マイコプラズマの滑走運動 — 現在の生物学が説明できないメカニズム —

宮 田 真 人

大阪市立大学大学院 理学研究科 生物地球系
〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

[受理: 2002年10月10日]

マイコプラズマが動くことは、マイコプラズマ研究者の間ですらあまり知られていない。この世で最も小さなゲノムを持つ、単純な(?)生物が、細胞の複製とは直接関係しない活性をもつことが受け入れられないのかもしれない。その先入観は、しかしマイコプラズマ・モービレを顕微鏡下で一目見たときに払拭される。視野いっぱいにはスムーズに動きまわる、フラスコ型の小さな物体! マイコプラズマには細胞表面にもゲノムにも既知の運動システムを示唆する構造はない。いったい、どんな装置で、どんなメカニズムで、動くのだろうか? 未知の世界への探検は、今、始まったばかりだ。

1. は じ め に

マイコプラズマは高ATブランチに属するグラム陽性菌で、クロストリジウムに近い(38, 74)。しかし人間に重い病気をおこすものはあまりない。よく知られているのは*Mycoplasma pneumoniae*で、これは非典型肺炎の第一原因である(54)。すべてのマイコプラズマは高等動植物に、一部をのぞいては組織中の宿主細胞の表面に寄生している。ゲノムサイズはとても小さく(580-2200 kb)(54)、ごく最近まで*Mycoplasma genitalium*が地球上でもっとも小さなゲノムをもつとされていた(13)。マイコプラズマのゲノム縮退は寄生生活に適応したものと考えられる。アミノ酸やヌクレオチド、脂質など、多くの栄養素を要求し、呼吸鎖もなく、ペ

プチドグリカン合成することもできない。反対に、抗原性変化や、細胞接着や、有機物とりこみなど、寄生に必要なシステムはよく発達している(18)。

滑走運動も、寄生性に適応するためにマイコプラズマが独自に発達させた形質であると考えられる。これまでのマイコプラズマ滑走に関する研究はほとんど*M. pneumoniae*と*M. mobile*について行われてきた。本総説では、はじめにマイコプラズマ滑走運動を紹介し、つぎにそれぞれの種について、これまでに明らかになっていることをこれからの展望を含めて解説する。

2. マイコプラズマの滑走運動

1) どんなふうに滑走する?

図1は*M. mobile*の滑走運動をビデオに撮影し、4秒間分のフレームを平均化したのちに最後の1フレームをひいたものである。どのくらいの速さで動いているかを、動いていない印刷物でお伝えするのはむずかしい。一昔前なら、切り取って輪

Makoto MIYATA
Gliding motility of mycoplasma —A mechanism cannot be explained by today's biology—
Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

図1. *M. mobile* の滑走 (4秒間の軌跡)。白い点が最後の菌の位置を示す。焦点はカバーガラスに合っている。うすい軌跡はスライドガラス上の菌を示す。ガラスについていない菌はブラウン運動をしている。スケールは5 μm 。

図2. *M. mobile* の走査電子顕微鏡像。Dr. Rosengarten の好意による。スケールは0.2 μm 。

ゴムで束ねる，ぱらぱら漫画でも作るところだが，現在はインターネットという便利なものがあるので，そちらを参照されたい (<http://www.geocities.co.jp/Technopolis/1721/myco.htm>)。1秒間に動く距離は2.0–4.6 μm で菌体長の3–7倍にあたる (57)。菌は図2で示すように，三角フラスコ，あるいは，くびれの少ないひょうたんみたいな形をしており，細くつきだした部分は head-like structure とよばれている (25, 27)。この部分をここでは head と省略する。滑走は head 側にむかっておこり，動きがとぎれることも逆行することもない。泳いでいるのではなくて，表面を這っていることは，ガラスからはずれた菌がブラウン運動しなくなることからわかる。*M. mobile* の滑走を見るのはわりと簡単で，生きているカルチャー

図3. *M. pneumoniae* の透過電子顕微鏡像。左上が接着器官。

でありさえすれば，すべての菌が止まることなく動いている。学名は，よく動くことからつけられた。ラテン語なので，モービレと発音するのが正しい。

M. pneumoniae (ニューモニエ) の滑走の観察は *M. mobile* にくらべると容易ではない。培養の条件やステージ，菌の収集方法や観察時の温度などに依存する。条件がそろってもすべての菌が動くわけではなく，どのような状態にある菌が動くのかはよくわからない。滑走の速度は毎秒0.3–0.5 μm で，*M. mobile* の約10分の1である (52)。動きはやはり一方向で，菌体の片方の極に三角すい型の短い突出部があり (図3)，その方向にすすむ。この三角すいの構造はチップ構造 (tip structure)，または接着器官 (the attachment organelle) とよばれている (30)。

もともとマイコプラズマの滑走は，1946年に *M. pulmonis* で最初に報告され (2)，1960年代に *M. pulmonis* と *M. pneumoniae* で確認された (7, 49)。それ以外にも，*M. genitalium*，*M. gallisepticum*，*M. penetrans* が滑走することが確認されている (表1)。これらはいずれも菌体の片方の極に突出部をもち，その方向に向かって滑走する。滑走の見た目がおなじなので，メカニズムは共通しているものと思われる。さらにこれらの種がマイコプラズマの系統内でそれほど近縁でないことを考えると，本当は現在知られているより，もっと多くのマイコプラズマ種が滑走運動を行うものと思われる。なぜなら，マイコプラズマ研究者は，あまり

表 1. 滑走するマイコプラズマとその特徴

マイコプラズマ種	平均速度 ($\mu\text{m/s}$)	最大速度 ($\mu\text{m/s}$)	停止時間 (%)	宿主	病原性
<i>M. pneumoniae</i>	0.3-0.4	1.5-2.0	0-80	人	肺炎
<i>M. genitalium</i>	0.1	不明	不明	人	尿道炎
<i>M. pulmonis</i>	0.4-0.7	1	0-25	鼠	肺炎
<i>M. gallisepticum</i>	0.03-0.05	0.15	40-80	鳥	肺炎
<i>M. mobile</i>	2.0-4.5	7.7	なし	魚	鰓炎

文献 (24) より改変。

マイコプラズマを光学顕微鏡で見ないからである。私自身は細胞に極性のあるマイコプラズマはみな滑走するものと考えている。

2) 病原性, 寄生性

滑走が認められているマイコプラズマは、すべて何らかの病原性をもっている (表 1) (54, 68-70)。しかし、滑走と病原性の関係に注目した研究は、これまでになされていない。*M. pneumoniae* の接着も滑走もできない変異株は、病原性をもたないが (29)、これは宿主への接着ができずに組織にとどまることができないせいで、滑走と病原性の関係を直接示しているわけではない。*M. pulmonis* をネズミから回収して培地中で培養すると、5 世代は滑走能力を保っているが、それ以降には失われてしまう (49)。宿主中では滑走できる菌が優位に生き残るのか、あるいは菌が宿主の何かに反応して滑走能力を発現させていると思われる。

3) 何のために滑走する? 走性は?

動くことは目に直接うったえるため、菌が生産するエネルギーの大半が消費されているように考えがちである。しかし、タンパク質や核酸などの合成に比べると運動に費やされるエネルギーは少ない。細菌の滑走に必要なエネルギーは多くても全体の 5% である (8)。もちろん、だからといってマイコプラズマが意味もなく滑走しているとは考えられない。

すぐ思いつくのは、より栄養が豊富で老廃物の少ない場所をもとめて動くことである。実際に、*M. mobile* が数種類の糖とアミノ酸に反応することが報告されている (24, 26)。しかし残念なことに、再三の挑戦にもかかわらず、私たちにはその実験が再現できない。もちろん、これはマイコプラズマの化学走性を完全に否定するものではない。

私たちは、低濃度 (0.1-0.5%) の寒天を含む培地中では、マイコプラズマのコロニーが、滑走能力に依存して小さなブロックの集合体になることを見いだし (図 4)、大きな一つのブロックから形成されるコロニーを探すことで滑走できない変異株をえた (48)。不思議なことに、小さなブロックを形成しない株の半数は、野生株と同じか、あるいは少し速く滑走した。このことはマイコプラズマの化学走性を示唆しているのかも知れない。なぜなら、べん毛で泳ぐバクテリアの固形培地中でのコロニーの広がりや化学走性にも依存することは、よく知られているからである。ここで 1 つ注目すべきことは、これまでに明らかになったマイコプラズマゲノム中に two-component system (二成分制御系) の遺伝子が見つからないことである (9, 12, 14, 19)。これは (i) マイコプラズマの細胞をつつむ構造が、ペプチドグリカンをもつ細菌と大きく異なるため、アミノ酸配列から two-component system を見つけだすことが困難である、(ii) 全く別のシステムで外界に反応している、(iii) マイコプラズマは外界に反応しない、などの可能性で説明される。

図 4. *M. mobile* の 0.1% 寒天培地中におけるコロニー。左は野生株、右は滑走変異株、スケールは 0.1 mm。

M. mobile の発見者である、Rosengarten らはさらに興味深い観察を行った (59)。それは、滑走するマイコプラズマの培地に流れをかけるとマイコプラズマが流れの上流にむかって滑走するというもので、*M. mobile* は 100–300 $\mu\text{m/s}$ の水流に対して 1–3 秒の遅れで反応し、上流への方向転換と 28% の速度上昇を起こす。このような性質は一般に走流性 (Rheotaxis) といわれ、魚などで観察される。*M. mobile* は鯉のえらから単離された。えら上では常に激しい水流があるので、水流に吹き飛ばされないようにこの性質をもっているのだという。Rosengarten らは論文の中で、この反応が菌体内における生化学的な経路を介するものであるように判断している。しかしこの現象は、*M. mobile* の接着タンパク質の位置 (以下を参照のこと) と、常に head 側に向かって滑走する性質によって説明できる。すなわち水流で押されることで、菌が接着タンパク質のある、head 付近を中心に方向転換するため、上流にむかって動くのである。この性質はマイコプラズマ尾部にピーズをつけて流れをかけると、さらに顕著になる (44, 45)。もともと、速度の上昇についてはこれだけでは説明できない。著者自身が観察したところ、たしかに滑走中の培地を入れかえると、それに反応して滑走は速くなる。しかし、この現象は水流の速さに依存しないので、必ずしも走流性に関係した現象とはいえない。

次に考えられる滑走の目的は、バイオフィームのようなコミュニティ形成である。マイコプラズマがバイオフィームを形成するという報告は、これまでになされていない。しかしマイコプラズマは高密度条件下におかれると集合体を形成する (5, 58)。そして、この集合体形成は滑走能力に依存する (48)。

マイコプラズマは細胞表面の抗原性を常に変化させ、宿主の免疫システムからののがれている (54, 77)。もし滑走が細胞性免疫からののがれるための生き残り戦略なら、マイコプラズマにとってそれは有効な手段といえるだろう。滑走するマイコプラズマのうち *M. gallisepticum*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae* については一部が宿主細胞中に侵入することが、知られている (1, 36, 60, 76)。滑走運動が、侵入や、宿主細胞中での移動になんらかの

役割をはたしている可能性も考えられる。

4) マイコプラズマの滑走運動は本当に未知のメカニズム!

マイコプラズマの表面をつぶさに観察しても、そこにべん毛は見られない (24, 28)。このことは、マイコプラズマのゲノムにべん毛の遺伝子がないことから支持される (9, 12, 14, 19)。また真核生物の運動のほとんどをになっている、モータータンパク質 (ミオシンやキネシンなど) のホモログもゲノム中に存在しない。

では、メカニズムが明らかになっていない他の細菌の運動とくらべた場合はどうだろうか? 細菌の固形物表面での動きは、ほぼ 200 年前から知られている。それらは細菌の系統上広い範囲にわたって分布しているにもかかわらず、滑走運動としてひとくくりにされてきた (67)。しかし近年、それらのいくつかのメカニズムが明らかになるにつれて、細菌の滑走はいくつかにわけて考えられるようになった (40)。そのうちの 1 つは線毛の伸び縮みによって起こるもので、pili motility といわれる。シュードモナス (*Pseudomonas*) の twitching motility, 滑走細菌 (*Myxococcus*) の social motility, 一部のらん藻 (*Synechocystis*) の gliding motility などがこれにあてはまる。第 2 はフィラメント状につながって生活するらん藻 (Cyanobacteria) に見られるもので、細胞端から多糖を分泌してその反動で動くものである。マイコプラズマの滑走は、細胞表面の構造からもゲノム配列からもこれらの運動と共通のメカニズムをもつとは考えられない。

滑走細菌 (*Myxococcus*) の adventurous motility と *Cytophaga-Flavobacterium-group* については滑走に必要な遺伝子がいくつか同定されているが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。これらの滑走運動は、菌表面に運動を示唆する構造がないことや、*Cytophaga-Flavobacterium-group* の細菌の動きが速い (毎秒 2–4 μm , 細胞長にすると 0.5–1 倍) ことなど、マイコプラズマと共通した特徴がある。しかし、これらの滑走メカニズムもマイコプラズマと共通とは考えにくい。その理由は、1 つにはこれらの細菌はグラム陰性菌で、系統上、マイコプラズマから離れていること。2 つめはこれらの細菌は形態上の極性のない桿菌で、

運動の方向が時々反転するなど、見た目の運動様式がマイコプラズマとは全くことなること。そして3つめはこれらの細菌の滑走に関与する遺伝子のホモログがマイコプラズマゲノム中では見つからないこと、である。

マイコプラズマのなかのサブグループにスピロプラズマ (*Spiroplasma*) という一群がいる。これらは名前のとおり、らせん型をしており、高粘度の溶液中を運動する。しかしそれはらせんを維持する細胞骨格の伸縮でらせんを動かして溶液中を泳いでいるのであって、表面運動ではない (6, 24)。

以上のことは、マイコプラズマ滑走が、本当に未知で、しかもユニークなメカニズムで起こっていることを意味する。

3. *M. pneumoniae*

M. pneumoniae は人の病原菌であるため、1970年頃から接着と細胞骨格にかんする研究がおこなわれ、情報も蓄積している (3)。ゲノム全配列は1996年に解読され (19)、十分とはいえないが遺伝学も可能である。

1) 接着器官

M. pneumoniae の片方の極には細胞膜が三角すい型につきだした接着器官が存在する (3, 31, 42)。宿主に結合しているマイコプラズマをよく観察すると、必ずこの構造が組織と接している (53, 75)。ネガティブ染色を行ったマイコプラズマの表面を電子顕微鏡で観察すると、その先端には nap と呼ばれる、細かいけば状の構造が見つかる (24, 28)。この nap は *M. genitalium*, *M. pulmonis*, *M. gallisepticum* にも見られるが、*M. mobile* だけには見られない。組織に結合している *M. pneumoniae*

を切片にして電子顕微鏡観察を行うと、マイコプラズマと組織の間にフィラメント状の構造が見えることがあるが (53, 75)、この構造が nap と同じものであるかは明らかではない。接着器官内部は他の部分にくらべて電子密度が低く、中心には電子密度のひときわ高い、棒状の構造が走っており、この構造は electron dense core と呼ばれている (5, 65, 75)。マイコプラズマを TritonX-100, または TritonX-114 で抽出すると、不溶画分が残るが、この画分には電子顕微鏡下で細胞骨格様の構造が見られるため、この構造はトライトンシェル (Triton shell) とよばれている。それは、細胞あたり一つ存在する比較的太い Rod と、かご状構造を形成する細いフィラメントからなる。Rod が接着器官を、そしてかご状構造がそれ以外の部分の形態をささえていると考えられている (15, 41, 55)。Rod をヨウ化カリウムでよく洗った後に詳細に観察すると、それは多数の細いフィラメントとそれを束ねるように結合しているリング、そして片端についた円盤から形成されていることがわかる (50) (図5)。私たちが現在考えている模式図を図6に示す (50)。

2) 接着に必須なタンパク質

接着能力は *M. pneumoniae* の病原性決定因子であるため、これまで接着タンパク質とそれ以外に接着に必須な7つのタンパク質が同定されてきた。これらのタンパク質のすべては接着器官に局在する (3, 30, 42, 61)。それぞれの特徴を表2に示す。

接着を直接になっているのは、P1 adhesin とよばれる 170 kDa のタンパク質である (53)。これは3-6ヶ所の膜貫通ストレッチを持ち、大部分は細胞外に位置する。ガラスへの結合もこのタンパク

図5. Rodの電子顕微鏡写真とそのモデル。左が細胞の先端部。

図6. *M. pneumoniae* の細胞骨格のモデル (50)。文献 (30) より改変。

表 2. 接着関連タンパク質とその性質

タンパク質	分子量 (kDa)	菌体内局在	遺伝子の存在する ゲノム領域	機 能
HMW1	112	接着器官中央部	HMW オペロン	接着器官の位置決め 接着関連タンパク質 安定性保持
HMW2	213	接着器官中央部	<i>crl</i> (cytadherence regulatory locus)	
HMW3	74	接着器官	HMW オペロン	
P1 adhesin	170	接着器官を中心 により広い範囲	P1 オペロン	接着タンパク質本体
P90	90	接着器官を中心 により広い範囲	P1 オペロン	P1 adhesin の構造, 位置の維持
P40	40	接着器官を中心 により広い範囲	P1 オペロン	P1 adhesin の構造, 位置の維持
P30	30	接着器官先端部	HMW オペロン	滑走?
P65	47	接着器官先端部	<i>crl</i>	

質が担っているが、動物細胞表面におけるリガンドは、糖蛋白質や糖脂質の糖部分の NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc である。このタンパク質を認識する抗体は、マイコプラズマの接着を阻害する。P1 adhesin は、菌体にトライトン処理を行ってもその一部がトライトンシエルに残ることから、細胞骨格に支えられていると考えられている。1980 年代初頭に、3つのグループによって、このタンパク質がマイコプラズマ細胞中で接着器官に局在していることが明らかにされた (4, 10, 20)。これは、細菌のタンパク質の局在が大腸菌の化学走性のタンパク質の研究で認められるより、10年以上早かった (37)。マイコプラズマ内でこのタンパク質はわりとよく保存されており、*M. genitalium* と *M. gallisepticum* それぞれの接着タンパク質である MgPa (21, 22) と GapA (16) は、P1 adhesin のオルソログである。また、*M. pirum* でもオルソログが見つかっている (71)。

一般的にマイコプラズマの動物細胞への接着能力はコロニーの赤血球の吸着でみることができると (66)、この吸着を調べることで、接着のできない変異株を単離できる (32)。接着のできない変異株は細胞形態にも異常が見られ、過剰の枝分かれを形成する (17, 42, 56, 61, 62)。他の生物では考えにくいことだが、主に変異株と野生株のタンパク質プロファイルを比較することで、接着に必須の7つのタンパク質、HMW1, HMW2, HMW3, P90, P40, P30, P65 が同定された (32)。HMW という名前は high molecular weight の略で、マイコプラズ

マの全画分をとくして電気泳動にかけると、最も高分子の位置に他のバンドからはなれた形であらわれる。これら7つのタンパク質もすべて接着器官に局在し、図7で示すようにゲノム上の3領域にコードされている (30)。

私たちは、マイコプラズマを蛍光抗体法で染色する方法を開発し、それぞれの株におけるタンパク質の局在を詳細に観察した (61)。P30 と P65 は接着器官の先端部より、HMW1 と HMW3 は中央に、P1, P90, P40 はより広い範囲に局在していた (62)。これは P1 に P40 や P90 が化学クロスリンクされる実験結果と一致する (34, 35)。HMW1 と HMW2 の変異株では electron dense core が形成

図 7. *M. pneumoniae* ゲノム上における接着関連タンパク質の遺伝子

されなかった (62)。このことは HMW1 と HMW2 が他の接着関連タンパク質を支配する立場にあることを意味する (3, 31, 42)。HMW1 変異株では他のタンパク質の局在化は完全に失われていたのに対して、HMW2 変異株ではタンパク質は同じ位置に集中して局在した (62)。ただしそのシグナルは弱く、このことは、HMW2 変異株で他の接着関連タンパク質の安定性がいちじるしく低下しているという報告と一致している (51)。さらに、P65 タンパク質を、蛍光を発するタンパク質である YFP に遺伝子工学的に融合させたものを強制発現させると、この P65 は HMW2 変異株中でも野生株と同じく接着器官に局在した (23)。このことから、HMW2 が P1 adhesin, および他の接着関連タンパク質の位置決めに直接には関与していないことがわかる。HMW2 は高いコイルドコイル含量を有することなどから、Krause らはこれが electron dense core のフィラメントであると主張している (3, 31)。Herrmann らのグループが、トライトン不溶画分に存在するタンパク質をマスマススペクトロメトリで同定すると、そこには接着関連タンパク質がすべて含まれていた (55)。しかし、前節であげた接着器官の微細構造がどのタンパク質に対応するのかは現時点ではよくわからない。

P1 adhesin および接着関連タンパク質がコードされているゲノム領域には、全部で 15 のタンパク質遺伝子がコードされているが、上にあげたもの以外はほとんど調べられていない。私たちは、トライトンシエルをヨウ化カリウムで抽出し、菌体の形状をかご状にささえるタンパク質の消失とともに溶出されてくるタンパク質として、P41 を同定した (50)。P41 は *crl* にコードされており、HMW2 とともに転写される (73)。

3) 滑走に關係するタンパク質

では、これらのタンパク質の中に滑走に直接関係するものが含まれているだろうか？ 著者は、これらの中に接着と滑走に必要なタンパク質の遺伝子がすべてふくまれていると、さしたる理由もなく信じている。ガラスへの結合能力のない変異株は接着も滑走もしないため、P1 adhesin の分子自体が動いて、菌体を前に押しだしているとも考えることもできる。しかし、P1 adhesin は菌体をガラスへ近づける役割をはたして、他の分子が菌

体を押しだすとも考えられる。Krause らのグループは P30 のある変異株が接着の能力をのこしながら、滑走できなくなっていることを見いだしている (私信)。真核生物で微小管を形成するチュープリンの、細菌におけるホモログは FtsZ だが、これはこれまでに調べられた真性細菌では細胞質分裂で中心的な役割をはたしている (39)。このタンパク質の遺伝子は滑走するマイコプラズマのゲノムにも存在するが (9, 12, 19)、滑走に関与するかどうかはわかっていない。唯一、滑走しないマイコプラズマの仲間ではゲノムの解読されている *Ureaplasma urealyticum* には *ftsZ* 遺伝子は存在しない (14)。

4) 接着器官の形成過程

M. pneumoniae に限らず、極性のあるマイコプラズマを観察すると、片方の極にのみ小さな突出部 (*M. pneumoniae* では接着器官) があることに気がつく。このことはこの突出部が菌体の成長、分裂に同調して形成されることを意味する (29, 42, 46)。60 年代後半に Bredt は位相差顕微鏡でマイコプラズマの細胞分裂を観察し、あたらしい接着器官がもともとあるものとなり形成されるという提唱をした (7)。私たちは、P1 adhesin を蛍光色素で染めることで接着器官をラベルし、菌体イメージをタイプ分けした (61) (図 8A)。同時に、それぞれの菌体イメージにおける DNA 含量を DNA に特異的な蛍光色素である DAPI を用いて定量することにより、それぞれの菌体イメージにおける複製の進行段階を見つかった。なぜなら、マイコプラズマはその複製の全進行時間を使って DNA 複製を行うことがわかっていたからである (63)。その結果、あたらしい接着器官は以前からあるものとなり形成され、菌体の側面を通して反対極に移動し、そののちに菌体の二分裂がおこることが明らかになった。

4. *M. mobile*

1981 年に、ドイツで、Tench という、鯉にいた観賞魚のえら病変からみつかった *M. mobile* は、他のマイコプラズマとは一線を画する滑走能力を持っており (25, 27)、その能力は他のマイコプラズマで不可能だった解析を可能にした。今年に入って全ゲノムもほぼ解読され、近々公開さ

(A)

0.5 μm

接着器官

(B)

図8. *M. pneumoniae* と *M. mobile* 菌体における接着（滑走）タンパク質の局在

(A) *M. pneumoniae* の菌体複製。上) いろんな菌体像。上段は P1 adhesin (赤) と DNA (青) のシグナルを、下段は P1 adhesin (赤) のシグナルと可視光で見た菌体像を示している。下) 菌体分裂のスキーム。もともとある接着器官を赤で、新しいものを緑で示してある。

(B) *M. mobile* における滑走タンパク質の局在（後出）。Gli349 が、赤でラベルされている。スケールは 2 μm。

れる（私信）。以下に私たちの過去3年間における研究を紹介する。

1) 発生する力

運動メカニズムを考えるとときに欠かすことのできない情報の1つは、その力学的性質である。そこで、私たちは図9に示すように、*M. mobile* 細胞の後部端にポリスチレンのビーズをつけ、2つの方法のどちらかでビーズに負荷をかけ、発生している力を測定した (44, 45)。1つの方法は、よくコントロールされた流れを与えるというものである。マイコプラズマは培地に流れをおこすと上流をむくので、いろんな速さの流れを与えたときにマイコプラズマ（実際にはビーズ）にかかる負荷をストークスの法則から計算できる。もう1つの方法は、“光ピンセット”で、この方法は強いレーザー光を屈折率のちがう物体にあてた時にレーザーの中心にその物体が捕捉される性質を利用したものである。近年、生物物理学の分野でよく使われるようになった。対象物（この場合はマイコ

プラズマに引っぱられるビーズ）の発生する横方向の力は、レーザーの中心と対象物の中心のずれから計算できる。この研究では光ピンセットを最大力の測定に用いた。マイコプラズマはいろんな速さの流れのもと、負荷に対応して連続的にその

図9. 力測定実験の模式図。マイコプラズマの後部端につけたビーズに、培地の流れ、あるいは光ピンセットで負荷をかけた。

速度を変化させた。このことは、滑走が宿主組織で生じるであろう、広い範囲の負荷に対応可能なことを示唆している。また、ガラス表面をつかむことのできるユニットが多数存在していて、ある瞬間に注目すると、それらのユニットの大半がガラスをつかんでいることを意味する。マイコプラズマの動きを止めるのに必要な力は温度に関係なく 27 ピコニュートンで、これはミオシンやキネシンなどのモータータンパク質 1 分子の 5-7 倍で、細菌べん毛モーターの力発生装置の 1 ユニットとほぼ同じである。この値は滑走装置が細胞膜中に浮かんでいるのではなく、菌体内の、なんらかの足場についていることを示唆する。*M. mobile* でもトライトン処理で不溶画分が得られるので、そこに *M. pneumoniae* で見られるような細胞骨格があるのかもしれない。最大力は温度に依存しないが、滑走速度は 11.5-36.5°C の範囲で温度に依存して直線的に変化した。このことは力発生と移動が別のステップであることを意味する。

2) 動きとそれを起こす構造は菌表面のどこに？

M. mobile の滑走のビデオを見た人の多くが最初にいただく疑問は、菌体表面のどこが動いているのか？ということである。そこで、私たちは小さなビーズをマイコプラズマの表面につけ、滑走中の動きをおった (47)。ビーズは菌体の同じ位置についてまま、菌体と共に移動した。このことは菌体が滑走中に細胞軸を中心としたロールをしていないことと、菌表面の動きが狭い部分にかぎられていることを意味する。*M. mobile* はカルチャーが古くなると菌体の head が長くなる傾向がある。菌が生えきった後に、さらに 24 時間の培養を続けたカルチャーの中には、head が非常に長くなった菌が低い割合で出現するが、これらの菌も滑走運動をしめす。その動きは head が head 以外の部分 (かりに body と呼ぶ) を引きずっているように見え、さらに時々、body がガラス上の何かにひっかかり、head が伸長する (47)。この現象は滑走のための力が head の部分で発生していることを示唆し、この考えは *M. mobile* に培地の流れをかけたときに、先端部を中心に旋回して進行方向が流れの上流を向くことを説明する (44)。

滑走を担う構造はどんなもので、どこにあるのだろうか？これらの具体的な情報をえるために、

手を加えていないマイコプラズマをマウスに免疫し、そのマウスからモノクローナル抗体を作製し、滑走を阻害する抗体をスクリーニングした (33)。その結果、滑走中のマイコプラズマのガラス結合を阻害する 2 つの抗体が得られた。すなわち、抗体の添加によって、滑走しているマイコプラズマの全てがガラスから遊離したのだ。蛍光抗体法で調べると、この抗体は、私たちが予測していた head 先端ではなく、それより少し body 側によった head 基部を認識したため、この部分をあたらしく neck と名づけた (図 8B)。この 2 つ以外に同様にえてきた、菌表面をよく染めるモノクローナル抗体は、head, head と body, body のパターンで菌体を染め分けた。これらのことは図 10 で示すように菌表面が 3 つの部分に分化していることを示唆する。

3) neck に存在する構造の可視化

滑走するマイコプラズマでは頭部端に nap が観察されているのに、*M. mobile* ではこの構造は見えない (24, 28)。一般的にこの nap がマイコプラズマ滑走に直接関与していて、*M. mobile* の場合はその構造がこわれやすくて見えないのではないだろうか？私たちはガラス上を滑走している *M. mobile* を瞬間凍結し、フリーズフラクチャー電子顕微鏡観察を行った (43)。図 11 で示すように、首の部分を中心に約 50 ナノメートル長のやわらかいスパイクが細胞膜中からつきだし、先端がガラス表面をつかんでいた。スパイクの角度は菌体の軸に対してまちまちだった。この結果は、このスパイクがガラスをつかんだりはなしたりして、菌体を前に押しだすことを示唆している。

図 10. タンパク質の局在パターンから見た *M. mobile* 表面の 3 つの領域。neck に滑走装置の存在が予想される。矢印は滑走する方向。

図 11. *M. mobile* のフリーズフラクチャー像 (E-face)。右下が head。下側の細胞膜の外葉を内側から見ている。上側の細胞膜、細胞質、そして下側の細胞膜の内葉は取り除かれている。

4) 滑走のタンパク質

現時点で遺伝学の使えない *M. mobile* で、滑走メカニズムに含まれるタンパク質を見つけだすにはどうすればいいだろうか？ すぐに思いつくのは滑走を阻害する抗体をたくさん作って、それぞれの標的を探すことである。もう 1 つは滑走できない変異株で欠失、あるいは変化しているタンパク質を探し出すことである。私たちはこれら 2 つの方法を用いてそれぞれ 2 つのタンパク質を同定した (64, 72)。興味深いことに、抗体の標的として同定した 2 つのタンパク質は、変異株で変化していることから同定した 2 つのタンパク質と同じも

図 12. *M. mobile* の滑走タンパク質の遺伝子と、*M. pulmonis* におけるその相同領域

のであった。その 2 つはゲノム上にタンデムにコードされる巨大タンパク質で、私たちはこれらのタンパク質を、滑走を意味する *gliding* から最初の 3 文字を取って、Gli349 と Gli521 と名づけた。それぞれの特徴を表 3 に示す。

どちらの配列にもモチーフは存在せず、配列からその機能は容易には予測されなかった。また *M. pneumoniae* の P1 adhesin の配列とくらべても、そこにシステインを含まないこと以外、おたがいの類似点はない。全生物で似ているものを探すと、唯一、*M. mobile* と近縁で、滑走運動能をもつ、*M. pulmonis* ゲノム中によく似た遺伝子が、同じならばで存在していた (図 12)。Gli349 や Gli521 に似た構造のタンパク質が他のマイコプラズマであまり見つからないことは、同じマイコプラズマ滑走運動の中でも、その装置やしくみの詳細にバリエーションがあることを示す。このことは、マイコプラズマ滑走運動に参加しているタンパク質の種類がべん毛や線毛などと違って、少ないことを示唆するのかも知れない。なぜなら、重要な相互作用をおこなうタンパク質の種類が少なければ、進化

表 3. *M. mobile* の滑走タンパク質

タンパク質	Gli349	Gli521
予想される分子量 (Da)	348,510	520,559
等電点	4.9	5.25
アミノ酸含量の特徴	Cys (0%), Asn (12.0%)	Cys (0%), Asn (13.5%)
膜貫通ストレッチ	N 末端に 1 カ所	N 末端と C 末端に 1 カ所ずつ
モチーフ	なし	なし
<i>M. pulmonis</i> でのオルソログ	MYPU2110	MYPU2120, 2130, 2140 ^a
変異株	ガラスへの結合と滑走ができない	
菌体内局在	neck	neck
菌あたり分子数	200-300 分子	未定
滑走における役割	ガラスへ結合する	Gli349 を動かす

^a *M. pulmonis* ゲノムのデータでは 3 つのオープンリーディングフレーム (orf) であるが (9), 私たちの保存している株では一つの orf からなっている (72)。

の過程で、より自由に構造に変化を与えられるはずだからである。

これら2つのタンパク質はneckに存在していた。Gli349分子を金コロイドでラベルし、電子顕微鏡像を立体視すると、この分子がneck領域の下側にかぎらず、どの側にも存在していた。また表面に結合することのできる抗体の分子数は、菌あたり200–300分子であった。もし菌表面のGli349分子の4分の1がガラス側に位置していて、最大力の発生に関与すると仮定すると、1分子あたり、0.09–0.14 ピコニュートンの力しか発生していないことになる。

5) 抗体による滑走の阻害

Gli349の抗体を、滑走しているマイコプラズマに加えると、滑走速度とガラスに結合している菌の数が時間に対して指数関数的に減少した。対数プロットしたその傾きから計算した、結合と速度に対する、それぞれの阻害の速度は、広い抗体の濃度範囲にわたってほぼ一致していた。このことはGli349のガラスへの結合が滑走のメカニカルサイクルの1ステップであることを意味する(72)。

これに対して、Gli521の抗体は低濃度で添加した場合にはマイコプラズマのガラスへの結合を阻害するが、高濃度で添加した場合にはマイコプラズマのガラスへの結合を保ったまま、動きのみを止めた。このことはGli521が力発生や接着タンパク質を動かすことに働いていることを意味する

(64)。

6) メカニカルサイクル (!)

私たちは、フリーズフラクチャーで観察されるスパイクは主に Gli349 か、あるいは Gli349 と Gli521 の両方で構成されていると信じている。Gli521 が失われている変異株は Gli349 を正常に発現しているにもかかわらず、ガラスに結合できない。また蛍光抗体観察時に Gli521 の抗体は Gli349 の抗体より高濃度を必要とする。これらのことから、Gli521 はより細胞膜に近いところで Gli349 をささえるような形で機能していると思われる。スパイクがガラスをつかむステップが滑走のメカニズムの一段階であるとする、滑走運動は図13のような5つのステップ、すなわち (i) 結合、(ii) 力発生、(iii) ストローク、(iv) 解離、(v) 戻り、からなる一連の反応と考えられる。Gli349 の抗体はステップ (i) あるいは (v) を阻害し、Gli521 の抗体はステップ (ii) (iii) (iv) のうちのどれかを阻害するのである。

7) 具体的なモデル構築のために

菌表面の Gli349 分子の数だけ滑走装置があるとすると、そのユニット数は菌あたり 200–300 になる。もしそうなら、図13のようにスパイクが動いて菌体を押し出すためには、装置ユニット間の協同性がなくてはいけない。あるいは、スパイクが大きく伸び縮みして、その分子内に力と動きをたくわえているのだろうか？

M. mobile は負に荷電したガラス表面も、疎水処理した表面も、プラスチックの表面も、さらには赤血球の表面もほぼ同じ速度で滑走する(11)。スパイクはどのような分子間力で、これら多彩な物質の表面への結合をやってのけるのだろうか？ しかも図13の様なスキームであるならば、その結合の強さは、スパイク自身のコンフォーメーション変化にもなって劇的に変化しなければならない。逆に、ガラス表面への結合によってスパイクは次のステップへ移行するわけだから、「結合した！」という情報が力を発生する Gli521 に伝わらなければならない。

直接のエネルギー源は何で、それがどのようにスパイクの動きに変わるのだろうか？ スパイクがガラスへの結合、解離をくり返していることは正しいとしても、スパイクは本当に動いているの

図 13. 滑走時におけるスパイクのメカニカルサイクル。下側の太い線はガラスを表す。スパイクが Gli349 で、膜中の構造が Gli521 でできていると想定している。詳しくは本文を参照のこと。

だろうか? もしそうなら, それはどのような動きなのだろうか? 2つのタンパク質以外には, どんなタンパク質が関与しているのだろうか? だいたい, スパイクは本当に Gli349 なのだろうか????????

5. お わ り に

この総説を読んで, 少しでも「おもしろい」と感じていただけたなら, それは著者冥利につきるというものである。「これのどこがうれしいのかな?」と思われた場合のために, 3つのいいわけ, すなわち, この研究の意義を用意してみた。1つは, マイコプラズマの寄生性に必要な接着, 滑走運動を理解することでマイコプラズマがおこす病気やコンタミネーションのよい対処法が開発できること, 2つめは, マイコプラズマをふくむ細菌の細胞構築と生き残り戦略の理解につながることで, 3つめは, 生体運動と細胞接着の分子レベルでのメカニズム解明, さらにタンパク質の構造変化や相互作用の理解のたすけになること, である。

この運動のメカニズムは, 近い将来に分子レベルでもっとわかってくるだろう。私個人は, それがどこまでも既知のメカニズムと同じであってほしくない。もし小さなべん毛や線毛が動いていたり, マイコプラズマの細胞骨格のレールの上をモータータンパク質が動いていたなら, これはもう, あまりおもしろい研究ではない様な気がする。運のよい(?) ことに, 今まで *M. mobile* の滑走に関与するタンパク質の配列をいくつか調べても, 既知のシステムを明らかに示唆するようなホモログに出会ったことはない。これまでのところは“セーフ!”である。

6. 謝 辞

ここにあげた研究の一部は, ウィーン獣医科大学の Dr. Renate Rosengarten, ハーバード大学の Dr. Howard C. Berg, NIH の Dr. Thomas Reese らの研究室との共同研究として行われた。ここに感謝の意を表する。また, 海のものとも, 山のものともわからない, マイナーな研究につきあってくれて, さらに未発表のデータをこころよく提供してくれた, 大阪市立大学の, 瀬戸真太郎博士, 上野

山敦子, 大垣裕史, 楠本晃子の諸氏に感謝する。

文 献

- 1) Andreev, J., Borovsky, Z., Rosenshine, I., Rottem, S. (1995): Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and the induction of tyrosine phosphorylation of a 145-kDa host cell protein. *FEMS. Microbiol. Lett.* **132**, 189–194.
- 2) Andrewes, C.H., V., W.F. (1946): A motile organism of the pleuropneumonia group. *J. Pathol. Bacteriol.* **58**, 578–580.
- 3) Balish, M., Krause, D.C. (2002): Cytoadherence and the cytoskeleton., p. 491–518. In R. Herrmann and S. Razin (eds), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.*, London, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- 4) Baseman, J.B., Cole, R.M., Krause, D.C., Leith, D.K. (1982): Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **151**, 1514–1522.
- 5) Biberfeld, G., Biberfeld, P. (1970): Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **102**, 855–861.
- 6) Bredt, W. (1979): Motility, p. 141–145. In M. F. Barile, S. Razin, J. G. Tully, and R. F. Whitcomb (eds), *The Mycoplasmas*, vol. 1, New York, Academic Press.
- 7) Bredt, W. (1968): Motility and multiplication of *Mycoplasma pneumoniae*. A phase contrast study. *Pathol. Microbiol. (Basel)* **32**, 321–326.
- 8) Burchard, R.B. (1981): Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**, 497–529.
- 9) Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., Moszer, I., Dybvig, K., Wroblewski, H., Viari, A., Rocha, E.P., Blanchard, A. (2001): The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic. Acids. Res.* **29**, 2145–2153.
- 10) Feldner, J., Göel, U., Bredt, W. (1982): *Mycoplasma pneumoniae* adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. *Nature* **298**, 765–767.
- 11) Fischer, M., Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Kerlen, G., Seack, K.-H. (1987): Gliding movement of *Mycoplasma* sp. nov. strain 163K on erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**, 321–324.
- 12) Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, R., Saudek,

- D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.-C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison III, C.A., Venter, J.C. (1995): The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397–403.
- 13) Gil, R., Sabater-Munoz, B., Latorre, A., Silva, F.J., Moya, A. (2002): Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 4454–4458.
 - 14) Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y., Cassell, G.H. (2000): The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**, 757–762.
 - 15) Göbel, U., Speth, V., Bredt, W. (1981): Filamentous structures in adherent *Mycoplasma pneumoniae* cells treated with nonionic detergents. *J. Cell Biol.* **91**, 537–543.
 - 16) Goh, M.S., Gorton, T.S., Forsyth, M.H., Troy, K.E., Geary, S.J. (1998): Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). *Microbiology* **144**, 2971–2978.
 - 17) Hahn, T.W., Willby, M.J., Krause, D.C. (1998): HMW1 is required for cytoadhesin P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **180**, 1270–1276.
 - 18) Herrmann, R., Razin, S. (eds). 2002. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. London, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
 - 19) Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkel, E., Li, B.-C., Herrmann, R. (1996): Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4420–4449.
 - 20) Hu, P.C., Cole, R.M., Huang, Y.S., Graham, J.A., Gardner, D.E., Collier, A.M., Clyde, W.A., Jr. (1982): *Mycoplasma pneumoniae* infection: role of a surface protein in the attachment organelle. *Science* **216**, 313–315.
 - 21) Hu, P.C., Schaper, U., Collier, A.M., Clyde, W.A., Jr., Horikawa, M., Huang, Y.S., Barile, M.F. (1987): A *Mycoplasma genitalium* protein resembling the *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein. *Infect. Immun.* **55**, 1126–1131.
 - 22) Inamine, J.M., Loechel, S., Collier, A.M., Barile, M.F., Hu, P.C. (1989): Nucleotide sequence of the MgPa (mgp) operon of *Mycoplasma genitalium* and comparison to the P1 (mpp) operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **82**, 259–267.
 - 23) Kenri, T., Seto, S., Sasaki, Y., Horino, A., Sasaki, T., Miyata, M. (2003): Visualization of the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae* by yellow fluorescent protein fusion. in preparation.
 - 24) Kirchhoff, H. (1992): Motility, p.289–306. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (eds), *Mycoplasmas — Molecular Biology and Pathogenesis*, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
 - 25) Kirchhoff, H., Beyene, P., Fischer, M., Flossdorf, J., Heitmann, J., Khattab, B., Lopatta, D., Rosengarten, R., Seidel, G., Yousef, C. (1987): *Mycoplasma mobile* sp. nov., a new species from fish. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 192–197.
 - 26) Kirchhoff, H., Boldt, U., Rosengarten, R., Klein-Struckmeier, A. (1987): Chemotactic response of a gliding mycoplasma. *Curr. Microbiol.* **15**, 57–60.
 - 27) Kirchhoff, H., Rosengarten, R. (1984): Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2439–2445.
 - 28) Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Lotz, W., Fischer, M., Lopatta, D. (1984): Flask-shaped mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. *Israel J. of Med. Sci.* **20**, 848–853.
 - 29) Krause, D.C. (1998): *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiol.* **6**, 15–18.
 - 30) Krause, D.C. (1996): *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol. Microbiol.* **20**, 247–253.
 - 31) Krause, D.C., Balish, M.F. (2001): Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **198**, 1–7.
 - 32) Krause, D.C., Taylor-Robinson, D. (1992): Mycoplasma which infect humans, p. 417–444. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (eds), *Mycoplasmas — Molecular Biology and Pathogenesis*, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
 - 33) Kusumoto, A., Seto, S., Miyata, M. (2003): Cell surface differentiation into three parts in *Mycoplasma mobile*, head, body, and neck including gliding machinery, revealed by production of monoclonal antibodies. submitted.
 - 34) Layh-Schmitt, G., Herrmann, R. (1994): Spatial arrangement of gene products of the P1 operon in the membrane of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**, 974–979.
 - 35) Layh-Schmitt, G., Podtelejnikov, A., Mann, M. (2000): Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* **146**, 741–747.
 - 36) Lo, S.C., Hayes, M.M., Kotani, H., Pierce, P.F., Wear, D.J., Newton, P.B., 3rd, Tully, J.G., Shih, J.W. (1993):

- Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.* **6**, 276–280.
- 37) Maddock, J.R., Shapiro, L. (1993): Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**, 1717–1723.
 - 38) Maniloff, J. (1992): Phylogeny of mycoplasmas, p. 549–559. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (eds), *Mycoplasmas — Molecular Biology and Pathogenesis*, Washington, D.C., American Society for Microbiology.
 - 39) Margolin, W. (2001): Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 647–652.
 - 40) McBride, M.J. (2001): Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 49–75.
 - 41) Meng, K.E., Pfister, R.M. (1980): Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J. Bacteriol.* **144**, 390–399.
 - 42) Miyata, M. (2002): Cell division., p.117–130. In R. Herrmann and S. Razin (eds), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.*, London, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
 - 43) Miyata, M., Petersen, J., Reese, T. (2003): Flexible spikes observed in freeze fracture image of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*. in preparation.
 - 44) Miyata, M., Ryu, W.S., Berg, H.C. (2002): Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. *J. Bacteriol.* **184**, 1827–1831.
 - 45) Miyata, M., Ryu, W.S., Berg, H.C. (2001): Force-velocity relationship of mycoplasma gliding. *Biophys. J.* **80**, 70.
 - 46) Miyata, M., Seto, S. (1999): Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie* **81**, 873–878.
 - 47) Miyata, M., Uenoyama, A. (2002): Movement on the cell surface of gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 285–289.
 - 48) Miyata, M., Yamamoto, H., Shimizu, T., Uenoyama, A., Citti, C., Rosengarten, R. (2000): Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology* **146**, 1311–1320.
 - 49) Nelson, J.B., Lyons, M.J. (1965): Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of *Mycoplasma*. *J. Bacteriol.* **90**, 1750–1763.
 - 50) Ogaki, H., Jaffe, J.D., Miyata, M. (2003): Identification of Cytoskeletal Elements of *Mycoplasma pneumoniae* by Electron Microscopy and Mass Spectrometry. submitted.
 - 51) Popham, P.L., Hahn, T.W., Krebs, K.A., Krause, D.C. (1997): Loss of HMW1 and HMW3 in noncytadhering mutants of *Mycoplasma pneumoniae* occurs post-translationally. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 13979–13984.
 - 52) Radestock, U., Bredt, W. (1977): Motility of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **129**, 1495–1501.
 - 53) Razin, S., Jacobs, E. (1992): *Mycoplasma* adhesion. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 407–422.
 - 54) Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y. (1998): Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1094–1156.
 - 55) Regula, J.T., Boguth, G., Gorg, A., Hegermann, J., Mayer, F., Frank, R., Herrmann, R. (2001): Defining the mycoplasma ‘cytoskeleton’: the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**, 1045–1057.
 - 56) Romero-Arroyo, C.E., Jordan, J., Peacock, S.J., Willby, M.J., Farmer, M.A., Krause, D.C. (1999): *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytodherence and associated with proper cell development. *J. Bacteriol.* **181**, 1079–1087.
 - 57) Rosengarten, R., Kirchhoff, H. (1987): Gliding motility of *Mycoplasma* sp. nov. Strain 163K. *J. Bacteriol.* **169**, 1891–1898.
 - 58) Rosengarten, R., Kirchhoff, H. (1989): Growth morphology of *Mycoplasma mobile* 163K on solid surfaces: Reproduction, aggregation, and microcolony formation. *Curr. Microbiol.* **18**, 15–22.
 - 59) Rosengarten, R., Klein-Struckmeier, A., Kirchhoff, H. (1988): Rheotactic behavior of a gliding mycoplasma. *J. Bacteriol.* **170**, 989–990.
 - 60) Rottem, S. (2002): Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells., p. 391–401. In R. Herrmann and S. Razin (eds), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.*, London, Kluwer Academic / Plenum Publishers.
 - 61) Seto, S., Layh-Schmitt, G., Kenri, T., Miyata, M. (2001): Visualization of the attachment organelle and cytodherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Bacteriol.* **183**, 1621–1630.
 - 62) Seto, S., Miyata, M. (2003): The attachment organelle formation represented by localization of cytodherence protein and formation of electron-dense core in the wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. in press.
 - 63) Seto, S., Miyata, M. (1998): Cell reproduction and

- morphological changes in *Mycoplasma capricolum*. J. Bacteriol. **180**, 256–264.
- 64) Seto, S., Uenoyama, A., Miyata, M. (2003): A 521 kilodalton protein (Gli521) is responsible for movement in *Mycoplasma mobile* gliding. in preparation.
 - 65) Shimizu, T., Miyata, M. (2002): Electron microscopic studies of three gliding mycoplasmas, *Mycoplasma mobile*, *M. pneumoniae*, and *M. gallisepticum*, by using the freeze-substitution technique. Curr. Microbiol. **44**, 431–434.
 - 66) Sobeslavsky, O., Prescott, B., Chanock, R.M. (1968): Adsorption of *Mycoplasma pneumoniae* to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence. J. Bacteriol. **96**, 695–705.
 - 67) Spormann, A.M. (1999): Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**, 621–641.
 - 68) Stadtlander, C., Kirchhoff, H. (1990): Surface parasitism of the fish mycoplasma *Mycoplasma mobile* 163 K on tracheal epithelial cells. Vet. Microbiol. **21**, 339–43.
 - 69) Stadtlander, C.T., Kirchhoff, H. (1995): Attachment of *Mycoplasma mobile* 163 K to piscine gill arches and rakers--light, scanning and transmission electron microscopic findings. Br. Vet. J. **151**, 89–100.
 - 70) Stadtlander, C.T., Lotz, W., Korting, W., Kirchhoff, H. (1995): Piscine gill epithelial cell necrosis due to *Mycoplasma mobile* strain 163 K: comparison of *in-vivo* and *in-vitro* infection. J. Comp. Pathol. **112**, 351–359.
 - 71) Tham, T.N., Ferris, S., Bahraoui, E., Canarelli, S., Montagnier, L., Blanchard, A. (1994): Molecular characterization of the P1-like adhesin gene from *Mycoplasma pirum*. J. Bacteriol. **176**, 781–8.
 - 72) Uenoyama, A., Kusumoto, A., Miyata, M. (2003): Glass binding of a 349 kilodalton protein (Gli349) is involved in *Mycoplasma mobile* gliding. submitted.
 - 73) Waldo, R.H., 3rd, Popham, P.L., Romero-Arroyo, C.E., Mothershed, E.A., Lee, K.K., Krause, D.C. (1999): Transcriptional analysis of the hmw gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol. **181**, 4978–4985.
 - 74) Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C.R. (1989): A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for their classification. J. Bacteriol. **171**, 6455–6467.
 - 75) Wilson, M.H., Collier, A.M. (1976): Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. J. Bacteriol. **125**, 332–339.
 - 76) Winner, F., Rosengarten, R., Citti, C. (2000): *In vitro* cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. Infect. Immun. **68**, 4238–4244.
 - 77) Yogev, D., Browning, G.F., Wise, K.S. (2002): Genetic mechanisms of surface variation., p. 417–443. In R. Herrmann and S. Razin (eds), Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas., London, Kluwer Academic / Plenum Publishers.