

## 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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580117

研究課題名（和文） マイクロチューブを形成する新規な含硫複合糖質の構造決定と超分子化機作の解明

研究課題名（英文） Structural determination and functional elucidation of novel thiolic glycoconjugates which can form microtube structures

研究代表者

武田 穰 (Takeda Minoru)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：40247507

研究成果の概要（和文）：糸状性鉄酸化細菌 (*Sphaerotilus natans* および *Leptothrix cholodnii*) が菌体外に形成するマイクロチューブ（鞘）を蛍光標識化する技術確立し、鞘が両末端で伸長することを確認した。さらに、鞘が両性多糖を主鎖とし、グリシンとシステインから成るジペプチドを側鎖とする含硫複合糖質であることを確かめた。その化学構造に基づいて、鞘形成含硫複合糖質をチオペプチドグリカンという新たな複合糖質カテゴリーに分類することを提案した。

研究成果の概要（英文）：Terminal elongation of microtubes (sheaths) which are extracellularly produced by filamentous iron-oxidizing bacteria, *Sphaerotilus natans* and *Leptothrix cholodnii*, was confirmed by fluorescent microscopy. The sheaths were revealed to be commonly assembled from thiolic glycoconjugates composed of amphoteric glycan core and dipeptide side chain containing glycine and cysteine. Considering their unique chemical structures, the sheath-forming thiolic glycoconjugates were proposed to be collectively termed thiopeptidoglucan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：天然物質化学

## 1. 研究開始当初の背景

糸状性鉄酸化細菌である *Leptothrix cholodnii* と *Sphaerotilus natans* は分類学的類縁性が高く、ともに鞘と呼ばれるマイクロチューブ状の菌体外構造体を構築するのが特徴である（図1）。鞘は細胞列を内包している。細胞列と鞘の長さは同じであることから、細胞分裂に連動して鞘伸長がもたらさ

れるのは当然である。鞘と細胞の間には隙間があり、鞘の伸長を細胞が直接的にもたらしことはできないと予想される。そこで、自己組織化能を持った高分子物質が細胞から分泌され、これが秩序だて凝集することによって鞘がもたらされると予想した。すなわち、鞘形成高分子の化学構造と凝集の機構を明らかにすることは、新たな微細構造形成手法

への展開の糸口となると考えた。

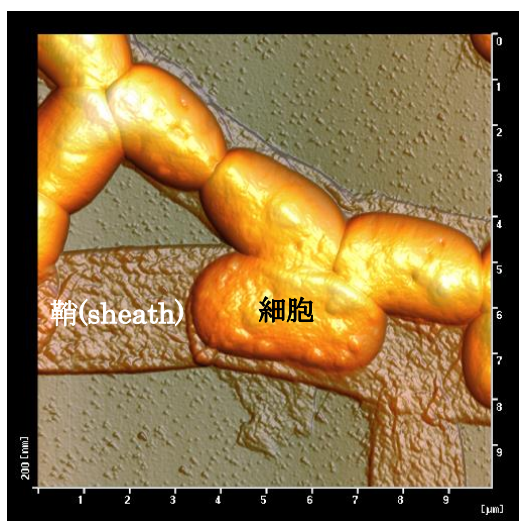


図1 *S. natans* の走査プローブ顕微鏡像

## 2. 研究の目的

(1) *Sphaerotilus natans* の鞘形成高分子の化学構造の決定 (*Leptothrix cholodnii* の鞘形成高分子の化学構造は当研究室にて決定済み)

(2) 鞘関連高分子の立体構造予測

(3) 鞘の伸長部位の特定

## 3. 研究の方法

(1) *Sphaerotilus natans* の鞘形成高分子の化学構造の決定にあたっては、鞘分解菌 (*Paenibacillus koleovorans*)由来の鞘分解酵素(多糖リアーゼの一種)を活用し、鞘を部分分解した。*Paenibacillus koleovorans* を鞘を炭素源として増殖させ、回収した培養液からイオン交換クロマトグラフィーで鞘分解酵素を部分精製した。部分精製酵素を鞘の断片化に用いた。分解に先立って鞘のチオール基を蛍光標識化し、この蛍光を追跡することによって液体クロマトグラフィーでの酵素分解物の精製を行った。得られた2種類の分解物をNMR分析することによってそれぞれの分解物(鞘の構造単位)の化学構造を決定した。さらに、鞘を分解(低分子化)することなく、そのチオール基をスルホ基に酸化して可溶化した。その溶液をNMR分析することで分子全体の化学構造を確認した。

(2) *Sphaerotilus natans* の鞘は含硫複合糖質を基本とするが、過剰な炭素源が培地中に存在すると、鞘の外側に酸性多糖(当研究室で構造決定済み)の粘質層が形成されること

が判明している。この酸性多糖を過剰分泌させることで一部を培養液中に拡散させ、これを回収・精製して詳細なNMR分析に供した。スペクトルを詳細に解析(NOEシグナル)することによって、分子を構成する水素原子間距離を算出した。これと並行して、化学構造に基づく立体構造予測を分子力学計算によって行った。算出された安定構造(ポテンシャルエネルギーが極小となる構造)における水素原子間距離とその実験値とを比較し、予測の確からしさを検証した。

(3) 鞘がチオール基に富むことに着目し、蛍光標識化試薬を用いて *Leptothrix cholodnii* および *Sphaerotilus natans* の鞘を選択的に蛍光標識化した。蛍光標識の後に培養し、蛍光顕微鏡観察を行うことによって鞘の伸長部位(非蛍光部位)と既存部位(蛍光部位)を識別した。さらに、非蛍光標識化剤との組み合わせ(*Leptothrix cholodnii*) ないし色調の異なる蛍光化試薬を用いた2重蛍光標識化(*Sphaerotilus natans*)によって伸長パターンをより明確に示した。また、顕微鏡下での培養(マイクロカルチャー)での経時的観察により、鞘に内包された細胞の伸長・分裂箇所およびその速度を特定および算出した。

## 4. 研究成果

(1) 酵素による部分分解物とスルホン化による可溶化物の分析によって、*Sphaerotilus natans* の鞘形成高分子の化学構造の決定に成功した。鞘はグルコース(1残基)・グルクロン酸(1残基)・グルコサミン(3残基)から成る5糖を繰り返し単位とする多糖主鎖を持つことを明らかにした。繰り返し単位中の一つのグルコサミン残基のアミノ基はN-アセチルシステイニルグリシンのカルボキシル基と結合しており、このジペプチドが側鎖を成していた。さらに、グルコース残基の3位のヒドロキシル基はその約50%がO-アセチル(Ac)化されて入ることが判明した(図2)。

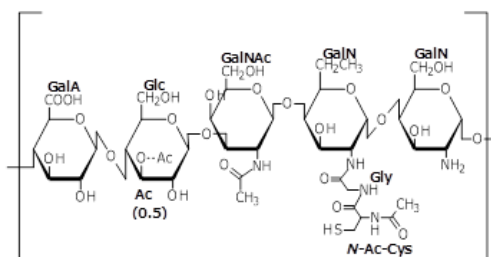


図2 *S. natans* 型チオペプチドグリカン

5糖の繰り返し単位から成る両性多糖を主鎖とし、グリシンとシステインから成るジペプチドを側鎖とするという特徴は、*Leptothrix cholodnii* の鞘形成高分子にも認められることから、両者は類似の含硫複合糖質であることが明らかとなった。豊富に含まれるチオール基によるジスルフィド結合が鞘形成を可能にするために重要と考えられる。類似の構造を持つ物質は発見されておらず新規性が高いことから、これらの鞘形成高分子に対してチオペプチドグリカンとの総称を与えることを提案した。さらに、*Sphaerotilus natans* の鞘形成高分子に作用する多糖リアーゼについては、切断する部位と分解産物の化学構造が明らかになったことより、チオペプチドグリカンリアーゼとの名称を与え、新規な多糖リアーゼとして発表した。

(2) *Sphaerotilus natans* の鞘を覆う粘質性多糖のNMR測定によって得た立体構造情報は、同多糖の分子力学計算によって求めた安定構造と合致した。これによって、酸性多糖が水中で多重鎖を形成せず、構造的自由度の高い一本鎖として存在することが判明した(図3)。すなわち、本多糖は高い分散能を発揮すると予想された。

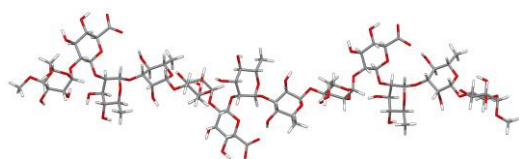


図3 粘質性多糖の安定構造

粘質多糖はグルコースなど資化の容易な炭素源が豊富に存在するなど、富栄養条件下で分泌され易く、逆に栄養状態が悪い条件下ではほとんど分泌されない。すなわち、旺盛な増殖が可能などときには菌体の表層は粘質性多糖であり、増殖が思わしくないときには含硫複合糖質が最表層に存在すると考えられる。粘質性多糖は分散、含硫複合糖質は付着・定着を促すことから、これらの高分子物質が*Sphaerotilus natans* の栄養状態に即した多様な増殖形態をもたらしていると予想される。

(3) *Leptothrix cholodnii* およびその近縁種である *Sphaerotilus natans* の鞘はどちらも両末端で伸長し、内包される細胞は鞘内の各所で伸長・分裂することが判明した。鞘は幅約6nmの微細繊維が不織布状にランダムに合していると考えられている。したがって、各細胞から分泌されたチオペプチドグリカ

ン分子は鞘内を徐々に拡散し、末端部において局所的に凝集することによって鞘を形成すると予想するに至った(図4)。

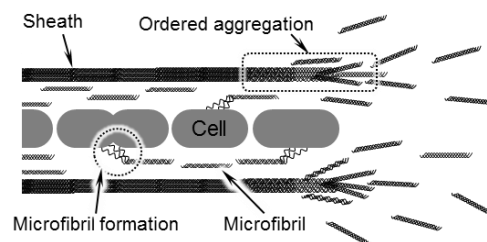


図4 鞘形成機構のモデル

これらの結論を得る過程で確立した蛍光標識化法は容易に入手できる試薬を組み合わせることによってこれを行うことができる。したがって、環境試料における *Leptothrix cholodnii* および *Sphaerotilus natans* の選択的検出に幅広く応用可能と考えられ、これらの細菌の水環境中での役割を探る手段となる。

#### 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4件)

- ① Minoru Takeda, Takuto Umezu, Yuta Kawasaki, Shoichi Shimura, Keiko Kondo, Koizumi Jun-ichi: A spatial relationship between sheath elongation and cell proliferation in *Sphaerotilus natans*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 2357-2359 (2012). 査読有  
DOI: 0.1271/bbb.120616
- ② Keiko Kondo, Minoru Takeda, Tsukasa Mashima, Masato Katahira, Jun-ichi Koizumi, Kazuyoshi Ueda: Conformational analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*, *Carbohydrate Research*, 360, 102-108 (2012). 査読有  
DOI: 10.1016/j.carres.2012.07.023.
- ③ Minoru Takeda, Yuta Kawasaki, Takuto Umezu, Shoichi Shimura, Makoto Hasegawa and Jun-ichi Koizumi: Patterns of sheath elongation, cell proliferation, and manganese(II) oxidation in *Leptothrix cholodnii*, *Archives of Microbiology*, 194, 667-673 (2012). 査読有  
DOI: 10.1007/s00203-012-0801-6
- ④ Kondo Kondo, Minoru Takeda, Wataru Ejima, Yuta Kawasaki, Takuto Umezu, Mina Yamada, Jun-ichi Koizumi, Tsukasa Mashima, Masato Katahira: Study of a novel glycoconjugate,

thiopeptidoglycan, and a novel polysaccharide lyase, thiopeptidoglycan lyase, International Journal of Biological Macromolecules, 48, 256-262 (2011). 査読有  
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.11.009

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yuta Kawasaki, Takuto Umezu, Makoto Hasegawa, Keiko Kondo, Manami Sumikawa, Minoru Takeda: Fluorescent labeling of the sheaths formed by the *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria, International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011 年 9 月, 札幌
- ② 河崎雄太、梅津卓人、武田 穰、小泉淳一、*Leptothrix cholodnii* の鞘の蛍光標識化による伸長部位の特定、日本農芸化学会、2011 年 3 月、京都
- ③ Mina Yamada, Keiko Kondo, Yuta Kawasaki, Takuto Umezu, Minoru Takeda, Jun-ichi Koizumi: Microtube-forming glycoconjugate of bacterial origin, 2010 International Symposium on Advanced Biological Engineering, 2010 年 7 月, 北京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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

武田 穰 (TAKEDA MINORU)  
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：40247507

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

上田 一義 (UEDA KAZUYOSHI)  
横浜国立大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：40223458