

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450249

研究課題名(和文) 自然海域における藻類感染性海洋ウイルスモニタリング法の開発

研究課題名(英文) Developmental study of marine virus monitoring method in natural sea area.

研究代表者

豊田 健介 (Toyoda, Kensuke)

日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：40585874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海産浮遊性珪藻類であるキリンドロテカ・クロステリウムに感染する新規ウイルス3種について、より高感度で安定的な自然海域におけるモニタリング法の開発を行った。主に、宿主リアルタイム定量PCR、3新種のウイルスの性状解析、各々のウイルスのリアルタイム定量RT-PCRの開発、ELISA法によるウイルス定量検出法の開発を行った。

結果、リアルタイム定量RT-PR法およびELISA法による安定的であり、良好な定量・検出感度の手法を開発するに至った。

研究成果の概要(英文)：A monitoring method in a more sensitive and stable natural sea area for three new viruses infected with marine floating diatoms, *Cylindrotheca closterium*, have developed. During the experiment, host real-time qPCR, genome analysis of three new viruses, development of real-time qRT-PCR, and development of a virus quantitative detection method by ELISA were performed. As a result, method of stable and good quantification / detection sensitivity from natural sea water by real-time qRT-PR method and Direct ELISA method have developed.

研究分野：海洋ウイルス学

キーワード：海洋ウイルス 珪藻 リアルタイムqPCR ELISA 定量検出

1. 研究開始当初の背景

海洋ウイルスの中には、海洋生態系において圧倒的な生物量および種多様性を誇る単細胞植物プランクトンに感染するものが多分に含まれていることが推察される。それらが保持する膨大な遺伝情報や構造タンパクからは、これまでになく多くの新知見が得られる可能性を秘めている。しかし、海洋ウイルスを実験題材とする研究グループは、哺乳類や陸上高等植物に感染するウイルスの研究を行うグループよりも、遥かに少数であり、これまでに報告された新規海洋ウイルスについて、それらが自然水域においてどのような挙動を示すのか、詳細なデータはほとんど得られていない。これは、宿主培養株の維持の困難さや、海洋からのウイルスの高感度な検出定量法が確立されていないことが原因の1つであると考えられる。このような現状の中、正確で効率の良い手法をもってして、本分野の海洋調査を進める事は、生物とウイルスの関係の道筋を示す上で、新たな見解を多くもたらす可能性を秘めていることが推察された。

2. 研究の目的

本研究では、予備実験で得られた海産浮遊珪藻である *Cylindrotheca closterium* を宿主とする新規ウイルス3種のを試料に、新たな調査法を確立することを目的とした。藻類感染性ウイルスに関し、同宿主に3種の異なるウイルスの報告がされた例はない。これらが東京湾周辺水域の狭いエリアから単離された事は、海洋ウイルスの多様性と、それらが自然水域における宿主生態への関与を明確にするツールを手に入れたと言える。しかしながら、自然水域において、宿主およびウイルスにどのような相互作用があり、各々どのような動態を示すのかは、詳細な現場調査法が確立がされていないことから、未だ憶測の域をでていない。そこで、本申請研究では、この3種の新規RNAウイルスを試料に、新たな調査法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ウイルス性状解析

予備実験により得られている

*Cylindrotheca closterium*に感染する3種の新規RNAウイルスのゲノム性状を明らかにし、同時に全長ゲノム解析を行う。これらを本申請実験の基礎データとし、また、3種の新規ウイルスの系統を既知ウイルスの情報との比較により明らかにする。

(2)リアルタイム定量RT-PCR法による検出定量法の開発

これまでは、特定の海洋ウイルスの検出法として限界希釈法が行われてきたが、本手法では検出に宿主生細胞が必要になり、ウイルス検出限界値も低い。そこで、これまでになく高感度の自然海域におけるウイルス動態調査法を確立するため、他分野において既に実績があるリアルタイム定量RT-PCR法を用いたウイルスおよび宿主の定量RT-PCR法について開発を行うことを目的とする。

(3)ELISA法によるウイルス検出定量法の開発

特定のタンパク質を抗原とし、検出定量する手法は様々開発されている。その内、Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay (ELISA法)は、特異性の高い抗原抗体反応により、特定のタンパク質の検出定量が行える手法である。海洋ウイルスの検出定量において足枷となるのは、溶媒である海水と、そこに含まれる標的以外のウイルスやバクテリア、その他の生物のコンタミである。また、現場調査を継続的に行うには、多くの研究室に設置されているであろう、既存設備による安定的な測定に加え、手法自体のコストパフォーマンスが強く求められる。これに対し、抗体の情報および測定手法が構築されれば、これまでの調査法にはない特異性の高さが高感度の定量性が、低コストにより得られることが期待される。そこで、ELISA法の複数の手法について検証を行い、より最適な自然海水調査法を開発することを目的とした。

4. 研究成果

(1)ウイルス性状解析

3種のウイルスについては、KT12RNAV, FTRNAV, そして、KURNVと仮称を付け、各々

についてゲノム全解析および検出定量法として Real Time qPCR 法の開発を行った。全てのウイルスは 3k~11kb の+センス 1 本鎖 RNA をゲノムとして所持することが確認された(図1)。

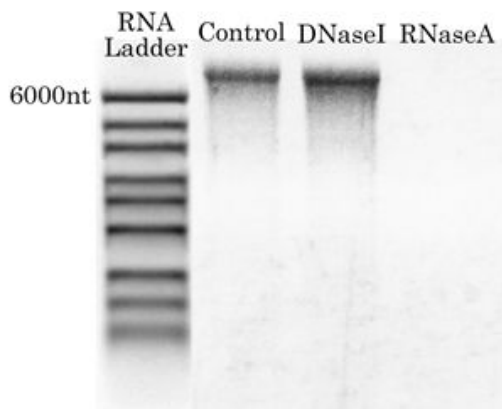


図1. KT12RNAV のゲノム性状解析

(2) 宿主およびウイルスの検出定量法の開発

宿主リアルタイム定量 PCR 法の開発
宿主リアルタイム定量 PCR 法の開発について、rDNA ITS1 領域に特異性の高い塩基配列を確認し、Syber Green 法による検出定量法を確立した。本手法により、下限 10 cells/ml の高感度により定量を行うことが可能となった。

また、解析された部分塩基配列より、特異性が得られる領域複数についてリアルタイム定量 RT-PCR 法を開発し、実験室系での安定的な検出定量法を確立した。しかしながら、3 種ウイルスのゲノム塩基配列の相同性は各々50%以上であるが、3 種を同時に検出定量可能な領域はなく、各々に特異的なプライマーを用いる必要がある。

ELISA 法によるウイルスの検出定量法の開発では、ウイルスの性状解析により得られた塩基配列より、カプシドタンパク質をコードする領域(各々約 2,200b)より、特異的と想定されたアミノ配列を用いてポリクローナル抗体を作成した。本実験系では、ELISA の手法として、直接吸着法、競合法、サンドイッチ法によるウイルスの検出定量を試みた

が、直接吸着法が最も安定的にデータを得ることが可能であることが明らかになった。

(3) 疑似海水を用いた検証結果

0.2µm メンブレンフィルターを用いて濾過した自然海水に、KT12RNAV, FTRNAV, そして、KURNV に加え、本研究室に保管されている他宿主感染性 8 種のウイルスを混ぜ疑似自然海水を作成し上記検出定量法を検証したところ、本研究により開発されたリアルタイム定量 RT-PCR 法および ELISA 法では、非特異的検出は確認されず、開発された手法に問題は確認されなかった(図2,3)。

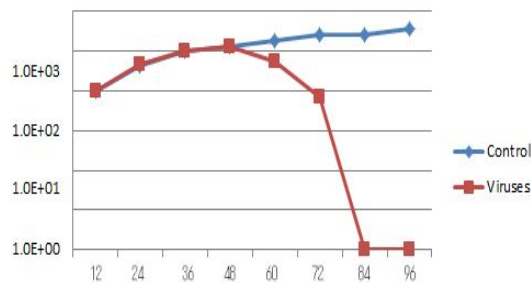


図2. リアルタイム定量 PCR を用いた宿主定量の検証

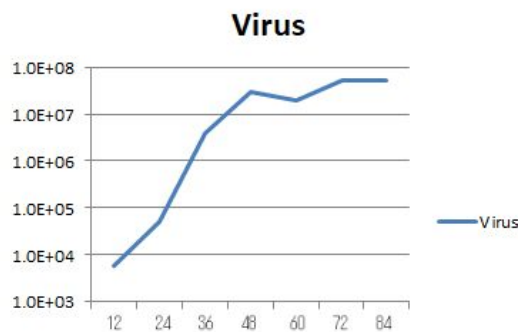


図3. リアルタイム定量 PCR を用いたウイルス定量の検証

(4) 自然海水を用いた検証

本検証では、千葉県稲毛海岸より採水した自然海水を用いた。沿岸の表層水および底泥を含んだ海水を採水し、開発された手法について各々試みた。結果、宿主については、リ

リアルタイム定量 PCR 法が適切に細胞を定量し、現段階で現場水域においての調査に用いられる手法であることを確認した。ウイルス検出定量については、リアルタイム定量 RT-PCR 法および ELISA 法について、限界希釈法では検出されない濃度のウイルスを検出定量し、これまでにない高検出定量法の開発に至ったことを確認した。しかしながら、各々、異なる定量数を示すことがしばしば確認され、さらなる検証が必要であることが明らかになった。同様に、多大なコンタミ（未知ゲノムおよびタンパク質）が想定される底泥水についても、両手法によるデータは、異なる値を示すことがしばしば確認され、これについてもさらなる検証が必要であることが明らかになった。

(5) まとめおよび今後の課題

本研究により、自然海水からの宿主およびウイルスの超高感度検出定量法が確立された。より正確な、そして、より精査された手法により、自然海域における宿主およびウイルスの動態調査に関しての調査が行われ、自然海域における宿主 vs ウイルスの関係が明らかになっていくことが期待される。

一方、ウイルスの検出定量においては、リアルタイム定量 RT-PCR 法と ELISA 法では異なる値が得られることが多々見られた。これは、各々の手法の特性が要因であると考えられる。リアルタイム定量 RT-PCR 法では、ゲノムを定量するという特性であることから、溶藻前の宿主細胞内で増殖中のウイルスゲノムも定量する。一方、ELISA 法は、既に海洋中に放出されたウイルスカプシドのみを定量するという特性がある。実際に、本手法を現場水域における調査に適応する際には、宿主細胞内のウイルス粒子を含めた係数を行うのか、または、水域中に放出されたウイルス粒子のみを係数するのかを明確にした上で用いる必要がある。また、本研究で開発

された手法の実践であるが、ウイルスの検出定量については、プロトコールの一つとして、超遠心分離機を用いた濃縮が含まれる。超遠心分離機の導入は、比較的高いハードルであることから、ウイルス濃縮方法について、さらなる検証が必要となる。今後、ウイルスの簡略的な濃縮法も含め、さらなる簡略的な自然水域におけるウイルスの検出定量法について検証していく。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

豊田健介. 自然海域における藻類感染性海洋ウイルスモニタリング法の開発. 日本珪藻学会第35回研究集会. 日光交通促進センター(群馬県)2015. 11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田健介 (TOYODA, Kensuke)
日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師
研究者番号: 40585874