

## 【 論文の内容の要旨 】

論文題目 : Identification and Characterization of Virulence Determinants  
of the Japanese Encephalitis Virus

(日本脳炎ウイルスの病原性決定因子の同定および性状解析)

氏名 : 山口 幸恵

日本脳炎は、蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス(JEV)に感染することで引き起こされるウイルス感染症である。東アジアから東南アジア、南アジア地域に広く分布し、それらの地域における流行性脳炎の中で最も重要なものの一つである。JEV の感染は不顕性感染率が高く、発症するのは 100～1000 人に 1 人と推定されている。しかしながら、発症機構はいまだ明らかになっておらず、特異的な治療法はない。発症すれば致死率が 20～30%であり、回復したとしても約半数の患者は精神神経に後遺症を残す重篤な疾患である。治療法の開発のためにも、発症機構の解明が求められている。

JEV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される約 70 種のウイルスの一つで、直径約 50nm の球状エンベロープウイルスであり、約 11kb のプラス鎖 1 本鎖 RNA ゲノムを有する。ゲノムの翻訳領域には 3 種類の構造蛋白質(カプシド[C]、プレメンブレン[prM]、エンベロープ[E])と 7 種類の非構造蛋白質(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)がコードされている。遺伝子の塩基配列から JEV は 5 つの遺伝子型(I～V)に分類され、それらの遺伝子型の分布は地域によって異なる。日本に分布する JEV の遺伝子型は 1993 年頃以前ではほとんどが III 型であったが、1993 年頃から I 型へと変化した。

JEV は蚊の吸血によってヒトの体内に入り、上皮細胞に達した JEV が増殖し、リンパの流れを介して血中に入り、全身のリンパ組織や親和性がある組織へと感染・増殖し、脳組織へと達することで脳炎を引き起こすと考えられている。本研究では JEV による脳炎発症機構の一端を解き明かすことを目的とし、ウイルス増殖性および病原性を決定するウイルス側因子(アミノ酸部位)の同定および、その部位のアミノ酸置換がウイルス性状へ及ぼす影響を調べた。

ヒトにおける脳炎発症モデルとしてマウスが広く用いられており、JEV の腹腔接種によるウイ

ルス増殖はヒトと同様に末梢における増殖に引き続き、脳組織での増殖が確認できる。JEV の病原性は末梢における増殖と脳組織へと到達する能力(神経侵襲性)と、脳組織において感染・増殖し脳炎を引き起こす能力(神経毒性)の 2 つに分けられる。神経侵襲性はマウスモデルにおいて腹腔接種による致死率を基に、神経毒性は脳内接種による致死率を基に求められる。

フラビウウイルスの病原性の強弱は構造蛋白質の1つであるE蛋白質のアミノ酸配列に依存していることが知られており、E蛋白質のN末端から123番目のアミノ酸がJEV病原性の決定において重要な働きを担っていることが報告されている。多くのJEV株においてE蛋白質123番目のアミノ酸はセリン(Ser)であるが、強毒株で見られるアルギニン(Arg)に置換することでマウス病原性は増強する。しかしながら、野外分離株において123番目のアミノ酸がSerに次いで多いのはアスパラギン(Asn)であった。E蛋白質123番目のアミノ酸がAsnであることが病原性に影響しているのではないかと予想したが、123番目のアミノ酸がAsnである株についての性状解析がなされておらず、123番目のアミノ酸がSerからAsnに変異することの影響は不明のままであった。そこで第一章では、E蛋白質123番目のアミノ酸をSerからAsnに置換した組換えウイルスをリバーシジェネティクスにより作製し、123番目のアミノ酸AsnがJEVの病原性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

リバーシジェネティクスにより弱毒株Mie/41/2002株のE蛋白質のアミノ酸123番目をSerからAsnへと置換した組換えウイルスを作製し、培養細胞における増殖性とマウス病原性を調べた。培養細胞における増殖性は親株であるMie/41/2002株に対し、顕著な差は認められなかった。次いで組換えウイルスのマウス病原性を神経侵襲性と神経毒性に分けて調べた。神経侵襲性の確認実験において3回の独立する研究中1回で組換えウイルスの神経侵襲性が親株(Mie/41/2002株)のそれより増強されていたが、他の2回の実験では親株と大きな差は認められなかった。組換えウイルスの神経毒性も親株のそれと比較して有意な差は認められなかった。組換えウイルスの培養細胞における増殖性および神経毒性は123番目のアミノ酸にSerを持つ親株のそれと顕著な差は認められなかったが、神経侵襲性は僅かながらも増強していたことから、E蛋白質123番目のアミノ酸がSerである株に比べてAsnである株の神経侵襲性が強い可能性が示唆された。E蛋白質123番目のアミノ酸がAsnであるJEV株のヒトにおける病原性の強弱は不明のままだが、中国においてヒトへの感染と脳炎発症が確認されていることから、今後E蛋白質123番目のアミノ酸がAsnである株についてさらなる研究を続け、自然界における分布についてもさらに情報収集する必要があると考えられる。

第二章では、E蛋白質以外のウイルス側の病原性決定因子の同定を試みた。ここでは、第

一章で用いた弱毒株である Mie/41/2002 株と E 蛋白質のアミノ酸配列が同一であるにも関わらず強い病原性を示す Mie/40/2004 株に注目した。2 株はともに遺伝子型 I 型であるが、全塩基配列を比較したところ、7ヶ所のアミノ酸配列の差異が確認された。7つのアミノ酸の差異のうち1つは構造蛋白質の1つである C 蛋白質、残る6つは非構造蛋白質で確認され、NS3 蛋白質と NS4A 蛋白質でそれぞれ1つずつ、NS5 蛋白質で4つが見つかった。この7ヶ所の差異について他の弱毒株2株(遺伝子型 I 型)と合わせて比較検討した結果、NS4A 蛋白質で見つかった差異が Mie/41/2002 株と Mie/40/2004 株の病原性の違いを決定している可能性が示された。NS4A 蛋白質の N 末端から3番目のアミノ酸は Mie/41/2002 株を含む弱毒株が共通してバリン(Val)であったのに対して強毒株 Mie/40/2004 株はイソロイシン(Ile)であった。そこで弱毒株 Mie/41/2002 株の NS4A 蛋白質3番目のアミノ酸を Val から Ile に置換した組換えウイルスを作製し、本部位が病原性決定に関与するか調べた。加えて NS4A 蛋白質3番目のアミノ酸が Ile である JEV 株(3-Ile 型)の地理的および時間的分布について分子疫学的に解析した。

第一章と同様、リバーシジェネティクスを用いて弱毒株 Mie/41/2002 株の NS4A 蛋白質3番目のアミノ酸を Val から Ile へと置換した組換えウイルスを作製し、培養細胞における増殖性とマウス病原性を調べた。組換えウイルスの培養細胞における増殖性を親株 Mie/41/2002 株のそれと比較したところ、2株間で大きな差は認められなかった。次いで、マウス病原性を神経侵襲性と神経毒性に分けてそれぞれ調べた。組換えウイルスの神経侵襲性は親株のそれらに比べて増強されていたが、神経毒性の増強は認められなかった。これらの結果から、NS4A 蛋白質3番目のアミノ酸 Val が Ile に変異することは、マウス病原性、特に神経侵襲性を増強させると考えられ、NS4A 蛋白質が神経侵襲性決定に関与することが示唆された。

これまでに知られている 3-Ile 型 JEV は国内では Mie/40/2004 株のみであった。そこで、国内で分離された I 型 JEV 98 株について NS4A 蛋白質のアミノ酸配列を決定したところ Mie/40/2004 株以外に 19 株の 3-Ile 型の株が新たに確認された。Mie/40/2004 株を含めた 20 株の 3-Ile 型を NS4A 配列と E 配列について系統樹解析を行ったところ、1株を除き、19株が1つのクラスターを独立して形成していた。また、3-Ile 型の株が自然界において少数派ではあるが一定の割合で存在することが示された。Mie/40/2004 株以外の 3-Ile 型の株の性状解析は行われておらず、3-Ile 型の株の神経侵襲性についても調べた。3-Ile 型の株の多くは強い神経侵襲性を示したが、1株が Mie/41/2002 株と同程度の弱い神経侵襲性を示した。3-Ile 型でありながら神経侵襲性は弱毒型であった株のアミノ酸配列を Mie/40/2004 株のそれと比較したところ、E 蛋白質を含めてアミノ酸の差異が5か所あり、これらアミノ酸による影響が予想された。

このことから、NS4A 蛋白質の3番目のアミノ酸の神経侵襲性決定における役割は絶対的ではなく、E 蛋白質といった他の要因との複合的作用によって神経侵襲性が左右されることが示唆された。しかし、今回確認された 3-Ile 株の多くは強毒性を示したことから、今後は JEV の病原性解析において構造蛋白質だけでなく NS4A 蛋白質についても注目する必要があると考えられる。