

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 15 日現在

機関番号: 82708

研究種目: 基盤研究 (A)

研究期間: 2008~2011

課題番号: 20247002

研究課題名 (和文 FF09): 海洋で繰り広げられるウイルス対宿主の分子生態学的チェイスゲームに関する研究

研究課題名 (英文): Examination on the molecular-ecological chase-games between hosts and viruses in the sea

研究代表者

長崎 慶三 (NAGASAKI KEIZO)

独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所・主幹研究員

研究者番号: 00222175

研究分野: 基礎生物学

科研費の分科・細目: 生態・環境

キーワード: RNA ウイルス・渦鞭毛藻・宿主特異性・レアコドン・コートタンパク質・タンパク質発現系・共進化・ヘテロカプサ サーキュラリカマー

1. 研究計画の概要

本研究では、海産赤潮プランクトンとウイルスの感染現象を巡る変異の様態を精査することで、海洋環境中において両者がいかなる(感染現象を巡る)戦略を展開しているか、さらには両者の共進化がどのように推移してきたかを分子生物学、構造生物学、および生態学的といった側面から解明することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

渦鞭毛藻ヘテロカプサ・サーキュラリカマーおよび同種感染性 1 本鎖 RNA ウイルス (HcRNAV) の関係は従来まで考えられていたよりも複雑であり、感染交叉性試験およびコートタンパク質アミノ酸配列の系統解析の結果、単純な 2 タイプ対 2 タイプではないことが示された。とくにウイルス側の感染特異性は株レベルで多様であり、コートタンパク質の表面側(環境水側)の微構造の差異が支持している可能性が強く示唆された。これまでのところ、HcRNAV-UA 型はその株特異性から 3 群以上に群別され、系統学的解析の結果、各群が UA 型の大きなクラスターの中で微妙に異なるクレードに分かれることが示された。

こうした現象を裏打ちする機構を解析するため、コートタンパク質遺伝子の大腸菌細胞内での発現試験を試みた。その結果、同遺伝子に高頻度(~15%)で含まれる全てのレアコドンを発現に適したコドンに置き換えることにより、コートタンパク質の発現系を構築することに成功した。得られたコートタンパク質を免疫原として、十分な力価を持つ抗コートタンパク質抗体の作製を完了した。また、コートタンパク質を可溶化・精製後、動的散乱法で測定した結果、粒径分布は 20~50nm と推定された。同試料中において、天

然由来の HcRNAV 粒子と形態学的にきわめて類似した粒子(粒径約 30nm の球形ウイルス様粒子)の形成が透過型電子顕微鏡観察により確認された。これらの結果から、発現タンパク質が自己凝集し、ウイルス様粒子を構成したものと考えられた。

3. 現在までの達成度

<区分>②おおむね順調に推移している

【理由】宿主側およびウイルス側の感染を巡る多様性については多くの知見が得られ、現場環境中において様々なタイプの宿主クローンとウイルスクローンが複雑な闘いを展開している可能性が明示された。また、こうした多様性を裏打ちするメカニズムを、HcRNAV のコートタンパク質の表面側(環境水側)の微構造の差異が支持している可能性が示された。当初、コートタンパク質遺伝子の大腸菌細胞内での発現を阻害していたコドンの偏りの問題も 2 年目迄に解消され、現在は構造解析のための発現タンパク質の大量生産を行っている段階にある。またレセプター探索のためのポリクローナル抗体の準備も整い、最終年度に向けて様々なプラットフォームが整備されたといえる。以上の理由から、上記の達成度評価が適当と判断した。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 近年、新たにヘテロカプサ赤潮の発生がみられるようになった新潟県佐渡島の汽水湖(加茂湖)など、日本各地から新たに得られた HcRNAV 株のコートタンパク質アミノ酸配列に基づく系統解析を実施し、ウイルス側の多様性を検討する。

(2) コートタンパク質の結晶化条件の最適化を試みるとともに、X 線構造解析を実施する。

- (3) 抗コートタンパク質抗体を用いた標識試験により、ウイルスレセプタータンパク質の局在を明らかにするとともに、同定を試みる。
- (4) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法を導入し、HcRNAV の立体構造を推定する。
- (5) 4 年間の研究実施期間に得られた知見について総合的考察を行う。とくに、海洋の宿主-ウイルス系における変異の蓄積・共進化(分子レベルでのチェイスゲーム)という観点から、とくに両者の多様性とそれを支持する機構に注目した解釈を試みる。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 8 件:すべて査読有)

1. 長崎慶三・外丸裕司. 原生物の寄生・共生者(ウイルスを中心に). 日本プランクトン学会報, 58: 94-97 (2011).
2. Naitow, H., Shirai, Y., Tomaru, Y., Nagasaki, K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a marine diatom-infecting singlestranded RNA virus. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66: 1449-1452 (2010).
3. Tomaru, Y., Mizumoto, H., Nagasaki, K. Virus resistance of the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to its single-stranded RNA virus infection. *Environ. Microbiol.*, 11: 2915-2923 (2009).
4. Tomaru, Y., Takao, Y., Mizumoto, H., Nagasaki, K. Co-occurrence of DNA- and RNA-viruses infecting the bloom-forming dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on the Japan coast. *Plankton Benthos Res.*, 4: 129-134 (2009).
5. 長崎慶三・外丸裕司. 近年の原生物ウイルス研究がもたらした新しい知見 —分子生態学・分類学から分子進化学まで—. ウイルス 59: 31-36 (2009).
6. Mizumoto, H., Tomaru, Y., Takao, Y., Shirai, Y., Nagasaki, K. Diverse responses of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to infection by a single-stranded RNA virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3105-3111 (2008).

[学会発表] (計 25 件)

1. Nagasaki, K., Nakayama, N., Tomaru, Y. Viruses as harmful algal bloom eliminator. International Conference on Viruses of the Environment: Challenges in Viral Ecology and Evolution, 2011.3.22, ISG ホテル(ドイツ・ハイデルベルグ). (招待講演)
2. 長谷川昭文, 和田啓, 橘川麻衣, 外丸裕司, 長崎慶三, 福山恵一. 有害赤潮原因藻に感染するウイルス HcRNAV のコートタンパク質の発現・精製系の構築および *in vitro* 粒子再

構成. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010.12.12, 神戸ポートアイランド(兵庫県).

3. Nagasaki, K., Nakayama, N., Tomaru, Y. Molecular ecology of viruses infecting harmful bloom-forming microalgae. First International Congress on Viruses of Microbes, 2010.6.22, パスツール研究所(フランス・パリ). (招待講演)
4. Nagasaki, K., Tomaru, Y. Ecology and genomics of aquatic viruses. International Symposium Marine Genomics, 2009.12.16, サザンホテル海鵬(沖縄県)
5. 和田啓・橘川麻衣・外丸裕司・長崎慶三・福山恵一. 有害赤潮原因藻ヘテロカプサに感染する海産ウイルス HcRNAV の結晶構造解析に向けたコートタンパク質の発現系の確立. 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009. 5.21, 熊本全日空ホテルニュースカイ(熊本県).
6. Nagasaki, K., Kawami, H., Tomaru, Y. "Algal virus variation" vs. "Algal host variation". Abstract of the third annual meeting of the Scientific Committee on Ocean Research (SCOR) Working Group on the Role of Viruses in Marine Ecosystems, 2009.5.15, デラウェア大学(米国・ニューアーク) (招待講演)

[図書] (計1件)

1. 山口峰生・長崎慶三 (2010) HAB 対策の現状と課題. 水産の 21 世紀 海から開く食料自給(編: 田中克, 川合真一郎, 谷口順彦, 坂田泰造) 京都大学学術出版会 pp.267-296.