

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 22日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790506

研究課題名（和文） インフラマゾームによる RNA ウイルス認識機構の解析

研究課題名（英文） Innate recognition of RNA viruses by inflammasomes

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳心筋炎ウイルス（EMCV）が、その非構造 2B タンパク質で NLRP3 インフラマゾームを活性化させて、炎症に関わるサイトカイン（IL-1beta）を誘導していることを明らかにした。これはこれまでに知られていた RNA ウイルス認識機構とは異なる全く新しいウイルス認識機構である。また麻疹ウイルスの非構造 V タンパク質が NLRP3 と相互作用してその活性化を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that the 2B viroporin from encephalomyocarditis virus (EMCV) activates NLRP3 inflammasome by increasing intracellular Ca^{2+} levels. In addition, measles virus V protein was found to be inhibit the activation of the NLRP3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ウイルスに対する自然免疫応答

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス、脳心筋炎ウイルス、麻疹ウイルス、自然免疫、NLRP3、inflammasome、caspase-1、viroporin

1. 研究開始当初の背景

(1) RIG-I や AIM2 inflammasome によるウイルス認識機構はよく理解されているが、NLRP3 inflammasome によるウイルス認識機構はほとんど明らかになっていなかった。

(2) EMCV は NLRP3 inflammasome を活性化することが報告されていたが、そのメカニズムは明らかにされていなかった。

(3) 麻疹ウイルスが NLRP3 inflammasome を活性化するかどうかは全く知られていなかった。

2. 研究の目的

(1) EMCV や麻疹ウイルスによる NLRP3

inflammasome の活性化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EMCV のウイルス RNA を抽出し、骨髄マクロファージに transfection したあと、IFN- β の mRNA レベルと定量 PCR で、培養上清中の IL-1b を ELISA で測定した。

(2) EMCV の 2A, 2B, 2C 遺伝子を発現する組換えレンチウイルスを作製し、LPS 刺激骨髄マクロファージに感染後、培養上清中の IL-1b を ELISA で測定した。

(3) HeLa 細胞に、NLRP3 発現プラスミドと influenza M2, EMCV 2A, 2B, 2C 遺伝子を発

現するプラスミドを co-transfection 後、NLRP3 の細胞内局在を confocal microscopy を用いて観察した。

(4) 骨髄マクロファージに EMCV を感染させて、BAPTA や EGTA 存在下での培養上清中に産生される IL-1b の量を ELISA で測定した。

(5) HeLa 細胞に、G-GECO1 発現プラスミドと EMCV 2A, 2B, 2C 遺伝子を発現プラスミドを co-transfection したときの、EGFP の蛍光を confocal microscopy で、EGFP の発現量を W. B. にて確認した。

(6) V タンパク質欠損麻疹ウイルスを THP-1 細胞へ感染させて、培養上清中に出てくる IL-1b を ELISA で測定した。

(7) V タンパク質と NLRP3 発現プラスミドを 293T 細胞へ co-transfection 後、V タンパク質特異的抗体で免疫沈降したあとの NLRP3 の発現を W. B. にて確認した。

4. 研究成果

(1) EMCV による NLRP3 活性化メカニズム
EMCV のウイルス RNA を抽出し、骨髄マクロファージに transfection すると、IFN- β mRNA が誘導されたが、培養上清中には検出可能な IL-1b が検出できなかった。そこで、EMCV の viroporin である 2B に注目し、2B 発現レンチウイルスを LPS 刺激マクロファージに感染させるとそれだけで培養上清に高いレベルの IL-1b を検出するようになった。HeLa 細胞を NLRP3 と EMCV 2B 発現プラスミドで co-transfection すると NLRP3 が核周囲に局在し（核周囲への集積は活性化した NLRP3 の特徴）、2B と共局在するようになった。また BAPTA 存在下では、EMCV 感染による IL-1b の誘導が抑制されたことから、EMCV 感染による IL-1b の誘導には、2B タンパク質が小胞体やゴルジ体の Ca²⁺を細胞質中に流出されることが必要であることが示唆された。また G-GECO1 と 2B 発現プラスミドを HeLa 細胞へ co-transfection することにより、EMCV 2B が特異的に小胞体やゴルジ体の Ca²⁺レベルを低下させていることが明らかとなった。

(2) 麻疹ウイルスによる NLRP3 の抑制効果
麻疹ウイルスが caspase-1 依存的に THP-1 細胞から IL-1b を誘導していることを明らかにした。またノックダウン細胞を用いた研究から、麻疹ウイルスは RIG-I inflammasome ではなく、NLRP3 inflammasome 依存的に IL-1b を誘導していることを明らかにした。さらに麻疹ウイルスの V タンパク質発現 THP-1 細胞は、NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1b の産生を有意に抑制した。最後に、麻疹ウイルス

の V タンパク質が NLRP3 と相互作用していることを明らかにした。これらのことから、麻疹ウイルスはその非構造タンパク質である V タンパク質が NLRP3 と相互作用することにより、inflammasome の活性化を抑制していることが明らかとなった。

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 3 件)

(1) Pang IK, Ichinohe T, Iwasaki A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell response to influenza A virus. *Nat Immunol.* 2013 Mar;14(3):246-53.

doi: 10.1038/ni.2514

(2) Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 2012 ;8(8) :e1002857.

doi : 10.137/journal.ppat.1002857

(3) Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *J Virol.* 2011 Dec;85(24):13019-26.

doi: 10.1128/JVI.05942-11

[学会発表] (計 12 件)

- ① 一戸猛志、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3 inflammasome の活性化、感染症若手フォーラム、2013 年 3 月 1 日、北海道
- ② 一戸猛志、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3 inflammasome の活性化、2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium、2013 年 1 月 15 日、沖縄
- ③ 一戸猛志、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3 inflammasome の活性化、第 35 回日本分子生物学会年会（招待講演）、2012 年 12 月 13 日、福岡
- ④ 一戸猛志、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3 inflammasome の活性化、第 60 回日本ウイルス学会、2012 年 11 月 13 日、大阪
- ⑤ 一戸猛志、脳心筋炎ウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化、第 49 回日本ウイルス学会九州支部総会、2012 年 8 月 24 日、沖縄
- ⑥ 一戸猛志、ウイルス感染における NLRP3 inflammasome の役割、東京大学医科学研究

- 究所学友会セミナー（招待講演）、2012年6月21日、東京大学医科学研究所
- ⑦ 一戸猛志、NLRP3 inflammasome によるウイルス認識機構、東京大学医科学研究所感染症国際研究センター第1回若手シンポジウム(招待講演)、2012年3月13日、東京
 - ⑧ 一戸猛志, 他、ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の役割、First Negative Strand Virus-Japan Symposium、2012年1月23日、長崎
 - ⑨ 一戸猛志、Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. The Korean Association of Immunologist (招待講演)、2011年11月18日、ソウル、韓国
 - ⑩ Ito M, Ichinohe T, 他、Recognition of encephalomyocarditis virus by NLRP3 inflammasome. International Union of Microbiological Societies. 2011年9月13日、札幌
 - ⑪ Komune N, Ichinohe T, 他、Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1b secretion. International Union of Microbiological Societies. 2011年9月13日、札幌
 - ⑫ 伊藤美菜子、一戸猛志, 他、脳心筋炎ウイルス感染による NLRP3 インフラマゾーム活性化メカニズムの解析、第48回日本ウイルス学会九州支部総会、2011年8月26日、北九州

[図書] (計3件)

- ① 一戸猛志、羊土社、実験医学 (増刊)、腸内細菌によるインフルエンザウイルス特異的粘膜免疫応答の制御、2012、P76-82
- ② 一戸猛志、医薬の門社、感染・炎症・免疫、ウイルス感染による inflammasome の役割、2012、P62-68
- ③ 一戸猛志, 他、福岡医学会、福岡医学雑誌、インフラマゾームによるウイルスの認識、2011、P21-30

[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：