

主論文の要約

論文題目 抗 HIV 薬開発に繋がるウイルスおよび宿主タンパク質に関する構造学的研究

氏名 中島 雅晶

論文内容の要約

1. 序論

ヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)は後天性免疫不全症候群(エイズ)を引き起こす主要原因ウイルスである。今日, HIV-1 感染者には抗 HIV-1 薬剤療法が適用され, 感染者の予後は改善し, HIV-1 は死に直面する感染症ではなくなった。しかしながら, HIV-1 を感染者体内より完全に排除する治療方法はいまだ見出されておらず, 感染者は治療開始から生涯にわたり服薬し続けなければならない。また, HIV-1 は薬剤耐性変異を獲得しやすい。そのため, ウイルスの薬剤耐性獲得と新規抗 HIV-1 薬開発の“いたちごっこ”の状態は今後も続くと考えられる。これらの理由から, 現在臨床利用されている治療薬の改良, 新規作用機序を有する抗 HIV-1 薬の開発, およびそれらを可能とするための HIV-1 に関する一層の理解が要求されている。

昨今, 治療薬開発あるいは改良研究では, 構造生物学を活用したアプローチが効率的であり, 重要視されている。そこで, 本研究では構造生物学を主体に, 薬剤耐性機序の解明, あるいは新規作用機序をもつ抗 HIV-1 治療薬開発につながる 2 課題の基礎的研究に取り組んだ。I) 臨床利用されている最も強力な抗 HIV-1 薬のひとつ Darunavir(DRV)に対する耐性獲得メカニズムの解析, II) 宿主防御因子 APOBEC3 (A3)と HIV-1 Virion infectivity factor (Vif)の相互作用の詳細の解明研究である。

2. HIV-1 プロテアーゼ(PR)の DRV 耐性獲得メカニズムに関する研究

2.1 背景

HIV-1 PR はウイルスがコードする *pol* 遺伝子領域の一産物で, アスパラギン酸プロテアーゼに分類される。酵素活性をもつ PR はウイルス複製に必須で, その活性を阻害す

ることにより HIV-1 感染が強力に抑制される。現在、HIV-1 PR の酵素活性阻害剤 (PI: Protease Inhibitor) が、有効な抗 HIV-1 薬のひとつとして臨床利用されている。最も新しい PI である DRV は、先代型の PI に薬剤耐性を示す HIV-1 に対しても阻害効果を発揮する優れた PI である。本章では、DRV に対する薬剤耐性を獲得したウイルス由来の PR について、構造生物学的観点から解析した結果について記述する。

2.2 材料と方法

DRV 耐性ウイルスを *in vitro* 耐性誘導により取得した。ウイルスの薬剤感受性を *in house* 薬剤感受性測定法により解析した。耐性誘導によって生じた、変異箇所を遺伝子配列解析により同定した。DRV 耐性に関与する遺伝子型の PR (以下、DRV 耐性 PR) の酵素活性中心残基に変異を導入し、非酵素活性型 (不活型) とした不活型 DRV 耐性 PR として、大腸菌を用いたタンパク質発現系により発現した。精製および結晶化を行い、PR の結晶構造を決定した。

DRV 結合状態の構造予測、あるいは非結合状態の PR の動体予測を、分子動力学 (MD) シミュレーションにて行った。

2.3 結果

HIV-1 感染者血漿サンプルから分離したウイルス FS5929 を用いて、*in vitro* 耐性誘導を行った。1000 nM の DRV 存在下においても増殖可能なウイルス FS5929R1 を回収した。耐性誘導によって 2 つの DRV 耐性主要変異 (I47V と I50V) が生じたことが分かった。また、このウイルスの *gag-PR* 遺伝子を野生型 HIV-1 NL4-3 に組み込んだ rFS5929R1 は、HIV-1 NL4-3 と比較して高度 DRV 耐性 (IC₅₀ が 175 倍以上) を示した。さらに、rFS5929R1 の PR の I50V を Ile に戻した rFS5929R1_{I50} の DRV 耐性度が 97 倍程度と大幅に減少したことから、耐性誘導によって生じた I50V が DRV 耐性に大きく寄与していることがわかった。

リガンド非結合状態の FS5929R1 PR の X 線結晶構造を分解能 1.8 Å で決定した。FS5929R1 PR はフラップが開いた構造 (開構造) を有していた。これは既報のリガンド非結合状態の DRV 耐性 PR と共通した特徴であった。一方、FS5929R1 PR の 50 番目の残基 (I50V) を含むフラップの先端はタンパク質内側に湾曲しており、既報の他の開構造の PR には認められない特有なコンフォメーションであった。

さらに PR と DRV の複合体を MD シミュレーションから予測した結果、野生型 PR-DRV もしくは FS5929 PR-DRV 複合体の構造と比較して、FS5929R1 PR-DRV 複合体のフラップ領域が外側に移動することが示唆された。

2.4 考察

FS5929R1 PR 特有のフラップ領域の開構造と、フラップの先端のタンパク質内部

に湾曲した独特のコンフォメーションが、DRV 耐性に寄与している可能性が示唆された。これらの情報が、さらに強力にウイルスの増殖を抑制し、なおかつ耐性変異に対して普遍的にその効果を発揮できるような抗 HIV-1 薬開発の開発基盤となることが期待される。

3. A3 と HIV-1 Vif の相互作用に関する構造学的研究

3.1 背景

宿主防御因子 A3 は、宿主細胞の細胞質で発現しているシチジン脱アミノ化酵素である。HIV-1 を含むレトロウイルスやレトロトランスポゾンなどのレトロエレメントに対して、それらの増殖に対して強力な抑制効果をもつ。ヒトでは 7 種類の A3 (A3A-H) が細胞内で発現しており、そのうち、A3F と A3G が抗 HIV-1 活性を有する。また少なくとも 7 種存在する A3H のハプロタイプのうち、A3H ハプロタイプ II (hapII) も抗 HIV-1 活性を持つことも知られている。しかしながら、HIV-1 は、A3 の解除因子として、Vif を感染細胞内で発現する。Vif は A3C と A3D, A3F, A3G, A3H と特異的に結合し、E3 ユビキチン化複合体に特異的にリクルートする。リクルートされた A3 はポリユビキチン化され、プロテアソーム系により迅速に分解される。つまり、HIV-1 は Vif を利用して細胞内の A3 を分解・除去することにより、自身の増殖に適した細胞内環境を整えている。

本章では、A3 と Vif の相互作用をより詳細に理解するために、いまだその詳細な Vif 結合インターフェイスが同定されていない A3F と A3H hapII を対象に Vif との相互作用について構造学的解析を行った結果について記述する。

3.2 材料と方法

A3 と Vif の相互作用に関与する可能性があるアミノ酸残基を変異置換した A3 発現プラスミドを Vif 発現プラスミドとともにヒト胎児腎細胞 (HEK 293T 細胞) に導入し、細胞内に存在する A3 タンパク質量をウエスタンブロッティングにより解析することにより、Vif 依存的な分解に関与する A3 の残基を検索した。さらに A3 と Vif の結合を共免疫沈降実験にて解析した。

野生型配列をもった A3F の C 末端ドメイン(CTD)を大腸菌タンパク質発現系にて発現し、精製および結晶化を行い、結晶構造を決定した。

A3H hapII の構造を予測した。また、既報の Vif の結晶構造は A3F と相互作用する C 末端領域を欠失していたため、同領域を延伸した構造を予測した。

3.3 結果

著者らは 2012 年に A3C と A3F において共通した 10 残基が Vif 結合インターフェイスを形成することを報告しているが、本研究では Vif 依存的な分解に関与するアミノ酸残基をさらに検索し、上記の 10 残基に加えて、A3F の L291 と A292, R293, E324 が関与することがわかった。また、同様の解析の結果、Vif においても A3F の分解には A3C の場

合よりも多くの残基(D17 と E76, E171, R173)が関与することがわかった。

X線結晶構造解析法によって Vif 結合ドメインである A3F CTD の結晶構造を分解能 1.8 Å で決定した。その構造上に同定された残基をマッピングした結果、新たに同定された残基を含めた Vif 結合インターフェイスは $\alpha 2$ と $\alpha 3$, $\alpha 4$ にわたって形成される広いインターフェイスであった。また、A3F 特異的な残基は $\alpha 3$ と $\alpha 4$ にマッピングされ、負に帯電したタンパク質表面を形成していた。A3F CTD の $\alpha 3$ と $\alpha 4$ 間の距離は A3C よりも狭かった。

同様の解析で A3H hapII の Vif 依存的な分解に関与する残基を、既報の D121 に加えて新たに 9 残基同定した。これら 10 残基を A3H hapII のモデル構造上にマッピングしたところ、A3H では $\alpha 3$ および $\alpha 4$ の領域にこれらの残基があることがわかった。また、10 残基は負に帯電したタンパク質表面を形成していた。

一方、Vif のモデル構造上に、既知の A3F あるいは A3H, A3G と相互作用する残基をマッピングした。その結果、それぞれのインターフェイスは立体構造上の異なる領域にマッピングされた。

3.4 考察

A3C と A3F を比較した結果、後者のほうが 4 残基分広いことがわかったが、これは A3C の $\alpha 4$ の裏側にある V143 が $\alpha 3$ を押し出しているためであると考えられる。これによって生じたヘリックス間の距離の違いが Vif の感受性の違いの原因である可能性がある。

A3F と A3H hapII の Vif と相互作用するインターフェイス共通の特徴として、負に帯電していること、浅いくぼみを形成することがあげられる。これらの特徴は Vif の A3 相互作用インターフェイスの構造学的特徴と相補的であった。

HIV-1 の Vif は 3 種類の A3 を分解するために、3 つのインターフェイスを使い分けていることがわかった。A3-Vif が相互作用するインターフェイスは A3 の種類によって全く異なり、両者が共進化してきた結果であると考えられる。

4. 結語

DRV 耐性 PR の解析では、その耐性獲得メカニズムについて構造学的な理解を深めた。今回得られた知見を利用し、より耐性変異を誘導しにくい、もしくは将来発生しうる DRV 耐性 HIV-1 に対しても有効な抗 HIV-1 薬開発の基盤情報となると考えられる。A3 と Vif の解析では、3 種類の Vif-A3 の結合インターフェイスについて A3 と Vif の両面から解析を行い、その構造学的な特徴を明らかとした。より包括的に A3 と Vif の相互作用を理解するため、もしくはより正確な薬剤開発基盤となるような情報を得るためには両者の複合体構造の決定が望まれる。