

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430184

研究課題名(和文) 海洋巨大ウイルス・ヴァイロファージ・真核生物の包括的エコシステム解析

研究課題名(英文) A holistic ecosystemic investigation of marine giruses, virophages and their eukaryotic hosts

研究代表者

緒方 博之(Ogata, Hiroyuki)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70291432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、全地球規模の海洋メタトランスクリプトームデータに基づき、巨大ウイルスが海洋のあらゆる地点で常に宿主に感染していることを明らかにした。また、新規設計した実験手法により、大阪湾の海水に6000種を超える巨大ウイルスが存在することを明らかにした。このことは、多様な海洋真核生物に巨大ウイルスが常に感染しその集団変動に影響を与えている可能性を示唆している。本研究で新規開発したウイルス情報解析ツールはインターネットを介して公開した(<http://www.genome.jp/viptree/>, <http://www.genome.jp/virushostdb/>)。

研究成果の概要(英文)：Based on a global scale eukaryotic metatranscriptomic data, we revealed that giant viruses actively infect their hosts everywhere at every depth examined. Newly designed PCR primers were used to reveal the existence of over 6,000 genotypes for giant viruses (Megaviridae) in a single water sample collected at Osaka Bay. Developed bioinformatics tools are made publicly accessible through internet (<http://www.genome.jp/viptree/>, <http://www.genome.jp/virushostdb/>).

研究分野：海洋ウイルス学

キーワード：巨大ウイルス 海洋ウイルス 海洋生態系 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

海洋微生物は海洋生態系の基盤であり、地球上の生命活動・人類の社会経済活動と深い関わりを持つ。中でもウイルスは、水圏において最多の生物学的粒子であり、微生物宿主のターンオーバー（増殖と死滅サイクル）を促進し、生態系と地球が織り成す生物地球化学的循環の原動力の一つである。同時にウイルスは、宿主に対する主要な淘汰圧であり、また遺伝子の水平伝搬を介し生態系の進化にも寄与している。本研究では、海洋ウイルスの中でも、あまり研究が進展していないが、その大きさと複雑性ゆえに近年多くの研究者の注目を集めている巨大ウイルスに着目し、その生態学的意義を包括的メタゲノム解析により明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 巨大ウイルスの頻度・多様性・地理的分布の解明：大規模海洋メタゲノムデータと既存のウイルスゲノムデータを比較し、巨大ウイルスとヴァイロファージの類縁配列の多様性・頻度分布を定量的に明らかにする。特に、既存の解析が少ない下深層（水深約 4000m）での巨大ウイルス・ヴァイロファージの分布を知ることは重要である。得られる結果は、巨大ウイルス・ヴァイロファージの生態系での意義を広く研究するための今後の基盤データとなる。

(2) 巨大ウイルスと宿主の相互作用：申請者らが開発した手法を、最新の統計学的手法を取り込み発展させる。ウイルスの頻度データと、18S rDNA/rRNA に基づく真核微生物の頻度データに開発した手法を応用し、巨大ウイルス・ヴァイロファージ・真核微生物の系統間相互作用ネットワークを推定し、三者の地理的分布と多様性を理解するための知見を得る。

(3) 地理的分布と物理化学的環境変数の相関解析：生物の存在は外部環境と密接な関係を持つ。本研究では、巨大ウイルス・ヴァイロファージ・宿主（候補）の地理的分布を環境勾配から説明できるかを明らかにする。そのために、頻度データと環境変数（温度・塩度・圧力・酸素濃度・栄養条件）を多変量解析し主要な相関関係を導く。

3. 研究の方法

本研究では、まず方法論の開発から進めた。第一に、メタゲノム配列からウイルス配列を解析するために、基本的なデータとなるウイルスと宿主の関係について知られているところをデータベース化した。また、ウイルス配列を自動分類する手法の開発も手掛けた。同時に、巨大ウイルス配列がメタゲノム配列には比較的微小な割合にしか見出されない現状を克服するために、巨大ウイルス特異的な PCR プライマーセットを新規開発した。最

後に大規模データとしては、Malaspia プロジェクトが産した深海由来のメタゲノムデータと Tara Oceans プロジェクトが産した海洋表層由来のメタゲノム、メタトランスクリプトームデータを解析に供した。

4. 研究成果

・ウイルス 宿主データベース：GenBank や RefSeq などのウイルスデータベースを自動処理し、同時に文献などから手でウイルスと宿主の関係を整理しデータベース化した (Mihara et al., *Viruses*, 2016)。当データベースは研究代表者らが開発しているゲノム ネット から 公開 している (<http://www.genome.jp/virushostdb/>)。

・ViPTree:メタゲノムから得られる比較的長いウイルス配列を分類するためのツール (Nishimura et al., *mSphere*, 2017; Nishimura et al., *Bioinformatics*, 2017)。リファレンスゲノムとのゲノム類似性に基づき、系統関係を反映したプロテオミックツリーを自動作成。遺伝子の自動アノテーションも行う (<http://www.genome.jp/viptree/>)。

・巨大ウイルスの多様性：巨大ウイルスの多様性を明らかにするために、Tara Oceans などの大規模メタゲノムデータを用いて解析を行った。その結果、巨大ウイルスの系統多様性は、原核生物の系統多様性よりも高いことが示唆された (投稿準備中)。また、より詳細な多様性の特徴づけのため、巨大ウイルスに DNA ポリメラーゼ遺伝子に特異的な高度縮退プライマーセットを開発した。それを大阪湾から採取した海水サンプルからの DNA に応用したところ、6000 以上の種 (遺伝子型、OTU) の巨大ウイルスが存在していることを解明した (投稿準備中)。

・深海におけるヴァイロファージの存在：Malaspina 深海海洋メタゲノムデータを解析したところ、巨大ウイルス配列のみならず、Marvirus ゲノムに類似したヴァイロファージ配列を検出し、深海微生物生態系においても、巨大ウイルスとヴァイロファージが存在していること明らかにした (投稿準備中)。また表層における巨大ウイルスの分布に関しても解析を行った。

・メタトランスクリプトーム：真核生物画分の Tara Oceans 由来メタトランスクリプトームデータ (>400 サンプル) を解析したところ、巨大ウイルスも含めて、真核生物に感染すると考えられるウイルス転写産物を、全てのサンプルで検出した。また、ウイルス由来遺伝子の 72% が巨大ウイルス由来であることを明らかにした。この発見と上記の高い多様性を合わせると、従来言われていたバクテリオファージのみならず、巨大ウイルスについても、その宿主 (巨大ウイルスの場合は真核微

生物) 集団への影響が大きい可能性を示唆している(投稿準備中)。

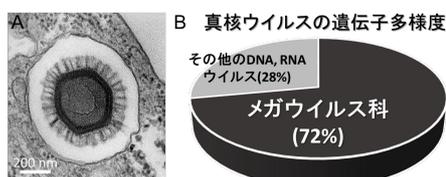


図1 メガウイルス科。(A) 126万塩基対ゲノムを保持するアモeba感染性の *Megavirus chilensis*。(B) Tara Oceans 真核微生物メタトランスクリプトームの解析から得られた真核ウイルス遺伝子多様度分布。

・物理化学的環境変数との相関：現在、物理化学的環境変数との相関を解析中である。予備的な解析によると、サイズ画分、海水面からの深度により、結果が異なり、より詳細な解析が必要であると結論している。

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 14件)

- Nishimura Y., Yoshida T., Kuronishi M., Uehara H., Ogata H., Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/btx157 (2017).
- Nishimura Y., Watai H., Honda T., Mihara T., Omae K., Roux S., Blanc-Mathieu R., Yamamoto K., Hingamp P., Sako Y., Sullivan M.B., Goto S., Ogata H., Yoshida T. Environmental viral genomes shed new light on virus-host interactions in the ocean. *mSphere*, 2, e00459-16 (2017).
- Mihara T., Nasr-Eldin M.A., Chatchawankanphanich O., Bhunchoth A., Phironrit N., Kawasaki T., Nakano M., Fujie M., Ogata H., Yamada T. A *Ralstonia solanacearum* phage phiRP15 is closely related to Viunaliikeviruses and encodes 19 tRNA-related sequences. *Virol. Rep.*, 6, 61-73 (2016).
- Bhunchoth A., Blanc-Mathieu R., Mihara T., Nishimura Y., Askora A., Phironrit N., Leksomboon C., Chatchawankanphanich O., Kawasaki T., Nakano M., Fujie M., Ogata H., Yamada, Y. Asian jumbo phages, phiRSL2 and phiRSF1, infect *Ralstonia solanacearum* and show common features of phiKZ-related phages. *Virology*, 494, 56-66 (2016).
- Mihara T., Nishimura Y., Shimizu Y., Nishiyama H., Yoshikawa G., Uehara H., Hingamp P., Goto S., Ogata H. Linking virus genomes with host taxonomy. *Viruses*, 8, 66, doi:10.3390/v8030066 (2016).
- Guidi L., Chaffron S., Bittner L., Eveillard D., Larhlami A., Roux S., Darzi Y., Audic S., Berline L., Brum J., Coelho L.P., Espinoza J.C., Malviya S., Sunagawa S., Dimier C.,

Kandels-Lewis S., Picheral M., Poulain J., Searson S.; Tara Oceans Consortium Coordinators, Stemmann L., Not F., Hingamp P., Speich S., Follows M., Karp-Boss L., Boss E., Ogata H., Pesant S., Weissenbach J., Wincker P., Acinas S.G., Bork P., de Vargas C., Iudicone D., Sullivan M.B., Raes J., Karsenti E., Bowler C., Gorsky G. Plankton networks driving carbon export in the oligotrophic ocean. *Nature*, 532, 465-470 (2016).

Lescot M., Hingamp P., Kojima K.K., Villar E., Romac S., Veluchamy A., Boccara M., Jaillon O., Iudicone D., Bowler C., Wincker P., Claverie J.-M., Ogata H. Reverse transcriptase genes are highly abundant and transcriptionally active in marine plankton assemblages. *ISME J.*, 10, 1134-1146, doi:10.1038/ismej.2015.192. (2016).

Takemura M., Yokobori S., Ogata H. Evolution of eukaryotic DNA polymerases via interaction between cells and large DNA viruses. *J. Mol. Evol.*, 81, 24-33, DOI: 10.1007/s00239-015-9690-z (2015).

Pesant S., Not F., Picheral M., Kandels-Lewis S., Le Bescot N., Gorsky G., Iudicone D., Karsenti E., Speich S., Trouble R., Dimier C., Searson S.; Tara Oceans Consortium Coordinators. Open science resources for the discovery and analysis of Tara Oceans data. *Sci. Data*, 2, 150023 (2015).

Sunagawa S., Coelho L.P., Chaffron S., Kultima J.R., Labadie K., Salazar G., Djahanschiri B., Zeller G., Mende D.R., Alberti A., Cornejo-Castillo F.M., Costea P.I., Cruaud C., d'Ovidio F., Engelen S., Ferrera I., Gasol J.M., Guidi L., Hildebrand F., Kokoszka F., Lepoivre C., Lima-Mendez G., Poulain J., Poulos B.T., Royo-Llonch M., Sarmiento H., Vieira-Silva S., Dimier C., Picheral M., Searson S., Kandels-Lewis S.; Tara Oceans coordinators, Bowler C., de Vargas C., Gorsky G., Grimsley N., Hingamp P., Iudicone D., Jaillon O., Not F., Ogata H., Pesant S., Speich S., Stemmann L., Sullivan M.B., Weissenbach J., Wincker P., Karsenti E., Raes J., Acinas S.G., Bork P. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348, 1261359 (2015).

de Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahe F., Logares R., Lara E., Berney C., Le Bescot N., Probert I., Carmichael M., Poulain J., Romac S., Colin S., Aury J.M., Bittner L., Chaffron S., Dunthorn M., Engelen S., Flegontova O., Guidi L., Horak A., Jaillon O., Lima-Mendez G., Lukes J., Malviya S., Morard R., Mulot M., Scalco E.,

Siano R., Vincent F., Zingone A., Dimier C., Picheral M., Searson S., Kandels-Lewis S.; Tara Oceans Coordinators, Acinas S.G., Bork P., Bowler C., Gorsky G., Grimsley N., Hingamp P., Iudicone D., Not F., Ogata H., Pesant S., Raes J., Sieracki M.E., Speich S., Stemann L., Sunagawa S., Weissenbach J., Wincker P., Karsenti E. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348, 1261605 (2015).

Lima-Mendez G., Faust K., Henry N., Decelle J., Colin S., Carcillo F., Chaffron S., Ignacio-Espinosa J.C., Roux S., Vincent F., Bittner L., Darzi Y., Wang J., Audic S., Berline L., Bontempi G., Cabello A.M., Coppola L., Cornejo-Castillo F.M., d'Ovidio F., De Meester L., Ferrera I., Garet-Delmas M.J., Guidi L., Lara E., Pesant S., Royo-Llonch M., Salazar G., Sanchez P., Sebastian M., Souffreau C., Dimier C., Picheral M., Searson S., Kandels-Lewis S.; Tara Oceans coordinators, Gorsky G., Not F. Ogata H., Speich S., Stemann L., Weissenbach J., Wincker P., Acinas S.G., Sunagawa S., Bork P., Sullivan M.B., Karsenti E., Bowler C., de Vargas C., Raes J. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348, 1262073 (2015).

Villar E., Farrant G.K., Follows M., Garczarek L., Speich S., Audic S., Bittner L., Blanke B., Brum J.R., Brunet C., Casotti R., Chase A., Dolan J.R., d'Ortenzio F., Gattuso J.P., Grima N., Guidi L., Hill C.N., Jahn O., Jamet J.L., Le Goff H., Lepoivre C., Malviya S., Pelletier E., Romagnan J.B., Roux S., Santini S., Scalco E., Schwenck S.M., Tanaka A., Testor P., Vannier T., Vincent F., Zingone A., Dimier C., Picheral M., Searson S., Kandels-Lewis S.; Tara Oceans Coordinators, Acinas S.G., Bork P., Boss E., de Vargas C., Gorsky G., Ogata H., Pesant S., Sullivan M.B., Sunagawa S., Wincker P., Karsenti E., Bowler C., Not F., Hingamp P., Iudicone D. Environmental characteristics of Agulhas rings affect interocean plankton transport. *Science*, 348, 1261447 (2015).

Blanc-Mathieu R., Ogata H. DNA repair genes in the Megavirales pangenome. *Curr. Opin. Microbiol.*, 31, 94-100 (2016).

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
緒方 博之(OGATA H.iroyuki)
京都大学化学研究所 教授
研究者番号：70291432

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()