

2000/034 ~ 1050/

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究

所 属 住友製薬株式会社 研究本部
主任研究者 金岡 昌治

要 旨

HIVの宿主細胞由来の因子を標的とした抗HIV薬の開発を目標として、その標的因子の同定および機能解析研究を継続した。HIV外被糖蛋白質プロセシング酵素については、最近 cDNA クローニングが報告された膜貫通領域を持つアスパルティックプロテアーゼ 2 種(Asp1、Asp2)について、gp160 のプロセシングとの関係を検討した。種々の細胞株に gp160 と Asp1 または Asp2 を共発現させたが、いずれにおいても顕著な gp160 プロセシングの亢進は認められなかった。HIV-LTR 領域に作用する因子については、ヒト T 細胞株 MOLT-4 の核抽出液より URE 結合蛋白質の単離を試み、比活性が 10,000 倍上昇した標品を得ることができた。この標品は SDS-PAGE で複数のバンドを与えること、また URE 結合活性はゲルろ過法で 260 KD と極めて大きなサイズを有することから、複数の蛋白質の複合体であることが示唆された。一方、MMTV などのレトロウイルスの転写を抑制する物質として知られるタンニン酸が HIV の転写抑制活性を有することを確認すると共に、HIV-LTR 中にも MMTV と同様な ACTG モチーフが存在すること、更に ACTG モチーフを含む領域に結合する蛋白質をサウスウエスタン法によりスクリーニングし、S μ bp-2 と同定した。

1. 研究組織

(1)住友製薬株式会社

研究本部 ゲノム科学研究所 金岡 昌治 所長

(2)国立感染症研究所 細胞化学部 西島 正弘 部長

(3)長崎大学 薬学部 医療薬剤学講座 小林 信之 教授

(4)東京理科大学 薬学部 生化学教室 田沼 靖一 教授

2. 研究目的

抗 HIV 剤の開発は従来からそのほとんどが HIV 特異的酵素を標的として行われてきており、現在まで HIV 逆転写酵素阻害剤、HIVgag 蛋白質分解酵素阻害剤が開発されてきた。このようなウイルス特異的酵素阻害剤を治療薬として開発することは細菌に対する抗生物質の開発同様、より宿主に副作用のない治療薬の開発が期待できるという利点を有しており、抗ウイルス薬開発の第一の選択肢である。しかしながら HIV は究めて変異を起こしやすいため、これら抗 HIV 剤に対する耐性株が容易に出現し、今日これら耐性株出現に対応するために多剤併用療法が行われるようになってきている。多剤併用、取り分け今日 HAART (Highly active anti-retroviral therapy)として行われているものはそれまでの単剤による治療法に比べ画期的な効果を表わしているが、HIV 感染症は感染ウイルス遺伝子が宿主遺伝子に入り込んでしまうため、完全にウイルスを生体から排除することは究めて困難である。そのため抗ウイルス剤の投与は長期に渡っており、多剤併用による副作用の問題は究めて深刻であり、またこのような療法に於いても最近の報告では血中ウイルスコピー数は依然として有意に残存していることが示されている。更に、治療費の高騰は今日 HIV 感染症が爆発的に広がっている開発途上国での治療をより一層困難なものとしている。そのため、より安価でかつ耐性株の出現し難い新規な抗 HIV 薬の開発が必要とされている。

一方 HIV は宿主への感染、複製の過程で種々の宿主細胞性因子を利用して増殖を行っているが、細胞由来蛋白質はウイルス由来蛋白質に比べ変異が起きにくく、従ってこれら宿主因子を標的とした薬剤は耐性株が出現し難いことが期待される。対象となる宿主因子としては、HIV 外被糖タンパク質 gp160 から gp120 および gp41 へのプロセシングに関与するプロテアーゼや、HIV 複製に関与する種々の宿主転写因子などが考えられる。これらはいずれも HIV 複製に必須の過程であり、その阻害は HIV 複製をほぼ完全に抑制することができる。しかしながら、これらの過程に関与する宿主因子の同定はまだ行われておらず、またこのような宿主側因子を標的とした抗 HIV 薬の開発も従来ほとんど行われていない。そこで本研究では宿主細胞由来蛋白質を標的とした新しい抗 HIV 薬の開発を行うことを目的として、次の2点を対象とした研究を行っている。

(1) HIV 外被糖蛋白質プロセシングプロテアーゼ

HIV は、被膜ウイルスの一種であり、その被膜は 2 種類の外被糖蛋白質 gp120 と gp41 を含む脂質二重膜により構成されている。gp120 と gp41 は、まず、分子量 16 万の gp160 として合成され、そのプロセシングにより産

生される。HIV は、gp120 と T 細胞表面の CD4 分子及び数種のケモカイン受容体との相互作用を介して宿主細胞に結合し、その後 gp41 の関与のもとにウイルスエンベロープと宿主細胞膜が融合することにより細胞内に侵入する。また一方、HIV 感染細胞と非感染細胞との融合が感染の成立に重要な役割をになっていることも示唆されているが、この感染細胞と非感染細胞との融合にも gp120 と gp41 と CD4 分子及びケモカイン受容体が関与することが明らかにされている。そして、gp160 から gp120 と gp41 へのプロセシングの阻止が HIV の感染性を著しく低下させることが報告されている。従って、このプロセシングに関与するプロテアーゼを阻止することにより、HIV の宿主細胞への結合、侵入、あるいは感染細胞と被感染細胞の融合を阻止できると考えられる。本研究では、この外被糖蛋白質のプロセシングに関与するプロテアーゼの同定を行い、その阻害剤を探索するための基盤づくりを目指した。

(2) HIV-LTR 領域に作用する因子

HIV の複製は宿主染色体に挿入された HIV プロウイルス 5' 領域に存在する LTR 部位に様々な宿主因子および HIV tat 遺伝子産物が作用して行われる。すなわち HIV-LTR 領域へのこれら因子の作用が HIV 複製効率を規定している。今日 HIV 感染から AIDS 発症の過程で血液中に検出されるウイルス量が究めて密接に関連していることが示されており、AIDS 発症を阻止するためには血中ウイルス量を抑え込む必要があると考えられている。このことから HIV-LTR 領域に作用する宿主因子を標的とした抗 HIV 剤の開発の可能性が考えられる。HIV-LTR からの HIV 複製を最も大きく増強させるのは HIV-LTR 領域中の EHN 領域であり、この領域に結合する細胞性因子 NF- κ B が見出されている。HIV 感染細胞に TNF (腫瘍壊死因子) や様々な刺激が作用すると、NF- κ B が活性化されその結果として HIV の複製が数百倍に増強することが知られている。しかしながら NF- κ B は HIV-LTR のみならず宿主細胞の多くの遺伝子の転写に密接に関与しているため、HIV 特異的な阻害剤の標的とすることは困難であると予想される。一方我々は既に HIV-LTR ENH 領域の上流に ENH 活性を制御する領域 URE を見出している。この URE 結合蛋白欠損時には ENH 活性もほぼ完全に阻害されることから、新規の抗 HIV 剤開発のターゲットとして究めて有効であることが期待される。また、これまでにタンニン酸等の薬剤が HIV-LTR の URE 以外の領域に作用して HIV 複製を抑制することを見出し、従って今後 HIV-LTR は種々の領域をターゲットとして抗 HIV 薬を開発できる可能性があると言える。本研究ではこれらの点を総合して HIV-LTR 領域に作用する因子をターゲットとした抗 HIV 薬の開発を目的に検討を行っている。

3. 研究方法

(1) HIV 外被糖蛋白質プロセシングプロテアーゼの生化学的解析

プラスミドの作製

ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞の cDNA ライブラリを用いて Asp1 及び Asp2 の蛋白コード領域を含む DNA 断片を PCR 法により得、ネオマイシン耐性遺伝子を有する発現ベクターに挿入した。各々の塩基配列は、シーケンシングを行い、確認した。得られたプラスミドをそれぞれ pSV OK Asp1、pSV OK Asp2 と名付けた。また、Asp1 については、抗体作成のためのリコンビナント融合蛋白を得るために、シグナルペプチド推定領域の下流から膜貫通推定領域の上流までの DNA 断片を 6×His タグ標識蛋白発現ベクターに挿入したのもも作製した。gp160 の発現ベクターとして、pHenv(AIDS Research and Reference Reagent Program Cat.#513,1991) の Sal I -Xho I フラグメント (3 kb) を pCMV-Script (STRATAGENE) に連結したものを作製した。

細胞

ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa S3 細胞に、pSV OK Asp1 あるいは pSV OK Asp2 をリン酸カルシウム法により導入し、ネオマイシン耐性株をそれぞれ 12 株 (HeLa S3/Asp1-1~12、HeLa S3/Asp2-1~12) 分離した。一過性の Asp1 及び Asp2 遺伝子導入とその発現については、HeLa S3 細胞株、CHO/WT (CHO-K1 細胞に gp160 を安定して発現させた細胞株) を用いた。

抗 Asp1-His 抗体の作製

ヒスチジン-タグを付加した融合蛋白質 (Asp1-His) を大腸菌 M15 株に遺伝子導入して発現させた。8M Urea, 0.1M Phosphate-Na, 10mM Tris·HCl, 10mM Imidazole (pH8.0) バッファーで可溶化して、Ni-NTA アフィニティークラム、ゲルろ過により精製し、これを抗原として 2 羽のウサギより抗血清を得た (業者依頼)。これら抗血清をそれぞれ ASP1-His を結合したニトロセルロース膜を用いて精製し、実験に用いた。

HeLa S3 細胞における一過性な Asp1 あるいは Asp2 と gp160 の共発現

HeLa S3 細胞株をプレートにまき 37°C で 1 晩培養した後、リポフェクタミン法により遺伝子を導入した。37°C 48 時間培養後、PBS(-) で洗浄し、細胞をハーベストして SDS サンプルバッファー中で破碎した。

HeLa S3/Asp1 株及び HeLa S3/Asp2 株における gp160 の発現及びその細胞内プロセッシング

HeLa S3/Asp1 株、HeLa S3/Asp2 株それぞれ 12 株ずつをプレートにまき、37°C で 1 晩培養した後に、vPE16(ワクシニアウイルスベクターに HIV env 領域を連結した gp160 の発現ベクター)液を 37°C 1 時間接種した。培地を加えてさらに 37°C で 24 時間培養した後、培地を除去、PBS(-)で洗浄して細胞をハーベストした。これらを SDS サンプルバッファー中で破碎して 95°C で 5 分間処理し、7.5%SDS-PAGE で展開して PVDF 膜にトランスファーした。その後、ラット抗 gp120 モノクローナル抗体またはマウス抗 gp41 モノクローナル抗体を用いて抗原抗体反応を行い、それぞれ対応する HRP 結合二次抗体と反応させた。

HeLa S3/Asp1 株における Asp1 の発現

HeLa S3/Asp1 株をプレートにまいて 37°C で培養し、PBS(-)で洗浄後ハーベストした。これを 0.25M Sucrose, 10mM Tris・HCl (pH7.5) バッファー中で破碎して 100,000×g、1 時間遠心し、その沈澱を再び同バッファー中で破碎して膜画分とした。これらに SDS サンプルバッファーを加え、95°C 5 分間処理したものを 10% SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜にトランスファーした。その後ウサギ抗 Asp1-His ポリクローナル抗体を用いて抗原抗体反応を行い、HRP 結合抗ウサギ Ig 抗体(二次抗体)とさらに反応させた。

Asp1 或いは Asp2 の CHO/WT 細胞株における一過性な発現

CHO/WT 細胞株をプレートにまき 37°C で 1 晩培養した後、リポフェクタミン法により遺伝子を導入した。37°C 48 時間培養後、PBS(-)で洗浄し、細胞をハーベストして、0.25M Sucrose, 10mM Tris・HCl (pH7.5) バッファー中で破碎した。

DNP-ペプチドの合成

DNP-ペプチドの合成は昨年度報告と同様の方法により行った。即ち、ペプチド部分については Fmoc-アミノ酸を使用して、自動固相合成機により合成し、N 末端アミノ酸をフリーとしてから、樹脂から切り離す前に 2,4-dinitrofluorobenzene を加えて DNP 化を行った。その後、脱保護と樹脂からの切断を同時に行い、更に逆相 HPLC により精製して目的物を回収した。各化合物の純度は、逆相 HPLC により測定し、更にこれら化合物はマスマスペクトルおよびアミノ酸分析により構造を確認した。

(2) HIV-LTR URE 領域結合蛋白の精製

ヒト株化細胞 MOLT-4 より核抽出液を調整し、放射標識合成 URE オリゴヌクレオチドに対する蛋白の特異的結合活性をゲルシフト法により検出し、この活性を指標に URE 結合蛋白の精製を行った。URE 結合活性は 1 pg の DNA をゲルシフトさせる活性を 1 Unit と定義した。

(3) HIV-LTR に作用する細胞内タンパク性因子の同定および作用領域・機能の解析

MMTV プロモーター及び HIV-LTR のデリーションシリーズの作製を行い、これを用いてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)レポーターベクターの構築を行った。当該レポーターベクターをそれぞれマウス繊維芽細胞の L929 細胞、及びヒト T 細胞白血病細胞である Jurkat 細胞に一過性に導入し、それぞれホルボールエステル、及びデキサメサゾンで発現誘導を行った。細胞を回収し細胞抽出液の CAT 活性を測定し、それを基に MMTV プロモーター及び HIV LTR のプロモーター活性の評価を行った。測定結果の標準化は、 β -ガラクトシダーゼベクターを同時導入することにより行った。

得られた MMTV プロモーター及び HIV-LTR 共通配列をプローブとして用い、cDNA ライブラリーはラット脾臓 λ gt11cDNA ライブラリーを用い、サウスウエスタン発現スクリーニングを行った。

4. 研究結果

(1) HIV 外被糖蛋白質プロセッシングプロテアーゼ

Asp1 或いは Asp2 と gp160 を一過性に HeLa S3 細胞株に共発現させた場合の細胞内における gp160 のプロセッシング

HeLa S3 細胞株に gp160 遺伝子と共に Asp1 遺伝子或いは Asp2 遺伝子を導入しても、これらプロテアーゼの遺伝子を導入しなかった場合と比較して顕著な gp160 のプロセッシングの亢進は見られなかった。

HeLa S3/Asp1 株、HeLa S3/Asp2 株における細胞内での gp160 プロセッシング

HeLa S3/Asp1 株、HeLa S3/Asp2 株それぞれ 12 株ずつ用いて、親細胞株である HeLa S3 細胞内での gp160 プロセッシングと比較したが、いずれの細胞株においてもプロセッシングの顕著な亢進は見られなかった (Fig.1)。

HeLa S3/Asp1 株における Asp1 の発現

ネオマイシン耐性株として樹立した細胞株において Asp1 或いは Asp2 が過剰発現していない可能性が考え

られたので、Asp1についてはHeLa S3/Asp1株でのその発現についてWestern Blotting法により解析した。その結果、抗Asp1・His抗体と交叉する分子サイズ55kDの蛋白がHeLa S3/Asp1株で特異的に発現していた(Fig.2)。

Asp1 或いは Asp2 を一過性に CHO/WT に発現させた場合の細胞内における gp160 のプロセッシング

CHO/WT細胞株は、gp160を安定して発現している細胞株である。そこで、この細胞株にAsp1 或いは Asp2を一過性に発現させ、gp160の細胞内プロセッシングについてWestern Blotting法により解析した。その結果、これらのプロテアーゼが発現することによるgp160プロセッシングの顕著な亢進は見られなかった。なお、Asp1については、その発現をWestern Blotting法により確認した。

(2) HIV-LTR URE 領域結合蛋白の同定

Fig. 3にMOLT-4細胞核抽出液に検出されるURE結合活性を示した。非標識UREオリゴDNAおよびNF- κ B結合配列の競合実験からMOLT-4細胞由来核抽出液には少なくとも活性の強いUpper bandと活性の弱いLower bandの2つのURE結合活性が検出される。Upper bandは昨年までの報告に示すようにその細胞株に共通に見られるが、Lower bandは細胞ごとに活性が異なっているため、本研究に於いてはUpper Bandの精製を進めている。昨年まではURE結合蛋白の精製はゲルシフト法により活性を追いかけ、それぞれ細胞核抽出液、DE52、MonoQ、Superose 6等を用いて行い、各抽出液にくらべ約600倍の比活性の上昇がみられる標品が得られたが、URE結合活性が失活しやすく、それ以上の活性上昇をえることができなかった。そこで本年は精製方法の改良を試みTable 1で示すように核抽出液に比べ10,000倍の比活性の上昇が得られるようになった。しかしながら得られた標品をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により解析すると依然として複数のバンドが検出され(Fig. 4)、どのバンドがURE結合蛋白であるか明瞭でなかった。この問題に関してはFig.5に示すようにSuperdex200によるゲルろ過カラムでの解析からURE結合活性は260KD付近に活性がある極めて大きな分子量をもっていることから、複数の蛋白質の複合体である可能性が高いと現在考えている。

(3) HIV-LTR に作用する細胞内タンパク性因子の同定および作用領域・機能の解析

タンニン酸による HIV 転写抑制活性

HIVLTR-CATレポータープラスミドベクターを用いてプロモーター活性に及ぼすタンニン酸の影響を調べたところFig. 6に示すように抑制活性があることが分かった。

HIV-LTR 中のタンニン酸感受性領域

タンニン酸により抑制されることが知られているMMTVプロモーターの抑制エレメント(ACTGモチーフ)を中心にHIVプロモーターを解析した結果、HIV-LTR中にもMMTVと同様なACTGモチーフが存在することが判明した(Fig. 7)。

ACTGモチーフ結合因子の同定

ACTGモチーフを含む領域に結合するタンパクを同定するため、サウスウエスタン法によりスクリーニングを行った結果、S μ bp-2を同定した(Fig. 8)。

5. 考察

新規にクローニングが報告された2種のアスパルティックプロテアーゼ(Asp1,Asp2)に着目し、そのgp160のプロセッシング能について検討したが、これらのプロテアーゼがgp160のプロセッシングに積極的に関与していることを示唆する結果は得られなかった。従ってAsp1 或いは Asp2 が gp160 のプロセッシングプロテアーゼである可能性は低いと考えられる。

MOLT-4細胞核抽出液には少なくとも活性の強いUpper bandと活性の弱いLower bandの2つのURE結合活性が検出される。本研究に於いては細胞株に共通に見られるUpper Bandの精製を進めている。今年度は精製方法の改良を試み、核抽出液に比べ10,000倍の非活性の上昇が得られた。しかし得られた標品をSDS-PAGEにより解析すると複数のバンドが検出された。Superdex200によるゲルろ過カラムでの解析からURE結合活性は260KD付近に活性がある極めて大きな分子量をもっていることから、複数の蛋白質の複合体である可能性が極めて高いと思われる。現在SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で検出される複数のバンドが260KDのURE結合蛋白の構成成分であると想定して各バンドの遺伝子クローニングを準備している。

HIVの転写がMMTVと同様にタンニン酸によって抑制されることを確認し、その抑制エレメントとしてACTGモチーフの存在を明確にした。HIV-LTR中のACTGモチーフはHIVの転写を負に制御するエレメントであると思われる。また、このエレメントに結合するタンパクとして同定されたS μ bp-2は、まだその機能は不明であるがその生理的役割としてプロウイルスの転写制御に関与していることが考えられる。

6. 結論

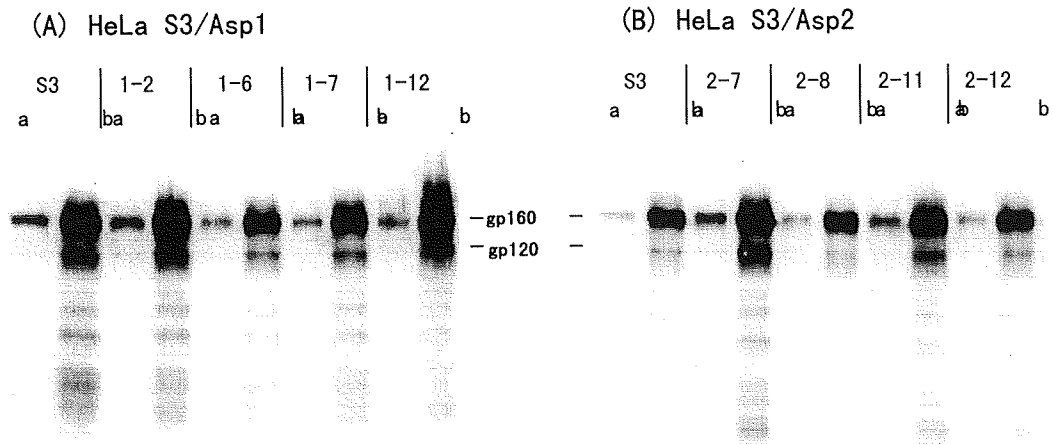
- (1) 新規にクローニングが報告された 2 種のアスパルティックプロテアーゼ (Asp1, Asp2) に着目し、その gp160 のプロセシング能について検討したが、これらのプロテアーゼが gp160 のプロセシングに積極的に関与していることを示唆する結果は得られなかった。
- (2) MOLT-4 細胞核抽出液から URE 結合蛋白の精製を進め、比活性で 10,000 倍の上昇が得られた。ゲルろ過による解析から、この URE 結合因子は複数の蛋白質の複合体と推定された。
- (3) HIV の転写が MMTV と同様にタンニン酸によって抑制されることを確認し、その抑制エレメントとして ACTG モチーフの存在を明確にした。さらに、このエレメントに結合する転写因子の 1 つとして S μ bp-2 を同定した。

7. 研究発表

特になし。

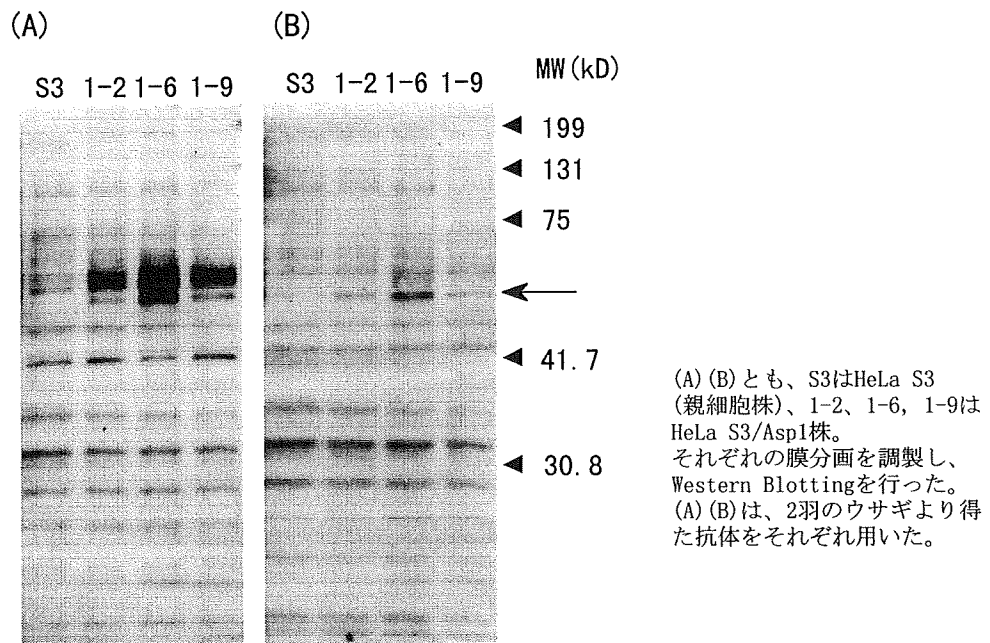
8. 知的所有権の取得状況

特許出願 出願番号 2001-65803 (転写制御剤)



Asp1の発現プラスミドを安定に取り込んだ細胞株1-2, 1-6, 1-7, 1-12、Asp2の発現プラスミドを安定に取り込んだ細胞株2-7, 2-8, 2-11, 2-12、親細胞株 HeLa S3 (S3)にm. o. i. 0.02(a)あるいは0.2(b)でワクシニアウイルスを感染させ、gp160を発現させた。

Fig. 1 Intracellular processing of gp160 in HeLa S3/Asp1 clones and HeLa S3/Asp2 clones



(A) (B)とも、S3はHeLa S3 (親細胞株)、1-2、1-6、1-9はHeLa S3/Asp1株。それぞれの膜分画を調製し、Western Blottingを行った。(A) (B)は、2羽のウサギより得た抗体をそれぞれ用いた。

Fig. 2 Expression of Asp1 in HeLa S3/Asp1 clones

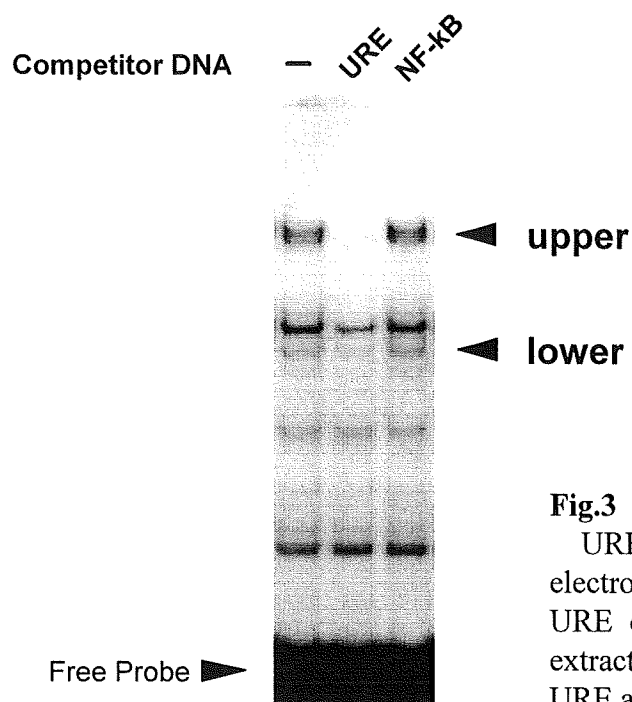


Fig.3 Detection of URE binding protein.

URE binding proteins were detected by electrophoresis mobility shift assay (EMSA) with URE oligonucleotide probe and MOLT-4 nuclear extract. EMSA was performed with and without URE and NF-kB DNA for competitor as indicated.

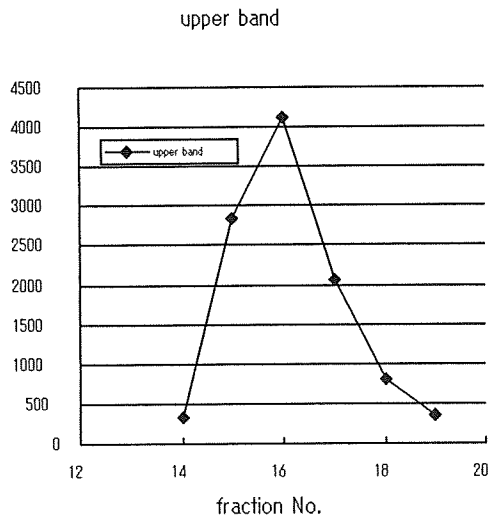
Table 1 Purification of the URE binding protein 'upper band'.

	Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Recovery (%)
^a Nuclear Extract	91.0	1.3×10^4	$0.14^e(1.0)$	100
^b DEAE	12.0	5.3×10^4	$4.4^e(31.4)$	414
^b RESOURCE S	9.0	2.3×10^4	$2.5^e(17.9)$	176
^b Mono Q	0.87	0.52×10^4	$6.0^e(42.9)$	41
^c Superdex 200	^d ND	0.39×10^4	^d ND	31
^c Mono Q	0.024	0.34×10^4	1.4×10^3 ^e (1.01×10^4)	27

ND: not detected

1 unit は 1 pg の DNA をシフトさせる活性とした。Carrier DNA 量を a)では 5 μ g、b)では 0.5 μ g 加え、c)では加えていない。d)はタンパク量が検出感度以下のため算出不可。e)核抽出液の比活性を 1 とした場合の、各精製段階での比活性の上昇度。ただし、検出条件が a、b、c において異なるのでこの値は参考値である。

(A)



(B)

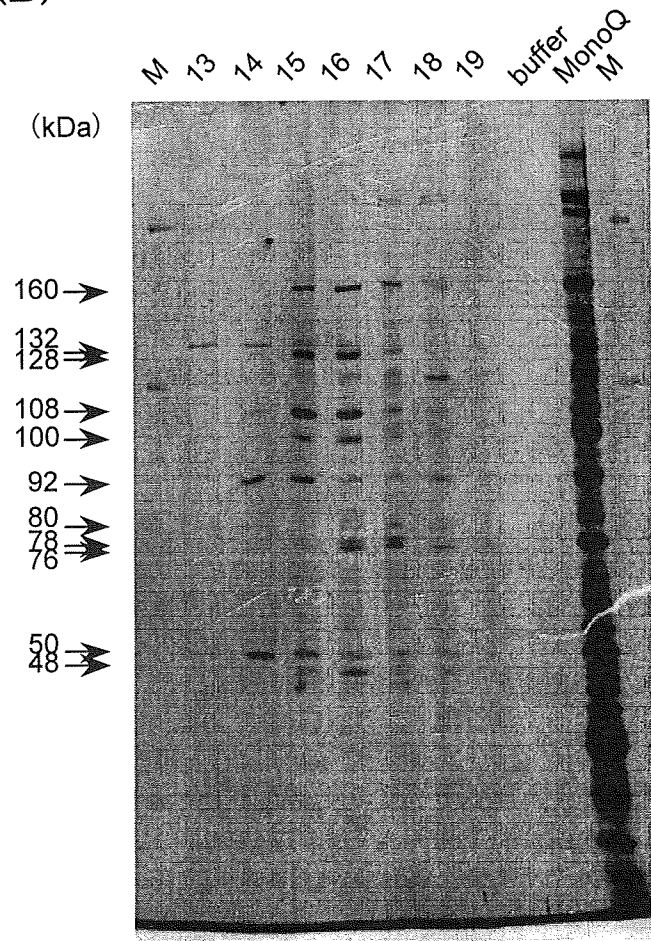


Fig. 4

(A) 2回目の MonoQ カラムにより精製、分離した各フラクションをゲルシフトにかけて URE DNA 結合活性を検出し、MacBas にて upper band の定量をした結果。

(B) (A) にて得られた URE DNA 結合活性が最も高いフラクションを中心に、その前後のサンプルを SDS-PAGE にかけての結果。M: 分子量マーカー。buffer: 精製時に用いた buffer。MonoQ: 1回目の MonoQ にかけてときの URE DNA 結合活性が最も高かったフラクション。

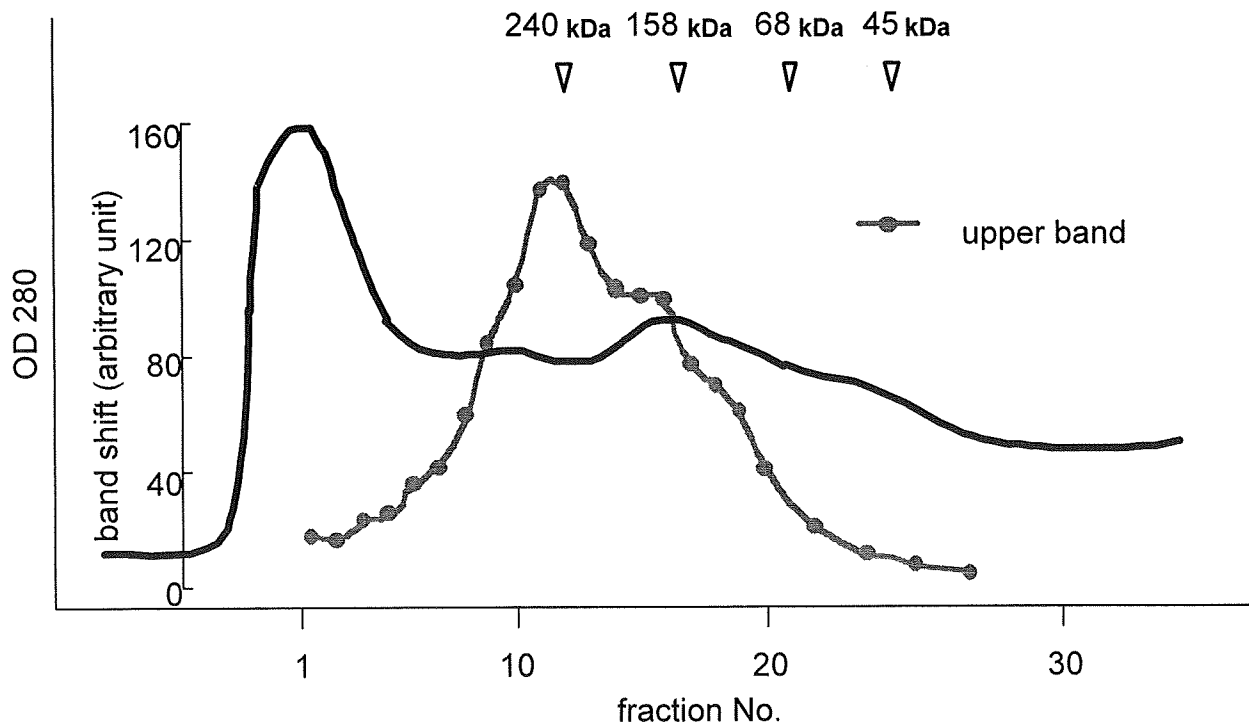


Fig. 5 Gel-filtration analysis of URE binding protein.

To determine a molecular weight of URE binding protein with FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech), protein (2.6mg) of MOLT-4 nuclear extract were loaded onto a Superdes-200 column (24mL). URE binding activity was analyzed with EMSA, and indicated by (●) upper band. Molecular weight Calibration kit (Boehringer Mannheim) were used and indicated.

Fig. 6 Determination of Elements Responsive to Tannic Acid in the HIV Promoter

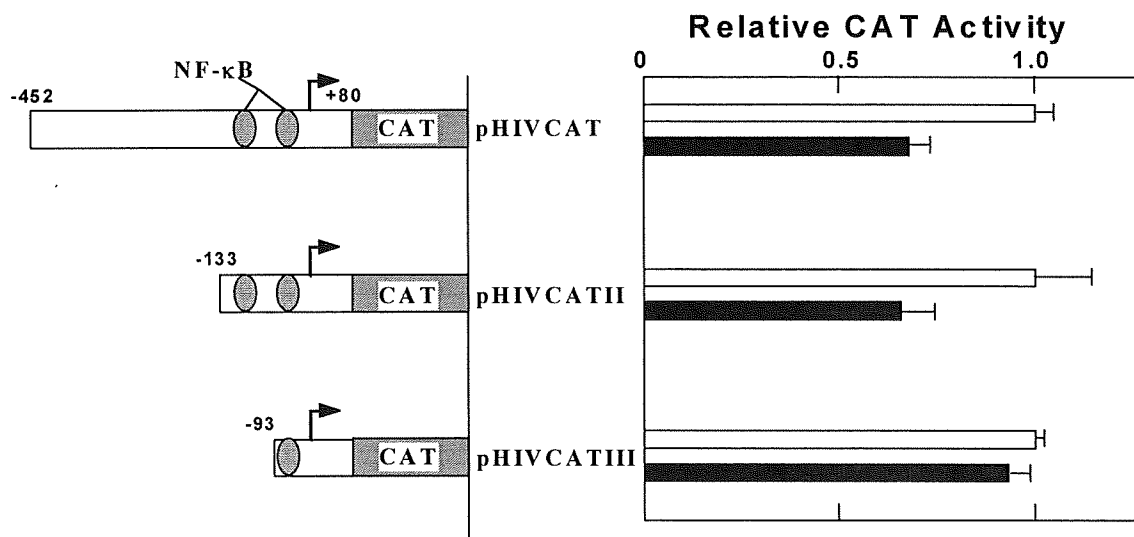


Fig. 7 Comparison of Sequences between MMTV and HIV Promoters

MMTV 50-bp: 5' -TCCCCCGCAGATCCGGTCACCCTCAGGTCGGCCGACTGCCGGCAGACGGAT- 3'

HIV 30-bp: 5' -CAAGAACTGTTGACATCGAGCTTGTTACAA- 3'

Fig. 8 Nucleotide Sequence of Rat Subp-2 cDNA aligned with the predicted Amino Acid Sequence

1 taggggctgatcgcggagcag

Supr1
23 ATGCCCCCGTCCACCGTGGAGAGTTTGTGGCCAGCAGCTACAGCTGTTGGAGCTAGACGGGCGCCGAGGTTGGAGGCGCAGGCTCTGGCAGGAACACAGTCTCTGAAAAGAGCTT
1 M A P S T V E S F V A Q Q L Q L L E L E R D A E V E E E R R S W Q E H S S L K E L

143 CAGAGCCGAGGGGTGTTTGTCTGAAGCTTACAGGATCGGGCCAGCCGAGGGTGTATGAGCAGCGGCTGGTCCACCTTTAGCCCCAGGAAGTITGGCCCTGCAGTGGTCTCCCGACG
41 Q S R G V L K L Q V S G Q R L V T F E P R K F G P A V V L P S

263 AACAGCTCAACCTCTGGTATCTGTTGCTGATCTAATAAAGCAGCCAACTGCCCCAGTGGGCTCTGCCCGCATCACAAAATCGGTATAGTGGCCCTTTAGTAGTCC
81 N S F T S G D I V G L Y D T N E S S Q L A T Q V L T R I T Q K S V I V A F D E S

383 CATGATTTCCAGTTAACTGGACCGAGAAAATACCTACAGACTCTGAAAGCTTGCCTGCAAGTACGCTACAAAGCCGTGAAAAGACTCTGCTGACACTGAAAAGTACCATTCTGGG
121 H D F Q L N L D R E N T Y R L L K L A N D V T Y K R L K K A L L T L K K Y H S G

503 CCAGCATCCTCCTCATTGATGTCGTGGTGGCTCCACCCCGAGTCTGCCACTGAAATACCCCGCTCACTTCTACAACAGCAACCTGGACCCTTCCGAAAAGAAAGCTGTGTCT
161 P A S S L I D V L L G G S T P S P A T E I P P L T F Y N T T L D P S Q K E A V S

623 TTTGCACCTGCCGAGAAAAGAGTGGCCATCCATCGGGCTCTGGCAGTGGGAAACACAACTGTTGGAAATAATCTTCAGCTGTGAAGCAAGGCCTAAAGGTTCTATGCTGT
201 F A L A Q K E V A I I H G P P G T G K T T T V V E I I L Q A V K Q G L K V L C C

743 GCTCCCTCCAACATCGCTGTGGCAACTGGTGGAGCGTCTGGCTCTGTCGCAAGCAGGATTCTTCGCTGGTCCAGCTGCCCCTCCTGGAGTCCGTTTCAGCAGCAGCTCACTGGAC
241 A P S N I A V D N L V E R L A L C K K Q I L R L G H P A R L L E S V Q Q H S L D

863 GCAGTGTAGCAGCAGTGAACAATGCCAGATTGTTGCTGACATCAGAAGGAGCATTGACCAGGTCCTTTGGCAAGAAACCAAAAGCCCAAGATAAGAGAGAAAAGTAAATTTTCGAAAT
I
161 A V L A R S D N A Q I V A D I R R D I D Q V F G K N K K T Q D K R E K S N F R N

983 GAAATTAAGCTGCTAAGGAAGAACTGAAAGAAAGGAAAGCAGCCATAGTTTCAGAGCTCAGTGCAGCAGATGTGGTCTAGCCACCAACAGGTCATCTACTGATGGCCCCCTG
321 E I K L L R K E L K E R E E A A I V Q S L S A A D V V L A T N T G A S T D G P L

1103 AAGCTGCTGCTGAGGACTACTTGTATGTTGGTGGTGGTGGGAGCGGCTGCCCGGCCTAGAGCCAGCTGCTGGATCCCTGCTGAAGGCCCTAAGTGCATCTAGCTGGGAGCCAC
361 K L L P E D Y F D V V V V D E C A Q A L E A S C W I P L L K A P K C I L A G D H III

1223 AGACAGCTGCCACCACCACTGCTCTCACAGGCAAGCAGTGGGCTGTTCCCGCAGCTGATGGAGCGTCTGGCAGAGAAGCATGGTGTCTGTTGGTAAGGCTGTGGTGTCCAG
401 R Q L P P T T V S H K A A L A G L S R S L M E R L A E K H G A A V R M L V V Q

1343 TACCGAATGCCAGGCCATCACGCGCTGGGCTCGGAAGCCATGATACCATGGACAGCTCCTGCCATCCCTCTGTGGCAGGACACCTCCTGAAGGACCTCCACAGTGTGGCTGCACACA
441 Y R M H Q A I T R W A S E A M Y H G Q L T A H P S V A G H L L K D L P G V A D T IV

1463 GAGGAGCAGAGTGCCCTCTGCTGCTATAGACACAGCTGGCTGCGGGCTGCTGGAGCTGGAGGAGGAGGAGCAGCAGCTCAAGGAAAACCCCGTGAAGTTCGCTGCTCACTTTCGCAC
481 E E T S V P L L I D T A G C G L L E L E E E D S Q S K G N P G E V R L V T L H

1583 ATCCAGGCTCTGGTGGATGCTGGGTTCCAGGCTGGTGCATTGCGCTACCGCACCTACAACCTTCAGTGGATCTGCTCAGACAGAGCTCTTAACAGGACCCTGAGCTGGAGATC
521 I Q A L V D A G I A V I A G D I A V I A F Y I A P Y N L Q V D L L R Q S L S N K H P E L E I

1703 AAGTCTGTGAGCGCTTCAAGGCCGAGAGAAGGAGGCTGTAGTCTGACCTTGTGCAGTCCAACAGGAAGGTGAAAGTGGTITTTCTGGCTGAGGACAGCCGATCAATGTTGCTGTC
561 K S V D G F Q G R E K E A V I L T F V R S N R K G E V G F L A E D R R R I N V A V

1823 ACCCGTGTAGCCGCGATGCGCGCTCATCTGATTTCCACACTGTCAACAACCCAGCCCTTTAGAACCTTGGTGGATTATTCACAGAGCATGGGAGGTACGCACAGCTTTGAG
601 T R A R H V A M I E E F V A S K E A Q L E F P T S L S S H D L R V Q L A

1943 TACCTGGATGACATGTCCTGAGAACTATACCATGAGGCTCCCGGAGCCAGTGTGCCCCAACCCAAGTGGCCCCACCCTCAGTCAGAAAGCCTCCAGTCTCAGGAGGT
641 Y L D D I V P E N Y T H E G S R S H S C A P K P K C P T T S V R K P A S A Q E S V

2063 AGACAAGAGCCAGGACCCACTGGACAGCAGCCGAGGAAGCCAGTGAAGGCCCTTAGGCTCTCAAGTCCAGCCACAGCAGCTCCAAAAGAAATGGCTCTGACCGAAGTGGAGGC
681 R Q E A R A A T G H S R R K P S E K P L G S Q V Q P Q H S S K A N G S D R T G G VI

2183 ACAAGCCGACAGACCTTTAGGCTATGATGAGGAGTTCGGCTAGCAAGGAGGCCAGTGGAGTITCCACATCCTGAGCTCCATGACAGACTGCGACTCCCAATAGCT
721 T D R T E H F R A M I E E F V A S K E A Q L E F P T S L S S H D L R V Q L A VII

2303 GAGGAGTTCGGCTGAAGCATGACAGCAGCGGAGGAGGACGGCACATCACAGTGAAGGAGGAGCCCTGCTGGTTCTGCGCAGTGAACCCCAACCTCCCTCACCGCCAGC
761 E E F G L K H D S T G E G K A R H T V S R R S P A G S G S A T P Q P P S P S

2423 CCTGCACAGCTGAGCCTGAGCCTCAGTGTAGAGCAGCCTGTAGGACAGCCACATGGCTCCACAGCAGCTGATCTGAAGGCACCTTACCTGGAGGCTGCAGCAGCAGGAGGCTGCCAG
801 P A Q A E P E P Q V E Q P V G Q P H G S T Q L D L K A L H L E R L Q R Q Q G C Q

2543 GCCAGTCTCAGTGGCGGGGTTTCAGGCCCAGAGGGCTCCACAGAAAAGAAAAGAACCGAAAAGGCCAGCCATGGCTCTGCCCTCTGAGGAGGATCTGCATGACCTAGT
841 A Q S Q L G G G S R P Q K A P Q K K K K R E P K G P A M A L P S E E D F D A L V

2663 TCAGCTGTGGTGAAGCCTGACAACCTGTGCTTACCAAGTCTGGCCAGCAGCAGCTGAGGCGAGTTCGATGCATGTAGCCCGGCTATTGCTCAGCCACCATCTGGCC
881 S A V V K A D N T C S F T K C S A S T T T L G Q F C M H C S R R Y C L S H H L P Rh3-2

2783 GAGATCCATGGCTGTGTGAAAGGCTGTCGCCATGCCCGCAGAGGATTAAGCGGGAAGAGTACTCTACGCAGCAGTGGGCAAGGACAGGCCCCCGGACCCAGGAGGGCC
921 E I H G C G E K A R A H A R Q R I S R E G V L Y A G S G T K D R A L D P A K R A Rh3-2

2903 CAGCTGCAGAGAACTGGACAAGAAGTGGCCAGCTCAGCAGCAGAGCAAGCAAGAGAAAGAGGAGGAGGGGACG tgaaggccaccctctgggagggctggtgtgggcaag
961 Q L Q R K L D K K L G E L S S Q R T S K K E K E R G T 988

3023 agtcagcaggtgggacacagtctacactggtatttctactctgagctagtgtgtccctaacctctctcatggaaggagacaagcctagtaccatcagagtaactgcttaccgctcag

3143 caggtctcaataacgctgtgagctctgcatggcagctagccatggcacccttattccttctcagctgacacagctggcagctgattgtgtgtctcaagagtgagggaaagccta

3263 ttccctgggtcagaagctcctagcctgattgctgctggcctgctgcttagtactgtgtggaaggagctctccagggaccacacagcctcaccctcacagagctgacccctctccag

3383 cgttctgaccagttgttcattaggaactttgacagatgattttagcctcagctctgttccaaaataataaaattttgcaaataaaaattggcaaaaaaaaaaaaaaaaa

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

