

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590423

研究課題名（和文） 日本脳炎ウイルス NS4A による病原性誘導機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the role of Japanese encephalitis virus NS4A protein in its pathogenicity

研究代表者

田島 茂 (TAJIMA SHIGERU)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：60311346

研究成果の概要（和文）：1）日本脳炎ウイルス NS4A の 3 番目のアミノ酸がイソロイシンである強毒株は神経浸潤毒性が高いことが示唆された。2）国内で分離された日本脳炎ウイルスの約 20% がイソロイシン型であったが、その中には強毒でない株も見つかった。3）日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸をセリンからアスパラギンに置換してもウイルス性状にはほとんど影響はなかった。4）日本脳炎ウイルスの 3' 非翻訳領域可変領域の短い欠失はウイルス性状に影響しないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study we showed that 1) Japanese encephalitis virus (JEV) with a 3-Ile residue in NS4A protein exhibits higher neuroinvasiveness than JEV with 3-Val in the protein, 2) approximately 20% of the JEV isolates in Japan have 3-Ile residue in NS4A, and in the 3-Ile group we found a strain with significantly weaker virulence as compared with the other 3-Ile strains, 3) a Ser-to-Asn substitution at position 123 in the JEV E protein has weak impact on viral growth properties in vitro or on pathogenicity in vivo, 4) the short VR in JEV 3' non-translated region do not affect its growth in vitro or its pathogenicity in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	800,000	0	800,000
2012 年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：日本脳炎ウイルス、NS4A、病原性

1. 研究開始当初の背景

国内の日本脳炎患者数はワクチンの普及により現在は年間数人程度である。しかし未だウイルスは常在しており、発症リスクは依

然として消えていない。国外をみると、中国、インド、東南アジアでは多くの患者および死者が発生している。

我々はこれまでに国内で分離された日本

脳炎ウイルスの病原性解析を続けてきたが、分離株の中に有意に病原性の高いものを1株見出した。しかしこの病原性の違いは何に起因するのかわかりませんでした。そこで病原性の高いウイルスと弱いウイルスとで、ゲノム塩基配列を比較したところ、非構造蛋白質の1つであるNS4A遺伝子の3番目のアミノ酸部位に差異があり、さらにその違いによりアミノ酸配列も異なることがわかった(弱毒株がバリンで強毒株がイソロイシン)。しかしこの解析からだけでは、病原性の差異との関連性を証明することはできない。そこで我々は、これまでに確立した日本脳炎ウイルスのリバースジェネティクス法を活用し、バリンからイソロイシンに置換することにより強毒になることを証明した。しかし、この毒性の違いが神経毒性の違いによるのかそれとも神経浸潤毒性の違いによるのか、また野外株でどの程度イソロイシン型が蔓延しているのか、さらにはイソロイシン型株すべてが強毒型なのかなど未解明の事柄が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 日本脳炎ウイルスNS4Aの3番目のアミノ酸による病原性の差異が、神経毒性あるいは神経浸潤毒性の違いによるものなのかをマウスへのウイルス接種方法を検討することにより調べた。

(2) 国内の日本脳炎ウイルス分離株についての網羅的な分子疫学的解析を行い、強毒型アミノ酸(イソロイシン型)を有する分離株の蔓延状況を調べた。また新たなイソロイシン型の分離株についてその培養細胞中での増殖性およびマウスに対する病原性を調べた。

(3) 上記の分離株の分子疫学的解析を行う過程で、我々が以前同定したエンベロープ

(E)蛋白質上の病原性決定部位(E123)にこれまでと異なる種類のアミノ酸残基を有する株を見出した。そこでこのアミノ酸残基が病原性に与える影響を同じくリバースジェネティクス法を用いて解析した。

(4) 近年の分離株のゲノム解析から、3'非翻訳領域に欠失のある分離株が複数見出された。ウイルス増殖や病原性にこの欠失が影響するのかわかるため、同様にリバースジェネティクス法により変異ウイルスを作製し性状解析を行った。

3. 研究の方法

ウイルス蛋白質中の特定のアミノ酸の差異および特定の塩基配列欠失だけの効果を調べるため、すでに我々が確立していた日本脳炎ウイルスのリバースジェネティクス法を用いた。強毒型組換え日本脳炎ウイルスクローン(プラスミド)である

rJEV-Mie41/pMW119のNS4A遺伝子およびE遺伝子にアミノ酸置換を伴う点変異を導入した。導入したクローンより完全長組換えウイルスRNAを合成し、これをVero細胞にトランスフェクトすることにより変異型組換え日本脳炎ウイルスを得た。得られた変異ウイルスを各種培養細胞に感染させウイルスの増殖能を調べた。さらにウイルスをマウス(C3H/He系統あるいはddY系統)に腹腔接種あるいは脳内接種し、ウイルス間で病原性を比較した。所属研究所で保存されている近年分離された日本脳炎ウイルス98株について、NS4A領域およびE領域の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。これらの分離株より、NS4A配列が強毒株と一致する株を選択し、マウスに腹腔接種し病原性の強弱を調べた。

4. 研究成果

(1) NS4Aの3番目のアミノ酸がバリンである弱毒型日本脳炎ウイルスMie/41/2002株と、この部位のみをイソロイシンに置換した強毒株(rJEV(M41)NS4A^{V31}株)をマウスに脳内接種した。腹腔接種の時と異なり、投与量に関係なく両者で有意な差異は認められなかった。これよりNS4Aの3番目のアミノ酸の違いによる病原性の差異は、神経毒性ではなく、神経浸潤毒性である可能性が示唆された。

(2) NS4Aの3番目のアミノ酸がイソロイシンである株がどの程度国内で蔓延しているかを調べるため、近年分離された日本脳炎ウイルス98株について、NS4A領域とE領域の塩基配列を決定した。20株がイソロイシン型であり残り78株はすべてバリン型であった。分子系統樹解析において、1株を除きイソロイシン型は同一のサブクラスタを形成した。イソロイシン型は中国でも4株報告されており、そのうちの1株は患者から分離されたものであった。イソロイシン型の分離株5株を選び出し、ヒトや蚊由来培養細胞中での増殖能を調べたが、株間で明らかな差異は認められなかった。一方これら5株をマウス腹腔に接種し経過観察したところ、4株はイソロイシン型強毒株と類似した生存曲線を示したが、1株(Mie51株)はバリン型弱毒株と類似した生存曲線を示した。解析に使用したウイルスの全塩基配列を決定し、株間で比較したところ、Mie51株はE配列に2ヶ所、NS4B領域に1ヶ所、NS5領域に2ヶ所計5ヶ所が他のイソロイシン株と異なっていることが明らかとなった。今後はどの部位が弱病原性に関わっているのかわかるかを調べてゆく予定である。

(3) 以前に我々は日本脳炎ウイルスE蛋白質の123番目がセリンからアルギニンへ置換することによりマウスに対する病原性が顕著に上昇することを見出した(Tajima et al.

2010)。一方 (2) の分子疫学的を解析する過程で、この部位がアスパラギンである分離株を見出した。しかしアスパラギンである場合の病原性の強弱については全く不明であった。そこでリバーシジェネティクス法によりこの部位のみをセリン (Mie/41/2002 株) からアスパラギンに置換した組換えウイルスを作製し、各種培養細胞での増殖性およびマウスに対する病原性 (神経浸潤毒性および神経毒性) を調べた。in vitro での増殖性はセリンの場合と変わらなかった。またマウス病原性もセリンの株と同等であった。これよりアスパラギンとセリンとで、ウイルス性状に有意な差異は無いことが示された。

(4) リバーシジェネティクス法により、日本脳炎ウイルス (Mie/41/2002 株) の 3' 非翻訳領域の可変領域に、野外株で稀に観察される欠失と同様の欠失を導入し、得られた組換えウイルスの増殖能およびマウスに対する病原性を調べた。しかし各種培養細胞中での増殖能およびマウスに対する病原性に有意な差異は認められなかった。以上より、野外株にみられる欠失はウイルス性状にほとんど影響しないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *Journal of General Virology* 94: 90-96, 2013.

(2) Kato, F., Kotaki, A., Yamaguchi, Y., Shiba, H., Hosono, K., Harada, S., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T., and Tajima, S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* 44: 191-197, 2012.

(3) 白鳥 (田島) 茂, 高崎智彦。「日本脳炎ワクチンの品質管理」臨床とウイルス 第 40 巻第 5 号: 297-305, 2012.

(4) Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Tajima, S., Nerome, R., Kato, F., Watanabe, H., Takasaki, T., and Kurane, I. An amino acid substitution (V3I) in the Japanese encephalitis virus NS4A protein increases its virulence in mice, but not its growth rate in vitro. *Journal of General Virology* 92: 1601-1606, 2011.

(5) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane,

I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by the additional mutations in the NS4B. *Archives of Virology* 156: 63-69, 2011.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 田島茂, 日本脳炎ウイルス NS4A の分子疫学的解析, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13 日, 大阪府飯大阪市.

(2) 田島茂, デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析, 第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2012 年 11 月 12 日, 大阪府大阪市.

(3) 田島茂, 非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析, 第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2012 年 5 月 25 日, 熊本県阿蘇市.

(4) Yamaguchi Y., Effect of a single amino acid substitution (S123N) of the Japanese encephalitis virus E protein on its growth in vitro., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sept. 15 2011, Sapporo, Hokkaido.

(5) 小滝徹, 日本脳炎ウイルス国内分離株の遺伝子解析 (2005-2009), 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日, 徳島県徳島市.

(6) 山口幸恵, ウイルス性状における日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 1 アミノ酸置換の影響, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日, 徳島県徳島市.

(7) 加藤文博, フラビウイルスレポーターレプリコンの構築, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日, 徳島県徳島市.

(8) 田島茂, In vitro におけるデング 1 型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖性および感染細胞側応答の比較, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 7 日, 徳島県徳島市.

(9) Tajima S., Effects of single amino acid substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein on its growth rate in vitro and pathogenicity in mice. 1st Asia-Pacific Workshop on Neurovirology, July 16 2010, Seoul, South Korea.

(10) 山口幸恵, 日本脳炎ウイルス E 蛋白質の 1 アミノ酸置換 (S123N) がウイルス増殖に及ぼす影響, 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2010 年 5 月 28 日, 東京.

(11) 加藤文博, 3' NTR 内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体の in vitro における増殖性および病原性解析, 第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2010 年 5 月 28 日,

東京.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 茂 (TAJIMA SHIGERU)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任
研究官

研究者番号：60311346