

フォーカス 26 <第 4 回> : 成果事例クローズアップ (京都・先端総合ネットワーク)

新規超巨大多糖類サクランの構造物性

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 金子達雄, 岡島麻衣子

京都大学化学研究所 先端ビームナノ科学センター 小川哲也, 北陸先端科学技術大学院大学 技術サービス部 東嶺孝一



(左から) 北陸先端科学技術大学院大学 金子達雄, 岡島麻衣子, 京都大学化学研究所 小川哲也, 北陸先端科学技術大学院大学 東嶺孝一

1. はじめに

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 金子研究室では発足以来、藍藻由来代謝産物に関する研究を進めている。その中でも、今回ご紹介するサクランという新規多糖類は 1000 万を超える分子量を持つなど極めてユニークな構造物性を示し、学術的にも社会的にもインパクトの高い成果として注目されてきた。本研究室は環境適応型材料を高分子ナノ構造制御の観点から創製することを研究方針として掲げている。中でもバイオマスという生物由来資源に注目してきた。古くからバイオ由来資源の概念はあり、数多く生息する多種多様な生物から様々な物質が抽出され、それらの多くは医薬品及び健康補助食品等に利用されてきた。しかし、今後は医薬品のみならず、工業製品としての微生物由来バイオマスにも注目するべきと考え、我々は、特にバイオマスとしての利用が未だ途上にある光合成微生物「藍藻」に着目した。特に、日本固有藍藻かつ絶滅危惧種である「スイゼンジノリ」に注目し、その付加価値を高めることをモチベーションに研究を始めた。その結果、スイゼンジノリの主成分であるサクランの抽出に成功し、

本事業により構造物性を調べたところ種々の新しい知見が得られた。本報ではその詳細について述べる。

なお、本研究は、文部科学省・先端研究施設共用イノベーションの一つで、京都大学・北陸先端科学技術大学院大学・奈良先端科学技術大学院大学が連携した京都・先端ナノテク総合支援ネットワークの支援を受けた。本ネットワークで開放されている北陸先端科学技術大学院大学の質量分析器 (FT-ICR-MS) によってサクランを分析し、同じく原子間力顕微鏡 (AFM) と透過型電子顕微鏡 (TEM) を利用して形状・構造解析を進めた。また、本ネットワークの大学間連携により、京都大学の Cryo-TEM を利用する機会に恵まれた。その結果、サクランとネオジウムの複合体がもつ特異な構造を初めて捉えることに成功した。本支援には、京都大学化学研究所・先端ビームナノ科学センター・小川哲也助教、北陸先端科学技術大学院大学・技術サービス部、主任技術職員・東嶺孝一氏に多大なるご支援を頂いた。

2. 藍藻とは

藍藻は地球上で初めて光合成を行い大気中に莫大な量の酸素をもたらした原核生物である。現在、異常発生する植物プランクトン「アオコ」の主成分であるミクロシステス属や地面にワカメのような姿で生息するノストック属などが有名であるが、この厄介な藍藻も堆肥化により農地還元へ利用されようとしている [1]。これら藍藻の殆どは細胞体の固定や重金属・微粒子捕捉のために多糖類を細胞外に大量に分泌している [2]。ラン藻は数十億年

*問い合わせ:

京都・先端ナノテク総合支援ネットワーク
北陸先端科学技術大学院大学
〒 923-1292 石川県能美市旭台 1-1
電話: 0761-51-1501
E-mail: nano-net@jaist.ac.jp

前から全ての生物の祖先として生息し続けている生物種であり、それが生産する多糖類などの分子は太古の構造物性を現在も記憶している。それらの中には、植物への進化の過程で失われたものが数多くある。一方、進化の過程で排除されてしまったこれら分子種の中には産業的には有用なものが含まれる可能性は十分にある。

本研究で特に注目したのは寒天性藍藻 *Aphanotheche sacrum* (和名：スイゼンジノリ) である。*A. sacrum* は日本固有種であり天然種は絶滅したとされているが現在熊本県と福岡県の養殖場で食用として年間合計約数十トン程養殖されている。一方、*A. sacrum* は 19 世紀に生物学的に分類された日本固有種であり、その生理については古くから研究されてきたが物質生産の観点では系統的に研究されたことはなかった [3]。*A. sacrum* は寒天状の細胞外マトリックスを大量に分泌するラン藻であり、見かけ上は上記で紹介した藍藻のように寒天で覆われた固まりである。*A. sacrum* の細胞はこの寒天質の中でコロニーを形成している。また、細胞の増殖はその細胞外マトリックスのサイズの変化から目視により確認できる。*A. sacrum* は大腸菌とおなじ原核生物であり、その細胞内構造は非常に単純であるので、その成長速度は高く時期によっては 3、4 日ほどで寒天質のサイズは倍化する。これは、単なる細胞分裂速度の高さを示しているだけでなく、マトリックスを構成する物質の産生速度が高いことも示している。そこで我々は細胞外マトリックスの主成分である多糖類を抽出しその構造物性を当支援対象機器を用いて調べた。その結果この多糖類は新規物質であることが判明し *sacrum* 由来多糖類という意味で *sacran* (サクラン) と呼ぶことにした。


サクランは、別に進めた研究の中で希少金属吸着への応用の可能性が見いだされた多糖類である。この結果は、*A. sacrum* が含水率が自重の 40 倍以上を維持しながら河川中の鉄やカルシウムイオンを濃縮するという特徴から、サクランが金属イオンと特異な相互作用を示すものと考えたことが発端となり得られたものである。特に、サクランは希土類イオンを 10ppm 程度の低濃度で特異的に吸着し複合体を形成することが確認された。希土類は様々なレアメタルの中でも特に深刻な状況にある。希土類はスカンジウム、イットリウム、ランタノイド族の各元素を合わせた総称であるが、それぞれの元素が各種用途で重要な役割を果たしており、その重要度は地殻中存在率を除いた全ての項目において最も高いと評されている [4]。特に、希土類は今や磁性材料における必須元素として利用されている。特に、強力磁石を用いたモーター類の用途は幅広く、またハイブリッド自動車や電気自動車が発展する昨今、需要も鰻登りであり、希土類は現代社会で不可欠の存在となっている。この希土類を特異的に吸着するメカニズムを解明するために、サクランの構造物性を追求する研究を進めた。

3. サクランの抽出

A. sacrum の原種を凍結融解することにより、しみ出てきたタンパク質などの水溶性成分を純水で洗浄し、続いてエタノールなどの有機溶媒でクロロフィルなどの脂溶性成分を洗い流した。得られた半透明なゲル状物質をアルカリ水溶液に溶かしこみ、不溶物がある場合には注意深く適切な濾紙を用いて除去した。濾液を濃縮しアルコール類に再沈殿させることで繊維状の物質を得た。この物質を水に再溶解し、再沈殿させる処理を数回繰り返すことで徹底的に生成した。さらにゲル濾過カラムなどで低分子量不純物を除くことで精製した。得られた物質は多糖類であることがフェノール硫酸法により定性的に確認され、かつビュレット試験には陰性であることからペプチド成分は含まれないことも確認した。また、多糖類水溶液の UV-vis スペクトルを測定することで、タンパク質、DNA、色素成分などの不純物が含まれないことを確認した。得られた多糖類を乾燥すると、綿状の物質となった。この物質は水と DMSO には溶解したが、その他の有機溶媒には不溶であった。

4. サクランの NMR 測定

サクランは原核生物由来であるにもかかわらず、カルボキシル基、アミド基、硫酸基を持つなど、動物が作るグリコサミノグリカン様の官能基を持つことが赤外分光法により判明した。また、その絶対分子量は 1600 万にも達することがゲル浸透クロマトグラフィーおよび静的光散乱法により分かった。一方、藍藻由来糖鎖を構成する単糖の種類は多く、結合様式及び配列も複雑であるために、元来その解析は非常に困難とされており、現在までに完全に分子構造の解明された藍藻由来糖鎖は僅か数種類である。そこで、本研究では NMR 法を用いてこの新規多糖類の糖残基の解析を行った。¹H NMR は部分加水分解した糖鎖を重水に溶解したものを試料として測定した。用いた装置は米国バリアン社製 GEMINI 300 型である。積算回数 256 回、室温で測定した。

Aphanotheche sacrum 由来糖鎖はその分子量がきわめて高いために、0.1% の希薄溶液でさえ高粘性の試料溶液を与える。このことは測定に不利であり、実際にできるだけ濃い重水溶液を調製して NMR 測定を行ったところ、解析に十分な明確性を持つスペクトルは得られなかった。そこで、NMR 測定を行う前に 0.1-6M の濃度の塩酸により 1-24 時間程度加水分解を行ったところ、 1 に示すような ¹H NMR スペクトルを得ることができた。このスペクトルは糖鎖構造に特有な 3.2ppm 付近から 4.5ppm 付近に多重ピークを示した。一方、通常の糖鎖によるスペクトルからは見られない位置である 1.2-1.6ppm 付近にはっきりとしたピークを見ることができた。これは、糖の 6 位の水酸基がデオキシ化された 6-デオキシ糖が本糖

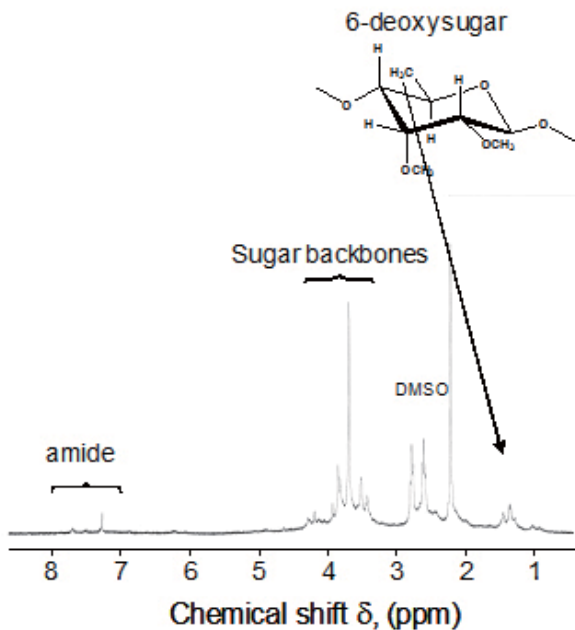


図1 ^1H NMR spectrum of partially-hydrolyzed sacran

鎖を構成することを示している。この種の糖の代表的なものはフコースなどであり、この結果は糖鎖に疎水領域があることを示し、構造から糖鎖の界面活性効果などの特異的な溶液物性を推測するに至った。さらに、7-8ppm付近に小さいピークが存在することが認められた。この付近に見られるピークはアミド基のプロトンに由来するピークである。本糖鎖はビュレット試験で陰性を示したことから、ペプチドを含まないことが分かっているため、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖誘導体を含むことも示唆できた。

5. サクラン FT-MS 測定

藍藻は地球上のあらゆる環境に生育可能な原核生物であり太鼓の地球上で始めに光合成を行った生物と言われている。また生育環境に応じ生存を有利にするためにユニークな多糖類を生産し分泌している。この藍藻由来の糖鎖は医薬品及び工業製品への応用の可能性は示唆されているものの未だ菌類や海藻由来の糖鎖程の普及は見られていない。その理由の一つとしてその種類の豊富さと、構造の複雑さ故に詳細な構造解析が進まないことが挙げられる。一方で近年は糖鎖の構造解析手法の幅も広がり、段階的な解析の積み重ねで完璧な分子構造の解明も不可能では無くなってきている。そのような中、藍藻由来糖鎖を有用物質として展開するために構造解析手法の確立は非常に意味のあることと考えられる。そこでまずサクランの複雑な構造の多糖類の構造決定に関する基本的知見を得るために、部分分解多糖類のFT-MS測定を行うことで、その構成糖の組成、及び糖残基配列の一部を明らかにした。

FT-MS測定は以下のように行った。多糖類を塩酸/メタノールなどの酸溶液中で部分加水分解したのち、風乾した。乾燥物をメタノールに溶解させものを試料とした。FT-MSの装置は独国ブルカー社製 BioAPEX 70eであり、イオン源はESI、イオン化モードは負の条件で測定した。

図2にm/zレンジが200-1400のFT-ICR-MSスペクトルを示す。ピークの集団が4-5つに分かれて出現しており、これらの集団の分子量差はおおよそ160-170であった。この結果から測定した試料は一つの多糖類から分解されて得られたオリゴ糖混合物であると考えられる。次に、これらのピークの値を小数点第4桁まで検出し、他方、得られたm/z値と考えられるオリゴ糖の分子量デー

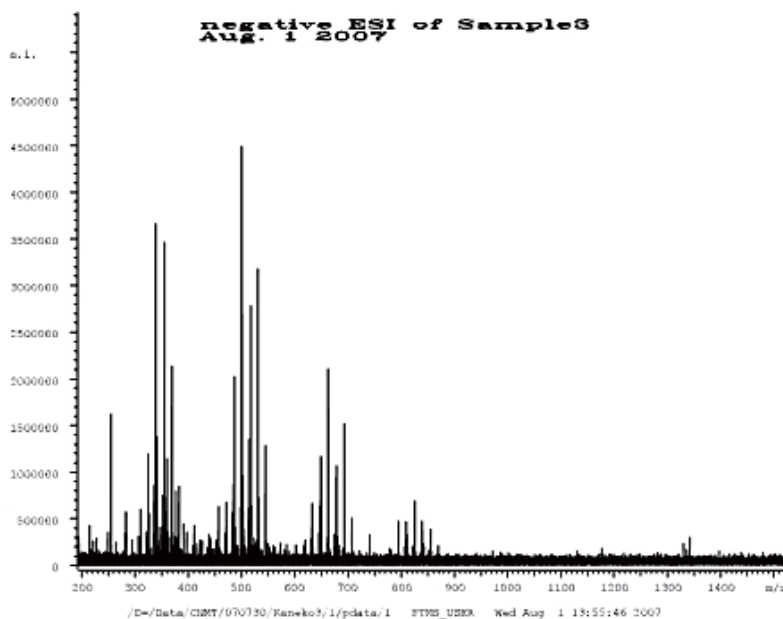


図2 FT-ICR-MS spectrum of partially-methanolized sacran (m/z:200-1400)

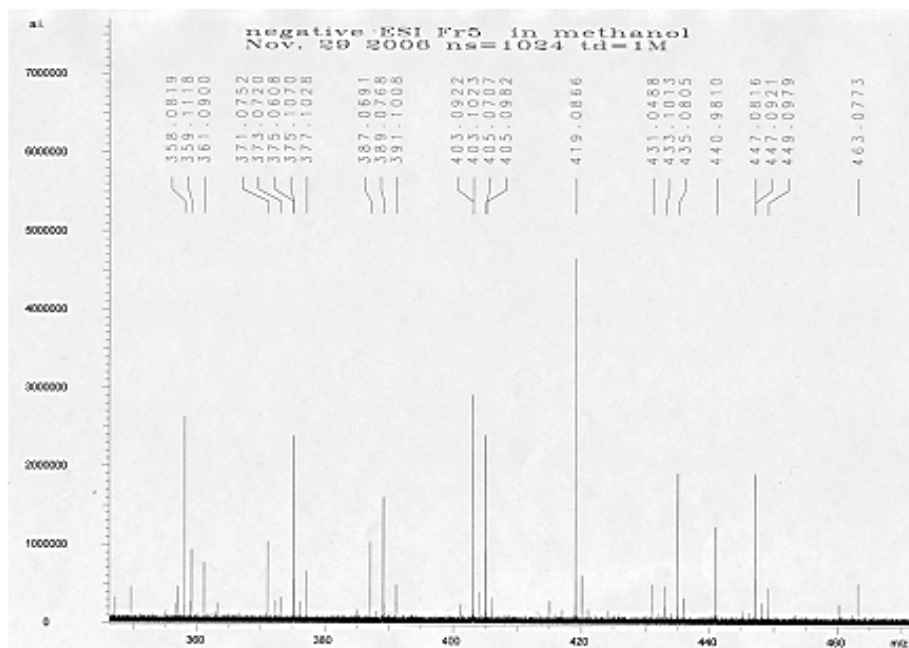


図3 Expanded view of Fig.2 (m/z=350-470)

データベースを作成し、m/z 値とデータベースを比較することで、オリゴ糖がどのような単糖から構成されているかを調べた。尚、この方法では、小数点第4桁までの測定が行われているので、小数点第3桁までの精度を持って組成式を完全に決定することが可能である。従って、ジアステレオマーまでを決定することは可能であるが、官能基や環構造、Nの有無などまでは完全に決定できた。その代表的なスペクトルを図2に示す。解析の結果、ヘキソース、ペントース、デオキシヘキソースなどの一般的な単糖とそれらの組み合わせられた二～四糖の存在が確認された。さらに、硫酸化ムラミン酸という今までに報告されたことの無い、新規糖の存在も確認された。

6. サクランのTEM観察

ここでは、環境適応型材料として重要なサクランの高次構造的特徴を見出すことを目的として進めた。この時、クロマト系の煩雑で長期間を要する方法を用いるのではなく、TEM法により短時間で大まかな構造的知見を得ることを主要な目標とした。TEM試料は糖鎖を約100℃の純水に溶解し、約0.01%の水溶液を調製した。ここから1mlを取り出し、100mlのメタノールで希釈した。得られた超希薄溶液をカーボンコートした銅グリッドの上に滴下した。その上に球面皿を少し浮かせてかぶせることで、ゆっくりと乾燥した。このようにして得られた試料をTEMシステム（日立製作所製 H-9000NAR）で観察した。

Aphanothece sacrum 由来糖鎖はその絶対分子量が1600万もの超巨大分子であることが、光散乱法などにより証明されている。従って、その姿は電子顕微鏡でも観

察しやすいものと考えられる。そこで、糖鎖の水溶液を調製し、それに約100倍量のメタノールを加え、全体として10ppm程度の糖鎖溶液を作成した。これをカーボンコートした銅グリッドの上に滴下し、自然乾燥を行うことで、試料を調製した。得られた画像を図4に示す。このTEM画像から糸状の黒っぽいコントラストを示すものが観察できた。この物質のEDXスペクトル（図5）を測定したところ、通常の銅グリッド由来のピークの他にナトリウムや酸素のピークが見られ、この物質が糖鎖であることが分かった。糖鎖は全体としてループ状の構造をとっていることが分かった。このことは本糖鎖は部分的に会合する部分を持ち、その部分が集まることで、投げ縄のような構造となり、TEMではループとして見られたものと考えている。

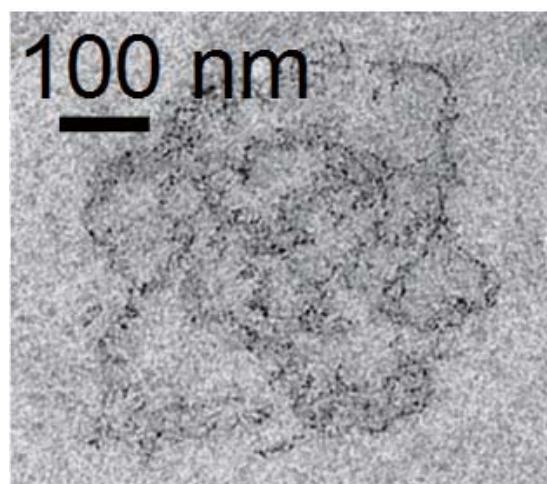


図4 TEM image of sacran

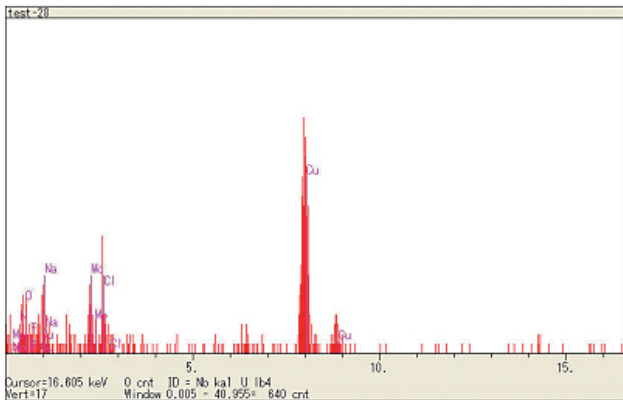


図5 EDX spectrum of sacran

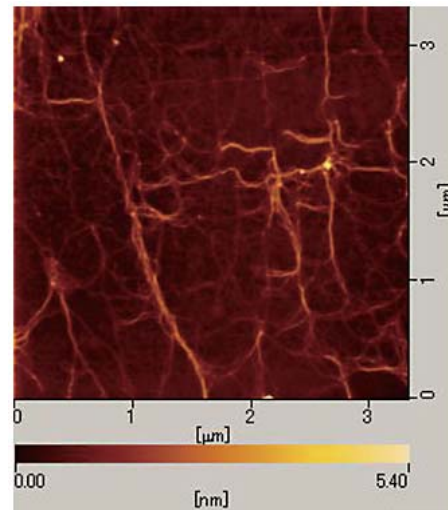


図6 AFM images of sacran

7. サクランのAFM観察

サクランの構造的特徴を見いだすことを目的として進めた。この時、できるだけ簡便な方法でAFM法により短時間で大まかな構造的知見を得ることを主要な目標とした。AFMはマイカ基板の上に糖鎖水溶液を滴下しそのまま乾燥したものを試料として、タッピングモードで室温、常圧で測定した。用いた装置はSII社製SPI-3800, SPA-400である。

Aphanothece sacrum 由来糖鎖はその分子量がきわめて高いために、0.1%の希薄溶液でさえ高粘性の試料溶液を与える。このことは測定に非常に有利となる。AFM測定により高分子鎖の形態を観察するときには、なるべく濃度の低い試料を準備して、キャスト後に分子鎖が重なり合って一本鎖の形態がわかりにくくならないように配慮する必要がある。しかし、濃度が下がりすぎると特に水溶液の場合には、基板の表面で塗れ広がりにくい場合が多く、高速スピんキャストなどの特別なキャスト法を用いる必要が出てくる。しかし、当該水溶液では上記の問題が発生せずに単なる滴下乾燥法で、きれいなキャスト膜がマイカ基板上に作成出来た。実際に用いた水溶液は500ppb-50ppmの非常に薄い溶液である。

この試料をAFMで観察した結果、単なる乾燥法で有るにもかかわらず、糖鎖は有る程度伸びきっており、観察が容易であった。図6の白っぽく見える部分が糖鎖である。糖鎖の一本鎖部分と思われる場所の厚みは0.5-0.7nmであり、実際の糖骨格のサイズと一致した。さらにその糖鎖の形状としていくつかの特徴を捉える事が出来た。

- 1) 通常の糖鎖のようなダマ状ではなく、お互いに有る程度距離をおいた配置をとっていた。
- 2) まっすぐな伸びきり状態の鎖がほとんどであった。
- 3) ところどころに網目状の模様が見られた。

以上の特徴から本糖鎖は非常に剛直であり、分子鎖間引

力は弱いものと考えられる。これは、本糖鎖が基本的にポリアニオンであることに由来する。また、部分的にカチオン性基も持っていることから、その部分がアニオンと相互作用し、網目状の構造を形成したものと考えている。

8. サクラン水溶液のCryo-TEM観察

Cryo-TEMはサクラン水溶液の超音波ミストをネオジウム水溶液中に散布し、形成した構造体を含む溶液の上澄みを瞬時に凍結し、それを試料として京都大学・化研との連携で撮影を行った。

サクランは希土類と複合体を形成することが既に判明しているが、その複合体の構造は明確ではない。そこで、ナノサイズの複合体を作成しその形態の観察をCryo-TEMで行った。その結果、ネオジウムとの複合体は針状でありそれが放射状に凝集した構造であることが判明した(図7)。以上のように藍藻由来超巨大多糖類は極めて剛直な



図7 Cryo-TEM image of sacran/Nd complexes

多糖類であり、今までに解析されたことのないようなユニークな構造を持つことが明確となった。

9. おわりに

実験装置の共同利用は、複雑な構造の分子の構造解析を進めるに当たり国際競争力を高めるのに大きく貢献した。その結果、米国化学会誌である *Macromolecules* の表紙を飾るレベルの結果を見出すに至った。同時に、知的財産の活用にも貢献し、物質特許の出願に至った。特に、本研究で取り扱う多糖類の水溶液中の構造を調べることは困難を極めるが、京都大学との共同支援による構造解析の結果重要な知見が得られ、独創的、先導的研究の推進に大きな役割を果たした。

サクランの構造物性を研究することで、当該物質の実用化実現に向けた研究では、研究室内における装置の使用だけでは難しいことが多かったが、本イノベーション創出における支援により、ハイレベルな技術を持つ技術員のサポートのもとで、最新の装置を使用することが出来、成果の達成効率を上げられたばかりか、研究費の

活用に於ける費用対効果においても非常に高い効果が認められた。特に、京都大学との共同支援により、従来概念では考えられない全く新しい現象が効率よく見出されたことは、イノベーション創出でないと成し得なかったものと考えられる。

参考文献

- [1] 齋木博 " 微生物利用の大辞典微生物利用の大展開 " p.889, エヌ・ティ・エス出版 (2002)
- [2] R. D. Philippis, M. Vincenzini, *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 151 (1998)
- [3] M. K. Okajima, M. Ono, K. Kabata, T. Kaneko, *Pure Appl. Chem.* 79, 2039 (2007)
- [4] 田中和明, レアメタル基本と仕組み, 株秀和システム (2007)

(北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科
金子達雄)