6. ヘルペスウイルスの分子進化

白形 正樹, 平井 莞二

(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

はじめに

ヘルペスウイルスは α , β , γ の三亜科に分類される。各グループに属する代表的なウイルスを挙げると α 亜科には herpes simplex virus 1 (HSV 1), herpes simplex virus 2 (HSV 2), varicella zoster virus (VZV), Marek's disease virus (MDV), equine herpesvirus 1 (EHV 1), bovine herpesvirus 1 (BHV 1) が, β 亜科には human cytomegalovirus (HCMV), human herpesvirus 6 (HHV 6) が, さらに γ には Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus saimiri (HVS) などが含まれる (表 1)。ピリオンより単離されるウイルスゲノムはいずれも二本鎖直線状 DNA であるが, その長さや全体の構造は多様である (表 1, 図 1)。各ゲノムの構造および遺伝子に関しては, すでに詳しい総説がある²²⁾。ここではヘルペスウイルスゲノムの分子進化に関する最近の興味ある知見を述べる。

1. オリゴヌクレオチド組成によるヘルペスウイルスゲノムの比較

ウイルスに限らず生物の系統関係を再構築するにあたり, まず相同なゲノム領域の塩基配列または相同なタンパク質のアミノ酸配列を並べてから, 次にさまざまな原理に基づいて系統樹が作られる。これらの方法を用いると, 解析に用いたゲノム領域またはタンパク質に何を選ぶかによって異なる系統樹ができてしまう。それはヘルペスウイルスの解析においても同様であ

る^{3,6,11,22-24,27,31,32)}。このようなデータの組み合わせに依存しない方法として, たとえば GC とか ATT などの短いオリゴヌクレオチド配列のゲノムでの相対出現頻度をすべての可能な配列に関して計算して, その結果をもとにゲノム間の相対距離をもとめる解析方法がある¹⁷⁾。

この方法を用いると, ゲノムの長さや全体構造, 含まれる遺伝子の数や種類に関係なくゲノム全体を直接比較することが可能となる。図 2 はこのようなゲノム DNA の解析から得られた結果のごく一部を表わしている。以下に得られた知見のいくつかを示す。

A. α ヘルペスウイルス亜科

EHV 1, HSV 1, HSV 2, VZV, MDV は比較的近縁なグループを形成している。BHV 1 と pseudorabies virus 1 (PRV 1) はこのグループからははずれているが, それでも γ よりも α 亜科のコンセンサス配列に近い¹⁷⁾。ここでいうコンセンサス配列とは各ウイルスゲノムの塩基配列をまとめて解析した結果をいう。

α 亜科のなかでは MDV が γ 亜科に最も近い。また VZV は HSV 2 よりも HSV 1 に近い。アミノ酸配列からは HSV 1 よりも EHV 1 の方が近い関係にあると指摘されているが³²⁾, 塩基配列では HSV 1 と EHV 1 は同様に近い結果になっている。図 2 では EHV 1 は α 亜科の中でも中心部にあり, このグループでは最初に出現したウイルスと考えられる。

α 亜科を代表するウイルスはいずれも宿主域が比較的広く, 増殖サイクルが短い。また, 潜伏感染は, 主として神経節で成立する。そのゲノム構造も似ている。HSV 1 や HSV 2 の DNA には 2 つのユニーク配列, U_L と U_S があり, 各々の両端にはそれぞれ TR_L/IR_L と IR_S/TR_S の倒置反復配列がある。しかし, VZV や PRV 1 の DNA には U_L の両端に倒置反復配列がない。 α 亜

Molecular evolution of herpesviruses

Masaki Shirakata and Kanji Hirai

Medical Research Institute

Tokyo Medical and Dental University Yushima 1-5-45,

Bunkyo, Tokyo 113

〒113 東京都文京区湯島1-5-45

図2 ジオリゴヌクレオチド(二塩基配列)の相対出現頻度に基づくヘルペスウイルス間の距離。高次元空間でのマッピングを2次元に縮重しているので、多くの情報が失われているが、大まかな距離関係は把握できる。chicken, human はそれぞれのコンセンサス配列の位置を、alpha, beta, gamma はそれぞれの亜科のコンセンサス配列の位置を示す。(文献17より改変)

とは近い関係にはないことが示されている。このことは U_L と U_S 領域の由来が異なることを示唆している。さらに β , および γ 亜科には α 亜科の U_S に対応する領域が無いゲノムが多いことから、 α 亜科の U_S 領域は比較的最近進化したと考えられる³²⁾。この進化過程としては、トランスポゾンもしくはレトロトランスポゾンが末端反復配列近傍に挿入し、その後 U_S としてウイルスとともに運ばれたとする説がある。もともとウイルス増殖には不要であったトランスポゾンの遺伝子が、ウイルスゲノムに取り込まれた後に何らかの機能を持つに至ったというのである。この仮説を支持する知見としては、ヘルペスウイルスのゲノムには明らかに宿主細胞ゲノムに由来すると考えられる遺伝子が存在すること、さらに実際に MDV ではレトロウイルスが IR_S と U_S の結合部位付近に挿入される場合があることなどがあげられる¹⁴⁾。

B. β ヘルペスウイルス亜科

β 亜科に属するウイルスの宿主域は種または属に限定されている。その増殖サイクルは比較的長い。DNAポリメラーゼ、カプシド、テグメント、糖蛋白 gB などの各タンパク質のアミノ酸配列の解析では、 β や γ の

亜科のウイルスは α 亜科のウイルスから同じ程度離れている結果が得られている¹⁷⁾。しかし、オリゴヌクレオチドの解析では β や α の亜科のウイルスは隔たってはならず、お互いにはまり込んだ位置関係にあることがわかる。しかも γ 亜科のウイルスからの距離は α, β のどちらの亜科のウイルスもほぼ同じである。また γ ヘルペスウイルス間の距離と比較すると、 β 亜科に属するウイルスと α 亜科のサブグループ (EHV 1, HSV 1, HSV 2, VZV, MDV) との距離は十分近いといえる。したがって、ゲノム DNA では β と α の両亜科のウイルスは完全に孤立したグループではなく、ひとつの大きなグループを形成しているといえる。

HHV 6 は α 亜科のコンセンサス配列に最も近く、また β 亜科のコンセンサス配列にも同程度近い。さらに全体のコンセンサス配列にも十分近く、HHV 6 ゲノムはヘルペスウイルスゲノムの中心に位置する。実際、HHV 6 はリンパ球に感染するだけでなく、単球、上皮細胞、中枢神経系など広範囲の細胞と関連がある^{10,18,19,30)}。タンパク質のアミノ酸配列の比較結果もあわせて考慮すると、ヘルペスウイルスの祖先ウイルスは HHV 6 に類似していることと、また α 亜科は β 亜科や γ 亜科のヘルペスウイルスより新しいウイルスで

あることなどが推察される。Human herpesvirus 7 (HHV 7) に関してオリゴヌクレオチド解析は行われていないが、ゲノム構造およびカプシドタンパク質のアミノ酸配列の比較によると HHV 6 に大変類似している²⁵⁾。

C. γ ヘルペスウイルス亜科

α 亜科や β 亜科のウイルス内のゲノム間の距離に比べ EBV, HVS, BHV 4 間の距離は大きい。例えば EBV と HVS 間の距離は HSV 1 と VZV 間より遠く、 γ 亜科のウイルスは α や β の亜科に属するウイルスより多様であることがわかる。ゲノム DNA の解析では γ 亜科ウイルスは 2 つのサブグループに分かれる。グループ 1 は lymphocryptovirus と呼ばれ、EBV が、グループ 2 は Rhadinovirus と呼ばれ、HVS がそれぞれのプロトタイプとなる。この解析結果に一致して、潜伏感染や細胞の不死化、遺伝子制御などにかかわる重要な遺伝子が EBV と HVS 間では保存されていない⁸⁾。また DNA ポリメラーゼ、カプシド、テグメント、gB の各タンパク質のアミノ酸配列でも、DNA 全配列と同様の差が見られる¹⁹⁾。

Bovine herpesvirus 4 (BHV 4) は以前 β 亜科とされていたが、その後塩基配列が明らかになると γ 亜科に近いことが示されている。さらに、EBV よりも HVS に進化的に近いとする考えもあるが^{5,6,9)}、オリゴヌクレオチド組成の解析では HVS よりも EBV にずいぶん近い。

MDV は従来、その好リンパ球性から EBV と同じ γ 亜科に属したが、ウイルス糖蛋白遺伝子の解析などから、 γ 亜科よりも α 亜科により近いことが示されている^{3,11)}。しかしながらオリゴヌクレオチド解析では、MDV は α 亜科ウイルスのどのゲノムよりもむしろ HHV 6 に最も近い。そこで、第43回ウイルス学会シンポジウムでの講演で Roizman 博士は MDV を α , β , γ 以外のグループに属させることを提唱している。

すべてのヘルペスウイルスのなかで EBV がヒトの配列に最も近い。この結果は、潜在ウイルスが発現する遺伝子すべてを含む約 1 / 3 の EBV ゲノムが宿主細胞ゲノムに由来するという考えと合致している¹⁰⁾。この点に関しては後に詳しく述べる。

最近、カポジ肉腫に特異的な DNA 塩基配列が representational difference analysis という方法により検出された⁷⁾。その塩基配列が γ ヘルペスウイルスのカプシド蛋白やテグメント蛋白の遺伝子と一部ホモロジーをもつため、新しいヒトヘルペスウイルス (Kaposi'

s sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) または HHV 8) の存在が示唆された。その後、90%以上のカポジ肉腫に同じ配列が検出され、さらに約20kbにわたる塩基配列解析によりこのゲノムは HVS に近いことが推測された²⁵⁾。

2. 宿主細胞ゲノムからの遺伝子獲得

ウイルス遺伝子のホモログが宿主細胞ゲノムにあり、しかもその類似性が高いとき、そのウイルス遺伝子は宿主細胞から獲得されたと考えられる。ヘルペスウイルスではこのような遺伝子が多数同定されており、宿主細胞からの遺伝子獲得はウイルス進化の重要な過程であったと推測される。HVS の DHFR (dihydrofolate reductase) 遺伝子はヒトの DHFR 遺伝子と約90%も一致している。DHFR 遺伝子はウイルス増殖に必須ではないことからごく最近 HVS に獲得されたと考えられる³⁴⁾。他にも、EBV の遺伝子 BCRF 1 はヒト IL-10 と¹³⁾、また他の EBV 遺伝子 BHRF 1 は bcl-2 と²⁰⁾と類似している。VZV と HVS の TS (thymidylate synthase) 遺伝子も宿主遺伝子の中に類似のものがある^{12,33)}。BCRF 1 と TS 遺伝子の場合、ヒトのホモログとのホモロジーは70%にも達する。HCMV はケモカインリセプター、MHC クラス I, T 細胞リセプター (TCR) 様の遺伝子を持っている^{2,4)}。また最近の解析では HVS が G 1 サイクリン、IL-8 リセプター、T 細胞活性化遺伝子、補体阻害因子、U-RNA 遺伝子と高い類似性を示す ORF を持つことも明らかにもなっている²⁶⁾。

3. EBV 進化のシナリオ (仮説)

EBV の祖先にあたるウイルスはもともとは純粋な lyticvirus であったものが、ヒトもしくは他の動物ゲノムから宿主体内で潜在するのに必要な latent 遺伝子を順次獲得して EBV へと進化したとする仮説がある¹⁶⁾。この仮説には様々な根拠がある。(i) EBV とほかのヒトヘルペスウイルスを比較すると、lytic phase の構造遺伝子はよく類似しているのに、latent 遺伝子では有意な類似性は全くない²¹⁾。EBV の latent 遺伝子は EBV に固有の遺伝子である。(ii) すべての EBV nuclear antigen (EBNA) 遺伝子は同一方向を向いて、6 種の EBNA 1-6 に固有のエクソンと多くの共通エクソンから構成されている。各 EBNA の mRNA はひとつの約90kb にもなる pre-mRNA からスプライシングによって生成される。このように非常に長い転写物は HSV, VZV, CMV では見つかっておらず、EBV に特有の遺伝子発現様式である²⁹⁾。(iii) EBV は腫瘍細胞などで潜

在しているときは大部分のゲノムが環状のプラスミド状態である。そのプラスミドの複製起点 oriP にみられる21-30bpの反復配列の解析により、oriP 領域はヒトなどから獲得された昔のトランスポゾンの遺跡ではないかと提唱されている¹⁵⁾。たしかに oriP 領域の A/T の割合 (60%) は EBV ゲノム全体 (41%) に比べ著しく高い。また latent 遺伝子の S 3 頻度 (コドンの3番目がCまたはGである頻度) は *Drosophila* のトランスポゾン遺伝子 (gypsy, hobo, copia, P) と似て大変低い¹⁶⁾。したがって、oriP 領域と latent 遺伝子はトランスポゾン由来である可能性がある。また latent と lytic の複製起点がはっきりと区別されていることもほかのヘルペスウイルスでは見られない EBV の特徴である。

(iv) EBV 進化のシナリオではウイルス産生サイクルは latent 遺伝子導入より先に確立される。したがって latent 遺伝子はウイルス産生サイクルには貢献しないことが予測される。(v) Latent 遺伝子は EBV ゲノム内で大きく2つの領域にまとまって位置している(図1)。ひとつは B95-8 の配列番号で7,000から50,000までで、oriP, 3 kb からなる反復配列 IR 1, EBNA 5, EBNA 2 を含む。長い RNA のプロモーターも IR 1 内にある。もう一つの領域は92,000から110,000までの18kbで、この領域には EBNA 3, EBNA 4, EBNA 6, EBNA 1 が含まれる。Latent membrane protein 1 と 2A, 2B (LMP 1, LMP 2 A, 2 B) はそれぞれエクソンを3個、または8個持つ latent 遺伝子で、両遺伝子とも末端反復配列 TR の近傍またはその TR を挟んだ位置にある。潜在 EBV ゲノムは TR を介して環状構造を形成するため、LMP 1 と 2 のコード領域も oriP を含む領域の延長部分として考えて、右端の TR 近傍にある LMP 1 コード領域から TR をふくむ50,000までを latent の遺伝子領域と考えることもできる。以上の点を考慮すると、まず最初に oriP がトランスポゾンなどにより導入され、その複製に必要な EBNA 1 が続いて導入され、EBNA 2 から EBNA 6、さらに LMP は後の段階で、一度にあるいは何度かに分かれて獲得されたことが推察される。このような過程を経て、EBV は latent サイクルを確立した可能性がある。

おわりに

現在ゲノムの構造決定は飛躍的な進んでおり、数年後にはヒトゲノムの全構造も明らかになる予定である。その膨大な情報を利用することにより、ヘルペスウイルスの分子進化のシナリオも大きく変わる可能性がある。今後のこの分野の研究の発展が期待される。

引用文献

- 1) Albrecht, J. C., and Freckenstein, B. (1990) Structural organization of the conserved gene block of herpesvirus saimiri coding for DNA polymerase, glycoprotein B, and major DNA binding protein. *Virology* **174**, 533-542.
- 2) Beck, S., and Barrell, B. (1991) An HCMV reading frame which has similarity with both the V and C regions of the TCR gamma chain. *DNA Sequence* **2**, 33-38.
- 3) Bennett, A. M., Harrington, L., and Kelly, D.C. (1992) Nucleotide sequence analysis of genes encoding glycoprotein D and J in simian herpes B virus. *J. Gen. Virol.* **73**, 2963-2967.
- 4) Browne, H., Smith, G., Beck, S., and Minson, T. (1990) A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature* **347**, 770-772.
- 5) Bublot, M., van Bresse, M.-F., Thiry, E., Dubuisson, J., and Pastoret, P.-P. (1990) Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. *J. Gen. Virol.* **71**, 133-142.
- 6) Bublot, M., Lomonte, P., LeQuarre, A.-S., Albrecht, J.-C., Nicholas, J., Flenkenstein, B., Pastoret, and P.-P., Thiry, E. (1992) Genetic relationship between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology* **190**, 654-665.
- 7) Chang, Y., Cesarnan, E., Pessin, M. S., Lee, J., Culpepper, J., Knowles, D. M., and Moore, P. S. (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **265**, 1865-1869.
- 8) Cullinane, A. A., Rixon, F. J., and Davidson, A. J. (1988) Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. *J. Gen. Virol.* **69**, 1575-1590.
- 9) Ehler, B., Buhk, H.-J., and Ludwig, H. (1986) Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure: cloning and mapping of the monomeric polypetitive DNA unit, and comparison of European and American strains. *J. Gen. Virol.* **66**, 55-68.
- 10) Geng, Y., Chandran, B., Josephs, S. F., and Wood, C. (1992) Identification and characterization of human herpesvirus 6 gene segment that trans activates the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J. Virol.* **66**, 1564-1570.
- 11) Griffin, A. M. (1991) The nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship of the homologous gene from other herpesviruses. *J. Gen. Virol.* **72**, 393-398.
- 12) Honess, R. W., Bodemer, W., Cameron, K. R., Niller, H.-H., and Fleckenstein, B. (1986) The A+T rich genome of herpesvirus saimiri contains a highly conserved gene for thymidylate synthase. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA. **83**, 3604-3608.
- 13) Hsu, D. H., de Waal Malefyt, R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Virira, P., de Vries, J., Spits, H., Mosmann, T. R., and Moore, K. W. (1990) Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* **250**, 830-832.
 - 14) Jones, D., Isfort, R., Witter, R., Kost, R., and Kung, H.-J. (1993) Retroviral insertions into a herpesvirus are clustered at the junctions of the short repeat and short unique sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3855-3859.
 - 15) Kalin, S., and Blaisdell, B. E. (1987) A model for the development of the tandem repeat units in the EBV ori-P region and a discussion of their possible function. *J. Mol. Evol.* **25**, 215-229.
 - 16) Kalin, S., Blaisdell, B. E., and Schachtel, G. A. (1990) Contrasts in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus : data and hypothesis. *J. Virol.* **64**, 4264-4273.
 - 17) Karlin, S., Mocarski, E.S., and Schachtel, G.A. (1994) Molecular evolution of herpesviruses : genomic and protein sequence comparisons. *J. Virol.* **68**, 1886-1902.
 - 18) Kondo, K., Kondo, T., Okuno, T., Takahashi, M., and Yamanishi, K. (1991) Latent human herpesvirus 6 infection of human monocyte/macrophages. *J. Gen. Virol.* **72**, 1401-1408.
 - 19) Kondo, K., Nagafuji, H., Hata, A., Tomomori, C., and Yamanishi, K. (1993) Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J. Infect. Dis.* **167**, 1197-1200.
 - 20) Marchini, A., Tomkinson, B., Cohen, J. I., and Kieff, E. (1991) BHRF1, the Epstein-Barr virus genes with homology to Bcl2, is dispensable for B-lymphocyte transformation and virus replication. *J. Virol.* **65**, 5991-6000.
 - 21) McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. c., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E., and Tylor, P. (1988) The complete DNA sequence of the long unique region o the genome of herpes simplex virus type I. *J. Gen. Virol.* **69**, 1531-1574.
 - 22) McGeoch, D. J. (1989) The genomes of the human herpesvirus : contents, relationship, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 235-265.
 - 23) McGeoch, D. J. (1990) Evolutionary relationship of virion glycoprotein genes in the S regions of alpha-herpesvirus genomes. *J. Gen. Virol.* **71**, 2361-2367.
 - 24) McGeoch, D. J. (1992) Molecular evolution of large DNA viruses of eukaryotes. *Semin. Virol.* **3**, 399-409.
 - 25) Moore, P. S., Gao, S.-J., Dominguez, G., Casarman, E. Lungu, O., Knowles, D. K., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J., and Chang, Y. (1996) Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* **70**, 549-558.
 - 26) Nicholas, J., Cameron, K. R., and Honess, R. W. (1992) Herpesvirus saimiri encodes homologues of G protein-coupled receptors and cyclins. *Nature* **355**, 362-365.
 - 27) Ross, L. J. N., and Binns, M. M. (1991) Properties and evolutionary relationship of Marek's disease virus homologues of protein kinase, glycoprotein D and glycoprotein I of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 939-947.
 - 28) Schachtel, G. A., Bucher, P., Mocarski, E. S., Blaisdell, B. E., and Karlin, S. (1991) Evidence for selective evolution in codon usage in conserved amino acid segments of human alphaherpesvirus proteins. *J. Mol. Evol.* **33**, 483-494.
 - 29) Speck, S., and Strominger, J. (1985) Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I : a potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 8305-8309.
 - 30) Takahashi, K., Sonoda, S., Higashi, K., Kondo, T., Takahashi, H., Takahashi, M., and Yamanishi, K. (1989) Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J. Virol.* **63**, 3161-3163.
 - 31) Telford, E. A. R., Studdert, M. J., Agius, C. T., Watson, M. S., Aird, H. C., and Davidson, A. J. (1993) Equine herpesviruses 2 and 5 are g-herpesviruses. *Virology* **195**, 492-499.
 - 32) Telford, E. A. R., Watson, M. S., McBride, K., Davison, A. J. (1992) The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**, 304-316.
 - 33) Thompson, R., Honess, R. W., Taylor, L., Morran, J., and Davison, A. J. (1987) Varicella-zoster virus specifies a thymidylate synthetase. *J. gen. Virol.* **68**, 1449-1455.
 - 34) Trimble, J. J., Murthy, C. S., Bakker, A., Grassmann, R., and Deroisiers, R. C. (1988) A gene for dihydrofolate reductase in a herpesvirus. *Science* **239**, 1145-1147.