

## 論文審査および最終試験結果報告書

論文提出者氏名：田中 千香也

論文題目：シオミズツボウムシのストレス応答機構と増殖不調の予知に関する研究

審査の概要：

シオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (複合種) は、海産魚の種苗生産に不可欠な初期餌料生物である。種苗生産の現場では数十トン規模でワムシの大量培養を行なっているが、増殖不調の問題が未だに残されている。増殖が停滞した個体群を回復させることは困難であるため、ワムシを安定して確保するためには不調の兆候を検知して対応する必要がある。しかし、これまでに飢餓耐性などを指標としてワムシの生理的な状態を評価する手法が開発されてきたものの、不調の予知には至っていない。そこで本論文は、ワムシのストレス応答機構に着目し、これを基にワムシ個体群の増殖不調を予知するための手法を開発するための研究を行ったものである。

第2章では、ワムシの生理状態を定量的に評価する手法の検討を行っている。ユグロンとパラコートの2種類の薬剤について有効性を検証し、ユグロンは濃度依存的な致死作用をもつ一方で、パラコートの毒性は顕著ではないことを認めている。また、ワムシに軽度のユグロン処理をした後に一定の回復時間を設け、その後に致死濃度のユグロンに曝した場合に生存時間が延長することを認めている。これにより、ワムシはユグロンに対するストレス応答機構を持っていることを考察している。さらに、cDNA サブトラクション法を行い、3種類の遺伝子がユグロン処理によって特異的に発現する可能性を示唆している。

第3章では、ユグロン耐性を指標としてワムシ個体群の増殖不調を予知する方法の開発を行っている。飽食区と給餌制限区を設けて培養実験を行い、個体数の変動とともにユグロン存在下の生存時間を比較している。その結果、給餌制限区では、飽食区と比べて6日目に給餌制限区で増殖率が低下したのに先立って、4日目で有意にユグロン存在下の生存時間が短くなることを認めている。さらに、ユグロン耐性が低下した時点で給餌量を調節したところ、増殖不調は回避されることを証明している。以上より、ユグロン耐性を指標とすることで、給餌量の不足に起因する増殖不調を予知することが可能であり、これに基づいて給餌量を改善することで培養を安定化できると考察している。





第4章では、給餌量の違いに応じて発現量変動する遺伝子群の探索を行っている。飽食区および給餌制限区の個体群からそれぞれ得た RNA を長鎖型および短鎖型の 2 種類の次世代シーケンサによる解析に供し、計 34,914 コンティグ配列を得た。このうち、約 2 万のコンティグについてはアノテーション情報を得ている。さらに、他のモデル生物で既知のストレス応答や老化に関連する遺伝子と同一性を示すコンティグを探索し、抗ストレス遺伝子群の発現を制御する転写因子である DAF-16 やゲノムの安定化に関わるヒストン脱アセチル化酵素 SIR-2 など計 26 種類のタンパク質の同定に成功している。さらにトランスクリプトーム解析を行い、(1) グルタチオンによるユグロンからの活性酸素種産生の抑制、(2) Cu/Zn-SOD の触媒作用による活性酸素の無毒化、(3) 熱ショックタンパク質による変性タンパク質のリフォールディング、の 3 段階からなるストレス応答機構がユグロン耐性の向上をもたらすと考察している。

以上、田中千香也による本論文は、ワムシのストレス応答機構の一端を解明し、これを基に初めてワムシの大量培養における増殖不調の予知を可能としたものである。本研究において得られた成果は、ストレス応答や老化の機構の理解をより深めるだけでなく、種苗生産における初期餌料生物の安定的な確保に直接的に貢献することが期待できるなど、博士論文にふさわしいものと判断できる。

また、平成 26 年 1 月 23 日に実施した最終試験において、論文の内容ならびに関連分野について、本人が学位を受けるのに必要十分な学識を持つことを認め、合格と判定した。

以上の結果から、審査員一同はこれを北里大学・博士（水産学）の学位を授与するものに値するものと判定した。

論文審査担当者：

主 査	北里大学教授	森山俊介 
副 査	長崎大学大学院教授	萩原篤志 
	北里大学教授	渡部終五 
	北里大学准教授	小檜山篤志 
	北里大学講師	吉永龍起 