

# ゲノム情報にもとづく *M. pneumoniae* の細胞構造の理解と病原性の解明

●見理 剛<sup>1)</sup> ◆宮田 真人<sup>2)</sup> ◆佐々木 裕子<sup>1)</sup> ◆堀野 敦子<sup>1)</sup>

1) 国立感染症研究所 2) 大阪市立大学大学院理学研究科

## <研究の目的と進め方>

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *Mycoplasma pneumoniae* は純培養が可能な最小の病原細菌の一つである。ペプチドグリカン層による細胞壁をもたないが、細胞骨格構造によって細長い細胞形態を維持しているとされている。この細胞骨格構造は、近年研究が進んだ他の細菌の細胞骨格とは大きく異なっており、*M. pneumoniae* のゲノムにはアクチンやチューブリンのホモログも見つからない。*M. pneumoniae* は、細胞壁をもつ細菌とは異なる細胞骨格構造を進化させてきたと考えられる。*M. pneumoniae* に特徴的な細胞骨格構造は、細胞の一端に存在する太さ約 80nm 長さ 300nm 程度の棒状の構造 (Rod) である。この Rod を中心軸とするようなかたちで細胞膜が突出し、接着器官が形成されている。接着器官の表面には P1 アドヘジンが多数集まっており、ヒトの呼吸器上皮細胞細などに対して接着性をもたらす。これがこの菌の病原性の大きな要素だとされている。また、接着器官は *M. pneumoniae* の滑走運動性をなす装置でもあり、細胞分裂の際には分裂に先立って二つに増えるので、この菌の細胞周期にも密接に関連していると考えられている。接着器官と細胞骨格構造を詳しく理解することは、この菌の病原性を解明することにつながり、より有効な診断、治療法の開発に役立つと考えられる。本研究計画ではゲノム情報を活用し *M. pneumoniae* の細胞骨格構造の形成機構について解明を進めることを目的としている。研究の進め方は *M. pneumoniae* のゲノムサイズが小さいこと (ゲノムサイズは約 816kb、含まれる ORF 数は 689 個) を生かして、ORF 産物の細胞内局在を、蛍光タンパク質タグ法によって網羅的に調べていく。この過程で、未知の細胞骨格成分を同定するとともに、電子顕微鏡観察によって細胞骨格の詳細な構造を調べていく。また、細胞骨格構成成分の変異株を取得することによって細胞骨格構造の形成機構を探っていく。得られた情報を統合して有効活用できるデータベースを構築していくことも目標とする。

## <2008 年度の研究の当初計画>

1. 蛍光タンパク質タグ法による全 ORF 産物の局在観察の完了をめざす。局在観察結果から細胞骨格様構造や接着器官の構成成分と考えられるもの、または局在パターンに興味を持たれる ORF 産物は、免疫電顕法で詳細な局在分析を行う。免疫電顕法は蛍光タンパク質タグに対する抗体で行うが、タグによる影響をできるだけ小さくするため His タグをつけた ORF を *M. pneumoniae* 細胞内で発現させ、抗 His タグ抗体による免疫電顕法の検討も行う。

2. トランスポゾン Tn4001 による挿入変異株のコレクションの数を増やす。Tn4001 が目的の ORF に挿入した変異株を効率よく取得するため、PCR を用いた変異株スクリーニング法を検討する。得られた変異株はその性質を解析する。

3. それぞれの分析から得られたデータを整理しデータベース化、web 上で公開する準備を行う。

## <2008 年度の成果>

蛍光タンパク質タグ法による局在分析は、約 620 個の ORF (全 ORF の約 90%) について終了した。その結果、蛍光顕微鏡で蛍光が観察できたのは、解析済み ORF の約 77% で、残りの約 23% は蛍光が観察されなかった。蛍光が観察されない ORF は膜タンパク質の遺伝子ホモログが多く、蛍光タンパク質タグ法を膜タンパク質に適用した場合、成功しない場合が多いことが示唆された。特に今回は ORF の N 末端側に蛍光タンパク質を連結する実験デザインだったため、N 末端にシグナル配列をもつリポタンパク質では蛍光タンパク質タグ法が機能しなかったものと思われる。蛍光が観察された ORF を蛍光のパターンによって大別すると、解析済み ORF の約 43% は蛍光が細胞内で収束 (Focus) して観察されることが多かった。また、約 23% は蛍光が細胞中に拡散した状態で観察された。それ以外の ORF では、細胞内の蛍光パターンは収束と拡散が混在し、不規則な蛍光パターン像が多く見られた。これまでの結果から、比較的再現性よく接着器官部位に明らかな局在を示した ORF は約 60 個だった。この中には以前から接着器官部位に存在することがわかっていた 9 個のタンパク質 (HMW1、HMW2、HMW3、P1、P30、P65、P200、P24、P41) も含まれる。しかし、これまで免疫蛍光法によって接着器官部位に存在することが観察されていた P90 と P40 タンパク質 (MPN142 遺伝子の産物で B、C タンパク質とも呼ばれる) は、今回の蛍光タンパク質タグ法では接着器官部位に局在して観察されなかった。P90 と P40 タンパク質は蛍光タンパク質と連結したことによって、本来の存在部位に局在することができなくなったと考えられる。接着器官部位に局在して観察されたその他の ORF 産物のうち、10 個は核酸・タンパク質合成にかかわるタンパク質、20 個は各種酵素タンパク質のホモログ、2 個は分子シャペロン、15 個は機能未知のタンパク質だった。新たに同定されたこれら約 50 個の ORF 産物のうちいくつかは、これまで同定できていなかった接着器官の構成成分であると推定される。また今年度は、ORF に His タグをつけて *M. pneumoniae* 細胞内で発現できるベクターの検討も行った。

## <国内外での成果の位置づけ>

今回、接着器官部位に局在して観察される ORF が新たに多数見つかった。この中にこれまで未知だった接着器官や細胞骨格の構成成分が含まれている可能性がある。今後の解析によってこれら ORF 産物の機能が明らかになってくれば、細胞骨格と接着器官の形成機構の理解に役立つと考えられる。また今回、網羅的局在観察が進んだことで、細胞内局在という観点での ORF の分類

リストができてきたと考えている。接着器官部位に局在して観察される ORF のリストを、これまで報告されている接着器官や細胞骨格の形成に重要と考えられる ORF のリスト (Triton X-100 に不溶性細胞画分に含まれる ORF 産物や、トランスポゾン挿入によって細胞接着または滑走運動性に異常が生じる ORF ) と比較すると、約半数が一致するが、残りは一致しなかった。このように ORF を局在観察という新しい視点でゲノムから選び出してくることによって、これまで見おとされていた ORF の細胞機能への関与が見つかってくる可能性があると考ええる。今回解析対象として選び出された ORF の中には核酸・タンパク質合成にかかわるタンパク質や各種酵素のホモログが多数含まれている。これらが接着器官部位に局在して観察されるのは、接着器官の形成と細胞周期との同調に何らかの機能を果たしているためとも推測される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

蛍光タンパク質タグ法による網羅的局在観察が約 60 個の ORF についてまだ完了していない。また、局在観察が終了した ORF についても、ほとんどの場合、蛍光タンパク質タグは N 末端側に連結されている。C 末端側に蛍光タンパク質タグを連結すれば、蛍光が観察できなかった ORF や、明らかな局在を示さなかった ORF についても再現性ある細胞内局在が観察される可能性は残る。また、蛍光タンパク質タグを連結した ORF を *M. pneumoniae* で発現させるために *M. pneumoniae* の *tuf* プロモーターを使用しているが、このプロモーターの活性はかなり高い。このため、しばしば蛍光タンパク質の過剰発現と思われる像が顕微鏡で観察される。これまでのデータを精査して、必要と考えられる ORF については *tuf* プロモーターより活性が低いプロモーターを使用した実験を実施する必要である。また、今年度は、電子顕微鏡観察および変異株の取得の作業はあまり進展させることができなかった。

#### <今後の課題>

今年度の細胞内局在観察によって、新たに約 50 個の ORF が接着器官部位に局在して観察された。これらの ORF は、今後電子顕微鏡観察など、より詳しい解析を行う対象とする。これらの ORF については C 末端への蛍光タグの連結や、低発現実験による検証も行う。また、これらの ORF の機能を探るために変異株を取得する試みも続ける。網羅的局在観察に多量の画像データが出てきており、これらを整理してデータベース化を進める。

#### <成果公表リスト>

##### 1)論文/プロシーディング

1. 0801191524

Miyata, M. Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. Trends Microbiol. 2008, 16, 6-12.

2. 0803211130

Kenri, T., Okazaki, N., Yamazaki, T., Narita, M., Izumikawa, K., Matsuoka, M., Suzuki, S., Horino, A. and Sasaki, T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: Type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. J. Med. Microbiol. 2008, 57, 469-475.

3. 0806201633

宮田真人 うごめく細菌 マイコプラズマのユニークな運動メカニズム 現代化学 2008 5月号, 27-32

4. 0809241741

宮田真人 滑走する病原細菌、マイコプラズマの細胞骨格 - チューブリンでもアクチンでもない 蛋白質核酸酵素(PNE) 2008, 53(13), 1752-1758.

5. (印刷中)

Uenoyama A., Seto S., Nakane D. and Miyata M. Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery suggested by inhibitory antibodies and mutants. J. Bacteriol. 2009, in press

6. (印刷中)

Horino, A., Kenri, T., Sasaki, Y., Okamura, N. and Sasaki, T. Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversions of phase-variable *mpl* lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*. Microbiology. 2009, in press

7. (印刷中)

宮田真人 実験室の厄介者、マイコプラズマのひみつ-モータータンパク質も細胞骨格も使わない細胞運動- 生化学. 2009