

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580281

研究課題名(和文) シオミズツボウムシのストレス耐性の動的変化と増殖不良の予知

研究課題名(英文) Dynamics in the stress tolerance in the rotifer

研究代表者

吉永 龍起 (Yoshinaga, Tatsuki)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：30406912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：初期餌料生物のシオミズツボウムシ複合種の大量培養を安定化させることを目的として、ストレス耐性の動的な変化に着目し、増殖不調の予知法を開発することを目的とした。まずストレス耐性に関わる遺伝子群を探索するため、次世代シーケンサにより98,437コンティグを得た。続いて網羅的なトランスクリプトーム解析を行った結果、ストレス応答に関わる種々の分子を含む294コンティグが得られた。続いて、加齢にともなうストレス応答の変化を検討した。熱および酸化ストレスについて発生の初期段階における応答機構の有無を調べたところ、孵化前の段階においてもすでに応答機構を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To achieve a stable mass culture of the live-food, rotifer, dynamic change in the stress tolerance has been studied. First, molecular basis on the stress tolerance was investigated using a comprehensive next-generation sequencing (NGS) technique. This has been resulted in the determination of 98,437 contains, involving numerous stress-response molecules. Subsequently, the effect of age on the stress tolerance was examined by both heat and oxidation stressors. Individuals at various ages were examined, and even the somatic cells before hatching were found to show the stress response against various factors.

研究分野：水産学

キーワード：シオミズツボウムシ ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

食糧危機は人類が今世紀中に直面する深刻な問題である。この問題の解決には、食資源の絶対量を増やすことが必須である。陸上での食糧生産はほぼ限界に達しており、水産資源の増産が期待される。栽培漁業とは、初期減耗が激しい水産動物の仔稚期の生残を人為的に高め、その後は天然で成長させたものを漁獲して人間の食料とする技術である。“多産多死”の典型である海産魚類を人為的に“多産少死”にすることで、理論的には無限大の食資源を期待できる。

海産魚の仔稚期に適した餌料はツボワムシ属 *Brachionus* だけである。したがって、栽培漁業では数百万尾の仔稚魚に与える大量のワムシを安定して確保することが必要となる。しかし、ワムシの大量培養では増殖不良の問題がしばしば起こる。ワムシの大量培養は、数十トンの大型水槽に餌である植物プランクトンを大量に入れた過度な富栄養条件で行う。こうした培養では、溶存酸素やアンモニア態窒素に加え、原生動物の混入やバクテリア相の変化など様々な環境条件が変化する。ワムシの大量培養では、こうした様々な要因が複合的に作用して増殖不良を引き起こしている。これに対し、現場では担当者が長年の経験からその都度に対応してワムシの確保に努めている。すなわち海産魚の種苗生産は、餌料を確保できなくなる危険を常にとまなっている。

ワムシの大量培養を安定化するため、これまでいくつかの手法が考案されてきた。例えば、糖や脂質を分解する酵素は、ワムシの増殖が停滞すると減少する。また、高濃度塩分や飢餓条件下の生存時間もワムシの生理状態の指標となる。一方、こうした手法は増殖が停滞した時の評価には有効であるものの、あらかじめ不調を評価することは出来ない。増殖が停滞したワムシ個体群を回復させることは非常に困難であるため、ワムシを安定確保するためには不調の兆候を検知して対応す

る必要がある。

申請者は、“酸化ストレス耐性”を指標とすることで、ワムシ個体群の増殖不良を予知できる可能性を見いだした。餌料を適量もしくは不足して給餌する条件で小規模培養した個体群について、酸化ストレス条件下における生存時間を比較した。その結果、給餌量が不足した個体群において、増殖が停滞する2日前に酸化ストレス耐性が低下した。すなわち、酸化ストレス耐性を指標としたワムシの生理状態の評価は、個体群の増殖不良を予知するのに有効と考えられる。

2. 研究の目的

以上の背景の下、本研究は(1)ワムシ個体群のストレス応答機構の動的な変動を転写および翻訳のレベルで明らかにし、その上で(2)ワムシ個体群の増殖不良を予知するための手法を確立することを目的とした。本研究では、まず種々の外因性ストレスに曝した場合のストレス応答パターンを、転写産物(トランスクリプトーム)および翻訳産物(プロテオーム)解析により明らかにする。これにより、ストレス負荷にともなって発現する分子を同定してストレス応答指標分子とする。続いて、ワムシ大量培養の推移にともなうストレス応答の変化を明らかにする。そして、ワムシ個体群の増殖不良を予知するための手法を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

酸化や飢餓等のストレスに曝した個体群を試料として、次世代シーケンサを用いた転写産物の網羅的解析を行う。解析には、長鎖型および短鎖型の異なる特長を持つ機器を使用する。両者を併用することで、ゲノム情報が未だ十分ではないワムシを対象とした解析でも十分な質と量のデータが得られる。また、個体の成長段階におけるストレス応答の変化を検討する。

4. 研究成果

小規模培養 4 日目の飽食区および給餌制限区の個体群から得た total RNA を用いて、次世代シーケンサによる発現解析を行った。ワムシの遺伝情報はまだ十分ではないため、まず長鎖型 (GD FLX+, Roche) と短鎖型 (Hiseq2000, Illumina) の 2 つの解析手法で得られた配列情報を基にリファレンスとなるトランスクリプトーム配列を作製した。その結果、98,437 コンティグからなるトランスクリプトーム配列が得られた。次に、得られたトランスクリプトーム配列に対して短鎖型解析で得られた配列をマッピングし、発現解析を行った。その結果、飽食区および給餌制限区で高発現している遺伝子の候補として、それぞれ 43 コンティグ、294 コンティグが得られた。GO 解析を行った結果、ストレス応答や発生に関わる様々な機能を持つ分子群から構成されていることが分かった。

続いて、配列のエラーや重複を取り除き、高品質の 34,914 コンティグに絞ってさらに解析を進めた。まず BLASTX 検索に供したところ、19,835 コンティグについて有効なアノテーション情報が得られた。さらに、モデル生物においてストレス応答や老化に関連する遺伝子として報告されている計 44 種類のタンパク質と同一性を示すコンティグを探索した結果、抗ストレス遺伝子群の発現を制御する転写因子である DAF-16 や、ゲノムの安定化に関わるヒストン脱アセチル化酵素 SIR-2 など計 26 種類のタンパク質と同一性を示すコンティグが得られた。これらの分子は真核生物で高度に保存されたものであり、ストレス応答分子として有用と考えられた。

ワムシの個体群は様々な齢の個体から構成されており、齢構成によって個体群は異なる挙動を示す可能性がある。そこで、齢がストレス耐性に及ぼす影響を検討した。まず 25°C で培養した単性生殖卵の携卵個体を無作為に 2 群に分け、2 時間にわたって 35°C の熱スト

レスを与える処理区と、無処理の対照区とした。これら 2 区の親個体がそれぞれ産んだ仔虫に 1.0 μ M ユグロンを投与して、生存時間を比較した。また、単性生殖卵のみを回収して熱ストレスを処理し、同様のデザインで生存時間を比較した。その結果、親個体に熱ストレスを処理した区のユグロン存在下における生存時間は 166.5 ± 5.6 分 (平均生存時間 \pm 標準誤差; 3 個体は 240 分で打ち切り) で、対照区のそれ (105.5 ± 5.2 分) と比べて有意に長くなった (logrank-test, $P < 0.01$; それぞれ $n = 20$)。また、単性生殖卵に熱ストレスを処理した場合も同様に、処理区の生存時間 (123.7 ± 4.0 分) は対照区のそれ (92.8 ± 4.1 分) と比べて有意に長くなった ($P < 0.01$; それぞれ $n = 23$)。すなわち、ワムシは発生初期においても熱ストレスに応答する防御機構を有することが明らかとなった。

続いて、単性生殖卵に対して熱ストレスを処理した直後から 12 時間後までにかけて 2 時間毎に孵化した仔虫を集め、ユグロン存在下での生存時間を対照区との間で比較した。その結果、処理区の生存時間 (195.0 ± 12.6 分; $n = 11$) は、対照区のそれ (140.0 ± 13.9 分; $n = 10$) と比べて有意に長くなった ($P < 0.01$)。処理区の観察時間の後半に孵化した個体は、熱ストレス処理時に体細胞分裂を繰り返す段階にあった。すなわち、個体を構成する体細胞の中には、熱ストレスの処理を受けた細胞と、その後に分化したためにストレスを受けていない細胞が混在していたことになる。処理から時間が経ってもユグロン耐性の向上は維持されていたことから、熱ストレスに応じて発現した防御機構は新たに分化した細胞にも備わっていた可能性を示唆する。これは、(1) 熱ストレスに応じて発現するタンパク質 (例えば HSP) の転写産物が細胞分裂の過程で分配されることや、(2) 熱ストレス処理によりゲノムに化学的な修飾が起こり、エピジェネティックな遺伝子発現の制御が起こってい

たことによる可能性が考えられた。このメカニズムが明らかとなれば遺伝的に均一な個体群に生じる表現形の多様性を説明できるため、今後の検証は極めて重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 田中千香也, 樽井 寛, 田上道平, Sengstag Thierry, 河合 純, 吉永龍起・シオミズツボワムシのインスリン/インスリン様成長因子シグナル伝達経路。第27回北里大学バイオサイエンスフォーラム。北里大学相模原キャンパス(神奈川県相模原市)(2014.8)。
2. 田中千香也, 樽井 寛, 田上道平, Sengstag Thierry, 河合 純, 吉永龍起・シオミズツボワムシの増殖不調の予知とそのメカニズムの解明。日本水産学会秋季大会。下関水産大学校(山口県下関市)(2012.9)。
3. 田中千香也, 樽井 寛, 田上道平, Sengstag Thierry, 河合 純, 吉永龍起・シオミズツボワムシの増殖不調の予知とそのメカニズムの解明。第25回北里大学バイオサイエンスフォーラム。北里大学白金キャンパス(東京都港区)(2012.8)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 龍起 (Yoshinaga, Tatsuki)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：30406912

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし