レトロウイルスプロテアーゼ†

——二量体のアスパルティックプロテイナーゼ——

加藤伊陽子, 吉 仲 由 之

(大塚製薬株式会社徳島研究所)

1. レトロウイルスの構造とプロテアーゼ

レトロウイルスとは逆転写酵素 (RT, reverse transcriptase) を持つウイルスの総称で, レトロウイルス科は RNA 腫瘍ウイルス, レンチウイルス, スプマウイルスの3つの亜科より成る. よく知られたラウス肉腫ウイルス (RSV), 成人T細胞白血病ウイルス (HTLV) など多くのウイルスは RNA 腫瘍ウイルスに, また後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスである HIV はレンチウイルスに分類される. 亜科間では病原性等が異なるが, ウイルス粒子を構成するタンパク質やゲノムの基本構造は類似しており, 本稿で取り上げるプロテアーゼもその性質はよく保存されている.

レトロウイルス粒子の内部はゲノム RNA と種々のタンパク質の高次複合体と言えるコア(核)が形成されていて, 外部は宿主細胞膜に由来する外被で包まれている. レトロウイルスの内部タンパク質としては, 3または4種の構造タンパク質 (gag タンパク質) と3種類の酵素 (pol タンパク質) がある. それらは 5' gag-pol-env 3' とマップされるゲノム長の mRNA の翻訳により合成されるが, その際に gag 遺伝子の終結コドンを抑止する read-through⁽¹⁾ または frameshift⁽²⁾ 機構が働き, 翻訳産物としては gag 前駆体 (Pr^{gag}) および pol 前駆体 (Pr^{gag-pol}) が 10:1~20:1 のモル比でできる. Pr^{gag} と Pr^{gag-pol} の N末端は脂肪酸で修飾され, 宿主細胞膜下に集合してウイルス粒子の形態形成を始める. 前駆体タンパク質とゲノム RNA により形成された複合体は出芽 (budding) により細胞から遊離し, ウイルス粒子となる. それと同時にまたは直後に Pr^{gag} と Pr^{gag-pol} は開裂して個々の gag および pol タンパク質となる. この前駆体

開裂の加水分解を触媒するのがレトロウイルスプロテアーゼ (PR) である⁽³⁾.

その加水分解様式によればプロテイナーゼと称するべき酵素と思われるが, レトロウイルスのタンパク質としてはプロテアーゼと呼び, PR と略記するという合意がある. レトロウイルス粒子のアセンブリーについて図1に簡単にまとめた.

2. PR の重要性

マウス白血病ウイルス (MuLV) の系でよく研究されたが, 前駆体開裂に伴ってウイルス粒子の形態が未成熟型から成熟型に変化することが知られている⁽⁴⁾. 未成熟粒子は前駆体タンパク質より成り, 電子顕微鏡下にドーナツ型内部構造が観察される. その構造は RNA と前駆体のコイル状複合体と考えられる. 一方, 成熟粒子は開裂産物より成り, 正二十面体のコア構造が観察される. すなわち, PR により前駆体タンパク質が開裂を受けると, 生成した各タンパク質は性質に応じて局在化し, ウイルス粒子を安定な構造に再構成する.

この成熟 (maturation) 過程はウイルス粒子が感染能を獲得するために必須であり, PR を欠損または不活化させることによりウイルス粒子を未成熟型にとどめ, 細胞に感染することを阻止できる^(5,6).

3. PR の性状

(1) アミノ酸配列の比較 種々のレトロウイルス遺伝子の PR 領域にコードされるアミノ酸配列を比較すると, 図2に示したように, Asp-Thr-Gly を含む7残基と Ile(Leu)-Ile(Leu)-Gly を含む7残基が保存されていることがわかる. この2カ所の配列がペプシンやカテプシンDで代表されるアスパルティックプロテイナーゼにも共通して見られる配列で, とくに Asp-Thr-Gly の Asp 残基がそれらの活性中心であることから, PR はアスパルティックプロテイナーゼと関連した酵素であることが示唆される^(7,8).

† Retrovirus Protease.

Iyoko KATOH and Yoshiyuki YOSHINAKA (Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Tokushima 771-01)

図1 レトロウイルス粒子のアセンブリー

前駆体タンパク質とゲノム RNA の集合, 出芽, ウイルス粒子の成熟の概要を図示した。レトロウイルスの種類により gag タンパク質の構成や pol 領域の発現様式に細かな違いがあるが, ここではマウス白血病ウイルスの粒子構成を基本としている。

ところが, PR 分子は HIV, RSV, MLV においてそれぞれ 99, 124, 125 残基のアミノ酸で構成され, アスパルティックプロテイナーゼ (300 残基程度) 分子の半分以下のサイズである。アスパルティックプロテイナーゼ 1 分子は配列や立体構造がきわめてよく似た 2 つのドメインを持ち, 各ドメインに活性中心 Asp-Thr-Gly がある (図 2, b)。すなわち PR 分子はアスパルティックプロテイナーゼの 1 ドメインに相当するわけである。

このように一次構造の比較において, PR はペプシンなどと類似の酵素であり, 2 分子が会合してペプシン様立体構造を作るものと想像できる。

(2) 阻害剤 PR はセリンプロテイナーゼに対する阻害剤 (ロイペプシン, 大豆トリプシン阻害剤, キモスタチン等) やシステインプロテイナーゼの阻害剤 (アンチパイン, E 64 等), およびメタロプロテイナーゼの阻害剤 (EDTA) では 1 mM 以上の濃度でも影響を受けない。しかし, アスパルティックプロテイナーゼの特異的阻害剤であり, 基質アナログとして作用することが知られるペプスタチン A は PR に対して一応の阻害効果を示す⁽⁷⁾。その IC₅₀ 値は 2~3×10⁻⁴ M という高濃度である。ペプシンやカテプシン D に対する IC₅₀ 値は 10⁻⁸

M 前後である。これらのことから, PR はアスパルティックプロテイナーゼと類縁の酵素ではあるが, それらとはかなり違った性質を持つものと判断できる。

さらに, ウシ白血病ウイルス (BLV) とニワトリ骨髓芽球症ウイルス (AMV) の PR が DAN (diazoacetyl-norleucine methylester) と反応させることにより⁽⁹⁾, また HIV の PR が EPNP [1, 2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane] と反応させることにより⁽¹⁰⁾失活するという報告があり, アスパルティックプロテイナーゼと同様の触媒機構により加水分解を行うことが示唆されている。

前述のように, PR を特異的に阻害する化合物が見つければ, ウイルス増殖を抑制する薬剤として使用できる可能性があり, 臨床応用を目的とした阻害剤のスクリーニングが現在盛んに行われている。

(3) 基質特異性 PR は Pr^{gag} および Pr^{gag-pol} を数カ所で特異的に切断する。ところがそれら切断部位や周辺のアミノ酸配列に明確な共通性がない (図 3)。1 つの PR がいくつかの違った配列を特異的に認識する。合成ペプチドを使って基質特異性を明らかにしようとする試みが行われているが, コンセンサスは得られて

a Retrovirus proteases

BLV	---- L V D T G A E ---- 63	----- I L G R D V L ----
HTLV-I	---- L L D T G A D ---- (62)	----- I I G R D A L ----
HTLV-II	---- L L D T G A D ---- 63	----- I I G R D A L ----
RSV	---- L L D S G A D ---- 66	----- I L G R D C L ----
Mo-MuLV	---- L V D T G A Q ---- 55	----- L L G R D L L ----
HIV	---- L L D T G A D ---- 54	----- I I G R N L L ----
Visna Virus	---- L V D T G A D ---- 56	----- V L G R D N M ----
EIAV	---- L L D T G A D ---- 59	----- I L G R D I L ----
SRV-1	---- L I D T G A D ---- 61	----- L W G R D L L ----
MMTV	---- L L D T G A D ---- 62	----- L W G R D I M ----

b Aspartic proteinases

NH₂-terminus

Pepsin (Human)	---- V F D T G S S ---- 45	----- G I L G Y D T V ----
Chymosin (Bovine)	---- L F D T G S S ---- 45	----- G I L G Y D T V ----
Cathepsin D (Pig)	---- V F D T G S S ---- 47	----- G Y L S Q D T V ----
Renin (Mouse)	---- I F D T G S A ---- 47	----- G F L S Q D S V ----
Renin (Human)	---- V F D T G S S ---- 47	----- G F L S Q D I I ----
Penicillopepsin	---- N F D T G S A ---- 45	----- G N V F T D S V ----

COOH-terminus

Pepsin (Human)	---- I V D T G T S ---- 80	----- W I L G - D V F ----
Chymosin (Bovine)	---- I L D T G T S ---- 75	----- W I L G - D V F ----
Cathepsin D (Pig)	---- I V D T G T S ---- 83	----- W I L G - D V F ----
Renin (Mouse)	---- V V D T G S S ---- 83	----- W V L G - A T F ----
Renin (Human)	---- L V D T G A S ---- 82	----- W A L G - A T F ----
Penicillopepsin	---- I A D T G T T ---- 78	----- I F G - D I F ----

図 2 PR とアスパルティックプロテイナーゼの間に認められるアミノ酸配列の相同性
 a, レトロウイルス間で保存されている PR 領域内アミノ酸配列. b, a の配列
 に対応するアスパルティックプロテイナーゼの配列. NH₂-末端半分と COOH-末
 端半分に相同配列が 1 組ずつある. アミノ酸残基は一文字表記法により表わした.

開裂部位	配列
	P5 P4 P3 P2 P1 P'1 P'2 P'3 P'4 P'5
<MuLV>	
p15 ▼ p12	Arg-Ser-Ser-Leu-Tyr ▼ Pro-Ala-Leu-Thr-Pro
p12 ▼ p30	Thr-Ser-Gln-Ala-Phe ▼ Pro-Leu-Arg-Ala-Thr
p30 ▼ p10	Met-Ser-Lys-Leu-Leu ▼ Ala-Thr-Val-Val-Ser
p10 ▼ TLDD	Gln-Thr-Ser-Leu-Leu ▼ Thr-Leu-Asp-Asp
<RSV>	
p19 ▼ ()	Gly-Thr-Ser-Cys-Tyr ▼ His-Cys-Gly-Thr-Ala
() ▼ p10	Pro-Pro-Tyr-Val-Gly ▼ Ser-Gly-Leu-Tyr-Pro
p10 ▼ p27	Pro-Val-Val-Ala-Met ▼ Pro-Val-Val-Ile-Lys
p27 ▼ ()	Ile-Ala-Ala-Ala-Met ▼ Ser-Ser-Ala-Ile-Gln
() ▼ p12	Gln-Pro-Leu-Ile-Met ▼ Ala-Val-Val-Asn-Arg
p12 ▼ p15	Pro-Pro-Ala-Val-Ser ▼ Leu-Ala-Met-Thr-Met
<BLV>	
p15 ▼ p24	Pro-Pro-Ala-Ile-Leu ▼ Pro-Ile-Ile-Ser-Gln
p24 ▼ p12	Gln-Pro-Ala-Ile-Leu ▼ Val-His-Thr-Pro-Gly
<HIV>	
p19 ▼ p24	Val-Ser-Gln-Asn-Tyr ▼ Pro-Ile-Val-Gln-Asn
p24 ▼ ()	Lys-Ala-Arg-Val-Leu ▼ Ala-Gln-Ala-Met-Ser
() ▼ p7	Thr-Ala-Thr-Ile-Met ▼ Met-Gln-Arg-Gly-Asn
p7 ▼ p6	Gln-Arg-Gln-Ala-Asn ▼ Phe-Leu-Gly-Lys-Ile

図 3 各種レトロウイルス PR の基質開裂部位アミノ酸配列

MuLV, RSV, BLV および HIV の PR の基質特異性を比較するため, それぞれのウイルスの
 gag 前駆体開裂部位アミノ酸配列を並べた. 切断されるペプチド結合を ▼ で示した.

いない。PR の特異性はおそらく基質となるウイルスタンパク質前駆体の二次、三次構造により決定されるのだろう。pH を変化させると開裂部位が変わる現象があることや、変性した前駆体は PR により切断されなくなる場合があることはこれを支持する。また、ヒトやウシ由来の PR がマウスの Pr^{MS} をマウス PR と同じ部位で切断するという結果を得ており、種間で基質特異性は保存されていると考えられる。

(4) 二量体形成 PR が二量体を形成していることは次のような方法により証明された。1) ゲル濾過法: PR (10~14 キロダルトン) は Sephadex G-75 などを使ったゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて 20~30 キロダルトンのタンパク質として溶出する。2) 架橋法^(9,10): PR を 2 価の化学架橋剤と反応させると会合分子間で共有結合し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) において 2 倍の分子量のタンパク質が形成されたことを確認できる。3) 分析超遠心法⁽¹¹⁾: 沈降平衡法により AMVPR の平均分子量を計算すると 22,800 という数値が得られ、14,000 の分子量を持つ PR が 4:6 の重量比で単量体と二量体として存在することがわかる。4) X線結晶解析: すでに数カ所の研究グルー

プにより RSV や HIV の PR の結晶解析が発表された。どの報告も二量体でアスパルティックプロテイナーゼ様の立体構造を明らかにしている。詳しくは後述する。

さらに、PR 分子をシアン化臭素で数カ所切断し、得られたフラグメントを PR 溶液に過剰に加えると、PR 活性が抑制される⁽⁹⁾。フラグメントが PR 分子の会合を拮抗的に阻害するものと解釈される。

(5) 立体構造 ニワトリのレトロウイルスから精製した PR^(12,13)、細菌で発現させた HIV の PR^(14,15)、および化学合成した HIV の PR⁽¹⁶⁾ の結晶が X線回折法により分析され、 $3\text{\AA} \sim 2.7\text{\AA}$ の精度で立体構造が明らかにされた。

PR 分子はアスパルティックプロテイナーゼの 1 ドメインと同じように折りたたまれており、その中心構造である 2 つの ψ 字型 β 構造 (活性中心を含む) や、活性中心の上部に突出した“フラップ”と呼ばれる構造や、C 末端近くの α ヘリックスがある。その 2 分子が会合して基質結合部位である“クレフト”が形成されている。二量体は各分子の N 末端と C 末端、合計 4 本のペプチド鎖から成る逆向き並行 β 構造によりささえられている。図

図 4 AMVPR の立体構造

AMV より精製した PR の X線結晶解析結果をもとに、ペプチド結合の骨格を描いた。二量体の左側の分子の末端を N および C で、他方の分子の末端を N' および C' で示した。活性中心 Asp 残基を星印で示した。

表 1 PP と他のアスパルティックプロテイナーゼの比較

酵 素	分子 会合	活性中心	至適 pH	天然の基質	開裂部位の配列
ペプシン, カテプシン D レニン	単量体	Asp...Asp	2~3 3.5~7.0	種々のタンパク質 アンジオテンシノーゲン	-Phe↓Trp(Phe, Tyr)-, etc. -Phe-His-Leu↓Val-Ile-His-
レトロウィル- スプロテアーゼ	二量体	2 (Asp)	5.5~7.0	gag および gag-pol 前駆体	
<i>S. Lignicolum</i> - カルボキシルペプチダーゼ	単量体	Asp...Glu	4	種々のタンパク質	-X-X↓Pro-X-

4 に AMV PR の二量体構造を示した。

(6) オートプロセッシング PR は $\text{Pr}^{\text{gag-pol}}$ (MA-?CA-NC-PR-RT-IN) の一部として合成される。PR 分子が生成するためには $\text{Pr}^{\text{gag-pol}}$ が PR 活性により開裂されなければならない。 $\text{Pr}^{\text{gag-pol}}$ がある程度の PR 活性を示しプロセッシングが開始され、PR ドメインが切り離されると、活性化された PR 分子が次々に前駆体を攻撃してゆくのだらうと考えられている。実際に PR 配列を含む長い pol 領域を細菌や酵母で発現させると、経時的に開裂が進み PR, PT, IN の各最終産物となる。しかし一般に試験管内翻訳実験ではオートプロセッシングは観察できない⁽²⁾。これは、 $\text{Pr}^{\text{gag-pol}}$ がある程度以上の濃度で存在して分子会合できないと、PR 活性が発揮できないためと想像される。 $\text{Pr}^{\text{gag-pol}}$ が二量体になる必要がある。

(7) PR の基質 PR 活性を試験管内で検出するために用いられる基質は次のようなものである。1) 変異ウイルスが持つ Pr^{gag} : マウス肉腫ウイルスの Gazdar 株は PR を持たず、その粒子タンパク質の約 95% が Pr^{gag} である。このウイルスを HTG-2 細胞の培養上清より精製すれば、非イオン性界面活性剤を加えるだけで基質溶液として供することができる⁽¹⁷⁾。開裂産物を SDS-PAGE により分析するのでやや定量性に欠けるが、未変性の gag 前駆体を基質とすることで他のアッセイでは得られない知見を得ることができる。2) 合成ペプチド: gag および pol タンパク質の開裂部位と同じ配列のペプチドを合成して基質として使用する方法が盛んに行われている⁽¹⁸⁾。開裂部位の C 末端, N 末端各 4~5 残基, 合計 8~10 残基が必要とされる。3) インシュリン B 鎖: 一般のプロテアーゼ活性測定に用いられるカゼインは PR の基質にならない。ウシ血清アルブミンは SDS-溶液中で煮沸すれば AMV PR の基質になりうる。最近私共はインシュリン B 鎖が AMV, BLV, HIV の PR によって特異的に切断されることを確認した。

以上 (1)~(7) の項目で述べてきた性質を考慮すれば、PR はアスパルティックプロテイナーゼのグループに新たに加えられた特殊な酵素といえるだろう。そのグループに属する種々の酵素との比較を中心に、PR の性質を表 1 に要約した。

4. おわりに

3 年ほど前まではウイルス学の領域でしか研究されていなかった PR が、今日では生化学の分野で取り扱われるようになった。ウイルスに関連した多くの現象は生化学の手法で解明することができる。農芸化学の研究者がウイルスにも興味を持たれることを希望する。

- (1) Y. Yoshinaka, I. Katoh, T. D. Copeland and S. Oroszlan: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 1618 (1985).
- (2) Y. Yoshinaka, I. Katoh, T. D. Copeland, G. W. Smythers and S. Oroszlan: *J. Virol.*, **55**, 870 (1985).
- (3) C. Dickson, R. Eisenman, H. Fan, E. Hunter and N. Teich: in "RNA Tumor Viruses", ed. by R. Weiss, N. Teich, H. Varmus and J. Coffin, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982, p. 513.
- (4) Y. Yoshinaka and R. B. Luftig: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3446 (1977).
- (5) I. Katoh, Y. Yoshinaka, A. Rein, M. Shibuya, T. Odaka and S. Oroszlan: *Virology*, **145**, 280 (1985).
- (6) T. D. Meek, D. M. Lambert, G. B. Dryer, T. J. Carr, T. A. Tomaszek, Jr, M. L. Moore, J. E. Strickler, C. Debouck, L. J. Hyland, T. J. Matthews, B. W. Metcalf and S. R. Petteway: *Nature*, **343**, 90 (1990).
- (7) I. Katoh, T. Yasunaga, Y. Ikawa and Y. Yoshinaka: *Nature*, **329**, 654 (1987).
- (8) L. H. Pearl and W. R. Taylor: *Nature*, **329**, 351 (1987).
- (9) I. Katoh, Y. Ikawa and Y. Yoshinaka: *J. Virol.*, **63**, 2226 (1989).
- (10) T. D. Meek, B. D. Dayton, B. W. Metcalf,

- G. B. Dreyer, J. E. Strickler, J. G. Gorniak, M. Rosenberg, M. L. Moore, V. W. Magaad and C. Debouck : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1841 (1989).
- (11) Y. Yoshinaka, I. Katoh, M. Adachi, N. Yamamoto, A. Ikai and Y. Ikawa : in "Proteases of Retroviruses", ed. by V. Kostka, Walter de Gruyter, Berlin, 1989, p. 35.
- (12) M. Miller, M. Jaskolski, J. K. Mohana Rao, J. Leis and A. Wlodawer : *Nature*, **337**, 576 (1989).
- (13) M. E. Fraser, K. Hayakawa, Y. Yoshinaka, I. Katoh and M. N. G. James : 私信.
- (14) M. A. Navia, P. M. D. Fitzgerald, B. M. McKeever, C. T. Leu, J. C. Heimbach, E. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke and J. P. Springer : *Nature*, **337**, 615 (1989).
- (15) R. Lapatto, T. Blundell, A. Hemmings, J. Overington, A. Wilderspin, S. Wood, J. R. Merson, P. J. Whittle, D. E. Danley, K. F. Geoghegan, S. J. Hawrylik, S. E. Lee, K. G. Scheld and P. M. Hobart : *Nature*, **342**, 299 (1989).
- (16) A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskólski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, S. B. H. Kent : *Science*, **245**, 616 (1989).
- (17) Y. Yoshinaka and R. B. Luftig : *Virology*, **118**, 380 (1982).
- (18) H. J. Kräusslich, R. H. Ingraham, M. T. Skoog, E. Wimmer, P. V. Pallai and C. A. Carter : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 807 (1989).
-