

病原細菌レジオネラによるユビキチンを介した宿主小胞輸送システムの操作

北尾 公英, 久堀 智子, 永井 宏樹

1. レジオネラによる宿主ユビキチンシステムの操作

ユビキチン化は、真核細胞において最も汎用性の高い翻訳後修飾の一つであり、E1, E2, E3という三つの酵素によって担われ、さまざまな細胞プロセスを制御している¹⁾。近年、病原細菌やウイルスが宿主のユビキチンシステムを操作することにより宿主の分解系や免疫を回避し、感染を確立することが明らかになっている。

重篤な肺炎を引き起こす病原細菌レジオネラはIV型分泌装置 (T4SS) を介して宿主細胞に約300ものエフェクタータンパク質を輸送し、初期分泌経路におけるゴルジ体-小胞体間の小胞輸送を乗っ取ることで小胞体様の液胞 (*Legionella* containing vacuole: LCV) を構築し、それを増殖のニッチとする²⁾。LCVにはユビキチン化されたタンパク質が集積することがわかっており³⁾、LCV上のユビキチンを宿主プロテアソームによって分解させることにより、細胞内増殖に必要な栄養を得ている⁴⁾。初期分泌経路に関わる多くの宿主タンパク質がLCV上に集積することが知られるが²⁾、レジオネラがユビキチンを介してどのように小胞輸送を操作するのか、あまりよくわかっていない。

レジオネラは原核生物でありながらユビキチン化や脱ユビキチン化反応を担うエフェクターを装備し、LCVへのユビキチン集積を制御する (図1)⁵⁾。ユビキチン化を担うレジオネラエフェクターにはカノニカルな反応を触媒するタイプとレジオネラだけに見いだされた型破りな反応を触媒するタイプの2種に大きく分類され、前者にはHECT, RING, F-Boxといった真核細胞のE3リガーゼが保有する機能ドメインを持つものがあり、また、レジオネラ独自の機能ドメインを持つE3リガーゼSidCやSdcAなどが含ま

れる。後者にはE1, E2やATPを必要とせず、ホスホリボシル化修飾 (PR修飾) を介して標的タンパク質にユビキチンを付与する反応を担うSidEファミリーユビキチンリガーゼ (SidE, SdeA, SdeB, SdeC) がある。脱ユビキチン化酵素 (DUB) に関しては、SidEファミリーによって付加されたホスホリボシル化ユビキチンを特異的に認識し切断するDupAおよびDupB、直鎖型ユビキチン鎖を切断するRavD、そして、真核生物の持つovarian tumor (OTU) ファミリー脱ユビキチン化酵素 (OTU-DUBs) に高い構造相同性を示すレジオネラDUB (*Legionella* OTU-like-DUBs: Lot-DUBs)⁶⁾ などが次々と同定されてきている。これまでに報告されている三つのLot-DUBs (LotA, LotB, LotC) について以下で紹介する。

2. Lot-DUBs

LotA (Lpg2248, Lem21) は、我々の研究によりレジオネラエフェクターの中で最初に同定されたDUBである⁷⁾。LotAは相同な活性ドメインが二つ直列に並ぶユニークな配列を持ち、触媒残基C13とC303を使ってLCV上に集積したK6結合型ユビキチン鎖とK48結合型およびK63結合型長鎖ユビキチン鎖をそれぞれ特異的に切断する。また、C末端領域を介して初期エンドソームマーカーであるホスファチジルイノシトール3-リン酸 [PI(3)P] と後期エンドソームマーカーであるPI(3,5) P₂ と結合し、LCV上に局在することがわかっている。この脂質結合領域を欠いたLotA変異体は感染下でLCV上に局在できず、また、LCV上のユビキチン鎖を脱ユビキチン化できないことから、LotAの脂質結合能がDUBとしての機能を発揮する上で重要であることが示された。二つの触媒残基をどう使い分けるかの詳細な機序やその役割に関しては現在解析を進めている。

LotB (Lpg1621, Ceg23) はN末端にDUBドメイン、C末端に膜貫通 (TM) ドメインを有するタンパク質であることが予測された⁸⁾。また、近年の結晶構造解析から、パパイン様OTUコア構造と同様のD-C-Hからなる触媒三残基を持つことがわかった⁹⁾。K63結合型ユビキチン鎖を特異的に切断し、感染条件下においてはTMドメインを介してLCVに局在する⁸⁾。また、LotBはユビキチンだけでなくユビキチン様タンパク質であるSUMO1やNEDD8を認識・切断する活性も持つことが報告されている^{6, 10)}。

岐阜大学大学院医学系研究科・病原体制御学分野 (〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1)

Ubiquitin-mediated manipulation of host vesicle trafficking by the intracellular bacterial pathogen *Legionella pneumophila*

Tomoe Kitao, Tomoko Kubori and Hiroki Nagai (Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Gifu University, 1-1 Yanagito, Gifu 501-1194, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930835

© 2021 公益社団法人日本生化学会

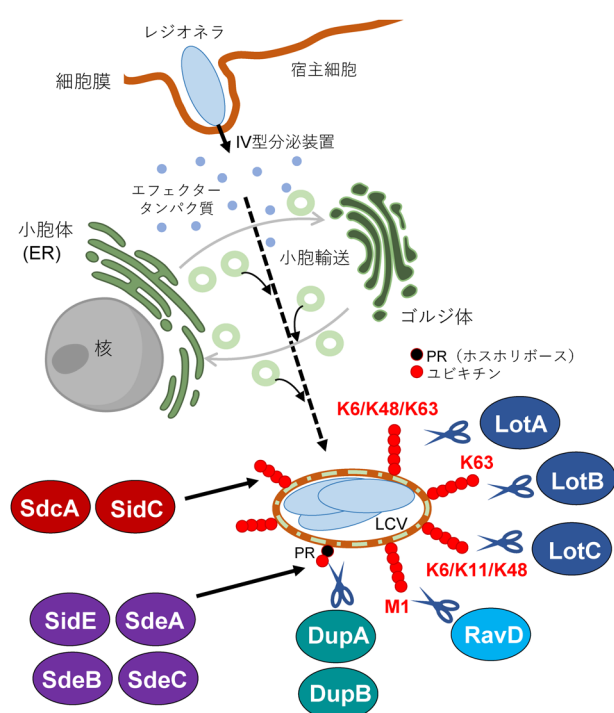


図1 ユビキチンシステムを操作しLCV構築に関わるレジオネラエフェクター

レジオネラが宿主細胞に感染すると、小胞体とゴルジ体の間の小胞輸送を乗っ取り、輸送小胞を獲得してLCVを構築する。その過程でレジオネラのIV型分泌装置（T4SS）を介して輸送されるエフェクタータンパク質の一部は宿主タンパク質をユビキチン化、あるいは脱ユビキチン化する。ユビキチン化に寄与するエフェクターには、カノニカルなユビキチンリガーゼとしての反応を担うSidC, SdcA, ホスホリボシル（PR）修飾を介したノンカノニカルなユビキチン化を担うユビキチンリガーゼであるSidEファミリー（SidE, SdeA, SdeB, SdeC）などが知られる。脱ユビキチン化を行うエフェクターにはDupA, DupB, RavD, Lot-DUBs（LotA, LotB, LotC）などが同定されている。

LotC（Lpg2529, Lem27）も配列解析からDUBであると予測されたエフェクタータンパク質で、結晶構造解析から、LotBと同様にD-C-Hからなる触媒三残基を持つOTU-DUBであることが明らかとなった^{10, 11}。in vitroの生化学解析条件下ではLotCは、K6, K11, およびK48結合型ユビキチン鎖を好むことが報告されており、感染条件下においてはLotA, LotBと同様にLCV上に局在し、LCVへのユビキチン集積を減弱させることが示されている¹¹。

複数の研究グループによるこれらのLot-DUBsについての構造学的解析から、Lot-DUBsは真核生物のOTU-DUBsと構造的に類似しているが、それらにはみられない挿入領域があり、レジオネラは真核生物とは機能的に異なる独自のDUBsを進化させたことが推察される^{10, 11}。三つのLot-DUBsのうち、LotBは小胞輸送に関与する宿主SNAREタンパク質Sec22bを⁸、LotCは宿主Rab10を¹¹、それぞれ脱ユビキチン化することが最近報告された。LotAについて

はまだ標的タンパク質が同定されていない。

3. LotBによる宿主SNAREタンパク質の操作

我々は感染条件下におけるLotBの役割についての手がかりを得るために、まず、培養細胞内でLotBと相互作用するタンパク質を解析したところ、ゴルジ体から小胞体への逆行性輸送を担うCOPI小胞の表面を覆うタンパク質複合体の七つのサブユニット（コートタンパク質； α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ -COP）と、DUB活性に非依存的かつTMドメイン依存的に相互作用することがわかった⁸。また、 β' -COPとLotBは核周囲、小胞体を含む初期分泌経路の働く場において共局在することが確認された。一方、Xuらによって、 β' -COPがK63結合型ポリユビキチン鎖と結合し、ユビキチン化された酵母のv-SNARE（Snc1）のリサイクルに寄与しているという報告がなされた¹²。レジオネラが感染すると、宿主小胞輸送に関わるv-SNAREタンパク質Sec22bは輸送小胞に乗ってLCVに集積することが知られている¹³。このような背景から、我々はレジオネラ感染過程でSec22bがK63結合型ユビキチン鎖で修飾され、LotBがそれを切断するのではないかと考え、検証を行った。その結果、レジオネラ野生株を感染させた1時間後にSec22bがポリユビキチン修飾されていることがわかり、感染4時間後にそのポリユビキチン修飾のレベルが減弱することが確認できた。lotB欠失株（ Δ lotB）を感染させると、感染1時間後に確認されたSec22bのポリユビキチン修飾のレベルは感染後4時間経っても減弱しなかった。 Δ lotBに野生型LotBを相補した場合、感染後4時間でポリユビキチン鎖の減少が確認されたが、非活性LotB^{C29S}変異体では減少しなかったことから、LotBがその酵素活性によりSec22b上のユビキチン鎖を切断していることが強く示唆された。興味深いことに、DUB活性は保持しているがTMドメインを欠いた変異体LotB Δ TMを相補してもSec22bのユビキチン修飾のレベルは減少しなかったことから、LotBのSec22bへの作用には膜との相互作用が必要であることが示唆された。

レジオネラが宿主細胞に取り込まれると、初期ファゴソーム上でSec22bが細胞膜に局在するt-SNAREタンパク質Syntaxin（Stx）2, Stx3, およびStx4と、非感染下の細胞では起こらないノンカノニカルなSNAREペアリングを形成し、LCVのリモデリングが開始される¹⁴。そこで我々は感染後4時間で起こるLotBによるSec22bの脱ユビキチン化がこのノンカノニカルなSNAREペアリングに何らかの影響を与えているのではないかと考えた。まず、レジオネラ野生株を感染させた細胞内では感染初期から後期にかけてStx3がSec22bから解離していくようすが見られる一方で、 Δ lotBを感染させた細胞ではStx3の解離が見ら

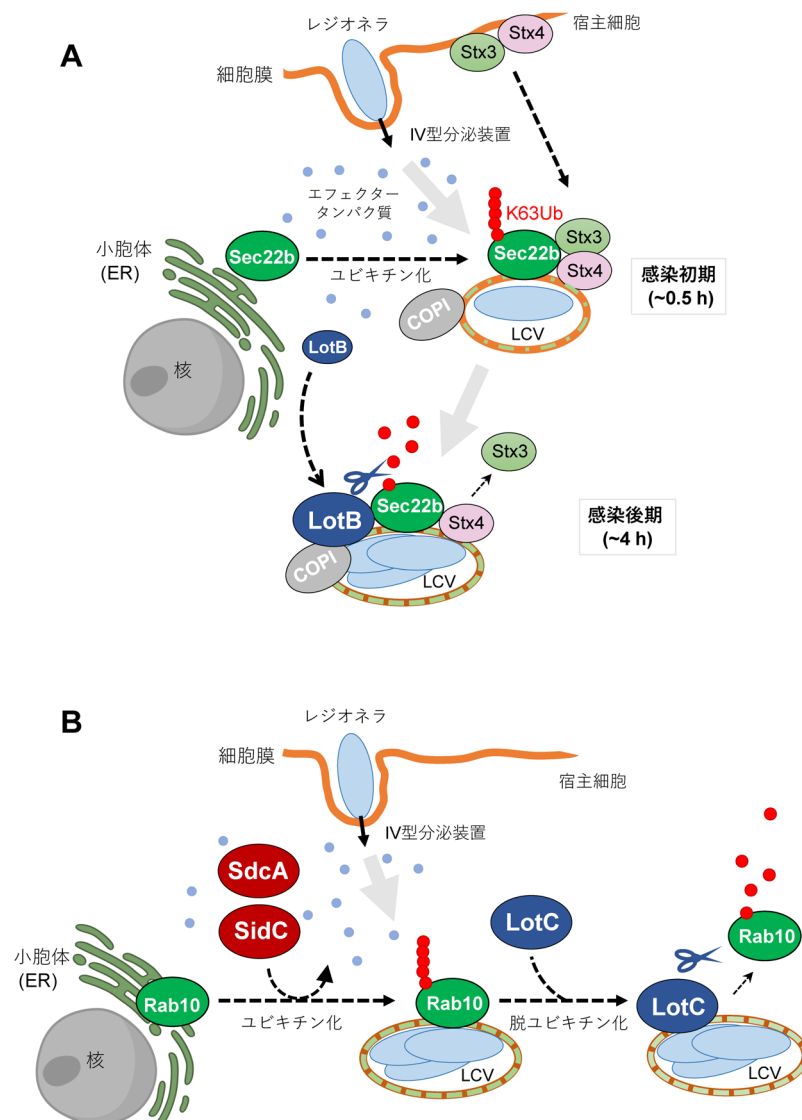


図2 レジオネラエフェクター LotB および LotC によるユビキチンを介した小胞輸送の操作

(A) LotB による Sec22b の操作. Sec22b はレジオネラ感染初期に IV 型分泌装置依存的な LCV へのリクルートとユビキチン修飾が認められる. 感染後期に LotB は LCV 上で Sec22b に付与された K63 結合型ユビキチン鎖を切断する. LotB による Sec22b の脱ユビキチン化は LCV からの Stx3 の解離を促進する. LotB は TM ドメインを介して LCV に局在し, COPI と相互作用することもわかっている. (B) LotC による Rab10 の操作モデル. Rab10 はレジオネラ感染初期に SidC あるいは SdcA によってユビキチン化され, LCV 上に集積する. Rab10 のユビキチン鎖は LotC によって脱ユビキチン化され, Rab10 は LCV から解離すると考えられる.

れず Sec22b と相互作用する Stx3 は感染後期にかけて増加した. また, $\Delta lotB$ を感染させた細胞では, 野生株を感染させた細胞よりも多くの Stx3 陽性 LCV が確認された. 以上のことから, レジオネラ感染依存的にユビキチン化された Sec22b を LotB が LCV 上で脱ユビキチン化することにより, LCV からの Stx3 の解離を促進する役割を担うと考えられた (図 2A). Sec22b は本来小胞体において Stx5 や Stx18 などの小胞体局在 SNARE と相互作用している. それゆえ, LotB を介した Sec22b からの Stx3 の解離は, 感染後期に小胞体と膜融合した LCV 上で Sec22b が本来の SNARE

ペアリングを形成し LCV の構築を完了するために必要なプロセスである可能性が考えられた. また, Sec22b から解離した 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ある. Sec22b のユビキチン化を担う因子については現在解析を進めている.

4. LotC による宿主 Rab タンパク質の操作

近年, CRISPR-Cas9 を用いた系統的ゲノムワイドスク

リーニング解析によって、膜小胞輸送系の制御因子として働く低分子量Gタンパク質Rabファミリーの一つであるRab10とそのシャペロンであるRABIFがレジオネラの宿主細胞内生存に重要な役割を担うことが明らかとなった¹⁵⁾。この研究でRab10はレジオネラ感染初期にレジオネラエフェクター、SidCとそのパラログであるSdcAによってユビキチン化され、LCVに集積することが示された¹⁵⁾。Liuらは、SidCとSdcAが、LotCによって優先的に切断されるK11型ユビキチン鎖を含むいくつかのタイプのポリユビキチン鎖の合成を触媒する点に着目し、SidCとSdcAによってユビキチン化されたRab10がLotCによって脱ユビキチン化されているのではないかと考えた¹¹⁾。彼らは感染条件下においてLCVにRab10がSidC依存的に集積する実験系を構築し、そこにLotCを発現させたところ、LCV上のRab10集積レベルが減少した。また、LotCを高発現するレジオネラ株の感染によって細胞内のRab10が脱ユビキチン化されることを示した。これらの結果から、レジオネラは感染初期にRab10をユビキチン化することによりLCVにリクルートし、Rab10を脱ユビキチン化することによりLCVから解離させる可能性が考えられる(図2B)。興味深いことに、LotCの非活性変異体とともにSidCあるいはSdcAを発現させた細胞を用いてLotCと相互作用するタンパク質を同定した研究から、LotCはSdcAの存在下で多くのリボソーム構造タンパク質と相互作用するが、SidCの存在下ではその相互作用が見られないということが明らかとなった¹⁰⁾。SidCとSdcAは配列類似性が高く、LCV構築において互いに相補的に機能すると考えられてきたが、SidCとSdcAは異なる機能を持ち合わせ、LotCを含んだ制御により、Rab10のみならず多岐にわたる宿主因子を標的とするカスケードを築いている可能性が考えられる。

5. おわりに

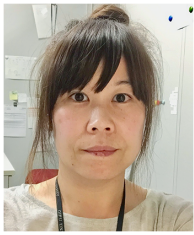
本稿ではレジオネラユビキチンリガーゼやLot-DUBsがユビキチンの制御を介して宿主細胞の小胞輸送に重要な役割を担う因子を操作し、レジオネラ増殖の場であるLCV構築に寄与していることを示す最近の知見を紹介した。今後、LotAの標的タンパク質やもう一つの機能未知のLot-DUBであるLpg0227 (Ceg7)の役割およびSec22bのユビキチン化メカニズムなどが明らかになれば、レジオネラがどのように宿主小胞輸送系を操作して増殖を果たすかについての理解がさらに深まる。また、宿主小胞輸送の細菌感染における新たな役割や、細菌感染によって受ける影響についてもさらなる知見が得られると考えられる。

文 献

- 1) Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479.
- 2) Isberg, R.R., O'Connor, T.J., & Heidtman, M. (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 13–24.
- 3) Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S., & Isberg, R.R. (2006) RNA interference analysis of *Legionella* in drosophila cells: Exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog.*, **2**, e34.
- 4) Price, C.T.D., Al-Quadani, T., Santic, M., Rosenshine, I., & Abu Kwaik, Y. (2011) Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science*, **334**, 1553–1557.
- 5) Kitao, T., Nagai, H., & Kubori, T. (2020) Divergence of *Legionella* effectors reversing conventional and unconventional ubiquitination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 1–13.
- 6) Schubert, A.F., Nguyen, J.V., Franklin, T.G., Geurink, P.P., Roberts, C.G., Sanderson, D.J., Miller, L.N., Ovaa, H., Hofmann, K., Pruneda, J.N., et al. (2020) Identification and characterization of diverse OTU deubiquitinases in bacteria. *EMBO J.*, **39**, 1–16.
- 7) Kubori, T., Kitao, T., Ando, H., & Nagai, H. (2018) LotA, a *Legionella* deubiquitinase, has dual catalytic activity and contributes to intracellular growth. *Cell. Microbiol.*, **20**, e12840.
- 8) Kitao, T., Taguchi, K., Seto, S., Arasaki, K., Ando, H., Nagai, H., & Kubori, T. (2020) *Legionella* manipulates non-canonical SNARE pairing using a bacterial deubiquitinase. *Cell Rep.*, **32**, 108107.
- 9) Ma, K., Zhen, X., Zhou, B., Gan, N., Cao, Y., Fan, C., Ouyang, S., Luo, Z.Q., & Qiu, J. (2020) The bacterial deubiquitinase Ceg23 regulates the association of Lys-63-linked polyubiquitin molecules on the *Legionella* phagosome. *J. Biol. Chem.*, **295**, 1646–1657.
- 10) Shin, D., Bhattacharya, A., Cheng, Y.-L., Alonso, M.C., Mehdi-pour, A.R., van der Heden van Noort, G.J., Ovaa, H., Hummer, G., & Dikic, I. (2020) Bacterial OTU deubiquitinases regulate substrate ubiquitination upon *Legionella* infection. *eLife*, **9**, 1–21.
- 11) Liu, S., Luo, J., Zhen, X., Qiu, J., Ouyang, S., & Luo, Z.-Q. (2020) Interplay between bacterial deubiquitinase and ubiquitin E3 ligase regulates ubiquitin dynamics on *Legionella* phagosomes. *eLife*, **9**, 1–23.
- 12) Xu, P., Hankins, H.M., MacDonald, C., Erlinger, S.J., Frazier, M.N., Diab, N.S., Piper, R.C., Jackson, L.P., MacGurn, J.A., & Graham, T.R. (2017) COPI mediates recycling of an exocytic SNARE by recognition of a ubiquitin sorting signal. *eLife*, **6**, 1–22.
- 13) Kagan, J.C., Stein, M.-P., Pypaert, M., & Roy, C.R. (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J. Exp. Med.*, **199**, 1201–1211.
- 14) Arasaki, K. & Roy, C.R. (2010) *Legionella pneumophila* promotes functional interactions between plasma membrane syntaxins and Sec22b. *Traffic*, **11**, 587–600.
- 15) Jeng, E.E., Bhadkamkar, V., Ibe, N.U., Gause, H., Jiang, L., Chan, J., Jian, R., Jimenez-Morales, D., Stevenson, E., Krogan, N.J., et al. (2019) Systematic identification of host cell regulators of *Legionella pneumophila* pathogenesis using a genome-wide CRISPR screen. *Cell Host Microbe*, **26**, 551–563.e6.

著者寸描

●北尾 公英 (きたお ともえ)



岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野助教。博士 (バイオサイエンス)。

■略歴 2003年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了。2010年同大学にて論文博士取得。ハーバードメディカルスクール・マサチューセッツ総合病院博士研究員、日本学術振興会特別研究員 (RPD) を経て2020年より現職。

■研究テーマと抱負 細菌の病原性システムの解析。細菌がどのように人に病気を引き起こすのかを理解し、抗菌薬に頼らずに細菌感染症を制御・制圧する手がかりを得たい。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/tomoe-kitao>

■趣味 どうぶつの森, パズル, 生き物の観察。