

# 博多湾和白干潟産アサリに寄生する新規繊毛虫類の感染率と局在性

○高嶺菜々子（福岡女子大）・生田哲朗（JAMSTEC）・松尾亮太（福岡女子大）・瀧下清貴（福岡女子大）

## 研究背景・目的

干潟生態系における代表的生物であるアサリは、水産学的にも生態学的にも重要な生物である。近年、日本国内におけるアサリの個体数は大幅に減少しており、その原因の一つとして寄生生物の感染が挙げられる。病原性を持つアサリの寄生生物としてパーキンサス原虫が有名であるが、その他のアサリへ寄生する生物に関する情報は非常に限られている。一方、環境DNA解析において、福岡県博多湾東部に位置する和白干潟のアサリから、**実態が分からない未知の繊毛虫類**に由来する2種類の遺伝子配列（WJR\_C1およびWJR\_C2）が検出され、その系統的位置からいずれも吸管虫類に近縁（図1）であることが示唆された（Takishita et al. 2020）。吸管虫類の中には、養殖ワカメの商品価値を下げる *Ephelota gigantea* (Sato et al. 2015) などが存在することを考慮すると、当該新規繊毛虫類がアサリに何らかの悪影響を与えている可能性も考えられる。そこで、これら新規繊毛虫類の実態を明らかにすることを目的とし、アサリにおけるその感染率および局在性を調べることにした。

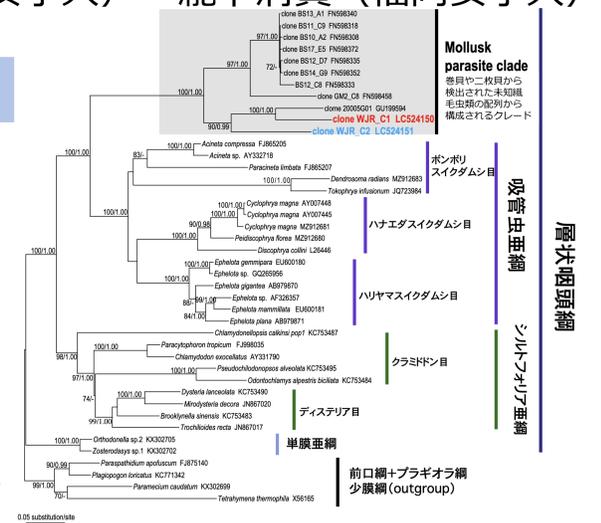


図1. 繊毛虫門 層状咽頭綱の18S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹。分岐点の数字は最尤法ブートストラップ値/ヘイズ法事後確率を示す。

## 実験方法

### サンプリング

和白干潟と津屋崎干潟でアサリを採取し、鰓組織(0.02 g)からDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いてトータルDNAを抽出



図2. 試料採取地点

場所	日時	採取数
和白干潟	2022年10月6日	10個体
	2023年4月19日	14個体
	2023年9月28日	15個体
津屋崎干潟	2023年3月22日	15個体

### 特異的PCR検出系の確立

新規繊毛虫類の18S rRNA遺伝子配列 (WJR\_C1, WJR\_C2) に基づき、それぞれに特異的なプライマーをデザイン

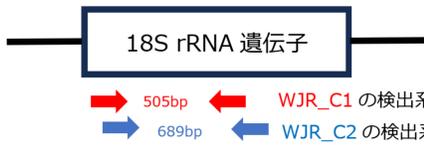


図3. PCRに使用するプライマーの位置関係

HotstarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN)を用いてPCR増幅

熱変性	94°C	1 min
アニーリング	50°C	1 min
伸長反応	72°C	2 min

40 サイクル

→増幅バンドの有無により各地点・時期の感染率を算出

### RT-PCR

WJR\_C1がgenomic PCRで検出されたアサリ (2 個体) の鰓組織から ISOSPIN Cell & Tissue RNA (NIPPON GENE)を用いてトータルRNAを抽出

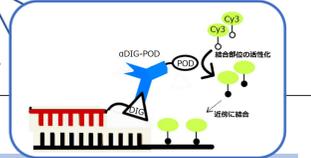
SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher)を用いてcDNAを合成

合成したcDNAを鋳型として特異的プライマーを用いたPCR検出 → rRNA遺伝子の転写 (=細胞の代謝活性)を確認

### 蛍光 in situ hybridization (FISH)

#### WJR\_C1が検出されたアサリ(2 個体)の鰓組織を用いて、宿主内におけるWJR\_C1繊毛虫を確認

- 4%PFAで15時間固定後、70%エタノールで置換
- パラフィン包埋後、10 μm厚に薄切
- True Blackによる自家蛍光軽減処理
- WJR\_C1に特異的なDIG標識オリゴプローブ(22bp)のハイブリダイゼーション
- 抗DIG抗体とチラミッドシグナル増幅による蛍光色素(Cy3)の結合
- DAPIによる対比染色
- 共焦点レーザー顕微鏡による観察



## 実験結果

### 特異的PCR検出系による感染率調査

	和白干潟 2022年10月	和白干潟 2023年4月	和白干潟 2023年9月	津屋崎干潟 2023年3月
WJR_C1	10/10(100%)	6/14(43%)	13/15(87%)	0/15(0%)
WJR_C2	0/10(0%)	0/14(0%)	1/15(6.7%)	0/15(0%)

### RT-PCRによるrRNA転写の確認

- 鋳型：cDNA (2023年9月採取 個体No.1)
- 鋳型：cDNA (2023年9月採取 個体No.2)
- 鋳型：トータルRNA:ネガティブコントロール (2023年9月採取 個体No.1)
- 鋳型：トータルRNA:ネガティブコントロール (2023年9月採取 個体No.2)

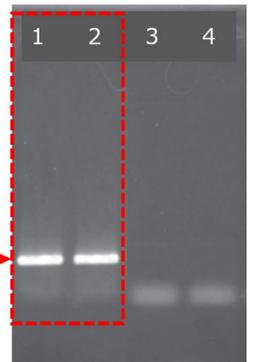


図4. RT-PCR増幅産物の電気泳動の結果

### FISHによるWJR\_C1繊毛虫の局在と感染強度の解析

使用した個体:2022年10月採取個体No.4, No.5

- 断面形態…楕円形 or 円形
- 大きさ…長径 10 μm程度
- 局在性…主に鰓の外表面(図5)や内腔(図6, 図7)
- 細胞密度…個体No.4: 12.5 cells / mm<sup>3</sup>  
個体No.5: 23.7 cells / mm<sup>3</sup>

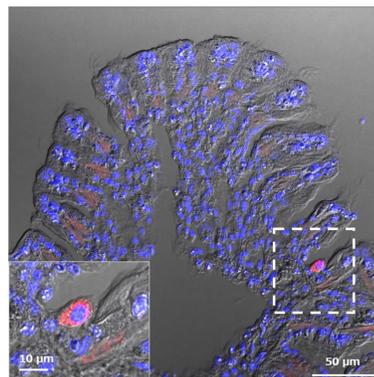


図5. 個体No.4の鰓の外表面に局在するWJR\_C1繊毛虫

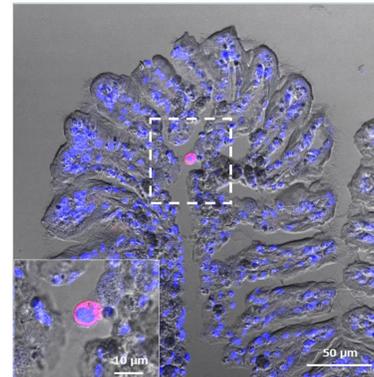


図6. 個体No.5の鰓の内腔に局在するWJR\_C1繊毛虫

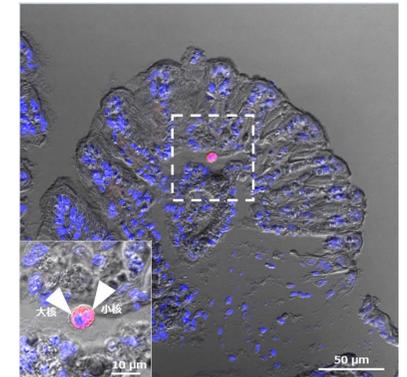


図7. 個体No.5の鰓の内腔に局在するWJR\_C1繊毛虫

## 考察

- 新規繊毛虫類は和白干潟では検出されるのに対し、津屋崎干潟では全く検出されなかった →津屋崎干潟の半閉鎖的な環境が影響している可能性
- 和白干潟産アサリにおいて、WJR\_C1はWJR\_C2に比べ、圧倒的に検出率が高かった →和白干潟産アサリにのみ見られる現象?
- 和白干潟産アサリにおいて、WJR\_C1の検出率は4月に比べ、9~10月のほうが高かった →水温等の環境要因が感染率に関わっている可能性
- RT-PCRによりWJR\_C1のcDNA断片の増幅が確認された →rRNA遺伝子は実際に発現しており、WJR\_C1繊毛虫は代謝的に活性があることが示された
- WJR\_C1繊毛虫は大核と小核を有していた →繊毛虫の典型的な特徴
- WJR\_C1繊毛虫は鰓の外表面や内腔に局在していた →系統的に近縁な吸管虫類のほとんどは固着性 →WJR\_C1繊毛虫も同様の寄生様式を有している可能性

## 今後の展望

- 同じ干潟の異なる時期や異なる干潟のアサリを対象とした調査を行うことにより、当該繊毛虫のより詳細な感染率や分布域を把握
- 組織学的観察や遺伝子発現解析等を行うことにより、感染の影響(免疫反応の有無等)を確認

### <参考文献>

- Takishita K, Kawai R, Tsutsumi A, Tanifuji G, Otsubo M (2020) Molecular detection of protists associated with the Manila clam *Ruditapes philippinarum* inhabiting the Wajiro tidal flat in Hakata Bay, Fukuoka Prefecture. *Fisheries Science* 86: 633-643
- Sato Y, Muto T, Endo Y, Kobayashi T, Nakano N, Sato H, Nishitani G, Satokoshi W (2015) Morphological, developmental, and ecological characteristics of the suctorian ciliate *Ephelota gigantea* (Ciliophora, Phyllopharyngea, Ephelotidae) found on cultured Wakame seaweed in northeastern Japan. *Acta Protozoologica* 54: 295-303