

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

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

所 属 北里研究所 医療環境科学センター センター長
主任研究者 鈴木 達夫

要旨

HIV-1の細胞への侵入には、CD4とコレセプターとして主にケモカインレセプターの存在が必要である。ケモカインレセプターは、G-protein-coupled 7-transmembrane receptor (GPCR)に属する。HIV-1は、人種により高率に腎症を起こしうるので、腎のメサンギウム細胞のHIV/SIV感受性を検討した。メサンギウム細胞はCD4とGPR1発現しており、GPR1を利用できるウイルスに感受性であることを明らかにした。オーファンレセプターRDC1が脳由来細胞に発現しており、HIV-1、HIV-2およびSIV(HIV/SIV)の新しいコレセプターとして作用することを明らかにした。APJも一部のHIV/SIV株のコレセプターとして知られているがAPJのリガンドであるアペリンのC末のペプチドに抗ウイルス作用を認めた。CCR5、CCR3、CCR8、CXCR4、GPR1、APJについてCD4に依存しないコレセプターとして作用できるか検討した。CD4に依存しないコレセプターとしては、一部のHIV-2株とSIV株が、CCR5あるいはCXCR4のどちらか一方のみを利用できた。細胞表面にCD4がない細胞の感染で、CCR5およびCXCR4の両方を同時に利用できるウイルス株はなかった。

感染宿主細胞表面に存在する複合糖質糖鎖のHIV感染における役割を解析するため、HIV-1感染感受性の異なる6種類の培養細胞株について、糖脂質についてその糖鎖組成の化学分析を行なった。TLC分析の結果、これまでにHIVの感染に関与するとの報告があるGalCer、CTHとは異なる糖脂質(Lipid Y)が低感受性細胞株K562/CD4に強く発現していることが明らかになった。一方、この糖脂質は、高感受性(C8166、MT-2、Raji/CD4)、中等度感受性細胞株(MOLT-4)には発現が認められなかった。Lipid Yは、ウシ赤血球由来のparaglobosideと呼ばれる糖脂質と同様の糖鎖構造、すなわちGal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Rを有することが明らかとなった。

生体微量元素として知られている亜鉛と、HIV増殖抑制作用があるp-クマル酸もしくはフェルラ酸との錯体を合成し、抗HIV活性を*in vitro*で評価した。また、抗酸化能を有することが知られているカフェイン酸、ロズマリン酸、ラブドシンおよびその類縁体の抗HIV活性を*in vitro*で評価した。バナジウム錯体のVO(3MPA)₂、数種類のアミノ酸誘導体-亜鉛錯体、クマル酸関連の新規亜鉛錯体TK-2とTK-4、インテグラーゼ阻害作用を示す可能性が考えられる抗酸化性ポリフェノール化合物caffaic acid、rabdosiin、fukinolic acidに抗HIV活性が認められた。

新しいHIV-1感染の抑制物質を見出すため、108種類のオリゴペプチドについてHIV-1抑制効果を検討した。NP-2/CD4/CCR5細胞とNP-2/CD4/CXCR4細胞を用い、細胞を被検物質で処理後、GUN1wt株を感染させ合胞体の形成で判定する系を確立し検討した。余り強い抗HIV活性を持つものは見いだせなかったが、数種類のオリゴペプチドが合胞体形成を抑制した。

コレセプター関連のオリゴペプチドで酸性アミノ酸の組み合わせを多く持つアミノ酸配列に比較的強い活性が認められた。さらに抗HIV-1活性の増強のためには(DYD)_nとCPF結合物の硫酸化体の合成およびスパーサによる結合距離の検討が必要であった。また第1ループのミミックペプチドであるSKG-51に有意な活性が見られたことから、今後、CCR5系アッセイ法による活性試験とgp120とループ部位の構造解析を行うことにより選択的な阻害剤の開発につながるものと考えられる。

1. 研究組織

- (1) 北里研究所 医療環境科学センター センター長 鈴木 達夫
- (2) 群馬大学医学部衛生学 教授 星野 洪郎
- (3) 京都薬科大学薬学部薬品分析教室 教授 桜井 弘
- (4) 静岡県立大学薬学部生化学教室 教授 鈴木 康夫
- (5) 静岡県立大学薬学部薬品製造化学教室 講師 池田 潔

2. 研究目的

CD4分子は、HIV-1、HIV-2、およびSIVの感染におけるレセプターとして同定された。更にGPCRに属するいくつかの分子が、HIV/SIVの感染のコレセプターとして働くことが報告された。本研究では、HIV/SIVの細胞への侵入過程に関与する新しいコレセプターを同定し、更にコレセプター関連ペプチドのHIV感染への影響を検討することで、これらの因子の感染初期過程での必要性を明らかにし、抗ウイルス剤の開発に

役立てることを目的とした。

GPR1 のコレセプターに注目し、新しい細胞のコレセプターとして働いているか検討することとし、腎のメサンギウム細胞が GPR1 を利用できる特別なウイルス株に感受性が検討した。また、コレセプターとなりそうな GPCR で、脳由来細胞で発現している GPCR を検出し、HIV/SIV 感染で機能するか検討した。また APJ が一部のウイルスのコレセプターとして機能すると報告されているので、APJ を発現する NP-2/CD4 細胞を作製し、そのリガンドであるアペリン関連のペプチドが感染を阻害できるか検討した。

HIV-2 株では CD4 を発現していない細胞に感染できる株が報告されている。我々は NP-2 細胞を用いて、CD4 とコレセプター CCR5、CCR3、CCR8、CXCR4、GPR1、APJ のうちひとつを発現している細胞を作成した。更に CD4 は発現していないが上記のコレセプターを発現している細胞を作製した。色々な HIV-1、HIV-2 および SIV 株についてその感染における CD4 とコレセプターの必要性をこれらの細胞を用い系統だてて検討する。以上の解析の結果を参考に新しい抗 HIV 剤の開発に役立つ情報を得ることを目的とした。

HIV 感染に関与する細胞性因子を同定・解析し、新しい薬剤開発をすることを目的に、感染宿主細胞表面に存在する複合糖質糖鎖の HIV 感染における役割を解析する。CD4 あるいは CXCR4 ケモカインレセプターを発現させた HIV-1 感染感受性の異なる 6 種類の培養細胞株について、細胞膜表面に存在する複合糖質糖鎖の一つであり、HIV-1 感染性との関連が注目されている糖脂質について、感染感受性との関連が示唆された糖脂質の単離、その構造の解析を行なう。

生体微量金属は多様な生理活性を示すが、その中でも亜鉛は種々のウイルスに対して幅広い増殖抑制活性を有している。これまでの本研究班の研究から、亜鉛を含む金属錯体が抗 HIV 作用を示すことが観察された。本年度は、HIV プロテアーゼ阻害活性をもつことが報告されている *p*-クマル酸やフェルラ酸のポリマーを意識して、これらを配位子とした亜鉛錯体を合成して、抗 HIV 作用を検討することとした。

また、ポリフェノール化合物であるカフェイン酸やその類縁体は活性酸素種に対して高い消去能をもつことが知られているが、抗 HIV 活性については検討されていない。最近になり、逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤に続く抗 HIV 活性の第 3 のターゲットとして、HIV インテグラーゼ阻害剤が注目されている。カフェイン酸の誘導体であるカフェイン酸フェネチルエステルがインテグラーゼ阻害作用を示すことを意識して、構造活性相関にもとづいたカフェイン酸類縁体の抗 HIV 活性を検討することとした。

HIV-1 の細胞進入を阻害する抗 HIV 薬の開発のため、HIV-1 感染を抑制する合成ペプチドおよびその関連化合物を見出すことを目的とした。合成ペプチドには、入手しやすいオリゴペプチドを選択し、ヒト T 細胞株 C8166 および HIV-1 のコレセプター CCR5 あるいは CXCR4 を発現している NP-2/CD4/CCR5 あるいは NP-2/CD4/CXCR4 細胞を用いて薬剤の最初のスクリーニングを行う。将来的には、ウイルス侵入および増殖機構への薬剤の効果解析し、より作用の強い薬剤を開発することを目的とする。

本研究では、HIV-1 が CCR5 をコレセプターとして細胞に接着する際、CCR5 の末端側細胞外領域とともに第 1, 2 細胞外ループ部位を介して進入するという報告をもとに、抗 HIV-1 活性と選択性の向上を目的にケモカインレセプター CCR5 の第 1 細胞外ループのアミノ酸配列をミミックしたペプチドの合成を計画した。さらに前回までの研究から酸性アミノ酸の組み合わせを多く持つアミノ酸配列に強い阻害活性が認められたことにより、(DYD)_n と CPF 結合物の硫酸化体の合成およびスパーサーの生物活性に与える影響を検討した。

3. 研究方法

細胞

ヒトグリオーマ由来 NP-2 細胞にヒト CD4 および HIV/SIV のコレセプター遺伝子 CCR3、CCR5、CCR8、CXCR4、GPR1、APJ を導入し、それらを安定発現した細胞株 NP-2/CD4/CCR3、NP-2/CD4/CCR5、NP-2/CD4/CCR8、NP-2/CD4/CXCR4、NP-2/CD4/GPR1、NP-2/CD4/APJ を用いた。また、CD4 を発現させていない NP-2 細胞に上記のコレセプターを発現させた細胞を作成した。メサンギウム細胞は市販のもの和我々が分離したものをを用いた。RDC1 は、脳由来の BT-3 細胞の RNA を逆転写後、PCR で増幅し、クローニングし、NP-2/CD4 細胞に発現させた。

HTLV-1 (陽性) ヒト T 細胞株由来 MT-2 細胞(高感受性)、バーキットリンパ腫由来 Raji/CD4 細胞(高感受性)、HTLV-1 (陽性) ヒト T 細胞株由来 C8166 細胞(高感受性)、急性リンパ性白血病ヒト T 細胞由来 MOLT-4 細胞(中等度)、ヒト単球性白血病由来 U937 細胞(弱感受性)、慢性骨髄性白血病ヒト赤芽球系細胞由来 K562/CD4 細胞(低感受性)。

HIV/SIV 株

GUN-1wt の wild type (wt) 株は、M-tropic と T-tropic の dual-tropic な HIV-1 であり、GUN-1 の variant 株 GUN1v、GUN1/S、GUN1/A、GUN1/T は、V3 領域の先端 GPGR の P (proline) の所に点変異(Ser、Ala あるいは Thr)を持ち、BT-20/N、BT-3 などの BT 細胞に感染し (BT-tropic)、T-tropic の性質も示す HIV-1 である。T-tropic ウイルスの代表的な株としては IIIIB 株、M-tropic 株としては BaL を用いた。HIV-2 株としては、CBL-20、CBL-21、CBL-23、GH-1、ROD、SBL6669、SIV 株としては agm、mac、mnd を用いた。

感染実験

NP-2 などの接着性細胞を 24 穴プレートなどにまき、37°C で 1 日培養した後に、培養液を除き、ウイルス液を 37°C で接種した。培地を加えさらに 37°C で 2-7 日間培養し、培地を除き PBS(-) で洗浄後、methanol を加えて固定した。HIV-1 抗原陽性細胞の foci を免疫染色法により検出した(Focal immunostaining assay, FIA)。またウイルス感染により多核巨細胞が形成されるので、この細胞の存在からウイルス感染の成立を判定した(多核巨細胞形成試験)。あるいはトリプシンで細胞を剥がし、細胞の smear を作製し、間接蛍光抗体法で検討した。C8166 細胞を用い、多核巨細胞形成試験あるいは間接蛍光抗体法でウイルスの感染程度を判定した。

Lipid Y の精製と β -galactosidase による酵素分解

K562/CD4 細胞に CHCl₃/MeOH (1:1, by vol.) を加えてよく懸濁し、超音波処理を行ない総脂質画分と得た。中性糖脂質画分と酸性糖脂質を分取し、中性糖脂質画分は、HPILC にスポットし、連続展開した。目的物質 (Lipid Y) に相当するバンドを掻き取り、Lipid Y を抽出した。サンプルに加え 37°C で 2hr インキュベートした。反応終了後、HPILC 上にスポットし、展開した。標準物質としてウシ赤血球由来の paragloboside (1.25 μ g/tube) についても同様の操作を行なった。

各細胞株の糖脂質の免疫化学的分析

各細胞株 (C8166, MOLT-4, K562/CD4) の中性糖脂質画分を TLC 上にスポットした後、連続的に展開した。TLC プレートに抗 paragloboside (PG) モノクローナル抗体反応させ、洗浄終了後、発色基質溶液と反応させ、スポットを検出した。

薬剤の調整

p-クマル酸、フェルラ酸、カフェイン酸およびロズマリン酸は市販品を用いた。バナジウム錯体の合成：昨年度と同様の方法で合成した。アミノ酸誘導体-亜鉛錯体の合成：昨年度と同様の方法で合成した。亜鉛-フマル酸関連錯体の合成：すでに報告されている合成法に従って合成した。ポリフェノール類の抽出：カフェイン酸類縁体であるポリフェノール化合物についてはそれぞれの天然物から抽出・精製して用いた。

オリゴペプチドおよび関連化合物

約 100 種類のオリゴペプチドおよび関連化合物は、ペプチド研究所から入手した。これらの化合物は、供給者の指示に従って、溶解し、保存溶解液とした。コントロールとして Dextran sulfate を用いた。

HIV 感染の抑制効果の判定

薬剤溶解液 30 μ l に dual-tropic HIV-1 株である GUN-1wt 株を加えた。この混合液にヒト T 細胞株 C8166 細胞を加え、ウイルスと接触させた。2-3 日間培養後、顕微鏡下に合胞体数を計測した。

CCR5 を介する HIV 感染の抑制効果の判定

感染の標的細胞として C8166 細胞のほかに、薬剤が特に CCR5 を介する系を阻害する可能性を検討するために NP-2/CD4/CCR5 細胞及び対象として NP-2/CD4/CXCR4 細胞を用いた。ウイルス感染後 2-4 日に細胞をメタノール固定・ギムザ染色し、多核巨細胞を検出し、感染の程度を判定した。

オリゴペプチドの合成

まず酸性アミノ酸の組み合わせとして(DYD)_n (n=1-3) と CPF との結合物である CPF-(DYD)_n (SKG-35, 37, 39) とその硫酸化体 (SKG-36, 38, 40) の合成を行った。さらにスペーサーとしてグリシンを介した DYDGDYD 硫酸化体 (SKG-41)、DYDGYDY 硫酸化体 (SKG-42) の合成も行った。また (DYD)_n と CPF との結合をエステル結合で行うことにより、標的細胞の近くで加水分解を受け易くし、スペーサーの結合距離に影響されないプロドラッグを目指した CPF-C5-(DYD) (SKG-43)、(YDY) (SKG-45) およびそれらの硫酸化体 (SKG-44, 46) の合成を行った。次に CCR5 の第 1 細胞外ループをターゲットとして Tyr89-Gly97 部位 (SKG-49) を選択した。さらに Ala-Ala-Ala の配列を非天然型アミノ酸であるスペーサーに置換し、体内のプロテアーゼによる分解の半減期の延長と合成の簡便化を指向したミミックペプチド (SKG-50, 51, 52) を設計および合成を行った。

4. 研究成果

メサングウム細胞における GPR1 の発現と HIV/SIV 感受性

ヒトメサングウム細胞の HIV-1 感受性を検討した。メサングウム細胞 HMes および NHMC は、GUN1v 株に感受性であった。そこでメサングウム細胞で CD4 および HIV 感染のコレセプターが発現しているか RT-PCR で検討した。CD4 は、T 細胞株の 1/20-50 程度の量発現していると推定された。コレセプターについては、CCR3、CCR5、CXCR4、CCR8、STRL/Bonzo、US28、v28、GPR15 の発現は検出できなかったが、CCR2b、GPR1 の発現が検出された。GPR1 の発現量は、脳由来細胞の数十分の 1 と推定された。メサングウム細胞は、NP-2/CD4/GPR1 細胞に感染性のある HIV-1 株、HIV-2 株、SIV 株に感受性であった (Fig. 1)。以上の結果は、メサングウム細胞に CD4 と GPR1 が発現しており、HIV/SIV のコレセプターとなりうる可能性が示唆している。

新しい HIV/SIV コレセプターとしての RDC1 の同定

脳由来細胞に発現している新しいコレセプターを同定するため、BT 細胞、U87/CD4 グリオーマ細胞株などについて GPCR の発現を RT-PCR で検討した。100 以上報告されている GPCR のうち、N 末細胞外ドメインにタイロシンを含むものについて検討した。BT 細胞および U87/CD4 細胞、ヒト T 細胞株 C8166 で CCR4 および RDC1 の発現が確認された。そこで NP-2/CD4 細胞に RDC1 を発現させ、HIV/SIV に対する感受性を検討した。この細胞は、HIV-1 株よりも HIV-2 および SIV 株により感受性が高かった。

APJ のリガンド apelin 関連ペプチドによる HIV/SIV 感染阻害

NP-2/CD4 細胞に APJ を発現させ、HIV/SIV への感受性を検討した。HIV/SIV に感受性であったが特に色々のコレセプターを利用できる HIV-2 株 CBL-23、GH-1、ROD に比較的感受性が高かった。次に APJ のリガンドである apelin 関連のペプチドの感染への影響を検討した (Fig. 2)。ペプチドの生理学的機能の効果 (EC50) と感染の抑制効果 (IC50) にむしろ逆相関が認められた。

CD4 依存性および CD4 非依存性の HIV/SIV 感染

CXCR4、CCR3、CCR5、CCR8、GPR1、APJ を発現する NP-2/CD4 細胞に各種の HIV-2、SIV、HIV-1 株を感染させ、その感受性を検討した。HIV-2 株の内、CBL-23、GH-1、ROD、SBL6669 は、色々のコレセプターを利用した。CBL-20 および CBL-21 株は、CXCR4 のみ利用した。次に CD4 を発現していない NP-2/GPCR 細胞への感染を可溶性 CD4 の存在下で検討した (Table 1)。HIV-2 株 CBL-23、GH-1、ROD、SBL6669 および SIV 株 mnd は、細胞表面に CD4 を発現していない NP-2/CCR5 あるいは NP-2/CXCR4 細胞に感染した。他のコレセプターは、CD4 非依存性のコレセプターとして作用しなかった。ROD および SBL6669 株は NP-2/CCR5 細胞に、SIVmnd は、NP-2/CXCR4 細胞に可溶性 CD4 の存在しない時にも感染できた。

Lipid Y 糖鎖末端構造の解析

Lipid Y の構造を推定するために、酵素反応により Lipid Y の水解を行なった。Lipid Y は β -galactosidase によって水解された。Lipid Y と TLC 上での移動度が類似した PG (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer) を対照糖脂質として酵素分解を行なった。Lipid Y の分解産物の TLC 上での移動度は PG の分解によって生じたアミノ-CTH とよく一致したことから、Lipid Y は PG と同様の糖鎖構造を持ち、その非還元末端に β 結合したガラクトース残基を有することが強く示唆された。

Lipid Y が低感受性の細胞株に存在し、感受性の高い細胞株には存在しないことと Lipid Y が PG と同一であることを更に明らかにする目的で、抗 PG モノクローナル抗体を用いて、免疫化学的分析を行なった。Lipid Y は PG と同一の糖鎖構造を持つことが示された。一方、高感受性の細胞株 C8166、Raji/CD4 および MT-2、中等度感受性の細胞株 MOLT-4 には PG に相当するバンドは検出されなかった。したがって Lipid Y すなわち PG が低感受性の細胞株に発現しており、感受性の高い細胞株に発現していないことが確認された。

錯体の合成と抗 HIV 活性の検討

亜鉛-クマル酸関連錯体 3 種類を合成し、IR、UV、元素分析により構造を解析した。バナジウム錯体 VO(3MPA)₂ に抗 HIV 活性があると判定した。ほかの数種の化合物にも弱い抗 HIV 活性がある可能性は否定できない。数種類のアミノ酸誘導体-亜鉛錯体について 10-100 μ g/ml の濃度で抗 HIV 活性が認められた。クマル酸関連の亜鉛錯体では、TK-2 と TK-4 とコードした化合物に 10-100 μ g/ml の濃度で抗 HIV 活性が認められた。しかし、細胞毒性濃度と活性を示す濃度に余り開きがなかった (Table 2)。また、同様の方法でインテグラーゼ阻害作用を示す可能性も考えられる抗酸化性ポリフェノール化合物を評価した。Caffeic acid、rabdosiin、fukinolic acid に抗 HIV 活性が認められた。

NP-2 細胞を用いた抗 CCR5 薬のアッセイ系の確立

多くの研究所で抗 HIV 剤のスクリーニングは、ヒト T 細胞株や HeLa 細胞由来の細胞を用いて行われてきた。これらの系では、もとの細胞が CXCR4 をよく発現しているため、CCR5 を特異的に介する感染を検出している保証が得られにくい。NP-2/CD4/CCR5 細胞は、IIIB 株などの X4 ウイルスにはほぼ完全に抵抗性である。一方、R5X4 ウイルスなど dual tropic ウイルスが感染すると 2-3 日で著明な合胞体が形成され、この感染は、10 μ g/ml 以上の dextran sulfate で完全に阻止された。すなわち、CCR5 を介する感染の測定系として有用であると判定できた。

オリゴペプチドによる HIV の抑制効果

108 種類のペプチドおよびペプチド関連化合物につき、表に示す濃度で抗 HIV 作用を検討した (Table 3)。Adjuvant peptide、chemotactic peptide、neurokinin、neuromedin C、neuropeptide Y、YVAD、bradykinin potentiator B、bradykinin、vasotocin、elastatinal、mastoparan、arphamenin A、vasotocin 誘導体に抗 HIV 活性がある可能性が示唆された。

コレセプター関連オリゴペプチドの合成と抗 HIV 活性

合胞体形成阻止能を指標として合成した化合物の HIV1 阻害活性を調べた。その結果 SKG-35-40 では、SKG-40 に明らかな抗 HIV-1 活性が見られ、全ての化合物に細胞毒性が認められた。また SKG-41-48 では、SKG-42、47 に明らかな抗 HIV-1 活性が認められた。さらに第 1 ループのミミックのペプチドである SKG-49-52 では、0-スパーサーを含む SKG-51 に比較的強い活性が観察されたが、細胞毒性も強いこと

が分かった。代表的な構造を Fig. 3 に示した。

5. 考察

HIV-1 associated nephropathy (HIVAN)は、アフリカ系アメリカ人に高頻度に発症が認められているが、アジア人、白人には認められない。メサングウム細胞が HIV-1 に感受性であるとする報告と非感受性であるとする報告がある。我々の結果は、メサングウム細胞が HIV/SIV に程度は低い感受性であり、その感染は CD4 とコレセプター GPR1 に依存することを示唆した。GPR1 に人種差があり、それにより HIVAN の発症が影響されるかは今後の課題である。RDC1 が脳由来細胞に発現しており、potential なコレセプターであることを明らかにした。

Apelin 関連ペプチドが HIV/SIV 感染を阻害した。ペプチドの生理学的な作用と抗 HIV 作用の間に矛盾がある。この矛盾の意味は、単純に考えれば、apelin と HIV/SIV は、APJ の違う領域と反応することであるかもしれない。APJ が HIV/SIV 感染で、どの程度病気の発症に関与するかは明らかでない。まずこの点を明らかにすることが APJ の HIV/SIV 感染における役割の解明には大切であろう。

HIV/SIV 感染における CD4 存在の必要性について検討した。CCR5 や CXCR4 以外のいくつかのコレセプターを利用できる promiscuous な CBL-23、GH-1、ROD および SBL6669 株は、細胞表面に CD4 の存在しない細胞にも、可溶性 CD4 の存在下、あるいは CD4 の非存在下で細胞に感染できた。しかし、promiscuous な HIV-1 株 GUN1v は、その感染に CD4 を必要とした。HIV-1 株と HIV-2/SIV 株のこの違いの理由は分らない。コレセプターのうち、CCR5 あるいは CXCR4 のみがコレセプターとなりうる理由も明らかではないが、promiscuous な株にとっても CCR5 あるいは CXCR4 は最も効率よく、また多くの株が利用できるコレセプターである。

最近、ケモカインレセプターの N 末側のセリン残基がシアル酸により修飾され細胞指向性を与えていることが示唆されており、シアル酸を含むケモカインレセプターペプチドの合成も今後の重要な研究課題である。

108 種類のオリゴペプチドおよびその関連化合物について抗 HIV-1 作用があるか検討した。10 数種の化合物に抗 HIV 作用がある可能性が示唆された。C8166 細胞の系では、ウイルスと薬剤をまず反応させ、細胞に感染させた。NP-2 細胞の系では、この他に細胞に薬剤を添加してからウイルスを接種し検討した。始めに薬剤とウイルスを incubate すると薬剤の効果が検出しやすと考えたが、一方でその非特異的作用が強く出過ぎる可能性が考えられたので、以降は細胞をまず薬剤で処理することとした。今まで得られた結果は、薬剤の振る舞いととして機能すると考え、陽性と判定されたものは、二次スクリーニングで更に検討する予定である。

糖脂質は細胞膜上に均一に存在するのではなく、形態学的な微小構造に分類されるカベオル等に近しい。本研究で低感受性細胞株に認められた PG は、前述した糖脂質とは逆の作用、すなわち HIV 感染に対し、何らかの抑制的機能を持つ可能性が考えられる。

6. 結論

CD4 と GPR1 がメサングウム細胞に発現しており、HIV/SIV に感受性であることを示した。オーファンレセプター RDC1 が脳由来細胞に発現しており、HIV/SIV のあたらしいコレセプターであることを明らかにした。Apelin 由来のペプチドが NP-2/CD4/APJ 細胞への HIV/SIV 感染を阻害した。Promiscuous な HIV-2 および SIV 株は、CCR5 あるいは CXCR4 を発現していれば細胞表面に CD4 を発現していない細胞にもしばしば感染できることを明らかにした。コレセプターの内 CCR5 および CXCR4 のみが CD4 非依存性コレセプターとして機能した。

CCR5 を介する HIV の感染を阻害する薬剤のスクリーニングを簡便に行う系を開発した。10 数種類のオリゴペプチドに弱い抗 HIV-1 作用を認めた。これらのペプチドをリード化合物とし、更に活性の強い化合物を合成したい。

CD4 および CXCR4 を発現している各種細胞株(C8166, MT-2, Raji/CD4, MOLT-4, U937, K562/CD4)に HIV-1 に対する感受性の相違が認められた。そのため、糖鎖と HIV-1 感染との関係に着目して、各種細胞株の糖脂質組成、特に中性糖脂質について分析を行なった。これまでに HIV の感染に関与するとの報告がある GalCer、CTH とは異なる糖脂質 (Lipid Y) が低感受性細胞株 K562/CD4 に強く発現していることが明らかになった。この糖脂質は、高感受性 (C8166, MT-2, Raji/CD4)、中等度感受性細胞株 (MOLT-4) には発現が認められなかった。そこで、この糖脂質は、ウシ赤血球由来の paragloboside と呼ばれる糖脂質と同様の糖鎖構造、すなわち Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-R を有することが明らかとなった。今後は、PG の宿主指向性 (トロピズム) の多様性への関与、さらには HIV 感染に対する制御機構を明らかにしていく予定である。

バナジウム錯体、亜鉛錯体を中心に抗 HIV 活性を検討した。バナジウム錯体の VO(3MPA)₂、数種類のアミノ酸誘導体-亜鉛錯体、クマル酸関連の新規亜鉛錯体 TK-2 と TK-4、インテグラーゼ阻害作用を示す可能性が考えられる抗酸化性ポリフェノール化合物 caffeic acid、rabdosin、fukinolic acid に抗 HIV 活性が認めら

れた。

酸性アミノ酸の組み合わせを多く持つアミノ酸配列に比較的強い活性が認められた。さらに抗 HIV-1 活性の増強のためには (DYD)_n と CPF 結合物の硫酸化体の合成およびスパーサによる結合距離の検討が必要である。また第 1 ループのミミックペプチドである SKG-51 に有意な活性が見られた。

7. 研究発表

(論文発表)

- (1) Liu, H-y, Soda, Y., Shimizu, N., Haraguchi, Y., Jinno, a., Takeuchi, Y., and Hoshino, H. (2000) CD4-dependent and CD4-independent utilization of coreceptors by human immunodeficiency viruses type 2 and simian immunodeficiency viruses. *Virology* 278, 276-288 (2000).
- (2) Zou MX, Liu HY, Haraguchi Y, Soda Y, Tatemoto K, and Hoshino, H. (2000). Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett.*, 473, 15-18.
- (3) Tokizawa, S, Shimizu N, Hui-Yu L, Deyu F, Haraguchi Y, Oite T, and Hoshino, H. (2000). Infection of mesangial cells with HIV and SIV: Identification of GPR1 as a coreceptor. *Kidney Int.*, 58, 607-617.
- (4) Shimizu,N., Soda,Y., Kanbe,K., Liu,Hy., Mukai,R., Kitamura,T., and Hoshino,H. (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74, 619-626.
- (5) Soda, Y., Jinno, A., Tanaka, Y., Akagi, T., Shimotohno, K., and Hoshino, H. Rapid tumor formation and development of neutrophilia and splenomegaly in nude mice transplanted with human cells expressing human T cell leukemia virus type I or Tax1. *Leukemia* 14, 1467-1476 (2000).
- (6) Konishi, K., Ikeda, K., Achiwa, K., Hoshino, H. and Tanaka, K. : Synthesis of Peptides Mimicking Chemokine Receptor CCR5 and Their Inhibitory Effects against HIV-1 Infection. *Chem.Pharm. Bull.*, 48(2), 308-309, (2000).
- (7) Yasuhiro Hosaka, Akihiro Ikeura, Yu-ichi Harada, Kazumichi Kuroda, Hideki Hamayasu, Takashi Suzuki, Kazunari Yamada, Yuji Kawase, and Yasuo Suzuki: Binding of influenza type A viruses to group B Streptococcus and haemagglutination by virus-bound bacteria. *J. Electron Microsc.* 2000, 49, 765-773
- (8) Yasuo Suzuki, Toshihiro Ito, Takashi Suzuki, Robert E. Holland Jr, Thomas M. Chambers, Makoto Kiso, Hideharu Ishida, and Yoshihiro Kawaoka: Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* 2000, 74, 11825-11831.
- (9) Toshihiro Ito, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Ayato Takada, Taisuke Horimoto, Krisna Wells, Hiroshi Kida, Koichi Otsuki, Makoto Kiso, Hideharu Ishida, Yoshihiro Kawaoka: Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the α 2,3 linkage is associated with the intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J. Virol.* 2000, 74, 9300-9305.
- (10) Tetsuya Furuike, Seiichi Aiba, Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Yasuo Suzuki, Kuriko Yamada, and Shin-ichiro Nishimura: Synthesis and anti-influenza virus activity of novel glycopolymers having triantennary oligosaccharide branches. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 2000, 1, 3000-3005.
- (11) Akiko Eguchi, Toru Kondoh, Hirokazu Kosaka, Takashi Suzuki, Hiroshi Momota, Akinori Masago, Tetsuya Yoshida, Hideharu aira, Akiko Ishii-Watanabe, Jun Okabe, Jianhong Hu, Naoyuki Miura, Shigeharu Ueda, Yasuo Suzuki, Takao Taki, Takao Hayakawa, and Mahito Nakanishi: Identification and characterization of cell lines with a defect in a post-adsorption stage of Sendai virus-mediated membrane fusion. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 17549-17555.
- (12) Yuichi Kawai, Akira Takeiri, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, and Masaharu Miyake: Anti-mouse sperm monoclonal antibody, A-1, inhibits sperm capacitation, acrosome reaction and calcium influx into spermatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 2000, 23, 922-925.
- (13) Kazuhiko Hayashi, Yuko M. Sagesaka, Takashi Suzuki, and Yasuo Suzuki: Inactivation of human type A and B influenza viruses by tea-seed saponins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 184-186.
- (14) Kuniho Nakata, Chao-Tan Guo, Motoko Matsufuji, Akihiro Yoshimoto, Masanori Inagaki, Ryuichi Higuchi, Yasuo Suzuki: Influenza A virus-binding activity of glyceroglycolipids of aquatic bacteria. *J. Biochem.* 2000, 127, 191-198.
- (15) Sayuri Miyashita, Yasumi Matsuura, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki, Yasuyuki Imai: Development of recombinant B subunit of Shiga-like toxin 1 as a probe to detect carbohydrate ligands in immunochemical and flowcytometric application. *Glycoconjugate J.* 2000, 16, 697-705.
- (16) Xue-Long Sun, Yoshimi Kanie, Chao-Tan Guo, Osamu Kanie, Yasuo Suzuki, Chi-Huey Wong: Synthesis of C-3 modified sialylglycosides as selective inhibitors of influenza hemagglutinin and neuraminidase. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 2643-2653.
- (17) Erzs_bet Kiss, Eugenio Garribba, Giovanni Micera, Tam_s Kiss and Hiromu Sakurai : Ternary complex formation between VO(IV)-picolinic acid or VO(IV)-6-methylpicolinic acid and small blood serum bioligands. *J. Inorg. Biochem.*, 78, 97-108 (2000).
- (18) Hiroyuki Yasui, Koji Takechi and Hiromu Sakurai : Metallokinetic analysis of disposition of vanadyl complexes as insulin-mimetics in rats using BCM-ESR. *J. Inorg. Biochem.*, 78, 185-196 (2000).
- (19) Hiromu Sakurai, Hiromi Sano, Toshikazu Takino, Hiroyuki Yasui : An orally active antidiabetic vanadyl complex,

- bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV), with VO(S₂O₂) coordination mode; in vitro and in vivo evaluations in rats. *J. Inorg. Biochem.*, 80, 99-105 (2000).
- (20) Tam_s Kiss, Erzs_bet Kiss, Eugenio Garribba, Hiromu Sakurai : Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.*, 80, 65-73 (2000).
- (21) Hiromu Sakurai, Asuka Tamura, Toshikazu Takino, Kazuhiko Ozutsumi, Kenji Kawabe and Yoshitane Kojima : Interaction of vanadyl complexes with biological systems: structure-insulinomimetic activity relationship of vanadyl-picolinate complexes. *Inorg. Reac. Mechan.*, 2, 69-77 (2000).
- (22) Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Kenji Kawabe, Hiroyuki Miyake, Hiromu Sakurai and Yoshitane Kojima : New insulin-mimetic zinc(II) complexes; bis-maltolato zinc(II) and bis-2-hydroxypyridine-N-oxide zinc(II) with Zn(O₄) coordination mode. *Chem. Lett.*, 874-875 (2000).
- (23) Akira Katoh, Kazutoshi Taguchi, Hiroko Okada, Manabu Harata, Yae Fujisawa, Toshikazu Takino, and Hiromu Sakurai : Synthesis of new vanadyl complexes of hydroxyazaine-type heterocycles and their insulin-mimetic activities. *Chem. Lett.*, 866-867 (2000).
- (24) Ikeda, K., Sano, K., Ito, M., Saito, M., Hidari, K., Suzuki, T., Suzuki, Y., Tanaka, T.: Synthesis of 2-deoxy-2,3-didehydro- N-acetylneuraminic acid analogues modified at the C-4 and C-9 positions and their behaviour towards sialidase from influenza virus and pig liver membrane. *Carbohydr. Res.* 2001 , 330, 31 -41 .
- (25) Kobayashi, T., Ito, M., Ikeda, K., Tanaka, K., Saito, M.: Purification and Characterization of a Membrane-Bound Sialidase from Pig Liver. *J. Biochem.* 2000 , 127, 569-575.
- (26) Konishi, K., Ikeda, K., Achiwa, K., Hoshino, H., Tanaka, K.: Synthesis of Peptides Mimicking Chemokine Receptor CCR5 and Their Inhibitory Effects against HIV-1 Infection. *Chem. Pharm. Bull.* 2000 , 48, 308-309.
- (27) Ikeda, K., Konishi, K., Sano, K., Tanaka, K.: A Convenient One- Pot Synthesis of 2-Deoxy-2,3-didehydroneuraminic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 2000,48, 1 63- 1 65 .
- (28) Ikeda, K., Miyajima, K., Shimizu, T., Achiwa, K.: Lipid A and Related Compounds. XXXVII. Determination of Favorable Binding Linkages of Lipid A Analog to Antigen Moiety for Synthetic Vaccines. *Chem. Pharm. Bull.* 2000 , 48, 32-40.
- (29) Kurohane, K., Namba, Y., Ikeda, K., Tanaka, K., Oku, N.: Effects of Liposomes Modified with Arg-Gly-Asp Mimics on Tumor Metastasis. *J. Liposome Res.* 2000 , 10 , 244.

Table 1 Syncytium formation in NP-2 and NP-2/CD4 cells expressing GPCRs after infection with HIV-1, HIV-2 or SIV.

Cell	HIV-2						SIV			HIV-1			Mock
	CBL-20	CBL-21	CBL-23	GH-1	ROD	SBL6669	agm	mac	mnd	Ba-L	IIIB	GUN1v	
NP-2/CD4	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-2/CD4/CCR3	-	-	++++	+	++++	+++	-	-	+	-	-	++++	-
NP-2/CD4/CCR5	-	-	++++	++++	++++	-	++++	++++	++++	++++	-	++++	-
NP-2/CD4/CCR8	-	-	++++	++++	++++	++	-	-	+	-	-	+++	-
NP-2/CD4/CXCR4	++++	++++	++++	+	++++	++++	+	-	++++	-	++++	++++	-
NP-2/CD4/GPR1	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	-	-	+++	-
NP-2/CD4/APJ	-	-	+++	++	++++	++	-	-	++	-	-	-	-
NP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-2/CCR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-2/CCR5	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-
NP-2/CCR8	-	-	-	(++) ^b	-	-	-	-	[++++] ^c	-	-	-	-
NP-2/CXCR4	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-
NP-2/GPR1	-	-	(+) ^b	-	[++++] ^c	[++++] ^c	-	-	-	-	-	-	-
NP-2/APJ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Symbols: -, negative results (no syncytium); +, 1-50; ++, 50-100; +++, 100-200; +++++, >200 syncytia per well in 12-well plates during 10 days after infection.

^b Syncytium formation only in the presence of human sCD4 at 10 µg/ml.

^c Syncytium formation in the presence and absence of sCD4.

^d NP-2/APJ cells were examined only in the absence of sCD4.

Table 2 Screening of anti-HIV-1 drugs by HIV-1-induced syncytium formation assay

Compound (µg/ml)	1000	100	10	1	0
Zn(GeG)	NS (3)	+/- (1)	- (0)	- (0)	
Zn(VtV)	NS (3)	NS (3)	- (1)	- (0)	
Zn(PA) ₂	NS (4)	+/- (2)	- (0)	- (0)	
Zn(MPA) ₂	NS (4)	+/- (2)	- (0)	- (0)	
Zn(AA) ₂	NS (4)	NS (4)	+/- (0)	- (0)	
Zn(PAA) ₂	NS (4)	NS (4)	+/- (0)	- (0)	
Zn(^{m2} D)	- (2)	- (1)	- (0)	- (0)	
Zn(^m D)	NS (4)	±(2)	+/- (0)	- (0)	
Zn(*H)	NS (3)	+/- (2)	- (0)	- (0)	
Zn(^{m+H})	+/- (3)	- (2)	- (0)	- (0)	
Zn(edtda)	NS (4)	NS (4)	±(0)	- (0)	
Zn(βAcβA)	NS (3)	NS (4)	±(0)	- (0)	
Zn(GtG)	NS (4)	NS (3)	±(0)	- (0)	
Zn(VeV)	NS (3)	±±(0)	±(0)	- (0)	
Zn(MeM)	NS (4)	- (0)	- (0)	- (0)	
Zn(^m H)ClO ₄	NS (4)	- (2)	- (0)	- (0)	
Zn(^{m2} V)ClO ₄	NS (4)	±±(0)	- (0)	- (0)	
Dextran sulfate	NS	NS	++ (0)	- (0)	

抗HIV作用: -, 無し; +/-, 保留; +, 弱い; ++, 中間; +++, 強い; NS, 判定不能
細胞毒性: 0, 無し; 1, 保留; 2, 明らかな毒性; 3, 強い毒性; 4, 全細胞死。

Table 3 Inhibitory activities by oligopeptides of syncytia formation after infection of C8168 cells with HIV-1

Pep No.	Activity				Property	M.W.	Concentration	Structure
	C8168	NP2/CD4/CCR5	NP2/CD4/CXCR4	CT				
1	N.D.	N.D.	++	*	Z-Leu-Leu-Nva-H (aldehyde)	462	0.1 mM	Carbobemzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norvalinal
1	++	-	-	-	Z-Leu-Leu-Nva-H (aldehyde)	462	0.01 mM	Carbobemzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norvalinal
2	-	++	++	*	Biotinyl-Asp-Glu-Val-Asp-H (Aldehyde)	687	2.0 mM	Botinyl-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspart-1-al
2	N.D.	N.D.	-	-	Biotinyl-Asp-Glu-Val-Asp-H (Aldehyde)	687	0.2 mM	Botinyl-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Aspart-1-al
3	++	++	++	*	Z-Leu-Leu-H (aldehyde)	362	20.0 mM	Carbobemzoxy-L-Leucyl-L-Leucinal
3	N.D.	N.D.	-	-	Z-Leu-Leu-H (aldehyde)	362	2.0 mM	Carbobemzoxy-L-Leucyl-L-Leucinal
4	-	-	-	-	Bradykinin	1060	1.0 mM	Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
5	-	++	++	*	Gastrin Related Peptide	711	5.0 mM	Apc-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
5	N.D.	N.D.	-	-	Gastrin Related Peptide	711	0.5 mM	Apc-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
6	-	+	-	-	Bradykinin-Potentiator B (Mamushi)	1182	1.0 mM	Pyr-Gly-Leu-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro
7	-	-	-	-	LH-RH (Human)	1182	1.0 mM	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂
8	-	-	N.D.	N.D.	Somatostatin	1638	1.0 mM	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
8	N.D.	N.D.	-	-	Somatostatin	1638	0.1 mM	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
9	-	-	-	±	MSH-Release Inhibiting Factor (MIF)	284	1.0 mM	Pro-Leu-Gly-NH ₂
9	N.D.	N.D.	-	±	MSH-Release Inhibiting Factor (MIF)	284	0.1 mM	Pro-Leu-Gly-NH ₂
10	-	-	-	±	[Asu, Arg]-Vasotocin	999	1.0 mM	cyclo (Tyr-Ile-Gln-Asn-Asu)-Pro-Arg-Gly-NH ₂
10	N.D.	N.D.	-	-	[Asu, Arg]-Vasotocin	999	0.1 mM	cyclo (Tyr-Ile-Gln-Asn-Asu)-Pro-Arg-Gly-NH ₂
11	-	++	++	*	Pepstain A	686	1.0 mM	isovaleryl-L-Val-(3S,4S)-4-Amino-3-Hydroxy-6-Methyl-Hetanoic Acid
11	N.D.	N.D.	-	-	Pepstain A	686	0.1 mM	isovaleryl-L-Val-(3S,4S)-4-Amino-3-Hydroxy-6-Methyl-Hetanoic Acid
12	-	-	-	±	Leupeptin	427	2.0 mM	Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Argininal (Sulfate Form)
12	N.D.	N.D.	-	-	Leupeptin	427	0.2 mM	Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Argininal (Sulfate Form)
13	-	-	N.D.	N.D.	Capcitonin (Human)	3418	0.1 mM	Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂
13	N.D.	N.D.	-	-	Capcitonin (Human)	3418	0.01 mM	Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂
14	-	-	-	±	Delta Sleep-Inducing Peptide (DSIP)	849	1.0 mM	Try-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu
14	N.D.	N.D.	-	-	Delta Sleep-Inducing Peptide (DSIP)	849	0.1 mM	Try-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu
15	-	-	N.D.	N.D.	α-Endorphin	1746	1.0 mM	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr
15	N.D.	N.D.	-	±	α-Endorphin	1746	0.1 mM	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr
16	-	-	N.D.	N.D.	α-MSH	1665	1.0 mM	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
16	N.D.	N.D.	-	±	α-MSH	1665	0.1 mM	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
17	-	-	-	-	Antipain	605	1.0 mM	[(S)-1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carpamoyl-L-Valyl-Argininal
18	-	++	++	*	Chymostain	170	1.0 mM	Pyrimidyl-(S)-Glycyl-X-Phenylalaninal
18	N.D.	N.D.	-	-	Chymostain	170	0.1 mM	[(S)-1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carpamoyl-α-[2-iminohexahydro-4(S)-
19	-	-	-	±	Elastatinal	170	1.0 mM	Pyrimidyl-(S)-Glycyl-X-Phenylalaninal
19	N.D.	N.D.	-	±	Elastatinal	170	0.1 mM	[(S)-1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carpamoyl-α-[2-iminohexahydro-4(S)-
20	-	-	-	±	Des-Arg-Bradykinin	904	1.0 mM	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe
20	N.D.	N.D.	-	±	Des-Arg-Bradykinin	904	0.1 mM	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe
21	-	+	-	±	Morphine Tolerance Peptide	170	58.8 mM	cyclo (Leu-Gly)
21	N.D.	N.D.	-	±	Morphine Tolerance Peptide	170	5.9 mM	cyclo (Leu-Gly)
22	-	±	-	-	[Tyr]-Bradykinin	1076	1.0 mM	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Tyr-Arg
23	-	-	-	±	α-Mating Factor	1684	1.0 mM	Try-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr
23	N.D.	N.D.	-	-	α-Mating Factor	1684	0.1 mM	Try-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr
24	-	-	-	-	Dynorphin A (Human,1-13)	1604	1.0 mM	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys
24	-	-	-	-	α-Mating Factor	1684	1.0 mM	Try-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr

CT, cytotoxic; *, 判定不能; N.D., 未测定; Inhibitory activity: -, negative; ±, marginal; +, positive; ++, clearly positive.

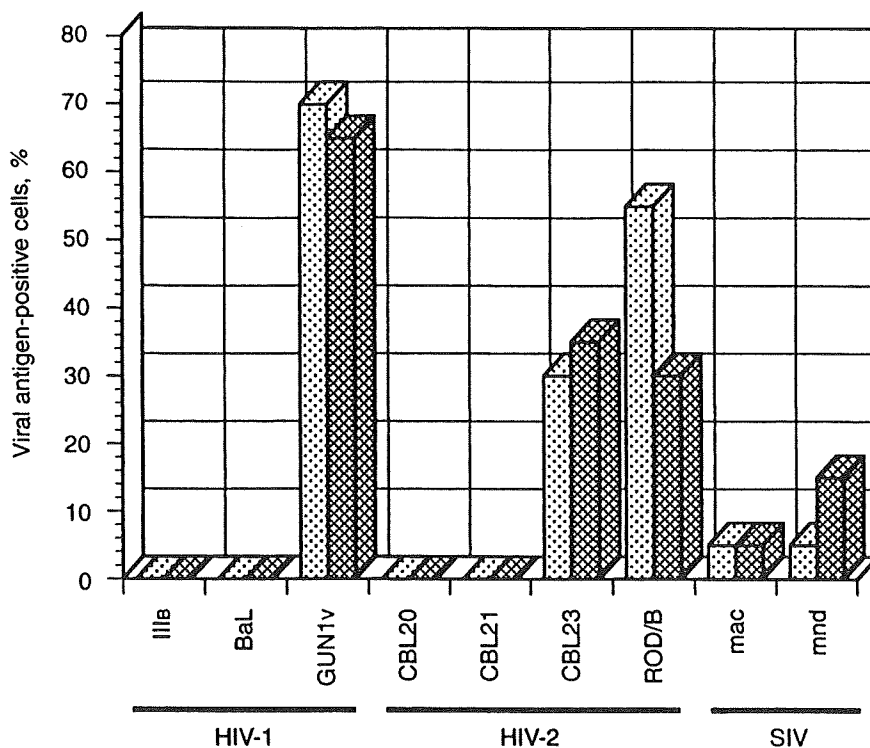


Fig. 1 Susceptibility of mesangial cells to HIV-2 and SIV.

HMeS and NHMeC (brightly and darkly shaded bars, respectively) mesangial cells were infected with HIV-2 and SIV strains as well as HIV-1 strains. Viral antigen-positive cells were detected by IFA 10 days after infection.

Peptide	Amino acid sequence	IC ₅₀ (μg/ml)	EC ₅₀ (nM)
Apelin-36	LVQPRGPRSGPGPWQGGRRKFRQRPRLSHKGMPF	0.3	20.0
Apelin-17	KFRQRPRLSHKGMPF	4.8	2.5
Apelin-13	QRPRLSHKGMPF	26.0	0.4
Apelin-12	RPRLSHKGMPF	63.0	ND
Apelin-11	PRLSHKGMPF	-	-

IC₅₀ represents the peptide concentration that induces the half-maximal inhibition of HIV infection in NP-2/CD4/APJ cells. The mean values for infection by HIV-1 (GUN4 and GUN12v) and HIV-2 ROD/B are shown. EC₅₀ represents the median effective peptide concentration in acidification-rate-promoting activity.

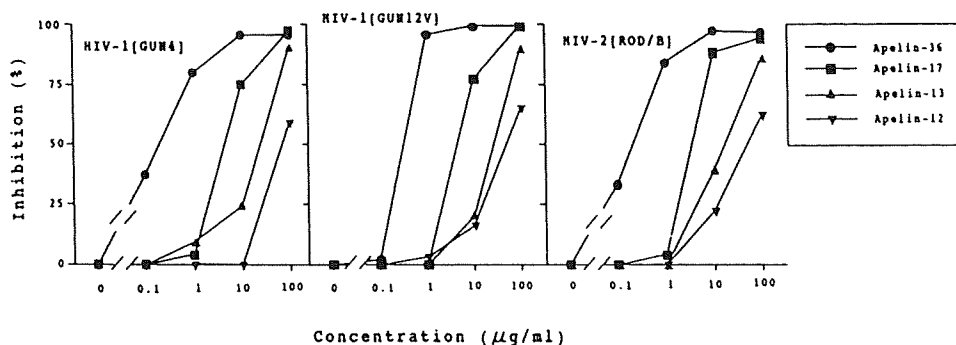


Fig. 2 Inhibitory effects of apelin peptides on the infection of NP-2/CD4/APJ cells with HIV-1 (GUN1v and GUN12v) and HIV-2 ROD/B. NP-2/CD4/APJ cells were preincubated with the peptide at the indicated concentrations and then infected with HIV. Numbers of virus antigen-positive cells were determined 4-7 days after infection.

Peptides Mimicking First Extracellular Loop of Chemokine Receptor CCR5

His Tyr⁶⁹ - Ala - Ala - Ala - Gln - Trp - Asp - Phe - Gly⁸⁷ Asn - Thr - Met - Cys - Gln

SKG-49

amino acid sequence of first extracellular loop of CCR5

Tyr - spacer X - Gln - Trp - Asp - Phe - Gly
Tyr - spacer Y - Gln - Trp - Asp - Phe - Gly
Tyr - spacer Z - Gln - Trp - Asp - Phe - Gly

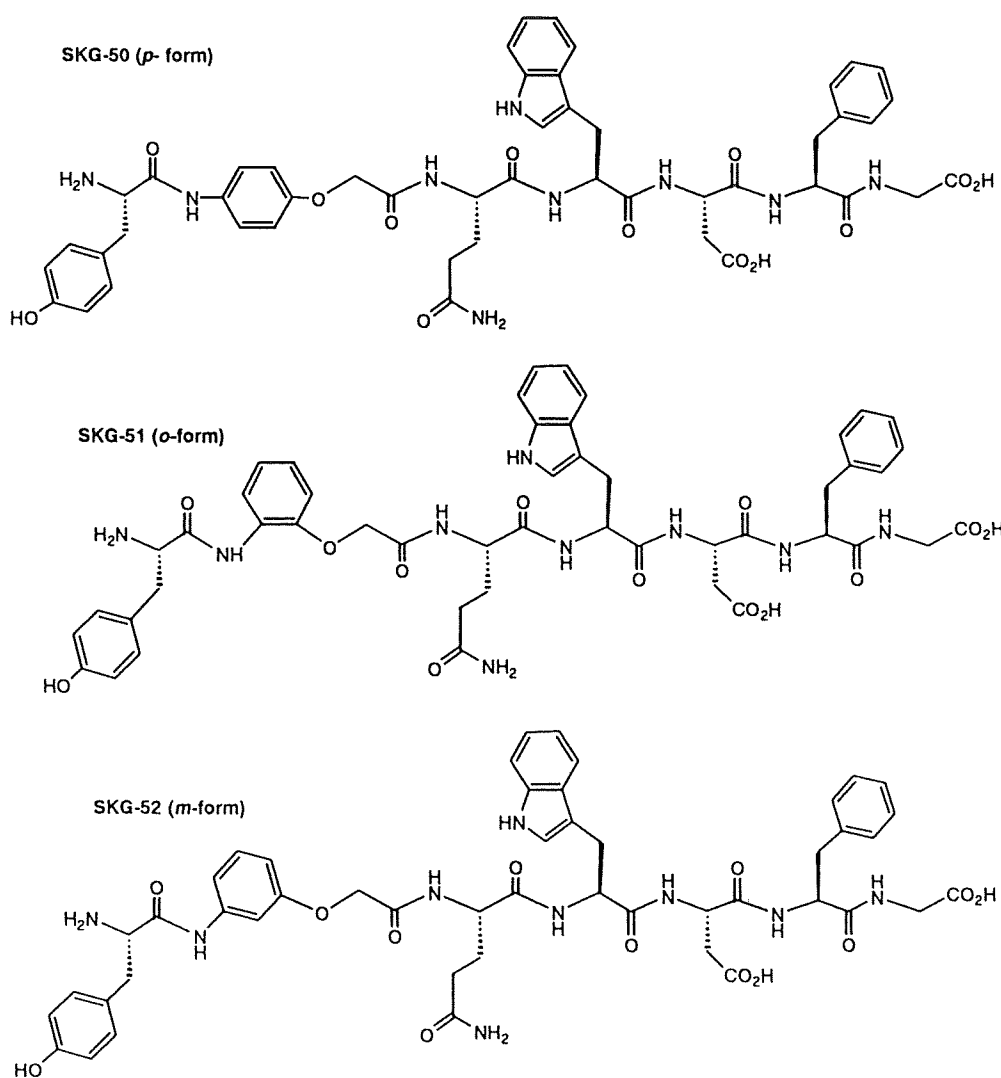


Fig. 3 Chemical structures of HIV coreceptor-related oligopeptides

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

