

平成27年度研究科長裁量経費による助成研究一覧
Reports of studies supported by Grant-in-Aid for Research from the Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

| 助成区分 | 研究課題名 | 研究代表者 |
|---|---|-----------------------------|
| 基盤研究サポート Grant-in-Aid for Fundamental Research | 環境ウイルスのキャラクタリゼーションに関する基礎研究 A study on characterization of novel environmental viruses | 中井 敏博 Toshihiro NAKAI |
| | ウシの行動反応と気質関連遺伝子多型との関係 Temperament Related Polymorphisms Associated with Behaviors in Cattle | 豊後 貴嗣 Takashi BUNGO |
| | クラスター構造の根を形成する植物の低リン適応特性の解明 Study on the properties of low P tolerance of plants forming root-cluster structures | 和崎 淳 Jun WASAKI |

A study on characterization of novel environmental viruses

Toshihiro NAKAI

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higasdhi-Hiroshima 739-8528, Japan

環境ウイルスのキャラクタリゼーションに関する基礎研究

中井 敏博

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

【研究目的】

自然環境中にフリーで存在しているウイルスを分離・培養し、それらの生物学および生態学的な特性をキャラクタライズすることで、これまでの病原ウイルス学的な知見をさらに拡大するとともに、「ウイルス進化生態学」とでも呼ぶべき新学問分野の開拓を図ることを目的とする。

【研究結果】

1) 滑走細菌 *Tenacibaculum maritimum* ファージの分離とその性状

海産魚の病原細菌である *T. maritimum* の新規溶菌ファージを集殖培養法により分離した。分離8株 (PTm1 ~ PTm8) はいずれもミオウイルスの形態をしていて、T4様ウイルスよりはかなり大型で (頭部直径: 約120nm 尾部長: 約150nm)、頭部に柔軟性のある数本のファイバー状構造物 (長さ: 約70nm) を持っていた。代表2ファージ (PTm1およびPTm5) について、次世代シーケンサーを用いたショットガンシーケンスを行ってゲノム解析をおこなった結果、PTm1およびPTm5は、それぞれゲノムサイズが224,680 bp および226,876 bp (GC% はいずれも29.7)、予測 ORF 数が308個および306個であった。この内、約50個の ORF は同じく T4様ウイルスの形態をした *Sphingomonas phage PAU* と相同性が認められた。ゲノム構造の新規性に加えて、これまで頭部にこのようなファイバー状構造物を有するファージは報告されていない。吸着試験の結果から、頭部ファイバーは菌体吸着へのセンサーのような役割を果たしているのではないかと考えられた。一部を平成28年度日本魚病学会秋季大会で発表した。

2) 超微小細菌 (ナノバクテリア) ファージの探索

豊潮丸航海により採取した海水から、10株の0.22 μm フィルター通過性細菌を分離した。この内、培養が比較的容易でありかつ3段階の0.2 μm フィルターを通過した株3株を得た。液体培養菌について TEM 観察をおこなったところ、いずれも極在単鞭毛を有するピブリオ菌の形態をしていた。しかし、菌体のサイズはいずれも1 μm 以上であったことから、これらは生活史の一部に超微小ステージを持つメロ・ナノバクテリアの可能性が高い。一部からはテンプレート・ファージが検出されたが、これまでのところビルレント・ファージの分離には成功していない。なお、ナノバクテリアに感染するファージは文献上は極めてまれである。

3) 巨大ウイルス (巨大核質 DNA ウイルス) の探索

新規巨大ウイルスの探索のため、宿主のひとつであるアカントアメーバ (*Acanthamoeba*) の培養条件をあらためて検討した。この培養系を用い、海水20L (豊潮丸航海により採取) の0.22 μm フィルター通過ろ液を試料として、アメーバでの分離・培養、TEM、および既報のプライマーでのPCRにより、巨大ウイルスの検出を試みた。残念ながら、これまでのところ巨大ウイルスの検出に成功していない。

“Temperament Related Polymorphisms Associated with Behaviors in Cattle”

Takashi BUNGO

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higasdhi-Hiroshima 739-8528, Japan

ウシの行動反応と気質関連遺伝子多型との関係

豊後 貴嗣

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

ヒトを含めた動物の性格（気質）と遺伝との関係については、ゲノム・サイエンスの進展によって、多くの知見を得るに至っている。家畜においても、性格（気質）に関連する遺伝子の変異（多型）に関する報告はあるが、それら変異と実際の表現型（性格（気質）を伴う行動様式など）との関係については、ほとんど調査はなされていない。本研究では、ウシの気質と遺伝子多型との関係について調査した。

試験Ⅰ：【材料および方法】

広島大学附属農場の黒毛和種子牛13頭を対象とした。子牛は母牛とともに分娩房で他と隔離して、生後2、4および6週に遊戯行動の観察を行った。観察項目は、gallop, leap, turn, buck, head-shake および物へのbuttingとした。遺伝子多型解析は、RFLP解析によりモノアミン・オキシターゼA (MAOA) とセロトニン受容体1B (HTR1B) を調査した。統計学的検定は、二元配置分散分析を行った。

【結果および考察】

MAOA 遺伝子に認められた遺伝子頻度は、C 遺伝子が0.68, T 遺伝子が0.32であった。C 遺伝子を持つ個体と持たない個体とで分けた場合、gallop は、遺伝子型および週齢の効果が認められ、gallop の発現はC を持たない個体で多く、成長とともに減少した ($P<0.05$)。leap, turn および head-shake では差はなかったものの、butting では遺伝子型の効果が認められ、C を持たない個体で発現回数が多かった ($P<0.05$)。また、buck では、交互作用が示され、6週齢においてC を持たない個体での発現回数が多かった ($P<0.05$)。一方、HTR1B 遺伝子では、認められた遺伝子頻度は、G 遺伝子が0.88, T 遺伝子が0.11であった。T 遺伝子を持つ個体と持たない個体とで分けた場合、gallop, leap, turn, head-shake および butting では差はなかったが、buck で遺伝子型の効果が示され、T を持たない個体で発現回数が多かった ($P<0.01$)。以上の結果から、MAOA および HTR1B 遺伝子が gallop, buck あるいは butting の発現に影響すること、また buck のように遺伝子の時期特異的な影響も考えられた。

試験Ⅱ：【材料および方法】

広島大学附属農場のホルスタイン泌乳牛24頭を対象とした。各牛の気質は、16項目からなる質問調査票を用いて分類するとともに、搾乳ロボットへの不要な侵入回数についても記録した。遺伝子解析は、試験Ⅰと同様とし、統計学的検定は、マンホイットニーのU検定を行った。

【結果および考察】

HTR1B 遺伝子に変異を持つ個体は、質問調査票の「率先的に行動する」の評点が高いこと、一方、MAOA 遺伝子では、変異個体が不要な侵入をより多く行うことが示された。以上の結果から、MAOA および HTR1B 遺伝子が、ホルスタイン乳牛の気質あるいは行動傾向に影響するものと考えられた。

Study on the properties of low P tolerance of plants forming root-cluster structures.

Jun WASAKI

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

クラスタ構造の根を形成する植物の低リン適応特性の解明

和崎 淳

広島大学大学院生物圏科学研究科, 739-8528 東広島市

リン酸質肥料の原料であるリン鉱石資源は涸渇に瀕している。我が国はこれを輸入に依存しているため、持続的な食料生産のためにはリンの有効活用が必要である。そのためには低リン環境で生育する植物のリン吸収能を理解し、そのしくみを活用する必要がある。

低リン環境で生育できる植物の一部は、クラスタ構造の根を作ることが知られる。すなわち、密な側根からなるクラスタ根や、側根に根毛を密生させたダウシフォーム根とよばれる特殊な形状をした根である。これらのクラスタ構造の根は、その表面積を拡大してリンの吸収効率が高まるだけでなく、最近の研究においてこれらの植物が未利用のリンを可給化する有機酸や酸性ホスファターゼを分泌する能力が高いことが示されてきた。また、極めて低いリンしか含まない土壌で生育するため、地上部にいったん取り込んだリンの有効利用能に優れることが期待される。そこで、これらの低リン適応特性について理解を深めることを目的とした研究を行った。

長期間リン欠乏条件で水耕栽培したピンクッションハケア (*Hakea laurina*) が形成したクラスタ根を用いて、有機酸および酸性ホスファターゼの分泌能を調査した。CE-MSを用いて根分泌物に含まれる代謝物の一斉分析を行ったところ、根分泌性有機酸として一般的に知られるクエン酸とリンゴ酸はともにクラスタ根特異的に分泌していることが示された。クエン酸、リンゴ酸に加えて、既知化合物においてはイソクエン酸がクラスタ根特異的に分泌されていることが示された。さらに、最も多量に分泌されたアニオン(分子量137.0)とクラスタ根特異的に分泌されていたアニオン(分子量95.0)は未同定物質であり、既知の化合物が分泌されることでこの植物が適応している可能性が示唆された。また、酸性ホスファターゼの活性は未成熟~成熟クラスタ根でノーマル根と比べて有意に高い値を示した。これらのことから、ピンクッションハケアの形成したクラスタ根は難利用性リンの獲得戦略として非常に重要であることが示唆された。

宮島におけるヤマモガシ (*Helicia cochinchinensis*) およびその周辺に生育する樹木から、成熟葉と老熟葉を採取し、そのリン濃度を測定した。植物が老化した葉を落葉させる前にどの程度のリンを回収し、成熟葉に受け渡しているかの指標として、リンの再転流効率を求めたところ、ヤマモガシでは53-63%であり、オガタマノキを除く他の樹種より大きい数値であった。また、窒素濃度との関係からリンの需要を求めたところ、他の樹木と比較してヤマモガシではリンの需要が低く抑えられていることが示された。以上のことから、ヤマモガシの低リン耐性の一部には、リンの再転流能と需要の抑制が重要な役割を果たしていることが示された。

ヤマモガシの成熟葉が含む各種元素をICP-MSを用いて一斉分析を行った。その結果、ヤマモガシの成熟葉はアルミニウムやマンガンなどの一部の多価カチオン濃度が高いことが示された。さらに、ヤマモガシと共存する樹木(共存木)と、同じ樹種でヤマモガシと共存しない樹木(単独木)における成熟葉のアルミニウムやマンガン濃度を比較すると、共存木で単独木より高い傾向にあった。また、元素濃度の一斉分析の結果について主成分分析を行ったところ、共存木の元素濃度はヤマモガシの葉の濃度に近づいていることが示された。影響を受けている元素は多価カチオンが中心であったことから、ヤマモガシが低リン条件下で形成したクラスタ根から分泌した有機酸が可溶化した多価カチオンが、根圏を共有する植物によって吸収された結果であると推察された。