

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658174

研究課題名(和文) シオミズツボウムシのエピジェネティクスと実験動物としての確立

研究課題名(英文) Epigenetics of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its use as experimental animal

研究代表者

萩原 篤志 (HAGIWARA, Atsushi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：50208419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Brachionus manjavacasの飢餓処理によって両性生殖誘導率の上昇が38世代目まで遺伝した。親の獲得形質が遺伝する様式については、DNAのメチル化が関与するエピジェネティックな遺伝が考えられる。そこでDNAメチル化酵素であるメチルトランスフェラーゼの部分的な塩基配列を用いてプライマーを作成し、B. manjavacasのcDNAを鋳型としてPCRを行った。B. plicatilis s.s.の塩基配列をもとに作成したプライマーを用い、B. manjavacasのcDNAを鋳型にしてPCRを行った結果、予測された大きさのDNA断片の増幅を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Starvation treatment to maternal rotifers resulted in the rise in mixis induction of *Brachionus manjavacas*, and it inherited up to the 38th generation. This may be explained by epigenetic inheritance involving methylation of the DNA. A primer was designed using partial base sequence of the methyl transferase (DNA methylase). As a result of templating cDNA of *B. manjavacas*, and having performed PCR with the primer designed on base sequence of *Brachionus plicatilis* s.s., the amplification of the DNA fragment of predicted size was confirmed.

研究分野：水産増殖学、応用プランクトン学

キーワード：水産学 シオミズツボウムシ エピジェネティクス 実験動物

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、水産動物幼生を飼育する際に、餌料生物として用いられるシオミズツボワムシ(以下ワムシ)やミジンコ類、カイアシ類等の動物プランクトンの生物機能解明のための基盤的研究に取り組み、種苗生産技術開発や環境毒性評価の試験生物としての応用を行うことによって、当該研究の高度化と国際化に努めてきた。特にワムシの生活史研究の経過の中で、与えられた環境によって母親が獲得した形質が、耐久卵を通じて孵化する次世代の娘に伝わる現象を、我々は数多く観察している。例えば、次のような研究例がある。

・母親が環境から得た表現型が単性生殖によって子孫に伝わる例

1) 耐久卵の休眠時の環境が、休眠期間、および孵化によって生じる次の個体群の単性生殖(増殖率)と両性生殖発現に影響(Hagiwara & Hino 1989)

2) 耐久卵孵化ワムシの餌料条件(飽食と飢餓)によって次世代以降の両性生殖発現とストレス体制が変化(Hagiwara ら 2005)

3) カロリー制限による長寿命化が子孫2世代に伝播(Kaneko, Watabe ら 2011)

・母親が得た表現系が両性生殖(耐久卵)を経て次の個体群の子孫に伝わる例

1) 母ワムシが経験した水温、塩分、光周期の影響が、耐久卵を経由して生じる次の個体群の両性生殖発現に影響(Hino & Hirano 1984, 1985)

2) 母ワムシの餌料条件が、耐久卵を経由して生じる個体群の孵化率、増殖率、耐久卵形成に影響。同じ操作を5回繰り返しても同様の現象を確認(Hagiwara & Hino 1994)

また、ワムシは世代時間と寿命が短く(1~2日で成熟、寿命は約10日)、単性生殖によってクローン個体群を形成すると共に、環境調節によって減数分裂をとまなう両性生殖を行い、受精卵(耐久卵、休眠卵)を形成するなど実験動物として優れた優位性をもっている。ここに着目したのが本研究である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水産学分野で研究が行われ、生物機能に関わる知見を蓄積してきたワムシを先端科学分野の実験動物として確立しようとする点にある。国内ではこのような

動きはみられないが、欧米ではワムシに対する関心は強く、1)無性生殖から有性生殖が進化した謎、2)休眠調節遺伝子の解明、3)老化に関わる遺伝子調節の解明、等の研究材料として先端科学の研究者がワムシに興味を寄せている。2008年に申請者はベルリンのマックスプランク研究所でワムシの休眠に関する招待講演を依頼されたが、その現実を目の当たりにした。すでに、我々は親が獲得した形質が10世代の子孫に伝わることを確認しているが、それが何世代まで続くのか本研究を通じて明らかにする。伝播する世代数が多ければ多いほど実験動物として安定的な材料となり得る。同時にワムシの表現型変化に関わるDNA領域を特定し、実験動物としての性能を解明する。

本研究の具体的な目的は次の3つの課題に取り組むことである。

実験1. 両性生殖誘導条件を最適化するため、知見の少ない、他個体との共存効果と、母ワムシの加齢が両性生殖誘導に与える影響を検討。

実験2. 耐久卵の休眠時や、耐久卵からの孵化個体(幹母)がおかれた環境によって獲得した形質は、それらに始まるクローン個体群の中で何世代にわたって伝わるか検討。

実験3. 上記の表現型の変化に関連するDNA領域を特定できるか検討。

実験にはシオミズツボワムシ *Brachionus manjavacas* (いわゆるL型ワムシの一種)を用いた。

3. 研究の方法

実験1. 培養水量とワムシ数を0.1, 1, 10 mLに各1個体、0.3, 3, 30 mLに各3個体、0.5, 5, 50 mLに各5個体に設定した(各々0.1, 1, 10 個体/mLに相当)。また、母ワムシの加齢が次世代から第3世代までの両性生殖誘導に与える影響を個別培養で求めた。

実験2. 耐久卵から孵化した母ワムシ(幹母)に飢餓処理を施すと、次世代以降の子孫の両性生殖発現頻度が上昇する。この傾向が何世代続くか、個体別継代培養によって確認した。飢餓を与えた場合、子孫の飢餓耐性が高まることから、これについても検討した。

実験3. 実験2で用いた母ワムシより全DNA、全RNAを精製した。全RNAに含まれているmRNAをoligo dTプライマーおよびrandom hexamerを用いて逆転写し、一本鎖cDNAを作成した。申請者の研究グループがこれまでに解析したシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis sensu stricto* NH1L株のcDNAライブラリーより構築したESTデータベースより、複数のDNAメチル化関連酵素遺伝子をBLAST検索で選び出した。この遺伝子配列を

他生物由来の DNA メチル化関連酵素遺伝子を用いた clustal W 解析により、共通塩基配列領域の探索および intron と exon 領域を推定した。これらの解析データをもとに、DNA メチル化関連酵素遺伝子のプライマーを作成し、本研究で使用した母ワムシ株由来の一本鎖 cDNA を鋳型として PCR を行った。同時に母ワムシ株由来の全 DNA を鋳型として PCR を行い、intron と exon 領域を確認した。

4. 研究成果

実験 1. 高密度下で両性生殖の発現が活発になり、他個体との共存の影響はみられなかった。また、若い親ほど高頻度で両性生殖雌を生じた。さらに、加齢が進んだ親から生じた子(単性生殖雌)は若い親から生じた子より多くの両性生殖雌を生じることが明らかになった。

実験 2. 飢餓処理による両性生殖誘導率の上昇は 38 世代目まで遺伝することが確認された。このとき、両性生殖誘導率は世代累積により上昇し、第 17 世代でピークとなり、その後も増減を繰り返すことが確認された。生涯産仔数については全 80 世代のうち 56 世代で飢餓処理区の産仔数が有意に減少した。寿命の長期化は最初の 4 世代のみ観察された。また、両性生殖誘導率と生涯産仔数は、約 13 世代を周期とする増加と減少を繰り返し、この現象は 80 世代以上継続することが明らかになった。

実験 3. シオミズツボワムシの全ゲノム DNA を他の無脊椎動物で確立されている既存の方法で精製した結果、高い頻度で DNA が断片化することが明らかとなった。これは、DNA 分解酵素群の活性が高いことによると推測し、DNase 活性を阻害する EDTA の濃度、プロテイナーゼ K 処理の温度と時間を検討したところ、湿重量が約 100mg のシオミズツボワムシを 100mM EDTA を含むプロテイナーゼ K 緩衝液に懸濁し、50 で 4-6 時間の酵素処理を行うことで損傷の少ないゲノム DNA が精製可能であることが分かった。

次に、*B. plicatilis* s.s. の塩基配列から作成したプライマーで、*B. manjavacas* の cDNA の PCR を行うと、DNA の増幅が確認されたことから、*B. plicatilis* s.s. と *B. manjavacas* のメチルトランスフェラーゼに関する遺伝子の相同性が高いことが示唆された。この増幅した cDNA 断片を精製し塩基配列を解析した結果、DNA メチルトランスフェラーゼと高い相同性を有していることが明らかとなった。

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 1 件)

菅向志朗, 阪倉良孝, 萩原篤志: 動物プランクトンの分子生物学的研究成果の環境修復への展開, 海洋と生物 AQUABIOLGY, 35(1), 42-46 (2013) (査読無し)

[学会発表](計 3 件)

上園翔平, 阪倉良孝, 萩原篤志: 飢餓処理によるシオミズツボワムシの形質の変化と遺伝, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 北海道大学(北海道函館市), 2014 年 3 月 28 日

上園翔平, 阪倉良孝, 萩原篤志: シオミズツボワムシとの両性生殖誘導に対する他個体との共存と母ワムシの加齢の影響, 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 三重大学(三重県津市), 2013 年 09 月 20 日

萩原篤志: ワムシ類のハイブリッドとクローン, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学(東京都港区), 2013 年 3 月 30 日

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
萩原 篤志 (HAGIWARA Atsushi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科
(水産)・教授

研究者番号：50208419

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

菅 向志郎 (SUGA Koushirou)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科
(水産)・准教授

研究者番号：60569185