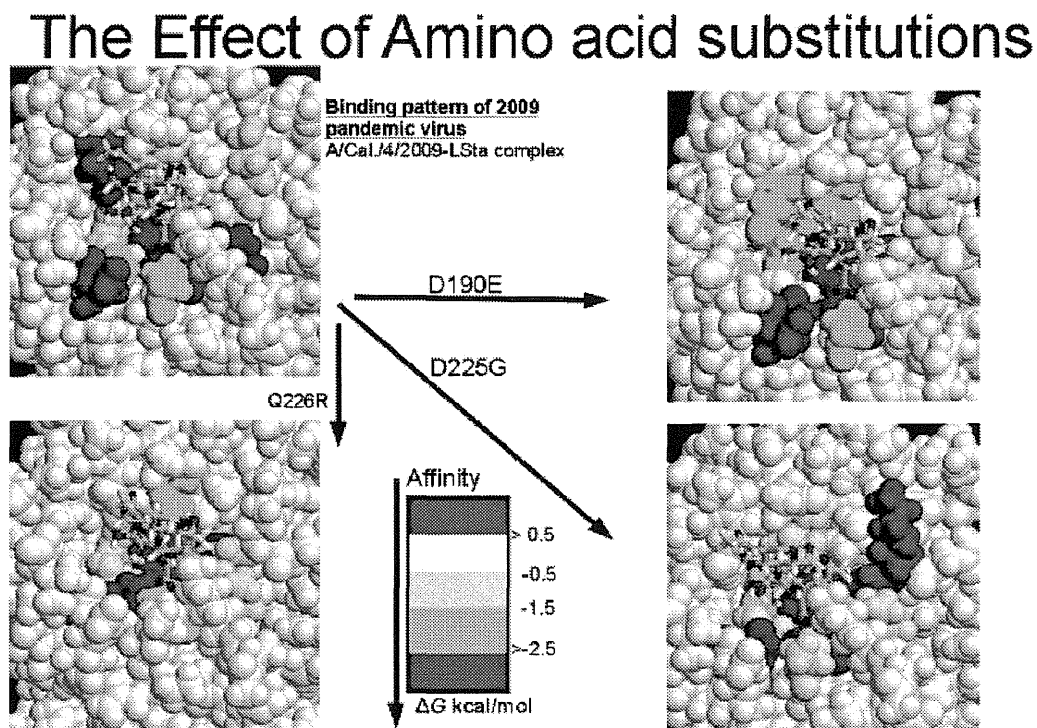


化した。特に、トリ型レセプターとの親和性を高めるアミノ酸変異を予想した（詳しくは D 参照）。

D. 考察

C (2) の結果を図を用いて説明する。



上図は HA (A/California/4/2009) のアミノ酸変異によるトリ型レセプターとの相互作用の変化を示している。HA とトリ型レセプターとの相互作用を分子動力学 (MD) シミュレーションとエネルギー解析により調べた。HA のトリ型レセプターとの相互作用の符号と強さを残基毎に示した。ΔG の値が (負の向きに) 小さいもの (青) ほど、引力的結合が強い。ヒト HA (Asp190, Asp225 をもつ) は、190 番目と 225 番目の残基が反発 (赤) している (左上の図)。190 番目と 225 番目の残基をトリ HA (Glu190, Gly225 をもつ) の残基に 1 アミノ酸変異すると、変異した残基の反発が消える (右上、右下の図)。また、Q226R 変異により、ヒト HA で見られた反発がほぼ消え、トリ型レセプターとの結合が最も

強くなることわかる (左下の図)。Q226R 変異によってトリ型レセプターとの結合が強くなることは、FM0 計算に基づく相互作用解析においても確認された。今後は、実際の変異実験を通して、この予想を検証する。

E. 結論

分子動力学 (MD) 法とフラグメント分子軌道 (FM0) 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た。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) T. Nakano, Y. Mochizuki, K. Yamashita, C. Watanabe, K. Fukuzawa, K. Segawa, Y. Okiyama, T. Tsukamoto, and S. Tanaka, “Development of the Four-Body Corrected Fragment Molecular Orbital (FM04) Method”, Chem. Phys. Lett. 523 (2012) pp. 128-133.
- (2) S. Tanaka, C. Watanabe, and Y. Okiyama, “Statistical Correction to Effective Interactions in the Fragment Molecular Orbital Method”, Chem. Phys. Lett. 556 (2013) pp. 272-277.

2. 学会発表

- (1) S. Tanaka: “Multi-Scale Simulations for Biomolecular Functions” (2nd AICS International Symposium - Computer and Computational Sciences for Exascale Computing -, March 1, 2012, RIKEN Advanced Institute for Computational Science, Kobe, Japan).
- (2) 田中成典:「FMO 計算の今後」 第4回「イノベーション基盤シミュレーションソフトウェアの研究開発」シンポジウム、2012年7月5日、東京大学生産技術研究所、東京

- (3) 田中成典:「フラグメント分子軌道 (FMO) 計算の現状と今後」 日本機械学会第25回計算力学講演会、2012年10月6日、甲南大学、神戸

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

HA 抗体複合体構造解析に向けた研究

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・主任研究員）

研究協力者 鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部・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・研究員）

研究要旨 本研究は、新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm09）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すものである。H23 年度から引き続いて、膜貫通領域を除去した可溶性 HA の調製を試み、収量が不十分ながらも、可溶性 HA の取得に成功した。また同時に、配列が明らかな 2 種の単一抗体に対して Fab フラグメントの精製を行い、Fab 単独の結晶化実験を行った結果、抗体 NSP29-Fab の結晶化に成功した。しかしながら、結晶が微細なため構造解析に用いる質の回折データ取得には至らなかった。さらに、抗原抗体間相互作用を高速原子間力顕微鏡で捉える試みを行い、複合体の形成を観察することに成功した。一方、HA 抗体複合体結晶化のためのテスト実験として、昨年度に得られた 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サンプルの結晶に対して回折データを収集し、構造解析を行った。解析の結果、Fab に相当する電子密度を確認することができず、抗原抗体相互作用の詳細を観察することはできなかったが、精密化した構造中には、これまでの結晶解析で観察されることがない複合型糖鎖の構造が明瞭に観察された。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm09）は、感染病態だけでなく、抗原性においても従来流行していた季節性インフルエンザウイルス H1N1 と大きく異なることが明らかとなっている。したがって、新型ウイルスへのさらなる変異の蓄積は、想定外の感染拡大や健康被害の増大につながる恐れがある。新型ウイルスのこれら脅威に備える為に、中和抗体が認識する新型ウイルス抗原上のエピトープ領域を調べ、今後の抗原変異予測やワクチン開発に

役立てることは極めて重要である。本研究では、新型ウイルス 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目指す。一般に HA は大腸菌やバキュロウイルスを用いた組換え発現によって大量調製し、結晶構造解析に用いられることが多い。しかし本研究では、本来のウイルス上に存在する HA 構造（立体構造や糖鎖付加の状態）を維持した分子を取得して構造解析を行うことを目指すため、ウイルスを実際に増殖させ、そこ

から HA 膜外ドメインを切り出して実験に用いることとした。これにより、実際に生体内で起きている抗原抗体相互作用を結晶中で捉えることを目指した。

B. 研究方法

1. HA 膜外ドメインの調製

(1) 改変 HA と組換えウイルス

本研究では、HA1 領域を A/California/7/09 由来、HA2 領域を A/Puerto Rico/8/34 由来とするキメラ HA 遺伝子、および Wang らが報告した最新の結果 (Vaccine, 2012, Jan 20;30(5):872-8) に基づいた、A/Narita/1/2009 の HA の 373 番目のアミノ酸を Asp から Asn へ、さらに 374 番目のアミノ酸を Glu から Gly に変えた HA 遺伝子を保持する組換えウイルス (それぞれ、Cal1PR2 および Narita373/374) を用いて研究を行った。

作製したインフルエンザウイルス (Cal1PR2 および Narita373/374) 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。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。

(2) HA 膜外ドメインの調製と精製

濃縮したウイルスとプロメライン (Sigma (B5144)) を 4:1 の割合で混ぜて 37°C で 17 hr 反応させた後、プロテアーゼ阻害剤 E64 を加えて反応を停止させた。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。この上清をゲルろ過クロマトグラフィーカラム (Superose 12 10/300 GL) に供し、遊離 HA 分画を回収した。これを Amicon Ultra (10K) を用いて濃

縮して、HA サンプルとした。

(3) SDS-PAGE

遊離 HA 分画後のサンプルを 37°C で 1 晩 PNGase 処理することで Deglycosylation を行った。2-メルカプトエタノール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、12%ゲルで SDS-PAGE を行った。

2. Fab 調製、精製

山形大学・松寄博士より供与いただいた抗 Narita HA マウスモノクローナル抗体を含む腹水を HiTrap Proten G カラム (GE healthcare) を用いて精製した後、Fab preparation kit (Pierce) を用いて Fab を調製した。Amicon Ultra (10 K) を用いて濃縮を行い、Superose 12 10/300 GL 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、Fab 画分を回収した。更に Amicon Ultra (10 K) を用いて濃縮し、Fab サンプルとした。

3. 結晶化

蛋白質の結晶化は全て、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。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) を用いて行った。昨年度までに得られた A/Aichi/2/68 ウイルス由来 HA とマウス単一抗体 (β 121d) Fab フラグメントの結晶に対しては、初期条件探索の後、さらに沈殿剤濃度と pH を最適化し、回折実験に適した結晶を得た。

4. X線回折実験・構造解析

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・シンクロトロン放射光施設 (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 Protein Data Bank に登録されている HA もしくは 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。モデルの精密化はプログラム REFMAC5 を用いて行い、モデルの構築と電子密度へのフィッティングはプログラム Coot を利用した。

5. 高速原子間力顕微鏡観察

取得した HA および単一抗体との相互作用状態を観察するため、茨城県つくば市にある株式会社生体分子計測研究所にて高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) 実験を行った。様々な緩衝溶液や純水に置換したサンプルを準備し、それをマイカ基板に添加後、室温にて高速 AFM 装置 NanoExplorer および Nano Live Vision を利用して画像データの取得を行った。画像処理には SPIP (Image Metrology 社) を用いた。

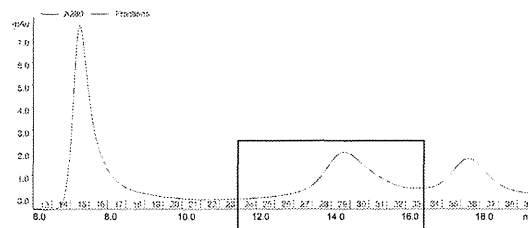
C. 研究結果

1. HA 膜外ドメインの調製

一般的に H1 亜型の HA タンパク質はブロメライン感受性であり、ウイルス粒子から 3 量体を形成した HA タンパク質の膜外ドメインをブロメラインにより切断することで容易に精製することができる。しかしながら H1N1pdm09 の HA タンパク質はブロメライン抵抗性であり、そのままでは HA タンパク質の膜外ドメインの調整が困難であ

った。一方、H1 亜型の代表的な実験室株である A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株の HA タンパク質はブロメライン感受性であり、その切断部位は HA2 の C 末端領域である事が知られている。そこで、ブロメライン感受性の H1N1pdm09 由来 HA タンパク質を得るために、HA1 は同じく H1N1pdm09 である A/California/7/09 株由来、HA2 は PR8 株由来としたキメラ HA (Cal1PR2) を作製した。また、HA タンパク質のブロメライン感受性に関わるアミノ酸残基についての最新の報告に基づき、H1N1pdm09 である A/Narita/1/2009 株の HA の 373 番目のアミノ酸残基を Asp から Asn へ、374 番目のアミノ酸を Glu から Gly に置換する変異 HA (Narita373/374) を作製した。続いて、それぞれの HA を有するウイルスをリバーシジェネティクス法により作出し、鶏卵により増殖させた。

鶏卵増殖後のウイルスを超遠心法により精製し、ブロメラインとの反応後、超遠心を行いウイルス粒子から遊離した HA タンパク質の膜外ドメインを含む上清を回収して、ゲルろ過カラムによる精製を行った (Fig. 1)。#24-33 のフラクションを回収して濃縮後に SDS-PAGE を行うと、HA1 と



HA2 に相当するバンドが確認された (Fig.2)。

Fig. 1 Narita373/374 HA のゲルろ過クロマトグラフィー溶出パターン

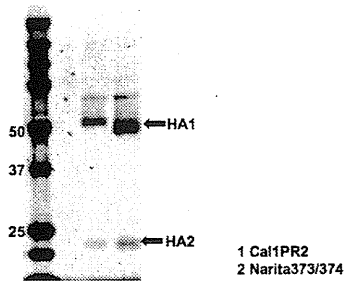


Fig. 2 精製 HA の SDS PAGE

2. Fab フラグメントの精製

マウス腹水から方法欄に記載した手順で Fab を精製、濃縮した結果、NSP-27 および 29 からのみ十分量の Fab が得られた。それぞれのサンプルを SDS-PAGE に供して Fab に対応するバンドを確認し (Fig. 3)、結晶化実験に用いた。

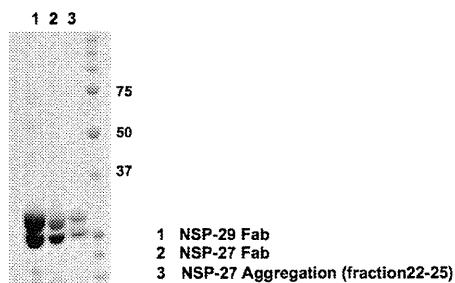


Fig. 3 精製後の Fab フラグメントの SDS PAGE

2. Fab の結晶化・回折実験

HA に関しては結晶化実験可能な充分量のサンプルを得られなかったため、中和抗体 Fab 領域単独の構造決定を目指した。Fab の構造が決まることで、ドッキングシミュレーション・分子動力学シミュレーションにより HA との相互作用を解析することが可能になると考えたからである。結晶化スクリーニングの結果、NSP29-Fab のみ、0.1 M bis-Tris pH 5.5, 2.0 M ammonium sulfate の条件下において結晶を得る事ができた (Fig. 4)。この結晶に対してシンクロトロン放射光施設 PF において X 線回折実験を行った。

しかしながら、8 Å 分解能までの回折スポットからは結晶系を決めることはできず、構造解析を行うことも困難であった。

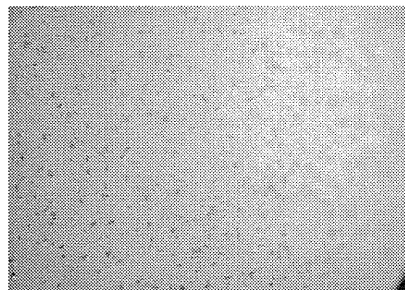


Fig. 4 NSP-29 Fab の結晶

3. 高速 AFM 観察

結晶学による抗原抗体間相互作用の解析が困難な状況となったため、代替手法として高速 AFM にて抗原抗体相互作用の観察を試みた。本実験では、Narita373/374 の HA を用い、Cal1PR2 HA は PR8 由来 HA とのキメラであり、抗体との反応が期待されないため除外した。いくつかの溶液、pH、蛋白質濃度の条件で分子の観察を行ったが、超純水に置換した 400 $\mu\text{g/mL}$ の抗体および抗

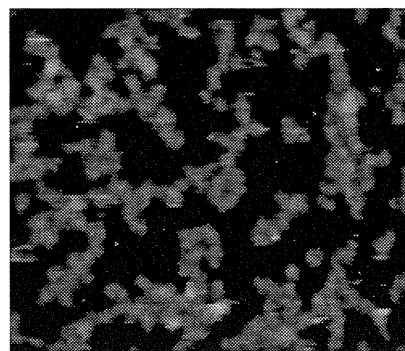
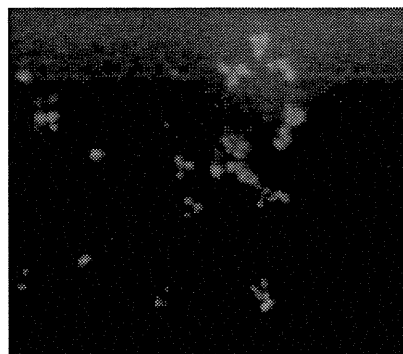


Fig. 5 高速 AFM でとらえた抗体単体 (上) および抗原抗体複合体 (下) の画像

原を用いることで、それぞれの抗体単体および複合体を形成していると思われる分子の画像を取得することに成功した (Fig. 5)。

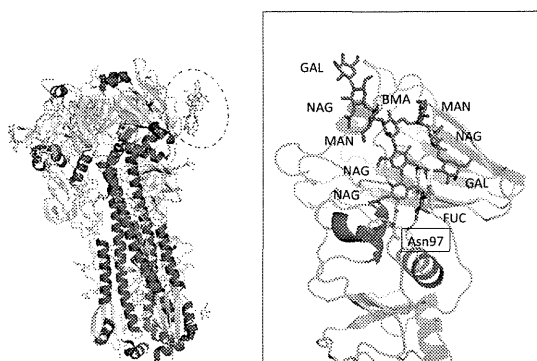
4. Aichi HA の結晶化・構造決定

H23 年度に確立した結晶化条件中で得られた別種の結晶から、3.0 Å 分解能の回折データを取得することに成功し、すでに報告されている HA の座標をサーチモデルとして用いた分子置換法によって構造解析に成功した。結晶学パラメータおよび精密化の統計を Table 1 に示す。

解析の結果、Aichi HA 分子を構築することができたが、結合しているはずの抗体 Fab 分子は観察されなかった。一方、HA の Asn97 に結合する巨大な複合型糖鎖に相当する電子密度が存在し、HA の 3 量体ヘッド部分を覆っている様子が観察された (Fig. 6)。

Table 1. Aichi HA 結晶から収集した回折データおよびモデル精密化の統計

Data collection statistics	
Resolution (Å)	50-3.00
Space group	C2
Cell dimensions	$a = 170.0, b = 98.1, c = 144.8$ (Å), $\beta = 113.1^\circ$
R_{merge}	0.1000
$I/\sigma(I)$	21.4
Redundancy	3.7
Data completeness (%)	99.7
Model refinement statistics	
R/R_{free}	0.216/0.275
Average B factor (Å ²)	84.7



RMSD bond length (Å)	0.006
RMSD bond angles (deg.)	1.25

Fig. 6 精密化された Aichi HA の構造モデル (左)、および Asn97 に結合した糖鎖の詳細 (右)

D. 考察

本研究では、組み換え体ではなくウイルスから直接取得した抗原分子 HA を利用し、抗原抗体相互作用の詳細情報を取得することを目指した。HA はウイルス表面の膜に融合して存在しているため、HA 分子を可溶性分子として取得するためには、プロテアーゼによって膜貫通領域を切断し切り離す必要がある。一般に H1 亜型の HA はプロメラインに感受性があり膜貫通領域を切り離すことが比較的容易であるが、新型ウイルスの HA はプロメラインに抵抗性であり、膜外ドメインを切り出すことができなかった。昨年度までに、配列特異的なプロテアーゼであるトロンビンの認識配列を人為的に挿入した HA 遺伝子、もしくは、既にプ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 (PR8) と Narita 株のキメラ HA を作製したが、両者とも HA 膜外領域の取得は成功しなかった。そこで本年度はまず、同じく H1N1pdm09 である A/California/7/09 株と PR8 とのキメラ (Cal1PR2) で切断可能か試行したところ、可溶性の HA を取得することができた。さらに、Wang らが報告した結果 (Vaccine, 2012, Jan 20;30(5):872-8) に基づいた二重変異体 (Narita373/374) を作製し、こちらも可溶性の HA を取得することができた。しかしながら、いずれも切断効率は低く、結晶化実験可能な量の HA を取得することはできなかった。現在の切断効率の場合、1 mg の HA 膜外ドメインを得るためには卵約 250 個を使ってウイルスを増殖させることが必要と見積られる。結晶化のためには数 mg から数十 mg のサンプルが必要であるため、ウイルスから直接 HA を取得するのは現実的ではなく、さらなる切断効率の改善が必要となる。キメラ HA において、プロメラインによって切断されるループ領域は、プロメライン感受性の PR8 のものであるが、

それでも切断効率は非常に悪かった。また、Narita373/374 の変異箇所は、ブロメライン切断部位ではなく、HA2 の分子表面に存在する α ヘリックスに存在する。これらのことより、ブロメライン感受性の有無は、単純にブロメラインで切断されるべきリンカー配列（膜貫通領域と膜外ドメインの間のリンカー）に依存しているのではなく、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のわずかな差異に依存することが示唆された。ウイルスから効率良く HA を回収するには、さらなる変異の導入や、別株 HA とのキメラ等を試す必要があるが、一方、結晶学的研究を行うには、組換え HA を準備することも視野に入れるのが現実的だと考えられる。

蛋白質の結晶化は mg オーダーの大量のサンプルを必要とする。そこで、少量のサンプルでも実験可能な高速 AFM を利用し、抗原抗体相互作用を捉える試みを世界で初めて行った。条件を最適化することで、マイカ基板上に Y 字をした抗体分子を認めることができ (Fig. 5)、さらにそこに抗原 HA を添加したところ、数多くの抗原抗体複合体と思われる分子を観察することができた。分子のサイズが小さいため抗原抗体がどのような方位で相互作用しているのか詳細な情報を得る事まではできなかったが、今後基板への固定方法、使用するバッファの種類等をさらに最適化することで、より鮮明な画像を取得できる可能性があると考えられる。

H23 年度までにテストケースとして行った A/Aichi/2/68 HA とそのマウス単一抗体 (β 121d) Fab との結晶化実験に関しては、本年度になって 3.0 Å 分解能までの X 線回折データの取得に成功し、分子置換法によって HA に相当する電子密度を計算することに成功した。ところが、結合しているはずの Fab 分子に相当する電子密度は存在せ

ず、また結晶格子内にも Fab が存在できる間隙が存在しないことから、結晶化母液中で解離した HA が単独で結晶化したものと考えられた。複合体の状態では結晶を得るためには、他の pH や沈殿剤、塩を含む条件で大量の結晶化スクリーニングを行う必要がある。そのために、サンプルを大量に取得できることがとても大切となるため、やはり組換え体を用いた結晶化実験が現実的であるかもしれない。一方、Aichi HA 単独の構造中の Asn97 には、これまでに観察されたことのない巨大な複合型糖鎖に相当する電子密度が観察された。糖鎖は一般に分子ごとに多様性があり、また一定の構造をとらないため結晶化が困難とされている。しかし今回はその結晶化に成功した。糖鎖は抗体が抗原へ近づく際の接近しやすさ (accessibility) に影響を与え、結果的に中和活性の程度を決める因子と考えられており今後の解析に重要な情報を提供することとなった。Aichi HA の結晶構造はすでに報告されているが、巨大な複合糖鎖を伴う点で新規の構造であったため、Protein Data Bank への登録を行った (Yasutake, Y., Suzuki, T., Kawaguchi, A. and Nobusawa, E. “Crystal structure of an influenza A virus (A/Aichi/2/1968 H3N2) hemagglutinin in C2 space group” Atomic coordinates and structure factor amplitudes were deposited in RCSB Protein Data Bank under accession code 3VUN.)。

E. 結論

新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) の HA 膜外ドメイン調製の条件探索を行った。HA1 領域は A/California/7/09 株由来、HA2 領域はブロメライン感受性として知られる PR8 株由来としたキメラ HA (Cal1PR2)、および二カ所に変異を導入することでブロメライン感受

性を獲得させた A/Narita/1/2009 株の HA (Narita373/374) の 2 種を作製した。両者は、プロメラインでの切断効率は悪いものの、可溶性の膜外ドメインを得ることに成功した。一方、Narita HA を認識する単一抗体のうち、配列が読まれている 8 種の精製 Fab フラグメントの調製を試みた。十分な Fab サンプルが取得できた 2 種のうち 1 種 (NSP29-Fab) において結晶を得ることに成功した。また、上記手法によって取得した HA のうち、Narita373/374 HA と、二種の精製抗体を用い、高速 AFM 観察を行い、抗原抗体複合体と思われる像の取得に成功したが、抗原抗体間の相互作用位置の詳細を観察することは困難であった。

A/Aichi/2/68 ウイルス由来 HA およびマウス単一抗体 (β 121d) Fab フラグメントの複合体サンプル結晶の回折データを収集し、構造解析を行った。解析の結果、複合体ではなく HA 単独の結晶であったことが示唆された。しかし、精密化した構造中には、これまでの結晶解析で観察されることがない複合型糖鎖の構造が明瞭に観察された。この座標は、重度に糖鎖修飾された HA 構造のひとつとして、抗体の抗原への accessibility の予測等、動力学シミュレーションの開始座標として有用だと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当無し。

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

該当無し。

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E	Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses.	Jpn. J. Infect. Dis,	66	65-68	2013
Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga A, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe- Nishikawa K.	Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees	Primates	54	89-98	2013
Tanaka S, Watanabe C, Okiyama Y	Statistical Correction to Effective Interactions in the Fragment Molecular Orbital Method	Chem. Phys. Lett.	556	272-277	2013
Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T..	Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11.	Virus Res.	170	109-117	2012
E Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima.	Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A.	Microbiol. Immunol.	56	99-106	2012

Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T.	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam.	Mod Pathol	Nov 23	doi: 10.1038 modpathol .2012.193. [Epub ahead of print]	2012
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama- Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T.	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood	120(24)	4733-43 doi:10.118 2	2012
van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H.	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine	30(40)	5893-900 doi:10.101 6	2012
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.	7(3)	552-62 doi:10.102 1	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 Virol	84(2)	336-44 doi:10.1002	2012
Yanagibashi, T. Hosono, A. Oyama, A Takahashi, Y Morose, Y Itoh, K Hirayama, K Takahashi, K Kaminogawa, S	IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: Bacteroides acidfaciens promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells	Immunobiology	Epub ahead of print		2012
Kaji, T Ishige, A Hikida, M Taka, J Hijikata, A Kubo, M Nagashima, T Takahashi, Y Kurosaki, T Okada, M Ohara, O Rajewsky, K Takemori, T	Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory.	J. Exp. Med.	209	2079-2097	2012
Onodera, T Takahashi, Y Yokoi, Y Ato, M Kodama, Y Hachimura, S Kurosaki, T Kobayashi, K	Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	109	2485-2490	2012

Ohnishi, K Takahashi, Y Kono, N Nakajima, N Mizukoshi, F Misawa, S Yamamoto, T Mitsuki, Y Fu, S Hirayama, N Ohshima, M Ato, M Kageyama, T Odagiri, T Tashiro, M Kobayashi, K Itamura, S Tsunetsugu- Yokota, Y	Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus.	Jpn. J. Infect. Dis.	65	19-27	2012
Yuki, N Takahashi, Y Ihara, T Ito, S Nakajima, T Funakoshi, K Furukawa, K Kobayashi, K Odaka, M	Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination.	J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry	83	116-117	2012
小野寺大志 小林和夫 高橋宜聖	B細胞内因性TLRシグナルによるB細胞応答の制御機構	臨床免疫・アレルギー科	58	275-282	2012
Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S	Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71	Journal of Virology	86	5686-5696	2012

Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, Kubo H, Nagatomi R	Inhibitory effects of tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells	European Respiratory Journal	40	122-132	2012
Shirato K, Kawase M, Watanabe O, Hirokawa C, Matsuyama S, Nishimura, Taguchi F	Differences in neutralizing antigenicity between laboratory and clinical isolates of HCoV-229E isolated in Japan in 2004-2008 depend on the S1 region sequence of the spike protein	Journal of General Virology	93	1908-1917	2012
清水宣明、片岡えりか、西村秀一、脇坂浩	ある小学校におけるA(H1N1)pdm09パンデミックインフルエンザの感染伝播動態の解析	日本環境感染学会誌	27	96-104	2012
西村秀一	殺菌能力を謳う各種空気洗浄電気製品の、塗布乾燥状態の細菌に対する効果の有無の検証	日本環境感染学会誌	27	342-345	2012
西村秀一	殺菌性能を有する空中浮遊物質の放出を謳う各種電気製品の、寒天平板培地上の細菌に対する殺菌能の本体についての解析	感染症誌	86	723-733	2012
Nakano T, Mochizuki Y, Yamashita K, Watanabe C, Fukuzawa K, Segawa K, Okiyama Y, Tsukamoto T, Tanaka S	Development of the Four-Body Corrected Fragment Molecular Orbital (FMO4) Method	Chem. Phys. Lett.	523	128-133	2012
Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S.	Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts.	J. Clin. Virol.	54(2)	130-134	2012

Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y.	Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein.	J. Virol.	86(23)	13108-13111	2012
Nishioka T, Yasutake Y, Nishiya Y, Tamura T	Structure-guided mutagenesis for the improvement of substrate specificity of <i>Bacillus megaterium</i> glucose 1-dehydrogenase IV	FEBS J.	279	3264-3275	2012
Takeuchi J, Maehashi K, Yasutake Y, Muramatsu Y, Miyata K, Watanabe T, Nagashima T	Properties of emu (<i>Dromaius novaehollandiae</i>) albumen proteins	Food Res. Int.	49	567-571	2012
Kitahara K, Yasutake Y. Miyazaki K.	Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in <i>Escherichia coli</i>	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	109	19220-19225	2012

