3P201

マイコプラズマ滑走運動における固形物への結合を担うタンパク質、Gli349の分子形態

○アダン 純¹、上野山 敦子¹、宮田 真人^{1,2} (¹大阪市大・院理・生物地球、²科学技術振興機構・さきがけ)

寄生性のバクテリア、*Mycoplasma mobile*は細胞の片側に膜突起を形成し、その基部、neckでガラスなどの固形物にはりついて動く滑走運動を行う。その動きは毎秒2.5 μm と速く動きはスムーズだが、メカニズムはモータータンパク質ともバクテリアのペン毛、あるいはそれ以外の既知のものとも本質的に異なる。neckには349kDaの巨大タンパク質、Gli349が局在し、これがガラス表面をつかんだり離したりすることで運動が起こると考えられる。Gli349の構造もタンパク質としての機能もアミノ酸配列から推測することはできない。

本研究では透過型電子顕微鏡でこのタンパク質を観察した。グリッドにはりついた細胞をネガティブ染色した結果、Gli349が局在すると考えられるneckの表面にスパイク様構造が多数観察された。その長さは約52nmで、細胞の長軸に対する角度分布は30~150°であった。これはこの範囲でスパイクが動いて細胞を押し出していることを示唆する。

Gli349を単離・精製し、単分子をロータリーシャドウイングで観察した。そこから明らかになったGli349の分子の形と長さ、角度を図に示す。 θ_1 はほぼ一定で、 θ_2 は広い範囲で分布していた。

O.J.Adan, A.Uenoyama and M.Miyata : Molecular shape of Gli349, contribute to binding to solid surface during mycoplasma gliding

3P203

マイコプラズマの滑走運動時における結合対象の同定

○永井 良一郎¹、宮田 真人^{1,2} (¹大阪市大・院理・生物地球、²PRESTO・JST)

寄生性のバクテリアであるマイコプラズマは、細胞の片方の端に接着滑走器官を形成し、いろんな固形物の表面に結合する。さらに結合したままこの器官の方向へ動く滑走運動を行う。*Mycoplasma mobile*の滑走運動は平均速度2-4.5 $\mu\text{m/s}$ 、最大力27pNに達するが、そのメカニズムは既知のいずれのものとも異なる。このメカニズムを明らかにするために、滑走運動時に固形物表面のどんな構造に結合するかを検討した。*M. mobile*はガラスだけでなく、プラスチック、セルロース膜、マイカなどのさまざまな表面に結合して滑走するが、そのためには固形物表面を血清で処理することが必要である。また血清で表面をコートしたガラスがプロテアーゼ処理によって活性を失うことから、滑走運動に必要な因子はタンパク質であると考えられている。本研究ではまず野生型株と結合できない変異株を用いた解析を行い、血清の因子には異なる2つの動きがあることを示した。1つは滑走時の結合対象として働き、もう1つは細胞の非特異的な結合を防ぐものとして働いていた。ヒト肺炎のマイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)の接着の対象は糖脂質の糖鎖末端のGal(3SO₄) β 1-残基と、糖タンパク質のNeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-残基である。*M. mobile*の滑走に必要な結合は、上記の糖タンパク質の糖鎖と同じ構造を持つオリゴ糖によって阻害され、血清でコートしたガラス表面を末端のシアル酸を加水分解するシアリダーゼで処理することにより失われた。これらから、*M. mobile*の滑走時における結合対象は、末端にNeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-残基を持つ糖タンパク質であることが示された。

R. Nagai and M. Miyata : Identification of target for binding during *Mycoplasma* gliding

3P202

マイコプラズマのトリトンモデル作製と、滑走運動エネルギー源の同定

○上野山 敦子¹、宮田 真人^{1,2} (¹大阪市大・院理・生物地球、²PRESTO・JST)

原核生物(=バクテリア)であるマイコプラズマ(*Mycoplasma mobile*)は、ガラスや宿主細胞などの固形物表面に接着し、接着したまま滑るように動く、滑走運動を行う。細胞壁はないが、片方の極に膜突起(頭部)をもち、固形物の表面に張り付き、頭方向に移動する。その速度は、毎秒2.5 μm (細胞長の4倍)で、最大力は27 pNに達する。この運動のメカニズムは、バクテリアのペン毛や線毛とも、さらにミオシンなど狭義のモータータンパク質とも異なる。ヒ酸により細胞中のATP濃度を下げると、濃度の低下とともに滑走速度が遅くなることから、運動のためのエネルギーがATPの加水分解により供給されていることが示唆されていた。本研究では、トリトンモデルを作製し、直接のエネルギー源を明らかにした。

ガラス上で滑走しているマイコプラズマを0.01% Tritonで処理すると、細胞が壊れ、構造物がガラス上に残された。ここに、高濃度のATPを加えると、数秒以内に構造物が滑走し始め、その動きは約20分間続いた。その速度は本来の滑走運動に近く、0.1mM以下ではATP濃度に依存していた。GTP添加によっても動きは観察されたが、ATPよりも高濃度を必要とした。また、ATP- γ -Sによっても遅い動きが見られた。ATPによる動きは、ADP、AMP-PNP、ATP- γ -Sによって、濃度依存的に阻害された。速度は、250mMの塩濃度下では遅く50mMの塩濃度下では速かった。また、pH6.8では遅くpH9では速かった。これらの結果は、トリトン処理後も滑走装置が構造物中に残っていること、また滑走にはATPの加水分解エネルギーが使われていることを示している。

A. Uenoyama and M. Miyata : Establishment of *Mycoplasma mobile* triton model and identification of energy source for gliding motility.

3P204

細菌ペン毛モーター低速回転時のステップ検出

○曾和 義幸¹、Alexander Rowe²、薬師 寿治³、本間 道夫³、Richard Berry²、石島 秋彦^{1,4} (¹名大院・工、²Oxford大・物理、³名大院・理、⁴科技振・さきがけ21)

細菌ペン毛モーターは、H⁺またはNa⁺の流入を回転運動に変換する分子機械であり、回転子の周りに配置された約10個の固定子が回転力を生み出すと考えられている。回転メカニズムを知るためには、回転の素過程を検出することが重要であり、回転速度をNa⁺濃度や阻害剤で制御できるNa⁺駆動型が有用である。通常大腸菌はH⁺駆動型ペン毛を持つが、我々は固定子を遺伝子工学的に改変し、Na⁺駆動型ペン毛を持つ大腸菌を作製した(Asai et al.2003)。さらにビーズを用いた回転計測が可能な菌株に最適化し、その計測結果については今年の年会で報告した。

今回、作製した菌株を用いて、固定子の数を~1個かつ低速度回転の条件を作り出し、モーター1回転中の動きの解析を目的とした。低濃度Na⁺存在下ではモーターは完全に停止したが、回転するのに十分な濃度に戻したところ、通常より遅い回転が観察された。低速回転を生み出す機構は明らかではないが、固定子に依存することを示唆する結果を得ている。この低速回転時(<2 Hz)において、モーターは約12度を基本単位とするステップ状の動きをしていた。1回転中に30個程度のステップが存在していることになり、約30の対称性を持つモーターの回転子に由来していると期待される。

Y.Sowa, A.Rowe, T.Yakushi, M.Homma, R.Berry and A.Ishijima : Steps in slow flagellar rotation