トピックス

未知のメカニズム, マイコプラズマ の滑走運動 レールのないすべり運動?

大阪市立大学大学院理学研究科生物地球,
科学技術振興機構さきがけ 宮田真人

1. マイコプラズマ滑走運動

ヒト肺炎の病原体であり, 小さなゲノムサイズでも知られるマイコプラズマは, 細胞の片方に小さな突出部(頭部)をもち, 頭部でガラスなどの固形物にはりつき, はりついたままその方向にすべるように動く“滑走運動”を行う(Fig.1). その速度は最も速い *Mycoplasma mobile* の場合, 毎秒 2.0-4.5 μm で, 毎秒細胞長の 3-7 倍に相当する¹⁾. この速さは「よく見ると確かに動いている」というレベルではなく, 顕微鏡をのぞいた瞬間に, 「動く細菌, マイコプラズマ!」が印象づけられるものである. 長さ 1 μm たらずの小さな細菌が顕微鏡の視野いっぱい, スムーズに, しかもちょうどいい速さかげんで動き回る光景は, いくら見ていてもあきることが

Fig.1 Light microscopy of *Mycoplasma mobile*. Gliding directions are presented by arrows. Gli349 protein is marked gray on the cell images. Similar images were obtained for Gli123 and Gli521. The subcellular position, “neck” is indicated for a cell. Bar, 2 μm . (電子ジャーナルにカラー画像あり)

ない(電子ジャーナル, あるいはURL (<http://www.geocities.co.jp/Technopolis/1721/myco.htm>) を参照のこと).

マイコプラズマは, バクテリア (= 原核生物, 細菌) のなかの 1 グループで, 系統的には枯草菌や, ボツリヌス菌などに近い. 多くの運動性バクテリアは, その表面に“べん毛”といわれる“スクリュー”をもっている. また, そうでないものは“線毛”といわれる, 出たり引っ込んだりする線維をもっている. しかし, マイコプラズマの細胞表面にはそのようなものはない. このことは, マイコプラズマのゲノム配列にべん毛や線毛の遺伝子がないことによっても支持される. さらに驚いたことには, ゲノムにはミオシンやキネシンなど“狭義”のモータータンパク質もない^{2),3)}.

2. 滑走装置のタンパク質

我々は2つの戦略を用いて, *M. mobile* の滑走装置に含まれる3つのタンパク質を同定した²⁾. それらはゲノム上にタンデムにコードされる, それぞれ 123, 349, 521 kDa という巨大な分子質量をもつタンパク質であった. そのアミノ酸配列には既知のタンパク質との類似性も, タンパク質としての機能を示唆するモチーフも存在せず, また巨大なタンパク質でありながら, 分子内の繰り返し配列やコイルドコイル予想配列も存在しない. これらのタンパク質はその機能だけではなく, フォールディングを含めた構造も特殊なものと考えられる. 我々はこれらのタンパク質をそれぞれ Gli123 (Gliding protein-123 kDa), Gli349, Gli521 と名づけた. マイコプラズマの滑走運動は, どの種でも, 細胞の片側に形成された突出部でガラスなどにはりつき, その方向にはりついたまま動くという点から, 本質的には共通のメカニズムで起こっていると考えられる. これまでに *M. mobile* 以外にも滑走するマイコプラズマ5種のゲノム配列が決定されているが^{2),3)}, 本研究で見つけた滑走タンパク質のオルソログは *M. mobile* のごく近縁の *M. pulmonis* でしか見つからなかった.

3. 抗体の阻害効果

Gli349 に対する抗体を滑走しているマイコプラズマに加えると, 滑走速度が抑えられ, 最終的にはすべての細胞がガラスからはずれてしまう²⁾. このことから, このタンパク質は滑走時の固形物への結合を担っている

Unknown Mechanism, Gliding Motility of Mycoplasmas : Gliding without Rail Proteins ?

Makoto MIYATA

Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University / PRESTO, JST

と考えられる。一方, Gli521 に対する抗体はマイコプラズマをガラスにつけたまま運動のみを止める。このことは Gli521 が Gli349 を動かしていることを示唆する。我々は2つのタンパク質それぞれに対する抗体の阻害効果を調べ、以下のように結論づけた。抗 Gli349 抗体は、(i) 解離しているマイコプラズマのガラスへの結合を阻害する、(ii) 滑走速度を遅くする、(iii) 滑走しているマイコプラズマを解離させる。抗 Gli521 抗体は、(iv) 解離しているマイコプラズマのガラスへの結合を阻害する、(v) 滑走速度を遅くする、(vi) マイコプラズマのガラスからの解離を阻害する、(vii) 抗 Gli349 抗体によるマイコプラズマのガラスからの解離を抑制する。これらの抗体の作用の解釈については「6. メカニカルサイクル (!?)」で述べる。

4. 滑走装置の構造

3つの滑走タンパク質のマイコプラズマ細胞における局在をそれぞれに対する抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法で調べたところ、どのタンパク質も突出部の基部の部分に存在していた (Fig.1)²⁾。我々はこの部分に“neck”という名をつけた。細胞のneck表面に存在する構造を可視化するために、滑走しているマイコプラズマをミリ秒以下の短時間で凍結し、フリーズフラクチャー・ディープエッチ・レプリカ法でマイコプラズマ-ガラス間の結合部分を観察した。期待したとおり、そこにはneckの部分を中心にマイコプラズマとガラス表面をつなぐ構造が存在していた (Fig.2)³⁾。スパイク状のその構造は長さが約50 nmで、直径は約4 nmであった。Gli349の役割からスパイクがGli349分子であることが予測される。実際に、観察されたスパイクの体積はGli349タンパク質の分子量と一致しており、この予測を支持している。免疫電子顕微鏡法でGli349分子の局在を調べると、neckに局在していることが金コロイドのドットとして観察された。さらに、電子顕微鏡撮影の際に試料を傾けることにより立体視を行うと、この分子がneckの周囲にまんべんなく存在していることが明らかになった²⁾。

マイコプラズマから精製したGli349分子をロータリーシャドウイング法で観察した (Fig.3)。Gli349は全長約115 nmの分子で、3カ所に折れ曲がり点があった。1つ目の折れ曲がり点は約90度という固定角を、残りの2つは自由な回転角をもっていた。一方、Gli521の構造に関するデータは現在のところまだ得られていない。しかし、もし521 kDaのタンパク質が“球状”なら、その直径はおおざっぱに見て20 nmくらいと考えられる。直径20 nmの分子500個をマイコプラズマのneckの部分、

Fig.2 Freeze fracture image of gliding mycoplasma. A spike is marked by a solid triangle. The molecules can be seen only when they are exposed at the fracture face, in this visualizing technique. Bar, 100 nm.

Fig.3 Gli349 molecule observed by rotary shadowing electron microscopy. A schematic is overlaid on the leftmost image, identical to the second left one. Bar, 50 nm.

すなわち直径200 nmの円筒上に並べると、その円筒の長さは約300 nmになる。これは細胞表面における滑走タンパク質の分布と一致している。このことはneckの部分にはGli521が2次元結晶のように並んでいることを示唆している。この半結晶構造が滑走装置が力を出すための足場になっているのかもしれない。

以下に挙げる理由から、3つの滑走タンパク質、Gli123, Gli521, Gli349は細胞上で複合体を形成していると考えられる。(i) 3つのタンパク質は細胞の同じ位置に同じ分子数存在している。(ii) Gli521を欠いている変異株はガラスや動物細胞に結合できない⁵⁾。(iii) Gli521のない変異株ではGli349の細胞内局在が失われており、Gli123のない変異株ではGli349とGli521の局在が失われている⁵⁾。このことはGli123-Gli521-Gli349が“親ガメ-子ガメ-孫ガメ”構造になって1つの滑走装置ユニットを構成しているとする説明がつく。(iv) Gli349抗体に耐性の変異株では、Gli521分子に点突然変異が起こっている。

5. 力測定

発生している力を測定するために、マイコプラズマの尾部にビーズをつけて、2つの方法のどちらかで負荷をかけた (Fig.4)⁶⁾。1つはよくコントロールされた液体の流れを与えるものである。運のいいことにマイコプラズ

マは流れに押されることにより、滑走装置のある neck を中心に方向転換し、流れに逆らった向きに動くようになった。そのためマイコプラズマが発生している力がストークスの式から容易に計算された。流れ、すなわち加える力を増やすと速度は遅くなった。負荷をかけていないときの3分の1以下の速度になるような流れを与えるとマイコプラズマはすべて吹き飛ばされてしまい、それ以上の負荷をかけることはできなかった。そこで最大力はもう1つの方法、すなわち光ピンセットを用いて測定した。マイコプラズマが引っぱっているビーズを光ピンセットで捕捉すると、ビーズがレーザーに吸い寄せられるためにマイコプラズマはガラスからいったん解離した。しかし、マイコプラズマはすぐにガラスへの結合を回復して横方向の力を発生したため、この力を追跡して最大力を求めた。

このようにして得られた力と速度の関係は以下のことを示していた (Fig.5)。(i) 速度は温度変化に対して直線的に変化した。最大力は温度に依存しなかった、こ

Fig.4 Schematic of force measurement. (電子ジャーナルに動画あり)

Fig.5 Force and velocity relationship of mycoplasma gliding. Data were obtained at 17.5 (triangle), 22.5 (closed circle), and 27.5 (open circle), respectively.

れは化学エネルギー (おそらく) から力が発生してどこかにためられる反応と、その力をもとに動きをつくる反応が別過程であることを示している。(ii) 負荷に対して速度は連続に、直線的に変化した。これは滑走装置がそれを支える細胞中の足場のどこかに動きを蓄えることのできる弾性要素があることを意味している。(iii) 最大力は 27 pN であった。マイコプラズマが水中で進むために必要な力が 15 fN であることを考えると⁷⁾、滑走に必要な力の最大 1,800 倍が発生可能なことになる (実際には固形物との間に未測定のひきずり力が生じていると考えられるので、滑走に必要な力はいくらか大きい可能性がある)。このことは Gli349 の抗体の添加で滑走速度が抑えられることが、働いている滑走装置のユニット数の減少のために起こっているのではないことを意味している。また外から負荷をかけていない状態で滑走しているマイコプラズマの速度は、発生する力と摩擦とのバランスで決まっているのではなく、滑走装置自体の運動速度であることを意味している。(iv) 液体の流れを用いて負荷をかけた場合、その方法によって速度を抑えることはできても、最大力の 65 % 以上の負荷をかけると細胞はガラスから流されてしまった。このことは、動いているある瞬間を見るとガラスに結合することのできる滑走装置の 65 % がガラスをつかんでいることを示唆する。

6. メカニカルサイクル(?)

これまでに得られた観察結果は、Gli521 によって動かされる Gli349 (スパイク (?)) が、以下に説明する 5 つのステップからなるサイクルを繰り返すと仮定することで説明できる (Fig.6)²⁾。もちろん、これ以外の可能性がないわけではない。(ステップ 1 : 結合) Gli349 分子がガラスに結合する。(ステップ 2 : 力発生) 化学エネルギーが力学エネルギーに変えられる。Gli349 に対する抗体はこのステップを阻害すると考えられ、それによって滑走時にひきずり力が発生する。このステップが阻害されると Gli349 はステップ 1 の逆反応を通してガラスから解離する。そのように解離した Gli349 分子は、ステージ (e) の構造で固定されるためガラスに結合できなくなる。(ステップ 3 : パワーストローク) 力が動きに変えられる。この過程が弾性要素に蓄えられるために滑走速度は負荷に対応して変化できる。最大力発生時にはこのステップで止まっていると考えられる。Gli521 に対する抗体はこのステップを阻害してステージ (b) で固定するため、ひきずり力が発生して滑走速度は抑えられる。またステージ (b) で固定された場合、Gli349 は抗 Gli349 抗体もガラスへの結合も受けつけなくなる。スパイクの長さが約 50 nm であること

Fig.6 Possible mechanical cycle. The unit of gliding apparatus rotates a cycle through 5 states (a)-(e) and 5 steps (1)-(5). (電子ジャーナルにカラー画像あり)

と、スパイクが棒状であることから、このステップによる細胞の押し出しは50 nmから大きく離れた値ではないと考えられる。(ステップ4：解離) Gli349分子がガラスから解離する。Gli521に対する抗体がこのステップを阻害している可能性もある。(ステップ5：戻り) Gli349分子が元の位置に戻り再びガラスに結合することが可能になる。

1回のパワーストロークが約50 nmであるとする、毎秒2.5 μm の速度を得るためには毎秒50回のパワーストロークで細胞が押し出されていることになる。すると1回のストロークに要する時間は約20ミリ秒ということになる。上述のように細胞の軸方向に20の装置が並んでいると仮定すると、最もduty ratioの低い場合、すなわちある瞬間を見たときに少数の滑走装置が細胞を動かしている場合には、1つの装置は毎秒2.5回のストロークを行うことになる。逆にduty ratioが非常に高い場合には毎秒50回のストロークになる。この場合には、装置の協同性を想定しなくてはならない、なぜなら多数の装置がでたらめに動いたのでは滑走装置とその周辺によほどの弾性要素がないかぎり前には進まないからである。動いている状態では最大力の65%の力で細胞がガラスから流されてしまうことは、以下のように解釈できる。すなわちduty ratioにかかわらず働いている滑走装置のすべてがステップ2で力を出していると仮定すれば、それ以外に要する時間は全サイクルの35%である。

7. すぐ解決すべき疑問

マイコプラズマはガラスや動物細胞をはじめ、さまざまな固形物の表面に結合して滑走する。いろいろな固形物表面への結合の強さを測定した結果、結合は固形

物表面の負電荷に依存することが明らかになった。しかし滑走には培地中に含まれる未同定のタンパク質も必要であるため⁸⁾、Gli349がクーロン力でガラスに結合すると結論づけるにはさらなる解析を必要とする。

なぜマイコプラズマは方向性のない固形物表面を動いているにもかかわらず一定方向に動くのだろうか？それはレールではなく、モーター側（この場合、細胞側）に方向性があるためと考えられる。すなわち筋肉などの場合には、モータータンパク質ジョイント部が回ってしまうためにモーター側に方向性をもたせることができないので、レール側に方向性が必要となる。それに対して、マイコプラズマの場合にはスパイクが細胞軸に対して回転することがないため、固形物側に方向性を必要としないのである。

運動のエネルギー源は何であろうか？それは、膜電位やイオン濃度勾配ではない。なぜなら、イオノフォアを用いて膜電位をなくした場合にもマイコプラズマは滑走するからである。これに対して、ヒ酸を用いて細胞内のATP濃度を減少させた場合にはATPの濃度とともに滑走速度は減少する⁸⁾。しかし、マイコプラズマでは細胞に必要なエネルギーは解糖で生産したATPでまかなうため、直接のエネルギー源同定にはさらなる検討が必要である。

謝 辞

私の言葉を信じて、何もないところからこの研究テーマと一緒に立ち上げてくれた、あるいは今も一緒に研究してくれている共同研究者諸氏、および研究内容を聞いてコメントをいただいた研究者諸兄に、深い感謝の念を表明する。

文 献

- 1) Rosengarten, R. and Kirchhoff, H. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 1891-1898.
- 2) Uenoyama, A., Kusumoto, A. and Miyata, M. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 1537-1545.
- 3) 宮田真人 (2002) 日本細菌学雑誌 **57**, 581-595.
- 4) Miyata, M. and Petersen, J. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 4382-4386.
- 5) Miyata, M., Yamamoto, H., Shimizu, T., Uenoyama, A., Citti, C. and Rosengarten, R. (2000) *Microbiology* **146**, 1311-1320.
- 6) Miyata, M., Ryu, W. S. and Berg, H. C. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 1827-1831.
- 7) Rosengarten, R., Fisher, M., Kirchhoff, H., Kerlen, G. and Seack, K. -H. (1988) *Curr. Microbiol.* **16**, 253-257.
- 8) Jaffe, J. D., Miyata, M. and Berg, H. C. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 4254-4261.

宮田真人(みやた まこと)

大阪市立大学大学院理学研究科 助教授, 科学技術振興機構さきがけ 研究者

連絡先: 〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138

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

URL: <http://www.geocities.co.jp/Technopolis/1721/myco.htm>