

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 19 年度博士課程 入学
氏名 大森 文人
指導教員 渡部 終五

対数増殖期初期のシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の増殖促進因子に関する研究

単生殖巣綱 Monogonont のワムシ類のほとんどは、雌のみの単性生殖により指数関数的に増殖する個体群と、増殖過程で出現する mictic female と呼ばれる雌が雄を産卵することで開始される両性生殖の個体群が同時にみられる、独特の生活環をもつ。シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下、ワムシと略記)は、ワムシ類の中でも最も培養が容易な種であることから、養殖魚の初期餌料として用いられるほか、環境毒性評価の指標動物としても利用されている。一方、ワムシ類は個体群の爆発的な増大と崩壊を周期的に繰り返すことから、個体群動態解析の研究にも用いられている。バッチ培養の条件下では、ワムシ個体群はシグモイド型の成長曲線を描き、増殖が不活発な対数増殖期初期を経た後に、指数関数的に増殖する対数増殖期へ移行する。その後、個体群がほとんど変化しない定常期を経て、退行期に移行する。ワムシは効率的な培養が産業上重要であることから、このような実験室の培養条件下における個体群の増大や減少が生じる

機構については種々の研究がなされてきた。しかし、これらの研究は、主に対数増殖期以降に限られている。すなわち、これまでの知見によると、対数増殖期初期のワムシ培養濾液には自身の増殖を促進させる何らかの因子が含まれている可能性が考えられるが、その詳細は不明である。

このような背景の下、本研究はワムシの増殖機構解明の一環として、培養初期に当たる対数増殖期初期に発現するワムシの増殖促進成分の性状解明と単離を目的とした。

1. ワムシ培養濾液に含まれる増殖促進成分の性状

本研究では独立行政法人水産総合研究センター能登島栽培漁業センターで10年間継代培養されたL型ワムシの小浜株を用いた。本株は雄が発生しにくく耐久卵を形成しない株であり、また、当研究室の培養で少なくとも2ヶ月間は単性生殖であった。増殖段階別の培養濾液を調製する前段階として、まず、ワムシ(<2 時間齢)300 個体を 1/2 人工海水 100 mL に導入して 25°C、14 日間培養し、成長曲線を作成した。成長曲線は、毎日ワムシを含む 1 mL の培養液に 10% ホルムアルデヒド(v/v)を適量加えてワムシを固定し、ワムシ個体数を実体顕微鏡で計測して作成した。この成長曲線から各増殖段階を決定し、別途用意したワムシを含む培養液から増殖段階別の培養濾液を調製した。増殖促進の活性測定に際しては、未処理の培養濾液、各種処理をした培養濾液、および 1/2 人工海水のみの対照溶液の試験区を調製した。次に、誤差が均一になるようにラテン方格法で 12 穴の培養プレート中、各穴に 7×10^6 細胞 mL^{-1} の緑藻 *Chlorella regularis* を含む 1 mL の培養濾液の試験区を配置した。さらに、各穴に孵化直後の個体(<2 時間齢)を 2 個体ずつ入れて 25°C、毎日 50 μL ずつ給餌しつつ 5 日後の個体数を測定した。

まず、対数増殖期初期、対数増殖期、定常期、および退行期の各増殖段階のワムシ個体数は、それぞれ 86.0 ± 4.2 、 253.3 ± 9.5 、 620.3 ± 16.0 および 471 ± 14.3 個体 mL^{-1} (平均値 \pm 標準偏差)であった。次に、これら個体群から調製した培養濾液を用いてワムシを培養して、増殖促進活性を調べた。その結果、対数増殖期初期および対数増殖期の培養濾液は有意な増殖促進作用を示したのに対し($p < 0.001$)、定常期および退行期の培養濾液は活性を示さなかった。これらの結果は、培養濾液中に含まれる増殖促進成分は対数増殖期初期から対数増殖期にかけて産生されることを示唆している。次に、当該増殖促進成分がワムシ由来であるかどうかを検討するために、ワムシを含まず餌料のみを培養した培養濾液を用いて増殖促進活性を比較した。その結果、餌料培養濾液は有意な増殖促進作用を示さなかった。さらに、ワムシ培養濾液を各種処理して増殖促進活性の変化を検討した。その結果、培養濾液の増殖促進活性は濃度依存的で 60°C 以上の加熱処理で低下し、分画 10 kDa 以下の限外濾過膜で処理した培養濾液では活性が低かった。さらに、proteinase K 処理で完全に失活し、増殖促進成分は水溶性物質であることが示された。以上の諸結果から、対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分は、熱に不安定な 10 kDa 以

上の水溶性タンパク質であることが明らかとなった。

2. ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の性状

増殖促進成分の精製に際して、培養濾液では当該成分の回収量は少なく、また、精製途中で活性測定が不可能となり、精製が困難であった。一方、対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分がワムシ由来であることから、当該成分はワムシ個体にも高濃度で含まれている可能性が考えられた。そこで、当該成分の精製に先立ち、対数増殖期初期のワムシ個体から抽出液を調製し、培養濾液と同様の処理を行って増殖促進成分の活性の変化を調べた。まず、抽出液の増殖促進活性の濃度依存性を検討した。すなわち、抽出液を 1/2 人工海水で希釈して増殖促進活性を調べたところ、25%の希釈液の活性は最高かつ有意に高かった($p < 0.05$)。また、60%以上で増殖停滞が生じることから、増殖促進成分は高濃度ではむしろ阻害作用を示す効果がある、あるいは抽出液には増殖促進成分のほか、増殖停滞物質が含まれている可能性が考えられた。そこで、25%希釈の抽出液につき培養濾液と同様の処理を行ったところ、培養濾液と同様に 60°C 以上の加熱処理で増殖促進活性は低下し、10 kDa 以下の限外濾液では活性が低かった。さらに、proteinase K 処理で完全に失活し、水溶性の成分であることが示された。以上の諸結果より、対数増殖期初期の個体抽出液に含まれる増殖促進成分は、培養濾液中のものと同様またはよく類似する物質で、個体中に高濃度に含まれていることが示唆された。

3. ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の精製

前節までの結果を踏まえ、各種クロマトグラフィーを駆使して、対数増殖期初期の個体抽出液からの増殖促進成分の精製を試みた。なお、増殖促進成分の活性測定では、クロマトグラフィーの溶出画分を 1/2 人工海水で透析し、12 穴の培養プレートを用いて各穴に透析内液と等量の 1/2 人工海水を加えて 2 倍に希釈、2 個体のワムシ(<2 時間齢)を導入して 25°C、3 日間培養した。その他の培養方法は前節と同様である。まず、個体抽出液を DEAE-Toyopearl 650M カラム(東ソー)の陰イオン交換クロマトグラフィーに付したところ、NaCl リニアグラジエントの広い範囲の溶出画分で増殖促進活性が認められた。活性画分を合一して凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、HiLoad16/60 Superdex 75 prep grade カラム(GE Healthcare)のゲル濾過に付したところ、 V/V_0 1.3-1.6 の範囲で活性画分がみられた。これらの活性画分を合一して凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、TSKgel Phenyl-5PW カラム(東ソー)の逆相高速液体クロマトグラフィーに付したところ、50-80%アセトニトリル溶液溶出画分に活性が認められた。溶出画分を SDS-PAGE 分析に供したところ、活性画分に約 25 kDa の単一のバンドが認められたことから、本タンパク質が増殖促進成分と同定された。

4. ワムシ増殖促進成分の cDNA クローニング

前節で同定された 25 kDa 成分につき SDS-PAGE 後の当該バンドをプロテインシーケンサを用いて N-末端アミノ酸配列を分析したところ、PAVVDFDTAVWFGPLQMIKP と決定された。この配列を NCBI のワムシ発現配列タグ(EST)データベースに対して TBLASTN 検索したところ、相同性を示す遺伝子が得られた(GenBank/EMBL/DDBJ accession number FM939833)。このワムシ EST 配列全長から演繹したアミノ酸配列を NCBI データベースに対して BLASTP 検索に供した結果、マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* および緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のチオレドキシシと高い相同性を示した。しかしながら、チオレドキシシは一般に 12 kDa 程度の低分子で、ワムシ EST の演繹アミノ酸配列から推定された分子量も約 13000 と、今回単離したワムシ増殖促進成分の分子量約 25000 とは大きく異なる。

そこで、単離した 25 kDa タンパク質をクローニングするため、相同性を示したワムシ EST の塩基配列をもとにプライマーを設計し、PCR を行った。その結果、PCR 増幅産物の塩基配列はワムシ EST のそれと高い相同性を示し、チオレドキシシの活性中心に存在する WCGPC モチーフも含まれていた。チオレドキシシは原核生物から真核の高等動物まで普遍的に存在するタンパク質で、生体内での主な機能は酸化還元反応の触媒作用であるが、近年では寿命の調節や酸化ストレスに対する応答、細胞内シグナル伝達への関与や、細胞の増殖因子としても機能することが報告されている。しかしながら、クローニングしたワムシ増殖促進成分の推定分子量は約 11000 と、前述の SDS-PAGE 分析によって得られた約 25000 とは大きく異なる。したがって、ワムシ増殖促進成分の分子構造についてはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

以上、本研究で、対数増殖期初期のワムシから増殖促進成分の単離を試みたところ、本成分は培養液に分泌されるほか、ワムシ個体中にも高濃度で含まれる熱に不安定で 10 kDa 以上の水溶性タンパク質であることが示された。さらに、種々のクロマトグラフィーに付して精製したワムシ増殖促進成分の N-末端アミノ酸配列は PAVVDFDTAVWFGPLQMIKP と決定され、他生物種のチオレドキシシの相同領域と高い相同性が示した。しかしながらワムシ増殖促進成分の分子量は約 25000 と、クローニングされた遺伝子から推定された分子量約 11000 とは分子サイズが大きく異なることから、さらに詳細な構造解析が必要と考えられる。以上の本研究による成果は、ワムシの増殖機構解明に資するとともに、魚類養殖の初期餌料として重要なワムシの効率的な培養に基礎的知見を与えるもので、応用面にも寄与するところが大きいと考えられる。