

論文の内容の要旨

論文題目 HIV-1侵入阻害剤を用いたEnv機能構造研究

氏名 引地 優太

ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV)は、CD4 陽性細胞を主標的に感染し、後天性免疫不全症候群を引き起こす。9種の HIV-1 遺伝子産物の1つであるエンベロープ (Env) タンパクは、外被糖タンパク gp120 および膜貫通タンパク gp41 の2つのサブユニットが非共有結合したプロトマーの三量体から構成される。gp120 は、5つの C (conserved) 領域および5つの V (variable) 領域から成る。他方、gp41 は細胞外ドメイン、膜貫通領域、および細胞質内領域の3つの機能ドメインから構成される。

この HIV-1 Env の主要機能である侵入過程は、宿主細胞表面の CD4 および補助受容体 (CXCR4 または CCR5) が、Env に結合することで誘起される連続した Env の高次構造変化によって執り行われる。具体的には、まず、gp120 に CD4 が結合することにより、gp120 の高次構造変化が誘起され、gp120 V3 領域の露出等、補助受容体結合の準備が整う。その後、V3 領域を中心に、gp120 が補助受容体に結合し、更なる Env 高次構造変化が進行する。その結果、gp41 N 末端の融合ペプチドが活性化し、膜融合が促進され、侵入過程が完了する。また、HIV-1 は、この侵入過程で使用する補助受容体の種類で機能的に、CCR5 指向性株 (R5 ウイルス)、CXCR4 指向性株 (X4)、および両指向性株 (R5X4 ウイルス) の3種に大別される。

HIV-1 Env は侵入機能を担う一方で、中和抗体をはじめとする液性免疫、新規感染個体への馴化、および各種宿主因子等、様々な選択圧の標的として晒される。しかし、HIV-1 はその高い変異性により、免疫および宿主馴化に迅速に対応し、容易に逃避する。結果、HIV-1 Env の多様性は、他の HIV-1 タンパクと比

べて非常に高い。他方、このように極めて高い多様性を有する HIV-1 Env は、各種選択圧から逃避しつつ、侵入機能を保持しているが、実際にどのような構造を保持しているのかは十分に理解されていない。

近年、この HIV-1 の侵入過程を標的にする化合物の研究開発が進められている。このような化合物に対する耐性株を誘導し、多様な HIV-1 Env 株を得て、その機能と構造を解析することは、HIV-1 Env 機能構造の必要条件の理解に繋がることが期待される。そこで本研究では、宿主レセプターを標的に Env 機能に影響する CXCR4 阻害剤および Env 機能に直接影響するトリテルペン誘導体をそれぞれ用いて、*in vitro* 耐性誘導実験を行い、得られた選択株 Env の機能と構造を解析することにより、HIV-1 Env 機能構造の必要条件の理解へ繋げることを試みた。

1. CXCR4 阻害剤選択株 Env の機能構造解析

所属研究室の先行研究において、X4 ウイルス NL4-3 株と PM1/CCR5 細胞を用いて、3 種の CXCR4 阻害剤 (KRH-3955、AMD3100 および AMD11070) に対する耐性誘導実験が行われ、多くの選択変異が gp120 V3 領域に蓄積していることが明らかになってきた。本研究において、これら選択変異を有する組換え株を構築し、各 CXCR4 阻害剤に対する感受性試験を行なったところ、いずれの選択株も各 CXCR4 阻害剤すべてに対して交差耐性を認め、耐性株であることが示された。また、V3 領域のみの組換え株においても、同様に交差耐性が示されことから、V3 変異が主要耐性変異であることが明らかとなった。加えて、これら耐性株の表現型耐性の指標が、通常用いられる IC_{50} 値の上昇で示される点から、耐性機序として、gp120 V3-CXCR4 間相互作用が CXCR4 阻害剤と競合することが示唆された。実際、これら V3 組換え株に対して分子動力学解析を行なったところ、V3 領域先端および基部の構造的ゆらぎが増大し、CXCR4 との相互作用機能が向上していることが示唆された。さらに、Env 機能構造を認識する各抗 HIV-1 中和抗体に対する V3 組換え株の感受性解析より、侵入過程における Env 高次構造変化により、CXCR4 結合に備えて露出・形成される機能領域を認識する抗体の感受性が有意に上昇することが明らかとなった。以上より、耐性株で認められる V3 領域構造変化は、V3 領域だけでなく Env 高次構造全般に重要な役割を担うとともに、主要機能である補助受容体との結合機能に影響する可能性が示唆された。

2. トリテルペン誘導体選択株 Env の機能構造解析

続いて、Env を直接標的とする侵入阻害剤に対する耐性株 Env の機能構造解析を目的に、所属研究室で見出した4種のトリテルペン誘導体(IC9564、OKS3-019、NAT-078、または NAT-078r)に対する耐性誘導実験を行なった。X4 ウイルス NL4-3 株および R5X4 ウイルス 89.6 株を PM1 細胞に感染させ、段階的に薬剤濃度を上げることにより、6種の選択株の分離に成功した。これら6種のトリテルペン誘導体選択株の Env 領域配列を解析したところ、NL4-3 選択株では、3種の誘導体共通に gp41 HR1 領域の A582T 変異が選択されることが示された。一方、89.6 選択株では、NL4-3 株とは異なり、共通変異は選択しないが、いずれも立体構造において gp120-gp41 の境界面近傍に位置する、gp41 細胞外ドメイン変異および gp120 C 領域変異が選択されることが示された。そこで、これら選択変異の組換え株を構築し、各トリテルペン誘導体に対する感受性試験を行なった結果、選択変異の蓄積に従い、耐性度が増大し、両ウイルス株共通に、gp41 細胞外ドメインが主要耐性変異であること、および gp120 C 領域に補完変異が生じることが示された。

次に、これら選択株のウイルス機能への影響を調べるために、PM1 細胞におけるウイルス複製能を解析した。結果、トリテルペン存在下では、NL4-3 野生株が複製できないのに対し、NL4-3 選択株は複製し、耐性であることが示された。一方で、トリテルペン非存在下における NL4-3 選択株の複製能は、野生株に比べ低下し、耐性変異によりフィットネスクストが生じることが示された。同様に、トリテルペン存在下において 89.6 選択株も複製可能であることから、89.6 選択変異も耐性に寄与することが示された。しかし、これら 89.6 耐性株は、トリテルペン非存在下では殆ど複製できず、NL4-3 選択株とは異なる薬剤依存的な耐性機序が明らかとなった。

続いて、Env 機能構造を認識する Env 標的化合物および抗 HIV-1 中和抗体に対する各耐性株の感受性を解析したところ、NL4-3 および 89.6 選択株のいずれにおいても、CD4 が結合する前の準安定状態 Env を認識する化合物および中和抗体に対する感受性が上昇することが明らかとなった。すなわち、侵入過程における Env 高次構造変化誘導が野生株よりも低い可能性が考えられ、フィットネスクストの一因となることが示唆された。また、R5X4 ウイルスである 89.6 選択

株においては、CXCR4 阻害剤の感受性が低下する一方で、CCR5 阻害剤の感受性が上昇する結果が得られた。加えて、PM1 細胞に比して、R5 ウイルス増殖が容易となる PM1/CCR5 細胞における 89.6 選択株の複製能は、トリテルペン非存在下においても、フィットネスコストこそ生じるが、複製可能なことが示された。以上の結果から、89.6 選択株のドミナント指向性が X4 から R5 に移行することが明らかとなり、gp41 細胞外ドメイン構造が補助受容体相互作用機能に重要な役割を担うことが示唆された。

今回、宿主側およびウイルス側の各 Env 標的化合物に対する耐性株 Env の耐性機序解析を足がかりとして、Env 機能構造解析を展開した結果、Env 主要機能の1つである補助受容体結合機能に関して、多くの知見を得ることができた。X4 ウイルスにおいては、CXCR4 結合の主要機能領域である gp120 V3 領域が、V3 自身の構造的ゆらぎ、および Env 高次構造変化に重要な役割を担い、CXCR4 との相互作用を向上させることが示唆された。他方、これまで、補助受容体相互作用をはじめとして、十分な理解がされていない R5X4 ウイルス性状においても、機能領域である gp120 V3 に加えて、新たに gp41 細胞外ドメイン構造が、R5X4 ウイルスにおける補助受容体相互作用機能に重要な役割を担うことが示唆された。また、gp120 V3 および gp41 細胞外ドメインの各機能領域のアミノ酸変化は、自身の領域だけでなく、Env 高次構造変化を誘導することで、各種選択圧から免れつつ、侵入機能を保持することが、改めて示された。しかしながら、同時に、今回解析した侵入阻害剤耐性変異の多くが、一方では中和抗体および別の侵入阻害剤に対する感受性を上昇させることも明らかとなり、特定の選択圧に対する回避の限界も示唆された。今後、複数の同時選択圧からの選択株の Env 機能構造解析を進めることにより、HIV-1 Env 機能構造の必要条件の解明に結びつくことが期待される。