、表現型とゲノム(遺伝子)の両面から分類学的特徴づけを行った。
- (5) *Haliscomenobacter hydrossis* の培養条件の検討  
*H. hydrossis* の基準株の炭素源利用性を調べた。多糖のうち比較的良好な増殖がもたらされたヒアルロン酸を炭素源とした培地から培養液を回収し、液体クロマトグラフィーでヒアルロン酸リアーゼを精製した。リアーゼ活性は 235 nm における吸光度の上昇で定量した。部分アミノ酸配列を解読し、ゲノムデータとの照合により遺伝子を特定した。酵素の立体配座を計算化学手法で予測した。分解産物の化学構造を誘導体化を経て NMR 測定で決定した。

### 4. 研究成果

- (1) *S. montanus* の鞘形成高分子の構造決定と鞘形成への静電的相互作用の関与の確認

*S. montanus* の鞘の完全加水分解からは有意な濃度のアミノ酸は検出されず、*S. natans* の鞘とは異なり Gly と Cys を含まないことが明らかになった。一方、糖組成分析では *S. natans* の鞘と同じく GlcA, Glc, GalN が検出された。凍結乾燥した鞘の固体 NMR 測定ではアセチル基に起因すると思しきシグナルが比較的強く検出されたことから、*S. natans* の鞘よりもアセチル度が高いと予想された。*S. natans* の鞘とは異なり、*S. montanus* の鞘に *N*-アセチル化を施すと可溶化した。可溶化した鞘の溶液 NMR 測定によって 5 糖の反復構造が示された。さらに、*S. natans* の鞘に対する分解酵素（チオペプチドグリカンリアーゼ）で *S. montanus* の鞘を分解することができた。HPLC で 2 種類の分解産物を鞘を誘導体（ABEE 化物）として精製し、溶液 NMR 解析で化学構造を決定した。得られた情報を総合して *S. montanus* の鞘形成高分子の化学構造を決定した（図 1）

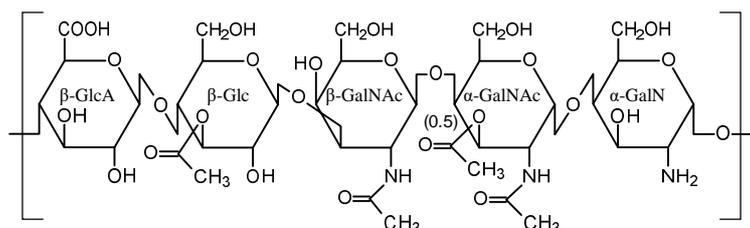


図 1 *S. montanus* の鞘形成高分子の化学構造

基本骨格は *S. natans* の鞘形成高分子と同じながら、アセチル化度が高くアミノ酸（特にシステイン）を含まない点において異なっている。加熱による鞘の変形は *S. montanus* の鞘で顕著であり、S-S 結合がないためと考えられる。完全 *N*-アセチル化（電荷中和の破綻）による溶解も *S. montanus* の鞘に特有の溶解も S-S 結合の欠如によると察せられる。

(2) チオペプチドグリカンリアーゼの基質特異性

*S. natans* の鞘と *S. montanus* の鞘に対するチオペプチドグリカンリアーゼの作用点は GalN から GlcA へのグリコシド結合であり、*N*-アセチル化すると作用しなくなった。すなわち、GalNAc の結合は認識しないことが判明した。既知の多糖リアーゼは逆に GalN を認識しないため、チオペプチドグリカンリアーゼの新規性が明らかとなった。

(3) *Sphaerotilus* 属細菌の鞘形成遺伝子群の予測

*S. natans* の鞘形成に関与する糖転移酵素遺伝子 (*sthA*) に類似した遺伝子は *S. montanus*、*S. slufidovorans*、*S. hippei* のゲノム中にも見出された。さらに、その下流には多糖分泌に関わる輸送タンパク質と思しき遺伝子が存在する点においても共通していた。立体配座予測ソフトウェアで示された翻訳産物の立体配座は輸送タンパク質として妥当であり、共通の輸送系による分泌が予想された。

(4) 好気性鞘形成細菌の単離と分類学的諸性質の検討

単離株は *Sphaerotilus* 属の化学分類学的特徴および形態学的特徴を示したものの、酸素に対して若干の感受性がある（好気性である）点において明確に区別できた。全ゲノムの塩基配列に基づく系統解析からも、近縁ながら同属とはみなせないほどの隔たりが示された。したがって、有鞘細菌の新属と思われる。新属提案のための基準株海外寄託を韓国の研究者の協力を得て進めている。

(5) *Haliscomenobacter hydrossis* の培養条件の検討

*H. hydrossis* は種々の単糖と多糖を利用できることが判明した。ヒアルロン酸も適した基質ながら、ゲノムには分解酵素遺伝子が存在しなかった。酵素を精製して調べたところ、作用としてはヒアルロン酸リアーゼだった。遺伝子を特定したところキサンチンオキシダーゼとして登録されており、全く新しい系統の多糖リアーゼであることが示唆された。一方、鞘形成にはグルコースが最適基質で、鞘はプロテアーゼで分解されたことから初のポリペプチド系と考えられた。一連の研究により、鞘の多様性に関する表 1 を表 2 のように更新（赤字部）することができた。

表2. 有鞘細菌と鞘の特徴（研究実施後）

| 分類群                        | 鞘の伸長様式 | 鞘の主成分（株による）            | 鞘形成高分子    |
|----------------------------|--------|------------------------|-----------|
| プロテオバクテリア門                 |        |                        |           |
| <i>Sphaerotilus</i> 属      | 付加伸長   | GlcA, GalN, (Gly, Cys) | 複合糖質ないし多糖 |
| <i>Leptothrix</i> 属        | 付加伸長   | GlcA, GalN, Gly, Cys   | 複合糖質      |
| <i>Thiothrix</i> 属         | 割込伸長   | Glc, GlcN              | 塩基性多糖     |
| 新属                         | 不明     | 不明                     | 不明        |
| バクテロイデス門                   |        |                        |           |
| <i>Haliscomenobacter</i> 属 | 不明     | アミノ酸                   | ポリペプチド    |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名<br>Kashiwabara Daisuke, Kondo Keiko, Usami Ryoji, Kan Daisuke, Kawamura Izuru, Kawasaki Yuta, Sato Michio, Nittami Tadashi, Suzuki Ichiro, Katahira Masato, Takeda Minoru                    | 4. 巻<br>183              |
| 2. 論文標題<br>Structural determination of the sheath-forming polysaccharide of <i>Sphaerotilus montanus</i> using thiopeptidoglycan lyase which recognizes the 1,4 linkage between -d-GalN and -d-GlcA | 5. 発行年<br>2021年          |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Biological Macromolecules  | 6. 最初と最後の頁<br>992 ~ 1001 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ijbiomac.2021.05.001  | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Mori Tomomi, Masuzawa Nozomi, Kondo Keiko, Nakanishi Yuta, Chida Shun, Uehara Daiki, Katahira Masato, Takeda Minoru | 4. 巻<br>87              |
| 2. 論文標題<br>A heterodimeric hyaluronate lyase secreted by the activated sludge bacterium <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>    | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>256 ~ 266 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/bbb/zbac207   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroki Morita, Keiko Kondo, Shun Chida, Masato Katahira, Minoru Takeda                   |
| 2. 発表標題<br>Functionalization of amino sugar-containing polysaccharides using environmental microbes |
| 3. 学会等名<br>The 12th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)                       |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>武田 穰、宇佐美 亮児、柏原 大輔、近藤 敬子、片平 正人 |
| 2. 発表標題<br>脱N-アセチル化された両性多糖に特異的な新規多糖リアーゼ  |
| 3. 学会等名<br>日本農芸化学会2021年度大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>成原菜、萩尾葵、秋本凌輔、武田穰            |
| 2. 発表標題<br>微好気環境を好む新規な有鞘細菌の単離と分類学的特徴付け |
| 3. 学会等名<br>第74回日本生物工学会大会               |
| 4. 発表年<br>2022年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関            |  |  |
|---------|--------------------|--|--|
| 韓国      | Gwangju University |  |  |