

## 実施課題名: 難培養アーキア細胞表層糖鎖のNMR解析

【背景】 ほぼ全てのアーキア(古細菌)の細胞表層は高度に糖鎖修飾を受けたタンパク質の層(S-レイヤー)で覆われている。近年様々なアーキアにおいて、その生息環境の変化に応じてS-レイヤーの糖鎖構造が変化する現象(糖鎖リモデリング)が見いだされ、超高温や高塩濃度、低pHといった極限環境に適応したアーキア独自の生命現象として注目されている。また一部のアーキアの糖鎖は、真核生物の糖鎖に類似した構造を有しており、基礎・応用の両面から大きな注目を集めている。しかしながら、これまでの糖鎖生物学的研究はごく一部の培養が容易なアーキアのみを対象としており、自然界に優占するアーキアの大部分を占める「難培養アーキア」における糖鎖の構造解析手法の確立が喫緊の課題である。我々は様々な難培養アーキアの大量培養し、高精度・高分解能のLC-MS/MSを用いてその糖鎖生物学的性質を解析してきた。本研究では、地球レベルの窒素循環・炭素循環において重要な役割を果たしているアンモニア酸化古細菌 *Nitrososphaerota archaea* を対象として、N型糖鎖の構造解析を実施した。

【実施内容】 本研究では、アンモニア酸化アーキア由来糖タンパク質に付加されたN結合型糖鎖の精密構造決定を目的として、NMRプラットフォームを活用した。まずLC-MS/MS解析により、本糖鎖は1分子のHex(NAc)<sub>2</sub>、1分子のHexA(NAc)<sub>2</sub>、および分子量287.11 Daの未知糖残基4分子から構成される新規の直鎖型糖鎖であることが示唆された。構造の精密化を目的として多次元NMR解析を実施した。HSQCスペクトルのアノマー領域には強度比1:1:1:3の4本のピークが観測され、主要ピークは3つの等価な287.11 Da残基に由来する重なりシグナルであることが示された。

加えて、残基内スカラー結合解析から、287.11 Da単位のC2およびC3位にアセトアミド基が存在することが明らかとなった。化学シフトの特徴からC1H2N1O1組成を有する追加官能基の存在が示唆され、287.11 Da単位はHex(NAc)<sub>2</sub>(CONH<sub>2</sub>)であることが示唆された。このように、MS単独では決定困難であった置換基の種類および結合位置を同定し、糖鎖の詳細な構造情報を明らかにすることができた。

本成果は、アーキアにおけるN結合型糖鎖の構造多様性を示すとともに、環境適応や窒素代謝との関連を考察する上で重要な基盤データを提供するものである。

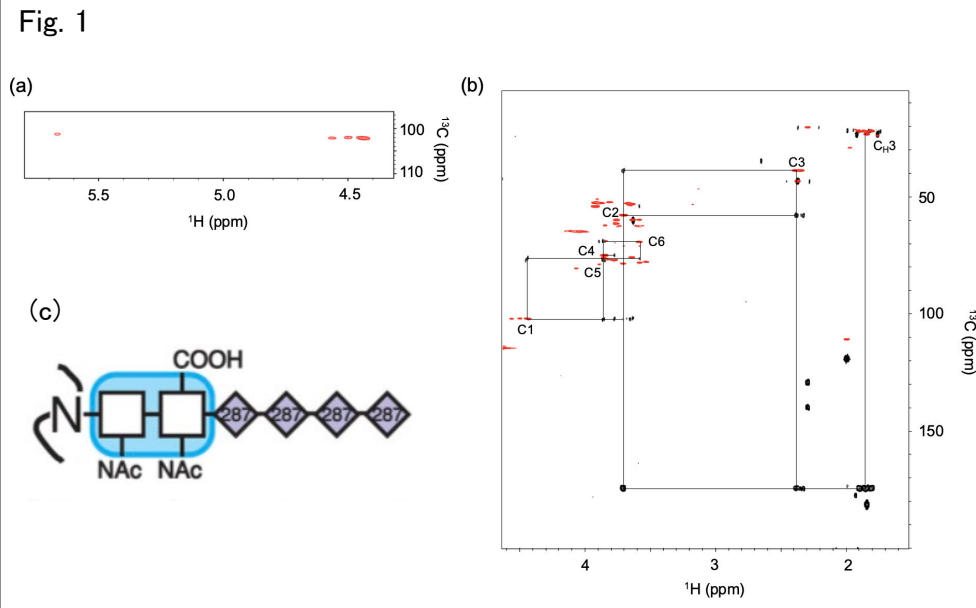


Fig.1 *N. viennensis*由来糖ペプチドのNMRスペクトル。(a) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQCのアノマー領域と、(b) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC(黒)と<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC(赤)のスペクトル。(c)本研究から予想される糖鎖構造 Nakagawa et al., 2025. mBio e0385924より

NMR プラットフォーム  
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-066		
利用課題名	難培養アーキア細胞表層糖鎖の NMR 解析		
所属機関	京都大学		
所属部署	大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋環境微生物学分野		
役職・氏名	役職	准教授	氏名 中川 聡
利用実施時期、及び期間	2023 年 12 月 1 日 ~ 2025 年 11 月 30 日  総利用日数: 4 日  <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

## 1. 本課題の概要・目的

ほぼ全てのアーキア(古細菌)の細胞表層は高度に糖鎖修飾を受けたタンパク質の層(S-レイヤー)で覆われている。近年様々なアーキアにおいて、その生息環境の変化に応じて S-レイヤーの糖鎖構造が変化する現象(糖鎖リモデリング)が見いだされ、超高温や高塩濃度、低 pH といった極限環境に適応したアーキア独自の生命現象として注目されている。また一部のアーキアの糖鎖は、真核生物の糖鎖に類似した構造を有しており、基礎・応用の両面から大きな注目を集めている。しかしながら、これまでの糖鎖生物学的研究は、ごく一部の培養が容易なアーキアのみを対象としており、自然界に優占するアーキアの大部分を占める難培養アーキアにおける糖鎖の構造解析手法の確立が喫緊の課題である。我々は様々な難培養アーキアの大量培養し、高精度・高分解能の LC-MS/MS を用いてその糖鎖生物学的性質を解析してきた。

本研究では、地球レベルの窒素循環・炭素循環において重要な役割を果たしているアンモニア酸化アーキア *Nitrososphaerota archaea* を対象として、N 型糖鎖の詳細な構造を明らかにすることを試みた。

## 2. 成果の概要

### 実施内容

本研究では、アンモニア酸化アーキア由来糖タンパク質に付加された N 結合型糖鎖の精密構造決定を目的として、NMR プラットフォームを活用した。まず LC-MS/MS 解析により、本糖鎖は 1 分子の di-N-acetylhexosamine [Hex(NAc)<sub>2</sub>]、1 分子の di-N-acetylhexuronic acid [HexA(NAc)<sub>2</sub>]、および分子量 287.11 Da の未知糖残基 4 分子から構成される新規の直鎖型糖鎖であることが示唆された。構造の精密化を目的として多次元 NMR 解析を実施した。HSQC スペクトルのアノマー領域には強度比 1:1:1:3 の 4 本のピークが観測され、主要ピークは 3 つの等価な 287.11 Da 残基に由来する重なりシグナルであることが示された。COSY および TOCSY 解析により各残基内スピン系を同定し、HSQC によって炭素シグナルを帰属した。さらに HMBC スペクトルでは残基間の長距離相関が確認され、直鎖構造モデルを支持する結合様式が示された。加えて、残基内スカラー結合解析から、287.11 Da 単位の C2 および C3 位にアセトアミド基が存在することが明らかとなった。化学

シフトの特徴から  $C_1H_2N_1O_1$  組成を有する追加官能基の存在が示唆され、287.11 Da 単位は  $Hex(NAc)_2(CONH_2)$  であることが示唆された。このように、MS 単独では決定困難であった置換基の種類および結合位置を同定し、糖鎖の詳細な構造情報を明らかにすることができた。

本成果は、アーキアにおける N 結合型糖鎖の構造多様性を示すとともに、環境適応や窒素代謝との関連を考察する上で重要な基盤データを提供するものである。

### 本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題では、対象糖鎖の完全な立体構造決定を当初目標として NMR 解析を実施した。その結果、置換基の種類や位置について明確な情報を得ることができ、質量分析結果と整合する予想構造を示すことに至った。一方で、本糖鎖は反復構造を多く含む配列であるため、超高磁場 NMR 装置を用いた解析においても化学シフトの縮重が顕著に観測され、一部残基の完全な帰属および結合順序の最終確定には至らなかった。特に類似環境にある糖残基間でシグナルが重なり、長距離相関の分離が困難であったことが制約要因となった。したがって、当初目標である全残基の完全帰属には一部未達の点が残るが、主要骨格構造の同定および構造モデルの高度化という点では当初計画を概ね達成したと評価できる。

### 成果発表

Exploring protein N-glycosylation in ammonia-oxidizing Nitrososphaerota archaea through glycoproteomic analysis

Nakagawa S, Yagi H, Suyama T, Shimamura S, Yanaka S, Yagi-Utsumi M, Kato S, Ohkuma M, Kato K, Takai K  
mBio 2025, e0385924.

DOI:10.1128/mbio.03859-24

### 今後の展開

本研究で対象とした糖鎖は反復構造を多く含むため、超高磁場 NMR 装置を用いてもシグナルの縮重が観測され、残基間の完全な帰属には技術的制約が残った。今後は、この課題を克服するために、難培養微生物に適用可能な安定同位体標識法の確立を進める。具体的には、培養液中の炭素源を<sup>13</sup>C 標識化合物へ段階的に置換し、代謝系を介して糖ヌクレオチドおよび糖鎖へ選択的に標識を導入する戦略を構築する。これにより、異種核相関スペクトルの分解能向上およびシグナル重なりを解消を図り、高感度かつ高精度な構造解析を可能とする。さらに、本手法を環境由来アーキアや未培養系統へ展開することで、難培養微生物の糖鎖多様性解明に資する基盤技術の樹立を試みたい。

## **3. 社会・経済への波及効果の見通し**

本研究で確立した NMR を基盤とする糖鎖構造解析技術は、難培養微生物を含む多様な生物資源の分子機能解明を加速する基盤技術であり、環境・産業分野への波及効果が期待される。特に、アンモニア酸化アーキアは地球規模の窒素循環を担う中核微生物であり、その糖鎖修飾機構の解明は、土壌改良技術や排水処理プロセスの高度化、さらには温室効果ガス排出制御の最適化に資する可能性がある。本研究により確立した安定同位体標識と NMR を統合した解析基盤は、未培養・難培養微生物由来糖鎖の精密構造解析を可能とし、未利用バイオリソースの機能開拓や新規酵素・機能性材料の創出へと展開し得る。これらの成果は、バイオ産業の高度化に貢献することが期待される。

## **4. 利用における感想(改善要望等を含む)**

本課題の実施には、糖鎖由来の NMR スペクトルが縮重するため、超高磁場 NMR 測定が必要不可欠である。自然科学研究機構・生命創成探究センターで、NMR 測定を実施することができ、本研究を進める上で大いに役

立った。計測から解析まで親切にご対応いただき、感謝している。

#### 5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

引き続きご支援をよろしくお願いしたい。

#### 6. 成果公開延期の希望の有無

( ) あり : ( ○ ) なし

「あり」の場合理由:

#### 7. その他

#### 8. 利用施設

生命創成探究センター

溶液 800MHz

利用期間 1: 2024 年 1 月 19 日～2024 年 1 月 21 日

利用期間 2: 2024 年 6 月 1 日～2024 年 6 月 2 日

#### 9. その他の利用施設