

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770123

研究課題名(和文) ミトコンドリア蛋白質の生体防御反応における役割解明

研究課題名(英文) The role of mitochondrial proteins involved in the 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

研究成果の概要(和文)：細胞内の抗ウイルス自然免疫は、複数のシグナル伝達により制御されており、最終的に I 型インターフェロンが誘導される。このシグナル伝達経路において、ミトコンドリア外膜上に発現しているアダプター分子、MAVS が重要な役割を果たしている。本研究では、ミトコンドリア融合に直接関与する因子、Mitofusin2 (Mfn2) が MAVS を介した抗ウイルスシグナル伝達の制御因子として作用することを発見し、Mfn2 におけるこのような機能は、これまで知られているミトコンドリアの動態における役割とは大きく異なる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Innate cellular immune response to viral infection results in the activation of multiple signaling steps, ultimately regulates the expression of type-I interferons (IFNs), and a mitochondrial membrane protein, MAVS plays an important role in the pathway. In the presence study, we found that mitofusin 2 (Mfn2), a mediator of mitochondrial fusion, cooperates with MAVS, and participates in the antiviral immunity. Our results suggest that Mfn2 acts as a negative regulator for antiviral signaling, and would have a distinct function unrelated to mitochondrial dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物物理学、蛋白質科学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ミトコンドリア、RNA ウイルス、自然免疫、シグナル伝達、インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内には、核、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア等の様々なオルガネラとよばれる細胞内小器官が独自の機能を発揮し、それぞれに生体の運営に関わっている。なかでもミトコンドリアは、その特有の構造および機能から他のオルガネラとは異なった器官として今日に至る研究対象となってきた。ミトコンドリアはその由来として、好氣的な細菌が最古に真核細胞の前身に感染し、その後の進化の過程で真核細胞には不可欠のオルガネラとして共生していったと考えられている。ミトコンドリアに独自の DNA が存在し、他のオルガネラと異なった二重膜構造になっていることはその名残と考えられている。ミトコンドリアの細胞内における生理的役割は、生体内における ATP の産生である。

ところが、近年のミトコンドリアを取り巻く研究環境には目覚ましい発展があり、その機能は細胞内エネルギー代謝にとどまらず、アポトーシス、アルツハイマー等の疾患、不妊症、及び細胞内におけるダイナミックな形態変化など、さまざまな興味深い現象に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。さらにここ数年間で、ミトコンドリアの新たな生理現象としてウイルス自然免疫と密接に関連していることが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

哺乳動物の RNA ウイルスに対する自然免疫は、二つの異なるシグナル伝達経路により制御されており、その両経路とも抗ウイルス活性の中心的な役割を担っている I 型インターフェロン(複数の IFN- $\alpha$ 及び一種類の IFN- $\beta$ )が産生誘導され、ウイルスに対する第一線の生体防御を行う。

一つ目は、Toll 様受容体(TLR-3)を介した経路であり、エンドサイトーシスにより侵入したウイルスの核酸(RNA)をエンドソーム内に発現している TLR-3 が認識し、一連のシグナル伝達が引き起こされ、その後の IFNs 産生へと導かれる。

二つ目は、TLR-3 非依存的に進行する別の経路で、ウイルス感染細胞内での複製過程に生じるウイルス由来二本鎖 RNA(dsRNA)を細胞内 RNA センサー分子である RIG-I または MDA-5 が検知し、その後下流因子へとシグナル伝達が行われ、最終的に IFNs が産生される。こちらの経路で RIG-I/MDA-5 のアダプター分子として働くのが MAVS とよばれるミトコンドリア外膜に局在する膜タンパク質である。

本研究では、細胞内におけるウイルス自然免疫応答において、ミトコンドリア外膜上

での MAVS を介したシグナル伝達機構を理解することを目的として、(1)ウイルス自然免疫の初期段階におけるミトコンドリアの役割の理解 (2) ウイルス自然免疫に関与するミトコンドリア蛋白質の探索、及びその役割解明 (3) ウイルス感染細胞内におけるミトコンドリア形態変化への影響の解析、に関する研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリア外膜上における MAVS 高分子複合体の解析

初めに、MAVS 分子のミトコンドリア外膜上における複合体形成の有無を調べる目的で、ヒト由来の 2 種類の細胞(HEK293 細胞、及び HeLa 細胞)からそれぞれミトコンドリアを単離・可溶化し、その各抽出液をゲル濾過法(Superdex-200 HR10/30 カラム)にて分子量による分画を行った。

### (2) プロテオーム解析による MAVS 相互作用因子の同定

MAVS と共役して働くミトコンドリア因子の探索を行った。実際に、ヒト由来細胞(HEK293)抽出液から MAVS の免疫沈降実験を行い、その結合画分を電気泳動により分離し、九州大学内(生体防御医学研究所)の質量分析装置(LC/MS/MS)を用いてプロテオーム解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ミトコンドリア外膜上における MAVS 結合因子 Mitofusin 2 (Mfn2)の発見

ミトコンドリアがウイルス免疫の最前線として働くことを理解する上で、MAVS 分子を含むタンパク質群がどのような大きさで存在しているのかを知ることは大変興味深い。そこで、ヒト腎臓由来細胞株(HEK293)からミトコンドリアを単離・可溶化し、ゲル濾過法により MAVS の分子量を見積もった。その結果、ミトコンドリア抽出液から分画された内在性 MAVS は、分子量約 60 万の位置に溶出し、MAVS の推定分子量(約 6 万)よりもはるかに大きな状態で存在していることを明らかにした。

次に、プロテオミクス的手法を用いることにより、MAVS 相互作用因子の同定を試みた。その候補タンパク質の中から、ミトコンドリアの融合に関わる膜タンパク質 Mitofusin 2 (Mfn2)を発見した。Mfn2 は、ミトコンドリア融合調節因子として知られている以外にも、小胞体とミトコンドリアの隣接作用、細胞増殖の制御、及び神経変性疾患の一種であるシャルコー・マリー・トゥース病(タイプ 2A)の原因遺伝子として働いていることがこれまでに報告されている。Mfn2 が

MAVS と相互作用することは、ウイルス免疫に関わるシグナル伝達にどのような影響を及ぼしているのかを次に調べた。

### (2) Mfn2 による MAVS シグナル伝達の負の抑制

Mfn2 と MAVS の結合によるシグナル伝達に及ぼす影響について検討するため、IFN- $\beta$  レポーター遺伝子を用いてその転写活性に与える影響を調べた。IFN- $\beta$  プロモーターは HEK293 細胞に MAVS を過剰発現させることで活性化されるが、この活性化は Mfn2 との共発現により著しく抑制されることが明らかになった。さらに、このような抑制効果は Mfn2 のアイソフォームである Mfn1 (約 60% の配列一致性; 機能的に類似) では観察されなかったことも発見した。

以上のように、Mfn2 の過剰発現によるシグナル伝達への影響が示されたので、本研究では Mfn2-欠損マウス胚線維芽細胞(MEF)を用いて、内在性 Mfn2 とウイルス応答との関連性を調べた。予想通り、Mfn2<sup>-/-</sup> MEF 細胞に対して RNA ウイルスの一種である水泡性口内炎ウイルス(VSV $\Delta$ G\*-G)を感染させた場合、野生型の細胞と比較して IFN- $\beta$  の産生量が増加し、その結果、ウイルス複製が減少した。また、他の RNA ウイルスを感染させた場合においても同様に著しい IFN- $\beta$  産生量の増加が Mfn2 の欠損により引き起こされたことなどから、Mfn2 は MAVS を介した抗ウイルス応答の抑制因子であることを明らかにした。

### (3) Mfn2 の構造機能解析

Mfn2 はその分子内に GTP 結合ドメイン(GTPase)、二つの 4,3 heptad repeat 領域(HR1 及び HR2)、及び膜貫通領域(TM)から成る分子量約 8 万の膜タンパク質である。

免疫沈降法により、MAVS との相互作用には Mfn2 の HR1 領域が必須であることが明らかになり、さらには HR1 領域単独でも前述の MAVS を介したシグナル伝達の負の制御因子として機能することも示した。

これまで、他種 Mitofusin ホモログタンパク質も含めて、HR1 領域の機能ドメインとしての研究知見は非常に乏しいものであったが、本研究では、HR1 領域の新たな役割も模索することができた。

## 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)

- (1) Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., and \*Koshiba, T. (2009). Mitofusin 2

inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science Signaling*, 2, ra47. (\*corresponding author)

- (2) \*小柴 琢己 (2010). ミトコンドリア外膜タンパク質 Mitofusin 2 によるウイルス免疫制御機構. *実験医学*(羊土社), 28, 429-432. (\*corresponding author)
- (3) \*小柴 琢己 (2010). ミトコンドリア外膜上でのウイルス免疫制御機構. *生化学日本生化学会*, 82, 135-139. (\*corresponding author)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Koshiba, T. : 「Mitochondrial dynamics in mammalian cells and an insight for antiviral innate immunity」 *STINT workshop on Invertebrates* (Uppsala University, Sweden, March 2010) (招待講演)
- (2) Koshiba, T. : 「Mitochondrial dynamics and an insight for antiviral innate immunity」 *International Symposium "Intercellular Recognition and Allogenic Authentication: Perspectives of Reproduction Mechanisms Shared by Animals and Plants"* (SIR Winston Hotel (Nagoya, Japan), January 2010) (招待講演)
- (3) 小柴 琢己 : 「Mitofusin 2 acts as an inhibitor of mitochondrial antiviral signaling」 *第 82 回 日本生化学会大会* (神戸ポートアイランド(神戸), 2009 年 10 月) (招待講演)
- (4) 小柴 琢己 : 「ミトコンドリア外膜上での自然免疫調節機構」 *第 9 回 日本蛋白質科学会年会* (熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本), 2009 年 5 月) (招待講演)
- (5) Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S. and Koshiba, T. : 「Mitofusin 2 acts as a negative regulator of mitochondrial antiviral immunity」 *第 32 回 日本分子生物学会年会* (パシフィコ横浜(横浜), 2009 年 12 月)
- (6) 安川 開, 川畑 俊一郎, 小柴 琢己 : 「自然免疫に関わるミトコンドリア膜蛋白質 MAVS 機能ドメインの大腸菌による大量発現系構築」 *第 31 回 日本分子生物学会年会* (神戸ポートアイランド(神戸), 2008 年 12 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  
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~koshiba/>

## 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

研究者番号：

### (3) 連携研究者 なし