

令和元年6月20日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07833

研究課題名(和文) カレニア・ミキモトイ殺藻性ウイルスKmVによる赤潮衰退への影響評価

研究課題名(英文) Influence of new algal viruses infectious on harmful bloom-forming microalga dinoflagellate *Karenia mikimotoi*

研究代表者

中山 奈津子 (Nakayama, Natsuko)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：20612675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：有害藻類カレニア・ミキモトイによる赤潮の被害は甚大であり、申請者は、同種を特異的に殺滅するウイルス(KmV)を、世界に先駆けて分離することに成功した。そのため、カレニア赤潮の衰退に及ぼすKmVの影響や生態学的意義に関する知見を蓄積し、赤潮防除技術の開発に向けた基盤作りを目的とした。本課題では、2種のKmVについて、形態的特徴やKmV感染時の宿主の増殖特性を明らかにした。また、画像解析技術を改変し、ウイルス感染時のホストの核の形態変化を捉えることに成功した。それらの結果から、自然環境中には、カレニアに感染するウイルスは複数存在することが推察され、赤潮の期間に影響を与えている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤潮防除法技術開発の中で、ウイルスとプランクトンに関する知見が乏しいため、防除法の現場適用に関する研究は進んでこなかった。しかしながら、新奇にカレニアウイルスが分離されたことより防除法開発への期待が高まり、ウイルスとカレニアに関する知見の収集が求められている。それと共に、これらのウイルスの特性や宿主への影響を解明することは生物生態学的に非常に意義がある。また、赤潮衰退期における宿主とウイルスの相互作用・感染機構解明の基盤的知見を収集できれば、目標とするウイルスを用いた赤潮防除に向けて、極めて重要な知見と成り得る。本研究は、学術的な知見を実学的成果に結びつけることのできる点が特徴である。

研究成果の概要(英文)：At least two viruses infecting the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* have been isolated from the coastal waters of Japan. KmDNAV5 was the first isolated from the Ago Bay in July 2013. The second one identified came from Uwajima Bay in July 2014. Recently, the virus is expected to be a promising tool for the prevention of the occurrence of some harmful microalgae. As the KmVs were isolated from the sea water in the end of bloom, the virus infection has been considered to have a significant impact on the host's bloom dynamics. As our goal in this study, we will characterize two viruses and reveal the effect of the viruses on their host growing. Furthermore, we try to develop the qPCR for KmV after obtaining their sequences. We will estimate the effects of the viruses on *K. mikimotoi* blooming and its potential as a preventative tool in the natural environment.

研究分野：藻類ウイルス生態学

キーワード：カレニア・ミキモトイ KmV

1. 研究開始当初の背景

【*Karenia mikimotoi* とその消滅要因解明の重要性】

有害藻類 *Karenia mikimotoi* (以下、カレニア) の大増殖によって起こる赤潮は、発生頻度の増加や分布域の拡大により、日本の水産業へ甚大な被害を及ぼしている。そのため、赤潮発生機構の解明や予察技術の開発とともに、赤潮衰退期の予測や赤潮防除技術の開発は喫緊の課題である。そのためには、カレニア個体群の発生から衰退までの動態について、物理、化学、生物的要因による影響を把握する必要があるが、未だ要因の特定には至っていない。特に、生物的要因については、捕食生物や競合種等との相互作用や生物自身の生理などさまざまな影響を受けやすいため、原因を特定することが難しい。最近の調査で、カレニアによる赤潮は長期化した後、急激に消滅する現象が見られた。これには、水温や光強度、栄養塩等、物理・化学的要因の影響に加え、生物的要因の重要性が指摘された。さらに、申請者は、最近、カレニア赤潮の衰退期の海水からウイルスを発見したことから、カレニア赤潮の衰退にウイルスが関わっていると考えている。「赤潮の衰退時期」は、極めて要望の高い情報であり、「衰退のメカニズム」に関する知見は、赤潮の終息を人為的に促進させる重要なツールになると期待が高まっている。

【赤潮ウイルスに関する研究の現状と課題】

海水 1ml 中には、約 1 億個ものウイルスが存在し、その生態学的意義や重要性が示唆されている(文献 1, 2)。赤潮藻類に感染するウイルスに関しては、ヘテロカプサ・サーキュラリスキーマやヘテロシグマ・アカシオの赤潮時に、それらウイルスの特異的増加が見られることから、赤潮衰退へのウイルスの関与が示唆されてきた。(文献 3, 4)。しかしながら、ウイルス感染が赤潮の衰退に「どのように」、「どの程度」関与するかなど、メカニズムの解明には至っておらず、これらを克服するには、ウイルスの赤潮藻類への感染過程をさまざまな条件下で詳細に把握する必要がある。新奇カレニアウイルスを利用する防除技術の開発に関心が高まる中、その基盤となるウイルスのカレニア個体群へ及ぼす影響の詳細や生態学的役割の解明が求められている。

2. 研究の目的

有害藻類カレニア・ミキモトイ (*Karenia mikimotoi*) による赤潮は、規模や分布域を拡大し、日本の水産業に深刻な被害を及ぼしている。そのような中、申請者は、最近、カレニアを特異的に殺滅するウイルスを、赤潮衰退期の海水から世界に先駆けて分離・培養することに成功した。これは、カレニア赤潮の衰退にウイルスが関わっている可能性を示す重要な発見であった。ウイルスは、標的生物のみを殺滅し、爆発的に増えるので、大増殖する赤潮生物を連鎖的に死滅させることが可能であり、赤潮防除技術への利用が大いに期待できる。本課題では、KmV の性質、殺藻力や殺藻範囲、ウイルス感染が与えるカレニア増殖速度への影響などの知見を蓄積する。また、KmV の性状解析や遺伝情報の収集、定量 PCR など KmV の高精度モニタリング技術の開発を目指す。これより、カレニア赤潮の衰退に及ぼすウイルスの影響や生態学的意義を明らかにし、赤潮防除技術の開発に向けた基盤作りを目的とする。

3. 研究の方法

有害藻類カレニア・ミキモトイによる赤潮の衰退や防除技術の開発に向けて、ウイルスの影響を評価するために、本課題では、以下の 3 点を実施した。1)カレニアウイルス KmDNAV5 の形態学的特徴および同ウイルス感染時の宿主増殖特性、2)カレニアウイルス KmDNAV3 の形態学的特徴および遺伝情報の蓄積、同ウイルス感染時の宿主増殖特性、3) KmDNAV3 感染時の宿主の核形態の変化を捉えるイメージング解析に向けた画像収集

4. 研究成果

1) カレニアウイルス KmDNAV5 の形態学的特徴および遺伝情報の蓄積、同ウイルス感染時の宿主増殖特性

2013 年に三重県英虞湾より分離に成功したウイルス KmDNAV5 について、精製したのち、透過型顕微鏡による形態観察を行った。カレニア・ミキモトイに感染している様子を示すために、透過型電子顕微鏡による細胞内観察を行うことにした。

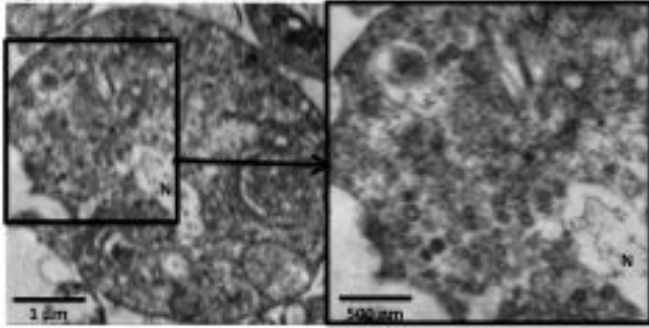


図1. カレニアKmh6細胞内のKmDNAV。右は左の拡大写真

度によって細胞が壊れることがしばしばあり、固定や試料調製が非常に難しい。そのため、2016年度には固定液の選択や固定時間の検討など観察試料の調製法を確立した。2017年には脱水や樹脂を再検討するなど検討を繰り返し、画像を得るに至った(図1)。

KmDNAV5感染時の宿主KmH6の増殖試験では、ウイルス接種後4日目頃から、増殖速度が低くなり、宿主KmH6が完全に死滅するには10~14日を要した(図2)。また、KmDNAV5接種後からKmH6が死滅に至るまでの時間は、一定ではなかった。分子技術導入の基盤となる塩基配列の解読については、DNAを回収し、本ウイルスが2本鎖DNAウイルスであることを確認し、シークエンスを実施した。しかしながら、DNAの回収効率を改善できないまま、現在も解析中である。

一般的に、ウイルスは宿主細胞の膜表面に吸着してから進入し、タンパク質が消失し、核のみになったあと、宿主の機能を用いて自己を複製させる。複製するウイルス個体数は、数百倍~数万倍にもなることもあり、細胞内における粒子形成から細胞破壊までの時間内のみ、細胞内におけるウイルス粒子の観察が可能となる。したがって、細胞内のウイルスを観察できる時間は、非常に限られている。また、植物プランクトンは、固定液の種類や濃

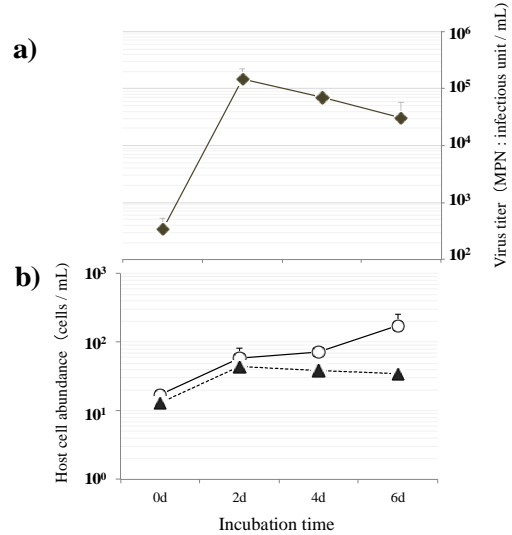


図2. KmDNAV5感染時のカレニアKmh6の増殖特性
a) KmDNAV5の推移, b) KmH6推移 実線; コントロール, 点線; KmDNAV5感染時

2) カレニアウイルス KmDNAV 3 の形態学的特徴および遺伝情報の蓄積、同ウイルス感染時の宿主増殖特性

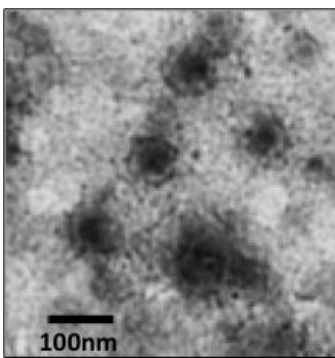


図3. KmDNAV3 陰染色

るものと推察された。

KmDNAV3の遺伝情報については、KmDNAV5同様、DNA回収効率が極めて悪かったが、最低量を回収できたため、部分配列の情報を得て、高感度定量PCRを開発しているところである。

KmDNAV3は、2014年7月に愛媛県宇和島湾の海水中から分離した。精製した後、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。陰染色による形態観察では、本種は、直径約100nmの正多面体ウイルスであることが明らかとなった(図3)。KmDNAV3感染時の宿主KmUW3の増殖試験では、1)のKmH6およびKmDNAV5と異なり、ウイルス接種後3~5間で全宿主が死滅した(図4)。これらのことから、KmDNAV5の感染力は比較的緩やか、KmDNAV3の感染力は強いことが示唆され、感染力の異なるウイルスが環境中に存在し、カレニの赤潮期間に影響を与えてい

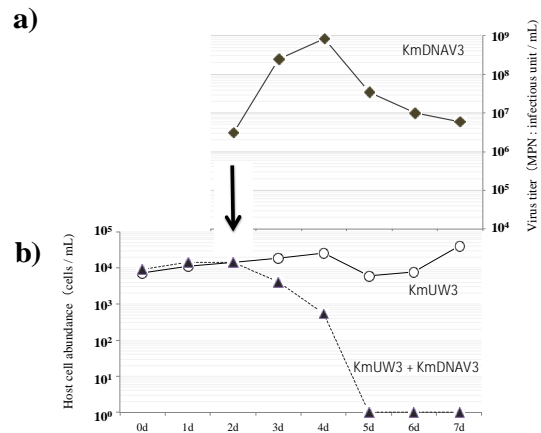


図4. KmDNAV3感染時のカレニアKmUW3の増殖特性
a) KmDNAV3の推移, b) KmUW3推移

3) KmDNAV3感染時の宿主の核形態の変化を捉えるイメージング解析に向けた画像収集

ウイルス感染時にカレニア生体内で起こるであろう核の形態変化をモニタリングする技術を開発するため、画像解析技術の確立に向けて実験を開始した。KmUW3培養液に、KmDNA3を感染さ

せ, 0, 24, 48, 72 時間後に KmUW3 細胞を染色し, 蛍光観察をしたところ, KmDNAV3 を接種した区では, 24 時間後から, 核の変化が認められ, 72 時間後ではほとんど認められなくなった。葉緑体の形にも変化が認められた (図 5)。

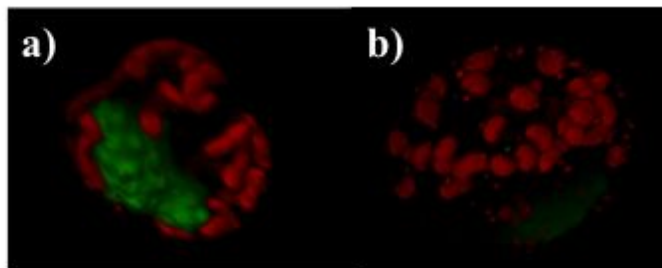


図5. KmUW3のKmDNAV3 a) 非感染細胞, b)感染細胞
培養72時間後

以上の結果から, 自然環境中には, カレニアには感染タイプの異なるウイルスが存在することが明らかになり, 赤潮の期間に影響を与えている可能性が考えられた。さらに, 本課題実施中に, 同種に感染するウイルスを複数分離することに成功したため, 今後はさらなる解明を目指すものとする。また, 感染には, ウイルスとホストの生理や環境の影響を含めた生理生態が影響するものと考えられるため, 次期課題中にカレニアとウイルスについて, さらに知見を深めるものとする。

<参考文献> 1 .Suttle C.A., 2005, Nature, 437, 356-361. , 2 .Fuhrman J.A., 1999 Nature 399, 541-548. , 3 .Nagasaki K. et al., 2004, Aquat. Microb. Ecol. 34, 219-226. , 4 .Yuji T. et al., 2004, Aquat. Microb. Ecol.34, 227-238. , 5 . 中山奈津子ら 日本水産学会誌 79(6), 1017-1019, 2013 (日本語)

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

Natsuko Nakayama and Masami Hamaguchi

Recent study of algal viruses infectious on *Karenia mikimotoi* The 18th International conference on Harmful Algae, October 2018, Nantes in France

N. Nakayama

Isolation and characterization of new viruses infectious to harmful bloom-forming microalga dinoflagellate *Karenia mikimotoi* 8th Aquatic Virus Workshop, July 2016, Plymouth UK

中山 奈津子・浜口 昌巳 Isolation and characterization of new viruses infectious to harmful bloom-forming microalga dinoflagellate *Karenia mikimotoi* 2016.8 Tokyo Japan

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 浜口 昌巳

ローマ字氏名: Hamaguchi Masami

所属研究機関名: 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

部局名: 瀬戸内海区水産研究所

職名: 主幹研究員

研究者番号(8桁): 60371960

科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。