

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 稲野 俊直

---

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は、水産養殖産業において重要なサケ科魚類の一種であるが、冷水性であるため温暖な気候での養殖には限界がある。わが国の南方に位置する宮崎県では標高の高い山間部以外でのニジマス養殖は難しいことから、宮崎県水産試験場は県内におけるニジマスの生産拡大を図るため、1966年から高温に対して抵抗性を有する系統の選抜育種に取り組み、14世代以上の選抜飼育を繰り返した。しかし、この高温選抜系ニジマスの高温耐性については、科学的な究明が必ずしも充分でない。本研究はこのような背景の下、宮崎県で作出した高温選抜系ニジマスを対象に受精卵や胚の高温処理に伴うふ化率の変化や半数致死温度、稚魚の臨界最高温度や半数致死温度、幼魚の水温上昇に伴う摂餌率の変化を調べて標準系のニジマスと比較した。さらに、高温選抜系ニジマスの高温処理に伴うタンパク質の動態変化や遺伝子の発現変化などを調べた。

まず、ニジマス高温選抜系および標準系（ドナルドソン系）のそれぞれの2才魚雌10尾ずつから採卵し、同系統、同サイズの雄各10尾の精子を用いて授精した後、授精時の10°Cまたは14°Cより高温で処理した。その結果、10°Cで授精した胚においては、胞胚期および神経胚期の処理で高温選抜系の胚のふ化率の方が標準系よりも有意に高かった ( $P<0.05$ )。次に、14°Cで授精した胚のふ化率は、概して高温選抜系の方が標準系より高かった。そこで処理時間毎に50%致死温度 ( $LT_{50}$ ) を算定したところ、10°Cで授精した胚の  $LT_{50}$  は、胞胚期の1,440分間処理で高温選抜系は15.1°Cと、標準系の13.5°Cより有意に高かった ( $P<0.05$ )。また、14°Cで授精した胚の  $LT_{50}$  では、いずれの発生段階においても高温選抜系は標準系より有意に高かった ( $P<0.05$ )。

予め15°Cまたは20°Cに馴致した高温選抜系と標準系（ドナルドソン系および長野系）の稚魚を対象に、5°C/時間で水温を上昇させて臨界最高温度 (CTM) と死亡温度 (DT) を調べて比較した。その結果、20°Cに馴致した高温選抜系および長野系のCTMはともに30.4°Cと有意な差はなかったが、ドナルドソン系のCTMは29.9°Cと他の2系統より有意に低かった ( $P<0.05$ )。20°C馴致魚のDTは、高温選抜系、長野系およびドナルドソン系で、それぞれ30.9°C、30.6°Cおよび30.2°Cと、高温選抜系が標準系の2系統より有意に高かった ( $P<0.05$ )。次に高温選抜系と標準系（ドナルドソン系）を対象に、24~29°Cにおいて3~12時間処理したときの  $LT_{50}$  は、両系統間で差は認められなかったが、72時間では高温選抜系の  $LT_{50}$  は25.8°Cと標準系の24.3°Cよりも有意に高かった ( $P<0.05$ )。

さらに自発摂餌装置を用いて0才の高温選抜系および標準系（ドナルドソン系）の高温下における摂餌活性を調べた。17.5~25.7°C、0.3°C/日で21日間水温を上昇させたところ、高温選抜系の日間摂餌率は7.1%と、標準系の4.1%より有意に高かった ( $P<0.05$ )。次に、水温を0.5°C/日で13日間かけて24.1°Cに上昇させたところ、18日目以降、高温選抜系の日間

摂餌率は0.8%と、標準系の0.2%より有意に高かった( $P<0.05$ )。さらに、水温を16.7°Cから21.7°Cへと1日で急上昇させ、以降28日間かけて0.1°C/日で24.4°Cに緩やかに水温を上昇させたところ、高温選抜系および標準系の日間摂餌率は、それぞれ1.0%および0.1%と前者の方が有意に高かった( $P<0.01$ )。

高温選抜系および標準系(奥多摩系)の幼魚を25°Cで1週間飼育した後、血漿を採取し二次元電気泳動に供したところ、標準系の血漿中で発現量が増加するいくつかのタンパク質がみられた。これらタンパク質はN末端アミノ酸分析により、クレアチンキナーゼ、アングイオテンシノーゲンおよびグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼと同定された。この原因は高温選抜系では高温ストレスに抵抗性を示したためと推定された。

さらに、2~3才魚から採卵し受精させた高温選抜系および標準系(ドナルドソン系)の胚を21°Cまたは22°Cで30分処理して、12°Cで発生させた。RAP RT-PCRで解析し両系統を比較したところ、高温選抜系で多く発現する遺伝子として、ミトコンドリア電子伝達系の呼吸反応を担う複合体IVのシトクロムcオキシダーゼ(COX)のサブユニットの一つであるCOXIIをコードする遺伝子*COXII*が同定された。この遺伝子の転写産物をノザンブロットで調べたところ、高温選抜系のCOXII mRNA蓄積量は標準系より胚では1.8倍、未受精卵では5倍多いことが示された。

以上、本研究において高温選抜系ニジマスでは、胚のLT<sub>50</sub>、稚魚のCTM、DTおよびLT<sub>50</sub>は標準系ニジマスに比べていずれも高い値を示した。また、高温下における高温選抜系稚魚の摂餌率は、標準系に比べて高かった。さらに、高温選抜系幼魚を高温下で飼育したところ、標準系とは異なり血漿中に異常に増大するタンパク質成分は認められず、一方、未受精卵および胚体のミトコンドリア遺伝子*COXII*の転写産物量は高温選抜系の方で多かった。以上、本研究は、宮崎県で高温選抜育種したニジマスが高温耐性能を獲得していることを生理、生化学的に示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。