

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660170

研究課題名(和文)メタゲノムを用いた沿岸海洋環境におけるファージの動態と細菌叢に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Study of the impact of bacteriophages on the microbiota in aquaculture environments using metagenome analysis

研究代表者

佐野 元彦 (SANO, Motohiko)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00372053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタゲノム解析を応用してクルマエビ養殖場のプランクトン・微生物叢に及ぼすバクテリオファージの影響を解明することを目的とした。メタゲノム解析を応用するための基礎的な検討を行った結果、今までほとんどブラックボックスであったエビ養殖池におけるプランクトン・微生物環境をメタゲノム解析によりモニタリングすることが可能となり、培養できないものも含めた棲息微生物全体の内訳が把握できるようになった。環境細菌に感染する新たなファージを分離し、それらのゲノム配列を登録するとともに、ファージの検出を試みたが、得られた配列は少数で、プランクトンのウイルスが大多数を占めると推測された。

研究成果の概要(英文)：We tried to show the impact of bacteriophage (phage) to microbiota in shrimp aquaculture using metagenome analysis. Application of metagenome analysis using MiSeq platform to rearing water of shrimp aquaculture pond was studied at the start. The results showed that the analysis could be applied to detect the whole plankton and bacterial population including unculturable ones in the water, which have been remained as a black box. It makes us possible to monitor the dynamics of planktons and bacteria in shrimp aquaculture. To monitor phage dynamics in the environment, we isolated new phages infecting environmental bacteria such as Cytophaga-Flavobacterium group bacteria and deposited the genome sequences. Further we tried to detect phage DNA in the pond water using metagenome analysis, but we obtained a small amount of bacteriophage DNAs and the most of the sequences were remained unknown in reference virus databases. The virus sequences obtained may be of the virus infecting planktons.

研究分野：水族病理学

キーワード：海洋生態 海洋微生物 ファージ マリンゲノム メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

1) 海洋環境において、最も多いものはウイルス(ファージ)であり、細菌類がこれに次ぐ。ファージは細菌を感染・溶解させることから、海洋生態系における物質循環に大きな役割を果たし、また、ファージから細菌への代謝等遺伝子の水平伝播は、細菌の環境適応や病原性獲得などをもたらす重要な機能であると考えられている。

2) 近年、次世代シーケンサーの高い DNA 解読能力を活かし、海水中のプランクトンや細菌などを一括し DNA 配列として解析するメタゲノム研究が可能となり、盛んになってきた。

3) これにより、主に沖合域で、海洋環境における細菌叢の多様性などに加え、ファージの多様性や細菌叢に及ぼす影響について、解析が始まった。ごく最近、プロテオバクテリアに感染するファージ類が海洋中で多くを占めることが報告されるなど予想通りファージの役割が大きいことが徐々に明らかとなり、世界の注目を集めている。

4) 一方、ごく沿岸で行われる魚介類の養殖においては、飼育微生物環境は極めて重要で、その変化が疾病発生の引き金となる。ファージについては、魚類養殖場において、病原細菌の動態に相関してその感染ファージが分離されることが報告されており、ファージが魚介類飼育環境に影響を及ぼすことが強く示唆されるが、その動態・影響を網羅的にとらえた研究はいまだない。

5) そこで、魚介類疾病・微生物が専門の研究代表者とゲノム・遺伝子研究が専門の研究分担者・連携者が結集し、現場に精通した水産試験場の協力の下、沿岸海洋生態系におけるファージの動態解明を目的に、エビ養殖場での疾病発生時におけるファージの動態と細菌叢への影響をメタゲノムデータから解明しようという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンサーを活用し、沿岸の海洋微生物生態系におけるファージの網羅的な動態解析と細菌叢への影響解明を目的に、クルマエビ養殖場を対象として、1) 飼育水中の細菌とその感染ファージの DNA データベースを構築し、2) エビ養殖場において、定期的に飼育海水からプランクトン、細菌とファージの分画を採取し、メタゲノム解析法が応用可能かどうか検討する。また、ピブリオ病等のエビ疾病発生時における飼育水中の細菌とその感染ファージのメタゲノム解析を行い、ここから両者の動態を捉える。本研究成果は、海洋微生物生態系での細菌叢形成や物質循環におけるファージの役割解明の糸口となる知見・技術となることに加え、魚介類養殖における飼育環境や健康の管理において、微生物培養を必要としない革新的なモニタリング技術となり得る。

## 3. 研究の方法

1) エビ養殖場において、飼育水中から細菌を分離し、収集・保存するとともに、その感染ファージを分離・収集する。これらの細菌(16SrRNA 等)とファージゲノムの DNA 配列データを次世代シーケンサーより取得してリファレンスデータベースを構築する。2) エビ養殖場において、定期的に飼育海水からプランクトン、細菌とファージの分画を採取し、メタゲノム解析法が応用可能かどうか検討する。3) エビ疾病発生のサンプルについて、次世代シーケンサーで網羅的にメタゲノムデータを取得し、構築したデータベースと照合しつつ、環境水中の細菌・ファージと腸管内の細菌・ファージの動態について、疾病の発生状況との関連と合わせて解析する。

## 4. 研究成果

1) 細菌およびファージのゲノム配列データベースの構築

熊本県下のエビ養殖場を選定し、飼育水およびエビ腸管から計 134 細菌分離株を選択・保存するとともに、リボゾーム RNA 配列を得た。上記で得られた細菌を用いて、エビ養殖場の飼育海水やエビ腸内容物等からファージの分離を試みた結果、計 4 種のファージが分離できた。これらは形態学的にミオウイルス属、シフォウイルス属およびポドウイルス属に分類された。16S リボゾーム RNA と DNA ジャイレスの配列から *Tenacibaculum* sp. とされた T24 分離株に感染するファージ pT24 の全ゲノム配列(データベース登録番号 LC168164)は、234,670 塩基に及び、299 の遺伝子が予測され、極めて大きなゲノムを有するファージであることが分かった。

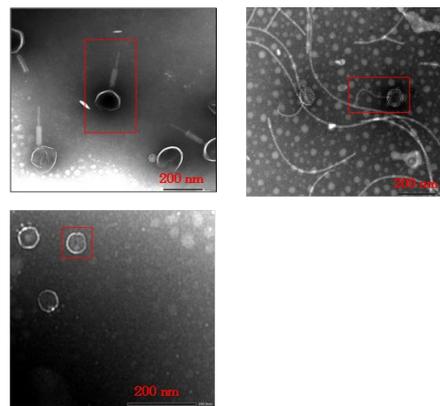


図 1. 分離されたファージの電子顕微鏡増

上左: pT24、上右: p7、下 p8

2) エビ養殖場の飼育水中のプランクトン・細菌検出へのメタゲノム解析の応用

エビ養殖場飼育水中のプランクトンと細菌を  $8\mu\text{m}$  から  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過することによりフィルター上に捕集し、このサンプルから DNA を抽出し、プランクトンでは 18S リボゾーム RNA 配列を、また細菌で

は 16S リボゾーム RNA 配列を PCR で増幅し、これをサンプルとして 600 塩基の配列分析可能な分析キット (MiSeq Reagent Kit v3) を用いてイリミナ社の次世代シーケンサー MiSeq で配列分析を行った。一方、ウイルスは、0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを通過したものから、鉄凝集法で捕集して、キットによって DNA を切断して MiSeq の配列分析に供した

まず DNA 抽出法を検討したところ、プランクトン・細菌ともに界面活性剤とフェノール・クロロホルムを用いた CTAB 法が良好な結果を与えた。また、キートセロスなどの培養した珪藻類を用いて DNA 抽出法を比較したところ、CTAB 法が優れていることが分かった。また、このときの MiSeq Nextera サンプル調製キットを用いた MiSeq での DNA 配列取得を行うとき、計算上では飼育水 20mL 程度からデータ取得が可能であることが判明した。また、サンプリングした飼育水を冷蔵して宅配便で送れるかどうか検討したところ、大学に送付する間に細菌叢が変化することも明らかとなり (図 2)、現場で直ちに濾過する必要があることも分かった。

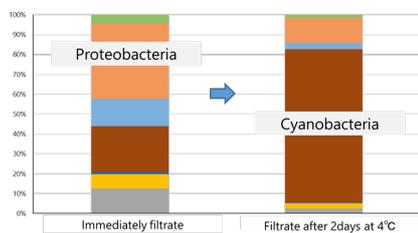


図 2 . サンプルの冷蔵保存による細菌叢の変化  
左：濾過直後サンプルを分析 右：4 日保存後のサンプルを分析

次いで、同じ養殖場の飼育海水を 4 日間採水し、プランクトンと細菌のメタゲノム解析を行い、データの再現性について調べた。その結果、換水や日照による変化が見られたが、連続的な変化を捉えられた (図 3)。データの再現性と検出感度は、プランクトン叢と細菌叢の動態をモニタリングする目的では、十分であることが分かった。

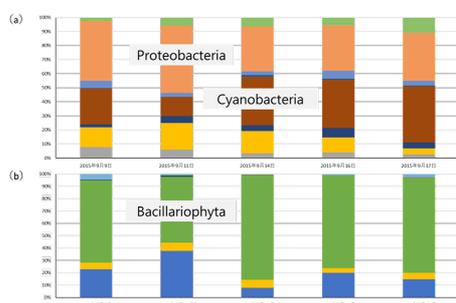


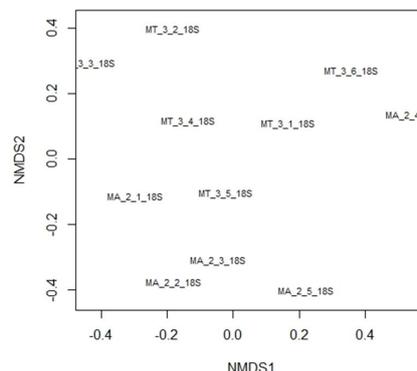
図 3 . 同一エビ養殖場における連続サンプリング  
上段：細菌叢 下段：プランクトン叢

一方、ウイルスは、いくつかのサンプルを分析した結果、大量のウイルス DNA 配列が取得できたが、一部の配列は既知のファージの配列や本研究で解読した pT24 ファージの配列と一致したが、ほとんどはデータベース配列とは一致しない不明なものであった。これら大半は、おそらくプランクトンに感染するウイルスと思われた。また、ウイルス DNA は、全体を細かく切断して配列分析を行う特性上、配列解読の効率が低い。プランクトンや細菌同様に、細菌に感染するファージに共通した配列を PCR で増幅して解読するといった工夫が必要と思われ、さらなるファージのゲノム配列の登録が必要と考えられる。

以上のことから、ファージ DNA の分析は難しいものの、今までほとんどブラックボックスであったエビ養殖池におけるプランクトン・微生物環境をメタゲノム解析によりモニタリングすることが可能となり、培養できないものも含めた棲息微生物全体の内訳が把握できるようになった。

### 3) 疾病発生時のプランクトン・細菌叢の動態

熊本県下のエビ養殖場では、ピブリオ病の発生が無かったため、サンプルにはタイ・スラタニ地域のバナメイエビ養殖池の飼育水で、2015 年 3 月のピブリオ属細菌の感染を原因とする急性肝臓壊死病の発生池 1 例と未発生池 2 例、2015 年 7 月の急性肝臓壊死病発生池 1 例と未発生池 1 例、及び 2016 年 3 月の急性肝臓壊死病発生池 2 例と未発生池 4 例を用いた。プランクトン及び細菌叢から MiSeq により配列データを取得し、メタゲノム解析を行った。さらに、得られた組成の類似度を比較した。その結果、プランクトン叢と細菌叢ともに、異なる養殖場間ではその組成が異なること、同一養殖場でも季節が異なるとその組成が異なることが判明した (図 4)。同一養殖場で隣接する 2 つの池で採取した疾病発生池 (MA\_2\_1) と未発生池 (MA\_2\_2) の細菌組成は類似していた (図 4 赤枠中)。この 2 つのサンプルから疾病発生池と未発生池を特徴付ける細菌あるいはプランクトンは見いだせていないが、今後、このような隣接する養殖池から同時に得たサンプルを分析することにより、疾病の発生しやすい環境の指標が得られることが十分期待できる。



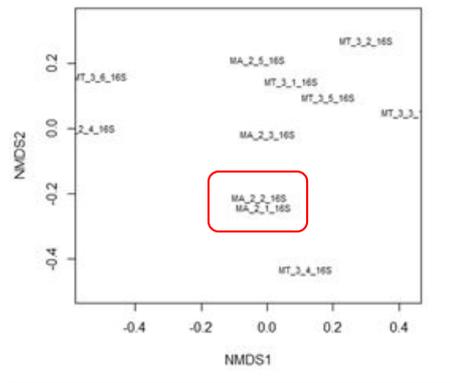


図4．群集構造解析プロット図  
 上段：プランクトン叢 下段：細菌叢  
 類似する組成のサンプルは隣接して配置される。

#### 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 1 件)

Ho Viet Khoa, Yuki Midorikawa, Tsubasa Uchino, Toshihiro Nakai, Goshi Kato, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Matthura Labaiden, Sataporn Direkbusarakom, Motohiko Sano. Complete Genome Sequence of Lytic Giant Bacteriophage pT24 Infecting *Tenacibaculum* sp. Isolated from Shrimp Culture Pond. Genome Announcements, 査読有, 2017. (印刷中)

〔学会発表〕(計 3 件)

Yuki Midorikawa, Tsubasa Uchino, Yoshinori Nomura, Motoyuki Nakane, Mamoru Sameshima, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Matthura Labaiden, Sataporn Direkbusarakom, Goshi Kato and Motohiko Sano. Metagenome monitoring of biological environment in shrimp culture pond. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Japanese Society of Fisheries Science, 2017.9.22, Tokyo.

Yuki Midorikawa, Tsubasa Uchino, Yoshinori Nomura, Motoyuki Nakane, Mamoru Sameshima, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Matthura Labaiden, Sataporn Direkbusarakom, Goshi Kato and Motohiko Sano. Application of metagenome analysis to biological environment monitoring of shrimp culture pond. 10th International Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 2017.8.29, Bali (Indonesia).

翠川優希・内野 翼・野村昌功・中根基行・鮫島 守・加藤豪司・近藤秀裕・佐野元彦。メタゲノム解析によるクルマエビ養殖池の生

物環境モニタリングへ向けた基礎的研究。  
 H29 年度日本水産学会春季大会, 2017.3.27, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

佐野 元彦 (SANO, Motohiko)  
 東京海洋大学・学術研究院・教授  
 研究者番号：00372053

##### (2)研究分担者

近藤 秀裕 (KONDO, Hidehiro)  
 東京海洋大学・学術研究院・准教授  
 研究者番号：20314635

##### (3)連携研究者

廣野 育生 (HIRONO, Ikuo)  
 東京海洋大学・学術研究院・教授  
 研究者番号：00270926

##### (4)研究協力者

鮫島 守 (SAMESHIMA, Mamoru)  
 野村 昌功 (NOMURA, Yoshinori)  
 中根 基行 (NAKANE, Motoyuki)