

論文の内容の要旨

論文題目：魚類寄生虫 *Nebenedenia girellae* 幼生および *Cryptocaryon irritans*
の繊毛不動化・凝集抗原に関する研究

氏 名：畑中 晃昌

近年の水産養殖業の拡大とともに、魚類寄生虫による感染症は大きな被害をもたらすようになってきた。これまで、養殖魚の治療は化学物質を用いたものが中心であったが、魚体および環境水への残留や、薬剤耐性虫の出現等の問題から、安全性の高い抗寄生虫ワクチンの開発が急がれている。養殖魚に感染する寄生虫の中でも、ハダムシ *Neobenedenia girellae* および海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* は宿主魚への特異性が低く、これまでヒラメ、ブリおよびトラフグなどの産業的に価値の高い養殖魚種への寄生が確認されている。しかしながら、これら寄生虫に関する生化学的研究、宿主魚と寄生虫の関係における免疫学的研究は十分には行われていない。魚類寄生虫ワクチンに関する研究はこれまで、淡水白点虫 *Ichthyophthirius multifiliis* で不動化・凝集抗原 (immobilization antigen: i-antigen) を中心に行われてきた。ナマズ類を用いた試験では、i-antigen は腹腔内への接種により抗体 (immunoglobulin M: IgM) の産生を誘導し、その血清は *in vitro* において淡水白点虫を不動化・凝集させること、i-antigen の接種は攻撃試験においてナマズ類の生残率を向上させること、などが明らかになっている。

以上のような背景の下、本研究ではハダムシおよび海産白点虫の不動化・凝集抗原を同定すること、さらにはこれら抗原の接種に伴う魚体の免疫学的性状の変化を明らかにすることを目的とした。得られた成果の概要は以下の通りである。

1. ハダムシの不動化・凝集抗原の同定

ハダムシ幼生（オンコミラシジウム：oncomiracidium）を超音波破碎し調製した抗原を用いて作製したウサギ抗血清は、*in vitro* でハダムシ幼生を不動化・凝集したことから、ハダムシが不動化・凝集抗原を発現していることが明らかになった。そこで次に、このウサギ抗血清を用いて免疫組織染色を行ったところ、ハダムシ幼生の繊毛が強く染色された。また、あらかじめ過剰な繊毛タンパク質を用いてウサギ抗血清を吸収した場合には、ハダムシに対する不動化・凝集能が著しく低下したことから、ハダムシ幼生の繊毛抗原が不動化・凝集抗原であることが示唆された。

さらに、ハダムシ幼生から調製した繊毛抗原をヒラメ腹腔内へ接種したところ、ウサギの場合と同様にその血清はハダムシ幼生に対して不動化・凝集能を示し、ハダムシ幼生の繊毛抗原が不動化・凝集抗原であることを支持した。さらに、ヒラメ血清 IgM を各種クロマトグラフィーを用いて精製し、ウサギ抗ヒラメ IgM 血清を作製してヒラメ抗血清のハダムシ幼生繊毛に対する抗体価を酵素免疫定量法（ELISA）で調べたところ、不動化・凝集能と高い相関を示した。また、ヒラメ血清の抗体価の上昇は 3 ヶ月以上持続することが明らかになった。一方、ヒラメ体表粘液の ELISA 抗体価は、ハダムシ幼生繊毛抗原の腹腔内への接種後、有意に上昇したものの（ $P<0.05$ ）、血清の ELISA 抗体価との相関はほとんどみられず、体表粘液によるハダムシ幼生への不動化・凝集能もみられなかった。

次に、ヒラメ腹腔内にハダムシ幼生繊毛抗原を接種しハダムシ幼生を用いて攻撃試験を行ったところ、ハダムシ幼生繊毛接種区および対照のウシ血清アルブミン接種区間で、ハダムシの寄生数に差はみられなかった。これは、ヒラメ体表粘液中に不動化・凝集能を示す抗体を産生することができなかったことが原因と考えられた。なお、繊毛から細胞膜タンパク質を調製し、ウサギおよびヒラメ抗血清を用いて行ったイムノブロット解析により、ハダムシの不動化・凝集抗原は繊毛の細胞膜表面に存在する 8 kDa の糖タンパク質であることが示された。

2. ハダムシに対して不動化・凝集能を示す血清レクチンの生化学的性状

ホシガレイのハダムシへの感受性は同じく異体類のヒラメのそれと比較して低いことが我々の両魚種の飼育経験上、知られていた。そこで本研究において、ハダムシ幼生を用いて両魚種に対して攻撃試験を行った。その結果、ホシガレイ体表へのハダムシの寄生数の体表単位面積あたりの平均値±標準誤差は 1.4 ± 0.6 個体/cm² と、ヒラメへの 6.8 ± 2.5 個体/cm² に比べて有意に低かった（ $P<0.01$ ）。そこで、両魚種から血清を調製してハダムシ幼生に対する不動化・凝集能の測定を行ったところ、ホシガレイの血清中においてハダムシ幼

生に対し強く反応する成分の存在が明らかになった。一方、ヒラメの血清には不動化・凝集能はみられなかった。ホシガレイ血清のハダムシ幼生に対する不動化・凝集能は、終濃度 2 mM の D-グルコース、D-ガラクトースもしくは myo-イノシトールの添加により阻害された。

そこで、D-グルコース・アガロースカラムを用いるアフィニティー・クロマトグラフィーにより上記の成分の精製を行い、ホシガレイ血清中に高濃度（約 2 mg/mL）で含まれ、非還元条件下の SDS-PAGE で 33 kDa および 30 kDa の易動度を示す 2 種類のレクチン (*Verasper variegatus* lectin: VVL) を得た。精製 VVL が *in vitro* でハダムシ幼生を不動化・凝集した一方、D-グルコース・アガロースカラムの素通り画分には不動化・凝集能はみられず、したがって VVL がハダムシ幼生の不動化・凝集能を示す成分であることが明らかになった。生化学的な解析から、これら 2 種類のレクチン間において N 型糖鎖の付加の有無の差しかないこと、還元条件下の等電点電気泳動で pI 4.6 および 4.8 を示す 15 kDa のサブユニットがジスルフィド結合したヘテロダイマーであること、などが示された。また、各種単糖を用いたウサギ赤血球凝集阻害試験によって、これら 2 種類のレクチンはいずれも D-マンノース、N-アセチル-D-グルコサミンおよび D-グルコースに特異性を示すことが明らかになった。

VVL の N 末端アミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法で VVL サブユニット遺伝子の単離を行ったところ、いずれも 163 アミノ酸残基からなるサブユニット・アイソフォームをコードする 4 種類の cDNA が得られた。ペプチド・マス・フィンガープリンティング法を用いて精製した 2 種類の VVL サブユニット分子種の同定を行ったところ、両 VVL とも一つのサブユニットは D-マンノースおよび D-グルコースの誘導体に特異性を示すレクチンに特異的な Glu-Pro-Asn 配列を有することが示された。しかしながら、もう一つのサブユニットについてはペプチド・マス・フィンガープリンティングで十分な情報を得ることができなかった。2 種類の精製 VVL を蛍光標識して組織染色したところ、ハダムシ幼生の繊毛を認識することが示された。さらに、VVL を用いたレクチンブロット解析により、前節で述べたハダムシ幼生繊毛の細胞膜表面に存在する 8 kDa の不動化・凝集抗原を認識していることが明らかになった。

3. 海産白点虫の不動化・凝集抗原の同定

海産白点虫の感染期の仔虫（セロント：theront）からタンパク質を調製して作製したウサギおよびトラフグ抗血清は *in vitro* で海産白点虫を不動化・凝集した。そこで、トラフグの血清 IgM を精製し、ウサギ抗トラフグ IgM 血清を作製することでトラフグ血清の海産白点虫セロントに対する ELISA 抗体価を調べたところ、トラフグ免疫後 2-6 週目に最大値を示した。また、トラフグ血清の ELISA 抗体価および不動化・凝集能には相関がみられた。

海産白点虫セロントから細胞膜タンパク質を調製し、非還元条件下で電気泳動を行いウサギおよびトラフグ抗血清を用いてイムノブロット解析したところ、海産白点虫セロントの不動化・凝集抗原は虫体表面に存在する 32 kDa タンパク質 (CISA-32) であることが示された。一方、還元条件下で電気泳動を行いイムノブロット解析を行ったところ、トラフグ抗血清に CISA-32 は認識されず、CISA-32 の抗原性にはジスルフィド架橋による立体構造が重要であることが示唆された。また、各種クロマトグラフィーを用いて CISA-32 を精製してマウス抗血清を作製したところ、免疫組織染色から CISA-32 抗原は海産白点虫の繊毛表面に主に発現していることが示された。

さらに、CISA-32 の N 末端アミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて、RACE 法で CISA-32 遺伝子の単離を行い、328 アミノ酸残基をコードする 1,147 bp の cDNA を得ることができた。同時に海産白点虫から部分領域を PCR 増幅した elongation factor-1 α (EF-1 α) cDNA の塩基配列およびその演繹アミノ酸配列の解析結果を併せると、海産白点虫では *Tetrahymena* 属および *Paramecium* 属などの繊毛虫と同様に TAA および TAG は終止コドンではなく、グルタミンをコードすることが示唆された。また、CISA-32 cDNA の演繹アミノ酸配列には N および C 末端に疎水性の高い領域がみられ、その特徴から CISA-32 は glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカータンパク質である可能性が考えられた。しかしながら、公開されているデータベースに、機能が明らかになっているタンパク質をコードする相同遺伝子が存在しなかったことから、海産白点虫における CISA-32 の機能および役割を推測するには至らなかった。さらに、イムノブロットおよび RT-PCR を用いた解析により、CISA-32 抗原が海産白点虫の寄生体 (トロホント : trophont) においても虫体表面に発現していることが示された。

以上、本研究において、8 kDa のハダムシ繊毛タンパク質が不動化・凝集抗原であることを明らかにした。次に、ホシガレイのハダムシへの感受性は同じく異体類のヒラメのそれと比較して低く、その原因がホシガレイノ血清中のレクチンによる可能性を示した。さらに、海産白点虫の不動化・凝集抗原は主に繊毛表面に存在する 32 kDa のタンパク質であることを明らかにした。これらの成果は魚類寄生虫の感染防除に基礎的な知見を与えるもので、魚類増養殖に資するところが大きい。