

魚類病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* 分離株の基質分解能力

江口 充・福田文美・永田恵里奈*

(環境グループ)

近畿大学大学院農学研究科

*日本学術振興会 PD 特別研究員

冷水病は、低水温期に発病することから名づけられた病気で、主にサケ科魚類の養殖に甚大な被害を与えている。原因細菌は、グラム陰性長桿菌の *Flavobacterium psychrophilum* である。もともとは北米のサケ科魚類の病気であったが、近年、日本全国で様々な魚種について冷水病の発生が報告されており、天然水域での本菌の定着と流行が始まっていると考えられる。

F. psychrophilum には、宿主特異性があり、アユに感染するタイプとニジマスなどのサケ科魚類に感染するタイプは異なると言われている。我々は、*F. psychrophilum* の *gyrA* 遺伝子の塩基配列の多型を用いて、4つの型(アユ型、サケ・マス型、多魚種型、最近出現した型)に型別することに成功した。本研究では、宿主特異性メカニズムを解明する一環として、分離源、種々の基質分解能力、遺伝子型との間に関連があるかどうかを調べた。

材料および方法

供試菌と培養 日本全国の様々な試料より分離された *F. psychrophilum* 231 株を用いた(Table 1)。分離源は、アユ(*Plecoglossus altivelis*)、ワカサギ(*Hypomesus nipponensis*)、コイ科、サケ科、河川水等の環境試料である。*F. psychrophilum* を FLP 培地(Bacto Tryptone 4 g、Yeast extract 0.4 g、CaCl₂·2H₂O 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、Glucose

0.5 g、蒸留水 1 L: pH 7.2~7.4)で対数増殖期前期(OD₆₀₀ = 0.3)まで培養した。この培養液を、OD₆₀₀ = 0.01 になるように希釈し、Casein (Skim milk)、Elastin、Fibrinogen の分解活性を調べるために、各種基質を添加した FLPA 寒天平板(1% agar、skim milk 1 %、Elastin 0.05 %、Fibrinogen 0.1 %)に滴下し、16 °C で 2 週間培養した。そして、寒天平板上に現れたコロニーとコロニー周辺の透明帯の直径をノギスで測定し、「透明帯の直径÷コロニーの直径」を各種分解能力の指数とした(Fig. 1)。

DNA 抽出 FLP 液体培地で培養した対数増殖期の培養液 1 ml を 1.5 ml のマイクロチューブに移し、18,750×g・4°C・10 分間の遠心分離を行った。上清を全て取り除いた後、Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)を用いてDNAを抽出した。実験に用いるまで-20 °Cで保存した。

***gyrA* PCR** *F. psychrophilum* の *gyrA* に特異的なプライマー(GYRA FP1F:

GAAACCGGTGCACAGAAGG と GYRA FP1R: CCTGTGGCTCCGTTTATTAA)を用いて *gyrA* PCR を行った¹⁾。PCR 反応液の組成は次のとおりである: 2.5 μl の 10×KOD Buffer (Toyo Boseki)、2.5 μl の 2 mM d-NTPs (Toyo Boseki Co.)、1.0 μl の 10 μM GYRA FP1F プライマー、1.0 μl の 10

μM GYRA FP1R プライマー、0.1 μl の 2.5 U/μl KOD Dash (Toyo Boseki Co.)、そして 16.9 μl の滅菌 MilliQ 水を混合し、1 μl の鋳型を加えて計 25 μl とした。PCR 反応の条件は、熱変性を 95 °C・5 分、続いて 94 °C・30 秒、53 °C・2 秒、74 °C・30 秒を 30 回繰り返し、最後に 74 °C・5 分の伸張反応を加えた。5 μl の PCR 産物と 3 μl のローディングダイを混ぜ合わせ、0.8 %アガロースゲルで 100 V・40 分間、電気泳動を行って、*F. psychrophilum* に特異的な 396 bp のバンドを確認した。

gyrA PCR-RFLP *gyrA* PCR 産物を Nsi I (New England Biolabs)および *Tsp509* I (New England Biolabs)を用いて切断処理を行った。10 μl の *gyrA* PCR 産物、5 μl の 10×NEBuffer 3 (New England BioLabs)、0.3 μl の *Nsi* I と 34.7 μl の滅菌 MilliQ 水を混合し、37 °C で 2 時間消化処理を行った。10 μl の *gyrA* PCR 産物、5 μl の 10×NEBuffer 1 (New England Biolabs)、0.3 μl の *Tsp509* I と 34.7 μl の滅菌 MilliQ 水を混合し、65 °C で 2 時間消化処理を行った。10 μl の各消化産物と 3 μl のローディングダイを混ぜ合わせ、3 %アガロースゲルで 100 V・40 分間電気泳動を行って、バンドパターンを確認した。

結果

F. psychrophilum 分離株の多くが Skim milk、Elastin、Fibrinogen の分解能を持っていたが、株間で分解能力に差が見られた (Fig. 2)。各種基質分解能力と遺伝子型・分離源との間に関係性は見られなかった。

考察

冷水病の最も代表的な症状として、体表面の出血および穴あきが挙げられる。これらの冷水病の症状は、細胞外タンパク質分解酵素によって引き起こされていると考えられる。本研究で、日本全国で分離された冷水病菌分離株の 3 種の基質

Table 1. Origin of used bacteria and its genotypes.

Origin	<i>gyrA</i> 遺伝子型			
	G-C	G-T	A-C	A-T
Plecoglossidae				
<i>Plecoglossus altivelis</i>	97	11	61	0
Osmeridae				
<i>Hypomesus nipponensis</i>	1	0	2	0
Cyprinidae	0	0	11	2
Salmonidae	0	5	12	22
Environmental samples	2	0	2	3

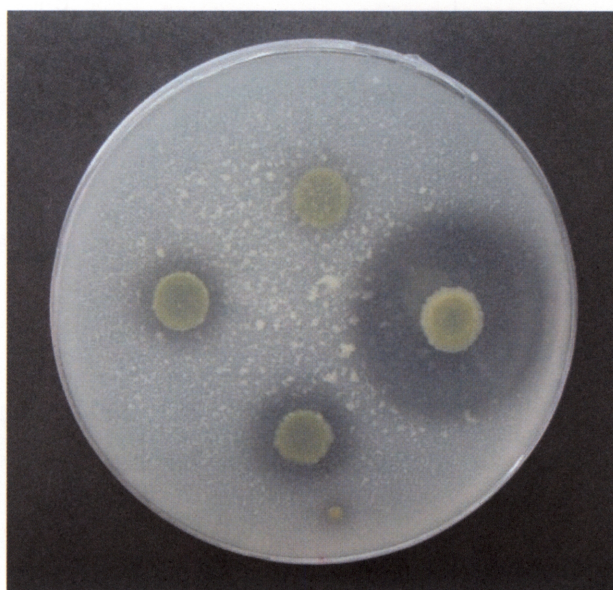


Fig. 1. Skim milk 添加平板における透明帯。

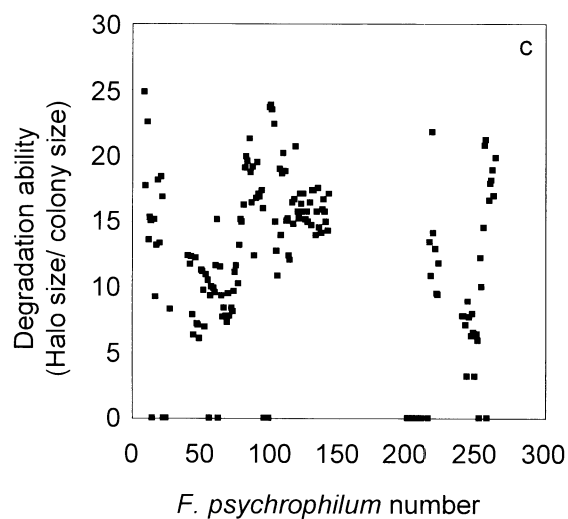
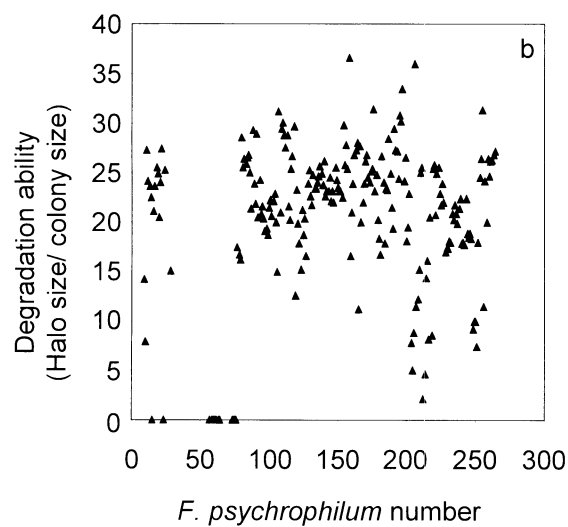
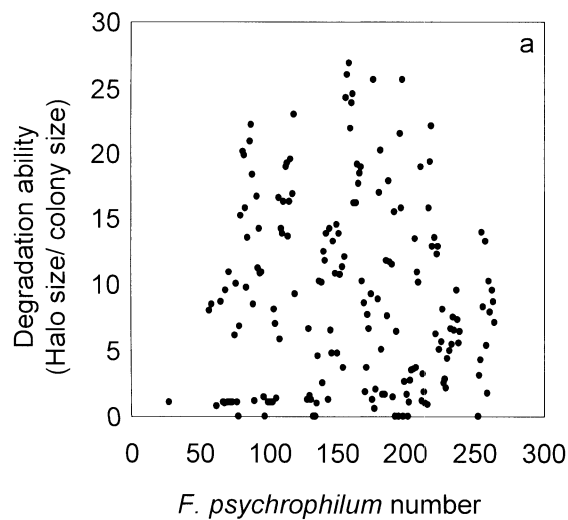


Fig. 2. *F. psychrophilum* 分離株の各種基質分解能力。a: Casein (Skim milk)、b: Elastin、c: Fibrinogen。

分解能力を調べたところ、株によってその能力が異なっていることがわかった。基質間による優劣は見られなかった。基質分解能力と遺伝子型および分離魚種についても検討したが、関係は見られなかった。以上のことから、*F. psychrophilum* の病原性に関与すると考えられるタンパク質分解能力は、宿主特異性とは関係が無いことが示された。

文献

- 1) Izumi S, Aranishi F (2004) Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. Applied and Environmental Microbiology 70:3968-3972