

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

1) 研究組織

小柴 琢己 (代表) 九州大学 大学院理学研究院生物科学部門・准教授
吉住 拓馬 九州大学 大学院システム生命科学府・大学院生
小迫 英尊 (受け入れ) 徳島大学 先端酵素学研究所・教授

2) 研究目的

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、近年の研究により、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。ミトコンドリアを介した抗ウイルス免疫では、宿主のウイルス感染に伴った細胞内シグナル伝達反応がミトコンドリア外膜上に集約され、その後、ミトコンドリア下流の各転写因子やリン酸化酵素の活性化、最終的にI型インターフェロンをはじめとした転写産物の発現へと導かれる。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関与する新たな因子の発見を目的として研究を行った。

3) 研究成果

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プロヒビチンに着目し、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行った。

i) 初めに、プロヒビチン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。その結果、BirA付加型プロヒビチンはauthenticタンパク質と同様に正しいミトコンドリア局在を確認することができ、その後の実験を進めることにした。

ii) 次に、この安定発現株を用いて、Bait分子との複合体形成をプロテオーム解析により明らかにすることを旨とした。具体的には、BirA付加型プロヒビチンの発現株 (HEK293) にビオチンを添加することで、Bait分子との隣接距離内に局在する相互作用因子に生細胞内でビオチン付加を行い、その後細胞抽出液を回収し、ストレプトアビジン樹脂によるビオチン化因子の精製を行った (proximity-dependent biotin identification法)。その結果、多数のビオチン化修飾因子をSDS-PAGEにより確認することができ、この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。

iii) 送付後の試料をトリプシン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。右図は、プロヒビチン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、プロヒビチンがミトコンドリアを介した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いる。特に、炎症応答に関わる分子群との特異的な相互作用も見られたために、今後の実験ではこれら因子の遺伝子改変も含めた細胞生物学的な実験により、抗ウイルス免疫応答とミトコンドリアの詳細な繋がりを明らかにしていきたい。

