

ミトコンドリア DNA の突然変異がウイルス感染ストレス応答に及ぼす影響の解析

福田恭子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：石川 香 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

ミトコンドリアは、酸化的リン酸化によって生体内で必要とされる ATP の大部分の産生を担う細胞小器官である。その内部には、核とは独立した独自のゲノムとしてミトコンドリア DNA (mtDNA) を細胞あたり数百~数千コピー有しており、呼吸酵素複合体のサブユニットの遺伝子や、それらを翻訳するために必要な tRNA、rRNA がコードされている。近年、ミトコンドリアが ATP 合成のみでなく、多くの生命現象に深く関わっていることが明らかにされつつあり、そのうちのひとつとして注目を集めている現象が、ウイルス感染に対する細胞の炎症応答プロセスである。

ウイルスが細胞に感染すると、Nod-like receptors (NLRs) ファミリータンパクの一つである NLRP3 が活性化し、幾つかのタンパク質と複合体を形成してインフラマソームが形成される。インフラマソームは Caspase 1 の活性化やサイトカインの分泌を介して、感染細胞に Pyroptosis と呼ばれる炎症性のプログラム細胞死を誘導することが判っている。このインフラマソームの活性化プロセスに、ミトコンドリアの膜電位やミトコンドリアから産生される活性酸素種 (ROS) が関与している可能性が指摘されているが、実際にミトコンドリアの機能がどのようにインフラマソームの活性化プロセスに関わっているのか、詳しいことはほとんど解明されていない。一方で、ウイルス感染細胞ではミトコンドリアからのシトクロム *c* 放出を介した Apoptosis も誘導されることが知られているが、そこに至るまでの詳細な応答経路も判っていない。このように、ウイルス感染細胞が引き起こす 2 つのタイプの細胞死については、いずれもミトコンドリアが関わっていることが示唆されているが、その詳細はほとんど明らかにされていないのが現状である。

所属研究室では、mtDNA に病原性突然変異を有することでミトコンドリアの呼吸機能が低下したり、ROS 産生が増加したりするマウス培養細胞が樹立されている。これらの細胞におけるウイルス感染応答を、野生型 mtDNA を有する細胞の応答と比較することは、ミトコンドリアの機能がウイルス感染応答にどのように関わっているのかを解析する上で、非常に有効な手段であると考えられる。

【目的】

mtDNA に病原性突然変異を有するマウス培養細胞を用いて、ウイルス感染応答におけるミトコンドリアの役割を検証する。

【材料と方法】

同一の核背景に、異なる mtDNA を有するマウス繊維芽細胞由来の培養細胞株として、所属研究室で樹立された以下の 3 種類の細胞を実験に用いた。

- ①B82mtB6 : C57BL/6 (B6) マウスに由来する、野生型 mtDNA のみを有する。
- ②B82mtND6^M : mtDNA にコードされた呼吸酵素複合体 I のサブユニットである ND6 遺伝子に G13997A 点突然変異を有し、

複合体 I の活性低下と、ROS の過剰産生が認められる。

- ③B82mtΔ : mtDNA 上に 4696 bp の大規模欠失を有する欠失型 mtDNA (ΔmtDNA) と野生型 mtDNA の両方を含有しており、ΔmtDNA の割合が高くなると、呼吸機能の低下が誘導される。

これらの細胞に対し、インフルエンザウイルス株 PR8 を感染させ、下記の項目を検証した。

1) ウイルス感染率の検証

感染後の細胞に対し、ウイルスに特異的なタンパク質である Nucleoprotein (NP) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、感染が成立した細胞の割合を検討した。

2) 誘導される細胞死の種類の検証

2) -1 阻害剤による検討

ウイルス感染により誘導される細胞死が、mtDNA の種類によって異なるかどうかを確認するために、Apoptosis に必須の Caspase 3 または、Pyroptosis に必須の Caspase 1 に対する阻害剤を添加した条件における細胞死を、トリパンブルー染色法によって継時的に計測した。同時に、阻害剤を添加しない条件での総細胞死数も計測し、細胞死誘導率も確認した。

2) -2 直接的な定量による検討

2) -1 の方法では、阻害剤の効果が十分に得られない場合には正確に Apoptosis と Pyroptosis の割合を検討することが難しくなる。そこで、Apoptosis と Pyroptosis にそれぞれ特異的に関与する分子をラベル化して観察することにより、どちらのタイプの細胞死が起きているかをより直接的に観察した。Apoptosis 特異的な分子として活性化 Caspase 3 に特異的な抗体を用いた。また、Pyroptosis 特異的な分子として Caspase 1 の活性化に必須のアダプター分子である Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) を GFP と融合した遺伝子を発現させ、インフラマソームの形成効率を観察した

【結果】

1) の検討の結果、各細胞に対するウイルスの感染率は、野生型 mtDNA を有する B82mtB6 と比較して B82mtND6^M や B82mtΔ では同等であった。

2) の検討より、総細胞死数は変異型 mtDNA を有する細胞において増加傾向が見られた。

これらの結果は、mtDNA に病原性突然変異が存在すると、細胞のウイルスに対するストレス応答性が変化する可能性を示唆している。より詳細な結果については、発表会にて報告する。