

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06238

研究課題名（和文）宿主の糖鎖は魚類寄生虫の宿主特異性に関与しているのだろうか？

研究課題名（英文）Are carbohydrates of hosts involved with parasites' host specificity?

研究代表者

田角 聡志（Satoshi, TASUMI）

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：90359646

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：トラフグ属魚類の複数魚種と、トラフグにしか寄生しない単生類Heterobothrium okamotoiとの組み合わせに着目し、魚類寄生虫の宿主認識機構を明らかにすることを旨とした。寄生組織である鰓におけるL-フコースの存在様式と、人為的感染後の虫体の脱落の様子との関連を調べたところ、L-フコースの存在量が多い種ほど、暴露直後に着定していた虫体はより速やかに脱落する傾向にあることが示された。L-フコースの宿主認識への関与を証明するために、糖鎖の生成に関与する酵素の一つ、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の機能を失ったクサフグの家系を複数作出した。今後、感染実験により直接的に証明する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類寄生虫の宿主認識の分子機構はこれまでほとんど解明されていない。本研究では、宿主特異性の極めて高い寄生虫とその宿主および近縁種を用いた比較研究を行うことによって、L-フコースが重要な役割を果たしている可能性が高いことを示した。さらに、遺伝子編集技術を用い、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の機能を欠失しうる個体の作出も行った。交配に要する時間的制約により、直接的証明には至らなかったが、今後これらの家系を用いて我々の仮説を証明してゆく予定である。宿主認識に関与する分子が特定できれば、学術的に重要な知見が得られるだけでなく、予防薬や予防方法の開発につながり、社会的にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate host-recognition mechanisms of fish parasite, we selected the combination of multiple species of genus Takifugu and monogenean parasite Heterobothrium okamotoi, which specifically parasitize gills of *T. rubripes*. It was shown that the parasites attached to the gills of species with more amount of L-fucose in the tissue tend to be detached earlier than the ones attached to the gills with less amount of L-fucose. To prove directly the involvement of L-fucose in host-recognition, several families being lost the function of fucosyltransferase, which transfers L-fucose to oligosaccharide were prepared by using CRISPR-Cas9. Those families and additional ones under preparation are going to be used for experimental *in vivo* challenge test in the near future, to examine our hypothesis that L-fucose is involved with host-recognition of *H. okamotoi*.

研究分野：魚介類免疫学

キーワード：宿主認識 寄生虫 糖鎖 魚類

## 1. 研究開始当初の背景

養殖魚の寄生虫症は、魚類の疾病の中でも最も対処の難しいものの一つである。寄生虫がどのようにして宿主を認識しているのか、その背景にある分子機構を解明できれば、感染予防へと繋がられるのではないだろうか？

多くの寄生虫は、特定の宿主にのみ寄生することが古くから知られている。例えば、トラフグの鰓に寄生する単生類、*Heterobothrium okamotoi* (以降、エラムシと記す)は、これまでのところ他の魚種への寄生例は報告されていない。しかし、感染実験の結果、暴露直後の時点ではクサフグ、ヒラメ、マダイといった、本来は宿主ではない魚種の鰓にも付着(着定と呼ばれる)することが示されている (Ohhashi et al, 2007)。ただ、これらの魚種の鰓に着定したエラムシはいず

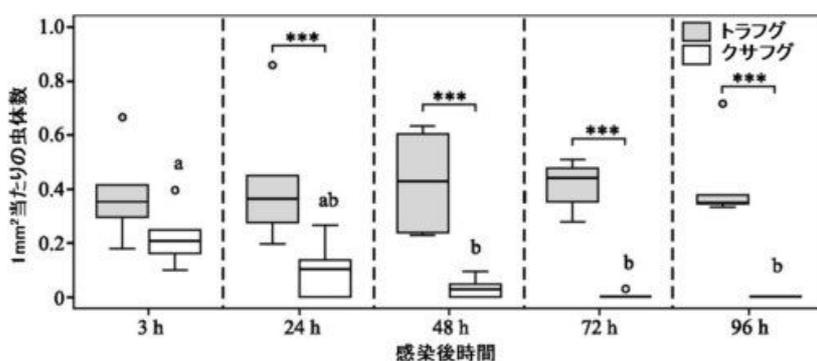


図1 トラフグとクサフグへのエラムシの暴露実験

暴露3時間後では両種の間には差はないが24時間以降トラフグにおいてクサフグより有意に多くの虫体が着定していた。

シの感染組織である鰓に着目して、トラフグとクサフグの間に表現型の種間差があるかどうかを検討した。はじめに、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して観察した結果、存在する細胞の

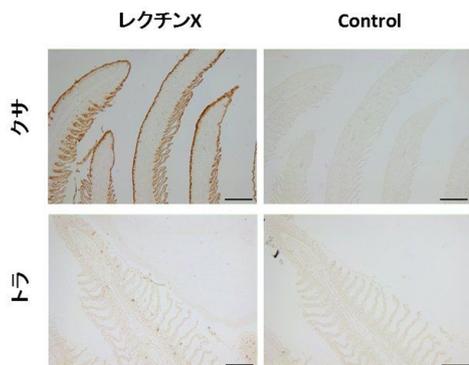


図2 トラフグとクサフグの鰓の表面に存在する糖鎖の組成の違い  
レクチン染色により、糖鎖の組成の違いを調べた。クサフグにはレクチンXの認識する糖が存在するが、トラフグにはしないことを示す。

れの場合も速やかに脱落する (Ohhashi et al, 2007)。我々もトラフグとクサフグを用いて同様の感染実験を行い、その結果エラムシは、どうやらそれほど厳密に宿主を見分けて着定を開始しているわけではないこと、トラフグ (= 宿主) では着定を継続できるがクサフグ (= 非宿主) ではできないらしいこと、を見出した (Igarashi et al, 2017、図1)。そこで我々は、エラムシ

の種類や組成については両種間に大きな違いはないことが明らかとなった。次に、レクチンという、特異的な糖鎖に結合するタンパク質を利用したレクチン染色を施したところ、鰓の表面に存在している糖鎖の組成に両種間で違いがあることを見出した (以降糖 X と記す、未発表データ、図2)。細胞表面に存在する糖鎖は様々な生命現象を引き起こすことがこれまでに広く知られている。ひょっとすると、感染組織に存在する糖鎖が寄生虫に宿主特異性をもたらす因子の一つなのではないだろうか？

## 2. 研究の目的

本研究は、魚類寄生虫の宿主特異性に糖鎖が関与しているのかどうかを明らかにすることを目的としている。本研究のような、寄生虫の宿主認識機構を分子レベルで明らかにしようという取り組みは、哺乳類を宿主とするものについては以前より比較的行われていたが、魚類寄生虫ではまれであった。近年、ヨーロッパの研究者を中心として、タイセイヨウサケに寄生する甲殻類、サケジラミを対象とした研究の進展が著しいが、それらの成果と我々のこれまでの成果を比べてみたところ、サケジラミの宿主認識機構は、本研究の対象であるエラムシとは大きく異なっていることが考えられた。この観点から、エラムシについても宿主認識の分子機構を明らかにすることは、魚類寄生虫の宿主認識に対する理解をより深めるために意義深いものであると考えられる。また、本研究は特に糖鎖に着目している。糖鎖生物学がタンパク質、DNA に次ぐ3つ目の鎖を扱う、ホットな研究分野であると捉えられているが、水産学の分野ではこれまでそれほど研究が盛り上がっているとは言い難い。しかし、将来的な研究の動向や方向性を考えると、当該研究分野においても、今のうちから糖鎖について研究を進め始めておくことは極めて重要であると考えられる。本研究は、水産学の分野で、魚病学、特に寄生虫学に関わる部分と、糖鎖生物学とを結び付け、新たな研究領域を切り開こうとするものである。

### 3. 研究の方法

#### トラフグ属魚類複数種の鰓の表面に存在する L-フコース量と実験的感染後のエラムシ着定数の比較

トラフグ属魚類の複数種(トラフグ、クサフグ、ヒガンフグ、ショウサイフグ)について、人工授精により感染履歴のない個体を作成し、これらの鰓の固定標本を集め、薄切切片を準備した。次に L-フコース(研究開始時には前述の通り糖 X と呼称していた)に特異的に反応するレクチン、UEAI を用いたレクチン染色を施すことで、それらの種の鰓における L-フコースの局在および存在量を調べた。続いて、これらにエラムシを実験的に暴露し、経時的に着定虫体数を調べた。

#### エラムシの *in vitro* 脱落実験

はじめに、トラフグから鰓を摘出し、出来るだけ長い時間(短くとも 1 日間)維持できるような器官培養方法を確立した。次に、エラムシの孵化幼生に暴露させたトラフグの鰓を、L-フコースまたは D-ガラクトースを含む培地、あるいは糖を含まない培地で培養し、着定した虫体数の経時的な変化を比較した。

#### L-フコース転移酵素(フコシルトランスフェラーゼ)機能欠失個体の作出

クサフグの鰓の表面に存在する L-フコースは、フコシルトランスフェラーゼの機能を欠失させてやれば消失することが予想された。我々のこれまでの予備的実験の結果、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子のうちいくつか、クサフグの鰓においてトラフグよりも高く発現していることを見出している。そのうちのいくつかについて、CRISPR/Cas9 法を適用することで機能を欠失した個体の作出を試みた。

#### エラムシ孵化幼生のトランスクリプトーム解析

エラムシ孵化幼生より total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq に供した。得られたリードを用いて *de novo* アッセムブリーを行い、得られたコンティグの BLAST 解析を行い、発現遺伝子の同定を行った。

#### フコシルトランスフェラーゼ阻害剤の探索

ヒトで去痰剤として用いられている物質を、クサフグに 1 週間経口投与した。これらの個体の鰓の固定標本を集め、それらの薄切切片に UEAI を用いたレクチン染色を施すことで、L-フコースの局在および存在量を調べた。

#### ブリ類魚類体表面に存在する糖鎖の種類の特定

感染履歴のないブリおよびカンパチの皮膚および胸鰭の固定標本を集め、薄切切片を準備した。次に各種レクチンを用いたレクチン染色を施すことで、それらの種の体表面における糖鎖の種類に違いがあるかどうかを検討した。

### 4. 研究成果

#### トラフグ属魚類複数種の鰓の表面に存在する L-フコース量と実験的感染後のエラムシ着定数の比較

トラフグ、クサフグ、ヒガンフグ、ショウサイフグについて、鰓における L-フコースの局在および存在量を UEAI を用いたレクチン染色によって調べた。その結果、クサフグでは鰓の表面が一様に強く染色された。ショウサイフグとナシフグでは、二次鰓弁の基部にまばらに存在する細胞が強く染色された。PAS 染色の結果、これらの一部は粘液細胞であると考えられたが、それ以外の細胞の同定には至らなかった。ヒガンフグはほとんど染色されず、トラフグは全く染色されなかった。

これらの魚を用いたエラムシの孵化幼生の *in vivo* 感染実験の結果、クサフグではエラムシの速やかな脱落が生じたが、トラフグとヒガンフグでは暴露 96 時間後でも比較的多くのエラムシが着定していた。ショウサイフグの場合、暴露直後でも着定虫体数が他の種の約半分程度で、その後経時的に脱落した。このように、着定後の動態には 3 つのパターンが観察された。

これら 2 つの実験結果より、L-フコースの存在量と脱落に要する時間との間に正の相関がありそうであると考えられた。

#### エラムシの *in vitro* 脱落実験

エラムシの孵化幼生に暴露させたトラフグの鰓を、L-フコース、D-ガラクトース、糖を加えない培地へ移し、移動直前と 24 時間後の虫体数を記録して脱落率を求めた。その結果、糖未添加培地と L-フコース添加培地、および L-フコース添加培地と D-ガラクトース添加培地のそれぞれ

の間で L-フコース添加培地の脱落率が統計的に有意に高いことが示された（それぞれ  $p=0.0010$ 、 $p=0.0168$ ）。このことより、エラムシの宿主ではないクサフグの場合、鰓に存在する L-フコースによって脱落が誘導されている可能性が示された。

### L-フコース転移酵素（フコシルトランスフェラーゼ）機能欠失個体の作出

はじめに、クサフグ受精卵に CRISPR/Cas9 法を適用したクサフグを作出した（19 年度、20 年度 CRISPR  $F_0$ ）。また、19 年度 CRISPR  $F_0$  クサフグオスと野生クサフグメスとを掛け合わせた 20 年度  $F_1$  クサフグ家系の作出を行った。これらの家系の一部個体を用いて、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子への変異導入様態と、鰓における L-フコースの局在との関連について予備的検討を加えた。その結果、両アレルに変異が導入されていないと L-フコースは消失しない可能性が高いことが分かった。この結果は、トラフグとクサフグを掛け合わせたトラクサ  $F_1$  を用いた予備実験の結果と一致していた。そこで、19 年度 CRISPR  $F_0$  クサフグメスと 20 年度  $F_1$  クサフグオスとを掛け合わせた新たな家系を作出した（21 年度  $F_0 \times F_1$ ）。この家系の稚魚の一部を用い、変異導入様態を予備的に調べたところ、約 10% 程度が両アレルに変異をもっているらしいこと、そのような個体においては L-フコースの存在量が大きく減少しているらしいことが示された。

### エラムシ孵化幼生のトランスクリプトーム解析

de novo アッセムブリーによって得られたコンティグの相同性解析の結果、孵化幼生において発現している遺伝子を多数同定することができた。その中には、糖の代謝や認識に關与するものが複数含まれていた。

### フコシルトランスフェラーゼ阻害剤の探索

これまでに進めてきた変異体の作出は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子がエラムシの宿主認識と関連しているのかを直接的に示すうえで必須であるが、年単位の時間を要するという欠点があった。そこで、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の阻害剤となりうる物質がないか探索した。ヒトで去痰剤として用いられている物質を経口投与したクサフグを用いた、UEAI によるレクチン染色の結果、クサフグの鰓から L-フコースは完全には消失しないものの、局在パターンに大きな変化がみられ、量的にも減少しているらしいことが示された。

### ブリ類魚類体表面に存在する糖鎖の種類の特定

エラムシと同じく単生類の寄生虫で、ブリ類を宿主とするハダムシについての研究も開始した。ハダムシ (*Neobenedenia girellae*) に対する感受性は、ブリ類の中でも種間差があり、カンパチの方がブリよりも高いことが知られている。そこで、両種の体表面について、レクチン染色による比較を行った。その結果、ブリの体表面は UEAI 陽性であったが、カンパチは陰性であった。すなわち、感受性の低い種は高い種と比べて L-フコースの存在量が多いことが示された。この結果はトラフグとクサフグの場合と同様であった。

以上、本研究の結果、L-フコースがエラムシの宿主認識に大きく関わっている可能性が示された。一方、クサフグは成熟にオスは 1 年、メスは 2 年を要し、両アレルに変異をもつ家系の作出が研究期間内ではできなかったため、変異体を用いた直接的証明には至らなかった。2022 年度 5 月現在、20 年度  $F_1$  クサフグのオスと 20 年度  $F_1$  クサフグメスとを掛け合わせた家系を作出しているところで、授精および初期発生が進むところまでは確認済みである。今後、L-フコースが鰓に存在しないクサフグを作出し、in vivo 感染実験を実施することにより、鰓における L-フコースの存在の有無と、寄生成立の可否との関連を明らかにしてゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤楽生、松永亮平、水野直樹、中根基行、田角聡志、菊池潔
2. 発表標題 Heterobothrium okamotoiの宿主認識に糖鎖が関与するのか？ トラフグ属魚類4種のin vivo感染実験とL-フコースの局在
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤楽生、上野裕都、田角聡志、山本淳、菊池潔
2. 発表標題 ブリとカンパチの体表の組織化学的比較
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤楽生・松永亮平・田角聡志・中村修・菊池潔
2. 発表標題 Heterobothrium okamotoiの宿主認識にL-フコースは関わるのか？
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------