

# ミトコンドリアを介した新しいウイルス認識機構の解析

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター

感染制御系ウイルス学分野

一戸 猛志

## 1. 背景

TLRs (Toll-like receptors) やRLRs (RIG-I-like receptors) は、ウイルス由来の核酸を認識して I 型インターフェロンを誘導する。TLR3, TLR7, TLR9 はエンドゾーム内に存在する膜受容体で、二本鎖RNA (double-stranded RNA : dsRNA)、一本鎖RNA (single-stranded RNA : ssRNA) とDNA をそれぞれ認識する。RIG-I とMda5 を含むRLRsは、細胞質中に存在するウイルスRNAを認識する。一方、細胞質中に存在する自然免疫受容体のNod-like receptor family, pyrin domain containing 3

(NLRP3) は、ウイルス、細菌、環境中刺激物などさまざまな刺激に応答し、アダプタータンパク質のapoptosis-associated speck-like protein (ASC) や未成熟型caspase-1 (pro-caspase-1) とともに複合体を形成してNLRP3 inflammasomeを形成する。活性型caspase-1 は、細胞質中の未成熟型interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) やIL-18 など炎症誘発性サイトカインの成熟と分泌を制御する。このIL-1 $\beta$ は、さまざまな病原体に対する免疫応答の誘導と炎症反応、自己免疫疾患などに関わる中心的なサイトカインである。例えば、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、ウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要である (1-3)。ウイルスの認識に関わるinflammasomeとして現在、RIG-I inflammasome、NLRP3 inflammasome、absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasomeが知られている。RIG-I やAIM2 はそれぞれウイルスのRNA やDNA を認識することにより活性化するのに対し、NLRP3 inflammasomeはウイルスRNAを認識しない。我々はこれまでに、インフルエンザウイルスや脳心筋炎ウイルス (EMCV) は、ウイルスが持つイオンチャネルタンパク質 (viroporin) によって、NLRP3 inflammasomeを活性化させていることを見出してきた (4-5)。インフルエンザウイルスの場合、NLRP3 の活性化にはウイルスのH<sup>+</sup>選択的なM2 タンパク質がトランスゴルジに局在することが必要であった (4)。またEMCVは、ウイルスの2B (Ca<sup>2+</sup>イオンチャネル) タンパク質が、小胞体やゴルジ体のCa<sup>2+</sup>を細胞質中へ流出させて、細胞質中のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇することが、NLRP3の活性化に必要であった (5)。このようなviroporin による、新しいウイルス認識機構の概念は、最近になって認識されつつあり、Triantafilouらは、human respiratory syncytial virus (RSV) のviroporin SH が、inflammasomeの活性化に関わることを示している (6)。ATP や尿酸一ナトリウム (MSU) 結晶によるNLRP3の活性化には、ミトコンドリアが産生する活性酸素種 (ROS) や、酸化ミトコンドリアDNA が必要であることが報告されているが (7-9)、ウイルス感染によるNLRP3の活性化メカニズムは未知である。そこで本研究では、ウイルス感染による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。

## 2. 方法および結果

ウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生においても、ミトコンドリア産生活性酸素種 (ROS) が必要であるかどうかを確かめるため、ミトコンドリアのROSを特異的に阻害するMito-TEMPO 存在下での、ウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生を調べた。ATP やMSUの刺激に対するIL-1 $\beta$ の産生は、これまでの報告通り、ミトコンドリアROSの阻害剤で完全に抑制された。これとは対照的に、麻疹ウイルス、EMCV、インフルエンザウイルスによるIL-1 $\beta$ の産生は、Mito-TEMPO 存在下では抑制されなかった。このことから、RNAウイルスによるNLRP3 inflammasomeの活性化は、ミトコンドリアROS以外のメカニズムが存在していることが示唆された。

ウイルス感染によるinflammasomeの活性化にミトコンドリアROSの影響が認められなかったため、ミトコンドリアDNAを脱落させたマクロファージにおけるinflammasomeの活性化について調べた。マウスマクロファージ細胞株であるJ774A.1細胞をethidium bromideを含む培地で2週間培養し、ミトコンドリアDNA が脱落していることをcytochrome c oxidase Iと18S ribosomal RNAのDNA コピー数の

比を定量的PCR法で確認した。これを  $\rho 0$  J774A.1細胞とし、この  $\rho 0$  J774A.1細胞 にインフルエンザウイルスやEMCV を感染させると、親株のJ774A.1細胞と比べて、IL-1 $\beta$  の産生が低下していることが分かった。JC-1 染色によりミトコンドリアの膜電位を解析すると、 $\rho 0$  J774A.1細胞では、ミトコンドリアの膜電位が低下していた。このことから、ウイルス感染によるNLRP3 インフラマゾームの活性化には、正常なミトコンドリア膜電位が必要であることが示唆された。

ミトコンドリア膜電位がNLRP3 inflammasomeの活性化に必要であるかどうかを確かめるために、脱共役剤であるcarbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) 存在下でミトコンドリア膜電位を消失させたときの、ウイルス感染後のIL-1 $\beta$  の産生をELISAで解析した。膜電位を消失したミトコンドリアはATP合成も抑制されるため、コントロールには、ミトコンドリアF1F0-ATPaseの阻害剤であるoligomycin B、あるいはミトコンドリアcomplex I (COXI) の阻害剤であるrotenone を使用した。このとき、CCCP 処理した骨髄マクロファージでミトコンドリア膜電位の消失していることをJC-1 染色により確認した。これにインフルエンザウイルス、EMCV、V欠損麻疹ウイルスを感染させると、CCCP処理により膜電位を消失させたマクロファージにおいてIL-1 $\beta$  の産生が低下していることが分かった。このことから、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化には、ミトコンドリア膜電位が必要であることが明らかとなった。

ミトコンドリアの膜電位が消失すると、連結したミトコンドリアの断片化が起こることが知られている。このことは、ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化には、連結したミトコンドリアが必要であることを示唆している。このミトコンドリア同士の連結には、ミトコンドリア外膜タンパク質の mitofusin 1/2 (Mfn1, Mfn2) が必要である。インフルエンザウイルスまたは EMCV 感染細胞の lysate を Mfn2 特異的な抗体で免疫沈降すると、NLRP3 が特異的に共沈してくることが分かった。CCCP 処理によりミトコンドリア膜電位を低下させて細胞では、この NLRP3-Mfn2 の相互作用が低下していたことから、ウイルス感染による NLRP3-Mfn2 の相互作用は、ミトコンドリア膜電位(連結したミトコンドリア) 依存的であることが示唆された。ウイルス感染細胞での NLRP3 inflammasome 活性化における Mfn2 の役割を明らかにするために、Mfn2 ノックダウン J774A.1 細胞にインフルエンザウイルスまたは EMCV を感染させると、Mfn2 ノックダウン細胞でウイルス感染による IL-1 $\beta$  の産生が有意に低下していることが明らかとなった。このことから、ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化には、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3-Mfn2 の結合が必要であることが示唆された (図 1)。

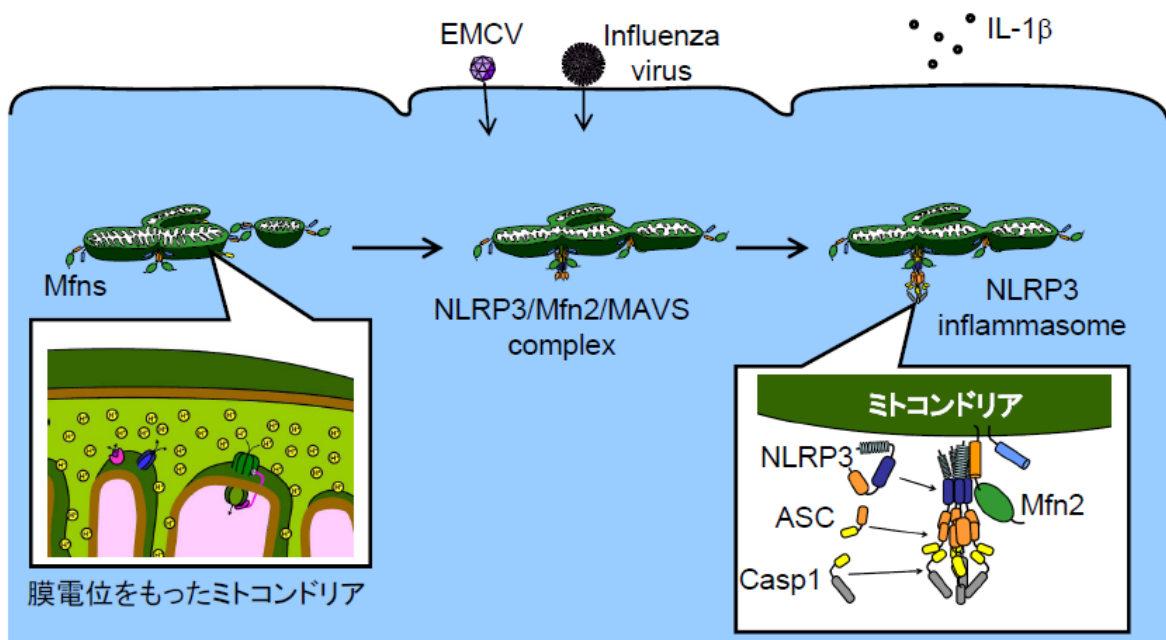


図 1. ウイルス感染による NLRP3 inflammasome 活性化メカニズム

### 3. 考察・まとめ

CCCPにより膜電位を消失させた細胞、ミトコンドリア同士の連結に必要なMfn2ノックダウン細胞では、ウイルス感染によるIL-1 $\beta$ の産生が有意に抑制された。このことからミトコンドリアの膜電位やMfn2は、ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化に必要であることが示唆された。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、ウイルス特異的な獲得免疫応答の惹起に必要であるが1-3)、その異常な活性化は、さまざまな自己免疫疾患にも関わる。このため、inflammasomeの活性化、収束反応について理解することは、ウイルス感染症に対する効果的なワクチン開発や、ウイルスの病原性発現機構の理解だけでなく、さまざまな自己免疫疾患の理解にも役立つ可能性がある(10-11)。

### 4. 発表論文・参考文献

1. Pang IK, Ichinohe T, Iwasaki A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus. *Nat Immunol* 2013 Mar;14(3):246-53.
2. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Mar 29;108(13):5354-9.
3. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 2009 Jan 16;206(1):79-87.
4. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 2010 May;11(5):404-10.
5. Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 2012;8(8):e1002857.
6. Triantafilou K, Kar S, Vakakis E, Kotecha S, Triantafilou M. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax* 2013 Jan;68(1):66-75.
7. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011 Jan 13;469(7329):221-5.
8. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011 Mar;12(3):222-30.
9. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012 Mar 23;36(3):401-14.
10. Yamazaki T, Ichinohe T. Inflammasomes in antiviral immunity : clues for influenza vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res.* 2013 (in press).
11. 一戸猛志. インフルエンザウイルス認識機構と経鼻インフルエンザワクチン. *臨床とウイルス.* 2013 Oct; 41(4): 212-21.