

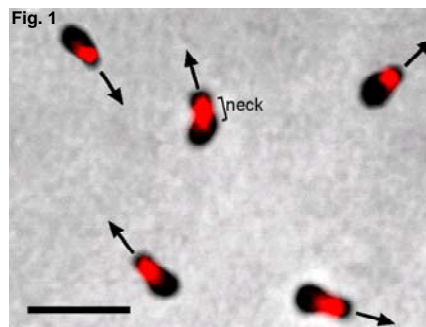
## 研究課題別評価

### 1 研究課題名: マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム

### 2 研究者氏名: 宮田真人

### 3 研究のねらい:

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”をおこなう(Fig. 1:矢印は運動の方向。Gli349(後述)が赤く染めてある。赤い部分が“neck”。スケールは2ミクロン)。本研究で主に用いたマイコプラズマ=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)にも達する。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らない。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る。私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、細胞が出す最大力が 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た。



### 4 研究成果:

#### (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。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

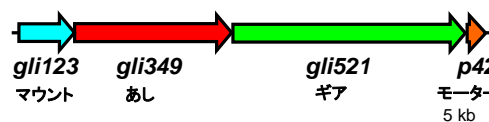
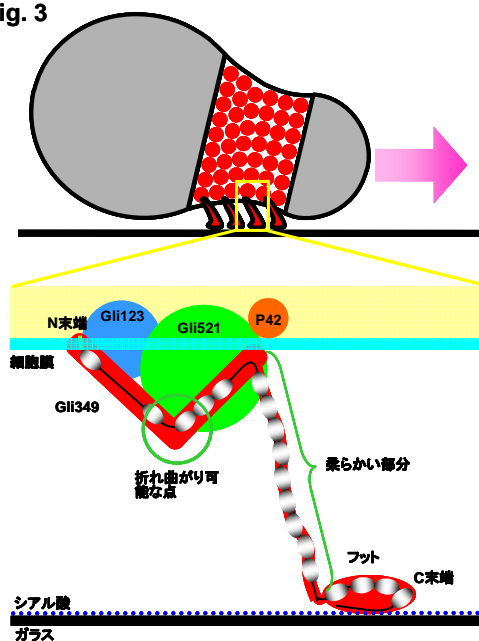


Fig. 3



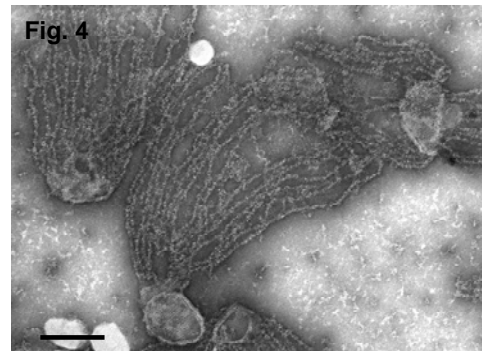
#### (2) 滑走タンパク質の分子形態

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、上は細胞の模式図で、下は滑走装置を拡大したもの。赤い棒状の分子が Gli349 タンパク質)。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 ナノメートルのほぼ球状で、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、滑走のための力を支えていることを示唆している。

### (3) 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、滑走のためのあし (Gli349) 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)。くらげの頭がマイコプラズマの細くなっている端に対応し、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。



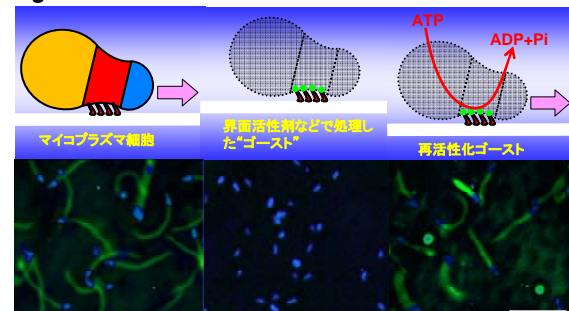
### (4) 滑走における結合対象

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。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組織に結合する際の標的分子として知られている。

### (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 中央カラム)。この図では左から右に向けて実験の段階が進行する。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。

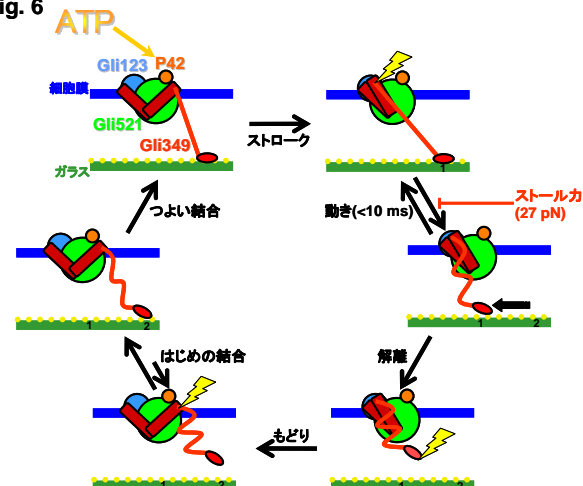
Fig. 5



### (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

Fig. 6



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、あしにかかる張力が変化することでステップが進行することである(Fig. 6 では稲妻で示してある)。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。

## 5 自己評価:

当初の研究目標は、(i)滑走にかかわる装置の構造を明らかにする、(ii)装置を構成しているタンパク質の構造を明らかにする、(iii)滑走にかかわる新たな構造とタンパク質を同定する、(iv)滑走のエネルギー源を特定する、(v)滑走の“あし”の実際の動きをとらえる、(vi)あしの固形物への結合を理解する、の6項目であった。研究はほぼ当初の計画に沿って展開し、5つの項目については目に見える形で結果を残すことができた。さらに、これらの結果は、今後に進むべき方向と手段を私に与えてくれた。残念なこと(vi)については期間中にはっきりとした結果を残すことができなかったが、実現に向けて、分子に関する情報と、計測技術と、ツールとして必要な分子、の3つの部分で確実な進歩を得た。さきがけ研究の期間は終了したが、ごく近い将来に結果を残せるものと思われる。

## 6 研究総括の見解:

従来知られている運動系と異なる運動系の研究で、非常にユニークで興味を引くテーマであり、本人のプレゼンテーション能力も優れていることもあって常に領域会議では議論が沸騰した。世界的に見てもこの系の研究者は他にまったく居ないと言う研究を推し進めている開拓者魂は、立派である。当初掲げた研究課題も地道に着実に進み、細菌関係の専門誌はもとより、米国科学アカデミー紀要(PNAS)の解説記事でも注目されたマイコプラズマの運動メカニズムの解明は高く評価できる。今年度のサイエンスチャンネル出演者として推薦し、現在成果ビデオが制作されているが、日本細菌学会の H19 年小林六造記念賞も内定した様に客観的にも評価され始めている。

## 7 主な論文等:

論文 英文原著 15 報、英文総説 2 報、邦文 7 報

- (1) 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)
- (2) 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) (selected for cover illustration and commentary)
- (3) 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) (selected for cover illustration)
- (4) 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)
- (5) **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)

受賞 1件:平成 19 年小林六造記念賞(日本細菌学会)

招待講演 国際 3 件、国内 10 件:

- (1) 宮田真人、「細菌学における可視化技術—運動、細胞内構造、分子形態—」、第77回日本細菌学会総会 2004年4月1-3日、大阪
- (2) Makoto Miyata, “Motility Organ of Mycoplasma.” The 104th general meeting of American Society for Microbiology. May 23-27, 2004, New Orleans, USA.
- (3) 宮田真人、「滑走バクテリア、マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム」、第32回生体分子科学討論会 2005年6月24-25日、大阪
- (4) Makoto Miyata, “Molecular mechanism of mycoplasma gliding, a novel mechanism of biological motility.” 10th Keihanna Conference on Molecular Biophysics (KCMB2005). July 31-Aug 2, 2005, Keihanna, Japan.
- (5) Makoto Miyata, “Molecular mechanism of mycoplasma gliding, a novel system of cell motility.” The 2006 Biophysical Society Annual Meeting. Feb 18-23, 2006, Salt Lake City, USA.