

寿命(8~17日)には、いずれの条件の間にも有意差はなかった。比増殖率は強化剤2区と無給餌区が低くなった。無給餌生残時間(30~152h)はナンノ区で短くなった。植え継ぎ培養48h後から収穫したワムシでは対照区に比べて強化剤2区の遊泳力が劣った。1次培養条件を比較すると、比増殖率が連続培養収穫槽とバッチ培養24h後で高くなった。

【2次培養がワムシの次世代に与える影響】被甲長(μm)、被甲幅(μm)、遊泳力、無給餌生残時間(h)、産仔数、および寿命(日)の6項目について調べた。寿命(9~17日)ではいずれの培養条件の間にも有意差はなかった。植え継ぎ培養48h後に二次培養したワムシの被甲長は対照区(198 μm)と比べ、無給餌区(182 μm)とクロレラ2区(183 μm)が小さくなり、被甲幅では対照区(118 μm)に比べて無給餌(107 μm)が小さくなった。また、連続培養培養槽から収穫したワムシの遊泳力は対照区に比べて強化剤2区と無給餌区、ナンノ区が劣っていた。無給餌生残時間(66~166h)と産仔数(10~21個体)は生クロレラV12とスーパー生クロレラV12で高生残と多産であった。一次培養条件を比較すると、植え継ぎ培養48h後の被甲長と被甲幅は植え継ぎ培養24h後より小さくなる傾向があった。連続培養収穫槽から収穫したワムシの産仔数は培養槽から収穫したワムシより多かった。

【ワムシの脂肪酸含量】強化剤2区が連続培養収穫槽でも植え継ぎ培養48h後も脂質含量、DHA、EPA、およびn-3HUFA総量が多かった。また、バイオクロミス区とマリングロス区でも同程度が多かった。連続培養収穫槽から収穫したワムシを各条件で二次培養したところ、n-3HUFA量は対照区と比べて強化剤1区、強化剤2区、ナンノ区、スーパー生クロレラV12区、バイオクロミス区、およびマリングロス区が多かったが、バッチ培養48h後から収穫したワムシでは強化剤2区、バイオクロミス区、およびマリングロス区だけが多くなっていた。

【結論】無給餌や過剰な強化剤の投与といった極端な条件で2次培養を行わない限り2次培養による生物学的、生理学的活性の変化は起こらないと考えられた。また、連続培養収穫槽やバッチ培養24h後でバッチ培養48h後より高い活性が示されたことから、1次培養条件はワムシに強い影響を与えると考えられた。

ハオコゼ *Hypodytes rubripinnis* の高温ストレスに対する適応機構について

生物育種工学研究室 横江洋一

小型海産魚であるハオコゼをモデル実験魚に用いて、変温動物の魚類にとって重要な環境要因である水温に注目し、高水温への変化に対する適応能の評価を試みた。

【高水温に対する応答】ハオコゼの高水温に対する馴化限界を検索するために、呼吸数(1分間あたりの鰓蓋運動の計数)を指標にして馴化の評価が可能であるか

否かを検討した。その結果、致死もしくは平衡喪失が観察された水温と、それらが見られなかった水温で呼吸数の変化に違いが見られた。前者では被曝後の呼吸数は増加を続け、後者では被曝直後には大きく呼吸数を増加させるものの、その後一定の水準で安定、もしくはわずかに減少した。この結果より、後者の呼吸数変化を見せる上限水温を馴化分岐点水温として、それ以上の水温では馴化が不可能であることが明らかとなった。この呼吸数の変化を指標とする方法により飼育水温ごとの馴化分岐点水温を決定し、両者の関係を明らかにした。

【馴化期間の検索】前項の実験結果は魚を一定期間ある水温に馴化すれば、その水温に応じた水温馴化能を獲得することを示している。しかし、魚類において馴化に要する期間に関する研究はほとんど行われていない。本実験では、飼育環境 24℃のハオコゼを 18℃へ移し、馴化にどのくらい時間を要するか検討した。24℃から 32℃は馴化分岐点水温以下であるため十分に対応できるが、18℃から 32℃では馴化分岐点水温を越えているため馴化不能になると予想された。馴化開始 7 日目から呼吸数は被曝時間内に減少を見せない馴化不能型となり、21 日目以降では平衡喪失、死亡個体があらわれた。これらのことから、24℃から 18℃への完全な馴化には約 3 週間が必要であることが明らかとなった。

【生体内での応答】本項では、ハオコゼを馴化分岐点水温(亜致死的水温)に曝露し馴化に関与すると予想される HSP(Heat shock protein)の検索を行った。その結果、他の魚種において認められている *Hsp90* と相同性の高い mRNA の発現がみられた。発現は高水温被曝より 1 時間後に強く見られ、5 時間後には減少した。高温ショックによって多量に *Hsp90* が発現するが、被曝水温に馴化したことで発現が減少するのではないかと考えられ、*Hsp90* の mRNA 動態が高水温への馴化評価に有効な指標となる可能性が示唆された。

【短期的馴化の影響】前項の実験において、高水温被曝後短時間で *Hsp90* の mRNA が発現したことは、長期間を要する馴化の他に、短期間の馴化(本実験では前処理とする)によって即応的に馴化能を獲得できることを示唆している。そこで本実験では、飼育水温 12℃のハオコゼを 22℃で前処理し、その後、32℃に被曝させた。その結果、前処理無しと 24 時間前処理では明らかに生存率に差が生じ、前者では被曝 5 時間の間に実験に供した 10 尾すべてが死亡したのに対し、後者での死亡は 10 尾中 1 尾のみだった。前処理 2、6 時間においても前処理無しと比較して生存率、生存時間共に増加し、前処理の効果によって高温への馴化能は明らかに上昇した。短期間の馴化により即応的に馴化能を獲得するシステムがあると考えられる。なお、前処理によって発現が増加すると予想される HSP の発現動態を *Hsp90* の mRNA を指標にして観察したところ、前項と同様の結果が得られた。

【成長段階での馴化能比較】魚類では成長段階によって高水温に対する耐性が変化することが知られている。そこで、呼吸数を指標として成魚と稚魚の馴化能比較を行った。成魚に比べて稚魚では被曝後の呼吸数の増加が少なく高水温に対する馴化能は稚魚の方が優れているのではないかと考えられた。