



量による長さの決定機構

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

象は大きくバクテリアは目に見えないくらい小さい。しかし、大きさの差ほどにはそれぞれのDNA含量に違いがない。生物にはそれぞれ固有の大きさがあり、それぞれ独特の大きさの制御方法をもっているようだが、一頭の象はおろかバクテリア1匹の大きさでさえ、その制御メカニズムがわかるのはまだだいぶ先の話だろう。現在までに大きさの制御がわかっているのは、電子顕微鏡レベルのものばかりであるが、この場合、大きさというより長さと言った方が的確である。なぜなら、タンパク質分子や核酸分子を伸ばした長さが、文字どおり「モノサシ」として働いているからだ。例えば、タバコモザイクウイルス (TMV) 粒子 (平均300 nm) はRNA分子をモノサシとして形成され、その長さにはわずか1.6%の誤差しかない¹⁾、ラムダファージの尾部 (平均152 nm) はタンパク質GpHをモノサシ分子として5.3%の誤差で制御されている²⁾。RNAやタンパク質の長さはDNAを鋳型として正確にコピーされるから、これらはきわめて正確な「モノサシ分子」となりうる。

バクテリアのべん毛フックも一定の長さ (平均55 nm) をもつ³⁾。その長さの制御にモノサシ分子が存在するかどうかは長年論争的であった。と言うのは、研究のごく初期の1973年にはフックが異常に長くなったポリフック (polyhook) 突然変異体が分離され、その原因遺伝子*fliK*が同定されたにもかかわらず⁴⁾、ついに今日までその分子メカニズムに迫ることができなかったのである。なぜか? それはほとんどの研究者がタンパク質*FliK*をモノサシ分子と考えて実験を進めたからなのだが、実はそうではなかった。この出発点の間違ひによって、30年という思いがけず遠い回り道を強いられたが、今やっとその本当の姿が見え始めてきた。

2. フックの長さは一定である

現在知られているバクテリアの大半はべん毛をもち、それを回転させて泳ぐことができる。お腹の中 (腸内細菌) や土の中 (土壌細菌)、さらに池や川、下水 (淡水性細菌) から海水中 (海洋性細菌) と棲む環境はおおいに異なるが、べん毛の構造は驚くほど似通っている。すなわち、べん毛は細胞表面に埋めこまれたべん毛モーターと、菌体の外に長く突き出たらせん形のべん毛フィラメント、そしてそれらをつなぐフックの3つのパーツからできているのである⁵⁾。

べん毛フィラメントは1本1本の長さがまちまち (5~10 μm) であるが、べん毛モーターとフックは大きさがよく制御されている。特に、フックは1種類のタンパク質*FlgE*からなっているにもかかわらず、長さが一定に制御されている (図1)。同様に1種類のタンパク質フラジェリン (*FliC*) からなるフィラメントと、何がどう違うのだろうか?

べん毛欠損株の中から見つかったポリフック変異体は、異常に長いフック (とは言っても、せいぜい1 μm)

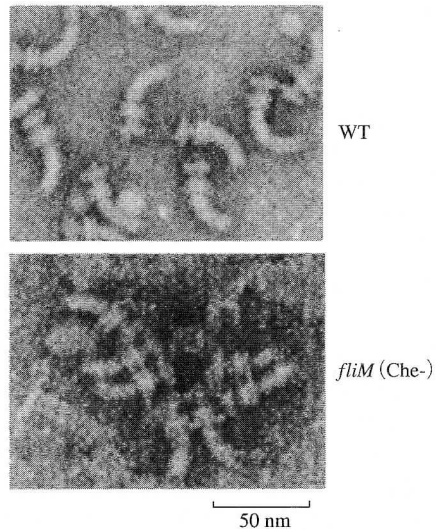


図1 フックの電子顕微鏡写真
べん毛を精製し、さらにフックと基部体だけにしたもの。野生株 (WT) のフックは大きくカーブしているのが特徴であるが、スイッチ変異体*fliM* (Che-) のフックはやや直線的である。

A Mechanism of Length Control by a Measuring Cup

Shin-Ichi AIZAWA

Department of Biosciences, Teikyo University

をもつものの、スクリュウとして働くフィラメントがないため泳ぐことはできない⁴⁾。その変異遺伝子 *fliK* はフック・タンパク質遺伝子 (*flgE*) とは速く離れた位置にある。以来、「フックの長さ制御遺伝子」と呼ばれ、実験対象として集中的にいじくりまわされるハメになった。この遺伝子 *fliK* (フライク) は語呂合わせ読みして「風来坊K」と呼ぶのがふさわしくらいミステリアスである。

3. 風来坊Kという曲者

とにかく、フックの長さ制御の秘密は風来坊Kが握っているらしい。どんな奴かその素顔を見てみよう。

構成アミノ酸は405個。システインを含まない可溶性の酸性タンパク質 (pI=4.9) である。分子を大きく3つに分けると、ポリフックはほとんどC末端領域の欠損で生じ、N末端領域や中央領域の小さな変異では起こらない。中央領域はプロリンが豊富 (約14%) であるが、その意味は不明である⁶⁾。

これらはべん毛遺伝学の大御所、山口滋先生 (明治大学) の豊富なコレクションを解析した結果だが、おかしなことが1つあった。それは風来坊Kがどんなに短くなくても、長いポリフックしかできないのだ。もし風来坊Kがモノサシ分子だったのならば、短い分子からは短いフックが生じてもいいはずではないか。なぜポリフックしかできないのだろうか? しかし、現実社会は忙しく、このような基本的な疑問に答えられないまま (いや、その答えを求めて闇雲に) 実験は進められた。

風来坊Kを大量に作ったら、フックは短くなるだろうか? フック・タンパク質を大量に作ったら、フックは長くなるだろうか? これらの疑問には論理的な欠陥があるが、まあ何が起こるかやってみないとわからないのがサイエンスだ。とにかく、やってみよう (この辺が闇雲たるゆえんである)。たとえモノサシ分子がたくさんあっても、フックの長さ (55 nm) は変わるまいというのが当初の予想であった。しかし、実際風来坊Kを大量発現させると、果たしてフックはわずかだが短く (46 nm) になった⁷⁾。なぜかな? 一方、フック・タンパク質 *FlgE* を大量発現させると、材料が豊富にある分だけモノサシ分子を超えて伸びる可能性は十分にある。しかし、その淡い期待も見事に打ち砕かれ、正常な長さのフックができたのである⁸⁾。

この他にも風来坊Kの挙動は一筋縄ではいかない不可解な点が多い。例えば、風来坊Kがある時点から菌体外に放出されることもその1つだが⁹⁾、まだうまい説明が見つからない。風来坊Kはいったい何をしているのか?

4. 生物学における精密測定

時間は前後するが、フックの長さが一定と言われた当初からきちんとした長さの計測はなかった。フックの長さ分布をきちんと計測したのは1994年になってからである³⁾。なぜか? それはまず、フックが言葉どおり大きく曲がっていることと、長さが短いことなど技術的な問題があったからだが、他方、一定と見えるものをわざわざ正確に計測することにどれほどの意味があるのか、という実験以前の素朴な疑問もあった。しかし、長さの制御を研究しているのに、そのような基本的な数値も知らないのでは情けない。というような漠然とした意地から、フックの長さを精密に測り始めた。

フックは常温中性溶液中では大きくカーブしているが、温度を4℃くらいに下げ、酸性pHで染色すると真っ直ぐになることが長年の経験からわかっていた。統計を取るからにはサンプリング数も100個くらいはいるだろう。そこで、せっせとべん毛を精製し、冷凍室に入ってたくさんの電顕試料を作り、たくさんの写真を撮って、そのネガから直接長さを計測した。そうすると、意外にも、フックの長さは平均値が55 nmに対して標準偏差が6 nm、すなわち誤差が10%もあることがわかった³⁾。もしモノサシ分子があったら、かなりいい加減なものである。どうして、こんな大きな誤差が出るのだろうか?

ついで、ポリフックの長さ分布を測ると、こちらはダラダラと山らしい山がなくて平坦である。電顕写真で見るとおり、長いものもあれば短いものもある、というふうで精密計測の無意味さが露呈された形となった。ところが、これはサンプリング数が少なすぎるためではないのか? という大先輩の指摘を受け、さっそくそれまでの10倍に数を増やして長さ計測を行った。そして、そこに思わぬ答えがあった。1000個のフックの長さ分布にはピークがあったのだ。しかも、そのピーク値は55 nmである。集団の中ではつい長いポリフックに目がいくのだが、実際は正常な長さのものが一番多いのであった。ピークから下ってくるカーブもなだらかできれいだ。そこで、コンピューターシミュレーションを行って、フックの重合速度などを計算すると、フックが急速に (初速度40 nm/min) 成長を始めて約3.5分後には55 nmに達し、それ以降はゆっくりとした一定速度で (8 nm/min) いつまでも伸びつづけることがわかった¹⁰⁾。これらのことから、「風来坊Kはモノサシ分子ではない。フックは風来坊Kなしでも正常な長さに成長するが、その後で成長を止めないといつまでも伸びつづけてポリフックになる」と結論される。

実はこの時点で、フックはモノサシ分子で制御される

のではなく、根元にあるフック・タンパク質を送る側の容量によって決定されるのでないか、という「升(ます)仮説」を思いついた。そこで、そのモデルを沿えて論文を投稿したのだが、直接証拠がないということでモデルは一蹴され計測結果だけが論文になった¹⁰⁾。あまりに悔しいので、モデルのことは日本語の雑文に書いて気を紛らわせた¹¹⁾。しかし、どうすれば直接証拠が得られるだろう？

5. 短いフックはどこに？

風来坊Kはモノサシ分子ではない。しかし、たとえモノサシ分子がないにしても、長さが制御されているということは普通よりも短いものがあるのもいいではないか。短いフックを見つけることこそ、この問題の解決方法ではないか。徐々にそういう考えになってはきたものの、ではどこにその短いフックがあるのかというと皆目見当がつかない。それまでの息の長い研究によりべん毛変異体はたいいてい調べてあり、その構造もほとんど知っているが、短いフックを見た覚えはない。しかし、どこかに見落としがあるに違いない。

そこで、もう一度すべてのべん毛遺伝子を見なおす。待てよ？今までべん毛の形成途中の部分構造はしっかり観察してきたが、完成して回転しているべん毛の構造を調べたことはなかった。機能が正常ならば構造も正常に違いない、という先入観があった。見かけ上べん毛構造が正常で機能がおかしいものと言えば、偏った泳ぎ方をするChe変異体がある。たいいていのChe変異体は外界感知センサーと情報変換系に関するタンパク質に欠陥があり、べん毛遺伝子とは直接関係はないのだが¹²⁾、スイッチ複合体のChe変異体だけはちょっと事情が違った。

6. スイッチ複合体の怪

スイッチ複合体はべん毛モーターの回転制御を行う装置、すなわちモーターの回転方向を時計回り(CW)から反時計回り(CCW)に、あるいはその逆に反転させる巨大なタンパク質複合体で、3種類のタンパク質FlhG, FlhM, FlhNからなる。そのためにその遺伝子はスイッチ遺伝子と呼ばれるが、これらの遺伝子はスイッチのみ関係するわけではない。べん毛形成にもモーター回転にも関わるミステリアスな遺伝子群である¹³⁾。

スイッチ複合体はべん毛構築のごく初期に、傘状の構造(Cリングと呼ばれる)としてモーターの細胞質側に形成される¹⁴⁾。このCリングが形成されない限り、ほとんどのべん毛タンパク質は細胞外に出て行くことができない。すなわち、Cリングはまずタンパク質輸送装

置の一部として働き、のちにべん毛が完成した暁にはべん毛モーターのトルク発生器の一部として、またスイッチ装置として働くのである。スイッチ複合体は実はべん毛の構造的機能的に中心的な存在なのである。

スイッチ複合体の変異体の中には回転方向の切換えができないで、CWかCCWかどちらか一方方向のみ回転するものがある。これらの変異がフックの長さに関係しているのではないか？そういう目で見始めると、今まで見えなかった小さな差異が明らかになってきた。スイッチ変異体のべん毛は一見すると正常な長さのフックをもつが、わずかにそのカーブが少ない。さっそくお家芸の精密計測に入ると、案の定長さ分布のピークの位置が45 nmにずれた。さらに山口コレクションから20あまりのスイッチ変異体を拾い出して解析をすると、もっと短い25 nmのものも見つかった。しかし、驚いたことにそれら変異体には正常な長さのフックはみられなかった。CW回転のみのものとCCW回転のみのものを比較すると、フックの長さとは回転方向は無関係であった。つまり、当初のフックの長さが回転方向に影響を及ぼしているのでは？という予想は外れた。しかし、すべての変異体フックの解析を終えてみると、不思議なことにフックは45 nmフックと25 nmフックのたった2種類に分けられたのである¹⁵⁾。

7. 量子化された計量カップ

フックほど短い構造になると、その構成タンパク質の数(サブユニット数)を数えることができる。フックの基本構造はらせんで、そのバックギングの最小単位である基本らせんのピッチは2.5 nm、フック5 nmの長さの中に11個のサブユニットが入る計算になる¹⁶⁾。したがって、55 nmの正常なフックには121個のサブユニットが含まれる。同様に、45 nmフックには99個、25 nmには55個のサブユニットが含まれていることになる。なぜ、このような飛び飛びの数値化(量子化)が起こるのだろうか？

こう考えてみよう(図2)。フック・タンパク質は根もとの輸送装置Cリングから送られてくる。したがって、フックの量子化はCリングの量子化を反映しているのではないか。Cリングは約30個ほどのFlhGあるいはFlhMのサブユニットからできていると考えられている。もし、その各サブユニットが4つのフック・タンパク質を結合することができれば、Cリング全体では120個のフック・タンパク質を容れることができるだろう。突然変異によって、そのうちの1つが壊れると、結合部位は3つになり、全体で90個となり、2つの変異では60個のフック・タンパク質を送り出すことになる¹⁵⁾。すな

量による長さの決定機構

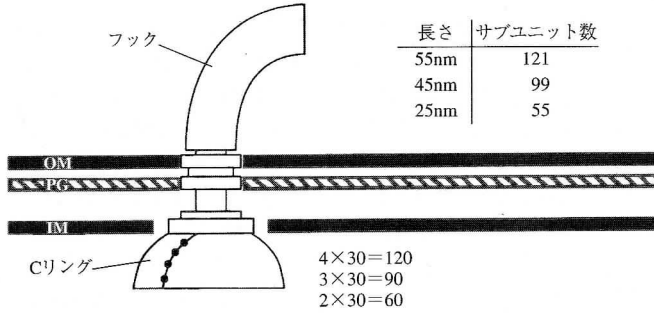


図2 弁（計量カップ）仮説のモデル

Cリングのサブユニットに4つのフック結合部位があるとすると、満杯では120個のフック・タンパク質が入ることになり、フックの長さ55 nmの中のサブユニットの数121個と合う。

わち、フック・タンパク質はあまりに少量なので、それを計量しているCリングの小さな変異が目に見える形で現れたのが、この量子化ではないだろうか？ この弁仮説あるいは計量カップ仮説を証明するには、Cリングの立体構造を解かねばならないが、これには少し時間がかかるだろう。

8. おわりに

べん毛フックの一定の長さはモノサシ分子で作られているのではない。べん毛の根元にあるべん毛タンパク質専用の輸送装置の一部であるCリングと呼ばれるカップ状構造体が計量カップの役割を果たし、フック・タンパク質の輸送量を制御して一定の長さのフックを作っているのである。長い間モノサシ分子と考えられていた風来坊Kは、いまだにその役割がはっきりしない。いずれ近いうちに、なんらかの役割を与えられるだろうが、それまでは相変わらずフラフラしているのだろう。困った奴だ。

紙数の関係で触れることができなかったが、べん毛のようなタンパク質輸送装置は病原性因子の輸送系にもありタイプIIIと総称されて、ただいま大ブレイク中である¹⁷⁾。べん毛フックで見られる「量による長さの制御」は、病原菌の毒針の長さ制御にも用いられていることが判明し¹⁸⁾、より広範囲な長さ制御方法として注目を集めている。べん毛という古いテーマがちよっとした見方の違いで、とてもファッショナブルなテーマに生まれ変わった。温故知新という古い言葉が浮かぶが、若い女性のファッション古着の再利用とでも言うておこうかな。

謝 辞

小森谷薫さんにやさしい言葉を教えていただきました。

文 献

- 1) Casper, D. L. D. (1963) *Adv. Protein Chem.* **18**, 37-121.
- 2) Katsura, I. (1987) *Nature* **327**, 73-75.
- 3) Hirano, T., et al. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5439-5449.
- 4) Patterson-Delafield, J., R. J., et al. (1973) *Arch. Microbiol.* **90**, 107-120.
- 5) Aizawa, S.-I. (2000) *Encyclopedia of Microbiology*, vol.2, 380-389, Academic Press.
- 6) Williams, A. W., et al. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 2960-2970.
- 7) Muramoto, et al. (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 871-882.
- 8) Muramoto, K., et al. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 5808-5813.
- 9) Minamino, T., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 295-304.
- 10) Koroyasu, S., et al. (1998) *Biophys. J.* **74**, 436-443.
- 11) 相沢慎一 (1996) 武者利光編『ゆらぎの科学6』pp.1-39, 森北出版
- 12) Aizawa, S.-I., et al. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 1459-1471.
- 13) Yamaguchi, S., et al. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 187-193.
- 14) Katayama, E., et al. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 458-475.
- 15) Makishima, S., et al. (2001) *Science* **291**, 2411-2413.
- 16) Jones, C. J., et al. (1990) *J. Mol. Biol.* **212**, 377-387.
- 17) Aizawa, S.-I. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 157-164.
- 18) Kubori, T., et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10225-10230.