

改変 HIV 逆転写酵素と DNA アプタマー複合体の結晶解析 Crystallographic analysis of HIV reverse transcriptase in complex with DNA aptamer

安武義晃^{1,*}, 田村範子¹, 林宏典², 前田賢次²

¹産業技術総合研究所生物プロセス研究部門, 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東 2-17-2-1

²国立国際医療研究センター研究所, 〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

Yoshiaki Yasutake^{1,*}, Noriko Tamura¹, Hironori Hayashi² and Kenji Maeda²

¹AIST, 2-17-2-1 Tsukisamu-higashi, Toyohira, Sapporo 062-8517, Japan

²NCGM, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

1 はじめに

B 型肝炎ウイルス (HBV) は世界全人口の 6% に相当する約 4 億人に持続感染していると推定されており、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌、肝不全を発症し、年間 100 万人以上が死亡している。現在、最も強力な抗 HBV 薬として用いられているエンテカビルに対し、薬剤耐性変異が現れていることから、新たな抗 HBV 薬の開発を進める必要がある。

これまでに、HBV 創薬ターゲット分子である HBV 逆転写酵素 (RT) の大量発現取得が世界中で広く試みられてきたが、本酵素は著しい不溶性の性質のため、決定的な成果は得られていない。一方、RT の結晶学的研究はヒト免疫不全ウイルス (HIV) の RT で広く行われており、また HBV RT と HIV RT の活性部位 (薬剤結合部位) はアミノ酸の保存性が見られることから、ポケットの構造は互いに類似していることが推測される。すなわち構造は類似しているながらも、わずかな構造の違いが薬剤感受性の相違を生んでいると考えられる。私たちは HIV-1 RT の活性部位を形成するアミノ酸を HBV RT のアミノ酸に置換した様々なバリエーションの変異体を作成しており、それらの立体構造を解析することで、HBV RT の活性部位構造を推定し、薬剤感受性・非感受性の機構、薬剤耐性獲得機構を理解することを目指している。

2 実験

HIV-1 RT p66/p51 heterodimer の発現精製は、以前に報告した手法に基づき行った [1]。様々に作成した HBV 模倣型 HIV-1 RT 変異体のうち、Q151M 変異が入った HIV-1 RT を用いて DNA 複合体結晶化を行った。DNA は、この先グアノシンアナログであるエンテカビルとの複合体解析を見据えて、以前に報告された DNA アプタマー (38 塩基のアプタマーで 2 箇所 2'-O-methyl 修飾を持つもの) [2] を基に新たに 3 塩基置換したものをを用いた。

HIV-1 RT:DNA complex の結晶は、室温におけるハンギングドロップ蒸気拡散法により、bis-tris buffer pH 6.0 の下、PEG 6000 及び di-ammonium

hydrogen citrate を沈殿剤として、また MgCl₂、グリセロール等を添加剤として用いることで取得した。X 線回折データは PF BL17A にて収集した。データの指数付及びスケリングはプログラム XDS を用いて行い、既知の HIV-1 RT:DNA complex (PDB code, 5d3g) をサーチモデルとして、分子置換法により解析を行った。分子置換法はプログラム MOLREP を用い、また精密化はプログラム Phenix により行った。モデルの構築はプログラム Coot 上で行った。データの統計を表 1 にまとめる。

表 1: 結晶データと精密化の統計

Data collection	BL-17A
Detector	Pilatus 3S 6M
Wavelength (Å)	0.9800
Resolution (Å)	50-2.60 (2.75-2.60)
Unit-cell	
<i>a, b, c</i> (Å)	284, 284, 96
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Space group	<i>H3</i>
R_{meas}	0.084 (0.758)
CC1/2	99.8 (75.8)
Completeness (%)	100.0 (99.8)
Redundancy	5.2 (5.0)
Mean $I/\sigma(I)$	16.9 (2.5)
Refinement	
R_{work}	In progress
R_{free}	In progress

3 結果および考察

HIV-1 RT:DNA 複合体の構造を 2.6 Å 分解能にて解析した。結晶の空間群は *H3* であり、非対称単位に 2 分子のヘテロダイマーが存在していた。それぞれのダイマー分子の DNA 結合グループには、明瞭な DNA アプタマーに相当する電子密度を確認した (図 1)。電子密度に基づいて DNA モデルの構築を行ったところ、DNA アプタマーの 3'末端は RT 分子の活性部位 (薬剤結合部位、N-site) に位置する

ように、確からしい方位で結合していることが確認された。変異残基である M151 は薬剤結合ポケットに位置し、基質（もしくは薬剤）が結合した後、ポケットに蓋をする位置関係に存在していることが明らかになった。

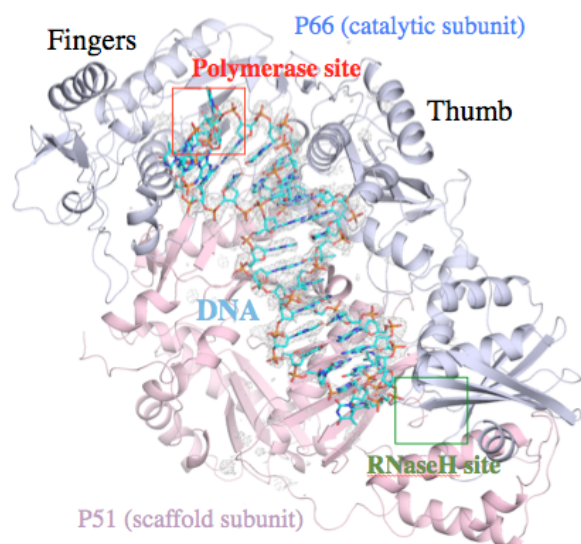


図 1 : HIV-1 RT-1M DNA complex の全体構造。

4 まとめ

HBV RT を模倣した HIV RT 変異体の DNA 複合体結晶解析を行った。解析の結果、エンテカビルが結合できるよう改変した DNA アプタマーに対する明瞭な電子密度を確認した。今後、薬剤との複合体解析を進めることが可能となる。

謝辞

本研究成果は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業等の支援により得られました。また回折データ収集、及び結晶交換ロボティクス使用において実験をサポートいただいた PF ビームラインスタッフの皆さまに深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] A. Nakamura *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. F.*, **71**, 1384-1390 (2015).
- [2] MT. Miller *et al.*, *Protein Sci.* **26**, 46-55 (2015).

* y-yasutake@aist.go.jp