

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06219

研究課題名(和文) カレニア・ミキモトイ殺藻ウイルスと宿主の間にある共存と対立の動的平衡の検証

研究課題名(英文) Examining the dynamic balance of coexistence and conflict between KmV and Dinoflagellate *Karenia mikimotoi*.

研究代表者

中山 奈津子 (Nakayama, Natsuko)

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：20612675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：有害藻類カレニア・ミキモトイに感染するウイルス(KmV)について、分離した3株のKmVは、感染型や宿主への感染時間が異なることが明らかになった。KmVの分子解析に向けた粒子回収および核酸抽出は極めて困難であったため、現在も進行中である。したがって、若干計画を変更し、遺伝子によらない方法である、ウイルス感染時にカレニア生体内で起こるであろう核の形態変化をモニタリングし、画像解析技術の確立を進めた。また、現場で起こりうる事象の一つであるUV照射がウイルス感染に及ぼす影響について検証実験を行った。その結果、UV領域の光照射によってKmV感染が促進されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有害藻類カレニア・ミキモトイ(*Karenia mikimotoi*)による赤潮は、規模や分布域を拡大し、日本の水産業に深刻な被害を与えている。数年前、カレニアを特異的に殺滅するウイルス(KmV)を、赤潮衰退期の海水から分離・培養することに成功したため、赤潮防除技術への利用が大いに期待された。ウイルスは、標的生物のみを殺滅し、爆発的に増えるので、大増殖する赤潮生物を連鎖的に死滅させることが可能であり、効率的かつ安全にカレニア赤潮を衰退に導くことができ得る。本課題で得られた成果は、赤潮防除技術開発の基盤となるだけでなく、新規藻類ウイルスの詳細はウイルス学の発展に資することも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Three isolates of the virus (KmV) infecting the Dinoflagellate *Karenia mikimotoi* were found to differ in infection type and time of infection of the host. Particle collection and nucleic acid extraction for molecular analysis of KmV has been extremely difficult and is still in progress. Therefore, we changed our plan slightly, and proceeded to establish an image analysis technique by monitoring the morphological changes of nuclei that would occur in vivo in *K. mikimotoi* during viral infection, a method that is not based on genes. In addition, we also examined the effect of UV irradiation, one of possible events in the field, on viral infection. The results showed that KmV infection was promoted by light irradiation in the UV.

研究分野：藻類ウイルス学

キーワード：カレニア・ミキモトイ KmV RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

有害藻類 *Karenia mikimotoi* (以下、カレニア) の大増殖によって起こる赤潮は、発生頻度が増加しているだけでなく、2015 年には北海道の函館湾で発生するなど、分布域が拡大している。したがって、日本の水産業への被害は甚大であり、赤潮発生機構の解明や予察技術の開発とともに、赤潮衰退時期の予測や赤潮防除技術の開発が喫緊の課題である。過去の研究より、同種赤潮は、天候悪化と大量の降雨、それに伴う栄養塩の流入、天候回復後の日射量増大と水温上昇などが続くと発生するなど、発生に関わる因子のいくつかは明らかにされている。しかしながら、形成された赤潮がいつまで続くのか、どのような要因で衰退していくのか、など赤潮形成期間に与える影響の要因や衰退のメカニズムは明らかになっていない。これには、物理、化学、生物学的な因子が複合的に関わっていると考えられるが、未だ要因の特定には至っておらず、中でも、捕食生物や競合生物との相互作用など、生物学的な影響については、ほとんど不明である。また、カレニアは、他種有害藻類と異なり、魚類や貝類の両方をへい死させるうえに、長期化する傾向があり、被害が広範になりやすく、近年最も対策が求められている種の一つである。しかしながら、本種の防除法に関する報告例はない。赤潮防除は、間接的な方法と直接的な方法が挙げられるが、モニタリングや予測に基づく生簀の移動や餌止めなど回避型、餌の改良や生簀の大型化などの環境改善型、直接法としては、粘土散布やウイルスや細菌を用いた方法があげられる。粘土散布は、現在実用化されている唯一の赤潮防除法であるが、対象種が限定されており、カレニアに対する効果はない。ウイルスなど天敵生物を用いた防除法は、申請者らが開発している、赤潮プランクトンヘテロカプサに対してウイルスを含む泥を利用した手法が唯一であり、現在、天然のヘテロカプサ赤潮に対して現場実証試験レベルで効果が得られている。したがって、本技術をカレニア赤潮に応用することにより、カレニアの増殖を制御できる可能性は十分にあると考えられる。申請者は、同種に感染するウイルスを、カレニア赤潮衰退期の海水から発見したことから、カレニア赤潮の衰退にウイルスが関わっていると考えた。しかしながら、ウイルス感染がカレニア赤潮の衰退に「どのように」、「どの程度」関与するかなど、メカニズムの理解には至っていない。ウイルスを用いた防除技術の開発を具体化するには、カレニア赤潮へのウイルスの影響について知見を蓄積する必要がある。それには、対象となる海域でのウイルスの分布や季節変動を正確に捉え、ウイルスとカレニアとの相互作用など感染過程の詳細を理解することなどが求められる。防除技術の開発に関心が高まる中、その基盤となるウイルスのカレニア個体群へ及ぼす影響の詳細や生態学的役割の解明は必要不可欠である。

2. 研究の目的

本課題では、赤潮発生から衰退において、カレニアとウイルスの分布や動態をモニタリングし、定量的に把握すること、感染速度の異なる 2 種の KmV それぞれの感染機構について、分子技術に基づいて詳細を明らかにすること、さらに、カレニアの死について、ウイルスによる感染死、ウイルス感染を免れることによる死(細胞の自殺)など、環境中でのカレニアのウイルスに対する応答について明らかにする。得られた結果から、赤潮衰退に関わるウイルスの影響を総合的に評価し、防除技術開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) KmV 粒子回収法の検討と核酸抽出

新規 KmV の核酸回収は、分解酵素などの夾雑物が回収の障害をするため、極めて困難であった。そのため、KmV 分子解析に向けて、粒子回収法や遺伝子抽出法及び精製法を検討した。

(2) ウイルス感染時の宿主細胞内で起こりうる核の形態変化

培養液中で、KmUW3 にウイルス KmRNAV3 を感染させ、経日的に細胞を取り出し、核の形態を観察し、1 サンプルにつき 10 個体以上撮影した。撮影画像は、画像処理により解析する予定である。

(3) 光照射がウイルス感染に与える影響の評価

大型スペクトログラフを光源とする単色光を対象生物に鉛直上方向から照射し、カレニアの細胞密度と KmRNAV3 密度を測定することにより、死滅への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) KmV 粒子回収法の検討と核酸抽出

KmV を宿主に感染させてほぼ透明になるまで溶藻させた培養液を、超音波で細胞片を破砕した後ボルテックスで混合し、低速遠心(3,000rpm × 10 分)により細胞片を除去した。上清を 0.45 μm フィルターでろ過したのち、PEG 沈殿法及び超遠心法等で回収した。核酸抽出は、マニュアル法(フェノール・クロロフォルム法)や市販のキットを検討した。粒子回収効率を上げる方法、核酸抽出効率を上げる方法、分解酵素を阻害する方法についても検討した。核酸抽出に関しては、マニュアル抽出法に加え、市販の抽出キットも検討した。いくつかのキットはコロ

ナの影響で納品が遅れて、検討中のものもある。藻類ウイルスの特に DNA ウイルスについては、他の藻類 DNA ウイルスでも回収が困難であった。引き続き、原因の究明、安定した抽出法の開発を行なっていきたい。

(2)ウイルス感染時の宿主細胞内で起こりうる核の形態変化

上述したように、核酸の抽出が困難であるため、遺伝子によらないウイルス感染診断方法を検討した。ウイルス感染時にカレニア生体内で起こるであろう核の形態変化をモニタリングする技術の開発に着手し、画像解析技術の確立に向けて実験を実施した。培養液中で、カレニア KmUW3 に KmRNAV3 を感染させ、経時的に細胞を取り出し、Hoechst33342 で核を染色し、SP8 LIGHTNING 共焦点顕微鏡(Leica)にて蛍光観察した。得られた画像を画像解析ソフトで解析し、モニタリングへの活用を検討している。

(3)光照射がウイルス感染に与える影響の評価

現場で起こりうる事象の一つに、UV 照射がウイルス感染に及ぼす影響について知見を深める必要がある。これは、ウイルスの中には、UV 照射や抗生物質処理により細胞崩壊が誘発されるものがあるため、赤潮プランクトンの現象を考えると、昼間プランクトンが表層に集積し、UV 照射によってウイルス感染が誘発され、赤潮の終息に関与すると考えられる。カレニアにウイルス KmDNAV3 を接種する区（試験区）および接種しない区（対照区）を各 3 区用意し、280～680nm の波長の光を 1 日 3 時間照射した。予備実験の結果をもとに、試験培養容器は 24 穴倍用プレート、カレニア培養液は 2 mL、ウイルス溶液は 100 μ L と決定した。本試験では、波長を 320nm, 360nm, 440nm, 600nm, 通常光のみ、とし、試験を開始したところ、2 日目（1 回照射後）から KmRNAV3 を接種した 320nm 照射区において、顕著にカレニアの細胞密度の減少が認められた。ウイルス非接種区では、ほとんど減少しなかった。今後は、核のサイズを数値化するか、核酸量を定量するなど、ウイルス感染によるカレニア細胞の死を定量化する手法を開発したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山奈津子
2. 発表標題 光照射がKarenia mikimotoiへのウイルス感染に及ぼす 影響評価
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	浜口 昌巳 (Hamaguchi Masami) (60371960)	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)・主幹研究員 (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		
ベルギー	Luven University	Prof. Rob Lavigne	Dr. Jeroen Wangemans