

## エイズウイルス逆転写酵素の鎖特異的な DNA 認識

非対称変異体グループ研究員 岩城 俊雄

**<要旨>** エイズウイルスの逆転写酵素はウイルスゲノム一本鎖 RNA から二本鎖の DNA を生成する。このウイルスのゲノム複製における DNA プラス鎖合成のプライマーとなるポリプリントラクト(PPT)はゲノム上の2カ所に存在し、その配列はレトロウイルス間でよく保存されている。PPT 配列を含むオリゴ DNA と逆転写酵素との結合親和性をバインディングアッセイで測定したところ、この親和性は結合の方向において非対称性を示すことが分かった。その他、種々のオリゴ DNA との親和性の検討より、結合には PPT 中のGトラクトが重要であること、逆転写酵素上の RNaseH ドメインも結合の非対称性に寄与することが明らかになった。さらに PPT 配列と HIV-1 RT の結合における非対称性は、PPT 配列からの DNA 伸長反応においても観察された。これらのことからエイズウイルス逆転写酵素は結合親和性により dsDNA 認識に方向性があり、PPT 周辺では正確に鎖特異的に DNA を認識することがわかった。

**<はじめに>** エイズウイルスと呼ばれるヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) は、ウイルス粒子中にゲノムを一本鎖 RNA でもち、逆転写酵素(Reverse transcriptase; RT)による DNA 合成活性と RNA 分解活性(RNaseH)によって、いったん DNA マイナス鎖に情報を移し替え、さらに RT によって合成された DNA マイナス鎖を鋳型に DNA プラス鎖を合成伸長させ、約 9700 塩基長の二本鎖 DNA を作りヒト染色体に侵入する。この DNA 合成過程において、HIV-1 RT による DNA 複製の正確さは他の生物の DNA 複製酵素のそれに比べて非常に低く、そのため複製に伴って自らの遺伝子配列を変えることになる。このことが、感染したウイルスが生体内で免疫システムによる攻撃をかわす要因となり、臨床的には生体内における抗ウイルス剤に対する耐性株による繰り返しの感染をもたらす、重篤な症状をもたらす要因とされている。

しかしながら、HIV-1 のゲノム配列中には、高頻度に変異を起こす領域が存在すると同時に、よく保存された配列も同時に存在することが知られている。このような配列のうち、HIV-1 ゲノム上の2カ所に存在するポリプリントラクト(PPT)と呼ばれる配列 (5'-TTTAAAAGAAAAGGGGGG-3') は、レトロウイルス間でも保存されており、RNA ゲノム鎖から RT により DNA マイナス鎖が合成される際のプライマー配列として機能することが明らかにされてきた。さらに、PPT に含まれる 5'-AAAGAA-3' という配列は HIV-1 ゲノム配列中でもっとも出現頻度が高いのに対して、G トラクトと呼ばれる6個の G が並んだ 5'-GGGGGG-3' という配列はゲノム中の4カ所にのみ存在する。これらのことと報告されている HIV-1 RT の構造解析結果から、RT は G トラクトに対して高い親和性を持つことが予想される。さらに、HIV-1 RT の DNA 合成における忠実度は、鋳型となるテンプレートとプライマー配列との親和性により決定されるということが考えられる。これらのことは、レトロウイルスの複製サイクルはもとよりウイルスの進化戦略を理解する

上で重要である。そこで本研究においては、種々のテンプレート/プライマー dsDNA と HIV-1 RT の解離定数(Kd)ならびに DNA 合成活性を測定し、RT の DNA との結合における部分配列特異性を明らかにすることを目的とした。

<本文> HIV-1 ゲノム配列上の 2 カ所に存在する PPT 配列を含む 18mer/19mer の長さの合成オリゴ dsDNA(RT2)を作成し、精製 HIV-1 RT との結合親和性をフィルターバインディングアッセイあるいはゲルシフトアッセイによって測定したところ、高い親和性(Kd = 0.33 nM)を持つことが明らかになった。RT2 はマイナス鎖の 5'末端が 1 塩基突出しているため、RT が RT2 に結合する場合は DNA プラス鎖合成の方向に結合する。この場合プラス鎖がプライマー鎖になり、マイナス鎖がテンプレート鎖になる。一方、逆に RT が PPT 配列のところで DNA マイナス鎖合成方向に結合するように設計した RT1 に対する Kd は 2.8 nM となり、この結合力の低さより、RT がマイナス鎖合成の過程でこの配列に到達したときに合成途中の DNA 鎖からいったん解離することが考えられる。

DNA-HIV-1 RT 複合体の構造解析によると PPT 配列のうち 6 mer の G トラクトは HIV-1 RT 上の polymerase 領域と相互作用する。そこで、G トラクト中の G を 1 塩基ずつ T に置き換えた各テンプレート/プライマー dsDNA の Kd 値を測定したところ、3' 端を置き換えたものを除きすべて RT2 の Kd 値より約 5 倍高かった。

PPT を含む dsDNA との親和性は、プライマー/テンプレート鎖部分の長さが長くなるにつれ Kd 値は小さくなった。このことは、オリゴ dsDNA と HIV-1 RT の結合にはプライマー鎖の 5'側も結合に関与することを示唆している。次にマイナス鎖合成に関して、RT1 のプライマー/テンプレート鎖を伸長したものについて解離定数の測定を行った。RT2 と同様、鎖長が長いものほど解離定数は小さくなり、29bp の二本鎖部分を持つ RT1(30)では Kd 値が RT2 とほぼ同じ程度の親和性を示した。

さらに、HIV-1 RT の PPT 配列からの DNA 合成の伸長性をプラス鎖方向およびマイナス鎖方向について 18mer/35mer のオリゴ DNA を作成し検討したところ、プラス鎖方向への伸長性が強く HIV-1 RT の DNA polymerase 活性についても配列方向特異性を持つことが明らかになった。

HIV-1 の一本鎖ゲノム RNA から、プロウイルスとしてゲノムに組み込まれる二本鎖 DNA が合成されるまでの過程で、マイナス DNA 鎖の合成は tRNA<sup>Lys</sup> と相補性をもつ開始部位から、RT のもつ逆転写活性によって始まる。ゲノム両末端の繰り返し配列のところでストランドジャンプの後、RT は PPT 配列に到達するが、RT の持つ RNaseH 活性の PPT 配列感受性と親和性の低さにより、RT は合成途中の RNA/DNA 鎖より解離すると考えられる。一方、RT は PPT に対してプラス鎖合成方向には、Kd 値が 0.33nM(RT2)という高い親和性で結合できるので、RT は再び合成途中の RNA/DNA 鎖に結合し RT のもつ DNA polymerase 活性によってプラス鎖合成が開始する。そしてプラス鎖合成がある程度進むと、PPT 部分から始まる二重鎖部分が長くなるので、RT は再びマイナス鎖合成方向に高い親和性で結合する。その結果、残ったマイナス鎖の合成が進行すると考えられる。

以上のことより、HIV-1 RT はゲノムの保存配列に対しては高い結合親和性を示し、その結合性は方向特異的であることがわかった。さらに、DNA 合成の変異率あるいは変異の入り方が DNA 二本鎖間で非対称性を示すことが示唆される。