

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05772

研究課題名（和文）レジオネラの宿主細胞内における自己化PLAMPの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Legionella self-PLAMP inside the host

研究代表者

新崎 恒平（Arasaki, Kohei）

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70609990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は肺炎を引き起こすレジオネラの細胞内における自己化PLAMPの解明を目的として行なった。具体的には、「レジオネラが細胞内で形成するレジオネラ含有液胞（Legionella-containing vacuole: LCV）のリソソーム輸送阻害機構の解明」、「LCVの小胞体移行機構の解明」、「LCVの小胞体定着化機構の解明」の3つの自己化PLAMPに関連する宿主・バクテリア両因子の解析を行なった。本研究では、3つ全てのテーマにおいて、自己化PLAMPを促進するレジオネラエフェクターの同定に成功した。更に、当該エフェクターの自己化PLAMP促進における分子機構の一部を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義として重要な点は、「細胞内に侵入したレジオネラが自身を分解する宿主機構を回避しながら、増殖の場となる小胞体へと移行し定着化する」レジオネラ自己化PLAMPに関わる宿主・バクテリア両因子の決定とその分子機序を明らかにできたことである。社会的意義としては、本研究結果が「新規レジオネラ治療薬開発への足掛かりとなるかもしれない」ことである。現時点では、レジオネラに対する治療法は抗生物質の投与が主流となっているが、本研究で明らかになりつつあるレジオネラPLMAPを阻害することによる増殖抑制といった新たな治療法を確立できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is elucidation of Legionella self-PLAMP inside the host cells. In particular, we have analyzed both host and bacterial factors that are related to Legionella self-PLAMP in 3 subjects including “elucidation of machinery in which Legionella inhibits trafficking of Legionella-containing vacuole (LCV) to the lysosome”, “elucidation of machinery of LCV trafficking to the ER”, and “elucidation of machinery of Legionella sustainment into the ER”. Upon these researches, we have successfully identification of bacterial factors that promote Legionella self-PLAMP. Moreover, we have revealed a part of molecular machineries in which these factors promote Legionella self-PLAMP.

研究分野：感染症学

キーワード：PLAMP レジオネラ レジオネラエフェクター 小胞輸送 Rabタンパク質 小胞体

1. 研究開始当初の背景

多くの病原菌は「非自己」として宿主細胞に認知・排除される対象となるが、細胞に侵入した後に「自己化」に成功することで、生存・増殖を可能としている。そして、この自己化の過程において病原菌は自身のライフサイクルによって生じる分子パターン (Pathogen “Life cycle”-Associated Molecular Pattern : PLAMP) を細胞内に作り出す。それゆえ、PLAMPを理解することは病原菌による「自己化機構」の解明に必須となる。また、PLAMPを明らかにすることは、宿主細胞内に備わっている未知の生理機能の発見にも繋がる可能性も秘めている。そこで、本申請研究では細胞内発症型細菌の一つであるレジオネラを感染症のモデルとして、宿主細胞内におけるレジオネラの自己化 PLAMP の全体像を明らかにすることを目的とする。

宿主細胞におけるレジオネラの自己化は、ファゴサイトーシスにより宿主細胞に取り込まれるところから始まる。細胞内に取り込まれたレジオネラは LCV (Legionella-containing vacuole) と呼ばれる膜構造体を形成する。通常、ファゴサイトーシスは細胞外の異物を取り込んだ後リソソームへと輸送し分解する役割を担っている。しかしながら、細胞内に侵入したレジオネラは LCV とリソソームとの融合を遮断する (図1:左方向)。

その傍ら、レジオネラは LCV に宿主細胞の小胞体より出芽した輸送小胞 (ER 小胞) を取り込みその膜構造を変換 (リモデリング) することで、LCV をレジオネラの増殖の場である小胞体と融合させる (図1:右方向)。なお、この一連の感染プロセスにはレジオネラが宿主細胞に対して放出する「レジオネラエフェクター」と呼ばれるタンパク質群が重要な役割を担っている。それゆえ、レジオネラの自己化 PLAMP を理解するためにはレジオネラの細胞内における動態およびレジオネラエフェクターの解析が必要不可欠となる。

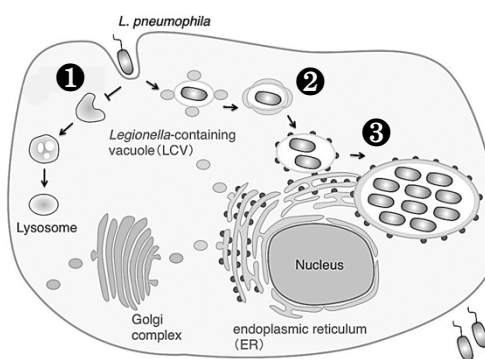


図1：レジオネラの細胞内自己化経路

2. 研究の目的

背景の項で記載した通り、本申請研究は宿主細胞内におけるレジオネラの自己化 PLAMP の全体像の解明を軸としている。そこで、レジオネラの自己化 PLAMP において未だ不明となっている以下の3テーマ

図1-①：LCVのリソソームへの輸送経路の遮断機構の解明：ファゴサイトーシスにより宿主内に取り込まれたレジオネラがリソソームへと輸送される過程をブロックするための PLAMP

図1-②：LCVの小胞体への移行機構の解明：リモデリングが完了した LCV を小胞体へと移行させるための PLAMP

図1-③：LCVの小胞体定着化機構の解明：小胞体に到達したレジオネラが小胞体に定着化し、増殖ニッチを作製するための PLAMP

に参与するレジオネラエフェクターの決定と、そのエフェクターの当該機構で織りなす PLAMP を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究の方法に関しては、上記した3つのテーマごとに記載する

①：LCVのリソソームへの輸送経路の遮断機構の解明

これまでの研究により、レジオネラ感染にともない Rab5 がユビキチン化されることを見出しており、このレジオネラによる Rab5 のユビキチン化が LCV のリソソーム輸送阻害の PLAMP となる可能性が強く推測された。そこで、本テーマにおいては、図2に示す pathogenic

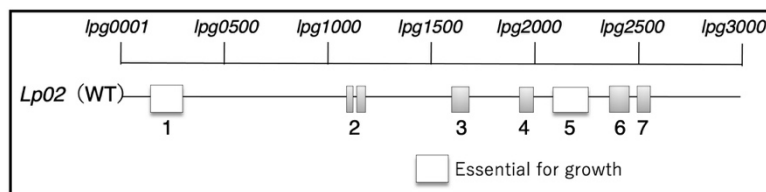


図2：レジオネラ pathogenic island におけるクラスター分布図

island 欠損レジオネラ株（レジオネラエフェクターの一部はレジオネラゲノム上の pathogenic island に集中的にコードされている。そして、レジオネラの生育に必須な遺伝子を含む island1 と island5 を除く 5 つの island 全ておよび各々を欠損させたレジオネラ株が作製されている）を用いたスクリーニングにより Rab5 のユビキチン化を担う PLAMP 実行エフェクターを同定する。同定後は、当該エフェクターによる Rab5 ユビキチン化の分子機構を明らかにする。更に、レジオネラによりユビキチン化された Rab5 のキャラクタライズ（ユビキチン鎖の種類・Rab5 のヌクレオチド依存性など）も平衡して行う。

②：LCV の小胞体への移行機構の解明

これまでの研究により、リモデリング後の LCV が小胞体へと移行する過程において、レジオネラは LCV 上に Rab6 および Rab33B をカスケード様に集積させることを見出している（レジオネラは Rab33B を LCV に集積させ、この Rab33B の集積がトリガーとなり Rab6 が LCV に集積する）。そこで、本テーマにおいては、Rab33B を LCV へと集積させる PLAMP 実行エフェクターの同定を図 2 に記した遺伝子欠損株を用いて行う。更に、2016 年に報告されたレジオネラによる Rab33B に対する PLAMP として同定されたホスホリボシルユビキチン化（PR-UB：従来のユビキチン反応とは全く異なり、ADP リボシル化されたユビキチンを基質のセリン残基に付与する反応）が Rab33B の LCV への集積に与える影響を調べることで、LCV が小胞体へと移行する過程におけるレジオネラ PLAMP を決定する。

③：LCV の小胞体定着化機構

LCV の小胞体定着化機構において、LCV は先ず滑面小胞体から接触し、その後粗面小胞体へと移行することで増殖ニッチを形成することを既に見出している。また、重要な知見として滑面・粗面小胞体を行き来することが可能である宿主タンパク質の Bap31 が LCV に集積することも見出している。以上の結果より、小胞体定着化機構において、レジオネラは Bap31 を LCV へと集積させることで、LCV の滑面から粗面小胞体への移行を促進することで小胞体における増殖ニッチを形成していることが示唆される。そこで、Bap31 の機能阻害が LCV の小胞体定着化機構に及ぼす影響を評価するとともに Bap31 の機能を制御する PLAMP に寄与するレジオネラエフェクターの同定を行う。

4. 研究成果

研究成果に関しても、上記した 3 テーマごとに記載する。

①：LCV のリソソームへの輸送経路の遮断機構の解明

研究方法の項で記載した遺伝子欠損株を用いた解析により、Rab5 のユビキチン化に必要な island の同定および当該 island にコードされているレジオネラエフェクターの中から Rab5 のユビキチン化に働くレジオネラエフェクターの同定に成功した。なお、レジオネラによりユビキチン化された Rab5 のキャラクタライズを行なったところ、レジオネラが Rab5 に対して施すユビキチン鎖の種類が K63 鎖（タンパク質分解ではなく、細胞内輸送・シグナル伝達・タンパク質間相互作用制御）であること、レジオネラは GTP 型（活性化型）の Rab5 特異的にユビキチン化を行なっていることを明らかにした。更に、レジオネラによってユビキチン化された活性型の Rab5 と Rab5 の不活性化因子である RabGAP-5 との相互作用が有意に増強されていることを見出した。これらの結果は、LCV のリソソーム輸送経路の遮断機構において、レジオネラは Rab5 のユビキチン化という PLAMP を介して RabGAP-5 による Rab5 の不活化を促進している可能性を示している。

②：LCV の小胞体への移行機構の解明

研究方法の項で記載した通り、2016 年に発見されたレジオネラの Rab33B に対する PLAMP（PR-UB 化）の Rab33B の LCV への集積に及ぼす影響を評価した。その結果、Rab33B の PR-UB 化に寄与するレジオネラエフェクター（SidE/SdeA/SdeB/SdeC の 4 つを含む SidE ファミリーの全て）欠損株を含む LCV において、Rab33B の集積が全くみられないことを見出した（図 3）。なお、本欠損株に野生型の責任因子及び酵素活性を欠損させた責任因子を導入する実験を行なったところ、野生型責任因子を導入した株を含む LCV には Rab33B が集積するのに対して、酵素活性欠損責任因子を導入した株を含む LCV には Rab33B の集積が見られな

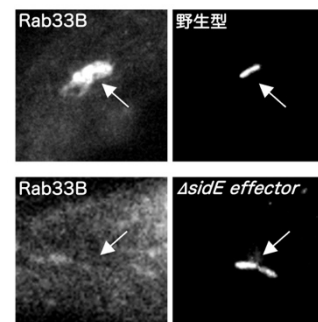


図 3：SidEエフェクター欠損の影響

化が Rab33B の LCV 集積のトリガーとなっていることを示している。一方、図 2 で示した island 欠損株を用いた解析から island7 を欠損しているレジオネラを含む LCV において Rab33B の集積が見られなくなることを明らかにした。重要な情報として、当該 island には PR-UB 化を促進するエフェクターがコードされておらず、この結果は island7 に Rab33B を LCV へとリクルートする真のエフェクターが存在することを示している。そして、種々の解析の結果、Rab33B の LCV へのリクルートに働く 2 つのエフェクターの同定に成功した。更に、PR-UB 化された Rab33B と当該エフェクターの相互作用が有意に増強されていることから、PR-UB 化という PLAMP は Rab33B と Rab33B を LCV へとリクルートする真のエフェクターとの間を繋ぐ反応であることを示唆している。

③ : LCV の小胞体定着化機構

研究方法の項で記載したように、本テーマ解決のためには宿主因子である Bap31 の役割を見出すことが最優先となる。そして、Bap31 を発現抑制させた細胞における LCV の小胞体内移行を解析した。その結果、通常は LCV が粗面小胞体に到達している感染経過時間において、Bap31 を発現抑制している細胞において LCV が滑面小胞体に留まっていることを示す結果を得た。このことは、レジオネラは Bap31 を利用することで、小胞体内の移行（滑面から粗面への移行）を可能としていることを意味する。続いて、Bap31 の機能を制御する PLAMP 実行因子の同定を試みた。図 2 で示した遺伝子欠損株によるスクリーニングと続く解析により Bap31 と特異的に相互作用するエフェクターを同定した。更に、当該エフェクターを欠損させたレジオネラ株において Bap31 の LCV への集積が減弱するとともに、本欠損株を含むレジオネラの LCV は滑面小胞体に留まり続けていた。上記の結果は、LCV の小胞体定着化機構において、レジオネラは Bap31 の機能を制御する PLAMP を作り出していることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitao Tomoe, Arasaki Kohei, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 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 ~ 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 Kato Shun, Arasaki Kohei, Tokutomi Natsuki, Imai Yuzuru, Inoshita Tsuyoshi, Hattori Nobutaka, Sasaki Taeko, Sato Miyuki, Wakana Yuichi, Inoue Hiroki, Tagaya Mitsuo	4. 巻 134
2. 論文標題 Syntaxin 17, an ancient SNARE paralog, plays different and conserved roles in different organisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258699	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 Murata Misaki, Kanamori Riku, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei	4. 巻 135
2. 論文標題 Requirement of phosphatidic acid binding for distribution of bacterial protein targeting syntaxin 17	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259538	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 Kawabata Mio, Matsuo Honoka, Koito Takumi, Murata Misaki, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei	4. 巻 17
2. 論文標題 Legionella hijacks the host Golgi-to-ER retrograde pathway for the association of Legionella-Containing vacuole with the ER	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009437	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 Klionsky Daniel J., et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 無
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 Wakana Yuichi, Hayashi Kaito, Nemoto Takumi, Watanabe Chiaki, Taoka Masato, Angulo-Capel Jessica, Garcia-Parajo Maria F., Kumata Hidetoshi, Umemura Tomonari, Inoue Hiroki, Arasaki Kohei, Campelo Felix, Tagaya Mitsuo	4. 巻 220
2. 論文標題 The ER cholesterol sensor SCAP promotes CARTS biogenesis at ER?Golgi membrane contact sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3355-3371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202002150	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 Kitao Tomoe, Taguchi Kyoichiro, Seto Shintaro, Arasaki Kohei, Ando Hiroki, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 32
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 ~ 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 新崎恒平
2. 発表標題 Ubiquitination of Rab5 as a Legionella PLAMP
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shun Kato , Kohei Arasaki, Mitsuo Tagaya.
2. 発表標題 Different roles of ACSL3 and ACSL4 in autophagosome formation.
3. 学会等名 EMBO Workshop: The endoplasmic reticulum; The master regulator of membrane Trafficking (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤駿・新崎恒平・多賀谷光男
2. 発表標題 Acyl-CoA合成酵素ACSL3のオートファゴソーム形成への関与
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤駿・新崎恒平・多賀谷光男
2. 発表標題 Involvement of Acyl-CoA synthase ACSL3 in autophagosome formation.
3. 学会等名 日本薬学会第134年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新崎恒平
2. 発表標題 レジオネラ感染におけるLCVリモデリング及び小胞体移行機構
3. 学会等名 第21回・Pharmaco-Hematology (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新崎恒平
2. 発表標題 レジオネラによる宿主輸送経路の多彩な制御機構
3. 学会等名 第31回・フォーラム・イン・ドージン(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新崎恒平
2. 発表標題 レジオネラはRabカスケードを利用してレジオネラ含有小胞(LCV)を小胞体へと移行させる
3. 学会等名 第94回・日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新崎恒平・杉沢優太・多賀谷光男
2. 発表標題 Syntaxin 17の機能を制御するリン酸化部位の同定
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤駿・新崎恒平・多賀谷光男
2. 発表標題 異種生物Syntaxin 17の局在および機能
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田直樹・大畑俊貴・新崎恒平・多賀谷光男
2. 発表標題 飢餓時の脂肪滴と隔離膜の形成はsyntaxin 17-ACSL3軸によって調節されている
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------