

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08866

研究課題名(和文)パラミクソウイルスV蛋白質のインフラマソーム抑制能は病原性発現に重要か？

研究課題名(英文)Is inflammasome antagonism of the paramyxovirus V protein important for the pathogenicity?

研究代表者

小松 孝行(KOMATSU, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20215388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルスのアクセサリー蛋白質Vのインフラマソーム抑制能について以下のことを明らかにした。1) マウスパラインフルエンザウイルス1型(SeV)のV蛋白質は、NLRP3と結合し、複合体の開始に必須のNLRP3ホモオリゴマー形成を阻害する。さらに、2) 引き続き起こるNLRP3/ASC複合体形成を阻害し、IL-1 $\beta$ の分泌を抑制する。3) 本抑制能は、SeV以外に、ニパウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス2型などのV蛋白質にも保存されている。以上より、本抑制能は、パラミクソウイルスに保存されており、IL-1 $\beta$ 分泌細胞であるマクロファージに存在するインフラマソーム複合体形成を阻害する活性である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、複数のパラミクソウイルス(マウスパラインフルエンザウイルス1型、ニパウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス2型)のV蛋白質に抗ウイルス免疫に重要なインフラマソームの活性化を抑制する能力が保存されていることが明らかになった。V蛋白質は多くのパラミクソウイルスに保存されているため、幅広いパラミクソウイルスの予防法や治療薬の標的になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：SeV V protein inhibited the assembly of NLRP3 inflammasomes, including NLRP3-dependent ASC oligomerization, NLRP3-ASC association, NLRP3 self oligomerization, and intermolecular interactions between NLRP3 molecules. Moreover, a high correlation between the NLRP3-binding capacity of V protein and the ability to block inflammasome complex assembly was observed. Therefore, SeV V protein likely inhibits NLRP3 self-oligomerization by interacting with NLRP3 and inhibiting subsequent recruitment of ASC to block NLRP3-dependent ASC oligomerization, in turn blocking full activation of the NLRP3 inflammasome and thus blocking IL-1 $\beta$  secretion. Notably, the inhibitory action of SeV V protein on NLRP3 inflammasome activation is shared by other paramyxovirus V proteins, such as Nipah virus and human parainfluenza virus type 2. We thus reveal a mechanism by which paramyxovirus inhibits inflammatory responses by inhibiting NLRP3 inflammasome complex assembly and IL-1 $\beta$  activation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス インフラマソーム IL-1 アクセサリー蛋白質 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アクセサリー蛋白質 V を欠損したパラミクソウイルスは弱毒化する。これは、V 蛋白質の抗インターフェロン (IFN) 能が喪失し、抗ウイルス作用に対抗できなくなるためと考えられている。しかし、マウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (SeV) の研究では、抗 IFN 能はウイルスの増殖・病原性には無関係で、*in vivo* に特有の免疫細胞が担う自然免疫に対する抑制能が本質ではないかと報告された<sup>(Virology, 2007 359:82-91, J Virol 2012 86:7136-7145)</sup>。最近、呼吸器ウイルスでは、感染時に免疫細胞から分泌されるインフラマソーム (FM) 依存性 IL-1 がウイルスの肺からの排除に極めて重要であり、抗 FM 能を有するウイルスは病原性が高いことが報告された。そのため、パラミクソウイルスでも、抗 FM 能が重要ではないかと考えた。

(2) NLRP3 FM は、センサー蛋白質 NLRP3、アダプター蛋白質 ASC、エフェクター蛋白質 pro-Caspase-1 からなる巨大蛋白質複合体で、Caspase-1 を活性化して、IL-1 の成熟・分泌を促進する。

(3) 過剰発現実験を用いた予備実験にて NLRP3 FM を再構成し V 蛋白質の影響を調べたところ、SeV を初めとする複数のパラミクソウイルスの V 蛋白質に抗 NLRP3 FM 能が保存されていることを見出した。このように、パラミクソウイルスのアクセサリー蛋白質 V は、抗 NLRP3 FM 能によって *in vivo* の抗ウイルス免疫を制御している可能性が示されたため、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

予備実験で見出した抗 NLRP3 FM 能について以下のことを明らかにする。

ウイルス感染時に機能しているのか？

どのようなメカニズムか？

パラミクソウイルスに保存されているのか？

## 3. 研究の方法

(1) SeV V(-)感染で誘導される IL-1 分泌と NLRP3 FM 活性化の解析 V 蛋白質欠損型 SeV [SeV V(-)]を THP1 細胞に感染させ、前駆体、成熟型 IL-1 の産生・分泌、NLRP3 FM 複合体の形成を野生型 SeV [SeV wt]感染と比較し、V 蛋白質 ( $V_{SeV}$ ) の役割を調べた。

(2) NLRP3 FM 依存性 IL-1 の分泌抑制における  $V_{SeV}$  蛋白質の解析 NLRP3 FM を再構成した 293T 細胞に  $V_{SeV}$  蛋白質を発現させ、予備実験で見出した抗 NLRP3 FM 能を確かめた。更に、 $V_{SeV}$  蛋白質安定発現 THP1 細胞を作製し、内在性の NLRP3 FM シグナルへの影響も調べた。

(3)  $V_{SeV}$  蛋白質と相互作用する NLRP3 FM 構成分子の探索  $V_{SeV}$  蛋白質の標的分子を検討するため、293T 細胞に  $V_{SeV}$  蛋白質と NLRP3 FM の複合体形成に関わる構成分子をそれぞれ発現させ、免疫沈降法によって相互作用を解析した。また、 $V_{SeV}$  蛋白質安定発現 THP1 細胞を用いて、相互作用する内在性分子を調べた。

(4) 抗 NLRP3 FM 能に必要な  $V_{SeV}$  蛋白質の領域の解析  $V_{SeV}$  蛋白質の標的分子との相互作用の重要性を確認するために、相互作用しない変異  $V_{SeV}$  蛋白質を作製し、免疫沈降法、分泌 IL-1 の測定を行った。

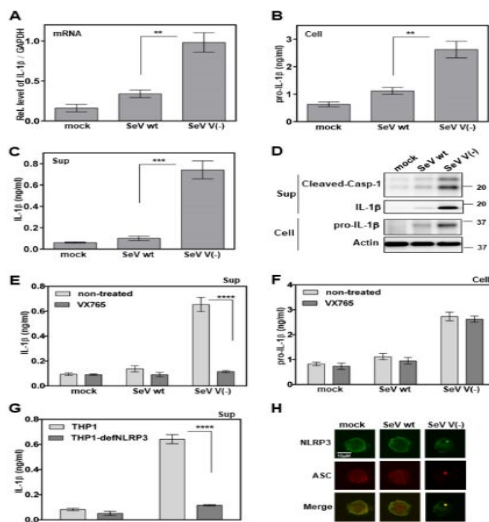
(5)  $V_{SeV}$  蛋白質の NLRP3 FM アッセンブリー抑制機構の解析 293T 細胞に NLRP3/ASC 複合体を再構成し、 $V_{SeV}$  蛋白質の影響を調べた。また、BRET 法にて NLRP3-ASC の相互作用への影響も調べた。

(6)  $V_{SeV}$  蛋白質の NLRP3 ホモオリゴマー抑制機構の解析 293T 細胞に NLRP3 ホモオリゴマーを再構成し、 $V_{SeV}$  蛋白質の影響を調べた。また、BRET 法にて NLRP3-NLRP3 の相互作用への影響も調べた。

(7) SeV 以外のパラミクソウイルス V 蛋白質の NLRP3 FM 活性化阻害の解析  $V_{SeV}$  蛋白質の抗 NLRP3 FM 能が, ニパウイルス(NiV), ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型(HPIV 2) の V 蛋白質にも保存されているのか調べた.

#### 4. 研究成果

(1) SeV V(-) 感染で誘導される IL-1 分泌と NLRP3 FM の活性化 1) SeV V(-) は SeV wt と比較して, 前駆体 IL-1 の産生, 成熟型 IL-1 の分泌がそれぞれ約 2.3-2.7 倍, 約 7 倍, Caspase-1 の開裂も増加した(図 1 A - D). この成熟型 IL-1 の分泌は, 2) Caspase-1 阻害剤



(図 1 E, F), NLRP3 分子の欠損で抑制された(図 1 G). さらに, 3) SeV wt と異なり, NLRP3 FM 粒状構造が観察された(図 1 H). 以上の結果から, SeV は感染時に分泌される IL-1 を,  $V_{SeV}$  蛋白質によって NLRP3 FM 依存性に抑制していると考えられた.

図 1. SeV V(-) 感染で誘導される IL-1 分泌と NLRP3 FM 活性化の解析 THP1 細胞に SeV V(-) を感染させ, 前駆体 IL-1 の産生, 成熟型 IL-1 の分泌, NLRP3 FM 複合体形成を解析した.

(2) NLRP3 FM 依存性 IL-1 の分泌抑制における  $V_{SeV}$  蛋白質の役割  $V_{SeV}$  蛋白質が特異的に

IL-1 の分泌を抑制する予備の結果が確認された(図 2 A). また,  $V_{SeV}$  蛋白質安定発現 THP1 細胞を複数の FM リガンドで刺激すると, NLRP3 FM リガンド刺激のみが抑制された(図 2 B). 以上より,  $V_{SeV}$  蛋白質は, NLRP3 FM に特異的な経路を抑制すると考えられた.

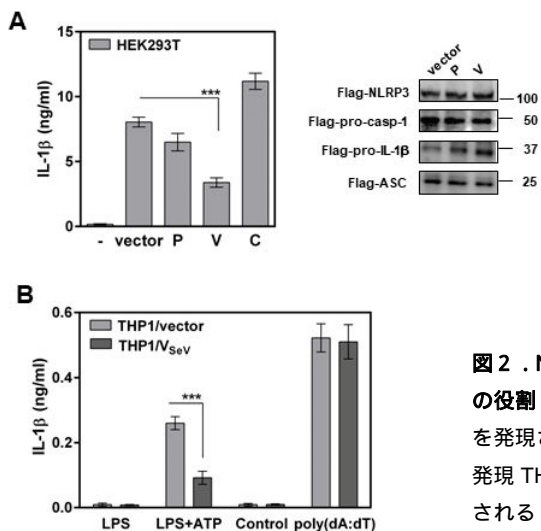


図 2. NLRP3 FM 依存性 IL-1 分泌の抑制における  $V_{SeV}$  蛋白質の役割 (A) NLRP3 FM を再構成した 293T 細胞に  $V_{SeV}$  蛋白質を発現させ, 分泌される IL-1 を測定した.(B)  $V_{SeV}$  蛋白質安定発現 THP1 細胞を LPS+ATP または poly(dA:dT) で刺激後, 分泌される IL-1 を測定した.

(3)  $V_{SeV}$  蛋白質と相互作用する NLRP3 FM の構成分子  $V_{SeV}$  蛋白質は, NLRP3 FM の構成分子の NLRP3 と結合することが示された(図 3 A). この結合は,  $V_{SeV}$  蛋白質安定発現 THP1 細胞を用いた内在性の NLRP3 でも確認された(図 3 B).

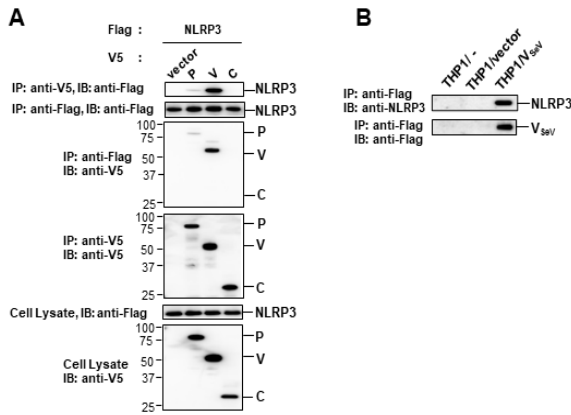
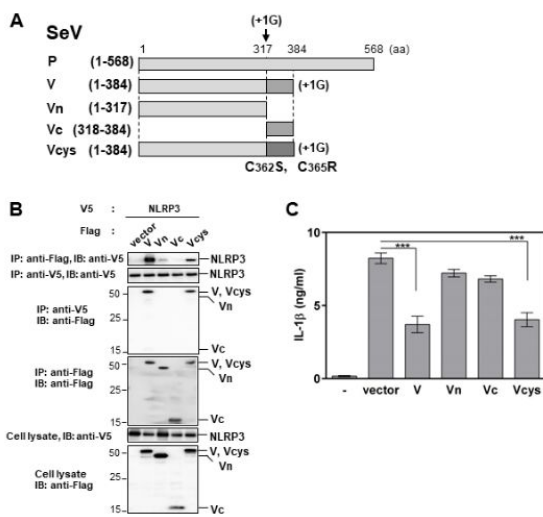


図3 . V<sub>SeV</sub> 蛋白質と NLRP3 分子の結合

(A)293T 細胞に V<sub>SeV</sub> 蛋白質と NLRP3 分子を発現させ、(B) V<sub>SeV</sub> 蛋白質安定発現 THP1 細胞を用いて、免疫沈降法によって相互作用を解析した。

(4) 抗 NLRP3 FM 能に必要な V<sub>SeV</sub> 蛋白質の領域 抗 NLRP3 FM 能に必要な V<sub>SeV</sub> 蛋白質の領域を調べたところ、抗 IFN-β 産生能の最小領域である C 末端 (Vc) では活性を示さず、N 末端



(Vn)C 末端 (Vc) の両領域が必要であった。また、抗 IFN-β 産生能に必須の Cys 残基は必要なかった (図 4 A-C)。これらの抑制は、V<sub>SeV</sub>-NLRP3 の結合に相関していた。以上の結果から、V<sub>SeV</sub> 蛋白質の抗 IFN-β 産生能と抗 NLRP3 FM 能は独立した活性であった。

図4 . 抗 NLRP3 FM 能に必要な V<sub>SeV</sub> 蛋白質の領域

(A, B)293T 細胞に変異 V<sub>SeV</sub> 蛋白質と NLRP3 分子を発現させ、免疫沈降法によって相互作用に必要な領域を解析した。(C) NLRP3 FM を再構成した 293T 細胞に変異 V<sub>SeV</sub> 蛋白質を発現させ、IL-1 分泌の阻害に必要な領域を解析した。

(5) V<sub>SeV</sub> 蛋白質は NLRP3 と ASC の相互作用を抑制することによって、NLRP3/ASC 複合体の形成を阻害する NLRP3/ASC 複合体形成を示す粒状構造が、V<sub>SeV</sub> 蛋白質の発現によって消失した(図 5 A, B)。さらに、NLRP3/ASC の複合体形成に必須の NLRP3 と ASC の相互作用も抑制された(図 5 C)。これらの抑制は、V<sub>SeV</sub>-NLRP3 の結合に相関していた。以上の結果から、V<sub>SeV</sub> 蛋白質は NLRP3 と結合することによって、ASC との相互作用、それによって起こる NLRP3/ASC 複合体の形成を阻害していると考えられた。

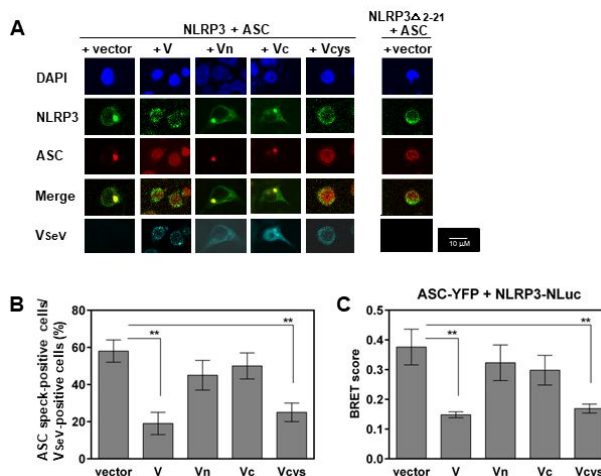


図5 . NLRP3 FM アッセムブリにおける V<sub>SeV</sub> 蛋白質の影響

(A, B)293T 細胞に NLRP3/ASC 複合体を再構成し、V<sub>SeV</sub> 蛋白質の影響を解析した。(C)BRET 法にて NLRP3 と ASC の相互作用への影響も解析した。

(6)  $V_{SeV}$  蛋白質は NLRP3-NLRP3 の相互作用を抑制することによって、NLRP3 ホモオリゴマーの形成を阻害する。NLRP3 ホモオリゴマー形成を示す粒状構造が、 $V_{SeV}$  蛋白質の発現によって消失した。さらに、NLRP3 ホモオリゴマーの形成に必要な NLRP3-NLRP3 の相互作用も抑制された。これらの抑制は、 $V_{SeV}$ -NLRP3 との結合に関連していた。以上の結果から、 $V_{SeV}$  蛋白質の抗 NLRP3 FM 能は、NLRP3 との結合によって、最初にかかる NLRP3 のホモオリゴマー形成、引き続き起こる ASC のリクルート、最終的に起こる NLRP3, ASC, pro-Caspase-1 の三分子複合体の形成を阻害すると考えられた。

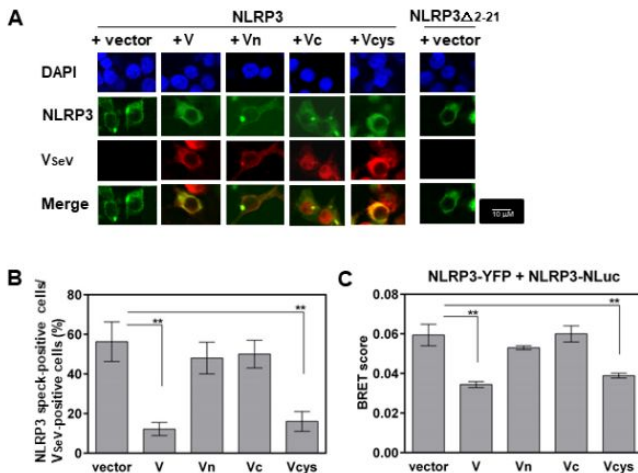
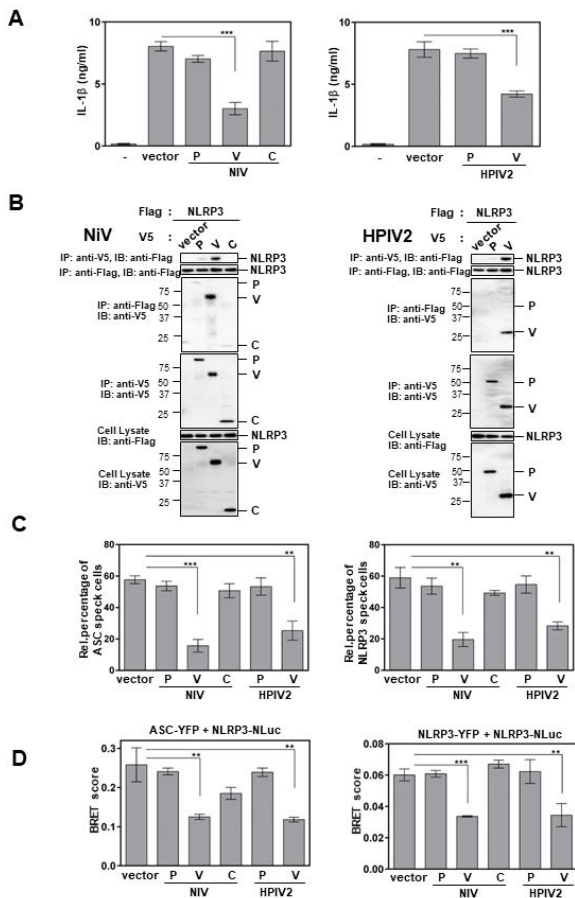


図6. NLRP3 ホモオリゴマーにおける  $V_{SeV}$  蛋白質の影響 (A, B) 293T 細胞に NLRP3 ホモオリゴマーを再構成し、 $V_{SeV}$  蛋白質の影響を解析した。(C) BRET 法にて NLRP3-NLRP3 の相互作用への影響も解析した。

(7) NLRP3 FM の活性化阻害は SeV 以外のパラミクソウイルス V 蛋白質にも保存されている。 $V_{SeV}$  蛋白質以外に、 $V_{NiV}$  蛋白質と  $V_{HPIV2}$  蛋白質はともに、1) IL-1 の分泌を抑制した



(図 7A). 2) NLRP3 と結合することが確認された(図 7B). 3) NLRP3/ASC 複合体の形成を抑制した(図 7C). 4) NLRP3 ホモオリゴマーの形成を阻害した(図 7C). 5) NLRP3/ASC の複合体の形成に必要な NLRP3 と ASC の相互作用を抑制した(図 7D). 6) NLRP3 ホモオリゴマーの形成に必要な NLRP3-NLRP3 の相互作用を抑制した(図 7D). 以上の結果から、 $V_{SeV}$  以外に、 $NiV$ ,  $HPIV2$  などの他のパラミクソウイルス V 蛋白質にも抗 NLRP3 FM 能が保存されていることが明らかになった。

図7. 他のパラミクソウイルス V 蛋白質の NLRP3 FM 活性化阻害の解析 293T 細胞に  $V_{NiV}$ ,  $V_{HPIV2}$  蛋白質をそれぞれ発現させ、(A) NLRP3 FM を再構成し分泌される IL-1 を測定した。(B) NLRP3 分子を発現させ、免疫沈降法によって相互作用を解析した。(C) NLRP3/ASC 複合体、NLRP3 ホモオリゴマーをそれぞれ再構成し、複合体を解析した。(D) BRET 法にて NLRP3-ASC, NLRP3-NLRP3 の相互作用をそれぞれ解析した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Komatsu Takayuk (共第一著者, 責任著者), Tanaka Yukie (共第一著者), Kitagawa Yoshinori, Koide Naoki, Naiki Yoshikazu, Morita Naoko, Gotoh Bin, Yokochi Takashi  | 4. 巻<br>92                |
| 2. 論文標題<br>Sendai Virus V Protein Inhibits the Secretion of Interleukin-1 by Preventing NLRP3 Inflammasome Assembly  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Virology  | 6. 最初と最後の頁<br>-           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1128/JVI.00842-18   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Odkhuu Erdenezaya, Komatsu Takayuki (責任著者), Koide Naoki, Naiki Yoshikazu, Takeuchi Kenji, Tanaka Yukie, Tsoimongyn Bilegtsaikhan, Jambalganiin Ulziisaikhan, Morita Naoko, Yoshida Tomoaki, Gotoh Bin, Yokochi Takashi | 4. 巻<br>24                |
| 2. 論文標題<br>Sendai virus C protein limits NO production in infected RAW264.7 macrophages Innate Immunity  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Innate Immunity  | 6. 最初と最後の頁<br>430 ~ 438   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1177/1753425918796619   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する              |
| 1. 著者名<br>OHMINE TAKAHITO, NARAI SEIKA, MATSUBARA TOSHIKI, NOMURA TOSHIHITO, ODA KOSUKE, FUKUSHI MASAYA, IRIE TAKASHI, KOMATSU TAKAYUKI, TOHYA YUKINOBU, SAKAGUCHI TAKEMASA  | 4. 巻<br>23                |
| 2. 論文標題<br>Eligibility of Feline Calicivirus for a Surrogate of Human Norovirus in Comparison with Murine Norovirus, Poliovirus and Coxsackievirus   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Biocontrol Science   | 6. 最初と最後の頁<br>145 ~ 149   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4265/bio.23.145   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Fukatsu Hitomi, Koide Naoki, Tada-Oikawa Saeko, Izuoka Kiyora, Ikegami Akihiko, Ichihara Sahoko, Ukaji Tamami, Morita Naoko, Naiki Yoshikazu, Komatsu Takayuki, Umezawa Kazuo  | 4. 巻<br>-                 |
| 2. 論文標題<br>NF- B inhibitor DHMEQ inhibits titanium dioxide nanoparticle-induced interleukin-1 production: Inhibition of the PM2.5-induced inflammation model   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Medicine Report  | 6. 最初と最後の頁<br>5279 ~ 5285 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3892/mmr.2018.9533  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Morita N, Tanaka Y(共第一著者), Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T(責任著者), Koide N.   | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Sendai virus V protein decreases NO production via inhibiting RIG-I signaling in infected RAW264.7 macrophages | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Micobes and Infection   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.micinf.2020.01.005.   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する    |

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Komatsu T (発表者), Tanaka Y, Morita N, Naiki Y, Koide N.  |
| 2. 発表標題<br>V gene knockout Sendai virus induces the secretion of IL-1 by facilitating NLRP3 inflammasome assembly. |
| 3. 学会等名<br>The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct. 28-30, 2018 Kyoto.                   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Morita N, Tanaka Y, Takeuchi K, Naiki Y, Koide N, Komatsu T.  |
| 2. 発表標題<br>Knockout of the Sendai virus V gene reduces the viral ability to prevent the macrophage phagocytosis. |
| 3. 学会等名<br>The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct. 28-30, 2018 Kyoto.                 |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小松孝行 (発表者), 内記良一, 森田奈央子, 小出直樹  |
| 2. 発表標題<br>パラミクソウイルスのNLRP3インフラマソーム抑制機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第48回 東海乳酸菌研究会 研究報告会            |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tanaka Y (発表者), Komatsu T, Morita N, Naiki Y, Koide N.                            |
| 2. 発表標題<br>Inflammasome antagonism by murine parainfluenza virus type1 V protein.            |
| 3. 学会等名<br>The 84rd Annual Meeting of the Japanese Society of Interferon & Cytokine Research |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Komatsu T (発表者), Tanaka Y, Takeuchi K, Morita N, Naiki Y, Koide N.  |
| 2. 発表標題<br>C gene knockout Sendai virus induces the secretion of IL-1 by facilitating the NLRP3 inflammasome assembly. |
| 3. 学会等名<br>The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct. 30, 2019 Tokyo.                          |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Morita N, Tanaka Y, Naiki Y, Koide N, Komatsu T.  |
| 2. 発表標題<br>C gene knockout Sendai virus activates the phagocytosis in infected RAW264.7 macrophages. |
| 3. 学会等名<br>The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct. 30, 2019 Tokyo.        |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|---------------|---|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 田中 幸枝<br><br>(TANAKA Yukie)<br><br>(10197486) | 福井大学・学術研究院医学系部門・助教<br><br><br><br>(13401) |    |