

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792010

研究課題名(和文) 新規インフルエンザワクチン開発のための付着抗原の糖鎖修飾の基礎的研究

研究課題名(英文) Intraoral influenza vaccine targeting hemagglutinin glycosylation

研究代表者

Cueno Marni (CUENO, Marni)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：20569967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのHAの構造、およびその糖鎖修飾に関しては不明な点が多い。本研究では、構造計算科学の手法を駆使し、隣接する2個のアスパラギン残基(N1452-N1462)がHA2鎖の根本部分に保存されていることを見出した。また、HA2の882部位のアミノ酸残基の方向が、HA1の受容体結合部位の構造に影響を及ぼすこと、H7N9ウイルスのアミノ酸残基とHA1との関連性も示すことができた。さらに、HAのN-glycosylationについても検討した後、植物にてHAキメラタンパクを作成すると共に、マウスを用いた実験でその免疫活性の確認を行い、新規ワクチン開発の基盤を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus is an RNA virus that initiates infection primarily attributed to the hemagglutinin (HA) glycoprotein which is a type I integral membrane with an ectodomain composed of a globular head and a stem region where both of these regions carry N-linked oligosaccharide chains. We established the significance of certain salt bridges found within HA that may have resulted in cross species infection of the H1N1 strain and the assembly of the novel H7N9 strain. In addition, we designed a potential tomato-produced influenza subunit vaccine that utilizes the oral mucosa and targets the influenza overlapping glycosylation sequons (OGS). We were able to vaccinate mice with the OGS-containing chimeric protein with the ideal protein vaccination concentration, however, we only detected low antibody amounts. We suspect that either the protein vaccination concentration is too low to induce high antibody response or the ELISA assay we developed was not so sensitive.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：インフルエンザウイルス ヘマグルチニン N-glycosylation glycosylation sequons

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは冬場に向け毎年のように流行し高齢者を中心に1万人近くの死亡をもたらすと共に、時にパンデミックを引き起こし、いまだに人類にとって脅威である。ウイルス NA 阻害薬やワクチンは予防と治療に効果的であるが、費用や薬剤耐性ウイルスの問題等多くの課題があり、新たな予防法と治療法の開発は喫緊の課題である。特に高齢者は罹患率、重症率ともに高いことから、日頃から予防策を講じることが重要である。本研究では、インフルエンザ予防における新規ワクチン開発のための基礎研究を行う。インフルエンザウイルスは、宿主細胞表面のシアル酸に結合することにより感染が成立する。この際、ウイルス表層のヘマグルチニン (HA) がウイルス側のレセプターとして重要な役割を演じる。HA は、ホモ型糖タンパク質の三量体で、ウイルスの表層の大部分を占め糸球状の脚部 (HA2) が差し込まれる形でエンベロープから突出しその先端の球状頭部 (HA1) を支えている。はじめに、計算構造解析を駆使し、H1N1 ウイルスのウイルス種内形質伝達および感染に伴い変化した可能性が高いと思われる HA2 構成アミノ酸残基の同定を試みる。その後、HA の N-glycosylation に関して検討をし、植物にてキメラタンパクを作成、ELISA 法などを用いて、免疫反応が起こっているかを検討することで新規予防法開発の基盤を構築する。本研究は、基礎と臨床をつなぐ萌芽的トランスレーショナルリサーチとしても大きな意味があるとともに、人々の健康増進、特に高齢者の健康増進に大きく貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの HA 抗原の中で、特に HA1 と HA2 は重要で遺伝子の変異の割合が大きく、その構造変化はウイルスの感染性と

病原性に多大な影響を与える。しかしながら、HA の構造、およびその糖鎖修飾に関しては不明な点が多い。したがって、本課題ではウイルス HA に注目し以下の研究を行う。

(1) HA1 と HA2 の構造と抗原性に関する研究: 実験で使用する HA タンパクを作成するために、GenBank に登録されている 400 種類以上の A 型ウイルス分離株のアミノ酸配列情報を収集し、よく保存されている領域を調べる。HA タンパクの作成と並行し、タンパク分子の高次構造の性質を検討する。

(2) HA の N-glycosylation の解析と HA キメラタンパクの作成およびその免疫活性の検討

3. 研究の方法

(1) ヒトインフルエンザウイルスはその内部抗原により A 型、B 型、C 型に分類され、A 型と B 型の表面には HA とノイラミニダーゼ (NA) をもつ。感染時において、HA は宿主細胞表面にある受容体のシアル酸残基に結合し、細胞内に取り込まれる。構造解析ソフト: GlobPlot を用い計算構造解析を駆使し、H1N1 ウイルスのウイルス種内形質伝達および感染に伴い変化した可能性が高いと思われる HA2 構成アミノ酸残基の同定を試みる。

(2) HA1 と HA2 は、現行のワクチンの成分としても使用されている。本研究においても抗原として HA をターゲットとし、HA の N-glycosylation に関して検討したうえで、植物 (トマト) にて HA キメラタンパクを作成すると共に、マウスを用いた実験でその免疫活性を ERISPOT assay 等により検討する。

4. 研究成果

(1) 解析の結果、ヒト、豚、トリ型ウイル

スの隣接する 2 個のアスパラギン残基 (N145₂-N146₂) が HA2 鎖の根本部分に保存されていることを見出し、この残基がウイルス HA 構造の安定性に寄与していることが推察された (Cueno ME et al. OMICS 2013)。また、HA2 の B ループに存在する 88₂ 部位のアミノ酸残基の方向が、HA1 の受容体結合部位の構造に影響を及ぼす可能性を見出した。さらに、この 88₂ 部位のアミノ酸残基はウイルスの変異にも寄与していることが推察された (図 1)。加えて、H7N9 ウイルスのアミノ酸残基と HA1 の受容体結合部位との関連性についても明らかにすることができた (Cueno ME et al. PLOS ONE 2013)。

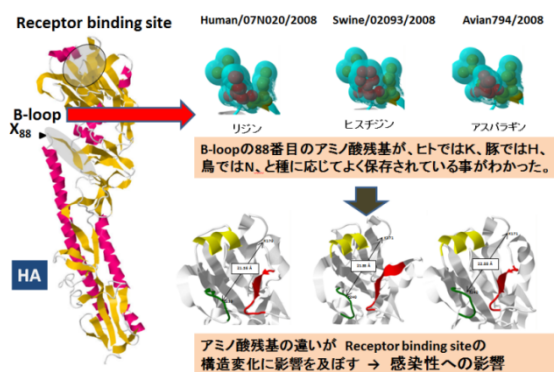


図 1 HA の構造と 88₂ 部位アミノ酸残基の重要性

(2) HA の N-glycosylation サイトは多くのインフルエンザウイルスで認められたが、なかでも glycosylation sequons (OGS) が種々のウイルス間でよく保存されていた。従い、OGS と RGD motif を含むキメラタンパクをトマトの発現系を用いて作成し、構造の発現と安定性を確認した。その後、500 mg/mL の濃度のタンパクをマウスに接種し、継続的に採血を行い、ELISA や ELISPOT assay 等によりキメラタンパクの抗体価の確認をおこなった (図 2)。新規ワクチン開発のための予備実験が完了し、現在実験を進めている。

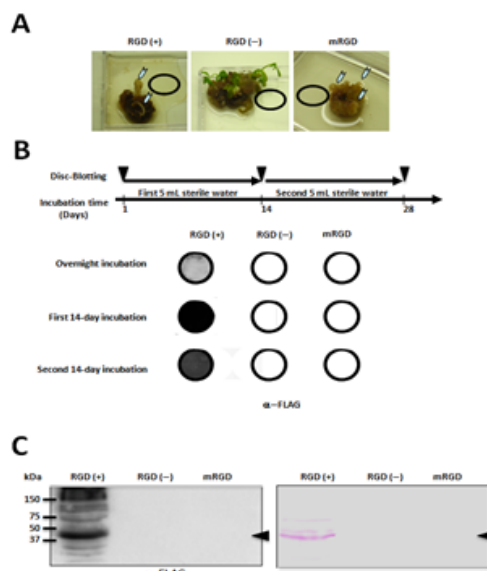


図 2 キメラタンパクの発現と ELISPOT assay の結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Imai K, Kamio N, Cueno ME, Saito Y, Inoue H, Saito I, Ochiai K : Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39h1 in maintaining Epstein - Barr virus latency in B95-8 cells. FEBS J, 査読有, vol.281(9), 2014, 2148-2158. DOI: 10.1111/febs.12768
- ② Cueno ME, Imai K, Matsukawa N, Tsukahara T, Kurita-Ochiai T, Ochiai K : Butyric acid retention in gingival tissue induces oxidative stress in jugular blood mitochondria. Cell Stress Chaperon, 査読有, vol.18, 2013, 661-665. DOI: 10.1007/s12192-013-0409-z.
- ③ Cueno ME, Imai K, Tamura M, Ochiai K : Structural differences between the

- avian and human H7N9 hemagglutinin proteins are attribute to modifications in salt bridge formation: a computational study with implications in viral evolution. PLOS ONE, 査読有, vol.8, 2013, 1-7.
DOI:10.1371/journal.pone.0076764.
- ④ Cueno ME, Imai K, Shimizu K, Ochiai K : Homology modeling study toward identifying structural properties in the HA2 B-loop that would influence the HA1 receptor-binding site. J Mol Graph Model, 査読有, vol.44, 2013, 161-167.
DOI: 10.1016/j.jm gm.2013.05.011.
- ⑤ Cueno ME, Imai K, Ochiai K : Structural insights on the potential significance of the twin Asn-residue found at the base of the hemagglutinin 2 stalk in all influenza A H1N1 strains: a computational study with clinical implications. OMICS, 査読有, vol.17, 2013, 297-301.
DOI: 10.1089/omi.2012.0107.
- ⑥ Cueno ME, Imai K, Okamoto T, Ochiai K : Overlapping glycosylation sequon influences the glycosylation pattern of a chimeric protein expressed in tomato leaf and callus. J Biotechnol, 査読有, vol.164, 2013, 9-12.
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.001.
- ⑦ Cueno ME, Imai K, Ochiai K, Okamoto T : Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. J Plant Physiol, 査読有, vol.169(8), 2012, 834-838.
DOI:10.1016/j.jplph.2012.01.008.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Marni E. Cueno, Kuniyasu Ochiai : Periodontal bacterial metabolite induces rat blood apoptotic and pyroptotic caspase activities. 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 28 日、タワーホール船堀、東京。
- ② Marni E. Cueno, Noriko Matsukawa, Takamitsu Tsukahara, Kuniyasu Ochiai : Butyric acid-induced heme accumulation is associated with an increase in rat blood CASP1 and CASP3 activities. 第 17 回国際フリーラジカル会議、2014 年 3 月 26 日、京都国際会議場、京都。
- ③ 神尾 宜昌、今井 健一、田村 宗明、Marni Cueno、清水 一史、落合 邦康 : 口腔細菌のインフルエンザウイルス感染促進と重症化に及ぼす影響、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日、神戸国際会議場、兵庫。
- ④ Marni E. Cueno, Kenichi Imai, Muneaki Tamura, Kuniyasu Ochiai : Butyric acid-retention in the rat gingival tissue induces whole blood oxidative stress and apoptosis: A possible link to systemic diseases. 第 13 回日本ミトコンドリア学会、2013 年 11 月 6 日、六本木アカデミーヒルズ、東京。
- ⑤ Marni E. Cueno, Noriaki Kamio, Kenichi Imai, Muneaki Tamura and Kuniyasu Ochiai : Positively-charged amino acid residues found in the sialidase domain influences -Porphyromonas gingivalis-. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 21 日、岡山コンベンションセンター、岡山。
- ⑥ Marni E. Cueno, Keiji Nagano, Kenichi

- Imai, Fuminobu Yoshimura and Kuniyasu Ochiai : Homology modeling and structural analyses of the six *Porphyromonas gingivalis* Firm A variants. 15th International Congress of Immunology, 2013年8月27日、Milano Congressi, イタリア.
- ⑦ Cueno ME, Imai K, Tamura M, Ochiai K : Molecular structure and characterization of *Porphyromonas gingivalis* FimA type I and II、第86回日本細菌学会総会、2013年3月20日、幕張メッセ 国際会議場、千葉.
- ⑧ Cueno, M.E. K. Imai, and K. Ochiai : Influenza A H1N1 Pathogenesis And Transmissibility Are Structurally Correlated To The Salt Bridge Between The HA1 110-helix And HA2 B-loop. Second isirv AVG conference, 2012 Oct 30, Melia Hotel, Vietnam.
- ⑨ Cueno, M.E. K. Imai, N. Matsukawa, T. Tsukahara and K. Ochiai : Butyric acid-induced mitochondrial oxidative stress is correlated to HEME accumulation. Keystone Symposia (S2): Aging and Diseases of Aging, 2012 Oct 25, Sheraton Miyako Hotel, Tokyo.
- ⑩ Cueno M. E., K. Imai and K. Ochiai : Hydrophobicity and *N*-glycosylation patterns of *Porphyromonas gingivalis* FimA variants. 第54回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2012年9月16日、奥羽大学, 福島.
- ⑪ Cueno, M.E. K. Imai, M. Tamura, and K. Ochiai : Structural comparison of *Porphyromonas gingivalis* FimA variants. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and other related

bacterial species, 2012 Aug 27, Nagasaki Univ., Nagasaki.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Cueno Marni (CUENO, Marni)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号 : 20569967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし