

20. レジオネラの宿主細胞内における多彩な生存戦略の解明

新崎 恒平

*東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子細胞生物学研究室

Key words : レジオネラ, レジオネラエフェクター, syntaxin 17, オートファジー・アポトーシス, Rab5

緒言

重篤な肺炎を引き起こすレジオネラは、宿主細胞に侵入した後、宿主細胞の膜輸送経路をハイジャックすることが知られており、このハイジャックにはレジオネラから宿主細胞に対して分泌する『レジオネラエフェクター』と呼ばれるタンパク質群が重要な役割を担っている¹⁾。また、レジオネラはオートファジーやアポトーシスを抑制することも分かっているが、これらの抑制機構には不明な点が多く残されている。我々は最近、オートファジー関連タンパク質である syntaxin 17 (Stx17)^{2,3)}が小胞体-ミトコンドリア接触領域に局在し、ミトコンドリアの分裂制御に働いていることを見いだした⁴⁾。近年、小胞体-ミトコンドリア接触部位はオートファジーやアポトーシスといった宿主細胞の生理機能のみならず、病原菌感染との関わりが示唆されていることから、レジオネラ感染下における Stx17 の挙動を解析した。更に、レジオネラは宿主細胞への侵入後に分解系オルガネラであるリソソームへの輸送を遮断することが知られているが¹⁾、その分子機構も不明である。そこで、リソソームへの輸送に重要な役割を担っている Rab5 がレジオネラ感染でどのような影響を受けるのかを解析した。

方法および結果

1. レジオネラは Lpg1137 を用いて Stx17 を分解する

レジオネラ感染が Stx17 に与える影響を解析するにあたり、培養細胞にレジオネラを感染させ、Stx17 の局在を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、レジオネラ感染により Stx17 のシグナルが著しく減少していた (図 1A)。また、イムノプロットより、レジオネラ感染は Stx17 のタンパク質量を減少させることを見いだした (図 1B)。一方、レジオネラエフェクターが放出できない *dotA* 変異株では変化が見られなかった (図 1B)。次に、レジオネラエフェクターの同定に着手した。いくつかのレジオネラエフェクターはゲノム上の遺伝子群にまとまってコードされており、増殖に必要な遺伝子群 1 と 5 以外の全て (2、3、4、6、7) を欠損させた変異株 (*pentuple*) 及び各々の遺伝子群を欠損させた変異株が作製されている⁵⁾ (図 1C)。当該変異株の感染実験より、遺伝子群 2 を欠損した株において Stx17 の分解が抑制され (図 1D)、遺伝子群 2 にコードされている Lpg1137 を Stx17 の分解に必要なレジオネラエフェクターとして同定した (図 1E)。更に、Lpg1137 に変異を加えたレジオネラ株 (*Lpg1137 TM*) や Lpg1137 の遺伝子を欠損させた変異株 (Δ *Lpg1137*) では Stx17 を分解できなかった (図 1F)。また、その後の解析により Lpg1137 がセリンプロテアーゼであり、68 番目のセリン残基がその活性中心であることを見いだした。

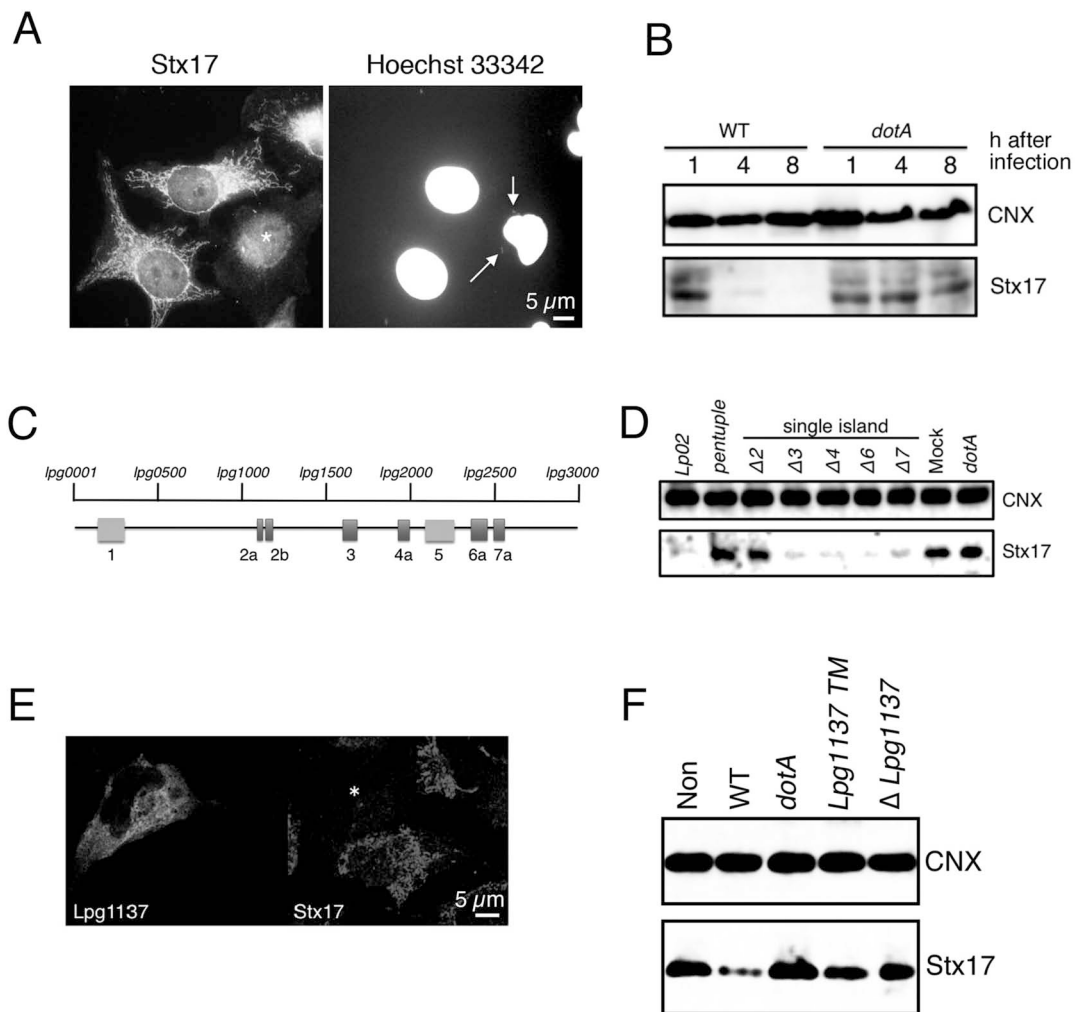


図1. レジオネラは Lpg1137 を介して syntaxin 17 を分解する
 (A) レジオネラ感染細胞での Stx17 の染色。星印がレジオネラ感染細胞の Stx17 染色像。矢印は感染したレジオネラ。(B) 野生型 (WT) 及び *dotA* 変異株レジオネラを感染させ、1、4、8時間後に細胞破砕液を調製し、抗カルネキシン (CNX) 及び Stx17 抗体を用いて検出。(C) 遺伝子群欠損株の概要 (D) 記載したレジオネラ株を感染させた細胞より細胞破砕液を調製し、抗カルネキシン (CNX) 及び Stx17 抗体を用いて検出。(E) Lpg1137 を発現させた細胞での Stx17 の染色。星印が Lpg1137 を発現させた細胞での Stx17 染色像。(F) 記載したレジオネラ株を感染させた細胞より細胞破砕液を調製し、抗カルネキシン (CNX) 及び Stx17 抗体を用いて検出。

2. Lpg1137 は Stx17 の分解を介してオートファジーとアポトーシスを阻害する

Stx17 はオートファジー^{2,3)}やミトコンドリアの切断制御⁴⁾に関わることから、Lpg1137 による Stx17 の分解がこれら生理機能に与える影響を解析した。栄養飢餓 (Starvation: SV) 等によりオートファジーが進行すると、LC3 がオートファゴソームにドット構造として集積するが、Lpg1137 を発現している細胞では LC3 のドット構造の形成が著しく抑制された (図 2A)。Bafilomycin A1 処理により大量の LC3 のドット構造が蓄積するが、Lpg1137 を発現している細胞では LC3 のドットが検出されなかった (図 2A)。また、Stx17 を分解できない Lpg1137 の変異体 (S68A) を発現している細胞において LC3 はドット構造を形成していることから (図 2A)、Lpg1137 は Stx17 を分解することでオートファジーを抑制していることが示唆された。次に、ミトコンドリアの分裂制御⁴⁾に対する Lpg1137 の影響を解析した。ミトコンドリアの分裂と抗病原菌活性として代表的なものがアポトーシスである。そこで、Lpg1137 を発現して

いる細胞に種々のアポトーシス誘導刺激を加え、Lpg1137のアポトーシスに対する影響を評価した。なお、本解析ではミトコンドリアの分裂を伴わずアポトーシスを促進する TRAIL とミトコンドリアの分裂が引き金になりアポトーシスを誘導するスタウロsporin (STS) を用いた。コントロールの細胞では、STS 刺激によりアポトーシスの指標となる核の凝集やカスパーゼ3の活性化が検出されたが、Lpg1137を発現している細胞では、これらの反応が著しく抑制された (図 2B)。更に、野生型のレジオネラ感染では STS 誘導性のアポトーシスを抑制しているが、Lpg1137の変異株 (*Lpg1137 TM*) の感染では、その抑制効果が有意に減衰していた (図 2C)。これらの結果より、レジオネラは Lpg1137 を介して Stx17 を分解し、オートファジーやアポトーシスといった抗菌活性を抑制していることが示唆された。なお、本研究は Nature Communications に掲載が決定している [6](#))。

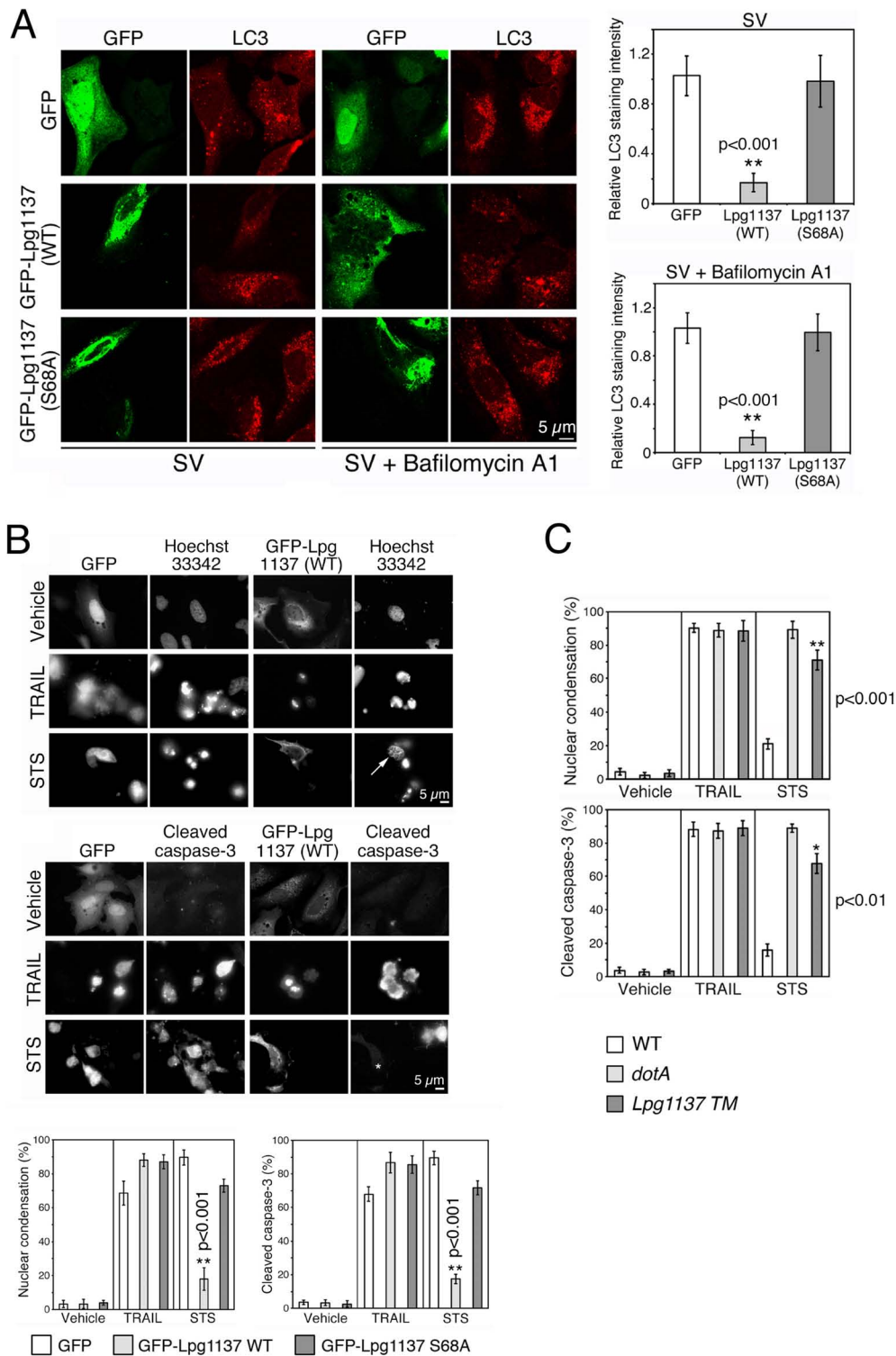


図2. Lpg1137 はオートファジーとアポトーシスを抑制する

(A) GFP、GFP-Lpg1137 の野生型及び S68A 変異体を発現させた細胞に飢餓誘導を ± Bafilomycin A1 で行い、処理後の細胞を LC3 抗体で染色。グラフは非発現及び発現細胞における LC3 の蛍光輝度比を示す。エラーバーは標準偏差。p 値は t 検定により算出。(B) GFP 及び GFP-Lpg1137 を発現させた細胞に、500 ng/ml の TRAIL 及び 1 μ m の STS 処理を 4 時間行い Hoechst と cleaved caspase3 で染色。グラフは、核の凝集及び cleaved caspase3 ポジティブな細胞の割合の定量化。エラーバーは標準偏差。p 値は t 検定により算出。(C) 記載したレジオネラ株を感染させた細胞に、500 ng/ml の TRAIL 及び 1 μ m の STS 処理を 4 時間行い核の凝集及び cleaved caspase3 ポジティブな細胞の割合を定量化。エラーバーは標準偏差。p 値は t 検定により算出。

3. レジオネラは Rab5 を分解することでリソソームへの輸送を遮断する

レジオネラは分解系オルガネラであるリソソームへの輸送を遮断する¹⁾。リソソームへの輸送には Rab5 と呼ばれるタンパク質が重要であることから⁷⁾、レジオネラ感染と Rab5 との関連を解析した。野生型及び *dotA* 変異株レジオネラ上での Rab5 の局在を観察したところ、これまでの報告通り *dotA* 変異株レジオネラ上においてのみ Rab5 のシグナルが検出された (図 3A)。次に Rab5 を発現させた細胞に野生型及び *dotA* 変異株を感染させた後、Rab5 と結合するタンパク質を銀染色法により解析した (図 3B)。その結果、野生型のレジオネラ感染により Rab5 のバンドパターンがスメア状になった (図 3B)。一般的にユビキチン化されるとスメア状で検出されることから、ユビキチン抗体で検出を行ったところ、野生型のレジオネラ感染により Rab5 がユビキチン化されていることが明らかになった (図 3C)。また、野生型レジオネラ感染により Rab5 のタンパク質量が有意に減少していることも明らかになった (図 3D)。次に、Rab5 のユビキチン化に必要な分子を同定するにあたり、遺伝子群欠損変異株を用いた解析を行ったところ、遺伝子群 7 を欠いたレジオネラ株において Rab5 のユビキチン化が顕著に抑制されていることを見いだした (図 3E)。更に、遺伝子群 7 を欠いたレジオネラ上において Rab5 が有意に集積していることから (図 3F)、遺伝子群 7 に Rab5 をユビキチン化し分解に導くレジオネラエフェクターが含まれていることを明らかにした。

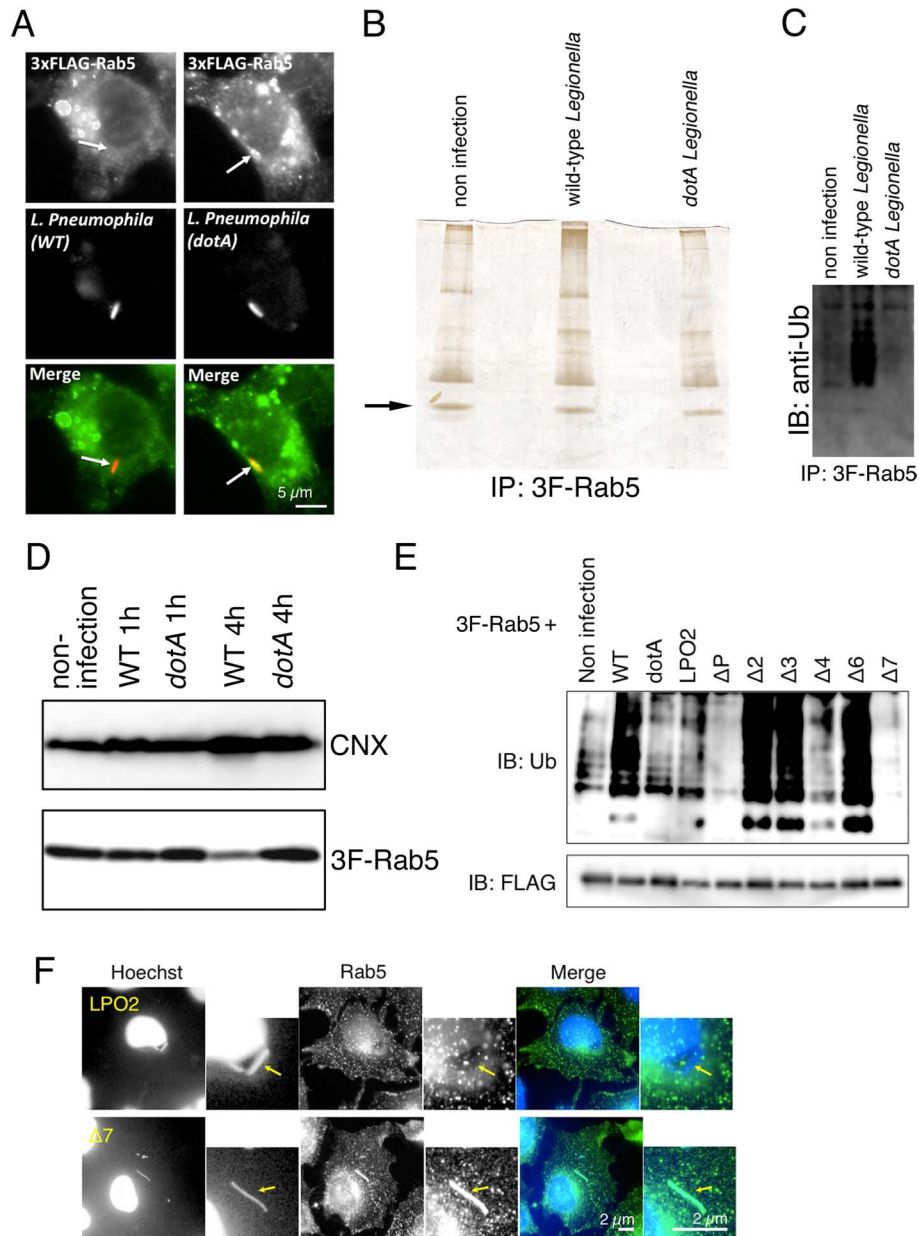


図 3. レジオネラ感染が Rab5 に与える影響

(A) 3×-FLAG-Rab5 を発現している細胞に野生型及び *dotA* 変異株レジオネラを感染させ、Rab5 の局在を観察。矢印はレジオネラの部分を示す。(B) 3F-Rab5 を発現している細胞に野生型及び *dotA* 変異株レジオネラを感染させ、感染後の細胞抽出液より免疫沈降を行い銀染色した。矢印は 3F-Rab5 を示す。(C) 3F-Rab5 を発現している細胞に野生型及び *dotA* 変異株レジオネラを感染させ、感染後の細胞抽出液より免疫沈降を行い抗ユビキチン抗体で検出した。(D) 3F-Rab5 を発現している細胞に野生型及び *dotA* 変異株レジオネラを記載した時間で感染させ、抗 CNX 及び FLAG 抗体で検出した。(E) 3F-Rab5 を発現している細胞に記載したレジオネラ株を感染させ、感染後の細胞抽出液より免疫沈降を行い抗ユビキチン抗体で検出した。(F) 野生型 (*Lp02*) 及び遺伝子群 7 欠損株 ($\Delta 7$) を感染させた細胞の Rab5 染色像。矢印がレジオネラを示す。

考 察

Lpg1137の解析において特筆すべき点は、Stx17がアポトーシスにも関わっていることを見いだせたことである。Stx17はミトコンドリアの切断制御に関わっていることは明らかになっていたが、アポトーシスへの関与は不明であった。今回、Lpg1137の研究を通じてStx17の新たな機能を発見出来たことは細胞生物学的にも意義深いものと考えている。また、Rab5の解析においてはユビキチン化を担う責任分子の同定により、レジオネラ感染におけるRab5のユビキチン化の重要性を証明できると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Yale University Department of Microbial Pathogenesis Dr. Stephanie Shames and Craig Roy である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Hubber A, Roy CR. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:261-83. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104034.
- 2) Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell.* 2012 Dec 7;151(6):1256-69. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.001.
- 3) Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):389-93. doi: 10.1038/nature11910.
- 4) Arasaki K, Shimizu H, Mogari H, Nishida N, Hirota N, Furuno A, et al. A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev Cell.* 2015 Feb 9;32(3):304-17. doi: 10.1016/j.devcel.2014.12.011.
- 5) O'Connor TJ, Adepoju Y, Boyd D, Isberg RR. Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 6;108(36):14733-40. doi: 10.1073/pnas.1111678108.
- 6) Arasaki K, Mikami Y, Shames SR, Inoue H, Wakana Y, Tagaya M. *Legionella* effector Lpg1137 shuts down ER-mitochondria communication through cleavage of syntaxin 17. *Nat Commun.* 2017 May 15;8:15406. doi: 10.1038/ncomms15406. PubMed PMID: 28504273; PubMed Central PMCID: PMC5440676.
- 7) Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 1997 May 16;272(20):13326-31. PubMed PMID: 9148954.