特集1 ウイルスの分子進化

1. ウイルスの分子進化

山口 由美^{1,2}, 五條堀 孝¹(¹国立遺伝学研究所生命情報研究センター遺伝情報分析研究室)
(²新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO))

はじめに

ウイルスは、宿主の細胞内で増殖する、小さくて単純な生命体である。ウイルスの遺伝子の突然変異率はその複製機構により異なり、ウイルスの中には HIV (ヒト免疫不全ウイルス) のように非常に速く進化するものがある。速い進化をするということは、研究者が時間を追って進化を観察できるという利点がある。

ウイルスの進化を議論する際に、そのウイルスが進化的にどこから由来してきたかという“起源の問題”と、そのウイルスがどのような機構で遺伝的変異を蓄積しているかという“進化機構の問題”の2つの大きな問題が存在する。これら2つの問題は深く関わり合っているが、区別して議論する必要がある。前者の問題については、ウイルスの分子系統樹を作成することによって、問題とするウイルスの起源や伝播過程を推測することが出来る。後者の問題を追求するには、問題とするウイルスの突然変異の頻度やパターン、突然変異体にかかる自然淘汰について分子レベルでの現象について知ることが重要である。

本稿では、我々の研究室が行っている HIV を中心とした分子進化の研究とその展望について述べさせて頂く。

ウイルスの分子進化学的解析

アミノ酸配列や塩基配列のデータを用いて進化過程を定量的に解析するには、系統間に塩基置換やアミノ

酸置換が何回生じたかという量 (これを塩基置換数あるいはアミノ酸置換数という) を推定することから始めるとよい。まず、比較する2つのアミノ酸配列の間でアミノ酸座位当りに起こったアミノ酸置換数を推定する方法を示す。2つのアミノ酸配列の比較から異なっているアミノ酸の割合 (p) が計算できる。しかし、1つの座位が複数回置換を受けている可能性があるため、このことを考慮してアミノ酸座位当たりの平均の置換数 (K_{aa}) を求めなければならない。これは次のようにして計算できる¹⁾。

$$K_{aa} = -\ln(1-p-0.2p^2) \quad (1)$$

アミノ酸配列と同様に塩基置換数も計算できる。塩基置換数の推定法にはいろいろな方法があるが、ここでは最も簡単な1パラメーター法²⁾を示す。いま、 K_{nuc} を2つの塩基配列間に生じた塩基座位当たりの平均の塩基置換数とし、p を2つの配列間で塩基が異なっている割合とすると、

$$K_{nuc} = -(3/4) \ln\{1 - (4/3)p\} \quad (2)$$

によって与えられる。

進化速度とは、生物の蛋白質や遺伝子の単位時間あたりのアミノ酸置換数や塩基置換数のことである。ウイルスの中にはレトロウイルスのように、進化速度の非常に速いものがあるので、進化速度算定の際には、単離された年代に着目する必要がある。ここで T_A 年に単離されたウイルス株 A と、 T_B 年に単離されたウイルス株 B の比較から、ウイルスの進化速度を計算する方法を紹介する。ウイルス株 A とウイルス株 B が分岐するよりもはるか以前に分岐したと推測されるウイルス株 C の塩基配列が分かっているとする (図1)。 $K_{nuc}(AC)$, $K_{nuc}(BC)$ を2つのウイルス間の塩基置換数だとすると、塩基置換速度は次の式で推定出来る³⁾。

$$v = \{K_{nuc}(AC) - K_{nuc}(BC)\} / (T_A - T_B) \quad (3)$$

表1 様々なウイルスとは乳類の α -グロビン遺伝子の同義及び非同義置換速度)

ウイルスまたは動物	ORF または遺伝子	比較した塩基数	同義置換数 (サイトあたり, 年あたり)	非同義置換数
HBV	P	2529	4.57×10^{-5}	1.45×10^{-5}
	pre-S	489	7.62×10^{-5}	2.57×10^{-5}
	S	777	5.75×10^{-5}	c
	C	636	5.54×10^{-5}	1.75×10^{-5}
	X	162	7.90×10^{-5}	5.45×10^{-5}
HIV	gag _e		26.00×10^{-3}	1.00×10^{-3}
	env _f		35.50×10^{-3}	3.90×10^{-3}
HCV	E _d	576	6.29×10^{-3}	0.32×10^{-3}
MMLV	gag _a	1611	1.16×10^{-3}	0.54×10^{-3}
インフルエンザウイルス A 型	hemagglutinin		13.10×10^{-3}	3.59×10^{-3}
ほ乳類	α -globin _b	423	3.94×10^{-9}	0.56×10^{-9}

- a. Gojobori and Yokoyama (1985)⁹⁾からのデータ
b. Li et al. (1985)からのデータ¹⁰⁾
c. ORF S では非同義置換は観察されなかった
d. Ina and Gojobori (1994)¹¹⁾からのデータ
e. HIV-BRU と HIV-CDC451 との比較 (HIV-MAL を参照配列とした)
f. HIV-BRU と HIV-SC との比較 (HIV-MAL を参照配列とした)

図1 ウイルス遺伝子の進化速度算定法

T_A年に単離されたウイルス株AとT_B年に単離されたウイルス株Bの遺伝子の配列を用いて進化速度を推定する場合、2つのウイルス株A, Bが直接の祖先と子孫の関係にあるとは限らない。しかし、2つのウイルス株A, Bが分岐したときよりも以前に分岐したと考えられるウイルス株Cの遺伝子の配列を用いることにより、進化速度を推定することができる。

塩基置換にはアミノ酸置換を伴わないものと、伴うものとがあり、それぞれ同義置換、非同義置換と呼ばれている。同義置換数、非同義置換数の推定の方法の一つに、根井と五條堀⁴⁾の方法がある。非同義置換には

蛋白質レベルでの制約が働いたり正の淘汰の影響を受けることがあるが、同義置換には蛋白質レベルでの淘汰は働かないと考えられる。遺伝子の同義置換数と非同義置換数を比較することにより、機能的制約の程度や正の淘汰の可能性の有無を推測出来る。

ウイルス株のアミノ酸配列や塩基配列を用いて進化系統樹を作成することができ、このようにして作成された系統樹を分子系統樹という。系統樹作成法には様々なものがあるが、進化速度の速いウイルスの系統関係や感染経路を知りたい場合、単離された年月が一定でない場合が多いので、進化速度の一定性を仮定しない系統樹作成法を使うのが良い。それらには、近隣結合法⁵⁾、最尤法⁶⁾、などがある。

ウイルスの進化速度

ウイルスの進化の材料は、ウイルスの遺伝子に生じる突然変異であるが、ウイルスの突然変異率は、そのウイルスの複製機構に依存している。レトロウイルスである HIV は、逆転写酵素のエラーの起こる率が高いため⁷⁾に、超高速で進化する⁸⁾。HIV の塩基置換速度は $10^{-3} \sim 10^{-2}$ のオーダーであり、これは宿主のゲノムの塩基置換速度のおよそ100万倍である。特に、外被糖タンパク質のアミノ酸配列はたいへん変わりやすく、ワクチンの開発を困難にしている。表1にさまざまなウイルスの塩基置換速度⁹⁾を示している。

表2 HIV-1における塩基置換のパターン

	A _a	T	C	G
<i>env</i> (全コドン)				
A _b	-	5.6	7.5	19.6
T	2.7	-	9.3	1.3
C	9.5	5.7	-	7.6
G	24.4 _d	0.0	6.8	-
[59.0] _c				
<i>gag</i> (全コドン)				
A	-	0.0	0.0	16.0
T	0.0	-	31.2	10.4
C	0.0	10.0	-	0.0
G	32.4	0.0	0.0	-
[89.6]				

a. 変異した塩基

b. 元の塩基

c. [] 内の数値は変異の頻度を表す

d. 下線の付された数字は AG 間の変異の頻度を表す

ウイルスの遺伝子の進化のパターン

塩基は4種類あるので、起こりうる塩基置換の種類は12通りになる。我々は HIV-1の塩基置換のパターンの解析を行った。方法は以下に述べる通りである。それぞれの領域で分子系統樹を作成して、各枝分かれ時点における祖先塩基配列の推定を行った。さらに、推定された祖先塩基配列と現存の塩基配列を比較して、どのような塩基置換が何個生じているかを、その方向を指定しながら計算した。そして、それぞれの種類の塩基置換の頻度を集計した。HIV-1の *env*, *gag* 遺伝子についての塩基置換のパターンの解析結果を表2に示した¹³⁾。表2からわかるように、HIV-1の塩基置換は A と G 間が圧倒的に多い。

また、塩基置換には、アミノ酸を変えない同義置換と、アミノ酸を変える非同義置換がある。ウイルスの遺伝子では、殆どの場合、同義置換数が非同義置換数を上回っており(表1)、アミノ酸レベルでの変化が能的制約を受けていると考えられる。しかし、ウイルス表面タンパク質の抗原決定基では、非同義置換数が同義置換数を上回ることがあり^{12,14)}、正の淘汰を受けている可能性が指摘される。

HIV の起源と分子疫学

HIV には、ゲノム構造の少し異なる HIV-1と HIV-2という2つのタイプがある。また、いくつかの野生のサル(マンドリル；mandrill, スーティーマンガベイ；sooty mangabey, アフリカミドリザル；African green

monkey, サイクスモンキー；Syke's monkey, チンパンジー；chimpanzee) から HIV と良く似たウイルス(それぞれ, SIV_{mnd}, SIV_{sm}, SIV_{agm}, SIV_{syk}, SIV_{cpz} と呼ばれる)の全ゲノムの塩基配列が報告されている。アフリカでの HIV の感染率の高さや野生の SIV は全てアフリカに存在することから、HIV の祖先はアフリカのサルの SIV と密接な関係にあると考えられる。HIV の起源を明らかにするために、われわれは HIV と SIV の分子系統樹を作成した¹⁵⁾。ここでは *pol* 遺伝子のアミノ酸配列データを使い、近隣結合法で最近作成した系統樹を示した(図2)。分子系統樹作成から、HIV, SIV の祖先はほぼ同時期に (1) SIV_{mnd}, (2) SIV_{agm}, (3) HIV-2/SIV_{sm}, (4) HIV-1/SIV_{cpz}, (5) SIV_{syk} の5つのグループに分かれたと推測された。そしてその分岐の時期は、進化速度の一定性を仮定すると、およそ150~200年前と推定される。

図4の系統樹では、HIV-1を全て含むクラスターの中に、SIV_{cpz}が含まれている。この系統樹が正しければ、次のような推論が可能である。HIV-1とこの SIV_{cpz}の共通祖先から、まず、カメルーンの HIV 2株^{16,17)}が、他のものと分かれた。その後、この SIV_{cpz}と残りの HIV-1が分かれたと推測される。カメルーンとチンパンジーの生息域は重なり合う部分があり、この分子系統樹の結果は、カメルーンでヒトとチンパンジーとの間で種間感染が起こっている可能性を示唆する。チンパンジーは SIV_{cpz}に感染していても病気にならず、抗体保有率は約2%¹⁸⁾だと報告されている。ヒトとチンパンジーのどちらが先に、このウイルスを持っていたのかをさらに明確にするには、アフリカ中央部のヒトやサルのウイルスのさらなる調査が必要である。

系統樹から HIV-2は SIV_{sm}と近縁であることがわかる。スーティーマンガベイの生息地と HIV-2感染者のいる地域には重なりがあり、スーティーマンガベイとヒトとの間で種間感染が起こった可能性がある。スーティーマンガベイは SIV に感染していても病気にならず、感染率は10%程度だと報告されている¹⁹⁾。これもまた、ヒトとスーティーマンガベイのどちらが先にこのウイルスを持っていたかを知るには、さらなる調査が必要である。

アフリカシロカンムリザルからも、SIV が単離されており、系統樹解析の結果、SIV_{agm}と近縁であることが報告されている²⁰⁾。マカク属のサルからも SIV が単離されているが、これらのサルはアメリカの霊長類センターのサルであり、野生のマカク属のサルからは、感染例は見つかっていない。

図2 HIV と SIV の系統関係

この系統樹は、HIV と SIV の逆転写酵素のアミノ酸置換数から、近隣結合法を用いて作成された。枝の上の数字は樹形の信頼性を示すブートストラップ確率を示す。HIV と SIV の共通祖先は、5つのグループに分かれたことが推測される。

HIV-1はHIV-2よりも病原性が強く、現在ではほぼ世界中に分布している。われわれは、HIV-1の伝播過程を推測するために、世界中からのHIV-1の塩基配列データを国際DNAデータバンクなどから集め、分子系統樹を作成を行った。得られた分子系統樹から、HIV-1がアフリカから、世界各地へ伝播していった経路が推測できた。ここで調べられた日本や西ヨーロッパ諸国のHIV-1株は、ハイチやアメリカの株と同じクラスターに属しており、これらのHIV-1株は、アフリカからハイチまたはアメリカを経由して伝わった可能性が推測される。一方、ロシア、ルーマニア、タイ、インドにはハイチ・アメリカ経由でない別の経路で伝わったものがあることが推測された²¹⁾。

我々は、HIV と SIV のいくつかの遺伝子領域で、それぞれ分子系統樹の作成を行ったところ、用いた遺伝子領域によって異なる樹形が得られることを見だし

た¹⁵⁾。このことは、HIV と SIV の進化の過程で組み換えが起こっている可能性を指摘するものである。

ウイルスの体内進化

ウイルスがヒトの体内で複製を行うたびに、遺伝情報の複製エラーが蓄積するので、人の体内のウイルスは近縁なヘテロな集団となっている^{22,23)}。ウイルスが人の体内に進入すると、通常、宿主の免疫系がウイルスを攻撃するように作動する。そのため、ウイルスの宿主の体内における進化は、宿主の免疫系の影響を受けている可能性が考えられる。ここでは、我々の研究室が行ってきた、HIV の体内進化の研究について述べる。

HIV は宿主の体内で遺伝的变化を蓄積することによって、抗原性が変化したり、細胞宿主域を変化させたり、薬剤耐性を獲得したりする²⁴⁾。HIV は人の体内で進化しており、最近、HIV の体内変異の経時的な調査

図3 一人の感染者から経時的に採られた HIV の塩基配列²⁵⁾から作成された系統樹
この感染者の HIV は最初は殆ど均一だったが、時間が経つにつれて塩基置換を蓄積し、異なる系統が形成されていった。AZT 投与直後の HIV は、非常に互いに近縁である。

が盛んになりつつある。我々は、主要なエピトープである V3 領域の変異が経時的に調べられている研究の塩基配列データを用いて、分子進化的な解析を行った。図3は、ある HIV 感染者²⁵⁾から約5年にわたって採取された HIV の系統樹を示したものである。最初のサンプルでは HIV の塩基配列はほぼ均一であるが、時間とともに様々な系統が出現し、限られた系統が生き延びていく様子がわかる。最後のサンプルを採る直前に、この患者は AIDS の発症が見られ、AZT の投与が開始されている²⁵⁾。AZT の投与直後の HIV の塩基配列は互いに非常に近縁であり、これは薬剤投与の効果である可能性も考えられる。

おわりに

ウイルスの分子系統樹の作成は、ウイルスの起源を探ったり、感染経路を解明するのに役立つであろうし、ヒトの病原性ウイルスの抗原決定基を含む遺伝子領域の変異の調査は、地域ごとのウイルス感染の検査や治療の対策に役立つと考えられる。

持続感染する病原性ウイルスについては、一人の感染者の体内ウイルスの進化の調査が、ウイルスの進化機構の解明のみならず、臨床面にも有益な情報を与えることが出来ると考えている。ウイルスの体内進化の調査は、ウイルスの集団のダイナミクスの変化を捉えることを可能にし、今後、発病との関係を明らかにしたり、薬剤の効果の評価するのに役立つと期待されるからである。

ウイルスの分子生物学的知見は急増しており、ウイルスの分子進化の研究も、ウイルス分子の機能を考慮にいれることにより、進化機構がより現実的に捉えられる時期にきている。遺伝情報解析に加えて、ウイルスの分子の構造・機能の情報なども組み入れたアプローチが、機能的に重要な部位を予測したり、治療法の開発などに役立つものと確信している。

文 献

- 1) Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution, Cambridge University Press
- 2) Jukes, T. H., and Cantor, C. R. (1969) Evolution of protein molecules. in *Mammalian Protein Metabolism*, ed. Munro, H.N. 21-132
- 3) Li, W.-H. Tanimura, M., and Sharp, P. M. (1988) Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* **5**, 313-330
- 4) Nei, M., and Gojobori, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 418-426
- 5) Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425
- 6) Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376
- 7) Preston, B. D., Poiesz B. J., and Loeb, L. A. (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168-1171
- 8) Gojobori, T., Moriyama, E.N., and Kimura, M. (1990) Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 10015-10018
- 9) Gojobori, T., Yamaguchi, Y., Ikeo, K., and Mizokami, M. (1994) Evolution of pathogenic viruses with special reference to the rates of synonymous and nonsynonymous substitutions. *Jpn. J. Genet.* **69**, 481-488
- 10) Gojobori, T., and Yokoyama, S. (1985) Rates of evolution of the retroviral oncogene of Moloney murine sarcoma virus and of its cellular homologues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4198-4201
- 11) Li, W.-H., Luo, C.-C. and Wu, C.-I. (1985) Evolution of DNA sequences. In R. J. MacIntyre, ed., *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Plenum Press
- 12) Ina, Y., and Gojobori, T. (1994) Statistical analysis of nucleotide sequences of the hemagglutinin genes of human influenza A viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8388-8392
- 13) Moriyama, E. N., Ina, Y., Ikeo, K., Shimizu, N., and Gojobori, T. (1991) Mutation pattern of human immunodeficiency virus genes. *J. Mol. Evol.* **32**, 360

-363

- 14) Seibert, S. A., Howell, C. Y., Hughes, M. K., and Hughes, A. L. (1995) Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol. Biol. Evol.* **12**, 803-813
- 15) Gojobori, T., Moriyama, E. N., Ina, Y., Kazuho, I., Miura, T., Tsujimoto, H., Hayami, M., and Yokoyama, S. (1990) Evolutionary origin of human and simian immunodeficiency viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4108-4111
- 16) Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., vonBrunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., and Kaptue, L. (1994) A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68**, 1581-1585
- 17) Haesevelde, M. V., Decourt, J. L., de Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., and van Heuverswijn, H. (1994) Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* **68**, 1586-1596
- 18) 井戸栄治, 速水正憲 (1994) サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性. 蛋白質 核酸 酵素 **39** : 1425-1437
- 19) Marx, P. A., Li, Y., Lerche, N. W., Sutjipto, S., Gettie, A., Yee, J. A., Brozman, B. H., Prince, A. M., Hanson, A., Webster, R. G. and Desrosiers, R. C. (1991) Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet sooty mangabey. *J. Virol.* **65**, 4480-4485
- 20) Tomonaga, K., Katahira, J., Fukasawa, M., Hassan, M. A., Kawamura, M., Akari, H., Miura, T., Goto, T., Nakai, M., Suleman, M., Isahakia, M. and Hayami, M. (1993) Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from African white-crowned mangabey monkeys (*Cercocebus torquatus lunulatus*). *Arch. Virol.* **129**, 77-92
- 21) 山口由美, 五條堀孝 (1995) エイズウイルスの進化と分子疫学. 細胞工学 **14** : 1052-1056
- 22) Eigen M (1993) Viral quasispecies. *Scientific American* July 32-39
- 23) Saag, M. S., Hahn, B. H., Gibbons, J., Li, Y., Parks, E. S., Parks, W. P., and Shaw, G. M. (1988) Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* **334**, 440-444
- 24) 塩田 達雄 (1996) HIV の感染個体内変異. 「医学のあゆみ」 **176**, 29-33, .
- 25) Wolfs, T. F. W., Zwart, G., Bakker, M., Valk, M., Kuiken, C. L., Goudsmit, J. (1991) Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. *Virology* **185**, 195-205