

3. Karahashi, H. and Amano, F. :Structure-activity relationships of lipopolysaccharide (LPS) in tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and induction of macrophage cell death in the presence of cycloheximide (CHX) in a murine macrophage-like cell line, J774.1. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1102-1105(1998).
 4. Nakamura, M., Imaoka, S., Amano, F., Funae, Y. : P-450 isoforms in a murine macrophage cell line, RAW264.7, and changes in the levels of P-450 isoforms by activation with LPS and IFN- γ . *Biochim. Biophys. Acta*, **1385**,101-106(1998).
 5. Noda, T., Amano, F.: Defect in induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharide (LPS) in an LPS-resistant mutant of a murine macrophage-like cell line, J774.1. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 673-677(1998).
 6. Momotani, E., Watanabe, S., Yoshihara, K., Amano, F. : The effect of oligosaccharides on the production of tumor necrosis factor- α by macrophage-like cell line J774.1/JA-4. *J. Vet. Med. Sci.*, **60** , 519-522(1998).
 7. Karahashi, H. and Amano, F.: Apoptotic changes preceding necrosis in lipopolysaccharide-treated macro-phages in the presence of cycloheximide. *Exp. Cell Res.* **241**,373-383(1998).
 8. 天野富美夫、田中康仁、唐橋久恵、荒尾雄二郎、倉田毅：HIV-1 が潜伏感染したヒト単球系細胞株 U1 細胞からの HIV-1 再活性化におけるアラキドン酸修飾の影響。脂質生化学研究。 **40**,249-250(1998).
2. 学会発表
1. 天野富美夫、田中康仁、唐橋久恵、荒尾雄二郎、倉田毅：HIV-1 が潜伏感染したヒト単球系細胞株 U1 細胞からの HIV-1 再活性化におけるアラキドン酸修飾の影響。第40回日本脂質生化学研究集会。1998年7月2日～3日。大阪。

図1. U1細胞を無添加、あるいはTNF α 、ホルボールエステル(PMA)で処理した場合のMAPキナーゼの活性化. U1細胞を無添加(1-4)、100 ng/ml TNF α (5-8)、10 nM PMA(9-12)でそれぞれ37 $^{\circ}$ C、7.5分間(1,5,9)、15分間(2,6,10)、30分間(3,7,11)あるいは60分間(4,8,12)処理した。細胞を洗浄後、抽出してSDS-PAGE/Western blottingにより、リン酸化型MAPキナーゼ(P-ERK1/2, P-JNK, P-p38)および対照のMAPキナーゼ(ERK1/2, JNK, p38)を検出した。

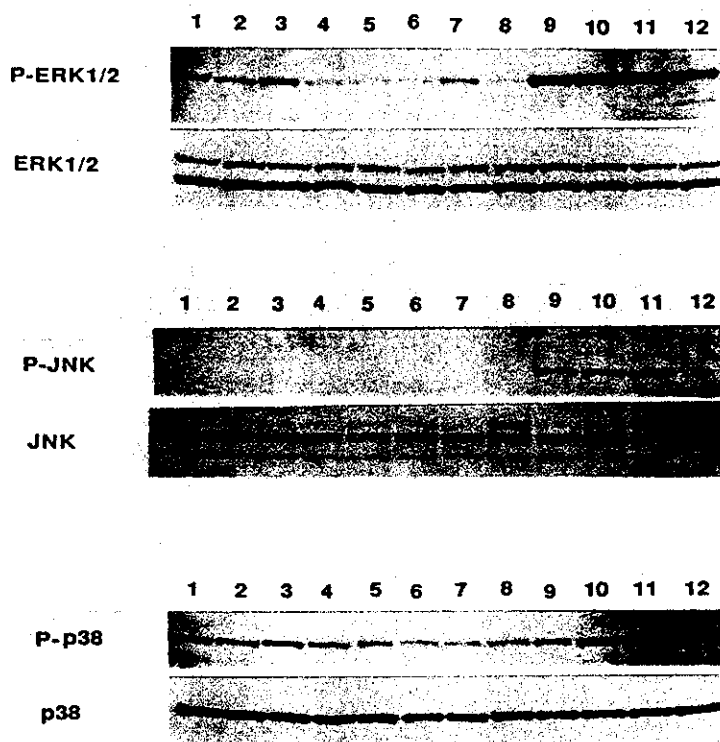


図2. MAPキナーゼ阻害剤によるU1細胞のHIV-1再活性化に及ぼす影響.

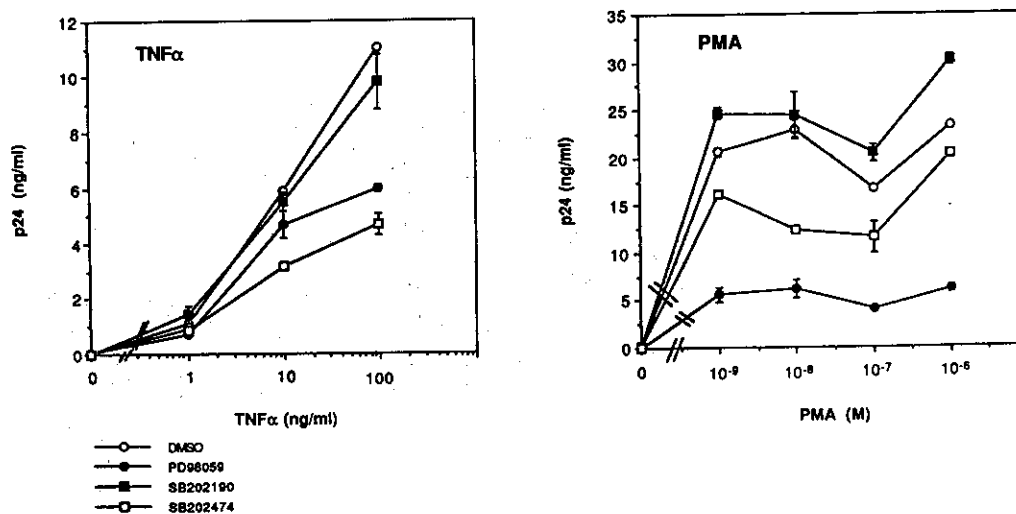


図3. N-アセチルシステイン(NAC)がU1細胞のHIV-1再活性化に及ぼす影響.

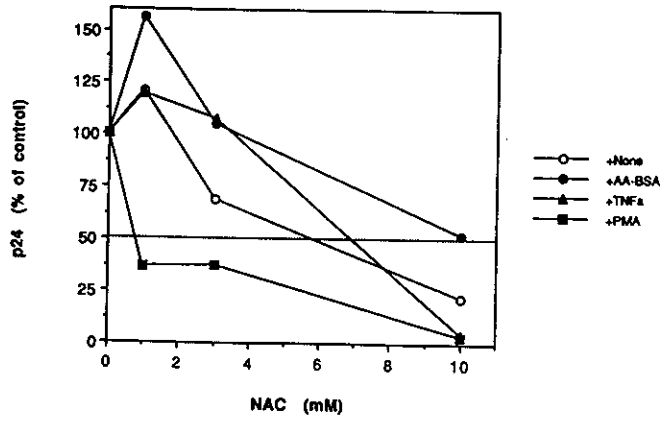


図4. MAPキナーゼ阻害剤によるU937およびヒトT細胞系培養株MT-2のHIV-INDKの増殖に及ぼす影響.

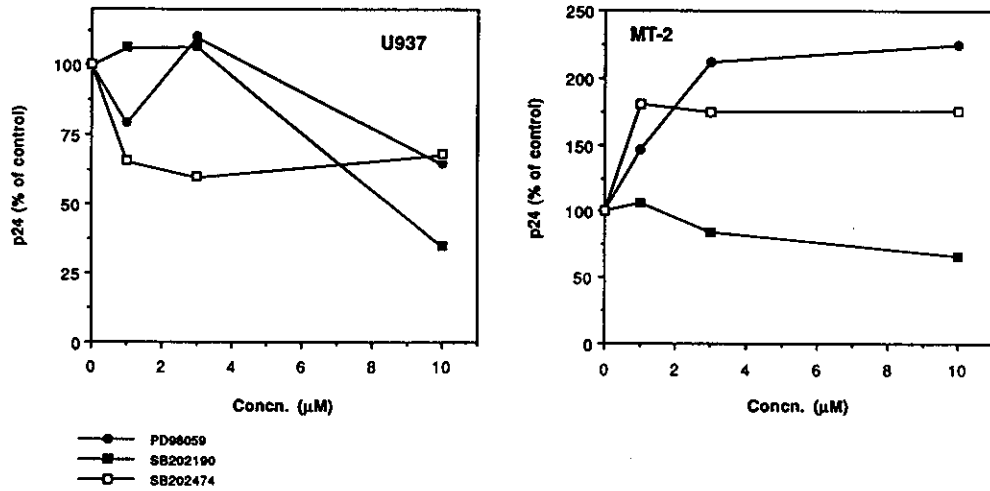
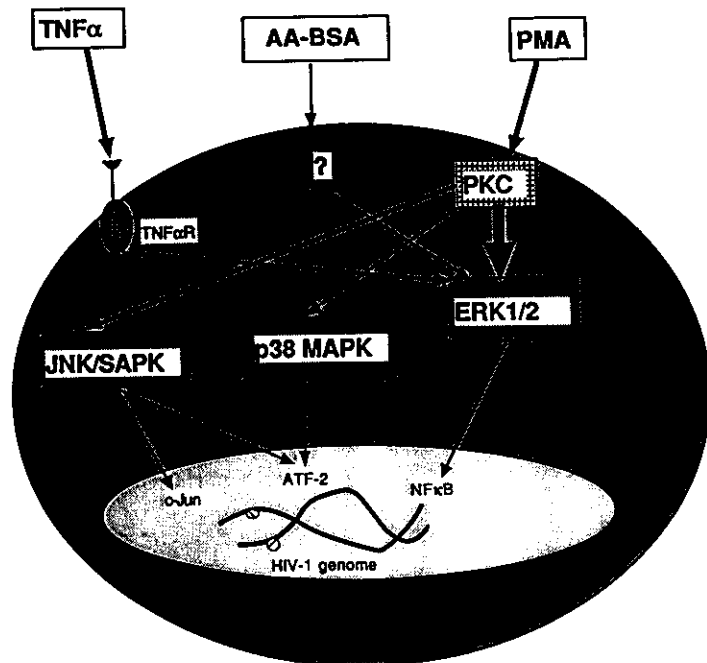


図5. U1細胞のHIV-1再活性化におけるMAPキナーゼカスケードの関与(モデル図).



19. タンニン酸による HIV プロモーターの抑制

分担研究者 田沼 靖一 (東京理科大学薬学部生化学教室)

研究要旨 レトロウイルスはゲノム構造が類似していること、たとえば gag、pol、あるいは env などのタンパク質をコードしていることが明かとなっている。さらに、HIV と MMTV では特にプロモーター領域の複数の制御エレメントの存在することやクロマチン構造の類似性等も指摘されている。本研究においては AIDS の発症を予防する一つの方法として、HIV 及び MMTV プロモーター中の共通の抑制エレメントを探索した。その結果、天然物であるタンニン酸に応答してプロモーター活性を抑制する ACTG モチーフの存在することを明かにした。

A. 研究目的

エイズは HIV なるレトロウイルスがヒトヘルパー T 細胞に感染し、長い潜伏期間を経た後発症する。本研究ではこの長い潜伏期間における HIV 遺伝子発現を天然の化合物タンニン酸を用いて人為的にコントロール(抑制)することを目的としている。潜伏期間を増大させ、発症を 30~40 年延期することができればエイズの根本治療とほぼ同等の効果が得られるものと期待される。

B. 研究方法

HIV 及び MMTV 遺伝子のプロモーターをクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の 5' 上流に接続したレポータープラスミドを作製し、それぞれヒトヘルパー T 細胞株 Jurkat、マウス繊維芽細胞株 L929 にトランスフェクションした。各遺伝子の発現を誘導するために Jurkat の場合にはフォルボールエステル (TPA) を、L929 の場合にはデキサメサゾン (Dex) によってそれぞれ処理し、このときタンニン酸 (TA) も同時に添加した。トランスフェクション後 15 時間で細胞を回収し、CAT アッセイサンプルを調製した。また、タンニン酸感受性領域を決定するために HIV および MMTV プロモーターを 5' 及び 3' 末端方向から欠削したレポータープラスミドを作製し、上記と同様の実験を行なった。

C. 研究結果

1. タンニン酸による MMTV 遺伝子発現の抑制効果

MMTV 遺伝子がクロモソーム中に組み込まれた 34I 細胞に対して Dex 及び TA 処理した後、細胞を回収した。次に、それぞれ全 RNA サンプルを調製し、MMTV 遺伝子と β -アクトリン遺伝子の発現をノーザンブロッティングによって解

析した (図 1)。 β -アクトリン遺伝子の発現にはほとんど変化が認められなかった。しかし、MMTV 遺伝子の 2 つの転写産物である 24S と 35S RNA は共に Dex により誘導され、TA 処理によってその量が減少した。以上の結果より、MMTV 遺伝子の発現はタンニン酸によって減少することが示された。

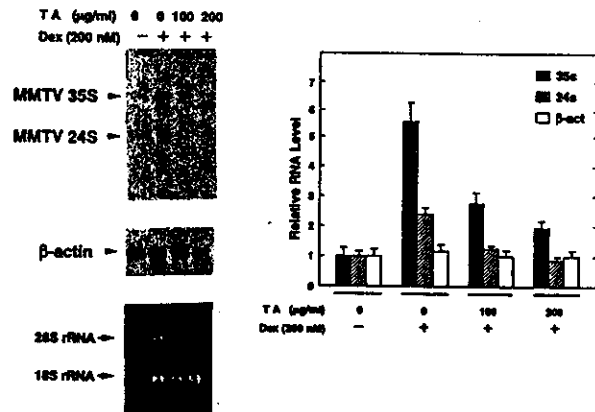


図 1. タンニン酸による MMTV 遺伝子発現の抑制効果
MMTV (マウス乳癌ウイルス) 遺伝子がクロモソーム中に組み込まれた 34I 細胞に対してタンニン酸 (TA) 及びデキサメサゾン (Dex) 処理を行った。得られた全 RNA を電気泳動し、MMTV 遺伝子コード領域及び β -アクトリン遺伝子をプローブとしたノーザンブロット分析を行った。右図は、rRNA 量に対するそれぞれ転写産物発現量を計算し、薬物未処理細胞の計算値に対する相対値として示した。

2. MMTV プロモーター活性に対するタンニン酸の効果

1. で示された MMTV 遺伝子発現の減少がそのプロモーター活性の変動によるものであるか否か検討するために、L929 細胞に pMMTVCAT プラスミドを DEAE-デキストラン法によってトランスフェクションした。48 時間後に Dex 及び TA を細胞培地に添加し、その 15 時間後に CAT アッセイサンプルを調製した。その結果、Dex によって誘導された MMTV プロモーター活性は TA 処理によって抑制されることが明らかとなった (図 2)。

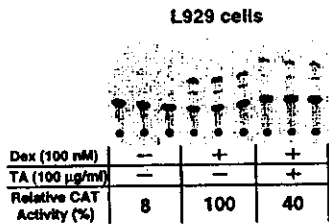
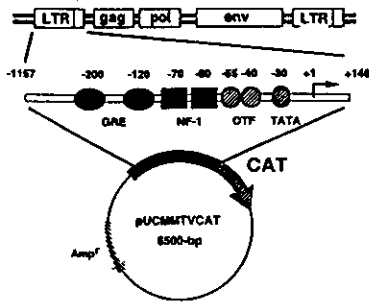


図2. MMTV プロモーター活性に対するタンニン酸の効果
L929 (マウス線維芽細胞株) に pUCMMTVCAT を DEAB- デキストラン法によってトランスフェクションした。48 時間後に Dex 及び TA 処理し、16 時間後にサンプルを調製した。これらを用いて CAT アッセイを行った結果を示す。

3. MMTV、HIV、及び HTLV-I プロモーターの構造とそれらの発現のタンニン酸感受性の比較

図3に示されるように、HIV については TPA 処理によって増大した転写プロモーター活性が TA 処理によって減少することが判明した。また、同様な実験を HTLV-I プロモーターについても行なったところ、p40*tax* によって増大した活性は TA 処理によって減少しなかった。このことから、HIV と MMTV プロモーターにはタンニン酸感受性の負の要素が存在することが示唆された。また両者が種々の正の制御要素や TATA エlementを有することや、類似のクロマチン構造をとることは既に明らかとなっており、今後も両者を比較検討しながらプロモーター制御について理解することが必要であると考えられる。

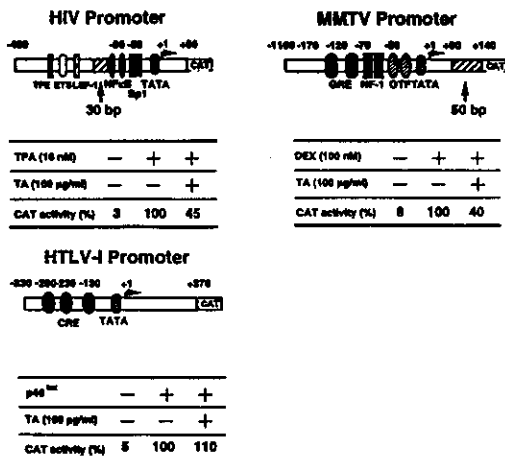


図3. MMTV、HIV、及び HTLV-I プロモーター構造とそれらのタンニン酸感受性の比較
MMTV、HIV、及び HTLV-I 転写開始点付近の構造を模式的に示した。各種転写制御要素の他に、タンニン酸感受性領域を斜線で示した。それぞれの下の表はこれらのプロモーター支配による CAT の発現を解析した結果である。(ただし、HIV と HTLV-I プロモーターの解析のためにはヒト T 細胞株 Jurkat を用いた。)

4. MMTV と HIV プロモーター中のタンニン酸感受性要素

MMTV と HIV プロモーター中のタンニン酸感受性配列は、それぞれプロモーター中の欠失変異プラスミドを用いることによって決定された(図4)。

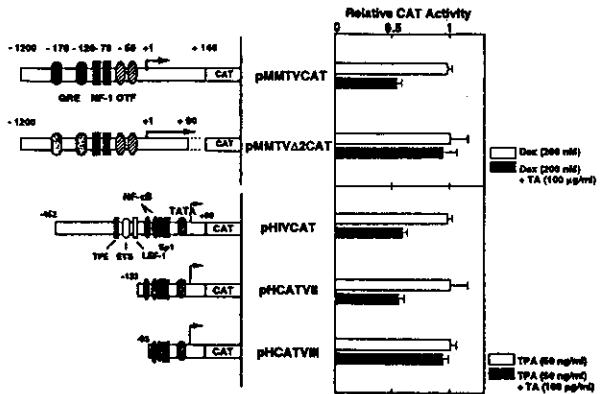


図4. MMTV と HIV プロモーター中のタンニン酸感受性要素
MMTV と HIV プロモーター中のタンニン酸感受性領域は、それぞれプロモーターの欠失変異 CAT プラスミドを用いることによって決定された。pMMTVCAT から 3' 下流の 50-bp エlementを欠失させた場合、そして pHIVCAT の -133 から -92 番目までの 30-bp 領域を欠失させた場合、共にタンニン酸感受性が消失した。

MMTV プロモーターの場合は、転写開始点より 3'下流に位置する+90 から+140 番目のヌクレオチドまでの 50-bp の要素が、HIV プロモーターでは-132 から-102 番目のヌクレオチドまでの 30-bp の領域がタンニン酸感受性の負の調節要素であることが示された。

5. HIV 及び MMTV プロモーター中の転写抑制要素 (サイレンサー) に見出されるコンセンサス配列

MMTV プロモーター中の 50-bp エlementと HIV プロモーター中の 30-bp エlementの塩基配列を比較することにより、5'-ACTG-3' という共通のモチーフの含まれることが明らかとなった(図5)。

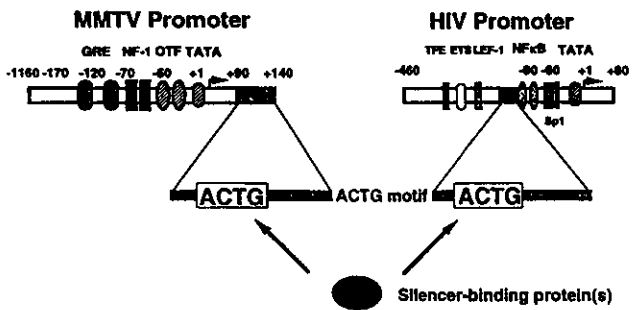


図5. HIV 及び MMTV プロモーター中の転写抑制要素 (サイレンサー) に見出されるコンセンサス配列
MMTV プロモーター中に 50-bp エlementと HIV プロモーター中の 30-bp エlementの塩基配列を比較した。ここでは 5'-ACTG-3' という共通のモチーフの含まれることを示している。

また、この ACTG モチーフを TK プロモーターの上流に導入した場合、TK プロモーター活性に抑制がかかることから、このモチーフはサイレンサーとしての機能を有することが支持される。

D. 考察

タンニン酸は天然の化合物であり、ポリ (ADP-リボース) 分解酵素であるポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼの阻害剤としても知られている。本研究において明かとなった HIV 及び MMTV プロモーター中のタンニン酸感受性の負の調節エレメントにはある特定の転写制御因子が結合することが予想される (図5)。この因子がポリ (ADP-リボシル) 化されたり、あるいはポリ (ADP-リボシル) 化されたヒストンなどクロマチンタンパク質と相互作用を及ぼしあうことによってプロモーター活性を制御していることが考えられる。実際に、ACTG モチーフに結合するタンパク質をコードする cDNA をサウスウエスタン法により得ることに成功しており、その解析を進めている。

E. 結論

本研究においては、HIV と MMTV プロモーターという構造的に類似した両者を比較することによって人為的に制御可能なサイレンサーエレメントの存在することが示された。今後はこれらのタンニン酸感受性エレメントに結合する因子を高度に精製するか、それをコードする cDNA をクローニングすることによってタンニン酸によるレトロウイルスプロモーター活性制御機構を明かにする予定である。最終的には天然物と遺伝子導入を利用した効果的な人為的レトロウイルス発現抑制法を確立することが十分期待できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shiokawa, D., Hirai, M. and Tanuma, S.
cDNA cloning of human DNase γ : chromosomal localization of its gene and enzymatic properties of recombinant protein.
Apoptosis, 3: 89-95, 1998.
- (2) Nishimura, K. and Tanuma, S.
Presence of DNase γ -like endonuclease in nuclei of neuronal differentiated PC12 cells.
Apoptosis, 3: 97-103, 1998.
- (3) Shiokawa, D. and Tanuma, S.
Cloning of cDNAs and genomic organization porcine and human DNase II.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 247: 864-869, 1998.
- (4) Fukai, F., Mashimo, M., Akiyama, K., Goto, T., Katayama, T. and Tanuma, S.
Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived anti-adhesive peptide.
Exp. Cell Res., 242: 92-99, 1998.
- (5) Umemori, K., Nishikawa, A. and Tanuma, S.
Purification and characterization of a DNase γ -like endonuclease from *Xenopus laevis* liver.
Apoptosis, 3: 145-153, 1998.
- (6) Uchiyumi, F., Sato, T., Komuro, M. and Tanuma, S.
Identification and characterization of a tannic acid responsive negative element in the mouse mammary tumor virus promoter.
J. Biol. Chem., 273: 12499-12508, 1998.
- (7) Shiokawa, D. and Tanuma, S.
Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase γ .
Biochem. J., 332: 713-720, 1998.

2. 学会発表

- (1) タンニン酸によるマウス乳癌ウイルス遺伝発現の抑制・第71回日本生化学会
内海文彰 田沼靖一
- (2) マウス乳癌ウイルス遺伝子プロモーター中のタンニン酸感受性抑制エレメントに結合するタンパク質をコードするcDNAのクローニング・第71回日本生化学会
内海文彰 田沼靖一
- (3) タンニン酸のマウス乳癌ウイルス遺伝発現抑制・第57回日本癌学会
内海文彰 田沼靖一
- (4) マウス乳癌ウイルスMMTV遺伝子プロモーターに結合するDNAヘリカーゼ様タンパク質の機能の解析・第21回日本分子生物学会
内海文彰 田沼靖一

論文発表

論文発表

1. Kannagi, M., Nakamura, T., Akari, H., Kuroda, M.J., Fujii, M., Oka, S., Iwamoto, A., Kurata, T., Higashi and D., Harada, S.: Dual phasic suppression of viral replication following de novo human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers. *Leukemia* 11 (Suppl 3): 545-547, 1997.
2. Chiba, J., Nakano, M., Suzuki, Y., Aoyama, K., Ohba, H., Kobayashi, T., Yasuda, A., Kojima, A. and Kurata, T.: Generation of neutralizing antibody to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. *J. Immunol. Methods* 207: 53-60, 1997.
3. Ota, S., Kizaka-Kondoh, S., Hashimoto, Y., Nishihara, H., Nagashima, K., Kurata, T., Okayama, H. and Matsuda, M: Constitutive association of EGF receptor with the CrkII-23 mutant that inhibits transformation of NRK cells by EGF and TGF- β . *Cell. Signal.* 10: 283-290, 1998.
4. Takahashi, H., Kurata, T. and Nagashima, K.: AIDS dementia and HIV-1 replication. *Neuropathology* 17: 4-10, 1997.
5. Obara, Y., Furuta, Y., Takasu, T., Suzuki, S., Suzuki, H., Matsukawa, S., Fujioka, Y., Takahashi, H., Kurata, T., and Nagashima, K.: Distribution of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Genomes in Human Spinal Ganglia Studied by PCR and In Situ Hybridization. *J. Med. Virol.* 52: 136-142, 1997.
6. Hashimoto, Y., Katayama, H., Kiyokawa, E., Ota, S., Kurata, T., Gotoh, N., Otsuka, N., Shibata, M. and Matsuda, M: Phosphorylation of CrkII adaptor protein at tyrosine 221 by epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 17186-17191, 1998.
7. Brandful, J.A.M., Ampofo, W.K., Janssens, W., Adu-Sarkodie, Y., Apeagyei, F. and Anyomi, F., Aidoo, S., Yamamoto, N., Ishikawa, K., Sata, T., Kurata, T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV type 1 strains from Southern Ghana. *Aids Res. Hum. Retrovir.* 14: 815-819, 1998.
8. Tokunaga, K., Kiyokawa, E., Nakaya, M., Otsuka, N., Kojima, A., Kurata, T. and Matsuda, M.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 virion entry by dominant-negative Hck. *J. Virol.* 72: 6257-6259, 1998.
9. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.* 79: 2447-2453, 1998.
10. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and Adachi, A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250: 565-568, 1998.
11. Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., Matsuda, M.: Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Develop.* 12: 3331-3336, 1998
12. Ogawa-Goto, K., Arao, Y., Ito, Y., Ogawa, T., Abe, T., Kurata, T., Irie, S. and Akanuma, H.: Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J. Gen. Virol.* 79: 2533-2541, 1998.
13. Takasaka, N., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Katsumoto, T., Kurata, T. and Sairenji, T.: Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* 247: 152-159,

1998.

14. Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Asonuma, K., Tanaka, K. and Asano, Y.: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J. Clin Pathol* 52: 65-67, 1999.
15. Lu, Y., Nerurkar, V.R., Dashwood, W., Woodward, C.L., Aban, S., Shikuma, C.M., Grandinetti, A., Chang, H., Nguyen, H.T., Wu, A., Yamamura, Y., Boto, W.O., Merriwether, A., Kurata, T., Detels, R. and Yanagihara, R.: Genotype and Allele Frequency of a 32-Base Pair Deletion Mutation in the CCR5 Gene in Various Ethnic Groups: Absence of Mutation among Asians and Pacific Islanders. (in press)
16. Gatanaga, H., Oka, S., Ida, S., Wakabayashi, T., Shioda, T. and Iwamoto, A.: Active HIV-1 redistribution and replication in the brain with HIV encephalitis. *Arch Virol* 144: 29-43, 1999.
17. Honda, M., Yasuoka, A., Aoki, M. and Oka, S.: A generalized seizure following initiation of nelfinavir in a patient with human immunodeficiency virus type 1 infection: suspected due to interaction between nelfinavir and phenytoin. *Intern Med* (in press)
18. Tachikawa, N., Goto, M., Hoshino, Y., Gatanaga H., Yasuoka, A., Wakabayashi, T., Katano, Y., Kimura, S., Oka, S. and Iwamoto, A.: PCR detects *Toxoplasma gondii*, Epstein-Barr virus, and JC virus DNAs in the cerebrospinal fluid in AIDS patients with focal CNS complications. *Intern Med* (in press)
19. Ayisi NK, Wiredu EK, Sata T, Nyadedzor C, Tsiagbe VK, Newman M, Cofie CN, Taniguchi K.: T-lymphocytopenia, opportunistic infections and pathological findings in Ghanaian AIDS patients and their sexual partners. *East Afr Med J* 74:784-791, 1997.
20. Brandful JAM, Ampofo WK, Janssens W, Adu-Sarkodie Y, Apegyei F, Anyomi F, Aidoo S, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Kurata T.: Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. *AIDS Res Human Retrovirol* 14: 815-818, 1998.
21. Yasuda S, Iwasaki M, Oka S, Naganawa S, Nakasone T, Honda M, Sata T, Kojima A, Matsuda S, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y.: Detection of HIV-Gag p24-specific antibodies in sera and saliva of HIV-1-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Microbiol Immunol* 41; 305-311, 1998.
22. Fujinaga, K., Nakaya, T. and Ikuta, K.: Generation of endogenous tumour necrosis factor- α in MOLT-4 cells during the acute replication phase of human immunodeficiency virus type 1 determines the subsequent latent infection. *J. Gen. Virol.* 79, 221-229, 1998
23. Goto, T., Nakai, M. and Ikuta, K.: The life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (review). *Micron* 29, 2/3, 123-138, 1998
24. Tobiume, M., Fujinaga, K., Kameoka, M., Kimura, T., Nakaya, T., Yamada, T. and Ikuta, K.: Dependence of host cell cycle for activation of HIV-1 gene expression from latency. *J. Gen. Virol.* 79, 1363-1371, 1998
25. Takahashi, A., Ogasawara, K., Matsuki, N., Fujinaga, K., Nakaya, T., Ikuta, K., Wattana, A., Honda, M., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K. and Onoé, K.: Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine* 16, 1537-1543, 1998
26. Kameoka, M. Wattana, A., Suzuki, S., Horikoshi, H., Khilai-Khiam, N., Meguro, T., Yamada, K., Tanaka, Y., Yoshihara, K., Luftig, R. B. and Ikuta, K.: A specific T-cell subset with CD4⁺/CD38⁻ markers derived from HIV-1 carriers induces apoptosis in healthy donor-derived T-lymphocytes. *Virus Res.* 56, 115-122, 1998
27. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Inubushi, R., Shimano, R., Kawamura, M., Akari, H., Koyama, H. and Adachi, A.: Producer cell-dependent requirement of the Nef

- protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 565-568, 1998
28. Saadat, M., Ikuta, K. and Yoshida, M. C.: Chromosome aberrations in peripheral blood mononuclear cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Chromosome Science* 2, 39-41, 1998
 29. Saadat, M., Takahashi, H., Bahmani, M.K., Ikuta, K. and Yoshida, M.C.: Does human immunodeficiency virus type-1 integrate in chromosomes randomly? *Chromosome Science* 2, 5-8, 1998
 30. Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, H., Kawamura, M., Inubushi, R., Shimano, R. and Adachi, A.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen. Virol.* 79, 2477-2453, 1998
 31. Inabe, K., Ikuta, K. and Aida, Y.: Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology* 245, 53-64, 1998
 32. Inabe, K., Nishizawa, M., Tajima, S., Ikuta, K. and Aida, Y.: The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J. Virol.* 73, 1293-1301, 1999
 33. Tanaka, T., Kameoka, M., Ota, K., Itaya, A., Ikuta, K. and Yoshihara, K.: Establishment of persistent infection with HIV-1 abrogates caspase-3-dependent apoptotic signaling pathway in U937 cells. *Experimental Cell Research* (in press)
 34. Hashida, S., Ishikawa, S., Hashinaka, K., Nishikata, I., Oka, S. and Ishikawa, E. : Immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgG to HIV-1 gp41 antigen using synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Lab. Anal.* 12: 197-204, 1998.
 35. Hashida, S., Ishikawa, S., Nishikata, I., Hashinaka, K., Oka, S. and Ishikawa, E. : Immune complex transfer enzyme immunoassay for antibody IgM to HIV-1 p17 antigen. *J. Clin. Lab. Anal.* 12: 329-336, 1998.
 36. Takahashi, H., Chiba, M., Kato, K., Nakagawa, Y., Iinuma, H., Nerome, K. Predominant priming of epitope-specific CD8+ CTL with recombinant vaccinia virus expressing an immunodominant epitope of HIV-1 envelope protein within an influenza hemagglutinin cassette. *AIDS Research Newsletter* pp.116, 1998.
 37. Kmiecik, D., Wasik, T.J., Tepler, H., Pientka, J., Hus, S., Takahashi, H., Okumura, K., Kaneko, Y., and Kozbor, D. The effect of deletion of the V3 loop of gp120 on cytotoxic T cell responses and HIV gp120-mediated pathogenesis. *J. Immunol.* 160: 5676-5683, 1998.
 38. Futagami, S., Takahashi, H., Norose, Y., Kobayashi, M. Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites. *Gut* 43: 168-175, 1998.
 39. Chen, M., Shirai, M., Liu, Z., Arichi, T., Takahashi, H., Nishioka, M. Efficient class II MHC presentation of endogenously synthesized structural proteins of hepatitis C virus by EVB-transformed B lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 72: 8301-8308, 1998.
 40. Ohashi, T., Kubo, M., Kato, H., Iwamoto, A., Takahashi, H., Fujii, M., Kannagi, M. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80: 209-216, 1999.
 41. Shirai, M., Arichi, T., Chen, M., Nishioka, M., Ikeda, K., Takahashi, H., et al.. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: Preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J. Immunol.* 162: 568-576, 1999.

42. Terabe, M., Hatabu, T., Takahashi, H., Onodera, T., Matsumoto, Y. *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. *Exp. Animals.*, (in press).
43. 8. Nakatsuka, K., Sugiyama, H., Nakagawa, Y., Takahashi, H. Purification of antigenic peptide from murine hepatoma cells recognized by class-I major histocompatibility complex molecule-restricted cytotoxic T-lymphocytes induced with B7-1-gene transfected hepatoma cell. *J. Hepatol.* (in press).
44. Tsumura, H., M. Miyazawa, S. Ogawa et al.: Detection of endogenous retrovirus antigens in NOD mouse pancreatic beta-cells. *Lab. Anim.* 32: 86-94, 1998.
45. Onoyama, H., Y. Saitoh and M. Miyazawa: Tumor imaging. In: Delves. P.J. And I. M. Roitt, eds. *Encyclopedia of Immunology*, 2nd Ed., Academic Press, London 1998: 2431-2435
46. Iijima, H., M. Miyazawa, J. Sasaki et al.: Expression and characterization of a very low density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J. Biochem.* 124: 747-755, 1998.
47. Sakamoto, M., M. Miyazawa, S. Mori and R. Fujisawa.: Anti-cytoplasmic autoantibodies reactive with epithelial cells of the salivary gland in sera from patients with Sjogren's syndrome: their disease- and organ-specificities. *J. Oral Pathol. Med.* 28: 20-25, 1999.
48. Okuda, H., M. Adachi, M. Miyazawa et al.: Protein kinase C α augments anoikis in anchorage-dependent gastric cancer cells. *Oncogene*: in press, 1999.
49. Miyazawa, M., Y. Yanai and M. Kurimoto: Squirrel monkey retrovirus (SMRV) sequence from an SMRV-negative cell line? (submitted) 1999.
50. Izuma, M., K. Kobayashi, M. Miyazawa et al.: In vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in response to HCV core antigen stimulation during IFN- β treatment and its relevance to sCD8 and sCD30. (submitted) 1999.
51. Kanamasa, K., N. Ishida, M. Miyazawa et al.: Suppression of cell proliferation during early phase after balloon injury by tissue plasminogen activator leads to minimal intimal hyperplasia in hypercholesterolemic rabbits. (submitted) 1999.
52. Niwa, A., M. Miyasawa, N. Iwanami et al.: Immunization with a single CD4+ T-cell epitope protects mice against immunosuppressive retrovirus infection by inducing CD8+ effector cells (submitted) 1999.
53. Miyazawa, M., C. Ishihara, H. Abe et al.: Overcoming the Rfv-3 gene-associated unresponsiveness to Friend retrovirus infection by immunization with a recombinant vaccinia virus expressing the env gene. (submitted) 1999.
54. Y. Hakata, T. Umemoto, S. Matsushita, H. Shida: Involvement of human CRM1 (Exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of the human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.*, 72: 6602-6607, 1998.
55. S. Shoji, K. Kazuchika, A. Ogata, K. Yamataka, K. Tachibana, R. Mukai, A. Uda, K. Harano, S. Matsushita, S. Misumi: An allisteric drug, o'o'-bismyristoyl thiamine disulfide, suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 tat and NF-kB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 745-753, 1998.
56. J. Wang, K. Harada, S. Matsushita, S. Matsumi, Y. Zhang, T. Shioda, Y. Nagai, and K. Matsuhshima: IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J. of Leukocyte Biology.*, 64:642-649, 1998.
57. Yasuda, S., Oka, S., Naganawa, S., Nakasone, T., Honda, M., Iwasaki, M., Sata, T., Kojima, A., Matsuda, S., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. : Detection of HIV-specific antibodies in sera and saliva of HIV-infected adults and in sera of infants born to HIV-1-infected mothers. *Mirobiol. Immunol.*, 42:305-311, 1998.

58. Yagi, T., Sugimoto, A., Tanaka, M., Nagata, S., Yasuda, S., Yagita, H., Kuriyama, T., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fas/FasL interaction is not involved in apoptosis of activated CD4⁺T cells upon HIV-1 infection in vitro. *J. Acq. Imm. Def. Synd. Hum. Retro.* 18:307-315, 1998
59. Tsunetsugu-Yokota, Y., Kato, T., Yasuda, S., Matsuda, Z., Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Akagawa, K., Cho, M.W. and Takemori, T. : Distinct regulation of HIV-1 LTR in CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cells activated by PPD-antigen presentation of dendritic cells. submit, 1999
60. Fujii Y, Mukai R, Akari H, Machida M, Mori K, Takasaka M, Kojima E, Murakami K, Yoshikawa Y.: Antiviral effects of 6-chlo-ro-2',3'-dideoxyguanosine in rhesus monkey acutely infected with simian immunodeficiency virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 9, 85-92, 1998
61. Akari H, Ono F, Sakakibara I, Murayama Y, Hiyaoka A, Terao K, Otani I, Mukai R, Adachi A, Yoshikawa Y.: Simian T cell leukemia virus type I-induced malignant adult T cell leukemia-like disease in a naturally infected African green monkey: implication of CD8⁺ T cell leukemia. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 14, 367-371, 1998
62. Shoji S, Furuishi K, Ogata A, Yamataka K, Tachibana K, Mukai R, Uda A, Harano K, Matsushita S, Misumi S.: An allosteric drug, o,o'-bismyristoyl thiamine disulfide suppresses HIV-1 replication through prevention of nuclear translocation of both HIV-1 Tat and NF-kappa B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 745-53, 1998
63. Ikeda-Moore, Y., H. Tomiyama, M. Ibe, S. Oka, K. Miwa, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Identification of a novel HLA-A24-restricted CTL epitope derived from HIV-1 Gag protein. *AIDS* 12 : 2073-2074, 1998.
64. Kmiecik, D., I. Bednarek, M. Takiguchi, T. J. Wasik, J. Bratosiewicz, A. Wierzbicki, H. Tepler, J. Pientka, S. H. Hsu, Y. Kaneko and D. Kozbor: The effect of epitope variation on the profile of cytotoxic T lymphocyte responses to the HIV envelope glycoprotein. *Int. Immunol.* 10: 1789-1799, 1998.
65. Chujoh, Y., Y. Sobao, K. Miwa, Y. Kaneko and M. Takiguchi: The role of anchor residues in the binding of peptides to HLA-A*1101 molecules. *Tissue Antigens.* 52: 501-509, 1998.
66. Tomiyama, H., T. Sakaguchi, K. Miwa, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Identification of Multiple HIV-1 Epitopes presented by HLA-B*5101 Molecules. *Hum. Immunol.* (in press)
67. Tomiyama, H., Y. Chujoh, T. Shioda, K. Miwa, S. Oka, Y. Kaneko and M. Takiguchi: Cytotoxic T-lymphocyte recognition of HLA-B*5101-restricted HIV-1 Rev epitope which is naturally processed in HIV-1 infected cells. *AIDS.* (in press)
68. Chen J, Ido E, Jin M, Kuwata T, Igarashi T, Mizuno A, Koyanagi Y, Hayami M. Replication of HIV-1, SIVmac and chimeric HIV-1/SIVmac viruses having env genes derived from macrophage-tropic viruses: an indication of different mechanisms of macrophage-tropism in human and monkey cells. *J Gen Virol* 79: 741-745, 1998.
69. Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Yamamoto N. Th1 and Th2 preferences of HIV-1 strains. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor*, p54. 1998.
70. Murakami T, Lu Z-H, Koyanagi Y, Tamamura H, Waki M, Matsumoto A, Tanaka Y, Hoxie JA, Fujii N, Peiper SC and Yamamoto N. Peptide T22 exerts its anti-HIV activity as an CXCR4 antagonist. *Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor*, p196. 1998.
71. Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, N, Kimura T, Hoxie JA, O'Brien WA and Yamamoto N. HIV-1 strain dependent preferences in Th1- and Th2-type condition. 12th world AIDS Conference, 1998.

72. Horiuchi S, Ampofo W, Koyanagi Y, Yamashita A, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, and Yamamoto N. High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia HTLV-I-associated myelopathy. *Immunology*. 95:360-369, 1998.
73. Suzuki Y, Koyanagi Y, Tanaka Y, Murakami T, Misawa, N, Maeda N, Kimura T, Shida H, Hoxie JA, O'Brien WA and Yamamoto N. Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine induced CD4+ T helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J Virol* 73: 316-324, 1999.
74. Shiokawa, D., Hirai, M. and Tanuma, S.: cDNA cloning of human Dnase γ : chromosomal localization of its gene and enzymatic properties of recombinant protein. *Apoptosis*, 3: 89-95, 1998.
75. Nishimura, K. and Tanuma, S.: Presence of Dnase γ -like endonuclease in nuclei of neuronal differentiated PC12 cells. *Apoptosis*, 3: 97-103, 1998.
76. Shiokawa, D. and Tanuma, S.: Cloning of cDNAs and genomic organization porcine and human Dnase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 864-869, 1998.
77. Fukai, F., Mashimo, M., Akiyama, K., Goto, T., Katayama, T. and Tanuma, S.: Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived anti-adhesive peptide. *Exp. Cell Res.*, 242: 92-99, 1998.
78. Umemori, K., Nishikawa, A. and Tanuma, S.: Purification and characterization of a Dnase γ -like endonuclease from *Xenopus laevis* liver. *Apoptosis*, 3: 145-153, 1998.
79. Uchiumi, F., Sato, T., Komuro, M. and Tanuma, S.: Identification and characterization of a tannic acid responsive negative element in the mouse mammary tumor virus promoter. *J. Biol Chem.*, 273: 12499-12508, 1998.
80. Shiokawa, D. and Tanuma, S.: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease Dnase γ . *Biochem. J.*, 332: 713-720, 1998.
81. Ohki, K., Amano, E., Yamamoto, S., and Kohashi, O.: Suppressive effects of serum on the lipopolysaccharide (LPS)-induced production of nitric oxide and TNF- α by a macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chain in LPS. *Immunology* (in press)
82. Katsuyama, M., Ikegami, R., Karahashi, H., Amano, E., Sugimoto, Y., Ichikawa, A.: Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251,727-731, 1998)
83. Karahashi, H. and Amano, E.: Structure-activity relationships of lipopolysaccharide (LPS) in tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and induction of macrophage cell death in the presence of cycloheximide (CHX) in a murine macrophage-like cell line, J774.1. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1102-1105, 1998)
84. Nakamura, M., Imaoka, S., Amano, E., Funae, Y. : P-450 isoforms in a murine macrophage cell line, RAW264.7, and changes in the levels of P-450 isoforms by activation with LPS and IFN- γ . *Biochim. Biophys. Acta*, 1385,101-106, 1998)
85. Noda, T., Amano, E.: Defect in induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharide (LPS) in an LPS-resistant mutant of a murine macrophage-like cell line, J774.1. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 673-677, 1998.
86. Momotani, E., Watanabe, S., Yoshihara, K., Amano, E. : The effect of oligosaccharides on the production of tumor necrosis factor- α by macrophage-like cell line J774.1/JA-4. *J. Vet. Med. Sci.*, 60, 519-522, 1998)

87. Karahashi, H. and Amano, E.: Apoptotic changes preceding necrosis in lipopolysaccharide-treated macro-phages in the presence of cycloheximide. *Exp. Cell Res.* 241:373-383, 1998)
88. Matano, T., Shibata, R., Siemon, C., Connors, M., Lane, H. C., and Martin, M. A. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of SIV/HIV chimeric virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* 72 :164-169, 1998.
89. Takahashi,R.H., Nagashima,K., Kurata,T., Takahashi,H. Analysis of HTLV-II-like particle produced by recombinant baculovirus infected insect cells. *Virology* (in press)
90. Takahashi,H., Takahashi,R.H., Hasegawa,H., Horiuchi,M., Shinagawa, T., Yokoyama,K., Kimura,K., Haritani,M., Kurata,T., Nagashima,K. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J.NeuroVirol.* (in press)
91. Chen,Z., Matsuo,K., Asanuma,H., Takahashi,H., Iwasaki,T., Suzuki,Y., Aizawa,C., Kurata,T., Tamura,S. Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuramidase -immunization expressing DNAs. *Vaccine*, 17:653-659, 1999
92. Saito T, Ishikawa K, Osei-kuwasi M, Kaneko T, Brandful J, Nuvor V, Aido S, Ampofo W, Apeagyei F, Ansah J, Adu-Sarkodie Y, Nkrumah F and Abe K. Prevalence of hepatitis G and characterization of viral genome in Ghana. *Hepatology Research*, (in press)
93. K Ariyoshi, F Cham, N Berry, E Harding, S Sabally, PT N'Gom, K Ishikawa, T Corrah, R Tedder, H Whittle. Diagnosis of HIV-1/-2 dual infection using dilution analysis of type-specific antibody ξ *AIDS* 1998, Vol. 12, No. 18,p2504-2505.
94. Ishikawa K, Fransen K, Ariyoshi K, Nkengasong JN, Janssens W, Heyndrickx L, Whittle H, Diallo MO, Ghys PD,Coulibaly IM, Greenberg AE, Piedade J, Canas-Ferreira W, van der Groen G. Improved detection of HIV-2 proviral DNA in dually seroreactive individuals by PCR.. *AIDS* 12: 1419-1425, 1998
95. Brandful J., Ampofo WK., Janssens W., Adu-Sarkodie., Apeagyei E., Anyomi F., Aido S., Yamamoto N., Ishikawa K. Sata T. and Kurata T. Genetic and phylogenetic analysis of HIV-1 strains from southern Ghana. *AIDS Res.Hum.Retro.* 14, 815-818, 1998
96. M. Kubo, Ohashi T., Fujii M., Oka S., Iwamoto S., Harada S., and Kannagi M. Abrogation of in vitro suppression of HIV-1 replication mediated by CD8+T lymphocytes of asymptomatic HIV-1 carriers by staphylococcal enterotoxin B and phorbol esters through induction of TNF-a. *J. Virol.* 71:7560-7566, 1997.
97. T. Ohashi, M. Arai, H. Kato, M. Kubo, M. Fujii, N. Yamamoto, A. Iwamoto, M. Kannagi. High SDF-1 expression in HIV-1 carriers does not correlate with CD8+ T cell-mediated suppression of viral replication. *Virology.* 244: 467-472, 1998.
98. T. Ohashi, M. Kubo, H. Kato, A. Iwamoto, H. Takahashi, M. Fujii, and M. Kannagi. Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by CD8+ T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 80:209-216, 1999.