

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05953

研究課題名(和文) 寄生性フジツボが宿主カニを寄生去勢する仕組みの解明

研究課題名(英文) Molecular understanding of the parasitic castration in the rhizocephalan barnacles

研究代表者

岡野 桂樹 (Okano, Keiju)

秋田県立大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号：40147070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イソガニフクロムシが寄生した雌イソガニの卵巣は全く委縮したままであり、寄生去勢されていた。その仕組みを明らかにするため、トランスクリプトームの結果に基づいて通常のイソガニ卵巣で高発現する卵巣機能関連遺伝子5種類を選び、qPCRでそれらの遺伝子発現を調べた。その結果、寄生されても有意な減少は見られず、寄生による卵巣への直接的な影響は認められなかった。そこで、卵巣に栄養を供給する中腸腺におけるビテロゲニンの遺伝子発現を調べた。その結果、ビテロゲニンの発現が寄生により劇的に減少することを見出した。以上の結果から、寄生去勢は寄生性フジツボによる栄養収奪の仕組みとリンクしている可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

その特異さが強調されることの多い寄生現象だが、海洋環境下では、一般的な共生現象・生物間相互作用のひとつである。ただし、寄生性フジツボを含め、多くの海洋寄生生物が宿主内にいるとき、その寄生は眼に見えない。寄生という現象自体が、過小評価されていることは事実である。本研究は純粋に「生物学的な不思議の解明をめざす」基礎研究であるが、寄生性フジツボによる寄生は、タラバガニなどの商業的に重要な種でも報告されている。現時点では推測の域を超えないが、寄生性フジツボによる寄生が、海洋生態系や生物分布の重大な制限要因となっている可能性は大いにある。

研究成果の概要(英文)：1. Four transcriptome assemblies were obtained from 3 species of rhizocephalan barnacles (*Parasacculina yatsui*, *Polyascus polygenea*, *Rhizocephala* sp. Oga) and their host crab *Hemigrapsus sanguineus* collected at the Oga Peninsula, Akita, Japan. 2. We investigated the parasitic castration in *P. polygenea* infesting *H. sanguineus*. The ovaries of the parasitized female crabs were atrophied, and the oocytes were barely visible only in the histological sections. To understand this parasitic castration, we performed qPCR analysis of 5 ovary-related genes, highly and selectively expressed in the normal ovaries. The results showed no significant decrease due to parasitism in all five genes examined. Then, we studied the gene expression of vitellogenin in the host hepatopancreas, and found a dramatic decrease in the expression, indicating that the parasitic castration in this experimental system is due to indirect effects of suppression of hepatopancreatic function.

研究分野：海洋分子細胞生物学

キーワード：寄生性フジツボ フクロムシ 寄生 寄生去勢 トランスクリプトーム ビテロゲニン フジツボ 栄養

1. 研究開始当初の背景

- (1) 寄生性フジツボ (根頭上目 Rhizocephala、和名フクロムシ) は、磯で見かけるフジツボと同じ鞘甲亜綱 Thecostraca、蔓脚下綱 Cirripedia に属する。しかし、通常のフジツボは、プランクトンを蔓脚でかすめ取って生きるのに対し、寄生性フジツボは十脚類 (主にカニ) などに寄生して、栄養を宿主から収奪して生きる。寄生性フジツボの成体の形態は、二つの構造体からなる。宿主内構造インテルナと宿主外構造エクステルナである。インテルナは宿主の栄養を収奪し、宿主を支配する役割を持つ。一方、エクステルナは生殖のために特化した複雑な構造体である。寄生性フジツボの特異な寄生形態は、19世紀以来、多くの生物学者の興味を引いてきた。
- (2) 寄生された宿主 (カニ) は寄生フジツボに栄養を収奪されるとともに、自己の生殖機能を奪われ (寄生去勢)、フジツボ胚を扶育する行動を行い、雄カニでは形態、行動の雌化が起こる (擬似雌化)。従って、宿主は“生殖的な死”を宣告され、寄生性フジツボの栄養供給装置、かつ生殖・胚発生・幼生扶育を手助けする乳母ロボットとされてしまう。
- (3) 近年では 18S・28S rDNA 配列などを基に広範な分類・進化の研究が行われている。しかし、ゲノムやトランスクリプトーム研究はなく、遺伝子導入系や培養細胞系もない。寄生の分子機構やカニの擬似性転換の分子機構に関する知見も推測の域を出ない。
- (4) 寄生去勢を含む宿主コントロールの機序については、インテルナが神経系内に入り込み、神経系を破壊するという考えと、ホルモン様物質を分泌し、宿主をコントロールするという説がある。しかし、しっかりした実験系に乏しいため、実験的な証拠はごく少数の寄生性フジツボに限られ、特に分子レベルの研究は存在しない。また、寄生性フジツボが大きな多様性に富む分類群でありながら、分類と同定が困難な問題もあり、ごく少数のデータであたかも全部の寄生性フジツボで当てはまるように議論されることも問題である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の究極的な目的は、「寄生とは何か?」、「寄生去勢とは何か?」という問いを、分子レベルで解明することである。
- (2) そのため、本研究課題では、秋田県男鹿半島の弁天岬に生息し、同じイソガニを宿主とする 3 属 3 種の寄生性フジツボ、すなわち、ヤツフクロムシ (*Parasacculina yatsui*)・イソガニフクロムシ (*Polyascus polygenea*) および *Sacculina* 属に属する未同定種 (*Rhizocephala* sp. Oga) について、寄生に伴う宿主制御、特に寄生去勢に関する実験系を確立し、実験事実を集積し、寄生による宿主コントロール、特に寄生去勢に関する分子レベルの仮説を得ることを目的とした。
- (3) 具体的には、3 属 3 種の寄生性フジツボにおいて、インテルナ、エクステルナ、および幼生時のトランスクリプトームを取得し、インテルナに特異的に高発現するペプチドホルモンや内分泌に関与する遺伝子群 (寄生による宿主制御に関わる可能性のある遺伝子群) を抽出する。
- (4) 宿主であるイソガニの寄生去勢のターゲットの可能性のある卵巣、精巣・輸精管・造雄腺、肝臓、神経系のトランスクリプトームを取得し、寄生や寄生のターゲットとなる可能性のある遺伝子群を抽出する。
- (5) 3 属 3 種の寄生性フジツボが寄生したイソガニにおいて、寄生に伴いどのような変化が起こるのかを形態と分子の両面から調べる。特に寄生去勢の実体について詳しく調べる。
- (6) (3) で得られた結果を元に、主にペプチドホルモンのホモログについて、組換えタンパク質を調製する手法を確立し、その機能を調べる。
- (7) 最終的に、遺伝子データに基づいた実験結果に基づく寄生去勢を中心とした寄生現象の実体に関する仮説を提出する。

3. 研究の方法

- (1) 寄生性フジツボは秋田県男鹿半島の弁天岬の限られた領域で採取されてものを、秋田県立大学に持ち帰り、小水槽内で 1 個体ずつ分けて飼育したものを使用した。一部の実験ではお茶の水女子大学湾岸生物教育研究所 (館山臨海実験所) の協力を得て、千葉県館山で採集された寄生性フジツボも使用した。
- (2) 種の同定には、孵出したノープリウス幼生の 18SDNA 配列を使用した。
- (3) RNA later 保存または直接液体窒素で凍結された組織を使用し、NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) を用いて RNA 抽出し、Agilent Bioanalyzer を用いて高品質であることを確認した後、TruSeq RNA sample preparation kit v2 (Illumina, USA) または TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep kit (Illumina, USA) を用いて、次世代シーケンス用ライブラリーを作製した。得られた配列は Trinity を用いて *De novo* assembling し、RSEM、Bowtie2、EdgeR、Omicsbox、in-house BLAST search などを用いて解析した。
- (4) qPCR は ReverTra Ace qPCR RT kit で作製した cDNA を template として、Thunderbird SYBR qPCR を用いて行った。
- (5) インテルナに特異的に発現しているペプチドホルモンホモログの遺伝子を単離して発現ベクターへ組み込み、大腸菌発現系による組換えペプチドの作製を試みた。
- (6) ノックダウン実験のための dsRNA 作製には、MEGAscript RNAi kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

4. 研究成果

(1) 寄生性フジツボのトランスクリプトームの取得と解析

ヤツフクロムシ、イソガニフクロムシ、*Sacculina* 属に属する未同定の1種、合計3属3種について、インテルナに特異的に高発現する遺伝子の中で、シグナルペプチド配列をN末端に持つ分泌タンパク質と膜貫通領域を持つ膜タンパク質を選抜し、その中から生殖や栄養に関連するグループを選抜した。具体的には CHH、Neuroparsin、insulin 様ペプチドホモログ、JH 結合タンパク質、脂質結合性のある MD-2 ドメインタンパク質を選抜し、解析した。

(2) 宿主イソガニのトランスクリプトームの取得と解析

イソガニの卵巢、精巢、輸精管、造雄腺、肝臓に特異的に高発現する遺伝子群の中で、アノテーションから見て、それぞれの器官の働きの重要なものを選抜した。具体的には、Insulin-like androgenic gland hormone (造雄腺ホルモン)、Vitellogenin, Vitellogenin-receptor などを選抜し、解析した。

(3) 雌イソガニに寄生した場合の寄生去勢：

男鹿半島では、正常雌は5月から8月にかけて数回卵巢が成熟し、受精した胚を腹部に抱える。一方、寄生された雌カニは卵巢の成熟が見られず、抱卵することもなかった。卵巢内の卵母細胞は組織切片を用いて拡大して初めて判別可能なほど小さかった。そこで、卵巢の成熟抑制をもたらす原因を探るため、卵巢に特異的に高発現する Hs-Vitellogenin receptor などの5種の遺伝子が寄生時にどのように変化するかを qPCR で検討した。その結果、調べた5遺伝子において、寄生による有意な減少は見られなかった。したがって、寄生性フジツボは宿主の卵巢機能を直接抑制するわけではないことが判明した。そこで、雌の中腸腺における卵黄タンパク質遺伝子の発現を qPCR で調べた。その結果、正常雌では卵巢の発達に応じて、劇的に増加する一方、寄生された個体ではその発現量はほぼ0のままであった。以上の結果から寄生による雌カニの卵巢の発達抑制は、中腸腺で卵黄タンパク質の生産がほぼ完全に抑制されることが原因である可能性が高いことが明らかになった。

(4) 雄イソガニに寄生した場合の寄生去勢：

寄生性フジツボの寄生によるイソガニ雄個体の造雄腺への影響を形態観察と造雄腺ホルモンの遺伝子発現の点から調べた。その結果、宿主の造雄腺の形態には大きな変化はなく、造雄腺ホルモンの遺伝子発現は減少せず、むしろ統計的には有意ではないものの、寄生されたときのほうがむしろ増加している結果が得られた。しかしながら、寄生雄個体の形態、すなわち、鋏の小型化、およびフンドシ部分の雌化は顕著に誘導されていた。この結果から、フクロムシの雄個体で見られる精巢への軽度の縮小傾向や形態の疑似雌化は、造雄腺ホルモンの減少に由来しない可能性が高いことが明らかとなった。

(5) ヤツフクロムシのインテルナに高発現するペプチドホルモンホモログの組換え体作製：

Neuroparsin と CHH ホモログを大腸菌で発現させるシステムを構築した。どちらも3対以上の分子内ジスルフィド結合を有するため、可溶性タンパク質と融合させて発現させた。Neuroparsin については、可溶性画分へのタンパク質の回収率が高い宿主とベクターの組み合わせを見出すに至らなかったが、CHH ホモログについては精製品を得ることができた。これを用いて、(3) で述べた宿主の卵黄タンパク質生産の抑制に PcCHH-2 が関わるかの検討が今後可能となるが、中腸腺の体外培養系の構築が課題となっている。

(6) 寄生去勢に伴って起こる行動変化の解析：

フクロムシの寄生去勢に伴って起こる行動であるフンドシ部分が開閉する現象の解析を、主にイソガニフクロムシを用いて行った。その結果、フンドシ部分が開閉する現象は、これまで抱卵したカニの雌が、フンドシ部分で発生する胚に酸素を供給するための行動とされていたが、フクロムシがバーজনかマチュアかに関わらず、少なくともエクステルナが形成されると、宿主にこの行動が誘起されることが判明した。この行動の誘起が寄生去勢と連動するか否かは今後の問題である。

(7) ノックダウンの手法の検討：

フクロムシの遺伝子のノックダウンの手法は報告がない。構造的にみて、dsRNA を投与できる可能性があるのは、宿主外部に形成されるエクステルナだけである。そこで、エクステルナに高発現するニューロパーシン(インテルナタイプとは別)の dsRNA をつくり、エクステルナに導入する実験系の構築を目指した。その結果、工夫を重ねることで、エクステルナのニューロパーシン遺伝子発現が有意に減少する条件があること、すなわち、フクロムシの系でノックダウンが可能であることがわかった。エクステルナに導入した dsRNA がインテルナに移行し、インテルナの遺伝子発現のノックダウンが起こるか否かは今後の問題である。

(8) 寄生性フジツボが宿主から栄養を収奪するシステムに関する解析：

寄生去勢の本質は卵巢や造雄腺への直接的な効果ではなく、むしろ、栄養を供給する肝臓(中腸腺)でのピテロゲニンの産生抑制を含むエネルギー不足状態の形成が原因と推測された。一方、ヤツフクロムシのインテルナでは、CHH、ニューロパーシン、インスリン様ペプチドのホモログが高発現している。これらは栄養・生殖と関連が深い、宿主のコントロール、インテルナ内部の制御、またはその両方に関わる可能性を否定できない。そこで、インテルナが宿主カニの体液からどのように栄養を搾取し、生殖装置であるエクステルナに輸送するかを、ヤツフクロムシのトランスクリプトームで再検討した。特に分泌タンパク質と膜タンパク質をコ

ードする遺伝子群の中で栄養吸収・輸送に関連するものを選抜した。その結果、インテルナではグルコーストランスポーターに加え、3種のトレハローストランスポーターが特異的に高発現することが明らかになった。また、体液中のタンパク質や脂質を低分子化するための分泌性、および膜貫通型消化酵素、分泌性のトリアシルグリセロールリパーゼやフォスホリパーゼ A2 と膜貫通型脂質トランスポーターも高発現していた。また、インテルナでは3種類のピテロゲニンホモログが、fpkm 値が4桁に達するほど高発現していた。また、免疫染色の結果から、少なくともその一種はインテルナで産生され、輸送されることが判明した。したがって、インテルナは体液中の糖に加え、脂質やタンパク質を低分子化して取り込み、ピテロゲニン類を用いてエクステルナに輸送し、その生殖機能を支えることが明らかとなった。

宿主側、寄生性フジツボ側のターゲットがほぼ明らかになったことで、今後は個々のホルモンホモログの組換えタンパク質やノックダウンを併用し、寄生去勢を含む宿主コントロールとインテルナ機能の分子レベルでの解明が可能になった。

(9) まとめ：仮説

研究当初は、宿主と寄生性フジツボの共進化の可能性を考え、宿主の卵巣や精巣形成に関わる宿主ホルモンが水平伝播(horizontal gene transfer)により寄生性フジツボの遺伝子となり、分子進化して宿主をコントロールするようなシステムを持つようになったという可能性を考えていた。しかし、本研究の過程でそのような可能性はほとんどないことが判明した。インテルナで特異的に発現する CHH やニューロパーシンホモログはエクステルナや幼生期に発現するホモログに比べ、活性に関わるシステインの配置に重大な変異を有することは注目に値する。むしろ寄生性フジツボが宿主の栄養を最大限かすめ取る過程で、邪魔な宿主の生殖機能を間接的に抑える可能性がより大きくなった。宿主が生殖をせず、ある意味糖尿病がひどいような状況を作り出し、体液中にあふれた栄養をインテルナが取り込むことができれば、寄生性フジツボにとってそれで充分であろう。その意味で、寄生性フジツボのインテルナにおける栄養収奪のしくみとその制御を含めて寄生去勢という現象を幅広く理解する必要性がより高まったと思われる。インテルナには排泄器官はない。したがって、低分子量のホルモンが寄生性フジツボの内部で働くだけでなく、外部である体液中に流れ出し、その影響が宿主にも現れる可能性も否定できない。

これらのことを含めて、インテルナの働きに関する仮説¹⁾を下図に示す。



<引用文献>

1. 岡野桂樹 (2022) 「寄生性フジツボ(フクロムシ)の生物学：寄生に特化した根・菌糸状の体を持つ動物の謎」化学と生物 in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aldred Nick, Chan Vera Bin San, Emami Kaveh, Okano Keiju, Clare Anthony S., Mount Andrew S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Chitin is a functional component of the larval adhesive of barnacles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0751-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Cleverley Robert, Webb David, Middlemiss Stuart, Duke Phillip, Clare Anthony, Okano Keiju, Harwood Colin, Aldred Nick	4. 巻 23
2. 論文標題 In Vitro Oxidative Crosslinking of Recombinant Barnacle Cyprid Cement Gland Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 928 ~ 942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-021-10076-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 岡野桂樹	4. 巻 in press
2. 論文標題 寄生性フジツボ（フクロムシ）の生物学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小黒（岡野）美枝子, Wong Yue Him, 滝沢那月, 岡野桂樹
2. 発表標題 寄生性フジツボのピテロゲニンホモログとLDL受容体の解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N. Takizawa, M. Kobayashi, R. Yoshida, M-Oguro-Okano, Y.H. Wong, K. Okano
2. 発表標題 Localization of vitellogenin homologs during oogenesis, embryogenesis and larval development in the parasitic barnacle, <i>Sacculina yatsui</i>
3. 学会等名 甲殻類学会Open International Symposium: Reproductive Biology of Barnacles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ishii, Y. Takahashi, M. Oguro-Okano Y.M. Wong, K. Okano,
2. 発表標題 Parasitic castration of the rhizocephalan barnacles infecting the Asain shore crab <i>Hemigrapsus sanguineus</i>
3. 学会等名 甲殻類学会Open International Symposium: Reproductive Biology of Barnacles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kikuchi, Y. Ishimoto, K. Okano, S. Nix
2. 発表標題 The swimming modes of barnacle cypris larvae
3. 学会等名 Soft Matter Conference (Edinburgh, Scotland) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地桂生、石本志高、岡野桂樹、Stephanie Nix
2. 発表標題 Collective behavior of barnacle larvae
3. 学会等名 理論と実験
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野桂樹
2. 発表標題 摩訶不思議な生物：寄生性フジツボ：カニに寄生する寄生性フジツボ（フクロムシ）の生物学
3. 学会等名 ソフトバイオ研究会2019.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	筒井 直昭 (Tsutsui Naoaki) (00643785)	三重大学・生物資源学研究科・准教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------