

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 20 年度博士課程 進学  
氏名 尾崎 依  
指導教員 渡部 終五

### シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の インスリン様シグナル伝達経路に関する研究

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不可欠な動物プランクトンであるが、培養中しばしば増殖不良や個体群の急激な減少が生じることが問題とされてきた。これまでの研究で、寿命、産仔数およびストレス耐性の変化が培養中に生じる個体群の崩壊と関連することが示唆されている。すなわち、餌が豊富なときワムシの寿命は短く、かつストレスタンパク質や抗酸化酵素の発現量が減少してストレス耐性が低下する。一方、このときワムシ個体群は急激に増大し、高密度による低酸素や代謝産物の急激な蓄積などのストレスに晒され、結果として個体群の急激な減少が生じると考えられている。インスリン/インスリン様成長因子-1 (IGF-1) シグナル (IIS) 伝達経路は、多くの生物で寿命とストレス耐性を制御する。IIS の下流に位置するホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI 3-K) の阻害剤を投与したワムシは寿命が延長して酸化ストレス耐性が増大することから、IIS の活性化が個体群の崩壊を引き起こす可能性が示されているが、ワムシにおける本経路に関する詳細な知見はない。

本研究はこのような背景の下、ワムシの個体群変動の分子機構の一端を明らかにすることを目的に、まず、ワムシの IIS 伝達および関連分子の探索を行った。次に、クローニングしたワムシのインスリン様ペプチド (ILP) およびインスリン/IGF-1 受容体 (IR) の分子構造を詳細に解析した。さらに、IIS の下流に位置する解糖系酵素の発現とカロリー制限 (CR) の関係を明らかにしたもので、得られた成果の概要は以下の通りである。

## 1. IIS伝達分子の探索

単性生殖のみで増殖するワムシ石川株を 1/2 人工海水中、25° C で約  $7 \times 10^6$  細胞/mL の淡水産クロレラ *Chlorella regularis* を給餌してバッチ培養した。常に給餌した個体群、約 10 日間新たな餌を加えずに絶食させた個体群、および絶食後に再給餌し 30 および 120 分が経過した個体群（各約 250000 個体）を集めリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で破碎し、抽出液を調製した。次に、IGF-1 感受性のラット L6 筋芽細胞を 37° C、湿度 100 %、CO<sub>2</sub> 5% の条件下にて無血清培地で約 14 時間培養後、各抽出液を培地に添加して、IIS 伝達分子のリン酸化量に及ぼす影響を調べた。IIS 伝達は主に MAP キナーゼ（MAPK）経路と PI 3-K 経路の 2 経路に分かれるが、いずれのワムシ抽出液を加えた場合でも、MAPK 経路では MAPK ファミリー分子のキナーゼ ERK のリン酸化量が増大した。このリン酸化量は、絶食および再給餌よりも給餌ワムシの抽出液を加えた場合に多かった。一方、PI 3-K 経路ではプロテインキナーゼ B（Akt）の基質 61 および 48 kDa タンパク質のリン酸化量が増大した。なお、ERK および Akt 基質のリン酸化は、それぞれ上流の MAPKK ファミリー分子の MEK および PI 3-K の阻害剤で処理した細胞では抑制された。以上の結果から、ワムシ抽出液中には IGF-1 様の成分が含まれ、当該成分の分泌は給餌により促進されることが示唆された。

次に、常に給餌して培養したワムシから界面活性剤デオキシコール酸ナトリウムを含む 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）緩衝液で調製した抽出液を用い、SDS-PAGE 後、哺乳類 IIS 伝達分子に対する市販抗体でイムノブロットを行い、ワムシ中の相同タンパク質の検出を試みた。その結果、ワムシ中に Shc、GRB2、リン酸化 ERK、リン酸化 Akt およびリン酸化 p38 MAPK に対する抗体で認識される成分が認められた。さらに、前述の給餌条件で培養したワムシにつきイムノブロットを行った結果、再給餌ワムシで ERK、Akt 基質および p38 MAPK のリン酸化量の増大が明らかとなり、給餌に伴い IIS が活性化することが示唆された。

次に、IIS 伝達関連分子の cDNA クローニングを試みた。まず、他生物で種々の IIS 伝達分子との結合が報告されている 14-3-3 タンパク質を bait にした酵母 two-hybrid 法を用いて、充分給餌したワムシから作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、rasGAP、G3BP および FAS をコードするクローンが得られた。一方、公開されている約 5 万の cDNA 断片からなるワムシ発現配列タグ（EST）データベースを自動アノテーションにより解析した結果、Gene Ontology において IIS 伝達経路を構成する 77 個のタンパク質中 35 個と相同性を示す配列が明らかとなり、本経路がワムシでも保存されていることが示唆された。別途、他生物種の ILP および IR のアミノ酸配列をプローブにワムシ EST データベースを BLAST 検索したところ、相同性を示す cDNA 断片が得られた。

## 2. ILPおよびIRの構造および機能解析

PCR および Rapid amplification of cDNA ends（RACE）によりワムシ ILP の cDNA 全長 598 bp を明らかにした。演繹アミノ酸 172 残基と他生物種 ILP とのアミノ酸同一

率は9-13%と低かったが、多様な生物種の ILP でジスルフィド結合を形成する6つのシステイン残基は、ワムシ ILP でもすべて保存されていた。哺乳類インスリンはプロセシングの結果生じる2本のポリペプチドがジスルフィド結合するが、IGF-1 は一本鎖ポリペプチドが分子内にジスルフィド結合を形成する。そこで、前述の Tris-HCl 緩衝液を用いて調製したワムシ抽出液を SDS-PAGE に供し、ILP に対するポリクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。なお、ワムシ ILP 抗体は、A ペプチドに相当する18残基に対して作成した。その結果、還元および非還元条件下でワムシ ILP の分子量は変化せず、ワムシ ILP は哺乳類 IGF-1 と同様に一本鎖ポリペプチドであることが明らかとなった。また、同抗体でワムシ個体の免疫染色を行った結果、輪毛器、側部触手、足部および卵に発現が見られた。

次に、IR の cDNA 全長 4146 bp を決定した。演繹アミノ酸 1321 残基は他生物種 IR のそれと 19-24%のアミノ酸同一率を示した。一般に、IR にリガンドが結合すると受容体チロシンキナーゼが活性化して IR b サブユニットが自己リン酸化される。そこで、別途 IR b サブユニットを構成する16残基に対して作成したポリクローナル抗体を用いて前節のワムシ抽出液を免疫沈降に供し、抗リン酸化チロシン抗体でイムノブロットを行った。その結果、免疫沈降物はチロシンリン酸化されていることが示された。なお、チロシンリン酸化に及ぼす給餌の影響は認められなかった。

また、上記 ILP および IR と、その下流の Akt の mRNA 蓄積量を、卵、給餌した孵化直後および給餌した孵化後約 12 時間の個体で定量的リアルタイム PCR により比較した。その結果、いずれの分子も卵の mRNA 蓄積量は孵化直後および孵化後約 12 時間の個体の 2.8-22.4 倍と有意に高く ( $p < 0.05$ )、IIS はワムシの発生段階で機能することが示唆された。

### 3. ワムシ類 ILP と IR の分子系統解析

一般に、無脊椎動物は複数の ILP 遺伝子を含むが、ワムシ EST データベースより単離された ILP は一種類のみである。そこで、ワムシと近縁の *B. manjavacas* および異なる綱のワムシ類 *Adineta vaga* の EST あるいはゲノムデータベースを用いて ILP をコードする配列を検索した。その結果、*B. manjavacas* から1種、*A. vaga* から3種の配列が得られた。*B. manjavacas* および *A. vaga* ILP の演繹アミノ酸はいずれもジスルフィド結合の形成に必須な6つのシステイン残基を含み、ワムシ ILP の相同領域と、それぞれ 90 および 4-7%のアミノ酸同一率を示した。ベイズ法による分子系統解析の結果、ワムシ類 ILP は一つのグループを形成し、他生物種 ILP とは異なる進化を遂げたと推定された。

一方、一般に無脊椎動物は1種類の IR 遺伝子を有する。そこで上記データベースを検索したところ、*A. vaga* から1種類の IR の部分塩基配列が得られ、その演繹アミノ酸と他生物種の配列も含めた分子系統解析でワムシ IR とひとつのグループを形成した。さらに、ワムシ IR の全配列を他生物種のものと比較したところ、線虫のホモログである DAF-2 と最も相同性が高かった。

#### 4. 解糖系酵素の発現に及ぼすCRの影響

哺乳類では IIS が減弱すると、転写因子 FoxO が活性化して標的遺伝子群の転写を誘導することが知られている。一方、モデル生物の線虫では、解糖系酵素グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が FoxO のホモログ DAF-16 の標的とされている。そこで GAPDH の cDNA をワムシからクローニングし、先述の IIS を抑制する CR の mRNA 蓄積量に及ぼす影響を調べた。毎日約  $7 \times 10^6$  細胞/mL の餌を含む新しい培地に移して個別培養する対照区と、1 日おきに給餌と絶食を繰り返す CR 条件で個別培養した 1-8 日齢の個体の mRNA 蓄積量は、すべての日齢で CR 区が対照区の 1.7-3.6 倍高く、二元配置分散分析で mRNA 蓄積量に及ぼす CR の影響は有意と判定された。以上の結果は、ワムシでも GAPDH の発現は IIS に制御されていることを示唆する。

バッチ培養したワムシは爆発的に増殖する指数増殖期を経て、個体群が安定する定常期に移行する。定常期個体群は個体あたりの餌の量が少ない CR 状態にある一方で、個体密度の増加に伴う低酸素に晒される。そこで、上述した CR 区および対照区の 3 および 4 日齢のワムシをそれぞれ無給餌、25°C で低酸素（酸素濃度 0.1%以下）に 11 および 7.5 時間晒し、両区の生残率を比較した。その結果、3 日齢の生残率は対照区および CR 区でそれぞれ 76 および 96%、4 日齢では 60 および 91%といずれも CR 区で有意に高く、CR によりワムシの低酸素耐性が増大することが示された。次に、解糖系酵素エノラーゼ (ENO) およびホスホグルコムターゼ (PGM) の mRNA 蓄積量を調べた。その結果、ENO は 5 日齢の試料で CR 区が対照区の 0.9 倍とわずかに低かったが、それ以外のすべての日齢で 1.5 - 3.0 倍高く、統計解析の結果、mRNA 蓄積量に及ぼす CR の影響は有意であった。統計的には PGM mRNA 蓄積量に及ぼす CR の影響は有意ではなかったが、CR 区は対照区よりも概ね高く、CR によりワムシは嫌氣的エネルギー代謝へシフトすると考えられた。さらに、バッチ培養した個体群の GAPDH、ENO および PGM の mRNA 蓄積量は、定常期で指数増殖期のそれぞれ 1.5、2.7 および 2.9 倍で、ENO の値は有意に高く、IIS の抑制を介した低酸素耐性の増大が定常期個体群の安定化に寄与する可能性が示された。

以上、本研究ではワムシの IIS 伝達および関連分子を網羅的にスクリーニングし、給餌の有無が IIS 伝達分子のリン酸化に影響を及ぼすなど、同伝達経路がワムシでもよく保存されていることを示した。また、ILP および IR につき、構造および機能解析を行うとともに、分子系統解析を行って分子進化を考察した。さらに、CR による解糖系酵素の発現や低酸素耐性に及ぼす影響を調べることにより、IIS 伝達の抑制がワムシ個体群の安定化に寄与することを示唆した。これらの成果は、個体群変動の分子機構の解明に寄与するのみでなく、ワムシを初期餌料として多く利用する水産養殖の発展にも資するところが大きいと考えられる。