

アユの冷水病原菌である *Flavobacterium psychrophilum* の Gyr-A 領域の DNA 塩基配列

大原健一, 武藤義範

DNA sequence of *Flavobacterium psychrophilum* Gyr-A gene

KENICHI OHARA AND YOSHINORI MUTO

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) の冷水病原菌である *Flavobacterium psychrophilum* は、特に河川におけるアユ漁業・養殖業に甚大な被害を与えている。一方で、*F. psychrophilum* には様々な遺伝子型 (Genotype) が存在することが報告されており、血清型 (Serotype)、PCR-RFLP (DNA 構造多型)、プラスミド型 (Plasmid type) 等によって類別される (Izumi et al., 2003; Izumi and Aranishi, 2004a, b; Izumi et al., 2007; Arai et al., 2007; Shah et al., 2012)。また、遺伝子型によって、宿主や病原性が異なることも指摘されている (田畑, 2004)。しかし、県内で分離された冷水病原菌についての遺伝子型の類型はわかっていない。

そこで、本研究では、2014 年に当研究所に魚病診断のため養殖場あるいは内水面漁協、および放流用種苗として保菌検査用として持ち込まれたアユから分離された *F. psychrophilum* の Gyr-A (DNA-gyrase のサブユニット A) 領域の一部の DNA 塩基配列を決定し、これまでに報告されている塩基配列と比較した。

キーワード：冷水病、*Flavobacterium psychrophilum*、DNA、Gyr-A、シーケンス

材料と方法

供試した *F. psychrophilum* を Table 1 に示した。A-Farm (A 養殖業者) は、地理的に離れた 2 つの養殖場 (A

および B) を保有しており、2014 年 3 月 28 日に持ち込まれたそれぞれの養魚場の 2 つ池の死亡魚から *F. psychrophilum* を分離した (A-1、A-2、B-1、B-2)。C-River (C 河川) は種苗放流後の 2014 年 5 月 8 日に持ち込まれ

Table 1. Origin of *Flavobacterium psychrophilum* analysed

Origin of bacteria	Collection day	
Isolated from dead fish in cultured pond A-Farm	Pond No.	
	A-1	2014. 3. 28
	A-2	2014. 3. 28
	B-1	2014. 3. 28
	B-2	2014. 3. 28
Isolated from dead fish in river C-River		2014. 5. 8
Isolated from fish before release D-River		2014. 5. 16

た河川における死亡魚から、D-River(D 河川)は、放流に用いる種苗を保菌検査したサンプルから *F. psychrophilum* を分離した。なお、C-River (C 河川) は A-Farm(A 養殖業者)のみから放流種苗の供給を受けており、D-River(D 河川)で保菌検査したアユは琵琶湖産系の種苗であった。持ち込まれたアユの鰓あるいは腎臓を改変サイトファーガ寒天培地に塗抹、4℃ (鰓) 及び 15℃ (腎

臓) で培養後、*F. psychrophilum* と思われる黄色コロニーから DNA を熱水抽出し、*F. psychrophilum* であることを同定後 (Izumi et al., 2003; Izumi and Aranishi, 2004a, b; Izumi et al., 2007; Arai et al., 2007; Shah et al., 2012)、供試した。Gyr-A 領域のシーケンス(塩基配列決定)はダイレクトシーケンス法を用いた。PCR プライマーは既知の塩基配列(AB158102)より、Primer3(Rozen and Skaletsky,

Table 2. Known data of *Flavobacterium psychrophilum* analysed

Accession number	Isolate no	Host fish	Isolation year	Isolation locality
AB158101	NCIMB1947	Coho salmon	Unknown	USA
AB158102	FPC826	Coho salmon	1980	USA
AB158103	FPC828	Coho salmon	1990	Miyagi
AB158104	FPC840	Ayu	1987	Tokushima
AB158105	FPC924	Ayu	1992	Wakayama
AB158106	FPC931	Ayu	1993	Hiroshima
AB158107	AA9401	Ayu	1994	Aichi
AB158108	FPC956	Ayu	1994	Shiga
AB158109	YMA9609	Ayu	1996	Yamanashi
AB158110	GFA9604	Ayu	1996	Gifu
AB158111	KNA9801	Ayu	1997	Kanagawa
AB158112	OKA9806	Ayu	1998	Okayama
AB158113	IP980601	Ayu	1998	Iwate
AB158114	MG980922-1	Ayu	1998	Miyagi
AB158115	YMA980608	Ayu	1998	Yamagata
AB158116	FPC814	Rainbow trout	1991	Tokyo
AB158117	FPC942	Rainbow trout	1994	Yamagata
AB158118	YMR9615	Rainbow trout	1996	Yamanashi
AB158119	OKR9801	Rainbow trout	1998	Okayama
AB158120	OKR9802	Rainbow trout	1998	Okayama
AB158121	FKR9801	Rainbow trout	1998	Fukui
AB158122	FPC958	Amago	1994	Tottori
AB158123	FKM9801	Amago	1998	Fukui
AB158124	OKM9801	Amago	1998	Okayama
AB158125	FPC945	Oikawa	1993	Hiroshima
AB158126	OY990ik-1	Oikawa	1999	Okayama
AB158127	YMY9604	Yamame	1996	Yamanashi
AM398681	JIP02/86 / ATCC 49511	Rainbow trout	-	-
HQ113166	F.nr 3984	Brown trout	1999	Western Norway
HQ113167	F.nr 4115	Atlantic salmon	2000	Western Norway
HQ113168	F.nr 4498/ATCC49418	Coho salmon	-	-
HQ113172	F.nr 6352	Atlantic salmon	2008	Western Norway
HQ113173	F.nr 6645	Atlantic salmon	2007	Western Norway
HQ113174	F.nr 6646	Atlantic salmon	2009	Western Norway
HQ113175	NCIMB1947	Coho salmon	-	-
HQ113176	F.nr 3922	Brown trout	1998	Western Norway
HQ113177	F.nr 3738	Atlantic salmon	1997	Western Norway
HQ113178	F.nr 3892	Brown trout	1998	Western Norway
HQ113179	F.nr 3987	Brown trout	1999	Estern Norway

*Modified Izumi et al., (2007) and Shah et al., (2012)

2000)を用いて設計した。プライマーの配列を下記に示す。

gyrA-F(Forward primer)

5'-GGTGCACAGAAGGGTTTG-3'

gyrA-R(Reverse primer)

5'-AGGCATTACTTTTGGCTCGT-3'

PCR 反応は Ex-Taq (タカラバイオ社製 DNA polymerase) を用いて下記の組成で行った。10×Ex-Taq buffer を 2.5 μL、dNTP(2mM) を 2 μL、gyrA-F および gyrA-R プライマー (10pmol/μL) を 0.5 μL ずつ、Ex-Taq (5u/μL) を 0.125 μL、DW(蒸留水) を 18.375 μL、DNA テンプレートを 1 μL とした。PCR 反応物の精製は Agencourt AMPure XP (ベックマン PCR 反応は 94°C5 分の熱変性の後、94°C30 秒、53°C30 秒、72°C 30 秒を 30 サイクル、その後 72°C7 分の伸長反応とした。PCR 終了後、PCR 反応液(5 μL)を用いてアガロースゲルによる電気泳動を行い、PCR 産物の有無を確認した。電気泳動は 3% アガロースゲルを用いて、1×TAE buffer を緩衝液として、100V で 25 分間行った。サイズマーカーとして 100bp ladder maker (タカラバイオ社製) を用いた。電気泳動の結果、設計したプライマーから予測される 350bp の増幅断片が確認された。コールター社製) を用いた。PCR 反応物は 20 μL を用いて、定法に従って精製を行った。シーケンス反応は、DTCS クイックスタートキット(ベックマンコールター社製)を用いて下記の組成で行った。Master Mix を 2 μL、gyrA-F あるいは gyrA-R プライマーを 1 μL (3.2pmol/μL)、精製 PCR 産物を 8 μL (約 300ng) とした。シーケンス反応は、96°C20 秒、50°C20 秒、60°C3 分を 35 サイクルとした。シーケンス反応は、gyrA-F および gyrA-R をそれぞれ用いて行った。シーケンス産物の精製は CleanSEQ (ベックマンコールター社製) を用いて、定法に従って精製を行った。精製したシーケンス産物は DNA シーケンサー (CEQ8000、ベックマンコールター社製) により塩基配列を決定した。

決定した塩基配列について clustalW を用いて相同性の高い配列を探し、相同性の高い 37 個の既知の配列を含め、近隣結合法により系統樹を作成した(Kosuge et al., 2014)。

結 果

本研究で分析した 6 サンプルから、Gyr-A 領域の 304 塩基を決定し、2 つの遺伝子型が検出された。A-Farm (A 養殖業者) の A-1、A-2、B-1、B-2 および C-River (C 河川) は全く同じ遺伝子型であった。一方で、D-River (D 河川) のサンプルは異なる遺伝子型が検出された。比較のために使用した 39 個の既知の配列の ISND (国際塩基配列データベース) Accession number は AB158101~AB158127、AM398681、HQ113166~

68、HQ113172~HQ113179 であった(Table 2)。その結果、5 ヶ所の変異サイトが検出され、8 つの遺伝子型 (Gyr-I~Gyr-VIII) が同定された。変異サイトを Table 3 に示し、近隣結合法により作成した系統樹を Fig. 1 に示した。

Table 3. The variation site of Gyr-A region of *Flavobacterium psychrophilum*

Genotype	Variation site				
	113	114	125	190	211
Gyr-I	A	C	G	C	T
Gyr-II	-	T	-	-	-
Gyr-III	-	T	-	-	-
Gyr-IV	G	-	-	T	-
Gyr-V	-	-	-	T	-
Gyr-VI	-	-	T	T	-
Gyr-VII	G	-	-	T	C
Gyr-VIII	-	-	-	T	C

Gyr-I には HQ113166~68、HQ113172~HQ113179、AB158101、AB158103、AB158109、AB158122、AB158124~AB158126 の 18 個が含まれた。Gyr-II には AM398681 が、Gyr-III には AB158112 および D-River (D 河川) が含まれた。Gyr-IV には AB158119 および AB158120 が、Gyr-V には AB158102、AB158116、AB158118、AB158123、AB158127 が含まれた。Gyr-VI には AB158121、Gyr-VII には AB158117 のみがそれぞれ含まれた。Gyr-VIII には AB158104~AB158108、AB158110、AB158111、AB158113~AB158115、A-Farm の A-1、A-2、B-1、B-2 および C-River が含まれた。Fig. 1 に示した系統樹に、塩基配列が決定された *F. psychrophilum* を分離した宿主の魚種を示した。Gyr-I にはタイセイヨウサケ (*Salmo salar*)、ブラウントラウト (*S. trutta*)、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、オイカワ (*Opsariichthys platypus*)、アマゴ (*On. masou ishikawae*) およびアユ由来の菌株が含まれていた。Gyr-II の AM398681 の配列は、菌株の由来が不明であった。Gyr-III には、アユ由来のみであり Gyr-IV はニジマス (*On. mykiss*) 由来のみであった。Gyr-V はギンザケ、ニジマス、アマゴ、ヤマメ (*On. m. masou*) 由来の菌株が含まれていた。Gyr-VI および Gyr-VII は両者ともニジマス由来であった。また、Gyr-VIII はすべてアユ由来であった。

考 察

本研究では、2014 年に当研究所に持ち込まれたアユから分離された *F. psychrophilum* と既知の塩基配列と比較した。その結果、2 つの異なる遺伝子型が決定された。そのうち、

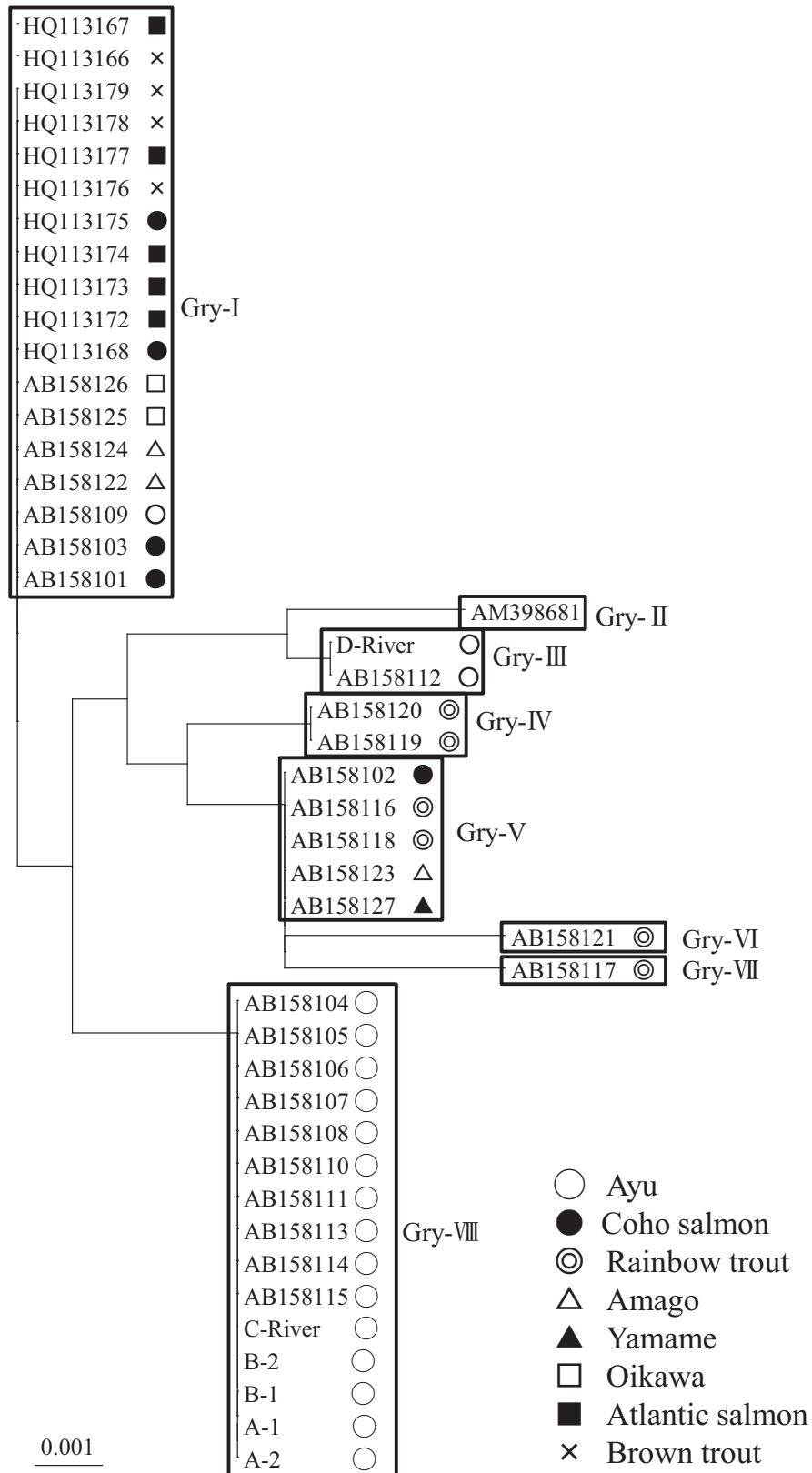


Fig. 1. Neighbor joining tree relating genotypes of Gyr-A region of *Flavobacterium psychrophilum*. The diagrams indicated hosts of *Flavobacterium psychrophilum*.

A-Farm(A 養殖業者)およびC-River(C 河川)が含まれていた、Gyr-VIIIの遺伝子型は、過去の報告においてもアユのみから分離されていた。また、D-River(D 河川)が含まれた Gyr-IIIも同様に、アユのみから分離されていた。このことは、アユ以外とアユで発症する冷水病は異なる遺伝子型を持つことを示唆しているものと考えられる。

A-Farm(A 養殖業者)とC-River(C 河川)から分離された冷水病原菌が全く同じ遺伝子型であった。C-River(C 河川)は死亡魚を取り上げた 2014 年 5 月 8 日時点では、A-Farm(A 養殖業者)由来の種苗のみを放流し、放流が終了してから 2 週間が経過していた。このことから、A-Farm(A 養殖業者)で発症した冷水病原菌が放流によって河川に持ち込まれC-River(C 河川)で発症したと考えられた。また、このGyr-VIIIの遺伝子型は 1996 年に単離された *F. psychrophilum* (AB158110)と全く同じ遺伝子型であった(Izumi et al., 2004)。また、A-Farm(A 養殖業者)のA-1、A-2、B-1、B-2の4つの養殖池から分離された *F. psychrophilum* も全く同じ遺伝子型であった。A-1 およびA-2、B-1 およびB-2 はそれぞれ隣接した養殖池であり、水源も同一である。一方で、A-1、A-2およびB-1、B-2 は地理的に離れた位置にある養殖池であり、水源も異なっていた。このことは、2 つの地理的に離れた養殖池で同じ遺伝子型を持つ冷水病が発症したことは、同一の感染源あるいは人為的な移動(輸送)が疑われるであろう。

しかしながら、本研究で分析した領域は Gyr-A 領域の 304 塩基のみであり、5 ヶ所の変異サイトが見つかったのみである。また、ほとんどのアユ由来の *F. psychrophilum* は同一の遺伝子型に類型されるなど、分析部位の変異性が十分であったとは言いがたい。今後は、さらに長い領域や異なる部位の塩基配列を分析することによって、岐阜県内で発生する冷水病の感染経路等の解明に繋がる可能性があると考えられる。

要 約

1. *Flavobacterium psychrophilum* の Gyr-A 領域の 304 塩基を決定した。
2. 比較のために使用した 37 個の既知の配列を含めて、5 ヶ所の変異サイトが検出され、8 つの遺伝子型(Gyr-I~Gyr-VII)が同定された。
3. 新たに検出された遺伝子型は過去にアユで検出されたものと同一であった。

文 献

- Arai, H., Y. Morita, S. Izumi, T. Katagiri and H. Kimura. 2007. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates derived from Japanese fish. *J. Fish Dis.*, 30: 345-355.
- Izumi, S., H. Liu, F. Aranishi and H. Wakabayashi. 2003. A novel serotype of *Flavobacterium psychrophilum* detected using antiserum against an isolate from amago, *Oncorhynchus masou rhodurus* Jordan & Gilbert, in Japan. *J. Fish Dis.*, 26: 677-680.
- Izumi, S. and F. Aranishi. 2004a. Relationship between gyrA Mutations and Quinolone Resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3968-3972.
- Izumi S., and F. Aranishi. 2004b. Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J. Aquat. Anim. Health*, 16: 99-103.
- Izumi, S., S. Ouchi, T. Kuge, H. Arai, T. Mito, H. Fujii, F. Aranishi and A. Shimizu. 2007. PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, 30: 141-147.
- Kosuge, T., J. Mashima, Y. Kodama, T. Fujisawa, E. Kaminuma, O. Ogasawara, K. Okubo, T. Takagi and Y. Nakamura. 2014. DDBJ progress report: a new submission system for leading to a correct annotation. *Nucl. Acids Res.*, 42: D44-D49.
- Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp. 365-386 in S. Krawetz and S. Misener, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Shah, S. Q. A., H. Nilsen, K. Bottolfsen, D. J. Colquhoun, and H. Sørum. 2012. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant *Flavobacterium psychrophilum* isolated from diseased salmonids in Norway. *Microb. Drug Resist.*, 18: 207-214.
- 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. *日本水産学会誌*, 70: 318-323.