

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790425

研究課題名(和文)肺炎原因菌であるレジオネラの宿主細胞内における病原性発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of intracellular pathogenesis of Legionella in the host

研究代表者

新崎 恒平 (Arasaki, Kohei)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：70609990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ菌は重篤な肺炎を引き起こす病原菌である。宿主細胞への感染において、レジオネラ菌は宿主細胞の細胞内輸送経路をハイジャックすることが知られている。また、細胞内輸送経路をハイジャックする過程においてレジオネラエフェクターと呼ばれるレジオネラ菌が宿主細胞に放出するタンパク質が重要な役割を担っている。本研究ではレジオネラエフェクターの一つであるDrrAが宿主細胞において細胞内輸送に機能するタンパク質であるexocyst複合体を操作することで効率的な感染を行っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) is a pathogenic microbe that cause sever pneumonia. In *L. pneumophila* infection to the host cell, *L. pneumophila* hijack intracellular trafficking pathway and Legionella effector proteins that are secreted from the *L. pneumophila* to the host cell play a crucial role in this hijacking. In this study, I revealed that one of the Legionella effector protein, DrrA manipulates exocyst complex (host protein complex) that is implicated in the intracellular trafficking and manipulation of exocyst complex by DrrA is required for the effective intracellular growth of *L. pneumophila*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：レジオネラ菌 レジオネラエフェクター 細胞内膜輸送 繫留因子

1. 研究開始当初の背景

近年、抗生物質の効かない病原菌が増え、抗生物質に頼らない治療法の確立が急務となっている。感染症とは病原性を持った微生物やウイルスが宿主細胞への侵入・増殖・破砕を繰り返すことで最終的に疾患を引き起こす病である。この侵入・増殖・破砕の過程において、病原菌は宿主細胞の生理機能をハイジャックすることが知られており、病原菌がどのように宿主細胞の生理機能をハイジャックしているのかを明らかにすることは感染症に対する新たな治療法の足がかりとなると考えられる。よって、レジオネラ菌を感染症のモデルとしてレジオネラ菌の細胞内感染機構に着目する。レジオネラ菌は重篤な肺炎を引き起こす細胞内発症型細菌である。また、レジオネラ菌は宿主細胞の生理機能の一つである細胞内小胞輸送をハイジャックすることが知られている。細胞内に侵入したレジオネラ菌はレジオネラ小胞 (LCV) を形成し、宿主細胞の小胞体から出芽した輸送小胞 (ER 小胞) を LCV に取り込み融合することで LCV の膜構造を変換し感染を成立させている。これまでの研究からレジオネラ菌が宿主細胞に対して放出するレジオネラエフェクターがこの過程に重要であることが判明している。レジオネラエフェクターの一つである DrrA は Rab1 (低分子量 GTP 結合タンパク質であり、ER 小胞とゴルジ体との繫留反応に關与するタンパク質) を LCV に供給させ、ER 小胞と LCV の繫留に機能することが示唆されているレジオネラエフェクターである。しかしながら、宿主細胞内における輸送小胞と標的膜 (この場合、ER 小胞と LCV 膜) との繫留には多数のタンパク質により構成される複合体が必要不可欠である。よって、ER 小胞と LCV との繫留反応においても Rab1/DrrA 以外に宿主側の繫留因子が存在している可能性が強く示唆されるが、未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

宿主細胞内において、輸送小胞と標的膜との結合には繫留因子と呼ばれるタンパク質群が必要不可欠である。ER 小胞と LCV との繫留反応において、レジオネラエフェクターの一つである DrrA と宿主タンパク質の Rab1 が必要であることが明らかになっているが、多数のタンパク質複合体より形成される繫留因子には、その他の因子も關与している可能性が推測される。そこで、本研究では ER 小胞と LCV との繫留反応への Exocyst 複合体の關与を明らかにすることを目的とする。Exocyst 複合体は細胞膜に局在する繫留因子であり、通常は細胞膜へと輸送

された小胞 (エキソサイトーシス小胞) と細胞膜との繫留反応に關与するタンパク質複合体である。Exocyst 複合体は 8 つのサブユニットより構成される巨大なタンパク質複合体であり、その中でも Sec15 と呼ばれるサブユニットはエキソサイトーシス小胞に含まれる Rab11 と結合することで、効率的な繫留反応を司っていることが明らかになっている。細胞内に侵入した直後の LCV は細胞膜によって覆われており、ER 小胞と LCV との繫留反応は ER 小胞と細胞膜との繫留反応ということになる。よって、ER 小胞と LCV との繫留因子として Exocyst 複合体が關与しているのか。及び Exocyst 複合体のどのサブユニットが ER 小胞と LCV との繫留機構に關与しているのかを明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) Exocyst 複合体を構成する因子が LCV 上に局在するのを確認する。具体的には 3x-FLAG タグを融合させた種々の Exocyst 複合体の構成因子を発現させた細胞にレジオネラ菌を感染させて LCV 上への当該タンパク質の局在を觀察する。また、Exocyst 複合体のサブユニットに対する抗体を使用し、内在性のサブユニットに關しても LCV への局在化を調べる。

(2) LCV 上に局在する Exocyst 複合体の因子が LCV-ER 小胞の繫留を促進していると考えられているレジオネラエフェクター DrrA と結合するのを調べる。背景及び目的で記載したが、現在までの解析から DrrA-Rab1 複合体が ER 小胞と LCV との繫留反応に寄与していることが明らかになっている。そこで、LCV 上に集積する Exocyst 複合体のサブユニットが同定された場合、当該サブユニットと DrrA との結合を解析し、DrrA-Rab1 複合体と Exocyst 複合体サブユニットが ER 小胞と LCV との繫留反応において協調的に働いているのかを明らかにする。

(3) LCV 上に局在する Exocyst 複合体の機能障害が LCV への ER 小胞の集積に与える影響及びレジオネラ菌の細胞内感染に与える影響を解析する。Exocyst 複合体サブユニットの一つである Sec15 は Rab11 と結合しエキソサイトーシス小胞と細胞膜との繫留機構に關与している。しかし、Rab11 との結合能を失った Sec15 の変異体を細胞に発現させると本繫留反応が阻害されることが知られている。そこで、Sec15 の変異体を発現させた細胞における LCV への ER 小胞の供給を調べる。また、種々の Exocyst サブユニットを siRNA により発現抑制させた細胞での

LCV への ER 小胞の供給及びレジオネラ菌の細胞内増殖への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) Exocyst 複合体は 8 つのサブユニット (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84) により構成されているが、その中の 3 つのサブユニット (Sec5, Sec6, Sec15) が発現系を用いた解析により特異的に LCV 上に集積することを見いだした。また、抗体を用いた内在性の解析においても、Sec5 と Sec15 が LCV 上に集積することを明らかにした。

(2) 上記の解析より、3 つのサブユニットが LCV 上に集積することを見いだした。そこで、当該サブユニットが DrrA と結合するのかを免疫沈降実験により調べたところ、Sec5, Sec6, Sec15 において DrrA との結合が確認された。また、興味深いことにその他のサブユニットにおいては DrrA との結合が見られなかったことから、LCV 上に集積する Exocyst サブユニットと DrrA との間に機能的相関関係があることを示唆している。

(3) Sec15 には Rab11 との結合能を失った変異体が存在していることは前述した。そこで、当該変異体を作製し、Sec15 変異体が発現している細胞での LCV への ER 小胞の供給を観察した。その結果、Sec15 変異体の発現により ER 小胞の LCV への供給が顕著に抑制されることを見いだした。更に、野生型の Sec15 と Rab1 との結合が確認でき、当該結合が Sec15 の変異体では検出されないことから、ER 小胞の LCV への繫留には DrrA-Rab1-Exocyst 複合体サブユニットの協調的な反応が必要であると考えられる。更に、種々の Exocyst 複合体サブユニットの発現抑制による ER 小胞の LCV への供給率及びレジオネラ菌の細胞内増殖への影響を調べたところ、Sec5 及び Sec15 の発現抑制により ER 小胞の LCV への供給が顕著に抑制されること及びレジオネラ菌の細胞内増殖を著しく抑制することを明らかにした。一方、その他のサブユニットの発現抑制では、上記した影響が検出されないことからレジオネラ菌は ER 小胞と LCV との繫留反応において Exocyst 複合体のサブユニットの中から数種類を特異的に操作することで ER 小胞と LCV との効率的な繫留とその後に続く細胞内増殖に利用していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. A new role for RINT-1 in SNARE complex assembly at the trans-Golgi network in coordination with the COG complex.

Arasaki K, Takagi D, Furuno A, Sohda M, Misumi Y, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. Mol Biol Cell. 24, 2013, 2907-17

doi: 10.1091/mbc.E13-01-0014.

2. Miyazaki, K., Wakana, Y., Noda, C., Arasaki, K., Furuno, A. and Tagaya, M. Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum. J Cell Sci. 125, 2012, 5658-66

doi: 10.1242/jcs.105304.

[学会発表](計 5 件)

1. 多賀谷光男、新崎恒平 小胞体とミトコンドリアの接触部位における syntaxin 17 の役割 第 86 回日本生化学大会 シンポジウム 2012 年 9 月 横浜

2. 川端美緒、新崎恒平 レジオネラエフェクター LidA を通じたレジオネラ感染に関与する Rab タンパク質の網羅的探索 第 86 回日本細菌学会総会 ポスター及びワークショップ 2013 年 3 月 千葉

3. 新崎恒平、川端美緒、Derek Toomre、多賀谷光男、Craig Roy レジオネラエフェクターである DrrA は ER 小胞と LCV 膜との融合を促進する 第 85 回日本生化学大会

シンポジウム 2012年12月
福岡

4. 清水浩顕、茂刈寛史、西田直貴、新崎恒平、多賀谷光男 syntaxin17 は mitochondria-associated membrane (MAM)に局在し、脂肪滴の形成に關与する 第85回日本生化学大会 ポスター 2012年12月 福岡

5. 野田睦乃、松下充、新崎恒平、多賀谷光男 VIMP は微小管結合タンパク質との相互作用を介して小胞体の形態を調整する 第85回日本生化学大会 ポスター 2012年12月 福岡

〔図書〕(計1件)

オルガネラ接触部位：多様な機能と疾患
多賀谷光男、谷佳津子、新崎恒平
実験医学、Vol 31、No.11 2013、1791-1797

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

- (1)研究代表者：新崎恒平
(Kohei Arasaki)
東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：70609990

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：