

# 博士論文要旨

## シオミズツボワムシの ストレス応答機構と増殖不調の予知に関する研究

指導教員 千葉洋明 准教授

北里大学大学院水産学研究科

田中千香也

2014

## シオミズツボワ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

田中千香也

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (複合種, 以下ワムシと呼ぶ) は, 1960年代から現在に至るまで未だ唯一の海産魚の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。増殖不調の原因は不適切な給餌や培養槽中の細菌叢の変化など多岐にわたる。大量培養の現場では長年の経験からその都度に対応してワムシの確保に努めているものの, 仔稚魚の餌料を確保できない危険を常にともなっている。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。

ワムシは, 好適な環境下では活発に繁殖し, 個体群は爆発的に増殖する。一方, 環境条件が悪化した場合は, 繁殖を抑制するために個体群の増殖は停滞する。しかし, この時に寿命は長くなり, 同時にストレス耐性が高くなることが知られている。また, ストレス耐性は世代間の影響を受けることも明らかとなっており, こうした複数の要因の集積として個体群全体のストレス耐性が決まっていると考えられている。

そこで本研究では, ワムシ個体および個体群に対するストレスがもたらす応答機構の変化の影響を解明し, 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ことを目的とした。このために, まず (1) ワムシの生理状態の定量的な評価法を検討した。続いて, (2) 給餌量に起因するワムシ個体群の増殖不調を予知できるかどうかを検証した。さらに, (3) 増殖不調に先立って発現量が変化する遺伝子群を同定するために, 次世代シーケンサを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析を行った。

## ワムシの生理状態の定量的な評価方法の確立（第 2 章）

薬剤耐性を指標としてワムシの生理状態を定量的に評価する方法を確立することを目的とした。本研究では、酸化ストレスの付加実験によく用いられるユグロン（5-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン）とパラコート（1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジニウムジクロリド）の 2 種類の薬剤について有効性を検証した。

まず、ワムシに対するユグロンおよびパラコートの致死濃度の検証を行った。その結果、ユグロンは 0.02~20  $\mu\text{M}$  の範囲で濃度依存的な致死作用をもつことが分かった。一方、パラコートは 0.1  $\mu\text{M}$ ~10 mM のいずれの濃度においても、24 時間の観察期間中に死亡する個体はほとんど見られなかった。以上の結果から、ワムシの生理状態を評価する薬剤としてユグロンを用いることとした。

続いて、ワムシがユグロンに対するストレス応答機構を有するかどうかを調べた。あるストレスに対して応答機構がある場合、軽度のストレス刺激によりストレス応答が起こり、耐性が向上すると考えられる。そこで、まず 0.2  $\mu\text{M}$  ユグロンを含む海水でワムシを 1 時間培養した（前処理）。続いて、ユグロンを含まない海水で 1~48 時間の 4 段階の時間にわたって回復させた（1, 12, 24, 48 時間回復区）。その後、ワムシを 20  $\mu\text{M}$  ユグロンを含む海水に移し、未処理の対照区との間で生存時間を比較した。その結果、12 時間および 24 時間回復区の生存時間（メディアン生存時間 $\pm$ 標準誤差, 35.0 $\pm$ 10.1 分と 35.0 $\pm$ 2.5 分）は、対照区のそれら（25.0 $\pm$ 1.8 分と 25.0 $\pm$ 1.6 分）と比べて有意に長くなった（いずれも  $P < 0.05$  ; log-rank 検定）。一方、1 時間および 48 時間回復区の生存時間（25.0 $\pm$ 5.6 分と 25.0 $\pm$ 3.3 分）と、対照区のそれら（25.0 $\pm$ 3.0 分と 25.0 $\pm$ 2.5 分）の間には有意な差は認められなかった（ $P=0.69$ , 1 時間回復区 ;  $P=0.23$ , 48 時間回復区）。したがって、軽度のユグロン処理は特定の条件下においてワムシのストレス耐性を向上させ、致死的濃度下での生存時間の延長を引き起こすことが分かった。すなわち、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が示唆された。

続いて、ユグロンに対するストレス応答に関わる遺伝子群を探索するために、上述の前処理および6時間の回復培養を行った処理区から得たRNAを用いて、cDNA サブトラクション法により解析した。その結果、ユグロン処理によって特異的に発現する候補として計3種類のcDNA クローンが得られた。しかし、これらのDNA塩基配列を決定したものの、機能の推定には至らなかった。

### **ワムシの増殖不調の予知法の開発（第3章）**

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目的とした。ワムシを1.0 個体/mLの個体密度で10 Lの海水（塩分16）に収容して培養した。3つの培養条件を設けて、50 万細胞/個体（飽食区）、15 万細胞/個体（給餌制限区）、および制限-飽食区とした。毎日、個体数の計測およびユグロン耐性の比較を行った。制限-飽食区は、飽食区と比較してユグロン耐性に変化が生じた時点で給餌量を調整することとした。

4日目までは3区はほぼ同様に増殖し、平均個体密度は、飽食区では $91.6 \pm 54.9$  個体/mL、給餌制限区では $105.7 \pm 36.6$  個体/mL、制限-飽食区では104.0 個体/mLとなった。ユグロン耐性は3日目までは3区間で有意な差は認められなかったものの、4日目では給餌制限区および制限-飽食区で有意に低下した（いずれも $P < 0.001$ ；log-rank 検定）。そこで、制限-飽食区の給餌量を50 万細胞/個体に増やしたところ、個体密度は2166.7 個体/mL（7日目）まで増大し、増殖不調を回避することができた。したがって、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ことが示唆された。

### **増殖不調に先立って発現量が変化する遺伝子群の探索（第4章）**

第3章の培養実験において、ワムシ個体群の増殖不調に先立って、給餌制限区でユグロン耐性に変化が生じた。そこで、給餌量の違いに応じて発現量が変動する遺伝子群の探索を行っ

た。培養4日目の飽食区および給餌制限区の個体群からそれぞれ得たRNAを用いて、次世代シーケンサによる解析に供した。まず、GS FLX+（長鎖型；Roche）およびHiseq2000（短鎖型；Illumina）の2つの解析手法で得られた配列情報（約97万リード、長鎖型；約5.5億リード、短鎖型）を基にリファレンスとなるコンティグ配列セットを作製した。その結果、34,914コンティグ配列が得られた。得られたコンティグをBLASTX検索に供したところ、19,835コンティグについては有効なアノテーション情報が得られた（ $e\text{-value} < 10^{-4}$ ）。一方、残りの15,079コンティグについては機能が未知であった。続いて、センチュウ *Caenorhabditis elegans* のストレス応答や老化に関連する遺伝子として報告されている計44種類のタンパク質と同一性を示すコンティグを探索した。その結果、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種類のタンパク質と同一性を示すコンティグが得られた。一方、抗酸化酵素CTL-2と哺乳類のFOXA転写因子ファミリーとオルソログスであるPHA-4を除いて、これらの遺伝子の発現量は飽食区と給餌制限区の間で有意な差は認められなかった。次に、リファレンス配列と短鎖型解析で得られた配列を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、飽食区で高発現している遺伝子群として *hsp60* や *hsp70*, Cu/Zn- *sod*, アデノシルホモシステイナーゼと同一性を示すコンティグを含む計66コンティグが得られた（ $P < 0.05$ ,  $t$  検定）。また逆に、カタラーゼと同一性を示すコンティグを含む計1,143コンティグの発現量は有意に低いことがわかった（ $P < 0.05$ ）。以上の結果から、(1) 抗酸化物質であるグルタチオンによるユグロンからの活性酸素種（ROS）産生の抑制、(2) Cu/Zn-SODの触媒作用によるROSの無毒化、(3) 分子シャペロンである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経路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可能性が示唆された。

本研究では、ユグロン耐性を指標として給餌量に起因するワムシ個体群の増殖不調の予知が可能であることを示した。また、次世代シーケンサを用いた解析より、多経路からなる

ストレス応答の機構が存在することを見出した。さらに、ストレス応答や老化に関わる多数の遺伝子群を同定できた。今後、ストレス応答遺伝子の発現パターンを蛍光タンパク質を利用して可視化することにより、より簡便にワムシの健康状態を知るための技術開発が可能になると考えられる。また、ワムシの大量培養の現場においてユグロン耐性を指標とした増殖不調の予知法の有効性の検証を行うことが重要である。本研究が同定したストレス応答遺伝子群について、個体数変動の過程における発現変動を明らかにすることで、ストレス応答の分子機構の解明につながると考えられる。さらに、こうして得られた知見を野生生物に応用することで、天然資源の動態予測にも繋がると期待できる。