

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670212

研究課題名(和文) レジオネラのゼノファジー回避の分子機構

研究課題名(英文) Molecular basis of evasion of Legionella from xenophagy

研究代表者

永井 宏樹 (NAGAI, Hiroki)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80222173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラによるゼノファジー回避の機構を解析するため、サルモネラとの共感染系を使ってレジオネラエフェクタータンパク質の網羅的解析を行った。その結果、ゼノファジー誘導に必要な宿主タンパク質 LC3 のシグナル分子として知られるユビキチンの細菌内包液胞へのリクルートメントを阻害するレジオネラプロテアーゼ RavZ を同定することができた。RavZ は semi in vitro 系を用いた解析で、ユビキチン結合を切断する活性を持つことが示唆された。本研究は、レジオネラによるゼノファジー回避の機構として、ユビキチンの制御に関わると考えられるエフェクタータンパク質を見出すことに成功したと意義付けられる。

研究成果の概要(英文)：Bacterial pathogens establish intracellular niches known as bacteria-containing vacuoles in which they can survive and replicate. Ubiquitin-dependent selective autophagy (xenophagy) is a host defense mechanism to counteract infection with bacteria. The Legionella effector protein RavZ interferes with autophagy by irreversibly deconjugating LC3, an autophagy-related ubiquitin-like protein, from phosphatidylethanolamine. Here we show that, using a co-infection system with Salmonella and Legionella, RavZ exhibited the activity to interfere ubiquitin recruitment to the Salmonella-containing vacuoles. Using semi-permeabilized cells and purified RavZ, ubiquitin on the vacuoles was removed depending on the catalytic cysteine residue of RavZ for LC3 deconjugation. These raise the possibility that the targets of the cysteine protease RavZ include not only LC3 but also ubiquitin. Ubiquitin targeting by RavZ is thought to be a strategy of Legionella to evade host xenophagy.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：細菌 オートファジー レジオネラ

1. 研究開始当初の背景

宿主細胞に侵入した病原体は、宿主細胞のリソソームによってしばしば排除される。しかし、多くの細胞内寄生性病原細菌はリソソームによる分解を回避する機構を持つ。近年、真核生物が普遍的に持つオートファジーが、宿主の二次的防御機構として、リソソーム分解経路を逸脱した細菌を除去する働きを持つことが示され、ゼノファジーと呼ばれている。病原細菌は宿主との相互作用の結果、このような宿主細胞の持つ多段階の防御機構を回避するための仕組みを獲得してきたと考えられる。

サルモネラやレジオネラのように感染細胞内で固有の液胞を構築してその中で増殖する細菌は、しばしばその液胞にユビキチン分子を集積する。そして液胞上のユビキチンはアダプタータンパク質を介してオートファジータンパク質のひとつである LC3 により認識されゼノファジーが誘導される。

Legionella pneumophila は 300 近くのエフェクタータンパク質を宿主細胞内に輸送し、多様な方法で宿主細胞のシステムを模倣あるいは攪乱し感染を達成する。研究開始当初の時点で、*L. pneumophila* は宿主ゼノファジーを高度に回避することがすでに知られており、その要因の一つは LC3 の脂質結合を不可逆的に切断する酵素活性を持つ RavZ というエフェクタータンパク質の働きによって説明されていた。しかしながら、*ravZ* を欠損した株でも LC3 の液胞への集積は起こらず、レジオネラの細胞内増殖は影響を受けなかったことから、レジオネラは極めて多重な方法でゼノファジーを回避することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、レジオネラの持つゼノファジー回避の分子機構を探ることを目的として行われた。ゼノファジー初期段階の隔離膜形成に中心的な役割を果たす LC3 のみでなく、アダプタータンパク質やシグナル分子としてのユビキチンにも着目し、これらの分子を標的とするレジオネラエフェクターを同定し、その役割を明らかにするため、300 近くある *L. pneumophila* エフェクタータンパク質の網羅的探索を行った。LC3 リクルートメントをリードアウトとした実験的評価が *L. pneumophila* では困難であるという問題を克服するため、ゼノファジー解析が先行しているサルモネラとの共感染系を柱として研究を展開し、レジオネラのゼノファジー回避の分子機構

の解明を目指した。

3. 研究の方法

- (1) レジオネラ・サルモネラ共感染系を用いたレジオネラエフェクターのスクリーニング

サルモネラ感染によるゼノファジー解析で主に使われる HeLa 細胞に *L. pneumophila* と *Salmonella Typhimurium* を同時に感染させ、サルモネラ内包液胞 (SCV) への LC3、ユビキチン、アダプタータンパク質の集積を蛍光顕微鏡法で解析した。SCV へのこれらのタンパク質の集積がレジオネラの共存によって阻害されれば、レジオネラから宿主細胞に輸送される特定のエフェクタータンパク質が阻害活性を担うと考えられた。次に、レジオネラの遺伝子群の幾つかの領域を大きく欠損した株を用い、どの領域欠損により上記の阻害活性が消失するかを調べ、該当エフェクタータンパク質候補の絞り込みを行った。

- (2) 該当エフェクターの欠損株及び真核細胞発現系を用いた解析

遺伝子領域欠損部位に含まれるエフェクタータンパク質の単独欠失レジオネラ株を構築し、(1)と同様の感染実験を行った。また、該当タンパク質の真核細胞発現系を構築し、HeLa 細胞に発現させて、サルモネラを感染させ、LC3 及びユビキチンの SCV 集積を解析した。

- (3) 該当エフェクタータンパク質の大量発現系の構築と精製

該当エフェクターはシステインプロテアーゼとしての酵素活性を持つことが知られていたため、この活性部位に変異を導入し、野生型タンパク質とともに大腸菌大量発現系を構築し、タンパク質を精製した。

- (4) 精製タンパク質を用いた *semi in vitro* の解析

HeLa 細胞にサルモネラを感染後、細胞膜を弱い界面活性剤で半可溶化したものに対し、精製したエフェクタータンパク質を

添加する *semi in vitro* 実験を行い、SCV への LC3 及びユビキチン集積を解析した。

- (5) レジオネラ液胞 (LCV) へのユビキチン集積に対する該当エフェクターの作用解析

見出されたエフェクターのレジオネラ感染における作用を調べるため、該当エフェクター欠損株を野生株とともにマクロファージに感染させ、LCV へのユビキチン集積を解析した。

- (6) オートファジータンパク質をノックアウトした細胞を用いた該当タンパク質の機能解析

該当タンパク質で見出されたユビキチンへの作用がオートファジーへの影響の結果である可能性を排除するために、オートファジーが起こらない MEF 細胞と野生型 MEF 細胞に該当エフェクターを発現させ、サルモネラを感染して SCV へのユビキチン集積を比較した。

4. 研究成果

- (1) レジオネラが共存することにより、SCV への LC3 集積が有意に阻害されることが確認され、ゼノファジーを制御するレジオネラエフェクターの存在が示唆された。該当エフェクターが含まれると考えられた遺伝子欠損領域には、LC3 を標的とする既知のエフェクタータンパク質 RavZ がコードされていたため、*ravZ* 単独欠損株を構築し、サルモネラとともに宿主細胞に感染させた。その結果、RavZ だけが、LC3 集積の阻害を引き起こすエフェクターであることが確かめられた。
- (2) ユビキチンやアダプタータンパク質の SCV への集積について解析を行ったところ、いずれも LC3 と同様にレジオネラの共存で阻害が起こることがわかった。意外なことに *ravZ* の単独欠損株でこの阻害がなくなったことから、RavZ は LC3 だけでなくユビキチン集積の制御にも関与することが示唆された。

- (3) RavZ 及びすでに知られているその酵素活性部位に変異を導入したタンパク質の真核細胞発現系を構築し、それを用いて SCV へのユビキチン集積を調べたところ、RavZ の酵素活性に必要なアミノ酸残基依存的にユビキチン集積を抑制することがわかった。

- (4) RavZ 及びその酵素活性部位変異体の大腸菌大量発現系を構築し、それを用いてタンパク質を精製した。精製タンパク質を用いた *semi in vitro* 系を用いた解析によって、SCV に集積していたユビキチンが RavZ の酵素活性に依存して切断を受けることが示された。

- (5) マクロファージを用いたレジオネラ単独感染系で、LCV へのユビキチン集積の程度は RavZ の有無で大きな影響を受けないことが示された。このことから、レジオネラはさらに多重なゼノファジー防御機構を持つ可能性が示唆された。

- (6) オートファジーを誘導しない MEF 細胞においても、野生型の MEF 細胞と同等の RavZ による SCV へのユビキチン集積の抑制が認められた。このことから、ユビキチン集積の抑制という観察された現象は、RavZ に依存したオートファジー抑制によるフィードバックによって引き起こされたという可能性が排除された。

以上の結果を統合し、本研究によって、レジオネラエフェクター RavZ が LC3 の機能を阻害するだけでなく、ユビキチンに対しても同じ酵素活性によって細菌内包液胞への集積を阻害する働きを持ち、レジオネラによるゼノファジー回避の多重な分子機構の一つを担うことが明らかとなった。

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 3 件)

Kubori T. Life with bacterial secretion systems. *PLoS Pathog.* In press. (2016)
10.1371/journal.ppat.1005562

査読有

Kubori T and Nagai H. The type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol.* **29**:22-9 (2016) doi: 10.1016/j.mib.2015.10.001. Epub 2015 Oct 31. 査読有

Kuroda T, Kubori T, Bui TX, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K and Nagai H. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep.* **5**:10192 (2015) doi:10.1038/srep 10912. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella* Deubiquitinases. 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 日 大阪国際交流センター(大阪府、大阪市)

永井 宏樹、偶然による病原菌 レジオネラ、共生・寄生物学シンポジウム、2016 年 3 月 5 日、筑波大学

Hiroki Nagai, Interdomain protein transfer as a critical mechanism for survival of intracellular bacteria. 2015 International Meeting of "Matryoshka-type Evolution", Sep. 30 - Oct. 2, 2015, Tsukuba University.

永井宏樹、レジオネラ病原性の分子基盤、平成 26 年度第 24 回学会賞受賞者特別講演会、2015 年 1 月 29 日、北里大学 (東京)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. *Legionella* RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles. 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2015 年 9 月 9 日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県、淡路市)

Hiroki Nagai, Type IV secretion system as a lethal weapon of bacterial pathogens. The 10th International Symposium of the Institute Network "Towards the next generation research for cancer and Immunology", Jul. 23-24, 2015, Hokkaido University

永井 宏樹、久堀 智子、Xuan Thanh Bui, 相沢慎一、今田 勝巳、レジオネラ病原性に必須な IV 型分泌装置の構造生物学、第 88 回日本細菌学会総会ワークショップ、2015 年 3 月 26 (26-28) 日、長良川国際会議場 (岐阜)

久堀智子、永井宏樹 レジオネラ IV 型分泌マシナリーの構造解析 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会 2015 年 6 月 5 日 琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県、大津市)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. *Legionella* RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles. 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 28 日 長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa S and Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for pathogenesis of *Legionella* infection. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2014 年 9 月 24 日 奈良県新公会堂(奈良県、奈良市)

Kubori T. Bacterial effector-involved temporal regulation by hijack of the host ubiquitin pathway. International Research Training Group 1273 "Strategies of human pathogens to achieve acute and chronic infections" 2014 年 9 月 1 日 (基調講演) Timmendorfer Strand, Germany

〔その他〕
ホームページ等
Nagai Lab
<http://nagailab.biken.osaka-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
永井 宏樹(NAGAI, Hiroki)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80222173

(3)連携研究者

久堀智子(KUBORI, Tomoko)
大阪大学・微生物病研究所・特任講師(常勤)
研究者番号：20397657