

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860256

研究課題名(和文) 感染応答時にmRNPで翻訳調節を受ける宿主遺伝子の網羅的同定

研究課題名(英文) Identification of cellular mRNAs targeted to mRNPs during 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：P-bodyは真核生物における細胞質mRNP顆粒のひとつで、mRNAの分解や翻訳を担う。寄生原虫Trypanosoma cruzi (T. cruzi) 感染による宿主P-bodyの変化を調べたところ、感染初期にP-body形成が顕著に誘導された。また、P-body形成を阻害すると、感染効率および細胞当たりの原虫数が増加した。この効果は、抗寄生虫応答に関わる宿主遺伝子がP-bodyで翻訳調節を受けることによるものと考えられた。そこで、感染時特異的にP-bodyにリクルートされる遺伝子を同定するため、P-body構成蛋白質の免疫沈降により精製したmRNAを次世代シーケンシングで解析した。

研究成果の概要(英文)：P-bodies are cytoplasmic mRNP granules involved in translation and degradation of mRNAs. In this study, we investigated the effect of Trypanosoma cruzi (T. cruzi) infection on P-body assembly in host cells, and found that the number of P-body foci dramatically increased within 24h post-infection. RNAi-mediated knockdown of P-bodies significantly enhanced the infectivity and growth of T. cruzi. It was therefore expected that accumulated P-bodies may positively regulate the expression of mRNAs required for anti-parasitic immune responses. To identify cellular mRNAs targeted to P-bodies during infection, we purified P-bodies using immunoprecipitation, and analyzed the coimmunoprecipitated mRNAs by deep sequencing.

研究分野：微生物学

キーワード：P - body mRNP Trypanosoma cruzi

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインやストレス応答関連蛋白質の迅速な量的調節のため、感染初期の宿主 mRNA 翻訳活性は短時間でダイナミックに変化する。しかし、その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 P-body という 2 つの異なる mRNP (mRNA-蛋白質複合体) 顆粒にとりこまれる。SG は宿主細胞への様々なストレス刺激により一過性に形成されることから、翻訳サイクルへと戻ることのできる mRNA を一時的に貯蔵する場として考えられてきた。一方、P-body は microRNA による mRNA 分解や翻訳抑制の場として同定されてきた。P-body には mRNA 分解に必要な蛋白質がリクルートされてくることも知られている。細胞質で mRNA は翻訳が停止しているこれら mRNP と翻訳が進行しているポリソームとの間を絶えず迅速に移動していると考えられている。近年、特に RNA ウイルス感染において mRNP の形成促進や阻害がおこること、また RNA ウイルスの中には自身の RNA が mRNP への取り込みによって翻訳抑制を受けることを防ぐため、mRNP 構成蛋白質を分解してその形成を阻害するシステムを備えるものがあることがわかってきた。

微生物感染がおこった細胞では感染応答の惹起と恒常性の維持のため、mRNA の選択的翻訳が迅速かつ緻密に行われることが重要であると考えられる。これまでのヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染における mRNP 顆粒の動態解析で、SG の形成は回避されるが P-body の形成は著名に誘導されることがわかった。また、その P-body には microRNA による mRNA 分解を担う Ago2 蛋白質がリクルートされてこないが、一方では一部の翻訳開始因子がリクルートされてくることを見いだした。そして siRNA によって P-body の形成を阻害した細胞への HCMV 感

染では、ウイルス感染によって発現が上昇することが知られている宿主の mRNA 量は変化しないにも関わらず、蛋白質発現量が減少した。これまで P-body は主に mRNA 分解の場と考えられてきたが、これらの結果から HCMV 感染でこれまでの定義とは異なる non-canonical P-body の形成が誘導され、その P-body は mRNA を翻訳サイクルへの移行に備えて一時的に蓄える場として機能することが示唆された。

このようにウイルス感染によって誘導される P-body が宿主遺伝子の翻訳維持に貢献するという報告は国内外で未だ例がない。そこで本課題では、感染応答時の P-body の mRNA 代謝における役割についてさらに宿主側に焦点を絞って解析するため、宿主の翻訳システムを利用せずに増殖するという点でウイルスとは異なる寄生虫を感染した時の P-body 動態解析を行った。*Trypanosoma cruzi* (*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。*T. cruzi* が感染した細胞で P-body によって支配を受ける宿主側 mRNA を生化学的手法および次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定することで、P-body が宿主感染応答に重要な mRNA の翻訳制御にどのように関わっているかを明らかにできると予想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、P-body が感染応答の初期におこるダイナミックな宿主翻訳制御においてどのような役割を果たすのか *T. cruzi* 感染モデルを用いて明らかにすることを目的とした。具体的には、1) P-body は抗寄生虫応答に必要かどうか。2) 抗寄生虫応答の際に

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) *T. cruzi* 感染における宿主 P-body 動態解析

ヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 に *T. cruzi* を感染させ、感染初期から時間経過ごとの P-body の細胞内局在を、マーカー蛋白質 EDC4 (enhancer of mRNA decapping 4) および Dcp1a (mRNA-decapping enzyme 1a) に対する免疫染色法を用いて調べた。P-body 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 (Sodium arsenite) で刺激した細胞を用いた。さらに、P-body 構成蛋白質をコードする mRNA および蛋白質の発現量を定量 PCR 法およびウェスタンブロット法により調べた。

#### (2) P-body 形成抑制が *T. cruzi* 感染に及ぼす影響

P-body の形成に必須な蛋白質である EDC4 あるいは Lsm14A に対する siRNA をトランスフェクションした HT1080 細胞に *T. cruzi* を感染させて経時的に細胞を固定した。Hoechst 33342 により細胞内の原虫 (amastigote) の核を染色し、感染効率および細胞当たりの原虫数を調べた。

#### (3) *T. cruzi* 感染時特異的に P-body 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 cell lysate から、Lsm14A 蛋白質に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降前の cell lysate (input sample) と沈降後 (IPed sample) のサンプルそれぞれから抽出した RNA より cDNA ライブラリを調整し、イルミナ社 Nextseq 500 を用いてシーケンシング解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *T. cruzi* 感染における宿主 P-body 動態解

### 析

*T. cruzi* 感染 1 時間後に細胞当たりの平均 P-body 数は非感染細胞と比較して約 3 倍に増加した。感染 3 時間後には非感染細胞よりも P-body 数は減少したが、その後再び増加し、24 時間後に最大となった。P-body 数が増加しても、P-body 構成蛋白質をコードする mRNA および P-body 構成蛋白質の発現量に大きな変化は見られなかったことから、P-body の形成は P-body 構成蛋白質の局在変化によって誘導されていると考えられた。

#### (2) P-body 形成抑制が *T. cruzi* 感染に及ぼす影響

EDC4 あるいは Lsm14A をノックダウンした細胞では P-body の形成が著しく抑制された。これらの細胞ではコントロール細胞と比較して感染 9 時間後から感染効率が上昇し、細胞内原虫数も増加した。このように感染早期から差が見られたことから、P-body の形成抑制は原虫の侵入を促進すると考えられた。また、細胞内原虫数の差は感染 9 時間から 48 時間後にかけて増加したことから、P-body の形成抑制によって原虫の増殖も促進されることがわかった。

#### (3) *T. cruzi* 感染時特異的に P-body 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 Lsm14A 蛋白質が効率よく沈降されていることを確認した。Lsm14A は Sm 様蛋白質ファミリーメンバーであり、U6 snRNA と結合することがすでに知られている。そこで、input sample と IPed sample のそれぞれから抽出した RNA より cDNA を作製し、定量 PCR 法により U6 snRNA 量を調べた。その結果、input sample と比較して IPed sample の U6 RNA 量が 10 倍であったことから、Lsm14A と結合している RNA を効率よく沈降できていると考えられた。次に、input sample から精製した mRNA と IPed sample から抽出した RNA から、次世代シーケンス解析用の

cDNA ライブラリを調整し、シーケンシング解析を行った。その結果、感染細胞で input sample と比較して IPed sample により濃縮されてくる 325 個の遺伝子を同定した。そのうち、非感染細胞と比較して感染細胞で 2 倍以上 IPed sample に濃縮されてきたのは 5 個であった。このように、感染時特異的に Lsm14A にリクルートされてくる候補遺伝子を絞り込んだが、定量 PCR による比較では同定した遺伝子の Lsm14A への結合量に非感染細胞と感染細胞で有意な差が見られなかった。今後はデータの正確性についてさらなる検討を重ねて行く予定である。

#### 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 4 件)

Onizuka Y., Takahashi C., Uematsu A., Shinjo S., Seto E., and Nakajima-Shimada J.: Inhibition of autolysosome formation in host autophagy by *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Tropica*, 170: 57-62, 2017. 査読有

DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.02.021

Seto E., Onizuka Y., and Nakajima-Shimada J.: Host cytoplasmic processing bodies assembled by *Trypanosoma cruzi* during infection exert anti-parasitic activity. *Parasitology International*, 64(6): 540-546, 2015. 査読有

DOI: 10.1016/j.parint.2015.07.009

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

[学会発表](計 17 件)

鬼塚陽子、高橋裕子、番場みのり、瀬戸絵理、嶋田淳子. クルーズトリパノソーム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: 第 87 回日本寄生虫学会大会、東京、2018 年 3 月

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. *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: 第 87 回日本寄生虫学会大会、東京、2018 年 3 月

生井琴巳、高橋裕子、鬼塚陽子、瀬戸絵理、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染細胞における飢餓誘導性オートファジー抑制: 第 63 回群馬県医学検査学会、前橋市、2017 年 12 月

金光萌花、鬼塚陽子、瀬戸絵理、嶋田淳子. *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: 第 63 回群馬県医学検査学会、前橋市、2017 年 12 月  
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.

*Trypanosoma cruzi* の形態変化における *TcATG8.1* 遺伝子の影響: 第 63 回群馬県医学検査学会、前橋市、2017 年 12 月  
鬼塚陽子、高橋裕子、番場みのり、瀬戸絵理、嶋田淳子. アメリカトリパノソーム感染による宿主オートファジー関連 SNARE 分子の解析: 第 40 回日本分子生物学会年会、神戸市、2017 年 12 月

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. *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: 第 40 回日本分子生物学会年会、神戸市、2017 年 12 月

瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子. 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: 第 86 回日本寄生虫学会大会、札幌市、2017 年 5 月

鬼塚陽子、新城翔子、植松亜美、瀬戸絵理、嶋田淳子. 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: 第 86 回日本寄生虫学会大会、札幌市、2017 年 5 月

鬼塚陽子、高橋裕子、植松亜美、新城翔子、瀬戸絵理、嶋田淳子. アメリカトリパノソーマは p62 を介する宿主の選択的オートファジーを回避する: 第 39 回日本分子生物学会大会、横浜市、2016 年 12 月

瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染における宿主細胞質顆粒 P-body の翻訳調節: 第 39 回日本分子生物学会大会、横浜市、2016 年 11 月

植松亜美、新城翔子、瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染細胞における宿主オートファジー標的認識について: 第 63 回北関東医学会、前橋市、2016 年 9 月

新城翔子、植松亜美、瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染は飢餓誘導性のオートファジーを抑制する: 第 63 回北関東医学会、前橋市、2016 年 9 月

鬼塚陽子、植松亜美、新城翔子、瀬戸絵理、嶋田淳子. アメリカトリパノソ-

マは宿主のオートファジー経路のオートファゴソーム形成を抑制する: 第 38 回日本分子生物学会大会、神戸市、2015 年 12 月

新城翔子、植松亜美、瀬戸絵理、鬼塚陽子、嶋田淳子. *Trypanosoma cruzi* 感染細胞におけるオートファゴソーム形成に関わる Atg 遺伝子、タンパク質の発現: 第 62 回北関東医学会、前橋市、2015 年 10 月

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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし