

審査の結果の要旨

氏名 山口 幸恵

本研究はアジアにおいて流行性脳炎を引き起こす原因の中で最も重要なものの一つである日本脳炎を引き起こす日本脳炎ウイルス（JEV）の発症機構を明らかにするため、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を同定し、さらに同定された部位のアミノ酸置換がウイルス性状に与える影響を調べたものである。本研究から下記の結果を得ている。

1. エンベロープ（E）蛋白質は JEV 病原性の決定因子の一つであり、N 末端から 123 番目のアミノ酸が病原性決定において重要な役割を果たすことが 123 番目のアミノ酸をセリン（Ser）からアルギニン（Arg）に置換した組換えウイルスの病原性増強によって報告されている。しかし野外分離株の中では E 蛋白質 123 番目のアミノ酸が Arg である株よりもアスパラギン（Asn）である株が多く確認されていた。これらの株について性状解析がなされておらず、123 番目のアミノ酸が Asn へとなることの影響は不明であった。そこでリバースジェネティクスを用いて弱毒株 Mie/41/2002 株の E 蛋白質 123 番目のアミノ酸 Ser を Asn に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について調べたところ、親株と比べて有意な差は認められなかった。
2. 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のマウス病原性について神経侵襲性と神経毒性に分けて調べた。組換えウイルスの神経毒性は親株のそれと比べると有意な差は認められなかったが、神経侵襲性について調べたところ僅かながら増強していた。このことから、E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸 Asn は弱いながらも神経侵襲性に影響を与えることが示された。E 蛋白質 123 番目のアミノ酸が Asn である JEV 株のヒトへの病原性の強弱は不明ではあるが、今後も研究を進め、123 番目のアミノ酸が Asn である株の自然界における分布についても調べる必要があると考えられた。
3. 弱毒株 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、マウス病原性が高い強毒株 Mie/40/2004 株のアミノ酸配列を Mie/41/2002 株と比較

したところ、非構造蛋白質である NS4A 蛋白質の N 末端から 3 番目のアミノ酸に差異が認められた。この NS4A 蛋白質 3 番目のアミノ酸が強毒株 Mie/40/2004 株の高病原性決定に関与する可能性が示された。

4. 弱毒株 Mie/41/2002 株では NS4A 蛋白質 3 番目のアミノ酸がバリン (Val) であったのに対し、強毒株 Mie/40/2004 株ではイソロイシン (Ile) であった。そこで、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、培養細胞における増殖性および神経侵襲性・神経毒性について調べたところ神経侵襲性が親株に比べて増強しており、NS4A 蛋白質が JEV 病原性決定に関与することが示された。
5. 強毒株 Mie/40/2004 株のように NS4A 蛋白質 3 番目のアミノ酸が Ile である野外分離株について分子疫学的な解析を行ったところ、少数派ではあるが一定の割合で自然界において存在することが示された。また、神経侵襲性についても調べたところ多くの株は高い神経侵襲性を示したが、一部の株では低い神経侵襲性を示した。このことより、NS4A 蛋白質は絶対的な役割は持たないが、JEV 病原性の決定因子の一つであることが示された。今後、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ことが考えられた。

以上、本論文は JEV の構造蛋白質と非構造蛋白質において、リバーシジェネテイクスを用いて組換えウイルスを作製し、性状解析を行うことで、構造蛋白質の一つである E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸 Ser の Asn への変異がウイルス性状に与える影響を明らかにし、新たな JEV の病原性決定因子として非構造蛋白質の一つである NS4A 蛋白質を同定した。本研究はこれまで構造蛋白質の特定のアミノ酸配列に注目が集まっていた発症機構の解明に発症に大きく関わる因子の新たな働きおよび新たな因子を示すことで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。