

4. 海洋真核性微細藻類ウイルスの現状と生態学的研究

木村 圭¹⁾, 外丸 裕司²⁾

1) 佐賀大学 低平地沿岸海域研究センター

2) 国立研究開発法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所

すべての生物の源である海, その中にはおびただしい量のウイルスが存在している。これらのウイルスは海洋の様々な生物に感染するが, その中には微細藻類に感染するものもある。1980年代に「海洋微細藻類に感染するウイルス」の存在が知られ, それ以降, これら微細藻類ウイルスの情報が蓄積されてきた。そして, これまでに40種以上の微細藻類ウイルスが発見され, それぞれが多様なウイルス群に分類されることが分かってきた。また一方で, 海洋ウイルスの多くが海洋細菌に感染するファージであるものの, 海洋微細藻類に感染するウイルスの量はそれに次ぐ量であるとも言われ, ウイルス自体のバイオマス, そして海洋微細藻類の生態や進化に対して重要な働きを持っていると考えられてきた。藻類は地球上の一次生産の半分を担うとも言われており, 微細藻類に感染するウイルスが, その宿主個体群の動態に及ぼす影響は, 生物生産の観点からも無視できない。そのため, 生態学的な視点での微細藻類ウイルスの研究が小規模ながらも地道に行われ, 徐々に環境中におけるウイルスの役割が理解されつつある。一方, 微細藻類ウイルスの感染に関わる分子機構については, ほとんど理解されていないという課題もあり, 両者の生態学的関係を理解する為の, 分子細胞学的研究基盤の強化が強く望まれている。本総説では, これまでの海洋における微細藻類ウイルス研究についての概要を報告し, そして今, 求められている課題について考えてみたい。

1. はじめに

天然海洋環境中に多量のウイルス様粒子が存在することが1980年代末に初めて報告されて以降, 水圏ウイルスの研究が盛んに行われてきた^{1,2)}。これまでの研究により, 海洋環境におけるウイルスの数は少なくとも貧栄養水域で約 10^6 粒子/mL, 富栄養水域では約 10^8 粒子/mLにも達すると試算されているが³⁻⁷⁾, 近年の技術革新によりそれらが過小評価されているとも言われている。このように海中には膨大なウイルス粒子が存在するが, その多くは水圏環境中で最も生物量の大きい細菌を宿主とする, バクテリオファージであると考えられており, 微細藻類(植

物プランクトン)に感染するウイルスは, それに次ぐ量であると考えられている。現在までに報告されている海洋微細藻類感染性ウイルスの種数は, 動植物のそれと比較して圧倒的に少ないが, そのゲノム構造は, dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNAと多様性に富み, その内部での系統も多様である⁸⁾。この事は, 我々が到達していない未知のウイルスが多量に存在している可能性を示唆している。現状では海洋微細藻類ウイルス間の分類学的な関係性についての情報は極めて乏しいため, 本稿では, これまでに報告された海洋微細藻類ウイルスを, ゲノム構造毎にまとめて紹介する。

海洋の微細藻類ウイルスは, それ自身が水圏環境の炭素循環, バイオマス, そして宿主の遺伝的多様性に影響を与える因子であるだけでなく⁹⁻¹²⁾, 宿主藻類の動態に影響を及ぼす生物学的因子でもある。一部の海洋微細藻類は, 大規模に増殖し赤潮(ブルーム)となって水産物や人体そして地球環境等, 人間の社会活動に影響を与える為, 他の藻類よりも盛んに研究されている。そして, これらの微細藻類とウイルスの生態学的関係の情報もまた, 集中的に蓄積されてきた。そこで, これまでに報告されてきた, 海洋微

連絡先

〒840-8502

佐賀県佐賀市本庄町1

佐賀大学 低平地沿岸海域研究センター

TEL/FAX: 0952-28-8498

E-mail: kimurak@cc.saga-u.ac.jp

表1 これまでに単離された海洋真核微細藻類に感染するウイルスの例

ウイルス	ウイルス直径(nm)	ゲノム構造	ウイルス(科)	ウイルス(属)	宿主	宿主(科)
EhV	170-200	dsDNA	Phycodnaviridae	<i>Coccolithovirus</i>	<i>Emiliana huxleyi</i>	Haptophyceae
MpV	115	dsDNA	Phycodnaviridae	<i>Prasinovirus</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	Prasinophyceae
HaV	202	dsDNA	Phycodnaviridae	<i>Raphidovirus</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Raphidophyceae
HcV	197	dsDNA	-	<i>Dinodnavirus</i>	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Dinophyceae
PpV	130-160	dsDNA	-	-	<i>Phaeocystis pouchetii</i>	Haptophyceae
PgV	-	dsDNA	-	-	<i>Phaeocystis globosa</i>	Haptophyceae
CsalDNAV	38	ssDNA	-	<i>Bacilladnavirus</i>	<i>Chaetoceros salsugineum</i>	Bacillariophyta
MpRV	90-95	dsRNA	Reoviridae	<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla</i>	Prasinophyceae
HaRNAV	25	ssRNA	Marnaviridae	<i>Marnavirus</i>	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Raphidophyceae
HcRNAV	30	ssRNA	Alvernaviridae	<i>Dinornavirus</i>	<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Dinophyceae
RsetRNAV	32	ssRNA	-	<i>Bacillarnavirus</i>	<i>Rhizosolenia setigera</i>	Bacillariophyta

細菌類とウイルスとの感染をめぐる生理・生態学的関係性についても、本稿後半で概説したい。微細藻類に感染するウイルスの研究は、クロレラに感染するウイルス(クロレラウイルス)の研究が先行しており、原核藻類であるシアノバクテリアのウイルスも盛んに研究されている。一方、本総説では、大規模なブルームを起こし、海洋環境や人間社会に影響を及ぼす海洋真核微細藻類に注目し、そのウイルスの関連する生態学的研究について考えてみたい。

2. 微細藻類ウイルスの分類

宿主である藻類が真核生物に広く分布する多様な光合成生物の総称であることにも起因して、これまでに多種多様な微細藻類に感染するウイルスが発見されてきた⁸⁾。真核微細藻類に感染するウイルスは大雑把に分けると、大型(粒径110-220nm, ゲノムサイズ170-510kbp)のdsDNAウイルスと、その他のssRNA, ssDNA, dsRNAをゲノムに持つ小型ウイルス(ゲノムサイズ4-25kb)に分けられる(表1)。

2.1. dsDNA ウイルス

これまでに報告されてきたdsDNAをゲノムに持つ微細藻類ウイルスは、nucleo-cytoplasmic large DNA viruses (NCLDVs)の仲間であり、ほとんどのウイルスがPhycodnavirus科に属している。具体的には、*Emiliana huxleyi*(ハプト植物、円石藻)に感染するEhV^{13,14)}、*Heterosigma akashiwo*(不等毛植物、ラフィド藻)のHaV^{15,16)}、*Micromonas pusilla*(緑色植物、プラシノ藻)に感染するMpV¹⁷⁾等がある。一方、最近の報告では、二枚貝類を斃死させる有害赤潮原因藻である*Heterocapsa circularisquama*(渦鞭毛藻)に感染するHcDNAVなどは、NCLDVsの中でも未だ分類群が不明であり、アフリカ豚コレラウイルスが属するAsfaviroidae科の仲間であるとも報告されている¹⁸⁾。有害赤潮を引き起こす*Phaeocystis globosa*(ハプト植物、プリムネシウム藻)に

感染するウイルスもまた、Phycodnavirus科には属さず、むしろ巨大ゲノムを持つMegavirus, Mimivirus(Acanthamoebaに感染するウイルス)¹⁹⁾や、*Cafeteria roenbergensis*という原生生物に感染するCroV²⁰⁾と近縁であると指摘されている^{20,21)}。Megavirusは、全長1μm、直径0.5μmと極めて大きい粒径と、2,556個ものORFを含む2.47Mbpのゲノムを持つ、これまでのウイルスの概念とは違う非常にユニークなウイルスとして最近報告された¹⁹⁾。こうしたユニークなウイルスと、微細藻類のdsDNAウイルスとの系統的關係・進化についての研究も、今後発展が期待される。

この他にも、微細藻類に感染するdsDNAウイルスと思われるウイルスが見つかり、部分的に解明が進んでいる。例えば、前述の*H. akashiwo*に感染するHaVとは異なるdsDNAウイルスの存在が報告されている。このウイルスは、大小2種類の形態とゲノムサイズの異なる粒子から構成され、これらが共感染し同細胞質内で同時に増幅しているという²²⁾。

2.2. ssDNA ウイルス

ssDNAをゲノムに持つ微細藻類ウイルスは、これまでのところ珪藻に感染するウイルスのみ発見されている²³⁻²⁵⁾。現在までに8種の珪藻ssDNAウイルスの詳しい性状が報告され、複製酵素アミノ酸配列を元に作成した系統樹から、少なくとも5種が*Bacilladnavirus*属に含まれると考えられている。珪藻ssDNAウイルスは、粒径32-38nmの小型のウイルスで、尾部とエンベロープは欠いている。ウイルスは宿主細胞の核で複製され(図1A,B)、複製過程の細胞内では、しばしばウイルス粒子からなる結晶状の構造や、ロッド状の形態が観察される。ロッド状の構造は、幅17-27nm、長さ0.5-1.4μmで、多く場合宿主の溶藻液中に放出された形状で観察されないこと、ロッド状構造の先端にウイルス粒子が観察されることから、ウイルス粒子の前駆体ではないかと考えられている^{25,26)}。一方で、*Chaetoc-*

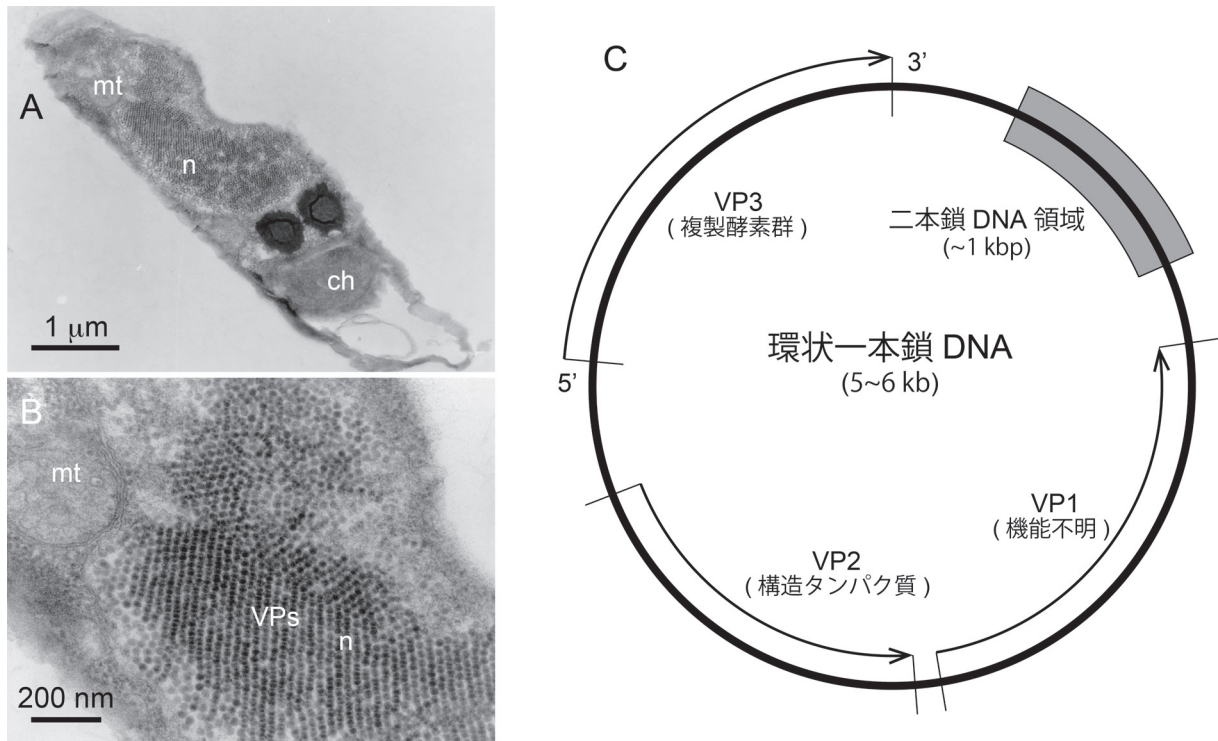


図1 (A) ssDNA ウイルスに感染した、珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* 細胞, ch:葉緑体, mt:ミトコンドリア, n:核 (B) 感染 *C. tenuissimus* 細胞核内で増殖するウイルス粒子. VPs: ウイルス粒子 (C) 珪藻 ssDNA ウイルスのゲノム構造の模式図

eros sp. SS628-11 株に感染する Csp07DNAV のように、ロッド状構造が溶藻液中に観察されることもあり、細胞外に放出されて何かしらの影響を及ぼしている可能性も捨てきれず、その詳細な機能は未知なままである²⁷⁾。

珪藻 ssDNA ウイルスのゲノム構造に注目すると、このウイルス群が極めて特徴的であることが分かる。ゲノムの基本構造は、5 - 7kb の閉環状一本鎖 DNA であるが、他に短い相補鎖断片を一つ（もしくは複数）持つ、部分的二本鎖構造を取っていると考えられている（図 1C）。多くの場合、この相補鎖断片のサイズは 1kb 以下であるが、*Chaetoceros setoensis* に感染する CsetDNAV では、少なくとも 8 個の 67-145b の断片を持っていることが報告されている²⁸⁾。この断片もしくは二本鎖領域は、ゲノム複製のプライマー領域として働くことや、複製・転写酵素群のリクルートに関わることなどが考えられるが、今のところ想像の域を出ない。この領域の果たす役割を理解するためには、詳細なウイルス学的視点の研究が必要であろう。ゲノム上には 3 - 4 個の ORF が存在しており、その中の 2 つは複製酵素群と構造タンパク質をそれぞれコードすると予想されている。この複製酵素を基にした相同性解析からは、トリヤコウモリに感染する ssDNA ウイルスの「rodent stool-associated circular genome virus」, 「bat circovirus」 (*Circoviridae* 科, *Circovirus* 属) が低い相同性でヒットするが、これは近縁ウイルス種の情報、特に海洋の ssDNA

ウイルスの情報蓄積が不十分であることを示していると考えられる。

2. 3. dsRNA ウイルス

微細藻類の dsRNA ウイルスとしては、唯一、ハプト藻 *M. pusilla* に感染する MpRV²⁹⁾ のみが知られている。MpRV は *Reoviridae* 科の 1 種であり、ゲノムは 11 個のセグメント (741-5,792 bp) から構成され、完全長は 25,563bp の dsRNA である³⁰⁾。この MpRV は、より大きいサイズの dsDNA ウイルス MpV と共に、同じ *M. pusilla* の細胞に共感染可能である。MpRV の宿主範囲は狭く、潜伏期間は 36 時間、35°C 以上の水温で不活化するといった性状が明らかになっている。外蓋構造を含む 90-95nm の粒子からなり、50nm の内部の粒子表面に突起がない形態から、non-turreted な *Reoviridae* のグループに属すると考えられている。

2. 4. ssRNA ウイルス

海洋微細藻類の ssRNA ウイルスは、2003 年にラフィド藻 *H. akashiwo* に感染する HaRNAV が、*Marnavirus* 属のウイルスとして初めて報告された³¹⁻³⁴⁾。その後、ラフィド藻と同じストラメノパイル生物の珪藻を宿主とした、複数の ssRNA ウイルス (*Bacillarnavirus*) が発見されている^{23,24)}。ストラメノパイル生物では、他にも原生生物のラ

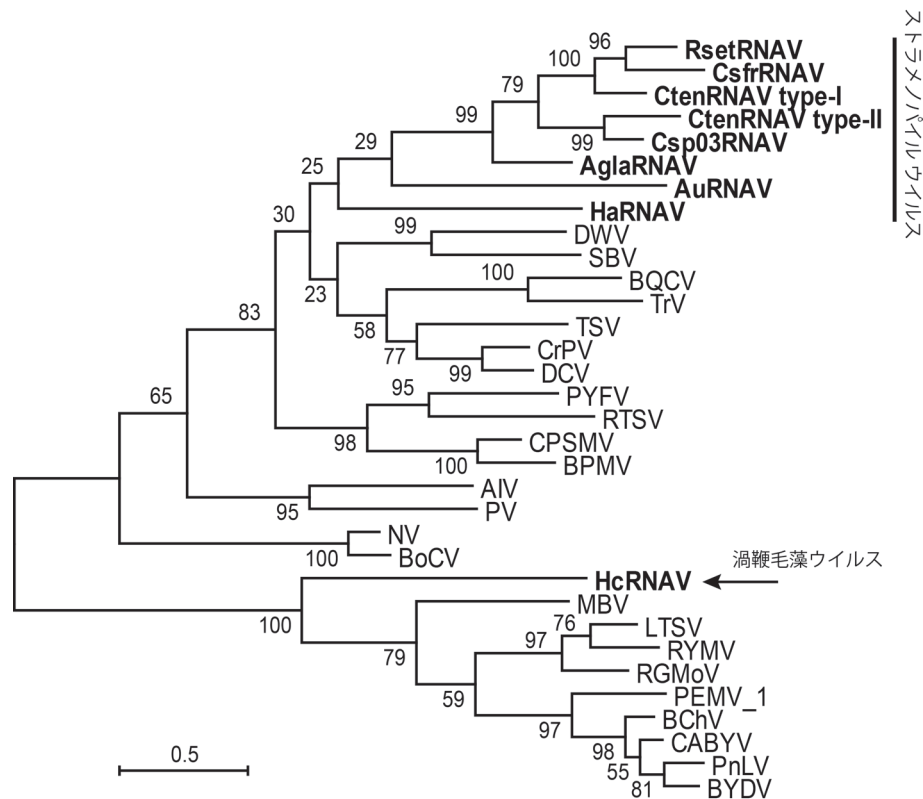


図2 複製酵素 RdRp のアミノ酸配列を基に構築した、真核微細藻類 ssRNA ウイルスを含む、ssRNA ウイルスの最尤系統樹。系統樹作成に用いた配列情報：aichi virus (AIV), NP_740444; *Asterionellopsis glacialis* (AglaRNAV) (unpublished data); *Aurantiochytrium* single-stranded RNA virus (AuRNAV), BAE47143; beet chlorosis virus (BChV), AAK49964; bovine enteric calicivirus (BoCV), AJ011099; bean pod mottle virus (BPMV), NC_003496; black queen cell virus (BQCV), NC_003784; barley yellow dwarf virus (BYDV), BAA01054; cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV), CAA54251; cowpea severe mosaic virus (CPSMV), M83830; cricket paralysis virus (CrPV), NC_003924; *Chaetoceros socialis* f. *radians* (CsfrRNAV), NC_012212; *Chaetoceros* sp. strain SS08-C03 single-stranded RNA virus (Csp03RNAV), AB639040; *Chaetoceros tenuissimus* single-stranded RNA virus type-I (CtenRNAV type-I), AB37547; *Chaetoceros tenuissimus* single-stranded RNA virus type-II (CtenRNAV type-II), AB971658; drosophila C virus (DCV), NC_001834; deformed wing virus (DWV), NC_004830; *Heterosigma akashiwo* RNA virus (HaRNAV), NP_944776; *Heterocapsa circularisquama* RNA virus 109 (HcRNAV), AB218609; lucerne transient streak virus (LTSV), NP_736596; Mushroom bacilliform virus (MBV), NP_042510; Norwalk virus (NV), M87661; Human poliovirus 1 Mahoney (PV), V01149; Pea enation mosaic virus 1 (PEMV-1), AAA72297; Poinsettia latent virus (PnLV), CAI34771; Parsnip yellow fleck virus (PYFV), D14066; Ryegrass mottle virus (RGMoV), NP_736587; Rice turgo spherical virus (RTSV), AAA66056; *Rhizosolenia setigera* (RsetRNAV), NC_018613; Rice yellow mottle virus (RYMV), CAE81345; sacbrood virus (SBV), NC_002066; Triatoma virus (TrV), NC_003783; and taura syndrome virus (TSV), NC_003005.

ピリンチュラ類に感染する ssRNA ウイルスの報告もある³⁵⁾。これらの ssRNA ウイルスは、粒径 22-35nm の正二十面体を呈し、エンベロープを持たず、細胞質内にウイルス粒子が蓄積する点で共通している。ゲノムサイズは約 9kb の直鎖状で、RNA helicase や RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) とした複製酵素群、ならびに構造タンパク質を含む ORF がコードされている³⁶⁾。ストラメノパイル生物以外の微細藻類 ssRNA ウイルスは、渦鞭毛藻 *H. circularisquama* に感染する HcRNAV が知られている。HcRNAV のゲノム

も直鎖 ssRNA であり、複製酵素群と構造タンパク質からなる 2 つの ORF を持ち、粒径 34nm の正二十面体からなること等、他の微細藻類 ssRNA ウイルスと共通性があるが、ゲノムサイズは 4.4kb と比較的小さい^{37,38)}。

複製酵素である RdRp を元に構築した系統樹では、宿主の系統群ごとにウイルスが同系統にまとまるのがわかっている (図2)。例えば、すべての珪藻 ssRNA ウイルスは単一系統にまとまり、それを含むストラメノパイル生物も単一系統にまとまっている。一方で、渦鞭毛藻に感染する

HcRNAV は、ストラメノパイル生物群に感染するウイルスとは独立した系統のウイルスであり、現在は *Alvernaviridae* 科の新属 *Dinornavirus* 唯一の種として理解されている。これまでに報告されてきた藻類 ssRNA ウイルスの特徴は、ピコルナウイルスの特徴と合致しており、全てピコルナウイルスの仲間であると考えられる。

dsDNA ウイルスのケースを除いて、未だ各ゲノム構造の海洋微細藻類ウイルスの情報は不足しているため、ウイルス全体の中における系統的位置に関して不明な点が多い。ウイルスの系統関係や宿主との共進化といった議論を深めるためにも、今後も海洋環境の微細藻類に感染するウイルスの情報蓄積が必要であろう。

3. 海洋真核性微細藻類ウイルスの生態学

一般に海洋環境中の真核微細藻類による生産量はきわめて膨大で、例えば珪藻の場合、ある海域の生産量の3-7割程度を占める場合もあることが知られている³⁹⁻⁴¹⁾。そのため微細藻類とウイルスの生態学的関係の理解は、地球環境科学的にも極めて重要である。また微細藻の大量増殖に伴うブルームの形成は、対象種によっては水産学的に無視できない現象であり、対象微細藻の生態学的理解は喫緊の課題となっている。これまでにウイルス感染が報告されている *E. huxleyi*, *Phaeocystis globosa*, *H. akashiwo*, *H. circularisquama* 等はブルームを形成する微細藻であり、ブルーム終焉とウイルス感染との関係について理解が進んできた。本章では、これまでに報告されてきた研究を元に、微細藻類ウイルスの感染がもたらす生態学的影響について紹介したい。

3. 1. ウイルス感染が影響を与える宿主個体群動態

これまで大規模なブルームを形成する微細藻類では、現場水域での綿密な観測によって、宿主ブルームの崩壊とウイルス感染との間に密接な関係があることが示唆されてきた。例えば、日本各地で初夏に観察される赤錆色のブルームの主である *Heterosigma akashiwo* 赤潮は、ある日突然姿を消すといった事例が頻繁に観察される。実はこの赤潮が消え去る直前に、個体群中に急速にウイルス感染が広がっているという事実が報告されている⁴²⁾。では実際にウイルス感染が微細藻類のブルーム崩壊にどれほど寄与しているのか？ウイルス感染が宿主の死亡に寄与する量については、これまでいくつかの推定方法が検討されている。例えば、透過型電子顕微鏡を使った、個体群での感染細胞の直接計数法や、宿主1細胞あたりのバーストサイズと総ウイルス量から、感染率を理論的に算出する方法、他に動物プランクトンの食作用の影響量を評価する手法を応用した希釈法による計算法等が挙げられる。1つ目の、感染細胞の直接観察は、*E. huxleyi*, *H. akashiwo*, *H. circularisquama* で

実施され、ブルーム終盤にウイルス粒子が確認された細胞の割合は5-88%であると報告されている^{13,37,43)}。また、*E. huxleyi* のブルーム崩壊期のバーストサイズとウイルス量から推定されたウイルスによる死滅率は、総死亡細胞の25-100%であった^{44,45)}。これらの方法で推定された感染率は範囲が広く、実際の感染率を推定することが容易でないことが分かる。一方、希釈法では1日あたり、*Micromonas* spp. の9-25%、*P. globosa* の35%の細胞が、ウイルス感染で死亡すると推察されている^{46,47)}。これらのウイルス感染による死滅細胞の割合を推定する手法には、方法ごとにメリットとデメリットがあり⁴⁸⁾、現状でも各々の宿主-ウイルス間で正確な値ははっきりしていない。現場での宿主藻類の減少・死滅過程を理解していくためには、より感染細胞と非感染細胞を高精度で見分ける手法などの開発によって、ウイルス感染の正確な寄与率を求めていく必要があるであろう。

3. 2. ウイルス感染に影響を及ぼす外部環境要因と宿主細胞内要因

現場の微細藻類個体群にウイルス感染が影響を与えている事は理解されてきたが、時と場合によってその感染率は異なっていた。その一つの理由として、宿主-ウイルスの両者の関係が環境条件によって変化することが挙げられる。例えば、水温は両者間の感染・溶藻に与える影響が大きいと知られている。例えば *H. akashiwo* は、25℃の環境で HaV の感染を受けて死滅するが、30℃では生残できる⁴⁹⁾。また全く異なるゲノムタイプのウイルス (CtenDNAV, CtenRNAV) の感染を受ける珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* を用いた室内実験では、それぞれのウイルスごとに感染に適した水温があり、それによりウイルス同士がニッチを分けている可能性が指摘されている⁵⁰⁾。同様に、海水の塩分濃度もウイルス感染に影響を与える可能性が、ごく最近の研究で明らかになってきた (Kimura and Tomaru, unpublished data)。微細藻類の多くが、水温や塩分など、物理・化学的環境が短期間で劇的に変化する沿岸海域に生息する種である。海面下では、時々刻々と変化する環境に合わせ、微細藻類とウイルスが激しい攻防戦を繰り返しているであろう。

環境変化は、ウイルスと宿主の物理的吸着に直接影響することで、ウイルス感染の成立に関わっているのかもしれない。一方で、宿主細胞内生理環境の違いが、ウイルス感染の成立を左右しているケースも考えられる。よく知られている現象として、宿主細胞の増殖フェーズによってウイルス感受性が変化する事がある¹⁰⁾。*Phaeocystis pouchetii* (ハプト藻) とそのウイルスである PpV (dsDNAV) の場合、バーストサイズが定常期で減少することが報告されている⁵¹⁾。*H. circularisquama* と HcDNAV の系でも、対数増殖期では定常期より、潜伏期間が短くなりバーストサイズが

大きくなると報告されている⁵²⁾。これとは逆のパターンもあり、*Chaetoceros* 属珪藻は対数増殖期でウイルスと共存しつつ増殖し続けるものの、後期定常期ではウイルス存在下で急速に死滅する²⁶⁾。微細藻類の生理状態とウイルス感染の関係は、未だ情報が十分に蓄積しているとは言えない。両者間の生態を明らかにするためには、さらなる現象の蓄積とそれを裏打ちする分子メカニズムの解明が必要であろう。

3.3. 宿主のウイルス抵抗性

宿主細胞が持つウイルス抵抗性能の理解は、宿主-ウイルス系を理解する上で重要である。他の動植物細胞と同様に、微細藻類においても細胞のウイルス抵抗性が知られている。Thyrhaug et al. (2003) は、いくつかの藻類とウイルスの系において、藻類がウイルスと共存する現象を報告している⁵³⁾。この報告では、感染・溶藻に伴って放出されたウイルス分子の一部が宿主細胞のウイルスレセプターに結合することで、ウイルス感染が抑制され宿主とウイルスが共存するようになることが推察している⁵³⁾。*M. pusilla* と MpV のケースでは、*M. pusilla* がウイルス感染圧の無い状態で数年間もウイルス抵抗性を維持し、溶原化を支持する結果も見出されないことから、*M. pusilla* 細胞表面のウイルス感染に関わる因子に突然変異が生じている可能性が指摘されている^{54,55)}。また、*H. circularisquama* と HcRNAV の系では、ウイルス感受性の細胞と、ウイルス感染後に生じたウイルス抵抗性細胞に、ウイルスゲノムをトランスフェクションする実験が実施され、抵抗性細胞ではウイルスゲノム複製が起こらないと示されている⁵⁶⁾。また *H. circularisquama* 細胞のウイルス抵抗性は、ウイルス存在下では維持されるものの、ウイルスフリーの環境ではウイルス感受性細胞に可逆的に変化する。それ故、本ケースでは、細胞内でウイルスゲノム複製を抑制するような一過的なシステムによって、*H. circularisquama* のウイルス抵抗性が生じているものと考えられている⁵⁶⁾。一方、珪藻 *C. tenuissimus* と CtenRNAV を用いた最近の我々の研究から、珪藻に付随するバクテリアによって、珪藻のウイルス抵抗性が誘導される事が分かってきた⁵⁷⁾。これは、微細藻類のウイルス感受性が、第三者のバクテリアの存在によって影響を受けており、バクテリアが存在する現場環境を宿主とウイルスだけの単純な系では評価できない事を示す興味深い報告となっている。こうしたこれまでのウイルス抵抗性の研究から、微細藻類のウイルス抵抗性システムは一様ではなく、また複雑な機構から成り立っている可能性が示唆されてきた。

単細胞の微細藻類は、動植物のような高度な恒常性機構を持たないが、それにもかかわらず多くの藻類で細胞性のウイルス抵抗機構が備わっていることが明らかになってきた。微細藻類のウイルス抵抗性研究は、生態学的な影響だ

けでなく、単純な細胞のウイルス応答を理解する土台になり、細胞のウイルス応答機構の進化について議論することにも役立つと期待される。

3.4. 宿主-ウイルス間の感染特異性

宿主-ウイルス間の感染特異性については、微細藻類ウイルスの場合、一般的に種よりもこまかい、(単離)株レベルで特異性があるとされている。例えば海水中から同種の植物プランクトンを無数に分離し、同様にそれらに感染するウイルスを多数分離する。両者の間で感染交差試験を実施すると、“ウイルスの宿主感染スペクトル”ならびに“宿主のウイルス感受性スペクトル”がそれぞれ多様である事がわかる。広島湾から分離した90株の *H. akashiwo* と、同種感染ウイルス65株の例では(5,850通りの対戦試験)、宿主とウイルスはそれぞれ少なくとも6グループならびに3グループに分かれていた⁵⁸⁾。では、このようなウイルスの感染特異性は何に起因しているのか? この研究分野においては、渦鞭毛藻 *H. circularisquama* とそれに感染する HcRNAV の関係において比較的研究が進んでいる。この系では、宿主・ウイルス共に感染パターンによって大きく2つのグループに分類される³⁷⁾。感染特異性の異なる HcRNAV の塩基配列を比較すると、90%以上の塩基配列が一致するものの、カプシド遺伝子領域内の数カ所に、集中的に変異が認められる。さらに興味深いことに、これらの変異に伴うアミノ酸置換のほとんどは、ウイルス粒子の外側に位置すると明らかになった³⁸⁾。加えて、感染が成立しない組み合わせでも、ウイルス吸着を介さないトランスフェクションでウイルスゲノムを導入すると、感染が成立する事も報告されているため⁵⁹⁾、*H. circularisquama* と HcRNAV 間の感染特異性は、宿主細胞表面とウイルスとの吸着に依存している可能性が極めて高いと考えられる。

このようなウイルス感染特異性の報告は、他にも多々ある。同一海域に生息する宿主藻類は、同種であってもウイルス感染性という観点ではバラエティーに富んだ株の集合体である。複雑な感染特異性を宿主個体群が維持することは、特定のウイルスの出現によって宿主が全滅することを防ぐ手段となっていると考えられ、個体群レベルでのウイルス抵抗性として働いているのかもしれない。その一方で、ウイルス側から見ると、多様な感染特異性を持つことで宿主の全滅が防がれ、ウイルス自身の全滅を防ぐことに繋がっているのかもしれない。*H. circularisquama* と HcRNAV の系では吸着が鍵であると考えられるが、両者間の複雑なシステムを司る鍵は他にもあると考えられる。その機構が何であるか? それを明らかにするような、さらなる研究が今後必要であろう。

3.5. まとめ

海洋の真核性微細藻類に感染するウイルスが発見されて

以降、これまでの調査・実験により、その宿主との生態学的関係が徐々に明らかになってきた。本章では、ウイルス感染の成立に関わる外部環境や宿主細胞内生理、ウイルス抵抗性、ウイルス感染特異性という視点で概説したが、実際の現場水域ではこれらの影響が複雑に連関し、他の生物（バクテリア等）とも関わりながら、ウイルスが宿主の動態に影響を与えているのであろう。今後、ウイルス感染の分子機構が明らかになり、本章で挙げた現象の生理学的理解が深まれば、微細藻類とウイルスとの生態学的関係の理解も大きく進展するだろう。現状では、海洋真核性微細藻類ウイルスの感染の分子機構が完全に明らかになった例はまだ無く、今後の微細藻類のウイルスに関する分子細胞学的研究の強化が強く望まれる。

4. 今後の海洋真核微細藻類ウイルスの研究

初めて海洋藻類ウイルスが発見されて以降、これまでの研究の蓄積で様々なことが分かってきたが、他の動植物やバクテリアに感染するウイルス研究の歴史や厚みからすると、微細藻類ウイルスの研究はまだ若い。しかしながらそれらとは異なる独特の生態や進化を辿り、海洋中に多様に、多量に生息する「真核性微細藻類」というグループに感染するウイルスの研究は、未だ開拓の余地を残す分野であるとも言え、多くの発見の可能性を秘めているかもしれない。実際に、約10年前に発見された珪藻 ssDNA ウイルスが、他に類を見ないゲノム構造を持っていた事が発見されるなど、今後も海洋微細藻類ウイルス研究は新発見の宝庫になる可能性がある。

これまでの研究から、微細藻類は多細胞生物と異なるウイルスとの関係を持ちながら様々な生物分類群に進化していったと考えられている。将来的には、微細藻類とウイルスの関係は、進化学的な研究に発展する可能性も十分にあるだろう。一方、生態学的視点で見れば、微細藻類とウイルスの関係の一端が明らかになってきており、様々な現象を説明付ける生理実験も蓄積してきた。今後、種々の現象やウイルス感染機構の分子細胞生物学的研究が進展することで、微細藻類とウイルス間の生態学的理解が飛躍的に深まることが期待される。

参考文献

- 1) Bergh Ø, Børshheim KY, Bratbak G, Heldal M.: High abundance of viruses found in aquatic environments. 1989.
- 2) Wommack KE, Colwell RR.: Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:69-114, 2000.
- 3) Suttle CA.: Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5:801-812, 2007.
- 4) Tomaru Y, Nagasaki K.: Flow cytometric detection and enumeration of DNA and RNA viruses infecting marine eukaryotic microalgae. *J Oceanogr* 63:215-221, 2007.
- 5) Holmfeldt K, Odić D, Sullivan MB, Middelboe M, Riemann L.: Cultivated single-stranded DNA phages that infect marine Bacteroidetes prove difficult to detect with DNA-binding stains. *Appl Environ Microbiol* 78:892-894, 2012.
- 6) Steward GF, Culley AI, Mueller JA, Wood-Charlson EM, Belcaid M, Poisson G.: Are we missing half of the viruses in the ocean? *ISME J* 7:672-679, 2013.
- 7) Mojica K, Evans C, Brussaard C.: Flow cytometric enumeration of marine viral populations at low abundances. *Aquat Microb Ecol* 71:203-209, 2013.
- 8) Hyman P, Abedon ST.: Smaller fleas: viruses of microorganisms. *Scientifica* 2012:Article ID 734023, 2012.
- 9) Fuhrman JA.: Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-548, 1999.
- 10) Brussaard CP.: Viral Control of Phytoplankton Populations -- a Review1. *J Eukaryot Microbiol* 51:125-138, 2004.
- 11) Suttle CA.: Viruses in the sea. *Nature* 437:356-361, 2005.
- 12) Brussaard CP, Wilhelm SW, Thingstad F, Weinbauer MG, Bratbak G, Heldal M, Kimmance SA, Middelboe M, Nagasaki K, Paul JH, Schroeder DC, Suttle CA, Vaque D, Wommack KE.: Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruses. *ISME J* 2:575-578, 2008.
- 13) Brussaard CP, Kempers RS, Kop AJ, Riegman R, Heldal M.: Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliania huxleyi* in the North Sea. *Aquat Microb Ecol* 10:105-113, 1996.
- 14) Schroeder DC, Oke J, Hall M, Malin G, Wilson WH.: Virus succession observed during an *Emiliania huxleyi* bloom. *Appl Environ Microbiol* 69:2484-2490, 2003.
- 15) Nagasaki K, Yamaguchi M.: Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat Microb Ecol* 13:135-140, 1997.
- 16) Nagasaki K, Tarutani K, Hamaguchi M, Yamaguchi M.: Preliminary Analysis on *Heterosigma akashiwo* Virus DNA. *Microbes Environ* 16:147-154, 2001.
- 17) Mayer J, Taylor F.: A virus which lyses the marine nanoflagellate *Micromonas pusilla*. *Nature* 281:299-301, 1979.
- 18) Ogata H, Toyoda K, Tomaru Y, Nakayama N, Shirai Y, Claverie J-M, Nagasaki K.: Remarkable sequence similarity between the dinoflagellate-infecting marine virus and the terrestrial pathogen African swine fever virus. *Virology* 6:1852-1860, 2009.
- 19) Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C.: Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 341:281-286, 2013.
- 20) Fischer MG, Allen MJ, Wilson WH, Suttle CA.: Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19508-19513, 2010.

- 21) Santini S, Jeudy S, Bartoli J, Poirot O, Lescot M, Abergel C, Barbe V, Wommack KE, Noordeloos AA, Brussaard CP. Genome of *Phaeocystis globosa* virus PgV-16T highlights the common ancestry of the largest known DNA viruses infecting eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:10800-10805, 2013.
- 22) Lawrence JE, Brussaard CP, Suttle CA. Virus-specific responses of *Heterosigma akashiwo* to infection. *Appl Environ Microbiol* 72:7829-7834, 2006.
- 23) Tomaru Y, Nagasaki K.: Diatom viruses. In: Seckbach J, Kocielek J, editors. *The diatom world, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Springer, pp.211-225, 2011.
- 24) Tomaru Y, Toyoda K, Kimura K, Hata N, Yoshida M, Nagasaki K. First evidence for the existence of pennate diatom viruses. *ISME J* 6:1445-1448, 2012.
- 25) Kimura K, Tomaru Y.: Discovery of Two Novel Viruses Expands the Diversity of Single-Stranded DNA and Single-Stranded RNA Viruses Infecting a Cosmopolitan Marine Diatom. *Appl Environ Microbiol* 81:1120-1131, 2015.
- 26) Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K.: Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Appl Environ Microbiol* 77:5285-5293, 2011.
- 27) Kimura K, Tomaru Y.: Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine diatom *Chaetoceros* sp. strain SS628-11 isolated from western Japan. *PloS one* 8:e82013, 2013.
- 28) Tomaru Y, Toyoda K, Suzuki H, Nagumo T, Kimura K, Takao Y.: New single-stranded DNA virus with a unique genomic structure that infects marine diatom *Chaetoceros setoensis*. *Scientific reports* 3:3337, 2013.
- 29) Brussaard CP, Noordeloos AA, Sandaa RA, Heldal M, Bratbak G.: Discovery of a dsRNA virus infecting the marine photosynthetic protist *Micromonas pusilla*. *Virology* 319:280-291, 2004.
- 30) Attoui H, Jaafar FM, Belhouchet M, De Micco P, De Lamballerie X, Brussaard CP.: *Micromonas pusilla* reovirus: a new member of the family Reoviridae assigned to a novel proposed genus (Mimoreovirus). *J Gen Virol* 87:1375-1383, 2006.
- 31) Tai V, Lawrence JE, Lang AS, Chan AM, Culley AI, Suttle CA.: Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J Phycol* 39:343-352, 2003.
- 32) Lang AS, Culley AI, Suttle CA.: Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Virology* 320:206-217, 2004.
- 33) Suttle CA.: Marnavirus. *The Springer Index of Viruses*. Springer, pp.835-837, 2011.
- 34) Adams M, Carstens E.: Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Archives of virology* 157:1411-1422, 2012.
- 35) Takao Y, Mise K, Nagasaki K, Okuno T, Honda D. Complete nucleotide sequence and genome organization of a single-stranded RNA virus infecting the marine fungoid protist *Schizochytrium* sp. *J Gen Virol* 87:723-733, 2006.
- 36) Lang AS, Suttle CA.: Marnaviruses. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV, editors. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp.280-285, 2008.
- 37) Tomaru Y, Nagasaki K.: Widespread occurrence of viruses lytic to the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* along the western coast of Japan. *Plankton Biology and Ecology* 51:1-6, 2004.
- 38) Nagasaki K, Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Nishida K, Tomaru Y.: Comparison of genome sequences of single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl Environ Microbiol* 71:8888-8894, 2005.
- 39) Armbrust EV.: The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459:185-192, 2009.
- 40) Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P.: Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281:237-240, 1998.
- 41) Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Queguiner B.: Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cy* 9:359-372, 1995.
- 42) Tarutani K, Nagasaki K, Yamaguchi M.: Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl Environ Microbiol* 66:4916-4920, 2000.
- 43) Nagasaki K, Tomaru Y, Nakanishi K, Katanozaka N, Yamaguchi M.: Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquat Microb Ecol* 34:219-226, 2004.
- 44) Bratbak G, Egge JK, Heldal M.: Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Marine Ecology Progress Series* 93:39-48, 1993.
- 45) Jacquet S, Heldal M, Iglesias-Rodriguez D, Larsen A, Wilson W, Bratbak G.: Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquat Microb Ecol* 27:111-124, 2002.
- 46) Evans C, Archer SD, Jacquet S, Wilson WH.: Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquat Microb Ecol* 30:207-219, 2003.
- 47) Baudoux A-C, Noordeloos AA, Veldhuis MJ, Brussaard CP.: Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in temperate coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 44:207, 2006.
- 48) Short SM.: The ecology of viruses that infect eukaryotic algae. *Environ Microbiol* 14:2253-2271, 2012.
- 49) Nagasaki K, Yamaguchi M.: Effect of temperature on the algicidal activity and stability of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus). *Aquat Microb Ecol* 15:211-216, 1998.
- 50) Tomaru Y, Kimura K, Yamaguchi H.: Temperature alters algicidal activity of DNA and RNA viruses

- infecting *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Aquat Microb Ecol* 73:171-183, 2014.
- 51) Bratbak G, Jacobsen A, Heldal M, Nagasaki K, Thingstad F.: Virus production in *Phaeocystis pouchetii* and its relation to host cell growth and nutrition. *Aquat Microb Ecol* 16:1-9, 1998.
 - 52) Nagasaki K, Tomaru Y, Tarutani K, Katanozaka N, Yamanaka S, Tanabe H, Yamaguchi M.: Growth characteristics and intraspecies host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Appl Environ Microbiol* 69:2580-2586, 2003.
 - 53) Thyrhaug R, Larsen A, Thingstad TF, Bratbak G.: Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Marine Ecology Progress Series* 254:27-35, 2003.
 - 54) Waters RE, Chan AT.: Micromonas-Pusilla Virus - the Virus Growth-Cycle and Associated Physiological Events within the Host-Cells - Host Range Mutation. *J Gen Virol* 63:199-206, 1982.
 - 55) Zingone A, Natale F, Biffali E, Borra M, Forlani G, Sarno D.: Diversity in morphology, infectivity, molecular characteristics and induced host resistance between two viruses infecting *Micromonas pusilla*. *Aquat Microb Ecol* 45:1-14, 2006.
 - 56) Tomaru Y, Mizumoto H, Nagasaki K.: Virus resistance in the toxic bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to single-stranded RNA virus infection. *Environ Microbiol* 11:2915-2923, 2009.
 - 57) Kimura K, Tomaru Y.: Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. *Aquat Microb Ecol* 73:69-80, 2014.
 - 58) Tomaru Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K.: Quantitative and qualitative impacts of viral infection on *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) population during a bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquat Microb Ecol* 34:227-238, 2004.
 - 59) Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K.: Intraspecies host specificity of a single-stranded RNA virus infecting a marine photosynthetic protist is determined at the early steps of infection. *Journal of Virology* 81:1372-1378, 2007.

Marine Viruses that infect Eukaryotic Microalgae

Kei Kimura¹⁾, Yuji Tomaru²⁾

1) Institute of Lowland and Marine Research, Saga University, 1 Honjo-machi, Saga-city, Saga 840-8502, Japan

2) National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan

Marine microalgae, in general, explain large amount of the primary productions on the planet. Their huge biomass through photosynthetic activities is significant to understand the global geochemical cycles. Many researchers are, therefore, focused on studies of marine microalgae, i.e. phytoplankton. Since the first report of high abundance of viruses in the sea at late 1980's, the marine viruses have recognized as an important decreasing factor of its host populations. They seem to be composed of diverse viruses infectious to different organism groups; most of them are considered to be phages infectious to prokaryotes, and viruses infecting microalgae might be ranked in second level. Over the last quarter of a century, the knowledge on marine microalgal viruses has been accumulated in many aspects. Until today, ca. 40 species of marine microalgal viruses have been discovered, including dsDNA, ssDNA, dsRNA and ssRNA viruses. Their features are unique and comprise new ideas and discoveries, indicating that the marine microalgal virus research is still an intriguing unexplored field. In this review, we summarize their basic biology and ecology, and discuss how and what we should research in this area for further progress.

