

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 尾崎 依

---

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。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 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、ワムシの IIS 伝達および関連分子の探索を行うとともに、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。

ワムシ石川株を 1/2 人工海水中、25°C で淡水産クロレラ *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を集め PBS 中で破碎し、抽出液を調製した。次に、ラット L6 筋芽細胞を無血清培地で約 14 時間培養後、各抽出液を培地に添加した。IIS 伝達は主に 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 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 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。次に、常に給餌して培養したワムシから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った。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、先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 のリン酸化量が増大した。

次に、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ところ、rasGAP、G3BP および FAS をコードするクローンが得られた。ワムシ 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った。さらに、PCR および RACE によりワムシインスリン様ペプチド (ILP) の cDNA 全長 598 bp を明らかにした。他生物種 ILP とのアミノ酸同一率は 9-13% と低かったが、ジスルフィド結合を形成する 6 つのシステイン残基は保存されていた。さらに、SDS-PAGE およびイムノブロットで、ワムシ ILP は一本鎖ポリペプチドであることが示された。また、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、インスリン/IGF-1 受容体 (IR) の cDNA 全長 4146 bp を決定したところ、他生物種 IR と 19-24% のアミノ酸同一率を示した。抗体を用いて前述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ところ、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。さらに、ワムシと近縁の *B. manjavacas* および異なる綱のワムシ類 *Adineta vaga* のデータベースを検索して、*B. manjavacas* から 1 種、*A. vaga* から 3 種の ILP 配列を得た。*B. manjavacas* および *A. vaga* ILP 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。一方、*A. vaga* から 1 種類の IR の部分塩基配列が得られた。

グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 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 倍高かった。次に、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 区で高かった。また、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、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 倍であった。

以上、本研究はワムシの 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。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。