

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892031

研究課題名(和文) 海洋ウイルス遺伝資源化計画：海洋RNAウイルスの探索手法確立と多様性・機能の解明

研究課題名(英文) Viruses in the ocean as a gene resource: development of RNA virus surveillance method and assessment of their function

研究代表者

浦山 俊一 (URAYAMA, Syunichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・ポスドクトラル研究員

研究者番号：50736220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新たな網羅的RNAウイルス探索手法を確立し、海洋環境中のRNAウイルス組成調査を行った。当該手法は病徴の有無に依存せず、従来手法と比較して高効率かつ高感度に、対象試料中の全ての非レトロRNAウイルスを同定可能である。本手法を用いて、従来手法では実質的に探査不可能だった潮溜り中の珪藻コロニーより多数の新規RNAウイルスを検出した。本結果から、海洋環境には従来の想定以上に多様な未知RNAウイルスが存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive dsRNA sequencing method was developed, and RNA virus community in the ocean was assessed. The method enabled us to detect total non-Retro RNA viruses in any cellular sample without host phenotypes. With this method, we detected more than 20 virus genomes, suggesting that unseen RNA viruses should also exist in the ocean.

研究分野：ウイルス学

キーワード：海洋 ウイルス 遺伝資源

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物の持つ機能や性質は、古くは発酵食品に利用され、現在では酵素産業や物質生産など広範囲に利用されている。近年ではウイルスに関しても、その性質や成分の利用が農学や医学、さらに工学分野でも試みられており、ウイルス研究の新たなトレンドとも言える。

(2) 研究代表者は特に、RNAウイルスの宿主細胞制御機能を“遺伝子レベル”で取り出し、様々な微生物の制御に応用出来ることを示してきた。つまりRNAウイルス遺伝子は、人類が有用微生物や病原微生物を制御するための全く新しい遺伝資源となることを意味している。

(3) RNAウイルスを遺伝資源と捉えた場合、遺伝資源の量や多様性は重要な因子であり、その意味で海洋は膨大な“ウイルス遺伝資源プール”と言える。地球表面の7割を占める海洋からは、1979年に初めて多量のウイルス粒子が観察され、近年では海水1ml中に100万個ものウイルス粒子が存在することが報告されている。

(4) しかし、歴史的背景から、海洋ウイルス研究の主な対象はバクテリアを溶菌させるDNAウイルスであり、RNAウイルスに関する報告は数例しかない。

(5) 海洋RNAウイルスの新規遺伝資源としての利用のためには、まず、海洋環境サンプルからの効率的なRNAウイルス探索手法の確立と、海洋環境におけるRNAウイルスの多様性や機能を明らかにすることが必要不可欠である。

(6) 全てのウイルスは宿主の細胞内でのみ増殖することが可能である。つまり、全てのウイルスの生活環には細胞内フェーズが存在する。一方で、ウイルスの伝播には昆虫の吸血や吸汁による水平伝播や親から子への垂直伝播など多様な経路が存在し、必ずしも細胞から外に出て、新たな細胞へ感染する経路を経る必要はない。

(7) つまり、ウイルス多様性の把握には、細胞外のウイルスだけではなく、細胞内のウイルスも捉える必要がある。しかし、これまで行われてきた海洋環境ウイルスの網羅的研究では、ターゲットがDNAウイルスかRNAウイルスかに関わらず、細胞を飛び出して海水中に単独で浮遊しているウイルスが研究対象となってきた。これは、一般的なウイルスの網羅探索において、細胞内に存在するウイルスの探索は技術的に困難であることの表れであり、細胞内のウイルスはこれまでほとんど、網羅的研究の対象とならなかった。

2. 研究の目的

(1) 細胞内外を問わず、海水や海底堆積物、海産生物といった幅広い海洋環境試料に対して有効な、RNAウイルスゲノムの効率的な抽出・精製技術を確立する。

(2) 上記の解析で得られたウイルスRNAをメタRNAウイルスゲノム解析に供し、海洋環境中のRNAウイルスの多様性を明らかにする。陸上で得られている既知のRNAウイルスと配列情報を比較することで、海洋性RNAウイルスの特徴や機能を推定する。

3. 研究の方法

(1) ウイルスRNAのみを効率的に解析するため、非レトロRNAウイルスに共通した分子マーカーとして、“長い2本鎖RNA”を海洋性試料より精製・解析する手法を構築する。一般に、長い2本鎖RNAは正常な細胞中にはほとんど存在しないため、海水や海底堆積物より長い2本鎖RNAを抽出精製することで、理論上は対象試料中のRNAウイルス組成を把握することが可能となる。

(2) 得られた長い2本鎖RNAプールに含まれるウイルス遺伝子の多様性を評価するため、次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンスを行う。長い2本鎖RNAを出発材料としたシーケンスライブラリーの作製手法は未だ十分に確立していないため、本研究では新たに効率的なシーケンスライブラリー作製手法の構築も行う。

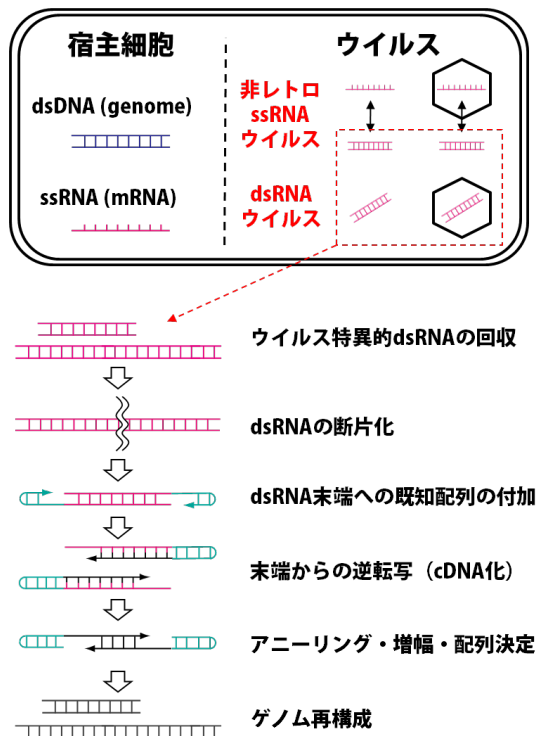


図1: FLDS法の概要

(3) 既知ウイルスとの配列類似性に基づき海洋試料に含まれるRNAウイルスの多様性を評価する。また、既知の陸上RNAウイルスと比較することで、海洋性RNAウイルスの特徴や機能を推定する。

4. 研究成果

(1) RNAウイルス探索手法として新たにFLDS法(fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing)(図1)を開発した。本手法は、精製した長い2本鎖RNAを超音波により断片化すること、得られた2本鎖RNA断片の末端より逆転写を開始すること、を特徴としている。FLDS法の有効性を評価するため、既知RNAウイルスを含む生物試料より全核酸を抽出後、長い2本鎖RNAを精製し、cDNAライブラリーを作製した。次世代シーケンサーを用いて遺伝子配列を解析した結果、9割以上がウイルスに由来する配列であることが明らかになった。さらに、従来手法ではRNAウイルスゲノムの末端配列取得にはRACE法などの別途実験が必要であったが、FLDS法ではウイルスの全長ゲノム配列が一度の解析で得られることが明らかになった。以上の結果から、FLDS法は既存手法と比較して極めて高い効率でRNAウイルスを探索可能であり、さらに従来手法では不可能だった全長ゲノム配列の取得も可能とする有効な手法であることが示された。

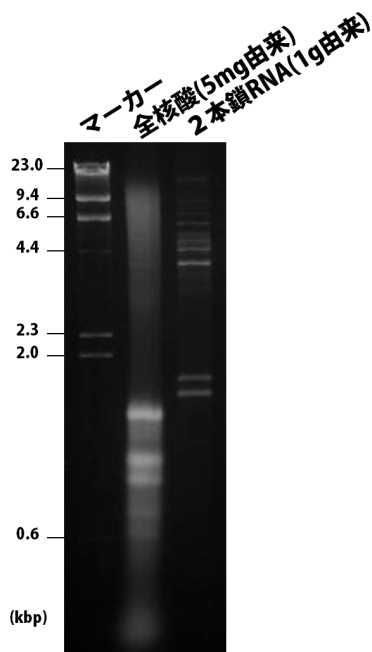


図2: 珪藻コロニーより得た全核酸と2本鎖RNAの電気泳動図

(2) 実際の海洋環境試料として、潮溜りに生息していた珪藻コロニー中のRNAウイルス組成解析を行った。一般的な手法では珪藻コロニーを含む“細胞性試料”からのRNAウイルス探索は非常に効率が悪く、これま

で“細胞性試料”に含まれるRNAウイルスの網羅的探索はほとんど行われていなかった。試料より抽出した全核酸にはゲノムDNAとrRNAが多量に含まれていたが、2本鎖RNAを精製・濃縮した結果、RNAウイルスゲノムと予想される複数のバンドが検出された(図2)。FLDS法を用いて作製したcDNAライブラリーを次世代シーケンサーで解読した結果、21種の新規RNAウイルス全長ゲノムが同定され、身近な生物試料中にも、従来想定されていなかった多様なRNAウイルスが存在することが明らかになった。また、21種中2種は動物病原ウイルスのグループに属する可能性が示唆された。これら2種のウイルスが現在動物に感染するとは考えられないが、動物病原ウイルスの進化や起源を考える上で重要な知見となることが予想された。

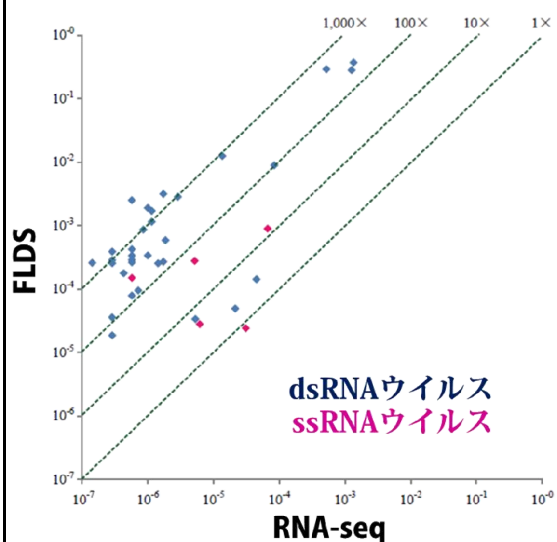


図3: 各ライブラリーにおけるウイルスリードの出現頻度(ウイルスごと)

(3) 比較対象として、同じ試料に対し、最も一般的なRNAウイルス探索の一つであるRNA-seq法による解析も行った。その結果、RNA-seq法で決定できた全長RNAウイルスゲノムは0種であり、RNAウイルスの部分配列も6種しか得られなかった。FLDS法とRNA-seq法で構築したライブラリー中の各RNAウイルスリード出現頻度を比較した結果、1例を除くほぼ全てのRNAウイルスに関して、FLDS法の方がよりRNAウイルスを効率的に探索可能であることが明らかになった(図3)。

(4) 海水中の微生物を対象に、上記同様、FLDS法によるRNAウイルス探索を行った。その結果、外洋の表層海水から少なくとも100種以上の新規RNAウイルスが検出された。これらRNAウイルスの中にはこれまで海洋環境から見出されていなかっ

たグループに近縁なウイルスが多数含まれており、海洋環境には従来の想定以上に多様なRNAウイルスが存在することが明らかになった。

(5) 上記の結果から、海洋環境は多様かつ新規なRNAウイルスを保持している“新たなフロンティア”であると考えられる。本研究で確立した網羅的RNAウイルス探索手法(FLDS法)には、「多様なRNAウイルス遺伝子の特異的な濃縮」という側面もあり、今回の研究において「海洋RNAウイルスの遺伝資源化」に向けた最低限の科学的知見と技術基盤の構築が達成された。

(6) これまで行われてきた網羅的RNAウイルス探索研究では、“細胞内のウイルス”はほとんど無視されてきたといっても過言ではなく、植物と昆虫を対象とした数例しか報告されていない。本研究で確立したFLDS法は非常に高効率かつ高感度な手法であり、事実上これまで解析が不可能だった微量試料や、ウイルスの探索対象とさえもならなかったあらゆる生物試料におけるRNAウイルス探索が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Syun-ichi Urayama, Yoshihiro Takaki, Takuro Nunoura. FLDS: A Comprehensive dsRNA Sequencing Method for Intracellular RNA Virus Surveillance, *Microbes and Environments*, 31(1): 33–40. 2016. 査読有.
DOI: 10.1264/jsme2.ME15171

Syun-ichi Urayama, Yukari Yoshida-Takashima, Mitsuhiro Yoshida, Yuji Tomaru, Hiromitsu Moriyama, Ken Takai, Takuro Nunoura. A New Fractionation and Recovery Method of Viral Genomes Based on Nucleic Acid Composition and Structure Using Tandem Column Chromatography. *Microbes and Environments*, 30(2):199–203. 2015. 査読有.
DOI: 10.1264/jsme2.ME14174

〔学会発表〕(計4件)

浦山俊一、吉田ゆかり、高木善弘、高井研、布浦拓郎. 宿主病徴に依存しない網羅的RNAウイルスゲノム決定手法の確立. 日本ゲノム微生物学会. 東京工業大学 大岡山キャンパス(東京都目黒区). 2016年3月5日.

浦山俊一、高効率 dsRNA シーケンシングによる細胞内 RNA ウイルスワールドの発見. 日本微生物生態学会. 土浦亀城プラザ(茨城県土浦市). 2015年10月20日.

Syun-ichi Urayama, Yukari Yoshida, Mitsuhiro Yoshida, Ken Takai, Takuro Nunoura. Fractionation of four types of viral nucleic acids by using hydroxyapatite and cellulose chromatography. The annual meeting of the American Society for Virology. Western University London ON (Canada). 2015年7月13日.

浦山俊一、吉田(高島)ゆかり、吉田光宏、高木善弘、高井研、布浦拓郎. ウイルス核酸種4種の同時分画及び dsRNA メタゲノム手法の確立. 日本ゲノム微生物学会. 神戸大学(六甲第二キャンパス)神大会館(兵庫県神戸市). 2015年3月7日.

〔図書〕(計2件)

浦山俊一・布浦拓郎、網羅的ウイルス診断の基礎となる高効率 RNA ウイルスメタゲノム解析手法の確立、バイオサイエンスとインダストリー、財団法人バイオインダストリー協会、in press. 2016年

浦山俊一・吉田光宏・吉田(高島)ゆかり、地球最大のウイルス貯留池：海洋 遺伝資源としての海洋ウイルス利用を目指して. 生物の科学 遺伝、エヌ・ティー・エス、69巻、4号、272-277頁、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦山 俊一 (URAYAMA, Syunichi)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・ポストドクトラル研究員
研究者番号：50736220