

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 29 年度博士課程進学

氏 名 渡邊 勇歩

指導教員名 良永 知義

論文題目 Studies on the parasitic ciliate of marine teleosts *Cryptocaryon irritans* for the development of new control methods against its infection

(海産真骨魚類に寄生する繊毛虫 *Cryptocaryon irritans* に対する新しい防除法の開発のための研究)

海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* は、絶対寄生性の繊毛虫であり、ほとんどの海産真骨魚類の鰓や体表の上皮組織内に寄生し、その重篤な寄生は宿主の死亡を引き起こす。その生活史は、宿主組織内の寄生期虫体（トロホント）、成長して宿主を離脱した直後の虫体（プロトモント）、宿主離脱後にシスト壁を形成して水底にとどまるシスト期虫体（トモント）、シスト内で細胞分裂により形成され、水中に放出される感染仔虫（セロント）の 4 つのステージからなる。本種による疾病、海産白点病は、元来、水族館などの閉鎖的な環境で発生するものと考えられていた。しかし、現在では世界中の温帯・熱帯海域に分布し、海面網生簀養殖場など開放的な環境でも発生することが知られている。本病は国内外で頻発し、養殖魚の死亡による大きな産業被害を出し、地域経済に影響を与えることも多い。また、本疾病は持続的養殖生産確保法でも養殖漁場環境の指標疾病とされており、海産魚養殖の重要な疾病のひとつとなっている。

これまでに、海産白点病防除法の開発のために多くの研究が行われているが、食用魚に対して安全かつ効果的な薬剤やワクチンは開発されていない。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、生簀密度が高く、また、移動できる海域が限られていることから生簀の移動は実施困難なことも多く、本病が一旦発生すると大被害につながることが多い。このような背景から、新しい海産白点病の防除法の開発が望まれている。

近年、寄生虫被害を抑えるために総合的寄生虫（病害虫）管理（IPM: Integrated Parasite/Pest Management）が有効であると考えられている。IPM は、生物学的手法、物理学的手法、化学的手法など様々な方法を組み合わせることで、経済的に許容可能なレベルにまで寄生虫や害虫による被害を抑えるという考え方である。本病においても、単独では効果が十分でない防除策を新たな手法と組み合わせることで IPM の実施が可能であると考えられる。

そこで、本研究では海産白点病に対する IPM 手法の開発のための基盤として、海産白点虫の発生と環境要因の関係を検討するとともに、海産白点虫の感染におけるプロテアーゼの関与を明らかにし、プロテアーゼを抗原とした新しいワクチンの開発を試みた。

第1章 海産白点虫の発達と環境要因の影響

本虫のシスト期虫体を低溶存酸素条件下（低 DO）で維持すると、発達が抑制されることにより感染仔虫の放出が阻害されるが、好気条件（高 DO）に戻ると放出が再開することが知られている。また、虫体の宿主からの離脱や感染仔虫の放出には明確な日周リズムがあることも知られている。加えて、本病が主として水温低下期の秋に頻発することや、養殖場の環境に影響されること、それぞれの養殖場でも発生は年によって大きく異なることから、本病の発生には環境要因が強く関連していると考えられている。しかし、低 DO のシスト期虫体への影響や虫体の宿主離脱や感染仔虫放出における日周リズムの形成要因、光受容のメカニズムなど、環境要因が虫体の生理生態に与える影響については不明な点が多い。そこで第1章では、環境因子が虫体の発達や日周リズムに影響を及ぼすメカニズム解明の基盤的知見を得るために、低 DO がシスト期虫体の発達に及ぼす影響を詳細に検討するとともに、光周期が虫体の宿主離脱や感染仔虫放出の日周リズムに及ぼす影響を調べた。

シスト期虫体の低 DO 下での発達動態と生存を把握するため、シスト期虫体を期間をかえて低 DO や高 DO 条件に暴露し、酢酸カーミン染色法を用いシストの発達を経時的に観察した。その結果、いずれの発達段階のシスト期虫体でも低 DO 下では発達を停止し、それらを高 DO に戻すと発達を再開し、感染仔虫の放出に至った。さらに、シスト期虫体を低 DO で1ヶ月間培養し、発達を停止させても高 DO に移したところ、低 DO に収容していないシストと同等の感染仔虫放出率を示し、感染仔虫の感染力も同等であった。このことから、海底が低 DO 化する夏季には海底にシスト期虫体が発達を停止し、蓄積しており、水温躍層の崩壊や台風等による水底への酸素供給直後に発達を再開し、感染仔虫を放出することで本病が大発生することが示唆された。次に、光周期が宿主離脱の日周リズムに与える影響を調べるため、感染仔虫に暴露して攻撃したブラックモーリー（*Poecilia* sp.）を二つの異なる光周期条件で飼育し、宿主から離脱した虫体を3時間毎に回収・計数した。その結果、宿主離脱虫体数のピーク時刻は、光周期を変えることで大きく変化し、光周期の変化により宿主離脱におけるリズムが変化することが示された。

また、光周期が感染仔虫放出における日周リズムの形成に与える影響を調べるため、細胞培養フラスコ内の海水中に宿主離脱直後の虫体を収容し、異なる光周期条件に暴露し、5日後にシストから放出された感染仔虫を3時間毎に回収・計数した。その結果、仔虫放出時刻も光周期により変化することが示された。このことから、虫体の日周性が光周期により調節されていることが示唆された。

第2章 海産白点虫の寄生ステージで発現するプロテアーゼの特性とそれを標的としたワクチンの有効性

魚類が海産白点虫に対して免疫を獲得すること、ならびに獲得免疫には虫体表面に存在する不動態抗原が関与していることがよく知られている。しかし、繊毛虫の不動態抗原は株間での変異が高く、同種内であっても免疫効果を示さないことが知られている。そのため、ワクチン開発には異なる株間で共通に免疫効果のある抗原の探索が必要である。一方、寄生性原虫類において、虫体のプロテアーゼが宿主への侵入、摂餌、発達などの重要な寄生プロセスに関与していることが多数報告されている。海産白点虫においても、寄生期に複数のプロテアーゼ遺伝子が高発現することが報告されている。このことから、本虫の寄生にもプロテアーゼが重要な役割を持つこと

が予想されるが、その機能は明らかではない。そこで、第2章では、海産白点虫の感染および寄生期で発現するプロテアーゼをワクチン開発のための候補抗原として注目し、その特性・機能を調べ、これを抗原としたワクチンの有効性を検討した。

まず、海産白点虫の *in vitro* および *in vivo* アッセイ系を用いて、各種のプロテアーゼ阻害剤が虫体の生存と成長に与える影響を調べた。その結果、セリンおよびシステインプロテアーゼ阻害剤添加区において、虫体生存率の低下および感染虫体数の減少が示された。また、ザイモグラフィにより、寄生期虫体は、セリンおよびシステインプロテアーゼを保有することが確認された。さらに、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行ったところ、感染仔虫および寄生期虫体でセリンおよびシステインプロテアーゼ遺伝子が高発現していることが示された。

そこで、感染仔虫と寄生期虫体で高発現していたセリンおよびシステインプロテアーゼの寄生への関与を確認するため、特に高発現していた遺伝子4種について、RNA干渉法（RNAi）により感染仔虫の遺伝子の発現を抑制し、これを用いてブラックモリーを攻撃した。その結果、RNAiを施した虫体では、対照区と比較して、成長して宿主を離脱した虫体数が減少した。このことから、感染仔虫および寄生期虫体で高発現するプロテアーゼ遺伝子は宿主への感染に関与していることが示唆された。

この結果からプロテアーゼ分子で魚を免疫することにより海産白点虫の寄生を抑制できる可能性が考えられた。そこで、RNAiで標的とした4種のプロテアーゼについて組み換えタンパク質を大腸菌発現系によって作製し、これを注射ワクチンとしてトラフグ（*Takifugu rubripes*）を免疫したのち、感染仔虫による攻撃試験を行った。その結果、プロテアーゼを抗原として接種した4種の試験区はいずれも対照区と比較して宿主へ感染した虫体数が減少した。特に、そのうちの1種のシステインプロテアーゼを抗原として用いた場合は、感染虫体数が有意に減少した。さらに、異なる株の虫体破碎液を用いた酵素結合免疫吸着法（ELISA）の結果から、ワクチン接種魚の抗体は異なる株にも反応することが確認された。このことから、海産白点虫のプロテアーゼによる免疫は、異なる株に対しても効果を示すことが示唆された。

総合考察

本研究では、低DOがシスト期虫体の発達に及ぼす影響や、光周期が宿主離脱や感染仔虫の放出に及ぼす影響の詳細を把握することができた。これらは、海産白点病の発生には、溶存酸素条件、日照条件、潮汐などの環境因子が大きく関与している可能性を改めて示し、環境因子をより詳細にモニタリングすることで海産白点病発生予測技術を開発できる可能性が示された。また、従来、内在的であると考えられていた虫体の日周性が光周期によってコントロール可能であることが明らかになったことから、養殖環境や水槽の光周期をコントロールすることで海産白点病の発生を軽減できる可能性も示唆された。また、海産白点虫のプロテアーゼを抗原としたワクチンは、完全な防除は困難ではあるが、異なる株に対しても免疫効果があることが示され、有効なワクチン抗原になる可能性が示された。

本研究により海産白点病に対するIPM手法の開発にむけて大きな手掛かりをあたえることができたと考えられる。