

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770099

研究課題名(和文)ミトコンドリアタンパク質を介した抗ウイルス自然免疫の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural basis of mitochondrial proteins involved in anti-viral innate immunity

研究代表者

小柴 琢己 (KOSHIBA, TAKUMI)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70403970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物における細胞内抗ウイルス自然免疫応答はミトコンドリアに依存的であり、その反応過程でMAVSが重要な役割を担っていることが知られている。本研究では、BRET実験を用いたMAVSの構造機能解析を展開し、MAVS活性化状態における構造生物学的な重要な知見を得ることが出来た。本成果により、ミトコンドリア膜上における抗ウイルス免疫の作用機序の一端を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria-mediated antiviral innate immunity in mammals depends on the activation of RIG-I signaling pathway, and a mitochondrial membrane protein, MAVS plays an important role in the pathway. In the present study, we found that the activated MAVS conformation is a highly ordered oligomer state by using BRET experiments. Our results reveal structural features underlying the regulation mechanism of MAVS signaling on the mitochondrial membrane.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ミトコンドリア 抗ウイルス免疫 MAVS 分子間相互作用解析 BRET

1. 研究開始当初の背景

近年、高等動物におけるミトコンドリアの新たな生理現象として、ウイルスに対する自然免疫と密接に関係していることがアメリカのグループによって報告された (Seth *et al.*, *Cell*, 2005)。これまで、哺乳動物の RNA ウイルスに対する自然免疫では、Toll 様受容体 (TLR-3) が、その一躍を担っていることが知られていた。その反応系は、ウイルスの核酸 (RNA) を、主にエンドソーム内に発現している TLR-3 が認識し、その後のシグナル伝達反応が行われ、最終的にウイルス制御因子である I 型インターフェロン (IFN) を産生する免疫応答反応を誘引するものである (TLR 経路)。一方、TLR-3 非依存的に進行する経路も存在することが明らかになった (RIG-I 経路)。例えば C 型肝炎ウイルスやセンドライウイルスのように、生体膜融合により宿主細胞内に移行したウイルス由来の二本鎖 RNA は、細胞内 RNA センサー分子である RIG-I、または MDA-5 によって細胞質中で感染初期に認識され、その情報がミトコンドリア外膜上に局在する膜タンパク質 MAVS (Mitochondrial anti-viral signaling) へと伝達される。その後、一連のシグナル伝達過程を経て、RIG-I 経路でも TLR-3 経路と同様に転写因子 (IRF-3/7 と NF- κ B) の活性化、最終的には IFN 産生へと導かれる (Koshiba, *BBA*, 2013)。このように、「ミトコンドリアを介した自然免疫応答」の理解は、現在では大変興味深いテーマの一つとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア依存による抗ウイルス自然免疫機構を構造基盤的に理解することを目的とした。これまで、宿主細胞のウイルス感染に伴ったシグナルがどのように MAVS まで伝達され、また MAVS から下流へと情報が伝わるのか? 構造に基づく知見が極端に不足していた。本研究は、そのような疑問に焦点を当てて、細胞内でのミトコンドリアを介した抗ウイルス免疫機構を分子レベルからその作用機序を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

分子生物学的な実験手法を用いて、ヒト MAVS cDNA にそれぞれルシフェラーゼ (Rluc) 及び黄色タンパク質 (YFP) をコードする遺伝子を融合させた各組換え遺伝子を作製し、それら遺伝子を HEK293 細胞にトランスフェクション、その後、生物共鳴エネルギー転移 (BRET) を利用した分子間相互作用解析により、MAVS 分子間の会合体形成と、シグナル伝達に伴う転写活性 (活性測定はレポーターアッセイにより) との相関性を詳細に調べた。

4. 研究成果

(i) ミトコンドリア膜上における MAVS 会合

体形成の解析:

まず初めに、BRET 実験に用いる Rluc-MAVS、及び YFP-MAVS の融合タグ付加による機能への影響を調べる目的で、それぞれの組換え遺伝子を培養細胞にトランスフェクションし、IFN- β または NF- κ B レポーター遺伝子による転写活性への効果を調べた。その結果、タグ付加による機能への影響は特に起こっていないことが明らかとなり (Sasaki *et al.*, *BBA*, 2013) 従ってこれら組換えタンパク質は野生型 MAVS と同様の構造・機能を維持しているものとして、以降の実験に用いることにした。

次に、Rluc-MAVS 及び YFP-MAVS を共同トランスフェクションし、ルシフェリン類似体であるセリテラジン存在下で BRET 実験を行った。その結果、Rluc-MAVS 発現細胞では、YFP-MAVS の用量依存的に分子間相互作用を表わす綺麗な飽和曲線が得られ、このことにより MAVS 分子は、シグナル伝達を惹起する際に少なくとも二量体を形成することが明らかになった。

(ii) MAVS 会合体は三量体以上の複合体を形成している:

上記、BRET 実験により、MAVS 活性化には分子の会合体形成が必要であることが示された。そこで、MAVS 会合体は二量体以上の高次会合体を形成しているかを調べるために、YFP 分子を 2 つに分割して、会合した時のみに蛍光を発することを利用した BiFC (bimolecular fluorescence complementation) と BRET を組み合わせる実験系を構築した。この BRET 実験により、MAVS は三分子種以上での会合体を形成していることが明らかになり、本研究で MAVS 活性化時の会合体形成とシグナル伝達機構との相関性を見出すことが出来た。

(iii) MAVS 阻害剤存在下における構造機能解析:

最後に、MAVS 阻害剤存在下における BRET 実験を行った。私たちのこれまでの研究により、ミトコンドリア融合因子の一つである Mfn2 は、RIG-I 経路の阻害剤として機能し、その作用機序として MAVS に結合することでその働きを抑制していることが明らかになっている (Yasukawa *et al.*, *Sci. Signal.*, 2009)。そこで、MAVS-MAVS 会合時において、Mfn2 を拮抗させ、その構造的影響がどのように現れるのかを BRET で観測した。その結果、Mfn2 存在下では、MAVS-MAVS 会合に伴った BRET シグナル値が有意に低下していることを観察でき (Sasaki *et al.*, *BBA*, 2013) 対象実験として行った他のミトコンドリアタンパク質介在下ではそのような抑制効果は見られなかった。また、Mfn2 のどの領域がこのような抑制効果をもたらしているのかを機能解析と共に進めた結果、HR1 領域が MAVS シグナルを阻害していること、

さらに MAVS 間の分子間相互作用に干渉していることが示された。従って、これまでその作用機序が明らかになっていなかった Mfn2 による RIG-I 経路の阻害は、Mfn2 が MAVS 同士の相互作用を物理的に阻害することで抑制していたことが構造学的に明らかになった。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1). Ichinohe, T., Yamazaki, T., Koshiba, T., and Yanagi, Y. (2013). A mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 17963-17968. DOI: 10.1073/pnas.1312571110 (査読有り)

2). Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T., and Kawabata, S. (2013). Transglutaminase-catalyzed protein-protein cross-linking suppresses the activity of the NF- κ B-like transcription factor Relish. *Sci. Signal.*, 6, ra61. DOI: 10.1126/scisignal.2003970 (査読有り)

3). Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., Oka, T., Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K., and Ishihara, N. (2013). Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.*, 126, 176-185. DOI: 10.1242/jcs.111211 (査読有り)

4). Sasaki, O., Yoshizumi, T., Kuboyama, M., Ishihara, T., Suzuki, E., Kawabata, S., and Koshiba, T. (2013). A structural perspective of the MAVS-regulatory mechanism on the mitochondrial outer membrane using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1833, 1017-1027. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.010 (査読有り)

5). Koshiba, T. (2013). Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1833, 225-232. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.005 (査読有り)

6). 小柴琢己 (2013). ミトコンドリアと抗ウイルス免疫. *生化学*, 85, 336-344. (査読なし)

7). Tagawa, K., Yoshihara, T., Shibata, T., Kitazaki, K., Endo, Y., Fujita, T., Koshiba, T., and Kawabata, S. (2012). Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or

-independent manner. *PLoS ONE*, 7, e36783. DOI: 10.1371/journal.pone.0036783 (査読有り)

〔学会発表〕(計 8 件)

1). Koshiba, T.: 「Mitochondria and antiviral signaling」 *The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (DynaMito2013)* (Organizers; Prof. Koji Okamoto and Prof. Michael Ryan, Okinawa, Japan, October 2013)

2). 小柴琢己: 「ミトコンドリアを介した抗ウイルスシグナル伝達」 *第86回日本生化学会大会* (会頭; 宮園浩平 教授、パシフィコ横浜(横浜)、2013年9月)

3). 小柴琢己: 「ミトコンドリア・ダイナミクスの作用機序とその生理的意義」 *日本生化学会平成24年度奨励賞受賞講演* (会頭; 藤木幸夫 教授、福岡国際会議場(福岡)、2012年12月)

4). 小柴琢己: 「Mitochondrial-mediated antiviral immunity」 *第85回日本生化学会大会* (会頭; 藤木幸夫 教授、福岡国際会議場(福岡)、2012年12月)

5). Koshiba, T.: 「MAVS signaling and its inhibition」 *International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012)* (President; Prof. Kensuke Miyake, Tokyo, Japan, October 2012)

6). Koshiba, T.: 「Antiviral innate immunity and mitochondrial function」 *The 2nd UCL-JSPS international Symposium "Mitochondria - from the Fundamental Aspects to Medical Importance"* (Organizer; Dr. Takehiro Yasukawa, UCL Wilkins Building, London, UK, June 2012)

7). 小柴琢己: 「ミトコンドリアの膜ダイナミクス制御とその生理機能的役割に関する研究」 *第14回花王研究奨励賞受賞記念講演* (主催; 公益財団法人 花王芸術・科学財団、花王すみだ事業所(東京)、2012年6月)

8). 小柴琢己: 「ミトコンドリアの自然免疫における役割解明」 *平成24年度日本生化学会九州支部例会 学術奨励賞・受賞講演* (支部長; 寺田成之 教授、福岡大学(福岡)、2012年5月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~koshiba/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小柴 琢己 (KOSHIBA, TAKUMI)
九州大学・理学研究院・准教授
研究者番号：70403970

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし