

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380051

研究課題名 (和文) 水田表面水中のウイルスの生態

研究課題名 (英文) Virus Ecology in the Floodwater of Rice Fields

研究代表者

木村 真人 (KIMURA MAKOTO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20092190

研究成果の概要：

本研究においては、水田表面水中のウイルスの生態解明を目的とし、1) 水田表面水中には細菌数の平均 8 倍程度多数のウイルスが存在すること、細菌数とウイルス数の間に正の相関がみとめられた。2) 表面水から分離した 18 株の細菌を供試し、これらに感染するバクテリオ数の季節変動と肥料の種類の影響を調査した結果、表面水中のファージ群集は、系統的に広い範囲の細菌に感染するファージから構成されていることが示唆された。3) 表面水中に生息する細菌へのウイルスの感染状況を、透過型電子顕微鏡による細菌細胞の観察から推定した結果、平均で 2～3% の細菌細胞中にファージの存在が観察され、水田表面水中のファージ群集が細菌群集の死滅を引き起こすとともに、細菌群集の遷移に大きく影響していることを推察した。また、4) 藍藻ファージに特異的なプライマーを用いて同ファージの群集構造を評価した結果、水田にはこれまで知られていなかった未知の藍藻ファージの存在が推定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：水田、ウイルス、ファージ、g23 遺伝子、季節変動、*Sphingomonas*、透過型電子顕微鏡、TEM

1. 研究開始当初の背景

本研究の背景である全体構想は、水田生態系におけるウイルスの生態を解明することであり、本研究課題を申請した当初、自然生態系におけるウイルスの重要性に関する研究が、主に海洋生態系を対象としてなされ、

陸水生態系を対象とした研究はごくわずかであり (Hennes and Simon 1995; Maranger and Bird 1995; Weinbauer and Höfle 1998)、特異な陸水生態系である水田の表面水を対象とした研究は皆無で本研究はきわめて独創的な研究であると判断された。特に、海洋におけ

る微生物と藻類の遷移・消長、有機物の循環においてウイルスが決定的な役割を演じていること、海洋中の DNA 量の数割はウイルス起源(Boehme et al. 1993)であることが明らかにされた。例えば、1) 細菌の 40% に temperate ファージが感染し、各種細菌の増殖を制御(Fuhrman and Suttle 1993; Fuhrman 1999)、2) 少量のウイルス添加により海水の炭素固定能は半減(Suttle 1992)、3) 海洋中の有機物循環は、主に細菌-ウイルス間で進行(Fuhrman and Suttle 1993; Wommack and Colwell 2000)、などは特筆すべき研究成果といえる。現在においても、陸域生態系におけるウイルスの生態に関する研究は、我々の研究以外ほとんどなされていないのが実情である。

2. 研究の目的

本研究においては、水田表面水中のウイルスの生態解明を目的として、1) 水田表面水中の細菌数とウイルス数の季節変動および細菌数とウイルス数の関係、2) 表面水中の各種細菌に感染するバクテリオファージ(以下、ファージ)数の季節変動、3) 表面水中に生息する細菌へのウイルスの感染状況を明かにする。加えて、4) 藍藻に対するファージの群集構造を明らかにするとともに、主要なファージを分離し、分子生物学的手法を用いて海洋や湖沼の藍藻に対するファージとの系統関係を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

上記の目的に対応する実験の方法は、以下のとおりである。

1) 愛知県安城農業技術センター内の長期肥料連用試験水田圃場(無肥料区、NPK 区、NPKCa 区、NPKCa 堆肥区)から定期的に表面水を採取し、SYBR Green I で染色後、蛍光顕微鏡でウイルス数および細菌数を計数した。本実験においては、灌漑水中のウイルス数も調査した。

2) これまでに水田表面水中から分離した細菌のコレクションから、系統的に大きく異なる 18 株を供試し、上記の実験 1 で採取した表面水を用いて、希釈頻度法により観察されたプラークの頻度から、各細菌に感染するファージの季節変動を求めた。

3) 表面水中の細菌を、グリッド上に集菌し、透過型電子顕微鏡(TEM)下、高倍率で、細菌細胞内に存在するファージを観察し、その存在割合から細菌へのファージの感染状況を調査し、ファージの感染が最近の死滅に及ぼす影響を評価した。

4) 上記実験 2 に使用した *Sphingomonas* を宿主として形成されたプラークからファージを分離し、その形態、*Sphingomonas* 近縁の細菌における宿主範囲、ゲノムサイズを

決定するとともに、カプシド遺伝子 *g23* の塩基配列を解読し、T4 型ファージ群集の特徴を評価した。

5) 藍藻に感染するファージのカプシド遺伝子 *g20* に特異的なプライマーを用いて、表面水中に存在する藍藻ファージの特徴を、これまでに海洋や湖沼で検出された藍藻ファージと比較した。

4. 研究成果

1) 本研究では、1925 年より行われている長期肥料連用試験圃場の表面水におけるウイルス粒子(VLP)数とバクテリア数を調査した。水田表面水中におけるウイルス数およびバクテリア数は、水稻生育期間中それぞれ $5.6 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^9$ VLP mL⁻¹、 $9.2 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^8$ cells mL⁻¹ であり、その平均数は、 1.5×10^8 VLP mL⁻¹ および 5.1×10^7 cells mL⁻¹ であった。また、水稻生育期間中のウイルス数およびバクテリア数は、それぞれ、50 倍以上、100 倍以上に大きく変動した。ウイルス数およびバクテリア数は、表面水中の懸濁物質による濁度の増加に伴って増加するとともに、ウイルス数とバクテリア数の比(VBR)は、湛水期間中 0.11 から 72 の間で大きく変動し、バクテリア数の減少に伴って、VBR は増加した。従って、表面水中のウイルスの起源として表層土壌が推察された。また、灌漑水中のウイルス数は、表面水中のウイルスの数より顕著に少なく、表面水中のウイルスの起源が水田と判断した。加えて本研究より、水田表面水におけるウイルスの数は、海水や他の淡水環境中よりも多いことが示唆された。

2) 調査に用いた 18 菌株は、系統的に広い範囲に属す 6 グループ(Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides bacteria(4 株)、 α -Proteobacteria(6 株)、 β -Proteobacteria(2 株)、 γ -Proteobacteria(2 株)、Firmicute(1 株)、Actinobacteria(3 株))から選び、水田表面水は、長期肥料連用試験の行われている 4 処理区(無肥料区、化学肥料区、4 要素区、堆肥区)から採取した。全ての水試料中に、調査に用いた細菌のいずれかに感染するファージが存在した。水稻生育期間中のファージ数は、田植え一週間後に多く、その後中干し期まで減少し、中干し後から落水期まで増加傾向にあった。ファージ数の処理区による違いや、細菌の分離された水稻生育時期と多数のファージが感染した時期との間に関連性は認められなかった。*Sphingomonas* sp.、*Enterobacter* sp.、*Cytophaga* sp.、*Microbacterium* sp.に感染するファージは、湛水期間中の表面水に頻繁に出現し、その数は 10^2 - 10^3 mL⁻¹に及ぶこともあった。本研究より、表面水中のファージ群集は、系統的に広い範囲の細菌に感染するファージから構

成されていることが示唆された。また、細菌がプロファージを含むか否かによって、ファージの感染性に違いは認められなかった。本結果は、水田表面水中の細菌群集の死滅や遷移にファージの感染が影響していることを示唆するものと判断された。

3) 上述した安城農業試験場長期肥料連用試験水田圃場から表面水を採取し、TEM をもちいて高倍率で細菌細胞を観察した結果、ファージの感染率は、堆肥連用区では 2.4~3.6% (平均 3.0%) で、化学肥料単用区の 1.6~2.9% (平均 2.0%) より高かった。本結果を基に、ファージの感染に伴う表面水中の細菌の死滅は、堆肥連用区では 21.7~35.0% (平均 27.9%) で、化学肥料単用区で 12.8~27.3% (平均 17.2%) と推定した。本結果もまた、水田表面水中のファージ群集が細菌群集の死滅を引き起こすとともに、細菌群集の遷移に大きく影響していることを示唆するものであった。

4) *Sphingomonas* に感染するファージ 58 株を分離した。それらはいずれも、長く、伸縮性のない tail を有することから、Siphoviridae 科のファージと判断された。宿主範囲としては、分離に用いた *Sphingomonas* にのみ感染するファージから、3 つの属にまたがって感染するファージまで宿主範囲はさまざまであった。ゲノムサイズは、40, 60, 100, 160 kb のいずれかであった。プライマー (MZIA1 bis, MZIA6) を用いて capsid 遺伝子 *g23* の塩基配列を解読したところ、その配列はこれまで海洋環境で得られた配列とはまったく異なる新奇の配列であり、それらは 6 つのクラスターを形成した。本結果より、水田表面水中には、海洋とは異なる T4 型ファージ群集の存在が示唆された。加えて、ゲノムサイズが 60 と 160 kb のファージにおいて全く同一の *g23* 配列が観察されたことより、水田表面水中でファージ遺伝子の水平移動が進行していることが推察された。

5) capsid 遺伝子 *g20* に特異的なプライマー CPS1、CPS8 を用いて、水田表面水中の藍藻ファージの多様性と特異性を評価した。その結果、多数の異なる *g20* 遺伝子が検出され、その推定アミノ酸配列は、海洋や湖沼中の *g20* 遺伝子とは異なるクラスターに収束した。この結果から、水田にはこれまで知られていなかった未知の藍藻ファージの存在が推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①□ Natsuko Nakayama, Takashi Tsuge,

Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2009: Morphology, host range and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* phages in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **55**(1), 53-64. (査読有)

② Natsuko Nakayama, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2009: Frequency of phage-infected bacterial cells in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Biol. Biochem.*, **41**(2), 186-191. (査読有)

③ Natsuko Nakayama, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2009: Comparison of *g23* gene sequence diversity between *Novosphingobium* and *Sphingomonas* phages and phage communities in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Biol. Biochem.*, **41**(2), 179-185. (査読有)

④ Natsuko Nakayama, Mami Okumura, Katsuhiko Inoue, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2007: Morphological analysis of viral communities in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Biol. Biochem.*, **39**(12), 3187-3190. (査読有)

⑤ Natsuko Nakayama, Mami Okumura, Katsuhiko Inoue, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2007: Abundance of bacteriophages of common heterotrophic bacteria in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**(5), 595-605. (査読有)

⑥ Natsuko Nakayama, Mami Okumura, Katsuhiko Inoue, Susumu Asakawa, and Makoto Kimura 2007: Seasonal variations in abundances of virus-like particles and bacteria in the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**(4), 420-429. (査読有)

⑦ Natsuko Nakayama, Akiko Okabe, Koki Toyota, Makoto Kimura, and Susumu Asakawa 2006: Phylogenetic distribution of bacteria isolated from the floodwater of a Japanese paddy field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**(3), 305-312. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 中山奈津子、浅川晋、木村真人：水田表面水におけるファージ群集と *Novosphingobium/Sphingomonas* ファージの *g23* 遺伝子の多様性。日本土壤肥料学会 2008 年度大会 (2008 年 9 月 11 日、名古屋)

② Natsuko Nakayama, Susumu Asakawa, Makoto Kimura : Morphology, host range and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* phages belonging to the family of Siphoviridae. International Union of Microbiological Societies [IUMS] World Congresses (2008 年 8 月 13 日、イスタンブール・トルコ)

- ③中山奈津子、浅川晋、木村真人：水田表面水に生息する細菌群集の死滅へのファージの寄与率推定. 日本土壤微生物学会 2008 年度大会 (2008 年 6 月 13 日、静岡)
- ④中山奈津子、奥村真未、井上勝弘、浅川晋、木村真人：水田表面水中の *Sphingomonas* sp. に感染する溶菌性ファージの遺伝子解析. 日本土壤肥料学会 2007 年度大会 (2007 年 8 月 22 日、東京)
- ⑤中山奈津子、奥村真未、井上勝弘、浅川晋、木村真人：サイズ分布から見た水田表面水中ウイルスの多様性. 日本土壤微生物学会 2007 年度大会 (2007 年 6 月 7 日、柏)
- ⑥中山奈津子、奥村真未、井上勝弘、浅川晋、木村真人：長期肥料連用試験圃場における水田表面水中のバクテリオファージの季節変動. 日本土壤肥料学会 2006 年度大会 (2006 年 9 月 7 日、秋田)
- ⑦中山奈津子、奥村真未、井上勝弘、浅川晋、木村真人：長期肥料連用試験圃場の水田表面水中におけるウイルス数と細菌数の関係. 日本土壤微生物学会 2006 年度大会 (2006 年 6 月 11 日、仙台)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 真人 (KIMURA MAKOTO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：20092190

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし