

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450267

研究課題名(和文)トラフグ寄生虫の着定メカニズムの解明とその駆除

研究課題名(英文) Host recognition of a parasite monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi* for fugu *Takifugu rubripes*

研究代表者

筒井 繁行 (Tsutsui, Shigeyuki)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：20406911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグは経済価値の高い水産重要種である。このトラフグの鰓に寄生する単生類ヘテロボツリウムは、宿主に吸血による貧血症状を誘発し、重篤な場合は死に至らしめるなど、トラフグ養殖の現場で大きな問題となっている。卵から孵化したヘテロボツリウムの幼生は体表に繊毛上皮細胞を有し、この細胞表面にある繊毛を用いて自由遊泳を行うが、宿主に到達するとこの細胞を脱落させ、すみやかに寄生期へと移行する。この現象、すなわち脱繊毛は、トラフグの体表を覆う粘液中の何らかの分子を幼生が探知することで生じると考えられている。

本研究において、その分子が、マンノースに親和性を持つIgM抗体であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fish ectoparasites make initial contact with their hosts at body surfaces, which are covered with mucosa. Fish are the most primitive vertebrates with adaptive immunity and produce and secrete IgM into mucus. In this study, we showed that a parasite *Heterobothrium okamotoi* utilizes IgM to recognize their host, fugu *Takifugu rubripes*. Oncomiracidia of *H. okamotoi* shed their cilia when exposed to purified mannose-binding fractions from fugu mucus. By LC-MS/MS, proteins contained in the fraction were identified as IgM and two lectins. However, although deciliation was significantly induced by the IgM and was inhibited by mannose or a specific antibody against fugu IgM, other lectins had no effect. Immunostaining showed that fugu mannose-specific IgM binds ciliated epidermal cells of oncomiracidium. Moreover, concentrations of mannose-binding IgM in gill mucus were sufficient to induce deciliation in vitro, indicating that the parasites initially use host antibodies to colonize host gills.

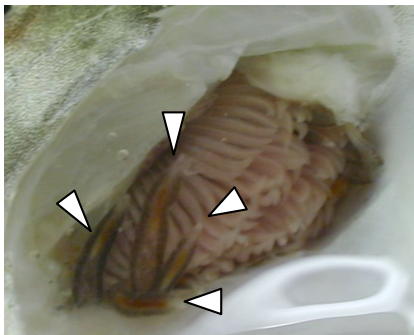
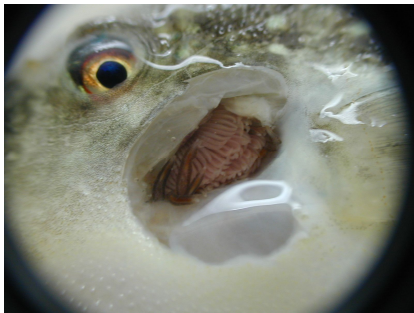
研究分野：魚類免疫

キーワード：寄生虫 宿主認識 粘液 抗体

1. 研究開始当初の背景

水産養殖業は我が国の水産業において総生産額の約 30% を占める重要な産業である。特に天然魚の漁獲量が減少しつつある現在、養殖業は今後ますます発展していくものと考えられる。しかし養殖場の環境は閉鎖的であるため、ウイルス、細菌、そして寄生虫による魚病被害、大量死が深刻な問題となっている。

トラフグ *Takifugu rubripes* は経済価値の高い水産重要種であり、西日本を中心に養殖も盛んに行われている。このトラフグの鰓に寄生する単生類ヘテロボツリウム *Heterobothrium okamotoi* (写真) は、宿主に吸血による貧血症状を誘発し、重篤な場合は死に至らしめるなど、トラフグ養殖の現場で大きな問題となっている。



この寄生虫に対して我が国では、かつてはホルマリンによる薬浴が施されてきたが、環境への影響から現在ではその使用が禁止されている。今日では、フェバンテルを有効成分とするマリンバンテルが水産用医薬品として承認されており、ヘテロボツリウム駆除剤として市販されている。しかし単価が非常に高く、養殖業者からは安価な代替品の開発が待ち望まれている。

卵から孵化したヘテロボツリウムの幼生は体表に繊毛上皮細胞を有し、この細胞表面にある繊毛を用いて自由遊泳を行うが、宿主に到達するとこの細胞を脱落させ、すみやかに寄生期へと移行する。この現象、すなわち脱繊毛は、トラフグの体表を覆う粘液中の何らかの分子を幼生が探知することで生じると考えられている。このメカニズムが明らかになれば、寄生成立の最初のステップ、すなわち宿主認識機構を分子生物学的に説明できる可能性があり、その知見はトラフグ養殖

におけるヘテロボツリウム駆除に応用できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

寄生虫の宿主認識メカニズムとして、しばしば糖を介した分子機構が報告されている。演者らはこれまで、トラフグの体表粘液から、2 つのマンノース結合レクチン、すなわちパフレクチンとカリクレクチンを見出してきた。そこで本研究では、ヘテロボツリウムがトラフグ粘液中のマンノース結合タンパク質を宿主認識に利用しているとの仮説を立て、検証した。

3. 研究の方法

(1) ヘテロボツリウム寄生部位である鰓粘液を多量に採取することは困難である。一方で、ヘテロボツリウム幼生は、トラフグの皮膚にも着定しうる事が報告されている。そこでトラフグの皮膚粘液を用いて以下の実験を行った。

皮膚抽出液をマンノースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーに供し、マンノース結合画分を得た。この画分をヘテロボツリウム幼生に曝露し、顕微鏡下で脱繊毛の有無を観察した。

(2) マンノース結合画分を SDS-PAGE に供した。その後、バンドを切り出し、LC-MS/MS 解析によるタンパク質の同定を試みた。また、抗パフレクチン抗体を用いたウエスタン解析も行った。

(3) マンノースアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせ、(2) で同定された 3 つの因子 (パフレクチン、カリクレクチン、およびマンノース結合 IgM) を精製した。カリクレクチンおよび IgM は、存在量の多いトラフグ血清から得た。これらをヘテロボツリウム幼生に添加し、脱繊毛誘導活性の有無を調べた。

(4) (3) で脱繊毛誘導活性が認められたマンノース結合 IgM に対し、マンノースおよび抗トラフグ IgM ウサギ抗体による阻害が生じるか調べた。

(5) マンノース結合 IgM が他の糖と結合するかどうかを調べるために、精製したマンノース結合 IgM を、GalNAc、GlcNAc、フコース、ラクトースをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーに供し、吸着画分と非吸着画分を得た。これらを SDS-PAGE に供した。

(6) 複数のゲルろ過クロマトグラフィーおよびマンノースアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせ、マンノースへの親和性を持たない IgM (非マンノース結合 IgM) を精製し、マンノース結合 IgM と脱繊毛誘導活性を比較した。

(7) 脱繊毛誘導因子の倍々希釈列を作製し、活性を示す最小濃度を検討した。

(8) トラフグ 3 個体から綿棒を用いて鰓粘液を採取し、これをマンノースアガロースと反応させた。マンノースアガロースを洗浄後、結合画分をマンノース結合 IgM の倍々希釈系列とともにウエスタンブロット解析に供し、シグナル強度を比較した。

(9) 免疫蛍光染色により、脱繊毛誘導因子のヘテロボツリウム幼生への結合部位を調べた。

4. 研究成果

(1) トラフグ皮膚粘液由来のマンノース結合画分はヘテロボツリウム幼生の脱繊毛を誘導した。

(2) この画分には 3 つのタンパク質が含まれていた。LC-MS/MS 解析およびウエスタン解析により、これらのタンパク質は、パフレクチン、カリクレクチン、および IgM であることが示された。

(3) 3 つの候補因子を完全精製し、ヘテロボツリウム幼生に添加した。その結果、カリクレクチンおよびパフレクチン添加群ではほとんど脱繊毛個体は認められなかったが、IgM 添加群ではほぼ全ての個体が脱染毛した。

(4) マンノース結合 IgM の脱繊毛誘導活性は、マンノースおよび抗トラフグ IgM ウサギ抗体により有意に阻害された。

(5) いずれの糖アフィニティークロマトグラフィーにおいても、マンノース結合 IgM は非吸着画分に検出された。従って、トラフグのマンノース結合 IgM は、少なくともこれら 4 種の糖には結合しないことが示唆された。

(6) 非マンノース結合 IgM 添加群でもわずかながら脱繊毛個体が認められたが、脱繊毛率はマンノース結合 IgM に比べ優位に小さかった。

(7) マンノース結合 IgM の脱繊毛誘導最小濃度は約 $25 \mu\text{l/ml}$ であった。

(8) 3 個体のトラフグの鰓粘液中には、 $25 \mu\text{l/ml}$ 以上のマンノース結合 IgM が含まれていた。(7)の結果と合わせて、トラフグの鰓には、脱繊毛を誘導するのに十分な量のマンノース結合 IgM が存在することが示唆された。

(9) 免疫蛍光染色により、トラフグのマンノース結合 IgM は、ヘテロボツリウム幼生の繊毛上皮細胞に結合することが示された。

以上の結果から、ヘテロボツリウム幼生が、宿主の獲得免疫系の中樞を担う IgM 抗体を巧みに利用し、宿主を認識していることが明らかとなった。おそらくヘテロボツリウム幼生の繊毛上皮細胞にマンノースを含むリガンドが存在し、これに IgM が結合することで細胞内にシグナルが伝達され、繊毛細胞が脱落するものと考えられる。

現在、リガンドの特定と、マンノース結合 IgM の可変領域のクローニングを試みてい

る。リガンドが特定でき、何らかの方法でこれを効果的にブロックすることができれば、ヘテロボツリウム駆虫薬の開発に繋がるかもしれない。また、ゲノム編集技術を用い、マンノース結合 IgM 遺伝子のノックアウト個体が生産できれば、ヘテロボツリウム幼生が脱繊毛できないトラフグ、すなわちヘテロボツリウム症に感染しないトラフグを作り出せる可能性があり、トラフグ養殖の発展に貢献できるものと期待される。

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 1 件)

Igarashi K, Matsunaga R, Hirakawa S, Hosoya S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y, Nakamura O, Miyadai T, Tasumi S, Tsutsui S. (2017) Mucosal IgM antibody with D-mannose affinity in fugu *Takifugu rubripes* is utilized by a monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi* for host recognition. *Journal of Immunology* 198(10):4107-4114. 査読有り。

〔学会発表〕(計 4 件)

筒井繁行「トラフグの抗体はエラムシの宿主認識に利用される」日本水産学会、2017 年 3 月 26 日～30 日、東京海洋大学(東京都港区)

Tsutsui S, Igarashi K, Hirakawa S, Hosoya S, Suetake H, Kikuchi K, Suzuki Y, Nakamura O, Tasumi S, Miyadai T. “Mannose-specific immunoglobulin M in the mucus of fugu *Takifugu rubripes* is utilized by a monogenean parasite *Heterobothrium okamotoi* for host recognition” 2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology (第 2 回国際魚介類免疫学会) June 26th-30th, 2016, Portland, Maine, USA.

五十嵐健斗・平河早智・細谷将・末武弘章・菊池潔・田角聡志・鈴木謙・宮台俊明・中村修・筒井繁行「ヘテロボツリウム幼生はトラフグのマンノース結合 IgM を利用し、宿主を認識する」日本水産学会、2016 年 3 月 26 日～30 日、東京海洋大学(東京都港区)

五十嵐健斗・平河早智・細谷将・末武弘章・菊池潔・中村修・宮台俊明・鈴木謙・田角聡志・筒井繁行「トラフグマンノース結合 IgM はヘテロボツリウム幼生の脱繊毛を誘導する」日本比較免疫学会、2015 年 8 月 20 日～23 日、小浜市働く婦人の家(福井県小浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 繁行 (TSUTSUI, Shigeyuki)
北里大学・海洋生命科学部・講師
研究者番号: 20406911

(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

細谷 将 (HOSOYA, Syo)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 60526466

末武 弘章 (SUETAKE, Hiroaki)
福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授
研究者番号: 00334326

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし