

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08782

研究課題名(和文) 寄生虫感染時の宿主翻訳制御におけるP-bodyの役割

研究課題名(英文) Role of P-body in host translation control during parasite infection

研究代表者

瀬戸 絵理 (Seto, Eri)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40431382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：P-body(PB)は細胞質に存在するRNA顆粒(mRNA-蛋白質複合体)のひとつで、mRNA分解などの翻訳制御機能をもつ。寄生原虫Trypanosoma cruzi(T. cruzi)感染の初期に形成されるPBの宿主mRNA代謝制御における役割を明らかにするため、PB形成能欠損細胞を作成し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、PB欠損細胞では原虫感染による炎症性サイトカインの発現や自然免疫関連シグナル経路の活性化が野生型細胞と比較して亢進していた。本研究の成果は、原虫がPB形成促進により宿主の自然免疫応答を負に制御して感染を成立させている可能性を示したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原体が感染した細胞では、迅速かつダイナミックなmRNA代謝調節により感染応答が惹起されると考えられるが、その制御機構については不明な点が多い。本研究により、原虫感染時に自然免疫応答に重要な複数の遺伝子の発現がPB形成依存的に抑制されていることが明らかとなった。このように、原虫が宿主の感染応答をPBによる遺伝子発現調節を利用して回避していることを示唆する報告はこれまでになく、mRNA代謝調節を介した宿主病原体相互作用について理解を深める一助となった。また、同定されたターゲット遺伝子のPBによる発現調節機構のさらなる解明により、その知見を基盤とした治療薬開発への応用につながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：P-bodies (PBs) are cytoplasmic messenger ribonucleoprotein (mRNP) granules mainly composed of mRNAs and proteins involved in translation repression and mRNA decay. To elucidate the role of PBs, which are formed in the early stages of infection with a protozoan parasite Trypanosoma cruzi (T. cruzi), in regulating host mRNA metabolism, we analyzed the impact of PB depletion on host transcriptome during T. cruzi infection. The results indicated that the expression of inflammatory cytokines and activation of innate immune-related signaling pathways were enhanced in PB-defective cells compared to wild-type cells. Our results show for the first time that T. cruzi may establish infection by negatively regulating the host innate immune response through the promotion of PB assembly.

研究分野：微生物学

キーワード：感染応答 RNA顆粒 P-body Trypanosoma cruzi

1. 研究開始当初の背景

Processing body (P-body, PB)は細胞質での相分離により形成される RNA 顆粒 (mRNA-蛋白質複合体) のひとつである。PB は定常状態の細胞にも存在するが、熱・UV・酸化ストレスなどの環境ストレス刺激でさらに形成誘導される。ストレス時にはポリソームを離れた mRNA が翻訳抑制や mRNA 分解機能をもつ RNA 結合蛋白質 (RBP) とともに PB に取り込まれ、一時的な貯蔵や分解を受けることが知られている。近年、主に国外における PB トランスクリプトーム解析により、環境ストレス時特異的に PB に局在してくる mRNA が同定されつつある。

環境ストレスのみならず、様々なウイルス感染の早期においても PB ダイナミクスに変化が起こることが多数報告されてきた。このことは PB が感染応答時の細胞質における RNA 代謝に何らかの役割を担っていることを示唆している。しかしながら、ウイルスは増殖のために宿主の翻訳システムを必要とするため、ウイルス感染で形成される PB がウイルスと宿主どちらの遺伝子の翻訳調節により利用されているのかを明確にすることは困難であると考えられる。

そこで、感染応答時の mRNA 代謝における PB の役割について宿主側に焦点を絞って解析するために、偏性細胞内寄生原虫である *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) をモデル生物として用いることにした。ウイルスとは異なり、寄生虫は宿主の翻訳システムを利用せずに増殖する。また *T. cruzi* は他の寄生原虫とは異なりエンドサイトーシスによって細胞に侵入したのち宿主由来の膜構造を破壊して細胞質内に寄生・増殖する。それ故に、異物識別排除システムである自然免疫応答時の宿主 mRNA 代謝を解析するうえで *T. cruzi* 感染が有用なモデルであると考えた。これまでの研究で、*T. cruzi* 感染の早期に宿主 PB の形成が顕著に誘導されることを見出したことから、感染応答に重要な宿主遺伝子のトリアージに PB が重要な役割を担っていると予想している。病原体の感染が起きた細胞では、感染応答の惹起や細胞の恒常性維持のために迅速かつ的確な翻訳制御が行われる必要があるが、その制御機構については不明な点が多い。本研究により、*T. cruzi* 感染時に PB により制御を受ける宿主ターゲット遺伝子やパスウェイを同定できれば、感染炎症制御の基盤技術の開発に極めて有用な知見を提供できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*T. cruzi* 感染モデルを用いて、感染応答初期の迅速かつダイナミックな宿主 mRNA 代謝制御における PB の役割を明らかにすることである。そのために、1) PB ノックアウトが *T. cruzi* 感染時のトランスクリプトーム変化にどのような影響を与えるか。2) *T. cruzi* 感染時特異的に PB にリクルートされる mRNA は何か。という設問に対して回答を得るための実験を行った。

3. 研究の方法

(1) PB 形成能欠損 (EDC4^{KO}) 細胞の作製

ヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 において、PB 形成に必須な蛋白質である EDC4 (enhancer of mRNA decapping 4) をコードする遺伝子を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトし、PB 形成能欠損 (EDC4^{KO}) 細胞を作製した。樹立した細胞クローンにおける EDC4 および他の PB マーカー蛋白質の発現をウェスタンブロット法により、また局在を免疫染色法により調べた。PB 形成誘導のポジティブコントロールとして、酸化ストレス誘導剤 (Ars; sodium arsenite) で刺激した細胞を用いた。

(2) *T. cruzi* 感染 EDC4^{KO} 細胞のトランスクリプトーム解析

(1) で作製した EDC4^{KO} 細胞と野生型 (WT) 細胞に *T. cruzi* を感染させ、感染 0, 3, 24 時間後の細胞から total RNA を抽出した。得られた各 RNA から RNA-seq 用ライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。また、解析で得られた発現変動遺伝子 (DEGs; differentially expressed genes) リストから ingenuity pathway analysis (IPA) を用いたパスウェイ解析を行った。これらの解析結果の検証には定量 PCR および ELISA を用いた。

(3) 同定した PB ターゲット遺伝子の EDC4^{KO} およびレスキュー細胞における発現解析

EDC4^{KO} 細胞に GFP のみ、GFP タグ付野生型 EDC4 もしくは PB 形成に必須の領域を欠いた変異型 EDC4 をレスキューし、安定発現細胞クローン (以下 +emp, +EDC4, +mtEDC4 と記載) を樹立した。樹立した細胞クローンにおける GFP タグ付 EDC4 の発現を、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット法により調べた。また、PB 形成能を PB マーカー蛋白質との共染色により確認した。続いて *T. cruzi* 感染各クローンにおける炎症性サイトカインの発現量を定量 PCR および ELISA により調べた。

(4) *T. cruzi* 感染時特異的に PB にリクルートされる mRNA の同定

HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させ、非感染および感染後 24 時間の細胞ライセートから、RNA 顆粒遠心分画法により PB 分画を行った。ウェスタンブロット法により分画前と分画後のサンプルにおける PB マーカー蛋白質の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) PB 形成能欠損細胞 (EDC4^{KO}) の作製

樹立した EDC4^{KO} 細胞クローンでは EDC4 蛋白質の発現が完全に欠失していた一方で、他の PB マーカー蛋白質の発現量は WT 細胞と比較して同等であることをウェスタンブロット法により確認した。また、WT 細胞では Ars 刺激により PB の形成が誘導されたが、EDC4^{KO} 細胞では刺激前と刺激後の両方において PB 顆粒構造は観察されなかった。このことから、EDC4^{KO} 細胞では PB 形成能が損なわれていることを確認できた。

(2) *T. cruzi* 感染 EDC4^{KO} 細胞のトランスクリプトーム解析

EDC4^{KO} 細胞では WT 細胞と比較して *T. cruzi* 感染により惹起される炎症性サイトカインなど自然免疫応答関連遺伝子の発現量が上昇していた。また DEGs を用いたパスウェイ解析の結果からも、EDC4^{KO} 細胞で複数の自然免疫関連シグナル経路の活性化が亢進していることがわかった。さらに、PB による発現抑制のターゲットとして同定された自然免疫関連遺伝子群について、WT 細胞と比較して EDC4^{KO} 細胞で mRNA と蛋白質レベルの両方で発現量が上昇していることを定量 PCR および ELISA により確認した。

(3) 同定した PB ターゲット遺伝子の EDC4^{KO} およびレスキュー細胞における発現解析

+EDC4 および +mtEDC4 細胞で目的のサイズの GFP タグ付 EDC4 蛋白質が発現していることをウェスタンブロット法により確認した。+EDC4 細胞では PB の形成がレスキューされ、炎症性サイトカイン遺伝子の発現量が +emp 細胞と比較して抑制されていた。一方、+mtEDC4 細胞では PB 形成はレスキューされず、炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制もおきなかった。これらの結果から、

T. cruzi 感染による炎症性サイトカイン産生が PB 形成依存的に抑制されていることを明らかにした。

(4) *T. cruzi* 感染時特異的に PB にリクルートされる mRNA の同定

ウェスタンブロット法により EDC4, 4E-T, Lsm14A といった PB 形成に必須のマーカ―蛋白質が PB 画分に濃縮されてくることを確認した。また、その画分から RNA-seq 用ライブラリ作製に適した純度の RNA を得られることも確認できた。今後はこの RNA から作製したライブラリのシーケンス解析により、感染時特異的な PB ターゲット遺伝子を同定していく予定である。また、得られたデータの正確性についてさらなる検討を行うために、(3) で樹立した EDC4^{KO} 細胞への EDC4 レスキュー細胞を対象とした免疫沈降法による PB 分画も行い、各細胞の IP 画分に濃縮されてくるトランスクリプトームの比較解析も行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Onizuka, Y., Takahashi, C., Uematsu, A., Shinjo, S., Seto, E., and Nalajima-Shimada, J.	4. 巻 21
2. 論文標題 Inhibition of autolysosome formation in host autophagy by Trypanosoma cruzi infection.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Tropica	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actatropica.2017.02.021.	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19件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 瀬戸絵理、喜名振一郎、川端麗香、鈴木万紀子、鬼塚陽子、嶋田淳子
2. 発表標題 寄生原虫Trypanosoma cruziは宿主P-body形成を誘導して自然免疫応答を抑制する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金光萌花、鬼塚陽子、瀬戸 絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi感染に対する宿主細胞の応答
3. 学会等名 第81回日本寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junko Nakajima-Shimada, Tatiana Ascencio, Yoko Onizuka, Eri Seto, Yutaka Suto
2. 発表標題 In vitro and in vivo effects of quinone derivatives on Trypanosoma cruzi
3. 学会等名 第15回国際寄生虫学会大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼塚陽子、鈴木万紀子、等々力優海、瀬戸 絵理、新崎恒平、多賀谷光男、嶋田淳子
2. 発表標題 クルーズトリパノソーマ感染による宿主オートファジー関連SNARE分子の解析
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢澤祐典、鬼塚陽子、番場みのり、村田涼子、瀬戸絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 パイオイメージングによるT. cruzi感染マウスの炎症の検出
3. 学会等名 第79回寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤祐典、鬼塚陽子、番場みのり、村田涼子、瀬戸絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 パイオイメージングによる慢性期Chagas病の炎症動態解析
3. 学会等名 第66回北関東医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金光萌花、鬼塚陽子、高橋裕子、瀬戸 絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 南米型トリパノソーマ感染による宿主オートファジー経路上流の活性化
3. 学会等名 第65回北関東医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼塚陽子, 金光萌花, 高橋裕子, 瀬戸 絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 クルーズトリパノソーマ感染細胞における宿主オートファジー抑制機構の解析
3. 学会等名 分子寄生虫学ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼塚陽子, 番場みのり, 瀬戸 絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 パイオイメージングによるマウス体内病原体検出法の開発
3. 学会等名 女性研究者アセンブリー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 番場みのり, 鬼塚陽子, 高橋裕子, 矢澤祐典, 瀬戸 絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 パイオイメージングによるTrypanosoma cruzi 感染マウスにおける原虫動態検出
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼塚陽子, 高橋裕子, 番場みのり, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 クルーズトリパノソーマ感染細胞における宿主オートファジー関連分子syntaxin17の解析
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋裕子, 鬼塚陽子, 番場みのり, 植松亜美, 新城翔子, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi感染はオートファジーアダプターp62のリン酸化を抑制する
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生井琴巳, 高橋裕子, 鬼塚陽子, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi感染細胞における飢餓誘導性オートファジー抑制
3. 学会等名 第63回群馬県医学検査学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金光萌花, 鬼塚陽子, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 T. cruzi感染細胞における宿主オートファジー経路上流に関わるAtgタンパク質発現の解析
3. 学会等名 第63回群馬県医学検査学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢澤祐典, 番場みのり, 鬼塚陽子, 東野基生, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruziの形態変化におけるTcATG8.1遺伝子の影響
3. 学会等名 第63回群馬県医学検査学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鬼塚陽子, 高橋裕子, 番場みのり, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 アメリカトリパノソーマ感染による宿主オートファジー関連SNARE分子の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋裕子, 鬼塚陽子, 番場みのり, 植松亜美, 新城翔子, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 Trypanosoma cruzi感染細胞における選択的オートファジーアダプター因子p62の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀬戸絵理, 鬼塚陽子, 嶋田淳子
2. 発表標題 南米型トリパノソーマ感染における宿主細胞質顆粒 P-bodyの翻訳調節
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鬼塚陽子, 新城翔子, 植松亜美, 瀬戸絵理, 嶋田淳子
2. 発表標題 アメリカトリパノソーマ感染細胞におけるオートリソソーム形成抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	嶋田 淳子 (Nakajima-Shimada Jyunko) (20211964)	群馬大学・保健学研究科・教授 (12301)	

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