

奨励金No.1633

環境水からのニドウイルス目ウイルスの網羅的探索

中川 草
東海大学 准教授

Comprehensive detection of nidoviruses in environmental water

So Nakagawa
Tokai University, Associate Professor



本研究では、環境水サンプルを用いてニドウイルスを効率的かつ網羅的に同定する手法を開発し、新規のニドウイルスを特定、その進化と多様性の解明し、将来起こりうるニドウイルス感染症に対して資することを目標とする。本研究では、ニドウイルスの増殖に必要な RNA 依存性 RNA 合成酵素（RdRp）遺伝子を基に、PCR 用プライマーを設計し、多様な環境水試料からの高感度で網羅的な探索を進めている。本研究で開発するプライマー配列や PCR プロトコールは公開し、ニドウイルス探索に広く活用されることを目指す。

This study aims to develop an efficient and comprehensive method for identifying nidoviruses from environmental water samples, thereby discovering novel nidoviruses and elucidating their evolutionary history and diversity to better prepare for future nidovirus outbreaks. We designed PCR primers targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene, which is essential for nidovirus replication, and are conducting highly sensitive and comprehensive surveys of diverse environmental water samples. The primer sequences and PCR protocols developed in this study will be made publicly available to facilitate and promote global research on nidovirus discovery and surveillance.

1. 研究内容

本研究では、環境水中に存在するニドウイルス（Nidovirales）を効率的かつ網羅的に探索するため、RNA 依存性 RNA 合成酵素（RNA-dependent RNA polymerase; RdRp）遺伝子を標的とした PCR プライマーの開発と、その実験的検証を進めた。ニドウイルスには新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）をはじめとする多くの重要な病原ウイルスが含まれており、未知のニドウイルスの発見やその進化的多様性の解明は、将来の新興感染症への備えとして極めて重要であると考えられる。

ニドウイルスの RdRp について、ICTV から 122 配列、および LucaProt から ICTV と重複しない

133 配列、合計 255 配列を取得した。これらの配列をクエリーとして、NeoRdRp version 2 データセットに対して BLASTP 検索を繰り返し実施した。検索結果から得られたヒット領域を BED 形式に変換し、重複領域を統合した上で対応するアミノ酸配列を抽出し、新たなクエリーとして再度検索を行った。この反復探索を新規配列が得られなくなるまで実施し、最終的に 5,129 配列を同定した。得られた各配列について、RdRp-scan および PalmScan2 を用いて RdRp 領域を推定し、すべての配列で RdRp モチーフの存在を確認した。さらに、CD-HIT を用いて 60% のアミノ酸一致率でクラスタリングを行い、43 の主要クラスターを同定した。各クラスターの代表配列を用いて

IQtree bootstrap = 1000

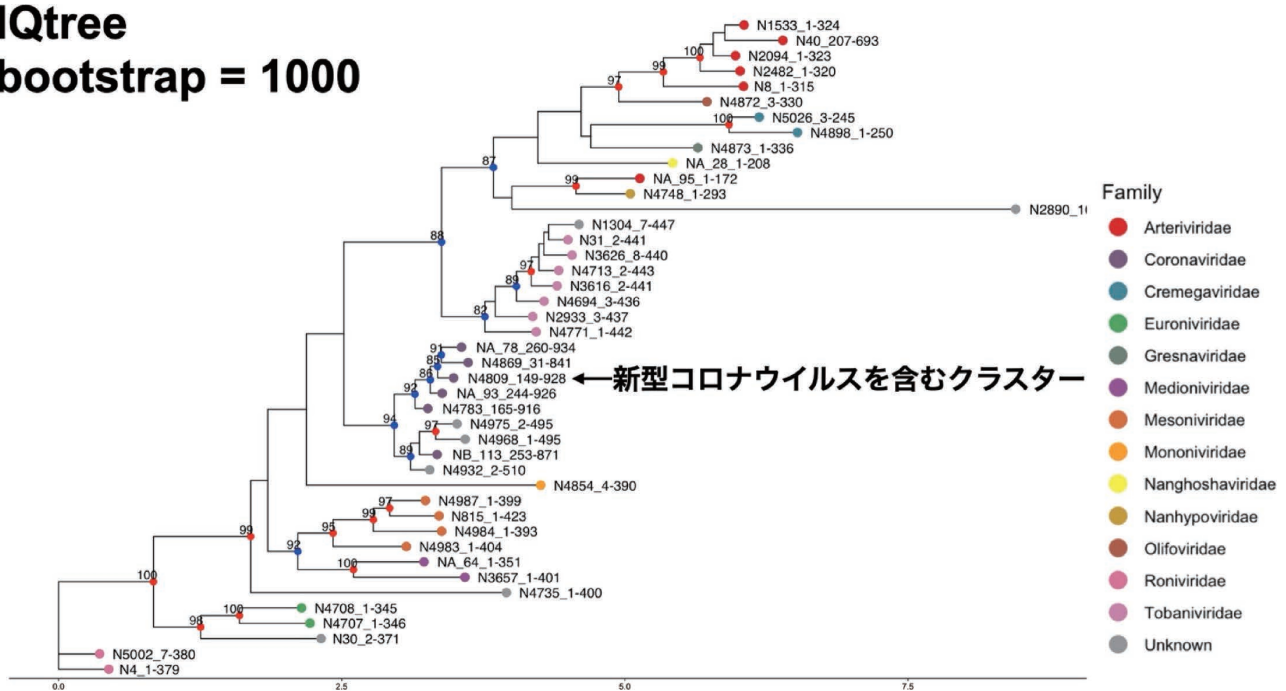


図 1. 5,384 配列のニドウイルス様 RdRp 配列を同定し、アミノ酸配列一致率 60%を閾値としてクラスタリングを行った。その結果得られた 43 の代表配列を用いて、IQ-TREE による最尤法に基づく分子系統樹を構築した。

MAFFT による多重アラインメントを作成し、AliView を用いてアラインメントの品質を確認した後、IQ-TREE2 による系統解析を実施した。作成した系統樹は ggtree を用いて可視化し、ニドウイルスの進化的関係を詳細に検討した（図 1）。

その後、新型コロナウイルスのクラスターに分類された RdP 配列について、更に 99%アミノ酸一致率でクラスタリングした結果、153 クラスターに分類された。これらの代表配列に基づいて系統樹を再構築し、新型コロナウイルスを含むベータコロナウイルス属全体、SARS-CoV-2 および MERS-CoV を含むクレード、Embecovirus クレード、さらに HCoV-229E および HCoV-NL63 を含むアルファコロナウイルス属を対象として、以下の手法でプライマー設計を行った。多重アラインメントから各塩基位置における保存度を算出し、20 塩基単位のスライディングウィンドウ解析によって保存度の高い領域を抽出した。その後、Primer3 を用いてプライマー候補を設計し、多重アラインメント情報を参照しながら必要に応じて

縮重塩基を導入した。最終的に、ベータコロナウイルスを対象とした B-1～B-5、およびアルファコロナウイルスを対象とした A-1、A-2 の計 7 系統のプライマーセットを設計した。また、縮重塩基を含む配列と代表配列を用いた配列の二種類を準備し、実験的な検証を行った。

PCR 実験では、新型コロナウイルス RNA を含むポジティブコントロールを用いて性能評価を実施した。共同研究者の松浦研究室において実施されたメソポーラスシリカ固定化 PCR 系では、当初すべてのプライマーで増幅が確認できなかった。一方、共同研究者の坂口研究室において SARS-CoV-2 感染細胞由来 RNA を用いて RT-PCR を実施した結果、B-2rep、B-3rep および B-4rep のプライマーセットで増幅が確認され、これらのプライマーが実際に機能する可能性が示された。また、メソポーラスシリカ固定化 KOD ポリメラーゼを用いた系でも、B-2rep で明瞭な増幅、B-3rep で弱い増幅が認められたことから、反応条件の最適化により感度向上が期待される。現在、共同研究

者の本多がサンプリングを行った環境水を QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を濃縮した 20 サンプルを活用し、PCR スクリーニングを開始するよていである。この中で、新型コロナウイルス特異的プライマーでは陰性であるものの、他のベータあるいはアルファコロナウイルス用プライマーで陽性となる試料の探索を進める予定である。また、家畜関連施設の排水など、コロナ様 RNA ウイルスの存在が期待される試料の利用も検討している。さらに、PCR で陽性となった試料についてはアンプリコンシークエンスを実施し、興味深い配列が得られた場合にはメタトランスクリプトーム解析へと発展させる計画である。本研究によって、環境中に存在する未知のニドウイルスの発見とその多様性の理解が進み、将来の新興感染症に対する監視・予測基盤の構築に大きく貢献することが期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

中川草、坂口翔一．RNA ウイルスハンティングの新時代 実験医学 43(13): 2093-2097. 2025.

Shoichi Sakaguchi, Takashi Kojima, So Nakagawa. Future updates on NeoRdRp for comprehensive RNA virus detection from metatranscriptome data. The 49th FEBS Congress. Istanbul, Turkey. 7/5-9, 2025.

中川草、Lihua Jin、Kirill Kryukov、齋藤乃威、小島嵩史、坂口翔一．大規模塩基配列情報を活用した微生物同定と進化解析．日本進化学会第 27 回大会 滋賀大会．長浜、滋賀．8/21, 2025.

坂口翔一、中川草．NeoRdRp を活用した大規模塩基配列から多様な RNA ウイルスハンティングの現状と展望．日本進化学会第 27 回大会 滋賀大会．長浜、滋賀．8/21, 2025.