

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15145

研究課題名(和文)COPI小胞を操作するレジオネラエフェクターの解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Legionella effector protein manipulating COPI vesicles

研究代表者

北尾 公英(安藤公英)(Kitao, Tomoe)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80462787

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):病原細菌レジオネラは、IV型分泌装置を介して約300ものエフェクタータンパク質を宿主に輸送することにより小胞体(ER)膜由来の液泡(LCV)を構築し感染を確立する。本研究では、宿主COPI小胞と相互作用するレジオネラエフェクターLotBの機能解析を通して、(1)宿主v-SNARE Sec22bがレジオネラ感染初期にユビキチン化されること、(2)感染後期になるとそのユビキチン化修飾がLotBによって解除されること、(3)LotBによるSec22bの脱ユビキチン化は感染初期にLCV上に形成されたSec22b-Stx3間のSNAREペアリングの解除を促進すること、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

レジオネラ感染において重要な役割を担うエフェクタータンパク質の機能を解明すること、ならびに、エフェクタータンパク質を宿主に輸送するIV型分泌装置の機能を解明することは、レジオネラ感染を制御する新たな治療法開発に役立つ。本研究課題では、機能未知レジオネラエフェクタータンパク質Lpg1621の機能解析を通してレジオネラ感染におけるLCV構築メカニズムの一端を解明することができた。

研究成果の概要(英文):The intracellular bacterial pathogen *L. pneumophila* uses many effector proteins delivered by the type IV secretion system to hijack the early secretory pathway to establish its replicative niche, known as the Legionella-containing vacuole (LCV). On LCV biogenesis, the endoplasmic reticulum derived v-SNARE Sec22b is recruited to the bacterial phagosome and forms non-canonical pairings with t-SNAREs from the plasma membrane. In this study we identified a Legionella deubiquitinase (DUB) LotB that could modulate the early secretory pathway by interacting with host COPI vesicles when ectopically expressed. Also we found that the Sec22b was ubiquitinated upon *L. pneumophila* infection, subsequently, LotB deconjugated K63-linked ubiquitins from Sec22b. The DUB activity of LotB stimulated dissociation of the t-SNARE syntaxin 3 from Sec22b, which resides on the LCV. Our study highlights a bacterial strategy manipulating the dynamics of infection-induced SNARE pairing using a bacterial DUB.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌感染 細胞内寄生 エフェクター 脱ユビキチン化酵素 SNARE 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

レジオネラは本来、淡水や土壌などの様々な環境中にいるグラム陰性細菌で、自然界ではアメーバを宿主とする。しかし、温泉施設や浴室、メンテナンスが行き届いていない加湿器などにも生息し、エアロゾルを介してレジオネラがヒト体内に入ると肺胞マクロファージ内で増殖し、免疫が低下した患者や高齢者などで重篤な肺炎を引き起こす。

本菌は自身の IV 型分泌装置を用いて約 300 ものエフェクタータンパク質を感染した宿主細胞に輸送することにより、宿主小胞輸送経路を操作し感染を確立する。レジオネラが細胞に侵入すると、細胞膜上にある SNARE タンパク質 syntaxin がレジオネラ初期ファゴソーム上に取り込まれ、小胞体由来の SNARE タンパク質 Sec22b との間に通常の細胞内ではみられない特殊な結合を形成することが知られる。この SNARE ペアリングと呼ばれる結合により、ファゴソーム膜が小胞体由来の膜で部分的に置き換わり、レジオネラ増殖に必要な液胞 (*Legionella*-containing vacuole: LCV) の構築が開始する。

しかしながら、この液胞がその後どのようなプロセスを経て小胞体を模倣したオルガネラ様構造体に変貌を遂げ、成熟 LCV が形成されるのかについて、詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

機能未知のレジオネラエフェクタータンパク質の機能解明を通して、レジオネラの宿主細胞内増殖に必要な LCV が構築される仕組み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

3.1. Lpg1621 (LotB) の機能特徴づけ

まず、Lpg1621 (LotB) タンパク質の膜貫通ドメインを除く脱ユビキチン化酵素をコードする領域 (LotB Δ TM) を精製し、*In vitro* Ub-PA アッセイおよび Di-Ub または PolyUb5 を用いた DUB アッセイを行った。これらのアッセイは、前述のように行った (Kubori et al. 2018)。Ub-PA アッセイについては、1 μ g の Ub-PA (UbiQ-057; UbiQ) を精製 LotB Δ TM タンパク質またはコントロール DUB タンパク質 (USP15; BML-UW9845-0100; Enzo) と混合した後、20 μ L の反応バッファー (50mM Tris-Cl pH7.5, 0mM NaCl, 5mM DTT) 中で 23°C で 1 時間インキュベートした。Di-Ub を用いた DUB アッセイでは、1 μ g の Di-Ub (UbiQ-L01; UbiQ) を反応バッファー中で LotB タンパク質と 37°C で 2 時間反応させた。polyUb5 を用いた DUB アッセイでは、0.20 μ L の 2 \times ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーを加え、95°C で 10 分間加熱して反応を停止させた。反応サンプルは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけて、銀染色でタンパク質を可視化した。

3.2. LotB と相互作用する宿主因子の同定と機能解析

3xFLAG タグ付き LotB タンパク質を HEK293T 細胞で発現させた後、抗 FLAG 抗体を結合したビーズ (WAKO) で免疫沈降した。サンプルはトリプシンで消化し、EASY-nLC 1000 システム (Thermo Fisher Scientific) と Q Exactive 質量分析機 (Thermo Fisher Scientific) を用いて LC-MS/MS で分析した。得られた MS データは、Proteome Discoverer 1.7 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Uniprot FASTA のヒトおよび *L. pneumophila* strain Philadelphia 1 のデータセットに対して処理した。

3.3. SEAP アッセイ

SEAP アッセイは、Berger および Qiu らと同様の方法で実施した (Berger et al., 1988; Qiu et al., 2016)。具体的には、LotB タンパク質をコードする pmGFP-LotB および SEAP をコードする pSEAP を HEK293T-Fc γ R2 にトランスフェクションし、24 時間後に細胞培養液 (10%

FBS を含む DMEM) を無血清 DMEM に交換した。さらに 24 時間培養した後、Tropix Phosphalight System Kit (T1015 ; Applied Biosystems 社) を用いて活性を測定した。SEAP 指数は、細胞外の SEAP 活性を細胞内の SEAP 活性で標準化することにより算出した。

3.4. VsvG アッセイ

pcDNA-VsvGts045-GFP を pmRFP-LotB あるいは pmRFP-LotB^{C29S} (酵素活性を持たない LotB をコードするプラスミド) と共に HEK-FcγRII 細胞にトランスフェクションし、40°C で 24 時間インキュベートした後、32°C でインキュベートすることにより、VsvGts045-GFP タンパク質の初期輸送経路における移動を観察した。細胞を抗 GM130 マウス抗体および Pacific Blue 標識抗マウス IgG で免疫染色し、蛍光顕微鏡で可視化した。

3.5. LotB による Sec22b の脱コピキチン化の確認

[実験 1] p3xFLAG-Sec22b をトランスフェクトした HEK293T-Fc RII 細胞に、野生型 *L.pneumophila* (Lp01)、*dotA* 変異株 (*dotA*)、*lotB* 変異株 (*lotB*)、*lotA* 変異株 (*lotA*) を感染させ、感染後 1 時間および 4 時間後の細胞から FLAG-Sec22b を免疫沈降し、抗 FLAG 抗体および抗コピキチン抗体を用いてイムノプロットングを行った。

[実験 2] p3xFLAG-Sec22b をトランスフェクトした HEK293T-Fc RII 細胞に、3xHA タグ付き LotB、LotBC29S、または LotB TM を発現する *lotB* 変異株を感染させ、感染後 1 時間および 4 時間後の細胞から FLAG-Sec22b を免疫沈降し、抗 FLAG 抗体および抗コピキチン抗体を用いてイムノプロットングを行った。

[実験 3] p3xFLAG-Sec22b をトランスフェクトした HEK293T-Fc RII 細胞に、*lotB* 変異株を MOI=20 で感染させた。感染から 1 時間後の細胞溶解液から、3xFLAG-Sec22b を抗 FLAG ビーズで免疫沈降させ、免疫沈降したタンパク質を 3xFLAG ペプチドで溶出させた後、精製した LotB または LotBC29S と 37 °C で 16 時間インキュベートした。サンプルは SDS-PAGE と抗 FLAG 抗体および抗コピキチン抗体によるイムノプロットングで分析した。

[実験 4] p3xFLAG-Sec22b をトランスフェクトした HEK293T-Fc RII 細胞に、野生型 (Lp01)、*dotA*、または *lotB* 株を MOI20 で感染させたのち、感染後 1 時間および 4 時間後の細胞溶解液から、ビオチン-K63 タンデムコピキチン結合体 (TUBE ; UM304 ; LifeSensors) およびストレプトアビジン結合ビーズ (28985738 ; GE ヘルスケアライフサイエンス) を用いて K63 結合ポリコピキチン化タンパク質を免疫沈降した。免疫沈降したサンプルは抗 FLAG 抗体および抗コピキチン抗体によるイムノプロットングで分析した。

3.6. LotB を介した脱コピキチン化による Sec22b からの Syntaxin3 の解離の観察

[実験 1] p3xFLAG-Sec22b をトランスフェクトした HEK293T-FcγRII 細胞に、3xHA タグ付き LotB または LotBC29S を発現する Δ*lotB* 変異株を感染させ、0.5、1、2、4 時間後に細胞溶解液を調整し、3xFLAG-Sec22b を (抗 FLAG ビーズを用いて) 免疫沈降させた。免疫沈降したタンパク質をイムノプロットングすることにより、Sec22b からの Stx3 の解離を観察した。Stx3 および Stx4 のバンドの強度は、ChemiDoc System Image lab ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて定量し、Lp01 感染 0.5 時間後の値で正規化して、イムノプロットングデータの下に表示した。数値は 3 回の独立した実験の平均値を示す。

[実験 2] GFP-Stx3 を一過性に発現させた HEK293T-FcγRII 細胞に、野生型 Lp01 または Δ*lotB* 変異株を感染させ、4 時間後に細胞を固定し、蛍光顕微鏡で可視化した。それぞれの感染細胞における LCV100 個あたりの GFP-Stx3 陽性 LCV 数をカウントした。グラフは 3 回の独立した実験の平均値を示す。**p < 0.001.

4. 研究成果

本研究から得られた結果を下記に簡潔にまとめる。

4.1. 機能未知レジオネラエフェクタータンパク質 Lpg1621 (LotB) の機能特徴づけ

隠れマルコフモデルを用いてレジオネラの機能未知エフェクタータンパク質のモチーフ検索解析を試みた結果、脱ユビキチン化酵素の特徴を持つタンパク質 Lpg1621 を同定した。Lpg1621 はヒト OTUB1 (脱ユビキチン化酵素) に類似した脱ユビキチン化酵素をコードするドメインと、膜局在に必要とされる膜貫通ドメインの 2 つのドメインから構成されるタンパク質であることが分かった。精製した Lpg1621 タンパク質を用いた生化学解析から、本酵素は K63 連結型ユビキチン鎖を特異的に切断する脱ユビキチン化酵素として機能することが明らかになった。そのため、*Legionella* OTU-like protein B (LotB) と名付けた。

4.2. LotB と相互作用する宿主因子の解明

LotB が宿主細胞内で相互作用する因子を解析したところ、宿主小胞輸送システムにおいて重要な役割を担う COPI 小胞と相互作用することが明らかとなった。SEAP アッセイと VSVG アッセイを行うことにより、一過的に宿主細胞内で発現させた LotB は COPI 小胞が機能する場である初期分泌経路を阻害し、また、その阻害には LotB の脱ユビキチン化活性と膜貫通ドメインの両方が必須であることが分かった。

4.3. LotB の標的タンパク質の同定

小胞体由来 SNARE タンパク質 Sec22b がレジオネラ感染初期にユビキチン化されることを発見した。さらに、感染後期になると Sec22b は LotB によって脱ユビキチン化されることが分かった。小胞輸送のキープレイヤーである Sec22b が細菌感染によってユビキチン化・脱ユビキチン化されるという現象を世界に先駆けて示すことができた。

4.4. LotB による Sec22b の脱ユビキチン化の意義

感染後期に起こる LotB による Sec22b の脱ユビキチン化は感染初期に LCV 上に形成された Sec22b-Stx3 間の SNARE ペアリングの解除を引き起こすことが明らかになった。LotB を介した Sec22b からの Stx3 の解離は感染後期に Sec22b が LCV 上で別の SNARE ペアリングを作ることにより LCV の構築プロセスを完了するのに必要である可能性がある。また、Stx3 を遊離させることで Stx3 が再び細胞膜で本来の SNARE ペアリングを形成し、正常な細胞状態を維持するためのプロセスに再利用される可能性が考えられた。

以上の研究成果を下記論文として公表した。

雑誌名: Cell Reports

タイトル: *Legionella* manipulates non-canonical SNARE pairing using a bacterial deubiquitinase.

著者: Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori

DOI 番号: 10.1016/j.celrep.2020.108107

論文公開 URL: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108107>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori	4. 巻 32(10)
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
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 -
1. 著者名 Tomoko kubori, Tomoe Kitao, Hiroki Ando	4. 巻 59
2. 論文標題 Structural and Functional Analyses of the <i>Legionella</i> Virulence Secretion System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 014～017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.59.014	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 Tomoko kubori, Tomoe Kitao, Hiroki Ando	4. 巻 47
2. 論文標題 Emerging insights into bacterial deubiquitinases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Microbiology	6. 最初と最後の頁 14～19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mib.2018.10.001	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 Tomoko kubori, Tomoe Kitao, Hiroki Ando, Hiroki Ando	4. 巻 20
2. 論文標題 LotA, a Legionella deubiquitinase, has dual catalytic activity and contributes to intracellular growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e12840～e12840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.12840	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北尾公英、久堀智子、永井宏樹
2. 発表標題 細菌の病原性制御システム
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久堀智子、北尾公英、永井宏樹
2. 発表標題 Vacuole manipulation by Legionella deubiquitinases
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北尾公英、田口馨一郎、瀬戸真太郎、新崎恒平、安藤弘樹、永井宏樹、久堀智子
2. 発表標題 宿主SNARE pairingを操作するレジオネラエフェクターの解析
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北尾 公英、久堀 智子、瀬戸 真太郎、新崎 恒平、永井 宏 樹
2. 発表標題 COP1 小胞と相互作用するレジオネラエフェクタータンパク質の 同定と機能解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoe Kitao, Kyoichiro Taguchi, Shintaro Seto, Kohei Arasaki, Hiroki Ando, Hiroki Nagai, Tomoko Kubori
2. 発表標題 Legionella manipulates non-canonical SNARE pairing by the function of a bacterial deubiquitinase
3. 学会等名 2019 Gordon Research Conference - Microbial Adhesion and Signal Transduction
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://sites.google.com/view/nagai-lab/home https://researchmap.jp/tomoe-kitao/?lang=japanese
--

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
---------	---------