

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390107

研究課題名(和文) マイコプラズマ滑走運動装置の構造と動き

研究課題名(英文) Structure and movement of gliding machinery for 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) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、世界的に大流行したマイコプラズマ肺炎は、マイコプラズマという細菌によって起こる。マイコプラズマは全くユニークなメカニズムで滑走運動を行い、この滑走運動はマイコプラズマの感染に必須である。本研究では、最速種の *Mycoplasma mobile* とヒト肺炎菌の *Mycoplasma pneumoniae* について、(1) 滑走装置のナノメートルレベルの三次元構造、(2) 滑走メカニズムに必須なタンパク質とその活性検出および構造アウトライン、(3) 滑走装置のATP加水分解反応、(4) “あし”分子の挙動、(5) 遺伝子操作開発とそれを用いた滑走装置構成タンパク質の局在決定、について結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Mycoplalasma pneumonia, epidemic recent years is caused by a bacterium, *Mycoplasma pneumoniae*. Mycoplasmas glide by quite unique mechanisms, which are essential for infection. In this project, we studied the fastest species, *Mycoplasma mobile* and the pathogenic *Mycoplasma pneumoniae* and got the following results, (1) nanometer-order three dimensional structure of gliding machinery, (2) identification, detecting activity and outline of structure, for essential proteins, (3) ATPase reaction of gliding machinery, (4) behaviors of “leg” molecule, (5) development of gene manipulation method and localization of gliding proteins.

研究分野：バクテリアの細胞生物学

キーワード：細胞運動 電子顕微鏡 一分子計測 病原細菌 構造生物学 電子線クライオトモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

2011年と2012年に世界的に大流行したマイコプラズマ肺炎は、マイコプラズマという細菌によって起こる。マイコプラズマは、“最小の微生物”としても知られる細菌の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宿主細胞など固形物の表面にはりつき一方向に動く“滑走運動”をおこなう。その速度はヒト肺炎原因菌の *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ・ニューモニエ、以下、*M. pneumoniae* と省略) では毎秒1ミクロン、淡水魚の鰓にネクロシスを起こす *M. mobile* (Fig. 1: 矢印は運動の方向) では、毎秒4.5ミクロン(細胞長の7倍)にも達する。ところがマイコプラズマには、べん毛や線毛など既知の細菌運動に関連する構造も、ミオシンに代表されるモータータンパク質の遺伝子も存在しない。このことはこの運動が、全くユニークなメカニズムで起こっていることを意味する。

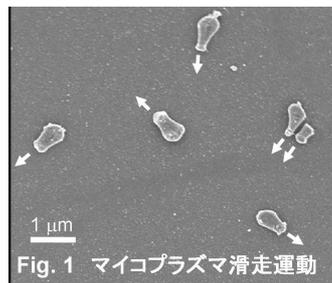
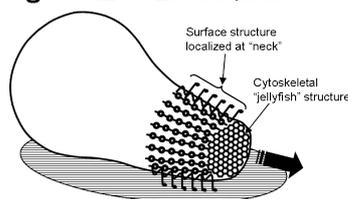


Fig. 1 マイコプラズマ滑走運動

2. 研究の目的

研究代表者は最速の種である *M. mobile* 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。すなわち、「滑走装置は菌体内部と表面の2つに分けられ表面構造は全く新規の3種類の巨大タンパク質で形成されている。滑走装置からは50ナノメートル長のやわらかい“あし”が多数つきだ

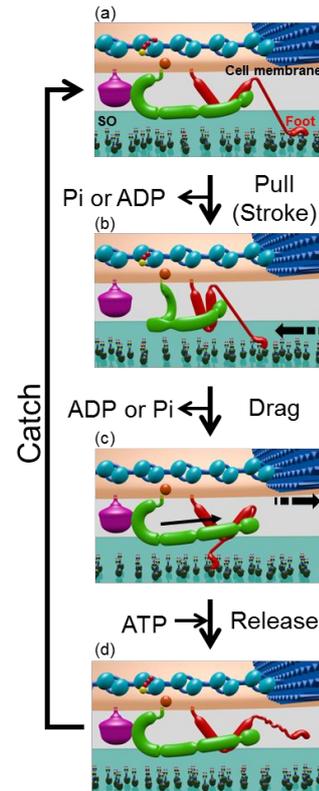
Fig. 2 菌体と滑走装置



している (Fig. 2). 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り、“あし”のタンパク質が宿主細胞などの固形物表面のシアル酸オリゴ糖をつかんだり、ひっぱったり、はなしたりすることによって滑走運動が起こる (Fig. 3).」

本研究計画では、この仮説に従って次項、“研究の方法”であげる(1)から(5)の項目について調べる。(1)と(2)と(5)については、*M. mobile* と *M. pneumoniae* の両方について実験を行い、それ以外は *M. mobile* について明らかにする。

Fig. 3 滑走メカニズム仮説



3. 研究の方法

以下の5つの実験を並行して行う。(1) ネガティブ染色法と、電子線クライオトモグラフィーの2つの方法による電子顕微鏡解析を行い、滑走装置全体の三次元像を明らかにする。(2) 単離したタンパク質の高解像度電子顕微鏡解析と、注目する部分の結晶構造解析と活性測定により、滑走装置を構成するタンパク質の活性と構造を明らかにする。(3) 単離した滑走装置について、ATP結合、ATP加水分解反応、構造変化、シアル酸オリゴ糖結合などを調べることで、ATP加水分解反応と“あし”の動きの対応を明らかにする。(4) 光学顕微鏡と、高速AFMを用いて、滑走している菌体における個々の“あし”分子の挙動を明らかにする。(5) 遺伝子を自由に改変する

方法を確立し、変異滑走タンパク質を新たな研究戦略として用いる。

#### 4. 研究成果

前項，“研究の方法”であげた(1) から(5)の項目それぞれについて以下に記述する。(1) *M. mobile* については滑走装置全体の三次元像を明らかにすることに成功し、装置内部のモーターと考えられる構造や、モーターから菌体表面の装置へと動きを伝える構造を特定した (Fig. 4, 投稿中論文)。 *M. pneumoniae* については、以前に報告されていた三次元像の解像度を大幅に改善し (Fig. 5, 論文 3), 15 の構成タンパク質のそれぞれが装置のどの部分を形成しているかを明らかにした (論文 5)。(2) *M. mobile* 滑走装置モーターと考えられる構造を単離し、単粒子解析電子顕微鏡法により、詳細な構造を明らかにした (Fig. 6)。その滑走装置モーターと菌体表面の構造をつなぐタンパク質を特定し、構造のアウトラインを明らかにした。“あし”の先端でシアル酸オリゴ糖のレセプターとして働いているタンパク質ドメインを組み替えタンパク質として単離することに成功し、その活性の存在を証明した。*M. pneumoniae* については、滑走運動に必須の 3 つのタンパク質それぞれを組み替えタンパク質として調整することに成功した。滑走装置内部で力を伝えていると考えられる 2 つのタンパク質については、その大まかな構造と装置像のどの部分に当てはまるかについて明らかにした (投稿中論文)。“あし”として働く P1 adhesin については、シアル酸オリゴ糖への結合活性を有することを証明し、現在はクライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、サブナノメートルの構造を得つつある。(3) *M. mobile* から単離した滑走装置のモーターと考えられるタンパク質について、ATP 結合、ATP 加水分解反応、構造変化、シアル酸オリゴ糖結合を調べ、ATP 加水分解反応と“あし”の動きの対応を明らかにした (投稿中論文)。(4) *M. mobile* と菌体を

透過化したモデル、滑走ゴーストの種々の条件における動きと結合を、光学顕微鏡を用いて詳細に調べることで、あしのストローク長さ (論文 7,11), ストローク方向 (論文 4), ストロークの力, 結合の共同性 (論文 18), 結合の方向性 (論文 1), シアル酸オリゴ糖の認識方法 (論文 8,17,18), を明らかにした。また、高速 AFM を用いて、単離した滑走タンパク質の動きを可視化し、滑走中における動きを考察

した。(5) *M. mobile* に遺伝子を導入する方法を開発し、滑走装置タンパク質 7 つの局在を明らかにした (論文 12)。(6) これまでの結果すべてを踏まえ、現在考えられる滑走運動のメカニズムと進化的な起源をそれぞれについて提案した (論文 2,6)。本研究により、*M. mobile* の滑走運動が ATP 合成酵素と接着タンパク質との偶然的接触から生じたこと、そしてそれが生体運動メカニズム発生の起源一般に通じることが示唆された。

Fig. 4 *M. mobile* 滑走装置

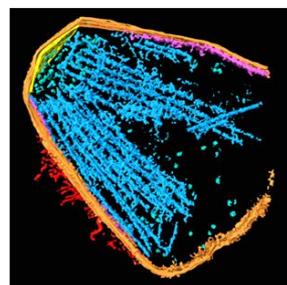


Fig. 5 *M. pneumoniae* 滑走装置

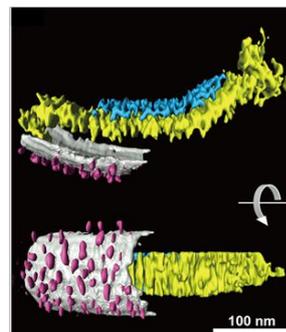
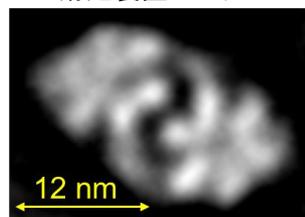


Fig. 6 *M. mobile* 滑走装置モーター



#### 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 22 件)

1. Tanaka A, Nakane D, Mizutani M, Nishizaka T, and Miyata M. Directed binding of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, shown by detachment force and bond lifetime. mBio, 査読有, 2016, 印刷中.
2. Miyata M and Hamaguchi T. Integrated information and prospects for gliding mechanism of the pathogenic bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Frontiers in Microbiology, 査読有, 2016, 7:960. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00960
3. Kawamoto A, Matsuo L, Kato T, Yamamoto H, Namba K, and Miyata M. Periodicity in attachment organelle revealed by electron cryotomography suggests conformational changes in gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. mBio, 査読有, 7, 2016, e00243-16. DOI: 10.1128/mBio.00243-16
4. Morio H, Kasai T, and Miyata M. Gliding direction of *Mycoplasma mobile*. Journal of Bacteriology, 198, 2016, 283-90, DOI: 10.1128/JB.00499-15
5. Nakane D, Kenri T, Matsuo L, and Miyata M. Systematic structural analyses of attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. PLoS Pathogens, 査読有, 11, 2015, e1005299. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005299
6. Miyata M and Hamaguchi T. Prospects for the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. Current Opinion in Microbiology. 査読有, 29, 2016, 15-21. DOI: 10.1016/j.mib.2015.08.010
7. Lee W, Kinoshita Y, Oh Y, Mikami N, Yang H, Miyata M, Nishizaka T, and Kim D. Super-resolved sampling of *Mycoplasma mobile* gliding based on extraordinary optical light transmission. ACS Nano, 査読有, 9, 2015, 10896-908. DOI: 10.1021/acsnano.5b03934
8. Kasai T, Hamaguchi T, Miyata M. Gliding motility of *Mycoplasma mobile* on uniform oligosaccharides. Journal of Bacteriology, 査読有, 197, 2015, 2952-7 (selected for cover illustration). DOI: 10.1128/JB.00335-15
9. 宮田真人. 「滑走するマイコプラズマ」臨床と微生物, 査読無, 42, 2015, 65-468,
10. 宮田真人. 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, 査読無, 12, 2015, pp10-15. [http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/alumni/html/download/vol12\\_2015.pdf](http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/alumni/html/download/vol12_2015.pdf).
11. Kinoshita Y, Nakane D, Sugawa M, Masaike T, Mizutani K, Miyata M and Nishizaka T. Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有, 111, 2014, 601-6. DOI: 10.1073/pnas.1310355111
12. Tulum I, Yabe M, Uenoyama A and Miyata M. Localization of P42 and an F1-ATPase  $\alpha$ -subunit homolog of the gliding machinery in *Mycoplasma mobile* revealed by newly developed gene manipulation and fluorescent protein tagging. Journal of Bacteriology, 査読有, 196, 2014, 1815-25 (selected for cover illustration). DOI: 10.1128/JB.01418-13
13. 小嶋誠司, 政池知子, 南野 徹, 宮田真人. Following the Random Walk : Howard Berg 先生インタビュー . 生物物理, 査読有, 54, 2014, 226-229. [http://www.biophys.jp/journal/journal\\_dl.php](http://www.biophys.jp/journal/journal_dl.php)
14. 宮田真人. 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, 査

- 読無, 3, 2014, 16.  
[http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22\\_letter/data/news\\_2014\\_vol3/news\\_2014\\_vol3.pdf](http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22_letter/data/news_2014_vol3/news_2014_vol3.pdf)
15. Kamada K, Miyata M, and Hirano T. Molecular basis of SMC ATPase activation: role of internal structural changes of the regulatory subcomplex ScpAB. Structure 査読有, 21, 2013, 581-94.  
DOI: 10.1016/j.str.2013.02.016
  16. Taniguchi T, Miyauchi K, Nakane D, Miyata M, Muto A, Nishimura S and Suzuki T. Decoding system for the AUA codon by tRNA<sup>Ile</sup> with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*. Nucleic Acids Research, 査読有, 41, 2013, 2621-31.  
DOI: 10.1093/nar/gks1344
  17. Kasai T and Miyata M. Analyzing inhibitory effects of reagents on *Mycoplasma* gliding and adhesion. Bio-protocol, 査読有, 3, 2013, e829.  
<http://www.bio-protocol.org/e829>
  18. Kasai T, Nakane D, Ishida H, Ando H, Kiso M and Miyata M. Binding in *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pneumoniae* gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds. Journal of Bacteriology, 査読有, 195, 2013, 429-35 (selected for cover illustration),  
DOI: 10.1128/JB.01141-12
  19. Miyata M and Nakane D. Gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae* subgroup -implication from *Mycoplasma mobile*-. In (Browning, G. and Citti, C., ed) Molecular and Cell Biology of Mollicutes. Horizon Press. Norfolk, 査読有, 2013, pp237-252.
  20. Wu HN and Miyata M. Whole surface image of *Mycoplasma mobile*, suggested by protein identification and immunofluorescence microscopy. Journal of Bacteriology. 査読有, 194, 2012, 5848-55,  
DOI: 10.1128/JB.00976-12
  21. Adan-Kubo J, Yoshii SH, Kono H and Miyata M. Molecular structure of isolated MvspI, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. Journal of Bacteriology. 査読有, 194, 2012, 3050-7 (selected for cover illustration),  
DOI: 10.1128/JB.00208-12
  22. Wu HN, Kawaguchi C, Nakane D, and Miyata M. "Mycoplasmal antigen modulation", a novel surface variation suggested for a lipoprotein specifically localized on *Mycoplasma mobile*. Current Microbiology, 査読有, 64, 2012, 433-40,  
DOI: 10.1007/s00284-012-0090-y
- 〔学会発表〕(計 178 件)
1. Miyata M. Origin of motility suggested by special bacteria. The 2015 OCARINA Annual International Meeting, 2016.03.18. 大阪市立大学 (大阪府大阪市)
  2. Miyata M. *Mollicutes* species developed three motility systems independently. University of Bordeaux - Osaka University, Osaka City University Mini-Symposium on Synthetic Biology, 2016.01.26. 大阪大学 (大阪府吹田市)
  3. Miyata M. Gliding Machinery of *Mycoplasma mobile*, pathogenic bacterium. the 2nd EastAsia Microscopy Conference (EAMC2), 2015.11.26. 姫路商工会議所 (兵庫県姫路市)
  4. 宮田真人. 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, 2015.09.25. 大阪大学(大阪府吹田市)
  5. 宮田真人. 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, 2015.09.03. 鳥取大学(鳥取県鳥取市)

6. 宮田真人. 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, 2015.06.05. 琵琶湖グランドホテル(滋賀県大津市)
7. 宮田真人. 滑走するマイコプラズマ. 第 7 回ニコニコ学会 シンポジウム, 2014.12.20. ニコファーレ(東京都港区)
8. 宮田真人. 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, 2014.12.11. 愛媛大学(愛媛県松山市)
9. 宮田真人. 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, 2014.06.28. 大阪大学(大阪府吹田市)
10. 宮田真人. 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, 2014.06.09. 名古屋大学(愛知県名古屋市)
11. 宮田真人. 最小微生物、マイコプラズマの滑走運動. 第 15 回大阪大学理学部同窓会, 2014.05.03. 大阪大学(大阪府豊中市)
12. Miyata M. *Mycoplasma*, the smallest microorganism moves by a novel mechanism. The 2013 OCARINA Annual International Meeting, 2014.03.04. 大阪市立大学(大阪府大阪市)
13. 宮田真人. 病原細菌、マイコプラズマ滑走運動のメカニズム. 第 86 回 日本生化学会大会, 2013.09.11. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
14. 宮田真人. 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 日本ウイルス学会九州支部総会, 2013.09.06. 長崎大学(長崎県長崎市)
15. Miyata M. Gliding motility of mycoplasma, a pathogenic bacterium on solid surfaces. IGER International Symposium on Cell Surfaces and Function, 2013.09.02. 名古屋大学(愛知県名古屋市)
16. Miyata M. Crawling receptors of *Mycoplasma*, pathogenic bacteria. the 1st Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", 2013.06.17. 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)
17. 宮田真人. *Mycoplasma pneumoniae* の滑走運動. 第 40 回 日本マイコプラズマ学会学術集会, 2013.05.23. UDX Gallery NEXT-2(東京都千代田区)
18. 宮田真人. 病原細菌、マイコプラズマの滑走運動のメカニズム. 第 45 回 日本原生動物学会大会, 2012.11.25. 兵庫県立大学(兵庫県姫路市)
19. 宮田真人. マイコプラズマ滑走運動の謎にせまる. 第 50 回 日本生物物理学会年会, 2012.09.23. 名古屋大学(愛知県名古屋市)
20. 宮田真人. 「おもしろい, 画像でつづる, 24 年 - マイコプラズマ研究でわかったこと」. 第 39 回 日本マイコプラズマ学会学術集会, 2012.5.24. いわて県民情報センター(岩手県盛岡市)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 宮田真人. 「マイコプラズマの運動機構」, 神谷 茂ら編, 「最新マイコプラズマ学」, 259(19-24)
- 〔その他〕
- ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/index.html>
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