

学 位 論 文 題 名

魚類仔稚魚期の栄養素の消化吸收機構の発達に関する研究

学位論文内容の要旨

、海産魚類の仔稚魚期における消化機構の発達過程を明らかにする目的で、各消化器管における消化機能を免疫組織化学的手法や生化学的手法により解析し、以下の結果を得た。

1) ウナギ成魚の膵臓からトリプシノーゲン(DE-52 celluloseとSuperose 12の2段階のクロマトグラフィーにより精製し、それに対する特異抗体(anti-eTrg)を作製した。Anti-eTrgを用いることによって、魚類の膵臓における主要プロテアーゼの前駆体であるトリプシノーゲンを検出できる免疫組織化学的手法を確立した。

2) Anti-eTrgを用いた免疫組織化学法により、ヒラメ仔魚の膵臓における消化酵素合成能の発達過程を観察した。水温17℃の飼育条件では、anti-eTrgに対する弱い反応が孵化2日目に初めて膵臓より検出され、摂餌開始時期である3日目には、強い反応を示すチモーゲン顆粒が膵臓中に多数検出された。またこの時点で、膵臓外分泌細胞にチモーゲン顆粒の開口像が電子顕微鏡により観察された。これらのことから、ヒラメ仔魚の膵臓は孵化2日目に消化酵素合成を開始し、摂餌の始まる孵化3日目には小腸への分泌を開始するものと考えられた。

3) 消化酵素の合成開始時期におけるヒラメ仔魚の膵臓は、compact-typeであった。そこで、compact-typeから成魚のdiffuse-typeの膵臓への発達過程を観察した。成魚では、膵臓は肝臓内の門脈と、脾臓、胃、幽門垂および小腸から肝門につながる肝門脈の分枝静脈に沿って広く分布する樹状形の組織であった。また、膵管は幽門垂の基部付近で胆管と平行して小腸管腔に開口していた。一方、仔魚においては、孵化3日目にはcompact-typeであった膵臓は孵化20日目頃から小腸の静脈に沿って後方へ伸び始め、変態後(孵化45日目)には、ほぼ成魚と同様の形態の組織となった。したがって、ヒラメのdiffuse-type膵臓が完成するのは変態後の稚魚期初期であると考えられた。

4) マダイの小腸冊子縁から、アミノペプチターゼをSephacryl S-200、Mono Q、Superose 6の3段階のクロマトグラフィーにより精製し、それに対する特異抗体(anti-rAm)を作製した。Anti-rAmを用いることによって、魚類の小腸上皮細胞膜におけるアミノペプチターゼ(終末酵素の一つ)の分布を、免疫組織化学的に明らかにすることができた。

5) Anti-rAmを用いた免疫組織化学法によって、ヒラメ仔魚の腸上皮細胞膜における消化酵素合成能の発達過程を観察した。孵化直後において、すでに小腸と直腸の上皮細胞膜の冊子縁からanti-rAmに対する弱い反応が検出された。孵化2日目に

は、腸上皮細胞の冊子縁の発達に伴ってanti-rAmp に対する反応は強まり、孵化3日目には、直腸でのみ反応は弱くなった。これらのことから、ヒラメの腸上皮細胞は孵化時点ですでに消化酵素の合成を開始しており、この機能は摂餌の始まる孵化3日目にかけて活性化されるものと考えられた。

6) 抗-ワムシ抗体(anti-Rot)または抗-ブラインシュリンプ抗体(anti-Art)を用いた免疫組織化学法によって、直腸上皮細胞に取り込まれた餌由来のタンパク質を検出する手法を開発した。

7) 様々な发育段階のヒラメ仔稚魚にワムシを摂餌させるか、またはブラインシュリンプの抽出液を肛門から注入し、その後餌料生物由来のタンパク質を直腸より検出することによって、直腸上皮細胞によるタンパク分子の取り込みと細胞内消化機能の獲得時期と消失時期を検討した。その結果、ワムシ由来タンパク質は摂餌開始直後の孵化3日目から直腸上皮細胞の細胞質より検出された。一方、体長4 cmの稚魚の直腸上皮細胞からはブラインシュリンプ由来のタンパク質が検出されたが、体長8 cmの稚魚の直腸上皮細胞からは検出されなかった。したがって、ヒラメの直腸上皮細胞は摂餌開始時の孵化3日目にはすでにタンパク分子に対する飲作用能を獲得しており、この機能は体長4~8 cmの发育段階の間に失われるものと考えられた。

8) 現在、ウナギは人為管理下で孵化仔魚を得ることには成功しているが、仔魚の育成には全く成功していない。ウナギ仔魚の飼育技術開発に資することを目的として、これまでに確立した手法およびヒラメ仔魚で得られた知見をウナギ仔魚に適用することによって、摂餌開始時期などの推定を試みた。その結果、水温23℃の飼育条件で、ウナギ仔魚の臍臓は孵化3日目に分化し、臍臓における消化酵素の合成は孵化6日目に始まり、翌7日目には活発化した。直腸上皮細胞によるタンパク質の取り込みは孵化5日目に直腸前半部で始まり、孵化7日目にかけて直腸全域で活発化した。またこの時期に、眼の黒化、口の開口方向の腹側から前方への移動および卵黄の吸収などが起った。これらのことを考え併せると、ウナギ仔魚の摂餌開始時期は孵化後7日目頃と推定された。

9) 餌料生物に由来する酵素が仔魚の消化管内において栄養物の消化に果たしている役割を検討した。Anti-Rot を用いたELISAによって、仔魚の腸管内に含まれるワムシ由来タンパク量を測定することができた。ワムシタンパク量とワムシプロテアーゼ活性との間の関係式を求め、仔魚腸管内のワムシ由来プロテアーゼ活性を算出する手法を確立した。

10) マイワシ仔魚にワムシを与えた後、仔魚を臍臓と腸管を含む部位に分離して採取した。仔魚の腸管に含まれる全プロテアーゼ活性のうちワムシ由来プロテアーゼ活性の占める比率は、空腹時で約0.1%、飽食時で約0.6%であった。したがって、マイワシ仔魚のタンパク質の消化過程における餌料生物由来のプロテアーゼの貢献度は極めて小さいと判断された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 崎 文 雄
副 査 教 授 麦 谷 泰 雄
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 助 教 授 後 藤 晃

学 位 論 文 題 名

魚類仔稚魚期の栄養素の消化吸收機構の発達に関する研究

有用魚種の種苗育成には仔稚魚期の摂餌能の発達に合わせた適切な初期餌料の投与が不可欠である。そのために仔稚魚期の消化機能の発達過程が明らかにされなければならないが、これまでには主に消化器官の発達過程を形態学的に調べたものが多く、消化機能の発達を消化酵素の合成・分泌と餌の取り込みの面から直接調べた研究は少ないのが現状である。

そこで申請者は有用種であるヒラメとウナギを中心に、消化機能の発達過程を特異抗体による免疫組織学的手法によって調べ、次のような評価すべき結果を得た。

1. トリプシン前駆物質であるトリプシノーゲンを多量に採取が可能なウナギの膵臓から抽出し、この特異抗体をウサギを用いて作成、特殊カラムを用いて精製の後、得られたトリプシノーゲンの特異抗体を用いてヒラメの孵化仔魚の消化酵素の合成時期を推定した。その結果、ヒラメでは膵臓でのトリプシノーゲンの合成は孵化2日目に始まり、摂餌の始まる孵化3日目には、膵臓外分泌細胞にチモーゲン顆粒の開口像を観察し、小腸への消化酵素の分泌が始まることを明らかにした。

2. ヒラメの膵臓は孵化3日目では Compact-type であるが、成魚でみられる Diffuse-type の膵臓に変わるのは変態後の稚魚期初期であることを組織学的に明らかにした。

3. マダイの小腸冊子縁から終末酵素であるアミノペプチターゼを分離精製し、これに対する特異抗体を作成した。この抗体を用いてヒラメの小腸上皮細胞膜におけるアミノペプチターゼの分布を調べ、孵化2日目には合成が開始され、3日目にはその合成機能が活発化することを明らかにした。

4. ヒラメ仔魚の摂餌能を調べるために、抗-ワムシ抗体または抗-ブラインシュリンプ抗体を作成し、ワムシまたはブラインシュリンプを餌として与えた場合、直腸上皮細胞にどのように取り込まれるか、免疫組織学的に調べた。その結果、ワムシ由来のタンパク質は摂餌開始直後の孵化3日目から、直腸上皮細胞の細胞質中に検出されること、体長4 cmの稚魚の直腸上皮細胞からはブラインシュリンプ由来のタンパク質が検出されるが、体長8 cmの稚魚では検出されないことを明らかにし、摂餌開始時の孵化3日目ではタン分子を直接取り込んでいるが4-8 cmではこの飲作用能は失い、完全消化した後に吸収している事実を明らかにした。

5. ウナギ仔魚の初期摂餌能に関しては全く知見がなく、このため申請者が開発した手法を用いて、ウナギ仔魚の摂餌開始時期を推定した。その結果水温23℃の飼育条件下で、ウナギ仔魚の膵臓は孵化3日目に分化し、膵臓の消化酵素の合成は孵化後6日目に始まり、翌7日目には活発化すること、直腸上皮細胞によるタンパク質の取り込みは孵化後5日目に直腸前半部で始まり、孵化7日目に活発化することを明らかにした。またこれら消化器官の機能的発達に併せて、口腔の開口方向が腹側から前方へ移動し、シラス型の開口となることを示し、ウナギ仔魚の摂餌開始時期は形態的にも機能的にも孵化後7日頃にあることを明らかにした。

6. 魚類の仔魚の餌として生餌が必要とされ、その理由の一つとして、生餌由来の消化酵素が仔

魚の初期消化機能の補助として必要との考えが提示されている。申請者はこの点に関し、マイワシ仔魚にワムシを与えて、マイワシ仔魚期の消化にワムシ由来のプロテアーゼがどの程度関与するかを消化活性の比較から推定した。その結果、生餌生物からの消化酵素の貢献度は空腹時で、0.1%、飽食時で0.6%と推定し、これまで提出された仮説を否定した。

以上の結果は魚類の仔稚魚の消化機能の発達に関して極めて有用な知見を与えるもので、種苗の育成技術の確率に貢献するとともに、本研究において開発した手法は仔稚魚期の消化機能の解析に広く応用が可能であることから、審査員一同は本研究が博士（水産学）の学位に相当する業績と判断した。