

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19H03470
研究課題名（和文）Tn-seqを活用したレジオネラ病原性研究の新展開

研究課題名（英文）Tn-seq analysis of Legionella pathogenicity

研究代表者

永井 宏樹（Nagai, Hiroki）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80222173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでのレジオネラ病原性研究の最大の問題点は、エフェクターおよびそれが標的とする宿主細胞内プロセスの冗長性のため、仮にひとつのエフェクターを欠損してもなんら病原性の減弱が観察されず、そのためエフェクターの病原性における役割を明確にできない点にあった。本研究では一度原点に立ち戻り、次世代シーケンサーを利用したトランスポゾン・シーケンシング(Tn-seq)法を活用した、全遺伝子を対象とした病原遺伝子の真に網羅的な探索を実施することにより、レジオネラエフェクターの発現制御における新たな階層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

Tn-seq法を用いたスクリーニングは、IV型分泌系遺伝子が見出された遺伝学的スクリーニングを発展させたものと捉えることができるが、文字通り真に網羅的に行うことが可能である点で画期的であり、実際新たな細菌側感染戦略の一端を明らかにすることができた。本研究の手法は他の病原微生物にも適応可能であり、当該領域に波及効果をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We conducted systematic search for genes involved in intracellular growth of Legionella pneumophila using Tn-seq, and identified numerous genes other than dot/icm required for intracellular growth.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ

1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生性の病原細菌レジオネラは、自然界では広く土壌・淡水環境中に分布するグラム陰性桿菌である。汚染された温泉水を吸引するなどして一旦レジオネラが人間の肺胞へ到達すると、肺胞マクロファージに感染・増殖し最終的に致死性の肺炎(レジオネラ症)を引き起こす。一方で、自然界では淡水環境に広く分布するアカントアメーバを自然宿主として、その細胞内に寄生している。レジオネラが肺炎を発症する主たる要因は肺組織での増殖そのものであり、細胞内増殖能を欠損すると病原性を失う。遺伝学的探索により、レジオネラの細胞内増殖(すなわち病原性)に必須な IV 型分泌系が 2000 年までに同定された。一方で、その輸送基質である病原因子・エフェクタータンパク質は遺伝学的探索では見いだせなかった。

レジオネラ病原性研究における大きな障壁は、エフェクターの1つをロックアウトしても、ほとんどの場合なんら病原性・細胞内増殖能の減弱が観察されないことである。このことは、レジオネラのエフェクター、およびそれが標的とする宿主細胞内プロセスには高度の冗長性があることを示している。したがってコンベンショナルな遺伝学・逆遺伝学的手法による還元論的解析には一定の限界がある。このような背景によりエフェクターの機能が病原性にどのように関わっているかについてはいまだに明らかにできておらず、エフェクターの機能解析一辺倒のアプローチとは一線を画す、新たな視点からのブレイクスルーが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

これまでのレジオネラ病原性研究の最大の問題点は、エフェクターおよびそれが標的とする宿主細胞内プロセスの冗長性のため、仮にひとつのエフェクターを欠損してもなんら病原性の減弱が観察されず、そのためエフェクターの病原性における役割を明確にできない点にあった。本研究では一度原点に立ち戻り、次世代シーケンサーを利用したトランスポゾン・シーケンシング(Tn-seq)法を活用した、全遺伝子を対象とした病原遺伝子の真に網羅的な探索を実施することにより、既存の研究で見えて来なかった新たな細菌側感染戦略を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Tn-seq

レジオネラ Lp01 株に mariner トランスポゾンを挿入した挿入株ライブラリを作成し、ヒト由来細胞、あるいは自然宿主アメーバへ感染させた。増殖前後の集団のトランスポゾン挿入点近傍の塩基配列を次世代シーケンスにより決定した。トランスポゾン挿入点の解析には ARTIST を利用した(Pritchard et al., 2014)。

(2) RNA-seq

レジオネラ Lp01 株および候補遺伝子欠失株を AYE 培地で培養し、全 RNA を抽出した。RNA-seq ノカウントデータの解析には DESeq2(Love et al., 2014)を、パスウェイ解析には gage(Luo et al., 2009)を利用した。

4. 研究成果

(1) Tn-seq による網羅的探索

レジオネラに mariner トランスポゾンを挿入した挿入株ライブラリを作成し、ヒト由来細胞、あるいは自然宿主アメーバへ感染させ、増殖前後の集団のトランスポゾン挿入点を次世代シーケンスにより決定した。感染後の集団で検出頻度が統計的に有意に低下するトランスポゾン挿入変異を同定することにより、各宿主細胞内での増殖に必要な遺伝子を網羅的に同定した。本実験系では、宿主細胞内で適応度が低下する一部のトランスポゾン挿入株に対して、大多数の適応度に影響を与えないトランスポゾン挿入株が競り勝つ。つまり本質的に拮抗実験であり、個々の遺伝子欠損株の感染時増殖能を個別に比較する従来法に比べ、より高感度であることが期待できる。また、ライブラリ規模と感染実験を適切にデザインすることにより、「真に網羅的」なスクリーニングであることを保証できる。

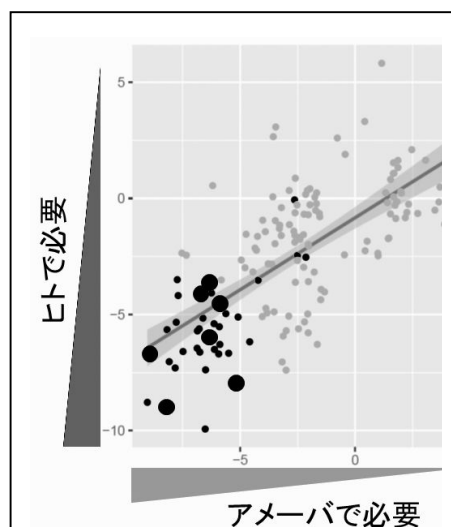


図 1. Tn-seq 法による病原遺伝子の網羅的探索。IV 型分泌系遺伝子群()と同程度以上に病原性に関与する機能未知遺伝子群()が見出される。

このスクリーニングの結果(図 1)、予想外なことに、見出されたほぼすべての候補遺伝子は、宿主細胞が自然宿主(アメーバ)であるか、偶然的宿主(ヒトなどの哺乳動物細胞)であるかにかかわらず、両方で同程度細胞内生存・増殖に必要であることが明らかとなった。また、IV型分泌系の全構成遺伝子が一回のスクリーニングにより同定され、IV型分泌系が最も重要な因子であることを再確認できた。さらに驚いたことに、IV型分泌系と同程度に細胞内生存・増殖に関与する機能未知の遺伝子が多数存在することが明らかとなった。

(2) Tn-Seq スクリーニングにより得られた IV 型分泌系以外の候補遺伝子の解析

Tn-Seq スクリーニングにより得られた、同一のシグナル伝達経路に関わると考えられる 2 つの候補遺伝子(仮に x と y とする)について解析を行った。まずは x, y 遺伝子の欠損株を作成し、マウス骨髄由来マクロファージに感染させ細胞内増殖を検討したところ、Tn-Seq スクリーニング結果から予想された通り、x, y 両遺伝子の欠損株とも細胞内増殖能が顕著に減弱していた。一方で AYE 液体培地中での増殖には差は認められなかった。顕微鏡下での観察による、感染 7 時間後のレジオネラ含有液胞(LCV)中での細菌数測定において、x, y 両遺伝子の欠損株とも野生株よりも顕著に少ないものの、細胞内増殖能を完全に欠損する IV 型分泌系欠損株よりも有意に多いことが認められた。このため、細胞内増殖能について詳細に検討したところ、感染 24-48 時間後以降、野生株と同様の増殖が見られることを見出した。何らかの理由により、細胞内増殖開始が遅れていることが考えられた。

遺伝子 x, y は細菌内でのシグナル伝達に関わることが予想されたため、RNA-Seq による標的遺伝子の同定を試み、レジオネラが感染能を獲得する増殖休止期において、遺伝子 x, y の欠失により強く発現が減弱する複数の標的候補遺伝子を得た。RNASeqの結果は、RT-PCR 法による追試により検証した。RNA-Seq の結果に基づきパスウェイ解析を行ったところ、x, y の欠失変異株では、レジオネラ病原性に必須な IV 型分泌系の基質である、エフェクタータンパク質群の 3 割強にあたるものの発現が変化していることを見出した(図 2)。さらにこの内の 3 割強は、他の研究グループによりすでにエフェクターの一部の発現制御に関わることが報告されている pmr 系の制御を受けることが明らかになった。さらに pmr 系の支配下にある(エフェクターおよびエフェクター以外)遺伝子について精査したところ、このうち 3 割強は、x, y による制御を受けることが明らかになった。この結果は本研究で対象としている x, y と、pmr 系の間に何らかのクロストークがあることを示唆している。この現象の分子基盤について知見を得ることを目的として、生化学的解析系を試みたが、肯定的な結果を得ることはできなかった。本研究の成果は、レジオネラエフェクターの発現制御における新たな階層を明らかにした。その分子基盤の解明にむけて、新たな研究を今後展開していきたい。

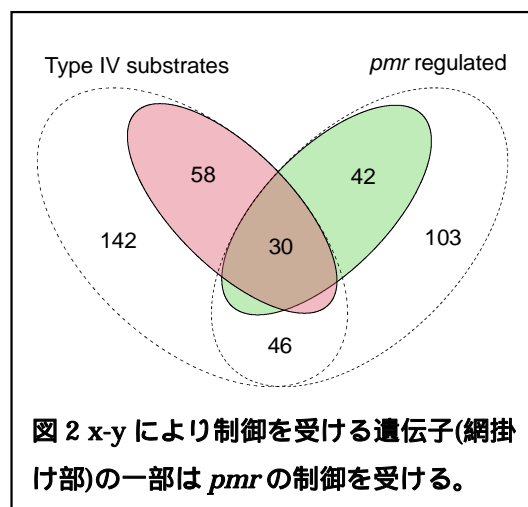


図 2 x-y により制御を受ける遺伝子(網掛け部)の一部は pmr の制御を受ける。

< 引用文献 >

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D., & Woolf, P. J. (2009). GAGE: Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161>
- Pritchard, J. R., Chao, M. C., Abel, S., Davis, B. M., Baranowski, C., Zhang, Y. J., Rubin, E. J., & Waldor, M. K. (2014). ARTIST: High-Resolution Genome-Wide Assessment of Fitness Using Transposon-Insertion Sequencing. *PLoS Genetics*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004782>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kitao Tomoe, Taguchi Kyoichiro, Seto Shintaro, Arasaki Kohei, Ando Hiroki, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 32
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 ~ 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim Hyunmin, Kubori Tomoko, Yamazaki Kohei, Kwak Mi-Jeong, Park Suk-Youl, Nagai Hiroki, Vogel Joseph P., Oh Byung-Ha	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural basis for effector protein recognition by the Dot/Icm Type IVB coupling protein complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16397-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kitao Tomoe, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Divergence of Legionella Effectors Reversing Conventional and Unconventional Ubiquitination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawabata Mio, Matsuo Honoka, Koito Takumi, Murata Misaki, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei	4. 巻 17
2. 論文標題 Legionella hijacks the host Golgi-to-ER retrograde pathway for the association of Legionella-containing vacuole with the ER	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitao Tomoe, Arasaki Kohei, Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for imaging proteins associated with Legionella-containing vacuoles in host cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100410 ~ 100410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takekawa Norihiro, Kubori Tomoko, Iwai Tomoya, Nagai Hiroki, Imada Katsumi	4. 巻 204
2. 論文標題 Structural Basis of Ubiquitin Recognition by a Bacterial Ovarian Tumor Deubiquitinase LotA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00376-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JB.00376-21	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 Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki	4. 巻 66
2. 論文標題 Recent advances in structural studies of the <i>Legionella pneumophila</i> Dot/Icm type IV secretion system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 67 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12951	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 Murata Misaki, Kanamori Riku, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Tagaya Mitsuo, Arasaki Kohei	4. 巻 135
2. 論文標題 Requirement of phosphatidic acid binding for distribution of the bacterial protein Lpg1137 targeting syntaxin 17	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259538	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 Kubori Tomoko, Lee Junyup, Kim Hyunmin, Yamazaki Kohei, Nishikawa Masanari, Kitao Tomoe, Oh Byung-Ha, Nagai Hiroki	4. 巻 119
2. 論文標題 Reversible modification of mitochondrial ADP/ATP translocases by paired <i>Legionella</i> effector proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e212872119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2122872119	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 Warren Gus D., Kitao Tomoe, Franklin Tyler G., Nguyen Justine V., Geurink Paul P., Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Pruneda Jonathan N.	4. 巻 83
2. 論文標題 Mechanism of Lys6 poly-ubiquitin specificity by the L.?pneumophila deubiquitinase LotA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 105 ~ 120.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.11.022	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 Pruneda Jonathan N., Nguyen Justine V., Nagai Hiroki, Kubori Tomoko	4. 巻 2023
2. 論文標題 Bacterial usurpation of the <sc>OTU</sc> deubiquitinase fold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北尾公英、永井宏樹、久堀智子
2. 発表標題 型破りな翻訳後修飾を介したレジオネラの宿主細胞内生存戦略
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021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シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

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シンポジウム（招待講演）
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 Tomoe Kitao, Kohei Arasaki, Shintaro Seto, Kyoichiro Taguchi, 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 Microbial Adhesion and Signal Transduction, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室webページ
<https://sites.google.com/view/nagai-lab/home>

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			
米国	Washington University			
韓国	Kyungpook National University	KAIST		