

マイコプラズマ滑走運動の装置とメカニズム

Machinery and Mechanism of *Mycoplasma* Gliding

宮 田 真 人

Makoto Miyata

^a大阪市立大学・大学院理学研究科

要 旨 病原性のバクテリアであるマイコプラズマは細胞の一方の極に膜突起を形成し、その部分で固形物表面にはりつき滑るように動く、滑走運動を行う。そのメカニズムはこれまでに調べられてきた生体運動とは根本的に異なる。最速種、*Mycoplasma mobile* を用いた一連の研究により、その装置と構成タンパク質、さらにはメカニズムが明らかになりつつある。滑走の装置は4つのタンパク質から構成され、細胞内部からくらげのような骨格構造に支えられている。ATPを加水分解することによって作られた動きが、細胞表面の“クランク”タンパク質をへて“あし”タンパク質に伝わる。あしはひも状の構造で、シアル酸を結合して決まった方向に引っ張ることにより、細胞を前方向に進める。

キーワード：病原性バクテリア、巨大タンパク質、分子形状、動き伝達、細胞骨格

1. はじめに

マイコプラズマは、京都の舞妓さんがプラズマ放電で光っている状態ではなく、寄生性、あるいは病原性のバクテリア（細菌）の1グループを指す。生物学では、(1) 最小の細胞と遺伝情報を持つ、(2) ヒト肺炎の病原菌、(3) 動物細胞のコンタミ菌、として知られている。これまでに200種類以上が見つかっているが、一般的にマイコプラズマは、宿主組織の表面にはりつく能力に長けている。12種類が細胞の片側に膜突起を形成し、その突起部分で動物細胞やガラスなど固形物の表面にはりつき、突起のある側に向かって滑るように動く（図1A）¹⁻⁶。この動きを“マイコプラズマの滑走運動”といい、それは長時間撮影ではじめて捉えられるようなものではなく、リアルタイムのビデオで実感できるレベルである（<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/myco1.htm>）。その速度は、最速種の *Mycoplasma mobile*（マイコプラズマ・モービレ、以下、*M. mobile* と略）では毎秒2.5-4 μmで、ヒトに肺炎を起こす *Mycoplasma pneumoniae*（マイコプラズマ・ニューモニエ、以下、*M. pneumoniae* と略）では毎秒0.5-1 μmである。

一見多様に見える生物の運動も、そのメカニズムは実は多様ではない。現在までによく知られているものは2つである。ひとつはATPなどのヌクレオチドを加水分解してモータータンパク質がレールタンパク質の上を動くもので、筋肉、鞭毛、アメーバ運動など、真核生物の運動のほとんどがこれに

相当する。もうひとつは、バクテリアのべん毛の基部に存在するモーターで、このモーターは細胞外部から内部へのイオン通過に伴うエネルギーで回転する。マイコプラズマの滑走運動はそのどちらにも属さないユニークなもので、ごく最近まではそのメカニズムは全くの謎であった。

著者らは1997年以来、主に最速種である *M. mobile* を用いてこの謎に挑戦してきた。その内容は2006年にも本誌にて紹介する機会をいただいたため⁶、本稿ではそれ以降に明らかになった部分に焦点をあてて解説する。

2. 滑走の装置

2.1 概要

装置は4つのタンパク質、Gli123, Gli349, Gli521, P42から構成される⁷⁻¹⁰。そのうち3つはタンパク質としては異例の大きな分子量を持つため、名称に分子量をあらわした。すなわち、Gli123は123kの分子量を持つ。滑走における役割は、それぞれ以下のように考えている。Gli123：他のタンパク質を正しい位置に配置させる“マウント”，Gli349：滑走の“あし”，Gli521：動きをモーターからあしに伝える“ギア”，P42：ATPを加水分解して動きを発生する“モーター”。これらが図1Bで示すように膜突起の基部、すなわち細胞neck部分表面に細胞あたり450分子ずつ存在して滑走の装置を形成している^{8,10,11}。フリーズフラクチャーディープエッチレプリカ法で細胞とガラス表面との間を観察すると、50 nm長の棒、あるいは紐のような構造が膜とガラス表面をつないでいることが明らかになった¹²。私達は、この構造が固形物表面を後ろ方向に引っ張って細胞を前に進めると考えている。

^a 〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

TEL: 06-6605-3157

E-mail: miyata@sci.osaka-cu.ac.jp

2009年5月28日受付

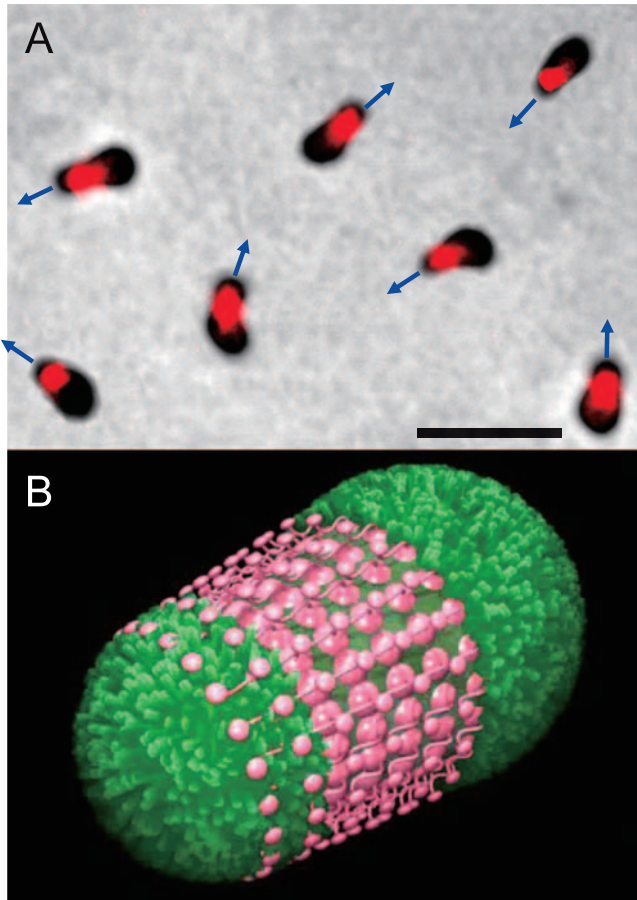


図1 *M. mobile* の細胞像。(A) 位相差顕微鏡像に、滑走装置の位置をあらわす蛍光シグナルが重ねてある。矢印は滑走方向を示す。滑走装置がある部分を neck と名づけた。スケールは 2 μm 。(B) 模式図。細胞の neck 部分に約 450 ユニットからなる滑走装置が存在する。それ以外の部分には宿主の免疫から逃れるための、抗原性変化のタンパク質が存在している。

2.2 あし

Gli349 に対するモノクローナル抗体が、滑走の速度とガラスへの結合の両方を阻害すること、Gli349 の 1 アミノ酸が置き換わった変異株がガラスに結合しなくなるなどから、このタンパク質が滑走のあしとして機能していると考えている^{10,15}。私達は、あしのタンパク質、Gli349 を単離精製し、ロータリーシャドウイングによる電子顕微鏡観察と、液中における原子間力顕微鏡観察でその分子形状を明らかにした^{13,14}。ロータリーシャドウイングでは斜め上方向から金属粒子を蒸着するため、解像度は犠牲になるが、ほそい構造でもコントラストが得られる。分子は単量体で、図2に示すように全長が 104 nm の八分音符のような形状をしていた。細胞上では N 末端で膜にアンカーされていると考えられる。20 nm の 2 つの“短いアーム”は比較的硬く、折れたたみ可能なヒンジでつながっているため、この部分が閉じたり開いたりしてあしが動いている可能性がある。C 末端には球状のドメイン、Foot が存在し、このドメインで結合対象である‘シアル酸’をつかんだり離したりしていると考えられる^{15,16}。シ

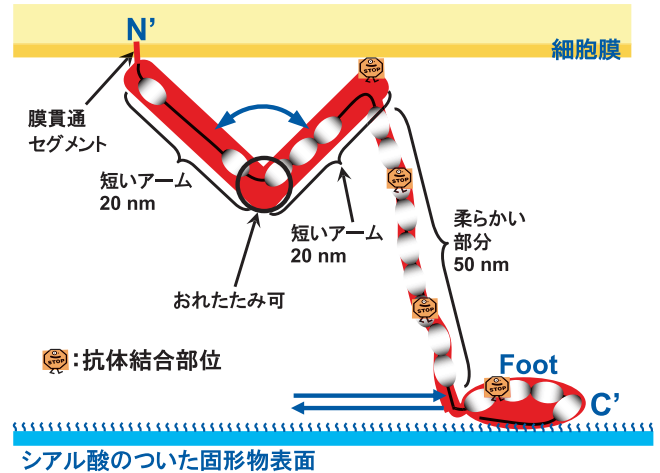


図2 細胞表面における Gli349 の模式図。中央のヒンジは 90 度の固定角を持つが、折れたたみ可と考えると電子顕微鏡の結果をよく理解することができる。Foot 内のアミノ酸 1 残基の置換で結合能が失われることから、この部分にシアル酸結合サイトが存在すると考えられる。分子の硬さは原子間力顕微鏡の液中観察からも示唆された。滑走や接着を阻害するモノクローナル抗体が結合する部分をマークしてある。

アル酸は動物細胞の表面の多くの分子、すなわちタンパク質や脂質に結合している多糖の先端に一般的に見られる構造で、ボツリヌス毒素やインフルエンザウイルスなど多くの病原因子の結合標的でもある。短いアームと球状の部分は 50 nm の柔らかい紐のような構造でつながっている。Gli349 タンパク質の全アミノ酸配列の 60% は、図中の楕円で示したように約 100 アミノ酸の弱いくりかえし配列で形成されている¹⁷。

2.3 ギア

Gli521 に対するモノクローナル抗体は、滑走しているマイコプラズマをガラスについたままに止めてしまう⁹。このことから、Gli521 はあしそのものではないが、滑走運動に必須な動きを行っている、すなわち“ギア”の様な役割を果たしていると考えられる。このタンパク質を精製してロータリーシャドウイングによる電子顕微鏡観察を行った。図3に示すように Gli521 は三量体で、“みつまた”形状であった。みつまたのそれぞれのアームが単量体である。単量体は、柔らかいヒンジを介してつながった 3 つのドメイン、すなわち C 末端側から Hook-Rod-Oval の様に構成され、膜貫通セグメントのある C 末端でお互いに結合してみつまたを形成している(図4)。みつまたの中心、すなわち Hook で形成されている部分は比較的硬く、3 回転対称である。滑走運動が細胞の決まった方向に向いていることを加味すると、Gli521 分子の Rod より N 末端側は細胞の軸に対して同じ方向を向いている可能性が高い。図中のアスタリスクで示した部分における変異が Gli349 に対するモノクローナル抗体による滑走と結合の阻害を抑制することから、Oval 部分で Gli349 に結合していることが示唆される^{15,18}。

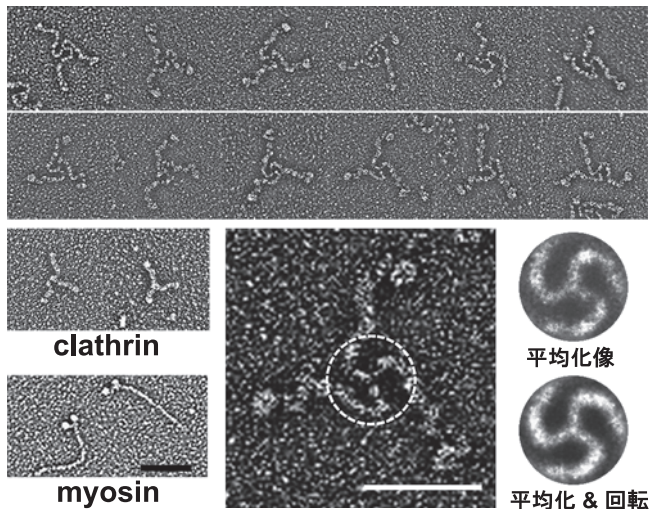


図3 Gli521のロータリーシャドウイング法による電子顕微鏡像。三量体の典型的なものを集めた。左下にはクラスリンとミオシンの、同様にして得た像が示してある。ここまでは同じ縮尺で、スケールは100 nm。中央下は拡大図。スケールは100 nm。白い枠で囲んだ部分は硬い構造であると考えられる。右下はその硬い部分を平均化したもので、120度ずつ回転させて重ねたのがその下の図である。

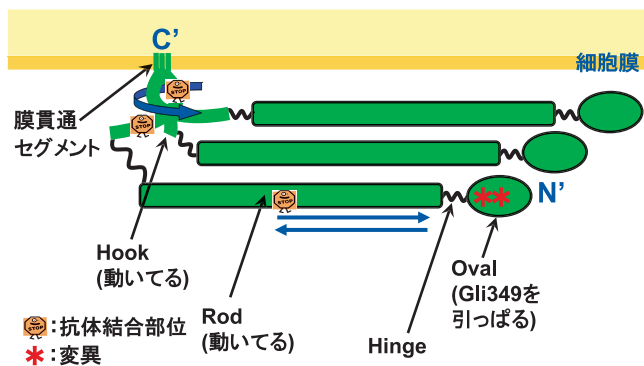


図4 細胞表面におけるGli521の模式図。ドメイン構造は、単離した分子をタンパク質加水分解酵素で部分的に分解することで明らかにした。Hook, Rod, Ovalはそれぞれ145, 230, 75 kDaの大きさである。HookとRodを合わせた長さは106 nmで、Ovalの大きさは16×11 nmである。遺伝子から予測されるアミノ酸配列ではN末端にも膜貫通セグメントが存在するが、合成後に除去される。Hookが集まってみつまたを形成している。滑走や接着を阻害するモノクローナル抗体が結合する部分をマークしてある。アスタリスクは、抗Gli349抗体が効かなくなる変異の位置を示す。

3 メカニズム

3.1 装置内における動きの伝達

図2と図4で示したそれぞれの位置を標的とするモノクローナル抗体は、添加することでマイコプラズマの滑走運動を阻害する¹⁵⁾。このことは標的位置が細胞の外側に露出しており、大きく動いていることを示唆している。膜にダメージを与えて細胞質を除いた“ゴースト”がATPの添加により細胞と同じ速度で滑走することから私達は、滑走運動の直接

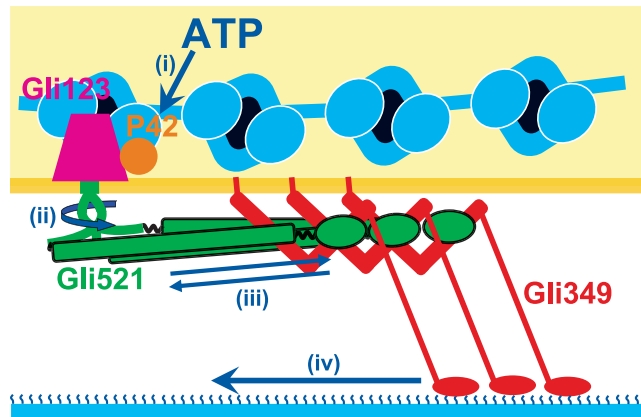


図5 滑走装置ユニットの模式図。Gli521のOvalがGli349の短いロッドの前方部分をつかんでいる。Gli123とP42の配置は想像である。滑走装置ユニットは細胞の内側からくだけ構造によって支えられている。P42がATPを加水分解して動きを作る。

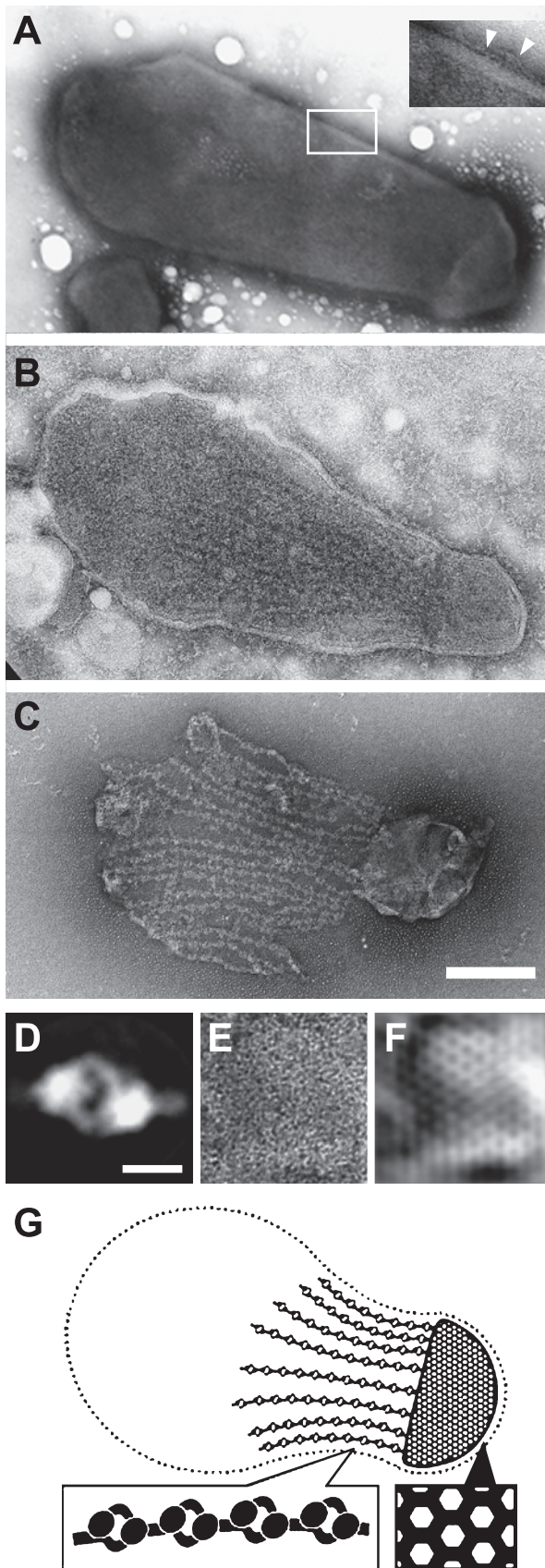
のエネルギー源がATPであると結論づけた¹⁸⁾。Gli123, Gli349, Gli521と共に合成されるタンパク質、P42はゴーストの滑走速度から予測されるATPaseの特徴に似た活性を持つ⁷⁾。また、Gli123タンパク質は開口部の方が広がっているガラスのような形状で、Gli349, Gli521と細胞上の同じ位置に、ほぼ同数が存在しており、Gli349, Gli521の細胞上での局在に重要である⁸⁾。これらのことから、私達は装置内での動きの伝達を図5のように考えている。すなわち、P42がATPを加水分解すること(i)で生じた動きがGli123や、Gli521の膜貫通セグメントをとおして外部に伝えられる。Gli521のHook部分は硬いみつまた構造で、軸を中心に動いている。この部分は回転しているかも知れない(ii)。柔らかいヒンジを介してHookとつながったRodは円運動を往復運動として伝える“クランク”として働き、OvalがGli349の短いロッドを引っばる(iii)。それに伴って50 nmのひも状部分がシアル酸をつかんでいるC末端の球状部分を引っばり、滑走運動が生じる(iv)。

3.2 前方向に動く

Gli349の短いロッドと、シアル酸を結合するFootは、50 nmの柔らかいひも状構造によって隔てられている。では滑走のあしはどのようにして決まった方向に細胞を引っばることが可能なのだろうか？以前の誌などで図を用いて議論してきたように、現在、私達は以下のように考えている^{2~6,13,19)}。すなわち、(1) Gli349がFootでシアル酸をつかんだ時に、前方向にかかった張力に装置が反応してFootを後ろ側に引っばる。(2) Footのシアル酸結合の強さは前方向への引っばりには弱いため、他のあしが動いて細胞を前に進めることによってシアル酸からはずれる。(3) シアル酸を離して張力がかからなくなるとGli349の短いロッドは元の構造に戻る。

4. 細胞内部からささえる構造

一般的にバクテリアには、細胞膜の外側にペプチドグリカ



ンの層が存在し、この構造が細胞壁として働く。しかしマイコプラズマにはこのペプチドグリカンが全く存在しない。ではどのような構造が接着や滑走に必要な力を受け止めるのであろうか？ヒトを含む真核生物では、内部に存在するチューブリンやアクチンなどのタンパク質で構成される‘細胞骨格’が細胞をささえている。近年、ほとんどのバクテリアでも、チューブリンやアクチンのホモログが細胞骨格として働いていることが明らかになってきた²⁰。しかし、*M. mobile*にはそのどちらも存在しない。この謎に迫るため私達は、*M. mobile*の細胞膜をトライトン X-100 で除去し、残った構造を観察した^{21,22}。その結果、*M. mobile*の滑走装置の内側に図6のようにくらげ様の構造が存在することが明らかになった。くらげの触手には長さ約 20 nm の回転対称体が 30 nm 周期に、傘には 12 nm 周期に格子構造が存在していた。くらげ構造は滑走装置と直接結合しているのだろうか？それに対する直接の答えはないが、Gli123, Gli349, Gli521 のそれぞれがない変異株において、くらげ構造の細部は保存されているものの、全体的な構造は野生株と異なり壊れていた。特に、Gli521 のない株でその傾向は顕著であった。また、触手にある回転対称体の数は滑走タンパク質の数と大きく異ならない。これらのことから、図5のように滑走装置のそれぞれのユニットが触手の回転対称体に結合している可能性が考えられる。くらげ構造を単離し、その構成タンパク質 10 個を、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法で同定した。PMF 法では、質量分析と遺伝情報をもちいてタンパク質を同定する。アミノ酸の配列からそれらタンパク質の機能を推定することは出来なかったが、興味深いことに 2 つのタンパク質が ATP 合成酵素の α , β サブユニットのそれぞれと明らかな相同性を持っていた。*M. mobile* はゲノム上の離れた位置に ATP 合成酵素の 8 サブユニットの全てを有している。また、くらげ構造の ATP 合成酵素サブユニットホモログの N 末端近辺には、既知のタンパク質と相同性のない配列が融合している。これらのことは、くらげ構造の ATP 合成酵素サブユニットホモログがくらげ構造特異的な役割を持っていることを意味している。滑走装置のユニットに結合していること、構成タンパク質に ATP 加水分解能があること、が示唆されたことなどから、くらげ構造の滑走運動における役割には以下のような可能性が考えられる。(1) 滑走装置を内側からささえる、(2) 滑走のタンパク質を輸送、配置する、(3) 装置と同様に動いて動きを伝えたり協同性を

図6 *M. mobile* の滑走をささえる細胞骨格、くらげ構造。(A) 細胞のネガティブ染色像。右上は表面の拡大像。滑走のあしであるフィラメント様の構造が観察される。(B) 細胞を 0.03% トライトンで処理した。細胞質が部分的に除去されたことで細胞骨格構造の輪郭が観察された。(C) 0.1% のトライトン処理によりくらげ構造ははっきりと観察された。(A, B, C) は同じ縮尺で、スケールは 200 nm。(D) 触手にある粒子の 970 像を平均化したもの。スケールは 10 nm。(E) 傘部分の拡大図。(F) (E) 画像をフーリエ処理したもの。格子構造のピッチは 12 nm。(G) 模式図。

作ったりする。もちろん、これらの役割の複数を果たしていることも考えられる。

5. おわりに

現在の微生物を対象とする研究は、遺伝学から発展した、狭義の“分子生物学”をぬきに考えることは不可能である。遺伝学は本来、目に見えないものを見えないものでもって説明する学問であるが、そこに生体高分子、その集合体、細胞、組織の構造を加えることで、具体的な理解が可能になる。その需要に答えるべく、蛍光をもちいた顕微鏡観察は今日の分子生物学の中心的手法になった。そして、次に分子生物学に必要な展開は、電子顕微鏡技術との融合かも知れない。私達の研究がそのテストケースになれば幸いである。

謝 辞

これまで研究につき合ってくれた共同研究者、とくに、未発表のデータを提供してくれた中根大介、野中孝裕、川口知恵各氏に、またこれまでに私達の研究にコメントをいただいた諸兄に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 宮田真人：生体の科学, 60, 98–102 (2009)
- 2) 宮田真人：生化学, 181, 31–35 (2008)
- 3) 宮田真人：現代化学, 446, 27–32 (2008)
- 4) 宮田真人：蛋白質核酸酵素 (PNE), 53, 1752–1758 (2008)
- 5) 宮田真人：日本細菌学会雑誌, 62, 347–361 (2007)
- 6) 宮田真人：顕微鏡, 41, 39–44 (2006)
- 7) Ohtani, N. and Miyata, M.: *Biochem. J.*, 403, 71–77 (2007)
- 8) Uenoyama, A. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 187, 5578–5584 (2005)
- 9) Seto, S., Uenoyama, A. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 187, 3502–3510 (2005)
- 10) Uenoyama, A., Kusumoto, A. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 186, 1537–1545 (2004)
- 11) Kusumoto, A., Seto, S., Jaffe, J.D. and Miyata, M.: *Microbiology*, 150, 4001–4008 (2004)
- 12) Miyata, M. and Petersen, J.: *J. Bacteriol.*, 186, 4382–4386 (2004)
- 13) Miyata, M.: in Lenz, P. (Ed.), *Molecular mechanism of mycoplasma gliding—a novel cell motility system*, Springer, New York, 137–175 (2007)
- 14) Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 188, 2821–2828 (2006)
- 15) Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 191, 1982–1985 (2009)
- 16) Nagai, R. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 188, 6469–6475 (2006)
- 17) Metsugi, S., Uenoyama, A., Adan-Kubo, J., Miyata, M., Yura, K., Kono, H. and Go, N.: *Biophysics*, 1, 33–43 (2005)
- 18) Uenoyama, A. and Miyata, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 12754–12758 (2005)
- 19) Miyata, M.: *Trends in Microbiol.*, 16, 6–12 (2008)
- 20) Gitai, Z.: *Cell*, 120, 577–586 (2005)
- 21) Nakane, D. and Miyata, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 19518–19523 (2007)
- 22) Nakane, D. and Miyata, M.: *J. Bacteriol.*, 191, 3256–3264 (2009)