

## DNA センサーによる RNA ウイルス認識機構の解析

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】

細胞内の DNA または RNA センサーは、ウイルスゲノムを認識することにより、ウイルスの侵入を検出してインターフェロンを誘導する。単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus type 1: HSV-1) やワクシニアウイルス (Vaccinia virus: VACV) などの DNA ウイルスが細胞に感染すると、細胞内の DNA センサーである cGAS が細胞内のウイルス二本鎖 DNA を認識することにより、cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) を合成し、STING を介してインターフェロンを誘導する。興味深いことに RNA ウイルスである水疱性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus: VSV)、センダイウイルス (Sendai virus: SeV)、脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus: EMCV)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus: NDV) が細胞に感染した場合にも、cGAS 依存的にインターフェロン応答が誘導されることが知られている。VSV やリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (Lymphocytic Choriomeningitis Virus: LCMV)、シンドビスウイルス (Sindbis virus: SINV)、デングウイルス (dengue virus: DENV) などの RNA ウイルスが細胞に感染するとミトコンドリア DNA が細胞質中へ放出されるため、この細胞質中のミトコンドリア DNA が cGAS 依存的なインターフェロン応答を誘導していると考えられていた。しかし RNA ウイルスがどのようにしてミトコンドリア DNA を細胞質中へ放出させているのかは不明であった。

### 【目 的】

本研究では、インフルエンザウイルスや EMCV などの RNA ウイルスが、ミトコンドリア DNA を細胞質中へ放出させるメカニズムと、これらのウイルスが細胞に感染したときのインターフェロン応答における細胞内 DNA センサーの役割を解明することを目的とした。

### 【方 法】

HEK293FT 細胞に、インフルエンザウイルスまたは EMCV を感染または各ウイルスタンパク質を発現するプラスミドを導入し、感染またはトランスフェクション 24 時間後に pure cytosolic fraction を回収した。Pure cytosolic fraction から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA に特異的なプライマーを用いた定量 PCR 法により、ウイルス感染細胞や各ウイルスタンパク質を過剰発現させた細胞質中のミトコンドリア DNA 量の相対値を測定した。また野生型、cGAS、STING 欠損マウスから調製した肺線維芽細胞にインフルエンザウイルスおよび EMCV を感染させ、感染 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR 法により測定した。さらに野生型、cGAS、STING 欠損マウスにインフルエンザウイルスを経鼻的に感染させ、感染 5 日目の肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中のウイルス量を MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により測定した。

### 【結 果】

HEK293FT 細胞にインフルエンザウイルスおよび EMCV を感染させると、感染 24 時間後に細胞質中のミトコンドリア DNA が有意に上昇していることが明らかとなった。またインフルエンザウイルスの M2 タンパク質および EMCV の 2B タンパク質を過剰発現させると、コントロールと比較して有意に細胞質中のミトコンドリア DNA が上昇した。M2 タンパク質はプロトン選択的

なイオンチャネルタンパク質であるため、M2 タンパク質のプロトンチャネル活性を欠失させた組換えインフルエンザウイルス (rgPR8/M2del29-31) を HEK293FT 細胞に感染させると、野生型ウイルス (rgPR8) と比較して細胞質中のミトコンドリア DNA 量が有意に低下することも確認できた。

野生型、cGAS、STING 欠損マウスから調製した肺線維芽細胞にインフルエンザウイルスおよび EMCV を感染させ、感染 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を測定すると、cGAS や STING 欠損細胞では、IFN- $\beta$  mRNA 量が野生型の細胞と比較して有意に低下していた。さらに STING 欠損マウスでは、ウイルス感染 5 日目の肺胞洗浄液中のウイルス量が野生型マウスと比較して有意に上昇していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。

## 【考 察】

インフルエンザウイルス感染細胞におけるインターフェロン応答には、細胞質中のミトコンドリア DNA と細胞内 DNA センサーである cGAS が重要な役割を果たしていることが示唆された。また肺胞洗浄液中のウイルス量は、STING 欠損マウスで有意に増加したものの、cGAS 欠損マウスではウイルス量の有意な増加は認められなかったことから、cGAS 以外の細胞内 DNA センサーがインフルエンザウイルスの増殖抑制に重要な役割を果たしていることが推察された。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

インフルエンザウイルスの感染細胞では、細胞内の RNA センサーだけでなく DNA センサーが働き、抗ウイルス免疫応答を惹起していることが明らかとなった。このことから効果的な経鼻インフルエンザワクチンの開発には、RNA アジュバントだけではなく、DNA センサーを刺激するアジュバントを添加することにより、インフルエンザウイルスの感染を模倣した有効なワクチンが開発できると期待できる。

## 【参考・引用文献】

1. Moriyama M, Koshihara T, Ichinohe T. Influenza A virus M2 protein triggers mitochondrial DNA-mediated antiviral immune responses. *Nat Commun.* 2019 Oct 11;10(1):4624.

## 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人先進医薬研究振興財団に深謝いたします。また本研究で用いた組換えインフルエンザウイルスの作製に必要なプラスミドを分与していただきました河岡義裕教授(東京大学医学研究所)に心より感謝申し上げます。