

# ウイルス多様性科学 2

## サルに学ぶレトロウイルス感染症

～病原ウイルスの起源・進化と病態モデル～

京都大学 人間・環境学研究科

自然環境動態論講座

三浦 智行

- (1) レトロウイルスと分子系統解析
- (2) 白血病ウイルスの起源・進化(1)  
HTLV-1/STLV-1の系統関係と種間感  
染
- (3) 白血病ウイルスの起源・進化(2)  
コスモポリタン型HTLV-1と人類移動
- (4) エイズウイルスの起源・進化
- (5) アカゲザルによるエイズ病態モデル
- (6) サルエイズモデルを用いたワクチン開発

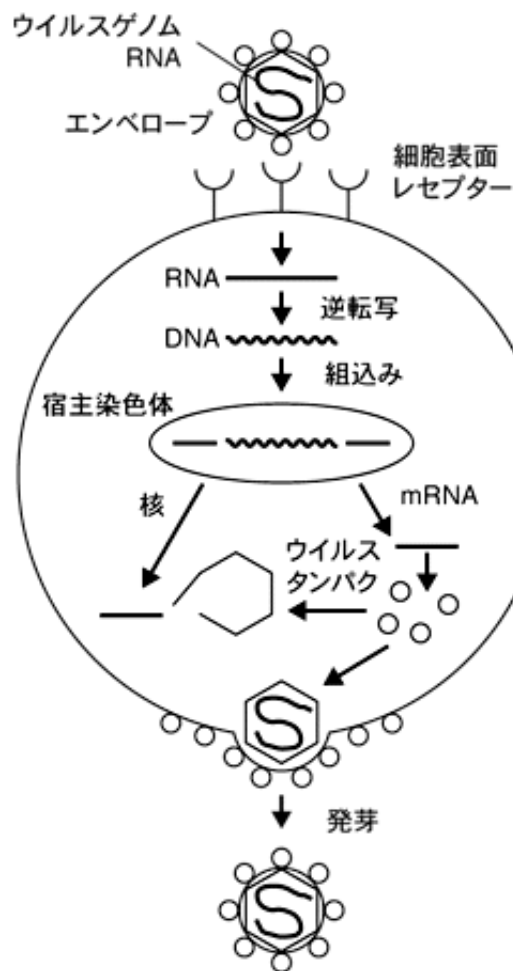
# レトロウイルスと分子系統解析

1960年代の分子生物学の発展に伴って生物の進化を遺伝子のレベルで明らかにしようとする分子進化学が生まれた。1968年に木村資生が提唱した中立説によれば、「分子レベルにおける進化的変化と多型は、主に、自然淘汰に関して、ほとんど中立で、その行動と運命が主として突然変異と偶然的浮動によって決定されるような突然変異遺伝子によるもの」である。この性質により、分子レベルでの進化は比較的一定の速度で起こり、種の系統を直接的に反映する。この性質を、「分子時計」として用いることによって、種の系統進化における分岐年代を推定する事も可能である。実際には、解析対象が限定されたり、環境からの正の選択圧を受ける場合があることに対する注意が必要であるが、基本的には塩基配列データが数多く蓄積することによって、真実により近い解釈が可能となってゆく。現在、ウイルスの起源と進化及び伝播について分子進化学的に解明しようとする試みが、インフルエンザウイルスをはじめとする多くのウイルスにおいて精力的に行われており、そのような研究は分子疫学と呼ばれている。我々の研究室では、20年以上にわたってヒトにエイズや白血病などの病気を起こすレトロウイルスの遺伝的背景について研究を行ってきた。以前は、これらのウイルスの系統関係を明らかにするためには、ウイルス分離、分子クローニング、塩基配列の決定といった、非常に労力と時間のかかる作業を経なければならなかった。しかし、1980年代になって試験管内で目的とする遺伝子の塩基配列を簡単に増幅する革新的技術（PCR法）が開発されたことにより、少量の試料からでも目的とする遺伝子の塩基配列を容易に決定できるようになり、さまざまな分野で応用されるようになった。我々も、この技術をウイルスの系統解析の研究に適用し、これまでに多くの病原性レトロウイルスの塩基配列情報を蓄積してきた。

**レトロウイルス科 (family Retroviridae)**  
**—逆転写酵素をもつプラス鎖RNAenvelopedウイルス—**

1. **オンコウイルス (Oncovirus) 亜科—腫瘍を起こす**
  - ヒトT細胞白血病ウイルス (human T -cell leukemia virus, HTLV)
  - サルT細胞白血病ウイルス (simian T-cell leukemia virus, STLV)
  - その他の動物の白血病ウイルス (leukemia virus)
    - マウス、ネコ、ウシ、ニワトリ
  - 肉腫ウイルス (sarcoma virus)
    - マウス、ネコ、サル、ニワトリ
  - 乳ガンウイルス (mammary tumor virus)
    - マウス
  
2. **レンチウイルス (Lentivirus) 亜科—エイズなどの変性疾患**
  - ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV)
  - サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus, SIV)
  - ビスナウイルス (visna virus)
  - ウマ伝染性貧血ウイルス (equine infectious anemia virus)
  
3. **スプーマウイルス (Spumavirus) 亜科—病原性不明**
  - フォーミーウイルス (foamy virus)

レトロウイルスについての簡単な説明。レトロウイルスは、3つの亜科にわけられ、ヒトに成人T細胞白血病を引き起こすヒトT細胞白血病ウイルスはオンコウイルス亜科に、エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルスはレンチウイルス亜科に属す。そして、各々類似のウイルスがヒト以外の霊長類（サル種）に感染している。レトロウイルスは、プラス鎖のRNAゲノムを持つエンベロープウイルスで、最大の特徴は、自身のゲノムの複製酵素として逆転写酵素をもち、複製の課程でゲノムRNAを鋳型としてcDNAを合成し宿主細胞のクロモソームDNAに挿入される。



出所 : [http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog\\_d.asp?C\\_ID=C1135](http://bio.takara.co.jp/catalog/catalog_d.asp?C_ID=C1135)

レトロウイルスの複製サイクルの模式図。レトロウイルスは、細胞表面にあるレセプター分子を介して吸着、侵入した後、自身の逆転写酵素により、ゲノムRNA（一本鎖）がDNA（二本鎖）に読み替えられる。ウイルスのコア蛋白やインテグラーゼ等の働きで宿主細胞の染色体DNAに組み込まれる。この状態をプロウイルスと呼び、長年にわたって潜在化した状況下で宿主細胞の遺伝子と同様に存続することができる。感染細胞の転写(mRNA、ゲノムRNA)、翻訳(蛋白)、修飾(糖鎖等)系を利用してゲノムRNAやmRNAを生成し、そこからウイルスの複製に必要な調節蛋白や構造蛋白が作られる。これらの材料が組み立てられて多数の子孫ウイルスが発芽によって産生される。

### 【研究方法の概要】



スライドにレトロウイルスの分子系統解析研究全体の概要を示す。調査地に出かけてゆき、ヒトやサルから採血し、ウイルスに対する血液中の抗体を調べ、抗体陽性検体のリンパ球からDNAを抽出し、PCR法によりウイルス遺伝子の一部を増幅する。ウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、その遺伝子情報から分子系統樹を作成し、その系統関係とウイルスが分離された宿主種と地域情報から、ウイルスの変異・進化と起原・伝播について考察する。



教授室に飾ってある世界地図。教授が実際に出かけて行ってサンプリングを行った場所に黄色のピンが刺してある。



1993年のガーナ調査時、ガーナ大学の共同研究者と野口英世博士の銅像の前で記念撮影。左端が三浦、右端が速水正憲教授。



1992年の南米コロンビア調査時の先住民からの採血風景。中央の白い帽子をかぶっているのが三浦。



2002年コンゴ共和国調査時の写真。中央で手をあげている日本人は速水教授。



2002年コンゴ共和国調査時のヒトからの採血風景。

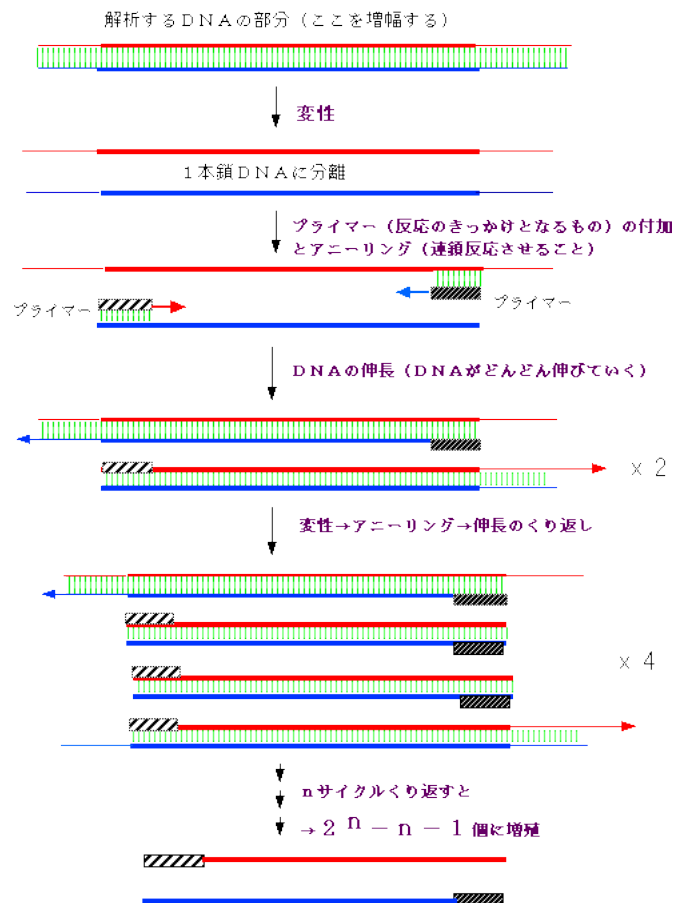


2003年のコンゴ民主共和国調査。修士の学生によるチンパンジーからの採血風景。



1995年のカメルーン調査時の写真。現地の研究室の学生やテクニシャンに技術指導も行った。

## PCR法によるDNA増幅の原理



出所: <http://www.shse.u-hyogo.ac.jp/kitamoto/Resources/DNA.html>

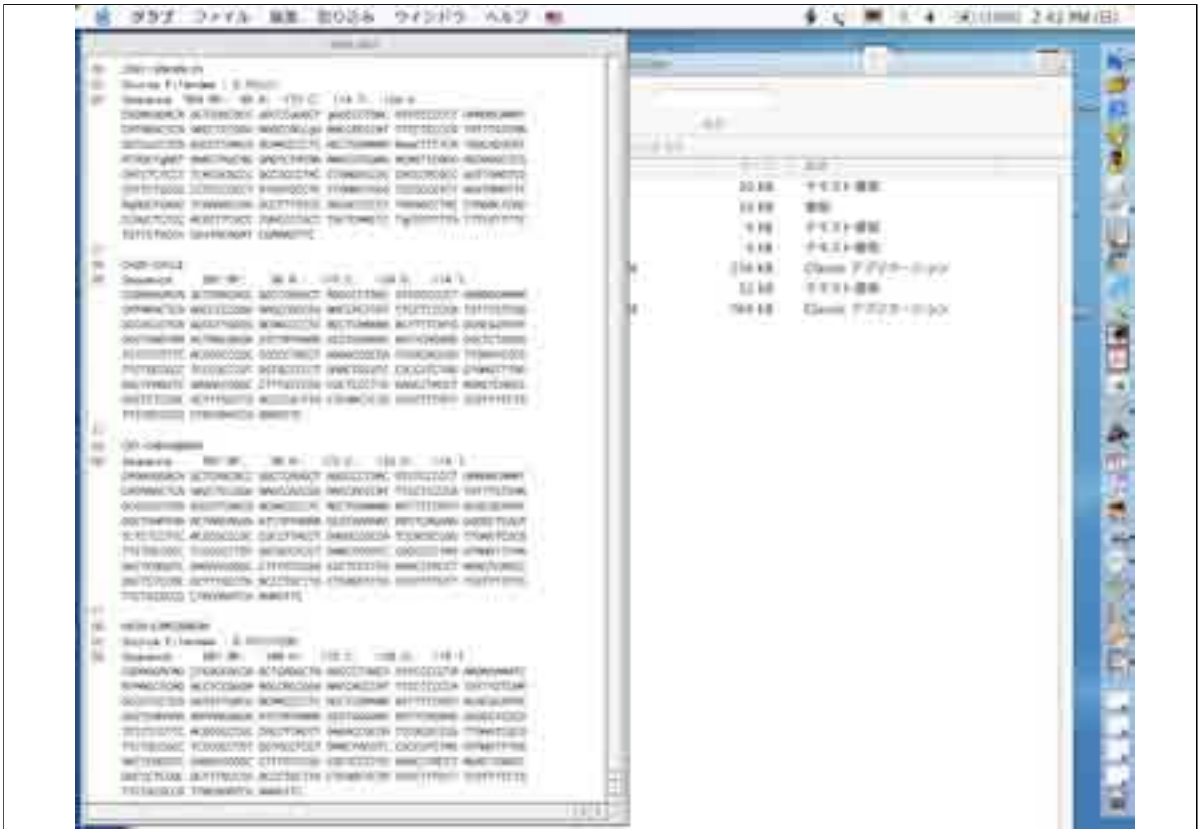
Polymerase Chain Reaction (PCR)法の原理。従来、ウイルスの系統関係を明らかにするためには、ウイルス分離、クローニング、塩基配列の決定といった、非常に労力と時間のかかる作業を経なければならなかった。ところが、近年試験管内で目的とするDNAを比較的簡単に増幅する技術が開発され、さまざまな分野で応用されるようになった。それがPCR法で、目的とするDNA領域を挟む2種のプライマー(DNA合成反応を開始する引金となる、合成開始部位に相補的な20-30塩基の一本鎖DNA)を用いて、試験管内でDNA合成酵素による鋳型特異的なDNA合成反応を繰り返すことによって、目的のDNA断片を数十万倍に増幅させる反応である。この技術をレトロウイルスの系統解析研究に応用することによって、以前には1年から2年もの歳月をかけて行ってきたことが数週間で行えるようになったのである。

# 分子系統解析

1. 塩基配列の決定
2. アラインメント
3. 遺伝的距離の推定
  - 2-パラメータ法
  - 6-パラメータ
4. 系統樹の作成
  - 近隣結合法
  - 最大節約法
  - 最尤法

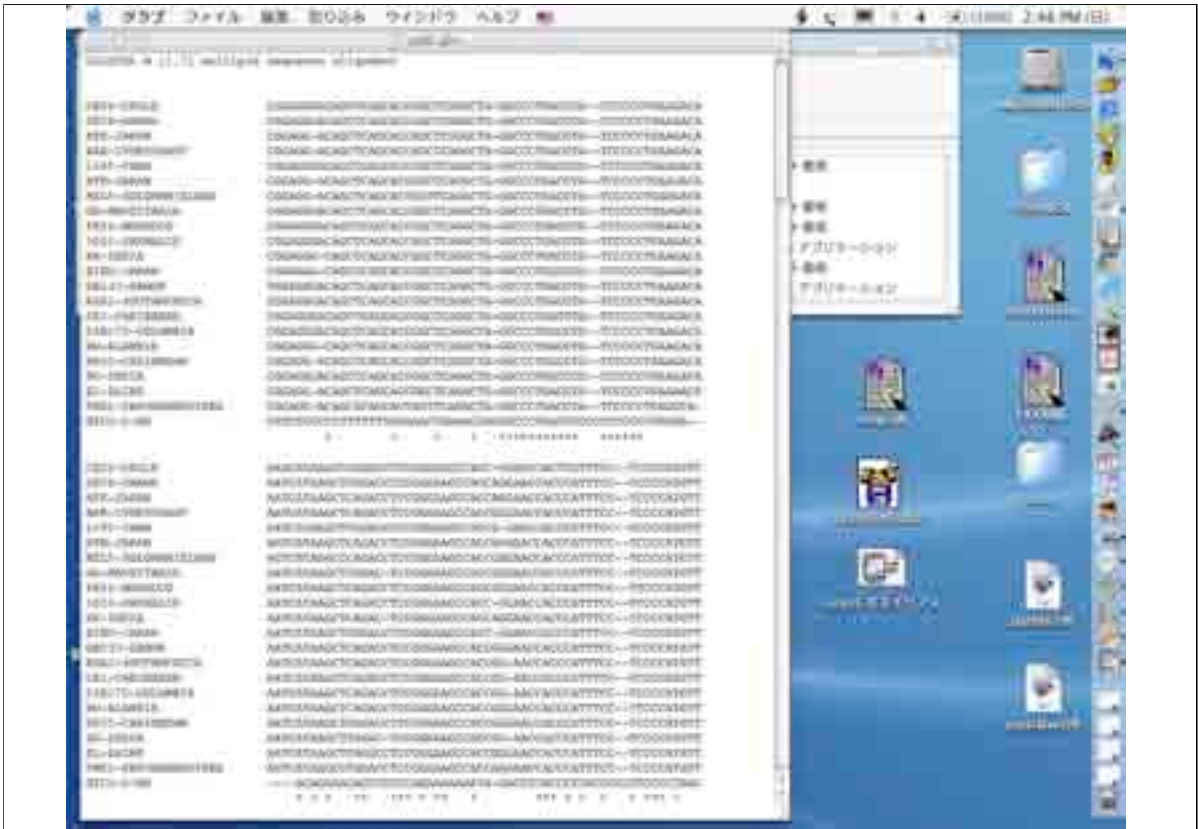
分子系統解析の説明。PCR法によって、目的とするDNA断片を十分増幅できれば、その領域の塩基配列を比較的容易に決定できる。この塩基配列データから、ウイルス株間の遺伝的距離を計算し系統樹を描くのである。しかし、一口に系統樹を描くと言っても実際には複雑な問題が絡んでくる。まず、各株間(塩基配列間)の遺伝的な距離を推定する方法が幾つか存在し、その推定値を基に系統樹を作成する方法がまた幾つか存在する。これらの方法は、一長一短があり、解析対象に応じて適したものを選ぶ必要がある。





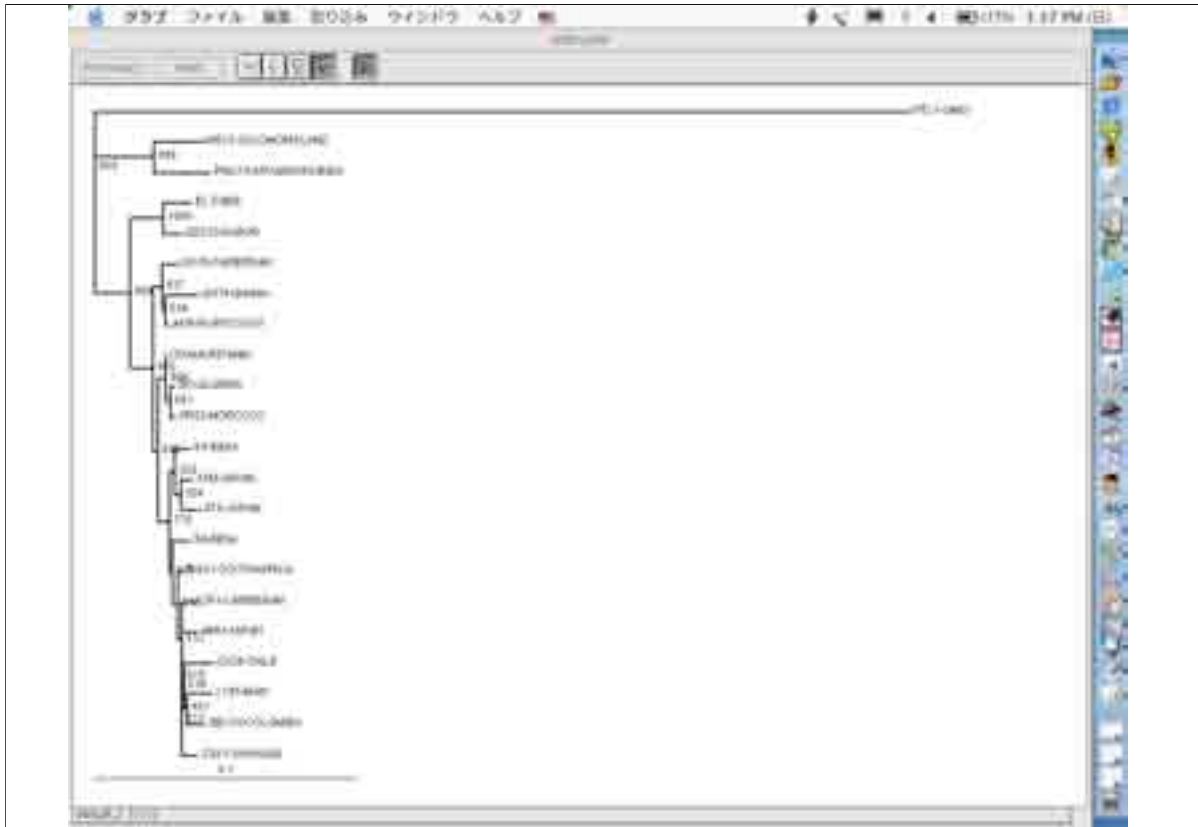
筆者本人による撮影

得られた塩基配列データを解析用フォーマットにのせる。



筆者本人による撮影

コンピュータ解析(CLUSTAL W 1.7)によるアラインメントデータの作成。時にマニュアルによる修正も必要。



筆者本人による撮影

アラインメントデータからコンピュータ解析 (TreeViewPPC) により分子系統樹を作成する。スライドは、ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)のゲノムの1部(LTR領域)について作成したものである。水平の枝の長さが互いの遺伝的距離に対応し、近縁なものどうしでクラスターを形成することから、ウイルスのサブタイピング等に利用される。