

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850139

研究課題名(和文) 粘液胞子虫クドア属における種内変異解析のための遺伝子マーカーの探索および性状解析

研究課題名(英文) Development of a genotyping assay and characterization of Kudoa septempunctata

研究代表者

米加田 徹 (Mekata, Tohru)

国立研究開発法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員

研究者番号：40597944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クドアのトランスクリプトーム解析により新規遺伝子情報を取得した。伸長因子1 は糞線虫と、熱ショックタンパク質83はウズムシと最も近縁であった。胞子の酵素活性は、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性フォスファターゼおよびナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ陽性であった。抗クドアモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ2株を得た。これらの抗体はシスト内あるいは分泌タンパク質を認識した。クドアのミトコンドリア様DNAのPCR-制限酵素断片長多型解析により、4つの遺伝子型が認められた。32検体の遺伝子型の解析の結果、国内には全遺伝子型が、海外株では単一の遺伝子型のみ認められた。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome data of *Kudoa septempunctata* (Ks) was obtained by next-generation sequencing. EF1- and Hsp83 of Ks shared the highest identity to EF1- of threadworm and Hsp90 of flatworm, respectively. The enzymatic activities were investigated using APIZYM. Positive signals were observed for leucine arylamidase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. The production of a monoclonal antibody was attempted. Mice were injected with an emulsion containing spores. The fusion of lymphocytes with myeloma cells produced 48 hybridoma lines, of which two were selected on the basis of their reactivity. The sequencing analysis of mitochondrial DNA revealed the presence of genetic polymorphisms of Ks. Four genotypes were identified based on a PCR-RFLP assay. The genotyping analysis of 32 specimens were revealed that all genotypes were found in domestic samples, and appearance frequency of each genotype were regionally uneven, whereas only genotype II was found in oversea sample.

研究分野：魚病学

キーワード：クドア・セブテンブクタータ モノクローナル抗体 酵素活性 遺伝子型別

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ筋肉に寄生する粘液胞子虫クドアとして、*K. septempunctata*、*K. thyrsites* および *K. lateolabracis* の3種が報告されており、*K. septempunctata* は極嚢数の違いで他のクドア属と区別される。クドア属の遺伝学的情報についてはこれまでに 18s および 28s リボソーム RNA 遺伝子 (rRNA) が報告されているが、その他の遺伝子に関してはほとんど報告されていない。そのため、クドア属の分類や検査法は rRNA 遺伝子の配列情報が基となっている。*K. septempunctata* は、国内外のヒラメから検出されているが、これらの rRNA 遺伝子の配列は 100%一致している。また、食中毒事例において確認された *K. septempunctata* は極嚢数が7極である場合が多い一方で、国内でしばしば確認されている株は6極であるため、これらの株間での差異を詳細に比較する必要がある。現在のところ、遺伝学的情報が乏しく、これら極嚢数の異なる *K. septempunctata* の遺伝学的差異を確認することができない。そのため一刻も早い遺伝子情報の整備が必要である。

また、*K. septempunctata* は筋肉細胞内に寄生することは明らかとなっているが、筋肉細胞内への侵入や筋肉細胞外への移行経路、また胞子の増殖などの体内動態に関しては不明であり、感染防除対策を講じる上でも重要な課題である。

2. 研究の目的

K. septempunctata の種内変異を把握するために、胞子を精製後、mRNA を単離し、cDNA ライブラリーを構築し、これまで全く明らかにされていなかった *K. septempunctata* の有する遺伝子情報の獲得を目指す。さらに、異なる株間で得られた遺伝子配列を比較し種内での遺伝的差異について解析する。

K. septempunctata 胞子が有する酵素活性を測定し胞子の特性を評価することで、*K. septempunctata* の新たな検出法への展開への可能性を探索する。

K. septempunctata の体内動態を把握するために、精製した胞子を用いて抗体を作製し、免疫組織染色によりヒラメ魚体内での *K. septempunctata* の分布を把握する。

3. 研究の方法

K. septempunctata の胞子を不連続密度勾配遠心分離法により精製し、total RNA を抽出後、精製を行う。これを基に遺伝子ライブラリーを構築し、網羅的にシーケンス解析を行う。得られたシーケンスのアセンブルやアノテーションを行い、*K. septempunctata* の遺伝子情報を得る。得られた情報を基に株間の比較を行う。

精製した胞子の粗タンパク質を用い、酵素活性測定キットによる性状試験を行う。

精製胞子をマウスに免疫し、抗 *K. septempunctata* マウス抗体を作製する。感染ヒラメの組織において免疫組織染色により *K. septempunctata* の存在を確認する。

4. 研究成果

K. septempunctata の EST 解析ならびにトランスクリプトーム解析により、新規遺伝子情報を取得した。このうち2遺伝子について分子系統解析を行ったところ、伸長因子 1α は糞線虫の一種と、熱ショックタンパク質 83 はウズムシ属の一種と最も近縁であった。

1×10⁷ の7乗個の胞子を精製後、超音波で破碎し、19種類の酵素活性の有無を検討した。その結果、ロイシンアリルアミダーゼ、酸性フォスファターゼおよびナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼの3酵素について陽性反応が認められた。

K. septempunctata に対するモノクローナル抗体作製のため、胞子懸濁液をアジュバントと混合し、マウスに免疫後、リンパ球を採取し、ミエローマ細胞と融合しハイブリドーマを得た。*K. septempunctata* 感染魚の凍結切片を用いた免疫組織化学法によるスクリーニングにより、*K. septempunctata* に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを2株得た。これらの抗体は *K. septempunctata* の偽シスト内に存在するタンパク質あるいは偽シストから分泌されているタンパク質を認識した(図1)。また、

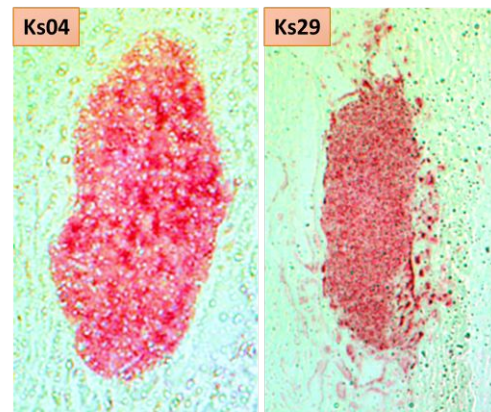


図1 モノクローナル抗体による免疫染色

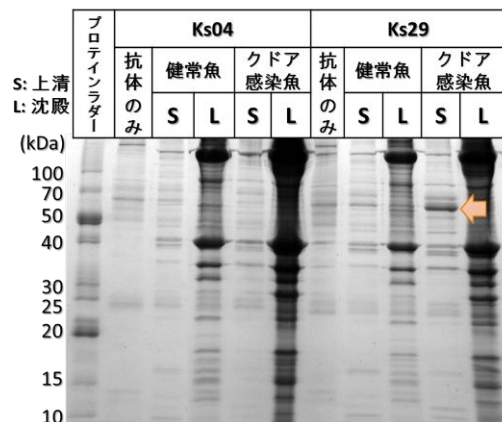


図2 免疫共沈降

分泌性のタンパク質を認識するモノクローナル抗体による免疫共沈降により結合タンパク質を得た(図2)。

K. septempunctata 株間での遺伝子型の比較を行うために約2000塩基対のITS領域の遺伝子配列を解析したが、不均一なマルチコピー遺伝子であったため正確な遺伝子配列を得ることができず、株間の比較を行うには至らなかった。一方、国内外の株における *K. septempunctata* のミトコンドリア様DNAの1932塩基対の遺伝子配列を解析した結果、国内株および海外株にそれぞれ特徴的な遺伝子配列が認められた。この変異領域を利用したPCR-制限酵素断片長多型(RFLP)解析により、クドアを4つの遺伝子型に識別することが可能となった(図3)。32検体の遺伝子型の解析から、国内には全ての遺伝子型が認められた一方で、海外株は単一の遺伝子型となった(表1)。また国内においては、地域的に遺伝子型が偏る傾向が認められた。

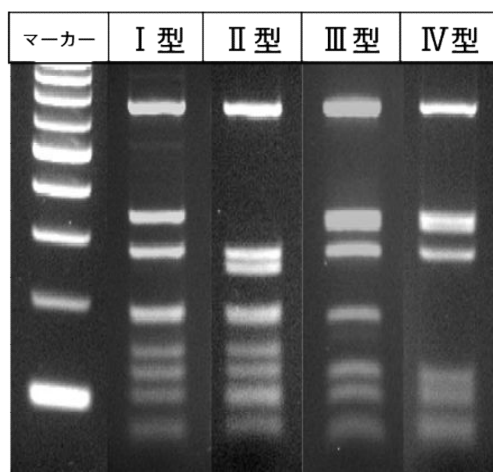


図3 *K. septempunctata*の遺伝子型別

表1 国内外における *K. septempunctata* 各遺伝子型の出現割合

	各遺伝子型の割合(%)			
	I型	II型	III型	IV型
国内	31	50	4	15
海外	0	100	0	0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) T Nishioka, J Satoh, T Mekata, K Mori, K Ohta, T Morioka, M Lu, H Yokoyama, T Yoshinaga. Efficacy of Sand Filtration and Ultraviolet Irradiation as Seawater Treatment to Prevent *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) Infection in Olive

Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathology, 51(1):23-27. (2016) (査読有り)

- 2) H Yokoyama, M Lu, K Mori, J Satoh, T Mekata, T Yoshinaga. Infection Dynamics of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in Hatchery-produced Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathology, 50(2): 60-67. (2015) (査読有り)
- 3) Sugita-Konishi Y, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A, Ohnishi T. New Validated Rapid Screening Methods for Identifying *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Jpn J Infect Dis. 2015 Mar 23;68(2):145-7. (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) T. Mekata, J. Satoh, H. Sako and T. Nishioka. Production of monoclonal antibody against *Kudoa septempunctata*. 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Ho Chi Minh City, Vietnam (Nov, 2014)
- 2) 西岡豊弘, 佐藤 純, 米加田 徹, 森 広一郎, 太田健吾, 森岡泰三, 呂 明媚, 横山 博, 良永知義「ヒラメ筋肉に寄生する粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* の感染防除法に関する検討」平成 26 年度日本魚病学会秋季大会, 九州大学, 2014 年 9 月
- 3) 横山 博, 呂 明媚, 良永知義, 森 広一郎, 佐藤 純, 米加田 徹「ヒラメの筋肉寄生粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* の感染動態と感染時期の推定」平成 26 年度日本魚病学会春季大会, 函館国際ホテル, 2014 年 3 月
- 4) 引間順一, 河野智哉, 児玉ひろの, Gouranga Biswas, 米加田 徹, 酒井正博「LAMP 法を用いたヒラメ粘液微胞子虫 *Kudoa septempunctata* の検出法の開発」平成 26 年度日本魚病学会春季大会, 函館国際ホテル, 2014 年 3 月
- 5) 小西良子, 石崎直人, 森 広一郎, 米加田 徹, 福田 穰, 木本圭輔, 吉岡左織, 難波豊彦, 大西貴弘「ヒラメに寄生するクドア セプテンブクタタの新しいスクリーニング検査法と妥当性評価」平成 26 年度日本水産学会春季大会, 北海道大学, 2014 年 3 月
- 6) 米加田 徹, 佐藤 純, 森 広一郎「粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* の EST 解析」平成 25 年度日本魚病学会秋季大会, 三重大学生物資源学部, 2013 年 9 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米加田 徹 (MEKATA, Tohru)
国立研究開発法人水産総合研究センター・
増養殖研究所・研究員
研究者番号：40597944