

# P-8

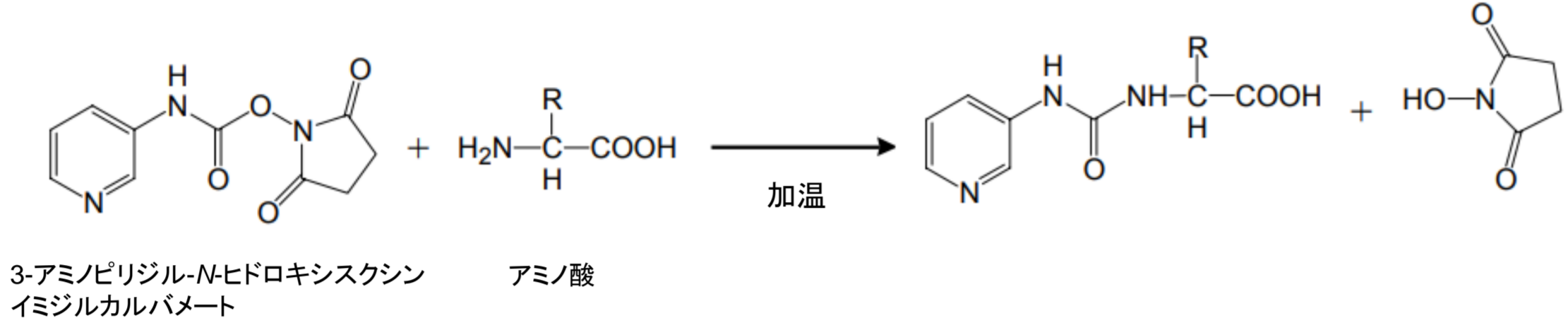
## 質量分析法を用いたバクテリアのペプチドグリカンアミノ酸構造決定法の開発

浜田 盛之 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)

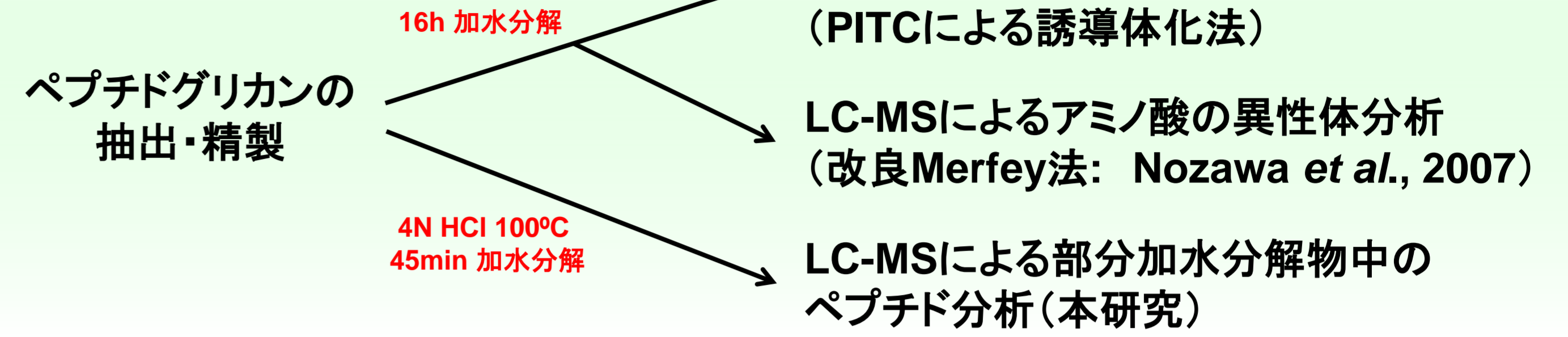
### 目的

ペプチドグリカンは細菌の細胞壁の主要構成成分であり、ペプチドグリカンのアミノ酸構造によって定義されるペプチドグリカンタイプ(Schleifer & Kandler, 1972)は、分子系統による分類と高い相関性を示すことから、グラム陽性細菌における主に属レベルの指標として広く用いられている。現在多くの分類学者は新規分類群の提唱に際し、ペプチドグリカンの加水分解物をTLCやHPLCを用いて分析し、含まれるアミノ酸の種類や量比からペプチドグリカンタイプを推定しているが、新規もしくは複雑な構造になると推定が困難となる。本研究では、従来のTLCに代えて質量分析装置を用いることで、正確かつ客観的なデータに基づき、簡便で信頼性の高いペプチドグリカンアミノ酸構造決定法を開発することを目的とした。

### 誘導体化反応



### 構造決定の流れ

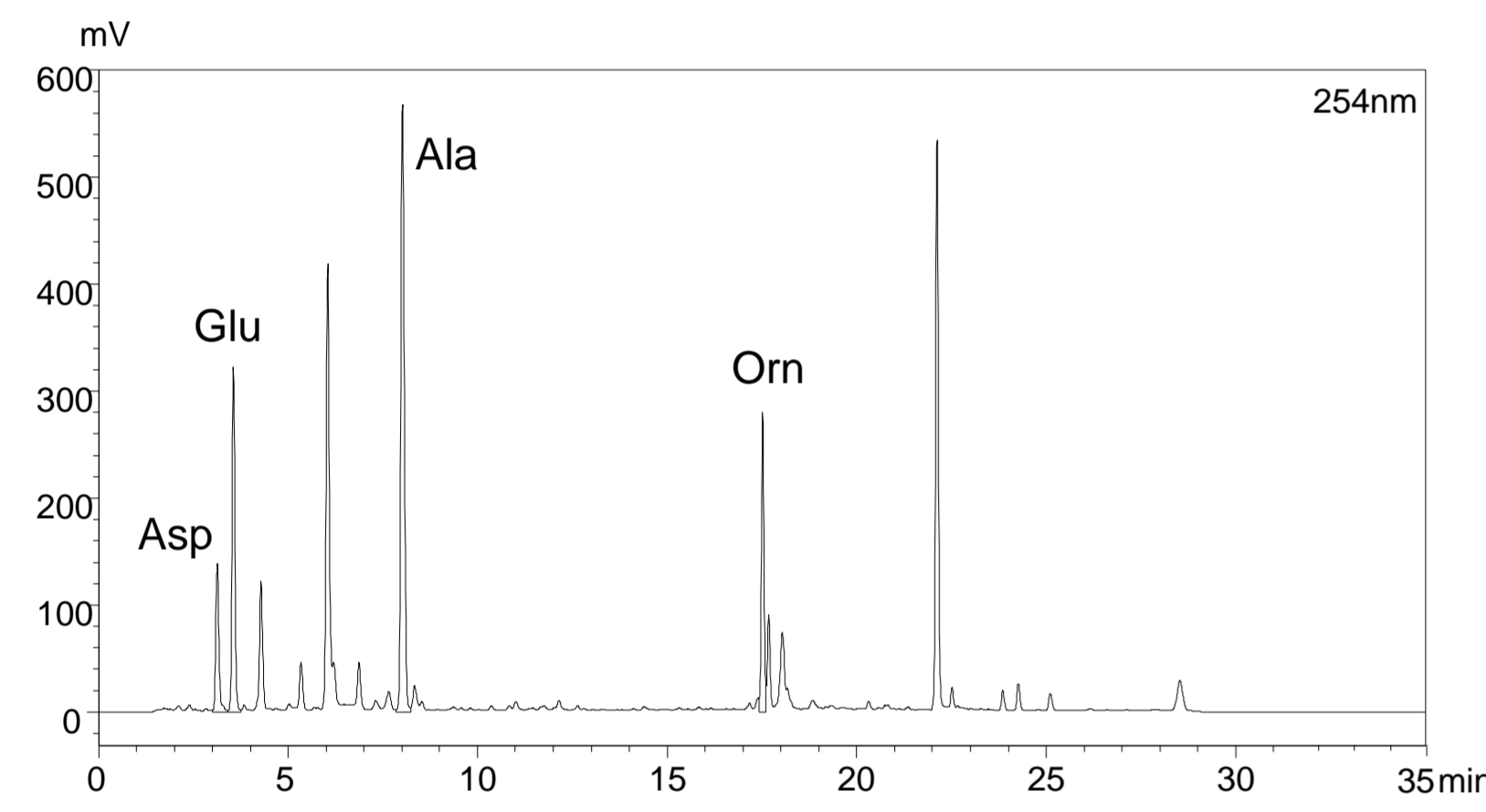


### 材料と方法

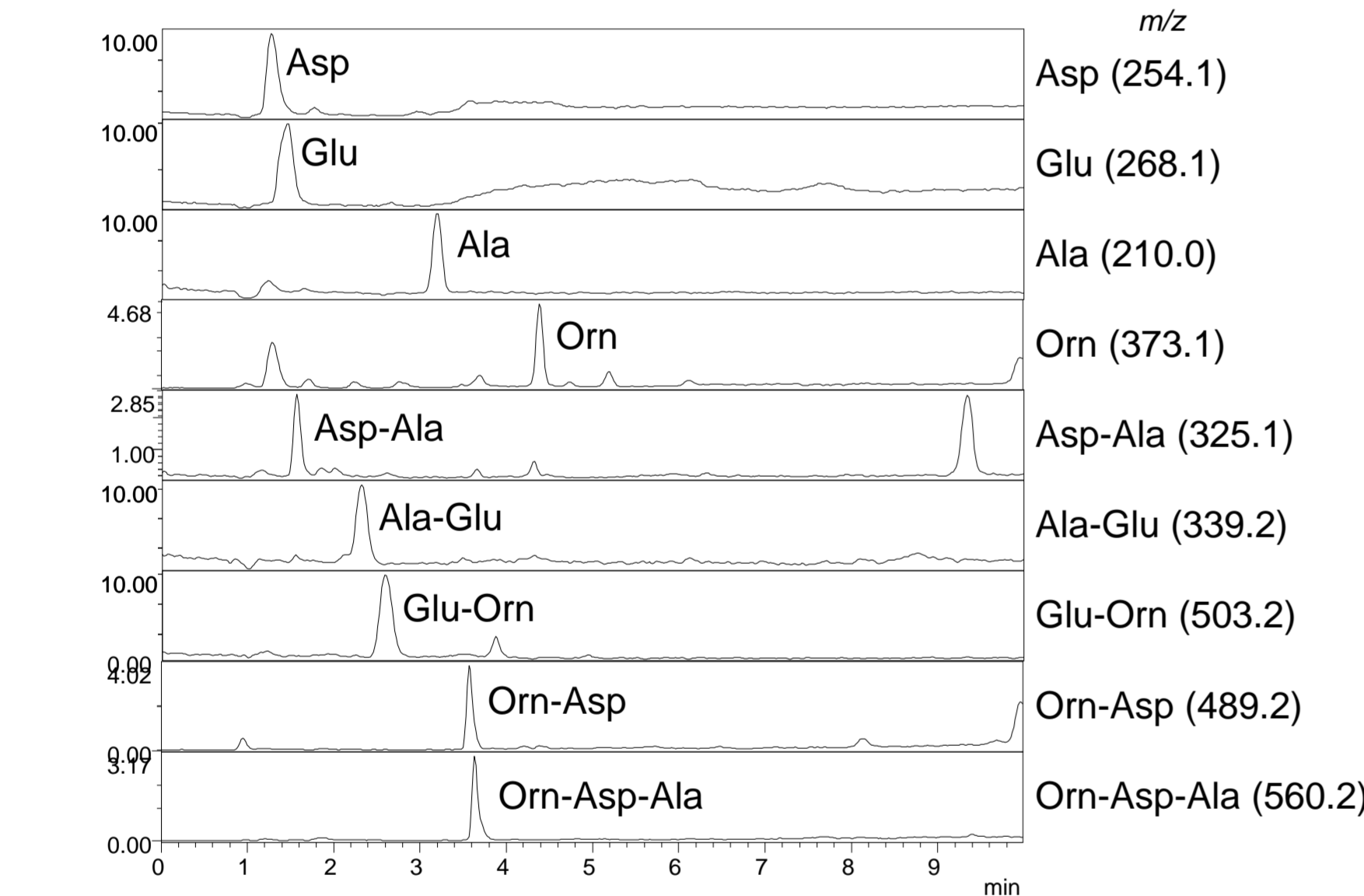
詳細なアミノ酸構造が決定されているアクチノバクテリア *Cellulomonas flavigena* NBRC 3775<sup>T</sup> と *Oerskovia turbata* NBRC 15015<sup>T</sup>、そして新奇なペプチドグリカン構造が示唆されていた *Arenivirga flava* NBRC 112289<sup>T</sup> を分析対象とした。

各株の湿菌体1gを超音波破砕器にて破砕し、遠心分離により未破砕の細胞を除いた。SDSで100°C 40分間煮た後、滅菌水で3回洗ったものを凍結乾燥してペプチドグリカンサンプルを得た。このサンプル1mgを4N HClで100°C 45分間加水分解した後、3-アミノピリジン-N-ヒドロキシスクシニミジルカルバメート(APDS)で誘導体化し(左図)、逆相系カラムを使用したLC-MSで分離し、各アミノ酸およびペプチドを分子量から同定した。

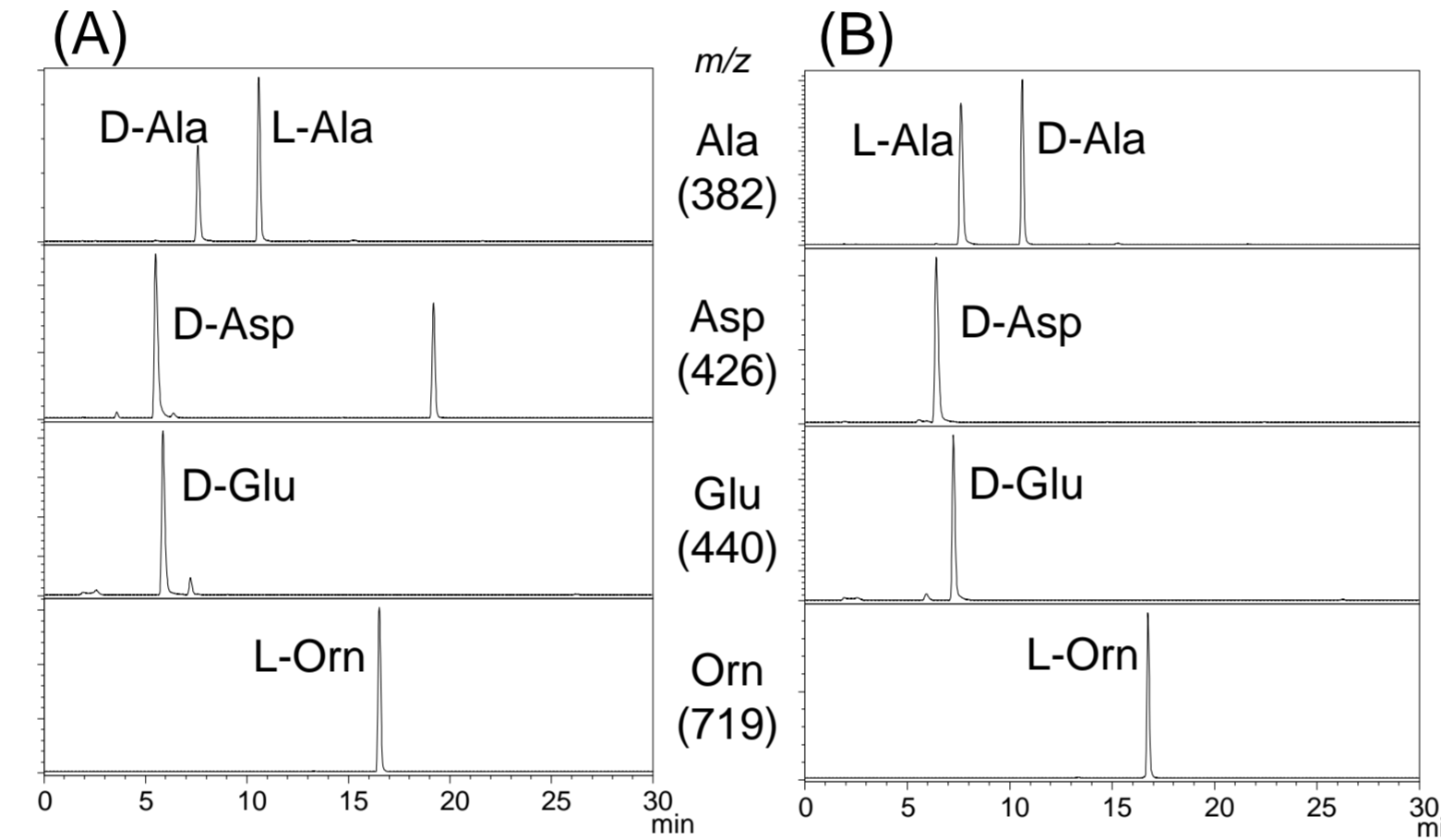
### *Cellulomonas flavigena* NBRC 3775<sup>T</sup>



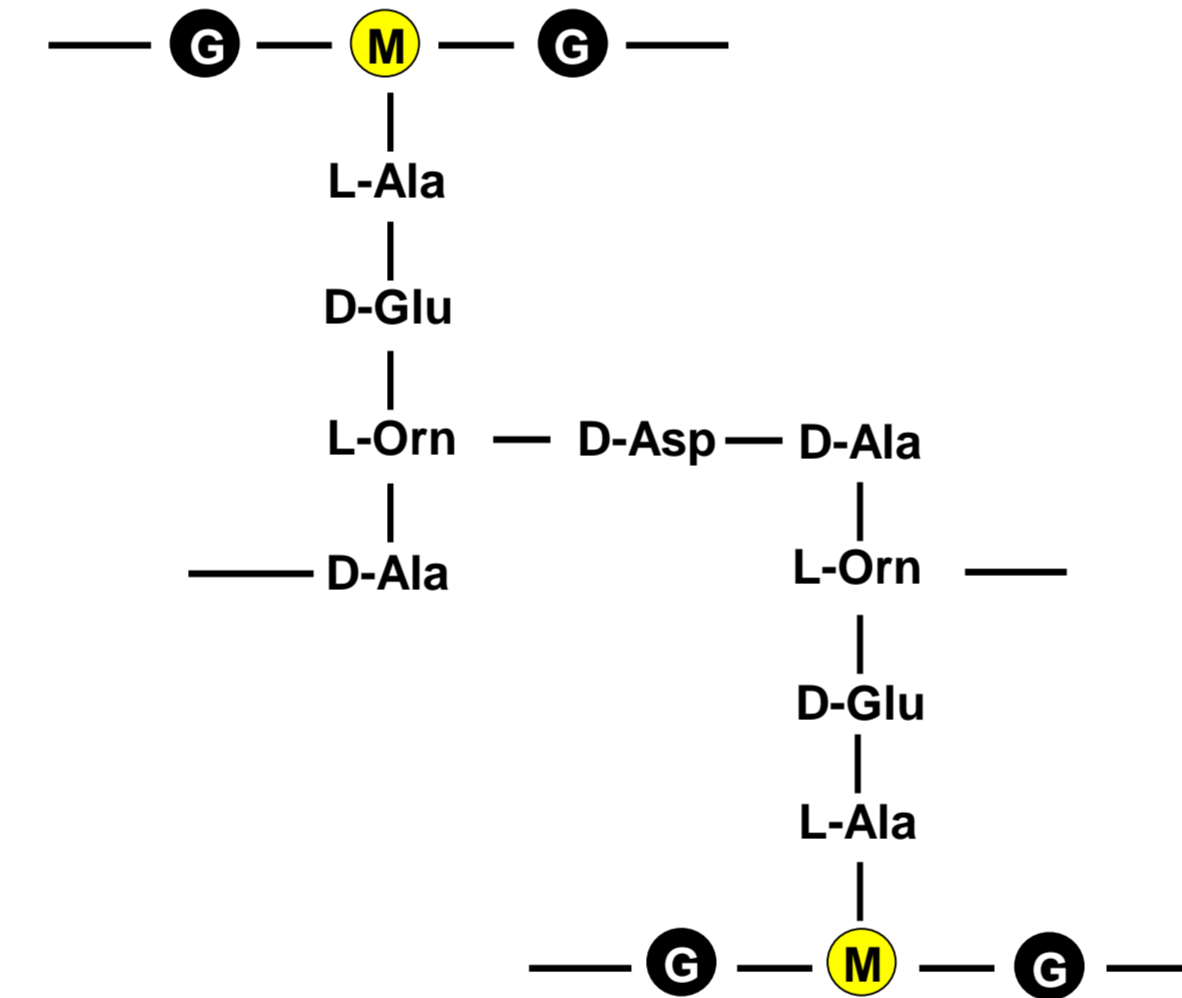
ペプチドグリカン完全加水分解物中のアミノ酸の定量分析結果



ペプチドグリカン部分加水分解物中のアミノ酸・ペプチドの分析

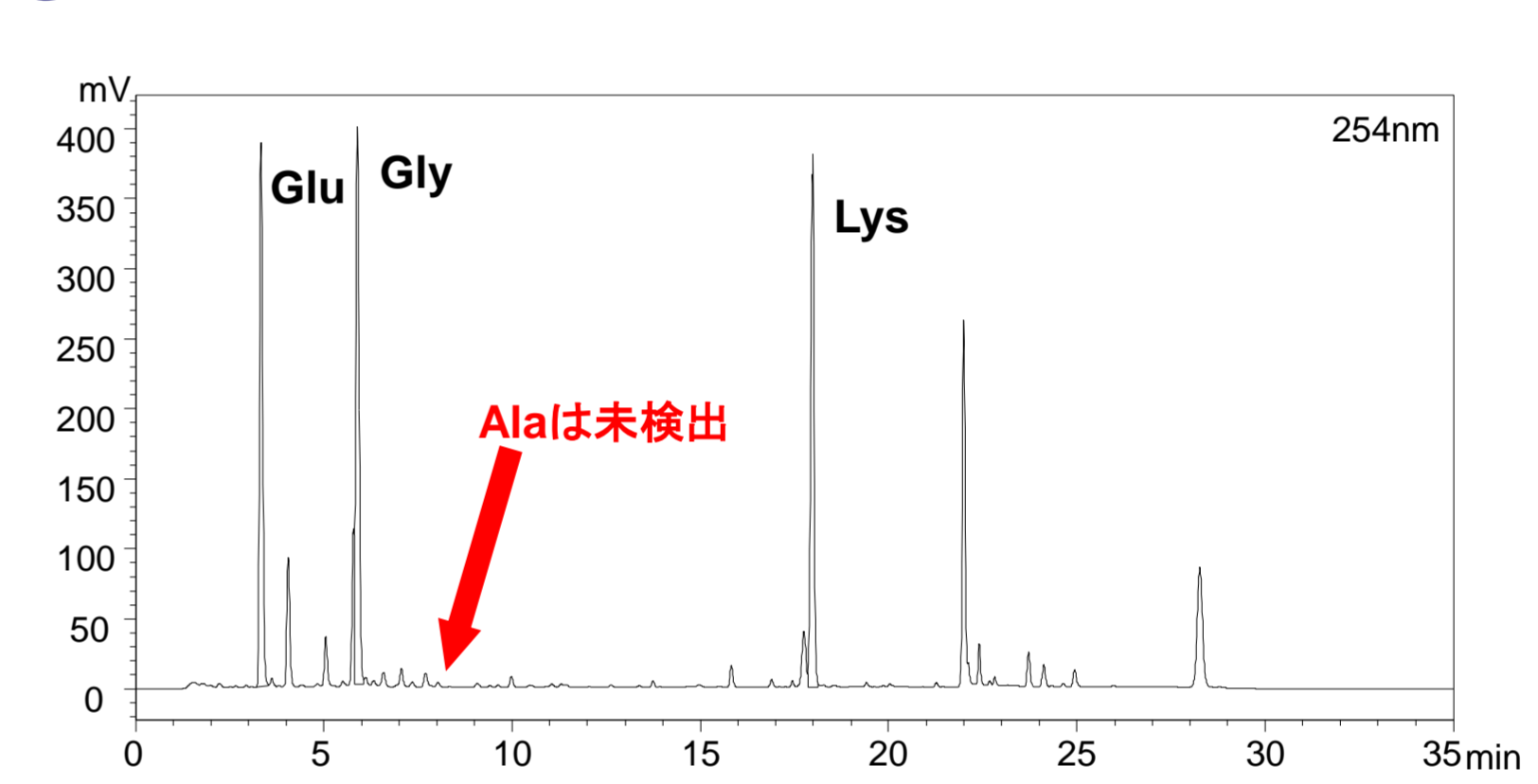


ペプチドグリカン加水分解物中のアミノ酸の異性体分析結果 (A), D-DLA誘導体; (B), L-DLA誘導体

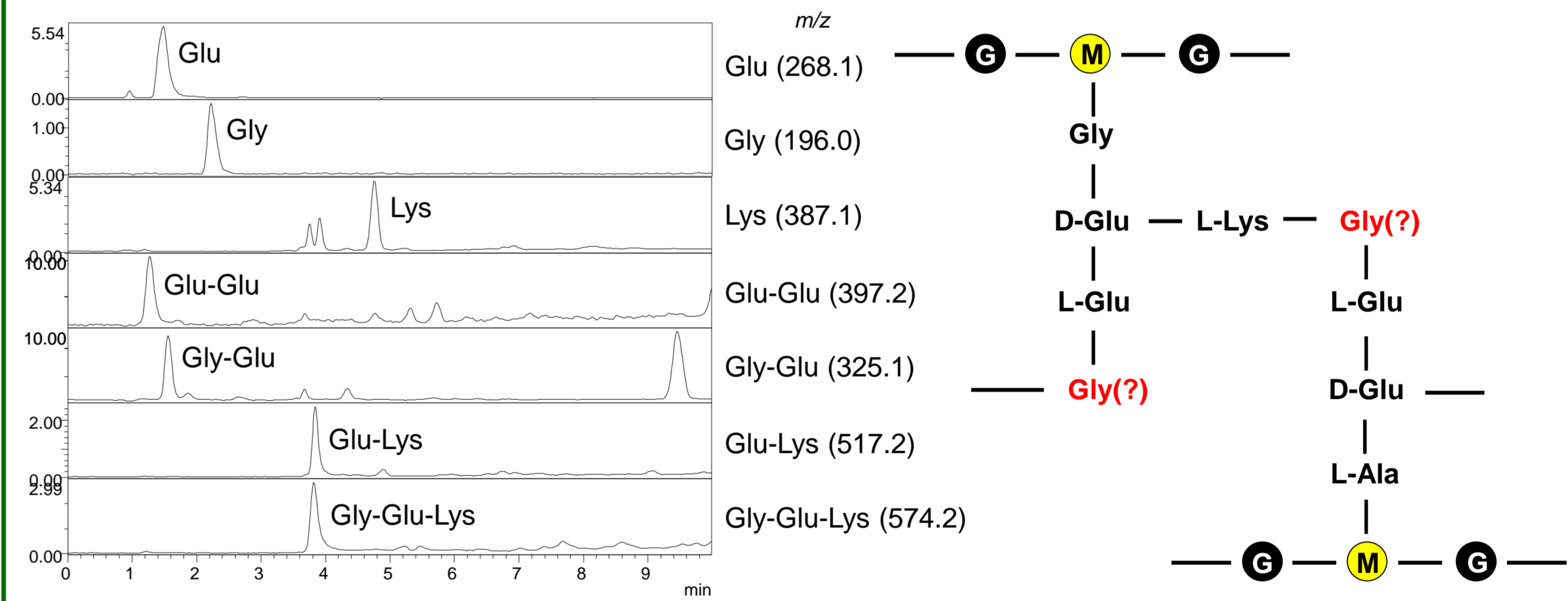


*Cellulomonas flavigena* NBRC 3775<sup>T</sup>の推定ペプチドグリカン構造

### *Arenivirga flava* NBRC 112289<sup>T</sup>



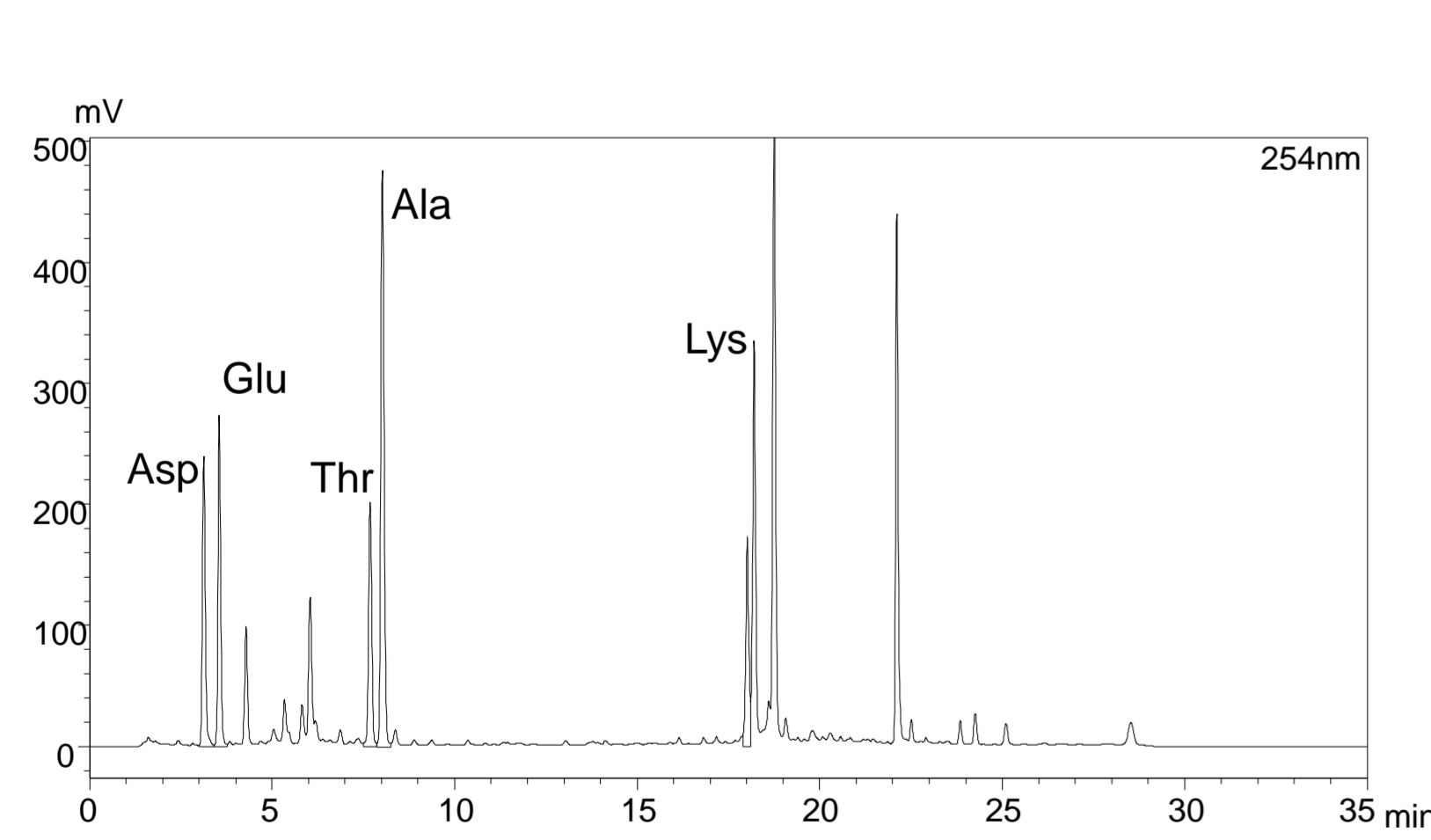
ペプチドグリカン完全加水分解物中のアミノ酸の定量分析結果



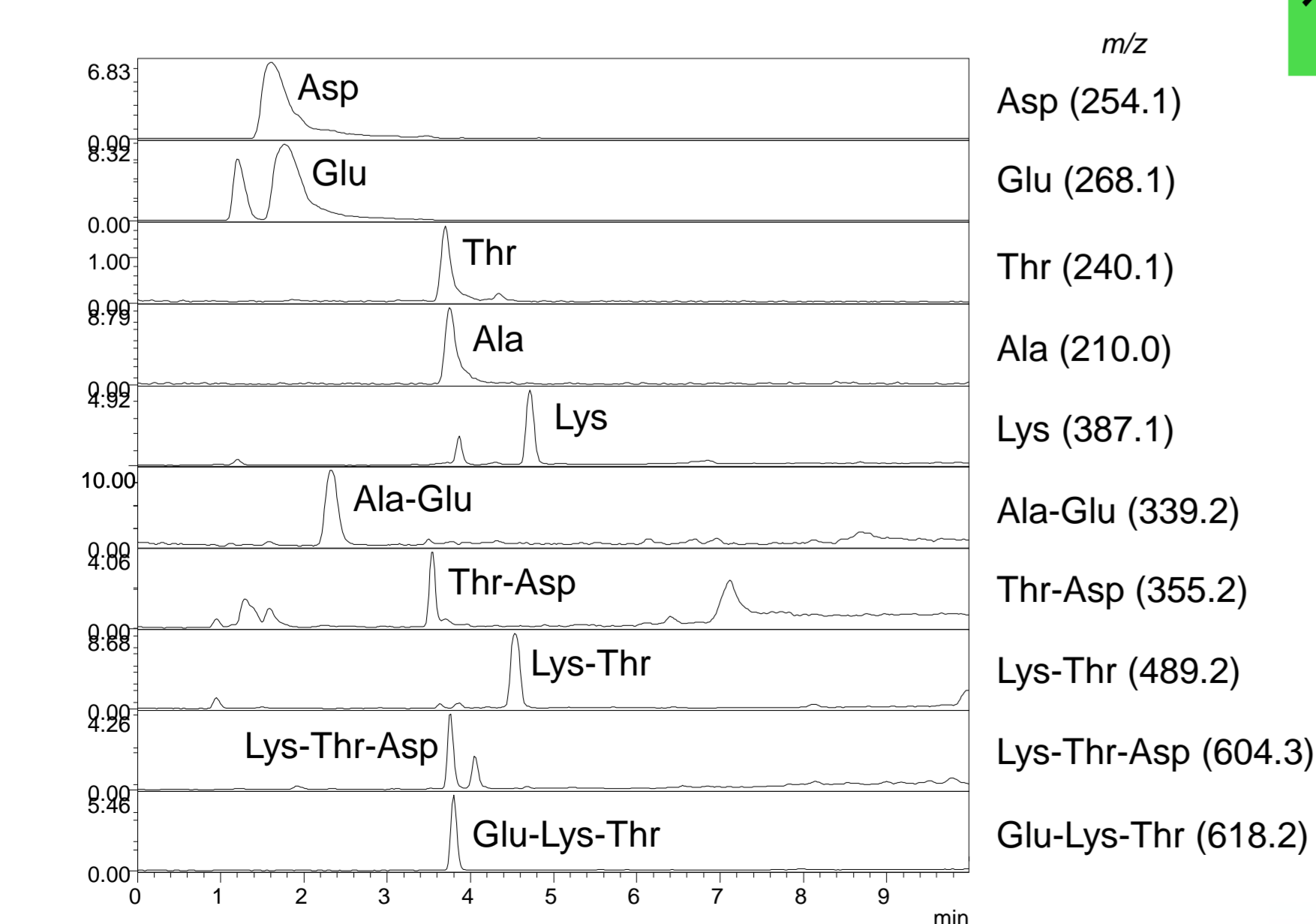
ペプチドグリカン部分加水分解物中のアミノ酸・ペプチドの分析

*Arenivirga flava* NBRC 112289<sup>T</sup>の推定ペプチドグリカン構造

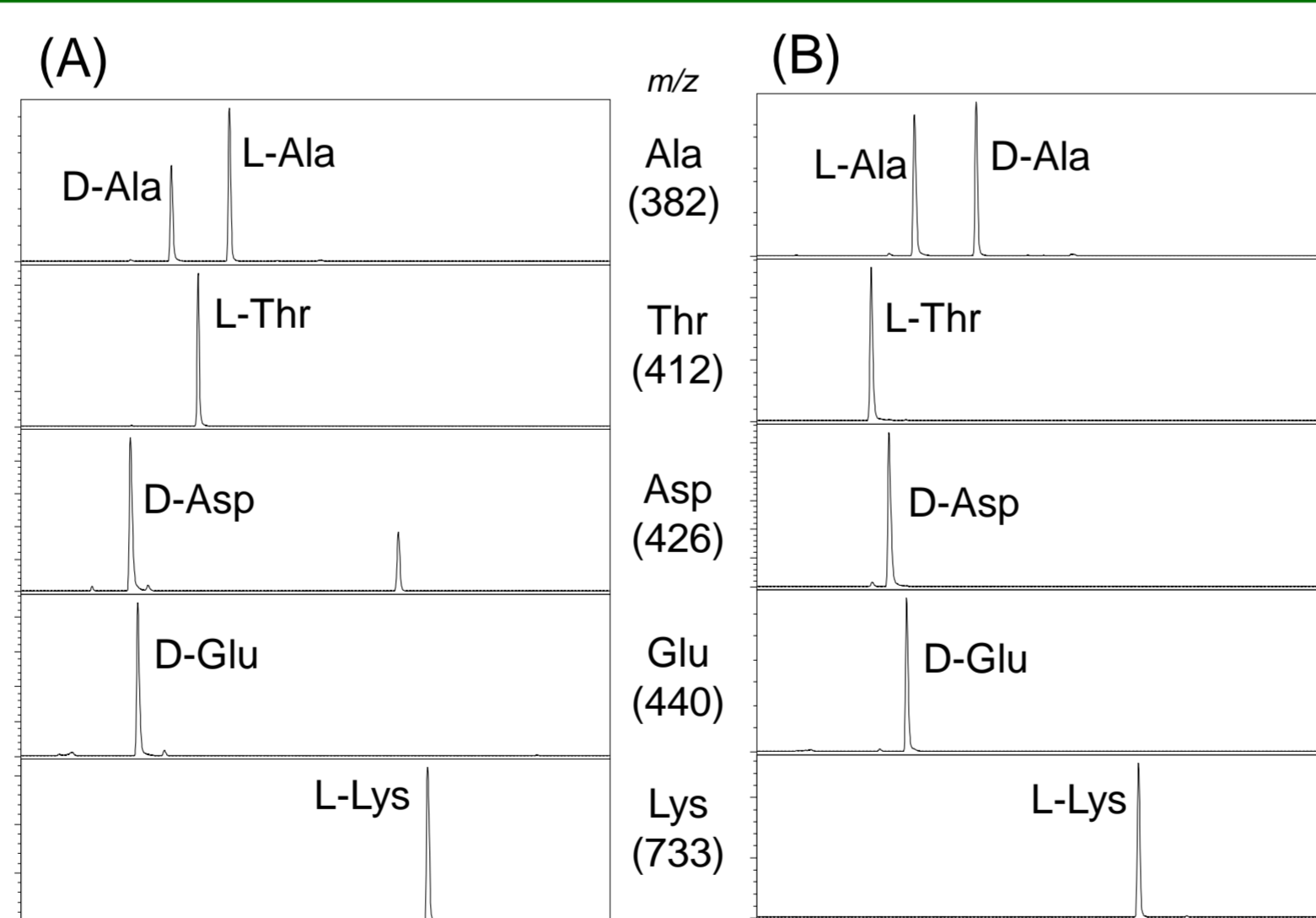
### *Oerskovia turbata* NBRC 15015<sup>T</sup>



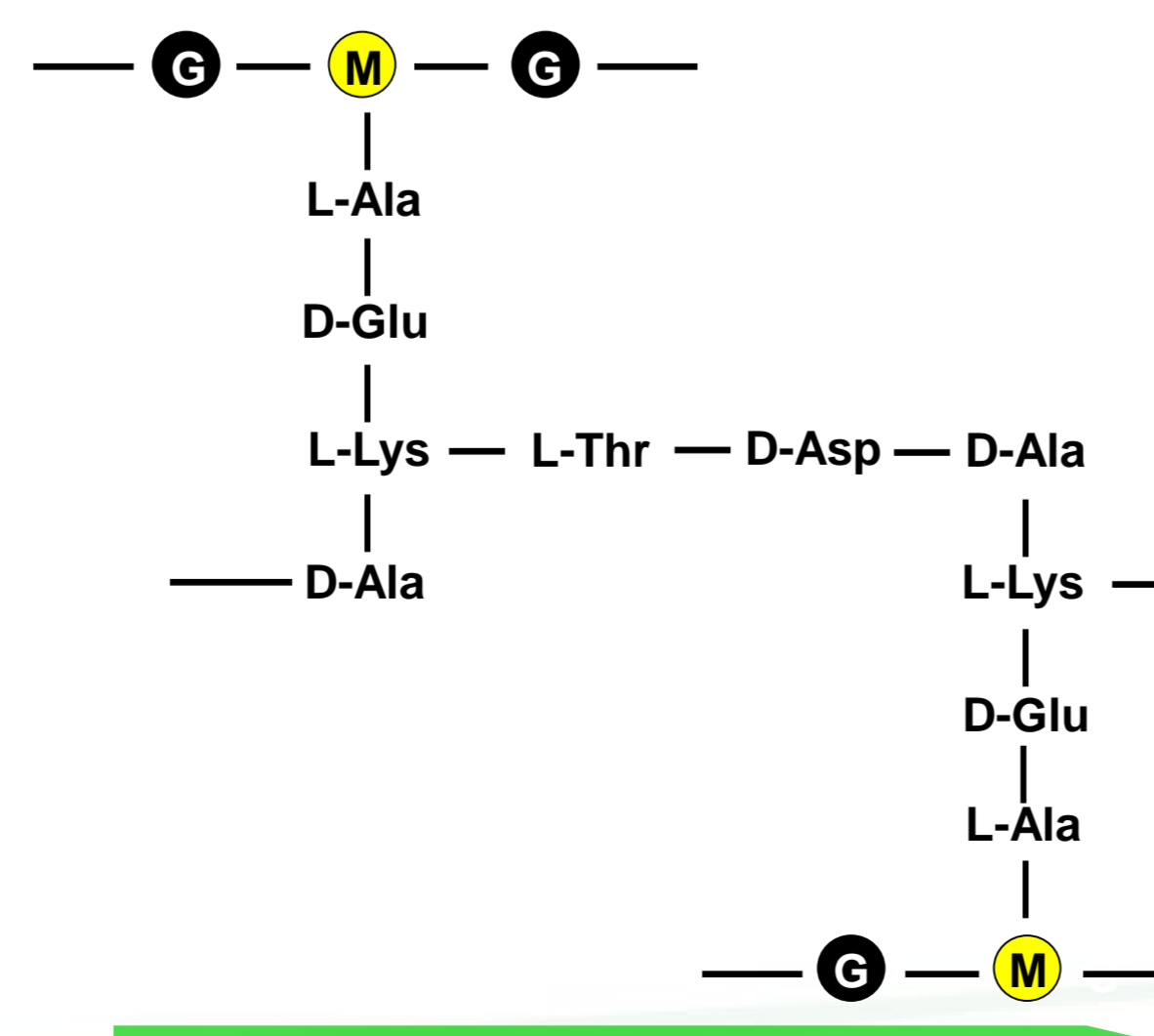
ペプチドグリカン完全加水分解物中のアミノ酸の定量分析結果



ペプチドグリカン部分加水分解物中のアミノ酸・ペプチドの分析



ペプチドグリカン加水分解物中のアミノ酸の異性体分析結果 (A), D-DLA誘導体; (B), L-DLA誘導体



*Oerskovia turbata* NBRC 15015<sup>T</sup>の推定ペプチドグリカン構造

### 結果と考察

- LC-MSによるアミノ酸およびペプチドの検出手法を検討したところ、APDSによる誘導体化法が最も適していた。
- ジペプチドおよびトリペプチドが多く残存する加水分解条件を検討したところ、4N HCl 100°C 45分間が最適であった。
- C. flavigena* NBRC 3775<sup>T</sup> と *O. turbata* NBRC 15015<sup>T</sup> の細胞壁サンプルを用いて分析したところ、構成成分のアミノ酸に加えて複数のジペプチドやトリペプチドが検出された。
- 従来のアミノ酸定量分析および異性体分析から得られた結果と併せて判断すると、既報のペプチドグリカンアミノ酸構造と一致することが示唆された。
- Alaを持たないという新奇なペプチドグリカン構造が予想される *Arenivirga flava* NBRC 112289<sup>T</sup> についても分析を行ったところ、従来の手法の結果から推測していたアミノ酸構造を支持するデータが得られたが、最終的な構造決定には至らなかった。
- アミノ酸やペプチドの種類により検出感度に差があるなど課題も残されているが、本手法を従来の分析と組み合わせることで、より詳細なアミノ酸構造を予測・決定できると考えられる。

[HPLC測定条件 (LC-20AB; 島津)]	[MS測定条件 (LCMS-2020; 島津)]
Column : Wakopak Wakosil-II 3C8-100HG (2.0mm × 100mm)	ESI, SIM (posモード)
Eluent : A) アミノタグワコ-溶解液	Probe voltage : 4.5kV
B) 60%アセトニトリル	Nebulizing gas flow : 1.5L/min
0-0.01min B 5-10%	Block heater temperature : 220°C
0.01-0.5min B 10-12%	CDL temperature : 250°C
0.5-0.51min B 12-20%	CDL, Q-array voltages : 1.5kV
0.51-7.75min B 20-45%	
7.75-7.76min B 45-49%	
7.76-10.0min B 95%	
10.0-15.0min B 5%	
Flow Rate : 0.3 ml/min at 40°C	