

はじめに

近年の分子生物学の進歩に伴い、生物種の分類や同定分野にも遺伝子レベルの解析が導入されはじめています。環境創造研究所では種々の遺伝子分析に対応すべく、周辺機器や技術の整備に取り組んできました。本稿では、遺伝子分析の中でも比較的操作が簡便で、迅速に結果が得られるPCR(Polymerase Chain Reaction)法及び*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いた魚病細菌・ウイルス遺伝子の検出について紹介します。

PCR法による魚病細菌・ウイルスの検出

PCR法は、DNA合成酵素を用いて遺伝子の特定領域を試験管内で大量に増幅して検出する手法です。PCR法は、検出対象とする生物種に特異的な遺伝子領域が判明していれば基本的には適用可能であり、いくつかの魚病細菌・ウイルス遺伝子についてもPCR法による検出例が報告されています(表1)。

表1 PCRによる検出が可能な魚病原因細菌・ウイルス

疾病	原因病原体	主な感染魚
細菌性疾病		
連鎖球菌症	<i>Streptococcus iniae</i>	ヒラメ
冷水病	<i>Flexibato psychrophilus</i>	アユ、ギンザケ
類結節症	<i>Pasteurella piscicida</i>	ブリ
ビブリオ病	<i>Vibrio sp.</i>	アユ、サケマス
ウイルス性疾病		
ウイルス性神経壊死症	ノダウイルス(SJNNV)	シマアジ、キジハタ
マダイイリドウイルス症	イリドウイルス(RSIV)	マダイ、ブリ
クルマエビ急性ウイルス症	PADV	クルマエビ

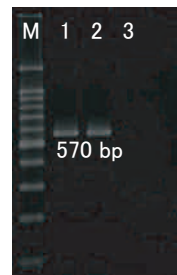
マダイの組織から抽出した全DNAを試料として、イリドウイルスに特異的な遺伝子領域をPCR法で増幅し、電気泳動で検出した結果を図1に示しました。イリドウイルス症を発しているマダイ(レーン2)では、イリドウイルスの標的遺伝子が増幅されたことを示すバンド(570bp)が増幅後の電気泳動で観察できます。

PCRでは、従来の培養法と同程度もしくはそれ以上の検出感度が得られます。近年、全国の河川等で問題とな

っているアユの冷水病の原因菌*Flexibacter psychrophilus*について、PCR法による検出感度を検討したところ、1回のアッセイに $10^0 \sim 10^1$ 細胞のDNA量に相当する10fg以上の冷水病菌DNAを用いてPCRを行った場合に電気泳動で目的サイズ(1089bp)のバンドが確認できました(図2)。また、外観上は健康であり、しかも培養法では検出されなかったアユから、冷水病菌がPCR法では検出された事例も報告されています。

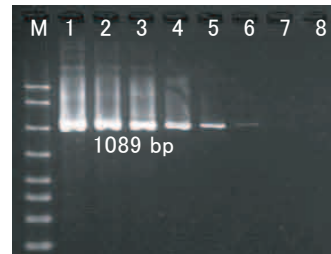
PCR法の分析に要する時間は、試料からのDNAを抽出する工程を含めても、現在では最短数時間で可能です。従来の寒天平板培地を用いた培養法では判定までに少なくとも数日間を要しており、十分な検出感度を備えたPCR法の迅速性は、その魅力のひとつといえます。

図1 PCRによるイリドウイルスDNAの検出



M: 100bp DNAラダーサイズマーカー
1: イリドウイルスDNA(陽性対照)
2: マダイ病魚から抽出したDNA(試料)
3: 鑄型DNAなし(陰性対照)

図2 PCR法による冷水病菌の検出限界の検討



M: サイズマーカー
1: 冷水病菌DNA 1 ng
2: 冷水病菌DNA 100 pg
3: 冷水病菌DNA 10 pg
4: 冷水病菌DNA 1 pg
5: 冷水病菌DNA 100 fg
6: 冷水病菌DNA 10 fg
7: 冷水病菌DNA 1 fg
8: 鑄型DNAなし(陰性対照)

*in situ*ハイブリダイゼーション法 によるアユ冷水病原菌の検出

in situ ハイブリダイゼーション法は、組織もしくは細胞中の標的遺伝子を、酵素や蛍光色素で標識した遺伝子(プローブ)と結合させることによって標的細胞を間接的に染色し、顕微鏡下で検出する手法です。

図3は、アユの冷水病魚から作製した鰓^{モロ}の組織切片に、冷水病菌に特異的な標識プローブを一定条件で反応させた後、通常の組織染色を行い顕微鏡で観察したものです。茶色に染まったアユの鰓組織中に標識プローブが結合して青く観察される細胞が検出された冷水病菌です。本手法は、組織切片の作製に熟練を要するものの、標的とする病原体の魚体組織における分布状況に加えて、宿主の組織についての情報も得られるため、感染症の診断ではPCR法よりも高い頻度で利用されています。

おわりに

今回紹介したPCR法及びハイブリダイゼーション法の遺伝子分析法は、病原体の検出や魚病診断法としては、従来の培養法と同程度もしくはそれ以上の有効性がみられ、その一部については疫学調査への適用が大いに期待できるものです。各種試験業務に用いる供試魚の選定やへい死原因の迅速な究明等、試験魚の品質管理への利用も可能です。

対象とする生物の遺伝子情報が明らかになっていること、もしくは明らかにすることが前提条件となりますが、これらの手法の適用は、魚病細菌・ウィルスの検出に限られるものではなく、今後、生物の類縁性や多様性を探求して高度な遺伝子解析を進めていく上でも、益々重要な技術となるでしょう。

図3 *in situ*ハイブリダイゼーション法による
アユ鰓組織からの冷水病菌の検出



▲は冷水病菌を示す。
左上の写真は冷水病菌の拡大図。

