

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658178

研究課題名(和文) ウイルス感染後の植物プランクトン個体群の生残を説明する新奇仮説の検証

研究課題名(英文) Bacterial communities help survivals of diatom populations from viral attacks

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・主任研究員

研究者番号：10416042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻は通常、ウイルス存在下では生残できず全滅する。ところが、海産浮遊性珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* は、バクテリア存在下ではウイルス CtenRNAV 接種後に一部が生残する。本研究ではウイルス存在下における珪藻生残におよぼすバクテリアの影響を評価した。増殖生理実験・バクテリア群集解析ならびに顕微鏡観察の結果、珪藻のウイルス抵抗性にかかわるバクテリアは種特異的ではなく、むしろ抵抗性には種や属を超えたバクテリアに共通する機能の一部が関与するものと推察された。

研究成果の概要(英文)：In axenic conditions, marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* cells were completely crashed due to viral inoculations and a regrowth of the population was not observed. The host populations inoculated with marine bacterial community also showed the rapid decreases of the cell concentration. After 7 days of post viral infection, however, a few cells survived and the population showed regrowth under a high viral concentration environment. In nature, many environmental factors and host strategies may affect the survival of the diatom populations from viral attacks. The host cell associated bacteria might be one of these factors, but the mechanisms are still unknown.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産・水産学一般

キーワード：珪藻 ウイルス バクテリア 抵抗性

1. 研究開始当初の背景

1980年代後半、水圏環境に大量のウイルスが存在することが報告されて以降、植物プランクトンの挙動とウイルスとの生態学的研究が盛んになった。これまで約20年間の研究の積み重ねにより、両者の関係について、1) 大増殖した植物プランクトン個体群(赤潮)の急激な崩壊にはウイルスが関与している、2) ウイルスは植物プランクトン個体群内の株多様性に影響を与えている、といった重要な知見が集積された。このような研究を背景に、植物プランクトンの挙動を理解する上で、現在ウイルスの影響はもはや全く無視できない重要な存在となっている。

一方、植物プランクトンの中でも「珪藻」は全地球上の生産量の約25%を供給する重要な生物群の一つであり、全球物質循環を考える上でも欠かせない存在である。また近年の珪藻の全ゲノム解析により、地球生態系の中における同生物群のより詳細かつ重要な役割が徐々に明らかにされている。このような重要な生物である珪藻に感染するウイルスは、申請者のグループにより2004年にその存在が初めて明らかにされた。それ以降、珪藻ウイルスは珪藻の挙動に影響を与える大きな因子であると認識されてきた。室内実験系ではウイルスは約一週間で珪藻培養を完全に崩壊させることから、その殺菌能力はきわめて強いことが明らかである。さらに現場環境中では珪藻のブルーム発達と共にウイルスが急増し、珪藻が減少する傾向が認められていることから、現場レベルでウイルスが珪藻の挙動に影響を与えているものと推察された。しかしながらその後、珪藻個体群はウイルス存在下にもかかわらずサイズを復活させ、一定のレベルで推移することが観察された。それらの結果から報告者は「自然環境中の珪藻個体群はウイルス感染を回避するための戦略を持つ」という仮説を導き、その戦略を裏付ける実験を展開してきた。珪藻個体群のウイルス回避戦略は幾つかの重要な機能により構成されていると考えられるが、最近数ヶ月間の予備実験により、申請者はバクテリアの存在が珪藻個体群の生残量を大きく左右するという現象に遭遇した。

2. 研究の目的

本課題では、「バクテリアの存在がウイルス感染した珪藻個体群の生残に大きな影響を与える」という現象について、【1】バクテリアが珪藻の生残に与える影響の定量的評価、【2】生残した宿主珪藻のウイルス感受性変化、【3】生残現象に強く関わるバクテリア種の同定、【4】珪藻生残に至る作用機序の解明、の4項目について生理・分子生物学的側面から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

【1】バクテリアが珪藻の生残に与える影響の評価

[1-1] 生残に関する因子サイズの評価
ウイルス感染後に生残が確認されている

宿主個体群の培養液を0.8 μ m(バクテリア画分)、0.2 μ m(バクテリア除去画分)に分け、感染性ウイルスとともに無菌宿主個体群に接種し、その後の宿主細胞数の変動を評価した。

[1-2] 培養実験によるウイルス抵抗性因子の生残への影響評価

無菌宿主培養に対し、感染性ウイルスの接種と同時にウイルス抵抗性因子の接種有無で培養を行い、両条件下での宿主細胞密度の変化を測定した。

【2】生残した宿主珪藻のウイルス感受性変化と細胞学的特徴

[2-1] 生残細胞のウイルス感受性変化
生残した珪藻個体群からサブクローン株を作製し、当該株のRNAウイルスに対する感受性を評価した。

[2-2] 生残細胞の細胞学的特徴

生残している細胞について、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡等を用いて細胞外側の状態を観察した。

【3】生残現象に関与するバクテリア種の同定：バクテリアのクローニング、塩基配列

[3-1] バクテリアの単離と塩基配列決定

宿主珪藻の生残に関与するバクテリアは、その種が明らかにされていない。そこで保有しているバクテリア群集をプレート培養により単離し、株毎に培養を行った。さらに単離したバクテリアが、ウイルス感染を受けた珪藻の生残に影響を与えるかどうかを評価した。さらに生残に関与するバクテリアのrDNA-16Sの塩基配列を決定して種同定を行った。

小課題【4】珪藻生残に至る作用機序の解明

ウイルス抵抗性細胞に対し、ウイルスは吸着して細胞内に進入できるのか？また進入が成立したとして、どの感染段階で宿主細胞がウイルス抵抗性を発揮するのかについて、進入前(抗ウイルス抗体+二次抗体を用いた蛍光・電子顕微鏡観察)および進入後(ウイルスゲノム鎖特異的分子プローブを用いたノザン解析)に分けた解析を行った。

最終的に全ての成果を総合し、3者の関係について考察を行った。

4. 研究成果

本種珪藻にウイルスを接種したところ、無菌培養区では個体群の完全崩壊が確認された。バクテリア群集存在下でも多くの珪藻細胞は死滅したと思われたが、一部が生残し、新しい培養液中で再増殖が観察された(図1)。

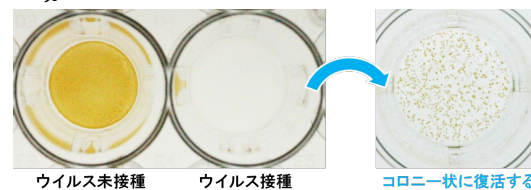


図1. ウイルス接種後の珪藻培養から、生残細胞が復活する様子。

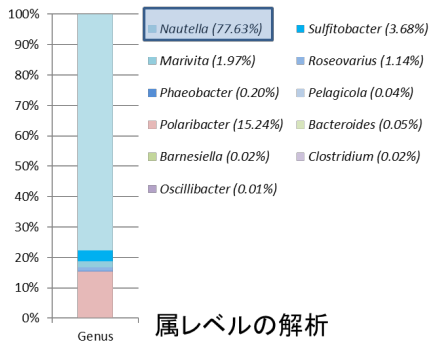


図2. 次世代シーケンシングによるバクテリア群集解析結果.

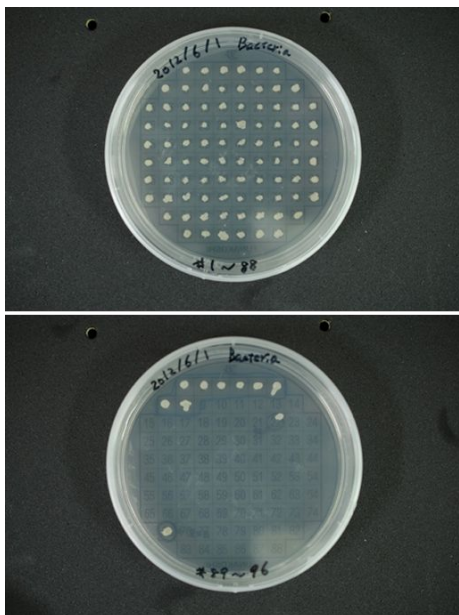


図3. プレート上に分離したバクテリア株.

次世代シーケンシング解析から推察された培養液中で優占していたバクテリアは *Nautella* sp. であったが (図2), 分離されたバクテリアは *Sulfitobacter* sp. が優占し, 他に *Nautella* sp. と *Polaribacter* sp. が分離された (図3, 4). いずれの分離株も珪藻のウイルス抵抗性に関与する可能性が, 培養実験により確認された。バクテリア存在下でウイルス抵抗性状態の珪藻培養について、核酸染色による蛍光顕微鏡観察を行ったところ、珪藻細胞の周辺にバクテリアが張り付いているような状態が観察された (図5)。そして培養実験では、珪藻個体群がウイルス抵抗性の状態の時には、珪藻細胞内でウイルスゲノムの複製が起こっていないことが、ノザン解析により明らかになった (図6)。具体的には、3者の現存量が平衡状態になったときには、宿主となる珪藻細胞内でのウイルスゲノム複製のシグナルはほとんど検出されていない。本研究ではバクテリア分離株の16s領域のアライメントからプライマー・プローブ領域の抽出に成功し、当該種の現場における特異的検出技術構築のための基盤を

構築した。

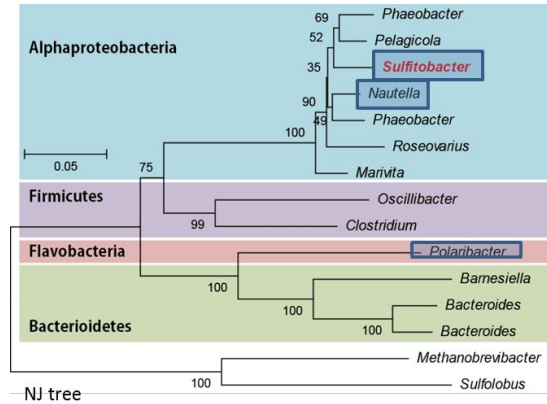


図4. 分離したバクテリアと近縁種の16s-rRNA遺伝子配列に基づく系統樹. 太線枠は分離株を示す.

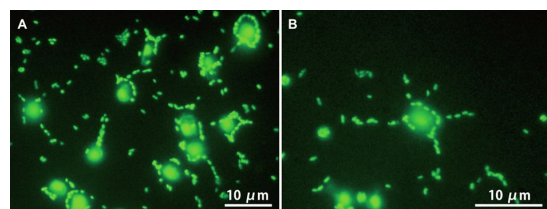


図5. 珪藻細胞の周辺に存在するバクテリア. SYBR-Gold染色.

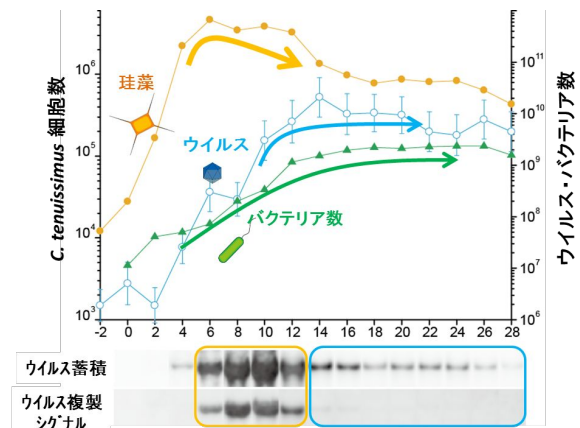


図6. 3者の培養実験グラフ (上段). 下段はノザン解析による、各培養日数時における、珪藻細胞内のウイルスゲノムRNAまたは複製シグナルの蓄積量.

以上の結果から、海洋環境中で珪藻個体群がウイルス感染から逃れて生残する戦略の一つに、バクテリアによる何らかの影響が存在するものと推察された。また、珪藻のウイルス抵抗性にかかわるバクテリアは種特異的ではなく、むしろ抵抗性には種や属を超えたバクテリアに共通する機能の一部が関与するものと推察された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

木村圭, 外丸裕司. 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* のウイルス抵抗性におよぼすバクテリアの影響. 平成 25 年度日本水産学会春季大会. 2013 年 3 月 28 日. 東京海洋大学 (口頭発表)

Kimura K, Tomaru Y. Bacterial communities help survivals of diatom populations from viral attacks. International Diatom Symposium 2012. 2012 年 08 月 30 日. Gent, Belgium (口頭発表)

外丸裕司, 木村圭, 辻彰洋. 新奇凸凹表面寒天プレートを用いた珪藻の培養と応用例. 日本藻類学会大会 2014 年 3 月 16 日. 東邦大学 (千葉県船橋市) (口頭発表)

木村圭, 外丸裕司. 珪藻のウイルス抵抗性はバクテリアの存在によって誘導される. 日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日. 富山大学 (富山市) (ポスター発表)

木村圭, 外丸裕司. 珪藻のウイルス抵抗性はバクテリアの存在によって誘導される. 第 29 回日本微生物生態学会大会. 2013 年 11 月 23 日. 鹿児島大学 (鹿児島市) (ポスター発表)

木村圭, 外丸裕司. バクテリア存在下で誘導される、珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* のウイルス抵抗性. 日本プランクトン学会ベントス学会合同大会 2013 年 9 月 28 日. 東北大学農学部 (仙台市) (口頭発表)

〔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

珪藻ウイルスの生態学的研究

http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Virus/index.html

[s/index.html](http://feis.fra.affrc.go.jp/keisou_Virus/index.html)

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・環境保全研究センター
有害・有毒藻類グループ・主任研究員

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: