

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570106

研究課題名（和文） 寄生線虫アニサキス・シンプレックスの同胞種間における形態的、遺伝的差異について

研究課題名（英文） Morphological and molecular based difference between the sibling species of parasitic nematode *Anisakis simplex*

## 研究代表者

倉持 利明 (Kuramochi Toshiaki)

独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・グループ長

研究者番号：80277590

研究成果の概要（和文）：鯨類の寄生線虫である *Anisakis simplex* には、遺伝的に異なる 3 つの同胞種 *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C が知られており、そのうち前 2 種については、魚類から採集した 3 期幼虫を培養液中で成熟させて得た雄成虫において、形態的に区別できるとの報告がある。しかし本研究において、鯨類から得られた雄成虫を用いて形態と遺伝子を調べたところ、培養虫体で見られたような同胞種特異的な形態は認められず、同胞種のちがいかかわらず多様な形態発現が見られた。

研究成果の概要（英文）： *Anisakis simplex*, a cetacean parasitic nematode is differentiated into three sibling species by molecular based analyses, i.e. *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C. Morphological differences between *A. simplex sensu stricto* and *A. pegreffii* are also reported in adult male worms cultured from third-stage larvae in an artificial medium. However in the present study, morphological differentiation in adult worms collected from the cetacean stomach is failed and the morphology of worms is diverse irrespective of sibling species.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，生物多様性・分類

キーワード：種分化・寄生・形態発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) *Anisakis simplex* は鯨類に寄生する線虫類で、その 3 期幼虫はヒトアニサキス症の原因寄生虫として知られている。

(2) *A. simplex* には遺伝的な差異に基づく 3 つの同胞種が知られており、*A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C と呼ばれている (Mattiucci & Nascetti, 2008: *Adv. Parasitol.*, 66: 47-148).

(3) これら同胞種のうち、日本近海に生息する *A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* については、魚類から採集した 3 期幼虫を培養液中で成熟させて得た雄成虫において、肛門後乳頭の配列、胃の長さ等の形態的差異によって区別できるとの報告がある (Quiazon *et al.*, 2008: *Parasitol Internat.*, 57: 483-489).

## 2. 研究の目的

本研究では、形態的差異に基づく同胞種の同定が、終宿主である鯨類体内から得られた雄成虫においても可能であるかどうかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 国立科学博物館に保存されていた北太平洋、オホーツク海産ミンククジラ、南極海産クロミンククジラ、鹿児島県の海岸に漂着したタイヘイヨウアカボウモドキからそれぞれ採集したアニサキス亜科線虫を材料に用いた。

(2) 雄の成虫の体長を測定し、ゲーター氏液により透徹後、体の各部位の計測を行い種を同定した。肛門後乳頭の配列はすべての観察個体についてスケッチし、Quiazon *et al.* (2008) に基づき型分けした。

(3) 形態観察を終了した虫体の一部について、頭部、中間部、尾部に分けて切断し、中間部を用いて DNA を抽出した。抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いた。

(4) 全 DNA を鋳型として PCR による増幅を行った。本研究で標的としたのは核 DNA の ITS-1 領域 (Mattiucci & Nascetti, 2008) およびミトコンドリア DNA に存在するシトクローム *c* オキシダーゼサブユニット 1 (*cox 1*) 遺伝子であった。ダイレクトシーケンスにより配列を決定し、ITS-1 の配列により *A. simplex* の同胞種を同定し、*cox 1* の配列により分子系統図を描き同胞種間の分岐を確認した。

(5) 2 つの同胞種内における遺伝的な差異を見いだすために、*cox 1* 遺伝子以上に鋭敏と考えられるミトコンドリア DNA に存在する非コード領域を増幅して配列を調べたが、ダイレクトシーケンスでは複数のピークが出て配列を決定できなかった。ヘテロプラスミーの状態にあることが示唆されたため、PCR 産物をクローニングし、複数のクローンについて配列を決定した。

## 4. 研究成果

(1) ランダムに抽出した虫体 173 個体につ

いて、形態的観察と計測結果に基づき種の同定を行なったところ、ミンククジラとクロミンククジラ由来の虫体 155 個体は *A. simplex*、タイヘイヨウアカボウモドキ由来の虫体 18 個体は本邦初記録の *A. ziphiidarum* であった。

(2) *A. simplex* について、Quiazon *et al.* (2008) に基づき体長-胃の長さ、体長-左右の交接刺の長さの散布図を作成したが、Quiazon *et al.* (2008) が示したような 2 つのグループに分かれることはなく変異が大きかった (図 1)。

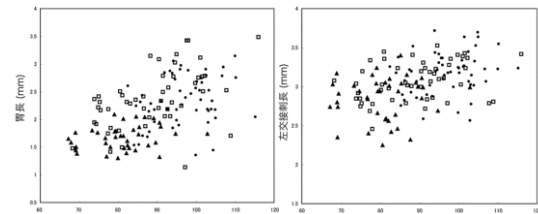


図 1. 計測値に基づく散布図の例. 左; 体長 (横軸) に対する胃の長さ (縦軸), 右; 体長 (横軸) に対する左交接刺の長さ (縦軸). 変異が大きく複数のグループに分けることはできなかった. ●; オホーツク海, □; 北太平洋, ▲; 南極海.

(3) *A. simplex* 155 個体の肛門後乳頭の配列は、Quiazon *et al.* (2008) が報告している *A. pegreffii* 型の配列を示すものが多く 104 個体、それに対して *A. simplex sensu stricto* 型の配列を示すものは 11 個体に過ぎなかった。一方、左右の乳頭がそれぞれ異なる型を示すもの 30 個体、さらにいずれの型とも判別しがたい中間的なものも 10 個体みられた (図 2)。

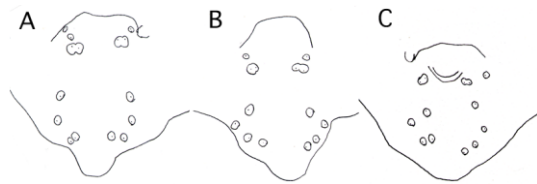


図 2. 肛門後乳頭の配列を示す. A; *A. simplex sensu stricto* 型, B; *A. pegreffii* 型, C; 本研究において複合型 (mixed-type) としたもの (図の個体では右側の乳頭が *A. simplex sensu stricto* 型, 左の乳頭が *A. pegreffii* 型を発現している).

(4) 各部の計測、種の同定、肛門後乳頭の配列の型分け等を行なった虫体から、ランダムに抽出した 32 個体において、ITS-1 領域の塩基配列を決定し、そのうち 27 個体について *cox 1* 遺伝子の配列を決定した。Mattiucci & Nascetti (2008) に基づき、ITS-1 領域の 306 番

目と 322 番目の塩基が T (チミン) のものを *A. simplex sensu stricto*, これらが C (シトシン) に置換しているものを *A. pegreffii* とした。

*cox 1* 遺伝子の配列を用いて、近隣結合法による分子系統図を描くと、系統図は 2 分岐し、それぞれ *A. simplex sensu stricto* からなるクラスターと、*A. pegreffii* からなるクラスターを形成し、ITS-1 領域から得られた結果とよく一致した (図 3)。

ミンククジラ由来の虫体 24 個体のうち 23 個体が *A. simplex sensu stricto* であり、残りの 1 個体とクロミンククジラ由来の虫体 8 個体は *A. pegreffii* であった。

(5) 遺伝子解析により同定された同胞種ごとに肛門後乳頭の配列型を整理すると、*A. simplex sensu stricto* 23 個体のうち Quiazon *et al.* (2008) の報告通りに *A. simplex sensu stricto* 型の配列を示したのは 3 個体にすぎず、16 個体が *A. pegreffii* 型、4 個体が複合型とも言える左右の乳頭がそれぞれ異なる型を発現するものであった。

一方 *A. pegreffii* 9 個体のうち、6 個体は *A. pegreffii* 型の乳頭配列を発現し、残りの 2 個体と 1 個体はそれぞれ *A. simplex sensu stricto* 型と複合型であった。

(6) 以上のように、今回得られた 2 つの同胞種それぞれにおいて、肛門後乳頭の配列は *A. simplex sensu stricto* 型と *A. pegreffii* 型、さらに複合型の 3 種類の形態発現がみられた。これらの形態発現が、何らかの遺伝的背景に基づいている可能性が考えられたので、個体間の遺伝的差異をより鋭敏にとらえて、系統関係を解析することにした。

本研究ではより変異に富んでいることが期待される、ミトコンドリア DNA に存在する非コード領域の配列を調べることにした。しかし、先に述べたように本領域はダイレクトシーケンス法では配列を決定することができず、ヘテロプラスミーの状態にある可能性が示唆されたため、PCR 産物をクローニングして、単離されたクローンの塩基配列を解析した。その結果、本領域は AT リッチで、ATAT の繰り返し配列が続く領域が 4 カ所存在するもので、同一個体由来の複数クローンの解析によれば、AT の繰り返しの数に変異がありそのためにダイレクトシーケンス法では解析不能であったことがわかった。しかしこの変異が、ヘテロプラスミーによるものか、PCR の際に生じた人工産物であるか、本研究でとった方法では特定することができなかった。

そこで、ATAT の繰り返しを排除した配列を用いて系統解析を行なったが、得られた系統樹は *cox 1* の配列から得られたものと大きく変わるものではなかった。従って、本研究で

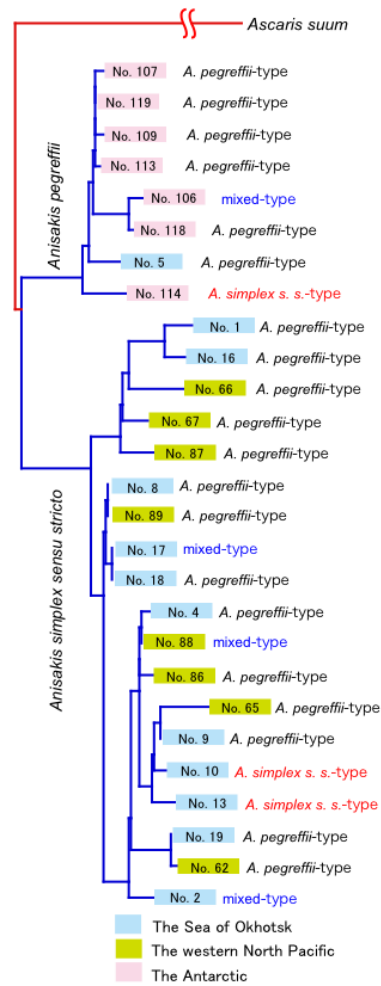


図 3. *cox 1* の塩基配列に基づく近隣結合法による分子系統図。各個体番号に続いて肛門後乳頭の配列型を示した。

用いた方法では、形態発現の 3 つの型と個体間の系統を関係づけることはできなかった。

(7) 本研究で調べた鯨類由来の *A. simplex* においては、遺伝子解析により同定した同胞種と、Quiazon *et al.* (2008) が示したそれぞれ同胞種がもつ形態的特徴を特異的に示すことはなかった。すなわち、終宿主である鯨類から得られた成虫では、培養液中で成熟した成虫とは異なり、2 つの同胞種を形態的に区別するのは困難である、というのが本研究における結論である。

これら結果が異なる 2 つの研究を比較すると、Quiazon *et al.* (2008) は培養という人工的に管理された生息条件で得られた成虫であるのに対して、本研究ではミンククジラ、クロミンククジラといういずれも *A. simplex* の好適な宿主から採集された成虫であった。Quiazon *et al.* (2008) が用いた成虫は、非常に制限された環境で成熟したものであるのに対して、本研究で用いたものは肥沃な環境で

急速に成熟したものであると推定され、成虫の体長も Quiazon *et al.* (2008)のものが 30~40 mm, 本研究のものは体長 65~120 mm で大きな違いがある。

従って両研究の結果の違いは、双方が用いた成虫の発育段階の違いによるものである可能性が指摘される。鯨類由来の成虫であっても、成熟して間もない小型の虫体を集めて同様の解析をすれば、Quiazon *et al.* (2008)と同様の結果が得られることが推測される。またもう一つの可能性として、既に述べた通り、双方の生息環境の違いよることも考えられ、与えられた環境によって、成長速度や成長の限界に違いが出てくる可能性は高く、その結果、形態の発現にも違いが出ることも推察される。Kuramochi *et al.* (2006) [*Rep. Int. Whal. Commn.*, 46: 415-419]は、北太平洋産のミンククジラから得られた *A. simplex sensu lato* と小型鯨類（イルカ類）から得られた本種とを比較して、ミンククジラ由来の虫体は成虫が多いこと、成虫の体長が大きいことを報告し、ミンククジラは *A. simplex sensu lato* の好適な終宿主であると考察した。従って、小型鯨類由来の虫体は、培養虫体と同様に制限をされた環境に生息していると考えられることから、小型鯨類由来の虫体では *A. simplex sensu stricto* と *A. pegreffii* との間で、Quiazon *et al.* (2008)が示したような形態的差異が見られる可能性が示唆される。

Quiazon *et al.* (2008)と本研究の結果と合わせると、培養液という自然界には存在しないが人工的で均一な環境で成熟した虫体では形態的に区別されるが、終宿主の体内で成熟したものでは区別がつかないという重要な結論を導くことができる。これは従来形態分類で使われてきた分類形質も、環境の影響を受けて変化しうることを示しており、その結果、自然界では区別できない隠蔽種が、想像以上に存在する可能性を示唆している。本研究により、生物多様性研究のあり方として、従来の分類学だけでは限界があることを明確に示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① 倉持利明, 日本産鯨類の寄生蠕虫類, 獣医寄生虫学雑誌, 査読なし, 9 巻, 2010, 21-34.

[学会発表] (計 9 件)

① 倉持利明, 日本産鯨類の寄生蠕虫類, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 28 日, 日本獣医生命大学 (東京都武蔵野市)  
② 倉持利明, 久保信隆, 箱瀬詩野, 山田 格,

タイヘイヨウアカボウモドキの胃より採集された *Anisakis ziphidarum* について, 第 79 回日本寄生虫学会大会, 2010 年 5 月 20 日, 旭川市大雪クリスタルホール (北海道旭川市)

[図書] (計 2 件)

倉持利明他, ソフトバンククリエイティブ, 海に生きるものたちの掟 食うか食われるか、命を受け継ぐ食物連鎖の秘密, 2009, 173-191.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉持 利明 (Kuramochi Toshiaki)  
独立行政法人国立科学博物館・動物研究部・グループ長  
研究者番号: 80277590

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: