

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580291

研究課題名(和文) 比較メタゲノム解析とマイクロアレイを活用したアコヤガイ赤変病の病原体究明

研究課題名(英文) Determination of causative agent of akoya oyster disease by combination of NGS-based shotgun metagenomic sequencing and DNA array technology.

研究代表者

松山 知正 (Tomomasa, Matsuyama)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員

研究者番号：20372021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ショットガンメタゲノム解析と、マイクロアレイによるスクリーニングを組み合わせ、アコヤガイ赤変病の原因微生物の特定を試みた。

病貝および健常貝の血リンパ液の超遠心沈渣より抽出したDNAを解読し、病貝の配列から健常貝と共通する配列を差し引き、76,542配列を得た。相同性検索を行ったところ、大部分は真正細菌に相同性を示し、ウイルスに相同な配列は稀であった。得られた配列を元にDNAマイクロアレイを作成し、病貝2個体と健常貝2個体をスクリーニングしたところ、病貝に共通して検出され健常貝では検出されない配列は1890配列まで絞りこまれた。これらの細菌群に病原体由来の配列が含まれると考えている。

研究成果の概要(英文)： We attempted to determine the causative agent of akoya oyster disease by combination of NGS-based metagenomics and DNA array technology.

Shotgun metagenomic sequences of hemolymph were obtained from diseased and healthy oyster. Common sequences in diseased and healthy oyster were subtracted from the sequences from diseased oyster, and remaining 76,542 sequences were analyzed by Blast homology search. A large portion of the sequence shows homology to eubacteria, but sequences homologous to the animal virus was rare. Candidate sequences of pathogen were narrowed to 1,890 by using DNA microarray that constructed from subtracted 76,542 sequences.

研究分野：魚病

キーワード：赤変病 メタゲノム アコヤガイ

1. 研究開始当初の背景

貝類においても感染症が疑われる死亡事例は多くあるが、病原体が特定された例は少ない。これは、貝類の生体内に多数常在する無害な細菌やウイルスに病原体が隠されてしまい、病原体を特定することが出来ないためである。ウイルスの分離に必要な培養細胞がないことも病原体の特定を難しくしている。そのため、二枚貝の細菌性・ウイルス性疾患では病原体を特定できないことが多い。本課題で研究モデルとするアコヤガイの赤変病も、申請者らの研究により細菌あるいはウイルス性の感染症であることは解っているが、病原体は特定されていない。

赤変病は 1994 年に一部の養殖場で発生し、現在では西日本各地の海域に拡大し、現在においても被害が続いている。このような状況下でアコヤガイ生産量が著しく減少するとともに、我が国の真珠養殖の特色である高品質真珠の生産が危機に瀕している。我々はアコヤガイの血リンパ液の小規模シーケンス解析を行い、13 種類のウイルス配列と 162 種類の細菌由来の配列を得ているが、いずれの配列も健康貝からも検出され、病原体特異的な配列は見つかっていない。病貝の電子顕微鏡観察でも様々な形態のウイルス様粒子が見つかっている。このことからアコヤガイの体内には極めて他種類のウイルスと細菌が存在することが解る。次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析は、環境サンプルから回収されたゲノム DNA を直接シーケンスすることで、環境中に存在する膨大な遺伝情報を網羅的に解明する手法である。体内に微生物が多く常在する二枚貝の特性を考えると、メタゲノム解析は二枚貝の未知病原体を特定する手法として有効と考えられる。また、マイクロアレイは多数の候補から目的配列を検索する優れた手法である。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析と、マイクロアレイによるスクリーニングを組み合わせ、アコヤガイの赤変病の原因微生物を特定する。

貝類養殖では、感染症によって産業が壊滅した例も珍しくない。欧米ではヒラガキが寄生虫の感染により壊滅し、フランスではマガキが、台湾ではトコブシ養殖がウイルスが疑われる感染症により危機的状況にある。病害の防除には迅速な病原体の特定が必須だが、上述のように貝類では病原体の特定は容易でない。申請課題で確立する病原体の特定手法は、その他の疾病にも応用可能と考えられ、迅速な感染症対策が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

これまでの研究で、病貝血リンパ液の 2 万 G 超遠心沈査分画に病原体が存在することが示されている。そこで、以下の様に病貝および健康貝の超遠心沈査を調整した。赤変病の発生例のない能登半島より入手した健康貝に赤変病感染貝より採取した血リンパ液を接種し、実験感染貝を作成した。実験感染貝と、健康貝より得た血リンパ液を 5000G で 5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清を 2 万 g 60 分間の超遠心に供し、病原体を含む沈査を得た。本沈査より DNA を精製し、whole genome amplification kit (Sigma) を用いて増幅した。病貝については 454 FLX、健康貝については Ion PGM シーケンサーを用いて塩基配列を解読した。病貝より得られた配列群を、アコヤガイゲノムデータベースに対して同源性検索を行い、アコヤガイを由来とする配列を除去した。さらに健康貝より得られた配列群に対して同源性検索を行い、共通する配列を除去した。残された配列群を病貝に特異的な配列と考え、Blast 解析を行った。

(2) DNA マイクロアレイによるスクリーニング

病貝の体内には極めて多様な環境性微生物が存在することから、上記のメタゲノム解析で得られた病貝特異的な配列群には、シーケンスした病貝個体に偶然含まれていた環境性の微生物を由来とする配列も多く含まれると考えられる。そこで、以下のようにして DNA マイクロアレイを用いて病原体を由来とする配列をさらに絞り込んだ。

メタゲノム解析により、病貝に特異的に得られた 76,542 配列を元に、各配列に 5 種類のオリゴプロブを設計し、約 38 万プロブを搭載した DNA マイクロアレイを作成した。由来の異なる病貝 2 個体と、健康貝 2 個体の血リンパ液より抽出した DNA を増幅し、それぞれ Cy3 で蛍光標識し、作成した DNA アレイにハイブリダイゼーションした(合計サンプル)。数値データを取得し、病貝 2 個体で共通に健康貝のいずれの個体よりも 2 倍以上の値があるスポットを陽性と判定した。一つの配列あたりに設計した 5 種類のオリゴプロブのうち、一つでも陽性であれば、その配列は病原体候補として選択した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

454 FLX シーケンサーを用いて病貝から約 120 万リード、Ion PGM シーケンサーを用いて健康貝より約 900 万リードを得た。病貝および健康貝由来の配列をそれぞれ個別にアセンブルし、それぞれ約 53 万配列および約 475 万配列に集約された。両ライブラリ から得られたリードをそれぞれ個別にアコヤ

ガイゲノムデータベースに対して相同性検索を行い、アコヤガイのゲノム配列を除去した。病員のリードを健常員リードのデータベースに対して相同性検索を行い、健常員と共通する配列を除去した。さらに200bp以下の配列を除去し、病員に特異的な76,542配列を得た。これらの配列をBlast解析したところ、約半数の34,098配列が既知の配列にヒットした。ヒットした配列のうち、61%が真正細菌に、23%が真核生物、13%が古細菌、3%がウイルスに相同性を示した。真核生物に相同性を示した23%の配列は殆どが植物プランクトンの配列であり、餌として給餌している珪藻のゲノムが何らかの形で血リンパ液に混入していると考えられた。真正細菌に相同性を示す配列群は、186科の分類群に割り当てられた。真正細菌では、Flavobacteriaceae、Vibrionaceae、Alteromonadaceae、Pseudomonadaceae、Enterobacteriaceaeの順に優先し、この5科の細菌で約45%を占めた。古細菌に相同性を示す配列群は、18科の分類群に割り当てられ、このうち96.3%がNitrosopumilaceae科に割り当てられた。Nitrosopumilaceae科に属する*Nitrosopumilus maritimus*は海洋古細菌で唯一分離培養されており、全ゲノム情報が公開されている。病員の血リンパ液中に本分類群の細菌が多く存在することは間違いなさそうだが、本分類群に多くの配列が割り当てられたのは、古細菌の中では本分類群のゲノム情報が充実していることも一因と考えられる。なお、以前は古細菌は極限環境のみに分布すると考えられていたが、*Nitrosopumilus maritimus*は水族館の水槽から分離された細菌であり、通常の中にも多く分布する。近縁の細菌は土壌中にも多く検出され、類似した細菌がアコヤガイから検出されたとしても不思議は無い。ウイルスに相同性を示す配列の91%はファージを由来とし、藻類や植物に感染するウイルスが3%、動物に感染するウイルスに相同性を示す配列は4%であった。動物ウイルス由来の配列はMegavirus, Moumouvirus, mamavirusといった巨大ウイルスに相同性を示す配列が多く得られた。これら巨大ウイルスは一般にアメーバなどの原生動物に感染すると考えられており、赤変病とは無関係と考えられる。今回解析した病原体を含む超遠心沈査に含まれるウイルスは、ファージを除いて極わずかであり、病原体がウイルスである可能性は低いと考えられた。

(2) DNA マイクロアレイによるスクリーニング

病員2個体で共通に健常員の両個体よりも反応が2倍以上高い配列、すなわち病原体由

来と想定する候補配列は、1890配列であった。メタゲノム解析では76,542配列が得られたが、マイクロアレイにより候補配列は約40分の1にまで絞りこまれた。マイクロアレイで絞り込んだ1890配列についてBlast検索を行ったところ、855配列が既知の配列にヒットした。ヒットした配列のうち、58%が真核生物、35.3%が真正細菌に、2.9%が古細菌、3.5%がウイルスに相同性を示した。シーケンスによるメタゲノム解析において、Blast解析により各生物に割り振られた配列の生物種ごとの出現頻度と、DNAアレイで陽性と判定した配列と相同性を示す生物の出現頻度を比較すると、真性細菌であるLeptotrichiaceae, Natranaerobiaceae, Acidaminococcaceae, Brachyspiraceae, Desulfurobacteriaceae, Spiroplasmataceae, Carnobacteriaceae, Spirochaetaceae科の出現頻度が10倍以上に増加していた。これらの細菌群の中に病原体が含まれると考えている。

病員血リンパ液の微生物群集構造が予想以上に複雑であったため、シーケンスとデータ解析に予定以上の費用と時間がかかり、3年目に予定していたPCRによる疫学調査は実施期間中に行うことができなかった。DNAアレイを用いて有力な候補細菌が絞られており、実施期間外ではあるが今後解析を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

松山知正・高野倫一・中易千早・安池元重・藤原篤・竹内猛・佐藤矩行・土橋靖史・小田原和史.メタゲノム解析によるアコヤガイ赤変病病原体の推定. 日本水産学会,2014

〔図書〕(計 1件)

中易千早・松山知正・小田原和史.アコヤガイ赤変病の病原体究明の現状. 真珠研究の最前線 高品質真珠生産への展望 水産学シリーズ,2014

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山知正 (MATSUYAMA, Tomomasa)
水産総合研究センター・増養殖研究所・主任
研究員

研究者番号：20372021

(2) 研究分担者

中易千早 (NAKAYASU, Chihaya)
水産総合研究センター・本部・コーディネ
ーター

研究者番号：00311225

安池元重 (YASUIKE, Motoshige)
水産総合研究センター・中央水産研究所・研
究員

研究者番号：20604820

藤原篤志 (FUJIWARA, Atsushi)
水産総合研究センター・中央水産研究所・グ
ループ長

研究者番号：30443352

高野倫一 (TAKANO, Tomokazu)
水産総合研究センター・増養殖研究所・研究
員

研究者番号：40533998

中村洋路 (NAKAMURA, Youji)
水産総合研究センター・中央水産研究所・研
究員

研究者番号：90463182

(3) 連携研究者

()

研究者番号：