

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010~2011

課題番号：22651004

研究課題名（和文）北太平洋中緯度海域で発見されたウイルス・ホットスポットの形成機構の解明

研究課題名（英文）Evaluation of mechanisms underlying the formation of viral hot spot observed in the mid latitude region of the North Pacific

研究代表者

永田 俊（NAGATA TOSHI）

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：40183892

研究成果の概要（和文）：

外洋域においてウイルス数が局所的極大を示す層、すなわち「ウイルス・ホットスポット(VHS)」の分布の実態把握と形成機構の究明を行った。観測の結果、VHS は中部および西部北太平洋において広範に見られ、その分布が溶存酸素アノマリーの分布と関連することが明らかになった。観測・実験データを基に、VHS の形成には、宿主依存的なウイルス生産、鉛直混合、紫外線影響の3要因が関与しているという新たな仮説を提案した。

研究成果の概要（英文）：

“Viral hot spot(VHS)”, oceanic water masses that contain large quantities of viruses, have been found in the Pacific. This study examined the extent of the distribution and formation mechanisms of VHS. Data collected from the observations and experiments in various regions of the Pacific indicated that VHS is widespread and that VHS formation is affected by host-dependent virus production, vertical water mixing and viral decay due to ultraviolet radiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：海洋、微生物、ウイルス、空間分布、生態系

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、海洋生態系において、大量の植物プランクトンや細菌がウイルス感染によって死滅していることが明らかされ、海洋における大規模な物質循環の制御におけるウイルスの役割についての議論が国際的に活発化している (Suttle 2007)。理論的研究によれば、ウイルスによる宿主細胞の破壊に

ともなう、粒子態有機物から溶存態有機物への転換によって、食物連鎖を通じての上位栄養段階（捕食者）への物質流や、粒子の沈降による炭素の下方鉛直フラックス（生物ポンプ）が著しく低減すると予測されている (Miki et al. 2007)。この理論的予測は、近年、研究代表者が主導する日仏合同チームの研究により初めて実験的に証明され

(Motegi et al. 2009)、ウイルスが地球規模の生物地球化学的循環に対して重大なインパクトを与えているという仮説が支持された。しかし、従来の理論や実験解析では、海洋におけるウイルスの空間分布が考慮されておらず、ウイルス生息環境の空間異質性の問題は、いわば研究の盲点として残されてきた。

(2) 研究代表者らは、2005年の8月から9月にかけて実施された中部太平洋の南北断面観測航海(学術研究船白鳳丸 KH05-2次航海)において、ウイルス数の空間分布を、高精度フローサイトメトリー法を用いて調べ、北太平洋中緯度海域(北緯 25 - 45 度、西経 160 度)の水深 20-75 m の層において、顕著なウイルス数の極大を見いだした。宿主である植物プランクトンや細菌の分布と、ウイルス数の極大が一致しなかったことから、宿主の分布によってウイルスの分布が一義的に決定されるという仮説は支持されなかった。一方、物理・化学パラメータとの関係を検討した結果、ウイルス数のピークが、溶存酸素アノマリーのピークと一致するという意外な結果が得られた。この新たな現象は、海洋生態系の構造変動や物質循環パターンの理解のうえで重要な意義を有する可能性がある。そこで、本研究では、外洋域においてウイルスが高密度で分布する水塊を「ウイルス・ホットスポット (VHS)」として新たに概念化し、その分布実態と形成機構の解明を目指して研究を進めた。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、以下の課題を追求することを目的として研究を進めた。

(1) 西部北太平洋海域および熱帯・亜熱帯太平洋における観測を実施し、VHS の分布実態に関する調査を行う。これらのデータおよび、中部北太平洋中緯度海域において得られたデータを統計学的に詳細に解析し、ウイルス分布を規定する主要因を抽出する。

(2) 船上で培養実験を行い、これまで知見の少ない、外洋域におけるウイルスの自然消滅率に関する情報を得る。

(3) 以上の情報を総合して、VHS の形成機構を考察する。

## 3. 研究の方法

(1) 平成 22 年度から 23 年度にかけて実施された学術研究船白鳳丸 KH-10-01 次航海、海洋地球研究船みらい MR10-06 次航海、および学術研究船白鳳丸 KH-11-10 次航海において観測を実施するとともに、それ以前に実施された航海で得られたサンプルの解析を進めることで、亜熱帯、亜寒帯、赤道域におけるウイルスの分布パターンを調べた。ウイル

ス計測に必要な試料は、CTD 採水装置に装着した清浄なニスキン X 型採水器により採取した。サンプル水は凍結保存用バイアルに分注したのち、グルタルアルデヒドで固定し、液体窒素中で凍結した。凍結サンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。陸上施設において、凍結サンプルを解凍後、試料中のウイルス濃度に応じて TE バッファーで希釈し、サイバークリーン I で染色後、フローサイトメトリー法によりウイルスを計数した。フローサイトメータには 15mV、488nm の空冷アルゴンレーザーを搭載した FACSCalibur (Becton Dickinson 社製)を用いた。また、フローサイトメトリー法により、ピコ植物プランクトン数および細菌数の計数も行った。フローサイトグラムは CellQuest ソフトウェアを用いて解析し、可能な場合は、ウイルスのクラスター別の計数も実施した(図 1)

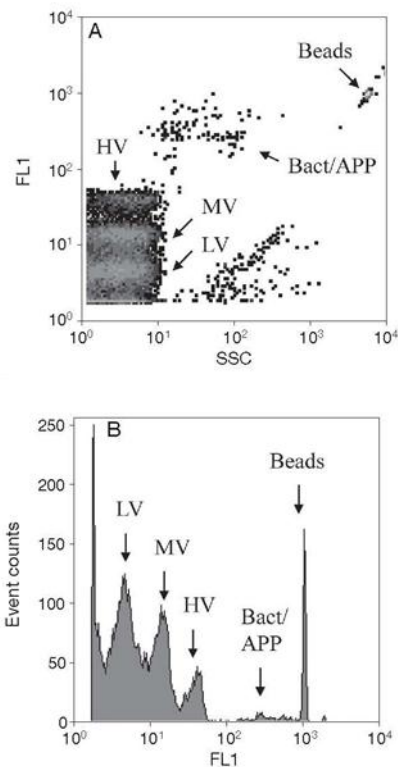


図 1 ウィルス計数に用いたフローサイトグラムの例。A は蛍光強度 (FL1) と側方散乱 (SSC) のプロット、B は蛍光強度の頻度分布。LV, MV, HV は異なるウィルスクラスターを表す。Beads は標準ビーズ。

ウイルス数と環境要因の関係を明らかにするために、Distance Based Linear Model によるステップワイズ重回帰分析を行った。説明変数間の共線性は許容限界値から判定した。また、ベイズ情報クライテリアを指標として統計モデルを選択した。

(2) 学術研究船白鳳丸航海において、外洋域におけるウイルスの消滅率を推定するための実験を実施した。海水サンプルを孔径  $0.2 \mu\text{m}$  のフィルターで濾過したのち、その濾過液を 100mL 容の石英管チューブにいれ、おおむね 8 時から 18 時の間の 10 時間、甲板水槽中で培養した (明条件培養区)。石英管チューブの一部はアルミホイルで包み甲板水槽中で培養した (暗条件培養区)。2~6 時間ごとにサンプルを採取し、ウイルス計数用のサンプルとして凍結保存した。サンプルは陸上施設に持ち帰り、ウイルスの計数に供した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究の推進により、太平洋の広範な海域 (亜熱帯、亜寒帯、赤道) におけるウイルス数の分布パターンに関する新たなデータを得ることができた。ここでは、中部北太平洋および西部北太平洋において得られたデータの解析結果を中心に成果を報告する。

まず、中部北太平洋において得られた結果を重回帰モデルを用いて解析した結果、広域的なウイルス変動の 5.3% が、ピコ植物プランクトン数によって説明できることが明らかになった。このことから、シアノバクテリアを中心とする宿主の分布が、ウイルスの広域分布を規定する大きな要因である可能性が示唆された。一方、中緯度海域にみられる VHS とピコ植物プランクトンの分布の間には統計学的に有意な関係は見いだせなかった。したがって、宿主の分布から VHS の形成を説明することは困難であった。一方、VHS の現れる海域のデータについて統計処理を行ったところ、ウイルス数と溶存酸素アノマリー (負の見かけの酸素消費) の間に有意な相関 ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 40$ ) が見られた。

西部北太平洋においても、中部北太平洋の結果と類似したウイルス数の分布パターンが見られた。この海域では、ウイルス数は  $0.2 - 4 \times 10^{10}$  particles  $\text{L}^{-1}$  の範囲で変動した。亜寒帯域では、表層 0-20m に分布の極大が見られたのに対し、亜熱帯海域では、すべての観測点において、顕著な亜表層極大が観測された。極大層の深度 (40 - 125 m) は、観測点によって異なり、クロロフィルの亜表層極大の深度と一致する場合と、そうでない場合があった。図 1 には、北緯 20 度の観測点におけるウイルス数と環境変数の鉛直分布を示す。細菌数は、75 m 以浅で高く、それより深い層では深度とともに単調に減少した。クロロフィル a 濃度は 125 m の層に極大を示した。ウイルス数は、密度躍層の上部の層 (水深、50 - 75 m) に亜表層極大を示した。このウイルスの亜表層極大は、溶存酸素アノマリー層 (AOU が負になる層) とほぼ一致した。この海域で得られたデータを用いた重回帰分析の結果、溶存酸素アノマリーとクロロフィル濃度の線形

結合により、ウイルス数の変動の 7.5% が説明された ( $p = 0.001$ ,  $n = 64$ )。このことから、中部北太平洋で発見された「ウイルス亜表層極大と溶存酸素アノマリーの共在現象」は、西部北太平洋においても見られることが明らかになった。

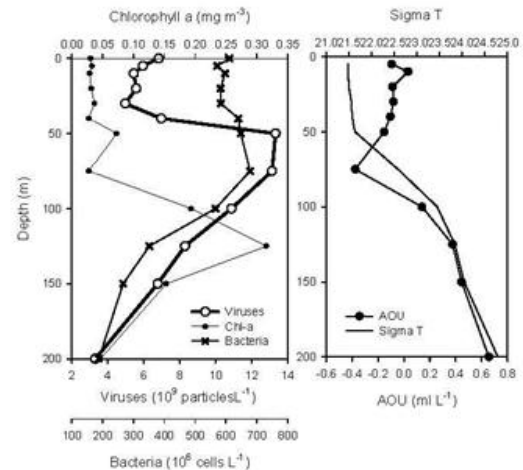


図 2 北緯 20 度東経 155 度の観測点におけるウイルス数、クロロフィル a 濃度、細菌数、海水密度 (Sigma-t)、みかけの酸素消費 (AOU) の鉛直分布。負の AOU 値は溶存酸素アノマリーを示す。

(2) 亜熱帯・赤道海域の 4 定点で実施した実験の結果、表層水の暗条件培養区におけるウイルス消滅率は概ね  $0.1 - 0.2 \text{ day}^{-1}$  (回転時間 5 - 10 日) の範囲で変動した。暗条件と明条件での消滅率の差は検出されなかった。深層水中 (水深 1500 - 4200 m で採取) におけるウイルスの消滅率も表層とほぼ同レベルであったが、表層とは異なり、明条件におけるウイルス死滅率が、暗条件に比べて高い傾向がみられた。

(3) 本研究により、VHS が、中部北太平洋中緯度海域のみでなく、西部北太平洋においてもみられる広範な現象であることが示された。統計解析の結果から、ウイルスの広域分布を決める主要因としては、宿主 (ピコ植物プランクトン) の生物量が重要であることが示唆された。しかし、VHS の成因はこのような宿主の分布のみでは十分に説明できなかった。

ウイルスの消滅実験の結果から、表層におけるウイルスの回転時間は数日~10 日程度であり、ウイルス分布を決める要因として無視できないことが示唆された。特に、深層水中のウイルスは明条件下で消滅率が增大する傾向がみられたことから、紫外線照射に対する感受性が高いと推察された。今後、紫外線影

響の変動やそのメカニズムに関するより詳細な検討が必要である。

では、外洋域において、ウイルス数の亜表層極大と溶存酸素アノマリーが同所的に現れるメカニズムは何であろうか？これを考えるために、まず、溶存酸素アノマリーの形成理由を考えてみる。溶存酸素アノマリーは、一般に、補償深度が混合深度を上回ったときに、その両者に挟まれた層に現れることが知られている(図3)。この層は、正味の光合成が起こることから、それ以深の層に比べて、ウイルスにとっての宿主の現存量は大きいと考えられる。一方、この層内の水は混合層とは隔離されているから、ウイルスが紫外線に照射されるリスクは低いと考えられる。つまり、溶存酸素アノマリー層は、ウイルスにとっての隠れ家(refuge)になっている可能性がある(図4)。本研究は、これを「殺し屋の隠れ家仮説」と名付けることを提案する。この仮説は、ウイルスと宿主の関係、水体の鉛直混合、紫外線影響という3要素がVHSの形成に関与すると予測する。今後、この仮説の妥当性を、実験と数値モデルからより詳細に検討する必要がある。

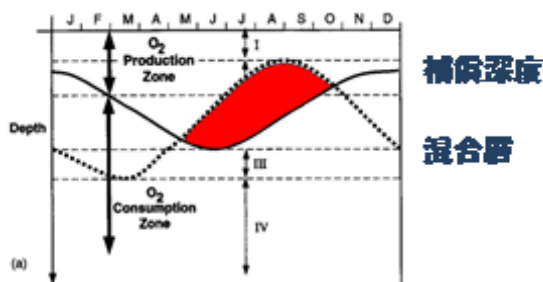


図3 溶存酸素アノマリーの形成機構を示す模式図。赤く塗りつぶした部分が溶存酸素アノマリー。Najjar and Keeling (1997)を一部改変。

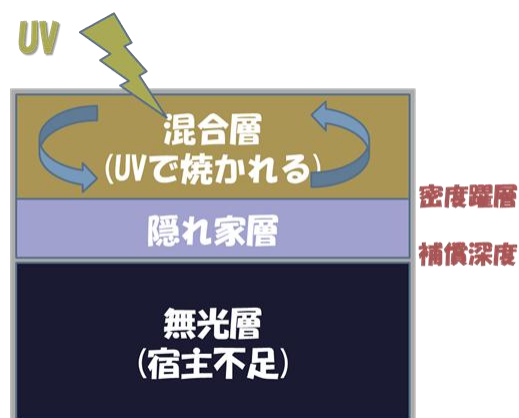


図4 本研究が提案する新しい仮説「殺し屋の隠れ家仮説」を説明する模式図。

以上の成果の一部は国際誌に公表するとともに、海洋生態系と生物地球化学の国際プログラムであるIMBERの国際会議において発表した。

(引用文献)

Miki T, Nakazawa T, Yokokawa T, and Nagata T (2008) Functional consequences of viral impacts on bacterial communities: a food-web model analysis. *Freshwater Biology* 53:1142-1153.

Motegi, C., Nagata, T., Miki, T., Weinbauer, M. G., Legendre, L. and Rassoulzadegan, F. (2009) Viral control of bacterial growth efficiency in marine pelagic environments. *Limnology and Oceanography* 54: 1901-1910.

Najjar, R.G. and Keeling R. R. (1997) Analysis of the mean annual cycle of the dissolve oxygen anomaly in the world ocean. *Journal of Marine Research* 55: 117-151.

Suttle, C.A. (2007) Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*. 5, 801-812.

#### 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1件)

① Yanhui Yang, Chiaki Motegi, Taichi Yokokawa, Toshi Nagata, Large-scale distribution patterns of viroplankton in the upper ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 査読有、Vol. 60, 2010, pp. 233-246

[学会発表] (計2件)

① 楊燕輝、横川太一、茂手木千晶、永田俊 「Viral gradient along the meridional overturning circulation」第五回日中韓IMBERシンポジウム-平成23年11月22日、上海(中国)

② 永田俊、楊燕輝、茂手木千晶、横川太一

「Regional variability in viral distribution patterns in the upper ocean」IMBER-IMBIZO Meeting 平成22年10月11日、クレタ（ギリシャ）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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://co.aori.u-tokyo.ac.jp/mbcg/j/members/nagata/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 俊（NAGATA TOSHI）  
東京大学・大気海洋研究所・教授  
研究者番号：40183892

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し