

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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。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。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。

まず、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。そこで、この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。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・凝集能を示した。一方、ヒラメ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。なお、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。

ホシガレイのハダムシへの感受性はヒラメのそれと比較して低いことが経験上、知られていた。そこで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 ($P < 0.01$)。また、ホシガレイにのみ血清中においてハダムシ幼生に対し強く反応し、その不動化・凝集能は、終濃度 2 mM の D-グルコース、D-ガラクトース、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て本成分の精製を行い、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。これら 2 種類のレクチン間には N 型糖鎖の付加の有無の差は小さく、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 のサブユニットはジスルフィド結合したヘテロダイマーであった。また、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した。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で両 VVL と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 配列を有していることが示された。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した。さらに、VVL を用いたレクチンブロット解析により 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。

次に、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、海産白点虫セロントから細胞膜タンパク質を調製し、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。また、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、RACE 法で CISA-32 遺伝子を単離し、328 アミノ酸残基をコードする 1,147 bp の cDNA を得た。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 GPI アンカータンパク質である可能性が考えられた。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、本研究は、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もので、学術上、応用上貢献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）の学位論文として価値あるものと認めた。

- ※ 使用アプリケーションで作成したもの。
プリントアウトしたもののほか電子データ（媒体は F D, MO 可）
で提出する。
ファイル名は「申請者氏名」（例：東大太郎.doc）