

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713016

研究課題名(和文) レジオネラ菌の細胞内感染経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of intracellular pathogenic pathway of Legionella pneumophila

研究代表者

新崎 恒平 (Arasaki, Kohei)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：70609990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、1：細胞内に侵入したレジオネラは小胞体に向かう過程においてLCV上でRab33b-Rab6カスケードを利用することを見だし、Rab33bをLCVに供給するエフェクターの候補因子を同定した。2：ファゴサイトーシスで細胞に取り込まれたレジオネラはLCVのリソソームへの輸送を遮断する。その際に、レジオネラはRab5をユビキチン依存的に分解することを見だし、E3ライゲース様エフェクターを同定した。3：LCVはERとの融合において滑面小胞体より侵入し粗面小胞体で増殖することを見だし、滑面から粗面への移行に必要な宿主因子を同定した。また、本因子を制御するエフェクター候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we demonstrated following three things. 1: Legionella manipulates Rab33b-Rab6 cascade to escort LCV to the host ER and we identified the candidate effectors that recruits Rab33b to the Legionella containing vacuole (LCV). 2: After internalization into host cells, Legionella blocks delivery of LCV to the lysosomal compartment. In this process, Legionella degrades Rab5 by ubiquitin dependent manner and we identified E3 ligase like effector against Rab5. 3: It is known that Legionella replicates inside host ER. In this process, we demonstrated that Legionella first associates and fuses with smooth ER to evade host ER. Subsequently, Legionella moves to rough ER and starts to replicates. In this traffic, we identified the host protein that requires traffic of Legionella from the smooth to the rough ER. Furthermore, we also identified the candidate effector that subverts this host factor.

研究分野：感染症学

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

1. 研究開始当初の背景

レジオネラは重篤な肺炎を引き起こすグラム陰性細菌である。主な感染経路は、レジオネラにより汚染された水源より発生するエアロゾルの吸引が挙げられ、我が国でも温泉や加湿器による感染・死亡事例がマスコミにより報道されるなど、楽観することができない感染症の一つである。肺に到達したレジオネラは、肺胞内マクロファージにファゴサイトーシスを介して侵入する。その後、*Legionella* containing vacuole (LCV)と呼ばれる膜構造を形成する。通常、ファゴサイトーシスで取り込まれた物質はリソソームへと輸送され分解される。しかし、レジオネラは LCV をリソソームへと輸送する過程を阻害する。一方、LCV には宿主小胞体より出芽した小胞 (ER 小胞) が供給され、その膜構造が変化する。この膜構造の変化により LCV はレジオネラの増殖の場となる小胞体との融合を可能とする。これら一連の感染過程では、レジオネラから分泌装置である Dot/Icm 装置を介して宿主細胞に対して放出される「レジオネラエフェクター」と呼ばれる多くのタンパク質群が重要な役割を担っている。LCV が ER 小胞を取り込む分子機構においては、その過程に働くレジオネラエフェクターが同定されるなど、その全体像が明らかになりつつある。また、レジオネラエフェクターには宿主細胞のタンパク質に対して宿主細胞には存在しないバクテリア特異的な修飾を加える分子も多く存在しており、世界中の研究者がレジオネラエフェクターの機能解析にしのぎを削っている。しかしながら、レジオネラの細胞内感染経路には不明な点も多く残されていることも事実である。ER 小胞を取り込んだ LCV が、その後どのように小胞体に向かうのか。レジオネラが小胞体へと侵入する過程において LCV は小胞体のどのドメインと融合し、そしてどのドメインで増殖するのか。また、LCV はどのような分子機構によりリソソームへの輸送を阻害しているのか、など未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

背景の項において記載したが、レジオネラの細胞内感染経路には未だ解明されていない点が多く残されている。不明な点としては、1: ER 小胞を供給し膜構造を変換させた LCV がどのような分子機構により小胞体へと向かうのか、2: 小胞体に到達した LCV は、小胞体のどのドメインと融合し、また、レジオネラは小胞体のどのドメインにおいて増殖するのか、3: ファゴサイトーシスにより細胞内に侵入したレジオネラが、どのような分子機構により LCV がリソソームへと輸送される過程を阻害しているのか、などが挙げられる。そこで、本研究では、上記した 1-3 のテーマに関わる宿主側の因子の同定を行なうことを第一の目標とし、これらの機構を制御するレジオネラエフェクターの同

定を最終目標とする。これらの解析を通じて、レジオネラによる細胞内感染経路の全容が明らかにできることが期待される。

3. 研究の方法

研究の方法に関しては、1-3 のテーマごとに記載する。

1: 小胞体へと向かう輸送過程には低分子量 GTP 結合タンパク質である Rab6 や Rab33b が関わっている。そこで、Rab33b や Rab6 が LCV ヘリクルートされるのかを観察する。また、Rab33b や Rab6 の発現抑制及び活性化型 (GTP 型)・不活性化型 (GDP 型) 変異体の発現が LCV の小胞体への到達に与える影響やレジオネラの細胞内増殖に与える影響を評価する。また、当該 Rab タンパク質を LCV にリクルートするレジオネラエフェクターは island 欠損レジオネラ変異株を用いたスクリーニングにより同定する。レジオネラエフェクターは 15-30 種類程度がレジオネラゲノム上の island にまとまってコードされている。それゆえ、ある island の欠損株においてレジオネラ感染で見られる現象が消失した場合には、その現象に関わるレジオネラエフェクターが当該 island にコードされていることを意味しており、容易かつ迅速にレジオネラエフェクターが同定できる。

2: 感染時間に応じて滑面小胞体及び粗面小胞体に局在するレジオネラの割合を評価する。また、細胞内で増殖しているレジオネラと滑面小胞体及び粗面小胞体との局在比較も合わせて行なう。レジオネラは小胞体で増殖する過程において、小胞体内を移動している可能性が考えられる。そこで、小胞体内の辺縁部 (滑面小胞体) と核近傍 (粗面小胞体) を循環する受容体様膜タンパク質として知られている Bap31 が LCV に集積するかを観察する。また、Bap31 の発現抑制がレジオネラ感染に与える影響も合わせて評価する。以前行なわれた解析では、小胞体内で増殖しているレジオネラの周辺にリボソームが付着していることを明らかにしている。すなわち、レジオネラは粗面小胞体で増殖している可能性が考えられることから、粗面小胞体の形態維持に重要な役割を担っている CLIMP-63 と増殖したレジオネラとの局在比較や CLIMP-63 の発現抑制がレジオネラ増殖に与える影響を調べる。更に、これら宿主側の因子をレジオネラが利用していることが明らかになった場合、上記 1: で記載した island 欠損変異株を用いて当該因子の機能制御に働くレジオネラエフェクターを同定する。

3: ファゴサイトーシスにより取り込まれた異物をリソソームへと輸送する過程において重要な役割を担っている分子が Rab5 である。そこで、野生型及びレジオネラエフェクターが放出できない変異株の感染によって Rab5 にどのような影響があるのかを解析する。また、野生型のレジオネラ感染特異的に Rab5 に何らかの影響が見られた場合は、その

影響に関わるレジオネラエフェクターを上記1：に記載した island 欠損変異株を用いたスクリーニングにより同定する。同定後は、当該レジオネラエフェクターの機能解析や当該レジオネラエフェクターの遺伝子破壊株の感染への影響などを評価する。

4. 研究成果

1: LCV の小胞体への輸送機構

細胞内の膜輸送経路において、Rab タンパク質が重要な役割を担っている。種々の輸送小胞に特異的な Rab タンパク質が局在化することにより小胞輸送の特異性を担保している。小胞体への輸送は主にゴルジ体からの輸送経路によって媒介されており、その過程に寄与する Rab タンパク質が Rab6、Rab33b である。それゆえ、LCV が小胞体へと輸送される過程において Rab6 や Rab33b が利用される可能性が考えられる。そこで、レジオネラ感染時間依存的な Rab6 や Rab33b の局在を解析したところ、感染 2-4 時間にかけて Rab6 及び Rab33b が LCV に集積していることを見いだした。この感染 2-4 時間というタイムコースは ER 小胞を取り込み膜構造が変化した LCV が小胞体へと向かう時間であることから、レジオネラは LCV の小胞体への移行に際して、Rab6 や Rab33b を利用していることが強く示唆された。そこで、Rab6 や Rab33b の機能阻害（発現抑制や不活性化型変異体の発現）がレジオネラ感染に与える影響を調べた。その結果、Rab6 や Rab33b の機能阻害は LCV が小胞体へと到達する時間に著しい遅延を引き起こし、レジオネラの細胞内増殖を抑制することを明らかにした。なお、Rab6 や Rab33b の機能を阻害した細胞においても LCV への ER 小胞の供給は問題なく進行していたことから、Rab6 及び Rab33b は小胞体への移行に特異的に働いている。それでは、レジオネラの感染には Rab6 及び Rab33b が独立して必要なのか？または、Rab6 と Rab33b には相関性があるのか？という疑問が生じる。その疑問に答えるために片方の Rab タンパク質の機能阻害がもう片方の Rab タンパク質に与える影響を解析した。Rab6 を発現抑制している細胞における Rab33b の LCV へのリクルートには影響は観察されなかった。しかしながら、Rab33b を発現抑制した細胞では LCV に供給される Rab6 が顕著に減少していた。この結果より、LCV 上では Rab33b に依存して Rab6 がリクルートされるという Rab33b-Rab6 カスケードが存在していることも明らかになった。Rab タンパク質の一部は標的膜側の t-SNARE 複合体と相互作用することにより、輸送小胞と標的膜との効率的な融合に働くことが知られている。それゆえ、Rab6 も小胞体側の t-SNARE 複合体 (syntaxin 18(Stx18)複合体) と相互作用する可能性が考えられる。そこで、野生型及びレジオネラエフェクターが分泌できない変異型のレジオネラ感染下における Rab6 と Stx18 複合体との結合状態を解析

したところ、野生型のレジオネラ感染特異的に Rab6 と Stx18 複合体の相互作用が増強していることが見いだされた。これらの結果より、レジオネラは LCV を小胞体へと輸送する過程において Rab33b-Rab6 カスケードを利用し、その後 Rab6 と Stx18 複合体との相互作用を介して LCV と小胞体との効率的な融合を促進していることを明らかにした。更に、研究方法 1：に記載した island 欠損変異レジオネラ株を用いた感染実験より、Rab33b が LCV に集積しない island を同定した。現在までに、本 island にコードされるレジオネラエフェクターから Rab33b の LCV への供給に関わる可能性がある 2 分子までの絞り込みまで完了している。

2: LCV と融合する小胞体ドメイン及びレジオネラの増殖に必要な小胞体ドメインの決定

小胞体内で増殖したレジオネラの周辺部にリボソームが付着していることから、レジオネラは粗面小胞体で増殖していることが示唆されている。しかし、小胞体に到達したレジオネラはダイレクトに粗面小胞体に侵入するのか？それとも、他のドメインより侵入した後に粗面小胞体へと移行してくるのか？は不明である。そこで、感染時間に応じた滑面及び粗面小胞体に局在するレジオネラの割合を定量した。その結果、レジオネラは小胞体に定着化する過程において、滑面小胞体より侵入した後に粗面小胞体へと移行し増殖していることを明らかにした。では、この移行を制御する宿主因子は何なのかということが次の疑問となる。その際に着目した分子が Bap31 である。Bap31 は小胞体に局在する受容体型膜タンパク質であり、細胞の辺縁部(滑面小胞体)と核近傍(粗面小胞体)を循環することができる分子である。それゆえ、Bap31 がレジオネラの小胞体内循環を制御する因子である可能性が考えられる。

先ず、Bap31 が小胞体に到達したレジオネラの周辺部に集積していることを確認した後に、Bap31 の機能阻害がレジオネラの小胞体内循環に及ぼす影響を調べた。その結果、Bap31 を発現抑制している細胞では小胞体に到達したレジオネラが滑面小胞体に留まったままであることが明らかになった。更に、island 欠損レジオネラ変異株を用いたスクリーニングにより、Bap31 を集積させるレジオネラエフェクター候補を同定している。更に、レジオネラは粗面小胞体において増殖している可能性が推測されていることから、粗面小胞体の機能がレジオネラの増殖に必要なのかを調べた。CLIMP-63 は粗面小胞体に局在し、粗面小胞体内腔側に適切なスペースを作り出す機能を介して粗面小胞体の形態と機能維持に重要な役割を担うタンパク質である。そこで、CLIMP-63 の発現抑制がレジオネラの増殖に与える影響を調べたところ、予想通り CLIMP-63 の発現抑制はレジオネラの増殖を阻害した。次に小胞体内で増殖

したレジオネラと CLIMP-63 との局在比較を検討したところ、CLIMP-63 が増殖したレジオネラの周辺部に特異的に集積していることを見いだした。重要なポイントとしては、他の粗面小胞体局在タンパク質では、このような集積が見られないことから、レジオネラは粗面小胞体で増殖する過程において CLIMP-63 のスペースを作り出す機能を都合良く利用している可能性を示唆している。現在、CLIMP-63 の機能を制御するレジオネラエフェクターの同定を目指している。

3 : LCV のリソソーム輸送阻害機構の解明

ファゴサイトーシスとは、取り込んだ細胞外の異物をリソソームへと輸送することで分解する機構である。レジオネラの宿主細胞の侵入はファゴサイトーシスによって媒介されているが、レジオネラは LCV をリソソームへと輸送する過程を遮断することができる。しかしながら、その過程に関わるレジオネラエフェクターや分子機構などの詳細は未だに不明である。本機構の解析に際して着目した分子が Rab5 である。Rab5 はファゴソームをリソソームへと輸送する過程において必須な役割を担っており、レジオネラは細胞内感染経路において Rab タンパク質を利用するケースが多いことから、レジオネラ感染が Rab5 に及ぼす影響から解析をスタートした。先ず、Rab5 を発現させた細胞に野生型及び dotA 変異型 (レジオネラエフェクターが分泌できない変異体) レジオネラ株を感染させ、Rab5 の LCV への集積を観察した。dotA 変異型のレジオネラを含む LCV には Rab5 の集積が観察されたが、野生型においては Rab5 の集積が完全に消失していた。それゆえ、レジオネラは何らかのレジオネラエフェクターを利用することで、Rab5 を LCV より除去している可能性が推測される。次に免疫沈降を用いて Rab5 と結合するレジオネラエフェクターの探索に着手した。当初は、野生型のレジオネラ感染依存的に Rab5 と結合するタンパク質が得られることを期待していたが、有意な結合タンパク質を示すバンドは得られなかった。しかしながら、野生型のレジオネラを感染させた場合においてのみ、Rab5 の免疫沈降後のレーンがスメア状のパターンとして検出された。このスメア状のパターンはタンパク質がユビキチン化した際に検出されることから、上記した免疫沈降サンプルに対して抗-ユビキチン抗体によりイムノプロットを行なったところ、有意な反応を示した。これらの結果より、野生型のレジオネラは Rab5 をユビキチン化することで、LCV より除去している可能性が考えられる。ユビキチン化は細胞内でのタンパク質分解に寄与していることから、高濃度のレジオネラを感染させタイムコース依存的な Rab5 のタンパク質量を解析したところ、野生型の感染においてのみ Rab5 の減少が確認された。また、この減少はプロテアソーム阻害剤である MG132 処理により抑制できることから、レジオネラは

Rab5 をユビキチン化依存的に分解することで LCV のリソソームへの移行を遮断していることが強く示唆された。それでは、Rab5 のユビキチン化に働くレジオネラエフェクターは何かという点が次の疑問となる。そこで、種々の island 欠損変異レジオネラ株を用いた感染実験を行なったところ、Rab5 のユビキチン化が起こらない変異株を見いだした。当該変異株の island には約 20 個のレジオネラエフェクターがコードされている。そして、その中に E3 ライゲース活性ドメインを有すると推測される分子が 1 つ含まれていた。あるタンパク質に対するユビキチン化は基質と E3 ライゲースの特異性により担保されていることを考慮すると、本エフェクターが Rab5 をユビキチン化する責任分子であると考えられる。そこで、本エフェクターのみを欠損させたレジオネラを細胞に感染させたところ、Rab5 のユビキチン化が顕著に抑制された。また、本エフェクターのみを細胞に発現させるだけで、Rab5 のユビキチン化が亢進した。更に、E3 ライゲース活性に重要な保存されたドメイン内に変異を導入すると Rab5 のユビキチン化が抑制されることも見いだした。これらの結果より、レジオネラは Rab5 をユビキチン化するレジオネラエフェクターを介して Rab5 を分解することで LCV のリソソームへの輸送を阻害していることを明らかにした。現在、当該レジオネラエフェクター欠損が細胞内増殖に与える影響や精製タンパク質を用いた *in vitro* による Rab5 ユビキチン化機構の解析を行なっている。

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 10 件)

主要論文

Arasaki K., and Tagaya M. *Legionella* blocks autophagy by cleaving STX17 (syntaxin 17). *Autophagy*, (査読あり), **13**, 2017, 2008-2009. doi: 10.1080/15548627.2017.1371395.

Arasaki K., Mikami Y., Shames SR., Inoue H., Wakana Y., and Tagaya M. *Legionella* effector Lpg1137 shuts down ER-mitochondria communication through cleavage of syntaxin 17. *Nature Communications*, (査読あり), 2017, e15406. doi: 10.1038/ncomms15406.

〔学会発表〕(計 21 件)

主要発表

新崎恒平、多賀谷光男 小胞体-ミトコンドリア接触部位における syntaxin 17 の多彩な生理機能 第 90 回 日本生化学会大会 2017 年 12 月 神戸ワークショップ (招待講演)

新崎恒平 レジオネラは syntaxin 17 の分解を介して宿主防御機構を回避する。第100回 日本細菌学会関東支部総会 2017年9月 東京 シンポジウム(招待講演)

新崎恒平、三上優美、James Havey、Stephanie Shames、Craig Roy、多賀谷光男 Legionella effector Lpg1137 shuts down ER-mitochondria communication through cleavage of syntaxin 17 第90回 日本細菌学会総会 2017年3月 仙台 ワークショップ

新崎恒平、川端美緒、加藤郁子、多賀谷光男 レジオネラ菌感染に関わる Rab タンパク質の同定及びレジオネラ菌の小胞体定着化機構 第88回 日本細菌学会総会 2015年3月 岐阜 シンポジウム(招待講演)

新崎恒平、川端美緒、野内優、多賀谷光男 レジオネラ菌の宿主小胞体への移行及び定着化の機構 第87回 日本生化学会大会 2014年10月 京都 シンポジウム(オーガナイザー)

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

〔図書〕(計1件)

〔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・講師
研究者番号：70609990

(2)研究分担者

()