

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 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) 海洋で繰り上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) Molecular-ecological chase-game between hosts and viruses in marine environments

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・研究推進部・研究開発コーディネーター

(瀬戸内海区水産研究所併任)

研究者番号:00222175

研究成果の概要(和文): 本研究では、海産有害赤潮藻ヘテロカプサとそれを宿主とする1本鎖RNAウイルス HcRNAV の感染現象を巡る変異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戦略を展開しているかを分子生物学、構造生物学、および生態学的といった側面から解明した。様々なタイプのウイルス株および宿主株の解析の結果、宿主-ウイルスが繰り上げてきた分子レベルでの追いかっこ(チェイスゲーム)の様態の一部が明らかとなった。

研究成果の概要(英文): In the present study, mutation tactics of host (marine harmful bloom-forming alga *Heterocapsa circularisquama*) and its infectious single-stranded RNA virus (HcRNAV) were examined from the viewpoint of molecular biology, structural biology and ecology. By analyzing various types of the host and the virus, the outline of host-virus chase-game was partially clarified.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2009年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 水産学・水産学一般

キーワード: RNAウイルス・渦鞭毛藻・宿主特異性・レアコドン・カプシドタンパク質・タンパク質発現系・共進化・ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ

1. 研究開始当初の背景

海水中に存在するウイルスの一部は、赤潮原因プランクトンに対する感染する。過去の研究から、赤潮の動態・終息にはウイルス感染が重要な影響を及ぼすことが明らかとなった。貝類斃死の原因となる赤潮原因渦鞭毛藻ヘテロカプサ (*Heterocapsa circularisquama*) に感染する1本鎖RNAウイルス HcRNAV は、粒径 30nm、ゲノ

ムサイズ 4.4kb の(+)鎖 RNA ウイルスである。約 7 年間に亘る現場調査の結果、ヘテロカプサ赤潮の生態学的挙動に HcRNAV が重大な影響を及ぼしている可能性が強く示唆されている。HcRNAV およびヘテロカプサはそれぞれ複数のタイプから構成されており、それぞれがタイプ特異的な感染性・感受性 (A→a', B→b' という選

択的感染性)を持つ。ウイルス側の宿主特異性の差異は、ビリオン表面の微構造の違いを反映していると考えられる。ここに介在する宿主-ウイルス間の吸着親和性を巡る攻防について詳細に検討した事例は皆無であった。こうした背景の下、本研究の着想に到った。

2. 研究の目的

本研究では、海産赤潮原因藻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推定することを目的とした。

3. 研究の方法

HcRNAV(図 1)の多様性の拡大を、種内宿主特異性(株間特異性)の変化、カプシド遺伝子の塩基配列の変化、およびウイルス粒子の3次元立体構造の変化という多面的な視点から比較した。これにより、宿主-ウイルスが繰り広げてきた「分子レベルでの追いかけっこ(チェイスゲーム)」の様態を推定し、海洋環境中における宿主対ウイルスの変異の蓄積・共進化のメカニズムについて分子生態学ならびに構造生態学的視点から考察を行なった。

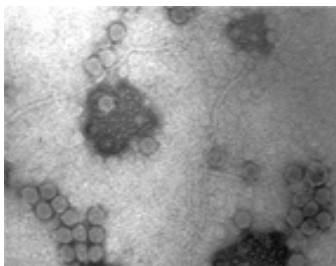


図 1. HcRNAV のネガティブ染色像(球形粒子)。

4. 研究成果

HcRNAV 株のコートタンパク質遺伝子を大腸菌で発現させる条件について検討した。最終的

に、同遺伝子に高頻度(~15%)で含まれる全てのレアコドン、大腸菌細胞内での発現に適したコドンに置き換えることで、コートタンパク質発現系の構築に成功した。結果的に、目的とするコートタンパク質は、不溶性の融合タンパク質として発現された。そこで、SDS-PAGE で分離したコートタンパク質を電氣的にゲルから抽出し、さらに有機溶媒で脱 SDS 化およびリフォールディングすることで、可溶性コートタンパク質の抽出・精製に成功した。精製したコートタンパク質を可溶性・再精製後、動的散乱法で測定した結果、粒径分布は 20~50nm と推定され、同試料中において、天然由来の HcRNAV 粒子(T=3 構造、粒径 30~34nm)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。このことから、発現タンパク質の自己凝集によるウイルス様粒子構成が起きたものと考えられた。コートタンパク質の N 末端領域には、塩基性残基に富む領域(22~47 残基)が存在し、*in vivo* で RNA と相互作用していると予想された。

硫酸塩析およびゲル濾過により精製したウイルス粒子の結晶化に最適な条件は、2% PEG4000, 0.1M 酢酸ナトリウム, 0.1M 塩化マグネシウム (pH4.5) であった。得られた結晶を回折 X 線測定に供した結果、約 20 オングストロームの分解能までのスポットが得られた。さらに PEG 沈殿およびクロロホルム三層分配により精製度を高めたところ、分解能は約 6 オングストロームまで改善した。最新データでは、3.5 オングストローム程度の反射が得られる結晶化条件が得られつつある(図 2)。

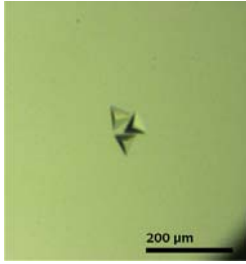


図 2. 発見させたコートタンパク質を自己集合させて作ったウイルス様粒子の結晶.

得られたコートタンパク質に対するウサギ抗血清を作製し、その特異性確認および様々な測定系・標識系試験への適用を行った。また、現場調査の結果、これまでにウイルス感受性という点で大きく異なると考えられてきた UA 型および CY 型のヘテロカプサ株の両方に対して感染性を持つ HcRNAV 群の存在が明らかとなった。具体的には、HcRNAV は少なくとも CY 型と UA 型の 2 タイプから構成され、さらに UA 型は其中で 3 群(以上)に分けられる可能性が示唆された。新たに得られたウイルスタイプの 3 次元立体構造推定の結果、変異箇所は他のウイルス株でも変異が特徴的にみられた「ホットスポット」に集中しており、その多くはカプシド表面側(環境水側)に露出していた。これらの結果は、現場環境中のヘテロカプサ対ウイルスの感染を巡る関係性が従来考えられていたよりもかなり複雑であり、それがカプシドタンパク質の微構造の差によって支持されている可能性を示す重要な知見である。

以上のことから、本研究により、ウイルス対宿主の共進化の様態を調べるためのプラットフォームはほぼ完全に整ったといえる。また、感染現象を巡る株間の多様性を、分子生物学、構造生物学、および生態学的側面から精査することができた。また、様々なタイプのウイルス株および宿主株の解析の結果、宿主-ウイルスが繰り広げてきた分子レベルでの追いかっこ(チェイスゲーム)の過程でウイルス・宿主ともに複雑な多様化の歴史をたどってきたものと推定された。

藻類ウイルスと宿主の共深化に関する詳細な研究事例は世界的にもまだ例がほとんどない。

今後、上述の 4 群(CY 型 1 タイプ+UA 型 3 タイプ)のコートタンパク質のアミノ酸配列、さらに立体構造について、より詳細な比較解析を実施することで、ウイルス対宿主の共進化の様態に関する全く新しい知見が得られるものと強く期待される。

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 12 件)

1) Brussaard, C. P. D., Wilhelm, S. W., Thingstad, F., Weinbauer, M. G., Bratbak, G., Heldal, M., Kimmance, S. A., Middelboe, M., Nagasaki, K., Paul, J. H., Schroeder, D. C., Suttle, C. A., Vaqué, D., Wommack, K. E. (2008) Global scale processes with a nanoscale drive - the role of marine viruses. *ISME J.* **2**: 575-578.

2) Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nagasaki, K., Dolja, V. V. (2008) The big bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 925-939.

3) 長崎慶三, 外丸裕司. (2009) 近年の原生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.

4) Tomaru, Y., Mizumoto, H., Nagasaki, K. (2009) Virus resistance of the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to its single-stranded RNA virus infection. *Environ. Microbiol.*, **11**: 2915-2923.

5) Tomaru, Y., Takao, Y., Mizumoto, H., Nagasaki, K. (2009) Co-occurrence of DNA- and RNA-viruses infecting the bloom-forming dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on the Japan coast. *Plankton Benthos Res.*, **4**: 129-134.

6) Nagasaki, K., Bratbak, G. (2009) Isolation of

viruses infecting photosynthetic and non-photosynthetic protists. *Manual of Aquatic Viral Ecology* (by the American Society of Limnology and Oceanography), Chapter 10, 90-99.

7) Ogata, H., Toyoda, K., Tomaru, Y., Nakayama, N., Shirai, Y., Claverie, J. -M., Nagasaki, K. (2009) Remarkable sequence similarity between the dinoflagellate-infecting marine virus and the terrestrial pathogen African swine fever virus. *Virology* **6**: 178.

8) Naitow, H., Shirai, Y., Tomaru, Y., Nagasaki, K. (2010) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a marine diatom-infecting single-stranded RNA virus. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **66**: 1449-1452.

9) Ogata, H., Ray, J., Toyoda, K., Sandaa, R-A. Nagasaki, K., Bratbak, G., Claverie J-M. (2011) Two new subfamilies of DNA mismatch repair proteins (MutS) specifically abundant in the marine environment. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2010.210.

10) Miller, J.L., Woodward, J., Chen, S., Jaffer, M., Weber, B., Nagasaki, K., Tomaru, Y., Wepf, R., Roseman, A., Varsani, A., Sewell, T. (2011) Three-dimensional reconstruction of *Heterocapsa circularisquama* RNA virus by electron cryo-microscopy. *J. Gen. Virol.* **92**: 1960-1970.

11) Salcedo, T., Upadhyay, R.J., Nagasaki, K., Bhattacharya, D. (2012) Dozens of toxin-related genes are expressed in a non-toxic strain of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/mss007.

12) Wada, K., Kimura, K., Hasegawa, A., Fukuyama, K., Nagasaki, K. (2012) Establishment of a bacterial expression system

and immunoassay platform for the major capsid protein of HcRNAV, a dinoflagellate-infecting RNA virus. *Microbes Environ.* (in press).

[学会発表] (計 35 件)

- 1) Tomaru, Y., Mizumoto, H., Nagasaki, K. (2008) How come virus-inoculated algal culture exhibits regrowth? Abstracts of The 5th Aquatic Virus Workshop O6-12.
- 2) 長崎慶三, 外丸裕司, 白井葉子, 高尾祥丈, 本多大輔, Valerian Dolja. (2008) 近年の海産ウイルスに関する研究はウイルス進化の理解を深めつつある。日本進化学会第 10 回大会講演要旨集, OP1-15.
- 3) 長崎慶三, 高尾祥丈, 水本祐之, 外丸裕司. (2008) 有害赤潮原因藻ヘテロカプサとウイルス間の感染現象を巡る両者の多様性について。2008 年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会 in 熊本講演要旨集, p.85.
- 4) Nagasaki, K., Mizumoto, H., Takao, Y., Shirai, Y., Tomaru, Y. (2008) Molecular ecology of viruses infectious to HAB-causing microalgae. Programs and Abstracts of 5th World Fisheries Congress, p.247.
- 5) Nagasaki, K., Tomaru, Y. (2008) Viral impacts on HABs in marine environments. Programme & Abstracts of the 13th International Conference on Harmful Algal Blooms, p.94.
- 6) 外丸裕司, 白井葉子, 高尾祥丈, 水本祐之, 長崎慶三. (2009) 海洋植物プランクトンに感染するウイルスのゲノム性状。第 3 回日本ゲノム微生物学会年会講演要旨集 p.30.
- 7) 長崎慶三, 外丸裕司, 川見寿枝, 白井葉子, 高尾祥丈, 水本祐之. (2009) 赤潮原因鞭毛藻に感染するウイルス -これまでの研究と今後の展望-. 日本藻類学会第 33 回大会 プログラム p.48.
- 8) 川見寿枝, 外丸裕司, 長崎慶三. (2009) 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* を宿主とする RNA ウイルスの宿主特異性。日本藻類学会第 33 回大会プログラム p.48.
- 9) 和田 啓, 橘川麻衣, 外丸裕司, 長崎慶三, 福山恵二. (2009) 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講演要旨集 2P-052.
- 10) Nagasaki, K., Kawami, H., Tomaru, Y. (2009) "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 015-11:15.
- 11) Nagasaki, K., Kawami, H., Mizumoto, H., Takao, Y., Tomaru, Y. (2009) Complex

interrelationship between marine microalgae and their viruses. Scientific programs and abstracts of American Society for Virology 28th Annual Meeting, p.162.

12) Nagasaki, K., Tomaru, Y., Yoshida, T. (2009) Viral impacts on harmful algal blooms.

Phycologia (Suppl.) 48(4):88. (Abstracts of papers to be presented at the 9th International Phycological Congress).

13) 長崎慶三, 外丸裕司, 川見寿枝, 和田啓, 福山恵一. (2009) 水圏環境中における宿主-ウイルスの感染現象を巡る多様性獲得について. 第11回日本進化学会大会講演要 p.136.

14) 長崎慶三, 高尾祥丈, 本多大輔, 外丸裕司. (2009) 原生生物の RNA ウィルス学 -ICTV への3つの「科」の提唱-. 第57回日本ウィルス学会学術集会講演要 p.232.

15) 長崎慶三, 外丸裕司, 中山奈津子, 豊田健介, 高尾祥丈, 緒方博之. (2009) 渦鞭毛藻ウイルス研究の最前線. 第25回日本微生物生態学会講演 1B-2.

16) Nagasaki, K., Tomaru, Y. (2009) Ecology and genomics of aquatic viruses. Abstracts of the International Symposium on Marine Genomics 2009, p.40.

17) Nagasaki, K., Toyoda, K., Nakayama, N., Ogata, H., Claverie, J. M., Tomaru, Y. (2009) The ocean is a treasury of strange viruses. Abstracts of the International Symposium on Marine Genomics 2009, p.58.

18) 長崎慶三, 豊田健介, 中山奈津子, 外丸裕司, 白井葉子, Jean-Michel Claverie, 緒方博之. (2010) 渦鞭毛藻感染性ウイルス HcDNAV と既知ウイルス群との系統学的比較. 日本藻類学会第34回大会. 藻類 58(1): 36.

19) 畑直亜, 西村昭史, 藤原正嗣, 山田浩且, 長崎慶三, 外丸裕司, 中山奈津子. (2010) ヘテロカプサ殺藻ウイルスの英虞湾における海底泥中の分布と保存温度. 平成22年度日本水産学会春季大会講演要 p.122.

20) 畑直亜, 西村昭史, 長崎慶三, 外丸裕司, 中山奈津子. (2010) 英虞湾で発生するヘテロカプサ個体群のウイルス感受性タイプの多様性. 平成22年度日本水産学会春季大会講演要 p.133.

21) 長谷川昭文, 和田啓, 外丸裕司, 長崎慶三, 福山恵一. (2010) 有害赤潮原因藻ヘテロカプサに感染するウイルス HcRNAV のコートタンパク質を用いた *in vitro* 粒子再構成. 第10回日本蛋白質科学会年会講演要旨集. p. 101.

22) Nagasaki, K., Nakayama, N., Tomaru, Y. (2010) Molecular ecology of viruses infecting harmful bloom-forming microalgae. Book of the First International Congress on Viruses of Microbes, pp.13.

23) 長崎慶三, 豊田健介, 中山奈津子, 外丸裕司, Jean-Michel Claverie, 緒方博之. (2010)

海産渦鞭毛藻感染性ウイルスと家畜病原性ウイルスの進化系統関係. 第12回日本進化学会大会 要旨集 p.103.

24) 畑直亜, 山田浩且, 西村昭史, 長崎慶三, 外丸裕司, 中山奈津子. (2010) 英虞湾におけるヘテロカプサ赤潮の動態に及ぼすウイルス感染の量的・質的影響. 平成22年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 p.66.

25) 長崎慶三, 外丸裕司, 水本祐之. (2010) プランクトンとウイルスとはお互いを許し合うことで共存してきた. 第58回日本ウィルス学会各術集会講演要旨集 p.475.

26) 長崎慶三, 外丸裕司, 中山奈津子, 吉田天士, 緒方博之, J.M.Claverie. (2011) 藻類とウイルスの関係—ゲノミクスの視点から. ナショナルバイオリソースプロジェクト藻類シンポジウム「未来を支える藻類, その多様性—ゲノミクス・ポストゲノミクスの視点から—」講演要旨集 p.14-15.

27) 中山奈津子, 長井敏, 畑直亜, 広石伸互, 外丸裕司, 長崎慶三. (2011) 有害赤潮藻 *Heterocapsa circularisquama* の HcRNAV に対する株特異的感受性について. 日本藻類学会第35回大会, 藻類 59(1) p.54.

28) Nagasaki, K., Nakayama, N., Tomaru, Y. (2011) Viruses as harmful algal bloom eliminator. Abstracts of International Conference on Viruses of the Environment: Challenges in Viral Ecology and Evolution, p. 9.

29) 長崎慶三. (2011) 藻類ブルームのウイルスの量的・質的インパクトについて. 日本地球惑星科学連合2011年大会プログラム

BBG021-12.

30) 長崎慶三, 中山奈津子, 外丸裕司. (2011) 海の中のウイルス学. 第26回中国四国ウィルス研究会プログラム・抄録集, 特別講演 1.

31) Nagasaki, K., Tomaru, Y. (2011) Newly-established groups for algal viruses. XV International Congress of Virology, VI-SY20-2.

32) 藤本章裕, 近藤伸一, 中尾令子, 中山奈津子, 外丸裕司, 長崎慶三. (2011) 有害赤潮藻ヘテロカプサに感染するウイルス: HcRNAV の新潟県加茂湖における出現動態. 2011年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会要旨集 p.65.

33) Nagasaki, K., Tomaru, Y., Nakayama, N., Kimura, K., Fujimoto, A. Viral impacts on harmful bloom-forming microalgae in natural

environments. 6th Aquatic Virus Workshop, p.34.

34) 長谷川昭文, 田中悠喜, 外丸裕司, 長崎慶三, 福山恵一, 和田啓. (2011) 有害赤潮原因藻に感染するウイルス HcRNAV 粒子の結晶学的研究. 日本結晶学会年会講演要旨集 2011, p.87.

35) 木村圭, 和田啓, 長谷川昭文, 福山恵一, 外丸裕司, 長崎慶三. 有害渦鞭毛藻ヘテロカプサに感染する HcRNAV を検出する抗体の開発と実用性の検証. 平成 24 年度日本水産学会春季大会 講演要旨集 p.170.

6. 研究組織

(1) 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
研究推進部・研究開発コーディネーター
(瀬戸内海区水産研究所 環境保全研究センター 併任)
研究者番号:00222175

(2) 研究分担者

外丸 裕司(TOMARU YUJI)
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 環境保全研究センター 主任研究員
研究者番号:10416042

(3) 研究分担者

福山 恵一(FUKUYAMA KEIICHI)
大阪大学理学研究科 教授
研究者番号:80032283

(4) 研究分担者

和田 啓(WADA KEI)
宮崎大学 テニュアトラック推進機構
医学系 物質科学分野 助教
研究者番号:80379304

(5) 連携研究者

白井 葉子(SHIRAI YOKO)
元 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・支援研究員
研究者番号: 90435850