

3 2) *gyrB* を標的とした PCR-RFLP による冷水病菌の型別

菅原和宏・山本充孝

【目的】冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* は、その遺伝子型の違いによりいくつかのタイプに分類できることが知られている。また、アユに感染する冷水病菌と、アユ以外の魚種に感染する冷水病菌とでは菌のタイプが異なり、アユ冷水病がアユ以外の魚種に感染しないのは、タイプの違いによるためだと考えられている。そこで、DNA ジャイレースの遺伝子領域（以下 *gyrB* 領域）を標的とした PCR-RFLP*を用いて、冷水病菌のタイプ分けを行った。

【方法】供試菌株は当水産試験場保存株 45 株、東京水産大学菊地氏から分与して頂いた 23 株および 2004 年 3 月 2 日に塩津大川で捕獲したワカサギから分離された 25 株の合計 93 株である。DNA 抽出は白金耳に少量の菌を取って 1.5mL マイクロチューブに入れ、5%Chelex100 溶液を 300 μ L 加え、55 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートし、約 10 秒攪拌後、さらに 100 $^{\circ}$ C で 20 分インキュベートして、10,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 10 分遠心分離した上清をテンプレートとした。PCR は *gyrB* 領域のユニバーサルプライマーペア GYR-2、GYR-1R を用いた場合と、冷水病菌の *gyrB* 領域に特異的なプライマーペア PSY-G1F、PSY-G1R を用いた場合の 2 通りを行った。反応液量は両 PCR ともに 20 μ L とし、組成は *Taq* DNA polymerase (5U/ μ L) 0.1 μ L、10 \times buffer (100mM Tris-HCl (pH8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂) 2 μ L、dNTP mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5mM) 2 μ L、primer 1、2 (各 10pmol/ μ L) 各 2 μ L、テンプレート 4 μ L、滅菌蒸留水 7.9 μ L とした。PCR 条件は両 PCR ともに、denaturation 94 $^{\circ}$ C、60 秒、annealing 48 $^{\circ}$ C、2 分、extension 72 $^{\circ}$ C、2 分を 35 サイクル、さらに first denaturation 94 $^{\circ}$ C、5 分、last extension 72 $^{\circ}$ C、5 分とした。制限酵素処理は PCR でユニバーサルプライマーペアを用いた場合は *Hinf* I、特異的なプライマーペアを用いたときは *Rsa* I を使用し、反応液量はともに 15 μ L とし、PCR 産物 12 μ L、滅菌蒸留水 1.125 μ L、制限酵素付属の buffer 1.5 μ L、制限酵素 (10U/ μ L) 0.375 μ L とした。反応は 37 $^{\circ}$ C で 3 時間行い、反応後の電気泳動は 3%アガロースゲル、TAE buffer を用い、条件は 4 $^{\circ}$ C、50V、100 分とし、その後臭化エチジウムで染色した。バンドパターンから、ユニバーサルプライマーペアで増幅し、制限酵素 *Hinf* I で処理したときは A、B の 2 種類に分けられ、冷水病菌に特異的なプライマーペアで増幅し、制限酵素 *Rsa* I で処理したときは R、S の 2 種類に分けられ、これらの組み合わせにより 4 種類 (AR、AS、BR および BS 型) に分類した。

【結果】結果を表 1 に示した。アユは腎臓、脳、卵巣といった体内から分離された株は A 型が多く、患部といった体表から分離された株は B 型が多い傾向を示した。また、アマゴ、イワナ、オイカワ、ギンザケ、ニジマス、ビワマスおよびニシキゴイから分離された株はすべて B 型であった。しかし、ワカサギの腎臓から分離された株は A 型であり、また環境水中から分離された株もすべて A 型であった。このことから、アユに感染する A 型の冷水病菌はワカサギに感染する可能性が示唆され、広く環境水中にも存在している可能性が示唆された。

* S. Izumi, F. Aranishi and H. Wakabayashi: Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis, *Dis. Aquat. Org.*, 56, 207-214(2003).

表1. 魚類および環境水から分離された冷水病菌の遺伝子型

魚種	分離部位	遺伝子型				合計
		AS	AR	BS	BR	
アユ	腎臓	16	2	5	1	24
	脳	0	2	0	0	2
	患部	1	0	8	0	9
	卵巣	1	0	0	0	1
	鰓	4	0	1	0	5
オイカワ	腎臓	0	0	3	0	3
	脳	0	0	1	0	1
ギンザケ	腎臓	0	0	3	1	4
ニジマス	腎臓	0	0	1	3	4
ワカサギ	腎臓	1	1	3	0	5
	精巣	0	0	19	2	21
	卵	0	0	0	1	1
	鰓	0	0	1	0	1
ニシキゴイ	患部	0	0	1	0	1
イワナ	腎臓	0	0	0	1	1
アマゴ	腎臓	0	0	2	0	2
ビワマス	腎臓	0	0	0	1	1
環境水	-	4	3	0	0	7