

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ジャゴダ スワルナ スバーニ サマンティカ ダ シルワ

観賞魚の需要は年々高まっており、多くの国で養殖が行なわれている。特に発展途上国にとっては有望な輸出品目として関心を集めている。現在、観賞魚の貿易には 100 カ国以上が関わっており、年間 10 億匹以上の観賞魚が取引されている。このような観賞魚産業の発展に伴い、感染症対策が大きな問題となってきた。そのため、適切な診断系を確立し、現場での適切な対応に資するため、感染病原体の情報を収集することが望まれる。本論文は、そのような背景の元で、スリランカにおいて観賞魚養殖において問題となっている主要な感染病原体である、エロモナス属に属する細菌群について、(1) 種判別を行なうためのマーカー遺伝子・多型の検討、(2) 主要な病原種である *Aeromonas hydrophila* の 1 菌株である Ae34 のゲノムシーケンシング、(3) 現場での種・株判別に用いる LAMP 法のプライマー設計、の内容について報告している。

(1) エロモナス属の種・株判別のためのマーカー遺伝子、多型の検討

運動性エロモナス敗血症(MAS)はスリランカにおいてしばしば問題となっている感染症であるが、これまで感染病原体に関して、あまり研究がなされていなかった。そこで MAS の原因となっているエロモナス属の多様性を検討するため、スリランカ各地の飼育現場に赴き、敗血症の兆候を示す観賞魚から、感染菌のサンプリングを行なった。それらによって収集した菌を対象に、従来の変型による判別に加えて、16SrRNA の RFLP、およびハウスキーピング遺伝子で、16SrRNA より進化速度が速く、より近縁の種・株判別に適していると考えられる *gyrB* 遺伝子、*rpoD* 遺伝子によるフィンガープリンティング、およびシーケンシング解析を用いて種・株の判別を行なった。その結果、エロモナス属の広い種において観賞魚の敗血症に関わっていることが示された。最終的にエロモナス属として同定された 53 検体は 10 種類の魚種から採取されたもので、エロモナス属の 6 つの種に分類された。また、従来は、*A. hydrophila* が主要な病原種として考えられていたが、本研究の結果、*A. veronii* の頻度がもっとも高かった。また病毒性に関わる遺伝子のプロフィールには特別な傾向は無いことなどから、エロモナスの感染は日和見感染であることが示唆された。このことから感染防御に関して、第一に重要なことは、飼育環境を整えることであり、病原感染菌の存在そのものでは無いことが示唆された。

本研究により、表現型による判別だけでは正確な種判別は困難であり、いくつかの分子生物学的な判別を併用することが望ましいことが示唆された。また、49%の検体が複数の薬剤耐性遺伝子を持っていることが示された。このことから養殖業での抗生物質の乱用が多剤耐性の原因であると考えられたが、それに加えて転移性遺伝因子なども寄与しているものと考えられた。

(2) *A. hydrophila* Ae34株の全ゲノムシーケンシング

敗血症の症状を示すコイから単離した*A. hydrophila* Ae34株の全ゲノム塩基配列決定を行なった。Ion Torrent PGMシーケンサー、318チップを用いてシーケンシングを行った。クオリティーの低いデータを除去した後、約150万リードのデータをアSEMBラーMIRA v3.4.0.1 およびCLC Genomics Workbench v 6.5を使ってアSEMBルし、コンティグを作製した。次に*A. hydrophila* strain ML09-109 (CP005966.1) および*A. hydrophila* ATCC 7966^T (NC_008570.1)を対照としてCLC Microbial Genome Finishing Moduleを用いて各コンティグをマップした結果、シーケンスは59コンティグに編集された。さらにマップされなかったリードを再度アSEMBル後、再マップしたところ、28コンティグに編集された。これらのドラフトゲノムの合計サイズは約4.7Mb、G+Cコンテンツは61.6%であった。アノテーションソフトを用いて4,258個のタンパク質コード遺伝子、117個のtRNA遺伝子、31個のrRNA遺伝子を見いだした。タンパク質コード遺伝子のうち67個は抗生物質等に対する耐性に関わる遺伝子であった。またphiO18Pと相同性をもつ完全長のプロファージが2個見いだされた。このプロファージがゲノム中に存在している菌と感染との間には明らかな関連が見られるた。

(3) LAMP法を用いた種判別法の確立

養殖現場で容易に*A. hydrophila* and *A. veronii*の判別を可能にするためLAMP法を用いた種判別手法の確立を目的に実験系のデザインを行なった。まず、*gcat* (glycerophospholipid cholesterol acyltransferase)遺伝子を用いて、*gcat*の既報の塩基配列、およびAe34株で得られた*gcat*全長の塩基配列の中から、適当なプライマーを設計してテストした。しかし*A. hydrophila*が検出できるのみであったため、次に*gyrB* 遺伝子、および16S-23S rDNA遺伝子間スペーサー領域(ISI)に新たにプライマーを設計した。最終的には*gcat*、*gyrB*、ISIを用いた検出系を目指している。

以上の成果は学術上、応用上資するところが大きく審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。