

対数増殖期初期のシオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* の

増殖促進因子に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

水圏生物学専攻 博士後期課程

大森 文人

目 次

序 論	1
謝 辞	10
省略記号	11
第 1 章 ワムシ培養濾液に含まれる増殖促進成分の性状	13
第 1 節 増殖段階別の培養濾液の増殖促進活性	15
第 2 節 種々の処理をした培養濾液の増殖促進活性の変化	20
第 3 節 考察	26
第 2 章 ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の性状	30
第 1 節 個体抽出液の増殖活性	31
第 2 節 種々の処理をした個体抽出液の増殖活性の変化	34
第 3 節 考察	39
第 3 章 ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の単離と cDNA クローニング	42
第 1 節 各種クロマトグラフィーによる精製	44
第 2 節 ワムシ増殖促進成分の cDNA クローニング	48
第 3 節 考察	55
第 4 章 総括的考察	58
参考文献	64
図表	76

序 論

単生殖巢綱 Monogononta のワムシ類のほとんどは、雌のみの単性生殖により指数関数的に増殖する個体群と、増殖過程で出現する mictic female と呼ばれる雌が雄を産卵することで開始される両性生殖の個体群が同時にみられる、独特の生活環をもつ(Hino and Hirano, 1976; 日野, 1983)。ワムシ類は単性生殖においては爆発的に個体群が増大するが、両性生殖においては生じる受精卵の形成数が一般的に少なく、孵化までに 2 週間前後の休眠が必要であり(Hagiwara and Hino, 1990)、結果として個体群の増殖停滞が起こることから、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が知られている(Gilbert, 1963, 1977, 2002, 2003, 2004; King and Pulik, 1967; Halbach, 1984; Snell and Hoff, 1985; Snell, 1987; Yoshinaga et al., 2003; 吉永, 2010)。このため、本生物種は、迅速かつ容易に培養できる特徴も合わせて、個体群動態の研究対象として広く用いられている(King and Pulik, 1967; Halbach et al., 1983; Preston and Snell, 2001; Yoshinaga et al., 2001; Kaneko et al., 2002, 2010; 金子, 2006; Yoshimatsu et al., 2006; Alver and Hagiwara, 2007)。

一方、Monogononta のワムシ類の一種である汽水性のシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (以下、ワムシと略記)は、1960 年に海水中で容易に増殖することが発見されて以降、水産養殖の現場において養殖魚の仔魚期の初期餌料として世界中で汎用されているほか(Fukusho, 1983; Lubzens, 1987; Lubzens et al., 1989; Hagiwara et al., 2007)、数あるワムシ類のうち最も培養が容易な種であることから(萩原, 1994)、環境毒性評価の指標動物としても

用いられている(Halbach et al., 1983, 1984; Yu and Hirayama, 1986; Snell and Persoone, 1989; Snell and Janssen, 1995)。日本の種苗生産分野では、本種には雄が出現しにくい石川株(Yohinaga et al., 1999)や、若干の雄は発生するものの耐久卵を形成しない小浜株(日野ら, 2000; Kotani et al., 2010)などが確立されている。上記 2 株は遺伝的変異が起こりにくいことから、遺伝的に均一なクローン個体群として分子生物学的研究にも用いられている(Kaneko et al., 2002, 2010; Yohinaga et al., 2003; 金子, 2006; Suga et al., 2007; Oo et al., 2010; Ozaki et al., 2010)。

実験室でのバッチ培養の条件下では、ワムシの個体群はシグモイド型の成長曲線を描くことが知られており(King and Pulik, 1967; Halbach et al., 1984; Yoshinaga et al., 2001)、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、個体数がほとんど変化しない定常期を経て、退行期を迎える(Yúfera and Navarro, 1995; 日野ら, 2000)。このような現象はワムシのほか、数種の珪藻類(Takeda and Watanabe, 1997)や緑藻 *Chlorella vulgaris* (Massie et al., 2010)などの植物プランクトン、大腸菌 *Escherichia coli* (Baranyi and Roberts, 1994; Fujikawa et al., 2005)などの細菌類でも報告されていることから、実験室の培養条件下における微生物の個体群動態の共通的な特徴であろうと考えられる。

ワムシは効率的かつ安定的な培養が産業上重要であることから、実験室の培養条件下における個体群の増大や減少が生じる機構については種々の研究がなされてきた(Yu and Hirayama, 1986; Yamasaki et al., 1987; Carmona et al., 1993; Yoshinaga et al., 1999; Kaneko et al., 2002, 2010; 小磯ら, 2002; 金子,

2006)。しかし、これらの研究は、主に対数増殖期以降に限られている。すなわち、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。また、ワムシの増殖は何故、対数増殖期初期ではなく対数増殖期に急激に起こるのか、換言するならば急激な増殖が起こる前の時期に、ワムシは何を行っているのかという問題に対しても明確な解答は得られていない。これに関連して、ワムシの増殖はワムシ自身が分泌する物質が制御することが示唆されている。例えば、対数増殖期のワムシ培養濾液は、ワムシの成熟速度を高めたり産仔数を増加させるなどの作用を示したり (Yoshinaga et al., 1999)、対数増殖期以降のワムシの培養濾液は産仔数の低下などを引き起こすことが報告されている (小磯ら, 2002)。しかしながら、いずれの場合も物質の同定には至っていない。一方、同じワムシでも両性生殖の株では、定常期の培養濾液が単性生殖の個体に対し両性生殖を誘導することが報告されており (Hino and Hirano, 1976; Carmona et al., 1993; Gilbert, 2003; Stelzer and Snell, 2003)、培養濾液中から両性生殖を誘導するタンパク質が同定されている (Snell et al., 2006)。一方、天然のワムシ個体群は夏期に急速に増大し、高密度下で両性生殖を行う (Castilho and Arcifa, 2000) ことから、上記タンパク質は自然環境下におけるワムシ類の増殖において個体群のバランスを調節する重要な役割を果たしているものと考えられる。

一方、このような自己分泌による個体群制御機構はワムシ類のほか、細菌類や藻類においても報告されているが (Parker and Bold, 1961; Chirac et al., 1985; Mouget et al., 1995; Azam, 1998; Lebsky et al., 2001; de-Bashan et al.,

2002, 2004; Vassilev et al., 2006; Liu et al., 2008)、いずれも増殖に関連した物質の同定には至っていない。

近年、実験室の培養環境下におけるワムシの個体群動態に関する知見の蓄積に伴い、ワムシの大量培養が従来に比べ容易に行えるようになってきているとはいえ(日野, 1983; Pourriot and Snell, 1983; Yu and Hirayama, 1986; Lubzens, 1987; Snell and Boyer, 1988; Lubzens et al., 1989, 日野ら, 2000; 小磯ら, 2002; Gilbert, 2003, 2004; Schröder and Gilbert, 2004; Alver and Hagiwara, 2007; Hagiwara et al., 2007; Serra et al., 2010)、大量培養の過程で起こる増殖不良やワムシ密度の急減などの問題の多くはバクテリアが原因となっていることが明らかになっているが(Hagiwara et al., 1994)、未だ完全に解決しているわけではない(小磯ら, 2002, 2009)。ワムシの増殖特性は親世代での増殖のあり方が影響することから(小磯ら, 2009)、培養初期におけるワムシの増殖機構の解明が上記問題の解決の一助になるものと思われる。

以上のような背景の下、本研究はワムシの増殖機構解明の一環として、培養初期に当たる対数増殖期初期におけるワムシの増殖促進因子についてその一端を明らかにすることを目的とした。これまでの知見に基づき、対数増殖期初期のワムシ培養濾液中には自身の増殖を促進させる何らかの成分が含まれている可能性が考えられた。そこで、対数増殖期初期のワムシ培養濾液が自身の増殖に及ぼす影響を詳細に検討した。さらに、当該成分が代謝産物であるならば、ワムシの体内にも類似の物質が含まれている可能性が考えられたため、同時期のワムシから抽出した成分について培養濾液と同様に詳細に検討し、さらに、当該成分を各種クロマトグラフィーを駆使して精製を試みた。精製した当該成

分を同定するため、N 末端アミノ酸配列の解析およびクローニングを行いデータベース上で既報の生物のものと相同性があるかどうかを調べた。本論文はそれらの諸結果を取りまとめたもので全 4 章からなる。

第 1 章では、独立行政法人水産総合研究センター能登島栽培漁業センターで 10 年間継代培養された L 型ワムシの小浜株を用いた。本株は雄が出現しにくく耐久卵を形成しない株であり、また、当研究室の培養で少なくとも 2 ヶ月間は単性生殖のみが観察された。増殖段階別の培養濾液を調製する前段階として、まず、ワムシ(<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、成長曲線を作成した。成長曲線は、毎日ワムシを含む 1 mL の培養液に 10%ホルムアルデヒド(v/v)を適量加えてワムシを固定し、ワムシ個体数を実体顕微鏡で計測して作成した。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に際しては、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、誤差が均一になるようにラテン方格法で 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た。さらに、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。

まず、対数増殖期初期、対数増殖期、定常期、および退行期の各増殖段階のワムシ個体数は、それぞれ 86.0 ± 4.2 、 253.3 ± 9.5 、 620.3 ± 16.0 および 471.4 ± 14.3 個体 mL^{-1} (平均値 \pm 標準偏差)であった。次に、これら個体群から調製した培養濾液を用いてワムシを培養して、増殖促進活性を調べた。その結果、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。これらの結果は、培養濾液中に含まれる増殖促進成分は対数増殖期初期から対数増殖期にかけて産生されることを示唆している。次に、当該増殖促進成分がワムシ由来であるかどうかを検討するために、ワムシを含まず餌料のみを培養した培養濾液を用いて増殖促進活性を比較した。その結果、餌料培養濾液は有意な増殖促進作用を示さなかった。さらに、ワムシ培養濾液を各種処理して増殖促進活性の変化を検討した。その結果、培養濾液の増殖促進活性は濃度依存的で 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** 処理で完全に失活し、増殖促進成分は水溶性物質であることが示された。以上の諸結果から、対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分は、熱に不安定な 10 kDa 以上の水溶性タンパク質であることが明らかとなった。

第 2 章では、増殖促進成分の精製に際して、培養濾液では当該成分の回収量は少なく、また、精製途中で活性測定が不可能となり、精製が困難であった。一方、対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分がワムシ由来であることから、当該成分はワムシ個体にも高濃度で含まれている可能性が考えられた。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。まず、抽出液の増殖促進活性の濃度依存性を検討した。すなわち、抽出液を $1/2$ 人工海水で希釈して増殖促進活性を調べたところ、**25%**の希釈液の活性は最高かつ有意に高かった ($p<0.05$)。また、**60%**以上で増殖停滞が生じることから、

増殖促進成分は高濃度ではむしろ阻害作用を示す効果がある、あるいは抽出液には増殖促進成分のほか、増殖停滞物質が含まれている可能性が考えられた。

そこで、25%希釈の抽出液につき培養濾液と同様の処理を行ったところ、培養濾液と同様に 60°C 以上の加熱処理で増殖促進活性は低下し、10 kDa 以下の限外濾液では活性が低かった。さらに、proteinase K 処理で完全に失活し、水溶性の成分であることが示された。以上の諸結果より、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一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。

第 3 章では、第 1 章および第 2 章の結果を踏まえ、各種クロマトグラフィーを駆使して、対数増殖期初期のワムシ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では、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 下で、3 日間培養した。その他の培養方法は前節と同様である。まず、個体抽出液を DEAE-Tyopearl 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 リニアグラジエントの広い範囲で増殖促進活性が認められた。活性画分を合一して凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、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凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、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。

次に、同定された 25 kDa 成分につき SDS-PAGE 後の当該バンドをプロテインシーケンサを用いて N 末端アミノ酸配列を分析したところ、PAVVDF TAV-WFGPLQMIKP と決定された。この配列を NCBI のシオミズツボ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 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number FM939833; Denekamp et al., 2009)。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 BLASTX 検索に供した結果、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* およびマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のチオレドキシンと高い相同性を示した。しかしながら、チオレドキシンは一般に 12 kDa 程度の低分子で、ワムシ EST の演繹アミノ酸配列から推定された分子量も約 13000 と、今回単離したワムシ増殖促進成分の分子量約 25000 とは大きく異なる。

そこで、単離した 25 kDa タンパク質をクローニングするため、相同性を示したワムシの EST の塩基配列をもとにプライマーを設計し、PCR を行った。その結果、PCR 増幅産物の塩基配列はワムシ EST のそれと高い相同性を示し、チオレドキシンの活性中心に存在する WCGPC モチーフ(Wollman et al., 1988)も含まれていた。チオレドキシンは原核生物から真核の高等動物まで普遍的に存在するタンパク質で、生体内での主な機能は酸化還元反応の触媒作用であるが (Williams et al., 2000)、近年では寿命の調節や酸化ストレスに対する応答(Jee et al., 2005)、細胞内シグナル伝達への関与(Meng et al., 2010)や、細胞の増殖因子としても機能することが報告されている(Powis et al., 2000; Khayat et al.,

2001; Powis and Montfort, 2001; Yoshioka et al., 2004)。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 とは大きく異なる。したがって、ワムシ増殖促進成分の分子構造についてはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

最後に第 4 章で以上の結果を総括し、将来の研究の展望について考察した。

なお、本研究で得られた成果は以下の通り公表済みである。

1. Ohmori, F., Kaneko, G., Saito, T. and Watabe S. (2011) A novel growth-promoting protein in the conditioned media from the rotifer *Brachionus plicatilis* at an early exponential growth phase. *Hydrobiologia* published online. doi:10.1007/s10750-011-0642-3.

謝 辞

本研究は東京大学 渡部終五教授の御指導、御鞭撻の下に行われたものであり、ここに深甚なる感謝の意を表す。また、本研究の細部にわたり直接指導を賜るとともに、本論文の作成にあたり多くの御助言を頂いた。心から感謝申し上げます。

本論文の作成に当たっては、東京大学 浅川修一教授、松永茂樹教授、潮秀樹准教授ならびに長崎大学 萩原篤志教授には多くの御助言を頂いた。ここに心から謝意を申し上げます。

本研究の計画の立案、要所における考察などにおいて数多くの御助言を戴いた東京大学 木下滋晴博士、金子元博士、中谷操子博士、北里大学 吉永龍起講師に深く謝意を表す。特に、金子元博士には、本研究の細部にわたり直接指導を賜るとともに、多くの御助言を頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。なお、中谷操子博士には N 末端アミノ酸配列分析を行って頂いたことにも感謝申し上げます。特に中谷操子博士には大変お世話になった。重ねて御礼申し上げます。

水産総合研究センターの鴨志田正晃氏、能登島栽培漁業センターの小磯雅彦氏には、株の提供のほか、配送時の株の生育状況など御助言を賜わり大変お世話になった。心より感謝申し上げます。最後に、本研究に際して何かと御手を煩わせた東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室ならびに水圏生物工学研究室の皆様にご心からの謝意を表す。

最後に、本研究は私を最後まで見守ってくれた両親の物心両面での支えがなければ成し得なかったものである。この場を借りて御礼申し上げます。

省略記号

本論文では以下の省略記号を用いた。

ASW: artificial sea water

BCA: bicinchoninic acid

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bp: base pair

cDNA: complementary DNA

CE: crude extract

CM: conditioned medium

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTP: deoxynucleotide triphosphate

DTT: dithiothreitol

EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid

EST: expressed sequence tag

GH: growth hormone

HPLC: high-performance liquid chromatography

kDa: kilodalton

LB: Luria-Bertani

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: polymerase chain reaction

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

RNA: ribonucleic acid

RP-HPLC: reverse phase HPLC

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SIP: steroidgenesis-inducing protein

TEMED: *N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine

TFA: trifluoroacetic acid

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

第1章 ワムシ培養濾液に含まれる増殖促進成分の性状

実験室でのバッチ培養の条件下では、ワムシの個体群はシグモイド型の成長曲線を描くことが知られており(King and Pulik, 1967; Halbach et al., 1984; Yoshinaga et al., 2001)、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、個体数がほとんど変化しない定常期を経て、退行期を迎える(Yúfera and Navarro, 1995; 日野ら, 2000)。ワムシは効率的な培養が産業上重要であることから、実験室の培養条件下における個体群の増大や減少が生じる機構については種々の知見があり(Yu and Hirayama, 1986; Yamasaki et al., 1987; Carmona et al., 1993; Yoshinaga et al., 1999; Kaneko et al., 2002, 2010; 小磯ら, 2002; 金子, 2006)、ワムシの増殖や停滞にはワムシ自身が分泌する物質が制御することが示唆されている(Carmona et al., 1993; Yoshinaga et al., 1999; 小磯ら, 2002; Gilbert, 2003; Stelzer and Snell, 2003; Snell et al., 2006)。しかしながら、これらの研究は主に対数増殖期あるいは定常期以降に限られており、対数増殖期初期までのワムシの生理や生態には不明な点が多く残されている。

そこで本章では、対数増殖期初期のワムシは培養液中にワムシ自身の増殖を促進させる何らかの成分を分泌している可能性を考えた。すなわち、対数増殖期初期から活発な増殖が行われる対数増殖期にかけての期間では増殖促進成分の濃度が一定以上になると考えられる。この仮説を検証するため、まず、ワムシを一定期間培養して成長曲線を作成し、これをもとに各増殖段階から培養濾液を調製しワムシの増殖に及ぼす影響を調べた。また、小磯ら(2002)は培養中の

ワムシに起こる増殖不良について培養液中のアンモニア態窒素の影響を指摘している。これを検証するため、上述した各種培養濾液中に含まれるアンモニア態窒素の濃度を測定した。さらに、培養濾液中に含まれる増殖促進成分の特性を詳細に検討するため、各種処理を加えた培養濾液でワムシを培養して増殖の変化を調べた。

第 1 節 増殖段階別の培養濾液の増殖促進活性

本節では、一定期間培養して得られるワムシ培養濾液がワムシの増殖に及ぼす影響を調べるため、まず、ワムシを 14 日間培養し成長曲線を作成した。次に、作成した成長曲線をもとに対数増殖期初期、対数増殖期、定常期および退行期のワムシ個体群から培養濾液を調製し、これら培養濾液中でワムシを培養して、増殖促進活性の違いを比較した。

方 法

試料

ワムシ小浜株(L 型ワムシ)を実験に用いた(Fig.1-1)。本種は独立行政法人水産総合研究センター小浜栽培漁業センターにて 20 年間、10-15°C で低温馴化され(日野ら, 2000; Kotani et al., 2010)、その後、能登島栽培漁業センターで 10 年間継代培養されたもので、雄が出現しにくく耐久卵を形成しない株である。また、当研究室で少なくとも 2 か月間は単性生殖のみが観察された。上記センターで 15 kL の 60%海水(塩分 20 ppt)中で大量培養された対数増殖期初期(個体密度約 100 個体 mL⁻¹)のものを実験に用いた。一部を培養実験に用いるために 1/2 人工海水で培養し、残りを 0.22 μm フィルター(Millipore, Billerica, MA, USA)で濾過して回収後、液体窒素を加えて凍結し-80°C で保存した。

ワムシの培養には 454 mM NaCl、26 mM MgCl₂、27 mM MgSO₄、10 mM

CaCl₂、10 mM KCl、2.4 mM NaHCO₃ および 0.8 mM NaBr を含む Brujewicz 人工海水(Subow, 1931; 塩分 33 ppt, pH 8.0)を超純水(> 18 MΩ·cm)で 2 倍に希釈した後、0.22 μm フィルター(Millipore)で濾過滅菌したものを用いた。

ワムシの餌料には市販の緑藻 *Chlorella regularis* (日海センター, 東京; 以下、餌料と略記)を用い、 7×10^6 細胞 mL⁻¹をワムシ培養液 100 mL 中に毎日 1 mL ずつ、培養液を交換せずに給餌した。

前培養

ワムシの日齢を一定に保つために、前培養を以下の手順で行った。まず、継代培養したワムシ個体群の中から携卵個体のみを選別し、これらを前述の 1/2 人工海水 3 mL を含む 6 穴培養プレート(Nunc, Roskilde, Denmark)の各穴に移し、24 時間培養した。培養後、新たに孵化した仔虫(< 2 時間齢)を選別して 48 時間培養し、孵化した仔虫(< 2 時間齢)を供試ワムシとした(Fig.1-2)。培養条件は、温度 25°C、24 時間暗条件、静置培養で、 7×10^6 細胞 mL⁻¹の餌料を毎日 50 μL ずつ培養液を交換せずに与えた。

成長曲線の作成

ワムシの成長曲線を作成するために、300 mL 容量のビーカーに 1/2 人工海水 100 mL を入れ、ワムシ(< 2 時間齢)300 個体を導入し 14 日間培養した(n = 3)。毎日、ワムシを含む 1 mL の培養液に 10%ホルムアルデヒド(v/v)を適量加えてワムシを固定し、ワムシ個体数を実体顕微鏡(オリンパス, 東京)で計測した。上記 3 つのビーカーのワムシ個体数の平均値をその培養日数におけるワムシ個体

数とし、個体数の経日変化をプロットして成長曲線を作成した。なお、給餌は 7×10^6 細胞 mL^{-1} の餌料を毎日 1 mL ずつ計数直後に培養液を交換せずに与えた。

各増殖段階の培養濾液の調製

ワムシ(< 2 時間齢)300 個体を収容した 1/2 人工海水 100 mL のビーカーを 4 つ用意し、 7×10^6 細胞 mL^{-1} の餌料を加えて、上述の成長曲線に基づき 4 日間(対数増殖期初期)、6 日間(対数増殖期)、10 日間(定常期)および 14 日間(退行期)培養し、0.22 μm フィルター(Millipore)で濾過し、各増殖段階の培養濾液を調製した。

培養濾液中のアンモニア態窒素濃度の測定

培養濾液中のアンモニア態窒素濃度はネスラー法(アルカリ性ヨウ化第二水銀法; Demutskaya and Kalinichenko, 2010)により測定した。測定に際し、水温および pH (Hampson, 1977)、塩分(Bower and Bidwell, 1978)に対する補正を行った。

培養濾液に含まれる増殖促進成分の活性測定

各増殖段階の培養濾液に含まれる増殖促進成分の活性を測定するために、各増殖段階別の培養濾液区(以下、それぞれ対数増殖期初期濾液区、対数増殖期濾液区、定常期濾液区および退行期濾液区と表記)と、1/2 人工海水のみの対照区を設定した。これら各試験区に供試ワムシ(< 2 時間齢)を導入して 5 日間培養し、ワムシ個体数の増大を比較して行った。まず、各試験区の培養液 1 mL を、

誤差が均一になるようにラテン方格法に基づいて 12 穴培養プレート(Nunc)上の 5 穴に配置した(Fig.1-3)。次に、各穴に供試ワムシ(< 2 時間齢)を 2 個体、 7×10^6 細胞 mL^{-1} の餌料を 50 μL ずつ入れて培養し、実体顕微鏡(オリンパス)で毎日ワムシ個体数を計数した。なお、培養条件は前培養の項と同様であり、再現性の確認のために同様の実験を 3 回行ない、これらの平均値を統計解析に供した。

統計解析

各試験区間のワムシ個体数の差は正規性の検定を行った後、一元配置分散分析法で検定し、各試験区間の平均値の統計的有意性を Tukey's ポストホック法により解析した。全ての統計解析は JMP7 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) により行った。

結 果

成長曲線

300 mL のビーカーを用いて 7×10^6 細胞 mL^{-1} の餌料を毎日 1 mL ずつ給餌してワムシを培養したところ、個体密度は培養 4 日目、6 日目、10 日目および 14 日目でそれぞれ 86.0 ± 4.2 、 253.3 ± 9.5 、 620.3 ± 16.0 および 471.4 ± 14.3 個体 mL^{-1} (平均値 \pm 標準偏差、以下同じ) となり、それぞれ対数増殖期初期、対数増殖期、定常期および退行期に相当することが示された(Fig.1-4A)。

培養濾液中のアンモニア態窒素濃度

得られた成長曲線をもとに、培養 4 日目、6 日目、10 日目および 14 日目にそれぞれ対数増殖期初期、対数増殖期、定常期および退行期に相当する培養濾液を調製した。これら各増殖段階の培養濾液中に含まれるアンモニア態窒素の濃度を測定したところ、対数増殖期初期濾液区、対数増殖期濾液区、定常期濾液区および退行期濾液区で、それぞれ 0.23、0.43、1.61 および 2.47 ppm であった(Fig.1-4B)。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性

各増殖段階から得られた培養濾液でワムシを培養したところ、培養 5 日目におけるワムシ個体数は対数増殖期初期濾液、対数増殖期濾液、定常期濾液および退行期濾液各區で、それぞれ 86.4 ± 8.4 、 113.0 ± 11.0 、 42.0 ± 7.6 および 42.0 ± 7.6 と、対数増殖期濾液は対照区の 42.0 ± 7.6 に比べ約 2.7 倍と有意に高かった ($p < 0.001$, Fig.1-4C, Table 1-1A, B)。また、対数増殖期初期濾液でも対数増殖期濾液よりは低いものの、対照区よりも有意に高い値を示した ($p < 0.001$, Fig.1-4C, Table 1-1A, B)。一方、定常期濾液と対照区の間には有意差は認められず、退行期濾液においては培養 3 日目で全てのワムシが死亡した(Table 1-1A)。なお、対数増殖期初期濾液および対数増殖期濾液各區と対照区における有意差は、培養 2 日目からみられた(Table 1-1A)。

第2節 種々の処理をした培養濾液の増殖促進活性の変化

前節では、対数増殖期初期由来のワムシ培養濾液がワムシの増殖を有意に促進させる作用があることを確認した。本節では、この時期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分がワムシ由来のものであるかどうかを検討し、次に種々の処理を加えた培養濾液でワムシを培養し、増殖促進活性の違いを比較した。

方 法

餌料由来の培養濾液の調製および活性測定

対数増殖期初期由来の培養濾液中に含まれる増殖促進成分がワムシ由来のものであるかどうかを検討するために、1/2 人工海水と餌料のみを含みワムシを含まない培養液を前節の方法で4日間保持し、培養濾液を調製した。培養濾液は前節の方法に従って調製した。

増殖促進活性の測定では、対数増殖期初期の培養濾液区と、1/2 人工海水と餌料を含み、ワムシを含まない培養濾液の対照区(以下、餌料濾液区と表記)および1/2 人工海水のみの対照区を設定し、12 穴培養プレート(Nunc)中に各試験区につき4穴を用いた以外は、前節の増殖促進成分の活性測定と同様の方法で行った。

培養濾液の希釈液の調製

培養濾液中に含まれる増殖促進活性の濃度依存性を検討するために、対数増殖期初期の培養濾液を 1/2 人工海水で 25、50 および 75%に希釈した試験区(以下、それぞれ 25、50 および 75%濾液区と表記)、希釈しない培養濾液区(以下、100%濾液区と表記)、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定した。増殖促進活性の測定は、上記の試験区につき前節と同様の方法で行った。

培養濾液の熱処理

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の熱安定性を検討するために、対数増殖期初期の培養濾液をウォーターバスを用いて 40°C、60°C および 80°C でそれぞれ 60 分間加熱した試験区(以下、それぞれ 40°C、60°C および 80°C 処理区と表記)と、加熱処理していない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定した。増殖促進活性の測定は、前節と同様の方法で行った。

培養濾液の分子量分画

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の分子量を推定するために、対数増殖期初期の培養濾液を分画分子量<1 kDa、<10 kDa および<30 kDa の限外濾過膜(それぞれ Amicon YM1、YM10 および YM30、Millipore)で限外濾過し、得られた濾液を実験に供した(以下、それぞれ<1 kDa、<10 kDa および<30 kDa 濾液区と表記)。さらに、限外濾過していない未処理区および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、前節と同様の方法で増殖促進活性を測定した。

培養濾液の proteinase K 処理

対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分の *proteinase K* 処理による影響を検討するため、Snell et al. (2006)の方法を一部改変し、培養濾液を $870 \mu\text{g mL}^{-1}$ の *proteinase K* (タカラバイオ, 津) で 37°C 、60 分間処理した。増殖促進活性の測定は、*proteinase K* で処理した試験区(以下、*proteinase K* 区と表記)、処理しない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、これらの試験区を 12 穴培養プレート(Nunc)中に各試験区につき 4 穴を用いて、前節と同様の方法で行った。

培養濾液の水溶性画分の調製

培養濾液中に含まれる増殖促進成分が水溶性画分であるのかどうかを検討するため、50 mL の対数増殖期初期の培養濾液に対し、等量のジエチルエーテル(和光, 東京)を加えて振とうした。1 時間静置した後に水層のみを取り出し、エバポレーターを用いてジエチルエーテルのみを除き、得られた培養濾液を脂溶性画分を除去した試験区(以下、水溶性画分と表記)とした。増殖促進活性の測定は、水溶性画分区、処理していない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を、12 穴培養プレート(Nunc)中に各試験区につき 4 穴を用いて、前節と同様の方法で行った。

統計解析

各試験区間のワムシ個体数の有意差は、前節の方法で検定した。

結 果

餌料由来の培養濾液の増殖促進活性

対数増殖期初期の培養濾液を用いて培養実験を行ったところ、培養 5 日目で培養濾液区のワムシ個体数は 81.2 ± 7.4 となり、餌料濾液区および 1/2 人工海水のみの対照区のそれぞれ 42.2 ± 5.7 および 41.6 ± 5.2 に比べて有意に高かった ($p < 0.001$) (Fig.1-5, Table1-2)。なお、餌料濾液区および 1/2 人工海水のみの対照区の間には有意差は認められなかった。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性の濃度依存性

対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性の濃度依存性を調べた。培養 5 日目における 100%濾液区のワムシ個体数は 82.8 ± 8.4 と、1/2 人工海水のみの対照区の 43.6 ± 8.3 よりも有意に高かった ($p < 0.001$) (Fig.1-6, Table 1-3A, B)。一方、75%および 50%濾液各区のワムシ個体数は、それぞれ 82.4 ± 7.2 および 72.8 ± 3.7 と、1/2 人工海水のみの対照区よりも有意に高かったが ($p < 0.01$) (Fig.1-6, Table 1-3A, B)、100%濾液区よりは少ない傾向を示した。なお、25%濾液区と 1/2 人工海水のみの対照区の間には有意差は認められなかった (Fig.1-6, Table 1-3A, B)。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の熱安定性

対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分の熱安定性を調べたところ、培養 5 日目における 60°C および 80°C 各処理区のワムシ個体数は、それ

ぞれ 59.0 ± 8.3 および 48.2 ± 8.7 と、未処理区の 83.8 ± 8.4 に比べて有意に低かった ($p < 0.01$) (Fig.1-7, Table 1-4A, B)。加熱処理の温度が高いほどワムシ個体数が少なくなる傾向がみられたが、 40°C および 80°C 両処理区間で有意差が認められた ($p < 0.01$) (Fig.1-7, Table 1-4A, B) 以外は、各処理区間で有意差は認められなかった。また、未処理区および 40°C 処理区間においても有意差は認められなかった (Fig.1-7, Table 1-4A, B)。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の分子量の推定

対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分の分子量を推定するために、種々の分画分子量をもつ限外濾過膜で処理した培養濾液を調製してワムシを 5 日間培養した。その結果、培養 5 日目における <1 kDa および <10 kDa 各区のワムシ個体数は、それぞれ 40.8 ± 5.4 および 55.0 ± 7.8 と、未処理区の 87.0 ± 5.1 に比べて有意に低かった ($p < 0.001$) (Fig.1-8, Table 1-5A, B)。一方、 <30 kDa および <10 kDa 両区間、あるいは <1 kDa 区と 1/2 人工海水のみの対照区との間に有意差は認められなかったが、 <30 kDa 区および 1/2 人工海水のみの対照区、あるいは <10 kDa 区と 1/2 人工海水のみの対照区の間では有意差が認められた ($p < 0.05$) (Fig.1-8, Table 1-5A, B)。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性に及ぼす proteinase K 処理の影響

加熱処理や分子量分画などから増殖促進成分がタンパク質と想定されたことから、proteinase K 処理した対数増殖期初期の培養濾液を用いてワムシを 5 日間培養した。その結果、proteinase K 処理区のワムシ個体数は 29.5 ± 3.5 と、未

処理区の 81.3 ± 9.3 に比べて有意に低く ($p < 0.001$) (Fig.1-9, Table 1-6A, B)、1/2 人工海水のみの対照区の 45.0 ± 4.1 に比べても有意に低かった ($p < 0.05$) (Fig.1-8, Table 1-6A, B)。

培養濾液中に含まれる増殖促進成分の水溶性画分の活性

脂溶性の物質が増殖促進に関与しているか否かを調べるため、対数増殖期初期の培養濾液をジエチルエーテルで処理して培養実験に供試した。その結果、培養 5 日目における水溶性画分のワムシ個体数は 84.8 ± 7.1 と、未処理区の 85.8 ± 6.3 との有意差は認められず (Fig.1-10, Table 1-7A, B)、いずれも 1/2 人工海水のみの対照区の 44.5 ± 5.4 に比べて有意に高かった ($p < 0.001$) (Fig.1-10, Table 1-7A, B)。

第3節 考察

本研究ではまず、対数増殖期初期のワムシ培養濾液が自身の増殖に及ぼす影響を検討するため、対数増殖期初期、対数増殖期、定常期および退行期由来の培養濾液でワムシをそれぞれ培養し、増殖に及ぼす影響を調べた。その結果、ワムシの増殖は対数増殖期初期および対数増殖期の培養濾液で有意に促進された($p < 0.001$) (Fig.1-4C, Table 1-1A, B)。

一方、定常期の培養濾液は 1/2 人工海水のみの対照区とほとんど変わらず、退行期の培養濾液では培養 3 日目に全ての個体が死滅した(Table 1-1A)。小磯ら(2002)は、定常期以降のワムシ培養濾液では増殖停滞が起こり、その原因を培養濾液中に含まれるアンモニア態窒素によるものであると指摘している。そこで、対数増殖期初期、対数増殖期、定常期および退行期由来の培養濾液中に含まれるアンモニア態窒素の濃度を測定したところ、それぞれ 0.23、0.43、1.61 および 2.47 ppm であった(Fig.1-4B)。L型ワムシに対するアンモニアの急性毒性は平均致死濃度(LC₅₀)で 17 ppm、慢性毒性は約 2 ppm と報告されている(Yu and Hirayama, 1986)。退行期の培養濾液中のアンモニア態窒素の濃度は 2.47 ppm であり、これを用いてワムシを培養して 3 日目においては、培養液中のアンモニア態窒素の濃度はそれ以上に増加している可能性がある。それ故の全個体死亡となったものと考えられる。

対数増殖期初期および対数増殖期におけるアンモニア態窒素の濃度を比べると、それぞれ 0.23 と 0.43 ppm で、後者の方が高い。それにもかかわらず、後者の方でワムシ個体数が有意に増大するのは、この時期は対数増殖期初期より

個体数が 2 倍以上多く、従って分泌される増殖促進成分の全体量も多くなること
が原因と考えられる。これは、当該成分の増殖促進活性には濃度依存性がある
ことを示唆している。

一方、当該成分が培養液中に多く残っているであろう定常期由来の培養濾液
では、ワムシ個体数が 1/2 人工海水のみの対照区と有意差が確認されなかった。
定常期由来の培養濾液中のアンモニア態窒素の濃度は 1.61 ppm であり、慢性毒
性あるいは急性毒性のいずれにも該当しない。従って、小磯ら(2002)が示唆して
いるように、定常期由来の培養濾液にはアンモニア態窒素以外の増殖を抑制す
る物質の存在が考えられる。

以上の諸結果から、ワムシは対数増殖期初期から対数増殖期にかけて自身の
増殖を促進する何らかの成分を培養液中に分泌していることが示唆された。ま
た、定常期以降は培養液中にアンモニア態窒素の濃度が増大し、これがワムシ
の増殖を阻害していると考えられた。

次に、対数増殖期初期のワムシ培養濾液に着目し、培養濾液中に含まれる増
殖促進成分の性状を詳細に検討した。まず、当該成分がワムシ由来のものであ
るか否かについて調べる必要があった。これは、細菌類などの分泌物質が他の
生物の増殖を促進させるという生物間の相互作用が報告されているためである
(Azam, 1998; Lebsky et al., 2001; de-Bashan et al., 2002, 2004; Vassilev et al.,
2006; Liu et al., 2008)。そこで、対数増殖期初期の培養濾液のほか、同条件で
培養した餌料と 1/2 人工海水のみからなる培養液から培養濾液を調製し、これら
の増殖促進活性と比較した。その結果、培養濾液区のワムシ個体数は餌料濾液
区および 1/2 人工海水のみの対照区よりも有意に高かった($p<0.001$) (Fig.1-5,

Table 1-2)。また、餌料濾液区および 1/2 人工海水のみの対照区間では有意差は確認されなかった。この結果は、対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分はワムシ由来の成分であることを示唆し、本研究におけるワムシが自身の増殖を促進させる何らかの成分を分泌しているという仮説を支持する。

次に、増殖促進成分の性状を詳細に検討するため、当該成分の活性の濃度依存性、熱安定性、分子量の推定、proteinase K 処理の影響および水溶性か否かを調べた。その結果、培養濾液の濃度が高いほど有意に高い増殖促進活性を示し($p<0.001$)、希釈するほどその活性は弱まる傾向を示した(Fig.1-6, Table1-3A, B)。また、40°C 以上の加熱処理や分画分子量<10 kDa の限外濾過膜で処理することでも有意に活性が低下し($p<0.01$) (Fig.1-7, 8, Table 1-4, 5A, B)、proteinase K 処理により完全に失活した(Fig.1-9, Table 1-6A, B)。なお、proteinase K 処理区のワムシ個体数は 1/2 人工海水のみの対照区よりも有意に低かった($p<0.05$) (Fig.1-9, Table 1-6A, B)。Proteinase K 処理区ではワムシの動きが緩慢であったり 1 個体当たりの抱卵数が少ないなど、他の試験区に比べ明らかに違いがみられた(データは示していない)。したがって、proteinase K 処理区が 1/2 人工海水のみの対照区よりも個体数が少ない原因として、proteinase K によるワムシの増殖阻害が考えられた。また、培養濾液から脂溶性成分を除去した水溶性画分でも未処理区と同様の増殖促進活性が認められた ($p<0.001$) (Fig.1-10, Table 1-7A, B)。

これらの諸結果から、対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分は、濃度依存性を示す熱に弱い分子量 10000 以上の水溶性タンパク質であることが示唆された。また、培養濾液を複数の分画分子量をもつ限外濾過膜でそれ

ぞれ限外濾過したところ、<30 kDa および<10 kDa 両区における増殖促進活性は 1/2 人工海水のみの対照区に比べ有意に高かったことから($p<0.05$) (Fig.1-8、Table1-5A, B)、ワムシの増殖を促進させる成分は単一のものではなく複数の成分から構成されている可能性が考えられた。

第2章 ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の特性

前章では、対数増殖期初期のワムシ培養濾液がワムシの増殖を有意に促進させることを明らかにした。また、当該培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性には濃度依存性があること、熱に弱く分子量 10000 以上の複数の水溶性タンパク質からなることが示唆された。さらに、増殖促進成分が餌料由来ではなくワムシ由来のものであることを示した。

ワムシの増殖促進成分の精製に際して、培養濾液からは当該成分の回収量が少なく、また、精製途中で活性測定が不可能となり、精製が困難であった。一方、対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分がワムシ由来であることから、当該成分はワムシ個体にも高濃度で含まれている可能性が考えられた。

ワムシは比較的単純な個体構造をしており、L 型種でも個体を構成する細胞数は 900 程度に過ぎないが(萩原, 1994)、高等生物と類似のストレス耐性(Kaneko et al., 2002, 2010; 金子, 2006; Oo et al., 2009; Ozaki et al., 2010)やインスリン様シグナル伝達経路(Yoshinaga et al., 2005)をもつことが、近年知られるようになってきた。これに関連して、Gallardo et al. (2006)はワムシ体内から成長ホルモン様物質を単離し、当該成分がワムシの増殖率を増大させることを報告している。このような知見から、ワムシ生体内には自身の増殖を促進させる成分がある可能性は十分に考えられる。

本章では、上述のことを明らかにするためにワムシ個体抽出液を調製し、その増殖促進活性を明らかにするとともに、培養濾液と同様の処理を行うことで培養濾液中に含まれている増殖促進成分との類似性を調べた。

第1節 ワムシ個体抽出液の増殖特性

本節では、対数増殖期初期のワムシ個体中から抽出液を調製してワムシを培養し、増殖促進作用の有無を検討した。

方 法

ワムシ個体抽出液の調製

第1章第1節において、 -80°C で保存した対数増殖期初期のワムシ約200g(個体密度約100個体 mL^{-1})を用いた。上記ワムシに3倍量の抽出緩衝液を加えて、乳鉢を用いて液体窒素中で大まかに破碎後、さらに超音波破碎機(沖, 東京)を用いて細胞を破碎した。抽出緩衝液には40 mM NaCl、2 mM MgCl_2 、0.5 mM EGTA、0.1 mM DTT、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ pepstatine、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin、0.1 mM PMSFを含む20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を用いた。破碎した試料を10,000 $\times g$ 、15分間の遠心分離に付して上清を回収して試料とした。

ワムシ個体抽出液の増殖促進活性の測定

培養に際しては、先述した試料を試料原液、10倍希釈、100倍希釈および1000倍希釈(いずれも1/2人工海水で試料を希釈)した試験区(以下、それぞれ原液区、10倍希釈、100倍希釈および1000倍希釈各区と表記)と、1/2人工海水のみの対照区を設定した。上記の試験区を、第1章第1節の増殖促進成分活性の測定

と同様の方法で行った。

タンパク質量の測定

原液区、10 倍希釈、100 倍希釈および 1000 倍希釈各区のタンパク質の濃度は、標準タンパク質にウシ血清アルブミンを用いて BCA キット(タカラバイオ)により吸光度を測定し、得られた検量線から求めた。吸光度の測定は、SpectraMax™ M2(モレキュラーデバイス, 東京)を用いた。

統計解析

各試験区間のワムシ個体数の有意差は、第 1 章第 1 節の方法に従って検定した。

結 果

ワムシ個体抽出液の増殖促進活性

対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を用いて培養実験を行ったところ、培養 5 日目で 10 倍希釈区のワムシ個体数は 66.6 ± 3.4 となり、100 倍希釈区、1000 倍希釈区および 1/2 人工海水のみの対照区のそれぞれ 49.2 ± 5.6 、 49.0 ± 2.6 および 47.4 ± 4.9 よりも有意に高かった($p < 0.05$) (Fig.2-1)。一方、100 倍希釈区、1000 倍希釈区および 1/2 人工海水のみの対照区間では有意差は認められなかった (Fig.2-1)。なお、原液区では培養 2 日目に全ての個体が死亡した (Table 2-1)。

タンパク質濃度

原液、10 倍希釈、100 倍希釈および 1000 倍希釈各区のタンパク質濃度は、それぞれ $340 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ および $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった。

第2節 種々の処理をしたワムシ個体抽出液の増殖促進活性の変化

前節では、対数増殖期初期由来のワムシ個体抽出液がワムシの増殖を有意に促進させることを確認した。本節では、この段階のワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分の性状を検討するため、種々の処理を加えたワムシ個体抽出液でワムシを培養し、増殖促進活性の変化を調べた。

方 法

ワムシ個体抽出液の希釈液の調製

ワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分の活性の濃度依存性を検討するために、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を 1/2 人工海水で 10%ずつ 10-90%と希釈した試験区(以下、それぞれ 10-90%抽出液各区と表記)と、1/2 人工海水のみの対照区を設定した。さらに、前節の結果を踏まえ、10%から 1%希釈間でのワムシの増殖促進活性を詳細に調べるため、5%ずつ 5-25%と希釈した試験区(以下、それぞれ 5-25%抽出各区と表記)および 1/2 人工海水のみの対照区を設定した。上記の試験区の増殖促進活性を、第1章第1節と同様の方法で行った。

ワムシ個体抽出液の熱処理

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の熱安定性を検討するために、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を第1章第2節と同様の方法で処理した。な

お、ワムシ個体抽出液の活性の濃度依存性の結果を踏まえ、ワムシ個体抽出液を 1/2 人工海水で 25%に希釈して調製し、熱処理に供した。また、次節以降の全ての未処理区には当該試料を用いて実験を行った。処理した試験区(以下、それぞれ 40°C、60°C および 80°C 各処理区と表記)、加熱処理していない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、増殖促進活性を、第 1 章第 1 節と同様の方法で測定した。

ワムシ個体抽出液の分子量分画

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の分子量を推定するために、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を第 1 章第 2 節と同様の方法で処理した。処理した試験区(以下、それぞれ<1 kDa、<10 kDa および<30 kDa 各区と表記)、限外濾過していない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、上記の試験区の活性を第 1 章第 1 節と同様の方法で測定した。

ワムシ個体抽出液の **proteinase K** 処理

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の活性の **proteinase K** 処理による影響を検討するため、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を第 1 章第 2 節と同様の方法で処理した。処理した試験区(以下、**proteinase K** 区と表記)と、処理しない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、第 1 章第 1 節と同様の方法で増殖促進活性を測定した。

ワムシ個体抽出液の水溶性画分の調製

ワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分について、活性が脂溶性成分を除去した水溶性画分にあるかどうかを検討するため、第 1 章第 2 節と同様の方法で処理した。処理した試験区(以下、水溶性画分区と表記)と、処理していない未処理区、および 1/2 人工海水のみの対照区を設定し、第 1 章第 1 節と同様の方法で増殖促進活性を測定した。

統計解析

各試験区間のワムシ個体数の有意差は、第 1 章第 1 節の方法に従って検定した。

結 果

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の活性の濃度依存性

対数増殖期初期のワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の活性の濃度依存性を調べたところ、培養 5 日目における 20%抽出液区のワムシ個体数は 64.4 ± 6.0 と、1/2 人工海水のみの対照区の 36.8 ± 5.1 よりも有意に高く ($p < 0.05$)、他の試験区に比べても最も高い値を示した (Fig. 2-2A, Table 2-2)。また、10%、30%および 40%抽出液各区のワムシ個体数は、それぞれ 50.2 ± 4.7 、 60.0 ± 5.0 および 55.6 ± 4.4 と、20%抽出液区よりも低いものの、1/2 人工海水のみの対照区に比べ有意に高かった ($p < 0.05$) (Fig. 2-2A, Table 2-2)。一方、20%および 30%抽出液区はそれぞれ 10%および 50%抽出液各区よりも有意に高く ($p < 0.05$)、40%

抽出液区は 50%抽出液区よりも有意に高かった($p<0.05$) (Fig. 2-2A, Table 2-2)。なお、20%以上の抽出液区では抽出液濃度が高くなるのに伴い徐々に個体数が減少し、60%以上の抽出液区ではワムシはほとんど増殖せず、100%の抽出液区では培養 3 日目に全ての個体が死亡した(Table 2-2)。

上述の濃度依存性をさらに詳細に調べたところ、培養 5 日目における 10%、15%、20%および 25%抽出液各区のワムシ個体数は、それぞれ 52.4 ± 4.7 、 59.2 ± 5.5 、 63.4 ± 8.8 および 66.8 ± 7.8 と、1/2 人工海水のみの対照区の 41.6 ± 8.4 に比べて有意に高かった($p<0.05$) (Fig. 2-2B, Table 2-3A, B)。一方、5%抽出液区および 1/2 人工海水のみの対照区の間には有意差は認められなかった(Fig. 2-2B, Table 2-3A, B)。

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の熱安定性

対数増殖期初期のワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の熱安定性を調べたところ、培養 5 日目における 60°C および 80°C 各処理区のワムシ個体数は、それぞれ 44.4 ± 8.3 および 40.2 ± 7.5 と、未処理区の 60.2 ± 8.1 に比べて有意に低かった($p<0.05$) (Fig. 2-3, Table 2-4A, B)。加熱処理の温度が高いほどワムシ個体数が少なくなる傾向がみられたが、各処理区間では有意差は認められなかった(Fig. 2-3, Table 2-4A, B)。また、未処理区および 40°C 処理区間においても有意差は認められなかった(Fig. 2-3, Table 2-4A, B)。

ワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分の分子量の推定

対数増殖期初期のワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の分子量を推定

するために、種々の分画分子量をもつ限外濾過膜で処理した培養濾液を調製してワムシを 5 日間培養した。その結果、<1 kDa および <10 kDa 各区のワムシ個体数は、それぞれ 41.6 ± 5.1 および 43.8 ± 6.5 と、未処理区の 59.6 ± 8.2 に比べて有意に低かった ($p < 0.01$) (Fig. 2-4, Table 2-5A, B)。一方、<1 kDa 区および 1/2 人工海水のみの対照区の間では有意差は認められなかった。<30 kDa 区 (54.6 ± 6.1) では <1 kDa 区および 1/2 人工海水のみの対照区に比べて有意に高かった ($p < 0.05$) (Fig. 2-4, Table 2-5A, B)。

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の活性の proteinase K 処理の影響

加熱処理や分子量分画などから増殖促進成分がタンパク質と想定されたことから、proteinase K 処理した対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を用いてワムシを 5 日間培養した。その結果、proteinase K 処理区のワムシ個体数は 29.0 ± 4.5 と、未処理区の 59.0 ± 7.8 に比べ有意に低かった ($p < 0.001$) (Fig. 2-5, Table 2-6)。また、proteinase K 処理区は 1/2 人工海水のみの対照区の 45.0 ± 7.5 に比べて有意差は認められなかったが低い値を示した (Fig. 2-5, Table 2-6)。

ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の水溶性画分の活性

脂溶性の物質が増殖促進に関与しているか否かを調べるため、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液をジエチルエーテルで処理して脂溶性成分を除去して培養実験に供試した。その結果、培養 5 日目における水溶性画分区のワムシ個体数は 56.8 ± 6.2 と、未処理区の 60.0 ± 8.5 とほとんど変わらず、1/2 人工海水のみの対照区の 41.5 ± 7.0 に比べて有意に高かった ($p < 0.05$) (Fig. 2-6, Table 2-7)。

第3節 考察

本章ではまず、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液が培養濾液と同様にワムシ自体の増殖を促進させるか否かを検討した。さらに、ワムシ個体抽出液を調製後、活性の濃度依存性、熱安定性、分子量の推定、proteinase K 処理の影響および水溶性か否かについて詳細に検討した。その結果、個体抽出液の原液ではワムシの増殖は促進するどころか逆に全ての個体が死亡した。これは、本抽出液中に含まれる増殖促進成分の濃度が高過ぎるためか、あるいはワムシの増殖を阻害する物質が含まれている可能性が考えられた。

そこで、本抽出液を 1/2 人工海水を用いて希釈したところ、10 倍希釈区のワムシ個体数は 66.6 ± 3.4 と、100 倍希釈区、1000 倍希釈区および 1/2 人工海水のみの対照区のそれぞれ 49.2 ± 5.6 、 49.0 ± 2.6 および 47.4 ± 4.9 よりも有意に高かった ($p < 0.05$) (Fig. 2-1, Table 2-1)。また、10 倍、100 倍および 1000 倍希釈区に含まれるタンパク質濃度は、それぞれ $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、 $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ および $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった(データは示していない)。そこで希釈効果をより詳細に調べるため、10-90%希釈したもので増殖促進活性の違いを検討した。

その結果、20%抽出液区のワムシ個体数は 64.4 ± 6.0 と 1/2 人工海水のみの対照区の 36.8 ± 5.1 よりも有意に高く ($p < 0.05$)、他の試験区に比べても最も高い値を示した (Fig. 2-2A, Table 2-2)。また、10%、30%および 40%抽出液各区のワムシ個体数は、20%抽出液区よりも低いものの 1/2 人工海水のみの対照区に比べ有意に高かった ($p < 0.05$) (Fig. 2-2A, Table 2-2)。一方、20%および 30%抽出液区はそれぞれ 10%および 50%抽出液各区より有意に高く ($p < 0.05$)、40%抽出液区は

50%抽出液区より有意に高かった($p<0.05$) (Fig. 2-2A, Table 2-2)。なお、20%以上の抽出液区では濃度の上昇に伴い徐々に個体数が減少し、60%以上の抽出液区ではワムシはほとんど増殖しなかった(Table 2-2)。これらの結果から、ワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分は高濃度に存在していることから低濃度でも活性を示すこと、また、ある一定以上の濃度を示すと増殖を阻害するが明らかになった。

そこで、さらに細かく希釈率を設定して増殖促進活性を調べた。その結果、培養5日目における10%、15%、20%および25%抽出液各区のワムシ個体数は、いずれも1/2人工海水のみの対照区に比べて有意に高く($p<0.01$) (Fig. 2-2B, Table 2-3A)、25%区で最大の値を示した。一方、5%抽出液区および1/2人工海水のみの対照区の間には有意差は認められなかった(Fig. 2-2B, Table 2-3A, B)。これらのことから、5-25%の希釈率に限ってはワムシ個体抽出液の活性には濃度依存性があることが示された。

次に、熱安定性については60°Cおよび80°C両処理区は未処理区に比べて有意に低かった($p<0.05$) (Fig. 2-3, Table 2-4A, B)。また、加熱処理の温度が高いほどワムシ個体数が少なくなる傾向がみられたが、各処理区間では有意差は認められなかった(Fig. 2-3, Table 2-4A, B)。また、未処理区および40°C処理区間においても有意差は認められなかったことから(Fig. 2-3, Table 2-4A, B)、ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分は、培養濾液に含まれるものと同様に60°C以上でその活性が弱まる熱に弱いタンパク質であることが示唆された。

さらに、当該成分の分子量を推定するために複数の分画分子量をもつ限外濾過膜で限外濾過したところ、<1 kDa および <10 kDa 両区では、いずれも未処理

区に比べて有意に低かった($p<0.01$) (Fig. 2-4, Table 2-5B)。一方、 <1 kDa 区および $1/2$ 人工海水のみの対照区の間では有意差は認められなかった。さらに、 <30 kDa 区では <1 kDa 区および $1/2$ 人工海水のみの対照区に比べて有意に高かった($p<0.05$) (Fig. 2-4, Table 2-5A, B)。この結果は、ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分が >10 kDa の複数の成分から構成されている可能性を示唆するものである。先程の熱安定性の場合と同様、分子量の推定においても培養濾液との類似性が示唆された。

さらに、proteinase K 処理の影響や、水溶性か否かの検討を行った。前者は proteinase K 処理により完全に失活し(Fig. 2-5, Table 2-6)、後者は水溶性画分において増殖促進活性を示した(Fig. 2-6, Table 2-7)ことから、培養濾液と同様に水溶性タンパク質である可能性が考えられた。

以上の諸結果より、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分は同段階の培養濾液中に含まれるものとよく類似し、高濃度に含まれていることが強く示唆された。

第3章 ワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分の単離と

cDNA クローニング

前章の結果より、対数増殖期初期のワムシ個体中には同段階の培養濾液に比べて増殖促進成分が高濃度に含まれていると考えられ、また、両者に含まれている当該成分はよく類似していることが示唆された。これまでの知見で、ワムシ個体抽出液が両性生殖を誘導することが報告されているが(Hagiwara et al., 1994)、増殖に関連した成分を単離した例はほとんどない(Gallardo et al., 2006)。一方、ワムシの培養濾液中に含まれる生理活性物質が単離されたこともほとんどない。例外的に、定常期以降のワムシ培養濾液より単性生殖から両性生殖を誘導するタンパク質が同定されている(Snell et al., 2006)。これらの事実は、ワムシ個体抽出液であっても培養濾液であっても、対数増殖期初期における試料量の確保が困難で、増殖関連成分の精製ならびに単離が困難であることを示唆する。以上のように、対数増殖期初期から対数増殖期にかけてのワムシの生理機構や、急激な増殖が起こる機構については不明な点が多く残されている。対数増殖期初期で増殖因子が解明されれば、水産養殖の現場で未解決であるワムシ大量培養の途上で起こる急激な増殖不良といった問題(小磯ら, 2009)の解決の一助になるものと思われる。

本研究では、対数増殖期初期におけるワムシの増殖機構解明の一環として、この時期の増殖促進成分の単離、同定を目指した。そのため、ある程度の試料量が入手できるワムシ個体抽出液を用いることが有効と思われた。

そこで本章では、まず、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を陰イオン交換

クロマトグラフィー、ゲル濾過および逆相 HPLC の種々のクロマトグラフィーに付して増殖促進成分の精製を試みるとともに、単離したタンパク質について SDS-PAGE 後の当該バンドをプロテインシーケンサを用いて N 末端アミノ酸配列を分析した。次に、分析された当該成分の配列をもとに、当該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を NCBI のワムシ EST データベースに対して検索し、得られたワムシ 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検索し、相同性の高いタンパク質を探索した。また、単離した増殖促進成分をクローニングするため、相同性を示したワムシ EST の塩基配列をもとにプライマーを設計、PCR を試みた。その後、クローニングされた配列についてワムシ EST データベース上の配列と比較するとともに、再度、NCBI のデータベースから相同性の高い配列と比較した。

第1節 各種クロマトグラフィーによる精製

本節では、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液から増殖促進成分を単離するために、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過および逆相 HPLC を駆使し、分画した各画分の増殖促進活性を調べた。

方 法

陰イオン交換クロマトグラフィー

対数増殖期初期のワムシ個体から第2章第1節のように調製した抽出液を、30・80%飽和硫酸分画に供した後、 $20,000 \times g$ 、30分間の遠心分離により沈殿を回収した。この沈殿に少量の抽出緩衝液を加えて溶解した後、20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)に対して一晩透析を行った。得られた透析内液を 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で平衡化した DEAE-Tyopearl 650M カラム(東ソー, 東京; 1.1×25 cm)陰イオン交換クロマトグラフィーに付し、吸着タンパク質を流速 1.5 mL min^{-1} 、20 - 600 mM NaCl のリニアグラジエントで溶出させた。

ゲル濾過

陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた活性画分を合一し、凍結乾燥で10倍に濃縮した試料を、600 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で平衡化した HiLoad16/60 Superdex 75 prep grade カラム(GE Healthcar

UK Ltd., Buckinghamshire, UK; 1.6 × 60 cm)のゲル濾過に付し、タンパク質を流速 0.5 mL min⁻¹で溶出させた。

逆相 HPLC

ゲル濾過により分画して得られた活性画分を合一し、凍結乾燥で 10 倍に濃縮した試料を少量の超純水で再溶解した。この試料を TSKgel Phenyl-5PW カラム(東ソー; 4.6 × 76 mm)を用いた逆相 HPLC に付し、吸着タンパク質を 0.1%TFA を含む 0 - 80%グラジエントのアセトニトリル、流速 0.5 mL min⁻¹で溶出させた。

タンパク質量の測定

各種クロマトグラフィーでは 280 nm 吸光度で溶出タンパク質を測定した。クロマトグラフィーにより得られた活性画分に含まれるタンパク質の濃度は、第 2 章第 1 節と同様に BCA キット(タカラバイオ)を用いて測定した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、0.1%SDS を含む 10 - 20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて行った。電気泳動後、ゲルを Sliver Stain Kit II (和光)を用いて銀染色し、タンパク質のバンドを検出した。

増殖促進活性の測定

陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画したワムシ抽出液の溶出画分

の増殖促進活性の測定は、各画分から 0.5 mL を分取して 1/2 人工海水で 10 倍に希釈して調製した培養液を用いてワムシを 3 日間培養して行った。なお、培養は第 1 章第 1 節で述べた方法で行った。

統計解析

各画分におけるワムシ個体数の有意差は、第 1 章第 1 節の方法に従って統計解析した。

結 果

陰イオン交換クロマトグラフィー

対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を DEAE-650M カラム陰イオン交換クロマトグラフィーに付したところ、画分 62-80 の広い範囲で活性が認められた (Fig.3-1A, B)。これらの活性画分についてタンパク質量を測定したところ、およそ $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった。また、SDS-PAGE 分析の結果、これらの画分は分子量約 75000、50000、25000 および 20000 の成分を含むことが示された (Fig.3-1B)。

ゲル濾過

陰イオン交換クロマトグラフィーに付して得られた活性画分を HiLoad16/60 Superdex 75 prep grade カラムのゲル濾過に供したところ、画分 20 - 23 で活性が認められた (Fig.3-2A, B)。活性画分のタンパク質量を測定したところ、280

$\mu\text{g mL}^{-1}$ であった。また、SDS-PAGE 分析により、活性画分には分子量約 37000、25000 および 18000 の成分が含まれていることが示された(Fig.3-2B)。

逆相 HPLC

ゲル濾過に付して得られた活性画分を TSKgel Phenyl-5PW カラムの逆相 HPLC に供したところ、画分 4 および 5 で活性が認められた(Fig.3-3A, C)。これらの活性画分についてタンパク質量を測定したところ、 $85 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった。また、SDS-PAGE 分析の結果、画分 4 および画分 5 にはそれぞれ、分子量約 25000 および 18000 成分が確認され(Fig.3-3B)、画分 4 では分子量約 25000 の単一の成分が含まれていた。一方、画分 6 には 18000 の単一成分が含まれていたが、有意な増殖促進作用は示さなかった(Fig.3-3B, C)。

第2節 ワムシ増殖促進成分の cDNA クローニング

前節で、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を各種クロマトグラフィーに付したところ、分子量約 25000 の単一のタンパク質を含む活性画分を得た。対数増殖期以降のワムシ個体抽出液には両性生殖を誘導する作用があることが報告され(Hagiwara et al., 1994)、成長ホルモン様タンパク質も単離されているが(Gallardo et al., 2006)、対数増殖期初期のワムシ個体抽出液から増殖促進成分を単離した報告はまだない。タンパク質が同定できれば、対数増殖期初期の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、応用面にも寄与するところが大きいと考えられる。

本節では、この活性画分を同定するために、まず、当該成分の N 末端アミノ酸解析を試みるとともに、当該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を NCBI のワムシ EST データベースに対して検索した。次に、得られたワムシ 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検索し、相同性の高いタンパク質を探索した。さらに、単離した増殖促進成分をクローニングするため、相同性を示したワムシ EST データベース上の遺伝子の配列をもとにプライマーを設計し、PCR を試みた。その後、決定した配列を再度データベースを用いて相同性タンパク質を検索した。

方 法

増殖促進成分の N 末端アミノ酸配列の解析

単離した分子量約 25000 の増殖促進作用をもつタンパク質について N 末端アミノ酸配列分析を行うために、SDS-PAGE 後の当該バンドを ABI 473A gas-phase 型プロテインシーケンサ(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)に供した。

増殖促進成分の相同性の検索

解析した増殖促進成分の N 末端アミノ酸配列について、まず、NCBI のワムシ発現配列タグ(EST)データベースを用いて TBLASTN 検索し、当該配列がワムシ EST データベース(Suga et al., 2007; Denekamp et al., 2009)に存在するかどうかを調べた。次に、得られたワムシ EST 配列全長につき NCBI データベースのタンパク質データバンクを用いて BLASTX 検索し、ワムシ EST の演繹アミノ酸配列と相同性の高い他生物種のタンパク質を検索した。また、ワムシ EST 配列全長から演繹したアミノ酸配列と相同性を示した配列を Clustal W (Thompson et al., 1994)で比較した。

RNA の抽出

第 1 章第 1 節の、-80°C で凍結保存したワムシ小浜株約 0.5 g を試料とした。このワムシ試料に対して約 5 倍量の ISOGEN(ニッポンジーン, 東京)を加え、ホモジナイザーで組織を破碎した。以後の操作は ISOGEN 付属の説明書に従った。得られた RNA 沈殿を 50 μ L の滅菌水に溶解し、このうち 1 μ L を分光光度計を用いて 260 nm の吸光度を測定し、全 RNA 量を求めた。

1st strand cDNA の作製

5 µg の RNA を用いて cDNA の合成を行った。すなわち、RNA 5 µg に 50 µM GeneRacer Oligo dT primer [5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)₂₄ -3'] 1 µL、10 mM dNTP 1 µL に、滅菌水を加えて 13 µL にした反応液を 65°C で 5 分間処理した後、氷上に 1 分間置いた。続いて、この反応液に 5 x 1st strand 緩衝液[250 mM Tris-HCl (室温 pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂]を 4 µL、0.1 mM dithiothreitol (DTT)を 1 µL, SuperScriptIII(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)を 1 µL (200 U)、および RNase OUT (RNase 阻害剤; Invitrogen) 1 µL (40 U)を加え、50°C で 60 分間逆転写反応を行った後、70°C で 15 分間処理し逆転写酵素を失活させて 1st strand cDNA を合成した。合成後、試料を滅菌水で 50 倍に希釈して以下の PCR に用いた。

プライマーの設計

ワムシ EST データベース上で検索された前述の遺伝子の塩基配列(Fig.4-2A)を参考にプライマーRotifer25kDa_F および Rotifer25kDa_R を設計した(Table 3-1)。プライマーの設計に際して、プライマーの melting temperature (T_m)およびプライマーの長さがそれぞれ 55°C 前後および 20 塩基になるようにした。データベースから予測される増幅断片サイズは 327 bp である。

PCR

前述のプライマー対を用いて PCR を行った。先に調製した 1st strand cDNA

1 μL 、フォワードプライマー10 pmol、リバープライマー10 pmol、10 \times *Ex Taq* 緩衝液 2 μL 、5U μL^{-1} *Ex Taq* (タカラバイオ) 0.2 μL 、2.5 mM dNTP 混合液 1.6 μL に滅菌水を加えて計 20 μL として反応を行った。PCR は 94°C、5 分間、cDNA を変性させた後、94°C で 30 秒間、52°C で 30 秒間および 72°C で 30 秒間のサイクルを 35 回行った。最後に 72°C で 7 分間保持し、反応を終了させた。

サブクローニング

pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA)を用いて、PCR 産物をプラスミドベクターpGEM-T Vector に挿入した。操作は付属の説明書に従った。次に、このベクターを用いて木下(2002)の方法に従い、大腸菌コンピテントセル JM109 を形質転換させた。

プラスミド DNA の精製

形質転換が確認された菌体を 5 mL アンピシリンを含む液体 Luria-Bertani (LB)培地に移し、37°C で一晩培養した。その後、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)によりプラスミド DNA を抽出した。操作は付属の説明書に従った。

電気泳動

前述の増幅産物 20 μL のうち、5 μL をアガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルは常法に従って 1%に調製し、SYBR Green(タカラバイオ)を用いて染色しバンドの観察を行った。なお、泳動は 15 mA の定電流で泳動マーカー

がゲルの 3 分の 2 に至るまで行った。

塩基配列の決定

ベクターのマルチクローニングサイト中の P1 および P5 の配列を利用して、組み込んだ DNA 断片を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により蛍光標識し、同社製の DNA シークエンサ ABI PRISM 3100 で塩基配列を決定した。操作はいずれも付属の説明書に従った。塩基配列の解析にはコンピュータープログラム BioEdit (Hall, 1999)を用いた。

相同性検索

クローニングにより決定した塩基配列から演繹されたアミノ酸配列について、まず、Clustal W (Thompson et al., 1994)でワムシ EST データベース上の配列と比較した。さらに、ワムシ EST 全配列をプローブに、BLASTX を用いて演繹されたアミノ酸配列と相同性のある既報の他生物種のタンパク質を検索し、その配列を Clustal W によって比較した。

結 果

増殖促進成分の N 末端アミノ酸配列

活性画分中の分子量約 25000 のタンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列を解析したところ、PAVVDF~~T~~AVWFGPLQMIKP と決定された(Fig.4-1A)。

増殖促進成分の相同遺伝子

決定された配列を NCBI のシオミズツボウムシ 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(Fig.4-1B) (DDBJ/EMBL/GenBank Accession number FM939833; Denekamp et al., 2009)。このウムシ 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、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* およびマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のチオレドキシンと高い相同性を示した(Fig.4-1C)。

PCR およびサブクローニング

アガロース電気泳動の結果、約 300 bp のバンドが確認され、目的とする PCR 産物が得られた(Fig.4-2B)。

前述のように得られた PCR 産物(約 300 bp)をプラスミドベクター-pGEM-T Vector に挿入後、大腸菌コンピテントセル JM109 を形質転換させた結果を Fig.4-2C に示す。コロニーNo.4, 5 および 7 で約 450 bp の目的とする PCR 産物のバンドが確認された。

相同性検索

前項で、コロニーNo.4, 5 および 7 は、目的とする PCR 産物を含むことが示された。これらのコロニーについて、プラスミドを抽出して塩基配列の解析を試みたところ、コロニーNo.5 のみ解析された(Fig.4-2C)。決定した配列は(Fig.4-3)、ウムシ EST と高い相同性を示した(Fig.4-4)。この配列から演繹され

たアミノ酸配列をさらに既報の他生物由来のタンパク質と比較したところ、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* およびマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のチオレドキシンと約 50%のアミノ酸同一率を示した(Fig. 4-5)。

第3節 考察

本章では、ワムシ個体抽出液を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、および逆相 HPLC に付して、25 kDa の増殖促進作用を持つタンパク質を単離した。精製に際しては、まず、ワムシ個体抽出液を DEAE-Tyopearl 650M カラムの陰イオン交換クロマトグラフィーに付し、NaCl リニアグラジエント溶出画分の広い範囲で活性が確認された(Fig.3-1A, B)。これらの活性画分を合一して凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、HiLoad16/60 Superdex 75 prep grade カラムのゲル濾過に付したところ、 V/V_0 1.3-1.6 の範囲で活性が確認された(Fig.3-2A, B)。これらの活性画分を合一して凍結乾燥で 10 倍に濃縮し、TSKgel Phenyl-5PW カラムの逆相 HPLC 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確認された(Fig.3-3A, C)。このうち、SDS-PAGE 分析より増殖促進活性のある画分 4 が約 25 kDa の単一の成分から構成されていた(Fig.3-3B)。一方、画分 5 は最も高い活性を示したが、約 25 kDa および約 18 kDa と 2 つの成分が含まれていた(Fig.3-3B)。また、画分 6 には約 18 kDa の単一成分が含まれていたが、有意な増殖促進作用は示さなかった。このことから、画分 4 に含まれる約 25 kDa のタンパク質が増殖促進成分であると考えられたが、画分 5 の結果から、約 25 kDa と約 18 kDa の 2 つの成分が協同してより高い増殖促進活性を示す可能性も考えられた。第 1 章および 2 章において、ワムシ培養濾液およびワムシ個体抽出液に含まれる増殖促進成分は、複数の成分から構成されている可能性が示されている (Fig.1-8, 2-4)。いずれにせよ、単離した約 25 kDa の成分について N 末端アミノ酸配列を分析し、当該成分をコードする遺伝子をクローニングし

て全長を決定する必要がある。

そこで、単離した 25 kDa の増殖促進作用をもつタンパク質について、当該成分をコードする遺伝子の塩基配列をワムシ EST データベース上から検索し、この配列をもとにプライマーを設計、PCR を行い当該成分をコードする遺伝子をクローニングした。さらに得られた配列について、再度データベース上で既報の他生物のタンパク質を検索した。その結果、当該成分はチオレドキシシンと約 50% のアミノ酸同一率を示し、チオレドキシシン様タンパク質である可能性が示唆された。

一方、チオレドキシシンは約 12 kDa 程度の低分子であり、単離した約 25 kDa のタンパク質のもの比べて分子サイズが大きく異なる。分子量の相違については二量体の形成や糖鎖修飾などが考えられる。ヒト由来のチオレドキシシンにおいては、二量体の形成により 27 kDa になることが知られている(Wollmen et al., 1988)。しかしながら、SDS とメルカプトエタノールが含まれている試料であれば二量体は形成されず、また、同程度の分子サイズの糖鎖が修飾されていたとは考えにくい。一方、ヒト由来のチオレドキシシン様タンパク質では 32 kDa と、比較的高分子のものも単離されている(Lee et al., 1998; Hirota et al., 2002)。

同定した 25 kDa タンパク質は原生動物や植物プランクトンのチオレドキシシンファミリータンパク質と約 50% のアミノ酸同一率を示した(Fig.4-5)。本研究により、目的の配列がチオレドキシシンと部分的には一致するものの、異なる部分も多く、同一のものというより関連物質であると考えた方が正しいと思われる。チオレドキシシンあるいはその関連物質は、原核生物から真核の高等動物まで普遍的に存在するタンパク質で、生体内では主に酸化還元酵素として働くが

(Williams et al., 2000)、近年では、寿命の調節、酸化ストレスに対する応答(Jee et al., 2005)、細胞内シグナル伝達への関与(Meng et al., 2010)、細胞の増殖因子としての機能(Khayat et al., 2001; Powis and Montfort, 2001; Yoshioka et al., 2004)などが報告されている。このように、チオレドキシンは多機能性タンパク質であるが、その活性中心には多くの場合 WCGPC モチーフが存在しており(Wollman et al., 1988)、本研究でクローニングして得られた配列も保存されていた(Fig.4-5)。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、前述のように SDS-PAGE 分析によって得られた約 25000 とは大きく異なる。したがって、ワムシ増殖促進成分の分子構造についてはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

第4章 総括的考察

単生殖巢綱 Monogononta のワムシ類は、ほとんどの種類において単性生殖により指数関数的に増殖するとともに、その過程で出現する mictic female と呼ばれる雌が雄を産卵することで開始される両性生殖も同時にみられ、独特の生活環をもつ(Hino and Hirano, 1976; 日野, 1983)。このような生活環をもつことから、結果としてワムシ類の個体群は爆発と崩壊をくり返すことが知られている。本生物種は培養が容易であることから生態学(Gilbert, 1963, 1977, 2002, 2003, 2004; King and Pulik, 1967; Halbach, 1984; Snell and Hoff, 1985; Snell, 1987)、水産養殖(小磯ら, 2002; 吉永, 2010)あるいは分子生物学(Kaneko et al., 2002, 2010; Yoshinaga et al., 2003; 金子, 2006; Oo et al., 2010; Ozaki et al., 2010)など様々な分野で使用されている。

本種を実験室でバッチ培養すると、シグモイド型の成長曲線を描くことが知られており(King and Pulik, 1967; Halbach et al., 1984; Yoshinaga et al., 2001)、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、個体数がほとんど変化しない定常期を経て、退行期を迎える(Yúfera and Navarro, 1995; 日野ら, 2000)。産業上、ワムシの効率的な培養が必要であったことから、個体群の増大や減少が生じる機構については種々の研究がなされてきたが(Yu and Hirayama, 1986; Yamasaki et al., 1987; Carmona et al., 1993; Yoshinaga et al., 1999; 小磯ら, 2002; Kaneko et al., 2002, 2010; 金子, 2006)、これらの研究は、主に対数増殖期あるいは定常期以降に焦点が当てられており、対数増殖期初期のワムシの生理や生態について

は不明な点が多く残されていた。

これに関連して、ワムシの増殖はワムシ自身が分泌する物質が制御することが示唆されている(Carmona et al., 1993; Yoshinaga et al., 1999)。また、増殖段階の異なる培養濾液がワムシの生理に様々な影響を引き起こすことが報告されている(小磯ら, 2002; Snell et al., 2006)。さらに、培養途上の増殖不良については親世代の給餌や環境のあり方が影響することも指摘されており(小磯ら, 2009)、この点からもワムシの増殖機構を明らかにするには、対数増殖期初期から対数増殖期にかけての培養初期に着目する必要がある。

以上の背景の下、本研究では対数増殖期初期のワムシの増殖機構を解明する一環として、この時期に働く増殖因子について詳細を検討することにした。

本論文では、まず、第 1 章で培養濾液中に含まれる増殖促進成分の特性について検討した。各種増殖段階ごとに得られた培養濾液によるワムシの増殖促進活性を調べ、さらに対数増殖期初期の培養濾液を用いて本濾液に含まれる増殖促進成分の起源、活性の濃度依存性、熱安定性、分子量、proteinase K 処理の影響、および水溶性か否かについて調べた。その結果、対数増殖期初期から対数増殖期の培養濾液にはワムシ個体数の有意な増殖促進作用がみられたのに対し、定常期から退行期の培養濾液には活性がみられず、死滅することもあるなど明らかな増殖阻害が確認された。この原因として、培養濾液中のアンモニア態窒素の影響が考えられた。そこで、それぞれの培養濾液についてアンモニア態窒素濃度を調べたところ、培養後期に向かうほど増大することが示された。L 型ワムシのアンモニアによる慢性致死量は約 2 ppm と報告されているが、培養後期の培養濾液に含まれるアンモニア態窒素の濃度はこれに近いか上回って

いた。

一方、対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分の特性については、50%以上の濃度で有意な増殖促進作用がみられ、40°C以上の処理、<10 kDa分画、proteinase K 処理により有意に増殖促進活性が低下し、培養濾液から脂溶性成分を除去した水溶性画分に有意な増殖促進作用がみられた。これらのことは、対数増殖期初期の培養濾液に含まれる増殖促進成分は、熱に弱い複数の成分から構成される水溶性タンパク質であることが示唆された。

対数増殖期初期におけるワムシの増殖は、対数増殖期のものに比べると低いが、培養濾液中に含まれる増殖促進成分の活性に濃度依存性があることから明らかのように、予め当該成分の濃度を高くすれば活発な増殖が起こるまでの時間は短縮されると考えられる。このように、個体が分泌する生理活性成分が個体の生理に濃度依存的に影響を及ぼすことがクオラムセンシングとして細菌などの微生物で報告されており (Fuqua et al., 1996)、近年ではワムシについても同様の現象が報告されている (Garcia-Roger et al., 2009; Snell et al., 2009; Gilbert et al., 2010; Serra et al., 2010)。本研究でも、個体が増殖促進物質を分泌しそれに濃度依存性があることからクオラムセンシングの一つと考えられる。

ワムシの増殖促進成分の精製に当たり、培養濾液では当該成分の回収量が少なく、また、精製途上で増殖促進活性が失われたことから培養濾液を用いての精製は困難であった。そこで第 2 章では、対数増殖期初期の培養濾液中に含まれる増殖促進成分がワムシ由来であったことから、当該成分あるいは類似の成分がワムシ体内に含まれている可能性について検討した。対数増殖期初期のワムシ個体抽出液を用いて、第 1 章と同様の処理を行ったところ、1/2 人工海水で

25%に希釈すると他の試験区に比べて最もかつ有意に高い活性を示した。また、60%以上の濃度では増殖停滞が生じることから、ワムシ個体抽出液中には増殖促進活性成分のほか、増殖停滞を起こす物質が含まれている可能性が考えられた。また、培養濾液と同様に 40°C 以上での加熱処理および分画分子量<10 kDa の限外濾過膜で限外濾過することで増殖促進活性が弱まること、proteinase K 処理で完全失活すること、さらには水溶性の成分であること、が示された。以上の諸結果により、対数増殖期初期の培養濾液中およびワムシ個体中に含まれる増殖促進成分は同一または類似のタンパク質である可能性が示唆された。

第 3 章では、ワムシの増殖促進成分をワムシ個体抽出液から精製することを試みた。その結果、増殖促進作用を示す約 25 kDa のタンパク質が単離された。次に、単離した約 25 kDa のタンパク質につき SDS-PAGE 後の当該バンドを、プロテインシーケンサを用いて N 末端アミノ酸配列を分析した。SDS-PAGE 後の当該バンドを、プロテインシーケンサを用いて 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 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(DDBJ/EMBL/GenBank accession number FM939833)。そこでワムシ EST 全配列をプローブに BLASTX 検索したところ、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* およびマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のチオレドキシシンと高い相同性を示した。しかしながら、チオレドキシシンは一般に 12 kDa 程度の低分子(Powis and Montfort, 2001)で、ワムシ EST の演繹アミノ酸配列から推定された分子量も約 13000 と、今回単離したワムシ増殖促進成分の分子量約 25000 とは大きく異なる。

そこで、単離した 25 kDa タンパク質をクローニングするため、相同性を示したワムシ EST の塩基配列をもとにプライマーを設計し、PCR を行った。その結果、PCR 増幅産物の塩基配列はワムシ EST のそれと高い相同性を示し、チオレドキシンの活性中心に存在する WCGPC モチーフ(Wollman et al., 1988)も含まれていた。チオレドキシンは原核生物から真核の高等動物まで普遍的に存在するタンパク質で、生体内での主な機能は酸化還元反応の触媒作用(Williams et al., 2000)であるが、近年では寿命の調節や酸化ストレスに対する応答(Jee et al., 2005)、細胞内シグナル伝達への関与(Meng et al., 2010)や、細胞の増殖因子としても機能する(Khayat et al., 2001; Powis and Montfort, 2001; Yoshioka et al., 2004)。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 とは大きく異なる。したがって、ワムシ増殖促進成分の分子構造についてはさらに詳細な検討が必要と考えられた。一方、対数増殖期初期のワムシから単離した約 25 kDa の相同タンパク質は bdelloid ワムシ類の EST データベース上では検索されなかった。このことから、当該成分は活発な増殖が起こる Monogononta のワムシに特有のものである可能性が考えられた。しかしながら、ワムシ EST データベースには、約 51000 件の EST が登録されているのに対し、bdelloid ワムシ類では *Philodina roseola* および *Adineta ricciae* でそれぞれ約 290 件および 80 件の EST しか登録されていないことから、上述した推測には疑問の余地がある。

本研究では、対数増殖期初期における増殖促進因子の解明についてその端緒を示したと言える。しかしながら、課題も山積しているのも事実である。まず、培養濾液およびワムシ個体抽出液中に含まれる増殖促進成分が同一のものであ

るかどうかの検討が必要である。分子量推定の項でも示唆しているように、増殖促進成分は単一の成分ではなく複数の成分である可能性も考えなければならない。ワムシ個体抽出液から抗体を作製して、同一性を確かめることもできるものと思われる。

また、直接増殖促進活性を示さなかったが、**25 kDa** タンパク質とともに単離された約 **18 kDa** タンパク質についても調べる必要がある。2つのタンパク質が合わさることで最も高い活性が示されたことから、増殖促進作用は複数の成分から成り立っている可能性も考えられる。

さらに、今回単離した成分がどのような発現パターンを示すのか、定量的 **RT-PCR** を用い対数増殖期初期、対数増殖期、定常期、および退行期の増殖段階で検討してみる必要がある。また、発現タンパク質を作製し、今回単離した成分と同様の増殖促進活性があるかどうかの検討も必要である。

これまで多くの知見の蓄積により、水産養殖におけるワムシの大量培養は以前よりも容易になってきた。しかし、未だ培養途中における増殖不良などの問題が解決されていない。本研究の成果は、水産養殖の現場で問題となっているワムシの増殖不良の解決の一助になるのではないかとと思われる。本研究が示した成果が、今後のさらなる水産増養殖産業ならびに生物学の発展に貢献できることを願い、本論文を締め括る。

参考文献

- Alver, M. O. and Hagiwara, A. (2007) An individual-based population model for the prediction of rotifer population dynamics and resting egg production. *Hydrobiologia*, **593**, 19-26.
- Azam, F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, **280**, 694-696.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 277-294.
- Bower, C. E. and Bidwell, J. P. (1978) Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH, and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1012-1016.
- Carmona, M. J., Serra, M. and Miracle, M. R. (1993) Relationships between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia*, **255/256**, 145-152.
- Castilho, M. S. M. and Arcifa, M. S. (2000) Production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Ploimida: Brachionidae) in Brazilian coastal lagoon. *Rev. Biol. Trop.*, **48**, 859-865.
- Chirac, C., Casadevall, E., Largeau, C. and Metzger, P. (1985) Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Phycol.*, **21**, 380-387.
- de-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J. P. and Bashan, Y. (2002)

Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic waste water by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.*, **36**, 2941-2948.

de-Bashan, L. E., Hernandez, J. P. Morey, T. and Bashan, Y. (2004)

Microalgae growth-promoting bacteria as helpers for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus for municipal wastewater. *Water Res.*, **38**, 466-474.

Demutskaya, L. N. and Kalinichenko, I. E. (2010) Photometric

determination of ammonium nitrogen with the Nessler reagent in drinking water after its chlorination. *J. Water Chem. Tech.*, **32**,

Denekamp, N. Y., Thorne, M. A., Clark, M. S., Kube, M. Reinhardt, R. and

Lubzens, (2009) Discovering genes associated with dormancy in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *BMC Genomics*, **10**, 108.

Fujikawa, H. and Morozumi, S. (2005) Modeling surface growth of

Escherichia coli on agar plates. *Environ. Microbiol.*, **71**, 7920-7926.

Fukusho, K. (1983) Present status and problems in culture of the rotifer

Brachionus plicatilis for fry production of marine fishes in Japan.

pp. 361-374 In: R. Hector (ed.) Symposium Internacionale de Aquaculture, Coquimbo, Chile.

Fuqua, C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. (1996) Census and consensus

in bacterial ecosystems: the LuxR-Lux I family of quorum-sensing

- transcriptional regulators. *Ann. Rev. Microbiol.*, **50**, 727-751.
- Gallardo, W. G., Hagiwara, A., Hara, K. and Soyano, K. (2006) Growth hormone-like substance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fish. Sci.*, **72**, 781-786.
- Garcia-Roger, E. M., Dias, N., Carmona, M. J. and Serra, M. (2009) Crossed induction of sex in sympatric congeneric rotifer populations. *Limnol. Oceanogr.*, **54**, 1845-1854.
- Gilbert, J. J. (2003) Environmental and endogeneous control of sexuality in a rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evol. Dev.*, **5**, 19-24.
- Gilbert, J. J. (2004) Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: new data for *Brachionus* and a review. *J. Limnol.*, **63**, (Supplement 1), 32-36.
- Gilbert, J. J. and Dieguez, M. C. (2010) Low crowding threshold for induction of sexual reproduction and diapauses in a Patagonian rotifer. *Freshwater Biol.*, **55**, 1705-1718.
- Hagiwara, A. and Hino, A. (1990) Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1965-1971.
- Hagiwara, A., Hamada, K., Hori, S. and Hirayama, K. (1994) Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Bio Ecol.*, **181**,

1-8.

萩原篤志 (2004) シオミズツボワムシの生活環に関わるホルモン. *化学と生物*, **42**, 591-595.

Hagiwara, A., Suga, K., Akazawa, A., Kotani, T. and Sakakura, Y. (2007) Development of rotifer strains with useful traits for rearing fish larvae. *Aquaculture*, **268**, 44-52.

Halbach, U., Siebert, M., Westermayer, M. and Wissel, C. (1983) Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **7**, 484-513.

Halbach, U. (1984) Population dynamics of rotifers and its consequences for ecotoxicology. *Hydrobiologia*, **109**, 79-96.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98.

Hampson, B. L. (1977) Relationship between total ammonia and free ammonia in terrestrial and ocean waters. *Journal du Conseil / International pour l'Exploration de la Mer*, **37**: 117-122.

Hino, A. and Hirano, R. (1976) Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis* – I
General aspects of bisexual reproduction inducing factors. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 1093-1099.

日野明德 (1983) シオミズツボワムシ — 生物学と大量培養. 恒星社厚生閣,

東京.

日野明德, 桑田博, 小磯雅彦, 山下貴示, 藤波祐一郎 (2000) 海産ワムシ類の培養ガイドブック. 日本栽培漁業協会, 東京.

Hirota, K., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J. (2002) Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 189-199.

Jee, C., Vanoaica, L., Lee, J., Park, B. J. and Ahnn, J. (2005) Thioredoxin is related to life span regulation and oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, **10**, 1203-1210.

Kaneko, G., Kinoshita, S., Yoshinaga, T., Tsukamoto, K. and Watabe, S. (2002) Changes in expression patterns of stress protein genes during population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Fish. Sci.*, **68**, 1317-1323.

金子元 (2006) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* 個体数変動の分子機構に関する研究. 東京大学博士論文.

Kaneko, G., Yoshinaga, T., Yanagawa, Y., Ozaki, Y., Tsukamoto, K. and Watabe, S. (2010) Calorie restriction-induced maternal longevity is transmitted to their daughters in a rotifer. *Funct. Ecol.*, doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01773.x.

Khayat, M., Stuge, T. B., Wilson, M., Bengten, E., Miller, W. and Clem, W. (2001) Thioredoxin acts as a B cell growth factor in channel catfish. *J. Immunol.*, **166**, 2937-2943.

- King, C. E. and Paulik, G. J. (1967) Dynamic model and the stimulation of ecological systems. *J. Theoret. Biol.*, **16**, 251-267.
- 木下滋晴 (2002) 珪藻 *Chaetoceros compressum* の熱ストレス応答に関する研究. 東京大学博士論文.
- 小磯雅彦, 日野明德 (2002) シオミズツボウムシの大量培養における増殖停滞の機構に関する研究. *水産増殖*, **50**, 197-204.
- 小磯雅彦, 吉川雅代, 桑田博, 萩原篤志 (2009) シオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* の親世代の餌料環境が次世代以降の生活史特性に与える影響. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **75**, 828-833.
- Lee, K. K., Murakawa, M., Takahashi, S., Tsubuki, S., Kawashima, S., Sakamaki, K. and Yonehara, S. (1998) Purification, molecular cloning, and characterization of TRP32, a novel thioredoxin-related mammalian protein of 32 kDa. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19160-19166.
- Liu, J., Lewitus, A. J., Brown, P. and Wilde, S. B. (2008) Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton. *Harmful Algae*, **7**, 1-10.
- Lubzens, E. (1987) Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, **147**, 245-255.
- Lubzens, E., Tandler, A. and Minkoff, G. (1989) Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, **186/187**, 387-400.
- Massie, M. T., Blasius, B., Weithoff, G., Gaedke, U. and Fussmann, G. F. (2010) Cycles, phase synchronization, and entrainment in

single-species phytoplankton populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4236-4241.

Meng, L., Wong, J. H., Feldman, L. J., Lemaux, P. G. and Buchanan, B. B. (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3900-3905.

Mouget, J., Dakhama, A., Lavoie, M. C. and Noüe, J. (1995) Algal growth enhancement by bacteria. Is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol. Ecol.*, **18**, 35-44.

Oo, A. K. S., Kaneko, G., Hirayama, M., Kinoshita, S. and Watabe, S. (2010) Identification of genes differentially expressed by calorie restriction in the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *J. Comp. Physiol. B*, **180**, 105-116.

Ozaki, Y., Kaneko, G., Yanagawa, Y. and Watabe, S. (2010) Calorie restriction in the rotifer *Brachionus plicatilis* enhances hypoxia tolerance in association with the increased mRNA levels of glycolytic enzymes. *Hydrobiologia*, **649**, 267-277.

Parker, B. C. and Bold, H. C., (1961) Biotic relationship between soil algae and other microorganisms. *Am. J. Bot.*, **48**, 185-197.

Powis, G., Mustacich, D. and Coon, A. (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 312-322.

- Powis, G. and Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 261-295.
- Preston, B. L. and Snell, T. W. (2001) Direct and indirect effects of sublethal toxicant exposure on population dynamics of freshwater rotifers: a modeling approach. *Aquat. Toxicol.*, **52**, 87-99.
- Schröder, T. and Gilbert, J. J. (2004) Transgenerational plasticity for sexual reproduction and diapauses in the life cycle of monogonont rotifers: intraclonal, intraspecific and interspecific variation in the response to crowding. *Funct. Ecol.*, **18**, 458-466.
- Serra, M., Smith, H. A., Weitz, J. S. and Snell, T. W. (2010) Analysing threshold effects in the sexual dynamics of cyclically pathenogenetic rotifer populations. *Hydrobiologia*, doi:10.1007/s10750-010-0517-z.
- Snell, T. W. and Hoff, F. H. (1985) The effect of environmental factors on resting egg production in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. World Maricul. Soc.*, **16**, 484-497.
- Snell, T. W. (1987) Sex, population dynamics and resting egg production in rotifers. *Hydrobiologia*, **144**, 105-111.
- Snell, T. W. and Boyer, E. M. (1988) Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **124**, 73-85.
- Snell, T. W. and Persoone, G. (1989) Acute toxicity bioassays using rotifers. I . A test for brackish and marine environments with *Brachionus*

plicatilis. *Aquat. Toxicol.*, **14**, 65-80.

Snell, T. W. and Janssen, C. R. (1995) Rotifers in ecotoxicology: a review.

Hydrobiologia, **313/314**, 231-247.

Snell, T. W., Kubanek, J., Carter, W., Payne, A. B., Kim, J., Hicks, M. K. and

Stelzer, C. P. (2006) A protein signal triggers sexual reproduction in

Brachionus plicatilis (Rotifera). *Mar. Biol.*, **149**, 763-773.

Snell, T. W., Shearer, T. L., Smith, H. A., Kubanek, J., Gribble, K. E. and

Welch, D. B. M. (2009) Genetic determinations of mate recognition

in *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *BMC Biol.*, **7**, 60.

Stelzer, C. P. and Snell, T. W. (2003) Induction of sexual reproduction in

Brachionus plicatilis (monogononta, rotifer) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 939-943.

Subow, N. N. (1931) Oceanographical tables. USSR, Oceanographic Institute,

Hydrometeorological Commission, Moscow, 208 pp.

Suga, K., Welch, D. M., Tanaka, Y., Sakakura, Y. and Hagiwara, A. (2007)

Analysis of expressed sequence tags of the cyclically

parthenogenetic rotifer *Brachionus plicatilis*. *PLoS ONE*, **8**, e671.

Takeda, S. and Watanabe, K. (1997) Growth response Antarctic

phytoplankton to iron enrichment. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*,

10, 14-24.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W:

improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

友田努, 小磯雅彦, 陳昭能, 竹内俊郎 (2006) 増殖ステージが異なるワムシを摂餌したヒラメ仔魚の発育と形態以上の出現. *日水誌*, **72**, 725-733.

Vassilev, N., Vassileva, M. and Nikolaeva, I. (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 137-144.

Williams, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K. and Schirmer, R. H. (2000) Thioredoxin reductase, two models of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6110-6117.

Wollman, E. E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J. P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P., Galibert, F., Bertoglio, J. and Fradelizi, D. (1988) Cloning and expression of cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15506-15512.

Yamasaki, S., Secor, D. H. and Hirata, H. (1987) Population growth of two types of rotifer (L and S) *Brachionus plicatilis* at different dissolved oxygen levels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1303.

Yoshimatsu, T., Higuchi, T., Zhang, D., Forthes, N. R., Tanaka, K. and Yoshimura, K. (2006) Effect of dietary cobalt supplementation on the population growth of rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Fish.*

Sci., **72**, 214-216.

Yoshinaga, T., Hagiwara, A. and Tsukamoto, K. (1999) Effect of conditioned media on the asexual reproduction of the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *Hydrobiologia*, **412**, 103-110.

Yoshinaga, T., Hagiwara, A. and Tsukamoto, K. (2001) Why do rotifer populations present a typical sigmoid growth curve? *Hydrobiologia*, **446/447**, 99-105.

Yoshinaga, T., Kaneko, G., Kinoshita, S., Tsukamoto, K. and Watabe, S. (2003) The molecular mechanisms of life history alterations in a rotifer: a novel approach in population dynamics. *J. Comp. Physiol. B*, **136**, 715-722.

Yoshinaga, T., Kaneko, G., Kinoshita, S., Furukawa, S., Tsukamoto, K. and Watabe, S. (2005) Insulin-like growth factor signaling pathway involved in regulating longevity of rotifers. *Hydrobiologia*, **546**, 347-352.

吉永龍起 (2010) シオミズツボワムシの生活史特性と個体群の大変動. *日水誌*, **76**, 617-620.

Yoshioka, J., Schulze, P. C., Cupesi, M., Sylvan, J. D., MacGillivray, C., Gannon, J., Hung, H. and Lee, R. T. (2004) Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation*, **109**, 2581-2586.

Yu, J. P. and Hirayama, K. (1986) The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1509-1513.

Yúfera, M. and Navarro, N. (1995) Population growth dynamics of the rotifer *Brachionus plicatilis* cultured in non-limiting food condition. *Hydrobiologia*, **313/314**, 399-405.

Table 1-1A The number of rotifers cultured in conditioned medium (CM) from various growth phases and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	Growth stage				Control (1/2 ASW)
	I	II	III	IV	
1	2.4 \pm 0.5	2.8 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	7.0 \pm 1.9 ^a	10.8 \pm 2.4 ^{ab}	3.8 \pm 0.8 ^{ac}	2.0 \pm 0.0 ^{cd}	3.4 \pm 0.5 ^{acde}
3	25.4 \pm 4.0 ^a	38.4 \pm 5.5 ^b	16.6 \pm 3.4 ^{ac}	—*	14.2 \pm 2.6 ^{acd}
4	42.4 \pm 4.9 ^a	60.4 \pm 3.4 ^b	28.8 \pm 6.1 ^{ac}	—*	28.4 \pm 4.8 ^{acd}
5	86.4 \pm 8.4 ^a	113.0 \pm 11.0 ^b	42.0 \pm 7.6 ^c	—*	42.0 \pm 7.6 ^{cd}

* All individuals of experimental group IV were deceased after 2 days

Growth stage I, II, III and IV indicate an early exponential growth, an exponential growth, stationary phase and senescent phases, respectively

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-1B The number of rotifers cultured in CM from various growth phases and 1/2 ASW (control) for 5 days

	Growth stage			Control (1/2 ASW)
	I	II	III	
Number of rotifers (mL ⁻¹)	80	98	37	51
	99	119	32	43
	90	124	51	37
	78	105	43	47
	85	119	47	32
Mean \pm SD	86.4 \pm 8.4 ^a	113.0 \pm 11.0 ^b	42.0 \pm 7.6 ^c	42.0 \pm 7.6 ^{cd}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.001$)

Table 1-2 The number of rotifers cultured in CM from rotifers, CM from algae and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)		
	CM		Control (1/2 ASW)
	From rotifers	From algae	
1	2.4 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	7.0 \pm 1.9 ^a	3.8 \pm 0.8 ^b	3.4 \pm 0.5 ^{bc}
3	19.0 \pm 4.0 ^a	10.8 \pm 1.6 ^b	10.4 \pm 3.2 ^{bc}
4	42.4 \pm 4.9 ^a	29.4 \pm 3.4 ^b	27.8 \pm 6.1 ^{bc}
5	81.2 \pm 7.4 ^a	42.2 \pm 5.7 ^b	41.6 \pm 5.2 ^{bc}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-3A The number of rotifers cultured in 25-100% CM and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	CM				Control (1/2 ASW)
	25%	50%	75%	100%	
1	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0
2	3.6 \pm 0.5 ^a	4.4 \pm 0.5 ^{ab}	5.6 \pm 0.5 ^{bc}	7.4 \pm 1.8 ^{cd}	3.4 \pm 0.5 ^{abe}
3	11.0 \pm 1.6 ^a	14.4 \pm 3.2 ^{ab}	17.2 \pm 2.9 ^{bc}	20.2 \pm 3.7 ^{cd}	10.2 \pm 2.9 ^{abe}
4	30.8 \pm 3.4 ^a	36.8 \pm 5.9 ^b	39.8 \pm 4.9 ^{bc}	40.0 \pm 5.7 ^{bcd}	25.4 \pm 6.2 ^{ae}
5	56.0 \pm 8.0 ^a	73.4 \pm 3.7 ^b	81.6 \pm 7.2 ^{bc}	82.6 \pm 7.4 ^{bcd}	43.6 \pm 8.3 ^{ae}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-3B The number of rotifers cultured in 25-100% CM and 1/2 ASW (control) for 5 days

	CM				Control (1/2 ASW)
	25%	50%	75%	100%	
Number of rotifers (mL ⁻¹)	59	76	83	84	45
	44	68	88	95	53
	64	72	90	84	39
	55	71	72	79	49
	59	77	79	72	32
Mean \pm SD	56.0 \pm 8.0 ^a	73.4 \pm 3.7 ^b	81.6 \pm 7.2 ^{bc}	82.6 \pm 7.4 ^{bcd}	43.6 \pm 8.3 ^{ae}

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-b, $p < 0.05$; a-c, $p < 0.001$; a-d, $p < 0.001$; b-e, $p < 0.01$; c-e, $p < 0.001$; d-e, $p < 0.001$)

Table 1-4A The number of rotifers cultured in CM treated at various temperatures and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	CM				
	Without heat treatment	40°C	60°C	80°C	Control (1/2 ASW)
1	2.6 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	7.6 \pm 1.5 ^a	7.0 \pm 1.0 ^{ab}	4.2 \pm 0.8 ^c	3.4 \pm 0.5 ^{cd}	3.4 \pm 0.5 ^{cde}
3	17.6 \pm 2.6 ^a	14.2 \pm 2.2 ^{ab}	11.8 \pm 2.3 ^{bc}	9.8 \pm 1.9 ^{cd}	9.8 \pm 1.6 ^{cde}
4	39.6 \pm 5.9 ^a	34.8 \pm 5.9	31.4 \pm 3.8	26.6 \pm 4.9 ^b	26.2 \pm 3.3 ^c
5	83.8 \pm 8.4 ^a	74.0 \pm 7.5 ^{ab}	59.0 \pm 8.3 ^{bc}	48.2 \pm 8.7 ^{bcd}	48.0 \pm 7.0 ^{cde}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-4B The number of rotifers cultured in CM treated at various temperatures and ASW (control) for 5 days

Number of rotifers (mL ⁻¹)	CM					Control (1/2 ASW)
	Without heat treatment					
	40°C	60°C	80°C	80°C	80°C	
	84	72	65	49	49	49
	87	76	70	53	52	52
	96	83	59	44	57	57
	77	69	50	58	42	42
	75	63	51	38	40	40
Mean \pm SD	83.8 \pm 8.4 ^a	74.0 \pm 7.5 ^{ab}	59.0 \pm 8.3 ^{bc}	48.2 \pm 8.7 ^{bcd}	48.0 \pm 7.0 ^{cde}	48.0 \pm 7.0 ^{cde}

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-c, $p < 0.05$; a-d, $p < 0.01$; a-e, $p < 0.001$; b-d, $p < 0.01$; b-e, $p < 0.01$)

Table 1-5A The number of rotifers cultured in CM filtered through various molecular weight cut off membranes and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental groups (mean \pm SD)			
	Without treatment	CM		Control (1/2 ASW)
		<30 kDa	<10 kDa	<1 kDa
1	2.6 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0
2	7.6 \pm 1.1 ^a	6.0 \pm 1.0 ^{ab}	4.6 \pm 1.1 ^{bc}	3.4 \pm 0.5 ^{cde}
3	17.4 \pm 2.4 ^a	13.2 \pm 2.4 ^b	10.6 \pm 2.1 ^{bc}	7.8 \pm 1.5 ^{cde}
4	38.4 \pm 4.2 ^a	31.6 \pm 4.3 ^{ab}	22.0 \pm 4.4 ^c	18.2 \pm 2.6 ^{cde}
5	87.0 \pm 5.1 ^a	66.6 \pm 7.3 ^b	55.0 \pm 7.8 ^{bc}	41.4 \pm 7.1 ^{de}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-5B The number of rotifers cultured in CM filtered through various molecular weight cut off membranes and ASW (control) for 5 days

Number of rotifers (mL ⁻¹)	CM				Control (1/2 ASW)
	Without treatment	<30 kDa	<10 kDa	<1 kDa	
	94	69	54	34	39
	86	70	63	48	52
	86	63	49	44	44
	80	56	46	38	39
	89	75	63	40	33
Mean \pm SD	87.0 \pm 5.1 ^a	66.6 \pm 7.3 ^b	55.0 \pm 7.8 ^{bc}	40.8 \pm 5.4 ^d	41.4 \pm 7.1 ^{de}

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-b, $p < 0.01$; a-c, $p < 0.001$; a-d, $p < 0.001$; a-e, $p < 0.001$; b-e, $p < 0.001$; c-d, $p < 0.05$; c-e, $p < 0.05$)

Table 1-6A The number of rotifers cultured in CM treated with proteinase K and in 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)		
	CM		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Proteinase K	
1	2.8 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.3 \pm 0.5
2	7.5 \pm 1.9 ^a	3.0 \pm 0.8 ^b	4.0 \pm 0.8 ^{bc}
3	17.5 \pm 4.9 ^a	7.5 \pm 1.3 ^b	9.3 \pm 1.9 ^{bc}
4	40.8 \pm 5.9 ^a	19.5 \pm 3.4 ^b	25.5 \pm 3.8 ^{bc}
5	81.3 \pm 9.3 ^a	29.5 \pm 3.5 ^b	45.0 \pm 4.1 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-6B The number of rotifers cultured in CM treated with proteinase K and in 1/2 ASW (control) for 5 days

	CM		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Proteinase K	
	81	33	51
Number of rotifers	94	26	44
(mL ⁻¹)	78	27	42
	72	32	43
Mean \pm SD	81.3 \pm 9.3 ^a	29.5 \pm 3.5 ^b	45.0 \pm 4.1 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-b, $p < 0.001$; a-c, $p < 0.001$; b-c, $p < 0.05$)

Table 1-7A The number of rotifers cultured in CM, water-soluble fraction of CM and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)		
	CM		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Water-soluble fraction	
1	2.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6	2.0 \pm 0.0
2	7.0 \pm 0.8 ^a	6.5 \pm 0.6 ^{ab}	3.8 \pm 0.5 ^c
3	17.3 \pm 4.0 ^a	15.5 \pm 1.3 ^{ab}	9.5 \pm 1.3 ^c
4	36.5 \pm 4.7 ^a	35.3 \pm 4.8 ^{ab}	21.3 \pm 2.2 ^c
5	85.8 \pm 6.3 ^a	84.8 \pm 7.1 ^{ab}	44.5 \pm 5.4 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 1-7B The number of rotifers cultured in CM, water-soluble fraction of CM and 1/2 ASW (control) for 5 days

	CM		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Water-soluble fraction	
	93	87	44
Number of rotifers	81	76	52
(mL ⁻¹)	80	83	43
	89	93	39
Mean \pm SD	85.8 \pm 6.3 ^a	84.8 \pm 7.1 ^{ab}	44.5 \pm 5.4 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-1 The number of rotifers cultured in 0.1-100% crude extract (CE) and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	CE				Control (1/2 ASW)
	0.1%	1%	10%	100%	
1	2.0 \pm 0.0	2.2 \pm 0.4	2.6 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	3.6 \pm 0.5 ^a	4.4 \pm 0.9 ^{ab}	6.0 \pm 1.0 ^c	—*	3.6 \pm 0.5 ^{ade}
3	9.0 \pm 1.2 ^a	9.6 \pm 2.1 ^{ab}	12.4 \pm 1.8 ^c	—*	8.2 \pm 1.3 ^{cde}
4	18.4 \pm 1.5 ^a	19.6 \pm 3.8 ^{ab}	27.0 \pm 2.9 ^c	—*	17.0 \pm 2.7 ^{cde}
5	49.0 \pm 2.6 ^a	49.2 \pm 5.6 ^{ab}	66.6 \pm 3.4 ^c	—*	47.4 \pm 4.9 ^{cde}

* All individuals of experimental group 100% CE were deceased after 2 days

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-2 The number of rotifers cultured in 10-100% CE and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)										Control (1/2ASW)
	CE										
	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	
1	2.4 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	5.8 \pm 0.8 ^a	6.8 \pm 0.8 ^{ab}	5.4 \pm 1.5 ^{ac}	4.4 \pm 0.5 ^{cd}	3.6 \pm 0.5 ^{de}	3.4 \pm 0.5 ^{ef}	2.8 \pm 0.8 ^{efg}	2.2 \pm 0.4 ^{gh}	—*	—*	3.6 \pm 0.5 ⁱ
3	12.8 \pm 2.2 ^a	17.0 \pm 2.7 ^b	12.8 \pm 3.3 ^{ac}	11.4 \pm 2.5 ^{acd}	7.8 \pm 1.5 ^{de}	6.6 \pm 0.9 ^{ef}	4.6 \pm 1.5 ^{fg}	3.6 \pm 0.9 ^{gh}	—*	—*	7.6 \pm 1.1 ⁱ
4	25.8 \pm 4.1 ^a	33.8 \pm 5.4 ^b	28.2 \pm 6.3 ^{abc}	24.6 \pm 4.2 ^{acd}	18.0 \pm 1.9 ^{de}	13.2 \pm 2.4 ^f	6.6 \pm 1.1 ^{fg}	5.2 \pm 0.8 ^{gh}	—*	—*	16.8 \pm 2.8 ⁱ
5	50.2 \pm 4.7 ^a	64.4 \pm 6.0 ^b	60.0 \pm 5.0 ^{bc}	55.6 \pm 4.4 ^{acd}	46.0 \pm 5.3 ^{ade}	18.0 \pm 3.4 ^f	9.0 \pm 1.6 ^g	6.0 \pm 0.7 ^{gh}	—*	—*	36.8 \pm 5.1 ⁱ

* All individuals of experimental group 100% CE were deceased after 2 days

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-3A The number of rotifers cultured in 0.1-100% CE and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)					
	CE					Control (1/2 ASW)
	5%	10%	15%	20%	25%	
1	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.5	2.6 \pm 0.5	2.8 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0
2	3.8 \pm 0.4 ^a	4.0 \pm 0.7 ^{ab}	6.4 \pm 0.9 ^{ac}	7.2 \pm 0.4 ^{cd}	7.4 \pm 1.1 ^{de}	3.4 \pm 0.5 ^{abf}
3	9.8 \pm 0.8 ^a	10.6 \pm 2.7 ^{ab}	13.6 \pm 2.5 ^{bc}	17.2 \pm 2.9 ^d	18.2 \pm 3.1 ^{de}	9.0 \pm 1.2 ^{abf}
4	20.0 \pm 2.7 ^a	22.6 \pm 5.3 ^{ab}	28.4 \pm 5.1 ^{bc}	36.8 \pm 6.4 ^d	38.4 \pm 6.3 ^{de}	19.6 \pm 3.2 ^{abf}
5	48.0 \pm 5.6 ^a	52.4 \pm 4.7 ^{ab}	59.2 \pm 5.5 ^{abc}	63.4 \pm 8.8 ^{bcd}	66.6 \pm 7.8 ^{cde}	41.6 \pm 8.4 ^{af}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-3B The number of rotifers cultured in 0.1-100% CE and 1/2 ASW (control) for 5 days

	CE					Control (1/2 ASW)
	5%	10%	15%	20%	25%	
Number of rotifers (mL ⁻¹)	43	57	59	75	71	48
	47	52	54	63	64	34
	49	50	62	56	78	37
	57	57	54	54	59	36
	44	46	67	69	61	53
Mean \pm SD	48.0 \pm 5.6 ^a	52.4 \pm 4.7 ^{ab}	59.2 \pm 5.5 ^{abc}	63.4 \pm 8.8 ^{bcd}	66.6 \pm 7.8 ^{cde}	41.6 \pm 8.4 ^{af}

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-d, $p < 0.05$; a-e, $p < 0.01$; b-e, $p < 0.05$; b-f, $p < 0.01$; c-f, $p < 0.01$; d-f, $p < 0.01$; e-f, $p < 0.001$)

Table 2-4A The number of rotifers cultured in CE treated at various temperatures and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	CE				Control (1/2 ASW)
	Without heat treatment	40°C	60°C	80°C	
1	2.6 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	7.4 \pm 1.1 ^a	6.6 \pm 1.1 ^{ab}	4.2 \pm 0.4 ^c	3.8 \pm 0.8 ^{cd}	3.8 \pm 0.8 ^{cde}
3	17.0 \pm 3.5 ^a	13.8 \pm 2.8 ^b	10.4 \pm 1.1 ^c	8.6 \pm 1.7 ^{cd}	8.4 \pm 1.1 ^{cde}
4	35.2 \pm 6.2 ^a	25.2 \pm 6.2 ^a	20.2 \pm 2.4 ^b	18.0 \pm 2.3 ^{bc}	18.0 \pm 1.9 ^{bcd}
5	60.2 \pm 8.1 ^a	49.4 \pm 7.5 ^a	44.4 \pm 8.3 ^b	40.2 \pm 7.5 ^{bc}	40.8 \pm 4.8 ^{bcd}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-4B The number of rotifers cultured in CE treated at various temperatures and 1/2 ASW (control) for 5 days

	CE				Control (1/2 ASW)
	Without heat treatment	40°C	60°C	80°C	
Number of rotifers (mL ⁻¹)	51	55	35	42	39
	61	39	38	30	35
	73	49	56	47	40
	59	46	45	35	42
	57	58	48	47	48
Mean \pm SD	60.2 \pm 8.1 ^a	49.4 \pm 7.5 ^a	44.4 \pm 8.3 ^b	40.2 \pm 7.5 ^{bc}	40.8 \pm 4.8 ^{bcd}

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-b, $p < 0.05$; a-c, $p < 0.01$; a-d, $p < 0.01$)

Table 2-5A The number of rotifers cultured in CE filtered through various molecular weight cut off membranes and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)				
	CE				Control (1/2 ASW)
	Without treatment	<30 kDa	<10 kDa	<1 kDa	
1	2.4 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
2	5.4 \pm 1.1 ^a	4.6 \pm 0.9 ^{ab}	3.4 \pm 0.5 ^c	3.2 \pm 0.4 ^{cd}	3.2 \pm 0.4 ^{cde}
3	12.4 \pm 2.3 ^a	10.4 \pm 2.5 ^{ab}	7.2 \pm 0.8 ^c	6.2 \pm 1.1 ^{cd}	6.0 \pm 1.2 ^{cde}
4	26.8 \pm 4.9 ^a	22.6 \pm 5.7 ^{ab}	15.4 \pm 2.7 ^{bc}	13.2 \pm 2.6 ^{cd}	12.6 \pm 2.8 ^{cde}
5	59.6 \pm 8.2 ^a	54.6 \pm 6.1 ^{ab}	43.8 \pm 6.5 ^{bc}	41.6 \pm 5.1 ^{cd}	39.2 \pm 8.5 ^{cde}

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-5B The number of rotifers cultured in CE filtered through various molecular weight cut off membranes and ASW (control) for 5 days

Number of rotifers (mL ⁻¹)	CE					Control (1/2 ASW)
	Without treatment	<30 kDa	<10 kDa	<1 kDa		
		70	49	42	35	41
	66	52	43	38	45	
	53	59	55	48	32	
	58	50	39	43	29	
	51	63	40	44	49	
Mean \pm SD	59.6 \pm 8.2 ^a	54.6 \pm 6.1 ^{ab}	43.8 \pm 6.5 ^{bc}	41.6 \pm 5.1 ^{cd}	39.2 \pm 8.5 ^{cde}	

Values in the same row followed by different letters are significantly different (a-c, $p < 0.01$; a-d, $p < 0.01$; a-e, $p < 0.01$; b-d, $p < 0.05$; b-e, $p < 0.05$)

Table 2-6 The number of rotifers cultured in CM treated with proteinase K and in 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)		
	CE		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Proteinase K	
1	2.8 \pm 0.5	2.0 \pm 0.0	2.3 \pm 0.5
2	6.0 \pm 0.8 ^a	2.8 \pm 0.5 ^b	3.8 \pm 1.0 ^{bc}
3	13.8 \pm 1.3 ^a	5.5 \pm 0.6 ^b	8.0 \pm 0.8 ^b
4	29.0 \pm 3.2 ^a	10.5 \pm 1.3 ^b	18.3 \pm 3.1 ^b
5	59.0 \pm 7.8 ^a	29.0 \pm 4.5 ^b	45.0 \pm 7.5 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2-7 The number of rotifers cultured in CE, water-soluble fraction of CE and 1/2 ASW (control) for various culture days

Culture days	Number of rotifers of each experimental group (mean \pm SD)		
	CE		Control (1/2 ASW)
	Without treatment	Water-soluble fraction	
1	2.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6	2.0 \pm 0.0
2	6.5 \pm 0.6 ^a	6.0 \pm 0.8 ^{ab}	3.5 \pm 0.6 ^c
3	14.0 \pm 1.8 ^a	13.0 \pm 1.2 ^{ab}	7.8 \pm 1.0 ^c
4	30.5 \pm 4.4 ^a	27.3 \pm 2.2 ^{ab}	18.8 \pm 3.0 ^c
5	60.0 \pm 8.5 ^a	56.8 \pm 6.2 ^{ab}	41.5 \pm 7.0 ^c

Values in the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3-1 Nucleotide sequences of primers designed for cDNA cloning of the approximately 25 kDa protein

Primer	Sequence (5'-3')	Bases (bp)
Rotifer25kDa_F	ATGAGCTCAGTCGTACACGT	20
Rotifer25kDa_R	ATGATTGTTGTAGTGAACAT	20

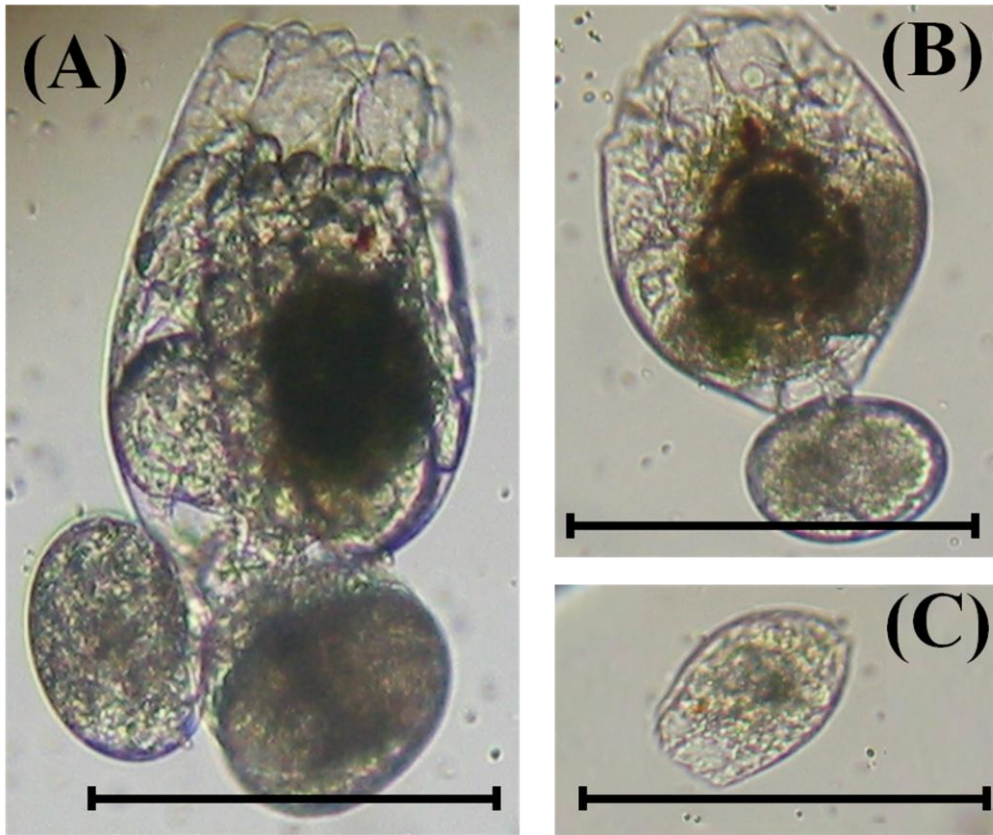


Fig. 1-1. The monogononta rotifer *Brachionus plicatilis* Obama strain. (A) and (B) indicate rotifers having amictic eggs, and (C) indicates a neonate (age <2 h) hatched from the rotifer. This neonate was used for the subsequent experiments. Scale bars indicate 100 μm.

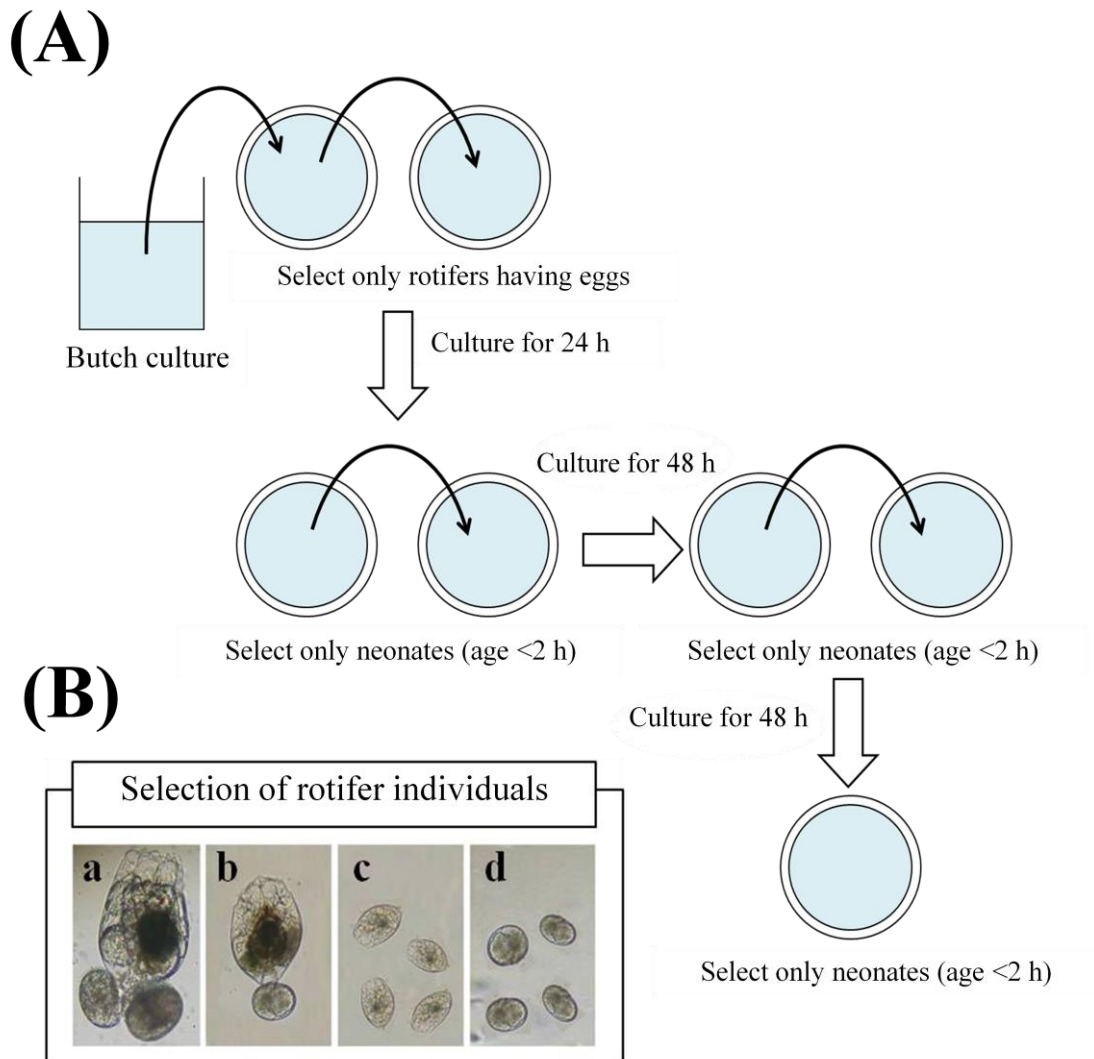


Fig. 1-2. Schematic representation of pre-cultured rotifers for the experiments. To obtain the population having the same age, the author performed the pre-culture. (A), rotifers having eggs were selected from a batch culture population at an exponential growth phase, transferred to each well of 12-well culture plates containing 3 mL 1/2 artificial seawater (ASW), and cultured at 25°C for 24 h under darkness with algae at approximately 7×10^6 cells mL⁻¹ at the start. Neonates (age <2 h) hatched from rotifers were individually cultured under the same conditions except 48 h during the pre-experimental period, and their neonates were used for the subsequent experiments. (B), selection of rotifer individuals for the experiments. Rotifer individuals of a, b, c and d indicate having two eggs, having one egg, neonates and eggs, respectively.

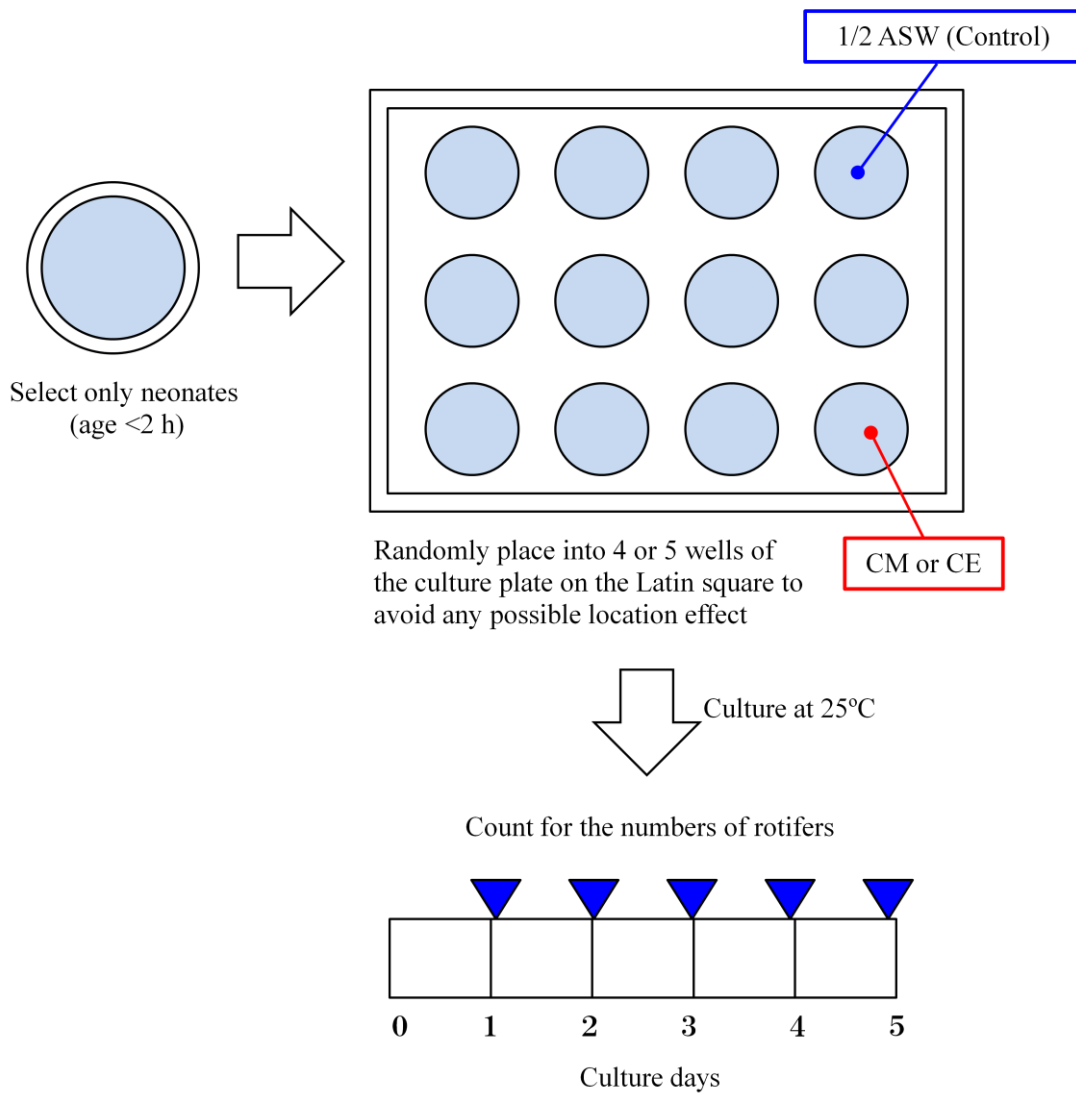


Fig. 1-3. Schematic representation of the experiments. Conditioned medium (CM) and crude extract (CE) were randomly placed into 4 or 5 wells of the culture plate on the Latin square to avoid any possible location effect. Then, 2 individuals of neonates (age $< 2 \text{ h}$) hatched from rotifers were poured into each well, cultured for 5 days and counted for the number of rotifers under a microscope everyday. The prey *C. regularis* in $50 \mu\text{L}$ was added to each well everyday at $7 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ without changing the medium.

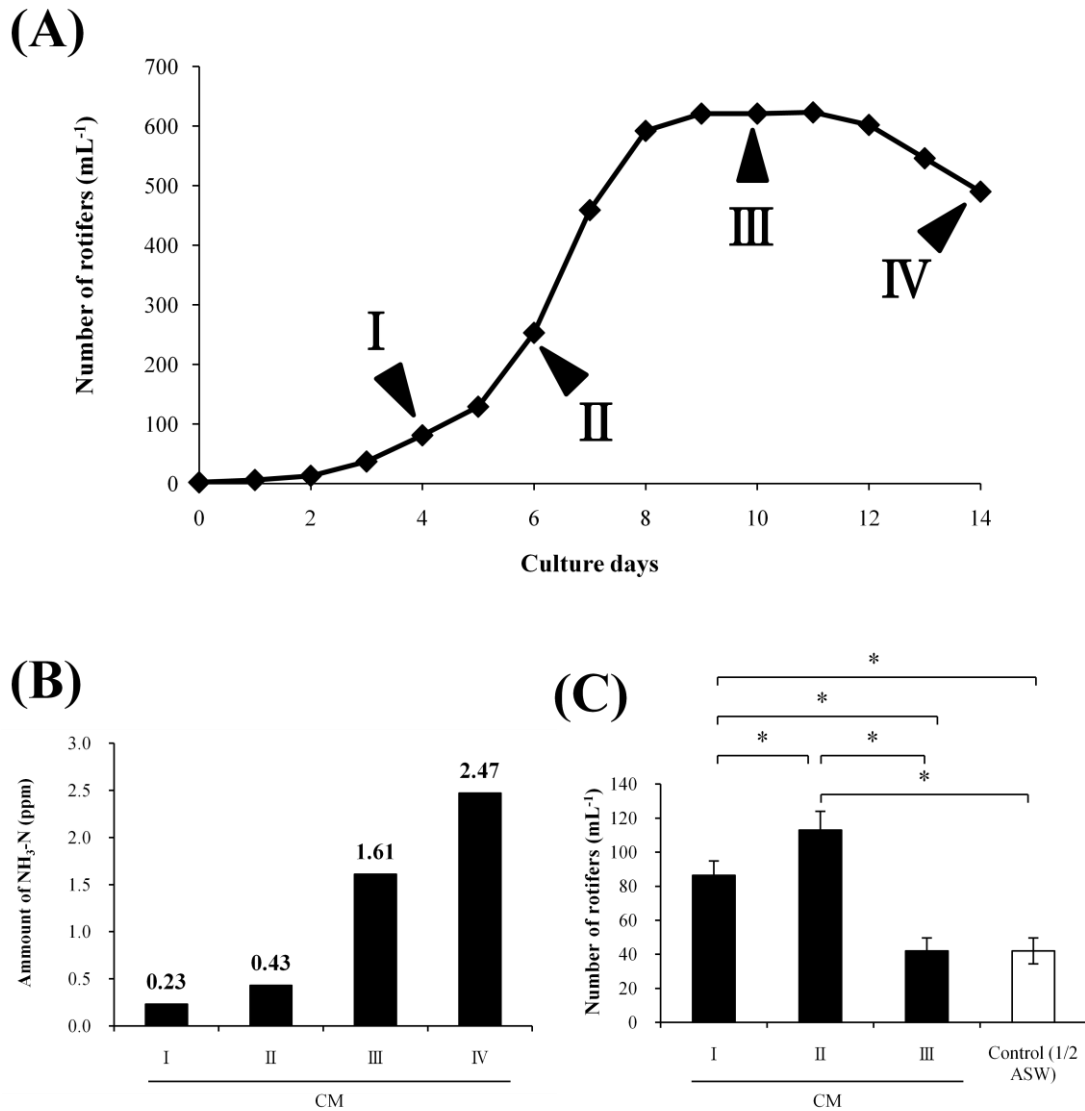


Fig. 1-4. The growth curve and growth-promoting activity of rotifers in CM. (A), the growth curve of rotifers. CMs were obtained from the culture media of rotifers at early exponential (I), exponential (II), stationary (III) and senescent phases (IV) (shown with arrowheads) and filtered through a 0.22 μm filter membrane. (B), the concentration of NH₃-N in CM. These concentrations were measured by the Nessler method using alkaline iodide. (C), growth-promoting activity based on the numbers of rotifers (mean \pm SD, n = 5) on day 5 after adding CM. CM from the decline phase killed all rotifers after 3 days. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

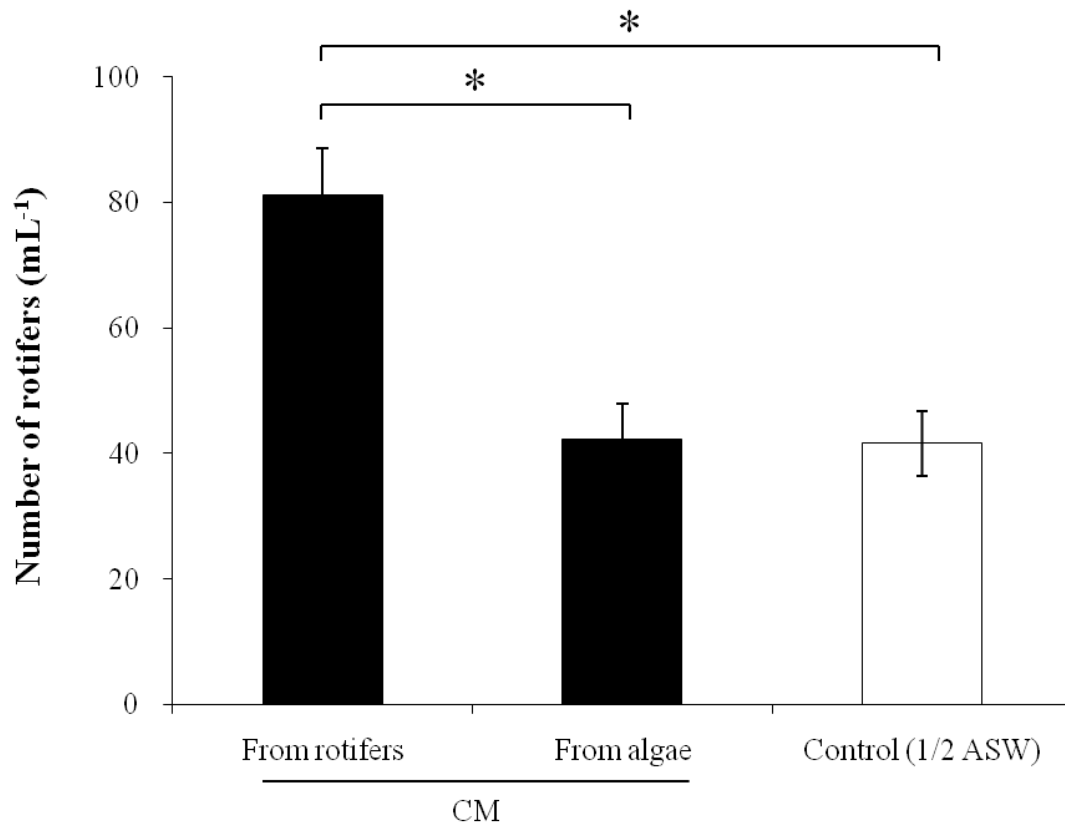


Fig. 1-5. The changes in the growth-promoting activity of rotifers of CM from rotifers, CM from algae and 1/2 ASW control. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates and subsequently the numbers of rotifers (mean \pm SD) were determined. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

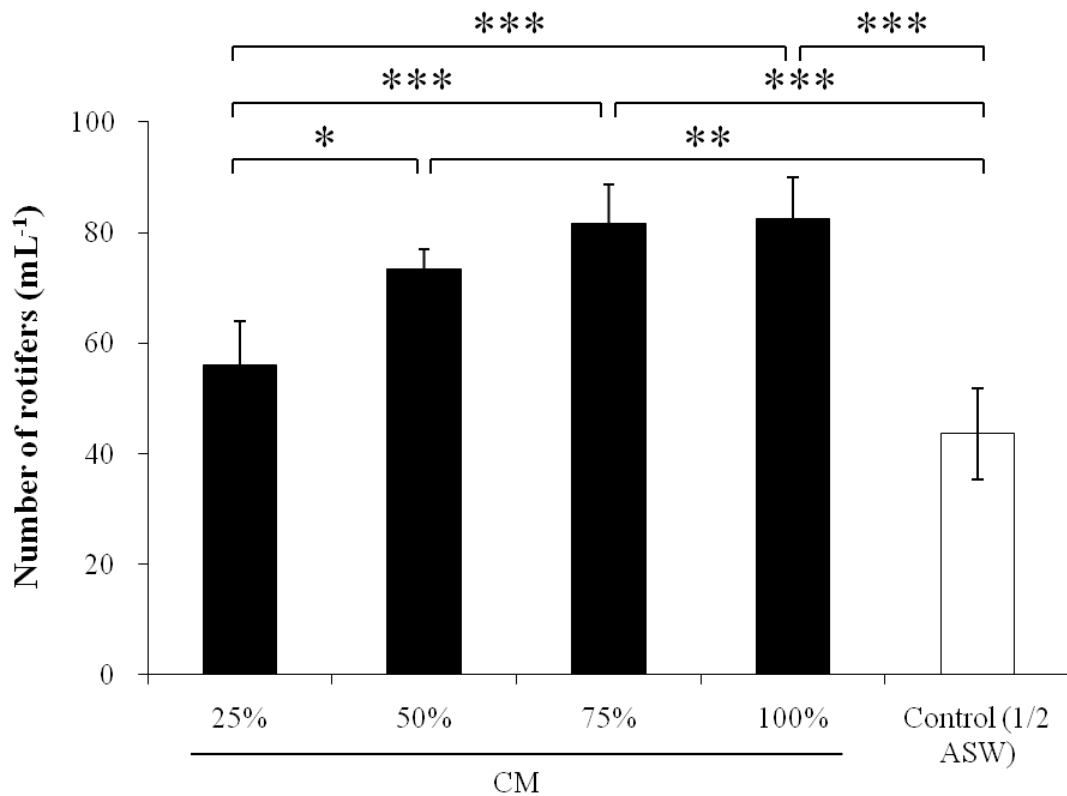


Fig. 1-6. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CM at various concentrations. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase. Rotifers were cultured in 25%, 50%, 75%, 100% CM at 25°C for 5 days in 12-well culture plates and subsequently the numbers of rotifers (mean \pm SD) were determined along with that of the 1/2 ASW control. CM were diluted by 1/2 ASW. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

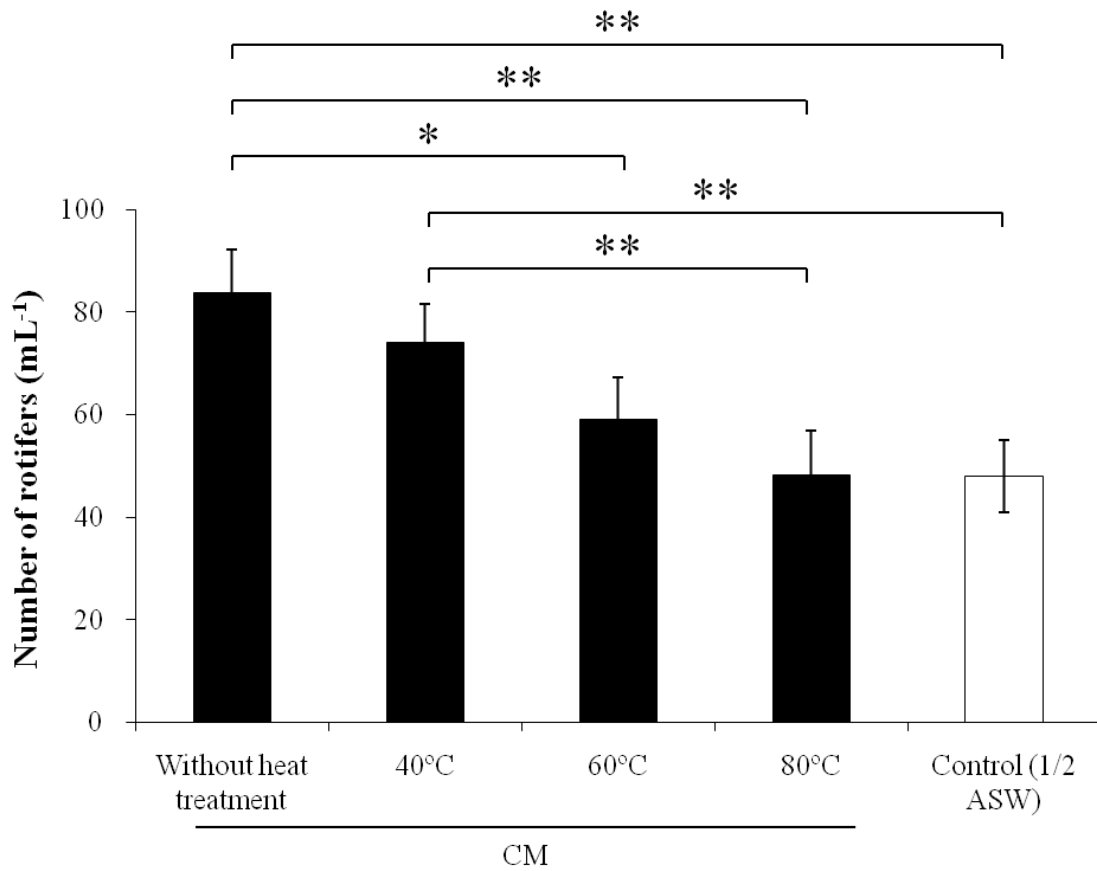


Fig. 1-7. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CM after heat treatment. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase and the numbers of rotifers (mean \pm SD) in CMs heated at 40°C, 60°C and 80°C for 60 min were determined along with that of the 1/2 ASW control after the culture at 25°C for 5 days. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

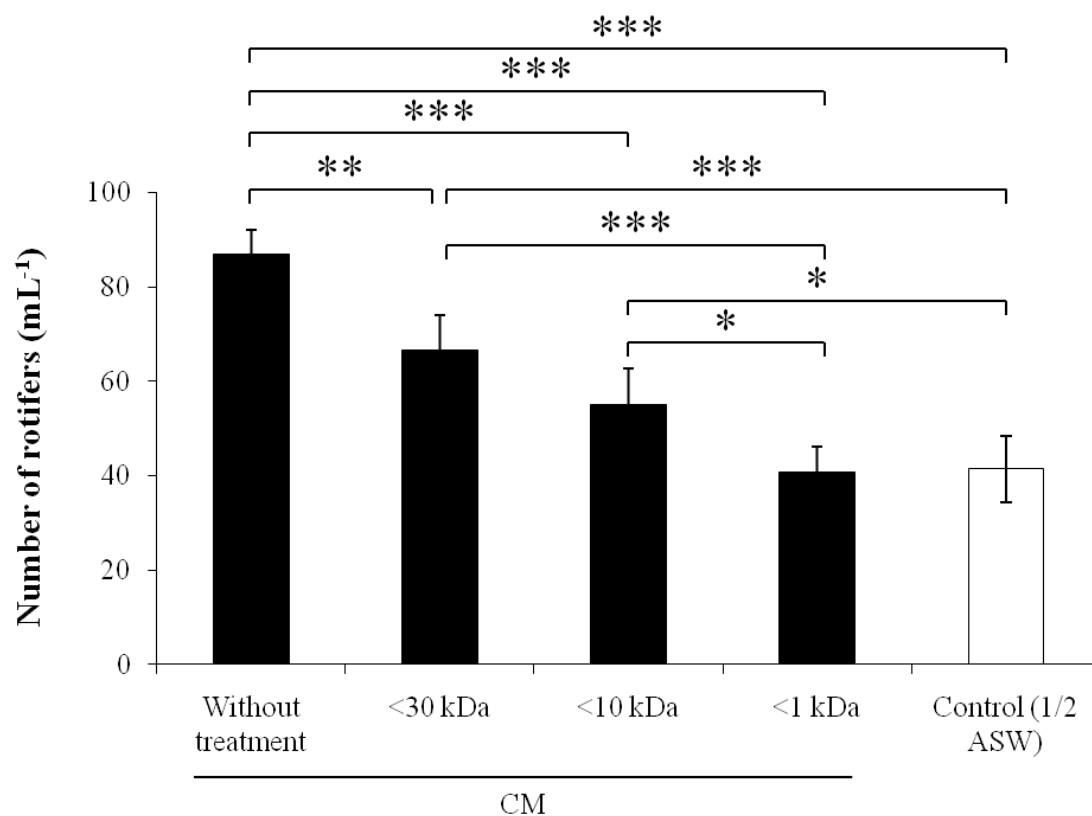


Fig. 1-8. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CM filtered through various molecular cut off membranes. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase and the numbers of rotifers (mean \pm SD) in CM without fractionation, and CMs of <30 kDa, <10 kDa and <1 kDa were determined along with that of the 1/2 ASW control after the culture at 25°C for 5 days. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

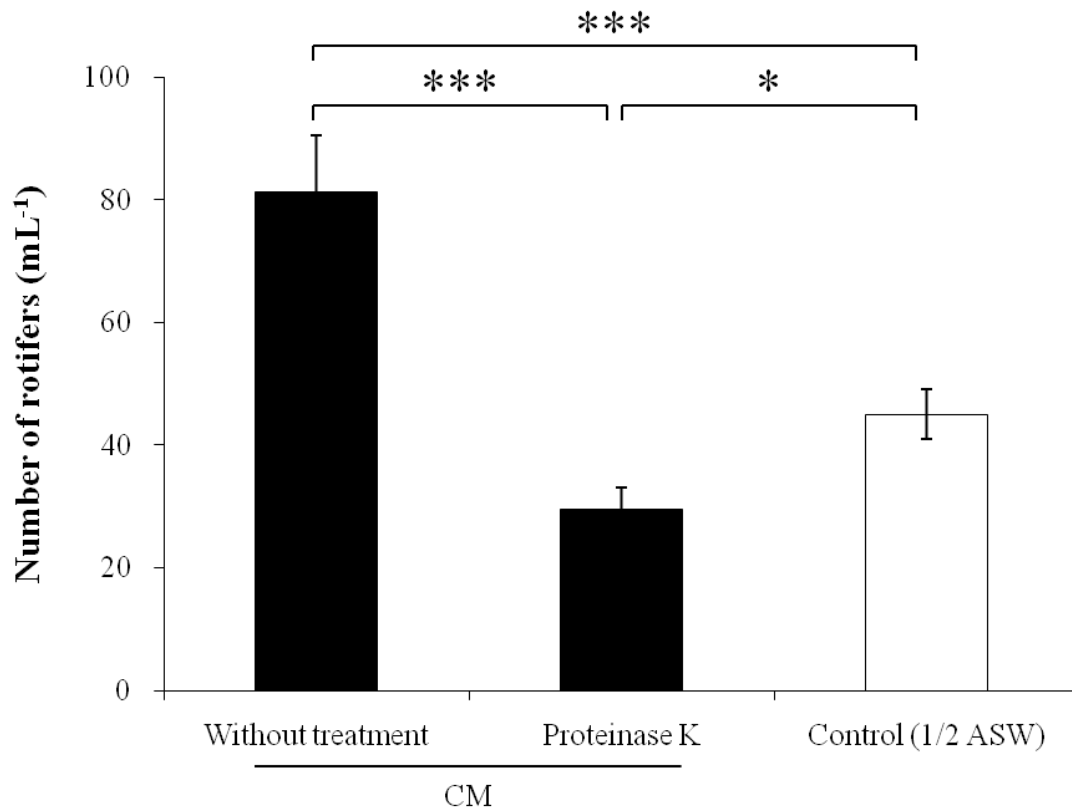


Fig. 1-9. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CM after treatment with proteinase K. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase and the numbers of rotifers (mean \pm SD) in CM without treatment and CM treated with 10 mg mL⁻¹ proteinase K at 37°C for 60 min were determined along with that of the 1/2 ASW control after the culture at 25°C for 5 days. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

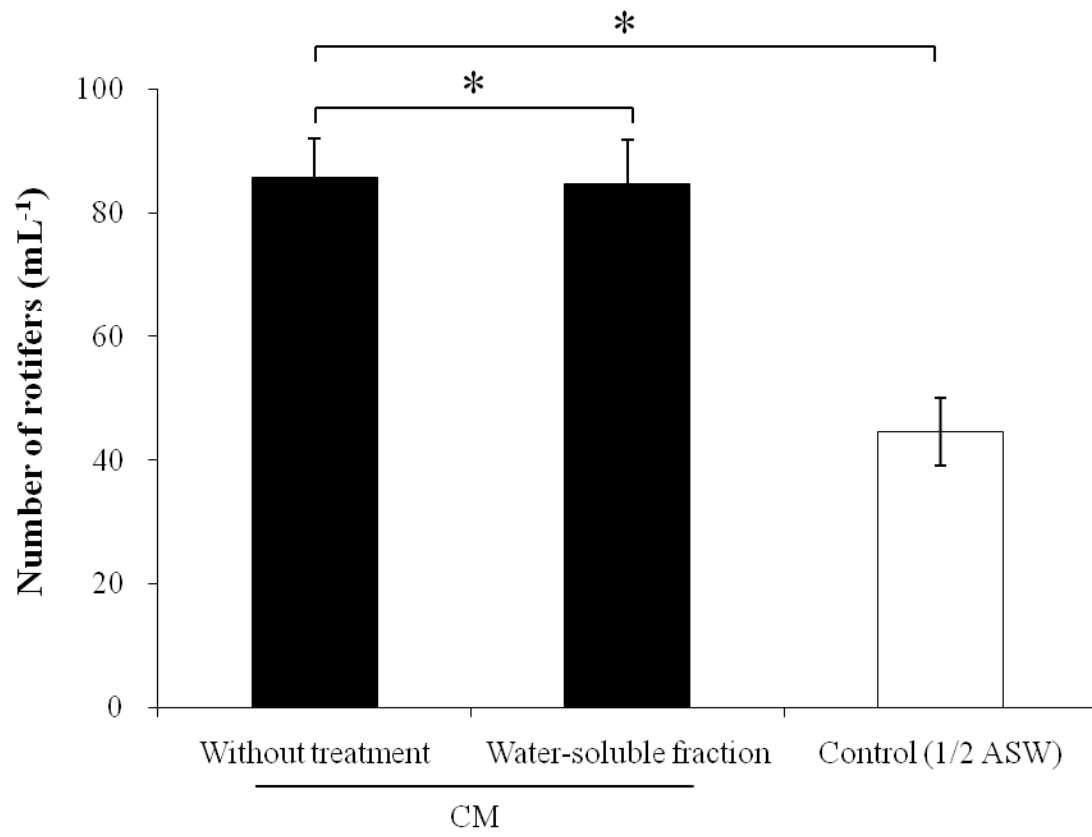


Fig. 1-10. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CM, water-soluble fraction of CM and 1/2 ASW control. CM was prepared from rotifers at the early exponential growth phase and the numbers of rotifers (mean \pm SD) in CM and water-soluble fraction CM after removing lipophilic substances with diethyl ether were determined along with that of the 1/2 ASW control after the culture 25°C for 5 days. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

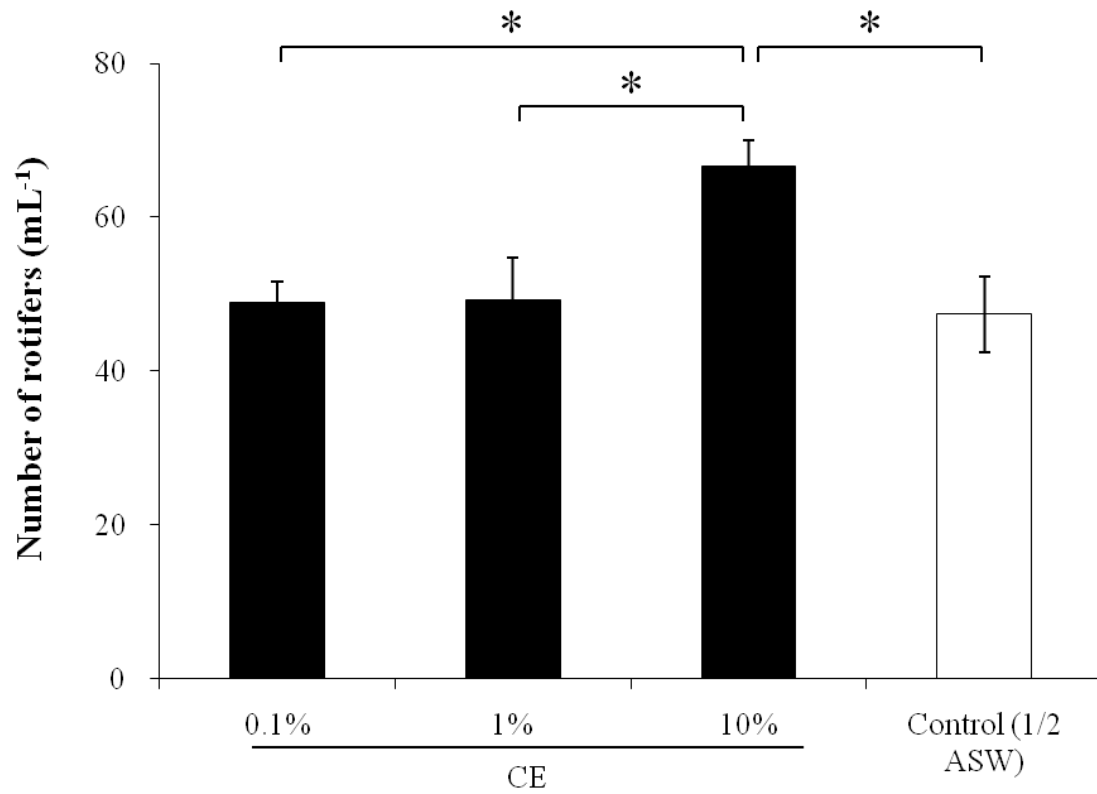


Fig. 2-1. The changes in the growth-promoting activity of the crude extract (CE) from rotifers at various concentrations. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. The numbers of rotifers (mean \pm SD) in 0.1%, 1% and 10% CE were determined along with that of the 1/2 ASW control. CEs were diluted by 1/2 ASW. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, Tukey's post hoc test).

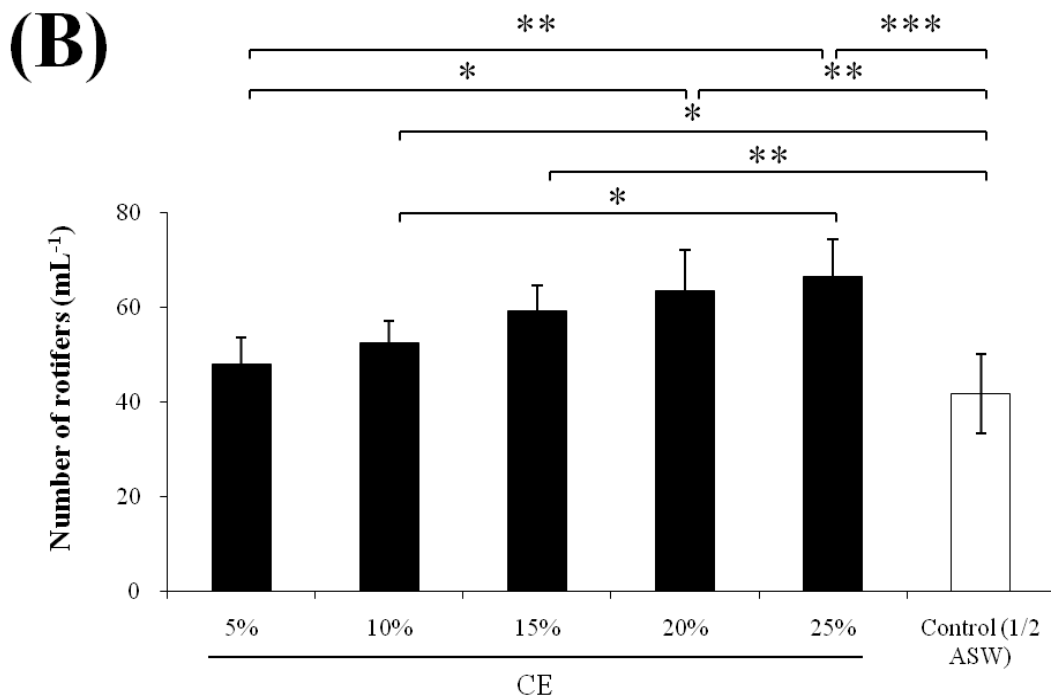
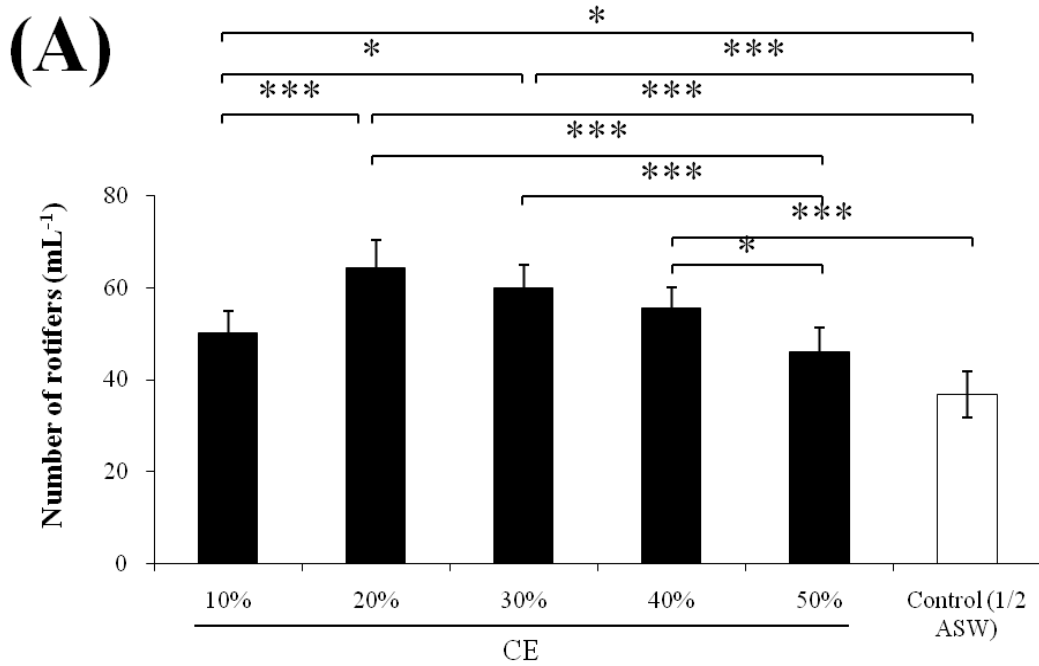


Fig. 2-2. The changes in the growth-promoting activity of CE from rotifers at various concentrations. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. (A), the numbers of rotifers (mean \pm SD) in 10-50% CE were determined along with that of the 1/2 ASW control. (B), the numbers of rotifers (mean \pm SD) in 5-25% CE were determined along with that of the 1/2 ASW control. CEs were diluted by 1/2 ASW. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

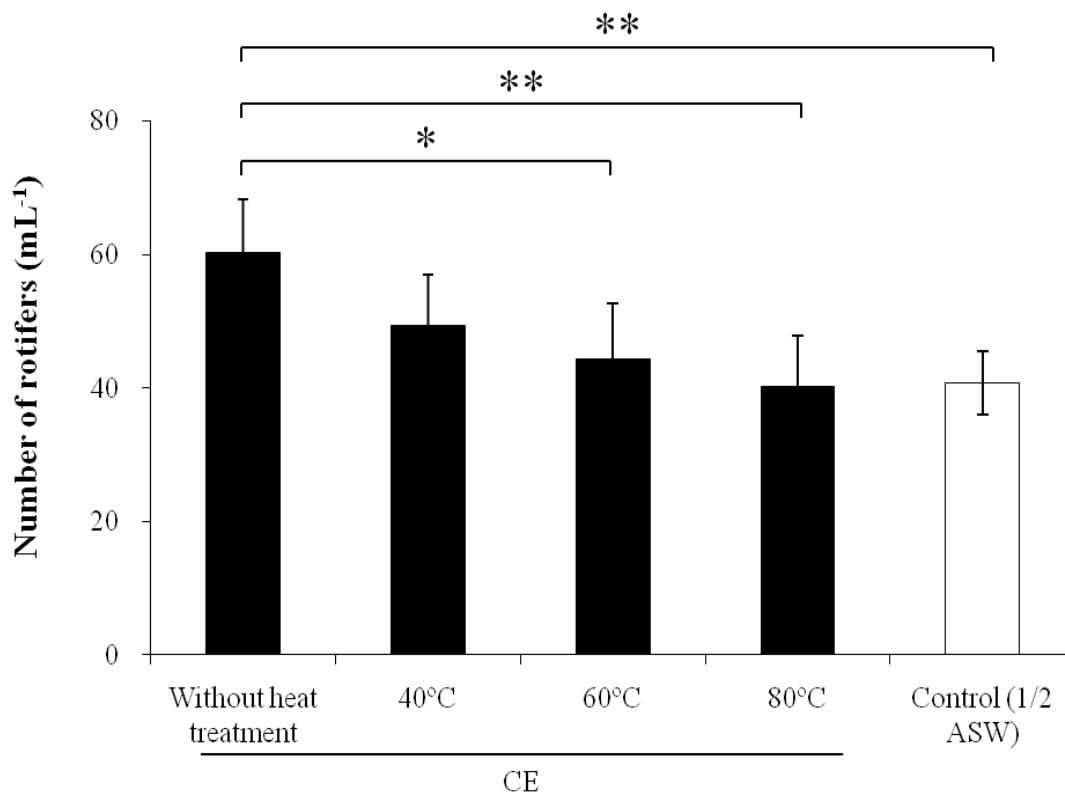


Fig. 2-3. The changes in the growth-promoting activity of CE from rotifers at various temperatures. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. The numbers of rotifers (mean \pm SD) in CE without heat treatment and CEs heated at 40°C, 60°C and 80°C for 60 min were determined along with that of the 1/2 ASW control. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's post hoc test).

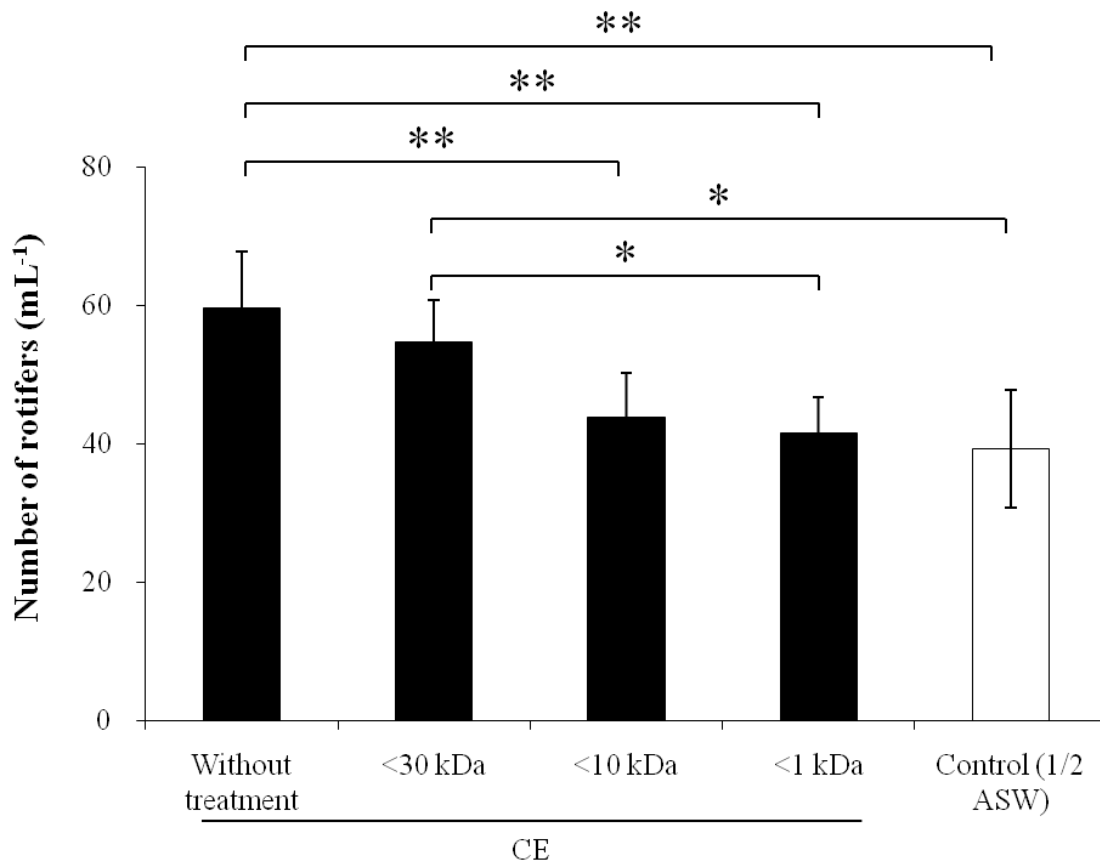


Fig. 2-4. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CE filtered through various molecular cut off membranes. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. The numbers of rotifers (mean \pm SD) in CE without fractionation and CEs of <30 kDa, <10 kDa and <1 kDa were determined along with that of the 1/2 ASW control. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's post hoc test).

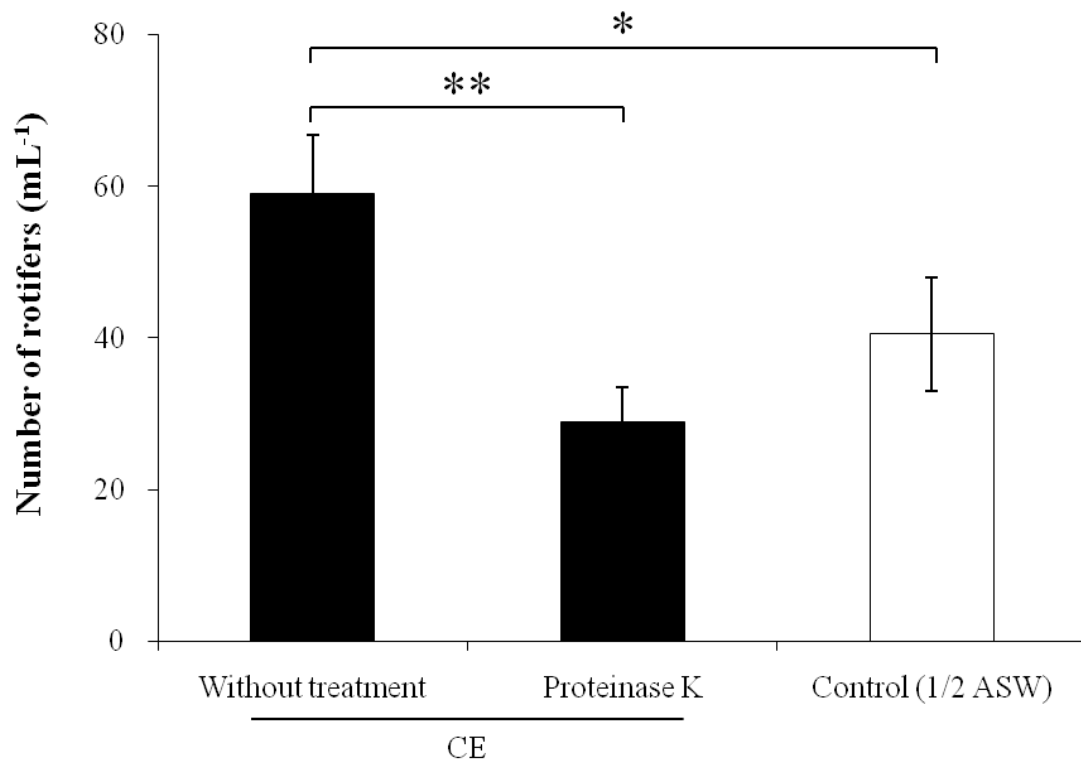


Fig. 2-5. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CE after treatment with proteinase K. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. The numbers of rotifers (mean \pm SD) in CE without treatment and CE treated with 10 mg mL⁻¹ proteinase K at 37°C for 60 min were determined along with that of the 1/2 ASW control. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, Tukey's post hoc test).

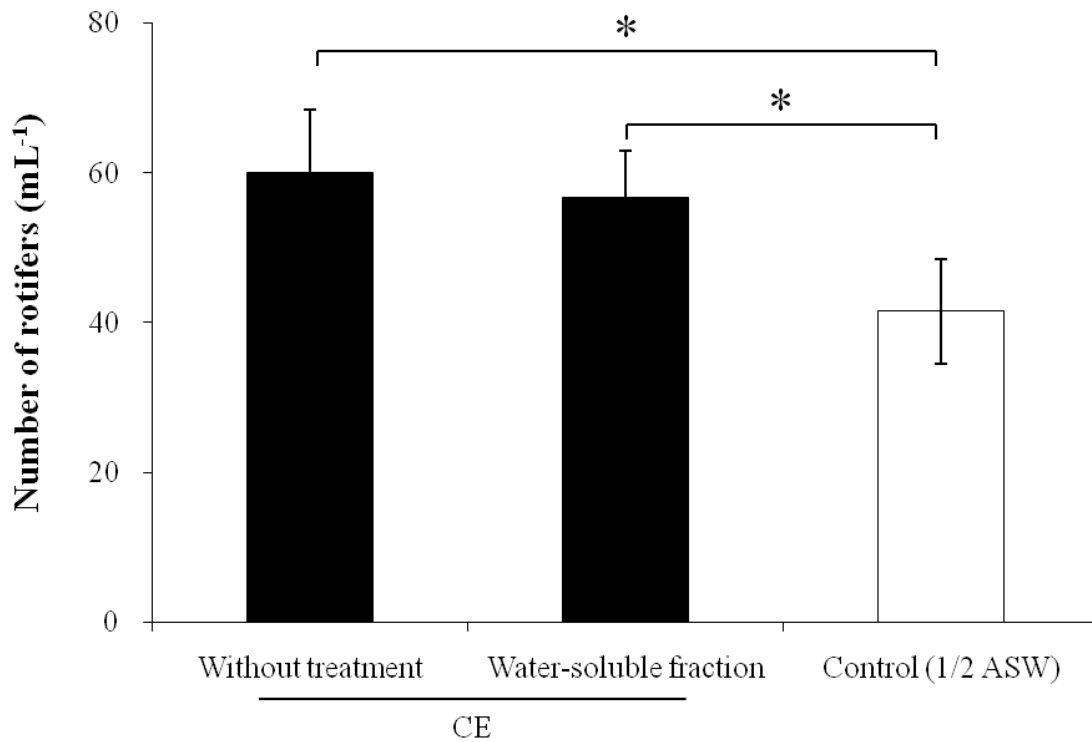


Fig. 2-6. The changes in the growth-promoting activity of rotifers in CE, water-soluble fraction of CE and 1/2 ASW control. CE was prepared from rotifers at the early exponential phase. Rotifers were cultured at 25°C for 5 days in 12-well culture plates. The numbers of rotifers (mean \pm SD) in CE and CE containing the water-soluble fraction after removing lipophilic substances with diethyl ether were determined along with that of the 1/2 ASW control. Asterisks indicate significant difference (* $p < 0.05$, Tukey's post hoc test).

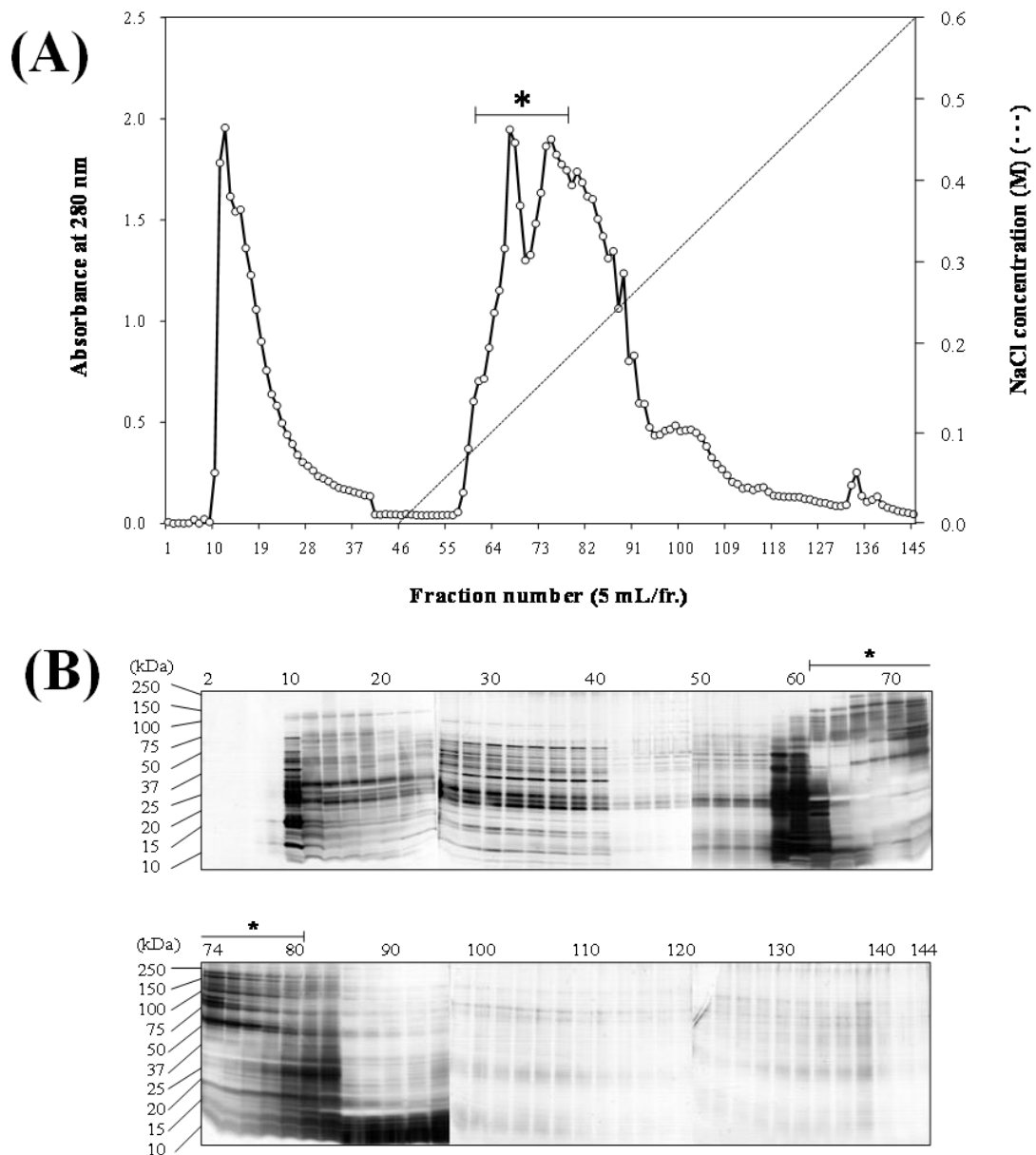


Fig. 3-1. DEAE-Toyopearl 650M anion exchange column chromatography of rotifer CE. (A), CE was applied to a DEAE-Toyopearl 650M column (1.1 x 25 cm, Tosoh) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). Absorbed proteins were eluted with a linear gradient of 20 - 600 mM NaCl at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹, and 5 mL fractions were collected and analyzed for their absorbance at 280 nm. A dotted line and an asterisk indicate the concentration of NaCl and the fraction showing the significant growth-promoting activity after 3 days ($p < 0.05$, Tukey's post hoc test), respectively. (B), SDS-PAGE patterns of fractions shown in panel A. SDS-PAGE was performed on 10 - 20% polyacrylamide gradient slab gels, and protein bands on the gels were detected by silver staining. The numbers above lanes indicate fractions shown in panel A, whereas asterisks indicate fractions showing the significant growth-promoting activity.

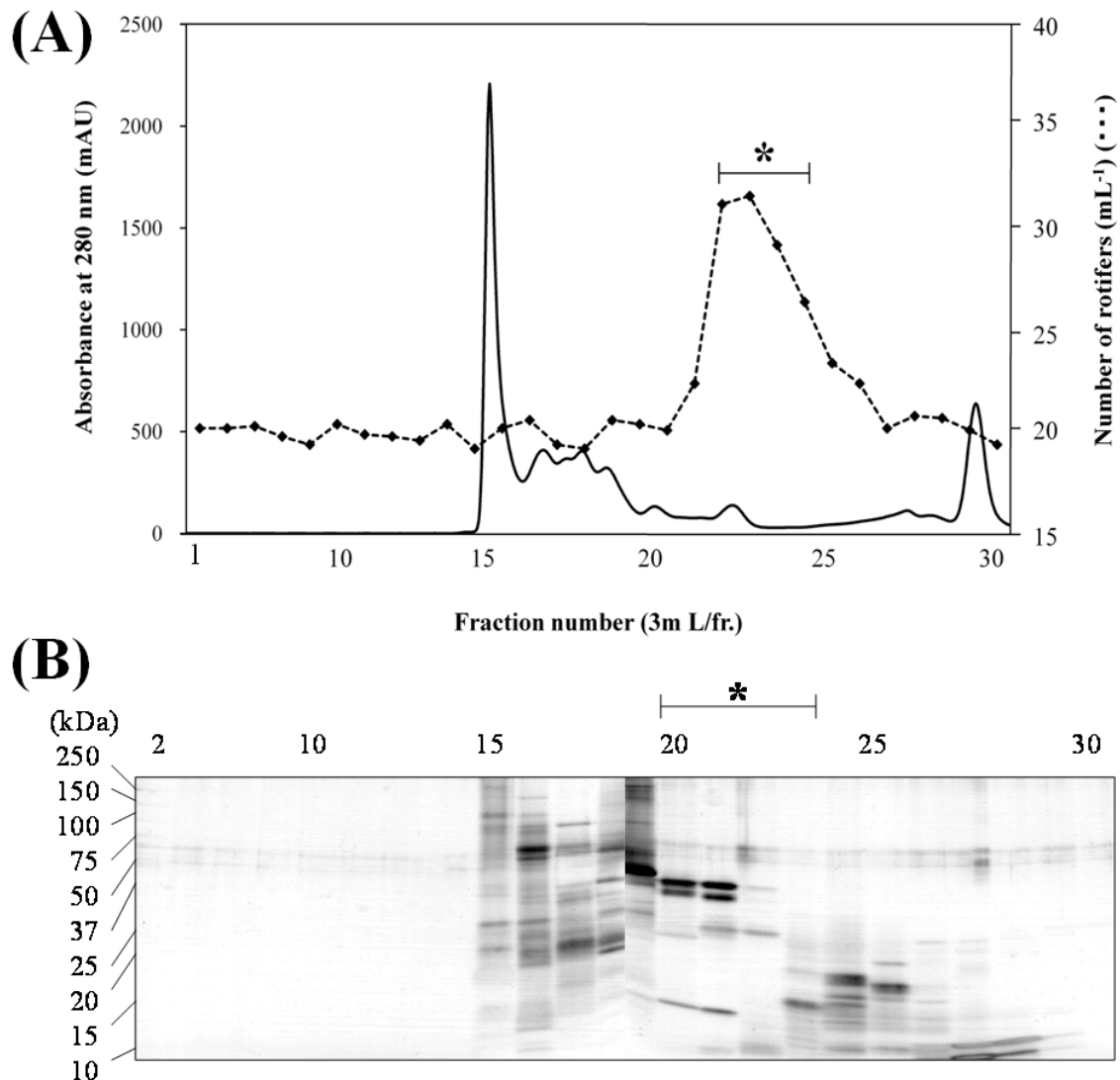


Fig. 3-2. HiLoad16/60 Superdex 75 gel filtration of fractions having the growth-promoting activity from DEAE-Toyopearl 650M column chromatography. (A), active fractions shown in Figure 3-1 were collected and applied to a HiLoad16/60 Superdex 75 prep grade column (1.6 x 60 cm, GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). Proteins were eluted with the same buffer at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, and 3 mL fractions were collected and analyzed for their absorbance at 280 nm. A dotted line and an asterisk indicate the numbers of rotifers incubated in each fraction and the fraction showing the significant growth-promoting activity after 3 days ($p < 0.05$, Tukey's post hoc test), respectively. (B), SDS-PAGE patterns of each fraction shown in panel A. SDS-PAGE was performed on 10 - 20% polyacrylamide gradient slab gels, and protein bands on the gels were detected by silver staining. The numbers above lanes indicate fractions shown in panel A, whereas asterisks indicate fractions showing the significant growth-promoting activity.

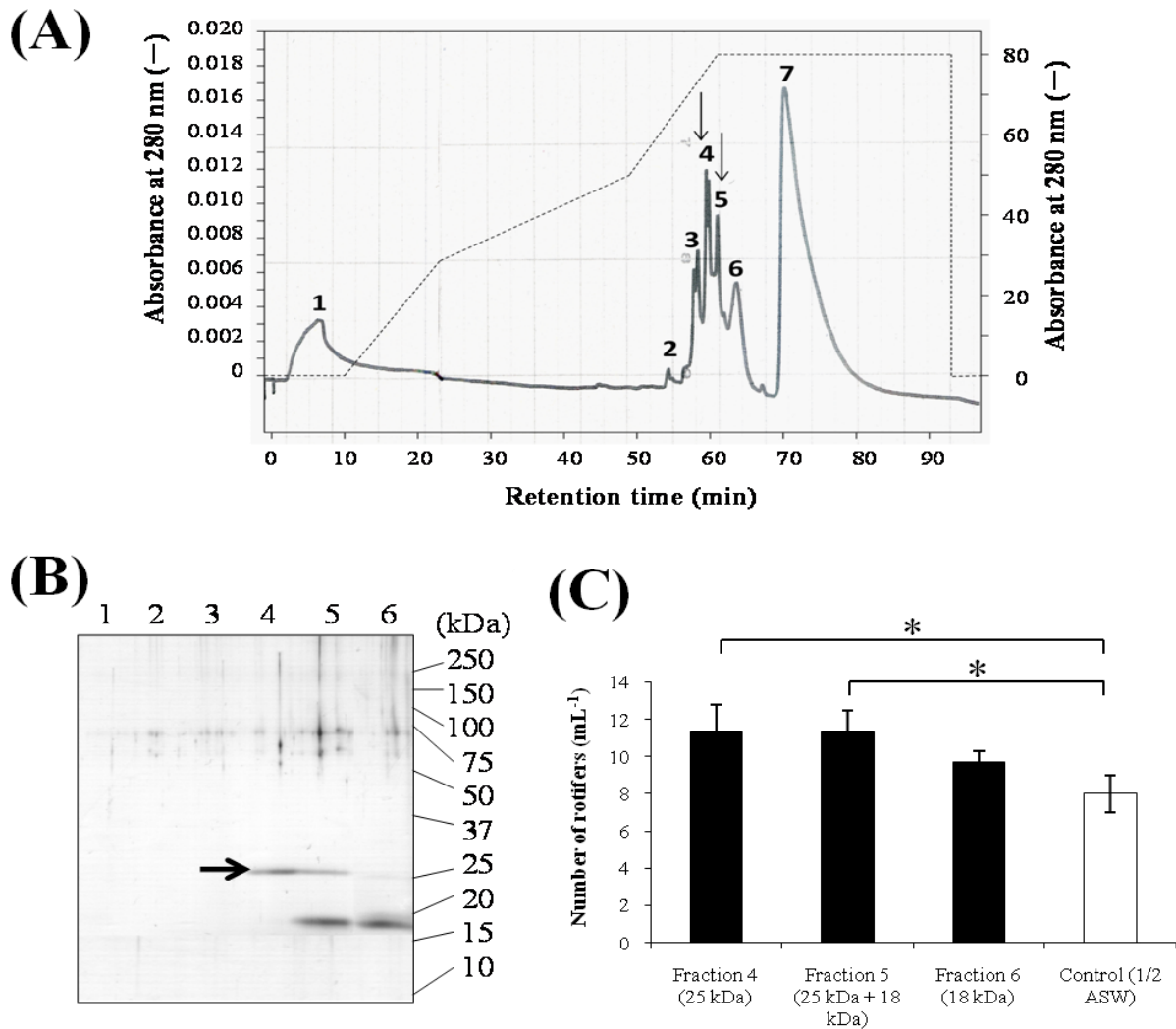


Fig.3-3. TSKgel Phenyl-5PW RP-HPLC of fractions having the growth-promoting activity from HiLoad16/60 Superdex 75 gel filtration. (A), active fractions shown in Figure 3-2 were applied to a TSKgel Phenyl-5PW column (4.6 x 76 mm, Tosoh). Proteins absorbed were eluted with a gradient of 0 - 80% acetonitrile at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and analyzed for their absorbance at 280 nm. Numbers and arrows indicate fractions and those showing the significant growth-promoting activity ($p < 0.05$, Tukey's post hoc test), respectively. (B), SDS-PAGE patterns of fractions shown in panel A. SDS-PAGE was performed on 10 - 20% polyacrylamide gradient slab gels, and protein bands on the gels were detected by silver staining. The numbers above lanes indicate fractions shown in panel A and a protein having the molecular weight of 25000 subjected to N-terminal amino acid sequencing is indicated with an arrow. (C), the numbers of rotifers incubated in fractions 4, 5 and 6 for 3 days. Asterisks indicates the significant growth-promoting activity ($p < 0.05$, Tukey's post hoc test) compared with that of control in 1/2 ASW.

(A)

```

                *  *
25 kDa protein      1 PAVVDFTAVWFGPLQMIKP  19
EST of B. plicatilis 31 PAVVDFTATWCGPCQMINP  49
```

(B)

```

TGTTTAATTGGAAACGTTGA
TTT GAA ATT AAA ATT TCA AAA AAT AAA AAA ATG AGC TCA GTC GTA CAC GTA ACT TCT GCT 60
GAA CAA TTC ACT GAA TTG ATC ACC AAA GGA CCT GCT GTG GTT GAT TTT ACT GCT ACA TGG 120
TGT GGA CCA TGT CAA ATG ATT AAT CCA GAG TTT GAG AGA CTT TCC GGT GTT TAC AGT TCA 180
ATT CAA TTT TTG AAG GTC GAT GTG GAT GAG TTG AAT GAA ATA GCT GCC ATT GCT GGT GTT 240
CAT GCT ATG CCC ACT TTT AAA GTA TAC CCC AAT GGT ATC ATC GTG GAT GAA TTA TTT GGA 300
GCT TCA AAA GAA AAA CTC GAA CAA CTG GTT AAA AAA TAT GTT CAC TAC AAC AAT CAT TAA 360
TTATTTTTCAAATACGTTTTTTTGGAGTAGAATTTTTTCTAGATGTATTTTTTTGTAAACCCAATACAAATTTTACAATT
AGAAACTT
```

(C)

```

EST of B. plicatilis  FEIKISKKNKMSSVHVTSAEQFTELITKG-----PAVVDFTATWCGPCQMINPEFERLS  55
Chlamydomonas         -----GGSVIVIDSKAAWDAQLAGKKEHKPIVVDFATWCGPCKMIAPLFETLS  50
Plasmodium           ----MAHHHHHHMVKIVTSQAEFDSIISQNE----LVIVDFFAEWCGPCKRIAPFYECS  52
                        *  :  *  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
EST of B. plicatilis  GVYS-SIQFLKVDVDELNEIAAIAGVHAMPTFKVYPNGIIVDELFGASKEKLEQLVKKYV  114
Chlamydomonas         NDYAGKVIIFLKVDVDAVAVAEAAAGITAMPTFHVYKDGVKADDLVGASQDKLKVAKHA  110
Plasmodium           KTYT-KMVFVKVDVDEVSEVTEKENITSMPTFKVYKNGSSVDTLLGANDSALKQLIEKYA  111
                        *:  .:  *:*****  :  ::  .:  :*****:*  :*  .*  *.*...  *:  *:  *:.
EST of B. plicatilis  HYNNH  119
Chlamydomonas         AA---  112
Plasmodium           A----  112
```

Fig.4-1. The N-terminal amino acid sequence of 25 kDa protein isolated from the rotifer *B. plicatilis* in comparison with an orthologue in the EST database of *B. plicatilis* and thioredoxins from other organisms. (A), the N-terminal amino acid sequence of 25 kDa protein isolated in the present study compared with an EST orthologue in the *B. plicatilis* database (DDBJ/EMBL/GenBank accession number FM939833; Denekamp et al., 2009). The numbers indicate amino acid residues from the N terminus. * denotes an amino acid which could not be analyzed correctly by N-terminal amino acid sequencing and possibly indicates cysteine. (B), the nucleotide sequence of the *B. plicatilis* EST. (C), the alignment of the amino acid sequence of the *B. plicatilis* EST with those of thioredoxins from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (DDBJ/EMBL/GenBank accession number X78822) and protozoa *Plasmodium falciparum* (DDBJ/EMBL/GenBank accession number XM_001348683). Homology search was performed by using BLASTX. The sequences were aligned with Clustal W. Boldfaces indicate amino acid sequences which showed high homology to the 25 kDa protein isolated in the present study. The numbers on the right margin of the sequences represent deduced amino acid residues from the N terminus.

(A)

```
TGTTTAATTGGAAACGTTGA
TTT GAA ATT AAA ATT TCA AAA AAT AAA AAA ATG AGC TCA GTC GTA CAC GTA ACT TCT GCT 60
F E I K I S K N K K M S S V V H V T S A 20

GAA CAA TTC ACT GAA TTG ATC ACC AAA GGA CCT GCT GTG GTT GAT TTT ACT GCT ACA TGG 120
E Q F T E L I T K G P A V V D F T A T W 40

TGT GGA CCA TGT CAA ATG ATT AAT CCA GAG TTT GAG AGA CTT TCC GGT GTT TAC AGT TCA 180
C G P C Q M I N P E F E R L S G V Y S S 60

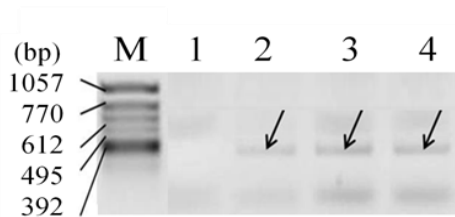
ATT CAA TTT TTG AAG GTC GAT GTG GAT GAG TTG AAT GAA ATA GCT GCC ATT GCT GGT GTT 240
I Q F L K V D V D E L N E I A A I A G V 80

CAT GCT ATG CCC ACT TTT AAA GTA TAC CCC AAT GGT ATC ATC GTG GAT GAA TTA TTT GGA 300
H A M P T F K V Y P N G I I V D E L F G 100

GCT TCA AAA GAA AAA CTC GAA CAA CTG GTT AAA AAA TAT GTT CAC TAC AAC AAT CAT TAA 360
A S k E K L E Q L V K K Y V H Y N N H * 119

TTATTTTTCAAATACGTTTTTTTTTGAGTAGAATTTTTTCTAGATGTATTTTTTTGTAACCCAATACAAATTTTACAATT
AGAAACTT
```

(B)



(C)

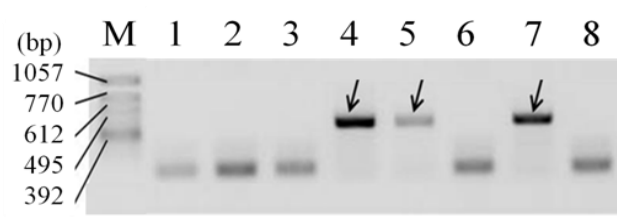


Fig. 4-2. cDNA cloning of the 25 kDa protein from *B. plicatilis*. (A), the nucleotide sequence of the *B. plicatilis* EST. The first and second black boxes indicate the start and stop codons, respectively. Boldfaces indicate amino acid residues which showed a high homology to the 25 kDa protein from the rotifer *B. plicatilis*. Locations of primers are indicated with arrows. (B), agarose gel electrophoresis patterns of PCR products from the rotifer *B. plicatilis*. Lane M indicates molecular size makers. Lane 1 indicates negative control, and lanes 2-4 indicate the PCR products of approximately 330 bp (arrows). (C), colony PCR products. PCR was performed using T7 and SP6. Lane M indicates molecular size markers, and lanes 1-8 indicate randomly selected colonies. Arrows indicate the PCR products of approximately 450 bp.

ATG	AGC	TCA	GTC	GTA	CAC	GTA	ACT	TCT	GCT	GAA	CAA	36
M	S	S	V	V	H	V	T	S	A	E	Q	12
TTC	ACT	GAA	TTG	ATC	ACC	AAA	GGA	CCT	GCT	GTG	GTT	72
F	T	E	L	I	T	K	G	P	A	V	V	24
GAT	TTT	ACC	GCT	GTA	TGG	TGT	GGA	CCT	TGT	CAG	ATG	108
D	F	T	A	V	W	C	G	P	C	Q	M	36
ATT	AAA	CCA	GAG	TTT	GAA	AGA	CTG	TCC	GGT	GTT	TAC	144
I	K	P	E	F	E	R	L	S	G	V	Y	48
AGT	TCA	ATT	CAA	TTT	TTG	AAG	GTC	GAT	GTG	GAT	GAG	180
S	S	I	Q	F	L	K	V	D	V	D	E	60
TTG	AAT	GAA	GTA	GCA	GCC	AGT	GCT	GGT	GTT	CGT	GCT	216
L	N	E	V	A	A	S	A	G	V	R	A	72
ATG	CCC	ACT	TTT	AAA	GTC	TAC	GTC	AAT	GGT	AGC	ATC	252
M	P	T	F	K	V	Y	V	N	G	S	I	84
GTT	GAT	GAA	TTA	GTT	GGA	GCT	TCA	AAA	GAT	AAA	CTC	288
V	D	E	L	V	G	A	S	K	D	K	L	96
GAA	GAA	CTG	ATT	AAA	AAA	TAT	GCT	CAA	TAA		356	
E	E	L	I	K	K	Y	A	Q	*		105	

AACAATCATTATTTATTATTTTTAGAAATTGGTTTTTGAGTAGAATTTTTTT
CTAAATTTAATTTTTTTGTAGCCAAATAAAAATTTTAGAATTAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 4-3. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the rotifer *B. plicatilis* 25 kDa protein cDNA. The first and second boldfaces indicate the start and stop codons. Black box indicates the sequence which was determined by N-terminal amino acid sequencing. The numbers on the right margin of the sequence represent nucleotides from the 5' site and deduced amino acid residues from the N terminus.

```

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
ATGAGCTCAGTCGTACAGTAACCTCTGCTGAACAATTCACCTGAATTGATCACCAAGGA 60
ATGAGCTCAGTCGTACAGTAACCTCTGCTGAACAATTCACCTGAATTGATCACCAAGGA 60
*****

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
CCTGCTGGTTGATTTACCGCTGTATGGTGTGGACCTTGTCCAGATGATTAACCCAGAG 120
CCTGCTGGTTGATTTACTGCTACATGGTGTGGACCATGTCAAATGATTAATCCAGAG 120
*****

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
TTGAAAGACTGTCGGGTGTTACAGTTCAATTTCAATTTTGAAGTCGATGGATGAG 180
TTGAGAGACTTTCGGGTGTTACAGTTCAATTTCAATTTTGAAGTCGATGGATGAG 180
*****

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
TTGAATGAAGTAGCAGCCAGTGGTGTTCGTGCTATGCCACCTTTAAAGCTACGTC 240
TTGAATGAATAGCTGCCATTCGCTGGTGTTCATGCTATGCCACCTTTAAAGTATACCC 240
*****

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
AATGGTAGCATCGTTGATGAATAGTTGGAGCTTCAAAGATAAACTCGAAGAATGATT 300
AATGGTATCATCGTGGATGAATATTTGGAGCTTCAAAGAAAAAACTCGAACAATGTT 300
*****

rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
AAAAAATATGCTCAATAA----- 318
AAAAAATATGTTCACTACAACAATCAATTA 330
*****

```

Fig. 4-4. The nucleotide sequences alignment of rotifer 25 kDa protein cDNA and EST of *B. plicatilis*. Alignment was performed by Clustal W. The numbers on the right margin of the sequences represent nucleotides from 5' site.

```

Rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
Chlamydomonas
Plasmodium
-----MSSVVHVTSAEQFTELLITKG-----PAVVDFATWCGPCQMIKPEFERLS 45
FEIKISKNNKSSVVHVTSAEQFTELLITKG-----PAVVDFATWCGPCQMINPEFERLS 55
-----GGSYIVIDSKAAWDAQLAKGKEHKPIVVDFATWCGPCQMIAPLEFETLS 50
----MAHHHHHHMVKIVTSQAEFDSLISQNE-----LVIYDFFAEWCGPCQKRIAPFYEECS 52
* : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
* : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

Rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
Chlamydomonas
Plasmodium
GYYS-SIQFLKVDVDELNEVAASAGVRAMPTEFKVYVNGSIVDELV-ASKDKLEELIKKYA 103
GVYS-SIQFLKVDVDELNEIAAIAGVHAMPTEFKVYPNGLIIVDELFGASKEKLEQLVKKYV 114
NDYAGKVIPLKVDVDAVAEAAGITAMPTEHYKDGKADLVGASQDKLKALVAKHA 110
KTYT-KMVFIKVDVDEVSEVTEKENITSMPTFKYKNGSSVDTLLGANDSALKQLIEKYA 111
* : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
* : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

Rotifer25kDa
EST of B. plicatilis
Chlamydomonas
Plasmodium
Q---- 104
HYNNH 119
AA--- 112
A---- 112

```

Fig. 4-5. The amino acid sequences alignment of rotifer 25 kDa protein, EST of *B. plicatilis*, and thioredoxin-like proteins of *C. reinhardtii* and *P. falciparum* by Clustal W. The amino acid sequence of the rotifer 25 kDa protein showed approximately 50% amino acid identity with those of *C. reinhardtii* and *P. falciparum*. The numbers on the right margin of the sequence represent nucleotides and deduced amino acid residues from the N terminus.