

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 アウン チョー ソア ウー

カロリー制限 (CR) は、様々な生物で適応的な生活史特性の変化を引き起こす。繁殖の抑制や寿命の延長は多くの生物で共通してみられる変化で、CR 応答には進化的に保存された分子機構が存在すると考えられている。養殖魚の初期餌料として有用なシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシと略記) では、CR による生活史特性の変化が個体数変動に影響を及ぼすことが明らかにされている。すなわち、個体密度が低いときは各個体が十分な量の餌を食べており、活発な繁殖を行うため個体数が指数的に増大する。一方、個体密度が高くなると各個体は CR 状態におかれ、繁殖を抑制し寿命を延長する。この変化が定常期への移行を引き起こすと考えられている。しかしながら、CR による繁殖抑制の分子機構には未知の部分が多く残されている。そこで本研究では、CR により発現が変化する遺伝子を cDNA サブトラクションにより同定した。次に、同定した遺伝子の一部につき、CR がその mRNA 蓄積量に及ぼす影響を個体および個体群レベルで調べた。さらに、CR が DNA 合成および上記遺伝子の mRNA 蓄積量に及ぼす影響を、同一齢のワムシを用いて詳細に調べた。

孵化したワムシを連続給餌する給餌区 (well fed, WF) および 1 日に 3 時間のみ給餌する CR 区に分け、培養 2 日目に後者をテスターとする cDNA サブトラクションに供した。同定した 163 個の遺伝子のうち、109 個が既存のデータベース中の遺伝子と相同性を示した。これらは 38 種の遺伝子に統合され、その機能は Gene Ontology (GO) 解析により cellular structure, transport and division, DNA replication, metabolism などに分類された。さらに、別途調製した WF および CR 区の試料を用いて、この 38 種の遺伝子につき elongation factor-1 $\alpha$  遺伝子を内部標準とした半定量的 RT-PCR を行った。その結果、CR により 29 種の遺伝子の mRNA 蓄積量が増大し、8 種は減少することが明らかとなった。また、1 種については CR の影響はみられなかった。

上記 38 種の遺伝子から、GO 解析で 1) DNA synthesis, 2) cellular structure, transport and division, 3) metabolism および 4) other functions に分類された 17 種を選び、定量的リアルタイム PCR による発現解析を行った。それぞれの群に含まれる遺伝子は、1) mismatch repair protein (*Msh6p*), DNA polymerase epsilon (*Pole*), CDT1 proteins (*CDT1*) および DNA polymerase sigma (*Pols*); 2) BRCA2 and CDKN1A-interacting protein isoform beta (*BCCIP $\beta$* ), lissencephaly-1 (*Lis1*), dynein heavy chain domain 3 (*Dnahc3*), spectrin beta (*Spnb1*) および calmodulin synthetic construct (*CaM64B*); 3) stom protein (*stom*), succinate dehydrogenase complex subunit D (*SDHD*), iron regulatory protein (*Irp*) および amylase 2 (*Amy2*); 4) tissue factor pathway inhibitor (*TFPI*), transposase (*Tsase*), mitochondrial 16S rRNA (*16S rRNA*) および multifunctional 14-3-3 family chaperone (*14-3-3*)であった。連続給餌する WF 区と 1 日 3 時間のみ給餌する CR 区を作製し、1-

8日齢の個体で上記遺伝子の mRNA 蓄積量を比較した。*Spnb1* の mRNA 蓄積量は CR 区で大きく変動し両区の間で有意な mRNA 蓄積量の差はみられなかったが、それ以外の遺伝子の mRNA 蓄積量は CR 区で有意に高かった。さらに、指数増殖期および定常期のワムシ試料につき、上記遺伝子群の mRNA 蓄積量を比較した。その結果、*CDT1* の mRNA 蓄積量は指数増殖期で有意に高く、*Pols* および *Spnb1* の mRNA 蓄積量も指数増殖期で高い傾向を示した。それ以外の遺伝子の mRNA 蓄積量は定常期で有意に高かった。

ワムシでは、成熟後の DNA 合成および細胞分裂は繁殖器官のみで起こることが知られている。WF および CR 区のワムシにつき、生後 3 時間から 39 時間まで 3 時間ごとに試料を採取し、bromo-deoxyuridine (BrdU) 染色で DNA 合成の有無および程度を比較した。なお、WF 区には連続給餌を行い、CR 区のワムシには生後 6-9 時間と 30-33 時間のみ給餌した。WF 区では卵黄腺で BrdU シグナルが検出され、卵黄腺の大きさおよび BrdU シグナル強度が飼育中、徐々に増大した。一方、CR 区では卵黄腺の増大および BrdU シグナルは生後 30 時間までは認められず、30-33 時間の給餌後にその両方が観察された。生後 0-33 時間の試料につき上記 17 遺伝子の mRNA 蓄積量を調べたところ、13 種は CR 区で有意に高かったが、*Pols*、*Lis1* および *14-3-3* は 9-21 時間まで CR 区で高く、その後は WF 区で高かった。*CDT1* の mRNA 蓄積量は繁殖を行っている WF 区の個体で高く、ワムシの繁殖と関連していることが示唆された。

以上、本研究ではワムシで CR により発現変動する遺伝子を多数同定し、CR に伴う発現変動様式を明らかにした。また、給餌がワムシの DNA 合成および CR 応答性遺伝子の発現に及ぼす影響についても詳細な解析を行い、有用な知見を得たもので、学術上、応用上資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。