

The microRNAs miR-302b and miR-372 regulate mitochondrial metabolism via the SLC25A12 transporter, which controls MAVS-mediated antiviral innate immunity

安川, 開

<https://doi.org/10.15017/4060013>

---

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (理学) , 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏 名 : 安川 開

論 文 名 : The microRNAs miR-302b and miR-372 regulate mitochondrial metabolism via the SLC25A12 transporter, which controls MAVS-mediated antiviral innate immunity  
(マイクロ RNA miR-302b と miR-372 は SLC25A12 トランスポーターによるミトコンドリアの代謝を調節することで MAVS を介した抗ウイルス自然免疫応答を制御する)

区 分 : 甲

### 論 文 内 容 の 要 旨

マイクロ RNA(miRNA)はおよそ 22 塩基で構成されている短いノンコーディング RNA であり、細胞内で多数の遺伝子発現を制御することで、細胞増殖や分化、発生、アポトーシスなど様々な細胞機能の調節に関与している。miRNA は、自身の 5'末端の 2 塩基目から 8 塩基目の 7 塩基からなるシード配列を介して、標的遺伝子 mRNA の 3'-UTR に対して mismatches を含む不完全な結合をすることで、mRNA からのタンパク質の翻訳阻害や mRNA の分解を引き起こし、標的遺伝子の発現を抑制する。これまでに、ヒトでは 2000 を超える miRNA が同定されており、その多くが疾患に関係していることから、新しい創薬標的としても注目されている。さらに、最近の研究において、miRNA がウイルスに対する自然免疫応答にも関わっていることが明らかになってきている。

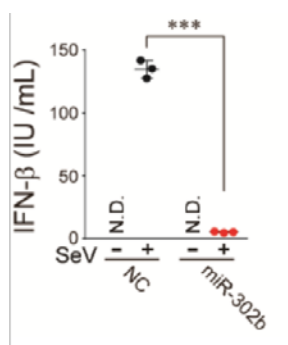
ミトコンドリアは ATP 産生やアポトーシス、カルシウムの恒常性維持などの様々な細胞内プロセスに関与している。また、ミトコンドリア外膜に局在する mitochondrial antiviral signaling (MAVS) を介して、ミトコンドリアが RNA ウイルスに対する抗ウイルス応答の制御に関与していることが明らかになっている。ミトコンドリアを介した抗ウイルス応答は、細胞質中の RNA センサー分子である RIG-I に代表される RIG-I like receptor (RLR) 経路の下流に位置しており、ミトコンドリア外膜上に MAVS を中心としたシグナル伝達複合体 (MAVS signalosome) を形成し、下流のシグナル伝達因子へとシグナルを伝達する。これまでに申請者らの研究によって、ミトコンドリアを介したウイルス応答を正常に機能させるためには、ミトコンドリアの膜電位や酸化的リン酸化活性、形態調節などのミトコンドリアの生理機能が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、現在までの研究で、一部の miRNA が抗ウイルス自然免疫に関与することが明らかになっているが、miRNA によるミトコンドリア機能調節を介した自然免疫応答の制御機構はまだ明らかになっていないことから、本研究ではミトコンドリアを介した自然免疫の制御機構における miRNA の機能や作用機序を検討した。

申請者らはまず、ミトコンドリアを介した抗ウイルス応答に関与している miRNA を見出すために、ウイルス感染や二本鎖ウイルス RNA アナログの poly (I:C) で刺激をした細胞において発現が変動する miRNA を調べた。その中で、miR-302b や miR-372 はウイルス感染により発現が上昇し、さらに、これらの miRNA を細胞内に導入することでウイルス感染による I 型インターフェロンやサイトカイン産生が抑制されることを明らかにした(参考図 1)。興味深いことに、これらの miRNA

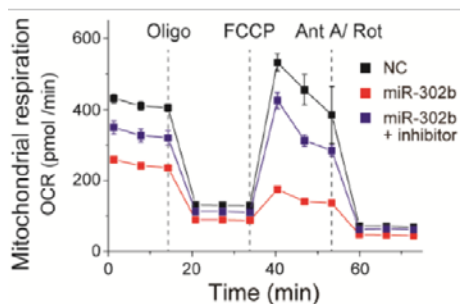
を導入した細胞では、ミトコンドリアが過剰に分裂した状態で存在していることも見出した。これらの miRNA がどのような標的遺伝子の発現を制御することで、ミトコンドリアの過剰分裂を引き起こしているかを調べるために、miR-302b を導入した細胞でマイクロアレイ解析を行ったところ、ミトコンドリアの形態調節や代謝調節に関与する RAB32 や SLC25A12 などの複数のミトコンドリアに局在している分子が標的遺伝子になっていることが明らかになった。次にこれらの標的遺伝子の機能解析を行ったところ、標的分子のひとつである RAB32 によって、DRP1 のリン酸化調節により DRP1 のミトコンドリア分裂活性が亢進することにより、ミトコンドリアの過剰な分裂が誘導されていることを見出した。また、DRP1 のアダプター分子である MID49 や MID51 の発現は上昇しており、DRP1 のミトコンドリア上への局在が亢進していることも明らかになった。これらの作用機序によるミトコンドリアの過剰分裂が、ミトコンドリアを介した抗ウイルス応答を抑制していることが示唆された。

さらに、miR-302b や miR-372 を導入した細胞では、ミトコンドリアの酸素消費が低下することも明らかになった (参考図 2)。この酸素消費の低下には、ミトコンドリア内膜に局在するアスパラギン酸/グルタミン酸トランスポーターである SLC25A12 が関与している可能性が考えられた。そこで、SLC25A12 の発現を欠損させた細胞を用いて酸素消費を測定したところ、ミトコンドリア酸素消費が低下することが明らかになり、さらに、ミトコンドリア関連の代謝物であるピルビン酸やアスパラギン酸量の減少や NAD/NADH 比の変化が見られた。また、siRNA による SLC25A12 ノックダウン細胞では、I 型インターフェロンやサイトカイン産生が抑制されることも見出されたが、興味深いことに、減少していたピルビン酸やアスパラギン酸を培地中に添加することで、I 型インターフェロンやサイトカイン産生が回復することが明らかになった。これらのことから、ミトコンドリアの呼吸活性や代謝物輸送の変化もミトコンドリア形態変化と同様に抗ウイルス応答の制御に寄与していることが示唆された。

上記の結果より、申請者らは、miR-302b や miR-372 がミトコンドリア局在分子の発現をコントロールし、ミトコンドリア形態調節や代謝調節を介してウイルス感染後の自然免疫応答を抑制することで、抗ウイルス応答の収束や過剰な反応の抑制に寄与していると結論付けた。



**参考図1: miR-302bによる抗ウイルス応答への影響**  
陰性対照のmiRNAを導入した細胞とmiR-302bを導入した細胞でウイルス感染によるIFN-β産生量を定量した。miR-302bを導入したHEK293細胞では、センダイウイルス(SeV)の感染によるIFN-βの産生が抑制される(赤)。n=3, mean±SD, N.D., not detected, \*\*\* P<0.001



**参考図2: miR-302bによるミトコンドリア酸素消費への影響**  
フラックスアナライザーを用いて各細胞のミトコンドリア酸素消費を測定した。miR-302bを導入した細胞(赤)では、ミトコンドリア酸素消費が低下するが、同時にmiR-302b阻害剤を導入した細胞(青)では、ミトコンドリア酸素消費が回復する。n=5, mean±SD

Oligo, Oligomycin: 酸化的リン酸化阻害剤  
FCCP: 脱共役剤  
Ant A, Antimycin A: 酸化的リン酸化阻害剤  
Rot, Rotenone: 酸化的リン酸化阻害剤