

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658162

研究課題名(和文) フグのウオジラミがフグの鱭のみに寄生する分子メカニズムを探る

研究課題名(英文) Molecular mechanism of site-specificity of Caligus fugu on fins of puffer fish

研究代表者

大塚 攻 (Ohtsuka, Susumu)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：00176934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ウオジラミ類のcopepodid期(広義)数は6であり、一部の種の成体は宿主交替を行うと推測された。カワハギ類の鱭に特異的に寄生するペンネラ類*Peniculus minuticaudae*の生活史を明らかにした。寄生性カイアシ類にとって鱭は感染が容易である反面、栄養摂取面では制限的であると推測される。(2)バイオアッセイとサブトラクティブPCRの結果、トラフグ類の鱭に寄生するウオジラミ類*Caligus fugu*の感染期の誘因物質は水溶性であり、鱭で発現量が多い遺伝子のうち分泌タンパク質または酵素をコードする少なくとも10個のうちのいくつかは誘因に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：(1) The life cycle and developmental stages of some parasitic copepods have been newly revealed by the present investigation. The number of post-naupliar stages of caligids is evidently six. Reinfection of adults is implied in some caligids. The whole life cycle of a pennelid *Peniculus minuticaudae* infecting fins of filefish is totally disclosed: the hatching stage is copepodids; no host switching is found. It is likely that fish fins are feasibly infected by infective stages of parasitic copepods but so limited for fecundity of adult females. (2) Results of bioassay indicate that attractants for the infective copepodid of *Caligus fugu* is water-soluble. At least 10 genes coding secretory proteins or enzymes were obtained by suppression subtractive hybridization, which was applied to isolate genes expressed higher in fins compared to skin. These are likely to be candidate genes related to the attachment site-specificity of the infective stage.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：トラフグ類 ウオジラミ類 宿主特異性 寄生部位特異性 鱭 サブトラクティブPCR法 カワハギ類
ペンネラ科

1. 研究開始当初の背景

寄生虫は通常、宿主特異性、寄生部位特異性を示すが、この機構が分子レベルで解明されれば予防法の開発にも発展できる。バージニアカキが餌を認識するのに用いているレクチンに対して *Perkinsus marinus* が宿主認識物質として逆利用していることが研究分担者の田角ら(Tasumi & Vasta 2007)によって明らかにされているが、魚類では同様の例が皆無である。

トラフグでは全ゲノムが解読されており、田角らが開発に関わった細胞表面ディスプレイ法(Tasumi et al. 2009)を用いればウオジラミ類の感染機構に関与する因子が特定できる可能性がある。ウオジラミ類 *Caligus fugu*(=*Pseudocaligus fugu*)はトラフグ養殖場で甚大な被害を出している寄生虫であるが、成長段階ごとの寄生部位特異性が研究代表者の大塚ら(Ohtsuka et al. 2009)によって明らかになっている(図1)。この特異性は特定の誘引物質があって寄生虫がそれを認識する、寄生虫が宿主の免疫系から逃れる機構を持つ、などによって起こると考えられる。感染期が宿主に付着する過程において何らかの物質を認識しているであろうことは実験的に推測されており、本研究はその特定をめざす。

また、魚類に寄生するカイアシ類の発生ステージの数・構成、感染・交尾行動も含む生活史を解明することは寄生虫防御のための基礎的研究として最も重要であり、水産学上重要なウオジラミ類およびペンネラ類の生活史についても研究を行った。

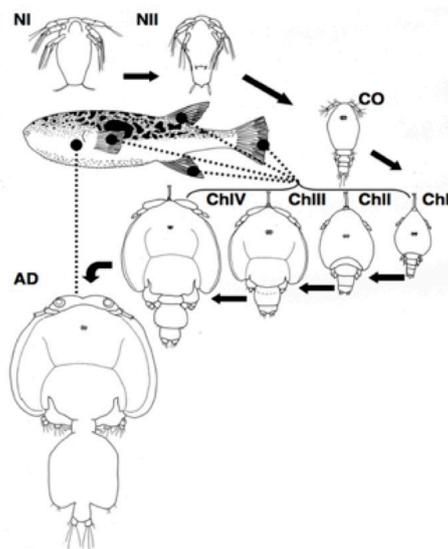


図1. *Caligus fugu* の生活史.NI, II: ノープスウス幼生 I, II 期; CO: コペポディド期(感染期); ChI~IV; カリムス I~IV 期; AD: 成体. CO~Ch は鰭に、AD は体表に寄生する

【参考文献】

Tasumi & Vasta (2007) J Immunol 179: 3086–3098; Tasumi et al. (2009) Proc Natl Acad Sci USA 106: 12891–12896; Ohtsuka et al. (2009) J Nat Hist 43: 1779–1804

2. 研究の目的

トラフグに寄生するウオジラミ類 *Caligus fugu* の感染はなぜフグの鰭のみで起こるのだろうか。トラフグのゲノム情報を活用すれば、ウオジラミ類を誘引する物質の特定からこの問いに答えることができるのではないだろうか。トラフグのタンパク質を網羅的に発現させる細胞表面ディスプレイ法という最新技術によってその鰭で産出される誘引物質を特定し、寄生の分子メカニズムを探ろうとするのが本研究である。

また、寄生虫防御の観点から寄生性カイアシ類の生活史についても調査を行った。*C. fugu* を含むウオジラミ科の生活史については新たな生活史が示唆されているためにこの検証を行った。さらに、成体がカワハギ類の鰭に寄生するカイアシ類 *Peniculus minuticaudae* の生活史について調査し、各発生ステージで寄生部位がどのように変化するか、また、ペンネラ科の生活史のバリエーションを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)寄生性カイアシ類の生活史

Caligus fugu の感染期(copepodid)の感染行動について宿主クサフグを用いて実験室内で観察した。

C. fugu の属するウオジラミ科では発生ステージ数について長年議論されてきたが、各ステージの第1触角のエレメント数、その他の付属肢の構造を精査、比較してこの検証を行った。また、成体が宿主交替をする行動(成体が積極的に宿主を離脱して水中に泳ぎでて新たな宿主を探索する行動)が示唆されているため、これをアジアの広範な海域で検証した。

成体がカワハギ類の鰭に寄生するペンネラ科カイアシ類 *P. minuticaudae* は生活史が完全に解明されていなかったため、全ステージの記載、生殖行動の観察およびこれらの結果に基づく生活史の推定、さらにペンネラ科内の生活史の比較を行い、鰭という寄生部位の適応的意義について考察した。材料は愛媛県宇和島市にある愛媛県農林水産研究所水産研究センターに畜養されているカワハギ宿主を用いた。

(2)誘因作用の検証

C. fugu の感染期は宿主から放出される化学的シグナルを感受することによって特定の宿主(トラフグ属)の特定の寄生部位(鰭)に定位すると考えられているため、クサフグを飼育した海水(以下、「飼育水」と呼ぶ)(2Lの海水に134~210gのクサフグ7~8個体を入

れて4時間経過したものが感染期に対して誘因作用があるかどうかをバイオアッセイにより検証した。また、その物質がタンパク質である可能性を探るため、飼育水に熱(80°C、20分間加熱)を加えて、変成すれば誘因作用が無くなるかどうかを検証した。実験室内で得られた感染期をY字型ガラス管の基部に入れて、二股の管の片方には飼育水を、もう片方にはコントロールとしてフグを入れなかった海水を流し、感染期の反応を記録した(図2)。溶液の滴下速度は約2mL/minである。共通管(4.5cm)の半分以上まで達した場合を「高い反応」、半分まで達しなかった場合を「低い反応」として扱った。また、飼育水を流している管にまで到達した場合も「高い反応」として扱った。

また、トラフグの鰭で発現する遺伝子由来の水溶性物質を含んだ海水(培養上清と呼ぶ)を10~300倍に希釈して感染期の反応を上記と同様の方法で記録した。この溶液の作成方法は「(3)誘因に關与する遺伝子探索」に記述した。

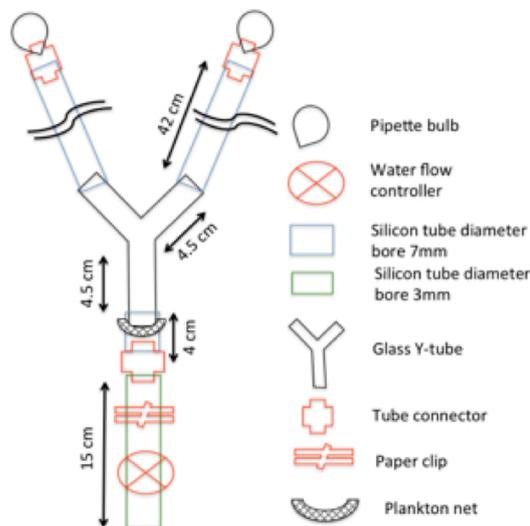


図2. Y字型ガラス管を用いた感染期の反応を見るためのバイオアッセイ装置.感染期をプランクトンネットの上にピペットで置き、実験時には最上部のバルブを外して2つの液体を滴下させる

(3)誘因に關与する遺伝子探索

トラフグ鰭由来cDNAを発現ベクターに組み込み、昆虫細胞High Fiveにトランスフェクトした。こうして得られた細胞ライブラリーを培養し、得られた培養上清に対する*C. fugu*の反応性について検討した(上述(2)誘引作用の検証)。コントロールにはインサートを含まない発現ベクターをトランスフェクトさせた細胞の培養上清を用いた。

これとは別に、*C. fugu*の組織特異性をもたらす遺伝子は胸鰭において皮膚よりも発現量が多いことが考えられたため、これら2つの組織からcDNAを調製し、サブトラクティブPCR法を適用してそのような遺伝子の探

索を行った。まずサブトラクティブPCR産物をクローニングベクターに組み込み、大腸菌を形質転換した。得られたコロニーからプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。これらをトラフグゲノムデータベースに照会し、ゲノム上の位置及びその場所に予想遺伝子が存在しているかどうかを調べた。候補遺伝子のうち、酵素または分泌タンパク質をコードするものを選び出し、これらに特異的なプライマー、胸鰭および皮膚由来のcDNAを鋳型として用いたRT-PCRにより発現量の違いの有無について検討した。

4. 研究成果

(1)寄生性カイアシ類の生活史

*Caligus fugu*の感染期はクサフグの鰭に第2触角と顎脚を用いて付着し、第2小顎で鰭組織を掘削する行動を示した。感染後2日目にfrontal filament(額糸)形成が完了しており、chalimus期に移行した。

ウオジラミ科の発生ステージ数は自由生活性カイアシ類と同様、広義のcopepodid期に相当するステージ数は6であった。しかし、属間で相違が見られ、早い発生ステージで額糸切断を行って宿主への固着を解除するタイプ(*Lepeophtheirus*属)と成体になるまで固着を維持するタイプ(*Caligus*属)が存在した。前者の場合、広義のcopepodid期はcopepodid1期、chalimus期2期、前成体2期、成体1期、後者ではcopepodid1期、chalimus期4期、成体1期という構成になる。ウオジラミ類の成体、特に*Caligus undulatus*の成体は世界各地のプランクトンサンプルから発見されており、egg sac当たりの卵数の少なさなどから判断して成体においても宿主交替を行う生活史を持つことが推測される。

*Peniculus minuticaudae*の発生段階はcopepodid1期、chalimus期4期、成体1期で構成され、nauplius期が欠如していた。chalimus I期から性的二型を示した。また、成体雄はchalimus期、特に雌を第2触角で把握してprecopulatory behaviorを示した(図3)。成体雌は交尾後、宿主を一旦宿主から離れて遊泳し、再度、基本的に同一種の宿主の鰭に固着し、脱皮することなく頭部後方が顕著に伸長・変形して産卵を続ける。本種は宿主交替、寄生部位変化はないが、ペンネラ科では成体雌になってから宿主交替を伴う種が存在する。成体雌が活発な産卵をするために宿主を替えて、心臓などに寄生し直して血液食に特化する種が存在する。また、nauplius期が存在する種もあり、科内で生活史にバリエーションがあることが判明した。

ウオジラミ類、ペンネラ類において、感染期・カリムス期は鰭に寄生し、成体(雌)は寄生部位を替えるものが多い。鰭に寄生する利点としては感染の容易さがある一方、栄養吸収の面では制限的であると考えられる。特に産卵を続ける成体雌にとって鰭は栄養制限的であろう。

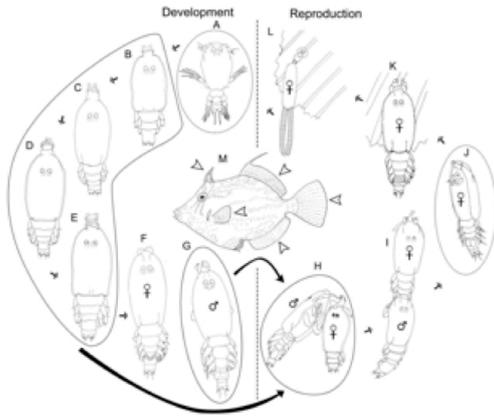


図 3. *Peniculus minuticaudae* の生活史. A: コペポデイド期(感染期); B~E: カリムス期 I~IV; F: 変形前の成体雌; G: 成体雌; H: 前交尾; I: 交尾; J: 宿主からの離脱; K: 変形前の成体雌の再感染; L: 産卵をする変形成体雌; M: 感染部位(矢印)

(2)誘因作用の検証

バイオアッセイ試験に用いた感染期の反応において、飼育水、加熱飼育水、コントロールの間には有意差が検出された(χ^2 検定, $p < 0.01$) (図 4)。飼育水とコントロールの間には有意な差がみられたが、飼育水と加熱飼育水の間、コントロールと加熱飼育水の間には有意な差がなかった (Tukey's test, $p > 0.05$)。有意差はないものの加熱が誘因作用の程度を左右する傾向がみられることから水溶性タンパク質が誘因物質の一つである可能性を示唆している。

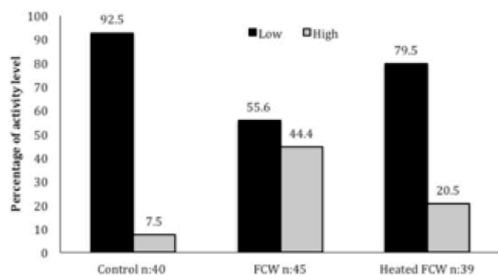


図 4. Y 字型ガラス管を用いたバイオアッセイの結果. High: 高い反応; Low: 低い反応. Control: 海水; FCW: 飼育水; Heated FCW: 加熱飼育水. n: 実験個体数

また、トラフグの鰭で発現している遺伝子産物のうち、可溶性タンパク質を含んだ培養上清を 10、20、100、150、200、300 倍に希釈してもその誘因効果は存在していると考えられる (図 5)。

なお、本実験で用いた Y 字型ガラス管は二股管から流れ込む 2 つの溶液は 1 つになった管の部分で混合しないことが色素を用い試験から判明した。このことは濃度勾配を作りにくいことを意味するので、バイオアッセイ

方法について今後改良が必要であろう。また、飼育水の加熱作用についても再検証が必要である。

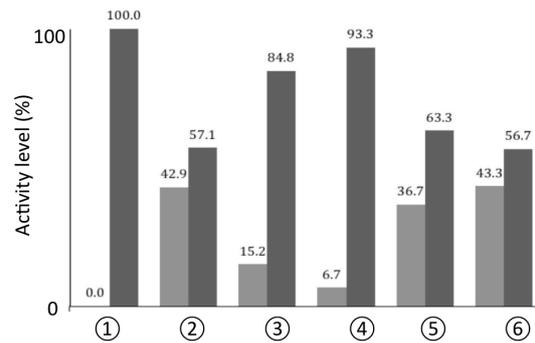


図 5. Y 字型ガラス管を用いたバイオアッセイの結果. トラフグ鰭由来 cDNA の昆虫細胞発現ライブラリーの培養上清 10、20、100、150、200、300 倍 (①~⑥) に希釈した場合の感染期の反応. 右: 高い反応; 左: 低い反応

(3)誘因に関する遺伝子探索

トラフグ鰭由来 cDNA の昆虫細胞発現ライブラリーの多様性は約 1×10^6 であり、以後のスクリーニングに使用するのに十分なサイズであることが分かった。この細胞ライブラリーの培養上清に対する *C. fugu* のコペポデイト幼生の反応性については (2) 誘引作用の検証のところに記述したとおりである。この結果は、トラフグ鰭で発現している分泌性タンパク質のいずれかが *C. fugu* の誘引物質の一つであることを強く示唆している。

G3PDH 特異的プライマーを用いた PCR によりサブトラクト効率を調べたところ、サブトラクト前の cDNA を鋳型とした場合にはバンドが認められたがサブトラクト後の場合は認められなかった。このことから、サブトラクトは問題なく実施できたと考えられた (図 6)。サブトラクティブ PCR の産物を用いて構築したライブラリーからこれまで 392 個の配列が得られ、独立した配列数は 276 個であった。トラフグゲノムデータベースを参照したところ、このうち 135 個は 118 個の予想遺伝子上に位置づけられた。このうち 47 個は分泌タンパク質または酵素をコードしているものであった。胸鰭および皮膚におけるこれらの遺伝子の発現量について RT-PCR により調べたところ、10 個について胸鰭において皮膚よりも発現量が多いことが示された (図 7)。なお、本結果については未発表のために詳細は近々公表される論文で詳述する。

C. fugu の感染期が鰭に限定的に定位するのは皮膚に比べて鰭で活発に発現している遺伝子産物が関与することを強く示唆する。この寄生部位特異性に関与する分子のさらなる絞り込みに不可欠な情報を得るとともに、今後の研究の方向性を見出すことができた。

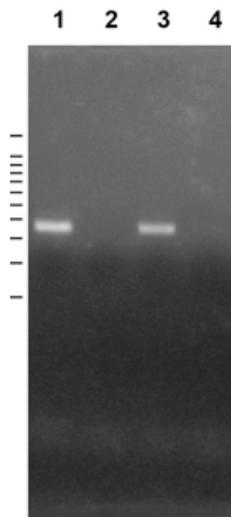
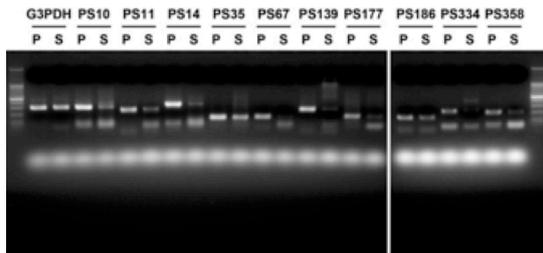


図 6 サブトラクション効率の検定 G3PDH 特異的プライマーおよびサブトラクト前または後の cDNA 断片を鋳型として用いた PCR を行った。1, 2: 皮膚; 3, 4: 胸鰭; 1, 3: サブトラクト前; 2, 4: サブトラクト後

図 7. 胸鰭、皮膚における、候補遺伝子



の発現量 G3PDH および候補遺伝子について、発現量を RT-PCR により調べた。胸鰭において皮膚よりも発現量が多かった 10 個の候補の結果について示した。P: 胸鰭; S: 皮膚

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 4 件)

1. B. A. Venmathi Maran, S. Y. Moon, S. Ohtsuka, S.-Y. Oh, H. Y. Soh, J.-G. Myoung, A. Iglkowska, G. A. Boxshall, The caligid life cycle: new evidence from *Lepeophtheirus elegans* reconciles the cycles of *Caligus* and *Lepeophtheirus* (Copepoda: Caligidae), *Parasite*, 査読有, 2013,20,15, 2013, pp1-22
2. N. Ismail, S. Ohtsuka, B. A. Venmathi Maran, S. Tasumi, K. Zeleha, H. Yamashita, Complete life cycle of a pennellid *Peniculus minuticaudae* Shiino, 1956 (Copepoda: Siphonostomatoida) infecting cultured threadsail filefish, *Stephanolepis cirrhifer*, *Parasite*, 査読有, 2013,20,42, 2013, pp1-6
3. B. A. Venmathi Maran, S. Ohtsuka, P. Jitchum, Occurrence of caligid copepods (Crustacea) in plankton samples collected from Japan and Thailand, with the description of a new species, *Species Diversity*, 査読有, 17, 2012, pp87-95
4. B. A. Venmathi Maran, S. Ohtsuka, X. Shang, Records of adult caligiform copepods (Crustacea: Copepoda: Siphonostomatoida) in marine plankton from East Asia, including

descriptions of two new species of *Caligus* (Caligidae), *Species Diversity*, 査読有, 17, 2012, pp201-219

[学会発表] (計 6 件)

1. 田角聡志、ノシダビンチイスマイル、鈴木讓、菊池潔、大塚攻、トラフグの鰭と皮膚において発現量の異なる遺伝子単離の試みー寄生虫防御の観点からー、平成26年度日本水産学会春季大会、平成26年3月28日、函館市
2. Norshida Ismail, 大塚攻, B.A. Venmathi Maran, 田角聡志、山下浩史、カワハギに寄生するカイアシ類 *Peniculus minuticaudae* の生活史、平成26年度日本水産学会春季大会、平成26年3月28日、函館市
3. S. Tasumi, A. Yamaguchi, Y. Hirabayashi, S. Kido, K. Kobayashi, W. Kai, S. Hosoya, S. Tsutsui, O. Nakamura, H. Suetake, K. Kikuchi, Y. Suzuki, Candidate key molecule(s) determining host specificity of parasite on fugu, *Takifugu rubripes*, The 12th Congress of ISDCI, 2012年07月10日、福岡市
4. 田角聡志・菊池潔・鈴木讓、トラフグとクサフグの鰭において発現量の異なる遺伝子単離の試み、平成24年度日本水産学会秋季大会、2012年09月15日、下関市
5. 平林陽・木戸慎一・木南竜平・細谷将・甲斐渉・菊池潔・城夕香・末武弘章・良永知義・小川和夫・鈴木讓、寄生虫の宿主特異性に関わるフグ遺伝子の探索、日本比較免疫学会第23回学術集会、平成23年8月22日、長崎市
6. 鈴木讓・菊池潔、トラフグのゲノム育種、平成23年度日本水産学会秋季大会、日本水産学会シンポジウム「フグ研究 とトラフグ生産技術開発の最前線」(招待講演)、平成23年10月2日、長崎市

[その他]

ホームページ等

広島大学大学院生物圏科学研究科附属瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター竹原ステーション (水産実験所) :

<http://fishlab.hiroshima-u.ac.jp/index.html>

東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所 :

http://www.se.a.u-tokyo.ac.jp/about_us.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 攻 (OHTSUKA SUSUMU)

広島大学・大学院・生物圏科学研究科・教授

研究者番号 : 00176934

(2)研究分担者

田角 聡志 (TASUMI SATOSHI)
東京大学・大学院・農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号：90359646

鈴木 譲 (SUZUKI YUZURU)
東京大学・大学院・農学生命科学研究科・
教授 (平成 23 年度～平成 24 年度)
研究者番号：40107412