

平成22年5月12日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780149  
 研究課題名（和文）地球上の重要生産者である珪藻類の動態はウイルス感染の影響をどの程度受けるか  
 研究課題名（英文）Effects of diatom viruses on diatom ecological dynamics

研究代表者  
 外丸 裕司（TOMARU YUJI）  
 独立行政法人水産総合研究センター・瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部・研究員  
 研究者番号：10416042

研究成果の概要（和文）：広島湾において珪藻とそれに感染するウイルスの挙動を解析した結果、両者は密接な生態学的関係を持つことが明らかとなった。また、珪藻の一種であるキートセロス・テヌイシマスに感染する新規環状一本鎖 DNA ウイルスを分離することに成功した。これまでに分離された珪藻感染性 RNA ウイルスの分子系統解析を行った結果、それらは新しいウイルス属に分類され、これを国際ウイルス分類委員会に提唱した。

研究成果の概要（英文）：Temporal changes of diatom virus abundances were studied in Hiroshima Bay, and the results showed that the dynamics of the viruses were related with its host dynamics. In this research period, a new single-stranded DNA virus which infects diatom species *Chaetoceros tenuissimus* was successfully isolated. Phylogenetic analysis of diatom RNA viruses revealed that they are belonging to the new genus “Bacillarnavirus” in the virus taxonomy, and the result was submitted to International Committee on Taxonomy of Viruses.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：珪藻・ウイルス・一本鎖 DNA・微生物生態

## 1. 研究開始当初の背景

珪藻類は、全海洋における一次生産量の40%を担う巨大な生物群であり、地球圏の炭素循環・酸素供給に果たす役割は陸上の熱帯雨林のそれに匹敵する。とくに春季には、世界中の至る所で珪藻優占型のブルームが発

生し、高次栄養段階生物の重要な栄養源になっている。それゆえ、珪藻の現場動態とその消長を左右する要因を詳細に把握することは、海洋生態系を解明していく上で重要なプロセスである。珪藻は光合成性単細胞生物であり、珪藻の動態を左右する要因としてこれ

までに、光、温度、栄養塩、そして捕食圧等に焦点を当てた研究が実施されてきた。これに対し、珪藻の動態に対するウイルス感染の影響の直接的な証拠は、21世紀に至るまでまったく得られていなかった。

1980年代末、ノルウエーの研究グループにより、海水中には $10^7$ - $10^8$ 個/mlも高密度でウイルス粒子が存在していることが見出された。試算によれば、海洋の全ウイルス量は $10^{31}$ 個（炭素量に換算するとシロナガスクジラ7500万頭分）に達すると見積もられており、その生態学的重要性に関する知見も近年徐々に蓄積されつつある。本課題担当者の研究グループではこれまでに赤潮原因藻類（ラフィド藻、渦鞭毛藻）とそれに感染するウイルスの関係を調査し、ウイルスが現場における植物プランクトンの動態に顕著な影響を与えていることを解明してきた。植物プランクトンの動態とウイルス感染との関係はもはや無視できない科学的テーマの一つとなっている。

このような背景の下、本課題担当者が所属する研究グループにより、2004年に世界で初めて珪藻リゾソレニア・セチゲラに感染するウイルス（RsetRNAV）が単離され、その性状が解析された。以降、応募者らは珪藻キートセロス属を宿主とする複数種のウイルスを次々に単離することに成功し、珪藻がウイルスによる攻撃に晒されていること、すなわちウイルス感染が珪藻の動態に影響を及ぼす重要な要因の一つである可能性を明示するに至った。しかしながら、珪藻ウイルスの生理・生態学的性状はまだ十分に解析されておらず、現場での動態調査による宿主との関係性に関する研究、複製に係るパラメータの解明が急務となっている。またゲノム解析からは、珪藻ウイルスが既知のウイルスとは異なる独立したグループに分類される可能性が示されたため、珪藻ウイルスの遺伝学的観点からの精査が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、珪藻ウイルスの生理学的および遺伝学的性状を室内実験で詳細に解明するとともに、現場調査によりその生態学的性状を克明に解析し、ウイルス感染が珪藻の動態に与える影響を総合的に評価することを目的とする。また、遺伝子データの充実を図りつつ、珪藻に感染するウイルス種間の共通性・相違性を明確化し、新しいウイルス科の設立を図る。

## 3. 研究の方法

(1) 現場における珪藻とウイルスの動態の把握：瀬戸内海において、定期的な現場調査（採水、採泥）を行うことにより、宿主珪藻ならびにウイルスの動態を明らかにする。珪

藻ブルーム時には調査の頻度を上げ、さらに詳細なモニタリングを実施する。

(2) 珪藻ウイルスの種内宿主特異性と遺伝情報との関係：珪藻ウイルスの種内宿主特異性を明らかにする。さらに複数の異なる種内宿主特異性を持つウイルス株のゲノム性状を比較する。具体的にはゲノムタイプ（DNA、RNA）、ゲノム構造（1本鎖、2本鎖）解析ならびに全塩基配列の決定を行い、それらをウイルス株間で比較する。

(3) 珪藻ウイルスの基本形態・生理・生態学的性状の解析：新奇に分離された珪藻ウイルスの基本性状（サイズ、宿主特異性、潜伏期間、バーストサイズ、主要構成タンパク質、温度耐性）を明らかにする。

(4) 珪藻ウイルスの分子系統学的解析：これまでに分離された珪藻感染性一本鎖RNAウイルス、RsetRNAV、CtenRNAV、CsfrRNAVのゲノム塩基配列のうち、種の分類指標に用いられるRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRP）をコードする領域を用いた分子系統学的解析を行い、これらの珪藻ウイルスが既知のウイルスグループとは異なる集団を形成することを明らかにする。さらにICTV（国際ウイルス分類委員会）に対して、珪藻感染性RNAウイルス群として新たなウイルス属を設立すべきであることを提言する。

## 4. 研究成果

(1) 広島湾における珪藻キートセロス・テヌイシマスの動態をリアルタイムPCR法で定量的に測定するとともに、本種感染性ウイルスの動態をMPN法で推定した結果、ウイルスの現場における急激な増加は宿主のブルームを反映していることが明らかとなり、両者の動態には密接な生態学的関係があるものと推察された。

(2) 沿岸域ブルーム原因珪藻キートセロス・テヌイシマス14株と同種感染性ウイルス9株との間で交差試験を行った。その結果、9株のウイルスの内2株が、明らかに先に発見されているCtenRNAV株を含む他ウイルス株と異なる宿主株感染特異性を示した。このことは本種個体群とウイルス個体群との間に複雑な感染-被感染性の関係があることを示すものと思われた。また感染特異性の異なる2株のウイルスは、いずれもDNAウイルスであることが明らかになった。本ウイルスは既知ウイルスCtenRNAVとは明らかにゲノム性状が異なる新規ウイルスであるため、本ウイルスをCtenDNAV（図1）と命名した。そのうち1株についてさらなるゲノム性状解析を行った結果、ゲノムは5639ntの環状1本鎖DNAであり、そのうち875ntが2本鎖DNAで構成されていることが明らかとなった（図2）。

共通の宿主を持つゲノムタイプの異なる

2種類のウイルス（RNA, DNA）と宿主の培養系確立に成功したのは、本事例が世界初である。

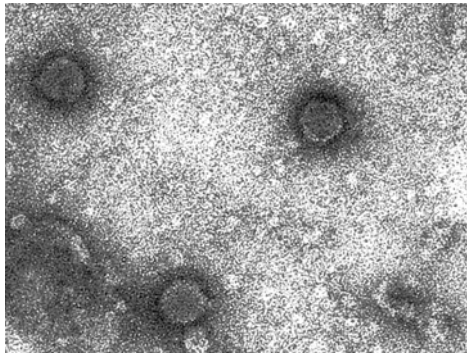


図1. CtenDNAVの陰性染色写真. 粒径は37nm.

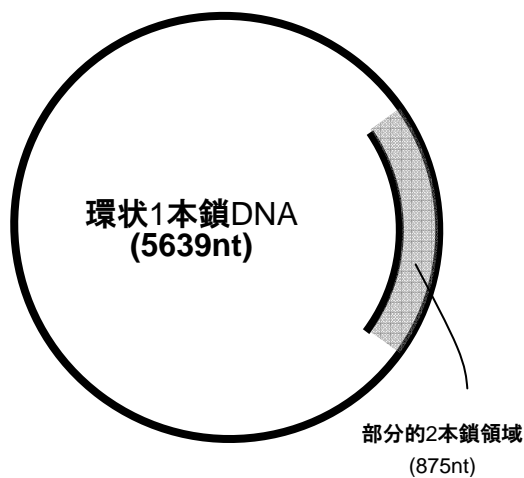


図2. CtenDNAVのゲノム構造.

(3) CtenDNAVの各種性状解析の結果、本ウイルス粒子は粒径 $37 \pm 2$ nmの球形ウイルスであり、38.5kDaの主要タンパク質を持つ事が明らかとなった。感染の過程において、本ウイルス粒子は宿主細胞の核内に蓄積されることが透過型電子顕微鏡による観察で明らかとなった。増殖試験の結果からは、本ウイルスのバーストサイズは宿主細胞当たり360感染単位であることが推察され、また4°C条件下で感染単位は高い割合で維持された。本ウイルスの宿主に対する潜伏期間については両者間に特殊な感染-被感染の関係があることが予測されたため、さらなる検討が必要と思われた。

(4) これまでに性状が明らかにされている珪藻感染性1本鎖RNAウイルス3種(CtenRNAV, RsetRNAV, CsfrRNAV)のRNA依存性RNAポリメラーゼドメインを対象としたNJ法ならびにML法による系統学的解析を行った結果、それらは既知のウイルスグループからは独立した明らかな単系統を形成した。研究開始

当初は本グループを「科」とする方針で考えていたが、詳細な検討を行った結果、「属」として独立させることが妥当であるという結論に至った。これにより本ウイルスグループを珪藻感染性RNAウイルス属(Bacillarnavirus属)として国際ウイルス分類委員会に提唱した。以上の結果より、海洋環境中には進化的に近しい珪藻感染性ssRNAウイルスグループが存在するものと推定された。

#### 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4件)

- ① Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., Nagasaki, K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom forming diatom *Chaetoceros socialis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75(8): 2375-2381. (2009) 査読有
- ② Park, Y., Sang-Eun, J., Tomaru, Y., Choi, W., Kim, Y., Mizumoto H, Nagasaki, K., Choi, T. Characterization of the *Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus coat protein gene. *Virus Research* 142: 127-133 (2009) 査読有
- ③ Shirai, Y., Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., Nagasaki, K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Applied and Environmental Microbiology* 74(13): 4022-4027 (2008) 査読有

[学会発表] (計17件)

- ① 外丸裕司, 豊田健介, 長崎慶三. 珪藻ウイルスの生態学に関する最新知見. 日本珪藻学会第29回研究集会, 2009年10月17日, タカミヤビレッジホテル樹林 (山形県山形市)
- ② 外丸裕司, 白井葉子, 豊田健介, 長崎慶三. 海産浮遊珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* に感染する第2のウイルス CtenDNAV の発見. 平成21年度日本水産学会秋季大会, 2009年10月2日, アイーナ岩手県民情報交流センター (岩手県岩手市)
- ③ 外丸裕司, 高尾祥丈, 鈴木秀和, 南雲保, 長崎慶三. 海産浮遊珪藻 *Chaetoceros lorenzianus* に感染する新奇環状1本鎖DNAウイルス ClorDNAV の性状. 平成21

年度日本水産学会秋季大会, 2009年10月2日, アイーナ岩手県民情報交流センター (岩手県岩手市)

- ④ 外丸裕司, 豊田健介, 長崎慶三. 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* と同種感染性ウイルスの生態学的関係. 2009年度日本海洋学会秋季大会, 2009年9月28日, 京都大学理学部 (京都府京都市)
- ⑤ Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T. and Nagasaki, K. Diatom viruses infectious to genera *Rhizosolenia* and *Chaetoceros*. 20th International Diatom Symposium 2008, 2008年9月9日, ドブロクニク (クロアチア)
- ⑥ 豊田健介, 長崎慶三, 外丸裕司. 珪藻類のリアルタイム PCR 法による検出・定量解析の試み. 2008年日本プランクトン学会・日本ペントス学会合同大会, 2008年9月6日, 熊本県立大学 (熊本県)
- ⑦ Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Mizumoto, H., Suzuki, H., Nagumo, T., Toyoda, K., Nagasaki, K. Fateful encounter of virology and diatomology. The 5th Aquatic Virus Workshop, 2008年7月8日, バンクーバー (カナダ)
- ⑧ Park, Y., Tomaru, Y., Lee, K., Nagasaki, K., Choi, T. Identification and characterization of the putative coat protein gene in *Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus. The 5th Aquatic Virus Workshop, 2008年7月8日, バンクーバー (カナダ)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①

名称: 海産藻類を形質転換するために用いられる新規プロモーター

発明者: 足立真佐雄, 長崎慶三, 外丸裕司  
権利者: 高知大学, (独) 水産総合研究センター

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/50843

出願年月日: 2010年2月22日

国内外の別: 外国

②

名称: 海産藻類を高効率に形質転換可能な新規ウイルスプロモーター

発明者: 足立真佐雄, 岡見卓馬, 長崎慶三, 外丸裕司

権利者: 高知大学, (独) 水産総合研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2010-32633

出願年月日: 2010年2月17日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://feis.fra.affrc.go.jp/cgi-bin/htmlgen/htmlab.cgi?seigyo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外丸 裕司 (TOMARU YUJI)

独立行政法人水産総合研究センター・

瀬戸内海区水産研究所・

赤潮環境部赤潮制御研究室・研究員

研究者番号: 10416042

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: