

2. ウエストナイルウイルスの脳炎病態の形成機構の解明

小林 進太郎

北海道大学大学院獣医学研究院 獣医学部門 衛生学分野 公衆衛生学教室

ヒトやウマなどに重篤な脳炎を惹起するウエストナイルウイルスは、神経細胞に感染し、細胞死を誘導する。ウイルス感染による神経細胞死は、様々な炎症反応の誘導につながることから、神経細胞死の分子機構を明らかにすることは、未だ開発されていないウエストナイル脳炎の特異的な治療法の開発のために重要である。本項では、ウエストナイルウイルスに感染した神経細胞の病理学的変化について解析し、その発生機序と脳炎病態の形成との関連についての知見を紹介する。

1. はじめに

ウエストナイルウイルス (WNV) はフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスで、同属のウイルスにはデングウイルス、ジカウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルスなどが含まれる。WNV はプラス鎖一本鎖の RNA をゲノムとして保有するウイルスであり、ゲノムは約 11 kb である。ウイルスゲノムは一つの ORF をコードしており、転写・翻訳された一つのタンパク質は、宿主およびウイルスのプロテアーゼにより、Capsid (C), premembrane (prM), Envelope (E) タンパク質の 3 つの構造タンパク質と、NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 の 7 つの非構造タンパク質へと切断される¹⁾。WNV はウイルスゲノムを用いた系統解析による分類から、少なくとも 5 つの系統 (lineage) に分類され^{2,3)}、ヒトに病原性を示し、アフリカ、西アジア、ヨーロッパ、アメリカなどで分離される株の大部分と、オーストラリアに存在するクンジンウイルスは lineage 1 に分類される。

WNV は自然界では蚊と鳥類の間で感染環が形成されている。ウイルスの増幅動物はカラスやスズメなどの鳥類であり、流行における主な媒介蚊はイエカ (*Culex*) 類である。

ウイルスを保有する蚊の吸血により、ヒトやウマなどの哺乳動物は感染するが、血液中のウイルス量は比較的 low、感染源とならない終末宿主であると考えられている⁴⁾。WNV に感染すると、発熱や頭痛、筋肉痛、倦怠感などの症状が起こり、感染者の 150 人に 1 人の割合で、激しい頭痛や高熱を伴う脳炎や髄膜炎の重篤な症状を示す^{5,6)}。これらの重篤な症状を示した場合は死に至るケースも報告されており、その致死率は 3-15% とされる。現在までに WNV に対してヒトで使用可能なワクチンおよび、感染によって起こる脳炎や髄膜炎などに対する特異的な治療法は存在せず、これらの開発が望まれている。

2. WNV 感染による神経細胞の病理学的変化

WNV はヒトやウマなどの終末宿主の体内に侵入すると、皮膚などの局所組織または局所リンパ節で増殖し、一次ウイルス血症を起こす。その後、ウイルスは全身の細網内皮系細胞に感染、増殖し、二次ウイルス血症を起こし、血行性に中枢神経組織に到達し、脳炎病態を形成する⁶⁾。ヒトにおける WNV 感染症の病理組織学的所見は実験動物における所見と一致しており、神経細胞死、神経食現象 (neuronophagia)、ミクログリアやマクロファージの浸潤、主にリンパ球から構成される血管周囲性細胞浸潤などを伴った非化膿性脳炎を示す⁷⁾。これらの動物において WNV は主に神経細胞に感染し、細胞変性および細胞死を誘導する。WNV 感染による神経細胞の変性および死は、脳内における様々な炎症反応の誘導につながる考えられており⁸⁾、発生機序を明らかにすることは重要である。

WNV の感染によって神経細胞に起こる変化を明らかにするために、WNV 感染マウスモデルを構築し、ウイルスが感染している神経細胞について、免疫組織学的手法を用

連絡先

〒060-0818

北海道札幌市北区北 18 条西 9 丁目

北海道大学大学院獣医学研究院 公衆衛生学教室

TEL: 011-706-5213

FAX: 011-706-5213

E-mail: shin-kobayashi@vetmed.hokudai.ac.jp

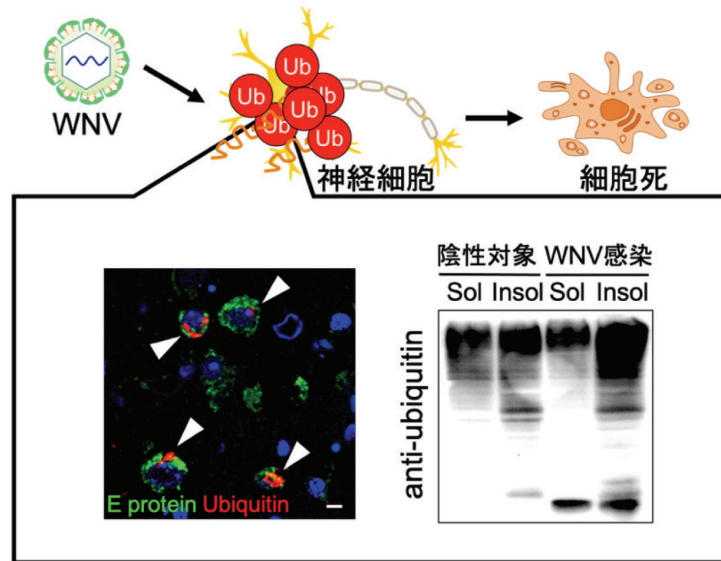


図1 WNV感染によるユビキチン化タンパク質の蓄積

WNVを接種したマウスの脳組織を用いた免疫組織蛍光染色（左）では、ウイルス抗原陽性細胞（緑）においてユビキチン化タンパク質の蓄積（赤）が認められる。Scale bar = 5 μ m。また、脳組織を用いたイムノブロット（右）により、WNVの感染でTritonX-100不溶性分画（Insol）においてユビキチン化タンパク質の蓄積が認められる。

いて詳細に解析した結果、WNV感染神経細胞においてTriton X-100に不溶性のユビキチン化されたタンパク質が蓄積することが明らかになった⁹⁾（図1）。不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積は、神経細胞死が病態形成の中心となるアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS）などの神経変性疾患の神経細胞に特徴的に観察される病理組織像である¹⁰⁻¹²⁾。神経変性疾患において、不溶性ユビキチン化タンパク質の蓄積は細胞内のタンパク質品質管理機構の異常との関連が数多く報告されていることから¹³⁻¹⁷⁾、WNV感染による神経細胞の傷害機構においてもタンパク質品質管理機構との関連が示唆され、以降の研究でその関連について解析した。

3. タンパク質輸送機構とWNVの増殖の関連

宿主の膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体上のリボソームで合成され、小胞輸送などの細胞内タンパク質輸送機構により適切な部位に輸送される。WNVは小胞体において、ウイルスタンパク質の合成やウイルスゲノムの複製を行い、ウイルス粒子を形成し、小胞体内腔に出芽する^{4, 18)}。出芽したウイルス粒子は宿主細胞の細胞内タンパク質輸送機構を利用することで細胞外に放出される^{19, 20)}。

小胞の出芽、輸送、融合の各ステップはRasスーパーファミリーに属する低分子量Gタンパク質であるRabタンパク質により制御されており、その制御機構を明らかにすることは細胞内のタンパク質の小胞輸送機構の理解につながる²¹⁻²³⁾。WNV粒子の小胞体から細胞膜までの輸送の分子

メカニズムを解明するために、小胞体から細胞膜までの小胞輸送に与与することが示唆されている18種類のRabタンパク質の発現をsiRNAで抑制した細胞を用いて、WNV粒子の細胞外への放出を評価した。フラビウイルスゲノムの全長から構造タンパク質領域の大部分を欠損させ、同部位にレポータータンパク質の配列を組込んだレプリコンを発現するプラスミドと構造タンパク質発現プラスミドを、哺乳動物細胞に共に導入することで一回のみ感染することが可能なウイルス様粒子（single-round infectious particles: SRIPs）が産生される²⁴⁻²⁶⁾。WNVのウイルス粒子の形成から細胞外への放出過程のみに関与するRabタンパク質を特定するために、Rabタンパク質の発現を抑制した細胞に、レプリコン発現プラスミドと構造タンパク質発現プラスミドを導入し、細胞上清中に放出されるSRIPsの量をレポータータンパク質の発現を観察することで解析した。その結果、Rab8bの発現を抑制した細胞の上清に含まれるSRIPsの量はコントロールと比較して、有意に減少していた。Rab8bとWNVの感染の関連について解析すると、感染細胞では非感染細胞と比較してRab8の発現が増加し、Rab8とウイルス抗原が細胞膜付近で共局在することが明らかになった。また、Rab8b欠損細胞では野生型細胞と比較して細胞外のウイルス量の減少と細胞内のウイルス抗原の蓄積が認められ、ウイルス抗原はRab11陽性のリサイクリングエンドソームに局在することが明らかになった。続いて電子顕微鏡を用いて解析し、WNVに感染したRab8b欠損細胞内では野生型細胞と比較して、多くのウ

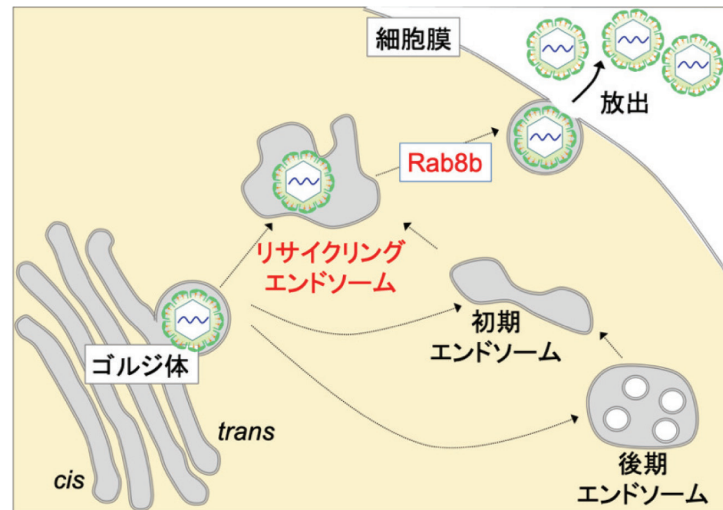


図2 WNVの細胞外への放出の模式図

WNV粒子はゴルジ体からリサイクリングエンドソームを経由して、Rab8bの作用により細胞外に放出される。

ウイルス粒子を含む小胞が多数認められ、Rab8bの欠損によりウイルス粒子の小胞輸送が妨げられ、細胞内に蓄積することが示唆された。以上の結果から、WNVはタンパク質の細胞内輸送に重要な小胞輸送機構によりリサイクリングエンドソームを経由して、Rab8bの作用により細胞外に放出されることが明らかになった²⁷⁾ (図2)。

4. オートファジーによるWNVの増殖への影響

細胞質中のタンパク質などをリソソームに運搬、分解するオートファジーは様々なウイルス感染で誘導され、ウイルスの増殖に影響を与えることが知られている²⁸⁻³³⁾。WNVを感染させた神経系培養細胞では、感染初期においてオートファジーのマーカーであるLC3 type 2 (LC3-II)の発現が上昇した。また、オートファジーの必須因子であるAtg5を欠損させた細胞では野生型細胞と比較してウイルスの増殖が亢進したことから、オートファジーはWNVの感染により誘導され、WNVの増殖を抑制することが明らかになった。

続いて、オートファジーによって影響を受けるWNVの増殖過程について解析した。オートファジー誘導ペプチドであるTat-beclin1をウイルス感染前に処理してもWNVの増殖に影響は認められなかったが、ウイルス感染後3時間から処理すると、ウイルスの増殖が抑制された。WNVは感染後3時間でウイルスゲノムの複製が認められることから、オートファジーはWNVの侵入過程には影響せず、細胞内へのウイルスゲノムの放出以降の過程に作用することが示唆された。さらに、感染細胞でウイルスタンパク質の合成およびゲノムの複製によりGFPを発現する一回感染性ウイルス様粒子(GFP-SRIPs)をAtg5欠損細胞に接種したところ、野生型細胞と比較してGFP陽性細胞数お

よびウイルスゲノム量の上昇が認められた。これらの結果により、オートファジーがWNVのウイルスタンパク質の合成およびゲノムの複製過程を抑制することが示唆された。

以上の結果をまとめると、オートファジーはWNV感染により誘導され、ウイルスタンパク質の合成およびゲノムの複製を抑制することで、WNVの増殖を抑制することが明らかになった³⁴⁾。しかし、WNV感染によるオートファジーの誘導は、ウイルス感染24時間後ではほとんど認められなかったことから、WNV感染ではオートファジー誘導を阻害する機構が存在することが示唆された。

5. WNV感染によるオートファジーの抑制

これまでの知見から、WNV感染神経細胞で認められる不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積は、神経細胞死および脳炎病態の形成において重要であることが示唆された^{9, 10)}。不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するウイルスタンパク質を特定するために、C, prME, 非構造タンパク質をそれぞれ発現させた細胞を用いて解析した結果、Cタンパク質の発現細胞においてユビキチン化タンパク質が蓄積することが明らかになった。一方、ユビキチン化タンパク質の蓄積は、WNVと同じフラビウイルス属の日本脳炎ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスのCタンパク質発現細胞では認められなかった。ユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するアミノ酸を特定するために、これらのウイルス間でCタンパク質の配列を比較解析し、WNVのCタンパク質のアミノ酸の51番目のLeuと52番目のAlaがユビキチン化タンパク質の蓄積に重要であることが明らかになった。

ユビキチン化タンパク質の細胞内蓄積は、プロテアソー

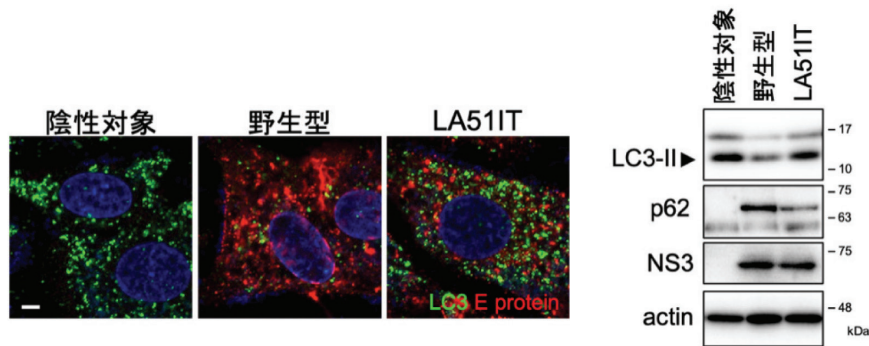


図3 WNV感染によるオートファジーの抑制

野生型のWNV感染細胞では陰性対象やLA51IT感染細胞に比較してLC3(緑)のドット上の蓄積が減少する(左)。Scale bar = 5 μm また、免疫ブロットによる解析(右)では、野生型感染細胞ではLC3-IIの発現量が減少し、オートファジー分解器質であるp62の蓄積が認められる。

ムやオートファジーなどの細胞内タンパク質分解機構の阻害により惹起されることが報告されている^{35, 36}。WNV感染によるユビキチン化タンパク質の蓄積機構を明らかにするために、哺乳動物細胞の相同組換え機構を利用することにより、相同配列を持つ複数の配列に分割したウイルスゲノムから組換えWNVを再構築する実験系を確立し³⁷、WNVのCタンパク質の51番目のLeuと52番目のAlaに変異を導入した組換えWNV(LA51IT)を作出した。LA51IT感染細胞では野生型WNV感染細胞と比較してユビキチン化タンパク質の蓄積が少なく、死細胞数も有意に減少したことから、これらのアミノ酸がWNV感染によるユビキチン化タンパク質の蓄積および細胞死の誘導に重要であることが明らかになった。これらのウイルスを感染させた細胞では、プロテアソームの抑制によって検出されるタンパク質は検出されなかった。一方、野生型WNVを感染させた細胞ではオートファジーのマーカーであるLC3-IIの発現量の低下、分解基質であるp62の蓄積が認められ、LA51IT感染細胞では認められなかった(図3)。以上の結果は、WNVはCタンパク質の51番目のLeuと52番目のAlaの作用により、オートファジーを抑制することを示している³⁸。

続いて、WNV感染で惹起される脳炎病態の形成とオートファジーの抑制によるユビキチン化タンパク質の蓄積の関連を明らかにするために、LA51ITを感染させたマウスモデルにおける脳炎病態の形成について病理組織学的に解析した。野生型を感染させたマウスと比較してLA51IT感染マウスでは、生存率が有意に上昇し、脳組織の変性神経細胞数およびユビキチン化タンパク質の蓄積の減少が認められた³⁸。

6. WNV感染によるオートファジーの抑制の分子機構

オートファジーの誘導は細胞のエネルギーセンサーであ

るAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)から下流のBeclin1-PI3KC3複合体にシグナルが伝わることで起こる³⁹。WNVの感染で起こるオートファジー抑制の分子機構を明らかにするために、WNV感染で影響を受けるオートファジー誘導シグナル因子の発現量を解析した結果、WNV感染細胞ではAMPKの発現が低下することが明らかになった。腫瘍細胞などで、AMPKはユビキチン-プロテアソームによって分解されることが報告されており⁴⁰、プロテアソーム阻害剤であるMG132での処理により、WNV感染細胞内にユビキチン化されたAMPKの蓄積が認められた。また、WNV感染細胞にAMPKを強制発現させると、WNV感染によるLC3-IIの発現量の回復が認められた。これらの結果により、WNV感染によりAMPKはユビキチン化され、プロテアソームで分解され、その結果、オートファジーの誘導が抑制されることが明らかになった。一方、AMPKのユビキチン化および分解はLA51IT感染細胞では認められず、WNV感染によるAMPKの分解へのCタンパク質の関与が示唆された。そこで、野生型またはLA51IT変異を有するCタンパク質を発現させた細胞を用いて、Cタンパク質とAMPKの結合をPull-downアッセイにより解析すると、AMPKは野生型のCタンパク質と結合し、LA51IT変異により結合が減少することが明らかになった。以上の結果から、WNV感染細胞では51番目のLeuと52番目のAlaの働きにより、Cタンパク質AMPKが結合し、AMPKのユビキチン化および分解が起こり、その結果、オートファジーが抑制されることが明らかになった³⁸。

7. おわりに

これまでの研究により、WNVの増殖や感染による病態形成に宿主のタンパク質品質管理機構が密接に関わることが明らかになってきた。その中で、タンパク質分解系の

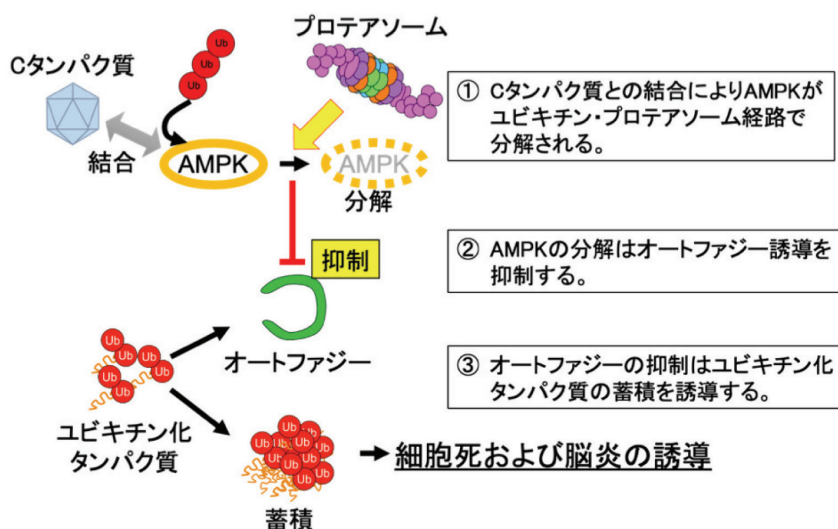


図4 WNV感染によるオートファジー抑制の分子機構の模式図

Cタンパク質と結合したAMPKはユビキチン・プロテアソームにより分解され、オートファジー誘導が抑制される。オートファジーの抑制はユビキチン化タンパク質の細胞内蓄積を誘導し、その結果、細胞死および脳炎が惹起される。

つであるオートファジーとWNV感染について着目すると、WNV感染の初期段階においてオートファジーは、ウイルスの増殖に対して抑制的に働くが、細胞内のCタンパク質の発現により、AMPKの分解およびオートファジーの抑制が起こることが明らかになった。オートファジーの抑制は神経細胞内のユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導し、その結果、神経細胞死および脳炎病態の形成へとつながると考えられた(図4)。WNV感染による神経細胞死および脳炎病態の形成は、ウイルスを排除しようとする宿主反応とその反応に対するウイルスの生存戦略の攻防の結果であると考えられた。

また、本稿で紹介したWNVの感染で認められるユビキチン化タンパク質の蓄積は、WNVの感染の維持や増殖に対する影響はほとんど認められなかった。従来WNVの神経病原性は、ウイルスの増殖性によって規定されると考えられていたが、それに加えて、「ウイルス因子による神経細胞の機能障害が病態形成に重要である」ことが明らかになり、ウイルス感染における脳炎病態形成に関する研究の新たな考え方になると考えている。さらに本研究で得られた結果は、WNV感染で認められた病理学的変化と同様の変化が観察されるALSなどの神経変性疾患の病態形成についても新しい示唆を与えるものである。このような小さな発見の積み重ねが、将来的にWNVの感染による病態形成の全容解明、さらには他の疾患の病態形成や、様々な生命現象の基礎的な基盤の構築につながることを期待している。

8. 謝辞

本稿で記載した研究は、私が2008年から北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所、分子病態・診断部門にて澤洋文教授の指導のもとで実施してきた研究を基礎として、2015年に着任した北海道大学大学院獣医学研究院、公衆衛生学教室にて荏和宏明教授のご支援を受けてまとめることができた研究です。一つの研究テーマを異なった研究室で継続して実施できたのは、理解ある指導者に恵まれたという幸運だけでなく、学生時代から長きに渡りご指導下さる澤先生、自由な研究を許していただける荏和先生、一緒にフラビウイルス研究を続け多くの実験に直接的にご協力下さった長崎大学の好井健太朗先生、研究者としてのイロハを教えてくださいました国立感染症研究所の鈴木忠樹先生をはじめ両研究室の多くの方の御指導、御協力、御支援のおかげであり、心より感謝しております。そして私事ではございますが、いつも支えてくれている家族にも改めて感謝致します。最後に、名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞にご推挙くださいました北海道大学の澤洋文教授、荏和宏明教授、高田礼人教授、長崎大学の好井健太朗教授に深く感謝申し上げます。

利益相反事項の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) G. Habarugira, W. W. Suen, J. Hobson-Peters, R. A. Hall, H. Bielefeldt-Ohmann, West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications. *Pathogens* **9** (2020).
- 2) V. P. Bondre, R. S. Jadi, A. C. Mishra, P. N. Yergolkar, V. A. Arankalle, West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *The Journal of general virology* **88**, 875-884 (2007).
- 3) D. Zaayman, S. Human, M. Venter, A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR. *J Virol Methods* **157**, 155-160 (2009).
- 4) T. C. Pierson, M. S. Diamond, The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* **5**, 796-812 (2020).
- 5) A. D. Byas, G. D. Ebel, Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. *Pathogens* **9** (2020).
- 6) F. Bai, E. A. Thompson, P. J. S. Vig, A. A. Leis, Current Understanding of West Nile Virus Clinical Manifestations, Immune Responses, Neuroinvasion, and Immunotherapeutic Implications. *Pathogens* **8** (2019).
- 7) N. Nagata *et al.*, The pathogenesis of 3 neurotropic flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol* **74**, 250-260 (2015).
- 8) M. A. Samuel, J. D. Morrey, M. S. Diamond, Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J Virol* **81**, 2614-2623 (2007).
- 9) S. Kobayashi, Y. Orba, H. Yamaguchi, T. Kimura, H. Sawa, Accumulation of ubiquitinated proteins is related to West Nile virus-induced neuronal apoptosis. *Neuropathology* **32**, 398-405 (2012).
- 10) J. A. Johnston, C. L. Ward, R. R. Kopito, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898 (1998).
- 11) J. P. Taylor *et al.*, Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet* **12**, 749-757 (2003).
- 12) J. P. Taylor, J. Hardy, K. H. Fischbeck, Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991-1995 (2002).
- 13) M. Komatsu *et al.*, Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).
- 14) T. Hara *et al.*, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889 (2006).
- 15) K. A. Markossian, B. I. Kurganov, Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 971-984 (2004).
- 16) E. Bentea, L. Verbruggen, A. Massie, The Proteasome Inhibition Model of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* **7**, 31-63 (2017).
- 17) E. Bentea *et al.*, Nigral proteasome inhibition in mice leads to motor and non-motor deficits and increased expression of Ser129 phosphorylated alpha-synuclein. *Front Behav Neurosci* **9**, 68 (2015).
- 18) C. L. Murray, C. T. Jones, C. M. Rice, Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 699-708 (2008).
- 19) J. M. Mackenzie, E. G. Westaway, Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* **75**, 10787-10799 (2001).
- 20) S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* **3**, 13-22 (2005).
- 21) L. Henry, D. R. Sheff, Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol Biol Cell* **19**, 2059-2068 (2008).
- 22) S. Chen, M. C. Liang, J. N. Chia, J. K. Ngsee, A. E. Ting, Rab8b and its interacting partner TRIP8b are involved in regulated secretion in AtT20 cells. *J Biol Chem* **276**, 13209-13216 (2001).
- 23) A. Guichard, V. Nizet, E. Bier, RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* **12**, 624-634 (2014).
- 24) H. Garg, R. T. Lee, N. O. Tek, S. Maurer-Stroh, A. Joshi, Identification of conserved motifs in the West Nile virus envelope essential for particle secretion. *BMC Microbiol* **13**, 197 (2013).
- 25) T. C. Pierson *et al.*, A rapid and quantitative assay for measuring antibody-mediated neutralization of West Nile virus infection. *Virology* **346**, 53-65 (2006).
- 26) F. Puig-Basagoiti *et al.*, High-throughput assays using a luciferase-expressing replicon, virus-like particles, and full-length virus for West Nile virus drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4980-4988 (2005).
- 27) S. Kobayashi *et al.*, Rab8b Regulates Transport of West Nile Virus Particles from Recycling Endosomes. *J Biol Chem* **291**, 6559-6568 (2016).
- 28) P. E. Joubert *et al.*, Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med* **209**, 1029-1047 (2012).
- 29) S. Shelly, N. Lukinova, S. Bambina, A. Berman, S. Cherry, Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* **30**, 588-598 (2009).
- 30) X. Dong, B. Levine, Autophagy and viruses: adversaries or allies? *J Innate Immun* **5**, 480-493 (2013).
- 31) M. Dreux, P. Gastaminza, S. F. Wieland, F. V. Chisari, The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14046-14051 (2009).
- 32) N. S. Heaton, G. Randall, Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**, 422-432 (2010).
- 33) W. T. Jackson *et al.*, Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**,

- e156 (2005).
- 34) S. Kobayashi *et al.*, Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. *Virus Res* **191**, 83-91 (2014).
 - 35) Y. Zhang, S. K. Calderwood, Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. *Int J Hyperthermia* **27**, 409-414 (2011).
 - 36) B. E. Riley *et al.*, Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J Cell Biol* **191**, 537-552 (2010).
 - 37) S. Kobayashi, K. Yoshii, M. Hirano, M. Muto, H. Kariwa, A novel reverse genetics system for production of infectious West Nile virus using homologous recombination in mammalian cells. *J Virol Methods* **240**, 14-20 (2017).
 - 38) S. Kobayashi *et al.*, West Nile virus capsid protein inhibits autophagy by AMP-activated protein kinase degradation in neurological disease development. *PLoS Pathog* **16**, e1008238 (2020).
 - 39) H. I. Mack, B. Zheng, J. M. Asara, S. M. Thomas, AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization. *Autophagy* **8**, 1197-1214 (2012).
 - 40) C. T. Pineda *et al.*, Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* **160**, 715-728 (2015).

Elucidation of neuropathogenesis of West Nile Encephalitis

Shintaro KOBAYASHI

Laboratory of Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

West Nile virus, which causes serious encephalitis in humans and horses, infects neuronal cells and induces cell death. As the neuronal cell death leads to the induction of various inflammatory responses, elucidation of the molecular mechanism of cell death is important for development of a treatment for West Nile encephalitis. In this paper, we investigated the pathology of the neuronal cells infected with West Nile virus and summarized the mechanism of neuronal cell death and their effect on the neuropathogenesis.

