

## 目 的

異型細胞性鰓病（ACGD）は養殖アユの突然大量死を引き起こすことがある疾病であり、県内のアユ養殖生産に大きな被害をもたらしている。これまでの研究から、ACGD は *Plecoglossus altivelis* Poxvirus (PaPV) の感染により起こると推察されたため、その診断にあたっては特異プライマーを用いた PCR が用いられている。ACGD の特徴の一つとして、他の魚病原ウイルスと比べて発症条件の幅広い点が挙げられ、例えば水温では 12–25°C、時期は 4–11 月、サイズは 10–100 g での発症が確認されている。一方で、他のウイルス性疾病では型や株によって病原性が異なるという報告もあり、ACGD が示す幅広い発症条件の背景には PaPV にも複数の型や株が存在する可能性が考えられる。そこで、ACGD の発症と PaPV の関係に関する基礎的知見を集積することを目的として、現在 PaPV の保有確認に用いられているプライマーセットで増幅される領域について、異なる条件下で ACGD を発症した病魚から得られた PaPV を対象に増幅断片の塩基配列を解読、比較した。

## 材料および方法

**比較対象とした検体** 発症条件の異なる 5 例および過去に県内で発症し陽性対照（PC）として利用している 2 サンプルを塩基配列の比較に用いた（表 1）。

表 1 配列比較に用いたサンプル

| 番号 | 検出年月     | 検出検体       |
|----|----------|------------|
| 1  | 2015. 4  | 稚魚         |
| 2  | 2015. 5  | 稚魚         |
| 3  | 2015. 6  | 稚魚         |
| 4  | 2015. 8  | 成魚         |
| 5  | 2015. 11 | 親魚         |
| 6  | -        | PC（抽出済DNA） |
| 7  | -        | PC（抽出済DNA） |

## シーケンスサンプルの獲得 罹病魚の鰓弁から

GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits（Sigma）を用いて total DNA を抽出した。続いて、Boke30 プライマーセット<sup>1)</sup> (Boke30-Fw:5'-CGATATCATATCTGTGATCG-3', Boke30-Rv:5'-AATGTTGATGTGTCAGGAT-3') を用いて PCR を行った。total DNA 1 μL, Premix Taq™ (TaKaRa) 6.25 μL, MQ 水 1.75 μL, 20 μM Boke30-Fw 0.5 μL, 20 μM Boke30-RV 0.5 μL を混合し、95°C で 2 分間の熱変性の後、95°C で 15 秒間の熱変性、57°C で 30 秒間のアニーリング、

72°C で 30 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして 35 サイクルの PCR 反応を行った後、72°C で 3 分間の最終伸長反応を行った。増幅産物は illustra ExoStar（GEヘルスケア）を用いて精製し、以降のダイレクトシーケンスに用いた。

**シーケンス** 精製 PCR 産物 1 μL, BigDye Terminator V3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) 1 μL, 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems) 1.5 μL, MQ 水 3.3 μL, 1 μM Boke30-Fw 3.2 μL を混合し、95°C で 1 分間の熱変性の後、96°C で 10 秒間の熱変性、50°C で 5 秒間のアニーリング、60°C で 75 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして 25 サイクルのシーケンス反応を行った。産物を Sephatex TG G-50 Medium (GE ヘルスケア) を充填したカラムにより精製し、全量を Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) 5 μl と混合した後、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

**比較領域** Boke30 プライマーセットにより増幅された 302 bp の領域のうち、DBJ に AB747357 として配列が登録されている 270 bp の領域について塩基配列を比較した。塩基配列の波形データの比較は Variant Reporter™ ソフトウェア v1.0 (Applied Biosystems) を用いて行った。

## 結果および考察

Boke30 プライマーセットで増幅される 270 bp の領域について塩基配列を比較した。その結果、AB747357 と同じ塩基配列（以下、1 型）および 1 塩基のみが置換（T/C）した配列（以下、2 型）が確認された（図 1）。全 7 サンプルのうち、1 型は 5 サンプル、2 型は 2 サンプルであった（表 2）。

```

1型 TTGATGTGCCAGGATAACAATAATATAACAAGAATTTACCAATTATATAGAACAAA
2型 TTGATGTGCCAGGATAACAATAATATAACAAGAATTTACCAATTATATAGAACAAA
*****

1型 AATGTTCCAAATGTATCAAATGCTAATAATGACATTATAGTAGACAAATTTTCGTATGGCA
2型 AATGTTCCAAATGTATCAAATGCTAATAATGACATTATAGTAGACAAATTTTCGTATGGCA
*****

1型 AATGTATTAGTACTAGTCCATCTACTATTGAGTTTATAACAACCTGGACATGCCAAAGCAA
2型 AATGTATTAGTACTAGTCCATCTACTATTGAGTTTATAACAACCTGGACATGCCAAAGCAA
*****

1型 ATTGTGCCATGAAGCATTAAATGAACTCAACATCAATGCACAACTGAACTGTGCGAAA
2型 ATTGTGCCATGAAGCATTAAATGAACTCAACATCAATGCACAACTGAACTGTGCGAAA
*****

1型 ATCAAAATCGATTTCTGGATTTTGGGTT 270
2型 ATCAAAATCGATTTCTGGATTTTGGGTT 270
*****

```

図 1 PaPV の塩基配列比較

このことから、今回配列を比較した領域は変異性の高い

部位では無いと考えられた。また、2型の波形データを分析したところ置換部位にわずかなTのピークが認められたことから、2型と判断されたサンプルDNA中には両方の型が含まれていたと考えられた(図2)。

しかしながら、本試験で確認された塩基置換(T/C)はアミノ酸置換を伴わないことから、本領域の変異がウイルスの性質に与える影響はほとんど無いと考えられた。

表2 各サンプルのPaPV型

| 番号 | PaPVの型 |
|----|--------|
| 1  | 1型     |
| 2  | 1型     |
| 3  | 1型     |
| 4  | 1型     |
| 5  | 2型+1型  |
| 6  | 1型     |
| 7  | 2型+1型  |

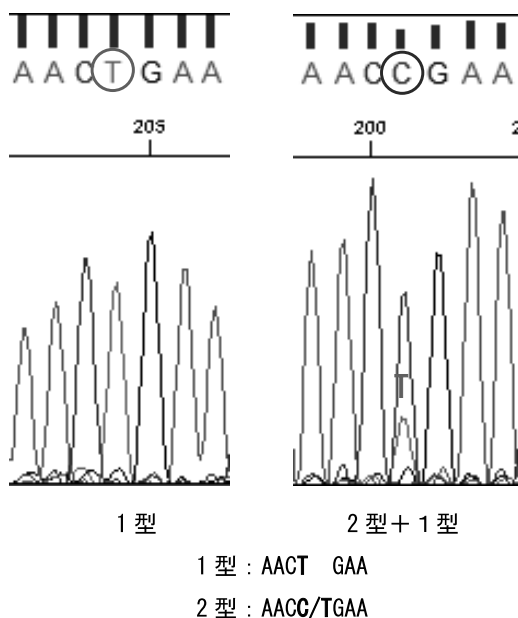


図2 変異部位の波形データと配列

本試験ではPaPVの検出に利用している領域の塩基配列を比較解析の対象としたが、当該部位はCowpox virus 099 proteinとの相同性が高いことが確認されているものの、機能に関する情報は無い。本試験の結果から、当該部位は保存性が高く、ウイルス型の判別には適さないと考えられた。遺伝的情報を基にウイルス型を分類する場合、アミノ酸置換が高頻度にかかるG蛋白が用いられている事例があることから、<sup>2)</sup> PaPVについてもさらなる遺伝的情報の収集と整理に取り組むことにより、今回解析の対象とした検体

についても多くの型が確認される可能性があると考えられた。

#### 引用文献

- 1) 渡邊長生, 尾田紀夫, 和田新平, 福田穎穂. アユの異型細胞性鰓病(通称ボケ病)の被害軽減化技術の開発. 海洋と生物 2015; 37(5): 538-543.
- 2) Mochizuki M, Kim HJ, Kasai H, Nishizawa T, Yoshimizu M. Virulence Change of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus against Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* with Viral Molecular Evolution. Fish Pathology 2009; 44(4): 159-165.

(水産研究部)