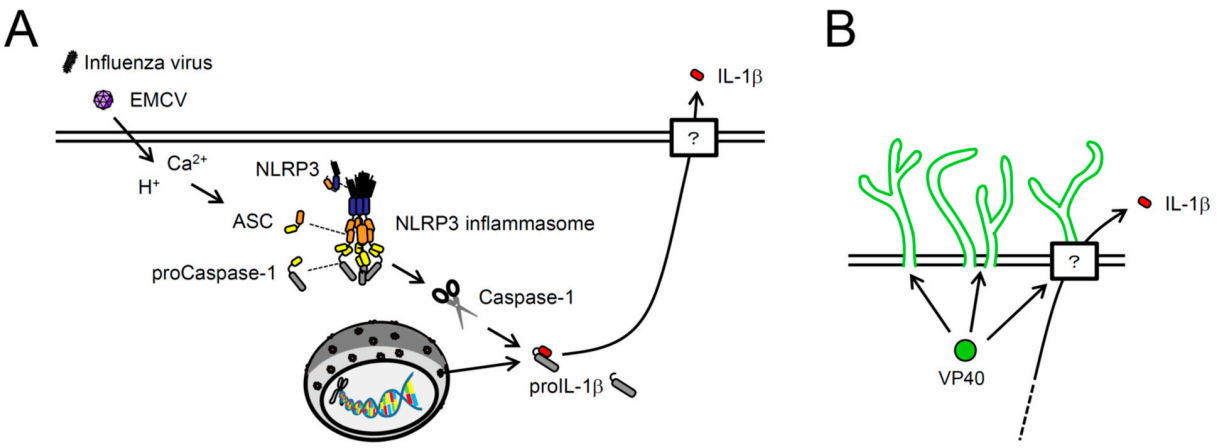
21　エボラウイルスによるNLRP3 inflammasome制御機構の解明	一戸　猛志

【目的】インフルエンザウイルスや脳心筋炎ウイルスのviroporin（ウイルスがコードするイオンチャネルタンパク質）は、細胞質中の自然免疫受容体であるNLRP3を活性化する（図A）。これにより活性化したcaspase-1が未成熟型のproIL-1βを切断し、成熟化したIL-1βはいまだに不明な点が多いunconventional protein secretion pathway（非典型的タンパク質分泌経路）により細胞外へ放出される（Cell. 2008）（図A）。マウスを用いた研究からエボラウイルス感染による過剰なIL-1βの産生が、ウイルスの病原性に関与しているという報告がある（J Infect Dis. 2015）。しかしエボラウイルスによるIL-1β分泌の制御機構は未知である。そこで本研究では、エボラウイルスタンパク質によるIL-1βの産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】HEK293FT 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系に、EGFP またはエボラウイルスの各ウイルスタンパク質を発現するプラスミドを導入し、24 時間後の培養上清中の IL-1β の量を ELISA で測定した。また VP40 が作る virus-like particles (VLPs) をショ糖密度勾配超遠心法により回収した。さらに HeLa 細胞に EGFP 融合 VP40 発現プラスミドを導入し、細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】エボラウイルスの VP40 タンパク質は、NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を促進させた。しかし VP40 タンパク質が作る VLPs 中には IL-1β を検出することができなかった。細胞に VP40 タンパク質を発現させると細胞膜表面にひも状構造が観察できるが（図 B）、このひも状構造を作らない C 末端欠損 VP40 タンパク質は、NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を促進しなかった。現在、VP40 タンパク質による IL-1β 分泌促進機構について解析を続けている。

ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化



21. エボラウイルスによる NLRP3 inflammasome 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 ウイルス学分野

Key words：ウイルス，病原性，炎症

緒　言

インフルエンザウイルスが細胞に感染すると、インフルエンザウイルス M2 タンパク質の働きにより、NLRP3 inflammasome が活性化する［1］。活性化した NLRP3 は、ミトコンドリア外膜タンパク質の mitofusin 2 と相互作用し、ミトコンドリア外膜上で NLRP3 inflammasome を形成する［2］。我々はこれまでに、インフルエンザウイルス PB1-F1 タンパク質が、ミトコンドリア膜電位を低下（連結した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こと［3］、さらにインフルエンザウイルス NS1 タンパク質が、NLRP3 と相互作用することにより、NLRP3 inflammasome の形成を阻害していることを明らかにしてきた［4］（図 1）。

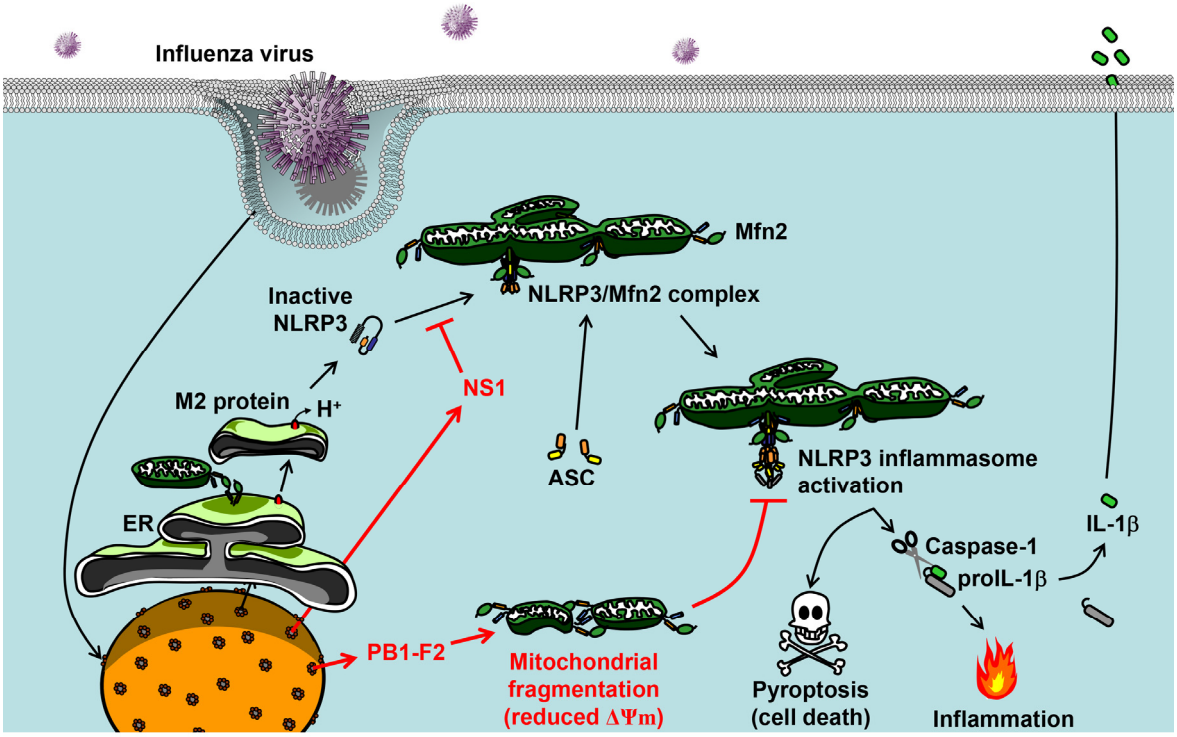


図 1. インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の制御機構
インフルエンザウイルス M2 タンパク質は、細胞内イオンバランスの恒常性を崩すことで NLRP3 inflammasome を活性化させるが、NS1 タンパク質や PB1-F2 タンパク質は、異なるメカニズムによりそれを抑制する。

2014 年に西アフリカでアウトブレイクを起こしたエボラウイルスは、エボラ出血熱の原因ウイルスである。ヒトにおける致死率は 50～90%で、マウスを用いた研究からエボラウイルス感染による過剰な IL-1β の産生が、ウイルスの病原性に関与しているという報告がある［5］。しかし、エボラウイルスによる IL-1β 産生の制御機構は未知である。そこで本研究では、エボラウイルスタンパク質による IL-1β の産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. エボラウイルスタンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的 IL-1β の分泌制御

HEK293FT 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系に、EGFP またはエボラウイルスの各ウイルスタンパク質を発現するプラスミドを導入し、24 時間後の培養上清中の IL-1β の量を ELISA で測定した。NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を抑制するポジティブコントロールとして、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用いた［4］。具体的には、24 ウェルプレートに撒いた HEK293FT 細胞に、30 ng の pCA7-NLRP3、5 ng の pCA7-ASC、5 ng の pCA7-procaspase-1、150 ng の pCA7-pro-IL-1beta とともに、500 ng のエボラウイルスの各ウイルスタンパク質またはインフルエンザウイルス NS1 タンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクションした。24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法により IL-1β の量を測定した。

2. エボラウイルス VP40 タンパク質の VLP 形成能と IL-1β 分泌促進能の解析

エボラウイルス VP40 タンパク質を細胞に発現させるとそれだけでウイルス様粒子（virus-like particles, VLP）が形成される［6］。この VLP の形成には、VP40 タンパク質の late ドメイン（7-PTAPPXY-13）や C 末端の 40 アミノ酸が重要である［7］。そこで、それぞれの VLP 形成能を欠いた変異 VP40 発現プラスミドを作製し、NLRP3 inflammasome 再構築系における IL-1β の分泌に与える影響を解析する。

3. 統計処理

エラーバーは、各 n 数における標準誤差を示した。また多群間の検定には Tukey's test を用いた。

結果および考察

1. エボラウイルスタンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的 IL-1β の分泌制御

HEK293 細胞に、NLRP3 inflammasome 構成タンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクションすると、培養上清中に IL-1β が検出される（NLRP3 発現プラスミドを含めないと IL-1β は検出されない）。この NLRP3 inflammasome の再構築系に、EGFP 発現プラスミドを混ぜても、IL-1β の産生に影響を与えないが、インフルエンザウイルス NS1 発現プラスミドを含ませると IL-1β の産生が抑制される［4］。驚くべきことに、エボラウイルス VP40 発現プラスミドを導入すると、培養上清中へ放出される IL-1β の量が有意に上昇した（図 2）。このことはエボラウイルス VP40 タンパク質がエボラウイルス感染による過剰な IL-1β の産生を関与していることを示唆している。

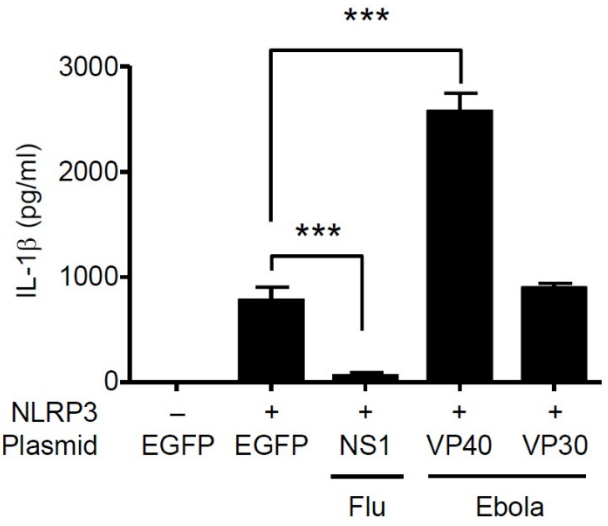


図 2. エボラウイルス VP40 タンパク質による IL-1β 分泌の促進効果

HEK293FT 細胞を用いた NLRP3 inflammasome 再構築系に、エボラウイルスの VP40, VP30 タンパク質またはインフルエンザウイルス NS1 タンパク質を発現するプラスミドを導入した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-1β の量を ELISA 法により測定した。*** $p < 0.001$。

2. エボラウイルス VP40 タンパク質の VLP 形成能と IL-1β 分泌促進能の解析

IL-1β の分泌促進効果におけるエボラウイルス VP40 タンパク質の VLP 形成能の役割を解析するため、C 末端の 40 アミノ酸を欠損した VP40 タンパク質（VP40ΔC）発現プラスミドを作製し、HEK293FT 細胞を用いた NLRP3 inflammasome 再構築系における IL-1β の分泌に与える影響を解析した。EGFP 発現プラスミドと比較して、全長の VP40 タンパク質を発現するプラスミドは、NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を有意に促進させたが、C 末端の 40 アミノ酸を欠損した VP40 タンパク質（VP40ΔC）発現プラスミドは NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を促進させなかった。

次に HEK293FT 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系に flag-VP40 発現プラスミドを導入し、24 時間後の培養上清を用いて、ショ糖密度勾配遠心法による超遠心を行うことにより VLP を精製した。超遠心後の培養上清および沈殿物を flag 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析すると、超遠心後の培養上清中には VP40 を検出することができなかったが、沈殿物には VP40 タンパク質を検出することができた。このとき NLRP3 inflammasome 依存的に分泌された IL-1β は、超遠心後の沈殿物ではなく、培養上清中に検出できることを ELISA 法およびマウス IL-1β 特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法により確認することができた。このことから、エボラウイルス VP40 タンパク質が NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1β の分泌を促進させているのは、細胞質中の成熟型 IL-1β が単に VP40 タンパク質が形成する VLP に包まれて細胞外へ放出されているのではなく、VP40 タンパク質が形質膜に何らかの変化を与えることで、unconventional protein secretion pathway（非典型的タンパク質分泌経路）を促進していると考えられた（図 3）[8]。

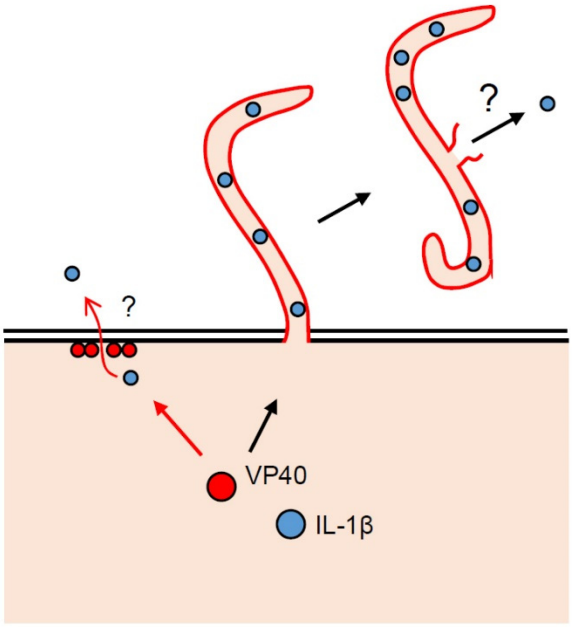


図 3. エボラウイルス VP40 タンパク質による IL-1β 分泌の促進メカニズム
VP40 タンパク質は形質膜に何らかの作用を及ぼすことで、IL-1β の分泌を促進させている。

共同研究者・謝辞

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, 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. Epub 2010 Apr 11.

2) Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba 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. Epub 2013 Oct 14.

3) Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshiba 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.

4) Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshiba 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-1β Secretion. J Virol. 2016 Mar 28;90(8):4105-14. doi: 10.1128/JVI.00120-16. Print 2016 Apr.

5) Hill-Batorski L, Halfmann P, Marzi A, Lopes TJ, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Loss of Interleukin 1 Receptor Antagonist Enhances Susceptibility to Ebola Virus Infection. J Infect Dis. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S329-35. doi: 10.1093/infdis/jiv335. Epub 2015 Jul 23.

6) Neumann G, Ebihara H, Takada A, Noda T, Kobasa D, Jasenosky LD, Watanabe S, Kim JH, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. J Virol. 2005 Aug;79(16):10300-7. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.001.

7) Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich IS, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. Cell Host Microbe. 2008 Mar 13;3(3):168-77. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.001.

8) Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. Cell. 2008 Mar 7;132(5):818-31. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.040.