

スピロヘータの運動メカニズム

中村 修一

はじめに

タイトルにある“スピロヘータ”は、本稿で取り扱う運動性細菌のグループを指す。スピロヘータの間には、ここ数年、特に若年層を中心に感染報告が急増している梅毒の原因菌 (*Treponema pallidum*) や、発生後の完全清浄化が難しい豚赤痢の原因菌 (*Brachyspira hyodysenteriae*) など、さまざまな病原性種が含まれることから、主には医学、獣医学、薬学の分野で研究対象とされてきた。筆者は獣医微生物学の立場でスピロヘータと出会ったのだが、顕微鏡下で見られる独特の運動性に魅了され、そのメカニズムや、病原性との関連について研究している。本稿では、世界的に発生報告がある人獣共通感染症レプトスピラ症の病原体に注目し、その構造や運動機構を紹介したい。

レプトスピラ

まずは、レプトスピラ症の病原体、その名も“レプトスピラ”がどういった細菌かを概説しよう。図1Aはレプトスピラの暗視野顕微鏡像である。細胞全体がネジのような右巻き螺旋になっているので、二次元像だとこのようにデコボコに見える。図2Bのように焦点面を移動

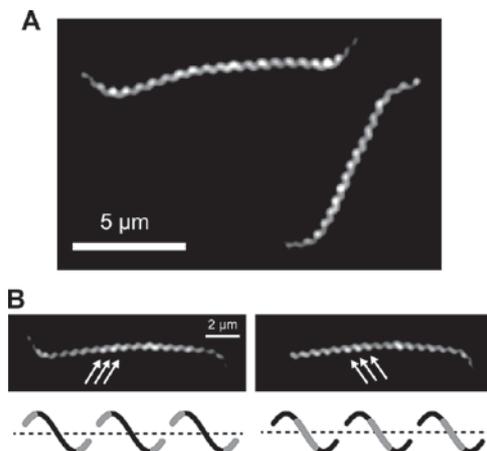


図1. (A) レプトスピラの暗視野顕微鏡像. (B) 同じ菌体を異なる焦点面で観察した結果. 矢印は螺旋の向きを示している. 左が正立顕微鏡のコンデンサー寄りに焦点を合わせたとき, 右が対物レンズ寄りに焦点を合わせた像. 下の模式図では, 焦点が合っている部分をグレーで示した.

させるとデコボコの向きが逆転することからも、菌体の右巻き螺旋を確かめられる。レプトスピラの菌体は、長さが約10 μmに対して幅は約140 nmと、非常に細長い。

分類学上は、スピロヘータ目・レプトスピラ科・レプトスピラ属の下に、今のところ22種が存在する。レプトスピラ種は、非病原性と病原性、そしてそれらの中間型(感染するが、症状が多様で軽いもの)に分けられる。図1に示したのは非病原性種 *Leptospira biflexa* だが、形態的には病原性種と非病原性種の区別はつかない。病原性種はさらに250以上もの血清型(菌体表層のリポ多糖の構造特性に依存する免疫学的分類)に分類される。非病原性種は、河川や土壌中で自由生活する。病原性種は、特定の宿主動物(野ネズミなど)の近位尿細管に長期間定着し、断続的に尿とともに環境中に排出され、汚染環境に触れた動物の皮膚から侵入する。侵入後は、血流によって全身をめぐる、黄疸、肺出血、腎障害などを引き起こす。べん毛形成の異常などで運動性が低下したレプトスピラ変異体は著しく弱毒化することから、運動性は必須の病原因子である¹⁾。

レプトスピラの構造

図2Aにレプトスピラ構造の概略図を示した。グラム

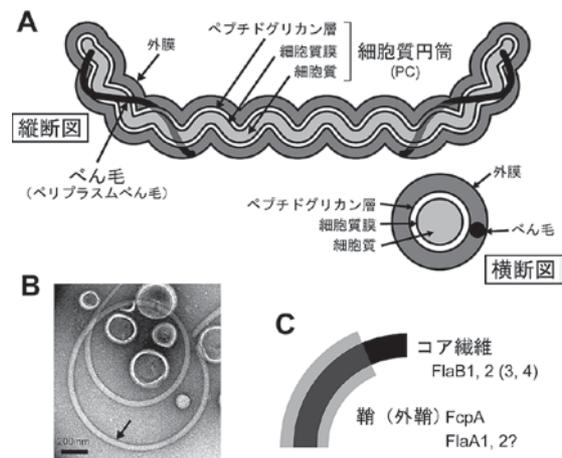


図2. (A) レプトスピラの細胞構造. べん毛の一端はPCに埋まっているべん毛モーターに連結している. (B) 菌体から取り出したべん毛の透過型電子顕微鏡写真(矢印). 近くに存在するベシクル様の物体は、破壊された菌体の残渣と思われる. (C) レプトスピラべん毛の構造予想図.

著者紹介 東北大学大学院工学研究科応用物理学専攻(助教) E-mail: naka@bp.apph.tohoku.ac.jp

陰性細菌に分類されるレプトスピラの膜は、大腸菌などと同様に、内側から細胞質膜、ペプチドグリカン層、細胞外膜という構成である。細胞質膜とペプチドグリカンに囲まれた部分は細胞質円筒 (protoplasmic cylinder, PC) と呼ばれる。レプトスピラのPCは右巻き螺旋を呈しており、これを外膜が覆っているため、菌体全体にわたって右巻き螺旋が観察される。ペプチドグリカンがレプトスピラの周期構造を決めていると考えられているが、詳細は不明である¹⁾。運動を司るべん毛は、大腸菌のように菌体外に出ておらず、PCに埋まって存在するべん毛モーターからペリプラズム空間に伸びている。菌体の内部にべん毛があるというのが、スピロヘータ類に共通の特徴である。図2Bは、菌体から取り出したべん毛である。丸まってしまうほどに大きく湾曲している。菌体の両末端は鉤状に大きく湾曲しているが、べん毛繊維の欠損株では、この湾曲がなくなる²⁾。つまり、レプトスピラ菌体の両末端は、べん毛によってグイッと曲げられているのである。菌体末端は頻繁に変形し、これが運動に大きく影響する(後述)。

レプトスピラのべん毛には“鞘”がある

大腸菌やサルモネラ属細菌のべん毛は、フラジェリンという1種類のタンパク質が、約2万分子重合して作られる左巻き螺旋である。一方、スピロヘータ類のべん毛は、少なくともFlaAとFlaBという2種類のタンパク質で構成される。スピロヘータの中でもっとも研究が進んでいる豚赤痢菌 *B. hyodysenteriae* のべん毛は、3種類のFlaB (FlaB1~FlaB3) が作る“コア”繊維を、FlaAでできた“鞘”が覆った構造をとる。これら4種類のべん毛繊維タンパク質のうち、どれか1種類が欠損してもべん毛繊維の形状には影響しないが、2種類を欠損した株の多くでべん毛繊維の形状パラメータに変化が現れることから、*B. hyodysenteriae* のFlaAとFlaBは互いの機能を補いながら、べん毛形成に寄与すると考えられている³⁾。

レプトスピラについては、べん毛繊維の構成や曲がった形状ができる仕組みなど、多くのことが未解明であるが、他のスピロヘータと同様に、FlaAとFlaBを持っていることはわかっている⁴⁾。非病原性レプトスピラ *L. biflexa* のゲノム中には、2種類の *flaA* (*flaA1*, *flaA2*) と4種類の *flaB* (*flaB1*~*flaB4*) が存在するが、小泉信夫氏(国立感染症研究所)らによって、タンパク質として発現してべん毛繊維に組み込まれるのは、FlaA1, FlaA2, FlaB1, FlaB2のみである可能性が示された(図2C)⁵⁾。豚赤痢菌と同様ならば、FlaAが鞘、FlaBがコアをそれぞれ形成するはずだが、パスツール研究所の

Picardeauグループが病原性種 *Leptospira interrogans* で得た結果は、「FlaA1とFlaA2の両方が欠損しても鞘は形成される」という意外なものであった⁶⁾。それなら、レプトスピラの鞘は何で形成され、FlaAはどこにいるのだろうか?この疑問に対する明確な答えは得られていないが、小泉グループの非病原性種における結果⁵⁾と、Yale School of Public HealthのKoグループが病原性種で得た結果⁷⁾が、次に述べる一つの仮説を提案した。

べん毛を曲げる外鞘タンパク質: FcpA

小泉グループとKoグループの研究は、互いの進捗を知らずに完全に独立して進められたが、「FcpAというタンパク質が欠損すると、べん毛の鞘が消失し、べん毛の形態は直線状になる」という結果が一致していた。FcpAは“flagellar coiling protein A”の略で、先に論文を発表したKoグループによって命名された⁷⁾。FlaAとFlaB以外のべん毛構成分子として初めて見つかったタンパク質である。上述の結果をそのまま受け取ると、「レプトスピラべん毛の鞘はFcpAでできており、FcpAはその名の通り、べん毛の湾曲にも関わっている」ということになる。Picardeauグループの「FlaA1とFlaA2の両方を失っても鞘はある」という結果も合わせると、FcpAが鞘タンパク質であるというのは受け入れやすい。しかしそれなら、単離べん毛のウェスタンブロットで間違いなく確認できるFlaA1とFlaA2^{5,7)}は、いったいべん毛のどこにあるのだろうか?小泉グループが、非病原性種についてべん毛タンパク質どうしの相互作用を調べたところ、FcpAはFlaA2と比較的強く相互作用することが明らかとなった。FcpAはFlaB1とも弱い相互作用を示したが、FlaA1, FlaB2との相互作用は見られなかった⁵⁾。べん毛構造の全容はまだ見えてこないが、FcpAを中心とした分子間相互作用が、ユニークな曲がったべん毛を作り出していることは間違いのないだろう。

べん毛回転のエネルギーは?

本特集の「バクテリアべん毛モーターの回転を測る」⁸⁾と「ハイブリッド型細菌モーターとその適応進化」⁹⁾に詳しく書かれているように、細菌べん毛は、膜電位と細胞内外の陽イオン濃度差を足し合わせた“イオン駆動力”を利用して回転する。イオン濃度差の項が何のイオンによって決まるのかというイオン選択性は、べん毛モーターの主要部品である「固定子」の種類に依存する。たとえば、MotA/MotB固定子を持つ大腸菌は水素イオン(プロトン)を利用し、PomA/PomB固定子を持つビブリオ属細菌の極べん毛はナトリウムイオンを利用する。

レプトスピラの場合は、プロトン駆動力を消失させる脱共役剤 CCCP を与えると運動が停止することから、そのべん毛はプロトン駆動型と言える。しかし、培地にナトリウムイオンを添加すると菌体の回転数が増加することから、ナトリウムイオン利用性も併せ持つ¹⁰⁾。レプトスピラは、ゲノム中に2組の固定子遺伝子を持つが、配列はほとんど同じで、いずれも *motA/motB* である (*motA1/motB1*, *motA2/motB2*)。つまり、レプトスピラは、大腸菌においてはプロトン型である MotA/MotB 固定子だけを持つにも関わらず、プロトンとナトリウムイオンの両方を利用できるハイブリッド型べん毛を備えている可能性がある。*Bacillus clausii* も MotA/MotB 固定子だけを持つが、プロトンとナトリウムイオンの両方を利用できることが知られている¹¹⁾。アーキアにはプロトンとナトリウムイオンの両方を利用する ATP 合成酵素があるようだ¹²⁾。生物界には、探せばまだまだたくさんのハイブリッドマシンがあるかもしれない。

レプトスピラは非対称な形で遊泳

ここからは、レプトスピラの遊泳メカニズムについて書いていこう。図3Aの左の写真は、遊泳中のレプトスピラを捉えたものである。誌面の左方向に向かって泳いでいる菌体の両末端は確かに湾曲しているが、前後の形は明らかに違う。“細胞末端は頻繁に変形する”と先に述べたが、これがその典型例である。遊泳方向に対して前方は左巻き螺旋を描き、後方はフック状に湾曲していることから、それぞれ“Spiral 末端”と“Hook 末端”と呼ばれる(図3A右)。遊泳中の菌体を Hook 末端側から見たとき、Spiral 末端と Hook 末端は反時計回りに、菌体全体にわたる右巻き螺旋は時計回りに回転する¹³⁾。左巻き螺旋が反時計回りに、右巻き螺旋が時計回りに回転

するのは、推進力を発生する(流体を後ろに押し出す)のには理にかなっている。ここから先は、これら三つの回転が頻出して、少しややこしい話になる。その前に、それぞれの回転の簡単な呼び方を決めておきたい。Spiral 末端と Hook 末端の回転は、菌体両末端のべん毛の回転を、外膜を介して観察しているものである。菌体両末端の回転については、それぞれの特徴的な形態を取り入れた呼び方が分かりやすいので、そのまま“Spiral 末端の回転”と“Hook 末端の回転”と呼ぼう。菌体全体にわたる右巻き螺旋の回転は、PCの回転を外膜の外から観察しているものだが、これを言い換える適切な用語が今のところない。そこで、スピロヘータ研究の慣例に従って、これを“PCの回転”と呼びたいと思う。「PCとSpiral末端、Hook末端の間で捻じれませんか?」と聞かれることが多いのだが、PCの右巻き螺旋はSpiral末端とHook末端も含む菌体の全長に及んでいるので、時計回りに回っているPCを、両末端で大きく反時計回りに振り回していると思っていただくと、いくらか理解しやすい(図3A右)。

このような複雑な動きを与えるのはべん毛の回転であり、運動の仕組みを理解するという事は、「べん毛の回転がどのように菌体に伝わるのか」を理解することに等しい。ただ、如何せん菌体の中で起こっていることなので、その様子を観察するのは相当に難しい。此処はひとつ、想像力を働かせながら、べん毛が菌体を回す仕組みを考えていきたい。

菌体の中の動きを想像する

大腸菌は左巻き螺旋のべん毛を反時計回りに回転させて推進するが、そのとき、菌体は時計回りに回っている(図3B左)。これはべん毛回転の反作用によるもので、私たちが上半身をクイッとひねると下半身が逆向きの力を受けるのと同じである。べん毛(flagellum)と菌体(cell body)の回転力をそれぞれ T_{fla} と T_{cell} とすると、 $T_{\text{fla}} = -T_{\text{cell}}$ (反時計回りをプラスとする)ということになる。これは基本的な物理の問題なので、レプトスピラも例外ではないだろうが、果たしてどこが菌体内べん毛の反作用を受けるのだろうか?これは菌体の構造に基づく想像だが、べん毛はPCにくっついていてるわけだから、おそらく、べん毛に対して逆に回るのはPCだろう(図3B右)。べん毛はPCの両末端、Spiral側とHook側に1本ずつあるので、2本のべん毛のモーターが生み出すトルクを T_S と T_H (大腸菌の場合と同じく、反時計回りがプラス)、PCが受ける反トルクを $-T_{\text{PC}}$ とすると、 $T_S + T_H = -T_{\text{PC}}$ となる。このシンプルな力関係には、「PCは

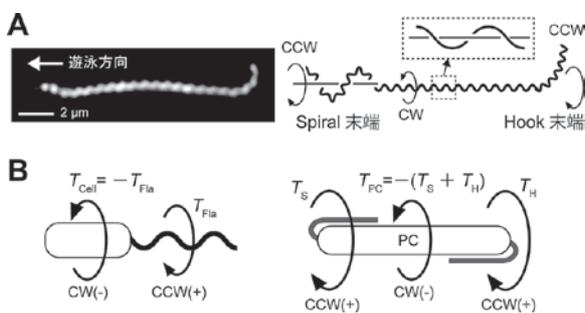


図3. (A左) 遊泳するレプトスピラの暗視野像。右の模式図では、右巻き螺旋の菌体の一端が大きく左巻きしてSpiralになることを示している。(B) 外べん毛細菌(左)とレプトスピラ(右)のトルクバランス。レプトスピラでは外膜が省略されている。A, Bともに、誌面右側から見た回転方向を示している(CW, 時計回り; CCW, 反時計回り)。

Spiral側べん毛とHookべん毛の影響を偏りなく受ける」という仮定が暗に含まれている。しかし、私たちは、Spiral末端とHook末端の形や動作に明らかな違いがあるのをすでに知っているのので、ここで単に $T_S + T_H = -T_{PC}$ としてしまうのには物足りなさを感じる。

“偏った相関関係” から想像する運動機構

Spiral末端、Hook末端、PCの間に、何かこれまでに報告されていない新しい関係性が見つかれば、もう少しまともな運動モデルを考える手がかりになるかもしれない。そのような考えのもと、高部響介氏（東北大学）を中心とする筆者らのグループは、Spiral末端、Hook末端、PCの回転速度を同時に計測し、3つの回転速度トレースを並べて比べてみた。すると、Hook末端の速度が減速するとほぼ同時に、PCの回転も遅くなっていく様子が見られた（図4A左に矢印で速度変化を示した）¹⁴⁾。速度変化の相関を調べてみると、PCとHook末端の間には強い相関を表す明らかなピークが現れたが、PCとSpiral末端の間にはピークが見られなかった（図4A右）。Spiral側べん毛とHook側べん毛はどちらも同じようにPCにくっついてはいるはずなのに、PCはHook側とだけ密接な関係を持つということだ。この不思議な偏った関係を、どう理解したらよいのだろうか。

図4Bの左に示したのは、川本晃大氏（大阪大学）によって撮影されたレプトスピラのクライオ電子顕微鏡写真である¹⁴⁾。外膜の直下に、べん毛が押し込められているのわかる。“押し込められている”と表現したのは、べ

ん毛の通り道に当たる外膜部分が、膨らむほどに強く押されているように見えるからだ。レプトスピラは運動活性が弱まると、両末端がHook形態になることがわかっている。非晶質氷の中でも多少の変形は避けられないだろうが、試料作製中の遠心によって運動性が低下した菌体の末端は、かなりHookに近い状態にあると思われる。ここで一気に“妄想”を膨らませよう（図4B右）。Hook末端ではべん毛が外膜に強く接しているとして、もしもSpiral末端ではべん毛がPCに接していたら……Spiral側べん毛は、根元のモーターが生み出すトルクの反作用（ $-T_S$ ）でPCを回しておきながら、繊維部分で逆向きのトルク（ T_S ）を与えてPCの回転を妨げる。つまり、Spiral側べん毛由来のトルクは相殺し、PCの回転は完全にHook側べん毛だけに依存することになる（ $T_{PC} = -T_H$ ）。実際には、Spiral側べん毛の繊維からPCへのトルク伝播にまったくロスがないということはないだろうし、Hook側べん毛の繊維もいくらかはPCの回転に影響するだろう。それでも、「Spiral側べん毛はPCに、Hook側べん毛は外膜に接している」という妄想的仮説は、実験結果を説明するにはとても都合がいい。

多くの方が気になっておられると思うが、相互相関解析の結果は、Spiral側べん毛とHook側べん毛の間にも、弱いながらも相関があることを示している（図4A右）。「およそ10 μm離れたべん毛どうしに相互作用があるのか」というのは、スピロヘータ類に共通する未解決問題である。高部らの結果は、Spiral側べん毛とHook側べん毛の間に何らかのやり取りがあることを示唆する。そのメカニズムが分かってくれば、より正確な運動モデルの構築につながるだろうと期待している。

おわりに

レプトスピラの運動について、最新の研究成果を交えながらできるだけ分かりやすく解説したつもりだが、運動様式のユニークさを猛アピールするような記事になってしまったのではと省察する。多様性は生き物にもっとも似合う言葉の一つだと思うので、他と違うことは、大して珍しいことではないかもしれない。この特集の多彩なラインナップを見て、改めてそう思う。一見するとユニークなレプトスピラの仕組みが、実はさまざまな生物システムと根幹原理を共にするものだった、というようなことがあると楽しいが、構造にも運動にも、まだまだ謎が多すぎる。複雑極まりない現象を少しずつ理解していくことが、そういった発見につながることを期待したい。

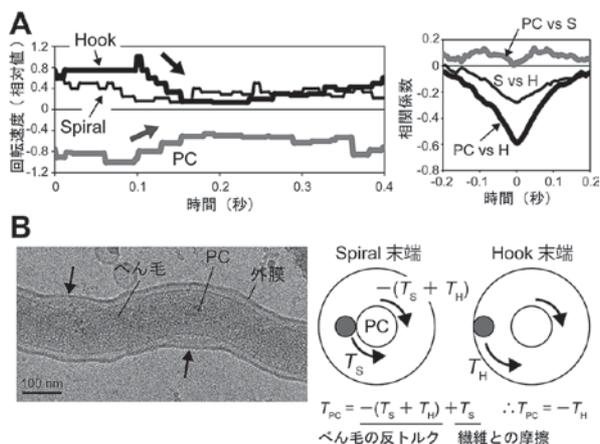


図4. (A左) Spiral末端、Hook末端、PCの回転速度の時間変化。PCのCW回転を負で示している。(A右) 左のような速度トレースについて行った相互相関解析の結果(21セルの平均)。(B左) クライオ電子顕微鏡像。矢印は、べん毛が外膜を押し上げている箇所を指している。(B右) Hook末端とPCの強い相関を説明するモデル。実験データはElsevier社の許可を得て、文献14を改変して使用。

文 献

- 1) Picardeau, M.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 297 (2017).
- 2) Bromley, D. B. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **1367**, 1406 (1979).
- 3) Li, C. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **190**, 5607 (2008).
- 4) Malmstrom, J. *et al.*: *Nature*, **460**, 762 (2009).
- 5) Sasaki, Y. *et al.*: *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0194923
- 6) Lambert, A. *et al.*: *Infect. Immun.*, **80**, 2019 (2012).
- 7) Wunder, E. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **101**, 457 (2016).
- 8) 曾和義幸, 笠井大司: 生物工程, **96**, 183 (2018).
- 9) 伊藤政博: 生物工程, **96**, 187 (2018).
- 10) Md. Islam, S. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **466**, 196 (2015).
- 11) Terahara, N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14359 (2008).
- 12) Schlegel, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 947 (2012).
- 13) Nakamura, S. *et al.*: *Biophys. J.*, **106**, 47 (2014).
- 14) Takabe, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**, 1040 (2017).