

2. RNA ウイルスと変異

佐藤 裕徳, 横山 勝

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第二室

自然界で活発に増殖する RNA ウイルスは、突然変異により絶え間なくゲノム情報を変化させる。ゲノム情報の変化は、しばしばウイルスの免疫感受性、薬剤感受性、細胞指向性、宿主域の変化につながり、予防治療効果の低下や新興再興感染症の原因となる。この“moving targets”に対処するには、ウイルスのゲノムと蛋白質の変化に関する情報が欠かせない。現在、自然界のウイルスゲノムの変異情報は急速に蓄積されつつある。一方、変異に伴う蛋白質の構造と機能の変化を実験的に検証するには未だに時間がかかる。本稿では、最も高速で変化する病原体の一つで、治療薬や免疫からの逃避能力に優れるヒト免疫不全ウイルス (HIV) を中心に、RNA ウイルスの変異研究の成果を整理する。また、近い将来、生命現象の記述や創薬に重要な役割を果たすと期待されている計算科学的手法をとりあげ、ウイルスの変異解析と創薬の支援に適用した研究を紹介する。

1. 自然界における RNA ウイルスの変異能力とそのインパクト

(1) ウイルスの変異能力の定量化：ゲノムに生じる突然変異には置換 (substitution), 挿入 (insertion), 欠失 (deletion), 重複 (duplication), 逆位 (inversion), などがある。ウイルスゲノムの易変異性を定量的に比較する尺度として最も頻繁に用いられるのは、塩基置換速度 (単位時間あたりの塩基置換率) である。第一に、塩基置換はウイルスで最も高頻度に観察される突然変異である^{1, 2)}。第二にウイルス以外の微生物や動物遺伝子での解析が進んでおり、生物間での比較が可能である³⁾。自然界におけるウイルス遺伝子の塩基置換速度は、一般には、感染者の追跡調査により得られる変異の観測値を元に推定する。あるいは近縁ウイルスの分子進化系統樹を作製し、分岐年代を特定して推定する。前者は観測期間を十分とることが難しく、後者は近縁ウイルスの分岐年代の特定が難しい。理想的には両方の解析結果を得ることが望ましい。

HIV：HIV では、上の2つの方法による解析が可能で、ほぼ一致する結果が得られている⁴⁻⁷⁾。HIV には、エイズの

世界的流行を引き起こしている HIV-1 と、散發的感染にとどまる HIV-2 があり、現在までの研究は主に HIV-1 を対象にしている。HIV-1 の遺伝子は、真核細胞生物や DNA ウイルスの遺伝子の 100 万倍以上のスピードで変異していく。この驚異的な高変異性が Hahn ら⁴⁾ によりサイエンス誌上に報告されたのは、HIV-1 が初めてエイズ患者から分離されて間もない 1986 年のことであった。この 20 年近く前の結論は、感染者とヒト集団における HIV-1 の塩基置換速度が徹底的に検証された現在においてもなお成立する。HIV-1 感染者の体内では、*env* 遺伝子の高度可変領域 (*env* V3 および V4-V5) は *gag* 遺伝子の数十倍の速度で変異を蓄積していることが判明している^{4, 5)}。すなわち塩基置換速度は平均 $1 \sim 5 \times 10^{-3}$ (*env*) と平均 1×10^{-4} (*gag*) 塩基置換/塩基/年とされる^{4, 5)}。ちなみに哺乳動物遺伝子の塩基置換速度は平均 5.5×10^{-9} 塩基置換/塩基/年と報告されている³⁾。現在では感染者の HIV-1 の塩基置換速度はウイルスの系統^{8, 9)} や病態・免疫状態¹⁰⁻¹²⁾ に影響を受けて変動することがわかっている。

SIV：HIV に最も近縁のレンチウイルスであるサル免疫不全ウイルス (SIV ; simian immunodeficiency virus) については、感染ザルの追跡調査により *env* の塩基置換速度が調べられている。その結果、平均 9×10^{-3} 塩基置換/塩基/年と、HIV-1 *env* と同程度の高変異性を示すことがわかっている¹³⁻¹⁵⁾。

HTLV：HIV と同じレトロウイルスに属する HTLV (human T-cell leukemia virus) の *gag*, *pol*, *env* 遺伝子の塩基置換速度は、世界に分布する亜株の分子進化系統解析の結果をもとに平均 $2.5 \sim 6.8 \times 10^{-7}$ 塩基置換/塩基/年と報告されている^{16, 17)}。すなわち、HIV-1 や SIV の $1/10^4$ の速度

連絡先

国立感染症研究所
病原体ゲノム解析研究センター 第二室
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1
TEL : 042-561-0771 (内線 370)
FAX : 042-567-5632
e-mail : hirosato@nih.go.jp

でしか塩基置換を蓄積しない。この値は、むしろ哺乳動物遺伝子の塩基置換速度に近く、RNA ウイルスでありながら自然界では変異しにくいウイルスの一つといえる。興味深い事に、HTLV は細胞で複製する際は HIV-1 と同等の高変異性を示す (2- (1) 複製時の変異能力の定量化 参照)¹⁸⁾。自然界での変異性が HIV-1 と大きく異なるのは、HTLV 感染では年間の複製サイクル数が著しく少ないためと考えられている。変異速度解析の結果は、「HTLV は通常は感染個体でプロウイルスとして維持され、ゲノム複製はもっぱら細胞分裂に同調して複製忠実度の高い細胞の複製用 DNA ポリメラーゼにより行われている」とする HTLV の oligoclonal expansion 説を支持する¹⁸⁾。

他の RNA ウイルス：自然界における変異速度は HIV ほど丹念に調べられておらず、一部を除き依然として実態が不明なものも多い。しかし、一般に、RNA ウイルスは HIV 同様に高変異性と考えられている。第一に、ウイルスが細胞で複製する際の変異頻度が HIV と同等で、DNA をゲノムに用いる微生物の数千倍に達する (2- (1) 複製時の変異能力の定量化 参照)。第二に、一部のレトロウイルスを除き、RNA ウイルスは宿主で活発に増殖するため、年間の複製サイクル数が多い。このため、RNA ウイルスは、自然界で最も高速に変化する能力をもつ生命体と考えられている。

(2) ウイルスの易変異性のインパクトと対策

薬剤治療：HIV-1 の易変異性は、感染者の薬剤治療効果に大きな影響を及ぼす。単剤治療の場合、薬剤の標的細胞に生じる少数の変異で、ウイルスは数週～2ヶ月ほどで耐性を獲得する。また、多剤治療においても、少数の変異セットで高度の多剤耐性を獲得する例が報告されている^{19, 20)}。さらに、欧米や日本では未治療感染者の数%がすでに耐性ウイルスを保有している。すなわち抗 HIV-1 薬の普及は、この易変異性ウイルスにとっては強力だが不完全な淘汰圧として働き、薬剤耐性株の蔓延を助長する危険性がある。

一方で、希望的観測もある。薬剤耐性変異をもつウイルスは、通常、治療前には見つからない。すなわち、耐性ウイルスは、生体内での適応度 (集団内で次世代に残すことのできる複製可能な個体数) が低下したウイルスである可能性がある²¹⁻²³⁾。そこで、既存の、あるいは新規の抗ウイルス薬を適切に組み合わせることにより、仮にウイルスが変異を蓄積して耐性を獲得してもその適応度が著しく低下するように誘導することが可能かもしれない^{24, 25)}。この人為的な定方向進化 (進化の袋小路への誘導) によりウイルスは弱毒化し、病態進行の阻止や遅延につながるかもしれない。このためには、新たな作用点をもつ薬剤の開発、様々な抗 HIV の組み合わせで生じる耐性変異とウイルス増殖能変化の情報蓄積、そして薬剤の再デザイン、といった試みを継続することが必要であろう。

ワクチン開発：HIV-1 の易変異性は、また、ワクチン開発

にも大きな影響を与える。免疫やワクチン効果の検証にはどのような株を用いればよいのか? 無限とも思える HIV-1 の変異性にも一定の制約があるのだろうか? これらの問いに明確な結論は出ていないが、抗原部位の変化にも一定の制約があることを示唆する結果が報告されている。1959 年の感染者検体に見いだされた HIV-1 の遺伝子断片の塩基配列情報をもとに、過去 60 年前後の間にヒト集団で感染が広がる間に *env* と *gag* 遺伝子全長がどの程度変化したかについて詳しく解析された。興味深い事に、塩基置換速度は平均 2.4×10^{-3} (*env*) と 1.9×10^{-3} (*gag*) 塩基置換/塩基/年と、両遺伝子ではほぼ一致する値が得られている⁶⁾。前述のように、HIV-1 は感染者の体内で免疫の主要な標的となる *env* 遺伝子の可変領域をより高速で変化させる^{4, 5)}。しかし、ヒトからヒトに伝播する際には特定の変異株集団が選択されることで変化の制約が生じているのかもしれない²⁶⁻²⁸⁾。また、持続感染時にも持続的に特定の変異株集団の選択が起きている証拠も報告されている^{8, 9, 29, 30)}。

興味深い事に、選択されるウイルスの高度可変領域 Env V3 のアミノ酸配列は病態進行に依存せず高度に保存され、感染の全時期で持続している^{8, 9, 29)}。このように、ウイルスの変化は無限ではなく、高度可変領域においてすら一定の規則に基づいて変化の制約が生じていると考えられる。ウイルスの高度可変領域の大半は中和抗体のエピトープである。その領域に、特定の変異株集団で変化の制約が生じることは、その集団では抗 V3 中和抗体の効果が遮断されていることを示唆する。この中和抗体遮断のしくみを解き明かせば、ワクチンの真の標的株が定まるとともにこれを淘汰する方法の開発につながるかもしれない。

2. 易変異性発現のしくみ

(1) 複製時の変異能力の定量化

培養細胞でウイルスが複製する際に生じる塩基置換の頻度は、ウイルスの潜在的な変異性を把握するのに役立つ。また、この変異頻度検出系は、ウイルスの変異性に影響を与える因子を検索するのに役立つ。これまでに、*lacZα* 遺伝子などを変異検出のレポーター遺伝子として用いることで、RNA ウイルスと DNA ウイルスの複製時の変異頻度が詳細に調べられている。また、HIV-1 については変異頻度に影響を与える因子の網羅的な検討が始まっている。

HIV：Manskey と Temin は、HIV-1 が細胞で 1 回だけ複製する複製系を開発し、複製あたりの突然変異頻度を解析した。その結果 3×10^{-5} 変異/塩基/複製サイクル (0.3 変異/ゲノム/複製サイクル) という数値を得ている³¹⁾。平均すると子孫ウイルスゲノムの 10 本に 3 本は新たな突然変異を有する計算になる。観察された突然変異の約 2/3 が塩基置換で、挿入・欠失の頻度は、 9×10^{-6} 挿入・欠失/塩基/複製サイクル (9×10^{-2} 挿入・欠失/ゲノム/複製サイクル) であった³¹⁾。HIV-1 は、未治療の感染者の体内で一日に 10^{10}

以上の子孫ウイルスを産生する。少なくとも 4000 万人を超すとされる感染者で日々産生される HIV-1 の変異体の総数は天文学的な数値となることが推察される。

薬剤治療時における HIV-1 変異率の変動：薬剤治療により HIV-1 の変異率が変動することが報告されている。治療時の変異率の動態に関する情報は、耐性発現を制御するための重要な基礎情報となる。しかし変異率測定系が複雑で時間がかかるため未だに散発的な情報しか無い。Mansky ら³²⁾は、HIV-1 複製時の変異率を比較的簡便に測定する系を樹立した。この系を用いて多剤併用治療に用いられる種々の逆転写酵素阻害薬、逆転写酵素の薬剤耐性変異、並びに逆転写酵素阻害薬と耐性変異の組み合わせが、ウイルス複製時の変異頻度に与える影響を網羅的に解析した。その結果、大部分の逆転写酵素阻害薬および耐性変異は変異率を昂進すること、一部の耐性変異は変異率を低下させること、逆転写酵素阻害薬と耐性変異の組み合わせは概ね相加的効果をもつことを見出した³²⁾。逆転写酵素に生じる変異や逆転写酵素と相互作用する因子は、ウイルスの変異率を有意に変動させることが明確になった。

他の RNA ウイルス：HTLV, BLV, SNV, Influenza A, poliovirus type 1, VSV, の複製時の突然変異発生頻度について、 $0.2 \sim 25 \times 10^{-5}$ 変異/塩基/複製サイクル (または $0.016 \sim 2.8$ 変異/ゲノム/複製サイクル) という数値が報告されている^{33, 34, 1, 35)}。すなわち、RNA ウイルスは、複製時には HIV-1 と同等の頻度でゲノムに変異を蓄積する能力をもつ。このことから、感染者でウイルスが活発に増殖している時期には、HIV-1 同様、膨大な数の変異体が混在していると考えられる。

他の微生物：種々のバクテリオファージについて、 $2 \sim 72 \times 10^{-8}$ 変異/塩基/複製サイクル ($3.3 \sim 4.6 \times 10^{-3}$ 変異/ゲノム/複製サイクル) という数値が報告されている³⁶⁾。また大腸菌について、 $4.1 \sim 6.9 \times 10^{-10}$ 突然変異/塩基/複製サイクル ($1.9 \sim 3.3 \times 10^{-3}$ 突然変異/ゲノム/複製サイクル) という数値が報告されている³⁶⁾。すなわち、DNA をゲノムに用いる微生物は、複製時には、RNA ウイルスの $1/10^3 \sim 1/10^5$ 程度の頻度でしか変異を蓄積しない。

(2) 易変異性発現のしくみ

RNA ウイルスが高い頻度で突然変異を導入するしくみとしては、主に以下のような可能性が提唱されている。第一に、ウイルスゲノムの複製装置のエラー導入効率が高い。第二に、ウイルスゲノム複製時に高頻度で遺伝情報の組み換えや再集合を行い、複数の変異セットを一気に獲得する。第三に、生体における複製速度と増殖効率が高い。自然界では、これらの性質が相乗的にはたらき、短期間で多くの変異体が生じると考えられている。ここでは第一と第二の点について、HIV を例にとり概説する。

複製エラーの発生過程：HIV が複製する際ゲノムに突然変

異が発生する過程には (i) ゲノム RNA の逆転写反応、(ii) 細胞分裂に伴うプロウイルス DNA の複製反応、(iii) ゲノム RNA の合成反応、の 3 種類がありうる。このうち、(i) は基質選択の忠実度 (fidelity) の極端に低いウイルスの逆転写酵素により進行するため、変異発生に主要な寄与をしていると考えられている^{37, 38)}。また、近年、逆転写反応過程での変異導入に宿主因子が関与している可能性も示唆されている。すなわち、シチジンデアミナーゼ活性を有する APOBEC3G には、HIV-1 および様々なレトロウイルスの新鎖 DNA 合成時に G → A 変異を高頻度に導入する活性があることが判明している^{39, 40)}。ただし、この活性はウイルスには致命的で、HIV-1 感染ではウイルスの Vif 蛋白質の働きで抑制されている^{40, 41)}。このため、HIV-1 ゲノムの変異発生に対する寄与率について明確な解答は得られていない。(ii) は、複製エラーの修復機能を有し、忠実度の高い細胞のゲノム複製用 DNA ポリメラーゼ (replicative DNA polymerase)⁴²⁾ により進行するので、変異発生にはほとんど寄与していないとされる。(iii) は、複製エラーの修復機能を有していない RNA ポリメラーゼ II により進行するので、エラー発生に貢献している可能性がある。しかし、今の所 HIV-1 ゲノムの変異発生に対する寄与は不明である。このように、突然変異の発生過程には、なおあまいな点が残されている。しかし、現時点では HIV の複製過程に生じる変異の大部分は (i) の逆転写反応で生じると考えられている。培養細胞を用いた HIV-1 増殖系における突然変異の種類と頻度³¹⁾ は、精製した HIV 逆転写酵素によるそれ⁴⁰⁻⁴²⁾ をよく反映していることが主な根拠となっている。

レトロウイルス逆転写酵素の忠実度：一般に、細胞のゲノム複製を専門とする DNA ポリメラーゼのエラー導入効率は、 $0.1 \sim 6.2 \times 10^{-6}$ エラー/塩基と非常に低い⁴²⁾。HIV-1 逆転写酵素のエラー導入効率は、レトロウイルスの逆転写酵素の中でも最も高く^{37, 38, 43, 44)}、DNA 合成時に $2.5 \sim 6 \times 10^{-4}$ 塩基置換/塩基の頻度で誤った塩基を導入する^{37, 38)}。この頻度は、例えば AMV あるいは MLV の逆転写酵素の約 10 倍高い (それぞれ 6×10^{-5} , 3×10^{-5} 塩基置換/塩基)。HIV-1 のゲノムサイズは約 10,000 塩基弱であるから、1 回ゲノムを合成する間に $2.5 \sim 6$ 箇所塩基置換が発生する計算になる。さらに HIV-1 の逆転写酵素は、ミスマッチが生じている鋳型/プライマー複合体の 3' 末端を伸長する活性が哺乳動物 DNA ポリメラーゼ α より約 50 倍も高い⁴⁵⁾。HIV-1 逆転写酵素の忠実度の鋳型配列依存性も詳しく調べられており、鋳型が RNA でも DNA でも同様の高い変異導入活性をもつことがわかっている⁴⁶⁾。ただし塩基置換に関しては RNA を鋳型とした時のほうが約 10 倍高い忠実度を有する⁴⁷⁾。塩基置換は周辺の配列にも依存し、発生率が平均値の 100 倍以上にも達する塩基置換の“hot spot”も観察されている⁴³⁾。これらの結果から、HIV-1 の逆転写酵素

による DNA 複製の忠実度は、ゲノム複製を専門とする DNA ポリメラーゼの中で最も低いものの一つと考えられている。

逆転写酵素の忠実度が低い理由：一般には、HIV をはじめレトロウイルスの逆転写酵素には、校正機能（3'-5'エクソヌクレアーゼ活性）がないためと解釈されている。しかし、理由はそれだけではないかもしれない。例えば、逆転写酵素と人為的に 3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を欠失させた酵素との間で忠実度を比較すると、依然として $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-7}$ エラー/塩基と大きな差がある⁴²⁾。また、3'-5'エクソヌクレアーゼ活性があっても、忠実度の向上は高々平均 10 倍程度にとどまるとの報告もある⁴⁸⁾。これらのことから、それぞれの酵素の忠実度の高低を決めているのは、おもにそれぞれの酵素の基質選択性に優劣があるためと推察される^{42, 48)}。したがって、HIV の逆転写酵素の忠実度が低いのも、校正機能の欠如に加え、この酵素の基質選択性が著しく劣ることが原因となっているのかもしれない。一般に、ゲノム複製を専門とする DNA ポリメラーゼの基質選択性は高く、本来の基質をそうでないものの 10^5 倍の正確さで酵素に取り込む⁴⁸⁾。どのようにしてこの高度の基質選択性が生じるのかについては、酵素の反応速度解析と基質・酵素複合体の立体構造をもとに、分子・原子レベルでかなり明確に議論できるようになっている^{42, 48)}。

遺伝情報の組み換え：HIV の高変異性発現の第二の鍵は、ゲノム情報の組み換えである。HIV 粒子には 2 本のウイルスゲノムが取り込まれる。逆転写酵素は、それぞれの一部を DNA 合成の鋳型に用いることでゲノム情報を組み換える。HIV-1 が一回複製するときのゲノム組み換え頻度は、2 ~ 3 回/ゲノム/複製サイクルと報告されている⁴⁹⁾。より最近の研究では、HIV-1 逆転写酵素による鋳型の組み換えの頻度は MLV や SNV 逆転写酵素の 10 倍高く、1kbp 以上離れた領域は約 40 ~ 50% の頻度で、100bp 離れた領域でも 12% の頻度で組換えがおきることが判明している^{50, 51)}。さらに、この組み換え反応は、HIV-1 が、主要標的細胞である T 細胞とマクロファージのどちらで複製する場合にも高い頻度で観察される⁵²⁾。これらの結果から、生体内の HIV-1 感染でも、新たな子孫ウイルスは全て組み換え体となっていることが推察される。

HIV / SIV は、ゲノム組み換えにより、致死の変異あるいは適応度の低下をもたらす変異の生じたゲノムを速やかに救出することができる^{53, 54)}。また、抗 HIV 剤存在下で、複数の変異により生じる高度耐性株を速やかに生み出す原因となる⁵⁵⁻⁵⁷⁾。さらには、感染者の異なった組織の増殖に適応した変異株を生み出す可能性もある⁵⁸⁾。このように、遺伝的組み換えは、遺伝情報の“shuffling”によりゲノムの複製エラーで生じた一連の変異セットを一気に獲得し、子孫の遺伝情報をより高速度で変化させる役割があると考えられている。組み換えはまた、突然変異に依存せず、

全く新しい形質を獲得するのにも役立つ。例えば、レトロウイルスや他の RNA ウイルスの中には、組み換えを用いて細胞の遺伝情報の一部を獲得し、ウイルスの生物活性あるいは病原性を劇的に変化させる例が報告されている^{59, 60)}。

3. ゲノム変異解析から蛋白質構造機能変化の解析へ

これまでのウイルスの変異研究は、ゲノム塩基配列の解析とウイルスの形質の解析が中心であった。これらの情報は全てのウイルス研究の出発点で、将来も変わらずに重要である。しかし、ウイルスの形質発現に直接関わる分子の多くは蛋白質である。変異によるウイルスの変化を理解するには、ウイルス蛋白質の構造・機能とその変化を理解する必要がある。また、そこで得られた情報は、創薬やワクチン開発に結びつく。しかし、従来の蛋白質科学の方法論のみでは、自然界のウイルスから得られる膨大な変異情報に対応することは難しい。新たな方法論の構築が必要となる。

現在、計算機を用いて生体高分子の立体構造予測、蛋白質と低分子化合物あるいは蛋白質間の結合シミュレーション、さらには蛋白質間ネットワークや細胞・生体機能のシミュレーションを高い精度で行うための方法を研究する学問分野が急速に発展している。これらの分野は、まとめて計算科学 (computational science あるいは *in silico science*) と呼ばれる。この分野で研究されている様々な方法論のうち、蛋白質の立体構造予測 (ホモロジーモデリング) と蛋白質-低分子化合物の結合シミュレーションについては実験で得られる結果と遜色ない精度で実行できる状況が達成されつつある。ここでは、計算科学の諸手法のうち特にウイルス蛋白質の構造機能変化の解析と創薬の支援に有用なホモロジーモデリング法とその適用例を紹介する。

(1) ホモロジーモデリング法

蛋白質の立体構造データベース Protein Data Bank [<http://www.rcsb.org/pdb/>]にはすでに 33152 (2005 年 10 月 18 日現在) の構造が登録されている。今まさに世界各地で大規模の蛋白質構造決定プロジェクトが進行しており、登録数は今後も急速に増大することが予測されている。ホモロジーモデリング法は、このデータベースに登録されている 3 次元構造情報をもとに配列の類似する蛋白質の構造を予測する方法である。アミノ酸の配列が類似している蛋白質同士は、分子構造も類似しているという原理^{61, 62)} を利用している。既知の分子構造でアミノ酸配列が類似している構造があれば、その構造を鋳型として未知の分子モデルを構築することができる。また得られたモデルの適切な評価法も開発されている^{63, 64)}。現在では、ホモロジーモデリングにより精度の高い蛋白質モデルを構築することのできるソフトウェアが多数開発されている。代表的なものに MOE (CGC, Inc), InsightII (Accelrys, Inc), MODELLER⁶⁵⁾ などが

ある。

ホモロジーモデリング法では、アミノ酸配列一致度が高いほど、より精度の高い分子モデルを構築することができる^{66, 67)}。多くの場合、鋳型との配列一致度が50%以上あればX線結晶構造と1 Å程度の誤差範囲で一致する⁶⁷⁾。結晶構造の解像度が1~3 Å程度であることを考慮すれば、実験誤差の範囲といえる。また、一般的には、鋳型との配列類似度が30%以上あれば、得られたモデルのうち約90%が主鎖の誤差が1.5~3 Å程度のモデルが得られる⁶⁷⁾。特筆すべきは、得られたモデルは、その精度が高ければ反応機構、リガンドのデザインや改善、結合シミュレーションなどの研究に利用できる^{66, 67)}。経験的に活性中心近傍の構造は他の部位に比べて保存されており、モデルの精度が高い傾向があるためである。すなわち、配列類似度が30%以上あれば、分子モデルを計算機を用いた阻害剤のスクリーニングや部位特異的変異導入解析の支援に使える。さらに、配列類似度が30%以下でも、アミノ酸アライメントを手動で調節する⁶⁸⁾、あるいは分子動力学法によってエネルギー的により安定な構造を得る⁶⁹⁾ことでモデルの精度は改善される。

(1) ホモロジーモデリング法の適用例

ホモロジーモデリング法は、ウイルスゲノムの変異情報をもとに変異体蛋白質の立体構造変化を検討していくのに適した方法と考えられる。前述のように適切な鋳型をもとに作られたモデルの精度は、実験で得られる構造の精度と同程度の水準まで向上している⁶⁷⁾。精度の高いモデルは、構造変化の解析に用いられるだけでなく、既に実用化段階にある蛋白質と低分子化合物の結合シミュレーション法と組み合わせる事で、創薬や機能変化予測にも適用できる。蛋白質間の結合シミュレーション法が実用化段階に達すれば、適用範囲がさらに広がる。難点は、モデル作製に類似蛋白質の結晶構造を必要とすることにある。しかし、鋳型に使える結晶構造の数が今後急速に増加していくことが予測されるため、将来的にはこの問題は解決されるであろう。以下に、ホモロジーモデリング法をウイルス研究に適用した研究を紹介する。

HIV-1の変異率研究：逆転写酵素構造³²⁾ (図1A)

2-(1)の章で、逆転写酵素阻害薬および逆転写酵素の薬剤耐性変異はHIV-1の変異率を変動を誘導することを述べた³²⁾。このしくみを検討するために、逆転写酵素の立体構造モデルを作製し、変異に伴う構造変化ならびに基質と薬剤の結合部位を検討した。その結果をもとに、全ての実験結果を矛盾無く説明できるモデルを提唱した³²⁾。

HIV-1の膜融合研究：外被蛋白質 Gp41 構造⁷⁰⁾ (図1B)

HIV-1外被蛋白質 Env Gp41は、3量体を形成してウイルスの標的細胞への膜融合に関与する。木ノ本ら⁷⁰⁾は、Env Gp41の36番目のアミノ酸(エクストドメインNヘリ

ックスに位置する)が、ウイルスの感染性を保持しつつ膜融合能を効率的に制御する残基として働くことを見出した。このしくみを検討するために、野生株と低融合活性変異株のGp41エクストドメイン3量体の分子モデルを構築して比較した。その結果、変異したアミノ酸の側鎖がGp41構造変化の際の立体障害となる事を見だし、膜融合能の低下を矛盾無く説明するモデルを提唱した⁷⁰⁾。

HIV-1亜株の薬剤感受性の研究：サブタイプ A/G プロテアーゼ構造⁷¹⁾ (図1C)

木ノ本ら⁷⁰⁾は、HIV-1のガーナ流行株(CRF02_AG)が、欧米の流行株(subtype B)をもとにデザインされたプロテアーゼ阻害剤の一部に低感受性であることを示した。両株のプロテアーゼホモダイマーの分子モデルを構築し、薬剤の結合シミュレーションを行った。その結果、CRF02_AGプロテアーゼでは一部の薬剤の結合エネルギーが低下し、加えて結合時の阻害剤の構造に親和性低下につながる歪みが生じることが示唆された⁷⁰⁾。

HIV-1 薬剤耐性の研究：プロテアーゼ構造

HIV-1プロテアーゼの阻害剤ネルフィナビル(NFV)による治療に失敗した患者ではしばしばウイルスのプロテアーゼにD30N, N88D, L90Mの変異が見られる。大出ら⁷²⁾は野生株、および変異体の分子動力学計算を行い、プロテアーゼの活性中心から離れた位置に生じる変異が活性中心の構造変化とNFV親和性の変化を誘導することを明らかにした。

HBV 薬剤耐性：RNA ポリメラーゼ構造⁷³⁾

HBV感染者の薬剤治療(3TCなどのヌクレオシド類似体)においてしばしば薬剤耐性ウイルスが出現する。Dasら⁷³⁾はHBVのRNAポリメラーゼの活性中心近傍の3次元分子モデルをHIV-1逆転写酵素を鋳型にして構築し、このモデルを用いて変異したアミノ酸の側鎖と3TCやFTCなどとの間に立体障害が生じる事を見だし、耐性の発現を矛盾無く説明するモデルを提唱した。

WNV プロテアーゼの基質認識機構と創薬研究：プロテアーゼ構造⁷⁴⁾

WNVのプロテアーゼNS2B/NS3は、治療薬の標的として注目されている。Chappelら⁷⁴⁾は、酵素と基質の相互作用に関わる残基を同定するために、NS3プロテアーゼの変異導入解析と反応速度解析を行った。実験で同定された鍵となる残基の機能を検証するために、ホモロジーモデリング法によりデングウイルスのNS3プロテアーゼを鋳型としてNS3プロテアーゼの分子モデルを構築した。結果をもとにこれらの残基が基質の認識と触媒効率の決定に関わる可能性を示唆した。

HCV 変異株のプロテアーゼ構造⁷⁵⁾

抗HCV薬の標的分子の候補としてNS3プロテアーゼがある。Silveiraら⁷⁵⁾はこのNS3プロテアーゼ変異体の阻害剤を開発するために計算化学的手法により分子モデルを

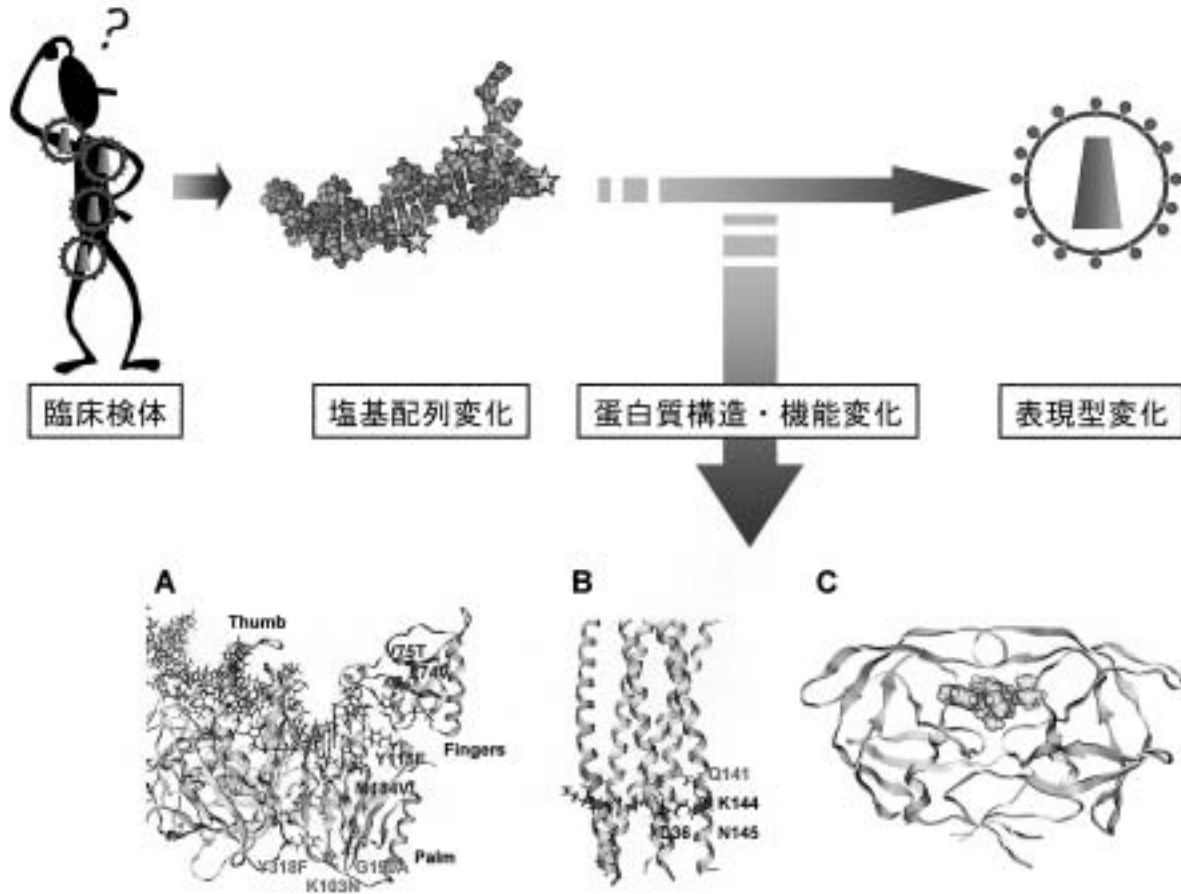


図1 RNA ウイルスと変異. 自然界で活発に増殖する RNA ウイルスは, 変異により絶え間なくゲノム情報と蛋白質を変化させ, その形質を変える. ウイルスの変化に対処するには, ゲノムと蛋白質の変化に関する情報が欠かせない. 計算科学的手法が進展すれば, ウイルス分子の変化をより迅速に把握することができるかもしれない. (A) HIV-1 逆転写酵素 (B) HIV-1 Env Gp41 エクトドメイン 3 量体 (C) HIV-1 CRF_02 A/G プロテアーゼ. それぞれホモロジーモデリング法で作製した変異体分子の立体構造. 構造変化に基づき変異体分子の活性変化を説明した^{32, 70, 71}.

構築し, Web 上で公開している.

おわりに

自然界におけるウイルスの進化を理解するのに, これまでは主にゲノム情報に依存していた. 計算科学が進展すれば, 蛋白質情報を取り入れてウイルスの変化を記述することが可能となろう. 計算科学はまた, 実験科学と適切に協調していくことにより, ウイルスの分子進化のみならず, あらゆる生命現象の理解を深めていくのに重要な役割を果たすようになるかもしれない.

文 献

- 1) Pathak VK, Temin HM: Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: deletions and deletions with insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6024-6028, 1990.
- 2) Pathak VK, Temin HM: Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6019-6023, 1990.
- 3) Li W-H, Graur D: *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Inc. Mass. USA1991.
- 4) 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: 1548-1553, 1986.
- 5) Balfe P, Simmonds P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ: Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 in patients infected from the same source: rate of sequence change and low frequency of inactivating mutations. *J Virol* 64: 6221-6233, 1990.
 - 6) Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T: Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-1796, 2000.
 - 7) Gojobori T, Moriyama E, Kimura M: Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 10015-10018, 1990.
 - 8) Sato H, Shiino T, Kodaka N, Taniguchi K, Tomita Y, Kato K, Miyakuni T, Takebe Y: Evolution and biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 subtype E gp120 V3 sequences following horizontal and vertical virus transmission in a single family. *J. Virol.* 73: 3551-3559, 1999.
 - 9) Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H: A Group of V3 Sequences from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E Non-Syncytium-Inducing, CCR5-Using Variants Are Resistant to Positive Selection Pressure. *J. Virol.* 74: 1069-1078, 2000.
 - 10) Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI: Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 71: 7498-7508, 1997.
 - 11) Shpaer E, Delwart E, Kuiken C, Goudsmit J, Bachmann M, Mullins J: Conserved V3 loop sequences and transmission of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1679-1684, 1994.
 - 12) Lukashov V, Kuiken C, Goudsmit J: Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period. *J. Virol.* 69: 6911-6916, 1995.
 - 13) Burns DP, Desrosiers RC: Selection of genetic variants of simian immunodeficiency virus in persistently infected rhesus monkeys. *J Virol* 65: 1843-1854, 1991.
 - 14) Johnson PR, Hamm TE, Goldstein S, Kitov S, Hirsch VM: The genetic fate of molecularly cloned simian immunodeficiency virus in experimentally infected macaques. *Virology* 185: 217-228, 1991.
 - 15) Overbaugh J, Rudensey LM, Papenhausen MD, Benveniste RE, Morton WR: Variation in simian immunodeficiency virus env is confined to V1 and V4 during progression to simian AIDS. *J Virol* 65: 7025-7031, 1991.
 - 16) Yanagihara R, Saitou N, Nerurkar VR, Song KJ, Bastian I, Franchini G, Gajdusek DC: Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41: S145-161, 1995.
 - 17) Salemi M, Vandamme AM, Gradozzi C, Van Laethem K, Cattaneo E, Taylor G, Casoli C, Goubau P, Desmyter J, Bertazzoni U: Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using isolates from European injecting drug users. *J Mol Evol* 46: 602-611, 1998.
 - 18) Mansky LM: In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J Virol* 74: 9525-9531, 2000.
 - 19) Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Chokekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, et al.: Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2398-2402, 1995.
 - 20) 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: 5604-5613, 2001.
 - 21) Back NK, Nijhuis M, Keulen W, Boucher CA, Oude Essink BO, van Kuilenburg AB, van Gennip AH, Berkhout B: Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *Embo J* 15: 4040-4049, 1996.
 - 22) Mammano F, Petit C, Clavel F: Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 72: 7632-7637, 1998.
 - 23) Zennou V, Mammano F, Paulous S, Mathez D, Clavel F: Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. *J Virol* 72: 3300-3306, 1998.
 - 24) Berkhout B: HIV-1 evolution under pressure of protease inhibitors: climbing the stairs of viral fitness. *J Biomed Sci* 6: 298-305, 1999.
 - 25) Clavel F, Race E, Mammano F: HIV drug resistance and viral fitness. *Adv Pharmacol* 49: 41-66, 2000.
 - 26) Wolinsky SM, Wike CM, Korber BTM, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Munoz JL: Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255: 1134-1137, 1992.
 - 27) Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJL, Simmonds P: Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J. Virol.* 67: 3345-3356, 1993.
 - 28) Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD: Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* 261: 1179-1181, 1993.
 - 29) Ida S, Gatanaga H, Shioda T, Nagai Y, Kobayashi N, Shimada K, Kimura S, Iwamoto A, Oka S: HIV type 1 V3 variation dynamics in vivo: long-term persistence

- of non-syncytium-inducing genotypes and transient presence of syncytium-inducing genotypes during the course of progressive AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 1597-1609, 1997.
- 30) Yamashita A, Yamamoto N, Matsuda J, Koyanagi Y: Cell type-specific heterogeneity of the HIV-1 V3 loop in infected individuals: selection of virus in macrophages and plasma. *Virology* 204: 170-179, 1994.
 - 31) Mansky LM, Temin HM: Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69: 5087-5094, 1995.
 - 32) Chen R, Yokoyama M, Sato H, Reilly C, Mansky LM: Human immunodeficiency virus mutagenesis during antiviral therapy: impact of drug-resistant reverse transcriptase and nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 mutation frequencies. *J Virol* 79: 12045-12057, 2005.
 - 33) Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P: Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 59: 377-383, 1986.
 - 34) Drake JW: Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4171-4175, 1993.
 - 35) Mansky LM, Temin HM: Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J Virol* 68: 494-499, 1994.
 - 36) Drake JW: A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7160-7164, 1991.
 - 37) Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA: Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242: 1168-1171, 1988.
 - 38) Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA: The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171-1173, 1988.
 - 39) Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L: The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424: 94-98, 2003.
 - 40) Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D: Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424: 99-103, 2003.
 - 41) Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH: DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113: 803-809, 2003.
 - 42) Kunkel TA, Bebenek K: DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69: 497-529, 2000.
 - 43) Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA: Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 264: 16948-16956, 1989.
 - 44) Roberts JD, Preston BD, Johnston LA, Soni A, Loeb LA, Kunkel TA: Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Mol Cell Biol* 9: 469-476, 1989.
 - 45) Perrino FW, Preston BD, Sandell LL, Loeb LA: Extension of mismatched 3' termini of DNA is a major determinant of the infidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8343-8347, 1989.
 - 46) Ji JP, Loeb LA: Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase copying RNA in vitro. *Biochemistry* 31: 954-958, 1992.
 - 47) Boyer JC, Bebenek K, Kunkel TA: Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6919-6923, 1992.
 - 48) Patel PH, Loeb LA: Getting a grip on how DNA polymerases function. *Nat Struct Biol* 8: 656-659, 2001.
 - 49) Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP: High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74: 1234-1240, 2000.
 - 50) Rhodes T, Wargo H, Hu WS: High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J Virol* 77: 11193-11200, 2003.
 - 51) Rhodes TD, Nikolaitchik O, Chen J, Powell D, Hu WS: Genetic recombination of human immunodeficiency virus type 1 in one round of viral replication: effects of genetic distance, target cells, accessory genes, and lack of high negative interference in crossover events. *J Virol* 79: 1666-1677, 2005.
 - 52) Chen J, Rhodes TD, Hu WS: Comparison of the genetic recombination rates of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages and T cells. *J Virol* 79: 9337-9340, 2005.
 - 53) Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R: Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* 63: 1455-1459, 1989.
 - 54) Wooley DP, Smith RA, Czajak S, Desrosiers RC: Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. *J Virol* 71: 9650-9653, 1997.
 - 55) Kellam P, Larder BA: Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol* 69: 669-674, 1995.
 - 56) Moutouh L, Corbeil J, Richman DD: Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6106-6111, 1996.
 - 57) Yusa K, Kavlick MF, Kosalaraksa P, Mitsuya H: HIV-1 acquires resistance to two classes of antiviral drugs through homologous recombination. *Antiviral Res* 36: 179-189, 1997.
 - 58) Morris A, Marsden M, Halcrow K, Hughes ES, Brettell RP, Bell JE, Simmonds P: Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. *J Virol* 73: 8720-8731, 1999.
 - 59) Khatchikian D, Orlich M, Rott R: Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 340: 156-157, 1989.

- 60) Charini WA, Todd S, Gutman GA, Semler BL: Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J Virol* 68: 6547-6552, 1994.
- 61) Chothia C, Lesk AM: The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo J* 5: 823-826, 1986.
- 62) Lecomte JT, Vuletich DA, Lesk AM: Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Curr Opin Struct Biol* 15: 290-301, 2005.
- 63) Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D: A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253: 164-170, 1991.
- 64) Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356: 83-85, 1992.
- 65) Sali A, Blundell TL: Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815, 1993.
- 66) Sanchez R, Pieper U, Melo F, Eswar N, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Mirkovic N, Sali A: Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol* 7 Suppl: 986-990, 2000.
- 67) Baker D, Sali A: Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294: 93-96, 2001.
- 68) Koehl P, Levitt M: A brighter future for protein structure prediction. *Nat Struct Biol* 6: 108-111, 1999.
- 69) Fan H, Mark AE: Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Sci* 13: 211-220, 2004.
- 70) Kinomoto M, Yokoyama M, Sato H, Kojima A, Kurata T, Ikuta K, Sata T, Tokunaga K: Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol* 79: 5996-6004, 2005.
- 71) Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, Yokoyama M, Nii-Trebi N, Ugly-Kwame E, Sato H, Ofori-Adjei D, Kurata T, Barre-Sinoussi F, Sata T, Tokunaga K: HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 41: 243-251, 2005.
- 72) Hirota Ode MO, Saburo Neya, Masayuki Hata, Wataru Sugiura, and Tyuji Hoshino: Resistant Mechanism against Nelfinavir of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteases. *J. Phys. Chem. B* 109: 565-574, 2005.
- 73) Das K, Xiong X, Yang H, Westland C, Gibbs C, Sarafianos S, Arnold E: Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J. Virol.* 75: 4771-4779, 2001.
- 74) Chappell K, Nall T, Stoermer M, Fang N, Tyndall J, Fairlie D, Young P: Site-directed mutagenesis and kinetic studies of the West Nile Virus NS3 protease identify key enzyme-substrate interactions. *J. Biol. Chem.* 280: 2896-2903, 2005.
- 75) da Silveira N, Arcuri H, Bonalumi C, de Souza F, Mello I, Rahal P, Pinho J, de Azevedo WJ: Molecular models of NS3 protease variants of the Hepatitis C virus. *BMC Struct Biol.* 5: 1, 2005.

RNA viruses and mutations

Hironori SATO and Masaru YOKOYAMA

Center for Pathogen Genomics, National Institute of Infectious Diseases

Gakuen 4-7-1, Musashi Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

E-mail: hirosato@nih.go.jp

Actively replicating RNA viruses in nature are continually changing their genetic information by spontaneous mutations. These changes often result in alterations in immune-sensitivity, drug-sensitivity, cell-tropism, and host-range, causing uncontrollability of the pathogen and emerging/re-emerging infections. To better understand the virus changes and develop effective methods to control the moving targets, it is essential to obtain information on changes in viral genomes and proteins. Although information on genetic changes is being accumulated very rapidly, assessment of changes in protein structure and function still requires time-consuming works. In this review, we will overview mutation studies of human immunodeficiency virus and other RNA viruses. In addition, we will introduce recent advances in the computational science and its application on mutation studies and drug development.