

博士論文

インフルエンザウイルスによる自然免疫応答制御機構の解析

森山 美優

## 目次

略語一覽 .....	1
要旨 .....	4
序論 .....	7
目的 .....	14
実験方法 .....	15
結果 .....	27
考察 .....	56
謝辞 .....	66
参考文献 .....	67

## 略語一覽

AIM2	absent in melanoma 2
ANT3	adenine nucleotide translocator 3
AMP	adenosine monophosphate
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
Bax	Bcl-2 associated X protein
BSA	bovine serum albumin
CARD	caspase-recruitment domain
Cardif	CARD adaptor inducing interferon- $\beta$
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CBX	carbenoxolone
cDNA	complementary DNA
cGAMP	cyclic GMP-AMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
COX1	cytochrome c oxidase I
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CsA	cyclosporine A
CX43	connexin 43
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DDX41	DEAD-box helicase 41
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded DNA
dsRNA	double-stranded RNA
DTT	dithiothreitol
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ERIS	endoplasmic reticulum interferon stimulator
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GMP	guanosine monophosphate
gRNA	guide RNA
HA	hemagglutinin
HSV-1	herpes simplex virus type 1
IFN- $\alpha$	interferon-alpha

IFN- $\beta$	interferon-beta
IKK- $\epsilon$	i-kappa B kinase epsilon
IL-1 $\beta$	interleukin-1 beta
ISG	interferon-stimulated gene
IPS-1	interferon- $\beta$ promoter stimulator 1
IRF3	interferon regulatory factor 3
MAVS	mitochondrial antiviral signaling
MEM	minimum essential medium
Mfn2	mitofusin 2
MITA	mediator of IRF3 Activation
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondrial DNA
M1	matrix protein 1
M2	matrix protein 2
NA	neuraminidase
NEP	nuclear export protein
NLRP3	nod-like receptor pyrin domain containing 3
NP	nucleoprotein
NS1	nonstructural protein 1
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthetase
PA	polymerase acidic protein
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PB1	polymerase basic protein 1
PB2	polymerase basic protein 2
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKR	double-stranded RNA-dependent protein kinase
PRRs	pattern recognition receptors
PVDF	poly vinylidene di-fluoride
RIG-I	retinoic acid inducible gene-I
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species

rRNA	ribosomal RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small Interfering RNA
ssRNA	single-stranded RNA
STING	stimulator of interferon genes
TANK	TRAF family member associated NF-kappa B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TFAM	transcription factor A, mitochondrial
TLR7	toll-like receptor 7
Tom20	translocase of outer mitochondrial membrane 20
Tom40	translocase of outer mitochondrial membrane 40
TRIM25	tripartite motif containing 25
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1
VISA	virus-induced signaling adaptor
vRNP	viral ribonucleoprotein

## 要旨

パターン認識受容体によるウイルス感染の認識とそれに続く自然免疫応答は、感染初期のウイルス増殖の抑制に重要であるだけでなく、獲得免疫応答の誘導にも必要である。細胞質中の RNA センサーである retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) はインフルエンザウイルスのゲノム RNA を認識し、ミトコンドリア上のアダプター分子である mitochondrial antiviral signaling (MAVS) を介して interferon-beta (IFN- $\beta$ ) 遺伝子の転写を誘導し、抗ウイルス状態を引き起こす。ヘルペスウイルスの感染細胞ではミトコンドリア DNA (mtDNA) が細胞質中に流出し、細胞質中の DNA センサーである cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) と、下流のアダプター分子である stimulator of interferon genes (STING) 依存的な自然免疫応答を誘導するが

1、インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答における mtDNA や DNA センサーの役割は不明である。そこで本研究ではインフルエンザウイルス感染における mtDNA や DNA センサーの役割を明らかにすることを目的として以下の結果を得た。(1) インフルエンザウイルスの感染により細胞質中に mtDNA が放出された。

(2) インフルエンザウイルスの感染による mtDNA の放出は MAVS 欠損細胞において大幅に低下し、活性酸素種またはミトコンドリア膜透過性遷移孔の阻害剤処理によって阻害された。(3) インフルエンザウイルスの M2 タンパク質を細胞に発現させるだけで mtDNA の流出を引き起こした。(4) M2 タンパク質のイオンチャネル活性を

欠損させた組換えインフルエンザウイルスの感染細胞では mtDNA の流出が有意に低下した。(5) インフルエンザウイルスの PB1-F2 タンパク質は合成二本鎖 RNA やウイルス RNA の刺激を加えることで mtDNA の流出を引き起こした。(6) cGAS 安定発現細胞株において、インフルエンザウイルス感染後の IFN- $\beta$  遺伝子の転写が増強された。(7) cGAS または STING 欠損細胞ではインフルエンザウイルス感染後の IFN- $\beta$  遺伝子の転写が低下した。(8) ギャップ結合の阻害剤処理や、ギャップ結合構成因子である Connexin 43 のノックダウンにより、インフルエンザウイルス感染後の IFN- $\beta$  遺伝子の転写が低下した。(9) インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は二本鎖 DNA 刺激による IFN- $\beta$  応答を抑制した。(10) インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は mtDNA と相互作用していた。(11) NS1 タンパク質の RNA 結合ドメインに変異を加えると mtDNA との相互作用が減弱した。(12) インフルエンザウイルス感染マウスの肺胞洗浄液中に mtDNA が検出された。(13) cGAS または STING 欠損マウスでは、肺組織中のインフルエンザウイルス感染後の IFN- $\beta$  遺伝子の転写が野生型と比較して低下した。以上の結果は、インフルエンザウイルスの感染に伴って細胞質中に流出した mtDNA が DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  産生を誘導していることを示している。さらに、インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の新しい役割として、mtDNA と相互作用することにより DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  産生を抑制し

ていることが明らかとなった。本研究は、インフルエンザウイルスが DNA センサー  
依存的な IFN- $\beta$  産生を制御するメカニズムを世界で初めて明らかにしたものである。



## 序論

### (1) インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、8本に分節化したマイナス極性の一本鎖 RNA をゲノムとする。現在までに A、B、C、D 型の存在が知られているが<sup>2</sup>、ヒトの間で流行を引き起こすのは主に A 型と B 型である<sup>3</sup>。

A 型インフルエンザウイルスの8本の各ゲノム RNA 分節は PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、NS1 をコードしており、さらに選択的スプライシングにより発現する M2 と NEP を含めた 10 個のウイルスタンパク質の存在が 1980 年頃までに明らかになっている<sup>4,5</sup>。また近年までに、PB1-F2 を代表とする新たなウイルスタンパク質が次々と同定されている<sup>6,7</sup>。

A 型インフルエンザウイルスの各ゲノム RNA 分節は核タンパク質 (NP)、RNA ポリメラーゼ複合体を形成する PA、PB1、PB2 サブユニットとともに vRNP を形成している。ウイルス粒子表面は糖タンパク質のヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA)、イオンチャネルタンパク質である M2 を含む脂質二重膜のエンベロープで覆われており、粒子構造はマトリクスタンパク質 (M1) に裏打ちされることで保たれている<sup>8</sup>。

A 型インフルエンザウイルスの感染は標的細胞表面のシアル酸と HA が結合することにより開始し、ウイルス粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる<sup>9</sup>。

エンドソーム内の pH の低下に伴い、ウイルス粒子表面の M2 は水素イオンをウイルス粒子内に汲み入れることにより M1 と vRNP の解離を促す<sup>10</sup>。また pH の低下は HA の構造変化を誘発し、エンドソーム膜とウイルスエンベロープの膜融合を引き起こす<sup>11</sup>。これによりウイルス RNP が細胞質中に放出され（脱殻）、宿主細胞の核内においてゲノムの複製と転写が行われる。核内で形成された vRNP は非構造タンパク質の NEP と M1 により核外に輸送され<sup>12,13</sup>、細胞表面に集合した RNP は HA、NA、M1、M2 とともに宿主細胞膜から出芽し、ウイルス粒子を形成する。NA は出芽した新生ウイルス粒子の HA と細胞表面のシアル酸の結合を切断し、ウイルスは細胞表面から放出される<sup>14</sup>。

## (2) A型インフルエンザウイルスの認識機構

宿主の自然免疫系は病原体の侵入を感知し早期に排除するために重要な役割を果たしている。またウイルスの感染に対する自然免疫応答は感染初期のウイルス増殖の抑制に重要な役割を果たしているだけでなく、その後の獲得免疫応答の誘導にも必要である。パターン認識受容体 (pattern recognition receptors, PRRs) は病原体固有の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) や、感染などにより損傷した細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) を認識することで病原体の侵入を感知している<sup>15</sup>。最も典型的なウイルス由来の PAMPs はウイルスゲノム由来の核酸である<sup>16</sup>。ウイルス感染細胞では多くの場合、エンドソーム内や細胞質中に二本鎖 RNA (dsRNA) や DNA (dsDNA)、また 5'末端が三リン酸化された一本鎖 RNA (ssRNA) などの特徴的な PAMPs が生じ、PRRs によって認識される。

A型インフルエンザウイルスの感染は、少なくとも3つの PRRs によって認識される (図1)<sup>16 17</sup>。第一に、エンドソーム内の ssRNA センサーである Toll-like receptor 7 (TLR7) は形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) において、エンドサイトーシスされたインフルエンザウイルス粒子内のゲノム ssRNA を認識し、大量の IFN- $\alpha$  を誘導する<sup>18 19</sup>。

第二に、細胞質中の RNA センサーである RIG-I は 5'末端が三リン酸化されたイン

フルエンザウイルスのゲノム ssRNA を認識する<sup>20 21 22</sup>。RIG-I は E3 ユビキチンリガーゼである TRIM25 による N 末端 caspase-recruitment domain (CARD) のユビキチン化を受けて活性化し<sup>23</sup>、ミトコンドリア外膜上のアダプター分子である MAVS (または IPS-1、Cardif、VISA として知られる) を足場として TANK-binding kinase 1 (TBK1) や I-kappa B kinase epsilon (IKK- $\epsilon$ ) を集合させる。これらのキナーゼにより、転写因子である Interferon regulatory factor 3 (IRF3) がリン酸化され、二量体化したリン酸化 IRF3 が核内に移行して IFN- $\beta$  遺伝子の転写を誘導する<sup>24 25 26</sup>。

第三に、細胞質中の Nod-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) はインフルエンザウイルスの M2 タンパク質がトランスゴルジ内の水素イオンを汲み出すことによる細胞内イオンバランスの変化を認識している<sup>27</sup>。NLRP3 はアダプター分子である apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) や未成熟型 caspase-1 とともに NLRP3 inflammasome と呼ばれる複合体を形成する。これにより活性化した caspase-1 が細胞質中の未成熟型 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) を切断し、活性化型 IL-1 $\beta$  の細胞外放出を引き起こす<sup>28</sup>。

また近年、小胞体上のアダプター分子である STING (または MITA、ERIS、MPYS として知られる) がインフルエンザウイルスの膜融合を認識していることが報告された<sup>29</sup>。

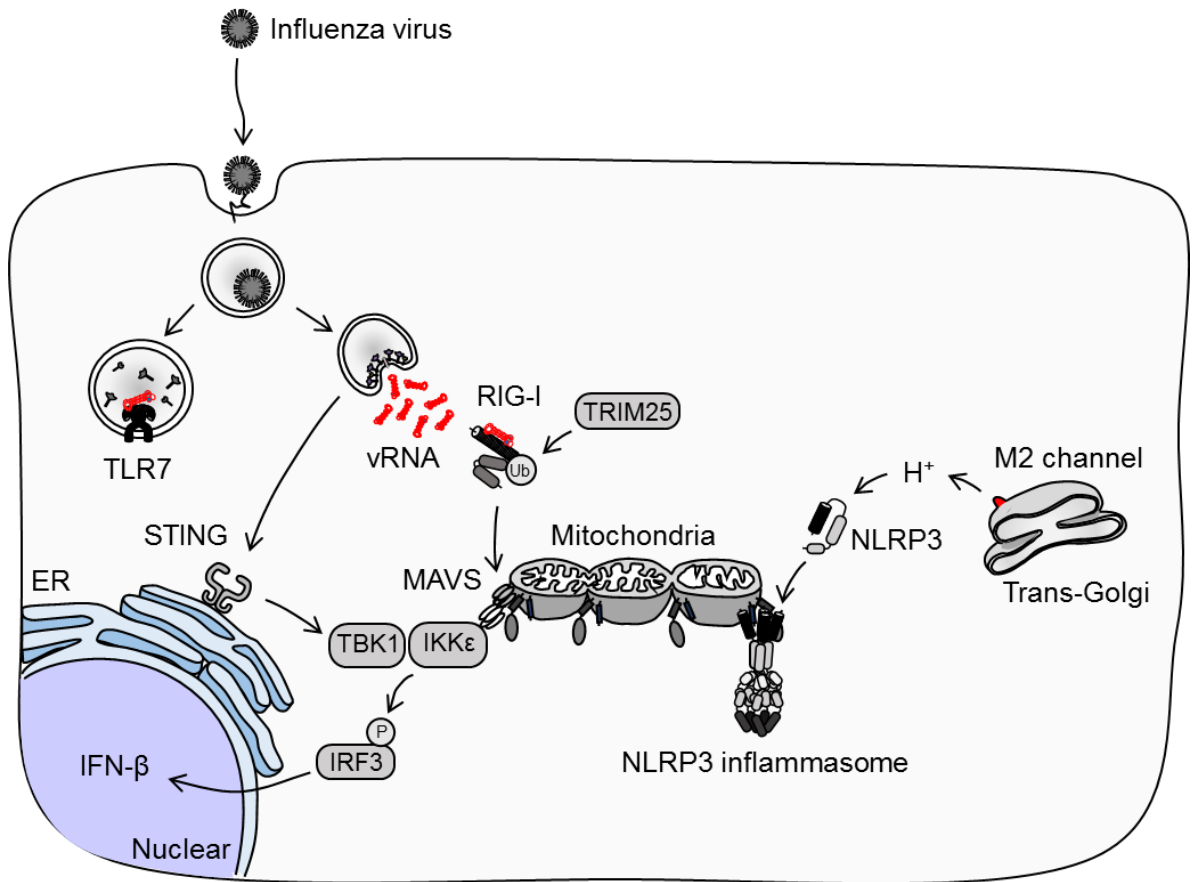


図 1. インフルエンザウイルス認識機構

インフルエンザウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、エンドソーム内のゲノム RNA は TLR7 によって認識される。小胞体上のアダプター分子である STING は膜融合の刺激を認識している。細胞質中に放出されたゲノム RNA は RIG-I により認識される。インフルエンザウイルスの M2 タンパク質は酸性条件のトランスゴルジ内の水素イオンを細胞質中に汲み出し、NLRP3 を活性化させる。

### (3) A型インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による自然免疫系の制御

A型インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は多くの宿主タンパク質や dsRNA と相互作用することで多岐にわたる機能を有している<sup>30</sup>。その機能は大まかに、(1) 宿主タンパク質発現の抑制、(2) ウイルスタンパク質発現の増強、(3) 抗ウイルス応答の抑制である<sup>30 31</sup>。特に、NS1 タンパク質と dsRNA との相互作用は IFN の誘導自体を抑制するだけでなく、dsRNA-dependent protein kinase (PKR) や 2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) といった抗ウイルス応答の実行因子である interferon-stimulated gene (ISG) の直接的抑制に働く<sup>32 33</sup>。また PRRs を介したインフルエンザウイルス認識機構に対して、NS1 タンパク質は多段階的な回避戦略を持っている。RIG-I 経路に対しては、RNA 結合ドメイン (38 番目のアルギニンと 41 番目のリジン) を介してウイルスゲノム RNA と結合することで、RIG-I によるゲノム RNA の認識を阻害する<sup>21</sup>。また、TRIM25 結合ドメイン (96 番目と 97 番目のグルタミン酸) を介して TRIM25 による RIG-I の活性化を阻害することが知られている<sup>34</sup>。NLRP3 inflammasome に対しては、NS1 タンパク質が NLRP3 と相互作用することによって NLRP3 inflammasome の形成を阻害し、caspase-1 の活性化やそれに続く IL-1 $\beta$  産生を抑制している<sup>35 36</sup>。この NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome 依存的 IL-1 $\beta$  産生の抑制には RNA 結合ドメインと TRIM25 結合ドメインが重要な役割を果たしている<sup>37 36</sup>。

#### (4) 細胞質 DNA センサーによるミトコンドリア DNA 認識機構

mtDNA は酸化的リン酸化に必須の 37 個の遺伝子をコードする全長 16,569bp の環状 dsDNA である<sup>38</sup>。ミトコンドリアは共生細菌由来の細胞小器官であることから、mtDNA は病原体固有の非リン酸化 CpG モチーフを含んでいる。また、複製過程でユニークな高次構造を示すことからウイルスの感染や細胞障害に伴い細胞質中や細胞外へ放出された mtDNA は DNA センサー依存的な自然免疫系を活性化させる<sup>38</sup>。

細胞質中に放出された mtDNA は、細胞質中の DNA センサーである cGAS によって認識され、セカンドメッセンジャーである cyclic GMP-AMP (cGAMP) の生成を誘導する<sup>39 40 41</sup>。下流のアダプター分子である STING は cGAMP と結合することにより活性化し、TBK1/IRF3 を介して IFN- $\beta$  遺伝子の転写を誘導する<sup>42 43</sup>。この cGAS/STING による自己 DNA の認識は、エカルディ・グティエール (Aicardi-Goutières) 症候群を始めとする自己免疫疾患の病態発現に関与する<sup>38</sup>。

## 目的

細胞質 RNA センサーである RIG-I によるインフルエンザウイルス認識機構についてはよく理解されているが、細胞質 DNA センサーによる認識機構は不明な点が多い。また単純ヘルペスウイルス 1 型 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1) の感染細胞ではミトコンドリアストレスが引き起こされ、細胞質中に放出された mtDNA が cGAS/STING 依存的な自然免疫応答を引き起こしているが<sup>1</sup>、インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答における mtDNA の役割は未知である。そこで本研究では、インフルエンザウイルスに対する自然免疫応答における mtDNA や DNA センサーの役割を明らかにすることを目的とした。



## 実験方法

### (1) マウス

野生型の C57BL/6J 系統は日本エスエルシー株式会社より購入した。また、C57BL/6J-STING<sup>gt/gt</sup>、C57BL/6J-cGAS<sup>-/-</sup>は The Jackson Laboratory より購入し、週齢と性別を揃えて実験を行った。本研究において実施された動物実験計画は、東京大学医科学研究所の動物実験委員会より承認を得た。

### (2) 細胞とウイルス

HEK293FT 細胞 (Invitrogen) は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境のもと、10% FBS (Gibco)、ペニシリン (100 U/ml) ・ ストレプトマイシン (100 µg/ml) (P/S、ナカライテスク)、を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (ナカライテスク) で維持した。

インフルエンザウイルス A/PR/8/34 株 (H1N1) は 10 日発育鶏卵に接種後、35°C で 2 日間培養して増やした<sup>44</sup>。組換えインフルエンザウイルスはイヌ腎臓上皮細胞由来の MDCK 細胞に感染させ、37°C で 2 日間培養した。NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR/8/34 株 (H1N1)<sup>45</sup> は NS1 安定発現 MDCK 細胞を用いて培養を行った<sup>36</sup>。これらのウイルスはそれぞれ、MDCK 細胞または NS1 安定発現 MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法によりウイルス力価を決定後、ウイルスストックを -80°C に保存

した。具体的には、0.1%BSA-PBS 溶液でウイルス液を 10 倍段階希釈し、6 well-plate に播種したコンフルエントの MDCK 細胞または NS1 安定発現 MDCK 細胞にウイルス液を吸着させた。1 時間後に細胞を PBS で洗浄し、アセチルトリプシンを添加した 1×MEM-アガロース培地を重層し、37°C で培養した。2 日後、クリスタルバイオレット溶液で固定・染色を行い、プラーク数からウイルス力価 (PFU/ml) を算出した。

Human Adenovirus 5 は ATCC より購入した。HEK293FT 細胞に感染させて培養し、TCID 50 法でウイルス力価を決定後、-80°C に保存した。具体的には、ウイルス液の 3 倍段階希釈系列を作製し、96 well-plate に播種した HEK293FT 細胞にウイルス液を吸着させ、10%FBS-DMEM 培地を添加した。細胞変性効果が認められた時点で 50%細胞変性終末点 (TCID50) を算出した。

### (3) プラスミド

ヒト TFAM の cDNA は非感染細胞から、またインフルエンザウイルス A/PR/8/34 株の HA、NA、M1、NS1、NEP タンパク質の cDNA は、感染細胞から抽出した total RNA をテンプレートとし、オリゴ dT を用いた逆転写反応と特異的なプライマーを用いた PCR 増幅によって得た。上述のように得た A/PR/8/34 株の NS1 タンパク質の cDNA をテンプレートとし、標準的な変異導入法により NS1 タンパク質の 38 番

目のアルギニンと 41 番目のリジンをアラニンに置換した RNA 結合ドメイン変異体 (NS1 38/41A) cDNA を得た<sup>36</sup>。チャンネル活性を欠損したインフルエンザウイルス A/PR/8/34 株の M2 遺伝子 (M2del29-31) は人工合成によって得た。これらはすべて真核生物の発現ベクター pCA7 にクローニングした<sup>46</sup>。Enhanced green fluorescent protein (EGFP)、HA-human IRF3、Flag-M2 またはタグ無しのインフルエンザウイルス PB1-F2 タンパク質を発現するプラスミドについては既報を参照した<sup>27,47-49</sup>。

#### (4) 抗体

ヒトリン酸化 IRF3 (Ser396; 4D4G)、STING (D2P2F)、ヒト cGAS (D1D3G) に対する抗体は Cell Signaling Technology より購入した。EGFP (GF200) に対する抗体はナカライテスクより購入した。Calnexin、Flag (M2) に対する抗体は Sigma-Aldrich より購入した。 $\alpha$ -tubulin (DM1A)、Tom20 (XX-1)、HA (F-7) に対する抗体、またマウス Control IgG1 は Santacruz より購入した。Myc (9E10) に対する抗体は Covance より購入した。

#### (5) 細胞質 mtDNA の定量

細胞質 mtDNA の定量は既報に準じて行った<sup>1</sup>。具体的には、HEK293FT 細胞またはマウス肺線維芽細胞を回収し、細胞懸濁液の 20 分の 1 量を取り分け、QIAamp

DNA mini kit (QIAGEN) を用いて mtDNA 量の補正用として total DNA を回収した。残りの細胞を 500 $\mu$ l のジギトニンバッファー (150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH7.4, 15-25  $\mu$ g/ml digitonin) で懸濁し、細胞膜のみが透過化するようマイクロチューブローテーターを用いて室温で 10 分間インキュベートした。その後 980 $\times$ g、3 分間で遠心し、新しい 1.5 ml エッペンチューブに上清を移す操作を 3 回繰り返し、最初の沈殿を Pellet としてウェスタンブロットに供した。上清を新たな 1.5 ml エッペンチューブに移してさらに 17,000 $\times$ g、10 分間遠心し、純粋な細胞質分画を得た。この純粋な細胞質分画から QIAquick Nucleotide Removal Columns (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出した細胞質 DNA とヒトまたはマウス mtDNA 特異的なプライマーを用いて定量 PCR を行った (表 1)。Total DNA に対しても同様に定量 PCR を行い、標準化のコントロールとして用いた。測定結果は  $\Delta \Delta$ Ct 法により解析し、非感染細胞または EGFP 発現プラスミドを導入した細胞 (ネガティブコントロール) を 1 とした相対値を算出した。

#### (6) 組換えインフルエンザウイルスの作製

6 well-plate に HEK293FT 細胞を播種し、0.1  $\mu$ g のインフルエンザウイルス A/PR/8/34 株 vRNA 発現用プラスミド (pPolI-PB1、pPolI-PB2、pPolI-PA、pPolI-HA、pPolI-NA、pPolI-NP、pPolI-M、pPolI-NS) とともに、ウイルス RNA ポリメ

ラーゼ発現用プラスミド (0.1 µg pCAGGS-PA、1 µg pCAGGS-PB1、1 µg pCAGGS-PB2、1 µg pCAGGS-NP) を 7.8 µl TransIT 293 (タカラバイオ) を用いたリポフェクション法により導入した<sup>50</sup>。変異組換えウイルス作成のため、任意の変異を加えた vRNA 発現用プラスミド (pPolI-PB1-ΔPB1-F2、pPolI-M-M2del29-31、pPolI-M-M2N31S、pPolI-NS-ΔNS1) を用いた<sup>45,51</sup>。48 時間後に最終濃度が 1 µg/ml になるようにトリプシン (Sigma) を加え、37°C で 15 分間インキュベートした。培養上清を MDCK 細胞に 1 時間吸着させ、2 ml OPTI-MEM (Gibco) を加えて 48 時間~72 時間培養を行い、必要に応じて新しい MDCK 細胞に培養上清の継代を行った。作成したウイルスは 225 cm<sup>2</sup> フラスコに播種した MDCK 細胞に接種してストックウイルスとし、プラークアッセイによりウイルス力価を決定した。

#### (7) siRNA を用いた遺伝子ノックダウン

cGAS-293FT 細胞を 6well-plate に播種し、ヒトの Connexin43 特異的な siRNA (Silencer Select s531800, s531801) 各 25 pmol またはネガティブコントロール siRNA (Silencer Select Negative Control No.1, No.2) 各 25pmol を 5 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により細胞に導入した。6 時間後培養上清を DMEM に置換し、48 時間後に細胞ライセートを回収してウェスタンブロットに供した。

#### (8) CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集

CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いてヒト MAVS (Gene ID: 57506)、ヒト STING (Gene ID: 340061) に特異的な gRNA を設計した (表 2)。gRNA 発現プラスミドを作製するため、アンチセンス鎖 3  $\mu$ l とセンス鎖 3  $\mu$ l を混合し、サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間、さらに 50°C で 10 分間反応させた (アニーリング)。制限酵素 BpiI で処理した pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458; Addgene) とアニーリングしたオリゴ DNA を Ligation high ver.2 (東洋紡) を用いてライゲーションし、標準的なクローニング法を用いてプラスミドを作製した。作製した gRNA 発現用 pX458 プラスミドをリポフェクション法により HEK293FT 細胞に導入し、FACS Aria (BD) を用いて EGFP 陽性細胞を 96 well-plate にシングルセルソーティングした。コロニーを形成した細胞の MAVS、STING の発現をウェスタンブロットで確認し、検出されなかったものを欠損細胞株とした。

#### (9) EGFP, cGAS 安定発現細胞株の樹立

ヒト cGAS タンパク質を発現するレンチウイルスを作製するため、ヒト cGAS をコードする cDNA を pLenti6.3/V5-TOPO vector (Invitrogen) にクローニングした。3  $\mu$ g の pLenti6.3/V5-TOPO-cGAS と ViraPower Packaging Mix (Invitrogen) をリポフェクション法により HEK293FT 細胞へ導入した。15 時間後に培養上清を新たな

DMEM 培地に置換し、72 時間後の培養上清を回収し、cGAS 発現レンチウイルスとして用いた。コントロールには EGFP 発現レンチウイルスを使用した。HEK293FT 細胞にレンチウイルスを 10 µg/ml の polybrene 存在下で感染させた。感染 24 時間後に培養上清を DMEM に置換した。さらに 24 時間後から 10 µg/ml の blasticidin を含む DMEM で 2 週間培養し、cGAS 安定発現細胞株を樹立した。

#### (10) マウス肺線維芽細胞の誘導

マウスの肺を PBS で洗浄して切込みを入れ、10 ml の Digestion buffer (0.25% Trypsin、400 nM EDTA in DMEM) を用いて 37°C で 30 分振とう反応させた<sup>52</sup>。セルストレーナーを用いて細胞懸濁液とし、1,100 rpm、5 分遠心した沈殿を新たな DMEM で再懸濁し、10 cm dish に播種した。10 日間培養し、肺線維芽細胞として実験に用いた。

#### (11) 共免疫沈降とウェスタンブロッティング

HEK293FT 細胞を 24 well-plate に播種し、0.5 µg の pCA7-Flag-NS1 とともに 0.5 µg の pCA7-Myc-human TFAM をリポフェクション法を用いて導入した。24 時間後に細胞を PBS で洗浄し、500 µl の 1×TNT バッファー (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10% glycerol) で溶解した。細胞溶解液を

11,000 rpm で 10 分間遠心し、遠心後の上清を 27  $\mu$ l 取り、sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer (50 mM Tris (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) と混合して 100°C で 5 分間煮沸した。残りの上清に 15  $\mu$ l の protein G-Sepharose (GE Healthcare AB) を加えて 4°C で 30 分間プレトリートを行い、5,000 rpm で 1 分間遠心した上清に 0.5  $\mu$ g の抗 Flag 抗体または normal mouse IgG1 を加えて 4°C で一晩反応させた後、protein G-Sepharose を加えて 4°C で 1 時間インキュベートした。反応液を 5,000 rpm で 1 分間遠心して複合体を沈殿させ、co-immunoprecipitation buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) で 3 回洗浄した。SDS loading buffer と混合して 100°C で 5 分間煮沸し、サンプルを 10%ポリアクリルアミドゲル SDS-PAGE で泳動し、PVDF メンブレン (Immobilon-P; Millipore) に転写した。メンブレンを 5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングし、マウス抗 Flag 抗体、マウス抗 Myc 抗体で一晩インキュベーションした。2 次抗体を反応させた後、メンブレンを 0.05% Tween-PBS で 3 回洗浄し、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) で 1 分間反応させ、シグナルを LAS-4000mini (GE Healthcare) で検出した。免疫沈降サンプルからのミトコンドリア DNA の検出には、抗体を反応させた後、protein G-Sepharose を加えてインキュベートした複合体から QIAquick Nucleotide Removal Columns (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、実験方法 (5) にしたがって定量 PCR を行った。



#### (12) IFN- $\beta$ レポーターアッセイ

HEK293T 細胞を 24 well プレートに播種し、レポータープラスミド p125-luc (100 ng)、phRL-TK (2.5 ng)、合成二本鎖 DNA の Poly(dA:dT) (100 ng) とともに 500 ng の pCA7-Flag-NS1 または pCA7-EGFP をリポフェクション法により導入した。24 時間後に passive lysis buffer (Promega) 100  $\mu$ l で細胞を溶解し、dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いて発光強度をルミノメーター (GloMax; Promega) で測定した。

#### (13) Total RNA の抽出と定量 PCR

細胞を 1 ml TRIZOL reagent (Invitrogen) で溶解し、1.5 ml エッペンチューブに回収した。マウス肺組織を用いる場合は肺を二つに分け、解剖ばさみで細かく切って TRIZOL と混合した。200  $\mu$ l のクロロホルムを加えて混合し、11,000 rpm で 15 分間遠心した。三層に分かれた中間層が混ざらないよう上層を新しい 1.5 ml エッペンチューブに回収し、500  $\mu$ l の 2-プロパノールを加えて転倒混和し、10 分間静置した。11,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て、1 ml 75%エタノールを加えて 9,000 rpm で 5 分遠心した。エタノールを完全に除き、50  $\mu$ l DEPC 処理水で沈殿を溶解したものを total RNA とした。SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen) とオリゴ dT プライマーを用いて total RNA から cDNA を作製した。インフルエンザウイルス NP また

はヒト、マウスの IFN- $\beta$  特異的なプライマー（表 1）と SYBR premix Ex *Taq* II

（タカラバイオ）を用いて定量 PCR を行った。Ct 値はヒト  $\beta$ -actin、マウス GAPDH 特異的なプライマーを用いた定量結果でそれぞれ補正した（表 1）。

#### (14) インフルエンザウイルスの経鼻感染と肺胞洗浄液の回収

マウスにソムノペンチルを腹腔内投与したのち（深麻酔）、インフルエンザウイルス A/PR8 株を 1000 PFU/30  $\mu$ l で経鼻投与した。感染 1~5 日後、マウスを安楽死させて肺を取り出し、2.5 ml シリンジと 21G ノンベベル針を用いて 2 ml 0.1% BSA-PBS を気管から肺に注入した。これをもう一度繰り返し、肺と洗浄液を 15 ml チューブに回収して 2,000 rpm で遠心し、上清を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。肺胞洗浄液中の mtDNA 定量のため、QIAquick Nucleotide Removal Columns（QIAGEN）を用いて DNA を抽出した。

#### (15) 統計解析

エラーバーは Triplicate で行った実験の標準誤差を示した。統計的有意性は Tukey's test を用いて解析し、P value  $< 0.05$  を統計的に有意とした。図中の記号はそれぞれ \* P  $< 0.05$ 、\*\* P  $< 0.01$ 、\*\*\* P  $< 0.001$  を示している。解析には Graph Pad Prism software を使用した。

表 1. 定量 PCR に用いたプライマー配列

---

Influenza virus NP	Forward 5'-AGAACATCTGACATGAGGAC-3' Reverse 5'-GTCAAAGGAAGGCACGATC-3'
Human IFN- $\beta$ <sup>53</sup>	Forward 5'-CTCCTGGCTAATGTCTATCA-3' Reverse 5'-GCAGAATCCTCCCATAATAT-3'
Human $\beta$ -actin <sup>53</sup>	Forward 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' Reverse 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3'
Mouse IFN- $\beta$ <sup>54</sup>	Forward 5'-GCACTGGGTGGAATGAGACTATTG-3' Reverse 5'-TTCTGAGGCATCAACTGACAGGTC-3'
Mouse GAPDH <sup>54</sup>	Forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA-3' Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
Mouse mtDNA (COX1) <sup>1</sup>	Forward 5'-GCCCCAGATATAGCATTCCC-3' Reverse 5'-GTTTCATCCTGTTCCCTGCTCC-3'
Human mtDNA (16S rRNA) <sup>55</sup>	Forward 5'-CCTAGGGATAACAGCGCAAT-3' Reverse 5'-TAGAAGAGCGATGGTGAGAG-3'

---

表 2. gRNA 発現プラスミド作製用オリゴ配列

Human MAVS gRNA	Target sequence	5'-cccatcaactcaaccgctgctgg-3'
	Sense strand	5'-CACCGcccatcaactcaaccgtgc-3'
	Anti-sense strand	5'-AAACgcacgggttgagttgatgggC-3'
Human STING gRNA	Target sequence	5'-ccaatgcggtcggcccgccctt-3'
	Sense strand	5'-CACCGaaggcgggccgaccgcatt-3'
	Anti-sense strand	5'-AAACaatgcggtcggcccgcccttC-3'

## 結果

(1) インフルエンザウイルスは MAVS 依存的に mtDNA を細胞質中へ流出させる

インフルエンザウイルスの感染が mtDNA の細胞質中への流出を引き起こす可能性を検討するため、まず HEK293FT 細胞においてインフルエンザウイルスが増殖することを確認し (図 2a-b)、また遠心分離法によりミトコンドリア膜成分を含まない純粋な細胞質分画を抽出できることを確認した (図 3a)。続いて HEK293FT 細胞またはマウス肺線維芽細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、感染 24 時間後に細胞質分画から DNA を抽出した。この細胞質 DNA を用いて、mtDNA 特異的プライマーを用いた定量 PCR を行った。その結果、野生型インフルエンザウイルス感染 24 時間後の細胞質分画に mtDNA が検出された (図 3b-c)。興味深いことに、NS1 タンパク質を欠損したインフルエンザウイルス ( $\Delta$ NS1 ウイルス) 感染細胞の細胞質中の mtDNA 量は野生型と比較して有意に高かった (図 3b-c)。インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は RIG-I 経路を阻害するため、 $\Delta$ NS1 ウイルスの感染細胞では高いレベルの IFN- $\beta$  プロモーター活性が誘導される<sup>45</sup>。このことから、 $\Delta$ NS1 ウイルスが引き起こす RIG-I/MAVS 依存的な抗ウイルス応答が mtDNA の流出に関与していると考えられた。そこで、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により MAVS 欠損 HEK293FT 細胞を樹立し、 $\Delta$ NS1 ウイルス感染 24 時間後の細胞質中の mtDNA 量を測定した。すると、MAVS 欠損細胞ではインフルエンザウイルス感染後の mtDNA の流出量が有意

かつ大幅に低下した（図 4a）。活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）や過剰なカルシウムイオン濃度はミトコンドリア膜透過性遷移孔（mitochondrial permeability transition pore, MPTP）の開口を促し、mtDNA の放出を引き起こす<sup>56</sup>。HEK293FT 細胞に  $\Delta$ NS1 ウイルスを感染させ、MPTP の阻害剤であるシクロスポリン A（CsA）、またはミトコンドリア抗酸化剤である Mito-TEMPO で処理すると、感染 24 時間後の細胞質中の mtDNA 量が有意に低下した（図 4b）。

以上の結果は、インフルエンザウイルスの感染による RIG-I/MAVS 経路の活性化や ROS の産生が、MPTP を介した mtDNA の放出を引き起こしていることを示している。

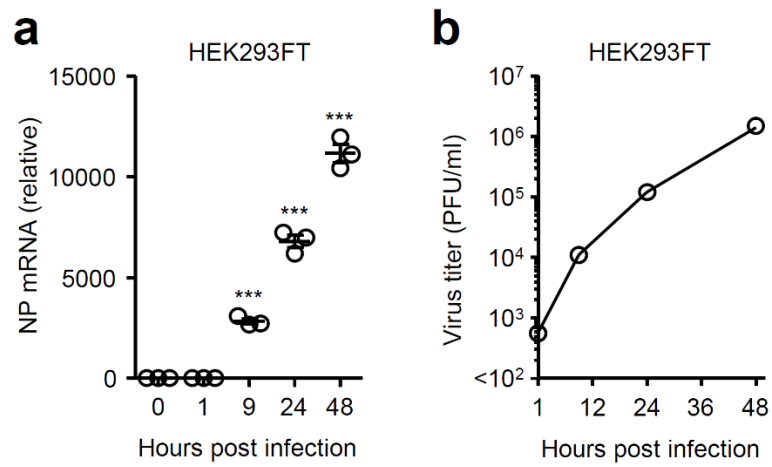


図 2. HEK293FT 細胞におけるインフルエンザウイルス増殖曲線

HEK293FT 細胞に野生型のインフルエンザウイルス A/PR8 株を感染させ、1、9、24、48 時間後の細胞内のインフルエンザウイルス NP mRNA 量 (a) を定量 PCR 法により、また培養上清中のウイルス量 (b) をプラークアッセイ法により測定した。\*\*\* P <0.001

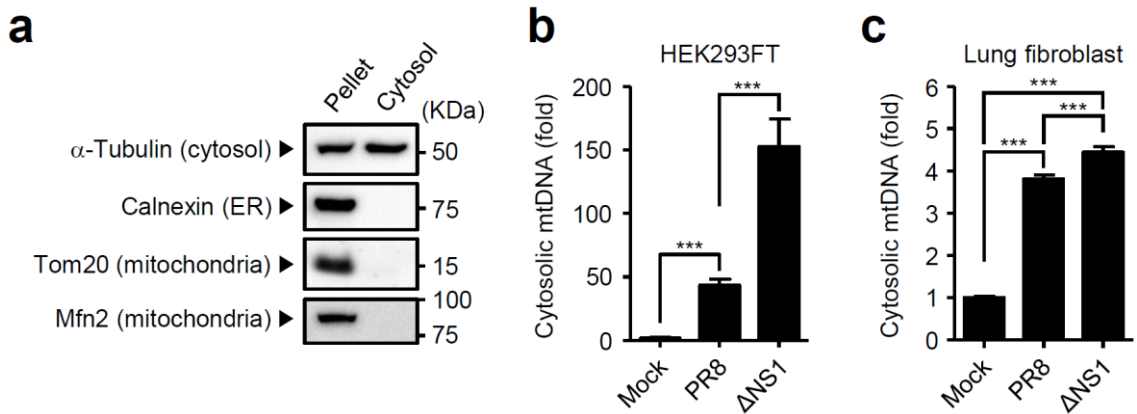


図 3. インフルエンザウイルス感染は mtDNA を細胞質中へ流出させる

(a) HEK293FT 細胞から遠心分離により細胞質分画を抽出し、ウェスタンブロットにより各細胞小器官のマーカー ( $\alpha$ -tubulin, Calnexin, Tom20, Mfn2) を検出した。(b) HEK293FT 細胞または (c) マウス肺線維芽細胞に野生型のインフルエンザウイルス A/PR8 株、または NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。

\*\*\* P < 0.001



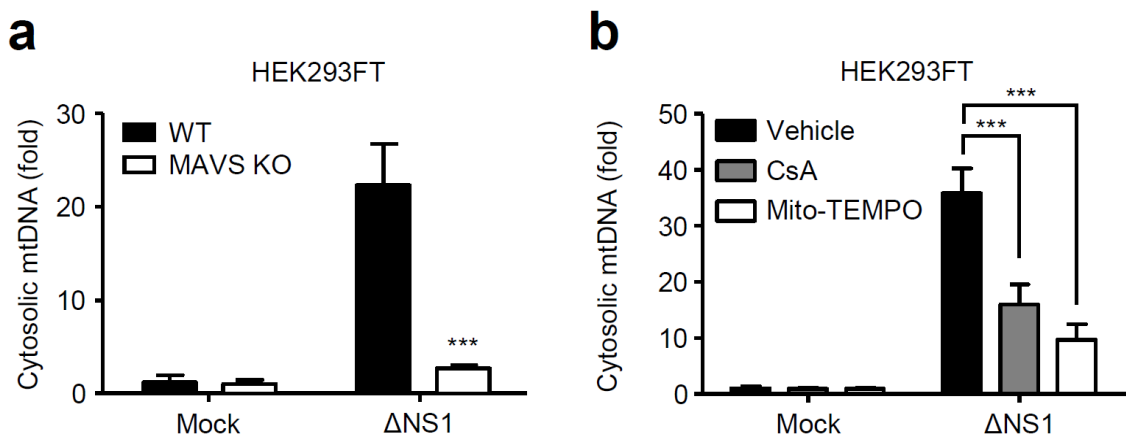


図 4. インフルエンザウイルス感染に伴う mtDNA 流出における MAVS、活性酸素種、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の役割

(a) 野生型の HEK293FT 細胞、または MAVS 欠損 HEK293FT 細胞に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。(b) HEK293FT 細胞に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を吸着させ、CsA (50  $\mu$ M) または Mito-TEMPO (500  $\mu$ M) を含む培地を加えた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。\*\*\* P < 0.001

(2) インフルエンザウイルス M2 タンパク質のチャネル活性が mtDNA の流出に重要である

次にインフルエンザウイルス感染による mtDNA の流出に重要なウイルス側因子を同定するため、HEK293FT 細胞に N 末端 Flag タグ付きのインフルエンザウイルスタンパク質 (HA, NA, M1, M2, NS1, NEP, PB1-F2) 発現プラスミドを導入し、24 時間後の細胞質中の mtDNA 量を測定した。その結果、M2 タンパク質を発現させた細胞の細胞質中のみ、高いレベルの mtDNA が検出された (図 5)。M2 タンパク質は四量体を形成することで水素イオンチャネルとして機能する<sup>57</sup>。そこで M2 タンパク質膜貫通ドメインの 3 アミノ酸を欠損させてチャネル活性を持たない変異 M2 タンパク質 (M2del29-31) 発現プラスミドを作製したところ、細胞に導入して 24 時間後の mtDNA の放出が完全に消失した (図 6a)。同様に M2 タンパク質のチャネル活性を欠損した組み換えインフルエンザウイルス (rgPR8/M2del29-31) をリバーシジェネティクス法で作出し、感染 24 時間後の細胞質中 mtDNA 量を測定すると、野生型の組み換えインフルエンザウイルス (rgPR8) と比較して mtDNA の放出が有意に減少した (図 6b)。アマンタジンは M2 イオンチャネルの孔に特異的に結合するチャネル活性阻害剤である<sup>58</sup>。本研究で用いているインフルエンザウイルス A/PR8 株はアマンタジン耐性であるため<sup>59 60</sup>、M2 タンパク質の 31 番目のアスパラギンをセリンに置換したアマンタジン感受性ウイルス (rgPR8/M2N31S) をリバーシジェネティクス法で作出した。このアマンタジン感受性ウイルス感染細胞において、アマンタジン存在下で感

染 24 時間後の mtDNA 放出の有意な低下が認められた (図 6c)。

以上の結果から、インフルエンザウイルスは M2 タンパク質のチャネル活性を介して mtDNA を細胞質中に流出させていることが明らかになった。

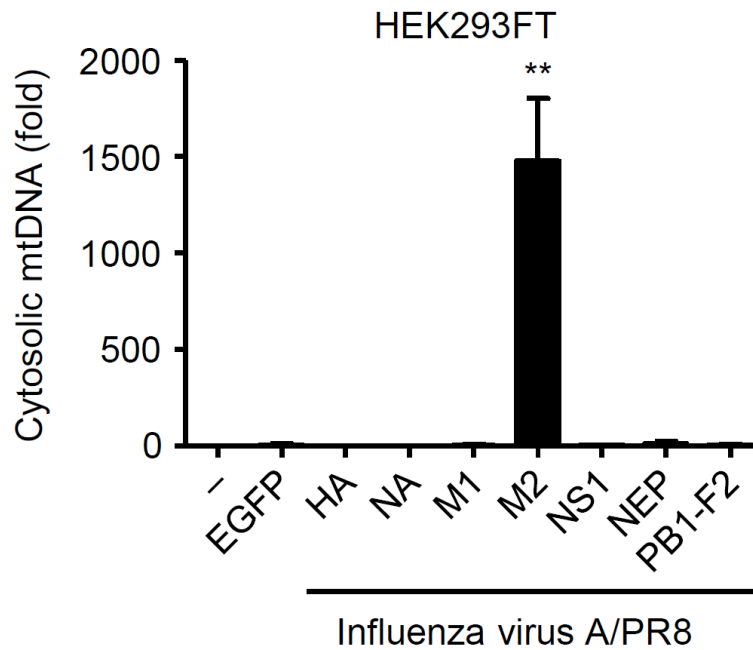


図 5. mtDNA 流出におけるインフルエンザウイルスタンパク質の役割

HEK293FT 細胞にインフルエンザウイルスタンパク質発現プラスミド (HA, NA, M1, M2, NS1, NEP, PB1-F2) を導入し、24 時間後に細胞質分画の mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。\*\* P < 0.01

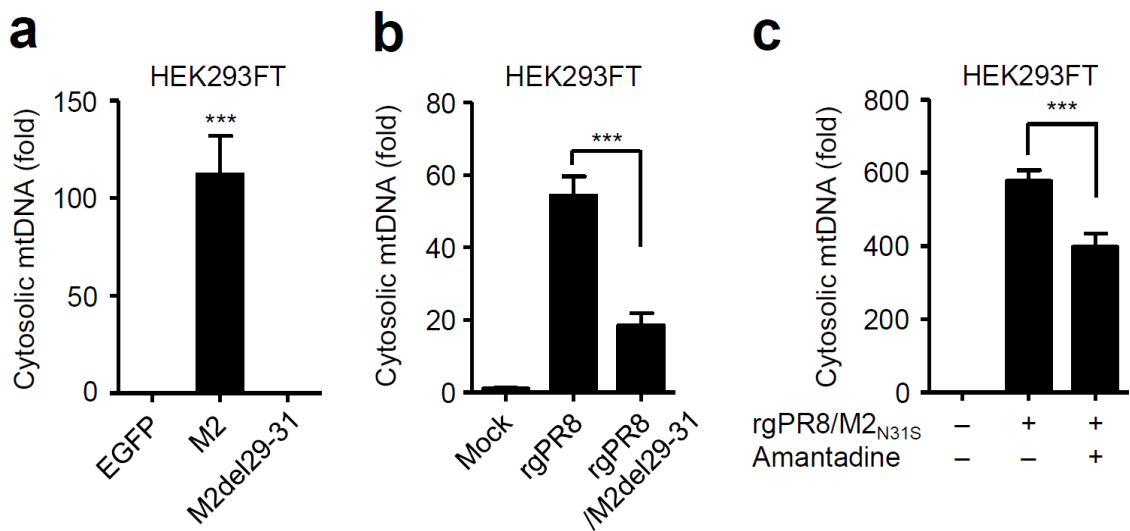


図 6. mtDNA 流出における M2 タンパク質のイオンチャネルの役割

(a) HEK293FT 細胞に Flag タグ付きの野生型 M2 タンパク質またはチャネル活性欠損 M2 タンパク質 (M2del29-31) 発現プラスミドを導入し、24 時間後に細胞質分画の mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。(b) HEK293FT 細胞に野生型の組換えインフルエンザウイルス A/PR8 株 (rgPR8) または M2 チャネル活性欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 (rgPR8/M2del29-31) を感染させた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。(c) HEK293FT 細胞にアマンタジン感受性組換えインフルエンザウイルス A/PR8 株 (rgPR8/M2<sub>N31S</sub>) を吸着させ、アマンタジン (100  $\mu$ M) を含む培地を加えた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。P < 0.001

(3) インフルエンザウイルス RNA と PB1-F2 タンパク質は相乗的に mtDNA の流出を引き起こす

インフルエンザウイルス感染による細胞質中への mtDNA の放出は MAVS 依存的に引き起こされていたことから (図 4a)、ウイルスゲノム RNA による RIG-I/MAVS 経路の活性化が mtDNA の放出に寄与していると考えられた。そこで、ウイルスゲノム RNA とウイルスタンパク質が相乗的に mtDNA の放出を引き起こしている可能性を検討するため、HEK293FT 細胞に RIG-I/MAVS 経路のリガンドである poly(I:C)とともにインフルエンザウイルスタンパク質 (HA, NA, M1, M2, NS1, NEP, PB1-F2) 発現プラスミドを導入し、24 時間後の細胞質中の mtDNA 量を測定した。その結果、M2 タンパク質だけでなく、PB1-F2 タンパク質を発現させた細胞の細胞質中にも高いレベルの mtDNA が検出された (図 7a)。M2 タンパク質の場合とは異なり、PB1-F2 タンパク質による mtDNA の放出には poly(I:C)が必要であった (図 7b)。また、PB1-F2 タンパク質が mtDNA の放出を引き起こすためには非感染細胞から抽出した total RNA の刺激では不十分で、インフルエンザウイルス感染細胞から抽出した total RNA の刺激が必要であった (図 7c)。インフルエンザウイルス感染細胞から抽出した total RNA に含まれる RIG-I リガンドは 5'末端が三リン酸化されたウイルスゲノム RNA であるため<sup>61</sup>、PB1-F2 タンパク質はインフルエンザウイルスゲノム RNA と相乗的に mtDNA の流出を引き起こしていることが示唆された。続いて PB1-F2 タンパク質を欠損した組み換えインフルエンザウイルス (rgPR8/ $\Delta$ PB1-F2) を作出し、感染 24 時

間後の細胞質分画を用いた mtDNA の定量を行った。すると、野生型の組み換えインフルエンザウイルス感染細胞と比較して、PB1-F2 欠損インフルエンザウイルス感染細胞では細胞質中の mtDNA 量が有意に低下した (図 8)。

以上の結果から、M2 タンパク質のみならず、PB1-F2 タンパク質もインフルエンザウイルス感染による mtDNA の放出に重要であることが明らかとなった。

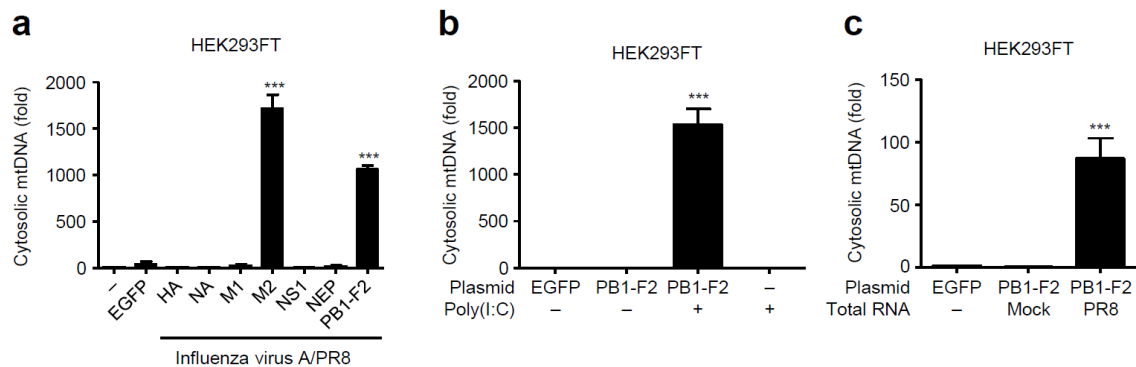


図 7. mtDNA 流出におけるウイルス RNA と PB1-F2 タンパク質の役割

(a) HEK293FT 細胞にインフルエンザウイルスタンパク質発現プラスミド (HA, NA, M1, M2, NS1, NEP, PB1-F2) とともに、Poly(I:C) (2  $\mu$ g) を導入し、24 時間後に細胞質分画の mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。(b) HEK293FT 細胞に PB1-F2 タンパク質発現プラスミドとともに、Poly(I:C) (2  $\mu$ g) を導入し、24 時間後に細胞質分画の mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。(c) HEK293FT 細胞に PB1-F2 タンパク質発現プラスミドとともに、非感染細胞またはインフルエンザウイルス A/PR8 株の感染細胞から抽出した total RNA を導入し、24 時間後に細胞質分画の mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。\*\*\* P < 0.001



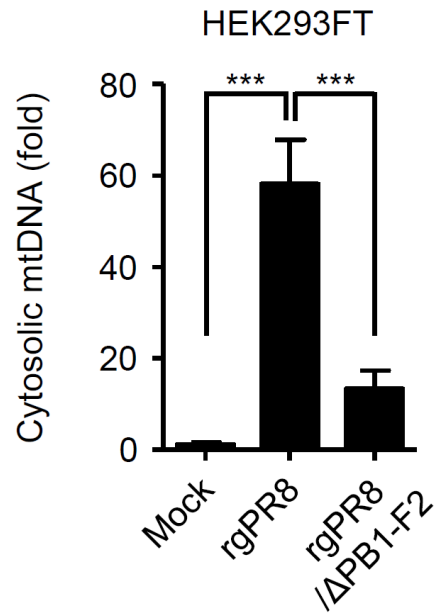


図 8. インフルエンザウイルス感染に伴う mtDNA 流出における PB1-F2 タンパク質の役割

HEK293FT 細胞に野生型の組換えインフルエンザウイルス A/PR8 株 (rgPR8) または PB1-F2 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 (rgPR8/ΔPB1-F2) を感染させた。感染 24 時間後に細胞質分画を抽出し、mtDNA 量を定量 PCR 法により測定した。\*\*\* P <0.001

(4) インフルエンザウイルスは cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  産生を誘導する

実際にインフルエンザウイルス感染において cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  産生が誘導されているかどうか検証するため、まず初めに cGAS の発現が確認されない HEK293FT 細胞にレンチウイルスベクターを用いて cGAS 遺伝子を導入し、cGAS 安定発現細胞株 (cGAS-293FT) を樹立した (図 9a)。この cGAS-293FT 細胞または EGFP-293FT 細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。その結果、cGAS-293FT 細胞では、EGFP-293FT 細胞と比較してインフルエンザウイルス感染 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量が有意に増加した (図 9b)。続いて、野生型、cGAS または STING 欠損マウス肺線維芽細胞を誘導し、アデノウイルスまたはインフルエンザウイルスを感染させて 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。dsDNA ゲノムを持つアデノウイルスの感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写は、cGAS/STING に完全に依存していた (図 10a)。一方で、インフルエンザウイルスの感染においても、cGAS または STING 欠損細胞の IFN- $\beta$  mRNA 量が野生型と比較して有意に減弱していたことから、cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  遺伝子の転写が引き起こされていることが明らかとなった (図 10b)。

以上の結果は、インフルエンザウイルスの感染が cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  遺伝子の転写を誘導していることを示している。

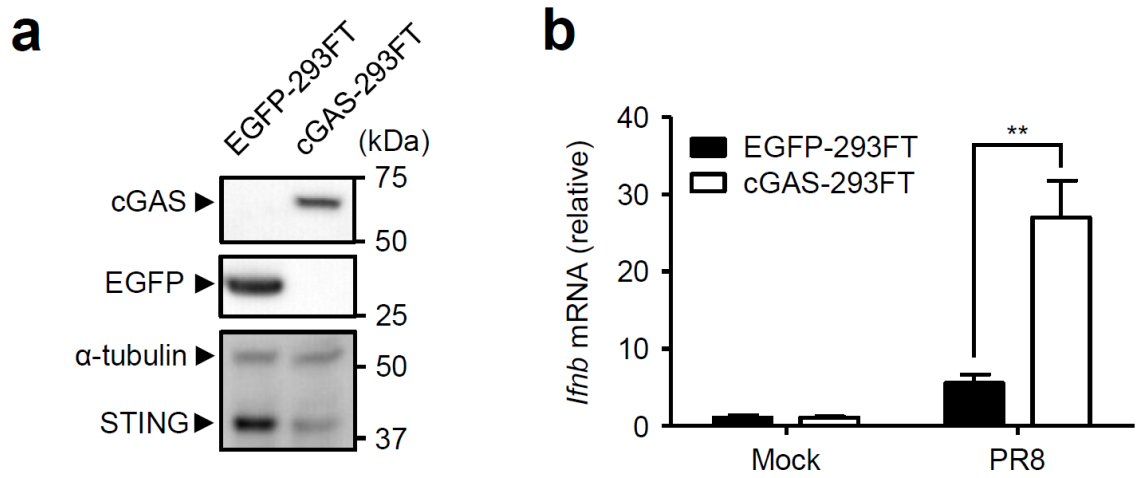


図 9. cGAS はインフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写を増強する  
 (a) cGAS-293FT 細胞または EGFP-293FT 細胞における cGAS、EGFP、 $\alpha$ -tubulin、STING の発現をウェスタンブロットで検出した。(b) cGAS-293FT 細胞または EGFP-293FT 細胞にインフルエンザウイルス A/PR8 株を感染させ、24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。\*\* P < 0.01

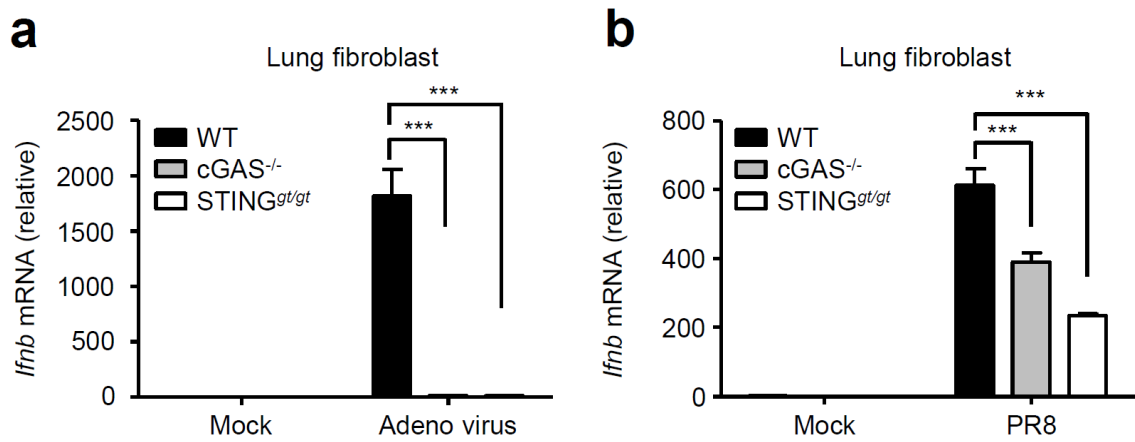


図 10. インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写における cGAS/STING の役割

(a-b) 野生型 (WT)、cGAS または STING 欠損 (cGAS<sup>-/-</sup> または STING<sup>gt/gt</sup>) マウス肺線維芽細胞を誘導し、(a) アデノウイルスまたは (b) インフルエンザウイルス A/PR8 株を感染させて 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。\*\*\* P < 0.001

(5) インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  応答はギャップ結合を介して拡散される

cGAS が dsDNA を感知することにより生成される cGAMP は細胞間のギャップ結合を介して隣接した細胞に拡散し、ワクチニアウイルス感染細胞のみならず周囲の非感染細胞の STING 依存的な IFN- $\beta$  応答を増幅させている<sup>62</sup>。インフルエンザウイルスの感染に対する IFN- $\beta$  応答におけるギャップ結合の重要性を検証するため、 $\Delta$ NS1 ウイルス感染 cGAS-293FT 細胞をギャップ結合の阻害剤である Carbenoxolone (CBX) で処理した。すると、感染 24 時間後の IFN- $\beta$  応答が有意に低下していた (図 11a)。また、 $\Delta$ NS1 ウイルス感染 24 時間後の IRF3 のリン酸化が抑制されていた (図 11b)。続いて、siRNA を用いてギャップ結合の構成因子である Connexin 43 (CX43) をノックダウンし (図 12a-b)、 $\Delta$ NS1 ウイルスを感染させた。感染 9 時間後に非感染 HEK293FT 細胞を加え、さらに 16 時間共培養して IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した (図 12a)。その結果、 $\Delta$ NS1 ウイルス感染細胞の CX43 をノックダウンすることによって、IFN- $\beta$  mRNA 量の有意な低下が認められた (図 12b)。非感染細胞の STING の役割を検討するため、cGAS-293FT 細胞に  $\Delta$ NS1 ウイルスを感染させて 9 時間後に非感染の野生型 HEK293FT 細胞、または CRISPR/Cas9 法により作製した STING 欠損 HEK293FT 細胞を加え、16 時間共培養して IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した (図 13a)。すると、後から加えた非感染細胞が野生型の場合と比較して、STING 欠損細胞の場合では IFN- $\beta$  mRNA 量が有意に低下し

た (図 13b)。

以上の結果は、CX43 からなるギャップ結合がインフルエンザウイルス感染細胞そのものだけでなく、隣接した細胞に STING 依存的な IFN- $\beta$  応答を増幅させていることを示唆している。

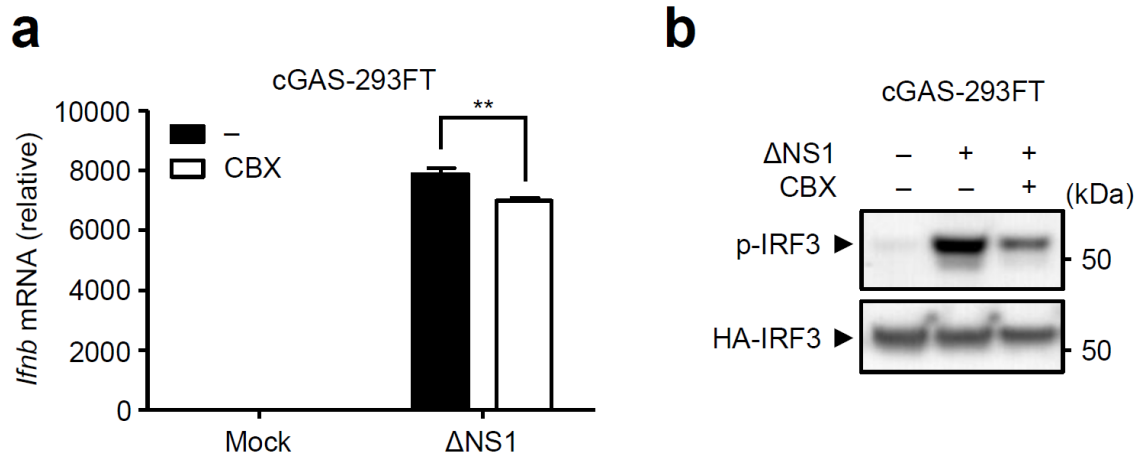


図 11. インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  応答におけるギャップ結合の役割  
 (a) cGAS-293FT 細胞に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を吸着させ、CBX を含む培地を加えた。感染 24 時間後の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。(b) cGAS-293FT 細胞に HA タグ付きの IRF3 発現プラスミドを導入し、NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を吸着させ、CBX を含む培地を加えた。感染 12 時間後のリン酸化 IRF3、HA-IRF3 の発現をウェスタンブロットで検出した。\*\* P < 0.01

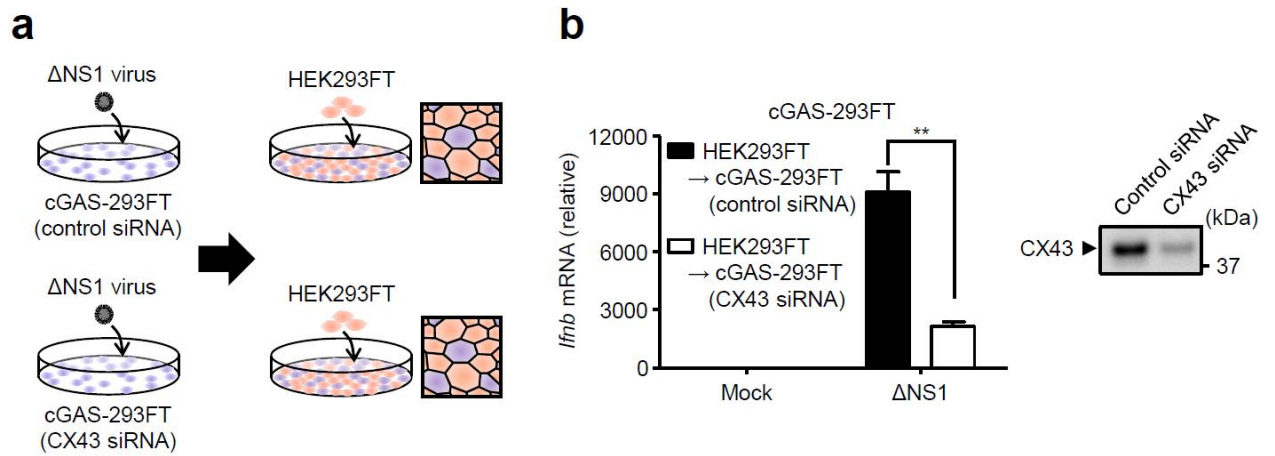


図 12. インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写における Connexin 43 の役割

(a-b) cGAS-293FT 細胞に Connexin 43 (CX43) 特異的な siRNA を導入し、48 時間後に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 9 時間後に非感染 HEK293FT 細胞を加えて 16 時間共培養し、IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。siRNA 導入から 48 時間後の CX43 の発現をウェスタンブロットで検出した。\*\* P < 0.01



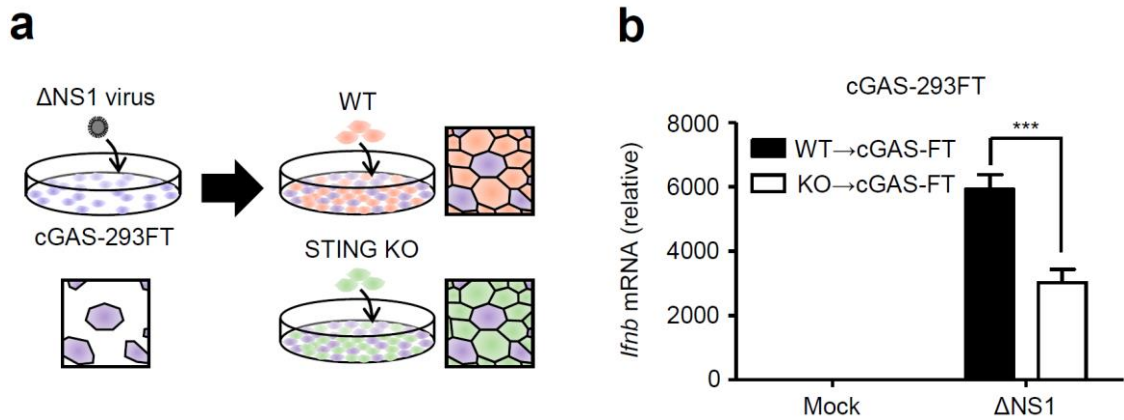


図 13. インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写における STING の役割

(a-b) cGAS-293FT 細胞に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 9 時間後に野生型の非感染 HEK293FT 細胞、または STING 欠損 HEK293FT 細胞を加えて 16 時間共培養し、IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。\*\*\* P < 0.001

(6) インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は mtDNA を標的として cGAS/STING 経路を阻害する

ここまでの結果から、インフルエンザウイルスは mtDNA を細胞質中に放出させることによって細胞質 DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  応答を引き起こしていることが明らかになった。本来、RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスはゲノム RNA を介して細胞質 RNA センサー依存的な IFN- $\beta$  応答を引き起こす<sup>20,21</sup>。そのため、インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質はゲノム RNA に結合することによって RIG-I による認識を阻害している<sup>21</sup>。細胞質 DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  応答における NS1 タンパク質の役割を明らかにするため、IFN- $\beta$  プロモーターの下流にルシフェラーゼを組み込んだレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行った。興味深いことに、NS1 タンパク質は cGAS のリガンドである poly(dA:dT) の刺激による IFN- $\beta$  応答を抑制した (図 14a)。次に NS1 タンパク質が dsDNA 依存的な IFN- $\beta$  応答を阻害するメカニズムとして、NS1 タンパク質が mtDNA と相互作用する可能性を検討した。Flag-NS1 または Flag-M2 タンパク質発現プラスミドを HEK293FT 細胞に導入し、 $\Delta$ NS1 ウイルスを感染させて 24 時間後に抗 Flag タグ抗体で免疫沈降を行い、免疫沈降したサンプル中の mtDNA 量を定量 PCR で測定した。驚くべきことに、Flag-NS1 タンパク質を免疫沈降したサンプル中には Flag-M2 タンパク質と比較して有意に高いレベルの mtDNA が検出された (図 14b)。環状 dsDNA である mtDNA は通常、ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) に収納されたヌクレオイドと

して存在している<sup>63</sup>。NS1 タンパク質と TFAM が相互作用する可能性を検証するため、Flag タグ付きの NS1 タンパク質と Myc タグ付きの TFAM の共免疫沈降実験を行った。すると、NS1 タンパク質と TFAM の相互作用は認められなかった (図 14c)。このことから、NS1 タンパク質は直接 mtDNA と相互作用していると考えられた。NS1 タンパク質と mtDNA の相互作用が特異的であることを確認するため、同様の実験でコントロール抗体と抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、抗 Flag 抗体で免疫沈降したサンプルにのみ mtDNA が検出された (図 14d)。さらに、NS1 タンパク質の RNA 結合ドメインをアラニンに置換した変異体 (NS1 38/41A) では、免疫沈降したサンプル中の mtDNA 量が有意に低下した (図 15a)。また NS1 タンパク質の 38/41A 変異は、合成 dsDNA である poly(dA:dT) の刺激による IFN- $\beta$  応答の抑制効果を有意に低下させた (図 15b)。

これらの結果から、インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は RNA 結合ドメインを介して直接 mtDNA と相互作用することで、cGAS による mtDNA の認識を阻害していることが示唆された。

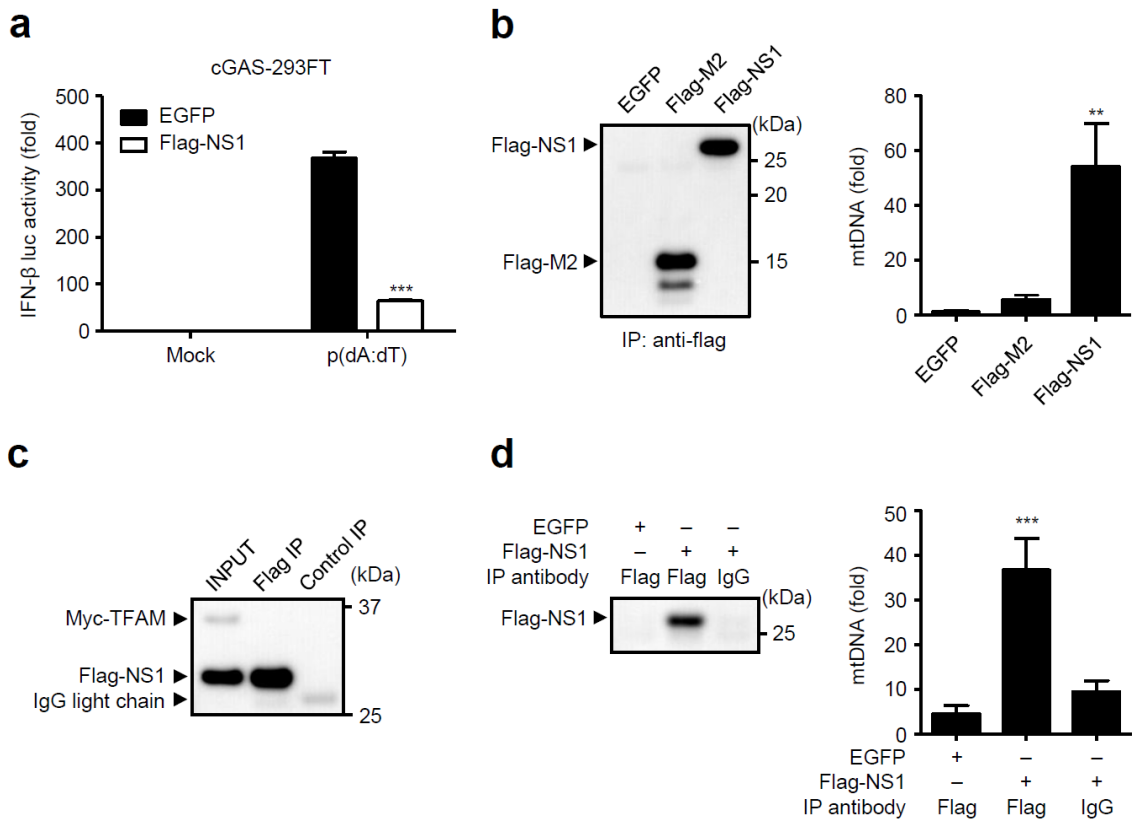


図 14. インフルエンザウイルス NS1 タンパク質は mtDNA と相互作用し、dsDNA に対する IFN- $\beta$  応答を阻害する

(a) cGAS-293FT 細胞に IFN- $\beta$  レポータープラスミド、poly(dA:dT)とともに、EGFP または Flag タグ付きの NS1 発現プラスミドを導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。(b) HEK293FT 細胞に Flag タグ付きの M2 または NS1 発現プラスミドを導入し、24 時間後に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 24 時間後に細胞ライセートを回収し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降した各サンプル中の Flag タグ付きのタンパク質をウェスタンブロットで検出し、mtDNA 量を定量 PCR で測定した。(c) HEK293FT 細胞に Flag タグ付きの NS1 発現プラスミドおよび Myc タグ付きの TFAM 発現プラスミドを導入した。24 時間後に細胞ライセートを回収し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。細胞ライセート (INPUT)、Flag IP、Control IP サンプルに含まれる Flag、Myc タグ付きのタンパク質をウェスタンブロットで検出した。(d) HEK293FT 細胞に Flag タグ付きの NS1 発現プラスミドを導入し、24 時間後に  $\Delta$ NS1 ウイルスを感染させた。感染 24 時間後に細胞ライセートを回収し、抗 Flag 抗体またはコントロール抗体を用いて免疫

沈降を行った。免疫沈降した各サンプル中の Flag タグ付きの NS1 タンパク質をウェスタンブロットで検出し、mtDNA 量を定量 PCR で測定した。 \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

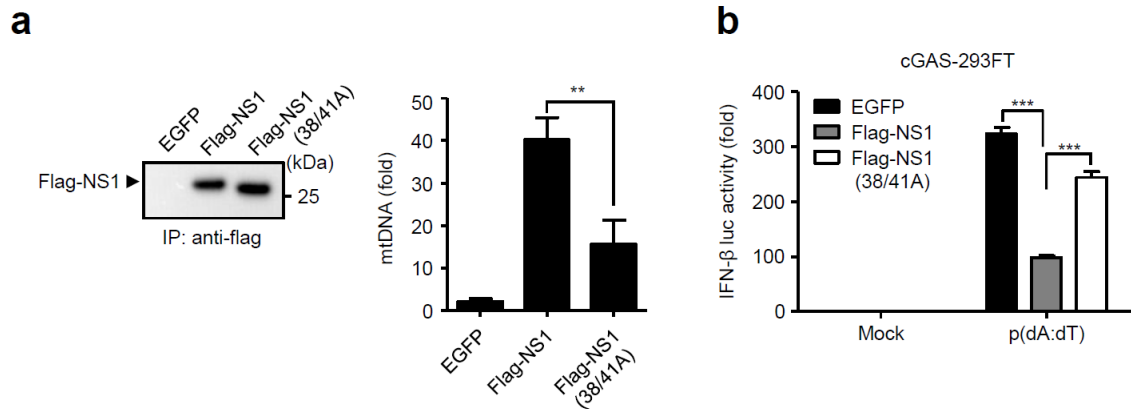


図 15. インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の RNA 結合ドメインは mtDNA との相互作用と dsDNA に対する IFN- $\beta$  応答の阻害に重要である

(a) HEK293FT 細胞に Flag タグ付きの野生型 NS1 または RNA 結合ドメイン変異型 NS1 (38/41A) 発現プラスミドを導入し、24 時間後に NS1 欠損インフルエンザウイルス A/PR8 株 ( $\Delta$ NS1) を感染させた。感染 24 時間後に細胞ライセートを回収し、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降した各サンプル中の Flag タグ付きの NS1 タンパク質をウェスタンブロットで検出し、mtDNA 量を定量 PCR で測定した。

(b) cGAS-293FT 細胞に IFN- $\beta$  レポータープラスミド、poly(dA:dT)とともに、EGFP または Flag タグ付きの野生型 NS1 または RNA 結合ドメイン変異型 NS1 (38/41A) 発現プラスミドを導入し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

(7) 生体内において mtDNA/cGAS/STING 経路は効果的な抗インフルエンザウイルス応答に寄与している

インフルエンザウイルス感染マウスにおける mtDNA/cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  応答の役割を明らかにするため、まず初めにインフルエンザウイルス感染マウスの呼吸器において mtDNA の放出が起こっているかどうか検討を行った。野生型の C57BL6/J マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、経時的に肺胞洗浄液中の mtDNA 量と、肺組織中の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。すると感染 2 日目以降、肺胞洗浄液中に有意な mtDNA 量の上昇が認められた (図 16a)。一方、肺組織中の IFN- $\beta$  mRNA は感染 1 日目から検出されるが、感染 2 日目から 3 日目にかけて  $10^2 \sim 10^3$  倍もの上昇が認められた (図 16b)。これらの結果から、インフルエンザウイルス感染マウスの呼吸器において、IFN- $\beta$  応答に伴って細胞外 mtDNA の放出が引き起こされていることが明らかとなった。次に、インフルエンザウイルスの感染が呼吸器における cGAS/STING 依存的な IFN- $\beta$  応答を引き起こしている可能性を検討するため、野生型、cGAS または STING 欠損マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、4 日目の肺組織中の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。その結果、cGAS、STING 欠損マウスの肺組織において、野生型マウスと比較して有意な IFN- $\beta$  mRNA 量の低下が認められた (図 17)。

以上の結果から、生体内において mtDNA/cGAS/STING 経路がインフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  応答に寄与していることが示された。

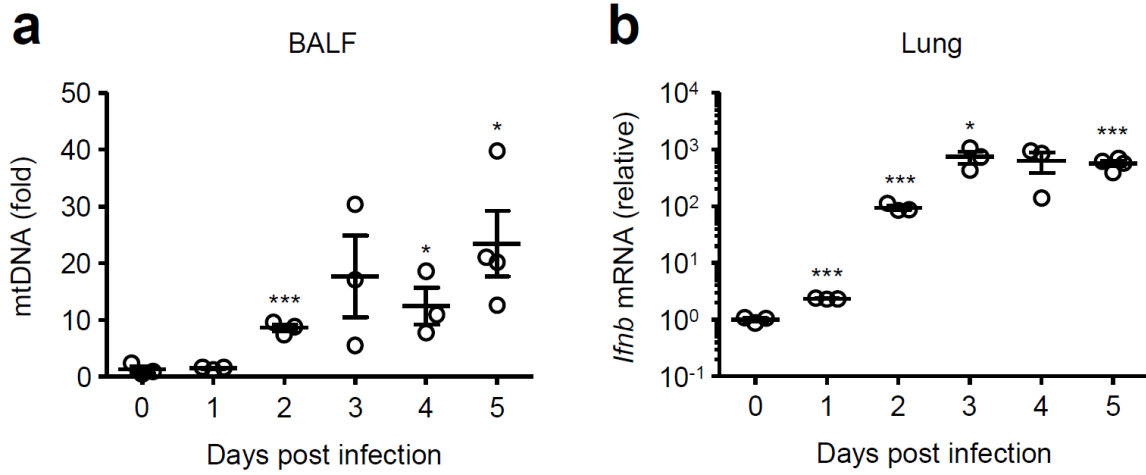


図 16. インフルエンザウイルス感染はマウス肺組織において mtDNA の細胞外流出を引き起こす

(a-b) 野生型の C57BL6/J マウスにインフルエンザウイルス A/PR8 株 (1000 PFU) を経鼻感染させ、感染 5 日後まで肺胞洗浄液と肺組織を回収した。肺胞洗浄液中の mtDNA 量 (a) と、肺組織中の IFN- $\beta$  mRNA 量 (b) を定量 PCR で測定した。\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001



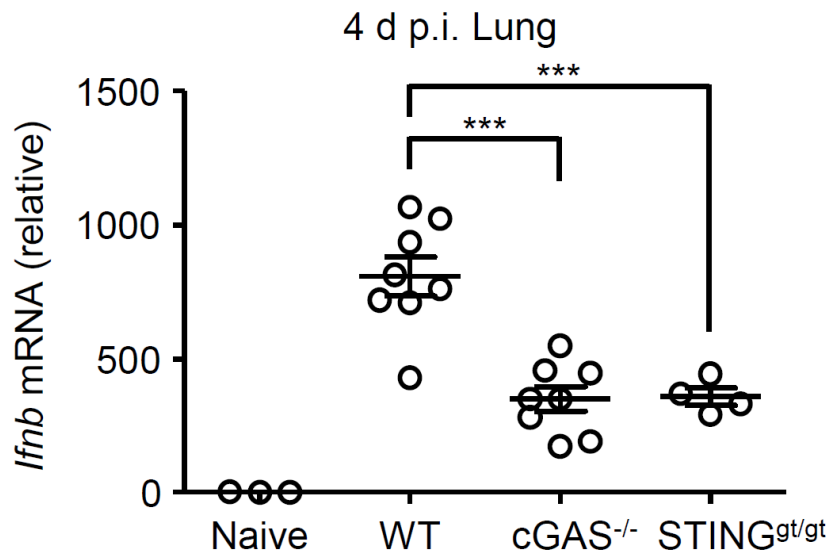


図 17. インフルエンザウイルス感染に対する IFN- $\beta$  遺伝子の転写における cGAS/STING の役割

野生型 (WT)、cGAS または STING 欠損 (cGAS<sup>-/-</sup> または STING<sup>gt/gt</sup>) C57BL6/J マウスにインフルエンザウイルス A/PR8 株 (1000PFU) を感染させて 4 日後の肺組織中の IFN- $\beta$  mRNA 量を定量 PCR で測定した。\*\*\* P < 0.001

## 考察

これまで、インフルエンザウイルスの感染に対する IFN- $\beta$  産生は RNA 認識機構によるものだと考えられてきた。本研究では、インフルエンザウイルスの感染が (1) mtDNA の細胞質中への放出を誘導し、(2) DNA 認識機構依存的な IFN- $\beta$  産生を引き起こすとともに、(3) DNA 認識機構を阻害していることを明らかにした。

### (1) インフルエンザウイルス感染による細胞質中への mtDNA 放出メカニズム

インフルエンザウイルスによる細胞質中への mtDNA の放出という現象の裏にはどのような分子機構が存在するのだろうか。ミトコンドリアマトリックスに局在する mtDNA が様々な刺激に伴ってミトコンドリア外へ放出されるメカニズムについてはいくつかの仮説が提唱されており、議論の余地がある。その内の一つはミトコンドリア内の ROS やカルシウムイオンの過負荷による MPTP の開口である<sup>56</sup>。もう一つは、アポトーシス促進因子である Bax や Bak によるミトコンドリア外膜上の孔形成である<sup>64</sup>。また、NLRP3 inflammasome の活性化によるものだという説もある<sup>65</sup>。本研究において、ROS や MPTP の阻害剤処理によってインフルエンザウイルス感染による mtDNA の流出量が低下したことから、MPTP の関与は明白である。一方で、mtDNA の細胞質中への流出には、インフルエンザウイルス M2 タンパク質を発現させるだけで十分であり、その水素イオンチャネル活性が必要であった。M2 タンパク

質はトランスゴルジ内の水素イオンを細胞質中に放出させ、これが NLRP3 inflammasome を活性化させていることから<sup>27</sup>、NLRP3 inflammasome が mtDNA の流出に関与している可能性も考えられる。しかし、細胞質中の oxidized mtDNA が NLRP3 に直接結合し、NLRP3 inflammasome を活性化させていることから<sup>66</sup>、mtDNA の流出が NLRP3 inflammasome 活性化よりも先に起こっている可能性もある。少なくともインフルエンザウイルス感染においては mtDNA の流出と NLRP3 inflammasome 活性化の両方を M2 タンパク質が担っているため、これらの反応はおおよそ同時に起こっていると推察される。このことは別の角度から見れば、これまで不明であった M2 タンパク質による NLRP3 inflammasome 活性化の具体的メカニズムを、M2 のイオンチャネル活性による細胞質中への mtDNA の流出によって説明できる可能性があると考えられる。この点で、今後の課題としてインフルエンザウイルスの感染によって細胞質中に放出された mtDNA が酸化型となっているか？といった更なる解析が必要である。

ミトコンドリアは通常、その機能を正常に保つ為に分裂と融合を繰り返している。ダメージを受けてミトコンドリア内膜電位が低下したミトコンドリアは切り離され、選択的オートファジーによって分解される<sup>67</sup>。インフルエンザウイルスの M2 タンパク質はオートファジーに必須の分子である LC3 を細胞膜へ局在変化させ、本来の機能を阻害することから<sup>68</sup>、M2 タンパク質が引き起こす高いレベルの細胞質中 mtDNA

の集積は、オートファジーによるダメージを受けたミトコンドリアの分解が阻害されていることによるものかもしれない。M2 タンパク質の 91 番目と 94 番目のアミノ酸は LC3 の機能阻害に必須であるため<sup>68</sup>、今後、M2 タンパク質の 91 番目と 94 番目のアミノ酸変異によるオートファジー阻害機能の喪失が細胞質中 mtDNA の集積に与える影響の解析が求められる。

さらに本研究において、PB1-F2 タンパク質もインフルエンザウイルス感染による mtDNA の放出に重要であることが明らかとなった。インフルエンザウイルスの PB1-F2 タンパク質はミトコンドリア外膜上の Tom40 チャンネルを介してミトコンドリア膜間スペースに局在し、内膜上に集積することでミトコンドリア膜電位を低下させる<sup>48</sup>。また、PB1-F2 タンパク質は MPTP 複合体の構成因子であるミトコンドリア内膜上の adenine nucleotide translocator 3 (ANT3) や外膜上の voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) と相互作用することにより、MPTP 複合体の一部として直接ミトコンドリアの透過性を亢進させている<sup>69</sup>。しかしながら M2 タンパク質の場合とは異なり、PB1-F2 タンパク質を発現させるだけでは不十分で、細胞に PB1-F2 タンパク質とともに RIG-I リガンドである poly(I:C)の刺激を加えてはじめて mtDNA の放出が引き起こされた。このことから、mtDNA の流出を誘導するには少なくとも PB1-F2 の過剰発現によるミトコンドリア膜電位の低下や MPTP の開口だけでは不十分で、RIG-I/MAVS 経路の活性化と相乗的に mtDNA の流出を誘導すると考えられ

る。過去の報告において、Poly(I:C)刺激は RIG-I/MAVS 経路の活性化のみならず、IRF3 を介して Bax 依存的なミトコンドリア外膜の透過性を亢進させていた<sup>70</sup>。このことは、Poly(I:C)による刺激が RIG-I/MAVS/IRF3/Bax 依存的に mtDNA の放出を誘導していることを示唆している。さらに、MAVS 欠損細胞では  $\Delta$ NS1 ウイルスの感染による mtDNA の放出がほとんど起こらなかったことから、インフルエンザウイルス感染による mtDNA の流出には、RIG-I/MAVS/IRF3/Bax 経路が重要であると考えられる。以上のように、mtDNA の流出という現象にはインフルエンザウイルスの感染に伴うミトコンドリアダメージ、オートファジー、アポトーシス、NLRP3 inflammasome、RNA 認識機構といった要素が複雑に絡み合っている。

## (2) インフルエンザウイルス感染による DNA 認識機構依存的な IFN- $\beta$ 産生

本研究において、インフルエンザウイルスの感染が DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  遺伝子の転写を誘導していることが明らかとなった。インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖 RNA であり、その複製機構において DNA が生じることはないため、宿主細胞由来の DNA がインフルエンザウイルスの感染に伴って DNA センサーを刺激していると推察される。実際に、インフルエンザウイルスの感染細胞では細胞質中にミトコンドリア由来の DNA 断片が蓄積しており、これが DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  遺伝子の転写を誘導していると考えられる。

過去の報告でデングウイルスや HSV-1 の感染細胞で mtDNA が細胞質中に放出されており、cGAS 依存的な自然免疫応答を引き起こしていることが知られている<sup>71 72 1</sup>。本研究は、インフルエンザウイルスの感染細胞でも細胞質中 mtDNA により cGAS 依存的な自然免疫応答が引き起こされていることを世界で初めて明らかにしたものである。mtDNA は核ゲノムと独立して独自の遺伝子をコードしていることから、細胞質中の mtDNA そのものが DNA センサーによって認識される dsDNA であるということに加え、その遺伝子発現過程で RNA/DNA ハイブリッドが生じる<sup>38</sup>。このことから、細胞質中の mtDNA は cGAS のみならず、細胞質中の RNA/DNA ハイブリッドを認識する DEAD-box helicase 41 (DDX41)によって認識されている可能性もある<sup>73</sup>。

さらに本研究では、DNA センサーによるインフルエンザウイルス感染の認識の生体内における役割を明らかにするため、マウスモデルを用いた評価を行った。興味深いこ

とに、インフルエンザウイルス感染マウスの呼吸器には感染の進行に伴って mtDNA が検出された。この mtDNA 漏出に先立って肺組織における有意な IFN- $\beta$  遺伝子の転写が認められ、mtDNA が検出される頃には格段に高いレベルの IFN- $\beta$  応答が引き起こされていた。mtDNA の流出には MAVS が必要であることを踏まえてこの結果を考察すると、細胞に侵入したインフルエンザウイルスがまず RIG-I/MAVS 経路依存的な IFN- $\beta$  遺伝子の転写を引き起こし、続いて細胞質中の mtDNA が DNA センサー依存的な IFN- $\beta$  応答を誘導することが、効果的な抗ウイルス応答の惹起に寄与していると考えられる。実際に cGAS または STING 欠損マウスにおいて、野生型と比較して感染 4 日目の肺組織における IFN- $\beta$  遺伝子の転写レベルが有意に低下していた。

また生体内ではインフルエンザウイルスの感染に対して、細胞質中 DNA センサーである absent in melanoma 2 (AIM2) が mtDNA を介した過剰な炎症に関与している可能性がある。過去の報告で、インフルエンザウイルスが細胞質中の二本鎖 DNA によって活性化する AIM2 inflammasome 依存的な炎症反応を引き起こし、病態を悪化させていることが知られていたが、そのリガンドは同定されていなかった<sup>74</sup>。おそらく細胞質中や細胞外に流出した mtDNA がこの AIM2 inflammasome の活性化を引き起こしていると推察される。以上のように、インフルエンザウイルス感染において、mtDNA による DNA 認識経路の活性化は RNA 認識経路と並んで抗ウイルス応答や炎症反応を引き起こす重要な分子機構であると考えられる。

### (3) インフルエンザウイルスによる DNA 認識機構阻害メカニズム

本研究において、インフルエンザウイルス NS1 タンパク質が mtDNA と相互作用することにより、cGAS 依存的な IFN- $\beta$  応答を阻害していることを明らかにした。また、NS1 タンパク質の RNA 結合ドメインが dsDNA 刺激による IFN- $\beta$  応答の阻害や、mtDNA との相互作用に必要であることも明らかとなった。NS1 タンパク質は cGAS と相互作用していなかったことや、先行研究において、RNA 結合ドメインを介して直接 dsDNA に結合していたことから<sup>75</sup>、NS1 タンパク質は直接 mtDNA と相互作用することによって、cGAS による mtDNA の認識を回避していると考えられる。

NS1 タンパク質による dsRNA と dsDNA の認識は共通のドメインを介して行われ<sup>75</sup>、NS1 タンパク質による dsRNA の認識は二量体化した RNA 結合ドメインを介して行われる<sup>76</sup>。NS1 タンパク質は非常に多岐にわたる機能を有し、その多機能性を可能にしているのは四次構造の立体配置的な可塑性である<sup>77</sup>。これらのことから、NS1 タンパク質二量体には立体配置的にある程度の自由度があり、DNA との結合能は NS1 タンパク質二量体構造の至適化により得られたものと推察される。

本研究の中で最も興味深かった現象のひとつは、 $\Delta$ NS1 ウイルスの感染細胞では細胞質中への大量の mtDNA の流出とともに高い IFN- $\beta$  応答が認められたことである。 $\Delta$ NS1 ウイルスは IFN を産生できない Vero 細胞において効率よく増殖するため<sup>45</sup>、



NS1 タンパク質による IFN- $\beta$  産生抑制効果はインフルエンザウイルスの増殖に極めて重要であると考えられている。従って、インフルエンザウイルスにとって IFN- $\beta$  産生抑制機能を獲得することは必然の生存戦略であったと考えられる。これまで、 $\Delta$  NS1 ウイルスが強く IFN- $\beta$  応答を誘導する主要な理由として NS1 タンパク質が多段階的にウイルスゲノム RNA 認識機構を阻害していることが挙げられていたが<sup>21,34,32</sup>、本研究結果から、NS1 タンパク質が mtDNA の認識を阻害していることもその一因として考えられた。また NS1 タンパク質はホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) を活性化することによりアポトーシスを抑制するため<sup>78</sup>、NS1 タンパク質が Bax を介した mtDNA 流出を抑制している可能性も考慮に入れるべきである。以上のように、NS1 タンパク質は従来から知られていた RNA 認識機構阻害メカニズムを巧みに利用して DNA 認識機構を阻害していると考えられる。

#### (4) 今後の展望

本研究で明らかにした、インフルエンザウイルス感染による mtDNA 放出という現象は、ウイルス感染で死にゆく宿主細胞が最後に発する危険シグナルと捉えることができる。なぜなら、細胞質中への mtDNA の放出を引き起こすインフルエンザウイルス側の因子である M2 イオンチャネルや PB1-F2 タンパク質はいずれもアポトーシスを誘導するため<sup>6,79</sup>、その細胞死の過程で mtDNA の放出が引き起こされていると考えられるからである。この細胞質中や細胞外へ放出された mtDNA は DNA センサー依存的な抗ウイルス応答の誘導を引き起こすと同時に、AIM2 inflammasome 依存的な肺組織の炎症を引き起こすことでインフルエンザの病原性に関与している可能性がある。そのため、インフルエンザウイルス感染による mtDNA の放出とそれに続く自然免疫応答活性化の生理学的意義の全貌を理解するためには今後のさらなる検討が必要である。

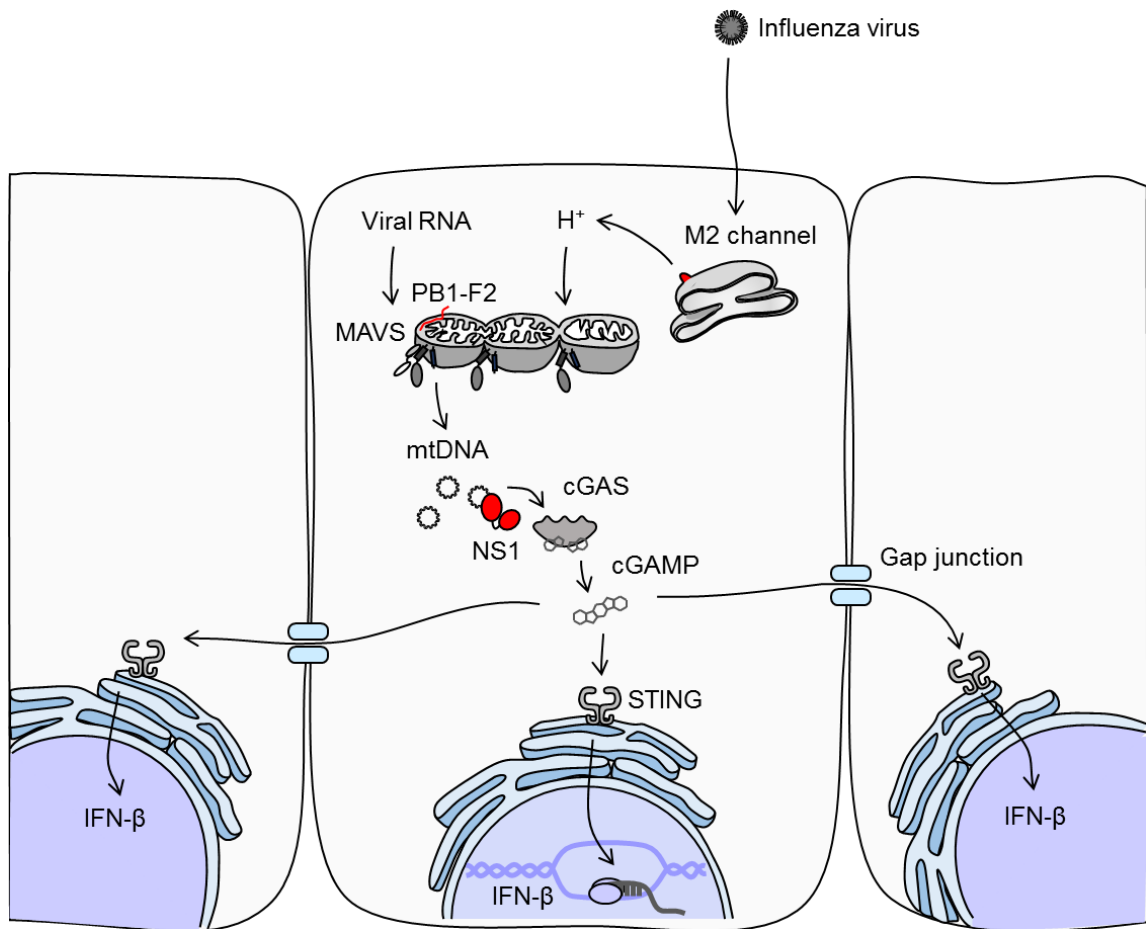


図 18. 本研究のまとめ

インフルエンザウイルスは M2 タンパク質の水素イオンチャネル活性や、PB1-F2 タンパク質とウイルス RNA の刺激によって MAVS 依存的に mtDNA を細胞質中へ放出させている。細胞質中に放出された mtDNA は cGAS/cGAMP/STING による DNA 認識機構依存的な IFN- $\beta$  産生を引き起こすと同時に、ギャップ結合を介して隣接した細胞の STING 依存的な IFN- $\beta$  産生を引き起こしている。この DNA 認識機構依存的な IFN- $\beta$  産生に対して、インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質は mtDNA と相互作用することにより、cGAS による認識を阻害している。

## 謝辞

本研究で組換えインフルエンザウイルスを作成するにあたってリバースジェネティクスの系を分与頂きました、東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス感染分野 河岡 義裕 教授に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたって、様々な面で多大なるご指導、ご支援を賜りました、東京大学医科学研究所 感染・免疫学部門 ウイルス病態制御分野 川口 寧 教授、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 准教授に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1 West, A. P. *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* **520**, 553-557, doi:10.1038/nature14156 (2015).
- 2 Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F. & Veit, M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* **8**, 1580-1591, doi:10.1080/21505594.2017.1365216 (2017).
- 3 Petrova, V. N. & Russell, C. A. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol* **16**, 60, doi:10.1038/nrmicro.2017.146 (2018).
- 4 Inglis, S. C., Barrett, T., Brown, C. M. & Almond, J. W. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3790-3794 (1979).
- 5 Lamb, R. A., Lai, C. J. & Choppin, P. W. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4170-4174 (1981).
- 6 Chen, W. S. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306-1312, doi:DOI 10.1038/nm1201-1306 (2001).
- 7 Yamayoshi, S., Watanabe, M., Goto, H. & Kawaoka, Y. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *Journal of Virology* **90**, 444-456, doi:10.1128/Jvi.02175-15 (2016).
- 8 Noda, T. Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol* **2**, 269, doi:10.3389/fmicb.2011.00269 (2011).
- 9 Shi, Y., Wu, Y., Zhang, W., Qi, J. & Gao, G. F. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol* **12**, 822-831, doi:10.1038/nrmicro3362 (2014).
- 10 Bui, M., Whittaker, G. & Helenius, A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* **70**, 8391-8401 (1996).
- 11 Blijleven, J. S., Boonstra, S., Onck, P. R., van der Giessen, E. & van Oijen, A. M. Mechanisms of influenza viral membrane fusion. *Semin Cell Dev Biol* **60**, 78-88, doi:10.1016/j.semcdb.2016.07.007 (2016).
- 12 Martin, K. & Helenius, A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**, 117-130 (1991).
- 13 Neumann, G., Hughes, M. T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with

- hCRM1. *EMBO J* **19**, 6751-6758, doi:10.1093/emboj/19.24.6751 (2000).
- 14 Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53 (2008).
- 15 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 16 Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. & Fitzgerald, K. A. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* **3**, 920-940, doi:10.3390/v3060920 (2011).
- 17 Iwasaki, A. & Pillai, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* **14**, 315-328, doi:10.1038/nri3665 (2014).
- 18 Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-5603, doi:10.1073/pnas.0400937101 (2004).
- 19 Asselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144-1150, doi:10.1038/ni736 (2001).
- 20 Hornung, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997, doi:10.1126/science.1132505 (2006).
- 21 Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001, doi:10.1126/science.1132998 (2006).
- 22 Rehwinkel, J. *et al.* RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* **140**, 397-408, doi:10.1016/j.cell.2010.01.020 (2010).
- 23 Gack, M. U. *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916-920, doi:10.1038/nature05732 (2007).
- 24 Sharma, S. *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151, doi:10.1126/science.1081315 (2003).
- 25 Fitzgerald, K. A. *et al.* IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-496, doi:10.1038/ni921 (2003).
- 26 Yoneyama, M. *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* **17**, 1087-1095, doi:10.1093/emboj/17.4.1087 (1998).
- 27 Ichinohe, T., Pang, I. K. & Iwasaki, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* **11**, 404-410, doi:10.1038/ni.1861 (2010).

- 28 Mangan, M. S. J. *et al.* Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 688, doi:10.1038/nrd.2018.149 (2018).
- 29 Holm, C. K. *et al.* Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nat Commun* **7**, 10680, doi:10.1038/ncomms10680 (2016).
- 30 Marc, D. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *Journal of General Virology* **95**, 2594-2611, doi:10.1099/vir.0.069542-0 (2014).
- 31 Hale, B. G., Randall, R. E., Ortin, J. & Jackson, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* **89**, 2359-2376, doi:10.1099/vir.0.2008/004606-0 (2008).
- 32 Min, J. Y. & Krug, R. M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7100-7105, doi:10.1073/pnas.0602184103 (2006).
- 33 Min, J. Y., Li, S., Sen, G. C. & Krug, R. M. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* **363**, 236-243, doi:10.1016/j.virol.2007.01.038 (2007).
- 34 Gack, M. U. *et al.* Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**, 439-449, doi:10.1016/j.chom.2009.04.006 (2009).
- 35 Cheong, W. C. *et al.* Influenza A Virus NS1 Protein Inhibits the NLRP3 Inflammasome. *PLoS One* **10**, e0126456, doi:10.1371/journal.pone.0126456 (2015).
- 36 Moriyama, M. *et al.* The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1beta Secretion. *J Virol* **90**, 4105-4114, doi:10.1128/JVI.00120-16 (2016).
- 37 Stasakova, J. *et al.* Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol* **86**, 185-195, doi:10.1099/vir.0.80422-0 (2005).
- 38 West, A. P. & Shadel, G. S. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol* **17**, 363-375, doi:10.1038/nri.2017.21 (2017).

- 39 White, M. J. *et al.* Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* **159**, 1549-1562, doi:10.1016/j.cell.2014.11.036 (2014).
- 40 Rongvaux, A. *et al.* Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* **159**, 1563-1577, doi:10.1016/j.cell.2014.11.037 (2014).
- 41 Gao, D. *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* **341**, 903-906, doi:10.1126/science.1240933 (2013).
- 42 Ablasser, A. *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380-384, doi:10.1038/nature12306 (2013).
- 43 Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674-678, doi:10.1038/nature07317 (2008).
- 44 Ichinohe, T., Lee, H. K., Ogura, Y., Flavell, R. & Iwasaki, A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* **206**, 79-87, doi:10.1084/jem.20081667 (2009).
- 45 Garcia-Sastre, A. *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-330 (1998).
- 46 Takeda, M. *et al.* Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* **79**, 14346-14354, doi:10.1128/JVI.79.22.14346-14354.2005 (2005).
- 47 Yasukawa, K. *et al.* Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* **2**, ra47, doi:10.1126/scisignal.2000287 (2009).
- 48 Yoshizumi, T. *et al.* Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* **5**, 4713, doi:10.1038/ncomms5713 (2014).
- 49 Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M. & Yanagi, Y. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *J Virol* **85**, 13019-13026, doi:10.1128/JVI.05942-11 (2011).
- 50 Neumann, G. *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9345-9350 (1999).
- 51 Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol* **76**, 1391-1399 (2002).



- 52 Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643, doi:10.1126/science.1087262 (2003).
- 53 Nakatsu, Y. *et al.* Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol* **82**, 8296-8306, doi:10.1128/JVI.00108-08 (2008).
- 54 Ito, M., Yanagi, Y. & Ichinohe, T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog* **8**, e1002857, doi:10.1371/journal.ppat.1002857 (2012).
- 55 Vaquero, E. C., Edderkaoui, M., Pandol, S. J., Gukovsky, I. & Gukovskaya, A. S. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **279**, 34643-34654, doi:10.1074/jbc.M400078200 (2004).
- 56 Patrushev, M. *et al.* Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell Mol Life Sci* **61**, 3100-3103, doi:10.1007/s00018-004-4424-1 (2004).
- 57 Sugrue, R. J. & Hay, A. J. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**, 617-624 (1991).
- 58 Stouffer, A. L. *et al.* Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* **451**, 596-599, doi:10.1038/nature06528 (2008).
- 59 Lubeck, M. D., Schulman, J. L. & Palese, P. Susceptibility of influenza A viruses to amantadine is influenced by the gene coding for M protein. *J Virol* **28**, 710-716 (1978).
- 60 Hay, A. J., Wolstenholme, A. J., Skehel, J. J. & Smith, M. H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* **4**, 3021-3024 (1985).
- 61 Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-1610, doi:10.1084/jem.20080091 (2008).
- 62 Ablasser, A. *et al.* Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* **503**, 530-534, doi:10.1038/nature12640 (2013).
- 63 Alam, T. I. *et al.* Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res* **31**, 1640-1645 (2003).

- 64 McArthur, K. *et al.* BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* **359**, doi:10.1126/science.aao6047 (2018).
- 65 Nakahira, K. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* **12**, 222-230, doi:10.1038/ni.1980 (2011).
- 66 Shimada, K. *et al.* Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36**, 401-414, doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009 (2012).
- 67 Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433-446, doi:10.1038/sj.emboj.7601963 (2008).
- 68 Beale, R. *et al.* A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* **15**, 239-247, doi:10.1016/j.chom.2014.01.006 (2014).
- 69 Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**, e4, doi:10.1371/journal.ppat.0010004 (2005).
- 70 Chattopadhyay, S. *et al.* Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J* **29**, 1762-1773, doi:10.1038/emboj.2010.50 (2010).
- 71 Aguirre, S. *et al.* Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* **2**, 17037, doi:10.1038/nmicrobiol.2017.37 (2017).
- 72 Sun, B. *et al.* Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci Rep* **7**, 3594, doi:10.1038/s41598-017-03932-1 (2017).
- 73 Stavrou, S., Aguilera, A. N., Blouch, K. & Ross, S. R. DDX41 Recognizes RNA/DNA Retroviral Reverse Transcripts and Is Critical for In Vivo Control of Murine Leukemia Virus Infection. *MBio* **9**, doi:10.1128/mBio.00923-18 (2018).
- 74 Zhang, H. *et al.* AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality. *J Immunol* **198**, 4383-4393, doi:10.4049/jimmunol.1600714 (2017).
- 75 Anastasina, M. *et al.* Influenza virus NS1 protein binds cellular DNA to block transcription of antiviral genes. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 1440-1448, doi:10.1016/j.bbagr.2016.09.005 (2016).
- 76 Wang, W. *et al.* RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic

- amino acids. *RNA* **5**, 195-205 (1999).
- 77 Hale, B. G. Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein. *J Gen Virol* **95**, 2099-2105, doi:10.1099/vir.0.066282-0 (2014).
- 78 Ehrhardt, C. *et al.* Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* **81**, 3058-3067, doi:10.1128/JVI.02082-06 (2007).
- 79 Gannage, M. *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* **6**, 367-380, doi:10.1016/j.chom.2009.09.005 (2009).