

第5回研究助成

ウイルスは海洋生物多様性を創生・維持する素粒子か？

プロジェクトリーダー

吉田 天士 京都大学農学研究科

プロジェクトメンバー

左子 芳彦 京都大学農学研究科

緒方 博之 京都大学化学研究所

五斗 進 京都大学化学研究所

山本 圭吾 大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター



1. 研究の背景と達成目標

海洋における一次生産は主に植物プランクトンが担い、その純生産量は陸上に匹敵すると推定されている。生合成された有機物を起点として、海洋生態系は極めて多様な微生物の代謝過程に支えられている。リボソーム RNA 遺伝子に基づく分子系統解析・群集構造解析が導入され、海洋微生物の多様性、分布や動態への全球的な理解が深まってきた。一方ウイルスは、その数で潜在的宿主といえる微生物の数をはるかに上回り（海洋全体で 10^{31} 粒子）、極めて大きな遺伝的多様性を含有する。日々 10%~40% もの微生物がウイルスにより感染・溶菌していると試算され、ウイルスは、有機物の流れを変え、海洋物質循環過程に深く関与する。さらに両者は絶えずせめぎ合い、多様性の形成に関わっていると予測されている。これらウイルスは、それぞれ固有の宿主特異性を持ち合わせるため、どの微生物と相互作用するのか（“Who infects whom?” 問題）を紐解き、ウイルス種ごとに多様性と分布状況を明らかにすることが、海洋物質循環過程を理解する上で極めて重要な課題であると認識されるようになった。

既存のウイルス株は培養可能なごく一部の宿主微生物との感染系を通じて分離されてきた。また、海洋ウイルスの遺伝子多様性の高さからメタゲノム解析で得られる配列の大部分が未知配列であり、海洋で真に卓越するウイルス-微生物系に関する知見は限定的であった。本研究では、ウイルス感染メカニズムに基づく包括的ゲノム解読法を確立し、“Who infects whom?” 問題を解決し、両者の遺伝的変動を検出し、海洋微生物の多様性が、ウイルスとの相互作用を通じた多様性維持と急速な軍拡競争による多様性創生という 2 つの並列的過程で、ダイナミックに変動している様子を提示する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・世界の海洋から採取されたウイルスメタゲノムより 1352 の完全長ウイルスゲノムを構築した。
- ・既存のウイルス分類群を 2 倍以上拡張する 600 の新たなウイルス属を見出した。
- ・ SAR86、MGII 古細菌といった未培養の海洋主要微生物のウイルスグループを特定した。
- ・メタゲノムに現れるウイルスゲノムが、同所的に生成されたウイルスに由来することを見出した。
- ・微生物-ウイルス感染系は局所的に生じていることを見出した。
- ・少なくとも一部の微生物-ウイルス系において、日周期的な感染周期を見出した。
- ・ウイルスゲノムデータベースを構築し、公開した。
- ・ゲノム類似性に基づくウイルス分類手段を提供するウェブツール ViPTree を開発・公開した。

3. 研究成果

(1) 海洋ウイルスメタゲノムから 1352 の完全長ウイルスゲノムの構築

大阪湾湾口部で 24 時間、3 時間毎に取水した 9 試料から、サイズ分画によるろ過を行い微生物を除去した。ろ液を鉄共沈法と密度勾配超遠心法に供してウイルスを精製した。精製ウイルスより DNA を抽出し、次世代シーケンサー-Miseq (Illumina 社) を用いて塩基配列を決定した(塩基配列の集まりをウイルスメタゲノム、すなわちピロームと呼ぶ)。9 サンプルすべてのピロームをまとめて配列間を連結(アセンブル)した。得られた約 12 万コンティグ (300 bp 以上) のうち、879 個は 10 kbp 以上の塩基長であった。さらに、46 コンティグ (28.5–192 kb、平均 54.2 kb) は、両末端の逆位相同性を示し環状にアセンブルされたため、完全長ウイルスゲノムと判断した。

この結果が得られた時点で、小さい規模のピローム（8.5Mb）から完全長ウイルスゲノムが構築されたとの報告は皆無であった。そのため、得られた完全長ウイルスゲノムが、関連のない配列間どうしが連結されたことなどによるキメラゲノムであるのか慎重に検討を行った。46個の完全長ゲノムのうち、16個は全長において3時間毎のピロームを個別にアセンブルしたコンティグが貼り付いた。残りの30個のゲノムに対しては、別々のアセンブルによるコンティグでは埋まらない領域が合計229個見いだされた。それらの領域の内21個を無作為に選び出してPCRによって配列を読んだ結果、完全長ゲノムと一致する配列が増幅された。さらに、46個のうち18個はデータベースに登録された既報ゲノムに対してほぼ完全または一定以上のゲノム共線性を示した。この結果によって、46個のゲノムの大域的な構造が正しいことがさらに根拠づけられた。

そこで、アメリカ・アリゾナ州立大学のグループが公開した26海域から採取された全地球的ピロームデータに本手法を適応した。その結果、ウイルス由来のものと予測された、1,554個の完全長ゲノム（10–211 kb）が構築された。塩基配列に基づくクラスタリングによって、大阪湾から得た完全長ゲノムと合わせて計1,600個のうち、ゲノム配列の類似性が高く、冗長であると考えられるものを取り除くと、1,352個の非冗長な完全長ゲノムが得られた。

(2) 構築したウイルスゲノムの新規性

得られたウイルスゲノムの新規性を評価した。まず、分離された原核生物ウイルスのゲノム（>10 kb、2,429個）の配列セットをデータベースから収集した。全ゲノム配列の類似度に基づくプロテオミクツリーによって、すべてのウイルスゲノムを合わせて分類した（図1）。プロテオミクツリーとは、2つのゲノム間を相同性検索ソフト（tblastx）で比較し得られたスコア（ S_G ：ゲノム類似度）で得られるゲノム全体の類似度に基づく系統樹である。 S_G が1であれば比較している2つのゲノムは同一であり、全く類似性のある領域が検出されなければ S_G は0となる。プロテオミクツリー上ではピロームから構築したゲノムと分離に基づくウイルスゲノムクレードがはっきりと分かれた（図1）。

また、分離ウイルスの属レベルの分類の一致する S_G の閾値を検証したところ、 $S_G = 0.15$ の時に最高の一致度を示した。この基準によると、すべてのウイルスゲノムセットから計1,087属に分類することができた。環境から構築したゲノムのみで構成された600個の新しいウイルス属を見出し、既存のウイルス分類群を2倍に拡充したことを意味する。

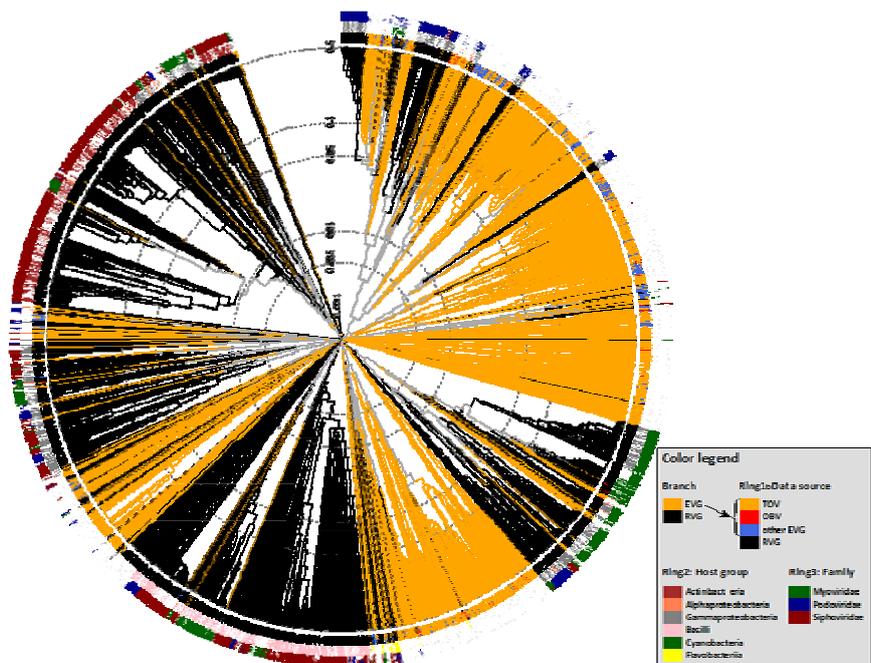


図1. ウイルスプロテオミクツリー

全ゲノム配列に基づいて計算された4,240原核生物dsDNAウイルスゲノムの類似性の関係を示している。枝の色が黄色のものがメタゲノムから構築したウイルス、黒が既存のウイルスであることを示している。枝長は対数スケールで表示されている。木は中間点を根として描かれている（mid-point rooted）。

これら未分離ウイルスに関して完全長ゲノム配列を用いて宿主予測を行った結果、海洋に多く存在するが依然未分離の原核生物であり、必然的にウイルスも未分離であるユーリ古細菌やガンマプロテオバクテリア綱 SAR86 クレードに属する細菌を宿主とするウイルス（図 2）が含まれていることが推定された。さらに、フラボバクテリア綱細菌に感染すると予測される、230 個の新規ゲノムを含む 2 つのウイルスゲノムグループを同定できた。このように、海洋ウイルスのリファレンスゲノムとして重要性が高いと考えられる、数多くの新規完全長ウイルスゲノムを取得することができた。さらに、本研究で構築されたウイルスゲノムに含まれる遺伝子の機能には大きな多様性が見られ、これまでウイルスゲノムにはあまり見られていない、あるいは全く検出されてこなかったシャペロニン（図 3）やリボソームタンパク質、窒素代謝に関わるトランスポーターや調節因子などが含まれていた。また、鉄硫黄クラスターに関わる遺伝子群や炭素同化及び細胞壁合成に関わる遺伝子群など、互いに機能的に関連する

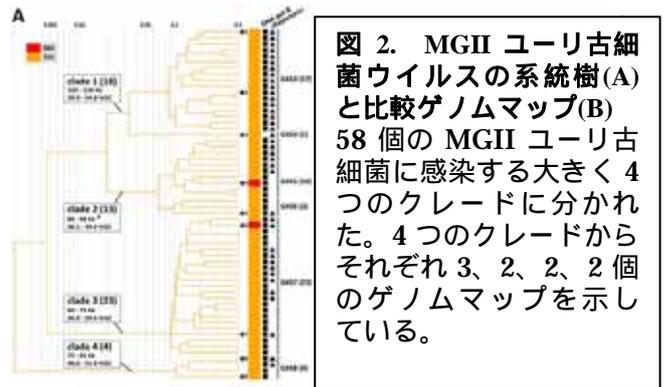
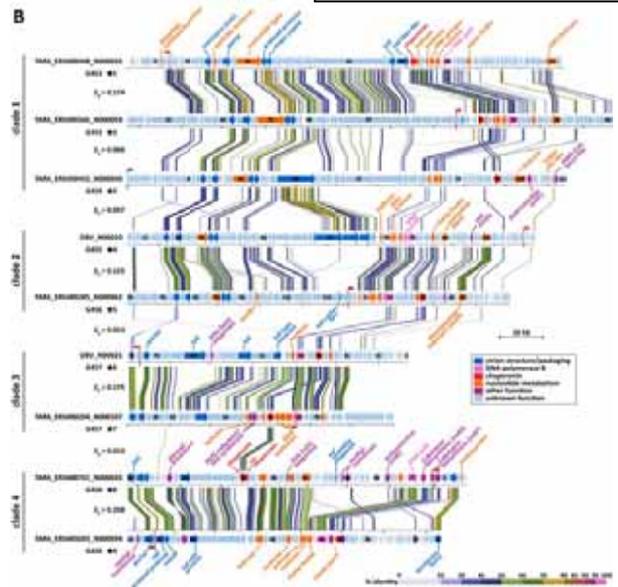


図 2. MGII ユーリ古細菌ウイルスの系統樹(A)と比較ゲノムマップ(B) 58 個の MGII ユーリ古細菌に感染する大きく 4 つのクレードに分かれた。4 つのクレードからそれぞれ 3、2、2、2 個のゲノムマップを示している。



遺伝子が 1 つのウイルスゲノム内に集中的に存在する例が発見された。これらのゲノムは、単に核酸のようなウイルスの構成要素を組み立てるだけでなく、宿主の様々な代謝過程に積極的に関与していく海洋ウイルスの生存戦略を示唆していると考えられる。

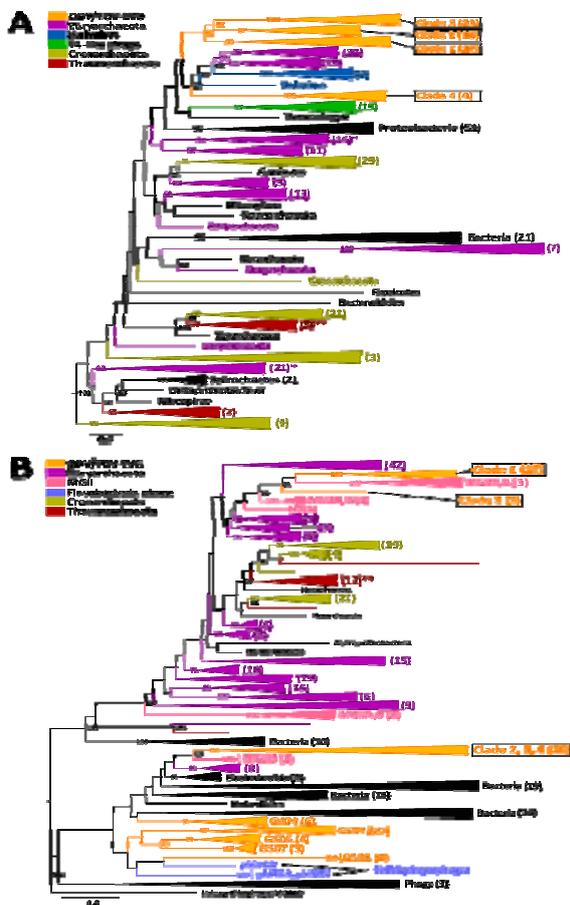


図 3. DNA ポリメラーゼ B とシャペロニンの系統樹 (A) 最尤法による DNA ポリメラーゼ B の系統樹。この系統樹は合計 348 配列を含み、4 つの細菌に含まれる DNA ポリメラーゼ遺伝子を外群として書かれている。(B) 最尤法によるシャペロニンの系統樹。この系統樹は合計 381 配列を含み、木は中間点を根として描かれている。

(3) ウイルスの転写動態解析

大阪湾より 24 時間 3 時間ごとに海水を採取し、微生物画分を現れる mRNA 塩基配列を解読し、新たに見出したウイルスゲノムと既報のウイルスを合わせた全 4000 ゲノムを対象に配列をマッピングした。そ

相互作用を明らかにする研究分野に大きな変革が起きている。一方、これら微生物に感染するウイルスは培養分離事例の乏しさや圧倒的な多様性の高さにもかかわらず共通遺伝子がないことにより研究が立ち遅れてきた。本研究により、完全長ゲノムを用いてウイルスを分類し、その群集・動態解析を行う手法を新たに提案した。また、ある環境で最も活発に増殖している微生物はウイルスの被感染が高い、いわゆる”Virus kills the winner” 仮説を考慮すると、本手法で環境に多いウイルスを知り、その宿主を推定することにより、その環境における微生物群集のうち、活発に増殖し、物質循環過程に対して重要度の高い微生物を抽出することが可能となる。環境で真にアクティブな宿主微生物構造を推定し、ウイルスによる物質循環過程を再構築することが次の課題となる。本プロジェクト成果は、本代表者による基盤研究(B)による日本近海のウイルス構造の包括的解明、新学術研究「ネオウイルス学」における赤潮へのウイルスの影響解明をはじめ、国内外の共同研究も始まりウイルス生態学の発展が期待される。

1. 発表実績

原著論文

1. Kopf, A.---Yoshida, T.---- et al. (167 researchers). The ocean sampling day consortium. *GigaScience* , 4:272015.
2. Mihara, T. et al. Linking Virus Genomes with Host Taxonomy. *Viruses*, 8, 66 (2016)
3. Nishimura, Y., Yoshida, T., Kuronishi, M., Uehara, H., Ogata, H. and Goto, S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics* (2017) in press.
4. Nishimura, Y., Watai, H., Honda, T., Mihara, T., Omae, K., Roux, S., Blanc-Mathieu, R., Yamamoto, K., Hingamp, P., Sako, Y., Sullivan, M. B., Goto, S., Ogata, H. and Yoshida, T. Environmental viral genomes shed new light on virus-host interactions in the ocean. *mSphere* (2017) 2, e00359-16. DOI: 10.1128/mSphere.00359-16

講演

5. 吉田天士「完全長ゲノムの再構築による海洋ウイルス生態学の転換」生命医薬情報学連合大会 2015年大会（招待講演）、番号なし、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ 京都府宇治市、2015年10月30日（口頭発表）
6. 吉田 天士「海はウイルスで満ちている」第63回日本ウイルス学会学術集会 市民公開講座「ウイルスをもっと知ろう」（招待講演）、番号なし、アクロス福岡 福岡県福岡市、2015年11月21日（口頭発表）
7. 吉田 天士 「環境における有毒ラン藻とファージのせめぎ合い」 招待講演 第32回マリントキシン研究会、番号無し、東京海洋大学品川 キャンパス 2016年3月26日（口頭発表）
8. 吉田天士「ウイルスから海洋微生物構造を知る」水圏微生物研究フォーラム 2016、東京大学大気海洋研究所講堂、2016年8月9日（招待講演、パネルディスカッション）
9. 第281回生態研セミナー「ウイルスメタゲノム解析は水圏生態学に何をもたらすのか」大津市、京都大学生態学研究センター2016年11月11日（講演）