

A型インフルエンザウイルスタンパク質PB1-F2と ミトコンドリアとの相互作用

吉住 拓馬¹, 小柴 琢己^{1,2}

1. はじめに

真核細胞内に存在するミトコンドリアは、エネルギー(ATP)産生をはじめ、細胞死(アポトーシス)などの高次生命機能を担う重要なオルガネラの一つである。近年の研究から、ミトコンドリアはRNAウイルスに対する自然免疫とも密接に関係することが明らかになってきた¹⁾。その免疫における役割としては、ウイルス感染に伴い細胞内で誘引される主なシグナル伝達反応が、ミトコンドリアの外膜上で起こることに起因する²⁾。ミトコンドリアと抗ウイルス免疫をつなぐ興味深い事例として、C型肝炎ウイルス由来のプロテアーゼ(NS3/4A)は、このミトコンドリア膜上で機能する必須タンパク質(MAVS)を切断することで抗ウイルスシグナル伝達系を阻害する³⁾。本稿では、ウイルスタンパク質とミトコンドリアとの関わりについて、当研究室で行ったA型インフルエンザウイルス由来タンパク質の研究知見を例に紹介したい。

2. A型インフルエンザウイルス由来タンパク質(PB1-F2)

A型インフルエンザウイルスは、8分節の一本鎖RNA(マイナス鎖)をゲノムとして有するオルトミクソウイルス科に属するRNAウイルスであり、エンドサイトーシスにより細胞内侵入後に約10種類以上のタンパク質が合成される。その際、ウイルス由来RNAポリメラーゼ遺伝子(PB1)内の読み枠のずれにより、新たな非構造タンパク質(PB1-F2)も同時に翻訳されていることが2001年に報

告された⁴⁾。この報告によると、研究グループが実験に用いたウイルス株(A/PR8)では87アミノ酸からなる新生PB1-F2ポリペプチドが宿主内で合成され、その翻訳産物はミトコンドリアと相互作用し、結果的にアポトーシスを誘引する可能性が示された。その後の研究により、PB1-F2はインフルエンザウイルスの複製などに必須なタンパク質ではなく^{5,6)}、また、亜型ウイルスごとにコードされる遺伝子サイズも均一でないことも明らかになっている⁷⁾(図1)。しかしながら、PB1-F2タンパク質の大きさにはある特徴がみられ、その多くが87、または90アミノ酸からなる長鎖型のポリペプチドと、そのC末端領域が欠けている57アミノ酸からなる短鎖型ポリペプチドにより占められている⁷⁾。

3. PB1-F2のミトコンドリア内への輸送

筆者らは、PB1-F2の分子サイズの違いとミトコンドリア親和性との関連を調べるため、長鎖(87、および90アミノ酸)、および短鎖(57アミノ酸)PB1-F2の細胞内局在を免疫染色法により調べた。その結果、各長鎖PB1-F2はその局在がミトコンドリア像と完全に一致し、その分布は対照実験として行った実際のウイルス(A/PR8;87アミノ酸よりなるPB1-F2をコード)感染細胞内で観察されたPB1-F2の分布結果と同様であった(図2A)。一方、短鎖型PB1-F2では上記と異なり、その発現タンパク質の局在パターンは細胞質全体に広がり、ミトコンドリア像との一致は確認できなかった。この結果は、生化学的手法による細胞分画実験からの結果とほぼ一致していた⁸⁾。以上のことから長鎖PB1-F2は特異的にミトコンドリア局在を示すことが明らかになった。

そこで、長鎖PB1-F2のミトコンドリア局在様式を調べるため、A/PR8感染細胞からミトコンドリアを単離調製し、そのミトコンドリア画分を用いてプロテアーゼ消化実験を行った。発現した長鎖PB1-F2は、界面活性剤の非存在下ではプロテアーゼ処理に耐性を示したが、ミトコンドリア外膜を低濃度の界面活性剤処理した条件下においては、ウイルスタンパク質が完全に消化されていた(図2B;上段パネル)。この結果から、PB1-F2はミトコンドリア表面に結合して存在するのではなく、膜間腔(ミトコンド

¹九州大学大学院システム生命科学府(〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

²九州大学大学院理学研究院生物科学部門(〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1)

Interaction between an Influenza A viral protein PB1-F2 and mitochondria

Takuma Yoshizumi¹ and Takumi Koshiba^{1,2} (¹Graduate School of Systems Life Sciences, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku Fukuoka 812-8581, Japan, ²Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku Fukuoka 812-8581, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870144

投稿受付日: 2014年9月11日

© 2015 公益社団法人日本生化学会

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																															
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	M	G	Q	E	Q	D	T	P	W	I	L	S	T	G	H	I	S	T	Q	K	R	E	D	G	Q	Q	T	P	R	L	E	H	N	S	T	R	L	M	D	H	C	Q	K	T	M	N	Q	V	M	P	K	Q	I	V	Y	W	K	Q	W	L	S	L	R	S	P	T	P	V	S	L	K	T	R	V	L	K	R	W	L	F	S	K	H	E	W	T	S		
A/Guiyang/1/1957 (H2N2)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	S	T	E	H	I	N	I	Q	K	R	G	S	G	Q	T	R	K	L	E	R	P	N	L	T	Q	L	M	D	H	Y	L	R	T	M	N	Q	V	D	M	H	K	Q	T	A	S	W	K	Q	W	L	S	L	K	N	P	T	Q	E	S	L	K	T	R	V	L	K	R	W	K	L	F	N	K	Q	E	W	T	N
A/Hong_Kong/1/1968 (H3N2)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	S	T	E	H	I	N	I	Q	K	R	G	S	G	Q	T	R	K	L	E	R	P	N	L	T	Q	L	M	D	H	Y	L	R	I	M	S	Q	V	D	M	H	K	Q	T	A	S	W	K	Q	W	L	S	L	K	N	P	T	Q	E	S	L	K	T	R	V	L	K	R	W	K	L	F	N	K	Q	E	W	T	N
A/chicken/Scotland/1959 (H5N1)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	S	T	E	H	I	N	I	Q	K	R	G	S	G	Q	T	R	K	L	E	R	P	N	L	T	Q	L	M	D	H	Y	L	R	T	N	Q	V	D	M	H	K	Q	T	A	S	W	K	Q	W	L	S	L	K	N	P	T	Q	E	S	L	K	T	R	V	L	K	R	W	K	L	F	N	K	Q	E	W	T	N	
A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	S	T	E	H	I	N	I	Q	K	R	G	S	G	Q	T	R	K	L	E	R	P	N	S	I	R	L	M	D	H	Y	L	R	I	M	S	R	V	G	M	H	K	Q	I	V	Y	W	K	Q	W	L	S	L	K	N	P	T	Q	E	S	L	K	T	R	V	L	K	R	W	K	L	F	S	K	Q	E	W	I	S
A/Wuxi/1/2013 (H7N9)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	S	T	E	H	I	N	T	Q	K	E	S	G	Q	R	T	Q	R	L	E	H	P	N	S	I	Q	L	M	D	H	Y	L	R	T	S	R	V	G	M	H	K	R	I	V	Y	W	K	Q	W	L	S	L	K	N	L	T	Q	E	S	L	K	T	R	V	S	K	R	W	K	L	F	S	K	Q	E	W	I	N	
A/Puerto-Rico/8/1934 (H1N1)	M	G	Q	E	Q	D	T	P	W	I	L	S	T	G	H	I	S	T	Q	K	R	E	D	G	Q	Q	T	P	R	L	E	H	R	N	S	T	R	L	M	G	H	C	Q	K	T	M	N	Q	V	M	P	K	Q	I	V	Y	W	K	Q	W	L	S	L	R	N	P	I	L	V	F	L	K	T	R	V	L	K	R	W	L	F	S	K	H	E				
A/Wisconsin/629-D00485/2009 (H1N1)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q	L	T	E	H	T	N	T	Q	K	R	E	S	G	R	T	Q	R	L	V	H	P	S	S	T	R	L	M	D	H	Y	L	R	I	M	N	Q	V	G	M	H	K	Q	T	V	F																																	
A/Beijin/262/1995 (H1N1)	M	G	Q	E	Q	T	P	W	I	Q	S	T	G	H	I	S	T	Q	K	E	E	D	G	Q	I	P	K	L	E	H	R	N	S	T	Q	L	M	G	H	Y	Q	K	T	M	N	Q	V	A	M	P	K	Q	I	V	Y																																		
A/Taiwan/4845/1999 (H1N1)	M	G	Q	E	Q	T	P	W	I	Q	S	T	G	H	I	S	T	Q	K	E	E	D	G	Q	I	P	K	L	E	H	R	N	S	T	Q	L	M	G	H	Y	Q	K	T	M	N	Q	V	A	M	P	K	Q	I	V	Y																																		
A/California/04/2009 (H1N1)	M	E	Q	E	Q	D	T	P	W	T	Q																																																																														

図1 A型インフルエンザウイルスの亜型によるPB1-F2のアミノ酸配列比較

各種亜型におけるPB1-F2のアミノ酸配列の違いを示した。図中で：は保存されたアミノ酸を表し、・は類似のアミノ酸を示している。図は文献8より一部を改変し、転載した。

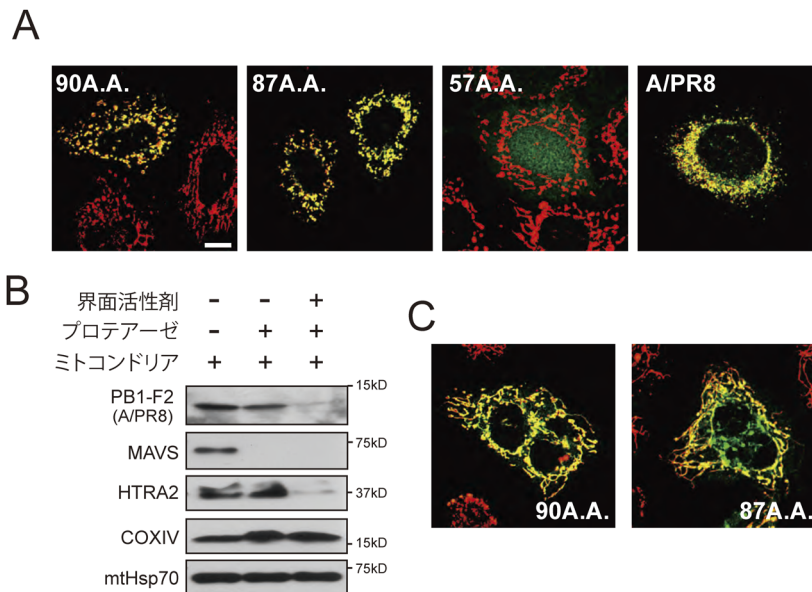


図2 PB1-F2はミトコンドリア内へ輸送される

(A) PB1-F2は発現されるサイズの違いにより細胞内での局在が異なる。写真は、HeLa細胞にそれぞれ長鎖(87, および90アミノ酸)、および短鎖(57アミノ酸) PB1-F2をコードした遺伝子を発現させ、免疫染色実験による各PB1-F2(緑色)の細胞内局在のようすを示した。長鎖PB1-F2を発現させた細胞内では、ミトコンドリア(赤色)との共局在が観察された。右図は実際のウイルス感染(A/PR8)細胞内でのようすを示している。スケールバー、10 μ m。(B) ウイルス感染細胞よりミトコンドリアを分離し、界面活性剤(外膜のみ可溶化)の有無による条件下でプロテアーゼによる消化実験を行った。実験では、ミトコンドリアの局在マーカーとして、それぞれMAVS(外膜)、HTRA2(膜間腔)、COXIV(内膜)、およびmtHsp70(マトリックス)を用いた。(C) ミトコンドリア分裂因子(Drp-1)をノックダウン系により発現抑制した細胞内では、長鎖PB1-F2(緑色)によるミトコンドリア(赤色)の形態異常は観察されなかった。(B)は文献8より一部を改変し、転載した。(カラー図は電子版参照)

リアの外膜と内膜の間)に輸送されていることが示唆された。一方、PB1-F2のミトコンドリア内への輸送には、外膜透過装置のTom40複合体が必須であることも明らかになった⁸⁾。

4. PB1-F2はミトコンドリアの形態異常をもたらす

筆者らがPB1-F2のミトコンドリア内への局在について解析していく過程で、長鎖PB1-F2が発現した細胞ではミトコンドリアの形態が著しく断片化していることを見いだした。通常、細胞内におけるミトコンドリア形態は、絶

えず融合と分裂を繰り返し網様構造を形成している⁹⁾。ところが、長鎖PB1-F2を発現した細胞内のミトコンドリアの形は、この動的平衡が極端に分裂側に傾いていた(図2A)。一方、短鎖型PB1-F2が発現している細胞では、上記のような特異的なミトコンドリアの形態異常は観察されなかった。長鎖PB1-F2蓄積によるミトコンドリア断片化の原因として、筆者らはミトコンドリア分裂現象と関係が深いミトコンドリアの内膜電位($\Delta\psi_m$)に着目した。事実、長鎖PB1-F2が局在しているミトコンドリア内 $\Delta\psi_m$ は、周囲のものと比較して有意に低下していることが確認でき、その後の実験により輸送されたPB1-F2のミトコ

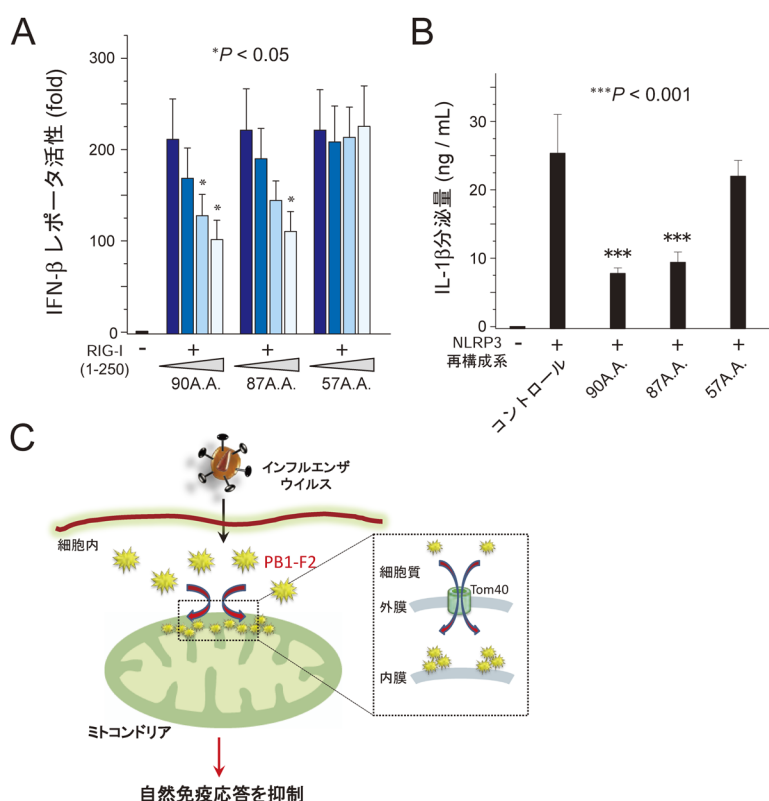


図3 PB1-F2とミトコンドリアを介した自然免疫

(A) ミトコンドリア局在型のPB1-F2は、用量依存的にRIG-I経路を抑制する。(B) HEK293細胞を用いた再構成系によるNLRP3インフラマソーム活性化の実験。NLRP3活性化に伴う炎症性サイトカイン (IL-1 β) の分泌量が、長鎖PB1-F2の発現により、有意に減少している。(C) PB1-F2はミトコンドリアを介した自然免疫を抑制する。(A)および(B)は文献8より一部を改変し、転載した。

ンドリア内膜上への蓄積が $\Delta\psi_m$ の低下を誘引していることが明らかになった⁸⁾。また、PB1-F2によるミトコンドリアの断片化は、ミトコンドリア分裂に関与するタンパク質(Drp-1)に依存した経路であることも示され(図2C)、その作用機序としてPB1-F2が分裂過程における初期段階で関与していることが予想された。

5. PB1-F2はミトコンドリアを介した自然免疫を抑制する

これまでの研究により、ミトコンドリアを介した抗RNAウイルス自然免疫(RIG-I経路)の作動においては、 $\Delta\psi_m$ が必須であることが明らかになっており¹⁰⁾、 $\Delta\psi_m$ を消失、または弱めた細胞ではウイルス感染に伴う転写因子(interferon regulatory factor-3: IRF-3)の活性化やその下流のinterferon β (IFN- β)産生が損なわれることが知られていた。そこで、PB1-F2のミトコンドリア内局在に伴う $\Delta\psi_m$ の低下もこのような自然免疫への影響をもたらすのか調べた。IFN- β レポーター遺伝子を用いて、PB1-F2がIRF-3転写活性に与える影響を調べた結果、予想どおり細

胞に長鎖PB1-F2を用量依存的に発現させた場合のみ、上流からのシグナルであるRIG-I過剰発現に伴うレポーター遺伝子の活性化効果は著しく抑制された(図3A)。RIG-Iの下流で働くアダプター分子MAVSの過剰発現系においても同様の結果が得られたことから⁸⁾、PB1-F2のミトコンドリア局在と抗ウイルスシグナル応答の抑制効果は相関していたことが示唆された。

次に、近年ミトコンドリアとの関係が議論されている生体内の炎症応答、NLRP3複合体を中心としたインフラマソームの活性化^{11, 12)}において、PB1-F2による $\Delta\psi_m$ 低下の影響も考察した。上述RIG-I経路と同様に、短鎖型PB1-F2発現細胞ではNLRP3活性化に伴う正常な炎症性サイトカイン(IL-1 β)の分泌が行われていたのに対して、長鎖PB1-F2では有意にその産生量が減少していた(図3B)。また、インフラマソーム活性化に依存したNLRP3のミトコンドリア局在¹²⁾も、長鎖PB1-F2発現細胞内では減少していた⁸⁾。したがって、筆者らはPB1-F2のミトコンドリア内局在によって誘引される $\Delta\psi_m$ の低下は、その後のミトコンドリアを介した自然免疫応答を抑制する効果があることを見いだした(図3C)。

6. おわりに

前述, A型インフルエンザウイルスは亜型ウイルスごとにミトコンドリア局在, または非局在性のPB1-F2を感染細胞内で発現している. 特筆すべきは, 高病原性ウイルスとして知られるH5N1型トリインフルエンザウイルスは, 非常に高い割合で長鎖PB1-F2をコードしており, 一方低病原性ウイルス (H1N1型) はそのゲノム内に主として短鎖PB1-F2を有している⁷⁾. さらに, 過去にパンデミックを引き起こしたスペイン風邪 (1918~1919年; H1N1型), アジア風邪 (1957年; H2N2型), および香港風邪 (1968年; H3N2型) のもとになったインフルエンザウイルスもすべて長鎖PB1-F2をコードしていたことも明らかになっている (図1). おそらくこれらのウイルスに感染した際には, ミトコンドリアを介した自然免疫機能の低下がその後の症状悪化に影響した可能性は十分に予想される. 事実, PB1-F2によるミトコンドリア機能の低下は, 細菌による二次感染との関連性を示す報告もなされている^{13, 14)}.

最後に, ウイルス由来のタンパク質が宿主の免疫系を標的にする例はいくつか報告されているが^{2, 3, 15)}, 特定のオルガネラに輸送され, その機能を低下させることで免疫忌避する戦略はほとんど明らかになっていない. 今後の新たなウイルスタンパク質の機能解析の進展に期待したい.

謝辞

初めに, 一戸猛志准教授 (東京大学・医科学研究所), 三原勝芳特任教授 (九州大学), 川畑俊一郎主幹教授 (九州大学), および本研究の共同研究者には多くの実験に関する御助言などを賜りましたことをここに深く感謝致します. また, 本研究で用いた研究試料に関しては, 東京大学・河岡義裕教授より快く分与していただきまして, この

場をお借りしまして御礼申し上げます. 最後に本研究は, 科学研究費補助金をはじめ, 上原記念生命科学財団, 武田科学振興財団, 内藤記念科学振興財団, 花王芸術・科学財団, など多数の研究支援を賜り行われた成果であります.

文 献

- 1) Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., & Chen, Z.J. (2005) *Cell*, **122**, 669–682.
- 2) Koshiha, T. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 225–232.
- 3) Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., & Tschopp, J. (2005) *Nature*, **437**, 1167–1172.
- 4) Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., & Yewdell, J.W. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 1306–1312.
- 5) Zamarin, D., Ortigoza, M.B., & Palese, P. (2006) *J. Virol.*, **80**, 7976–7983.
- 6) Ozawa, M., Basnet, S., Burley, L.M., Neumann, G., Hatta, M., & Kawaoka, Y. (2011) *J. Virol.*, **85**, 4596–4601.
- 7) Chakrabarti, A.K. & Pasricha, G. (2013) *Virology*, **440**, 97–104.
- 8) Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., & Koshiha, T. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 4713.
- 9) Chan, D.C. (2012) *Annu. Rev. Genet.*, **46**, 265–287.
- 10) Koshiha, T., Yasukawa, K., Yanagi, Y., & Kawabata, S. (2011) *Sci. Signal.*, **4**, ra7.
- 11) Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011) *Nature*, **469**, 221–225.
- 12) Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M.R., Wang, Z., & Germain, R.N. (2013) *Cell*, **153**, 348–361.
- 13) McAuley, J.L., Hornung, F., Boyd, K.L., Smith, A.M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J.W., & McCullers, J.A. (2007) *Cell Host Microbe*, **2**, 240–249.
- 14) Weeks-Gorospe, J.N., Hurtig, H.R., Iverson, A.R., Schuneman, M.J., Webby, R.J., McCullers, J.A., & Huber, V.C. (2012) *J. Virol.*, **86**, 9035–9043.
- 15) Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006) *Science*, **314**, 997–1001.

著者寸描

●吉住 拓馬（よしずみ たくま）



九州大学大学院システム生命科学府大学院生、学士（理学）。

■略歴 2013年九州大学理学部生物学科卒。同年より九州大学大学院システム生命科学府の大学院生。

■研究テーマと抱負 RNAウイルス感染時におけるミトコンドリアの役割に関する研究。ウイルスが感染した際の細胞内現象を分子レベルで明らかにしたい。

■趣味 ジョギング、ソフトボール。

●小柴 琢己（こしば たくみ）



九州大学大学院理学研究院准教授。博士（理学）。

■略歴 1996年北海道大学水産学部水産化学科卒。2001年同大学院理学研究科生物科学専攻・博士後期課程修了。その後、00～02年まで日本学術振興会特別研究員、05年までカリフォルニア工科大学（David Chan教授）にて博士研究員として留学。05年より九州大学大学院理学研究

院生物科学部門助教授。07年より現職。12年には科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞、第14回花王研究奨励賞、日本生化学会奨励賞などを受賞。

■研究テーマと抱負 高等動物におけるミトコンドリアの生理機能解析。特に、ミトコンドリアのダイナミックな動きに魅せられ、その本質的な意義を明らかにしたいと考えている。

■ウェブサイト <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~koshiba/>

■趣味 野球観戦、九州内の温泉地をめぐる旅行。