

研究終了報告書

「環境中の損傷ウイルスサルベージ技術の開発」

研究期間：2021年10月～2024年3月

研究者：高橋 迪子

1. 研究のねらい

近年、メタゲノム解析をはじめとする次世代シーケンス技術により、環境から多くのウイルス配列が見出され、公共データベースに蓄積されている。これにより、微生物生態系におけるウイルスの多様性や役割などが解き明かされつつある。しかしながら、環境からウイルスを感染性粒子として単離、培養された事例は極端に少ない。このことは、ウイルスの性状を解析するうえで障壁となっている。ウイルスの単離・培養が困難な理由のひとつに、ウイルスカプシド(外殻)が何らかの損傷を受けているため、宿主細胞に自身のゲノムを導入できず感染が成立しない可能性が、研究代表者のこれまでの研究経過から示唆された。すなわち、損傷したウイルス粒子を本来の宿主に接種しても、ウイルスの吸着機能が正常に作動せず細胞死が起きないため、スクリーニングの時点で検出されないというケースが想定された。

そこで、カプシドの損傷が原因で感染できないウイルスについては、損傷カプシドが本来担うはずであった機能(ウイルスの吸着・ゲノム導入)をサポートすることで、感染能を持つ成熟ウイルスとして再生できるのではないかと着想した。本研究では、環境中から抽出したウイルスゲノムを宿主候補細胞へ導入することで感染を誘導し、感染能をもったウイルス粒子として再生する基盤技術を開発することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

研究開始当初、渦鞭毛藻に感染する小型ウイルスを用いて、ウイルスサルベージ技術の条件検討を行ったが、感染成立には至らなかった。並行して、導入したいウイルス(*Heterocapsa circularisquama* RNA virus, HcRNAV)の全長配列を取得した。構築したウイルスゲノムは既存の登録配列よりも5'側に80塩基長かったことが判明し、登録配列では見逃されていた末端領域を特定できた。一方、細菌-バクテリオファージの関係性においては、上述の渦鞭毛藻ウイルスでのノウハウを活用し、感染誘導系の構築に成功した。さらに、ファージの感染誘導が成立する条件を検討する過程で、ファージの宿主への適応が重要であることが見出され、ファージの適応現象に伴う宿主-ファージ間のエピジェネティックな相互作用を明らかにした。以上のように、本研究ではゲノム導入によるウイルス感染誘導の基盤技術の確立に成功したといえる。

(2) 詳細

研究開始当初、渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama*(ヘテロカプサ)に感染する小型ウイルスを用いてウイルスサルベージ技術の条件検討を行った。遺伝子導入にはエレクトロポレーション(EP)を用いることとし、蛍光小分子(FITC 標識デキストラン)をヘテロカプサ細胞内に導入するための前処理・印加条件の最適化を行った。ここでは、細胞の生存率を維持しつつキユ

ベット電極間の抵抗値を適正範囲(0.08~0.15 kΩ)に調整する必要があった。そこで、浸透圧で細胞が死滅しない前処理法や印加条件の構築に取り組んだが、ウイルスゲノムの導入による感染成立には至らなかった。

並行して、導入したいウイルス(Heterocapsa circularisquama RNA virus, HcRNAV)の全長配列を取得した。HcRNAVは渦鞭毛藻に感染する唯一のRNAウイルスであり、約4 kbの一本鎖RNAをゲノムにもつ。本ウイルスの登録配列は2株と限られていたため、保有しているウイルス株の全長配列を決定した。シーケンスにはFLDS法(Fragmented and primer ligated double-stranded RNA sequencing)を用いた。本手法は2本鎖RNAを回収し、断片化した後シーケンスするものであり、RNAシーケンスと比較して末端配列の解析に強いというメリットがある。シーケンスの結果、4,457塩基のウイルス全長配列を決定することに成功し、その完全長は登録配列よりも5'末端側に80塩基長かった。これは、登録配列の末端配列決定に用いられたRACE(Rapid amplification of cDNA ends)法では本来の末端配列が見逃されていた可能性を示唆している。本成果は論文としてまとめ、Virus Gene誌に採択された(成果論文1)。

一方、藻類ウイルスとは異なる宿主-ウイルス系で、EPによるウイルスゲノム導入系を検討し、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)とそのバクテリオファージの関係性においてファージの感染誘導系の構築に成功した。併せて、その感染成立にかかわる複数の要件を見出した(未公開情報)。その要件の中でも、ファージによる宿主への「適応」が重要であることが判明した。

適応とは、感染価が低いファージ-宿主の組み合わせにおいて、再度同一宿主に感染させるとファージの感染能が向上する現象である。これまで、古典的な制限修飾系を保有する細菌は、侵入したファージDNAに対して確率的にメチル化修飾を施すため、宿主保有の制限酵素による切断を免れていると考えられていたが、実際にファージDNAが宿主からメチル化修飾を受けているのかは不明であった。本研究では、古くから想定されていた細菌-ファージ間のエピジェネティックな関係性を、多段階感染フローとエピゲノム解析を合わせることで明らかにした。本研究成果はプレプリントとして公開し、現在、査読段階にある(成果論文2)。

3. 今後の展開

研究代表者の長期目標はウイルスの振る舞いやそれを支持する戦略を理解し、バイオレメディエーションやセラピー等へ応用することである。ACT-Xではウイルスゲノムを宿主細胞に人為導入することで感染誘導することを目指し、その基盤技術の構築に成功した。このほか派生した研究成果として、ファージの適応現象に伴うエピジェネティックな変化を描出することができた。これにより、異なるメチル化モチーフを保有する適応ファージをカクテルにすることで、ファージの溶菌範囲を拡大できることが期待される。すなわち、単離例の限られているファージにバリエーションを持たせることで、その機能を向上(溶菌範囲を拡大)し得る技術としての展開が期待できる。ピロリ菌ファージセラピーの開発は、今後20年間の目標である。その達成のために、ファージ感染を受けた宿主ピロリ菌のトランスクリプトーム解析、ピロリ菌のファージ耐性化率の検証、培養細胞および動物モデルを用いた接種・投与試験を進めていきたい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

提案当初の研究対象であった渦鞭毛藻へのウイルス導入に関しては、導入対象であるウイルス全ゲノム配列を決定し論文化できたが、ウイルス導入系の確立までには至らなかった。この理由として、宿主細胞の EP 耐性が低いこと、ならびに形質転換効率が低いことが挙げられる。一方、バクテリオファージに関しては DNA の人為導入による感染誘導を実証することができた。ファージ DNA の EP 処理においては、研究当初から苦戦していたヘテロカプサへのウイルス導入系での処理条件やノウハウが生かされたと考えている。本研究に関連して、宿主保有の MTase が適応ファージの感染能に及ぼす影響についても検証し、宿主ーファージ間の相互作用の一端を明らかにすることができた。このように、研究構想時とは異なる材料にはなったものの、想定以上の成果を得られたと自負している。

研究の進め方

研究を進めていく中で計画通りに進まないことや、予想していなかった結果を得られたことが何度かあった。その際、サイトビジットや領域会議でアドバイザーの先生方からいただいた助言を受けて、研究方針を一部変更することとした(EP 以外の遺伝子導入法を試したこと、異なる宿主ーウイルス系での検討も進めたこと等)。

ACT-X は個人型研究ではあるが、対面で集う機会(領域会議、サイトビジット)において研究を進めるヒントを数多く得ることができた。また、個別の研究会やミニセミナー等で ACT-X 内外の研究者とのネットワークを構築できたことは、今後の研究者人生において貴重な財産になったと自負している。実際に、ACT-X 内の共同研究を複数立ち上げつつある。これらは新たな研究の萌芽として、今後も続けていきたい。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

プレプリントで公開した査読中論文(成果論文 2)は、宿主微生物ーバクテリオファージのエピゲノムを直接観測し、ファージ DNA のエピジェネティックな変化が感染能に及ぼす影響を定量的に評価した初めての報告である。微生物エピゲノム研究において、メチル化モチーフの探索はバクテリア、ウイルス(ファージ)それぞれに研究例があるが、両者のエピゲノムを直接比較し、修飾パターンの差異をファージ感染能と紐づけて議論した研究は他になく、マイルストーンとなり得る報告であると考えている。まだ社会実装に至る成果は得られていないが、本検証を進めることで新たなピロリ菌制御法の一つとして発展させたい。

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: 2件

1. **Michiko Takahashi**, Yuichi Masuda, Yuto Chiba, Syun-ichi Urayama, Keizo Nagasaki. DsRNA sequencing revealed a previously missed terminal sequence of a +ssRNA virus that infects dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Virus Genes*. vol. 60, pp. 97–99 (2024).

Heterocapsa circularisquama RNA virus (HcRNAV)は、渦鞭毛藻に感染する RNA ウイル

スとして唯一単離・培養がされた種であり、これまでに登録されている HcRNAV の全ゲノム配列は 2 株のみであった。本研究では HcRNAV のゲノム情報を拡充するため、環境単離株の全長配列を FLDS (Fragmented and primer ligated double-stranded RNA sequencing) 法により決定した。4,457 塩基のウイルス全長配列を決定することに成功し、その完全長は登録配列よりも 5' 末端側に 80 塩基長いことが判明した。これは、従来の末端配列決定手法 (5' Rapid amplification of cDNA end) では見逃されていた末端配列を、FLDS 法により得られた可能性を示唆している。本研究は、単離例に限られている渦鞭毛藻ウイルスの理解に資するものである。

2. **Michiko Takahashi**, Satoshi Hiraoka, Yuki Matsumoto, Rikako Shibagaki, Takako Ujihara, Hiromichi Maeda, Satoru Seo, Keizo Nagasaki, Hiroaki Takeuchi, Shigenobu Matsuzaki. Host-encoded DNA methyltransferases modify the epigenome and host tropism of invading phages. bioRxiv. 2024. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.05.05.592563>

多くの細菌は DNA をメチル化修飾する DNA メチルトランスフェラーゼ (MTase) を保有し、その一部は制限修飾 (RM) 系としてファージ防御機構に関与している。しかしながら、宿主およびファージゲノム上の DNA 修飾を直接比較した報告はほとんどなく、感染効率との関係も明らかになっていない。本研究では、ゲノムサイズに対して多くの RM 系を保有するピロリ菌とピロリ菌感染性バクテリオファージ KHP30 を用いて、宿主に適応したファージの感染価の推移とエピゲノムを明らかにした。多段階感染フローにより作出した適応ファージは、いずれも最後に感染した宿主に対してのみ高い感染価を示し、当該宿主とおおむね同一のメチル化修飾を獲得していた。本研究は、細菌-ファージ間のエピジェネティックな相互作用を明らかにした世界でも類を見ない研究であり、ファージセラピーで重要な溶菌範囲の拡大に資する知見をもたらした。

(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)

学会発表

1. **高橋迪子**, 平岡聡史, 柴垣里加子, 前田広道, 瀬尾智, 松崎茂展「ピロリ菌保有 DNA メチルトランスフェラーゼがバクテリオファージ KHP30 の感染能に及ぼす影響」日本微生物生態学会第 36 回浜松大会、浜松アクティシティ、2023 年 11 月
2. **高橋迪子**, 柴垣里加子, 前田広道, 瀬尾智, 松崎茂展「バクテリオファージ KHP30 の感染能に及ぼすピロリ菌の制限修飾系」第 37 回中国四国ウイルス研究会、岡山大学工学部キャンパス、2023 年 9 月
3. **Michiko Takahashi**, Kei Wada, Syun-ichi Urayama, Yuichi Masuda, Yuto Chiba, Yuji Tomaru, Keizo Nagasaki. Historical dynamics and molecular diversity of Heterocapsa circularisquama RNA virus. Aquatic Virus Workshop 11, Quebec City, Canada, May 23–27, 2023.

著作物

1. **高橋迪子**, 和田啓, 高野義人, 松野恭平, 増田雄一, 新井和乃, 村山雅史, 外丸裕司、

田中幸記、長崎慶三「海底泥コアは生物環境履歴を記した古文書 ～赤潮の歴史を探る～」pp.84-89 ,「4次元統合黒潮資源学」佐野有司・徳山英一監修, 中島出版, 2022 年