

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291032

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Mitochondrial dynamics in mammals and its molecular mechanism

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、細胞内におけるエネルギーの産生をはじめ、さまざまな生命活動における重要な役割を果たすオルガネラである。その「形」は特徴的で、動的に融合・分裂を繰り返している発達した構造を形成している(ミトコンドリア・ダイナミクス)。しかしながら、このミトコンドリア・ダイナミクスにどのような意味があるのか、その理解はあまり進んでこなかった。本研究では、哺乳動物におけるミトコンドリア・ダイナミクスに着目し、その調節機構に関わる分子群の構造機能解析を行った。具体的には、(1) 遺伝子改変マウスの作製、及び(2) 外的(ウイルスの感染)刺激によるミトコンドリア・ダイナミクスへの影響解析を行った。

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 biologic process. Although the importance of mitochondrial dynamics is well documented, the molecular mechanism remain unclear.

Our aims of the project is to elucidate their knowledges of mitochondrial dynamics, and try to understand the mechanism at molecular level. In this project, (1) we generated mice deficient in molecules involved in mitochondrial dynamics, and also (2) we investigated relationship between mitochondrial dynamics and antiviral innate immunity in vitro.

研究分野：生物物理学

キーワード：ミトコンドリア 分子機構 抗ウイルス自然免疫

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞内におけるエネルギーの産生をはじめ、さまざまな生命活動における重要な役割を果たすオルガネラであるが、その「形」は特徴的で、細胞質全体に発達したネットワーク様の構造を形成し、動的に融合・分裂を繰り返していることが知られている（ミトコンドリア・ダイナミクス）。しかしながら、このミトコンドリア・ダイナミクスにどのような意味があるのか、その理解はあまり進んでこなかった。

興味深い事実として、ミトコンドリア・ダイナミクスを調節する複数の遺伝子変異と疾患との関わりも明らかになってきた。このような背景をうけて、ミトコンドリア・ダイナミクスの本質的な理解が望まれてきた。

2. 研究の目的

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機構を明らかにすることを目的とした。そこで本研究では、その調節機構に関わる分子群の構造機能解析を行い、最終的にミトコンドリア・ダイナミクスが分子レベルで調節されている仕組みを明らかにすることを目的とした。その目的を達成するために本研究では、1) 遺伝子改変マウスの作製、及び2) 外的（ウイルスの感染）刺激によるミトコンドリア・ダイナミクスへの影響解析を行った。

3. 研究の方法

1) 遺伝子改変マウスの作製

本研究では、ミトコンドリア外膜局在型タンパク質で E3 リガーゼ活性様ドメインを有する *Mul1* の遺伝子改変マウスの作製を研究分担者らと共に行った。*Mul1* はこれまでに詳細な解析が行われておらず、ミトコンドリア・ダイナミクスへどのような分子的寄与が行われるのかを明らかにしたいと考えた。

2) ウイルス感染によるミトコンドリア・ダイナミクスへの影響解析

本研究では、細胞のウイルス感染に伴うミトコンドリア・ダイナミクスへの影響を分子レベルで明らかに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 A 型インフルエンザウイルスの感染実験を行い、その際のミトコンドリア・ダイナミクスの変化を生化学、細胞生物学的な実験により詳細に調べた。

4. 研究成果

1) 遺伝子改変マウスの作製

まず初めに、遺伝子改変ベクターの構築を行い、その後、構築したベクターの ES 細胞へのインジェクションを行った。ベクター導入後の ES 細胞は、薬剤を用いたセレクションにより選別を行い、遺伝子改変キメラマウスの作製に成功した。キメラマウスの交配実験を繰り返し、ヘテロ接合体マウスの誕生まで確認することが出来た。

2) ウイルス感染によるミトコンドリア・ダイナミクスへの影響解析

i). インフルエンザウイルス感染に伴うミトコンドリア・ダイナミクスの変化

ヒト培養細胞 (HeLa) に A 型インフルエンザウイルス (PR8 株) の感染実験を行っている過程で、感染細胞内のミトコンドリア・ダイナミクスのみならず顕著な異常 (ミトコンドリアの断片化) が見られることが確認できた。その原因を突き止めるべく実験を進めていく中で、インフルエンザウイルス由来のタンパク質 PB1-F2 がミトコンドリア形態に影響を及ぼしていることを実験的に明らかにすることができた (Yoshizumi *et al.* 2014)。

ii). PB1-F2 とミトコンドリアとの関係

そこで、PB1-F2 がどのようにミトコンドリア・ダイナミクスに影響するのか、その作用機序を調べるため、感染細胞内のミトコンドリアを分画し、生化学実験 (プロテアーゼ限定消化、アルカリ処理、界面活性剤処理など) を行った。その結果、PB1-F2 はミトコンドリア内に運ばれ、ミトコンドリア内膜と結合していることが明らかにな

った。興味深いことに、PB1-F2は宿主のミトコンドリアタンパク質が輸送される際に利用しているミトコンドリア・チャンネル (Tom40) を使ってミトコンドリア内に運ばれることが分かった。

iii). PB1-F2がミトコンドリア内に輸送されるとミトコンドリアの活性は損なう

PB1-F2が局在したミトコンドリアは、ミトコンドリア本来の活性を維持できず、内膜電位 ($\Delta\psi_m$) が低下することが蛍光プローブを用いた観察により示された。この結果は、他の実験による内容 (Yoshizumi *et al.* 2014) とも一致しており、PB1-F2の一種の生理的な役割とも考えられる。

最後に、インフルエンザウイルス感染に伴うミトコンドリア・ダイナミクスへの影響 (モデル) を考察した。インフルエンザウイルスが感染した細胞内では、ウイルス性タンパク質PB1-F2が新たに合成され、それらが宿主ミトコンドリア内にチャンネルを介して輸送される。輸送されたPB1-F2は、ミトコンドリア内膜と結合し、 $\Delta\psi_m$ を低下させる。 $\Delta\psi_m$ が低下したミトコンドリア内では、ミトコンドリア融合に働くOPA1のプロセッシングが亢進するために、融合・分裂のバランスが一方向的に分裂側に傾くために、最終的にミトコンドリア・ダイナミクスへの異常 (影響) が確認できた。以上のように、ミトコンドリア・ダイナミクスはそれら調節因子の突然変異以外にも、生理的な環境下においてウイルス感染等の外的な刺激による影響を大いに受けており、このような観点からの更なる研究の発展が望まれる。

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 11件)

1). Moriyama, M., Chen, I-Y., Kawaguchi, A., Koshiba, T., Nagata, K., Takeyama, H., Hasegawa, H., and Ichinohe, T. (2016) The RNA- and TRIM25-binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion. *J. Virol.*, 90, 4105-

4114. DOI: 10.1128/JVI.00120-16

2). Kanatsu, K., Hori, Y., Takatori, S., Watanabe, T., Iwatsubo, T., and Tomita, T. (2016) Partial loss of CALM function affects γ -secretase-mediated A β 42 production and amyloid deposition *in vivo*. *Hum. Mol. Genet.*, 25, 3988-3997.

DOI: 10.1093/hmg/ddw239

3). Ogoh, H., Tanuma, N., Matsui, Y., Hayakawa, N., Inagaki, A., Sumiyoshi, M., Momoi, Y., Kishimoto, A., Suzuki, M., Sasaki, N., Ouchi, T., Nomura, M., Teruya, Y., Yasuda, K., Watanabe, T., Shima, H. (2016) The protein phosphatase 6 catalytic subunit (*Ppp6c*) is indispensable for proper post-implantation embryogenesis. *Mech. Dev.*, 139, 1-9. DOI: 10.1016/j.mod.2016.02.001

4). Shibata, T., Maki, K., Hadano, J., Fujikawa, T., Kitazaki, K., Koshiba, T., and Kawabata, S. (2015) Crosslinking of a peritrophic matrix protein protects gut epithelia from bacterial exotoxins. *PLoS Pathog.*, 11, e1005244. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005244

5). Kobayashi, T., Takahashi, T., Shibata, T., Ikeda, S., Koshiba, T., Mizumura, H., Oda, T., and Kawabata, S. (2015) Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. *J. Biol. Chem.*, 290, 19379-19386. DOI: 10.1074/jbc.M115.653196

6). #Koshiba, T. (2015) Protein-protein interactions of mitochondrial-associated protein via bioluminescence resonance energy transfer. *Biophysics and Physicobiology*, 12, 31-35. (#責任著者)
DOI: 10.2142/biophysico.12.0_31

7). Sumiyoshi, M., Masuda, N., Tanuma, N., Ogoh, H., Imai, E., Otsuka, M., Hayakawa, N., Ohno, K., Matsui, Y., Hara, K., Gotoh, R., Suzuki, M., Rai, S., Tanaka, H., Matsumura, I., Shima, H., and Watanabe, T. (2015) Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality. *FEBS Lett.*, 589, 2754-2762.

DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.050

8). Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., and #Koshiba, T. (2014) Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat. Commun.*, 5, 4713. (#責任著者)
DOI: 10.1038/ncomms5713

9). Nguyen, T.T., Oh, S.S., Weaver, D., Lewandowska, A., Maxfield, D., Schuler, M.H., Smith, N.K., Macfarlane, J., Saunders, G., Palmer, C.A., Debattisti, V., **Koshiba, T.**, Pulst, S., Feldman, E.L., Hajnóczky, G., and Shaw, J.M. (2014) Loss of Miro1-directed retrograde mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E3631-E3640. DOI: 10.1073/pnas.1402449111

10). Kobayashi, Y., Shiga, T., Shibata, T., Sako, M., Maenaka, K., **Koshiba, T.**, Mizumura, H., Oda, T., and Kawabata, S. (2014) The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. *J. Biol. Chem.*, 289, 25987-25995. DOI: 10.1074/jbc.M114.586933

11). Hayakawa, N., Ogoh, H., Sumiyoshi, M., Matsui, Y., Nishikawa, S., Miyamoto, K., Maede, Y., Kiyonari, H., Suzuki, M., and **Watanabe, T.** (2014) The ADP-ribosylation factor 1 gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 453, 748-753. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.014

[学会発表] (計 6件)

1). **Koshiba, T.** : 「Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity and oxidative phosphorylation」*The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine* (Chair; Prof. Akira Ohtake, Tokyo, October 2016)

2). **Koshiba, T.** : 「Mitochondrial respiration and MAVS-mediated antiviral innate immunity」*International Symposium on "Molecular Basis of Virus-Host Interactions"* (Organizer; Prof. Kyosuke Nagata, Sapporo, October 2016)

3). **小柴 琢己** : 「Mitochondrial-mediated antiviral immunity and oxidative phosphorylation」*第54回日本生物物理学学会年(年会長; 豊島陽子 教授、つくば国際会議場(筑波)、2016年11月)*

4). **小柴 琢己** : 「Mitochondria and antiviral signaling」*BMB2015* (会頭; 遠藤斗志也 教授、神戸ポートアイランド(神戸)、2015年12月)

5). **Koshiba, T.** : 「Influenza A viral protein PB1-F2 and mitochondria」*The 5th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology*

(*CMCB-2015*) (Organizers; BIT Congress Inc., Nanjing, China, April 2015)

6). **小柴 琢己** : 「ミトコンドリアと抗 RNA ウイルス自然免疫」*第52回日本生物物理学学会年(年会長; 川端和重 教授、札幌コンベンションセンター(札幌)、2014年9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/>
http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/faculty2_j.cgi?ID=K002718

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
渡邊 利雄 (WATANABE TOSHIO)
奈良女子大学・自然科学系・教授
研究者番号：60201208
- (3) 連携研究者 なし
- (4) 研究協力者 なし