

る。近年、日本大学松戸歯学部吉垣先生らのグループは機能を保持した細胞培養の開発に精力的に挑んでおり、めざましい成果を上げている¹⁴⁾。外分泌の機能を維持したままの培養細胞系が確立できれば開口分泌のメカニズム解明はもとより、唾液腺の機能回復においても飛躍的に研究が進むものと思われる。

謝辞

本研究に協力してくださいました東北大学大学院生命科学研究所の福田光則教授、並びに日本歯科大学新潟生命歯学部生化学講座の皆様をはじめとする共同研究者の方々に深くお礼申し上げます。

- 1) Gorr, S.-U., Venkatesh, S.G., & Darling, D.S. (2005) *J. Dent. Res.*, **84**, 500-509.
- 2) 谷村明彦, 東城庸介 (2006) 日薬理誌, **127**, 249-255.
- 3) Ishikawa, Y., Cho, G., Yuan, Z., Skowronski, M.T., Pan, Y., & Ishida, H. (2006) *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 495-512.
- 4) Seino, S. & Shibasaki, T. (2005) *Physiol. Rev.*, **85**, 1303-1342.
- 5) Takuma, T. & Ichida, T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 22124-22128.
- 6) Shimomura, H., Imai, A., & Nashida, T. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **431**, 124-128.
- 7) Fujita-Yoshigaki, J. (1998) *Cell Signal.*, **10**, 371-375.
- 8) Imai, A., Nashida, T., Yoshie, S., & Shimomura, H. (2003) *Arch. Oral Biol.*, **48**, 597-604.
- 9) Imai, A., Nashida, T., & Shimomura, H. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **422**, 175-182.
- 10) Fukuda, M., Imai, A., Nashida, T., & Shimomura, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39175-39184.
- 11) Fukuda, M. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2801-2813.
- 12) Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Shimomura, H., & Fukuda, M. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 1945-1953.
- 13) Imai, A., Yoshie, S., Nashida, T., Fukuda, M., & Shimomura, H. (2009) *Eur. J. Oral Sci.*, **117**, 224-230.
- 14) Fujita-Yoshigaki, J., Matsuki-Fukushima, M., & Sugiya, H. (2008) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, C774-C785.

今井 あかね

(日本歯科大学新潟生命歯学部生化学講座)

Mechanisms of salivary secretion from parotid acinar cells
Akane Imai (Department of Biochemistry, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University, 1-8 Hamaura-cho, Chuo-ku, Niigata 951-8580, Japan)

ミトコンドリア外膜上でのウイルス免疫制御機構

はじめに

真核細胞内では核をはじめ、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソーム等の様々な細胞小器官(オルガネラ)が独自の機能を有し、それぞれに生体運営に関わっている。なかでもミトコンドリアは、細胞内におけるエネルギー工場とも呼ばれ、その特有の構造及び機能の両面から今日に至るまで研究対象となってきた。ミトコンドリアは、好気性細菌の一種、 α -プロテオバクテリアが真核細胞の前身となる細胞に感染し、その後の進化の過程で共生する選択肢をとり、現在では細胞の生存に不可欠のオルガネラとして獲得されたものと考えられている(細胞内共生説)。ミトコンドリア内に独自のDNAが存在し、他のオルガネラとは異なる二重膜構造になっていることはその名残とも考えられている。ミトコンドリアの細胞内における主な生理的役割は、アデノシン三リン酸(ATP)の産生である。ところが、ミトコンドリアの役割は細胞内のエネルギー代謝にとどまらず、細胞死(アポトーシス)、老化、神経変性疾患、発がん等の様々な現象とも密接に関連していることが知られるようになってきた。さらに近年の研究から、ウイルスに対する細胞内自然免疫応答とも関係していることが次第に明らかになってきた¹⁾。本稿では、細胞内における抗ウイルス自然免疫機構、特にミトコンドリア外膜上での負の制御機構に関して概説する。

1. ウイルス自然免疫とミトコンドリア

哺乳動物のRNAウイルスに対する自然免疫機構は、二つの異なるシグナル伝達経路により巧妙に制御されている(図1)。そのひとつは、Toll様受容体(TLR-3)を介した経路であり(TLR経路)、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、主にエンドソーム内に発現しているTLR-3が認識し、インターフェロン調節因子(IRF-3/7)とNF- κ B転写因子の活性化を引き起こす。その後、各々に活性化された転写因子の働きにより、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- α 及び1種類のIFN- β)及び炎症性サイトカインが産生誘導され、ウイルスに対する第一線の生体防御を行っている²⁾。一方、TLR-3非依存的に進行する別

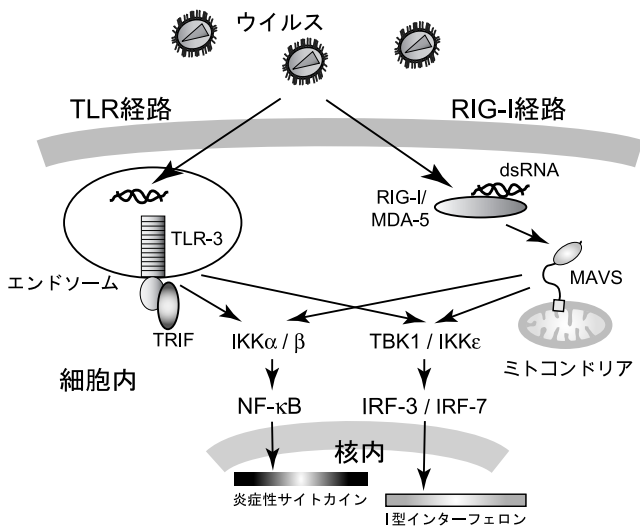


図1 TLR-3及びRIG-Iを介したシグナル伝達経路の概略図
哺乳動物の細胞内におけるRNAウイルスに対する自然免疫機構は、ウイルス由来のRNAをエンドソーム内に存在するTLR-3、または細胞質内に存在するRIG-I/MDA-5が認識し、一連のシグナル伝達が行われる。両経路ともに、最終的にはI型IFN及び炎症性サイトカインが産生され、ウイルスに対する第一線の生体防御を担っている。

経路 (RIG-I 経路) は、細胞内に移行したウイルスゲノム由来の二本鎖 RNA (dsRNA) や複製過程に生じる dsRNA を細胞内 RNA センサー分子である retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)、または melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA-5) が検知し、その後、IRF-3/7 と NF-κB 転写因子が活性化され、最終的には TLR 経路と同様に I 型 IFN 及び炎症性サイトカインが産生される³⁾。この経路において、RIG-I / MDA-5 は共通したアダプター分子として働く mitochondrial antiviral signaling (MAVS⁴⁾) (別名; IPS-1⁵⁾, VISA⁶⁾, Cardif⁷⁾) と相互作用し、下流にシグナルが伝えられる。

MAVS はミトコンドリア外膜に局在する分子量約 6 万の膜タンパク質であり、そのアミノ末端側に RIG-I/MDA-5 との相互作用に必要な caspase recruitment domain (CARD) を有する (図 2A)。大阪大学・審良教授らの MAVS 欠損マウスを用いた実験により、このアダプター分子が抗ウイルス免疫における必須の因子であることが実証され^{8,9)}、RIG-I 経路におけるウイルス免疫とミトコンドリア間のクロストークの重要性が注目されるようになってきた。以上のような背景から、筆者らは細胞内におけるウイルス免疫応答において、特に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がどのように調節され

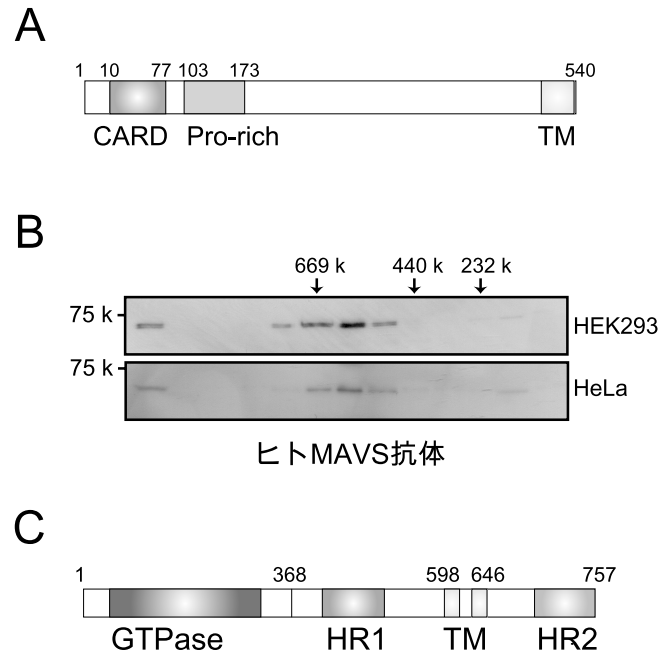


図2 ミトコンドリア膜タンパク質 MAVS 及び Mfn2 の構造
A). ヒト MAVS の構造. 分子量約 6 万の内在性膜タンパク質であり、分子の N 末端側に機能発現に重要と思われる CARD 及びプロリンリッチドメイン (Pro-rich) を有し、C 末端側に存在する膜貫通領域 (TM) でミトコンドリアの外膜にアンカーされている。数字はアミノ酸残基を示す。B). HEK293 及び HeLa 細胞から調製したミトコンドリア抽出液を、ゲル濾過カラム (Superdex-200 HR-10/30) にて分子量による分画を行い、その後 MAVS 抗体を用いたウエスタンブロットにより MAVS 複合体を検出した。C). ヒト Mfn2 の構造. MAVS 同様、ミトコンドリアの外膜に存在し、主としてミトコンドリア融合を調節している内在性膜タンパク質。GTPase: GTP 結合ドメイン, HR: 4, 3 heptad repeat 領域, TM: 膜貫通領域。

ているのかを調べた¹⁰⁾。

2. ミトコンドリア上での MAVS 複合体

筆者らは、まず初めに 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にて分子量による分画を行った。その結果、両細胞由来の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た (図 2B)。また、比較対象実験として行ったミトコンドリア抽出液の酸性条件 (pH 2) における分子量分画では、その溶出位置が大きく低分子側にシフトしており、これら

の結果から、MAVSはミトコンドリア膜上で何らかの因子と複合体を形成している可能性が高いことが示唆された。

そこで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、筆者らはミトコンドリアの融合に関わる膜タンパク質 Mitofusin 2 (Mfn2) に着目した (図 2C)。Mfn2 はミトコンドリア融合調節因子¹¹⁾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¹²⁾、細胞増殖の制御¹³⁾、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¹⁴⁾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。

3. Mfn2 は MAVS を介した IRF-3 及び NF- κ B の活性化を抑制する

IFN- β 及び NF- κ B レポーター遺伝子を用いて、MAVS-Mfn2 両タンパク質が IRF-3 や NF- κ B の転写活性に与える影響を調べた結果、HEK293 細胞に Mfn2 を用量依存的に発現させることで、MAVS 過剰発現に伴うレポーター遺伝子の活性化効果が著しく抑制された (図 3A)。また、MAVS の上流に位置する因子 (RIG-I) を過剰発現した HEK293 細胞でも、Mfn2 の過剰発現による抑制効果が観察された (図 3B)。さらに、ゲルシフトアッセイを用いた実験においても、通常 RIG-I (抗ウイルス) 刺激により細胞質内で行われる IRF-3 の二量体形成が、Mfn2 の用量依存的に著しく阻害された (図 3C)。

以上のことから、Mfn2 の過剰発現によるシグナル伝達への負の制御が実証されたので、さらに内在性 Mfn2 分子の役割について考察するため、Mfn2 欠損マウス胚線維芽細胞 (MEF)¹⁵⁾を用いて、ウイルス応答との関連を調べた。事実、Mfn2^{-/-}MEF 細胞に対してピコルナウイルス科に属するマウス脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus; EMCV) を感染させた場合、野生型の細胞に比べ約 4 倍程度 IFN- β の産生量が増加した (図 3D)。また、他の RNA ウイルスをこれら細胞に感染させた場合においても、著しい IFN- β 産生量の増加が Mfn2 の欠損により引き起こされた。したがって、筆者らは Mfn2 が MAVS を介した抗ウイルス応答の抑制因子であると考えた。

4. Mfn2 の HR1 領域による MAVS 分子の認識

Mfn2 は 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 (図 2C)。これら Mfn2 の機能ドメインのうち、どの領域が MAVS との相互作用に重要であるのか免疫沈降法により解析すると、HR1 領域が MAVS との相互作用に必須であることが判明した (図 3E)。そこで、HR1 領域内に点変異を導入した変異タンパク質を作製し、前述のレポーターアッセイにより、MAVS のシグナル伝達への影響を調べた。HR1 変異体 (E424G 及び R468H) では、野生型 Mfn2 で観察されるような抑制効果が損なわれており (図 3F)、Mfn2 による MAVS を介した抗ウイルス応答抑制は、Mfn2 分子内の HR1 領域による調節であることが推定された。事実、HR1 単独ドメインを用いたレポーターアッセイにおいても、このドメインが 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を確認している。

これまでに、ヒト・マウス以外の生物種を含めて Mfn 分子内における GTPase ドメイン¹⁵⁾、及び HR2 領域¹⁶⁾の機能的役割は比較的よく理解されていたが、HR1 領域に関する研究知見は非常に乏しいものであった。今回筆者が行った実験結果は、Mfn ホモログにおける HR1 領域の新たな役割模索の観点からも興味深いものとなった。

おわりに

以上の実験結果を総合して考えると、Mfn2 はミトコンドリアの外膜上で HR1 領域を介して MAVS と結合し (高分子複合体の一部として)、細胞内における抗ウイルス応答を制御していることが推定される¹⁰⁾。今回の発見は、これまでに知られているミトコンドリア融合に関する Mfn2 の機能とは著しく異なり、ミトコンドリアの自然免疫への寄与を考えていく上で非常に興味深い。また特筆すべきは、このような Mfn2 のウイルス免疫への関与は、そのアイソフォーム分子である Mfn1 (アミノ酸の同一性 60%) では観察されず¹⁰⁾、両タンパク質の細胞内での役割の相違を反映している可能性がある。他の細胞質因子も含めたミトコンドリアの外膜上における抗ウイルス免疫調節機構の詳細な解析が必要であろう。

謝辞

本研究は、川畑俊一郎研究室 (九州大学) で行われた研究成果であり、多くの実験は大学院生の安川開氏によって

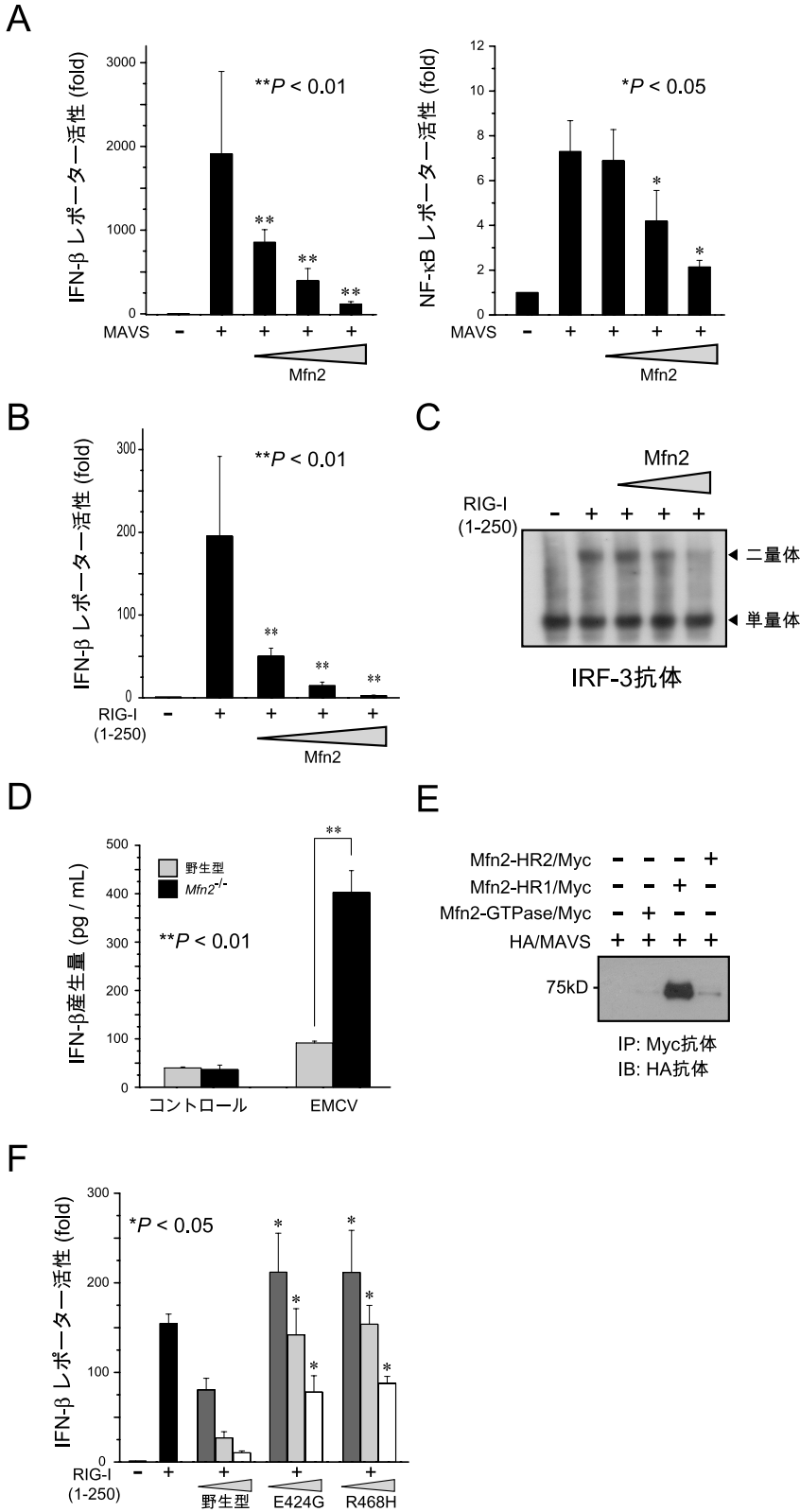


図3 Mfn2による抗ウイルス制御

A). Mfn2は用量依存的にMAVSを介したシグナル伝達を抑制する。B). Mfn2過剰発現がMAVS上流因子RIG-I刺激に伴うIFN-βレポーター活性に与える影響。C). native PAGEを用いたIRF-3活性化(二量体化)に及ぼすMfn2過剰発現の効果。D). 野生型及び*Mfn2*欠損MEF細胞に対するRNAウイルス(EMCV)感染後のIFN-β産生量の相違。E). 免疫沈降法によるMfn2各ドメインとMAVSとの相互作用解析。F). HR1変異体(E424G及びR468H;タンパク質間相互作用に重要であることが予想される部位)がMAVSシグナル伝達に与える影響。(図は文献10より改変)

行われました。また、本研究の共同研究者である瀬谷司教授・押海裕之助教（北海道大学）、柳雄介教授・竹田誠准教授（九州大学）、及び石原直忠講師（東京医科歯科大学）にはここに深く感謝致します。最後に、本稿を査読いただき、貴重なコメントを頂きました中條信成助教（九州大学）には厚く御礼申し上げます。

- 1) Kawai, T. & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 131–137.
- 2) Akira, S. & Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499–511.
- 3) Yoneyama, M. & Fujita, T. (2009) *Immunol. Rev.*, 227, 54–65.
- 4) Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., & Chen, Z.J. (2005) *Cell*, 122, 669–682.
- 5) Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Nat. Immunol.*, 6, 981–988.
- 6) Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005) *Mol. Cell*, 19, 727–740.
- 7) Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., & Tschopp, J. (2005) *Nature*, 437, 1167–1172.
- 8) Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K.J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *J. Exp. Med.*, 203, 1795–1803.
- 9) Sun, Q., Sun, L., Liu, H.H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., & Chen, Z.J. (2006) *Immunity*, 24, 633–642.
- 10) Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., & Kishimoto, T. (2009) *Sci. Signal.*, 2, ra47.
- 11) Chan, D.C. (2006) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 79–99.
- 12) de Brito, O.M. & Scorrano, L. (2008) *Nature*, 456, 605–610.
- 13) Chen, K.H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R.P., & Tang, J. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 872–883.
- 14) Züchner, S., Mersianova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battolglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schröder, J.M., & Vance, J.M. (2004) *Nat. Genet.*, 36, 449–451.
- 15) Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., & Chan, D.C. (2003) *J. Cell Biol.*, 160, 189–200.
- 16) Kishimoto, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., & Chan, D.C. (2004) *Science*, 305, 858–862.

小柴 琢己

(九州大学大学院理学研究院生物科学部門)

Regulation of antiviral immunity on the mitochondrial outer membrane

Takumi Koshiba (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, 6–10–1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan)

超分子マシナリーが担う鉄硫黄クラスターの生合成

1. はじめに

Wächtershäuserが提唱した“Iron-Sulfur World”という仮説では、海底の熱水孔の周辺で硫化鉄などの鉱物が鋳型、触媒、かつエネルギー源 ($\text{FeS} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ の発エルゴン反応) となって、原始代謝ひいては原始生命が生じたとされている¹⁾。その説の真偽はともかく、太古の生き物は当時豊富に存在した鉄原子と硫黄原子を組み合わせ、 $[\text{2Fe-2S}]$ や $[\text{4Fe-4S}]$ などの鉄硫黄クラスターの形で利用することを始め、それらは多彩かつ際だった有用性のゆえに、おびただしい種類のタンパク質にコファクターとして採用されるようになった^{2,3)}。呼吸鎖電子伝達複合体 I, II, III や光化学系 I 複合体、フェレドキシンなどのタンパク質では、 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ の酸化還元を利用して鉄硫黄クラスターを電子伝達に用いているが、それらの酸化還元電位は -600 mV から $+500 \text{ mV}$ と実に広い幅の中から特定の値に設定されている。これはクラスターの電位がそれを取り巻くタンパク質側の環境によって自在に制御されているためである⁴⁾。一方、アコニターゼのような(デ)ヒドラーゼ類では、 $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターを酸化還元ではなくルイス酸として触媒反応に用いている。また、鉄硫黄クラスターを酸素濃度や鉄イオン濃度のセンサーとして用いる発現制御タンパク質も知られている。近年では、 $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターと S-アデノシルメチオニン (SAM) からラジカルを生成して酵素反応に利用するラジカル SAM スーパーファミリーの酵素群が続々と報告され、そのメンバーは 2000 種類以上とも言われている。さらに最近では、DNA ヘリカーゼ、RNA ポリメラーゼ、RNA プライマーゼといった酵素の中にも鉄硫黄クラスターが存在することが示されている⁵⁾。大腸菌だけを見ても、鉄硫黄タンパク質は 120 種類を超えており、その数は今なお増加しつつある。

鉄硫黄クラスターについては、1960 年代の後半に鉄イオンと硫化物イオン (S^{2-}) を DTT などのチオール化合物の存在下でアポタンパク質に加えると再構成されることが示され、以来、細胞の中でも化学的(非酵素的)に生じるものと考えられてきた。しかし現在では、鉄硫黄クラスターの生合成に多成分酵素系(マシナリー)が関与するこ