

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21452

研究課題名（和文）巨大ウイルスのクロレラへの全ゲノム挿入とクロレラ-ミドリゾウリムシ共生進化機構

研究課題名（英文）Whole genome insertion of a giant virus into *Chlorella* and the mechanism of evolution of symbiosis

研究代表者

小倉 淳 (Ogura, Atsushi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：60465929

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）：本研究では、巨大ウイルスの存在とそのゲノムへの影響を調べるため、数種のクロレラ種についてゲノムアセンブリを行った。ショートリードとロングリードのデータを組み合わせたハイブリッドアセンブリを用い、3種のゲノムを高い精度でアセンブルした。次に、共生生物における二次共生の初期段階で起こるゲノムの変化の解明に焦点を当て、近縁の自由生活種とゲノム比較した。また、共生と非共生の条件下でトランスクリプトームを解析し、共生の基礎となる遺伝的メカニズムを解明した。藻類ゲノムにおける巨大ウイルス遺伝子の発現を確認するため、機能解析も行った。その結果、発現量の異なる遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、緑藻ゲノムにほぼ全長の巨大ウイルスが挿入されていることを発見した。真核生物のゲノム内における巨大ウイルスゲノムの発見は、ウイルス学、ゲノミクス、進化生物学など、生物学の複数の分野に大きな影響を与えることになる。ウイルスの進化とウイルス学の理解につながることで期待され、真核生物における巨大ウイルスのゲノムの発見は、ウイルスの進化や細胞生命との関わりについて、さらなる知見が得られる。また、新しいウイルスファミリーや新しいタイプのウイルスの発見にもつながる。真核生物と巨大なウイルスがゲノムレベルでどのように相互作用しているかについての知見が得られる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to investigate the presence of giant viruses and their effect on the genomes, we performed genome assembly of several *Chlorella* species. Using a hybrid assembly approach combining short-read and long-read data, we successfully assembled the genomes of 3 species with high accuracy. We then focused on the understanding of genomic changes that occur during the early stages of secondary endosymbiosis in symbiotic organisms. We compared the genome of *C. variabilis* with closely related free-living species. We also analysed transcriptomes under symbiotic and nonsymbiotic conditions to elucidate genetic mechanisms underlying symbiosis. To verify the expression of giant virus genes in algal genomes, we also performed functional analyses. We identified differentially expressed genes. Our functional analysis revealed that while most of the giant virus-derived genes were not expressed, some genes showed confirmed expression.

研究分野：進化学

キーワード：巨大ウイルス 藻類 遺伝子移行 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

我々は、クロレラという緑藻のゲノムにほぼ全長の巨大ウイルスゲノムが挿入されていることを発見した。これまでも、巨大ウイルスゲノムの一部が他の生物に見つかっている事例は存在している。例えば、巨大ウイルスは藻類やアメーバなどに感染することが知られているが、そうした宿主において遺伝子の移行が確認されている(Filée, J., Siguier, P., & Chandler, M. (2007). *Trends in Genetics*, 23(1), 10-15.)。また、巨大ウイルス自体も宿主の遺伝子を取り込み、それがさらに他の生物に拡散する事例も報告されている(Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., & Raoult, D. (2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21848-21853.)。また、植物ゲノムに巨大ウイルスの関連ウイルスからの遺伝子断片が見つかる事例が報告されている。報告では、植物ゲノムにヌクレオシド酸性ポリメラーゼ(DNA ポリメラーゼ)遺伝子が挿入されており、この遺伝子は、巨大ウイルスの関連ウイルスである Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses (NCLDV)に由来すると考えられている(Maumus, F., Epert, A., Nogué, F., & Blanc, G. (2014). *Nature Communications*, 5(1), 1-7.)。

今回の真核生物のゲノム内における巨大ウイルスゲノムの発見は、ウイルス学、ゲノミクス、進化生物学など、生物学の複数の分野に大きな影響を与えることになる。ウイルスの進化とウイルス学の理解につながることを期待され、真核生物における巨大ウイルスのゲノムの発見は、ウイルスの進化や細胞生命との関わりについて、さらなる知見が得られる可能性がある。また、新しいウイルスファミリーや新しいタイプのウイルスの発見にもつながりうる。真核生物の宿主に巨大なウイルスゲノムが存在することで、ウイルスが宿主とゲノムレベルでどのように相互作用しているかについての知見を得ることもできる。例えば、ウイルスが宿主機能改変を促進する方法や、宿主がウイルス感染に対する耐性を進化させる方法などが明らかになる。さらには、巨大ウイルスの挿入は、生物に新しい遺伝物質を導入し、その進化に貢献する重要なメカニズムである。真核生物に巨大なウイルスゲノムが発見されれば、ウイルスと真核生物の間の水平遺伝子伝達の明確な例となり、そのメカニズムや頻度について新しい知見が得られる。

2. 研究の目的

本研究では、巨大ウイルスが他の生物に全ゲノム挿入された発見事例をもとに、全ゲノム挿入先生物への影響に関する解析を行った。巨大ウイルスとは、最大 1µm のサイズと 1Mb を超えるゲノムを持つウイルスで、巨大ウイルスとは、そのゲノムサイズや形状、複製サイクルなどが他のウイルスと大きく異なる。巨大ウイルスは、一般的なウイルスに比べてゲノムサイズが大きく、数百から数千の遺伝子を持っている。また、その形状やサイズも大きく、細胞内での複製サイクルも独自のものがある。巨大ウイルスの発見は、ウイルスの進化や生物学的多様性に関する新たな視点を提供できる。また、これらのウイルスが他の生物と遺伝子の交換を行っていることから、生物の進化や共生関係においても重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、配列における変異速度が激しく系統だった進化解析は非常に難しい上、過去に宿主生物などにどのような影響を与えていたかは明らかになっていない。細胞の起源とも言われる巨大ウイルスが生命進化に果たした役割の解明につながる研究である。ミドリゾウリムシに細胞内共生をするクロレラ(*Chlorella variabilis*)は、共生により巨大ウイルス(PBCV)から保護されているが、外界に放出されると巨大ウイルス(PBCV)に感染し死滅してしまう。一方、共生クロレラの近縁種だがミドリゾウリムシに共生しない自由生活クロレラ(*Chlorella vulgaris*)は、巨大ウイルスの全ゲノムを自身のゲノムの中に獲得していて、ウイルス抵抗性を示す。巨大ウイルスが他生物に全ゲノム挿入されていることは非常に稀な発見である。ウイルスが種分化や共生の原動力となったかを研究できる挑戦的な課題でありこれを解明する目的とした研究を実施した。

3. 研究の方法

- 巨大ウイルス全ゲノム挿入の確認: ショートリードシーケンサとロングリードシーケンサの利用によるハイブリッド全ゲノム配列の新規決定で、巨大ウイルスゲノム配列を宿主ゲノムにおける挿入を確認した。
- 近縁種比較ゲノムによる巨大ウイルス挿入とゲノム変異の確認: 巨大ウイルスが確認された *Chlorella variabilis* の他、近縁種である *C. variabilis*、*C. vulgaris*、*C. sorokiniana* の全ゲノムを確認し、*Chlorella variabilis* の他には巨大ウイルスが挿入されていないことを確認した。
- 挿入されたウイルスの配列と遺伝子機能に関する関係性: 挿入された巨大ウイルスゲノムにおける遺伝子の機能に関する予測解析を行い、どのような機能群であるかを確認した。

4. 研究成果

まず、巨大ウイルスの挿入の確認と他のクロレラに挿入されているかどうかの確認のため、複数のクロレラゲノム情報の整備を行った。*C. variabilis*、*C. vulgaris*、*C. sorokiniana* のゲノムを組み立てるために、ショートリードとロングリードデータを用いたハイブリッドアセンブリという手法を採用した。3種のハイブリッドデータをそれぞれアセンブルし、これらのアセンブルが断片化されているかどうかを指標を用いて評価し、各ゲノム非常に高精度にアセンブルすることに成功した。*C. variabilis* に関

して、決定したゲノムにおいて、巨大ウイルスゲノムが挿入されていることを確認した(図 1)。さらに近縁種における巨大ウイルスの挿入を確認したところ、*C. vulgaris* と *C. sorokiniana* に関しては、想定通り巨大ウイルスの挿入がないことを確認した。巨大ウイルス(PBCV-1)のほぼ全長ゲノムである 289,474bp の配列を宿主である *C. variabilis* のゲノムにおいて確認した。誤同定でないことは、ロングリードシーケンサにおける、境界領域の確認により達成した。

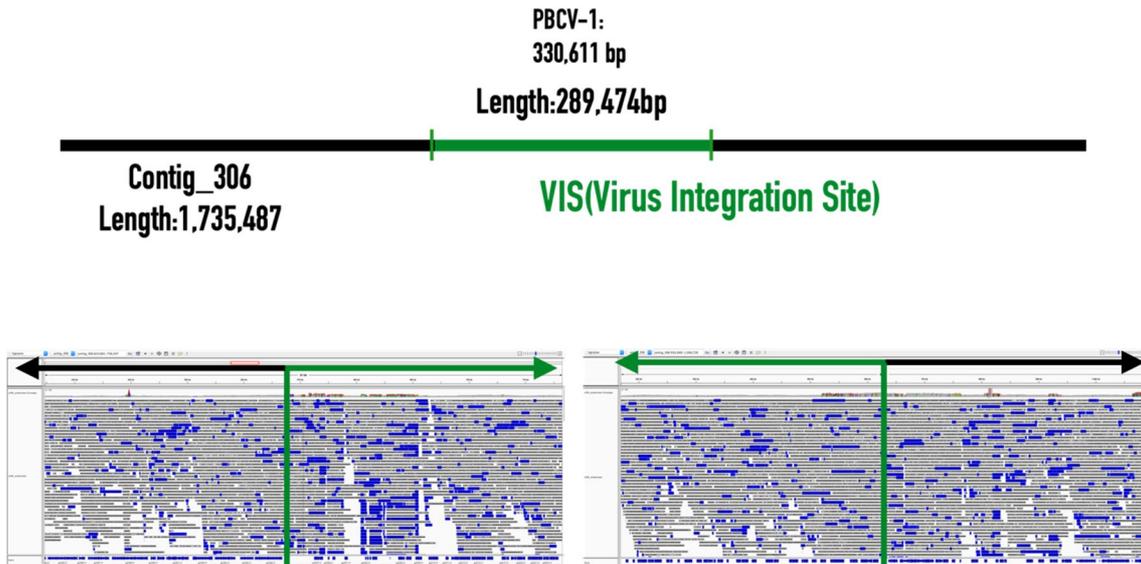


図 1 PBCV-1 ウイルスゲノム配列が *C. variabilis* ゲノムに挿入されていることの確認

次に、巨大ウイルスゲノムと、*C. variabilis* におけるゲノムのシンテニー解析(遺伝子の並び順に関する解析)を行なったところ(図 2)、あまり遺伝子の順番は保存されていないことが示唆された。このことは、巨大ウイルスが進化の過程において遺伝子の順番を変えたか、宿主ゲノムにおける遺伝子の並びが、相同組換えなどで変化していることを示している。また、宿主に挿入されたウイルス挿入サイト(Virus inserted site:VIS)における予測遺伝子の機能カテゴリ解析においては、PBCV(*Paramecium bursaria chlorella virus*)というクロレラ感染巨大ウイルスそのものの機能遺伝子予測が 45%予測されたほか、他のクロレラに感染するウイルス(15%)や他のウイルス群における遺伝子が予測された(図 3)。

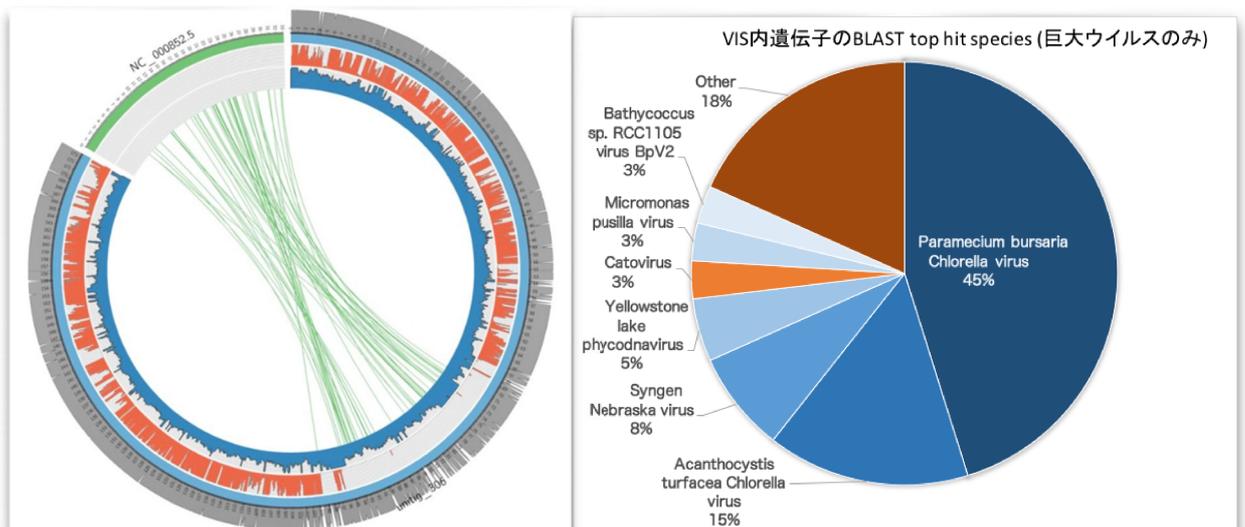


図 2 ホストゲノムと巨大ウイルスゲノムのシンテニー解析 (上左図)

図 3 Virus inserted site (VIS)における遺伝子の機能群解析 (上右図)

次に、二次共生初期における共生体のゲノム変化に着目し共生への移行に伴う遺伝子の変化を調べるため、*C. variabilis* のゲノムを近縁の自由生活種と比較した。また、共生の遺伝的メカニズムを明らかにするために、*C. variabilis* の共生条件下と非共生条件下でのトランスクリプトームを解析した。その結果、*C. variabilis* の遺伝子は、細胞壁の生合成と分解、宿主との代謝交換に関与し、共生において重要な役割を担っていることが分かった。

さらに、藻類ゲノムにおける巨大ウイルス遺伝子が発現しているかの検証と機能分析を行った。発現変動遺伝子を同定するために、通常状態の *C. variabilis* をコントロールとしてウイルスに晒されう

る非共生条件で培養、ウイルスに晒され得ない共生条件で培養から得た RNA-seq データの比較検討を行った。フィルタリング後、ゲノムにマップされたリードを遺伝子ごとにカウントし、一般化尤度比検定を用いて、3 条件間のペアワイズ比較から有意な発現遺伝子を抽出した。機能解析の結果、ほとんどの巨大ウイルス由来遺伝子は発現していないことがわかったが、いくつかの遺伝子は発現していることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakagawa So, Sakaguchi Shoichi, Ogura Atsushi, Mineta Katsuhiko, Endo Toshinori, Suzuki Yoshiyuki, Gojobori Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Current trends in RNA virus detection through metatranscriptome sequencing data	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13626	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Khedkar Gulab, Kambayashi Chiaki, Tabata Hiromasa, Takemura Ikuyo, Minei Ryuhei, Ogura Atsushi, Kurabayashi Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 The draft genome sequence of the Brahminy blindsnake <i>Indotyphlops braminus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-022-01530-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakajima Yuichi, Ogura Atsushi	4. 巻 48
2. 論文標題 Genomics and effective trait candidates of edible insects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Bioscience	6. 最初と最後の頁 101793 ~ 101793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fbio.2022.101793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Tomohiko, Goto-Inoue Naoko, Kimishima Masaya, Toyoharu Jike, Minei Ryuhei, Ogura Atsushi, Nagoya Hiroyuki, Mori Tsukasa	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel ND1 mitochondrial DNA mutation is maternally inherited in growth hormone transgenesis in amago salmon (<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10521-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamba Seiji, Ogura Atsushi, Miura Yoshiko, Hasegawa Makoto	4. 巻 37
2. 論文標題 Enrichment of Uncommon Bacteria in Soil by Fractionation Using a Metal Mesh Device	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21P042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon Tetsuo, Pei Liyi, Ichikawa Ryota, Chen Chunyan, Wang Ping, Takemura Ikuyo, Ye Yingying, Yan Xiaojun, Guo Baoying, Li Weiye, Lauden Hagai Nsobi, Tabata Hiromasa, Pan Hao, Omori Yoshihiro, Ogura Atsushi, Jiang Lihua	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-genome resequencing of large yellow croaker (<i>Larimichthys crocea</i>) reveals the population structure and signatures of environmental adaptation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90645-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jiang Lihua, Kon Tetsuo, Chen Chunyan, Ichikawa Ryota, Zheng Qiyuan, Pei Liyi, Takemura Ikuyo, Nsobi Lauden Hagai, Tabata Hiromasa, Pan Hao, Omori Yoshihiro, Ogura Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Whole-genome sequencing of endangered Zhoushan cattle suggests its origin and the association of MC1R with black coat colour	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96896-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kim Oanh T. P., Kagaya Yuki, Tran Hoang S., Minei Ryuhei, Tran Trang T. H., Duong Ha T. T., Le Binh T. N., Dang Lua T., Kinoshita Kengo, Ogura Atsushi, Yura Kei	4. 巻 165
2. 論文標題 A novel circular ssDNA virus of the phylum Cressdnaviricota discovered in metagenomic data from otter clams (<i>Lutraria rhynchaena</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 2921 ~ 2926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04819-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida Masa-aki, Imoto Junichi, Kawai Yuri, Funahashi Satomi, Minei Ryuhei, Akizuki Yuki, Ogura Atsushi, Nakabayashi Kazuhiko, Yura Kei, Ikeo Kazuho	4. 巻 22
2. 論文標題 Genomic and Transcriptomic Analyses of Bioluminescence Genes in the Enope Squid <i>Watasenia scintillans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 760 ~ 771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-020-10001-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bonad Morgane, Ogura Atsushi, Corre Erwan, Bassaglia Yann, Bonnaud-Ponticelli Laure	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity of Light Sensing Molecules and Their Expression During the Embryogenesis of the Cuttlefish (<i>Sepia officinalis</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.521989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	保科 亮 (Hoshina Ryo) (40373089)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助教 (34204)	

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
---------	---------