談話室

細菌表面のニードル状超分子

国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター

久堀智子

帝京大学理工学部バイオサイエンス学科

相沢慎一

1. はじめに

我々は最近、サルモネラ菌細胞表層に針のように突出している構造体（ニードル状超分子）を見つけ、それが病原性に関わるものであることをつきとめた¹⁾。構造が先にわかってからその機能が判明するという、通常の実験的アプローチとまったく逆の経過を辿ったこの研究は、幸運なことに現在ホットな話題となっている細菌感染の分子論的研究に大きな寄与をもたらした。この逆行型の研究の進め方は決して一般的ではないが、場合によっては有効な方法だろう。暗中模索で実験を進めた我々の実感を交えながら、ニードル状超分子の実体解明に至った経緯をお伝えしようと思う。

2. これは一体何？

我々がその奇妙な構造体を見つけたのはかれこれ10年ほど前のことだった。当時、我々は細菌べん毛の構造的解析を主として行うプロジェクトに参画しており、電子顕微鏡を用いてサルモネラ菌べん毛の根本の部分を詳細に観察していた。その時、べん毛基部に非常によく似ているが、針状の突起を細胞外に出している構造体が目にとまった（図1A）。この「針」は細胞あたり数十から百個のオーダーで存在した。その特徴ある形態から、細菌にとって何らかの重要な役割を果たすものであることは想像に難くなかったが、「これが一体何であるか？」という問いに答えるには当時の知見は少なすぎた。後に我々はこの構造体の実体を明らかにすることに成功したが、それは細菌の病原性研究にとって画期的でき事となった。実はその分野の研究者た

図1 (A) オスモティックショック法を用いて可視化したサルモネラ菌細胞表層の構造。(B) 単離したニードル状超分子。いずれもネガティブ染色による電子顕微鏡像。

ちが探し求めていたもの - 病原細菌が宿主に病気を起こさせるために必要な、毒素等の因子を送り込むための輸送装置 - であったのである。

3. 偶然がもたらしたもの

この構造体を見つけることができたのは、いくつかの偶然の結果だと言って良い。細菌の表面に存在するべん毛を観察するために我々が採った手段のひとつは、オスモティックショック法と呼ばれるものだった。無処理の菌体を透過型電子顕微鏡で観察しても菌体の影で膜表面のべん毛基部構造は観察できない。そこで、浸透圧ショックによって細胞の内容物を取り除いて、細胞膜が透けて見えるような処理をするわけである。この処理のお陰で微小な「針」を細胞表面に見いだすことができた。また、我々が対象とした細菌は大腸菌ではなく、たまたま病原性のあるサルモネラ菌であった。これは明治大学

Supramolecular Structure on the *Salmonella typhimurium* Cell Envelope

Tomoko KUBORI* and Shin-Ichi AIZAWA**

* Structural Biology Center, National Institute of Genetics

**Department of Biosciences, Teikyo University

図2 ベン毛基部体とニードル状超分子の構造の比較。

の山口滋先生がこつこつと行ってこられた膨大なサルモネラ菌べん毛の遺伝子解析の賜である。

4. ニードル状超分子

その構造体を細胞膜から単離して観察すると構造の詳細が見えてきた。それはべん毛基部体と同様細胞内膜と外膜に渡って構築されており、各々の膜上に2枚ずつあるリングとそれらを繋ぐロッド、さらに細胞外に突出した針の部分から構成されている。十種類程度のタンパクから構成されていると考えられる超分子である（図1B）。先端の針の部分は電子顕微鏡で中心に染色が入っていることから、べん毛繊維同様空洞になっていると考えられる。基部の大きさは直径が約40 nm、高さ約40 nm、針の部分は直径が約13 nm、長さ約80 nmである。基部の大きさはべん毛の基部とほぼ同じである（図2）。

これほどべん毛に似ているので、我々は当初、ニードル状超分子はべん毛の構築途上の未同定の中間体ではないかという仮説を立てた。これを確かめるために、べん毛遺伝子すべての発現を支配する遺伝子の欠失株を観察した。この株にもニードル状超分子が見つかったことから、この可能性は否定された。実は、我々がつけるより以前、1976年に同じ構造体を写真に収めた人たちがいた²⁾。彼らもこの構造体をべん毛の中間体の一種であると受け取っていた。

当時我々は、この構造体と病原性との関連については想像だにしていなかったが、この構造は他の細菌にもあるだろうか？という疑問に対しては行い得る手だてがあった。我々ができることはとにかく「見ること」だった。系統の異なる大腸菌野生株をあちこちから譲り受け、片っ端から調べていった。「針」はどの株にも見い

だされなかった。大腸菌には必要なくて、サルモネラ菌に必要な器官とは何だろう。この疑問を抱えたまま、この問題はしばらくの間あたためられることとなった。

5. 機が熟して

ニードル状超分子に対して打つ手がないまま本来の研究課題に没頭していた数年間に、べん毛研究は新たな局面にさしかかっていた。運動性をもたらす回転機構の解明の他に、タンパクを特異的に輸送する器官としてのべん毛の働きに学界の目が向けられつつあった。べん毛はそれ自身を構成するタンパクを細胞外に輸送する輸送器官としての働きも兼ね備えている。べん毛の回転リングの下にはさらに複雑な構造体が存在することがわかってきており、その構造体には回転機能の実現に必要な装置とべん毛特異的輸送装置とが含まれることが示唆されていた³⁾。

べん毛特異的輸送装置を構成する成分が遺伝子あるいはタンパクのレベルで解明され、その配列が示されたときある事実が浮かび上がった。それらのタンパクと仮想の病原性因子輸送装置を構成するタンパク群との間で一次配列上の相同性が見つかったのである。能動輸送のためには何らかのエネルギー供給が必要であるが、一つのタンパクにはATPase活性が見いだされ、病原性遺伝子産物にもATPase活性のあるホモログが次いで見つかり、輸送装置の存在にはにわかに現実味を帯びてきた。

これらの研究成果を横目で見ながら、我々の頭にはある考えが巡っていた。配列類似性から想像される構造類似性。個別に想定された類似の機能をもつ器官の存在。昔見たべん毛基部にそっくりな構造体がこれであると考えるもおかしくないのではないか。細菌の膜上には多くの超分子が存在するであろうし、それらの中で形態の類似性があっても不思議ではない思いながらも、ニードル状超分子を病原性因子輸送装置であると仮定してさまざまな関連文献を調べても一点の矛盾も見いだされないことに気づいていた。

6. 実体の証明

我々は上のような期待を抱きながら、ニードル状超分子の構成成分を同定するための努力をした。方法はひとつしかない。超分子を生化学的解析に十分な純度で精製することである。ここでも幸運なことに、べん毛の中間体単離のために長い年月をかけて確立した方法がそのまま適用できた。膜を溶かして細胞膜上のタンパクを分離し、超遠心法を用いて分子集合体だけを単離する。さらに塩化セシウムによる密度勾配遠心によ

り目的の構造体を精製する方法である。電気泳動で分離されたタンパク成分をアミノ酸解析し、既知のタンパクの配列と照らし合わせる。主要タンパクの解析結果が初めて出たあの秋の一日のことは忘れることができない。それはまさしく望んでいたものだった。

しかし、検出されたタンパクのアミノ酸配列が一致したというだけでは証明とは言えない。我々はサルモネラ菌の病原性については第一人者であるニューヨーク州立大学の Jorge Galan 博士の協力を請うことにした。Galan 博士のもとで病原性遺伝子の一連の変異株や特定タンパクに対する抗体を作っていたが、こちらで免疫電子顕微鏡法を行った。構成成分と考えられるタンパクをコードする遺伝子が欠失するとニードル状超分子ができないこと、構成成分の一つと考えられるタンパクの抗体はニードル状超分子の特定の部位に反応したこと、この二つの結果から我々はニードル状超分子が病原性因子輸送装置であることを確信した。

7. 病原性因子輸送装置

病原性因子輸送装置は、これまで病原細菌の遺伝学的研究から「存在するはずのもの」として想定されており、病原性を実現するのに必要な遺伝子群のうちいくつかがその構成タンパクをコードしていると考えられていた⁴⁾。それは主として、これらのタンパクの予測される配列が細胞内膜あるいは外膜上に存在するタンパクであることを示唆するという理由からであった。これらの情報を元に「病原性因子輸送装置」なるものの模式図がいろいろな総説を飾りたてていたが、それらは所詮絵に描いた餅だったわけである。実体がわかってみるとその絵と矛盾する点はなかった。さらに、我々が見つけたニードル状超分子の特徴的な構造である「針」は、病原細菌が宿主の細胞にとりついた後始めに行う操作「毒素注入」の目的にまさに適った形態をしている。ただし、この「針」が実際に病原性因子を送り込む目的で使用されるかどうかの厳密な意味での証明は今後の課題である。

8. 終わりに一広がる展望一

細菌による感染症は病原細菌と宿主との相互作用の結果である。この相互作用の機構解明に対して、我々は細菌側からアプローチをしたことになる。細菌側の機構の要であり、感染成立の第一歩に重要な機能を果たす器官を構造的に捉えることに成功した。しかしべん毛研究がそうであったように、構成成分の個々の働き

を丁寧に追っていき、輸送のメカニズムを解明するにはまだ長い道のりを要するだろう。細胞内でこの装置の機能を助けている分子や送られる対象となる因子の認識機構についても知らねばならないし、さらに重要なことは宿主細胞に接触した時点でどうやってその内部に因子を送るのかを明らかにしなければならない。

宿主細胞は病原菌との最初の接触後、形態を変化させ食作用で細菌を呑み込む。さらに多段階の複雑な経路の末宿主は発病に至る訳だが、このプロセスは異なる生物種間の分子レベルでのコミュニケーションの仕組みについて興味深い問題を数多く提起している。お互いが相手を利用しながら、一方で自分の身を守る機構を持っているのである。この分子機構はまだまだ不明点が多い。

O-157 を代表とする近年の細菌感染症についての報告は抗生物質が期待ほど効を奏しないことを示している。細菌感染症の予防や治療のためには感染の分子機構を解明する必要があるだろう。たまたま、今回は構造から研究が出発した訳だが、機構の解明は構造の解明と表裏一体であると考え。この二つは相補しあうもので、いずれか一方だけでは正しい答えを導くことは難しいだろう。また、構造の解明は研究の終結ではなく、新たな問題提起への一歩であることは言うまでもない。

この研究を価値あるものに仕上げることできたひとつの大きな要因は、研究の機が熟した時を適切に捉えたことにある。我々にとっての研究の成功は見方を変えれば分野に対する貢献を意味する。生命の根元を問う普遍的な問題意識を持続けることは必要なことだが、一方で、学問や世の中の潮流の中で回答を求められている問いが何であるかを念頭に置くことは研究成果を生かすために重要なことだと考える。

文 献

- 1) Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.-I. (1998) *Science* **280**, 602-605.
- 2) 飯野徹雄, 鈴木孝仁 (1967) 細胞 **8** (4), 2-14.
- 3) Macnab, R.M. (1996) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. (Neidhardt, F. C., eds.) 123-145, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 4) Galan, J. E. (1996) *Mol. Microbiol.* **20**, 263-271.