

海底熱水系から得られたウイルスの精製

岩山 幸弘 (筑波大学 生物学類 4年)

指導教官：桑原 朋彦 (筑波大学 生物科学系)

導入：

当研究室が水曜海山の海底熱水系から得た *Thermococcus* sp. TS1 は超好熱性 Archaea の 1 種であり、16S rDNA 配列から *T. stetteri* や *T. kodakaraensis* に近縁であることがわかっている。TS1 は、他の *Thermococcus* とは異なり、培養液中のほとんどの細胞が成長末期には、球菌から細胞内が透けて見える透明菌に変化する (図 1)。透明菌体内には、DNA 染色性のケイ光試薬で染色される、菌体直径の 1/6 から 1/5 のサイズのスポットが形成される (図 1)。本研究では、電子顕微鏡観察結果から、透明菌体内のスポットはウイルスであると考え、このウイルスの精製を試みた。

材料及び方法：

スポットは透明菌体外に出てもケイ光顕微鏡で観察が可能であった。本研究ではこれを twinkler と名づけ、精製した。TS1 を *Thermococcus medium* を用いて培養 (120 ml、90°C、14 時間) して透明菌リッチな培養液を得た。培養液を超音波処理後、遠心 (10,000 rpm、4°C、10 分) し、その上清を超速心 (30,000 rpm、4°C、60 分) し、沈殿として twinkler を集めた。twinkler は 1 ml の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM MgSO₄/3.0% (w/v) NaCl で suspend し、DNase I 及び RNase A で処理した (各々 20 mg/ml、60 分、37°C)。これに 1 ml のクロロホルムを加え 2 層分配の上層を採取した。新しい 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM MgSO₄/3.0% (w/v) NaCl を中間層に加えて再度 2 層分配を行い、上層を採取して前の上層に加えた。これを Starting Material (SM) とし、シヨ糖密度勾配遠心 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM MgSO₄/3.0% (w/v) NaCl 中、各 2 ml の 40、30、20、10% sucrose (w/v)、15,000 rpm、45 分) にかけて。得られた fraction を 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM MgSO₄/3.0% (w/v) NaCl で希釈後、超速心で沈殿させ、再度、シヨ糖密度勾配遠心にかけて精製した。

結果及び考察：

電子顕微鏡観察では、スポットは直径約 50 nm の dense particle のクラスターとして認められた。また、菌体内は、dense particle 以外はほとんど空白であることから、透明菌は死菌であることが示唆された。更に、培養過程において培養液中の ATP 濃度を測定すると、ATP 量の推移は球菌の成長曲線とほぼ一致した。一方、透明菌が増加すると球菌及び ATP 量は共に減少した (図 2)。この結果は、透明菌が死菌であることを支持する。

シヨ糖密度勾配遠心後、各層の界面及び沈殿直上に注射器を突き刺し、それぞれ 1 ml の fraction を回収した (図 3a)。ケイ光顕微鏡観察では 10/20%、20/30%、30/40%、および沈殿直上画分に、下方ほど大きな twinkler が観察された。位相差顕微鏡観察では twinkler は黒色のチラチラするものとして認識された。各 twinkler 画分とも同様の吸収スペクトルを示した (図 3b)。これらの結果は、シヨ糖密度勾配遠心では twinkler は dense particle のクラスターの大きさによって分離されていることを示唆する。

twinkler 含有画分の SDS-PAGE では、いずれも 70 kDa から 30 kDa に 10 本のバンドが観察された。これらのうち、いくつかあるいは全てがウイルスの構成要素であると思われる。これらの事実から、ウイルスはほぼ精製されたと考えられる。しかし、アガロースゲル電気泳動では、使用した条件下では、核酸のバンドは検出できなかった。今後は、ウイルスゲノムを構成する核酸バンドの検出を目標とする。ウイルス粒子の抗体を作成し、同様な dense particle のクラスター (ウイルス様粒子) が観察されている *Cyptomonas* (真核藻類の一種) のヌクレオモルフ (共生核) との反応性を見る。また、環境中の水圏では sherial なウイルス様粒子が generalized transduction に関与しているとの報告があることから、TS1 から大腸菌への遺伝子伝達を試みる。

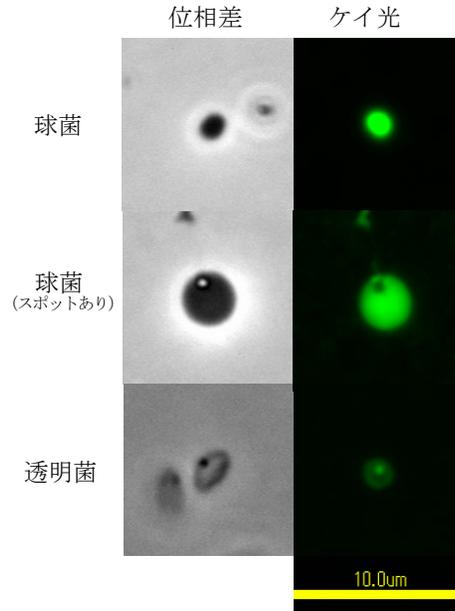


図 1 TS1 の顕微鏡写真
左：位相差顕微鏡 右：ケイ光顕微鏡

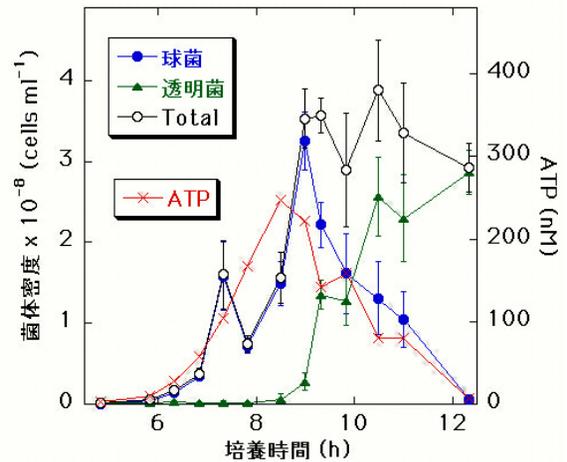


図 2 TS1 の成長曲線と ATP 量の推移

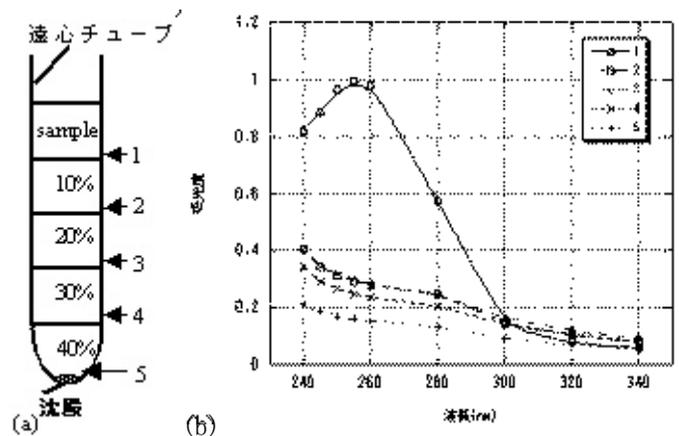


図 3 シヨ糖密度遠心 fraction の採取法と吸収スペクトル
(a) 重層の様式と各 fraction の採取位置 (b) 各 fraction の吸収スペクトル