TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌性疾病の防除に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2023-07-10
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 翠川, 優希
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1909

［課程博士・論文博士共通］

博士学位論文内容要旨
Abstract

専　攻 Major	応用生命科学	氏　名 Name	翠川　優希
論文題目 Title	アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌性疾病の防除に関する研究		

ノコギリガザミは *Scylla serrata*、*S. paramamosain*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica* の合計 4 種類が知られている。現在多くの国でノコギリガザミ類の種苗を供給するために種苗の大量生産が試みられている。しかし、種苗生産施設では細菌や卵菌類による幼生の大量斃死が頻発しており、感染症がノコギリガザミエ種苗生産の最も大きな障害の一つとされている。2000 年に、グラム陰性長桿菌が疾病に罹患したアミメノコギリガザミ幼生から分離された。疾病に罹患した幼生は背棘部に壊死症状を伴うメラニン色素性結節形成が生ずる。しかしながら、この原因細菌の正確な分類や診断方法、薬剤を用いない防除方法は開発されていない。そこで本研究では、上記の壊死症状を伴うアミメノコギリガザミ幼生の大量死について、生化学性状試験、ゲノム解析、他の甲殻類への病原性を検討し原因細菌の同定と性状に関する知見を得ること（第 2 章）、原因細菌の診断を行うための検出ツールの開発（第 3 章）、薬剤を用いずに原因細菌の防除をする方法の開発（第 4 章）を行うこととした。

第 2 章では、アミメノコギリガザミ壊死症の原因細菌の代表株である NY1 株の性状解析、同定、ショットガンシーケンスによるゲノム解析、他の甲殻類への感染試験を行った。本細菌は細胞の大きさが 5-10 μm のグラム陰性長桿菌であり、コロニーは明るい黄色を示した。また、マリンアガー上で 20-33℃の間で発育し、キチンやカゼイン、ゼラチンなどを分解することも明らかとなった。本細菌の 16S rRNA を解析したところ、フラボバクテリア科の *Aquimarina hainanensis* と同定された。ショットガンシーケンスの結果、29 コンティグに分かれた全長 3.6 Mbp、G+C 含量 32.5%の配列を得た。このゲノム情報の中には甲殻類に対する病原因子だと考えられるキチナーゼ関連（T9SS）遺伝子が含まれていた。アミメノコギリガザミのほかにアルテミア、ヤマトヌマエビ、ガザミの幼生を用いて感染実験を行った。その結果、ガザミを除く 3 種の甲殻類では高濃度感染区（10^5 CFU/ml 程度）、低濃度感染区（10^3 CFU/ml 程度）ともに非感染区に対して有意に死亡し、ガザミでは高濃度感染区において非感染区に対して有意に死亡したことから、*A. hainanensis* が他の甲殻類幼生に対して広い宿主域を有していることが示唆された。また、感染したアミメノコギリガザミ幼生のホルマリン固定サンプルから切片を作製したところ、メイグリュンワルド・ギムザ染色、蛍光免疫染色像において *A. hainanensis* が幼生の体内に菌塊を形成している様子が観察できた。

第 3 章では、*A. hainanensis* を検出する方法を開発した。第 2 章で取得した NY1 株のキチナーゼ関連遺伝子をターゲットとして PCR 用のプライマーを作製した。所持している原因細菌 3 株、リファレンスとなる *A. hainanensis* 1 株、*Aquimarina* 属細菌 12 種、フラボバクテリア科の細菌 3 種を対象に PCR を行い、*A. hainanensis* を特異的に検出するプライマーを作製することができた。本検出法で、第 1 章で行った感染実験の 4 種の生物から *A. hainanensis* を検出できた。もう一つの検出法として抗 NY1 株血清を作製した。NY1 株のホルマリン不活化菌体をウサギに摂取し、抗血清を作製した。*Aquimarina* 属細菌は自家凝集性があり、凝集反応による検出は困難であった。そこで蛍光抗体による検出法を検討したところ *A. hainanensis* のみを特異的に検出することができた。

第 4 章では、アミメノコギリガザミ壊死症の防除法の検討を行った。疾病制御に用いるツールとして薬剤を用いることができないため、自然由来の溶菌性バクテリオファージと拮抗細菌を検討した。バクテリオファージと拮抗細菌はアミメノコギリガザミ飼育槽、沿岸海水、マングローブ、種苗生産施設排水、オニヒトデ・サンゴ水槽から分離した。分離されたバクテリオファージは形態の観察から

2 種類に分けられた（TJI1701P、TJI1707P）。拮抗細菌は 3 株（TJI1713B、TJI1717B、TJI1752B）分離され、16S rRNA の配列から *Pseudoalteromonas* 属、*Photobacterium* 属細菌であることが判明した。2 種類のバクテリオファージを用いて *in vitro* で NY1 株に対する溶菌能力を試験したところ、TJI1707P がより溶菌性が高いことが示唆された。そこで TJI1707P を用いてアルテミアを用いた添加試験を行ったところ、飼育水に対して 1.1×10^2 PFU/ml のバクテリオファージを添加することで非感染区と同程度まで死亡を抑えることができた。また、拮抗細菌 3 種を用いて *in vitro* 試験を行ったが、NY1 株の菌数は大きな差がみられなかった。バクテリオファージと同様にアルテミアを用いて添加試験を行ったが、拮抗細菌を添加することで死亡が抑えられる傾向にあったが、一部の菌株において幼生を長期間拮抗細菌へ暴露することで悪影響を及ぼす可能性があった。

第 2 章において、アミメノコギリガザミ壊死症の原因細菌の性状、分類、宿主域の広さ、感染個体の病態が明らかとなった。第 3 章において *A. hainanensis* の病原性関連遺伝子であるキチナーゼ関連遺伝子をターゲットとして検出用プライマーを作製した。特異性、検出感度、生体からの検出の有無が確かめられた。さらに、抗 NY1 株血清を用いた蛍光抗体法を検討したところ、*A. hainanensis* のみを特異的に検出することができた。これらの検出法は今後アミメノコギリガザミの種苗生産現場で本疾病の診断に役立つことが期待される。第 4 章にて防除に用いるツールとしてバクテリオファージと拮抗細菌を提案し、分離培養および有効性の試験を行った。その結果、バクテリオファージのうち 1 株が最も効率的に *A. hainanensis* の排除を行えることが示唆された。よって、バクテリオファージの飼育水への添加がアミメノコギリガザミ壊死症への対策として有効であると考えている。実際の種苗生産現場においては、外部から原因細菌の持ち込みを防ぐために、供給される海水の消毒（紫外線殺菌等）と親ガニの搬入時のバクテリオファージによるトリートメントを行う。その後は産卵前の養成時、産卵後、幼生孵化直前に分けてバクテリオファージを飼育水に添加し、*A. hainanensis* を排除する。幼生孵化後はバクテリオファージの耐性菌出現を抑えるためにバクテリオファージの添加を控え、*A. hainanensis* の増殖が弱めるために、希釈した海水を用いて幼生飼育を行うことで *A. hainanensis* を原因とした疾病を抑えつつ種苗生産を行うことができると考えている。