

令和元年6月13日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07714

研究課題名(和文) マイクロチューブを形成する塩基性分岐多糖における希少デオキシ糖残基の重要性

研究課題名(英文) Importance of deoxy sugar residues in a microtube-forming basic branched polysaccharide

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物模倣三次元造形技術の確立を目指し、糸状性硫黄酸化細菌(*Thiothrix nivea*)のマイクロチューブの形成機構を、相互作用の要と思しき新規なデオキシ糖に着目して研究した。高純度なデオキシ糖は得られたものの結晶化は困難で立体構造の決定および相互作用の解明には至らなかった。その一方、主成分であるグルコース・グルコサミン共重合体の立体構造予測には至り、セルロース素材との強い相互作用が可能であることを見出した。また、マイクロチューブの表面にタンパク質層(S-レイヤー)を発見し、これがマイクロチューブの補強に寄与していると予想するに至った。さらに、マイクロチューブが全域で伸長することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状性硫黄酸化細菌(*Thiothrix nivea*)のマイクロチューブから相互作用の要となる新規なデオキシ糖を精製し、誘導体化による立体配座決定への展望を開いた。また、マイクロチューブの主成分であるグルコース・グルコサミン共重合体がセルロースのアミノ化剤として有用であることを示した。さらに、マイクロチューブ表面に酸性タンパク質層(S-レイヤー)を発見した。細胞壁を補強するのみと考えられていたS-レイヤーがマイクロチューブの補強にも関わることが判明しS-レイヤーに関する理解が深まった。この他、マイクロチューブの全域での伸長を確認し、他の細菌のマイクロチューブ(末端伸長)とは異なることを示した。

研究成果の概要(英文)：A filamentous sulfur-oxidizing bacterium *Thiothrix nivea* forms a microtube surrounding a line of cells. This microtube is an assemblage of polysaccharides containing a novel deoxy sugar that is essential for microtube formation. In order to develop a biomimetic 3-dimensional printing method, the microtube was studied. Despite its successful purification from the microtube, the deoxy sugar could not be crystallized. Accordingly, its conformation and interaction mechanism remained undetermined. However, conformation of the major component (copolymer of glucose and glucosamine) of the microtube was successfully determined and its strong interaction with the cellulose was also revealed. It was observed that a surface layer of the protein (S-layer) reinforced the microtube. Furthermore, it was revealed that the microtube expanded in the whole region in contrast to the other microtube-forming bacteria (the genera *Sphaerotilus* and *Leptothrix*) that are known to exhibit terminal elongation.

研究分野：応用生物化学

キーワード：マイクロチューブ ルコース・グルコサミン共重合体 デオキシ糖 *Thiothrix nivea*

1. 研究開始当初の背景

糸状性細菌には細胞列の外側にマイクロチューブ（鞘）を形成するものがあり、有鞘細菌と総称される。鞘形成は自発的に凝集する特異な細胞外高分子（鞘形成高分子）によってもたらされ、それらを詳細かつ体系的に分析すれば、バイオミミックな微細構造形成技術の端緒となる知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、 γ -プロテオバクテリア綱(*Thiothrix* 属)に属する硫黄酸化細菌の鞘形成多糖に焦点を当て、鞘形成多糖の構造決定、デオキシ糖残基の同定、デオキシ糖残基の架橋形成への関与の立証、鞘の微細構造および伸長パターンの観察、を目指した。これらの目標を達成し、 β -プロテオバクテリア綱の有鞘細菌に関する検討結果と合わせ、プロテオバクテリア門の鞘形成高分子に共通の特徴と多様性を把握するとともに、凝集というデオキシ糖の新機能を示しつつ、 β と γ -プロテオバクテリアにおける鞘形成機構の違いを明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

T. nivea の鞘形成多糖の構造決定

鞘ないし鞘にアルカリ処理による脱アセチル化を施した後にジメチルスルホキシドで溶解ないし懸濁し、水酸化ナトリウム存在下でヨウ化メチルを作用させて *O*-メチル化した。*O*-メチル化物をクロロホルム抽出で回収し、酸加水分解を経て部分 *O*-メチル化単糖を遊離させた。還元と *O*-アセチル化を施した後に GC/MS 分析に供して得られた部分メチル化アルジトールアセテートを分離および同定することにより鞘形成多糖中に存在する各糖残基の結合位置の特定を目指した。

鞘形成多糖の主鎖をなすグルコサミノグルカンを部分加水分解により遊離させることによって回収し、NMR (NOESY) 測定に供した。検出されたシグナルの強度からプロトン間距離を算出した。一方、分子動力学シミュレーションによりグルコサミノグルカンの安定構造を予測した。シミュレーション中の平均プロトン間距離を算出し、得られた理論値と NMR 測定による実験値との比較から水中での分子の挙動を予測した。

鞘に対して重水素化無水酢酸での *N*-アセチル化を施してから濃塩酸による加水分解で *N*-アセチルグルコサミンを遊離させた。遊離した *N*-アセチルグルコサミンを 4-アミノ安息香酸エチルエステルで還元アミノ化し誘導体として HPLC により精製した。誘導体のプロトン NMR スペクトルを測定し、グルコサミン由来のプロトンシグナルに対するアセチルプロトンシグナルの相対強度から *N*-アセチル化度を推算した。

T. nivea の鞘形成多糖に含まれるデオキシ糖残基の同定

鞘に部分加水分解を施して未同定デオキシ糖を遊離させ、4-アミノ安息香酸エチルエステルによって還元アミノ化した後、逆相 HPLC で精製した。さらに純度の確認を NMR 測定によって行った。デオキシ糖の還元アミノ化物の各種有機溶媒に対する溶解性を調べ、良溶媒と貧溶媒の組み合わせた種々の溶媒系での結晶化を試みた。

デオキシ糖残基の架橋形成への関与の立証

未同定デオキシ糖の構造決定に至ったのちに行う予定の鞘形成多糖自体の分子動力学シミュレーション（相互作用の予測）に備え、任意の化学構造を有する高分子のシミュレーションを支援するソフトウェアの開発を行った。

鞘の微細構造および伸長パターンの観察

T. nivea 及び近縁種の *T. fructosivorans* の鞘に豊富に存在するアミノ基をピオチン化した後に培養した。*N*-ピオチン化菌体を培養すると培養開始時に存在していた部分の鞘のみが *N*-ピオチン化された状態となる。したがって、培養後の菌体に蛍光標識化抗ピオチン抗体を作用させれば既存部のみが蛍光を発するはずであり、その部位を蛍光顕微鏡観察によって特定した。鞘に内包された細胞列の伸長パターン（細胞分裂箇所）の観察は生体膜の蛍光染色によって行った。すなわち、染色後に経時的にマイクロカルチャーの蛍光顕微鏡観察を行い、蛍光強度の減衰により示される細胞分裂箇所を特定した。

鞘の微細構造の観察については、*T. nivea* のみならず近縁種の *T. fructosivorans* に対して行った。観察には走査プローブ顕微鏡のほか透過および走査電子顕微鏡観察を用いた。超薄切片の透過電子顕微鏡観察では化学固定と凍結置換固定による試料の両方を観察に用いた。菌体の表面の観察にはネガティブ染色による透過電子顕微鏡観察を行った。その際、鞘の表面に格子構造を発見した。格子構造をもたらす高分子をタンパク質と想定し、精製を経て部分アミノ酸配列を解読した。さらに、アミノ酸配列情報をもとに遺伝子を特定した。

β -プロテオバクテリア (*Sphaerotilus* 属、*Leptothrix* 属) の鞘におけるチオール基の機能解析

Leptothrix cholodnii による金イオンの還元について主として電子顕微鏡観察によって検討した。還元には鞘に豊富に含まれるチオール基が関与すると想定し、チオール基の修飾の還元への影響を調べた。このほか、*Sphaerotilus montanus* の鞘を溶菌処理によって調製し、糖およびアミノ酸組成分析に供した。さらに、部分加水分解で可溶化し NMR 特定を行い、鞘形成高分子中にシステイン残基が存在するか否かを判定した。

グルコサミノグルカンの用途の検討

グルコサミノグルカン溶液を乾固してフィルム化し、これをメタノール存在下での無水酢酸添加で*N*-アセチル化することによって*N*-アセチルグルコサミノグルカンのハイドロゲルを作成した。ハイドロゲルにリゾチームを作用させて崩壊が起こるか否かを調べた。さらに、生じた分解物を還元アミノ化物に誘導体化してHPLCで精製した。その後、質量分析による構造決定を行った。グルコサミノグルカン溶液にろ紙を浸漬したのちに水洗した。ろ紙を乾固後、アミノ基の蛍光標識化を施して紫外線を照射し、グルコサミノグルカンのセルロースへの吸着の有無を観察した。

4. 研究成果

T. nivea の鞘形成多糖の構造決定

鞘のメチル化分析を試みたが、メチル化反応が進行せず部分メチル化アルジトールアセテートの同定による構成糖残基の結合位置決定には至らなかった。その原因としては鞘およびその*N*-アセチル化物のジメチルスルホキシドへの溶解性の低さがあると考えている。溶解性の低さはデオキシ糖に起因する強い相互作用によるものと思われる。結合位置はNMR解析では示されているため、その裏付けを得ることはできなかったものの構造決定の大きな妨げにはならない。

T. nivea の鞘形成多糖に含まれるデオキシ糖残基の同定

逆相HPLCを用いることによって、鞘から高純度のデオキシ糖を得る手順を確立した。これによって高純度な誘導体（還元アミノ化物）を得ることも可能となった。デオキシ糖および誘導体にとってアルコール系の溶媒が良溶媒であり、炭化水素やエーテルが貧溶媒であることが判明した。デオキシ糖はいかなる溶媒系でもシロップ状になるにすぎなかったが、誘導体の良溶媒溶液に徐々に貧溶媒を添加すると不定形の沈殿物となった。しかしながらこの沈殿物には規則性が乏しく結晶構造解析には供することができず、立体配座の決定には至らなかった。デオキシ糖を還元アミノ化物とするのではなく、*O*-アセチル化物として結晶化を目指すべきであると思われる。

デオキシ糖残基の架橋形成への関与の立証

未同定デオキシ糖の構造決定に至ったのちには、それによってもたらされる鞘形成多糖間の相互作用を分子動力学シミュレーションによって予測する予定である。その際に必要となるソフトウェアとして、任意の化学構造を有する高分子のシミュレーションを支援するプログラム（o2p）の開発に至った。本ソフトは多糖に限らず、反復構造を有するあらゆる高分子のシミュレーションに有効である。

鞘の微細構造および伸長パターンの観察

T. nivea の菌体表面、すなわち鞘の表面にはカルシウム結合タンパク質からなる格子構造が存在することが明らかとなった（図1）。この格子構造は、細菌および古細菌の細胞壁の補強に寄与するS-レイヤーの特徴であり、*T. nivea* の鞘の表面の格子構造もS-レイヤーの一種と考えられる。*T. nivea* のS-レイヤーは細胞壁ではなく鞘の表面に存在し、おそらくはその補強に関与すると思われる。*Thiothrix* 属で初のS-レイヤーである点と細胞壁ではなく鞘表面に存在する点において新規のS-レイヤーといえる。なお、*T. fructosivorans* の鞘の表面にはS-レイヤーは存在しなかった。*T. nivea* のS-レイヤーをもたらすカルシウム結合タンパク質には酸性下で凝集するという特徴があった。そのため、*T. nivea* の懸濁液も酸性化で凝集することがわかった。S-レイヤーを形成しない*T. fructosivorans* では酸依存的な凝集は起こらなかった。

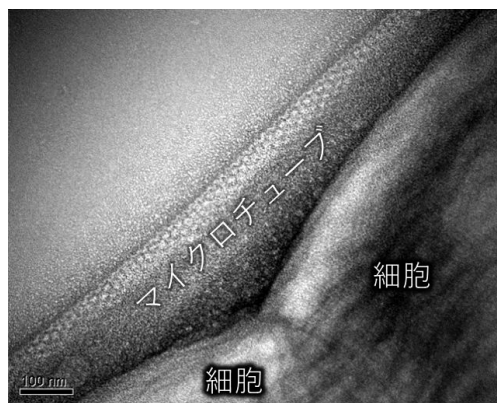


図1 マイクロチューブ表面の格子構造

T. nivea 及び *T. fructosivorans* の鞘および細胞に対する生体蛍光標識法を開発し、それぞれの伸長パターンの解明に成功した。どちらの種においても鞘は全域で一様に伸長することが判明した。細胞も同じく全域で一様に伸長・分裂することがわかった。すなわち、これらの特徴はγ-プロテオバクテリアに属する有鞘細菌に共通の特徴といえる。細胞分裂が随所で起こることはβ-プロテオバクテリア（*Sphaerotilus* 属、*Leptothrix* 属）の有鞘細菌と同じであるものの、β-プロテオバクテリアの鞘の伸長様式は末端伸長であり、γ-プロテオバクテリアとβ-プロテオバクテリアの鞘は化学構造のみならず形成機作の面でも異なることが明らかとなった。これは、マイクロチューブ形成機構の多様性を示すとともに、マイクロチューブ形成という形質が分類群ごとにそれぞれ独自に獲得されたものであることを示すものである。

β-プロテオバクテリア（*Sphaerotilus* 属、*Leptothrix* 属）の鞘におけるチオール基の機能解析

γ-プロテオバクテリアとβ-プロテオバクテリアの鞘の化学構造における最大の違いは、チオール基の有無である。β-プロテオバクテリアにはシステインが含まれており豊富にチオール基が存在するが、γ-プロテオバクテリアの鞘は純然たる多糖でシステインを含めアミノ酸は存在しない。チオール基はジスルフィド結合を形成するため、この結合が鞘形成の要と考え

られてきた。すなわち、システイン残基は γ -プロテオバクテリアの鞘におけるデオキシ糖の役割を担うと考えられてきた。 γ -プロテオバクテリアと β -プロテオバクテリアの鞘の違いをより詳細に理解すべく、 β -プロテオバクテリアの鞘におけるチオール基の機能を調べることとした。*Leptothrix* 属は金イオンの還元による金ナノ粒子の形成が可能で、これに鞘中のチオール基が関与することが示唆された。さらに *Sphaerotilus* 属については、これまで分析されていなかった *S. montanus* の鞘の予備的な分析を行い、システインをはじめとするアミノ酸が含まれない可能性が高いことを見出した。このことは、チオール基（システイン残基）が鞘形成に少なくとも必須の要素ではないことを示している。 β -プロテオバクテリアの鞘の形成に重要な役割を担うのは多糖部分の相互作用であるとの可能性は本研究で初めて示された。

グルコサミノグルカンの用途の検討

N-グルコサミノグルカンのハイドロゲルはリゾチームによって崩壊し（図 2）、2 糖と 4 糖を生じることが明らかとなった。すなわち、*N*-グルコサミノグルカンはキチンと同じ機構（6 糖単位で認識される）でリゾチームの作用を受けると考えられた。また、ハイドロゲルは生体内で分解される可能性が高いことから、インプラント素材としての応用が可能と思われる。さらに、グルコサミノグルカンはセルロースに不可逆的に吸着し、結果としてセルロース表面に化学反応なしでアミノ基を導入できることがわかった。アミノ化セルロースは止血ガーゼとしての用途があるとともに種々の機能性の付与が容易なセルロース素材として幅広い用途が期待されている。グルコサミノグルカンは化学反応なしでセルロースをアミノ化セルロースに変換する特異なアミノ化剤であるといえる。

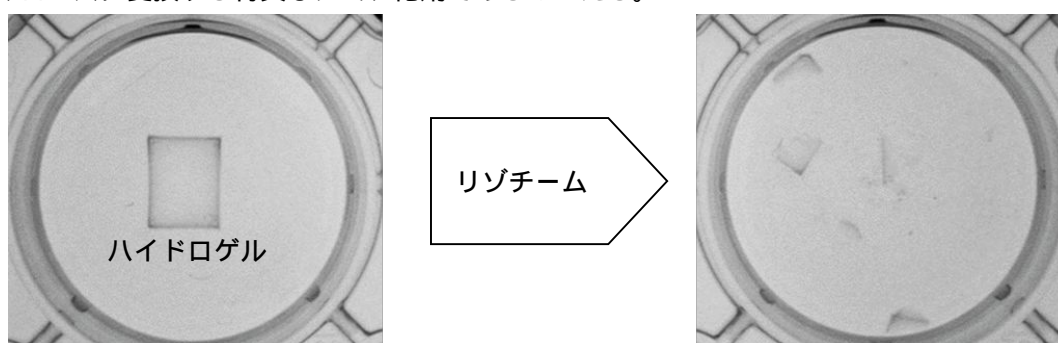


図 2 リゾチームによる *N*-アセチル共重合体ハイドロゲルの分解

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kunoh T, Kusano Y, Takeda M, Nakanishi M, Matsumoto S, Suzuki I, Takano M, Kunoh H, Takada J. Formation of Gold Particles via Thiol Groups on Glycoconjugates Comprising the Sheath Skeleton of *Leptothrix*. *Geomicrobiology Journal*, 36, 251-260 (2019). (査読有)

DOI: 10.1080/01490451.2018.1550127

Kawasaki Y, Kurosaki K, Kan D, Borges IK, Atagui AS, Sato M, Kondo K, Katahira M, Suzuki I, Takeda M. Identification and characterization of the S-layer formed on the sheath of *Thiothrix nivea*. *Archives of Microbiology*, 200, 1257-1265 (2018). (査読有)

DOI: 10.1007/s00203-018-1543-x

Kunoh T, Takeda M, Matsumoto S, Suzuki I, Takano M, Kunoh H, Takada J, Green Synthesis of Gold Nanoparticles Coupled with Nucleic Acid Oxidation. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6, 364-373 (2017). (査読有)

DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b02610

Takeda M, Kondo K, Sanda S, Kan D, Borges IK, Suzuki I, Katahira M. Enzymatic degradation of β -1,4-linked *N*-acetylglucosaminoglycan prepared from *Thiothrix nivea*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 109, 323-328 (2018). (査読有)

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.065

矢部 誠、園部 智彩、上田 一義、武田 穰. 反復構造を持つ高分子に対する分子動力学計算のためのパラメータ設定支援プログラム o2p の開発. *Journal of Computer Chemistry, Japan*. 16, 63-69 (2017). (査読有)

DOI: 10.2477/jccj.2017-0013

Kawasaki Y, Endo T, Fujiwara A, Kondo K, Katahira M, Nittami T, Sato M, Takeda M. Elongation pattern and fine structure of the sheaths formed by *Thiothrix nivea* and *Thiothrix fructosivorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 1280-1288 (2017). (査読有)

DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.025.

〔学会発表〕(計 11 件)

Minoru Takeda, Microtube-forming polymers of bacterial origin. The 7th International Symposium

of Advanced Energy Science (2016).

園部 智彩, 矢部 誠, 上田 一義, 近藤 敬子, 片平 正人, 武田 穰. 糖質系高分子に対する分子動力学計算のためのパラメータ設定支援プログラム. 日本生物工学会 (2016).

黒崎海志, 菅 大介, 佐竹あゆみ, 河崎雄太, 佐藤道夫, 遠藤智友樹, 武田 穰. 糸状性硫黄酸化細菌の表層構造の透過型電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会 関東支部講演会 (2017).

黒崎海志, 菅 大介, 佐竹あゆみ, 河崎雄太, 佐藤道夫, 遠藤智友樹, 武田 穰. 糸状性硫黄酸化細菌の表層構造の透過型電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会 関東支部講演会 (2017).

Kunoh T, Takeda M, Matsumoto S, Suzuki I, Takano M, Kunoh H, Takada J. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Coupled with Nucleic Acid Oxidation. 19th World Congress on Biotechnology (2017).

三田 修平, 浜口 悠貴, 近藤 敬子, 片平 正人, 武田 穰. 硫黄酸化細菌由来の -1,4-N-アセチルグルコサミノグルカンのリゾチーム感受性. 日本生物工学会 (2017).

Kashiwabara D, Kondo K, Sanda S, Kawasaki Y, Fujiwara A, Katahira M, Takeda M. Structural analysis of the microtube formed by *Sphaerotilus montanus*. The 8th International Symposium of Advanced Energy Science (2017).

菅 大介, 黒崎 海志, 河崎 雄太, 佐藤 道夫, 武田 穰. 糸状性細菌由来の自己組織化タンパク質の微細構造. 日本顕微鏡学会第 73 回学術講演会 (2017).

柏原大輔, 河崎雄太, 遠藤友智樹, 三田修平, 浜口悠貴, 武田 穰. 糸状性細菌 *Sphaerotilus montanus* のマイクロチューブ形成機構. 化学工学会 (2017).

宇佐美亮児, 菅 大介, 藤原篤男, 南雲玲香, 上原大輝, 矢部 誠, 武田 穰. 表面アミノ化セルロースの酵素分解性と酵素固定化能. 酵素工学研究会 (2018).

上原大輝, 菅 大介, 藤原篤男, 森帆乃美, 宇佐美亮児, 鈴木市郎, 武田 穰. グルコース・グルコサミン交互共重合体を用いたセルロースのアミノ化. 日本農芸化学会(2019).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：アミノ化セルロース及びアミノ化セルロースの製造方法

発明者：武田 穰

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-121990

出願年：2018

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。