

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05189

研究課題名(和文) 宿主ユビキチンシステムを負に制御する細菌エフェクタータンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of bacterial effector proteins that negatively regulate 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌レジオネラは多様なエフェクタータンパク質群を宿主真核細胞に送り込み、細胞の機能を操作することで感染を達成する。我々は宿主ユビキチン反応系を負に制御する脱ユビキチン化酵素(DUB)候補として5つのタンパク質をゲノム解析より見出した。そのうちの1つ LotA は酵素としての活性部位を独立に2つ持つという初めて見出された DUB であり、感染細胞内でのレジオネラ液胞に集積するユビキチンの除去に働くことで細菌増殖に寄与することを見出した (Cell. Microbiol. 2018)。さらに別のタンパク質の DUB 活性を明らかにし、その宿主細胞内標的の同定に成功した(投稿準備中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌が感染を確立する上で、宿主真核細胞の持つ普遍的なタンパク質修飾系であるユビキチンシステムを操作・攪乱することは重要な戦略として理解されている。しかしながら、ユビキチン化の負の制御機構はほとんどわかっていなかった。多様なエフェクターレパートリーを持つレジオネラをモデルシステムとして複数の脱ユビキチン化酵素を同定し、その感染における役割を分子レベルで明らかにした本研究課題は、真核生物との共存の中で確立された病原細菌の巧妙な戦略の理解に飛躍的前進を与えるものである。さらに、細菌が正負両面からユビキチン系を操作する仕組みの理解は、従来とは異なる視点からの感染防御への手がかりを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Legionella is a bacterial pathogen that transports an extraordinary amount of effector proteins into host eukaryotic cells to manipulate various cellular systems. We have identified Legionella deubiquitinases (DUBs) as negative regulators of the host ubiquitin system. LotA was found to have dual catalytic cysteine residues and to remove ubiquitin from bacterial vacuoles in the infected cells. The DUB activity of LotA contributes intracellular bacterial growth in conjunction with other bacterial ubiquitin ligases. We also identified another Legionella DUB and its cellular target. These results demonstrate that Legionella possesses multiple approaches to manipulate host ubiquitin systems for bacterial benefit.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：ユビキチン 脱ユビキチン化酵素 レジオネラ エフェクター 細菌感染

## 1. 研究開始当初の背景

病原細菌は宿主細胞の様々な機構を乗っ取り、それを改変することで感染に有利な状況を作り出す。真核生物が普遍的に持ち、多様な局面で細胞機能を文字通り支配する重要な修飾系であるユビキチン反応系は病原細菌が標的とする細胞内機構の代表であると言える。病原細菌が宿主細胞との相互作用の結果、ユビキチン系を模倣する機構を進化的に獲得してきたことは広く知られており、その中でこれまでに報告された細菌エフェクタータンパク質の多くは E3 ユビキチンリガーゼとしての機能を有するものであった。しかしながら、ユビキチン修飾を負に制御する「脱ユビキチン化酵素: Deubiquitinase (DUB)」は、その重要性が示唆されていながら、病原細菌エフェクタータンパク質としてはまだ殆ど同定されていなかった。我々は、極めて多彩なエフェクターレパートリーを持つレジオネラという病原細菌が保有するエフェクタータンパク質から、ゲノム解析により5つの DUB と想定される候補タンパク質を見出していた。

## 2. 研究の目的

レジオネラ DUB 候補タンパク質の酵素活性を証明し、それらのエフェクタータンパク質が宿主感染において果たす役割を明らかにすることにより、レジオネラをモデルシステムとして、病原細菌が正と負の両面から宿主細胞機構を操作することで感染を達成するメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) DUB であると想定されているレジオネラエフェクタータンパク質について、大腸菌発現系を使った精製を試みる。精製されたタンパク質を使って *in vitro* の脱ユビキチン化反応を行い、DUB 活性を証明する。

(2) 同定された DUB の活性型及び非活性型の細胞内発現系を構築する。また、それらを発現するレジオネラ株を構築し、宿主細胞への感染を行う。細胞内での当該 DUB の局在やユビキチンとの共局在、細胞内のユビキチンレベルを解析する。

(3) 同定された DUB を細胞内で発現させ、免疫沈降法などで結合する宿主細胞内タンパク質の同定を試みる。結合タンパク質の解析から、当該 DUB の標的タンパク質を探索する。

(4) これまでの研究からユビキチンが集積することが報告されているレジオネラ内包液胞 (*Legionella*-containing vacuole: LCV) において DUB の働きによるユビキチンの除去の有無を解析する。

(5) 当該 DUB の欠損変異レジオネラ株を構築し、感染における LCV や特定の細胞内タンパク質のユビキチン修飾にどのような変化が起こるかを解析する。

(6) DUB 欠損変異株感染によって生じるレジオネラの細胞内増殖能や細胞内機能の変化を解析する。

これらの解析結果を統合して、レジオネラ DUB の感染における役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

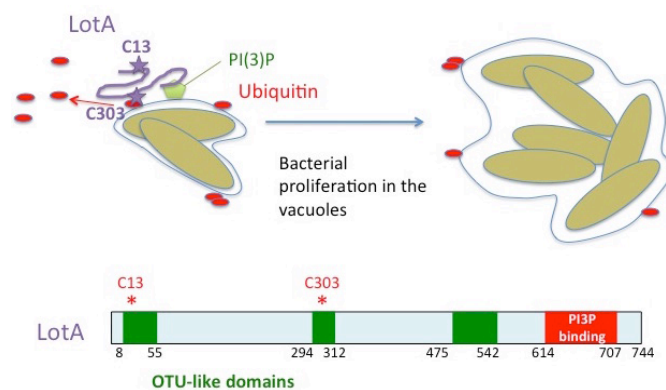


図1. レジオネラ DUB である LotA はふたつの活性 Cys 残基 (C13, C303) を持つ。LotA は C-末に存在する PI3P 結合ドメインの働きによりレジオネラ内包液胞に結合し、液胞上のユビキチン鎖を切断除去することでレジオネラの細胞内増殖に寄与することが示された (Kubori et al., *Cell Microbiol.*, 2018)。

5つの DUB 候補タンパク質の中で、感染において重要な役割を果たすと考えられ、我々が LotA (*Legionella* OTU-like protein A) と名付けたタンパク質について解析を行った。LotA は2つの独立した活性 Cys 残基を持つことが予測された。精製タンパク質を用いた *in vitro* 脱ユビキチン化解析から、これらの Cys 残基は長鎖ユビキチンの切断及び K6-link ユビキチン鎖の切断という異なる DUB 活性を担うことが示された。これは、全生物種を通じて初めて同定された多重活性型 DUB と位置付けられる。また、LotA は C 末に脂質結合ド

メインを持ち、これにより感染時に LCV 上に局在し、LCV に集積するユビキチンを除去する作用があることが示された (図 1)。さらに、LotA はこれまでに同定されている別のレジオネラ ユビキチンリガーゼとの機能的なリンクの上に細菌の細胞内増殖に寄与する働きを持つことが明らかとなった (図 2)。この成果は 2018 年に論文として発表し (Kubori *et al.*, *Cell Microbiol.*, 2018)、Editor's choice として取り上げられた。

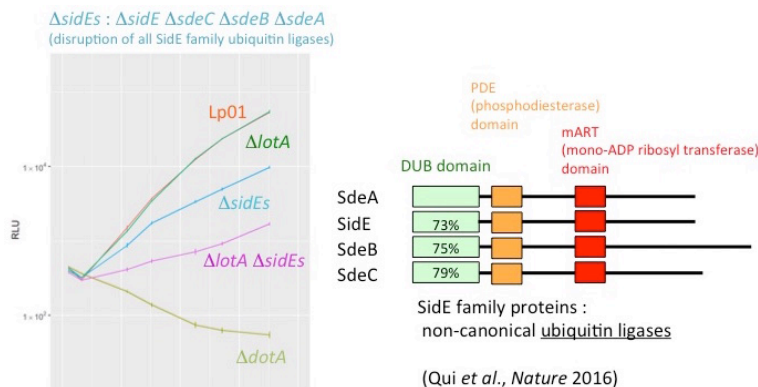


図2. マクロファージに感染したレジオネラの細胞内増殖をモニターする実験システム。LotA 単独欠損株は野生株 (Lp01) と比較して細胞内増殖に影響を与えないが、レジオネラの持つ一連のユビキチンリガーゼ (SidE ファミリータンパク質群) が欠損した条件下では、細胞内増殖に寄与することが示された。この結果は LotA と SidE タンパク質群との間の機能的リンクの存在を示すものである (Kubori *et al.*, *Cell Microbiol.*, 2018)。

また、残る 4 つの DUB 候補タンパク質のうち、タンパク質 X について解析を行った。X の大腸菌発現系を構築して活性型及び非活性型タンパク質を精製し、*in vitro* の脱ユビキチン化反応を行った。その結果、X は K63-link ユビキチン鎖を特異的に切断する DUB 活性を持つことが証明された。また、宿主細胞内結合タンパク質の解析から、標的タンパク質を同定することに成功し、この DUB はレジオネラが細胞内増殖を果たす上で重要な役割を持つ増殖ニッチとしての液胞の構築のための小胞輸送制御に関わることが明らかとなった。この成果は、現在論文投稿準備中の段階である。

病原細菌が感染を確立する上で、宿主真核細胞の持つ普遍的なタンパク質修飾系であるユビキチン系を操作することは非常に重要な戦略であると理解されている。その操作の過程においてこれまでほとんど分かっていなかった負の制御機構である細菌 DUB の果たす役割について理解を推し進めたという点で、本研究成果は飛躍的前進を与えるものである。細菌が正負の両面から宿主ユビキチン系を操作する仕組みの解明は、感染症制御法確立への重要な手がかりを与える結果につながる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件) \* 責任著者

1. \*[Kubori T.](#), Kitao T. and Nagai H. Emerging insights into bacterial deubiquitinases. *Curr Opin Microbiol.* (2018) 47:14-19. doi: 10.1016/j.mib.2018.10.001. (査読有)
2. \*[Kubori T.](#), Kitao T, Ando H and \*[Nagai H.](#) LotA, a *Legionella* deubiquitinase, has dual catalytic activity and contributes to intracellular growth. *Cell Microbiol.* Mar 15; e 12840. (2018) doi: 10.1111/cmi.12840. (査読有)
3. \*[Kubori T.](#), Bui XT, Hubber A and \*[Nagai H.](#) *Legionella* RavZ Plays a Role in Preventing Ubiquitin Recruitment to Bacteria-Containing Vacuoles. *Front Cell Infect Microbiol.* Aug 28; 7:384 (2017) doi: 10.3389/fcimb.2017.00384. (査読有)
4. Hilbi H, Nagai H, [Kubori T.](#), Roy CR. Subversion of Host Membrane Dynamics by the *Legionella* Dot/Icm TypeIV Secretion System. *Curr Top Microbiol Immunol.* 413:221-242. (2017) doi: 10.1007/978-3-319-75241-9\_9. (査読有)
5. \*[Kubori T](#) and Nagai H. Isolation of the Dot/Icm Type IV Secretion System Core Complex from *Legionella pneumophila* for Negative Stain Electron Microscopy Studies Vol 7, Iss 8, 2017 DOI: 10.21769/BioProtoc.2229 (査読有)

6. Hubber A., Kubori T., Coban C., Matsuzawa T., Ogawa M., Kawabata T., Yoshimori T., and \*Nagai H. Bacterial secretion system skews the fate of *Legionella*-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis. *Sci Rep.* 7: 44795 (2017) doi:10.1038/srep 44795. (査読有)
7. \*Kubori T. Life with bacterial secretion systems. *PLoS Pathog.* Aug 11; 12(8):e1005562. (2016) doi: 10.1371/journal.ppat.1005562 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Cold Spring Harbor Asia Conference on Bacterial Infection and Host Defense (2019) Suzhou, CHINA (招待講演)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella*  
Tomoko Kubori
2. 14th Rencontres du Vietnam "Innovative Approaches to the Study of Bacterial Pathogens" (2018) Qui Nhon, VIETNAM (招待講演)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella*  
Tomoko Kubori
3. 第 91 回日本細菌学会総会(2018) 福岡県、福岡市 (シンポジウム口頭発表)  
*Legionella* manipulates host cellular systems utilizing the type IV secretion system  
久堀智子
4. 日本顕微鏡学会 第 60 回記念シンポジウム (2017) 宮崎 (招待講演)  
宿主オートファジー関連システムとレジオネラ  
久堀智子
5. International Union of Microbiological Societies (IUMS2017) (2017) Singapore (招待講演)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella*.  
Tomoko Kubori
6. 第 90 回日本細菌学会総会 (2017) 宮城県、仙台市 (シンポジウム口頭発表)  
宿主オートファジー関連システムとレジオネラ  
久堀智子、Andree Hubber、Xuan Thanh Bui、永井宏樹
7. Bacterial Flagella, Injectisome and Type III Secretion Systems (2017) Okinawa, JAPAN (Talk)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella* Deubiquitinases.  
Tomoko Kubori
8. T4SS2016: Type IV secretion in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria (2016) Beilngries, GERMANY (Talk)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella* Deubiquitinases.  
Tomoko Kubori and Hiroki Nagai
9. The 15<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity (2016) Awaji, JAPAN (Talk)  
Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella* Deubiquitinases.  
Tomoko Kubori and Hiroki Nagai

[図書] (計 1 件)

1. \*Kubori T and Nagai H. Isolation of the Dot/Icm Type IV Secretion System Core Complex from *Legionella pneumophila*. (*Legionella* Methods and Protocols, Second Edition) 1921, 241-247. Springer Nature, 2019 doi: 10.1007/978-1-4939-9048-1\_15.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ

<https://sites.google.com/view/nagai-lab/home>