

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14372

研究課題名（和文）最も単純な古細菌ウイルスClavaviridae科APBV1の増殖機構の解明

研究課題名（英文）Replication mechanism of hyperthermophilic Clavaviridae virus APBV1

研究代表者

望月 智弘（Mochizuki, Tomohiro）

東京工業大学・地球生命研究所・特任助教

研究者番号：90748279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：熱水などの極限環境に生息する超好熱古細菌に感染するウイルスのうち、代表者が過去に単離し、ゲノムサイズが最も小さくシンプルなClavaviridae科ウイルスAPBV1の解析を行った。ウイルス粒子を構成する4つの構造タンパク質の解析では、主殻タンパク質は単独でウイルス様粒子を構成し、粒子内の局在が不明だった1つのタンパク質は粒子の表層部に付加されていることが明らかになった。新たな熱水サンプルから単離したAPBV2とAPBV1のゲノム配列を比較したところ、両者は極めて高く保存されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析したAPBV1ウイルスの殻タンパク質は、長細い桿菌型に自己会合する珍しいタンパク質であることが明らかとなった。タンパク質工学的観点からの利用も見込まれるため、福井大学との共同でこの成果で得られた技術的知見について特許出願を行った。4種ある構造タンパク質の粒子内局在も徐々に明らかになりつつあることから、今後は遺伝子組換え法を用いた配列改変なども行うことで、将来的にはコンタミと無縁なワクチンを生産するための新たなウイルスベクターとなることも期待される。また、古細菌ウイルスの多様性を理解することで、数十億年に亘るウイルスの起源や進化の解明にも繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the replication mechanism of one of the most simplest archaeal virus, APBV1 of the Clavaviridae family. Experimental investigation on the virion structural protein revealed that the major capsid protein self assembles to form the bacilliform structure. And by performing immuno-electron microscopy, we identified that one of the minor capsid proteins are being located on the outer surface of the virion. We have also succeeded in isolating the second isolate of the Clavaviridae virus, APBV2, from fresh sample obtained from a Japanese geothermal environment. Comparative genomics of the two genomes revealed that two clavaviruses are highly conserved in their genetic content. Due to their unusually small genome size, it may be that clavaviruses cannot tolerate much flexibility in their genetic composition.

研究分野：環境ウイルス学

キーワード：古細菌 ウイルス 超好熱菌 ゲノム 殻タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、古細菌(Archaea)、細菌(Bacteria)、真核生物(Eukarya)の全てのドメインに存在するが、最も研究例が乏しいのが古細菌を宿主とするウイルスである。僅かな研究例ながら、80°C以上の高温環境に生息する超好熱古細菌を宿主とするウイルスは、レモン型やボトル型をはじめとし、粒子形状やゲノム配列が極めて多様性に富んでおり、ウイルスの進化や多様性を考察する上でも特異な存在である。1980年代に最初の超好熱古細菌ウイルスが発見されて以来、単離例は漸く100株を超えるまでになったものの、その多くはウイルス粒子の電子顕微鏡画像とゲノム配列などの一次情報に限られており、詳細な生物学的解析まで行われているものは限定的である。このような背景から本研究では、既に単離されている超好熱古細菌ウイルスのうちの1種をターゲットに、その生物学的特性をより詳細に研究することで、地球上のウイルス界において特別な存在である古細菌ウイルスの理解を深化させたいと考える。

## 2. 研究の目的

本研究では代表者が2005年に九州の沿岸熱水環境から単離した、超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* (至適増殖温度 90-95°C)に感染する *Clavaviridae* 科ウイルス *Aeropyrum pernix bacilliform virus 1* (APBV1)の詳細を研究することを目的とした。本ウイルスは5.2kbの環状二本鎖DNAゲノムを有するが、これは全ての古細菌ウイルスの中で最小のゲノムサイズである。全ての二本鎖DNAウイルスと比較しても、哺乳類などに感染しゲノムサイズが最小の *Polyomaviridae* 科の真核ウイルスより数十塩基大きいのみである。本ウイルスは他の古細菌ウイルスと比較しても、培養が極めて簡単である上に粒子生産能も非常に高い。また本研究に先立ち、研究代表者を含めた欧州の国際研究グループによりクライオ電子顕微鏡解析による構造解析が行われており、143×15.8 nmの桿菌型粒子の3Åレベルでの詳細構造が既に解明されている。これらの特性から、本ウイルスは、将来的に古細菌ウイルス研究におけるモデルウイルスの一つになりうると十分に予想される。そこで本研究ではAPBVをより多角的に解析することで、様々な応用研究への発展を含め、本ウイルスが将来的に古細菌ウイルス研究におけるモデルウイルスの一つとなるための二次情報を提供することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、*Clavaviridae* 科ウイルス APBV1 を用い、下記4点の解析実験を行った。

### (1) 感染サイクルの理解を目的とした一段増殖実験

本ウイルスは倍加時間が2.5時間の宿主 *A. pernix* に感染し、1-2日程度の培養後には高濃度のウイルス粒子が細胞外に放出されることは経験的に分かっていたが、詳細な感染サイクルはこれまで検証していなかった。一般的なウイルスでは、感染サイクルを解明するための一段増殖実験(one step growth curve)は、ウイルスの溶菌性を計数の指標、もしくは核酸染色剤と蛍光顕微鏡を用いたウイルス粒子の直接計数により行う。しかし本ウイルスは、宿主を殺さない非溶菌性ウイルスであり、また蛍光観察が検出限界以下の小さいゲノムのウイルスである。そのため本研究では、細胞外液からウイルス粒子を濃縮精製し、ウイルスゲノムDNAの核酸量を定量化することによりウイルス粒子数を算定した。

### (2) 計4つの殻タンパク質の粒子内局在の解明

代表者による先行研究により、本ウイルスは4つの構造タンパク質(ORF6-81, 7-201, 8-93, 9-99)から構成されていることは明らかとなっていた。各タンパク質の存在量比から、そのうちのORF6-81がウイルス粒子本体を司る主殻タンパク質(major capsid protein)であることは既に解明しており、また先述の詳細な構造解析からも同様の結果が得られていた。しかし残りの3つの構造タンパク質(minor capsid protein)がウイルス粒子内のどの部位を構成しているかについては一切情報が得られていなかった。そこで本研究では、全ての構造タンパク質に対する抗体を作成(外注)し、金コロイドを付着した二次抗体を用いた免疫電顕法を行うことで、各 minor capsid protein の粒子内局在の解明を試みた。

### (3) 主殻タンパク質の粒子形成メカニズムの解明

先述の通り、本ウイルスはORF6-81産物が主殻タンパク質として桿菌型のウイルス粒子本体を構成していることは明らかになっているが、当タンパク質が単体で桿菌型の粒子を形成するのか、またはゲノムDNAや他の構造タンパク質などの他の要素が組み合わさって形成す

るのかなどは未解明である。一般的にウイルスの主殻タンパク質は大腸菌などの発現系では封入体を形成してしまうなど、発現が困難である。研究代表者も過去に一度大腸菌での発現を試みたものの、可溶性タンパク質を得ることはできなかった。そこで本研究では、好熱性古細菌のタンパク質発現の研究実績を豊富に有する福井大学の里村武範准教授らの協力を仰ぐことにより、大腸菌を用いた ORF6-81 の発現を再度試みた上で、桿菌型粒子のアッセムブリーのメカニズムの解明を行った。

#### (4) "APBV2"の単離による比較ゲノミクス

本研究開始時点では *Clavaviridae* 科ウイルスは、本研究で対象としている APBV の 1 種のみが報告されていた。そのため、これまで近縁種間を比較する比較ゲノミクスを行うことができなかった。本研究ではこれを可能にするため、日本各地の熱水活動域(温泉)にて再度熱水のサンプリングを行うことで、"APBV2"の単離を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 感染サイクルの解明を目的とした一段増殖実験

ウイルスのゲノム DNA の定量化により得られた実験結果から、本ウイルスの 1 回の感染サイクルは 60-90 分程度で完了することが明らかとなった。これは比較的短時間で本ウイルスが宿主へ吸着、複製、子ウイルスの放出といった一連の感染サイクルを完了していることを意味するが、電子顕微鏡を用いた従来の観察結果とも合致する。

一方で、本実験では安定的なデータの再現性を得ることに苦労した。本実験ではデータ取得のための本培養の前の前培養までの条件は可能な限り統一していたものの、前前培養までの条件統一が必要であることも明らかとなった。このことは、ウイルス粒子が細胞から放出された後、未感染の宿主菌と短時間のうちに出会うことができなければ、熱ストレスなどにより失活していることが原因であると考えられる。

### (2) 殻タンパク質の粒子内局在の解明

4つの構造タンパク質に対する抗体を外注したところ、配列特異性のため、大腸菌によるタンパク質の生成は3つにおいて生成不可能と判断された。唯一生成された抗体を一次抗体として、金コロイドを付着した二次抗体を用いた免疫電顕を行ったところ、当該タンパク質はウイルス粒子の主軸部の最表層域に存在することが明らかとなった。本研究の開始以前に行ったクライオ電顕を用いた構造解析では、このような表層構造は認められなかったことから、本研究の結果はやや意外なものであった。一般的にクライオ電顕を用いた粒子の再構成では、画像データを平均化することで構造を取得する。そのため、低い割合での付着・修飾物などは構成データから省略されることとなる。そのため本実験で対象とした構造タンパク質も、低頻度で表層タンパク質に付着しているものと推察される。

当初は抗体作成に至らなかった残りの殻タンパク質に関しては、配列を部分的に改変させることなども含めて検討していた。しかし本研究期間内に勃発した新型コロナ禍により、バイオ系企業の受託サービスに世界規模で混乱が生じたことに加えて国際物流システムにも混乱が生じ、期間内に抗体を入手することは叶わなかった。今後、システム混乱は落ち着くことが予想されるため、機会があれば他の構造タンパク質にも再挑戦したいと考えている。中でも、桿菌型ウイルス粒子の異なる 2 つの末端を構成するタンパク質を同定した上で、感染直後に宿主細胞表層に付着する側の末端の特定を行いたいと考えている。

### (3) 主殻タンパク質の粒子形成メカニズムの解明

超好熱古細菌由来のタンパク質の大腸菌発現実験の経験が豊富な、福井大学の里村准教授らのグループと行った共同研究の結果、主殻タンパク質である ORF6-81 の大腸菌による発現試験に成功した。カラム精製後の高濃度の発現タンパク質を電子顕微鏡下で観察したところ、APBV1 のウイルス粒子に極めて類似したウイルス様粒子(VLP: Virus-Like Particle)が認められた(図 1)。この結果は、本ウイルスの桿菌型粒子の主要部分は、主殻タンパク質であり 81 残基のアミノ酸から成る ORF6-81 のみの自己会合により形成・構成されることが明らかとなった。先のクライオ電顕を用いた詳細な構造解析においては、ウイルス粒子の中心部には複雑に織り込まれたゲノム DNA 分子の存在が明らかとなっていた。他の長形・線形ウイルスなどにおいては、ゲノム DNA を芯として、その周辺に殻タンパク質が巻き付く形で会合することにより粒子が形成されることが知られていた。またそのような長形ウイルスでは、ウイルスのゲノム長が粒子の長さを決定する主要因となっている。本研究により得られた結果から、本ウイルスは他の多くの長形ウイルスと異なり、ORF6-81 産物が単独でウイルスの殻部分を構成しており、折りたたまれたゲノム DNA や他の殻タンパク質などは粒子形成には不要であることが明らかとなった。また興味深いことに、観察された発現タンパク質由来の VLP は本ウイルスと同程度の粒子長のものが多く、200 nm を越えるような VLP は観察されなかった。現在はさらに、ORF6-81 の配列を改変させたタンパク質の発現試験も行っている。

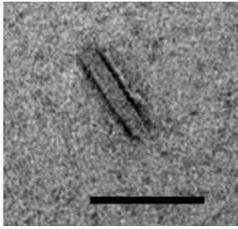


図1. 組換え大腸菌により発現させた APBV1 の ORF6-81 産物による桿菌型 VLP の透過型電子顕微鏡画像。スケールバーは 100 nm。

(4) “APBV2”の単離による比較ゲノミクス

国内外の熱水活動域(温泉)にて熱水サンプルを採取し、*A. pernix* を宿主とする新たなウイルスの単離培養を試みたところ、新規ウイルスの単離に成功した。透過型電子顕微鏡にてその形状を観察したところ、APBV1 と同じ桿菌型ウイルスであったことから、APBV2 と命名した(図 2A)。そのゲノム配列を解析したところ、APBV1 の全 14 の ORF が APBV2 においてもコードされていた(図 2B)。配列保存性も高く、1つを除く 13 の ORF では DNA レベルで 97-100%の一致が見られた。そのため、ウイルス分類学上 APBV2 は、*Clavaviridae* 科の新種ではなく、APBV1 の同種別株であると判断される。古細菌ウイルスにおいてこのように高度に配列が保存された株が単離されることは極めて珍しいことである。

両ウイルスのゲノム配列を BLAST 解析したところ、APBV1 の ORF11-90 から ORF14-191 までの同一オペロン上の 4 遺伝子は、本ウイルスの実験宿主である *Aeropyrum* 属と同じ *Desulfurococcales* 目に属し、太平洋北東部の深海熱水孔から 2016 年に単離された *Pyrodictium delaneyi* のゲノム上にも保存されていることが明らかとなった。この遺伝子水平伝播がどちらの配列を起源とするかは定かではないが、*Clavaviridae* 科のウイルスでは 2 つのゲノムに保存されている一方、古細菌においてこの配列を有しているのはこれまでのところ *P. delaneyi* のみであることから、ウイルスから古細菌へ起きたと推察される。また、*Clavaviridae* 科のウイルスが太平洋の熱水環境に広く分布していることを示唆するものである。今後は、より広域環境から更なる *Clavaviridae* 科ウイルスの単離を試みることで、同科ウイルスの多様性と進化の解明にも繋げたいと考えている。

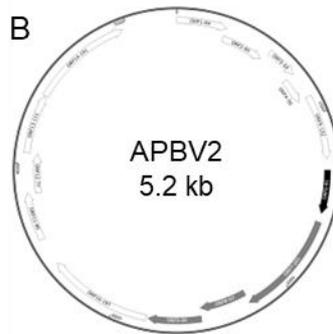
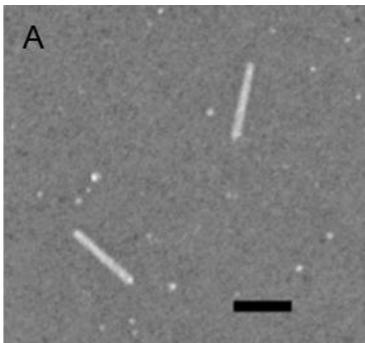


図2. 新たに単離された APBV2 の電子顕微鏡画像(A)とゲノムマップ(B)。電顕画像のスケールバーは 100 nm。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 望月智弘	4. 巻 85
2. 論文標題 世界一変わり者のウイルス：古細菌ウイルスの世界	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	6. 最初と最後の頁 14-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Linard Benjamin, Ebersberger Ingo, McGlynn Shawn E, Glover Natasha, Mochizuki Tomohiro, Patricio Mateus, Lecompte Odile, Nevers Yannis, Thomas Paul D, Gabaldon Toni, Sonhammer Erik, Dessimoz Christophe, Uchiyama Ikuo, QFO Consortium	4. 巻 38
2. 論文標題 Ten years of collaborative progress in the Quest for Orthologs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 3033-3045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msab098	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 Prangishvili D, Mochizuki T, Liu Y, Krupovic M, Ictv Report Consortium	4. 巻 100
2. 論文標題 ICTV Virus Taxonomy Profile: Clavaviridae.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gen Virol	6. 最初と最後の頁 1267-1268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001295	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 Krupovic M, Turner D, Morozova V, Dyal-Smith M, Oksanen H.M., Edwards R, Dutilh BE., Lehman SM., Reyes A, Baquero DP., Sullivan MB., Uchiyama J, Nakavuma J, Baryliski J, Young MJ., Du S, Alfenas-Zerbini P, Kushkina A, Kropinski AM., Kurtboke I, Brister JR, Lood C, Zarkar BL, Yigang T, Liu Y, Huang L, Wittmann J,	4. 巻 166
2. 論文標題 Bacterial Viruses Subcommittee and Archaeal Viruses Subcommittee of the ICTV: update of taxonomy changes in 2021	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 3239 ~ 3244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-021-05205-9	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 Berliner Aaron J., Mochizuki Tomohiro, Stedman Kenneth M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Astrovirology: Viruses at Large in the Universe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Astrobiology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ast.2017.1649	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 Yoshikawa Genki, Blanc-Mathieu Romain, Song Chihong, Kayama Yoko, Mochizuki Tomohiro, Murata Kazuyoshi, Ogata Hiroyuki, Takemura Masaharu	4. 巻 93
2. 論文標題 Medusavirus, a Novel Large DNA Virus Discovered from Hot Spring Water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02130-18	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

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 熱水中の古細菌ウイルスと 生命の起源
3. 学会等名 日本細菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 本日の温泉のウイルス模様は、レモン、ときどき月着陸船、ところによって一時ブルゴーニュワインでしょう
3. 学会等名 微生物ウィーク2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Mochizuki
2. 発表標題 Yet Unsaturating Limit of Archaeal Viruses -Similarities and Dissimilarities with Bacteria
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 古細菌ウイルス vs 細菌ウイルス
3. 学会等名 第20回極限生物学年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 本日の温泉のウイルス模様は、レモン、ときどき月着陸船、所によって一時ブルゴーニュワインでしょう
3. 学会等名 第49回神戸大学インターゲノミクスセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Mochizuki, Yukiko Kawabata, Juliarni, Mart Krupovic, Miho Hirai, Shigeru Shimamura, Takuro Nunoura
2. 発表標題 Comparison between Viruses of Archaea and Bacteria
3. 学会等名 GRC Origin of Life (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Mochizuki
2. 発表標題 Crenarchaeal viruses from Japan
3. 学会等名 Diversity and Evolution of Microbes and Their Viruses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Mochizuki
2. 発表標題 New hyperthermophilic crenarchaeal virus with unusual genotype
3. 学会等名 Evolution - Genetic Novelty/ Genomic Variations by RNA Networks and Viruses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 Isolation of novel hyperthermophilic archaeal ssDNA virus, with new perspectives on the archaeal virosphere
3. 学会等名 環境ウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 炭竈 優花, 里村 武範, 望月 智弘, 末 信一朗
2. 発表標題 超好熱性ウイルス由来キャプシドタンパク質の大腸菌でのタンパク質発現系の構築と発現タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月智弘
2. 発表標題 超好熱古細菌のウイルスから探る原始ウイルス叢
3. 学会等名 極限生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Mochizuki
2. 発表標題 Viurses of the (hyperthermophilic) Archaeal Viruses
3. 学会等名 10th Aquatic Virus Workshop (AVW10) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 河岡 義裕、岩見 真吾、大場 靖子、川口 寧、佐藤 佳、澤 洋文、鈴木 信弘、高橋 英樹、朝長 啓造、中川 草、長崎 慶三、西浦 博、野田 岳志、古瀬 祐気、堀江 真行、牧野 晶子、松浦 善治、松野 啓太、村田 和義、望月 智弘、渡辺 登喜子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 集英社	5. 総ページ数 320
3. 書名 ネオウイルス学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 極限環境ウイルス粒子のタンパク質又はその修飾型からなる桿状粒子、その製造方法、及びその使用方法	発明者 里村武範、末信一朗、望月智弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-193199	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

地球生命研究所(ELSI)一般講演  
[https://wpi.elsi.jp/ja-JP/news\\_events/news/2021/public\\_lecture\\_2021\\_q\\_a.html](https://wpi.elsi.jp/ja-JP/news_events/news/2021/public_lecture_2021_q_a.html)

Asia research news  
<https://www.asiaresearchnews.com/content/virus-hunter>

NHK-BS「Roots 生命起源への旅」(2021年2月10日放送)

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
研究協力者	布浦 拓郎  (Nunoura Takuro)  (60359164)	海洋研究開発機構   (82706)	
研究協力者	里村 武範  (Satomura Takenori)  (50412317)	福井大学   (13401)	

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1件

国際研究集会	開催年
ELSI Thermophiles seminar: Microbes from the Hadean Hell	2019年～2019年

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