

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659268

研究課題名(和文) インフルエンザ誘導サイトカインストームを制御するウイルス遺伝子NS1による評価法

研究課題名(英文) Evaluation methods for viral gene NS1 regulating cytokine storm induced with influenza virus

研究代表者

鈴木 和男 (Suzuki, Kazuo)

帝京大学・医療共通教育研究センター・教授

研究者番号：20192130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性トリインフルエンザウイルス(A/H5N1)感染は急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を誘発し60%の高死亡率を示す。その発症にNS1タンパク質構造が関与することを明らかにした(Kato YS, Fukui K, Suzuki K, Prot Pep Lett, 23(4), 2016, 372-8)。すなわち、二本鎖RNAに結合するSer42が、A/H5N1では、Pro42となり結合を示さなかったことがH5N1の病原性に影響したと考えられる。一方、PLサイトにGSEVをもつNS1が肺上皮細胞のバリア機能を低下させ、劇症肺炎を誘発する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Avian influenza H5N1 has shown high mortality rate in human with 60%. Non-structural protein 1 (NS1) is a virulence factor of H5N1. Mutation at the 42nd residue within the RNA-binding domain (RBD) of NS1 dramatically changes the degree of pathogenicity of H5N1 in mice. We here studied the impact of this mutation on the function of RBD, and found that RBD with S42 binds double-stranded RNA (dsRNA), whereas that with P42 does not. Analysis of structural models of the RBD proteins with S42 and P42 suggested remarkable difference in the structure of the dsRNA-binding interface, whereas structural analysis did not indicate difference between those RBD proteins. Our results suggest that the single amino acid replacement induces a minor, but global structural change leading to the loss of function of NS1 thereby the change in the degree of pathogenicity. In addition, PL site of NS1 may associate with down-regulation of tight junction molecules on epithelial cells in lung.

研究分野：感染症と免疫

キーワード：インフルエンザ A/H5N1 高病原性 分子構造 ARDS 肺上皮細胞 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

パンデミックインフルエンザでは致死的な重症化に伴うサイトカインストームによる急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome: ARDS) を誘発し高死亡率を示す。高病原性トリインフルエンザウイルス (A/H5N1) 感染による重症化に關するサイトカインストームの原因に上皮細胞への感染 ((Nguyen & Suzuki et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2008; 61: 157-160) に続き、インフルエンザ (IFV) の non-structure protein 1 (NS1) タンパク質が關与している可能性が指摘されている。NS1 は多くの RNA やタンパク質に結合してインフルエンザの症状を悪化させる。NS1 によるサイトカインストーム誘導機構の詳細は明らかではなかったが、われわれは H_2O_2 -myeloperoxidase (MPO) が NS1 と連動してサイトカインストームの引き金になることを明らかにしてきている (Phung TT, Suzuki K. et al. Microbiol Immunol. 2011; Dec; 55(12):874-84)。

2. 研究の目的

本研究では、NS1 に結合する細胞内因子を探索し、その因子の構造解析に基づいた分子機構を明らかにする。本研究は、高病原性インフルエンザウイルス感染に伴うサイトカインストームの発症の予防と治療の開発に必要なエビデンスを提供する。

3. 研究の方法

- (1) NS1 蛋白質の発現系の構築および蛋白質精製法の確立を行った。発現系の構築にはアフィニータグを利用し、精製効率を検討した。大腸菌の大量発現系を構築した。
- (2) NS1 結合成分の複合体を結晶化およびナノスケールでの微量結晶化。分子量の小さいものであればコンビナントサンプルを用いて NMR により相互作用解析を行った。
- (3) 得られた微結晶品をさらに成長させる 2 次スクリーニングを施行し、より良好な結晶を得、放射光設備で良好な X 線屈折像を得、クライオ条件での X 線データを得ることも検討した。
- (4) NMR での相互作用解析においては、候補となる生体高分子を用いて安定同位体標識した NS1 を滴定する。N1dR シグナル移動が大きいところがあるかどうか確かめ、既知の NS1 構造と見比べて相互作用面を決定した。相互作用のパートナーが構造既知のものであれば、以上の情報だけからでもドッキング計算により複合体構造モデルを構築。
- (5) 立体構造情報を用いて総合的に判断することで、構造に基づいた分子機構を示した。その分子機構に基づいて、あらたな薬剤のリード化合物を提案することも検討した。

4. 研究成果

IFV の感染により劇症型となる重篤な肺炎を併発することがある。近年では、高病原性トリインフルエンザ (A/H5N1 型) がヒトでは 60% もの高死

亡率を示している。病態は ARDS を示し呼吸不全に至る。その発症機構には不明な点が多く、現在その 1 番の候補として考えられている要因として NS1 タンパク質がある。

本研究では、インフルエンザ重症化因子に關連する遺伝子 NS1 の機能について検討した。

トリインフルエンザウイルス H5N1 の重症化因子としての NS1 遺伝子の解析:

H5N1 の遺伝子変異が及ぼす NS1 のタンパク質構造変化についてシミュレーション解析により、タンパク質の構造の關与を明らかにした。 (Kato Ys, Fukuia K, Suzuki K, Mechanism of a Mutation in Non-Structural Protein 1 inducing High Pathogenicity of Avian Influenza Virus H5N1. Protein & Peptide Letters, 23(4), 2016, 372-8)。具体的には NS1 の RNA 結合ドメインの 42 番目のアミノ酸の異変が、H5N1 の病原性に決定的な影響を与える。RNA 結合ドメインに対する機能的な影響 (図 1) を調べたところ、42 番目の残基がセリンの場合には、二本鎖 RNA に対する結合を示したのに対し、プロリンの場合には結合を示さなかった (図 2)。本解析結果から、変異により RNA 結合インターフェイスの構造に違いが見られた。

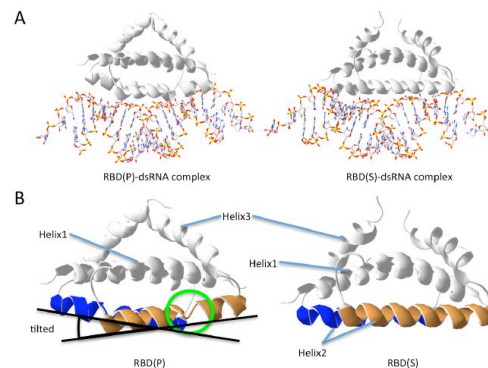


図 1. Model structures of the RBD proteins.

(A) Model structures of the RBD-dsRNA complexes. Dimer models of the RBD(P) (left panel) and RBD(S) (right panel). (B) Comparison of models of the RBD proteins. The models of RBD(P) (left panel) and RBD(S) (right panel) are depicted as ribbons.

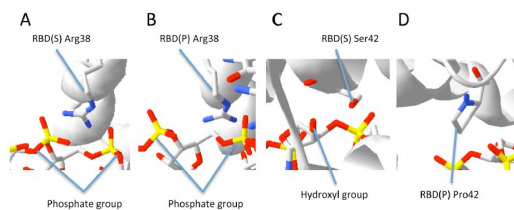


図 2. Difference in local structures of the RBD-dsRNA complexes. (A) The guanidinium group of R38 of the RBD(S), (B) R38 of the RBD(P) model, (C) The hydroxyl group of S42 of the RBD(S) model and P42 of the RBD(P) model lacks a hydroxyl group present in Ser.

一方、インフルエンザウイルス遺伝子の NS1

が、どのように劇症化に関与するかを解析した結果、NS1 遺伝子の PL サイトに「GSEV」の構造が関与している可能性が浮上した。具体的には、インフルエンザウイルスが肺上皮細胞に感染するとタイトジャンクション分子の発現調節因子に NS1 が結合しバリアー機能を低下させ、劇症化肺炎を誘発する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 23 件)

Kato YS, Fukui K, Suzuki K. Mechanism of a Mutation in Non-Structural Protein 1 Inducing High Pathogenicity of Avian Influenza Virus H5N1. *Protein & Peptide Letters*, 査読有, 23(4), 2016, 372-8

Yasuda H, Kawachi S, Suzuki K. Simulated pathogenesis of severe acute respiratory distress syndrome and leukopenia induced with influenza A/H5N1 virus infection and its treatment with immunoglobulins. *J Math Monographs*, 査読有, 9, 2016, 89-104

Okochi1 Y, Aratani Y, Adissu HA, Miyawaki N, Sasaki M, Suzuki K, Okamura Y. The voltage-gated proton channel Hv1/VSOP inhibits neutrophil granule release. *J Leuko Biol*. 査読有, Jan;99(1) 2016;:7-19.

菱木はるか、石和田稔彦、内藤幸子、長澤耕男、染谷知宏、井上紳江、原木真名、黒崎知道、亀岡洋祐、鈴木和男. 2013/2014 シーズンのインフルエンザ小児症例に対するノイラミニダーゼ阻害薬の臨床効果の比較. *JpJAntibiotic*, 査読有, 68 巻, 2015, 337-343

Oshiro S, Tada T, Kameoka Y, Suzuki K, Ohmagari N, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Development and evaluation of immunochromatography to detect Gram-negative bacteria producing ArmA 16S rRNA methylase responsible for aminoglycoside resistance. *J Microbiol Methods*, 査読有, 118, 2015, 159-163

DOI: 10.1189/jlb.3HI0814-393R.

Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N. Mutations in HADHB, which encodes the β -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *Am J Med Genet A*. 164, 2014, 査読無, 1180-1187

DOI: 10.1002/ajmg.a.36434.Epub 2014 Mar 24

Hirahashi J, Kawahata K, Arita M, Iwamoto R, Hishikawa K, Honda M, Hamasaki Y, Tanaka M, Okubo K, Kurosawa M, Takase O, Nakakuki M, Saiga K, Suzuki K, Kawachi S, Tojo A, Seki G, Marumo T, Hayashi M, Fujita T. Immunomodulation with eicosapentaenoic acid supports the treatment of autoimmune small-vessel vasculitis. *Scientific Rep*, 査読有, 4, 2014, 6406

DOI: 10.1038/srep06406

Hamano Y, Abe M, Matsuoka S, Zhang D, Kondo Y, Kagami Y, Ishigami A, Maruyama N, Tsuruta Y, Yumura W, Suzuki K. Susceptibility QTLs for pathogenic leukocytosis in SCG/Kj mice, a spontaneously occurring crescentic glomerulonephritis and vasculitis model. *Clin Exp Immunol*. 査読有, 177(1), 2014, 353-65

DOI:10.1111/cei.12333.[Epub.aheadvof page]

Sugamata R, Sugawara A, Nagao T, Suzuki K, Hirose T, Yamamoto K, Oshima M, Kobayashi K, Sunazuka T, Akagawa KS, Omura S, Nakayama T, Suzuki K. Leucomycin A3 (LM-A3), a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. *J. Antibiotics*. 査読有, 67, 2014, 213-22,

DOI: 10.1038/ja.2013.Epub 2014 Feb 5

Suzuki N, Imai LF, Kato Y, Nagata K, Ohashi Y, Kuchitsu K, Tanokura M, Sakamoto A, Nara M, Nakano M, Yonezawa N. Coordination structures of Mg²⁺ and Ca²⁺ in three types of tobacco calmodulins in solution: Fourier-transform infrared spectroscopic studies of side-chain COO(-) groups. *Biopolymers*. 査読有, 99, 2014, 472-483

DOI: 10.1002/bip.22203

Shiga Y, Sugamata R, Iwamura C, Nagao T, Zao J, Kawakami K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Effect of invariant natural killer T cells with IL-5 and activated IL-6 receptor in ventilator-associated lung injury in mice. *Exp Lung Res*. 査読有, 40, 2014, 1-11

DOI: 10.3109/01902148.2013.854518. Epub 2013 Nov 18.

Suzuki K, Nagao T, Itabashi M, Hamano Y, Sugamata R, Yamazaki Y, Yumura W, Tsukita S, Wang PC, Nakayama T, Suzuki K. A novel autoantibody against moesin in the serum of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有, 29(6), 2013, 1168-77

DOI: 10.1093/ndt/gft469

Suzuki K. Remarks on the Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. *Clin Exp Nephrol*. 査読有, 17, 2013, 599-602

DOI: 10.1007/s10157-013-0805-9.Epub 2013 Apr

Suzuki K, Suzuki K, Nagao T, Nakayama T. Proposal of anti-moesin as a novel biomarker for ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol*. 査読有, 17, 2013, 638-641

DOI: 10.1007/s10157-013-0861-1.Epub Sep

Nagao T, Kusunoki R, Iwamura C, Kobayashi S, Yumura W, Kameoka Y, Nakayama T, Suzuki K. Correlation of Interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 levels with the crescent formation and myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody titer in SCG/Kj mice by treatment with

anti-interleukin-6 receptor antibody or Mizoribine. *Microbiol Immunol*. 査読有, 57, 2013, 640-650
DOI: 10.1111/1348-0421.12080.

Tateno N, Matsumoto N, Motowaki T, Suzuki K, Aratani Y. Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils. Myeloperoxidase deficiency induces MIP-2 production via ERK activation in zymosan-stimulated mouse neutrophils. *Free Radic Res*. 査読有, 47, 2013, 375-386
DOI: 10.3109/10715762.2013.778990. Epub 2013 Mar 22.1.

Kato YS, Yumoto F, Tanaka H, Miyakawa T, Miyauchi Y, Takeshita D, Sawano Y, Ojima T, Ohtsuki I, Tanokura M. Structure of the Ca²⁺-saturated C-terminal domain of scallop troponin C in complex with a troponin I fragment. *Biol Chem*. 査読有, 394, 2013, 55-68
DOI: 10.1515/hsz-2012-0152

Yamada K, Takado Y, Kato YS, Yamada Y, Ishiguro H, Wakamatsu N. Characterization of the mutant β -subunit of β -hexosaminidase for dimer formation responsible for the adult form of Sandhoff disease with the motor neuron disease phenotype. *J Biochem*. 査読有, 153, 2013, 111-119
DOI: 10.1093/jb/mvs131. Epub 2012 Nov 5

Nakajima N, Ngo VT, Sato Y, Hoang NT, Katano H, Pho HD, Kumasaka T, Nguyen TT, Hasegawa H, Long TS, Kawachi S, Nguyen TL, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from 5 fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Modern Pathol*. 査読有, 26, 2012, 357-369
DOI: 10.1038/modpathol.2012.193. Epub 2012 Nov 23.

Yamanishi Y, Ito-Ihara T, Nagao T, Uno K, Kobayashi S, Muso E, Shane PY, Firestein GS, Hashimoto H, Okazaki T, Suzuki K. Clinical features of patients with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies targeting native myeloperoxidase antigen. *Modern Rheumatol*. 査読有, Oct 21, 2012, ahead of print
DOI: 10.1007/s10165-012-0781-z.

④ Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y, Tsukita S. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of interleukin-1 beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology*, 査読有, 142(2), 2012, 292-304

② Koshio O, Nagao T, Mabuchi A, Ono Y, Suzuki K. Apoptotic signaling in endothelial cells with neutrophil activation. *Mol Cell Biochem*, 査読有, 363, 2012, 269-280
10.1053/j.gastro.2011.10.040. Epub 2011 Nov 10.
DOI: 10.1007/s11010-011-1179-5

③ Fujimori Y, Sato T, Hayata T, Nagao T,

Nakayama M, Nakayama T, Sugamata R, Suzuki K. Novel antiviral characters of nanosized copper(I) iodide particles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Appl Environ Microbiol*, 査読有, 78(4), 2012, 951-955
DOI: 10.1128/AEM.06284-11. Epub 2011 Dec 9.

(学会発表)(計 15 件)

加藤有介, 菱木はるか, 亀岡洋祐, 伊東玲子, 鈴木章一, 小川知子, 石和田稔彦, 鈴木和男. インフルエンザの薬剤耐性を見る. 第 24 回バイオイメージング学会(招待講演). 2015 年 09 月 27 日 ~ 2015 年 09 月 28 日. 東京理科大学(東京, 葛飾区)

Kazuo Suzuki. Contribution of MPO sever e ARDS inducted with influenza virus and autoimmune disease MPO-AMCA-related vasculitis. 9th International Human Peroxidase Meeting. (招待講演)(国際学会)2015 年 09 月 14 日 ~ 2015 年 09 月 16 日, Colone, Germany

鈴木和男. Project JST/AMED e-ASIA JRP. 第 8 回 ADC 研 Symposium (招待講演)2015 年 03 月 14 日. 帝京大学(東京, 板橋区)

鈴木和男. エボラ出血熱 In the NIAID-NIH, USA. 第 7 回 ADC 研 Symposium (招待講演). 2015 年 01 月 17 日. 帝京大学(東京, 板橋区)

鈴木和男. 国際共同研究によるインフルエンザおよび血管炎の臨床疫学の成果と今後の展開. シンポジウム「感染症/生態系監視ネットワークの構築」(招待講演)2014 年 12 月 12 日 ~ 2014 年 12 月 13 日. 日本大学(神奈川県, 藤沢市)

加藤有介. トリインフルエンザ劇症化における NS1 分子機構. 第 20 回 MPO 研究会. 2014 年 11 月 07 日 ~ 2014 年 11 月 08 日. KKR ホテル(静岡, 熱海市)

鈴木和男. 天然痘とバイオテロ: バイオテロ対策のシミュレーション. 第 5 回 ADC 研 Symposium (招待講演)2014 年 08 月 01 日. 帝京大学(東京, 板橋区)

鈴木和男. 東南アジアのパンデミックインフルエンザおよび危機管理の現状と対策. 13 回日本旅行医学会(招待講演)2014 年 04 月 19 日 ~ 2014 年 04 月 22 日. 国立オリンピック青少年会館(東京, 渋谷区)

Kazuo Suzuki. Trends in quality of healthcare and Asian infectious diseases. International Symposium I. 2014 年 01 月 19 日. Teikyo University, Tokyo, Japan

Kazuo Suzuki. Pulmonary Infectious Diseases induced associated with Influenza and TB in Asia Countries. International Symposium in e-ASIA. 2014 年 01 月 18 日. Teikyo University, Tokyo, Japan

鈴木和男. 「難治性疾患の治療法と新薬開発の最前線」難病対策の動向と難治性血管炎の治療戦略. 産学連携セミナー(招待講演). 2012 年 11 月 30 日. バイオインダストリー協会(東京, 中央区)

鈴木和男. 抗好中球細胞質抗体関連血管炎に関わる新規自己抗体 Anti-Moesin. 第40回臨床免疫学会総会. 2012年09月27日~2012年09月29日. 京王プラザ(東京, 新宿区)

鈴木和男. 呼吸器系ウイルス検出パネルの評価と感染症におけるサイトカインパネルの有用性. PLANET xMPA 2012(招待講演). 2012年05月16日. 六本木ヒルズ(東京, 港区)

鈴木和男. インフルエンザ(H5N1)の死因となる劇症型ARDSの病態解析とモデル動物・治療法の開発: 海外症例に学ぶ. 高病原性インフルエンザ H5N1 のパンデミックの脅威とハノイとの共同研究. 第9回肺研究フォーラム21. 2012年04月21日~2012年04月22日. 神戸コンベンションセンター(兵庫, 神戸)

鈴木和男. バイオサイエンス研究のために研究費をいかに獲得するか?. 第87回日本細菌学会(招待講演). 2014年03月26日. タワーホール船堀(東京, 江戸川区)

(図書)(計2件)

鈴木和男. 日本臨床社, 「血管炎 - 基礎と臨床のクロストーク」, 序文, 2013, 19

鈴木和男, 鈴木浩也, 日本臨床社, 「血管炎 - 基礎と臨床のクロストーク」, 血管炎の新しいバイオマーカー: 抗 moesin 抗体, 2013, 19

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 和男 (SUZUKI Kazuo)

帝京大学・医療共通教育研究センター・教授
研究者番号: 20192130

(2)研究分担者

加藤 有介 (KATO Yusuke)

徳島大学・疾患酵素学研究センター 准教授
研究者番号: 70596816