

学 位 論 文 題 名

海産微細藻類に感染するウイルスの探索と
その特性に関する研究

学位論文内容の要旨

海産微細藻類での異常増殖現象が知られており、特に、渦鞭毛藻類が異常増殖して海面が赤色化する赤潮は産業被害を伴うことから、その防除研究が強く求められ、積極的に進められてきた。その過程の中で赤潮防除に化学物質を使用することは海域汚染の面から、困難であるため、近年、赤潮藻類への攻撃性を示す微生物を環境にやさしい微生物農薬として利用する試みが検討されている。これまでに赤潮藻類を殺藻する細菌およびウイルスが見出されてきている。その中でも、赤潮防除のための微生物農薬的な応用を考える上で、ウイルスは宿主特異性が高く、その安全性と可能性に期待が寄せられている。本研究は、赤潮のバイオコントロール研究の一環として、赤潮藻類をはじめとする海産微細藻類の増殖に影響を及ぼすウイルスの探索を行ったものであり、微細藻類の増殖抑制を引き起こすウイルス様因子が見出された。本論文では、このウイルス様因子の特性と生態学的な知見について得られた結果を述べる。

まず、第一章では、1993年から1995年の3年間にわたり、北海道噴火湾沿岸海水から海産微細緑藻の *Tetraselmis* sp.、赤潮原因渦鞭毛藻の *Alexandrium catenella* および *Gymnodinium mikimotoi* に感染し、溶藻あるいは殺藻を引き起こすウイルスの探索を試みた。その結果、調査した3年間ともに9月から10月の秋季に採

取した海水試料から、供試藻類の増殖抑制を示すろ過性因子の存在が見出された。得られた計18試料の増殖抑制を示すろ過性因子は継代操作を繰り返しても増殖抑制効果が消失しなかったこと、0.22 μ mのフィルターろ過後も増殖抑制効果が減少しないことから、藻類の増殖とともに増える生物学的な因子、つまりウイルスあるいは微小細胞生物の可能性が示唆された。

第二章では、増殖抑制因子18試料の理化学的な特性を検討した。第一節では増殖抑制が観察された培養上清を試料として本因子の性質について検討した結果、培養上清中の本因子の本体を以下のように推定した。1)いずれの藻類増殖抑制因子とも径50-100nm程度の粒子で、易熱性であり、核酸を有する因子である。2)*Tetraselmis* sp. および *A. catenella* 増殖抑制因子11試料は脂質層構造がなく、感染に関与するタンパク質構造を持ち、RNAを有するウイルス様因子である。3)*G. mikimotoi* 増殖抑制因子7試料は脂質層構造がなく、感染に関与するタンパク質構造を持たず、RNAを有するウイルス類似の因子である。従って、*Tetraselmis* sp. および *A. catenella* 増殖抑制因子と *G. mikimotoi* 増殖抑制因子とは異なる特性を有するろ過性因子であることが示唆された。

第二節では、増殖抑制を受けた藻類細胞から細胞内抽出液を調製し、細胞内での本因子の存在の確認を行うとともに、増殖抑制効果の経時変化について検討した。増殖抑制された *Tetraselmis* sp., *A. catenella* および *G. mikimotoi* から調製した藻類細胞内抽出液が増殖抑制効果を示した。*Tetraselmis* sp. および *A. catenella* では増殖抑制が観察された直後、*G. mikimotoi* では増殖抑制効果が最大になった時期に細胞内抽出液の増殖抑制効果が高くなった。従って、本因子は藻類細胞内に侵入し、増殖していることが強く示唆された。

第三節では本因子を赤潮防除に利用するための特性評価とし

て、宿主特異性および低温・凍結状態での保存安定性などについて調べた。その結果、本因子は緑藻の *Tetraselmis* sp. と渦鞭毛藻の *A. catenella* および *G. mikimotoi* に増殖抑制を引き起こし、宿主域が比較的広いと考えられた。なお、1993年に得られた試料と1994年および1995年に得られた試料では宿主域に違いが認められた。次に、本因子に感染した藻類細胞の挙動を追跡調査するため、継代を行った結果、感染微細藻類の増殖は健全細胞に比べ明らかに劣り、さらに本因子を細胞外に放出することが確認された。従って、本因子に感染した細胞は二次的な感染源となりうると考えられた。さらに、本因子は凍結、低温下では安定で長期保存が可能であるものの、宿主藻類の培養温度(15～20℃)では一ヶ月で増殖抑制効果が消失したことから、本因子が環境に放出された場合、一ヶ月以内に宿主と接触しなければ不活化されることが示唆された。

第二章までの結果から、本因子はウイルス様の特性を示す因子であることが示唆されたため、第三章では、本因子の精製を試みた。第一節では、本因子の濃度が極めて低いことから濃縮方法を検討し、限外ろ過法に比べ、遠心分離法は濃縮効果が高いことを示した。超遠心分離で濃縮した試料をショ糖密度勾配遠心法で精製したところ、*Tetraselmis* sp. および *A. catenella* 増殖抑制因子では、ショ糖濃度が20～26%の画分に増殖抑制効果が認められた。また、藻類細胞内抽出液についても、同様のショ糖濃度画分に増殖抑制効果が認められた。特に、*A. catenella* 増殖抑制因子の精製画分でウイルス様粒子が観察された。一方、*G. mikimotoi* 増殖抑制因子は他の増殖抑制因子と異なり、超遠心分離を行っても沈降しないことが明らかになった。従って、*G. mikimotoi* 増殖抑制因子は、ウイルスよりもウイロイドに近い性状を有することが示唆された。

第二節では前節で確認されたウイルス様粒子が増殖抑制を引

き起こす原因微生物であるか否かを確認するため、感染細胞内の微細構造の変化を観察した。その結果、*A. catenella*で細胞構造の崩壊が始まる培養16日目および崩壊が最も激しくなる培養24日目の細胞内に培養上清から精製したウイルス様粒子と同様の構造体が観察された。従って、少なくとも、*A. catenella*細胞の増殖抑制は本ウイルス粒子によるものと推察した。

最後に、第一章で明らかにしたように、増殖抑制効果は9月と10月の試料からのみ検出され、季節的な消長を示すことが考えられたことから、このウイルスが調査海域のこの時期に存在する要因の解明に興味を持たれた。そこで、第三節では、本ウイルスの生態を明らかにするため、調査海域に広く分布するマコンブとの関連性を若干検討した。マコンブの先枯れ現象の初期症状と思われる白色斑症状を示すマコンブが確認されたため、この部位の破碎抽出液を調製し、*A. catenella* 培養液に接種したところ、*A. catenella*の増殖が抑制される現象が認められ、その効果は継代が可能であった。本ウイルスの検出時期はマコンブの先枯れ現象が発生する時期に追隨していたため、本来はマコンブを宿主としているウイルスである可能性が示唆された。

本研究では北海道噴火湾の沿岸海水から見出された*A. catenella*増殖抑制因子の一つは大きさ約70nmのウイルス様粒子がその本体であることが明らかに出来た。今後は、本ウイルスにおける遺伝学的性状を明らかにするとともに、本ウイルスの噴火湾での生態について詳細に調べる必要がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	絵面良男
副査	教授	池田勉
副査	教授	吉水守
副査	助教授	田島研一

学位論文題名

海産微細藻類に感染するウイルスの探索と その特性に関する研究

水圏での微細藻類の異常増殖はよく知られている現象である。特に、渦鞭毛藻類が異常増殖して海面が赤色化する赤潮は水産業に大きな被害を与えることから、その防除研究が積極的に進められてきた。赤潮防除には、化学物質の使用が検討されてきたが、化学物質による海洋汚染が懸念され、実用化にはいたっていない。近年、赤潮藻類を殺藻する細菌およびウイルスが見いだされ微生物農薬として利用する試みが検討されている。その中でも、赤潮防除のための微生物農薬的な応用を考える上で、ウイルスは宿主特異性が高く、その安全性と可能性に期待が寄せられている。本研究は、赤潮のバイオコントロール研究の一環として、赤潮藻類をはじめとする海産微細藻類の増殖に影響を及ぼすウイルスの探索を行ったものである。特に、評価される成果は以下のとおりである。

1. 1993年から1995年の3年間にわたり、北海道噴火湾沿岸海水から海産微細緑藻の *Tetraselmis* sp., 赤潮原因渦鞭毛藻の *Alexandrium catenella* および *Gymnodinium mikimotoi* に感染するウイルスの探索を試み、これら藻類の増殖抑制を引き起こす過性因子を得た。
2. これらの過性微細藻類増殖抑制因子は、毎年9-10月にかけての一定の時期にのみ存在することを示した。
3. 本ろ過性因子18試料について、理化学的性状を調べ、①いずれの因子とも大きさ50-100nm程度の易熱性粒子であり、そのうち、② *Tetraselmis* sp. および *A. catenella* 増殖抑制因子11試料は脂質層構造がなく、感染に関与するタンパク質構造を持ち、RNAを有するウイルス様因子であり、③ *G. mikimotoi* 増殖抑制因子7試料は脂質層構造がなく、感染に関与するタンパク質構造を持たず、RNAを有するウイルス類似の因子であることを明らかにした。

にした。

4. 増殖抑制を受けた藻類細胞内抽出液にも増殖抑制効果が観察され、本因子が藻類細胞内に侵入し、増殖していることを示した。
5. 増殖抑制を受けた *A. catenella* の培養上清精製画分から大きさが70nmのウイルス様粒子を観察した。また、感染 *A. catenella* 細胞の微細構造の変化を観察し、細胞構造の崩壊の進行、および培養上清中と同様のウイルス様粒子が存在することを確認した。
6. *G. mikimotoi* 増殖抑制因子は、超遠心分離で沈降しないウイロイド様因子であることを示した。
7. 得られたウイルスを赤潮防除に安全に利用することが可能であるか否かを検討したところ、①本ウイルスは緑藻の *Tetraselmis* sp. と渦鞭毛藻の *A. catenella* および *G. mikimotoi* に増殖抑制を引き起こす宿主域が比較的広いウイルスである、②本ウイルスに感染した藻類細胞を二代に渡し、継代培養を行ったところ、ウイルス感染藻体は健全細胞に比べて明らかに増殖が劣ったうえ、ウイルスを細胞外に放出することを確認した。③本ウイルスが凍結、低温下では安定で長期保存が可能であるものの、宿主藻類の培養温度である15～20℃では、約1ヶ月で感染性が消失することを示した。
8. 増殖抑制因子が、9月と10月の試料からのみ検出された理由を明らかにするために、調査海域に広く分布するマコンブとの関連性を若干検討し、マコンブの先枯れ現象の初期症状と思われる白色斑患部の破碎抽出液が、*A. catenella* の増殖を抑制する現象を見いだした。その効果は継代が可能であり、本ウイルスとタンパク質分解酵素および核酸分解酵素感受性が類似していた。

以上、本論文では、北海道噴火湾沿岸海水から、RNAを核酸型とする赤潮原因藻類に感染性を示す新しいウイルスの存在を明らかにした。また、本ウイルスを実用化する場合に問題となる、他生物への感染性、ウイルス感染細胞およびウイルス自体の環境中での消長を調べ、実用化に際しての適切な評価基準の必要性を示した。

以上の成果は、海産藻類に感染性を示すウイルスの存在を明らかにしたものであり、生物を用いた赤潮防除研究の進展に寄与することが期待される。また、適正な安全対策を講じれば、本ウイルスは赤潮防除に有効であると考えられるため、水産学に貢献するところ大であることから、審査員一同は本論文が博士（水産学）の学位論文として十分な内容を有するものと判定した。