

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

HIV感染を阻害する
シュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 温子

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV 感染を阻害するシュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム-----	3
小川温子	
(資料) 図 1 天然のプロテオグリカン (PG) モノマー、シュードPGプローブ、および単鎖型プローブ	
図 2 シュードPGのサイズ排除HPLCにおける溶出曲線と分子量	
表 1 種々の天然GAGを用いて調製したシュードPGの抗HIV活性	
表 2 GAGおよび骨格分子の鎖長の異なるシュードPG の抗HIV活性	
表 3 パルナパリンナトリウムの質量分析により得られた主要糖鎖	
図 3 ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合する	
II. 分担研究報告	
1. シュードプロテオグリカンの抗 HIV スクリーニング-----	20
棚元憲一	
(資料) 表 1 各種複合体の抗HIV活性	
2. 種々のシュードプロテオグリカン型薬剤の HIV-1増殖抑制効果と作用機序 -----	26
牛島廣治	
(資料) 表 1 抗HIV試験結果	
3. ヘパリンによるHIV-1感染機序の解析 -----	31
星野洪郎	
(資料) 図 1 ヘパリンはHIV-1を抑制する	
図 2 ヘパリンはgp120のCD4領域ではなくV3領域に結合する	
図 3 ヘパリンはHIV-1の細胞への結合をブロックする	
4. シュードプロテオグリカンの検定と構造解析 -----	36
川崎ナナ	
(資料) 図 1 パルナパリンナトリウムの構造	
図 2 パルナパリンナトリウムのnanoLC/ESI-TOFMSにより得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) の比較	
図 3 パルナパリンナトリウムのC18カラムを用いたnanoLC/ESI-TOFMS	
図 4 GAG糖鎖の解析	
図 5 エクストラクテッドイオンクロマトグラムによる異性体の解析	
図 6 糖鎖の長さとの溶出時間の関係	
表 1 パルナパリンナトリウムのnanoLC/ESI-TOFMSにより得られた主要糖鎖	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	54

HIV 感染を阻害するシュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

主任研究者 小川温子 お茶の水女子大学大学院教授

研究要旨

シュードプロテオグリカン(シュード PG)は、天然のプロテオグリカンの分子構造を模倣して、直鎖高分子に複数のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖を共有結合させてわれわれが創成した人工複合体分子である。その新しい構造に基づき、シュード PG はサイクロフィリン A (CypA) などの GAG 結合タンパク質に対して単独の GAG 鎖とは異なる結合活性を示すことを見出した。本研究では、シュード PG の構造的特徴と顕著な結合特性に着眼し、細胞膜上プロテオグリカンを必要とする HIV-1 ウイルスの初期感染機構をブロックし、かつ HIV-1 に対する宿主の抵抗性を回復する効果を併せ持つ感染阻害剤としての利用を目指し、シュード PG の抗 HIV-1 メカニズムを解明する。18 年度は、シュード PG の GAG 鎖の種類および鎖長、ならびに骨格高分子の鎖長と、抗 HIV 活性の関係を明らかにした。シュード PG の構造解析法として nanoLC/ESI-TOFMS を用いた GAG オリゴ糖の分析が有効であることを見出した。また、感染抑制機序については、HIV-1 エンベロープタンパク質 gp120 中の V3 領域にヘパリンが結合することが HIV-1 の細胞表面への吸着を阻害していることを明らかにした。

分担研究者

棚元憲一	国立医薬品食品衛生研究所
牛島廣治	東京大学医学系研究科
星野洪郎	群馬大学医学系研究科
川崎ナナ	国立医薬品食品衛生研究所

シュードプロテオグリカン(シュード PG)は、天然のプロテオグリカンの分子構造を模倣して、コアタンパク質に代わる直鎖高分子に複数のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖を共有結合させてわれわれが合成した人工分子である(特許審査請求中)。その新しい構造に基づき、シュード PG は従来の GAG プローブに比べて優れた特性、たとえば宿主のウイルス抵抗性を調節するサイクロフィリン A (CypA) と強く結合する性質をもつことをわれわれは見出した。

CypA は宿主の制限因子によるレトロウイルス認識を回避して HIV-1 を保護する効果があることが最近見出された (Towers, 2003)。一方、マクロファージへの HIV-1 初

A. 研究目的

若者のエイズ感染増加が日本の社会問題となっている。しかし現在のエイズ治療においては決定的な薬剤がなく、副作用や耐性ウイルスの出現等の問題から、耐性ウイルスにも効果を示す新しいメカニズムを有する新薬が求められている。

期接着においては、シンデカンとよばれる細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) が認識に必要である (Saphire, 2001) (図 1). シュード PG を活用すれば、接着に関わる HIV-1 ウイルス表面分子とマクロファージとの相互作用を有効に阻害し、かつ CypA をブロックして HIV-1 に対する宿主の抵抗性を回復する効果を併せ持つ新規感染阻害薬に繋がるのが期待される。実際に、試験的に調製したシュード PG の一部は、エイズ医薬品スクリーニングテストで有力な活性物質であることが見いだされた。

本研究では、糖鎖構造、分子サイズ、GAG 鎖部分の固定化量、ならびに骨格直鎖分子構造の 4 つの観点で構造の異なる種々のシュード PG を調製する。これらのシュード PG について抗 HIV 活性スクリーニングを行い、化学修飾による糖鎖構造改変および直鎖高分子の性質を検討して、標的分子への結合特異性と親和性を向上することにより、抗ウイルス効果をもち、毒性の低い薬剤構造の最適化をはかる。GAG 鎖内の多様性の高い二糖くり返し単位の内、優れた抗ウイルス活性を示すシュード PG の部分構造を解析し、その構造的特徴を明らかにする。さらにシュード PG が抗 HIV 作用を示すメカニズムを、ウイルス侵入から放出までの各段階について、コレセプターとの関係にも着眼して、細胞レベルで解明する。それらの結果をもとに、HIV-1 感染を阻害する創薬へと発展させることを目的とするものである。

B. 研究方法

1. GAG 鎖の種類と鎖長の異なるシュード PG の調製

1) GAG 鎖の種類異なるシュード PG
GAG 鎖として、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、コロミン酸などの種々の天然多糖とオリゴ糖鎖を用いてシュード PG プローブを、また比較のために 1 種類の単鎖型プローブを調製した。シュード PG の調製は、各糖鎖とポリ L-リジン (PLL、分子量 15,000~30,000) を 0.5 M リン酸緩衝液中で混合し、沈殿する場合には 4 M NaCl を加えて溶解した。水素化シアノホウ素ナトリウムまたはボランジメチルアミン複合体を加えて還元アミノ化反応により 12 日間カップリング反応させた後、0.1 M 酢酸ナトリウムに対して透析し脱塩した。NHS-ビオチンを用いてビオチン標識を導入し、さらに無水酢酸により残存アミノ基を N-アセチル化した。1 M NaCl を含むリン酸緩衝液に対して透析し、試料とした。カップリングの進行はセルロースアセテート膜電気泳動により分子の荷電の変化から確認した。サイズ排除 HPLC により生成物のサイズを求めた。単鎖型プローブは、多糖鎖をビオチンヒドラジドと室温で 1 晩反応させ還元末端を標識することにより調製し、透析により過剰の還元剤試薬を除いて使用した。

2) GAG および骨格分子鎖長の異なるシュード PG

次に GAG 鎖長と骨格分子の鎖長をそれぞれ変化させてシュード PG を調製した。GAG としては分子量 3,000 以下から約 20,000 までのサイズの異なる 4 段階の天然ヘパリン (H1~H4) と、分子量 8,000 以下の天然デキストラン硫酸 (H5) を、骨格分子としては分子量 500 から 30,000 までの 4 段階の

PLL (P1~P4) を材料に使用した。調製した 19 種類のシュード PG 中の PLL と GAG の濃度を測定する簡便な方法を検討し、PVDF 膜とセルロースアセテート膜上での CBB 染色およびトルイジンブルー染色度からそれぞれ算出した。各標品について抗 HIV-1 活性と細胞毒性を指標に、活性を示すシュード PG の要因を調べた。

2. シュード PG の抗 HIV 活性と細胞毒性測定

1) マイクロプレート法

抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも 96 穴平底培養プレートを使用し、左端 8 穴に 10%FCS 加 RPMI1640 培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を 100 μ l ずつ入れ、左端の穴から 8 連ピペットで 2 倍あるいは 5 倍段階希釈を 11 穴 (5 倍希釈については 8 穴) まで行い、12 穴目は薬剤濃度を 0 として細胞増殖及び HIV 感染のコントロールとする。被検薬剤 1 種類につき細胞毒性と抗 HIV 活性測定プレートのそれぞれ 2 列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にある MT-4 細胞を集め、その 2×10^6 個を 10 ml の培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に 100 μ l ずつ加えた。一方、抗 HIV 測定用のプレートには遠心分離により集めた 2×10^6 の MT-4 細胞に 100TCID₅₀ となるように HIV (HTLV-B) のストック溶液を加え、37°C、1 時間感染させた後、培地 10 ml で再浮遊し抗 HIV 活性測定プレートのすべての穴に 100 μ l 加える。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。マイクロプ

レート法を終えたサンプルはさらに、MAGIC-5 細胞を用いて測定した。

2) MAGIC-5 アッセイ法

ウェルあたり 10,000 個の MAGIC-5A 細胞を 96 穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで 37°C インキュベーター内で培養する。培養液を取り除いた後、培養液で 2 段階希釈 (希釈倍数は 5 倍) した薬剤液を加える。その後 HIV-1 Ba-L 株を 100~200BFU/50 μ l になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加える。37°C の CO₂ インキュベーターで 48 時間培養する。培養液を取り除き固定液 (1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PBS) を加えて室温で 5 分間インキュベートし、洗浄の後、染色液 (4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂ and 400 μ g/ml X-gal.) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートする。染色液を取り除き洗浄し、青く染まった細胞の数を顕微鏡下でカウントする。抗 HIV 活性陽性検体として TAK-779 および AZT を用いる。病原微生物の取り扱い指針を遵守した。

3. シュード PG の検定と構造解析方法の検討

1) 試料

パルナパリンナトリウムはローヘパ注 500 (味の素株式会社, 東京) を使用した。ギ酸, 酢酸, トリブチルアミン及びアセトニトリルは和光純薬 (東京) より購入した。

ローヘパ注 2 ml に 7 倍量の冷アセトンを加えて、-20 °C で 3 時間放置した。遠心

分離 (8,500 x g, 4 °C, 10 分間) 後上清を除去し、遠心エバポレーターを用いて沈殿物を乾燥した。乾燥物を 400 μ l の H₂O で完全に溶解させた後、3.6 ml の 40 mM 酢酸/40 mM トリブチルアミン溶液を加えて試料溶液とした。

3) 糖鎖定量

フェノール/硫酸法を用いた。20 μ l の試料溶液に 20 μ l の 5% フェノールを加えて混和した後、200 μ l の濃硫酸を加えた。室温で 15 分間インキュベートした後、490 nm の吸光度を測定した。

4) nanoLC/ESI-TOFMS

nanoLC 装置は Paradigm MS4 (Michrom BioResources, Auburn, CA, USA) を用いた。カラムは C18 カラム (内径 0.2 mm x 長さ 50 mm, 粒子径 3 μ m), C18 カラム (0.2 mm x 750 mm, 3 μ m) 及びグラファイトカーボンカラム (0.2 x 150 mm, 5 μ m) を使用した。溶離液は、2% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 90% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。パルナパリンは、流速 400 nl/min で B 液を、C18 カラム (内径 0.2 mm x 長さ 50 mm, 粒子径 3 μ m) の場合は 60 分間で 5-50% に、C18 カラム (0.2 mm x 750 mm, 3 μ m) の場合は 180 分で 15-35% に、またグラファイトカーボンカラム (0.2 x 150 mm, 5 μ m) の場合は、180 分で 40-70% に増加させて溶出した。ESI-TOFMS はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源を接続した QSTAR Pulsar I, (MDS Sciex, Tronto, Canada) を用いた。測定はネガティブイオンモードで

行った。測定範囲は m/z 400-2000, スプレー電圧は -2.5 ekV に設定した。

4. ヘパリンによる HIV-1 感染抑制機序の解析

1) HIV-1 感染試験

HIV-1 感染試験には T 細胞株指向性の IIIB 株を用いた。異なる濃度のヘパリンを HIV-1 と混合し、標的細胞 (NP-2/CD4/CXCR4 細胞) に 37°C で 2 時間接種し、洗浄後、培地を加え、4 日後の培養上清中の HIV-1 抗原 (gag タンパク質: p24) 量を以下の ELISA 法で定量した。

2) p24 ELISA

p24 に対するモノクローナル抗体で、ELISA プレートのコートしておき、ブロッキングの後に HIV-1 抗原を加えた。HIV 陽性ヒト血清を反応させ、つぎに HRP 標識の抗ヒトイムノグロブリンの結合の後、基質を加えて、発色させた。プレートリーダーにて、OD₄₅₀ を測定した。

3) 組み換えエンベロープタンパク質 (recombinant gp120: rgp120) 結合試験

ELISA プレートにあらかじめ HIV-1 のコレセプター-GPR1 の N 末端側細胞外領域由来ペプチド (GPR1ntP(1-27)) アミノ酸配列: MEDLEETLFEFENYSYDLDYYSLESC)、あるいは可溶性 CD4 (sCD4) を 4°C で 16 時間コートしておき、T 細胞株指向性由来 rgp120 を室温で 2 時間反応させた。rgp120 は、前者 (GPR1ntP(1-27)) の場合は、V3 領域を介して、そして後者 (sCD4) の場合は、CD4 結合領域を介してプレートに吸着する。この系を用いて、ヘパリンの有無による rgp120 の

結合に及ぼす影響を ELISA 法にて解析した。

4) HIV-1 と細胞の結合試験

細胞への HIV-1 結合試験は、細胞とウイルスを 37°C で 1 時間インキュベートし、未吸着ウイルスを洗浄除去後、細胞溶解液中に含まれる p24 量を ELISA 法で定量した。細胞内に侵入したウイルス量を決定する場合は、細胞とウイルスを 37°C でインキュベートし洗浄した後、トリプシン処理（まだ細胞表面に吸着しているウイルスを除くため）後に、ELISA を行った。

C. 研究結果

1. シュード PG の調製

種々の多糖鎖を用いて調製したシュード PG は、N-アセチル化前のセルロースアセテート膜電気泳動において、骨格分子の PLL よりも泳動度がいちじるしく変化したことにより、分子荷電状態の変化が示され、GAG 鎖と PLL のカップリングが確認された。N-アセチル化によって試料の泳動度はすべて中性にシフトした。また、この場合 RI ピークが小さく光散乱法で算出できなかったが、サイズ排除 HPLC の溶出位置から BPLH の分子量は、約 23 万（図 2）、PLL 1 分子につき、GAG 鎖の平均分子量を約 2 万として～11 本の GAG 鎖が結合と推定された。調製した試料を活性測定に使用した。

2. GAG 鎖の種類による抗 HIV 活性と細胞毒性への影響

種々の多糖鎖を用いて調製したシュード PG についてマイクロプレート法 (MT-4 細胞) 及びマクロファージ系 MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性測定を行った。その結

果、表 1 に示すように多糖の種類により非常に差が存在し、グリカン H と BPLH の差にみられるように、シュード PG 構造を取ることによって MT-4 と MAGIC-5 アッセイ両方で IC_{50} が減少し、抗 HIV 活性が増強することが示された。すなわち T 細胞好性ウイルス及びマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制効果が高まった。その活性は、濃度数値でみると材料の天然多糖に比べて 2 倍程度、単鎖型プローブ (BHYH) への誘導化の場合に比べて 2-4 倍であるが、試料が精製前であるため未反応の遊離の天然多糖鎖が高い割合で残存していることを考慮すると、実際のシュード PG の抗 HIV 活性は表 1 の数値より高いと考えられる。シュード PG の細胞に対する毒性はいずれも低かった。なお骨格分子である PLL およびその N-アセチル誘導体は、調べた濃度範囲では全く活性を示さなかった ($>200 \mu\text{g/ml}$)。

3. GAG と骨格分子の鎖長による抗 HIV 活性と細胞毒性への影響

次に GAG 鎖長と骨格分子の鎖長をそれぞれ変化させて比較した (表 2)。なお、表 1 の BPLH が表 2 の H3P4 に相当する。表 2 についても、試料が精製前であるため未反応の遊離の天然多糖鎖が高い割合で残存していることを考慮すると、実際のシュード PG の抗 HIV 活性は表の数値より高いことが推測される。表 2 に示すように、誘導化前の多糖鎖については鎖長が大きいほど抗 HIV 活性が高く (H3>H2, H1)、それらを用いて調製したシュード PG でも同じ傾向が存在した。H3 はウシ由来、H2 および H1 はブタ由来で動物の違いがあるため、活性の差には鎖長の差だけでなく、硫酸化度や構成糖組

成など一次構造の差が原因している可能性も考えられる。

一方、骨格分子である PLL については、サイズが小さい P1 および P2 を用いる方が P3 および P4 よりも抗 HIV 活性が高まる傾向が示された。

デキストラン硫酸 (H5) についてもシュード PG に誘導化することにより活性向上が示唆されたが、PLL の鎖長に対する依存性はヘパリンほど明確ではなかった。例外的に GAG 鎖の状態よりもシュード PG にすることで活性が低下する H4 については、遊離の還元末端が少ないなどの理由が考えられる。H4 は他の粉末ヘパリン試料とは異なり、注射用の溶液試料であるために初期の濃度測定方法が他の試料と異なり、 IC_{50} の絶対値については濃度評定の検討が必要である。

シュード PG の検定と構造解析方法の検討

nanoLC/ESI-TOFMS において低分子量ヘパリンの構造解析を種々のカラムで LC 条件を検討した結果、逆相系 C18 カラムを用いて分子量 400~3,800 Da の範囲で、129 種類の構造を分離・検出することができた (表 3)。ESI-TOFMS スペクトルの解析から、構成糖や硫酸結合数の異なる 2~14 糖の GAG 糖鎖の構造を推定することが可能になり、シュード PG の構成糖と硫酸結合数を決定する基盤的な解析方法が開発された。

HIV-1 感染抑制機序の解析

シュード PG が抗 HIV 活性を示す機構を解明するためには、GAG の HIV-1 感染への関与を詳細に明らかにすることが必要である。GAG の 1 つであるヘパリンは、HIV-1 の細胞

への感染を抑制した。ヘパリンに対するウイルスレセプターと考えられる HIV-1 エンベロープタンパク質 gp120 のコレセプター GPR1 の N 末端ペプチドへの結合がヘパリンにより阻害され、可溶性 CD4 への結合は阻害されなかったことから、ヘパリンは gp120 の CD4 結合領域ではなく V3 領域に結合することが示された (図 3)。またヘパリンは V3 への結合を介して HIV-1 の細胞表面への吸着を阻害していることが明らかとなった。

D. 考察

今回の結果から、調製したシュード PG の抗ウイルス活性は、GAG 鎖の種類により大変異なり、GAG 鎖とウイルスまたは細胞に存在する分子との相互作用により発揮されるもので、骨格分子である直鎖分子 PLL によるものではないことが示された。

活性を示す構造要因としては、表 2 の結果から、中性オリゴ糖鎖に比べて GAG 鎖が有効であり、また糖鎖の鎖長が大きいほど抗 HIV 活性が高いが、本研究で用いた H3 はウシ由来、H2 および H1 はブタ由来で動物の違いがあるため、活性の差には鎖長の差だけでなく、硫酸化度や構成糖組成など一次構造の差が原因している可能性も考えられる。一方、骨格分子である PLL については、分子量 4,000 以下の材料を用いる方が抗 HIV 活性が高まる傾向が示された。PLL のサイズが小さい方が溶解性も高まるので、今後は低分子 PLL を用いるとともに、GAG 鎖の動物種差を考慮して、より高活性な材料を選択する。さらに還元条件の検討により GAG 鎖の固定化量を調節し、シュード PG の活性向上をはかることが可能である。

シュード PG の活性構造要素を明らかに

するための構造解析については、nanoLC/ESI-TOFMS による GAG 鎖部分の構成糖と硫酸基数の微量分析が可能になった。本研究で提示した新法は、従来のイオンペア試薬を用いる方法に比べて、5 倍に感度が向上し、今後は 4,000 Da 以上のオリゴ糖分析にも適用できるよう前処理および誘導体化を検討するとともに、タンデム質量分析による硫酸基結合位置等の詳細な構造解析方法を開発する。シュード PG の活性と構造の関係解明へと活用することが可能となる。

シュード PG の HIV-1 感染抑制機序の解析を解明するための基礎として、GAG の HIV-1 感染への関与の分子レベルでの解析も進み、HIV-1 表面の gp120 の V3 領域がヘパリン結合部位であることが明らかとなった。ヘパリンは露出した V3 を介して直接ウイルス粒子に会合でき、gp120 の構造安定化に寄与すると予測される。今後は、ヘパリンを含めた GAG 鎖がシュード PG の構造をとることによって、gp120 との結合および活性に与える影響を詳細に解析することによって、シュード PG の HIV-1 感染抑制の機構解明を進め、高機能化に役立てる。

以上、主任研究者と本研究班内の分担者との協力によってシュード PG の調製、抗 HIV スクリーニング、構造解析、機能解析の成果が上がり、これらの結果を生かして、シュード PG の改良と創薬への研究推進が大いに期待される。

E. 結論

種々の天然 GAG 鎖を用いて調製したシュード PG の比較から、ヘパリン鎖の鎖長が大きく、また骨格分子である PLL の鎖長が短

いものが、抗 HIV 活性の高いシュード PG を与えることが示唆された。750 mm の C18 カラムを用いた nanoLC/ESI-TOFMS により、2~14 糖からなるヘパリン鎖をもつシュード PG の構成糖と硫酸結合数を解析することが可能となった。ヘパリンは、HIV-1 エンベロープタンパク質 gp120 の V3 領域に結合することで、HIV-1 の細胞表面への吸着を阻害していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takekawa H, Ina C, Sato R, Toma K, Ogawa H. Novel carbohydrate-binding activity of pancreatic trypsins to *N*-linked glycans of glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 281(13), 8528-38 (2006)

2) Yasukawa, Z., Sato, C., Sano, K., Ogawa, H., and Kitajima, K.

Identification of disialic acid-containing glycoproteins in mouse serum: a novel modification of immunoglobulin light chains, vitronectin, and plasminogen. *Glycobiology*, 16 (7), 651-65(2006)

3) Matsushita-Oikawa, H, Iida-Tanaka, N., Komatsu, M., Kanamori, T., Matsumoto, I., Seno, N., and Ogawa. H. Novel carbohydrate-binding activity of bovine liver β -glucuronidase toward lactose/*N*-acetyllactosamine sequences. *Glycobiology*, 16 891-901(2006)

4) Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., Hattori, S., and Ogawa, H. Changes in glycosylation of vitronectin modulates multimerization and collagen binding during liver regeneration. *Glycobiology*,

17, (2007) in press

5) Ogawa, H., and Nakagawa, K. Development of neoglycoconjugate probes and detection of lectins Glycoscience Lab Manual, Tanigubhi N., ed. Elsevier Science Publishers, (2007) in press.

2. 学会発表

1) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Carbohydrate-binding Activity found for Pancreatic Trypsins. Takekawa H, Ina C, Sato R, Toma K, Ogawa H. 2006

2) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Screening, purification and characterization of novel self-aggregatable lectins in the bark of leguminous trees. Ina C, Sano K, Yamamoto M, Matsushita H, Takekawa H, Takehara Y, Ueda H, Ogawa H. 2006

3) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. How Glycosylation Activates Multifunctional Extracellular Matrix Glycoprotein, Vitronectin, during Liver Regeneration. Sano K, Asanuma K, Kawasaki N, Ito S, Arisaka F, Ogawa H. 2006

4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and

11th FAOBMB Congress. Pancreatic α -amylase sugar-specifically binds to and is activated by N-linked glycans in duodenum brush border membrane. Ihara Y, Oikawa-Matsushita H, Le Na, Nakayama K, Umemura M, Ishikawa K, Ogawa H.

5) Extracellular Glycomatrix in Health and Disease Symposium (Satellite symposium of IUBMB 2006) Reduced glycosylation of vitronectin modulates the tissue lytic system and stellate-cell spreading during liver regeneration. Sano K, Kawasaki N, Ito S, Hashii N, and Ogawa, H, 2006

6) Extracellular Glycomatrix in Health and Disease Symposium (Satellite symposium of IUBMB 2006). Reactivity and utility of pseudoproteoglycan (pseudo PG) probes that simulate PG supramolecular structure. Ogawa H. 2006

7) The 23rd International Carbohydrate Symposium. Mammalian pancreatic trypsins exhibit carbohydrate-binding activity to N-linked glycans of glycoproteins. Takekawa H, Ina C, Sato R, Toma K, Ogawa H. 2006

8) The 23rd International Carbohydrate Symposium. Self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group which form complex with endogenous ligands in the bark of leguminous trees. Ina C, Sano K, Yamamoto-Takahashi M, Matsushita-Oikawa H, Takekawa H, Takehara Y, Ueda H, Ogawa H. 2006

9) 26th Japanese Carbohydrate Symposium. Characterization of Glycan Structures of Fibronectin During Liver Regeneration. Asahi M, Sano K, Hashii N, Ito S, Kawasaki N, Yanagibashi M, Miyamoto Y, Ogawa H. 2006

10) 26th Japanese Carbohydrate Symposium. Purification and characterization of a lectin from the fruiting body of *Pleurocybella porrigens*. Yoshida N, Takehara Y, Sano K, Mukoyama E, Kawasaki N, Hashii N, Kawanishi T, Akiyama H, Yoshioka Y, Maitani T, Ogawa H. 2006

11) 26th Japanese Carbohydrate Symposium. Characterization of the novel carbohydrate-binding activities of pancreatic enzymes. Takekawa H, Oikawa H, Ihara Y, Ina C, Le Na, Sati R, Toma K, Ogawa H. 2006

12) 文科省科研費特定領域研究題 4 回夏期シンポジウム Quantitative analysis and the biological significance of the changes in the oligosaccharides of vitronectin during liver regeneration. Sano K, Kawasaki N, Ito S, Hashii N, Miyamoto Y, Yasukawa Z, Sato C, Kitajima K, Ogawa H. 2006

13) 文科省科研費特定領域研究題 4 回夏期シンポジウム Pancreatic α -amylase sugar-specifically binds to N-linked glycans of glycoproteins in the brush border membrane of the duodenum and is activated of the interaction. Le Na, Ihara Y, Oikawa-Matsushita H, Takekawa H, Sano K, Sakagami H,

Ogawa H. 2006

14) XIX International Symposium on Glycoconjugates. How Glycosylation Activates Vitronectin and Modulates Tissue Remodeling during Liver Regeneration. Sano K, Asanuma-Date K, Arisaka F, Ito S, Hashii N, Kawasaki N, Yasukawa Z, Sato C, Kitajima K, Hattori S, Ogawa H. 2007

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 国際特許出願 PCT/JP2004/004589 審査請求中(2007)

[発明の名称] シュードプロテオグリカンおよびその用途

[出願人] お茶の水女子大学長

[発明者] 小川温子

2) 特願 2004 - 050592 審査請求中(2007)

[発明の名称] 蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬および固定化方法

[出願人] お茶の水女子大学長

[発明者] 小川温子

図1 天然のプロテオグリカン(PG)モノマー(上)、
シュードPGプローブ(左)、および単鎖型プローブ(右)

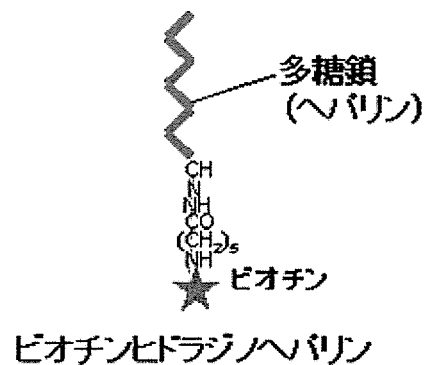
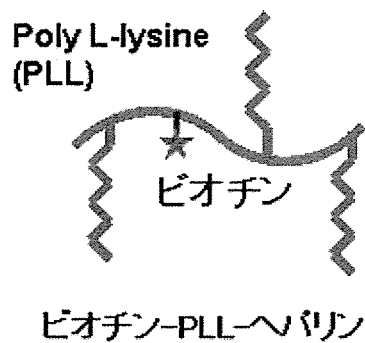
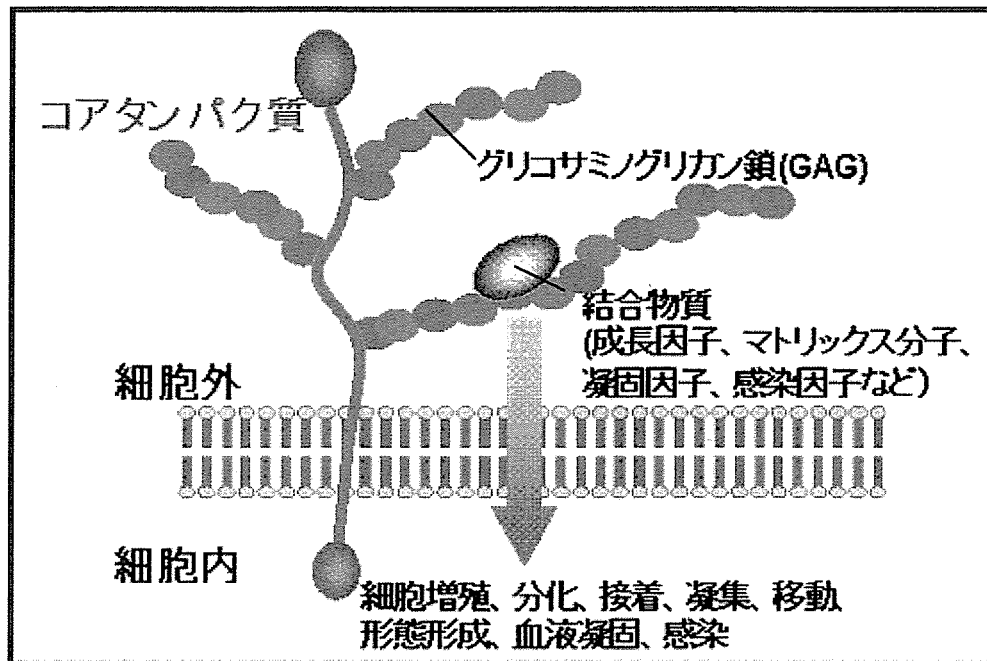
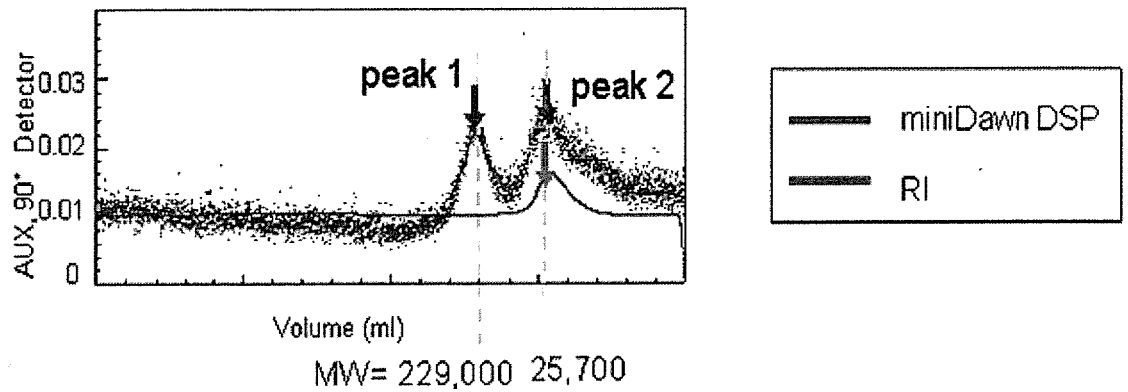
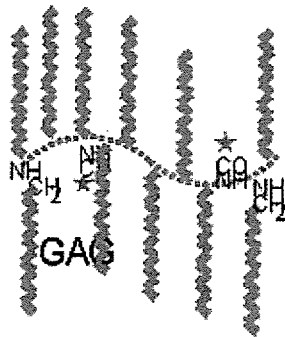


図2 シュードPGのサイズ排除HPLCにおける溶出曲線と分子量



溶出条件
 カラム: PROTEIN KW802.5
 移動相: 1/15 M PB (pH 7.4)
 温度: 40°C
 流速: 1 ml/min
 検出: UV 220nm
 miniDawn DSP
 RI
 試料: BPLH



⇒PLL1分子あたり~約11分子のGAG鎖が結合.

表1. 種々の天然GAGを用いて調製したシュードPGの抗HIV活性

サンプル	MT-4 assay		Magic 5A assay	
	細胞毒性最小濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	最小 HIV 抑制濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性最小濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
BPLCSA	100	25	200	11.3
BPLH	200	12.5	200	5.9
BB	200	100	200	86.8
グリカン H	200	25	200	11.6
グリカン HC	200	25	200	5.9
BPLLAC	200	200	100	>100
BPLLNT	80	NE	80	>80
BPLHS	>200	NE	>200	176.9
BPLHSCEL	200	NE	>200	>200
BHYH	>200	50	>200	10.9
HS	200	50	200	5.8
Cont	1.6	0.0005	18 μM	0.06 μM

表2. GAG および骨格分子の鎖長の異なるシュードPGの抗HIV活性

	サンプル名	MT-4 細胞アッセイ		MAGIC5 アッセイ	
		CC	IC ₅₀	CC	IC ₅₀
複合体	H1P1P2	>100	3.13	>500	NE
	H1P3	>100	6.25	500	NE
	H1P4	>100	12.50	100	NE
	H2P1	>100	3.13	>500	NE
	H2P2	>100	3.13	>500	(125)
	H2P3	>100	12.50	>500	NE
	H2P4	>100	50.00	500	NE
	H3P1	>100	0.78	>500	11.0
	H3P2	>100	1.56	>500	11.5
	H3P3	>100	NE	500	16.5
	H3P4	>100	3.13	500	38.0
	H4P1	>100	12.50	>500	NE
	H4P2	>100	12.50	>500	NE
	H4P3	>100	NE	>500	NE
	H4P4	>100	1.56	>500	NE
	H5P1	>100	3.13	>500	10.5
H5P2	>100	1.56	>500	5.0	
H5P3	>100	1.56	>500	28.5	
H5P4	>100	3.13	>500	18.0	
多糖	H1	>100	3.13	>500	69.0
	H2	>100	6.25	>500	60.0
	H3	>100	1.56	>500	18.0
	H4	>100	0.39	>250	9.5
	H5	>100	3.13	>500	15.0
ポリマー	P1	>50	NE	500-100	NE
	P2	>50	NE	>500	NE
	P3	>12.5	NE	100	NE
	P4	>6.25	NE	20	NE

陽性コントロール	AZT	>0.25	0.0039	NT	NT
	TAK-779	NT	NT	1 uM	0.004 uM

(表注)

MT-4 細胞アッセイ

- ・最終濃度 100 μ g/ml から 2 倍希釈

MAGIC5 アッセイ

- ・最終濃度 500ug/ml から 5 倍希釈 (ただし、H4 は 250ug/ml から 5 倍希釈)
- ・ () : 細胞毒性が認められない濃度では、完全な HIV 増殖抑制効果は見られない

NE: not effected、NT: not tested、CC: cytotoxic concentration、IC: inhibitory concentration、

表3 バルナバリンナトリウムのnanoLC/ESI-TOFMS(negative ion mode)により得られた主要糖鎖

Oligosaccharide size	Eluted times (min)	Observed ion (m/z)	charge (negative)	The number of residues	Composition ^{b)}				Sulfates/units ^{b)}	theoretical Mass ^{c)} Calc (Da)
					HexA	HexN	HexNAc	Sulfate		
Disaccharides	31.7,34.5	434.13	1	2	1	1	0	1	1.0	435.07
	34.5,41.1	514.05	1	2	1	1	0	2	2.0	515.02
	34.5,41.1	514.05	1	2	1	1	0	2	2.0	515.02
	40.4,41.3	594.04	1	2	1	1	0	3	3.0	594.98
Trisaccharide	46.7,47.3	424.56	2	3	2	1	0	4	2.7	850.97
Tetrasaccharides	44.2,45.1,49.5,51.2	505.07	2	4	2	2	0	4	2.0	1012.04
	48.7,49.6,51.2	545.05	2	4	2	2	0	5	2.5	1092.00
Pentasaccharides	55.0,56.3	585.03	2	4	2	2	0	6	3.0	1171.95
	48.3,53.2	625.57	2	5	2	3	0	5	2.0	1253.06
	53.2,58.7	665.60	2	5	2	3	0	6	2.4	1333.02
	58.7,67.6	705.55	2	5	2	3	0	7	2.8	1412.98
	62.8	745.52	2	5	2	3	0	8	3.2	1492.94
	51	633.06	2	5	3	2	0	5	2.0	1268.03
Hexasaccharides	55.5	673.04	2	5	3	2	0	6	2.4	1347.98
	60.3	713.02	2	5	3	2	0	7	2.8	1427.94
	43.6,45.3	694.62	2	6	3	2	1	4	1.3	1391.15
	48.5,49.4	734.60	2	6	3	2	1	5	1.7	1471.11
	53	774.58	2	6	3	2	1	6	2.0	1551.06
	53.3	713.56	2	6	3	3	0	5	1.7	1429.10
	53.4,58.8	753.57	2	6	3	3	0	6	2.0	1509.05
	53.8,58.7	793.56	2	6	3	3	0	7	2.3	1589.01
Heptasaccharides	61.7,63.3,66.5,67.5	555.39	3	6	3	3	0	8	2.7	1668.97
	58.7	555.74	3	7	3	4	0	6	1.7	1670.12
	61.4	582.43	3	7	3	4	0	7	2.0	1750.08
	61.4	609.07	3	7	3	4	0	8	2.3	1830.04
	65.1,68.8	635.73	3	7	3	4	0	9	2.6	1909.99
	68.6	662.38	3	7	3	4	0	10	2.9	1989.95
	61.8,63.2,67.3	614.07	3	7	4	3	0	8	2.3	1845.00
	66.8	640.70	3	7	4	3	0	9	2.6	1924.96
	76.8	667.32	3	7	4	3	0	10	2.9	2004.91
	53.1,57.7	628.48	3	8	4	3	1	6	1.5	1888.17
Octasaccharides	57.7	655.10	3	8	4	3	1	7	1.8	1968.12
	61.7	681.75	3	8	4	3	1	8	2.0	2048.08
	73.6,75.4	420.61	4	8	4	4	0	4	1.0	1686.24
	73.6,75.5	440.62	4	8	4	4	0	5	1.3	1766.20
	73.6,76.5	460.61	4	8	4	4	0	6	1.5	1846.15
	73.6,76.5	480.61	4	8	4	4	0	7	1.8	1926.11
	69.2,73.3,76.2	500.58	4	8	4	4	0	8	2.0	2006.07

	69.0.73.3.76.3	520.58	4	8	4	4	0	9	2.3	2086.02	2086.32	-0.30
	69.0.73.3.76.3	540.56	4	8	4	4	0	10	2.5	2165.98	2166.24	-0.26
	73.3.76.3	560.56	4	8	4	4	0	11	2.8	2245.94	2246.24	-0.30
	73.3.76.3	580.55	4	8	4	4	0	12	3.0	2325.90	2326.20	-0.30
nonasaccharides	75.0.78.1	620.81	4	9	4	5	0	12	2.7	2486.96	2487.24	-0.28
	78.1.81.5	640.83	4	9	4	5	0	13	2.9	2566.92	2567.32	-0.40
	81.5.83.8	660.81	4	9	4	5	0	14	3.1	2646.88	2647.24	-0.36
	73.6.77.2	584.55	4	9	5	4	0	10	2.2	2342.01	2342.20	-0.19
	77.3.80.5	604.55	4	9	5	4	0	11	2.4	2421.97	2422.20	-0.23
	78	624.54	4	9	5	4	0	12	2.7	2501.93	2502.16	-0.23
Decasaccharides	61.6	595.33	4	10	5	4	1	8	1.6	2385.18	2385.32	-0.14
	63.5.65	615.37	4	10	5	4	1	9	1.8	2465.14	2465.48	-0.34
	68.7.72.3	635.35	4	10	5	4	1	10	2.0	2545.09	2545.40	-0.31
	72.3	655.33	4	10	5	4	1	11	2.2	2625.05	2625.32	-0.27
	75.2	675.30	4	10	5	4	1	12	2.4	2705.01	2705.20	-0.19
	75.2.78.5.80.1	604.82	4	10	5	5	0	9	1.8	2423.13	2423.28	-0.15
	75.2.80.5	499.67	5	10	5	5	0	10	2.0	2503.08	2503.35	-0.27
	75.1.78.7.82.2.84.3	515.69	5	10	5	5	0	11	2.2	2583.04	2583.45	-0.41
	75.1.78.7.82.3.84.6	531.62	5	10	5	5	0	12	2.4	2663.00	2663.10	-0.10
	79.0.82.1.84.4.85.1	547.62	5	10	5	5	0	13	2.6	2742.95	2743.10	-0.15
Dodecasaccharides	81.2.82.2.84.3.85.1	563.65	5	10	5	5	0	14	2.8	2822.91	2823.25	-0.34
	84.2.88.6	579.59	5	10	5	5	0	15	3.0	2902.87	2902.95	-0.08
	73.7	506.07	6	12	6	5	1	12	2.0	3042.11	3042.42	-0.31
	87.4.90.1	499.06	6	12	6	6	0	12	2.0	3000.10	3000.36	-0.26
	87.5.90.3	512.38	6	12	6	6	0	13	2.2	3080.05	3080.28	-0.23
	87.4.90.1.93.8	525.69	6	12	6	6	0	14	2.3	3160.01	3160.14	-0.13
	86.2.87.9.90.2	539.03	6	12	6	6	0	15	2.5	3239.97	3240.18	-0.21
	88.1.90.3	552.39	6	12	6	6	0	16	2.7	3319.92	3320.34	-0.42
	90.1.92.6.94.7	565.69	6	12	6	6	0	17	2.8	3399.88	3400.14	-0.26
	92.7.94.7	578.90	6	12	6	6	0	18	3.0	3479.84	3479.40	0.44
Tetradecasaccharides	90.0.92.7	592.32	6	12	6	6	0	19	3.2	3559.79	3559.92	-0.13
	89.8.93.0	581.84	6	14	7	7	0	14	2.0	3497.11	3497.04	0.07
	89.8.93.0	595.25	6	14	7	7	0	15	2.1	3577.07	3577.50	-0.43
	89.8.93.8	608.51	6	14	7	7	0	16	2.3	3657.03	3657.06	-0.03
	89.9.93.8	621.88	6	14	7	7	0	17	2.4	3736.98	3737.28	-0.30
	94.8	635.20	6	14	7	7	0	18	2.6	3816.94	3817.20	-0.26

a) HexA: グルクロン酸及び(β-イソロン酸, HexN: グルコサミン, HexNAc: N-アセチルグルコサミン, sulfate: 硫酸基, b) 繰り返し構造あたりの硫酸基の数, c) Monoisotopic values.

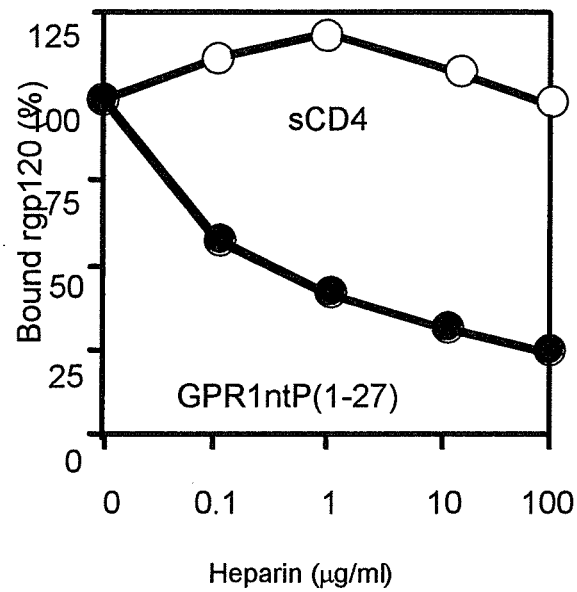


図3 ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合する。

ヘパリンに対するウイルスレセプターと考えられるHIV-1エンベロープタンパク質gp120 (recombinant, rgp120) と HIV-1 コレセプターGPR1 のN末端側細胞外領域ペプチド (GPR1ntP(1-27)) との結合をヘパリンは阻害したが、rgp120 と可溶性CD4 (sCD4) との結合は阻害しなかったことから、ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合することが示された。

シュードプロテオグリカンの抗 HIV スクリーニング

分担研究者 棚元憲一（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 大竹徹、森治代、川畑拓也（大阪府立公衆衛生研究所）

研究要旨

5 種類の動物及び微生物起源多糖と 4 種類の合成高分子骨格ポリマーを用いて作製した種々の複合体につき、MT-4 細胞及びマクロファージ系 MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性測定を行った。今回調製した複合体の中には一部活性上昇が認められたものもあったが顕著な活性上昇ではなく、多くの複合体では活性の保持、もしくは減弱が認められた。

A. 研究目的

種々のグリコサミノグリカン (GAG) 鎖をもつ分子量数万から数十万に調製されたシュード PG を用い、それらの抗 HIV 活性スクリーニングを行う。スクリーニングは MT-4 細胞による T-tropic virus に対する抗 HIV 活性、及び MAGIC-5A 細胞と M-tropic HIV-1 を用いた抗ウイルス活性をスクリーニングした。

B. 研究方法

1) スクリーニング試験

a) マイクロプレート法：抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも 96 穴平底培養プレートを使用し、左端 8 穴に 10%FCS 加 RPMI1640 培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を 100・1 ずつ入れ、左端の穴から 8 連ピペットで 2 倍あるいは 5 倍段階希釈を 11 穴（5 倍希釈については 8 穴）まで行い、12 穴目は薬剤

濃度を 0 として細胞増殖及び HIV 感染のコントロールとする。被検薬剤 1 種類につき細胞毒性と抗 HIV 活性測定プレートのそれぞれ 2 列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にある MT-4 細胞を集め、その 2×10^6 個を 10 ml の培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に 100・1 ずつ加えた。一方、抗 HIV 測定用のプレートには遠心分離により集めた 2×10^6 の MT-4 細胞に 100TCID₅₀ となるように HIV (HTLV-B) のストック溶液を加え、37°C、1 時間感染させた後、培地 10 ml で再浮遊し抗 HIV 活性測定プレートのすべての穴に 100・1 加える。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。

b) MAGIC-5 アッセイ法：ウエルあたり 10,000 個の MAGIC-5A 細胞を 96 穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで 37°C インキュベーター内で培養する。培養液を取り除いた後、培養液で 2 段階希