

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19235

研究課題名（和文）海藻に感染する，新奇「善玉・悪玉」RNAウイルスの探索と機能解明

研究課題名（英文）Research on novel "good" and "bad" RNA viruses infecting seaweeds and their functions

研究代表者

木村 圭（Kimura, Kei）

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：30612676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルスは病害要因の『悪玉』と知られているが、宿主細胞内で限定的に働く『善玉』の存在も明らかにされてきている。本研究は、ウイルス探索技術FLDS法を用いて、これまであまり知られていなかった海藻ウイルスを探索し、その役割の解明に挑戦する課題である。本研究では、特にノリに注目して研究し、養殖品種のスサビノリや、アマノリ種にmitovirusが存在することを初めて明らかにした。mitovirusは、ほぼ全てのスサビノリ品種に存在しており、養殖状況で感染は変化しなかった。一方で、スサビノリ近縁種ではmitovirusが検出されておらず、養殖品種と本ウイルス感染との間に関係がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、スサビノリにmitovirusが存在することを初めて明らかにしたことにある。mitovirusは、宿主生物に持続的に感染し、その子孫に「遺伝」する。このようなウイルスは栽培作物にも存在している。本研究では、ノリにも持続型ウイルスを持つ個体が存在し、特に養殖品種のスサビノリでウイルスが存在していたことから、スサビノリ栽培化の過程でウイルスをもつ個体が選抜されてきた可能性も考えられる。今後、持続型ウイルスがノリ品種の表現型に与える影響やウイルスの分布、ノリ品種の栽培化過程とウイルス進化などを明らかにすることで、ノリ品種の栽培化と持続型ウイルスの関係の解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：To date, our understanding of viruses that infect seaweeds has not been fully developed. Viruses are considered to be "bad" agents of disease, but the existence of "good" viruses that work in a limited manner in host cells has also been discovered. This research is a challenge to search for seaweed viruses using the FLDS method of virus search technology and to elucidate their roles. The mitovirus was found to be present in almost all strains of Neopyropia yezoensis which was the cultivated species, and the infection did not change depending on the cultivation conditions. On the other hand, mitovirus was not detected in the related species in Neopyropia, suggesting that there may be a relationship between the cultivated species and this virus infection.

研究分野：藻類生命科学

キーワード：海藻 ウイルス FLDS ノリ養殖 mitovirus ウイルス進化

1. 研究開始当初の背景

『海藻』は米や大豆とともに、日本の食文化を支える重要な食物であり、日本人の健康にも貢献してきた。特にノリ、コンブ、ワカメ等の海藻は日本各地で養殖され、海面養殖・総生産額の3割以上を占める巨大な産業に成長している。現代の海藻養殖は、数世紀もの間に蓄積された先人の知恵と、近年の研究・開発の上に成り立っており、将来の海藻養殖持続、そして発展には、さらなる海藻に関する知見の集積が必要である。海藻養殖において、海藻の病害は減収に直結するために、古くから研究が行われており、カビや細菌に関する知見は蓄積されてきた。しかし、「病気」の代表格とも言える『ウイルス』については、理解は十分には進んでいなかった。

一般的に、ウイルスは宿主生物の「病害」要因、つまり『悪玉』と捉えられているが、近年は宿主生物に生理変化を与える因子として限定的に働く『善玉ウイルス』の存在も明らかにされてきている。例えば、エノキダケの場合、善玉ウイルスの感染が生理機能に変化を与え、最終的に商品としての価値を高めていることが知られている⁽¹⁾。ウイルスは生物界に普遍的に存在する遺伝因子であるため、海藻にも既知のウイルス以外の『悪玉ウイルス』や『善玉ウイルス』が存在することは大いに期待される。

多くの生物において、『悪玉ウイルス』だけでなく、捉えにくい生理変化しか起こさない『善玉ウイルス』を探索することはこれまで容易ではなかった。ところが、生物体から効率良く RNA ウイルスを探索する画期的な技術・FLDS 法 (fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing) が開発され、ウイルス探索は飛躍的に発展することとなった⁽²⁾。そこで、数種の海藻にこの FLDS 法を適用したところ、予想通り潜伏感染している RNA ウイルスが、電気泳動により確認された⁽³⁾。そして、これまでに認識されてこなかった「海藻と RNA ウイルス」の全く新しい関係を理解できる環境が整いつつあった。

2. 研究の目的

この背景から、本研究では、「RNA ウイルス探索の技術的プラットフォーム・FLDS 法を基盤とした未知海藻ウイルスの探索」を実施し、『海藻に感染する未知 RNA ウイルス』の存在を明らかにする研究を実施することとした。さらに挑戦的研究として、「海藻感染ウイルスの役割」を解明することを目標に、「養殖海藻スサビノリを対象に、海藻の品種・品質とウイルス感染の関係」を調査することに挑戦することとした。特に、ノリ品種とウイルス感染の関係が見出されれば、新たな有用品種開発や安定・高付加価値養殖に対して、『悪玉・善玉ウイルス』視点での画期的な情報を提供することに繋がり、実学面でも期待される。この目的を果たすため、本研究では、「(課題1)天然海藻に感染している RNA ウイルスの探索」「(課題2)強制感染法を使った、海藻感染性 RNA ウイルスの探索」「(課題3)スサビノリ品種・品質と RNA ウイルス感染との関係の精査」を実施することを計画してきた。

課題1では、容易に手に入り、室内培養実験も可能な、天然海藻を利用することを検討してきたが、佐賀の立地条件(有明海に近くスサビノリの採取が容易で、有明海では他の海藻が手に入りづらい)から、最も利用しやすい養殖海藻スサビノリを主な対象として研究を開始することとした。一方で、本研究を進めている過程で、製品化されている乾海苔(焼き海苔ではない)から RNA 抽出を行い、FLDS を行うことが可能であることが判明した。そこで、乾海苔を利用した RNA ウイルス探索から開始することとした。

3. 研究の方法

(1) 乾海苔からの RNA ウイルスの探索

保有している、2017~18年養殖シーズン、2019~2020年養殖シーズンの乾海苔106検体から選抜き、秋一池田(2017.11.23摘菜)と東与賀(2017.11.15摘菜)の乾海苔0.1gを試料とした。サンプルは液体窒素下で破碎したのち、非レトロ RNA ウイルス感染の分子マーカーである2本鎖 RNA (dsRNA) を精製し⁽²⁾、電気泳動で検出することで RNA ウイルスの探索を行った。その後、乾海苔に存在する RNA ウイルスを同定するために、dsRNA の完全配列情報を高効率で取得可能な FLDS 法を用いてシーケンス解析を行った。

(2) スサビノリとその他のノリ種の糸状体からの RNA ウイルスの探索

6種類のノリ種の糸状体(スサビノリ培養株、カイガラアマノリ、タンシサイ、オニアマノリ、スサビ×アサクサ交雑種、ミノミアサクサ佐賀国本)を質量約0.5g以上となるまで培養し、この試料から dsRNA を精製し、FLDS 法を用いてシーケンス解析を行った。

(3) nested RT-PCR 法を用いたノリ由来 mitovirus 類似ウイルスの特異検出

FLDS 法で取得した配列情報をもとに、東与賀および秋一池田の乾海苔由来の2種の mitovirus 類似ウイルスである mitovirus_V1 および mitovirus_V2 を対象とした特異的 Primer を primer-blast により作製した。mitovirus_V1 の 1st. PCR 用 Primer として V1-250F (5'-TAGAGGTTCCCAAGACATGG-3')と 1610R (5'-AAGACTGGTCACCTTGTCTC-3')を、2nd. PCR 用

Primer に V1-259F (5'-CCAAGACATGGTCTTGAGAG-3') と V1-1476R (5'-AAGGAGGTCTTCAGAGACTC-3') を作製し、mitovirus_V2 の 1st. PCR 用 Primer は V2-291F (5'-TCGCAAGACATGAAGGGGTC-3') と V2-1326R (5'-ATGGCATACTATCACGCGG-3') を、2nd. PCR 用 Primer は V2-671F (5'-CAGAAAGGCCCTAACGGGTC-3') と V2-1270R (5'-CGGCTGCTATTCAGACGATG-3') をそれぞれ作製した。

採取時期および採取地点の異なる、養殖生ノリ葉状体 24 検体 (スサビノリを中心とした混合種)、乾海苔 32 検体 (スサビノリを中心とした混合種)、ノリ糸状体 6 検体 (スサビノリ、ミノミアサクサ、スサビ×アサクサ交雑種、オニアマノリ、カイガラアマノリ、タンシサイ) を nested RT-PCR に供した。また、mitovirus_V1 の検出には上記のサンプルに加えて、上記とは別のノリ糸状体 79 検体も同様に試験に供した。サンプルは液体窒素下で破碎したのち、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA)により RNA を抽出し、SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)を用いて RNA の逆転写を行なった。得られた cDNA は EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japan)の protocols に従い、作製した特異検出用 Primer と共に PCR に供した。PCR 産物の有無は電気泳動により確認した。

(4) ノリから検出された mitovirus_V1 の分子系統解析

nested RT-PCR 法により得られた mitovirus_V1 の PCR 増幅産物を鋳型に、mitovirus_V1 の 2nd. PCR 用 primer である V1-259F または V1-1476R primer および BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)を用いてサンガーシーケンス反応を行なった。得られた産物を Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に供し、各サンプル中の mitovirus_V1 の塩基配列情報を両端から取得した。MEGA7 v 7.0.26 (Kumar et al. 2016) を用いて、塩基配列の結合、アライメント、系統樹作成を行なった。系統樹は、bootstrap の 500 回検定の後、Kimura 2 パラメータモデルを利用して maximum likelihood 法により作成した。

4. 研究成果

(1) 乾海苔からの RNA ウイルスの探索

dsRNA の電気泳動の結果、秋一池田と東与賀の乾海苔から特異的な dsRNA のバンドがそれぞれ 3 本検出され、乾海苔中に RNA ウイルスが存在していることが示唆された (図 1)。そこで、ウイルスの同定を目的に FLDS 法によるシーケンス解析を行った。その結果、秋一池田からは 3 種類の、東与賀からは 2 種類の主要なウイルス配列 (存在比 1%以上) を検出した。

秋一池田から検出された 3 種類のウイルス配列の内、2 種類は複製酵素 (RdRp) のアミノ酸配列の類似性解析と系統解析の結果から、それぞれ mitovirus 属に属する新規ウイルスであることが示唆された。残る 1 種類のウイルス配列は菌類を宿主とするウイルス (partitiviridae 科に近縁な未分類のウイルス) と最も高いアミノ酸配列類似性を示した。mitovirus に関しては完全長配列の取得に成功し、そのゲノムサイズから dsRNA の電気泳動で秋一池田から検出された分子量が約 2.3kbp の 2 本のバンドはこれらのウイルスであることが示唆された。未分類のウイルスに関しては部分配列であるが、決定済みの配列が約 3.0kbp であることから dsRNA の電気泳動では検出されていないウイルスであると考えられる。秋一池田から検出された 3 本のバンドのうち、0.8kbp のバンドに相当する配列は今回のシーケンス解析からは得られなかった。

東与賀の乾海苔から検出された 2 種類の主要なウイルス配列は秋一池田から検出された 2 種類の mitovirus と同一のウイルスであり (塩基配列の類似性が 100%)、こちらも完全長配列が得られた。東与賀から dsRNA の電気泳動で検出された 3 本のバンドのうち、分子量が約 2.0kbp の 2 本は秋一池田と同様に mitovirus であると考えられるが、シーケンス解析では 8.0kbp のバンドに相当する長さの配列は得られなかった。

本研究成果は、乾海苔中に RNA ウイルス由来の核酸が存在することを初めて明らかにしたものである。また、秋一池田と東与賀の乾海苔両方から同一の mitovirus が検出されたことから、今回検出した mitovirus は乾海苔の原料となったノリ (スサビノリ) 品種中に存在 (内在) している可能性が考えられた。

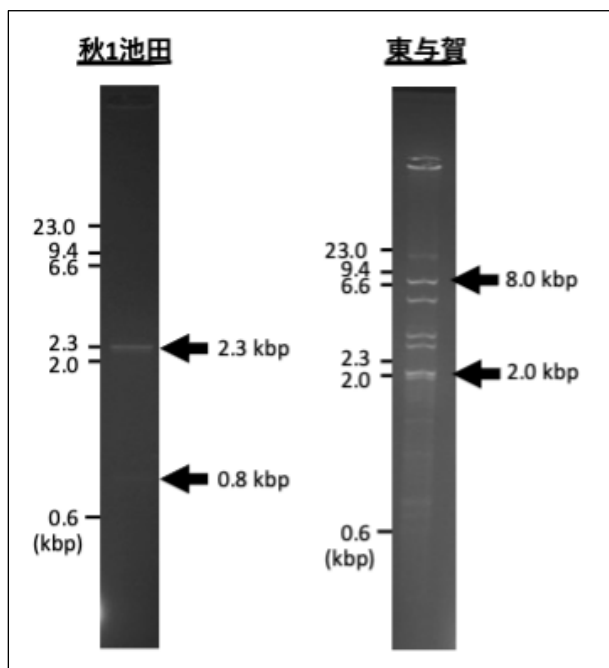


図 1 : 乾ノリから得られた dsRNA の電気泳動像。矢印は乾ノリに特異的な dsRNA を示す。

(2) スサビノリとその他のノリ種の糸状体からの RNA ウイルスの探索

6 種類のノリ種 (アマノリ属) の糸状体のうち、スサビノリ培養株、タンシサイ、スサビ×アサクサ交雑種の 3 種からはウイルス配列が検出された。一方で、カイガラアマノリ、オニアマノリ、ミノミアサクサ佐賀国本の 3 種からはウイルス配列が検出されなかった。スサビノリ培養株からは乾海苔から検出された 2 種類の mitovirus が検出され (塩基配列が 99%一致)、栽培品種に 2 種類の mitovirus が存在していることが明らかになった。スサビ×アサクサ交雑種からは 1 種類のウイルス配列が検出された。それはスサビノリ培養株から検出された 2 種類の mitovirus のうち 1 種と 94%の塩基配列類似性を示し、スサビ×アサクサ交雑種にはスサビノリ培養株と非常に近縁なウイルスが存在していることが明らかになった。タンシサイからは 1 種類のウイルス配列が検出され、その RdRp は昆虫 (ハエなど) のメタゲノム解析により検出された toti-like virus と最も高いアミノ酸配列類似性を示した。この配列類似性と系統解析の結果から、このウイルスは既存の Totiviridae 科の属には属さない新規ウイルスであることが示唆された。これまでも紅藻が主要な構成生物であると考えられる環境試料からは Totiviridae 科に近縁なウイルスが検出されているが、純粋培養した紅藻から検出されるのは本研究が初めてである。

(3) nested RT-PCR 法を用いたノリ由来 mitovirus 類似ウイルスの特異検出

nested RT-PCR 法を利用した特異検出の結果、使用した生ノリ葉状体および乾海苔全てのサンプルから、mitovirus_V1 および mitovirus_V2 の PCR 増幅産物が得られた。一方で、糸状体サンプルでは、mitovirus_V1 はスサビノリ、スサビ×アサクサ交雑種からは検出されたものの、ミノミアサクサ、オニアマノリ、カイガラアマノリ、タンシサイからは検出されず、mitovirus_V2 はスサビノリを除く全てのサンプルから検出されなかった。また、追加で行なった 79 検体の糸状体のうち、73 検体から mitovirus_V1 が検出された。

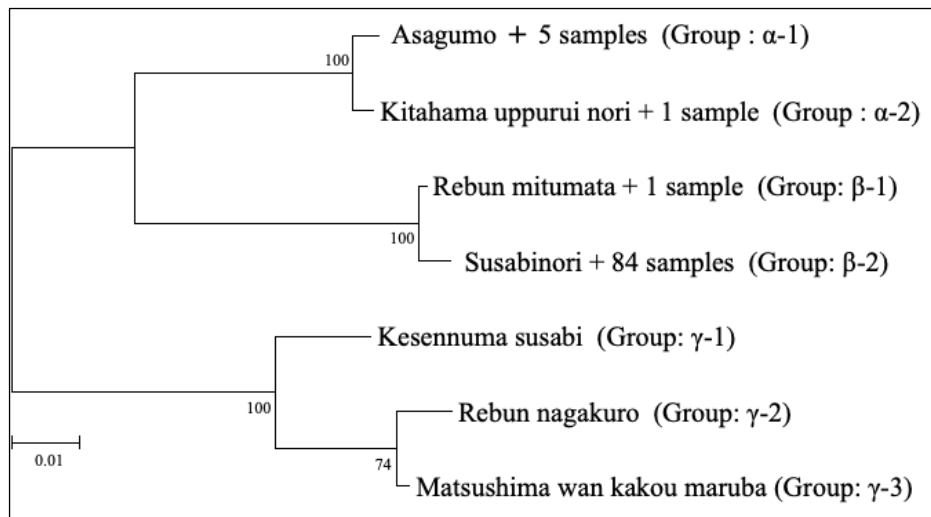
本研究で使用した生ノリ葉状体、および乾海苔の種同定はまだできていないが、これらのノリを養殖している養殖場では、スサビノリをタネとして使っているため、単一種ではなくとも大半がスサビノリ由来であることが考えられる。また、生ノリは有明ノリ養殖場の 3 地点から、1 ヶ月ごとに採取されたノリを使用している。そのため、mitovirus_V1 および mitovirus_V2 は、地点や季節、ノリの成長段階、さらには乾燥状態に左右されず、スサビノリノリに感染していることが示唆された。また、純系化した糸状体を用いた試験では、ノリの種類によって mitovirus の感染状況が異なっていた。mitovirus_V1 はスサビノリとスサビ×アサクサ交雑種から検出されたが、この交雑種はアサクサノリとスサビノリの交配によって作られた品種である。今回ノリから検出されたウイルスが過去に報告されている mitovirus のように宿主のミトコンドリアに感染している場合⁽⁴⁾、このウイルスはスサビノリのミトコンドリアを介してスサビ×アサクサ交雑種に感染したこと予想されるが、スサビ×アサクサ交雑種やスサビノリのミトコンドリアゲノムを解析した報告⁽⁵⁾では、スサビ×アサクサ交雑種のミトコンドリアゲノムはスサビノリよりもアサクサノリに近い。よって、今回発見された mitovirus_V1 および mitovirus_V2 がミトコンドリアに局在していた場合、スサビ×アサクサ交雑種作出の際に、スサビノリの精子がアサクサノリの造果器に受精した後、スサビノリ由来のミトコンドリアが自己消化される過程で、mitovirus_V1 はアサクサノリのミトコンドリアに感染し、mitovirus_V2 は消化されたことが考えられる。今回発見された新規ウイルスの感染過程を明らかにするためには、今後これらウイルスの局在部位から解明していく必要がある。

(4) ノリから検出された mitovirus_V1 の分子系統解析

nested RT-PCR 法により、mitovirus_V1 が検出された 141 検体のうち、98 検体の配列情報を取得した。同じ配列をもつ mitovirus_V1 ごとにグループに分けたところ、7 つのを 1 つのグループに分けられた。

それらのグループ中から 1 検体分の配列情報を代表として選抜し、系統樹を作成した (図 2)。さらに、それぞれの代表配列間での配列類似度を算出した (図 3)。

nested RT-PCR 法により得られたシーケンスのうち、グループ β -2 の配列



情報と FLDS で得たスサビノリの配列情報、グループ α -1 の配列情報と FLDS で得たスサビノリアサクサ交雑種の配列情報がそれぞれ一致した。残りの5タイプは FLDS で得られたどの配列情報とも異なっていた。得られた7種の配列の中では、スサビノリ由来の配列と松島湾河口の丸葉ノリ由来の配列が最も配列類似度が低く、89.7%の値を示した。また、もっとも多く検出された *mitovirus_V1* はスサビノリから検出された *mitovirus_V1* を代表とするグループ β -2 のウイルスであり、シーケンス解析を行なった98検体のうち85検体から検出された。これは、研究に供したノリの多くがスサビノリであったことが理由であると推察されたが、本研究で使用したノリのカテゴリーは形態学的分類にとどまっているため、今後ノリのシーケンス情報を用いて詳細に解析する必要がある。

	α -1	α -2	β -1	β -2	γ -1	γ -2	γ -3	Sequencing gap (b)
α -1		8	77	81	97	94	96	
α -2	99.2		76	76	98	95	97	
β -1	92.7	92.8		6	98	96	106	
β -2	92.3	92.8	99.4		101	99	109	
γ -1	90.8	90.7	90.7	90.4		40	33	
γ -2	91.1	91.0	90.9	90.6	96.2		10	
γ -3	90.9	90.8	89.9	89.7	96.9	99.1		
Sequence similarity (%)								

図3. ノリ糸状体から検出された *mitovirus_V1* ごとの配列類似度

(5) 本研究成果の総括と将来性

本研究の成果は、食用に用いられているスサビノリやそれに近縁なアマノリ種に RNA ウイルスが存在することを初めて明らかにしたことにある。今回検出されたウイルスは細胞外伝播経路を持たずに宿主生物に持続的に感染し、いわば細胞小器官のような生活環をもつウイルス群に属するものである。このような持続型ウイルスは我々が普段実際に食している米やピーマンなどにも存在しており、栽培化の過程でも持続型ウイルスを保持する個体は排除されずに残ってきたと言える。本研究の成果は栽培植物と同様にノリ品種においても、持続型ウイルスを保持する個体が排除されずに残ってきたことを示している。特に食用として広く栽培されているスサビノリの培養株に持続型ウイルスが存在していることから、スサビノリにおいては栽培化の過程でウイルスをもつ個体が選抜されてきた可能性も考えられる。今後、ノリ品種に潜在している持続型ウイルスが宿主であるノリ品種の表現型に与える影響やノリ品種におけるウイルスの分布、ノリ品種の進化(育種や栽培化の過程)とウイルスの進化との対応を明らかにすることで、ノリ品種の栽培化と持続型ウイルスの関係の解明が期待される。なお、本研究費によるこの成果に基づいて論文を執筆中であり、この課題の成果を基にした、*mitovirus* の機能を解明する次なる課題を実施する準備を整えおり、研究の萌芽が実りつつある段階である。

[引用文献]

1. Magae Y, Hayashi N. 1999. Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake). *FEMS Microbiol Lett.* 180: 331–335.
2. Urayama S, Takaki Y, Nunoura T. 2016. FLDS: A Comprehensive dsRNA Sequencing Method for Intracellular RNA Virus Surveillance. *Microbes Environ.* 31:33-40.
3. Chiba Y, Tomaru Y, Shimabukuro H, Kimura K, Hirai M, Takaki Y, Hagiwara D, Nunoura T, Urayama S 2020. Viral RNA Genomes Identified from Marine Macroalgae and a Diatom, *Microbes Environ.* 35: doi:10.1264/jsme2.ME20016.
4. Shahi S, Eusebio-Cope A, Kondo H, Hillman B, Suzuki N. 2019. Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. *J Virol.* 93: e01503–18.
5. Nagano Y, Kimura K, Kawamura Y, Kobayashi G, 2020. Genomic diversity of 39 samples of *Pyropia* species grown in Japan, *PLOS ONE*, in press.

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 木村圭・永野幸生・小林元太・川村嘉応
2. 発表標題 複数のノリ糸状体株のゲノム解析と比較
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019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	外丸 裕司 (Tomaru Yuji) (10416042)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(廿日市)・主任研究員 (82708)	
研究分担者	浦山 俊一 (Urayama Syunichi) (50736220)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	

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