

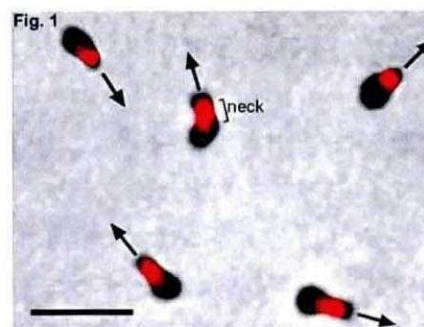
マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム

宮田 真人

大阪市立大学大学院理学研究科

概要

病原性のバクテリア(=細菌)の1グループであるマイコプラズマは、片方の極に形成される膜突起でガラスなど固形物の表面にはりつき、はりついたまま一方に動く“滑走運動”をおこないます(Fig. 1:矢印は運動の方向。Gli349(後述)が赤く染めてある。スケールは2ミクロン)。マイコプラズマ=モービレの場合、速度は毎秒2-4.5ミクロン(細胞長の約3-7倍)にも達します。しかし、どのマイコプラズマのゲノムを調べても、ミオシンなどのモータータンパク質の遺伝子も、運動性のバクテリアで一般的に見つかるべん毛や線毛などの遺伝子も見あたりません。これはマイコプラズマの滑走運動が、現在の生物学では説明できないミステリーであることを意味しています。本研究者はさきがけ研究開始時まで、マイコプラズマ=モービレについて、膜突起基部(neckと命名)表面に局在する2つの巨大タンパク質が重要な役割を果たしていること、またフリーズフラクチャー電子顕微鏡法で neck 部分に約50ナノメートルの“あし”の様な構造が観察されること、最大力が27ピコニュートンであることなどを明らかにしていました。本研究では、以下の(1)-(6)などに示す実験結果を得て、それをもとに滑走メカニズムのモデルを提案しました。



1. 滑走タンパク質の同定

滑走運動に直接かかわる4つのタンパク質を同定した(文献 1,5,9,10)。それらはゲノム上にタンデムにコードされており、分子量はそれぞれ123K、349K、521K、42Kと予測される(Gli123, Gli349, Gli521, P42と命名)(Fig. 2)。これらの滑走タンパク質のアミノ酸配列には既知のものとの類似性は見られなかった。抗体や変異株を用いた実験から、滑走タンパク質各々の数百分子が細胞 neck 上に存在して、滑走装置を形成しており、Gli123、Gli349、Gli521、P42のそれぞれがマウント、あし、ギア、モーターとして働いていると考えられた。

Fig. 2

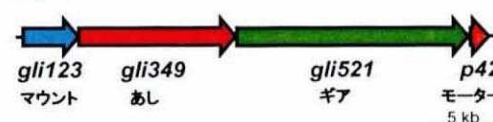
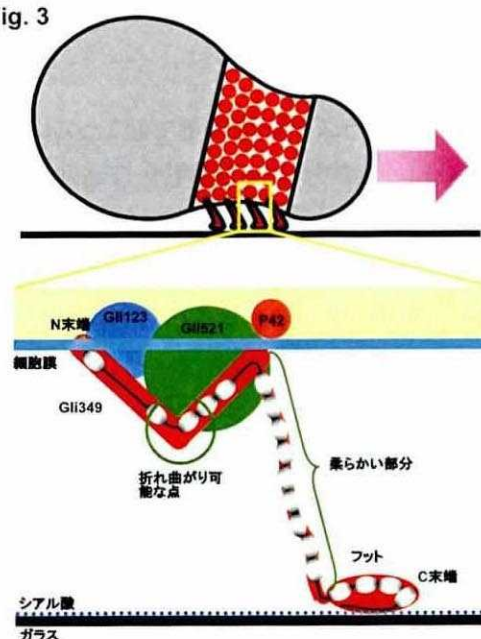


Fig. 3



2. 滑走タンパク質の分子形態

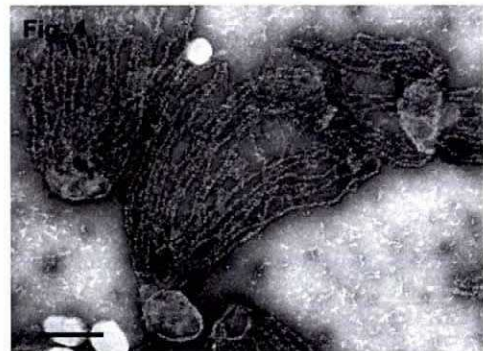
Gli349 タンパク質を精製して電子顕微鏡および原子間力顕微鏡で観察したところ、その分子は全長約 100 ナノメートルの、3カ所のおれ曲がりをもつ“音符”のような形状をしていた(Fig. 3)(文献 8,12)。Gli349 分子はN 末端側で細胞に埋め込まれており、C 末端側でガラスなどの固形物表面に接してあしとして働いていると考えられる。Gli521 タンパク質分子は直径約 13 ナノメートルの球状で、2次元に重合する性質を持っている。このことはこの分子が細胞表面でシートを形成していることを示唆している。

3. 滑走における結合対象

マイコプラズマはガラス、プラスチック、動物細胞など様々な固形物表面に結合して動くことができる。しかし実際には、培地中に添加している血清中に含まれるシアル酸に結合して運動していることが、各種物質の滑走に与える影響を調べることで明らかになった(文献 14)。シアル酸は動物細胞表面に一般的に見られる構造で、インフルエンザウイルスやボツリヌス毒素などの病原因子が動物に結合する際の標的分子として知られている。

4. 滑走装置とそれを支える構造

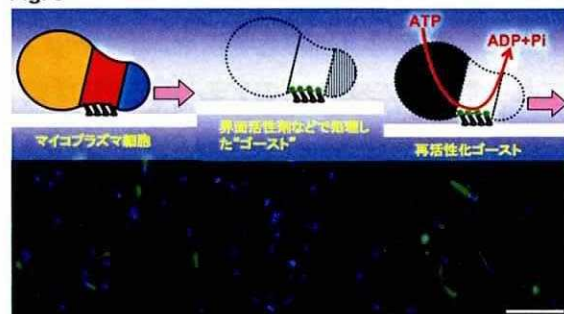
細胞表面を電子顕微鏡で詳細に観察すると neck 表面に繊維状の構造が観察される。これは、滑走のあしが固形物表面をつかんでいないときに細胞表面にはりついている状態が見えているものと考えられる。細胞から界面活性剤で細胞膜を除去すると、くらげ様の構造が観察された(Fig. 4、スケールは 0.2 ミクロン)。くらげの足に当たる部分が neck に対応している。くらげ構造が骨格としてマイコプラズマ細胞を支えているか、滑走装置形成の足場になっているものと考えられる。



5. 滑走ゴースト

マイコプラズマ細胞内部で起こっている反応を直接とらえるために、細胞膜を界面活性剤で透過化し、“ゴースト”を作製した(Fig. 5、下図は2秒間の軌跡。スケールは 5 ミクロン)。このゴーストに ATP を加えることにより、生きた細胞と同じ速さで動かすことに成功した。この系を用いて、未知の ATP アーゼ(前出の P42 と考えられる)が ATP を ADP とリン酸に加水分解することで滑走運動が起こっていることを証明した(文献 2,11)。

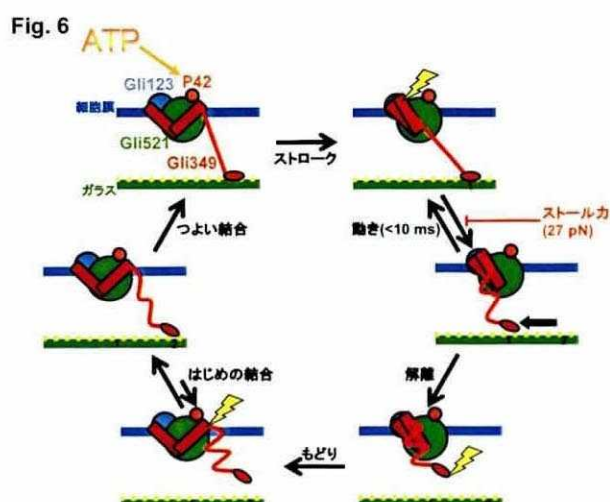
Fig. 5



6. マイコプラズマ滑走運動の特徴とメカニズム

本研究により、マイコプラズマ滑走運動が既知の生体運動のものとは全く異なることが明らかになった。メカニズムをミオシンなどのモータータンパク質とくらべた場合、以下のことが特徴となる。(i)装置の半分は細胞外に存在している。(ii)ATP が加水分解される部位とガラス表面のシアル酸をつかんだり離したりする位置は 50 ナノメートルという長い距離で隔てられている。(iii)レールであるシアル酸には方向性がない。(iv)滑走装置1

ユニットは熱ゆらぎレベルの弱い力しか発生していない。(v)あしは横方向の力に対して弱いため、メカニズムには引く過程しか存在しないと考えられる。これらの特徴と滑走装置の構造をもとに、Fig. 6 の様なモデル(作業仮説)を提出した。ここでの重要な仮定は、あしに張力がかかることによりステップが次に進行することである。これまでに調べた滑走やガラス結合に影響を及ぼす因子、すなわち抗体や変異の阻害効果と、それらの滑走装置における作用点の全てはこの作業仮説を支持している。



7. 今後の展開

本研究により、マイコプラズマの滑走運動は具体的にイメージできるメカニズムになった。今後はモータータンパク質と、バクテリアのぺん毛モーターに続く「第3の生体運動」の地位を得ることを目指し、以下の5項目について研究を行う。(i)滑走タンパク質の高解像度の像を得る。(ii)蛍光観察と力測定を行い、モデルを検証する。(iii)モデルを数学的に検証する。(iv)単離したタンパク質を用いた再構成系を確立する。(v)シアル酸結合部位の構造など、医療分野に役立つ情報を提供する。

参考文献

1. Atsuko Uenoyama, Akiko Kusumoto, and Makoto Miyata, "Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during *Mycoplasma mobile* gliding" *Journal of Bacteriology*, **186**, 1537-1545, (2004)
2. Jake D Jaffe, Makoto Miyata, and Howard C Berg, "Energetics of gliding motility in *Mycoplasma mobile*" *Journal of Bacteriology*, **186**, 4254-4261, (2004) (関連する図が表紙に採用された。)
3. Makoto Miyata and Jennifer D Petersen, "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)

4. Tsuyoshi Kenri, Shintaro Seto, Atsuko Horino, Yuko Sasaki, Tsuguo Sasaki, and Makoto Miyata, "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)
5. Akiko Kusumoto, Shintaro Seto, Jake D Jaffe, and Makoto Miyata, "Cell surface differentiation of *Mycoplasma mobile* visualized by surface protein localization" *Microbiology*, **150**, 4001-4008, (2004) (学会誌 *Microbiology Today* Feb 2005 の hot off the press に採りあげられた。)
6. Shintaro Seto, Tsuyoshi Kenri, Tetsuo Tomiyama, and Makoto Miyata, "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, (2005) (関連する図が表紙に採用された。)
7. Yuichi Hiratsuka, Makoto Miyata, and Taro QP Uyeda, "Living microtransporter by uni-directional gliding of *Mycoplasma* along microtracks" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**, 318-324, (2005)
8. Metsugi Shoichi, Atsuko Uenoyama, Jun Adan-Kubo, Makoto Miyata, Kei Yura, Hidetoshi Kono, and Nobuhiro Go, "Sequence analysis of gliding protein Gli349 in *Mycoplasma mobile*" *Biophysics*, **1**, 33-43, (2005)
9. Shintaro Seto, Atsuko Uenoyama, and Makoto Miyata, "Identification of 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding" *Journal of Bacteriology*, **187**, 3502-3510, (2005)
10. Atsuko Uenoyama and Makoto Miyata, "Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*" *Journal of Bacteriology*, **187**, 5578-5584, (2005)
11. Atsuko Uenoyama and Makoto Miyata, "Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12754-12758, (2005) (関連する図が表紙に採用された。)(コメントリーに採りあげられた。)(2005年8月23-24日の、日本経済新聞夕刊、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。)
12. Jun Adan-Kubo, Atsuko Uenoyama, Toshiaki Arata, and Makoto Miyata, "Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for glass binding of *Mycoplasma mobile* gliding revealed by rotary-shadowing electron microscopy" *Journal of Bacteriology*, **188**, 2821-2828, (2006) (関連する図が表紙に採用された。)

13. Yuichi Hiratsuka, Makoto Miyata, Tetsuya Tada, and Taro QP Uyeda, "A microrotary motor powered by bacteria" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13618-13623, (2006)
14. Ryoichiro Nagai and Makoto Miyata, "Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces" *Journal of Bacteriology*, **188**, 6469-6475, (2006)
15. Makoto Miyata, "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)
16. Makoto Miyata and Hiroshi Ogaki, "Cytoskeleton of *mollicutes*" *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **11**, 256-264, (2006)
17. 宮田真人
「未知のメカニズム, マイコプラズマの滑走運動 -レールのないすべり運動?」*生物物理*, **44**, 218-221, (2004)
18. 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)
19. 宮田真人
「マイコプラズマの細胞運動メカニズム ATP で滑走するバクテリア」*BioNics*, **3**, 52-58, (2006)
20. 宮田真人
「マイコプラズマの滑走運動-ここまでわかった未知の構造と生体運動メカニズム」*顕微鏡*, **41**, 39-44, (2006)
21. 宮田真人
「電顕に期待するもの」*細胞工学*, **25**, 1186-1187, (2006)