

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06186

研究課題名(和文) 渦鞭毛藻ウイルス感染過程の徹底精査：吸着-侵入-複製-形態形成から放出過程まで

研究課題名(英文) A study of infection process of a dinoflagellate-infecting virus HcDNAV : attachment &#8211; invasion &#8211; replication &#8211; formation - release

研究代表者

高野 義人 (TAKANO, YOSHIHITO)

高知大学・海洋コア総合研究センター・客員講師

研究者番号：10435852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：有害赤潮藻類 *Heterocapsa circularisquama* に感染する大型DNAウイルスHcDNAVについて、蛍光顕微鏡観察像を得た細胞を用いたqPCR法により、1細胞内でのウイルス特定遺伝子コピー数推定を行い、宿主細胞内のウィロプラズム形状とウイルス遺伝子増幅の相関的経時変化を明らかにした。ウイルスゲノムはほぼ全領域解読し、計385,325 bpとなった。蛍光顕微鏡撮影した158細胞を用いたシングルセルトランスクリプトーム解析により、ウイルス増幅段階毎での発現遺伝子解析に成功し、予測された260個の遺伝子のうち244個の発現が検出された。それらうち74個が他のウイルス配列にhitした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小な細胞について鮮明な蛍光顕微鏡観察像を得た細胞をqPCR法や1細胞トランスクリプトーム解析に用いて成功させた。qPCR法では細胞の部位毎に単離することで、ウイルス遺伝子の所在を明らかにした。科学的に大切なことは証拠を残すことであり、技術の修練により可能であることが示せた。感染状態を把握した発現解析は初の試みであり、感染過程の発現遺伝子の解明とその後の遺伝子解析に繋がる。HcDNAVは、二枚貝の斃死を起こす有害赤潮藻類の一種(Hc)に感染し死滅させる。増幅過程を把握した本ウイルス遺伝子を標的としたqPCR検出により、Hc出現後および赤潮発生後からの消失時期の推察可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：For a large-sized DNA virus, HcDNAV, infects a harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, relational time-course changes of the viroplasm morphology and the number of the gene copy were revealed by combination of epifluorescence microscopy (EFM) and qPCR. Almost the whole HcDNAV genome was sequenced, resulting in 385,325-bp. We applied 158 cells after taking photos with EFM to a single cell transcriptome analysis. The obtained transcriptome data was analyzed about single cells sorted into the viral replication stages, A, B, C, D, and E. From all of used cells, transcripts for a total of 244 of 260 genes predicted based on genome sequences were found. Based on Blastx search, 74 genes of HcDNAV expressed in this study have similarity to genes of other viruses.

研究分野：藻類学

キーワード：藻類ウイルス ウイルス形態 ウイルス感染過程 ウイルスゲノム シングルセルトランスクリプトーム解析

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻類は、2本の鞭毛を持ち遊泳する水圏環境に普通にみられる単細胞生物である。渦鞭毛藻類の諸性状については様々な研究が進められてきた。一方、ウイルスとの関係に関する研究は立ち後れているのが現状である。研究分担者(長崎)は、2001年に海産渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*(Hc;図1)に感染する2本鎖DNAウイルス(HcDNAV;図2,図3)を発見し、その基礎的性状を報告した。しかし、本ウイルスを巡る知見は甚だ断片的であり、特にウイルスの宿主への吸着・侵入から宿主細胞死滅に至るプロセスは、ほとんど明らかにされていない状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、HcDNAVの宿主Hcへの感染から溶藻までの全過程(～)について、様々な顕微鏡(微分干渉、蛍光、共焦点レーザー、FE-SEM、TEM)を用いて高解像度で観察するとともに、1細胞トランスクリプトーム解析を用いて遺伝子発現パターンの変化を追跡し、「現象:可視化できるイベント」と「機構:遺伝子発現様態」の経時的なマッチングについて徹底比較する。これにより、渦鞭毛藻感染性ウイルスHcDNAVの感染戦略を微形態学および分子生物学という2つの視点から詳細に解明することを目指す。

吸着過程・・・HcDNAVのHc細胞への吸着に必要な時間は？どこに、どのように吸着するか？

ウイルスゲノムの侵入・・・Hcにどのようにウイルスコア(ゲノムDNAを包む袋)が注入されるか？

宿主細胞内でのウイルスゲノムの複製・・・細胞質内に侵入したウイルスコアの挙動は？どこでどのような増幅が行われるか？

ウイルス殻の形成と成熟・・・ウイルス殻はどのタイミングから、どこで作られ、ウイルスゲノムが収納されるのか？

宿主細胞の崩壊とウイルス粒子の放出・・・細胞を内側からどのように壊して外界に出るか？

3. 研究の方法

< 吸着過程、および、宿主細胞内でのウイルスゲノムの複製 >

qPCR法を用いて、HcDNAVのDNAポリメラーゼ配列をターゲットとし、1コピーでもある程度の確立で感度を示す反応系を別プロジェクトと共に開発した。Hc株とウイルス株を混合した後、Hc細胞を単離・洗浄し、MilliQ水に移し、細胞が破裂するか、細く伸ばしたパスツールピペットで優しく破裂させる。その後、Hc細胞を1)Hc細胞の殻のみ、2)細胞質、3)核のみ、4)それぞれを回収する際の周囲の水をごく少量、をPCR法の試料として回収し、混合後からHc細胞を洗い始めてからMilliQ水に移すまでの時間を「ウイルスの反応時間」として記録した。また、洗い漏れによるウイルスのコンタミを防ぐため、4)において「undetermined」であったサンプルのみを結果として採用した。385細胞を用いた。

Hc株とウイルス株を混合した後、Hc細胞を単離し、NucBlue Live ReadyProbe Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて染色し、蛍光顕微鏡観察を用いて観察・撮影を行った。その細胞を洗浄し、MilliQ水に移し、細胞を破裂させ、細胞全部を回収し、qPCR法に供した。また、洗い漏れによるウイルスのコンタミを防ぐため、回収する際の周囲の水をごく少量において「undetermined」であったサンプルのみを結果として採用した。試薬は、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (TaKaRa Bio)を用いた。

< HcDNAVのゲノムの全長解読 >

DNA抽出には、Qiagen Genomic-tip 20/G (Qiagen, Valencia, CA)を用いた。抽出DNAは、超音波破碎装置 (Covaris M220, Covaris, USA)を用いて切断し、Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina, CA, USA)を用

いてライブラリー作成を行い、MiSeq (Illumina, CA, USA) を用いて配列を得た。また、MinION (Milipore, Canada) を用いてロングリードデータを得た。さらに、抽出 DNA を基に MinION によって得られたデータでは不十分であったため、REPLI-g WTA Single cell Kit (Qiagen) を用いて DNA 増幅を行った試料からも MinION によるシーケンスデータを取得した。これらの配列を基に解析を行い、複数のコンティグ配列を得たため、それらを繋ぐためにプライマーを作製し、ABI PRISM 3130 Genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて配列を得た。遺伝子推定には、GeneMarkS を用いた。

<1 細胞トランスクリプトーム解析>

Hc 株とウイルス株を混合した後、Hc 細胞を単離し、NucBlue™ Live ReadyProbe™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて染色し、蛍光顕微鏡観察を用いて観察・撮影を行った。蛍光顕微鏡観察撮影中に破裂しなかった細胞を数回洗浄し、MilliQ 水に移し、細胞が破裂するか、細く伸ばしたパスツールピペットで優しく破裂させ、細胞全部を 200 μ L チューブに回収した。120 細胞は DNase I (amplification grade, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) で処理し、38 細胞は未処理後の反応に用いた。試薬は、DNase I 未処理 38 細胞と、DNase I 処理 24 細胞は、SMART-Seq® HT (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) と Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina, CA, USA)、DNase I 処理 48 細胞は、SMART-Seq® v4 PLUS kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)、DNase I 処理 48 細胞は、SMART-Seq® Single Cell PLUS kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)、を用いてライブラリー作成を行った。それぞれを HiSeq X (Illumina) を用いて配列を得た。アセンブルには trinity を用い、マッピングには HISAT2 on Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) を用いた。

4 . 研究成果

< 吸着過程、および、 宿主細胞内でのウイルスゲノムの複製 >

qPCR 法を用いて、細胞表面に吸着するまでの時間を調べた。ウイルスと宿主細胞を混合してから 1 分で単離した細胞の殻 (鎧板) からウイルス遺伝子を検出した (Table 1)。また、先行研究での FE-SEM 観察からウイルスの多くは横溝内に吸着しており、渦鞭毛藻類においては横溝にある横鞭毛の推進力で泳ぐため、水中に漂うウイルスを多く巻き混むためであると考えられた。これらのことから、宿主とウイルスが同じ水塊に存在すれば直ぐに吸着機会を得ることが示された。また、宿主ウイルス混合後 30 分の核サンプルから検出された。これらから、1 ~30 分で細胞質に侵入でき、30 分で核に侵入できることが示された。一方で、Fig.1 より宿主ウイルス混合後から徐々にコピー数の増加がみられるが、各時間においてコピー数が少ないものも多くみられる。これらは、感染初期と考えられるため、宿主ウイルス混合後に全ての宿主にウイルスが直ちに感染するのではなく、徐々に感染個体数が増えていることが示された。また、核内でもコピー数が増加しているため、核に侵入したウイルスゲノムは核にも残り、核内で増幅されていることも示唆された。最大検出コピー数は 41,337 であった。

ウイルス DNA 領域 (ウイロプラズム; viroplasm) が細胞質内で大きくなるに伴い、検出されるコピー数も増えていたことから、実際に、細胞質内でウイルス DNA が増幅していることが示された (Fig.2)。

Table 1. ウイルスと宿主混合後 1 分に単離し、30 分以内に破裂させた細胞の qPCR の結果

(-: undetermined)

殻 (鎧板)	1.07.E+00	-	3.33.E+00	1.33.E+00	2.47.E+00	2.89.E+00
細胞質	-	2.83.E+00	9.27.E-01	-	-	8.56.E+00

Fig. 1. 385 細胞の qPCR の結果

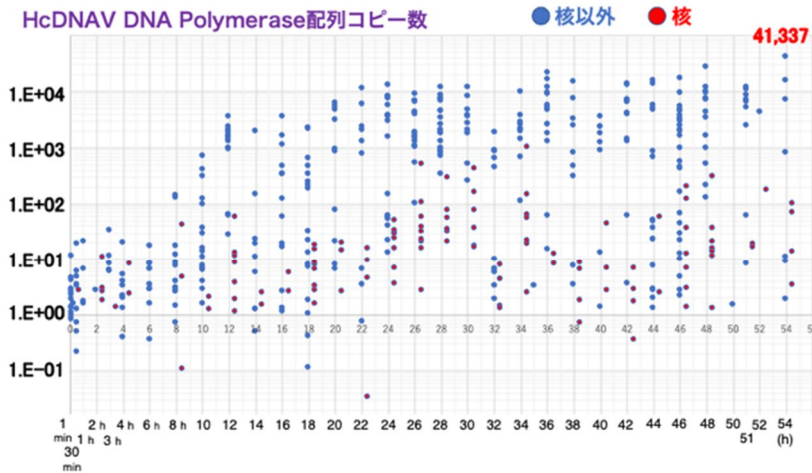
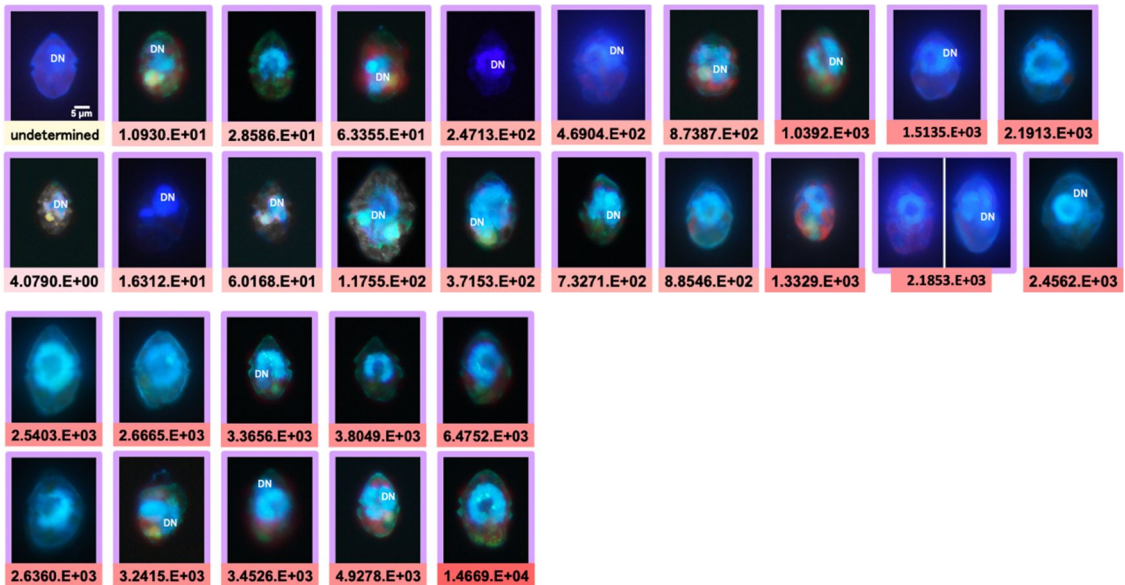


Fig. 2. 蛍光顕微鏡像と qPCR 法の結果; DNA 領域が青く光る、DN は宿主核



< HcDNAV のゲノムの全長解読 >

MiSeq、MinION、およびサンガーシーケンスによって得られた配列を解析した結果、4つのコンティグとなり合計 385,325 bp (373,509 bp, 10,660 bp, 627 bp, 529 bp) となった。サンガーシーケンスによって得られた領域の多くは反復配列領域であり、この結果はほとんどの配列が得られたと見なせる。遺伝子予測プログラム “GeneMarkS” を用いて解析を行い、260 個の遺伝子が推定された。

< 1 細胞トランスクリプトーム解析 >

ウイルスと宿主細胞を混合したサンプルから 1 細胞を単離し、蛍光顕微鏡撮影によって細胞内のウイロプラズム (ウイルス工場) の形状を把握した合計 158 細胞を用いてシングルセルトランスクリプトーム解析を行った。ゲノム配列から予測された 260 個の遺伝子のうち 244 個の発現が検出された。各細胞からは、2-110 個の遺伝子の発現が検出された。Blastx の結果、発現が確認された遺伝子のうち 74 個の遺伝子が他のウイルス配列に hit した。ウイロプラズムの発達形状を基に 5 つに分けて発現遺伝子数を比較すると、A) ウイロプラズムが確認できない細胞では、2-70 個、B) 粒・点状の細胞では、12-110 個、C) 帯状・環形の 5 割未満の細胞からは、16-97 個、D) 環形の 5 割以上から環形の細胞では、10-92 個、E) 大きなゴツゴツした環形の細胞では、9-94 個、であった (Fig.3)。

前提として、1 細胞トランスクリプトーム解析は、発現している全ての遺伝子を検出されている訳ではない。そのため、検出された遺伝子についてのみ議論できる。今回、ステージ A からも多く遺伝子が発現していることが

ら、遺伝子発現のタイミングに制御機構はないのかもしれない。しかし、今回が初めての試行であったため、試薬も高価で限りがあるので、細胞質内にウイロプラズムが観察されないステージAのサンプルは少なくした。今後は、ステージAのサンプルを増やして解析することで、ごく初期での遺伝子発現について考察が可能となる。ステージA B、ステージA B C、ステージA B C Dで発現がゼロであった遺伝子はいくつかみられたが、それらの働きは不明である。これらの遺伝子は、感染後期のイベントに関与する可能性が考えられ、その機能については興味深い。一方で、最も多くの細胞から検出され、Blastxでhitした遺伝子は「DNA topoisomerase II」であった。また、多くの細胞で発現している遺伝子の多くはDNAおよびRNAに関わる酵素であり、他の機能不明な発現遺伝子についての解析がウイルス増殖機構の解明の鍵を握っていると言える (Table 3)。

ウイルス感染の条件を揃えられないために1細胞トランスクリプトーム解析を試み、詳細な手法の検討や特性を把握することができ、新たな多くのデータを得ることができた。さらに試行を増やすことと機能不明な遺伝子の解明、および、今回行えなかったTEM観察と合わせることでウイルス感染増幅機構の解明が期待できる。

Fig. 3. ウイロプラズムの形状とサイズによる分類

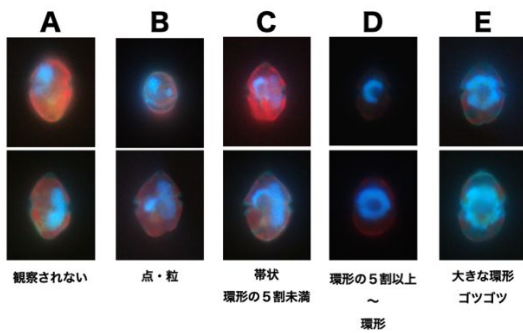


Table 2.1 細胞トランスクリプトーム解析の結果：細胞毎のHcDNAV発現遺伝子数

A (5)		B (35)			C (29)			D (46)			E (43)				
no-187	70	no-151	110	no-164	31	no-079	97	no-057	92	no-171	37	no-144	94	no-086	29
no-195	23	no-157	104	no-194	31	no-100	75	no-059	91	no-180	36	no-092	67	no-087	29
no-077	18	no-016	86	no-114	30	no-015	72	no-074	79	no-172	35	no-190	60	no-089	28
no-191	4	no-058	72	no-038	29	no-066	67	no-003	75	no-175	34	no-142	58	no-146	28
no-192	2	no-055	71	no-196	29	no-081	64	no-070	75	no-104	33	no-136	51	no-046	27
		no-141	70	no-050	28	no-156	62	no-068	74	no-177	33	no-042	50	no-189	27
		no-167	63	no-137	28	no-056	55	no-135	71	no-063	31	no-088	47	no-131	25
		no-198	56	no-037	24	no-078	52	no-182	69	no-103	31	no-134	47	no-148	23
		no-013	55	no-112	24	no-105	39	no-073	68	no-184	31	no-026	43	no-047	22
		no-195	51	no-193	23	no-153	37	no-080	60	no-174	28	no-090	43	no-149	22
		no-036	45	no-159	22	no-169	37	no-060	59	no-021	27	no-143	43	no-145	19
		no-158	40	no-039	21	no-139	33	no-067	58	no-183	27	no-094	42	no-030	18
		no-186	40	no-168	18	no-076	32	no-072	57	no-008	26	no-096	42	no-034	18
		no-185	37	no-166	16	no-107	32	no-062	51	no-023	26	no-130	41	no-028	16
		no-201	37	no-035	14	no-109	32	no-085	39	no-044	16	no-085	39	no-044	16
		no-152	36	no-049	14	no-018	31	no-069	51	no-179	26	no-133	39	no-031	15
		no-161	34	no-108	12	no-138	30	no-071	51	no-154	25	no-150	38	no-033	14
		no-113	32			no-101	29	no-071	51	no-154	25	no-150	38	no-033	14
						no-106	29	no-007	50	no-178	25	no-095	36	no-024	13
						no-098	28	no-065	50	no-005	16	no-048	34	no-045	13
						no-097	27	no-075	50	no-052	16	no-084	34	no-029	12
						no-155	25	no-111	48	no-061	16	no-132	34	no-027	9
						no-160	25	no-111	48	no-061	16	no-091	31		
						no-082	24	no-111	48	no-061	16				
						no-110	23	no-176	42	no-006	15				
						no-064	22	no-173	41	no-040	11				
						no-140	21	no-102	38	no-053	10				
						no-014	16								
						no-017	16								

Table 3. ウイルス配列にhitしたHcDNAV発現遺伝子の上位20

	計	A	B	C	D	E		E value
gene_131	106	2	22	22	31	29	MAG: DNA topoisomerase II [Marseillevirus LCMAC101]	0
gene_161	105	2	24	24	31	24	polyprotein pp220-like protein (core assembly) [Pacmanvirus S19]	0.003
gene_247	93	1	21	16	27	28	MAG: hypothetical protein LC1VAC01_00790 [Iridovirus LC1VAC01]	7.E-41
gene_198	91	1	21	21	31	17	type B DNA polymerase [Heterocapsa circularisquama DNA virus 01]	0
gene_118	87	3	23	20	26	15	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Pacmanvirus S19]	0
gene_241	86	1	21	16	25	23	MAG: UvrD/REP helicase [Mimivirus LCMiAC02]	4.E-70
gene_210	85	2	18	16	26	23	Replication origin-binding protein [Pacmanvirus A23]	1.E-50
gene_067	80	0	9	10	31	30	hypothetical protein UFOVP116_4 [uncultured Caudovirales phage]	2.E-11
gene_036	79	2	23	16	25	13	hypothetical protein IM014_gp105 (helicase-like protein)[African swine fever virus]	5.E-113
gene_104	75	2	21	15	21	16	W A18-like intein-containing helicase [Phaeocystis globosa virus]	2.E-121
gene_239	75	0	17	13	26	19	superfamily II DNA or RNA helicase [Klonsneuvirus KNV1]F129	0
gene_058	74	1	13	14	24	22	hypothetical protein F-E9_157 [Faustovirus]	0.003
gene_195	68	2	18	10	22	16	hypothetical protein BNJ_00083 (putative W A8L-like transcription factor) [Kaumobavirus]	9.E-19
gene_148	67	0	11	10	26	20	phage tail fiber-like protein [uncultured Mediterranean phage uvMED]	0.029
gene_016	61	4	16	10	26	5	DEAD-like helicases family protein [Catovirus CTV1]	7.E-77
gene_182	58	3	10	9	17	19	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Pacmanvirus S19]	2.E-153
gene_170	57	1	11	13	22	10	g10L homolog protein [Abalone asfa-like virus]	7.E-66
gene_065	54	0	6	4	23	21	hypothetical protein Va1_172 [Vibrio phage Va1]	5.E-12
gene_179	51	0	11	12	21	7	MAG: hypothetical protein Barrevirus2_20 [Barrevirus sp.]	0
gene_168	49	2	15	8	16	8	pNP868R (guanylyltransferase) [African swine fever virus]	2.E-47

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野義人, 櫻井哲也, 池田彩乃, 遠藤寿, 外丸裕司, 緒方博之, 長崎慶三
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i> に感染するウイルスHcDNAVの単細胞トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本藻類学会第46回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長崎 慶三 (Nagasaki Keizo) (00222175)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------