

令和元年6月17日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19432

研究課題名(和文) ウイルスのゲノム外トランスポゾン様エレメントの探索と解析

研究課題名(英文) Researches on extra-genome transposon-like elements in insect viruses

研究代表者

高務 淳 (Takatsuka, Jun)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80399378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫ボックスウイルスに随伴するトランスポゾン様のエレメントは、生物のゲノムに広く分布するトランスポゾン、ポリントンから進化したものであると推定された。本エレメントは、寄主である昆虫ボックスウイルスの複製機構を利用して複製していた。これは、同様にポリントンから誕生したと考えられ、大型DNAウイルスの寄生者として知られる、進化・生態的に注目されているヴィロファージの複製様式と同様である。しかし、寄主である昆虫ボックスウイルスやその宿主である昆虫との相互作用は、ヴィロファージ-大型DNAウイルス-原生動物の相互作用とは異なると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原生動物の大型DNAウイルスに随伴するポリントン様のエレメントが発見されてきた。本研究の対象であるエレメントは、多細胞生物(昆虫)に感染する大型DNAウイルスから初めて発見されたポリントン様エレメントであると同時に、保健衛生的にも重要な脊椎動物のウイルスを含むボックスウイルス科から世界で初めて発見されたモバイルエレメントである。本エレメントの正体や大型DNAウイルスや宿主生物との相互作用に関する本研究の知見は、ウイルスに随伴するポリントン様のエレメントが遺伝的にも生物学的相互作用においても多様であり、それらエレメントが、より広い生物の生態や多様性に関わっていることを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Our data indicated that transposon-like elements found in this research, as associated with entomopoxviruses, had evolved from ancestors of large DNA transposon, polinton, which is widely distributed in genomes of life. Replication of the elements depended on the presence of an entomopoxvirus co-infecting the same cells. This replication mode is similar to virophages which are known to parasites of the large DNA viruses and thought to be important key players in ecology and evolution of protists. However, a tripartite interaction among the elements, an entomopoxvirus and an insect host seemed to be different from that of virophages.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：ウイルス モバイルエレメント ボックスウイルス ポリントン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスポゾン、生物の多様性創出に重要な役割を担っている。ポリントン (polinton) と呼ばれるトランスポゾンは、生物に広く分布している大型の DNA トランスポゾンである。ポリントンは、ウイルスの証であるカプシドと呼ばれる遺伝子を持っており、ウイルス (ポリントウイルスと仮に命名されている。本稿では、生物のゲノムとは独立して複製する存在という意味でのみポリントウイルスという語を使用する。) とも言える。原生生物の大型 DNA ウィルスに寄生するヴィロファージ (virophage) というウィルスは、ポリントンによく似ており、ポリントンから進化したと考えられている。ヴィロファージに寄生されたウィルスの複製は阻害され、その結果、原生生物の生存率が上昇する。そのため、原生生物はヴィロファージをゲノムに取り込むことによって、大型 DNA ウィルスの感染に対して対抗することができるようになるかと推定される。すなわち、この相互作用には、ウィルスが DNA トランスポゾンの起源となるための生態的な要因としての意味がある。実際、ある原生生物では、ヴィロファージが容易にゲノムに組み込まれることが示されている。ゲノムにヴィロファージを持つ個体群は、大型 DNA ウィルスの存在下において、ヴィロファージを持たない個体群よりも生存率が高まることが実験的に証明されている (Fischer & Hackl, 2016)。また、ヴィロファージが引き起こすこの相互作用は、原生生物の動態に影響し、生態系や多様性に絶大な影響力を持つと考えられている。このようなポリントンに関連するウィルスに随伴するエレメントは、原生生物のみから発見されてきた。ところが、我々は、多細胞生物である昆虫に感染するウィルスの昆虫ボックスウィルス (EPV) から、そのゲノムとは独立して存在するポリントン様のエレメント (以下、EPV エレメントと記載) を発見した。

2. 研究の目的

チャノコカクモンハマキの昆虫ボックスウィルス (AHEPV) から発見した EPV エレメントの解析と、同種のエレメントの探索により、ヴィロファージ - 大型 DNA ウィルス - 宿主のような相互作用が、原生生物だけでなく多細胞生物の世界にも存在し、より広く地球上の生物の生態や多様性に影響している可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) エレメントの探索とシーケンス解析

昆虫の大型 DNA ウィルスである昆虫ボックスウィルス、虹色ウィルス、アスコウィルス、およびバキュロウィルス株を供試した。これらウィルスから核酸を抽出し、電気泳動に供し、EPV エレメントの分画 (10 ~ 30kb の分画) に核酸が検出されるかどうか調査した。検出された場合には、次世代シーケンサーを用いて配列を決定した。明らかとなった配列からゲノムの構造や系統解析を行い、既に発見している EPV エレメントやポリントン、ヴィロファージ等との比較をした。

(2) エレメント - 昆虫ボックスウィルス - 宿主の相互作用の解析

培養細胞を用いる必要があるため、AHEPV が感染する培養細胞を探索した。次に、既に発見している EPV エレメントについて、その複製の昆虫ボックスウィルス依存性や、EPV エレメントが EPV の複製に与える影響を培養細胞系で解析した。EPV エレメントを培養細胞に単独接種した場合と EPV とともに接種した場合の EPV エレメントおよび EPV の経時的な複製数を調べた。また、昆虫における EPV エレメントと EPV の複製を調べた。さらに、野外のチャノコカクモンハマキ個体群において、EPV エレメントと EPV の罹病を調査した。

(3) 昆虫ゲノムからのエレメントの探索

AHEPV の宿主昆虫であるチャノコカクモンハマキのゲノムから次世代シーケンサーで取得した DNA シーケンスデータ、チャノコカクモンハマキおよびチャハマキの RNA シーケンスデータを用いてエレメント配列を探索した。また、宿主昆虫のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法によるエレメントの探索を行った。また、公開されている昆虫のゲノムデータベースを利用し、探索した。

4. 研究成果

(1) エレメントの探索とシーケンス解析

既に発見していた AHEPV の別株のウィルス (宮崎株)、コスジオビハマキの昆虫ボックスウィルス (CDEPV) から EPV エレメント分画に核酸を発見した。シーケンス解析の結果、AHEPV 宮崎株からのものは、すでに発見していた 2 つの EPV エレメント (エレメント 1 およびエレメント 2) とほぼ相同なものであった。しかし、既発見のエレメント 2 が直鎖状であるのに対し、宮崎株のものは環状の核酸であった。CDEPV からのものは、エレメント 2 に該当するもので環状であった。AHEPV のエレメント 2 が持っていない遺伝子もコードしており、また、AHEPV のエレメント 2 が持つ遺伝子と同種の遺伝子についても、類似度は比較的低かった。また、遺伝子の並び方も AHEPV のエレメント 2 と異なる場所があった。EPV エレメントは、ゲノムサイズは、11 ~ 12 キロベースでポリントンのゲノム (17 ~ 30 キロベース) よりも小さい。ポリントンやこれまでに報告されているポリントン様のエレメントが持つメジャーカプシド蛋白遺伝子

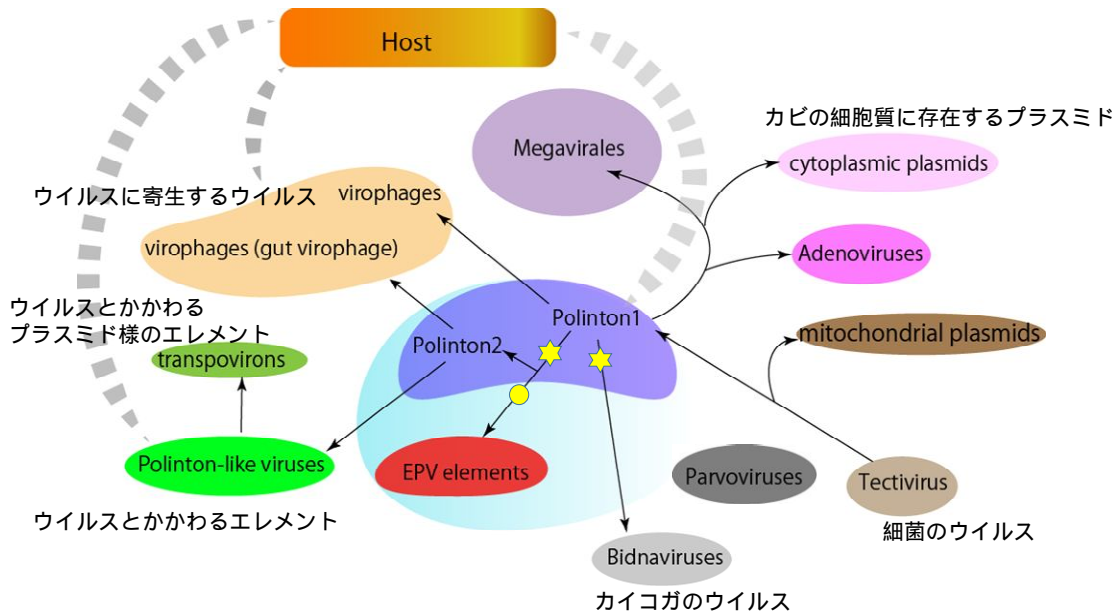


図1 EPVエレメントの進化についての類推。黄色の星：パーボウイルスVp-1遺伝子の獲得。黄色の丸：MCPとmCPの喪失とゲノムの縮小化。点線は、それぞれのポリントウイルス様エレメントについて、宿主のゲノムに入っている例が報告されていることを示す。ポリントンとポリントウイルス様のエレメント (virophage, polinton-like virus, transpoviron等)、tectivirusとの関係はKrupovic & Koonin (2015) を参考にした。

(MCP)、マイナーカプシド蛋白遺伝子 (mCP) を持っていない。パーボウイルスのカプシド構

成蛋白遺伝子である Vp-1 様の遺伝子を持つという特徴があった。また、系統解析の結果、EPV エレメントは、これまでに報告されているポリントン様エレメントとは異なること、および、多様なポリントンから進化したことが推定された。EPV エレメントは、ポリントウイルスとパーボウイルスの相互作用により、ポリントウイルスが Vp-1 様遺伝子を獲得し、MCP と mCP を喪失、さらにゲノムの縮小によって生じたと推定した (図 1)。さらに、EPV エレメントと EPV が共通に持つオルソログがあり、系統的にもリンクしていることも分かった (例として図 2 参照)。EPV エレメントと EPV 間で遺伝子のやり取りがあることを示唆している。EPV エレメントは、EPV ゲノムの進化や多様性の創出に関して、役割を持っているのかもしれない。

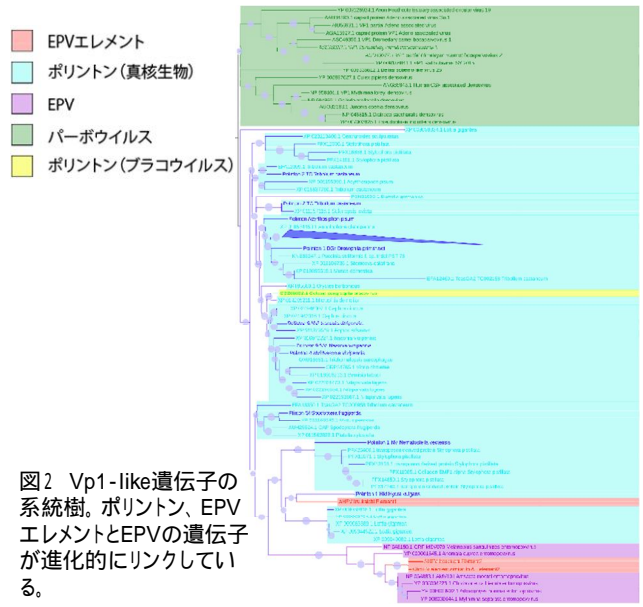


図2 Vp1-like遺伝子の系統樹。ポリントン、EPV エレメントとEPVの遺伝子が進化的にリンクしている。

(2) エレメント - 昆虫ボックスウイルス - 宿主の相互作用の解析

AHEPVIは、NIAS Ah-MR2細胞に感染し複製できることが分かった。本細胞系に、EPVエレメントを持っていないAHEPVIとEPVエレメント、もしくはEPVエレメントのみを接種したところ、前者の場合にのみ、EPVエレメントの複製が認められた (図 3)。ヴィロファージの複製が大型DNAウイルスに依存しているように、EPVエレメントの複製もEPVの複製システムに依存していることが明らかになった。ヴィロファージでは、ヴィロファージと大型DNAウイルスが宿主に感染すると、大型DNAウイルスはほとんど複製できないことが示されている。しかし、EPVエレメントとEPVは宿主昆虫体内で、同調して増殖することも分かった

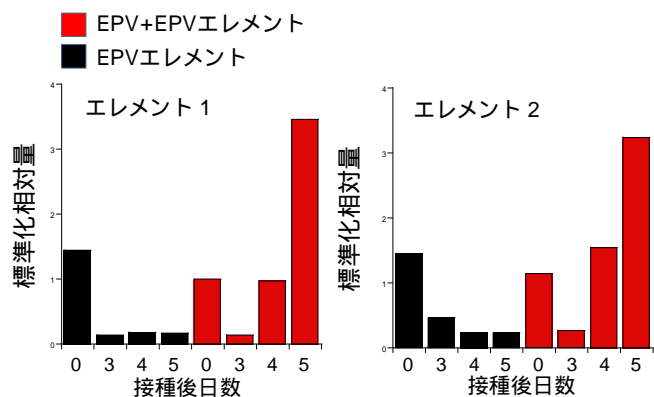


図3 EPVエレメントの複製はEPVに依存している。EPVは、EPVエレメントを持っていない株を供した。定量的PCR法により相対定量した。

(図4)。EPVエレメントは、EPVの適応度に対して中立的か、もしくは、プラスに働いている可能性も考えられる。

野外のチャノコカクモンハマキ幼虫個体群において、EPVエレメントは高い割合で感染していた(エレメント1:70%、エレメント2:30%)。EPVエレメントはEPVが感染している幼虫からしか検出されなかった。EPVとエレメント1、エレメント2が何ら関係なくチャノコカクモンハマキに感染すると仮定した場合に比べて、EPVとエレメント1に共感染しているもの、EPVとエレメント1とエレメント2に多重感染しているものが多かった。また、EPVのみに感染しているものは極めて少なかった(図5)。この結果は、EPVエレメントがその複製をEPVに依存しているという先述の結果を裏打ちするものである。また、EPVエレメントが高い割合で感染していることを考えると、EPVエレメントは、EPVに対してプラスに働いていることも考えられる。

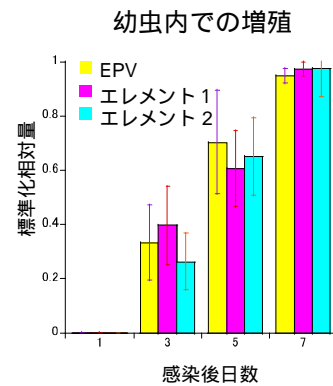


図4 EPVエレメントとEPVは宿主体内で同調して著しく複製する。定量的PCRを用いて相対定量した。

- 感染していない
- EPV
- EPV + エレメント1
- EPV + エレメント2
- EPV + エレメント1 + エレメント2
- エレメント1 + エレメント2
- エレメント1
- エレメント2

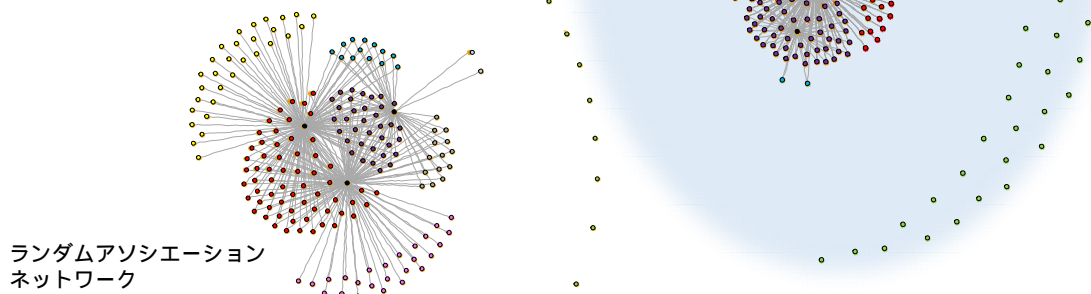


図5 野外宿主個体群においてEPVエレメントとEPVは関連を持って感染している。感染個体のネットワーク分析を可視化したもの。それぞれの色の丸は、EPVエレメント、EPVに感染した宿主個体もしくは非感染の宿主個体を示す。EPVエレメントおよびEPVの感染がランダムに起こると仮定した場合は有意に異なる。EPVエレメントは、EPVに感染した個体からしか検出されなかった。感染は、診断PCRによって行った。

(3) 昆虫ゲノムからのエレメントの探索

次世代シーケンサによって、チャノコカクモンハマキのゲノムのショートリードを大規模に取得し、EPVエレメントにマッピングしたが、ゲノムにEPVエレメントがあるという証拠は得られなかった。また、チャノコカクモンハマキ及びチャハマキのRNAseqデータを解析したが、同様にEPVエレメントが存在する証拠は得られなかった。昆虫のゲノム情報をデータベースから取得し、EPVエレメントを探索したがポリントンやポリントンの一部と考えられるものは見つかるが、確実にEPVエレメントであるといえるものは発見できなかった。

当初、EPVエレメントがEPVゲノムとは独立して存在し、細胞内で複製していること、また、ポリントンと構造的に類似していること、ポリントン(ポリントウイルス)は生物のゲノムに入っているものしか見つからないことから、EPVエレメントは世界初の細胞内で複製しているポリントウイルスの発見ではないかと考えていた。本エレメントを解析することでポリントウイルスが生物のゲノムに入った生態的要因をこれまでよりも直接的に解明できると期待していた。

本研究の結果、EPVエレメントは、これまでに報告されているポリントン様のエレメントの中で最もポリントンに酷似している存在であることが明らかになった。現在の科学界に認めら

れている考え方では、EPV エLEMENTはポリントウイルスの一種ともいえるが、ポリントンとは異なる特徴も明らかになった。複製は、ヴィロファージのように、EPV に依存しているが、EPV ELEMENT - EPV - 宿主の相互作用はヴィロファージのような大型 DNA ウィルスへ負に働き、宿主に正に働くものとは異なると考えられた。現在のところ、本研究結果から、ポリントウィルスが生物のゲノムに入った要因を推察することは難しい。しかしながら、本研究は、ポリントン様のELEMENTが多様であり、寄主である大型 DNA ウィルスやその宿主である生物との相互作用も多様であることを物語っている。これまで、ウィルスに随伴するポリントン様のELEMENTは、ヴィロファージのような相互作用をしていると考えられてきたが、本研究はその考え方を打ち破るものである。このような、これまで報告されているポリントン様のELEMENTとは異なる特徴を持つ EPV ELEMENTが、EPV や宿主の動態にどのように影響するのかという新たな課題が創出された。

ウィルス、特に大型 DNA ウィルスからトランスポゾンのようなモバイルELEMENTが発見されているが、ポックスウィルス科のウィルスからは発見されていない。本科には、無脊椎動物である昆虫を宿主とする EPV とは別の亜科に属し、脊椎動物を宿主とする保健衛生学的にも重要なウィルスが含まれている。本研究の EPV ELEMENTの発見は、このような脊椎動物のウィルスにも本ELEMENTのようなモバイルELEMENTが存在する可能性があることを示唆している。本研究は、そのようなモバイロームの発見を世界に促し、脊椎動物のウィルス病の生態解明やウィルス病管理対策にも貢献する可能性を秘めるものである。

<引用文献>

Krupovic M, Koonin EV, Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution, Nat Rev Microbiol, 25 巻, 2015, 7-15

Fischer MG, Hackl T, Host genome integration and giant virus-induced reactivation of the virophage mavirus, Nature, 540 巻, 2016, 288-291

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

高務 淳、仲井 まどか、ポックスウィルスが保持しているモバイルELEMENT、日本応用動物昆虫学会、2019 年

高務 淳、ポリントウィルス、昆虫病理研究会、2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：仲井 まどか

ローマ字氏名：(NAKAI, madoka)

所属研究機関名：国立大学法人 東京農工大学

部局名：(連合)農学研究科(研究院)

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60302907

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。