

宮田真人

大阪市立大学・大学院理学研究科
教授

合成細菌 JCVI syn3.0B とゲノム操作を用いた細胞進化モデル

§ 1. 研究成果の概要

本計画では、地球の細胞 40 億年の歴史の中で起こった重要な進化イベントの中から、(I) 運動能の獲得(宮田グループ)、(II) ペプチドグリカン層の獲得(塩見グループ)、(III) 細胞骨格の進化(Robinson グループ)に着目している。ゲノム情報と操作を駆使することで、(a) 合成細菌 JCVI-syn3.0B と (b) 大腸菌 L-form において、これらのイベントの再現と制御を行う。これにより、原始細胞から、細菌、アーキア、を経て真核生物に至る進化過程を実験として検証する系を確立する。さらにその知見を基に、目的に応じてあらゆるパターンの細胞を構築する技術を確立する。2019 年度は以下の成果を得た。

(宮田グループ)

合成細菌 syn3.0B の研究については、これまでに再構築に成功しているスピロプラズマ遊泳運動の研究に注力した。DNA コンストラクト作製と形質転換における問題点とその解決方法を見出し、研究の効率を格段に向上させることに成功した。得られた実験結果を基に直近の目標を以下に設定した。(1) 遊泳を再構築するために発現させている 7 つのタンパク質それぞれを除いた細胞の挙動。(2) 移動はできなくても細胞に動きを与える最小タンパク質セットの特定。(3) 7 つの遺伝子をオフからオンに切り替えた際の細胞の経時変化。(4) MreB タンパク質局在の解明。

急速凍結レプリカ電子顕微鏡法をチーム内で共有することで、合成細菌の膜構造、ペプチドグリカン合成酵素の変異株などの解析を進めた。

再構築の対象である、スピロプラズマの遊泳装置とマイコプラズマ・モービレの滑走装置をそれぞれ本来の細胞から単離し、主にクライオ電子顕微鏡法により高分解能で解明し、原子モデルを構築した。マイコプラズマ・モービレの滑走装置については、さらに新しい構成タンパク質や ATP 加水分解に伴う構造変化を明らかにした^{1,2)}。

(塩見グループ)

当グループはこれまでに L-form への変換が亢進した変異株、および L-form として増殖できない変異株を複数単離していた。本年度はこれらの変異株の L-form への変換、増殖、復帰をリアルタイムで観察した。大腸菌 L-form への変換が亢進した変異株は大腸菌の外膜構築に関与する遺伝子であった。また、L-form として増殖できない変異株は、ペプチドグリカンの分解やリサイクリングに関与する遺伝子に変異があった。L-form として増殖できない変異株のリアルタイム観察の結果、これらの変異株は L-form への変換を開始して形態変化を起こすことはできるが、その後、L-form として維持することができず溶菌することが分かった。外膜と細胞壁はその構築に共通の基質を用いており、その基質の供給のバランスを保つことが L-form の増殖に重要であると考えられる。以上の結果は、今後、細胞壁を持つ合成細菌をデザインするときに、細胞壁合成だけでなく、リサイクリングに関わるタンパク質も発現させる必要があることを示唆している。

(Robinson グループ)

Asgard アーキアがもつ真核細胞様タンパク質のうち、細胞骨格タンパク質に焦点を絞り、研究を行ってきた。2020 年、井町らによって報告された初の Asgard アーキアの電子顕微鏡画像は、メンブレントラフィッキングを彷彿とさせる小胞や、細胞骨格の存在を示唆する細胞表面の突起など、当グループが単離、機能解析してきた Asgard アーキア由来細胞骨格タンパク質の細胞内での局在を示唆するものであり、我々の知見を大いに深めた。我々はこれらの知見を更に深めるため、Asgard アーキア由来チューブリンタンパク質の異種発現、およびその解析を行った。その結果、重合した Asgard アーキア由来チューブリンタンパク質の電子顕微鏡像が観察された。現在、構造の精密化を進めている。また、これまでは分子進化のミッシング・リンクであったアクチンとその制御タンパク質の分子進化を、分子系統解析により明らかにした。この例は、細胞骨格タンパク質のみならず、現在も続いている Asgard アーキアの進化系統樹上の位置づけに関する議論にも一石を投じるものであり、今後の我々のプロジェクトを強力に推し進めるものである。

【代表的な原著論文】

- 1) Miyuki S Nishikawa, Daisuke Nakane, Takuma Toyonaga, Akihiro Kawamoto, Takayuki Kato, Keiichi Namba, and Makoto Miyata, “Refined mechanism of *Mycoplasma mobile* gliding based on structure, ATPase activity, and sialic acid binding of machinery”, mBio. vol. 10, No. 6. e02846-19. 2019
- 2) Isil Tulum, Kenta Kimura, Makoto Miyata, “Identification and sequence analyses of the gliding machinery proteins from *Mycoplasma mobile*”, Scientific Reports. vol. 10, No. 3792. s41598-020-60535-z. 2020

§ 2. 研究実施体制

(1) 宮田グループ

- ① 研究代表者: 宮田 真人 (大阪市立大学大学院理学研究科 教授)
- ② 研究項目
 - 合成細菌の特徴づけ(細胞膜構造と増殖過程, 細胞内部構造のダイナミクス)
 - 進化イベントの再構築(合成細菌におけるモリクテス綱の運動能)
 - 再構築された合成細菌の構造と機能の解析(細胞膜, 細胞内部構造, 細胞構造ダイナミクス)

(2) 塩見グループ

- ① 主たる共同研究者: 塩見 大輔 (立教大学理学部 准教授)
- ② 研究項目
 - 大腸菌 L-form の増殖機構およびペプチドグリカン合成再開機構
 - 異種バクテリアやヒメツリガネゴケ葉緑体のペプチドグリカン合成酵素の大腸菌内での発現

(3) Robinson グループ

- ① 主たる共同研究者: Robert C. Robinson (岡山大学異分野基礎科学研究所 特任教授)
- ② 研究項目
 - 合成細菌 JCVI Syn3.0 内における Asgard アーキア由来真核生物様タンパク質の再構築
 - 大腸菌内での上記タンパク質の発現系構築