

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大森 文人

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よく利用されている。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。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。本研究は、ワムシ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。

まず、L型ワムシ小浜株 (<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、ワムシ個体数を実体顕微鏡で計測して成長曲線を作成した。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では、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、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、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。

対数増殖期初期、対数増殖期、定常期、および退行期の個体群から調製した培養濾液を用いてワムシを培養したところ、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。また、対数増殖期初期培養濾液の増殖促進活性は 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 処理では完全に失活し、増殖促進成分は水溶性タンパク質であることが示された。

増殖促進成分の精製に際して、培養濾液では困難であった。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。その結果、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じ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。この結果を踏まえ、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 日間培養して行った。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 リニアグラジェ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/V₀1.3-1.6 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。同定された 25 kDa 成分につき SDS-PAGE 後の当該バンドを用いて N-末端アミノ酸配列を分析したところ、PAVVDFTAVWFGPLQMIKP 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。さらに、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* のチオレドキシシンと高い相同性を示した。さらに、単離した 25 kDa タンパク質をクローニングしたところ、25kDa 遺伝子の塩基配列はワムシ EST のそれと高い相同性を示し、チオレドキシシンの活性中心に存在する WCGPC モチーフも含まれていた。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 とは大きく異なった。

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アミノ酸配列は、他生物種のチオレドキシシンの相同領域と高い相同性が示した。以上の成果は、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、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。