

自然感染でさえも今回調べたような抗体価が上がりにくい人たちが確認されたが、こうした人たちが、いったい何によって感染から護られているのか、あるいは護られないのかも興味深い。

E. 結論

本研究は、まだまだ完結しておらず、考察で述べた通り、むしろインフルエンザワクチンないしインフルエンザそのものにかかわる免疫学的興味がますます深まることとなった。

本研究の一環として、今回の研究期間ならびに将来の研究における解析対象となる血清を、種々の属性ごとに、ワクチン接種歴あるいは感染情報とあわせて収集保存することができたので、本研究で得られた情報/データそして発想とともに、長きにわたって将来につながられる態勢が整いつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

伊藤洋子ほか 不活化ワクチンに対する抗体反応無/低反応群の解析 第66回日本細菌学会東北支部総会 2012年8月24日 仙台市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 22～24 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

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ならびに分子動力学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 $\alpha 2-3$ ）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 の変異に対するマイ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

3 年間の研究成果をまとめると以下のようになる。

(1) HA とヒト型・トリ型レセプターの複合体構造で、HA の 190, 225, 226 番目のア

ミノ酸に対し、変異の導入と相互作用解析の計算機実験によって、アミノ酸残基の重要性を定量化した。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。

(2) 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。

(3) 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。

(4) 以上の解析を定量的かつ効率的に進めるシミュレーション・ツールとして、フラグメント分子軌道 (Fragment Molecular Orbital; FMO) 法ならびに分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) 法の基礎的方法論の新規開発を行った。

D. 考察

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、実験と相互補完的なアプローチとなってきた。上で述べた結果を踏まえた今後の展開ならびに課題としては以下のようなことが挙げられる。

・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、計算機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詳細に調べ、変異予測に役立てる。

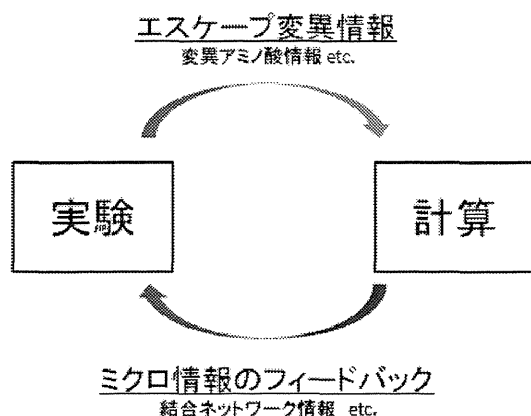
・ワクチン開発に有用な情報を提供する目的で、糖鎖結合 (特にトリ型) に重要な HA のアミノ酸残基の特定を計算機実験により行うことができたので、実際に変異実験を行って検証する。

・HA を中心とするインフルエンザウイルスのタンパク質に対する計算機シミュレーションを、古典力場を用いた MD 計算と量子力学的な FMO 計算を組み合わせることで実行し、変異による相互作用エネルギーの変化の解明や抗原変異予測等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 (下図参照)。



(図の説明)

実験と計算機シミュレーションの連携。実験から構造情報や変異アミノ酸情報などを得、その情報を基に分子シミュレーションを行って、詳細な結合解析などのマイクロ情報をフィードバックする。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Mochizuki, K. Yamashita, K. Fukuzawa, K. Takematsu, H. Watanabe, N. Taguchi, Y. Okiyama, M. Tsuboi, T. Nakano, and S. Tanaka, "Large-Scale FMO-MP3 Calculations on the Surface Proteins of Influenza Virus, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA)", Chem. Phys. Lett. 493 (2010) pp. 346-352.
- (2) 田中成典:「インフルエンザウイルスの分子シミュレーション」、アンサンブル 12, No. 4 (2010) pp. 27-30.
- (3) 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.

- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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 (FMO4) Method", Chem. Phys. Lett. 523 (2012) pp. 128-133.
- (7) 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) 吉岡彬生、栗崎以久男、渡邊博文、田中

- 成典：「分子動力学シミュレーションによるインフルエンザウイルス NS1 タンパク質と dsRNA の結合解析」(日本コンピュータ化学会 2010 春季年会、2010 年 5 月 21 日、東京)
- (2) 田中成典：「スーパーコンピュータでインフルエンザウイルスの変異の仕組みを探る」(地球シミュレータ産業利用シンポジウム 2010、2010 年 10 月 8 日、東京)
- (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 22 年度地球シミュレータ利用報告会、2011 年 2 月 4 日、横浜)
- (4) 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)
- (5) 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)
- (6) 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)
- (7) 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).
- (8) 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)
- (9) 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

本研究では、新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm09）の抗原蛋白質ヘマグルチニン（HA）と、中和抗体との複合体結晶構造解析を目指した。HA は組換え体を使用せず、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重要視し、ウイルスから直接プロテアーゼ（ブロメライン）を用いて HA 膜外ドメインを切り出す手法を用いた。一般に、H1 亜型の HA はブロメライン感受性であり、ウイルス粒子から HA 膜外ドメインをブロメラインにより切断し精製できる。しかしながら、Narita 株 H1N1 ウイルスはブロメラインに抵抗性を示したため、膜外ドメインの切り出しの条件検討を行う必要があった。全部で 4 種類の変異体もしくはキメラ HA を作製し、そのうち 2 種で可溶性 HA を取得することができた。しかしながら切断効率は低く、複合体結晶化に適した大量のサンプルを準備することができなかった。そこで、方針を変更し、高速原子間力顕微鏡（AFM）を利用した抗原抗体相互作用の観察を試みた。結果、抗体単独、および抗原抗体複合体となった状態の分子を観察することができた。蛋白質濃度、基板へ固定化する際の分子の方位をコントロールするなど、観察条件の最適化を行うことで明瞭な画像を得られる可能性が示された。またテストケースとして行った、A/Aichi/2/68 ウイルス由来からブロメラインを用いて取得した HA と単一抗体との複合体結晶化に関して、HA 単独の構造解析に成功した。これまでに観察できなかった糖鎖を伴った新規構造であったため、Protein Data Bank に登録し、公開した。

A. 研究目的

ヘマグルチニン（HA）蛋白質は、インフルエンザウイルスが細胞に感染する際に重要な役割を果たす。HA はウイルス表面に存在する主な抗原分子であり、その C 末端側が膜にアンカーされた状態の 3 量体として存在する。新型インフルエンザウイルス

（A/H1N1pdm09）は、抗原性において従来流行していた季節性インフルエンザウイルス（A/H1N1）と大きく異なることが明らかになっており、様々な中和抗体が認識する HA 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、実際

に HA と、HA を認識する単一抗体の結晶構造解析を行うことを目指した。その際、HA は組換え体ではなく、実際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することを考慮し、ウイルスを増殖させそこからプロテアーゼを用いて HA 膜外ドメインを切り出し、精製、結晶化を行う戦略をとった。

B. 研究方法

1. HA 膜外ドメインの調製

(1) 組換えウイルスの取得

以下の 4 種の改変型 HA を保持する組換えウイルスを用いて研究を行った。

- ① A/California/7/2009 株の HA 蛋白質の 524 番目セリンと 525 番目のスレオニン間に Thrombin（トロンピン）認識配列（LVPRG）を導入した HA 遺伝子（Cal7TCS）
- ② A/Narita/1/2009 株の HA 蛋白質の 509 番目のグルタミン酸から後方の 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（Narita509）
- ③ 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（Cal1PR2）
- ④ A/Narita/1/2009 の HA の 373 番目のアミノ酸を Asp から Asn へ、374 番目のアミノ酸を Glu から Gly に変えた HA 遺伝子（Narita373/374）

増殖することができたインフルエンザウイルス（A/Narita/1/2009、Narita509、Cal1PR、Narita373/374、および HA 切り出しのテストケース（陽性のコントロール実験）として用いた A/Aichi/2/68）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、再度、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

取得したウイルスと精製ブロメラインを 4:1 の割合で混ぜ、37°C で 17 hr 反応させた後、プロテアーゼ阻害剤 E64 を加えた。反応後の溶液を超遠心（320000 rpm, 50 min）し、切断された HA を上清中に集めた。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーカラム（Superose 12 10/300 GL）を利用し、遊離 HA 分画を回収した。

(3) SDS-PAGE

遊離 HA 分画後のサンプルを 37°C で 1 晩 PNGase 処理して Deglycosylation を行い、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・松崎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 Melon Gel Monoclonal IgG Purification kit (Pierce)を用いて精製した。精製 IgG は高速原子間力顕微鏡観察に用いた。さらに、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を含む腹水を HiTrap Proten G カラムを用いて精製した。両者とも、結晶化実験には構造が安定している Fab 領域のみを利用することとし、Fab preparation kit (Pierce)を用いてそれぞれの Fab 領域を調製した。

3. 結晶化

蛋白質の結晶化は全て、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、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、約 480 条件の初期スクリーニングを行った。結晶が得られたものに対しては、バッファー pH、沈殿剤濃度等を変化させ、結晶化条件の最適化を行った。

4. X線回折実験・構造解析

結晶回折実験は、茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構に設置されているシンクロトロン放射光施設 (PF) で行った。結晶は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 線を照射し、回折像を得た。回折データは HKL2000 プログラムパッケージによる空間群の決定、指数付けと回折強度の計算を行ない、MOLREP、REFMAC 等のソフトウェアを用いて構造解析を行った。

5. 高速原子間力顕微鏡観察

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、HA および単一抗体との相互作用状態を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) により観察した。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を取得した。画像処理には SPIP (Image Metrology 社) を用いた。

C. 研究結果

本研究を遂行した二年の間に行った内容を Fig. 1 にまとめた。最終目標であった新型ウイルス由来 HA と抗体複合体の結晶化は取得サンプル量が足りず実現できなかったが、代わりに高速原子間力顕微鏡を用いた観察を行った。さらに、テストケースとして行った Aich HA の結晶化に成功し、構

造決定を行った。

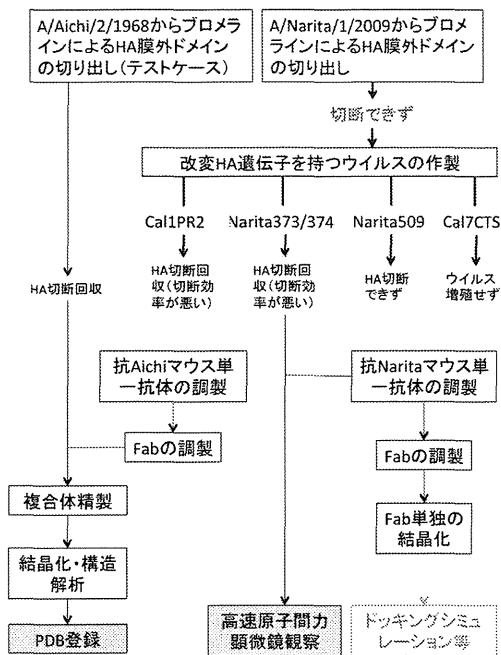


Fig. 1 本研究実施内容の概観

1. HA 膜外ドメインの調製

当初の研究計画では、H1 亜型の HA タンパク質はブロメラインにより膜外ドメインを切り出せることを想定していた。ところが、H1N1pdm09 の HA タンパク質はブロメライン抵抗性であり、膜外ドメインを調製することができなかった。そこで私たちは、HA 遺伝子の改変を行い、改変 HA 遺伝子を所持したウイルスを作製し、ブロメラインによって HA 膜外ドメインを調製することが可能か、検討を行った。「研究方法」のセクションに記載した、4 種の変異体もしくはキメラ HA を持つウイルスを作製し、ブロメラインによる処理を行ったところ、Cal1PR2、および Narita373/374 の 2 種において、切断効率は悪いものの HA 膜外ドメインの取得に成功した。本実験では、有精卵 20 個から約 80 μg の精製 HA 膜外ドメインを取得することができた。一方、Narita509 は切断することができず、トロンビンサイトを導入した Cal7TCS は何らかのウイルス毒性を発現したのかウイルスそのものを増

やすことができなかつた (Fig. 2)。

テストケース実験として、A/Aichi/2/1968 を用い、ブロメライン処理によるウイルスからの HA 膜外ドメインの単離を行った。本実験では抗 Aichi 単一抗体 Fab との複合体結晶化を試みる事が可能なミリグラムオーダーのサンプルを取得することができた。

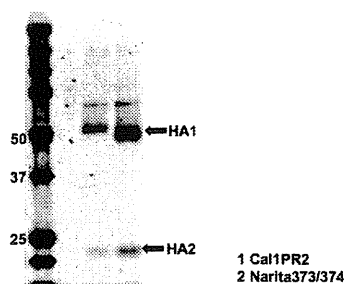


Fig. 2 精製 HA の SDS PAGE

2. 結晶化・X線回折実験・構造決定

Aichi HA-Fab 複合体サンプルは、0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M LiCl, 40% PEG400 (Qiagen JCSG core suite, D7)、0.1 M imidazole pH 7.0, 20% Jeffamine ED-2001 (Hampton Research PEG-RX, C2)、および 0.1 M Tris pH 8.5, 20% PEG 6000 (Qiagen Protein complex suite, D12) の3種の初期結晶化スクリーニング溶液中で、結晶の成長を確認した。結晶化ボリュームをスケールアップし、条件の最適化を行った結果、0.1-0.3 M imidazole pH 7.0, 20-25% Jeffamine ED-2001 の条件で単結晶を得た (Fig. 3)。

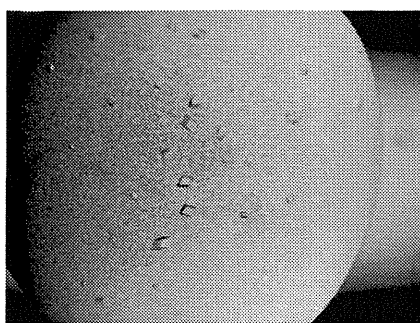


Fig. 3 Aichi HA-Fab サンプルから得られた結晶(空間群 C2 の結晶)

上述の Jeffamine を含む結晶化条件において二種の異なる結晶を得た。ひとつは空間群 $P4_21_2$ に属する結晶、もうひとつは空間群 C2 に属する結晶であった。構造解析は、既知の HA モデルをサーチモデルとして用いた分子置換法により行った。前者の結晶に対して解を得られなかつたが、後者の結晶に関しては明快な解を得ることができ、結晶構造解析に成功した。解析の結果、結晶格子 (非対称単位) 中にひとつの 3 量体 HA が存在していたが、複合体となっているはずの Fab フラグメントに相当する電子密度は観察されなかつた。よって、HA 単体が Fab から解離して結晶化したと考えられた (Fig. 4)。

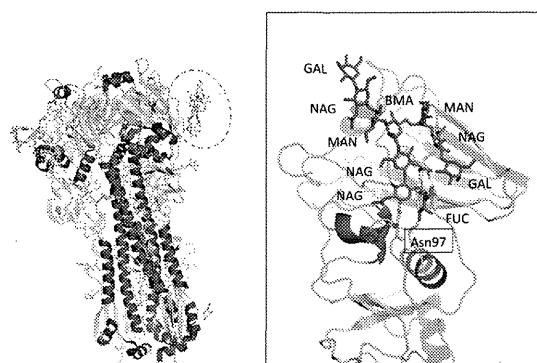


Fig. 4 精密化された Aich HA の構造モデル (左)、および Asn97 に結合した糖鎖の詳細 (右)

Narita HA と抗 Narita 単一抗体 Fab フラグメントの複合体に関しては、HA の取得量が結晶化を行うに不十分であったため、HA 構造は既知のものを利用したドッキングシミュレーションを念頭に、抗 Narita Fab 単独の結晶化を行った。結晶化を行った Fabのうち、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. 5)。しかしながら本結晶は 8 Å 分解能までの回折スポットまでしか得られず、構造解析を行うことが困難であった。

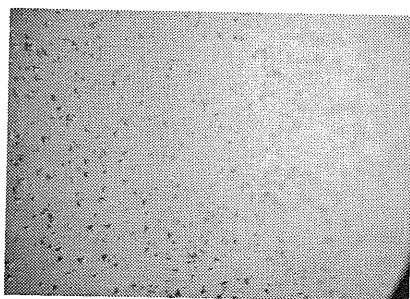


Fig. 5 NSP-29 Fab の結晶

3. 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM)

結晶を用いた抗原抗体複合体の結晶化が困難であったため、代替手法として高速原子間力顕微鏡による抗原抗体間相互作用の観察を試みた。これまで、インフルエンザウイルス HA と抗体の相互作用を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) で観察する試みは行われておらず、今回が最初となる。Narita373/374 の HA および抗 Narita マウス単一抗体を用い、バッファの種類、pH、蛋白質濃度の条件を変化させながら、分子の観察を行った。結果、バッファを用いずに超純水に置換した 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体および抗原を用いることで、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. 6, 7)。

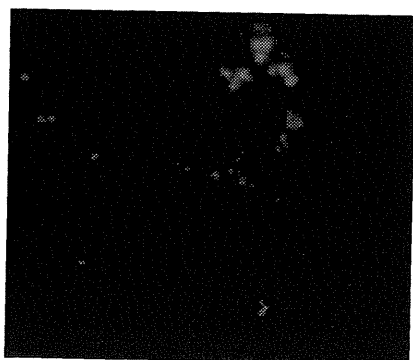


Fig. 6 高速 AFM でとらえた抗体単体の画像

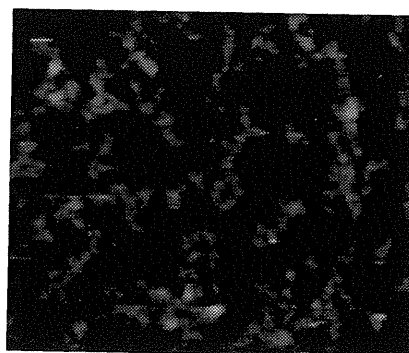


Fig. 7 高速 AFM でとらえた HA-抗体複合体の画像

D. 考察

本研究では、新型インフルエンザウイルス HA と中和抗体の複合体結晶構造解析を目指し、得られた結晶から抗原抗体間相互作用の原子レベルでの情報取得を目指した。また、構造情報を基盤とし、季節性インフルエンザウイルスとの違いを考察し、新たなワクチン開発に役立てることを目標とした。結晶構造解析の大きな障壁の一つとして、多量のサンプルが必要という点が挙げられる。一般に蛋白質の結晶化には、初期スクリーニングに mg オーダーのサンプルが必要であり、遺伝子組換え技術を用いて目的蛋白質を大量に取得するのが常法となっている。しかしながら抗原抗体相互作用の詳細を明らかにするためには、組換え体は適さないと私たちは考えた。なぜなら、抗体の中和活性は native 体と組換え体との間で大きく異なることもあり、それは構造の微細な違いや糖鎖付加の違いに起因すると考えられるからである。

本研究ではウイルスを大量に増殖させ、そこから結晶化に必要な充分の HA を取得することを目指した。一般に H1 亜型の HA タンパク質はブロメラインによりウイルス粒子から HA 膜外ドメインを切り出せることが知られる。A/H1N1pdm09 において、この方法を用いて HA を取得し研究を遂行できると当初判断していた。しかしながら、実際には A/H1N1pdm09 の HA はブロメライ

ン抵抗性を示したため、ブロメライン感受性の改変型 HA の作製を行う必要が生まれた。そこで、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、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 (PR8) と新型ウイルス Narita 株のキメラ HA、PR8 と新型ウイルスである A/California/7/09 株とのキメラ HA、さらには Wang らが報告した論文 (Vaccine, 2012, Jan 20;30(5):872-8) に基づいた Narita 株 HA の二重変異体を作製した。このうち、後者 2 種の HA を持つウイルスから HA 膜外ドメインを切り出すことに成功したが、残念ながら切断効率は低く、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。現在の切断効率は 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である。結晶化のために 5 mg のサンプルが必要だとするならば、卵約 1250 個が必要となる。実際には、抗体との複合体化後のクロマトグラフィー精製過程でのサンプル損失も考慮する必要があるため、さらに多量のウイルスを取得する必要があるため、現在の切断効率のままでは、結晶学的研究を行うためにウイルスから直接 HA を取得する事は現実的ではないかもしれない。

キメラ HA において、ブロメラインによって切断されるループ領域は、ブロメライン感受性の PR8 のものである。しかしながら切断効率は非常に悪い。また、二重変異体の二カ所の変異箇所は、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 ヘリックス上に存在する。これらの結果から、ブロメラインによる切断効率は、切断されるループ領域のアミノ酸配列に依存していないことが分かる。ウイルスから効率良く HA を回収するには、HA 遺伝子全体へのランダム変異の導入や、さらに別株由来の HA とのキメラ等を作製する必要が

あるが、安全性や実験効率の上で現実的とは言えない。今後、バキュロウイルスや大腸菌などの大量発現系を利用することを検討しなければならない。

A/H1N1pdm09 の HA 結晶化が困難であったことから、高速 AFM を用いた抗原抗体相互作用を捉える試みを世界に先駆けて行った。マイカ基板上に Y 字をした抗体分子、さらにはそこに抗原 HA を添加することで抗原抗体複合体と思われる分子の画像を取得することができた。しかしながら、分子量が相対的に小さいことと、HA 3 量体分子が棒状の分子であり、形状に特徴がないことから、高速 AFM 画像からどの位置にどのように抗体が結合するのか、詳細な情報を得ることは難しかった。今後、溶液条件や基板への固定条件の検討を行う事で、さらに鮮明な画像を取得できる可能性はあると考えている。

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 Fab との結晶化実験に関しては、HA のみの構造決定に 3.0 Å 分解能で成功した。結合しているはずの Fab 分子が存在しなかったため、結晶化母液中で両者は解離し、HA のみが単独で結晶化したものと考えられる。Aichi HA の 3 つのサブユニット全てにおいて、Asn97 にこれまで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。本構造データは、Protein Data Bank への登録を行ない、一般に公開した (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 HA の膜外ドメインを、ウイルスから直接取得する試みを行った。しかしながら、新型ウイルス HA はプロテアーゼ (ブロメライン) による切断を受け付けず、改変 HA においても高い切断効率を得ることができなかった。本研究の骨子である抗原抗体複合体の構造情報取得を達成するには、リコンビナント HA を大量調製する必要がある。

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行い、1 種 (NSP29-Fab) の Fab において結晶を得ることに成功した。残念ながら構造決定可能な良質な結晶を研究期間内に得る事ができなかったが、Fab の結晶化は前例も多くあり、多量のサンプルを取得し、多くの結晶化条件を試す事ができれば、構造解析は十分に可能だと考えている。構造決定できれば、リコンビナントの HA 構造とのドッキングシミュレーションなどから、抗原抗体相互作用領域に関する考察が可能になるだろう。

高速 AFM は、その解像度は結晶構造に比べると大きく落ちるのは否めないが、しかし少量のサンプルで実験可能であり、観察に最適な条件設定ができれば、どのように相互作用するかを観察することは可能だと考える。

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

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 |
|-----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|------|-----|------|
| 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 徳久剛史 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 |

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 |
|--|---|----------------------|-----|---------|------|
| 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 |
| Eri 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 modpatho l.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, Ainai 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:10.1182 | 2012 |

| | | | | | |
|---|---|----------------|--------|-------------------------|--------------------------------|
| van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. | Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. | Vaccine | 30(40) | 5893-900 doi:10.1016 | 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:10.1021 | 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 |
| 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 doi:10.1038 | 2012 Epub 2011 Aug 26 |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------|---------------------|-----------|------|
| 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: <i>Bacteroides acidfaciens</i> 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) | 103-134 | 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 Bacillus megaterium 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 |
| Akio.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 | 1197- 1202 | 2011 |
| Akio. 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 | 110-119 | 2011 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------|
| Kaori Fukuzawa, Katusmi Omagari, Katsuhisa Nakajima, Eri Nobusawa, Shigenori Tanaka. | Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1 virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin. | Protein and Peptide letters | 18 | 530-539 | 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 doi:10.1016 | 2011 |
| Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. | Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. | Jpn J Infect Dis | 64(1) | 40-9 | 2011 |
| Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H. | Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. | Hum Vaccin | 7 | Suppl:174-82 | 2011 |
| 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 |