

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06212

研究課題名(和文)多座位遺伝子タイピングと表現型に基づくシロサケ種苗由来冷水病菌の多様性解析

研究課題名(英文) Studies on diversity of *Flavobacterium psychrophilum* from *Oncorhynchus keta* fry as revealed by Multilocus Sequence Typing and their phenotypes

研究代表者

笠井 宏朗 (Kasai, Hiroaki)

北里大学・海洋生命科学部・特任教授

研究者番号：00221870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：岩手県内のサケマス孵化場で虚弱な遊泳を示したシロサケ稚魚の鰓、体表、腎臓から20種131株を分離培養した。そのうち、16株を *Flavobacterium psychrophilum* と同定し、7種類の遺伝子に基づく多座位遺伝子タイピング法で遺伝的多様性を解析した。その結果、5株が新規な遺伝子型を示した。また、PCR法によってシロサケ仔魚飼育槽内における冷水病菌の検出を行ったところ、ミスカビ感染卵や仔魚床の表層に冷水病菌が高濃度に検出された。新規遺伝子型株の表現型の比較によって、疎水性表面への付着能に違いが認められた。疎水表面付着株は稚魚の飼育環境でバイオフィルムを形成する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロサケは北海道と岩手県を中心に年間14億尾以上の稚魚がサケ孵化場で生産放流されている最重要魚種であるにも関わらず、健康な放流種苗の生産に影響する冷水病の原因菌種についての系統的な遺伝子型の解析例はなかった。岩手県水産技術センターでは、海況が変動する中でも母川回帰する頑健な稚魚の生産するために、県内のさけます孵化場における放流用稚魚の飼育の履歴を詳細に調査し、冷水病の発生状況についても実態を把握している。我々は、冷水病菌及びその類縁菌の解析結果をデータベースに蓄積すると共に生産現場にフィードバックすることによって、東日本大震災津波被災以前から低迷している親魚の回帰率向上に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Chum salmon is an important species for coastal fisheries in Hokkaido and Sanriku area, Japan. However, studies on the genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* are limited. We isolated 131 strains of 20 species from the gills, body surface, and kidney of juveniles that showed frail swimming at a salmon hatchery in Iwate Prefecture. Among them, 16 strains were identified as *F. psychrophilum*, and genetic diversity was analyzed by Multi-Locus Sequence Typing based on 7 kinds of genes. As a result, five strains showed novel genotypes. In addition, cold water disease was detected in the white salmon larva breeding tank by the PCR method, and a high concentration of *F. psychrophilum* was detected on the surface layer of the larval fish bed and the eggs infected with the mold. A phenotypic comparison of the newly isolated strains revealed the ability to adhere to hydrophobic surfaces. Hydrophobic surface-adhering strains may form biofilms in juvenile rearing environments.

研究分野：微生物学

キーワード：シロサケ 健苗生産 冷水病菌 遺伝的多様性 バイオフィルム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冷水病菌 (*Flavobacterium psychrophilum*) は世界的な規模でサケ科魚類の増養殖生産に多大な影響を与えている。冷水病菌の遺伝的多様性や増殖や感染性等の表現型の情報はワクチンや薬剤処理等の対策を検討する上で必要不可欠である。本研究は、冷水病菌の採集、MLST 解析や表現型解析、さらには、全ゲノム情報に基づいた冷水病菌の進化研究や疫学研究をもとに、最終的には冷水病対策に貢献することを目指した。

本研究で研究対象とするシロサケ (*Oncorhynchus keta*) は北海道と岩手県を中心に年間 14 億尾以上の稚魚がサケ孵化場で生産放流されている最重要魚種であるにも関わらず、シロサケ由来の冷水病菌についての系統的な遺伝子型の解析例はまだなかった。冷水病菌が淡水性であることから母川回帰した成魚が遡上前に河口で感染すると考えられていたが、河口に入る前の成魚の体腔液から冷水病菌が採取されたという報告もあり、その生態についても不明な点が多い。既存の冷水病菌の MLST 解析データは、データベース (BIGSdb) に集約され、疫学研究、進化研究、生態学的研究に活用されている。そこで、本研究課題でシロサケ種苗から採集する冷水病についても MLST データを取得することにより、国内のサケマス孵化場で感染が常態化している冷水病菌の進化研究や疫学研究を加速的に進展させるための有用な情報基盤としたい。

2. 研究の目的

岩手県内のシロサケ種苗及びその生産拠点で蔓延している冷水病菌の遺伝的多様性を明らかにすると共に増殖特性や感染性等の表現型を詳細に調査し、年度や地域による優占種の遺伝子型と表現型の違いを明らかにするために基礎データを収集し、情報基盤を構築する事を目的として実施した。

3. 研究の方法

冷水病菌の単離と培養

岩手県水産技術センター 熊野川試験孵化場 (GPS: 39.191352898357934, 141.8621057015371、岩手県釜石市唐丹町) で放流試験用に飼育されていた稚魚のうち、飼育槽の下流域で飼育水に流される等、虚弱な遊泳を示した稚魚、尾柄部に病変部を持っていた稚魚を分離源として冷水病菌を単離した。体表、鰓、腎臓の拭い液を 5 µg/ml のトブラマイシンを含んだ TYES 寒天培地 (0.4% Bacto-Tryptone、0.04% Bacto-Yeast Extract、0.05% CaCl₂ · 2H₂O、0.05% MgSO₄ · 7H₂O、1.0% 寒天粉末) 表面に塗布して、15 度で 1 週間程度保温して、出現したコロニーを釣菌した。単コロニーから InstaGene Matrix (BioRad) を用いて DNA 粗抽出液を調製し、ロタマーゼ遺伝子を標的としたプライマー (fpPPICF; 5'-GTACCATGATACAGTCAGGTTTTTATACCA-3'、fpPPIC-R; 5'-GCGTTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCG-3') を用いた PCR 法によって、冷水病菌候補株を選抜した。*F. psychrophilum* の培養には、50 mL のカルチャーフラスコを用い、10 mL の TYES 液体培地で 15 度、5~7 日間、20 rpm で振盪培養した。

ゲノム DNA の調製と Multilocus sequence typing (MLST)

単離した菌株を 1.0 mL の TYES 液体培地で培養して得られた菌体から、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて DNA を調製した。MLST のための PCR は、Fujiwara-Nagata らが 2013 年に発表した方法を用いた。1 µL の DNA を鋳型として 7 種類の遺伝子断片

(*trpB*, *gyrB*, *dnaK*, *fumC*, *murG*, *tuf*, *atpA*)を既報のプライマー及び TaKaRa Ex Taq (Takara) を用いて増幅した。増幅条件は、既報の通りとした。増幅断片を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製した。40 ng の精製した PCR 産物を鋳型として塩基配列を決定した。塩基配列決定は、AZENTA 社に委託した。得られた 7 種類の遺伝子の塩基配列の解析は、PubMLST データベースが提供している解析ツールを利用して行った (<https://pubmlst.org/organisms/flavobacterium-psychrophilum/>)。

系統解析

分離株の同定には *gyrB* 遺伝子の塩基配列を利用し、*F. psychrophilum* の種内の関係については、MLST で得られた 7 種類の遺伝子の塩基配列を連結して解析に用いた。いずれの系統解析においても、塩基配列を ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) でアラインメントした。アラインメントのパラメーターは初期設定値を使用した。系統解析には MEGA X version 10.1.8 を用いた。系統関係の推定は、最尤法と田村-根井モデルを使用して推定し、対数尤度が最も高い樹形を検索した。枝分かれの信頼度は、1000 回のブートストラップ法によって推定した。ヒューリスティック検索の初期ツリーは、田村-根井モデルを使用して推定されたペアごとの距離の行列に近隣結合および BioNJ アルゴリズムを適用し、優れた対数尤度値を持つ樹形を選択した。

仔魚飼育槽における冷水病菌の検出

gyrB 配列をもとに、*F. psychrophilum* を特異的に検出するプライマー(順方向プライマー; 5'-AAAGCAAATAGGCGAAACGA-3'、逆方向プライマー; 5'-AAAACCTTGCAAATGCGTTC-3')をデザインした。プライマーのデザインには、Primer 3 plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)を用いた。デザインしたプライマーを用いて、浮上槽に流入水、流出水及び仔魚床の表層から調製した DNA を鋳型とした PCR を行った。DNA の調製には、InstaGene Matrix (BioRad)、PCR 反応には、KOD One PCR Master Mix (東洋紡)を用いた。増幅は、94 度、2 分の初期変性後、98 度、10 秒、65 度、5 秒、68 度、1 秒からなる増幅反応を 30 回繰り返した。増幅産物は、電気泳動法によって確認した。

4. 研究成果

サケマス孵化場から単離した冷水病菌及び類縁菌の同定

岩手県内のサケマス孵化場で虚弱な遊泳を示したシロサケ稚魚の鰓、体表、腎臓から 131 株を分離培養した。ロタマゼ遺伝子を標的とした PCR 法によって、冷水病菌候補株を 49 株選抜した。それらの *gyrB* 遺伝子の部分塩基配列を決定し、分子系統解析を行った結果を図 1 に示した。*gyrB* 遺伝子に基づく分子系統解析で分類されたグループについて、塩基配列から翻訳されたアミノ酸配列による類似性解析によって種を同定した (表 1)。サケ科魚類の病原菌種として、*F. psychrophilum* だけでなく、*F. tructae* (= *F. spartansii*) (20FP44、20FP46、20FP56、20FP86) が含まれており、今後シロサケ稚魚生産現場においても注視する必要があることが示唆された。

表 1. GyrB アミノ酸配列に基づく同定結果

株番号	種名	アミノ酸配列長 ^a	一致したアミノ酸配列長 ^b	類似度 b/a * 100 (%)
20FP01	<i>Flavobacterium ercivesense</i>	401	399	99.50
20FP02	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	401	401	100.00
20FP03	<i>Flavobacterium muglaense</i>	401	401	100.00
20FP09	<i>Flavobacterium soli</i>	400	379	94.75
20FP14	<i>Flavobacterium hercynium</i>	400	395	98.75
20FP15	<i>Flavobacterium branchiicola</i>	400	395	98.75
20FP29	<i>Flavobacterium chilense</i>	400	399	99.75
20FP31	<i>Flavobacterium bernardetii</i>	400	396	99.00
20FP32	<i>Flavobacterium sangjuense</i>	400	381	95.25
20FP35	<i>Flavobacterium hibernum</i>	400	400	100.00
20FP36	<i>Flavobacterium chilense</i>	400	399	99.75
20FP42	<i>Flavobacterium ginsenosidimutans</i>	400	397	99.25
20FP44	<i>Flavobacterium tructae</i>	400	399	99.75
20FP56	<i>Flavobacterium tructae</i>	400	398	99.50
20FP57	<i>Flavobacterium omnivorum</i>	401	398	99.25
20FP58	<i>Flavobacterium aquariorum</i>	401	401	100.00
20FP60	<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	401	394	98.25
20FP61	<i>Flavobacterium kayseriense</i>	401	392	97.76
20FP64	<i>Flavobacterium aquatile</i>	400	399	99.75
20FP66	<i>Chryseobacterium aquaticum</i>	399	399	100.00
20FP69	<i>Flavobacterium muglaense</i>	401	401	100.00
20FP70	<i>Flavobacterium kayseriense</i>	401	393	98.00
20FP86	<i>Flavobacterium tructae</i>	400	399	99.75
20FP87	<i>Flavobacterium difficile</i>	400	398	99.50

シロサケ稚魚由来冷水病菌の遺伝的多様性

本研究で単離したシロサケ由来の冷水病菌と他機関に保存されていた冷水病菌の MLST 結果を表 2 に示した。シロサケ由来の 21FP01 株の *trpB*、21FP22 株の *atpA* に見いだされた遺伝子型は冷水病菌の MLST データベースに登録がない遺伝子型を持つ株であることが明らかになった。

表 2. 本研究で取得した株の遺伝子型

Strain No.	Source	<i>atpB</i>	<i>dnaK</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>murG</i>	<i>trpB</i>	<i>tuf</i>
20FP02	<i>O. keta</i>	4	6	5	7	6	4	8
21FP01	<i>O. keta</i>	4	4	2	37	25	-	18
21FP22	<i>O. keta</i>	-	8	7	19	25	11	9
23G5	<i>O. keta</i>	14	9	9	68	32	41	18
23K1	<i>O. keta</i>	14	9	9	68	32	41	18
CW-8	<i>O. mykiss</i>	2	2	2	8	2	2	2
CW-1w	<i>O. mykiss</i>	2	15	5	-	23	-	-
CW-ot	<i>O. mykiss</i>	-	33	5	20	6	-	54
NBRC111643	<i>Plecoglossus altivelis</i>	4	4	4	24	2	5	4
NBRC109952	<i>Plecoglossus altivelis</i>	4	4	4	24	2	5	4
NBRC108951	<i>Plecoglossus altivelis</i>	4	4	4	24	2	5	4
NBRC108952	<i>O. masou</i>	-	8	-	23	18	-	-
NBRC100250	<i>O. kitsuch</i>	4	6	5	7	6	4	8

-; 冷水病菌の MLST データベースに登録のなかった遺伝子型

7 種類の遺伝子を連結した塩基配列 (6, 695 塩基) に基づく冷水病菌の種内の系統関係を図 2 に示した。飼育水の水源が同一でも、複数の遺伝子型を示す冷水病菌が単離されたこと、受精卵の履歴と単離された冷水病菌に相関があることが示唆された。

仔魚飼育槽内の冷水病菌の特異検出

本研究で収集したシロサケに由来する冷水病菌の *gyrB* 遺伝子の塩基配列に見いだした冷水病菌

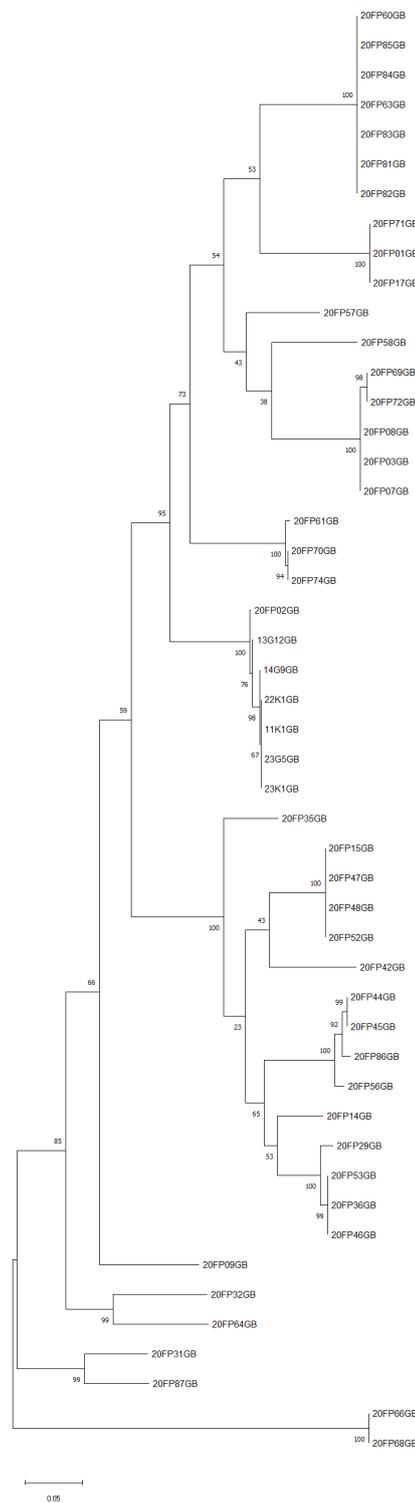


図 1. 虚弱なシロサケ稚魚から単離した 49 株の *Flavobacterium* 属細菌の系統樹。 *gyrB* 遺伝子の部分塩基配列 (1197-1203 塩基) に基づいて系統関係を推定した。類縁属の 20FP60GB と 20FP68GB を外群とした。サイトごとの置換数で測定された系統樹の枝長は縮尺左下に示した。

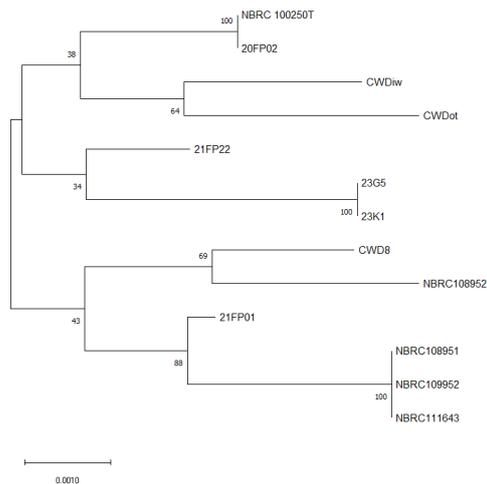


図 2. 7 種類の遺伝子の連結塩基配列に基づく冷水病菌の系統樹
サイトごとの置換数で測定された系統樹の枝長は縮尺左下に示した。

に特異的な配列にもとづく PCR プライマーを用いてシロサケ仔魚飼育槽内における冷水病菌の検出試験を行った。図 3 に示したように、仔魚飼育槽に流入する水からは冷水病菌は検出されなかったが、流出する水からは、冷水病菌の存在を示唆する PCR 産物が検出された。仔魚飼育槽内は仔魚床としてネットリングと呼ばれるポリプロピレン製の土木資材が 6 槽敷き詰められている。流入した水は最下層の仔魚床から最上層に向けて流出していた。最下層の仔魚床には、死仔魚やミズカビが感染した受精卵がひっかかっていた。本研究では、仔魚床の表面だけでなく、死仔魚やミズカビ感染卵における冷水病菌の検出を試みたところ、最上層の仔魚床表面と最下層にあったミズカビ感染卵から冷水病菌が検出された。このことは、冷水病菌が流入している水よりもミズカビ感染卵に高濃度に存在していること、それらは流水によって仔魚槽内を流れ最上層の仔魚床の表面にも付着していることを示唆していた。

本事業で単離した冷水病菌の中には、図 4 に示したように疎水表面に付着能を持つ冷水病菌株が含まれており、これらの冷水病菌株がバイオフィルムを形成し、さらなる感染原因となることが考えられた。今後、シロサケの仔魚、稚魚の飼育環境において、さらに詳細な冷水病菌やその他感染性の菌種をモニタリングすることによって、健康なシロサケ種苗の生産に寄与する情報を生産現場にフィードバックすることができると考えられる。

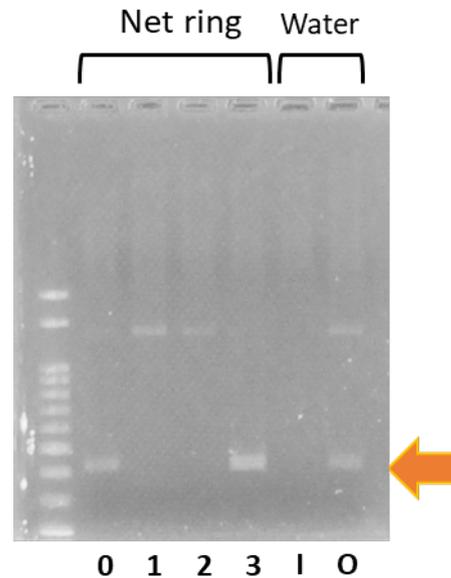


図 3. 仔魚飼育槽内の冷水病菌の検出
冷水病菌由来の増幅産物の泳動位置を矢印で示した。レーン 0、1、2、3 は仔魚床の表面層；レーン I は飼育槽への流入水、レーン O は飼育槽からの流出水を示した。レーン 0；最上層の仔魚床、レーン 1；レーン 2；最下層の仔魚床にひっかかった死仔魚の体表面、3；最下層の仔魚床にひっかかったミズカビ感染卵の表面。

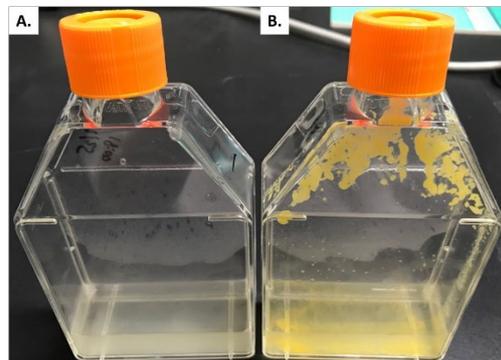


図 4. 冷水病菌が示した疎水表面付着能
シロサケ種苗由来の冷水病菌をポリスチレン製カルチャーフラスコで振盪培養したところ、21FP01 株はポリスチレン表面への付着は観察できなかった (A) が、21FP22 株はポリスチレン表面に付着して急速に増殖する様子が観察された (B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 笠井宏朗	4. 巻 5
2. 論文標題 MLST法によるシロサケ稚魚冷水病菌の遺伝的多様性（続報）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoon J, Yasumoto-Hirose M, Kasai H.	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification and classification of <i>Croceivirga thetidis</i> sp. nov., a marine Flavobacteriaceae isolated from the hard coral <i>Acropora</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antonie Van Leeuwenhoek	6. 最初と最後の頁 1407-1416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10482-021-01611-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Orui Sakaguchi S, Ikuta T, Tame A, Shimizu Y, Takishita K, Nagano Y, Kasai H, Fujikura K	4. 巻 546
2. 論文標題 Infection of oomycetes and bacteria associated with their specific colocalization in chum salmon eggs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 737244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2021.737244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kasai H, Takahashi Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Marinhabitans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9781118960608.gbm01948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 笠井宏朗	4. 巻 4
2. 論文標題 MLST法によるシロサケ稚魚冷水病菌の遺伝的多様性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 46-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------