

研究題目 抗ウイルス自然免疫機構に関わるミトコンドリアタンパク質間の相互作用解析

研究組織

研究代表者：小柴 琢己（九州大学・大学院理学研究院）
共同研究者：小迫 英尊（徳島大学 先端酵素学研究所）
研究分担者：吉住 拓馬（九州大学・大学院理学研究院）
安川 開（九州大学・システム生命科学府）
松尾 輝尚（九州大学・システム生命科学府）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ミトコンドリアはエネルギー産生に関わる主要な場として広く認識されているが、近年はRNAウイルスに対する自然免疫においても積極的に関与していることが明らかになってきた。本研究では、ミトコンドリアを介した抗ウイルス免疫システムに働く新たなタンパク質群の発見を目的として、この免疫系に関与するミトコンドリア分子を中心としたプロテオーム解析により、その網羅的な探索を実施した。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、ミトコンドリアを介した抗ウイルス免疫システムの調節に関与するProhibitin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以下のように進めた。

i) 初めに、Prohibitin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）を作製し、その遺伝子の培養細胞への導入により安定発現株の樹立を試みた。同様に、Prohibitin内の機能領域を一部欠損した変異体においてもBirA付加型の組換え遺伝子を作製

し、その安定発現株の作製も行った。その結果、両BirA付加型Prohibitinコンストラクトにおいて天然型タンパク質と同様の正しいミトコンドリア局在を確認することが出来たことから、以下の実験を進めた。

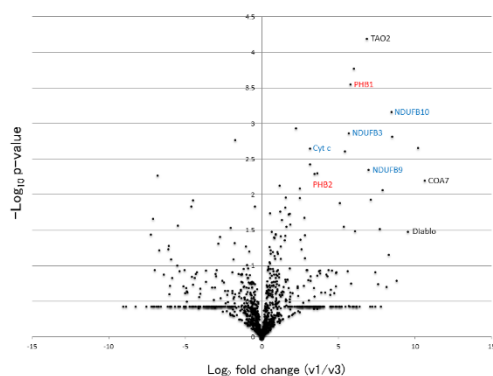
ii) これら安定発現株を用いて、Prohibitinとの複合体形成をプロテオーム解析により行った。培養細胞中の培地に終濃度100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ となるようにD-ビオチンを添加し、その後16時間培養した。培養後の細胞からミトコンドリアを単離し、界面活性剤によるビオチン化タンパク質の抽出画分をストレプトアビジン樹脂による精製を行った。最終的に、本試料を小迫教授のもとに送付し、その後の質量分析を行うことにした。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

送付後の試料は、各種プロテアーゼによる限定消化を施し、脱塩処理後に、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。下図は、Prohibitin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の一例を示した（野生型と変異体間での比較の様子）。この結果は、Prohibitin 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を示しており、特に、Prohibitin 内の欠損した機能領域が相互作用に重要な役割を担っていることを示している。今後の実験では、Prohibitin と本研究により明らかになった因子との関わりについて生化学的な実験を中心に明らかにしていきたい。



[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

小迫らの研究グループは、これまでプロテオーム解析を軸にした網羅的な探索や、高性能質量分析計を駆使した特定部位の翻訳後修飾の高感度な同定や定量法の確立により、ミトコンドリアの選択的分解（マイトファジー）に関わるタンパク質群の詳細な分子機構を明らかにしてきた。このような背景より、本研究において明らかになった Prohibitin を起点にした抗ウイルス免疫シグナル応答における新規ミトコンドリアタンパク質の発見、及びそれら機能解明は該当する研究領域

における新たなブレークスルーが大いに期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

- 1) [雑誌] なし
- 2) [書籍] 小柴琢己.ミトコンドリアと抗ウイルス自然免疫シグナル. 実験医学, 印刷中, 2019年.

[3-2]学会発表

- 1) Takumi Koshiba, Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals, *The 15th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine*, Busan (Korea), November, 2018.

- 2) Takumi Koshiba, Mitochondrial-mediated antiviral innate immunity in mammals, *The 3rd Asian Invertebrate Immunity Symposium*, Fukuoka, September, 2018.

[3-3]成果資料等 なし

【4】今後の課題等

なし