

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249030

研究課題名（和文）マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular 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

研究成果の概要（和文）：ヒト肺炎の原因菌などとして知られるマイコプラズマは菌体の片側に“滑走装置”を形成し、固形物表面を滑るように動く、“滑走運動”を行う。これまでの研究代表者らの研究によりこの運動のメカニズムのアウトラインが最速種、*Mycoplasma mobile*（マイコプラズマ・モービレ、以下モービレと略）について明らかになっていた。本研究では、これまでよりさらに踏み込んだ実験を行い、メカニズムの本質に迫った。また、最速種で得られた知識や技術をヒト肺炎病原菌である、*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）に応用した。

研究成果の概要（英文）：*Mycoplasma*, known as the cause of human pneumonia etc. form "gliding machinery" at a cell pole and exhibit "gliding motility", by which they slide on solid surfaces. The outline of this gliding mechanism had been elucidated about the fastest species, *Mycoplasma mobile* based on our previous studies. In this project, we succeeded in going to the next stage through more critical experiments. Moreover, we applied the knowledge and techniques obtained here to a human pathogen, *Mycoplasma pneumoniae*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |
| 2010年度 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |
| 2011年度 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 36,900,000 | 11,070,000 | 47,970,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：マイコプラズマ，滑走運動，ATPアーゼ，シアル酸オリゴ糖，分子構造，電子顕微鏡，細胞骨格構造

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマの滑走運動はその寄生性と病原性に必須である。研究代表者らは、最速種のマイコプラズマ・モービレを材料に1997年から研究を行い、タンパク質や滑走装置の発見と特徴づけ、運動と力の詳細な解析、エネルギー源や結合対象の特定などの結果を

基に、以下の運動メカニズムの作業仮説を提案していた。「滑走装置は膜突起の基部に新規の4種類の巨大タンパク質から形成されており、やはりユニークな細胞骨格、“くらげ構造”により細胞内部から支えられている。滑走装置からは長さ50ナノメートルのやわらかい“あし”が多数つきだしている。“モーター”

が ATP を加水分解することにより生じた動きが、“あし”のタンパク質に伝えられ、“あし”が宿主細胞表面の構造であるシアル酸をつかんだり、ひっぱったりして、滑走運動が起こる。」

2. 研究の目的

モービレの滑走メカニズムの本質にさらに迫り、またニューモニエのメカニズムのアウトラインを得ること。これらにより、マイコプラズマの滑走運動にかんする知見と研究を、より正確、高解像度、かつ具体的なものに押し上げることである。

3. 研究の方法

以下のそれぞれについて実験を行った。(1) 滑走に直接かかわるタンパク質の高解像度像をネガティブ染色電子顕微鏡観察で、液中像を高速原子間力顕微鏡観察で得る。(2) 滑走に直接かかわるタンパク質の原子レベル像をバイオインフォマティクスと結晶構造解析により得る。(3) 滑走装置と膜を単離し、その全体像と構成タンパク質を主にクライオ電子線トモグラフィと質量分析により明らかにする。(4) 各種条件下での滑走運動の詳細な解析結果に基づいて“あし”の動きを考察する。(5) 各 ATP 反応中間体のシアル酸オリゴ糖への結合、シアル酸化合物による滑走の阻害、シアル酸オリゴ糖への結合の方向依存性を調べ、ATP 加水分解とシアル酸オリゴ糖結合のカップリングを調べる。(6) これまでに得られた知見と物理法則を基に、運動特性のデータをフィッティングする。

4. 研究成果

本研究により、モービレの滑走運動メカニズムの知見と研究は新たな段階へと進んだ。すなわち、ATP 加水分解によって生じた動きは、固い棒状の構造が柔らかいヒンジでつながったタンパク質、Gli521 をつうじて、“あし”の役割を持つ細く柔らかいタンパク質、Gli349 に伝えられる。Gli349 は極めて柔軟に伸び縮みをして、結合対象であるシアル酸オリゴ糖に力を伝える。シアル酸オリゴ糖の結合は鍵と鍵穴の関係にあり、さらに共同性を有している。“あし”は柔らかい構造ではあるが結合は前方への引きに弱く、後方には強いという方向性、そして、ADP 中間体では強く、ADP+Pi 中間体では弱いという特徴を持つ。滑走装置から突き出している数百本の“あし”は独立に動くことが可能だが、通常時の動きには共同性があり、前に進むときには他の“あし”により得られる推進力でシ

アル酸オリゴ糖を遊離する。

いっぽう、次の段階へ向けて多くの手がかりを得たことも特筆される。すなわち、電子顕微鏡観察を行うための試料調整法を大幅に改良したため、今後は、各 ATP 反応中間体における滑走装置の構造変化を三次元像で議論できるようになった。また、滑走に直接かかわるタンパク質の一つがチューブリンと共通の祖先をもつこと、“あし”タンパク質のシアル酸結合部位には、糖を認識する Toll-like receptors と構造上の類似があることを見出したことは、今後のヒントになるであろう。また、現在、いくつかのタンパク質について構造解析に向けた結晶化を進めている。光学顕微鏡による解析方法も格段に向上した。

ニューモニエについては滑走装置の単離を行い、新たな構成タンパク質と、構造の特徴を発見した。また、滑走の“あし”のタンパク質を単離し、サブユニット構成とドメイン構造を明らかにした。さらに滑走時の結合対象がモービレのものと少し構造の異なるシアル酸オリゴ糖であることを明らかにした。モービレの場合と同様に、電子顕微鏡観察、光学顕微鏡解析、タンパク質構造解析のそれぞれに、今後につながる格段の向上を得た。

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, 総件数 24 件)

1. Taniguchi T, Miyauchi K, Nakane D, Miyata M, Muto A, Nishimura S, Suzuki T. Decoding system for the AUA codon by tRNA^{Ile} with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*, *Nucleic Acids Research*, 41, 2621-31, 2013, 査読有
2. Kasai T, Nakane D, Ishida H, Ando H, Kiso M, Miyata M. Role of binding in *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pneumoniae* gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds, *Journal of Bacteriology*, 195, 2621-31, 2013, 査読有
3. Wu HN, Miyata M. Whole surface image of *Mycoplasma mobile*, suggested by protein identification and immunofluorescence microscopy, *Journal of Bacteriology*, 194, 5848-55, 2012, 査読有
4. Adan-Kubo J, Yoshii SH, Kono H, Miyata M. Molecular structure of isolated MvspI, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. *Journal of Bacteriology*, 194, 3050-7, 2012, 査読有

5. Wu HN, Kawaguchi C, Nakane D, Miyata M. "Mycoplasmal antigen modulation," a novel surface variation suggested for a lipoprotein specifically localized on *Mycoplasma mobile*. *Current Microbiology*. 64, 433-40. 2012, 査読有
 6. Sato C, Manaka S, Nakane D, Nishiyama H, Suga M, Nishizaka T, Miyata M, Maruyama Y. Rapid imaging of mycoplasma in solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). *Biochemistry Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417, 1213-8.2012, 査読有
 7. Nakane D, Miyata M. *Mycoplasma mobile* cells elongated by detergent and their pivoting movements in gliding. *Journal of Bacteriology*, 194, 122-30. 2012, 査読有
 8. 宮田真人. マイコプラズマの生物学. 月刊メビオ, 29, 8-14, 2012, 査読無
 9. Nakane D, Adan-Kubo J, Kenri T, Miyata M. Isolation and characterization of P1 adhesin, a leg protein of the gliding bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 193, 715-22. 2011, 査読有
 10. Miyata M. Unique centipede mechanism of *Mycoplasma* gliding. *Annual Review Microbiology*, 64, 0519-37, 2010, 査読有
 11. Lesoil C, Nonaka T, Sekiguchi H, Osada T, Miyata M, Afrin R, Ikai A. Molecular shape and binding force of *Mycoplasma mobile*'s leg protein Gli349 revealed by an AFM study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391, 1312-7. 2009, 査読有
 12. 宮田真人, 中根大介. 病原細菌, マイコプラズマのユニークな滑走運動を支える細胞骨格. *生物の科学 遺伝*, 2010.3月号, 47-51, 2010, 査読無
 13. 宮田真人. 病原細菌, マイコプラズマのユニークな滑走運動. *化学と生物*, 48, 176-181, 2010, 査読無
 14. Chen J, Neu J, Miyata M, Oster G. Motor-substrate interactions in mycoplasma motility explains non-Arrhenius temperature dependence. *Biophys J*. 97, 2930-8. 2009, 査読有
 15. Nonaka T, Adan-Kubo J, Miyata M. Triskelion structure of the Gli521 protein, involved in the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. *Journal of Bacteriology*, 192, 636-42. 2009, 査読有
 16. Nakane D, Miyata M. Cytoskeletal asymmetrical dumbbell structure of a gliding mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, revealed by negative-staining electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 191, 3256-64. 2009, 査読有
 17. Uenoyama A, Seto S, Nakane D, Miyata M. Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants. *Journal of Bacteriology*, 191, 1982-5. 2009, 査読有
 18. 宮田真人. 実験室の厄介者, マイコプラズマのひみつ—モータータンパク質も細胞骨格も使わない細胞運動—, *生化学*, 81, 31-5. 2009, 査読有
 19. 宮田真人, 中根大介. *Mycoplasma pneumoniae* の滑走運動, *生体の科学*, 60, 98-102, 2009, 査読無
 20. 宮田真人. マイコプラズマ滑走運動の装置とメカニズム. *顕微鏡*, 44, 210-214. 2009, 査読無
 21. 宮田真人. 病原細菌, マイコプラズマ滑走運動—構造とメカニズム—. *可視化技術の最前線*, '07-'08, 87-95. 2009, 査読無
 22. 宮田真人. マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム. *IFO Research Communication*, 23, 131-138. 2009, 査読無
- [学会発表] (計 15 件)
1. Tahara Y, Kodera N, Ando T, Miyata M. Gliding of *Mycoplasma mobile* can be explained by directed binding, BLAST XII, 2013.1.22, Tucson, AZ, USA
 2. 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, 姫路市
 3. 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, 2012.9.23, 名古屋市
 4. Miyata M Gliding head of *Mycoplasma mobile*, 19th Congress of International Organization for Mycoplasmaology, 2012.7.19, Toulouse, France
 5. 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, 盛岡市
 6. 宮田真人. New foci to clarify *Mycoplasma gliding*, 第 85 回 日本細菌学会総会, 2012.3.29. 長崎市
 7. Miyata M. Gliding mechanism suggested from isolated machinery of *Mycoplasma mobile*, The 2012 Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganisms, 2012.1.17, Venture, CA, USA
 8. Miyata M. A novel biomotility, *Mycoplasma gliding*, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2012.9.7, 札幌市
 9. 宮田真人. マイコプラズマの滑走運動, 大阪府立大学・大阪市立大学ニューテックフェア, 2010.12.21, 大阪市

10. 宮田真人. 新規の生体生物, マイコプラズマ滑走運動, 第48回 日本生物物理学会, 2010.9.21, 仙台市
11. Kasai T, Nakane D, Ishida S, Ando H, Kiso M, Miyata M. Structure of sialic-acid oligosaccharide recognized by *Mycoplasma* leg proteins for Mycoplasmaology, 18th Congress of International Organization, 2010.7.15, Chianciano Terme, Italy
12. 宮田真人. Gliding motility of human pathogen, *Mycoplasma pneumoniae*. 第83回 日本細菌学会総会, 2010.3.29, 横浜市
13. 宮田真人. 最小生物、マイコプラズマのユニークな滑走運動, 日本物理学会 第65回 年次大会, 2010.3.21, 岡山市
14. 宮田真人. 病原細菌、'マイコプラズマ'の全くユニークな滑走運動メカニズム, 第55回 生命機能研究科研究交流会, 2009.12.18, 吹田市
15. 宮田真人. *Mycoplasma* gliding -a novel mechanism of bacterial surface motility-, 第4回 人工筋肉コンファレンス-生体模倣、人工筋肉とナノバイオに関する第5回国際会議, 2009.11.26, 豊中市

[図書] (計1件)

1. Miyata M, 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, 2013

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/~miyata/myco1.htm>

新学術領域ホームページ:

<http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/index.php>

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

なし

(3) 連携研究者

なし