

# バクテロイデーテス細菌の滑走運動

柴田 敏史<sup>1</sup>・中山 浩次<sup>2\*</sup>

## はじめに

生体運動はより良い環境へ自身を導き、生存ニッチ獲得と生存範囲拡大のための重要な戦略であり、各々の生活環境に適合した様式へと進化してきた。細菌運動はVan Leeuwenhoekが350年前その存在を発見して以来さまざまな研究がなされ、近年、細菌のべん毛運動についてはその構造や構築メカニズム、モータータンパク質の駆動メカニズムが明らかになりつつある。一方、細菌運動の多様性も知られ、他種多様な細菌がべん毛に依存しないメカニズムを用いて運動している。しかしながら、これらの運動メカニズムはあまり解明されていない。筆者らはその中でバクテロイデーテス細菌の滑走運動に注目し研究している。

## 細菌の固体表面での運動

細菌の多くは液体中でべん毛をスクリューのように回転させ遊泳している。一方、宿主の組織表面や、土や岩などの環境中の固体表面では遊泳とは異なる運動性を持つ細菌がいる。Twitching運動はその中でもよく知られ、ATPを駆動力としてIV型線毛を線毛構成タンパク質の重合・脱重合の繰り返しにより伸び縮みさせて固体表面を掴み、菌体をたぐり寄せるようにして移動する。また菌体が固体表面上を滑るように動く滑走運動 (Gliding motility) も知られている。滑走運動能はマイコプラズマ、ミクソコッカス、バクテロイデーテス細菌が持つが、これらの滑走運動関連遺伝子には類似性が見られないことから、それぞれまったく異なるメカニズムを用いて滑走運動していると考えられる<sup>1)</sup>。これらの運動は固体表面にとどまりながらも、その生存範囲を広げるために有効な運動様式であり、細菌の固体表面と液体中の棲み分けがなされる過程で進化したものであると考えられる。

## バクテロイデーテス細菌の滑走運動

バクテロイデーテス門はグラム陰性細菌の主要なグループであり、これに属する細菌は宿主体内、海洋を中心とした水系、土壌などさまざまな環境に広く分布している。これらの多くは滑走運動能を有し、 $\sim 5 \mu\text{m}/\text{sec}$ の非常に早いスピードで運動するものもある。また、

スイッチバック フリッピング ピボットイング



図1. バクテロイデーテス細菌の滑走運動. 三つの動きの組合せによってバクテロイデーテス細菌はさまざまな方向に滑走運動し広がっていく。

滑走細菌のモデル生物として用いられる土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* はガラス、ポリスチレン、テフロンなどさまざまな個体表面上で滑走運動することができる。バクテロイデーテス細菌の滑走運動は固体表面上で前進運動、菌体が行ったり来たりするスイッチバック、片極を接着させたまま菌体が立ち上がり異なる向きに倒れることで滑走する方向を変えるフリッピングや立ち上がったまま回転を続けるピボットイングといった動きが組み合わさったもので (図1)、これにより菌体はさまざまな方向に広がり、寒天培地上では薄く伸びたスプレディングコロニーを形成する。滑走運動には菌体の固体への接着が必須であり、菌体が固体表面から外れてしまうと運動できずに水中を漂うのみになってしまう。古くから、菌体表面に小さなゴミやビーズが付着し、それらが菌体の長軸方向に直線的に動くことが観察されており、その動きが滑走運動に関連していると考えられてきたがメカニズムは不明であった。近年ようやく遺伝学、生化学的アプローチによってバクテロイデーテス細菌の滑走メカニズムが徐々に明らかになってきた。

## 滑走運動のアドヘンジンタンパク質 SprB

SprB は *F. johnsoniae* において滑走運動に関与するタンパク質群の中で最初に機能が同定されたタンパク質であり、菌体が固体表面に接着し滑走するためのアドヘンジンタンパク質の一つである。SprB 欠損株は寒天上でのコロニスプレディング能力を失う。*F. johnsoniae* の SprB は分子量 66.9 万 (6497 アミノ酸残基) の SprB 繰り返しモチーフを持った非常に巨大なタンパク質であり、他の滑走性バクテロイデーテス細菌にもモチーフの繰り返し数が異なる SprB が保存されている。*F. johnsoniae* の SprB

著者紹介 <sup>1</sup> 沖縄科学技術大学院大学 生体分子電子顕微鏡解析ユニット (スタッフサイエンティスト)

<sup>2\*</sup> 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病原微生物学分野 (教授) E-mail: knak@nagasaki-u.ac.jp

は菌体表面に約150 nmのフィラメント構造をしており、このSprBフィラメントを、SprB抗体を付けたプロテインGビーズや、蛍光免疫染色によって標識し軌跡を追うと、菌体表面を滑走運動する菌体の移動速度とほぼ同じである2~3  $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速さで長軸方向に約6  $\mu\text{m}$ のピッチを持った左向きらせんループ(ヘリカルループ)に沿って動く様子が観察できる<sup>2)</sup>。また、菌体のガラス上への接着や滑走運動はSprB抗体の濃度依存的に阻害されることからSprBが滑走運動に関与していることがわかる<sup>2)</sup>。一方、菌体の動きを調べるために菌体外膜表面上の固定された分子を蛍光標識すると、菌体が反時計周りに回転しながら前進する(1回転で約6  $\mu\text{m}$ 進む)様子も観察される(Shibataら投稿中)。この菌体の回転はSprBが動かせんピッチの軌跡を反映しており、これらのことから菌体表面で動くSprBが個体表面に付着すると、菌体を押し出す推進力を生み出すキャタピラのような役割をしていると考えられる(図2A)。

### マルチレール構造

*F. johnsoniae*野生株や分裂阻害抗生物質により伸張させた菌体上のSprBを適当に希釈した抗体を使って、1から数分子を限定的に標識すると、それらの複雑な動きを捉えることができる(Shibataら投稿中)。SprBのスピードに関して菌体上で異なるスピードで動くSprBが混在し、さらに減速やストップ・アンド・ゴーといった速度変化もみられた。また、菌体上で速度の異なる二つのSprBシグナルの動きを追うと、低速で動くSprBシグナルがそれより速く動くSprBシグナルに追いつかれ、

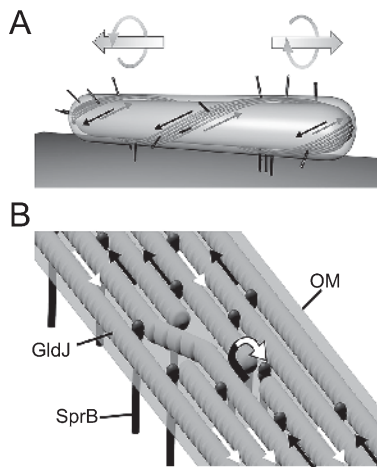


図2. 滑走運動モデル. A:左巻きらせんループ形状のマルチレールに沿ってSprBが動き、固体表面にSprBが接着すると菌体を反時計回りに回転させながら押し出す。滑走方向は対向するSprBの接着度合いによって変わる。B:マルチレール構造上をSprBはレーン変更、Uターン、追い越しなどしながら動く。

追い越される様子が観察された。さらに、通常SprBは両極でターンして菌体の周囲を循環しているが、稀に菌体の極以外の場所でUターンして引き返すSprBもあった。そして、引き返したSprBは再び極でターンし、反対側の極へUターンすることなく向かい、通常の極から極へ循環する動きに戻った。このことはSprBが決まったルート上を循環しない場合もあることを示している。これらの観察からSprBは複数のレーンを持ったらせんループトラック上を動いており、さらにレーンの変更が可能であることを示唆している。

SprBは菌体の周囲を戦車のキャタピラの板のように均一に分布して循環しているわけではなく、さまざまなスピードで個々に動くことで、偏った分布となって循環していると予想される。この偏りにより菌体の固体への接着具合が変化し、スイッチバック、フリッピング、ピボットリングなどダイナミックな滑走運動様式を生み出し、その結果、菌体がさまざまな方向に広がっていくことを可能にしていると考えられる。そして、SprBの過度な渋滞や詰まりを解消するために複数のレーンが存在し、レーン変更しながらSprBが動いていると予想される(図2B)。

### 滑走運動マシナリーの可視化

SprBの動きから推測された、らせんループトラック構造がSprBの根元にあるのだろうか?そこで菌体内部の構造観察を試みた。培養した菌体を蒸留水で懸濁し浸透圧ショックを与え破裂させたのち、酢酸ウランを用いてネガティブ染色し、透過型顕微鏡で観察すると、外膜

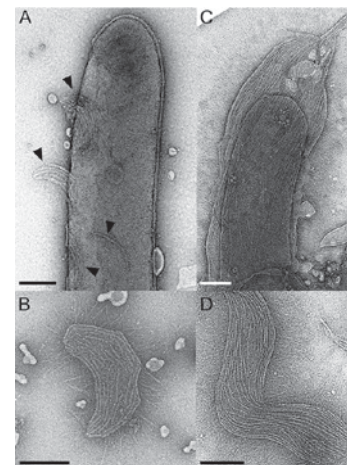


図3. 滑走運動装置. A:*F. johnsoniae*のマルチレール構造, B:菌体から脱落した*F. johnsoniae*のマルチレール構造, C:*S. grandis*のマルチレール構造, D:菌体から脱落した*S. grandis*のマルチレール構造. B, DともSprBフィラメントがマルチレール構造に付随しているのが見える。Bar = 200 nm.

から剥がれるように2本から12本の繊維が並んで束になった、まさしくレール状の構造が観察された(図3A, B). さらに、この構造にSprBが付随していることが免疫電験やSprB変異株との構造比較により確かめられた。また、透過型顕微鏡による透過像からは構造の位置を特定することが難しかったため、フリーズフラクチャー電子顕微鏡法やクライオ電子線トモグラフィーによって菌体を立体的に観察し、構造が外膜の内側に位置していることを明らかにした(Shibataら投稿中)。これらのことから、観察された構造はSprBが動くためのマルチレール構造として滑走運動に関与していると考えられる。同様な構造は海洋性滑走細菌*Saprospira grandis*中にも存在する(図3C, D)。*S. grandis*では菌体全体がマルチレール構造に覆われ、また非常に多くのフィラメントが付随していた。細菌べん毛では本数や存在位置(極毛や周毛など)は種によって異なり、環境に適合した“はえ方”をしていると考えられている。滑走運動装置も同様にマルチレール構造のレーン数や菌体表面のSprBフィラメントの数は菌種によって異なっていると思われる。

#### マルチレール構造構成タンパク質

*F. johnsoniae*の滑走運動にはSprBの他に少なくとも滑走運動コア構成タンパク質Gld 13種(GldA, B, D, F, G, H-O)とアクセサリタンパク質(SprA-F, T, RemA)が関与している<sup>3)</sup>(図4)。これらの滑走運動関連タンパク質の変異株についてマルチレール構造の有無を調べた。すると*gld*遺伝子が一つでも変異すると構造は欠失した。つまり、Gldタンパク質は協調的に機能し

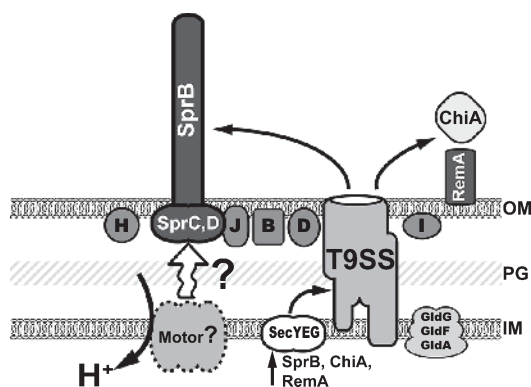


図4. 滑走運動関連タンパク質とT9SS. GldK-N, SprA, SprE, SprT, PorV, SprFはT9SSを構成する。GldB, D, H, I, Jはリポタンパク質であり、その中でGldJはマルチレール構造を構成する。GldG, F, AはABCトランスポーターを構成する。SprB, ChiA, RemAはSec, T9SSを通して菌体外へ分泌される。内膜に位置するプロトン駆動モーター分子とその駆動力がどのようにSprBの動きを生み出すかは未だ不明である。

滑走運動装置の形成や滑走運動に関与していることが示唆された。一方、アクセサリタンパク質の変異はマルチレール構造の構築には影響を与えなかった。次に、Gldタンパク質やSprタンパク質に対する抗体を使用した免疫電子顕微鏡解析によってマルチレール構造に含まれるタンパク質の同定を行った。その結果、GldJ抗体がマルチレール構造と反応しマルチレール構造に局在している様子が観察できた。GldJは膜タンパク質として外膜内側でらせん状に局在することも報告されており<sup>4)</sup>、GldJがマルチレール構造のコンポーネントの一つであると考えられる。またアクセサリタンパク質SprDもマルチレール構造に含まれていた(未発表)。SprDはSprCとともにSprBと関連することが知られている<sup>5)</sup>のでSprBのマルチレール構造上での動きに関与していると考えられる。

#### 滑走運動のエネルギー

プロトン駆動力(PMF)の阻害剤であるプロトノイオノフォアCCCPを培養液中に添加すると、菌体表面のSprBの動きは速やかに停止し滑走運動も止まる。そして、培養液を交換しCCCPを取り除くとSprBの動きは可逆的に回復し菌体は滑走する。一方、このような滑走運動の阻害はATP合成阻害剤のシアン化物では見られない。このことから滑走運動にはPMFが用いられていると考えられる<sup>2)</sup>。PMFは膜を隔てたプロトンの電気化学ポテンシャルの差によって生み出されることから、内膜に局在し膜貫通領域を持つ分子がモーター分子の候補としてあげられる。*F. johnsoniae*ではGldF, GldG, GldL, GldMが膜貫通領域を持ち、内膜に位置する。中でもGldLのN端の膜貫通領域にはプロトン結合部位になり得る酸性のグルタミン酸残基が保存されており、GldLとGldMは複合体を形成し、モーター分子として機能している可能性があるが、未だ直接的な証拠は得られていない。GldF, GldGについてはGldAと共に複合体を作りABCトランスポーターとして機能することが予想されている<sup>3)</sup>。またGldF, GldGを持たない滑走性のバクテロイデーテス細菌もいるため、これらは滑走に必須ではないと考えられる。

プロトン駆動型モーターはべん毛モーターのように回転しているものやタンパク質輸送装置の一部であるSecDFのように反復運動するものがある<sup>6)</sup>。滑走運動に使われているプロトン駆動型モーターがどのようにSprBの直線的な動きを生み出すのかは謎である。



## 走化性

*F. johnsoniae*では50 mMグルコースや25 mM NaClを培地中に添加すると、スムーズに直線的に滑走していた菌体のスイッチバックの頻度が上昇し、その場でバタバタ動く様子が観察できる(未発表)。このように*F. johnsoniae*は環境を認識し滑走運動様式を変化させるので走化性を有していると思われる。しかしながら滑走運動の変化がどのように起こるかなど、走化性シグナル伝達系の解明も含めて今後の課題である。

## 滑走運動とIX型分泌機構

*F. johnsoniae*の滑走運動関連タンパク質GldK-N, SprA, SprE, SprTは滑走運動だけでなく、SprBやレクチンタンパク質RemA, キチン分解酵素ChiAが菌体表面への輸送にも関与する<sup>3)</sup>。また、これらは非滑走性のバクテロイデーテス細菌にも保存されており、ヒトの歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*では病原因子を分泌するためのIX型分泌機構(T9SS)を構成するタンパク質PorK-N, Sov, PorW, PorTとそれぞれ類似性を示す<sup>7)</sup>。つまり、T9SSが滑走運動とタンパク質分泌という二つの役割をつかさどっており、細菌べん毛とIII型分泌機構と同様な関係にあると思われる。T9SSはこれまでに知られた細菌の分泌機構(I-VIII型)のいずれとも異なるバクテロイデーテス細菌特有の分泌機構である。T9SSによって分泌されるタンパク質はN末端にSec輸送シグナル配列を有し、C末端にT9SS認識配列(T9SS分泌シグナル)を有する。これらはまずSec装置によって内膜を通過し、T9SSにより外膜を通過し菌体外に分泌される。この過程でシグナル配列とT9SS分泌シグナルは切断され、分泌されたタンパク質は機能を発揮する<sup>8)</sup>。

T9SSが滑走運動に必須であることは明らかであるが、それらが滑走運動装置自身として機能しているのか、それとも滑走運動装置の構築に必要なものは定かではない。しかしながら滑走運動のモーター分子候補にあげられたGldL (PorL) とGldM (PorM) はT9SSの一部であることから、滑走、分泌両方のモーターとして機能している可能性もあり、これらの機能解析は今後の重要な研究テーマである。

## 病原性と滑走運動

病原性細菌の運動性はその病原性に寄与する。人畜共通感染症を引き起こす*Capnocytophaga canimorsus*や魚類感染症病原菌*Flavobacterium psychrophilum*, 歯周病関連細菌*Capnocytophaga ochracea*などは滑走運動能力を持った病原性バクテロイデーテスであり、滑走運動の病原性への関与が疑われている。実際に*C. ochracea*では病原性と関係のあるバイオフィーム形成がSprB, GldK, SprT変異によって低下することから滑走運動の病原性への関与が示唆されている<sup>9)</sup>。

## まとめ

バクテロイデーテス細菌は分泌機構として独自のT9SSを進化させてきた。これに伴い、滑走運動というユニークな細菌運動を獲得したと思われる。これまで、細菌べん毛運動とT9SSの研究が発展してきたように、バクテロイデーテス細菌の滑走運動とT9SSの機能解明が進めば、バクテロイデーテス細菌による感染症の感染制御や治療アプローチとしての有用性が生まれる。また、滑走運動装置による直線的な動きを生み出すメカニズムは工学的な観点からも非常に面白いターゲットであると考えられる。モーター分子の特定やSprBの根元に存在する滑走運動装置の詳細な解明が今後の中心な課題と思われる。

## 謝 辞

この研究は、科学研究費補助金(24117006, 25293375)の支援を受けた。

## 文 献

- 1) Jarrell, K. F. and McBride, M. J.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 466 (2008).
- 2) Nakane, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11145 (2013).
- 3) McBride, M. J. and Nakane, D.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **28**, 72 (2015).
- 4) Braun, T. F. and McBride, M. J.: *J. Bacteriol.*, **187**, 2628 (2005).
- 5) Rhodes, R. G. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **193**, 599 (2011).
- 6) Tsukazaki, T. *et al.*: *Nature*, **474**, 235 (2011).
- 7) Sato, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 276 (2010).
- 8) Nakayama, K.: *J. Periodontal Res.*, **50**, 1 (2015).
- 9) Kita, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 1756 (2016).