

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870035

研究課題名(和文) 寄生虫によるマガキ卵形成操作現象の解明とその応用

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of Pacific oyster oogenesis by a protozoan parasite

研究代表者

伊藤 直樹 (ITO, Naoki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30502736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非産卵期にも卵巣が発達し卵母細胞形成が行われるマガキの卵巣肥大症は、卵母細胞内で胞子形成を行う原生動物寄生虫 *Marteilioides chungmuensis* が宿主生殖サイクルを支配することにより発症すると推測される。本研究では寄生虫が宿主生殖サイクルを支配する因子を同定することはできなかったが、発現遺伝子解析結果より、感染したマガキでは通常の生殖サイクルが何らかの要因で途中から変化し、発症へつながることが強く示唆された。また得られた遺伝子解析結果は、二枚貝の性成熟機構を理解する上でも有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Abnormal enlargement of the ovary in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is characterized as development of the ovary and active oogenesis after the regular spawning season of Pacific oyster. This unusual physiological condition is considered to be induced and regulated by a protozoan parasite, *Marteilioides chungmuensis*, which sporulates in oocyte of Pacific oyster, but its mechanisms has not been fully elucidated. In the present study, transcriptome data were successfully accumulated from the ovaries infected with the causative protozoan parasite. Based on these data, it was revealed that the gene expression profiles of the infected ovary were obviously different from uninfected/normal ovary, suggesting that information collected from this project will be useful to understand both the targeted phenomenon and the bivalve reproduction systems.

研究分野：魚病学

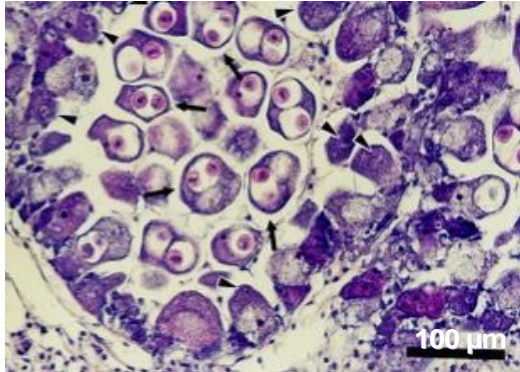
キーワード：マガキ 卵形成 原虫 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

マガキは放卵の終わる秋から翌年の春までは生殖腺が完全に消失する生物であるが、しばしば、放卵後も卵巣が消失せず、肉眼的に認めることが出来るほど大きな膨隆卵巣を形成する卵巣肥大症の存在が知られている(下図)。



罹病マガキの膨隆卵巣を組織切片により観察を行うと、卵母細胞内に原生動物 *Marteilioides chungmuensis* (以下 MC) が寄生し胞子形成を行っている様子が観察される(下図)ことから、この卵巣形成現象は寄生虫 MC が宿主マガキの生理機構を支配し、卵母細胞形成を亢進していると推測される。



これまでのより詳細な観察結果から、この MC によるマガキ卵形成操作メカニズムは、1) 卵形成支配を行う神経節に MC 感染は認められないこと、2) 異常な卵形成は全身に限無く起こる訳ではなく MC 感染部位に限定されていること、及び 3) MC が感染したオス個体で卵形成は見られないという観察所見から、MC が感染卵巣において局所的に卵形成促進因子を放出していることで起きていると想定される。しかし、本現象の物質的および生理学的メカニズムについては全く不明であった。

2. 研究の目的

軟体動物二枚貝綱にはマガキをはじめとし水産学的有用種を多く含み、増養殖生産が世界的にも広く行われている。しかし、魚類等と異なり生殖生理に関わる情報が極めて乏しく、増養殖に用いる種苗の生産を人為的にコントロールすることが難しい。

本研究で対象とする寄生虫によるマガキの卵母細胞形成促進現象について、正常な卵巣の状態と比較・解析することで、卵形成を促進する物質および卵形成時に関与する遺伝子群の同定が可能となると考えられた。これらの情報を整理することにより、二枚貝の生殖生理に関する知見の拡充と、将来的な水産増養殖への応用が可能になると考えた。

そこで本研究ではマガキで観察される寄生虫 MC による卵形成促進現象メカニズムについて、関連因子の探索と発現遺伝子解析の両面から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マガキ卵形成促進因子の探索

観察されるマガキ卵形成促進現象は寄生虫が合成する因子によると推定し、当該物質の同定を目指した。まず、肉眼で膨隆卵巣と判断された感染卵巣を切り出し、顕微鏡観察により MC 感染が確認された卵巣組織についてはリン酸緩衝液 (PBS) 中および DMSO 中でホモジナイズした。次にこれらのホモジネートを遠心分離して上清を回収し、PBS 抽出画分および DMSO 抽出画分を得た。対照区として MC 感染が認められない正常なマガキの卵巣片を同様に処理し、それぞれの PBS 抽出画分および DMSO 抽出画分を得た。

マガキ卵形成促進因子の評価系には、培養卵巣片を用いた。まず、MC 感染の見られない卵巣を摘出し 5 mm 角に細切、70% EtOH で消毒を行ったのち、海水と等張に調整した Medium 199 内にて維持した。その後、上述の手法で作成した各抽出液を培地中に添加し、培養を行った。

その後、経時的に組織片を採取し緩衝ホルマリンにて固定、定法に従いパラフィン樹脂に包埋し、組織切片を H&E 染色して光学顕微鏡下で観察、濾胞の周縁長あたりの卵母細胞数を指標として、組織片中の卵母細胞の形成促進効果を判定した。

(2) 発現遺伝子群解析

これまでの組織切片観察より、MC の感染した卵巣の濾胞上皮では、正常卵と比較すると卵径が小さく、ピテロジェニン蓄積も少ないと思われる卵母細胞が大量に形成されることが知られている。また、胞子形成を開始する前の初期発育段階にあると思われる MC 細胞も、濾胞上皮周辺に集まって観察されることから、感染卵巣の濾胞上皮で観察される活発な小型の卵母細胞形成は、局在する MC の影響を受けて起きていると想定されている。そこで、この感染卵巣の濾胞上皮における卵母細胞形成を理解するために、網羅的な発現遺伝子解析を行った。

まず、感染した卵巣を薄く切り出し、直ちに緩衝ホルマリンで固定した。その後、OCT コンパウンドを用いて包埋し、凍結切片を作成した。凍結切片を光学顕微鏡下で観察、卵母細胞形成が確認できた卵巣濾胞上皮を

Laser Microdissection 装置により切り出し、直ちに total RNA を抽出した。なおこの際、濾胞中央部にあるやや大型の卵母細胞は、卵母細胞形成が完了していると考え、濾胞上皮組織のみを切り出すように配慮して行った。

抽出した RNA より cDNA ライブラリーを作成、次世代シーケンサー-HiSeq 2000 を用いて発現遺伝子情報を取得を試みた。

次に、上述の手法では MC 感染の影響を受けず濾胞上皮組織で発現している遺伝子についても検出されることになる。そのため MC 感染によって濾胞上皮組織で発現量が変化する遺伝子を探索するには、別の手法により MC 感染により発現量が変動する遺伝子をリストアップする必要がある。

そこで、二番目の網羅的遺伝子解析として、MC の感染した卵巣組織と、MC 感染の認められない正常な卵巣組織より total RNA をそれぞれ抽出、cDNA ライブラリーをそれぞれ作成したのちに次世代シーケンサー-HiSeq 4000 を用いて発現遺伝子情報を取得した。その後、各遺伝子の発現量を両者の間で比較し、MC 感染のある卵巣でのみ特異的に発現量が変動（増加 / 低下）する遺伝子リストを作成を試みた。

4. 研究成果

(1) マガキ卵形成促進因子の探索

MC 感染した卵巣組織の PBS 抽出物および DMSO 抽出物を卵巣組織片に添加したものの、正常卵巣抽出物を添加した対照区と比較して、明確な卵母細胞形成現象は確認できなかった。また、培養した卵巣内に存在する卵母細胞径についても計測したが、正常卵巣抽出物を添加した対照区との間に差は認められず、卵母細胞の成長促進効果についても認められなかった。従って、本研究で用いた手法では、マガキ卵形成促進因子の同定やアッセイ系の構築には至っていない。

この原因として、PBS および DMSO では対象因子の溶媒として不適当であることがまず考えられる。対象因子が細胞内へ浸透して作用するのであれば、標的細胞の細胞膜を通過する必要があり、PBS および DMSO とは親和性の低い疎水性の強い物質である可能性がある。今後はエタノールやヘキサンの有機溶媒を用いて組織抽出液を作成、凍結乾燥するなどして試料を作成する試みが必要かもしれない。

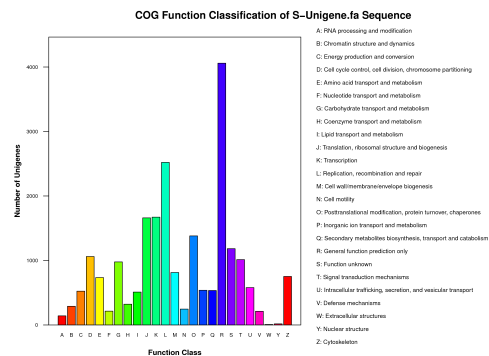
さらに、本研究で用いた海水等張 Medium 199 では二枚貝卵巣組織を 1 週間程度維持することが限界である。従って、本研究で対象とする卵母細胞形成促進現象が組織学的に認められるに要する時間が 1 週間以上であれば、その効果を確認することは難しいかもしれない。本研究の項目 (2) において、MC 感染卵巣で特徴的に発現する遺伝子の探索を行っており、今後は、それらの発現遺伝子発現をマーカーとすることで、マガキ卵形

成促進因子の探索が可能になるかもしれない。

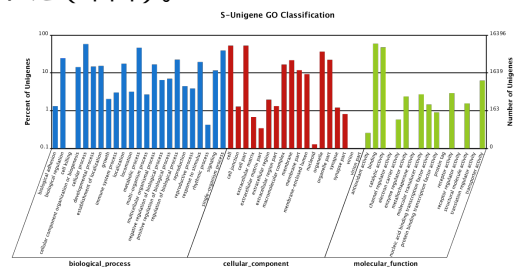
(2) 発現遺伝子群解析

Laser Microdissection 装置により切り出した MC 感染卵巣の濾胞上皮より RNA を抽出、次世代シーケンサーで網羅的に解析したところ、143,341 の unigene を取得した。そのうち、約 70,000 の配列について機能推定ができた。

Clusters of Orthologous Groups (COG) による解析では replication, recombination and repair に関与するとされる遺伝子群の発現が多くみられた (下図)。



一方、gene ontology (GO) によれば生殖関連遺伝子の発現は比較的少なく、それ以外の機能に関与する遺伝子群が多いと考えられた (下図)。



なお、機能付けできた配列の 9 割程度は宿主であるマガキ由来のものと判断された。マガキの全ゲノム解析が終了していることを鑑みると、感染組織において宿主が発現している遺伝子群については概ね把握できたと考えられる。一方、MC については small subunit ribosomal RNA 配列以外は解読されていないため、MC が感染組織で発現している遺伝子群については annotation できていないか、もしくはその他の生物種として分類されていると思われる。今後は、MC の全ゲノム配列を解読し、今回得られた情報と合わせて解析することにより、当該感染組織で MC が宿主組織を支配するメカニズムを理解する情報が得られるかもしれない。

2 回目に行った MC 感染卵巣と未感染の正常卵巣の発現遺伝子解析では、合計 53,334 の unigene を取得した。両者の間の発現量比較を行ったところ、感染組織で発現量が増加しているものが 6,582、減少しているものが

4,006 となり、卵細胞形成促進現象に関与すると考えられ、今後の研究対象とすべき遺伝子群を大幅に絞ることに成功した。

二枚貝の性成熟において発現量が増加すると報告されている遺伝子のいくつかについて検討を行ったところ、二枚貝の卵母細胞形成過程で発現量が増加するとされる foxL2 や Fatty acid synthase, endoribonuclease, Piwi, Nanos などの発現は感染個体において、有意に低下していることが示された。これらの結果より、卵巣肥大症でみられる卵母細胞形成は正常なカスケードで起こるものではないこと、また、カスケードの途中から外的要因が作用し、結果的に卵母細胞形成が促進されているという、研究開始時の仮説を裏付ける結果が示唆された。

今後、感染組織における卵母細胞の形成状況に応じてこれらの遺伝子発現がどのように変化するのかを調査することで、本疾病に関するメカニズムの解明につながることを期待される。

一方、宿主マガキの卵母細胞形成カスケードに対し、寄生虫がどのようにして関与し、そして支配を及ぼすかについては明らかにできていない。原因寄生虫である MC の遺伝子情報について全く不明であるため、今回得られた遺伝子情報からは十分に解析できなかったためである。今後は、上述したように、MC のゲノム解析についても進めていくことで、寄生虫からの働きかけという視点からの新たな展開が期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 直樹 (ITO, Naoki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30502736