

## 144. 肺炎マイコプラズマが宿主表面で歩くメカニズムの解明

中根 大介

学習院大学 理学部 物理学科 生物物理研究室

Key words : マイコプラズマ, 滑走運動, 細胞骨格, 光学顕微鏡, シアル酸

### 緒言

日本で毎年数千～数万人が発症しており、ヒト市中肺炎の 10–30 %を占める“マイコプラズマ肺炎”は、マイコプラズマ・ニューモニエという小さな細菌によって起こります<sup>1)</sup>。この肺炎は、2010–2011 年に世界的に大流行しました。また、最近ではごく近縁のマイコプラズマ・ジェニタリウムが起こす「非クラミジア性非淋菌性尿道炎」患者の増加も問題になっています。さらには、マイコプラズマ感染症はマクロライド系抗生剤での治療が行われますが、耐性菌の比率が増えていることも懸念されています。

これらのマイコプラズマは、菌体の片側に小さな突起“接着器官”を形成し、この突起で宿主組織の表面にはりつき、はりついたまま動く“滑走運動”を行います<sup>2,3)</sup> (図 1A、B、C)。この接着と滑走は、マイコプラズマの感染に必須です<sup>4)</sup>。接着器官は、多種類のタンパク質により形成される複雑な装置で、ゲノム情報を見るかぎり既知の生物に類似のものは一切ありません。そのため、構造も接着と運動のメカニズムもあまり明らかになっていませんでした<sup>2,5)</sup>。これまでに 10 種類の構成タンパク質が報告されていますが、それらが装置のどの部分に存在するのか、あるいはこの 10 種類以外にも構成タンパク質があるかなど、多くの部分が謎でした。

### 方法および結果

本研究では、まず接着器官を単離・精製して、その形状と大きさをナノメートルレベルで明らかにしました (図 1D、E)。マイコプラズマの菌体を Triton X-100 で処理し、溶け残った構造を密度勾配遠心にかけてのち、40 % スクロース層を回収し、電子顕微鏡で観察すると均一な構造を観察できました。その構造は長さ 300 nm、太さ 50–100 nm で、以前に報告された骨格構造とよく一致していました。

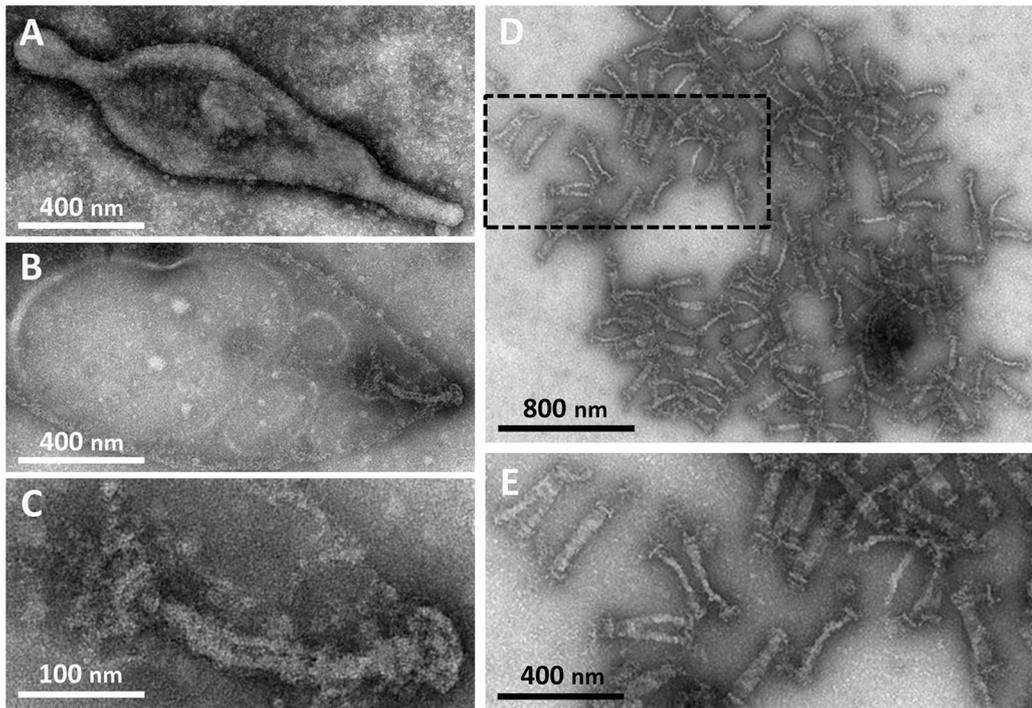


図1. *M. pneumoniae* の細胞骨格構造

(A) 無処理の細胞。右端にある膜突起部位が接着器官。(B) 界面活性剤で細胞を処理した後の溶け残り構造。細胞膜が部分的に壊れ、中の骨格構造が露出している。(C) 骨格構造の拡大図。(D) スクロース密度勾配遠心で集めた骨格構造。(E) 四角で囲った領域の拡大図。

次にそこに含まれるタンパク質を質量分析で解析しました (図 2A)。得られた画分の中からは、34 種類のタンパク質が同定されました。これらのタンパク質が本当に接着器官を構成しているのかを検証するために、それぞれのタンパク質の YFP 融合株をマイコプラズマで発現させ、蛍光顕微鏡を用いて局在を観察しました<sup>6)</sup> (図 3A)。タンパク質の局在パターンは4つに分けることができました: 接着器官に局在するもの、複数の点に局在するもの、明確な局在位置をもたずにぼんやりとしているもの、シグナルが得られないもの。この一連の解析の中で、接着器官を構成するタンパク質が13種あることが明らかになりました。その中には、新たに見つかった3種のタンパク質が含まれていました(図 2B、C)。

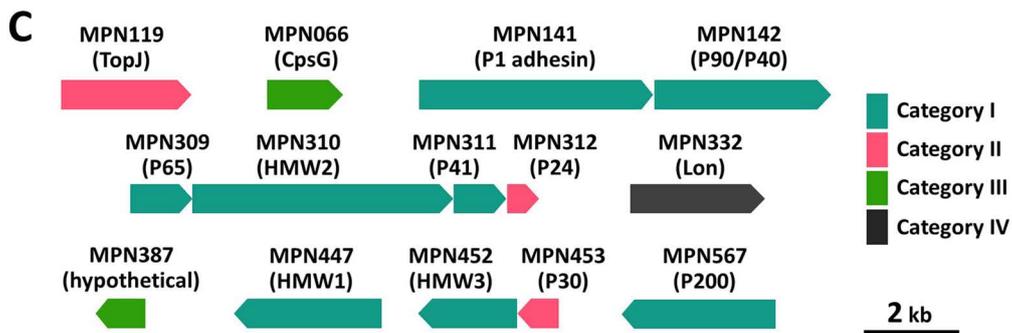
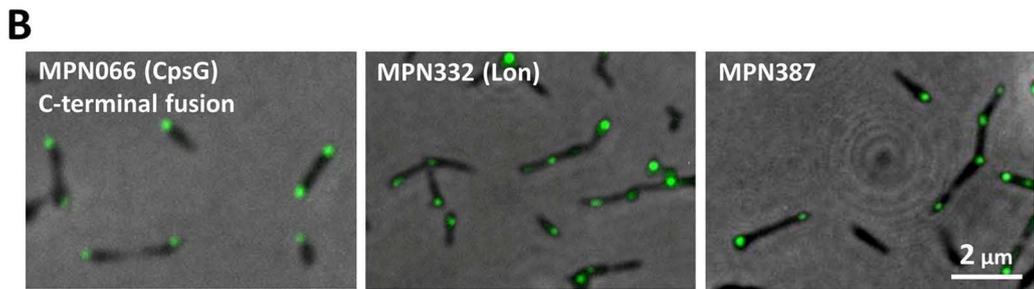
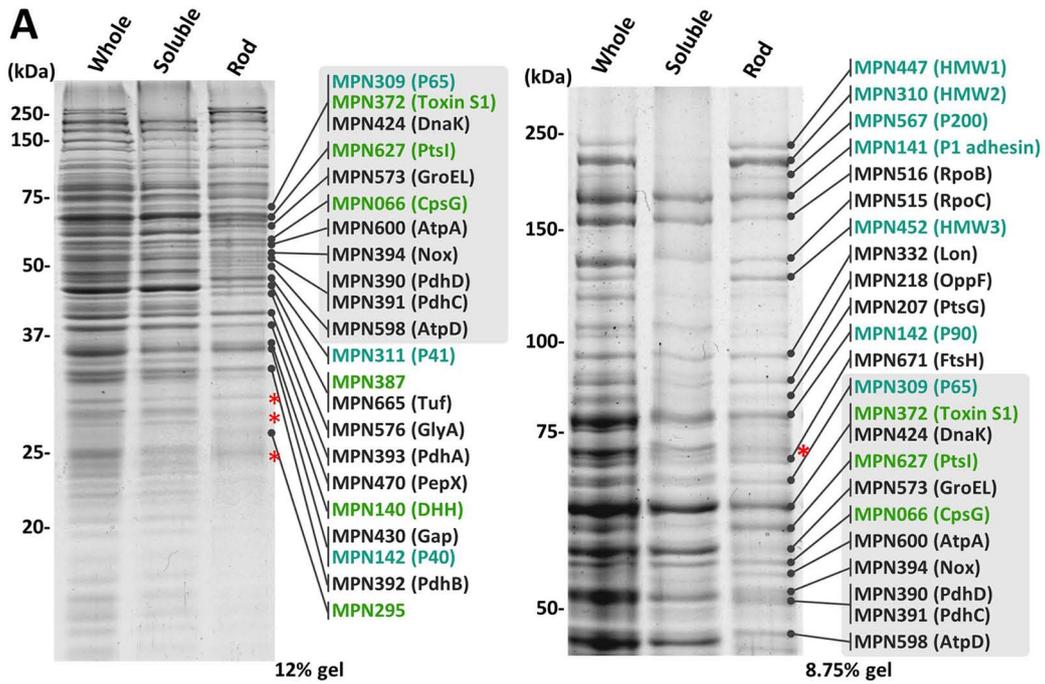
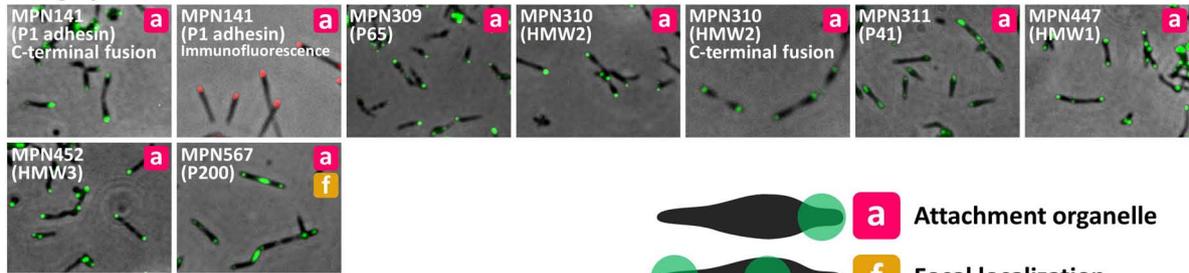


図2. 細胞骨格の構成タンパク質

(A) 骨格構造の画分の中に含まれるタンパク質。SDS-PAGEをしたのちCBBで染色をした。ペプチドMASSフィンガープリンティングで同定できたもののgene ID (MPN number)を右側に示している。同定できなかったものをアスタリスクで示している。(B) 新しく見つかった骨格構造の構成タンパク質。位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡のマージ像。細胞にYFP融合MPN066、MPN332、MPN387をそれぞれ発現させた。それ以外の像は、図3に示している。(C) 接着器官を構成するタンパク質のORFs。

## A

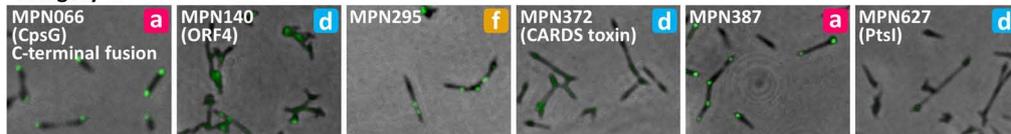
### Category I



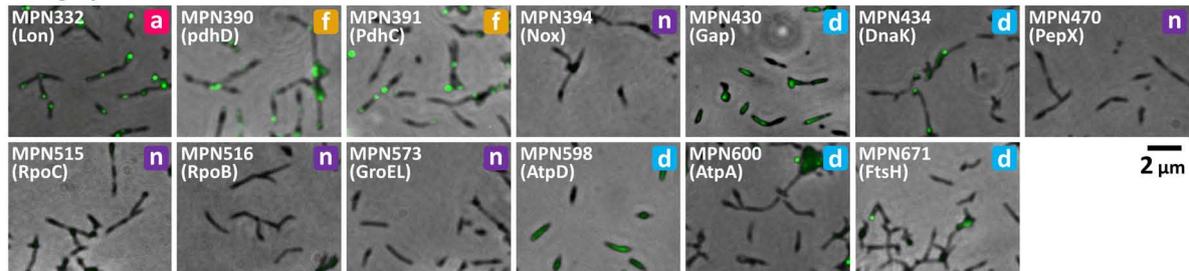
### Category II



### Category III



### Category IV



## B

### Double labeling

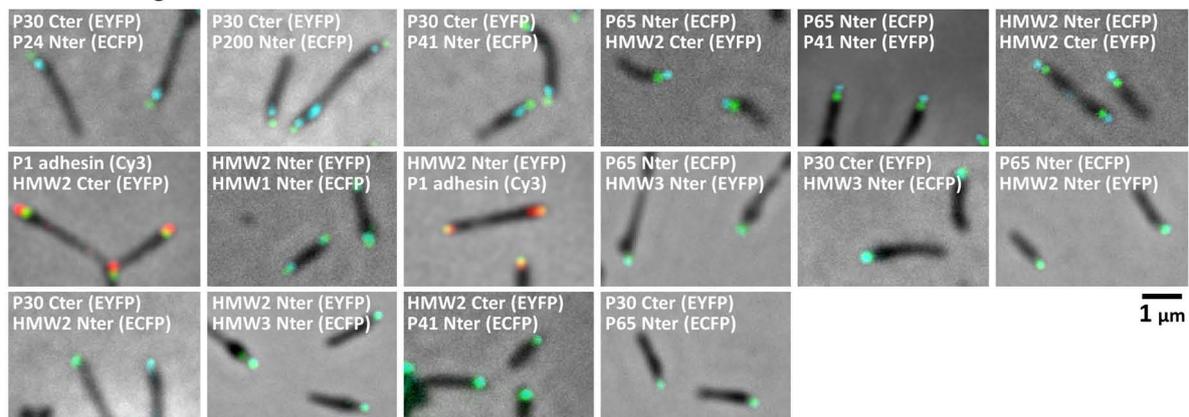


図 3. 接着器官構成タンパク質の局在観察

(A) YFP を融合させたタンパク質の細胞内局在。P1 adhesin (あしタンパク質) のみモノクローナル抗体で染色している。局在の模式図を右上に示している。(B) YFP と CFP を 2 つのタンパク質に融合した細胞の光学顕微鏡像。

さらに、得られた画像を詳細に解析することで 13 種類のタンパク質それぞれが接着器官のどの部分を構成しているかを決定しました (図 4A)。接着器官はおおよそ 300 nm の長さで、先端から terminal button、paired plates、bowl

complex という部分構造に分かれます。蛍光シグナルの輝度中心を高精度に位置決定することで、それぞれのタンパク質が細胞先端からどの程度離れた距離に存在しているのかを明らかにすることができました。また、2種類の蛍光タンパク質で2つの異なるタンパク質を別々に標識することで、タンパク質間の距離もナノメートルレベルで明らかにすることができました (図3B and 図4B、C)。構成タンパク質の1つである HMW2 という 200 kDa の巨大タンパク質の場合、N 末端に CFP を、C 末端に YFP を標識したものを細胞に発現させると、2つの蛍光タンパク質間の距離は約 200 nm となり、骨格構造の全域にわたってこのタンパク質が分布していることが初めて明らかになりました。このような二重標識法を 16 の組み合わせで試しましたが、得られた距離は 単独標識で得られた結果とほとんど変わりなく、これらのタンパク質群が接着器官においてきちんと組織化され局在パターンが決定されていることが明らかになりました (図4D)。

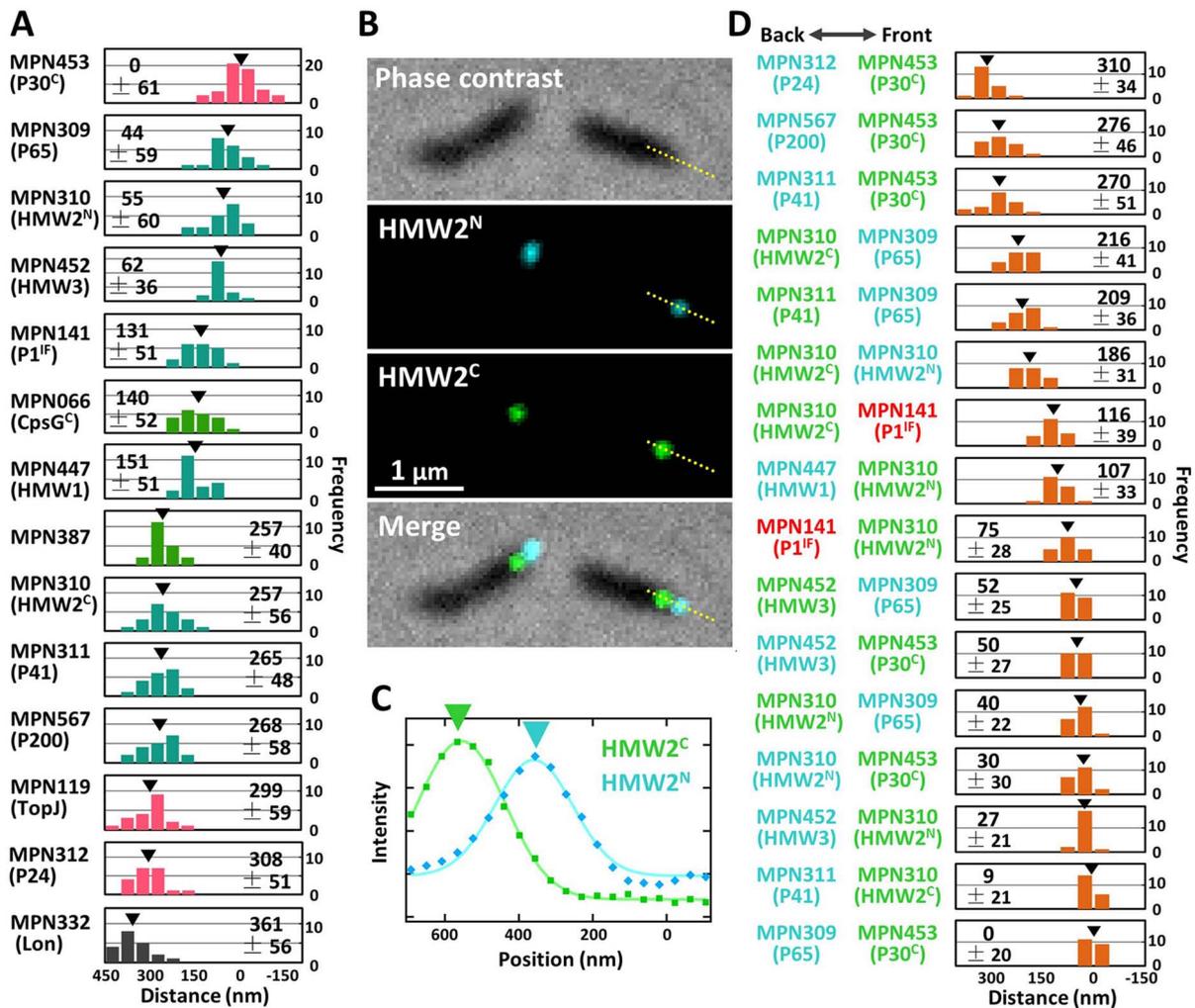


図4. 接着器官構成タンパク質の詳細な位置決定

(A) 細胞先端から蛍光シグナルのピーク位置までの距離分布。各タンパク質の Gene ID を左に示している。20 個体の平均値と SD を各パネルに示している。(B) HMW2 タンパク質の N 末端に CFP、C 末端に YFP を融合した二重標識株の顕微鏡像。(C) YFP と CFP シグナルの位置関係。パネル B にある画像を黄色の点線に沿ってシグナル強度分布をみたもの。(D) 2つのタンパク質間の距離分布。緑文字、青文字、赤文字はそれぞれ YFP、CFP、Cy3 で標識したもの。Cy3 の標識はモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光によるもの。20 個体の平均値と SD を各パネルに示している。

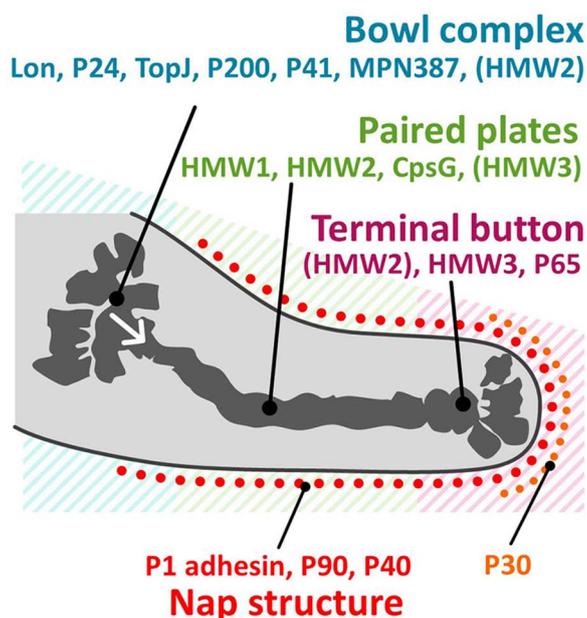


図5. 接着器官の模式図

接着器官の表面構造（Nap structure）および、内部の細胞骨格（rod）に分けて、構成タンパク質を示している。細胞骨格構造は、先端から Terminal button、Paired plates、Bowl complex の3つの部位に分け、それぞれの構成タンパク質を示した。

## 考 察

本研究では、接着器官を構成するタンパク質をシステムティックに調べることで、接着器官に局在するタンパク質の配置の全体像をとらえることができました<sup>7)</sup> (図5)。マイコプラズマの接着器官は病原性発揮に必須の運動装置であることは広く知られています<sup>6)</sup>。しかし、そのように運動の推進力が発生しているのか、そのメカニズムはほとんど分かっていません。ただし、これまでに *M. pneumoniae* の滑走運動の仕組みを説明する仮説が1つだけ提案されています<sup>5)</sup>。それは、膜突起部位に局在する 300 nm の棒状の細胞骨格構造が、シャクトリムシのように動くことで推進力を生み出すという仮説です。しかし、この根拠は電子顕微鏡観察によるもののみであり、構造変化の大きさも 20–30 nm と小さいためさらなる検証が必要不可欠と言えます。今回得られたタンパク質間の距離情報はこの点において、非常に重要な位置を占めます。接着器官の先端と末端ではおよそ 250 nm の距離があることが光学顕微鏡下でも検出することができました。また、巨大タンパク質の場合、たった1種類であっても N 末端と C 末端で 200 nm もの距離を持つことが明らかになりました<sup>7)</sup>。今後は、蛍光標識したタンパク質の動きや接着器官の構造変化を調べることで、どの部分が動いて滑走運動が起こっているかを調べるのが重要になってくると考えられます<sup>8-10)</sup>。滑走と接着に必須のタンパク質の構造は、マイコプラズマ感染症の対策のための重要な情報となるでしょう。

本研究は、マイコプラズマの接着器官の構造と機能に関する今後の研究を大きく進展させるものです。他に類のないマイコプラズマの接着器官の研究は、生体運動の共通原理と進化、そして細菌がどのように進化して生き残って来たのかという命題への理解につながります。また、耐性菌の蔓延により、抗生剤がマイコプラズマ感染症への第一選択剤ではなくなるかもしれない現代において、次の対策を得るためのヒントになると期待されます。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は大阪市立大学理学研究科の宮田真人教授、感染症研究所細菌第二部の見理剛博士です。

## 文 献

- 1) Radestock U, Brecht W. Motility of *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. 1977;129(3):1495-501. PubMed PMID: 14925.
- 2) Miyata M, Nakane D. Gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae* subgroup implication from *Mycoplasma mobile*. In Molecular and Cell Biology of Mollicutes, ed. by Browning G, Citti C., Horizon Press, Norfolk, pp 237-52, 2013.
- 3) 中根大介：細菌の滑走運動メカニズムに関する研究. 日本細菌学雑誌 2015;70(4):375-382. doi: 10.3412/jsb.70.375. PubMed PMID: 26632217
- 4) Prince OA, Krunkosky TM, Krause DC. In vitro spatial and temporal analysis of *Mycoplasma pneumoniae* colonization of human airway epithelium. Infect Immun. 2014;82(2):579-86. doi: 10.1128/IAI.01036-13 PubMed PMID: 24478073.
- 5) Henderson GP, Jensen GJ. Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility. Mol Microbiol. 2006;60(2):376-85. PubMed PMID: 16573687.
- 6) Kenri T, Seto S, Horino A, Sasaki Y, Sasaki T, Miyata M. Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. J Bacteriol. 2004;186(20):6944-55. PubMed PMID: 15466048.
- 7) Nakane D, Kenri T, Matsuo L, Miyata M. Systematic structural analyses of attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*. PLoS Pathog 2015;11(12):e1005299. doi:10.1371/journal.ppat.1005299. PubMed PMID: 26633540.
- 8) Nakane D, Miyata M. Cytoskeletal asymmetrical-dumbbell structure of a gliding mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, revealed by negative-staining electron microscopy. J Bacteriol. 2009;191(10):3256-64. doi: 10.1128/JB.01823-08. PubMed PMID: 19286806.
- 9) Kawamoto A, Matsuo L, Kato T, Yamamoto H, Namba K, Miyata M. Periodicity in attachment organelle revealed by electron cryotomography suggests conformational changes in gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. MBio. 2016;7(2):e00243-16. doi: 10.1128/mBio.00243-16. PubMed PMID: 27073090.
- 10) Nakane D, Adan-Kubo J, Kenri T, Miyata M. Isolation and characterization of P1 adhesin, a leg protein of the gliding bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. 2011;193:715-22. doi:10.1128/JB.00796-10. PubMed PMID: 21097617.