

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550019

研究課題名(和文) 海洋有機物における糖ペプチドの構造解明および炭素循環に果たす役割の評価

研究課題名(英文) Contribution of chemical characteristics of glycopeptide to dynamics of organic matter in the sea

研究代表者

塚崎 あゆみ (Tsukasaki, Ayumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員

研究者番号：40585402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は海洋有機物が糖ペプチドの働きによって分解から免れ海水中に蓄積しているとする仮説を立て、糖ペプチドの化学的性質の解明から本仮説の検証を目指すものである。海洋懸濁態有機物中の糖鎖について様々な抽出液や分解法を用いて試料から糖鎖を抽出・精製後、糖鎖を蛍光標識して電気泳動することで、糖鎖の分子量による分離に成功し、還元末端が未修飾のグルコースが3から13繋がった糖鎖と、連続的な幅広い移動度をもつ糖ペプチド鎖が検出された。しかしこれらの糖鎖は、同試料に含まれる全糖の1.6%にすぎず、多くの糖は本法では検出されない巨大な分子量をもつ糖鎖として存在し、有機物の蓄積に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For better understanding of the dynamics of organic matter in the ocean interior, particulate organic matter (POM) in oceanic surface water is a key material as a starting material in food chain and biological carbon pump. In our previous studies we reported that most of POM existed as glycopeptide. The details of molecular-level structures including sugar chains are unknown. In this study, we applied various chemical fractionation and the electrophoretic separation for sugar chains to the POM samples and tried to clarify chemical characteristics of the glycopeptides. Some band and background were detected on electrophoretogram. The bands were sugar chains with unmodified reduced terminus and consistent with 3-13 glucose polymer. The background sugar chains had broad degree of polymerization. These visible sugar chains accounted for only 1.6% of sugar of POM. It was suggested that most of sugars in POM were large polymers which could not migrate in the gel for the electrophoresis.

研究分野：生物地球化学

キーワード：海洋有機物 糖鎖 ペプチド鎖 物質循環

### 1. 研究開始当初の背景

海水中には大気中に存在する CO<sub>2</sub> の全量に匹敵する量の炭素が有機物として固定されており、海洋有機物の動態は地球表層の炭素循環に大きく影響を与えている。海洋有機物を構成する炭素や窒素の存在量や同位体組成に関する研究は進んでおり、それを使った炭素循環のモデリングがおこなわれているが、有機物の構成分子に関する知見はまだ少ない。そのため、どのようにして有機物が分解・無機化せずに海水中に蓄積しているのかはほとんど分かっておらず、巨大な海洋有機物プールの維持メカニズムは分かっていない。本研究では海洋表層に存在する粒子状の有機物 (POM; Particulate Organic Matter) の構成分子に着目し、その化学的特性を明らかにすることで海洋有機物の残存・蓄積メカニズムの解明を目指す。

海洋表層 POM は、植物プランクトン (1次生産者) 等の生物体有機物と、デトリタスと呼ばれる生物の死骸や排出物等の混合物である。海洋炭素循環過程のなかで、POM は海洋有機物の生成と初期分解の場にある物質群といえる。研究代表者はこれまでに太平洋の広範な海域 (太平洋～南極海) において、POM の中に糖鎖が結合した短いペプチド鎖 (糖ペプチド) が存在することを発見し、それが POM の主要構成成分であることを示した (Tsukasaki and Tanoue, 2010)。しかしながら分析手法の問題からいまだ有機物の詳細な化学特性は明らかとなっておらず、海洋有機物の残存・蓄積メカニズムは分かっていない。

### 2. 研究の目的

海洋有機物プール全体に占める“生きている”生物の有機物の割合は 1% にも満たない。デトリタスや生物からの溶出物など“死んだ”有機物が海水中に残存・蓄積するためには、分解酵素からの攻撃を免れる何らかのメカニズムが必要である。研究代表者が POM 中に検出した糖ペプチドは糖タンパク質やプロテオグリカンなどの複合糖質の分解産物と考えられる。複合糖質はあらゆる生物が分泌し、その糖鎖は粘着性をもつこと、荷電していること等が知られている。研究代表者はこのような糖鎖の性質から、糖ペプチドの糖鎖が海洋有機物の凝集体の形成に寄与し、海洋有機物を分解酵素がアクセスし辛い形へと変え、海洋に蓄積しているとする仮説をたてた。本研究では糖ペプチドの化学的性質を明らかにすることで海洋有機物の残存・蓄積メカニズムと糖ペプチドの関わりを解明し、糖ペプチドを定量することでそのメカニズムが海洋有機物の動態に中心的役割を担うものか否かが明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) POM 試料の調整

分析に必要な海洋表層 POM を大量の

海水から集めるため、まず海洋有機物濃度が高く海洋表層 POM サンプルングが容易であると予想された沿岸海水からの POM 採取を産総研阿賀臨海実験場 (広島県呉市) の海水くみ上げ施設を利用して試みた。採取した海水には粗い粒子が非常に多く含まれ濁りがみられたが、採水後数分で海水中の粒子は沈殿したことや色から、粒子は懸濁態の有機物ではなく、潮汐や風による攪乱およびくみあげポンプからの吸引によって巻き上げられた海底の砂粒と考えられた。また、海水の栄養塩濃度を測定したところ、無機窒素・リンともに沿岸域にしては低濃度であった (2 μM N, 0.2 μM P) ことから、それを利用するプランクトンを含む懸濁態有機物量はさほど多くないことが予想された。そのため阿賀臨海実験場で採取可能な海水からの糖ペプチド画分の濃縮は困難と判断し、計画を変更して伊勢湾および赤道域航海でフィルター上に採取した表層 POM 試料を名古屋大学より提供いただくこととした。試料はフィルターごと凍結乾燥し、フィルター表面の表層 POM をピンセットで剥離した。剥離した有機物はまとめてめのう乳鉢で粉碎・均質化し、糖ペプチドの精製、ペプチド鎖の定量等全実験に使用する POM 試料を調製した。

#### (2) POM の有機物含有量分析

POM が含有する有機炭素および窒素量は銀製コンテナに POM をはかりとり、6 mol/L 塩酸を加えて POM から無機炭素を除去し、ホットプレート上で乾燥させた後、元素分析計 (Thermo Scientific FLASH2000) で分析した。POM の単糖組成は、中性糖は 2 mol/L トリフルオロ酢酸 (TCA)、アミノ糖は 4 mol/L 塩酸を使用し、それぞれ POM に添加後 100 °C で 6 時間加水分解し、高速液体クロマトグラフィー (Shimadzu LC-20A) で分離・定量した。

#### (3) 糖鎖の標識および電気泳動による検出

POM に含まれる糖ペプチド鎖の化学的特性を明らかにするため、糖ペプチド鎖の抽出・濃縮方法の検討をおこなった (図 1)。尿素を含む緩衝液をもちいて POM からタンパク質や糖などの有機物を抽出し、氷冷した 10% TCA 溶液を添加することでタンパク質を沈殿させた (図 1(I))。沈殿しない画分は透析して TCA を除去後乾固することで濃縮した (図 1(II))。尿素で可溶化できなかった画分については界面活性剤 (SDS) を加えてさらに抽出し尿素可溶画分と同様に TCA 溶液を用いて分離した (図 1(III)(IV))。各画分について含まれる糖鎖の性質を調べるため、fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) 法による糖鎖の分離・検出を試みた。本法は糖鎖の還元末端を 8-Aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS 図 2) を用いて蛍光標識すると同時に 3 つの荷電硫酸基により糖鎖に負の電荷が与え、糖鎖を電気泳動により分離・検出する方法である。また糖タンパク質 (ペプチド)

のように還元末端がペプチド鎖で修飾されている糖鎖を検出するために、ヒドラジン分解により、ペプチド鎖を分解し糖鎖を遊離後、Nアセチル化した試料についてFACEに供した(図1 (I\*) (II\*))。

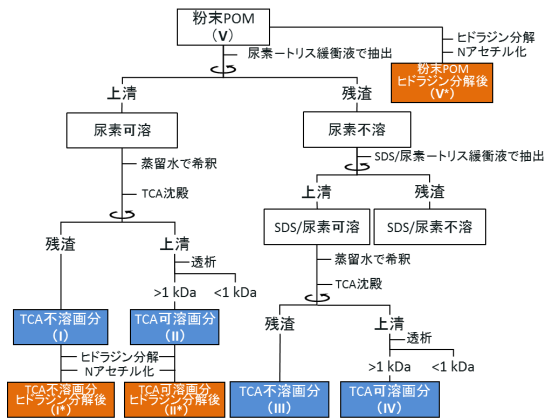


図1 POMの抽出および分画

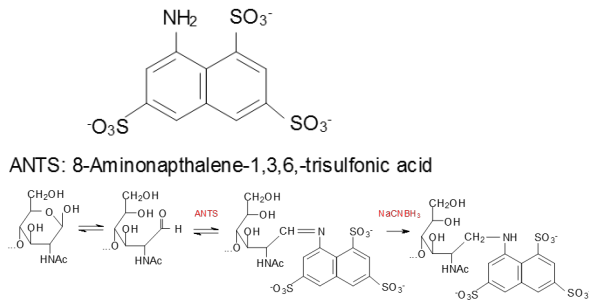


図2 FACE (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) 法における還元糖の標識

#### 4. 研究成果

POMにFACE法を適用した結果を図3に示す。尿素に可溶性なTCA可溶画分(図1(II))からのみ、11本のはっきりとした糖鎖のバンドが検出された。これらのバンドはグルコースが3から13繋がった分子の電気泳動での移動度と一致しており、還元末端が何の修飾も受けていない糖鎖がPOMには存在しているものと考えられる。

続いてペプチド鎖と結合した糖鎖を検出するため、各画分をヒドラジン分解に供してペプチド鎖を破壊後FACE法を適用した(図4)。糖タンパク質であるfetuinをPOM試料と同様にヒドラジン分解に供したところ、ヒドラジン分解前は糖鎖が検出されず(図4: Native fetuin) ヒドラジン分解後の試料からは遊離した糖鎖が検出された(図4: Fetuin\*)。このことからPOMのヒドラジン分解処理は適切に行われたものと考えられる。ヒドラジン分解をおこなうことで、分解前は糖鎖が検出されなかった尿素に可溶性な

TCA残渣画分(図3(I))からも1本のバンドとバックグラウンドからなる糖鎖が検出された(図4(I\*))。ここで検出された糖鎖はタンパク質あるいはペプチド鎖が結合した糖鎖であると考えられる。ヒドラジン分解前にも糖鎖のバンドが検出されていた尿素に可溶性なTCA可溶画分(図1(II))については、分解後に幅広い分子量のバックグラウンドが増加し、各バンドの移動度はわずかに小さくなった。バックグラウンドの増加は糖ペプチド鎖から遊離した糖によるもので、移動度の変化は処理の中でNアセチル化をおこなったことで糖の水酸基がすべてアセチル基に置き換わり分子量が増加したことによるものと考えられた。また、POM粉末試料を抽出・分画せずに直接ヒドラジン分解処理をし、FACE法を適用した結果、尿素に可溶性な画分で検出された糖鎖の合計(図4 I\*+II\*)の4倍近くの糖鎖が検出された(図4 V\*)。粉末POMのヒドラジン分解で新たに検出できた糖鎖は、尿素で可溶化できなかった糖鎖もしくは透析中に失われた分子量1000以下の糖鎖であると推察される。

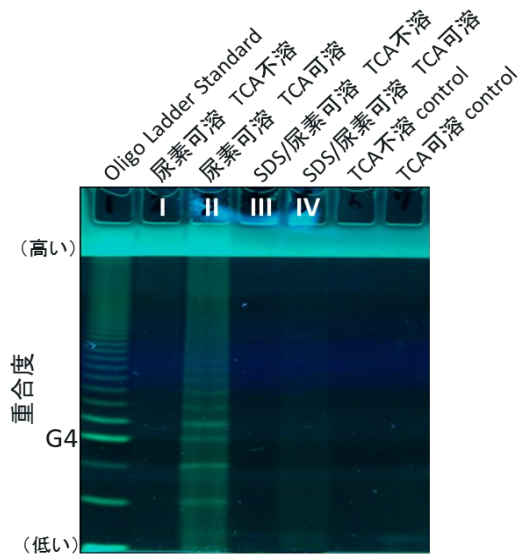


図3 POM各画分のFACE法による電気泳動像(図1(画分I, II, III, IV))  
各試料の泳動量は海水10L POM当量。

各泳動像には標準物質として40 pmolのグルコースのテトラマー(各泳動像のG4のバンド)を試料と同時に泳動した。泳動像のデンストグラムからG4を使って各画分で検出された糖鎖を単糖に換算すると、ヒドラジン分解後の粉末POM(図4(V\*))で検出された糖鎖は471 pmol/L相当の量の単糖であることが明らかとなった。粉末POMについて加水分解し、単糖組成を高速液体クロマトグラフィーで定量した結果、POMには中性糖・アミノ糖合わせて29.4 nmol/Lが含まれていることがわかった(図5)。したがってPOMに

含まれる糖のうち 1.6%が糖鎖として本法で検出でき、糖の多くは本電気泳動法で検出できていないことが明らかとなった。電気泳動では未検出ながら、適用した実験条件からこれらの未検出糖は本電気泳動法で検出されない単糖もしくは電気泳動されない程巨大な分子量をもつ糖鎖として存在しているものと予想される。今回扱っている試料は懸濁粒子の有機物であることから、存在する多くの糖が単糖として粒子の形状をとっていることは考えにくく、本結果は巨大糖鎖が懸濁態有機物の中に多く存在し、それらが有機物の蓄積に寄与している可能性を示唆するものである。

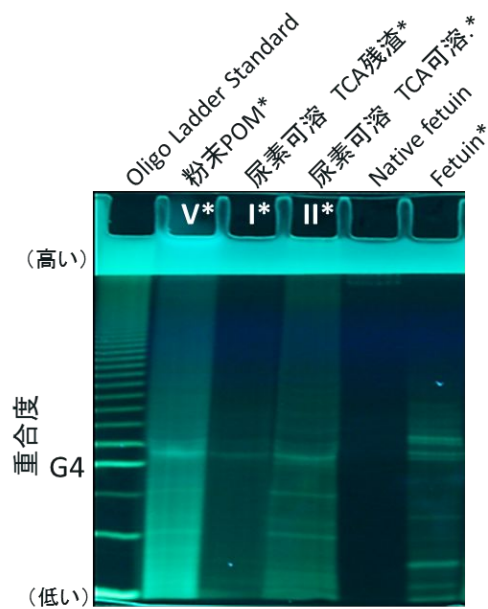


図 4 ヒドラジン分解後 (\*) の POM 各画分および fetuin の FACE 法による電気泳動像  
各試料の泳動量は海水 10 L POM 当量. fetuin は 1 mg.

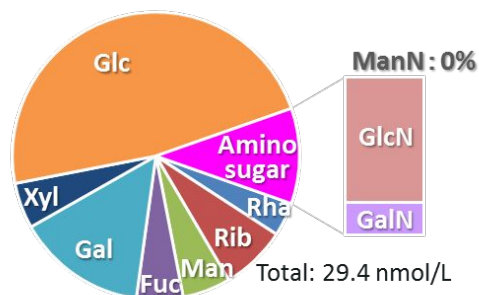


図 5 粉末 POM (V) の単糖含有量および組成

## 参考文献

Tsukasaki, A., Tanoue, E., (2010)  
Chemical qualification of electrophoretically detectable peptides and sugar chains in oceanic surface particulate organic matter. *Marine Chemistry* 119, 33-43.

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Tsukasaki A., Nishida T., Tanoue E.,  
Chemical characterization of detrital sugar chains with peptides in oceanic surface particulate organic matter. *Ocean Sciences Meeting 2016*, New Orleans, LA, USA.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

塚崎 あゆみ (TSUKASAKI, Ayumi)  
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員  
研究者番号: 40585402