

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640112

研究課題名(和文) ウイルスが駆動する古細菌ゲノム進化の解明

研究課題名(英文) Studies on viral-driven evolution of archaeal genomes

研究代表者

左子 芳彦 (Sako, Yoshihiko)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：60153970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱性のAeropyrum属古細菌をモデルとして、ウイルス駆動によるゲノム進化過程の解明を試みた。3か所の温泉から分離した本属22株のゲノム比較により、本属は系統学的な地域性を示した。本属共通遺伝子を除いた地域特有遺伝子の由来を推定した結果、ウイルス由来様ORFan及びウイルス関連遺伝子は40～60%を占めるため、本属ゲノムはウイルスとの共進化と、遺伝子重複と欠失により局所的進化を遂げてきたと推定された。また核外ゲノムとして維持される新規本属溶原ウイルスを見出し、本種ゲノム上の遺伝子ホモログも認められるため、核外溶原ウイルスも本属古細菌のゲノム進化に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aeropyrum is an aerobic hyperthermophilic archaea that has been found from hot waters in deep-sea hydrothermal vents and coastal solfataric vents. In this study we addressed viral-driven evolution of archaeal genomes using this genera. Twenty two strains of Aeropyrum pernix were isolated from three sampling points and were subjected to comparative genome analysis. Each A. pernix population was phylogenetically clustered, suggesting local genomic differentiation of A. pernix. Forty to 60% of population-specific genes were predicted to be derived from mobile elements including viruses. The rest genes were predicted to be from duplication and lost. Further, we succeeded in isolation of a novel lysogenic virus that was maintained as episomal genome. Some homologues of genes of this viral genome were found on genomes of A. pernix, suggesting that episomal genomes also contributed to genome evolution of this genus.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：超好熱古細菌 ウイルス ゲノム進化 共進化 溶原ウイルス 海洋熱水環境

## 1. 研究開始当初の背景

*Aeropyrum* 属古細菌は海洋性の超好熱菌で、現在知られている絶対好気性生物において最高温(100 °C)で増殖する。我々は世界に先駆けて *A. pernix* をトカラ列島浅海熱水孔から分離し、クレンアーキオータ門古細菌として最初に全ゲノムを解読した。さらに、小笠原トラフ深海熱水孔から近縁な *A. camini* (図1) を分離し、2種のゲノム比較解析を行った。その結果、互いに生息環境(深海と浅海)が異なるが、保有する遺伝子とその並び(シンテニー)が高度に保存され、極限環境に適応してゲノムに合理的縮小化が起こっている可能性を見出した。

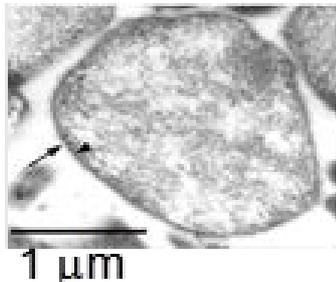


図1. 超好熱古細菌 *A. camini* の電子顕微鏡像

一方、*A. pernix* においてシンテニーが崩壊する2か所の遺伝子領域がウイルスとして放出されることを示し、古細菌における初発の溶原ウイルスの報告事例となった。一方のみが含むゲノム領域の多く(41-45%)はウイルスに由来すると考えられる ORFan (データベースに相同遺伝子が見いだされない)であった。また、熱水環境より2種の新規ウイルスを発見したことにより、古細菌においてウイルス駆動によるゲノム多様化が引き起こされている可能性を見出した。

現在およそ1700種の微生物ゲノム(そのうち古細菌は116種)が解読され公開されている。これらの微生物ゲノム上にウイルス由来遺伝子が数多く見出され、微生物はウイルスとのせめぎ合いの中で共進化してきたと考えられるようになった。しかし、古細菌と古細菌ウイルスのゲノム情報は少なく、両者の相互作用によるゲノム進化過程は未解明課題であった。本研究成果は、生命の起源と考えられる熱水孔で生息する古細菌とそのウイルスの共進化過程の一端を解き明かし、生物初期進化への理解を深化させることとなり、学術上きわめて重要である。

## 2. 研究の目的

*Aeropyrum* 属古細菌は、浅海・深海熱水孔より世界に先駆けて見出した超好熱古細菌である。本研究では、本古細菌をモデルとす

る次の課題により、3つの超生物界の一角を担う古細菌において、ウイルスによって駆動されるゲノム進化過程を解明することを目的とした。

日本各地の沿岸・浅海熱水孔から本属古細菌を分離し、比較ゲノムにより株間・地理的差異に基づくゲノム多様性を明らかにする。

ゲノム上のウイルス耐性遺伝子領域と環境に存在する多様なウイルス由来配列(ウイルスメタゲノム)を比較し、株間・地理的差異による感染ウイルスの差異を明らかにする。

上記を合わせ、ウイルス群集ごとに古細菌ゲノム変化をもたらす様式を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Aeropyrum* 属古細菌の分離

*Aeropyrum* 属古細菌は海洋性超好熱古細菌である。既に、本属古細菌並びにウイルスの分離実績がある鹿児島県山川温泉・長崎県小浜温泉や橘湾に加え、静岡県伊豆市下賀茂温泉・北海道養老牛温泉といった塩分を含む熱水が噴出する地点にて、50 mLプ

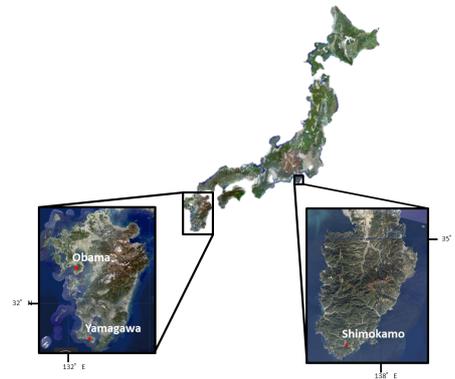


図2. 本研究の試料採取地

ラスティックチューブに熱水堆積試料を採取した(図2)。試料からDNAを抽出したのうち、本属が認められた地点の熱水堆積試料約0.5 gをJXTm海水培地に添加して90 °Cで静置培養する。約1週間集積培養したのち、ゲランガム含有JXTm平板培地(90 °Cでも液化せず固化している)に塗抹した。高温培養による培地の蒸発を防ぐため、密閉ジャー内で一週間培養した後、形成された単一コロニーを取得した。この単離操作を3回繰り返すことによって、分離株を確立した。この時、単一クローンに由来する分離株の重複を防ぐため、一つの集積培養より一株のみ分離株を得た。

### (2) 本属古細菌の比較ゲノム解析

上記地点より新たに分離確立した本属古細菌株、ならびにこれまでに分離・保存している分離株よりDNAを抽出し、本属古細菌を培養し、DNAを抽出したのち、イルミナ社製次世代シーケンサーを用いたドラフトゲノム解読に供した(冗長度50以上)。アセンブリを行い、nrデータベースに対するBLAST検索により、遺伝子の注釈付けをしてORF推定を行った。完全長が得られている*A. pernix* K1株と*A. camini* SY1株ゲノムとのアライメントデータをもとにして、オルソログに基づいて全ての*A. pernix*株で共通する遺伝子(コアゲノム)を抽出した。

5つのハウスキーピング遺伝子およびGenome Similarity Score (GSS)に基づいて系統関係を推定した。

また、ゲノム上に溶原ウイルスおよび株間で異なる遺伝子領域(ゲノムアイランド)の検索とその遺伝子の注釈付けを行った。各株の地域性に基づくゲノム多型とウイルス感染履歴という上記で得られる情報を整理し、本属古細菌の祖先型からゲノム多様性が生じた過程を予測した。

### (3) 本属新規ウイルスの分離性状解析

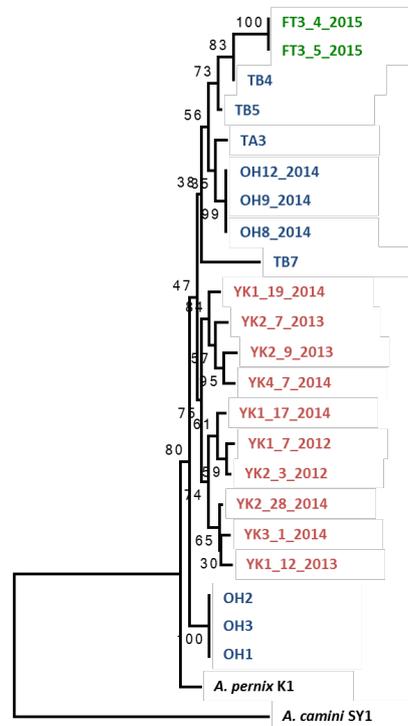
鹿児島県山川熱水環境より採取した砂をJXTm培地に添加し、90°Cで*A. pernix*を集積培養した。集積培養よりPEG沈殿法でウイルス画分(環境ウイルスとする)を調製し、緩衝液(20mM Tris-acetate pH7.0)に懸濁した。同環境より分離した本種を宿主として、環境ウイルス接種区、緩衝液添加区と無添加区の各系を培養し、ウイルス画分を調製して透過型電子顕微鏡で観察した。緩衝液添加区から精製したウイルスと宿主からDNAを抽出し、MiSeqでゲノム解析を行った。ウイルスの増殖様式を調べるため、qPCR法を用いて、緩衝液添加区および無添加区における宿主細胞内/上清中のウイルスゲノムコピー数の経時変化を調べた。培養液の吸光度を測定することで、緩衝液添加区、ウイルス接種区と無添加区における宿主の増殖を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) *Aeropyrum* 属の分離と比較ゲノム解析

鹿児島県山川熱水環境(YK)、長崎県小浜温泉(OH・TA)、静岡県下賀茂温泉(FT)由来の試料をJXTm培地に添加し、90°Cで集積培養して*A. pernix*を分離した。

YKより5株、OHより3株およびFTより2株を分離した。過去に分離されたYK株(5株)とOH株(3株)、TA株(1株)と小浜温泉に面する橋湾から分離されたTB株(3株)を加えた系統解析の結果、全ての分離株は*A. camini* SY1とは異なり*A. pernix* K1とクラスターを形成した。YK株とFT株はそれぞれ単一のサブクラスターを形成した一方で、OH、TAとTB株は複数のサブクラスターに分岐した(図3)。*A. pernix*株のコアゲノム(1228個)



0.002

図3. 5つのハウスキーピング遺伝子に基づく本属古細菌の最尤系統樹

は、既に報告されている属内での共有遺伝子(1455個)よりも少なかった。このことから*A. pernix*においてゲノム縮小化が進行していると考えられた。山川、小浜(OH、TA、TB株)、下賀茂個体群において地域特異的な遺伝子のそれぞれ82%、68%と53%は株特異的遺伝子であった(図4)。これらのうち、ウイルス由来と予測されるORFanおよびウイルス関

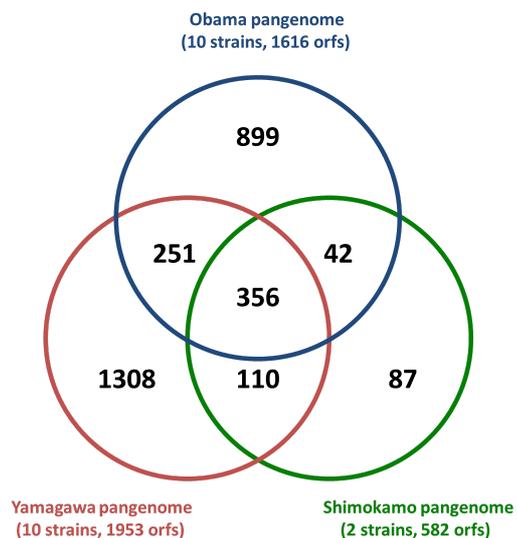


図4. 本属古細菌の分離地別ごと共有遺伝子と特異的遺伝子のベン図

連遺伝子は YK で 16-63%(平均:41 ± 5)、OH で 25-70%(43 ± 4)と FT で 48-72%(60 ± 12)であった。その他、K1 および SY1 株と相同性を示した遺伝子は YK で 7-34%(19 ± 2)、OH で 11-22%(17 ± 1)と FT で 20-43%(31 ± 11)であり、これらは他の株での欠失に由来すると考えられた。遺伝子重複は YK で 6-75% (32 ± 4)、OH で 7-61%(37 ± 6)と FT で 8-10%(9 ± 1)であった。以上より *A. pernix* ではウイルス由来遺伝子に加え、ゲノム縮小化および遺伝子重複により個体群間・株間でゲノム多様性が生じると推察された(図5)。

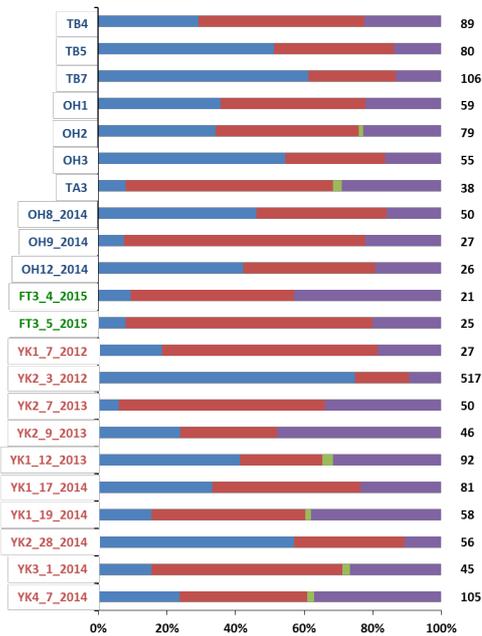


図5. 本属分離株ごとに特異的な遺伝子の由来

青、重複遺伝子; 赤、ORFan; 緑、ウイルスを含む可動遺伝子; 紫、単独遺伝子

### (2) 本属新規ウイルスの分離性状解析

環境ウイルス接種区と緩衝液添加区のみで単一のウイルス様粒子が観察され、宿主溶原化ウイルスに由来するものと考えられた。本ウイルス粒子は直径約 60 nm の球状を示し、

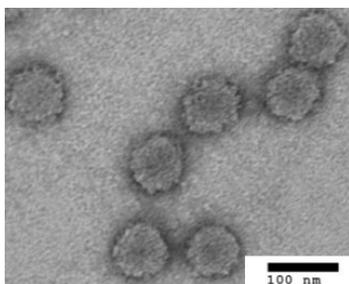


図6. AGV1 の電子顕微鏡写真

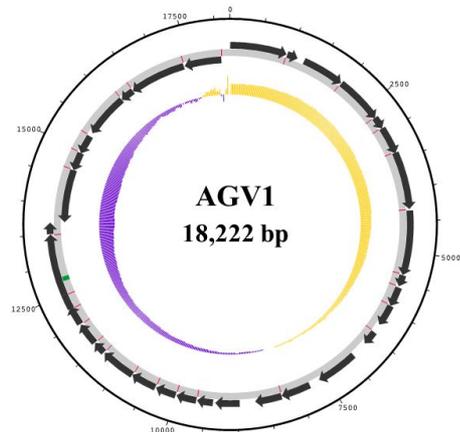


図7. AGV1 のゲノムマップ

矢印は、ORF を示す。ゲノム上の G/C 量が、紫は高く、黄は低いことを示す

*Aeropyrum* 属古細菌では未報告の Globuloviridae 科ウイルスと類似し、*Aeropyrum globular virus 1* (AGV1)と命名した(図6)。AGV1 は 18,222 bp の 2 本鎖環状ゲノム上に 34 個の遺伝子を保有した(図7)。一般に溶原化ウイルスは宿主染色体内にゲノムを挿入する。しかし、宿主のゲノム配列上に AGV1 と一致する領域は認められず、通常培養下では宿主に対する AGV1 ゲノムコピー数は少ないと考えられた。qPCR の結果、無添加区において AGV1 ゲノムコピー数は宿主の  $1/10^3$ - $1/10^4$  倍だったが、緩衝液添加後 9 時間以降に増加し、48 時間以降では宿主ゲノムの 9-26 倍多く検出された。上清においても AGV1 ゲノムは同様に増加した。さらに、宿主の対ウイルス獲得免疫機構 CRISPR 上には、AGV1 と完全一致する感染履歴配列が認められ、AGV1 は過去に宿主に感染し、耐性獲得されたウイルスであると示唆された。以上の結果より、以下のような新規な宿主-ウイルス相互作用の様式が予測された。AGV1 ゲノムは CRISPR の標的であり、また宿主と異なるタイプの複製起点を持つため、通常の培養下では宿主の細胞分裂と同時に複製されず、培養液中で希釈される。しかしながら、緩衝液存在下では急激に増殖可能となり、複製された娘ウイルスは周囲の細胞に再感染し、増殖を阻害する。

### (3) 新規超好熱古細菌の分離

静岡県熱川温泉・陸性熱水環境より *Desulfurococcales* 科の球形古細菌を分離した。本菌は好気性の超好熱古細菌であり、本科に属する古細菌では *Aeropyrum* 属に次ぐ例である。本菌の至適増殖温度と pH はそれぞれ 90 と 6.5 であった。本菌はトリプトンやリンゴ酸、コハク酸といったタンパク質や有機酸を資化する従属栄養生物である。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析および陸性温泉に由来する本科超好熱性古細菌は未報告であ

り(図8) 新属種として記載を進めている。

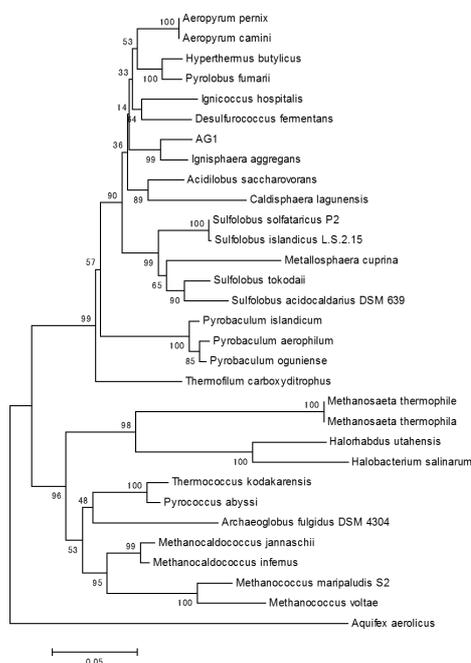


図 8. AG1 株とその近縁種の 16S rRNA 遺伝子の一部配列(615bp)に基づく NJ 系統樹

## 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 1 件)

大福高史, 弓矢真穂, 左子芳彦. 古細菌ゲノム進化とウイルス—生命の起源といわれる熱水環境における共進化過程の解明に期待 (2015). *生物の科学 遺伝*, 69, 326-31.

〔学会発表〕(計 6 件)

藤原慎、大福高史、吉田天士、左子芳彦  
「超好熱古細菌 *Aeropyrum* 属におけるウイルス感染履歴配列の解析」環境微生物系学会合同大会 2014、2014 年 10 月 24 日、アクトシティ浜松

大福高史、吉田天士、左子芳彦「好熱古細菌クレンアーキオータ門のゲノム進化」平成 26 年度日本水産学会近畿支部例会、2014 年 11 月 22 日、京都大学 北部キャンパス

藤原慎、大福高史、吉田天士、左子芳彦  
「超好熱古細菌 *Aeropyrum* 属における宿主-ウイルス相互作用の解明」第 17 回マリンバイオテクノロジー学会、0-1-15、東京海洋大学(品川キャンパス)、2015 年 5 月 31 日(口頭発表)

弓矢真穂、藤原 慎、吉田天士、左子芳彦  
「超好熱古細菌 *Aeropyrum permix* に感

染する新規ウイルスの探索」第 17 回マリンバイオテクノロジー学会、0-1-14、東京海洋大学(品川キャンパス)、2015 年 5 月 31 日(口頭発表)

弓矢真穂、藤原 慎、吉田天士、左子芳彦  
「超好熱古細菌 *Aeropyrum permix* に感染する新規ウイルスの探索」平成 28 年度日本水産学会春季大会、722、東京海洋大学(品川キャンパス)、2016 年 3 月 28 日(口頭発表)

弓矢真穂、藤原慎、吉田天士、左子芳彦  
「超好熱古細菌 *Aeropyrum permix* に感染する新規溶原化ウイルスの増殖様式に関する一考」日本微生物生態学会 第 31 回大会、P-234、横須賀市文化会館、2016 年 10 月 23-24 日(ポスター発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

左子 芳彦 (SAKO, Yoshihiko)  
京都大学・農学研究科・教授  
研究者番号：60153970

### (2)研究分担者

吉田 天士 (YOSHIDA, Takashi)  
京都大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：80305490