

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¹⁾ ◆宮田 真人²⁾ ◆佐々木 裕子¹⁾ ◆堀野 敦子¹⁾

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* はペプチドグリカン細胞壁をもたないが、細胞内に細胞骨格様の構造をもち、細長い細胞形態を維持していると考えられている。この細胞骨格様構造は、近年研究が進んでいる他の細菌の細胞骨格構造とはかなり異なっており、*M. pneumoniae* のゲノムには MreB タンパク質などの遺伝子も存在しない。*M. pneumoniae* は、細胞壁をもつ細菌とは異なる独自の細胞骨格構造を発達させてきたと考えられる。*M. pneumoniae* の細胞骨格の主要な構造は、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 構造) 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て接着器官が形成されている。接着器官は *M. pneumoniae* の細胞接着性と滑走運動性をなす装置で、病原性を発揮するのに必要である。接着器官はまた *M. pneumoniae* の細胞分裂に先だって倍化するので、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様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* の細胞骨格様構造の構成成分と形成メカニズム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構築メカニズムを探っていく。得られた情報を統合して有効活用できるデータベース構築していくことも目標とする。

<2007 年度の研究の当初計画>

2007 年度は、以下の項目について研究を計画した。

1. 蛍光タンパク質タグと蛍光顕微鏡観察による、ORF 産物の網羅的細胞内局在分析を進める。この作業には、昨年までに作製した *M. pneumoniae* の全 ORF クローンコレクションを利用する。蛍光タンパク質としては EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) を用いる。
2. トランスポゾン Tn4001 挿入による変異株コレクションを拡大する。
3. 細胞骨格成分と考えられるものや細胞内局在パターンに興味を持たれる ORF 産物について電子顕微鏡による詳細な局在観察を行う。
4. これまで得られたデータを統合しデータベース化していく。
5. ゲノム塩基配列の情報を利用して、*M. pneumoniae* のより正確で高感度な PCR 検出プライマーなどをデザインする。

<2007 年度の成果>

本年度まで、蛍光タンパク質タグを用いて局在分析が終了した ORF 産物は 133 個である (全 ORF の 19%)。この分析によって既知の接着器官構成成分 7 種 [MPN141(P1)、MPN309(P65)、MPN310(HMW2)、MPN447(HMW1)、MPN452(HMW3)、MPN453(P30)、MPN567(P200)]、に加えて 11 種の ORF 産物 [MPN001、MPN022、MPN065、MPN092、MPN117、MPN295、MPN311(P41)、MPN312(P24)、MPN321、MPN387、MPN688] が接着器官部位に局在するのが観察されている。また MPN474 は細胞の尾部に局在して観察される。これらのうち MPN092、MPN117、MPN295、MPN311(P41)、MPN309(P24)、MPN387、MPN474、MPN688 は界面活性剤 Triton X-100 で不溶な画分に含まれるタンパク質で、細胞骨格の構成成分である可能性が高い。また、MPN022、MPN065、MPN321 は代謝酵素のホモログ、MPN001、MPN688 はそれぞれ DnaN、Soj タンパク質のホモログであった。これらのタンパク質が接着器官部位に存在するのは接着器官形成と細胞分裂周期が同調する上で、何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。本年度は、これらの ORF 産物の局在を電子顕微鏡によってより高解像度で観察する試みも行った。電顕による ORF 産物の局在観察を行う上で、*M. pneumoniae* 細胞を Triton X-100 で処理し、細胞骨格構造を露出させる必要がある。その条件検討を行った結果、0.1% の Triton X-100 でおだやかに *M. pneumoniae* を処理することで細胞骨格構造 (Rod 部分) をきれいに露出させることができるようになった。また、電顕で撮影した複数の画像 (10 画像程度) を平均化することによって、より解像度の高い像を取得できるようになった。電顕による ORF 産物の局在観察は、ORF 産物に連結した蛍光タンパク質タグ (EYFP) に金コロイド抗体を反応させた免疫電顕法によって行った。本年度は MPN447(HMW1)、MPN452(HMW3)、MPN309(P65)、MPN312(P24) タンパク質にこの方法を適用し、これらのタンパク質が Rod 構造の先端から P65、HMW3、HMW1、P24 の順で存在しているのを明確に観察した。さらに、MPN453(P30) タンパク質に EYFP をつけた場合は、金コロイド抗体を反応させなくても電顕で Rod の先端部分が野生型より太くなって観察された。このことから、P30 タンパク質が Rod 構造の先端部分に存在していることが強く支持された。これら電子顕微鏡関連の研究は宮田研究室で行われた。また、Tn4001 挿入による変異株は現在まで 32 株が取得できている。この変異株の中には MPN474 の欠損株も含まれており、この株について細胞接着性などの性質を調べたが、現時点で野生株と比べて明らかな違いは見つかっていない。さらに、*M. pneumoniae* のより高性能な検出法をデザインするために、全ゲノム配列が明らかになっている M129 株と臨床分離株のゲノムをタイリング アレイで比較するとともに、PCR 検出型別プライマーの改良を行った。

<国内外での成果の位置づけ>

今年度は、電顕による細胞骨格構造の観察、局在分析を開始した。電顕観察を行うために、Triton X-100 を使用して細胞骨格構造を露出させるのは新しい方法ではないが、我々は処理条件を改良し、現時点でこの菌に対して最適な方法を確認している。また、電顕画像を平均化して高解像度の画像を得る方法は、海外のグループがクライオ電顕で取得した画像と比べても遜色のない良好な結果が得られている。高価な機器と長時間の解析が必要なクライオ電顕に比べて、本法は一般的な電顕装置で比較的簡便に行うことができ、今後研究を進める上で有用な方法になると考えられる。また、本研究計画で進めている全 ORF 産物の細胞内局在分析が完成すれば、自律増殖が可能な最小クラスの細菌である *M. pneumoniae* の細胞における全タンパク質の存在様式を概観するデータとなり価値が高いと考えている。本研究計画で作成した *M. pneumoniae* M129 株の全 ORF コレクションも Gateway システムに対応したベクターにクローン化されているので、汎用性が高く今後有効に利用できると思われる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

蛍光タンパク質による局在観察が当初のスケジュールに比べてかなりの遅れが出ている。技術的な問題ではなく作業手順の問題なので、今後作業効率を上げる努力をする。また、変異株コレクションの取得が思うように進んでいない。変異株のスクリーニングの方法 (Tn4001 の挿入部位の確認) がやや煩雑なため、多数の変異株を扱うには作業効率が悪い。今後スクリーニング法の改良も試みる。

<今後の課題>

ORF 産物の網羅的局在観察を完了させ、細胞骨格の構成成分と考えられるものや、興味をもたれる細胞内局在パターンを示す ORF を絞り込んでいく。その中から電子顕微鏡による観察対象とすべきものを決定していく。免疫電顕観察はこれまで蛍光タンパク質タグに対して金コロイド抗体を反応させて行っているが、さらに解像度を上げるために、His タグなど低分子量のタグを用いた方法、ORF 産物そのものに対する抗体を用いる方法も検討していく。また、Tn4001 挿入による変異株コレクションをさらに増やしていくとともに、ゲノムの塩基配列情報を利用して、マイコプラズマ肺炎のより精度の高い DNA 検出・診断法も検討していく。これらの解析で得られたデータは順次データベース化していく。

<成果公表リスト>

1. 0801191524

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

2. 0712282017

Miyata, M. Chapter 6 Molecular Mechanism of *Mycoplasma* Gliding - A Novel Cell Motility System, *In* Lenz, P. (ed.) *Cell Motility*, 2007, Springer New York, ISBN : 0387730494

3. 0712281957

Nakane, D. and Miyata, M. Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104, 19518-19523.

4. 0709281735

宮田真人 マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム —ユニークな生体運動— *日本細菌学会雑誌* 2007, 62, 347-361.

5. 0702132023

宮田真人 表面を・つかんではなす・マイコプラズマ *表面科学* 2007, 28, 198-203

6.

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, in press