

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H00956

研究課題名（和文）地球レベルの基礎生産を担う珪藻の「ウイルス感染死を介した」ブルーム維持戦略の解明

研究課題名（英文）Maintenance of diatom bloom by 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・水産技術研究所(廿日市)・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） 34,700,000円

研究成果の概要（和文）：海洋生態系の土台を形成している植物プランクトン的一种である珪藻が、感染性ウイルス存在下でも個体群を維持可能な（両者が共存する）現象を明らかにするための実験を行った。その結果、珪藻は分裂速度が速いほどウイルス感染によって死滅しにくく、遅くなるほど感染死しやすいことが明らかになった。以上から、分裂の遅い細胞はウイルス感染によって個体群から排除される一方、分裂の早い細胞が個体群を維持していると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻が全地球上の海洋生態系ダイナミクスを理解する大きなカギになっていることが、近年の研究によって明らかにされつつある。ところが、何故、珪藻はウイルスが存在しても長期ブルームを維持出来るのか？についての全貌は十分に理解されているとは言い難い。我々の研究は、珪藻が分裂不調な細胞はウイルスで速やかに殺し、それら細胞遺骸を珪藻自身の強力な酵素で分解、栄養塩として再利用する、という一連の流れを示唆した。本研究結果に基づき、海洋珪藻の全く新しい生態戦略「ウイルス感染死を介した珪藻のブルーム維持戦略」という独創性の高い仮説が支持された。

研究成果の概要（英文）：We conducted an experiment to clarify the phenomenon in which diatoms, a type of phytoplankton that forms the foundation of marine ecosystems, are able to maintain their populations even in the presence of infectious viruses. The results revealed that the faster growing diatom cells are less likely to be killed by virus infection, and the slower cells are likely to be killed. From the above, it was inferred that the slower growing cells are eliminated from the population by virus infection, while faster growing cells maintain the population.

研究分野：海洋微生物生態学

キーワード：珪藻

1. 研究開始当初の背景

地球上の様々な海域において、珪藻は数週間～数ヶ月にわたる大増殖（ブルーム）を維持することで、多様な生態系の土台を形成している。珪藻ブルームの生産力はきわめて大きく、全地球上一次生産の 20～30% に達するため、珪藻は食物連鎖を通じて人間社会にも深く恩恵をもたらしている。生態系を形作るほど巨大な力を持つ珪藻ブルームは、珪藻細胞の増殖と減衰のバランスで維持されるが、そのブルーム維持機構は未だ十分解明されていない。

過去 100 年間、珪藻の増殖に関わる生理生態が徐々に明らかにされた。一方、珪藻の動物プランクトンによる捕食、珪藻自身の海底への沈降など、珪藻の減衰に関わる研究も盛んに行われ、全体として“珪藻のブルーム維持機構”の理解が進んでいるように見える。ところが実際には、沈降や捕食だけでは珪藻個体群の減衰を定量的に説明できず、未だブルーム維持機構の統一見解は提示されていない。

このような背景の下、2002 年、我々は珪藻に感染するウイルスの存在を初めて報告した。それ以降、沿岸海中には様々な珪藻感染ウイルスが分布していることを示すとともに、ウイルスはフラスコ培養中の珪藻細胞に感染し、個体群を接種からほぼ数日で全滅させることを明らかにしてきた。これらの知見に基づき、天然海域における珪藻ブルームの強力な衰退要因の一つとしてウイルス感染の可能性を当初は予測した。このようなウイルスによる死滅現象は、他の植物プランクトン種でも観察されていたことから、我々の予測もそれらの事例に基づいていたと言える。

ところが、沿岸海域において「珪藻 vs. ウイルス」の関係を詳細に調べていくと、ウイルスが常に（殺滅能を有する状態で）存在する環境においても、2 ヶ月近くも珪藻個体群は一定の密度を維持していることが明らかになった。室内のフラスコ培養実験のように、ウイルスが珪藻を一方的に殺すのではなく、両者が共存していることが示唆されたのである。これにより珪藻増殖・減衰の根本的理解を変えざるを得ない問いかけが生じた。

2. 研究の目的

何故、珪藻は自身を殺すウイルスが存在しても長期ブルームを維持出来るのか？上記背景の下、一つの答えとして、珪藻は“逆に”「ウイルスに殺されることで」ブルームを維持する戦略を持つ可能性が浮上した。我々の予備調査は、珪藻個体群はウイルス感染に抵抗する術を持ちつつも、分裂不調な細胞はウイルスで速やかに殺し、それら細胞遺骸を珪藻自身の強力な酵素で分解、栄養塩として再利用する、という一連の流れを示唆した。本課題では、一連の過程を精密な培養実験等により検証し、海洋珪藻の全く新しい生態戦略「ウイルス感染死を介した珪藻のブルーム維持戦略」を提唱することを最終目的とする。

3. 研究の方法

「珪藻のウイルス感染死を介したブルーム維持戦略」を解明するため、現場環境を模した珪藻の無菌半連続培養系を構築した。この系を用いたモデル珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* (以下 Cten) と本種に感染するウイルス CtenDNAV または CtenRNAV の培養実験を行い、両者の関係について、フローサイトメータに基づく光学情報解析、遺伝子発現解析、メタボローム解析ならびに数理生態学的解析等を行った。また、本課題で使用したモデル珪藻の全ゲノム解析を行うと共に、それらの情報に基づいたウイルス感染細胞の直接検出技術の構築を試みた。

4. 研究成果

1) 本課題の遂行によって、主な研究成果として「珪藻のウイルス感染死は珪藻の増殖速度と密接に関係する」ことを明らかにした。実験には、本邦沿岸で頻りにブルームを形成する *Chaetoceros tenuissimus* (NIES-3715) ならびにそれに感染する CtenRNAV type-II ならびに CtenDNAV type-II を用いた。本珪藻の一日あたりの分裂回数が 1, 3 ならびに 5 回になるように、半連続培養の希釈率を 50%, 88%, 97% に設定した 3 つの系を用意し、培養が安定した日から毎日、ウイルスを最終感染単位 $10^7/\text{ml}$ になるように接種した (+V 区) (初期の $\text{moi} = \sim 10$)。対照としてウイルス非接種区 (-V 区) を設けた。その結果、CtenRNAV 接種区において、希釈率 88%, 97% 区においては、ウイルス接種を開始した翌日から概ね 6 日後まで珪藻の細胞密度は減少したものの、細胞数の減少が停止し、ウイルス存在下にもかかわらず対照区の半分程度の細胞密度が維持され続けた。さらに、希釈率 50% では、ウイルス接種後に細胞密度が急減少したものの直ぐに回復し、希釈率 50% かつウイルス常在下という条件で高い細胞密度を維持した。この事からは、珪藻個体群はウイルス存在下でも安定して増殖を維持させられる細胞レベルでのシステムを持つものと推察された。また、CtenDNAV 接種区においても同様に、珪藻の増殖速度が早くなるほどウイルス感染による珪藻の死亡率

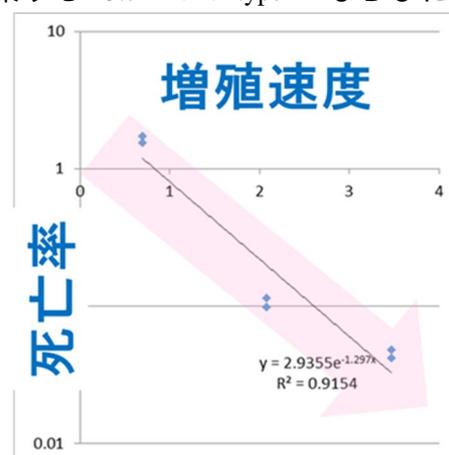


図 1 珪藻の増殖速度とウイルス感染による死亡率の関係

は低下する事が確認された。また各増殖速度で半連続培養中の珪藻はウイルス感染後一時的に減少するものの、最終的にはある一定の細胞密度でウイルスと共存する現象が観察された。これらの結果について増殖モデルに基づく数理生態学的解析を行ったところ、珪藻の増殖速度が速くなる程、ウイルス感染による死滅速度が減少する関係が確認された(図1 Tomaru *et al.* 2021 改変)。またこの時、細胞当たり生産されるウイルスの感染単位は、増殖速度が遅い程高くなる傾向が観察された。これらの結果に基づき、我々は次の仮説を構築した(図2)。「自然環境下の珪藻個体群は増殖速度を維持できなくなった細胞がウイルスに感染して死滅し、各種分解作用によって栄養塩として再び珪藻個体群に還元される。」これらの研究成果は、Tomaru *et al.* (2021) として発表した。

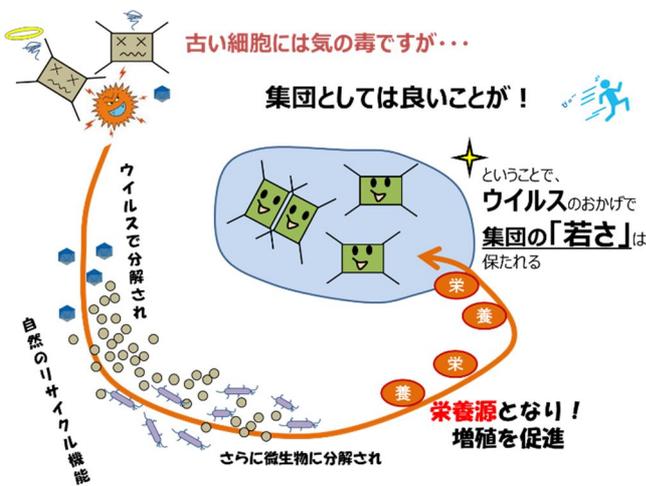


図2 珪藻とウイルス感染に関する仮説

2) 珪藻とウイルスとの関係を明らかにすることを目的として、本課題で実験に使用している珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* NIES-3715 の全ゲノム解析を実施した。その結果、半数体ゲノムサイズ約 41Mb の中に、感染性ウイルスがコードする replication-associated protein に相同な遺伝子断片(endogenous virus-like fragment, EVLF)が1 コピー挿入されていることを発見した。この EVLF は、国内の地理的分布の異なる他株についても同じ座位に挿入されていることが PCR 解析から明らかになった。また、株間で EVLF のアミノ酸配列が若干異なるもののウイルスの replication-associated protein との系統解析から *C. tenuissimus* の祖先株でウイルス遺伝子の挿入が起こったと推察された。どのようなメカニズムでウイルス遺伝子の挿入が起こったか、ゲノムにコードされるタンパク質のレポーターを既にゲノムが読まれている *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Fistulifera solaris* で比較したところ、逆転写ドメインを持つタンパク質コードの遺伝子が *C. tenuissimus* で多いことがわかった。さらに、ゲノム中の EVLF コード領域の両端には target site duplication (TSD)と言われる逆転写機能を有するレトロトランスポゾン的一种である Long interspersed element (LINE)が挿入した際に残す特徴的な配列が存在したことから(図3)、感染時にホストの LINE がウイルスの mRNA を逆転写して挿入を促したと考えられた。EVLF は低量ながら発現しているが、現代においてこういった役割があるか分かっていない。しかし、過去の挿入初期では EVLF の転写は RNA 干渉としてウイルスの複製を妨害していたかも知れない。こうしたウイルス遺伝子のゲノムへの挿入は進化歴において関係性が密であることを示した。この成果は論文 Hongo *et al.* (2021) として発表した。

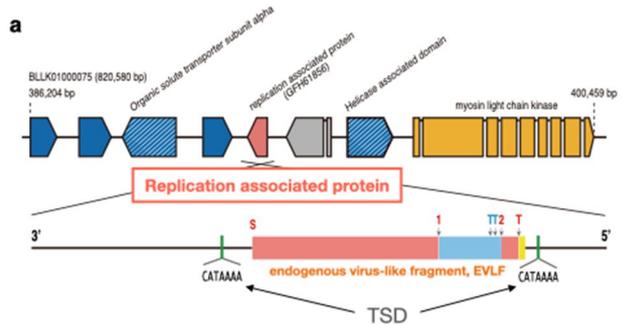


図3 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* ゲノムに挿入されていたウイルス配列 (Hongo *et al.*, 2021 改変)

3) 珪藻のウイルス感染時における生理代謝産物の変動を明らかにするため、先ずバックグラウンドとなる珪藻の増殖フェーズ毎のメタボローム解析を実施した。Cten 培養株を経時的にサンプリングし、メタボローム解析に供した結果、38 代謝物が培養細胞より検出された。さらに細胞内代謝物群の挙動は生理状態によって顕著に変動することが明らかとなった(図4)。特に、対数増殖期(2d,7d)にはアミノ酸が多く、糖類が減少する傾向にあり、定常期(13d,21d)ではその傾向は逆になった。これは、対数増殖期の細胞では増殖に多くのエネルギー源を必要とするため、細胞内の糖類は専ら消費されるとともに、タンパク質分解によるアミノ酸をエネルギー供給に援用していることが伺われた。一方、定常期の細胞では、エネルギー要求が対数期ほど高くないため、アミノ酸増産は抑えられ、光合成で合成された糖類も消費量が少ないために細胞内に

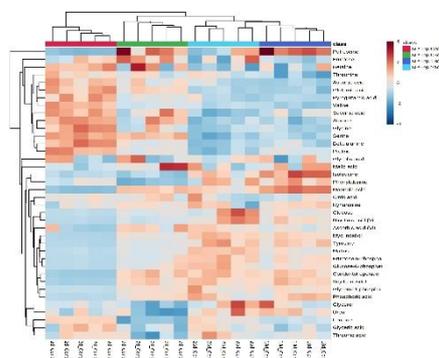


図4 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* のメタボローム解析に基づく代謝産物のヒートマップ

蓄積したものと考えられる。この研究成果は Hano and Tomaru (2023) に掲載された。

4) 栄養制限下でウイルスが珪藻個体群の遺伝子発現へどう影響を及ぼすかについて、ウイルス非感染区または感染区における通常栄養下と栄養制限下で比較する必要があった。これに基づき、まずウイルス非感染区におけるリン制限下の遺伝子発現の比較解析を実施した。リン制限下では増殖の定常期で細胞数や光合成能、リン酸エステル化合物を加水分解するアルカリフォスファターゼ(AP)活性に差が出てくるため、この時の遺伝子発現を比較した。リン制限によって、リン酸エステル化合物やリン酸ジエステル化合物、イノシトールに6つのリン酸が結合するフィチン酸などからリン酸を切り離す酵素群(AP, phosphodiesterase, and phytase)が高発現し、細胞外からリン酸を取り込むための輸送体(Pi-transporter)も高発現した。細胞内の代謝においては、リン脂質の合成から分解に動く酵素群の遺伝子発現が上昇し、葉緑体膜を形成するガラクト脂質の合成系における遺伝子発現が上昇した。一般的に植物では、リン制限下になると、細胞膜リン脂質のリン酸を使用するために分解が起こり、その代わりにリン酸を含まないガラクト脂質に置き換わっていくことが知られている。*C. tenuissimus* もこれと同様な現象が起きていることが推察され、リン制限下での基礎的な遺伝子発現の応答として論文(Hongo *et al.*, Gene, 2023)にて発表した。

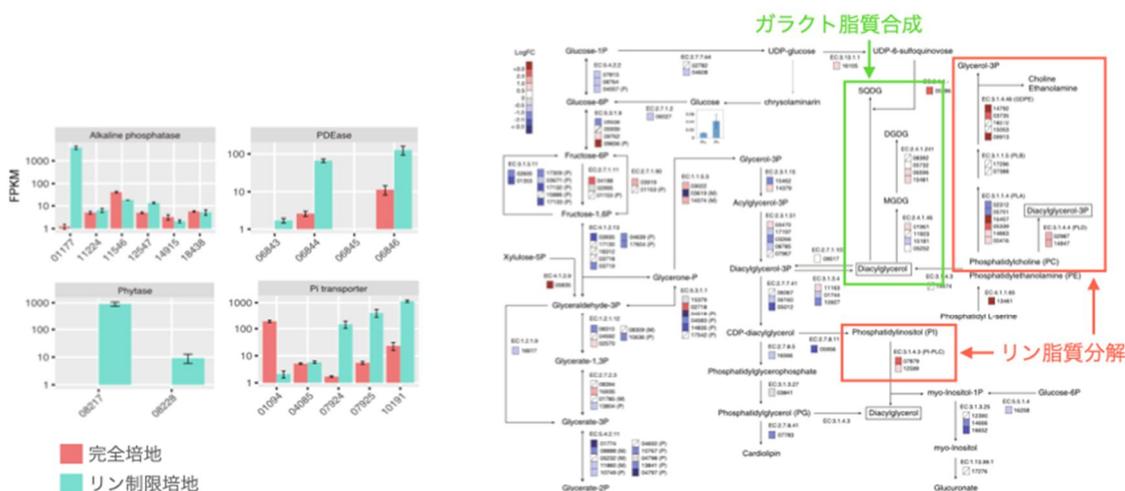


図5 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* のリン制限時における遺伝子発現。Hongo *et al.*, 2023 改変

5) ウイルス非感染区における窒素制限下の遺伝子発現の比較解析を実施した。この実験もリン制限下と同様、定常期でのサンプリングを実施した。窒素が制限されると硝酸/亜硝酸輸送体やアンモニア輸送体の発現上昇が確認でき、積極的な窒素源取り込みが行われていると予想された。

ウイルス感染区と非感染区の遺伝子発現を時系列で比較解析すると、DNAウイルス感染区では、DNA複製や修復、組み換えに関連する遺伝子群の発現が上昇し、RNAウイルス感染区では、オートファジーに関連する遺伝子群の発現が上昇した(図6)。

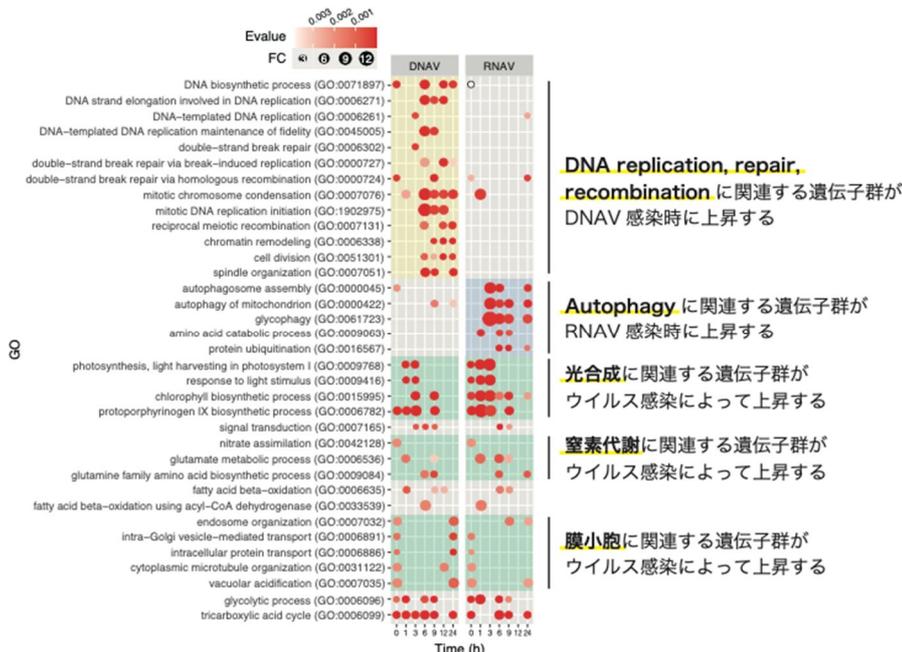


図6 珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* のウイルス感染時における遺伝子発現

スのゲノムは一本鎖環状 DNA の構造をとっており、ローリングサークル型の複製を行うと考えられ、宿主の複製機構を乗っ取って自身のゲノムを複製していると考えられた。一方で RNA ウイルス感染区では、DNA ウイルス感染区には見られない異物排除で働くオートファジー関連遺伝子群が上昇した。*C. tenuissimus* RNA ウイルスに近縁なポリオウイルスは、オートファジー膜を誘導し、その膜上で自身のゲノムを複製することが知られており、*C. tenuissimus* RNA ウイルスも同様の複製機構を行っていることが考えられた。これらの成果は、令和 6 年日本藻類学会第 48 回大会でポスター発表にて報告した。

上記成果の他、本課題では無菌自動半連続培養装置の構築を行い、概ね一定量の培地交換を定期的に一日一回自動で行う事に成功した。また併行して連続培養装置の構築にも取り組み、無菌条件での駆動が可能となった。また、本課題では培養個体群に占めるウイルス感染細胞の割合を直接的に検出する手法の構築に着手した。ウイルス接種された珪藻個体群の培養からセルソーターを用いて 1 細胞ずつ分離し、それら細胞のウイルス感染有無を qPCR 法で評価する手法の構築を試みた。その結果、培養液から 1 細胞を分離し、細胞の存在を検出できることが明らかになった。さらに、ウイルス感染したと思われる細胞の検出にも成功した。ただしウイルス感染の有無を評価するに当たっては、プライマーやプローブの調整など技術的検討が残るため、今後も引き続き技術の蓄積が必要と思われた。

引用文献

- Hano, T., & Tomaru, Y. (2023). Chronological age-related metabolome responses in the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*, can predict future bloom demise. *Communications Biology*, 6(1), 273.
- Hongo, Y., Hano, T., Yamaguchi, H., & Tomaru, Y. (2023). Transcriptional responses of the marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* to phosphate deficiency. *Gene*, 884, 147695.
- Hongo, Y., Kimura, K., Takaki, Y., Yoshida, Y., Baba, S., Kobayashi, G., ... & Tomaru, Y. (2021). The genome of the diatom *Chaetoceros tenuissimus* carries an ancient integrated fragment of an extant virus. *Scientific reports*, 11(1), 22877.
- Tomaru, Y., Yamaguchi, H., & Miki, T. (2021). Growth rate-dependent cell death of diatoms due to viral infection and their subsequent coexistence in a semi-continuous culture system. *Microbes and environments*, 36(1), ME20116.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Hano Takeshi, Tomaru Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Chronological age-related metabolome responses in the dinoflagellate <i>Karenia mikimotoi</i> , can predict future bloom demise	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04646-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hongo Yuki, Kimura Kei, Takaki Yoshihiro, Yoshida Yukari, Baba Shuichiro, Kobayashi Genta, Nagasaki Keizo, Hano Takeshi, Tomaru Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 The genome of the diatom <i>Chaetoceros tenuissimus</i> carries an ancient integrated fragment of an extant virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00565-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomaru Yuji, Yamaguchi Haruo, Miki Takeshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Growth Rate-dependent Cell Death of Diatoms due to Viral Infection and Their Subsequent Coexistence in a Semi-continuous Culture System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME20116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hano T, Tomaru Y	4. 巻 1128
2. 論文標題 Metabolomics-based approach to explore growth phase-dependent markers in cultured diatom <i>Chaetoceros tenuissimus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 121779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jchromb.2019.121779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本郷悠貴、外丸裕司、他
2. 発表標題 Integration of ssDNA fragment from an infectious virus in the genome of the diatom <i>Chaetoceros tenuissimus</i> .
3. 学会等名 Aquatic Virus Workshop 10
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外丸裕司
2. 発表標題 海の牧草を持続的に管理するウイルス
3. 学会等名 高知大学 研究拠点プロジェクト2020年度 公開シンポジウム海の恵みを享受するために（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomaru Yuji
2. 発表標題 Challenges for detecting diverse viruses infecting marine planktonic diatoms from coastal sediments
3. 学会等名 EastHAB2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 外丸裕司、長崎慶三	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1204
3. 書名 理科年表	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三木 健 (Miki Takeshi) (00815508)	龍谷大学・先端理工学部・教授 (34316)	
研究分担者	山口 晴生 (Yamaguchi Haruo) (10432816)	高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授 (16401)	
研究分担者	本郷 悠貴 (Hongo Yuki) (20737316)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産資源研究所(横浜)・研究員 (82708)	
研究分担者	羽野 健志 (Hano Takeshi) (30621057)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(甘日市)・主任研究員 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スウェーデン	ウプサラ大学			
フィンランド	ヘルシンキ大学			