

(4) HIV-1 逆転写酵素活性測定系確立の試み

中尾隆介¹⁾²⁾ 山本政弘¹⁾²⁾ 堀田飛香²⁾

IN VITRO MEASUREMENT OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE ACTIVITY

Ryusuke NAKAO¹⁾²⁾, Masahiro YAMAMOTO¹⁾²⁾ and Asuka HORITA²⁾

背景および目的

抗 HIV ウイルス剤の併用による強力な治療法 (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) の導入により, HIV 感染症においても血中ウイルス量を測定感度以下に維持することが可能となった. しかしながら, 主として不完全な服薬により HIV は容易に薬剤耐性を獲得し, 治療失敗に終わる例も少なくない.

薬剤耐性獲得の機序は, 薬剤の作用する酵素 (逆転写酵素やプロテアーゼ) に変異を生じることによる. しかしながら, 一方でこの変異は本来の酵素自身の活性も変化させるため, 多くの薬剤耐性株では酵素活性が野生型に比べて低下しているとされる. 薬剤耐性株はその薬剤存在下では野生型よりも増殖するものの, 薬剤非存在下ではその増殖能は野生型よりも低下していることが知られており, これを広義に fitness (適合能) という言葉で表現している¹⁾.

今回われわれは, fitness の低下は本来その酵素の機能低下に基づくものであるとの前提のもとに, 逆転写酵素活性を直接測定比較する系の確立を試みたので報告す

る.

方法および結果

野生型 HIV 遺伝子を含むプラスミド pNL432 の逆転写酵素領域および RNase H 領域を PCR にて増幅し, 大腸菌発現ベクターに組み込んだ. 逆転写酵素の 2 つのサブユニット p66 と p51 のうち, p66 に相当する配列は 3' 側に His-Tag を有し, p51 に相当する配列は 5' 側に GST-Tag と S-Tag を有するように 2 種類の発現ベクターを構築した (図 1). それぞれを isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG) にて独立して発現誘導し, 菌塊を p51 過剰の状態状態で混合した後, MgCl₂ 存在下で溶菌し二量体形成を促進した. 可溶性画分を Ni-NTA カラム (Qiagen 社), さらに Glutathione Sepharose 4B カラム (Amersham Bioscience 社) にて粗精製し

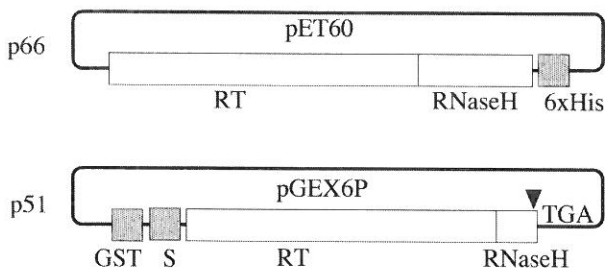


図 1 逆転写酵素サブユニット発現ベクター

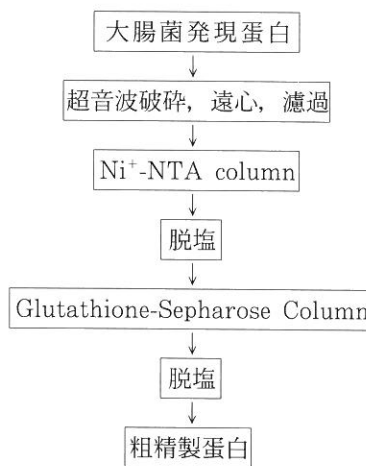


図 2 発現蛋白粗精製のシェーマ

国立病院九州医療センター National Kyushu Medical Center 内科 ¹⁾臨床研究部 ²⁾感染症対策室
Address for reprints: Ryusuke Nakao, Clinical Research Institute, Department of Internal Medicine,
National Kyushu Medical Center, 1-8-1 Jigyohama, Chuo-ku, Fukuoka 810-8563 JAPAN

Received March 25, 2003

Accepted September 19, 2003

ヘテロダイマーのみを得た(図2)。こうして得られた粗精製蛋白はFRETWorks S-Tag Assay Kit (Novagen社)にて定量が可能であった。またColorimetric Reverse Transcriptase Assay Kit (Roche社)にて転写活性の測定が可能であった。蛋白定量、活性測定ともにキットのLinear Range内でサンプル量に対して直線的な増加を認め、再現性も良好であった。p66, p51計20 mlの培養液から20 pmol前後の逆転写酵素蛋白が得られた。

考 察

HIV感染症の臨床において、ウイルスのfitnessが問題となるケースは少なくない。薬剤耐性検査では、薬剤中断後に耐性株は検出されなくなることが多いが、これは野生型がそのfitnessにおいて耐性株を凌駕した為であり、耐性株が消失したわけではない。また最近では耐性株による初感染が増加しているが、この株が持続するのか、将来野生型など他の型に凌駕されるのかという点にもfitnessは大きく関与する。さらに、治療失敗例であらゆる抗HIV剤に対する耐性がある場合、fitnessの低い耐性株を選択する治療を選ばざるを得ないことがある。耐性株の方が野生株よりもAIDSへの進行が遅いことが期待されるからである。

このように臨床と密接に関係しているfitnessであるが、現在その測定にはcompetitive study, すなわち野生型と耐性株を1:1で培養し、どちらが優勢を占めるかを見る方法が一般的である²⁾。この方法では、fitnessの強弱を見ることはできても、多くの株の具体的な比較は困難である。実際、fitnessの強弱を定量化した報告はない。しかしながら、fitnessの強弱は本来それぞれの酵素活性の変化によるものであるため、酵素活性を見ることによりfitnessの推察が可能と考えられる。

今回われわれはウイルスの培養を必要とせず、逆転写酵素活性の定量を行えるシステムを構築した。2つのタグを用いて逆転写酵素を精製する方法は既に報告されて

いるが³⁾、われわれの方法のように3つのタグによりさらに蛋白定量も可能としたシステムはこれが初である。この方法の特徴として、(1)蛋白定量が可能である為さまざまな変異体の比較が可能、(2)PCR baseであるため遺伝子型薬剤耐性検査の延長として臨床検体への応用が可能、(3)少量の培養で解析に十分な量の蛋白が得られる、(4)逆転写酵素活性のみを独立して見るというユニークなシステムであるため、ウイルス培養系を用いたcompetitive studyと併用することによりfitnessに關与する他の部位の新たな異常を検出できる可能性がある、などがあげられる。今後は種々の変異を有する逆転写酵素の活性を比較し、fitnessとの関連を検討していく予定である。

ま と め

大腸菌発現系を用いて、活性を測定できるHIV-1逆転写酵素を得る方法を確立した。遺伝子型薬剤耐性検査の延長として臨床検体への応用が可能であり、今後fitnessなどの検討に役立つと考えられる。

文 献

- 1) Nijhuis M, Deeks S, Boucher C : Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opin Infect Dis* **14** : 23-28, 2001
- 2) Kosalaraksa P, Kavlick MF, Maroun V et al : Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an in vitro competitive HIV-1 replication assay. *J Viol* **73** : 5356-5363, 1999
- 3) Maier G, Dietrich U, Panhans B et al : Mixed reconstitution of mutated subunits of HIV-1 reverse transcriptase coexpressed in *Escherichia coli*-two tags tie it up. *Eur J Biochem* **261** : 10-18, 1999
(平成15年3月25日受付)
(平成15年3月19日受理)