

第11回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

in silico 構造解析の HIV/AIDS 研究への応用

Molecular-structure Simulation for HIV/AIDS Research

大出 裕 高

Hirotaka ODE

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第2室

Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases

Abstract : To understand atomistic-scale mechanism of function on bio-molecules, we need to know their tertiary or quaternary structures. In the recent years, computer simulation techniques for understanding structures and dynamics of bio-molecules have improved. The technique can suggest unknown molecular structure using known structures that have been determined by X-ray crystallography or NMR, and can also predict structure of small peptide without using known structure information. I have applied the technique for HIV/AIDS researches and has suggested that (i) drug resistant mechanism by several mutations in HIV-1 proteins and (ii) atomistic-scale mechanism of function on HIV-1 proteins and anti-HIV-1 proteins. The paper overviews the researches I have reported.

はじめに

第11回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞に選考頂いた「*in silico* 構造解析の HIV/AIDS 研究への応用」について概説する。

背 景

生体高分子の機能を、原子・分子レベルで理解するには、その立体構造を明らかにする必要がある。一般に生体高分子の立体構造解析は、X線回折や核磁気共鳴分光法(NMR)などの技術により行われる。それら技術の発展により、さまざまな生体高分子の構造が決定され、生体高分子立体構造公共データベースである Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) には、2010年12月末現在約70,000の立体構造が登録されており、年々登録数を増加させている。

その一方、“*in silico*”つまりコンピュータシミュレーションを利用した生体高分子の立体構造の“予測”技術もまた、近年の著しいコンピュータ性能の向上とともに急速に発展している。*in silico* 構造予測では、主に既知の立体構造情報を基に、変異体あるいは類縁蛋白質の構造を効率よく推測することが可能である¹⁻³⁾。また、数~数十アミ

ノ酸から構成されるペプチドあるいは小型タンパク質について、一次構造の情報からタンパク質の立体構造や動的平衡を推測することが可能になってきている⁴⁻⁶⁾。その他、標的タンパク質と結合する薬物のスクリーニングなどにも用いられている技術である^{7,8)}。

私はこの“*in silico*”構造予測技術に着目し、HIV-1の薬剤耐性機構および増殖機構について、原子レベルでの理解を目指した。

HIV 薬剤耐性の発現機構を原子レベルで明らかにする

薬剤耐性の発現機構を原子レベルで理解することは、より適切な薬剤選択や、効果のより高いあるいは耐性を回避しうる阻害薬の開発に繋がるものと考えられる。しかしながら、HIVの易変異性ゆえに、さまざまな変異が出現し、その組合せも多数であることから、耐性機構の予想すら困難な場合も生じる。例えば、①未治療感染者に認められる遺伝子多型的変異が組合わさることで耐性を発現する、②CTL エスケープ変異とまれな多型的変異が組合わさることで耐性を発現する、③薬物結合部位の外側での変異にも関わらず耐性を賦与する変異が存在する。私はこれまでに、このような予想困難な耐性変異に関し、コンピュータシミュレーションにて耐性機構の理解を試みた⁹⁻¹⁵⁾。

著者連絡先：〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第2室

2011年2月25日受付

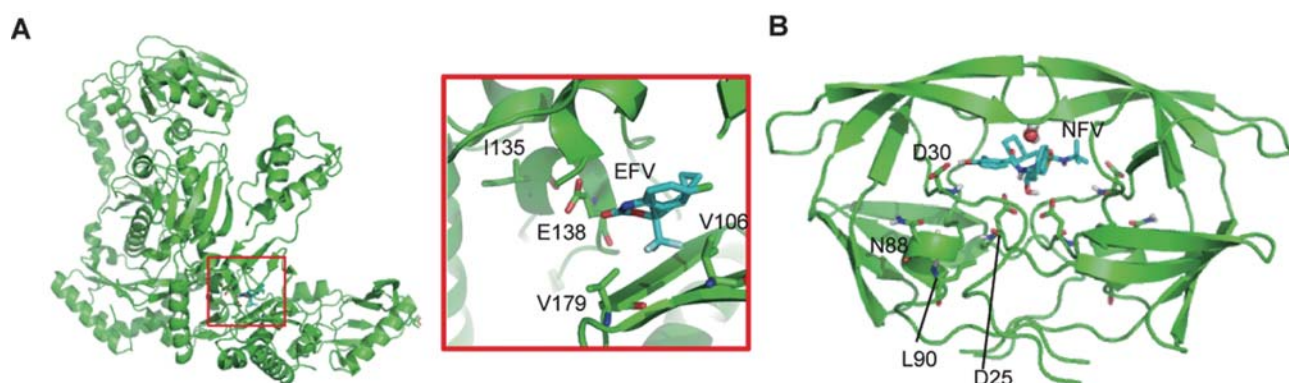


図 1 HIV-1 RT-EFV 複合体の結晶構造 (PDB code : 1IKW) (A) と HIV-1 PR-NFV 複合体の結晶構造 (PDB code : 1OHR) (B)。タンパクの構造を Cartoon 表示し, 耐性に関わるアミノ酸および EFV, NFV を Stick 表示した。

①未治療感染者に認められる遺伝子多型的変異の組合せによる耐性獲得機構を明らかにする

湯永らは, 未治療感染者に認められる HIV-1 逆転写酵素 (RT) の多型的変異 V106I, V179D が, それぞれ 1 変異では耐性を賦与しないものの, 変異の組合せ V106I/V179D により非核酸系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) である Efavirenz (EFV) および Nevirapin (NVP) に耐性を賦与することを見いだした⁹⁾。さらに, V106A 単独でも NVP 耐性を示すが, V179D が組合わさることで, その耐性度が増強すること, EFV にも耐性をもたらすことを見出した。一方, これらの変異の組合せは, 第 2 世代 NNRTI Etravirine (ETR) の耐性を賦与しないことを示した。

これら変異の組合せによる HIV-1 の EFV/NVP 耐性獲得と ETR の抗 HIV 活性維持の分子機序を明らかにすることを目的として, 変異による RT-NNRTI 複合体構造と親和性の変化をコンピュータシミュレーションにより調べた (図 1A)。6 種の HIV-1_{NL4.3} 由来 RT (薬剤感受性親株 V106/V179, V106I, V106A, V179D, V106I/V179D, V106A/V179D の RT) と EFV, NVP, ETR との複合体分子モデルを, RT-NNRTI 複合体結晶構造を基にホモロジーモデリング法 (Homology modeling) により構築した。ホモロジーモデリング法とは, 立体構造未知のとあるタンパク質立体構造を, 配列類似性 (ホモロジー) の高いタンパク質を鋳型として推定する方法であり, 最も簡便な立体構造予測方法である。一般に, 可能性のある複数の構造を推測し, その中から最も総エネルギーの低い, つまり最も安定な構造をモデルとして選択する方法である。さらに, 構築したモデルについて, MM/GBSA 法にて結合エネルギー ($\Delta G_b^{RT/NNRTI}$) を算出し, RT-NNRTI 間親和性を推定した。

まず, $\Delta G_b^{RT/NNRTI}$ と薬剤の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) との関係, 単回帰分析により調べることで各モデルの予測

構造の妥当性を検証した。 ΔG_b は小さい値ほど親和性が高いことを表し, これまでに ΔG_b と IC_{50} の対数値の間に正の相関性があることが報告されている^{16, 17)}。単回帰分析の結果, EFV と NVP では RT への結合親和性が小さいほど, IC_{50} 値が大きくなった ($P < 0.05$) (図 2)。このことから構築したモデルが妥当なものであると推察された。そこで, RT-NNRTI 間の親和性を大きく低下させた V106I/V179D と V106A/V179D 変異体モデルの予測構造を観察したところ, これら変異が EFV あるいは NVP の両端で生じ, 阻害薬両端で不利な相互作用が生じることで, 耐性度を増強させることが示唆された (文献⁹⁾ 中, 図 3)。V106I 変異はアミノ酸側鎖の立体障害, V106A 変異は相互作用低下, V179D は反発的静電相互作用をそれぞれもたらしていた。一方, ETR は, 各変異に応じて異なる結合配座をとり, 変異による $\Delta G_b^{RT/NNRTI}$ 値の著しい増加は認められなかった (文献⁹⁾ 中, 図 4)。ETR は EFV や NVP に比べ構造柔軟性が高く, 変異に応じて自身の構造を変化させることで RT 親和性を維持できることが示唆された。

② CTL エスケープ変異とまれな多型的変異の組合せによる耐性獲得機構を明らかにする

上記の HIV-1 RT 中の V106 と V179 の多型的変異の組合せに加えて, 湯永らは RT 中の HLA-B*51 拘束性 CTL からのエスケープ変異 I135X (X=L,V,T,R)¹⁸⁾ 単独あるいはまれな多型的変異 E138K 単独では NVP, EFV, ETR に耐性を発現しないものの, それらの組合せ, 特に I135T/E138K によって, NVP, EFV だけでなく ETR にも耐性を獲得することを示した¹⁰⁾。

I135T/E138K 変異による EFV/NVP/ETR 耐性獲得機序を構造的側面から予測するため, 上述のホモロジーモデリング法を用いて, EFV/NVP/ETR と I135T, E138K, I135T/E138K 変異体について解析を行った (図 1A)。各モデル

の $\Delta G_b^{RT/NNRTI}$ を算出したところ、変異が組合わさることで $\Delta G_b^{RT/NNRTI}$ 値の増加を示し、 IC_{50} との関係性が認められた ($P < 0.02$)。ゆえに、各モデルの予測構造が適切であると判断し、これら変異アミノ酸の構造的配置を観察した。RT の I135 は直接 NNRTI と相互作用できる位置には存在せず、I135T 変異単独では RT-NNRTI 間相互作用に影響をほとんど与えなかった (文献¹⁰中、図3)。E138 は NNRTI 近傍に存在していたが、E138K 変異が生じても変異側鎖が NNRTI に近接し親和性を維持した。しかし、両アミノ酸座位での変異が組合わさることで、本来 E138 側鎖があった位置を、I135T/E138K 変異体では E138K 側鎖が占められなくなり、RT-NNRTI 間に大きな空洞ができることが示唆された。このことで RT-NNRTI 間の立体的相互作用が弱まり、耐性を獲得することが示唆された。

③薬物結合部位の外側での変異による耐性獲得機構を明らかにする

薬物結合部位の外側での変異に関わらず耐性に関わる変異もある。HIV-1 プロテアーゼ (PR) の変異の中にはそのような変異も多く見られる。例えば、L90M は多くの PR 阻害薬 (PI) 耐性に関与する。N88S は、PI のひとつ Nel-finavir (NFV) の耐性に関わる。これらの薬物結合部位の外側での変異の効果を観察すべく、分子動力学法 (Molecular dynamics : MD) により、それら変異体の立体構造を予測した¹²⁻¹⁵。

MD は、ホモロジーモデリング法に比べ、より生理的環境下の生体高分子の立体構造を反映しうる方法であり、また大きな構造変化などの動的挙動も観察可能な方法である。一般に、水溶液中、約 37°C、1 atm 環境下での生体高

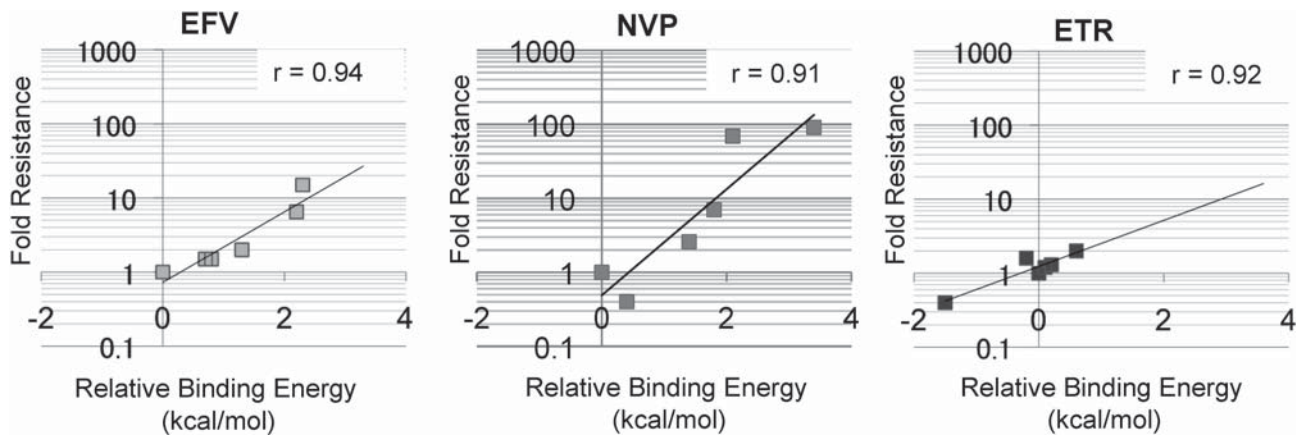


図 2 *in silico* 構造解析により予測した構造での RT-NNRTI 間結合エネルギー ($\Delta G_b^{RT/NNRTI}$) と耐性度との相関性。横軸に、各構造での結合エネルギーと wild-type (WT) RT での結合エネルギーの差分値、縦軸に耐性度の対数値を示す。



図 3 HIV-1 PR による反応経路の模式図 (A)。ヒト Tetherin 膜貫通領域モノマーの予測構造 (B)。ペプチド、タンパク質は Cartoon 表示、脂質は line 表示した。ヒト Tetherin 中の Vpu 結合、拮抗能に重要なアミノ酸は Sphere 表示でハイライトした。

分子の分子運動を1ピコ (10^{-15}) 秒程度ごとに時間を追って観察していき、100万 (10^6) から10億 (10^9) 回の計算をすることで、1ナノ (10^{-9}) 秒から1マイクロ (10^{-6}) 秒の運動の観察が行われる。これらの過程の中で、分子の運動が平衡に達したとみなせる状態での構造を安定構造として扱う。

私は既知結晶構造に変異を人為的に加え、wild-type (WT, HIV-1_{HXB2} 株) および変異体のMDを実施し、それぞれの安定構造を探索することで、PRの薬物結合部位の外側での変異L90M, N88Sによる耐性機構を明らかにすることを試みた(図1B)。RT-NNRTIの場合と同様に、MM/PBSA法にて $\Delta G_b^{PR/PI}$ 値を算出し、耐性度と比較することで妥当性を検証した。

L90M変異の耐性機構を推定するため、私はL90Mが耐性を賦与するNFV, Saquinavir (SQV)^{19, 20}、とL90M単独では耐性を賦与しないLopinavir (LPV)²¹を対象に解析を行った。結果、それぞれのPIにおけるL90M PRの $\Delta G_b^{PR/PI}$ は、NFV, SQVではWT PRよりも大きな値、つまりPIの親和性はWT PRより低下し、LPVではほぼWT PRとほぼ同等の値であった。ゆえに、得られた安定構造がモデルとして妥当と考えられた。得られたモデルを観察すると、L90M変異体において、PR内でのNFV, SQVの配置の変化が認められた^{14, 15}。さらに、WT PRでは見られた水素結合の消失が見られ、静電相互作用の低下が認められた。一方、LPVには大きな変化は認められなかった。PRの90番目のアミノ酸側鎖は、PRの活性中心であるD25主鎖近傍に位置している。そのため、L90M変異は、D25主鎖との相互作用を変化させ、さらにPIと直接相互作用するD25側鎖の配置を変化させ、間接的にPIと薬物結合部位での相互作用に変化をもたらすことで耐性を賦与するものと考えられた。特に、D25と相互作用するPI中の水酸基(-OH)付近に大員環をもつ場合、その影響が著しくなることが示唆された。

L90M同様、N88S変異による耐性機構を推定するため、N88Sが耐性を賦与するNFVを対象に、サブタイプB HIV-1 PRの立体構造を予測した。さらに、N88S同様、NFV耐性変異であり薬物結合部位で生じるD30N変異と比較した。算出した $\Delta G_b^{PR/PI}$ は、N88S PR, D30N PRともにWT PRよりも大きな値を示したが、N88S PRの方がD30N PRよりも小さい値を示し、サブタイプBにおいてN88SはD30Nよりも弱い耐性を示すことを示唆した^{12, 13}。この結果は、これまでの報告^{19, 22}と一致するため、得られたモデルを妥当とみなした。予測構造を観察すると、WT PRに見られたN88側鎖, T31側鎖, T74主鎖間の水素結合ネットワークが変化し、N88S PRでは、S88側鎖とD30側鎖の間に変異による新たな水素結合を形成

した。そのために、NFVとPR間の結合に重要な、D30側鎖とNFVのフェノール基(-C₆H₄-OH)間の相互作用が低下し、NFV耐性を獲得することが示された¹²。さらに、CRF01_AE HIV-1におけるN88S, D30N変異体の構造を予測すると、構造変化は類似しているものの、N88SはD30NよりもNFV-PR間相互作用を低下させ、サブタイプBと逆の傾向となった。N88SはサブタイプB PRよりもCRF01_AE PRで多く観察され、D30Nは逆にCRF01_AE PRよりもサブタイプB PRで多く観察される²³。このことから、サブタイプ間での耐性変異の出現頻度の違いは、サブタイプ間の遺伝子多型の影響による耐性度の変化が関わっていることを示唆した。

私がN88Sの耐性機構を報告した後、N88S PRの結晶構造が報告された^{24, 25}。これら結晶構造においても、私が予測した水素結合ネットワークの変化が認められた。このことから、MDは構造変化、少なくとも水素結合ネットワークの変化を観察できることを強く示唆している。

HIVとその増殖制御因子の生物活性を支える分子構造を明らかにする

in silico 構造予測技術は、変異による耐性機構の予測以外にも、実験データと比較することで、さまざまな現象の理解に応用が可能である。例えば、これまで① HIV-1 PRによる基質の切断感受性を制御する構造要因²⁶、あるいは② Tetherin (BST-2/CD317/HM1.24) のVpuとの結合および拮抗能を制御する構造要因を明らかにしようと試みた²⁷。

① HIV-1 プロテアーゼによる基質切断感受性を決める構造要因を明らかにする

これまで、HIV-1 PRの基質切断効率を制御する構造的要因を明らかにすることを目的とし、HIV-1前駆体の切断部位周辺の構造特性と、酵素親和性あるいは切断反応効率との関連を調べた²⁶。HIV-1の粒子形成では、Gag, Gag-Pol前駆体蛋白質がPRにより切断される。この切断は感染性粒子の形成に必須で、複数の切断部位が順序だって切断される。切断の制御機構を知ることは、粒子成熟の理解と阻害薬の開発に役立つが、不明な点が多い。

上記目的を達するため、HIV-1_{HXB2}株Gag及びGag-Pol前駆体の7箇所切断部位に相当する8アミノ酸長ペプチドの折畳みを、コンピュータシミュレーションを用いて調べた。PR非結合状態でのペプチドの折畳みは、レプリカ交換分子動力学法(REMD)を用いて解析した(図3A)。REMDにより、ペプチドのとりうる任意の構造を通常のMDよりも広範囲に探索し、それぞれの構造の安定性を明らかにできる。PR結合状態でのペプチドの折畳みは、報告されているPR-基質ペプチド複合体の結晶構造を鋳型

としてホモロジーモデリング法により解析した。得られた構造を基にペプチドの折り畳みを規定する側鎖間、または主鎖間の二面角を測定し、既報のペプチドの反応速度パラメータ $1/K_m$ と k_{cat} ²⁸⁾ との関係、単回帰分析により調べた。

結果、切断部位の両側に位置する2つのアミノ酸 (P1 と P1') の側鎖の二面角 $C\beta(P1)-C\alpha(P1)-C\alpha(P1')-C\beta(P1')$ が 150-180 度を取る確率が高いほど、 $1/K_m$ が大きくなることを見出した ($R=0.95$, $P=0.0008$) (文献²⁶⁾中、図2)。また、切断部位の上流に位置する2つのアミノ酸 (P1 と P2) の主鎖の二面角 $O(P2)-C(P2)-C(P1)-O(P1)$ が大きいほど、 k_{cat} が小さくなることを見出した ($R=-0.94$, $P=0.001$) (文献²⁶⁾中、図3)。これらのことから、基質の P1 と P1' 部位アミノ酸の側鎖が伸長状態をとりやすいほど基質の PR 親和性が高まること、基質の P1 と P2 部位アミノ酸の主鎖のねじれが大きいほど切断反応効率が高まること示唆された。HIV-1 前駆体の切断部位周辺の折畳みの指向性は、基質の PR 親和性と切断反応効率を制御する要因の一つと考えられた。

② Tetherin 中の Vpu 感受性を制御する領域の生理的環境下での構造特性を明らかにする

小林らによって、ヒト Tetherin 中 N 末膜貫通領域の3アミノ酸 (I34, L37, L41) が HIV-1 Vpu との結合に重要であることが同定された²⁷⁾。これらのアミノ酸はヒトと African green monkey (agm) との間で共通しているものの、ヒト Tetherin では Vpu に結合可能であり、agm Tetherin では Vpu に結合できない。このことから、構造的な相違がこれら活性の相違をもたらすものと予想される。さらに、ヒト Tetherin の活性発現に必要なアミノ酸として、T45 が同定された。

これら Tetherin 中膜貫通領域のアミノ酸の生理的環境下での構造的意義を明らかにするため、MD にて脂質二重膜中での Tetherin 膜貫通領域の構造を予測した (図3B)。約120個の Palmitoyl-oleyl-*sn*-phosphatidyl-choline (POPC) で脂質二重膜を構築し、Tetherin 膜貫通領域をはさむ約45アミノ酸ヘリックスペプチドをその二重膜に垂直に挿入したモデルをシミュレーションの初期構造とし、この初期構造に生理的環境と同様の温度、圧力下でモデル中の原子・分子の運動を平衡状態に至らせた。平衡状態において最も高頻にみられた構造を予測構造とした。

結果、MD から得られた構造から、(i) ヒト Tetherin では、Vpu との結合に重要な3アミノ酸と活性発現に必要な1アミノ酸が、膜貫通領域ヘリックス構造の一面に並ぶこと、(ii) ヒト Tetherin, agm Tetherin で膜貫通領域ヘリックス中の Vpu との結合に重要なアミノ酸は共通して存在するものの、それらアミノ酸が並ぶ面の構造が大きく異な

り、それによって結合能が変わること、(iii) T45 によってその周辺の構造が変化することで、活性発現を調整していること、を示唆した (文献²⁷⁾中、図5)。Tetherin の膜貫通領域 Helix, 特にその一面の構造が Vpu との結合、拮抗能に重要であることを提唱した。

展 望

in silico 構造予測技術は発展途上の分野であり、予測を実行するコンピュータの性能の進展もあいまって、新しい技術が次々と開発されている現状にある。例えば、近年、巨大なウイルスキャプシド粒子の安定性をシミュレーションした報告がなされている²⁹⁻³¹⁾。これら *in silico* 構造予測技術を、実験データ、臨床データ、疫学データ等と組み合わせることで、基礎と応用の幅広い分野の感染症対策研究 (創薬、ワクチン抗原設計、迅速診断法の開発、病原体サーベイランスなど) に *in silico* 構造予測技術を活用できるものと期待される。

謝辞

第11回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞にあたり、賞に推薦してくださいました、国立感染症研究所 佐藤裕徳室長、ならびに選考委員の先生がたに深く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり多大な協力を頂きました千葉大学薬学研究院 星野忠次准教授、名古屋医療センター 杉浦互先生、国立国際医療センター 湯永博之先生、京都大学ウイルス研究所 小柳義夫教授はじめ、多くの共同研究者の先生がたに心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Baker D, Sali A : Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294 : 93-96, 2001.
- 2) Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A : Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29 : 291-325, 2000.
- 3) Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T : Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol* 15 : 1184-1191, 2008.
- 4) Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D : Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science* 302 : 1364-1368, 2003.
- 5) Hori N, Chikenji G, Berry RS, Takada S : Folding energy landscape and network dynamics of small globular proteins.

- Proc Natl Acad Sci U S A 106 : 73–78, 2009.
- 6) Klepeis JL, Lindorff-Larsen K, Dror RO, Shaw DE : Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr Opin Struct Biol* 19 : 120–127, 2009.
 - 7) Lyne PD : Structure-based virtual screening : an overview. *Drug Discov Today* 7 : 1047–1055, 2002.
 - 8) Gane PJ, Dean PM : Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr Opin Struct Biol* 10 : 401–404, 2000.
 - 9) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S : Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not etravirine. *Antimicrob Agents Chemother* 54 : 1596–1602, 2010.
 - 10) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S : Impact of human leukocyte antigen-B* 51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS* 24 : F15–22, 2010.
 - 11) Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T : Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. *J Phys Chem B* 114 : 521–530, 2010.
 - 12) Ode H, Matsuyama S, Hata M, Hoshino T, Kakizawa J, Sugiura W : Mechanism of drug resistance due to N88S in CRF01_AE HIV-1 protease, analyzed by molecular dynamics simulations. *J Med Chem* 50 : 1768–1777, 2007.
 - 13) Ode H, Matsuyama S, Hata M, Neya S, Kakizawa J, Sugiura W, Hoshino T : Computational characterization of structural role of the non-active site mutation M36I of human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Mol Biol* 370 : 598–607, 2007.
 - 14) Ode H, Neya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T : Computational simulations of HIV-1 proteases—multi-drug resistance due to nonactive site mutation L90M. *J Am Chem Soc* 128 : 7887–7895, 2006.
 - 15) Ode H, Ota M, Neya S, Hata M, Sugiura W, Hoshino T : Resistant mechanism against nelfinavir of human immunodeficiency virus type 1 proteases. *J Phys Chem B* 109 : 565–574, 2005.
 - 16) Shenderovich MD, Kagan RM, Heseltine PN, Ramnarayan K : Structure-based phenotyping predicts HIV-1 protease inhibitor resistance. *Protein Sci* 12 : 1706–1718, 2003.
 - 17) Price MLP, Jorgensen WL : Analysis of binding affinities for celecoxib analogues with COX-1 and COX-2 from combined docking and Monte Carlo simulations and insight into the COX-2/COX-1 selectivity. *J Am Chem Soc* 122 : 9455–9466, 2000.
 - 18) Kawashima Y, Pfafferoth K, Frater J, Matthews P, Payne R, Addo M, Gatanaga H, Fujiwara M, Hachiya A, Koizumi H, Kuse N, Oka S, Duda A, Prendergast A, Crawford H, Leslie A, Brumme Z, Brumme C, Allen T, Brander C, Kaslow R, Tang J, Hunter E, Allen S, Mulenga J, Branch S, Roach T, John M, Mallal S, Ogwu A, Shapiro R, Prado JG, Fidler S, Weber J, Pybus OG, Klenerman P, Ndung'u T, Phillips R, Heckerman D, Harrigan PR, Walker BD, Takiguchi M, Goulder P : Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* 458 : 641–645, 2009.
 - 19) Patick AK, Duran M, Cao Y, Shugarts D, Keller MR, Mazabel E, Knowles M, Chapman S, Kuritzkes DR, Markowitz M : Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 42 : 2637–2644, 1998.
 - 20) Jacobsen H, Hanggi M, Ott M, Duncan IB, Owen S, Andreoni M, Vella S, Mous J : In vivo resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J Infect Dis* 173 : 1379–1387, 1996.
 - 21) Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, Bernstein BM, Japour AJ, Sun E, Rode RA : Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 75 : 7462–7469, 2001.
 - 22) Resch W, Ziermann R, Parkin N, Gamarnik A, Swanstrom R : Nelfinavir-resistant, amprenavir-hypersusceptible strains of human immunodeficiency virus type 1 carrying an N88S mutation in protease have reduced infectivity, reduced replication capacity, and reduced fitness and process the Gag polyprotein precursor aberrantly. *J Virol* 76 : 8659–8666, 2002.
 - 23) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W : Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33 : 336–342, 2003.
 - 24) Bandaranayake RM, Kolli M, King NM, Nalivaika EA,

- Heroux A, Kakizawa J, Sugiura W, Schiffer CA : The effect of clade-specific sequence polymorphisms on HIV-1 protease activity and inhibitor resistance pathways. *J Virol* 84 : 9995-10003, 2010.
- 25) Bihani SC, Das A, Prashar V, Ferrer JL, Hosur MV : Resistance mechanism revealed by crystal structures of unliganded nelfinavir-resistant HIV-1 protease non-active site mutants N88D and N88S. *Biochem Biophys Res Commun* 389 : 295-300, 2009.
- 26) Ode H, Yokoyama M, Kanda T, Sato H : Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. *J Mol Model* 17 : 391-399, 2011.
- 27) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, Koyanagi Y : Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J Virol* 85 : 932-945, 2011.
- 28) Maschera B, Darby G, Palu G, Wright LL, Tisdale M, Myers R, Blair ED, Furfine ES : Human immunodeficiency virus. Mutations in the viral protease that confer resistance to saquinavir increase the dissociation rate constant of the protease-saquinavir complex. *J Biol Chem* 271 : 33231-33235, 1996.
- 29) Arkhipov A, Roos WH, Wuite GJ, Schulten K : Elucidating the mechanism behind irreversible deformation of viral capsids. *Biophys J* 97 : 2061-2069, 2009.
- 30) Freddolino PL, Arkhipov AS, Larson SB, McPherson A, Schulten K : Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. *Structure* 14 : 437-449, 2006.
- 31) Arkhipov A, Freddolino PL, Schulten K : Stability and dynamics of virus capsids described by coarse-grained modeling. *Structure* 14 : 1767-1777, 2006.