

細菌細胞壁ペプチドグリカン構造解析法の確立と *Micromonosporaceae* 科放線菌の分類への応用

感染制御科学府 創薬科学履修コース・細胞機能制御科学
武 晃

【目的】

放線菌は、二次代謝産物として多様な生物活性物質を生産することから、重要な微生物資源として分離、分類されてきた^{1,2)}。原核生物であるにも関わらず、多様な表現型（形態、細胞組成、生理性状など）を示す放線菌は、それらを基に分類が行われてきた。しかし近年、16S rRNA 遺伝子解析の導入に伴い、表現型による分類が軽視されたまま新規分類群が増加することとなり、属間での表現型に大きな差が見られなくなった。したがって、一部の遺伝子情報に偏重せず表現型から分類学を見直すことが必要であると考え、細菌細胞壁に含まれるペプチドグリカン構造に着目した。放線菌のペプチドグリカン構造解析の報告は *Streptomyces* 属のみで³⁾、多くの場合は Schleifer & Kandler によって 1972 年に提案されたペプチドグリカン構造の分類⁴⁾に基づきアミノ酸組成比からその構造を推定しているにすぎない。その理由として、ペプチドグリカン構造解析は一般に細胞壁溶解酵素を使用するが、その酵素に耐性を示す放線菌が存在すること、さらに微量成分の解析技術が要求されることから進んでこなかった。そこで、全ての放線菌（細菌）に適用できる新たな細胞壁ペプチドグリカン構造解析法を、*Micromonospora* 属放線菌を用いて確立することとした。

また、本属が属する *Micromonosporaceae* 科の放線菌は、1970 年代まで 4 属であったが、2016 年現在 30 属を擁し、既存の表現型での基準では分類が困難になりつつある (Fig. 1)。一方、本科放線菌はペプチドグリカン構造解析の基礎となる細胞壁アミノ酸組成の報告がほとんどないため、全属のアミノ酸組成を分析し、ペプチドグリカン構造を解析、分類に応用することとした。

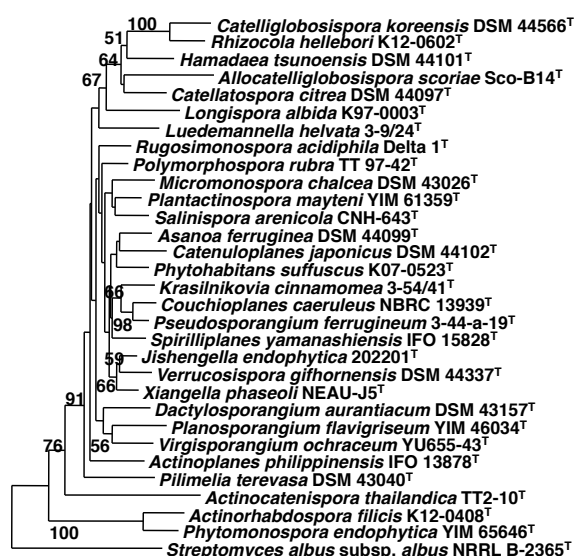


Fig. 1. 16S rDNA に基づく *Micromonosporaceae* 科全属基準種の系統樹

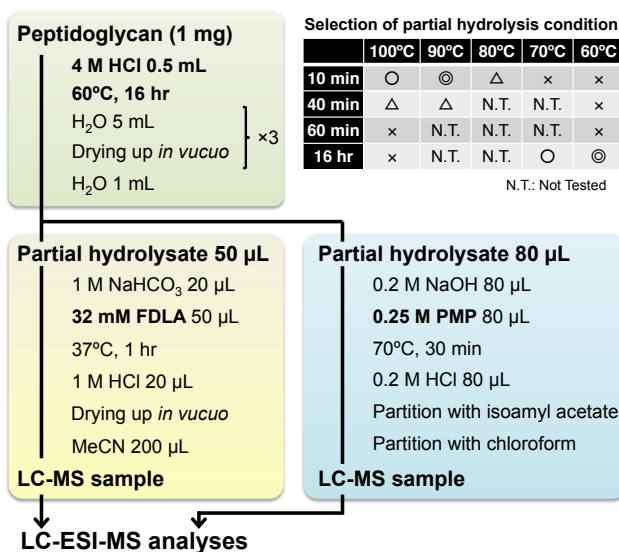


Fig. 2. 加水分解条件検討とペプチドグリカン構造解析法

【方法および結果】

1. 細胞壁ペプチドグリカン構造解析法の構築

Micromonospora aurantiaca JCM 3232^T を液体培地で培養後、集菌した菌体を常法に基づき細胞壁ペプチドグリカンを経験した。精製ペプチドグリカンを経験で完全に加水分解し、アミノ酸誘導体化試薬 *N*^α-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide (FDLA) を修飾後、LC-ESI-MS で解析を行った。その結果、*Micromonospora* 属の細胞壁アミノ酸組成比は Gly : D-Glu : *meso*-diaminopimelic acid (mDAP) : D-Ala = 1.1 : 1 : 1.0 : 0.7 であった⁵⁾。

ペプチドグリカン一次構造の決定には、塩酸による非特異的かつ部分的に分解した断片を解析することで得られると考え、部分加水分解条件を検討した。塩酸濃度、反応温度および反応時間を変化させて加水分解し、FDLA 修飾したものを LC-ESI-MS で解析したところ、4 M HCl, 60°C, 16 時間および 4 M HCl, 90°C, 10 分の反応条件で多くの分解物が検出された。そこで、本条件でペプチドグリカンを経験加水分解し、FDLA 修飾または糖誘導体化試薬 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP) による修飾で、加水分解物中に含まれるペプチドあるいは糖鎖を経験誘導体化し、各試料を LC/MS で解析した (Fig. 2)。

Micromonospora 属ペプチドグリカンの部分加水分解 FDLA 修飾物からは、テトラペプチド Gly-Glu-DAP-Ala ($[M+H]^+ = 1036.3967$) およびテトラペプチド Ala-DAP-Ala-DAP ($[M+H]^+ = 1387.5545$) が得られ、PMP 修飾物からは、アミノ糖 *N*-glycolylmuramic acid (MurNGlyc, $[M+H]^+ = 640.2613$) および *N*-acetylglucosamine (GlcNAc, $[M+H]^+ = 552.2453$) と、アミノ酸結合アミノ糖 MurNGlyc-Gly ($[M+H]^+ = 697.2828$) が検出された。このことから本株のペプチドグリカン構造は Fig. 3a の通りであった。また、一般にグリカン鎖からは L-Ala が結合していることが知られているが、本株は Gly に置換した珍しい構造であるといえる⁵⁾。今後本研究ではこの構造を Type I と呼称する。

(a) *Micromonospora* [Type I]

(b) *Catenuloplanes* and *Couchioplanes* [Type II]

(c) *Rhizocolla* [Type I]

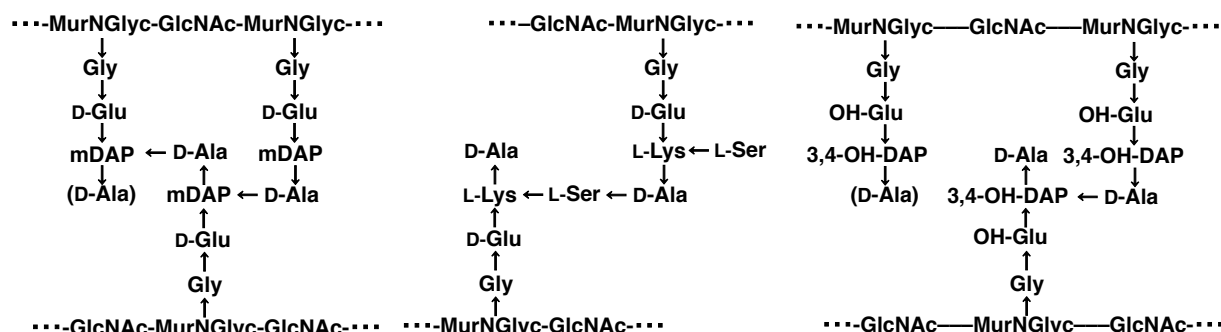


Fig. 3. 本研究により判明したペプチドグリカン構造

このように、塩酸で部分加水分解し、FDLA または PMP で修飾した後、LC-ESI-MS で解析することで、ペプチドグリカン構造を決定することが可能となった。本手法は全ての細菌で利用することができ、わずか数 mg のペプチドグリカンよりその構造が解析可能であるため、放線菌以外の細菌においても応用できる⁵⁾。

2. ペプチドグリカン構造を用いた *Micromonosporaceae* 科放線菌の分類への応用

2-1. *Catenuloplanes* 属および *Couchioplanes* 属 のペプチドグリカン構造解析

1. と同様の方法で解析を行ったところ、*Catenuloplanes japonicus* NBRC 14176^T および *Couchioplanes caeruleus subsp. caeruleus* NBRC 13939^T 株の細胞壁アミノ酸組成比は、いずれも Gly : D-Glu : L-Lys : D-Ala : L-Ser = 1.0 : 1 : 1.0 : 0.7-0.8 : 1.0 であり、各ペプチドグリカンの部分加水分解 FDLA 修飾物からは、テトラペプチド Gly-Glu-Lys-Ala ($[M+H]^+ = 992.4068$) およびテトラペプチド Lys-Ala-Ser-Lys ($[M+H]^+ = 1315.5601$) が検出された。また、PMP 修飾物からは、*Micromonospora* 属と同様の結果が得られた。このことからこれら 2 株のペプチドグリカン構造は、Fig. 3b に示した構造であることが分かった⁵⁾。MurNGlyc から Gly が繋がり、架橋に L-Ser を有する本構造は過去に報告例がない。本研究ではこの構造を Type II と呼称する。

2-2. OH-Glu, 3,4-OH-DAP および 3-OH-DAP の精製

細胞壁アミノ酸組成比を算出するためには、細胞壁に含まれるアミノ酸の標品が必要となる。そこで、*Micromonosporaceae* 科の放線菌に含まれる特殊なアミノ酸、hydroxyglutamic acid (OH-Glu), 3,4-dihydroxy-DAP (3,4-OH-DAP) および 3-hydroxy-DAP (3-OH-DAP) の単離を行った。

OH-Glu および 3,4-OH-DAP を含む *Rhizocola hellebori* K12-0602^{T6)} および 3-OH-DAP を含む *Phytohabitans suffuscus* K07-0523^T の精製ペプチドグリカン 60 mg を 6 M HCl でそれぞれ完全に加水分解した後、benzoyl chloride で誘導体化し、HPLC により *N*-benzoyl-OH-Glu, *N,N*-dibenzoyl-3,4-OH-DAP および *N*-benzoyl-3-OH-DAP を単離した。それぞれ塩酸による加水分解で benzoyl 基を脱離し、定量 NMR により 3-OH-Glu, 3,4-OH-DAP および 3-OH-DAP をそれぞれ 2.9 mg (純度 44%), 1.3 mg (純度 21%) および 4.5 mg (純度 50%) 得た。

2-2. *Rhizocola* 属のペプチドグリカン構造解析

Rhizocola hellebori K12-0602^T のペプチドグリカン完全加水分解物とアミノ酸標品を FDLA 修飾後、LC-MS で比較し組成比を算出すると、Gly : 3-OH-Glu : 3,4-OH-DAP : D-Ala = 0.9 : 1 : 1.0 : 0.3 となり、他菌株と比較して D-Ala が非常に少ないことが判明した。ペプチドグリカン一次構造の決定は、精製ペプチドグリカンを 4 M HCl, 50°C, 16 hr 処理で得た部分加水分解物を FDLA, PMP または benzoyl chloride で修飾後、LC/MS で解析した。その結果、*Micromonospora* 属ペ

プチドグリカン構造 (Fig. 3a) の D-Glu および mDAP がそれぞれ 3-OH-Glu および 3,4-OH-DAP に置換された Type I の構造であることが明らかとなった (Fig. 3c)。

2-3. *Micromonosporaceae* 科全属基準種のペプチドグリカン構造解析

Micromonosporaceae 科全属におけるペプチドグリカンのアミノ酸組成比をそれぞれ算出し、構造を解析した結果、Type I および Type II に分類され、Type I はさらに、ジアミノ酸に① mDAP のみを有するもの、② 3,4-OH-DAP を有するもの、③ mDAP および 3-OH-DAP を有するもの、④ mDAP および③とは異なる OH-DAP を有するもの、⑤いずれにも属さないものの、5 つのグループに分けられた。

【結論】

Micromonospora 属放線菌のペプチドグリカンを用いて、塩酸による非特異的加水分解後、FDLA または PMP による化学修飾を用いた構造解析法を構築した⁵⁾。本手法は全細菌に適用できるため、他細菌のペプチドグリカン構造解析に利用できると考えられる。本科全属のアミノ酸組成比を算出、ペプチドグリカン構造を解析した結果、(1) Type I および II の 2 つの構造に分けられること、(2) Type I はアミノ酸組成から少なくとも 5 つのグループがあること、が判明した。このように、1 科の中に多種類のペプチドグリカン構造が存在することから、ペプチドグリカン構造の多様性が分類指標の 1 つとして、放線菌さらには全細菌の分類にも利用できると考えられる。

【参考文献】

- 1) Barka E. A., *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**, 1-43, 2016.
- 2) Také A., *et al.*, *J. Antibiot.*, **68**, 322-327, 2014.
- 3) Nakamura T. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 763-768, 1977.
- 4) Schleifer K. H. & Kandler, O., *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477, 1972.
- 5) Také A., *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **62**, 199-205, 2016
- 6) Matsumoto A., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 2706-2711, 2014.