

高松 由基 論文内容の要旨

主 論 文

NS1' protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs

(日本脳炎ウイルスの NS1' タンパク質はトリ細胞でのウイルス産生を促進する)

高松 由基、岡本 健太、Dinh Tuan Duc、余 福勲、早坂 大輔、
内田 玲麻、鍋島 武、Corazon C Buerano、森田 公一

(Journal of General Virology 2014 掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田 公一 教授)

【緒 言】

ウイルス遺伝子のフレームシフトは、ウイルスタンパク質発現量の制御や多様なウイルスタンパク質の産生に関与している。近年、日本脳炎ウイルス (JEV) において、非構造タンパク質の 1 つである NS1 タンパク質の変異体である NS1 prime (NS1') が、特異的な RNA 配列と高次構造に誘導され、リボソームフレームシフトにより発現することが報告された (Melian, *et al.* 2010)。NS1' はフラビウイルスの中でも脳炎を発症する JEV ならびに JEV 近縁のウエストナイル熱ウイルスなどに特異的に発現していることが確認されている。しかし、NS1' の分子機能は解明されておらず、病原性との関わりも不明である。本研究では、日本脳炎ウイルス感染性 cDNA クローンを用いて、NS1' の分子機能を解明し、ウイルスの増殖特性、病原性、宿主特異性との関連を明らかにする事を目的とした。

【対象と方法】

2 つの日本脳炎ウイルス株、JaTH160 株 (NS1' 産生株) と JaOArS982 変異株 (NS1' 非産生株) の感染性 cDNA クローンを構築した。ウイルス遺伝子全長を 3-4 領域に分けて cDNA を合成してプラスミドに導入し、サブクローニングした。それらを順次つなぎ合わせて SP6 プロモーターとともに pMW119 ベクターに組み込み、遺伝子全長を有する感染性クローンとした。その後、精製したプラスミドからウイルス RNA を転写し、電気穿孔法で培養細胞に導入・培養し培養上清から感染性ウイルス (JaTH-IC、S982-IC) を回収した。また、ウイルス変異体の作製は、感染性クロンプラスミド

に部位特異的変異導入法を用いて変異体感染性クローンを構築し、前述の手法により変異体ウイルスを回収した。それぞれの人為的に作成したクローンウイルスはハムスター、サル、ブタ、トリ培養細胞（BHK, Vero, PS, DF-1）に感染させ、増殖性を比較した。さらに、孵化鶏卵に接種してトリ胚におけるウイルス増殖を検証した。NS1'タンパク質に対する特異抗体（抗NS1'特異抗体）はNS1'のC末端にある特異的アミノ酸配列を大腸菌で発現させ精製したペプチドをマウスに免疫することで作成し、ウイルス感染細胞を免疫染色してNS1'の発現と細胞内局在、その他のウイルスタンパク質との共局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞中のウイルスRNA量はリアルタイムRT-PCR法を用いて定量・比較した。

【結 果】

1. クローンウイルス S982-IC は NS1 のみ、JaTH-IC は NS1 と NS1' を発現していた。
2. 上記二株のゲノム塩基配列では NS2A 遺伝子の 67 番塩基に差異（前者は A、後者は G）がみられた。この変異によりウイルス RNA の高次構造が変化し、リボソームフレームシフトが誘導されることが予想された。
3. それぞれのクローンウイルスの NS2A 遺伝子の 67 番塩基を相手側の塩基に置換することで、NS1' 発現のオン・オフが逆転した。
4. NS1' 発現ウイルスを培養細胞に感染させると、トリ由来 DF-1 細胞で特異的に NS1' の発現量の増加が見られ顕著なウイルス量、ウイルス RNA 合成の増加が観察された。
5. NS1' 発現株と非発現株を DF-1 細胞に同時に感染させると NS1' 発現株は競合において顕著な優位性をしめした。
6. 孵化鶏卵における感染実験では、NS1' 発現株が、高いウイルス増殖性と致死率を示した。
7. ウイルス感染 DF-1 細胞では、ウイルス RNA 合成酵素である NS5 と NS1' は共局在しており、他の細胞と比較してその共局在率は有意に高かった。

【考 察】

NS1' は、病原性への関与が示唆されているが、幅広い JEV の宿主に対する機能は報告されていなかった。本研究では、JEV の待機宿主として重要な鳥類において、NS1' がウイルス増殖性に重要な役割をになうことが示された。トリは自然界における JEV の感染環の重要なメンバーと考えられているが今回の研究結果は、自然界で分離される日本脳炎ウイルスの 99% 以上が NS1' を発現していることと合致している。

また、NS1' と NS5 が感染細胞内において共局在していることから、NS1' が JEV の遺伝子複製に関与し replication complex として RNA 複製を亢進することで、トリ細胞におけるウイルス量の増加をもたらすと考えられた。

今後、NS1' の研究を通し、JEV 株の宿主特異性におけるさらに詳細な分子基盤、病原性発現の分子機構を詳細に解明することが期待される。