

平成 31 年 4 月 24 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14963

研究課題名(和文) 海洋に溢れる未知ウイルスの正体は珪藻ウイルスに寄生するウイルスか？

研究課題名(英文) Previously unknown marine ssDNA satellite viruses associating to diatom ssDNA viruses

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性浮遊珪藻に感染するウイルス様因子ChV83の解析を実施した。その結果、本因子は既知の珪藻ss(一本鎖)DNAウイルス(>30nm)ならびに、これまでに報告のない120nm程度のウイルス様粒子で構成されているものと推察された。各種解析から、小型ウイルス様粒子は、珪藻に感染する従来のssDNAウイルスに付随するサテライトウイルスである可能性が考えられた。またそれは、系統学的に珪藻ssDNAウイルスとは全く異なるグループに属していた。さらに別種のサテライト様ウイルスは、本邦海底泥中に通年にわたって感染可能な状態で存在している可能性が示唆された。今後、それらの生態学的役割を解明する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境メタゲノム研究は技術の発展とともに急速にデータが蓄積しているものの、次世代シーケンスに基づくウイルス様配列の正体は、現在全く理解されていない。本研究はそのような未知ウイルスに対して意味付けを行い、それらの海洋における重要性を評価するという観点できわめて重要な作業である。現在、海洋の珪藻研究は分子生物学と融合したフロンティア分野であり、海外からの注目も高い。新奇性が高く、生物地球科学的にも重要な成果が次々に生まれている分子珪藻学分野においても、今回発見した新種珪藻ウイルスの性状解明は大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the basic biological characters of a virus-like agent that infects the marine planktonic diatom *Chaetoceros debilis*. The virus-like agent was considered to be composed of a known diatom ssDNA virus (>30 nm in diameter) and a previously unknown smaller virus-like particle (VLP) (~20 nm). Based on the morphologic and genomic analysis, the smaller VLP was considered to be a satellite virus associating to the diatom ssDNA virus. Phylogenetic analysis for a putative capsid protein gene of the smaller VLP revealed that it makes monophyly with those of unrevealed environmental viruses, which is independent of the diatom ssDNA viruses. Furthermore, the satellite like agents that infectious to a different diatom species were detected from sediment pore waters in western Japan. These results might suggest the satellite viruses associating to the diatom ssDNA viruses are present in Japanese coastal waters as active agents, although their ecological roles are still unknown.

研究分野：海洋微生物生態学

キーワード：珪藻 ssDNAウイルス サテライト 沿岸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンス技術の発展は、海洋環境中には人知を越える膨大な量の未知ウイルスが存在していることを示してきた。これまでに DNA/RNA、1 本鎖(ss)/2 本鎖(ds)、環状/直鎖などの核酸タイプに基づき、様々な新種と思われるウイルス様配列が公のデータベース上に登録され続けてきた。その結果、現在では宿主不明・機能不明のウイルス様塩基配列がデータベース上に溢れかえっている。中でも近年、海洋における ssDNA ウイルスの多様性がきわめて高いことや、現存量がこれまでの想像を超えているなどの結果が、世界中の研究グループによって報告されている。一方、それらのウイルスが実際の海洋環境中で、どのような宿主とどのような関係性を持っているのか？その基本的な側面は全く明らかになっていない。現実的には正体不明のウイルスを海洋から分離・培養・機能解析する事はきわめて難しく、研究最前線におけるブラックボックスとなっている。ところがごく最近、正体不明のウイルスに該当する、複数の新種ウイルスが海洋環境から分離された。

2. 研究の目的

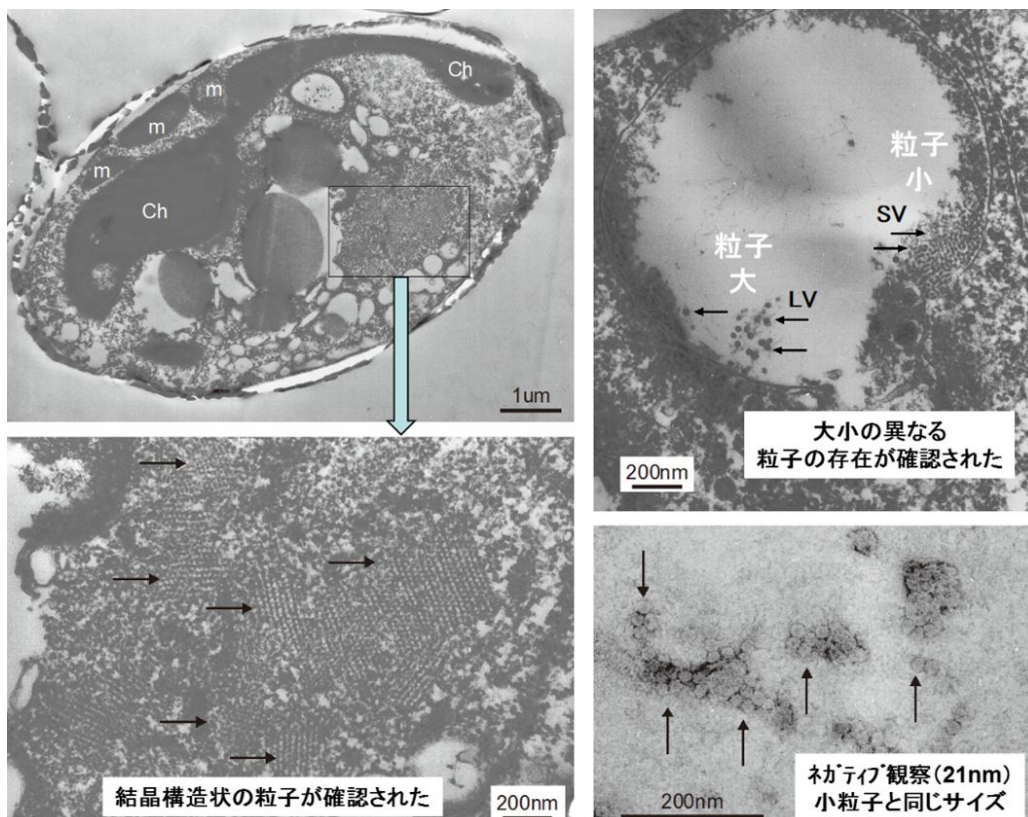
本課題担当者は海洋の重要一次生産者である植物プランクトン(珪藻)に感染する全く新しい複数のウイルスの分離に成功した。それらは ssDNA ウイルスであり、環境ゲノム由来の未知ウイルスグループに属すること、さらにウイルスに寄生するウイルスである可能性が示唆されている。本研究ではそれらのウイルスの性状を明らかにすることにより、未知の環境ウイルス配列で占められている系統のウイルス群について、実際の生態学的役割が何であるかを考察することを目的とする。

3. 研究の方法

珪藻 *Chaetoceros debilis* (キートセロス・デビリス) に感染し、最終的に溶藻させるウイルス様因子 (ChV64, 83) につて、各種顕微鏡や分子生物学的手法ならびに培養実験を通して形態学的・遺伝学的性状の解析を行った。また、*Chaetoceros tenuissimus* (キートセロス・テヌイシマス) に感染する ssDNA に付随していると推定されるサテライト DNA ウイルスの配列を基に作製したプライマーを用いて、環境中からの当該配列の検出を試みた。

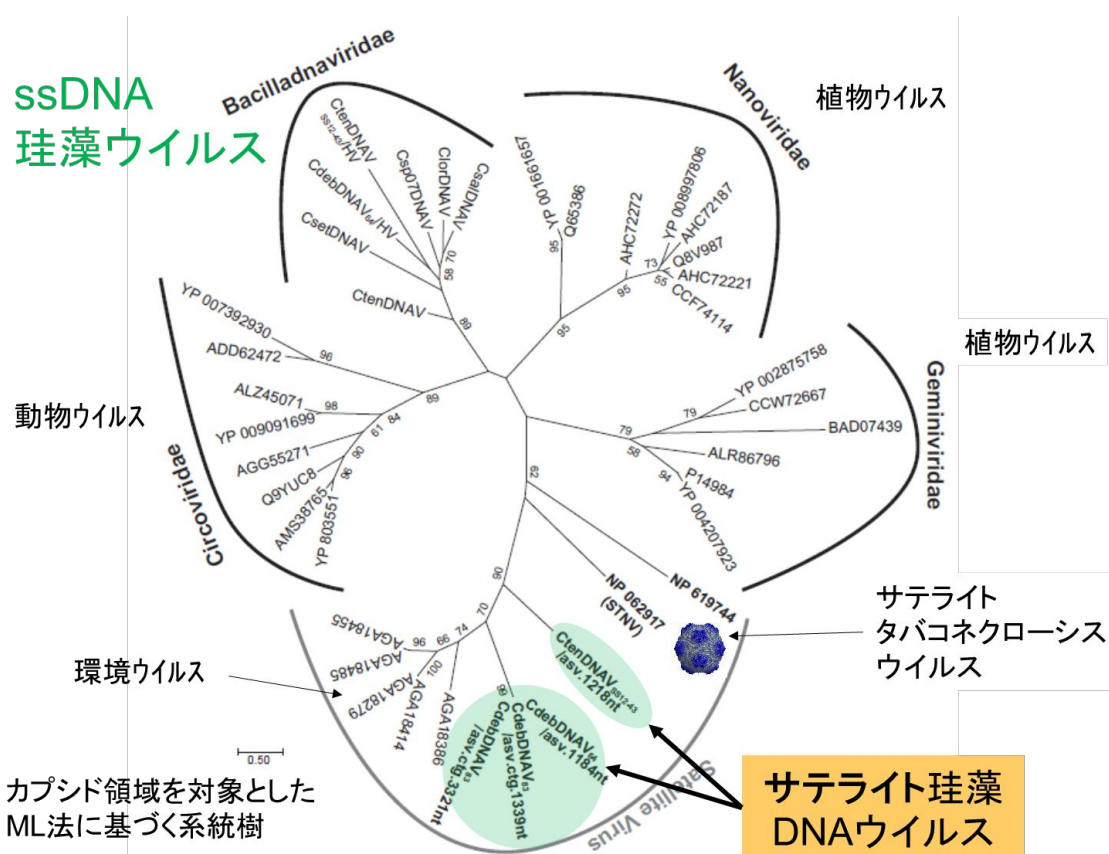
4. 研究成果

海洋性浮遊珪藻キートセロス・デビリスに感染するウイルス様因子 ChV83 の解析を実施した。本ウイルスを宿主培養に接種すると、宿主の崩壊は約 2 週間後に起きた。宿主の溶藻は、多くの珪藻ウイルスによる死滅と比較して緩慢であると思われた。次に大量培養したウイルス粒子について、電子顕微鏡を用いてネガティブ染色観察したところ、21nm 程度の粒子が観察された(下図右下)。また、ウイルス感染した細胞の切片を観察すると、大小 2 種類の異なるウイルス様粒子が観察された(下図右上)。そのうち小型のウイルス様粒子は、ネガティブ染色像の粒子と概ねサイズが等しかった。



本ウイルスのタンパク質を、SDS 電気泳動法を用いて解析したところ、26-28kDa のバンドが確認された。回収したウイルス粒子からゲノムを抽出して電気泳動を実施したところ、約 1.2kb ならびに 0.7kb 付近に計 2 本のバンドが観察された。さらに大量にゲノム抽出を行った時には、上記 2 本のバンドに加えて 5-6kb 付近に比較的薄い 2 本のバンドが確認された。以上の観察結果は、これまでに知られている CdebDNAV の溶藻パターン、粒子サイズ等とは異なっていた。さらに電子顕微鏡観察で 2 種類の粒子が観察されたことや、ゲノムの電気泳動パターンが既知のものとは異なることから、解析したウイルス様因子は、本種に感染する従来の ssDNA ウイルス CdebDNAV (粒径 38nm) を含むが、それ以外の因子も同時に存在している可能性、すなわちサテライトウイルスが存在しているが可能性が推察された。

海洋性浮遊珪藻キートセロス・デピリスに感染するウイルス様因子の別株 (ChV64) の塩基配列解析を実施した。次世代シーケンシングに供するに十分な核酸が得られなかったため、ランダム PCR による増幅とサンガーシーケンスを用いて解析を実施した。その結果、ChV83 に含まれるサテライトウイルス様配列と相同な配列が検出された。また、この配列には他の RNA ウイルスに付随するサテライトウイルスのカプシドタンパク質と相同な配列が含まれることが明らかとなった。さらに、系統解析を行った結果、本課題で得られたサテライトウイルス由来のカプシドタンパク質と植物 RNA サテライトウイルスのそれとが単系統を成した (下図)。このことはカプシドタンパク質を基準として、サテライトウイルスは他のウイルスグループと独立していることが推察された。



現場環境に含まれる *Chaetoceros tenuissimus* に感染する ssDNA に付随していると推定されるサテライト DNA ウイルスの検出を目的とした実験を行った。広島湾から採取した泥について、等量の海水培地と混合攪拌した後、遠心分離を行った。上清を 0.2 μ m フィルターで濾過した後、0.5mL からキアゲン社製 DNA 抽出キットで核酸の回収を行った。キートセロス・テヌイシマスの死滅誘導に関連すると思われるウイルス様因子から分離されたサテライト DNA 様因子の配列を基に、カプシドと推定される遺伝子領域約 700nt を対象として増幅させるプライマーセットを構築した。上記により準備した核酸抽出物 28 サンプルを対象として PCR によって核酸増幅を試みたところ、目的とする配列の増幅は見られなかった。PCR によって配列が抽出できない原因として、サテライトウイルス様因子の存在がきわめて低密度である可能性が考えられたため、濾過した底泥間隙水中の因子を宿主珪藻に感染させ、増幅が見込まれる段階で藻体ごと回収し、その総核酸から PCR を行うというトライアルを実施した。その結果、複数のサンプルから目的サイズのバンドを得ることが可能となった。PCR で確認された 600-700bp 程度のサイズのバンドは全て切り出し、クローニング後に配列確認を行い目的配列の有無を確認した。その結果、年によって出現時期の傾向は異なるものの、サテライトウイルス様因子は約 40%の

サンプルから検出された。今回の実験は結果的に宿主細胞内での核酸の増幅を経ていることから、泥中の感染可能な状態にあったサテライトウイルス様因子を検出していることになる。約4割という高頻度で泥中から感染可能なサテライトウイルス様因子が検出されたことは、当該因子が沿岸生態系内で実際に機能している事を示唆している。以上の結果から、珪藻に感染するDNAウイルスには、それに随伴して自己複製をしているサテライトウイルス様因子が存在し、沿岸生態系内では感染力を保った状態で泥中に保存されている可能性が推察された。

以上のことから、珪藻に感染するssDNAウイルスには、それに付随するサテライトウイルスと思われる因子が存在することが明らかになった。またそれらは、系統的に珪藻ssDNAウイルスとは全く異なるグループに属しているものと推察された。これまでに環境配列から形成されていた未知のウイルス集団は、植物プランクトンに感染するssDNAのサテライトウイルスである可能性が高まった。また、サテライトウイルスは海底泥中に感染可能な状態で本邦沿岸に存在しているものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tomaru Y, Toyoda K, Kimura K. Occurrence of the planktonic bloom-forming marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier and its infectious viruses in western Japan. *Hydrobiologia* 805(1): 221-230 (2018). DOI:10.1007/s10750-017-3306-0

〔学会発表〕(計3件)

Tomaru Y, Kimura K. Effects of temperature and salinity on virus-mediated diatom cell death. 15th International Congress of Protistology (国際学会), 2017年8月

外丸裕司、豊田健介、木村圭. 海産珪藻 *Chaetoceros debilis* に感染するDNAウイルスの性状に関する再検討. 平成30年度日本水産学会春季大会, 2018年3月

外丸裕司、豊田健介、木村圭. 珪藻に感染するウイルスに感染しているサテライトウイルスの発見. 日本藻類学会第42回仙台大会, 2018年3月

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 木村 圭

ローマ字氏名: Kimura Kei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。