

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・1 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・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。

C. 研究経過および考察

5 種類の動物及び微生物起源多糖 (H1~H5) 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。結果を表 1 および表 2 に示す。表 1 は複合体 19 試料についての結果を示している。用いた 5 種類の多糖はいずれも単独で MT-4 細胞及び MAGIC-5A 細胞両アッセイにおいて抗 HIV 活性を示した。一方作製した複合体は MT-4 細胞アッセイではそれらの多糖単独での活性と比較した場合、一部 (H2P1、H2P2、H3P1、H5P2、H5P3) では若干の活性上昇が認められたものの顕著な活性上昇ではなく、その他の多くの複合体ではむしろ活性の減弱が認められた。一方 MAGIC-5 アッセイの結果では、相対的に MT-4 細胞アッセイに比較して活性は弱いものの、やはりいずれの多糖も単独で抗 HIV 活性を示した。しかしなが

ら MT-4 細胞アッセイの場合と同様に、多糖 H3 及び H5 由来の一部複合体では若干の活性上昇が認められたものの顕著な活性上昇ではなく、多くの複合体ではむしろ活性の減弱が認められた。特に多糖 H1、H2、H4 由来の複合体ではまったく活性が認められなかった。

表 2 に示した試料は、表 1 の試料と同じ 5 種類の多糖 (H1~H5) を用いているが、4 種類の合成高分子骨格ポリマー及び複合体の調整方法が表 1 のものとは異なる 20 試料である。それらの抗 HIV 活性を測定した結果、この調製法における複合体の活性はもとの多糖に比較して、MT-4 細胞及び MAGIC-5A 細胞両アッセイにおいてほとんどすべての試料で活性の減少が見られた。特に H4 由来の複合体では顕著な活性の減弱が認められた。

以上のように、今回作製した複合体では顕著な活性上昇は見られなかったが、用いた試料はいずれも精製されたものではない。今後はこれらの試料の精製を進めて活性分画を単離し、それらの活性を確認した後に最終的な判断を下すことになる。

D. 結論

5 種類の天然由来多糖と 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。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、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。今後活性分画につき、さらに検討を進めたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M & Tanamoto K. Lipid A and its precursor lipid IVa require different region of mouse MD-2 molecule to induce Toll-like receptor 4-mediated NF- κ B activation. J. Biol. Chem. 2006
- 2) Mutsuga M, Kawamura Y, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Takatori K, Tanamoto K. Migration of formaldehyde and acetaldehyde into mineral water in polyethylene terephthalate (PET) bottles. Food Addit Contam. 23, 212-218, 2006
- 3) Kawamura Y, Kawasaki C., Mine S., Mutsuga M, Tanamoto K. Contents of eight harmful elements in baby toys and their migration test. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47 51-57, 2006
- 4) Ogawa Y, Kawamura Y, Wakui C, Mutsuga M, Nishimura T, Tanamoto K. Estrogenic activities of chemicals related to food contact plastics and rubbers tested by the yeast two-hybrid assay. Food Addit Contam. 23, 422-430, 2006.
- 5) Sugimoto N., Kuroyanagi M., Kato T., Sato K., Tada A., Yamazaki T., & Tanamoto K. Identification of the main constituents in Sandarac Resin a natural gum base. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47(2), 76-79, 2006
- 6) Kanno S., Kawamura Y., Mutsuga M., Tanamoto K. Determination of epoxidized soybean oil and linsed oil in rapping film and cap sealing. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 89-94, 2006
- 7) Ozaki A., kawaski C/. Kawamura Y., Tanamoto K. Migration of bisphenol A and benzophenones from paperand paperboard products used in contact with food. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 99-104, 2006
- 8) Kanno S., Kawamura Y., Mutsuga M., Tanamoto K. Surbey of epoxidized soybean oil in cap sealing forbottled foods. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 196-199, 2006
- 9) Kitamura Y., Iwasaki T., Mifune M., Saito M., Sato K., Yomota C & Tanamoto K. Standard infrared absorption spectrum of betaine and optimal conditions for its measurement. J. Food. Hyg. Soc. Japan, 47, 232-236. 2006
- 10) Sugimoto N., Yomota C., Furusho Sato K., Yamazaki T., Tanamoto K. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance for the identification of ethyldimethylpyradine, a food flavoring agent Food Additives & Contaminants 23:1253-1259. 2006
- 11) Igarashi A., Ohtsu S., Muroi M., & Tanamoto K. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF- κ B. Biol. Pharm. Bull. 29, 2120-2122 2006
- 12) Kin Z-L., Tada A., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. Masuda A., Yamagata K. & Tanamoto K. Analysis of constituents in Urushi Wax, a natural food gum base. J. Food. Hyg. Soc. Japan, 4, 167-172, 2006

13) Kawamura Y., Kanno S., Mutsuga M., Tanamoto K. Determination of epoxidized soybean oil in bottled foods. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 243-248, 2006

2. 学会発表

1) Yokota S., Amano K., Ohnishi T., Okabayashi T., Yokosawa N., Muroi M., Tanamoto K. and Fujii N. : *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, which have low endotoxic activity, upregulate Toll-like receptor 4 expression and enhance inflammatory reaction induced by other bacterial lipopolysaccharide. The 26th International Symposium of Sapporo Cancer Seminar (2006, 7)

2) Muroi M., and Tanamoto K. : Overexpression of IRAK-1 leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

3) Ohnishi T., Igarashi A., Muroi M., and Tanamoto K. : Novel lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

4) Sugiyama K., Muroi M., and Tanamoto K. : Isolation of peptides that inhibit lipopolisaccharide signaling using Toll-like receptor 4-baited yeast

two-hybrid screening. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

5) Igarashi A., Muroi M., and Tanamoto K. : Effects of possible endocrine disrupting chemicals on Toll-like receptor 2 and 4 signaling. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

6) Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Tanamoto K., and Kaminishi M. : Endotoxin-induced endothelial and macrophage cells apoptosis. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

7) Nishida M., Hatao F., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M. Muroi M., and Tanamoto K. : New approach for analyzing biological activity of lipopolysaccharide in blood. Joint Meeting of the Society for Leukocyte Biology and the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2006, 11)

G. 知的財産の出願・登録状況

特許出願

1. 「抗ウイルス剤」 (特願 2006-030248)
2. 「新規ペプチドおよびこれを用いたエンドトキシン由来疾患治療剤」 (特願 2006-21779、国内、PCT/JP2007/51439、国外)

表 1. 各種複合体の抗 HIV 活性

	サンプル名	MT-4 細胞アッセイ		MAGIC5 アッセイ	
		CC	IC	CC	IC50
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
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

	P4	>100	NE	100	NE
	AZT	>0.25	0.0039	NT	NT
	TAK-779	NT	NT	1 μ M	0.004 μ M

(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 500 μ g/ml から 5 倍希釈 (ただし、H4 は 250 μ g/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、

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

分担研究者 教授 牛島廣治（東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室）
研究協力者 沖津祥子、柳生文宏（東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室）

研究要旨

MT-4細胞を用いた T-tropic virus および Magic 5A 細胞を用いた M-tropic virus に対する 11 種類の薬剤の効果を検討した結果、6 種類のサンプルで両方の virus に対して増殖抑制効果が認められた。

A. 研究目的

主任研究者から送られた 11 サンプルについて MT-4 細胞を用いた HIV による細胞傷害抑制性試験および Magic 5A 細胞を用いたマクロファージ向性 HIV によるプラーク産生能抑制試験により、抗 HIV 活性を測定した。

B. 研究方法

MT-4 assay: 抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートの 2 種類のプレートを用意した。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 RPMI で所定の濃度に希釈した試料溶液 200 μ l を加えた。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 段階希釈を 11 穴まで行い、12 穴目は薬剤濃度を 0 として細胞増殖および HIV 感染のコントロールとした。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 列を使用した。被検薬剤を希釈したプレートに 1 プレート辺り 2×10^6 個の対数増殖期にある MT-4 細胞を遠心分離により集め、培地 10ml で再浮遊し細胞毒性測定用のプレートには 100 μ l ずつすべての穴に加えた。一方、抗 HIV 活性測定プレートは以下のように調整した。遠心分離により集めた 2×10^6 個の MT-4 細胞に 100TCID₅₀ となるように HIV (HTLV-III_B) のストック溶液を加え、37°C 1 時間感染させた後、培地 10ml 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 ずつ加えた。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察した。

Magic 5A assay: 実験当日の朝、Magic 5A 細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度で 2.5%FCS 添加 DMEM に浮遊し 100 \cdot 1 ずつ 96 穴平底プレートに分注した。6 時間培養後、細胞が平底プレートにしっかりと張り付いていることを確認し、培養上清を取り除いた。薬剤を MT-4 細胞によるスクリーニングの結果、細胞毒性がないと思われる最大濃度とその 5 倍希釈した 2 点の濃度に培養液を用いて希釈し、各穴に 50 \cdot 1 ずつ加えた。HIV-1 Ba-L 株を 100 ~ 200BFU/50 \cdot 1 になるように 40 \cdot 1/ml DEAE dextran (最終濃度 20 \cdot 1/ml) 添加培養液で調整し、薬剤添加プレートに 50 \cdot 1 加え、37°C の CO₂ インキュベーターで 48 時間培養した。培養液を取り除いた後、所定の方法により染色し、プラーク数により判定した。M-tropic virus に対し、比較的効果のあった薬剤については、50%ウイルス増殖抑制濃度 (IC₅₀: 50% Inhibitory concentration) を測定した。

C. 結果及び考察

小川班から送付されたサンプルに対して 11 検体について、T-tropic virus および M-tropic virus に対する増殖抑制効果を調べたところ、6 検体 (BPLCSA, BPLH, グリカン H, グリカン HC, BHYH, HS) が T-tropic ウイル

スに対しても、M-tropic ウイルスに対しても増殖抑制効果が認められた (表 1)。今後もシュードプロテオグリカン誘導体のスクリーニングを続けるとともに、次年度は抑制効果の作用機序を詳細に検討する。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 78(7): 971-978, 2006.
2. Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab* 52 (5-6): 247-253, 2006.
3. Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 857-858, 2006.
4. Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis*. 12(5): 865-867, 2006.
5. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 78(7):986-994, 2006.
6. Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 78(6):839-846, 2006.
7. Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 78(10):1318-1324, 2006.
8. Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52 (9-10): 515-518, 2006.
9. Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 52 (9-10): 519-525, 2006.
10. Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52(7-8):363-366, 2006.
11. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44(10):3784-3786, 2006.
12. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in

- Japan in 2004–2005. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 347–253, 2007.
13. Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003–2004. *Clin Lab*, 53: 41–48, 2007.
 14. Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113–4119, 2006.
 15. Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab*, in press.
 16. Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet and Evol* 7:247–253, 2007
 17. Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *European J Clin Microbiol & Infect Diseases* 26(1): 21–27, 2007.
 18. Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932–941, 2007.
 19. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Norvel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
 20. Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. (short communication) *Clin. Lab*,. in press.
 21. Dieng H, Boosts M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House and household insect pest, in press.
 22. Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalamisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entomol Zool*, in press.
 23. Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol*, in press.
 24. Trinh QT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002–2003. *J Med Virol*, in press.
 25. Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with

- persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic and reconstructive surgery*. 119(1):227-234, 2007
26. Ushijima H. Foreword. *Mother and child health in Asia and Africa*. Pediatrics International, in press.
 27. Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatrics International*, in press.
 28. Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, in press.
 29. Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, in press.
 30. Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatrics International*, in press.
 31. Li L, Li K, Ushijima H. Moderate- to -vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatrics International*, in press.
 32. Manilay P, Ali M, Yagy F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatrics International*, in press.
 33. Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagy F, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, in press.
 34. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. in press.
 35. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, in press.
 36. Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of Intragenotype Recombinant Sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, in press.
2. 学会発表
- 1) 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞におけるGプロテインレセプターの発現. 日本ウイルス学会 第54回学術集会 2006.11.29-21.
- E. 知的財産の出願・登録状況
特になし。

表1. 抗HIV試験結果

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

ヘパリンによる HIV-1 感染抑制機序の解析

分担研究者 星野洪郎（群馬大学大学院医学系研究科）

研究要旨

グリコサミノグリカンの1つであるヘパリンは、HIV-1 の細胞への感染を抑制した。この感染抑制機序として、HIV-1 エンベロープタンパク質 gp120 の V3 領域にヘパリンが結合することで、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。

A. 研究目的

HIV-1 の細胞への感染には、細胞側レセプターとして CD4 とさらに CXCR4 や CCR5 などのコレセプターを必要とする。これらレセプター/コレセプター以外にウイルスの細胞への結合に大きく影響する因子として、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンが知られている。実際、酵素処理により細胞表面のヘパラン硫酸を除去すると HIV-1 の感染性が低下することや、ヘパラン硫酸あるいはヘパリンが HIV-1 の感染を阻害することが報告されている。

ヘパラン硫酸あるいはヘパリンの構造的特徴は、その分子内に多数の硫酸基を保持し、陰性荷電をおびていることである。従って、その結合様式は相手側の陽性荷電を介した電気的結合が中心となる。タンパク質の場合、塩基性アミノ酸 (Lys, Arg, His) が重要である。ヘパリンと相互作用するアミノ酸配列のモチーフとして、ヘパリン結合ドメイン (Heparin Binding Domain: HBD) が知られている。HIV-1 における HBD は、とくに T 細胞株指向性株のエンベロープタンパク質 gp120 の V3 領域内に X-B-B-B-X-B-X-X-B-X (X はすべてのアミノ酸、B は塩基性アミノ酸) 配列としてコードされている。従って、V3 領域内の HBD を介して HIV-1 は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するものと考えられているが、その詳細は明らかではない。

そこで、本研究の目的は、ヘパリンによる HIV-1 感染抑制機序を解析することで、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンを介した HIV-1 の細胞吸着の分子機序の詳細を明らかにすることである。

B. 研究方法

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。

p24 ELISA

p24 に対するモノクローナル抗体で、ELISA プレートにコートしておき、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。

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 (GPRIntP(1-27)) アミノ酸配列: MEDLEETLFEEFENYSYDLDYYSLESC)、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 (GPRIntP(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。

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

へパリンは、濃度依存性に HIV-1 (IIIB 株) の NP-2/CD4/CXCR4 細胞への感染を抑制した (図 1)。rgp120 結合試験では、へパリンは rgp120 と GPRIntP(1-27) との結合を阻害したが、sCD4 との結合を阻害しなかった (図 2)。このことは、へパリンは、rgp120 の CD4 結合領域ではなく、V3 領域に結合することを示していた。次に、T 細胞株 (MOLT-4 細胞) への HIV-1 (IIIB 株) の 37°C での結合に及ぼすへパリンの影響を調べた (図 3)。あらかじめ感染を完全に抑制する濃度の CD4 抗体で細胞を処理したが、依然として抗体未処理コントロールのおよそ 6 割のウイルスは、細胞に結合したままであった。しかし、細胞外に結合したウイルスをトリプシン処理により除去し、細胞内のウイルスの量だけを求めると、p24 は検出されなかった (図 3 右側)。このことより、HIV-1 の細胞表面への結合には CD4 だけでなく CD4 以外の分子を介した結合も関与していることが推測された。次に、抗 V3 抗体の影響を調べたところ、驚いたことに、細胞表面への HIV-1 結合を完全に抑制した。この結果は、V3 領域は CD4 を含めたすべての細胞表面分子への HIV-1 結合に関与していることを示唆していた。へパリンは抗 V3 抗体と同様に、細胞への HIV-1 結合を強く抑制した。

D. 考察

以上の結果より、へパリンは HIV-1 の V3 領域と結合することで、CD4 を含めたすべての細胞表面分子への HIV-1 の結合を阻害していることが推測された。V3 領域は、部分的に HIV-1 粒子表面に露出しているとの報告がある。従って、へパリンはこの露出した V3 を介して直接ウイルス粒子に会合できるものと予想された。

HIV-1 と細胞との結合に関与する CD4 以外の細胞

表面分子としては、コレセプターやへパリン硫酸プロテオグリカンが候補として挙げられる。gp120 と CD4 が結合してはじめてコレセプターとの結合に必要な gp120 の構造変化が生じるとされている。従って、CD4 と HIV-1 との相互作用も阻害するへパリンは、コレセプターとの結合に必要な gp120 の構造変化を未然に防いでいることが推測できる。

以上のことを考えあわせると、へパリンは、HIV-1 粒子表面の V3 領域と細胞表面へパリン硫酸プロテオグリカンの結合を阻害することで、HIV-1 感染の最も初期の細胞への吸着段階を抑制しているものと考えられた。

E. 結論

へパリンは、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) Abe K, Nozaki A, Tamura K, Ikeda M, Naka K, Dansako H, Hoshino H, Tanaka K, and Kato N. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol. Immunol.* 2007, 51, 117-125.

2) Roy BB, Jinno-Oue A, Shinagawa M, Shimizu A, Tamura K, Shimizu N, Tanaka A, and Hoshino H. Isolation of the feline alpha1,3-galactosyltransferase gene, expression in transfected human cells and its phylogenetic analysis. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2006, 306, 59-69.

3) Shimizu Y, Okoba M, Yamazaki N, Goto Y, Miura T, Hayami M, Hoshino H, and Haga T. Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microbes Infect.* 2006, 8, 105-113.

2. 学会発表

1) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、森 隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎 HIV-1 感染感受性に対する重粒子線の効果の解析
第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年、名古屋

2) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、森 隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎 臨床分離 HIV 株のコレセプター使用性の解析
第20回日本エイズ学会学術集会、2006年、東京

3) 星野洪郎、清水宣明、大上厚志、田中 淳、Manujendra N. Saha、品川雅彦、大槻貴博、Ariful Hoque、森 隆久、和田成一、浜田信行、船山知夫、小林泰彦 重イオン照射によるウイルスおよび細胞遺伝子発現への影響
第1回高崎量子応用研究シンポジウム、2006年、高崎

4) 大槻貴博、大上厚志、清水宣明、星野洪郎 Establishment of a convenient and rapid detection system for determination of HIV/SIV coreceptor usage.
第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

5) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、山口華代、中谷陽子、森 隆久、和田成一、小林泰彦、星野

洪郎 HIV-1 感染における重粒子線照射の効果とフォルミルペプチド受容体の HIV-1 コレセプター活性に関する研究
第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

6) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎 ヒト脳微小血管に由来する内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験
第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

7) 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、田中 淳、星野洪郎 重粒子線照射による潜伏感染からの再活性化機構の解明第12回 COE 研究会、2006年、前橋

8) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎 ヒト血液脳関門構成細胞への HIV-1 感染性におよぼす血清の影響について
第20回日本エイズ学会学術集会、2006年、東京

G. 知的所有権の取得状況

1) B型肝炎ウイルスの感染性を容易に短期間に判定する方法 (国際出願: PCT/JP2006/317984)

図1:ヘパリンはHIV-1感染を抑制する

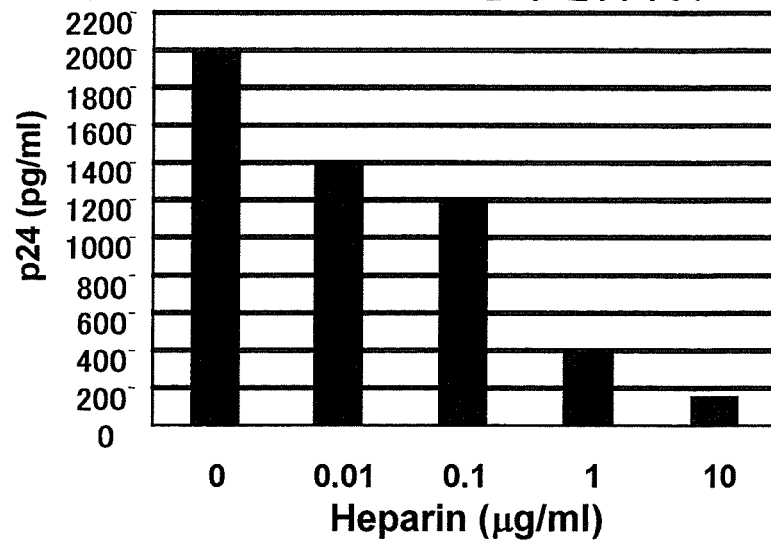


図2: ヘパリンはgp120のCD4結合領域

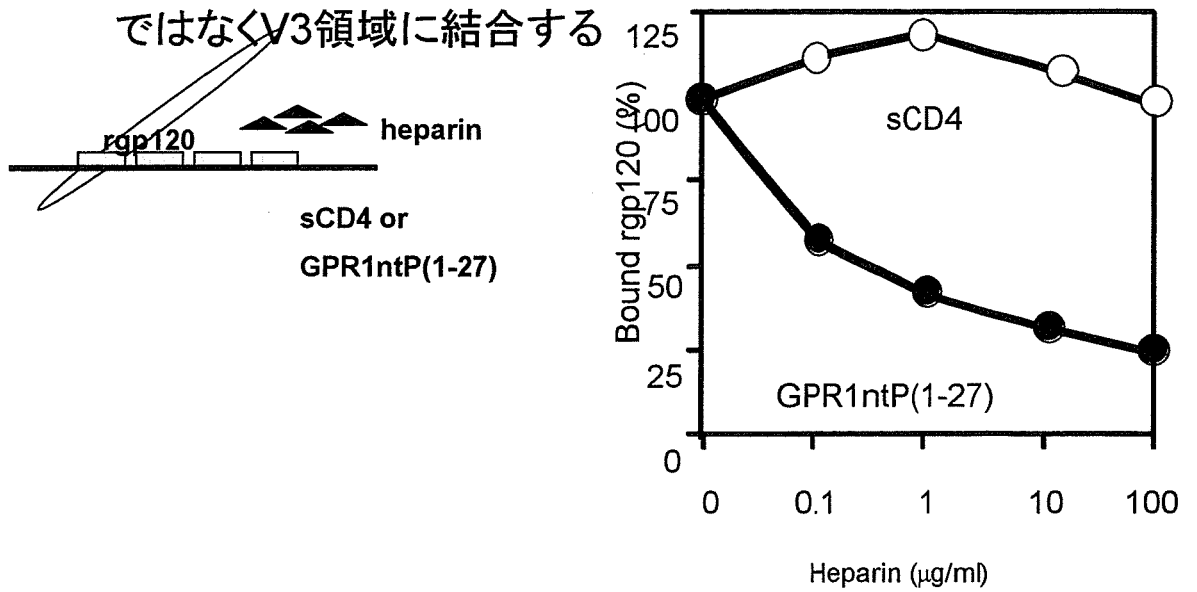
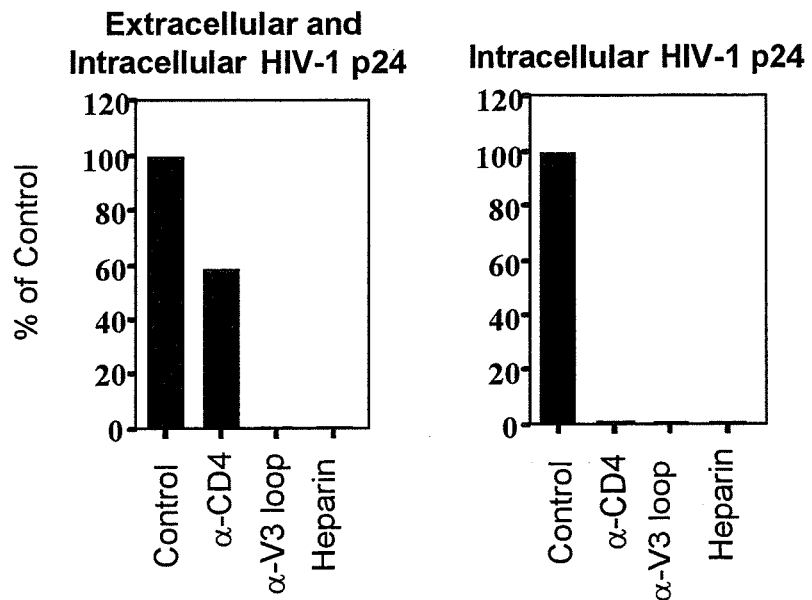


図3: ヘパリンはHIV-1の細胞への結合をブロックする



シュードプロテオグリカンの検定と構造解析

分担研究者 川崎ナナ（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

協力研究者 橋井則貴（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員）

研究要旨

シュードプロテオグリカン（シュードPG）の構造解析法の開発を目的として、ナノフロー液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析計（nanoLC/ESI-TOFMS）を用いたグリコサミノグリカン（GAG）オリゴ糖のプロファイリングを検討した。GAGオリゴ糖のモデルとして、低分子量ヘパリンであるパルナパリンを用いた。750 mmの逆相系C18カラムを用いることによって、分子量400～3,800 Daの範囲で、129種類のパルナパリンを分離・検出することができた。本分析法により、2～14糖からなるシュードPGの構成糖と硫酸結合数を決定することが可能となった。

A. 研究目的

グリコサミノグリカン（GAG）は、ウロン酸またはガラクトース、及びグルコサミンまたはガラクトサミンからなる2糖繰り返し構造をもつ分子量1万を超える高分子量糖鎖で、天然には構成糖が異なるヘパリン、ケタラン硫酸及びコンドロイチン硫酸などが存在する。シュードプロテオグリカン（シュードPG）は、ポリ-L-リジン等の直鎖高分子に、酵素的あるいは化学的に断片化したGAGオリゴ糖を共有結合させた人工プロテオグリカンで、抗HIV活性を示す。シュードPGの構造と活性の関係を明らかにするために、GAGの分子量分布や構造を解析する方法の開発が不可欠である。

GAGオリゴ糖の分子量分布を測定する方法として、従来からサイズ排除型クロマト

グラフィー（SEC）が利用されてきた。しかし、SECではおおよその分子量しかわからないため、正確な構成糖や硫酸基の数が分からないこと、また、糖や置換基の違いによる異性体を解析できないこと、などの理由により、最近では、逆相系カラムを用いた液体クロマトグラフィー/質量分析法（LC/MS）が検討されるようになってきた。代表的な例として、トリブチルアミン等のアルキルアミンを用いたイオンペア逆相クロマトグラフィーが報告されているが、LCの分離能改善のために添加したイオンペア試薬によって、MSの感度低下が生じるため、多量の試料（約50～100 nmol）が必要となるなど課題が多く残されている。

本研究では、抗HIV活性を示すシュードPGのGAG部分の構造解析法を開発する

ことを目的として、イオンペア試薬を用いずに LC/MS によって GAG オリゴ糖を分析する方法を検討した。GAG オリゴ糖のモデルとして、低分子量ヘパリンであるパルナパリンを用いた。ヘパリンは、ウロン酸 [β -D-グルクロン酸, (GlcA) または α -L-イズロン酸 (IdoA)] と α -D-グルコサミン (GlcN) からなる 2 糖が繰り返した高分子量糖鎖で、2 糖あたり 2~3 分子の硫酸基が結合している。パルナパリンは、ヘパリンを過酸化水素及び酢酸第二銅を用いて分解して得られた低分子量ヘパリンで、平均分子量は約 4,500~6,500、また 2 糖あたりの硫酸基の数は 2.0~2.5 である (図 1)。本年度は LC/MS 装置として、ナノフロー液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析装置 (nanoLC/ESI-TOFMS) を用いて、パルナパリン各分子種の分離及び検出を検討した。

B. 研究方法

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。

2) 試料の調製

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 \cdot 1 の H_2O

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 \cdot 1 の試料溶液に 20 \cdot 1 の 5% フェノールを加えて混和した後、200 \cdot 1 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 Paradaigm MS4 (Michrome 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 \cdot m), C18 カラム (0.2 mm x 750 mm, 3 \cdot m) 及びグラファイトカーボンカラム (0.2 x 150 mm, 5 \cdot 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 \cdot m の場合は 60 分間で 5-50% に、C18 カラム (0.2 mm x 750 mm, 3 \cdot 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 \cdot 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。

C. 研究結果

1) LC 条件の検討

はじめに、構成糖の数や種類及び硫酸基の結合数の違いによって生じる様々な分子種を分離するために、3種類のカラムを検討した。今回は、nanoLC で一般によく利用されている長さ 50 mm の C18 カラム、吸着力が高くオリゴ糖（分子量 900~4,500）の分析に利用されるグラファイトカーボンカラム、及び分離困難なペプチド混合物の分離等に用いられる長さ 750 mm の C18 カラムを選んだ。一回の分析に使用するパルナパリンは 18 nmol とし、溶離液はギ酸/アセトニトリルを用いた。測定はネガティブイオンモードで行った。

図 2A は 50 mm の C18 カラムを用いた nanoLC/ESI-TOFMS によって得られたパルナパリンのトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。保持時間が長くなるほど、分離が悪くなることがわかった。図 2B はグラファイトカーボンカラムを用いて得られた TIC である。吸着力の高いカラムを使用することで分離の改善を期待したが、50 mm の C18 カラムよりも分離能が悪かった。また糖鎖はアセトニトリルの濃度が 40% 以上になってから溶出されることから、アセトニトリルに対する溶解性の悪い糖鎖の分析には適さないと判断された。図 2C は 750 mm の C18 カラムを用いて得られた TIC である。図 2A と比較して、糖鎖がゆっくりと溶出され、たくさんのピークが見られること、また、25% 程度のアセトニトリル濃度で糖鎖の溶出が始まっていることから、パルナパリンの分離には 750 mm のカラムが適していると判断された。

このように、750 mm の C18 カラムを使

用することにより、感度低下を招くアルキルアミンなどのイオンペア試薬を溶離液に添加することなく、パルナパリンを分離できることが確認された。

2) オリゴ糖の構成糖及び硫酸基の数の決定

次に、ESI-TOFMS によって得られたマスペクトルから、構成糖や硫酸基の数を決定できるかどうかを検証した。図 3 は 750 mm カラムで得られたベースピーククロマトグラムである。約 41.5 分 (Region I) に取り込まれたマスペクトルを図 4A に示す。最も強度の高いイオン (m/z 594.0) は、同位体イオンの間隔が 1.0 であることから、1 価イオンであることが分かった。このイオンは計算質量 595.0 Da から、1 分子のウロン酸、1 分子のヘキソサミン及び 3 分子の硫酸基からなる disaccharide ($\text{HexA}_1\text{HexN}_1\text{S}_3$) と推定された。図 4B は 70.6 分付近 (Region II) で得られたマスペクトルである。 m/z 420.6, 440.6, 460.6, 480.6 及び 500.6 に検出されたイオンは、同位体イオンの間隔 (0.25) から 4 価イオンであることが分かった。 m/z 420.3 (4 価) のイオンは、計算質量 1686.4 Da から、 $\text{HexA}_4\text{HexN}_4\text{S}_4$ (理論値: 1686.2 Da) と推定された。 m/z 440.6, 460.6, 480.6 及び 500.6 に検出されたイオンは、 m/z 値の差 (20.0) から、硫酸基の数が異なる糖鎖、すなわち $\text{HexA}_4\text{HexN}_4$ に 5~8 分子の硫酸基が結合した糖鎖と帰属された。

以上のように、ESI-TOFMS から、パルナパリン分子種の構成糖の数、及び硫酸基の数を明らかにできることが確認された。

3) オリゴ糖の溶出位置の決定

さらに、750 mm のカラムにおける GAG オリゴ糖の溶出位置を明らかにするために、パルナパリン各分子種の溶出位置を特定した。構成糖 2 個以上、また硫酸基が 1 個以上結合したヘパリン由来オリゴ糖の理論値を計算し、エクストラクテッドイオンクロマトグラム (EIC) によって出現したピークの位置から、パルナパリン各分子種の溶出位置を決定した。例として図 5A に HexA₄HexN₄S₈ (理論値: 2086.0 Da) の溶出位置を決定した例を示す。HexA₄HexN₄S₈ の 4 価イオン (m/z 520.6) の EIC を描いたところ、3 本のピークが出現した。これらのピークのマススペクトルを確認したところ、同位体イオンからいずれも 4 価イオンであることが明らかになった。これらの 3 つのピークは、計算質量がいずれも HexA₄HexN₄S₈ の理論値に一致することから、HexA₄HexN₄S₈ の異性体であることが明らかとなった。また、図 5B は HexA₅HexN₅S₁₂ の溶出位置を特定した例である。HexA₅HexN₅S₁₂ (理論値: 2663.0 Da) の 5 価イオン (m/z 531.6) に相当する EIC 上に複数のピークが出現した。マススペクトルから、矢印で示した 4 本のピークが HexA₅HexN₅S₁₂ の異性体であることが確認された。

同様に、パルナパリン各分子種の溶出位置を特定した (表 1)。溶出位置と構造を確認できた糖鎖は 129 種類であった。パルナパリン分子種の帰属結果から、本分析法によって、構成糖 2~14 個 (分子量: 約 400~3,800 Da) で、硫酸基が 1~19 個結合している糖鎖を分離・構造確認できることが明らかになった。図 6 は帰属したオリゴ糖鎖の構成糖の数と、溶出時間の関係を

まとめたものである。はじめに 2 糖が溶出され、4, 6, . . . , 14 糖の順に溶出されることが分かった。また硫酸基の数の増加に伴い、保持時間が長くなる傾向がみられた。硫酸基の数は 2 糖当り 1~4 個 (平均 2.3 個) であり、過去の報告 (平均 2~2.5 個) とほぼ一致した。

以上のように、750 mm の C18 カラムを用いた nanoLC/ESI-TOFMS により、イオンペア試薬を用いることなく低分子量ヘパリンの分離・構造解析が可能であることが確認された。本分析法は、シュード PG の GAG オリゴ糖の構成糖及び硫酸基の数等の解析に応用可能であると思われる。

D. 考察

本研究では、シュード PG の GAG オリゴ糖の構造解析法を確立するために、nanoLC/ESI-TOFMS による GAG オリゴ糖のプロファイリングを検討した。一般的に使用されているカラムよりも長い 750 mm のカラムを用いて、モデルとして用いたパルナパリンの LC/MS を行い、パルナパリンを構成糖と硫酸基の数の違いで分離し、それぞれの構成糖数及び硫酸基結合数を明らかにできることを実証した。本分析法は、従来のイオンペア試薬を用いた方法に比べて、1/5 のサンプル量で GAG を検出することが可能であった。

しかし、分析法の課題も明らかになった。まず、本分析法では 4,000 Da 以上のオリゴ糖を検出することができなかった。この理由として、①冷アセトン沈殿による脱塩過程において 4,000 Da 以上の糖鎖が除去された、②サンプル中に存在する夾雑物によって、4,000 Da 以上の GAG オリゴ糖の

イオン化が阻止された、③4,000 Da 以上のオリゴ糖はイオン化効率が悪い、等が考えられた。まず、①については、フェノール/硫酸法を用いて、アセトン沈殿によるオリゴ糖の回収率が 98% であったことから否定されると思われる。②については、今後、イオン交換またはゲルろ過カラム等を用いた分析試料の前処理を検討する予定である。③については、オリゴ糖の揮発性を高めることによって解決できると考えられるので、今後、オリゴ糖の誘導体化を検討する予定である。

さらに、今回はオリゴ糖の質量測定しか検討しなかったため、詳細な構造情報を得ることができなかった。硫酸基等の結合位置の違いにより、シュード PG の抗エイズ活性が変わる可能性もあることから、今後より多くの構造情報が得られる方法が必要となるだろう。来年度以降、タンデム質量分析 (MS/MS) を用いた硫酸基及びアセチル基等の結合位置の確認についても検討する予定である。

E. 結論

750 mm の C18 カラムを用いた nanoLC/ESI-TOFMS により、GAG オリゴ糖のモデルとして用いたパルナパリンの 129 種類の分子種を帰属することができた。本分析法により、2~14 糖からなるシュード 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。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし