3P177

モノクローナル抗体を用いた、マイコプラズマの滑走運動と極性に関連する表面構造の同定

○楠本 晃子、瀬戸 真太郎、宮田 真人（大阪市大院・理・生物地球）

マイコプラズマ (*Mycoplasma mobile*) は滑走運動をおこなうバクテリア (= 原核生物) で、その速さは 2.5mm/s、毎秒細胞長の 4 倍に相当する。細胞表面には他の運動性バクテリアに見られる構造はなく、ゲノムにもこれらの構成タンパク質やモータータンパク質の遺伝子は存在しない。細胞はフラスコ型をしており、頭部 (図の a+b 領域) が他の部分を引っ張るようにして滑走するため、滑走に関する構造は頭部付近に存在しているか、細胞の軸方向に局在していると考えられる。本研究では、マイコプラズマ表面構造に対するモノクローナル抗体を作製し、その中から滑走に対する影響と細胞局在を指標にして、滑走に関する構造を認識している 5 つの抗体を選択した。そのうち 2 つは滑走中のガラス接着を特異的に阻害した。すなわち抗体 1 は図の b 領域に局在し、接着能力を欠く変異株で欠失している、P349 を認識する。抗体 2 は b 領域の構造を認識するが、プロテッキングではタンパク質を検出できない。他の 3 つは滑走は阻害しないが、以下に示すタンパク質の局在を示した。すなわち 58kD タンパク質は a 領域に、133kD タンパク質は a+c+d 領域に、62kD タンパク質は生細胞では d 領域で、固定された状態では c+d 領域に局在していた。

A.Kusumoto, S.Seto and M.Miyata : Identification of surface structures related to gliding motility and polarity of mycoplasma

3P178

マイコプラズマ滑走における力と速度の関係

○宮田 真人^{1,2,3}, Ryu William S.^{2,3}, Berg Howard C.^{2,3} (1 大阪市大院・理・生物地球、2 ローランド科学研究所、3 ハーバード大・分子細胞生物)

寄生性のバクテリア (= 原核生物) であるマイコプラズマは、ガラスなどの表面に張り付いたまま細くなった細胞極の方向へ動く、滑走運動を行う。その速度は *Mycoplasma mobile* では毎秒 2.5 マイクロメートル (細胞長の 4 倍) に相当する。マイコプラズマ表面には他の運動性バクテリアで見られる、べん毛や線毛などの付属物はなく、またゲノム中にこれらの構成タンパク質や、モータータンパク質の遺伝子は存在しない。マイコプラズマの滑走は全く未知の仕組みによる。我々はこれまでに膜貫通領域を持つ 349kDa のスパイク状タンパク質がマイコプラズマの首部分に局在し、滑走に関与することを明らかにした。本研究では滑走の仕組みに迫るため、運動の力学的性質を解析した。まず、滑走速度の温度依存性を測定したところ、速度は 10℃ から 38℃ にかけて直線的に増加した。次にマイコプラズマの尾部にプラスチックビーズをつけた。ビーズのついたマイコプラズマをフローチャンバーに入れて培地の流れをかけると、マイコプラズマはビーズを引きずりながら流れに逆らう方向に滑走した。このときの速度をビデオを用いて測定し、また、マイコプラズマにかかる負荷をストークスの法則から求めた。その結果、滑走速度はもとの 3 分の 1 まで負荷に対して直線的に減少した。それ以上の負荷では、マイコプラズマはガラス表面から解離した。滑走速度が負荷に対して直線的に変化すると仮定して速度をゼロ負荷に外挿すると、その値はビーズなしで動いている時と同じになった。力をゼロ速度へ外挿した場合には、最大力は温度に依存せず約 27pN となった。マイコプラズマが引っ張られているビーズを光ピンセットを用いて捕捉し、動きが止められたときの最大力を測定した。その結果、実際に動きを止められたときの最大力も温度に依存せず、約 27pN であることが明らかになった。

M.Miyata, W.S.Ryu and H.C.Berg : Force-velocity relationship of mycoplasma gliding

3P179

滑走運動バクテリア、マイコプラズマにおける新規細胞骨格タンパク質の同定と骨格構造の電子顕微鏡詳細観察

○大垣 裕史¹、Jaffe Jake²、宮田 真人¹ (1 大阪市大院・理・生物地球系、2 ハーバード大・分子細胞生物学)

原核生物 (= バクテリア) であるマイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) は細胞壁を持たないにもかかわらず細胞形態に極性を持ち、宿主やガラス表面に接着して滑るように動く滑走運動を行う。この特徴的な細胞形態は真核生物における細胞骨格のような構造で維持されていると考えられている。しかし、ゲノム上にアクチンのホモログはなく、そのタンパク質は同定されていない。本研究では細胞骨格が含まれていると考えられているトライトン不溶画分 (トライトンシエル) に注目し、細胞を段階的に処理したものを電子顕微鏡で観察した。その結果、トライトンシエルに含まれる繊維状構造は 0.1M KI で伸展し、0.3-0.8M KI で溶解された。さらに、1M KI 不溶性の網状構造物が観察され、上記の繊維状構造と結合していた。また、浸透圧ショックで破壊した細胞では頭部から繊維状構造が伸びたものや、繊維状構造が網目状になっているものが観察された。これらの結果から、細胞の骨格は図のようであると考えられる。また、繊維状タンパク質をマスマスペクトロメトリーで同定した結果、P41 であることが示唆された。P41 は細胞接着に関与する遺伝子が局在している領域にコードされているタンパク質で、コイルドコイル予測配列を持つ。

H. Ogaki, J. Jaffe and M. Miyata : Identification of Novel Cytoskeletal Protein and Electron Microscopy of Cytoskeletal Structures in Gliding Bacteria, *Mycoplasma*

3P180

MAP4 projection domain is also important for microtubule dynamics regulation.

○Permana Sofy¹、Nagatomo Yoko¹、Hisanaga Shin-ichi²、Iida Junko²、Hotani Hirokazu¹、Itoh Tomohiko¹ (1 Nagoya Univ., Div. Biol. Sci., 2 Tokyo Metropolitan Univ., Dept. Biol.)

Microtubules (MTs), an eukaryotic cytoskeleton, widely accepted involving in various essential cellular functions. Both *in vitro* and *in vivo*, MTs show behavior known as "dynamics instability," in which individual MTs showed alternating phases of growth and rapid shortening. MTs are composed of alpha- and beta-tubulin heterodimer and decorated by a number of microtubule-associated proteins (MAPs). Among MAPs, MAP4 is a major, ubiquitous MAP in proliferating vertebrate cell. MAP4 is divided into two domains: N-terminal projection (PJ) domain and C-terminal microtubule-binding (MTB) domain. MTB domain has been studied in detail and found to be able to promote MT-assembly. However, the role of the PJ domain, which protrudes from MT-wall, is still obscure. To understand the roles of the PJ domain on the microtubule dynamics, we used truncations of human MAP4 with different length of the PJ domain: KDM/b-MTB or b-MTB that contain two-third or one-third of PJ domain length, respectively. When MTs were observed by dark field microscopy in the presence of 0.7 micro M of KDM/b-MTB or b-MTB, shortening velocity of MTs becomes significantly slower than that in full length MAP4. Distance of a depolymerization phase becomes short than that in intact MAP4. In contrast, significant decrease in growth velocity and increase in catastrophe frequency were observed only in b-MTB. Total amount of polymerized MTs decreased in the presence of b-MTB. These results suggest that projection domain of MAP4 is important for MTs dynamics regulation.

S.Permana, Y.Nagatomo, S.Hisanaga, J.Iida, H.Hotani and T.J.Itoh : MAP4 projection domain is also important for microtubule dynamics regulation.