

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770092

研究課題名（和文）深海底熱水生態系を支える化学合成独立栄養細菌に感染するファージの多様性解析

研究課題名（英文）Diversity of bacteriophages infecting chemolithoautotrophs in hydrothermal ecosystems

研究代表者

吉田 ゆかり（YOSHIDA YUKARI）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主任

研究者番号：10553216

研究成果の概要（和文）：深海底熱水生態系において重要な一次生産を担う化学合成独立栄養細菌とそれらに感染するファージの生物学的相互関係を解明するため、化学合成独立栄養細菌に感染するファージの単離を試み、単離ファージ株について性状解析を行った。イプシロンプロテオバクテリア綱の化学合成独立栄養細菌に感染する溶原性ファージの一つを代表株としてゲノム解析を行ったところ、極めて新規なゲノム構造を有するファージであることが明らかとなった。また、イプシロンプロテオバクテリアの生息域や生理機能が多様化する以前から、ファージと宿主の関係が成立しており、ファージ-宿主間やファージ-ファージ間で遺伝子交換を繰り返しながら、ファージと宿主が共進化してきたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This main objective of this study is to reveal the interaction between chemolithoautotrophs and their phages in deep-sea hydrothermal vent ecosystems. We isolated a novel temperate phage that infected a deep-sea vent chemolithoautotrophic isolate of *Epsilonproteobacteria*, and its entire genome sequence was obtained and analyzed. The widespread occurrence of phage genes in diverse *Epsilonproteobacteria* supports early co-evolution between temperate phages and *Epsilonproteobacteria* prior to the divergence of their habitats and physiological adaptation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生物多様性・分類

キーワード：深海熱水噴出域・バクテリオファージ・化学合成独立栄養細菌・多様性・共進化

1. 研究開始当初の背景

海洋環境中には 1mL あたり数百万～数億個というきわめて高い密度でウイルス粒子が存在し、細菌の現存量よりも 1～2 桁多い豊富な現存量を有することが明らかとなっている。さらに近年、環境中のウイルス群集

から直接ゲノムを抽出し、シーケンシングするメタゲノム解析が行われ、海洋のウイルス群集は遺伝学的に極めて多様な構成種から成り立っていることが明らかとなっている。これらのウイルス群集の中で特に、海洋表層において重要な一次生産者であるラン藻や

単細胞真核藻類に感染するウイルスの研究が精力的に行われ、ウイルスが宿主の動態に対し量的（バイオマス）・質的（群集構造）な変化をもたらすこと、ウイルスによる宿主の死滅が炭素や窒素等の生物地球化学的物質循環へ多大な影響を与えていること、遺伝子伝播により宿主の多様性や進化がもたらされること、といったウイルスの生態系における重要性が次々と明らかになってきた。

1977年に初めて深海底熱水噴出孔が発見されて以来、世界中の様々な深海底熱水噴出域から多種多様な新規微生物が分離・培養されるとともに、培養に依存しない分子生物学的手法を用いた解析により、深海底熱水噴出域における微生物の生理・生態・多様性について様々な知見が蓄積されてきた。その結果、深海底熱水噴出域では光合成に依存しない独自の生態系が存在しており、硫黄酸化細菌や水素酸化細菌、超好熱メタン菌といった各種の化学合成独立栄養細菌によってその一次生産が支えられていることが明らかとなっている。しかしながら、上述のようにウイルスが水圏生態系において重要な構成員として既に認識されているにも関わらず、深海底熱水噴出域においては、これまでほとんどその存在が注目されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、深海底熱水噴出域におけるウイルスの生態学的影響の解明に向けた基礎的知見を蓄積するため、(1) 深海底熱水生態系で優占し、重要な一次生産者である化学合成独立栄養細菌とそれらの宿主細菌に感染するファージを単離し、(2) 単離したファージのウイルス学的な基本性状、形態・系統学的分類ならびにその多様性を明らかにする。これにより、化学合成独立栄養細菌とファージの生物学的相互関係を詳細に把握する。

3. 研究の方法

深海底熱水噴出域から効率的にウイルスを単離するため、ウイルスの分布調査を行い、各環境にどのような生活史を持つウイルスが優占しているのかを推定した。次に、深海底熱水噴出域から多様な化学合成独立栄養細菌を単離・培養し、系統学的分類データを付与することで、宿主培養株の整備を行った。それらの化学合成独立栄養細菌を宿主として用いることで、深海底熱水噴出域からファージを単離し、多様な「宿主-ファージ」のライブラリーを構築した。特に、熱水生態系のなかでも熱水噴出孔付近に繁茂し、豊富な微生物量を有する微生物マットに着目し、微生物マットに生息する化学合成独立栄養細菌からのファージの単離を精力的に行った。さらに、単離ファージ株について、形態観察・ゲノム解析などの各種性状解析を行い、

宿主細菌とファージの生物学的相互関係を詳細に把握するとともに、ファージ株間における形態学的・生物学的・遺伝学的多様性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) ウイルス分布調査

NT08-13 および NT09-11 航海において、沖縄トラフ鳩間海丘の熱水噴出域周辺のウイルスの分布調査を行った。熱水噴出域周辺の水試料では、全菌数とウイルス数の間に有意な相関関係は得られなかったものの、熱水噴出孔に近いほどウイルス数が多くなり、また全菌数に対するウイルス数の比も大きくなる傾向が得られた。一方、チムニー表面に付着した微生物マットやゴカイの巣、ゴエモンコシオリエビの剛毛などの微生物付着試料では、全菌数とウイルス数との間に有意な相関関係が得られたが、全菌数に対するウイルス数の比は極めて小さく、いずれの試料においても1以下であった。また、浅海熱水噴出域である竹富島沖の海底温泉から採取した水試料および微生物マット試料においても同様の傾向が得られたことから、熱水活動域周辺において普遍的な現象であることが示唆された。これらの結果を現場周辺の微生物群集組成や微生物活性と併せると、ウイルスの生活様式が生息環境（水環境と微生物マット環境）によって大きく異なっており、水中では溶菌型、微生物マット環境では溶原型の生活史を持つウイルスが卓越している可能性が示唆された。これらのウイルスの生活様式の差異を考慮し、微生物マットに生息する化学合成独立栄養細菌から溶原性ファージの分離を試みた。

(2) 宿主菌株の単離

沖縄トラフ鳩間海丘に位置する深海底熱水活動域で採取した様々な微生物マット試料から、水素酸化や硫黄酸化を行うイプシロンプロテオバクテリア綱に属する細菌を36株、硫黄酸化を行うガンマプロテオバクテリア綱に属する細菌を4株、水素酸化および硫黄酸化を行うアクウィフェクス目に属する細菌を7株、計48株を単離した。

(3) ファージ株の単離

(2)で単離した菌株に対し、マイトマイシンCを添加後、顕微鏡観察を行い、溶原性ファージの有無を明らかにした。その結果、イプシロンプロテオバクテリア綱に属する細菌11株、アクウィフェクス目に属する細菌2株、計13株の細菌で溶原性ファージの存在が認められた。

(4) 代表ファージ株の性状解析

(3)で確認された溶原性ファージのうち、イ

プシロンプロテオバクテリア綱に属する *Nitratiruptor* sp. SB155-2 株の溶原性ファージ NrS-1 について、詳細な解析を行った。添加するマイトマイシン C の濃度、添加時間について検討を行ったところ、最適な添加条件を得る事ができた (図 1)。電子顕微鏡により NrS-1 の形態観察を行ったところ、直径 64nm の多角形の頭部と非収縮性の長い尾部 (長さ 210nm, 幅 10nm) を有するシフォウイルス科に分類された (図 2)。

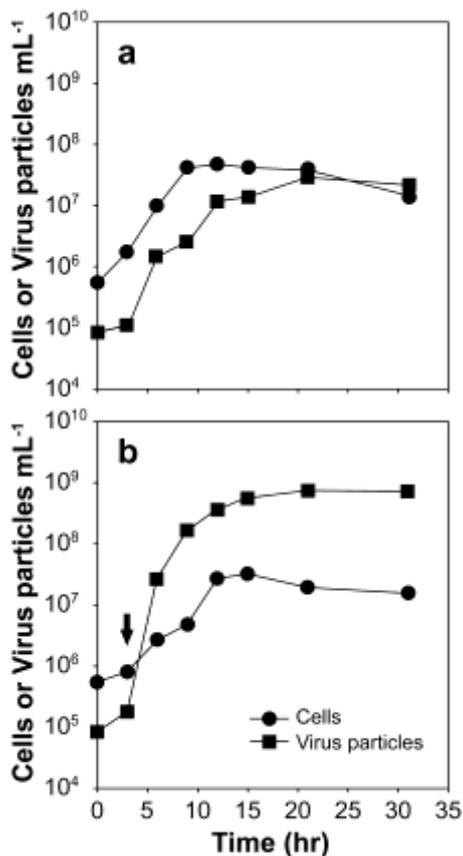


図 1. 宿主細胞数とウイルス数の継時的変化。
a: マイトマイシン非添加区。b: マイトマイシン添加区。矢印の時点でマイトマイシン C を最終濃度 0.01 μ g/mL となるように添加した。

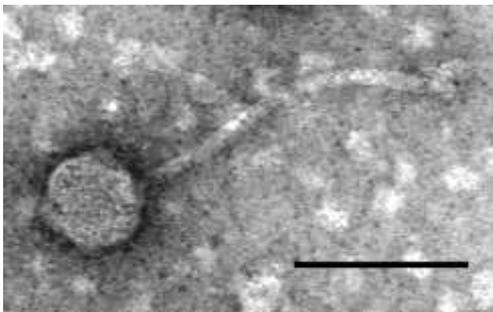


図 2. NrS-1 のネガティブ染色像。バーは 100nm を示す。

(5) 代表ファージ株のゲノム解析

NrS-1 は全長 37,159 bp の直鎖状二本鎖 DNA を有しており、ゲノム上には 51 個の CDS (coding sequence) が見出された。それらのうち、24 個の CDS については、複製関連遺伝子、溶菌・溶原のスイッチに関与する遺伝子、パッケージングに関わる遺伝子、ファージ構造タンパク質をコードする遺伝子、溶菌酵素をコードする遺伝子など、遺伝子の機能が決定された。ゲノム比較解析を行ったところ、既知のシフォウイルス科のファージのゲノムとの相同性が極めて低いことから、NrS-1 はシフォウイルス科の新規系統群に分類されることが示唆された。さらに、生息環境やエネルギー獲得系が異なる多様なイプシロンプロテオバクテリアのゲノム上に、NrS-1 ゲノムにコードされた遺伝子のホモログが数多く分布していた。したがって、イプシロンプロテオバクテリアの生息環境や生理機能が多様化する以前に、既にイプシロンプロテオバクテリアとファージの相互関係が成立し、ファージ-宿主間およびファージ-ファージ間で遺伝子交換を繰り返しながら、両者が共進化してきたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yoshida-Takashima Y., Takaki Y., Shimamura S., Nunoura T. and K. Takai. Genome sequence of a novel deep-sea vent epsilonproteobacterial phage provides new insight into the co-evolution of *Epsilonproteobacteria* and their phages. *Extremophiles*. 2013. 17:405-419. 査読有
DOI:10.1007/s00792-013-0529-5
- ② Yoshida-Takashima Y., Nunoura T., Kazama H., Noguchi T., Inoue K., Akashi H., Yamanaka T., Toki T., Yamamoto M., Furushima Y., Ueno Y., Yamamoto H. and K. Takai. Spatial distribution of viruses associated with planktonic and attached microbial communities in hydrothermal environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012.78:1311-1320. 査読有
DOI:10.1128/AEM.06491-11

[学会発表] (計 5 件)

- ① 吉田 (高島) ゆかり、高木善弘、島村繁、布浦拓郎、高井研. 深海熱水活動域に生息するイプシロンプロテオバクテリアの溶原性ファージのゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会. 2013 年 3 月 9 日.

長浜バイオ大学

- ② 吉田（高島）ゆかり、高木善弘、島村繁、布浦拓郎、高井研. 深海底熱水活動域に生息する化学合成独立栄養細菌に感染するファージのゲノム解析. 日本進化学会第14回東京大会. 2012年8月21日. 首都大学東京（招待講演）
- ③ Yoshida-Takashima, Y., Nunoura T., Kazama H., Noguchi T., Inoue K., Akashi H., Yamanaka T., Toki T., Yamamoto H., Furushima Y., Ueno Y., Yamamoto H., Takai K. Spatial distribution of viruses associated with planktonic and adhesive microbial communities in hydrothermal environments. The 6th Aquatic Virus Workshop. 2011年11月3日. オランダ海洋研究所. オランダ
- ④ 吉田（高島）ゆかり、布浦拓郎、島村繁、高井研. 深海底熱水噴出域から単離した化学合成独立栄養細菌の溶原性ファージの性状解析. 第27回日本微生物生態学会大会. 2011年10月8日. 京都大学
- ⑤ 吉田（高島）ゆかり、布浦拓郎、高井研. 熱水噴出域におけるウイルスの分布と現存量. 第26回日本微生物生態学会大会. 2010年11月25日. 筑波大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/xbr/index.html>

アウトリーチ活動：施設一般公開における研究紹介

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 ゆかり (YOSHIDA YUKARI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究副主任

研究者番号：10553216