

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03057

研究課題名（和文）海洋性動物プランクトンに感染するウイルスの存在意義の解明

研究課題名（英文）Ecological role of marine viruses infecting zooplankton

研究代表者

平井 惇也（Hirai, Junya）

東京大学・大気海洋研究所・講師

研究者番号：30762554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

研究成果の概要（和文）：海洋動物プランクトンへのウイルス感染の報告事例は極めて少なく、その生態学意義は謎に包まれている。そこで本研究は北海道紋別市オホーツクタワーにおいて毎週採集を行い、主要カイアシ類 *Pseudocalanus newmani* とウイルスの関係性を調査した。トランスクリプトーム解析を行ったところ、主要4種の新規ウイルスが検出された。各ウイルスはそれぞれ異なる季節性を示し、主にカイアシ類の個体数が減少する時期に検出された。また、発現解析により、特定のウイルスの存在下でカイアシ類の生理状態が大きく変化した。これらの結果からウイルスは動物プランクトンの個体群動態や生理状態に関わる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は海洋におけるウイルスと動物プランクトンの関係性の詳細を調べた初の研究である。複数の解析により主要動物プランクトンであるカイアシ類から新規ウイルスが検出され、動物プランクトンの生態に関わる可能性も示され、得られた結果は学術的に非常に価値が高い。動物プランクトンは海洋の低次から高次生態系をつなぐ重要な役割を果たしており、動物プランクトンの個体群動態の理解は水産重要種の資源量変動とも密接に関わっている。本研究で得られた成果がさらに発展することで、動物プランクトンの個体数変動の理解がさらに進み、将来的には資源量変動を含めた海洋生態系の理解にも貢献可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：The interactions between zooplankton and viruses have been overlooked despite their crucial roles in marine ecosystems. In this study, extensive weekly samplings of zooplankton were performed, and interactions between viruses and key copepod *Pseudocalanus newmani* were investigated. Four novel RNA viruses were detected from the massive transcriptome data. RT-qPCR revealed that all RNA viruses were observed during the low-abundance period of *P. newmani*. Copepods with high viral loads of a specific virus showed significant physiological changes by transcriptome analysis. These results showed that copepod-virus interactions cannot be neglected to understand the marine ecosystem.

研究分野：プランクトン学

キーワード：カイアシ類 ウイルス 共生-寄生 個体群動態 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは細菌から人間まで様々な生物に感染し、宿主の機能を利用しつつ自己増幅する寄生体である。海洋にも夥しい量のウイルスが存在し、その多くは微小な細菌や植物プランクトンの低次栄養段階の生物に感染するとされ、ウイルスはこれらの約 20%を日常的に死滅されることで海洋の物質循環や食物網構造に多大な影響を与えている。また、世界各地で行われた網羅的な遺伝子解析(メタゲノム解析)から海水中には多くの未知のウイルスが存在することが明らかにされ、海洋プランクトンの多様性維持にウイルスが大きく関わる可能性が指摘されている(Brum et al. 2015, Science)。ウイルス感染は高次栄養段階での研究例も多く、魚類や甲殻類の養殖事業での大量致死を引き起こすことで食糧供給の問題とも密接に関係している。

一方、プランクトンネットで採集される動物プランクトンへのウイルス感染の報告事例はきわめて少なく、沿岸域のカイアシ類(Dunlap et al. 2013, PNAS)やクシクラゲ類(Breibart et al. 2015, Front Microbiol)の報告例にとどまる。さらにこれらの研究例は single strand DNA(ssDNA)型ウイルスのみの報告例であり、RNA 型等の多様なウイルスの検出はなされていない。そこで申請者は網羅的に RNA ウイルスが検出可能な革新的技術である FLDS 法(Urayama et al. 2015, Microbes Environ)を導入したところ、わずか湿重量約 2 g の動物プランクトン群集から多様な新規 RNA ウイルスが検出された。また、カイアシ類各種で個体ごとの網羅的な発現遺伝子解析 RNA-seq を行ったところ、各種につき 10 を超える DNA および RNA ウイルスに類似した配列が検出された。これらの知見から動物プランクトンに感染するウイルスの高い多様性が明らかとなりつつあるが、なぜこのような高いウイルス多様性が維持されるのかは不明なままである。また、動物プランクトンに感染するウイルスの量・質に関する既往知見はなく、それらがどのように動物プランクトンを介して海洋生態系に影響を与えるかについては不明である。動物プランクトンは魚類等の主要な餌料として低次～高次栄養段階をつなぐ役割を果たし、ウイルス感染による動物プランクトンの個体群動態の変化は魚類等の高次栄養段階の資源量変動にも関わる可能性がある。そのため、ウイルス感染が動物プランクトン群集に与える影響を明らかにすることは、海洋物質循環に関する新たな知見を得ることを意味し、生態系の成り立ちを解明する上で重要な課題であるといえる。

2. 研究の目的

ウイルスの未知なる生態学的意義、動物プランクトンの自然界における高い致死率を考えると、動物プランクトンのウイルス感染は海洋生態系に大きな影響を与えると予想される。近年の申請者を中心とした研究から動物プランクトンに感染するウイルスの多様性が明らかになりつつあるが「実際にウイルスが動物プランクトンの生態に影響を及ぼすか」、「どれほどの影響を海洋生態系に与えるか」といった単純な疑問は明らかにされていない。そこで本研究は、動物プランクトンとウイルスの相互作用に着目し、ウイルス感染が動物プランクトンに及ぼす影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

試料の採集は2020年の3月から北海道紋別市のオホーツクタワー（水深：約10 m）において毎週行った。ノルパックネットを用いて動物プランクトンを採集し、試料はRNA later に保存した。また、水温、塩分、栄養塩、クロロフィル *a* 濃度などの環境要因の取得も行った。対象種は冬季から春季にかけて優占するカイアシ類 *Pseudocalanus newmani* とし、同種が出現する7月後半まで採集を行った。形態分類用の動物プランクトン試料は5%ホルマリン海水で保存した。

ウイルス探索のため、動物プランクトン試料より対象種 *P. newmani* を抜き出し、抽出したRNAを用いて rRNA 枯濁法によるトランスクリプトーム解析を行った。NGS から得られたショートリードの大量配列はインフォマティクスにより配列の再構築を行い、データベースとの相同性からウイルス配列の特定を行った。得られたウイルス配列はデータベース上にある近縁な配列を含めて系統解析を行った。さらに、カイアシ類の個体群動態とウイルスの関係を調べるため、得られた各ウイルスの配列を基にプライマーおよびプローブを設計し、qPCR の手法を確立した。確立した手法は各試料の *P. newmani* に適用し、ウイルスの検出率およびコピー数を調べた。得られた各ウイルスの季節変化の結果はカイアシ類の個体数密度の結果と比較を行った。分子生物学的手法に加え、追加の試料採集を2022年に行い、透過型電子顕微鏡によりウイルス様粒子の検出を試みた。

ウイルスがカイアシ類の生理状態に及ぼす影響を調べるため、ウイルスが検出された個体およびコントロール区の個体（ウイルス非検出）のRNAを用いてポリA選択法によるトランスクリプトーム解析を行った。NGSにより得られた配列を用い、インフォマティクスによりウイルスを有する個体で有意に発現が異なる遺伝子の特定を行った。

カイアシ類の個体群動態や生理状態に影響を及ぼす他の要因の調査も行った。採集地点で集団構造の変異を調査するため、各個体のミトコンドリア DNA COI 領域の配列を取得し、集団遺伝解析を行った。また、5%ホルマリン海水に固定された試料を用いてカイアシ類の捕食者となる他の動物プランクトンを計測し、個体数密度の季節変化を調べた。現場のプランクトン相とカイアシ類の消化管内容物を調べるため、真核生物を対象とした18S領域のDNAメタバーコーディングも行った。

4. 研究成果

トランスクリプトームからウイルスを探索した結果、RNAウイルスに分類される4種のウイルスが検出された（表）。データベースとの相同性検索の結果、全てのウイルスがこれまで報告例のない新規ウイルスであることが明らかとなった。系統解析の結果、4種のうち2種（PSNE-Pico1 および PSNE-Pico2）は *Picornavirales* に属し、残りの2種（PSNE-Narna および PSNE-Toga）はそれぞれ *Narnaviridae* および *Togaviridae* に近縁なウイルスと考えられた。また、PSNE-Pico1 は植物プランクトンのウイルスに近縁なことから餌由来の水平伝搬で可能性であることが示唆された。一方、PSNE-Pico2 は同じ *Picoenavirales* の中でも無脊椎動物のウイルスからなるグループに属し、親から子に伝わる鉛直伝搬の可能性が考えられた。

表 . 得られたウイルス配列と BLASTX 解析の結果 .

	length (bp)	Identity (%)	evalue	BLASTX best hit
PSNE-Pico1	9,182	59.6	0	YP_009505620.1 replicase polyprotein [Chaetoceros tenuissimus RNA virus 01]
PSNE-Pico2	7,676	50.8	0	QYV43051.1 MAG: polyprotein [Picomavirales sp.]
PSNE-Nama	3,221	27.9	2.08E-43	APG77107.1 RNA-dependent RNA polymerase, partial [Changjiang nama-like virus 5]
PSNE-Toga	11,039	28.4	1.44E-103	YP_009337236.1 hypothetical protein [Wenling toga-like virus]

採集期間中、水温は 0 以下から 18 近くまで大きく変化し、カイアシ類 *P. newmani* の増減も見られた (図 1)。RT-qPCR により各ウイルスのコピー数および検出率を調べたところ、各ウイルスは異なる季節変化を示し (図 1; PSNE-Pico1 を例として表示) 同時に 2 種のウイルスが検出される例は 1 個体のみであった。ウイルスはカイアシ類の個体数が多い時期には検出されず、4 月以降の個体数が増減する期間でのみで検出された。また、PSNE-Pico1 が検出される期間に電子顕微鏡観察を行ったところ、カイアシ類の消化管内容物および体内からウイルス様粒子が検出され、系統解析の結果との整合性が示された。

カイアシ類の発現解析の結果、特に PSNE-Pico1 の存在下にある個体で大きく発現遺伝子のパターンが異なることが明らかとなった。コントロール区との比較の結果、PSNE-Pico1 存在下で有意に発現が異なる遺伝子が検出され (図 2) 機能解析の結果、発現量が上昇する遺伝子はウイルス感染に関連すると考えられる機能が検出され、発現量が減少する遺伝子では循環系や筋組織など遊泳に関わる機能が検出された。これらの結果から、PSNE-Pico1 のカイアシ類への感染の可能性、ウイルスによるカイアシ類の生理状

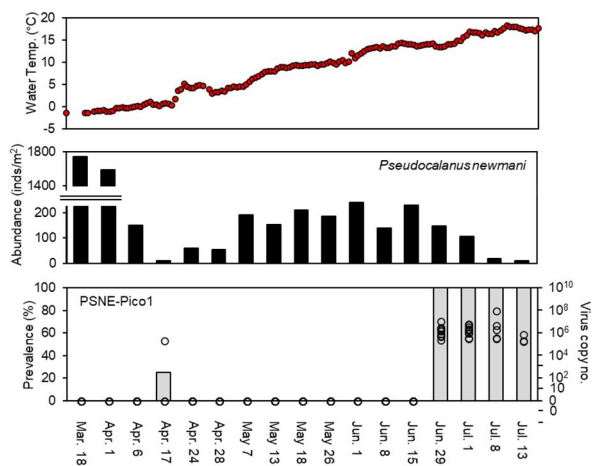


図 1. 研究期間中の水温、カイアシ類の個体数密度、ウイルスコピー数と検出率 . PSNE-Pico1 を代表して記載している .

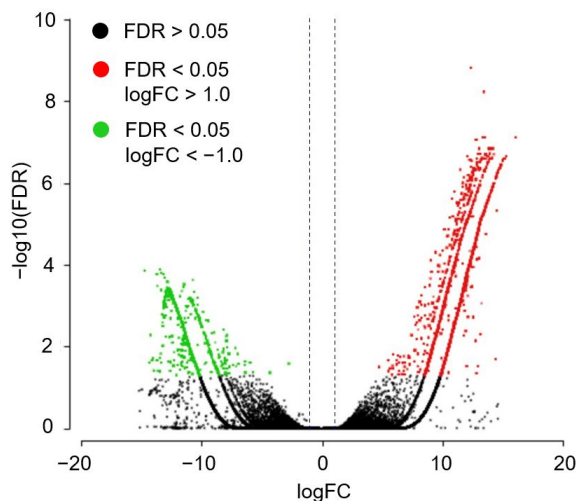


図 2. PSNE-Pico2 存在下で有意に発現の異なる遺伝子。発現量が上昇する遺伝子が赤で減少する遺伝子が緑で示されている。

態変化の可能性が示された。

カイアシ類の個体群動態や生理状態に影響を及ぼす他の要因の解析では、集団遺伝解析においては月ごとに大きな集団の変化は見られなかった。また、捕食者についてはカイアシ類を捕食するクラゲ類が見られたが、カイアシ類の個体数との大きな関わりは見られなかった。現場のプランクトン相は春のブルーム時に珪藻の割合が高く、水温の上昇に伴い渦鞭毛層の割合が高くなった。一方、カイアシ類の消化管内容物は季節を通じて珪藻が多く占め、主要な餌は珪藻であり、PSNE-Pico1 も珪藻由来であると考えられた。カイアシ類の個体数変化とそれに及ぼす要因を調査したところ、水温や餌環境が大きく影響を与え、ウイルスの検出率も説明要因として寄与することが示された。そのため、ウイルスもカイアシ類の個体数の増減や生理状態に影響を与える一つの要因になると考えられた。

これらの成果は海洋のウイルスが動物プランクトンの生態に影響を明らかにした初の研究であり、海洋生態系を理解する上で重要な情報を提供するため学術的な価値が高い。動物プランクトンに影響を及ぼすウイルスが実際に動物プランクトンの死亡率に寄与するのか、海洋生態系全体にどのような影響を及ぼすかは今後の課題として残っているが、今後はさらに研究を進めることで、海洋生態系や資源量への影響も解明できるのではないかと期待される。得られた成果は Zooplankton Production Symposium 等の著名な国際学会で発表され、成果は論文として国際誌に投稿中である（2024年6月現在）。

また、主要な研究成果をまとめる中で、研究海域であるオホーツク海に *P. newmani* に近縁な *P. acuspes* が分布することが明らかとなった。*P. acuspes* は北極を中心に分布するカイアシ類であり、日本周辺海域での出現は初めての記録となる。さらに詳細な集団遺伝解析を行ったところ、オホーツク海と北極海の *P. acuspes* は異なる遺伝的な集団であることが明らかとなった。この派生的な研究成果は論文としてまとめられ、Marine Biodiversity 誌に掲載された（Hirai et al. 2023）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hirai Junya, Katakura Seiji, Nagai Satoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Comparisons of genetic population structures of copepods <i>Pseudocalanus</i> spp. in the Okhotsk Sea: the first record of <i>P. acuspes</i> in coastal waters off Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Marine Biodiversity	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12526-022-01323-y	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 -
1. 著者名 Hirai Junya, Urayama Syun-ichi, Takaki Yoshiro, Hirai Miho, Nagasaki Keizo, Nunoura Takuro	4. 巻 37
2. 論文標題 RNA Virosphere in a Marine Zooplankton Community in the Subtropical Western North Pacific	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME21066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.me21066	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 Hashihama Fuminori, Kouketsu Shinya, Kondo Yoshiko, N. Sasaki Yoshi, Sugimoto Shusaku, Takahashi Kazutaka, Nagai Takeyoshi, Nishioka Jun, Hayashida Hakase, Junya Hirai	4. 巻 30
2. 論文標題 Decadal vision in oceanography 2021: Mid-latitude ocean	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oceanography in Japan	6. 最初と最後の頁 127 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5928/kaiyou.30.5_127	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Watanabe Tsuyoshi, Hirai Junya et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Improving taxonomic classification of marine zooplankton by molecular approach: registration of taxonomically verified 18S and 28S rRNA gene sequences	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e15427 ~ e15427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.15427	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 Sildever Sirje, Nishi Noriko, Tazawa Satoshi, Kasai Hiroki, Hirai Junya, Shiimoto Akihiro, Kikuchi Taisei, Katakura Seiji, Nagai Satoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Eight years of weekly eDNA monitoring in the North Western Pacific	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.452	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 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Junya Hirai, Seiji Katakura, Satoshi Nagai
2. 発表標題 Characterization of the genetic population structures of three Pseudocalanus species (Copepoda, Calanoida) in the Okhotsk Sea
3. 学会等名 The 37th International Symposium on Okhotsk Sea & Polar Oceans 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junya Hirai, Seiji Katakura, Satoshi Nagai
2. 発表標題 Interactions between marine viruses and planktonic copepod Pseudocalanus newmani
3. 学会等名 MetaZooGene symposium 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井惇也
2. 発表標題 海洋動物プランクトンの分子生態学
3. 学会等名 日本プランクトン学会若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井 惇也
2. 発表標題 メタバーコーディングによる動物プランクトン群集の把握 これまでの進展と今後の展望
3. 学会等名 OceanDNAテック2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井 惇也, 片倉 靖次, 長井 敏
2. 発表標題 オホーツク海における浮遊性カイアシ類 <i>Pseudocalanus acuspes</i> の初記録および遺伝的集団構造の近縁種比較
3. 学会等名 日本海洋学会海洋生物シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井 惇也, 片倉 靖次, 長井 敏
2. 発表標題 海洋性動物プランクトンのウイルス研究
3. 学会等名 第69回 日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Junya Hirai, Seiji Katakura, Satoshi Nagai
2. 発表標題 Ecological dynamics of marine copepods and viruses in the Okhotsk Sea
3. 学会等名 The 36th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井 惇也
2. 発表標題 分子生物学的手法を用いた動物プランクトンの多様性研究
3. 学会等名 日本プランクトン学会シンポジウム「次世代プランクトン研究を開拓する新技術・方法論」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 惇也, 宮正樹, 藤木徹一, 吉田聡, 乙坂重嘉, 帰山秀樹, 加古真一郎, 片岡智哉, 松岡大祐, 日高弥子, 杉山大祐, 小嶋不二夫
2. 発表標題 海洋学会将来構想2021: 新たな手法と問題
3. 学会等名 日本海洋学会創;周年記念シンポジウム;日本の海洋学の今とこれから
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 惇也, 片倉靖次, 長井 敏
2. 発表標題 浮遊性カイアシ類Pseudocalanus newmaniから検出された2種のウイルスの生態学的挙動
3. 学会等名 日本海洋学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 惇也, 片倉靖次, 長井 敏
2. 発表標題 ウイルス存在下におけるカイアシ類Pseudocalanus newmaniの網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本ベントス学会;日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 惇也
2. 発表標題 動物プランクトンのメタバーコーディング
3. 学会等名 OceanDNAテック2021 環境DNA技術はどこまで進むか？
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagai S, Tazawa S, Nishi N, Sildever S, Kasai H, Shiomoto A, Hirai J, Kikuchi T, Maruyama F, Katakura S
2. 発表標題 Prediction of species appearance patterns of microeukaryotes using weekly-based time-series monitoring for ten years in Mombetsu off, Hokkaido, Japan by AI technology
3. 学会等名 The 37th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirai J, Katakura S, Kasai H, Tamamushi N, Nagai S
2. 発表標題 Metabarcoding analysis of zooplankton communities during a period of sea ice in the Okhotsk Sea
3. 学会等名 The 38th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hirai J, Katakura S, Kasai H, Nagai S
2. 発表標題 Copepod-virus interactions revealed by molecular and morphological approaches.
3. 学会等名 ICES/PICES 7th Zooplankton Production Symposium (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hirai J
2. 発表標題 Reference sequence data for marine zooplankton in the era of high-throughput sequencing
3. 学会等名 ICES/PICES 7th Zooplankton Production Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平井 惇也
2. 発表標題 動物プランクトンの分子生態学のこれまでと今後
3. 学会等名 OceanDNAテック2023
4. 発表年 2023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
研究協力者	片倉 靖次 (Katakura Seiji)		
研究協力者	長井 敏 (Nagai Satoshi)		

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
---------	---------