

ノート

河川環境中からのPCR法による冷水病菌検出方法の検討

田畑和男*

Detection of *Flabobacterium psychrophilum* by PCR from a river environment

Kazuo TABATA*

キーワード：冷水病菌，遺伝子型別，PCR，感度比較，環境

筆者が2004年と2005年のアユ非生息期である冬期間に行った，兵庫県内の延べ6河川，15地点における培養法による調査で得られた環境中からの冷水病菌の分離株数は，わずか1株であった。このことから，培養法だけに頼った検出は非常に困難であると示唆された(田畑2006)。実際，培養法によって環境中から細菌を分離することの困難性は，環境細菌を扱う専門分野において大きな問題「viable but nonculturable (VBNC) bacterial cell」として認識されている(Colwell RR and Grimes DJ 2004)。そこで，次の調査手法としてPCR法が考えられる。しかしながら，PCR法によって検出されたとしても対象細菌の核酸成分の検出，同定に限られているため，生きた細菌の詳しい生態的性状を調べることができず，この点はPCR法の大きな弱点である。しかしながら培養法の困難性を考慮すると，PCR法による検出に重きをおくことは止むを得ないことであろう。

本研究では，まず，環境中からの冷水病菌検出の感度上昇法について述べ，次に，冷水病菌が検出されたサンプルから直接遺伝子型を求める方法について述べる。

PCR法による冷水病菌の検出 PCR法による冷水病菌の検出には，現在まで16S rRNA領域を用いたnested法(16S rRNA nested法，Toyama 1994)が主に使われ

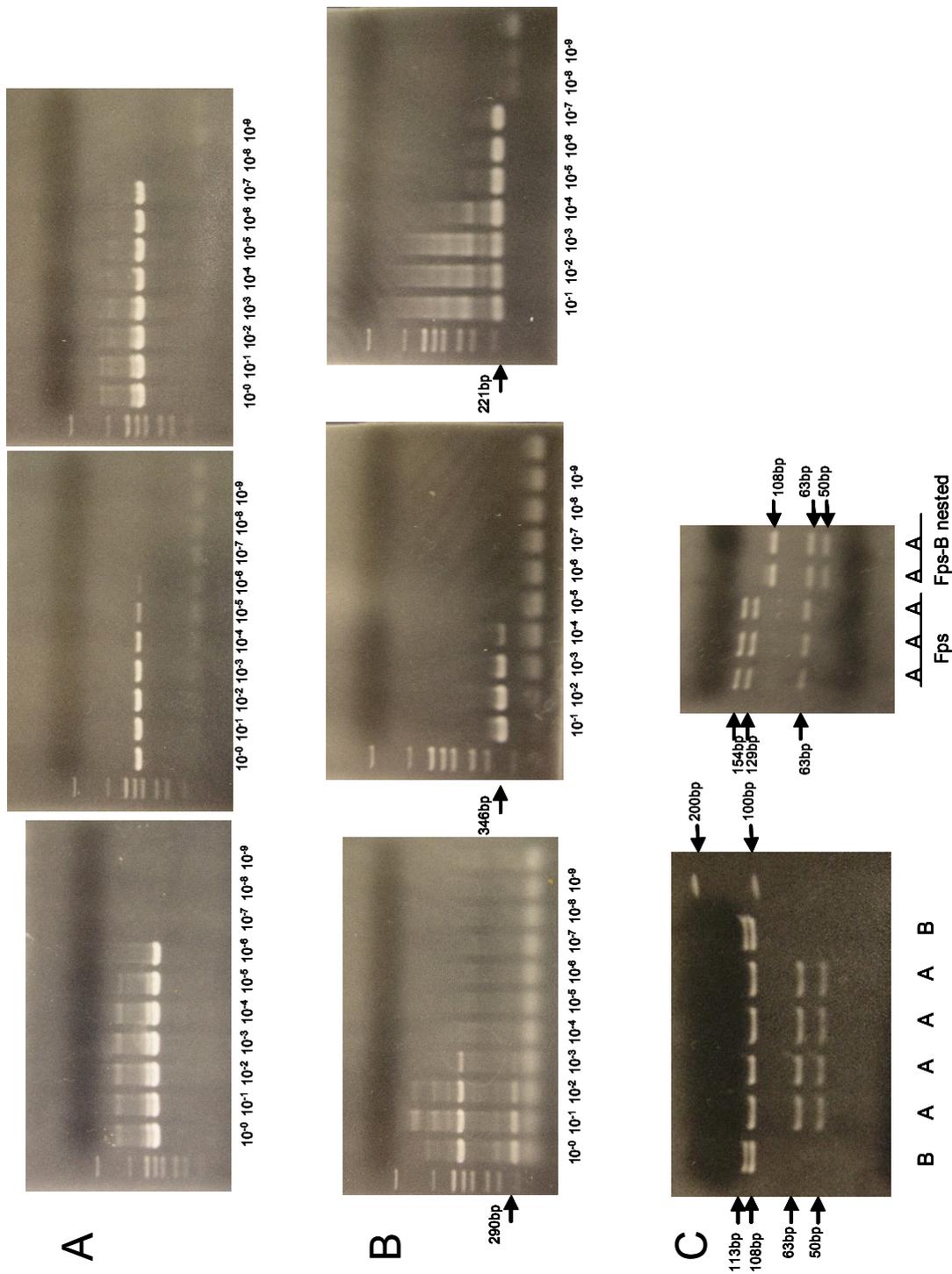
てきたが，近縁の細菌にも反応する疑いがあるといわれ出したために，最近では，*gyrB*領域の冷水病菌固有と考えられるDNA領域を増幅する，PSY-Gプライマー(PSY-G1F, PSY-G1R)を用いたPCR(PSY-G PCR, Izumi and Wakabayashi 2000)を併用使用することが奨励されている。一方環境中では，対象とする冷水病菌の生息密度が非常に低いと予想されるため，単独のPSY-G PCRのみでは検出できにくいと思われる。

そこで，今回*gyrB*領域のユニバーサルプライマー(GYR-1, GYR-1R)を用いたPCR(GYR-B, Izumi and Wakabayashi 2000)を1stPCRとしてPSY-G PCRを2ndPCRとするnested PCR化を検討した。内水面漁業センターで保存している冷水病菌(0180-4K株)から，Chelex100法(Izumi *et al.* 2005)によって得られたDNA抽出液の10倍希釈系列をDNAテンプレートとし，上記3種類のプライマーセットを用いて増幅した。それらを1%アガロースゲルを用いて100Vで30分間電気泳導し，EtBr染色後，UV照射により増幅DNAバンドを検出した(第1図A)。各プライマーセットで検出できた最大希釈倍率は，16S rRNA nested法が 10^{-6} ，Psy-G単独法が 10^{-5} ，Psy-G nested法が 10^{-7} であった。このようにPsy-G単独PCRをnested化することにより，検出感度を 10^2 倍上昇できることが明らかになった。この手法は，環境中からの冷水病菌検出のためのより有

*Tel: 078-941-8601. Fax: 078-941-8604. Email: kazuo_tabata@pref.hyogo.jp

兵庫県立農林水産技術総合センター内水面漁業センター(679-3442 兵庫県朝来市田路1134)

現所属：兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター(674-0093 兵庫県明石市二見町南二見22-2)



第1図 冷水細菌検出PCRの比較。
 A: 冷水細菌検出プライマーの感度比較 (左から, 16S rRNA nested, PSY-G, PSY-G nested), B: A, B 遺伝子型検出プライマーの感度比較 (左から, GYR-B, FPS, FPS-B nested), C: RFLP (左から, FPS-B nested, FPS と FPS-B nested の比較)。

効な検出方法になるものと考えられる。

遺伝子型の決定 次に 検出された冷水病菌をアユ特有と考えられているA型菌と他の魚種に多いB型菌とに分ける必要があるが、上記2種類のnested PCR産物は直接この型別に使用できない。これに必要なDNA領域は、PSY-G nested PCRの1stPCR (GYR-B)の増幅の際、副次的に増幅されてくる領域である (Rotamase遺伝子領域の一部, Yoshiura 2006)。しかも、分離菌株から抽出したDNAからでさえ、GYR-B単独でこの領域を増幅することに多くの研究者が失敗したため、容易に検出できるプライマーの開発が強く望まれていた。この問題はYoshiura *et al.* (2006)がFPSプライマー (FPS-1F, -1R)を開発することによって解決し、菌株のAB型の判別が容易にできるようになった。

今回、GYR-B法とFPS法の感度比較を前述と同じ方法で行ったところ (第1図B)、各プライマーセットで検出できた最大希釈倍率はGYR-B法が 10^{-3} 、またFPS法が 10^{-4} であった。この結果は、分離菌株では十分な感度であることを示しているが、環境中から直接AB型別を検出するためには、さらに感度の高いプラ

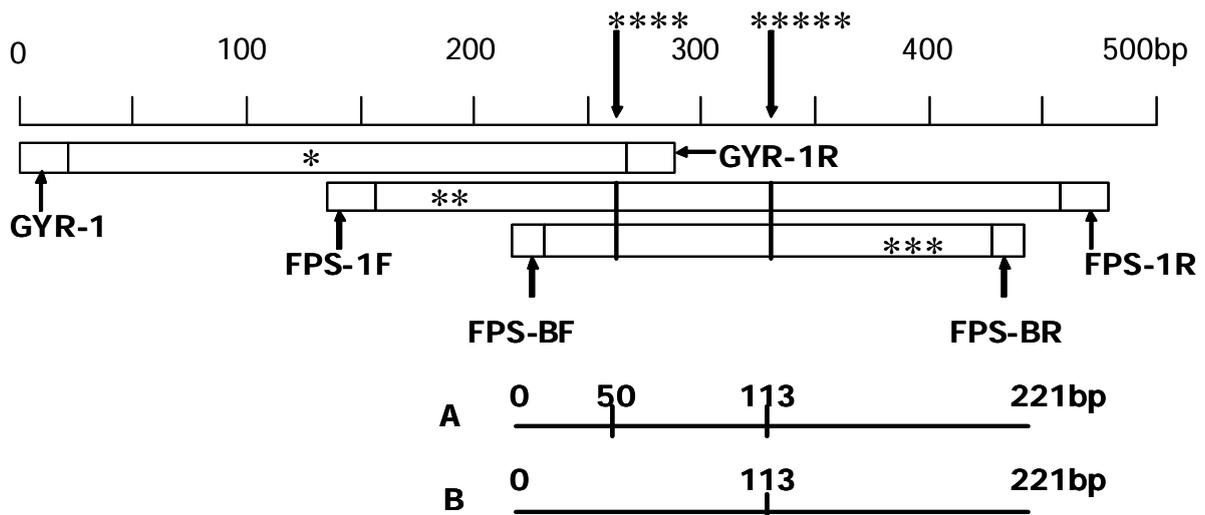
イマーが必要であると考えられた。

Yoshiura (2006)がFPSプライマーを開発する際明らかにしたその周辺の塩基配列から、今回、新たにフリーソフトPrimer3 (Rozen, Skaletsky 2000)を使って、FPSによる増幅領域の内側に新たなプライマーを設計した (FPS-BF, FPS-BR)。これらプライマーのシーケンスは以下のとおりである。

FPS-BF : 20mer 5'-CTTCGATGTGGTTTCTGTGC-3'

FPS-BR : 20mer 5'-ATTGTCTGCAACGGGATTT-3'

なお、GYR-B、FPS、FPS-B各プライマーによるDNA増幅位置の相互関係は、第2図に示したとおりである。FPS-Bプライマーを使ったPCR (FPS-B PCR)増幅は、94℃ 1分、54℃ 1分、72℃ 1分の35回サイクルで行った。反応液の全量は10 μ lで行い、反応液組成はTaq (TaKaRa EX Taq 5U/ μ l) 0.05 μ l、10X PCR Buffer 1.0 μ l、dNTP mix 0.8 μ l、蒸留水 4.15 μ l、プライマー各1 μ l、テンプレートDNA (FPS-1F, -1R PCR産物を1/10TEで20倍に希釈したもの) 2 μ lとした。なお、プライマー濃度はそれぞれ5 pmol/ μ lとした。1stPCRをFPSで行い、この増幅産物をテンプレート



第2図 冷水病菌のA、B遺伝子型を決めるロタマーゼ遺伝子領域の検出に用いる3種類のプライマーセットの位置関係

*はGYR-Bプライマー (GYR-1, GYR-1R)による副次的増幅領域 (Izumi *et al* 2003); **はFPSプライマー (FPS-1F, FPS-1R)による増幅領域 (Yoshiura *et al* 2006); ***はFPS-Bプライマー (FPS-BF, FPS-BR)による増幅領域 (本研究); ****は、制限酵素 *Hinf*Iの変異制限サイト; *****は *Hinf*Iの制限サイト; A, BはFPS-Bによる遺伝子型A, Bの切断位置をそれぞれ示す。

DNA として FPS-B PCR (FPS nested PCR) を前述と同じ方法で行った(第1図B)。この方法で検出できた最大希釈倍率は 10^{-7} であった。つまり, GYR-B法よりも 10^4 倍, FPS法よりも 10^3 倍の感度上昇が確認された。

次に, 既知の冷水病菌を材料にして FPS nested法で増幅した PCR 産物を制限酵素 *Hinf*I で切断した RFLP (制限酵素断片長変異) 像を第1図Cに示した。増幅断片の50番目の塩基が変異制限サイト (Izumi *et al.* 2003) であるため B 型の113塩基長断片が, A 型では50塩基長断片と63塩基長断片に分かれていることが第2図から理解できる。また, B 型の FPS PCR および FPS-B nested PCR の RFLP 像の比較も示した(第1図C)。63塩基長断片が共通であることが第2図から理解できる。

まとめ GYR-B および FPS 法では絶対的感度が低いため, 環境サンプルに直接応用することはできなかったが, 今回 FPS PCR および PSY-G PCR の nested 化を試みた結果, 感度の大幅上昇化に成功した。河川環境サンプルから培養法によることなく冷水病菌の検出と AB 型別を知ることができる素地ができたと考える。

文 献

- Colwell RR, Grimes DJ (2004) 培養できない微生物たち 自然環境中の微生物の姿 (遠藤圭子訳), 学会出版センター, 東京, 1-329.
- 井上 潔 (2000) アユの冷水病. 海洋と生物, **126**, 35-38.
- Izumi S, Wakabayashi H (2000) Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* **35**, 93-94.
- Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**, 207-214.
- Izumi S, Fujii H, Aranishi F (2005) Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *Journal of Fish Diseases*, **28**, 559-564.
- Rozen S Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* **132**, 365-86.
- 田畑和男 (2004) 河川における冷水病菌をめぐる在来魚と放流アユとの関係. 日水誌, **70**, 318-323.
- 田畑和男 (2006) アユ非生息期における河川環境中からの冷水病菌の初分離. 兵庫農技総セ研報 (水産編) **39**, 27-30.
- Toyama T (1994) Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR target 16s ribosomal RNA. *Fish Pathol.* **29**, 271-275.
- Yoshiura Y (2006) Direct Submission to the DDBJ/EMBL/GenBank databases. AB254195.
- Yoshiura Y, Kamaishi T, Nakayasu C, Ototake M (2006) Improved method for genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* detection and genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR targeted to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C (PPIC) gene. (in press)