

次世代型インテグラーゼ阻害剤開発に向けた分子基盤の確立

増田貴夫

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

【研究の背景】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、ウイルスゲノム RNA の逆転写酵素(RT)による DNA 変換とインテグラーゼ(IN)による染色体への組み込み反応により、宿主ゲノムと一体化させ持続感染を成立させる。申請者は、HIV IN がウイルス RNA ゲノムの逆転写反応の遂行にも必須な役割をもつことを世界に先駆けて報告した¹⁾。その後も、リバーズジェネティクスの手法を駆使し、このINの新たな機能に關与する必須なアミノ酸残基を同定し、新規IN阻害剤開発への応用と展望を提案している²⁾。最近、申請者らは、HIV 複製レベルにおいて、RTとINが融合した pol 前駆体蛋白としてIN依存的に逆転写反応を制御する可能性を見出し、INの「逆転写反応」における機能關与機序の手がかりとなる独自の知見を得て報告した³⁾。

【目 的】

近年、IN はゲノム組み込み以外に極めて重要な機能を担っていることが申請者らの研究により明らかになってきた。本研究課題では、このINの新たな機能を機能標的とする次世代型IN阻害剤の開発に資する分子基盤情報の提示に向けINの未知機能の解明を目的とし、リコンビナント RT-IN 蛋白を調整し、逆転写過程への直接的關与の有無を無細胞逆転写アッセイ系により評価した。

【方 法】

1) rRTIN の発現系の構築、発現条件の最適化および精製

HIV-1 pNL4-3 クローン由来 RTIN 領域を pET-47b(Novagen)の Sam I と Xho I サイトに挿入し、His-tagRTIN 発現ベクター(pET47bRTIN)を構築した。Rosetta(DE3)大腸菌株に pET47bRTIN ベクターを導入し、種々の濃度の IPTG (0.1~1mM)、温度 18~37°C、培養時間(2~20 時間)により rRTIN 発現誘導条件の検討を行なった。至適条件下で発現誘導後、溶解液 [20mM HEPES(pH8.0), 1M NaCl, 1% TritonX-100, 10% グリセロール, 0.1% 2-メルカプトエタノール, プロテアーゼ阻害剤カクテル(ロッシュ)]に懸濁し、核酸分解酵素(ベンゾナーゼ、メルク)処理を室温1時間行なった。10,000xg で 30 分遠心後、上清を可溶性分画として回収した。可溶性分画中の His-tagRTIN を Ni-agarose カラム・陽イオン交換カラム(Hi-trap SP HP)により、rRTIN を精製した。精製した 2 μ g の rRTIN を 0.4 μ g の HIV-1 プロテアーゼ(Prospec)と反応バッファー[20mM Tris-HCl(pH7.0), 1M NaCl, 1mM DTT]中で 37°C、30 分反応させた、Western Blot 法により抗 HIV-1 RT 抗体(ab63911, Abcam)及び IN 抗体(ab6645, Abcam)との反応性を、ケミルミシステム(Chemilum ImageQuant Las 400, GE)を用いて検出した。

2) 無細胞 HIV 逆転写反応による機能評価

先行研究で我々が樹立した無細胞 HIV 逆転写反応アッセイ系^{4,5)}により rRTIN の逆転写酵素活性を検討した。

【結 果】

1) rRTIN の発現系の構築

pET47bRTIN を Rosetta(DE3)大腸菌株に導入し、0.1mM IPTG 添加後 18°C で 20 時間の培養により、可溶性分画からの

rRTIN の回収率が最大となり、本研究での至適条件として用いた。可溶性分画に抽出された rRTIN を Ni-agarose カラム・陽イオン交換カラム等により rRTIN を精製した。精製 rRTIN の分子量～98kDa(p98)は、抗 RT 抗体と抗 IN 抗体に反応することを確認した。また、HIV-1 プロテアーゼ処理により、66kDa (p66)と 51kDa (p51)の RT 産物および 32kDa (p32)の IN 産物の生成を確認した。以上より、精製された 98kDa のタンパク質 (p98)は、RT と IN が融合したタンパク質 (rRTIN) であることが確認された。

2) rRTIN の逆転写酵素活性

rRTIN の逆転写酵素活性を無細胞逆転写アッセイ系[Huang,2019#32;Masuda,2015#2]により評価した。RT は、三つの酵素活性:RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ(RDDP)、RNaseH、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ(DDDP)活性を確認した。

【考 察】

HIV 逆転写過程におけるインテグラーゼの機能解明に向け、転写酵素とインテグラーゼの融合蛋白質のリコンビナント蛋白質の調整に着手し、精製度が不十分ではあるが、可溶性分画より機能活性を保持した蛋白質精製に成功した。rRTIN は、RNA および DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性および RNaseH 活性を有しており、DNA ポリメラーゼ活性は、rRTp66 と比較して有意に高い可能性も示唆され、RT-IN 融合状態であることの酵素的優位性を示唆する結果であり、HIV 阻害剤開発に向けた基礎研究基盤形成⁶⁾の促進への貢献も期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

作用点の異なる抗ウイルス薬の開発とそれらの併用療法は、AIDS 発症阻止を可能にした。しかしながら、生涯にわたり複数の薬剤による HIV 複製制御が「無症候状態」の維持と AIDS 発症阻止に必須となる。本研究により、「逆転写」と「組み込み」反応を“**単剤で阻害**”する次世代型 HIV 阻害剤開発に向けた基礎研究基盤を確立できた。こうした革新的薬剤が開発されれば、現行の多剤併用療法を基盤とする HIV 治療が単剤で可能となり、AIDS 発症阻止のための薬剤コスト削減やアドヒアランスの向上化が促進される。これにより、他者への新規感染が確実に制御され、将来的には、HIV 感染症の「根絶」への貢献も期待される。

【参考・引用文献】

1. Masuda T, Planelles V, Krogstad P, Chen IS. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol.* 1995;69(11):6687-96. PubMed PMID: 7474078.
2. Masuda T. Non-Enzymatic Functions of Retroviral Integrase: The Next Target for Novel Anti-HIV Drug Development. *Front Microbiol.* 2011;2:210. Epub 2011/10/22. doi: 10.3389/fmicb.2011.00210. PubMed PMID: 22016749; PubMed Central PMCID: PMC3192317.
3. Takahata T, Takeda E, Tobiume M, Tokunaga K, Yokoyama M, Huang YL, et al. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase. *J Virol.* 2017;91(1). doi: 10.1128/JVI.02003-16. PubMed PMID: 27795445.
4. Huang YL, Kawai G, Hasegawa A, Kannagi M, Masuda T. Impact of 5'-end nucleotide modifications of HIV-1 genomic RNA on reverse transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;516(4):1145-51. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.152. PubMed PMID: 31284953.
5. Masuda T, Sato Y, Huang YL, Koi S, Takahata T, Hasegawa A, et al. Fate of HIV-1 cDNA intermediates during reverse transcription is dictated by transcription initiation site of virus genomic RNA. *Sci Rep.* 2015;5:17680. doi: 10.1038/srep17680. PubMed PMID: 26631448.
6. Obayashi CM, Shinohara Y, Masuda T, Kawai G. Influence of the 5'-terminal sequences on the 5'-UTR structure of HIV-1 genomic RNA. *Sci Rep.* 2021;11(1):10920. doi: 10.1038/s41598-021-90427-9.