

# ゲノム情報を用いた、マイコプラズマの滑走と細胞構築に関する構造の統合的理解

●宮田真人

大阪市立大学大学院理学研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

寄生性のグラム陽性細菌であるマイコプラズマは、細胞壁がないにもかかわらず形態に極性があり、片方の端に膜が突きだした接着器官を有する。この形態は内部の骨格により維持され、形成は細胞分裂と同調している。さらにマイコプラズマは接着器官でガラスなどの表面にはりついたまま、未知のメカニズムで頭部の方向にうごく（滑走運動）。これらはマイコプラズマ特有の性質であるが、同時に原核生物の細胞一般における細胞質や、膜や、細胞骨格の挙動を端的にあらわしていると考えられる。本計画は、2種類のマイコプラズマ (*Mycoplasma mobile*と*Mycoplasma pneumoniae*)の細胞中で細胞骨格と滑走運動に関与するタンパク質を網羅的に探しだし、それらの構造と細胞中での挙動を明らかにすることを目的とする。検索にはゲノム情報、モノクローナル抗体、免疫蛍光顕微鏡法、GFP融合技術、電子顕微鏡観察などを活用する。

## ＜研究開始時の研究計画＞

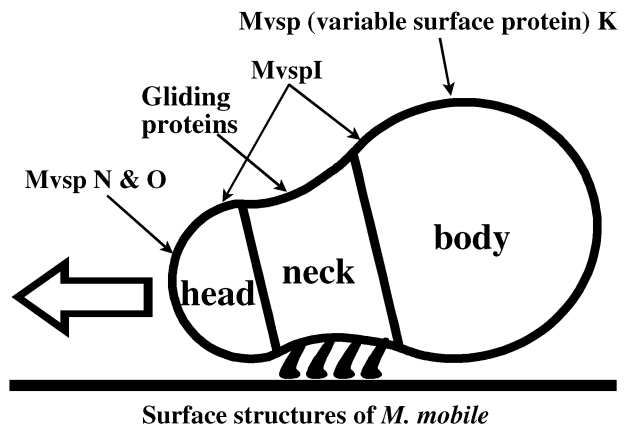
- 1)すでに取得している、*M. mobile*細胞のhead、neck、bodyのそれぞれに局在するタンパク質を認識するモノクローナル抗体の標的タンパク質を同定する。
- 2)(1)で同定したタンパク質の生細胞中での機能と挙動を明らかにする。
- 3)*M. mobile*の遺伝子操作方法を開発する。
- 4)*M. pneumoniae*ですでに細胞構築にかかわると考えられているタンパク質の機能を調べる。
- 5)*M. pneumoniae*の細胞構築にかかわると考えられる新たなタンパク質をその局在を指標に見つけ出す。
- 6)*M. pneumoniae*におけるGFP融合技術を改良する。また*M. mobile*への適用を行う。
- 7)細胞骨格様構造および滑走装置複合体を単離する。
- 8)注目するタンパク質を精製し、トポロジー、ドメイン構造、活性部位のマッピングを行う。
- 9)精製した複合体とタンパク質の構造を電子顕微鏡を用いた解析により明らかにする。
- 10)注目するタンパク質に結合する因子を検索する。

## ＜研究期間の成果＞

項目番号は＜研究開始時の研究計画＞の番号と対応している。

- 1)*M. mobile*細胞の表面に局在している7つのタンパク質を同定した(図を参照のこと)(論文6,10,14,15)。
- 2)それらの細胞における役割を明らかにした。headとbodyに局在する4つのタンパク質は宿主から身を守るための抗原性変化のタンパク質であった(論文10)。neckは滑走運動のために特化されていた。neckに局在する3つのタンパク質はそれぞれ、123、349、521キロという巨大な分子量を持ち、滑走運動を担っていた。それぞれが、“マウント”、“足”、“ギヤ”の役割を果たしていた(論文6,14,15)。さらに滑走運動の特徴を詳細に調べることにより(論文1,2,3,7,12,16)、上記の“滑走タンパク質”がどのように運動を起こすかについてモデルを提案した(論文6,14,17)。
- 3)*M. mobile*のタンパク質を大腸菌の中で発現し精製標品

を取得することは部分的に成功したが、マイコプラズマそのものを遺伝子操作することはまだ成功していない。



- 4)これまで*M. pneumoniae*での細胞構築にかかわることが示唆されてきた7つのタンパク質について、それぞれの変異株と抗体のすべての組み合わせで免疫蛍光顕微鏡解析を行うことにより、それぞれのタンパク質の役割を提案、あるいは支持した(論文4,5,11)。
- 5)*M. pneumoniae*の細胞構築にかかわると考えられるタンパク質2つをその局在を指標に見つけ出した(論文9)。
- 6)*M. pneumoniae*におけるGFP融合技術を改良し、この新しい方法を用いて(5)で示した成果を得た(論文9)。この方法の*M. mobile*への適用は達成できなかった。
- 7)*M. pneumoniae*の接着滑走器官の中心に背骨のように存在しているロッド構造を単離し、電子顕微鏡でその構造を詳細に観察した(投稿中)。
- 8)*M. mobile*の滑走にかんする4つのタンパク質と1つの抗原性変化のタンパク質、*M. pneumoniae*の滑走の足のタンパク質を精製した(論文18)。それらについて、トポロジー、ドメイン構造、活性部位のマッピングを行った(論文13,18)。研究の一部は現在も進行中である。
- 9)*M. mobile*の足のタンパク質と細胞上に存在する足の構造を電子顕微鏡で解析し、分子とアミノ酸配列の対応、細胞中でのトポロジー、ドメイン構造を明らかにした(論文8,13,18)。また同様の解析を抗原性変化のタンパク質についても行い、滑走メカニズムの進化的由来について考察した(投稿中)。
- 10)滑走タンパク質間の物理的相互作用を、化学架橋実験、表面プラズモン共鳴などで調べた。研究は現在も進行中である。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

研究は当初の目標を上まわる進展を見せた。その過程は以下に示すPNASのコメンタリーでも採りあげられている。(Charon NW: *Mycoplasma* takes a walk. Proc Natl Acad Sci USA 102, 13713-13714. (2005)) また、研究代表者は3編の英語総説と6編の日本語総説の依頼を受けそれらを発表した(ただし、3編は印刷中)。研究成果はバクテリア研究の分野でもっとも主要な雑誌である*Journal of Bacteriology*の10編、アメリカ科学アカデミー紀要(PNAS)の1編をはじめとする全18編の論文として発

表された。その中で、PNASのものをはじめとする5編に関連する図がその号の表紙の絵として採用され、3編が解説記事の対象に採用された。さらにPNASに掲載された論文は、2005年8月23-24日の、日経新聞夕刊、日経産業新聞朝刊、読売新聞朝刊、日刊工業新聞朝刊、9月9日の毎日新聞朝刊の、各紙で報道された。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

M. mobileの遺伝子操作については進展を見ることができなかった。これまでにうまく行かなかった理由は、直接にはM. mobileには他のマイコプラズマとは異なり2つの制限酵素システムがあるため形質転換が困難であること、間接には結果の出かかっている研究を先に進めたために人手と時間を十分にかけれなかったことである、と考えられる。

#### 〈今後の課題〉

滑走のメカニズムに深く踏み込むために、滑走タンパク質の立体構造とその変化、物理的性質などを明らかにすると共に、メカニズムモデルのシミュレーションを行う。またそれと平行して、滑走メカニズムの進化的由来や生き残り戦略における位置づけ、運動や細胞形態を支える構造などの謎にも積極的に取り組む。さらにマイコプラズマや、それに類似した感染メカニズムを持つ他の病原因子の予防と治療に役立つ情報を提供することも視野に入れて研究を進める。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### (1)論文

1. 0303271833

Shimizu, T., and Miyata, M.: Electron microscopic studies of three gliding mycoplasmas, *Mycoplasma mobile*, *M. pneumoniae*, and *M. gallisepticum*, by using the freeze-substitution technique. *Current Microbiology* 44, 431-434 (2002).

2. 0303271651

Miyata, M., Ryu, W. S., and Berg, H. C.: Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. *Journal of Bacteriology* 184, 1827-1831 (selected for "guest commentary") (2002).

3. 0303271558

Miyata, M., and Uenoyama, A.: Movement on the cell surface of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiology Letters* 215, 285-289 (2002).

4. 0303271613

Miyata, M.: Cell division. In Herrmann, R., and Razin, S. (ed.), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. pp. 117-130. Kluwer Academic / Plenum Publishers., London (selected for cover) (2002).

5. 0303271602

Seto, S. and Miyata, M.: Attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence protein and formation of electron-dense core in the wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 185, 1082-1091 (2003).

6. 0403061152

Uenoyama, A., Kusumoto, A., and Miyata, M.: Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during *Mycoplasma mobile* gliding. *Journal of Bacteriology* 186, 1537-1545 (2004).

7. 0406291737

Jaffe, J. D., Miyata, M., and Berg, H. C.: Energetics of gliding motility in *Mycoplasma mobile*. *Journal of Bacteriology* 186, 4254-4261 (selected for cover) (2004).

8. 0406291735

Miyata, M. and Petersen, J. D.: Spike structure at interface between gliding *Mycoplasma mobile* cell and glass surface visualized by rapid-freeze and fracture electron microscopy. *Journal of Bacteriology* 186, 4382-4386 (2004).

9. 0410200931

Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., and Miyata, M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *Journal of Bacteriology* 186, 6944-6955 (2004).

10. 0501270912

Kusumoto, A., Seto, S., Jaffe, J. D., and Miyata, M.: Cell surface differentiation of *Mycoplasma mobile* visualized by surface protein localization. *Microbiology* 150, 4001-4008 (selected for "hot off the press" in *Microbiology Today* Feb 2005) (2004).

11. 0502171009

Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T., and Miyata, M.: Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *Journal of Bacteriology* 187, 1875-1877 (selected for cover) (2005).

12. 0505131424

Hiratsuka, Y., Miyata, M., and Uyeda, T. Q. P.: Living microtransporter by uni-directional gliding of *Mycoplasma* along microtracks. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 318-324 (2005).

13. 0506220958

Metsugi S, Uenoyama, A., Adan-Kubo, J., Miyata, M., Yura, K., Kono, H., and Go, N.: Sequence analysis of gliding protein Gli349 in *Mycoplasma mobile*. *Biophysics* 1, 33-43 (2005).

14. Seto, S., Uenoyama, A., and Miyata, M.: Identification of 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *Journal of Bacteriology* 187, 3502-3510 (2005).

15. 0508051643

Uenoyama, A. and Miyata, M.: Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *Journal of Bacteriology* 187, 5578-5584 (2005).

16. 0509011328

Uenoyama, A. and Miyata, M.: Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12754-12758 (selected for cover and "commentary") (2005).

17. 0505131430

Miyata, M.: Gliding motility of mycoplasmas -A mechanism cannot be explained by current biology- Blanchard, A. & Browning, G eds. *Mycoplasmas: molecular biology, pathogenesis, and strategies for control*. Horizon Biocience, Norfolk.137-163 (2005).

18. 0601311620

Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T., Miyata, M.: Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for glass binding of *Mycoplasma mobile* gliding revealed by rotary-shadowing electron microscopy. *Journal of Bacteriology* (selected for cover) (2006) in press.

(4)その他で特筆するもの

1. 0502251053

宮田真人: マイコプラズマの滑走運動 -新たな生体運動メカニズム. 蛋白質核酸酵素 (PNE)、50, 239-245 (2005).