

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03667

研究課題名(和文)ミトコンドリア・ダイナミクスの分子機構の解明と高次生理機能の考察

研究課題名(英文) Mechanism of mitochondrial dynamics and its physiological relevance

研究代表者

小柴 琢己 (Koshiba, Takumi)

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：70403970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、真核細胞においてエネルギーの産生以外にも多くの生命活動で重要な役割を担うオルガネラである。その形態はユニークで、動的に融合と分裂を繰り返すダイナミックなオルガネラである。本研究では、哺乳動物におけるミトコンドリア・ダイナミクスの分子基盤解析を通じて、この現象の高次生理機能への意義を明らかにすることを目的とした。本研究では、期間全体を通じてミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の探索を試みた。その探索結果を基に、同定された各候補分子の構造機能解析を進め、最終的にそれら因子による高次生理機能への役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳動物におけるミトコンドリア・ダイナミクスの生理的な重要性と、その仕組みに関して分子レベルで明らかにした課題である。具体的に達成された事項として、ミトコンドリア・ダイナミクスに関わる新規な分子群を明らかにし、それらを介した抗ウイルス免疫への作用機序も明らかにした。一般に、ミトコンドリア・ダイナミクスの破綻は、神経変性疾患の発症や目の異常以外にも、糖尿病やガンの発病などとも深く関係し、私たちの健康に多大な影響を及ぼすことが知られている。今回の研究成果は、このような疾患や病態の仕組みを理解する上で学術的な知見を提供することに繋がると思われる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria are dynamic organelles that undergo cycles of homotypic fusion and fission events, which are believed to play an important role in controlling organelle number, subcellular distribution, morphology, and ATP production. In some cells, fusion of numerous mitochondria into a well-organized reticulum is thought to enable transmission of mitochondrial membrane potential, thereby facilitating ATP generation to active regions of the cells. However, the reality of the mitochondrial dynamics in their functional significance is still poorly understood. In this project, we are trying to figure out the relationship between mitochondrial dynamics and its physiological relevancy, especially for innate immune response against RNA viruses.

To address this issue, we use a wide range of approaches, including cell biology, biochemistry, and biophysics.

研究分野：生物物理学

キーワード：ミトコンドリア 分子基盤解析 高次機能 自然免疫 RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、真核細胞内においてエネルギーの産生の場として、それ以外にも多くの生命活動で重要な役割を担う細胞小器官(オルガネラ)である。その形態はユニークで、動的に融合と分裂を絶えず繰り返すダイナミックなオルガネラである。これまでの遺伝学的な研究を中心に、ミトコンドリアのダイナミックな特性が、生物の発生段階において不可欠であることが次第に明らかになってきた。ところが、このミトコンドリア・ダイナミクスについての生理的な意義や、その作用機序に関する詳細は、ほとんど理解されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、哺乳動物におけるミトコンドリア・ダイナミクスの分子基盤解析を通じて、この現象の高次生理機能への意義を明らかにすることを目的とした。本研究では、期間全体を通じてミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の探索を試みた。その探索結果を基に、同定された各候補分子の構造機能解析を進め、最終的にそれら因子による高次生理機能への役割解明を目指した。この目的の達成に向けて、本研究では具体的に以下の課題を行った。

- 1) ミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の網羅的な探索
- 2) ミトコンドリア・ダイナミクスに関連する因子の遺伝子改変マウスの作製
- 3) ミトコンドリア・ダイナミクスの自然免疫における役割の解明

3. 研究の方法

1) ミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の網羅的な探索

本研究では、ミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の網羅的な探索を行うために、各分子に超耐熱性真正細菌由来ビオチンリガーゼ (BirA) を付加した組換え遺伝子 (Bait) を初めに作製し、その組換え遺伝子の安定発現株を主に用いて相互作用探索を行った。

2) ミトコンドリア・ダイナミクスに関連する因子の遺伝子改変マウスの作製

本研究では、ミトコンドリア・ダイナミクスに関連する因子群の中で、これまであまり解析が行われていないミトコンドリア外膜局在分子 (MUL1) の遺伝子改変マウスの作製を研究分担者らと共にを行った。Mull 遺伝子改変マウスは、予定通り、研究期間内に作製することが出来た。

3) ミトコンドリア・ダイナミクスの自然免疫における役割の解析

本研究では、ミトコンドリア・ダイナミクスの生理的な意義を明らかにすることを目的として、特にその役割の自然免疫における関わりについて解析した。実際には、哺乳動物培養細胞を利用して、ミトコンドリア・ダイナミクス破綻の影響が細胞の RNA ウイルス (主にセンダイウイルスや A 型インフルエンザウイルス) 感染時の自然免疫応答に与える効果を免疫生化学、及び細胞生物学的な実験を通じて明らかにした。

4. 研究成果

1) ミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に関わる分子群の網羅的な探索

哺乳動物において、ミトコンドリア・ダイナミクスに関与するタンパク質は、これまでに数十種類以上発見されている（生物物理 2011）。その主要なタンパク質は、MFN（融合）、OPA1（融合）、DRP1（分裂）、MIRO（輸送）、MUL1（修飾）、PHB（膜動態）などが挙げられ、特に PHB に関しては、その機能的役割が不明な点が多い。そこで本研究では、特にミトコンドリア内膜タンパク質 PHB を介したミトコンドリア・ダイナミクスの調節機構に着目した。

1-1) PHB 相互作用分子の探索

初めに、ヒトやマウス由来の培養細胞からミトコンドリアを生化学的に分画し、PHB の相互作用分子を免疫沈降法 (IP) や近位依存性ビオチン標識法 (BioID) を用いて網羅的に探索したところ、PHB は多くのミトコンドリアタンパク質と相互作用していることが明らかになった (図 1)。

1-2) PHB の立体構造解析

次に、大腸菌を宿主として、PHB の組換えタンパク質を作製した。組換え体を用いた *in vitro* の実験から、PHB の C 末端領域は水溶液中で会合状態を形成しており、さらにこの領域の α -

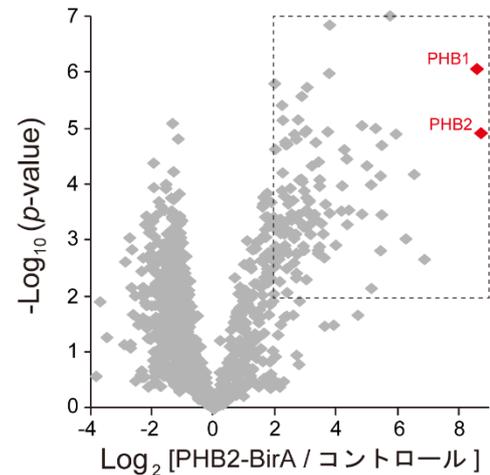


図 1. BioID 法による PHB 複合体の解析。枠内が PHB と隣接した主な分子群。

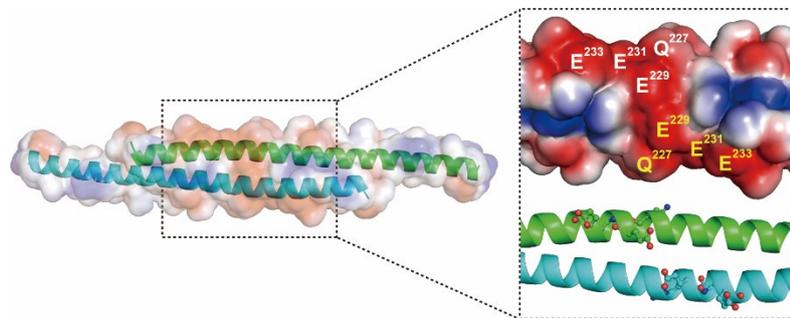


図 2. PHB の C 末端領域の結晶構造。

PHB は二量体を形成し、機能発現に必須の酸性クラスターを構成する。

ヘリックス含有量が非常に高いことが示された。そこで、PHB の C 末端領域の組換え体を用いた X 線結晶構造解析を行ったところ、この領域は coiled-coil による二量体構造を形成していることを明らかにした (*iScience* 2019)。さらに、得られた結晶構造から、その表面電荷を計算したところ、複数の酸性アミノ酸 (主にグルタミン酸) から成る負電荷のクラスターが PHB 内に存在していることを確認した (図 2)。

1-3) PHB の機能解析

PHB 内に存在する酸性クラスターの機能的意義を明らかにするために、この負電荷を相殺するようなアミノ酸置換 (正電荷) を導入し、PHB 変異体を作製した。今回新たに作製した PHB 変異体を、そのノックアウト細胞株に入れ戻し実験を行い、入れ戻された細胞株を用いた機能解析を行ったところ、変異細胞株では上記で見られたような PHB 結合分子

の存在が確認できなくなり、細胞内で PHB を中心とした複合体の形成は行われていないことが明らかになった。さらに、この変異株のミトコンドリア・ダイナミクスを蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、野生型で見られるようなダイナミックなミトコンドリアは確認できなかった。以上のことから、PHB はミトコンドリア内で多くのタンパク質の足場として機能し、ミトコンドリア・ダイナミクスを調節していることが明らかになった。

2) ミトコンドリア・ダイナミクスに関連する因子の遺伝子改変マウスの作製

本研究では、ミトコンドリアの外膜に局在する E3 ユビキチンリガーゼ *Mul1* の遺伝子改変マウスを研究分担者と共に作製した。その研究目的として、MUL1 によるミトコンドリア・ダイナミクスとの関連性を生理的な観点から明らかにすることを目指した。

実際には、ヘテロ接合体マウスの交配によりホモ接合体マウスを作製した。その後、ホモ接合体マウスの入れ戻し交配を 10 世代まで進め、誕生した変異体マウスを野生型マウスと比較したところ、変異体の方が有意に低体重であることが確認できた (図 3)。その後、両個体群の体重変化を追跡したが、両群間の差が埋まることはなかった。この結果から、個体における MUL1 の生理的な意義として、代謝系に関与していることが示唆された。

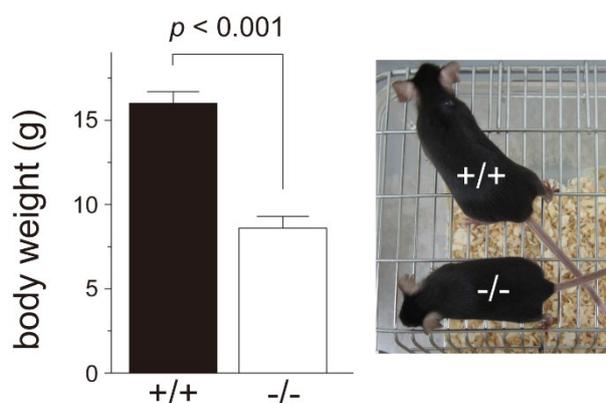


図 3. *Mul1* 遺伝子改変マウスの特性。
ノックアウトマウスと野生型マウスの体重比較。

3) ミトコンドリア・ダイナミクスの自然免疫における役割の解析

本研究では、宿主の RNA ウイルス感染に際して、ミトコンドリア・ダイナミクスがどのような役割を担うのか、その意義を分子レベルで理解することを目的とした。そこで、ヒト及びマウスの各種培養細胞にセンダイウイルス (SeV) の感染実験を行い、その際のミトコンドリア・ダイナミクスの変化や、自然免疫応答時のミトコンドリアタンパク質の機能を生化学と細胞生物学的な実験により詳細に調べた。

3-1) ミトコンドリア融合分子 OPA1 の自然免疫における役割

ミトコンドリア・ダイナミクスの生理的な意義として、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の安定維持が挙げられる。特に、ミトコンドリア融合はその上で重要な位置づけであり、OPA1 はその機能における中心的な分子である。そこで、OPA1 の機能解析を行った。

OPA1 が欠損した null 細胞では、ミトコンドリアの融合が起こらないために、結果として一方的なミトコンドリア分裂が進行する。この細胞の mtDNA 含有量 (コピー数) を定量 PCR により調べたところ、野生型細胞と比較して mtDNA 量が約 10%程度にまで低下していることが確認できた (*Sci. Rep.* 2017)。次に、この変異細胞に OPA1 遺伝子を入れ戻すと、ミトコンドリア・ダイナミクスは回復し、mtDNA コピー数も野生型レベルにまで戻っていた。そこで、これらの細胞株へ SeV の感染実験を行い、その自然免疫応答を調べたところ、感染に伴う IFN- β の産生量は、綺麗に OPA1 の発現レベルと相関性が見られた。従って、OPA1 を介したミトコンドリア・ダイナミクスの調節は自然免疫の活性化において重要であ

ることが示された。

3-2) PHB 複合体による自然免疫応答の制御

上記1の項目で、PHBの相互作用分子の探索を行ったが、PHBインタラクトーム内にMAVSが含まれていた(*iScience* 2019)。実際に、免疫沈降実験により別検証した結果でも、PHB-MAVS間の結合は確認できた。他にもPHBインタラクトーム内には、CLPBやATAD3Aなどのミトコンドリア膜間スペースのタンパク質が多く含まれていた。実験では、PHBノックアウト細胞株にSeVの感染実験を行い、その自然免疫応答を調べた。その結果、自然免疫の活性化に伴うIFN- β とIL-6の産生量は、PHBの有無に依存していることが確認できた。さらに、PHB内の酸性クラスターを置換した変異体の入れ戻し細胞でも、PHBノックアウト細胞株と同様にSeV感染に伴う免疫応答は確認されなかった。以上の実験から、PHB複合体はミトコンドリア・ダイナミクスの調節以外にも、自然免疫を制御する重要な働きがあることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yasukawa Kai, Kinoshita Daisuke, Yaku Keisuke, Nakagawa Takashi, Koshiba Takumi	4. 巻 295
2. 論文標題 The microRNAs miR-302b and miR-372 regulate mitochondrial metabolism via the SLC25A12 transporter, which controls MAVS-mediated antiviral innate immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 444 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010511	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 -
1. 著者名 Koshiba Takumi, Kosako Hidetaka	4. 巻 167
2. 論文標題 Mass spectrometry-based methods for analysing the mitochondrial interactome in mammalian cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 225 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Miyu, Koshiba Takumi, Ichinohe Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Influenza A virus M2 protein triggers mitochondrial DNA-mediated antiviral immune responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12632-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshinaka Takahiro, Kosako Hidetaka, Yoshizumi Takuma, Furukawa Ryo, Hirano Yu, Kuge Osamu, Tamada Taro, Koshiba Takumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Structural Basis of Mitochondrial Scaffolds by Prohibitin Complexes: Insight into a Role of the Coiled-Coil Region	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1065 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.08.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小柴琢己	4. 巻 37
2. 論文標題 ミトコンドリアと抗ウイルス自然免疫シグナル	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 145 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Moriyama, M., Igarashi, M., Koshihara, T., Irie, T., Takada, A., and Ichinohe, T.	4. 巻 92
2. 論文標題 Two conserved amino acids within the NSs of SFTS phlebovirus are essential for anti-interferon activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Virol.	6. 最初と最後の頁 e00706-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00706-18	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 -

1. 著者名 Maruzuru, Y., Ichinohe, T., Sato, R., Miyake, K., Okano, T., Suzuki, T., Koshihara, T., Koyanagi, N., Tsuda, S., Watanabe, M., Arii, J., Kato, A., and Kawaguchi, Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Herpes simplex virus 1 VP22 inhibits AIM2-dependent inflammasome activation to enable efficient viral replication	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Host Microbe	6. 最初と最後の頁 254-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chom.2017.12.014	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 -

1. 著者名 小柴琢己	4. 巻 265
2. 論文標題 ミトコンドリアを介した自然免疫応答	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1101-1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yoshizumi Takuma, Imamura Hiromi, Taku Tomohiro, Kuroki Takahiro, Kawaguchi Atsushi, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Koshiba Takumi	4. 巻 7
2. 論文標題 RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05808-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小柴琢己、今村博臣	4. 巻 57
2. 論文標題 蛍光ATPプローブによるミトコンドリア呼吸活性の評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 268 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.57.268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小柴琢己	4. 巻 47
2. 論文標題 インフルエンザウイルス感染に伴うミトコンドリア形態への影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 感染・炎症・免疫	6. 最初と最後の頁 42 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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9件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takumi Koshiba
2. 発表標題 Structural basis of mitochondrial scaffolds by prohibitin complexes
3. 学会等名 The 16th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 ミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 ミトコンドリアにおける自然免疫応答ゾーンの解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 Structure-function analysis of the prohibitin complexes in mitochondria
3. 学会等名 第71回 日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Koshiba
2. 発表標題 Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals
3. 学会等名 The 15th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Koshiba
2. 発表標題 Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals
3. 学会等名 The 3rd Asian Invertebrate Immunity Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質による膜構造への影響
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 ミトコンドリアの呼吸活性と抗ウイルス自然免疫
3. 学会等名 第69回 日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小柴琢己
2. 発表標題 ミトコンドリア・ダイナミクスの生理機能解析
3. 学会等名 平成29年度「AMED難治性疾患実用化研究事業・ミトコンドリアシンポジウム」(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページの公開 http://www.sci.fukuoka-u.ac.jp/lab/chem/koshiba/ researchmapでの情報公開 https://researchmap.jp/read0124036/?lang=japanese

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
研究 分 担 者	渡邊 利雄 (Watanabe Toshio) (60201208)	奈良女子大学・自然科学系・教授 (14602)	遺伝子改変マウスの作製、及びその表現型の解析
研究 協 力 者	玉田 太郎 (Tamada Taro) (50391248)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発・高崎量子応用研究 所・上席研究員 (82502)	タンパク質のX線結晶構造解析