

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25450148

研究課題名(和文) マイクロチューブを成す塩基性分岐多糖の構造決定と形態形成機作の解明

研究課題名(英文) Structural and functional elucidation of basic branched polysaccharides capable of microtube formtion

研究代表者

武田 穰 (Takeda, Minoru)

横浜国立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40247507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糸状性硫黄酸化細菌である *Thiothrix fructosivorans* は、細胞列を内包するマイクロチューブ(鞘)を形成する。鞘の組成分析を行ったところ、グルコース、グルコサミン、フコース、ペロサミン(Rhap4N)が検出された。また、鞘形成におけるアミノ基の置換の重要性が示唆された。NMR解析によって、鞘形成高分子は[4)-D-GlcpN-(14)-D-Glcp-(1)nを主鎖とし、-D-Rhap4N-(13)-L-Fucp-(1)の側鎖を持つと判明した。さらに、GlcNが約50%N-アセチル化されており、Rha4Nの80%がN-L-ラクチル化されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Sulfur-oxidizing bacterium, *Thiothrix fructosivorans*, forms a microtube (sheath) that encloses a line of cells. The sheath was prepared by selectively removing the cells. D-glucose, D-glucosamine, L-fucose, and D-perosamine (D-Rhap4N) were detected from the sheath. When the sheath was strongly treated with sodium hydroxide, the original microtube structure was lost and the sheath became soluble under acidic conditions, suggesting the importance of N-substitution in maintaining the sheath structure. According to ¹H and ¹³C NMR analyses of the deacetylated sheath, the sheath-forming polymer (deacetylated form) of *T. fructosivorans* was found to have a main chain of [4)-D-GlcpN-(14)-D-Glcp-(1)n, to which disaccharide side chains of -D-Rhap4N-(13)-L-Fucp-(1) were attached at position 3 of Glc. Further detailed structural analysis revealed that GlcN is substoichiometrically (about 50%) N-acetylated and more than 80% of Rha4N is N-L-lactylated.

研究分野：天然高分子学

キーワード：マイクロチューブ 鞘 塩基性多糖 *Thiothrix* 希少糖 構造決定

1. 研究開始当初の背景

(1) 鞘とは細菌の細胞列を包み込むマイクロチューブ状構造体を指す。鞘と細胞は接していないにもかかわらず、鞘と細胞列の伸長は同期している。通常の細胞外高分子は不溶性であれば細胞表層に不規則な網目状構造を成し、水溶性であれば粘質層を成すに過ぎない。これに対して鞘形成高分子は自律的な会合でマイクロチューブを成す機能性を備えている。その化学構造と会合機構を明らかにすれば、微細構造を成す機能性高分子創生への展開が期待される。

(2) 従属栄養有鞘細菌はバクテロイデス科、*-*プロテオバクテリア科、*-*プロテオバクテリア科に存在する。このうちバクテロイデス科については、鞘に着目した研究は行われていない。*-*プロテオバクテリア科の鞘については詳細な研究がなされ、その鞘は特異な含硫複合糖質(チオペプチドグリカン)の凝集によって両末端部で伸長することが判明している。*-*プロテオバクテリア科については、*Thiothrix nivea* の鞘形成高分子の部分構造が調べられているのみである。その鞘形成高分子は塩基性の複合多糖(グルコース-グルコサミン交互共重合体系)でアミノ酸は含まないことから、*-*プロテオバクテリア科の鞘とは全く異なる系統の鞘といえる。したがって、鞘形成に関わる高分子とその凝集機構は分類群ごとに様々であると推察され、それぞれから機能性高分子創生への道のりが示されるはずである。

2. 研究の目的

本研究では *-*プロテオバクテリア科の有鞘細菌である *Thiothrix* 属に焦点を絞り、*Thiothrix* 型鞘形成高分子の化学構造および凝集機構に関する共通の特徴と多様性を明らかにすることを目的に設定した。すなわち、*Thiothrix nivea* と、その近縁種である *Thiothrix fructosivorans* の鞘の分析を並行して実施することとした。以下に達成目標を列挙する。

- (1) 鞘形成多糖の構造決定
- (2) 鞘の蛍光標識化法の確立とこれを用いた鞘伸長パターンの解明
- (3) グルコース-グルコサミン交互共重合体(グルコサミノグルカン)の立体構造予測

3. 研究の方法

(1) 鞘調製

T. nivea の鞘調製法は確立しているが、*T. fructosivorans* の鞘については確立していなかった。そこで、界面活性剤、溶菌酵素、NaOH での処理によって鞘を回収する方法を考案した。ただし、この方法ではアミノ基に結合している置換基の脱離が NaOH 処理の際に引き起こされる恐れがある。そこで、この処理を回避し、界面活性剤、蛋白分解酵素、有機溶媒洗浄による温和な鞘調製法も考

案した。

(2) *T. fructosivorans* の鞘形成多糖の構造の決定

鞘を塩酸で部分加水分解すると多糖(主鎖)とオリゴ糖(側鎖)が遊離した。それぞれを回収し、NMR 測定によって主鎖と側鎖の基本構造の決定を行った。鞘に強い水酸化ナトリウム処理を施すことによってアミノ基に結合していた置換基を完全に取り去った。処理後の鞘はギ酸酸性下で可溶となったので、NMR 測定に供して主鎖と側鎖の結合様式を調べるとともに基本構造を再確認した。鞘を完全加水分解して単糖を遊離させた後、(-)-2-ブタノール配糖体に変換した。トリメチルシリル化を経て GC 分析に供し、フコースの絶対配置を決定した。ペロサミンの絶対配置については、加水分解後に *N*-アセチル化を施して比旋光度を測定することによって確認した。NaOH 処理を行わず調製した鞘に対して希塩酸による加水分解ないしメタリシスを施して HPLC および GC による有機酸分析を行った。同じ鞘に対して重水素化無水酢酸による *N*-アセチル化を施した。これを濃塩酸での低温での加水分解に供することによって、アミノ基に結合した置換基を温存した状態でグリコシド結合を選択的に切断し、単糖を遊離させた。*N*-アセチルグルコサミンを 4-アミノベンゼンエチルエステルで還元アミノ化し、誘導体を精製後に NMR 測定を行った。そして、アセチル基の相対強度から鞘中のグルコサミン残基の *N*-アセチル化度を推算した。同様な手順で *N*-アセチルペロサミンと *N*-ラクチルペロサミンの混合物を回収し、両者の比率を NMR スペクトルから算出することによって鞘中のペロサミン残基の *N*-ラクチル化度を推算した。

(3) *T. nivea* の鞘形成多糖の基本構造の決定

ギ酸酸性下で鞘を可溶化し、NMR 測定に供して構造解析を行った。さらに、塩酸での部分加水分解によって遊離させたデオキシ糖を回収して 4-アミノベンゼンエチルエステル(ABEE)での還元アミノ化を経て質量分析および NMR 測定を試みた。また、鞘に対してスミス分解をほどこした後に糖組成分析を行ってグルコサミノグルカン主鎖へのデオキシ糖の結合位置を予想した。

(4) 鞘の蛍光染色と微細構造観察

T. nivea および *T. fructosivorans* の培養液に蛍光標識(FITC)化レクチン(ConA ないし WGA)を添加し、一晩静置した。洗浄後、落射蛍光顕微鏡観察することによってレクチンを介した鞘の蛍光標識化の可能性を探った。グルタルアルデヒドと四酸化オスミウムを用いた固定での SEM 観察および樹脂包埋、切片化、電子染色を経た TEM 観察を行って鞘の微細構造を調べた。

(5) 立体構造予測

分子力学(CHARMM)計算によって

Glc-GlcN, GlcN-Glc, Glc-Glc, GlcN-GlcN の 2 糖モデルにおける 8-1,4 結合の結合角に対するポテンシャルエネルギーマップを作成し、それらを比較することによって、グルコサミノグルカン中の 2 糖ユニット (Glc-GlcN, GlcN-Glc) の取り得る安定構造をキトサン (GlcN-GlcN) 及びセルロース (Glc-Glc) のそれと比較した。さらに分子動力学シミュレーション (GROMACS) によってグルコサミノグルカンの動的安定構造を予測した。結果の確からしさを検証するため、グルコサミノグルカンの NMR 測定 (NOESY 測定) を行い NOE シグナルからプロトン間距離を算出し、シミュレーションの値と照合した。

4. 研究成果

(1) 鞘の微細構造

菌体の SEM 観察では、*T. nivea*, *T. fructosivorans* と同菌体フィラメントの末端部は閉じていることが判明した。すなわち、*Thiothrix* 属の鞘は正確にはマイクロチューブではなく、細長い袋状の形状であることが明らかとなった。また、菌体表面すなわち鞘の表面にはしばしば皺が認められ、化学固定処理ないし脱水・乾燥工程における変形が疑われた。TEM 観察での鞘の断面は厚さ数 nm から約 200 nm まで様々だったのに加え、多層、単層、波状など多彩な形状が認められた。厚さと形状の多様性も前処理の影響によるものである可能性がある。多層構造については、*T. nivea* で報告がなされているが、その所見も前処理による変形が原因の誤った解釈の恐れがある。すなわち今回の取り組みによって、急速凍結法などの変形の懸念の少ない観察法の適用が、鞘の正しい形態を観察するには望ましいと推察するに至った。

(2) グルコサミノグルカンの分子シミュレーション

グルコサミノグルカンの溶液中での静的および動的安定構造はキトサンおよびセルロースと同様に振幅が少なく直線状に近いものであることが予想された。ところが、予想構造では説明できないプロトン間距離を示す複数のシグナルが溶液 NMR で観測された。したがって、グルコサミノグルカン分子は陽性荷電を帯びながら、それによる反発を上回る凝集力で会合していると考えられた。すなわち、グルコサミノグルカン分子の会合を考慮したシミュレーションを行うべきであることがわかった。強い凝集力は鞘形成をもたらすという点で妥当であり、グルコサミノグルカン部分も形態形成の一端を担うことが示唆するものである。

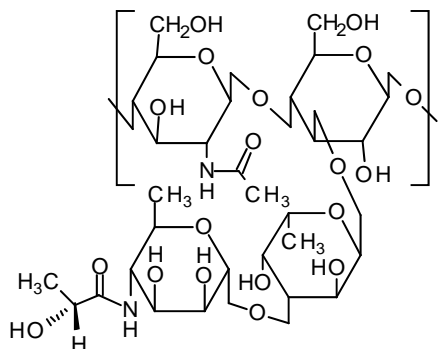
(3) 鞘の蛍光標識

T. nivea および *T. fructosivorans* の鞘の蛍光標識化は FITC 化レクチンを用いて試みた。種々のレクチンを比較したところ、両細菌ともグルコース残基を認識する ConA とグルコサミン残基を認識する WGA を用いた場合に鞘の蛍光染色がもたらされた。しかしながら

蛍光強度は不均一であり、染色後の培養で鞘の新生部位を非蛍光部位として識別することは不可能と思われた。蛍光標識化による鞘の新生部位の特定にはレクチンは不向きであり、鞘に豊富に存在すると想定されるアミノ基の蛍光標識化が有望と考えられる。ただし、アミノ基の修飾にあたっては細胞壁中のアミノ基の修飾を回避しつつ選択的に鞘中のアミノ基を修飾するための方策が必要である。

(4) *T. fructosivorans* の鞘形成多糖の化学構造

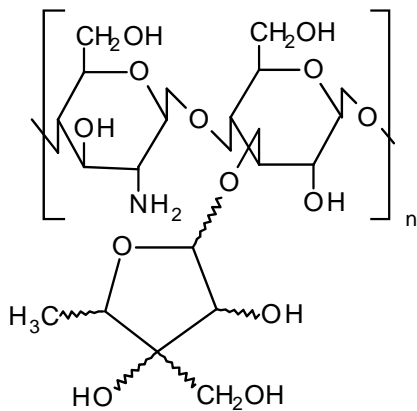
鞘からはグルコース、グルコサミンに加えてフコースとペロサミンが検出された。鞘を NaOH で処理すると酸性下で可溶となり、詳細な NMR 測定に供することができた。得られたスペクトルの解析によって、鞘形成多糖はフコースとペロサミンから成る 2 糖の側鎖が施されたグルコサミノグルカンとであることが判明した。NaOH を施さず施された置換基を温存した状態で調製した鞘の組成分析により、グルコサミノグルカン主鎖中のアミノ基の半分がアセチル化され、側鎖のアミノ基は L-ラクチル化されていることも確認した。側鎖の N-ラクチルペロサミン残基に起因する相互作用が鞘形成 (微細構造形成) の主たる要因と推察するに至った。



T. fructosivorans 型鞘形成多糖の化学構造

(5) *T. nivea* の鞘形成多糖の化学構造

鞘がギ酸酸性下で可溶となることを見出し、NMR 測定による鞘形成多糖の化学構造決定を試みた。観測された NMR シグナルより、グルコサミノグルカン主鎖中のグルコース残基の 3 位にフラノース骨格を有するデオキシ糖がグリコシド結合していることが判明した。3 位への結合はスミス分解によってグルコースが遊離したことから裏付けられた。鞘から遊離させたデオキシ糖を ABEE 誘導体として逆相 HPLC で精製後に質量分析を行ったところ分子量 313 と示された。さらに、同誘導体の NMR 測定によって、デオキシ糖は 5-デオキシ-3-ヒドロキシメチル-ペントフラノースと推察された。さらに、鞘の固体 NMR では、アセチル基に由来するシグナルがほとんど検出されなかったことから、グルコサミン残基の大半は N-アセチル化などの置換を受けていないと予想された。



T. nivea 型鞘形成多糖の予想構造

5-デオキシ-3-ヒドロキシメチル-ペントフラノースは穏やかな HCl 処理で容易に遊離させることが可能だったが、凝集しやすく結晶化できなかったため、X 結晶構造解析による同定には至らなかった。しかしながら、*Thiothrix* 属の鞘形成多糖にはデオキシ糖で修飾されたグルコサミノグルカンであるという共通性があることが本研究によって明らかになった。さらに、希少デオキシ糖残基が分子間会合をもたらす、形態形成において重要な役割を担うという新たな仮説を得るに至った。*Sphaerotilus-Leptothrix* 型の鞘形成複合糖質はシステインとグリシンからなるジペプチドの側鎖が施された両性多糖で、形態形成の主たる要因は S-S 結合であることがすでに分かっている。したがって、分類学的に異なる有鞘細菌群は進化の過程で独自に鞘形成という形質を獲得したと推察される。すなわち、微細構造を成す機能性高分子の設計指針としてはいくつかの選択肢があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kawasaki Y, Kondo K, Narizuka R, Endo T, Katahira M, Kawamura I, Sato M, Takeda M., Presence of N-L-lactyl-D-perosamine residue in the sheath-forming polysaccharide of *Thiothrix fructosivorans*, Int J Biol Macromol., 82, 772-779 (2016) 査読有

Kondo K, Umezu T, Shimura S, Narizuka R, Koizumi J, Mashima T, Katahira M, Takeda M., Structure of perosamine-containing polysaccharide, a component of the sheath of *Thiothrix fructosivorans*, Int J Biol Macromol., 59, 59-66 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計4件)

河崎雄太、遠藤智友樹、藤原篤男、近藤敬子、片平正人、佐藤道夫、武田 穰、糸状性細菌 *Thiothrix fructosivorans* にお

ける鞘伸長パターンおよび細胞分裂パターン、日本農芸化学会、2016年3月、札幌

河崎雄太、遠藤智友樹、近藤敬子、片平正人、武田 穰、糸状性硫黄酸化細菌 *Thiothrix fructosivorans* 由来のマイクロチューブ形成多糖の構造決定、日本農芸化学会、2015年3月、岡山

河崎雄太、佐藤道夫、遠藤智友樹、近藤敬子、片平正人、武田 穰、糸状性硫黄酸化細菌が形成するマイクロチューブの微細構造、日本顕微鏡学会関東支部講演会、2015年2月、東京

成塚理絵、近藤敬子、真島 司、片平正人、武田 穰、糸状性硫黄酸化細菌由来のマイクロチューブ形成多糖の構造解析、日本農芸化学会、2014年3月、川崎

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

松本 真哉 (MATSUMOTO, Shinya)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授
研究者番号：50345469