

流入下水中の (+) 一本鎖 RNA ウイルスのメタゲノミック解析

東北大学大学院 学生会員 ○沼澤 聡
東北大学大学院 正会員 真砂佳史
東北大学大学院 フェロー会員 大村達夫

1. はじめに

ノロウイルスをはじめとした腸管系ウイルスは、感染者の糞便に大量に含まれており、これらのウイルスは糞便と共に下水に流入する。下水道は管路によるネットワークであり、下水処理区域の各所（病院、家庭、学校、オフィスなど）から下水が集められてくる。これは、処理区域に住む様々な感染者由来の様々なウイルスが下水中に集約されることを意味している。このため、下水中に存在するウイルスを網羅的に解析することで、都市のウイルス性感染症状況の把握が可能となると考えられる。

本研究では、次世代シーケンサーGS Junior を用いて、下水中の (+) 一本鎖 RNA ウイルス (+ssRNA virus) を網羅的に同定した。全ウイルスを対象とした場合、二本鎖 DNA ウイルスであるバクテリオファージの配列が多量に得られるため¹⁾、+ssRNA ウイルスのみを検出対象とした。一方下水中の+ssRNA ウイルスの濃度は低いことが知られているため²⁾、+ssRNA ウイルスゲノムの増幅が必要となる。本研究では、+ssRNA ウイルスを非特異的増幅手法についても評価をした。

2. 実験方法

2.1 ウイルスライブラリの非特異的増幅の評価

模擬ウイルスライブラリを作成した。増幅前後の各ウイルスの定量値を測定し増幅割合を求め、比較した。模擬ウイルスライブラリはポリオウイルス 1 型 Sabin 株 (Polio) 10^5 copy/ μ L、バクテリオファージ MS2 (MS2) 10^4 copy/ μ L、マウスノロウイルス S7-PP3 株 (MNV) 10^3 copy/ μ L の 3 種のウイルスを混合して作成した。逆転写反応および非特異的 RNA 増幅には SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) を用いた。RNA 増幅を行わない試料には iScript cDNA Synthesis Kit

(Bio-Rad) を用いて逆転写反応のみを行った。各ウイルスの定量は、一つのウイルスにつき 5'末端近傍領域と 3'末端近傍領域の二つの領域を TaqMan PCR 定量系 (6 定量系、本研究で作成) により定量した。増幅をしたものと増幅しないものの定量値から各ウイルスの 5'末端近傍領域と 3'末端近傍領域における増幅割合を求め、各ウイルス間の増幅割合および、各遺伝子領域間の増幅割合を比較した。

2.2. 下水中ウイルスのメタゲノム解析

2.2.1. 下水試料からのウイルス粒子回収

試料は、2012 年 12 月に宮城県内の下水処理場で採取した流入下水 (2 L) を用いた。試料を PBS で 10 L に希釈した後、30 分間攪拌機を用いて攪拌し、汚泥ブロックからウイルス粒子を分離、分散させた。この下水希釈溶液を孔径 1.2μ m のグラスファイバーフィルター (GE) を用いて吸引ろ過し、砂、有機物などの夾雑物を除去した。次に、孔径 0.2μ m のクロスフローフィルター (Sartorius) を用いてろ過し、細菌等のウイルス以外の微生物を除去した。さらに、分画分子量 100 kDa のクロスフローフィルター (Sartorius) を用いてろ過し、50mL 程度の残余液をウイルス溶液として回収した。次に、 $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し、ウイルス粒子をペレット化させ上清を破棄した。少量の PBS でペレットを再分散させ、ウイルス濃縮液とした。

2.2.2. ウイルス RNA の精製

ウイルス濃縮液に混入していると考えられる非ウイルス由来 RNA を分解除去するために、RNase ONE Ribonuclease (Promega) を用いて RNase 処理を行った。次に、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN) を用いて、ウイルス RNA を抽出した。次に、DNA ウイルス由来のゲノム DNA、非ウイルス由来の DNA を分解除去するために、RQ1 RNase-Free DNase (Promega) を用いて DNase 処理を行った。さらに、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を用いて、数十 μ L 程度にウイルス RNA 溶液を濃縮した。

2.2.3. RNA ウイルスの非特異的増幅とシーケンシング

SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) を用いて RNA ウイルスゲノムを非特異的に増幅し、RNA ウイルスメタゲノムライブラリを作成した。GS Junior を用いたシーケンシングは、Roche Applied Science より提供されたプロトコルを参考にして行った。

2.2.4. 遺伝子配列の同定

同一性検索 (BLASTn, DNA Data Base of Japan) を行い、得られた塩基配列に相同な遺伝子配列を検索した。条件として、e-Value 値が 10^{-5} よりもの小さく、かつスコア値が最も高いものを採用した。この条件を満たさない塩基配列は、データベース上に相同な遺伝子配列が存在しないものと判断し「Unknown」とした。

キーワード：下水，ウイルス，ノロウイルス，次世代シーケンシング，メタゲノム

連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL : 022-795-7483, E-mail : masago@water.civil.tohoku.ac.jp

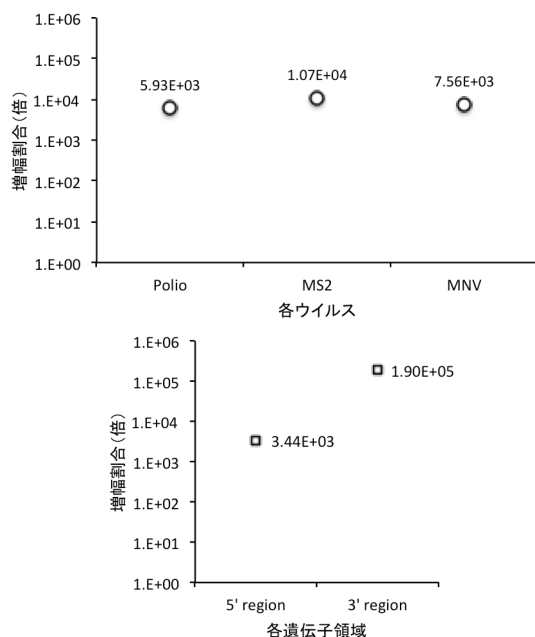


図1 増幅割合のウイルス間比較（上）
増幅割合の遺伝子領域間比較（下）

3. 結果及び考察

模擬ウイルスライブラリの非特異的増幅の評価を行ったところ、各ウイルス間の増幅割合が同等であることから、各ウイルスが均等に増幅されることがわかった（図1上）。一方で、各遺伝子領域間では、3'末端近傍領域が5'末端近傍領域に対して増幅されやすいことがわかった（図1下）。

GS Juniorにより得られた塩基配列は55,311リードであった。そのすべてに対して相同性検索（BLASTn, $e\text{-Value} < 10^{-5}$ ）を行った結果（図2A）、BLAST検索によって16,667リードが除外された。これはホモポリマー配列が多く含まれていたためである。Unknownとされた配列が31,662リードであり、全体の57.2%に当たる。これは、まだ認識されていない微生物が数多く存在していることを意味している。Knownとされた配列は6,892リード得られた。

Knownとされた配列を生物ドメインごとに分類した（図2B）ところ、ウイルスに分類された配列は1,777リード（16.9%）であった。真核生物由来の配列が大半をしめ、その多くはmRNA（5464リード）であった。本研究で用いたRNAウイルスの非特異的増幅手法は+ssRNAウイルスのポリA配列を起点にしている。mRNAもこのポリA配列を有しているために、RNAウイルスとともにmRNAも増幅されたと考えられる。

ウイルスとされた配列をその宿主ごとに分類したものを図2Cに示す。合計で28種類のウイルスが検出された。本研究の目的であるヒトに感染するウイルスの配列が276リード得られ、ノロウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスが主に検出された（表1）。ノロウイルスの中ではGII/4が最も多く（83リード）、次

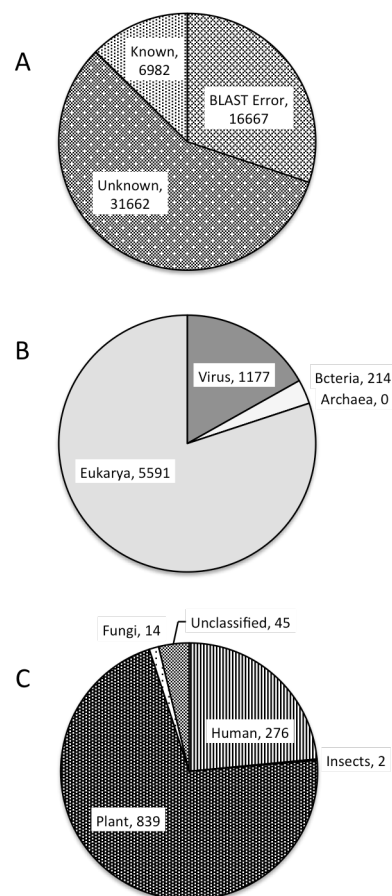


図2 BLASTによる同定結果

表1 同定されたヒトに感染するウイルス

Family	Genus	Species	No. of Reads
Caliciviridae	Norovirus		106
Picornaviridae	Kobuvirus	Aichi virus	103
Astroviridae	Mamastrovirus		61
Caliciviridae	Sapovirus		5
Picornaviridae	Cosavirus		1

いでGI/1（10リード）、GI/7（3リード）の順であった。また現在流行しているGII/4 2012 Sydney株の配列が37リード得られた。ヒト以外のウイルスでは、近年下水の汚染指標として提案されている³⁾Pepper mild mottle virus (PMMoV, Plant) が最も多く、日本でも指標として有用である可能性が示された。

謝辞

本研究は戦略的創造研究推進事業（CREST，科学技術振興機構）および科学研究費補助金（若手A，日本学術振興会）の補助を受けて行われた。

参考文献

1. Cantalupo *et al.*, 2011, *mBio*, 2(5): e00180-11.
2. Katayama *et al.*, 2008, *Wat. Res.*, 42(6-7): 1441-8.
3. Colson *et al.*, 2010, *PLoS ONE*, 5(4): e10041.