

## 24. インフルエンザウイルスによる自然免疫制御機構の解明

一戸 猛志

東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 感染制御系 ウイルス学分野

Key words : インフルエンザウイルス, 自然免疫, NLRP3

### 緒言

TLRs (Toll-like receptors) や RLRs (RIG-I-like receptors) は、ウイルス由来の核酸を認識して I 型インターフェロンを誘導する。TLR3、TLR7、TLR9 はエンドゾーム内に存在する膜受容体で、二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA)、一本鎖 RNA (single-stranded RNA: ssRNA) と DNA をそれぞれ認識する。RIG-I と Mda5 を含む RLRs は、細胞質中に存在するウイルス RNA を認識する。一方、細胞質中に存在する自然免疫受容体、Nod-like receptor (NLR) ファミリーの NLRP3 は、細菌、ウイルス、環境中刺激物などさまざまな刺激に応答し、アダプタータンパク質の apoptosis-associated speck-like protein (ASC) や未成熟型 caspase-1 (pro-caspase-1) とともに巨大なタンパク質複合体である NLRP3 inflammasome を形成する (図 1)。NLRP3 inflammasome の形成により活性化された caspase-1 は、細胞質中の未成熟型 interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) や IL-18 など炎症誘発性サイトカインの成熟と分泌を制御する (図 1)。この IL-1 $\beta$  は、さまざまな病原体に対する免疫応答の誘導と炎症反応、自己免疫疾患などに関わる中心的なサイトカインである。例えば、インフルエンザウイルス感染による肺での inflammasomes の活性化は、ウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要である<sup>1-3)</sup>。ウイルスの認識に関わる inflammasome として現在、RIG-I inflammasome、NLRP3 inflammasome、absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasome が知られている (図 1)。RIG-I や AIM2 は、それぞれウイルスの RNA や DNA を認識することにより活性化する inflammasome であるのに対し、NLRP3 inflammasome はウイルス RNA を認識しない<sup>1,4)</sup>。我々はこれまでに、インフルエンザウイルスや脳心筋炎ウイルス (EMCV) は、ウイルスが持つイオンチャネルタンパク質 (viroporin) によって、NLRP3 inflammasome を活性化させていることを見出してきた<sup>4,5)</sup>。インフルエンザウイルスの場合、NLRP3 の活性化にはウイルスの H<sup>+</sup>選択的な M2 タンパク質がトランスゴルジに局在することが必要であった (図 1)<sup>4)</sup>。また EMCV は、ウイルスの 2B (Ca<sup>2+</sup>イオンチャネル) タンパク質が、小胞体やゴルジ体の Ca<sup>2+</sup>を細胞質中へ流出させて、細胞質中の Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇することが、NLRP3 の活性化に必要である (図 1)<sup>5)</sup>。さらにこれらウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化にはミトコンドリアの膜電位 (連結したミトコンドリア) が必要で、NLRP3 はミトコンドリア外膜タンパク質の mitofusin 2/MAVS を足場に、NLRP3 inflammasome を形成していることを明らかにした (図 2)<sup>6)</sup>。逆に、インフルエンザウイルスの PB1-F2 タンパク質は、Tom40 チャネルを介してミトコンドリアの膜間スペースへ輸送され、ミトコンドリアの膜電位を低下 (ミトコンドリアを断片化) させることにより、NLRP3 inflammasome の活性化を抑制している (図 2)<sup>7)</sup>。同様にインフルエンザウイルス NS1 タンパク質は、caspase-1 の活性化をそれに続く IL-1 $\beta$  の分泌を抑制していることが知られているが<sup>8)</sup>、その具体的なメカニズムは不明である。そこで本研究では、インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome の抑制機構を明らかにすることを目的とした。

## 方法および結果

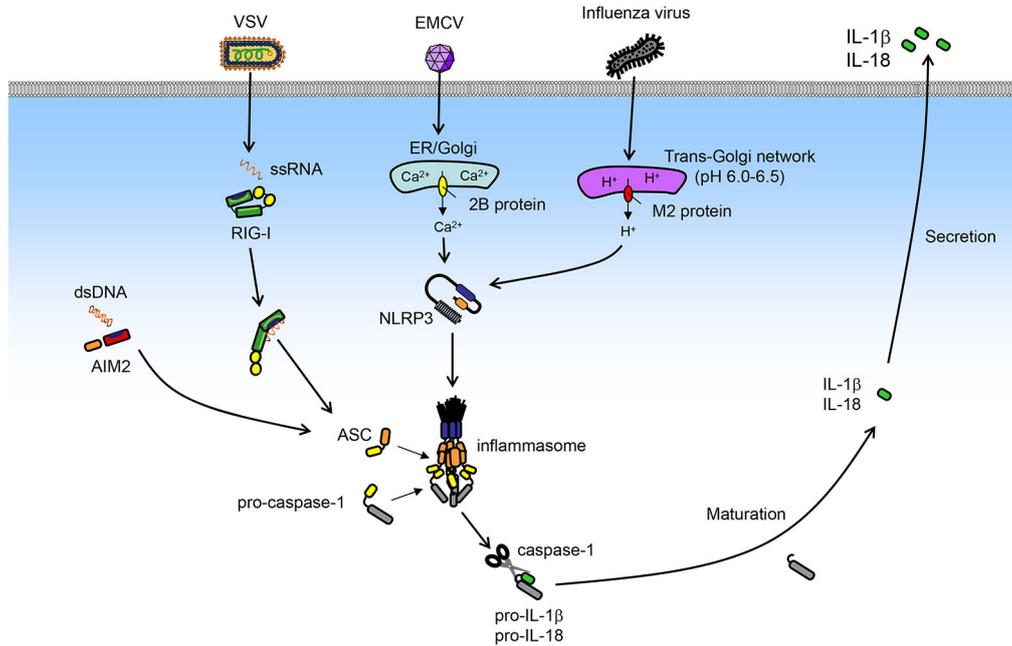


図1. ウイルス感染と inflammasome

インフルエンザウイルス M2 タンパク質は、トランスゴルジ中の H<sup>+</sup> を細胞質中へ流出させて NLRP3 inflammasome を活性化させている。また EMCV 2B タンパク質は、小胞体やゴルジ中の Ca<sup>2+</sup> を細胞質中へ流出させて NLRP3 inflammasome を活性化させる。また RIG-I は水疱性口内炎ウイルス (VSV) の一本鎖 RNA (ssRNA) を認識して RIG-I inflammasome を形成し、細胞質中のウイルス DNA (dsDNA) は AIM2 inflammasome を活性化させる。Inflammasome の形成により活性化した caspase-1 は細胞質中の未成熟型のサイトカイン (pro-IL-1 $\beta$ 、proIL-18) を切断し、細胞外への分泌を促進させる。

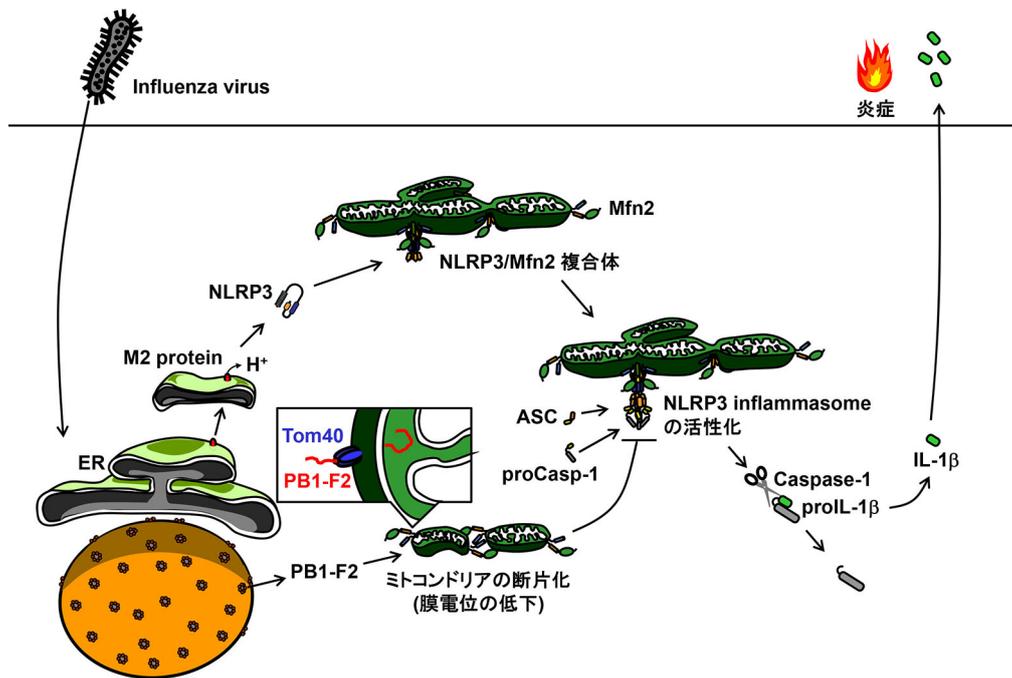


図2. ミトコンドリアの膜電位依存的な NLRP3 inflammasome の活性化

インフルエンザウイルスなどの感染により活性化した NLRP3 は、ミトコンドリアの外膜タンパク質である mitofusin 2 (Mfn2) や MAVS と結合する。これを足場として、アダプタータンパク質の ASC や pro-caspase-1 (proCasp-1) が集合し、NLRP3 inflammasome が形成される。インフルエンザウイルスの PB1-F2 タンパク質は、Tom40 チャネルを介してミトコンドリアの膜間スペースへ輸送され、ミトコンドリアの膜電位を低下（ミトコンドリアを断片化）させることにより、NLRP3 inflammasome の活性化を抑制している。

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質が NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の分泌を抑制するかを検証するため、HEK293T 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系を利用した。HEK293T 細胞に NLRP3、ASC、procaspase-1、pro-IL-1 $\beta$  の発現プラスミドを導入すると、培養上清中に成熟型の IL-1 $\beta$  が分泌される (図 3)。これまでの報告の通り<sup>6,7)</sup>、ヒト uncoupling protein-2 (hUCP-2) 発現プラスミドを導入すると、IL-1 $\beta$  の分泌が抑制された。同様に、インフルエンザウイルス NS1 発現プラスミドを導入すると NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の分泌を有意に抑制した。しかし、NS1 タンパク質により細胞質中の pro-IL-1 $\beta$  の発現量には影響を与えなかったことから、NS1 タンパク質は NLRP3 inflammasome の活性化そのものを抑制していることが示唆された。

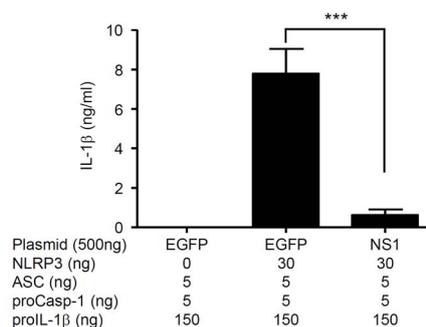


図3. HEK293T 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系

HEK293T 細胞に、図に示すプラスミドをトランスフェクションした。24 時間後の培養上清を回収し、IL-1 $\beta$  の量を ELISA で測定した。\*\*\* $P < 0.001$  (t-test)。

次に HEK293T 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系で得られた現象を、IL-1 $\beta$  の主要な産生細胞であるマウスマクロファージで再現できるかを確認した。まずインフルエンザウイルス NS1 タンパク質を発現するレンチウイルスを作製し (invitrogen)、これをマウスマクロファージ細胞株である J774A.1 細胞に感染させ、NS1 発現 J774A.1 を樹立した。これに NLRP3 のアゴニストである ATP や、NS1 欠損インフルエンザウイルス (Prof. Adolfo Garcia-Sastre, The Mount Sinai Hospital) を感染させた場合、コントロールの EGFP 発現 J774A.1 と比較して、NS1 発現 J774A.1 では、ATP 刺激 30 分後または NS1 欠損ウイルス感染 24 時間後の培養上清中の IL-1 $\beta$  の産生が有意に低下していることが分かった。

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の産生抑制機構を調べるため、ミトコンドリアの膜電位に与える影響を解析した。これまでの報告通り<sup>6,7)</sup>、HEK293T 細胞に hUCP-2 の発現プラスミドを導入、または細胞を carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) で処理するとミトコンドリアの膜電位が低下した (TMRM 染色)。しかし、インフルエンザウイルス NS1 タンパク質発現プラスミドを導入しても、ミトコンドリアの膜電位に影響を与えなかった。

次にインフルエンザウイルス NS1 タンパク質が NLRP3 inflammasome の構成因子と相互作用しているかを調べるため、HEK293T 細胞に、myc-tag NLRP3 と flag-tag NLRP3、ASC を co-transfection し、抗 flag 抗体を用いた免疫沈降を行った。するとインフルエンザウイルス NS1 タンパク質が NLRP3 と相互作用していることが確認できた。

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の産生抑制機構のさらに詳細なメカニズムを解析するため、NS1 タンパク質の NLRP3/ASC によるスペックの形成に与える影響を解析した。HeLa 細胞に NLRP3 と ASC の発現プラスミドを導入すると、NLRP3/ASC が形成するスペック構造を 1 細胞に 1 つ観察できた。しかし、ここにインフルエンザウイルス NS1 タンパク質発現プラスミドを導入すると NLRP3/ASC が形成するスペック構造が分散することが分かった。

最後に NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の産生抑制に必要な、インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の機能ドメインを解析した。そこで RNA 結合ドメイン (38 番目のアルギニンと 41 番目のリジン) と TRIM25 結合ドメイン (96 番目と 97 番目のグルタミン酸) をアラニンに置換した変異 NS1 発現プラスミドを作製し、NLRP3 inflammasome 再構築系における IL-1 $\beta$  の産生、NLRP3 との相互作用、NLRP3/ASC スペック形成について検討を行った。その結果、RNA 結合ドメインと TRIM25 結合ドメインは、NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の抑制、NLRP3 との相互作用、NLRP3/ASC のスペック形成の抑制に必要であることが分かった<sup>9)</sup>。

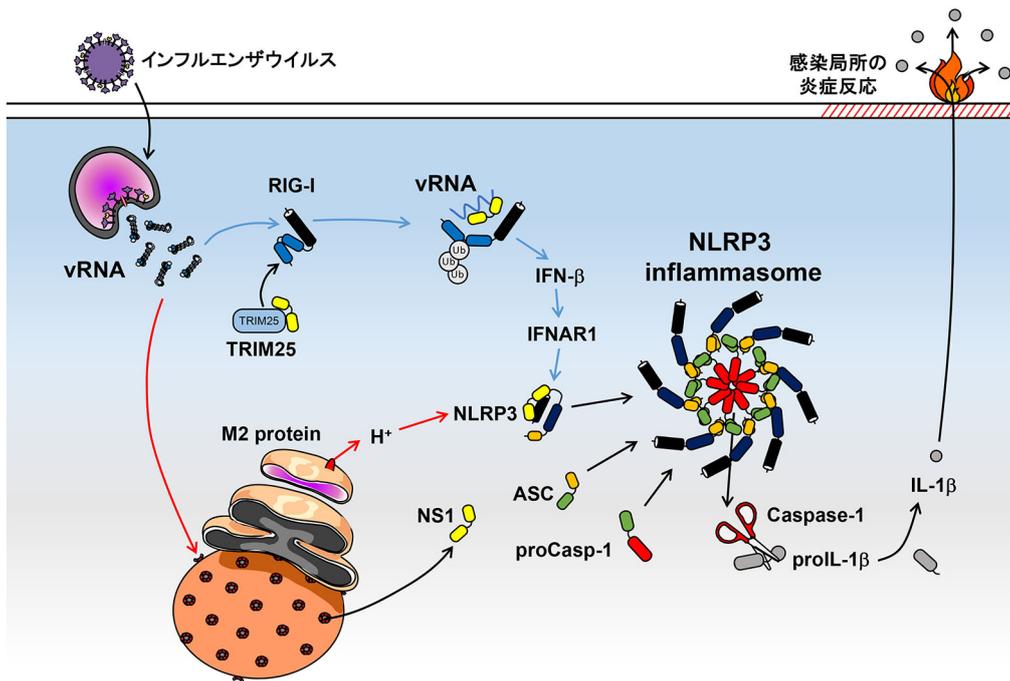


図4. インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome の抑制機構

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は、NLRP3 と相互作用することにより NLRP3 inflammasome の活性化とそれに続く IL-1 $\beta$  の産生を抑制している。この抑制効果には、NS1 タンパク質の RNA 結合ドメインや TRIM25 結合ドメインが必要であった。

## 考 察

インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は、NLRP3 と相互作用することにより NLRP3/ASC によるスペックの形成を阻害し、NLRP3 inflammasome の活性化とそれに続く IL-1 $\beta$  の産生を抑制していた。この抑制効果には、NS1 タンパク質の RNA 結合ドメイン（38 番目のアルギニンと 41 番目のリジン）と TRIM25 結合ドメイン（96 番目と 97 番目のグルタミン酸）が必要であったことから、NS1 タンパク質はウイルス RNA による NLRP3 inflammasome の増幅経路<sup>10)</sup>にも影響を与えていることが推察された。Inflammasome の活性化はウイルス特異的な獲得免疫応答の誘導に必要であるが<sup>1)</sup>、その異常な活性化はさまざまな自己免疫疾患に関わる。このため inflammasome の活性化や抑制機構について理解することは、ウイルス感染症に対する効果的なワクチン開発やアジュバントの開発、またウイルスの病原性発現機構の理解に役立つ可能性がある。この知見を活かして、今後も inflammasome の活性化・抑制機構とウイルスの病原性発現機構を理解していきたい。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):79-87. doi: 10.1084/jem.20081667.
- 2) Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, Iwasaki A. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 29;108(13):5354-9. doi: 10.1073/pnas.1019378108.
- 3) Pang IK, Ichinohe T, Iwasaki A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8<sup>+</sup> T cell responses to influenza A virus. *Nat Immunol*. 2013 Mar;14(3):246-53. doi: 10.1038/ni.2514.

- 4) Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):404-10. doi: 10.1038/ni.1861.
- 5) Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002857. doi: 10.1371/journal.ppat.1002857.
- 6) Ichinohe T, Yamazaki T, Koshihara T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 29;110(44):17963-8. doi: 10.1073/pnas.1312571110.
- 7) Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshihara T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun.* 2014 Aug 20;5:4713. doi: 10.1038/ncomms5713.
- 8) Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, Egorov A. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol.* 2005 Jan;86(Pt 1):185-95.
- 9) Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshihara T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1 $\beta$  Secretion. *J Virol.* 2016 Mar 28;90(8):4105-14. doi: 10.1128/JVI.00120-16.
- 10) Pothlichet J, Meunier I, Davis BK, Ting JP, Skamene E, von Messling V, Vidal SM. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003256. doi: 10.1371/journal.ppat.1003256.