

海洋性超好熱菌とウイルスのゲノムレース

左子芳彦*

1. はじめに

海洋は地球表面積の約70%を占め、陸上とは異なる環境（特に温度、圧力、塩分、光等）が存在することから多様で特異な微生物が生息している。海洋微生物は生態・環境・進化・生物資源の面からも興味深い対象であるが、培養や試料採取の困難さのため土壌微生物に比べて研究の進展が遅れ、ウイルスでは研究者も限られていた。

ところが近年、海洋の主要な一次生産者であるラン藻の生態が地球規模で調査され、メタゲノム解析の進歩により培養を経ずに遺伝子解析が可能になったため、海洋微生物の地球環境に果たす役割がにわかに注目を集めるようになってきた^{1,2)}。また最近のゲノム解析から、これら海洋性ラン藻 *Synechococcus* 属に感染するウイルス（シアノファージ）の動態が徐々に明らかになり、海洋生態系における微生物とその感染ウイルスの重要な役割とともに微生物とウイルスがおりなす共進化やゲノムレースの一端が解明され始めている。このように最新のゲノム解析技術により、海洋における微生物とウイルスの研究に熱いスポットが当たり始めている。

水圏環境に極めて多量のウイルスが存在しているとの Bergh ら（1989）の報告³⁾以来、それらの生態学的意義がにわかに注目を集め、最近の環境ウイルス研究の発展の端緒となった。海洋をはじめとする環境で見出されたウイルスの大部分に尾部が存在することから、これらは細菌感染性ウイルスである³⁾。海洋に存在する

ウイルス数は細菌数の約15倍に達し、総数はおよそ 10^{30} 粒子と見積もられ^{4,5)}、海洋では1日に細菌の20-40%がウイルスによって溶菌していると推測されている⁴⁾。従ってウイルスは水圏生態系の微生物ループにおいて、宿主細菌へ感染し溶菌によって溶存有機物への分岐路を作る viral shunt として機能し、物質循環に多大な影響を及ぼしていることが知られるようになってきた^{4,5)}。

さらにメタゲノム解析により、微生物と感染ウイルスの詳細なゲノム科学的情報や生態学的知見が飛躍的に増大することによって、ウイルスは宿主微生物が有する遺伝子の運搬や伝播に重要な役割を有し⁶⁾、微生物の遺伝的多様性に顕著な役割を担うことが明らかになってきた（図1）。また細菌は多くのウイルス防御関連遺伝子を有しており、多様なウイルスとの相互作用が認められ始めている。メタゲノム解析により海洋において多様で未知の海洋微生物とウイルスの存在が推測されているが、熱水環境に

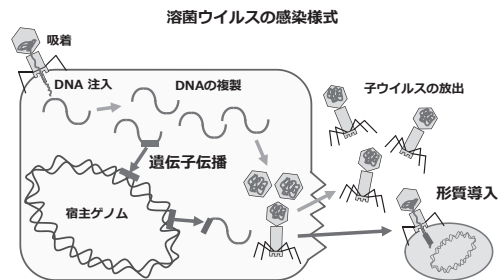


図1 微生物とウイルスのゲノム進化
ウイルスは遺伝子ベクターとして宿主細菌の遺伝的多様性に寄与する⁶⁾。

*京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻、海洋分子微生物学分野

第35回石橋雅義先生記念講演会（平成27年4月25日）講演

おける研究は始まったばかりである。本稿では、海洋熱水環境に生息する超好熱性の *Aeropyrum* 属古細菌と近年発見された多様なウイルスを例にして、超好熱菌ゲノム進化とウイルスの相互作用の一端について考察する。

2. 異なった海洋熱水環境に生息する超好熱菌

地球内部マントルの物質やエネルギーが地表にもたらされる海洋底プレートの形成域であるリフト系では、内部熱の60%以上が放出される。このようなプレート境界や海嶺より、東太平洋海膨(2,500m)、沖縄トラフ(1,200m)、小笠原水曜海山(1,300m)、大西洋中央海嶺(TAGマウント, 3,640m)等多様な海底熱水孔が近年発見され、地球化学や微生物学の分野から研究が進んでいる。その結果深海熱水噴出孔周辺には、高温かつ還元的で高濃度の H_2S 、 CH_4 、 H_2 や重金属を含有し周辺海水との混合により極めて多様な微環境が形成され、高密度で特異な生物群集から構成される生態系の存在が明らかになってきた。このような深海熱水孔には、独立栄養性の好熱性水素細菌が広く分布して深海熱水環境の一次生産を担っていることが明らかになり⁷⁾、各々の熱水環境により特徴的な嫌気性超好熱菌が主に生息していることが見出されている⁸⁾。

超好熱菌とは、至適増殖温度が80℃以上または90℃以上で増殖可能な微生物群と定義されており、これまで超好熱性古細菌としてメタン菌、硫酸還元菌、硫黄代謝菌と、真正細菌の *Thermotogales* 目、*Aquifex* 属が知られ、系統的にも生理的にも多様な微生物群である。超好熱菌の大部分が嫌気性であるが、一般にこれらの嫌気性菌は、独立栄養的または従属栄養的に増殖するかの違いはあっても、分子状 H_2 を電子供与体とした硫黄呼吸によりエネルギーを獲



| | <i>A. camini</i> | <i>A. pernix</i> |
|-----------|--|---|
| 分離源 | 水曜海山 深度 1385m 深海熱水孔 高圧・暗黒で還元的 | 子宝島 深度 2m 浅海熱水孔 太陽光が極き酸化的 |
| 至適増殖温度・pH | 85℃・pH 8 | 90℃・pH 7 |
| ゲノム配列 | Daijuku et al., Appl. Environ. Microbiol. 2013 (12) | Kawarabayashi et al. DNA Res. 1999 (11) |
| ゲノムサイズ | 1.6 Mb | 1.67 Mb |
| 電子顕微鏡像 |  1 μm |  0.2 μm |
| | Nakagawa S. et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004.(10) | Sako Y. et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. (9) |

図2 *Aeropyrum* 属超好熱古細菌2種 の分離地点と特性

得する代謝様式を有するものが多い。

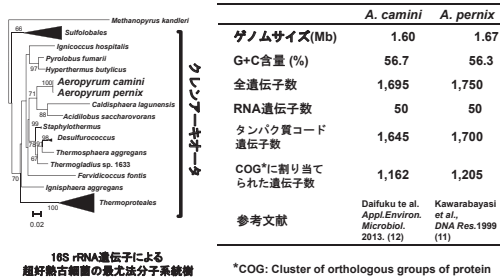
好気性超好熱古細菌として最も高温で増殖が可能な *Aeropyrum pernix* は、これまで好気性では不可能と考えられていた90℃以上で良好な増殖が可能な現在唯一の絶対好気性の特異な超好熱古細菌である⁹⁾。本種はトカラ列島子宝島の浅海熱水孔から分離され、その後も九州の長崎や鹿児島県沿岸熱水環境から分離されている。近年小笠原トラフ水曜海山の深海熱水孔のチムニー外壁から分離された *A. camini* は、同様な生理特性を有する好気性超好熱古細菌である¹⁰⁾。これらの種は現在日本近海の熱水孔以外では報告が無い特徴的な超好熱古細菌である(図2)。

3. 超好熱菌 *Aeropyrum* 属2種のゲノム比較

Aeropyrum 属は分子系統学的に極めて近縁な *A. camini* と *A. pernix* の2種からなる(表1左)。両種は、16S rDNAの配列では99%の相動性を示すが、DNA-DNAハイブリダイゼーションでは低い値を示し別種とされている¹⁰⁾。*A. camini* は深海熱水孔から、*A. pernix* は浅海熱水孔から分離され両種の生息環境は異なるが、その表現形質は相似している^{9,10)}。

A. pernix の全ゲノムは1999年に解読されているので¹¹⁾、深海熱水孔から分離された *A.*

表1 *Aeropyrum* 属のゲノムの性状



camini の全ゲノムを解析して、両種のゲノム比較を行ってその特性を調べた。

A. camini ゲノムの 8 kb ペアエンドライブラリーを作成し、次世代シーケンサー Genome Sequencer FLX を用いてシーケンスを行った。GS *De Novo* アセンブラーで、10 個のコンティグからなる総塩基数約 1.6 Mbp の単一スケファールドを構築した。コンティグ間をプライマーウォーキングによってシーケンスし、最終的に 1 つの環状ゲノムの解読に成功し、Microbial genome annotation pipeline を用いてゲノムの注釈づけを行った。*A. camini* のゲノムサイズは *A. pernix* と同様に小さく (1.60 Mbp)、GC 含量は 56.7% と高い値を示した。タンパク質をコードする遺伝子は 1645 個であり、これら基本性状は *A. pernix* と類似していた (表 1)。また、両者は共通祖先に由来し同じ機能を持つ遺伝子 (オルソログ遺伝子) を多く (88%) 共有していた¹²⁾。

生息環境が異なる両種において、オルソログ遺伝子の配置順 (シンテニー) はよく保存されており、大規模なゲノム再編は認められなかった (図 3)。この原因として、本属ゲノム上にゲノム再編の起点となる可動性遺伝因子 (挿入配列と Miniature Inverted Repeat Transposable Element) が少ないためと推測される。一方嫌気性超好熱古細菌である

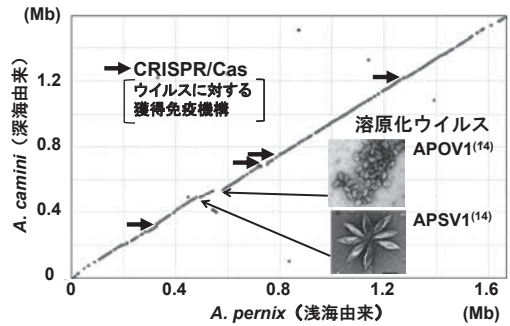


図 3 *A. pernix* と *A. camini* の全ゲノム配列の比較。両種のゲノムは相同遺伝子の配置順が保存され高度なシンテニーを示した¹²⁾。

Pyrococcus 属間ではゲノムシンテニーが低く、ゲノム進化や特性において対照的であった¹³⁾。

さらに、*Aeropyrum* 属に必要な遺伝子を残してゲノムを縮小させていたことから、本属祖先は酸化的な熱水環境に局所適応し、ゲノム再編に伴う転写制御の変化が許容されないと推察された。このように、好気性の *Aeropyrum* 属古細菌は熱水環境に適応したスペシャリストであると推察された。その一方で、シンテニー崩壊箇所が少数認められ、その主要な要因の一つは、古細菌で初めて発見された *A. pernix* の 2 つの溶原化ウイルス (APOV1 と APSV1) に由来した¹⁴⁾。また、ウイルスに対する獲得免疫機構 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) / Cas¹⁵⁾ システム (図 4) において顕著なシンテニー崩壊が認められた。*A. camini* と *A. pernix* の両種は 3 つの CRISPR/Cas を共有し、*A. camini* はそれに加えて 1 つの独自の CRISPR/Cas を有していた。さらに、CRISPR に含まれるスペーサー配列 (ウイルス感染履歴) の組成はまったく異なっていた。2 つの溶原化ウイルスを欠如した *A. camini* の CRISPR に由来する 59 個のスペーサー配列の内、3 つのスペーサー配列が APOV1 あるいは APSV1 のゲノム

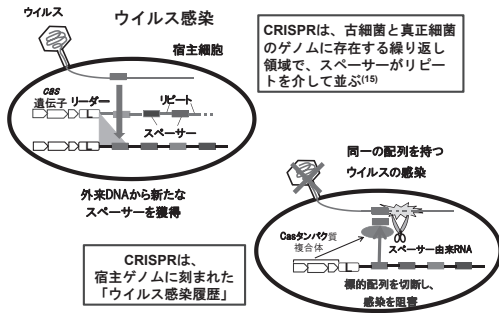


図4 獲得免疫機構 CRISPR/Cas¹⁵⁾
 CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

配列と相同性を示した。これは *A. camini* と *A. pernix* が、近縁であるが遺伝的に差異を有するウイルスとそれぞれの生息環境で相互作用したことを示している。さらに、両種はオルソログ遺伝子を多く共有していたが、各々の種はオルソログでない遺伝子も保有していたことから、その由来を解析した。その結果、オルソログでない遺伝子の内、ウイルスに由来する遺伝子が最も多かった。実際 *A. pernix* の生息環境や本種の培養株から新規ウイルスが分離されており^{16,17)}、本属が多様なウイルスと相互関係を有していると思われる。従って、好気性である *Aeropyrum* 属古細菌は熱水環境のスペシャリストとしてゲノムの大きな改編が許容されないが、ウイルスによりゲノム可塑性を示すことが示唆された。

4. 超好熱菌とウイルスのゲノム共進化

微生物はウイルスとの相互関係を通じて「共進化」すると考えられている¹⁸⁾。微生物はウイルスに対抗するために、CRISPRなどのウイルス防御システムを発達させスペーサーを獲得する。他方ウイルスは宿主が有する防御システムを克服するためにゲノムの塩基置換を引き起こし、ウイルス自身の遺伝子を変異させてきた

と推測される。最近の詳細なゲノム比較により、熱水環境に生息する *Aeropyrum* 属古細菌の祖先はゲノムを縮小化させ、変化しにくいゲノムを保有しているが、各々の生息環境に応じて隔離された宿主古細菌とウイルスの感染系が形成され、それらのゲノム進化が促される可能性が大きいと推測された。実際各地の海洋熱水環境から分離された本属種のゲノム解析の結果、地理的に隔離された個体群間で遺伝的な差異が生じていることが明らかになってきた(未発表)。一般に微生物は、地球上に広く分散可能で共通の遺伝子プールを共有すると考えられてきた。しかし高温環境に生息する超好熱菌では、地理的に隔離された個体群で遺伝的な差異が生じることが報告されている¹⁹⁾。

さらに、*Aeropyrum* 属古細菌のゲノム上にはウイルスに由来する遺伝子が見出された(図5)。従って宿主の新たな表現形質の獲得にウイルスが寄与している可能性が示唆される。これまでの研究は新規古細菌とウイルスの分離が中心であり、古細菌とウイルスの相互作用に関する詳細な生理学的実験やウイルスの増殖に関する分子メカニズムに関する知見は乏しい。今後はこれらの残された課題を明らかにすることにより、生命の有力な起源と考えられる熱水環境

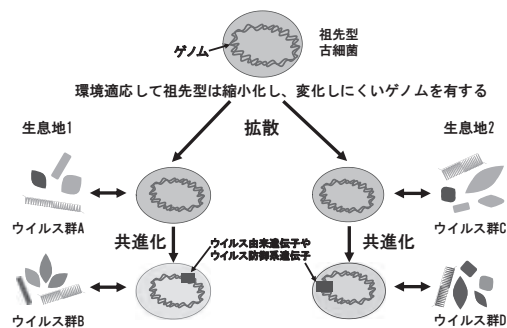


図5 スペシャリストである *Aeropyrum* 属超好熱古細菌とウイルスの共進化のモデル図。スペシャリストであってもウイルスと相互作用することでゲノムを多様化させている。

に生息する古細菌とそのウイルスの共進化過程を解き明かすことが期待される。

参考文献

- 1) Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goerickler, R., Waterbury, J. B., & Welschmeyer, N. A. A novel free-living Prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**, 34-343 (1988).
- 2) Johnson, Z. I., Zinser, E. R., Coe, A., McNulty, N. P., Woodward, E. M. S., & Chisholm, S. W. Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* **311**, 1737-1740 (2006).
- 3) Bergh, O. et al. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467-468 (1989).
- 4) Suttle, C.A. Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361 (2005).
- 5) Suttle, C.A. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 801-812 (2007).
- 6) Canchaya, M-L., & Brössow, H. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 417-424 (2003).
- 7) Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Chiba, H., Ishibashi, J., Kataoka, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., & Sako, Y. Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of seafloor phase separation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**, 141-155 (2005).
- 8) 左子芳彦 熱水に生きる海洋微生物 p.91-123 「生物資源から考える 21世紀の農学 第6巻 微生物機能の開発」(植田充美 編) 京都大学学術出版会 京都 (2008).
- 9) Sako, Y., N. Nomura, A. Uchida, Y. Ishida, H. Morii, Y. Koga, T. Hoaki & T. Maruyama. *Aeropyrum pernix* gen nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 1070-1077 (1996)
- 10) Nakagawa, S., Takai, K., Horikoshi, K., & Sako, Y. *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 329-335 (2004).
- 11) Kawarabayasi, Y., et al. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarohaenon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA. Res.* **6**, 83-101 (1999).
- 12) Daifuku, T., Yoshida, T., Kitamura, T., Kawaichi, S., Inoue, T., Nomura, K., Yoshida, Y., Kuno, S., & Sako, Y. Variation on the virus-related elements within syntenic genomes of the hyperthermophilic archaea *Aeropyrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5891-5898 (2013).
- 13) Zivanovic, Y., Lopez, P., Philippe, H., & Forterre, P. *Pyrococcus* genome comparison evidences chromosome shuffling-driven evolution. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1902-1910 (2002).
- 14) Mochizuki T., Sako, Y., & Prangishvili, D. Provirus induction in hyperthermophilic Archaea: characterization of *Aeropyrum pernix* spindle-shaped virus 1, APSV1, and

- Aeropyrum pernix* ovoid virus 1, APOV1. *J. Bacteriol.* **193**, 5412-5419 (2011).
- 15) Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712 (2007).
- 16) Mochizuki, T., Yoshida, T., Tanaka, R., Forterre, P., Sako, Y., & Prangishvili, D. Diversity of viruses of the hyperthermophilic archaeal genus *Aeropyrum* and isolation of the *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1, APBV1, the first representative of the family Clavaviridae. *Virology* **402**, 347-354 (2010).
- 17) Mochizuki T., Krupovic M., Pehau-
Arnaudet G., Sako Y., Forterre P., &
Prangishvili, D. An archaeal virus with
exceptional virion architecture and the
largest single-stranded DNA genome.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. **109**, 13386-13391
(2012).
- 18) Koonin, E. V. & Wolf, Y. I. Evolution of
microbes and viruses: a paradigm shift in
evolutionary biology? *Front. Cell. Infect.
Microbiol.* **2**, 119, doi:10.3389/fcimb.
2012.00119 (2012).
- 19) Renoa, M. L., Helda, N. L., Fieldsb, C. J.,
Patricia, V., Burkea, P. V., & Whitakera, R.
J. Biogeography of the *Sulfolobus*
islandicus pan-genome. *Proc. Natl. Acad.
Sci. USA.* **106**, 8605-8610 (2009).