

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82691

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04065

研究課題名(和文)水環境中の未知ウイルス発見のための選択的メタゲノム解析技術の開発

研究課題名(英文) Selective metagenomic analysis of novel viruses in water environment

研究代表者

真砂 佳史 (Masago, Yoshifumi)

国際連合大学サステナビリティ高等研究所・サステナビリティ高等研究所・リサーチフェロー

研究者番号：50507895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は効率的な新興病原ウイルスの発見に適した検出手法の開発を目標とした。下水中のウイルスゲノム群から解析対象のゲノムのみを選択的に回収し、次世代シーケンシング法によりその塩基配列を決定することで、下水中の存在量が低いウイルスであってもゲノム解析を可能にする手法を開発した。また、下水中のウイルスを対象としたメタゲノム解析を行い、得たほとんどの配列がデータベースに近縁配列がないことを確認した。メタゲノムで得た塩基配列で得た塩基配列をもとに、未知のウイルスによると考えられるコンティグを作成し、その配列を持つウイルスゲノムが国内下水に常在する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at developing effective detection methods for novel human RNA viruses from domestic wastewater using selective metagenomic analysis. Capture probe-based selection followed by next-generation sequencing using illumina MiSeq platform enabled to detect virus genome with relatively low concentration in wastewater. Viral metagenomic analysis revealed that most viral genome sequences are not homologous to any sequences in the database. Based on the metagenome, we constructed contigs that are expected to be from novel viruses. We also confirmed that virus genome with the contig sequence are present in wastewater samples throughout the study period.

研究分野：環境工学

キーワード：ウイルス 下水 メタゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

新興病原ウイルスの早期発見・分離は感染症の診断や治療に不可欠であることは言うまでもない。2009年の新型インフルエンザウイルス(Influenza A (H1N1) 2009 pdm 株)、2012年の新型ノロウイルス(Norovirus GII.4 2012 Sydney 亜型)の流行などを見ても明らかのように、病原ウイルスは世界中で絶えず進化を繰り返し、新たな感染症の流行を招いている。このような状況において、新しい病原ウイルスを迅速に発見することは、感染症対策を講じる上で最も重要な要素である。

消化器感染症の原因ウイルスの多くは感染者の糞便と共に放出され、下水中に集積される。したがって、下水中の病原ウイルスを検出することで、流行している病原ウイルスを効率的に発見することが可能である。このような環境水からの病原体検出による感染症モニタリングは、すでに一部で実用化されている。

近年、次世代シーケンシング技術の進歩とともに、下水に存在するウイルスを網羅的に解析するメタゲノム解析についての研究が進められている。しかし下水試料中には多種多様なウイルスが存在しており、またほとんどのウイルスは同定不能な未知のウイルスであるため、個々のウイルスについて得られる配列数が極めて少なく、解析の妨げとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究は、感染症対策を講じる上で必須の要素である迅速かつ効率的な新興病原ウイルスの検出手法の開発を目標とした。メタゲノム解析により得ることのできる配列数は、そのウイルスの相対的な存在量に強く依存する。そこで、下水中の雑多なウイルスゲノム群から解析対象のゲノムのみを選択的に回収し、次世代シーケンシング法によりその塩基配列を決定することで、下水中の存在量が低いウイルスであってもゲノム解析を可能になると考えた。また、開発した手法を国内の都市下水に適用することで、本手法の実用性を評価し、新規技術としての確立を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究は下の3つの要素からなる。

1) ウイルスゲノムの選択的回収技術の開発  
多様なウイルスゲノムを含む試料から解析対象のウイルスゲノムのみを選択的に回収する手法を開発した。回収には細菌遺伝子の蛍光標識等に用いられているハイブリダイゼーション法を応用した。対象ウイルスゲノムにのみ結合するプローブの設計、ハイブリダイゼーション条件の最適化、結合したウイルスゲノムの回収方法の検討等が必要である。

## 2) 下水中のウイルスのメタゲノム解析

国内の下水処理場にて2015-2016年に採取した流入下水を対象に、既知の多くのヒト消化器ウイルスが属する1本鎖+鎖RNAウイルスを対象としたメタゲノム解析を行った。下水試料をPEG沈殿法および超遠心分離によりウイルスを再度濃縮した後、3'末端のポリA鎖を標的に磁気ビーズによるゲノムの選択を行った。illumina Miseqシステムで得た塩基配列に対し、BLASTnとMEGANにて生物種を分類した。

## 3) 実試料への適用

上記で開発した手法を国内下水試料に適用し、選択的回収手法の適用可能性と、メタゲノム解析による未知ウイルスの探索を行った。

## 4. 研究成果

1) ウイルスゲノムの選択的回収技術の開発  
検出対象ウイルスゲノムに特異的な塩基配列を持つプローブ(キャプチャープローブ)を対象RNAに結合させ、磁気ビーズを用いて回収する手法を開発した。キャプチャープローブの設計、ハイブリダイゼーション条件(プローブ濃度、温度、バッファー、時間)、および回収ビーズから非対象ウイルスゲノムを洗浄する方法について、モデルウイルス(ポリオウイルスワクチン株)の回収率を基準に最適条件を決定した。プローブ設計ではキャプチャープローブに加えて4種のヘルパープローブ(キャプチャープローブの結合部位周辺に結合するプローブ)を加えることで回収率を顕著に上昇させることができた。

## 2) 下水中のウイルスのメタゲノム解析

+鎖RNAウイルスゲノムの全長を非特異的に増幅する技術を用いて、流入下水中のウイルスメタゲノム解析を実施した。その結果、ヒトに感染するウイルス由来の塩基配列は全体の5-8%(全ウイルス由来の塩基配列数の62-74%)で検出され、本技術を用いない場合より40-1000倍の効率であった。また、ノロウイルスやサポウイルスはその流行期(冬季)に最も高い割合で検出された。定量PCR法による調査結果も同様であったことから、本技術を用いたメタゲノム解析により、下水中ウイルスの存在を定量的に評価できることが示唆された。さらに、ノロウイルスは全塩基長の96%を占める塩基配列を得ていたことから、本手法により環境試料(下水)においてもウイルスゲノム全体の非特異的増幅が可能であることがわかった。したがって、下水中のウイルスゲノム群から検出対象(未同定ウイルス)のゲノムを選択的回収するための十分な塩基配列を得ることが可能であると考えられた。

また、国内下水処理場にて初沈汚泥、活性汚泥、余剰汚泥および嫌気性消化汚泥試料を採取し、DNAおよびRNAウイルスを対象と

したメタゲノム解析を行った。解析に先立って細菌を対象とした微生物群集構造解析を実施し、群集構造として特異なサンプルではないことを確認した。試料中のファージ・ウイルス様粒子を集積し、核酸抽出後 MiSeq を用いたメタゲノム解析に供した結果、DNA ウィルスと RNA ウィルスの塩基配列をそれぞれ 100-200 万リード得た。しかし、消化汚泥試料から得た配列を用いて BLAST による相同性検索を行ったところ、既知のウィルスには 100-200 リードとごくわずかにしかヒットしなかったことから、試料に存在したウィルス・ファージの大部分が未知であることがわかった。

### 3) 実試料への適用

1) で開発した特定の配列を持つ RNA ウィルスゲノムを選択的に回収する手法を下水試料中の F 特異 RNA 大腸菌ファージ (F-RNA ファージ) に適用し、回収効率を評価した。F-RNA ファージ I 群のゲノムに結合するキャプチャプローブ、ヘルパープローブを設計し、最適化した実験条件において国内の都市下水等に適用したところ、70%程度の回収率を得た。本手法は検出対象外の RNA を除去するのが主目的であるが、同時に対象 RNA を高効率で回収できることが示された。

2) で取得した一本鎖 + 鎖 RNA ウィルスのメタゲノムデータをもとに、未知ウィルスの探索を試みた。流入下水試料ごとにコンティグを作成し、BLASTn 検索により既知のウィルスに由来する配列を除去した結果、1 試料あたり 4-27 のコンティグを得た。複数の試料に由来する配列を統合するためさらに解析を行い、データベースに近縁配列を持たない 7 つのコンティグを得た。これらの配列は下水中存在する未知の一本鎖 + 鎖 RNA ウィルスに由来すると考えられる。得た配列のいくつかは近年新しいピコルナ様ウィルスとして報告された配列に類似度は低いものの似ており、今回得られた配列も同様の分類に属する可能性がある。すなわち、国内の下水には未知のピコルナ様ウィルスが多数存在しており、今回の解析でその一部を検出したと考えられる。さらに、得たコンティグの 1 つについて、PCR 法で検出するためのプライマーを設計して下水試料からの検出を試みたところ、すべての下水試料から増幅産物を得た。これは、このようなウィルスが下水中に常在している可能性を示している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

- 1) E. Haramoto, M. Kitajima, A. Hata, J. R. Torrey, Y. Masago, D. Sano, and H. Katayama. A review on recent

progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research*, 135, 168-186, 2018.

- 2) S. Kazama, T. Miura, Y. Masago, Y. Konta, K. Tohma, T. Manaka, X. Liu, D. Nakayama, T. Tanno, M. Saito, H. Oshitani, and T. Omura. Environmental surveillance of norovirus genogroups I and II for sensitive detection of epidemic variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), e03406-16, 2017.
- 3) 三浦尚之, 風間しのぶ, 今田義光, 真砂佳史, 当広謙太郎, 真中太佳史, 劉曉芳, 斎藤繭子, 押谷仁, 大村達夫, 感染性胃腸炎流行の早期検知を目的とした下水中ノロウィルスモニタリングの有用性, 土木学会論文集 G (環境), 72(7), III\_285-III\_294, 2016.
- 4) Y. Masago, Y. Konta, S. Kazama, M. Inaba, T. Imagawa, K. Tohma, M. Saito, A. Suzuki, H. Oshitani, and T. Omura. Comparative evaluation of real-time PCR methods for noroviruses in wastewater and human stool. *PLoS ONE*, 11(8), e0160825, 2016.
- 5) S. Kazama, Y. Masago, K. Tohma, N. Souma, T. Imagawa, A. Suzuki, X. Liu, M. Saito, H. Oshitani, and T. Omura. Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases. *Water Research*, 92, 244-253, 2016.
- 6) 勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫, 原田秀樹, ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウィルスゲノム回収手法の開発, 土木学会論文集 G (環境), 査読あり, 71(7), III\_329-III\_338, 2015.
- 7) 風間しのぶ, 真砂佳史, 沼澤聡, 大村達夫, 下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウィルスの選択的メタゲノム解析手法の検討, 土木学会論文集 G (環境), 71(7), III\_339-III\_349, 2015.

[学会発表](計 8 件)

- 1) J. Ni, K. Kubota, S. Kazama, and Y.Y. Li. Diversity of phages in an anaerobic sludge digester. *International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2017*, 2017.
- 2) 風間しのぶ, 真砂佳史, 三浦尚之, 今田義光, 井原賢, 田中宏明, 森山一葉, 大瀧雅寛, 下水由来 ss (+) RNA ウィルス

メタゲノム中の未知塩基配列の探索 ,第 20 回日本水環境学会シンポジウム , 2017 .

- 3) 倪嘉苓,久保田健吾,李玉友,風間しのぶ,嫌気性消化槽内に存在するファージの多様性の探索,第 51 回日本水環境学会,2017 .
- 4) 風間しのぶ,真砂佳史,三浦尚之,今田義光,大村達夫,下水中のヒト消化器ウイルスの検出を目的とした選択的メタゲノム解析手法の開発,第 53 回環境工学研究フォーラム,2016 .
- 5) S. Kazama, Y. Masago, T. Miura, Y. Konta, and T. Omura, Distribution of human caliciviruses identified in municipal wastewater by metagenomic analysis using a newly developed method, The 6th International Calicivirus Conference, 2016.
- 6) S. Kazama, Y. Masago, T. Miura, Y. Konta, and T. Omura, Development of a selective-metagenomic method for human enteric viruses in wastewater, 5th Food and Environmental Virology Conference, 2016.
- 7) 勝又雅博,真砂佳史,大村達夫,原田秀樹,ハイブリダイゼーション法を用いた下水中の対象ウイルスゲノム回収手法の開発,第 52 回環境工学研究フォーラム,2015 .
- 8) 風間しのぶ,真砂佳史,沼澤聡,大村達夫,下水中のポリ A 鎖を有する 1 本鎖 (+) RNA ウイルスの選択的メタゲノム解析手法の検討,第 52 回環境工学研究フォーラム,2015 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特にありません。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

真砂 佳史 (MASAGO, Yoshifumi)

国際連合大学・サステナビリティ高等研究所・リサーチフェロー

研究者番号 : 5 0 5 0 7 8 9 5

### (2)研究分担者

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号 : 0 0 4 0 1 1 4 1

久保田 健吾 (KUBOTA, Kengo)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 8 0 4 5 5 8 0 7

大瀧 雅寛 (OTAKI, Masahiro)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号 : 7 0 2 7 2 3 6 7

### (3)連携研究者

斉藤 繭子 (SAITO, Mayuko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 2 0 5 9 8 0 3 1

風間 しのぶ (KAZAMA, Shinobu)

お茶の水女子大学・シミュレーション科学・

生命情報学教育研究センター・特任講師

研究者番号 : 2 0 7 4 9 4 4 4