

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（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18～20年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 温子

目 次

I. 総合研究報告

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 ----- 4

小川温子

- (資料) 図1 シュードPGのサイズ排除HPLCにおける溶出曲線と分子量  
 図2 ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合する.  
 図3 種々のシュードPGの溶出曲線 (SEC-MALLS)  
 図4 シュードPG (H7P4) 合成へのpH、時間、温度の影響  
 図5 デキストランシュードPG (H7P4) の構造解析  
 図6 ヒトサイクロフィリンA (Cyp A) のタンパク質発現と精製  
 図7 ヒアルロン酸シュードPG (H15P4) の合成とSEC-MALLSによる分子量推定  
 図8 ヒアルロン酸、低分子量ヒアルロン酸、硫酸化H15及びシュードPG (P4H15) の<sup>1</sup>H-NMR  
 図9 マクロファージ指向性ウイルスに対する有効性  
 図10 NP-2/GFP細胞を用いた抗HIV活性検出  
 図11 細胞またはウイルスへの処理によるシュードPGの感染抑制活性  
 図12 シュードPGのHIV-1吸着および侵入阻害効果  
 図13 シュードPGによるHIV-1 Env V3領域への結合阻害効果  
 図14 PPG感作ラテックスによるHIV-1感染細胞 (MOLT4/IIIB) の凝集能
- 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 パルナバリンナトリウムのnano LC/ESI TOF-MSにより得られた主要糖鎖  
 表4. 非硫酸化シュードPG (H7P7)、ネオPGの抗HIV活性  
 表5. 非硫酸化シュードPG型薬剤のHIV-1感染抑制効果  
 表6. 非硫酸化シュードPG型薬剤のHIV-1 Envによる合胞体形成への影響  
 表7. HIV-1感染者の特徴  
 表8. HIV-1感染者由来のウイルスの力価  
 表9 パルナバリンナトリウムのLC/MS(negative ion mode)により得られた主要GAG糖鎖  
 表10 ヒアルロン酸、低分子量ヒアルロン酸、硫酸化H15及びシュードPG (P4H15) の化学シフト  
 表11 シュードPG (PLL-デキストラン) の組成と合成収率  
 表12 種々のシュードPGのアミノ基修飾による抗HIV活性変化  
 表13 NP-2/GFP細胞を用いたシュードPGの抗HIV-1活性と細胞融合抑制活性  
 表14 薬剤耐性ウイルス交差耐性試験  
 表15 シュードPGのPre-treatment, Treatment, Post-treatmentにおける巨細胞形成への影響

表 1 6 シュードPGのMOLT4/IIIB細胞からのHIV-1産生への影響

表 1 7 シュードPGの逆転写酵素阻害活性

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 46

III. 研究成果の刊行物・別刷 (別冊)



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業））

総合研究報告書

## 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

研究代表者 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) などの糖鎖を共有結合させて我々が創成した人工複合体分子である。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年度は硫酸化多糖を中心にGAG鎖の種類ならびに骨格高分子の鎖長を変えて合成し、抗HIV活性の関係を研究した。また、硫酸化多糖の感染抑制機序についてはHIV-1 Envタンパク質gp120中のV3領域へのヘパリンの結合がHIV-1の細胞への吸着を阻害することを明らかにした。シュードPGの構造解析方法としてnanoLC/ESI-TOF-MSを用いたGAGオリゴ糖鎖の分析が有効であることを見出した。19年度は合成収率向上の検討と並行して、さらに多種類のシュードPGを調製すると同時に、プローブの有効な精製方法と<sup>1</sup>H-NMRを活用した構造特性の解明を検討した。調製したプローブについて、種々の細胞系を用いて抗HIV活性と構造の関係を調べた結果、単独では活性を示さないデキストランやヒアルロン酸を用いて調製したシュードPGが顕著な抗HIV-1活性を示すことを発見した。特にデキストランシュードPGは硫酸化多糖の耐性株を含めマクロファージ指向性ウイルスを強く抑制し、その作用メカニズムに興味をもたれた。感染抑制機序を解明するためサイクロフィリンA (Cyp A) のcDNAクローニングとタンパク質発現系を構築する一方、プローブの有効性を広く検証するためHIV-1感染者より臨床分離株を分離した。20年度は、有効性を見出したプローブの活性向上と作用機序の解明に向けて、多糖鎖と骨格分子の構造の改良を行い、活性向上と毒性低下に必要な構造要素を明らかにした。シュードPGの糖鎖構造解析法として高分解能<sup>1</sup>H-NMRを活用して、GAGの硫酸基の位置を特定する方法を樹立し、作用機序の解明に有効な活性プローブに対する特異抗体を作成した。本プローブは、ウイルスと細胞の両方に作用して接着と侵入段階を抑制するが、ウイルス上の結合部位はヘパリンの結合するV3領域とは異なり、プローブの糖部分の硫酸化によって抗HIV活性を失うことから、硫酸化多糖とは異なる新たな作用機序が示唆された。新規の抗HIV活性機構が予想されるシュードPGは新規抗HIV活性薬剤への発展が大いに期待されるものである。

## 研究分担者

棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所・部長  
 牛島廣治 藍野大学藍野健康科学センター・教授  
 星野洪郎 群馬大学大学院・教授  
 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所・室長

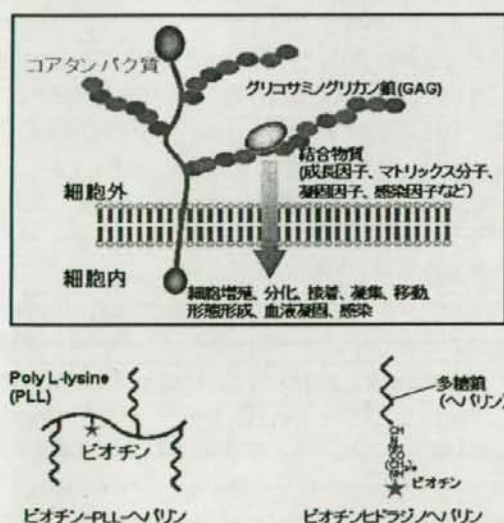
## A. 研究目的

先進国中で唯一、日本では若者のエイズ感染増加が社会問題となっている。また、途上国では今も悲惨な現状が続いている。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。



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(国際特許出願 PCT/JP2004/004589、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、たとえばヘパリンシュードPGは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報告されている(Towers, et al., *Nat. Med.*, 9, 1138-43, 2003)。一方、マクロファージへのHIV-1初期接着においては、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 et al., *J. Virol.*, 2001)(下図)。

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)



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、試験的に調製したヘパリンシュード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。

本研究で小川グループは、GAG鎖をはじめとする

糖鎖部分の構造、骨格直鎖分子構造、分子サイズ、ならびに糖鎖部分の固定化量の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について分担者の下で抗HIV活性スクリーニングを行い、その結果をフィードバックして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。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多糖鎖と骨格分子の種類と鎖長の異なるシュードPGの調製

1) シュードPG合成に用いた材料を次にまとめる。

#### 【表1】

#### アミノ基をもつ骨格分子

| 表記      | 試薬名                     | 製造元                   | 分子量<br>(又は平均分子量) |
|---------|-------------------------|-----------------------|------------------|
| P1      | $\alpha$ -PLL (ポリリジン)   | Sigma-Aldrich         |                  |
| (P8954) | 0.5-2 k                 |                       |                  |
| P2      | $\alpha$ -PLL (ポリリジン)   | Sigma-Aldrich         |                  |
| (P0879) | 1-4 k                   |                       |                  |
| P3      | $\alpha$ -PLL (ポリリジン)   | Sigma-Aldrich         |                  |
| (P6516) | 4-15 k                  |                       |                  |
| P4      | $\alpha$ -PLL (ポリリジン)   | Sigma-Aldrich         |                  |
| (P7890) | 15-30 k                 |                       |                  |
| P5      | PAA (ポリアクリルアミド 小)       | Sigma-Aldrich(434930) | 1.5 k            |
| P6      | PAA (ポリアクリルアミド 大)       | Sigma-Aldrich(434949) | 10 k             |
| P7      | $\alpha$ -PLL (ポリリジン)   | Sigma-Aldrich         |                  |
| (P3995) | 40-60 k                 |                       |                  |
| P8      | $\epsilon$ -PLL (ポリリジン) | チッソ                   | 4.7 k            |

およびこれらの一部をヒドラジノ化して使用した。

#### 【表2】

#### 糖類

| 表記 | 試薬名 | 製造元 | 分子量 |
|----|-----|-----|-----|
|----|-----|-----|-----|



(又は平均分子量)

|              |   |                       |          |
|--------------|---|-----------------------|----------|
| H1           | Heparin (ブタ)                                    | Sigma-Aldrich         |          |
| (H3400)      | 3 k   |                       |          |
| H2           | Heparin (ブタ)                                    | Sigma-Aldrich         |          |
| (H8537)      | 4-6 k   |                       |          |
| H3           | Heparin (ウシnativeへパリン)                          | Sigma-Aldrich (H6777) | native   |
| H4           | パルナパリンNa (ブタへパリン)                               | Ajinomoto             | 5.5-6.5k |
| H5           | Dextran sulfate 8000 ( <i>Leuconostoc</i> spp.) | Sigma-Aldrich (D4911) | 8 k      |
| H6           | Heparin (ブタnativeへパリン)                          |                       | Wako     |
| (081-00131)  | native  |                       |          |
| H7           | DextranT-10 スタンダード                              | Pharmacia             |          |
| (T-10)       | Mn 5.9 k, Mw 9.4 k                              |                       |          |
| H8           | DextranT-20 スタンダード                              | Pharmacia             |          |
| (T-20)       | 18-22 k   |                       |          |
| H9           | Fucoidan  | Sigma (F5631)         | 180 k    |
| H12          | Dextran sulfate                                 | Pharmacia             |          |
| (17-0340-01) | 500 k   |                       |          |
| H13          | Mannan ( <i>S. cerevisiae</i> )                 | Sigma                 |          |
| (M7504)      |   |                       |          |
| H14          | Alginate acid Nakarai (01227)                   |                       | 約17 k    |
| H15          | Hyaluronan (ultra low MW)                       | R&D systems           |          |
| (GLR003)     | 5k  |                       |          |
| H16          | Mannotriose                                     | Dextra laboratories   |          |
|              | 504.44  |                       |          |
| H17          | $\alpha$ 1-3, $\alpha$ 1-6 Mannopentose         | DLL (M536)            |          |
|              | 828.74  |                       |          |
| H19          | $\alpha$ -D-Mannose wako (130-00872)            |                       |          |
|              | 180.16  |                       |          |
| H20          | Heparin/Wako                                    | wako                  |          |
| H21          | Dextran sulfate/ICN                             | ICN                   | 1,400 k  |
| H22          | glucose   | wako                  | 180      |
| H23          | maltose   | wako                  | 342      |
| H24          | maltotriose                                     | wako                  | 504      |
| H25          | maltotetraose                                   | wako                  | 666      |
| H26          | maltopentaose                                   | wako                  | 828      |
| H27          | maltohexaose                                    | wako                  | 990      |
| H28          | maltoheptaose                                   | wako                  | 1152     |

2) 合成方法の検討 上記の多糖鎖の内、へパリンまたはデキストランを用いてシュードPGブローブ調製の条件検討を行った。従来法では各糖鎖と骨

格分子を、種々濃度のNaClを含む0.5 Mリン酸緩衝液 (pH 7.7) 中で混合し、還元剤水素化シアノホウ素ナトリウム ( $\text{NaCNBH}_3$ ) またはボランジメチルアミン複合体 ( $(\text{CH}_3)_2\text{N} \cdot \text{BH}_3$ ) を加えて40-45°Cで、7日~21日間振とうして還元アミノ化反応を行った。0.1 M酢酸ナトリウムに対して透析し脱塩した。NHS-ビオチンを用いて未反応アミノ基に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。しかし、検討の過程で、ビオチン化とN-アセチル化を省略して活性測定に使用した。

また糖鎖誘導化装置PALSTATIONを用いて、90°C1時間ブレインキュベーションを行い、還元剤を添加後、80°Cで0.5~3時間反応を行い経時的に生成物を測定して、温度条件を検討した。また、反応時のpHを最適化するため、デキストラン、デキストラン硫酸とへパリンについて、種々のpHをもつ反応溶媒を用いてシュードPGの生成量を比較した。0.1 Mホウ酸-ホウ砂 (pH7, 8)、0.1 Mホウ酸-0.1 M KCl - 0.1 M NaOH (pH9, 10, 11) を用いて、反応温度40°Cまたは80°Cで、16時間または90時間の合成反応を行い、比較した。

生成状態の分析は、1 M NaClを含むリン酸緩衝液に対して透析し、これを試料として後述するSEC-MALLS (Size-Exclusion Multi-Angle Laserlight Scattering) のHPLCシステムにインジェクトし、カップリングの進行を追跡した。

### 3) その他の調製方法

#### i) ネオプロテオグリカン(ネオPG)の調製

比較のための非シュードPG型へパリンブローブは、へパリン3mgをPLL (P1~P3) 4 mg/0.9 ml D.W.に加えて溶解し、EEDQ (3 mg/0.6 ml EtOH) を加えて4°Cで3日間反応させ、へパリンのカルボキシル基とPLLのアミノ基との酸アミド縮合反応により調製し、透析により試薬と過剰の出発物を除いて使用した。

#### ii) デキストランの硫酸化

小型ナスフラスコ中で約0.6 mgの多糖を3 mlのホルムアミドに溶かし、200  $\mu$ lのクロロ硫酸を氷上で滴下した。還流管を付けて5°Cで5時間反応させた後、水に対して透析した。

硫酸基の導入は、乾固させたサンプルを重水に溶かし、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにより解析、または1 M酢酸-ピリジン (pH3.5) 中で0.5 mA/cm、20分間セルロースアセテート膜電気泳動を行い、トルイジンブルーにより染色して泳動度の変化により確認した。



### iii) ヒドラジノ化PAAおよびPLLの調製

50% PAA (P6/P5) 溶液 1g (約0.85 ml, PAAとして0.5 g) に抱水ヒドラジン0.35 mlを加え、40°Cまたは45°C、8時間振とうした後、透析した。PAAへのヒドラジノ基導入は、溶液の一部を取り1.3 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>中で2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) と反応させ複合体の橙色、ならびに<sup>1</sup>H-NMRスペクトルから確認した。

PLL (P3, 4-15 kDa) 30 mgを95°CでKOH溶液に溶かし、1.02 g/500 μl のヒドロキシアミン-O-スルホン酸溶液を滴下し、98°Cで15分間反応させた。反応後、室温に戻し、50 μlの酢酸を加え中和し、水に対して透析を行った。TNBS染色、FT-IRと<sup>1</sup>H-NMRでヒドラジノ基の導入を確認した。

## ②. 合成物の分離・分析

1) サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱分析 (SEC-MALLS): 材料の吸着の起こらないポリヒドロキシメタクリレート系充てん剤を用いたカラム (Waters Ultrahydrogel 250, Ultrahydrogel 500) を用いてサイズ排除HPLCを行った。HPLC分析は、1/15 M リン酸緩衝液 (pH7.4)-2 M NaClをrunning bufferに用いて、試料100 μlをインジェクトし、40°C、流速 1 ml/minで行い、生成物をサイズ分画により分離した。SECからの溶出液中に示差屈折率 (RI) と光散乱 (MALLS) により検出された各ピークについて、出発物質と生成物それぞれのdn/dc値を用いて絶対分子量を求めることができるソフトASTRA V (version 5.3) を利用して解析式により計算した。

2) ゲルろ過クロマトグラフィーによる大量精製  
Toyopearl HW50のオープンカラム (22 mm×870 mm) を用いて、溶離液には1/15 M リン酸バッファー (pH7.4)+ 2 M NaCl を使用し、0.185 ml/minの流速でシュードPGの精製を行った。

### 3) シュードPG中の多糖とPLL濃度の定量

中性糖については主にフェノール-硫酸法により各糖溶液を標準として比色定量を行った。

PLL濃度はPierce社のBicinconic acidキットを用いて、BCA法により既知濃度のPLL溶液を標準として定量した。

### 4) シュードプロテオグリカンの検定と構造解析

#### 1) 試料及び試薬

パルナバリンナトリウムはローヘパ注 500 (味の

素) を使用した。ギ酸、酢酸、トリブチルアミン (TBA) 及びアセトニトリルは和光純薬より購入した。Dowex 50W-X8 はBIO-RADより購入した。ヘパリナーゼ及びヘパリチナーゼII は、生化学工業より購入した。

#### 2) 試料の調製

2 mlのローヘパ注 500に、12 mlの冷アセトンを加えて、-20°Cで3時間インキュベートした。遠心分離 (8,500 × g, 4°C 10分間) 後上清を取り除き、Speed Vac を用いて沈殿物を乾燥した。乾燥物を100 μl のH<sub>2</sub>Oで完全に溶解させた後、Dowex 50 (H<sup>+</sup>) のミニカラム (2.0 × 0.7 cm) に添加した。通過画分と洗浄画分 (100 μl) を回収後、TBA を用いて溶液を中和し、試料溶液とした。

#### 3) ヘパリナーゼ及びヘパリチナーゼII消化

200 μlのローヘパ注500に、1.2 ml の冷アセトンを加えて、-20°Cで3時間インキュベートした。遠心分離 (8,500 × g, 4°C, 10分間) 後上清を取り除き、Speed Vac を用いて沈殿物を乾燥した。乾燥物を 50 μlの10 mM 酢酸カルシウム及び50・1の100 mM 酢酸ナトリウム (pH 7.4)の混合液に溶かした後、ヘパリナーゼ及びヘパリチナーゼII各10 mUを加えて、37°Cで48時間消化した。反応終了後、100°Cで2分間加熱して酵素を失活させた。消化溶液をDowex 50 (H<sup>+</sup>) のミニカラム (2.0 × 0.7 cm) に添加して、通過画分と洗浄画分 (100 μl) を回収後、TBA を用いて溶液を中和し、試料溶液とした。

#### 4) LC/MS 及び MS/MS

LC装置はParadaigm MS4 (Michrome BioResources, USA) を用いた。カラムはグラファイトカーボンカラム (Michrome BioResources, 0.2 × 150 mm, 5μ) 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。パルナバリンは、流速2 μl/minで、5-50% B溶媒 (0-110分) 及び 50% B溶媒 (110-120分) のグラジエント条件で溶出した。MS装置は、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, 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 200-2100, スプレー電圧は -2.5 kV に設定した。MS/MS は、衝突エネルギーを25~70 eV に設定した。

#### <sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>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 $45^\circ$  ( $^1\text{H}$ -NMR) 及び $30^\circ$  ( $^{13}\text{C}$ -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), ダミースキャンは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。

### 5) 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 JC-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、ダミースキャンを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。

## ③抗HIV活性と細胞毒性スクリーニング

### 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  $\mu\text{l}$  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 $2 \times 10^6$ 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  $\mu\text{l}$  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 $2 \times 10^6$ のMT-4細胞に100TCID<sub>50</sub>となるようにHIV (IIIB) 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  になるようにDEAE-dextran添加培養液で調整し加える。37°CのCO<sub>2</sub>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 MgCl<sub>2</sub> and 400  $\mu\text{g/ml}$  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。

### 3) NP-2/GFP細胞を用いるスクリーニング

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。(表4の参考写真を参照)

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II



IB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°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、dextran DA10、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化処理した。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°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1 well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 ( $IC_{50}$ ) を算出した。

**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)を形成しうる。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、N

4R5/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。

#### 4) 薬剤耐性ウイルス交差耐性試験

種々の合成プローブまたは材料物質を96 well microplate上にtriplicateで5段階希釈し、 $2 \times 10^5$  /mlに調整したMT-4細胞にMockあるいは100 x  $CCID_{50}$ /mlのHIV-1 (IIIB)、逆転写酵素阻害剤耐性ウイルス (RT r)、プロテアーゼ阻害剤耐性ウイルス (PR r) を感染し、5日間培養後、MTT ; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromideを加え、生細胞のMTTを取り込みにより、 $IC_{100}$  ( $\mu$ g/ml)を測定した。

#### ④作用メカニズムの検討

1) 薬剤の作用対象 細胞またはウイルスへの薬剤処理を行った後、感染性を測定して薬剤がどちらに作用して阻害するかを解明する。

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。

#### 2) 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、シュードPG薬剤と反応させたX4ウイルスをN4X4/GFP細胞と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。

#### 3) ウイルスの接着・侵入過程への影響

HIV-1ウイルスのEnvおよびTatを発現している細胞 (HeLa/Menv/Tat、HeLaKS386、MOLT4/IIIB) を用い、N4R5/GFP細胞あるいはN4X4/GFP細胞と混合培養



し、経時的に薬剤添加し合胞体（多核巨細胞）形成への影響を測定した。また、薬剤処理のタイミングを変えて、4℃か37℃で感染実験を行い、細胞溶解液中のウイルスタンパク質p24をELISA法で定量し、接着と侵入に対する阻害効果を分けて測定した。

#### 4) ラテックス粒子を用いた結合実験

P4H18、P4H15を抗原としてマウス単クローン抗体を作成した。P4H18または抗P4H18抗体で被覆したラテックス粒子を、シュードPG特異的なモノクローナル抗体と反応させ凝集すること、同時にHIVとラテックス-シュードPGが反応し凝集することを確認する。さらにシュードPG-ラテックスがウイルスまたはMOLT4/IIIB、マクロファージ株化細胞、末梢血T細胞と混合し凝集の有無を観察した。HIVのWB（ダイナボット）を利用し、ピオチン化PPGがどの構成蛋白と結合するか調べた。

#### 5) 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。

#### 6) 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。

#### 7) 逆転写酵素活性に対する阻害作用

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) を加え、100%逆転写酵素反応系が阻害されるかを調べた。

#### 8) シュードPGの組換えヒト(rh)CypA結合性

ヒトCypA 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、ヒト

肝cDNAライブラリーから、high-fidelity DNAPolym eraseを用いたPCRにより507bp CypA遺伝子(GenBank: Y00052)のクローニングを行った。pET15bプラスミドに組み込むことでN末にHisタグの付いたリコンビナントヒトCypAを大腸菌で発現させ、コバルトアフィニティーカラム (TALON metal affinity resins, Clontech) を用いて精製した。

各シュードPGをBiacore用センサーチップに固定化し、rhCypAとの相互作用をBiacore2000 (GE Healthcare社) を用いてSPRにより測定した。リガンドの固定化はアミンカップリング法により7分間活性化した後、10 mMホウ酸buffer (pH8.5) で作成した20  $\mu$ g/mlのシュードPG溶液を7分間インジェクトし固定化させた。残っているN-hydroxysuccinimide estersを1 M ethanolamine hydrochloride (pH8でブロックを行った。50 mM NaOH, 1M NaCl溶液で1分間3回洗浄後、フローセル内をPBS (pH7.4) に置換し、各濃度のアナライト (rhCypA, HSP90) の希釈系列を作成し、120秒間、20  $\mu$ l/min、25℃でフローセルにインジェクトした。解離は120秒間行った。再生は25 mM NaOHで5  $\mu$ lを流すことにより行った。親和定数は、得られたセンサーグラムを用いて、BIAevaluation software version 3.1の1:1 binding modelを使用したglobal analysisにより算出した。

9) 抗血液凝固活性への影響 IWAKI assay plate に50  $\mu$ lの血液凝固試験用コントロールヒト血漿 (Dade Behring 社) と50  $\mu$ lのサンプルを加え37度で1分間ブレインキュベーションした。その後、80 mMカルシウム溶液を25  $\mu$ l加え37度で反応を行った。血液凝固反応の検出にはViento XS (DS Pharma Biomedical社) を用いて、経時的に波長350 nmで測定した。

#### ⑤ NP-2/GFP指示細胞とHIV-1感染者由来PBMCの混合培養とHIV-1の分離

16名のHIV-1感染者の血液10 mlからFicoll-Paqueを用いて末梢血単核球 (PBMC) を分離した。5 $\times$ 10<sup>4</sup>個のN4R5/GFP、N4X4/GFP、N4G1/GFP細胞を12-well plateにまき、翌日5 $\times$ 10<sup>4</sup>個のPBMCを上層し、phytohemagglutinin A (PHA) 存在下で1週間培養後、PHAを除いた培地で5週間まで継代した。GFP陽性巨細胞を含む細胞の上清を回収し、NP-2/GFP指示細胞



に感染させて上清中のウイルスの力価およびコレステリン利用能を調べた。

(倫理面への配慮)すでに倫理委員会などの承諾を得て行政管理下でのHIVを用いた測定によって研究を進めている。病原微生物の取り扱い指針を遵守した。

## C. 研究結果

<18年度>

### 1. シュードPGの調製

18年度に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1)、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-5A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  $\mu$ 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。

### 4. 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。

## 5. 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2)。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。

### <19年度>

#### 1. シュードPGの調製条件の検討

##### 1) ヘパリンを用いた還元剤、反応時間、温度の影響

18年度の検討から解決すべき問題としてシュードPGの合成収率の向上が考えられたので、まずブタヘパリン(H3)とポリアクリルアミド(P6)を用いて反応条件を検討した。還元アミノ化に2種類の還元剤( $\text{NaCNBH}_3$ と $(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{BH}_3$ )を用いて40℃、pH 7.7でシュードPGを合成すると、図3Aに示すように、いずれの場合も数時間後から多角度光散乱(MALLS)検出により高分子量ピーク(シュードPG)の増大が検出され還元剤による差は無いことが示された。しかし、絶対量に比例する示差屈折率(RI)では高分子量ピークの生成はほとんど検出されず大部分が出発材料の位置に溶出され、シュードPGの生成量が低いことが示された(図3A)。

次に反応温度を80℃に設定して、低分子ヘパリン(H4)とP6で反応させたところ、図3Bに示すようにMALLS検出では、45℃で反応させたものよりも迅速に60分後以降180分まで経時的にシュードPGのピークが増大し、高温で反応時間が短縮されることが示唆された。しかし高温の場合でもRIではほとんどピークとして検出されないことから

生成物の収率が低いことが示された。骨格分子としてPLL、アミノ基より反応性の高いヒドラジノ基をもつPLLを用いた場合にも、収率の目立った増加は認められなかった(データ示さず)。

##### 2) デキストランおよびデキストラン硫酸を用いる合成条件の検討

次に中性多糖のデキストランを用いてヘパリンと同条件でシュードPGを合成した。図3Cに示すように、45℃、2日間の反応でRI検出により溶出位置の早いシュードPGと考えられるピークが検出された。PLL分子のサイズの異なるP4とP7では、PLL分子のサイズに依存した溶出位置にピークが検出された。また、サイズ排除HPLCによって生成物の分離生成がある程度可能であったことから、大量精製にはToyopearl HW50ゲルろ過クロマトグラフィーを用いてシュードPGの分離精製を行うことができた(データ示さず)。

さらにデキストランシュードPG合成の条件について詳しく調べると、図4Aに示すようにpH 8が適しており、時間依存的に生成量が増加し(図4B)、45℃よりも80℃の方がシュードPGの生成量も大きく、かつ分子量も少し高いことが示された(図4C)。ところが同じ条件でデキストラン硫酸を用いてシュードPG合成反応を行ったところ、RI溶出パターンは出発材料から変化が見られず、シュードPGはほとんど生成されないことが示唆された(図4C)。この理由は還元力測定から、分子サイズにかかわらずデキストラン硫酸ではほとんどの分子の還元末端がブロックされていることが主な原因と考えられた。

デキストランシュードPGの分子量をSEC-MALLSの結果から計算すると、図4Aに示すようにH7P4では約7万と計算された。材料のデキストランとPLLの平均分子量はそれぞれ15,000と1万と求められ、公称値とよく一致しているので、この値の信頼性は高いと考えられる。また $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、シュードPG画分中にはデキストランとPLLに特徴的なプロトンシグナルが検出された(図4B)。

##### 3) ヒアルロン酸シュードPGの合成

低分子ヒアルロン酸を用いた合成でも、図3Dに示すように45℃、1週間後にRIでシュードPGの生成が観測されたが、デキストランの場合よりも反応の進行は遅く、より長時間を必要とした。

##### 4) ヘパリン-ネオPGの合成

シュードPGとは異なる、酸アミド縮合によって合成したヘパリン-ネオPGではRIによって非常に早い



位置に溶出されるピークが検出され、ヘパリンとPLLが高分子量の重合体を形成したことが示唆された(図3E)。

## 2. シュードPGの抗HIV活性と作用機構

以上の合成物について、抗HIV活性を種々の細胞とウイルス株について測定した。その結果、表4に示すように、MT-4およびMAGIC5に対するアッセイにおいて単独では全く活性のないデキストラン(H7)およびPLL(P7)から合成したシュードPG(H7P7)がMT-4細胞、マクロファージ系MAGIC-5に対して弱いながらも低濃度で抗HIV活性を示した。ヘパリンを多糖成分とする酸アミド結合により調製したネオPGではポリアクリルアミド骨格のもの(H4P6)がPLL骨格のもの(H4P1-H4P3)よりも高い活性を与える傾向が見られたが単鎖ヘパリン(H4)よりも向上は示されなかった。ネオPGではカルボキシル基を介して多点でヘパリンが固定化されているために不活性化された可能性が考えられる。

これらのプローブならびに他の糖を用いて合成したプローブを、表4とは異なるヒトグリオーマ由来のトランスジェニックなN4R5X4/GFP細胞を用いる系で感染抑制効果を調べると、H7P7>H7P4の順で硫酸化多糖耐性のR5株に対してもX4株と同様に、コントロールのデキストラン硫酸やヘパリンよりも一桁以上低い濃度で感染を抑制した(表5)。この結果はマクロファージMAGIC5やMT-4細胞を用いて調べた表4の結果とも一致して、さらに感度が高かった。多糖レベルでは活性を示さないヒアルロン酸を用いて合成したシュードPG(No.12)でも両方のウイルスに対して高い抑制効果を示すようになった。予備的に化学的硫酸化も行った試料(No.4-9およびNo11,13)では、多糖レベルの硫酸化ではいずれもT細胞指向性ウイルスX4に対する感染抑制効果が出現した。しかし、シュードPGレベルの硫酸化では逆に活性が低下し、硫酸化操作によりプローブが分解したか、あるいは硫酸化多糖とは異なる作用メカニズムをもつことが示唆された。

作用段階に関する情報を得るため、HIV-1Envによる合胞体形成への影響を調べると、表6に示すようにH7P7でR5ウイルスに対する弱い阻害活性が示唆され接着・進入過程に関わる可能性が考えられたがさらに検討を要すると考えられる。プローブの有効性を広く検証するためHIV-1感染者より臨床分離株を分離した(表7、8)。

## 3. シュードPGの検定と構造解析

本年度は、18年度開発したGAG鎖の質量分析による構造解析方法を、改良、発展させて、特に3,800 Da以上のより大きな分子量をもつGAG分子種の質量を測定すること、また、硫酸基の結合位置等の詳細な構造情報を得ることを検討した。表9に示すように、GCCカラムを用いたLC/MSにより、GAGオリゴ糖のモデルとして用いたバルナパリンの138種類の分子種(400~5,700Da)の質量を測定し、構成糖と硫酸基の数を推定することができた。また、バルナパリンを酵素消化した後、MS/MSを行うことにより、硫酸基の結合位置まで推定することができるようになった。

## 5. リコンビナントヒトCypAのクローニングなど

次年度、シュードPGの作用メカニズムの解明に向けて、ヒトCypAとの相互作用解析およびCypAノックダウン細胞を作るため、cDNAクローニングを行い、大腸菌での発現タンパク質を精製95%以上の精製度で大量に得ることに成功した(図6)。また糖鎖の関わる抗ウイルス細胞過程を解析する参考として、グリコシダーゼ阻害剤であるデオキシノジリマイシンの阻害作用について解析した。さらに反応の効率向上を意図してヒドラジノ骨格分子の調製を行った。

## <20年度>

### 1. シュードPGの合成

これまでに87種類合成し、内57種類の抗HIV活性を測定した。硫酸化多糖では高反応性のヒドラジノ化PAAを骨格に用いても収率が低いことが19年度に判明した。一方、中性多糖である平均分子量1万のdextran(H7およびH18)、mannotriose(H16)、非硫酸化多糖ヒアルロン酸(H15)、重合度1~7糖のマルトオリゴ糖Glc-Glc<sub>7</sub>を用いると、SEC-MALLSにおいて材料よりも高分子量化したピークが45℃、7-14日間でほぼ定量的に生成した。

図7にヒアルロン酸-PLLを例にとり、SEC-MALLSにおいてRIで検出した溶出曲線とMALLSから算出したピークの分子量値を示す。H15P4の平均分子量は約5万と求められ、約15kのPLLに約5kのヒアルロン酸鎖が約7本結合した複合体が生成したと推定される。図8(D)と表10に示す800 MHz <sup>1</sup>H-NMRに



おけるシグナルの変化より、H15P4ではPLLとヒアルロン酸の両成分が共有結合して存在している。また、Dextran シュード PG について、化学的に組成分析により求めたアミノ酸と糖の含有比は、表 1 1 のように、分子量からの計算値とよく一致した。

## 2. HIV 活性スクリーニングと細胞毒性

種々のシュード PG につき、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 (図 9、表 1 2)。用いた多糖のうち、硫酸化 dextran (DexS または DS8000) は単独で抗 HIV 活性を示した。しかし興味深いことに、多糖鎖として単独では活性のない非硫酸化 dextran を用いて PLL と複合体を合成したとき、硫酸化 Dextran を超える顕著な活性発現が認められた。また鎖長の長い dextran および PLL を用いると、より強い抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。一方、合成後の PLL のアミノ基を N-アセチル化またはビオチン化により修飾すると活性が全く無くなることから、活性発現には骨格分子の遊離アミノ基が関与することが示唆された (図 9、表 1 2)。

Dextran-PLL は、NP-12/GFP 細胞を用いたアッセイ系においては X4 および R5 ウイルス (図 1 0、表 1 3)、および逆転写酵素阻害剤耐性およびプロテアーゼ阻害剤耐性株のウイルス (表 1 4) に対しても、低濃度で感染抑制効果を示した。やはり活性を持たないヒアルロン酸やマンノトリオースの H15、H16 を用いて合成したシュード PG は X4 ウイルスに対してのみ感染抑制効果を示した (表 1 3)。一方、H15 を硫酸化すると単独で X4 ウイルスの感染抑制効果を示すようになり (表 1 3)、GlcNAc の 6 位と GlcA の 2 位が硫酸化されたことを NMR により確認した (表 1 0)。しかし、H15 をシュード PG 合成後に硫酸化すると失活した (表 1 3、sulfatedH15P4)。また、Dextran-PLL は高濃度で R5 の Env を介した細胞融合を抑制した (表 1 3、Coculture 列)。なお毒性については、4-60kD の骨格分子、αPLL (P3、P4、P7) は高濃度で細胞毒性を示し、 $CC_{50}$  は 25-55  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であったが、シュード PG に合成後は著しく細胞毒性が低下した (表 1 3)。

今回、硫酸基の無い dextran 誘導体で活性が見られたことは画期的であり、用いた PLL の骨格を毒性の低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。一方、α-PLL の異性体で毒性が無く食品添加剤にも使用される ε-PLL を用いて合成した dextran-PLL (P8H7) は抗 HIV 活性を示さなかった (表 1 3) ため、骨格分子のアミノ基の結合位置も活性発現に重要であることが示された。

## 3. Dextran シュード PG の作用メカニズム

R5 および X4 ウイルスの感染と R5 Env の合胞体形成を阻害する P4H18 を中心に検討した。

### 1) 作用対象はウイルスか、細胞か

薬剤を細胞側に処理した場合 (図 1 1 A) よりも、ウイルス側に処理する方が感染を著しく抑制し、特に Bal ウイルスに対して顕著に抑制した (図 1 1 B)。よって P4H18 は細胞とウイルスの両方に作用するが、特にウイルス側への感染抑制効果が大きいことが示唆された。

### 2) 作用段階

P4H18 は 4°C で濃度依存的にウイルス接着を阻害し、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ではヘパリンより高く阻害した (図 1 2 A)。37°C ではウイルスの接着-細胞内侵入を通じて約 90% 抑制し (図 1 2 B)、さらに侵入段階も抑制することが示唆された (図 1 2 C)。また、持続感染している MALT4/IIIIB 細胞と非感染 MALT4 の接着融合を抑制する作用を、薬剤処理のタイミングを変えて調べると、ウイルス吸着・融合段階に強く影響を与えていることが示された (表 1 5)。

### 3) 標的部位

Heparin は HIV-1 Env の V3 領域と結合してウイルス接着を阻害するが、P4H18 は MALT-4/IIIIB 細胞と抗 V3 単クローン抗体の結合を阻害せず (図 1 3)、HIV-1 との結合部位は V3 領域ではないことが示唆された。

### 4) 被覆ラテックスを用いた結合実験

P4H18 に対する単クローン抗体が得られ、P4H15 に対しては得られなかった。P4H18 で被覆したラテックス粒子は、HIV-1 と感染 MOLT-4/IIIIB 細胞を凝集し (図 1 4)、マウスマクロファージ株細胞



RAW264.7 とは弱く反応したが、末梢血 T 細胞には明確に反応しなかった。P4H18 がウイルスおよび細胞表面へ結合することと、細胞による差が示された。

#### 5) 産生ウイルスの感染性への影響

HIV-1 持続感染 MOLT-4/IIIB 細胞から産生された HIV-1 ウイルスの感染性に対しては、シュード PG の明らかな影響は見られなかった (表 1 6)。

#### 6) rhCypA との結合性

シュード PG をアミンカップリング法により CM-5 センサーチップに固定化して、大腸菌で発現し精製した rhCypA との結合を測定した。P7 に対しては  $K_a=10^7 M^{-1}$  の有意な結合を示したが、P7H7 に対しては  $K_a=10^5 M^{-1}$  の弱い結合を示し、P7H15 に対しては全く結合しなかった。

#### 7) 逆転写酵素活性への影響

P4 は 100 $\mu$ g/ml、P4H18 は 1  $\mu$ g/ml で酵素活性を 100% 抑制した。H18 では抑制が無かった (表 1 7)。

#### 8) 血液凝固活性

P4H7 や P7H15 はヘパリンより多糖として 2-3 桁高い濃度で弱い凝固遅延が認められた。

以上の作用機構に関する結果をまとめると、P4H18 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 の接着および侵入を阻害することが示唆された。一方、インビトロで逆転写酵素阻害作用が示され HIV の保護作用をもつヒト recCypA との結合性も HSP90 存在下で検出されたことから、接着侵入阻止以外の段階で作用することも考えられる。

さらに、本研究において、LC/MS<sup>n</sup>を利用して GA G の構成糖数、硫酸エステル基結合数及び結合位置を解析する方法も確立された。また二次元 NMR を用いて硫酸化ヒアルロン酸およびヒアルロン酸シュード PG の構造解析を行う事ができた。シュード PG の硫酸化が活性を失う理由ならびに詳細な複合体構造と抗 HIV 活性の関係解明に、今後本法を活用していく。

#### D. 考察

本研究結果として特筆すべき事は、当初の研究テーマである硫酸化多糖のシュード PG に見出された抗 HIV 活性の最適化研究を行っている中で、合成ア

ミノ酸ポリマーと dextran という、全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である。当初、いろいろの化合物のスクリーニングに時間がかかったことと、硫酸化多糖を合成材料に使用した場合に、合成収率が非常に低かったため薬用量が少なく抗 HIV 機構の解明に時間がかかった。しかし、結果として作用機構の全く異なる新規の抗エイズ活性化合物を見出し、その作用機構が見えてきつつある。

硫酸化多糖の抗 HIV 活性に関しては既に多くの研究がなされ、その新規性は少ないが、非硫酸化多糖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本研究結果から示されたように Env V3 の先端以外を標的としているらしく、硫酸化多糖とは全く異なるものと考えられ、新しいタイプの抗ウイルス剤の可能性がある。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。その意味で本研究により見出された新規抗 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。

**今後の展望について** 細胞への HIV-1 の接着阻害が作用の第一段階と考えられるので、今後はシュード PG が結合する HIV-1 および細胞性因子を究明したい。また、細胞内移行の有無、および HIV-1 が粒子表面に取り込んだ CypA とその受容体 CD147 を介した感染経路に対しても、シュード PG の影響を検討する。

#### E. 結論

抗 HIV 活性が見出された、天然由来多糖と合成高分子ポリマー複合体である種々のシュード PG につき、抗 HIV 活性測定を行った。これらの複合体の中から、意外にも硫酸化多糖の代わりに、多糖として単独では活性を示さない dextran 等の非硫酸化糖類を用いた複合体が顕著な活性を示した。これらのシュード PG の HIV 感染抑制機序の一つとしてウイルスの接着侵入抑制があり、標的分子は硫酸化多糖とは異なることが示唆されたので、新たな抗 HIV 活性機構が期待される。



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

別紙4 (研究成果の刊行に関する一覧表) に記載したとおり。

### 2. 学会発表

小川温子

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  $\alpha$ -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, Sato R, Toma K, Ogawa H. 2006

12) 文科省科研費特定領域研究 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) 文部省科研費特定領域研究題 4 回夏期シンポジウム Pancreatic  $\alpha$ -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
- 15) Ogawa H., Takekawa H., Sano K., Mukouyama E., Shirai T., Novel Carbohydrate-binding Activity of Bovine Trypsinogen toward O-glycans of Glycoproteins and the Discrepancy between the specificities of trypsinogen and trypsin to Trypsin., XIX International Symposium on Glycoconjugates, 2007
- 16) 佐野琴音、旭美穂、浅沼公恵、伊藤さつき、橋井則貴、川崎ナナ、安川然太、佐藤ちひろ、北島健、小川温子、組織再生に関わるマトリクス糖タンパク質の活性調節と修復過程における糖鎖変化、糖質学会年会、2007
- 17) 楽娜、伊原友紀、松下-及川浩子、中村公亮、川崎ナナ、小川温子、ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対する十二指腸刷子縁膜糖タンパク質レセプターの探索、糖質学会年会、2007
- 18) 小川温子、中村公亮、佐藤・中川慶子、坂上ひろみ、シュードプロテオグリカンの創製とその応用、お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センター公開シンポジウム、2007.11.21.
- 19) 中村公亮、佐藤慶子、棚元憲一、牛島廣治、配島由二、小川温子、シュードプロテオグリカン(シュードPG)のリガンド結合性と抗HIV-1活性、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007. 12. 11-15
- 20) 大崎加奈恵、坂上ひろみ、小川温子、ウシ腎リボヌクレアーゼおよびブタ脾エラスターゼの糖結合性の発見、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、2007. 12. 11-15
- 21) Sano K., Asahi M., Asanuma K., Yanagibashi M., Ito S., Hashii N., Kawasaki N., Yasukawa Z., Sato C., Kitajima K., Ogawa H., Mechanism of tissue remodeling regulation by the change in glycosylation and biological activity of extracellular matrix glycoproteins., 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、2007. 12. 11-15
- 22) 楽娜、伊原友紀、松下-及川浩子、中村公亮、川崎ナナ、白井剛、小川温子、膵臓 $\alpha$ -アミラーゼに対する内在性レセプターの同定と糖結合部位の予測、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、2007. 12. 11-15
- 23) 竹川寛子、齊藤泉、中村公亮、向山恵津子、白井剛、小川温子、ウシトリブシノーゲンの糖タンパク質の $\alpha$ -型糖鎖に対する糖結合活性、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、2007. 12. 11-15
- 24) Nakamura K., Sato K., Tanamoto K., Ushijima H., Haishima Y., Tsuchiya T., Ogawa H., Interaction of synthesized pseudoproteoglycan (pseudoPG) with specific proteins and its biological meanings. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. 2007.12.3-4 Tokyo
- 25) 小川温子、相川京子、糖鎖研究のパートナー、レクチンの精製から解析まで 第1回糖鎖産業技術フォーラム、2007
- 26) 大山真実、高原有未、佐野琴音、小川温子：血液凝固因子フィブリノーゲンとフィブリンに見出した糖結合性、糖質学会 (2008)
- 27) 齊藤泉、坂上ひろみ、小川温子：ウシトリブシノーゲンの活性化は、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 28) 樋上智子、中村公亮、竹川寛子、相川京子、小川温子、哺乳類膵臓リパーゼの糖結合性-レコンピナントヒト膵臓リパーゼの調製とその性質-、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 29) 中村公亮、坂上ひろみ、中原義昭、小川温子、Fmoc-アミノアシル糖鎖を用いる糖鎖-レクチン相互作用のSPR解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)
- 30) 平島友里恵、加藤真利、坂上ひろみ、小川温



子、抗体分子の持つ抗原認識とは異なる糖結合性の発見とその意義、第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)

31) 佐野琴音、伊藤さつき、橋井則貴、川崎ナナ、安川然太、佐藤ちひろ、北島健、小川温子、組織再生または繊維化に関わるピトロネクチンの活性調節と修復過程における糖鎖変化、第31回日本分子生物学学会年会・第81回日本生化学会大会合同代会 (2008.12)

#### 棚元憲一

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 26<sup>th</sup> 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)

8) Kikuchi Y., Kakeya T., Nakajima O., Sakai A., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J., and Takatori K. : Effect of hypoxia on the expression of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in human glioblastoma cell line T98G Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (2007. 1)

9) Nakamura K., Sato K., Tanamoto K., Ushijima H., Haishima Y., Tsuchiya T, Ogawa H. : Interaction of synthesized pseudoproteoglycan (pseudoPG) with specific proteins and its biological meanings. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences Tokyo (2007. 12)

10) Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M, Sugita-Konishi Y., : Effect of deoxynivalenol on LPS signaling in macrophage. The Society of Toxicology Annual Meeting (2008. 3)

11) 多田敦子、杉本直樹、濱田ひかり、小林義和、山



- 崎 壮、棚元 憲一：味認識装置による食品添加物苦味料および関連苦味化合物の測定 日本薬学会代 127 年回(2007. 3)
- 12) 室井正志、棚元 憲一：IRAK-1 による TRAF6 蛋白の proteasome に依存した減少、第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)
- 13) 大西貴弘、室井正志、棚元 憲一：MyD88 非依存性経路における TLR4 細胞内領域の会合の重要性についての解析、第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)
- 14) 塩入利一、室井正志、棚元 憲一：血管内皮細胞のアポトーシスに及ぼすエンドトキシンの影響、第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)
- 15) 伊藤裕才、杉本直樹、張慧利、伊藤澄夫、山崎 壮、棚元 憲一：タマネギ色素の色素成分の単離と構造決定 日本食品科学学会代 13 回学術大会(2007. 5)
- 16) 六鹿元雄、山口未来、河村葉子、棚元 憲一：瓶詰食品のセミカルバジド 日本食品化学学会第 13 回学術大会(2007. 5)
- 17) 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：血管内皮細胞およびマクロファージ細胞におけるエンドトキシン誘発性アポトーシス、第 44 回日本外科代謝栄養学会、(2007. 7)
- 18) 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動物循環血液中の endotoxin 生物活性の測定、第 44 回日本外科代謝栄養学会、(2007. 7)
- 19) 菊池裕、中島治、掛谷知志、酒井綾子、池田喜久子、山口直人、山崎壮、棚元 憲一、松田治男、澤田純一、高鳥浩介、山口照英 GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質産生に及ぼす低酸素応答の影響に関する研究、プリオン研究会 (2007. 8)
- 20) 室井 正志、棚元 憲一：MyD88 および IRAK-1 による NF- $\kappa$ B の活性化には異なる様式で TRAF6 が関与する、第 13 回日本エンドトキシン研究会 (2007. 10)
- 21) 塩入利一、畑尾史彦、西田正人、上西紀夫、小川利久、三村芳和、室井正志、棚元 憲一：血管内皮細胞およびマクロファージ細胞におけるエンドトキシン誘発性アポトーシス、第 13 回日本エンドトキシン研究会 (2007. 10)
- 22) 杉山 圭一、室井 正志、棚元 憲一：TLR4 をターゲット分子とした LPS シグナル阻害ペプチドの諸性質について、第 13 回日本エンドトキシン研究会 (2007. 10)
- 23) 西田正人、畑尾史彦、塩入利一、上西紀夫、小川利久、比企直樹、三村芳和、室井正志、棚元 憲一：TLR4/MD-2/CD14 定常発現細胞を用いた動物循環血液中の endotoxin 生物活性の測定、第 13 回日本エンドトキシン研究会 (2007. 10)
- 24) 久保田浩樹、佐藤恭子、棚元 憲一：カット野菜の次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する塩素系消毒副生産物について 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会(2007. 10)
- 25) 多田敦子、杉本直樹、秋山卓美、山崎 壮、棚元 憲一、尹永淑：既存添加物ジャマイカカシカア抽出物中の副成分の分析 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会(2007. 10)
- 26) 河村葉子、山口未来、六鹿元雄、棚元 憲一、菌部博則、宮本真一：ピューター製品中のアンモチンの成分 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会 (2007. 10)
- 27) 石附恭子、多田敦子、山崎 壮、棚元 憲一：GC/MS によるエステル系ガムベース確認分析法の検討 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会 (2007. 10)
- 28) 秋山卓美、山崎 壮、棚元 憲一：ジエチルジチオアセタール化法による増粘多糖類構成糖の分析 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会 (2007. 10)
- 29) 伊藤裕才、山崎 壮、棚元 憲一、尾登賢一、山形一雄：既存添加物「シコン色素」の成分に関する研究 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会 (2007. 10)
- 30) 六鹿元雄、河村葉子、棚元 憲一：フッ素樹脂加工された食品用器具・容器包装の安全性に関する研究 第 94 回日本食品衛生学会学術講演会(2007. 10)
- 31) 河村葉子、山口未来、六鹿元雄、棚元 憲一：合成樹脂製器具・容器包装の溶出試験における油脂及び脂肪性食品擬似溶媒の検討 第 44 回全国衛生化学技術協議会 (2007. 11)
- 32) 伊藤裕才、山崎 壮、広瀬雅雄、棚元 憲一：既



存添加物大豆サポニンの成分分析 第44回全国衛生化学技術協議会 (2007.11)

33) 秋山卓美、山崎 壮、棚元 憲一: 既存添加物名簿収載の樹脂由来ガムペースの成分・品質に関する研究 第44回全国衛生化学技術協議会 (2007.11)

34) 建部千絵、細川晶、木村慎太郎、安河内義和、森曜子、山下靖子、飯塚太由、宮崎泰之、高橋仁一、内田裕美、佐藤恭子、棚元 憲一: タール色素およびタール色素アルミニウムレーキの純度試験の改良に関する研究 (1) 第44回全国衛生化学技術協議会 (2007.11)

35) 古庄紀子、杉本直樹、佐藤恭子、山崎 壮、棚元 憲一: 1H核磁気共鳴法による香料ピラジン類の定量 第44回全国衛生化学技術協議会 (2007.11)

36) 中村公亮、佐藤慶子、棚元 憲一、牛島廣治、配島由二、小川温子: シュードプロテオグリカン (シュードPG) のリガンド結合性と抗HIV-1活性、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会 合同大会 (2007.12)

37) 室井 正志、棚元 憲一: TRAF6 は MyD88 および IRAK-1 による NF- $\kappa$ B の活性化に異なる様式で関与する、第81回日本細菌学会総会 (2008.3)

38) 大西貴弘、室井正志、棚元 憲一: 可溶性 MD-2 および CD14 の細菌増殖抑制作用、第81回日本細菌学会総会 (2008.3)

39) 塩入利一、室井正志、大西貴弘、棚元 憲一: 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と可溶性 CD14, MD-2 の効果、第81回日本細菌学会総会 (2008.3)

40) 杉山 圭一、濱田 理、室井 正志、葉袋 裕二、棚元 憲一、芳賀 実、小西 良子: Toll-like receptor シグナリングに及ぼすデオキシニパレノールの影響、日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008.3)

41) 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)

42) 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)

43) 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)

44) 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)

45) 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)

46) 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)

47) 杉山圭一、室井正志、葉袋裕二、棚元 憲一、芳賀実、小西良子: デオキシニパレノールの 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)

48) 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)

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)