細菌べん毛の基部構造

東京大学理学部 鈴木孝仁*
植物学教室

1. はじめに

細菌の運動器官であるべん毛は、菌体外にあるらせん型をした線維とその基部にあるフック、およびフックにつながって細菌表層膜に埋まった基体 (basal body) の少なくとも3部分から成立している。線維部分については、物理化学的方法と遺伝学的方法とがあいまって多くの独創的な仕事がなされてきた^{1,2,3}。フック部分は、線維の構成成分であるフラジェリンとは異なる単一のタンパク質から成り、鉤状円筒構造をしている^{4,5}。基体部分は、自己溶菌試料や超薄切片から得られる電顕像によってその存在が1950年後半から報告されてきた⁶。それらのなかには試料調製時に表層膜の一部がらぎれて袋状に基体をおおったものをべん毛基部の構造と見誤り、基粒 (basal granule) と記載したものもある。

基体の微細構造は、DePamphilisとAdlerによって基部を含むべん毛を系統的に分離する方法が確立されてはじめて明確になった^{7,8,9}。

2. 基部をもったべん毛の分離

DePamphilisとAdlerの方法の要点は次のようである。遠心集菌した対数増殖の細胞を、EDTA存在下でリゾチーム処理してスフェロプラストにし、非イオン性界面活性剤であるトリトンX-100を加えて溶菌させべん毛基部を膜から遊離させる。DNase処理を経て、次に25%硫酸で分画し、続いて低速と高速の遠心を繰り返し、最後に塩化セシウム密度平衡遠心により精製する⁷。

筆者はトリトンX-100の代わりにまずブリジェ-58を用いて溶菌させ、ほとんどのべん毛を膜分画に結合させたまま集め、次にトリトンX-100で処理してべん毛基部を遊離させる方法を開発した¹⁰。この方法では分離操作が簡便になるほか、後述する無べん毛突然変

異株からの不完全べん毛を検出するのに有効であった。

図1. グラム陰性菌におけるべん毛基部のモデルと細胞表層膜の構造。

3. べん毛基部の構造

図1にグラム陰性菌のべん毛基部モデルを示した。大腸菌、サルモネラ菌などの周毛菌 (べん毛が細胞表層に散在して着生) では、フックは一般に大きく曲がっている。しかし緑膿菌のように細胞極にべん毛が局在している極毛菌では曲がりが小さい (図2)。周毛菌はべん毛を束にして回転させながら直進する。個々のべん毛は基部に向かって反時計回りに回転する。方向転換の際にべん毛回転が時計回りになり、一時的に束がほどけ、数秒してから再び反時計回りに回転を始め再び束を作って新しい方向に進む¹¹。こうしたべん毛運動は極毛菌でも同様である¹²。しかしべん毛束形成には、周毛菌ではフックが大きく曲がる必要があり、極毛菌では、菌の進行方向とフックはほとんど平行に分布しているため曲がりが少ないと推定できよう。

基体は回転モータあるいはその一部と予想されている¹³。中心軸をなすロッド、細胞外表膜 (LPS膜) に結合しているLリング、ペプチドグリカン層に連絡しているPリング、細胞形質膜に接し、ペリプラズミッ

Morphogenesis of the structure of bacterial flagella.

* TAKAHITO SUZUKI, (Laboratory of genetics, Faculty of Science, University of Tokyo)

図2. 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のべん毛基部と試料傾斜・リンタンクス
 テン酸ナトリウム (pH, 6.8) 染色 × 400,000

クススペースに局在しているSリング、そして細胞形質膜に埋まったMリングから基体は成っている。さらにLリングとPリングの間にはフックとほぼ等しい径のシリンダ構造 (OCYと筆者が命名) が認められる。ロッド先端はフック内に一部入り込んでいる。緑膿菌ではLリングに二層の微細構造が認められる。分離したLPS膜分画と、分離した基部を含むべん毛とを、 Mg^{++} イオン存在下で再構成させると、LPS膜はLリングに特異的に結合し、またMリングとも弱い結合性を示すのが観察される¹⁴⁾。これらはLリングとPリング (およびSリングとMリング) の相違を示している。

支持膜上に散布された個々のべん毛基部を眺めると、4つのリングは厚さや形状が様々にみえる。これはべん毛基部が多様な傾きをもって染色液に浸ること、およびリングとフックあるいは線維との径が異なるために支持膜上で傾いてしまうためである。図2には緑膿菌べん毛基部を電顕中で試料傾斜させて撮影した結果を示した。矢印の方向は、試料を読者に向けて30°傾けたことを示す。試料傾斜と共に、見かけ上のリングの形状が異なってみえるのがわかるはずである。

グラム陰性菌とは細胞表層膜の構成を異とするグラム陽性菌では、外側の2つのリング (LリングとPリング) に相当する部分が欠いている^{8,15)}。この事実は、べん毛基部構成と細胞表層膜との密接な形成依存性を示唆している。

基体部分はタンパクからできていることは、大腸菌で³⁵S標識した細胞から分離精製した試料が約10個の異なるペプチドに分けられること¹⁶⁾から推定される。しかし、どの構造部分がどのタンパクに相当するかは不明である。また、べん毛基部に特有な酵素活性も知られていない。

4. べん毛基部形成と *fla* 遺伝子群の機能

アカバシカビの生化学的突然変異体を研究して一遺伝子-酵素説を確立することになった Beadle と Tatum¹⁷⁾の研究以来、生物の反応経路を突然変異で特異的に阻止し、反応中間段階を明らかにしていく方法は、生物現象の解明に広く有効性を発揮してきた。べん毛基部形成にも同様な解析法の適用が考えられよう。べん毛線維を失なって運動性の喪失した突然変異体を遺伝分析した結果、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) では約20にもおよぶ遺伝子 (*fla* シストロン) がべん毛形成に必要なことが同定されてきた^{18,19)}。また、べん毛線維構成成分であるフラジェリンの構造遺伝子 (*H*/および*H2*) に欠損をもった突然変異株には、線維の形態が異常なものほかに、べん毛線維の失なわれたものがあり、後者では、「フックと基体」 (*HOB*と命名する) ができていることが知られていた²⁰⁾。また *fla R* 突然変異株には、ポリフックと言って、フックが異常に長くなり線維の失なわれ

ることも報告されていた²⁰⁾。しかし、その他の *fla* 突然変異体には、不完全なべん毛構造は検出されていなかった。またポリフックのタンパクと野生型フックのタンパクとは差がみられず、基部を含めたべん毛構成成分に対する構造遺伝子は、フラジェリンのそれ以外には不明であった。これら *fla* 遺伝子の個々の機能が不明であった大きな理由は、べん毛基部についての知見が乏しかったことによる。筆者らは、前述した分画

法を *fla* 突然変異体に応用し、また菌に浸透圧ショックを加えて細胞外表膜上のべん毛基部を数える方法を開発して、不完全べん毛構造体を検出することができるようになった¹⁰⁾。分画中の構造体の定量には既知濃度のラテックス粒子を試料に加え、Brenner と Horne²²⁾ によるスプレー法などを用いた。また浸透圧ショック法は細胞ごとに基部構造の分析を調べられる利点がある。

図3. ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 野生型および *fla* 突然変異体に見られるべん毛基部構造。リンタングステン酸ナトリウム染色。Bar は100 nm. 1). 2). 3). 4) 野生型, LT 2株 5) *fla L* 突然変異株 SJW 801 6) *fla R* 突然変異株 SJW 880 7) *fla FV* 欠失突然変異株 SJW 1160 8) *fla FIV* 欠失突然変異株 SJW 1169 9). 10). 11). *fla FVIII* 突然変異株 SJW 1155 12) SJW 1155 株に、低頻度ではあるが線維のついたものも見出される。13). 14). 15) *fla FIX* 欠失突然変異株 SJW 1154 16) SJW 1154 株に、低頻度ではあるが線維のついたものも見出される。

図 4. べん毛形成と *fla* 遺伝子の機能に関するモデル。

fla 突然変異株に見出されるべん毛構造は図 3 に示し、またこれらの結果から示唆されるべん毛形成モデルを図 4 に示した。図 4 において遺伝子記号の示す点は、形成過程が突然変異によって阻止されていることを表わし、そのすぐ左側には、親株におけるべん毛と同じ頻度で構造体が認められるか、あるいは、迂廻した構造体が見出されるかを示している。このモデル設定の場合、より簡単な基部構造体は、複雑なものに比べて形成経路の前の段階にあること、親株のべん毛数に匹敵する基部構造体が突然変異株に見出される時に、その変異体で欠損した遺伝子機能は、次のより複雑な構造体に進む段階で必要であることを仮定した。HOB の先に線維が重合するまでは、フラジェリン構造遺伝子のほか *fla L*, *fla U* の機能を必要とする。これらの突然変異体の浸透圧ショックを施した細胞に高濃度のフラジェリンを試験管内で外から加えると、これら変異株のフック先端に、べん毛線維が重合するのが観察された²³⁾。一方、ポリフックになる *fla R* 変異株では、同じ条件でポリフック先端にフラジェリン重合が見出されなかった。そこで *fla R* の機能は、フックの長さの調節とフック先端におけるフラジェリン重合の開始の両方に必要と考えられる。

fla FV 突然変異株では基体に相当する構造体 (BAB) までができる。なお、この構造体は試料調製の過程で外側の 2 つのリングがはずれやすい (図 3)。べん毛形成が温度感受性になった突然変異株のうち *fla FV* にその変異がマップされる株では、低温でフックの曲がり異常になり、高温でフックと線維が失われる²⁴⁾。この株に *fla R* 突然変異をさらに導入すると、異常な曲がりのままポリフックになり、低温でも線維が失われた。またこの温度感受性株のフックタンパクと、*fla FV* の野生型フックタンパクとは、SDS を加えない電気泳動条件で差が認められた。そこで *fla FV* がフックタンパクの構造遺伝子である可能性が高い。*fla FIV* 変異株では、基体から L リングと OCY の欠

けた構造に相当するもの (CAS) が存在する。しかし、ロッド先端部にはフックは検出できない。一方、*fla FI* や *fla FIX* の変異株では「S リング + M リング + ロッド」(RIV) が存在するほか、ほぼ同じ頻度で RIV のロッド先端に、抗フックタンパク抗血清と反応する不定形フックのついた構造体 (HRV) がみられた。また *fla FVIII* 変異株では CAS のほか、CAS のロッド先端部に同じ様な不定形フックのついた構造体 (HCS)、さらに HCS に L リングに相当するリングの加わった (HOC) が低頻度に見出される。そこで *fla FIV* 変異株は、フック - OCY - L リングが同時に失われ、他方 P リングまではできるとみなされよう。故に *fla FIV* の機能は、電顕で検出できる構造の形成であるよりはむしろ、これら 3 つの構成成分を修飾してロッドに加わるようにするのか、あるいはロッドの側を修飾してこれらの成分が結合できるようにするかのいずれかを考える方が妥当である。そこで後者の仮定を採用して図 4 に示した。形成経路のうち、RIV 粒子には形態的には区別できずとも、この *fla FIV* の作用を受けていないもの (RIV_o) とすでにその作用を受けているもの (RIV_m) の二種類を想定する必要がある。そして *fla FIV* 変異株では RIV_o に P リングが加わった CAS_o という迂回産物が存在すると考えられる。P リング形成には *fla FI*, *fla FIX* の機能を必要とし、さらに OCY - L リングのいずれかの形成に *fla FVIII* の機能が必要と考えられる。

RIV 形成までには多くの遺伝子機能を必要としている。これらの遺伝子の突然変異体では、べん毛の基部構造に相当する構造体を検出できない。これら遺伝子のうちのあるものは、RIV 構造の構成に必要であろう。また、あるものは、細胞表層膜との相互作用に必要であろう。例えば、大腸菌 *gal U* 突然変異株は、細胞外表層形成に欠損を生ずる。この突然変異体ではべん毛形成も欠損する²⁵⁾。また RNA ポリメラーゼ欠損株でべん毛形成が欠損したり²⁶⁾、DNA 合成や細胞分裂の突然変異体でもべん毛形成が行われなくなること²⁷⁾が知られている。こうした細胞調節機構とも、*fla* 遺伝子のあるものは共軛して機能していると思われ、今後の研究が待たれている。

なお、*fla AII* 突然変異体には、基部構造の検出できないもの、形態的には親株のそれと区別できないべん毛を形成するのに回転運動の麻痺したもの、べん毛数の減少するものが同じシストロン内の変異にもかかわらず現われる。そこで *fla AII* の機能は、RIV 形成 (すなわち、ロッド、S リング、M リング) の形成と回転運動の両方に必要と考えられる。

今後, *fla* 突然変異体に存在する基部構造体を化学的に比較同定し, また遺伝子クローニングによる遺伝子産物の同定などの結果を組合せることによって, より詳細なべん毛形成の全容が明らかにできよう。

またべん毛形成が菌の内側から外側へ向かう極性が認められる。またその際にべん毛の各成分がどのように細胞表層を輸送され, 分配されるのかという疑問も, 将来に残された課題である。

謝 辞

最後にこの研究に際して御指導をいただいた東京大学理学部, 飯野徹雄教授, また小生を大いに叱咤激励してくださった名古屋大学理学部, 香川弘昭博士に心から感謝申しあげます。

文 献

- 1) S. Asakura: Adv. Biophys., 1, 99 (1970)
- 2) T. Iino: Bacteriol. Rev., 33, 454 (1969)
- 3) R. Kamiya, S. Asakura: J. Mol. Biol., 106, 167 (1976)
- 4) 香川弘昭, 朝倉昌: 細胞 8, 125 (1976)
- 5) H. Kagawa, K. Owaribe, S. Asakura, N. Takahashi: J. Bacteriol., 125, 68 (1976)
- 6) R. W. Smith, H. Koffler: Adv. Microbiol. Physiol., 6, 219 (1971)
- 7) M. L. DePamphilis, J. Adler: J. Bacteriol., 105, 376 (1971)
- 8) M. L. DePamphilis, J. Adler: J. Bacteriol., 105, 384 (1971)
- 9) M. L. DePamphilis, J. Adler: J. Bacteriol., 105, 396 (1971)
- 10) T. Suzuki, T. Iino, T. Horiguchi, S. Yamaguchi: J. Bacteriol. in press
- 11) R. M. Macnab, D. E. Koshland Jr.: J. Mol. Biol., 84, 399 (1974)
- 12) B. L. Taylor, D. E. Koshland Jr.: J. Bacteriol., 119, 640 (1974)
- 13) H. C. Berg: Nature, 254, 389 (1975)
- 14) M. L. DePamphilis: J. Bacteriol. 105, 1184 (1971)
- 15) K. Dimmitt, M. Simon: J. Bacteriol., 105, 369 (1971)
- 16) M. Hilmen, M. Simon: Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation and Motility (ed. R. Goddson, T. Pollard, J. Rosebaum) 3, 35, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1976)
- 17) G. W. Beadle, E. L. Tatum: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 27, 499 (1941)
- 18) S. Yamaguchi, T. Iino, T. Horiguchi, K. Ohta: J. Gen. Microbiol., 70, 59 (1972)
- 19) T. Horiguchi, S. Yamaguchi, T. Suzuki, T. Iino: To be published
- 20) S. Yamaguchi, T. Iino, T. Kuroiwa: J. Gen. Microbiol., 70, 293 (1972)
- 21) J. Patterson-Delafield, R. J. Martinez, B. A. D. Stocker, S. Yamaguchi: Arch. Microbiol., 90, 107 (1973)
- 22) S. Brenner, R. W. Horne: Biochim. Biophys. Acta, 34, 103 (1959)
- 23) 鈴木孝仁, 飯野徹雄: 日本遺伝学会第49回大会 (札幌 1977年9月)
- 24) 沓掛和弘, 鈴木孝仁, 飯野徹雄: 日本遺伝学会第49回大会 (札幌 1977年9月)
- 25) Y. Komeda, T. Icho, T. Iino: J. Bacteriol., 129, 908 (1977)
- 26) T. Yamamori, K. Ito, T. Yura, T. Suzuki, T. Iino: J. Bacteriol., 132, 254 (1977)
- 27) 西村昭子, 鈴木秀穂, 広田幸敬: 遺伝学雑誌, 50, 484 (1975)

(1978年1月12日受理)