

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23686075

研究課題名(和文)水環境ウイルスライブラリの構築と水中ウイルスの網羅的同定技術の開発

研究課題名(英文) Construction of virus genome libraries and exhaustive identification of viruses in water environment

研究代表者

真砂 佳史 (Masago, Yoshifumi)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・准教授

研究者番号：50507895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円、(間接経費) 6,270,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンシング法(NGS)を用いて水環境中の多種多様なウイルスを網羅的に同定する技術の開発を行った。流入下水を調査対象とし、試料の前処理手法、NGSによる塩基配列獲得手法、得られた配列データの解析方法についてそれぞれ検討し、実際にウイルスの検出・同定を行った。ノロウイルスの解析では既存の手法より多くの遺伝子型の検出に成功し、また存在量の少ない遺伝子型も検出できることを示した。RNAウイルスのメタゲノム解析では、下水中の大多数のウイルスが未同定であることが明らかとなった。また、これまで国内で検出例がないウイルスを含む11属の既知ウイルスが検出され、本手法の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated various viruses in water environment using next-generation sequencing (NGS) technology. Component technologies such as pre-treatment of environmental samples, molecular technologies for sequencing and bioinformatic analysis of obtained sequence data were examined and developed. In genotyping of noroviruses in wastewater, we could detect various genotypes including minor types such as GII.2. In metagenomic analysis of RNA viruses, we found that most viruses in wastewater are unidentified. We could detect viruses from 11 genera, some of which have not identified in Japan. These findings demonstrated that the developed methods for NGS analysis are very useful in identifying viruses in the environment.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：病原ウイルス 次世代シーケンシング メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

新興病原ウイルスの早期発見・分離は感染症の診断や治療に不可欠であることは言うまでもない。昨年の新型インフルエンザウイルスの出現を見ても明らかなように、病原ウイルスは世界中で絶えず進化を繰り返し、新たな感染症の流行を招いている。このような状況において、新しく発生した感染症の原因ウイルスを迅速に発見することは、感染症対策を講じる上で最も重要な要素である。

これまで未知の病原ウイルスは臨床検体からの病原微生物同定の際発見されることがほとんどであった。すなわち、個々の臨床検体に対して可能性のある既知の病原微生物の検出を試み、病原体の同定ができない検体から偶然に発見されてきた。この手法は多大な労力を必要とするため、新興病原ウイルスの発見という観点では非常に効率が悪い。

ほとんどの消化器感染症原因ウイルスは、感染者の糞便と共に放出されたのち水や食品などの外部環境を経由して次の感染者に移動する。したがって、多数の感染者から放出されたウイルスが集積する都市域下水中のウイルスを網羅的に同定することで、未知のヒト病原ウイルスを効率的に発見することが可能である。

しかし、下水試料からの未知の病原ウイルス探索には技術的な限界がある。下水を対象とした様々なウイルス調査はこれまでも行われている。これらの調査では定量 PCR 法を用いることが主流である。しかし、定量 PCR 法の増幅領域の塩基長は 100bp 程度と非常に短く、また増幅領域中に検出用のプローブを設計する必要があるため、非常に保存性の高い遺伝子領域にしか用いることができない。さらに、個々のウイルスの存在量が臨床検体と比較して非常に少ないことも下水試料中のウイルス同定を妨げている。そのため、環境調査では属レベルの検出・定量にとどまっており、遺伝子型レベルの詳細な同定や未知の病原ウイルスの探索を行う事は不可能である。

## 2. 研究の目的

本研究では、この技術的障壁を乗り越えるため、次世代シーケンシング法 (NGS) を用いて水環境中の多種多様なウイルスを網羅的に同定する技術の開発を行う。本技術は、ヒト病原ウイルスに限らず幅広いウイルスを検出対象とする。そのため、病原体の同定のみならず水環境のウイルスライブラリを構築することも可能であり、環境工学以外の幅広い分野で活用することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) 下水中のノロウイルスの NGS 解析

国内の A 下水処理場の流入下水 40ml をポリエチレングリコール沈殿法により濃縮し、RNA 抽出および逆転写反応を行った。Nested-PCR 法によりノロウイルス GI 群お

よび GII 群のゲノム断片を増幅し、GS Junior を用いてノロウイルスの塩基配列を得た。得た配列より OTU を作成し、その代表配列を BLASTn 検索により同定した。

### (2) 下水中の RNA ウイルスの NGS 解析

国内の A 下水処理場で採取した流入下水 2 L を 3 段階の膜濾過により濃縮したのち、超遠心分離によりウイルス濃縮液を得た。ウイルスゲノム以外の RNA を RNase 処理により除去したのち RNA を抽出し、DNase 処理により DNA を除去した。次に、一本鎖 RNA ウイルスゲノムのみを非特異的に逆転写および増幅して下水ウイルスライブラリを作成し、ライブラリ中の RNA ウイルスの塩基配列を GS Junior を用いて取得した。得た配列は BLASTn を行うことでウイルスを同定した。

## 4. 研究成果

### (1) 下水中のノロウイルスの NGS 解析

NGS により得た OTU の代表配列とノロウイルス遺伝子型の代表配列で作成した系統樹を図 1 (GI 群) および図 2 (GII 群) に示す。得られた全 6 個の OTU のうち、OTU1.3 (1,471 リード) は GI.6 型、OTU1.5 (11,158 リード) は GI.14 型、OTU3.1 (9,714 リード) は GII.4 型、OTU3.4 (30 リード) は GII.2 型とそれぞれ判定された。また、どの標準配列とも相動性が低い OTU1.1、OTU1.6、OTU3.2、OTU3.3 について解析した結果、これらは遺伝子増幅等により産生されたキメラ配列である可能性が高いと判定された。

NGS を用いることにより、従来の遺伝子型同定手法では検出できないと考えられるノロウイルス GII.2 型のような存在比率の非常に少ない遺伝子型の検出に成功した。また、ノロウイルス GI 群、GII 群共に主要な OTU 同士の組み替えであるキメラ配列が検出された。このように、属する配列が少ない OTU 全てが下水中の相対的な存在割合の低いウイルスに由来するとは言えないため、キメラかどうかの判定は必須であると言える。また、OTU3.3 のように、BLAST 検索により近縁な塩基配列が存在しないが、キメラである可能性も高くない配列も得られた。このような配列を持つウイルスが試料中に存在していたかは、臨床検体や他の環境試料から同じ配列を持つウイルスが検出されたかどうかを確認する必要がある。

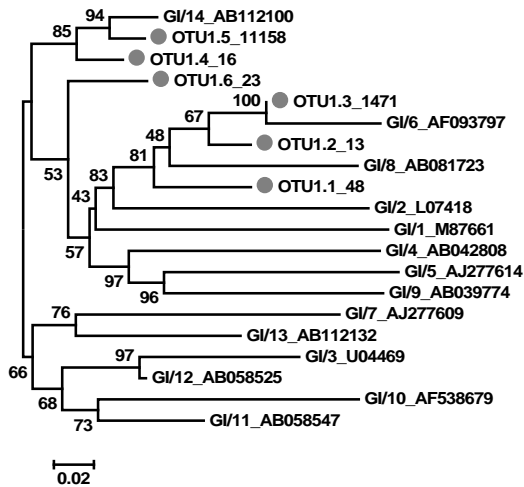


図1 検出されたノロウイルス GI 群

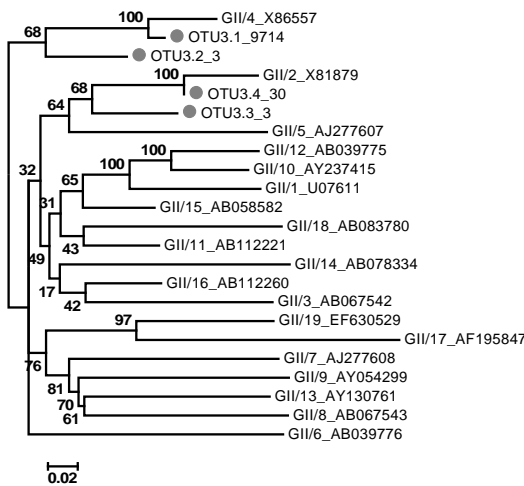


図2 検出されたノロウイルス GII 群

(2) 下水中の RNA ウイルスの NGS 解析

NGS 解析により、55,311 本のウイルス由来の塩基配列を取得することができた。そのほとんどはデータベース上に近縁な配列が存在せず、下水中には未同定のウイルスが非常に多いことが確認された。既知のウイルス由来と判定された塩基配列 (1,151 リード) を属レベルで分類すると 11 種類におよんだ。もっとも配列数が多かった種はトウガラシ微斑ウイルスであった。このウイルスは近年ヒトの糞便による汚染の指標として提案されており、日本においてもこのウイルスが有用であることが示された。ヒトに感染するウイルスでは *Aichivirus A*, *Norovirus*, *Mamastrovirus 1* などが検出された。また、これまで国内では報告例のないウイルスも数多く検出された。例えば *Cosavirus* 属はヒト病原ウイルスの可能性があると指摘されており、東南アジアや南アジアでは検出例があるが、国内では本研究が初である。また、アメリカやネパールの下水から検出され、新たなウイルスとして提案されている *Picalivirus* や *Niflavivirus* も検出され、これら

のウイルスは日本にも存在していることが示された。

このように、RNA ウイルスに限定した NGS 解析を行うことで、1 試料から同時に多数のウイルスが同定できることが示された。*Cosavirus* のように検出を想定していなかったウイルスを検出することができるのが、今回用いたメタゲノム解析の大きな特徴である。本研究で開発した手法は、ヒト病原ウイルス、特に新興・再興感染症を引き起こすようなウイルスを検出するのに適していると考えられる。

表1 検出された RNA ウイルス

Genus	No. of Reads
<i>Tobamovirus</i>	590
<i>Kobuvirus</i>	122
<i>Norovirus</i>	91
Unclassified Partitiviridae	87
<i>Mamastrovirus</i>	54
<i>Potyvirus</i>	46
<i>Betacryptovirus</i>	27
<i>Carlavirus</i>	22
<i>Potexvirus</i>	2
<i>Cosavirus</i>	1
<i>Levivirus</i>	1
<i>Sapovirus</i>	1
others	107

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 3 件)

勝又雅博, 真砂佳史, 大村達夫, パイロシーケンシング法による下水中のノロウイルスの同定, 土木学会論文集 G (環境), 査読有, 69(7): III\_639-III\_646, 2013.  
真砂佳史, 水中の健康関連微生物検出に関する研究動向と新たなリスクの考え方, 水環境学会誌, 査読無, 36(5): 146-150, 2013.  
 Miura, T., Y. Masago, D. Sano and T. Omura. Development of an effective method for recovery of viral genomic RNA from environmental silty sediments for quantitative molecular detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, 77(12): 3975-3981, 2011. doi: 10.1128/AEM.02692-10

〔学会発表〕(計 14 件)

真砂佳史, 久保田健吾, 勝又雅博, 佐竹明日香, 佐藤紀子, 島田祐輔, 袖野太士, 原田秀樹, 大村達夫, 人為汚染の有無が大腸菌群の種構成に与える影響, 第 46 回日本水環境学会年会, 仙台, 2014 年 3 月 17-19 日.  
 風間しのぶ, 真砂佳史, 大村達夫, + 鎖 RNA ウイルスゲノムの完全長増幅におけ

る諸条件の検討，第 46 回日本水環境学会  
年会，仙台，2014 年 3 月 17-19 日。

Masago, Y., S. Kazama, S. Numazawa  
and T. Omura, Identification of  
positive-strand RNA viruses in  
wastewater using pyrosequencing. The  
2nd Global Leadership Initiative Special  
Workshop on Water Virology, Kusatsu,  
Japan, January 21st, 2014.

Masago, Y., Water sanitation and health  
in tropical countries, RSET Biomass  
Seminar 4, Kanazawa, Japan, December  
1, 2013.

勝又雅博，真砂佳史，大村達夫，パイロシ  
ーケンシング法による下水中のノロウイ  
ルスの網羅的同定，第 50 回環境工学研究  
フォーラム 札幌 2013 年 11 月 19-21 日。

Masago, Y., S. Numazawa and T. Omura,  
Vast identification of positive-stranded  
RNA viruses in wastewater using  
pyrosequencing. The 17th International  
Symposium on Health-Related Water  
Microbiology, Florianopolis, Brazil,  
September 15-20th, 2013.

Masago, Y., S. Numazawa and T. Omura.  
Metagenomic analysis of positive  
stranded viruses in wastewater in Japan.  
The 5th Congress of European  
Microbiologists, Leipzig, Germany, July  
24, 2013.

Katsumata, M., Y. Masago and T. Omura.  
Exhaustive identification of Norovirus  
by using pyrosequencing method. Water  
and Environment Technology  
Conference 2013, Tokyo, June 16, 2013.

勝又雅博，真砂佳史，大村達夫，パイロシ  
ーケンサーを用いたウイルス同定技術の  
開発，平成 24 年度土木学会東北支部技術  
研究発表会，仙台，2013 年 3 月 9 日。

沼澤聡，真砂佳史，大村達夫，流入下水中  
の (+) 一本鎖 RNA ウイルスのメタゲノ  
ミック解析，平成 24 年度土木学会東北支  
部技術研究発表会，仙台，2013 年 3 月 9  
日。

Masago, Y., Viral pathogens in the water  
environment. GRANDE Café, La Paz,  
Bolivia, July 19, 2012.

Masago, Y., Human pathogens in water  
environment and its risk to human  
health. JSPS Workshop on Water and  
Urban Environment 2012, Lyon, France,  
June 20, 2012.

菅野未聖，真砂佳史，大村達夫，酵素を用  
いた流入下水からのウイルス誘出手法の  
比較検討，平成 23 年度土木学会東北支部  
技術研究発表会，秋田，2012 年 3 月 3 日。

真砂佳史，病原微生物のリスク，企画セッ  
ション「リスク解析学の環境リスク評価へ  
の適用」，第 48 回環境工学研究フォーラム，  
名古屋，2011 年 11 月 26 日。

〔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

真砂 佳史 (MASAGO, YOSHIFUMI)  
東北大学・未来科学技術共同研究センタ  
ー・准教授  
研究者番号：50507895

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：