

4. 近年の原生生物ウイルス研究がもたらした新しい知見 —分子生態学・分類学から分子進化学まで—

長崎 慶三, 外丸 裕司

独立行政法人 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所

海水 1ml の中には $10^5 \sim 10^8$ 個, また全海洋中には 10^{31} 個のウイルスが浮遊しているといわれている。その多くは海洋細菌や藍藻類などの原核生物を宿主とするファージ群であり, 次いで真核性微生物 (原生生物) を宿主とするさまざまなウイルスが優占していると考えられる。筆者らのグループでは, 海産真核性藻類を宿主とするウイルスの研究を継続しているが, その過程で出会った種々のウイルスは, これまでに知られているあらゆるウイルスと大きく異なっていることが明らかとなった。それらの生態・生理, ならびに遺伝学的性状を解析することで, これまでのウイルス学分野に登場してこなかった幾つもの新たな知見が蓄積されつつある。本稿では, 最近の原生生物ウイルス研究から発信された知見として, 赤潮原因藻と RNA ウイルス間の株特異的な感染性を支持するメカニズム, ガラスの殻を纏う珪藻類に感染する DNA ウイルスおよび RNA ウイルスの発見, ならびに原生生物ウイルス研究がもたらした新しい RNA ウイルス進化ストーリー仮説, の3項目についてその概要を紹介する。動物ウイルスや植物ウイルスに馴染み深い読者の皆様に, 一風変わったウイルスたちに関する読み物としてご笑覧いただければ幸いである。

1. はじめに

前回, 本誌に藻類ウイルスに関する解説を掲載したのが2005年のこと。そのときの原稿には「ラボで研究材料として扱われている真核藻類感染性ウイルスは15種」とある²⁰⁾。2009年現在, 無色の海産原生生物に感染するウイルスも含めると, ラボで扱える種類数は約40種⁷⁾。わずか3年余の期間に, 公平に見て相当量の努力が本分野に投入されたと言えるだろう。また, 同期間中の原生生物ウイルス研究の中からは, それまでに知られていなかった種々の新事実が見いだされてきた。スペースの関係上, ここで全てを網羅することは叶わない。本稿では, 分子生態学・分類学・分

子進化学といった観点から注目される, 原生生物ウイルスに関連した最新のトピックを紹介する。

2. 分子生態学的研究:

海産渦鞭毛藻と RNA ウイルスの関係

前報²⁰⁾では, 赤潮原因渦鞭毛藻ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ³⁾ (図 1A) (以下, ヘテロカプサと略記) と, 同種に感染するプラス鎖 RNA ウイルス HcRNAV¹⁵⁾ (図 1B) の関係を紹介した。その概要は以下の通りである。ヘテロカプサ赤潮の挙動に量的・質的な影響を与える HcRNAV は, 相補的な宿主範囲を持つ2グループに大きく群別される。HcRNAV のゲノム上には主要構造タンパク質をコードする遺伝子 (ORF2) が存在し, 相補的な宿主範囲を持つ2グループ間で, ORF2 中の4箇所の領域 (計29アミノ酸) に特徴的な違いがみられる⁸⁾。また *in silico* での立体構造推定の結果, 同領域がコードするアミノ酸のほとんどはウイルス表面側に露出している可能性が高い。

これらの結果に基づき, 筆者らは, ウイルス表面構造と宿主細胞表面との親和性が HcRNAV の株特異的な感染を決定しているという仮説を提示した⁸⁾。

連絡先

〒739-0452
広島県廿日市市丸石 2-17-5
TEL: 0829-55-3529
FAX: 0829-54-1216
E-mail: nagasaki@affrc.go.jp

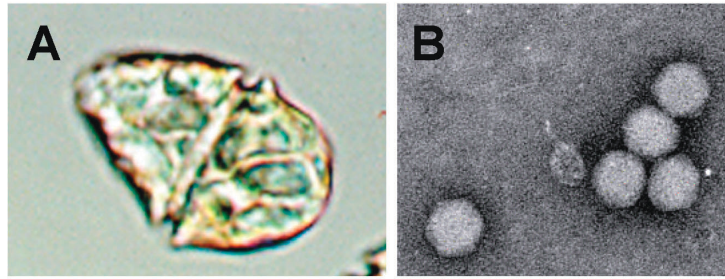


図1 (A) ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ細胞 (長径約 20 μm), (B) HcRNAV 陰性染色像 (直径約 30nm).

本仮説をさらに検証するため、以下のトランスフェクション実験⁵⁾を実施した。HcRNAV からウイルスゲノム RNA を抽出後、金粒子に付着させ、遺伝子銃を用いてヘテロカプサ細胞への導入 (打ち込み) を行った。打ち込み後に継続培養したヘテロカプサ細胞から RNA を抽出し、そこに HcRNAV 複製の証拠となるマイナス鎖が出現しているかどうかをノザンハイブリダイゼーション法により、ウイルス粒子の形成の有無を TEM 観察によりそれぞれ調べた。その結果、通常接種 (ウイルス懸濁液添加) で感染が起こる宿主株-ウイルス株の組合せで打ち込みを行った場合には、マイナス鎖の強いシグナルが検出され、さらにウイルス粒子の形成も確認された。一方、通常接種で感染 (マイナス鎖合成) が起きない宿主株-ウイルス株の組合せでも、ゲノム RNA の打ち込みを行った細胞では微弱ながらマイナス鎖合成が検出され、ウイルス粒子の形成がみられた。形成されたウイルス粒子は、予想通り、導入された RNA にコードされる感染特異性を呈した。

これらの結果から、少なくとも宿主細胞内のコンディションはウイルス感染への抵抗性を決定する直接的な要因ではなく、株間での感染の可否はウイルスの宿主細胞への侵入過程 (吸着~脱殻) で制御されているものと推察された。株の組み合わせによってウイルスの複製効率 (マイナス鎖シグナルの強さ) が異なる点については、3' 末端にあるステムループ構造の差異¹⁵⁾、それによる宿主因子とウイルスゲノムとの相性の好悪など、他の要因が影響している可能性が高い。今後、検証すべき課題である。

ごく最近の研究により、宿主側ならびに HcRNAV 側の感染特異性を巡る多様性は、筆者らの当初の予想を超えて高いことが明らかとなった⁶⁾。この多様性を決定するのにもまたウイルスゲノム上に書かれた遺伝情報であり、天然環境中には感染特異性という点で異なる多様な HcRNAV クローンが存在していることは間違いない。しかしながら研究者は、その中から往々にして「高感受性の宿主株」対「強毒性のウイルス株」の組合せを抽出し、長い期間、その「選ばれし」実験系に固執しがちである。これは研究者が、

意識的・無意識的に関わらず、ドラスティックな実験結果 (劇的な溶藻・完璧な抵抗性等の検出) を望む傾向にあるためだろう。しかしながら実際の環境中では、様々な組合せの宿主株対ウイルス株の対戦が展開しており、それぞれにおける感染効率は大きく異なるものの、トータルとして赤潮の動態や終息に対してウイルスが質的・量的な影響を与えているということを確認しておく必要がある¹⁴⁾。実験系で再現できるのは、あくまでもその中の一部の現象に過ぎない。

3. 分類学的研究：2つの珪藻感染性ウイルスグループ

珪藻は最も多様かつ豊富な海産植物プランクトンである。そのため、膨大な光エネルギーを他の生物に利用可能な化学エネルギーの形に変換することで、海洋の基礎生産に大きく貢献するとともに、大気圏中の酸素濃度を適正值 (約 21%) に維持する上でもきわめて重要な役割を果たしている微生物である。したがって、珪藻の動態に影響する要因の研究は、海洋生態学・水産学および地球科学的な視点からも必要不可欠であるといえる¹⁸⁾。しかしながら、珪藻に対するウイルスの影響についてはつい最近まで全く分かっていなかった。事実、20 世紀末の段階では、珪藻に感染するウイルスの存在自体が疑われる傾向さえあった¹⁹⁾。

こうした背景の下、筆者らのグループは、2002 年に珪藻リゾソレニア (*Rhizosolenia setigera*) を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルス RsetRNAV を単離することに成功した⁹⁾。これが世界で初めて単離された珪藻ウイルスである。その後、複数種のキートセロス (*Chaetoceros* 属) に感染するウイルスが次々に分離された^{1, 10, 13, 16, 17)}。筆者らのグループでは、これまでに 5 種類の珪藻感染性ウイルスの分離および基本性状を報告した。これらはいずれも粒径 40nm 以下の小型球形ウイルスで、1 本鎖 RNA (ssRNA) ウイルスおよび 1 本鎖 DNA (ssDNA) ウイルスの 2 グループに大別される (表 1)。

上記のうち ssRNA ウイルスのゲノムはいずれも 10kb 前後のプラス鎖であり、複製酵素群および構造タンパク質群

表 1 これまでに報告されている珪藻感染性ウイルス

ウイルス	宿主珪藻	平均粒径 (nm)	ゲノムタイプ	文献
RsetRNAV	<i>Rhizosolenia setigera</i>	32	ssRNA	9, 12)
CtenRNAV	<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	31	ssRNA	13)
CsfrRNAV	<i>Chaetoceros socialis</i> f. <i>radians</i>	22	ssRNA	17)
CsalDNAV	<i>Chaetoceros salsugineum</i>	38	ssDNA	10, 11)
CdebDNAV	<i>Chaetoceros debilis</i>	32	ssDNA	16)
CspNIV	<i>Chaetoceros</i> cf. <i>gracilis</i>	25	未報告	1)

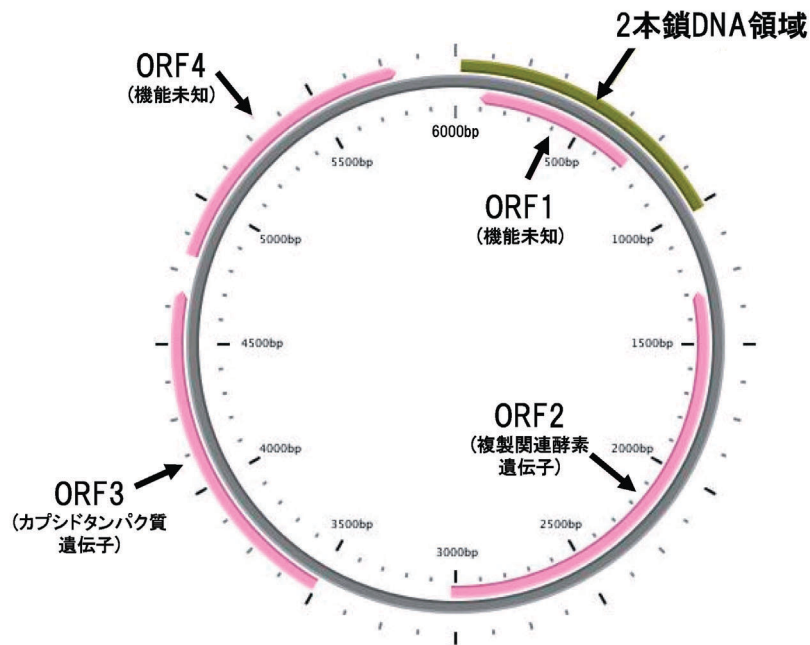


図 2 CsalDNAV のゲノム構造の模式図.

をそれぞれコードする 2 つのポリプロテイン遺伝子を持つ¹²⁾. RNA ウイルスの必須酵素である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) ドメインの系統学的比較の結果, 3 種類の RNA ウイルス(表 1)が 100% のブートストラップ値で支持される単系統性を示し, 既知のウイルスファミリーには属さない新奇なクラスターを形成した¹⁷⁾. この結果を受けて, 「珪藻に感染する ssRNA ウイルス」を新科 Bacillarnaviridae (珪藻 = Bacillariophyte, ゲノム = RNA) として ICTV に提唱しているところである.

ssDNA ウイルスとしては 2 種類が単離されている. このうちキートケロス・サルスギネウムを宿主とする CsalDNAV (CsNIV より改称)¹⁰⁾ のゲノムは, 共有結合的に閉じた環状 ssDNA (6000 nt) の一部が相補的な配列を

持つ直鎖 DNA (997 nt) と水素結合した 2 本鎖領域を形成しており (図 2), 従来のウイルス学の教科書に載っていない奇妙な構造を呈する. Taq ポリメラーゼ処理により直鎖側が伸張したことから, 同直鎖はゲノム複製の際のプライマーとして機能する可能性が高いが, なぜその長さが限定されているかは不明である. この新奇なゲノム構造は, 現在単離されつつある他のキートケロス属感染性ウイルスでもみられ, 水圏中にこうした奇妙な珪藻感染性 ssDNA ウイルスのグループが存在する可能性が高いと考えられる. CsalDNAV のゲノム上には 6 個の ORF の存在が確認されており, そのうちの 2 つは複製関連タンパク質およびカプシドタンパク質をそれぞれコードすると考えられている (図 2 ではメジャーな ORF 4 個のみを表示)¹¹⁾. 前者は, 環

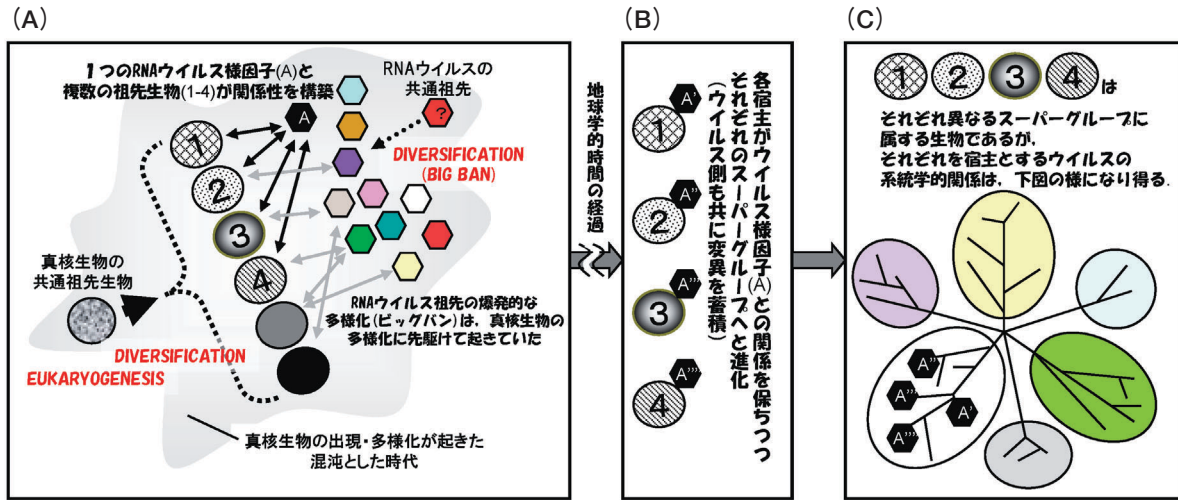


図3 「分類学的にかけ離れた宿主」に感染する各RNAウイルス同士を「今」の時点で比較した場合、異なるスーパーグループの生物群を宿主とするウイルスが同じクラスターに入ってくる。例えば、単系統群の中に動物ウイルス（ユニコンタウイルス）・植物ウイルス（プラントウイルス）・珪藻ウイルス（クロムアルベオラータウイルス）が共存する。図は、この事実を合理的に説明するためのピコルナウイルスの進化ストーリーに関する一仮説を示す。

状 ssDNA ゲノムを持つ鳥類感染性サーコウイルスと低いながらも相同性 (e-value = $\sim 10^{-4}$) を示すことから、環状ゲノムの複製に関与する酵素をコードしていると推察される。また後者は、既存のデータベースに含まれるあらゆるタンパク質と相同性を示さない新奇なカプシドタンパク質をコードしていることが分かった。このことから、CsalDNAV は、従来知られているウイルスとは大きく異なるグループに属する可能性が高い。同属のキートケロス・デビリスを宿主とする CdebDNAV のゲノムもまた ssDNA であるが、泳動度の異なる複数 (4 個?) の分子から構成されているという点で CsalDNAV のそれとは構造が異なっているようである¹⁶⁾。しかしながらその配列の一部には、CsalDNAV の複製タンパク質と高い相同性を示すタンパク質がコードされており、今後、両者の関係性が注目される。

このように、20 世紀末にはその存在さえ疑われていた珪藻ウイルスとして、海洋環境中には ssRNA および ssDNA という異なる 2 タイプのゲノムを持つグループが存在することが明らかとなった。今後さらなる研究努力を投入することにより、他のゲノムタイプを持つ珪藻ウイルス、あるいは淡水産珪藻を宿主とする珪藻ウイルスの発見などが期待される。

4. 分子進化的仮説：

ピコルナウイルスの進化を巡る新しい考え方

カナダ・ブリティッシュコロンビア大学の Keeling ら⁴⁾ は、真核生物がプラント、エクスカバータ、ユニコンタ、リザリア、クロムアルベオラータという 5 つのスーパー

グループから構成される星状系統図を提案した。これらのうち、前三者については 20 世紀中にそれらを宿主とする RNA ウイルスの存在が知られていた。21 世紀に入ると、ラフィド藻、珪藻、ラビリンチュラ、および渦鞭毛藻といったクロムアルベオラータに属する海産プランクトンを宿主とする RNA ウイルスが次々と単離され、そのゲノム情報が明らかとなった。こうした背景の下、Koonin ら²⁾ は、リザリアを除く 4 つのスーパーグループに属する生物をそれぞれ宿主とする RNA ウイルスの RdRp ドメインの系統学的比較を行った。その結果、RNA ウイルスが 6 つのクラスターに群別されること、さらに各クラスターには異なるスーパーグループに属する生物をそれぞれ宿主とするウイルスが混在して含まれることを示した。その系統樹の中で、例えば Southern bean mosaic virus は、クロムアルベオラータを宿主とする HcRNAV とは同じクラスターに含まれたが、同じ植物 RNA ウイルスである Tobacco etch virus とは全く異なるクラスターに含まれた。こうしたケースはごく普通にみられ、RdRp ドメインの系統解析に基づき単系統性が支持された 6 つのクラスターは、いずれも宿主生物の属するスーパーグループという観点からするとヘテロなウイルス群から構成されることが明らかとなった (図 3C)。このように宿主生物の系統関係と RNA ウイルスの系統関係とが一致しないという事実を鑑み、以下のような考察がなされた。

まだ真核生物が出現していない時代に、「全真核生物の共通祖先」と「RNA ウイルスの共通祖先」とが 1 対 1 で関係を構築し、それがその後の各スーパーグループへの分化の

道を辿っていったと仮定すれば、宿主とウイルスの共進化がそれぞれのスーパーグループの進化の過程で同時並行的に起こったはずである。その結果、現存する RNA ウイルスの系統樹は、それぞれのクラスターがある同じスーパーグループに属する生物を宿主とするウイルス群で構成されるような明解(?)な樹形になったはずである。しかし実際にはそのような系統樹は描かれない。おそらく、真核生物群の分化・多様化に先んじて、RNA ウイルスの進化ビッグバンが起こり、それらが真核生物の祖先たちと緩く複雑な関係性を築いたのであろう(図 3A)。そして、それぞれの宿主-RNA ウイルスの組合せが、様々な環境の中で共に進化し(図 3B)、それぞれのスーパーグループへと進化していった結果、ある一つのスーパーグループを宿主とするウイルス群が、系統学的に大きく異なる多種多様な RNA ウイルスから構成されるという現在の状況(図 3C)が作られたと考えられる。

このように、海産原生生物のウイルスを巡る研究は、ウイルス進化の歴史を巡る論争への新しい仮説の提示にも貢献することとなった。海のウイルスの研究が持つ可能性は計り知れない。

5. おわりに

今、世界では 20 を超えるグループが原生生物ウイルス研究に携わっている。各グループの興味は、ウイルス感染が地球規模での物質循環に及ぼす影響、ウイルスのゲノムインフォマティクス、進化系統学、メタゲノミクス、ウイルス分子に関する生化学、藻類ブルームとの関係など様々だ。筆者らの研究の焦点は、水圏におけるウイルスの生態学的役割や分子機能、赤潮終息との関係性などであるが、研究の進捗に伴いその興味の範囲は広がりつつある。深海ウイルス学の展開、古代ウイルスの復元試験、ウイルスベクターを用いた原生生物による物質生産系の構築など、夢は尽きない。いずれにせよ、自然水中にはまだまだ未知の、筆者らが想像もしていないような、奇妙で、魅力的な、そして興味深いウイルスが隠れているに違いない。あたりかまわず掘れば黄金の出る山の上で、手を休めるのは勿体ない。今後も、より大きな研究努力が本分野に注がれることを強く望む。

文 献

- 1) Bettarel Y, Kan J, Wang K, Williamson KE, Cooney S, Ribblett S, Chen F, Wommack KE, Coats DW: Isolation and preliminary characterisation of a small nuclear inclusion virus infecting the diatom *Chaetoceros* cf. *gracilis*. *Aquat Microb Ecol* 40: 103-114, 2005.
- 2) Koonin EV, Wolf YI, Nagasaki K, Dolja VV: The big bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nat Rev Microbiol* 6: 925-939, 2008.
- 3) Horiguchi T: *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycol Res* 43: 129-136, 1995.
- 4) Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW: The tree of eukaryotes. *TRENDS Ecol Evol* 20: 670-676, 2005.
- 5) Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K: Intraspecies host specificity of a single-stranded RNA virus infecting a marine photosynthetic protist is determined at the early steps of infection. *J Virol* 81: 1372-1378, 2007.
- 6) Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K: Diverse responses of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to infection by a single-stranded RNA virus. *Appl Environ Microbiol* 74: 3105-3111, 2008.
- 7) Nagasaki K: Dinoflagellates, diatoms and their viruses. *J Microbiol* 46: 235-243, 2008.
- 8) Nagasaki K, Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Nishida K, Tomaru Y: Comparison of genome sequences of single-stranded RNA viruses infecting the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl Environ Microbiol* 71: 8888-8894, 2005.
- 9) Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N, Shirai Y, Nishida K, Itakura S, Yamaguchi M: Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Appl Environ Microbiol* 70: 704-711, 2004.
- 10) Nagasaki K, Tomaru Y, Takao Y, Nishida K, Shirai Y, Suzuki H, Nagumo T: Previously unknown virus infects marine diatom. *Appl Environ Microbiol* 71: 3528-3535, 2005.
- 11) Park Y, Jung SE, Tomaru Y, Choi WB, Mizumoto H, Nagasaki K, Choi TJ: Characterization of the *Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus coat protein gene. *Virus Res* (in press).
- 12) Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Tomaru Y, Honda D, Nagasaki K.: Genomic and phylogenetic analysis of a single-stranded RNA virus infecting *Rhizosolenia setigera* (Stramenopiles: Bacillariophyceae). *J Mar Biol Ass UK* 86: 475-483, 2006.
- 13) Shirai Y, Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K: Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Appl Environ Microbiol* 74: 4022-4027, 2008.
- 14) Tomaru Y, Hata N, Masuda T, Tsuji M, Igata K, Masuda Y, Yamatogi T, Sakaguchi M, Nagasaki K: Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environ Microbiol* 9: 1376-1383, 2007.
- 15) Tomaru Y, Katanozaka N, Nishida K, Shirai Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K: Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat Microb Ecol* 34: 207-218, 2004.
- 16) Tomaru Y, Shirai Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K: Isolation and characterization of a novel single-

- stranded DNA virus infecting a cosmopolitan marine diatom *Chaetoceros debilis*. *Aquat Microb Ecol* 50: 103-112, 2008.
- 17) Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K: Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*. *Appl Environ Microbiol* 75: 2375-2381, 2009.
- 18) Werner D. Introduction with a note on taxonomy. pp. 1-23. In D. Werner [ed.] *The biology of diatoms*. Botanical monographs. Blackwell Scientific Publications, Victoria, Australia, 1977.
- 19) Zingone A: The role of viruses in the dynamics of phytoplankton blooms. *Giorn Bot Ital* 129: 415-423, 1995.
- 20) 長崎慶三: プランクトンに感染するウイルスに関する分子生態. *ウイルス* 55: 127-132, 2005.

Recent progress in protist virology – molecular ecology, taxonomy, molecular evolution

Keizo NAGASAKI, Yuji TOMARU

Natl. Res. Inst. Fish. Environ. Inland Sea, Fisheries Research Agency

At present, more than 40 protist-infecting viruses have been isolated and characterized. From the viewpoints of molecular ecology, taxonomy and molecular evolution, several new discoveries were made within the last five years. In this minireview, three topics of interest on protist-infecting viruses are introduced: 1) molecular ecological relationships between a bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its ssRNA virus (HcRNAV); 2) findings of new ssRNA- and ssDNA-virus groups infecting diatoms; 3) establishment of a hypothesis concerning the evolution of picornaviruses. The potential of aquatic virus studies is far-reaching and inestimable.