

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19561

研究課題名(和文)ミトコンドリアの動的な構造特性の改変；抗ウイルス自然免疫への影響

研究課題名(英文)Structural modifications of mitochondrial dynamics; antiviral innate immunity

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：生命機能の根幹を支えるミトコンドリアは、細胞質全体に管状の網様構造を形成・分布し、絶えず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。このミトコンドリアの動的な構造特性が破綻すると、生命の高次機能にさまざまな悪影響がおよぶ。本研究では、ミトコンドリアの「形」に着目し、その構造特性を人為的に改変することで、ミトコンドリア本来の機能発現、特にウイルスに対する自然免疫応答へどのような影響が及ぶのか、実験的アプローチで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは、古くからエネルギー産生の場や、アポトーシス制御に関わるプラットフォームとしての詳細な機能解析が行われてきた。実際に、これらミトコンドリアの機能発現は、自身の動的な構造特性が大きく関与していると思われる。本研究では、これまでほとんど研究されていない「ミトコンドリアの構造的特性」の本質に迫り、その特性が機能面に及ぶ仕組みを解明した。本研究により、生体内におけるミトコンドリアの構造的特性の一端が解明されたことで、生命科学分野における新たな学術領域の確立に繋がることはもちろん、創薬や臨床医療の周辺領域への波及効果は大きいものと考えられる。

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. Recent studies in model animals demonstrated that genetic ablation of individual components involved in mitochondrial dynamics impairs organ function and its whole body metabolism. Although the importance of mitochondrial dynamics is well documented, the molecular mechanism and its pathogenesis remain unclear. Here we report that mitochondrial dynamics involved in antiviral innate immunity has been revealed.

研究分野：生物機能化学

キーワード：ミトコンドリア 抗ウイルス自然免疫 構造改変 形態形成 タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、生命活動に不可欠なエネルギー（アデノシン三リン酸；ATP）を創り出すオルガネラである。近年、ミトコンドリアはウイルスに対する自然免疫のハブとしても機能していることが明らかになった（Koshiba BBA 2013）。一般にミトコンドリアの「形」は特徴的で、単一の構造体として存在していることは稀で、細胞質全体に管状の網様構造を形成・分布し、ダイナミックに融合と分裂を繰り返している（Koshiba et al. Science 2004）。しかしながら、このような複雑なミトコンドリアの「形」が、抗ウイルス自然免疫過程においてどのように寄与するのかは明らかになっていない。

そこで本研究は、「哺乳動物におけるミトコンドリアの動的な構造特性とその生理機能（ウイルスに対する自然免疫応答）」に着目して研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究は、哺乳動物における「ミトコンドリアの動的な構造特性」に着目して、その生理的な役割（ウイルスに対する自然免疫応答）を明らかにすることを目的とした。そこで研究期間内に、以下に示す4つのミトコンドリアの構造的な特性を人為的に改変し、その影響がどのように抗ウイルス自然免疫に波及するか、*in vitro*（細胞）と*in vivo*（個体）の両面から解き明かす計画を立てた。

- (1) ミトコンドリアの「形」や「動き」の改変
- (2) ミトコンドリアの「内部構造（クリステ）」の改変
- (3) ミトコンドリアの形態形成に関わる「新規分子」の網羅的な探索
- (4) 「ミトコンドリアゲノム（mtDNA）」の改変

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリアの「形」や「動き」の改変

ミトコンドリアの動的な構造特性を三つの素過程（運動、融合・分裂、修飾）と仮定し、それら各過程に働く分子群の遺伝子改変マウスより変異細胞株（*Mfn1/2<sup>-/-</sup>*、*OPA1<sup>-/-</sup>*、*Miro2<sup>-/-</sup>*、*Mull1<sup>-/-</sup>*、*PHB2<sup>-/-</sup>*など）を樹立した。

### (2) ミトコンドリアの「内部構造（クリステ）」の改変

ミトコンドリア内部のクリステ構造は、他の細胞小器官には見られない特徴的な動的構造であり、ミトコンドリアの生理機能（呼吸活性）を語るうえで必須要素と言える。クリステ構造の維持には、内膜タンパク質 OPA1（融合）が関与している。そこで、*OPA1<sup>-/-</sup>* 変異細胞に対して、GTPase 活性を失わせた OPA1 変異体、及び truncate した OPA1 遺伝子をレトロウイルス系により遺伝子導入し、恒常発現株を樹立した。

### (3) ミトコンドリアの形態形成に関わる「新規分子」の網羅的な探索

ミトコンドリアの形態形成に関わる PHB2 の役割に着目し、その相互作用分子を網羅的に探索する実験系の構築を行った。初めに、PHB2 にビオチンリガーゼ（BirA）を付加した組換え遺伝子（Bait）を作製し、その遺伝子の HEK293 細胞への導入により安定発現株の樹立を行った。次に、この培養細胞の培地にビオチンを添加し、その後 16 時間培養を行った。培養後の細胞からミトコンドリアを単離し、界面活性剤によるビオチン化タンパク質の抽出画分をストレプトアビジン樹脂による精製を行った。精製試料を質量分析法によりビオチン化分子の同定を行った。

### (4) 「ミトコンドリアゲノム（mtDNA）」の改変

ミトコンドリア・マトリックスには約 16 キロ塩基対の環状 2 本鎖 mtDNA が存在し、13 種類のタンパク質（全てが呼吸鎖複合体サブユニット）がコードされている。mtDNA の役割に着目し、薬剤処理による mtDNA 欠損を培養細胞で行う一方で、実験動物での影響に関しても調べた。

## 4. 研究成果

### (1)、(2) ミトコンドリアの「形」や「動き」の改変による抗ウイルス自然免疫への影響

ミトコンドリアの「形」や「動き」に関わるミトコンドリア因子（*Mfn1/2*、*OPA1*、*PHB2*）の欠損細胞、及び入れ戻し変異株を用いて、RNA ウイルス（センダイウイルスや A 型肝炎ウイルス）の感染実験による自然免疫応答や呼吸活性への影響を調べた。特に、*OPA1* 欠損、及び *PHB2* 欠損細胞内におけるミトコンドリアの形態変化を透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果、明らかに内膜構造やクリステ構造の異常（崩壊）が確認できたが、これら欠損細胞にそれぞれの野生型遺伝子を入れ戻すことで正常なミトコンドリアの膜構造の回復が確認できた。また、同様の入れ戻し実験を変異遺伝子で行った際にはこのような綺麗な回復効果は見られなかった。そこで、これらレスキュー細胞を用いたウイルス感染を行ったところ、各野生型入れ戻し細胞では、感染に伴った自然免疫応答や呼吸活性の両方で正常なレベルにまで機能が回復されていたが、欠損株や不活性型遺伝子の

入れ戻し細胞ではこのような機能相補は確認出来なかった。以上のことから、ミトコンドリアの「形」や「動き」はミトコンドリアを介した自然免疫応答に重要な働きがあることが明らかになった。

#### (3) ミトコンドリアの形態形成に関わる「新規分子」の網羅的な探索

ビオチン化タンパク質を質量分析機 (LC-MS/MS) に提供し、Mascot、Proteome Discoverer、 Scaffold などを用いたデータ解析を行った (徳島大学・小迫英尊教授との共同研究)。その結果、PHB2 のミトコンドリア内における相互作用ネットワーク解析が明らかになった。特に興味深い結果として、PHB2 がミトコンドリア内で様々なシグナル伝達反応に関与する分子群と相互作用していることが明らかとなり、このような相互作用は PHB2 内の coiled-coil 構造を欠損させた変異体では見られなかった。今回の結果は、PHB2 がミトコンドリア内において多数の分子と巨大な複合体を形成し、その構造物が上記、自然免疫応答時の反応場として重要な役割を持っていることが示唆された。

#### (4) 「ミトコンドリアゲノム (mtDNA)」の改変

mtDNA の改変を培養細胞、及び実験動物を用いて行い、その生理的な影響を調べた。初めに、培養細胞を薬剤処理することで mtDNA を減少させ、その細胞の RNA ウィルス (センドライウィルス) の感染実験による自然免疫応答や呼吸活性への影響を調べた。mtDNA 量が著しく低下した細胞内の呼吸活性は大きく減少しており、ウィルス感染にともなう自然免疫応答も大幅に抑制されていた。同様に、mtDNA が一部欠損したマウス (筑波大学・中田和人教授との共同研究) におけるウィルス感染実験 (A 型インフルエンザウィルス) においても同様の実験結果が得られた。以上の結果から、mtDNA の自然免疫における重要性を *in vitro* (細胞) 及び *in vivo* (個体) の両面から明らかにすることができた。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Moriyama, M., Igarashi, M., **Koshiba, T.**, Irie, T., Takada, A., and Ichinohe, T. (2018) Two conserved amino acids within the NSs of SFTS phlebovirus are essential for anti-interferon activity. *J. Virol.*, 92, e00706-18. (査読有) DOI: 10.1128/JVI.00706-18

(2) Maruzuru, Y., Ichinohe, T., Sato, R., Miyake, K., Okano, T., Suzuki, T., **Koshiba, T.**, Koyanagi, N., Tsuda, S., Watanabe, M., Arii, J., Kato, A., and Kawaguchi, Y. (2018) Herpes simplex virus 1 VP22 inhibits AIM2-dependent inflammasome activation to enable efficient viral replication. *Cell Host Microbe*, 23, 254-265. (査読有) DOI: 10.1016/j.chom.2017.12.014

(3) 小柴琢己 (2018) ミトコンドリアを介した自然免疫応答. *医学のあゆみ*, 265, 1101-1107. (査読無)

(4) Yoshizumi, T., Imamura, H., Taku, T., Kuroki, T., Kawaguchi, A., Ishikawa, K., Nakada, K., and **Koshiba, T.** (2017) RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity. *Sci. Rep.*, 7, 5379. (責任著者)(査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-05808-w

(5) 小柴琢己、今村博臣 (2017) 蛍光 ATP プローブによるミトコンドリア呼吸活性の評価. *生物物理*, 57, 268-270. (査読有)

(6) 小柴琢己 (2017) インフルエンザウィルス感染に伴うミトコンドリア形態への影響. *感染・炎症・免疫*, 47, 42-44. (査読無)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) **Koshiba, T.** : 「Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals」 The 15th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (Chair; Prof. Jin Han, Busan, Korea, November 2018)

(2) **Koshiba, T.** : 「Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals」 *The 3<sup>rd</sup> Asian Invertebrate Immunity Symposium 2018* (Chair; Prof. Shun-ichiro Kawabata, Fukuoka, Japan, September 2018)

(3) 小柴琢己 : 「ミトコンドリアタンパク質による膜構造への影響」 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (会頭; 大野茂男 教授、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月)

(4) 小柴琢己 : 「ミトコンドリアの呼吸活性と抗ウィルス自然免疫」 第 69 回 日本細胞生物

学会大会（大会長；水野健作 教授、仙台国際センター、2017年6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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：小迫 英尊

ローマ字氏名：Kosako, Hidetaka

研究協力者氏名：中田 和人

ローマ字氏名：Nakada, Kazuto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。