

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790395

研究課題名(和文) 自然免疫細胞における新規 mRNA 代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) A novel mechanism for the regulation of mRNA metabolism in innate immune cells

研究代表者

瀬戸 絵理 (Seto, Eri)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40431382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは炎症応答における機能の違いからM1型とM2型の2つのサブタイプに分類される。本研究では、これらの細胞での感染応答時のmRNA代謝制御機構を明らかにするため、mRNAの翻訳不活化を担う細胞質RNA顆粒であるstress granule (SG)とprocessing body (P-body)の動態解析を行った。その結果、酸化ストレスやTLR4リガンドの刺激によるSGやP-bodyの形成誘導はM1型とM2型で異なる制御を受けることがわかった。また、EDC4蛋白質およびDcp1a蛋白質を構成因子として含むP-bodyの形成が、M1型でのIL-6産生に必要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Macrophages play fundamental roles in innate immunity. They consist of two main functional subsets, M1 and M2, which are differentially involved in inflammation and its resolution. In this study, the differences in the RNA metabolic machineries such as stress granules (SGs) and processing bodies (P-bodies) in M1- and M2-polarized human macrophage THP-1 cells were investigated. M1-THPs had less ability to assemble oxidative-stress-induced SGs than M2-THPs. In contrast, P-body assembly upon TLR4 stimulation was increased in M1-THPs as compared to M2-THPs. These results suggest that mRNA metabolism is controlled differently in M1-THPs and M2-THPs. Knocking down EDC4 or Dcp1a, which are components of P-bodies, severely reduced the production of IL-6 in M1-THPs without decreasing the amount of IL-6 mRNA, indicating that the formation of P-bodies containing EDC4 and Dcp1a is critical in the posttranscriptional regulation of IL-6.

研究分野：微生物学

キーワード：Stress granule P-body 翻訳制御 IL-6 Macrophage mRNP

1. 研究開始当初の背景

マクロファージはその活性化経路の違いによって M1 型と M2 型の 2 種類に大別される。M1 型は炎症応答を惹起し、細菌やウイルス感染に対する宿主防御に関わる。一方、M2 型は抗炎症反応や寄生虫感染応答に関与している。微生物感染による炎症やストレス応答の際、サイトカインやストレス関連蛋白質等の量的調節が迅速かつ的確に行われることで、各々のマクロファージは異なる機能を的確に発揮できると考えられる。しかし、これらの細胞の感染応答時における mRNA 翻訳制御機構については不明な点が多い。

真核生物において翻訳が不活化された mRNA は細胞質で stress granule (SG) と processing body (P-body) という 2 つの異なる細胞質内 RNA 顆粒 (mRNP) に取り込まれることが知られている。SG は環境の急激な変化 (ストレス刺激) により一過性に形成される。一方で P-body は定常状態の細胞に存在し、ストレス時に形成が促進される。両者は独立したメカニズムで形成されるが、翻訳制御に関わる複数の蛋白質を共通のコンポーネントとして有すること、これら 2 つの細胞内構造は共局在しうることから、翻訳不活化 mRNA は必要に応じて両者の間を移動していると予想され、機能的重複性が存在すると考えられる。またどちらの顆粒にも翻訳開始因子が含まれていることから、ポリソームへと戻って再度翻訳サイクルへと入ることの可能な mRNA を一時的および可逆的に貯蔵する場であり、mRNA の翻訳制御と代謝制御に重要な役割を果たしていると考えられている。

細胞内で RNA を感知する緻密なシステムを構築している自然免疫細胞においては、宿主および感染性微生物それぞれから由来する mRNA の選別や翻訳が、包括的かつダイナミックに制御されることが、感染応答

の惹起と恒常性の維持という点において重要である可能性が考えられる。また多くのサイトカインやケモカインをコードする mRNA の 3'-UTR 領域には ARE (adenine and uridine-rich element) とよばれる AU リッチなクラスターが存在し、この領域に結合する蛋白質によって分解を受けることが知られている。そして、SG や P-body の構成因子として mRNA の翻訳制御や分解を担う蛋白質のなかにも ARE 結合性を示すものがある。これらのことから、サイトカインをコードする mRNA は SG/P-body への mRNA ソーティングによって翻訳レベルでの発現調節を受けている可能性が十分考えられる。そして、このソーティングを受けた mRNA の mRNP での一時的または可逆的な貯蔵が、感染応答時のサイトカインレベルの迅速な調節を容易にしているのではないかと考えられる。

これらの背景のもと、感染応答において異なる機能を示す M1 型および M2 型ヒトマクロファージ細胞の炎症やストレス応答時における mRNP 動態変化を比較し、mRNP がこれらの細胞の感染応答時の mRNA 代謝制御にどのように関わっているかを明らかにしていきたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、M1 および M2 型に分化させたヒトマクロファージ細胞株での感染応答に、SG や P-body がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。具体的には、1) SG や P-body は自然免疫応答に必要かどうか。2) 自然免疫活性化の際に SG や P-body での翻訳制御が重要となる 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) M1 および M2 型ヒトマクロファージ細

胞株における mRNP 動態解析

M1 および M2 型に分化させたヒトマクロファージ THP-1 細胞株 (M1-THP1s, M2-THP1s) を酸化ストレス誘導剤 (Sodium arsenite) あるいは TLR4 リガンド (LPS) で刺激し、SG および P-body の細胞内局在を各顆粒のマーカー蛋白質に対する免疫染色法を用いて調べた。TIA1 (T-cell intracellular antigen 1) および G3BP1 (Ras-GAP SH3 domain binding protein 1) を SG マーカーとして、EDC4 (enhancer of mRNA decapping 4) および Dcp1a (mRNA-decapping enzyme 1a) を P-body マーカーとして用いた。

(2) P-body 形成抑制が自然免疫応答に及ぼす影響

EDC4 あるいは Dcp1a に対する siRNA をトランスフェクションした THP1 細胞を LPS で刺激し、各種サイトカインの mRNA レベルの変化を定量 PCR 法、蛋白質レベルの変化を ELISA 法により比較した。

4 . 研究成果

(1) M1 および M2 型ヒトマクロファージ細胞株における mRNP 動態解析

M1-THP1s および M2-THP1s を酸化ストレスで刺激した場合、P-body の数に変化は見られなかったが、SG の数が増加した。また、M2 型では M1 型と比較して SG 形成誘導率が有意に高かった。一方、これらの細胞を LPS で刺激した場合、M2 型では P-body 形成は誘導されなかったが、M1 型では刺激後 4 時間をピークに P-body 数が増加した。これらの結果は、炎症応答時の mRNP 形成がマクロファージの分化状態によって異なる制御を受けていることを示していた。

(2) P-body 形成抑制が自然免疫応答に及ぼす影響

EDC4 あるいは Dcp1a をノックダウンし

てこれらの構成因子を含む P-body の形成を阻害した M1-THP1s では、LPS 刺激による IL-6 蛋白質の産生量が有意に減少した。一方、IL-6 の mRNA 量には影響がなかったことから、EDC4 および Dcp1a ポジティブの P-body は IL-6 の転写後調節に必要であることが明らかとなった。またノックダウン細胞では IL-6 の翻訳抑制に関わることが知られる microRNA (hsa-let7a, miR-155) および NF-IL6 mRNA の発現が有意に上昇していたことから、ノックダウン細胞における IL-6 の産生抑制にこれらの調節因子が関与している可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Seto E., Yoshida-Sugitani R., Kobayashi

T., and Toyama-Sorimachi N.: The assembly of EDC4 and Dcp1a into processing bodies is critical for the translational regulation of IL-6. PLOS

ONE, 10(5): e0123223, 2015. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0123223.

Seto E., Inoue T., Nakatani Y., Yamada M., and Isomura H.: Processing bodies accumulate in human

cytomegalovirus-infected cells and do not affect viral replication at high multiplicity of infection. Virology, 458-459: 151-161, 2014. 査読有
DOI: 10.1016/j.virol.2014.04.022.

Vereide D.T., Seto E., Chiu Y.F., Hayes M., Tagawa T., Grundhoff A., Hammerschmidt W., and Sugden B.:

Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. Oncogene, 33(10), 1258-1264, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/onc. 2013.71.

[学会発表](計5件)

瀬戸絵理、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染によって形成誘導される宿主細胞質顆粒 P-body は amastigote の増殖を抑制する: 第 84 回日本寄生虫学会大会、三鷹市、2015 年 3 月

瀬戸絵理、嶋田淳子. Dynamic analysis of mRNPs (messenger ribonucleoprotein particles) during *Trypanosoma cruzi* infection: 13th International Congress of Parasitology. メキシコ Mexico City, 2014 年 8 月

瀬戸絵理、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染における宿主ストレス顆粒の動態解析: 第 83 回日本寄生虫学会大会、松山市、2014 年 3 月

瀬戸絵理、磯村寛樹. ヒトサイトメガロウイルスの宿主ストレス応答を利用した翻訳抑制: 第 61 回日本ウイルス学会学術総会、神戸市、2013 年 11 月

瀬戸絵理、磯村寛樹. 宿主の mRNA 代謝制御の場である Processing-body を利用したヒトサイトメガロウイルスの翻訳制御機構: 第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 絵理 (SETO, Eri)
群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号: 40431382

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし