

抗 HIV 剤治療下における Protease と Gag の相互干渉と共進化に関する解析

東京医科歯科大学 柴田 潤子 (Junko Shibata)
Biomedical Science Ph.D. Program,
Tokyo Medical and Dental University

【背景】

HIV-1 感染症・AIDS の治療法は、1996 年（日本では 1997 年）のプロテアーゼ阻害剤の実用化とともに始まった 3 剤以上の抗 HIV 剤を組み合わせる多剤併用療法 (highly active antiretroviral therapy: HAART) により大きく進歩した。HAART の導入により先進諸国では AIDS による死亡率は顕著に低下し、HIV-1 感染者の QOL も大きく改善された。しかしながら、HIV-1 はその本来の性質として変異を獲得しやすい (error prone) ため、厳格に治療薬の服薬をしないと (95% 以上のアドヒアランス) 容易に治療薬剤に対して抵抗性を呈する薬剤耐性ウイルスを誘導してしまう。これは相当な努力を強いることから、遵守できない感染者も多く、その結果多数の薬剤耐性症例を生むこととなった。抗 HIV 治療下にある患者集団において、76% の患者が 1 つ以上の薬剤に対して耐性を示したとの報告もある。

HAART が始まってから 10 年目の今日、薬剤耐性 HIV-1 を獲得したため治療困難に陥っている症例が我が国においても大きな問題となっている。薬剤耐性の獲得はその後の治療を困難にするが、これには大きく 2 つの理由が挙げられる。一つは現在使用されている薬剤は同一クラスの薬剤間での交叉耐性が著しいことであり、もう一つは HIV-1 がその本来の性質として宿主細胞に持続感染 (latency, persistency) をすることから、一度薬剤耐性ウイルスが出現すると長期間にわたり体内から消失せずに存在し続けることである。この何れもが薬剤耐性獲得後の効果ある薬剤の選択肢を大きく狭めてしまう。薬剤耐性 HIV-1 を克服するためには既存の薬剤と交叉耐性を示さない新薬の開発やより高いアドヒアランスを維持しやすい服用条件の改善に加え、HIV-1 の薬剤耐性変異獲得のメカニズムの深い理解に向けた基礎研究の推進が急務となっている。

また、抗 HIV 剤の 1 つであるプロテアーゼ阻害剤 (PI) はプロテアーゼ (PR) 遺伝子に耐性変異を誘導するが、PI 投与に対する変異が PR 分子内だけでなく、その基質である Gag 蛋白質に対しても誘導されることが知られている。PR が薬剤耐性変異を獲得すると酵素活性が低下し Gag の切断活性が低下するが、Gag の基質部に観察されるアミノ酸置換は往々にしてこの酵素活性低下を相補する働きを呈する。このように、複数の分子が相互に影響を与えながら環境への適応を高める方向に進化することを共進化と呼ぶが、ここで観察される PI 耐性変異獲得による二次的な Gag

の変異獲得は「Gag-PR の共進化」として知られている現象である。

【従来の研究における問題点】

Gag と PR の進化の間に密接な関連があることは今までの研究で確認されてきたものの、従来の分子レベルでの共進化解析では下記に記すようないくつかの問題点が指摘されてきた。

1) シーケンスデータにおける問題点

従来は目的とする遺伝子領域を PCR で増幅したのちクローニングし、その遺伝子配列解析を行ってきたが、この手法では、PCR 反応の際に約 5~60% という高い頻度で生じる人工的な組換えを防ぐことができず、得られた遺伝子配列が元々存在していたクローンから増幅されたという保障が得られない。従って、共進化のような塩基間置換の相関を評価するようなインフォマティクス解析では、この人工的な組み換えが誤差として結果の信頼性に影響を及ぼしてしまい問題となっていた。

2) 解析手法における問題点

従来、共進化解析法として利用されていた Comparative Sequence Analysis では、ペアとして存在する頻度が有意に高いものを共進化サイトとして検出していた。但し、偶然に出現するペアが当然あるため、Comparative Sequence Analysis の検出結果は擬陽性が多いという問題があった。

以上のような背景を踏まえ、我々は HIV-1 の遺伝子内、遺伝子間に存在する共進化部位の全貌を明らかにすることで、1) HIV-1 の薬剤耐性変異獲得のメカニズムを理解し、2) 薬剤耐性を獲得した HIV/AIDS 症例に対して適切な HAART を行う上での基礎的な知見を得ることを目的に、改良したシーケンシング技術と最新のバイオインフォマティクス手法を取り入れて、HIV-1 の Gag、PR 分子内および分子間に存在する未知の共進化候補ペアを網羅的にサーチし検出することを試みた。

【方法】

まず我々は、HAART を受けている HIV-1 感染者の体内で、抗 HIV 剤の変更とともに Gag と PR がどのように変異を獲得し、またどのような領域が変異獲得に際して相互に干渉したのかを調べるため、1998 年 4 月から 2002 年 8 月までの 52 ヶ月間、抗 HIV 剤治療を受け、且つ PI 耐性変異を獲得した 1 症例（血友病患者、38 歳の日本人男性、HIV サブタイプ B）より経時的に血漿サンプルを採取した。サンプルの総採取回数は 8 回であり（平均採取間隔 7.4 ヶ月）、総解析ウイルスクローン数は 132 クローンである。

次に、Palmer らにより開発された Single Genome Sequencing 法（SGS 法）による

シーケンシングを行った。SGS 法は PCR の鋳型となる HIV cDNA を限界希釈によりクローニングすることで、PCR による人工的ゲノム組換えの出現確率をほぼ 0% にまで抑えこむことを可能とした手法である。この方法では解析対象である HIV RNA を抽出後、cDNA に逆転写した時点で限界希釈を行いクローン化し、その上で目的とする遺伝子領域を PCR で増幅する。クローン化の是非についてはポアソン分布に基づき判定する。理論的に、cDNA 希釈溶液の PCR 増幅成功率が 30% 以下であるとき、cDNA が単クローンとして存在する確率は 80% 以上であると考えられる。本法でクローニングを行う際には、予め複数の濃度の cDNA 希釈溶液を準備し、PCR 成功率が 30% 以下となる適切な希釈条件を決定することが必要である。

SGS 法により得られたシーケンス結果は、Dutheil らにより開発された共進化解析プログラム CoMap を用いて共進化解析を行った。CoMap はマルコフ置換モデルを用いることで、配列データを基に作成された系統樹上の各ノード間（各枝）で生じた塩基置換数をマッピングするプログラムである。また、独立進化を仮定したシミュレーション結果と実際の観察結果とを比較することで擬陽性の検出を抑えている。さらに、多塩基置換が生じることや、各サイト間での塩基置換速度が異なることを考慮しており、既存のマルコフモデル基盤型のプログラムに比べ精度の高い手法である。

最後に、検出された共進化ペアについて、HIV-1 の蛋白質の機能や構造及び薬剤耐性に関する既知の情報を加えて分析し、薬剤耐性に寄与する可能性の高いサイトを絞り込んだ。HIV-1 の共進化解析において、SGS 法およびバイオインフォマティクス手法を用いた解析は本研究が初めてである。

【結果・考察】

前述の実験および解析を経て、我々は nelfinavir (PI の一種)耐性変異である PR の D30N, N88D と分子内共進化し、且つ Gag の切断領域近傍の P453L と分子間共進化する PR の E35D という未知の共進化サイトを見出した。D30N と N88D が PR 分子内で強く連鎖しているという報告は以前にもあったが、E35D と D30N/N88D との分子内共進化、および E35D と P453L の分子間共進化についての報告は初めてである。E35D は薬剤耐性変異ではないため、その獲得が薬剤耐性の獲得と進化に及ぼす効果については今まであまり注目されてこなかったが、いくつかの報告がある。E35D は PR の活性部位および基質結合部位からは離れて位置しているが、基質の出入りを制御するのに重要なフラップ領域に変化をもたらすことが知られている。フラップが開くと、基質は PR 活性部位へ進入・結合できるようになり、基質の切断領域が PR の基質活性部位に結合するとフラップは閉じられ、その後、加水分解により基質は切断される。基質が結合した PR の結晶構造ではフラップ構造が必ず閉じていることから、基質と PR との相互作用にフラップの開閉は重要であると考えられている。また、野生型の PR では、E35 はフラップ領域に位置する R57 と塩

橋を形成しているが、E35D 変異をもつ PR では塩橋は保たれているものの、R57 との結合が弱まり、これによりフラップが半開きとなってしまうことで、PI だけでなく、基質との相互作用が減少すると報告している。つまり、E35D が PR と PI および基質との結合を制御する変異であることが伺える。さらに、amprenavir 耐性変異である I50V, V32I, I47V, I54L/M が集積した後に E35D を含む二次変異が獲得されると薬剤耐性レベルが増大し、治療効果が有意に減少したとの報告もされている。以上、E35D は構造学的に薬剤耐性の獲得に関与していると考えられている。

今回の解析で、E35D は PR 分子内で D30N と N88D の 2 つの耐性変異と連鎖しているだけでなく、Gag の P453L 変異とも強い相関を示すことが明らかとなった。PR の E35D において、分子内および分子間共進化が認められた機序を次のように考察した。

- 1) PR の E35D は、D30N, N88D 獲得による nelfinavir 耐性レベルをさらに高めるために、二次変異として選択・獲得された。
- 2) E35D の獲得による薬剤耐性レベルの上昇機序は、PR のフラップ領域の構造変化による nelfinavir の PR 基質結合部位との親和性低下である。
- 3) しかし、E35D の獲得による PR の構造変化は nelfinavir だけでなく、基質である Gag との結合親和性をも低下させたため、Gag 前駆体の切断効率が悪くなり、ウイルスの増殖能力が低下した
- 4) 長期間にわたるプロテアーゼ阻害剤による選択圧低下で、低下してしまった PR との親和性と増殖能力を回復させるために、代償として Gag が P453L を獲得した。

しかしこの機序では、なぜ p1/p6 切断点から 5 アミノ酸離れた P453L と PR の薬剤耐性変異ではない E35D との間に共進化が生じたのか説明が出来ない。切断点により近いアミノ酸や、薬剤耐性変異を誘導するアミノ酸が選択されなかったのはなぜだろうか。Gag の各切断点前後 4 個のアミノ酸については、PR 基質結合領域を構成するどのアミノ酸と相互作用するか決まっているが、P453L は p1/p6 切断点より 5 アミノ酸後ろに位置しており、PR の基質結合部位を構成するアミノ酸とは構造学的に直接作用することはないと考えられる。しかし、位置からみて PR 分子の外側面と何らかの形で接触していることは間違いないと考えられる。PR 分子と基質領域以外の Gag 分子が構造学的にどのように結合し相互干渉しているかは未だ明らかではなく、今後の研究が必要である。

我々は現在、次のようなモデルを考えている。PR の基質結合部位と Gag の切断領域はそれのみで共進化するのではなく、それぞれから離れて位置するアミノ酸間の相互作用も Gag と PR の共進化に重要な役目を果たしているという可能性である。実際、Gag の切断領域の変異と非切断領域の変異が共にウイルス増殖能力に影響を及ぼしているという報告もある。本研究の結果は、切断領域と基質結合部以外における

PRとGagの相互作用が重要であることをピンポイントで示した知見であり、PRとGagにおける構造学的、酵素学的に未だ知られていない相互作用を知る手がかりとなることが期待される。