

厚生労働科学研究費(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 23 年度研究分担報告書

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

研究分担者 田中 成典 (神戸大学大学院システム情報学研究科 教授)
研究協力者 福澤 薫 (みずほ情報総研)
尾曲 克己 (名古屋市立大学)
中島 捷久 (名古屋市立大学)
吉岡 彬生 (神戸大学)
牛尾 律子 (神戸大学)

研究要旨 宿主の糖鎖及び抗体と結合したインフルエンザウイルス HA タンパク質の抗原領域にある重要なアミノ酸残基の分子認識に関わる情報を計算機シミュレーションによって求め、病原性、抗原性等に関係する解析を行った。

A. 研究目的

以下の 2 点を主な研究の目的とした。

(1) ヒト中和抗体が認識する抗原構造を第一原理電子状態計算を基に明らかにし、抗体からのエスケープ・メカニズムを解明し、新型ウイルスにおいてヒト抗体から逃れるような HA の変異を予測する手法を確立すること。

(2) 糖鎖レセプター結合 (特にトリ型 α 2-3) に重要なアミノ酸残基の特定をすることで、ワクチン開発に貢献すること。

B. 研究方法

分子動力学 (MD) 法ならびにフラグ

メント分子軌道 (FMO) 法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、タンパク質内の全アミノ酸の相互作用に関する網羅的・系統的な解析を行う。FMO 法に関しては、電子相関効果を 2 次あるいは 3 次の摂動法 (MP2 あるいは MP3 法) 等により考慮することで、アミノ酸間に働く分散力などの弱い相互作用も適切に記述する。多数の変異株を用意してアミノ酸残基レベルでの病原性、抗原性を実験的に特定するのは困難であるが、計算機シミュレーションの手法を用いることにより、タンパク質内の全アミノ酸の網羅的・系統的な解析が可能となり、実験では困難な、HA の

変異に対するミクロな構造変化や結合エネルギーの微小変化をアミノ酸ごとに解析することができる。

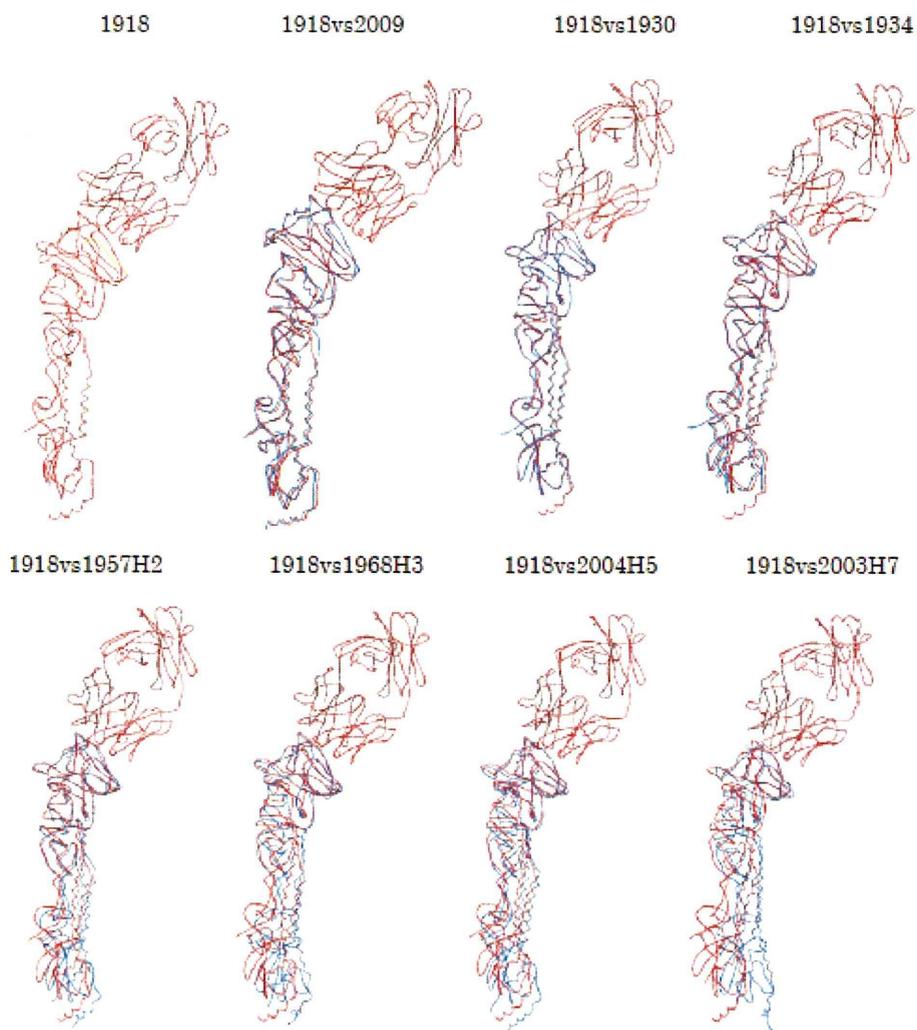
C. 研究結果

今年度得られた主な研究成果は以下の通りである。

(1) 2009年に出現した新型 HA と糖鎖レセプターとの相互作用解析を FMO 法により行い、ヒト型レセプターとの結合における Lys145 の重要性を解明した

(Protein & Peptide Letters に論文発表)。

(2) 1918年ヒト抗体と過去の HA サブタイプ (1918, 1930, 1934, 2009 など) の複合体構造を計算機上で作成し、結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認した。シミュレーションによりアミノ酸ごとの相互作用解析を行い、実験からは判断できない各アミノ酸間の結合の生成・消失情報を得た (以下の図参照)。



(図の説明) スペイン風邪 (1918) の Fab 抗体と様々な HA 抗原との結合構造のモデリング。1918 年の抗原抗体構造 (3LZF) を鋳型 (赤) とし、それからのずれ (青) を重ね合わせて表示した。

D. 考察

以上の結果を踏まえた今後の展開ならびに課題として以下のことが挙げられる。

・1918 年および 2009 年ヒト抗体に対する新型 HA 抗原の結合解析を行い、抗体から逃れるような HA アミノ酸変異を特定する。特に、新型 H1N1 のうち、スペイン風邪 (1918) の抗体 (2D1) に対するエスケープ変異株が実験的に特定されたので、シミュレーションにより、HA の変異によってどのような構造変化・相互作用変化が起きたかを調べる。

・糖鎖結合 (特にトリ型) に重要な HA のアミノ酸残基の特定をすることで、ワクチン開発に有用な情報を提供する。

・上記の解析を、古典力場を用いた MD 計算と量子力学的な FMO 計算を組み合わせを行い、変異による相互作用エネルギーの変化の解明と抗原変異予測を行う基本プロトコルを確立する。そして、最新の実験データと比較検討することで、今後の研究方針を策定する。

・さらに、水溶媒の効果、タンパク質ダイナミクス (構造ゆらぎ) の影響などを適宜取り入れてシミュレーションの高精度化を目指すことや、HA 以外のタン

パク質 (NA、NS1 など) に注目した解析を行うことも今後の課題である。

E. 結論

分子動力学 (MD) 法とフラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いた高精度計算機シミュレーションを行うことで、HA タンパク質に関わる分子間相互作用の定量的な解析が可能となり、計算結果に基づき、新型インフルエンザウイルスの病原性や抗原性に関係した変異予測やワクチン・薬剤開発に有用な知見が得られつつある。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

「1. 論文発表」

- (1) K. Fukuzawa, K. Omagari, K. Nakajima, E. Nobusawa, and S. Tanaka, "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", *Protein Peptide Lett.* 18 (2011) pp. 530-539.
- (2) A. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations

in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", J. Mol. Graph. Model. 30 (2011) pp. 110-119.

- (3) A. Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", Theor. Chem. Acc. 130 (2011) pp. 1197-1202.

「2. 学会発表」

(1) Akio Yoshioka and Shigenori Tanaka :

「 Comparison of Antigen-Antibody Binding by the Fragment Molecular Orbital Calculations for Swine-Origin Influenza Hemagglutinin Proteins」

(日本生物物理学会第 49 回年会、2011 年 9 月 18 日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス)

(2) 田中成典 :

「蛋白質の電子状態計算と医療・創薬・環境科学への応用」

(第 4 回バイオナノシステムズ研究会、2011 年 8 月 5 日、臨床情報研究センター、神戸)

(3) 田中成典 :

「フラグメント分子軌道法を用いた薬

剤耐性メカニズムの解析」

(平成 23 年度地球シミュレータ利用報告会、2012 年 2 月 7 日、横浜)

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

以上

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23 年度分担研究報告書

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

HA 抗体複合体の構造解析

研究分担者 安武義晃 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 研究員

研究協力者 川口 晶 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター第四室 研究員

鈴木忠樹 国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員

研究要旨 新型インフルエンザウイルス 2009 (H1N1)pdm（新型ウイルス）の抗原性は、季節性インフルエンザウイルス H1N1（季節性ウイルス）とは異なることが明らかになっている。本研究では、新型ウイルスの主な抗原蛋白質であるヘマグルチニン（HA）とその単一抗体との複合体結晶構造解析を行い、抗原抗体間の相互作用の詳細情報の取得を目指した。本年度はまず、結晶化実験を行うために不可欠な膜貫通領域を除いた可溶性 HA の調製を試みた。しかしながら、HA 膜外ドメインの調製に広く用いられるブロメラインによる処理は新型ウイルスには適用できなかった。また、遺伝子改変によるトロンピン切断サイトの導入、ブロメラインによる切断が確認されている A/Puerto Rico/8/34 株 HA とのキメラの作製を行ったが、新型ウイルス HA 膜外ドメインをウイルスから切り離すための最適条件が見出されず、HA 膜外ドメインを大量に調製することができない状態にある。一方、HA 抗体複合体結晶化のためのテスト実験として、膜外ドメインの調製法が確立されている A/Aichi/2/68 ウイルス由来 HA と、サブサイト B を認識するマウス単一抗体（ β 121d）Fab フラグメントの複合体を調製し、結晶化スクリーニングを行ったところ、いくつかの条件で結晶化させることに成功した。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス 2009 (H1N1)pdm（新型ウイルス）の感染病態は季節性インフルエンザ H1N1 とは大きく異なっており、また抗原性も季節性インフルエンザウイルス H1N1（季節性ウイルス）と異なることが明らかになっている。今後、新型ウイルスへのさらなる変異の蓄積によ

り、病原性の増悪化、感染拡大、健康被害の増大が懸念されている。これらの脅威に備えるため、感染者もしくはワクチン接種者から採取した血清中の中和抗体が認識する新型ウイルス抗原上のエピートプ領域の特定およびその構成アミノ酸残基を詳細に調べ、今後の抗原変異予測やワクチン開発に役立てることが重要となる。本研究では、

新型ウイルスの抗原である HA と、HA を認識する単一抗体の結晶構造解析を行い、抗原 HA と中和抗体間の相互作用の詳細を原子レベルで明らかにすることを旨とする。また、得られた情報は、さらなる分子動力学もしくはフラグメント分子軌道法によるシミュレーションのための初期構造モデルとして役立て、将来におけるエスケープ変異やレセプター結合親和性の変化の予測に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1. HA 膜外ドメインの調製

(1) ブロメライン (Bromelain) の精製

市販のブロメラインは粗精製品であり活性が低いため精製を行った上で用いた。Bromelain (Wako) を 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で 0.1 mg/ml として 4°C で 4 hr かけて溶解させ、さらに 0.45 μm のフィルターに通し、FPLC システム AKTA PRIME plus および HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによりピーク分画を分取、さらに限外濾過法により濃縮を行ったものを用いた。

(2) 組換えウイルスの作製

(i) 組換え HA プラスミドの作製

A/California/7/2009 株の HA 蛋白質の 524 番目セリンと 525 番目のスレオニンの間に Thrombin (トロンビン) 認識配列 (LVPRG) を導入した遺伝子を PCR 法により作製し、pPolI vector に組み込み pPol-Cal7TCS を作製した。A/Narita/1/2009 株の HA 蛋白質の 509 番目のグルタミン酸から後ろの 58 残基を A/Puerto Rico/8/34 株の相同部位と入れ替えたキメラ HA 遺伝子を PCR 法により作製し、pPol vector へ組み込んだ pPol-Narita509 を作製した。

(ii) リバースジェネティクス

作製した pPol-Cal7TCS または

pPol-Narita509 を河岡博士 (東大) が開発したインフルエンザウイルスのリバースジェネティクス用プラスミド 11 個と共に FuGene HD を用いて LLCMK 細胞へトランスフェクションした。トランスフェクション後 40 時間の培養上清を有精卵へ接種し、48 時間後に漿尿液を回収し、組換えウイルスを得た。

(iii) ウイルスの回収・精製・濃縮

インフルエンザウイルス (A/Aichi/2/68、A/Narita/1/2009 または Narita509) を有精卵 (10 日卵) に接種し、35°C で 48 時間培養後に漿尿液を回収した。A/Aichi/2/68 の精製は、得られた漿尿液をスクロースグラジエント超遠心 (25000 rpm, 1.5 hr) に供することで行い、ウイルスバンドを回収した。また A/Narita/1/2009 と Narita509 は 20% スクロースクッション存在下で超遠心 (25000 rpm, 1.5 hr) を行い、ペレットになったウイルスを回収した。それぞれ PBS で洗浄後、再び超遠心 (25000 rpm, 1.5 hr) を行いペレットとなったウイルスを 1 ml の PBS で再懸濁した。得られた精製ウイルスは -80°C で保管した。

(3) HA 膜外ドメインの調製と精製

濃縮したウイルスと精製済みブロメラインを 1:4 の割合で混ぜて DTT を加え (0.25 μM)、37°C で 17 hr 反応させた。反応後の溶液を超遠心 (320000 rpm, 50 min) し、未切断のウイルスをペレット化し、切断された HA を上清中に集めた。この上清を HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーゲルに供し、遊離 HA 分画を回収した。

(4) 赤血球凝集反応

ブロメラインとの反応前後のサンプル、および超遠心分離後の上清の HA 価を測定

した。各サンプル 50 μ l を二段階希釈し、0.5% TRBC (七面鳥血球) 50 μ l を加えて 45 分間静置後判定を行った。

(5) SDS-PAGE

ブロメラインとの反応前後のサンプルを 37°C で 1 晩 PNGase 処理することで Deglycosylation した。2-ME を加えたサンプルバッファーと混ぜ 95°C、5 分のインキュベーションを行う事で変性させたものをサンプルとした。各 6 μ g を 12%ゲルにアプライして泳動後、染色した。

2. Fab 調製、精製

山形大学菅原博士・高下博士より供与いただいた抗 Aichi HA マウスモノクローナル抗体 β 121d を Melon Gel Monoclonal IgG Purification kit (Pierce)を用いて精製した後、Fab preparation kit (Pierce)を用いて Fab を調製した。

3. 複合体形成

精製した A/Aichi/2/68 由来 HA 膜外ドメインと mAb β 121d Fab フラグメントを 1:1 のモル比で混ぜ、4°C で一晩、転倒混和しながら反応させた。ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、複合体となっている分画を回収して限外濾過により、約 6 mg/mL の濃度にまで濃縮し、結晶化実験に利用した。

4. 結晶化

HA-Fab 複合体サンプルは、市販のスパースマトリックス結晶化スクリーニングキットを用い、シッティングドロップ蒸気拡散法によって 20°C で行った。サンプル量が少ないことから、微量蛋白質結晶化ロボット・モスキートを利用した結晶化実験を行った。初期条件の探索は、それぞれ異なる 480 種類の結晶化溶液 (沈殿剤溶液) を用いて行い、その中の 3 条件で結晶の生成

を確認した。次に結晶化溶液の pH、塩濃度、沈殿剤の濃度等を変化させ、良質な単結晶を得るための結晶化条件の最適化を行った。

5. X線回折実験

得られた結晶は、つくば市にある高エネルギー加速器研究機構・シンクロトン放射光施設 (PF) に持ち込み、高輝度 X 線を利用した回折実験を行った。結晶は結晶化母液に 20%グリセロールを添加した抗凍結試薬にソーキングし、液体窒素ストリーム下で瞬間冷却を行い、100K の低温を保ちながら X 線照射を行った。得られた回折データは HKL2000 プログラムパッケージによる指数付けと回折強度の計算を行った。構造解析は、既にプロテインデータバンクに登録されている HA および Fab の座標モデルを用い、プログラム MOLREP および PHASER を利用して分子置換法によって行った。

C. 研究結果

1. A/Narita/1/2009 株の HA の切り出し

既に A/Aichi/6/68 で HA が切断される事を確認した同一の条件下において、濃縮 A/Narita/1/2009 ウイルスとブロメラインの反応を行ったところ、HA 価の減少は認められたものの (Table 1)、反応液中に遊離した HA は認められなかった。

切断配列特異性の高いプロテアーゼである トロンビンとの反応で HA を切り出すことを次に試みた。トロンビンの認識、切断配列を HA 配列内の膜外ドメインと膜貫通部位間のリンカー領域に導入し、既に HA のサブローニングが終了していた A/Narita/1/2009 と同じ H1N1pdm に属する A/California/7/2009 を用いて実験を行った。しかしながら、リバースジェネティクス法を行うことでウイルスの産生を行なうことはできなかった。

次に、A/Narita/1/2009 株 HA 配列とブロメラインで効率よく切断される事が知られている A/Puerto Rico/8/34 のキメラ HA を持つウイルスの作製を試みた。A/Puerto Rico/8/34 のブロメラインによる切断部位は膜貫通近傍領域である事が分かっている。そこで大半の配列が A/Narita/1/2009 由来、膜貫通領域近傍に位置する 509 番目のアミノ酸から C 末側を A/Puerto Rico/8/34 由来に組み変えたキメラ HA を持つプラスミドを作製し、リバースジェネティクス法により組換えウイルス (Narita509) を作製した。作製したウイルスをブロメラインと反応させると、HA 価の減少は認められたが (Table 1)、SDS-PAGE の結果、上清中への HA の遊離は認められなかった (Fig.1)。

Table 1. 本研究で取り扱った HA の Bromelain 処理に伴う HA 価の変化

A/Narita/1/2009		Narita509		A/Aichi/6/68	
0 hr	>4096	0 hr	>4096	0 hr	>4096
17 hr	128	17 hr	8	17 hr	256
sup	16	sup	0	sup	32
ppt	128	ppt	0	ppt	



Fig. 1 ブロメライン処理後のキメラサンプル (Narita509) の SDS-PAGE

2. A/Aichi/2/68 の HA と Fab 抗体の複合体形成と結晶化、回折実験

ブロメラインによる HA の切り出しが可能である A/Aichi/2/68 を用いて、その HA とマウス単一抗体 (β 121d) Fab フラグメントとの結晶化を試みた。本実験は、目的と

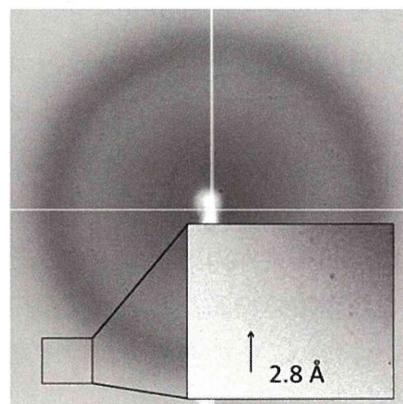
する新型コロナウイルス HA-Fab 複合体の結晶化実験を行うためのテストケースとして行ったものであるが、これまでに HA-Fab 複合体の構造解析例は少なく、本複合体解析によって、新たな抗原抗体複合体相互作用に関する知見が得られることが期待された。

結晶化スクリーニングテストの結果、0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 40% PEG400 (Qiagen JCSG core suite, D7) からなる条件、0.1 M imidazole pH 7.0, 20% Jeffamine ED-2001 (Hampton Research PEG-RX, C2) からなる条件、0.1 M Tris pH 8.5, 20% PEG 6000 (Qiagen Protein complex suite, D12) からなる条件の 3 種の結晶化溶液中で、結晶の成長を確認した。これら条件を最適化した結果、0.3 M imidazole pH 7.0, 23% Jeffamine ED-2001 の条件で、 $0.1 \times 0.1 \times 0.1$ mm 程度のサイズの単結晶を得た (Fig. 2)。



Fig. 2 最適化実験の後に得られた結晶

得られた結晶は全て、シンクロトロン放射光施設 PF に設置されているビームライン BL-5A において回折実験を行った。初期条件で得られた結晶は全て低い分解能の回折能しか示さなかったが、最適化して得られた結晶 (Fig. 2) は 2.8 Å 分解能の回折を



示し、良好なデータ収集を行うことができた (Fig. 3 and Table 2)。

Fig. 3 X線回折写真

Table 2. 結晶パラメータと回折データの統計

Resolution (Å)	53.8-2.80
Space group	$P4_21_2$
Cell dimensions	$a = b = 106.5, c = 71.0$ (Å), $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$
R_{merge}	0.065
$I/\sigma(I)$	26.4
Redundancy	11.3
Data completeness (%)	99.4

D. 考察

本研究では、新型ウイルス HA と単一抗体との複合体結晶構造解析を目指した。結晶化のためには、疎水性である膜貫通領域を除去する必要がある。そこで、HA 膜貫通領域を除去し可溶性 HA の取得をまず試みた。一般に HA からの膜貫通領域の切断は、システインプロテアーゼの一種であるブロメラインを用いて行われる。しかしながら、新型ウイルス HA に対してブロメラインは有効に作用しなかった。ブロメライン処理後に HA 価の減少が認められたことから、ブロメラインにより HA が何らかの影響を受けていることは明らかである。HA はホモ三量体を形成しており、膜貫通領域もヘリックスバンドル構造からなる三量体を形成していると推測される。したがって、サブユニットの部分的な切断によって高次構造が変化し、1 分子あたり 3 カ所全てのペプチドの切断が進行できない状況に陥っている可能性がある。ブロメラインは配列特異的な切断を触媒する酵素ではない。そこで、配列特異的に切断するトロンピンを用いるため、トロンピン認識配列を持った HA を遺伝子工学技術により作製したが、ウイルスの生産を阻害する結果となった。HA とは無関係な配列を導入することは、HA の機能に大きな影響を与えると考えられた。次に、

既にブロメラインで切断されることが分かっている A/Puerto Rico/8/34 とのキメラ HA を作製した。このキメラのブロメライン切断領域が A/Puerto Rico/8/34 の HA となるよう作製した。しかしながら、ウイルスは増殖したものの切断には成功できず、可溶性 HA 膜外ドメインの調製はできなかった。このことから、切断が可能かどうかは、膜貫通領域と膜外ドメイン間のリンカー配列に依存するのではなく、HA 分子全体のアミノ酸配列もしくはそれによって決まる高次構造に依存することが示唆された。

HA 抗体複合体結晶化のテストケースとして、A/Aichi/2/68 を用いて、その HA とマウス単一抗体 ($\beta 121d$) Fab フラグメントとの結晶化を行い、2.8 Å 分解能までの X 線回折データの取得に成功した。しかしながら、既に報告されている HA および Fab の構造モデルをサーチモデルとした分子置換法による解析を行ったところ、解を得ることができない。空間群と結晶格子定数を考慮すると、結晶の非対称単位内に HA 三量体と Fab フラグメントは収まらないため、何らかの分解物や夾雑蛋白質が結晶化してしまった可能性がある。

E. 結論

新型ウイルス HA の膜外ドメイン調製の条件探索を行ったが、ブロメラインでの切断、トロンピンサイトの導入、他の HA 分子種とのキメラ作製を行ったものの、いずれの方法によっても安定な可溶性 HA 膜外ドメインを調製することができなかった。しかしながら、ブロメライン処理により HA 価の顕著な減少が見られることから、今後、切断時のバッファーの種類や pH、塩強度等を最適化することで効果的に切断できる条件を引き続き探索する。もしくは、バキュロウイルスを用いた組換え発現の系を検討する。また、単一抗体のみの構造決定を行

い、抗原抗体相互作用のシミュレーションのために座標提供することを目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yasutake Y, Ota Y, Hino E, Sakasegawa S, Tamura T. Structures of Burkholderia thailandensis nucleoside kinase: implications for the catalytic mechanism and nucleoside selectivity. *Acta Crystallogr. Sect. D.* 67:945–956 (2011).

Yasutake Y, Tamura T. Efficient production of active form of vitamin D3 by microbial conversion. *Synthesiology.* 4:222–229 (2011)

2. 学会発表

該当無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高橋宜聖 小野寺大志 小林和夫	ウイルス感染局所における 記憶B細胞応答	中山俊憲 徳久剛久 山本一彦	実験医学 増刊 免疫記憶 の制御と 疾患治療	羊土社	東京	2011	81-86

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobusawa E., K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima	Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A.	Microbiol. I mmunol.			2012 (in press)
Yoshioka A, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka	"Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation"	Theor. Chem. Acc	130	1197- 1202	2011
Yoshioka A., K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka,	Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large- Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations	J. Mol. Graph. Model.	30	110-119	2011
Kaori Fukuzawa, Katusmi Omagari, Katsuhisa Nakajima, Eri Nobusawa, Shigenori Tanaka	Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1virus:binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin.	Protein and Peptide letters	18	530-539	2011

Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	ACS Chem Biol	Jan 13	491-5	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Viro	84(2)	336-44	2012
Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H.	Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response.	PLoS One	6(10)	e26163. Epub 2011 Oct 14.	2011
Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H.	A novel function of the N- terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase.	Biochem Biophys Res Commun	414(4)	719-26. Epub 2011 Oct 6	2011

Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol	25(1)	1-13	2012
Harada, Y. Ninomiya, A. Takahashi, Y. Shirakura, M. Kishida, N. Kageyama, T. Tada, Y. Tashiro, M. Odagiri, T.	Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice.	Vaccine	Epub ahead of print		2011
Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S.	Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle.	J. Virol.	85	1322-1329	2011

