

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07522

研究課題名（和文）HIVとHBVの逆転写酵素の構造比較・解析を基盤とした新規抗HBV薬開発への応用

研究課題名（英文）Comparative structural analysis of reverse transcriptase of HIV and HBV for development of anti-HBV agents

研究代表者

服部 真一郎（Hattori, Shinichiro）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：60709484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HBV逆転写酵素（RT）は、著しい不溶性のためその構造学的研究は遅々として進んでいない。本研究では、HIV RTにHBV RTのアミノ酸を導入したキメラRTを作成、さらに既報の薬剤耐性変異を導入することで、薬剤耐性化機序を構造学的・ウイルス学的に検討した。抗HBV薬であるエンテカビル（ETV）耐性変異導入で薬剤結合部位の形状が変化、立体障害を起こすことが示された。これは、この立体障害によりETV結合が減弱、感受性を低下させていることを示唆している。本研究で得られた構造情報および薬剤感受性との相関解析は、耐性変異株に対しても活性を示すような新たな核酸アナログのデザイン・開発に資すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だ成し遂げられていないHBV RTの結晶構造解析を、キメラRTを用いることで実際の結晶を取得し、詳細な構造解析を可能とし、HBV RTの構造学的特徴をより詳細かつ明確に理解でき、さらなる知見を蓄積できる。さらにウイルス学的・酵素学的解析を加味することで、生物学的な特性を詳細かつ総合的に検討できるようになる。これは薬剤の活性発揮機序やウイルスの耐性獲得機序の解明につながり、より強力かつ耐性獲得を許さない新規抗HBV薬の開発に応用・貢献すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Structural studies of HBV reverse transcriptase (RT) have made no progress due to its significant insolubility. In this study, we constructed RT chimeras by introducing amino acids from HBV RT into the HIV RT, and furthermore, by introducing known drug-resistant mutations, we investigated the drug resistance mechanism structurally and virologically. Mutations of the anti-HBV drug entecavir (ETV) was shown to change the shape of the binding site of ETV and cause steric hindrance. This suggests that the steric hindrance attenuates ETV binding and reduces its susceptibility. The structural information obtained in this study and the correlation with drug susceptibility are expected to contribute to the design and development of new nucleic acid analogs that exhibit activity against resistant mutant strains.

研究分野：ウイルス学

キーワード：逆転写酵素 HBV HIV 核酸アナログ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

逆転写酵素 (RT) の構造学的研究は、1990 年代に HIV RT の結晶構造が解明されて以降、新規薬剤と RT の相互作用や薬剤耐性ウイルスにおける耐性獲得機序の解析に応用されてきた。一方で HBV RT に関しては、世界中の研究者の長年の努力にも拘わらず、著しく不安定かつ不溶性のため、結晶構造の取得が困難であることがネックとなり、HIV に比して構造学的解析が遅々として進んでいない。さらに HBV は細胞株等ではその感染性が著しく低下、ヒト初代肝細胞が必要であることも研究遅延の一因でもある。本研究においては、HIV 研究を基盤とした HBV 研究を行ってきたアドバンテージを生かしながら、我々が作成したキメラ RT を用いて結晶構造解析を実施、さらにその変異をコードした HIV を用いることで容易にウイルス学的研究を実施でき、より詳細な解析が可能であると考えた。HIV や HBV のように抗ウイルス療法が導入されるも生涯にわたる服薬が必要であり、薬剤耐性変異出現の危惧は常に在り、継続した解析、薬剤耐性ウイルス出現の予測、およびそれに対抗するための新薬開発が今後も必要である。

2. 研究の目的

HBV 逆転写酵素 (RT) は、HBV の複製を担う重要な蛋白質であり、HBV 阻害剤開発の主な標的であり、HBV の増殖を直接的に阻害する核酸アナログ製剤 (NA) は、この HBV RT に結合し活性を発揮する。近年、これら NA に対する薬剤耐性株が出現しており、薬剤耐性株にも強い活性を示し、またさらなる耐性化を許さないような新規 NA の開発が求められている。本研究は、HIV RT の活性部位に HBV RT のアミノ酸、あるいは薬剤耐性関連アミノ酸を導入したキメラ RT およびそれをコードするキメラ HIV を作成、それらを用いて薬剤感受性の検討および構造学的解析によって HBV RT の活性部位構造および NA との相互作用を推定し、NA の薬剤作用や RT の耐性獲得機構の知見・情報蓄積を目的とした。

3. 研究の方法

我々は、HIV-1 RT の活性部位 3 箇所のアミノ酸を HBV RT 型のアミノ酸に置換した 3MB キメラ (Q151M/F115Y/Y116F) が、抗 HBV NA である ETV や 3TC に高い薬剤感受性を示すことを同定しており、この 3MB キメラをさらに HBV RT 型アミノ酸置換を付加した多重変異のキメラを多数作成した。また 3MB キメラに薬剤耐性変異として知られる M184V および M184V/F160M を付加したキメラを作成した。これらキメラ RT の薬剤感受性を、キメラ RT をコードするキメラ HIV を作成し、抗ウイルスアッセイによって評価した。また、大腸菌発現系により精製したキメラ RT を用いて結晶構造解析を行なった。薬剤感受性評価と構造解析から得られた結果は、野生型 HIV RT の構造・薬剤感受性と比較、検討を行った。

4. 研究成果

3MB キメラに HBV RT の M204V/L180M に相当する薬剤耐性変異、M184V/F160M を導入したところ、HBV 同様に ETV/3TC に対する薬剤感受性が M184V の導入で減少し、M184V+F160M でさらに大きく減少することがわかった。そこで、HIV RT 3MB および 3MB/M184V、3MB/M184V/F160M の結晶構造解析を行った。解析した構造の活性部位構造を 3MB キメラの構造と比較したところ、M184V による構造変化はほとんど観察されなかった一方、F160M により F115 側鎖の位置が移動してポケットが膨らみ、結合している dNTP も 3MB と比較して浅く結合している状態が観察された (図 1)。この結合位置の変化に従い、Mg²⁺ の結合位置も大きく変化していた。3MB/M184V/F160M に結合した dNTP を 3MB に結合した dGTP と重ね合わせたところ、dNTP のリボース酸素がプライマー鎖の 3'-end リボースの 2 位炭素 (C2) と近接することがわかった。dNTP の結合位置のずれに伴い Mg²⁺、Asp185 側鎖の位置にも変化が認められた。ETV ではリボース酸素が環外メチレン基に置き換わるため、メチレンと C2 は立体障害の関係となり、活性部位に結合しにくくなることが予想され、薬剤耐性化の一因であることが示唆される。本研究で観察された薬剤耐性を合理的に説明する微細構造変化は、以前に報告されているインシリコモデリングの研究では全く予測できておらず、本キメラ RT の実験結晶解析の有効性が示された。さらに、薬剤感受性試験を行った結果、3MB キメラの ETV 感受性に比して、3MB/F160M キメラは同等の感受性であったが、3MB/M184V キメラは～10 倍低下、3MB/F160M/M184V キメラは～30 倍の ETV 感受性低下を示し (表 1)、酵素学およびウイルス学的両試験で創刊する結果が得られた。これらの研究成果は、F160M および M184V 変異による HBV-RT の ETV 耐性発現メカニズムについて新たな知見を与えるものである。

我々は引き続き、様々な変異の組み合わせによるキメラ RT を作成し、引き続き薬剤感受性と構造学的研究を進めている。

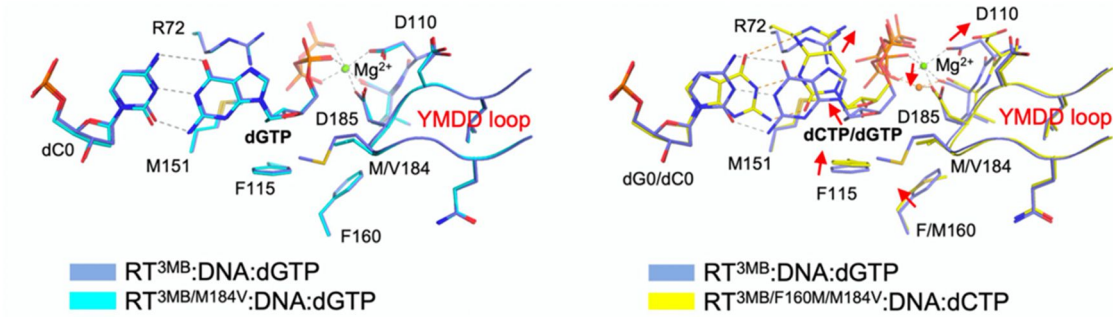


図1 3MB キメラ、3MB/M184V、3MB/M184V/F160M の活性部位構造の比較。耐性変異 F160M の側鎖位置の変化により活性ポケットの形状が変化し、dNTP の結合に大きな影響を与えることが示された。

表1. 種々のHBVキメラRTにおけるエンテカビル感受性の比較

RT	IC ₅₀ (50%阻害する能度)	
	酵素活性阻害試験 (μM)	細胞培養試験 (nM)
Q151M/Y115F/F116Y (3MB)	3.4	96
3MB/F160M	5.7	未実施
3MB/M184V	35	451
3MB/F160M/M184V	94	1136

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Shogo, Watashi Koichi, Kato Takanobu, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Tamura Noriko, Hattori Shin-ichiro, Maeda Kenji, Mitsuya Hiroaki, Yasutake Yoshiaki, Toyoda Tetsuya	4. 巻 95
2. 論文標題 Biochemical and Structural Properties of Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Polymerase with L180M/M204V Mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02401-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02401-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安武義晃、服部真一朗、熊本浩樹、田村範子、前田賢次、満屋裕明
2. 発表標題 HIV/HBVキメラ逆転写酵素の構造情報を基盤とした抗HBV核酸アナログE-CFCPの作用機構の洞察
3. 学会等名 第30回日本抗ウイルス療法学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安武 義晃 (Yasutake Yoshiaki) (20415756)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------