

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03469

研究課題名（和文）病原細菌による宿主ユビキチンシステムの多重的操作機構の解析

研究課題名（英文）Bacterial pathogen-mediated tiered regulations on the host ubiquitin system

研究代表者

久堀 智子（Kubori, Tomoko）

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20397657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：病原細菌レジオネラはきわめて多彩な機能性タンパク質（エフェクタータンパク質）群を保有し、それらを感染宿主細胞に輸送して細胞システムを制御することで細胞内での増殖を実現している。本研究課題では、レジオネラエフェクター間の機能的な階層性に着目し、真核細胞に普遍的に存在し細胞機能調節の中核として働くユビキチン系に対してどのような制御を行うかを分子レベルで明らかにすることを目指した。レジオネラ固有のユビキチンリガーゼのひとつを新たに同定し、さらにそのユビキチンリガーゼに特殊な化学修飾を与えることでその機能を抑制する上流のエフェクターを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、真核細胞で確認されていない特殊な化学修飾を触媒する酵素群が病原細菌から次々と見つかっている。特に病原細菌レジオネラはその保有する酵素群の多様性、特殊性において並外れており、細菌学の枠組みを超え、有機化学、酵素学、構造生物学を含む分野横断的な研究対象として注目を集めている。本研究課題では、レジオネラ酵素が触媒する化学修飾の特異性のみならず、その機能の階層性に光をあてた。本成果は、病原細菌が実現する細胞内での精緻な調節機構を解明し病態発症の分子メカニズムへの理解を導く一つの足掛かりと位置付けられる。レジオネラを始めとする細菌感染症防除の創薬開発にこれまでにない視点を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Legionella pneumophila, a bacterial pathogen which causes Legionnaires' disease, transports numerous "effector proteins" to the host cell cytosol to accomplish intracellular replication by hijacking cellular systems. Here, we have focused on the tiered structure of the effector functions and aimed to understand in a molecular level how this bacterium manipulates the host ubiquitin system which is known to play pivotal roles in regulating cellular functions. We identified a novel Legionella E3 ligase, and further identified another effector proteins which can chemically modify the E3 ligase to down-regulate its function. This finding demonstrates an example of elaborate bacterial strategies which can be executed by multiple effector proteins with their sequential enzymatic activities.

研究分野：分子生物学

キーワード：ユビキチン エフェクター レジオネラ 細菌感染

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン修飾系は真核生物が普遍的に持つシステムであり、細胞の機能を文字通り支配する中核的な修飾系である。原核生物である細菌はユビキチンを保有しないとされているが、ユビキチン修飾やその制御に関わるタンパク質を数多く持ち、感染宿主細胞のユビキチン修飾系による制御を攪乱している。重篤な肺炎を引き起こす病原細菌レジオネラは、病原細菌の中でも極めて多くの機能性タンパク質（エフェクタータンパク質）を保有することで知られ、多彩な酵素活性によってユビキチン修飾系を含めた細胞システムを様々な方向から制御し、細胞内で増殖できる環境を作り上げている。

レジオネラエフェクターによる酵素活性の特異性を示す端的な例として、あらゆる生物種でこれまで見出されてこなかった特殊なユビキチン修飾メカニズムの発見が挙げられる。それらは、E1、E2、E3 という3つの酵素による古典的なユビキチン反応カスケードとは全く異なり、例えば、2種類の酵素活性を1分子内に持つエフェクターが触媒する2段階反応によるユビキチンのフォスホリボシル化が介在する標的タンパク質へのユビキチン転移であったり、トランスグルタミナーゼ活性を持つエフェクターによるユビキチンと標的タンパク質の間の架橋反応であったりする。

レジオネラの持つ数多くのエフェクタータンパク質の間には機能的階層構造が存在することを我々は過去に見出した (Kubori et al., PLOS Pathogens 2010)。この発見を端緒として現在に至るまで、様々なエフェクター間ネットワークがレジオネラで次々に見出されてきている。この階層構造性はおそらくレジオネラが多様な宿主生物との共生関係を築き上げる過程で獲得されたものであり、様々な環境で生き延びるために必要な極めて精緻な制御を可能にするものであると考えられる。ユビキチン修飾という生物種を問わない普遍的な細胞機能に対して、レジオネラがエフェクターの階層性を使ってどのように巧妙な戦略を感染細胞内で繰り広げているかを明らかにすること、そしてそれを支える分子メカニズムを解明することは分子生物学として非常に興味深い課題であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではレジオネラエフェクターによる宿主標的へのユビキチン修飾において、さらに上流に位置するエフェクターの働きによる多重な操作を示す新たな例を見出し、その分子メカニズムを解明することを目指した。本研究を通じて、病原細菌が宿主真核細胞の機能を破綻させて病態を引き起こす巧妙な戦略を細菌エフェクターの多重的作用という観点から描画することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ユビキチン操作に関わる新規レジオネラエフェクターの探索

プロファイル検索を含む配列解析技術を用いて、ユビキチン E3 リガーゼとして機能する可能性のあるタンパク質をコードする遺伝子をレジオネラゲノムから網羅的に抽出した。その中で、真核細胞の E3 リガーゼとは相同性を持たないが、レジオネラ固有の既知の E3 リガーゼ LpgY および LpgZ と酵素活性部位に相同性を持つタンパク質 LpgX を見出し、解析の対象とした。

### (2) *in vitro* ユビキチン反応解析

大腸菌発現系を用いて LpgX 及び予測される活性残基を置換した変異体を精製し、*in vitro* のユビキチン反応解析を行った。

### (3) 培養細胞での免疫蛍光染色法による発現解析

LpgX の真核細胞での発現系を構築し、細胞内局在や細胞に与える影響を蛍光顕微鏡法で解析した。

### (4) LpgX の上流に位置する別のレジオネラエフェクターの探索

酵素活性を持つ既知のレジオネラエフェクター群の細胞内発現系を構築し、LpgX と共発現することにより LpgX への作用をイムノプロットング法などで解析した。さらに、見出された上流エフェクターが LpgX のホモログであるレジオネラ E3 リガーゼ LpgY に対しても同等の作用を及ぼすかどうかを検証した。

### (5) 上流エフェクターの LpgX への作用の *in vitro* 反応解析

見出された化学反応を詳細に調べるために上流エフェクターも大腸菌発現系を用いて精製

し、*in vitro* 反応解析を行った。

- (6) LpgX 発現プラスミドを保有するレジオネラ株および、欠損変異株を用いた感染系における解析

タグ付きの LpgX を発現するプラスミドを保有するレジオネラ株を培養細胞に感染させ、LpgX の細胞内局在を蛍光顕微鏡法で観察した。また、LpgX/Y 及び上流エフェクターの欠損変異株を構築し、LpgY の既知の細胞内ターゲットを対象として上流エフェクターが LpgX および LpgY の E3 リガーゼ活性に及ぼす作用を感染条件下で解析した。

#### 4. 研究成果

- (1) 配列解析技術により新たなレジオネラ E3 リガーゼ LpgX を見出した。このタンパク質はレジオネラに固有の E3 リガーゼ活性ドメインを持ち、C-末に Ankyrin repeat ドメインを持つことから、宿主細胞内の標的に結合し活性を実現すると考えられた。
- (2) *In vitro* 自己ユビキチン修飾解析により LpgX は実際にユビキチン化を担う酵素活性を持ち、多様な E2 酵素の存在下で機能することが示された。

- (3) HeLa 細胞に発現させた場合、LpgX はその酵素活性に依存して小胞体の顕著な空砲化を誘導した。また、空砲化された膜上にミトコンドリアタンパク質と共局在を示したことから、LpgX は小胞体とミトコンドリアの接触部位に存在する標的をユビキチン化することが示唆された (図1)。(LpgX の持つ Ankyrin repeat ドメインに結合する細胞内タンパク質を質量分析法で解析したが、標的の同定には至らなかった。)

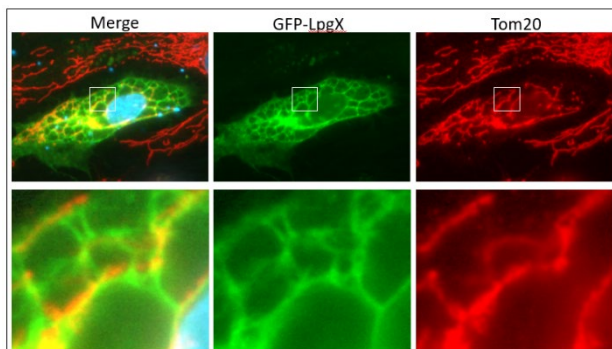


図1 LpgX を HeLa 細胞に発現させると生じる小胞体の顕著な空砲化。LpgX は空砲化部位にミトコンドリアタンパク質 (Tom20) と共局在を示した。

- (4) 酵素活性を持つことが知られている様々なレジオネラエフェクターとの細胞内共発現解析の結果、既知のエフェクター LpgA および LpgB が LpgX を化学修飾することが明らかとなった。解析の結果、この修飾は LpgA が担うことが報告されている

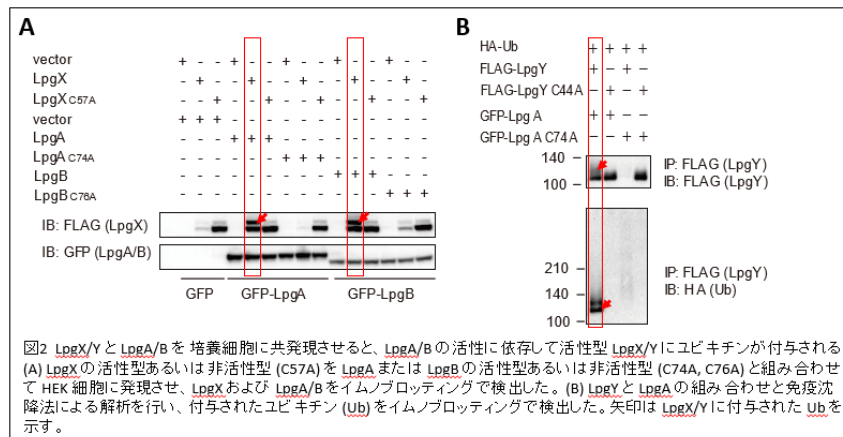


図2 LpgX/Y と LpgA/B を培養細胞に共発現させると、LpgA/B の活性に依存して活性型 LpgX/Y にユビキチンが付与される。(A) LpgX の活性型あるいは非活性型 (C57A) を LpgA または LpgB の活性型あるいは非活性型 (C74A, C76A) と組み合わせ HEK 細胞に発現させ、LpgX および LpgA/B を免疫プロテイングで検出した。(B) LpgY と LpgA の組み合わせと免疫沈降法による解析を行い、付与されたユビキチン (Ub) を免疫プロテイングで検出した。矢印は LpgX/Y に付与された Ub を示す。

トランスグルタミナーゼ活性による特殊なユビキチン化であることが示唆された。このユビキチン化は LpgX のホモログである LpgY に対しても起こることがわかった。さらに、この修飾は LpgX および LpgY が E3 リガーゼとして活性型である場合に限定的に起こることがわかった (図2)。

(5) 精製 LpgA, LpgB, LpgX を用いた反応解析により、*in vitro* では LpgA が LpgX に対し E1, E2, ATP を必要としない特殊なユビキチン修飾を施すことがわかった。この結果は LpgX に対する修飾が LpgA のトランスグルタミナーゼ活性に依存したユビキチン架橋反応であることを強く示唆した (図 3)。

(6) 感染条件下ではレジオネラを内包する液胞の周囲に LpgX が局在することが確かめられた。LpgA および LpgB を欠失したレジオネラ株を感染させると宿主細胞内の LpgY の標的タンパク質のポリユビキチン化レベルが上昇した (図 4)。この結果は、LpgY の E3 リガーゼとしての酵素活性を LpgA/B が抑制することを示唆する。

(7) 以上の結果を統合すると、LpgA/B のトランスグルタミナーゼ活性による LpgX/Y へのユビキチン架橋反応により LpgX/Y の E3 リガーゼとしての活性を抑制するエフェクター間の機能的階層性が存在すると考えられた。LpgX および LpgY、さらに LpgY の既知のユビキチン化ターゲットはレジオネラ液胞に局在し、LpgY ターゲットはレジオネラの細胞内増殖に寄与する因子であることが報告されている。これらの知見から、LpgY ターゲットや未知の LpgX ターゲットのレジオネラ液胞への繫留が LpgX/Y によるユビキチン化を介しており、さらに上流の LpgA/B がユビキチン化反応を制御し、必要な場面で乖離を誘導するなどの精緻な調節をしている可能性が考えられた (図 5)。

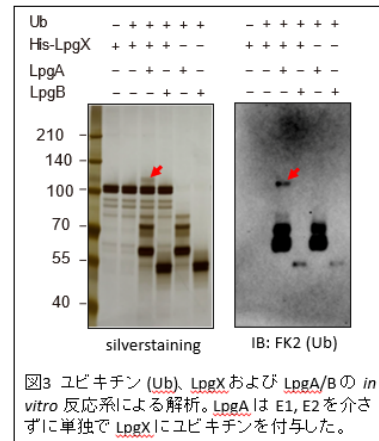


図3 ユビキチン (Ub), LpgX および LpgA/B の *in vitro* 反応系による解析。LpgA は E1, E2 を介さずに単独で LpgX にユビキチンを付与した。

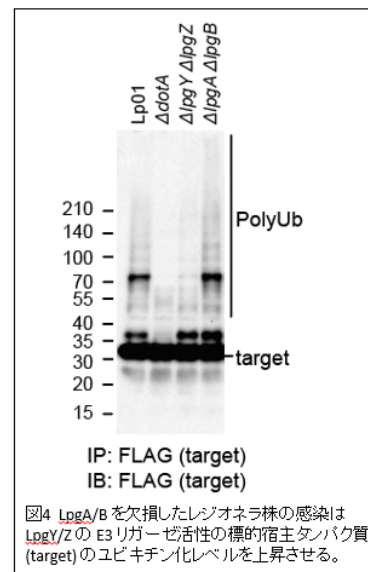


図4 LpgA/B を欠損したレジオネラ株の感染は LpgY/Z の E3 リガーゼ活性の標的宿主タンパク質 (target) のユビキチン化レベルを上昇させる。

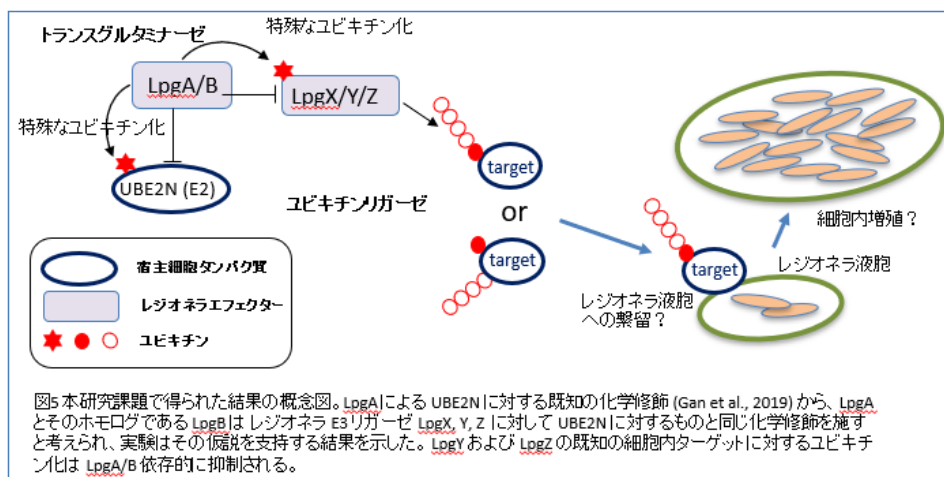


図5 本研究課題で得られた結果の概念図。LpgAによる UBE2N に対する既知の化学修飾 (Gan et al., 2019) から、LpgA とそのホモログである LpgB はレジオネラ E3 リガーゼ LpgX, Y, Z に対して UBE2N に対するものと同じ化学修飾を施すと考えられ、実験はその仮説を支持する結果を示した。LpgY および LpgZ の既知の細胞内ターゲットに対するユビキチン化は LpgA/B 依存的に抑制される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kitao T, Arasaki K, Nagai H, Kubori T.   | 4. 巻<br>29;2(2)               |
| 2. 論文標題<br>Protocol for imaging proteins associated with Legionella-containing vacuoles in host cells            | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>STAR Protoc.   | 6. 最初と最後の頁<br>100410          |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xpro.2021.100410.  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Kitao Tomoe, Taguchi Kyoichiro, Seto Shintaro, Arasaki Kohei, Ando Hiroki, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko | 4. 巻<br>32                    |
| 2. 論文標題<br>Legionella Manipulates Non-canonical SNARE Pairing Using a Bacterial Deubiquitinase                   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>108107 ~ 108107 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2020.108107   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Kitao Tomoe, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko   | 4. 巻<br>10                    |
| 2. 論文標題<br>Divergence of Legionella Effectors Reversing Conventional and Unconventional Ubiquitination           | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Front Cell Infect Microbiol.   | 6. 最初と最後の頁<br>448             |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fcimb.2020.00448   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Kubori T, Kitao T, Nagai H.  | 4. 巻<br>47                    |
| 2. 論文標題<br>Emerging insights into bacterial deubiquitinases.   | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Curr Opin Microbiol.   | 6. 最初と最後の頁<br>14-19.          |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.mib.2018.10.001.   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Kawabata Mio, Matsuo Honoka, Koito Takumi, Murata Misaki, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei          | 4. 巻<br>17      |
| 2. 論文標題<br>Legionella hijacks the host Golgi-to-ER retrograde pathway for the association of Legionella-containing vacuole with the ER | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>PLOS Pathogens   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.ppat.1009437   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Takekawa Norihiro, Kubori Tomoko, Iwai Tomoya, Nagai Hiroki, Imada Katsumi                  | 4. 巻<br>204     |
| 2. 論文標題<br>Structural Basis of Ubiquitin Recognition by a Bacterial Ovarian Tumor Deubiquitinase LotA | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Bacteriology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1128/jb.00376-21   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki   | 4. 巻<br>66            |
| 2. 論文標題<br>Recent advances in structural studies of the <i>Legionella pneumophila</i> Dot/Icm type IV secretion system | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology and Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>67 ~ 74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1348-0421.12951  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Murata Misaki, Kanamori Riku, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei              | 4. 巻<br>135     |
| 2. 論文標題<br>Requirement of phosphatidic acid binding for distribution of the bacterial protein Lpg1137 targeting syntaxin 17 | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cell Science   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1242/jcs.259538  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>北尾公英、久堀智子、永井宏樹               | 4. 巻<br>93      |
| 2. 論文標題<br>病原細菌レジオネラによるユビキチンを介した宿主小胞輸送 | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>生化学                          | 6. 最初と最後の頁<br>6 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>久堀智子                     |
| 2. 発表標題<br>レジオネラエフェクターの細胞内機能        |
| 3. 学会等名<br>第 94 回日本感染症学会学術講演会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai H, Tomoko Kubori |
| 2. 発表標題<br>Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing using a bacterial deubiquitinase                      |
| 3. 学会等名<br>the IUMS 2020 Virtual Congresses (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoko Kubori  |
| 2. 発表標題<br>Manipulation of the host ubiquitin system by Legionella                                  |
| 3. 学会等名<br>Cold Spring Harbor Asia Conference on Bacterial Infection and Host Defense (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoko Kubori  |
| 2. 発表標題<br>Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing by the function of a bacterial deubiquitinase |
| 3. 学会等名<br>The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)                              |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>久堀智子   |
| 2. 発表標題<br>Vacuole manipulation by Legionella deubiquitinases |
| 3. 学会等名<br>第93回日本細菌学会総会                                       |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                           |
|---------------------------|
| 1. 発表者名<br>北尾公英、久堀智子、永井宏樹 |
| 2. 発表標題<br>細菌の病原性制御システム   |
| 3. 学会等名<br>第93回日本細菌学会総会   |
| 4. 発表年<br>2020年           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北尾公英、田口馨一郎、瀬戸真太郎、新崎恒平、安藤弘樹、永井宏樹、久堀智子 |
| 2. 発表標題<br>宿主SNARE pairing を操作するレジオネラエフェクターの解析  |
| 3. 学会等名<br>第56回日本細菌学会中部支部総会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoe Kitao, Kohei Arasaki, Shintaro Seto, Kyoichiro Taguchi, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori        |
| 2. 発表標題<br>Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing by the function of a bacterial deubiquitinase |
| 3. 学会等名<br>Microbial Adhesion and Signal Transduction - Gordon Research Conference (国際学会)                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>竹川宜宏、久堀智子、岩井朋也、永井宏樹、今田勝巳             |
| 2. 発表標題<br>レジオネラ菌の脱ユビキチン化酵素LotAによるユビキチン認識の構造的基盤 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本生化学会大会                         |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| Nagai lab<br><a href="https://sites.google.com/view/nagai-lab/home">https://sites.google.com/view/nagai-lab/home</a> |
|--|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 連携研究者 | 永井 宏樹<br><br>(Nagai Hiroki)<br><br>(80222173) | 岐阜大学・医学系研究科・教授<br><br><br><br>(13701) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 連携研究者 | 北尾 公英<br><br>(Kitao Tomoe)<br><br>(80462787)       | 岐阜大学・医学系研究科・助教<br><br><br><br>(13701)   |    |
| 連携研究者 | 新崎 恒平<br><br>(Arasaki Kohei)<br><br>(70609990)     | 東京薬科大学・生命科学部・准教授<br><br><br><br>(32659) |    |
| 連携研究者 | 今田 勝巳<br><br>(Imada Katsumi)<br><br>(40346143)     | 大阪大学・理学研究科・教授<br><br><br><br>(14401)    |    |
| 連携研究者 | 竹川 宜宏<br><br>(Takekawa Norihiro)<br><br>(50791810) | 大阪大学・理学研究科・助教<br><br><br><br>(14401)    |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                            |  |  |  |
|---------|------------------------------------|--|--|--|
| 韓国      | KAIST Institute for the BioCentury |  |  |  |
| 米国      | Oregon Health & Science University |  |  |  |