

病原性細菌の非培養系による検出方法の確立

— 冷水病原菌を例として —

永田 恵里奈,¹ 江口 充^{2*}

(環境保全・資源動態グループ)

¹近畿大学水産研究所 COE 博士研究員, ²近畿大学大学院農学研究科

*eguchi@nara.kindai.ac.jp

一般的に病原細菌の検出には、培養法、抗体法および PCR 法などが、単独もしくは組み合わせて用いられている。病魚の組織などから病原菌を検出する場合は、細菌数が多い上、細菌の生理活性も活発なので、これらの方法が有効である。しかし、天然環境水の病原菌を検出するとすると、これらの方法では検出不可能なことが多い。天然環境の細菌は常に様々な環境ストレス(栄養飢餓, pH・温度・浸透圧の変化, 紫外放射など)にさらされており、その影響で生理活性が低く、寒天平板等を用いた培養法で検出できる細菌は総細菌数の 1/1000 以下に減ってしまう。さらに、培養法では培養に時間がかかり、迅速性に欠ける。培養法に比べて抗体法や PCR 法は検出時間が短く優れた方法であるが、近縁種に対する特異性や検出感度が存外に低い。検出感度を上げるため nested-PCR という方法も開発されたが、判定に長時間を要するなど、疫学的追跡調査等で多数の試料を解析する場合には実用的と言えない。

本研究では、天然水域での病原菌を、迅速・精度高く検出する高感度検出系の開発を目的とし、新しい DNA 増幅方法である loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP)法¹⁾の適用を試みた。モデルケースとして、サケ科魚類の養殖に甚大な被害を与えている冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* を標的とした。

材料および方法

供試菌 *F. psychrophilum* SG990302 株を冷水病原菌の代表株として用い、*F. psychrophilum* SG990302 株から抽出したゲノム DNA をポジティブコントロールとした。*F. psychrophilum* SG990302 株は、1999 年に滋賀県で冷水病のアユの腎臓より分離され、滋賀県の冷水病原菌代表株になっている。プライマーの特異性を確認する為に、*F. psychrophilum* の近縁種 8 株、アユビブリオ病原菌 *Vibrio anguillarum* 1 株、そして全国で冷水病原菌として分離された *F. psychrophilum* SG990302 株を含む 43 株の計 56 株を用いた。近縁種 8 株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(NBRC)から基準株をそれぞれ購入した。

細菌の計数 生菌数は MCY 寒天培地を用いた CFU(Colony Forming Unit)法で計数し、総菌数は核酸蛍光染色剤である 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 終濃度 1%) で染色し落射型蛍光顕微鏡により計数した。

ゲノム DNA の抽出 天然環境試料水 500 ml をろ過・遠心分離により最終的に 200 μ l の細菌懸濁液にまで濃縮し、これをゲノム DNA の抽出に用いた。また、*F. psychrophilum* SG990302 株を始めとする純粋培養株については、対数増殖期後期の培養液 200 μ l をゲノム DNA の抽出に用いた。ゲノム DNA の抽出には、Generation Capture Column Kit (Gentra SYSTEMS)を用いた。

PCR 抽出したゲノム DNA の 2 μ l を PCR の鋳型として用いた。アユ冷水病対策協議会が平成 16 年 3 月に発行した「アユ冷水病防疫に関する指針」に従い、16S rDNA を標的遺伝子とした nested-PCR²⁾および DNA ジャイレースサブユニット B (*gyrB*) を標的遺伝子とした PCR³⁾を行っ

た。この指針では、両方の PCR で共に陽性反応が出た場合に *F. psychrophilum* による冷水病と判定している。

LAMP 抽出したゲノムDNAの2 µlをLAMPの鋳型として用いた。本研究では特異性を高める為に、*gyrB* を標的遺伝子とし、プライマー設計を行った。*gyrB*は、16S rDNA よりも進化速度が速いため近縁種間での相同性が少なく、16S rDNA と同様に普遍的に存在しているハウスキーピング遺伝子である。*F. psychrophilum* FPC840株の *gyrB*配列(Accession No. AB012860)から、PrimerExplorer Ver.2(富士通)ソフトを用いてLAMP用プライマーセットを設計した(Fig. 1)。反応は、*Bst* DNA Polymerase (New England BioLabs), dNTPs (Amersham Biosciences), 各プライマーを混和し、鋳型を加えて25 µlの反応液を作成した。そして64°Cで80~120分間保温することによりDNAの増幅を行った。反応産物の特異性の確認のために *Ban*III (TOYOBO)による制限酵素処理を行った。

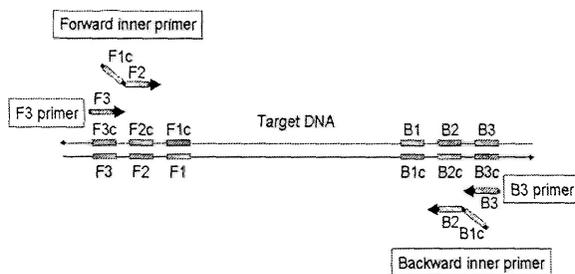


Fig. 1 Primer image of LAMP.

リアルタイム-LAMP 天然環境試料に含まれる *F. psychrophilum* の定量化を行うために、リアルタイム濁度測定装置 Realoop-30 (モリテックス)を用いた定量化の検討を行った。LAMP 反応では、反応副産物として、DNA 鎖が伸長する際に遊離したリン酸と反応バッファー中のマグネシウムイオンが結合してピロリン酸マグネシウムが生成される。⁴⁾ このピロリン酸マグネシウムはDNA 鎖の伸長と比例して蓄積し白濁していくため、一定時間ごとに濁度の測定を行うと、指数関数的増幅曲線を得ることができる。初発のDNA 量が多いほど増幅産物量が検出可能な量に達する

時間は少なくすむので、増幅曲線は早く立ち上がる。従って、段階希釈した標準物質を用いてLAMP 反応を行い、任意の閾値と増幅曲線が交わる点を横軸に、初発DNA 量を縦軸にグラフを描くと直線が得られる。これを検量線として、未知DNA 濃度を知ることができる。検量線作成用の標準物質として *gyrB*-PCR産物の希釈系列を用いた。吸光度から、DNA の純度および濃度を計算により求め、このDNA 溶液を滅菌したMilliQ 水を用いて1/10 ずつ段階希釈し、標準物質の希釈系列を作成した。これらを鋳型としてLAMP を行い、濁度の経時変化を調べた。

結果

***F. psychrophilum* 検出のためのLAMP 反応条件の検討** LAMP では鎖置換型DNA 合成酵素を用いる為、プライマーの塩基配列によっては、プライマー自身を鋳型としたDNA 増幅もしくはプライマーダイマーの形成によるプライマー同士でのDNA 増幅が起こりうる。今回設計したプライマーでは、反応時間が120分を超えてもプライマーダイマーの形成あるいは自己を鋳型とした非特異的な反応が起こらなかった。LAMP 産物を電気泳動すると、標的部位を繰り返しもつスメアーな像が得られるが、標的部位に1箇所だけ存在する *Ban* III の認識部位を切断すると、一本のバンドになった。

近縁種間識別試験および検出感度におけるPCR 法とLAMP 法の比較 従来法であるPCR 法と新規検出手法であるLAMP 法のどちらが近縁種間の識別および検出感度に優れているかの比較を行った。16S rDNA を標的としたnested-PCR では、冷水病原菌として分離された43株のうち41株で1089 bp のバンドが確認できた。近縁種では、*Chryseobacterium balustinum*において、DNA の増幅が見られたが、*F. psychrophilum* と異なるサイズのバンドであった(Fig. 2)。 *gyrB* を標的としたPCR では、供試した冷水病原菌41株で1017 bp のバンドが確認できた。近縁種においては、*F. johnsoniae*, *F.*

flevense, *F. branchiophilum*, *F. aquatile* および *F. columnare* の計 5 株で紛らわしい DNA の増幅が見られたが、このうち 4 株については電気泳動を長く行い、サイズの異なる DNA 断片であることを確認した (Fig. 2)。 *F. aquatile* に関しては、 *F. psychrophilum* の *gyrB*-PCR 産物と同じサイズのバンドであった。 *V. anguillarum* は 16S rDNA および *gyrB* の両方の PCR において DNA の増幅は見られなかった。一方、LAMP では、PCR と同様に冷水病原菌 41 株でのみ DNA の増幅がみられ、近縁種におけるまぎらわしい DNA の増幅はなかった (Fig. 3)。検出限界試験では、16S rDNA を標的とした nested-PCR の場合、1 反応あたり 10^1 cells まで検出した。 *gyrB* を標的とした PCR では 1 反応あたり 10^4 cells まで検出した。一方 LAMP では、 $10^7 \sim 10^2$ cells まで信頼性の高い検出 ($r^2 = 0.99$) が可能であった。

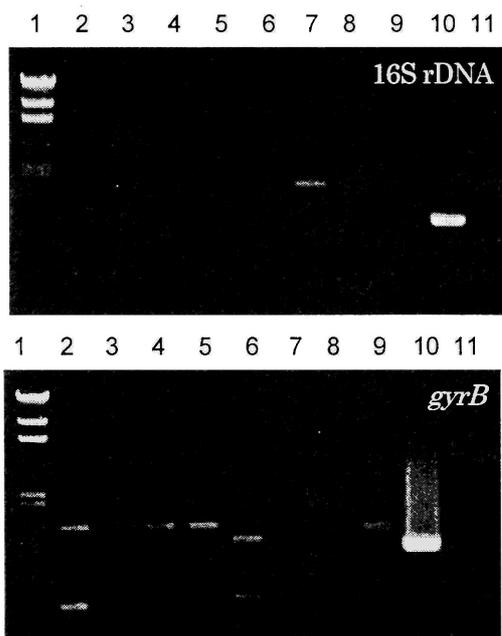


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products. Lane 1: λ Hind III marker; lane 2: *F. johnsoniae* NBRC14942; lane 3: *F. hydatis* NBRC14958; lane 4: *F. flevense* NBRC14960; lane 5: *F. branchiophilum* NBRC15030; lane 6: *F. aquatile* NBRC15052; lane 7: *C. balustinum* NBRC15053; lane 8: *Tenacibaculum maritimum* NBRC15946; lane 9: *F. columnare* NBRC100251; lane 10: *F. psychrophilum* NBRC; lane 11: *V. anguillarum* M93.

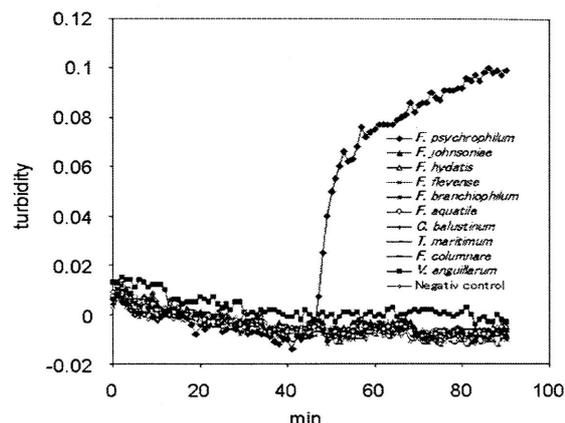


Fig. 3 DNA amplification using LAMP.

検量線の作成と様々な増殖段階の *F. psychrophilum* に含まれる *gyrB* コピー数の把握 SG990302 株の各増殖段階の細胞からゲノム DNA を抽出し、それらを鋳型として LAMP を行った。同時に検量線作成用の標準物質である *gyrB*-PCR 産物の希釈系列 (10 コピーから 10^9 コピー) を作成し、これらを用いて LAMP を行った。その結果、信頼できる検量線 ($y = -0.2007x + 15.247$, $r^2 = 0.99$) が得られ、この検量線から、 *F. psychrophilum* の *gyrB* が 2~3 コピー/cell であることが明らかになった。

天然試料水中の *F. psychrophilum* 数の定量化 天然環境中には、PCR 反応を阻害する物質が多数存在することが知られている。⁵⁾ そこで、実際にどれほどの阻害を受けるのか、また阻害物質の影響を受けてもそれを補正することが可能なのかを検討した。検量線作成用の *gyrB*-PCR 産物を内部標準として加えた試料中に反応阻害物質が含まれている場合、DNA の増幅が抑制され、検量線からずれることが予想される。しかし、全ての DNA 増幅反応が同程度に阻害されるため、ずれた検量線からも標的遺伝子の初期存在量を見積もることができると考えられる。天然河川水から抽出した DNA 溶液 2 μ l に既知濃度の *gyrB*-PCR 産物希釈系列を各 1 μ l ずつ加えて LAMP 反応を行った。予想通り、天然試料に内部標準物質を加えた場合、増幅の立ち上がり時間が検量線よりも少し遅くなった。しかし立ち上がり時間が全体的に同じだけずれたため、相関係数が 1 に近い、信頼できる検

量線($y = -0.1973x + 15.047$, $r^2 = 0.99$)を得ることができ、阻害物質の影響を無視することができた。

考察

LAMP は、栄研化学株式会社が独自に開発した新しい遺伝子増幅法である。LAMP では、PCR とは異なり、標的遺伝子の 6 箇所の領域を認識する 4 種類のプライマーを使用する。それゆえ、PCR よりも特異性の高い DNA 増幅を行うことができる。反応は、鎖置換型で行われ、標的とした遺伝子領域を繰り返し持つ長い DNA 鎖が合成される。この反応は PCR よりも速い。

16S rDNA を標的とした nested-PCR を行うと、 10^1 cells 分の鋳型から DNA の増幅が行われた。nested-PCR は PCR を 2 回繰り返して行うため、少ない鋳型から DNA の増幅が可能になる方法だが、その分手間と時間がかかり、実験室や器具の汚染が生じる危険性もある。また、16S rDNA の nested-PCR で陽性になっても、抗 *F. psychrophilum* 抗体が反応しない株が検出されている。このため、冷水病細菌の判定には、16S rDNA および *gyrB* を標的とした PCR によるダブルチェックを行うことが定められている。しかし、*gyrB* を標的とした PCR では 10^4 cells 以上の鋳型がないと検出できないため、PCR 法を用いた場合の検出感度は非常に低くなってしまふ。鰻をホモジナイズして得た細菌懸濁液や寒天平板で分離したコロニーを対象にした場合は、細菌量が多いので、PCR を用いた判定が有効である。河川などの天然環境を考えた場合、総細菌数は 10^{5-6} cells/ml 程度であり、*F. psychrophilum* が 10^4 cells も含まれている状態というのは考えにくい。さらに、PCR によるダブルチェックでは、ゲノム抽出操作を含まない DNA 増幅と検出という作業だけで 12 時間以上かかってしまふ。これらのことから、多数の試料を扱うことが予想される現場環境のモニタリングや、対処に急を要する養殖魚の病気診断等の場合には、実用的な方法とは言えない。本研究で我々が開発した新規検出方法では、60 分以内に 10^1 コピーまで検出が可能であった。さらに、

DNA 増幅から検出までが 1 ステップで行えるため、実験器具や実験室でのコンタミネーションの心配もなかった。

現在、新規検出手法を用いて天然環境での *F. psychrophilum* の分布調査を行っており、従来法では検出されなかった場所からも本菌を検出している。例えば、これまではアユが遡上できないことから本菌がないとされてきた上流域、水生生物、および底泥にも本菌が存在することがわかってきた。本手法は細菌だけでなく DNA および RNA ウィルス等にも適用することができるため、今後は他の魚病への適用も考えている。

謝辞

供試菌および試料水を提供していただいた滋賀県水産試験場に深謝する。本研究の一部は滋賀県の受託研究費により行った。

文献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**: e63.
- 2) Toyama T, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H. Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathol.* 1994; **29**: 271-275.
- 3) Izumi S, Wakabayashi H. Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol.* 2000; **35**: 93-94.
- 4) Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **289**: 150-154.
- 5) Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WG. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; **65**: 4715-4724.