

氏 名	なめ き だい すけ 行 木 大 輔
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 42 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	HIV-1融合阻害剤耐性に寄与する変異は gp41 および Rev responsive element の機能に制限される

論文調査委員	(主 査) 教 授 下 遠 野 邦 忠	教 授 杉 田 昌 彦	教 授 小 堤 保 則
--------	------------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

HIV の膜タンパクの一つである gp41 は HIV の細胞融合において重要な役割を果たしている。gp41 由来のペプチドである T-20 は HIV と細胞との融合阻害に効果を示し、HIV 感染者への治療薬として欧米で認可されている。既に T-20 耐性ウイルスが報告されているが、その耐性機序の詳細は未だ明らかになっていない。

In vitro における gp41 由来ペプチドに対する耐性機序を明らかにするため、gp41 C 末端 heptad repeat (C-HR) 由来ペプチド C34 耐性 HIV-1 株を作製し、その耐性機序を解析した。その耐性ウイルスの gp120 では連続する 5 アミノ酸が欠失しており (ΔFNSTW)、また、gp41 では計 7 つのアミノ酸置換が認められた (A30V, D36G, Q39H, I37T, I37K, N126K, L204I)。MAGI (multinuclear activation of the β -galactosidase indicator) assay と replication kinetic assay の結果、I37T, I37K および N126K は耐性化に関与しており、その中でも I37K が耐性責任変異であることが明らかになった。しかし、I37K のみでは十分な C34 耐性を得られず、高度耐性を獲得するためにはアミノ酸変異の蓄積が必要であることが示された。解析の結果、A30V, D36G および L204I は複製能の向上に関与していることが明らかとなった。gp120 に認められた FNSTW は耐性度の上昇と複製能の向上の両方に関与していた。本研究の結果から、耐性化に関与する変異が先に挿入され、それらの変異は同時に複製能を低下させる。そして次に低下した複製能を向上させる変異が出現し、そして、耐性化に関与する変異と複製能を向上させる変異が交互に追加されてゆくことが示された。また、耐性責任変異である I37K は C34 との結合力を弱めるが、C-HR に存在する N126K は、I37K を有する変異 N-HR との結合力を回復させることが peptides binding assay により明らかとなった。A30 と D36 における塩基置換は、*env* やウイルスゲノム RNA を細胞核外へ輸送する Rev タンパクが結合する Rev responsive element (RRE) 領域中に存在し、I37 の置換によって変化した RRE の 2 次構造を補正するための 2 次変異と考えられた。さらに gp41 コード領域は RRE のみならず、*tat* や *rev* の一部をコードしていることから、HIV は融合阻害剤に対する変異を容易に導入することはできないと推測された。また、本研究において gp41 で検出された全てのアミノ酸変異位置は、gp41 の結晶構造から C-HR と 3 量体 N-HR が直接結合すると考えられているそれぞれの結合表面に存在していないことが示され、C34 は N-および C-HR の結合面に直接作用していないことが考えられた。このことから N-HR と C-HR の結合表面に直接作用する薬剤は N-, C-HR の結合をより強く阻害することが考えられることから、HIV-1 の細胞融合または複製をより効率的に阻害する可能性があることを示唆した。これらの結果は、HIV-1 の融合阻害が HIV-1 の化学療法における有効な標的の一つであることを示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

HIV の膜タンパクの一つである gp41 は HIV の細胞融合において重要な役割を果たしている。gp41 由来ペプチドである T-20 は HIV と細胞との融合阻害効果を示し、HIV 感染者への治療薬として欧米で認可されている。既に T-20 耐性ウイルスが報告されているが、その耐性機序の詳細は未だ明らかになっていない。

そこで申請者は gp41 由来ペプチドに対する耐性機序を明らかにするため、gp41 C 末端 heptad repeat (C-HR) 由来ペプチド C34 耐性 HIV-1 株を誘導し、その耐性機序を解析した。得られた C34 耐性ウイルスの gp120 において 5 アミノ酸欠失 (Δ FNSTW) と gp41 において計 7 つのアミノ酸置換が認められた (A30V, D36G, Q39H, I37T, I37K, N126K, L204I)。Multinuclear activation of the β -galactosidase indicator assay と replication kinetic assay の結果、I37T/K と N126K が耐性責任変異であり、他の変異は高度耐性化に伴うアミノ酸変異の蓄積であることを示した。I37K は C34 の結合を阻害し、N126K は C34 との競合力を増加させていた。一方、A30V, D36G および L204I は複製能の向上に、gp120 に認められた FNSTW は耐性度と複製能に関与していることを明らかとした。この複製能の改善にはウイルスゲノム RNA の高次構造が関与するという興味深い結果を示した。このことは gp41 由来ペプチドに対する耐性 HIV が出現しにくいという臨床治験の結果と一致する。また、本研究では既に報告されている gp41 の結晶構造を基に、新しい阻害剤の標的として gp41 が優れている可能性を報告している。

さらにこれらの耐性変異誘導の実験を通して、現在最も HIV 研究に用いられている感染性クローン pNL4-3 の問題点も指摘した。

以上の結果は HIV の細胞融合阻害剤の耐性機序を耐性と複製という 2 方面から観察・検討し、近年同定された gp41 立体構造今後のペプチドを含めた薬剤開発に対し、有用な情報を提供している。そのため、本論文は生命科学博士の学位論文として価値のあるものと認めた。また、申請者は、平成17年1月24日、論文内容とそれに関連した口頭試問を受け、合格と認められたものである。