

多様な拮抗細菌を用いた抗生物質を使わないエビ養殖の達成

小祝 敬一郎

東京海洋大学 学術研究院 水圏生物生産工学研究所

研究の目的

クルマエビ類水産養殖は、その生産量が世界的に拡大し続けている。一方で、細菌性およびウイルス性の病原微生物を原因とした魚病被害が頻発している。無脊椎動物であるクルマエビ類に対して、獲得免疫を基盤としたワクチンを活用することは困難である。そこで、海産無脊椎動物養殖の魚病対策として、病原細菌の増殖を抑制可能な拮抗細菌を用いた生物学的防除法が注目されている。自然環境中からの新規有用細菌の単離には寒天平板培地を用いた細菌培養法が汎用されるが、大量のスペースと資材、労力を必要とし、絶えず発生する新興感染症に対応する上でのボトルネックとなっている。近年、マイクロ流路とフッ素オイルを活用して作製する直径 30-100 μm の微小液滴を培養区画として微生物を効率的に培養することが可能となっている¹。そこで本研究では、微小液滴を培養区画とした拮抗細菌のハイスループットスクリーニングを実施し、クルマエビ類養殖において実用的な拮抗細菌の効率的な単離を目指す。

方法

本研究では拮抗細菌スクリーニングのモデル病原細菌として、国内のクルマエビ養殖場で分離されたクルマエビ類病原性 *Vibrio harveyi*² を使用し、感染試験の対象生物としてクルマエビ *Penaeus japonicus* を選択した。

1. 緑色蛍光恒常発現 *V. harveyi* の作出

グラム陰性の非モデル細菌である *Vibrio* 属細菌に対して遺伝子導入実績のある手法として、本研究では大腸菌を用いた接合伝達による相同組換え遺伝子導入系を採用した。*V. harveyi* 由来 16S rRNA 遺伝子および緑色蛍光タンパク質 (eGFP) 恒常発現遺伝子配列からなる複合配列を導入したスーサイドベクター pRE112 を調整し、本ベクターをエレクトロポレーション法により大腸菌 SM10 株に導入した。目的のベクターが導入された大腸菌 SM10 株と *V. harveyi* を 0.02 μm メンブレンフィルターを乗せた HI 寒天培地上で共培養し、ベクターの接合伝達を促した。pRE112 内に組み込まれているクロラムフェニコール耐性遺伝子をもとに、相同組み換えが達成された *V. harveyi* を得た。その後、菌体をスクロースが含まれた培地で培養することにより、pRE112 の排除を促し、目的の位置に eGFP を組み込んだ *V. harveyi* を調整した。得られた蛍光株はロングリードシーケンサー GridION (Oxford Nanopore Technologies, UK) を用いた全ゲノム配列リシーケンスに供し、*V. harveyi* 染色体へ

の目的遺伝子導入を確認した。

2. 蛍光 *V. harveyi* を用いた拮抗細菌の微小液滴スクリーニング

拮抗細菌のスクリーニング源として、本研究ではクルマエビ飼育水中の細菌叢を選択した。飼育水を 0.22 μm メンブレンフィルターに通して細菌叢をフィルター上を取得し、本フィルターを Marine Broth (Becton, Dickinson and Company, USA) に浸して細菌叢の前培養を行った。本培養サンプルと緑色蛍光恒常発現 *V. harveyi* を微小液滴作製装置 On-chip droplet Generator (オンチップ・バイオテクノロジーズ, Japan) を用いて直径 30 μm の微小液滴内に共封入し、25°C で静置培養した。培養後、微小液滴分取装置 On-chip droplet Selector (オンチップ・バイオテクノロジーズ, Japan) を用いて蛍光強度が低い微小液滴を 96-well Plate に分取した。Marine Broth により再培養された単離細菌は、終濃度 15 % のグリセロールストックにより -80°C で保管した。

3. 単離された拮抗細菌候補株の解析

単離された拮抗細菌候補株の 16S rRNA 遺伝子全長配列をサンガー法によりシーケンスした。得られた配列に基づく系統解析は MAFFT を使って実施した。また、VSEARCH により 99 % の配列類似性で Operational taxonomic units (OTU) クラスタリングを実施した。得られた拮抗細菌候補株の感染症防除能を調べるため、クルマエビに *V. harveyi* および拮抗細菌候補株を筋肉内注射により共感染させ、クルマエビの死亡率の変動を確認した。

結果

1. 緑色蛍光恒常発現遺伝子の *V. harveyi* 16S rRNA 遺伝子内への導入

相同組換え遺伝子導入系により、緑色蛍光を発する *V. harveyi* の作出に成功した (Fig. 1A)。本蛍光株に対してロングリードシーケンサーによる全ゲノムリシーケ

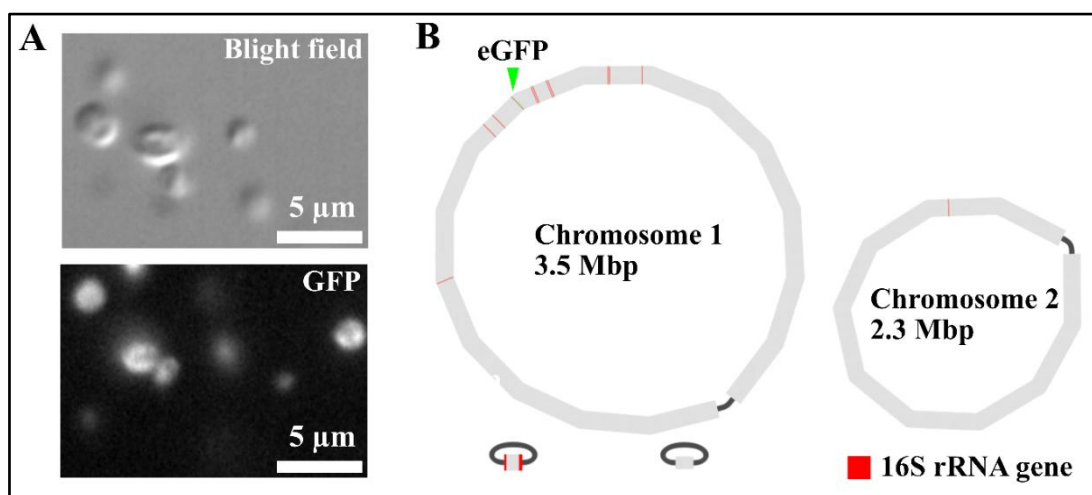


Fig. 1 調整した蛍光タンパク質発現 *V. harveyi*。明視野および蛍光視野における緑色蛍光恒常発現 *V. harveyi* (A)。Bandage により可視化した緑色蛍光恒常発現 *V. harveyi* の全ゲノムアセンブリグラフ (B)。

ンスを実施した結果、*V. harveyi* の第一染色体の 16S rRNA 遺伝子内に緑色蛍光恒常発現遺伝子が挿入されていることを確認した (Fig. 1B)。

2. 単離された拮抗細菌候補株

クルマエビ飼育水中細菌叢と緑色蛍光恒常発現 *V. harveyi* の微小液滴内共培養により、緑色蛍光が低い微小液滴を確認した (Fig. 2A)。微小液滴スクリーニングの結果、クルマエビ飼育水中細菌叢から *Tenacibaculum* 属 2 株、*Shewanella* 属 2 株および *Pseudoalteromonas* 属 16 株からなる計 20 株の拮抗細菌候補株を単離した (Fig. 2B)。得られた細菌の全長 16S rRNA 遺伝子配列の 99 %以上配列類似性に基づく OTU クラスタリングの結果、計 4 つの OTU にグルーピングされた (Fig. 2B)。

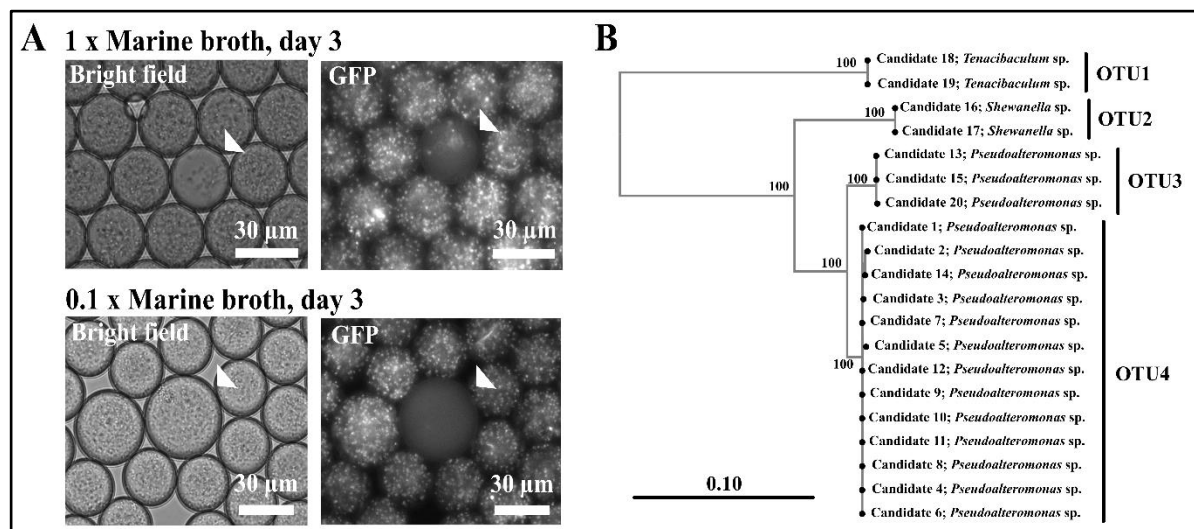


Fig. 2 微小液滴による拮抗細菌スクリーニングの様子。明視野および蛍光視野における緑色蛍光が低くなった微小液滴(A)。微小液滴スクリーニングにより単離された計 20 株の拮抗細菌候補株(B)。

3. クルマエビに対する拮抗細菌候補株の有効性

得られた拮抗細菌候補株および *V. harveyi* を筋肉内注射によりクルマエビに共感染させたところ、いくつかの細菌においてクルマエビの死亡率の低下が確認された (Fig. 3)。

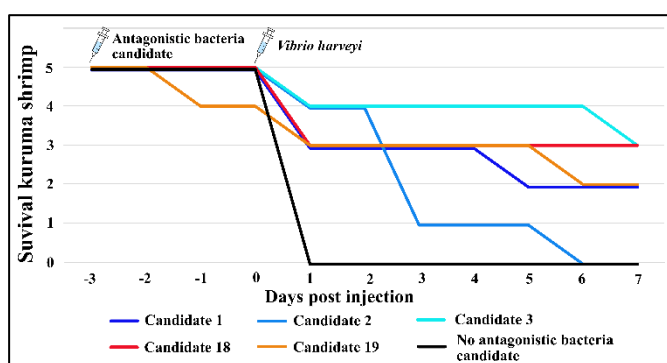


Fig. 3 筋肉内注射による拮抗細菌と *V. harveyi* の共感染試験。

結論

本研究は、微小液滴作製技術を用いて水産病原細菌に対する拮抗細菌をスクリーニングした初の事例である。クルマエビ類病原性 *V. harveyi* への GFP 配列導入として相同組換え遺伝子導入系を採用し、蛍光株の作出に成功した。微小液滴スクリー

ニングの結果、3 属 20 株からなる拮抗細菌候補株の単離に成功し、一部の細菌のクルマエビに対する魚病抑止性が示唆された。

文献

- 1 Ota, Y. *et al.* (2019) Fluorescent nucleic acid probe in droplets for bacterial sorting (FNAP-sort) as a high-throughput screening method for environmental bacteria with various growth rates. *PLoS One* **14**: e0214533.
- 2 Yuasa, H. *et al.* (2025) Genome sequence of *Vibrio harveyi* strain TUMSAT-2019, isolated from kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Microbiol. Resour. Announc.* **14**: e0074624.