

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12189

研究課題名(和文) 海洋深層viromeの萌芽的究明

研究課題名(英文) Large-scale distribution of virome along the thermohaline circulation

研究代表者

横川 太一 (YOKOKAWA, Taichi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員

研究者番号：00402751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋深層大循環(循環時間：1500年，循環距離：40000km)の始点(北部大西洋)から終点(北部太平洋)を構成する複数の水塊におけるウイルス組成(virome)解析を行い，海洋深層大循環に沿った系統組成の遷移とその動態メカニズムを明らかにすることを目的とした．北大西洋深層水塊中の9点，および中部太平洋深層水塊中の7点の試料のウイルス粒子由来DNAの配列解析を行ったところ，海洋深層生態系でのviromeの動態が確認された．この動態の解析結果により，海洋深層生態系における「viromeの動態メカニズム」および「細菌-ウイルス間の相互作用」の一端が明らかになった．

研究成果の概要(英文)：We examined the distribution pattern of viral communities of deep-water samples along the “Thermohaline circulation (transit time: 1500 years; distance: 40000km)” in the Atlantic and the Pacific. We used a novel viromic approach, which is a combination of flowcytometer-sorting technique and whole genome amplification, to produce dsDNA-enriched viromic libraries from a 1-mL water sample. Using this approach on the environmental samples, we managed to produce nine libraries from the Atlantic samples and seven libraries from the Pacific samples. All the libraries composed of 12 broad taxonomic groups. Taxonomic compositions among the samples were different and changed dynamically along the thermohaline circulation. Our data demonstrate that viral taxonomic compositions are useful parameters for examining the dynamics of viral communities and the host-virus system in the ecosystem of the deep ocean realm.

研究分野：微生物海洋学

キーワード：深海微生物生態 ウイルス組成

1. 研究開始当初の背景

海洋深層生態系におけるウイルス組成 (virome) 解析

海洋生態系に生息する細菌および、それに感染するウイルス (ファージ) は他の生物を圧倒する数で存在し (細菌: $10^3 \sim 10^6$ cells mL^{-1} , ウイルス: $10^4 \sim 10^7$ particle mL^{-1}), 様々な生態系プロセス (とくに物質循環や群集組成遷移) の主要構成因子として存在している。環境微生物 DNA 解析によって, 細菌の系統組成や, 様々な物質代謝に関わる機能が網羅的に明らかになる一方で, 細菌を宿主とするウイルスの系統組成解析はほとんど進んでいない。

海洋生態系におけるウイルス研究の遅れは, virome 解析に大量の試料 (数十リットル規模) が必要なこと, 他の生物由来とウイルス由来遺伝子の分画が技術的に困難であること, ウイルス由来遺伝子のみをターゲットとした増幅が難しいこと, 得られる遺伝子配列が未知 (既存のデータベースにない) のものであることなどに起因している。さらに, 試料採取の機会が極端に少ない海洋深層生態系に関しては, 深層生態系自体がウイルスの巨大プールであることは確認されているが, 生態系内で起きているウイルスと宿主との相互関係, ウイルスの系統組成や, その動態などの解析が進んでいないのが現状である。

海洋生態系における微生物群集の機能に関する観測・研究により, 海洋深層における細菌群集の生物量および活性の大洋スケールでの分布が明らかにされ始めている^{1), 2), 3)}。これらの研究は, 深層における細菌群集が時空間的に大きく変動することを明らかにしてきた。さらに深層における細菌-ウイルス間の量的関係が深度とともに大きく変化していることも明らかになっている^{1), 3)}。これらの知見をもとに海洋深層大循環における virome 解析をすることによって, 細菌とウイルスの関係, ウイルス系統組成の遷移とその機構を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

現地球環境における最も大きな水塊輸送過程「海洋深層大循環 (循環時間: 1500 年, 循環距離: 40000km)」における, ウイルス組成 (virome) 解析が主目的である。海洋深層大循環の始点 (北部大西洋) から終点 (北部太平洋) を構成する複数水塊の中央部および境界領域における virome 解析を行い, 海洋深層大循環に沿ったウイルス組成の遷移とその動態メカニズムを解析する。海洋生態系においてウイルスの圧倒的な数的優占 ($10^4 \sim 10^7$ mL^{-1}) が確認されているが, その組成については未解明の部分が多い。とくに海洋深層 (深度 1000m 以深) における, その密度および組成動態のメカニズムは依然として不明である。

本研究では, ほとんど観察が行われてこなかった深層生態系の virome 解析に挑戦した。本研究グループは世界のどの研究グループも追従ができない, 非常にユニークな試料をすでに保有しており, その試料解析に主眼を置いた。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

試料は, 海洋深層大循環の全移動域をカバーする, 2 つの大西洋縦断航海 (GEOTRACES1 & 2, 2010 年 (北緯 65 度から赤道までの西部北大西洋), GEOTRACES3, 2011 年 (赤道から南緯 49 度までの西部南大西洋), Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ) 主催) および 2 つの太平洋縦断航海 (KH13-7, 2013 年, (西経 170 度線上の赤道から南緯 40 度まで), KH14-3 航海, 2014 年 (西経 170 度線上の北緯 70 度から赤道まで) 東京大学大気海洋研究所主催) において得られたものを使用した。試料は水温・塩分・深度計を搭載したニスキンロゼッタサンプラーによって深層の任意の深度から採取された。2mL の試料をグルタルアルデヒド (最終濃度 1%) で固定し, -80 度冷凍庫で解析まで保存した。

(2) ウイルス粒子の分取・核酸の増幅・シーケンス・データ解析

ウイルス粒子の分取および核酸の増幅は, Martinez Martinez et al. (2014)⁴⁾ に記載の方法と同様に行った。概略を次に示す。グルタルアルデヒドで固定した試料を解凍, TE バッファー (Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0) で希釈したのち, 二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光染色剤 (SYBR Green I, Molecular Probes) を用いて, 試料中のウイルス粒子を染色した。染色した試料はフローサイトメータを用いて分取した (Influx (BD Biosciences), JJ MacIsaac Facility for Aquatic Cytometry, at Bigelow Laboratory for Ocean Sciences)。一試料につき約 5000 の SYBR Green I で染色されたウイルス粒子を分取した。試料毎に分取されたウイルス粒子を溶菌したのち, GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification (WGA4) Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いてウイルス粒子由来の核酸の増幅を行った。増幅産物を Illumina MiSeq platform (San Diego, CA, USA) をもちいて配列決定を行った。得られたデータは, 主に Winter et al. (2014)⁵⁾ に記載の手法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

本研究では, ウイルス生態の研究がまだほとんど行われていない海洋深層大循環経路において複数の異なる地点, 深度において virome 解析を実施することに成功した。また今回の virome 解析には, 少量 (1 ミリリット

ル) 試料解析の新手法を適用した。必要試料量の大幅な縮小化(数十リットル→1ミリリットル)により、申請者研究グループの微生物試料アーカイブを用いた virome 解析が可能となった。本研究で成功した必要試料量の縮小化は、試料採取作業の時間的・工率的効率化、および観察対象の時空間的高解像度化に資する技術であると考えられる。

北大西洋深層水の9点(いずれも水深2500m)、および中部太平洋深層水の7点(4300m~5300m)の試料はいずれも、フローサイトメータの解析により、粒子あたりのDNA含有量の異なる2つのサブグループとして識別することができた(図1)。全試料からこの2サブグループをそれぞれ分取し、シーケンス解析を行った。

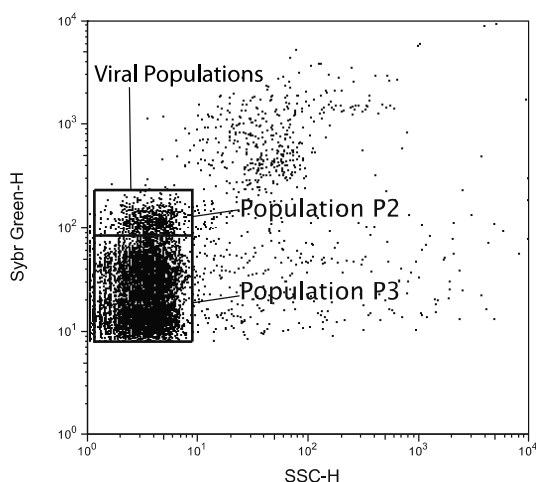


図1. フローサイトメータを用いたウイルス粒子解析図。縦軸はDNA蛍光色素(SyberGreen I)に由来する蛍光値、横軸は粒子サイズと比例関係にある側方散乱光値。大枠で囲った部分がウイルス粒子、全サンプルにおいて、DNA蛍光値の異なる二つのサブグループを確認した。DNA蛍光値の高いグループをPopulation P2、DNA蛍光値の低いグループをPopulation P3とした。

各試料から得られたシーケンス結果を元に各サブグループに属するウイルス粒子の系統解析およびウイルス叢解析を行ったところ、得られたシーケンスのうち、2%から30%(average ± SD: 12 ± 7, n = 32)の配列の系統属性が判明した。優占する系統としては、dsDNA viruses, Caudovirales, Mimiviridae, Poxviridae, Phycodnaviridae, Iridoviridae, unclassified dsDNA phages, unclassified dsDNA viruses, unclassified bacterial viruses, ssDNA viruses, Microviridae, Virusesが示された。また、二つのサブグループPopulation P2, Population P3のウイルス系統組成は、いずれの試料においても異なることが明らかになった。

群集生態学解析法の一つである非計量多

次元尺度構成法(NMDS)を用いて各群集の系統組成を解析した結果、Population P2では、大西洋内でのウイルス組成が比較的類似しているのに対し、太平洋のウイルス組成はいずれのサンプル間でも類似度は低いことが明らかになった。一方で、Population P3は対象的なパターンを示し、太平洋内でのウイルス組成が比較的類似しているのに対し、大西洋のウイルス組成はいずれのサンプル間でも類似度は低いことが明らかになった。

以上の結果から、海洋深層生態系に存在するウイルス粒子群はDNA含有量の異なる2つのサブグループから構成され、そのサブグループは異なる系統群によって構成されていることが示された。また、そのサブグループ自体も特定の系統群によって占められているのではなく、空間的に遷移していること、さらに、その遷移パターンは太平洋・大西洋の二大洋間で異なることも本研究で初めて示された。この遷移パターンの解析により、海洋深層生態系における「ウイルスの動態機構」、「細菌-ウイルス間の相互作用」の一端が明らかになった。

<引用文献>

- 1) Yang Y, Yokokawa T, Motegi C, Nagata T (2014) Large-scale distribution of viruses in deep waters of the Pacific and Southern Oceans. *Aquat Microb Ecol* 71:193-202
- 2) Yokokawa T, Yang Y, Motegi C, Nagata T (2013) Large-scale geographical variation in prokaryotic abundance and production in meso- and bathypelagic zones of the central Pacific and Southern oceans. *Limnol Oceanogr* 58:61-73
- 3) De Corte D, Sintès E, Yokokawa T, Reinthaler T, Herndl GJ (2012) Links between viruses and prokaryotes throughout the water column along a North Atlantic latitudinal transect. *The ISME journal* 6:1566-1577, doi:10.1038/ismej.2011.214
- 4) Martinez J, Swan BK, Wilson WH (2014) Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. *The ISME Journal*. 8:1079-1088
- 5) Winter C, Garcia JAL, Weinbauer MG, DuBow MS, Herndl GJ (2014) Comparison of Deep-Water Viromes from the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea *PLoS ONE* 9(6): e100600. doi:10.1371/journal.pone.0100600

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 太一 (YOKOKAWA, Taichi)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋
生命理工学研究開発センター・研究員
研究者番号：00402751

(2) 連携研究者

山田 奈海葉 (YAMADA, Namiha)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・環
境管理技術研究部門・主任研究員
研究者番号：90435769

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