

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 渡邊 勇歩

海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* は、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する絶対寄生性の繊毛虫である。本虫による疾病、海産白点病は国内外の海産魚養殖場で頻発し、養殖魚の死亡による大きな産業被害を与えているが、未だ防除法は確立されていない。また、一般に寄生虫を単一の方法で完全に防除することは困難であるため、様々な手法を組み合わせる寄生虫被害を抑える総合的寄生虫管理 (IPM) 手法の開発が有効であると考えられている。本論文では、海産白点病に対する IPM 手法の開発のために重要な要素である発生予測法の開発とワクチン開発にむけた基盤的知見の集積を試みた。

海産白点虫の発達と環境要因の影響

既報の研究結果から、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。そこで、本論文では、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、低溶存酸素条件（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。

低 DO 下では、いずれの発達段階のシスト期虫体でも発達を停止し、それらを好気条件（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、発達を停止させた後に高 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。また、異なる光条件下で感染魚およびシスト期虫体を維持した結果、宿主離脱および仔虫放出におけるピーク時刻が異なり、虫体の日周性が光周期により調節されることが示唆された。

これらのことから、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が改めて示された。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。

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化抗原が関与していることが知られているが、不動化抗原は株間での変異が高く、

ワクチン抗原として有用ではない。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。また、海産白点虫において、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。そこで、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、ザイモグラフィーにより、寄生期虫体は、セリンおよびシステインプロテアーゼが高い活性を持つことが確認された。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い、感染仔虫および寄生期虫体で複数の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を見出した。

そこで、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 を施した虫体を用いると対照区と比較して感染虫体数が減少した。

次に、RNAi で標的とした 4 種のプロテアーゼの組換えタンパクを大腸菌発現系を用いて作製し、これを注射ワクチンとしてトラフグを免疫したのち、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感染虫体数が減少した。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 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。海産白点虫のプロテアーゼを抗原としたワクチンは、感染の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。

これらの研究により、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。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学または獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。