

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24117002

研究課題名(和文)マイコプラズマ滑走運動のメカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of Mycoplasma gliding

研究代表者

宮田 真人(MIYATA, Makoto)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50209912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 135,600,000円

研究成果の概要(和文)：淡水魚の病原細菌、*Mycoplasma mobile*はその片側に滑走装置を形成し、ユニークなメカニズムで「滑走運動」する。本研究ではこれまでの実験結果から提案した運動メカニズムの作業仮説に基づき、滑走装置の構造、構成タンパク質、力学特性、シアル酸オリゴ糖結合、ATP加水分解とのカップリングなどを明らかにし、メカニズムの具体的な議論を行った。また、*M. mobile*と同じモリクテス綱に属する *Mycoplasma pneumoniae* と *Spiroplasma eriocheiris* についても、運動装置とその構成タンパク質を明らかにして運動メカニズムの議論を行った。

研究成果の概要(英文)： *Mycoplasma mobile*, a pathogenic bacterium of freshwater fish, forms a gliding machinery at a pole and performs 'gliding motility' by a unique mechanism. In this study, we clarified the structure of gliding machinery, component proteins, mechanical characters, binding with sialic acid oligosaccharides, coupling with ATP hydrolysis etc, based on the working model of the motility mechanism proposed from previous experimental results, and provided concrete discussion. In addition, we clarified the motility machinery and component proteins, for *Mycoplasma pneumoniae* and *Spiroplasma eriocheiris* belonging to the class Mollicutes like *M. mobile*, and discussed the motility mechanisms.

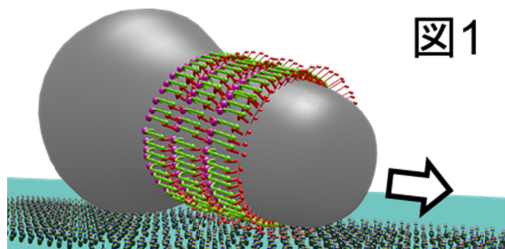
研究分野：細菌学

キーワード：細胞運動 力学測定 電子顕微鏡 スピロプラズマ モリクテス綱 病原細菌 ATP合成酵素 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマの仲間(モリクテス綱)は、ヒト肺炎病原菌や最小の微生物として知られる細菌の1グループである。ペプチドグリカン層をもたず、その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一方向に動く“滑走運動”を行う。その速度は最速種の *Mycoplasma mobile* (マイコプラズマ・モービレ、以下モービレと略)では、毎秒4.5ミクロン(細胞長の7倍)に達する。滑走運動はマイコプラズマの感染に重要であると考えられるが、代表者がこのテーマを手がけた1997年には現象の記載しか情報はなかった。

代表者は最速種のモービレを主に用いて研究を行い、滑走の装置、構成タンパク質、装置とタンパク質の構造、結合対象、運動と力の詳細、などを明らかにし、その研究成果からメカニズムを説明する仮説を提案した。モービレの研究は代表者とその共同研究者のみによって行われてきたもので、この仮説は全て自身の結果によっている。内容は次のとおりである。「滑走装置は膜突起の基部に全く新規の4種類の巨大タンパ



ク質から形成されており、やはりユニークな内部構造により支えられている。滑走装置からは長さ50ナノメートルのやわらかい“あし”が多数突きだしている(図1)。ATPの加水分解により装置の一部に動きが生じ、それが“クランク”のタンパク質を通して伝わると、“あし”のタンパク質が宿主細胞表面などのシアル酸オリゴ糖をつかんだり、ひっばったり、はなしたりして、滑走運動が起こる。代表者はさらに、ヒト肺炎菌である *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ・ニューモニエ、以下ニューモニエと略)や、その近縁種の運動や滑走装置を調べ、マイコプラズマの

仲間の運動の装置とメカニズムには大きな多様性があることを示唆していた。

2. 研究の目的

(1) 前項であげたモービレの滑走運動メカニズムを検証し、さらに具体性を与える。(2) モービレ以外のマイコプラズマの仲間の運動メカニズムについてアウトラインを明らかにする。(3) マイコプラズマという小さなグループに3種類もの運動能が存在する理由を考察する。

3. 研究の方法

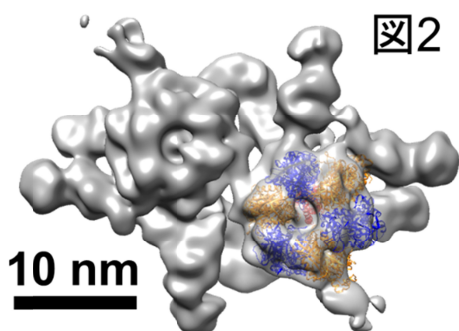
(i) 菌体、運動装置、運動装置タンパク質の電子顕微鏡による構造解析、(ii) 遺伝子操作による滑走装置タンパク質の同定、(iii) 運動装置タンパク質の生化学的解析、(iv) 光学顕微鏡による力学解析、(v) 高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いた運動装置の動き解析、を用いてモービレ、ニューモニエ、そして *Spiroplasma eriocheiris* (スピロプラズマ・エリオケイリス、以下スピロプラズマと略)の運動能の研究を行った。

4. 研究成果

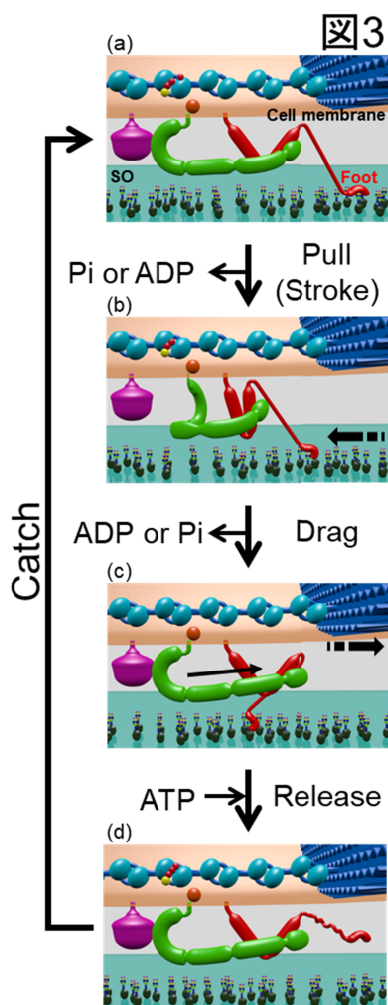
(1) モービレの滑走運動

クライオ電子顕微鏡、電子線トモグラフィー、単粒子解析、ネガティブ染色、急速凍結レプリカ法などの様々な電子顕微鏡解析を行うことにより、滑走装置構造を明らかにした。滑走装置の内部構造では、すだれ状の構造が細胞膜内側を支えており、膜を介して表面構造につながっていた。すだれ状の構造から滑走のモーターと考えられる粒子を単離して電子顕微鏡で解析したところ、ATP合成酵素と極めて似通った六量体が、他に例のないアームでつながった二量体を形成していた(図2)。また蛍光タンパク質によるラベルと生化学的解析により、滑走に直接かわる13種類のタンパク質を同定し、それぞれの役割を示唆した(雑誌論文15, 19, 20, 21, 22)。

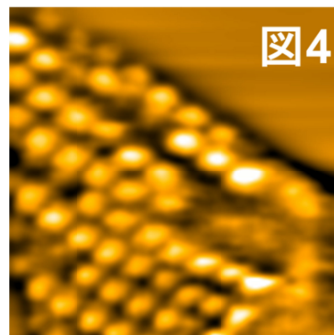
シアル酸オリゴ糖の認識機構および、あしたンパク質において結合活性を持つドメインを明らかにした(雑誌論文 13, 14, 17, 18) .



ATP 加水分解中間体とシアル酸オリゴ糖への結合の関係, あしのストローク, シアル酸オリゴ糖解離の方向性, あしの発生する力, などを明らかにすることで, 滑走メカニズムを具体的に議論することを可能にした(図3)(雑誌論文 1, 4, 8, 10, 12, 13, 14, 23) .



活性のある滑走モーターを, 単離した状態と菌体内部に存在する状態(図4, 粒子のそれぞれが図2の構造に対応)のそれぞれにおいて, 高速 AFM を用いて動きを可視化することに成功した .

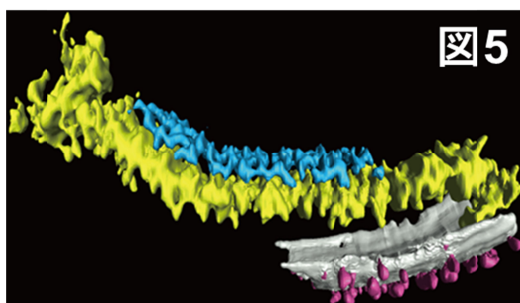


(2) 他のマイコプラズマの運動

ニューモニエの滑走装置の構造とその構成タンパク質の配置をクライオ電子顕微鏡と蛍光顕微鏡で明らかにした(図5) . その結果を基に滑走運動メカニズムの議論を行った(雑誌論文 3, 7, 9, 11) .

滑走に直接かかわる3つのタンパク質, P1 adhesin, MPN387, P65 について組み換えタンパク質を単離して, 構造解析を行った(雑誌論文 6) .

スピロプラズマのゲノム配列を決定し, 遊泳装置の内部構造の単離と構成タンパク質の同定を行った . また, two component system に依存しない化学走性の存在を示した(雑誌論文 2, 5) .



以上の結果より, モービルの滑走運動が F-type ATPase と接着タンパク質の偶然的接触から, スピロプラズマの遊泳運動が細菌のアクチンである MreB の構造変化から発生したことを提案した(雑誌論文 7, 英文総説 1) . この提案は, 総括研究において, 全生命における運動能進化を議論することにつながった .

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 23 件)

1. Mizutani M, Tulum I, Kinosita Y, Nishizaka T, and Miyata M (2018) Detailed analyses of stall force generation in *Mycoplasma mobile* gliding. **Biophysical Journal** 114, 1411-9. 査読有 DOI:10.1016/j.bpj.2018.01.029.
2. Terahara N, Tulum I, and Miyata M (2017) Transformation of crustacean pathogenic bacterium *Spiroplasma eriocheiris* and expression of yellow fluorescent protein. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 487, 488-93. 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2017.03.144.
3. Trussart M, Yus E, Martinez S, Baù D, Tahara YO, Pengo T, Widjaja M, Kretschmer S, Swoger J, Miyata M, Marti-Renom MA, Lluch-Senar M, and Serrano L (2017) Defined chromosome structure in a genome-reduced *Mycoplasma pneumoniae*. **Nature Communications** 8, 14665. 査読有 DOI: 10.1038/ncomms14665.
4. Mizutani M and Miyata M (2017) Force measurement on *Mycoplasma mobile* gliding using optical tweezers. **Bio-protocol** 7, Iss 3, 2/5/2017. 査読有 DOI:10.21769/BioProtoc.2127.
5. Liu P, Zheng H, Meng Q, Terahara N, Gu W, Wang S, Zhao G, Nakane D, Wang W, and Miyata M (2017) Chemotaxis without conventional two-component system, based on cell polarity and aerobic conditions in helicity-switching swimming of *Spiroplasma eriocheiris*. **Frontiers in Microbiology** 8, 58. 査読有 DOI:10.3389/fmicb.2017.00058.
6. Kawakita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Tulum I, Tahara YO, Katayama E, Namba K, and Miyata M (2016) Structural study of MPN387, an essential protein for gliding motility of a human pathogenic bacterium, *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal of Bacteriology** 198, 2352-9. 査読有 DOI:10.1128/JB.00160-16.
7. Miyata M and Hamaguchi T (2016) Integrated information and prospects for gliding mechanism of the pathogenic bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology** 7, 960. 査読有 DOI:10.3389/fmicb.2016.00960.
8. Tanaka A, Nakane D, Mizutani M, Nishizaka T, and Miyata M (2016) Directed binding of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, shown by detachment force and bond lifetime. **mBio** 7, e00455-16. 査読有 DOI:10.1128/mBio.00455-16.
9. Kawamoto A, Matsuo L, Kato T, Yamamoto H, Namba K, and Miyata M (2016) Periodicity in attachment organelle revealed by electron cryotomography suggests conformational changes in gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. **mBio** 7, e00243-16. 査読有 DOI:10.1128/mBio.00243-16.
10. Morio H, Kasai T, and Miyata M (2015) Gliding direction of *Mycoplasma mobile*. **Journal of Bacteriology** 198, 283-290. 査読有 DOI:10.1128/JB.00499-15.
11. Nakane D, Kenri T, Matsuo L, and Miyata M (2015) Systematic structural analyses of attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. **PLOS Pathogens** 11, e1005299. 査読有 DOI:10.1371/journal.ppat.1005299. (2015年12月4-7日の, 日刊工業新聞, 日本経済新聞, 大阪日日新聞の, 各紙で報道された.)
12. Lee W, Kinosita Y, Oh Y, Mikami N, Yang H, Miyata M, Nishizaka T, and Kim D (2015) Three-Dimensional superlocalization imaging of gliding *Mycoplasma mobile* by extraordinary light transmission through arrayed nanoholes. **ACS Nano** 9, 10896-908. 査読有 DOI:10.1021/acsnano.5b03934.
13. Kasai T, Hamaguchi T, and Miyata M. (2015) Gliding motility of *Mycoplasma mobile* on uniform oligosaccharides. **Journal of Bacteriology** 197, 2952-7. 査読有 DOI:10.1128/JB.00335-15. (selected for cover). 
14. Kinosita Y, Nakane D, Sugawa M, Masaike T, Mizutani K, Miyata M, and Nishizaka T (2014) Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111, 8601-6. 査読有 DOI:10.1073/pnas.1310355111. (2014年5月29日の日刊工業新聞 Business line, 2014年8月4日の産経新聞で報道された.)
15. Tulum I, Yabe M, Uenoyama A, and Miyata M (2014) Localization of P42 and an F1-ATPase α -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. **Journal of Bacteriology** 196, 1815-24. 査読有 DOI:10.1128/JB.01418-13. (selected for cover). 
16. Taniguchi T, Miyauchi K, Nakane D, Miyata M, Muto A, Nishimura S, and Suzuki T (2013) Decoding system for the AUA codon by tRNA^{Ile} with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*. **Nucleic Acids Research** 41, 2621-31. 査読有 DOI:10.1093/nar/gks1344.

17. Kasai T and **Miyata M** (2013) Analyzing inhibitory effects of reagents on *Mycoplasma* gliding and adhesion. **Bio-protocol** 3, e829. 査読有 DOI:10.21769/BioProtoc.829.

18. Kasai T, Nakane D, Ishida H, Ando H, Kiso M, and **Miyata M** (2013) Role of binding in *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pneumoniae* gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds. **Journal of Bacteriology** 195, 429-35. 査読有 DOI:10.1128/JB.01141-12. (selected for cover).



19. Wu HN and **Miyata M** (2012) Whole surface image of *Mycoplasma mobile*, suggested by protein identification and immunofluorescence microscopy. **Journal of Bacteriology** 194, 5848-55. 査読有 DOI:10.1128/JB.00976-12.

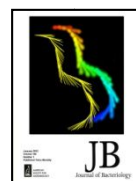
20. Adan-Kubo J, Yoshii SH, Kono H, and **Miyata M** (2012) Molecular structure of isolated MvspI, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. **Journal of Bacteriology** 194, 3050-7. 査読有 DOI:10.1128/JB.00208-12. (selected for cover).



21. Wu HN, Kawaguchi C, Nakane D, and **Miyata M** (2012) "Mycoplasmal antigen modulation", a novel surface variation suggested for a lipoprotein specifically localized on *Mycoplasma mobile*. **Current Microbiology** 64, 433-40. 査読有 DOI:10.1007/s00284-012-0090-y.

22. Sato C, Manaka S, Nakane D, Nishiyama H, Suga M, **Nishizaka T**, **Miyata M**, and Maruyama Y. (2012) Rapid imaging of mycoplasma in solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 417, 1213-8. 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.111.

23. Nakane D and **Miyata M** (2012) *Mycoplasma mobile* cells elongated by detergent and their pivoting movements in gliding. **Journal of Bacteriology** 194, 122-30. 査読有 DOI:10.1128/JB.05857-11. (selected for cover).



[英文総説] (計 2 件)

1. **Miyata M** and Hamaguchi T (2016) Prospects for the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. **Current Opinion in Microbiology** 29, 15-21. 査読有 DOI:10.1016/j.mib.2015.08.010.
2. **Miyata M** and Nakane D (2013) Gliding

mechanism of *Mycoplasma pneumoniae* subgroup -implication from *Mycoplasma mobile*-.

Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis.

Browning G, Citti C (Ed.) Caister Academic Press. 237-52. 査読有



(和文総説) (計 7 件)

1. **宮田真人** (2018) 「マイコプラズマ・モービルの滑走運動」, ~運動マシナリーの多様性から見えるもの(前編)~, **生物工学会誌** 96, 4. 200-203. 査読無 https://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_vol96_no05.html
2. **宮田真人**, 南後 守, 橋爪 章仁, 原田 明他(2017) 「最小微生物, マイコプラズマのユニークな滑走運動」, **CSJ レビュー26 分子マシンの科学 分子の動きとその機能を見る**, 日本化学会編 14-21.68-75. 査読有
3. **宮田真人** (2017) 「最小微生物, マイコプラズマのユニークな滑走運動」, 日本化学会編, 「CSJ レビュー26 分子マシンの科学 分子の動きとその機能を見る」 68-75. 査読無
4. **宮田真人** (2017) 「肺炎病原菌, マイコプラズマの滑走運動」, **化学療法の領域** 33, 275-81. 査読無
5. **宮田真人**, 神谷 茂他 (2016) 「マイコプラズマの運動機構」, **最新マイコプラズマ学** 19-24. 査読有
6. **宮田真人** (2015) 「滑走するマイコプラズマ」, **臨床と微生物** 42, 465-8. 査読無
7. **宮田真人** (2012) 「マイコプラズマの生物学」, **月刊メビオ** 29, 8-14. 査読無



(和文その他) (計 2 件)

1. **宮田真人**(2015) 最小微生物, マイコプラズマの滑走運動, **Biologia 阪大理生物同窓会誌**, 12, pp10-5. 査読無 http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/alumni/html/download/vol12_2015.pdf
2. **宮田真人**(2014) 最小生物, マイコプラズマ滑走運動のメカニズム. **科研費 NEWS**, 3, 16. 査読無 https://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22_letter/data/news_2014_vol3/news_2014_vol3.pdf

[学会発表] (計 239 件)

1. **Miyata M** (2017) Gliding motility of *Mycoplasma* developed from rotary ATPase, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017 (名古屋市)

2. **Miyata M** (2017) Gliding motility of *Mycoplasma mobile*, IGER International Symposium on "Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity (名古屋市)
3. **宮田真人** (2017) 感染と生き残り戦略から俯瞰するモリクテス綱の運動能, 日本マイコプラズマ学会 第44回学術集会 (千葉市)
4. **宮田真人** (2016) F-ATPase から進化したマイコプラズマ滑走運動, 第54回日本生物物理学会年会 (つくば市)
5. **宮田真人** (2016) 病原細菌, マイコプラズマの滑走運動 - メカニズムと起源 -, 第83回日本細菌学会北海道支部各術総会 (札幌市)
6. **宮田真人** (2016) マイコプラズマ滑走運動, 大阪大学蛋白質研究所セミナー第6回分子モーター討論会 分子モーターの研究の最前線 (吹田市)
7. **Miyata M** (2016) Origin of motility suggested by special bacteria, The 2015 OCARINA Annual International Meeting (大阪市)
8. **Miyata M** (2016) *Mollicutes* species developed three motility systems independently, University of Bordeaux - Osaka University, Osaka City University Mini-Symposium on Synthetic Biology (吹田市)
9. **Miyata M** (2015) Gliding Machinery of *Mycoplasma mobile*, pathogenic bacterium, the 2nd EastAsia Microscopy Conference (EAMC2) (姫路市)
10. **宮田真人** (2015) 最小細菌、マイコプラズマの滑走運動, 大阪大学微生物研究所アドバンスセミナー (吹田市)
11. **宮田真人** (2015) 最小細菌、マイコプラズマの滑走運動, エアロ・アクアバイオメカニズム学会 第33回定例講演会 (鳥取市)
12. **宮田真人** (2015) 最小生物、マイコプラズマの滑走運動, 第12回21世紀大腸菌研究会 (大津市)
13. **宮田真人** (2014) 滑走するマイコプラズマ, 第7回ニコニコ学会βシンポジウム ~日常に埋め込まれるニコニコ学会β~ (東京都港区)
14. **宮田真人** (2014) 最小微生物、マイコプラズマの滑走運動, 日本生体エネルギー研究会 第40回討論会 (松山市)
15. **宮田真人** (2014) マイコプラズマ運動三種盛り, 理研シンポジウム 第4回分子モーター討論会 (吹田市)
16. **宮田真人** (2013) マイコプラズマの滑走運動の機構, 6月分子ロボティクス研究会 (名古屋市)
17. **宮田真人** (2013) 肺炎細菌、マイコプラズマの滑走運動, 第25回 寝屋川小児科懇話会 (寝屋川市)
18. **宮田真人** (2013) 肺炎細菌、マイコプラズマの滑走運動メカニズム, 第66回日本細菌学

会九州支部総会/第50回ウイルス学会九州支部総会 (長崎市)

19. **宮田真人** (2012) 病原細菌, マイコプラズマの滑走運動メカニズム, 第45回日本原生動物学会大会 (姫路市)

(図書)
該当なし.

(その他)
研究室ホームページ
<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/index.html>

新術領域「運動マシナリー」ホームページ
<http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/index.php>

新学術領域「運動マシナリー」による汎用3Dプリンターの生物学への応用 Facebook
<https://www.facebook.com/motility.machinery>

新学術領域「運動マシナリー」総括班による先端的電子顕微鏡観察法の開発 Facebook
<https://www.facebook.com/freeze.fracture>

運動マシナリー・ディスカッション Facebook
<https://www.facebook.com/mycmobile>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 真人 (MIYATA, Makoto)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 50209912

(2) 研究分担者

西坂 崇之 (NISHIZAKA, Takayuki)
学習院大学・理学部・教授
研究者番号: 40359112

(3) 連携研究者

古寺 哲幸 (KODERA, Noriyuki)
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・准教授
研究者番号: 30584635