

学 位 論 文 要 旨

氏名 李 迎春

題 目：形態学および分子系統学に基づく粘液胞子虫の分類に関する試み

論文要旨：

Myxozoa 門の粘液胞子虫綱に分類される 2,400 余種は、魚類と環形動物(水棲貧毛類や多毛類)を交互宿主とする多細胞性寄生虫である。1970 年代以降、食用魚の養殖が世界各地で盛んになるに伴って、その生産性に関わる魚病の病原体として研究が行われてきたが、2011 年以降は生鮮魚喫食を原因とする集団食中毒の病原体として公衆衛生学分野でも重要な寄生虫となった。また、生物多様性研究としても精力的な研究が世界的に行われている。

粘液胞子虫(Myxosporea)の胞子は殻片が組み合わされ構成され、その内部には宿主上皮組織への接着に働く極糸を容れた極囊、宿主への侵入体である胞子原形質などが見られる。殻片数(SV)と極囊数(PC)は同数が基本である。さて、粘液胞子虫綱は SV/PC が 2 つの双殻目と 3 つ以上の多殻目に分けられている。前者が約 52 属、後者が約 8 属に分けられてはいるが、1 属 1 種が総計 60 属の 3 割を占める一方で、*Myxobolus* 属に約 900 種、*Henneguya* 属に約 200 種といったように、特定の属は膨大な種を含んでいる。最近益々活発な研究が進められている粘液胞子虫類において、そのいびつな分類体系の見直しと種鑑別について研究者が広く共有できる基準が早急に準備されることが望まれている。従来 of 胞子の形態学的特徴に基づく表徴分類(体系)に対して、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列情報を利用する分子系統分類の試みも本格化してきた。現在、その両分類体系をどのように繋ぐかを模索する世界的な研究状況の中にあって、その一助となることを念頭に、本研究では、1) 特有の胞子形態をもつ *Cardimyxobolus* 属粘液胞子虫について世界で初の rDNA 解析を成功させ、また、淡水魚の鰓寄生種がほとんどを占める *Myxobolus* 属において筋肉寄生種がどのような分子系統学的な位置づけをもつのかを明らかにし、次に 2) 淡水魚を主要な宿主とする *Myxobolus* 属粘液胞子虫について、海産魚寄生種を収集して分子系統学的な解析を行い、3) 胞子形態が酷似しながらも死後筋肉融解現象の誘導能が違うことを根拠に区別される *Kudoa* 属粘液胞子虫について、その表徴的違いが分子遺伝学的な違いとしてどのように確認されるかを検討し考察した。

第 1 章では、日本国内山口市で採集されたドンコ(*Odontobutis obscura*)から検出された粘液胞子虫類双殻目(Myxosporea: Bivalvulida)の 2 種について形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴づけを行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* として新種記載するとともに、前種が淡水魚の体側筋にシュードシストを形成して寄生していること、後種がこれまでにまったく分子系統学的な解析が行われていない小属(世界的に今回の種が 3 種目)に属することに注目して、その分子系統学的な位置づけについて解析した。18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、前種は *Henneguya/Myxobolus* クレード内に独自の支枝を作って位置し、後者はこのクレードから外れて双殻目として独自の位置づけを示した。本研究は、分子

系統学的解析が進まない Ortholineidae 科双殻目粘液胞子虫に分類される *Cardimyxobolus* 属について世界で初めて分子遺伝学的研究を行ったことが特記される。

第2章では、Myxozoa のほぼ半数の種を占める *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属のほとんどの種が淡水魚、殊に鰓寄生である中で、ごく限られた種記載しかない海産魚寄生種あるいは内臓寄生種がどのような系統進化的位置づけをもつかに注目して実施した。*Henneguya* 属の2新種は日本国内瀬戸内海産クロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*) 2尾の食道および腸管壁、あるいは、胆嚢壁や腹腔の漿膜下に寄生し、*Myxobolus* 属の新種は、日本国内下関沖の日本海で釣られたイシガキダイ (*Oplegnathus punctatus*) 1尾の食道壁から検出された。*Henneguya* 2種 (*H. ogawai* と *H. yokoyamai*) は分子系統学的に海外の海産魚寄生の *Henneguya* spp. と極めて近縁な位置づけをもち、*M. machidai* は、既知の海産魚寄生の *Myxobolus* spp. との近縁性より、淡水魚から記載された種との近縁性が確認された。

第3章では、粘液胞子虫の形態分類において重要な指標とされる「死後筋肉融解現象 (post-harvest myoliquefaction)」の有無が、実際の種鑑別においてどのような意義をもつのかという点に注目して実施した。形態学的にはほぼ同一の胞子をもち、死後筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* 分離株をキハダマグロから、一方、重度感染にも関わらず筋肉融解を起こさない *Kudoa neothunni* 分離株をクロマグロから得て、一連の rDNA 塩基配列の比較検討を行った。18S および 5.8S rDNA 塩基配列は同一であるが、他の領域では顕著な変異が確認された。現在、Myxozoa、殊に粘液胞子虫綱のあるべき分類体系が模索され、形態分類と分子系統分類の間の乖離について様々な研究材料の解析を通して解決策が議論されている。*K. scomberi* については、四角形の胞子形態をもつ種の分類を考える新たな知見を提供できた。rDNA を中心として分子系統進化的視点から種分類が考えられているが、どの領域をどのように評価するのかは未だ研究者で基準が共有されていない。この点も含め、今後の種分類のあり方について考察した。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	李 迎春
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査： 山口大学 教授 山本 芳実
	副 査： 鳥取大学 教授 奥 祐三郎
	副 査： 山口大学 教授 音井 威重
	副 査： 山口大学 教授 度会 雅久
題 目	形態学および分子系統学に基づく粘液胞子虫の分類に関する試み

審査結果の要旨：

Myxozoa 門の粘液胞子虫綱(Myxosporea)に分類される 2,400 余種は、魚類と環形動物(水棲貧毛類や多毛類)を交互宿主とする多細胞性寄生虫である。19 世紀末以降生物多様性の観点から精力的な研究が散見されるが、1970 年代以降、食用魚の養殖が世界各地で盛んになるに伴って、その生産性に関わる魚病の重要な病原体として研究が行われるようになった。更に、2011 年以降は生鮮魚喫食を原因とする集団食中毒の病原体として公衆衛生学分野でも重要な寄生虫となった。本研究では、生物学的ならびに社会的に重要性を増し、その種記載が益々増加する粘液胞子虫綱について、分子系統学的なデータを部分的に補完し、現在保持される形態学的分類体系について、その抱える課題を明らかにしようとする試みである。

粘液胞子虫の胞子は殻片からなり、その内部には宿主上皮組織への接着に働く極糸を容れた極囊、宿主への侵入体である胞子原形質などが見られる。殻片数(SV)と極囊数(PC)は基本的に同数で、SV/PC が 2 つの双殻目と 3 つ以上の多殻目で粘液胞子虫綱は構成される。前者が約 52 属、後者が約 8 属に分けられてはいるが、1 属 1 種が総計 60 属の 3 割を占める。一方で、*Myxobolus* 属に約 900 種、*Henneguya* 属に約 200 種といったように、特定の属は膨大な種を含んでいる。最近益々活発な研究が進められている粘液胞子虫類において、そのいびつな分類体系の見直しについて研究者が広く共有できる基準が早急に準備されることが望ましい。従来 of 胞子の形態学的特徴に基づく表徴分類(体系)に対して、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列情報を利用する分子系統分類の試みも本格化してきている。

第 1 章では、日本国内山口市で採集されたドンコ(*Odontobutis obscura*)から検出された粘液胞子虫類双殻目の 2 種について形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴づけを行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* を新種記載するとともに、前種が淡

水魚の体側筋にシュードシストを形成して寄生していること、後種がこれまでにまったく分子系統学的な解析が行われていない小属(世界的に今回の種が 3 種目)に属することに注目して、その分子系統学的位置づけについて解析した。18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、前種は *Henneguya*/*Myxobolus* クレード内に独自の支枝を作って位置し、後者はこのクレードから外れて双殻目として独自の位置づけにあることを示した。本研究は、分子系統学的解析が進まない Ortholineidae 科双殻目粘液胞子虫に分類される *Cardimyxobolus* 属について世界で初めて分子遺伝学的研究を行ったことが特記される。

第 2 章では、Myxozoa のほぼ半数の種を占める *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属のほとんどの種が淡水魚、殊に鰓寄生であることから、ごく限られた種記載しかない海産魚寄生種あるいは内臓寄生種がどのような系統進化学的位置づけをもつかに注目して実施された。*Henneguya* 属の 2 新種は瀬戸内海産クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*) 2 尾の食道および腸管壁、あるいは、胆嚢壁や腹腔の漿膜下に寄生し、*Myxobolus* 属の新種は、下関沖の日本海で釣られたイシガキダイ(*Oplegnathus punctatus*) 1 尾の食道壁から検出された。*Henneguya* 2 種(*H. ogawai* と *H. yokoyamai*) は 18S rDNA の分子系統学的に海外の海産魚寄生の *Henneguya* spp. と極めて近縁な位置づけをもち、*M. machidai* は、既知の海産魚寄生の *Myxobolus* spp. との近縁性より、淡水魚から記載された種との近縁性が確認された。尾状突起の有無で区別される *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属については、今後、検討が必要であることが示唆された。

第 3 章では、粘液胞子虫の形態分類において重要な指標とされる「死後筋肉融解現象 (post-harvest myoliquefaction)」の有無が、実際の種鑑別においてどのような意義をもつのかという点に注目して実施されている。形態学的にほぼ同一の胞子をもち、死後筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* 分離株をキハダマグロから、一方、重度感染にも関わらず筋肉融解を起こさない *Kudoa neothunni* 分離株をクロマグロから得て、一連の rDNA 塩基配列の比較検討を行った。18S および 5.8S rDNA 塩基配列は同一であるが、他の領域では顕著な変異が確認された。現在、Myxozoa、殊に粘液胞子虫綱のあるべき分類体系が模索され、形態分類と分子系統分類の間の乖離について様々な研究材料の解析を通して解決が模索されている。rDNA を中心として分子系統進化学的視点から種分類が考えられているが、どの領域をどのように評価するのかは未だ研究者で基準が共有されていない。この問題点を指摘した。

以上の結果について学位論文としての妥当性を審査し、審査委員一同は、博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有すると判定した。