

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14914

研究課題名（和文）海産白点虫の摂餌機構および宿主細胞へのアポトーシス誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the host cell feeding mechanisms of *Cryptocaryon irritans*.

研究代表者

渡邊 勇歩（Watanabe, Yuho）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：40895893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：魚類寄生性繊毛虫 *Cryptocaryon irritans*（海産白点虫）は海産魚に感染し、宿主細胞にアポトーシスを誘導し、それを餌として摂食しながら成長と考えられている。この現象は本虫の生存戦略上重要であると推察され、これを明らかにすることで防除法の開発への一助に繋がる。本研究では、寄生期虫体周囲の宿主細胞がアポトーシスを起こしており、虫体はそれを餌として摂食することが改めて示し、本虫の摂餌機構に関する基盤的な知見を得た。さらに、全ゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を試み、塩基配列情報およびその発現レベルに関する知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海産白点虫は海産白点病の原因寄生虫である。海産白点病は海面生簀など様々な温水性海産魚養殖場で発生し、大きな産業被害を引き起こすことがあるが、有効な防除法は確立されていない。本研究では、本虫の摂餌機構の一端の解明に加えて、情報が不足していた多くの遺伝子情報の取得にも成功した。これらの成果は本虫に関する研究の基盤となる多くの情報を提供し、今後の対策研究を進展させることに貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The fish parasitic ciliate *Cryptocaryon irritans* is hypothesised to induce apoptosis in host cells, feeds on them and grows. This phenomenon is considered to be important for the survival strategy of the parasite, and elucidation of this phenomenon will assist in the development of control methods. In this study, it was demonstrated that host cells around the parasite undergo apoptosis and that the parasite feeds on them, providing fundamental knowledge on the feeding mechanism of the parasite. In addition, whole genome and transcriptome analyses were attempted to obtain sequence information and knowledge on the expression levels of various genes of the parasite.

研究分野：魚病学

キーワード：寄生虫 原虫 繊毛虫 摂餌 アポトーシス ゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* (以下、白点虫) は、絶対寄生性の繊毛虫であり、ほとんどの海産魚に寄生し、その重篤な寄生は魚類の死亡を引き起こす。本種による疾病、海産白点病 (以下、白点病) は世界中の暖海域の海面養殖場で発生しており、日本国内でも時として一度に数億円単位の大きな産業被害を出し、地域経済に大きな影響を与えている。しかし、食用魚に使用できる著効を示す薬剤療法は未だ確立されていない。また、ワクチン開発も進んでいない。現在の海面養殖では網生簀を発生海域から移動させることが唯一の有効な対処法とされているが、発見の遅れや網生簀の移動の遅れにより、大量死が起こることが多く、新たな防除法の確立が切望されている。

このような背景から白点病の防除法の構築を目指した研究が数多く行われているが、すでに畜産分野で使用されている駆虫剤の応用や、虫体の表面に存在する構造タンパクを対象としてワクチン開発が試みられてきた。しかし、残念ながら著効をしめず防除法の確立には至っていない。また、近年、宿主側の白点虫に対する防御メカニズムに重点を置いた研究も数多く行われているが、未だ有効な防除法の開発につながっていない。このため、本病に対する防除法の構築にあたっては、従来とは異なるアプローチにより、薬剤療法やワクチンの開発を目指す必要がある。

### 2. 研究の目的

予備的研究において、寄生期虫体は宿主細胞にアポトーシスを誘導し、アポトーシスを起こした細胞を餌として摂食することが示唆されている。そのため、アポトーシスの誘導は本虫の生存戦略上重要な現象であると推察され、また、この現象を明らかにすることは白点病に対する防除法の開発への新たな糸口になると考えられる。そこで本研究では、将来の新たな海産白点病の防除法の開発に資するため、白点虫の摂餌における宿主細胞のアポトーシスの役割、ならびにアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 海産白点虫による宿主細胞のアポトーシス誘導について

白点虫を感染させたブラックモーリー *Poecilia sp.* の鱗を Hoechst33342 により染色し、虫体周辺の宿主細胞にアポトーシス小体に特徴的な核濃縮・断片化などがみられるか調べた。また、常法により鱗の組織切片を作製し、これを用い、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出も行った。さらに、宿主細胞を摂食し、宿主から離脱してきた虫体 (プロトモント) 内に含まれる DNA 断片の大きさについても解析した。

#### (2) 寄生期虫体のトランスクリプトーム解析

前段階の研究により、白点虫は周辺の宿主細胞にアポトーシスを起こし、それを摂食していることが強く示唆された。そこで、寄生期虫体を対象に de novo トランスクリプトーム解析を実施し、アポトーシスの誘導もしくは分泌性のプロテアーゼなど細胞の傷害に関与する遺伝子が発現しているか検討した。

また、これまでの研究から白点虫には種内でも塩基配列に多様性が存在することが報告されている。そのため、本研究では由来の異なる虫体の混入を防ぐため、白点虫の単一クローン株を作成し、これを用いて解析を行った。

#### (3) 海産白点虫の全ゲノム取得の試み

白点虫の遺伝子配列は AT リッチであり、de novo トランスクリプトーム解析では完全長に近い遺伝子配列の取得および遺伝子の機能予測等が困難であった。そのため、PacBio HiFi シーケンスによる全ゲノムシーケンスの取得を試みた。

#### (4) 魚類アポトーシス細胞を用いた in vitro 摂餌実験

白点虫がアポトーシス細胞を選択的に摂食しているかは不明である。これを検証することで本虫の生存戦略上のアポトーシス誘導の役割および必要性が明らかになると考えられる。そこで、魚類細胞のアポトーシスの有無による虫体の成長・生存への影響を検討する。具体的には、人為的にアポトーシスを誘導した魚類培養細胞 (FMH 細胞) を無血清培地中に懸濁させ、そこに感染幼虫を接種、培養し、細胞の摂食の有無および虫体の成長を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 海産白点虫による宿主細胞のアポトーシス誘導について

白点虫が感染した組織を核染色したのちに観察したところ、虫体周囲の宿主細胞および虫体内部にある摂食後の宿主細胞が核濃縮を起こしている様子が観察された。また、組織切片を用いて TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行ったところ、虫体周囲および内部の宿主細胞に陽性シグナルが認められた。さらに、プロトモント内には核濃縮・断片化を起こした宿主細胞

が多くみられ、プロトモントから抽出した DNA を電気泳動したところ、アポトーシス細胞に特徴的な 180 bp のラダーが確認できた。これらの結果から、白点虫は宿主細胞にアポトーシスを誘導し、これを摂食していることが示された。

#### (2) 寄生期虫体のトランスクリプトーム解析

白点虫の単一クローン株を作成し、これから RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、宿主細胞へのアポトーシスの誘導に直接関与することが推測されるような遺伝子は見つからなかったが、カテプシンなどのプロテアーゼをコードする遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。また、それらプロテアーゼ遺伝子の演繹アミノ酸配列解析を行ったところ、分泌性の分子であることが推測された。これらの分子が宿主細胞へのアポトーシスの誘導に関与するかは明らかではないが、本虫の寄生期に重要な分子であることが示唆された。これらは海産白点虫のアポトーシス誘導メカニズムの解明、または今後の白点病対策研究における薬剤のターゲット分子やワクチンの抗原候補の探索に有益な情報となると思われる。

#### (3) 海産白点虫の全ゲノム取得の試み

上記の研究と同様に樹立した単一クローン虫体から DNA を抽出し、全ゲノム配列の取得を試みた。白点虫は *in vitro* 培養が困難であり、宿主である魚類を用いて虫体を増殖させるため、宿主ゲノムの混入等のためか完全性の高い全ゲノムの取得には至らなかった。しかし、先行研究のドラフトゲノムでは確認できなかった遺伝子配列が数多く取得できたことに加えて、RNA-seq では部分配列しか得られなかった遺伝子の ORF 配列の取得にも成功した。これにより、いまままで困難であった白点虫遺伝子がコードする分子の立体構造予測やそれによる機能予測などが可能となった。

さらに、培養可能な自由生活性の繊毛虫であるテトラヒメナを用いて、白点虫の組換えタンパクの発現にも成功した。また、白点虫の膜タンパクである不活化抗原のシグナルペプチド領域および GPI アンカーシグナル領域を用いることで任意のタンパク質を細胞表面に発現させる手法を構築した。これにより虫体と宿主細胞の相互作用等の解析が可能となった。

#### (4) 魚類アポトーシス細胞を用いた *in vitro* 摂餌実験

人為的にアポトーシスを誘導した魚類培養細胞を無血清培地中に懸濁させ、そこに感染幼虫を接種、培養したところ、培地が酸性化し、翌日には生存している虫体はみられなくなった。本実験については実験手法の再検討が必要である。

#### (5) まとめ

本研究では当初目的としていた白点虫の宿主細胞へのアポトーシス誘導に関する詳細なメカニズムの解明には至らなかった。一方、予備的な研究で確認されていた宿主細胞へのアポトーシスを検証することができ、アポトーシスの誘導は本虫の生存戦略上重要な現象であることが改めて示唆された。このことに加えて、トランスクリプトーム解析から、寄生期虫体ではカテプシンなどのプロテアーゼ遺伝子の発現レベルが高いことが新たに示され、それらがアポトーシス誘導もしくは本虫の寄生生態に関与している可能性も示唆された。これらの成果はアポトーシス誘導メカニズムの解明の第一歩となるだけでなく、今後の白点病対策研究における薬剤のターゲット分子やワクチンの抗原候補の探索に有益な情報である。さらに、本研究では、全ゲノムの取得や組換えタンパクの発現手法など今後の白点虫研究の基盤となる多くの知見や研究技法の開発に成功した。今後、これらの知見を基にした白点虫のアポトーシスの誘導メカニズムの解明や対策研究の進展に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe Yuhō, Hansen Jorgen, Kotake Maho, Fujii Ryotaro, Matsuoka Hiromi, Yoshinaga Tomoyoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Effect of Biokos, a natural lipopeptide surfactant extracted from a bacterium of the <i>Pseudomonas</i> genus, on infection of <i>Cryptocaryon irritans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Fish Diseases	6. 最初と最後の頁 1311 ~ 1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfd.13849	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 Watanabe Yuhō, Asada Masahito, Inokuchi Mayu, Kotake Maho, Yoshinaga Tomoyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Target Protein Expression on Tetrahymena thermophila Cell Surface Using the Signal Peptide and GPI Anchor Sequences of the Immobilization Antigen of <i>Cryptocaryon irritans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biotechnology	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) 10.1007/s12033-023-00824-w	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 -
1. 著者名 Watanabe Yuhō, Takada Yuzo, Kotake Maho, Zenke Kosuke, Itoh Naoki, Yoshinaga Tomoyoshi	4. 巻 548
2. 論文標題 Evaluation of the protective effects of DNA vaccines encoding an infection-related cysteine protease from <i>Cryptocaryon irritans</i> , the pathogenic organism of cryptocaryoniasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 737641 ~ 737641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2021.737641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yuhō, Yoshinaga Tomoyoshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Vaccine Development against Cryptocaryoniasis: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.57.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 渡邊勇歩, 麻田正仁, 井ノ口繭, 小竹真帆, 伊藤直樹, 良永知義
2. 発表標題 テトラヒメナを用いた偽海産白点虫の作製に向けた研究
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuho Watanabe, Masahito Asada, Mayu Inokuchi, Maho Kotake, Tomoyoshi Yoshinaga
2. 発表標題 Target protein expression on Tetrahymena cell-surface using the signal peptide and GPI-anchor sequences of a immobilization antigen of Cryptocaryon irritans
3. 学会等名 21st International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松岡大海, 小竹真帆, 本領智記, 白樫 正, 良永知義, 伊藤直樹, 渡邊勇歩
2. 発表標題 和歌山県で分離した海産白点虫 3 株の遺伝子配列と性質の比較
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡邊勇歩・麻田正仁・井ノ口繭・小竹真帆・伊藤直樹・良永知義
2. 発表標題 テトラヒメナを用いた偽海産白点虫の作製に向けた研究
3. 学会等名 日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuho Watanabe, Maho Kotake, Naoki Itoh, Tomoyoshi Yoshinaga
2. 発表標題 Studies on the development of vaccines targeting proteases of Cryptocaryon irritans, the parasitic ciliate of marine fishes
3. 学会等名 15th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------