

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17474

研究課題名（和文）インフラマソームがRSウイルスの病原性発現に与える影響

研究課題名（英文）Influence of inflammasome on RS virus pathogenesis

研究代表者

森田 奈央子（Morita, Naoko）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：20815881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RSウイルスによるインフラマソーム活性化のメカニズム解明を試みた。各RSウイルスタンパク質について、インフラマソームへの影響を調べた結果、あるウイルスタンパク質単独でインフラマソーム活性を促進することを見出した。さらにそのタンパク質の一部のドメインのみで同様の活性を認めたことから、活性化に関わる機能領域を特定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RSウイルスは、インフラマソームを過剰に活性化させることが重症化の一因になることが分かってきている。今回、そのメカニズムとして、活性化に関わる領域を特定した。今後、さらに詳細なメカニズムを明らかにすることで、その領域をターゲットとした治療薬などへの開発に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the mechanism of inflammasome activation by RS virus. Through analysis of the impact of individual RS virus proteins on the inflammasome, we identified a specific viral protein capable of independently promoting inflammasome activity. Further investigation revealed that certain domains within this protein were sufficient to elicit a similar enhancement in activity, indicating that the regions involved in activation have been identified.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RSウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科ニューモウイルス亜科に属するヒトRSウイルスは、高率に細気管支炎、肺炎などに移行し重症化する。この病原性は、自然免疫の制御によると考えられているが、TLRs (Toll-like receptors)やRIG-I (retinoic acid inducible gene 1) では説明できない。近年、インフラマソームが呼吸器ウイルスの肺からの排除に重要な自然免疫として注目されている。

インフラマソームは、ウイルス感染時に誘導されるシグナルを察知して活性化される。構成因子であるNLRP3が重合することによりスペックを形成し、アダプタータンパク質の会合を経てカスパーゼ1を活性化する。活性化カスパーゼ1は抗ウイルス免疫に重要なIL-1の産生を促進する。この一連のシグナルはウイルスの排除に重要であり、病原性発現に関わる。当研究室では、近縁ウイルスにおいてインフラマソーム抑制機構が保存されていることを見出しており、RSウイルスにも保存されていると推測した。

2. 研究の目的

本研究は、RSウイルスの病原性発現におけるインフラマソームの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RSウイルスをマクロファージ細胞株THP1に感染させ、24時間後に培養上清中に産生されたIL-1量をELISAにて測定した。

(2) 各RSウイルスタンパク質を発現するプラスミドを作製し、インフラマソーム構成因子であるNLRP3、ASC、pro-Caspase1、pro-IL-1と共に発現させた。24時間後、培養上清中に産生されたIL-1量をELISAにて測定した。

(3) (2)で特定したウイルスタンパク質Xをインフラマソーム構成因子と共に発現させ、24時間後に以下を測定した。インフラマソーム構成因子の活性化体が増加するかどうかをウエスタンブロッティングで確認した。GFPタグを付加したNLRP3を用い、スペック形成が促進されるかどうかを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。カスパーゼの酵素活性を、基質分解による発光法で測定した。カスパーゼインヒビターを用いて、IL-1産生量が減少するかどうかをELISAにて測定した。

(4) タンパク質Xについて、アミノ酸置換や欠失をさせた変異体発現プラスミドを12種作製し、(2)と同様の方法でインフラマソーム活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 当研究室では、近縁ウイルスであるセンドライウイルス(SeV)が、インフラマソームを抑制すること、さらに、SeVのVタンパク質やCタンパク質をノックアウトすることでその抑制能が解除されることを見出してきた。本研究開始当初は、RSウイルスでも同様の抑制効果があると推測していたが、予想に反して、RSウイルス感染ではIL-1量が増加していた。さらに、NLRP3やASCをノックアウトした細胞ではIL-1の産生が見られなかったことから、RSウイルスはインフラマソームを活性化することが示唆された(図1)。

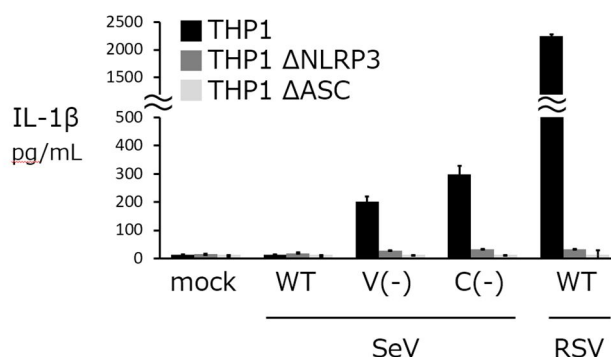


図1 ウイルス感染によるIL-1産生量

(2) インフラマソームの活性化に直接影響を及ぼすタンパク質があるかどうかを調べるため、全RSウイルスタンパク質について、インフラマソーム再構成系にて個別にIL-1量を測定した。その結果、単独でIL-1産生量を促進するタンパク質があったことから、このタンパク質X

がインフラマソームを活性化していることが示唆された。

(3) タンパク質 X について、インフラマソームシグナルのどの部分に影響を及ぼしているかを検討した。タンパク質 X を共発現させても、構成因子の活性化体や NLRP3 のスペック形成量は増加しなかった。また、カスパーゼの酵素活性も変化がなかった。カスパーゼインヒビターは、再構成系によって産生された IL-1 量は減少させたものの、タンパク質 X によって増加した分には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、タンパク質 X はこれら以外のシグナルを調整していることが示唆された。本研究期間では、具体的な標的シグナルを突き止めることができなかったため、今後も引き続き検討を行う。

(4) タンパク質 X の活性化ドメインを探索するため、インフラマソーム再構成系にて、様々な変異体を用いて IL-1 量を測定した。その結果、タンパク質 X の野生型全長を共発現させた場合と比較して、8 種の変異体 (mutant 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11) が同等以上の活性を示した (図 2)。これらの変異体は 1 つのドメインが共通しており、特に mutant 8 はそのドメインのみからなる。それ以外の mutant にはそのドメインが無い。このドメインのみで、タンパク質全長と同程度の IL-1 産生を引き起こしたことから、このドメインがインフラマソーム活性化に関わることが示唆された。ドメインの特徴から、インフラマソームシグナルの終盤に影響を及ぼすと推測されるため、今後 (3) の結果と合わせて更なる検討を行う予定である。

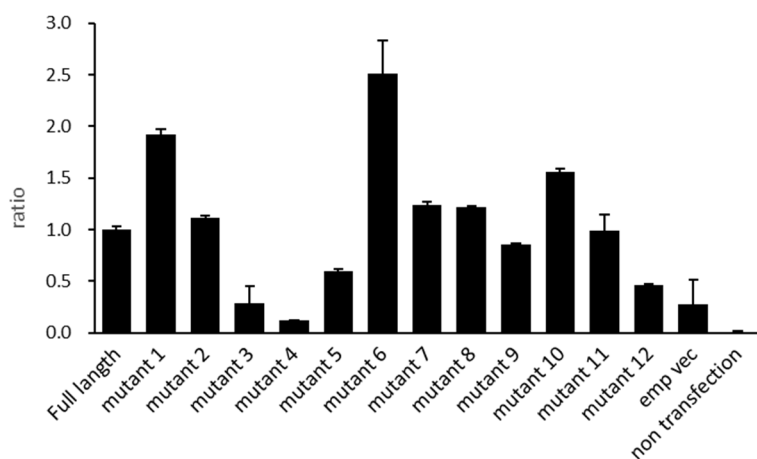


図 2
各変異体による
IL-1 産生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Yukie, Morita Naoko, Kitagawa Yoshinori, Gotoh Bin, Komatsu Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits RIG-I signaling by preventing TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.970750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morita Naoko, Tanaka Yukie, Takeuchi Kenji, Kitagawa Yoshinori, Sakuma Ryusuke, Koide Naoki, Komatsu Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 SeV C Protein Plays a Role in Restricting Macrophage Phagocytosis by Limiting the Generation of Intracellular Double-Stranded RNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.780534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakuma Ryusuke, Morita Naoko, Tanaka Yukie, Koide Naoki, Komatsu Takayuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Sendai virus C protein affects macrophage function, which plays a critical role in modulating disease severity during Sendai virus infection in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12956	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Morita Naoko, Tanaka Yukie, Odkhuu Erdenezaya, Naiki Yoshikazu, Komatsu Takayuki, Koide Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Sendai virus V protein decreases nitric oxide production by inhibiting RIG-I signaling in infected RAW264.7 macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Infection	6. 最初と最後の頁 322 ~ 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micinf.2020.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoko Morita, Yukie Tanaka, Takayuki Komatsu
2. 発表標題 Human RS virus proteins involved in NLRP3 inflammasome activation
3. 学会等名 The 70 th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka Y, Morita N, Kitagawa Y, Gotoh B, Komatsu T.
2. 発表標題 Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits RIG-I signaling by preventing TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination.
3. 学会等名 The 70 th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中幸枝、森田奈央子、小松孝行
2. 発表標題 ヒトメタニューモウイルスM2-2蛋白質のインターフェロン-シグナル抑制機構
3. 学会等名 細菌学会中部支部総会（金沢） 2022年
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田奈央子 田中幸枝 小松孝行
2. 発表標題 センダイウイルスV蛋白質は RIG-Iシグナルを阻害することで一酸化窒素の産生を抑制する
3. 学会等名 ウイルス学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------