

博士論文

有害赤潮原因藻 *Heterocapsa circularisquama* に感染するウイルスの現場動態

および感染関連因子の探索

平成 25 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科
環境循環系制御学専攻

藤本 章裕

目次

目次	2
謝辞	3
緒言	4
第1章 新潟県加茂湖における <i>Heterocapsa circularisquama</i> 赤潮とウイルスの生態学的関係 ..	15
【背景】	15
【材料と方法】	18
【結果】	23
【考察】	28
第2章 <i>Heterocapsa circularisquama</i> のウイルス感染に関与する RNA 因子の探索	34
第1節 次世代シーケンスを用いたウイルス感染に関与する mRNA の探索	39
【背景】	39
【材料と方法】	40
【結果】	44
【考察】	46
第2節 ウイルス感染に関与する機能性小分子 RNA の探索	49
【背景】	49
【材料と方法】	51
【結果】	54
【考察】	55
総合考察	58
引用文献	66
図表	86

謝辞

本研究は、広島大学 大学院生物圏科学研究科 長崎慶三 教授のご指導、ご鞭撻の下におこなわれたもので、このことを深く感謝いたします。また本論文の作成にあたり多くの貴重なご助言を賜りました、広島大学 大学院生物圏科学研究科 中井敏博 教授、瀨口昌巳 教授、小池一彦 准教授に深く感謝いたします。研究を行うにあたり、水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所の職員の皆様にたいへんお世話になりました。とくに外丸裕司 博士、中山奈津子 博士、木村圭 博士、および板倉茂 博士には、実験上のご助言およびご指導を賜りますとともに、研究室での活動を支えていただきました、心より感謝いたします。近藤伸一様、中尾玲子様をはじめとする新潟県水産海洋研究所 佐渡水産技術センターの皆様には加茂湖の海水・底泥試料のご提供をいただきました。また、東京工業大学 緒方博之 特任准教授には、ゲノム解析について貴重なアドバイスをいただきました。さらに、東京大学 寺田篤史 助教には miRNA のクローニングに関して実験技術をご指導いただきました。このように本研究を支えてくださいました皆様に心より感謝いたします。最後に、両親、兄弟に深く感謝いたします。

緒言

赤潮は、プランクトンが高密度に繁殖することにより海水や湖水が着色する現象であり、しばしば水産生物のへい死や商品価値の低下を引き起こすため、現在でも水産学上の問題となっているが、21 世紀に到る現在においても有効な防除策が確立されていないのが現状である。

旧約聖書を初めとして様々な古い書物に赤潮を表現したと思われる記述がみられることから、赤潮は古(いにしえ)の時代にもたびたび発生する現象であったと考えられている。我が国では、瀬戸内海において 1970 年頃から赤潮が頻発するようになり、ピーク時には年間約 300 件の赤潮発生が報告された。こうした状況を改善すべく施行された瀬戸内海環境保全臨時措置法(1973)、瀬戸内海環境保全特別措置法(1978)等による水質規制が奏功し、近年の瀬戸内海における赤潮発生は年間 100 件程度に留まっているものの、依然として赤潮による壊滅的な漁業被害の事例は枚挙に暇がない。また現在、有明海・八代海を中心とした九州海域でも年間 100 件程度の赤潮が発生しており、魚類養殖やノリ養殖等に甚大な被害を与えている。このような漁業活動や生態系に悪影響を及ぼす植物プランクトンまたは微細藻類の中には、海色を変化させるほどの濃度ではないにもかかわらず、被害を与えるものも存在することから、これらを「有害藻類(harmful algae)」、そしてこれらが高密度に増殖する現象を有害赤潮とは別に「有害藻類ブルーム(harmful algae bloom: HAB)」と呼ぶこともある。この赤潮(ブルーム)の発生機構ならびに赤潮原因生物の生物学的特性に関しては、多くの知見が蓄積しつつあり、

赤潮の発生予察技術についてはある程度の精度が達成されつつあるといえる。しかしながら、赤潮の防除に関する研究はまだ十分ではなく、粘土散布法など一部の技術を除いては実用化に到っていないのが現状である。

あらゆる赤潮は、発生してある期間継続し、やがて消滅に到る。この過程において、赤潮の消滅はしばしば唐突であり、構成種の劇的な交替を伴う場合がある。すなわち、ある種の巨大な赤潮個体群が一斉に死滅し、他種に取って代わるという図式である。このとき、種特異的な死滅(優占個体群の消滅)が起こるための、何らかのメカニズムが関与していると考えられる。発生した赤潮の挙動を経時的に精査し、赤潮の中でいかなる微視的なイベントが起きているかを明らかにすることは、赤潮の消滅機構を探ることに繋がると期待されるとともに、赤潮防除のためのきわめて重要なヒントが関わっていると考えられる。

上述の瀬戸内海・九州海域における有害赤潮は、*Chattonella antique*, *Chattonella marina*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Karenia mikimotoi* 等が主な原因生物である。一方、近年の傾向として、それまで発見されていなかった、あるいは赤潮を形成することがほとんどなかった種による赤潮形成が挙げられる。例えば、特異的な高温・少雨年であった 1994 年には、瀬戸内海においてそれまで赤潮を形成したことのない「新奇赤潮原因種」*Chattonella ovata* が大発生し、甚大な漁業被害をもたらした。また 1988 年に高知県浦ノ内湾でアサリ(*Ruditapes philippinarum*)の大量死を起こしたプランクトンは、後に新種の有害赤潮原因藻として *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi sp. nov. と命名され

(Horiguchi 1995)、当時は「新型赤潮プランクトン」と呼ばれた。

以下、本論文では *H. circularisquama* を研究対象とした研究の成果を報告する。

H. circularisquama は単細胞性の光合成生物であり、分類上、渦鞭毛藻類に属する。細胞は紡錘形を呈し、長径および短径はそれぞれ 20.0-28.8 μm (平均 23.9 μm)および 13.8-20.0 μm (平均 17.3 μm)である(図 0-1)。細胞表面は円形の鱗片で覆われ、種名 (*circularisquama*) にはこの形質が反映されている。本種は、2本の鞭毛(縦鞭毛・横鞭毛)を持ち回転遊泳するが、頻繁にキツツキ様の行動(前進-後退-前進)を示して遊泳方向を変えするという特徴を持つ(Horiguchi 1995)。

H. circularisquama は、魚類には直接的な影響を与えないが、貝類に対して強い毒性を示す。本種の貝類に対する毒性には、*H. circularisquama* の細胞表面に局在する不安定な糖タンパク質の関与が示唆されている(松山 2003)。具体的には、この糖タンパク質が貝類の細胞表面に普遍的に含まれる膜やレセプター等の糖タンパク質分子を特異的に攻撃・破壊することで細胞内に大量のカルシウムイオンが流入し、著しい生理傷害、心拍異常、ならびに心臓停止に到るといふ仮説が提示されている(松山 2003)。*H. circularisquama* がへい死させる貝類には、マガキ(*Crassostrea gigas*)・アサリ・アコヤガイ(*Pinctada fucata martensii*)といった二枚貝やクロアワビ(*Haliotis discus discus*)など一部の巻貝が含まれる。これらはいずれも重要な水産資源であり、*H. circularisquama* 赤潮による貝類の大量へい死は、しばしば壊滅的な被害をもたらす。なかでも 1992 年の英虞湾での養殖アコヤガイのへい死(30-90%が死滅、推定被害額約

30 億円)(松山ら 1995, 本城・松山 1998, 玉井 1999)や 1998 年の広島湾での養殖マガキのへい死(被害額約 39 億円)(水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1999)などは、その典型的な事例である。このような理由から、本種は重要警戒プランクトン種の一つに位置付けられており、現在でも沿岸域における本種の発生細胞密度は、多くの自治体において検査対象項目の一つとなっている。

本種による赤潮は、地理的に離れた海域で飛び火的に発生し、その範囲を拡大してきた。1988 年に浦ノ内湾で本種が初めて発見された際には、その分布域は近場の海域に限定されるか、あるいは徐々に拡大するものと予測された。だが、翌 1989 年には、大方の予想に反して地理的に大きく離れた福岡県博多湾で本種赤潮の発生が確認された。さらに 1992 年には三重県英虞湾、1995 年には広島湾、1997 年には豊前海、周防灘など、これまで本種の発生が確認されていなかった場所へと飛び火的にその分布域を広げた。これらの赤潮発生海域は、いずれも貝類養殖が盛んであるという点が共通している(Honjo 1998)。その後、初発生からわずか 10 年のうちに、本種の分布域は、北は福井県小浜湾(1997 年)まで、東は静岡県浜名湖(1993 年)までそれぞれ広がった。

こうした *H. circularisquama* 赤潮の飛び火的発生の理由を探るため、種々の室内実験や模擬輸送試験が行われた。その結果、*H. circularisquama* は二枚貝の殻の外側や内側に付着し、少なくとも 24 時間は生存することが判明した(Honjo 1998, Imada et al. 2001)。また、模擬輸送条件に長く置かれた貝類の体内から排出された *H. circularisquama* は、再び海水中で増殖す

る能力を有していることが確認された(Imada et al. 2001)。プランクトンの輸送は海流によっても引き起こされるため海流による本種の移入の可能性を完全に否定することは難しいが、本種が短期間のうちに西日本全域に拡大した理由の一つとして、大規模な種苗や養殖貝の人為的輸送が関与しているのではないかと考えられている(今田・本城 2001)。また、日本での赤潮初発生より5年以上前に香港で本種が発生したことを示唆する状況証拠があること(Iwataki et al. 2002)、本種の増殖至適温度および塩分がそれぞれ 30°C 以上ならびに 30 psu 以上であること、および水温 10°C 以下では全く増殖することができないこと(Yamaguchi et al. 1997)等を考慮すると、*H. circularisquama* は温暖な地域の気候に適応した種であると可能性が高い。松山(2003)と、2001年(平成13年)以降の「瀬戸内海の赤潮」(水産庁瀬戸内海漁業調整事務所)、「九州海域の赤潮」(水産庁九州海漁業調整事務所)、「三重県における赤潮発生状況」(三重県)からの報告を合わせると、本種は2008年までに我が国の全29海域で延べ76件の赤潮を形成し、そのうちの25件で漁業被害を引き起こしている。赤潮の被害は魚介類のへい死のみに留まらず、風評被害による特産品のブランドイメージの低下等の副次的な影響も含めれば、*H. circularisquama* 赤潮が水産業に及ぼす被害は計り知れない。したがって、赤潮に対する予察・防除対策の構築は、依然として水産学上最も重要な課題の一つであるといえる。

赤潮への適切な対応策を講ずるには、その原因種の生物学的特性を十分に解明しておく必要がある。単細胞性光合成生物である *H. circularisquama* の挙動には、生活史や栄養要求性といったその生物自身が備える能力や特性の他に、様々な外部要因が影響を与える。具体

的には、温度・塩分・日照などの物理的要因、栄養塩・ビタミン・ミネラルなどの化学的要因、および捕食生物や細菌、ウイルス感染等の生物的要因の関与が考えられる。個々の要因が *H. circularisquama* にいかなる影響を与えるかを精査することで、本種の挙動の予測・解釈をより的確に行うことが可能である。

1990年代に、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* ならびにハプト藻 *Emiliania huxleyi* による赤潮の挙動にウイルス感染が影響を及ぼしている可能性があることが報告された(Nagasaki et al. 1994, Brussaard et al. 1996)。いずれの場合も、大型の2本鎖DNAウイルス(それぞれ HaV および EhV)による感染に伴い宿主細胞が崩壊していく過程が明瞭に捉えられ、それぞれが宿主個体群に対して与える生態学的影響が注目された。こうした植物プランクトンを宿主とするウイルスは「藻類ウイルス」と総称され、近年の分子生物学手法の発展と相まって、その多様性も詳細に解明されつつある。これまでに発見され、性状解析が行われた主な藻類ウイルスのリストを表 0-1 に示す。

H. circularisquama の場合にも、ウイルス感染がその挙動に重大な影響を及ぼしている可能性が注目されている。畑ら(2010)は、英虞湾において *H. circularisquama* 赤潮の推移とウイルス密度の関係を調査した結果、赤潮が消滅する直前にウイルスの密度が急激に増加したこと、ならびにウイルスに感染したヘテロカプサ細胞が急激に増加したことを報じた。一般的にウイルスは、自らの複製を行う際には宿主に感染し宿主細胞内の生合成系を利用するため、宿主の存在しない条件下では生存できない。そのため、ウイルスは宿主を完全に駆逐することは

ない。*H. circularisquama* に感染するウイルスの場合でも、室内実験の結果、*H. circularisquama* を完全には死滅させることはないが、一定期間は *H. circularisquama* の増殖を 20%~70%程度にまで抑制できる可能性があることがわかった(畑ら 2010)。したがって、ウイルスの殺藻力だけでは赤潮を完全には抑制できないが、*H. circularisquama* の増殖を抑制する因子の 1 つとして作用させることで、少なくとも赤潮を小規模化させる働きは期待できる。また、ウイルスは特定の生物にのみ感染するという特徴(高い宿主特異性)を持つため、ウイルスの利用は他の生物に対して影響の小さい赤潮防除技術の候補と考えられる。これまでに *H. circularisquama* を宿主とする 2 種類のウイルス(HcDNAV, HcRNAV)が発見され、それぞれの感染性状や環境中での動態を明らかにするための研究が行われてきた。

先に発見された HcDNAV (図 0-2 B)は、約 356 kbp の 2 本鎖 DNA ゲノムを持つ粒径約 0.2 μm の巨大正 20 面体ウイルスである(Tarutani et al. 2001, Nagasaki et al. 2005b)。HcDNAV は、定常期の *H. circularisquama* 細胞よりも対数増殖期の細胞に対する感染性が高く、感染後は *H. circularisquama* の細胞質内で複製する。潜伏期間は 40-56 時間で、1 感染細胞あたり 1,800-2,440 感染単位の娘ウイルス粒子を放出する(Nagasaki et al. 2003)。DNA ポリメラーゼ遺伝子の系統学的解析の結果、本ウイルスはこれまで近しいグループが発見されていなかった Asfavirus と高い相同性を示した(Ogata et al. 2009)。HcDNAV は、渦鞭毛藻が属するアルベオラータ生物群を宿主とする 2 本鎖 DNA ウイルスとしてこれまで唯一報告が成されているウイルスであること、ならびに DNA ポリメラーゼの活性中心の保存的アミノ酸配列である

「YGDTDS」に特異的な置換(YSDTDS)が存在する点から、進化学的にも興味深い要素を備えたウイルスであるといえる。

これに対して、HcRNAV (図 0-2 A)は、1 本鎖のプラス鎖 RNA ゲノム(mRNA として機能しうる側の鎖)を持つ、粒径約 30 nm の小型正 20 面体ウイルスである。約 4.4 kb の直鎖 RNA ゲノム上には、複製酵素(群)をコードすると予想される翻訳領域 ORF1 (open reading frame)と、単一主要構造タンパク質(カプシドタンパク質)をコードする ORF2 が存在する(図 0-4) (Tomaru et al. 2004a, Nagasaki et al. 2005a, Mizumoto et al. 2007)。対数増殖期の宿主に対して HcRNAV を接種した場合、約 1-2 日後に 1 感染細胞あたり数千個以上の娘ウイルス粒子を放出しつつ宿主細胞は崩壊に至る。本ウイルスもまた、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子(RdRp)アミノ酸配列の系統学的解析の結果、既知の RNA ウイルスとは大きく離れた進化的位置にあることが推定されており、進化学的にも興味深いウイルスである(Shirai et al. 2006)。

ここで、*H. circularisquama* とウイルスの関係に関する既知情報を概説する。英虞湾での先行調査の結果、①水柱中のウイルス力価が *H. circularisquama* 赤潮発生時期に特異的に増加し、赤潮終息後に減少したこと、②底泥中のウイルス力価が赤潮発生時期以前に検出限界以下まで減少した年には *H. circularisquama* 赤潮の中～大規模な発生が起きたこと、③感染性ウイルス粒子が大量に環境中に蓄積・残存していた年には *H. circularisquama* 赤潮の発生に到らなかったこと、等が観測された。これらの結果は、ウイルス感染が *H. circularisquama* 赤潮個体群に対して量的影響(生物量変動への影響)を与えている可能性を強く示唆するもの

である(Nagasaki et al. 2004b, Tomaru et al. 2007)。

さらに Tomaru et al. (2004a)は、西日本各地より分離された *H. circularisquama* 株(56 株)と HcRNAV 株(107 株)の間でのクロスアッセイ(5,992 通りの組み合わせでの交叉感染性試験)の結果に基づき、HcRNAV と *H. circularisquama* がそれぞれ複数のタイプ(UA タイプおよび CY タイプ)のクローンから構成されることを明らかにした。すなわち、HcRNAV の感染は宿主株特異的であり、宿主側の感受性タイプと適合した場合にのみ感染・溶藻が起こるといふ「種内特異性」が存在することを示した(図 0-3 A)。現場環境中において両タイプのウイルスがそれぞれ異なる量的変動を示したという観測結果は、異なるタイプのウイルスがそれぞれ感染可能な *H. circularisquama* を溶藻することで宿主個体群中の“質”に相当するサブタイプ組成比を変化させている可能性を示唆するものである(Nagasaki et al. 2004b) (図 0-3 B)。このことから HcRNAV は、*H. circularisquama* 赤潮個体群に対して「量的」のみならず「質的」な影響も与えていると考えられる(Tomaru et al. 2004a)。さらにその後の研究により、UA タイプ、CY タイプのいずれのウイルスにも感染しない(感受性を示さない)*H. circularisquama* 株を溶藻するウイルス株が単離されるなど、本宿主-ウイルス間の関係性はこれまで考えられていたよりも複雑であると推察されている (Nakayama et al. in press) (図 0-3 C)。さらにこれらの複雑な宿主特異性を巡る関係性が、カプシドタンパク質のアミノ酸配列によって決定されている可能性も指摘されている(Nagasaki et al. 2005a, Nakayama et al. in press)。

このように、ウイルス感染は *H. circularisquama* の挙動に重要な影響を与えているものと推

察される。両者の関係性に係る理解をさらに深化するためには、多様な視点からのアプローチによるデータ収集が求められる。そこで本研究では、宿主とウイルスとの関係をマクロな視点で捉えるための生態学的解析を行うとともに、細胞内でウイルス感染時特異的に作用する RNA 因子の網羅的探索(分子生物学的解析)を行った。

本論文第1章では、宿主とウイルスとの関係をマクロな視点で捉えるための生態学的解析として、現時点での *H. circularisquama* の発生北限である新潟県加茂湖における宿主とウイルスとの関係性の解明を目的として実施した現場調査および室内実験の結果を述べる。加茂湖は佐渡島に位置するきわめて閉鎖性の高い汽水湖であり、*H. circularisquama* の発生環境としては、知られている限り最も寒冷な海域である。近年、地球温暖化の進行に伴う生物分布の拡大(生息域の高緯度化)は、赤潮研究分野においても重要な課題であることから、*H. circularisquama* とウイルスの生態を知る上で、本調査は重要なモデルケースとなると考えられる。

ウイルス感染による *H. circularisquama* の挙動への影響という現象自体はマクロなスケールで捕らえることができるが、実際にはマイクロな世界、つまりは 1 細胞対ウイルスの感染現象が集合して具現化した結果である。したがって、ウイルスと *H. circularisquama* の両者の関係性に係る理解を深めるには、1 細胞対ウイルスというマイクロな視点で、細胞内で起こっている感染を巡る両者の関係性についても理解する必要がある。そこで第2章では、マイクロな視点からのウイルス感染時特異的に作用する RNA 因子の網羅的探索(分子生物学的解析)として、

HcDNAV 感染を受けた *H. circularisquama* 細胞内で、RNA レベルでの発現調節がどのように機能しているのかに注目し、感染に関与する RNA 候補を探索することを目的とした。最終目標としてウイルス感染過程における時間経過に伴う転写産物の変化を網羅的に解析した時間的転写マップ(Temporal transcription map)の構築を目指し、まずそのプラットフォームとなる解析を行った。第 1 節では感染に伴い特異的な発現量変化を示す mRNA の探索を、また第 2 節では感染に関与する機能性小分子 RNA、特に miRNA の探索をそれぞれ試みた結果について述べる。時間的転写マップを構築することで、ウイルス感染過程においてヘテロカプサ細胞の生死を決定する鍵となるステップの抽出が期待され、分子工学的にその段階をターゲットとしたヘテロカプサ駆除技術への応用も期待される。

総合考察では、これらの研究を通して明らかとなった *H. circularisquama* とウイルスの関係性を総括するとともに、得られた知見に基づきウイルスを利用した *H. circularisquama* 赤潮の防除の可能性についても展望した。

第1章

新潟県加茂湖における *Heterocapsa circularisquama* 赤潮とウイルスの生態学的関係

【背景】

新潟県佐渡島に位置する加茂湖は、面積約 486 ha、湾内最大水深 8.7 m のきわめて閉鎖性の高い汽水湖である。夏季の水温は全域で 20°C を超え、30°C に及ぶ日も観測される。全体に椀状の構造をしていること、また外海との海水交換がほとんどないことから、夏季には密度成層に伴う底層の貧酸素化が顕著であり、溶存酸素量は 1 mg/L 以下まで低下する。年間生産量 1,500~2,000 トンにも及ぶマガキ(*Crassostrea gigas*)の筏養殖は、新潟県内で最も重要な養殖産業に位置付けられる。

加茂湖では従来、貧酸素水塊の発生やシロボヤ(*Styela plicata*)の付着に起因する養殖マガキのへい死が起きていたが、赤潮によるへい死はみられなかった。しかし 2009 年秋に、同湖において突如として *H. circularisquama* 赤潮が発生し、マガキの大量死という非常事態が生じた。加茂湖ではこれまで *H. circularisquama* の検出報告はなく、これは従来の本種の分布北限であった福井県小浜湾から緯度にして 2.5° 北上しての出現(赤潮発生)であった。漁業者からの聞き取り調査で得られた情報および定点調査の結果から、この年の赤潮は少なくとも 3 週間以上継続したと推定されている。この赤潮により、養殖マガキの約 2/3 がへい死し、それに伴う被害額は 1.9 億円と推算された(近藤ら 2012)。

当時、加茂湖におけるマガキ養殖は、宮城県の養殖業者からカキ種苗を購入して営まれていた。宮城県では過去に *H. circularisquama* の発生例が全くないことから、同県産カキ種苗によって *H. circularisquama* が加茂湖へ人為的に移入されたという可能性は考えにくい。また、佐渡島周辺の海流および加茂湖の閉鎖性から考えて、対馬海流の上流域から *H. circularisquama* が移送され同湖に進入・定着した可能性も低いと思われる。

上述の通り、*H. circularisquama* が飛び火的にその分布範囲を拡大してきた理由として、陸上輸送条件下でも生残できるという本種独自の特性が挙げられる。2009年に加茂湖で大量増殖した *H. circularisquama* の由来の特定は困難であるが、他所からの稚貝の移入により本種が同時に輸送され、生残し、秋季に大量増殖したのではないかと考えられる。また、*H. circularisquama* は 10℃以下の低温域では増殖しないことから(Yamaguchi 1997)、当時、加茂湖での越冬は難しいと考えられていた。しかし実際には、同湖において2010年夏季に *H. circularisquama* 赤潮が再発した。外部からの再移入がなかったとすれば、本種個体群の少なくとも一部は冬期に水温が 10℃を下回る海域で越冬したことになる。さらに2012年まで連続して夏季の赤潮発生が観測されていることから、すでに *H. circularisquama* は加茂湖に定着したと考えるとよいだろう。このように高度に隔離された、きわめて寒冷的な汽水湖での *H. circularisquama* 赤潮の挙動を精査することは、本種の生態に関する理解を深化させる上で大きな意味があると言える。最近行われた新潟大学工学部情報工学部牧野秀夫教授の研究室で実施されている「佐渡島加茂湖水温分布とGISによる可視化研究」による加茂湖水温のモ

ニタリングデータによれば、冬期でも水温が 10°C以上の場所が存在することが示されていることから(佐渡島加茂湖・水温測定データ:<http://kamoken08.web.fc2.com/niigata-u/>), ホットスポット的に *H. circularisquama* が生存できる条件が確保されているのかもしれない。

加茂湖では 2009 年の赤潮中期以降、*H. circularisquama* の細胞密度や水温・塩分・透明度等いくつかのパラメータの測定が行われたものの、*H. circularisquama* 赤潮とウイルスの関係性については、溶藻性ウイルスの存在が確認されただけで、2009 年には詳しい調査は全く行われなかった。そこで本章では、2010 年夏季の加茂湖におけるウイルスの力価を測定し、発生した *H. circularisquama* 個体群の挙動との比較、加茂湖海水から単離した *H. circularisquama* および HcRNAV の感染特異性のタイプ分け、HcRNAV のカプシドタンパク質を構成するアミノ酸配列の推定、ならびに過去に単離・解析された HcRNAV 株との系統学的比較を行うことで、加茂湖における *H. circularisquama* とウイルスの関係性を解明することを目的とした。

【材料と方法】

1. 現場試料

2010年7月7日～11月11日の期間、加茂湖に設定した3定点(潟上(St. 1; 水深 6.8 m)、原黒(St. 2; 水深 7.8 m)、秋津(St. 3; 水深 5.5 m))より海水試料および底泥試料の採取を行った(図 1-1)。このうち赤潮発生時期は週1回の頻度で採取した。採水には北原式採水器を使用し、表層(0 m)および底層(B-0.5 m)の海水を採取した。底泥試料は、表面から深さ0-1 cmの泥をエクマンバージ式採泥器を使用して採取した。採取した試料は冷蔵状態で研究室に急送し、以下の実験に供した。また本論文中では、*H. circularisquama* 細胞数と物理データ(温度、塩分、溶存酸素量 等)について、新潟県水産海洋センターの測定結果(近藤ら 2012)を引用した。

2. 試料測定

宿主単離株の確立

試水中の *H. circularisquama* 細胞は、倒立顕微鏡(Nikon Eclipse TE300 Inverted Microscope, Tokyo, Japan)下で観察しながら、マイクロキャピラリーを使用して捕獲し、無菌海水中で洗浄後、単離した。単離した *H. circularisquama* 細胞は 2 nM Na_2SeO_3 を加えた改変 SWM3 培地(Imai et al. 1996, Hatano & Imai 2010)中で、20°C、白色蛍光灯 130-150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、12/12-h 明暗サイクルの条件下で培養した。

ウイルス感受性タイプの決定

宿主である *H. circularisquama* の種内ウイルス感受性タイプを決定するために、単離した宿主培養に、UA-type と CY-type の代表ウイルス株としてそれぞれ HcRNAV34 と HcRNAV109 を接種した(Nagasaki et al. 2005a)。ウイルスによる溶藻は接種後 7-10 日まで毎日、ウイルスを接種していない *H. circularisquama* 培養液を陰性対照として、光学顕微鏡下で比較・観察することにより判定した。

3. ウイルス力価の測定

海水と底泥試料中のウイルス力価は、Nagasaki et al. (2004b)の方法に従って行った。まず、海水試料は大型粒状有機物と動物プランクトンを除くために、0.8 μm に続いて 0.45 μm のポリカーボネイトフィルター(Whatman, Kent, UK)で濾過した。一方、底泥については、湿重量 5 g の泥試料に対して 5 ml の滅菌した改変 SWM3 培地を加え、振とう攪拌(400 rpm, 30 min)した後、低速遠心(2,000 rpm, 10 min, 4°C)を行った。その上清を 0.2 μm pore-sized Dismic-25cs filter (Advantec, Tokyo, Japan)で濾過し、通過してきた濾液をウイルス画分とした。ウイルス画分試料は、それぞれ改変 SWM3 培地により $10^0 \sim 10^7$ 倍となるよう段階希釈を行った。このとき、溶藻因子が塊状のままでは実際の密度よりも力価が低く算出されるため、希釈操作に際しては十分に攪拌するよう注意した。この操作で得られた希釈試料 100 μl ずつを、150 μl の対数増殖期の宿主細胞懸濁液を入れた 96 平底ウェルの細胞培養プレート(BD-Falcon, Franklin

Lakes, NJ, USA)に対し、各希釈段階につき8ウェルとなるよう分注した。このとき用いた宿主株は、高知県浦ノ内湾で単離された HU9433-P 株、三重県五ヶ所湾で単離された HCLG-1 株、三重県英虞湾で単離された 05HC06 株、および新潟県加茂湖で単離された HCKM02 株とした。HU9433-P、HCLG-1、05HC06 はそれぞれ HcRNAV34、HcRNAV109 に対して異なる感受性を示す宿主の代表株として使用した(Tomaru et al. 2004a, Mizumoto et al. 2008)。HCKM02 は 2009 年に加茂湖で発生した赤潮から単離した株で、予備試験によりその感受性がCYタイプであると確認されたものである。細胞培養プレートは 20℃、白色蛍光灯 130-150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、12/12-h 明暗サイクルの条件下で培養した。培養開始後 7-10 日まで毎日、ウイルス画分を接種していない宿主培養を陰性対象として比較しつつ、光学顕微鏡下で観察を行い、ウェル毎に溶藻の有無を判定した。各希釈段階の溶藻ウェル数に基づき、最確数算出用コンピュータープログラムを用いてウイルス力価を求めた(Nishihara et al. 1986)。

4. ウイルスの単離と感染タイプのチェック

4-1. ウイルスの単離

上述のウイルス力価測定工程と並行して、*H. circularisquama* 溶藻性ウイルス因子の単離を行った。具体的には、ウイルス力価測定工程で溶藻がみられたウェルのうち、最高希釈段階の溶藻液を採取し、これに対して同様の限界希釈法を 2 回繰り返すことでクローン化を行った(Nagasaki & Yamaguchi 1997)。ウイルス溶藻液は、10,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、細胞デブリを

沈殿・除去後、上清を 0.2 µm pore-sized Dismic-25cs filter で濾過することでバクテリアを除去した。こうして得られたウイルス懸濁液を 4°C で保存し、以下の実験に用いた。

4-2. 単離ウイルス株の感染タイプのチェック

ウイルスの宿主特異性を決定するために、500 µl のウイルス懸濁液を対数増殖期の *H. circularisquama* 株 HU9433-P、HCLG-1、および 05HC06 の対数増殖期培養それぞれ 1 ml に接種した。培養条件および溶藻の判定は上述の方法に従った。

ウイルス種の特異性は、HcRNAV 特異的なプライマーセットを用いた逆転写 PCR による増幅産物の有無を判定基準として行った。この特異的プライマーは、HcRNAV の主要カプシドタンパク質(Major Capsid Protein: MCP)をコードしている HcRNAV ORF2 の断片を増幅するように、HcRNAV34 と HcRNAV109 の塩基配列を基にデザインしたものである(フォワードプライマー; 5'- TTT CAC CCT GAG CAC CTT CCG C -3' ; リバースプライマー; 5'- CGC CAT GCA ACG CAT TAA GCA GC -3')(Nagasaki et al. 2005a)。以下、試料調製および逆転写PCRの一連の工程を述べる。

各ウイルス株の単離時に用いた宿主株を培養し、対数増殖期にウイルス接種を行った。これを上記(4-1. ウイルスの単離)条件下で培養して得られた溶藻液を、0.2 µm フィルターでろ過してウイルス懸濁液とした。このようにして得られた各ウイルス懸濁液 250 µl から、TRIzol LS reagent (Life Technologies, California, USA)を使用して全 RNA を抽出後、Superscript III

Reverse Transcriptase (Life Technologies, California, USA)を使用して cDNA への逆転写を行った。次に、1 μ l cDNA 溶液、2 μ l 10 \times Buffer for Blend Taq、2 μ l 2mM dNTPs、0.5 μ l 2.5 units μ l⁻¹ Blend Taq (TOYOBO, Osaka, Japan)、1 μ l 10 μ M Forward Primer、1 μ l 10 μ M Reverse Primer (超純水で 20 μ l にメスアップ)の反応溶液を調整した。これらを、GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, California, USA)を用いて、変性 94 $^{\circ}$ C \times 72 分 \times 1 サイクル + [(変性 94 $^{\circ}$ C \times 30 秒) + (アニーリング 68.3 $^{\circ}$ C \times 30 秒) + (伸長反応 72 $^{\circ}$ C \times 1 分)] \times 30 サイクル] + 最終伸長 68 $^{\circ}$ C \times 10 分のサイクルで PCR 反応を行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ORF2 領域に相当する増幅産物を確認した。この段階で、目的サイズ (854 bp)の増幅産物が検出された場合に、溶藻因子が HcRNAV であると判定した。

5. 主要カプシドタンパク質のアミノ酸配列推定と系統解析

得られた PCR 産物は Exo-Sap IT (USB, Ohio, USA)で精製後、ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, California, USA)を用いてダイレクトシーケンシングを行った。得られた塩基配列を基に予測したアミノ酸配列と、HcRNAV34 と HcRNAV109 を含むこれまでに分離・解析された HcRNAV ORF2 の予測アミノ酸配列について、MEGA 5 (Tamura et al. 2011)を使用して Maximum Parsimony 法 (最尤法) によって系統樹を作成した。この解析に使用した HcRNAV 株の一覧を表 1-1 に示す。

【結果】

1. 加茂湖におけるウイルス力価の変動

調査期間中、3つのサンプリング地点全てで *H. circularisquama* とウイルスが検出された。湧上(St. 1)、原黒(St. 2)、および秋津(St. 3)での *H. circularisquama* 細胞数とウイルス力価の経時変化をそれぞれ図 1-2～1-4 に示した。3地点の *H. circularisquama* 細胞密度の経時変化は概ね一致しており、*H. circularisquama* 細胞は 7 月 27 日に St.2 と St.3 の底層で初めて検出された。その後、8 月 12～16 日にかけて、3地点のいずれの層においても $>1,000 \text{ cells ml}^{-1}$ の細胞密度を記録し、これが今季のブルームのピークとなった。その後9月中旬にかけて、細胞数は減少した。9月下旬以降は大きなブルームを形成することはなく、時折散発的に各地点で低密度の *H. circularisquama* 細胞の微増が観察される程度であり、10 月 27 日に *H. circularisquama* 細胞が観察されたのを最後に 2010 年の加茂湖での *H. circularisquama* の出現はみられなくなった。

次に、各地点での *H. circularisquama* とウイルス力価の経時変化について述べる。

湧上(St. 1)(図 1-2)では、8 月 6 日に底層で *H. circularisquama* 6 cells ml^{-1} が初観測され、その後細胞数は増加し、8 月 14 日に表層で $1,100 \text{ cells ml}^{-1}$ を、底層で $2,000 \text{ cells ml}^{-1}$ をそれぞれ記録した。9 月上旬にかけて細胞数は減少し、9 月 15 日には検出限界以下 ($<1 \text{ cell ml}^{-1}$) になった。9 月 15 日以降は定常的な *H. circularisquama* 細胞の出現はみられず、散発的に 10 月 13 日の底層で確認された $240 \text{ cells ml}^{-1}$ をピークとする比較的低密度の発生が確認され

た。一方、ウイルス力価は *H. circularisquama* 細胞出現と共に増加したが、感染性タイプによってその変動パターンにはばらつきがみられた。表層(0 m)では、ブルームピーク時に $10^1 \sim 10^2 \text{ ml}^{-1}$ オーダーの感染単位密度を記録したが、9月中旬までにみられた *H. circularisquama* 細胞数の減少に伴い、ウイルス力価も減少傾向を示した。9月22日以降は *H. circularisquama* 細胞密度の増減を反映することなく、8月中旬の値と同程度のウイルス密度が維持された。底層(B-0.5 m)でも8月中旬のブルームピーク時に $10^1 \sim 10^3 \text{ ml}^{-1}$ オーダーの感染単位密度を記録し、表層に比べ高濃度のウイルス密度が観測されたが、*H. circularisquama* が検出されなくなった9月8日にはウイルス力価も検出限界以下となった。その後再び8月中旬に検出されたと同程度のウイルス密度を維持した。底泥中では *H. circularisquama* 細胞が初めて観察された8月3日以前の7月27日に採取したサンプルから05HC06株とHCLG-1株に感染するウイルスがそれぞれ3.85と7.74 感染単位 g^{-1} 検出された。他の株(HU9433-PとHCKM02)に感染するウイルスも8月3日の *H. circularisquama* 出現と同じタイミングで出現・増加した。水柱(0 m、B-0.5 m)のウイルス力価の変動は、底泥中のウイルス力価と同様、詳細にみると *H. circularisquama* 細胞の経時変化と完全には一致しなかったものの、9月22日を除き湿泥1gあたり $10^1 \sim 10^2$ オーダーの感染単位を維持し続けた。

原黒(St. 2)(図 1-3)では、7月27日に底層(B-0.5 m)で 5 cells ml^{-1} の *H. circularisquama* 細胞が初観測された。その後、細胞数は増加し、8月12日に底層で $2,000 \text{ cells ml}^{-1}$ を、8月14日に表層で $1,300 \text{ cells ml}^{-1}$ をそれぞれ記録した。その後、9月上旬にかけて細胞数は減少

し、9月8日には検出限界以下まで減少した。ここでもウイルス力価は *H. circularisquama* のブルーム発生時に特異的に増加し、表層(0 m)ではブルームピーク時に、 $10^1 \sim 10^2$ 感染単位 ml^{-1} を記録した。その後、*H. circularisquama* 細胞数の減少に伴い、ウイルス力価も減少する傾向がみられた。底層(B-0.5 m)でも、ブルームピーク時には $10^1 \sim 10^3$ 感染単位 ml^{-1} のウイルス力価が検出された。このブルームの後、 $<10^2$ 感染単位 ml^{-1} 程度の低密度でウイルス力価は維持された。底泥では *H. circularisquama* 細胞が初めて観察された7月27日に採取したサンプルから05HC06株に感染するウイルスが85.1感染単位 g^{-1} 検出された。他の2株(HU9433-P, HCKM02)に感染するウイルスも8月3日の調査以降に増加した。底泥中のウイルス力価の増減は *H. circularisquama* 細胞密度の経時変化と完全には一致しなかったが、ほぼ $<10^3$ 感染単位 g^{-1} のウイルス力価を維持した。

秋津(St.3)(図1-4)では、*H. circularisquama* 細胞は7月27日に底層(B-0.5 m)で2 cells ml^{-1} が初観測された。その後、細胞数は増加し、8月16日に表層で2010年加茂湖での最高細胞密度(20,000 cells ml^{-1})を記録した。その後、9月上旬にかけて細胞数は減少し、9月8日には <1 cells ml^{-1} まで減少した。この地点では、底泥のみのウイルス力価を測定したが、他地点と同様に8月3日以降 *H. circularisquama* 細胞出現に伴って増加を始め、その後は $10^1 \sim 10^3$ 感染単位 g^{-1} のウイルス力価を維持した。ただし、その増減のパターンは *H. circularisquama* 細胞の経時変化と完全には一致しなかった。

一連の調査では、ウイルス力価を測定する際に、タイプの異なる代表宿主株を同時に用い

た。結果的に、海水中のウイルスタイプの組成比は測定タイミングによって顕著に変化していることが確認できた(図 1-2~1-4)。

2. 加茂湖産宿主株とウイルス株のタイピング

加茂湖から採取した海水サンプルから 62 株の *H. circularisquama* を単離し、各株のウイルス感受性を上述の接種試験により調べた(表 1-2)。その結果、62 株中 20 株と 26 株は HcRNAV34 または HcRNAV109 によってそれぞれ溶藻した。残りの 16 株はどちらのウイルスでもはっきりとした溶藻は確認できなかった。

限界希釈法による最確数測定と並行して単離した 19 株のウイルス株の株間宿主特異性を明らかにするため、宿主株として UA タイプの HU9433-P と 05HC06、CY タイプの HCLG-1 をそれぞれ用いた接種試験を行った。その結果、19 株のうち、10 株が UA-type の HU9433-P を溶藻させ、うち 2 株がもう 1 つの UA タイプである 06HC06 も溶藻させた。別の 2 株は UA タイプの 05HC06 を溶藻させたが HU9433-P は溶藻させなかった。残りの 7 株は CY-type の HCLG-1 を溶藻させた(表 1-3)。また、各ウイルス株の全 RNA について HcRNAV-MCP 遺伝子特異的な逆転写 PCR を行った結果、すべての株で目的サイズの増幅産物が得られた(後述)ことから、これらはすべて HcRNAV と推定された。

3. HcRNAV MCP のアミノ酸配列に関する系統解析

加茂湖から単離した 19 株の HcRNAV 株の MCP 遺伝子の一部を PCR 増幅し、得られた産物の塩基配列を決定した。ユニバーサルコドンに従い推定されたアミノ酸配列を、過去に単離された HcRNAV 株(表 1-1)のアミノ酸配列と系統学的に比較した。最尤法を用いて描かれた系統樹を図 1-5 に示す。その結果、解析に供した HcRNAV クローンは、代表株 HcRNAV109 を含む CY タイプのクレードと、代表株 HcRNAV34 を含む UA タイプのクレードの2つに群別された。

【考察】

1. 加茂湖における宿主対ウイルスの関係性

本研究では、*H. circularisquama* の発生北限とされている加茂湖において本種とウイルスが
いかなる関係性を保っているかを調べた。赤潮発生期間に特異的に *H. circularisquama* に対
する溶藻因子が検出され、限界希釈法によるクローン化の結果、採取された 19 株の殺藻因子
はすべて HcRNAV であることが特異的プライマーを用いた逆転写 PCR により確認された。こ
の結果は、2010 年の加茂湖における *H. circularisquama* のブルーム期間中に、その溶藻因子
として HcRNAV が突出して多く出現したことを示すと考えられる。なぜなら限界希釈法では、
確率的にその試料中に最も多く存在した溶藻因子が最終的に選択される場合が多いからで
ある。言い換えれば、今回の結果は HcDNAV など他の溶藻因子の存在を否定するものでは
ない。過去に Tomaru et al. (2009a) は、広島湾において発生した *H. circularisquama* のブル
ーム中に HcDNAV 様の大型ウイルスと HcRNAV 様の小型ウイルスの同時出現を確認した。
このことから、少なくとも複数種のウイルスが *H. circularisquama* 個体群の挙動に影響を及ぼし
ていると思われる。過去に、英虞湾での現場調査において、限界希釈法で HcDNAV が単離
されてきたケースもあるが(長崎 未発表)、通常、この方法で単離されるのは HcRNAV である。
このことは、粒子数という点で HcRNAV が HcDNAV を大きく上回って存在している可能性を
示す。この違いは、HcRNAV のバーストサイズ(1感染細胞から放出されるウイルス数)が、
HcDNAV のそれを大きく上回っていること(Tarutani et al. 2001, Tomaru et al. 2004a)、ならびに

HcRNAVの方が保存性の点でHcDNAVよりも優っていること(Tomaru et al. 2005)とも関係しているのかもしれない。これは、現場から単離した *H. circularisquama* ウイルスの約 96%が HcRNAV であったという過去の知見によっても支持される知見である(Tomaru et al. 2007)。

いずれにせよ今回の調査結果は、加茂湖という寒冷な環境においても、少なくとも *H. circularisquama* と HcRNAV が密接な生態学的関係性を保ちながら共存している可能性を強く示すものである。株間感受性の異なる宿主株を用いて求められた最確数はそれぞれ微妙に異なっていたことから、それぞれの宿主細胞のウイルス感染による溶藻頻度は経時的に変化していたものと考えられる。この結果から、*H. circularisquama* の組成比も、ウイルス感染の影響を受けながら変化していたと予想される。すなわち、環境中には株感受性の異なる宿主(複数タイプの *H. circularisquama* サブタイプ)が共存し、異なる宿主特異性を持つウイルスによる感染を受け、その組成比率を変化させているという構図が想像できる。したがって、*H. circularisquama* とウイルスは、量的にも質的にも生態学的に影響を及ぼし合う関係にあったと考えられる。

実験室内での観察では、ウイルス感染した *H. circularisquama* 細胞は遊泳性を失い、培養容器の底に沈む傾向にあった。また、ウイルスの保存性試験から、HcRNAV は長期間に亘り感染能力を維持することがわかっている(Tomaru et al. 2005)。これらのことから、底泥中で高い力価を維持するのはウイルス感染した *H. circularisquama* が湖底まで沈み、細胞内で複製したウイルス粒子が放出される、もしくは水中で放出されたウイルス粒子が沈んだ後、底泥中で

感染性を維持したまま潜伏していることによると考えられる。

今回の調査で興味深かった点として、9月から10月に間に水柱と底泥の両方で、*H. circularisquama* 細胞が観測されていないにも関わらずウイルス力価の上昇がみられたことが挙げられる。この現象を説明する一つの可能性として、9月中旬の低気圧通過による擾乱が影響した可能性が考えられる(新潟地方気象台 2010)。感染性を維持したまま底泥に潜んでいたウイルスが大規模な擾乱により巻き上げられれば、見かけ上のウイルス力価の上昇が観測されることはあり得る。加茂湖のような比較的浅い環境では、こうした気候の急変が生物相に対しても様々な影響を及ぼすのであろう。2009年の*H. circularisquama* 赤潮の場合にも、台風による強風で湖水の擾乱が起こり底に蓄積していた栄養塩が供給されたことが引き金となって、約2週間のタイムスパンを経て赤潮となったと推察されている(近藤ら 2012)。これに対して、2010年10月上旬に起きた上述の低気圧通過後には、水温・塩濃度等の増殖条件を満たしていたにも関わらず、*H. circularisquama* 細胞の大発生は起きなかった。今回のデータだけでその可能性を検証することは難しいが、環境中に蓄積したウイルスが、擾乱により巻き上がり、*H. circularisquama* の増殖を抑止した可能性も考えられる。2010年の*H. circularisquama* 赤潮発生期間が2009年よりも圧倒的に短かった理由としても、2009年に環境中に蓄積したウイルスが個体群の挙動に影響した可能性が注目される。

加茂湖と同様に、きわめて閉鎖性が高く、貝類養殖の盛んな英虞湾では、1992年に初めて*H. circularisquama* 赤潮が発生し、アコヤガイ養殖に大被害をもたらされた(最大細胞密度

87,420 cells ml⁻¹)。これに対して、翌 1993 年の赤潮は最大細胞密度が 980 cells ml⁻¹と発生は小規模であった。この理由は明らかでないが、ウイルスの蓄積が影響した可能性は強く疑われる。いずれにせよある環境中で一種類の生物が大量に増殖する状態は、現場スケールでの「集積培養(その優占生物を攻撃する生物が増殖しやすい条件下での培養)」と考えることができる。その結果、環境に蓄積した攻撃性微生物が、翌年の赤潮発生規模を小さくした可能性も考えられる。

2. 加茂湖産宿主株とウイルス株のタイピング

単離した宿主株 62 株にウイルス接種をした結果、UA タイプおよび CY タイプの存在が確認された。また明瞭な溶藻は確認できなかったため群別できなかった株については、未知のタイプ、もしくは表現型としての溶藻性が極めて弱い株と推定される。英虞湾産 *H. circularisquama* 株の中には HcRNAV34 と HcRNAV109 に対して感染性を示さない、もしくは非常に低い溶藻性しか示さない株も見出されていることから(Mizumoto et al. 2008)、*H. circularisquama* のウイルス感受性タイプの多様性が注目されている。今回の加茂湖産 *H. circularisquama* 株の中にも新たなグループに属するものが含まれているかもしれない。

上述の通り、今回の試験で単離したウイルスは全て HcRNAV であることが示された。また、種内宿主特異性の異なるタイプは、既知の2つのタイプである UA タイプと CY タイプに分かれた。ウイルスの単離には UA タイプと CY タイプの代表株を用いているため、単離されたウイル

ス株がどちらかに分類されたのは理にかなっているといえるだろう。一方、加茂湖から単離した宿主株では、HcRNAV34にもHcRNAV109にも抵抗性の新しいタイプの存在が示唆されたことから、これらを宿主としたスクリーニングを別途行うことで、新しいタイプの宿主株に対応するウイルスが単離できる可能性も考えられる。

3. HcRNAV MCP アミノ酸配列の系統解析

単離した HcRNAV 計 19 株と、これまでに解析した HcRNAV 計 46 株の ORF2 のアミノ酸配列のデータを基に、最尤法による系統学的比較を行った結果、HcRNAV109 を含むクレードと HcRNAV34 を含むクレードの 2 群に大別された。この系統解析による群別の結果は、ウイルスと宿主代表株を用いたクロスアッセイによって得られた宿主特異性のタイプの違いとよく一致した。Nagasaki et al. (2005a)は、MCP 遺伝子である ORF2 の変異集中領域を対象として系統解析を行い、今回と同様、HcRNAV クローンが明確に異なる2つのクレードに群別されること、ならびにその分かれ方がクロスアッセイにより明らかとなったサブタイプの群別結果とよく一致することを示した。また彼らは、*in silico* でのカプシドタンパク質の立体構造予測の結果、UA タイプと CY タイプの間でのアミノ酸置換が集中している領域の一部が、ウイルス表面側に露出している可能性を示した。そしてこれらの結果から、HcRNAV の株特異的な感染特異性は、ウイルス粒子表面の超微細構造の差異を反映しており、ウイルス粒子表面構造と宿主細胞表面との親和性により決定されるとの仮説を提示した(Nagasaki et al. 2005a)。

本研究で得られた結果は、この仮説を強く支持する結果であった。他の赤潮発生海域から地理的に隔絶された加茂湖に *H. circularisquama* が侵入した経緯は特定されていないが、おそらく稚貝の移入等に伴う侵入に際して複数の宿主-ウイルス系が同時に持ち込まれ、定着したと考えるのが合理的であろう。一連の調査には、代表的な宿主株とウイルス株が用いられているが、新たな宿主株を用いることでカプシドタンパク質のアミノ酸配列並びに株特異性が異なる HcRNAV 株が採取可能であったことから(Nakayama et al. in press)、実際の宿主-ウイルスの多様度は従来の想定よりも高いと推察される。RNA ウイルスの場合、RNA ゲノムの転写に用いられる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)には校正機能が備わっていないため、DNA ウイルスよりも変異が起きやすい。この事実は、HcRNAV の多様性が今後も急速に高まっていく可能性を示すものであり、今後の HcRNAV を巡る生態研究には欠かせない視点であるといえる。加茂湖というきわめて閉鎖的な環境の中で、HcRNAV がどのように変化し、優占タイプが移り変わっていくかを調べることは、藻類ウイルスの進化という視点からも興味深い。

また、赤潮発生時期以外の底泥中のウイルス力価を、今回用いた限界希釈法により測定すると、多くの場合に検出限界を下回るが、実際には多様な配列を有した HcRNAV がすでに加茂湖には定着していると考えられる。これらが *H. circularisquama* 赤潮の発生規模や発生期間に対してどの程度影響しているかは、生態学的にも、また漁場環境や養殖といった水産学的観点からも興味深い。こうした問題の検証に向けて、逆転写定量 PCR や免疫学的手法を用いた更に高感度な HcRNAV の検出方法の導入が望まれる。

第2章

Heterocapsa circularisquama のウイルス感染に関与する RNA 因子の探索

宿主対ウイルスの関係性を包括的に理解するためには、両者の生態学的関係のみならず、細胞内で起こっている感染現象を巡る宿主とウイルスの分子レベルでの相互作用にも目を向ける必要がある。例としては、宿主細胞へのウイルスのエントリー(吸着・脱殻)過程でのタンパク質同士の相互作用、ウイルス感染細胞内で宿主側の防御機構の発現、ウイルス側が宿主側の防御機構を打ち破ろうとする機構等が挙げられる。なかでも、ウイルス感染への免疫機構の一部(Takeuchi & Akira 2010)や植物の RNA サイレンシング(Ding & Voinnet 2007)など、核酸レベルでの発現調節は、感染の成否、あるいは感染の強弱を決定する要因として、ウイルス感染において重要な役割を担っていることが近年わかってきた。これに対してウイルス側も、宿主側の免疫機構を回避し、感染を成立させるための機構を有している場合がある。例えば、ミカン属の植物に感染する *Citrus tristeza virus* (CTV)は、宿主側の防御機構である RNA サイレンシングを回避するための「RNA サイレンシング抑制活性」を持つ3種のタンパク質をコードすることが報告されている(Lu et al. 2004)。このように、ウイルス感染を巡る宿主-ウイルス間の相互作用の過程で、様々な分子レベルでのクロストークが行われ、その結果として宿主細胞内におけるウイルスの複製(あるいは見かけ上の非感染)に到っているものと考えられている。

藻類ウイルス分野における分子レベルでの宿主-ウイルス間の相互作用に関する研究例と

しては、*Emiliana huxleyi* に感染するウイルス *E. huxleyi*-specific virus 86 (EhV-86) と *Chlorella* sp. に感染するウイルス *Paramecium bursaria chlorella virus 1* (PBCV-1) の事例が先行している。

EhV と *E. huxleyi* においては、expressed sequence tag (EST) 法を用いて、EhV 感染により *E. huxleyi* 細胞の中で起こる遺伝子発現変化が追跡された。その結果、EhV 感染 6 時間後以降に宿主内で主に光合成やタンパク代謝に関わるトランスクリプトームが顕著に変化し、ウイルス転写産物が検出されるようになり、感染 24 時間後にはタンパク質分解や、核酸分解、転写、複製に関与するタンパク質をコードするウイルス由来の転写産物が最も豊富に発現することがわかった(Kegel et al. 2007)。

一方、*Chlorella* と PBCV-1 については、365 個の protein-encoding gene (CDS) を用いて、感染を7つのフェーズに分け、各フェーズ毎に発現する CDS を解析したマイクロアレイ解析が行われた。その結果、PBCV-1 複製サイクルは時間的にプログラムされ調節されていることがわかった。解析に用いた CDS のうち 227 個(62%)がウイルス DNA の合成が始まる以前に発現し、これらは2つのグループに分けられた。すなわち、227 個の CDSのうち 127 個の CDS はウイルス DNA 合成の開始よりも前(ウイルス感染初期)に姿を消し、100 個の CDS はウイルス DNA 合成が始まってからも(ウイルス感染初期/後期)検出された。365 個のうち 133 個(36%)はウイルス DNA 合成が開始されてから(ウイルス感染後期)発現した(Yanai-Balser et al. 2010)。

このように、宿主藻体にウイルスが感染すると、時間の経過とともに様々な遺伝子の発現が調節され、感染が進行する。この遺伝子の発現調節には、DNA のメチル化をはじめ、さまざま

な要因が関与していると考えられる。

中でも、ウイルス感染に係る発現調節因子として RNA が果たす機能は興味深い。特に注目されているのが small interference RNA (siRNA)や micro RNA (miRNA)などの small RNA による RNA 干渉(RNA interference : RNAi)である。例えば、植物は RNA サイレンシングでウイルス感染から自らを防御するが、この抗ウイルス免疫にはウイルス由来の小さな RNA (virus-derived small interfering RNA : vsiRNAs)の生産を必要とする(Ding & Voinnet 2007)。他の例としては、ヒトやマウスがコードする miRNA がウイルスをターゲットとし、ウイルス増殖を抑制するケースが知られている(Kasschau et al. 2003, Otsuka et al. 2007)。逆に、ウイルス側が miRNA による防御機構を抑制するという報告もある。ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency Virus : HIV)はある miRNA クラスターの発現を抑制し、効率よく複製を行う(Triboulet et al. 2007)。さらに、HIV を含む多くの動物ウイルスが miRNA をコードしていることが近年明らかとなってきた(Nair & Zavolan 2006)。ウイルスがコードする miRNA は、ウイルス遺伝子の発現制御を行うとともに(Sullivan et al. 2005)、宿主 mRNA の翻訳に影響を与えることで、ウイルスの複製に都合の良い細胞環境を整えると考えられている(Gupta et al. 2006)。このように、ウイルスと宿主の関係の中で、機能性小分子 RNA は非常に重要な役割を担っている。

以上のことから、RNA は調節される側、調節する側のいずれの立場から見ても非常に重要な分子であり、ある宿主-ウイルス間の感染現象を理解するには、そこに介在する RNA の種類

や挙動を精査する必要があると考えられる。*H. circularisquama* とウイルスに関してはこれまで分子レベルでの感染機構の解明に関する研究は行われておらず、感染過程で両者のいかなる遺伝子が RNA レベルで発現調節されているのかについては全くわかっていない。さらに、機能性小分子 RNA に目を向けてみると、ヒトや植物、昆虫など陸上生物と一部の魚類を対象とした研究がほとんどであり、単細胞プランクトンに限れば、緑藻クラミドモナスの small RNA が確認されている(Zhao et al. 2007)のみである。このように、ウイルス感染に関わる機能性小分子 RNA に関する知見はまだまだ一部の生物種に限られているのが現状である。

H. circularisquama は、植物とも動物とも異なる「クロムアルベオラータ生物群」に属する。このことから、既に研究が進められている動植物での発現調節機構とは異なる分子メカニズムの介在が予想される。とくにウイルス感染の過程でいかなる RNA が関与しているかについては、現時点では全く知見が得られていない。

こうした背景の下、本研究では、*H. circularisquama* とそのウイルスの感染過程に関わる RNA 因子の探索を目的とし、本種に対して強い感染力を示す DNA ウイルス(HcDNAV)を研究材料として、分子生物学的なアプローチを試みた。HcDNAV は、約 356 kbp の 2 本鎖 DNA ゲノムを持つ粒径約 0.2 μm の大型の正 20 面体ウイルスである。(Tarutani et al. 2001, Nagasaki et al. 2005b)。HcDNAV ゲノムについては一部のみが解読されており、推定された ORF はそれぞれ mimivirus の HNH endonuclease と metal-dependent hydrolase、African swine fever virus の DNA-directed DNA polymerase と高い相同性を示す。とくに DNA polymerase の系統

解析結果から、HcDNAV は *Asfaviridae* に近縁であると考えられている(Ogata et al. 2009)。しかし、HcDNAV の性状には未知の部分が多く、感染時の遺伝子発現ならびにその調節機構等は未だ解明されていない。これらを解明し、ウイルス感染によって時間経過とともにどのような遺伝子がどのように発現調節がなされていくのかを網羅的に理解し、一連の流れをまとめたマップ(Temporal transcription map)を構築することで、ヘテロカプサ発生防除に応用できるような因子を抽出できるのではないかと考えられる。そこで本章では、この Temporal transcription map 構築に向けたプラットフォームともなるべき、ウイルス感染における HcDNAV 感染時に発現量が顕著に変化する遺伝子、および感染時に検出される小分子 RNA の探索を行うことで、ウイルス感染機構を巡る理解の深化に資することを目指した。

第1節 次世代シーケンスを用いたウイルス感染に関与する mRNA の探索

【背景】

mRNA は、ゲノム DNA から一旦転写されてタンパク質への翻訳の中継役として働く情報伝達分子である。RNA レベルでのサイレンシング(遺伝子発現制御)は転写時サイレンシング(Transcriptional gene silencing : TGS)と転写後サイレンシング(Post-transcriptional gene silencing : PTGS)の2種類に大きく分けられる。TGS は、DNA から mRNA が転写されなくなることによってサイレンシングを起こす現象であり、これには遺伝子のメチル化やクロマチンの構造変化などが関わっていると言われている(Dillon 2004)。PTGS は、通常通り転写された mRNA が何らかの原因で分解されるか、あるいは翻訳が阻害されることにより、遺伝子の発現が抑えられる現象である(Vaucheret et al. 2001)。このように、遺伝子発現は RNA レベルでの調節をかなり受けていることがわかってきた。

こうした背景の下、本研究では、次世代シーケンサーを用いて、HcDNAV に感染させた *H. circularisquama* 細胞の中で、感染時に特異的に発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行うこととした。これにより、*H. circularisquama* への HcDNAV 感染の過程でどのような遺伝子が関わっているかを明らかにし、HcDNAV 感染機構に関する理解を深化するための端緒とすることを目的とした。

【材料と方法】

1. 非感染細胞および HcDNAV 感染細胞からの全 RNA 抽出

全 RNA 調製工程の概要を図 2-1-1 に示す。HcDNAV01 未接種、接種後 12 時間目、および接種後 24 時間目の *H. circularisquama* HU9433-P 培養より、以下の要領で全 RNA 試料をそれぞれ調製した。

対数増殖期の *H. circularisquama* HU9433-P 培養(約 3×10^7 細胞)を準備した。非接種区(HcDNAV01 を接種しない区)については、2,000 rpm × 10 分間の低速遠心により細胞を集めた。ウイルス接種区では、宿主培養液に感染多重度(MOI: 細胞数に対するウイルス数の比)が 100 程度になるように HcDNAV01 を接種し、12 時間後および 24 時間培養後に同様の遠心集藻を行った。いずれの場合も、上清を取り除いたペレットに素早く 1 ml の RNeasy Lysis Buffer(QIAGEN, Hilden, Germany)を加えて懸濁させ、1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これを 4°C で 12,000 rpm × 10 分遠心し、上清を取り除き再びペレット状にした後、直ちに 250 μ l の TRIzol LS Reagent(Life Technologies, California, USA)を加え、ペレットミキサーで細胞ペレットを十分に破碎した。さらに 750 μ l の TRIzol LS Reagent を加え、よく混合した。これを 4°C で 12,000 rpm × 10 分遠心し、上清を回収後、室温で 5 分間インキュベートした。これに 200 μ L の Chloroform を添加し、15 秒激しく手で攪拌後、室温で 3 分インキュベートした。4°C で 13,000 rpm 15 分遠心し回収した水層より、イソプロパノール沈殿により核酸画分をペレットとして回収し、これを 20 μ L のジエチルピロカーボネイト(DEPC)処理水に溶解した。これに

DNase (TaKaRa, Shiga, Japan)を 1 μ L 加え、37°Cで 30 分反応させた後、2.5 μ L の 0.5 M EDTA を加え、80°Cで 2 分間インキュベートすることで DNase を失活させた。ここからエタノール沈殿により RNA ペレットを回収し、20 μ L の RNase-free water に溶かした。調製した全 RNA の品質は変性アガロースゲル電気泳動で確認した。

2. 次世代シーケンスとリード解析

調製した全 RNA の測定工程の概要を図 2-1-2 に示した。全 RNA からの mRNA の精製は、Micro Poly(A) Purist (Life Technologies, California, USA)による処理を2回繰り返すことで行った。得られた mRNA を2価の陽イオンと熱処理により断片化後、ランダムプライマーを用いて cDNA への逆転写を行った。次に、断片化された cDNA の両端にアダプタを結合させ、アダプタ配列に相補的な配列を持つビーズと合わせてエマルジョン PCR に供した。これにより1ビーズに1種類のアダプタ付加した cDNA 配列をエマルジョン内で増幅させることが可能である。増幅した配列が結合したビーズを1粒子ずつピコタイタープレートに充填し、Roche FLX 次世代シーケンサー(Roche, Basel, Schweiz)で配列を解析した。

得られたリードデータは、FLX 付属のソフト(GS De Novo Assembler v2.6)を用いて de novo アセンブルを行った。得られたコンティグの構成リード本数を集計することで、アセンブル解析をおこなった。アセンブル解析では、カウントされたリード本数から Reads per kilobase of exon model per million mapped reads (RPKM)値を算出し各検体のトランスクリプト発現量とした。こ

ここでいう RPKM 値は、検体毎に異なる総リード数を、すべて 100 万本ずつあるものと仮定して補正した値であり、検体間の比較にはこの値を使用した。得られた各サンプルのトランスクリプトから、RPKM 値がウイルス非接種区のものと比較して、ウイルス接種後の発現量が 10 倍以上に増加もしくは減少したトランスクリプトを抽出した。さらに、ウイルス非接種区では検出されず、ウイルス接種区でのみ検出された RPKM 値が 1000 以上のトランスクリプトを抽出した。

アセンブルに使用されるソフトは効率的に配列を連結することが目的のアルゴリズムであるため、アセンブル解析では、各配列の構成リードのカウントが、正確に遺伝子の発現量を反映するかは疑問が残る。そこで、さらにアセンブルで得られたコンティグに対して、マッピング解析をおこなった。マッピング解析の概要を図 2-1-3 に示す。マッピング解析では、FLX 付属のソフト(GS Mapper)を使用し、解析した 3 検体の混合アセンブルをリファレンスとして各サンプルのリードをマッピングした。マッピング後、ソフトでトランスクリプト毎にリードの集計を行い、カウントされたリード本数から RPKM 値を算出し各検体の発現量とした。アセンブル解析同様、RPKM 値は、検体毎に異なる総リード数を、すべて 100 万本ずつあるものと仮定して補正した値であり、検体間の比較にはこの値を使用した。得られた各サンプルのトランスクリプトから、RPKM 値がウイルス非接種区のものと比較して、ウイルス接種後の発現量が 10 倍以上に増加もしくは減少したトランスクリプトを抽出した。さらに、ウイルス非接種区では検出されず、ウイルス接種区でのみ検出された RPKM 値が 1000 以上のトランスクリプトを抽出した。アセンブル解析およびマッピング解析で得られたトランスクリプトの推定アミノ酸を BLAST 検索し、既知配列

データとの相同性から、どのような遺伝子が感染前後に発現量の顕著な増減を示すかを推定した。

【結果】

1. 全 RNA の調製

回収された全 RNA 試料の吸光度を測定したところ、非感染細胞からは 129 μg (644 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $\text{OD}_{260/280}$: 2.14)、感染後 12 時間後の細胞からは 100 μg (370 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $\text{OD}_{260/280}$:2.09)、また感染後 24 時間後の細胞からは 230 μg (1150 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $\text{OD}_{260/280}$:2.07)の RNA の抽出が確認された。電気泳動により RNA の品質確認を行ったところ、18S および 28S rRNA のバンドがシャープに認められたこと、また 28S rRNA のバンドの方が濃く、バンド間にスメアもみられなかったことから、シーケンス解析を行う上で十分な品質の全 RNA が調製できたと判断した。

2. 次世代シーケンス

ウイルス未接種、接種後 12 時間後、24 時間後、およびこれらを合わせた混合データのアセンブルに用いたリード数はそれぞれ順に、22,210、19,187、18,383 および 79,292 であった。アセンブルの結果得られたコンティグを更に連結して得られた 1 つのトランスクリプトの配列と推定されるアイソティグの数はそれぞれ、1,326、1,260、1,172 および 4,677 であった。アセンブル解析により、ウイルス未接種のものと比較して、ウイルス接種後発現量が 10 倍以上に増加もしくは減少したトランスクリプトを抽出した。それらの推定アミノ酸配列を BLAST 検索した結果を表 2-1-1 に示す。BLAST 解析で既知配列と相同性を示したものは 69 個あった。そのうち、感染後に発現量が増加したものは 19 個、減少したものは 50 個であった。さらにウイルス未接種

では検出されずウイルス接種したサンプルから特異的に検出された RPKM 値:1000 以上のトランスクリプトを抽出し、推定アミノ酸配列を BLAST 検索した結果、1 つのトランスクリプトが相同性を示した。そのトランスクリプトは感染12時間後では 139.68 RPKM であったが、感染 24 時間後では 1142.18 RPKM だった。このトランスクリプトと相同性を示したのは、*Cronobacter dublinensis* 582 の DNA-3-methyladenine glycosylase II(Accession Code: ZP_19159021.1)で、E-value は 0.55 だった。

マッピング解析で求められた RPKM 値から、ウイルス非接種区と比較してウイルス接種後の発現量が 10 倍以上に増加もしくは 1/10 以下に減少したトランスクリプトと、ウイルス未接種では検出されずウイルス接種区でのみ特異的に検出された RPKM 値が 1000 以上のトランスクリプトの推定アミノ酸配列を BLAST 検索した結果をそれぞれ表 2-1-2 と表 2-1-3 に示した。その概要を以下に述べる。

マッピング解析の結果、ウイルス接種によって発現量が上記条件で変化したトランスクリプトのうち、BLAST 解析で既知配列との相同性を示したものは 35 個あった。そのうち、感染によって発現量が 10 倍以上に増加したものが 12 個、1/10 以下に減少したものが 23 個であった。一方、ウイルス接種区でのみ特異的に発現が確認されたもののうち、BLAST 検索により既知配列と相同性を示したものは 17 個であった。

【考察】

アセンブル解析とマッピング解析の結果、ウイルス未接種区と比較してウイルス感染細胞で発現量が増加したのべ 104 個のトランスクリプトのうち 31 個が既知配列と同一性を示した。ウイルスには自己複製能がなく、感染した宿主の機能を利用することで、ウイルスの複製・増殖を行う。どのような宿主側因子をどのように利用するのか、多くの場合、その分子機構は未解明である。

今回のスクリーニングで同一性が検出された Translation elongation factor 1-alpha (EF-1 α) は、Dengue 4 Virus RNA の 3' UTR (非翻訳領域)と相互作用し、EF-1 α が RNA ヘリカーゼとして機能することで、ウイルス複製に必要なタンパク質のフォールディングの保持に関わっていることが報告されている (Nova-Ocampo et al. 2002)。また、ウエストナイルウイルスのゲノム RNA (Blackwell and Brinton1997)、HIV type 1 Gag ポリタンパク質 (Cimarelli and Luban, 1999)と相互作用することが報告されている。これらの報告から考えるに、EF-1 α は、感染したウイルスの複製過程で利用されている可能性が高いと予想される。HcDNAV の *H. circularisquama* への感染に際しても、宿主の EF-1 α を利用して、ウイルスが効率的に娘ウイルスを宿主に作らせるための戦略を司っている可能性が考えられる。EF-1 α がクロストークする分子の特定は今後の課題であるが、ウイルスの複製能力を決定する重要な要因の一つであると推察されることから、*H. circularisquama* への感染性がより強い株の選択(強毒・弱毒の判定)に際しても、EF-1 α の分子の性能判定は重要な基準になるかもしれない。今後、HcDNAV

による赤潮防除を考える際には、適正株判定のためにこうした鍵となる分子の性状にも注目することは有意義であると考えられる。

また、今回の実験では、ウイルス感染後に ankyrin repeats の発現量が特異的に増加した。ankyrin repeats は、NCLDV (Nuclear Cytoplasmic Large DNA Virus: 核・細胞質で複製する大型 DNA ウイルス群) の一種である Poxvirus にみられる、タンパク質間相互作用を司る領域である。HcDNAV も HCLDV の一員であることから、HcDNAV 由来の ankyrin repeats が感染を進行させる上で何らかの役割を担っている可能性がある。

逆に発現量が減少したのべ 73 個の遺伝子候補のうち、35 個が何らかの酵素の配列と相同性を示した。これらはウイルス感染を受けていない *H. circularisquama* 細胞内での代謝や生合成に関わっていると考えられる。ウイルス感染によりこれらの宿主側の酵素機能が抑制されることで、宿主の本来の生合成が行われず、ウイルス複製に有利な反応が進んでいくものと推察される。同様の事象はクロレラウイルスの感染過程でも観察されており、感染と同時に宿主側のそれまでの生合成系がウイルス複製のための生合成系に一斉に切り替わることが推定されている (Van Etten et al. 1984)。

今回の実験で感染時特異的に発現することが確認されたトランスクリプトのうち、少なくとも 4 個は HcDNAV 由来であることが、BLAST による相同性解析の結果から推定された。これらは、HcDNAV と同じ NCLDV に属する *Chlorella virus* または African swine fever virus の遺伝子に対して最も高い相同性を示した配列であった。いずれも非感染区では検出されていない配

列であり、HcDNAV の感染により細胞内に持ち込まれたウイルスゲノム DNA から mRNA に転写されたと考えるのが合理的であろう。

第2節 ウイルス感染に関与する機能性小分子 RNA の探索

【背景】

2004年10月、Nature誌に掲載された論文をもって、1991年から始まったヒトゲノム計画が一つの節目を迎えた(Stein 2004)。このプログラムによって、ヒト全ゲノムの98%はノンコーディング領域で、タンパク質の設計図部分はわずか2%ほどに過ぎないことが明らかとなった(Venter 2001)。かつて、ノンコーディング領域は特別な役割を持たない「ジャンク領域」と考えられてきた。しかし近年、タンパク質の遺伝子配列をもたないノンコーディング領域から、膨大な数のRNA(non-coding RNA : ncRNA)の転写が起こっていることが明らかになった(Carninci et al. 2005)。さらにncRNAに遺伝子転写制御などの重要な機能が備わっていることが解明され、こうした機能を持つRNAは、現在では「機能性RNA」と呼ばれている。とくに近年では、機能性RNAのうち18-30塩基長の小さなRNA集団(small RNA)が注目されるようになった。この機能をもったsmall RNA(機能性小分子RNA)は、いわゆるRNA干渉(RNA interference : RNAi)分子として、細胞内の遺伝子発現制御(遺伝子サイレンシング)を引き起こす。これまでのところ、機能性小分子RNAは、small interfering RNA (siRNA)、micro RNA (miRNA)、およびPIWI interacting RNA (piRNA)に大別される。siRNAはdouble-stranded RNA (dsRNA)が細胞内でエンドヌクレアーゼDicerによって切断されてできる。Dicerに切断されて出来た2本鎖siRNAは、RISC-loading complex (RLC)で1本鎖となり、活性型RNA-induced silencing

complex (RISC)を形成して、その主要コンポーネントであるタンパク質 Argonaute2 (AGO2)による外来の標的 mRNA の切断をガイドする。miRNA は siRNA と似た作用機序を示すが、miRNA は内在性の、つまり自身のゲノム上のイントロンに存在し、発生のタイミングや寿命の制御、細胞増殖、アポトーシス、脂質代謝、植物では葉の形状の制御や花びらの発生を制御など、実に多彩な遺伝子の発現調節を行っている(Wienholds & Plasterk 2005)。さらに、siRNA は標的 RNA の配列と完全に一致することで機能する。対して、miRNA は標的 RNA 配列と完全に一致することで標的 mRNA を分解する場合と、完全に一致しなくても標的遺伝子の mRNA にある相補的配列に結合し、その翻訳を抑制する場合がある(Bartel 2007)。

渦鞭毛藻に対するウイルス感染現象の中で、遺伝子発現調節機構として、このような機能性小分子 RNA が働いているかどうかを検証した例はない。そこで本節では、HcDNAV 感染を受けた *H. circularisquama* 細胞から小分子の RNA を精製後、クローニングすることで、その塩基配列の解読を行った。siRNA は工学的な利用を目的とした研究が進んでいるが、miRNA は生命活動を支える因子として、より生理学的な意味で他の機能性小分子 RNA よりも研究が進んでいる。そのため、作用機構の解明など基礎的な知見も含めたデータベースが充実している。そこで、機能性小分子 RNA の関与を知るためにまず、得られた配列を、既知の機能性小分子 RNA (特に miRNA)との相同性を調べることで、得られた小分子の RNA 配列が miRNA である可能性について検討した。

【材料と方法】

1. HcDNAV 感染細胞からの RNA 調製

小分子 RNA 調製工程の概要を図 2-2-1 に示した。

まず、約 2×10^7 細胞の対数増殖期の HU9433-P 培養に対して HcDNAV01 を接種し、感染直前および感染後 12、24、および 48 時間目の細胞懸濁液を採取した。低速遠心 (2,400 rpm \times 10 分) により集藻し、上清を取り除いたペレットに直ちに RNAlater (QIAGEN, Hilden, Germany) を適量加えて保存した。次に、4°C、12,000 rpm で 10 分遠心して上清の RNAlater を取り除き、直ちに 150 μ L の RNAzol RT (Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA) を加え、ペッスルで細胞を破碎した。これを新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、液量が 1 ml になるようにさらに RNAzol RT を添加して、ピペッティングにより混和した。これに 400 μ L の RNase-free 水を加え、15 秒ボルテックスにかけよく攪拌したものを室温で 10 分静置し、4°C、12,000 $\times g$ で 15 分遠心した。上清 1 ml を新しいチューブに回収し、400 μ L の 75% エタノールを加え、室温で 10 分静置した後、4°C、12,000 $\times g$ で 8 分遠心した。この上清を新しいチューブ 2 本に分注し、溶液の 0.8 vol. のイソプロパノールを加え、4°C で 30 分静置後、4°C、12,000 $\times g$ で 15 分遠心した。上清を除去後、ペレットに 400 μ L の 70% イソプロパノールを加えて 4°C、8,000 $\times g$ で 3 分遠心することで洗浄した。この洗浄工程を 2 回行い、上清を取り除いた後、ペレットを風乾させた。風乾させたペレットを 14 μ L の 0.1 \times TE に溶解させ、55°C で 15 分インキュベート後、次の工程に進むまで -80°C で保存した。

2. 小分子 RNA の精製

RNA サンプルを 80°C で 5 分インキュベートし、17.5%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供した。分子量マーカーとして Prestain Marker for Small RNA (BioDynamics Laboratory Inc., Tokyo, Japan) 5 μ L を泳動した。マーカーの位置を参考として泳動を停止し、目的産物部分 18-30 nt に相当する位置のゲルを切り出した。ゲルからの小分子 RNA の精製は small RNA Gel Extraction Kit (TaKaRa, Shiga, Japan) を使用して添付のプロトコールに従って行った。精製した小分子 RNA は最終的に 40 μ L の RNase-free 水に溶かした。

3. 小分子 RNA の塩基配列決定

精製した小分子 RNA は small RNA Cloning Kit (TaKaRa, Shiga, Japan) を使用してクローニングを行った。手順は基本的に付属のプロトコールに従った。2. で精製した小分子 RNA を BAP 処理し、3' adaptor のライゲーション、マグネットビーズへの吸着、5' 末端のリン酸化、5' adaptor のライゲーション、逆転写反応、および PCR を行った。PCR 産物の一部を未変性の 12.5% ポリアクリルアミドゲルで泳動し、目的産物の増幅を確認した。残りの PCR 産物をフェノール/クロロホルム処理により抽出後、エタノール沈殿し、TE バッファー 5 μ L に溶かした。この PCR フラグメント溶液を未変性の 12.5%ポリアクリルアミドゲル中で泳動後、目的産物部分 (小分子 RNA 配列に両端に結合させたアダプタ配列分を加えた、60~80nt に相当する位置) のゲルを切り取り、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を利用して、ポリ

クリルアミドゲルからの抽出を行った。最終的に 5 μ L の dH₂O に懸濁させた。5 μ L の溶液を DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて 16°C 1 時間ライゲーションさせた後、TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing (Life Technologies, California, USA)を用いて TA クローニングし、プラスミドベクターを One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* に形質転換した。一連の操作は付属のマニュアルに従った。LB-プレートに生えたコロニーを LB 培地で培養し、Nucleospin Qickpure (MACHEREY-NAGEL, Dueren, Germany)でプラスミド精製した。プラスミド DNA を鋳型とし、M13 Forward primer、M13 Reverse primer をプライマーとして ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1(Life Technologies, California, USA)を用いてシーケンス反応を行い、精製したものを、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies, California, USA)で塩基配列を決定した。得られた塩基配列のうち、アダプタ配列に挟まれた部分を目的配列とした。目的配列に対して、miRBase から得た既知の miRNA データベースとの BLAST 検索を行い、相同性のあるものを探した。目的配列と、BLAST 検索で得た相同性のある配列をそれぞれ二次構造予測用ソフトウェア mfold (Zuker et al. 1999) (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)を用いて、それぞれの RNA 塩基配列が取りうる二次構造を推定した。

【結果】

シーケンスの結果、19-35 nt の RNA 配列を 13 個得ることができた。ウイルス未接種のサンプルからは配列を得ることができなかつたため、ウイルス非感染 *H. circularisquama* が持つ miRNA を調べることはできなかつた。感染後 12 時間のサンプルからは 2 個の配列(12-3; 26 nt、12-6; 35 nt)、感染後 24 時間のサンプルからは 7 個の配列(24-1; 26 nt、24-2; 21 nt、24-3; 27 nt、24-5; 20 nt、24-6; 20 nt、24-7; 19 nt、24-8; 22 nt)、感染後 48 時間のサンプルからは 4 個の配列(48-4; 27 nt、48-5; 22 nt、48-6; 23 nt、48-7; 34 nt)をそれぞれ得た(表 2-2-1)。これら 13 個の RNA 配列をデータベースを用いて BLAST 検索した結果、13 個中 9 個の配列で、既知の miRNA との相同性が検出された。この 9 個の配列とそれに相同性があると判断された配列を表 2-2-2 に示した。

mfold によって推定された二次構造を図 2-2-2~2-2-26 に示した。これにより、各分子中で形成されるステム・ループ構造の存在について検討した。

【考察】

これまでに発見された miRNA の数は、2012 年 8 月現在 microRNA のデータベース (miRBase) 上ですでに 21,000 を超えている。しかし、いまだに多くの miRNA がいかなる分子をターゲットにして、どのような働きを担っているのかは明らかでない。本研究で得られた配列のうち、“24-6”の配列の相補鎖は、ポプラ由来の miRNA: *ptc-miR395a* との相同性を示した。この miR395 は、今回スクリーニングされた miRNA のなかで唯一、機能推定が成されているものであり、植物の成長に必要な硫黄を合成する硫酸イオン代謝経路に関わる ATP スルフィラーゼと硫酸イオン輸送体 2;1 をターゲットとする。硫酸塩欠乏状態になると miR395 が過剰発現し、硫酸イオン輸送体遺伝子の発現を調節し、根ではなく若い枝への硫酸イオンの蓄積を促す。また ATP スルフィラーゼの発現量を調製し、硫酸イオンを生命維持に必須な成分のタンパク質をつくる一次代謝に集中させるようにする(Jones-Rhoades & Bartel 2004, Liang et al. 2010a, Liang & Yu 2010b)。

また、“48-4”は、今回のスクリーニングの結果、唯一ウイルス由来の miRNA と相同性を示した miRNA であり、アカゲザルに感染するガンマヘルペスウイルス Rhesus lymphocryptovirus の miRNA と若干の相同性を示した。Rhesus lymphocryptovirus は約 171.1 Kbp の 2 本鎖 DNA ゲノムをもつウイルスで、ヒトに感染する Epstein-Barr virus と同属である(Riley et al. 2010)。ただし、相同性を示した *rlcv-miR-rl1-28-5p* は、ゲノム配列からコンピューターを用いて予測されたものであり、実際の細胞内における標的分子並びにその機能はわかっていない。

ここでは便宜的に抽出された miRNA 候補配列が取ると予測される 2 次構造について検討した。多くの場合、特徴的なループ配列が含まれており、何らかの構造とのクロストークを支持している可能性が示唆された。より詳細な機能推定については、さらに精緻な分子間作用測定が求められる。

miRBase に登録されている miRNA も、ターゲットや作用機構が明らかになっていないものが多い。本研究で相同性が検出された配列について、完全にその配列が一致したケースはみられなかったが、miRNA として機能している可能性は十分に考えられる。今後の課題としては、まず得られた配列が miRNA であるかどうかを検証する必要がある。そのためには、得られた小分子 RNA の周辺領域の配列を解読し、miRNA 前駆体にみられる特徴的な二次構造を取るかどうかを調べる必要がある。さらに、リアルタイム PCR 等により発現量の経時的变化を追跡すること、さらに相補鎖配列を人工的に組み込み結合させることで小分子 RNA をノックアウトさせ発現系にどんな影響が及ぶのかを精査することなどにより、抽出された配列が miRNA であるかどうかについての総合的判断が求められる。

ごく最近、NCLDV の一つである *Iridoviridae* 科の *Rana grylio virus* (RGV)には 18 の成熟 miRNA がコードされていることがわかり、自身の遺伝子の発現を調節し複製をコントロールしているとの推定が成された(Lei et al. 2012)。同じ NCLDV の一員である HcDNAV からもこうした機能性小分子 RNA が見つかる可能性は十分に考えられる。本研究では、そのプラットフォームとなる小分子 RNA 探索技術が渦鞭毛藻に適用可能であることを示すとともに、その

候補分子を抽出した。渦鞭毛藻という、動物とも植物とも異なる別グループの生物群で、ウイルス感染にいかなる小分子 RNA が関与しているかは生理・生態学的のみならず、進化学的にも興味深いテーマであるといえる。今後のさらなる検討が望まれる。

総合考察

日本は周りを海に囲まれ、古来より魚介類など海から得られる水産資源を有効に利用してきた。天然水産生物の漁だけでなく、放流による栽培漁業や水産生物の養殖漁業も盛んに行われている。その中で、赤潮は魚介類のへい死や、ノリの色落ちなど商品価値の低下を引き起こすため、水産業にとって大きな問題である。特に、生け簀や筏など限られた範囲に高密度で飼育する海面養殖では、赤潮が発生しても急に避難させることは難しく、時には大きな被害が発生させる。赤潮はプランクトンが高密度に繁殖しておこる現象である。赤潮の発生から消滅にはプランクトン自身の生活史の他にも環境など実に多くの要因が複雑に作用し合うため、総合的な理解は容易ではない。赤潮に対する対応の基本は、予察と防除である。予察は、予測を含め赤潮をいかに早く察知するかである。早く察知できれば、その分被害が出る前に餌止めや避難させるといった対応も可能となる。防除に関しては、まず赤潮が発生しにくい環境を整えることが重要であるが、発生した赤潮に対しては粘土散布などが試みられている。粘土散布は閉鎖的な水域では一定の効果は望めるが、開放性漁場には弱い。これまでに粘土散布以外にも多くの策が試されてきたが、実用レベルの有効な防除策は未だ確立されていない。

Heterocapsa circularisquama は有害赤潮原因藻の一つで貝類に対して強い毒性を持つ。アサリ(*Ruditapes philippinarum*)やマガキ(*Crassostrea gigas*)、真珠をつくるアコヤガイ(*Pinctada fucata martensii*)など、水産学的にも貴重で、養殖も盛んに行われている貝類に壊

滅的なダメージを与え、大きな被害をもたらすため、重要警戒種の 1 つとして位置づけられている。*H. circularisquama* は 1988 年に発見された比較的新しいプランクトンである。その生物学的な理解や赤潮のメカニズムは未だ完全には解明されていない。*H. circularisquama* 赤潮対策には、まずその理解を深め、有効な方法を検討していく必要がある。*H. circularisquama* には、2 種類の感染するウイルスが確認されており、ウイルスが *H. circularisquama* の挙動に大きなインパクトを与えることが明らかとなった。この事実は今後、*H. circularisquama* 赤潮の対策を考えるのに必要な、*H. circularisquama* の生態を理解する上で無視できないものであり、対策の“鍵”となる可能性もある。そのためには両者の関係性を詳しく知る必要がある。

そこで本研究では、「生態学」および「分子生物学」という2つの視点から有害赤潮原因渦鞭毛藻 *H. circularisquama* とウイルスの関係性について精査を試みた。

第 1 章では、「生態学」的な視点から、*H. circularisquama* の発生北限環境である新潟県加茂湖において、同種に対する溶藻ウイルス因子の挙動調査を行った。その結果、他の海域と同様に、赤潮の出現時に特異的に *H. circularisquama* 溶藻因子の特異的増加が観測された。この溶藻因子の多くは 1 本鎖 RNA ウイルスの HcRNAV であると考えられ、少なくとも UA タイプおよび CY タイプを含む複数のサブタイプから構成されていることが確認された。各サブタイプの株間感染特異性とカプシドタンパク質のアミノ酸配列パターンはよく一致しており、ウイルスの表面構造と宿主細胞との相互関係により感染特異性が決定されているものと推察された。この結果は、従来の Nagasaki et al. (2005a)の仮説を支持するものである。他の海域でみられ

たのと同様に、加茂湖においてもヘテロタイプからなる宿主-ウイルス系が定着しており、それは今回のサンプリング強度でも十分に検出できるほどに、量的に拮抗していたということであろう。ただし、更にサンプリング頻度を上げることで、よりマイナーなタイプの宿主・ウイルスが検出される可能性も十分ある。Nagasaki et al. (2005a)の仮説に示された宿主-ウイルス系の2グループへのタイプ分けは、恐らく今後、詳細に調べれば調べるほどその多様性が明らかになるものと推定される。Nakayama et al. (in press)の示した、UAタイプ内でのサブグルーピングという結果は、その推定を支持する知見であるといえる。

H. circularisquama の分布域拡大は今後も十分に予測される。2009年の赤潮初発生からわずか1年で*H. circularisquama* とウイルスの複雑な関係性が加茂湖に定着していたことから、稚貝等の移入により「ヘテロタイプの宿主-ウイルス群」が移入してきた可能性が高いと考えられる。海流に乗って、宿主-ウイルスが加茂湖に移入してきた可能性も完全には否定できないが、*H. circularisquama* の陸上輸送への耐性を考慮すれば、二枚貝稚貝の人為的移入に際して持ち込まれたとみるのが合理的であろう。すなわち、*H. circularisquama* の発生記録のある海域から稚貝等を安易に移入することは非常に危険であることが、宿主-ウイルスの関係性を追うことから検証される結果となった。さらに加茂湖は、知られている限り、*H. circularisquama* の生息北源である。冬季、数か月間に亘り10℃以下に下がる加茂湖で*H. circularisquama* がどのように越冬するか明らかでないが、一旦侵入してしまえば、加茂湖のような寒冷な環境でもこれまで他の海域でみられたのと同様の繁茂および宿主-ウイルスの関係

性の成立に到ることがわかった。

加茂湖はきわめて閉鎖性が高い、他の赤潮頻発海域から地理的に離れた湖であるため、当初、養殖用稚貝等の移入が制限されれば、長期的に考えれば、加茂湖特有の宿主-ウイルス系の相互進化が注目されると考えられていた。ただし実際には、東北大震災の影響で宮城県からのマガキ稚貝の購入は中断され、広島県・三重県等からのマガキの移入も行われていたため、今後、加茂湖における宿主-ウイルスの関係性は、よりヘテロに、より複雑になっていくものと考えられる。ただし、加茂湖においては、その特殊な気候条件により、より低温耐性の高い宿主クローンが生残する(選択される)可能性が高いという点に注目すれば、ウイルスタイプの変動、あるいは微進化にもその影響が反映する可能性は否定できない。ある程度時間が経ってから再度加茂湖の個体群と他海域の個体群を比較することで、加茂湖に定着した優占個体群の特性が明らかになるかもしれない。

海洋中において、*H. circularisquama* 赤潮はしばしばパッチ(局所的な高密度の細胞集団)を形成する。したがって、*H. circularisquama* 赤潮発生時でも、採水のタイミングなどにより、その細胞集団を捕らえることができない場合がある(実際、しばらくの時間、赤潮発生域を眺めていると、着色した海水と、そうでない海水が不連続に流れすぎていく場合もある)。

ウイルスと宿主が同時出現すること、また現場調査の結果、宿主が検出されない場合でもウイルスカバが検出されたことから、ウイルスを標的とした高感度な検出技術を用いれば、*H. circularisquama* の早期発見に応用できるかもしれない。例えば、栄研化学株式会社が開発し

た loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法という遺伝子増幅法をウイルスに対して適用することで、その高感度検出が可能になると思われる(Notomi et al. 2000)。基本的にこの方法は、標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴とする。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を混合し、一定温度(65°C付近)で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。さらに目的配列を特異的に15分~1時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅するため、迅速・簡易・正確な検出が可能である。宿主である *H. circularisquama* についてはすでに、この LAMP 法を用いた簡易検出法が坂本らによって開発されており(坂本・山口 2010)、現場でも利用されている。LAMP 法を用いた HcRNAV および HcDNAV の検出法を開発すれば、ウイルス力価の増加と共に増加する可能性のある *H. circularisquama* の出現を早い段階で検出することに繋がるかもしれない。ただし HcRNAV の場合はウイルスゲノムの逆転写操作が必要になるため、工程がやや増える点が問題であろう。

なお、今回の調査からも、底泥がウイルスの重要なリザーバーになっている可能性が示唆された。赤潮発生直後の底泥は抗 *H. circularisquama* ウイルスを多く含んでいること、なかでも HcRNAV は凍結耐性が強いこと、さらに土着性の泥を再投入することで他海域からの生物移入に関する懸念もない。そこで、赤潮終息時の底泥を保存し、翌年に再投入することでウイルス密度を高め、赤潮の発生を抑えようとする試みが現在行われている(中山 未発表)。本研究で得られたデータは、こうした試みの合理性を支持するものである。赤潮防除を巡る方法論に

については、いくつか基本的な評価項目があるが、上述の方法は、土着性のウイルスをタイミング良く利用するという点では、安全性は十分に高いといえる。また、粘土などの異物投入ではなく、天然の持つ抗赤潮作用を利用しているという点で、合理的であるといえる。ただし、いわゆるパブリックオピニオンへの対策として、いかなる機構でいかなる効果が期待できるかは一般に分かりやすく、十分な説明を行う準備をしておく必要がある。

こうした点に鑑み本研究では、外側からみえる宿主-ウイルス間の関係性を精査することに加え、細胞内でのイベント、すなわちいかなる分子生物学的クロストークの下にウイルス対宿主の関係性が成立しているかにも着目することとした。第 2 章で行った、「分子生物学」的な視点からの感染時特異的な発現 RNA 探索は、その一つのアプローチである。実験の結果、感染によってさまざまな種類の因子が発現量を変化させること、また miRNA 様の小分子 RNA が存在していることが示された。顕著な発現量変化を示した候補分子のうち、ウイルスの複製に必要と予想される分子は増加を、ウイルス感染には不要であり宿主の生合成に必要な酵素等はそれぞれ減少を示すと考えられた。今後、各分子の挙動をより詳細に精査していくことで、分子レベルでの *H. circularisquama* のウイルス感染経路の解明が進むものと期待される。本研究は、その端緒となるスクリーニング結果を提示するものである。

この一連の研究により構築されたプラットフォームを出発点とする次の研究展開は、鍵分子となる重要候補の再吟味と、そのもとのゲノム領域の特定であろう。mRNA の場合、宿主ゲノム上でエクソンを含んでマルチな領域にコードされている可能性もある。その発現を司る領域を

調べ、精査し、いかなる発現調節が可能であるかを推定することで、ウイルス感染工程を駆動していくためのメカニズムの端緒が得られるかもしれない。また、miRNA の場合には、まずは他の既知小分子 RNA との配列比較、さらに推定される2次構造から予測されるループ構造の配列を既知の機能分子と比較することで、その作用機序についても情報が得られると期待される。

ウイルス感染経路および作用機序を明らかにすることで、*H. circularisquama* にとってウイルス感染のなかで、細胞の運命を決定する鍵となるフェーズを特定することができる可能性がある。そのフェーズを刺激し細胞を死滅に至らしめる薬剤を、ウイルス粒子を模したバイオナノカプシドを用いて運搬させ、特異的に *H. circularisquama* に対して反応させることができれば、人工的な模造ウイルス様因子としての活用も可能であろう。これらの実現には、本研究で得られた結果をさらに精査するとともに、さまざまな角度からのアプローチをつなぎ合わせることで、ウイルス感染機構を総合的に解明することが必要であり、今後の課題であるといえる。

長径 20 μ m 程度の微小な宿主細胞の中で、絶妙の発現調節がなされ、感染が成立し、溶藻が起こり、感染が広がり、それが個体群全体としての生物量やクローン組成の劇的な変化に反映されるということは、ある意味、ウイルス感染は赤潮自身が自らの挙動をコントロールすべく備わった「機能」ということができるかもしれない。赤潮が消え、他種が繁茂している間、*H. circularisquama* は少数の（おそらく分裂活性の低い）栄養細胞として水中に存在しているので

あろう。それらが増殖モードに入り、赤潮化する際には、ウイルスは宿主個体群の量と質を左右する形でそのブルームの挙動に関わる。すなわち、海洋での顕著な生物学的イベントであるブルームの制御因子としてウイルスは有効に機能していると思われる。

この一連のイベントに、いかなる分子レベルでの制御がかかっているかは興味深く、今後の重要研究課題の一つに位置付けられるだろう。本研究では、感染に関与する可能性がある RNA 因子の抽出を行うことで、同分野の研究のプラットフォーム構築には寄与したが、各因子の機能に関する精査まではカバーできなかった。今後、さらに集約的な研究勢力の投入が望まれる。

引用文献

- Allen MJ, Schroeder DC, Holden MTG, Wilson WH (2006) Evolutionary history of the Coccolithoviridae. *Molecular Biology and Evolution* 23:86-92
- Attoui H, Jaafar FM, Belhouchet M, de Micco P, de Lamballerie X, Brussaard CPD (2006) *Micromonas pusilla* reovirus: a new member of the family Reoviridae assigned to a novel proposed genus (Mimoreovirus). *Journal of General Virology* 87:1375-1383
- Bartel DP (2007) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell* 131:11-29
- Baudoux AC, Brussaard CPD (2005) Characterization of different viruses infecting the marine harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*. *Virology* 341:80-90
- Bettarel Y, Kan J, Wang K, Williamson KE, Cooney S, Ribblett S, Chen F, Wommack KE, Coats DW (2005) Isolation and preliminary characterisation of a small nuclear inclusion virus infecting the diatom *Chaetoceros* cf. *gracilis*. *Aquatic Microbial Ecology* 40:103-114
- Blackwell JL, Brinton MA (1997) Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *Journal of Virology* 71:6433-6444
- Bratbak G, Jacobsen A, Heldal M, Nagasaki K, Thingstad F (1998) Virus production in *Phaeocystis pouchetii* and its relation to host cell growth and nutrition. *Aquatic Microbial Ecology* 16:1-9

Brussaard CPD, Bratbak G, Baudoux A-C, Ruardij P (2007) *Phaeocystis* and its interaction with viruses. *Biogeochemistry* 83:201-215

Brussaard CPD, Kempers RS, Kop AJ, Riegman R, Heldal M (1996) Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliana huxleyi* in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 10:105-113

Brussaard CPD, Noordeloos AAM, Sandaa RA, Heldal M, Bratbak G (2004a) Discovery of a dsRNA virus infecting the marine photosynthetic protist *Micromonas pusilla*. *Virology* 319:280-291

Brussaard CPD, Short SM, Frederickson CM, Suttle CA (2004b) Isolation and phylogenetic analysis of novel viruses infecting the phytoplankton *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae). *Applied and Environmental Microbiology* 70:3700-3705

Bubeck JA, Pfitzner AJP (2005) Isolation and characterization of a new type of chlorovirus that infects an endosymbiotic *Chlorella* strain of the heliozoon *Acanthocystis turfacea*. *Journal of General Virology* 86:2871-2877

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest ARR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato X, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SPT, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Babu MM, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Sempile CAM, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y, Consortium F, S RGERG (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559-1563

- Castberg T, Thyrhaug R, Larsen A, Sandaa RA, Heldal M, Van Etten JL, Bratbak G (2002) Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *Journal of Phycology* 38:767-774
- Cimarelli A, Luban J (1999) Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *Journal of Virology* 73:5388-5401
- Cottrell MT, Suttle CA (1991) Wide-spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan, eukaryotic marine phytoplankter *Micromonas pusilla*. *Marine Ecology Progress Series* 78:1-9
- Cottrell MT, Suttle CA (1995) Genetic diversities of algal viruses which lyse the photosynthetic picoflagellate *Micromonas pusilla*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3088-3091
- Derelle E, Ferraz C, Escande M-L, Eychenie S, Cooke R, Piganeau G, Desdevises Y, Bellec L, Moreau H, Grimsley N (2008) Life-cycle and genome of OtV5, a large DNA virus of the pelagic marine unicellular green alga *Ostreococcus tauri*. *Plos One* 3:e2250
- Dillon N (2004) Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell* 96:631-637
- Ding S-W, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130:413-426
- Fitzgerald LA, Graves MV, Li X, Feldblyum T, Hartigan J, Van Etten JL (2007a) Sequence and annotation of the 314-kb MT325 and the 321-kb FR483 viruses that infect *Chlorella Pbi*. *Virology* 358:459-471

- Fitzgerald LA, Graves MV, Li X, Feldblyum T, Nierman WC, Van Etten JL (2007b) Sequence and annotation of the 369-kb NY-2A and the 345-kb AR158 viruses that infect *Chlorella* NC64A. *Virology* 358:472-484
- Fitzgerald LA, Graves MV, Li X, Hartigan J, Pfitzner AJP, Hoffart E, Van Etten JL (2007c) Sequence and annotation of the 288-kb ATCV-1 virus that infects an endosymbiotic chlorella strain of the heliozoon *Acanthocystis turfacea*. *Virology* 362:350-361
- Friessklebl AK, Knippers R, Muller DG (1994) Isolation and characterization of a DNA virus infecting *Feldmannia simplex* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 30:653-658
- Garry RT, Hearing P, Cosper EM (1998) Characterization of a lytic virus infectious to the bloom-forming microalga *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *Journal of Phycology* 34:616-621
- Gastrich MD, Leigh-Bell JA, Gobler CJ, Anderson OR, Wilhelm SW, Bryan M (2004) Viruses as potential regulators of regional brown tide blooms caused by the alga, *Aureococcus anophagefferens*. *Estuaries* 27:112-119
- Gobler CJ, Anderson OR, Gastrich MD, Wilhelm SW (2007) Ecological aspects of viral infection and lysis in the harmful brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*. *Aquatic Microbial Ecology* 47:25-36
- Gobler CJ, Deonaraine S, Leigh-Bell J, Gastrich MD, Anderson OR, Wilhelm SW (2004) Ecology of phytoplankton communities dominated by *Aureococcus anophagefferens*: the role of viruses, nutrients, and microzooplankton grazing. *Harmful Algae* 3:471-483

- Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW (2006) Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript (Retracted Article. See vol 451, pg 600, 2008). *Nature* 442:82-85
- Henry EC, Meints RH (1992) A persistent virus infection in *Feldmannia* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 28:517-526
- Hatano M, Imai I (2010) Selenium requirements for growth of the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama*, *H. triquetra* and *Karenia mikimotoi*. *Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University* 60:51-56
- Honjo T (1998) Potential transfer of *Heterocapsa circularisquama* with pearl oyster consignments. *Harmful Algae*:224-226
- Horiguchi T (1995) *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycological Research* 43:129-136
- Imada N, Honjo T, Shibata H, Oshima Y, Nagai K, Matsuyama Y, Uchida T (2001) The quantities of *Heterocapsa circularisquama* cells transferred with shellfish consignments and the possibility of its establishment in new areas. in: *Harmful Algal Blooms 2000*, Hallegraeff GM et al eds, IOC of UNESCO, Paris,;474-476
- Imai I, Itakura S, Matsuyama Y, Yamaguchi M (1996) Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fisheries Science* 62:834-835

- Iwataki M, Wong MW, Fukuyo Y (2002) New record of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) from Hong kong. *Fisheries Science* 68:1161-1163
- Jacobsen A, Bratbak G, Heldal M (1996) Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* 32:923-927
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14:787-799
- Kapp M, Knippers R, Müller DG (1997) New members of a group of DNA viruses infecting brown algae. *Phycological Research* 45:85-90
- Kasschau KD, Xie ZX, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4:205-217
- Kegel J, Allen MJ, Metfies K, Wilson WH, Wolf-Gladrow D, Valentin K (2007) Pilot study of an EST approach of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* during a virus infection. *Gene* 406:209-216
- Lang AS, Culley AI, Suttle CA (2004) 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
- Lanka STJ, Klein M, Ramsperger U, Muller DG, Knippers R (1993) Genome structure of a virus infecting the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Virology* 193:802-811

- Lawrence JE, Brussaard CPD, Suttle CA (2006) Virus-specific responses of *Heterosigma akashiwo* to infection. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7829-7834
- Lawrence JE, Chan AM, Suttle CA (2001) A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Phycology* 37:216-222
- Lei X-Y, Ou T, Zhu R-L, Zhang Q-Y (2012) Sequencing and analysis of the complete genome of *Rana grylio* virus (RGV). *Archives of Virology* 157:1559-1564
- Liang G, Yang F, Yu D (2010a) MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 62:1046-1057
- Liang G, Yu D (2010b) Reciprocal regulation among miR395, *APS* and *SULTR2;1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 5:1257-1259
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15742-15747
- Maier I, Wolf S, Delaroque N, Muller DG, Kawai H (1998) A DNA virus infecting the marine brown alga *Pilayella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae) in culture. *European Journal of Phycology* 33:213-220
- Mayer JA, Taylor FJR (1979) Virus which lyses the marine nanoflagellate *Micromonas pusilla*. *Nature* 281:299-301

- Meints RH, Ivey RG, Lee AM, Choi T-J (2008) Identification of two virus integration sites in the brown alga *Feldmannia* chromosome. *Journal of Virology* 82:1407-1413
- Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K (2007) 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
- Mizumoto H, Tomaru Y, Takao Y, Shirai Y, Nagasaki K (2008) Diverse responses of the bivalve-kiving dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to infection by a single-stranded RNA virus. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3105-3111
- Monier A, Larsen JB, Sandaa R-A, Bratbak G, Claverie J-M, Ogata H (2008) Marine mimivirus relatives are probably large algal viruses. *Virology Journal* 5:12
- Moreau H, Piganeau G, Desdevises Y, Cooke R, Derelle E, Grimsley N (2010) Marine prasinovirus genomes show low evolutionary divergence and acquisition of protein metabolism genes by horizontal gene transfer. *Journal of Virology* 84:12555-12563
- Muller DG (1991) Mendelian segregation of a virus genome during host meiosis in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Journal of Plant Physiology* 137:739-743
- Muller DG, Kapp M, Knippers R (1998) Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research*, Vol 50 50:49-67
- Muller DG, Sengco M, Wolf S, Brautigam M, Schmid CE, Kapp M, Knippers R (1996) Comparison of two DNA viruses infecting the marine brown algae *Ectocarpus siliculosus* and *E-fasciculatus*. *Journal of General Virology* 77:2329-2333

- Nagasaki K, Ando M, Imai I, Itakura S, Ishida Y (1994) Virus-like particles in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) – A possible red tide disintegration mechanism. *Marine Biology* 119:307-312
- Nagasaki K, Kim J-J, Tomaru Y, Takao Y, Nagai S (2009) Isolation and characterization of a novel virus infecting *Teleaulax amphioxeia* (Cryptophyceae). *Plankton Benthos Research* 4:122-124
- Nagasaki K, Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Nishida K, Tomaru Y (2005a) Comparison of genome sequences of single-stranded RNA viruses infecting the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8888-8894
- Nagasaki K, Shirai Y, Tomaru Y, Nishida K, Pietrokovski S (2005b) Algal viruses with distinct intraspecies host specificities include identical intein elements. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3599-3607
- Nagasaki K, Tarutani K, Yamaguchi M (1999a) Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Applied and Environmental Microbiology* 65:898-902
- Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N, Shirai Y, Nishida K, Itakura S, Yamaguchi M (2004a) Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:704-711

- Nagasaki K, Tomaru Y, Nakanishi K, Hata N, Katanozaka N, Yamaguchi M (2004b) Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in Ago Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology* 34:219-226
- Nagasaki K, Tomaru Y, Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H (2006) Dinoflagellate-infecting viruses. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86:469-474
- Nagasaki K, Tomaru Y, Takao Y, Nishida K, Shirai Y, Suzuki H, Nagumo T (2005c) Previously unknown virus infects marine diatom. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3528-3535
- Nagasaki K, Tomaru Y, Tarutani K, Katanozaka N, Yamanaka S, Tanabe H, Yamaguchi M (2003) Growth characteristics and intraspecies host specificity of a large virus infecting the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2580-2586
- Nagasaki K, Yamaguchi M (1997) Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquatic Microbial Ecology* 13:135-140
- Nagasaki K, Yamaguchi M (1998) Effect of temperature on the algicidal activity and the stability of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus). *Aquatic Microbial Ecology* 15:211-216
- Nagasaki K, Yamaguchi M (1999b) Cryopreservation of a virus (HaV) infecting a harmful bloom causing microalga, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Fisheries Science* 65:319-320

- Nair V, Zavolan M (2006) Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends in Microbiology* 14:169-175
- Nishihara T, Kurano N, Shinoda S (1986) Calculation of most probable number for enumeration of bacteria on a microcomputer. *Eisei Kagaku-Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 32:226-228
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:e63
- Nova-Ocampo M, Villegas-Sepveda N, del Angel RM (2002) Translation elongation factor-1 alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* 295:337-347
- Ogata H, Toyoda K, Tomaru Y, Nakayama N, Shirai Y, Claverie J-M, Nagasaki K (2009) Remarkable sequence similarity between the dinoflagellate-infecting marine girus and the terrestrial pathogen African swine fever virus. *Virology Journal* 6:178-185
- Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, Kang YJ, Jiang Z, Du X, Cook R, Das SC, Pattnaik AK, Beutler B, Han J (2007) Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 27:123-134
- Reisser W, Burbank DE, Meints SM, Meints RH, Becker B, Etten JLV (1988a) A comparison of viruses infecting two different chlorella-like green algae. *Virology* 167:143-149

- Reisser W, Klein T, Becker B (1988b) Studies on phycoviruses. I. On the ecology of viruses attacking *Chlorellae* exsymbiotic from an European strain of *Paramecium bursaria*. *Archiv Fur Hydrobiologie* 111:575-583
- Riley KJL, Rabinowitz GS, Steitz JA (2010) Comprehensive Analysis of Rhesus Lymphocryptovirus MicroRNA Expression. *Journal of Virology* 84:5148-5157
- Rowe JM, Dunlap JR, Gobler CJ, Anderson OR, Gastrich MD, Wilhelm SW (2008) Isolation of a non-phage-like lytic virus infecting *Aureococcus anophagefferens*. *Journal of Phycology* 44:71-76
- Sandaa RA, Heldal M, Castberg T, Thyrrhaug R, Bratbak G (2001) Isolation and characterization of two viruses with large genome size infecting *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae) and *Pyramimonas orientalis* (Prasinophyceae). *Virology* 290:272-280
- Schroeder DC, Oke J, Hall M, Malin G, Wilson WH (2003) Virus succession observed during an *Emiliania huxleyi* bloom. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2484-2490
- Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Tomaru Y, Honda D, Magasaki K (2006) Genomic and phylogenetic analysis of a single-stranded RNA virus infecting *Rhizosolenia setigera* (Stramenopiles : Bacillariophyceae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86:475-483
- Shirai Y, Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K (2008) Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* Meunier. *Applied and Environmental Microbiology* 74:4022-4027

- Stein LD (2004) Human genome - End of the beginning. *Nature* 431:915-916
- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435:682-686
- Suttle CA, Chan AM (1995) Viruses infecting the marine Prymnesiophyte *Chrysochromulina* spp.: isolation, preliminary characterization and natural abundance. *Marine Ecology Progress Series* 118:275-282
- Tai V, Lawrence JE, Lang AS, Chan AM, Culley AI, Suttle CA (2003) Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Journal of Phycology* 39:343-352
- Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739
- Tarutani K, Nagasaki K, Itakura S, Yamaguchi M (2001) Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Microbial Ecology* 23:103-111
- Tarutani K, Nagasaki K, Yamaguchi M (2000) Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4916-4920

- Tomaru Y, Hata N, Masuda T, Tsuji M, Igata K, Masuda Y, Yamatogi T, Sakaguchi M, Nagasaki K (2007) Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environmental Microbiology* 9:1376-1383
- Tomaru Y, Katanozaka N, Nishida K, Shirai Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K (2004a) Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Microbial Ecology* 34:207-218
- Tomaru Y, Mizumoto H, Takao Y, Nagasaki K (2009a) Co-occurrence of DNA- and RNA-viruses infecting the bloom-forming dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on the Japan coast. *Plankton Benthos Research* 4:129-134
- Tomaru Y, Shirai Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K (2008) Isolation and characterization of a new single-stranded DNA virus infecting the cosmopolitan marine diatom *Chaetoceros debilis*. *Aquatic microbial ecology* 50:103-112
- Tomaru Y, Shirai Y, Toyoda K, Nagasaki K (2011a) Isolation and characterisation of a single-stranded DNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus*. *Aquatic Microbial Ecology* 64:175-184
- Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K (2009b) Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2375-2381

- Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K (2011b) Isolation and characterization of a single-stranded DNA Virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Applied and Environmental Microbiology* 77:5285-5293
- Tomaru Y, Tanabe H, Yamanaka S, Nagasaki K (2005) Effects of temperature and light on stability of microalgal viruses, HaV, HcV and HcRNAV. *Plankton Biology & Ecology* 52:1-6
- Tomaru Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K (2004b) Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology* 34:227-238
- Tomaru Y, Toyoda K, Kimura K, Hata N, Yoshida M, Nagasaki K (2012) First evidence for the existence of pennate diatom viruses. *Isme Journal* 6:1-4
- Toyoda K, Kimura K, Hata N, Nakayama N, Nagasaki K, Tomaru Y (2012) Isolation and characterisation of a single-stranded DNA Virus infecting the marineplanktonic diatom *Chaetoceros* sp. (TG07-C28). *Plankton Benthos Research* 7:20-28
- Triboulet R, Mari B, Lin Y-L, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K, Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, Reynes J, Corbeau P, Jeang K-T, Benkirane M (2007) Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315:1579-1582
- Van Etten JL, Graves MV, Muller DG, Boland W, Delaroque N (2002) Phycodnaviridae - large DNA algal viruses. *Archives of Virology* 147:1479-1516
- Van Etten JL, Meints RH (1999) Giant viruses infecting algae. *Annual Review of Microbiology* 53:447-494

- Van Etten JL, Burbank DE, Joshi J, Meints RH (1984) DNA-synthesis in a *Chlorella*-like alga following infection with the virus PBCV-1. *Virology* 134:443-449
- Van Etten JL, Burbank DE, Xia Y, Meints RH (1983) Growth cycle of a virus, PBCV-1 that infects *Chlorella*-like algae. *Virology* 126:117-125
- Van Etten JL, Lane LC, Meints RH (1991) Viruses and virus-like particles of eukaryotic algae. *Microbiological Reviews* 55:586-620
- Vaucheret H, Beclin C, Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114:3083-3091
- Venter JC (2001) The sequence of the human genome (vol 292, pg 1304, 2001). *Science* 291:1304-1351
- Waters RE, Chan AT (1982) *Micromonas pusilla* virus: the virus growth cycle and associated physiological events within the host cells; host range mutation. *Journal of General Virology* 63:199-206
- Weynberg KD, Allen MJ, Ashelford K, Scanlan DJ, Wilson WH (2009) From small hosts come big viruses: the complete genome of a second *Ostreococcus tauri* virus, OtV-1. *Environmental Microbiology* 11:2821-2839
- Wienholds E, Plasterk RHA (2005) MicroRNA function in animal development. *Febs Letters* 579:5911-5922

- Wilson WH, Schroeder DC, Allen MJ, Holden MTG, Parkhill J, Barrell BG, Churcher C, Harnlin N, Mungall K, Norbertczak H, Quail MA, Price C, Rabbinowitsch E, Walker D, Craigon M, Roy D, Ghazal P (2005) Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus. *Science* 309:1090-1092
- Wilson WH, Schroeder DC, Ho J, Canty M (2006) Phylogenetic analysis of PgV-102P, a new virus from the English Channel that infects *Phaeocystis globosa*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86:485-490
- Wilson WH, Tarran GA, Schroeder D, Cox M, Oke J, Malin G (2002) Isolation of viruses responsible for the demise of an *Emiliana huxleyi* bloom in the English Channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82:369-377
- Yamada T, Chuchird N, Kawasaki T, Nishida K, Hiramatsu S (1999) Chlorella viruses as a source of novel enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88:353-361
- Yamada T, Onimatsu H, Van Etten JL (2006) *Chlorella* viruses. *Advances in Virus Research*, Vol 66 66:293-336
- Yamaguchi M, Itakura S, Nagasaki K, Matsuyama Y, Uchida T, Imai I (1997) Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). *Journal of Plankton Research* 19:1167-1174
- Yanai-Balser GM, Duncan GA, Eudy JD, Wang D, Li X, Agarkova IV, Dunigan DD, Van Etten JL (2010) Microarray analysis of *Paramecium bursaria* *Chlorella* Virus 1 transcription. *Journal of Virology* 84:532-542

Yan XD, Chipman PR, Castberg T, Bratbak G, Baker TS (2005) The marine algal virus PpV01 has an icosahedral capsid with T=219 quasisymmetry. *Journal of Virology* 79:9236-9243

Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang X-J, Qi Y (2007) A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & Development* 21:1190-1203

Zingone A, Natale F, Biffali E, Borra M, Forlani G, Sarno D (2006) Diversity in morphology, infectivity, molecular characteristics and induced host resistance between two viruses infecting *Micromonas pusilla*. *Aquatic Microbial Ecology* 45:1-14

Zuker M, Mathews DH, Turner DH (1999) Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. *RNA Biochemistry and Biotechnology*:11-43

今田信良, 本城凡夫 (2001) 沿岸性赤潮に関するシード個体群の起源. *日本プランクトン学会報* 48:121-124

坂本節子, 山口峰生 (2010) 有害渦鞭毛藻 *Herero capsula circularisquama* の LAMP 法による簡易検出技術の開発. *日本水産学会大会講演要旨集* pp. 221

新潟地方気象台 (2010) 平成 22 年 9 月 11 日から 9 月 14 日の大雨に関する新潟県気象速報.
In: 新潟地方気象台防災業務課 (ed)

畑直亜, 西村昭史, 山田浩且 (2010) 自然の自己修復機能を利用した赤潮防除新技術開発研究. *三重県水産研究所事業報告* 2009:40-45

本城凡夫, 松山幸彦 (1998) 特集 貝類養殖業を脅かすヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ
赤潮 発生の状況と被害. In: 瀬戸内海, Book 14. (社)瀬戸内海環境保全協会

松山幸彦 (2003) 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究 -II:
H. *circularisquama* の毒性および貝類斃死機構の解明. 水産総合研究センター研究報
告 9:13-117

松山幸彦, 永井清仁, 水口忠久, 藤原正嗣, 石村美佐, 山口峰生, 内田卓志, 本城凡夫 (1995)
1992年に英虞湾において発生した *Heterocapsa* sp.赤潮発生期の環境特性とアコヤガイ
斃死の特徴について. *Nippon Suisan Gakkaishi* 61:35-41

水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 (1999) 平成 10 年 瀬戸内海の赤潮

玉井恭一 (1999) *Heterocapsa circularisquama* 赤潮の発生と被害の現状. 日本プランクトン学
会報 46:153-154

近藤伸一, 中尾令子, 岩滝光儀, 坂本節子, 板倉茂, 松山幸彦, 長崎慶三 (2012) 有害赤潮藻
の分布北上現象 -佐渡島加茂湖でのヘテロカプサ赤潮によるマガキの大量死-. 日本
水産学会誌 78:719-725

图表

表0-1. 真核性藻類に感染するウイルス

ウイルス	宿主 (Class)	大きさ (nm)	ゲノム	主な文献
[単細胞藻類に感染するウイルス]				
AaV (BtV)	<i>Aureococcus anophagefferens</i> (Pelagophyceae)	140	dsDNA	Garry et al. (1998), Gastrich et al. (2004) Gobler et al. (2004, 2007), Rowe et al. (2008)
AglaRNAV	<i>Asterionellopsis glacialis</i>	31	ssRNA, 9.5 kb	Tomaru et al. (2012)
CbV	<i>Chrysochromulina brevifilum</i> (Haptophyceae)	145-170	dsDNA	Suttle and Chan (1995)
BpV	<i>Bathycoccus</i> sp. RCC1105		dsDNA, 187-198 kbp	Moreau et al. (2010)
CdebDNAV	<i>Chaetoceros debilis</i> (Bacillariophyceae)	30	ssDNA, fragmented?	Tomaru et al. (2008)
CeV	<i>Chrysochromulina ericina</i> (Haptophyceae)	160	dsDNA, 510 kbp	Sandaa et al. (2001), Monier et al. (2008)
<i>Chlorella virus</i> (ex. ATCV-1, ATCV-2)	<i>Chlorella</i> SAG 3.83 (Chlorophyceae) (symbiont of <i>Acanthocystis turfacea</i>)	140-190	dsDNA, 288 kbp	Bubeck and Pfitzner (2005), Fitzgerald et al. (2007c)
<i>Chlorella virus</i> (ex. PBCV-1, NY-2A, AR158)	<i>Chlorella</i> NC64A (Chlorophyceae) (symbiont of <i>Paramecium bursaria</i>)	150-190	dsDNA, 331-369 kbp	Van Etten et al. (1983, 1991, 2002), Van Etten and Meints (1999), Yamada et al. (1999, 2006), Fitzgerald et al. (2007b)
<i>Chlorella virus</i> (ex. MT325, FR483)	<i>Chlorella</i> Pbi (Chlorophyceae) (symbiont of <i>Paramecium bursaria</i>)	140-150	dsDNA, 314-321 kbp	Reisser et al. (1988a, b), Van Etten et al. (1991), Yamada et al. (2006), Fitzgerald et al. (2007a)
ClorDNAV	<i>Chaetoceros lorenzianus</i> (Bacillariophyceae)	34	(ss+ds)DNA, 5.8 kb	Tomaru et al. (2011b)
CsfrRNAV	<i>Chaetoceros socialis</i> f. <i>radians</i> (Bacillariophyceae)	30	RNA	Tomaru et al. (2009b)
CsNIV	<i>Chaetoceros salsugineum</i> (Bacillariophyceae)	38	(ss+ds)DNA, 6.0 kb	Nagasaki et al. (2005c)
Csp03RNAV	<i>Chaetoceros</i> sp. (Strain SS08-C03)(Bacillariophyceae)	32	ssRNA, 9.4 kb	Tomaru et al. (in press)
Csp05DNAV	<i>Chaetoceros</i> sp. (Strain TG07-C28)(Bacillariophyceae)	32-34	(ss+ds)DNA	Toyoda et al. (2012)
CspNIV	<i>Chaetoceros</i> cf. <i>gracilis</i> (Bacillariophyceae)	25	-	Bettarel et al. (2005)
CtenDNAV	<i>Chaetoceros tenuissimus</i> (Bacillariophyceae)	37	(ss+ds)DNA, 5.6 kb	Tomaru et al. (2011a)
CtenRNAV	<i>Chaetoceros tenuissimus</i> (Bacillariophyceae)	31	ssRNA	Shirai et al. (2008)
CwNIV				
EHV	<i>Emiliania huxleyi</i> (Haptophyceae)	170-200	dsDNA, 410-415 kbp	Castberg et al. (2002), Wilson et al. (2002, 2005), Schroeder et al. (2003), Allen et al. (2006)
HaNIV	<i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	30	-	Lawrence et al. (2001)
HaV	<i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	202	dsDNA, 294 kbp	Nagasaki and Yamaguchi (1997, 1998, 1999b), Nagasaki et al. (1999a, 2005b), Tarutani et al. (2000), Tomaru et al. (2004b)
HaRNAV	<i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	25	ssRNA, 9.1 kb	Tai et al. (2003), Lang et al. (2004)
HcRNAV	<i>Heterocapsa circularisquama</i> (Dinophyceae)	30	ssRNA, 4.4 kb	Tomaru et al. (2004a), Nagasaki et al. (2004a, 2005a, 2006), Mizumoto et al. (2007, 2008)
HcDNAV	<i>Heterocapsa circularisquama</i> (Dinophyceae)	197	dsDNA, 356 kbp	Tarutani et al. (2001), Nagasaki et al. (2003, 2005b, 2006)
MpRV	<i>Micromonas pusilla</i> (Prasinophyceae)	50-60	dsRNA, 24.6 kbp	Brussaard et al. (2004b), Attoui et al. (2006)
MpV	<i>Micromonas pusilla</i> (Prasinophyceae)	115	dsDNA, 200 kbp	Cottrell and Suttle (1991, 1995), Mayer and Taylor (1979), Waters and Chan (1982)
MpVN1	<i>Micromonas pusilla</i> (Prasinophyceae)	110-130	(ds?)DNA	Zingone et al. (2006)
MpVN2	<i>Micromonas pusilla</i> (Prasinophyceae)	110-130	(ds?)DNA	Zingone et al. (2006)
OIs1	<i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	30 and 80	dsDNA, 20 and 130 kbp	Lawrence et al. (2006), J. Lawrence, unpublished data
OIV1	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCMP2972 (Prasinophyceae)		dsDNA, 194 kbp	Moreau et al. (2010)
OrV	<i>Ostreococcus tauri</i> (Prasinophyceae)	122	dsDNA, 186-191 kbp	Derelle et al. (2008), Weynberg et al. (2009)
PgV-102P	<i>Phaeocystis globosa</i> (Haptophyceae)	98	dsDNA, 176 kbp	Wilson et al. (2006)
PgV Group I	<i>Phaeocystis globosa</i> (Haptophyceae)	150	dsDNA, 466 kbp	Brussaard et al. (2004a, 2007), Baudoux and Brussaard (2005)
PgV Group II	<i>Phaeocystis globosa</i> (Haptophyceae)	100	dsDNA, 177 kbp	Brussaard et al. (2004a, 2007), Baudoux and Brussaard (2005)
PoV	<i>Pyramimonas orientalis</i> (Prasinophyceae)	180-220	dsDNA, 560 kbp	Sandaa et al. (2001), Monier et al. (2008)
PpV	<i>Phaeocystis pouchetii</i> (Haptophyceae)	130-160	dsDNA, 485 kbp	Jacobsen et al. (1996), Bratbak et al. (1998), Yan et al. (2005), Monier et al. (2008)
RsRNAV	<i>Rhizosolenia setigera</i> (Bacillariophyceae)	32	ssRNA, 11.2 kb	Nagasaki et al. (2004b), Shirai et al. (2006)
TampV	<i>Teleaulax amphioxia</i> (Cryptophyceae)	203	dsDNA	Nagasaki et al. (2009)
TnitDNAV	<i>Thalassionema nitzschioides</i> (Bacillariophyceae)	32	ssDNA, 5.5 kb	Tomaru et al. (2012)
[多細胞藻類に感染するウイルス]				
EsV	<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Phaeophyceae)	130-150	dsDNA, 336 kbp	Müller (1991), Lanka et al. (1993), Müller et al. (1996, 1998), Van Etten et al. (2002)
EfasV	<i>Ectocarpus fasciculatus</i> (Phaeophyceae)	135-140	dsDNA, 340 kbp	Müller et al. (1996, 1998)
FlexV	<i>Feldmannia simplex</i> (Phaeophyceae)	120-150	dsDNA, 170 kbp	Friessklebl et al. (1994), Müller et al. (1998)
FirrV	<i>Feldmannia iresgurialis</i> (Phaeophyceae)	140-170	dsDNA, 180 kbp	Kapp et al. (1997), Müller et al. (1998)
FsV	<i>Feldmannia</i> species (Phaeophyceae)	150	dsDNA, 158 & 178 kbp	Henry & Meints (1992), Müller et al. (1998), Meints et al. (2008)
HincV	<i>Hinckia hinckiae</i> (Phaeophyceae)	140-170	dsDNA, 220 kbp	Kapp et al. (1997), Müller et al. (1998)
MclaV	<i>Myriotrichia claviformis</i> (Phaeophyceae)	170-180	dsDNA, 340 kbp	Kapp et al. (1997), Müller et al. (1998)
PlitV	<i>Pilayella littoralis</i> (Phaeophyceae)	161	dsDNA, 280 kbp	Maier et al. (1998), Müller et al. (1998)

表1-1. 本研究で用いたHcRNAV株

ウイルス株	単離場所	年	単離に用いた宿主株	MCPタイプ*
HcRNAV15-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV28-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV46-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV62-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV63-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV75-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV79-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV80-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	05HC06	UA
HcRNAV82-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV85-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV86-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV89-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV90-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	05HC06	UA
HcRNAV92-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	05HC06	UA
HcRNAV99-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	05HC06	UA
HcRNAV103-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV107-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV110-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HU9433-P	UA
HcRNAV106-kamo10	Lake Kamo, Niigata, Japan	2010	HCLG-1	CY
HcRNAV13	Gokasho Bay, Mie, Japan	2000	HCLG-1	CY
HcRNAV34	Ago Bay, Mie, Japan	2001	HA92-1	UA
HcRNAV109	Obama Bay, Fukui, Japan	2001	HY9423	UA
HcRNAV136	Ago Bay, Mie, Japan	2001	HU9433-P	UA
HcRNAV141	Ago Bay, Mie, Japan	2001	HCLG-1	CY
HcRNAV142	Ago Bay, Mie, Japan	2001	HCLG-1	CY
HcRNAV616	Ago Bay, Mie, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV626	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV630	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV631	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV633	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV635	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV637	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV639	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV640	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HCLG-1	CY
HcRNAV641	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV643	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV644	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HCLG-1	CY
HcRNAV645	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV647	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV649	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV650	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV653	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV654	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV655	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV658	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV659	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV660	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV662	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV663	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV664	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV665	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HCLG-1	CY
HcRNAV667	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV668	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV669	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HCLG-1	CY
HcRNAV671	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV672	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV674	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV676	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV678	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV679	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV680	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV683	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA
HcRNAV684	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	HU9433-P	UA
HcRNAV686	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC05	UA
HcRNAV687	Kusuura Bay, Kumamoto, Japan	2007	05HC06	UA

* 参照 図5.

表1-2. 2010年の加茂湖海水試料から単離した*Heterocapsa circularisquama*クローン株とウイルス感受性のリスト

<i>H. circularisquama</i> 株 (No.)	Virus感受性		感染タイプ
	HcRNAV 34に対する感受性	HcRNAV 109に対する感受性	
1	-	-	n.d.*
3	-	+	CY
4	+	-	UA
5	-	+	CY
6	-	+	CY
7	+	-	UA
9	+	-	UA
10	+	-	UA
11	-	-	n.d.
12	-	-	n.d.
13	+	-	UA
15	+	-	UA
16	+	-	UA
17	+	-	UA
19	-	+	CY
20	+	-	UA
21	-	+	CY
22	-	-	n.d.
23	-	+	CY
25	+	-	UA
28	-	+	CY
29	-	-	n.d.
30	-	-	n.d.
32	+	-	UA
34	-	+	CY
35	-	+	CY
36	-	-	n.d.
37	-	+	CY
38	-	+	CY
39	-	+	CY
40	-	+	CY
41	-	+	CY
42	-	-	n.d.
43	-	-	n.d.
44	+	-	UA
45	-	+	CY
46	+	-	UA
47	+	-	UA
48	-	+	CY
49	-	+	CY
51	+	-	UA
53	-	+	CY
55	+	-	UA
56	-	-	n.d.
60	-	-	n.d.
62	-	+	CY
64	-	-	n.d.
65	+	-	UA
70	-	+	CY
71	+	-	UA
73	+	-	UA
77	+	-	UA
n1	-	+	CY
n2	-	-	n.d.
n3	-	+	CY
n4	-	-	n.d.
n5	-	+	CY
n6	-	+	CY
n8	-	-	n.d.
n9	-	+	CY
n10	-	-	n.d.
n11	-	+	CY

* not determined.

表1-3. 2010年の加茂湖試料から単離したHcRNAVとそれらのMCPタイプのリスト

ウイルス株	<i>Heterocapsa circularisquama</i> 株への感染性			ウイルス単離に用いた 宿主株	MCPタイプ*
	HU9433-P	05HC06	HCLG-1		
HcRNAV75-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV79-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV82-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV86-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV89-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV103-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV107-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV110-kamo10	+	-	-	HU9433-P	UA
HcRNAV80-kamo10	-	+	-	05HC06	UA
HcRNAV90-kamo10	+	+	-	05HC06	UA
HcRNAV92-kamo10	-	+	-	05HC06	UA
HcRNAV99-kamo10	+	+	-	05HC06	UA
HcRNAV15-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV28-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV46-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV62-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV63-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV85-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY
HcRNAV106-kamo10	-	-	+	HCLG-1	CY

* 参照 図5.

表2-1-1. アセンブル解析でウイルス接種前と比較して、接種後、発現の増減度が10倍以上もしくは10分の1以下になったトランスクリプト

No.	isotig_Name	12hpi/only	24hpi/only	発現量比*	発現量比*	BLAST検索でヒットした遺伝子	E-value	遺伝子のAccession Code
1	isotig00413	23.15	11.59	ATP synthase CF0 B' subunit [Pyropia yezoensis]	3.00E-16	YP_536926.1		
2	isotig02943	18.19	3.86	60S ribosomal protein L8/L2 [Cryptosporidium muris RN66]	1.00E-118	XP_002141378.1		
3	isotig01492	14.88	0.97	chloroplast acyl carrier protein [Heterocapsa triquetra]	4.00E-38	AAW79290.2		
4	isotig01433	14.06	4.83	RecName: Full=60S ribosomal protein L13a [Cyanophora paradoxa]	1.00E-77	P93099.1		
5	isotig02446	12.40	2.90	50S ribosomal protein L15 [Prochlorococcus marinus str. MIT 9215]	2.00E-17	YP_001485011.1		
6	isotig01434	12.40	4.83	RecName: Full=60S ribosomal protein L13a [Cyanophora paradoxa]	1.00E-77	P93099.1		
7	isotig04195	11.58	non-24hpi	light-harvesting protein, partial [Symbiodinium sp. clade C3]	4.00E-23	CB183412.1		
8	isotig01491	10.75	0.97	chloroplast acyl carrier protein [Heterocapsa triquetra]	8.00E-39	AAW79290.1		
9	isotig03383	10.75	0.97	arginine/serine-rich splicing factor4-like [Pfiesteria piscicida]	3.00E-36	ACU44937.1		
10	isotig03711	4.96	30.91	histone-like protein [Lingulodinium polyedrum]	1.00E-28	AAO49325.1		
11	isotig00818	4.55	13.04	40S ribosomal protein S4, X isoform, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-110	XP_002772984.1		
12	isotig00820	4.55	13.04	40S ribosomal protein S4, X isoform, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	4.00E-108	XP_002772984.1		
13	isotig03059	1.65	12.56	phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-60	XP_002772351.1		
14	isotig00819	4.55	12.07	40S ribosomal protein S4, X isoform, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-107	XP_002772984.1		
15	isotig00821	4.55	12.07	40S ribosomal protein S4, X isoform, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	5.00E-105	XP_002772984.1		
16	isotig02731	non-12hpi	11.59	60S ribosomal subunit protein L4, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-100	XP_002769741.1		
17	isotig01853	6.62	11.59	aminotransferase, DegT/DnrJ/EryC1/StrS family protein [Beggiatoa sp. PS]	9.00E-77	YP_01999921.1		
18	isotig02064	0.83	11.59	beta-tubulin, partial [Gymnodinium aureolum]	0	AFX83586.1		
19	isotig01988	5.79	10.63	putative mitochondrial ADP/ATP translocase [Pyrocystis lunula]	0	ABV25601.1		
20	isotig04477	0.09	non-24hpi	pentafunctional AROM polypeptide, putative [Phytophthora infestans T30-4]	9.00E-34	XP_002896252.1		
21	isotig03552	0.08	non-24hpi	conserved protein with diacylglycerol kinase catalytic domain [Janibacter sp. HTCC2649]	4.00E-11	XP_00994173.1		
22	isotig03772	0.08	non-24hpi	hypothetical protein GUTHIDRAFT_157816 [Guillardia theta CCMP2712]	1.00E-68	EKX45869.1		
23	isotig01842	0.08	1.26	chloroplast hydroxymethylbilane synthase [Guillardia theta]	4.00E-86	ABD51930.1		
24	isotig01894	0.06	1.19	2-methylcitrate synthase, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	9.00E-180	XP_002780466.1		
25	isotig02126	0.09	0.97	chloroplast carbonic anhydrase [Heterocapsa triquetra]	2.00E-58	AAW79301.1		
26	isotig02008	0.09	0.59	enolase 2, partial [Heterocapsa triquetra]	7.00E-12	AAU20794.1		
27	contig00075	0.08	0.57	peridinin-chl a protein [Heterocapsa pygmaea]	7.00E-81	CAC19481.1		
28	isotig01431	0.07	0.48	helicase, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-149	XP_002769569.1		
29	isotig02134	0.09	0.43	peptidase C14, caspase catalytic subunit p20 [Trichodesmium erythraeum IMS101]	6.00E-04	YP_721570.1		
30	isotig02591	0.06	0.37	EF-1 alpha-like protein [Heterocapsa triquetra]	0	AAV34145.1		
31	isotig00352	0.05	0.36	succinate dehydrogenase, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	4.00E-120	XP_002774783.1		
32	contig00072	0.08	0.35	peridinin-chl a protein [Heterocapsa pygmaea]	5.00E-69	CAC19481.1		
33	isotig02543	0.07	0.32	Sell domain-containing protein [Magnetococcus marinus MC-1]	3.00E-25	YP_885910.1		
34	isotig02803	0.08	0.29	TIC 20 related, plastid import [Ectocarpus siliculosus]	5.00E-19	CBN73802.1		
35	isotig01487	0.08	0.18	RecName: Full=Ribulose biphosphate carboxylase, chloroplastic; Short=RubisCO; Flags: Precursor	4.00E-48	QSENN5.1		
36	isotig03451	0.05	0.12	NF-kappa-B inhibitor alpha, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	3.00E-48	XP_002774032.1		
37	isotig02421	0.08	0.10	Mitochondrial solute carrier protein (ISS) [Ostreococcus tauri]	9.00E-93	XP_003084181.1		
38	isotig03255	0.08	0.10	TCCD-inducible-PARP-like domain-containing protein [Naegleria gruberi]	8.00E-09	XP_002671099.1		
39	isotig03354	0.08	0.10	lectin-domain protein, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	5.00E-05	XP_002774548.1		
40	isotig03879	0.04	0.08	alpha/beta-hydrolase [Coccomyxa subellipsoidea C-169]	5.00E-15	EE19364.1		
41	isotig04397	0.06	0.07	ATP-dependent RNA helicase-like protein (ISS) [Ostreococcus tauri]	1.00E-58	XP_003074367.1		
42	isotig02328	0.05	0.06	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase [Ostreococcus lucimarinus virus OIV3]	1.00E-118	AFK66219.1		
43	isotig04217	0.04	0.05	adenosylhomocysteinase [Amphidinium carteriae]	2.00E-88	ACJ13434.1		
44	isotig02534	non-12hpi	0.10	vacuolar ATP synthase subunit C, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	9.00E-76	XP_002771389.1		
45	isotig03417	non-12hpi	0.10	putative peptidase [Bathycoccus prasinos]	4.00E-70	CCO15195.1		
46	isotig03470	non-12hpi	0.10	ABC transporter, ATP binding protein [Synecococcus sp. WH 8102]	1.00E-92	NP_896424.1		
47	isotig03943	non-12hpi	0.10	40S ribosomal protein S16 putative [Albugo laibachii Nc14]	1.00E-59	CCA24817.1		
48	isotig01142	0.74	0.10	pyruvate:ferredoxin oxidoreductase/NADPH-cytochrome P450, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-68	XP_002765111.1		
49	isotig00984	0.66	0.10	aconitate hydratase 2 [Methylomonas methanica MC09]	3.00E-83	ref YP_004513438.1		
50	isotig02345	0.45	0.10	light-harvesting protein, partial [Symbiodinium sp. clade C3]	8.00E-90	CB183419.1		
51	isotig04451	0.41	0.10	plastid C1 class II fructose biphosphate aldolase [Heterocapsa triquetra]	6.00E-18	AAV71135.1		
52	isotig02726	0.17	0.10	formate nitrite transporter [Prorocentrum minimum]	2.00E-72	ACU45194.1		
53	isotig03438	0.17	0.10	alkaline phosphatase, partial [Amphidinium carteriae]	2.00E-17	ADT91623.1		
54	isotig01889	0.25	0.10	pyrroline-5-carboxylate reductase [Singulisphaera acidiphila DSM 18658]	1.00E-70	YP_007202349.1		
55	isotig02690	non-12hpi	0.09	phosphoglycerate mutase, related [Neospora caninum Liverpool]	5.00E-74	XP_003880176.1		
56	isotig03825	non-12hpi	0.09	cell differentiation protein Rcd1, putative [Toxoplasma gondii ME49]	1.00E-63	XP_002365112.1		
57	isotig01621	non-12hpi	0.09	light-harvesting protein, partial [Symbiodinium sp. clade C3]	5.00E-36	CB183419.1		
58	isotig01622	non-12hpi	0.09	light-harvesting protein, partial [Symbiodinium sp. clade C4]	1.00E-36	CB183419.1		
59	isotig02482	0.23	0.09	DNA replication licensing factor Msm6, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-96	XP_002772787.1		
60	isotig03652	0.15	0.09	60S ribosomal protein L9 [Cryptosporidium parvum Iowa II]	7.00E-45	XP_625501.1		
61	isotig04352	non-12hpi	0.08	PREDICTED: polycystin 2 [Taeniopygia guttata]	4.00E-18	XP_002190375.1		
62	isotig04610	non-12hpi	0.08	TBC1 domain family member 13 [Polysphondylium pallidum PN500]	1.00E-16	EFA75392.1		
63	isotig03616	non-12hpi	0.08	chloride channel clc, putative [Ricinus communis]	7.00E-12	XP_002530769.1		
64	isotig02433	non-12hpi	0.07	RNA helicase-related protein required for pre-mRNA splicing, related [Neospora caninum Liverpool]	1.00E-127	XP_003884506.1		
65	isotig03533	non-12hpi	0.07	Flagellar associated protein [Oxytricha trifallax]	2.00E-40	EJY75559.1		
66	isotig02202	0.12	0.07	ribosomal protein 4 [Diphyysium perminutum]	2.00E-21	AAAM27359.1		
67	isotig03889	non-12hpi	0.06	PpsA [Pseudomonas fluorescens]	6.00E-85	AAAD5983.1		
68	isotig04291	non-12hpi	0.06	n-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, urea cycle [Thalassiosira pseudonana CCMP1335]	5.00E-67	XP_002287306.1		
69	isotig01782	0.24	0.06	ferredoxin-dependent glutamate synthase [Caldalkalibacillus thermarum TA2.A1]	2.00E-122	XP_08531912.1		

* 12hpi/only 発現量比および24hpi/only 発現量比は *H. circularisquama* 未接種時を分母とした各時間後の isotig の発現量の比を表す

表2-1-2. マッピング解析でウイルス接種前と比較して、接種後、発現の増減度が10倍以上もしくは10分の1以下になったトランスクリプト

No.	isotig_Name	12hpi/only 発現量比*	24hpi/only 発現量比*	BLAST検索でヒットした遺伝子	E-value	遺伝子のAccession Code
1	isotig03711	35.92	5.99	Bacterial DNA-binding protein	5.78E-04	pfam00216
2	isotig2943	21.39	11.97	Ribosomal Proteins L2, C-terminal domain	1.57E-46	pfam03947
3	isotig01088	13.97	4.28	Elongation Factor 1-alpha (EF1-alpha) protein family	7.49E-119	cd01883
4	isotig03059	12.97	2.57	Phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) beta chain core domain	6.85E-20	cd00769
5	isotig4391	12.83		non-24hpi ankyrin repeats	5.37E-09	cd00204
6	isotig4325	11.98		non-24hpi Transmembrane amino acid transporter protein	1.19E-06	pfam01490
7	isotig01988	10.98	5.99	Mitochondrial carrier protein	2.24E-23	pfam00153
8	isotig02197	10.98	6.84	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1	1.93E-70	PLN00037
9	isotig2272	10.26	2.00	GGCT-like domains	2.11E-15	cd06661
10	isotig2908	10.26	3.99	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD	8.52E-21	pfam0160
11	isotig573	10.26	8.98	Eukaryotic elongation factor 5A hypusine	5.86E-19	pfam01287
12	isotig4535	10.26		non-24hpi PCI domain	1.92E-10	pfam01399
13	isotig01113	0.10	0.26	PP5, C-terminal metallophosphatase domain	1.20E-61	cd07417
14	isotig01782	0.10	0.43	Glutamine amidotransferases class-II (Gn-AT)	1.08E-117	cd00713
15	isotig01899	0.10	0.26	pyrroline-5-carboxylate reductase	4.95E-99	PLN02688
16	isotig04158	0.10		non-12hpi cyclophilin_ABH-like	1.23E-61	cd01926
17	isotig02534	0.10		non-12hpi V-ATPase subunit C	4.74E-44	pfam03223
18	isotig01929	0.10	0.67	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases (SAM or AdoMet-MTase), class I	1.17E-04	cd02440
19	isotig04477	0.10		non-24hpi Dehydroquinase synthase (DHQS) catalyzes the conversion of DAHP to DHQ in shikimate pathway for aromatic compounds synthesis	1.29E-55	cd08195
20	isotig03417	0.09	0.10	Insulinase (Peptidase family M16)	1.29E-06	pfam00675
21	isotig03470	0.09	0.10	ABC transporter transmembrane region 2	1.08E-42	pfam06472
22	isotig03376	0.09	0.10	SecY translocase	1.54E-31	pfam00344
23	isotig01694	0.09		non-24hpi type II citrate synthase	0.00E+00	PRK05614
24	isotig04352	0.08		non-12hpi Polycystin cation channel	1.11E-17	pfam08016
25	isotig00553	0.08		non-12hpi Ribosomal L18/L5e	1.89E-13	cd00432
26	isotig03533	0.08		non-12hpi Leucine-rich repeats (LRRs), ribonuclease inhibitor (RI)-like subfamily	1.45E-13	cd00116
27	isotig03646	0.08		non-12hpi Chlorophyll A-B binding protein	2.69E-12	pfam00504
28	isotig02591	0.07	0.33	EF1 alpha II	9.31E-34	cd03693
29	isotig01075	0.07	0.08	Class II Type A Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) aldolases	0.00E+00	cd00946
30	isotig02155	0.07	0.29	Ribulose biphosphate carboxylase large chain, Form II	4.18E-60	cd08211
31	isotig4397	0.07	0.69	DEAD-like helicases superfamily	9.58E-14	cd00046
32	isotig02771	0.07	0.08	GTP-binding nuclear protein Ran	2.10E-73	PLN03071
33	isotig03451	0.05	0.19	ankyrin repeats	4.68E-29	cd00204
34	isotig02328	0.05	0.06	3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase family (AHBA_syn)	9.62E-76	cd00616
35	isotig04217	0.05		non-24hpi S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	8.41E-80	smart00996

* 12hpi/only 発現量比および24hpi/only 発現量比は *H. circularisquama* 未接種時を分母とした各時間後の isotig の発現量の比を表す

表2-1-3. マッピング解析でウイルス接種前には検出されなかったが、接種後RPKM値が>1,000で検出されたトランスクリプト

No.	isotig_Name	12 hpi		24 hpi		BLAST検索でヒットした遺伝子	E-value	遺伝子のAccession Code
		RPKM	RPKM	RPKM	RPKM			
1	isotig01672	2268.39	1391.57	1391.57	hypothetical protein NY2A_B805R [Paramecium bursaria Chlorella virus NY2A]	0.001	YP_001498001.1	
2	isotig01673	1440.01	1027.57	1027.57	threonine dehydratase [Odoribacter splanchnicus DSM 20712]	4.00E-12	YP_004254051.1	
3	isotig01675	2110.36	1737.60	1737.60	major capsid protein p72 [African swine fever virus]	8.00E-11	AAT84441.1	
4	isotig01676	1471.68	2303.32	2303.32	cold-shock DNA-binding domain-containing protein [Anaerococcus prevotii DSM 20548]	4.00E-10	YP_003152984.1	
5	isotig01723	1214.77	177.12	177.12	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	1.00E-14	XP_001432020.1	
6	isotig01745	426.14	1366.94	1366.94	hypothetical protein [Mavirus]	4.00E-04	YP_004300284.1	
7	isotig02240	1179.38	305.71	305.71	60S ribosomal protein L10A-2, putative [Perkinsus marinus ATCC 50983]	2.00E-21	XP_002773252.1	
8	isotig02300	1440.01	52.49	52.49	pB602L [African swine fever virus Benin 97/1]	8.00E-21	CANI0179.1	
9	isotig03767	1078.08	179.65	179.65	HctD [Lyngbya majuscula]	2.00E-30	AAV42396.1	
10	isotig03816	155.96	1000.53	1000.53	60s ribosomal protein L17, related [Neospora caninum Liverpool]	6.00E-66	XP_003880508.1	
11	isotig04357	1473.78	0.00	0.00	type I polyketide synthase-like protein KB6736 [Karenia brevis]	3.00E-09	ABQ85802.1	
12	isotig04530	0.00	1603.33	1603.33	isocitrate lyase [Phytophthora infestans T30-4]	3.00E-43	XP_002904993.1	
13	isotig04564	2114.70	234.92	234.92	chloroplast ATPH isoform 5 [Heterocapsa triquetra] >gb ABV22127.1	2.00E-40	AAW80675.1	
14	isotig04569	510.64	1072.14	1072.14	unknown [Heterocapsa triquetra]	1.00E-33	ABV72538.1	
15	isotig04614	499.43	1310.74	1310.74	unknown protein [Heterocapsa triquetra]	2.00E-27	AAW79405.1	
16	isotig04637	1200.01	599.89	599.89	serine carboxypeptidase [Beauveria bassiana ARSEF 2860]	1.00E-09	EJP62646.1	
17	isotig04645	415.39	1695.84	1695.84	unknown [Heterocapsa rotundata]	5.00E-11	ABV72572.1	

表 2-2-1.

lcDNAV を感染させたヘテロカプサ細胞からクローニングできた小分子 RNA の
配列

name	塩基数	配列(5' ~3')
12-3	26 nt	GTCGTGACACTGATAATAAATTTTCA
12-6	35 nt	AGCTGACAGCACCCCTAAGGTAGCTGACAGCACCCCT
24-1	26 nt	TGCACACCTGCACGTACACACGTTTT
24-2	21 nt	GCGCTAAAGTGAAACAAAATG
24-3	27 nt	ACTATCGCAAACCTGCGCGAAGGCGACC
24-5	20 nt	TGATCGCCCTAAGCTATTTT
24-6	20 nt	GCCGACTTCCCTTACCTACT
24-7	19 nt	TGGGGTCTCTAAGACCCAA
24-8	22 nt	TCCTGGGTCCTAATAGCGCGAA
48-4	27 nt	ACTTTCATTGCGCAAGCAGGTTTACCC
48-5	22 nt	GTGTATGTACGTATGAGTGCTG
48-6	23 nt	TTTTTGAGCAAGAACGCTATCAT
48-7	34 nt	TTTTTTTTTTTTTTTTCGCCGCTTCCAAGCTGATC

表 2-2-2.

クローニングできた小分子 RNA と相同性を示した miRNA のリスト

12-3 comp. 26nt	1	CAGCACUGUGACUAUUUUUUAAAAGU	26
cin-miR-101	1	UACAGUACUGUGAUAAAUAUUU	22
<i>Ciona intestinalis</i> (ホヤ/カタユレイボヤ)			
12-6 35nt	1	AGCUGACAGCACCCUAAGGUAGCUGACAGCACCCU	35
bfl-miR-4890	1	GUGAUUAGCUAAGGUAGCUGAUA	23
<i>Branchiostoma floridae</i> (ナメクジウオ)			
12-6 comp. 35nt	1	UCGACUGUCGUGGGAUUCCAUCGACUGUCGUGGGA	35
esi-miR3457-3p	1	UAGCUUGUCCUGGGAUUCCGU	21
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (褐藻/シオミドロ)			
24-1 comp. 26nt	1	ACGUGUGGACGUGCAUGUGUGCAAAA	26
mmu-miR-466j	1	UGUGUGCAUGUGCAUGUGUGUAA	23
<i>Mus musculus</i> (ハツカネズミ)			
24-1 comp. rev. 26nt	26	AAAACGUGUGUACGUGCAGGUGUGCA	1
mmu-miR-466j	1	UGUGUGCAUGUGCAUGUGUGUAA	23
<i>Mus musculus</i> (ハツカネズミ)			
24-3 27nt	1	ACUAUCGCAAACUGCGCGAAGGCGACC	27
cin-miR-4123-3p	1	AGCAAACU-CGGGAAGGCGCG	20
<i>Ciona intestinalis</i> (ホヤ/カタユレイボヤ)			
24-3 comp. 27nt	1	UGAUAGCGUUUGACGCGCUUCCGCUGG	27
ame-miR-3727	1	UUCGCGAACGCGCUCCCGCUAA	22
<i>Apis mellifera</i> (セイヨウミツバチ)			
24-6 comp. 20nt	1	CGGCUGAAGGGAAUGGAUGA	20
ptc-miR395a	1	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC	21
<i>Populus trichocarpa</i> (ポプラ)			
48-4 Rev. 27nt	27	CCCAUUUGGACGAACGCGUUACUUUCA	1
rlcv-miR-rL1-28-5p	1	UGGAAGGCGUUGCUUUCAGCUG	22
<i>Rhesus lymphocryptovirus</i> (アカゲザルに感染するガンマヘルペスウイルス)			
48-5 22nt	1	GUGUAUGUACGUAUGAGUGCUG	22
dme-miR-4961-5p	1	UCUCUAUGUGUAUGUAUGUAUC	22
<i>Drosophila melanogaster</i> (ショウジョウバエ)			
48-5 comp. 22nt	1	CACAUACAUGCAUACUCACGAC	22
mmu-miR-466o-3p	1	UACAUACAUGCACACAUAAAGAC	22
<i>Mus musculus</i> (ハツカネズミ)			
48-6 comp. 23nt	1	AAAAACUCGUUCUUGCGAUAGUA	23
ame-miR-3754	1	UCAUGGUGAAAAACUCAUUCUUU	23
<i>Apis mellifera</i> (セイヨウミツバチ)			
48-7 comp. rev. 34n	34	CUAGUCGAACCUUCGCCGUUUUUUUUUUUUUU	1
bta-miR-2325c	1	GGUUGUUUUUUUUUCUUUUUC	20
<i>Bos Taurus</i> (ウシ)			

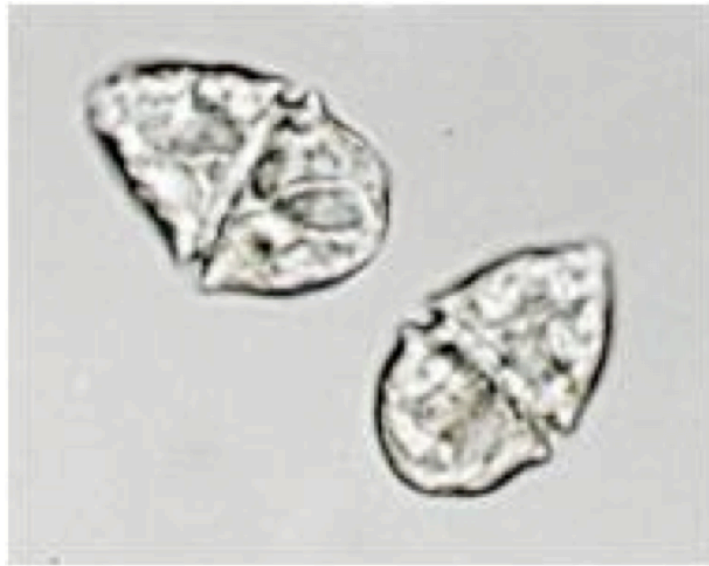


図0-1. *Heterocapsa circularisquama* (ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ).
細胞は紡錘形を呈し、長径および短径はそれぞれ20.0-28.8 μm (平均23.9 μm)および13.8-20.0 μm (平均17.3 μm)の大きさを持つ。2本の鞭毛(縦鞭毛・横鞭毛)を持ち回転遊泳するが、頻りにキツツキ様の行動(前進-後退-前進)を示して遊泳方向を変えるという特徴を持つ。

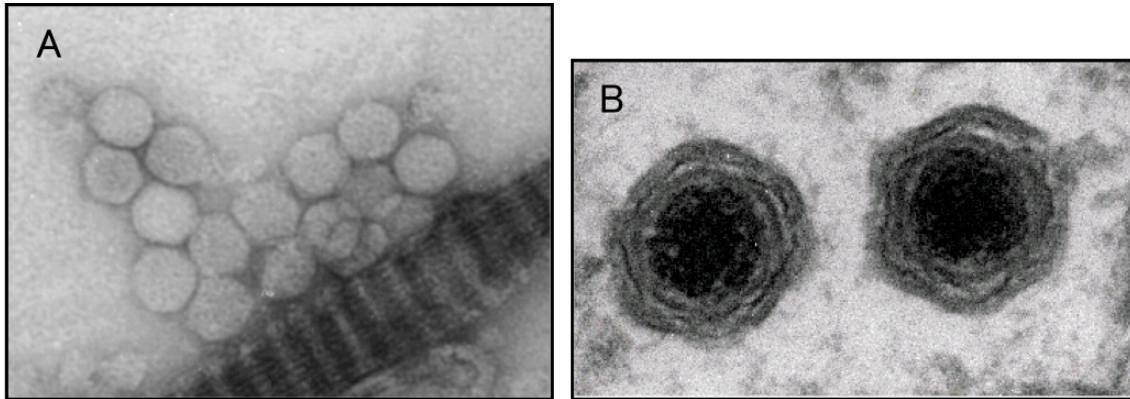
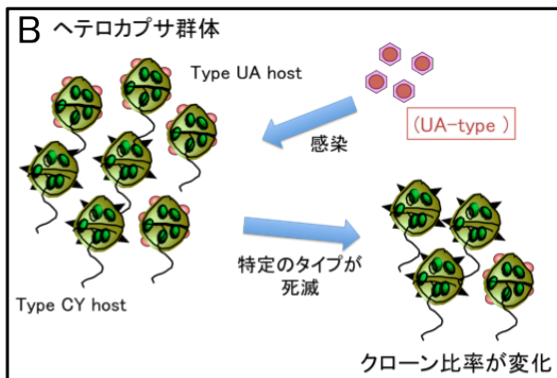
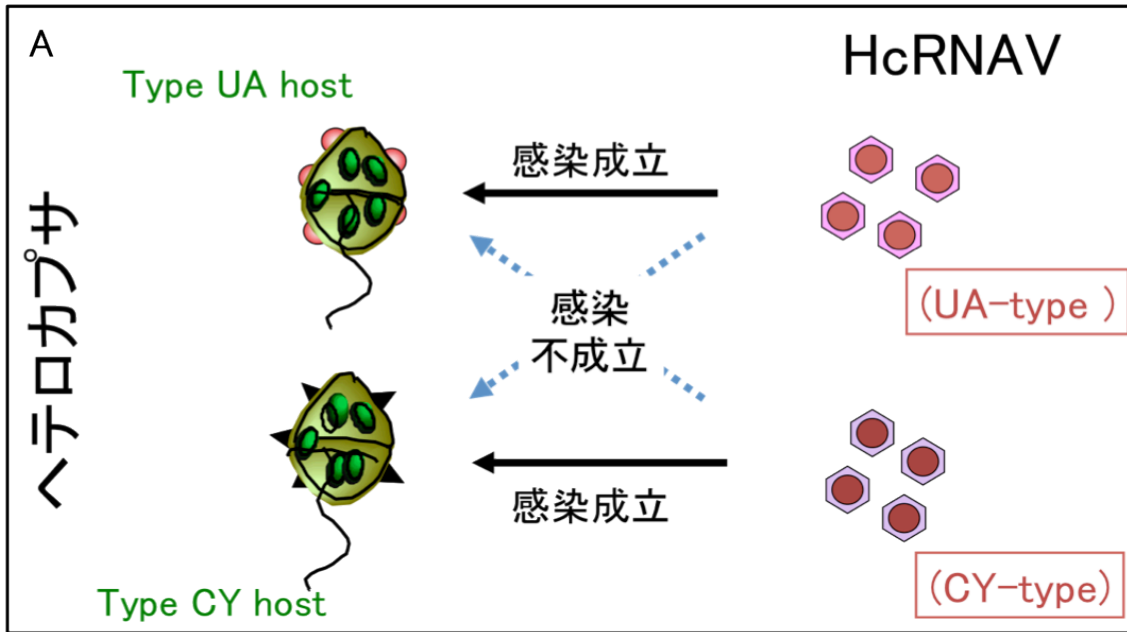


図0-2. ヘテロカプサに感染するウイルスHcRNAV(A)とHcDNAV(B).
(A)HcRNAV は約4.4 kbの直鎖上の1本鎖(+)のゲノムを持ち、粒径約30 nmの正20面体ウイルス。感染後約1-2日の後に1感染細胞あたり数千個の娘ウイルス粒子を放出しつつ宿主細胞は崩壊に至る。(B)HcDNAVは約356 kbpの二本鎖DNAゲノムを持つ粒径約0.2 μm の大型の正20面体ウイルス。感染後40-56時間後に1感染細胞あたり1800-2440感染単位の娘ウイルス粒子を放出しつつ宿主細胞は崩壊に至る。



C

		ウイルス		
		UA-type	CY-type	06-type
ヘテロカプサ	UA-type	○	×	○/×
	CY-type	×	○	×
	06-type	×	×	○

図0-3. HcRNAVの種内株特異性.

(A) HcRNAVと*H. circularisquama*はそれぞれ同じ種の中で複数のサブタイプ(UAタイプ、CYタイプ)に分かれる。HcRNAVの感染性タイプと*H. circularisquama*の感受性タイプが適合した場合にのみ感染が成立し、*H. circularisquama*の溶藻が起こるという「種内株特異性」が存在する。(B)環境中ではそれぞれに感染する異なるタイプのウイルスが、独立して*H. circularisquama*に感染することで個体群のなかのサブタイプの組成比を変化させる。(C)ごく最近の研究で、UA、CYタイプ両方のウイルスに感受性を示さないタイプのヘテロカプサ(06タイプ)が単離され、さらに06タイプの宿主に顕著に感染性を示すウイルスが発見された。

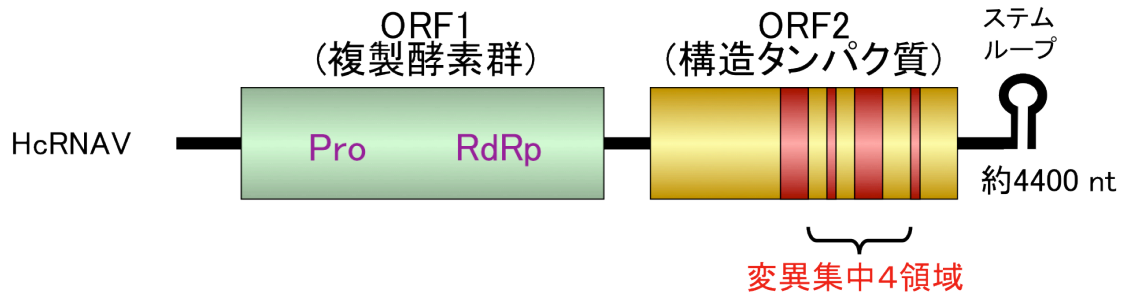


図 0-4. HcRNAV のゲノム構造.

約 4.4 knt の大きさの一本鎖の直鎖型 RNA ゲノムを持ち、3'末端にステムループ構造を持つ。HcRNAV は複製酵素群をコードする ORF と構造タンパク質をコードする ORF の 2 つの ORF で構成される。ORF2 には 4 つの変異が集中する領域があり、この領域のアミノ酸配列の違いが「種内株特異性」を決定していると考えられている。

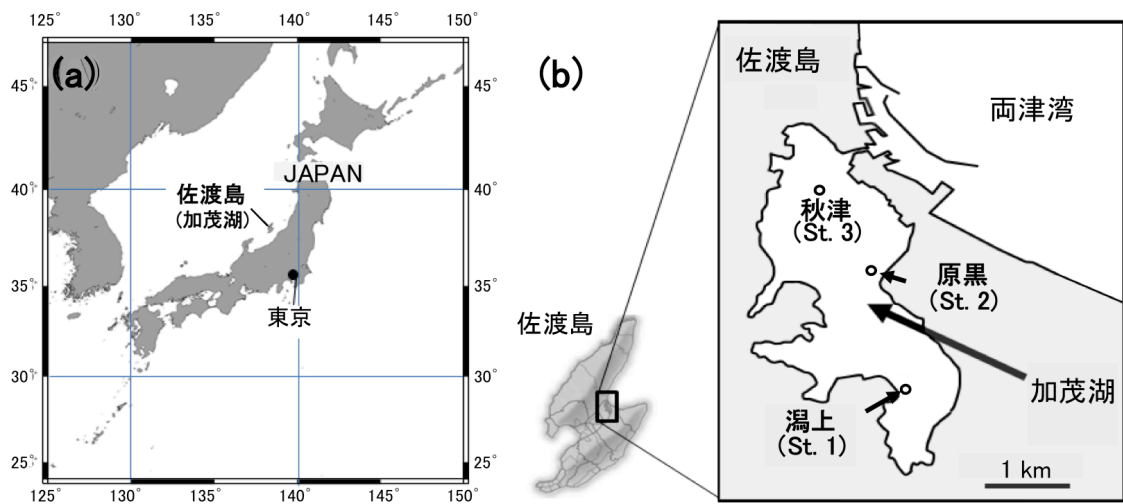


図 1-1. 加茂湖の位置(a) と加茂湖での試料サンプリング地点(b).
 (a)加茂湖は佐渡島にある汽水湖である。(b)海水と泥試料のサンプリングは、3 地点
 でおこなった。3地点はそれぞれ、両津湾から最も遠い潟上(St. 1)、3地点のうち真ん
 中にあたる原黒(St. 2)、最も両津湾に近い秋津(St. 3)とした。

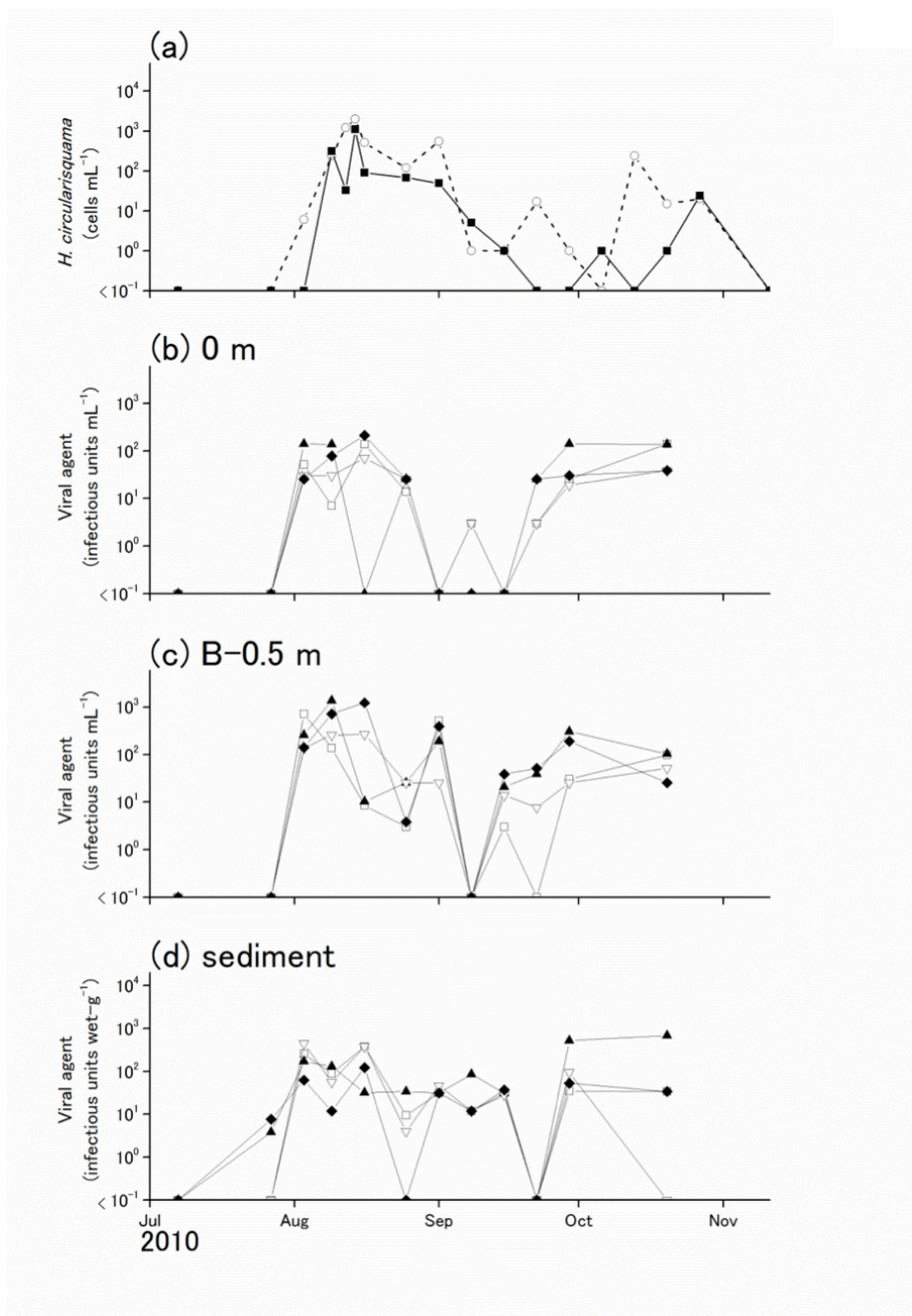


図1-2. 潟上(St. 1)での*Heterocapsa circularisquama*細胞数と溶藻性ウイルスカ価の変化。(a) 表層(■)と底質から0.5 m上部(B-0.5 m)(○)での*H. circularisquama*細胞数の変化。(b) 表層、(c) 底質から0.5 m上部(B-0.5 m) と(d) 底泥での溶藻性ウイルスカ価の変化。*H. circularisquama*を溶藻させるウイルス因子の密度は、MPN法を用いて算出した。MPN法では4つの宿主代表株 HU9433-P (□)、05HC06(▲)、HCKM03 (▽)とHCLG-1 (◆)を用いた。*H. circularisquama*細胞数はKondo et al. (2012)のデータを参照した。

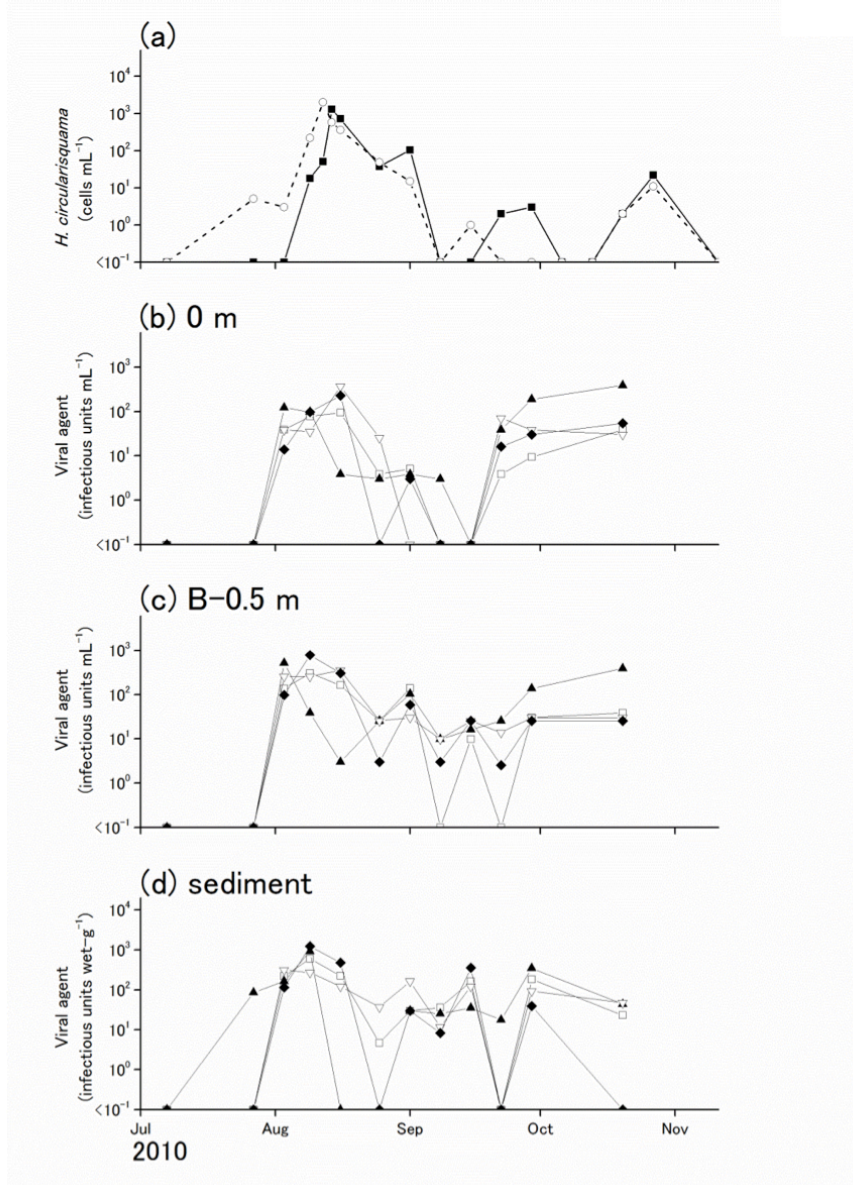


図1-3. 原黒(St. 2)での*Heterocapsa circularisquama*細胞数と溶藻性ウイルスカ価の変化。(a) 表層(■)と底質から0.5 m上部(B-0.5 m)(○)での*H. circularisquama*細胞数の変化。(b) 表層、(c) 底質から0.5 m上部(B-0.5 m)と(d) 底泥での溶藻性ウイルスカ価の変化。*H. circularisquama*を溶藻させるウイルス因子の密度は、MPN法を用いて算出した。MPN法では4つの宿主代表株 HU9433-P(□)、05HC06(▲)、HCKM03(▽)とHCLG-1(◆)を用いた。*H. circularisquama*細胞数はKondo et al. (2012)のデータを参照した。

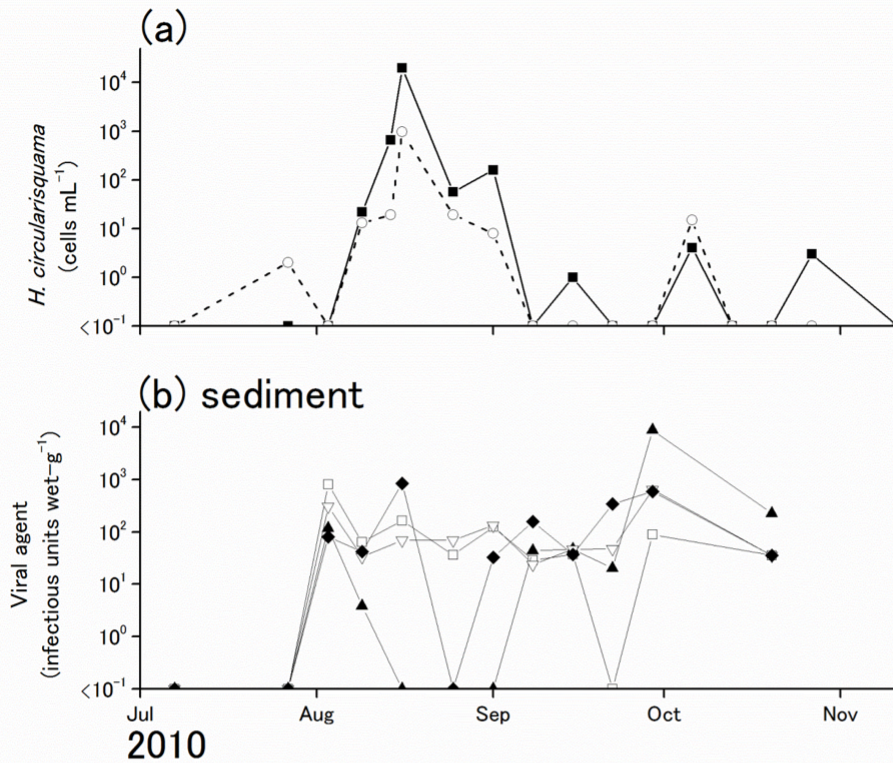


図1-4. 秋津(St. 3)での*Heterocapsa circularisquama*細胞数と溶藻性ウイルスカ価の変化。(a) 表層(■)と底質から0.5 m上部(B-0.5 m)(○)での*H. circularisquama*細胞数の変化。(b) 底泥での溶藻性ウイルスカ価の変化。*H. circularisquama*を溶藻させるウイルス因子の密度は、MPN法を用いて算出した。MPN法では4つの宿主代表株 HU9433-P (□)、05HC06(▲)、HCKM03 (▽)とHCLG-1 (◆)を用いた。*H. circularisquama*細胞数はKondo et al. (2012)のデータを参照した。

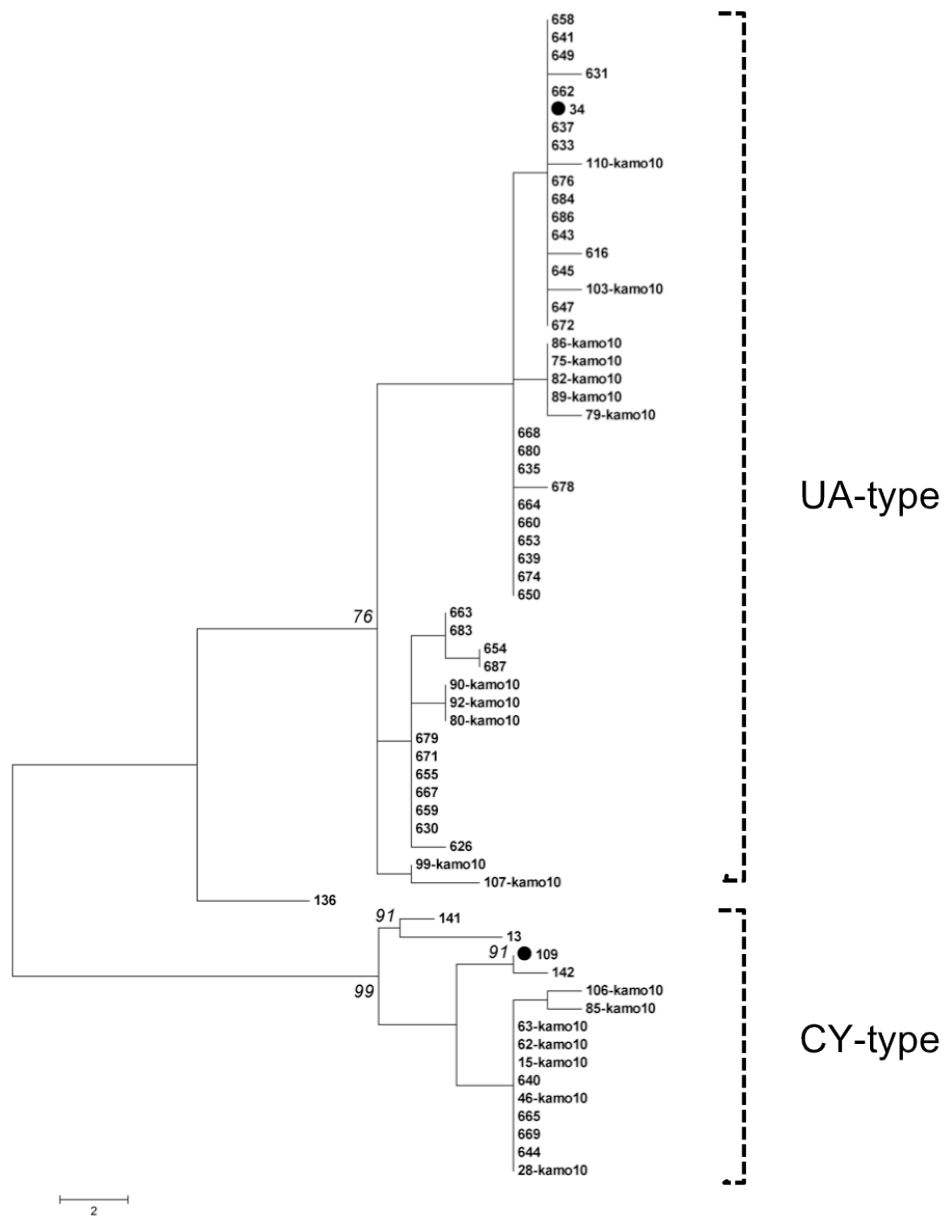


図1-5. HcRNAVのmajor capsid proteinを構成するアミノ酸配列から計算した系統樹。HcRNAVクローン株は大きく二つのクレード UA-typeとCY-typeに分かれた。ブートストラップ値70%以上をイタリック体で結束点に表した。縮尺バーはアミノ酸位置に対して2つの変異を示す。HcRNAV34とHcRNAV109はそれぞれ UA-typeとCY-typeの代表株として、表中に(●)で注釈をつけた。



ヘテロカプサ培養液

- ①HcDNAV未感染
- ②感染後12時間
- ③感染後24時間



TRIzol

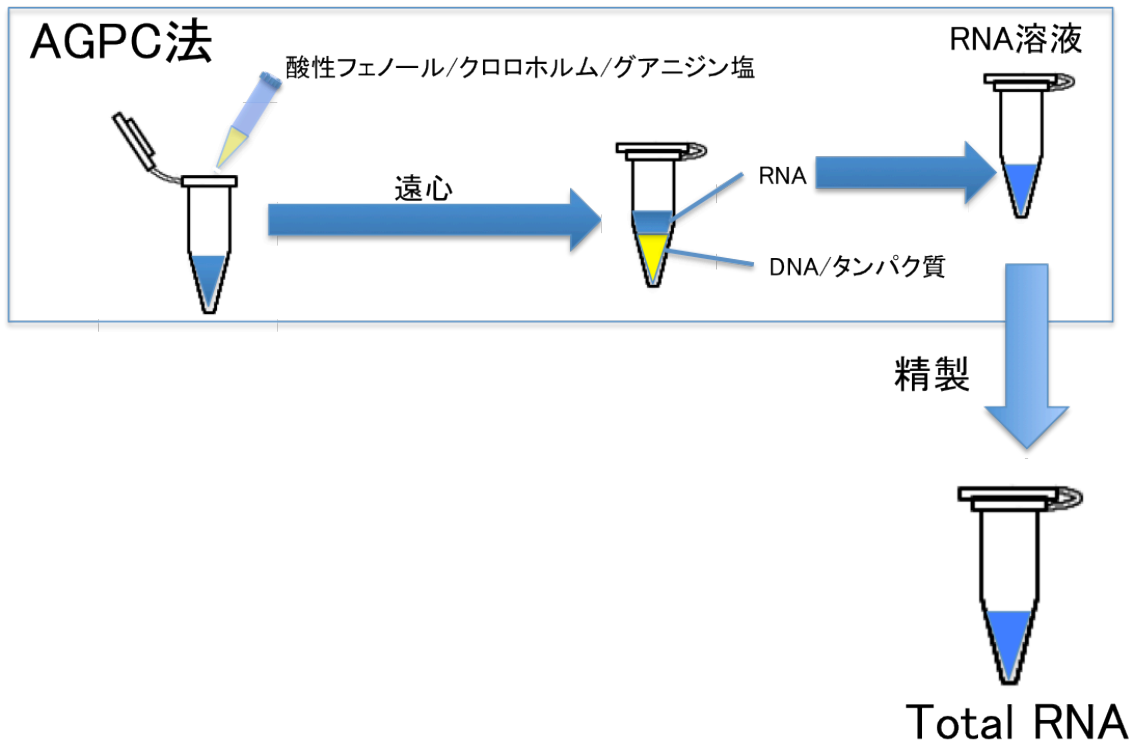


図2-1-1. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞培養液からtotal RNAの抽出方法. ウイルス接種したヘテロカプサ培養液から低速遠心し、ペレットに集めたものをAGPC法に準拠したTRIzolを用いてRNAを抽出、精製しtotal RNAを得た。

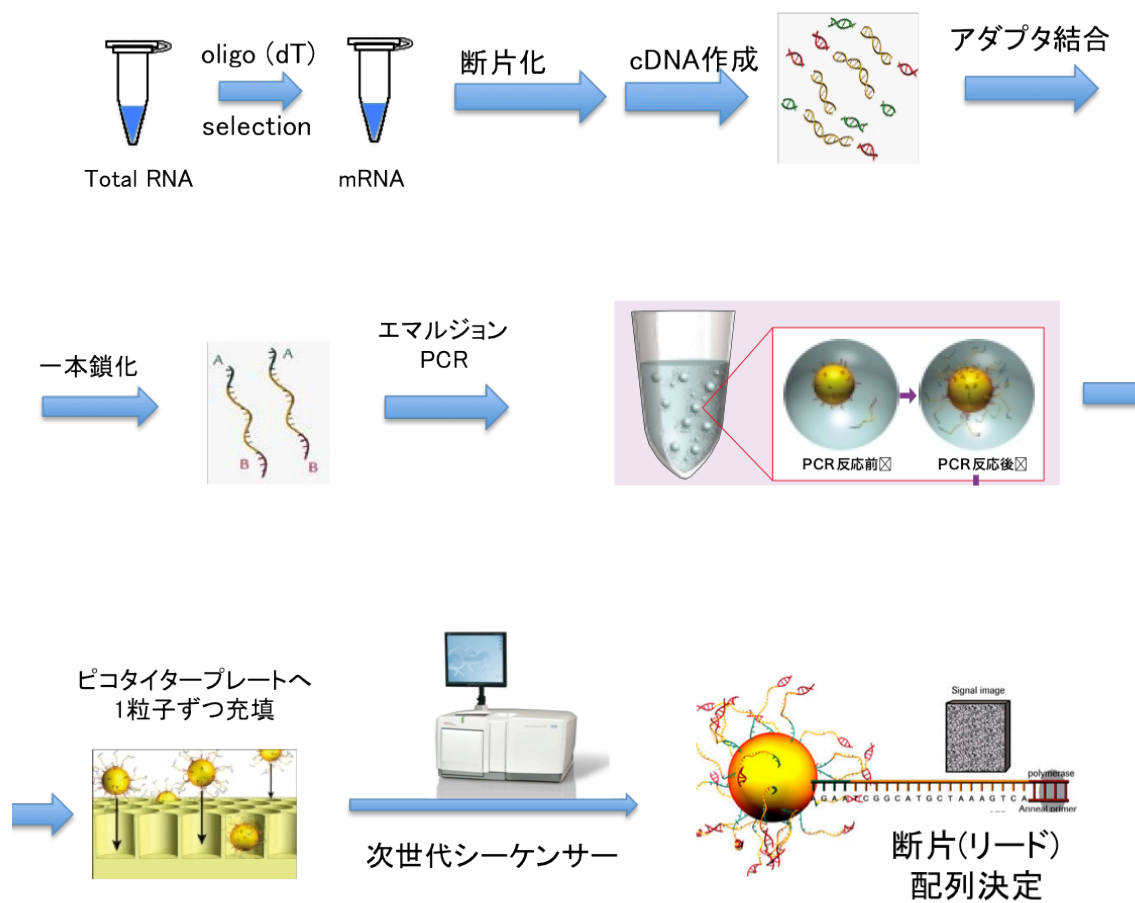


図2-1-2. ウイルス感染させたヘテロカプサで発現しているトランスクリプトの配列決定.
 Fig. 2-1-1で得られたtotal RNAからoligo (dT)を用いてmRNAをセレクションし、2価の陽イオンと熱変性で断片化、ランダムプライマーを用いてcDNAを作成した。断片化したcDNAの両端にアダプタを結合させ、一本鎖化したものをエマルジョンPCRで増幅させ、次世代シーケンサーにかけ配列決定した。

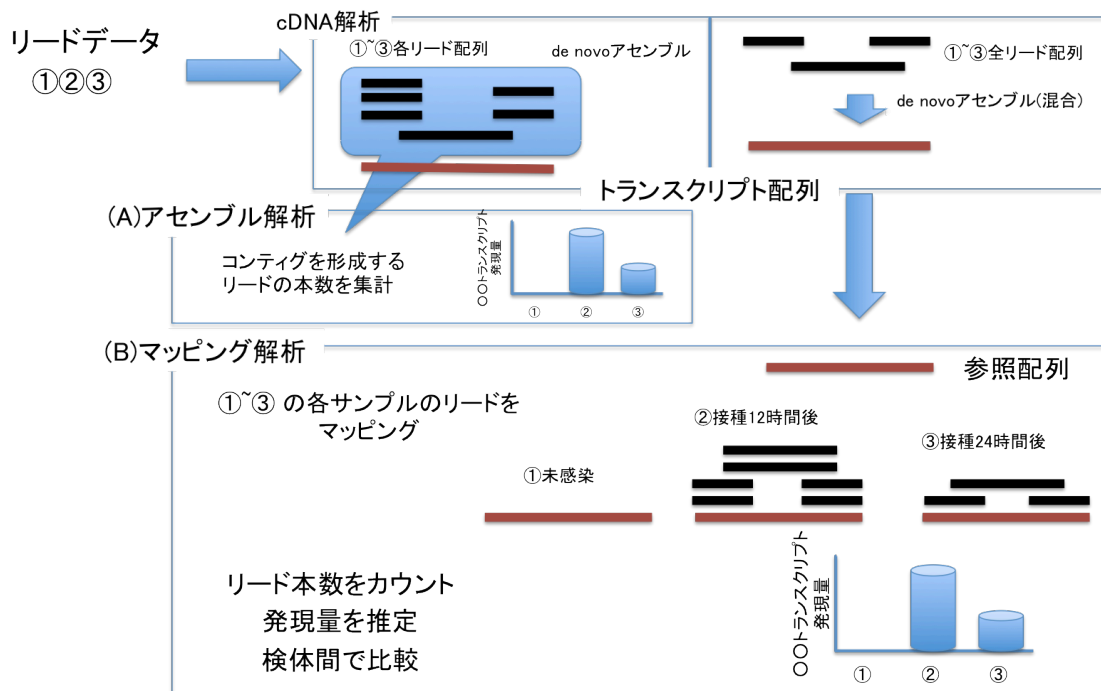


図 2-1-3. 次世代シーケンサーで得たリードデータを用いたマッピング解析とアセンブル解析.

次世代シーケンサーによって得たリードデータから cDNA 解析を行い、de novo アセンブルによりトランスクリプト配列を得た。リードデータおよびトランスクリプト配列から、アセンブル解析(A)およびマッピング解析(B)を行った。

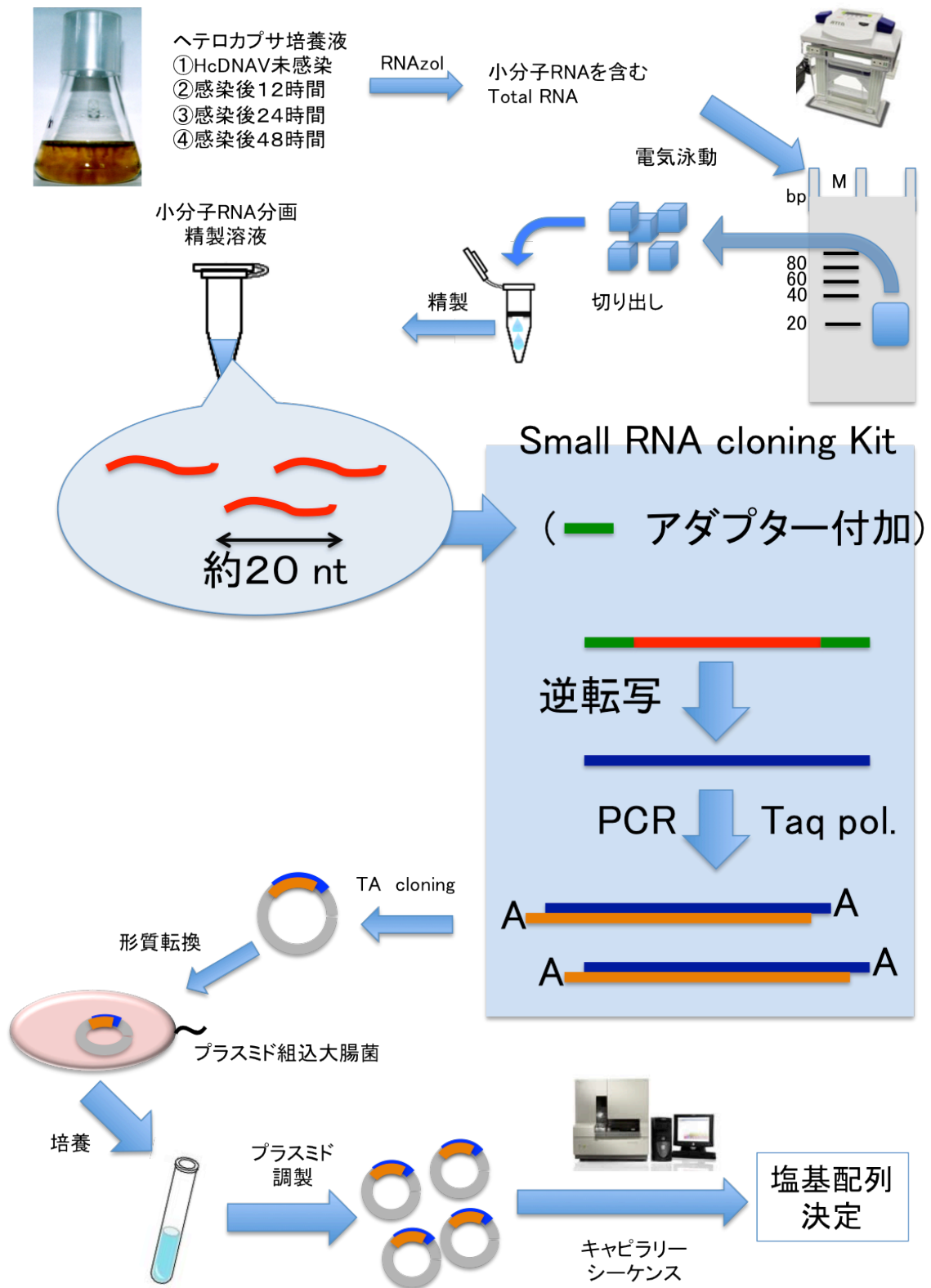


図2-2-1. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子RNAの配列決定.

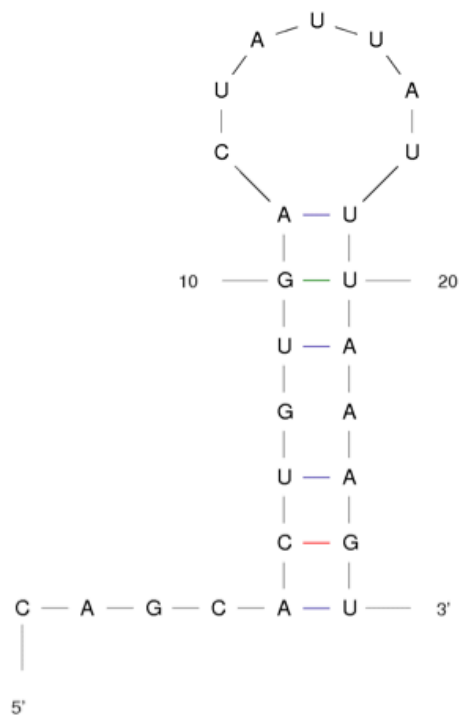


図 2-2-2. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “12-3” の相補鎖 (Comp.)の推定二次構造.
 “12-3 Comp.” は 26 nt で 6 塩基長のステムと 9 塩基で構成されるループ構造を持つ。

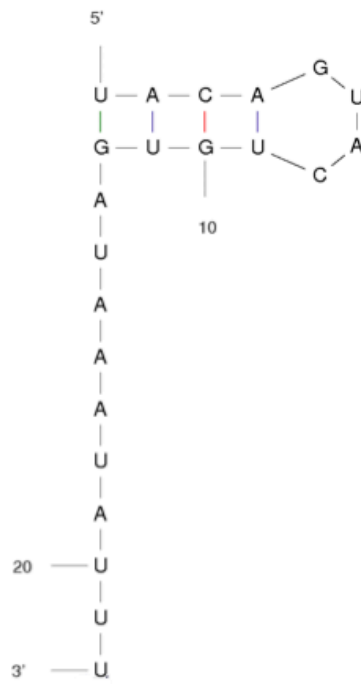


図 2-2-3. “12-3 Comp.”と相同性を示した miRNA: cin-miR-101 の推定二次構造. 22 nt の大きさに 3 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

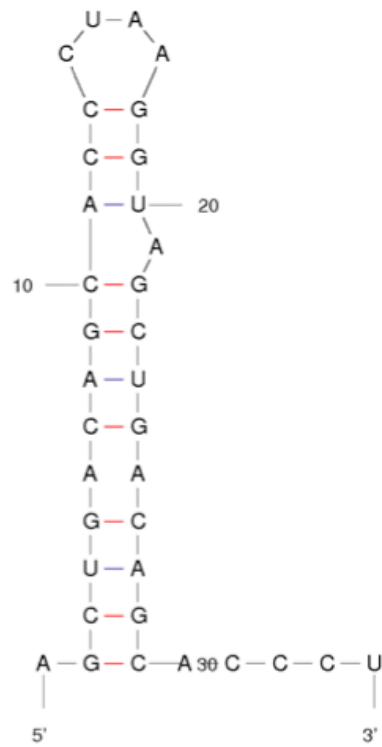


図 2-2-4. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “12-6” の推定二次構造.

“12-6” は 35 nt で 11 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

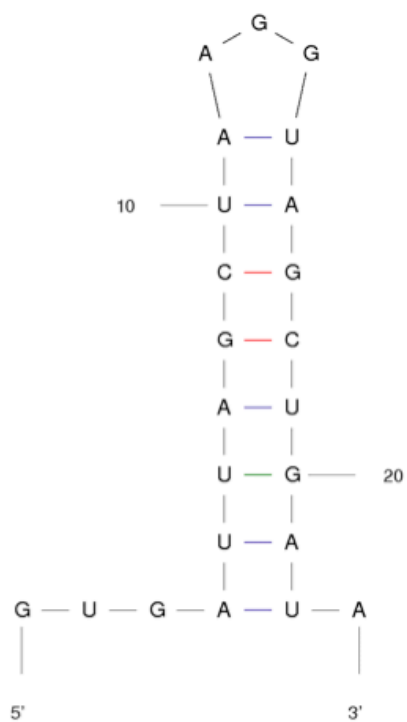


図 2-2-5. “12-6”と相同性を示した miRNA: bfl-miR-4890 の推定二次構造.
35 nt の大きさで 11 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

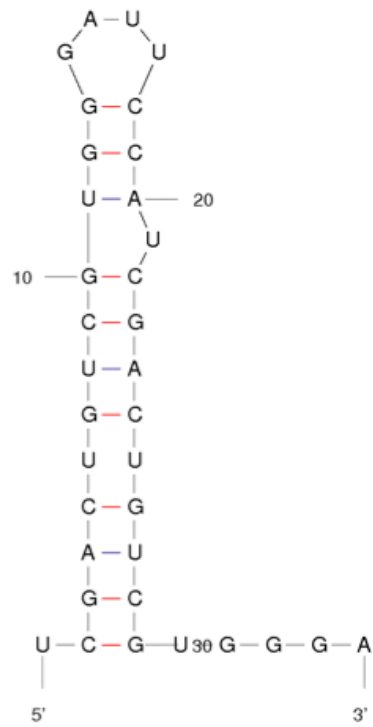


図 2-2-6. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “12-6” の相補鎖 (Comp.)の推定二次構造.
 “12-6 Comp.” は 35 nt で 11 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

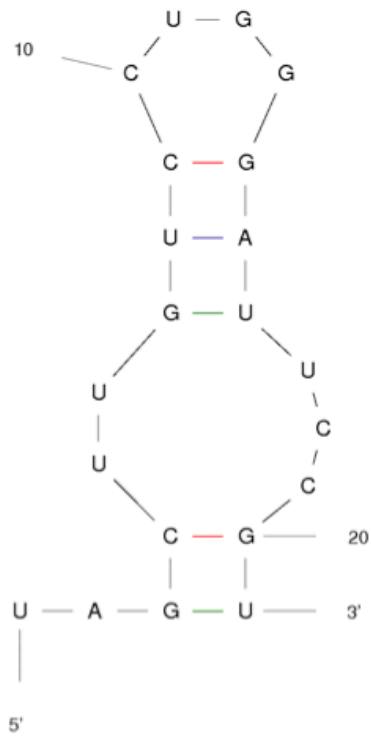


図 2-2-7. “12-6 Comp.”と相同性を示した miRNA: esi-miR3457-3p の推定二次構造.
 21 nt の大きさで 2 つのループ構造を持つ。

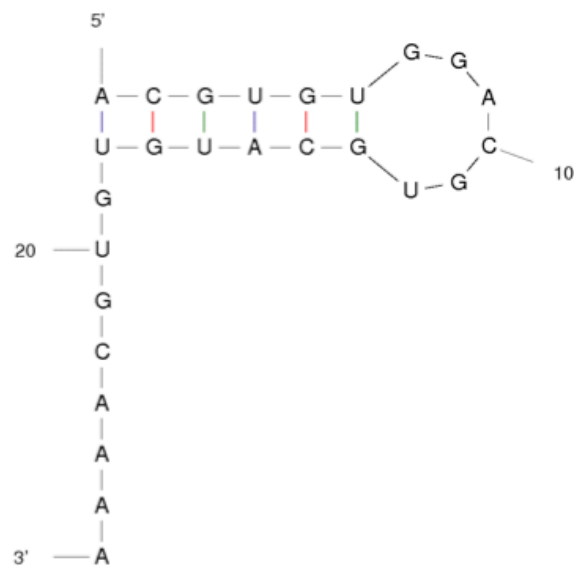


図 2-2-8. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “24-1” の相補鎖 (Comp.)の推定二次構造.
 “24-1 Comp.” は 26 nt で 5 塩基長のステムと 8 塩基で構成されるループ構造を持つ。

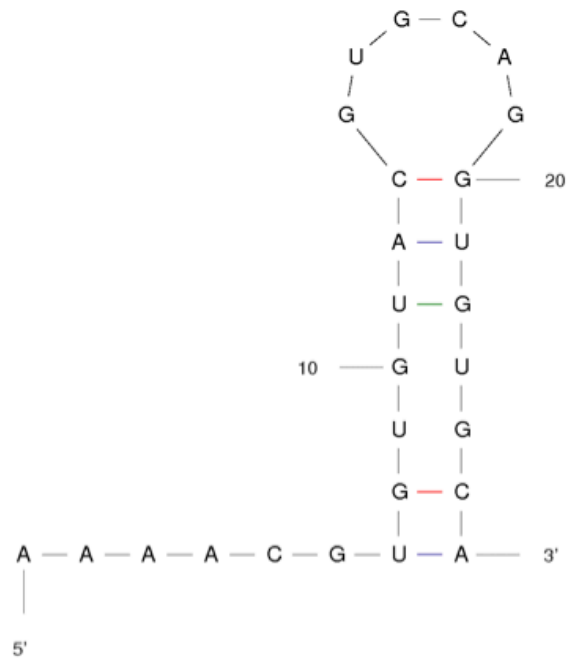


図 2-2-9. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “24-1” の相補鎖 (Comp.)の逆鎖(Rev.)の推定二次構造.
 “24-1 Comp. Rev.” は 26 nt で 6 塩基長のステムと 8 塩基で構成されるループ構造を持つ。



図 2-2-10. “24-1 Comp., Comp. Rev.”と相同性を示した miRNA: mmu-miR-466j の推定二次構造.

23 nt の大きさを 8 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

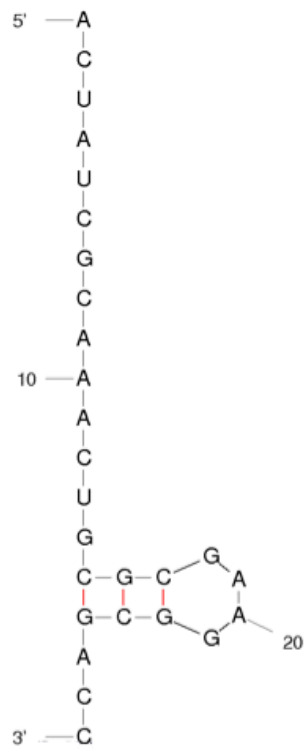


図 2-2-11. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “24-3” の推定二次構造.

“24-3” は 27 nt で短いステムで 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

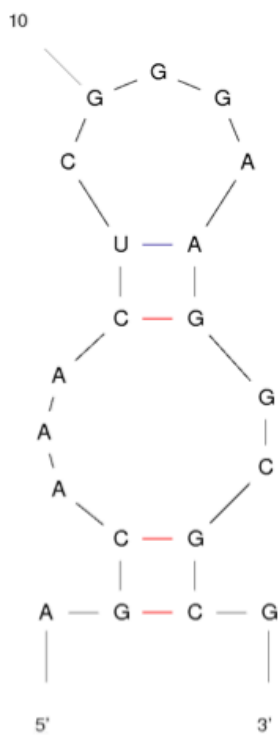


図 2-2-12. “24-3”と相同性を示した miRNA: cin-miR-4123-3p の推定二次構造. 20 nt の大きさで 2 つのループ構造を持つ。

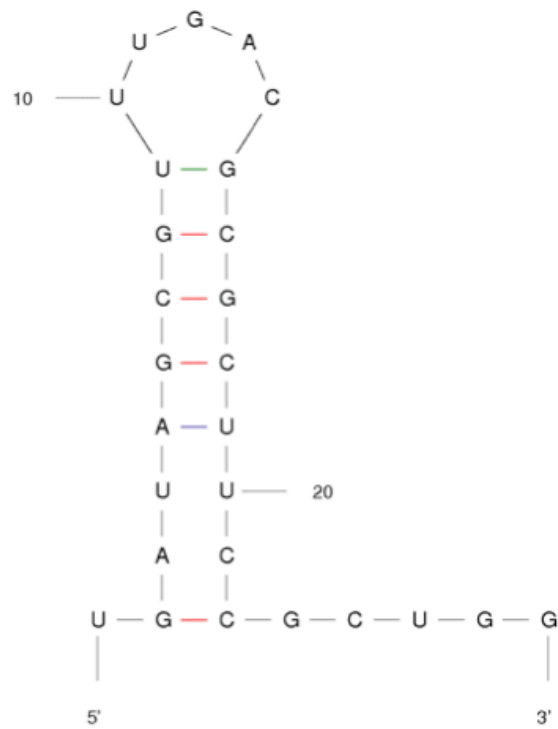


図 2-2-13. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “24-3” の相補鎖 (Comp.) の推定二次構造.

“24-3 Comp.” は 27 nt で 7 塩基長のステムと 7 塩基で構成されるループ構造を持つ。



図 2-2-14. “24-3 Comp.”と相同性を示した miRNA: ame-miR-3727 の推定二次構造.
 22 nt の大きさで短いステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

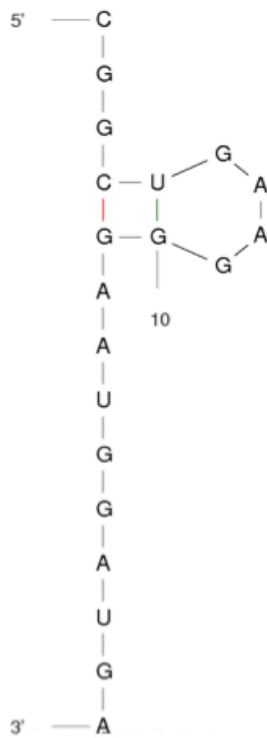


図 2-2-15. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “24-6” の相補鎖 (Comp.) の推定二次構造.

“24-6 Comp.” は 20 nt で一カ所の 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

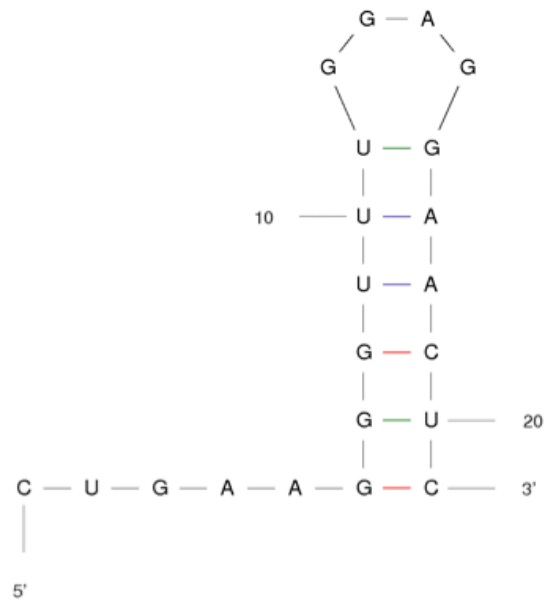


図 2-2-16. “24-6 Comp.”と相同性を示した miRNA: ptc-miR395a の推定二次構造. 21 nt の大きさを 5 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

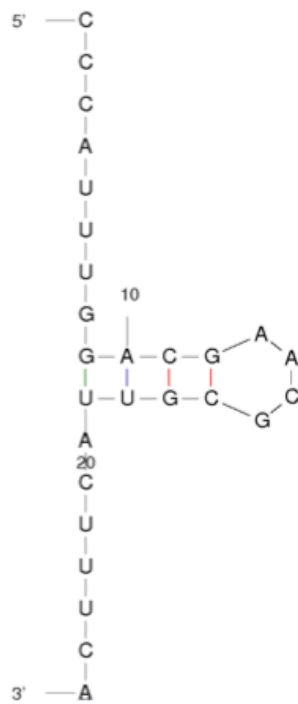


図 2-2-17. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “48-4” の逆鎖 (Rev.) の推定二次構造.

“48-4 Rev.” は 27 nt で 3 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

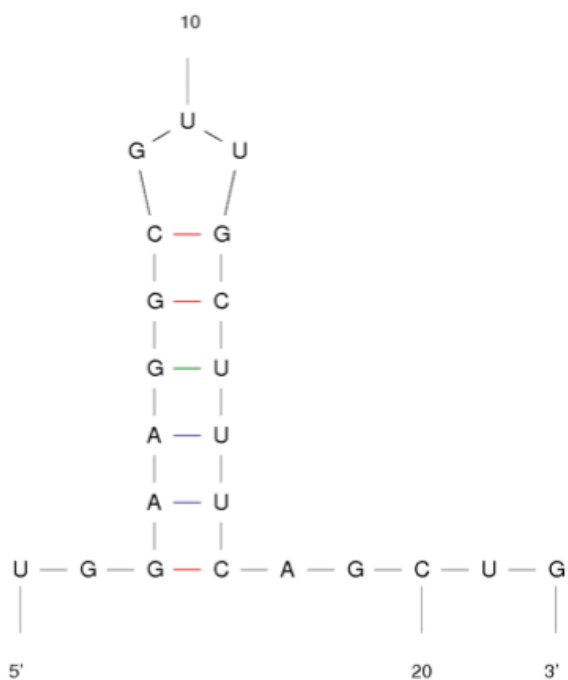


図 2-2-18. “48-4 Rev.”と相同性を示した miRNA: Rlcv-miR-rl1-28-5p の推定二次構造. 27 nt の大きさで 5 塩基長のステムと 5 塩基で構成されるループ構造を持つ。

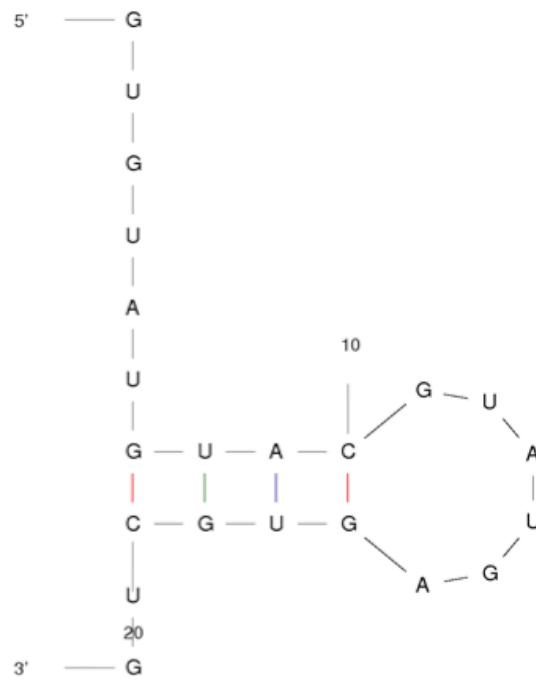


図 2-2-19. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “48-5” の推定二次構造.

“48-5” は 22 nt で 3 塩基長のステムと 8 塩基で構成されるループ構造を持つ。

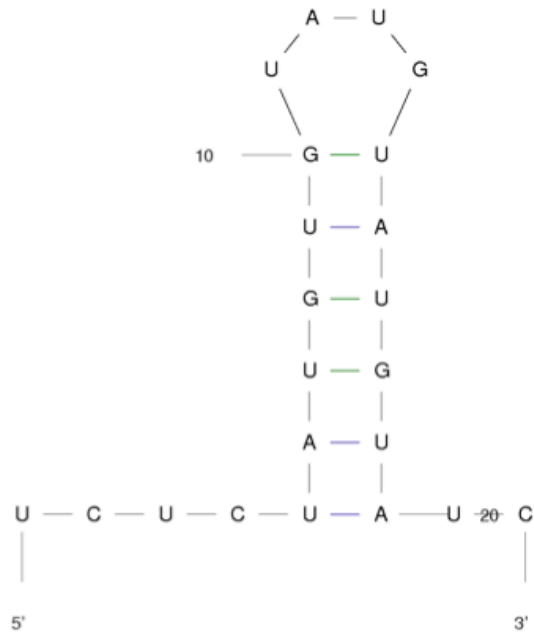


図 2-2-20. “48-5”と相同性を示した miRNA: dme-miR-4961-5p の推定二次構造. 22 nt の大きさを 5 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

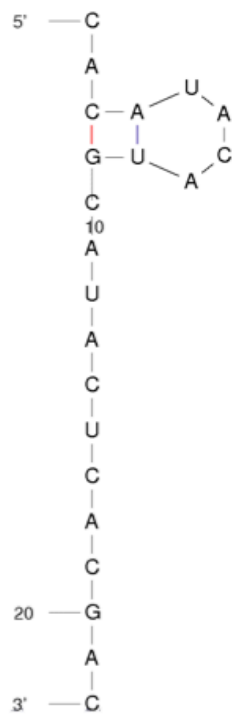


図 2-2-21. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “48-5” の相補鎖 (Comp.) の推定二次構造.
 “48-5 Comp.” は 22 nt で一カ所の 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

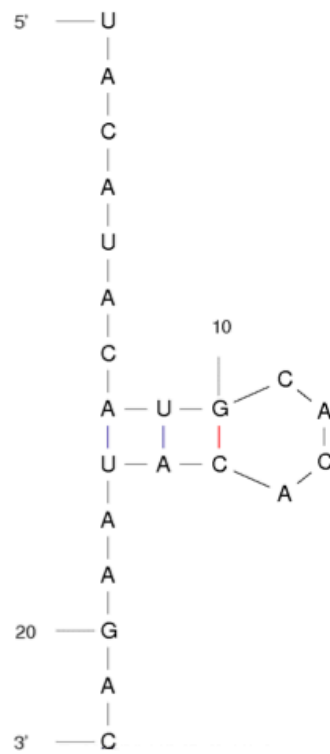


図 2-2-22. “48-5 Comp.”と相同性を示した miRNA: mmu-miR-466o-3p の推定二次構造. 22 nt の大きさで 2 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

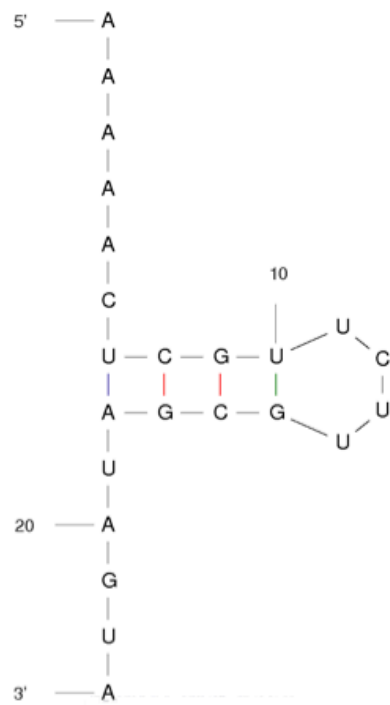


図 2-2-23. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “48-6” の相補鎖 (Comp.)の推定二次構造.
 “48-6 Comp.” は 22 nt で 3 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

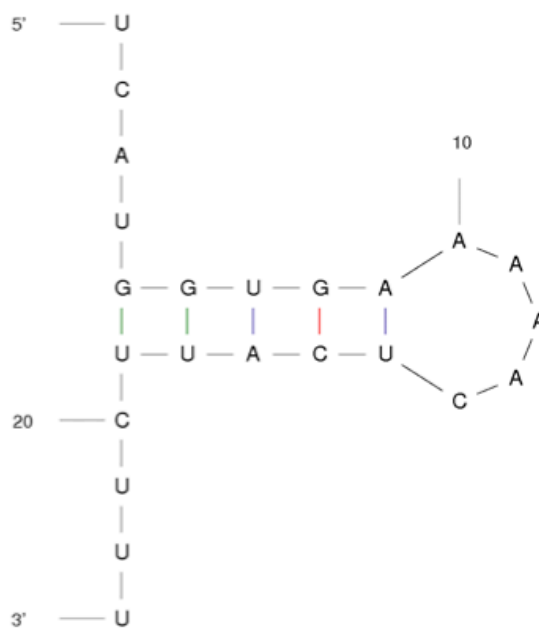


図 2-2-24. “48-6 Comp.”と相同性を示した miRNA: ame-miR-3754 の推定二次構造. 23 nt の大きさを 4 塩基長のステムと 7 塩基で構成されるループ構造を持つ。

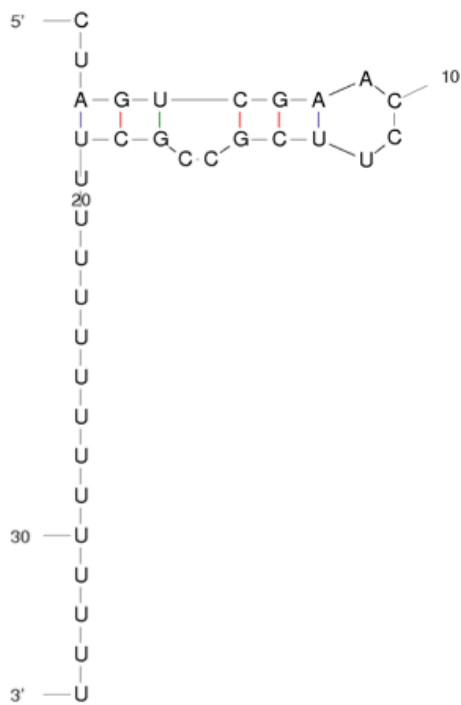


図 2-2-25. ウイルス感染させたヘテロカプサ細胞で発現する小分子 RNA “48-7” の相補鎖 (Comp.)の逆鎖(Rev.)の推定二次構造.
 “48-6 Comp. Rev.” は 34 nt で 5 塩基長のステムと 6 塩基で構成されるループ構造を持つ。

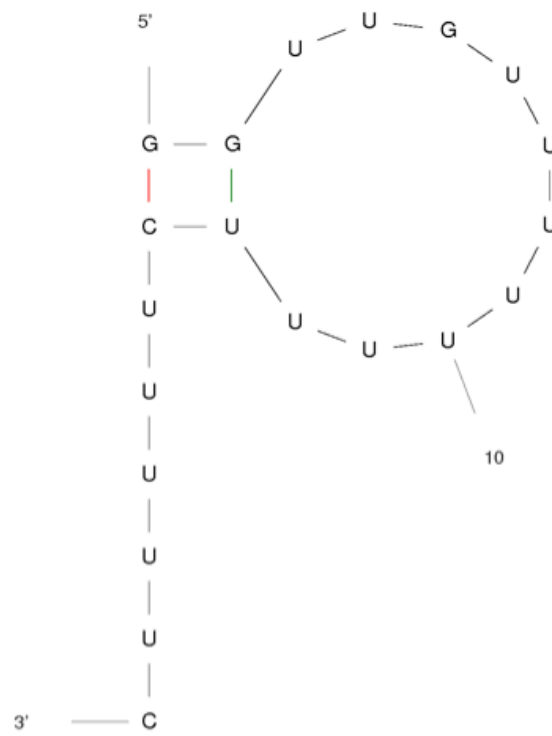


図 2-2-26. “48-7 Comp. Rev.”と相同性を示した miRNA: bta-miR-2325c の推定二次構造. 20 nt の大きさに 12 塩基で構成されるループ構造を持つ。