

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580270

研究課題名(和文) シオミズツボワムシ腸管内における魚病細菌の病原性関連遺伝子群の解析

研究課題名(英文) Analysis of the virulence related genes on the fish pathogenic bacteria residing in the rotifer intestine

研究代表者

菅 向志郎 (SUGA, Koushirou)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：60569185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：シオミズツボワムシを介して仔魚に疾病を引き起こす魚病細菌の発症機構を解明するため、ワムシと魚病細菌の関係について研究を行った。実験に用いた細菌(*A. hydrophila*、*E. tarda*、*P. damusela*、*P. plecoglossicida*、*V. anguillarum*、*V. ichthyenteri*)は、パルスフィールドゲル電気泳動によるジェノタイプング法で分類して最適株を選択した。ワムシ培養液に魚病細菌を添加した結果、培養液1ml当たり4乗の魚病細菌を添加してもワムシの生活史に影響がないこと、ワムシ1個体当たり $3.67E+2$  CFUの細菌が取り込まれることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pathogenic mechanism caused by oral administration of fish pathogenic bacteria via the rotifer *Brachionus plicatilis* in larval fish, that the present study investigated the relationship between the bacteria and *B. plicatilis*. The bacteria strains, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damusela* subsp. *piscicida*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ichthyenteri*, used at this study were selected by Pulsed-field Gel Electrophoresis genotyping method. The results from the addition of the bacteria into the culture of *B. plicatilis* showed that  $1.0E+4$  cells / ml of the bacteria did not affect their life span, fecundity, and hatching rate of amictic eggs, and an individual rotifer contained  $3.67E+2$  CFU of bacteria in their intestine.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病細菌 動物プランクトン

### 1. 研究開始当初の背景

魚介類の種苗生産において仔魚期に細菌等の疾病が発生すると、急激な大量斃死が発生することで経済的に甚大な損失となるだけでなく、その後の計画的な種苗生産の実施に対する阻害要因となっている。このため仔魚期の疾病による減耗を防ぎ、安定的な種苗生産技術を確立することが重要である。細菌性疾病の発症機構について、成魚については多くの知見が蓄積されているが、仔魚については不明な点が多い。また、成魚と仔魚に同様の疾病を引き起こす魚病細菌は知られておらず、仔魚に腸管白濁症を発症させる *Vibrio sp.* INFL は、成魚に同様の疾病を発症させないこと、浸漬法では疾病を発症せず、シオミズツボワムシ（以下ワムシと略す）を介した経口投与により仔魚において病気を再現できることが報告されている。また、エドワジエラ症などの成魚に疾病を引き起こす細菌は、飼育水が殺菌されている仔魚飼育槽に混入する可能性は低いが、開放培養されているワムシ培養槽に混入し、ワムシ腸管内に取り込まれた状態の本細菌を仔魚が摂取している可能性があるが、本疾病は仔魚で確認されていない。この違いは、仔魚と成魚でこれらの細菌類の接触様式が異なることに起因している可能性がある。これらの知見から「ワムシに取り込まれた細菌は、自らの代謝経路をワムシ腸管内の環境に対応させ、これに起因して病原性関連遺伝子群の発現もしくは抑制が制御されることで、ワムシを摂餌する仔魚と摂餌しない成魚とで細菌性疾病の発症が異なる」との可能性に着目したのが本研究である。

### 2. 研究の目的

「魚に病気を発症させる細菌は、仔魚と成魚で共通な細菌があまりいないのはなぜか」という問に明確な答えは出していない。本研究は、仔魚と成魚で魚病細菌との接触様式が異なることが、魚病を発症させるか否かを定める一因であると考え、種苗生産における仔魚期にのみ用いられるワムシに着目した。ワムシの腸管内に取り込ませた魚病細菌と通常の培地で培養した魚病細菌のタンパク質発現パターンを網羅的に比較し、発現の異なるタンパク質と魚病細菌が生産する病原性物質との関連を明らかにすることで、細菌性疾病の発症機構の一端を解明することを本研究の目的とした。そこで、(1) 魚病細菌のワムシに対する病原性の有無、(2) PFGE による全ゲノム DNA を用いたジェノタイプングによる魚病細菌の解析、(3) ワムシに取り込ませた魚病細菌の挙動および発現タンパク質解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1: 魚病細菌がワムシの生活史に与える影響

96 ウェルプレート of 1 ウェルあたり、雌ワムシ 1 個体を収容した。培養水には人工海水 (18 ppt) を用い、無菌クロレラを最終濃度が  $4.0E+6$  cells/mL となるように給餌した。濁度測定で調製した菌液は人工海水を用いて希釈し、菌濃度が  $1.0E+4$ 、 $1.0E+6$ 、 $1.0E+8$  CFU/mL になるように調製して培養水を作製した。この培養水を 200  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートの 1 ウェルにいれ、無菌区には、菌液の代わりに人工海水を加えた。全ての試験区において、ワムシを 12 個体ずつ供試し、24 時間毎に培養水を交換し、8 時間毎に死亡個体数、産仔数、未孵化卵率を計数した。これらのデータをもとに平均寿命、平均産卵数、孵化率を算出した。統計処理には R Ver 2.14.1 の Tukey-test を用い、有意水準は 0.05 とした。

#### 実験 2: PFGE による最適菌株の選択

申請者の研究室に多くの菌株が保存されているエドワジエラおよびレンサ球菌を低融点アガロースで包埋し、Lysozyme および Proteinase K により DNA を精製し、DNA ゲルプラグを作成した。DNA ゲルプラグは TE Buffer で洗浄した後、1 mM PMSF にて処理することで Proteinase K を不活化した。処理済み DNA ゲルプラグを適量切り出し、制限酵素緩衝液で bufferize した後、制限酵素により消化した。制限酵素処理 DNA ゲルプラグは、1% Pulse Field Certified Agarose、泳動装置には CHEF-DR III を用いて電気泳動を行った。各菌株の制限酵素消化 DNA 断片のパターンを解析し、菌株を分類した。

#### 実験 3: ワムシの腸管内に取り込ませた魚病細菌と通常の培地で培養した魚病細菌の比較

ワムシ培養液に添加することでワムシ腸管に取り込ませた *V. ichthyenteri* および人工培地で培養した *V. ichthyenteri* で発現しているそれぞれのタンパク質の差異解析を行うことにより、動物プランクトンの腸管内で特異的に発現量が変化している病原性関連タンパク質群を解析した。まず、ワムシ腸管内からの *V. ichthyenteri* およびワムシが腸管内に取り込んで飼育水中に排出した *V. ichthyenteri* の回収法を検討し、これら細菌の SDS-PAGE によるタンパク質解析を行った。また、本菌がワムシに摂餌されて腸管内に取り込まれているか SDS-PAGE による確認を行い、ワムシ腸管内で消化されることなく生存しているか TCBS 寒天培地を用いた生菌数測定で調べた。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1

すべての魚病細菌は、菌濃度  $1.0 \times 10^4$  cells/mL において対照区と比較し、ワムシの平均寿命、平均産卵数、孵化率に有意な差が無かったことから、本菌濃度はワムシ生活史に影響を与えないことが明らかとなった。また、類結節症を発症する細菌は終濃度  $1.0 \times 10^6$  cells/mL 以上でワムシ単性卵の孵化率を大きく阻害することが分かった。

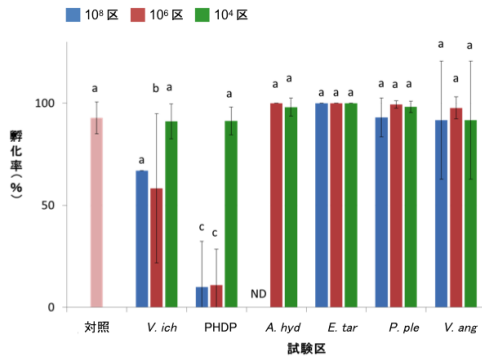


図 4. 各試験区の平均孵化率  
各カラムは試験区の平均値、バーは標準偏差、アルファベットは統計的な有意差を表す。  
ND = No Data, Fisher-PLSD,  $p < 0.0001$ ,  $a > b > c$ ,  $n = 1 \sim 19$

##### 実験 2

DNA ゲルプラグの調製、制限酵素処理、泳動条件を最適化した結果、低融点アガロースの終濃度は 0.8%、制限酵素処理は ROTARY MIXER を用いて 20/N 消化することが最適であった。また、PFGE の条件は、 $0.5 \times$  TBE Buffer、泳動時間 18 時間、変動パルスタイム、パルス角度  $120^\circ$ 、水温 14 により制限酵素消化 DNA 断片の分離が良いことを見出した。エドワジエラのジェノタイプは、BSI 解析により大きく 3 つに分類でき、実験に用いる菌株を効率よく選出する手法を確立した。また、本細菌の強毒株と弱毒株は遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。

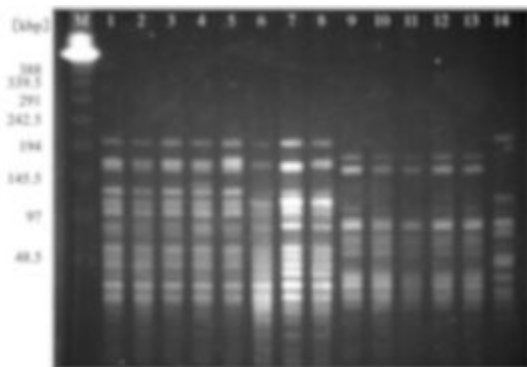


図 5. E. tarda 菌株の PFGE パターン

##### 実験 3

ワムシを破碎して遠心分離やフィルターを用いて取り出した *V. ichthyenteri* の試料からワムシの残渣由来のタンパク質バンドのみが検出され、*V. ichthyenteri* 特有のバンドは確認できなかった。また、無菌ワムシの試料は薄くバンドが確認できたが、比較できるタンパク質バンドは見当たらなかった。よって、今回用いた方法では、魚病細菌を取り込んだワムシを破碎もしくは腸管に取り込んで排出した魚病細菌をタンパク質解析が可能な量として効率よく分取することは困難であった。今後の課題として、より多くのワムシを用いて腸管内の細菌を分取する手法を検討する必要がある。

ワムシと細菌を分離せずに、 $1.0 \times 10^9$  cells/mL の菌液を含む汽水で 24 時間飼育したワムシを破碎して SDS-PAGE に供した結果、魚病細菌のタンパク質バンドが確認出来た。また、この破碎液の濁度から推定した菌数および人口培地に塗布して計数した菌数は、それぞれ、ワムシ 1 個体あたり  $5.45 \times 10^4$  cells、 $3.67 \times 10^2$  CFU であった。本結果より、ワムシ腸管内に取り込まれた *V. ichthyenteri* のうちの約 1% が TCBS 培地にコロニーを形成する能力を有しており、ワムシが摂餌した菌は腸管内において短期間で完全に消化されることはないが、コロニー形成能が低下することが明らかとなった。

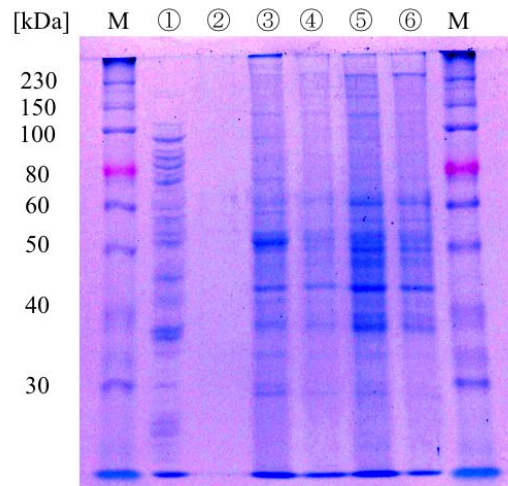


図 6. ワムシが腸管内に取り込み排出した *V. ichthyenteri* の SDS-PAGE 像  
(アクリルアミド濃度 10% 分離ゲル)

M: Marker ①: *V. ichthyenteri*  
②: ワムシが腸管内に取り込み排出した *V. ichthyenteri*  
③: 腸管内 *V. ichthyenteri* 15,000 rpm ④: 腸管内 *V. ichthyenteri* 3,000 rpm  
⑤: 腸管内 *V. ichthyenteri* 2,500 rpm ⑥: 腸管内 *V. ichthyenteri* 1,500 rpm

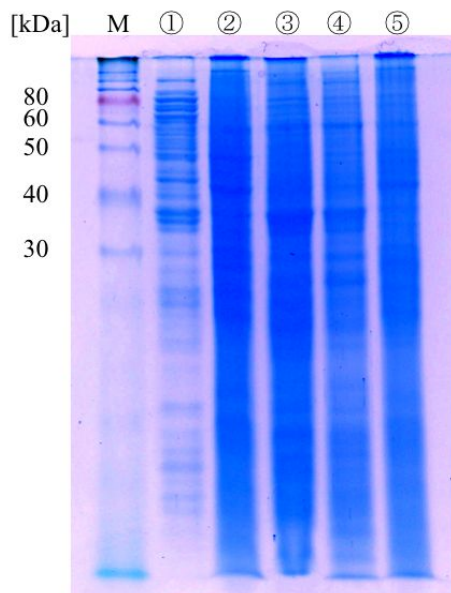


図. ワムシ腸管内に6および24時間取り込ませた *V. ichthyenteri* の SDS-PAGE 像 (アクリルアミド濃度15%分離ゲル)

M: Marker ①: *V. ichthyenteri*  
 ②: *V. ichthyenteri* を添加して6時間後の飼育水中全ワムシ  
 ③: *V. ichthyenteri* を添加して24時間後の飼育水中全ワムシ  
 ④: *V. ichthyenteri* を添加して24時間後の飼育水中の遊泳ワムシのみ  
 ⑤: 無菌ワムシ

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) T. Rahman, K. Suga, K. Kanai, Y. Sugihara : Biological and Serological Characterization of a Non-gliding Strain of *Tenacibaculum maritimum* Isolated from a Diseased Puffer Fish *Takifugu rubripes*. Fish Pathology (査読有) 49 (3), 121-129 (2014) DOI: 10.3147/jsfp.49.121

(2) 菅 向志郎、阪倉 良孝、萩原 篤志 : 動物プランクトンの分子生物学手研究成果の環境修復への展開 . 海洋と生物 Aquabiology (査読無) 35, 42-46 (2013)

[学会発表](計3件)

(1) T. Rahman, K. Suga, K. Kanai, Y. Sugihara : Kinetics of Infection of a Gliding and Non-gliding Strain of *Tenacibaculum maritimum* on the Abraded Skin of Japanese Flounder 平成26年度日本魚病学会秋季大会、2014年9月23日「九州大学中央図書館視聴覚ホール(福岡県・福岡市)」

(2) 松崎 祐佳、菅 向志郎、金井 欣也 : パルスフィールドゲル電気泳動による *Edwardsiella tarda* のジェノタイピング . 平成26年度日本魚病学会春季大会、2014年3月30日「函館国際ホテル(北海道・函館市)」

(3) 菅 向志郎 : 動物プランクトンの分子生物学的研究成果の環境修復への展開 テクノオーション2012 オーガナイズドセッション 豊かの海を知る、守る、活かす、2012年11月19日「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅 向志郎 (SUGA, Koushirou)  
 長崎大学・  
 水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授  
 研究者番号: 60569185

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

金井 欣也 (KANAI, Kinya)  
 長崎大学・  
 水産・環境科学総合研究科(水産)・教授  
 研究者番号: 40145222