

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	800 千円
研究代表者 : 酒徳 昭宏	所属 : 学術研究部理学系	職位 : 講師
研究題目 : 1級品真珠生産量増加と安定供給を目指したアコヤガイ殻黒変病の原因細菌特異検出法の開発		

研究概要

日本の真珠養殖は三重県、長崎県、愛媛県を合わせて生産量の約9割を占めている。それらの地域で生産されるアコヤ真珠は、世界的にも非常に評価が高い。その年間生産量と輸出額はそれぞれ20トンと300億円を超え、地域経済・産業の根幹を担っていると同時に、輸出品としても重要な産業となっている。近年、真珠形成母貝アコヤガイの殻黒変病が深刻化し、大きな問題となっている。本症例は1967年に初報告され、2021年現在も解決には至っていない。重症な殻黒変病個体は死亡に至り、真珠を収穫できる個体が養殖開始時の半分に満たない年すらある。また、死亡に至らなくても本疾病個体は、抱いている真珠にも黒変様の「しみ」が形成され、低品質真珠（ドクズ珠）として格下げとなり、取引価格に雲泥の差が出る。これらのことから、殻黒変病に対する対策が急務とされているが、その原因すらわかっていなかった。そのような中、申請者は、2018年に、滑走細菌 *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 株の感染が殻黒変病の原因であることを明らかにした。現在、本細菌の感染の有無を確認する方法は、我々が開発したユニバーサルプライマーを用いた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）によるものしかなく、操作の煩雑性や検出までに時間がかかることなど問題点も多い。そこで、本研究では、養殖業者が用いることができる簡便で特異的かつ、高感度な Pbs-1 株検出キットの開発を目指して、Pbs-1 株を特異的に検出することができる PCR 法を開発する。

成果要約

まず、*Tenacibaculum* sp. Pbs-1 株と近縁種の 16S rDNA と 23S rDNA の間にある Internal Spacer Region の遺伝子配列をマルチプルアライメントすることで、Pbs-1 株に特異的な遺伝子配列を見出し、そこに PCR 用のプライマーを設計した。このように設計したプライマーと DNA ポリメラーゼ（Ex Taq HS; タカラバイオ株式会社）を用いて、Pbs-1 株の DNA を用いた際の目的遺伝子断片の増幅と、7種の近縁種（独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから購入）の DNA を用いた際の増幅が生じない PCR 条件の検討を行った。PCR は、3step PCR, 2step PCR, nested PCR, タッチダウン PCR の4種類の方法をそれぞれ検討し、その中で最も迅速で特異性の高い、以下の 2step PCR の条件を見出した。

- 反応液：全量 20 μ l で、0.125 μ M 各プライマー、200 μ M dNTPmix, \times 1 buffer, 0.5U Ex Taq HS
- PCR プログラム：94 $^{\circ}$ C 3min \rightarrow 【94 $^{\circ}$ C 30s \rightarrow 69.6 $^{\circ}$ C 1min】 \times 35 サイクル

最後に、濃度を変えて Pbs-1 株を添加した天然海水から Pbs-1 株が検出できるかどうかを調べた。その結果、10⁶ cells/ml を添加した海水からも Pbs-1 株を検出することができた。

本 PCR 法は、唯一の Pbs-1 株の検出法であった DGGE よりも約 17 時間、既報の他の細菌の PCR 法よりも約 30 分早く検出することができた。本研究成果は、「アコヤ貝殻黒変病原因細菌の特異的検出法及びそのためのキット」として、特許出願した（特願 2021-021128）。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <p>出願番号 : 特願 2021-021128 出願日 : 令和 3 年 2 月 12 日 発明の名称 : アコヤ貝殻黒変病原細菌の特異的検出法及びそのためのキット 学内整理番号 : R02-G16</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p>区 分</p>	<p>執行額 (円)</p>	<p>備 考</p>
	<p>【物品費】 研究用試薬 細菌培養用試薬 DNA 抽出関連試薬 PCR 関連試薬</p> <p>【旅費】</p> <p>【謝金】</p> <p>【その他】</p> <p>合計</p>	<p>800,000</p> <p>0</p> <p>0</p> <p>0</p> <p>800,000 円</p>	