

A 型インフルエンザウイルス由来タンパク質 (PB1-F2) と感染宿主内 ミトコンドリアとの相互作用解析

九州大学大学院 システム生命科学府 システム生命科学専攻
博士後期課程 1 年 吉住 拓馬

真核細胞内に存在する二重膜の細胞小器官 (オルガネラ) であるミトコンドリアは、生命活動に必要なエネルギー (ATP) の産生や細胞死の制御など多様な機能を有する、生命現象の根幹を担うオルガネラである。さらに近年、ミトコンドリアは RNA ウイルス感染時における自然免疫応答の中心としても機能していることも明らかになってきている。また、生細胞内においてミトコンドリアは細胞全体に管状のネットワークを形成しながら常に融合と分裂を繰り返していることも知られており、これによる形態変化がミトコンドリアの生理機能の維持にも関わっていると考えられている。

RNA ウイルスの一種である A 型インフルエンザウイルスは、細胞に感染するとウイルス由来のゲノムから主に 10 種類のタンパク質が合成する。これらのタンパク質とは別に、複製されたウイルスの構造には組み込まれないタンパク質として PB1-F2 と呼ばれるタンパク質を発現するウイルスが多数存在する。過去の報告から、PB1-F2 は感染細胞内のミトコンドリアに作用することにより、細胞死を引き起こすことが明らかになっていた (Chen et al., *Nat. Med.*, 2001)。また、PB1-F2 が局在したミトコンドリアはその形態が異常になる (断片化する) ことも明らかになっていたが、この形態異常がミトコンドリアの生理機能にどのような影響を及ぼすのか、その詳細な解析はあまり行われてこなかった。そこで本研究では、細胞内において PB1-F2 がどのような構造体として存在し、その生理機能、特にミトコンドリアを介した自然免疫応答への影響を明らかにすることを目的とした。

共免疫沈降法により PB1-F2 の構造体の解析を行ったところ、PB1-F2 同士で多量体を形成することが明らかになった。また、生体発光共鳴エネルギー転移 (bioluminescence resonance energy transfer; BRET) による生細胞内での PB1-F2 多量体の解析を行った結果、少なくとも三量体以上の多量体を形成することが示された。

PB1-F2 は感染細胞内のミトコンドリアに局在することは先行研究からも明らかになっていたが、実際にミトコンドリアのどの区画に局在しているのかが明確になっていなかった。そこで、生化学的手法を用いて PB1-F2 のミトコンドリア内局在を解析したところ、ミトコンドリアの膜間スペースで内膜と強く結合していることが示唆された。また、PB1-F2 が局在したミトコンドリアは内膜の電子伝達系の活動により生じる膜電

位 ($\Delta\Psi_m$) が低下していることが確認された。脱共役剤等の処理による $\Delta\Psi_m$ の低下は、ミトコンドリアの断片化を引き起こすことが明らかになっているため、PB1-F2 が局在することによるミトコンドリアの形態異常は、 $\Delta\Psi_m$ の低下によるものであると考えられた。しかし、ミトコンドリア外膜に局在する、またはミトコンドリアに局在しないそれぞれの変異体では $\Delta\Psi_m$ の低下は認められなかったため、PB1-F2 が膜間スペースに局在することが $\Delta\Psi_m$ の低下を引き起こすことが示唆された。

$\Delta\Psi_m$ は、RNA ウイルス感染時のミトコンドリアを介した自然免疫応答 (RIG-I 経路、NLRP3 インフラマソーム) の活性化に必要であることが明らかになっており、PB1-F2 による $\Delta\Psi_m$ の低下もこれらの経路に何らかの影響を与えていることが予想された。そこで、レポーター解析やインフラマソーム再構成系の構築によって PB1-F2 発現時における活性化を測定したところ、RIG-I 経路、NLRP3 インフラマソームの両経路ともに PB1-F2 存在下ではその活性化が抑制されることが明らかになった。また、あらかじめ PB1-F2 を発現させた細胞に、感染細胞内で GFP を発現するウイルス (VSV Δ G-G*) を感染させると、ミトコンドリアに局在しない変異体を発現させた場合よりも GFP を発現している細胞が多く観察され、感染率が上昇していることが確認された。これらの結果から、PB1-F2 はミトコンドリアに局在することで自然免疫応答を抑制することにより、ウイルスが増殖しやすい環境を作り出していることが示唆された。