

## 第14回日本エイズ学会 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

## HIV-1 逆転写酵素阻害剤に対する新規薬剤耐性変異と分子機序解析

Molecular Mechanisms of Novel HIV-1 Resistance to  
Reverse Transcriptase Inhibitors

蜂谷 敦子

Atsuko HACHIYA

国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター感染・免疫研究部

Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center,  
National Hospital Organization, Nagoya Medical Center

日本エイズ学会誌 16: 84-91, 2014

## はじめに

HIV 感染症において治療薬剤に対する耐性ウイルスの出現は患者の予後に大きな影響を与える<sup>1,2)</sup>。とりわけ、バックボーン薬剤となる逆転写酵素阻害剤は今もなお開発がすすめられているため、逆転写酵素阻害剤に対する薬剤耐性変異情報を集積し詳細な分子機序を明らかにすることは临床上重要な役割を果たす。単剤治療が行われていた時代からその基盤情報が蓄積されてきた一方で、新規逆転写酵素阻害薬の導入とともに新たな耐性度予測システムが求められてきた。そこで筆者は逆転写酵素に現れる変異解析に取り組み、臨床的に重要な5つの新規逆転写酵素阻害剤耐性変異を見出した。さらにその分子機構を明らかにした<sup>3-7)</sup>。

これまで、逆転写酵素のC末端側領域は活性中心から離れていることから変異による耐性獲得には重要ではないという認識がなされ、薬剤耐性検査の解析対象領域から除外されていた。しかし、「逆転写酵素C末端側領域の変異が薬剤耐性に寄与する」という筆者らによる報告により、現在では世界的な商業ベースで行われている耐性検査法が改善され、解析領域がC末端側領域までに拡張された。本稿では、C末端側領域の耐性変異とN末端側領域の耐性変異や多型変異に分けて、それぞれの変異が薬剤耐性(感受性)に及ぼす分子機構について概説する。

## 研究背景

本邦では逆転写酵素阻害剤を長期間使用していることから、逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異を獲得あるいは蓄積が疑われる臨床分離ウイルスが検出されることが非

常に多い。現在、薬剤耐性遺伝子検査と感受性検査のそれぞれの弱点を補うべく、膨大な数の検査結果をもとに耐性予測アルゴリズム (<http://hivdb.stanford.edu/>, <http://www.hivfrenchresistance.org/>) が構築され、薬剤標的部位の遺伝子配列から耐性度を予測することが可能となった。しかしながら、この方法にも問題が残されており、データの少ない新規薬剤では精度が低く、また未知の耐性変異や解析領域外に耐性変異が出現した場合、耐性度予測がまったく不可能であった。

そこでウイルス学的失敗と判断された症例からウイルスを分離し、逆転写酵素阻害剤に対する未知の耐性変異の同定を試みた。さらに、ウイルス学的解析および酵素学的手法、X線結晶構造解析、生物物理学的手法による多角的解析から新規耐性変異の薬剤耐性獲得の分子機構を明らかにし、HIV-1 逆転写酵素の機能に対する科学的知見をさらに深めることとした。臨床学的意義として新規耐性変異を明らかにし、耐性度予測システムの精度を高め、臨床現場で適切な薬剤選択に有用な情報のひとつとして貢献することを目的とした。また基礎的意義として薬剤の標的酵素となる HIV-1 逆転写酵素の機能を知り、新規薬剤の開発に役立てることを目的とした。

## 臨床検体の薬剤感受性検査と薬剤耐性遺伝子検査から得られる結果の不一致

1998年から2003年に分離された臨床分離ウイルス ( $n=339$ ) を対象に、薬剤感受性ならびに薬剤耐性遺伝子検査の結果を比較した。両検査法の結果に乖離が認められる症例について、下記に示す詳細な解析を行った。

## 逆転写酵素 C 末端側領域に存在する耐性変異の探索

## 1. 薬剤耐性遺伝子検査と薬剤感受性検査

スタブジン (d4T)/ジダノジン (ddI)/インジナビル (IDV)

著者連絡先: 蜂谷敦子 (〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1  
国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター  
感染・免疫研究部)

2014年3月28日受付

治療中 (図1 ポイント1 [CL1]) に分離されたウイルスは、IAS-USA による Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1 : Fall 2006<sup>8)</sup> に基づいた非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性関連変異がまったく検出されなかった。しかし薬剤感受性検査結果では、非核酸系逆転写酵素阻害剤のひとつであるネビラピン (NVP) に対し 25 倍耐性を示していた (図1)。また治療中断後 (ポイント2 [CL2]) のウイルスは、NVP 2.4 倍と感受性を示していた。

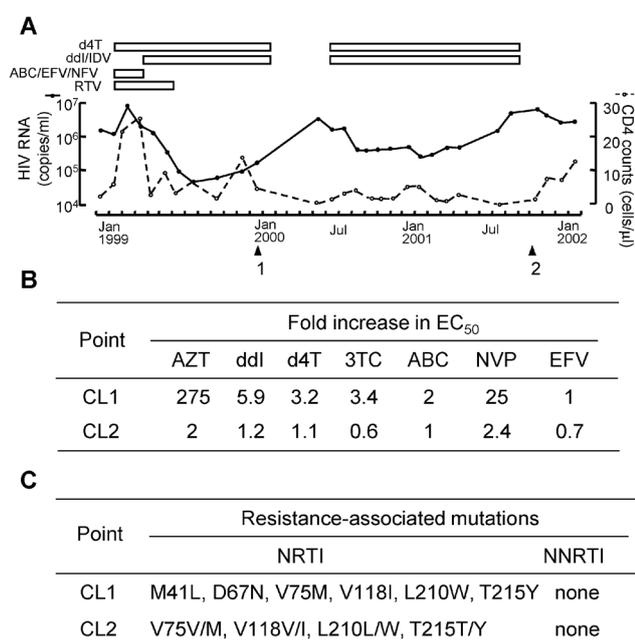


図 1 臨床経過と薬剤感受性、耐性遺伝子検査結果 (A) 臨床経過。(B) 薬剤感受性検査結果。(C) 薬剤耐性遺伝子検査結果。

## 2. 逆転写酵素 N 末端側, C 末端側領域を患者ウイルス由来の遺伝子配列と組換えた感染性ウイルスの解析

NVP 耐性の責任領域と特定するため、pNL101 (WT) の逆転写酵素の N 末端側領域 (RT 15~267 aa) と C 末端側領域 (RT 267~560 aa) を臨床分離ウイルス由来の遺伝子配列と置き換え、作製した感染性ウイルスの薬剤感受性を調べた (表1)。逆転写酵素 N 末端側領域を耐性ウイルスと組換えた場合 (CL1-WT), NVP に対し 2 倍と感受性を示し、また C 末端側領域を置換した場合 (WT-CL1) では NVP に 33 倍と耐性を示した。この結果から NVP 耐性を誘導した責任領域は C 末端側領域にあると考えられた。C 末端側領域のアミノ酸配列をさらに詳しく検索したところ、治療開始/中断に伴い、出現/消失した変異として N348I と I393L が見出された。

次に site-directed mutagenesis 法を用い、pNL101 に N348I, I393L 変異を導入し、感染性クローンを作製した。薬剤感受性検査の結果 (表1) から、N348I がジドブジン (AZT), ddI, NVP に対し 6.9 倍, 5.2 倍, 27 倍と耐性に付与していることが明らかとなった。一方、I393L は 1.7 倍, 0.9 倍, 1.3 倍とこれらの薬剤に対しまったく耐性に関与していなかった。さらに AZT 耐性関連変異である Thymidine Analogue-Associated Mutations (TAMs ; M41L/T215Y) に N348I が伴った場合、AZT 耐性度が 39 倍上昇した。これらの結果から、N348I は AZT, ddI (ともに核酸系逆転写酵素阻害剤), NVP (非核酸系逆転写酵素阻害剤) に対する多剤耐性変異であり、また TAMs と共出現することで AZT 耐性増強に関与していることが示唆された。

## 3. 臨床検体における N348I 出現頻度

臨床検体における N348I の出現頻度を明らかにするため、国立国際医療研究センターに来院した患者 231 名を対象にダイレクトシーケンシングを用いて HIV-1 の塩基配列を決定した (表2)。N348I は AZT, ddI に対し耐性を示すこ

表 1 組換えウイルスによる薬剤感受性検査結果

RT-replaced region		Fold increase in EC <sub>50</sub>					
N terminus	C terminus	AZT	ddI	d4T	3TC	NVP	EFV
WT	WT	1	1	1	1	1	1
CL1	WT	33	1.8	ND	ND	2	0.7
WT	CL1	5	5.3	ND	ND	33	2
CL1	CL2	39	2.3	ND	ND	2	0.7
—	N348I	6.9	5.2	0.8	0.8	27	1.7
—	I393L	1.7	0.9	0.5	0.7	1.3	1
TAMs	—	8	2	ND	0.6	1.3	0.7
TAMs	N348I	39	4.3	ND	0.7	28	0.7

表 2 N348I の出現頻度

Treatment group	Total in group	No. of N348I (%)	p-value
<b>AZT and/or ddI</b>	<b>48</b>	<b>6 (12.5%)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
AZT	22	2 ( 9.1%)	0.011
ddI	16	2 (12.5%)	0.006
AZT/ddI	10	2 (20%)	0.002
<b>Control</b>	<b>183</b>	<b>0</b>	
Antiretrovirals with neither			
AZT nor ddI	55	0	
No antiretrovirals	128	0	

とから、臨床検体を①AZT, ddI 使用群, ②AZT, ddI の未使用群 (無治療者を含む) の 2 群に分類した。①AZT, ddI 使用群をさらに細かく分類し, i) AZT のみ, ii) ddI のみ, iii) AZT/ddI 併用群とした。① AZT, ddI 使用群から N348I を有するウイルスが 6 例検出され, さらに i), ii), iii) からはそれぞれ 2 例ずつ検出された。これとは対照的に, ② AZT/ddI 未使用群では N348I はまったく検出されなかった。①群と②群を比較したところ, 統計学的に有意な差が認められた ( $p < 0.0001$ )。

本邦では NVP が第一選択薬剤ではなく代替治療薬剤であったため使用頻度が少ないこと, また現在の抗 HIV 治療の薬剤組合せが核酸系逆転写酵素阻害剤を主軸として行われ AZT, ddI を除いた NVP だけの治療を受けている症例が少ないことから, この NVP に対する解析は不可能であった。

#### 4. C 末端側領域における薬剤耐性遺伝子検査について

酵素活性中心から離れており, これまで耐性関連変異に関する研究はほとんどなされていなかった逆転写酵素 C 末端側領域まで解析領域を広げることにより, 核酸系, 非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する多剤耐性変異 N348I<sup>4,9,10)</sup> だけでなく, いくつかの新規耐性変異が相次いで報告された。核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異として E312Q, G335C/D, A360I/V, V365I, A376S<sup>11)</sup>, 非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する耐性変異として T369I/V<sup>12~14)</sup>, A376S<sup>6,15)</sup>, Q509L<sup>6)</sup> がウイルス学的解析, 臨床研究から報告され, さらに逆転写酵素 connection サブドメインや RNase H ドメインの機能と耐性獲得機序が報告されるようになった<sup>16~19)</sup>。これらの報告により, 世界的に商業ベースで行われていた耐性検査法が改善され, 解析領域が C 末端側領域まで広げられ, より精度の高い耐性度予測システムの構築がなされた。

#### 逆転写酵素 N 末端側領域に存在する耐性変異の探索

テノフォビル (Tenofovir Disoproxil Fumarate; 以下 TDF)

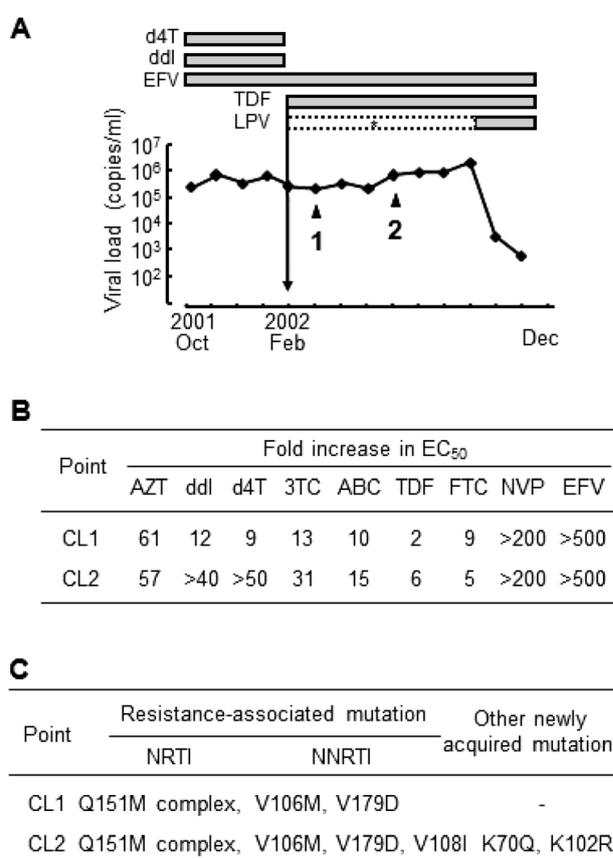


図 2 臨床経過と薬剤感受性, 耐性遺伝子検査結果  
(A) 臨床経過 (\*期間中, LPV のアドヒアランス不良)。  
(B) 薬剤感受性検査結果。(C) 薬剤耐性遺伝子検査結果。

を含む治療中にウイルス学的失敗をした症例について, 下記の解析を行った。

#### 1. 薬剤耐性遺伝子検査と薬剤感受性検査

エファビレンツ (EFV), TDF, ロピナビル (LPV) 投与中に, 時期を異なってウイルスを分離した (図 2)。この 2 つのウイルスの核酸系逆転写酵素阻害剤に対する薬剤耐性

遺伝子検査結果はどちらも同じで Q151M complex を獲得していた。ところが2つの薬剤感受性検査結果が大きく異なっていた。CL2 のサンプルでは, ddi, d4T, ラミブジン (3TC), アバカビル (ABC) に対する耐性度が大きく上昇し, また TDF 耐性 (6 倍) が新たに認められた。一般的に Q151M は多剤耐性変異であることが知られているが, 唯一 TDF に感受性を示すことが知られている<sup>20)</sup>。そのため CL2 の臨床分離ウイルスには TDF に対する新たな耐性変異が存在すると示唆された。

## 2. 組換えウイルスを用いた解析

新規 TDF 耐性変異を同定するため, 臨床分離ウイルスの逆転写酵素領域におけるアミノ酸配列を比較した。異なる変異箇所は K70Q, K102R, V108I であった。プロテインデータベース (PDB) に登録されている逆転写酵素の立体構造 (1HYS)<sup>21)</sup> から, K102, V108 (ともに p66) は非核酸系逆転写酵素阻害剤の結合部位周辺に位置し, 今回の TDF 耐性度合に影響を与える可能性は少ないとされた。一方, K70 (p66) はポリメラーゼ活性中心近傍に位置し, TDF 耐性度を上昇させた責任変異として最も疑わしいとされた。Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) にて K70Q に対する薬剤耐性度を確認したところ, これまでに報告されていないアミノ酸変異型であった。

そこで臨床検体で検出された K70Q, ならびに Q151M complex を含む変異を site-directed mutagenesis 法により導入し, 組換えウイルスを作製後, 核酸系逆転写酵素阻害剤に対する薬剤感受性検査を行った (図 3)。K70Q は ddi, 3TC に低度耐性を示し, また Q151M complex は TDF を除くすべての核酸系逆転写酵素阻害剤に耐性を示した。ところが臨床分離ウイルスで認められた K70Q/Q151M complex は AZT, ddi, d4T, 3TC, ABC に対する耐性度が上昇するだけでなく, TDF に対する耐性も新たに獲得していることが明らかとなった。

## 3. 酵素学的手法を用いた耐性機構解析

K70Q による TDF 耐性機構を明らかにするため, 変異を組み込んだ HIV-1 逆転写酵素 (HIV-1 RT) を大腸菌に発現させ, 精製し, 酵素学的実験を試みた。前定常状態での Tenofovir-diphosphate (TFV-DP) と dATP の取り込み速度と結合親和力をそれぞれ測定した (表 3)。HIV-1 RT<sub>K70Q</sub> と RT<sub>K70Q/Q151M complex</sub> は RT<sub>WT</sub> に比べ TFV-DP に対する結合親和力が 4.5 から 4.7 倍低下しており, また RT<sub>Q151M complex</sub> に K70Q の変異が加わることによって, TFV-DP の取り込み速度が低下していることが明らかとなった。最終的に dATP と TFV-DP の識別力 (selectivity) を比較すると, RT<sub>WT</sub> が 1.6 に対し RT<sub>K70Q/Q151M complex</sub> が 26.3 と高いことがわかった。つまり K70Q/Q151M complex は TFV-DP に比べ dATP の取り込

みを効率よく行うことにより, TDF に対して耐性を獲得していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。

## 逆転写酵素 N 末端側領域に存在する多型変異の探索

### 1. ウイルス学的解析

薬剤感受性に影響を及ぼす遺伝子多型についても解析を行った。逆転写酵素活性中心近傍に位置する多型変異 172K は, 臨床分離株だけでなく標準株として知られている BH10 にも付随する。172K に核酸系あるいは非核酸系逆転写酵素阻害剤に対する既存の耐性変異が伴った場合, 薬剤感受性にどのような影響を及ぼすかを調べるため, site-directed mutagenesis 法を用い, さまざまな組合せの耐性変異ウイルスを作製し, 薬剤感受性を測定した (図 4)。その結果, 172K は既存の耐性変異がもたらす薬剤耐性を感受性に引き戻していた。とくに 172K は核酸アナログ製剤と核酸の識別を高めることによって耐性を獲得する変異 (K65R, Q151M など) ではなく, 核酸アナログ製剤の切除 (excision) 機序により耐性を獲得する耐性変異 (TAMs など) を伴った場合のみ, 耐性度を減弱することが分かった。また核酸系逆転写酵素阻害剤だけでなく, 非核酸系逆転写酵素阻害剤に対しても耐性度を弱めていた。

### 2. 酵素学的と立体構造解析による分子機構の解明

耐性度を脆弱させる分子機構を明らかにするため, 172K/R を伴った HIV-1 逆転写酵素 (HIV-1 RT) を精製し, 酵素化学的性質を比較した。各酵素の processivity を測定したところ RT<sub>172K</sub> では低く, 特にその傾向は excision を機序とした耐性変異 (TAMs) を伴った場合に, よりいっそう顕著に観察された。この結果から DNA への結合力が弱いことが示唆されたため, Biacore を用いた生物物理学相互作用解析を行った (図 5)。HIV-1RT<sub>172K</sub> は 2 本鎖 DNA に対し乖離定数 ( $k_{off}$ ) が 31 倍高く, 最終的に Template/primer となる DNA への結合力が HIV-1RT<sub>172K</sub> に比べ弱くなることが分かった。立体構造解析 (図 6) では, 172K を介して活性中心と非核酸系逆転写酵素阻害剤の結合部位を形成する  $\beta$ -sheet 9 と  $\alpha$ -helix に位置するアミノ酸側鎖の相互作用が変わり, YMDD (酵素活性中心) を構成するループの可動性に制限が生じた。そのため 172K を有する逆転写酵素はリガンド非結合型に遷移しやすく, 逆転写反応がそこで停止することがわかった。その結果, 172K は既存の耐性変異がもたらす耐性度を脆弱させるということが考えられ, 新しい感受性分子機構を提唱することとなった<sup>7)</sup>。

## おわりに

筆者が薬剤耐性研究を始めた頃から状況が変わり, 現在では初回治療から多剤併用療法が導入されるため薬剤耐性変異を獲得するリスクが下がったこと, 抗ウイルス効果が

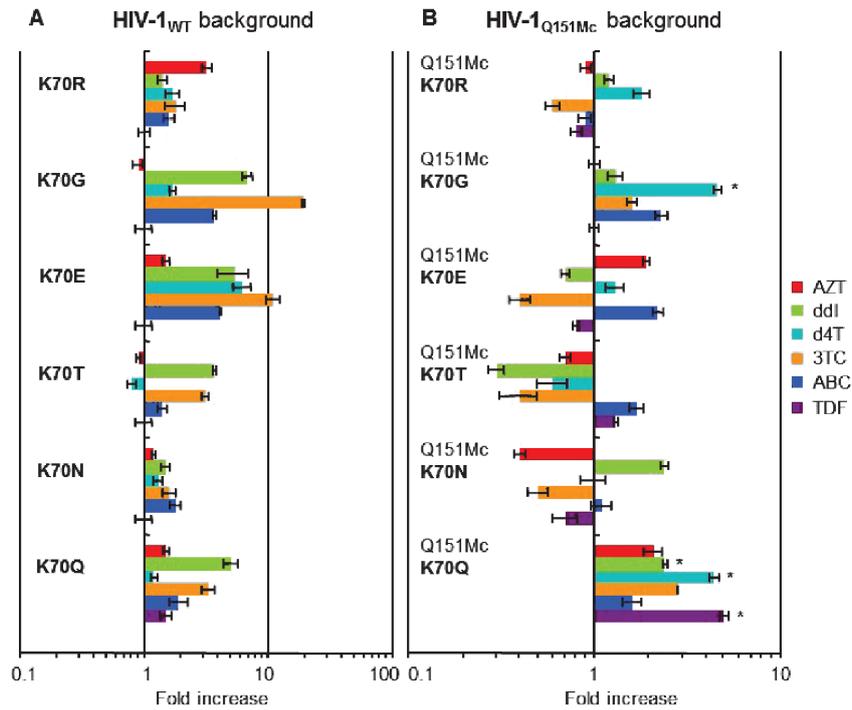


図 3 組換えウイルスによる薬剤感受性検査結果  
 (A) WT と比較した耐性度。(B) Q151M complex (Q151Mc) と比較した耐性度 (\*Q151Mc の EC<sub>50</sub> と比較し, 統計学的に優位差が認められた [ $p < 0.05$ ,  $t$ -test])。

表 3 Pre-steady state での dATP と TFV-DP の取り込み

HIV-1 RT	dATP			TFV-DP			Selectivity	Resistance
	$k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (μM)	$k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	$k_{pol}$ (s <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> (μM)	$k_{pol}/K_d$ (μM <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )		
WT	6.3	2.6	2.4	2.8	1.9	1.47	1.6	—
K70Q	8.4	3.8	2.2	3.1	8.6	0.36	6.1	3.8
Q151Mc	17.9	5.4	3.3	1.3	4.3	0.3	11	6.9
K70Q/Q151Mc	14.6	5.0	2.9	1	8.9	0.11	26.3	16.4

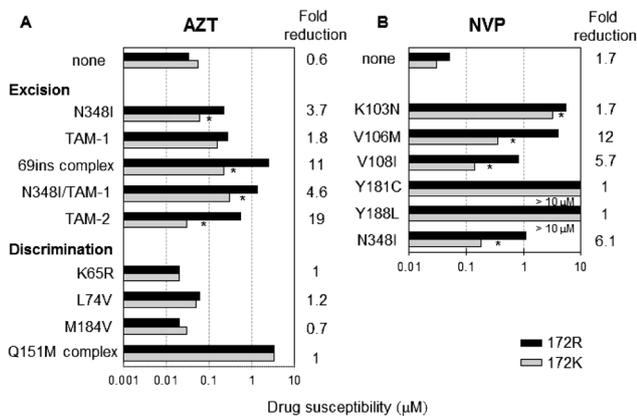


図 4 組換えウイルスによる薬剤感受性検査結果  
 \*EC<sub>50</sub> を比較し, 統計学的に優位差が認められた ( $p < 0.05$ ,  $t$ -test)。  
 (A) AZT に対する感受性。(B) NVP に対する感受性。

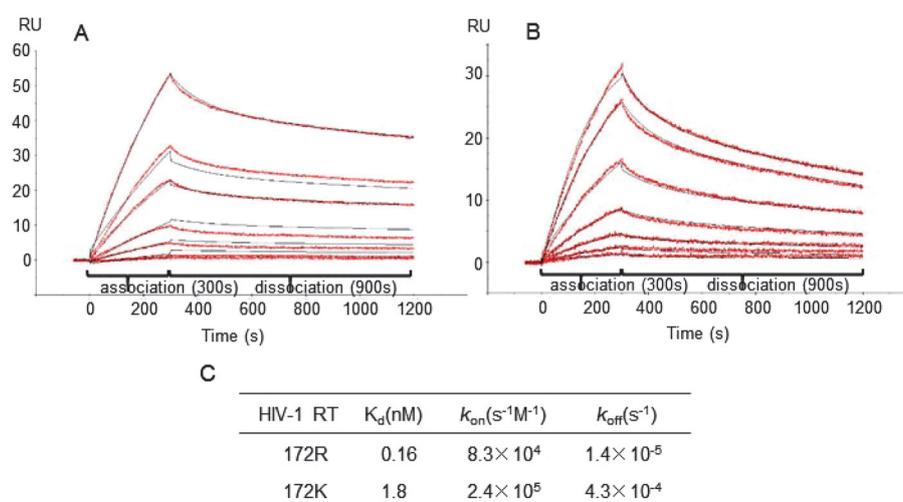


図 5 Surface Plasmon Resonance による DNA 結合速度定数  
(A) 172R。(B) 172K。(C) DNA 結合速度定数。

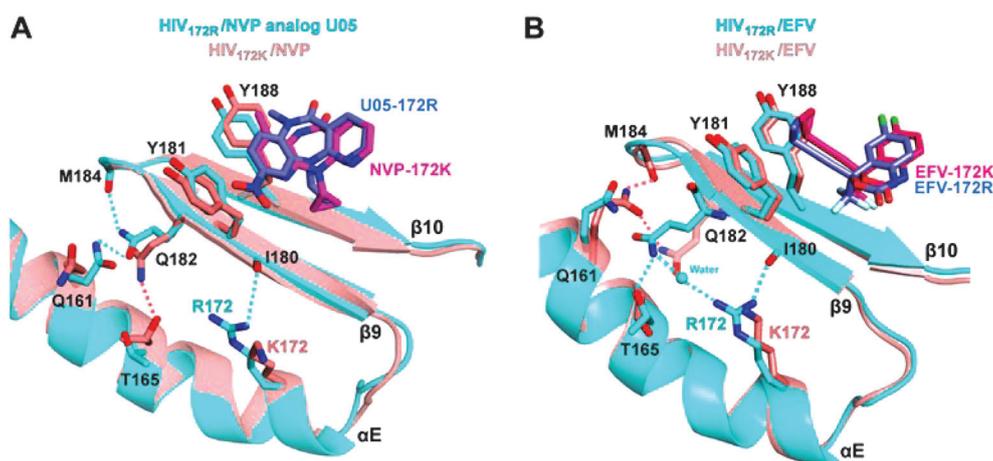


図 6 HIV-1 RT 172K と 172R の比較  
(A) HIV-1 RT<sub>172R</sub> もしくは <sub>172K</sub> に NVP (NVP analog U05) が結合した状態。  
(B) HIV-1 RT<sub>172R</sub> もしくは <sub>172K</sub> に EFV が結合した状態。

高く、耐性変異の獲得しにくい (genetic barrier) 抗ウイルス薬の開発が進められたこと、そして服薬アドヒアランスを良好に維持できる抗ウイルス薬の導入などの複合的な要因によって、薬剤耐性変異ウイルスの出現率が大幅に減少した。しかし、今もなお耐性ウイルスの出現により治療薬の選択肢が制限される難治性症例が存在することは確かである。一般的に耐性ウイルスの蔓延阻止の対策として、適切な治療と耐性ウイルスに効果のある新規薬剤の開発、そして耐性ウイルスの監視と動向把握があげられる。これらの対策に対し、今後も既存の薬剤耐性データベースの正確性を高めることを目指し、最適な薬剤選択の実現化を図

ること、また薬剤の標的酵素の分子機構を明らかにしていくことで耐性変異の獲得しにくい新規薬剤の開発に取り組みたいと考えている。そして現職場の名古屋医療センターにおいて、3つ目の対策法である「国内で流行する耐性ウイルスの動向把握に関する研究班」に携わることになり、これまで培った基礎、臨床学的研究に加え、疫学研究といった多角的視野で薬剤耐性ウイルスの根絶に、若輩ながら貢献できるよう努力していきたいと考える。

#### 謝辞

第 14 回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞の受賞に

あたり、国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターで10年以上にわたりご指導とご鞭撻を賜わり、また本賞にご推薦いただいた岡慎一先生に厚く御礼申し上げます。本研究を推進するうえで、臨床研究において国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターの湯永博之先生、ウイルス学的解析では東北大学大学院医学系研究科の児玉栄一先生、酵素学的、立体構造学的解析では University of Missouri School of Medicine の Stefan G. Sarafianos 先生、そして現職場の名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部の杉浦互先生、岩谷靖雅先生、横幕能行先生の多大なるご指導、ご尽力を賜りましたことを心より御礼申し上げます。また大学院生時代、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました熊本大学 エイズ学研究センター ウイルス制御分野、滝口雅文教授に深謝致します。

本研究では多方面にわたり、たくさんの方々のご協力とご指導のもと、支えていただきました。国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センターの皆様、University of Missouri School of Medicine, SGS ラボの皆様、そして名古屋医療センター 臨床研究センター 感染・免疫研究部の皆様に心より深く感謝致します。そして臨床検体を管理してくださった国立国際医療研究センター、エイズ治療・研究開発センター 高橋由紀子さん、根岸ふじ江さんに合わせて御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-2199, 1999.
- 2) Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, Nadler J, Verbiest W, Hertogs K, Ames M, Rinehart AR, Graham NM, Team VS : A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 16 : 579-588, 2002.
- 3) Hachiya A, Gatanaga H, Kodama E, Ikeuchi M, Matsuoka M, Harada S, Mitsuya H, Kimura S, Oka S : Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology* 327 : 215-224, 2004.
- 4) Hachiya A, Kodama EN, Sarafianos SG, Schuckmann MM, Sakagami Y, Matsuoka M, Takiguchi M, Gatanaga H, Oka S : Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* 82 : 3261-3270, 2008.
- 5) Hachiya A, Kodama EN, Schuckmann MM, Kirby KA, Michailidis E, Sakagami Y, Oka S, Singh K, Sarafianos SG : K70Q adds high-level tenofovir resistance to "Q151M complex" HIV reverse transcriptase through the enhanced discrimination mechanism. *PLoS One* 6 : e16242, 2011.
- 6) Hachiya A, Shimane K, Sarafianos SG, Kodama EN, Sakagami Y, Negishi F, Koizumi H, Gatanaga H, Matsuoka M, Takiguchi M, Oka S : Clinical relevance of substitutions in the connection subdomain and RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase from a cohort of antiretroviral treatment-naive patients. *Antiviral Res* 82 : 115-121, 2009.
- 7) Hachiya A, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Tu X, Palczewski K, Ong YT, Li Z, Griffin DT, Schuckmann MM, Tanuma J, Oka S, Singh K, Kodama EN, Sarafianos SG : HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations to both nucleoside and non-nucleoside RT inhibitors. *J Biol Chem* 287 : 29988-29999, 2012.
- 8) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD : Update of the drug resistance mutations in HIV-1 : Fall 2006. *Top HIV Med* 14 : 125-130, 2006.
- 9) Yap SH, Sheen CW, Fahey J, Zanin M, Tyssen D, Lima VD, Wynhoven B, Kuiper M, Sluis-Cremer N, Harrigan PR, Tachedjian G : N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med* 4 : e335, 2007.
- 10) Sluis-Cremer N, Moore K, Radzio J, Sonza S, Tachedjian G : N348I in HIV-1 reverse transcriptase decreases susceptibility to tenofovir and etravirine in combination with other resistance mutations. *AIDS* 24 : 317-319, 2010.
- 11) Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S, Maldarelli F, Fivash MJ, Jr., Coffin JM, Pathak VK : Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 317-322, 2007.
- 12) Zhang Z, Xu W, Koh YH, Shim JH, Girardet JL, Yeh LT, Hamatake RK, Hong Z : A novel nonnucleoside analogue that inhibits human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to current nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 51 : 429-437, 2007.
- 13) Gupta S, Fransen S, Paxinos EE, Stawiski E, Huang W, Petropoulos CJ : Combinations of mutations in the connection

- domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase : assessing the impact on nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 54 : 1973–1980, 2010.
- 14) Lengrubler RB, Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Baumann J, Santos AF, Pathak VK, Soares MA : Phenotypic characterization of drug resistance-associated mutations in HIV-1 RT connection and RNase H domains and their correlation with thymidine analogue mutations. *J Antimicrob Chemother* 66 : 702–708, 2011.
- 15) Paredes R, Puertas MC, Bannister W, Kistic M, Cozzi-Lepri A, Pou C, Bellido R, Betancor G, Bogner J, Gargalianos P, Banhegyi D, Clotet B, Lundgren J, Menendez-Arias L, Martinez-Picado J, Euro SSG : A376S in the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase confers increased risk of virological failure to nevirapine therapy. *J Infect Dis* 204 : 741–752, 2011.
- 16) Schuckmann MM, Marchand B, Hachiya A, Kodama EN, Kirby KA, Singh K, Sarafianos SG : The N348I mutation at the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase decreases binding to nevirapine. *J Biol Chem* 285 : 38700–38709, 2010.
- 17) Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Barr R, Pathak VK : Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance. *J Virol* 81 : 6837–6845, 2007.
- 18) Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK : A novel molecular mechanism of dual resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Virol* 84 : 5238–5249, 2010.
- 19) Biondi MJ, Beilhartz GL, McCormick S, Gotte M : N348I in HIV-1 reverse transcriptase can counteract the nevirapine-mediated bias toward RNase H cleavage during plus-strand initiation. *J Biol Chem* 285 : 26966–26975, 2010.
- 20) Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Wensing AM, Richman DD : Update of the drug resistance mutations in HIV-1 : March 2013. *Top Antivir Med* 21 : 6–14, 2013.
- 21) Sarafianos SG, Das K, Tantillo C, Clark AD, Jr., Ding J, Whitcomb JM, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E : Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA : DNA. *EMBO J* 20 : 1449–1461, 2001.