

V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

本研究では動物及び微生物起源多糖と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（シュードプロテオグリカン）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活性測定を行ってきた。しかしそれ自身が抗HIV活性を示すいくつかの硫酸化多糖を構成糖とする複合体は、いずれも多糖単独での活性と比較した場合、ほとんど有意な活性変化は認められなかった。しかし興味深いことに、Poly-L-lysine (PLL)骨格に多糖鎖として単独では活性のない非硫酸化デキストラン (H7) を導入したとき、MAGIC-5Aアッセイで顕著な活性が出現することを見出し、昨年度報告した。本年度はその新規化合物につき、さらに検討を加えた。その結果、この複合体の活性は合成後の複合体をゲル過により分離した異なる分子サイズのものでは差が見られないこと、また合成後の硫酸化によって活性が消失し、単独では活性を示さない（表1）-L-lysineをアセチルとアキビオチン化によりアミノ基修飾をした場合には活性が全くなくなることから、その活性発現には骨格分子のアミノ基が関与していることが示唆された（表2）。一方、骨格分子であるPLLの鎖長が長いもの、さらにはデキストラン鎖の鎖長が長いものがより強い抗HIV活性を示すことが明らかとなった（表3）。今回用いたPLLは、それ自体に非常に強い細胞毒性が認められたが、その骨格を毒性のない物質に変えることによってより実用的な抗HIV化合物が期待できる。

以上のように、合成アミノ酸ポリマーとデキストランというまったく抗エイズ活性とは関係のない物質同士の複合体形成により、新規の抗エイズ活性が出現したことは大きな意味を持つ。デキストラン硫酸のような硫酸化多糖の抗HIV活性に関しては多くの研究がなされており、それ自身が抗HIV活性を示すことはすでに知られていてその新規性は少ないが、硫酸基のないデキストラン誘導体による活性出現は画期的である。またその作用機作は正電荷を持つ物性から考えて、負電荷が活性発現に関与していると

考えられている硫酸化多糖のそれとは異なったものと考えられる。いくつかの有効な抗HIV薬が開発され、その複合投薬によりある程度の対処が可能となっている現在、最も期待されているのが従来とは異なった作用機作を持つ新たな化合物である。その意味で本研究で見出された新規抗HIV活性体は今後の創薬に向けての発展が大いに期待されるものである。

### D. 結論

単独では活性を示さないPoly-L-lysine (PLL)とデキストランの複合体が、MAGIC-5Aアッセイで顕著な抗HIV活性を示す。この複合体の活性は硫酸化およびアセチル化、ビオチン化によるアミノ基修飾で活性が完全に消失すること、さらにはPLLおよびデキストラン鎖のいずれも鎖長が長いものがより強い抗HIV活性を示すことが明らかとなった。この化合物群は物性から考えて新たな抗HIV活性機構が期待され、新規抗HIV活性薬剤への発展意味において非常に興味深く、今後の発展が期待される。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Muroi M. & Tanamoto K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- $\kappa$ B. *J. Leukocyte. Biol.* 83, 702-707, 2008
- 2) Sugimoto N, Tada A, Kuroyanagi M, Yoneda Y, Yun YS, Kunugi A, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. Survey of synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 49, 56-62. 2008
- 3) Hatao F, Yamamoto M., Muroi M., Kaminishi M. & Tanamoto K. MyD88-induced downregulation of IRAK-4 and its structural requirements. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 260-264, 2008

- 4) Kikuchi Y, Takeya T, Nakajima O, Sakai A, Ikeda K, Yamaguchi N, Yamazaki T, Tanamoto KI, Matsuda H, Sawada JI, Takatori K. Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein. *FEBS J.* 275, 2965-2976, 2008
- 5) Kawamura Y, Yamaguchi M, Mutsuga M, Sonobe H, Miyamoto S, Tanamoto K: Analysis of antimony and lead in pewtereares. *JJFC*, 15, 1-5, 2008.
- 6) Mutsuga M, Kawamura Y, Tanamoto K, : Semicarbazide in the sealing gasket of bottled food. *JJFC*. 15, 23-27, 2008.
- 7) 棚元憲一、室井正志、中川恭好、島圭介、市村克彦：日本薬局法指定菌株の特性と保存管理法に関する研究、*医薬品研究*、39, 309-312, 2008
- 8) Mutsuga M, Kawamura Y. & Tanamoto K. Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide. *Food Addit Contam.* 27, 1-8, 2008 160.
- 9) Mutsuga M, Yamaguchi M, Kawamura Y, Tanamoto K: Study on semicarbazide in the glass bottled foods *JJFC*. 15, 67-72, 2008.
- 10) Tatebe C., Kawasaki H., Sugimoto N., Sato K. & Tanamoto K. Quantitative analysis of polysorbates using liquid chromatography-mass spectrometry. *Lpn. J. Food Chem.* 15, 129-134, 2008
- 11) Kawasaki H., Tatebe C., Takagi S., Kawasaki Y., Hara T., Iizuka T., Sugimoto N., Sato K. & Tanamoto K. Analysis of polysorbates in foods. *Jpn. J. Food Chem.* 15, 122-128, 2008
2. 学会発表
- 7) 塩入利一、室井正志、畑尾史彦、西田正人、小川利久、三村芳和、棚元憲一、上西紀夫：エンドトキシンによる血管内皮細胞のアポトーシス誘導および可溶性 CD14, MD-2 の効果について、日本外科代謝栄養学会 第 45 回学術集会 (2008, 7)
- 8) 西田正人、畑尾史彦、比企直樹、小川利久、三村芳和、塩入利一、室井正志、棚元憲一、上西紀夫：TLR4/MD-2/CD14 定常発現細胞を用いた TLR4 刺激能測定による、グラム陰性菌への抗生剤投与後の LPS 生物活性の評価、日本外科代謝栄養学会 第 45 回学術集会 (2008, 7)
- 9) Masashi Muroi, Takahiro Ohnishi and Ken-ichi Tanamoto: TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- $\kappa$ B. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 10) Takahiro Ohnishi, Masashi Muroi, Ken-ichi Tanamoto: Dimerization of intracellular domain of TLR4 is not required for the activation of MyD88-independent signaling pathway. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 11) Kei-ichi Sugiyama, Masashi Muroi, Ken-ichi Tanamoto, Motohiro Nishijima, Yoshiko Sugita-Konishi: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 12) Nishida M., Hatao F., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y. Muroi M., and Tanamoto K.: New assay for biologically active of lipopolysaccharide using NF- $\kappa$ B activity in Toll-like receptor (TLR) 4/MD-2/CD14-transfected HEK293 cells. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 13) 杉山圭一、室井正志、葉袋裕二、棚元憲一、芳賀実、小西良子：デオキシニバレノールの Toll-like receptor シグナル伝達系に対する作用機構の解析、第 15 回日本免疫毒性学会学術大会 (2008, 9)

- 14) 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 との相互作用による TRAF6 の proteasome 依存性の分解、第 82 回日本細菌学会総会 (2009, 3)
- 15) 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：LPS 刺激は TRIF を TLR4 から解離させる、第 82 回日本細菌学会総会 (2009, 3)

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表1 高分子ポリマー-多糖複合体の抗HIV活性

サンプル	MAGIC5 アッセイ	
	CC	IC50
PLL1	NT	NE
PLL2	NT	NE
dextran	>220	NE
PLL1-dextran	>125	7.75
Large PLL1-dextran	>120	7.92
Small PLL1-dextran	>190	15.4
Large PLL2-dextran	>120	9.6
Small PLL2-dextran	>145	7.8
sulfated PLL1	<13.2	NE
sulfated PLL2	<13.2	NE
sulfated dextran	>260	120
sulfated PLL1-dextran	42.0	NE
sulfated PLL1-dextran	61.0	NE
AZT	>1 $\mu$ M	0.0062 $\mu$ M
DS8000	500 $\mu$ g/ml	45.0 $\mu$ g/ml

PLL1: 分子量 15-30K

PLL2: 分子量 40-60K

Dextran: 分子量 10K

DS8000: デキストラン硫酸 MW: 8000

NE: not effected

表2 高分子ポリマー-多糖複合体の抗 HIV 活性

サンプル	MAGIC5 アッセイ	
	CC	IC50
dextran	0	NE
acetylated dextran	0	NE
biotinylated dextran	0	NE
PLL1	7.6	NE
acetylated PLL1	>245	NE
biotinylated PLL1	15.9	NE
Acetylated/biotinylated PLL1	645	NE
PLL2	7.6	NE
acetylated PLL2	270	NE
biotinylated PLL2	1.76	NE
Acetylated/biotinylated PLL2	155	NE
PLL1-dextran	120	17.3
acetylated PLL1-dextran	>65	NE
biotinylated PLL1-dextran	>2.1	NE
Acetylated/biotinylated PLL1-dextran	>44.5	NE
PLL2-dextran	150	2.7
acetylated PLL2-dextran	>110	NE
biotinylated PLL2-dextran	95	NE
Acetylated/biotinylated PLL2-dextran	>46	NE
DS8000	>500 $\mu$ g/ml	45.0 $\mu$ g/ml
TAK779	>1 $\mu$ M	0.047 $\mu$ M

PLL1: 分子量 15-30K

PLL2: 分子量 40-60K

Dextran: 分子量 10K

DS8000: デキストラン硫酸 MW: 8000

NE: not effected

表 3. 抗 HIV 活性に及ぼす、高分子ポリマー及び多糖の鎖長の影響

サンプル	MAGIC5 アッセイ	
	CC	IC50
PLL(short)-dextran(long)	42.5	5.8
PLL(short)-dextran(short)	>15	33
PLL(long)-dextran(short)	>52.5	4.4

## 種々のシュードプロテオグリカン型薬剤の抗HIV増殖抑制効果と作用機序

研究分担者 牛島 廣治 藍野大学藍野健康科学センター  
研究協力者 山本 直彦 名古屋大学大学院医学系研究科医動物学  
沖津 祥子 藍野学院短期大学藍野健康科学センター

### 研究要旨

シュードプロテオグリカン (PPG) がHIVの吸着阻害を示すことを幾つかの方法で確認できた。それ以外に逆転写酵素阻害など他のメカニズムも考えられた。逆転写酵素およびプロテアーゼ阻害薬耐性ウイルスについても効果があり耐性ウイルスに使用可能と思われた。今後、ペプチドおよび糖鎖を代えることにより、さらに有効な抗HIV薬の開発が期待される。

### A. 研究目的

シュードプロテオグリカン (PPG) が抗HIV増殖抑制効果を有することがわかり、より有効なものを求めるとともに、その作用機序について平成18年、19年に続いて解明する。I) 種々のPPGおよびそのコンポーネントとなるペプチドおよび糖鎖について抗HIV活性を見る。II) 細胞へHIVを感染させる前にPPGを作用させる (Pretreatment)、感染時に作用させる (Treatment)、および細胞へHIVを感染させた後に作用させる (Posttreatment) で、PPGの作用を見る。III) さらに感染時、感染後の作用を詳細に見るために、細胞あるいはウイルスへのPPGの反応を調べる。

PPGの細胞への吸着あるいはウイルスへの結合を見る。及び逆転写酵素、インテグラーゼ、糖鎖合成、放出への影響を見る。

IV) PPGの糖鎖の新規候補としていくつかの糖鎖コンポーネントについて抗HIV活性を試みる。

### B. 研究方法

I) 糖鎖の1つの候補と考えられるブチルデオキシノジリマイシン (コントロール) およびデオキシノジリマイシン (DNM) 誘導体5個について抗HIV活性を調べた。MOLT4/IIIB細胞の培養液中に希釈した薬剤を入れ培養後、N4X4 /GFP細胞と融合させGFP陽性細胞を数えた。

II) 持続感染細胞 MOLT4/IIIB と非感染 MOLT4 と混合の前、最中、後 (Pretreatment, Treatment, Posttreatment) において PPG を作用させて巨細胞形成能を見た。Pretreatment は非感染細胞に PPG を一定時間反応させることにより、巨細胞形成抑制あるいは増強因子の出現の可能性をみること、Treatment はウイルスあるいは細胞に作用して抑制があるかどうか、Posttreatment は感染した後の段階に影響及ぼすかを調べた。Posttreatment は逆転写、インテグレーション、糖鎖結合あるいはウイルス放出をねらったが、細胞内への PPG の侵入がなければ逆転写、インテグレーション、糖鎖には影

響がない。この実験では既に抗 HIV 活性の高い P4H18[PLL(15-30k)-dextranT10(10K)fraction 58-67 を使用した。PPG 添加は 72 時間前、48 時間前、24 時間前、1 時間前、感染時 (0 時間)、4 時間後で行った。判定は明らかに巨細胞形成が PPG のないコントロールと同等の場合を 2 (+) とコントロールの約半数の巨細胞形成が見られるものを 1 (+) とした。添加する PPG は感染時の実験 (P 4, H18, P4H18) で 100% 抑制があった 1000  $\mu$ g/ml を用いた。コントロールとして薬剤なしでの感染を行った。実験は 2 重で行った。

III) 逆転写に対する影響

III-1) 逆転写酵素活性に対する PPG 作用

逆転写酵素活性測定キット (CAVIDI AB社) を用い、マウスレトロウイルスの逆転写酵素反応の段階に PLL (15-30K), dextranT10(10K), PLL(40-60K)-dextran T10(10K) 入れ 100% 逆転写酵素反応系が阻害されるかを調べた。

III-2) PPG の HIV 結合、細胞への影響

HIV の結合については分担者の星野が EnvV3 の先端以外が関係することを述べている。我々は HIV の WB (ダイナボット) を利用し、ビオチン化 PPG がどの構成蛋白と結合するか調べた。また Latex に PPG を被覆させ (Latex-PPG)、PPG 特有のモノクローナル抗体と反応し凝集すること、同時に HIV と Latex-PPG が反応し凝集することを確認する。さらに Latex-PPG がリンパ球、マクロファージと結合するか、MOLT-4/IIIB と反応するかを調べた。

IV) PPG 候補としてのデオキシノジリマイシン (DNM) 誘導体

DNM とブチル DNM に対するポリクローナル抗体を家兎で作製した。各々の抗 HIV 活性については I) で述べた通りである。現在の PPG が細胞外のみならず細胞内に取り込まれるとした場合には、細胞内での糖鎖の修飾を目的としても利用可能と考え行った。

### C. 研究結果

I) DNMの誘導体DNM-6-phosphate, methylDNM-6-phosphateの抗HIV作用を見たところIC50はブチルDNM (9  $\mu$ g/ml)あるいはそれ以上程度であった(表I)。

II) Pretreatmentでは効果なく、Post-treatmentではわずかに、そしてTreatment時には完全に抑制を示した。すなわち吸着、融合に強く影響を与えていることがわかった。Post-treatmentには軽度の作用を示しており、これが吸着、融合の阻害効果が続いているのか、その後のウイルスのライフサイクルに影響をわずかに及ぼしているのかと考えられた(表II-1)。

III-1) in vitroでの逆転写酵素活性阻害を見たところPLL(15-30K)は100  $\mu$ g/mlで、PLL(40-60K)-dextran T10(10K)は1  $\mu$ g/mlで抑制が見られ、dextran T10(10K)では抑制がなかった(表III-1、図III-1)。

III-2) PPGのHIVへの結合および細胞膜への影響：PPGのうち、PLLデキストランについては2つのモノクローナル抗体ができたがPLLヒアルロン酸についてはできなかった(図III-3)。

HIVのWB(ダイナボット)へのビオチン化PLLおよびビオチン化PLL-dextran結合を見たところ、両者ともHIVのほとんどの蛋白と薄く結合した。今後検討が必要だが非特異反応の可能性はある(詳細省略)。

また、ラテックス粒子をPLL-dextranで被覆したものはPLL-dextran抗体と反応を示し、凝集が見られた。逆にラテックス粒子をPLL-dextran抗体で被覆したものはPLL-dextranと反応した。

ラテックス粒子をPLL-dextranで被覆したものは培養HIVと凝集を示し、さらに感染細胞MOLT4/IIIBにも凝集(ロゼット様)を来した。マウスのマクロファージ株化細胞RAW264.7(非感染細胞)との反応は弱く認められ(ロゼット形成)、ヒト末梢血T細胞には反応が見られなかった。したがってPLL-dextranはHIVおよびHIV感染細胞に結合するとともにマクロファージ系細胞にも結合しうることが示唆された。尚コントロールとした非感作ラテックス粒子との凝集はなかった。PLL-dextranが細胞に結合し細胞内に到達するかは今後検討が必要である。

IV-1)  $\beta$ グリコシダーゼ立体構造の両端に糖鎖が結合する。HIVの糖鎖がそこに関係し、HIVのアスパラギンと結合している。DNMが結合することにより $\beta$ グリコシダーゼの構造が変化し糖鎖の修飾が抑制されると考えられる。 $\alpha$ グリコシダーゼと $\beta$ グリコシダーゼは構造上類似しており、DNMの $\alpha$ グリコシダーゼへの作用も同じと考えられる。

IV-2) DNMおよびブチルDNMのポリクローナル抗体の作製ができた。それぞれ濃度依存性のOD値を酵素抗体法で見ることができた。また、抗体は交差反応を示した。

#### D. 考察

PPGはPretreatmentでは効果がないことから、インターフェロン等のサイトカインの産生には関係がない。Posttreatmentにも多少の効果があること、試験管内

ではあるが逆転写酵素阻害作用があることから、吸着以外のPPGの作用も考えられた。Posttreatmentは逆転写、インテグレーション、糖鎖結合あるいはウイルス放出を考えたが時間的にできなかった。今後の展望についてはHIVとPPGの結合様式を詳細にみるために細胞因子が明らかになれば、X線での構造解析に持っていきたい。またサイクロフィリンとの結合についても構造解析をしたい。PLL-デキストランの抗体を用いてPLL-デキストランの細胞表面への吸着、細胞内への侵入の有無についても研究を行いたい。またHIV構造蛋白の部分蛋白を大腸菌で発現させ、結合部位を決定したい。PPGの糖鎖をDNMなどに代えて、細胞内でも効果を期待できる化合物を作製し、その効果を期待したい。

#### E. 結論

PPGは、サイトカインなどの誘導はなく、直接HIVの吸着阻害を示すが、それ以外に逆転写酵素阻害などのメカニズムも考えられた。逆転写酵素およびプロテアーゼ阻害薬耐性ウイルスについても効果があり耐性ウイルスに使用可能と思われる。今後、ペプチドおよび糖鎖を代えることにより、さらに有効な抗HIV薬の開発が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr;46(4):1169-73. Epub 2008 Jan 30.
- 2) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol.* 2008;153(4):667-74. Epub 2008 Feb 14.
- 3) Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin. *Emerg Infect Dis.* 14(4): 686-688, 2008.
- 4) Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr.* 2008 Apr;54(2):102-13. Epub 2008 Mar 4.
- 5) Rathore A, Chatterjee A, Sood V, Khan SZ, Banerjee AC, Yamamoto N., Dhole TN. Risk



- for HIV-1 infection is not associated with repeat-region polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC-SIGN variants among North Indians *Clin Chim Acta* 2008 May; 391(1-2): 1-5.
- 6) Pham NTK, Trinh, QD, Khamrin P, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Med Virol* 2008 Jul; 80(7):1222-1227.
  - 7) Rathore A, Chatterjee A, Sivarama P, Yamamoto N., Singhal PK, Dhole TN. Association of RANTES\_403 G/A, \_28 C/G and In1.1 T/C polymorphism With HIV-1 transmission and progression among North Indians. *J Med Virol* 2008 Jul; 80(7):1133-1141.
  - 8) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrheic. *Emerg Infect Dis*, 14(6): 985-986, 2008.
  - 9) Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WE. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat Prod Res.* 2008 Jun; 25(3):455-474. Epub 2008 Apr 8.
  - 10) Dey SK, Islam A, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiological and molecular analysis of astrovirus gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Trop Pediatr* 2008 Dec, 54(6):423-425. Epub 2008 Jul 9.
  - 11) Khamrin P, Peerakome S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *Virus Genes.* 2008 Aug 12; 37: 314-321. [Epub ahead of print]
  - 12) Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*, 2008 Aug 19; 80(10):1749-1755. [Epub ahead of print]
  - 13) Rathore A, Chatterjee A, Yamamoto N, Dhole TN. Absence of H186R polymorphism in exon 4 of the APOBEC3G Gene among North Indian individuals. *Genet Test* 2008 Sep; 12(3):453-456.
  - 14) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol* 89(pt 9): 2275-2279, 2008.
  - 15) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P[10] human rotavirus strain. *J Med Virol* 2008 Nov 21; 81(1): 176-182.
  - 16) Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N. Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities. *J Med Virol* Nov 21; 81(1): 183-191.
  - 17) Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses. *J Virol Method*, 2008 Dec 4. [Epub ahead of print]
  - 18) Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol* 2009 Feb; 81(2): 345-353.
  - 19) Dey SK, Hayakawa Y, Rhaman M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2009 Jan; 15(1): 91-94.
  - 20) Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009 Jan 6 [Epub ahead of print]
  - 21) Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print]
  - 22) Usami M, Trinh QD, Yagy F, Hayakawa Y, Inaba N, Okitsu S, Phan TG, Ushijima H. Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells,

trophoblasts, and breast milk cells. Clin Lab, in press.

2. 学会発表

- 1) 牛島廣治、早川有子、清水優子、沖津祥子、山本直彦. HIV陽性母乳の加熱不活性化についての研究 第23回日本母乳哺育学会学術集会(2008.10.4-5) 岡山
- 2) 牛島廣治、早川有子、Phengxay Manilay、清水優子、沖津祥子、山本直彦: どこでも出来る固形アルコール燃料と飲料アルミ缶を用いたHIV陽性母乳の加熱不活性化について 第23回日本国際保健医療学会学術集会(2008.10.25-26) 東京

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

表I) デオキシノジリマイシン誘導体のIC50

Drug	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
DH15-84-1	10
DH15-84-2	30
DH15-84-3	>100
DH15-84-4	90
DH15-84-5	>100
N-butyl deoxynojirimycin	9

DH15-84-1-4にはいずれもdeoxynojirimycin及びN-methylDNMに相当する質量が観測された。

DH15-84-5はほぼ純粋なN-methyl - DNM-6-phosphateである。

また、DH15-84-4にはN-methyl - DNM-6-phosphateが含まれる。

表II-1) PPGのPre-treatment, Treatment, Post-treatmentでの巨細胞形成に関する効果

P4H18(1000 $\mu\text{g/ml}$ )	Giant cell formation
before 3days	2+
before 2days	2+
before 1day	2+
before 1hours	2+
at infection	—
after 4 hours	1+
control	2+

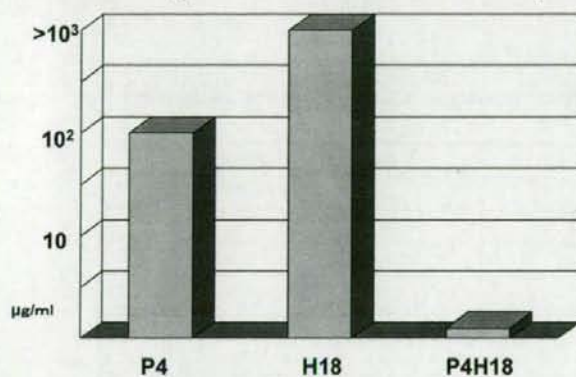
参考 巨細胞形成能: P4とH18に巨細胞形成阻害はみられなかったため、効果のみられたP4H18(1000  $\mu\text{g/ml}$ )で、経時的添加による効果を検討した。

Sample	Toxicity	100%inhibition
P4: PLL (15-30 k)	20 $\mu\text{g/ml}$	>20 $\mu\text{g/ml}$
H18: dextran10 (T10)	>2000 $\mu\text{g/ml}$	>2000 $\mu\text{g/ml}$
P4H18: PLL(15-30 k)-dextran T10 (10 k) fraction 58-67	>2000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$

表III-1) 逆転写酵素阻害

Sample	100%inhibition
P4: PLL (15-30 k)	100 $\mu$ g/ml
H18: dextran10 (DA10)	>1000 $\mu$ g/ml
P4H18: PLL(15-30 k)-dextran T10 (10 k) fraction 58-67	1 $\mu$ /ml

Table III-1)  
100% Inhibition against murine reverse transcriptase



P4 : PLL (15-30 k)

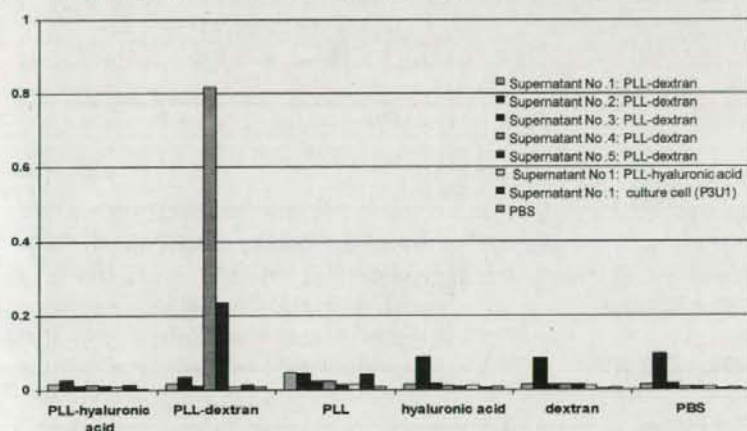
H18 : dextran10 (DA10)

P4H18 : PLL(15-30 k)-dextran T10 (10 k) fraction 58-67

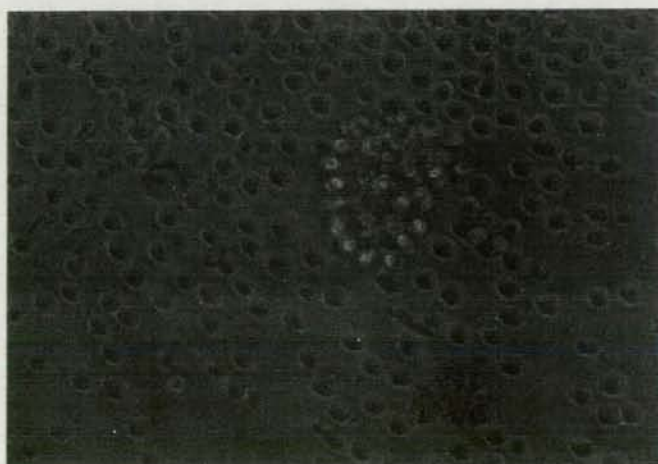
表III-3) PLL-デキストランに対するモノクローナル抗体の作成  
 (左欄のNo. 4とNo. 5のモノクローナル抗体がPLL-デキストランと反応した)

	PLL-ヒアルロン酸	PLL-デキストラン	PLLのみ	ヒアルロン酸のみ	デキストランのみ	PBSのみ
PLL-デキストラン 上清No.1	0.018	0.019	0.046	0.016	0.016	0.015
PLL-デキストラン 上清No.2	0.025	0.036	0.045	0.087	0.086	0.098
PLL-デキストラン 上清No.3	0.011	0.013	0.024	0.017	0.016	0.017
PLL-デキストラン 上清No.4	0.014	0.818	0.022	0.013	0.015	0.010
PLL-デキストラン 上清No.5	0.011	0.236	0.016	0.009	0.016	0.010
PLL-ヒアルロン酸 上清No.1	0.010	0.009	0.016	0.011	0.011	0.009
P3U1培養上清	0.016	0.014	0.040	0.005	0.004	0.004
PBS	0.002	0.008	0.010	0.008	0.007	0.006

Figure III-3) Reactions of supernatant of hybridoma cells against PLL-dextran and others (OD value)



(Supernatant No.4 and No.5 against PLL-dextran are only positive against PLL-dextran.)



PPG感作ラテックスによるHIV感染細胞(MOLT4/III B)の凝集能(40X)

## 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

研究分担者 星野 洪郎 群馬大学医学系研究科教授

### 研究要旨

コアタンパク質の代わりにpoly-L-lysine (PLL)にグリコサミノグリカン (GAG) が共有結合したシュードプロテオグリカン (シュードPG) の抗ウイルス作用について検討した。様々なGAG鎖と異なる分子量の骨格分子を持つシュードPGで、マクロファージ指向性あるいはT細胞指向性のHIV-1の感染を抑制した。Dextran T10が共有結合した $\alpha$ -PLL (P4H18) は、高濃度でR5ウイルスのEnvを介した細胞融合を抑制した。ウイルスの細胞吸着および侵入阻害実験から、P4H18は主にウイルス側に作用することで細胞への吸着を阻害し、さらには細胞へのウイルス吸着後の侵入過程も抑制していることが明らかとなった。HIV-1のEnv V3の先端に結合する抗V3単クローン抗体とP4H18との結合阻害実験により、高濃度でも結合阻害が見られないことから、シュードPGは、R5及びX4ウイルスのEnv V3の先端部分以外に結合し、標的細胞へのウイルスの吸着および侵入を阻害することが示唆された。

### A. 研究目的

シュードプロテオグリカン (シュードPG) は、コアタンパク質の代わりにpoly-L-lysine (PLL)または、polyacrylamide (PAA)に複数のグリコサミノグリカン (GAG) が共有結合した人工分子である。このシュードPGは細胞表面に存在する天然のPGと似た働きをする。

HIV-1のマクロファージへの感染の際に、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) への結合により、感染が促進されることが報告されている。一方、本研究で作成したヘパリンを含むシュードPGに抗HIV-1活性があることが分かった。また、シュードPG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の感染性を保護する効果を持つサイクロフィリンA (CypA) と強く結合することが分かった。従ってシュードPGを活用すれば、HIV-1ウイルスのマクロファージへの接着を有効に阻害し、かつCypAをブロックしてHIV-1に対する宿主細胞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ことを期待される。本研究では、色々のGAG鎖と異なる分子量をもつシュードPGを調製し、その抗HIV活性を検討し、その抗HIV-1作用メカニズムを明らかにすることを研究目的とする。

### B. 研究方法

#### NP-2/GFP細胞

本研究では、ヒトグリオーマ由来のNP-2細胞に、CD4、およびCCR5あるいはCXCR4を発現させたN4R5/GFP、およびN4X4/GFP細胞を用いた。これらの細胞はHIV-1 LTRの下流に核局在シグナルが融合したGFP遺伝子が導入されているがGFP発現の無いクローンを用いている。そのため感染により細胞核内にGFPの発現が誘導される。

#### ウイルス

マクロファージ指向性でCCR5を使用するHIV-1 (R5ウイルス)としてBaL株、T細胞株指向性でCXCR4を使用するHIV-1 (X4ウイルス)としてIIIB株を使用した。BaL株およびIIIB株は、C8166/CCR5細胞に感染させ、上清を回収し、0.45 $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌し、-80 $^{\circ}$ Cに凍結保存し、用いた。

#### 薬剤

骨格分子として分子量の異なるPAA、ヒドラジノ化PAA、 $\alpha$ -PLLあるいは $\epsilon$ -PLLを使用した。骨格分子に共有結合させるGAG鎖として、heparin, dextran sulfate (DS) (8 kD)、dextran T10, dextran T20, hyaluronan, D-mannose, mannotriose, mannopentaose, およびmannanを使用してシュードPG合成を行った。また各骨格分子、GAGおよびシュードPGを硫酸化あるいはアセチル処理した。抗HIV剤のコントロールとしてheparinおよびAZT, DS (8 kDまたは50 kD)を使用した。

#### 抗ウイルス活性試験

N4R5/GFPまたはN4X4/GFP細胞を5,000個/100 $\mu$ lで96-well plateの各wellに播種した。翌日薬剤をEMEM/10%FBS培地で段階希釈して10 $\mu$ l各wellに加えた。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、HIV-1 BaL株あるいはIIIB株100 $\mu$ lを、GFP陽性細胞数が1wellあたり50-200個出る濃度で感染させた。2日後GFP陽性細胞数をカウントし、薬剤を添加していない対照と比較し、感染を50%抑制する濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

#### 細胞融合抑制試験

N4R5/GFPあるいはN4X4/GFP細胞は、HIV-1 Envを発

現している細胞と混合培養すると合胞体（多核巨細胞）を形成する。さらに細胞がTatを発現していると合胞体の核がGFP陽性となるので、合胞体形成を判定しやすい。R5あるいはX4ウイルスのEnvおよびTatを発現している細胞としてHeLa/Menv/Tat細胞あるいはHeLaKS386細胞を用い、N4R5/GFP細胞あるいはN4X4/GFP細胞と薬剤存在下で混合培養し、合胞体形成への影響を検討した。

#### 細胞毒性試験

薬剤の50%細胞毒性濃度（ $CC_{50}$ ）は、N4R5/GFP、N4X4/GFP細胞に薬剤を添加し、培養2日後にTetracolor oneを加え、 $OD_{450}$ を測定して算出した。また、 $IC_{50}$ と $CC_{50}$ の比を指標としてselectivity index (SI) ( $CC_{50}/IC_{50}$ ) を算出した。

#### p24 ELISA

p24の測定はELISA法で行った。すなわち、p24に対する単クローン抗体で、ELISAプレートをコートし、ブロッキングの後にHIV-1抗原を加えた。HIV-1陽性ヒト血清を反応させ、次にHRP標識抗ヒトIgGの結合後、基質を加えて発色させた。 $OD_{450}$ をプレートリーダーで測定した。

#### 細胞およびウイルスのシュードPG処理による抗ウイルス効果の検討

シュードPGの抗ウイルス作用を解析するために、シュードPGがウイルスあるいは細胞のどちらに作用しているか検討した。ウイルス側への作用を解析するために、シュードPGとBaL株あるいはIIIB株を37°Cで1時間処理し、N4R5/GFPあるいはN4X4/GFP細胞に感染させた。細胞への作用を解析するために、シュードPGをN4R5/GFPまたはN4X4/GFP細胞に添加し、37°Cで1時間処理し、薬剤を洗浄除去後、BaL株あるいはIIIB株を感染させた。感染2日後にGFP陽性細胞をカウントして感染価を算出した。

#### HIV-1の細胞への吸着・侵入阻害試験

細胞へのウイルス吸着は、N4X4/GFP細胞と薬剤と反応させたX4ウイルスを1時間4°Cで反応させ、未吸着のウイルスを洗浄除去後、細胞溶解液中に含まれるp24をELISA法で定量し判定した。細胞内に侵入したウイルスは、細胞、ウイルスおよび薬剤を37°Cで1時間培養し、未吸着のウイルスを洗浄除去後にELISAを行い定量した。吸着後、細胞内に侵入するウイルスの定量は、N4X4/GFP細胞にX4ウイルスを4°Cで1時間吸着後、薬剤を添加し、37°Cで1時間培養後、未吸着のウイルスを洗浄除去し、ELISA法で定量した。

#### HIV-1 Env V3領域への結合阻害実験

HIV-1 Env V3とシュードPGの結合を解析するため、HIV-1が持続感染しているMOLT-4/IIIB細胞を薬剤で処理し、マウス抗V3単クローン抗体と反応させ、FITC

標識抗マウス抗体の結合後、flow cytometryでシュードPGのV3への結合を調べた。コントロールとしてV3に結合するheparinを用いた。

#### 産生ウイルスの感染性への影響

シュードPGの感染後期過程における影響は以下のように検討した。MOLT-4/IIIB細胞に薬剤を添加し、3日培養後、培地交換して薬剤を添加し、さらに3日間培養し、培養上清中のウイルスの感染性をN4X4/GFP細胞に感染させて調べた。コントロールとして糖鎖修飾阻害剤のN-butyl deoxynojirimycin (N-buDNJ)を使用した。同時に薬剤によるMOLT-4/IIIB細胞への毒性効果をTetracolor oneにより検討した。

#### C. 研究結果及び考察

色々のGAG鎖と異なる分子量の骨格分子を持つシュードPGについて、マクロファージ指向性R5およびT細胞指向性X4のHIV-1に対する感染抑制効果を検討した。表1に示すようにGAG鎖および骨格分子のみでは感染抑制効果見られなかった。ネオプロテオグリカン合成反応により分子量の異なるdextranT10, T20を4kD以上の分子量を持つ $\alpha$ PLLに共有結合したシュードPGは、R5およびX4ウイルスに対して感染抑制効果を示した。また、シュードPGは硫酸化、アセチル化により感染抑制効果が低下することが明らかとなった。GAG鎖にmannotriose, hyaluronanを用いたシュードPGもX4ウイルスに対してのみ感染抑制効果を示した。興味深いことに硫酸化したhyaluronanは、dextranT10と同様にGAG単独でX4ウイルスに対して感染抑制効果を示した。また、P4H18, P7H7は、高濃度でR5ウイルスのEnvを介した細胞融合を抑制した。

シュードPG合成に用いた骨格分子、GAG鎖およびシュードPGについて細胞毒性効果を調べた。4から60kDの分子量の $\alpha$ PLLは、高濃度で細胞毒性効果を示した。 $CC_{50}$ は25-55  $\mu$ g/mlであった（表1）。

以上の結果からR5およびX4ウイルスの感染及びR5 Envの合胞体形成阻害効果を持つP4H18について、シュードPGの感染抑制メカニズムの検討を行った。

初めにシュードPGが、ウイルス側あるいは細胞側のどちらに作用しているか検討を試みた（図1）。P4H18は細胞側に処理すると、R5およびX4ウイルスの感染を若干抑制した（図1A）。ウイルス側に処理すると、R5およびX4ウイルスの感染抑制を著しく抑制した（図1B）。このことからシュードPGは主にウイルス側に作用することで感染抑制効果を示すことが示唆された。

次にシュードPGが、ウイルスの細胞への吸着あるいは侵入を阻害するか検討した（図2）。シュードPGによる細胞へのウイルス吸着を阻害する効果を4°Cで調べた（図2A）。P4H18は、濃度依存的に細胞

への吸着を阻害した。100  $\mu$ g/ml ではウイルスの吸着をコントロールの約 80% に阻害した。また吸着阻害の陽性コントロールとして用いた 100  $\mu$ g/ml のヘパリンでは約 40% の吸着阻害効果を示した。37°C での細胞へのウイルス吸着侵入阻害実験から、P4H18 はコントロールに比べてウイルスの細胞内への侵入を約 90% に抑制した (図 2B)。次に細胞へのウイルス吸着後の細胞内侵入過程をシュード PG が阻害するか検討した (図 2C)。P4H18 は細胞へのウイルス吸着後の侵入過程も抑制していることが明らかとなった。以上の結果からシュード PG はウイルスの細胞への吸着および侵入を阻害することが示唆された。

ウイルスの細胞への吸着の阻害剤として用いられる heparin は、HIV-1 Env の V3 領域と結合し、吸着を阻害することが知られている。シュード PG が HIV-1 の Env V3 の先端と結合し、抗 V3 単クローン抗体の V3 領域への結合を阻害するかどうかを検討した (図 3)。Heparin は 100  $\mu$ g/ml で処理すると V3 と抗 V3 単クローン抗体との結合を阻害したが、P4H18 は、高濃度で処理しても結合を阻害しなかった。このことからシュード PG は、V3 領域に結合し抑制しているのではない可能性が示唆された。

これまでの結果から、シュード PG は主に感染前期過程に作用することが示唆されたが、感染後期過程の産生ウイルスに対するシュード PG の効果も検討した (表 2)。HIV-1 持続感染 MOLT-4/IIIB 細胞から産生された HIV-1 ウイルスの感染性を定量したが、シュード PG の明らかな影響は見られなかった。

以上の結果から、シュード PG は、R5 及び X4 ウイルスの Env V3 の先端以外に作用して、標的細胞への HIV-1 の吸着および侵入を阻害することが示唆された。

#### D. 結論

シュード PG は、R5 及び X4 ウイルスの Env V3 の先端部分以外に結合し、標的細胞へのウイルスの吸着および侵入を阻害することが示唆された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimizu, N., A. Tanaka, T. Mori, T. Ohtsuki, A. Hoque, A. Jinno-Oue, C. Apichartpiyakul, S. Kusagawa, Y. Takebe, and H. Hoshino. A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus. *Retrovirology* 5:52(2008).
- 2) Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, C. Apichartpiyakul and H. Hoshino. A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as co-receptors for human and simian

immunodeficiency viruses. *J. Gen. Virol.* 89:3126-3136 (2008).

- 3) Shimizu, N., A. Tanaka, A. Oue, T. Mori, T. Ohtsuki, C. Apichartpiyakul, H. Uchiumi, Y. Nojima, and H. Hoshino. 2008. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of human immunodeficiency virus Article type. *AIDS* In press.
- 4) Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H. Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix. *Br J Dermatol.* 2008 Jun;158(6):1273-9.

##### 2. 学会発表

- 1) 清水宣明、大上厚志、田中淳、Saha M. Narayan, Hoque Ariful, 品川雅彦、大槻貴博、森隆久、和田成一、浜田信行、舟山知夫、小林泰彦、星野洪郎。重粒子線照射ヒトグリオーマ細胞のヒト免疫不全ウイルス 1 型感受性の亢進。第 12 回日本神経ウイルス研究会 2008 年 7 月 (鹿児島)
- 2) Shimizu, N., A. Oue, A. Tanaka, T. Mori, I. Salequl, T. Ohtsuki, H. Uchiumi, Y. Nojima, S. Kusagawa, Y. Takebe, C. Apichartpiyakul, and H. hoshino. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors by primary isolates of human immunodeficiency viruses. The seventh Japan-China International Conference of virology (2008), Tokyo.
- 3) Oue, A., N. Shimizu, N. Hamada, S. Wada, A. Tanaka, M. shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, M. Saha, A. Hoque, I. salequl, K. Kogure, T. Funayama, Y. Kobayashi, and H. Hoshino. Cellular senescence unduced by irradiation with carbon ion beam. The 4<sup>th</sup> International symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology (2008), maebashi.
- 4) Hoshino, H., N. shimizu, A. Oue, A. Tanaka, M. Shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, S. Islam, Y. Kobayashi, S. Wada, N. Hamada, T. Funayama, I. Narumi. Virological and molecular biological analyses of cellular phenotype-changes induced by irradiation with heavy ion beams. The 4<sup>th</sup> International symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology (2008), maebashi.
- 5) 大上厚志、清水宣明、田中淳、品川雅彦、大槻貴博、森隆久、Ariful Hoque, Salequl Islam, 浜田信行、小林泰彦、舟山知生、星野洪郎。ヒトグリオーマ由来細胞株への重粒子線照射による細胞老化の誘導。第 3 回高崎量子応用研究シンポジウム (高崎)



- 6) Hoque SK Ariful, 大上厚志、清水宣明、田中淳、大槻貴博、星野洪郎. Incorporation of non-susceptible bystander cells into HIV-1 syncytia. 第 22 回日本エイズ学会学術集会 (2008)大阪
- 7) 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、Islam Salequl, 和田成一、舟山知生、浜田信行、小林泰彦、星野洪郎. 重粒子線が細胞の

HIV-1-1感染感受性におよぼす効果の解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (2008)岡山

F. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

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)

表1. シュードPGの抗ウイルス活性

Code	Drug	IC <sub>50</sub> (μg/ml) *1				Selectivity index CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub>				
		Infection		Coculture		Infection		Coculture		
		BaL	IIIB	HeLa/M-emv/Tat	HeLaKS386	CC <sub>50</sub> (μg/ml)	BaL	IIIB	HeLa/M-emv/Tat	HeLaKS386
H7	Dextran T10	>100	>100	ND*2	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H8	Dextran T20	>147.5	>147.5	ND	ND	>100	<0.8	<0.8	ND	ND
H18	Dextran DA10	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P2	αPLL (1-4k)	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P3	αPLL (4-15k)	>1	>1	>1	>1	35	<35	<35	<35	<35
P4	αPLL (15-30k)	>1	>1	>1	>1	25	<25	<25	<25	<25
P7	αPLL (40-60k)	>6	>6	ND	ND	55	<16.7	<16.7	ND	ND
P8	αPLL	>1300	>1300	ND	ND	>100	<0.08	<0.08	ND	ND
P2H18	αPLL (1-4k)-dextran DA10	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
P3H18	αPLL (4-15k)-dextran DA10	3	3	>100	>100	>100	>33	>33	<1	<1
P4H18	αPLL (15-30k)-dextran DA10	2	0.5	60	>100	>100	>50	>200	>1.7	<1
P4H7	αPLL (15-30k)-dextran T10	3.8	1.2	>100	>100	>100	>26	>83	<1	<1
P4H8	αPLL (15-30k)-dextran T20	2	0.6	ND	ND	>100	>50	>167	ND	ND
P7H18	αPLL (40-60k)-dextran DA10	6	1.5	ND	ND	>100	>17	>67	ND	ND
F7H7	αPLL (40-60k)-dextran T10	0.02	0.01	3	>100	>100	>5000	>10000	>33	<1
P8H7	αPLL-dextran T10	>38.5	>38.5	ND	ND	>100	<2.6	<2.6	ND	ND
H19	D-mannose	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H16	Mannotriose	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H17	Mannopentaose (0.829k)	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
H13	Mannan	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
P4H16	Mannotriose-αPLL (15-30k)	>100	1	>100	>100	10-100	<1	10-100	<1	<1
P4H17	Mannopentaose (0.829k)-αPLL (15-30k)	>100	>100	ND	ND	1-10	<0.1	<0.1	ND	ND
P4H13	Mannan-αPLL (15-30k)	>100	>100	ND	ND	10-100	<1	<1	ND	ND
H15	Hyaluronan (4.7k)	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
Sulfated H15	Sulfated hyaluronan	5.7	1	>100	>100	>100	>18	>100	<1	<1
P4H15	Hyaluronan (4.7k)-αPLL (15-30k)	21	7	>100	>100	>100	>5	>14	<1	<1
Sulfated P4H15	Sulfated hyaluronan-αPLL (15-30k)	>100	>100	ND	ND	>100	<1	<1	ND	ND
F4 with sulfation step	αPLL (15-30k) with sulfation step	>100	>100	ND	ND	10-100	<1	<1	ND	ND
High-sulfated H7	High-sulfated dextran T10	>100	5.3	>100	>100	>100	<1	>19	<1	<1
Low-sulfated H7	Low-sulfated dextran T10	>100	10	>100	>100	>100	<1	>10	<1	<1
High-sulfated P4H7	High-sulfated dextran T10-αPLL (15-30k)	>100	>100	>100	>100	>100	<1	<1	<1	<1
Low-sulfated P4H7	Low-sulfated dextran T10-αPLL (15-30k)	>100	33	>100	>100	>100	<1	>3	<1	<1
acetylated P4H18	Acetylated αPLL (15-30k)-dextran DA10	>100	50	ND	ND	>100	<1	>2	ND	ND
acetylated P4H8	Acetylated αPLL (15-30k)-dextran T20	>28	20	ND	ND	>100	<4	>5	ND	ND
acetylated P7H18	Acetylated αPLL (40-60k)-dextran DA10	35	6	ND	ND	>100	>3	>17	ND	ND
acetylated P8H7	Acetylated αPLL-dextran T10	>46.5	>46.5	ND	ND	>100	<2	<2	ND	ND
AZT	Azidothymidine	0.02	0.02	>100	>100	>100	>5000	>5000	<1	<1
Heparin	Heparin	70.0	0.3	ND	ND	>100	>1	>333	ND	ND
DS50k	Dextran sulfated (50k)	6.7	0.21	>100	4	>100	>15	>476	<1	>25
DSSk	Dextran sulfate (8k)	0.14	0.02	>100	>100	>100	>714	>5000	<1	<1

\*1 PLLは骨格分子濃度で、GAG網及びシュードPGは多糖濃度で算出した。

\*2 N.D (Not done)

表2. シュードPGのMOLT-4/IIIB細胞からのHIV-1産生への影響

Sample	Drug	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	CC <sub>50</sub> (μg/ml)
P2	αPLL (1-4k)	>100	>100
P3	αPLL (4-15k)	10 <sup>#1</sup>	25
P4	αPLL (15-30k)	2.5 <sup>#1</sup>	6
H18	Dextran DA10	>100	>100
P2H18	αPLL (1-4k)-dextran DA10	>1.4	>1.4
P3H18	αPLL (4-15k)-dextran DA10	>4.6	>4.6
P4H18	αPLL (15-30k)-dextran DA10	>15.4	>15.4
N-butDNI	N-butyl deoxyinosine	20	>100

\*1 薬剤によるMOLT-4/IIIB細胞への毒性によりウイルス産生細胞数が減少し、HIV-1産生に影響が出た

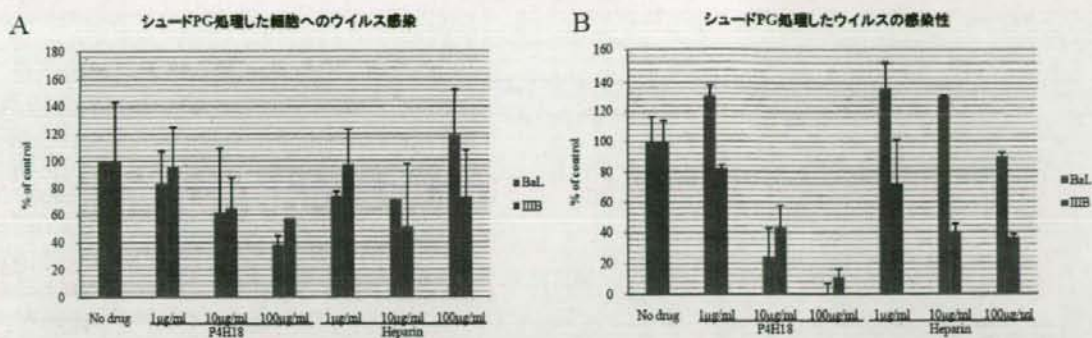


図1. 細胞およびウイルスへの処理によるシュードPGの抗ウイルス活性

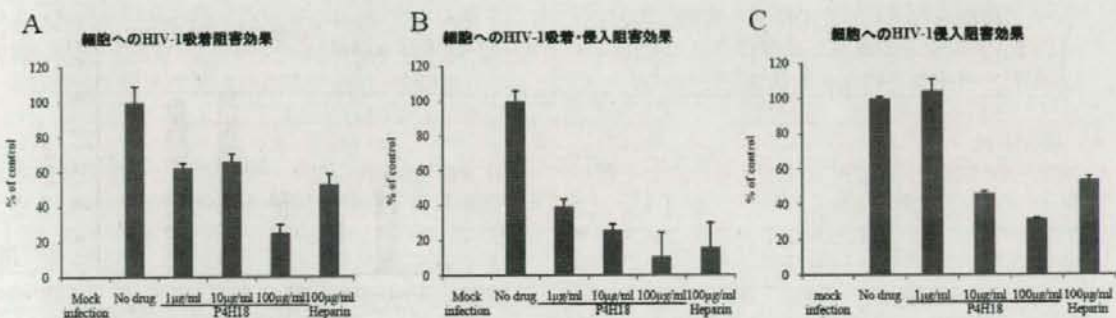


図2. シュードPGのHIV-1吸着および侵入阻害効果

(A) HIV-1吸着阻害実験では、N4X4-GFP細胞にIIIb株を接種し、シュードPGと共に4°Cで1時間培養後、細胞を溶解し、ELISAでHIV-1 p24量を定量した。(B) ウイルス吸着・侵入阻害実験では、37°Cで同操作を行った。(C) ウイルス侵入阻害実験は、4°Cで1時間感染後、シュードPGを加えて37°Cで1時間さらに培養し、次に細胞を溶解し、ELISAでp24量を定量した。

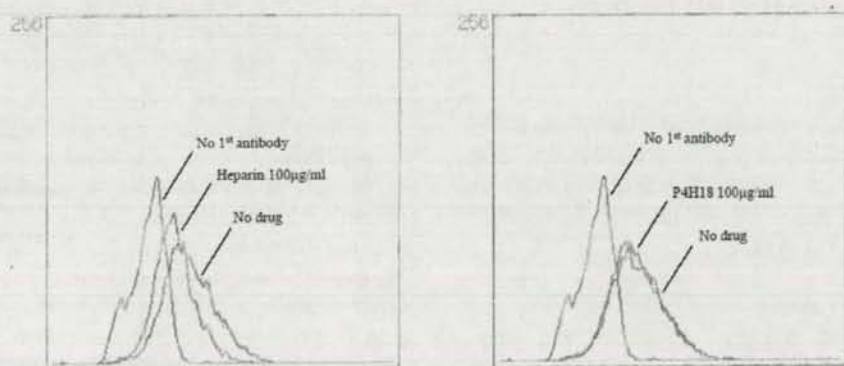


図3. シュードPGによるHIV-1 Env V3領域への結合阻害効果

MOLT-4/IIIb細胞をシュードPGあるいはheparinで1時間4°Cで処理し、抗V3単クローン抗体の結合をflow cytometryで検出した。シュードPGは、抗V3単クローン抗体のMOLT-4/IIIb細胞への結合を阻害しなかった。

## シュードプロテオグリカンの検定と構造解析

研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長  
研究協力者 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

二次元核磁気共鳴（二次元NMR）により、HIV-1感染抑制効果の認められた硫酸化した低分子量ヒアルロン酸（H15）、及び $\alpha$ -ポリ-L-リシン（PLL）とH15を共有結合させたシュードPG（P4H15）の構造解析を行った。その結果、硫酸化H15のN-アセチルグルコサミンの6位の水酸基及びグルクロン酸の2位の水酸基が硫酸化されていること、P4H15の糖鎖構造はH15と類似した物理化学的性状を有することが明らかとなった。

### A. 研究目的

昨年度、小川らによって部分硫酸化した低分子量ヒアルロン酸（H15）、及び $\alpha$ -ポリ-L-リシン（PLL）とH15を還元アミノ化法により共有結合させたシュードPG（P4H15）がHIV-1感染抑制効果を示すことが明らかにされた。非硫酸化H15が抗HIV-1活性を示さないことから、硫酸化H15の硫酸エステル基が抗HIV-1活性に関与している可能性が示唆された。また、P4H15は硫酸エステル基を有しないことから、硫酸化H15とは異なるメカニズムで抗HIV-1活性を示したものと考えられた。今後、より抗HIV活性の高いシュードPGを開発するためには、詳細な構造を明らかにすることが不可欠である。

そこで本年度は、シュードPG型薬剤の構造特性解析を目的として、二次元核磁気共鳴（二次元NMR）により硫酸化H15及びP4H15の構造解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 試料及び試薬

H15、硫酸化H15及びP4H15は、小川温子教授より分与された。ヒアルロン酸（HA、分子量13万）は、生化学工業より購入した。重水（重水素化率99.96%）及びNMR試料管（5.0 mm×18 cm）は、アルドリッチ及び株式会社シグマより購入した。

#### 2) NMR

##### 2-1 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$

NMR装置は日本電子（JEOL）のJNM-ECA800（800 MHz）を用いた。試料を重水0.5 mlに溶解し、凍結乾燥の繰り返しにより、交換可能なプロトンを除いた。乾燥した試料を0.55 mlの重水に溶かしNMR測定管に移した後に測定を行なった。温度は303 Kに設定した。データポイント数は32,768とし、観測幅は8 kHz（ $^1\text{H-NMR}$ ）及び160 kHz（ $^{13}\text{C-NMR}$ ）とした。 $^1\text{H-NMR}$ の積算数は32~128回、パルス角は45°（ $^1\text{H-NMR}$ ）及び30°（ $^{13}\text{C-NMR}$ ）、繰り返しパルス待ち時間は1.5秒（ $^1\text{H-NMR}$ ）及び2秒（ $^{13}\text{C-NMR}$ ）、ダミーキャンは

1回（ $^1\text{H-NMR}$ ）及び4回（ $^{13}\text{C-NMR}$ ）とした。ウィンドウ関数は指数関数（Line broadening factor = 0.2 Hz）を用いた。

##### 2-2 二次元NMR

JNM-ECA800（800 MHz）を用いて、 $^1\text{H-}^1\text{H}$  Correlation Spectroscopy（COSY）及び $^1\text{H}$  Detected Multiple Quantum Coherence（HMQC）を測定した。COSYのデータポイント数は1,024×512、観測幅は4 kHzとした。HMQCのデータポイント数は1,024×256、観測幅は $^1\text{H}$ 側を4 kHz、 $^{13}\text{C}$ 側を120 kHzとした。HMQCの $J_{\text{C-H}}$ 定数は140 Hzとした。測定温度を303K、繰り返しパルス待ち時間を1.5秒と設定し、ダミーキャンを4回行った。HMQC及びCOSYの積算回数は、それぞれ64~128及び16~64回とした。データはゼロフィーリング（データマトリックスサイズ1,024×1,024）し、ウィンドウ関数はサイン-ベル関数を使用した。得られたデータは、NMRデータ処理プログラムALICE 2（JEOL）を用いて解析した。

### C. 研究結果

#### 1) HA及びH15のNMRスペクトルの帰属と硫酸化HAのNMRスペクトルの比較

HAはN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位（GlcNAc  $\beta$ 1-4GlcA  $\beta$ 1-3）で構成される非硫酸化グリコサミノグリカンであり（Fig. 1A）、硫酸化H15は分子量約4,700 Daの低分子量HAを化学的に部分硫酸化した糖鎖である。また、P4H15は $\alpha$ -PLL（Fig. 1B）の $\epsilon$ -アミノ基とHAの還元末端を還元アミノ化法により共有結合させた樹状の多重合体である。硫酸化H15やP4H15のように化学修飾した多糖より得られる複雑な二次元NMRスペクトルを解析するためには、HAの基礎スペクトルデータの取得が不可欠である。本研究ではまず、HA（分子量、13万）及びH15のNMRスペクトル測定とシグナルの帰属を行った。