

## 4. バイオインフォマティクスに基づく HIV-1 の薬剤耐性研究

大 出 裕 高

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  
国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

今日、HIV-1 感染症の治療には 20 を超える薬物が使用可能となり、これらを組み合わせた多剤併用療法は、AIDS の発症率や AIDS による死亡率を劇的に低下させた。しかし、感染ウイルスの増殖抑制に不十分な薬物量で治療が行われると、HIV-1 の易変異性ゆえに感染ウイルスゲノム中に変異が蓄積し、薬剤耐性ウイルスが出現してしまう。結果、病態の悪化をもたらしたり、治療薬の変更も余儀なくさせてしまう。そこで、より適切な治療薬選択をめざし、バイオインフォマティクス技術を利用してウイルス配列情報から抗 HIV-1 薬の感受性を予測する方法がこれまでに開発されてきた。また、新型シーケンサーによる ultra deep sequencing や *in silico* 構造解析により、薬剤耐性の分子機序を理解する試みも行われてきた。これらバイオインフォマティクス技術は、近年のコンピュータの性能の向上もあいまって著しい発展を遂げている。本稿では、これらバイオインフォマティクス技術に基づく HIV-1 の薬剤耐性研究について概説する。

### はじめに

治療薬に対して抵抗性を示す変異ウイルスの出現（薬剤耐性）は、ウイルス感染症治療における大きな問題のひとつである。なかでも HIV-1 感染症は、慢性感染症として位置づけられ、治療が長期に渡ることから、薬剤耐性は予後を左右する深刻な問題である。

HIV-1 感染症治療には、2010 年末現在、核酸系逆転写酵素阻害薬（Nucleoside-analogue Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI）、非核酸系逆転写酵素阻害薬（Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI）、プロテアーゼ阻害薬（Protease Inhibitor, PI）、インテグラーゼ阻害薬（Integrase Strand Transfer Inhibitor, INSTI）、CC ケモカイン受容体 5 (CCR5) 阻害薬の 5 クラス、計 20

以上の薬物の使用が認可されている。これらを組み合わせた多剤併用療法（Combination Anti-Retroviral Therapy, cART）は AIDS による死亡率を著しく低下させることに成功してきた<sup>1,2)</sup>。しかしながら、HIV-1 の易変異性<sup>3)</sup> ゆえに、治療過程でウイルスタンパクに変異、特に薬剤耐性関連変異が蓄積し、治療薬に対して耐性を獲得したウイルスが出現してしまう<sup>4-7)</sup>。一方で、抗 HIV-1 薬による治療を受けた経験のない感染者中のウイルスであっても、いずれかの薬剤耐性関連変異が時折検出される<sup>8-10)</sup>。さらに、薬剤耐性 HIV-1 に見られる薬剤耐性関連変異のパターンはそれぞれの抗 HIV-1 薬で異なり、薬剤耐性関連変異の組合せも多種多様である<sup>11,12)</sup>。このため、それぞれの感染者に対して適切な治療薬の選択をすることが困難となり、薬剤耐性の問題をより複雑化させている。

これら薬剤耐性の問題を低減する一助として、これまでにバイオインフォマティクスの手法を用い、ウイルス配列情報から薬物感受性を予測し、各 HIV-1 感染者への適切な治療薬選択を補助する方法が考案されてきた。また、治療薬選択だけでなく、より効果的な薬物の開発をめざし、薬剤耐性の分子機序を深く理解するための試みも行われてきた。実際に、これらの試みは、感染者の薬物治療効果の向上に大きく貢献してきた。本稿では、これらバイオインフォマティクス技術を用いた HIV-1 の薬剤耐性研究の進展と現状について概説する。

### 連絡先

〒460-0001

愛知県名古屋市中区三の丸4丁目1番1号

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

TEL: 052-951-1111

FAX: 052-963-3970

E-mail: odehir@nih.go.jp

## ウイルス配列情報に基づく 抗 HIV-1 薬感受性予測法の開発

HIV-1 の配列は、HIV-1 の易変異性ゆえに感染者ごとに異なる。さらに、NRTI, NNRTI, PI, INSTI について、それぞれが標的とするウイルスタンパク中に多くの薬剤耐性関連変異が報告されており、それらの組合せも多種多様である<sup>7, 11, 12</sup>。そのため、患者ごとにそれらの抗 HIV-1 薬を適切に選択することは容易ではないといえる。

そこで、NRTI, NNRTI, PI, INSTI を対象に、医師による抗 HIV-1 薬の適切な選択を補助するため、ウイルス配列情報からこれら抗 HIV-1 薬それぞれに対する感受性を予測する方法が考案されてきた<sup>13-15</sup>。これらの方法は、これまでに蓄積された、ウイルスの配列とそのウイルスに対する各薬物の *in vitro* での感受性データの組となる情報に基づき、ウイルスの薬物感受性を、例えば、感受性、低度耐性、中度耐性、高度耐性のように定性的に予測する。

代表的な予測法のひとつに、抗 HIV-1 薬の標的タンパク中に存在する既知の薬剤耐性関連変異の種類を基に評価する“ルールベースアルゴリズム (rule-based algorithm)”が挙げられる。例えば、Rega<sup>16, 17</sup>、ANRS<sup>17, 18</sup>、Stanford HIVdb<sup>17, 19</sup> がこの方法に分類される。Rega<sup>16, 17</sup>、ANRS<sup>17, 18</sup> では、既報の論文の記述をもとに選別した薬剤耐性関連変異やそれらの組合せの出現如何によって薬物感受性を評価する。また、Stanford HIVdb<sup>17, 19</sup> では、出現した薬剤耐性関連変異それぞれに経験的に決められたスコアを合計し、その合計値から薬物感受性の評価を行う。もうひとつの代表的な方法に、“統計的学習法 (statistical learning method)”が挙げられる。統計的学習法では、大量のウイルス配列と薬物感受性の組となる既知情報から、ニューラルネットワーク (neural network)、サポートベクターマシン (support vector machine)、決定木 (decision tree) などの手法を駆使してウイルス配列と薬物感受性の間に内在するルールを導きだし、その導き出したルールを用いて、ある配列を持つウイルスの未知の薬物感受性を推定する方法である。ルールベースアルゴリズムに比べ客観的なルールに基づいているのが特徴であり、Virco 社の VirtualPhenotype (Virco, Belgium) や、geno2pheno<sup>20</sup>、PIRSpred<sup>21</sup> がよく知られている。これらの方法によって、ウイルス配列情報さえ取得すれば、非常に短時間で、おおよそ 70% から 90% の精度で予測が可能と報告されている<sup>15, 22</sup>。また、一部の方法は Web 上で簡便に抗 HIV 薬に対する感受性予測ができるようになっている。

その他、ウイルス配列からウイルスタンパク質-薬物複合体の立体構造、さらにタンパク質-薬物間親和性を予測することで薬剤耐性を評価する方法も開発され始めている<sup>15, 23-30</sup>。立体構造をもとにした方法は解析に大量の時間はかかるが、ルールベースアルゴリズムや統計的学習法に基づく方法の

ように大量のウイルス配列や薬剤感受性の既知情報を必要としない。そのため、十分な既知情報の集まらない新規薬物に対しても予測可能というメリットもある。

しかしながら、臨床的には抗 HIV-1 薬のウイルスに対する *in vitro* ではなく *in vivo* での効果を予測することが理想的である。そのため、cART の実施を念頭に、複数の抗 HIV-1 薬の投薬から一定期間後における、総合的な効果の予測をめざした方法も開発され始めた<sup>14, 31-38</sup>。これらの方法は、上述の *in vitro* の感受性予測法とは異なり、一般に、治療薬変更事例のウイルス配列、治療薬の組合せ、治療効果などの情報に基づいている。これまでに、数学的に HIV-1 の血中ウイルス量の変化を予測する方法<sup>31</sup> や、治療薬それぞれの効果をスコア (genotypic susceptibility score) で表しそれらを加算する方法<sup>32-34</sup>、また、治療薬変更事例の情報をもとに統計的学習法により予測する方法<sup>14, 35-38</sup> が開発されている。なかでも、大量の臨床情報に基づいた geno2pheno-THEO<sup>35</sup> や EuResist システム<sup>37, 38</sup> は、約 80% の精度で予測が可能と報告されており、Web 上で自由に利用できることから抗 HIV-1 治療に大いに役立つことが期待される。

## ウイルス配列情報に基づく CCR5 阻害薬感受性予測法の開発

抗 HIV-1 薬として、ウイルスタンパクを標的とした薬物のほかに、宿主タンパクである CCR5 を標的とした薬物も治療に用いられている。CCR5 阻害薬は、ウイルスの侵入時にコレセプターとして CXCR4 を利用可能なウイルスに対しては、その侵入を抑えることができない<sup>7, 39, 40</sup>。そのため、ケモカイン受容体と相互作用するとされる HIV-1 gp120 V3 領域の配列情報からコレセプター指向性を予測することで CCR5 阻害薬の感受性予測を行う方法が考案されてきた<sup>41-44</sup>。予測は経験則に基づいた 11/25 ルール<sup>41, 42</sup> や、統計的学習法に基づいた geno2pheno<sup>43</sup>、position-specific scoring matrix (PSSM)<sup>44</sup> がよく知られている。これら方法による CXCR4 指向性ウイルスの検出感度は、おおよそ 60% の精度で予測が可能と報告されている<sup>45</sup>。

一方で、CCR5 のコレセプター指向性を保持したまま、gp120 の変異により CCR5 阻害薬に対して耐性を示した事例も報告されている<sup>39, 46</sup>。しかし、これら変異による耐性獲得に関しては前述の指向性予測法は適応できないため、今後の CCR5 阻害薬感受性予測の課題と言えるだろう。

## 新型シークエンサーによる 微少な準種 (quasi-species) の検出

バイオインフォマティクスの技術は、薬剤感受性の予測ばかりでなく、薬剤耐性の分子機序を理解する際にも大きく貢献してきた。

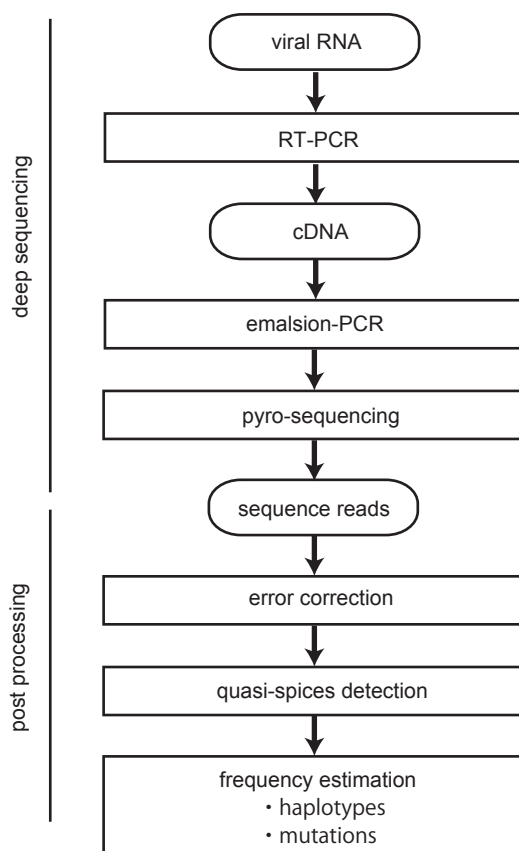


図1 GS FLXによる準種解析のフローチャート。Pyro-sequencingで得られた膨大なread情報は、ポスト処理(post processing)で補正、抽出され、準種の検出とその頻度の推定が行われる。

近年の新型シーケンサーの出現によって、膨大なゲノム配列を一度に得られるようになった<sup>47, 48)</sup>。例えば、新型シーケンサーのひとつであるRoche-454社の最新のGenome Sequencer FLX (GS FLX) システムでは、1回のシーケンスランで、平均400bpの配列を最大1,000,000本程度得ることが可能である(<http://www.454.com> 参照)。バイオインフォマティクス技術は、ひとつひとつ手動で解析していくことは現実的に不可能なこれら膨大なゲノム配列情報を、コンピュータ上で半自動的に解析することで大きく貢献している(図1)<sup>48)</sup>。

新型シーケンサーの中でも、特に長い配列が得られるGS FLXシステムを利用し、HIV感染者体内に微量に存在する薬剤耐性ウイルスの検出が試みられ始めている<sup>47-56)</sup>。新型シーケンサーは、従来のSanger法でのdirect PCR sequencingに比べると短い配列しか得られないため、HIV-1プロテアーゼとGagの共進化解析など離れた座位の変異間の相互作用を解析することは困難であるものの、direct PCR sequencingで検出が難しいとされる20%以下の準種の配列も検出が可能である<sup>49)</sup>。また、これまで準種解析に用いられてきたclonal sequencingに比べても、時間

や労力をかけずに微量な準種の配列の決定ができ、allele-specific hybridization法よりも網羅的な解析ができる<sup>49, 50)</sup>。

例えば、GS-FLXシステムを利用して、感染者のNRTIによる治療におけるウイルス中の薬剤耐性関連変異のダイナミクスを観察した例が報告されている<sup>51)</sup>。治療前には検出されなかった薬剤耐性関連変異が治療中に出現する、あるいは治療中に見られた薬剤耐性関連変異が治療中止に伴い減少するダイナミクスが見られた。また、INSTIであるラルテグラビルやCCR5阻害薬による治療で失敗した症例において、投薬前のウイルス配列を観察したところ、ラルテグラビル耐性関連変異ウイルスやCXCR4指向性のウイルスが1%前後で存在し、投薬後にそれら薬剤耐性ウイルスが増殖していたことが報告された<sup>52-54)</sup>。

しかしながら、GS FLXのpyro-sequencingのエラーは、0.005-0.010置換/塩基であり<sup>48, 57, 58)</sup>、このエラー率は一般的なDNAポリメラーゼのエラー率よりもはるかに高い。Taq, Pfu, KOD DNAポリメラーゼは、それぞれ $2.0 \times 10^{-5}$ ,  $1.6 \times 10^{-6}$ ,  $1.1 \times 10^{-6}$ 置換/塩基と報告されている<sup>59, 60)</sup>。特にpyro-sequencingでは、同じ塩基が並ぶホモポリマー配列の決定において塩基の挿入・欠失エラーが生じやすく、



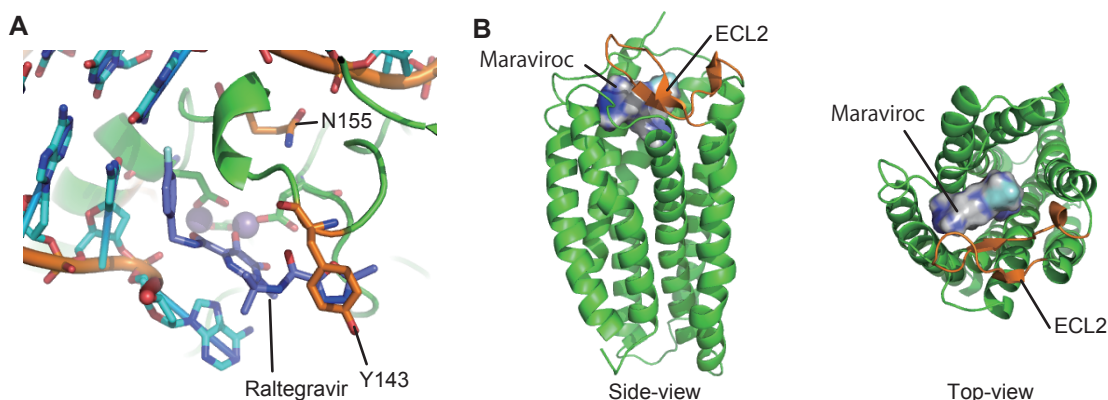


図2 (A) HIV-1 インテグラーゼ-ラルテグラビル (Raltegravir) 複合体の予測構造と, (B) CCR5-マラビロク複合体の予測構造. タンパク質を緑色, 核酸をシアン, 阻害薬をネイビーで表示した. また, インテグラーゼ内のラルテグラビル耐性に関わるアミノ酸, CCR5 の ECL2 をオレンジ色でハイライトした. インテグラーゼ-ラルテグラビル複合体構造は, PFV インテグラーゼ-ラルテグラビル複合体の結晶構造 (PDB code: 3L2V)<sup>149</sup> を鋳型にホモロジーモデリング法<sup>79-81</sup> により文献<sup>116</sup> にならい予測を行った. CCR5-マラビロク複合体構造は, まずロドプシンよりも CCR5 との配列相同性の高い CXCR4 の結晶構造 (PDB code: 3ODU)<sup>154</sup> を鋳型に, CCR5 の立体構造を予測し, さらに ASEDock<sup>155</sup> によるドッキングシミュレーションにてマラビロクを予測 CCR5 の構造に結合させることで予測した. いずれの構造予測も, MOE ver. 2008.10 (Chemical Computing Group, Canada) を使用し, エネルギー関数として MMFF94x force field<sup>156, 157</sup> および GB/VI 溶媒関数<sup>158</sup> を用いて実施した.

全体のエラーの大半を占める<sup>48, 57, 58</sup>. さらに, RNA ウィルスである HIV-1 のゲノム解析を行う上で, pyrosequencing の前処理として RT-PCR による cDNA 合成が必要であるため, PCR での組換えや変異も生じうる. 300 塩基程度の増幅では 1% 弱の組換え率であるものの<sup>51, 53</sup>, HIV-1 ゲノム全長の cDNA 合成を行うと 10% 程度の組換えが生じる可能性がある<sup>61</sup>. また, subtype C HIV-1 の準種解析を行った際に, NRTI 耐性変異 K65R が PCR エラーによって 2% 前後出現する問題も報告されている<sup>62</sup>.

このような高頻度のエラーによる問題を克服するため, これらエラーを補正し, より低頻度の準種の存在を根拠づけるための方法の開発も行われ始めている<sup>47-55, 63-68</sup>. Hedskog らは, 独自のエラー補正により, エラー率を 0.0005 置換 / 塩基と 1/10 に低減することに成功し, 0.1% 前後の薬剤耐性関連変異の存在を議論している<sup>51</sup>. また, Tsibris らは, 89:10:1 で混ぜたサンプルを用いたコントロール実験にて, 約 0.001 置換 / 塩基のエラー率で, 存在比を大きく変えずにそれぞれの配列を得ることに成功した<sup>53</sup>. そのほかに, 準種解析ソフトウェアとして SHORAH<sup>63-65</sup>, AmpliconNoise<sup>66</sup>, PyroNoise<sup>67, 68</sup> などが開発されている.

今日では, 直接 RNA を読む技術の開発もなされ始めている<sup>69</sup>. Helicos 社の Genetic Analysis System は単分子シーケンシング技術 (single-molecule sequencing technology) により, cDNA の作成なしに, 大量の RNA を一度に解析することを可能にさせている. RNA ウィルスである HIV を対象に, より生体内でのウィルスの準種を反映させるために, この技術が近いうちに活用されるかもしれない.

#### *in silico* タンパク質立体構造解析による薬剤耐性研究

生体高分子の機能を深く理解するためには, その分子の立体構造を観察する必要がある. これは薬剤耐性の分子機序を理解する上でも変わらない. これまで, X 線結晶構造解析や NMR により多くのウィルスタンパク質-薬物複合体の構造が決定され, 薬剤耐性の分子機序を明らかにしてきた<sup>70-74</sup>. その一方で, *in silico*, つまりコンピュータ上でのシミュレーションにより, 分子の立体構造や動的挙動を予測することで<sup>75-85</sup>, 薬剤耐性を理解しようとする研究も行われてきた<sup>86-124</sup>.

薬剤耐性関連変異のタンパク質立体構造への影響を観察する上で, もっとも代表的な *in silico* 立体構造予測法のひとつとして, ホモロジーモデリング法が挙げられる<sup>77-81</sup>. この方法では, 進化的類縁性があり配列相同性 (ホモロジー) が高い 2 つの分子の立体構造は類似するという経験則にのっとり, 構造未知の生体高分子の立体構造を, その分子と配列相同性が高い分子の既知の立体構造から予測する方法である. まず既知立体構造群の中から, 目的分子と配列相同性の高い鋳型構造とする立体構造を用意する. 鋳型構造として利用する立体構造は, NCBI での protein blast 検索により, Protein Data Bank の情報群から容易に検索が可能である. 次に, 用意した鋳型構造を模倣して目的分子の立体構造を仮定し, さらに分子内側鎖の配座探索などの安定構造探索アルゴリズムにより変化させていくことで, 目的分子の立体構造を予測していく. したがって, 出発構造と予測構造の配列相同性が高いほど, 精度よくか

つ短時間での立体構造予測が可能である。

もうひとつの代表的な *in silico* 立体構造予測法に、分子動力学法 (MD; Molecular dynamics) が挙げられる<sup>82-85)</sup>。MDでの立体構造予測も配列相同性の高い既知構造を出発構造して行すが、ホモロジーモデリング法よりも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る。さらに、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ことが大きな特徴である。一般に、水溶液中、約37°C、1atm環境下での生体高分子の分子運動を1ピコ(10<sup>-15</sup>)秒程度ごとに時間を追って推定していき、100万(10<sup>6</sup>)から10億(10<sup>9</sup>)回の計算を行うことで、1ナノ(10<sup>-9</sup>)秒から1マイクロ(10<sup>-6</sup>)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。

NRTI, NNRTI および PI は、それらが標的とするウイルスタンパク質との複合体の立体構造が古くから決定されていたこともあり<sup>125-144)</sup>、これらの方法を用いた多くの研究事例が報告されている<sup>86-115)</sup>。例えば、野生型ウイルスタンパク質-阻害薬複合体の結晶構造<sup>125-144)</sup>をもとに、薬剤耐性関連変異を持つウイルスタンパク質と阻害薬の複合体構造の予測が行われてきた<sup>86-105)</sup>。予測構造からタンパク質-阻害薬間の親和性を予測し、その傾向を、実験的な感受性試験や結合能測定の結果と比較することで、構造の妥当性が検証されてきた。一部の変異タンパク質は、シミュレーションによる報告<sup>90)</sup>の後に結晶構造が決定され<sup>145-147)</sup>、シミュレーションによって変異による影響、少なくとも特徴的な相互作用変化を観察できることが示唆されている。この方法は、薬剤耐性に関わるプロテアーゼ-基質間の共進化の分子機構予測にも応用されている<sup>148)</sup>。その他、MDの特徴を活かして、薬剤耐性関連変異によるウイルスタンパク質分子のナノ(10<sup>-9</sup>)秒からマイクロ(10<sup>-6</sup>)秒の動的挙動の変化を観察した報告もなされている<sup>107-115)</sup>。例えば、NRTI耐性をもたらず逆転写酵素の69番目のアミノ酸付近のアミノ酸挿入によって、その挿入部位付近の構造と運動に変化が起き、それによってNRTI耐性が生じることが示唆されている<sup>107)</sup>。また、NNRTIは逆転写酵素への結合によって、その酵素運動を抑えることで酵素機能を阻害するが、NNRTI耐性変異V106A, Y181C, Y188Cの組合せによって、NNRTIによる運動抑制作用が減弱されることが示唆されている<sup>113)</sup>。

一方で、INSTIやCCR5阻害薬については、いまだに標的タンパク質との複合体の立体構造が報告されていない。そのため、類縁タンパク質の結晶構造から、それぞれの複合体を予測し、予測したモデルから阻害薬の作用機序および薬剤耐性の分子機序を推定する試みが行われてきた<sup>116-123)</sup>。例えば、近年決定された、HIV-1と類縁のPFV (prototype foamy virus) のインテグラーゼと、DNA, INSTIのひとつであるラルテグラビルの三者複合体の結晶構造<sup>149)</sup>を鏡

型構造として、ホモロジーモデリング法<sup>79-81)</sup>により、HIV-1インテグラーゼ-DNA-ラルテグラビルの複合体の予測構造が報告された<sup>116)</sup>(**図2A**)。この予測構造により、HIV-1インテグラーゼと結合時のラルテグラビルの結合様式が推定された。さらにラルテグラビル耐性関連変異のひとつであるY143Xが、直接ラルテグラビルと相互作用する位置で生じることが示唆された。

同様に、CCR5阻害薬についても、類縁タンパク質の結晶構造を基に薬剤標的タンパク質の分子モデルを構築し、構造解析を実施することで抗HIV作用の分子機序を推察する試みが行われている<sup>117-122)</sup>。CCR5阻害薬は、間接的な、アロステリックな機構によってウイルスの増殖を阻害するとされているものの<sup>150, 151)</sup>、その詳しい分子機序は明らかにされていなかった。そこで、CCR5-CCR5阻害薬複合体の構造予測が行われた。まず、7回膜貫通タンパクでありCCR5の構造を、代表的な7回膜貫通タンパクであるロドプシンの結晶構造から、CCR5の立体構造がホモロジーモデリング法により予測された<sup>117-122)</sup>。さらに、ドッキングシミュレーションにてCCR5-CCR5阻害薬複合体の構造が予測された<sup>117-122)</sup>(**図2B**)。CCR5阻害薬の結合様式は、実験的にCCR5の変異体の阻害活性あるいは結合活性を測定することでCCR5阻害薬の結合に重要なアミノ酸を同定し、それらアミノ酸との位置関係により検証された。CCR5阻害薬の結合による影響を観察したところ、CCR5阻害薬結合時にCCR5のExtra-cellular loop2 (ECL2)で構造変化が惹起されることが示唆された<sup>121, 122)</sup>。この部位が、HIV-1 gp120 V3と結合するため<sup>152, 153)</sup>、この部位の構造変化によって、HIV-1がCCR5を認識できなくなるものと推察されている<sup>121, 122)</sup>。

その他、上述のとおり、CCR5阻害薬感受性には、コレセプター指向性も影響する<sup>7, 39, 40)</sup>。この点に関し、コレセプター指向性の決定に関わる構造要因が報告されている。すなわち、HIV-1 Gp120 V3領域の荷電量が変化するとV3のGp120上の立体配置が変化し、コレセプター指向性の変化に結びつくことが示された<sup>123)</sup>。V3の立体配置の情報は、コレセプター指向性の変化やCCR5阻害薬への耐性度を予測する上で重要かもしれない。

### おわりに

抗HIV-1治療において、薬剤耐性は大きな問題である。今日までに、バイオインフォマティクス技術を利用し、さまざまな研究がなされてきた。特にバイオインフォマティクス技術は、抗HIV-1薬の感受性予測、新型シーケンサーの大量データ処理、生体高分子の立体構造予測、あるいは新薬デザインにおいて大きく貢献してきた。コンピュータの性能はますますの向上が見込まれており、バイオインフォマティクス技術もさらなる向上が期待されるだろう。また、これら技術を、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、薬剤耐性研究のみならず、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、基礎と応用の幅広い分野の感染症対策研究に活用できるものと期待される。

## 謝 辞

本稿の執筆にあたり、助言等を頂きました名古屋医療センター 臨床研究センター 杉浦互部長、エイズ診療科 横幕能行医長、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 佐藤裕徳室長に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD.: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 338:853-60, 1998.
- 2) Vittinghoff E, Scheer S, O'Malley P, Colfax G, Holmberg SD, Buchbinder SP.: Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. *J. Infect. Dis.* 179:717-20, 1999.
- 3) Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, Redfield RR, Markham PD, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC, Parks ES, Parks WP.: Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* 232:1548-53, 1986.
- 4) Wainberg MA.: A new source of resistance to HIV drugs. *JAMA* 281:2169-70, 1999.
- 5) Bartlett JA, DeMasi R, Quinn J, Moxham C, Rousseau F.: Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. *AIDS* 15:1369-77, 2001.
- 6) Phillips AN, Staszewski S, Lampe F, Youle MS, Klauke S, Bickel M, Sabin CA, Doerr HW, Johnson MA, Loveday C, Miller V.: Human immunodeficiency virus rebound after suppression to <400 copies/mL during initial highly active antiretroviral therapy regimens, according to prior nucleoside experience and duration of suppression. *J. Infect. Dis.* 186:1086-91, 2002.
- 7) Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD.: Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top. HIV Med.* 18:156-63, 2011.
- 8) Salomon H, Wainberg MA, Brenner B, Quan Y, Rouleau D, Cote P, LeBlanc R, Lefebvre E, Spira B, Tsoukas C, Sekaly RP, Conway B, Mayers D, Routy JP.: Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. *AIDS* 14:F17-23, 2000.
- 9) Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD.: Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 347:385-94, 2002.
- 10) Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, Saag MS, Schechter M, Carpenter CC, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Volberding PA.: Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 292:251-65, 2004.
- 11) Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW.: Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 31:298-303, 2003.
- 12) Shafer RW.: Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database. *J. Infect. Dis.* 194 Suppl 1:S51-8, 2006.
- 13) Beerenwinkel N, Sing T, Lengauer T, Rahnenfuhrer J, Roomp K, Savenkov I, Fischer R, Hoffmann D, Selbig J, Korn K, Walter H, Berg T, Braun P, Fatkenheuer G, Oette M, Rockstroh J, Kupfer B, Kaiser R, Daumer M.: Computational methods for the design of effective therapies against drug resistant HIV strains. *Bioinformatics* 21:3943-50, 2005.
- 14) Lengauer T, Sing T.: Bioinformatics-assisted anti-HIV therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:790-7, 2006.
- 15) Cao ZW, Han LY, Zheng CJ, Ji ZL, Chen X, Lin HH, Chen YZ.: Computer prediction of drug resistance mutations in proteins. *Drug Discov. Today* 10:521-9, 2005.
- 16) van Laethem K, De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Perna CF, Vandamme AM.: A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir. Ther.* 7:123-9, 2002.
- 17) Zazzi M, Romano L, Venturi G, Shafer RW, Reid C, Dal Bello F, Parolin C, Palu G, Valensin PE.: Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:356-60, 2004.
- 18) Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, Matheron S, Lamotte C, Guiramand S, Costagliola D, Brun-Vezinet F, Clavel F, Girard PM.: Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS* 16:727-36, 2002.
- 19) Liu TF, Shafer RW.: Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin. Infect. Dis.* 42:1608-18, 2006.
- 20) Beerenwinkel N, Daumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R, Lengauer T, Selbig J, Walter H.: Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res.* 31:3850-5, 2003.
- 21) Jenwitheesuk E, Wang K, Mittler JE, Samudrala R.: PIRSpred: a web server for reliable HIV-1 protein-inhibitor resistance/susceptibility prediction. *Trends Microbiol.* 13:150-1, 2005.



- 22) Rhee SY, Taylor J, Wadhwa G, Ben-Hur A, Brutlag DL, Shafer RW.: Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:17355-60, 2006.
- 23) Shenderovich MD, Kagan RM, Heseltine PN, Ramnarayan K.: Structure-based phenotyping predicts HIV-1 protease inhibitor resistance. *Protein Sci.* 12:1706-18, 2003.
- 24) Jenwitheesuk E, Samudrala R.: Prediction of HIV-1 protease inhibitor resistance using a protein-inhibitor flexible docking approach. *Antivir. Ther.* 10:157-66, 2005.
- 25) Pepe G, Courcambeck J, Perbost R, Jouanna P, Halfon P.: Prediction of HIV-1 protease inhibitor resistance by Molecular Modeling Protocols (MMPs) using GenMol software. *Eur. J. Med. Chem.* 43:2518-34, 2008.
- 26) Hou T, McLaughlin WA, Wang W.: Evaluating the potency of HIV-1 protease drugs to combat resistance. *Proteins* 71:1163-74, 2008.
- 27) Hou T, Zhang W, Wang J, Wang W.: Predicting drug resistance of the HIV-1 protease using molecular interaction energy components. *Proteins* 74:837-46, 2009.
- 28) Hao GF, Yang GF, Zhan CG.: Computational mutation scanning and drug resistance mechanisms of HIV-1 protease inhibitors. *J. Phys. Chem. B* 114:9663-76, 2010.
- 29) Sadiq SK, Wright D, Watson SJ, Zasada SJ, Stoica I, Coveney PV.: Automated molecular simulation based binding affinity calculator for ligand-bound HIV-1 proteases. *J. Chem. Inf. Model.* 48:1909-19, 2008.
- 30) Sadiq SK, Wright DW, Kenway OA, Coveney PV.: Accurate ensemble molecular dynamics binding free energy ranking of multidrug-resistant HIV-1 proteases. *J. Chem. Inf. Model.* 50:890-905, 2010.
- 31) Wodarz D, Nowak MA.: Mathematical models of HIV pathogenesis and treatment. *Bioessays* 24:1178-87, 2002.
- 32) DeGruttola V, Dix L, D'Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, Baxter J, Clevenbergh P, Hammer S, Harrigan R, Katzenstein D, Lanier R, Miller M, Para M, Yerly S, Zolopa A, Murray J, Patick A, Miller V, Castillo S, Pedneault L, Mellors J.: The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir. Ther.* 5:41-8, 2000.
- 33) Brun-Vezinet F, Costagliola D, Khaled MA, Calvez V, Clavel F, Clotet B, Haubrich R, Kempf D, King M, Kuritzkes D, Lanier R, Miller M, Miller V, Phillips A, Pillay D, Schapiro J, Scott J, Shafer R, Zazzi M, Zolopa A, DeGruttola V.: Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns. *Antivir. Ther.* 9:465-78, 2004.
- 34) Frentz D, Boucher CA, Assel M, De Luca A, Fabbiani M, Incardona F, Libin P, Manca N, Muller V, B ON, Paredes R, Prospero M, Quiros-Roldan E, Ruiz L, Sloat PM, Torti C, Vandamme AM, Van Laethem K, Zazzi M, van de Vijver DA.: Comparison of HIV-1 genotypic resistance test interpretation systems in predicting virological outcomes over time. *PLoS One* 5:e11505, 2010.
- 35) Altmann A, Daumer M, Beerenwinkel N, Peres Y, Schuster E, Buch J, Rhee SY, Sonnerborg A, Fessel WJ, Shafer RW, Zazzi M, Kaiser R, Lengauer T.: Predicting the response to combination antiretroviral therapy: retrospective validation of geno2pheno-THEO on a large clinical database. *J. Infect. Dis.* 199:999-1006, 2009.
- 36) Rhee SY, Fessel WJ, Liu TF, Marlowe NM, Rowland CM, Rode RA, Vandamme AM, Van Laethem K, Brun-Vezinet F, Calvez V, Taylor J, Hurley L, Horberg M, Shafer RW.: Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms. *J. Infect. Dis.* 200:453-63, 2009.
- 37) Zazzi M, Kaiser R, Sonnerborg A, Struck D, Altmann A, Prospero M, Rosen-Zvi M, Petroczi A, Peres Y, Schuster E, Boucher C, Brun-Vezinet F, Harrigan P, Morris L, Obermeier M, Perno CF, Phanuphak P, Pillay D, Shafer R, Vandamme AM, van Laethem K, Wensing A, Lengauer T, Incardona F.: Prediction of response to antiretroviral therapy by human experts and by the EuResist data-driven expert system (the EVE study). *HIV Med.* 12:211-8, 2011.
- 38) Rosen-Zvi M, Altmann A, Prospero M, Aharoni E, Neuvirth H, Sonnerborg A, Schuster E, Struck D, Peres Y, Incardona F, Kaiser R, Zazzi M, Lengauer T.: Selecting anti-HIV therapies based on a variety of genomic and clinical factors. *Bioinformatics* 24:i399-406, 2008.
- 39) Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G, Perros M.: Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J. Virol.* 81:2359-71, 2007.
- 40) Westby M, van der Ryst E.: CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir. Chem. Chemother.* 16:339-54, 2005.
- 41) Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H.: Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* 66:3183-7, 1992.
- 42) Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C.: Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9434-8, 1992.
- 43) Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, Harrigan PR.: Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J. Clin. Microbiol.* 45:279-84, 2007.
- 44) Jensen MA, van 't Wout AB.: Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev.*

- 5:104-12, 2003.
- 45) Recordon-Pinson P, Soulie C, Flandre P, Descamps D, Lazrek M, Charpentier C, Montes B, Trabaud MA, Cottalorda J, Schneider V, Morand-Joubert L, Tamalet C, Desbois D, Mace M, Ferre V, Vabret A, Ruffault A, Pallier C, Raymond S, Izopet J, Reynes J, Marcelin AG, Masquelier B.: Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3335-40, 2010.
  - 46) Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, Palani A, Shapiro S, Clader JW, McCombie S, Reyes GR, Baroudy BM, Moore JP.: HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:395-400, 2002.
  - 47) Bushman FD, Hoffmann C, Ronen K, Malani N, Minkah N, Rose HM, Tebas P, Wang GP.: Massively parallel pyrosequencing in HIV research. *AIDS* 22:1411-5, 2008.
  - 48) Droege M, Hill B.: The Genome Sequencer FLX System-longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *J. Biotechnol.* 136:3-10, 2008.
  - 49) Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW.: Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res.* 17:1195-201, 2007.
  - 50) Ji H, Masse N, Tyler S, Liang B, Li Y, Merks H, Graham M, Sandstrom P, Brooks J.: HIV drug resistance surveillance using pooled pyrosequencing. *PLoS One* 5:e9263, 2010.
  - 51) Hedskog C, Mild M, Jernberg J, Sherwood E, Bratt G, Leitner T, Lundberg J, Andersson B, Albert J.: Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS One* 5:e11345, 2010.
  - 52) Codoner FM, Pou C, Thielen A, Garcia F, Delgado R, Dalmau D, Santos JR, Buzon MJ, Martinez-Picado J, Alvarez-Tejado M, Clotet B, Ruiz L, Paredes R.: Dynamic escape of pre-existing raltegravir-resistant HIV-1 from raltegravir selection pressure. *Antiviral Res.* 88:281-6, 2010.
  - 53) Tsibris AM, Korber B, Arnaout R, Russ C, Lo CC, Leitner T, Gaschen B, Theiler J, Paredes R, Su Z, Hughes MD, Gulick RM, Greaves W, Coakley E, Flexner C, Nusbaum C, Kuritzkes DR.: Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS One* 4:e5683, 2009.
  - 54) Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, Lewis M, Robertson DL.: Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* 23:1209-18, 2009.
  - 55) Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, Thielen A, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, Harrigan PR.: Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J. Infect. Dis.* 203:237-45, 2011.
  - 56) Willerth SM, Pedro HA, Pachter L, Humeau LM, Arkin AP, Schaffer DV.: Development of a low bias method for characterizing viral populations using next generation sequencing technology. *PLoS One* 5:e13564, 2010.
  - 57) Fischer W, Ganusov VV, Giorgi EE, Hraber PT, Keele BF, Leitner T, Han CS, Gleasner CD, Green L, Lo CC, Nag A, Wallstrom TC, Wang S, McMichael AJ, Haynes BF, Hahn BH, Perelson AS, Borrow P, Shaw GM, Bhattacharya T, Korber BT.: Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 5:e12303, 2010.
  - 58) Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM.: Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.* 8:R143, 2007.
  - 59) Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ.: High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108:1-6, 1991.
  - 60) Mizuguchi H, Nakatsuji M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T.: Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *J. Biochem.* 126:762-8, 1999.
  - 61) Fang G, Zhu G, Burger H, Keithly JS, Weiser B.: Minimizing DNA recombination during long RT-PCR. *J. Virol. Methods* 76:139-48, 1998.
  - 62) Varghese V, Wang E, Babrzadeh F, Bachmann MH, Shahriar R, Liu T, Mappala SJ, Gharizadeh B, Fessel WJ, Katzenstein D, Kassaye S, Shafer RW.: Nucleic acid template and the risk of a PCR-Induced HIV-1 drug resistance mutation. *PLoS One* 5:e10992.
  - 63) Eriksson N, Pachter L, Mitsuya Y, Rhee SY, Wang C, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW, Beerwinkler N.: Viral population estimation using pyrosequencing. *PLoS Comput. Biol.* 4:e1000074, 2008.
  - 64) Zagordi O, Geyrhofer L, Roth V, Beerwinkler N.: Deep sequencing of a genetically heterogeneous sample: local haplotype reconstruction and read error correction. *J. Comput. Biol.* 17:417-28, 2010.
  - 65) Zagordi O, Klein R, Daumer M, Beerwinkler N.: Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies. *Nucleic Acids Res.* 38:7400-9, 2010.
  - 66) Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ.: Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* 12:38, 2011.
  - 67) Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT.: Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat. Methods* 6:639-41, 2009.
  - 68) Wang GP, Sherrill-Mix SA, Chang KM, Quince C, Bushman FD.: Hepatitis C virus transmission bottlenecks analyzed by deep sequencing. *J. Virol.*



- 84:6218-28, 2010.
- 69) Oszolak F, Platt AR, Jones DR, Reifengerger JG, Sass LE, McInerney P, Thompson JF, Bowers J, Jarosz M, Milos PM.: Direct RNA sequencing. *Nature* 461:814-8, 2009.
  - 70) Ali A, Bandaranayake RM, Cai Y, King NM, Kolli M, Mittal S, Murzycki JF, Nalam MNL, Nalivaika EA, Özen A, Prabu-Jeyabalan MM, Thayer K, Schiffer CA.: Molecular basis for drug resistance in HIV-1 protease. *Viruses* 2:2509-35, 2010.
  - 71) Singh K, Marchand B, Kirby KA, Michailidis E, Sarafianos SG.: Structural aspects of drug resistance and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase. *Viruses* 2:606-38, 2010.
  - 72) Acosta-Hoyos AJ, Scott WA.: The role of nucleotide excision by reverse transcriptase in HIV drug resistance. *Viruses* 2:372-94, 2010.
  - 73) Tu X, Das K, Han Q, Bauman JD, Clark AD, Jr., Hou X, Frenkel YV, Gaffney BL, Jones RA, Boyer PL, Hughes SH, Sarafianos SG, Arnold E.: Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:1202-9, 2010.
  - 74) Weber IT, Agniswamy J.: HIV-1 protease: structural perspectives on drug resistance. *Viruses* 1:1110-36, 2009.
  - 75) Harvey SC, Petrov AS, Devkota B, Boz MB.: Viral assembly: a molecular modeling perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11:10553-64, 2009.
  - 76) Chou KC.: Structural bioinformatics and its impact to biomedical science. *Curr. Med. Chem.* 11:2105-34, 2004.
  - 77) Xiang Z.: Advances in homology protein structure modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7:217-27, 2006.
  - 78) Schueler-Furman O, Wang C, Bradley P, Misura K, Baker D.: Progress in modeling of protein structures and interactions. *Science* 310:638-42, 2005.
  - 79) 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.
  - 80) Baker D, Sali A.: Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294:93-6, 2001.
  - 81) 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.* 15:1184-91, 2008.
  - 82) Adcock SA, McCammon JA.: Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem. Rev.* 106:1589-615, 2006.
  - 83) Hansson T, Oostenbrink C, van Gunsteren W.: Molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:190-6, 2002.
  - 84) Lee EH, Hsin J, Sotomayor M, Comellas G, Schulten K.: Discovery through the computational microscope. *Structure* 17:1295-306, 2009.
  - 85) Klepeis JL, Lindorff-Larsen K, Dror RO, Shaw DE.: Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19:120-7, 2009.
  - 86) Carvalho AT, Fernandes PA, Ramos MJ.: The excision mechanism in reverse transcriptase: pyrophosphate leaving and fingers opening are uncoupled events with the analogues AZT and d4T. *J. Phys. Chem. B* 111:12032-9, 2007.
  - 87) Yokoyama M, Mori H, Sato H.: Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection. *PLoS One* 5:e8867, 2010.
  - 88) Carvalho AT, Fernandes PA, Ramos MJ.: Insights on resistance to reverse transcriptase: the different patterns of interaction of the nucleoside reverse transcriptase inhibitors in the deoxyribonucleotide triphosphate binding site relative to the normal substrate. *J. Med. Chem.* 49:7675-82, 2006.
  - 89) Sato H, Tomita Y, Ebisawa K, Hachiya A, Shibamura K, Shiino T, Yang R, Tatsumi M, Gushi K, Umeyama H, Oka S, Takebe Y, Nagai Y.: Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 subtype E (CRF01\_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J. Virol.* 75:5604-13, 2001.
  - 90) 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.* 50:1768-77, 2007.
  - 91) 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.
  - 92) 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.* 128:7887-95, 2006.
  - 93) 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* 109:565-74, 2005.
  - 94) Dirauf P, Meiselbach H, Sticht H.: Effects of the V82A and I54V mutations on the dynamics and ligand binding properties of HIV-1 protease. *J. Mol. Model.* 16:1577-83, 2010.
  - 95) Chen J, Zhang S, Liu X, Zhang Q.: Insights into drug resistance of mutations D30N and I50V to HIV-1 protease inhibitor TMC-114: free energy calculation and molecular dynamic simulation. *J. Mol. Model.* 16:459-68, 2010.
  - 96) Batista PR, Wilter A, Durham EH, Pascutti PG.: Molecular dynamics simulations applied to the study of subtypes of HIV-1 protease common to Brazil, Africa, and Asia. *Cell Biochem. Biophys.* 44:395-404, 2006.
  - 97) Soares RO, Batista PR, Costa MG, Dardenne LE, Pascutti PG, Soares MA.: Understanding the HIV-1 protease nelfinavir resistance mutation D30N in subtypes B and C through molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Model.* 29:137-47, 2010.

- 98) Wittayanarakul K, Aruksakunwong O, Saen-oon S, Chantratita W, Parasuk V, Sompornpisut P, Hannongbua S.: Insights into saquinavir resistance in the G48V HIV-1 protease: quantum calculations and molecular dynamic simulations. *Biophys. J.* 88:867-79, 2005.
- 99) Hou T, Yu R.: Molecular dynamics and free energy studies on the wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprenavir and two amprenavir-related inhibitors: mechanism for binding and drug resistance. *J. Med. Chem.* 50:1177-88, 2007.
- 100) Stoica I, Sadiq SK, Coveney PV.: Rapid and accurate prediction of binding free energies for saquinavir-bound HIV-1 proteases. *J. Am. Chem. Soc.* 130:2639-48, 2008.
- 101) Sadiq SK, Wan S, Coveney PV.: Insights into a mutation-assisted lateral drug escape mechanism from the HIV-1 protease active site. *Biochemistry* 46:14865-77, 2007.
- 102) Kagan RM, Shenderovich MD, Heseltine PN, Ramnarayan K.: Structural analysis of an HIV-1 protease I47A mutant resistant to the protease inhibitor lopinavir. *Protein Sci.* 14:1870-8, 2005.
- 103) Saskova KG, Kozisek M, Lepsik M, Brynda J, Rezacova P, Vaclavikova J, Kagan RM, Machala L, Konvalinka J.: Enzymatic and structural analysis of the I47A mutation contributing to the reduced susceptibility to HIV protease inhibitor lopinavir. *Protein Sci.* 17:1555-64, 2008.
- 104) 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.* 54:1596-602, 2010.
- 105) 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.
- 106) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H.: Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral. Res.* in press, 2011.
- 107) White KL, Chen JM, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Naeger LK, Swaminathan S, Miller MD.: Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:992-1003, 2004.
- 108) Lauria A, Ippolito M, Almerico AM.: Molecular dynamics studies on HIV-1 protease: a comparison of the flap motions between wild type protease and the M46I/G51D double mutant. *J. Mol. Model.* 13:1151-6, 2007.
- 109) Foulkes-Murzycki JE, Scott WR, Schiffer CA.: Hydrophobic sliding: a possible mechanism for drug resistance in human immunodeficiency virus type 1 protease. *Structure* 15:225-33, 2007.
- 110) Seibold SA, Cukier RL.: A molecular dynamics study comparing a wild-type with a multiple drug resistant HIV protease: differences in flap and aspartate 25 cavity dimensions. *Proteins* 69:551-65, 2007.
- 111) Perryman AL, Lin JH, McCammon JA.: HIV-1 protease molecular dynamics of a wild-type and of the V82F/I84V mutant: possible contributions to drug resistance and a potential new target site for drugs. *Protein Sci.* 13:1108-23, 2004.
- 112) Piana S, Carloni P, Rothlisberger U.: Drug resistance in HIV-1 protease: Flexibility-assisted mechanism of compensatory mutations. *Protein Sci.* 11:2393-402, 2002.
- 113) Zhou Z, Madrid M, Evanseck JD, Madura JD.: Effect of a bound non-nucleoside RT inhibitor on the dynamics of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. *J. Am. Chem. Soc.* 127:17253-60, 2005.
- 114) Rodriguez-Barrios F, Balzarini J, Gago F.: The molecular basis of resilience to the effect of the Lys103Asn mutation in non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors studied by targeted molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 127:7570-8, 2005.
- 115) Rodriguez-Barrios F, Gago F.: Understanding the basis of resistance in the irksome Lys103Asn HIV-1 reverse transcriptase mutant through targeted molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 126:15386-7, 2004.
- 116) Krishnan L, Li X, Naraharisetty HL, Hare S, Cherepanov P, Engelman A.: Structure-based modeling of the functional HIV-1 intasome and its inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15910-5, 2010.
- 117) Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, Norman R, Takaoka Y, Ding J, Arnold GF, Arnold E, Mitsuya H.: Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J. Biol. Chem.* 281:12688-98, 2006.
- 118) Seibert C, Ying W, Gavrilo S, Tsamis F, Kuhmann SE, Palani A, Tagat JR, Clader JW, McCombie SW, Baroudy BM, Smith SO, Dragic T, Moore JP, Sakmar TP.: Interaction of small molecule inhibitors of HIV-1 entry with CCR5. *Virology* 349:41-54, 2006.
- 119) Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M.: Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 73:789-800, 2008.
- 120) Wang T, Duan Y.: Binding modes of CCR5-targeting HIV entry inhibitors: partial and full antagonists. *J. Mol. Graph. Model.* 26:1287-95, 2008.
- 121) Maeda K, Das D, Yin PD, Tsuchiya K, Ogata-Aoki H, Nakata H, Norman RB, Hackney LA, Takaoka Y, Mitsuya H.: Involvement of the second extracellular loop and transmembrane residues of CCR5 in inhibitor

- binding and HIV-1 fusion: insights into the mechanism of allosteric inhibition. *J. Mol. Biol.* 381:956-74, 2008.
- 122) Da LT, Wu YD.: Theoretical Studies on the Interactions and Interferences of HIV-1 Glycoprotein gp120 and Its Coreceptor CCR5. *J. Chem. Inf. Model.* 51:359-69, 2011.
- 123) Naganawa S, Yokoyama M, Shiino T, Suzuki T, Ishigatsubo Y, Ueda A, Shirai A, Takeno M, Hayakawa S, Sato S, Tochikubo O, Kiyoura S, Sawada K, Ikegami T, Kanda T, Kitamura K, Sato H.: Net positive charge of HIV-1 CRF01\_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity. *PLoS One* 3:e3206, 2008.
- 124) Sato H, Yokoyama M.: RNA viruses and mutations. *Uirusu* 55:221-9, 2005.
- 125) Sarafianos SG, Clark AD, Jr., Das K, Tuske S, Birktoft JJ, Ilankumaran P, Ramesha AR, Sayer JM, Jerina DM, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E.: Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *EMBO J.* 21:6614-24, 2002.
- 126) Tuske S, Sarafianos SG, Clark AD, Jr., Ding J, Naeger LK, White KL, Miller MD, Gibbs CS, Boyer PL, Clark P, Wang G, Gaffney BL, Jones RA, Jerina DM, Hughes SH, Arnold E.: Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:469-74, 2004.
- 127) Ren J, Esnouf R, Garman E, Somers D, Ross C, Kirby I, Keeling J, Darby G, Jones Y, Stuart D, et al.: High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat. Struct. Biol.* 2:293-302, 1995.
- 128) Lindberg J, Sigurdsson S, Lowgren S, Andersson HO, Sahlberg C, Noreen R, Fridborg K, Zhang H, Unge T.: Structural basis for the inhibitory efficacy of efavirenz (DMP-266), MSC194 and PNU142721 towards the HIV-1 RT K103N mutant. *Eur. J. Biochem.* 269:1670-7, 2002.
- 129) Das K, Clark AD, Jr., Lewi PJ, Heeres J, De Jonge MR, Koymans LM, Vinkers HM, Daeyaert F, Ludovici DW, Kukla MJ, De Corte B, Kavash RW, Ho CY, Ye H, Lichtenstein MA, Andries K, Pauwels R, De Bethune MP, Boyer PL, Clark P, Hughes SH, Janssen PA, Arnold E.: Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants. *J. Med. Chem.* 47:2550-60, 2004.
- 130) Lansdon EB, Brendza KM, Hung M, Wang R, Mukund S, Jin D, Birkus G, Kutty N, Liu X.: Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase with etravirine (TMC125) and rilpivirine (TMC278): implications for drug design. *J. Med. Chem.* 53:4295-9, 2010.
- 131) Krohn A, Redshaw S, Ritchie JC, Graves BJ, Hatada MH.: Novel binding mode of highly potent HIV-proteinase inhibitors incorporating the (R)-hydroxyethylamine isostere. *J. Med. Chem.* 34:3340-2, 1991.
- 132) Chen Z, Li Y, Chen E, Hall DL, Darke PL, Culberson C, Shafer JA, Kuo LC.: Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J. Biol. Chem.* 269:26344-8, 1994.
- 133) Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge CA, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP, Wideburg NE, Saldivar A, Ruizl L, Kati WM, Sham HL, Robins T, Stewarti KD, Hsu A, Platrner JJ, Leonardt JM, Norbeck DW.: ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2484-8, 1995.
- 134) Kim EE, Baker CT, Dwyer MD, Murcko MA, Rao BG, Tung RD, Navia MA.: Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 117:1181-2, 1995.
- 135) Thaisrivongs S, Skulnick HI, Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Johnson PD, Aristoff PA, Judge TM, Gammill RB, Morris JK, Romines KR, Chrusciel RA, Hinshaw RR, Chong KT, Tarpley WG, Poppe SM, Slade DE, Lynn JC, Horng MM, Tomich PK, Seest EP, Dolak LA, Howe WJ, Howard GM, Schwende FJ, Toth LN, Padbury GE, Wilson GJ, Shiou L, Zipp GL, Wilkinson KF, Rush BD, Ruwart MJ, Koeplinger KA, Zhao Z, Cole S, Zaya RM, Kakuk TJ, Janakiraman MN, Watenpaugh KD.: Structure-based design of HIV protease inhibitors: sulfonamide-containing 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors. *J. Med. Chem.* 39:4349-53, 1996.
- 136) Kaldor SW, Kalish VJ, Davies JF, 2nd, Shetty BV, Fritz JE, Appelt K, Burgess JA, Campanale KM, Chirgadze NY, Clawson DK, Dressman BA, Hatch SD, Khalil DA, Kosa MB, Lubbehusen PP, Muesing MA, Patick AK, Reich SH, Su KS, Tatlock JH.: Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J. Med. Chem.* 40:3979-85, 1997.
- 137) Stoll V, Qin W, Stewart KD, Jakob C, Park C, Walter K, Simmer RL, Helfrich R, Bussiere D, Kao J, Kempf D, Sham HL, Norbeck DW.: X-ray crystallographic structure of ABT-378 (lopinavir) bound to HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem.* 10:2803-6, 2002.
- 138) Surleraux DL, Tahri A, Verschuereen WG, Pille GM, de Kock HA, Jonckers TH, Peeters A, De Meyer S, Azijn H, Pauwels R, de Bethune MP, King NM, Prabujeyabalan M, Schiffer CA, Wigerinck PB.: Discovery and selection of TMC114, a next generation HIV-1 protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 48:1813-22, 2005.
- 139) Clemente JC, Coman RM, Thiaville MM, Janka LK, Jeung JA, Nukoolkarn S, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, McKenna R, Leelamanit W, Goodenow MM, Dunn BM.: Analysis of HIV-1 CRF\_01 A/E protease inhibitor resistance: structural determinants for maintaining sensitivity and developing resistance



- to atazanavir. *Biochemistry* 45:5468-77, 2006.
- 140) Klei HE, Kish K, Lin PF, Guo Q, Friberg J, Rose RE, Zhang Y, Goldfarb V, Langley DR, Wittekind M, Sheriff S.: X-ray crystal structures of human immunodeficiency virus type 1 protease mutants complexed with atazanavir. *J. Virol.* 81:9525-35, 2007.
- 141) Muzammil S, Armstrong AA, Kang LW, Jakalian A, Bonneau PR, Schmelmer V, Amzel LM, Freire E.: Unique thermodynamic response of tipranavir to human immunodeficiency virus type 1 protease drug resistance mutations. *J. Virol.* 81:5144-54, 2007.
- 142) Reddy GS, Ali A, Nalam MN, Anjum SG, Cao H, Nathans RS, Schiffer CA, Rana TM.: Design and synthesis of HIV-1 protease inhibitors incorporating oxazolidinones as P2/P2' ligands in pseudosymmetric dipeptide isosteres. *J. Med. Chem.* 50:4316-28, 2007.
- 143) Tie Y, Kovalevsky AY, Boross P, Wang YF, Ghosh AK, Tozser J, Harrison RW, Weber IT.: Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir. *Proteins* 67:232-42, 2007.
- 144) Shen CH, Wang YF, Kovalevsky AY, Harrison RW, Weber IT.: Amprenavir complexes with HIV-1 protease and its drug-resistant mutants altering hydrophobic clusters. *FEBS J.* 277:3699-714, 2010.
- 145) 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.
- 146) 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.
- 147) Kozisek M, Bray J, Rezacova P, Saskova K, Brynda J, Pokorna J, Mammano F, Rulisek L, Konvalinka J.: Molecular analysis of the HIV-1 resistance development: enzymatic activities, crystal structures, and thermodynamics of nelfinavir-resistant HIV protease mutants. *J. Mol. Biol.* 374:1005-16, 2007.
- 148) Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H.: Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *Antiviral. Res.* 90:33-41, 2011.
- 149) Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P.: Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464:232-6, 2010.
- 150) Murga JD, Franti M, Pevear DC, Maddon PJ, Olson WC.: Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3289-96, 2006.
- 151) Watson C, Jenkinson S, Kazmierski W, Kenakin T.: The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 67:1268-82, 2005.
- 152) Cormier EG, Dragic T.: The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 76:8953-7, 2002.
- 153) Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD.: Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310:1025-8, 2005.
- 154) Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC.: Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330:1066-71, 2010.
- 155) Goto J, Kataoka R, Muta H, Hirayama N.: ASEDock-docking based on alpha spheres and excluded volumes. *J. Chem. Inf. Model.* 48:583-90, 2008.
- 156) Halgren TA.: MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.* 20:720-9, 1999.
- 157) Halgren TA.: MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. *J. Comput. Chem.* 20:730-48, 1999.
- 158) Labute P.: The generalized Born/volume integral implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *J. Comput. Chem.* 29:1693-8, 2008.

# Bioinformatics studies on drug resistance against anti-HIV-1 drugs

## Hirotaoka ODE

Laboratory of Infectious Diseases, Clinical Research Center,  
National Hospital Organization Nagoya Medical Center  
Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases

More than 20 drugs have been available for anti-HIV-1 treatment in Japan. Combination therapy with these drugs dramatically decreases in morbidity and mortality of AIDS. However, due to high mutation rate of HIV-1, treatment with ineffective drugs toward patients infected with HIV-1 causes accumulation of mutations in the virus, and emergence of drug resistant viruses. Thus, to achieve appropriate application of the drugs toward the respective patients living with HIV-1, methods for predicting the level of drug-resistance using viral sequence information has been developed on the basis of bioinformatics. Furthermore, ultra-deep sequencing by next-generation sequencer whose data analysis is also based on bioinformatics, or *in silico* structural modeling have been achieved to understand drug resistant mechanisms. In this review, I overview the bioinformatics studies about drug resistance against anti-HIV-1 drugs.

