

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（水・環）甲 第 1 3 号	氏 名	塗 伝灯
学位審査委員		主査	金 井 欣 也
		副査	長 富 潔
		副査	菅 向 志 郎
論文審査の結果の要旨			
塗 伝灯氏は、2011年4月に長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科博士後期課程に進学し、現在に至っている。同氏は、水産・環境科学総合研究科博士後期課程に進学以降、環境海洋資源学を専攻して所定の単位を修得するとともに、魚病細菌 <i>Streptococcus parauberis</i> の血清型と莢膜合成遺伝子群に関する研究に従事した。2015年7月にその成果を学位論文「Studies on the Serotypes and Genetic Structure of Capsular Polysaccharide Biosynthesis Loci of the Fish Pathogen <i>Streptococcus parauberis</i>」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文1 編（うち審査付き論文1 編）、印刷公表予定論文2編（うち審査付き論文2編）を付して、博士（学術）の学位の申請をした。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授会は、2015年7月15日の定例教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施するとともに、最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を2015年9月2日の水産・環境科学総合研究科教授会に報告した。 <i>Streptococcus parauberis</i> は日本・韓国ではヒラメ、ヨーロッパではターボットのレンサ球菌症の原因菌として知られている。ヒラメから分離される <i>S. parauberis</i> には 2 つの血清型（I および II 型）があるが、I、II 型抗血清と反応しない菌株が近年分離されていることから、新たな血清型の存在が示唆されていた。また、I、II 型両抗血清と反応する非特異株の存在も知られている。本菌の血清型は菌体表面の莢膜多糖抗原に起因すると考えられており、莢膜多糖の構造の違いが複数の血清型を生じる。さらに、莢膜多糖はゲノム DNA 上の莢膜合成遺伝子群によって合成されることから、莢膜合成遺伝子座の構造と血清型とは関連がある。本論文は、研究室保存の <i>S. parauberis</i> の血清型を再検討し、各血清型のゲノム DNA 上の莢膜合成遺伝子座の構造を解明して当該遺伝子座の構造と血清型の関係を論じたものである。 まず、保存株 188 株の血清型を再検討し、I 型が 3 つの亜血清型（Ia、Ib および Ic）に細分化されることが明らかにした。I、II 型抗血清と反応しない菌株は Ic 型に型別された。Ia 型と Ib 型、Ib 型と Ic 型は交差反応を示す。ゲノム DNA の <i>Sma</i>I 消化断片のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）解析により、188 株の遺伝子型別を試みた			

ころ、Ib/Ic 型が PFGE/Cluster I に、Ia 型が PFGE/Cluster II に、II 型が PFGE/Cluster III に型別され、*Sma*I-PFGE による遺伝子型と血清型が一致することが判明した。非特異株は Cluster I または Cluster III に型別された。

次に、各血清型・亜血清型・非特異株の代表 6 株について、莢膜合成遺伝子座の塩基配列（それぞれ約 19 kbp）を解読し、他の細菌由来のタンパク質とのアミノ酸配列の相同性から当該遺伝子群を構成する各遺伝子の同定を試みた。その結果、Ia タイプ、Ib/Ic タイプおよび II タイプの 3 種類の遺伝子座の存在が明らかになった。Ib 型株と Ic 型株は同じ遺伝子構造を有していたが、両者には数か所の 1 塩基置換が認められ、さらに Ic 型株の一部に *IS* エLEMENT の挿入が確認されたことから、これら遺伝子変異が両亜血清型間の莢膜多糖構造の違いを生む可能性があると考えた。非特異株の PFGE/Cluster I 株は Ib/Ic タイプと、PFGE/Cluster III 株は II タイプと同じ遺伝子構造を有しており、それぞれ Ib/Ic 型あるいは II 型から莢膜非産生株（非特異株）に変異したものと考察した。保存株 188 株の遺伝子構造を PCR 法で調べたところ、すべての株がそれぞれの血清型に応じて代表株と同じ遺伝子構造を有することが判明した。

最後に、莢膜合成遺伝子の塩基配列に基づいて Ia 型、Ib/Ic 型および II 型に特異的なプライマーを設計し、マルチプレックス PCR による血清型の判別法を検討した。その結果、本マルチプレックス PCR 法は保存株 188 株を正確に血清型別した。一方、ウシ由来の *S. parauberis* を含む他のレンサ球菌およびグラム陰性魚病細菌では反応が見られなかったことから、本法はヒラメの *S. parauberis* 感染症の診断および *S. parauberis* の血清型別に利用できると考えられた。

以上のように、本論文は魚類病原性 *S. parauberis* の血清型を明確にし、血清型と関連する莢膜合成遺伝子座の構造を明らかにした。これらはヒラメの *S. parauberis* 感染症の診断および防除に役立つ重要な情報であり、養殖現場ですぐに利用できるマルチプレックス PCR 法を開発したことを含め、高く評価できる。学位審査委員会は、本論文は魚病学ならびに養殖漁業の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。