

平成 22 年 2 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590446

研究課題名（和文）レジオネラユビキチンリガーゼの発現と輸送の分子機構

研究課題名（英文）Molecular analyses of a *Legionella* ubiquitin ligase.

研究代表者

永井 宏樹（NAGAI HIROKI）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：80222173

研究成果の概要：

肺炎を引き起こす病原菌であるレジオネラは、多数の細菌由来タンパク質(エフェクター)を宿主細胞に注入することにより、宿主細胞をハイジャックする。本研究ではそのようなエフェクターの一つで、宿主細胞内のタンパク質分解系をハイジャックする LubX と結合するレジオネラタンパク質の探索を行った。驚いたことに、LubX は別のエフェクターに結合し、宿主のタンパク質分解系と共同して、その時間的制御を司ることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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; IV 型分泌; LubX; ユビキチン; プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

病原細菌は宿主細胞が本来持つ細胞内機能を細菌の目的に合わせて改変・修飾することにより感染を成立させ、また宿主の免疫機構から免れる。これらは細菌から宿主細胞に移行し宿主細胞の中で機能するさまざまなタンパク質因子（エフェクター）により実現され、多くのエフェクターは宿主細胞のタンパク質機能を模倣した働きを持つことが示されてきた。

病原細菌であるレジオネラによる肺炎は、

汚染された温泉などを原因とするアウトブレイクで問題となっている新興感染症である。レジオネラは宿主細胞が持つ貪食作用により侵入した後、ファゴソームを改変して作り出されたオルガネラの内部で増殖する。このプロセスにはレジオネラの持つ Dot/Icm IV 型分泌系(T4SS)が必須であり、この輸送系が宿主内増殖を可能にするエフェクタータンパク質を宿主細胞に送り込む。レジオネラの場合、宿主細胞内での増殖をいかにして可能にするかが感染成立の鍵となり、そのために必要なエフェクターの探索がしのぎを

削る勢いで行われている。

我々は、レジオネラで初のエフェクター RalF を同定し、これが宿主 ER-Golgi 間メンブレントラフィックに関わる低分子量 G タンパク質 ARF1 の活性化因子であることを明らかにした。さらに、Dot/Icm T4SS による宿主細胞への輸送のためのシグナル配列が RalF の C 末端に存在し、三次元構造上溶媒側に突出していることを示した。これらの成果を基盤にして、我々はレジオネラ新規エフェクターを探索するためのスクリーニング系を構築し、その結果 20 余りの新規エフェクタータンパク質を同定した。

そのうちの一つであるエフェクター LubX は、真核生物のユビキチン E3 リガーゼのモチーフのひとつである Ubox が 2 度繰り返される特徴的な構造を持つ (Ubox1、Ubox2)。それまでに知られていた Ubox 型 E3 リガーゼは単一の Ubox しか持たなかった。我々は、LubX がユビキチンリガーゼとしての機能を有することを *in vitro*、*in vivo* の実験で明らかにした。その過程で、LubX 全長を持つ精製タンパク質は、溶液中で凝集体を作ることが明らかになった。このような凝集体は Dot/Icm T4SS の輸送基質にはならないと考えられるため、レジオネラ細胞内に、LubX を輸送可能な状態に保つための分子機構が存在するものと考えられた。さらに、これまでに知られている他のエフェクターとは異なり、LubX は単独培養したレジオネラ中では発現していなかった。宿主細胞に感染させると、LubX の発現・輸送が誘導され、感染 10 時間後にピークに達する。従って、LubX の発現・輸送を時間的に制御する分子機構が存在するものと考えられた。

2. 研究の目的

エフェクタータンパク質のひとつである LubX は E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、宿主細胞内のユビキチン・プロテアソーム系をハイジャックすることにより、レジオネラに有利な環境を作り出すと考えられる。LubX が適切に細胞内で機能するために、輸送の時期、細胞内局在、ユビキチンリガーゼとしての活性が巧妙に調節されている可能性がある。

本研究では、LubX タンパク質がレジオネラ細胞内でどのように発現や輸送の調節を受けているかを明らかにするために、LubX と相互作用するレジオネラタンパク質を探索し、LubX の発現・輸送・機能において果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 精製 LubX 凝集の責任領域の決定

タグタンパク質 GST と LubX 全長を特異的プロテアーゼ PreScission 切断サイトを介して融合した GST-LubX 融合タンパク質を発現するプラスミドを構築する。GST-LubX 融合タンパク質を発現する大腸菌溶菌液を、GST と結合するグルタチオンセファロースビーズと反応させ、固相化する。この状態で PreScission と反応させると、LubX 部分が切断されて、遊離してくる。この画分をサイズ排除カラムで分画すると、大部分が排除体積で溶出されるが(凝集体)、これに加えて、大腸菌内で分解されたと見られる LubX 分解産物が、モノマー位置に溶出される。この画分に含まれる LubX 分解産物は、GST アフィニティ精製の原理から、N 末端は正常であるが C 末端を欠失していると考えられる。そこで、この LubX 分解産物の正確な質量を質量分析法で決定することにより、凝集体を作らない LubX 分解産物を同定する。

(2) LubX と相互作用するレジオネラタンパク質の探索

LubX と相互作用するレジオネラタンパク質を探索するため、GST プルダウン法を用いる。大腸菌発現系を利用して発現・精製した GST-LubX 融合タンパク質 とレジオネラ野生株の溶菌液を反応させた後、LubX に結合するレジオネラタンパク質をグルタチオンセファロースビーズに固相化する。還元グルタチオンを用いて GST-LubX 融合タンパク質ごと溶出した後、SDS ゲル電気泳動法で分画する。銀染色法で染色後、目的のタンパク質を、質量分析法により同定する。

4. 研究成果

(1) LubX の C 末端ドメイン (CTD) が LubX の凝集に必須である。

精製した全長 LubX タンパク質は凝集をおこす。LubX の精製過程において、C 末端が欠失していると考えられる LubX 分解産物が同時に精製でき、この分解産物は溶液中でモノマーであった。この分解産物を質量分析法により同定したところ、C 末端側 25 アミノ酸が欠失していた。さらに、この C 末端 25 残基を欠失する LubX (LubX ΔC) の発現系を構築し、精製したところ、予想通り凝集を起さず、モノマーとして挙動した。従って、LubX の凝集に必須な領域が C 末端 25 アミノ酸の領域 (CTD) に存在することが明らかになった。

LubX ΔC は、Dot/Icm T4SS による輸送活性も消失することから、CTD には分泌シグナルもコードされている。分泌シグナルと凝集活性が独立のものであるかどうかは今後の課

題であるが、これまでに解析されたレジオネラエフェクターではこのような現象は報告されていない。凝集を起こすと T4SS の基質にはなれないため、LubX には凝集を回避するためのシャペロンが存在する可能性が考えられた。T4SS では基質エフェクターに特異的に働く輸送シャペロンはほとんど知られていないため、LubX に結合するレジオネラタンパク質の探索を行った。

(2) LubX に結合するレジオネラタンパク質の探索

GST ブルダウン法により、LubX と結合するレジオネラタンパク質の探索を行った。精製 GST, GST-LubX, GST-LubX Δ C と共沈するレジオネラタンパク質を野生型レジオネラ溶菌液から分離し、GST では共沈しないが、GST-LubX, GST-LubX Δ C のいずれかで共沈するタンパク質を候補として、質量分析法により同定を行った。その結果、GST-LubX とは共沈するが GST-LubX Δ C とは共沈しないタンパク質が 3 種、GST-LubX, GST-LubX Δ C いずれのタンパク質とも共沈するが、GST とは共沈しないタンパク質を 3 種同定した。

① GST-LubX とは共沈するが GST-LubX Δ C とは共沈しないタンパク質

これらのタンパク質は LubX の CTD に特異的に結合する可能性と、GST-LubX が凝集を起こすことから、凝集タンパク質に非特異的に結合する可能性の両者が考えられる。同定したタンパク質のうち二つは、ハウスキーピングタンパク質であり、後者の可能性が考えられた。残る一つは高発現している外膜タンパク質 Momp であり、これもシャペロンとは考えられないため、以降の解析から除外した。

② GST-LubX, GST-LubX Δ C いずれのタンパク質とも共沈するが、GST とは共沈しないタンパク質

この分類でも、同定したタンパク質のうち二つは、ハウスキーピングタンパク質であり、解析から除外した。残る一つは、LubX とは別のエフェクターであった。

この探索では、当初の目論見であった LubX 特異的シャペロン、あるいは T4SS 構成タンパク質は同定できなかった。しかしながら、LubX が宿主細胞内で機能を発揮する E3 リガーゼであることから、この探索で分離されたエフェクターとの結合には生物学的意義があると考えられた。

(3) エフェクターを制御するエフェクター：メタエフェクターの発見

このエフェクターと LubX との結合を詳細

に検討した結果、LubX の基質結合ドメインである Ubox2 に特異的に結合した。そこで *in vitro*, *in vivo* 実験で検討したところ、このエフェクターが LubX の基質としてポリユビキチン化を受けることが明らかとなった。感染細胞中ではまず LubX のターゲットとなるエフェクターが輸送され一時的に蓄積する。感染後 LubX の発現・輸送が誘導されるに伴ない、宿主細胞内レベルが LubX および宿主プロテアソーム活性に依存した形で減少し、感染 8 時間後には消失する。つまり、LubX はこのエフェクターを時間的に制御するエフェクターであることが明らかになった。エフェクターをターゲットとするエフェクターはこれまで全く知られておらず、我々はこのようなエフェクターをメタエフェクターと呼ぶことを提唱している。

メタエフェクターの発見は、これまでのエフェクターの定義を打ち破り、発展させるものである。近年、多くの病原菌が多数のエフェクターを持つこと、また E3 リガーゼ活性を持つエフェクターが多数同定されてきている。メタエフェクターによるエフェクターの時間的・空間的制御は、おそらく病原菌による病態発現において、普遍的にみられる現象ではないかと考えている。

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 1 件)

- ① Tomoko Kubori, Akihiro Hyakutake and Hiroki Nagai. *Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions.* *Mol. Microbiol.* 67: 1307-1319 (2008). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Tomoko Kubori. Effector regulating effector: A *Legionella pneumophila* metaeffector that temporally regulates proteasomal degradation of another effector in the host cytosol. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 9, 2009, Awaji, Japan.
- ② Tomoko Kubori, Naoaki Shinzawa, Hirotaka Kanuka, and Hiroki Nagai. Effector regulating effector: A *Legionella pneumophila* metaeffector that temporally regulates proteasomal degradation of another effector in the

host cytosol. Gordon Research Conference “Microbial Adhesion & Signal Transduction”, July 26-30, 2009, New Port RI, USA

- ③ 永井 宏樹 レジオネラ Dot/Icm IV 型分泌系により輸送されるエフェクターの時間的制御 第 82 回日本細菌学会総会ワークショップ、2009 年 3 月 14 日、名古屋
- ④ 久堀 智子, 永井 宏樹, Temporal regulation of a Legionella effector directed by a bacterial E3 ubiquitin ligase, 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12 日, 名古屋
- ⑤ Hiroki Nagai, The Dot/Icm Type IV secretion system and effector proteins. Mexico-Japan Workshop “Bacterial Physiology and Biophysics”, Feb 2009, Mexico City, Mexico.
- ⑥ Hiroki Nagai, A Legionella E3 ubiquitin ligase and its function in infected host cells. INRA-JSPS workshop “Molecular Dialogue of bacteria with the host” Jan. 2009, Paris, France.
- ⑦ Tomoko Kubori, Akihiro Hyakutake, Hiroki Nagai. A Legionella E3 ubiquitin ligase and its function in infected host cells. Current Trends in Biomedicine Workshop “Bacterial TypeIV Secretion Systems in Human Disease”, Oct. 2008, Baeza, Spain.
- ⑧ Tomoko Kubori, Hyakutake Akihiro, Hiroki Nagai. A Legionella E3 ubiquitin ligase and its function in infected host cells. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 9, 2008, Awaji, Japan.
- ⑨ Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Akihiro Hyakutake Molecular analysis of Legionella type IV effectors. 第 81 回日本細菌学会総会国際シンポジウム、2008 年 3 月、京都
- ⑩ Tomoko Kubori and Hiroki Nagai, Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 4, 2007, Awaji, Japan.

〔産業財産権〕

なし。

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(平成 20 年度)

永井 宏樹 (HIROKI NAGAI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号: 80222173

(平成 19 年度)

久堀 智子 (Tomoko Kubori)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号: 20397657

(2) 研究分担者

(平成 19 年度)

永井 宏樹 (HIROKI NAGAI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号: 80222173

(3) 連携研究者

なし。