

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713018

研究課題名(和文)腸内細菌とインフラマゾームによるインフルエンザウイルス特異的免疫応答の制御

研究課題名(英文)Regulation of influenza virus-specific immune responses by inflammasomes and microbiota

研究代表者

一戸 猛志 (Ichinohe, Takeshi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10571820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回、インフルエンザウイルスのNS1タンパク質が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 β の産生を抑制していることを明らかにした。この抑制効果には、RNA結合ドメイン(38番目のアルギニンと41番目のリシン)と、TRIM25結合ドメイン(96、97番目のグルタミン酸)が必要であったことから、ウイルスRNAによるNLRP3 inflammasomeの活性化経路にもこのNS1タンパク質が大きく関与していることが示唆された。本研究成果は、インフルエンザウイルスの病原性を理解するのに重要である。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that the influenza A virus M2 protein activates the NLRP3 inflammasome, leading to the secretion of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 following the activation of caspase-1. Although the nonstructural protein 1 (NS1) of influenza virus inhibits IL-1 β secretion, the precise mechanism by which it achieves this remains to be defined. Here, we demonstrate that the NS1 protein interacts with NLRP3 to suppress NLRP3 inflammasome activation. J774A.1 macrophages stably expressing the NS1 protein suppressed NLRP3-mediated IL-1 β secretion. The NS1 RNA-binding domain (basic residues 38 and 41) and TRIM25-binding domain (acidic residues 96 and 97) are important for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion. These results will facilitate the development of new anti-inflammatory drugs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染後の肺での inflammasome の活性化と IL-1 の産生は、ウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要である。またこれまでの研究から、ある種の腸内細菌がインフルエンザウイルス感染後の肺での IL-1 の産生を高めて、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導をサポートしていることが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染による NLRP3 inflammasome の制御機構を解明する。また腸内細菌叢によるインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の増強メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 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 の分泌を抑制するかを検証するため、HEK293 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系を利用した。

(2) HEK293T 細胞を用いた NLRP3 inflammasome の再構築系で得られた現象を、IL-1 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するため、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、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 細胞を樹立した。

(3) 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 の産生抑制機構を調べるため、HEK293R 細胞に NS1 発現プラスミドを導入したときのミトコンドリアの膜電位を解析した。

(4) 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。

(5) 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 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共焦点顕微鏡を用いて解析した。

(6) NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 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 の産生、NLRP3 との相互作用、NLRP3/ASC スペック形成に与える影響について検討を行った。

(7) マウスの腸内細菌を死滅させるため、4 種類の抗生物質 (アンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール、バンコマイシン) を飲み水に含ませて 4 週間与えた。

4. 研究成果

(1) HEK293T 細胞に NLRP3、ASC、procaspase-1、pro-IL-1 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 を分泌される。これまでの報告の通り、ヒト uncoupling protein-2 (hUCP-2) 発現プラスミドを導入すると、IL-1 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 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 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。

(2) NS1 発現 J774A.1 細胞に 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を感染させた場合、コントロールの EGFP 発現 J774A.1 細胞と比較して、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 の産生が有意に低下していることが分かった。

(3) これまでの報告通り、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。

(4) 抗 flag 抗体を用いた免疫沈降法により、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。

(5) 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。

(6) 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 の抑制、NS1 タ

ンパク質と NLRP3 タンパク質との相互作用、NLRP3/ASC によるスペック形成の抑制に必要であることが分かった。

(7) 抗生物質により腸内細菌を死滅させたマウスは、通常の水を飲んでいただけのマウスよりもインフルエンザウイルス感染に対する感受性が増した。さらに次世代シーケンサーを用いた解析により、4 種類の抗生物質を飲ませたマウスの腸内には、ある種の腸内細菌の割合が増加していることを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

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 Secretion. *J Virol*. 2016 Mar 28;90(8):4105-14. doi: 10.1128/JVI.00120-16. 査読有

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. 査読有

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. 査読有

[学会発表](計 30 件)

Ichinohe T. Regulation of inflammasomes by influenza A viruses. 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 2015 年 9 月 6-9 日、淡路島夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

Ichinohe T, Yoshizumi T, Koshihara T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. 16th Negative Strand Virus Meeting. 2015 年 6 月 14-19 日、Siena

(Italy)

Moriyama M, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. Influenza A virus protein NS1 inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin 1beta secretion. 16th Negative Strand Virus Meeting. 2015 年 6 月 14-19 日、Siena (Italy)

[図書](計 4 件)

森山美優、一戸猛志. 常在菌とウイルス感染症、カレントセラピー、株式会社ライフメディコム、Vol.34 (No.11)、2016 (印刷中)

森山美優、一戸猛志. 常在菌とウイルスに対する粘膜免疫、実験医学、羊土社、Vol.34 (No.8)、2016 (印刷中)

森山美優、一戸猛志. インフルエンザワクチンと腸内細菌、Pharma Medica、メディカルレビュー社、Vol.33 (No.10)、p.33-37、2015

一戸猛志. インフルエンザウイルス認識機構とワクチン開発に関する研究、ウイルス、日本ウイルス学会、Vol.65 (No.1)、p.127-134、2015

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/ichinohe-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一戸 猛志 (ICHINOHE, Takeshi)
東京大学医科学研究所・准教授
研究者番号：10571820

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：