

深海底水サンプルにおけるウイルス様粒子の探索と、微生物の生育に対する影響

佐藤 孝子*¹ 加藤 千明*¹ 堀越 弘毅*¹

1992年度の「しんかい6500」による日本海溝、1993年度の「しんかい2000」による小笠原水環海山、及び「しんかい6500」によるマリアナトラフ南部の潜航調査より得られた、深海底の冷水や熱水より、ウイルス様粒子の探索を行った。

その結果、陸上の湖沼や、浅海よりすで見いだされている代表的な構造のウイルス様粒子が、深海底水サンプルから初めて検出された。すなわち、高水圧下におかれた深海底の環境においても、陸上や浅海環境と同様に、深海ウイルスと深海微生物等の宿主生物との間に、密接な関連があるということが、示唆された。

さらに、地理的に隔絶している、2地点の熱水鉱床から得られた熱水サンプルのいずれからも、海洋性としては、新規と思われる棒状のウイルス様粒子が検出された。これらの熱水サンプルからは、それぞれ新種と思われる超好熱性古細菌が分離されており、その特殊な形態（棒状）から推定される熱安定性という性質からも、本棒状ウイルス様粒子の宿主が熱水に特異的な生物である可能性が考えられた。

また、ウイルス濃縮海水の、微生物に対する影響を調べたところ、日本海溝の冷水サンプルより得られた濃縮海水において、原核生物であるバクテリアにおいて広く生育阻害活性を示すが、真核生物である酵母に対しては示さないという現象が見いだされた。この活性には、ウイルス、あるいはそれより小さい核酸や蛋白質などを含めた分子が関与していると思われた。

キーワード：ウイルス様粒子、熱水鉱床、超好熱性細菌、好圧性細菌、生育阻害活性

An Electron Microscopic Study of Virus like Particles from Deep Sea Water Samples and the Effect of Virus-sized Concentrated Seawater for Growth of Various Microorganisms

Takako SATO*² Chiaki KATO*² Koki HORIKOSHI*²

The morphology of virus like particles from concentrated deep-sea water samples were isolated. One of them was cold seawater at Japan trench (sea-side, 6,269m depth), and others were two hydrothermal vent fluids at Suiyou sea-mount in Ogasawara and

* 1 海洋科学技術センター深海環境プログラム

* 2 The DEEP STAR group, Deep-sea Environment Exploration Program, Japan Marine Science and Technology Center

Southern Mariana Through (305°C, 1,378m depth, and 90–100°C, 1,480m depth, respectively). The diversity of virus like particles was similar to shallow seawater samples. But, rod shaped particles like a tobacco mosaic virus were only found in both two hydrothermal vent fluid samples. It seems to be characteristic to vent fluid.

The effect of virus-sizes concentrated cold seawater was also studied. The growth of microorganisms including yeast, *E. coli*, and 4 marine bacteria was prevented, but only yeast could grow again with 4 hours intervals.

Key words : Virus like particle, Hydrothermal vent, Hyperthermophiles, Barophilic bacteria, Growth inhibiting activity

1. はじめに

近年、海洋から分離されるウイルス様粒子（バクテリオファージなど）に対する関心が高まっている（Bergh *et al.*, 1989 ; Bratbak *et al.*, 1990 ; Suttle *et al.*, 1992）。ウイルスは、主にその宿主生物に対する病原性が問題となって様々な研究がなされてきた。しかし最近では、一般に核酸等の遺伝情報の媒介者（運び屋）として、海洋だけでなく、陸上の生態系内でも注目されてきており、宿主生物の進化にも重要な役割を果たしている可能性もあるとの見方も出てきた。一方、ウイルスの溶菌、抗菌作用や、細菌への遺伝形質導入などの活性は、すでに陸上の様々な生物をコントロールする手段として応用されており、海洋バイオテクノロジーへの応用が期待される。そこで我々は、ほとんど研究例のない深海底の冷水、熱水より、ウイルス様粒子の形態学的分布を調査するとともに、新規ウイルス様粒子の探索、及びその活性の調査を試みた。

2. 方 法

2. 1 深海底での採水について

1992, 93年度の潜水調査船「しんかい6500」、及び1993年度の潜水調査船「しんかい2000」による調査にて、海洋科学技術センターの運航チームのアドバイスにより作成した独自のシステム（ポリバック法）にて採水を行なった。6KDIVE#131にて得た海底冷水10l（日本海溝海側斜面深度6,269m）は、4°Cにて8か月間保存培養後、2KDIVE#690にて得た305°Cの海底熱水15l（小笠原水曜海山チムニー内深度1,378m）、及び6KDIVE#188にて得た90–100°Cの海底熱水17l（マリアナトラフ南部チムニー内深度1,480m）は採水後、ただちに船上でフジフィルトンモデルFF006システムを用い濃縮処理した。濃縮は、0.3µmポア膜を通過した底水を、日本海溝と小笠原では100kDa、南部マリアナでは30kDa

ポア膜上にて濃縮し、ウイルス画分とした。

2. 2 ウイルス様粒子の電子顕微鏡による探索

まず、ウイルス様粒子の探索を直接電顕検鏡法にて行なった（Demuth *et al.*, 1993）。普通の海水中のウイルス様粒子濃度は電子顕微鏡観察には低すぎるので上記のように限外濾過膜による分画濃縮を行なった（Proctor *et al.*, 1990 ; Paul *et al.*, 1991）。その結果、ウイルスを含む海水試料の濃縮率は、日本海溝の冷水で250倍、熱水はそれぞれ小笠原由来が500倍、南部マリアナ由来では700倍となった。この濃縮海水を試料として電顕標本を作成した。すなわち、コロジオン膜で覆って炭素蒸着したシートメッシュ上に試料を滴下し、2%酢酸ウラニルにて5分間ネガティブ染色後、ろ紙で試料液を吸い取り乾燥させた。これを電顕標本として日本電子社製透過型電子顕微鏡に挿入し、電顕実拡大30,000倍にて観察した。形態、及び大きさが既知のウイルスと相同な粒子を検索した。

2. 3 ウイルス濃縮海水の微生物に対する影響

また、ウイルス様粒子の微生物に対する影響をみるため、既存の数種の菌の生育阻害活性を調べた。既に当グループで深海サンプルより分離した原核生物である細菌4種類（耐圧好冷菌DSK1株、耐圧中温菌DSK25株、耐圧好冷菌DSJ4株及びDSS12株）と大腸菌JM109株、それに真核生物である酵母菌IFO2,347株、計6種類の微生物を培養し、対数増殖期にウイルス濃縮冷水を10分の1量加えた。生育の変化は、ADVANTEC社製N-112Dバイオフォトレコーダーを使い、培養液の透過光の濁度により測定した。

3. 結 果

3. 1 ウイルス様粒子の電子顕微鏡による探索

電顕による濃縮サンプルの直接観察では、冷水からは既知ウイルスの大きさの範囲内の粒子が見いだされな

かった。ただ、直径約10nmの粒子の凝集物がまばらに観察されたので、かなり小さい未知のウイルス様粒子の存在する可能性が考えられる。一方、小笠原、及び南部マリアナ由来の熱水からは、いずれも多種類の粒子が高頻度で観察された。様々な大きさ（50—300nm）の球形粒子が多数見いだされ（写真1A, B）他にウイルス様粒子に特徴的な六角形の輪郭を持つ粒子（写真1E）や、バクテリオファージに一般的に見られるテールを持つ粒子などが若干見いだされ（写真1A右上）、その特殊な形態や大きさからウイルス粒子であることが示唆される。特に熱水に特徴的と思われるのは、タバコモザイクウイルス様の棒状のもの（直径38nm、長さ160—570nm、写真1, C, D, F）が見いだされたことである。

3. 2 ウイルス濃縮海水の微生物に対する影響

原核生物である大腸菌及び4種類の海洋細菌は、いずれも日本海溝から得た冷水のウイルス濃縮海水の培養菌液への添加によって、その時点からの菌の生育が完全に阻害された。ところが、真核生物である酵母菌だけは、一時的に阻害を受けるものの生育の回復が見られ、後に、添加しない菌液と同程度の増殖を示した（図1）。また、さらに濃縮後の濾液（普通のウイルス様粒子よりもかなり小さいもの、例えば核酸や蛋白質などを含む）にも同様の活性が見られることがわかった。

4. 考 察

深海より採水したこれらの試料はその環境（温度、圧力）が全く違うものの、それぞれの海水から高水圧、高温環境下に適応した細菌が分離されており、それらを宿主とするファージ等のウイルス様粒子の存在が予想される。今回、小笠原及び、南部マリアナトラフ由来の摂氏100℃を越す熱水のウイルス分画から電子顕微鏡観察で発見された棒状のウイルス様粒子は、既に報告のある超好熱性細菌を宿主とするファージに見られる特殊な形態である（Zillig *et al.*, 1986）。また、海洋からはただひとつ、真核藻類の *Chara corallina* に感染するウイルス（*Chara corallina virus*; CCV）が棒状（直径18nm×長さ532nm）であることが見いだされている（Van Etten *et al.*, 1991）。しかしながら、これまでのところ浅海の海水からは、棒状ウイルス様粒子が検出された例はまだない。一方、植物ウイルスのような、陸上の生物を宿主とするウイルスの中でも、オドントグロッサムリングスポットウイルスという棒状ウイルスは、他の形態のウイルスよりもずっと熱に対して安定であることが知られている（Inoue, 1992）。よって、まだ宿主は確認されては

いないが、これらは特に高温下に適応した性質を持つ新規ウイルスであることが示唆される。

また、深海高圧下における冷海水中のウイルス様粒子の報告はまだない。よって、今回電顕で観察された小粒子や、その原核生物と真核生物への作用の違いが見いだされたウイルス濃縮液及び濾過海水の、種々の原核生物に特徴的に見られた生育阻害活性が、いわゆるウイルス由来かどうかは現時点では判断できない。しかし、これらの研究で見いだされた知見は、そのウイルスの宿主による増殖系の開発により、遺伝情報を含めたより多くの情報が得られると考えられる。

謝 辞

本研究においては、筆者の参加した潜航調査においてお世話になった段野司令以下、「しんかい2000」運航チーム並びに支援母船「なつしま」船長以下乗組員の方々、井田司令以下、「しんかい6500」運行チーム並びに支援母船「よこすか」船長以下乗組員の方々に深く感謝したい。特に、採水装置の作成及び取り付けに関し、今井副司令並びに福井副司令に技術面で協力していただ

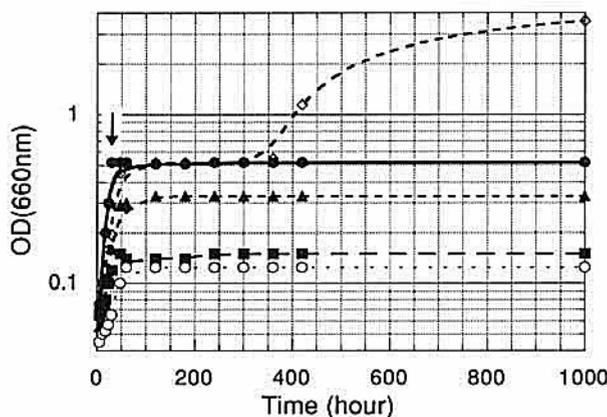


図1 濃縮ウイルス海水画分の、微生物の生育の変化（図中の矢印の時点で濃縮ウイルス液を加えた）

OD (660nm); 660nm における菌培養液の濁度, ◇-◇; 酵母菌 (IFO 2347), ●-●; 大腸菌 (JM109), ▲-▲; 耐圧中温菌 (DSK25), ■-■; 耐圧好冷菌 (DSJ-4), ○-○; 耐圧好冷菌 (DSK-1 及び DSS12)

Fig.1 The effect of virus-sized concentrated seawater for growth of various microorganisms (Arrow shows a point of adding concentrated seawater for bacterial culture).

◇-◇; *Saccharomyces cerevisiae* (IFO 2347), ●-●; *Escherichia coli* (JM109), ▲-▲; barotolerant mesophile (DSK25), ■-■; barotolerant psychrophile (DSJ-4), ○-○; barotolerant psychrophiles (DSK1 and DSS12).

いた。また、東京大学の蒲生俊敬氏、角皆潤氏にも採水サンプリングの実際について、貴重な助言、ご協力をいただいた。困難なサンプリングを実行して下さった「しんかい2000」、「しんかい6500」の潜航士の方々にも心から感謝したい。

参考文献

- Bergh, O., K.Y. Borsheim, G. Bratbak and M. Heldal (1989): High abundance of viruses found in aquatic environment. *Nature*, **340**, 467-468.
- Bratbak, G., M. Heldal, S. Norland and T.F. Thingstad (1990): Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1400-1405.
- Demuth, J., H. Neve and K.-P. Witzel (1993): Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in lake Pluß see. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3378-3384.
- Inoue, N. (1992): On virus diseases of orchids in Japan. *Proc. NIOS'92, Nagoya*, 52-59
- Paul, J.H., S.C. Jiang and J.B. Rose (1991): Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2197-2204.
- Proctor, L.M. and J.A. Fuhrman (1990): Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, **343**, 60-62.
- Suttle, C.A. and F. Chen (1992): Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3721-3729.
- Van Etten, J.L., L.C. Lane and R.H. Meints (1991): Viruses and viruslike Particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.*, **55**, 586-620.
- Zillig, W., F. Gropp, A. Henschen, H. Neumann, P. Palm, W.-D. Reiter, M. Rettenberger, H. Schnabel and S. Yeats (1986): Archaeobacterial virus host systems. *System. Appl. Microbiol.*, **7**, 58-66.

(原稿受理: 1994年6月30日)

(注) 写真は次ページ以降に掲載

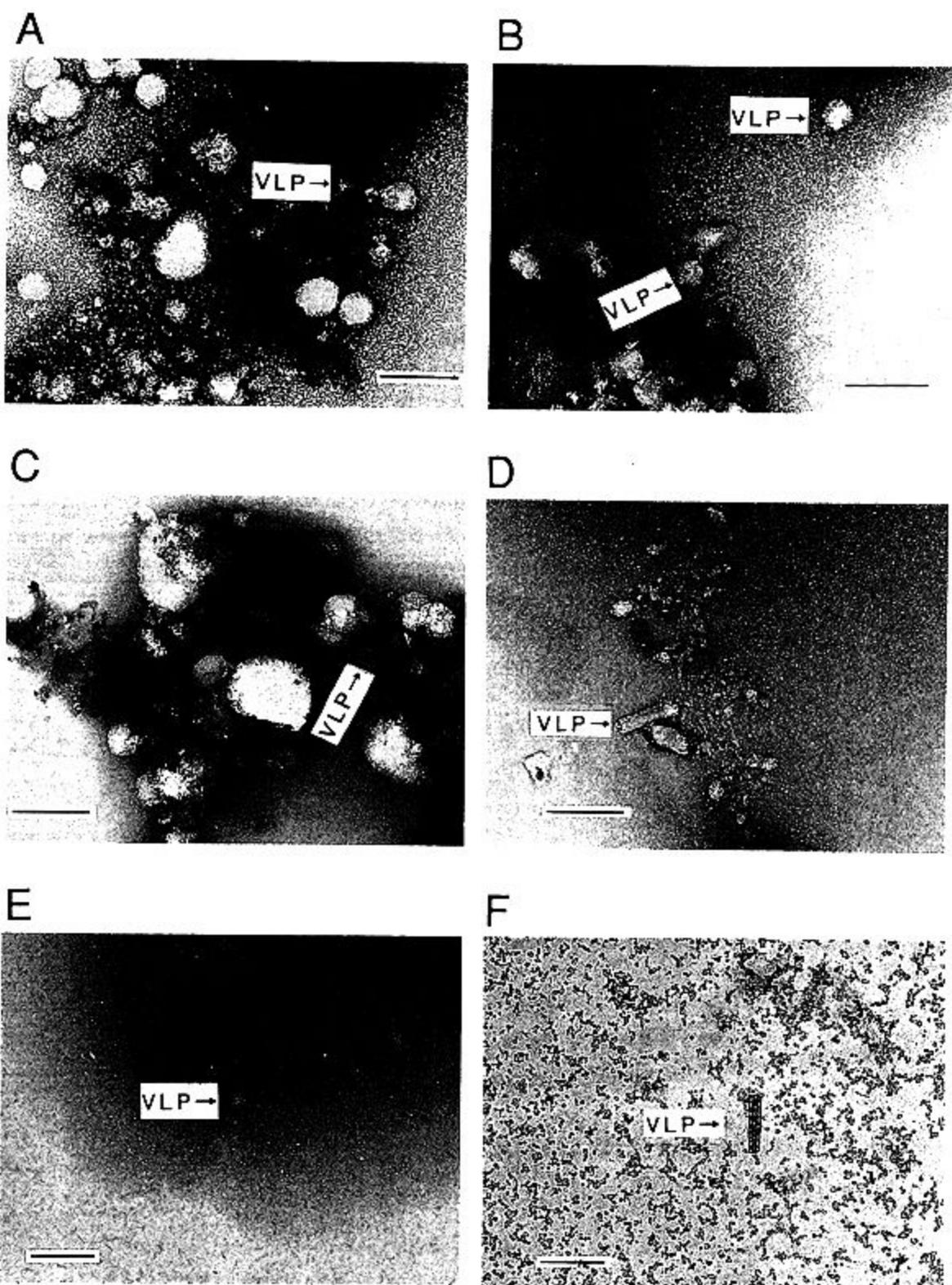


写真 1 直接電子顕微鏡観察によって得られた、深海底熱水の濃縮ウイルス画分からのウイルス様粒子 (virus like particle; VLP) ネガティブ染色像。A)–D); 小笠原水曜海山内チムニーの熱水サンプルより。E), F); 南部マリアナトラフチムニーの熱水サンプルより。すべて黒線は 200nm を示す。

Photo 1 TEM micrographs of direct negative stained virus like particles (VLP) found from concentrated hydrothermal vent fluids. A)–D); sample obtained at a hydrothermal vent in Suiyou sea mount, Ogasawara (approx. 28°34.2' N, 140°38.9' E). E), F); sample obtained at a hydrothermal vent at Southern Mariana Trough (approx. 13°23.7' N, 143°55.2' E).