

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14724

研究課題名(和文)ゼノファジーを誘導するユビキチン脂質結合の可能性

研究課題名(英文)The possibility of lipid-ubiquitin conjugation associated with xenophagy

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) 2,800,000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、レジオネラ内包液胞上のユビキチン集積の解析から、従来タンパク質のみが標的であると考えられてきたユビキチン修飾反応において脂質結合という新たな反応様式の可能性を見出した。ラテックスビーズを細胞内に導入することで細菌感染を模した実験系から、ビーズ上のユビキチンが脂質修飾されていると考えられる結果を得た。また化学合成した特定の脂質を含むリポソームを用いた反応系により、レジオネラエフェクターの一つがリポソームへのユビキチン結合を担う酵素活性を持つ可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン修飾系は様々な局面で細胞内システムを文字どおり支配する重要な反応系である。従来、ユビキチン修飾の標的はタンパク質のみであると信じられてきた。一方、オートファジーに必須なユビキチン様タンパク質である LC3は脂質に結合することが広く知られている。我々は病原細菌を用いた感染実験を通じてユビキチンが脂質に共有結合する可能性を見出した。本研究課題ではリポソーム反応系などを用いてその可能性を確認するとともに、その活性を担う可能性を持つ新たな酵素を見出した。仮説の証明はユビキチン反応系の常識を塗り替える新たな概念の創出につながり、ユビキチンが介在する様々な疾患の予防や治療への基盤提供をもたらす。

研究成果の概要(英文)：Legionella is a Gram-negative bacterial pathogen that can deliver a large array of effector proteins into host eukaryotic cells to manipulate various cellular systems including the ubiquitin modification. Ubiquitin is known to conjugate exclusively with proteins. However, our analyses of ubiquitin accumulated on the bacterial vacuole raised the possibility of lipid-ubiquitin conjugation. By transfection of HeLa cells with latex beads, which mimics bacterial infection, we found that ubiquitin accumulated on the beads were subjected to modification. In order to examine the covalent binding of ubiquitin with lipid, we established the chemical synthesis of liposomes with combination of lipids. The result of in vitro analysis using Legionella effector proteins and the liposomes suggested that a bacterial ubiquitin ligase mediates the ubiquitin-lipid conjugation. Taken together, we raised the possibility of the non-canonical form of ubiquitin conjugation.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：ユビキチン エフェクター 脂質結合 液胞 病原細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

レジオネラやサルモネラなどの細胞内寄生性の細菌による感染においては、通常細菌の侵入に伴ってファゴソームが形成される。細菌を包むファゴソームは感染後時間経過とともに増殖のニッチとなる固有の液胞へと変換されていく。この過程において、細菌内包液胞の周りにはしばしばユビキチンの集積が認められ、宿主オートファジーマシナリーの認識シグナルとなると考えられている。レジオネラが宿主細胞に輸送するエフェクタータンパク質の中で、RavZ はユビキチン様タンパク質である LC3 とオートファゴソーム前駆体膜上のリン脂質分子のひとつフォスファチジルエタノールアミン (PE) との間の共有結合を不可逆的に切断する酵素活性を持つことが示されている。私たちは、細菌内包液胞へのユビキチン集積を解析する途上で、RavZ が LC3 のみならず液胞に集積するユビキチンの除去にも機能することを見出した (Kubori *et al.*, *Front Cell Infect Microbiol.*, 2017)。この結果が示す可能性のひとつとして、ユビキチンが脂質というタンパク質以外の標的に対しても共有結合することが考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでタンパク質のみが修飾反応の対象であると考えられてきたユビキチン反応系において、ユビキチンと脂質との共有結合が存在する可能性を検証する。可能性が確認できれば、その反応を担うユビキチンリガーゼの同定を試みる。これらの結果を統合し、ユビキチン反応系の基本原理に対して新たな概念の提起を行うことを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 脂質であるトランスフェクション試薬でコートされたラテックスビーズを細胞に導入することで細菌感染を模擬した実験系を用い、ビーズに集積するユビキチンに対する脂質修飾の有無を電気泳動法、質量分析法などで解析する。

(2) 様々な組成のリポソームを化学合成し、細胞抽出液あるいは特定の酵素を含む組成で *in vitro* のユビキチン化反応を行う。その後、リポソーム画分を回収してユビキチン修飾の有無を生化学的に解析する。

(3) 予備的解析からユビキチン切断にも関与する可能性のある RavZ をリポソーム反応系に作用させて、ユビキチン切断反応が起こるかどうかを検証する。

(4) 脂質へのユビキチン結合を証明するために、その反応に関わる E3 ユビキチンリガーゼの同定を試みる。真核細胞あるいは細菌由来の E3 リガーゼを用いてリポソーム反応系での *in vitro* ユビキチン化反応から、候補タンパク質を見出す。

## 4. 研究成果

(1) トランスフェクションでラテックスビーズを HeLa 細胞に導入し、細菌感染を模擬する実験系の確立に成功し、ビーズへのユビキチンの集積が蛍光顕微鏡法により確認できた (図 1)。細菌感染時には細菌内包液胞の膜破綻がトリガーとなってユビキチンが集積することがこれまでに報告されているが、ビーズ導入の系でもビーズ内包液胞(ビーズファゴソーム)の破綻を示す

Galectin8 (Gal8) などのガレクチンがユビキチン陽性ビーズに検出された (図 1A)。さらにビーズファゴソームへの LC3 の集積も観察された。LC3 及びユビキチンのビーズファゴソームへの集積が活性型 RavZ の存在により影響を受けるかどうかを解析するために、RavZ の野生型及び活性変異型 (C258A) を HeLa 細胞に発現させ解析を行ったところ、変異型に比べて野生型 RavZ の発現によって LC3 のみならず、ユビキチンのビーズへの集積も減弱することがわかった (図 1B)。この結果は細菌内包液胞へのユビキチン集積に対する RavZ の作用がビーズトランスフェクションの系においても確認できたことを示す。

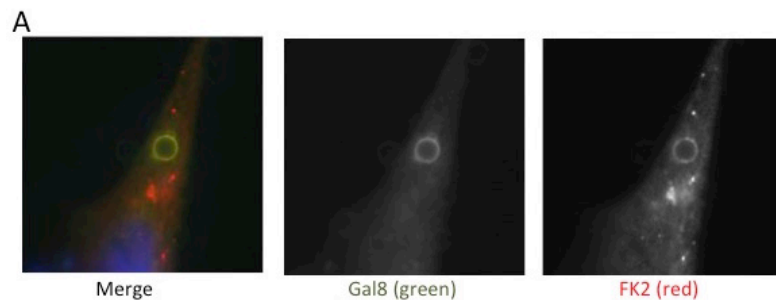
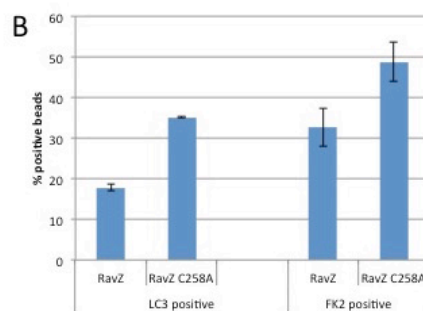


図1 トランスフェクションでラテックスビーズを HeLa 細胞に導入し、細菌感染を模擬した実験システム。(A) ビーズを内包する液胞の周りがユビキチンで修飾されていることがユビキチン抗体 (FK2) による染色から確認された。ユビキチン陽性のビーズは液胞の破綻を示す Galectin のリクルートメントを伴うことがある。(B) ユビキチン (FK2) 陽性のビーズは活性型 RavZ 存在下で非活性型 (C258A) 存在下と比較して減弱した。



(2) HeLa 細胞にトランスフェクションでビーズを導入後、ビーズファゴソームをショ糖密度

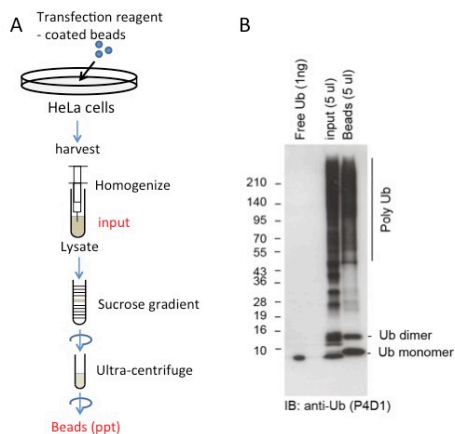


図2 (A) ビーズファゴソームの単離方法の模式図。(B) 細胞抽出液中(input)とビーズファゴソーム上(Beads)のユビキチンの電気泳動上での移動度を比較した。

勾配遠心法で単離し(図2A)、その画分に存在するユビキチンが修飾を受けている可能性があるかどうかを解析した。細胞抽出液(ビーズファゴソーム単離プロセスにおけるinput)中のユビキチンモノマーや精製ユビキチンと比較して、ビーズファゴソーム画分中に存在するユビキチンモノマーは電気泳動上での移動度に差が認められた(図2B)。この結果は、ユビキチンが脂質修飾を受けている可能性を示唆するものであると考えている。どのような修飾を受けているかを質量分析法で解析することを計画していたが、高純度での精製が困難であったため、同定に至っていない。

(3) 複数の脂質を組み合わせてリポソームを化学合成した(未発表データであるため、脂質の種類は記載しない)。レジオネラの保有するエフェクタータンパク質の中でユビキチンリガーゼであることを確認しているタンパク質 LpX, LpY を加えた *in vitro* ユビキチン化反応を行った。この際に、当該 E3 ユビキチンリガーゼに対して作用することを確認している E2 酵素、及びユビキチン、E1 を加えて反応を行った。この反応を行う際に化学合成したリポソームを加え、反応後にリポソーム画分を Opti-prep 密度勾配遠心法で分離して、リポソームにユビキチンが結合しているかどうかを解析した(図3A)。その結果、LpY 存在下で生成されたポリユビキチン鎖がリポソーム画分に認められたが、LpX により生成されたポリユビキチン鎖は認められなかった。さらに LpY はリポソーム画分中に検出され、LpX は検出されなかった。この結果から、LpY はタンパク質だけでなく脂質を基質としてもユビキチン修飾を行う E3 リガーゼである可能性が考えられた(図3A)。また、ユビキチンがリポソームと結合しうるかどうかを解析するため、クロスリンカーを用いた結合解析を行った。その結果、リポソームと反応させたユビキチンの電気泳動上での移動度のシフトが認められた(図3B)。リポソーム画分に存在するポリユビキチン鎖が RavZ 存在下で減弱するかどうかの解析も行ったが、現在のところ再現性のある結果は得られていない。

以上の結果から、完全な証明には至らないものの、ユビキチンは脂質に結合し得るものであり、病原細菌の持つエフェクタータンパク質の中にその反応を触媒する可能性のあるユビキチンリガーゼを見出すことができた。今後、もしユビキチンを脂質に共有結合させるユビキチンリガーゼの存在が証明できれば、ユビキチン反応系においてかつて想定されていなかった新たな反応機構があることが示され、細菌の感染機構を通じて、新たな概念をユビキチン研究領域に提示する結果となると考えている。さらに、細菌感染によって操作されるユビキチン反応系への理解によって、細菌感染に伴う疾病や、ユビキチンが介在する様々な疾患の予防や治療への道筋を与えるための基盤となる情報を提供することができる。

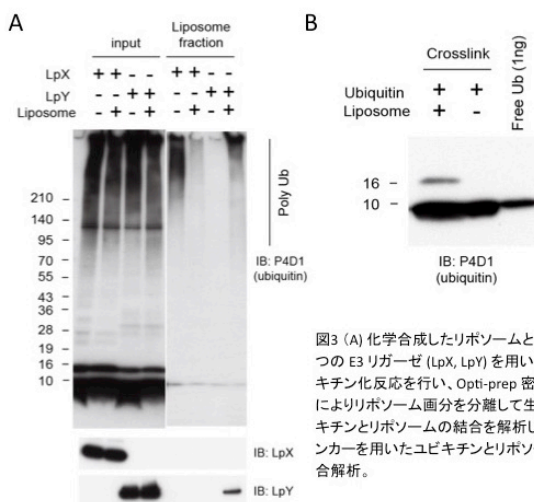


図3 (A) 化学合成したリポソームとレジオネラの2つのE3リガーゼ(LpX, LpY)を用いて *in vitro* ユビキチン化反応を行い、Opti-prep 密度勾配遠心法によりリポソーム画分を分離して生成したポリユビキチンとリポソームの結合を解析した。(B) クロスリンカーを用いたユビキチンとリポソーム成分との結合解析。

## 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>