

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292101

研究課題名(和文)海産珪藻の死滅・減衰を巡る生態過程の徹底解明 - 物理・化学的制限要因とウイルス感染

研究課題名(英文) Effects of physical, chemical factors and viral infections on decreasing for marine planktonic diatom

研究代表者

外丸 裕司 (Tomaru, Yuji)

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：10416042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物プランクトン的一种である珪藻は、地球規模の物質循環において重要な位置を占めている。本研究では、生態学的に重要な珪藻種(キートセロス)を用い、海洋表層における死滅・減衰要因と、その詳細過程に関する基礎的知見を収集することとした。当該珪藻の基本的な生理学的特性把握実験(ウイルス接種実験含む)や各種沈降実験を行った結果、本種の減衰要因として、窒素制限が大きな割合を占める可能性が示唆された。また、現場調査の結果、珪藻個体群の減衰にウイルスが何らかの影響を与えている可能性が考えられた。今後、本課題で得られた知見を基に、現場における珪藻の死亡が多角的に理解されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Diatom is one of significant primary producers in marine environments. In this study, we focused on the effects of physical, chemical and viral factors on the decreasing of *Chaetoceros tenuissimus* which is an ecologically important diatom species in Japanese coastal waters. Using culture based physiological studies under various environments including light, salinity, nutrients and viral infections, we examined the relationships between ecological factors and diatom cell decreasing/death. Furthermore, we tested the downward flux of the cells under nutrient deficiencies. The results showed that the most important factor on the cell decreases or death would be nitrogen deficiencies. Other factors tested in this study would be relatively moderate.

研究分野：微細藻類生態学

キーワード：珪藻 死滅 ウイルス 光 栄養塩 沈降

1. 研究開始当初の背景

植物プランクトン的一种である珪藻は、地球上の一次生産の約 20%を担う巨大な生物群であり、地球規模の物質循環において重要な位置を占めている。そのため珪藻個体群の精確な挙動把握は、水産学的にも生物地球科学的にも重要な課題となっている。珪藻は短期間に盛衰を繰り返すが、これまでの珪藻の挙動に関する研究では、主にその増殖過程が注目されていた。一方、珪藻の減衰は動物プランクトンによる捕食や自然死、そして沈降によって起こると考えられているが、それらに関する研究例はきわめて少なく、実際に現場で起こる珪藻の減少を十分に説明するには至っていない。近年の珪藻全ゲノム解析の結果、細胞の自殺 (= プログラム細胞死 [PCD]) 等の、珪藻の死滅に関わる様々な問題が解明されてきたように見えるが、それらは自然界では現存量の少ない珪藻種を使用した、分子生物学レベルの理解に留まっている。未だ多くの謎に包まれている珪藻の死滅過程 (ブラックボックス) は、海洋学における最も大きな未解決問題の一つであるといえる。以上のような観点から、現在、生態学的に重要な珪藻種を用いた「物理・化学・生物学的死滅要因と、その詳細過程」「生理状態と沈降による減衰」に関する定量的知見の重要性が増している。

2. 研究の目的

海洋の最重要基礎生産者である珪藻の挙動解析は、地球上の物質循環システムを理解する上で必要不可欠である。過去の研究により、珪藻の増殖に関わる諸要因は解明されつつあるが、その死滅要因や減衰過程はほとんど未解明のままである。そこで本課題では、水圏生態学分野の最大のフロンティアである「珪藻の死滅に関わる生態過程」の徹底解明を目指す。申請者らは、長期に亘る室内実験・現場調査の結果に基づき、珪藻の死滅・減衰の重要過程に物理・化学的増殖制限要因ならびにウイルス感染が複合的に関与する可能性を抽出するに到った。本課題では、この作業仮説を様々な角度から解析し、珪藻の死滅・沈降プロセスを包括的に解明することを目的とする。珪藻の生死を巡る定量的知見は、海洋生態系の構造と物質循環に関する理解を飛躍的に向上させるものと強く期待される。

3. 研究の方法

本研究課題では海洋生浮遊珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* をモデルとして用い、ウイルス感染の実験には CtenRNAV type-II を主に用いた。

物理・化学環境条件が珪藻の死滅に与える影響：光環境ならびに栄養環境と珪藻の増殖速度との関係を明らかにするため、基本的な増殖特性ならびに生理学的特性把握実験を行った。また、珪藻を生細胞と死細胞とで区

別しつつ、高効率にカウントするための取組を実施した。さらに、それらの基本的情報を基に、塩分環境が急激に低下した場合の珪藻個体群の挙動を追跡した。

ウイルスによる死滅速度の解明：上記の塩分環境を急激に変化させる実験に平行して、ウイルスが存在している場合を想定した実験を行った。

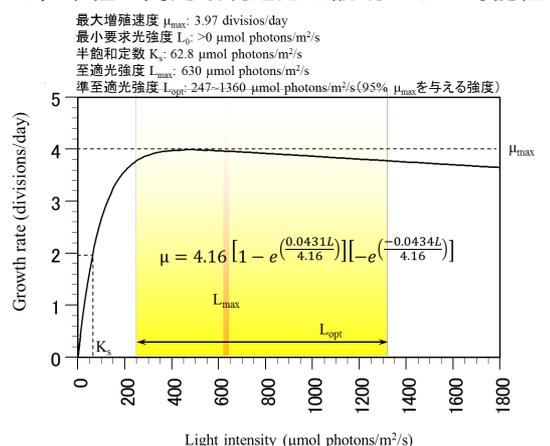
死滅・沈降関連シグナルの検出手法開発：モデルとしている珪藻 *C. tenuissimus* の全ゲノムについて次世代シーケンサーを用いて解析することにより、遺伝子レベルでの実験を行うための基盤構築を行った。

生理状態と沈降速度の解析：リンならびに窒素欠乏時におけるモデル珪藻の沈降速度を、筒型の培養装置を用いて測定した。

現場モニタリング
有明海における *C. tenuissimus* と本種感染性ウイルスの挙動に関する調査を行った。

4. 研究成果

C. tenuissimus と環境変動の関係を精査するにあたり、これまでに知見が収集されていなかった基本増殖環境要因として、光環境に関する実験を行った。その結果、本種は 20 環境下では 1~5 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の光があれば、最大増殖速度の 1~5%で有意に増殖可能であり、光強度 250 ~ 1360 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であれば、最大の増殖速度を有意に維持可能であると判断された。そのため本種は自然界において、表層~中層に存在しているものと推察される。また、光強度 1650 ~ 2000 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ でも最大増殖速度の 90%を推定維持可能であることから、炎天下の表層環境でも活発な分裂をするものと推察された。また、光強度依存的に細胞当たりのクロロフィル量が変化することからも、本種の高光環境適応も説明できる可能性



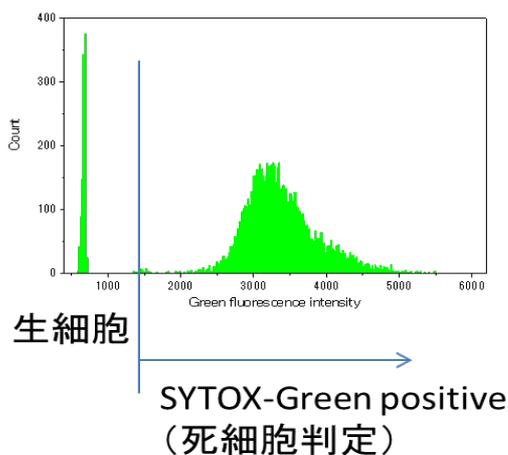
があると考えられた。

当該珪藻の栄養要求生を明らかにするための半連続培養実験を実施したところ、次の結果が得られた。N 制限培養で当該珪藻は、最大増殖速度 0.678 /day ならびに最小細胞内含量 72.0 fmol-N/cell、そして P 制限培養では最大増殖速度 0.806 /day、最小細胞内含量 1.51 fmol-P/cell であった。このこ

とからは、本珪藻は、非常に小さい最小細胞内リン含量を有しており、リン制限環境にきわめて強いと考えられた。一方、42.7という高い NP 比は、彼らの窒素要求量が高いことを意味する。総合すると本珪藻は窒素制限に陥りやすい、あるいは最終的に窒素制限になる可能性が高い。したがって、彼らの死滅には窒素の欠乏が強く影響すると考えられた。また、本珪藻の細胞内含量依存型の増殖速度と硝酸・リン酸輸送体の発現との関係を qPCR により解析した結果、N 制限では硝酸輸送体がリン酸輸送体よりも相対的にたくさん発現し、P 制限では逆になることが明らかとなった。このような栄養塩利用戦略によって、本珪藻は栄養塩の減少にともなう衰退に抗おうとしつつ、増殖と死滅を繰り返しているものと推察された。

生・死細胞のカウント効率化に関する検討

珪藻 *C. tenuissimus* の生細胞ならびにアルデヒド系試薬で固定した細胞（死細胞）を SYTOX-Green で染色し、Tali®イメージベースサイトメーター（IBC）を用いて、SYTOX-Green 染色陽性細胞（死細胞）ならびに陰性細胞（生細胞）を検出するための染色処理法を最適化した（下図）。その結果 IBC による珪藻生細胞の計数値は $10^4 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$ において顕微鏡による計数値とほぼ一致した。また死細胞を区別して計数することに成功した。本測定手法は以下の実験で使用した。

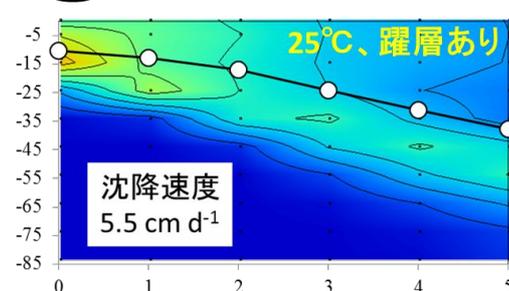


塩分 30 で培養していた *C. tenuissimus* について、塩分を急激に 28, 25, 23, 20, 15, 10 に下げた場合の個体群の変動を追跡した。併せて、ウイルス接種の有無についても検討した。ウイルス接種が無い場合、塩分が 30 20 までは、生細胞に対する死細胞の割合は対照区（30 30）と明確な差は見られなかった。一方、塩分 30 15 の場合、塩分変化後 1 日目までは生細胞数に対する死細胞数の割合が対照区（0-0.1%）に対し、実験区で（0.9-0.68%）上昇していた。さらに塩分 30 10 の環境では、その値は実験期間中を通して 1.24-4.04%と、対照区の 100 倍程度高く推移していた。このことから、本種は塩分 30

からの塩分変動に対する耐性は比較的強いことが予測されるが、塩分 10 まで急激に低下すると、平常時よりも死亡率が 100 倍程度高まることが予測された。一方、塩分が急激に変化する際にウイルスが同時に存在した場合、塩分変動の影響によってウイルス感染による死亡が促進される可能性については明確な結果が得られなかった。具体的には、塩分が 20 以下になった場合、生産されるウイルス量は対照区と比較して約 10%以下になる傾向が観察されたものの、統計学的に有意な差を得ることは出来なかった。塩分の希釈によってウイルス感染の影響は弱まる可能性については検討の余地があると思われる。環境変動とウイルス感染に関しては、その他の要因も含め、引き続き検討していく必要があると判断された。

死滅・沈降関連シグナルの検出手法開発として、本小課題では珪藻の細胞外に滲出する多糖類などの検出も想定して調査研究を進めていたが、遺伝子発現との関連性を考慮した基盤情報が不可欠であると判断し、本種の全ゲノム情報の収集を優先して実施した。本種のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解読を行った。また、得られた結果についてシーケンスのアッセンブル（つなぎ合わせ）ならびに遺伝子の特定と機能推定を実施した。その結果、本種のゲノムサイズは約 30Mbp であり、遺伝子数は約 1.4 万である事が明らかとなった。これは珪藻で先行的に全ゲノムが公開されている他種と似ていた。遺伝子の機能推定においても、各種栄養制限がかかってきた場合に強く発現すると予測される多くの候補遺伝子を抽出する事に成功した。

栄養制限のかからない完全培地で培養していた *C. tenuissimus* の沈降速度を、高さ 85cm の大型筒を用いて 5 日間に亘って測定した。その結果、本種の沈降速度はきわめて遅く、一日あたり 5.5cm 程度であることが明らかになった。リン欠乏培養を行った本種を用いて同様な実験を行ったが、顕著な沈降速度の増加は確認でき



なかった。そこで、沈降速度の評価方法を検討し、SETCOL法を用いて再度本種の沈降速度を評価することにした。その結果、リン欠乏のみならず窒素欠乏においても、本種の沈降速度はほとんど変化しないことが明らかとなった。このことから、自然環境下では今回検討出来ていない要因によって、死にかけまたは死亡個体が効率的に沈降していく場合があるものと考えられた。

2015年4月～2016年3月の有明海の水柱を対象として、当該珪藻の現存量と本種感染性ウイルスの出現状況を調査した。その結果、当海域において本種は最高で数万細胞/mlのブルームを形成するものの、感染性ウイルスの出現は確認できなかった。ただし、これまでの調査結果では、底泥中に本種感染性ウイルスが検出されている。このことから、有明海では本種感染性ウイルスは極めて低い密度で存在し、珪藻に死亡をもたらしている可能性が推察された。水柱に存在するウイルスが極めて低い濃度であったとしても、珪藻個体群内では何らかの感染イベントがあり、死亡が発生しているものと思われる。今後、本課題で得られた知見を基に、現場における珪藻の死亡が多角的に理解されることが期待される。

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 14件)

Tomaru Y, Kimura K, Yamaguchi H (2014) Temperature alters algicidal activity of DNA and RNA viruses infecting *Chaetoceros tenuissimus*. *Aquat Microb Ecol*, 73: 171-183.

<https://doi.org/10.3354/ame01713>

Kimura K, Tomaru Y (2014) Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. *Aquat Microb Ecol*, 73:69-80. <https://doi.org/10.3354/ame01705>

Kimura K, Tomaru Y (2015) Discovery of two novel viruses expands the diversity of single-stranded DNA and single-stranded RNA viruses infecting a cosmopolitan marine diatom. *Appl Environ Microbiol*, 81(3): 1120-1131. doi:10.1128/AEM.02380-14.

Tomaru Y, Kimura K, Toyoda K (2015) Marine diatom viruses and their hosts: Resistance mechanisms and population dynamics. *Perspectives in Phycology*, DOI: 10.1127/pip/2015/ 0023.

木村圭, 外丸裕司 (2015) 海洋真核性微細藻類ウイルスの現状と生態学的研究. ウィルス, 65: 37-45. doi.org/10.2222/jsv.65.37

外丸裕司, 木村圭 (2015) 珪藻ウイルスの生態学 ~ ガラスの鎧を持つ生物に感染するウイルス ~. *生物の科学 遺産*, 69: 284-289.

Tomaru Y, Kimura K (2016) Rapid quantification of viable cells of the planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* and associated RNA viruses in culture. *Plankton & Benthos Research* 11: 1-8.

<http://doi.org/10.3800/pbr.11.9>

山口晴生, 早川由真, 関美紀, 足立真佐雄, 木村圭, 外丸裕司 (2016) 滅菌処理した表面微細凸凹寒天培地による有害赤潮藻類の培養. *藻類* 64, 89-93. http://sourui.org/publications/sorui/list/64_02.html

[学会発表](計 11件)

外丸裕司, ウィルスから見た珪藻の生態, 日本微生物生態学会若手交流会, 2014/10/21, アクティシティ浜松

Tomaru Y, Kimura K, Viruses infecting harmful bloom forming diatoms in western Japan. HAB2014, 2014/10/28, Wellington, NZ.

外丸裕司 他, 珪藻個体群はウイルス存在下でも直ちに崩壊しない, 日本海洋学会, 2015年3月24日, 東京海洋大学

外丸裕司, 木村圭, 豊田健介, 本邦沿岸域における海産浮遊珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* と本種感染性ウイルスの分布. 日本水産学会, 2017年3月27日, 東京海洋大学

[図書](計 2件)

Tomaru Y, Kimura K, Nagasaki K (2015) Marine protist virus (Chapter 20). *Marine protist*, pp. 501-517, Springer, Tokyo.

外丸裕司 (2015) 藻類の感染症「感染症の生態学(川端ら編)」pp. 159-168, 共立出版, 東京.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[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_Viruses/members_tomaru.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外丸 裕司 (TOMARU, Yuji)

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：10416042

(2)研究分担者

山口 晴生 (YAMAGUCHI, Haruo)
高知大学・自然科学系・准教授
研究者番号：10432816

紫加田 知幸 (SHIKATA, Tomoyuki)
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・研究員
研究者番号：40603048

(4)連携研究者

木村 圭 (KIMURA, Kei)
佐賀大学・低平地沿岸海域研究センター・
講師
研究者番号：30612676