

**【目的】** フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどが属する。ジカ熱の世界的流行、デング熱の国内発生、ダニ媒介性脳炎による国内死亡例が報告されていることから、公衆衛生危機管理上重要な疾病の病原体である。現在までに有効な抗ウイルス薬はなく、対症療法しかない。また、ワクチンが実用化されていないフラビウイルス感染症が多数ある。その理由は現行の動物モデルが不十分で、病態の分子メカニズムが不明であるからである。これまでにマウスの自然免疫系の遺伝子に変異していることが、一般的な実験用マウスでの病態解析を困難にさせる一因と考えられている。一方で、自然免疫系の遺伝子を欠損したマウスの培養細胞でのフラビウイルスの増殖性も、ヒトの細胞と比較して著しく劣っていることがこれまでにわかっている。従って、本研究はマウスにおけるフラビウイルスの増殖に関与する新たな宿主因子の同定を目指し、企図された。

**【方法】** まず、ウイルス感染細胞を分取し、単離することを可能とする各種フラビウイルスのレポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスを作製する。次に、マウスの遺伝子を網羅する cDNA ライブラリーを用いて CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子転写活性化 (CRISPRa) ライブラリーを構築する。ライブラリーをコードするレンチウイルスを作製し、マウスの培養細胞に感染させることでそれに安定的に発現させる。レポーター搭載フラビウイルスを感染させ、発光するウイルス感染細胞を分取し、単離することで、宿主遺伝子を同定する。さらに同定した宿主因子の機能を解析する。

**【結果】** これまでに報告のある様々な種類の色の併せて 9 種類の蛍光タンパク質を各々搭載した組換え日本脳炎ウイルスの作製を試みた。その結果、その全てで自立増殖することができる組換えレポーターウイルスを得ることができた。次にレポーター遺伝子がウイルス遺伝子に安定して維持されるか否かを検証した。その結果、9 種類のうち、2 種類のみウイルスを 5 回連続継代してもレポーター遺伝子が維持されていた。さらに、作製した組換えウイルスをマウスに接種して、その増殖性を解析した。その結果、レポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスの増殖性は親株と比較して著しく低下していた。そのため、スプリット型蛍光タンパク質の実験系を取り入れることで、親株と同等に増殖するレポーター遺伝子を搭載したフラビウイルスの作製に成功した。現在、マウスの遺伝子を網羅的に発現する CRISPRa ライブラリーをもとに、蛍光色にてウイルス感染細胞を単離するスクリーニング実験を実施している。

本研究の背景と展開

