特集 3 : TTV および関連ウイルス

2. TTV-like viruses

三代 俊治

(東芝病院研究部・部長)

I. 序

自治医大眞弓教授の教室で発見され⁴⁾, 遺伝子クローニングされ⁵⁾, Abbott Laboratories の Mushahwar 等³⁾と鳥取大学日野教授等²⁾によってゲノムの完全長化が達成された新種ウイルス TT virus (TTV) は, ヒトという動物種に見出されるものとしては前例の無い環状一本鎖 DNA ウイルスであった。しかし, プタやニワトリや植物に環状一本鎖 DNA ウイルスが存在することは夙に知られており, *Circoviridae* という family name の下に一括されていた。

TTV は, そのゲノムが circular で single-stranded で且つ DNA であるという基本的な (ハードウェア的な) 點に於いては circoviruses とソックリであったが, 塩基配列情報に基づく系統解析に於いて (ソフトウェア的には) 既知の circoviruses 達からは相当にかけ離れた存在であることが明白だった。よって Mushahwar 達は, TTV 一族と既知 circoviruses との間には画然たる一線を引くべきであると提言し, 前者に *Circinoviridae* という新名を与えることを提唱した³⁾。

次いで筆者の仲間, 高橋, 土方等は, TTV の genotypes の一種であるとするにはプロトタイプとの相溶性が低過ぎる系統も少なからず存在することを報告し (SANBAN¹⁾, YONBAN⁸⁾), 剩え, 粒子径もゲノムサイズも TTV より明らかに小型である TTV-like

mini virus (TLMV)⁷⁾ という新種をも採集するに及んで, TTV とその類似ウイルス集団の広がり相当に大きいものであることを指摘した。

更に興味深かったことに, この TLMV は, chicken anemia virus (CAV) という従前 *Circoviridae* の中に分類されてはいたものの circoviruses 一般からは少々断絶する孤立的な特徴を保有しているウイルスとの間に, 看過すべからざる類似性を示した。同時に TLMV は, その名の示唆する如く, TTV や SANBAN, YONBAN とよく似ていたのである。即ち TLMV は CAV と TTV の中間に来了。よって我々は, *Circoviridae* から CAV だけを引き抜いて来て, TTV や SANBAN, YONBAN, TLMV 等と一緒に分類し直すことが妥当であると考え, それらを包摂するための *Paracircoviridae* という新科名を提唱した⁷⁾。

一方, イタリアの Diasorin の研究者 Primi 等の発見した SEN virus (SEN-V) は, 当初は既知の如何なるウイルスとも異なる全く新種のウイルスであると報道されていたが, 極く最近その特許が公開されるに及んで⁶⁾, 塩基配列の比較から SEN-V も実は TTV の類縁ウイルスの一つであったと, 発見報道以来 1 年以上経過して漸くにして皆の知るところとなった。

本稿では, 未だ認知されていない我々の造語「*Paracircoviridae*」の傘下ではなく, 京大ウイルス研の下遠野教授から頂戴した御題目「TTV-like viruses」の傘下に, SANBAN, SEN-V, YONBAN, TLMV を入れる。以下この 4 種の夫々と全体像 (相互関係) について解説する。

II. TTV-TLMV-CAV

TTV-like viruses の全体像を早分かりして貰う為の近道として, 先ず図 1 を御覧頂きたい。そこには TTV と TLMV と CAV のゲノム構造の比較が図示してある。三者間の比較の要點 (類似點と相違點) を列

TTV-like viruses

Shunji Mishiro

Department of Medical Sciences Toshiba General Hospital
6-3-22 Higashi Oh-i, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8522,
Japan

〒140-8522 品川区東大井 6-3-22

Phone : 03-3764-8981

Fax : 03-3764-8992

E-mail : shunji.mishiro@po.toshiba.co.jp

図2 TTVとTLMVのCsCl中レートゾーナル遠心
説明は本文を参照 (Takahashi et al⁷より)。

を全く認めない領域が、ゲノム全体の約1/4の長さにわたって存在する。この非翻訳領域の内部の、前述した高度保存領域の上流に、TTVではGC tractが、TLMVとCAVではdirect repeats (DR)が存在する(図1a)。DRが存在するという共通点はTLMVとCAVの間の類似性を示唆し、DRを持たぬTTVをば孤立させたかに見える。しかし同時に、TLMVのDR1-DR2-DR3で反復されている配列はTTVのGC tractの配列そのものをほぼ完璧に近く含有しているので、この点からすればTLMVはTTVとCAVの両方の性質を具有していることになる(図1c)。

(5) ORF1の5'端アミノ酸配列

上述の、非翻訳領域に於いて見ることできたTLMVの「両性具有」の性質は、ORF1にエンコードされている蛋白のアミノ酸配列の中にも再び見ることができる。ORF1の5'末端領域がコードしているアミノ酸配列はTTV, TLMV, CAVのいずれに於いても塩基性アミノ酸(特にアルギニン)を極めて豊富に含んでいる。しかし、特別にこの領域が我々の興味を惹いたのは、アルギニンの次に目立つアミノ酸は何であるか、という点に於いてであった。図1dを御覧頂きたい。TTVに於いてそれはトリプトファン(W)である。CAVに於いてそれはフェニールアラニン(F)である。そしてTLMVに於いてそれはトリプトファンとフェニールアラニンの両方(W+F)

である！即ち、ここでもまたTLMVはTTVとCAVの中間に来た。

Ⅲ. TTV vs TLMV

前項で述べたことから、少なくとも遺伝子レベルで見た場合のTTV-TLMV-CAV三者間の相対的位置関係は臆ろげながら御理解頂けたと思うが、ウイルス間の異同を云々するには物理化学的諸性質もまた比較されねばならない。しかし我々はCAVを含有するナマの試料を保有していなかったもので、直接的な比較はTTV vs TLMVに限定された。そして両者を比較する為に用いるべき試料はゴロゴロ転がっていた。本邦成人の殆んどがTTVにもTLMVにも感染しているので、TTV陽性検体にTLMVを(あるいはその逆を)パルスしたりする必要なく「内部コントロール設定済み」の試料をいくらでも用意できた。

我々が先ず比較したのは粒子径である。塩化セシウム密度勾配の上にTTV/TLMV陽性血清を重層し、長時間の平衡遠心ではなく極く短時間のレートゾーナル遠心を行なうことによって、両ウイルスが溶媒由来の浮力と粘性抵抗を受けつつ重力(遠心力)場を沈降して行く時の速度の差を見ようと試みた(i.e., 大きい粒子ほど速く沈降)。図2に示す如く、TTVの方がTLMVより明らかに早く管底に向かって沈んで行き、以てTTVの方がTLMVより粒子径が大きいこ

とを間接的に示唆した。

Filtration studyの結果からも同様の示唆が得られた。表1に示す如く、大孔径フィルターから小孔径フィルターへと小刻みにポアサイズを縮小しつつ順次段階的にTTV/TLMV陽性試料を通過させて行くと、ウイルスの「通過障害」はTTVの方に於いてTLMVよりずっと早い段階で出現した。即ち、TTVの方がTLMVより粒子径が大きい、という相対評価が得られたのである（註：通過し得たあるいは通過し得なかったフィルターのポアサイズから単純にウイルス粒子径の絶対値を推測するとTTVは30-50nm、TLMVは<30nmということになるが、これらの数字を鵜呑みには出来ない。相対的にTLMVの方が小さい、という解釈に留めるべきだと思われる）。

ゲノム長がTTV>TLMVであることは既に前項で述べたが、ここに述べた二つの実験に於ける直接比較によって、粒子径もまたTTV>TLMVであると推測された。

次の課題は、TLMVのウイルス粒子内に存在するDNAがプラス鎖で出来ているのかマイナス鎖で出来ているのかを調べることであった。TTVもCAVもマイナス鎖であると報告されていたから、もし同系統ならTLMVもマイナス鎖である筈だった。そして実際、TLMVのgenome polarityをstrand-specific hybridizationで調べた結果はTLMV粒子が主としてマ

表1 Filtration study to compare TTV and TLMV particle sizes.

Filtrate	PCR titer	
	TTV	TLMV
Before filtration	10 ³ , 10 ³	10 ² , 10 ²
Through 100nm	10 ³ , 10 ³	10 ² , 10 ²
Through 50nm	10 ³ , 10 ²	10 ² , 10 ²
Through 30nm	10 ² , 10 ¹	10 ² , 10 ²

(From ref-7)

イナス鎖DNAを包含していることを示唆した（表2）。

かくて、遺伝子の塩基配列情報には敢えて目をつむり、専ら物理化学的性質のみを以てTTVとTLMVを直接比較すると、両者の違いは主としてサイズにある。後者に”mini”という名を奉った所以である。

IV. TLMV

話は前後するが、そもそもTLMVという“新種”は「偶然のいたずら (serendipity)」に導かれて筆者同僚の高橋が発見したウイルスである⁷⁾。彼は当時、TTVの塩基配列に基づいて種々様々のoligonucleotide primersを設計し、種々様々の組み合わせでTTV DNAのPCRに用いていた。

或る日のこと高橋は、或る組み合わせのプライマーセット(T945/T814, forward ; T936/T935, reverse)を用いて、或る血清検体をPCRにかけた(図3)。もしこの検体が通常のTTVを含有しているなら約1.8 kbのamplification productが現出して来る筈だった。ところがゲル上に彼の眼が捉え得たバンドは約1.2 kbの長さのものであり、しかもそのバンドは如何にも薄く如何にも頼りなかった(図3の“amplicon-0”)。

凡庸な研究者ならこのゲルをゴミ箱の中に抛擲してしまっただかもしれないが、高橋は違った。彼はこのゲル上の「faint band」からDNAを抽出し断然sequencingを敢行した。読み難きを読み進んで行く作業を辛抱強く続けた果てに、彼は辛うじてプライマーを設定出来そうな場所を2箇所見つけ、amplicon-0由来プライマーとして1ES, 1IS, 1EAS, 1IASを合成した。

1ES, 1IS, 1EAS, 1IASを用いたinverted PCRは見事に成功した。約2.1kbの長さの、実にしっかりしたバンドが今度は得られたのである(図3の“amplicon-1”)。ここまで来ればあとは一瀉千里。Ampli-

表2 Hybridization study to determine TLMV genome polarity.

Oligonucleotide immobilized on the beads	Hybridized TLMV DNA detected by PCR			
	Dilution			
	1/1	1/10	1/100	1/1000
M1349B (5'-ATTGCCGACCACAA	+	+	+	-
ACTGAC-3', sense)	+	+	+	-
M1350B (5'-GACTGATCTAGCCC	+	-	-	-
GAATTG-3', antisense)	-	-	-	-

(From ref-7)

図3 TLMVの遺伝子クローニング
説明は本文を参照(Takahashi et al⁷⁾より)。

con-1をsequencingし specific primers (2 ES, 2 IS, 2 EAS, 2 IES)を合成し, inverted PCRで amplicon-0を取り直す。

取り直した amplicon-0は今度こそ如何にも太く如何にも頼り甲斐のあるバンドとしてゲル上に姿を現した(図3の“amplicon-2”)。Amplicon-1と amplicon

-2の配列を繋ぎ合わせて全体像が完成した。その全長は約2.9kbで, TTVより約1kbだけ短小だった。

これがTLMVの発見譚である。筆者の怠惰の所為でpublicationに随分手間取ったが, 1999年の初頭に既に高橋はTLMVを見つけていた。

図4 TTV-like viruses のORF 2 アミノ酸配列のアラインメント (Takahashi et al⁸⁾より)。

V. SANBAN, YONBAN

話がまた前後するが、TLMV より前に SANBAN, YONBAN は見つかった。

筆者の同僚土方美奈子 (現国立国際医療センター研究所) は、「好きではないがなりゆきで」と嘯きつつも TTV 関連の仕事を着実にこなしていた。当時の彼女の仕事ぶりは既に別稿に書いた⁹⁾。以下に一部を引用する。

……筆者同僚の土方は ORF 2 領域の配列を 10 本、20 本、30 本……と手当たり次第に決めて行くうちに「ミシロさん大変ですよ、イヌ・ネコの如くにジェノタイプがぞろぞろ」との感懐を漏らしていたが、50 本、60 本、70 本……となるに及んでは彼女の使う比喻が「浜の真砂の如くに」へと変化した。当初は各々のジェノタイプに「イヌ族」、「ネコ族」、「ウシ族」、「ウマ族」、「ヤギ族」、「ヒツジ族」、「サル族」等と命名していたのだが、やがて名前の方が間に合わなくなって来たのである……

そうこうするうちに彼女は SANBAN という変種を見つければ完全長配列を決めた¹⁾。SANBAN とは？ 再び同上出典⁹⁾から引用する。

……扱て、では愈々「第二世代 PCR では陰性なのに第三世代 PCR では陽性になる検体が一体どういう TTV を含んでいるのか」という問に対する一つの答をお見せしよう…… (中略) ……TTV-SANBAN の完全長環状一本鎖ゲノム DNA は 3808 塩基から成り、TTV-TA278 との間の塩基配列一致度は 57% でしかない。アミノ酸レベルでの相同性は更に低く、ORF 1 で 34%、ORF 2 で 40% である。プロトタイプの TTV からかくも遠く隔たった SANBAN をも果たして TTV と呼んでいいのだろうか？ …… (中略) ……

結局、第三世代 PCR 系で拾われて来る「TTV」は「TTV を含む TTV 的ウイルス達」の大集合なのである、と合点が行った……

SANBAN ですら TTV のプロトタイプに対して塩基レベルで 57%、アミノ酸レベルで 34-40% 程度の相同性しか保有していない。YONBAN は SANBAN より更に遠い変種であった。土方は YONBAN で TTV を「卒業」した。

VI. ORF 2 の保存モチーフ

前項までに登場させた TTV, TLMV, CAV, SANBAN, YONBAN の五者が相互縁関係にあることを最も雄弁に示唆するのは、先述の「アラインメント可

図5 TTV-like viruses (SEN-V は除く) の分子系統樹

高度保存領域の塩基配列をもとに描いた。番号で表した各アイソレート
の名称は01. TA278; 02. JA20; 03. JA 4; 04. US35; 05. JA 1; 06.
TUS01; 07. SANBAN; 08. IR1031; 09. S039; 10. KC009; 11. LC
011; 12. KC186; 13. KC197; 14. CBD231; 15. CBD279; 16. CLC138;
17. CLC205; 18. NLC026; 19. NLC023; 20. CLC062; 21. NLC030;
22. CLC156; 23. CBD203; 24. A48606; 25. CAECUX 1; 26. CAE
26P 4; and 27. AR021343である。(Takahashi et al⁸⁾より)。

能な高度保存領域」の存在である。しかし、それに次ぐ、あるいは匹敵するかもしれない要素が他にもある。それは、ORF 2によってコードされている蛋白のアミノ酸配列上に見出される保存モチーフである。

ORF 2の開始点・終止点は上記五者夫々に様々であるが、W-X₇H-X₅C-X-C-X₅Hというモチーフだけはほぼ完璧に保存されている(図4)⁸⁾。このモチーフがどのようなファンクションに関連するモチーフなのかは未だ明らかでないが、かくも高度に保存されているからには、必ずや何等かの活性と関連している筈である。

鳥取大学の日野教授から最近頂戴した *J. Virol.* の論文別刷によれば、TTV の mRNA はスプライシングで成熟する。そして、予想どおり、上記の W-X₇H-X₅C-X-C-X₅H というモチーフを含む領域はスプライス・アウトされることなく成熟 mRNA 1.2kb と 1.0 kb の中に残っているようである。蛋白レベルでは、このモチーフによって代表される function (酵素活性?) が、かかる一群のウイルス達 (= TTV-like viruses) を一つに束ねる為のキー・ワードになるのではないだろうか?

VII. 系統樹

ここに至るまで分子系統樹を出さずに来たことに特別の理由はない。しかし、SEN-V のことを書くのは最後の方にしようと思っただけだったので、そ

の為には今が出し頃である。

図5は前述の高度保存領域塩基配列に基づいて描いた系統樹である⁸⁾。一目して瞭然たる如く、TTV prototype (TA278) を起点にしてこれを眺めれば、SANBAN と YONBAN が「近い親戚」で、TTMV が「遠い親戚」で、CAV は「ひょっとしたら血縁?」といった具合の関係になっている。

では SEN-V は?

VIII. SEN-V も追加

イタリアの Primi 達が見つけた SEN-V の実体が何物であるか、ずっと謎のままだった。色々の理由があって隠蔽されて来たようである。しかし、研究者仲間同士の噂話や、いずこからともなく漏れ伝わって来る断片的情報を繋ぎ合わせて憶測するに、それが TTV-like viruses の一員であるという可能性は十分に考えられていた。

現に筆者は本年4月にアトランタで開催されたシンポジウムで不特定多数の相手(その中には Primi 自身も含まれていた)に対して「私は SEN-V を TTV 一族のメムバアだと思いが如何にや」と問い掛けてみたが、否定した人物は一人もいなかった。

但し、公然と肯定した人物もまた皆無だったのである。それなりに、しかし、The cat is out of the bag の機は熟しつつあるように見えた。

本年10月初旬、ふとしたきっかけで Entrez-Pub-

図6 SEN-V と TTV G1-G16の系統樹
Accession#で示したのがSEN-V (Patent⁹⁾に基づいて作図)。

Medを開き, “SEN-V” という検索語をエントリイしたところ, 122本の塩基配列が目の前に現われた。Sequence xxx from Patent WO0028039と出典が明示されている。こころみに, その中の一本を開いてみると,

VRL 16-SEP-2000

SOURCE SEN virus.

AUTHORS Fiordalisi,G., .. Primi,D.,.

TITLE Identification of senv genotypes

JOURNAL Patent : WO0028039-A18-MAY-2000

と書いてあった。

Primi 達のpatentでは以前に大変失望した経験がある(新種肝炎ウイルスの配列だというので開けてみたらGBVの配列だった)ので, 今回はあまり期待せずに中身を覗いてみることにして一本一本塩基配列を首實驗して行ったら, 驚くなかれ今回はfakeではなかった。既知ウイルスを相手にホモロジー検索を試みたら, TTVがゾロゾロとヒットして来たのである。

図6に, この特許公開から得られたSEN-V配列と既知16種類のTTV genotypesを一緒にして解析した場合の分子系統樹を示す。

VIII. 結

TTVがそうであったように, TLMVも我々の調べた範囲では我国健康成人の殆んどが感染しているvery common virusで, 輸血でもうつり⁷⁾, (胆汁中に

出る故)便からもうつる。TTVがそうであるように, TLMVも疾病相関が明白でない。上記ウイルスほどには積極的に調べられていないSANBAN, YONBANも, 疫學的にはTTVやTLMVと同工異曲だと思われる。唯一SEN-Vのみが, 少なくともNIHのHarvey Alterのデータでは疾病相関を保有しているように見える。しかし, そのSEN-Vとて, これからデータのディスクロージャーが進むに連れて, この先どう転ぶか分からない。

結局, 臨牀的観点からは, このTTV-like virusesは“orphan virus”の大群である。即ち, この中から「大化け」するウイルスが将来出て来るかもしれないし, そうでないかもしれない。ウイルス學的には, 分類の問題を含めて課題が多く残されている。例えば日野先生達が見つけたTTV mRNAのsplicing。それはTLMVにもあるのだろうか?

文 献

- 1) Hijikata, M., Takahashi, K., and Mishiro, S., (1999). Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF 2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes., *Virology*, **260**, 17-22
- 2) Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., and Hino, S., (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the

- circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus., *J. Virol.*, **73**, 3582-3586
- 3) Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J., and Desai, S. M., (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus : Evidence for a new virus family infecting humans., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3177-3182
 - 4) Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M., (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 92-97
 - 5) Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M., (1998). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with post-transfusion hepatitis of unknown etiology., *Hepatol. Res.*, **10** : 1-16
 - 6) Patent WO 0028039-A 18-MAY-2000, VRL 16-SEP-2000
 - 7) Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., and Mishiro, S., (2000). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus : TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus., *Arch. Virol.*, **145**, 979-993
 - 8) Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E. I., and Mishiro, S., (2000). Full or near-full length nucleotide sequences of TTV variants (types SANBAN and YONBAN) and the TTV-like mini virus (TLMV)., *Intervirology*, **43**, 119-123
 - 9) 三代俊治., (1999). TTVについて. In : 藤原研司 (ed) 慢性肝炎肝硬変肝癌, 永井書店, 東京, pp370-375