

トピックス

1. 一億年にわたるボルナウイルス感染の歴史

堀江 真行^{1,2)}

1) 大阪公立大学大学院獣医学研究科

2) 大阪公立大学国際感染症研究センター

私たち生物のゲノムには内在性ウイルス様配列 (endogenous viral element: EVE) とよばれるウイルス由来の遺伝子配列が存在する。EVE の多くは数百万年以上前に宿主生物のゲノムへと組み込まれたことが知られており、太古のウイルスの「化石」として、存在年代・宿主生物・配列 (系統) を知る貴重な手がかりとなる。私たちは近年、RNA ウイルスであるボルナウイルス由来の EVE の大規模検索と網羅的な「古ウイルス学」的解析によって、約一億年にわたるボルナウイルス感染の歴史の一端を明らかにした。本稿では上記の研究を概説するとともに、得られた知見の中でも特に「古ウイルス学とウイルス学の接点」を詳説する。

1. 古ウイルス学とウイルスの分子化石

地球上には多様なウイルスが存在し、様々な生物に感染し続けている。太古の地球にも同様に様々な生物が存在したことが知られており、おそらく多様なウイルスも存在していたのであろう。その中には、現在も子孫ウイルスが繁栄しているものもあれば、その系統が絶滅してしまったようなものもあるだろう。このような太古のウイルスを探究することによって、長期のウイルスの進化や、宿主との共進化について詳しく知ることができる。この古代のウイルスに関する学問を古ウイルス学 (paleovirology) とよぶ¹⁾。

私たちは恐竜そのものを見たことがないが、太古の地球に恐竜が存在したであろうということを知っている。それはなぜだろうか。化石が存在するからである。生物はごく稀に体化石となって長期間保存されるからこそ、私たちは古生物の存在やその姿を知ることができる。それではウイルスについてはどうだろうか。残念ながらウイルスは体化石を残すことができないため、太古のウイルスを直接観察

することはできない。しかし、私たち生物のゲノムの中には太古の「ウイルスの化石」ともいえる、ウイルスに由来する遺伝子配列が存在する。このウイルスの化石を解析することによって、過去のウイルスについて知ることができる。

ウイルスゲノムあるいはウイルスゲノムの一部が宿主の生殖系列細胞ゲノムへと挿入され、その細胞から個体が発生すると、挿入されたウイルス由来の配列は宿主ゲノムの配列の一部となる。この過程をウイルスの内在化とよび、内在化したウイルス由来の配列を内在性ウイルス様配列 (Endogenous viral element: EVE) と呼ぶ。EVE は過去のウイルス感染の証拠であり、生物のゲノムに存在する「ウイルスの分子化石」といえよう。このウイルスの分子化石を詳細に解析することによって、過去のウイルスの宿主生物、存在年代、さらにはその塩基配列 (系統) を推定することができる (図 1)。

2. ボルナウイルス

ボルナウイルス (モノネガウイルス目ボルナウイルス科) は、多様な脊椎動物を宿主とする RNA ウイルスである。2019 年にボルナウイルス科には 2 つの新属が設立され、現在はオルソボルナウイルス属、カルボウイルス属、カルターウイルス属の 3 属が存在する²⁾。代表的なウイルスであるオルソボルナウイルス属のボルナ病ウイルス 1 は、ヒトを含むさまざまな哺乳動物に感染し、免疫介在性脳脊髄炎を引き起こす。近年はヒトの脳炎患者からボルナ病ウイルス 1 が検出されており、人獣共通感染症としても再注目を浴びつつある³⁾。

連絡先

〒598-8531

大阪府泉佐野市りんくう往来北1番地の58

大阪公立大学大学院獣医学研究科

TEL: 072-463-5694

FAX: 072-463-5694

E-mail: mhorie@omu.ac.jp

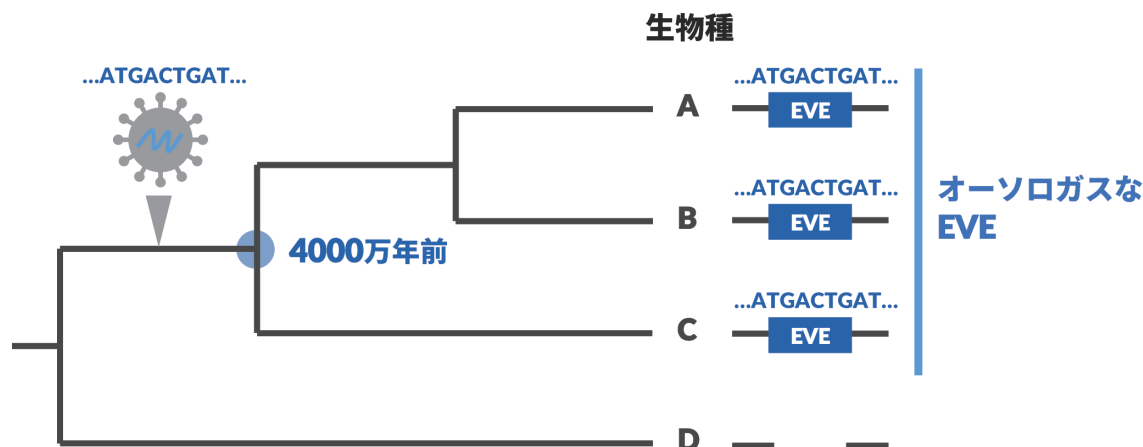


図1 内在性ウイルス様配列の解析からわかる太古のウイルスの年代、宿主、遺伝子配列。

図のような系統関係の生物種 A-D が存在すると仮定する。生物種 A-C がオーソロガスな（ここではゲノム上の同じ位置に挿入されていると考えられる配列をオーソロガスとした）EVE を持つとすると、その EVE の内在化は A-C の共通祖先において起こった、つまり宿主生物は A-C の共通祖先であったと考えられる。さらに、生物種 A-C の分岐年代が約 4000 万年であるとする、この内在化は 4000 年以上前に起こったと考えられる。また、現存する EVE の配列を利用した分子系統樹解析によって太古のウイルスの系統を推定することができる。

私たちは 2010 年にボルナウイルス由来の遺伝子配列が哺乳動物ゲノムに存在することを報告し、その配列を「内在性ボルナウイルス様 (Endogenous bornavirus-like: EBL) 配列」と名づけた⁴⁾。さらにその後の様々な報告により、哺乳動物のみならず、多様な脊椎動物のゲノムに EBL 配列が存在することが明らかとなり、太古のボルナウイルスが多様な脊椎動物に感染していたことを示す証拠が得られた^{4,7)}。一部の EBL 配列については詳細な古ウイルス学的解析が行われ、例えば、四千万年以上前に霊長類動物の祖先において複数回のボルナウイルスの内在化が起こったことが示されるなど、太古のボルナウイルスに関する知見も得られた^{4,8)}。

一方、EBL 配列を用いた古ウイルス学的解析が十分に行われたとは言い難い。これまでの EBL 配列に関する研究の大半は、内在化した配列の生物学的意義、すなわち動物における EBL 配列の機能解明のための研究が中心であった^{8,9)}。そのため、同定されている大半の EBL 配列についての古ウイルス学的な解析は十分に行われていなかった。さらに、過去の EBL 配列の大規模な探索は、オルソボルナウイルス由来の配列のみを用いた配列類似性検索によって行われていたため、他の系統、すなわちカルボウイルスおよびカルターウイルス属の EBL 配列は見逃されてきたのかもしれない。実際に 2018 年、カルボウイルス等の発見によって、いくつかの新規の EBL が同定された^{10,11)} が、カルボ/カルターウイルスの配列を用いた大規模検索は行われていない。太古のボルナウイルスについて深く知るためには、これらの EBL 配列も網羅的に解析

する必要がある。

本研究では、太古のボルナウイルス感染の歴史を明らかにするために、①3 属すべてのボルナウイルスの配列を用いた大規模 EBL 配列検索および、②同定した EBL 配列の網羅的なオーソログ関係の同定による太古のボルナウイルスの存在年代・宿主生物の同定、さらには③分子系統解析などを行った¹²⁾。

3. 網羅的な内在性ボルナウイルス様配列の検索

はじめに、EBL 配列の網羅的な検出を行った。現代のボルナウイルスの各遺伝子 (N, X, P, M, G, L) のアミノ酸配列をクエリーとした tBLASTn 解析により、969 種の真核生物ゲノムから EBL 配列の検出を行った。その結果、131 種の脊椎動物ゲノムから 1,465 遺伝子座の EBL 配列を検出した。これらのうち、870 遺伝子座の EBL 配列は、オルソボルナウイルスをクエリーとした検索では検出することができなかった。すなわち、本研究ではカルボウイルスとカルターウイルスの配列を用いることによって、オルソボルナウイルスの配列では検出できない EBL 配列を多数同定した。これは、分類上の属レベルでの新規ウイルスの配列を用いることによって、大量の新規 EVE を検出することができることを実証した貴重な例である。

4. 一億年にわたるボルナウイルス感染の歴史の解明

さらに、得られた EBL 配列の内在化年代の推定を行うため、各 EBL 配列のオーソログの同定を行った。本研究では大規模な配列データを取り扱うため、独自の手法によ

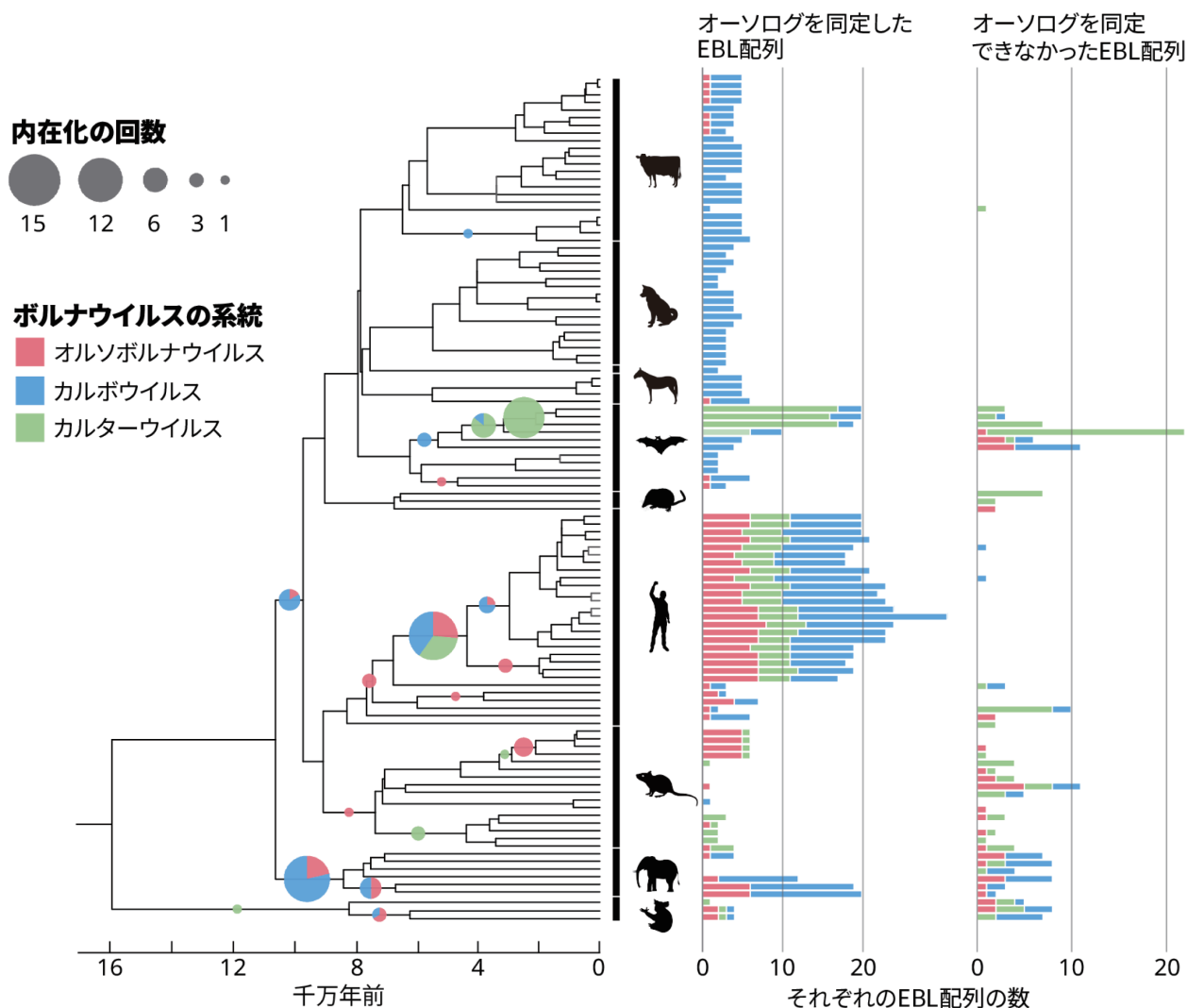


図2 哺乳動物におけるボルナウイルス感染の歴史.

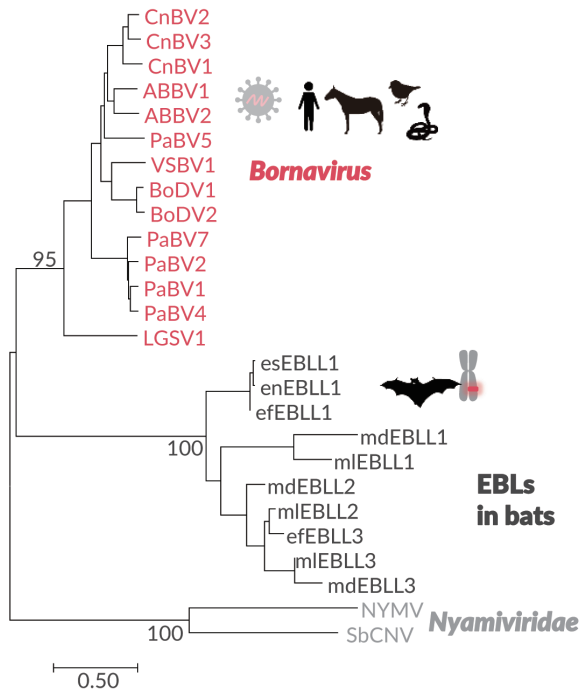
脊椎動物における EBL 配列のオーソロジーを網羅的に探索し、それをもとにボルナウイルスの内在化年代を推定した。本図では哺乳動物のみを示す。左側には哺乳動物の進化の系統樹（TimeTree より入手）と分岐年代およびボルナウイルスの内在化（系統樹の各枝の上の円グラフ）を示した。各系統の代表的な生物種をシルエットで表す。円グラフの大きさは内在化した回数を、色が内在化したウイルスの系統を示す。右側には各生物種のゲノムに存在するオーソログを同定した EBL 配列およびオーソログを同定できなかった EBL 配列をそれぞれ積み上げ棒グラフで示した。棒グラフの色は内在化したウイルスの系統を表す。図は当該論文において得られたデータを用いて再構成した。

りオーソログ関係を推定した。詳細な手法は論文を参考にしていた¹²⁾。これにより、脊椎動物における各 EBL 配列のオーソログ関係が明らかとなった。これによって、図2（本稿では哺乳動物の結果のみを示す）で示すような過去のボルナウイルス感染の歴史を追跡することが可能となり、現代のウイルスの研究のみからは得られない、下記のような様々な知見が得られた。

4.1. 最古のボルナウイルス感染の証拠

本研究において検出した最古の EBL 配列は、少なくとも 9600 万年以上前の内在化に由来すると考えられた。これらの EBL 配列はオルソボルナウイルスあるいはカルボウイルス由来であり、北方真獣類の動物間で保存されたオーソログ配列であった。つまり、オルソボルナ/カルボウイルスの系統のボルナウイルスは、少なくとも 9600 万年前には哺乳動物に感染していたと考えられる。

A 2016年に作成した系統樹



B 2018年に作成した系統樹

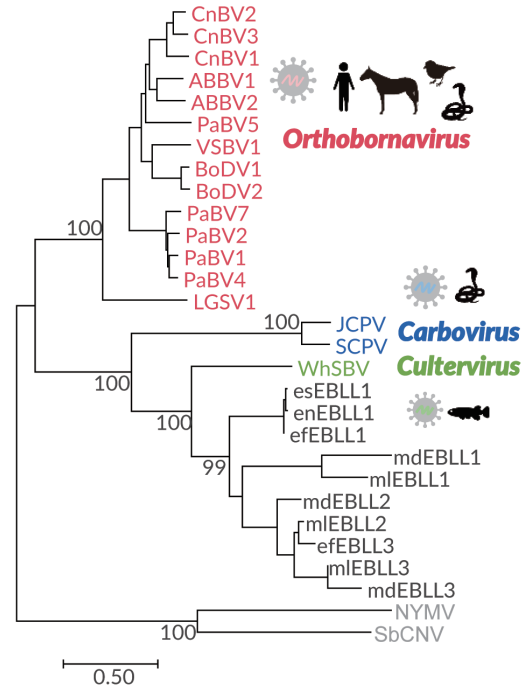


図3 EVEによる新規のウイルス系統の存在を推定することができる？

ボルナウイルスと *Eptesicus* および *Myotis* 属コウモリのゲノムに存在する EBL 配列の分子系統樹解析. *Nyamiviridae* 科のウイルスを外群（灰色）として用いた. A は著者らの 2016 の論文¹⁶⁾ の分子系統樹解析に用いた EBL（黒）と当時に知られていたボルナウイルスの配列を用いて推定した系統樹である. B は A にカルボウイルスとカルターウイルスの配列を加えて推定した系統樹である. オルソボルナウイルスを赤, カルボウイルスを青, カルターウイルスを緑で示している.

4.2. ボルナウイルスの宿主域

ボルナウイルスの宿主域は, 現代のボルナウイルスで知られている宿主域よりもはるかに広いことも分かった. 例えばカルボウイルスとカルターウイルスの既知の宿主として, それぞれヘビと魚のみが知られている^{10, 11)}. しかし, カルボウイルスおよびカルターウイルス由来の EBL 配列は哺乳動物にも多く存在することから, 過去にこれらの系統のウイルスが哺乳動物に感染していたことが明らかとなった. 特に霊長類動物やコウモリの祖先動物において, これらの系統のウイルスが長期にわたって繰り返し感染していたと考えられる. またオルソボルナウイルスについても, これまでに宿主として報告されていない系統の動物(例えばコウモリ)において感染が起こったことも明らかとなった.

4.3. 各系統の生物における内在化の数の違い

興味深いことに, 各生物の系統によって内在化の数が大きく異なっていた. 例えば霊長類の系統では様々な年代において各系統のウイルスが内在化していることがわかる.

一方, 翼手目(コウモリ)を除くローラシア獣上目の系統では, ほとんど内在化が起こっていない. この違いは何が原因であろうか. ボルナウイルス配列の内在化に関与する要因としては, ①宿主への感染性, ②生殖系列細胞への感染性, ③細胞傷害性や病原性, ④宿主細胞における逆転写酵素の発現量, ④宿主細胞における逆転写酵素とウイルスの相性, さらに⑥内在化後の自然選択圧などが考えられる^{8, 13)}. 現時点では, どのような要因が上記の違いを生み出したのかは定かではない. しかし, 例えば霊長類の系統では, ボルナウイルスの mRNA の逆転写と宿主ゲノムへの挿入にかかわる宿主細胞因子であるレトロトランスポゾン LINE-1 の活性が最も高かった時期に最も多くの EBL の内在化が見られており, LINE-1 の活性は EBL の数の違いを説明する一つの要因であるかもしれない¹⁴⁾. 今後, より詳細な解析が必要である.

5. 古ウイルス学とウイルス学の接点

上記の解析によって得られた知見は古ウイルス学のみならず, より一般的なウイルス学においても有用である. ここでは, ①ウイルス宿主域の推定と②ウイルス探索への応

用という二つの観点から、古ウイルス学とウイルス学の接点について紹介したい。

5-1. 宿主域の推定

上述の通り、太古のボルナウイルスが感染したであろう宿主動物（系統）を網羅的に同定することによって、ボルナウイルスの宿主域に関する新たな知見が得られた。現在、ウイルスメタゲノム解析によって次々と新しいウイルスが見つかるものの、私たちが知っているウイルスは、未だ地球全体のウイルスの氷山の一角にしか過ぎないといわれている¹⁵⁾。

またウイルスメタゲノム解析は極めて有用なウイルス探索法であるが、労力やコストの観点から、際限なくウイルスメタゲノム解析を続けることはできない。しかし、EVE から過去のウイルスの宿主を同定することによって、それぞれのウイルスの宿主域をより詳しく知ることができる。

上記の通り、既知のカルボウイルスとカルターウイルスは、それぞれヘビと魚からしか見つかっていないが、EBL 配列の解析によってこれらの系統のウイルスが過去にコウモリや霊長類に感染していたことが示された。また特にカルターウイルスの系統のウイルスが頻繁にコウモリに感染していたことが示されており、もしかしたら現在もこれらの系統のウイルスがコウモリやその他の哺乳動物に感染しているのかもしれない。今後、人獣共通感染症や家畜などの動物の新興感染症の観点からも、これらのウイルスを探索する必要がある。

5-2. ウイルス探索への応用

また、EVE から得られた知見はウイルス探索へと応用が可能である。まず、未発見のウイルス系統の存在を予測するのに有効であろう。例えば私たちは2016年に、*Eptesicus* 属コウモリのゲノムに存在する EBL 配列に関する論文を発表した¹⁶⁾。当時はオルソボルナウイルス属（正確には当時はボルナウイルス属であった）のみしか存在しなかったため、EBL とオルソボルナウイルスの配列を用いて分子系統樹を推定したところ、上記の EBL 配列はオルソボルナウイルスとは遺伝的に遠く、当時知られているボルナウイルスとはクラスターを形成しなかった。しかし、2018年にカルボウイルスとカルターウイルスが発見され、これらのウイルスを含めて系統樹を改めて作成したところ、上記の *Eptesicus* 属コウモリの EBL 配列がカルターウイルスとクラスターを形成することがわかった（図3）。これは EBL 配列の発見によって、未発見の系統のウイルスが現代にも存在するというを示した貴重な一例であろう。このように、EVE を用いた分子系統樹解析によって、現代の未発見のウイルス系統の予測も可能となる。ボルナウイルス以外の RNA ウイルスに由来する EVE も多く存

在する。例えば内在性フィロウイルス様配列も多く脊椎動物のゲノムに存在し、多くは既知のフィロウイルスとは異なる系統に属する^{5, 6, 17)}。今後、これらの内在性フィロウイルス様配列に比較的近縁なフィロウイルスが発見されるかもしれない。

また、EVE の配列情報はウイルスメタゲノム解析における配列類似検索のデータベースの配列としても有用かもしれない。ウイルスメタゲノム解析では、ハイスループットシーケンス解析によって得られた配列をクエリーとし、既知のウイルスからなるデータベースに対して配列類似性検索を行うことによって、ウイルス様配列を検出するという手法が主流である。この手法による検出感度は、既知のウイルスとの配列類似性に依存する。そのため、遺伝的に遠いウイルスは検出が難しい。そのため、ウイルスメタゲノム解析におけるデータベース配列として、既知のウイルスだけではなく EVE 配列を加えることによって、より高感度にウイルスが検出できるようになるのかもしれない。

6. EVE 研究の限界

本稿では、当該論文では詳細に書ききれなかった EVE 研究の限界においても記しておきたい。

6-1. 化石はスナップショットに過ぎない

はじめに、EVE は過去のウイルス感染の化石であるが、これは様々な生物の化石と同様に、あくまでも過去に起こったことのごく一部を切り取ったスナップショットに過ぎないということである。そのため、実際に起こった感染の中には反映されていないものも多いであろう。上記の「4-3」の項の通り、内在化し各生物種に固定されるには様々な要因が考えられる。そのため、現存する生物の EVE から得られたデータが、必ずしも当時のウイルス感染の状況をそのまま反映しているとは限らず、解釈には注意が必要である。

6-2. オーソログ同定の限界

オーソログの同定にも限界があり、オーソログ関係を推定することができなかった EBL も多く存在する（図2）。データベース上でゲノム配列を利用可能な生物種には偏りがあり、霊長類のように極めて多種の生物のゲノムが公開されている系統もあれば、真無盲腸目のように、遺伝的に遠く離れた3種のみしかゲノム配列が公開されていないような系統も存在する。この後者のケースでは、オーソログの同定が困難なことが多い。このようなオーソログを同定できなかった EVE については、比較的近年に内在化したものなのか、それともはるか昔に内在化したにもかかわらず近縁種のゲノムが存在しないために年代を推定すること

ができなかったのかはわからない。

私たちはこれまで、データベース検索においてオーソログを同定することのできなかった EBL 配列について、ゲノム DNA を用いた PCR とサンガーシークエンスによってオーソログを同定し、内在化年代を推定したこともある^{16, 18)}。現状、ゲノム配列が公開されていない系統の生物種の解析を行う場合はこのような古典的な手法が有用であろう。

現在、生物のゲノムの解読を目指した種々プロジェクトが進行している。おそらく今後、生物のゲノムは爆発的な速度で公開されていくだろう。それによってより精度の高い内在化年代の推定が可能となることを期待する。

6.3. EVE の検出限界

EVE の検出には技術的な限界がある。EVE の検出には、既知のウイルスの配列をクエリーとし、生物ゲノムを対象とした配列類似性検索が用いられる。そのため、既知のウイルスと EVE の間に有意な配列類似性が見られない場合には、たとえ EVE が存在したとしても検出することができない。

本研究において同定した最古の EBL は約一億年前に内在化した EBL 配列であった。実際はこれよりも古い時代に挿入された配列も存在するかもしれない。しかし、あまりにも古い EBL 配列については現存するウイルスとの配列類似性が低く、既存の配列類似性検索法では検出することができないであろう。

また、進化速度のはいウイルス遺伝子や配列の短い遺伝子についても、EVE を検出することは難しい⁸⁾。実際に、進化速度が最も速く、短い遺伝子であるボルナウイルスの X/P 遺伝子に由来する EBL 配列はほとんど検出されていない。また、内在化後の変異の蓄積によってフレームシフトが起こる場合も検出感度が落ちるため、検出が難しくなる。私たちはオルソボルナウイルスのリードスルー転写産物が、「高度に保存された N 遺伝子」と「進化速度がはやい短い遺伝子である X/P 遺伝子」をコードしていることに着目し、検出法を工夫することによって、従来の検索法のみでは検出できなかった X/P 遺伝子由来の EBL 配列を検出できることを明らかにした¹⁹⁾。今後は単純な配列類似性検索のみではなく、検出における種々の工夫や、より EVE の検出に適した検索プログラムの開発が必要であろう。

7. おわりに

本研究において、約一億年にわたる脊椎動物におけるボ

ルナウイルス感染の歴史の一端を明らかにすることができた。本稿では紹介することはできなかったものの、当該論文では、太古のボルナウイルスに関する分子系統学的知見を明らかにするとともに、生物地理学的情報を統合することによって、宿主と長期間共存したウイルスが、宿主生物の移動に伴って大陸間を移動し、他の生物へと伝播したことを示唆するデータも得られている。本稿では「ウイルスの化石」を徹底的に解析することによって、現代のウイルスからは得られない古ウイルス学的な知見のみならず、一般的なウイルス学やさらには他の研究分野にわたる貴重な知見が得られた。という一例を紹介した。近年、生物のゲノム配列が驚くべき速度で次々と解読されている。それに伴い古ウイルス学もますます発展していくであろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご協力いただいた川崎純菜博士（現所属：早稲田大学）小嶋将平博士（現所属：理研 IMS）をはじめとした、京都大学医生物学研究所の朝長先生および研究室の皆さまに深謝いたします。

利益相反の開示

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Patel, M.R., M. Emerman, and H.S. Malik, *Paleovirology - ghosts and gifts of viruses past*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(4): p. 304-9.
- 2) Rubbenstroth, D., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Bornaviridae*. J Gen Virol, 2021. **102**(7).
- 3) Rubbenstroth, D., et al., *Human bornavirus research: Back on track!* PLoS Pathog, 2019. **15**(8): p. e1007873.
- 4) Horie, M., et al., *Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes*. Nature, 2010. **463** (7277): p. 84-7.
- 5) Belyi, V.A., A.J. Levine, and A.M. Skalka, *Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001030.
- 6) Katzourakis, A. and R.J. Gifford, *Endogenous viral elements in animal genomes*. PLoS Genet, 2010. **6**(11): p. e1001191.
- 7) Horie, M., et al., *Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1626): p. 20120499.
- 8) Horie, M. and K. Tomonaga, *Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses*. Virus Res, 2019. **262**: p. 2-9.
- 9) Horie, M., *The biological significance of bornavirus-derived genes in mammals*. Curr Opin Virol, 2017. **25**: p. 1-6.

- 10) Hyndman, T.H., et al., *Divergent bornaviruses from Australian carpet pythons with neurological disease date the origin of extant Bornaviridae prior to the end-Cretaceous extinction*. PLoS Pathog, 2018. **14**(2): p. e1006881.
- 11) Shi, M., et al., *The evolutionary history of vertebrate RNA viruses*. Nature, 2018. **556**(7700): p. 197-202.
- 12) Kawasaki, J., et al., *100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(20).
- 13) Horie, M., *Interactions among eukaryotes, retrotransposons and riboviruses: endogenous riboviral elements in eukaryotic genomes*. Genes Genet Syst, 2020. **94**(6): p. 253-267.
- 14) Horie, M. and K. Tomonaga, *Non-retroviral fossils in vertebrate genomes*. Viruses, 2011. **3**(10): p. 1836-48.
- 15) Shi, M., Y.Z. Zhang, and E.C. Holmes, *Meta-transcriptomics and the evolutionary biology of RNA viruses*. Virus Res, 2018. **243**: p. 83-90.
- 16) Horie, M., et al., *An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative-strand RNA virus*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25873.
- 17) Taylor, D.J., R.W. Leach, and J. Bruenn, *Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 193.
- 18) Mukai, Y., M. Horie, and K. Tomonaga, *Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats*. J Vet Med Sci, 2018. **80**(8): p. 1356-1363.
- 19) Garcia, B.C.B., et al., *Unraveling the hidden diversity of endogenous bornavirus-like elements derived from ancient orthobornaviral X and P genes in mammalian genomes*. bioRxiv, 2022.

