

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金子 元

自然界においては生物の個体数はときに数百倍の規模で変動するが、その機構解明は生態学における重要なテーマの一つである。シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下、ワムシと略記) は、水産養殖魚の初期餌料として重要なだけでなく、単為生殖による増殖や短い世代交代時間など個体数変動に関する研究のモデルとして多くの利点をもつ。これまでの知見により、給餌量の低下が寿命延長および産仔数の減少をもたらし、個体数変動に影響を及ぼすことが示唆されているが、その分子機構は不明である。そこで本研究では、ワムシ個体数変動の分子機構を明らかにすることを目的とした。

培養開始後 3 日目 (指数増殖期) および 13 日目 (定常期) の個体群に 50°C、5 分間の熱処理 (実測温度 41.5°C) を加えたところ、30 分後の生存率はそれぞれ 47 および 91% で、後者の熱ストレス耐性は明らかに高かった。そこで、熱ショックタンパク質 (HSP) 60、HSP70、HSP90 および glucose regulated protein 94 (GRP94) と、抗酸化酵素のマンガン型スーパーオキシドジスムターゼ (Mn SOD) およびカタラーゼの mRNA 蓄積量を上記の熱処理の前 (対照区) および 30 分後 (50°C 処理区) で調べた。対照区では、指数増殖期の HSP70、GRP94、Mn SOD およびカタラーゼの mRNA 蓄積量はそれぞれ定常期の 3.7、2.5、0.3 および 0.4 倍であった。HSP60 および HSP90 の mRNA 蓄積量は両増殖段階でほぼ同じであった。一方、50°C 処理区では全ての遺伝子の mRNA 蓄積量が定常期で高く、指数増殖期のその 1.4 - 4.5 倍であった。定常期では一定量の餌条件の下、増大した個体数から考えてワムシはカロリー制限状態にあると考えられる。また、個体群における成熟個体の割合は指数増殖期よりも定常期で高い。これらの違いが熱ストレス耐性および遺伝子発現に影響したことが考えられた。

そこで、50°C、5 分間の熱処理から 30 分後の成熟および未成熟個体の生存率を調べたところ、それぞれ 90 および 56% で、前者のストレス耐性が高いことが示された。しかしながら、熱処理の前 (対照区) および 30 分後 (50°C 処理区) における成熟および未成熟個体の上記遺伝子群の mRNA 蓄積量はほぼ同じであった。一方、成熟個体の HSP60 および HSP70 タンパク質量は、対照区では未成熟個体のそれぞれ約 8 分の 1 および 3 倍であったが、50°C 処理区ではいずれのタンパク質量とも未成熟個体の約 10 倍高く、ストレス耐性との相関がみられた。

次に、1 日に 3 時間のみ給餌したワムシ (カロリー制限区) および常に餌を供給して培養したワムシ (連続給餌区) に 50°C、5 分間の熱処理を加え、30 分後の生存率を調べた。例えば 2 日齢のワムシでは、生存率はそれぞれ 96 および 49% で、カロリー制限によるストレス耐性の増大が観察された。また、2、4、6 および 8 日齢のワムシの HSP70、Mn SOD およびカタラーゼの mRNA 蓄積量は、ほぼ全ての日齢においてカロリー制限区のワムシで有意

に高かった。HSP60 および GRP94 の mRNA 蓄積量は両試験区でほぼ同じであった。

2 日齢の連続給餌区およびカロリー制限区のワムシに上記の熱処理を加え、30 分後の上記遺伝子の mRNA 蓄積量を調べたところ、HSP90 の mRNA 蓄積量以外は全てカロリー制限区で高いか、もしくは両試験区で同程度であった。また、熱処理後のカロリー制限区における HSP60 および HSP70 量はいずれも連続給餌区のそれの約 2 倍と、ストレス耐性との関連が示唆された。さらに、インスリン様シグナル伝達経路の制御因子の一つであるホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3) キナーゼの阻害剤による寿命の延長および酸化ストレス耐性の増大がみられ、これらに対する本経路の関与が示唆された。

次に、連続培養装置を用いて 4×10^7 細胞/mL の餌を毎日給餌した連続給餌区と、 7×10^6 細胞/mL を 1 日おきに給餌したカロリー制限区の個体数変動を、それぞれ 25 および 42 日間にわたって調べた。その結果、連続給餌区では 250 - 800 個体/mL で急激な増大および減少を示したのに対し、カロリー制限区では全培養期間を通じて 300 - 600 個体/mL と個体密度の変化は小さかった。また、携卵数と個体数から推定した 1 日あたりの死亡率の平均値は、連続給餌区およびカロリー制限区でそれぞれ 0.20 および 0.03 と、カロリー制限はワムシ個体群を安定化させることが示された。以上、本研究はワムシ個体数変動の分子機構の一端をストレス耐性の点から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。