

## インフルエンザウイルスによる自然免疫抑制機構の解析

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

### 【研究の背景】

細胞質中の NLRP3 (Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3) は、環境中の刺激物やある種の細菌、DNA/RNA ウイルスの感染など、様々な刺激により活性化する自然免疫受容体である。インフルエンザウイルスは、ウイルスの M2 (プロトン選択的なイオンチャネル) タンパク質がトランスゴルジのプロトンを経由して細胞質中へ流出させることにより、NLRP3 inflammasome を活性化させている(1)。インフルエンザウイルス感染による肺での inflammasome の活性化は、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の惹起に必要であるが(2)、インフルエンザウイルスが、NLRP3 inflammasome 経路を抑制するような戦略を持つかどうかについてはあまり知られていない。

### 【目 的】

インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の制御機構を明らかにすることを目的とする。

### 【方 法】

#### 1. ウイルス

インフルエンザウイルス A/PR8 は、10 日発育鶏卵に接種後、35℃ で 2 日間培養して増やした。ウイルス力価は、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により測定し、ウイルスストックを -80℃ に保存した。

#### 2. ミトコンドリア分画の抽出

細胞を 1ml の homogenization buffer [20 mM Hepes (pH 7.5)、70 mM sucrose、220 mM mannitol] で懸濁し、27G 針と 1ml シリンジを用いて、30 回ピペッティングした。これを 800×g で 5 分遠心して核を取り除いたあと、10,000×g で 10 分間遠心して、沈殿したものをミトコンドリア分画とした。

### 【結 果】

まず始めに、ウイルス感染細胞におけるインフルエンザウイルス PB1-F2 タンパク質の細胞内局在を解析した。細胞溶解液を細胞質、小胞体/ゴルジ体、ミトコンドリア分画に分けて W.B. 法により PB1-F2 タンパク質を検出すると、PB1-F2 タンパク質はミトコンドリア分画に特異的に検出されることが分かった。このことを共焦点顕微鏡により確認すると、全長 (~90 アミノ酸) の PB1-F2 タンパク質はミトコンドリアと共局在しているのに対し、70% の H1N1 型ウイルスに見られる C 末端側を欠いた PB1-F2 (57 アミノ酸) タンパク質は、ミトコンドリアには局在せずに細胞質中に観察された。次に、この PB1-F2 タンパク質がミトコンドリアのどこに局在しているかを解析した。ミトコンドリア分画をそのまま proteinase K で処理すると、ミトコンドリア外膜タンパク質 (MAVS、Mfn1、Mfn2、Tom20) は分解されて、W.B. 法により検出できなくなるが PB1-F2 タンパク質は分解を受けなかった。さらに 500  $\mu$ g/ml の digitonin 存在下 (ミトコンドリアの外膜が透過される状態) では、PB1-F2 タンパク質は proteinase K による分解を受けることから、PB1-F2 タンパク質の局在はミトコンドリアのマトリックスではなく、膜間スペースで内膜と強く相互作用していることが示唆された。最後に PB1-F2 タンパク質による自然免疫系への影響を解析すると、PB1-F2 タンパク質は IFN- $\beta$  の産生や NLRP3 inflammasome 依存的な IL-1 $\beta$  の産生を抑制していることが明らかとなった(3)。

## 【考 察】

インフルエンザウイルスのM2タンパク質はトランスゴルジ内のプロトンを細胞質中に流出させることにより、ヘマグルチニン(HA)の構造変化を防いでいる。宿主側はNLRP3により、このM2タンパク質による細胞質中のイオンバランスの変化を異常と感知し、NLRP3 inflammasomeの活性化とそれに続くIL-1 $\beta$ の分泌を促進させている。これにより感染局所での炎症が起こり、免疫細胞が集積して、ウイルス特異的な免疫応答が惹起されるが、インフルエンザウイルスは、PB1-F2タンパク質によりミトコンドリアの膜電位を低下(連結したミトコンドリアを断片化)させ、ウイルス感染により誘導される抗ウイルス(インターフェロン)応答やNLRP3 inflammasomeの活性化を抑える戦略を進化させたと考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

インフルエンザウイルス感染による肺での inflammasomes の活性化は、ウイルス特異的な獲得免疫応答の惹起に必要であるが(2)、今回の研究成果は、ウイルス感染後の過剰な炎症反応を抑える治療薬の開発や、炎症を促進させることによりインフルエンザウイルスワクチンの効果を高めるようなアジュバントの開発につながる可能性がある。

## 【参考・引用文献】

1. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. 2010. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. Nat Immunol 11:404-410.
2. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. 2009. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. J Exp Med 206:79-87.
3. Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshiba T. 2014. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. Nat Commun 5:4713.