

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07477

研究課題名（和文）v-SNAREの翻訳後修飾を介した病原細菌の宿主細胞内生存戦略の解明

研究課題名（英文）The intracellular survival strategy of pathogenic bacteria via post-translational modification of host v-SNARE protein

研究代表者

北尾 公英 (Kitao, Tomoe)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80462787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：病原細菌レジオネラはIV型分泌装置を介して宿主細胞にエフェクターと呼ばれる病原タンパク質を送ることにより宿主小胞輸送を操作し、自身の増殖のための液胞（LCV）を構築する。本研究では、レジオネラ感染初期に宿主v-SNAREをユビキチン修飾するレジオネラエフェクターLpgXを同定した。LpgXは通常のユビキチン化反応とは異なる機序によりv-SNAREのセリン残基にユビキチンを付加する。また、LpgXによるv-SNAREのユビキチン化は通常の細胞内では見られないt-SNARE結合の形成に寄与し、v-SNAREのLCV上への集積を促進していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はこれまでにレジオネラ感染初期にLCVの成熟に寄与する宿主v-SNAREがユビキチン修飾され、感染後期にレジオネラエフェクターLotBによってその修飾が解除されることを見出したが、この一連の翻訳後修飾の意義や機序は不明であった。本研究から、病原細菌レジオネラは宿主感染時にLpgXとLotBによる可逆的な翻訳後修飾により宿主v-SNAREをハイジャックし、LCVの成熟化における膜融合に役立っていることが明らかとなった。本研究成果は、レジオネラ感染を防御するための重要な手がかりを得るために役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The intracellular pathogenic bacterium Legionella manipulates host vesicular trafficking to establish their replicative niche called Legionella-containing vacuole (LCV) by translocating virulent proteins known as effectors into host cells using a dot/icm type IV secretion apparatus. In this study, we identified a Legionella effector, LpgX, which ubiquitinates a host v-SNARE in the early stage of Legionella infection. The LpgX was found to conjugate ubiquitin to a serine residue of v-SNAREs by unconventional mechanism that is different from the usual eukaryotic ubiquitination. Ubiquitination of v-SNAREs by LpgX enhances to the formation of noncanonical SNARE pairing with t-SNARE derived from host plasma membrane, and promotes the recruitment of v-SNAREs onto LCVs during infection.

研究分野：細菌学、生化学、細胞生物学

キーワード：細菌感染 レジオネラ 細胞内寄生 ユビキチン 翻訳後修飾 SNARE

## 1. 研究開始当初の背景

病原細菌レジオネラはIV型分泌装置を介して宿主細胞にエフェクタータンパク質を送ることでより宿主小胞輸送を操作し、自身の増殖のための液泡 (**Legionella Containing Vacuole: LCV**) を構築する。レジオネラが食作用により宿主に取り込まれると初期ファゴソームが小胞体 (**ER**) から派生した輸送小胞と膜融合し、成熟した **LCV** へと変貌を遂げる。その際に **ER** 由来の **v-SNARE** と細胞膜由来の **t-SNARE** がノンカノニカルな **SNARE** 結合を形成することが知られる。近年の研究から、私たちはこの過程における膜融合を司る宿主 **v-SNARE** タンパク質がレジオネラ感染初期にユビキチン修飾され、感染後期にレジオネラエフェクター **LotB** によってその修飾が解除 (脱ユビキチン化) されることを見出した (**Kitao et al. Cell Reports 2020**)。さらに、**LotB** による **v-SNARE** の脱ユビキチン化はノンカノニカルな結合の解離を促し、**LCV** の成熟化に寄与していることを解明した。しかしながら、レジオネラが感染初期に **v-SNARE** をユビキチン化することの意義やその機序はまだ分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、レジオネラが宿主 **v-SNARE** のユビキチン化を介してどのように宿主の膜融合を操作し、増殖環境を確立しているのかを明らかにすることを目的とし、レジオネラ感染時において **v-SNARE** をユビキチン化する因子の同定とその機能解析を実施した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. **v-SNARE** のユビキチン化を担うユビキチンリガーゼの同定

これまでに研究代表者は5つのレジオネラゲノム大規模欠失株 (**Lp02 2ab**、**3**、**4a**、**6a** および **7a**) を感染させたヒト細胞から **v-SNARE** を免疫沈降 (**IP**) した後にイムノプロット (**IB**) 解析を行い、ゲノム領域 **2ab** を欠損する株を感染させた細胞では **v-SNARE** のユビキチン化が顕著に減少することを確認している。この結果は、ゲノム領域 **2ab** にコードされる17個のレジオネラエフェクターのうちどれか、あるいは複数のエフェクターが **v-SNARE** のユビキチン化に関与していることを示唆していた。そこで、17個のエフェクターをそれぞれ発現するプラスミドを構築し、それぞれ宿主細胞に一過的に発現させることにより **v-SNARE** のユビキチン化に関与するかどうかを解析した。また、並行して、レジオネラ既知エフェクターの中でユビキチンリガーゼ活性を持つものを欠損させたレジオネラ株を構築し、それらを宿主細胞に感染させることにより **v-SNARE** のユビキチン化の有無を解析した。

### 3-2. **v-SNARE** のユビキチン化に関わるレジオネラエフェクターの機能解析

3-1の実験で **v-SNARE** をユビキチン化すると同定されたレジオネラエフェクター **LpgX** に関して **GFP** タグを付与したコンストラクト (**GFP-LpgX**) を構築し、宿主細胞内における局在を調べた。また、**FLAG** タグを付与した **v-SNARE** と **GFP-LpgX** を一過的に宿主細胞内で発現させた後、**FLAG-v-SNARE** を免疫沈降により単離し、ユビキチン化の有無をウェスタンブロットングにより確認した。

### 3-3. **v-SNARE** のユビキチン化部位の決定

**v-SNARE** は3つのドメイン (**longin**、**SNARE**、膜貫通 (**TM**)) より構成される。そこで、まず各ドメインを欠失した **v-SNARE** を発現するプラスミド (**pFLAG-v-SNARE longin**、**pFLAG-v-SNARE SNARE**、**pFLAG-v-SNARE TM**) を構築し、それらをトランスフェクションした宿主細胞にレジオネラ野生株を感染させたのちに **FLAG-v-SNARE** を免疫沈降し、イムノプロットでユビキチン化の有無を確認した。ユビキチン化されることが明らかとなったドメインに関しては、そのドメインに存在するセリンをアラニンに置換した **v-SNARE** 変異体を発現するプラスミドを構築し、同様の感染実験を行いユビキチン化の有無を検証した。

### 3-4. **v-SNARE** のユビキチン化がノンカノニカルな **SNARE** 結合に与える影響

**v-SNARE** はレジオネラ感染初期に宿主細胞膜に局在する **t-SNARE** と通常の細胞内では見られないノンカノニカルな **SNARE** 結合を形成する。そこで、3-1の実験で同定された **v-SNARE** のユビキチン化を担うレジオネラエフェクターの欠失株とレジオネラ野生株をそれぞれ感染させた **FLAG-v-SNARE** を発現する宿主細胞の抽出液から **FLAG** ビーズで免疫沈降し、抗 **t-**

**SNARE** 抗体でイムノブロット解析することにより **FLAG-v-SNARE** に結合した **t-SNARE** を定量した。また、別の方法として、3-3の実験から明らかになったユビキチン化部位に変異を導入した **v-SNARE** 変異体および野生型 **v-SNARE** をそれぞれ発現させた宿主にレジオネラ野生株を感染させ、同様に免疫沈降を行い、抗 **t-SNARE** 抗体でイムノブロット解析することにより **v-SNARE** のユビキチン化の有無が **SNARE** 結合へ与える影響を解析した。

### 3-5. **v-SNARE** のユビキチン化が **v-SNARE** の **LCV** への集積に与える影響

**v-SNARE** はレジオネラ感染初期に **LCV** に集積する。そこで、3-1の実験より見出された **v-SNARE** のユビキチン化に関わるレジオネラエフェクターの欠失変異株を **mRFP-v-SNARE** を発現させたヒト細胞に感染させ、**mRFP-v-SNARE** の **LCV** への集積がレジオネラ野生株を感染させた場合と比較して増減するかどうかを蛍光顕微鏡で解析した。また、3-3の実験から明らかとなった **v-SNARE** のユビキチン化部位に変異を導入した変異型 **v-SNARE** および野生型 **v-SNARE** をそれぞれ一過的に発現させた宿主細胞にレジオネラ野生株を感染させ、変異体と野生型 **v-SNARE** の間で **LCV** 集積率に差が出るかどうかを蛍光顕微鏡で解析した。

## 4. 研究成果

### 4-1. **LpgX** がレジオネラ感染初期に **v-SNARE** をユビキチン化する

ゲノム領域 **2ab** にコードされる **17** 個のレジオネラエフェクターに関しては、いずれも **v-SNARE** のユビキチン化には関与していないことが分かった。一方で、ユビキチンリガーゼ活性を持つことがこれまでに報告されているレジオネラ既知エフェクターについての解析から、**LpgX** が **v-SNARE** のユビキチン化に関与していることが明らかとなった。また、この **LpgX** による **v-SNARE** のユビキチン化反応は通常の実核細胞内で見られる **ATP** 依存的な反応とは異なり、**NAD** 依存的でかつ、リン酸リボース (**PR**) を介した型破りなユビキチン化反応であることが明らかとなった。

### 4-2. **LpgX** は宿主 **v-SNARE** と共局在する

**GFP-LpgX** は宿主細胞内において、核周囲の **ER** に局在することが明らかとなった。この局在は宿主ないにおける **v-SNARE** の局在と同様であった。また、**FALG** タグを付与した **v-SNARE** と **GFP-LpgX** を一過的に宿主細胞内で発現させたところ、**GFP-LpgX** によって **v-SNARE** がユビキチン化されることが分かった。

### 4-3. **LpgX** は **v-SNARE** の **137** 番目のセリンにユビキチンを付与する

**v-SNARE** の各ドメイン (**longin**、**SNARE**、膜貫通 (**TM**)) をそれぞれ欠失した **v-SNARE** 変異体を発現させた宿主細胞にレジオネラ野生株を感染させ、各 **v-SNARE** 変異体のユビキチン化の有無を確認したところ、**SNARE** ドメインを欠いた **v-SNARE** でユビキチン化の消失が確認された。上述したように、**LpgX** による **v-SNARE** のユビキチン化反応は **NAD** 依存的でかつ **PR** を介した反応で、この場合ユビキチンはセリンやチロシンなどの側鎖に水酸基を有する残基に **PR** を介してユビキチン分子が付加されることが知られている。そのため、**SNARE** ドメインに存在するセリンをアラニンに置換した各種 **v-SNARE** 変異体を発現させた宿主にレジオネラを感染させ、変異体のユビキチン化を検証したところ、**v-SNARE** の **137** 番目のセリンがユビキチン化部位であることを同定した。**LpgX** と野生型 **v-SNARE** を宿主細胞内で共発現させた場合、**v-SNARE** のユビキチン化が確認された一方で、**v-SNARE** の **137** 番目のセリンをアラニンに置換した **S137A** 変異体と **LpgX** とを宿主細胞内で共発現させた場合には **S137A** 変異体のユビキチン化が起こらないことを確認できた。

### 4-4. **LpgX** による **v-SNARE** のユビキチン化は **v-SNARE/t-SNARE** 間に形成されるノンカノニカルな **SNARE** 結合を促進する

**FLAG-v-SNARE** を発現する宿主細胞にレジオネラ野生株と **LpgX** 欠失株をそれぞれ感染させた条件における **v-SNARE** と **t-SNARE** の相互作用について解析したところ、野生株を感染させた場合と比較して **LpgX** 欠失株を感染させた場合に **v-SNARE** と **t-SNARE** 間の **SNARE** 結合が減弱した。また、野生型 **v-SNARE** あるいは **v-SNARE S137A** 変異体をそれぞれ発現させた宿主にレジオネラ野生株を感染させ、同様に **SNARE** 結合について解析したところ、**v-SNARE S137A** 変異体と相互作用する **t-SNARE** 量は、野生型 **v-SNARE** と相互作用する **t-SNARE** 量と比較して有意に減少することが明らかとなった。本結果は、**LpgX** による **v-SNARE** のユビキチン化がレジオネラ感染時に形成される **v-SNARE-t-SNARE** 間の相互作用を促進している可能性を強く示唆していた。

#### 4-5. v-SNARE のユビキチン化が v-SNARE の LCV への集積に与える影響

**mRFP-v-SNARE** を発現させたヒト細胞にレジオネラ野生株と **LpgX** 欠失レジオネラ株をそれぞれ感染させ、**mRFP-v-SNARE** の LCV への集積を確認したところ、**LpgX** 欠失レジオネラ株を感染させた細胞内における **mRFP-v-SNARE** の LCV への集積率は、野生株を感染させた場合のそれと比較して顕著に減少した。また、野生型 **mRFP-v-SNARE** およびその **S137A** 変異体をそれぞれ一過的に発現させた宿主細胞にレジオネラを感染させることにより、野生型 **mRFP-v-SNARE** および **S137A** 変異体の LCV への集積を解析したところ、**S137A** 変異体の LCV への集積率は野生型のそれと比較して有意に低いことが明らかとなった。本結果は、**LpgX** による **v-SNARE** のユビキチン化は **v-SNARE** の LCV への集積に関与していることを示していた。

以上の結果、本研究から、レジオネラはユビキチンリガーゼ **LpgX** を用いて宿主 **v-SNARE** をノンカノニカルな反応によりユビキチン化し、**t-SNARE** との相互作用を操作することにより LCV 構築に役立っていることが明らかとなった。研究代表者による先行研究結果と統合すると、レジオネラはユビキチンリガーゼ活性を有する **LpgX** と脱ユビキチン化活性を有する **LotB** の 2 つのエフェクタータンパク質を駆使することにより宿主 **v-SNARE** を可逆的に翻訳後修飾し、自身の感染に役立っていることが本研究から見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 北尾 公英	4. 巻 Vol.55, No.6
2. 論文標題 病原細菌レジオネラによる宿主SNAREタンパク質の操作	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Warren GD, Kitao T, Franklin TG, Nguyen JV, Geurink PP, Kubori T, Nagai H, Pruneda JN.	4. 巻 83(1):105-120.e5.
2. 論文標題 Mechanism of Lys6 poly-ubiquitin specificity by the <i>L. pneumophila</i> deubiquitinase LotA.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 105-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2022.11.022	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Kitao T, Arasaki K, Nagai H, Kubori T	4. 巻 2(2)
2. 論文標題 Protocol for imaging proteins associated with Legionella-containing vacuoles in host cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100410	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Tomoe Kitao, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori	4. 巻 10
2. 論文標題 Divergence of Legionella Effectors Reversing Conventional and Unconventional Ubiquitination.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.00448	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori	4. 巻 32(10)
2. 論文標題 Legionella Manipulates Non-canonical SNARE Pairing Using a Bacterial Deubiquitinase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108107	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomoe Kitao
2. 発表標題 Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing using post-translational modifications
3. 学会等名 The 10th International Conference on Legionella (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北尾公英、久堀智子、永井宏樹
2. 発表標題 レジオネラによる型破りなユビキチン修飾を介した宿主v-SNAREの操作
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori
2. 発表標題 Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing using a bacterial deubiquitinase.
3. 学会等名 IUMS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年~2021年

1. 発表者名 北尾公英、永井宏樹、久堀智子
2. 発表標題 型破りな翻訳後修飾を介したレジオネラの宿主細胞内生存戦略
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------