

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291092

研究課題名(和文) ウイルス・宿主共存機構：宿主個体群構造ダイナミクスの生理生態学的・数理的解析

研究課題名(英文) Study of population dynamics of host population during viral infection

研究代表者

植木 尚子 (Ueki, Shoko)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：50622023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：赤潮原因藻ヘテロシグマと大型二本鎖DNAウイルスHeterosigma akashiwo virus (HaV)をモデルとし、HaVに対して異なる感染応答を示す宿主混合個体群へのウイルス感染進行の過程を解析を目的として研究を行った。本研究により、HaV全長遺伝子配列を解読し、他の大型二本鎖DNAウイルスとの比較解析により、進化的・分類学的知見を得た。また、ヘテロシグマのウイルス感染への応答は、宿主遺伝子型のみではなく、宿主に随伴する細菌の種類に依存することが明らかとなった。本研究は、予定とは異なる方向に進展したが、今後のヘテロシグマおよびHaV研究の進展の基盤となる成果を上げたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The initial goal of the project was to analyze the infection process of Heterosigma akashiwo virus (HaV) to its host population, bloom-forming algae, Heterosigma akashiwo, that consisted from strains showing the different reactions to HaV infection. During the project, we completed the whole genome sequencing and gene predictions of HaV, and obtained the insights into the evolutionary and phylogenetical position to other giant double-stranded DNA viruses. In addition, contradicting to the initial understanding, we found out that the host reactions to HaV infection were not only determined by the host genotypes, but also by the presence/absence or the species of the accomplice bacteria associating to the host. The project developed into direction unpredicted when it was initially planned: however, the insights obtained by the project will provide infrastructure for future studies about H. akashiwo and its virus from cellular and molecular biology view points.

研究分野：生態・環境

キーワード：宿主 ウイルス 個体群 感染 遺伝子型

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、自己複製過程で宿主の生理機能を妨げ、多くの場合死滅させる一方で、ウイルスの種としての存続には宿主の存続が不可欠である。このような逆説的な関係にあるウイルスと宿主の共存はいかにして可能となるのか？本研究では、赤潮原因藻ヘテロシグマとそのウイルスをモデルとして、一種類のウイルスに対して異なる感染応答をする個体を含む群集が、長期間の共存を果たすメカニズムを解明することを目的として発案した。

赤潮原因藻ヘテロシグマは、日本近海の浅海域で夏季に赤潮を形成し、周辺海域に生息する魚介類にダメージを与えることで知られる。このヘテロシグマ特異的に感染するウイルスの一つとして単離されたのが *Heterosigma akashiwo virus (HaV)* である。HaV の特徴として、大型の二本鎖 DNA (dsDNA) をゲノムとして持つウイルスであることが挙げられる。ウイルスでも特に RNA ウイルスは、変異が起こりやすく、境内を繰り返すことで、ゲノムにバリエーションが生じたり、環境に応じた変異が生じたりという懸念があるが、HaV は dsDNA ウイルスであることから、宿主のゲノム校正機構により変異が抑制されると考えられ、長期間における感染研究のモデルとしては最適と考えられる。

研究代表者は、研究開始前に、ウイルス感染に異なる応答を示す 4 系統のヘテロシグマを入手した。これらは、死滅型 = 感染後、二日程度で溶藻・死滅に至るもの、非感染型 = ウイルスゲノムの増幅が全く見られないもの、排除型 = 感染後、一度はウイルスゲノムが増幅するが、その後ウイルスゲノム量は減少し、最終的には消滅するもの、潜在型 = 感染後、持続して低レベルでウイルスゲノムが検出されるもの、という感染応答を示した。自然界におけるウイルス対宿主のせめぎ合いは、このように、異なる感染応答を示す個体の混合群対ウイルスという、均一でない集団における感染過程の総和によって決定されると考えられる。本研究では、ヘテロシグマと HaV をモデルとし、これら異なる感染応答を示す宿主個体が混合個体群として存在する場合の宿主個体群の構成遺伝子型変動と、宿主個体群におけるウイルス増幅・維持の時間変動を観察することで、ウイルスと宿主の種としての存続の両立についての知見を得ることを目標として、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、単細胞藻であるヘテロシグマと、遺伝子変異が起こりにくい二本鎖 DNA をゲノムとする HaV をモデルとして、致死性を持つウイルスが、異なる感染型を示す混合個体群に感染した場合に示す感染過程の精査と理解を目的としていた。

ヘテロシグマは、これまで赤潮原因藻である故に生態学的な研究がされてきた生物種

であるが、一方、分子細胞レベルの知見の蓄積は非常に少なく、ゲノム配列などの情報は得られていない。また、HaV は、~275 kbp という、ウイルスとしては破格に大型な二本鎖 DNA をゲノムとするウイルスであり、研究開始時点では遺伝子全長配列は得られていなかった。本研究の目的には、当初より、赤潮原因藻であり、その挙動が生態系に大きなインパクトを与えうる赤潮原因藻であるヘテロシグマと、生物学的に非常に興味深い特徴を有する HaV について、本研究終了後の他の研究を推進する場合の基盤を与えるような分子生物学的知見を蓄積することも含まれていた。

## 3. 研究の方法

### (1) 宿主識別マーカー遺伝子の選定

上述した 4 つの異なる感染応答を示すヘテロシグマ株は、顕微鏡観察では識別できない。そのため、株別別バーコードとして利用できる遺伝子配列の選定を計画した。具体的には、4 株についてミトコンドリアゲノムが葉緑体ゲノムの配列を解読し、株特異的な配列を選定し、株特異的にターゲットを増幅し、qPCR に用いることができるプライマーをデザインすることを目標とした。

### (2) ウイルスゲノム解読および各株において、ウイルス感染の各ステージを示す遺伝子マーカーの選定

まず、ウイルスゲノム全長を解読し、さらに、ウイルス感染過程の RNAseq を行い、ウイルス感染過程のステージによる遺伝子発現パターンを解析し、ステージ特異的に発現する遺伝子を特定することを目標とした。

### (3) 異なる感染型を示す株を混合培養した系に対するウイルス感染過程の時系列解析

異なる感染系を示す株を様々な割合で混合培養し、そこにウイルスを感染させたのち、混合培養系における宿主個体の割合変動やウイルスゲノムの個体群保持量などを決定し、混合個体群とウイルスの動態モニタリングと解析を計画した。

## 4. 研究成果

### (1) 感染型と宿主遺伝子型の対応

本研究は、もともと 4 つの感染型が宿主遺伝子型に決定されるという前提条件のもとに計画した。つまり、それぞれの感染型を示す宿主株は、異なる遺伝子型を有し、遺伝子型の差、あるいは発現量の差が感染型の差の原因であると考えていた。しかし、研究を進めるうちに、ヘテロシグマのウイルスに対する感染反応の決定因子として、ヘテロシグマの随伴細菌が大きな役割を持つことが明らかとなってきた。たとえば、潜在型宿主は、感染後、ウイルスゲノムを低レベルで長期間保持するという結果を得ていたが、この宿主株がいくつかの細菌を随伴していることを

見出した。また、抗生物質の添加により、潜在型宿主株を無菌化した結果、それまでは観察された低レベルでのウイルスゲノムの維持が見られなくなった。つまり、無菌化により、潜在型が非感染型に変化した。この知見は、ウイルスに対する感染反応は、宿主遺伝子型だけでなく、随伴する細菌によっても規定されることを示している。また、自然界において、個体群に保持されるウイルス量は、このような海洋細菌の存在に大きな影響を受けることが示唆された。

## (2) 宿主株識別マーカーとミトコンドリアゲノム上に存在する超可変領域

株別の挙動を調べるための識別マーカー遺伝子選定を目的として、合計6株のヘテロシグマの総ゲノムをMiSeqにて小スケールで解読し、リードをアセンブルすることでミトコンドリアゲノム全長配列情報と、葉緑体ゲノム部分配列情報を得た。ミトコンドリアゲノム配列を、すでにデータベースに登録されていた3株のヘテロシグマ・ミトコンドリアゲノム配列を合わせて解析したところ、ゲノム上の一部分に超可変領域を見出した。

この超可変領域は、特に北米産株と日本産株の間で違いが大きかったため、ヨーロッパ・アジア・南米を含めた多くの地域からヘテロシグマを入手し、この超可変領域配列を決定したところ、配列は、それぞれの株の産出地域と相関することを見出した。プランクトン類で、このような産出地域マーカーとして利用可能な配列についての発表はこれまで存在しないため、本研究による結果は非常に興味深いと言える。ミトコンドリア配列解読結果、および超可変領域と産出地域相関についての研究結果は、3報の論文として国際誌に発表した。

## (3) *HaV* ゲノムの特徴と感染過程の時系列解析

まず、*HaV* の1系統である *HaV53* の全長配列を解読し、遺伝子予測を行った。*HaV* は藻類であるヘテロシグマを宿主とすることから、藻類に感染する二本鎖DNAウイルスファミリー *Phycodnaviridae* に分類されている。*HaV* と他の *Phycodnaviridae* の全長配列とともに、コードされる遺伝子種の比較を行ったところ、*HaV* は従来見出されてきた他の *Phycodnaviridae* とは類似しない、ユニークなものであることが明らかとなった。以上の結果は二報の論文として国際紙に発表した。また、宿主への感染過程をRNAseqによって精査したところ、ウイルス由来の転写物にはpolyAが付加されないことが明らかになった。これまでに発表されている他の大型二本鎖DNAウイルスの転写物は全てpolyAが付加されていることから、*HaV* はユニークな感染戦略を取ると言える。現在は、*HaV* 感染過程におけるウイルスおよび宿主遺伝子発現解析とともに、ウイルス感染過程の細胞生物学的解

析により、*HaV* の感染戦略の解明を目指した研究を行っている。

以上のように、本研究は、当初予想していなかった方向に進展した。当初の計画からは大きく外れたものの、一方でヘテロシグマおよび *HaV* について多くの知見と蓄積し、成果をあげることができたと考えている。

以上の研究は、本研究助成にくわえ、ゲノム支援、および先進ゲノム支援による研究支援を受けて行った。

## 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, \* : 責任著者)

[雑誌論文](計8件)

- (1) Higashi A, Nagai S, Salomon P. S. and Ueki S\* A unique, highly variable mitochondrial gene with coding capacity of *Heterosigma akashiwo*, class *Raphidophyceae*. *J Appl Phycol* (査読あり) DOI: 10.1007/s10811-017-1142-2(2017)
- (2) Higashi A, Nagai S, Seone S. and Ueki S\* A hypervariable mitochondrial protein coding sequence associated with geographical origin in a cosmopolitan bloom-forming alga, *Heterosigma akashiwo*. *Biology Letters* (査読あり) DOI: 10.1098/rsbl.2016.0976 (2017)
- (3) Maruyama F. and Ueki S\*. Evolution and Phylogeny of large DNA viruses, *Mimiviridae* and *Phycodnaviridae* including newly characterized *Heterosigma akashiwo* virus. *Frontiers in Microbiology* (査読あり) fmcb.2016.01942 (2016)
- (4) Ogura Y, Nakayama N, Hayashi T, and Ueki S\*. Mitochondrial genome sequences of four strains of bloom-forming raphidophyceae, *Heterosigma akashiwo* Genome Announcements (査読あり) DOI: 10.1128 (2016)
- (5) Ogura Y, Hayashi T, and Ueki S\* The complete genome sequence of *Phycodnavirus*, *Heterosigma akashiwo* virus strain 53. *Genome Announcements* (査読あり) 4: e01279-16, doi: 10.1128/genomeA.01279-16 (2016)

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 植木 尚子 *Heterosigma akashiwo virus* 配列解析と *Phycodnaviridae* 再定義、微生物生態学会、2016.10.24、横須賀市文化会館(神奈川県横須賀市)
- (2) 丸山 史人、植木 尚子 *Heterosigma akashiwo virus* 遺伝子；その構造と大型 dsDNA ウイルスにおける進化的・分類学的位置付け、ファージ・環境ウイルス合同シンポジウム、2016.10.22、日本海洋研究機構(神奈川県横須賀市)
- (3) Shoko Ueki Characterization of genome organization of a phycodnavirus, *Heterosigma akashiwo virus*, The 8th Aquatic Virus Workshop, 2016.7.11. Plymouth University (Plymouth, Devon), United Kingdom.
- (4) 植木 尚子 大型二本鎖 DNA ウイルスの感染過程の解析 ゲノム微生物学会、2016.3.25、東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/index-j.html>

<http://innoveresg.blogspot.jp/2017/04/4.html>

<http://innoveresg.blogspot.jp/2016/12/3.html>

[http://innoveresg.blogspot.jp/2016/12/blog-post\\_16.html](http://innoveresg.blogspot.jp/2016/12/blog-post_16.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

植木 尚子 (Ueki, Shoko)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：50622023

### (2)研究分担者

佐藤 昌直 (Sato, Masanao)

北海道大学・連合農学研究院・助教

研究者番号：20517693

### (3)研究分担者

中山 奈津子 (Nakayama, Natsuko)

国立研究開発法人水産研究教育機構・国立研究開発法人水産総合研究センター・主任研究員

研究者番号：20612675

### (4)研究協力者

東 藍子 (Higashi, Aiko)

岡山大学・資源植物科学研究所・非常勤研究員

小橋 理絵子 (Kobashi, Rieko)

岡山大学・資源植物科学研究所・非常勤職員