

細菌が高分子多糖に走化性を示す分子機構

高瀬 隆一¹, 村田 幸作², 河井 重幸³, 橋本 渉¹

1. はじめに

細菌は繊維状の構造体であるべん毛により運動性を示す。約30種類のタンパク質が機能的に会合し、運動器官としてべん毛を形成する。べん毛は、細胞膜に埋め込まれた基部体（動力発生装置）、基部体と線維を連結するフック（ジョイント）、およびらせん状の線維（スクリュープロペラ）より構成される。細菌細胞における着生状態によって、べん毛は、極毛、亜極毛、側毛、周毛などに分類される。たとえば、*Pseudomonas aeruginosa* は1本の極毛を¹⁾、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium は複数の周毛を形成する²⁾。通常、*Vibrio parahaemolyticus* は極単べん毛を用いて運動性を示すが、極毛での運動性が低下する高粘性下では、側毛を形成し運動性を回復する³⁾。べん毛の線維はフラジェリンというタンパク質から構成されており、その構造的特徴から側毛型と非側毛型に大別される。側毛型フラジェリンは側べん毛を構築し、極べん毛にはみられない。

ある種の細菌はべん毛運動により、誘引物質に接近し、忌避物質から遠ざかる。前者は正の走化性、後者は負の走化性とよばれる。これまでに、アミノ酸や糖などの低分子物質に対する走化性の発現機構が明らかにされているが、多糖のような高分子物質に対する走化性は知られていない。本稿では、特異な線維構造の極単べん毛をもつ細菌に焦点を当て、本菌におけるべん毛線維の形成と多糖に対す

る走化性に関わる分子機構を概説する。

2. 高分子多糖を取り込む細菌の極単べん毛形成

土壌から単離されたグラム陰性細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株（以下、A1株）は、多糖であるアルギン酸とペクチンを資化する。その特徴的な資化機構として、アルギン酸を細胞外で低分子化することなく直接多糖の状態に細胞内に取り込む⁴⁾。一般に、細胞が高分子物質を利用する場合、細胞外に低分子化酵素を分泌し、低分子化物を細胞内に取り込む。一方、A1株は、細胞表層に形成する体腔とATP結合カセット（ABC）トランスポーターの作用により、アルギン酸を細胞質に輸送する。

当初、電子顕微鏡像とコロニー形状の観察から、A1株はべん毛を形成せず、運動性を示さないと考えられていたが、A1株のゲノム構造が決定されると、側毛と極毛の形成に関わる2種類の遺伝子クラスター（セットIとII）が存在することが判明した⁵⁾。セットIは、*Aeromonas* や *Vibrio* 属細菌の側べん毛遺伝子クラスター³⁾と類似しており、A1株ゲノムの特定部位に集約されている。その中には側毛型フラジェリン LafA と相同性を示すタンパク質 p6 がコードされている。一方、非側毛（周毛や極毛）型フラジェリン FliC と相同性を示す2種類のタンパク質（p5とp5'）がコードされているセットIIは、側べん毛遺伝子クラスターとは構造的に異なり、A1株ゲノムの複数箇所に散在している。また、セットIIのべん毛関連遺伝子群の一部には、その上流に、べん毛形成に関わる σ^{28} 因子の認識モチーフ TAAAGTTT(X)₁₁GCCGATAA⁶⁾ が存在する。一方、p5'遺伝子の上流には σ^{54} 因子の認識モチーフ⁷⁾ が認められる。以上のことから、A1株はべん毛を形成する能力を潜在的にもつことが示唆された。

3. 側毛型フラジェリンからなる極単べん毛線維

定法に従って、軟寒天培地（0.5%寒天）で継代培養して得られたA1-M5株細胞は運動性を示すようになり、極単べん毛を形成した（図1A）⁵⁾。暗視野顕微鏡解析によりA1-M5株細胞は活発に遊泳（swimming）していることが観察され、軟寒天培地上では遊走（swarming）することが確認された。しかし、側毛はまったく形成されない。非運

¹ 京都大学農学研究科（〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄）

² 京都大学名誉教授

³ 石川県立大学生物資源工学研究所（〒921-8836 石川県野々市市末松1丁目308番地）

Molecular mechanism for bacterial chemotaxis toward polysaccharides

Ryuichi Takase¹, Kousaku Murata², Shigeyuki Kawai³ and Wataru Hashimoto¹ (¹Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan, ²Emeritus Professor of Kyoto University, ³Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, 1-308 Suematsu, Nonouchi, Ishikawa 921-8836, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930257

© 2021 公益社団法人日本生化学会

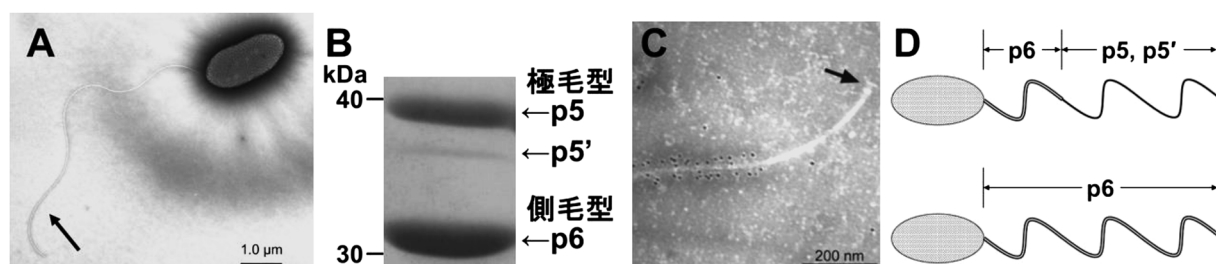


図1 極毛型と側毛型フラジェリンからなる極単べん毛線維

(A) A1-M5株細胞の極単べん毛 (矢印) の電子顕微鏡像 (文献8より引用), (B) 極単べん毛の構成タンパク質 (SDS-PAGE/クマシーブリリアントブルー染色), (C) 極単べん毛の免疫電子顕微鏡解析 [矢印: 基部体, p5からなる線維を表す金コロイド粒子 (黒い点) が基部体から離れたべん毛線維 (極毛型フラジェリン線維) に検出される] (文献8より引用), (D) A1-M5株細胞の極単べん毛の構造モデル。

動性 (A1株) と運動性 (A1-M5株) の各細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した結果, 運動性を示す A1-M5株細胞では二つのセットに存在する全べん毛関連遺伝子の転写レベルが, 非運動性細胞に比べて顕著に上昇していた。また, 運動性 A1-M5株細胞から単離した極単べん毛線維の構成タンパク質は主に極毛型フラジェリン p5 と側毛型フラジェリン p6 の2種類であり (図1B), その構成比は増殖相に応じて変化することがわかった⁸⁾。極単べん毛線維に側毛型フラジェリンが含まれる点から, この A1-M5株のフラジェリン構成は初めての例である。

A1株の特異なべん毛線維の形成機構について, 3種類のフラジェリン (極毛型 p5 と p5' および側毛型 p6) 遺伝子破壊株を非運動性 A1株より育種し, 軟寒天培地での継代培養後, それらの運動性, べん毛形成能, および線維タンパク質の構成と配置を調べた⁸⁾。p6 遺伝子破壊株はべん毛形成能を著しく低下させ, 運動性 (軟寒天培地上でのコロニーの swarming 能) を示さなかった。一方, p5 または p5' の各1遺伝子破壊株は運動性を示し, p6 を含むべん毛線維を形成した。遺伝子組換え大腸菌より発現精製した p5 と p6 を用いて, 抗 p5 ウサギ抗体と抗 p6 ラット抗体を調製した。なお, p5 と p5' の sequence identity は 85%, p5 と p6 の sequence identity は 40% である。組換え p5 または p6 タンパク質がそれぞれ自己会合により形成した線維に対して, 抗 p5 抗体が p5 線維のみを特異的に検出し, 抗 p6 抗体は両線維とまったく結合しない。抗 p6 抗体で認識されるエピトープ部位が p6 線維の表面に露出していないことが考えられる。そこで, 抗 p5 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析により, べん毛線維における各タンパク質の配置を決定したところ, A1-M5株細胞は, 細胞 (基部体) 側に p6, 先端側に p5 (と p5') を配置するべん毛線維 (図1C と D 上),あるいは p6 のみからなるべん毛線維 (図1D 下) のいずれかからなる極単べん毛を形成することが判明した。抗 p5 抗体を用いた免疫沈降実験により, 抗体に結合した p5 を含むべん毛線維に p6 が検出されたことから, 同一のべん

毛線維に p5 と p6 の両フラジェリンタンパク質が存在することが示され, 極単べん毛に極毛型と側毛型の両フラジェリンが共存することが実証された⁸⁾。

4. 高分子多糖に対する細菌走化性

A1株は炭素源としてグルコースよりも酸性多糖であるアルギン酸とペクチンを良好に資化し, 生育する。A1株の極単べん毛の生理機能を明らかにするため, Darias らの方法⁹⁾に基づいた変法を用いて, A1-M5株細胞を走化性試験に供した。0.25% 寒天を含むミネラル最少培地の中央に, アルギン酸をスポットし, 4°C で16時間静置すると, アルギン酸がスポット部分から拡散し濃度勾配を形成する。その後, アルギン酸のスポット位置から一定の距離を置いて A1-M5株の細胞懸濁液をスポットし, 30°C で保温した (図2A)。その結果, 細胞が2日目に当初のスポット位置から離れ, 5日目にはアルギン酸をスポットした周辺に接近するようすが観察された (図2B)。一方, 運動性を示さない A1株細胞はまったく動かない (図2C)。したがって, べん毛運動により A1-M5株細胞が多糖であるアルギン酸に対して正の走化性を示すことが明らかになった。なお, 被検物質として, アルギン酸の代わりにグルコースをスポットすると, A1-M5株細胞は濃度勾配に従った運動性を示さず, 細胞をスポットした周辺にランダムに動くため, グルコースに対しては走化性を示さないことがわかった (図2D)。また, ペクチンに対しても A1-M5株細胞は走化性を示さなかった (図2E)。

フラジェリン遺伝子破壊株についても走化性を評価したところ, 極毛型フラジェリン (p5 と p5') の各1遺伝子破壊株の細胞は, アルギン酸に対して走化性を示した。一方, これらの遺伝子破壊株細胞がペクチンに対しても正の走化性を示すことがわかった。そこで, 非運動性の A1株細胞を再度軟寒天培地で継代培養し, 運動性 A1-MP株細胞を単離した。A1-MP株細胞はアルギン酸に加えて, ペ

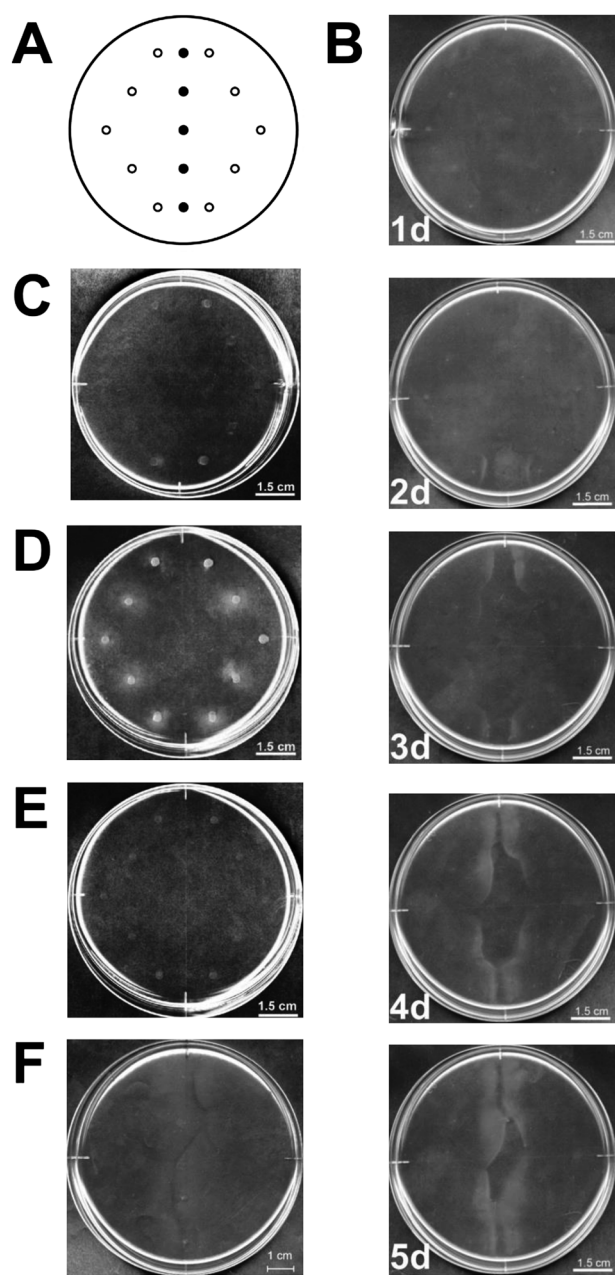


図2 多糖に対する細菌走化性
(A)走化性評価実験のスポット位置(黒丸:被検物質, 白丸:細菌細胞懸濁液), (B)アルギン酸/A1-M5株細胞の経時変化(上から順に, 1日目, 2日目, 3日目, 4日目, 5日目), (C)アルギン酸/A1株細胞(5日目), (D)グルコース/A1-M5株細胞(5日目), (E)ペクチン/A1-M5株細胞(5日目), (F)ペクチン/A1-MP株細胞(5日目). (Fを除いて文献8より引用)

クチンに対しても正の走化性を示した(図2F). 以上のことから, A1株は本細菌細胞にとって優れた栄養素であるアルギン酸とペクチンの両多糖を認識し, 正の走化性を発現させることにより, 巧みな生存戦略を発揮していると考えられる.

5. 走化性発現に関わる高分子多糖の認識機構

これまでに低分子物質を標的とする細菌の走化性発現機構が解析されている. ペクチンに関しても, 低分子化されたペクチンオリゴ糖と結合するタンパク質TogBが走化性発現に関わっていることが植物病原細菌 *Dickeya dadantii* で報告されている¹⁰⁾. 一方, 高分子多糖に対する細菌の走化性は例をみない.

A1-M5株細胞はべん毛を形成し, アルギン酸に対して走化性を示すが, ペクチンに対して走化性を示さない. このことは, べん毛形成能は正常であるが, ペクチン認識能が欠損変異した可能性を示唆している. そこで, A1-M5株細胞のゲノムを解析し変異点を探索したところ, 変異率は全体の0.007%以下と低いが, 予想よりはるかに多い104遺伝子に297変異点が見つかった¹¹⁾. すべての変異遺伝子について, 相補株を育種することは困難と思われたため, A1-M5株細胞にA1株ゲノムライブラリーを導入し, ペクチン走化性を復帰する相補株を分離した. 相補株に含まれるA1株ゲノム断片とA1-M5株細胞の変異遺伝子とを照合し, 変異を相補する最終候補としてSPH1118とSPH1119遺伝子が見いだされた. A1株細胞より新たにクローニングした各遺伝子をA1-M5株細胞へ導入した株を育種した. また, アルギン酸とペクチンの両多糖に走化性を示すA1-MP株を対象に, SPH1118またはSPH1119の各遺伝子を破壊した. 得られた遺伝子導入株と破壊株のペクチン走化性を評価したところ, SPH1118遺伝子がペクチン走化性発現に必須であることが明らかとなった¹¹⁾.

SPH1118は, オリゴペプチドの輸送に関わるABCトランスポーターに基質を渡す基質結合タンパク質と相同性を示す(sequence identity, $\approx 50\%$). また, トポロジー解析から, SPH1118はシグナルペプチドを有し, ペリプラズムに局在することが示唆された. 遺伝子組換え大腸菌より発現精製したSPH1118を用いて, 各種リガンドとの結合性を評価した. その結果, SPH1118はペクチン特異的な結合性を示し($K_d=8.5\mu\text{M}$), アルギン酸やグルコースに対してはまったく結合しなかった(図3A). 以上のことから, SPH1118はペクチン走化性発現のトリガータンパク質としてペクチンを認識する機能を示すことが判明した¹¹⁾.

6. おわりに

細菌のべん毛線維はフラジェリントタンパク質の重合化により構築される. 一方, べん毛線維におけるフラジェリンの構成と配置には多様性が見られる. *S. enterica* serovar Typhimuriumは1種類のフラジェリン(FliC)からなる周毛線維を形成するのに対し²⁾, *V. parahaemolyticus*は6種類のフラジェリン(FlaA~F)からなる極単べん毛と1種類

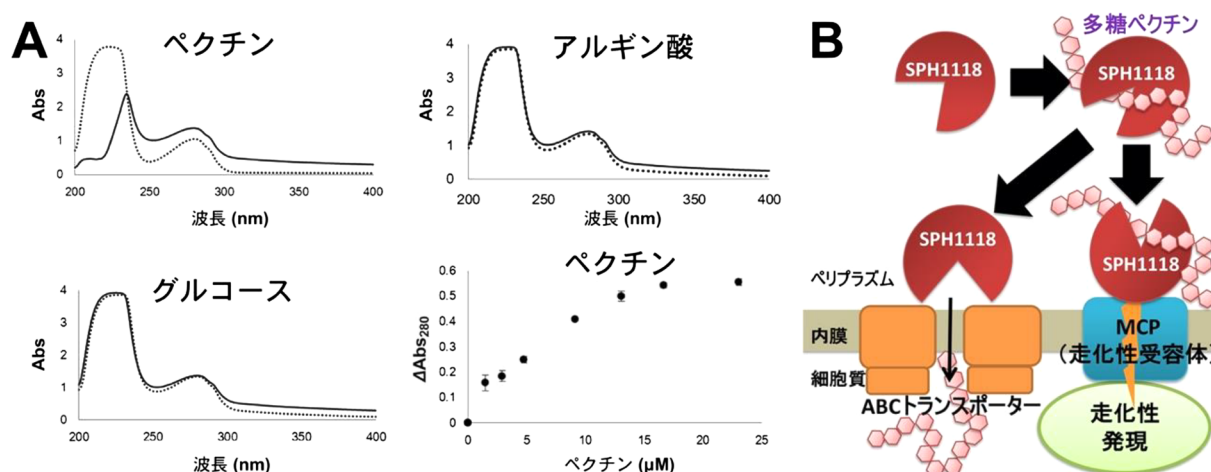


図3 SPH1118の多糖結合性と走化性発現モデル（文献11より引用改変）

(A)SPH1118のリガンド有無による紫外吸収スペクトルの変化（実線：リガンドあり，点線：リガンドなし）。左上：ペクチン，右上：アルギン酸，左下：グルコース，右下：ペクチンの濃度依存的に変化する280nmにおける吸光度。(B)SPH1118のペクチン結合による走化性発現とペクチンの取り込みモデル。

の側毛型フラジェリン（LafA）からなる複数の側毛をもつ³⁾。これまでに極べん毛の構成要素に側毛型フラジェリンが見いだされていなかったが，A1-M5株細胞では側毛型フラジェリンが極単べん毛の線維を構成することがわかった。これは，細菌のべん毛の線維形成がより複雑で多様であり，巧妙な生存戦略の一器官として重要であることを示している。

A1-MP株細胞は，アルギン酸とペクチンに対して正の走化性を示すことがわかった。ペクチン走化性発現にはSPH1118によるペクチン認識が必須であり，このペクチン結合によるシグナルが走化性発現に関わるメチル基受容走化性タンパク質（MCP）に伝達されると予想される。一方，SPH1118はABCトランスポーターと連携する基質結合タンパク質としても機能し，栄養素としてのペクチンの取り込みにも関与することが示唆される。実際，SPH1118遺伝子破壊株では野生株と比較してペクチン資化性が低下するが，喪失することはない。これは，A1株のゲノムに*D. dadantii*のペクチンオリゴ糖取り込み系（TogMNAB）¹⁰⁾と相同性を示す一連のタンパク質がコードされていることと関係があるのかも知れない。したがって，SPH1118は，*Escherichia coli*のマルトース結合タンパク質（MBP）¹²⁾と同様，走化性発現と栄養素輸送に関わる二機能性タンパク質として位置づけることができる（図3B）。

近年，二酸化炭素の固定量が陸上生物よりも海洋生物の方が多くことが示されており，海藻をはじめとする海洋生物資源がブルーカーボンとして注目されている。当研究室ではブルーカーボンの積極的利活用の一環として，微生物を用いて，海藻多糖アルギン酸や単糖マンニトールから有用物質を生産している。合成生物学的手法による遺伝子改変A1株細胞は，アルギン酸からバイオエタノール¹³⁾とピ

ルビン酸¹⁴⁾を分泌する。海洋から分離された酵母はマンニトールから油脂を蓄積する¹⁵⁾。また，海藻は多糖を介してレアメタルを含有していることが示されているため，海藻多糖アルギン酸を直接取り込むA1株はレアメタル回収細菌として応用可能である。最近，走化性を付与した遺伝子改変A1株細胞が非運動性のA1株細胞と比較して，速やかに増殖しバイオエタノールを生産する予備的成果を得ている〔日尾ら（2019）日本農芸化学会関西支部第507回講演会講演要旨集，p.8〕。これは，走化性という基質接近能を強化した新たな発酵微生物の育種法につながると期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は主に京都大学で行われたものであり，実験を行った^元博士研究員丸山如江先生，修了生，卒業生および在校生に感謝いたします。また，その研究の一部は，日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号：26660062），文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム（課題番号：07050217），および長瀬科学技術振興財団などの支援を受けました。

文 献

- 1) Kazmierczak, B.I., Schniederberend, M., & Jain, R. (2015) Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: The intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.*, **28**, 78–82.
- 2) Aizawa, S.I. & Kubori, T. (1998) Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells*, **3**, 625–634.
- 3) McCarter, L.L. (2004) Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 18–29.

- 4) Maruyama, Y., Itoh, T., Kaneko, A., Nishitani, Y., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2015) Structure of a bacterial ABC transporter involved in the import of an acidic polysaccharide alginate. *Structure*, **23**, 1643–1654.
- 5) Maruyama, Y., Kobayashi, M., Murata, K., & Hashimoto, W. (2015) Formation of a single polar flagellum by lateral and polar bacterial flagellar gene sets in *Sphingomonas* sp. strain A1. *Microbiology*, **161**, 1552–1560.
- 6) Ide, N., Ikebe, T., & Kutsukake, K. (1999) Reevaluation of the promoter structure of the class 3 flagellar operons of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.*, **74**, 113–116.
- 7) Barrios, H., Valderrama, B., & Morett, E. (1999) Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4305–4313.
- 8) Kobayashi, M., Konishi, H., Maruyama, Y., Murata, K., & Hashimoto, W. (2016) Lateral-typed flagellin responsible for formation of a polar flagellum but not of lateral flagella in *Sphingomonas* sp. strain A1. *Microbiology*, **162**, 2042–2052.
- 9) Darias, J.A., García-Fontana, C., Lugo, A.C., Rico-Jiménez, M., & Krell, T. (2014) Qualitative and quantitative assays for flagellum-mediated chemotaxis. *Methods Mol. Biol.*, **1149**, 87–97.
- 10) Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Blot, N., & Reverchon, S. (2001) Identification of TogMNAB, an ABC transporter which mediates the uptake of pectic oligomers in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.*, **41**, 1113–1123.
- 11) Konishi, H., Hio, M., Kobayashi, M., Takase, R., & Hashimoto, W. (2020) Bacterial chemotaxis toward polysaccharide pectin by pectin-binding protein. *Sci. Rep.*, **10**, 3977.
- 12) Spurlino, J.C., Lu, G.Y., & Quirocho, F.A. (1991) The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5202–5219.
- 13) Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2011) Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ. Sci.*, **4**, 2575–2581.
- 14) Kawai, S., Ohashi, K., Yoshida, S., Fujii, M., Mikami, S., Sato, N., & Murata, K. (2014) Bacterial pyruvate production from alginate, a promising carbon source from marine brown macroalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 269–274.
- 15) Nakata, S., Hio, M., Takase, R., Kawai, S., Watanabe, D., & Hashimoto, W. (2020) Polyunsaturated fatty acids-enriched lipid from reduced sugar alcohol mannitol by marine yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis* Y2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 1138–1142.

著者寸描

●高瀬 隆一（たかせ りゅういち）

京都大学大学院農学研究科助教。博士（農学）。

■略歴 2009年京都大学農学部卒業。15年同大学院博士課程修了。同年 Thomas Jefferson University 博士研究員。19年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞膜の湾曲・切除・融合にかかる微生物の細胞膜動態制御機構の解明と膜小胞を利用した有用物質生産。

■趣味 日曜大工。

●村田 幸作（むらた こうさく）

京都大学名誉教授。農学博士。

■略歴 1972年京都大学農学部卒業。74年同大学院農学研究科修了。80年京都大学食糧科学研究所助手。88年同助教授。95年同教授。2001年同大学院農学研究科教授。13年摂南大学理工学部特任教授。19年同定年退職。

■研究テーマと抱負 巨大分子の起源と生理・エネルギー論；細菌と酵母における巨大分子輸送装置の構造生物学（ABC トランスポーターとエンドサイトーシスの起源と進化）。

■趣味 寺社巡り，農業。

●河井 重幸（かわい しげゆき）

石川県立大学生物資源工学研究所教授。博士（農学）。

■略歴 1994年京都大学農学部卒業。98年同大学院博士課程中退。同年京都大学食糧科学研究所助手。2001年同大学院農学研究科助手（その間、08年ジュネーブ大学理学部研究生）を経て、18年より現職。

■研究テーマと抱負 褐藻の分解機序の解明と応用。今は、漂着褐藻を分解するハマトビムシと油脂蓄積酵母に注目しています。

■ウェブサイト <https://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/staffname/kawai-shigeyuki/>

■趣味 （温泉）旅行。

●橋本 渉（はしもと わたる）

京都大学大学院農学研究科教授。博士（農学）。

■略歴 1990年京都大学農学部卒業。95年同大学院博士課程修了。同年京都大学食糧科学研究所助手。2000年同助教授。01年同大学院農学研究科助教授（その間、05年イリノイ大学医学部客員研究員）を経て、15年より現職。

■研究テーマと抱負 微生物と各種生物（動物・植物・微生物）との相互作用に関わる分子機構を分子生物学・構造生物学・細胞生物学の観点から明らかにし、その成果を「生命・食料・環境」分野へ応用すること。

■ウェブサイト <http://www.molbiotech.kais.kyoto-u.ac.jp>

■趣味 読書，スポーツ観戦。