

# 研究終了報告書

## 「シングルゲノム情報を用いた水圏ファージ-宿主間の相互作用解析」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：西川 洋平

### 1. 研究のねらい

ウイルス(主にバクテリオファージ)は地球上で最も豊富な生命体(様物質)として知られ、宿主となる原核生物への感染と溶菌を通じて、地球上の物質循環に直接/間接的に関与している。また、ウイルスゲノムを宿主に取り込ませる(溶原化)ことによって宿主の代謝活性に影響を与え、細菌の遺伝的多様性の形成に関わっている。ウイルスはまた、水圏環境において高密度( $10^7 \sim 10^8$  個/mL)に分布しており、主要な可動遺伝因子の一つとして、様々な遺伝子の伝播に関わっていることが知られている。こうした環境ウイルスの機能解明に向け、主にショットガンメタゲノム解析を用いて、ウイルスゲノムを対象とした解析が精力的に進められている。

一方で、これまでに取得されたウイルスのゲノム情報は全体のごく一部に限られており、環境ウイルスの多様性や機能は大部分が未解明である。この理由として、ウイルスゲノムは細菌に比べて遺伝子の変異や組み換えが頻繁に発生するため、配列のアセンブリなどの工程において、モザイク性の高い領域が欠落してしまうことが大きな要因であるとされている。また、メタゲノム解析に代わる手法として、セルソーターを用いてウイルス粒子を分取し、個別にゲノム解析を行う手法(Single virus genomics 手法)が提案されている。しかしながら、ナノメートルサイズのウイルス粒子をセルソーターによって効率的に分取することは技術的に困難であり、配列取得の効率やスループットには課題が残されていた。

そこで本研究では、ピコリットル容量の微小液滴を反応場として活用することにより、一本鎖および二本鎖 DNA ウイルス 1 粒子のゲノム情報を、個別に解析することのできる新たなゲノム解析技術を開発することを目標とした。また、開発した手法を河川環境に応用することにより、河川水中の未知ウイルスのゲノムデータベースを拡充するとともに、ウイルス間の遺伝子伝播に関する解析を試みた。さらに、ウイルスの宿主となる細菌のゲノム情報からウイルス様配列を検出することにより、ウイルス-細菌間の相互作用をシングルセルレベルで明らかにすることを目標とした。

本研究の目標達成に向け、①モデルウイルスを用いた 1 粒子ゲノム解析手法の開発、②河川水サンプルを用いたウイルスゲノムの取得・解析、③ウイルス・細菌ゲノムの大規模取得・解析、の 3 項目に分けて研究を進めた。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では、一本鎖および二本鎖 DNA ウイルス 1 粒子を対象とした、高精度かつハイスループットなゲノム解析手法を開発し、水圏環境中のウイルスを対象とした解析によって、環境ウイルスのゲノム多様性を明らかにした。

まず、粒径 30  $\mu\text{m}$  のアガロース製の微小液滴内にウイルス粒子を封入し、個別に全ゲノム増幅を行う手法を開発した。本手法では、液滴内で個々のウイルスゲノムを増幅した後、蛍光色素を用いて DNA の増幅を検出し、セルソーターによって液滴を分取する。原理検証として、実験室環境下で調製したウイルス粒子を用いて 1 粒子レベルでのゲノム解析を行ったところ、粒子ごとの配列情報が夾雑することなく個々の液滴内で増幅されることが明らかとなった。また本手法では、一度に  $10^5$  個以上のウイルス粒子を対象としたゲノム増幅が可能であり、目標とする高精度かつハイスループットなゲノム解析手法を構築することができた。

次に、神田川の河川水中ウイルスを対象としたゲノム解析を行い、1400 個を超えるウイルス配列を獲得した。これらの配列は、従来のメタゲノム解析では構築できない存在量の少ないウイルスや、配列多様性の高いウイルスの情報を多く含んでおり、1 粒子ゲノム解析によって未知ウイルスゲノムの拡充が可能であることが示された。さらに、同種のウイルス配列間におけるゲノム構造の多様性を解析することにより、ウイルスのゲノム情報が粒子レベルで多様化していることを明らかにした。

以上の解析に加え、海水からのウイルス粒子のゲノム解析にも着手し、当初の予定を大きく上回る累計 6,000 個以上の新規ウイルス配列の獲得に至った。また、細菌 1 細胞由来のゲノム情報からウイルス配列を検出することにより、多様な細菌系統に対して感染能を有する新規ウイルス配列を検出した。以上の成果は論文として *ISME communications* に発表した。

### (2) 詳細

#### ①モデルウイルスを用いた 1 粒子ゲノム解析手法の開発

2 種類の異なる DNA を搭載したウイルス粒子を調製し、モデルとして用いた。2 種類のウイルスを混合したアガロース溶液を調製し、マイクロ流体デバイスを用いて粒径 30  $\mu\text{m}$  の微小液滴を作製した。これにより、ウイルス粒子を個々の液滴内に個別に封入した。液滴内でウイルス粒子の溶解および全ゲノム増幅を実施した後、セルソーターを用いて DNA が増幅された液滴の分取を行い、次世代シーケンサーによる配列解析を実施した。なお本研究では、アガロースの濃度およびウイルス粒子の溶解手法の検討を行うことによって、高精度な配列情報の取得を可能にした。全ゲノム増幅後の液滴に対して DNA 結合性色素を加えたところ、増幅した DNA 由来の蛍光が確認された。また配列解析の結果、液滴内において 2 種類の配列が夾雑することなく、高精度なゲノム増幅が可能であることが確認された。

#### ②河川水サンプルを用いたウイルスゲノムの取得・解析

本項目は、当初の研究スケジュールを一部前倒して遂行した。神田川から河川水を採取し、ウイルス粒子を濃縮した。比較対象として、濾過液からのショットガンメタゲノム解析を実施した。電子顕微鏡を用いたウイルス濃縮液の観察により、直径数百 nm の粒子が確認された。ウイルス濃縮液に対して微小液滴を用いたゲノム増幅を行い、1400 個を超えるウイルス配列(viral single amplified genomes: vSAGs)を検出した。一方で、同程度の配列情報を取得したショットガンメタゲノム解析では、構築されたウイルス配列(viral metagenome assembled genomes: vMAGs)の数は 100 個に留まった。以上の結果から、1 粒子ゲノム解析により、従来のメタゲノム解析に比べてハイスループットかつ高効率に新規ウイルスのゲノム情報が取得できることが示された。さらに、得られたウイルス配列について詳細な解析を行うことにより、同種と判定されるウイルスゲノム間においても保有する遺伝子のパターンに多様性があることが明らかとなった。

### ③ウイルス・細菌ゲノムの大規模取得・解析

#### ③-1. 多様な環境から取得された細菌 1 細胞ゲノム情報からのウイルス様配列の探索

本項目は、項目①、②と並行する形で研究を進め、*ISME communications* での成果報告に至った。紅海およびその周辺の多様な環境(海水、海泥、土壌、土漠を含む)から取得した 734 個の 1 細胞ゲノム情報を対象にウイルス様配列を検出し、91%が新規と推定される 303 個のウイルス様配列を獲得した。遺伝子の保有パターンに基づいて VC への分類を行った結果、40 個の VC が獲得された。同一 VC に分類された配列に着目し、配列が検出された宿主細菌の系統やサンプルの採取地点を紐付けて解析することにより、ウイルス配列の地理的分布および宿主域の広さを評価した。これにより、複数の細菌系統や異なる環境に共通して検出されるウイルス様配列の存在が明らかとなり、環境や宿主系統を超えて紅海周辺の環境に幅広く分布するウイルス様配列の存在が示唆された(図 1)。

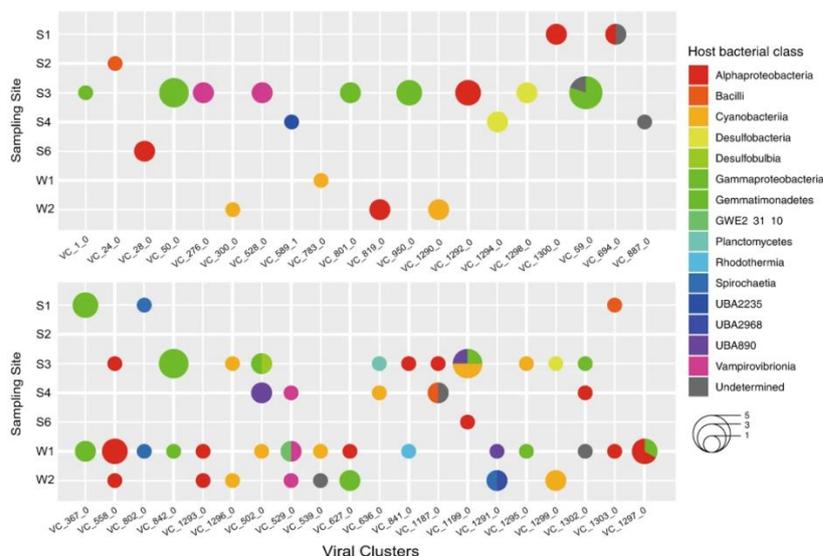


図 1 異なる環境や細菌系統に共通して検出されるウイルス様配列

177 のウイルス様配列を含む 40 個のウイルスクラスターの分布。上段は、1 種の環境において 1 種の細菌系統(クラスレベル)から検出された 20 個の VC を示している。下段左側の

19 個の VC は、複数の環境から検出された VC を示し、下段右側の 14 個の VC は、複数の細菌系統から検出された VC を示す(複数の環境かつ複数の細菌系統から検出された VC は 13 個)。(Nishikawa et al., *ISME Communications*, 2022)

### ③-2. 駿河湾海水を対象とした細菌・ウイルスの大規模ゲノム解析

本項目は、発展的課題の位置づけとして第二年度より検討を開始し、現在解析を進めている。河川水以外の環境サンプルへのウイルス 1 粒子解析の応用例として、駿河湾の複数地点・複数水深から取得された海水を対象としてゲノム解析を実施し、これまでに累計 4,600 個以上のウイルス配列を取得した。また駿河湾の海水からは、ACT-X とは異なるプロジェクトにおいて、これまでに細菌 1 細胞ゲノム情報の蓄積を行っており、累計 9,000 個を超える細菌ゲノム情報の獲得に至っている。そこで、細菌のゲノム情報に対し、本研究で獲得したウイルス配列を参照することにより、海洋環境において溶菌サイクル(宿主への感染と溶解を繰り返している状態)にあるウイルスの検出を試みている。これらの配列を詳細に解析することにより、ウイルス-宿主間の相互作用に関わる新たな知見の獲得を試みる。

### ④その他、特記事項

- ACT-X での研究をもとに、マリンバイオテクノロジー学会、日本分子生物学会のワークショップで招待講演を行った。また、研究成果の発信を積極的に実施し、ACT-X の研究期間内に学会発表を 14 件、書籍の執筆を 2 件(分担執筆)行った。
- 上記の学会発表を通じて新たな共同研究へとつながっており、現在複数件の共同研究を進めている。また、科研費等での予算獲得にもつながっている。
- ACT-X 研究領域内で研究者ネットワークを構築し、複数の研究者と共同研究に向けた取り組みを進めている。

## 3. 今後の展開

本 ACT-X での研究成果により、環境中の一本鎖および二本鎖 DNA ウイルスを対象とした、高精度かつハイスループットなゲノム解析手法が確立された。これにより、従来までのメタゲノム解析では取得が困難であった多様な系統のウイルスゲノムが獲得され、ウイルス間での遺伝子伝播などを詳細に明らかにすることができた。さらに現在、発展的課題として、水圏以外の環境からのウイルス配列の取得を進めるとともに、RNA ウイルスデータベースの拡充に向けた取り組みを開始している。

今後は上記の研究を通じ、環境中の未知ウイルスのゲノム情報を蓄積するとともに、有用ウイルスの機能をつールとして活用することによって、ウイルス機能を用いて細菌(あるいは様々な環境)の制御を可能とする技術の開発に展開したいと考えている。近年、ウイルスの製剤化を目指した様々な取り組みが行われている一方で、現行の技術では、宿主細菌がウイルスへの耐性を獲得することや、目的外の有害遺伝子が伝播するなどのリスクが報告されており、ウイルスのツールとしての実用化には課題が残されている。こうした課題を克服し、ウイルスの機能を効果的かつ安全に活用するためには、環境ウイルスゲノムのビッグデータが必要になると考えられる。そこで、多様な環境からウイルスゲノムを蓄積して比較解析を行うことにより、ウイルス宿主域の決定



機構や、宿主細菌に導入される遺伝子の機能を明らかにするとともに、新規ウイルスの機能を実環境下における細菌制御へと応用することを目指す。

#### 4. 自己評価

**【研究目的の達成状況】** 研究開始時に設定した研究スケジュールの全ての項目に対し、「予定通り」あるいは「予定を前倒し」して計画を進行させることができた。 COVID-19 の流行によって、特に研究期間前半においてサンプリングの機会が制限されることとなったが、モデルウイルスを用いた検証を進めるとともに、サンプリング1回あたりの配列情報の取得数を増やすことによって、十分量のデータを獲得することができた。これにより、当初の予定を上回る6,000 個以上の環境ウイルスのゲノム情報を取得することができた。また、発展的課題として新たに項目を追加して取り組みを始めており、一部の項目については期待した成果がすでに得られている。

**【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】** 研究データの収集・解析において、所属する研究室の学生2名(最終年度は1名)とともに研究を進めた。この内1名については、本研究によって取得された配列情報を活用し、ウイルス1粒子由来のゲノム情報に特化した、効率的なウイルス配列の解析手法の構築を独自に進めている。また、研究費の執行については概ね当初の予定通りに支出を行い、1 サンプルあたりに取得する配列情報のデータ量を最適化することにより、当初の予定を上回る数の配列情報の取得に繋がった。

**【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】** ウイルス1粒子のゲノム解析手法の開発により、水圏環境において当初の想定以上に多様な未知ウイルス叢が形成されていることが明らかとなった。本手法は、未知ウイルスのゲノム情報の拡充において有用であり、本研究で開発した手法が、今後の環境 DNA ウイルスのゲノム解析手法の主流となることを確信している。 また、本システムは水圏以外の環境についても適応が可能であることを確認しており、多様な環境に適応可能なシステムを開発することができた意義は大きいと考えている。さらに、細菌ゲノムからウイルス配列を検出することによって宿主域の広いウイルス配列の検出を可能とし、論文発表に至った。これら未知ウイルスの配列情報は、有用な機能遺伝子を含んでいると考えられ、今後の研究展開に向けた、事前検討を行うことができた。また、ウイルスのゲノム解析技術を応用した共同研究が複数件スタートしており、研究期間の終了後も、長期間にわたって研究の発展が期待できるネットワークを構築することができた。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Nishikawa, Y., Kogawa, M., Hosokawa, M. et al. Validation of the application of gel beads-based single-cell genome sequencing platform to soil and seawater. ISME COMMUN. 2, 92 (2022).

微小液滴作製技術を応用した1細胞ゲノム解析技術を新たに開発し、紅海およびその周辺の多様な環境から、合計734個の1細胞ゲノム情報を獲得した。1細胞ごとのゲノム情報比較により、海洋性 *Rhodobacter* 細菌の株レベルのゲノム多様性を明らかにした。また、細菌

ゲノムからウイルス配列を検出することによってウイルス-宿主細菌の紐付けを可能とし、多様な環境あるいは宿主系統に広く分布するウイルス配列の存在を明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- (著作物) 海の生物と環境をどう守るか, 第2部-3: 海洋遺伝資源の利活用の進展 (分担執筆), 2022 年 10 月 11 日
- (展示会発表) 環境細菌・ウイルスを対象とした 1 細胞・1 粒子レベルのゲノム解析技術の開発と応用, 第 4 回 ファーマラボ EXPO, 2022 年 7 月 13 日
- (学会発表) Microfluidic droplet-based single-cell genome sequencing reveals biological diversities of environmental microbiome in the surrounding area of the Red Sea, The 2020 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2020), 口頭発表, 2021 年 12 月 17 日
- (学会発表) Microfluidic droplet-based single-cell genomics in aquatic and marine environments for revealing microbial and phage diversity., 2021 AFOB virtual conference, 招待講演, 2021 年 11 月 3 日
- (学会発表) Single-cell Genomics of River Water Microbiomes for Revealing the Distribution of Mobile Genetic Elements, World Microbe Forum 2021, ポスター発表, 2021 年 6 月 21 日