

ウナギ仔稚魚の消化生理機能の発達過程を探る

黒川忠英^{*1}・鈴木 徹^{*1,*2}

Developmental process of digestive system in Japanese eel larvae

Tadahide KUROKAWA^{*1}, Tohru SUZUKI^{*1,*2}

Abstract To improve the larval rearing technology, the ontogeny of pancreatic exocrine function and its endocrine regulation systems were examined in the early larval stage of Japanese eel. The eel pancreas starts to synthesize the digestive enzymes by 8 days post hatching and the endocrine systems for the regulation of pancreatic enzyme secretion develop synchronously with the development of exocrine pancreas by the first feeding in eel larvae. Moreover, the digestive tract of eel larvae recognized Aquaran (freeze-dried shark egg powder) as a nutrient, and that the exocrine pancreas secreted digestive enzymes into the intestine and began to synthesize digestive enzymes in response to feeding.

Key words: eel, larvae, digestive system, pancreatic enzyme, endocrine system

長年の成熟誘起手法の改良によって、ウナギの受精卵を得ることは比較的安定して行えるまでになってきている(Kagawa *et al.*, 1995; 1997)。しかし、ふ化率や初期生残率がきわめて低い場合が多く、ウナギ種苗生産の実現のためには、さらに様々な観点からの技術改良が必要である(Tanaka *et al.*, 2001)。

魚類の初期発生においては、卵黄内の母性由来の mRNA や調節因子などの蓄積量の異常が斃死や奇形を引き起こす要因の一つになっていることが考えられる。また、仔魚の生残率の改善には仔魚用飼料の改良が不可欠であるが、そのためにはウナギ仔魚の消化吸収特性を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、ウナギ未受精卵から母性由来の mRNA を単離すると共に、それらの遺伝子発現と卵質との関連を検討することを試みた。また、仔魚やシラス期の消化器官などの発達過程を解析し、仔魚期の摂餌や消化吸収特性を明らかにすることを目的とした。

ウナギ未受精卵からの mRNA の単離

まず、未受精卵 2g から total RNA を抽出し、未受精卵中の total RNA と mRNA 含量を採卵親魚ごとに比較した。その結果、total RNA と mRNA 含量にはロット間での差はみられず、その後の受精率やふ化率との相関は認められなかった。

次に、ふ化率が 80% 以上であった良質卵から mRNA の単離を行い、一方向性にベクターに組み込んだウナギ未受精卵 cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーの無作為シーケンスを行い、57 種類の遺伝子を同定することができた (Table 1)。このうち、細胞骨格に関係する histon、卵最終成熟に関与すると考えられる D7、アポトーシスに関与すると考えられる survivin、次世代の成熟に影響を及ぼすと考えられる magonashi、プロテアーゼである cathepsin S と serin protease、プロテアーゼ阻害因子である trypsin inhibitor の 5 種類の遺伝子について、80% 以上のふ化率が

2005 年 11 月 15 日受理 (Received: November 15, 2005)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

^{*2} 現 東北大学農学部生物生産情報システム学研究室 〒981-855 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 (Laboratory of Bioindustrial Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan)

Table 1. Identified genes from unfertilized eel eggs.

Germinal vesicle breakdown	Cell membrane	Mitochondria proteins
maternal mRNA D7(1)	tight junction transmembrane protein claudin A(3)	cytochrome B(3)
Cell cycle	human putative membrane protein(1)	cytochrome C oxidase subunit I (4)
cyclin BI(3)	Enzymes	cytochrome C oxidase subunit II (16)
CDC2 kinase(1)	cathepsin S(1)	cytochrome C oxidase subunit III (6)
CDC20(1)	serine protease(1)	NADH dehydrogenase subunit I (1)
Cell growth	glutathion S-transferase(1)	Others
proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29(1)	E-1 enzyme, ubiquitin activation enzyme(1)	caicum-and integrin-binding protein CIB(1)
Apoptosis	DNA topoisomerase I(1)	GM2 ganglioside activator protein(1)
apoptosis regulator NR-13(2)	uracil-DNA glycosidase(1)	Unknown functions
survivin(2)	Protease inhibitor	mouse RIKEN cDNA 1810020E01(1)
Transcriptional regulators	pancreatic secretory trypsin inhibitor(1)	mouse RIKEN cDNA 2310020H20(1)
TATA-binding protein(1)	Transfer proteins	mouse RIKEN cDNA 2310004B22(1)
ras-related nuclear protein Ran-a(2)	phosphatidylinositol transfer protein beta isoform(1)	mouse RIKEN cDNA 1600013p15(1)
ras-related nuclear protein Ran-b(1)	Histones	human clone MGC19825(1)
e(y)2 homologue(1)	histone H1(2)	human hypothetical protein FLJ20643(1)
CCAAT binding transcription factor-B subunit(1)	histone H1-like(5)	human hypothetical protein FLJ10342(1)
RNA-binding protein	histone H2A/e(1)	human KIAA0101(1)
cold inducible RNA-binding protein(2)	histone H2A/z(1)	human similar to RIKEN cDNA 2010208K18(1)
mago nashi(2)	histone H2B(9)	human similar to CGI-130 protein(1)
small nuclear ribonucleoprotein F(1)	histone H3(2)	human cDNA DKFPz686N1651(1)
small nuclear ribonucleoprotein E(1)	Non-histone chromosomal proteins	No homology
pre mRNA cleave factor I subunit(1)	Similar to sperm specific antigen(1)	(12)
Repairment of DNA	High mobility group protein BOX2(1)	
SNM-protein(1)	prothymosin(1)	
Cytoskeletons	single strand D box binding factor(1)	
dynein light chain(1)	Nopp 34 nucleolar phosphoprotein(1)	

Numbers of () indicate number of clones in this analysis.

得られた良質卵 5 ロットとほとんど孵化しなかった不良卵 5 ロット間で、遺伝子発現に差があるか否かを定量PCRにより比較した。しかし、いずれの遺伝子もロット間での有意差は認められなかった。

ウナギ仔魚期の消化生理機能の発達過程

ウナギ仔魚期には胃腺が未発達なため、消化の主体は膵臓由来の消化酵素群であると考えられる(Kurokawa and Pedersen, 2001; Kurokawa and Pedersen, 2003; Pedersen *et al.*, 2003)。そこで、まずウナギ外分泌膵臓から、各栄養成分に対する主要な消化酵素(タンパク質:トリプシン;糖質:アミラーゼ;脂質:リパーゼ)遺伝子を単離し、cDNA塩基配列を決定した(Kurokawa *et al.*, 2002)。これら、膵消化酵素遺伝子のウナギ仔魚における発現部位を、whole mount *in situ* hybridization (WISH)により観察した結果、仔魚の膵臓で特異的に遺伝子発現がみられることが確認された(Fig. 1)。次に、仔魚期における遺伝子発現パターンを、RT-PCRにより解析した(Fig. 1)。その結果、トリプシンとアミラーゼはふ化後 6 日目から発現がみられ 7 日から 8 日目にかけて発現量が増加して

いた。一方、リパーゼはふ化後 8 日目から遺伝子発現が観察された。これらのことから、ウナギ仔魚の膵臓では、摂餌を開始するふ化後 8 日目までに消化酵素の合成が開始されるものと推察された。

膵消化酵素の分泌は、消化管ホルモンであるCCK(分泌促進)やPYY(分泌抑制)などによって制御されていると考えられる。そこで、ウナギ小腸からCCKとPYY遺伝子を単離し、cDNA塩基配列を決定した(Kurokawa *et al.*, 2004)。ウナギ仔魚におけるCCKとPYY遺伝子の発現パターンを*in situ* hybridization (ISH)により観察した結果、これらのホルモン遺伝子はふ化後 8 日目から仔魚の腸管で発現し始めることが観察された(Fig. 2)。

したがって、ウナギ仔魚の外分泌膵臓における消化酵素合成能と、その内分泌制御機構は、摂餌開始時のふ化後 8 日目までに連動して発達することが明らかになった。

ウナギ膵消化酵素の消化特性

ウナギの膵液の消化特性を明らかにするため、ウナギ成体の膵臓の抽出液を調製し、タンパク質や糖質に

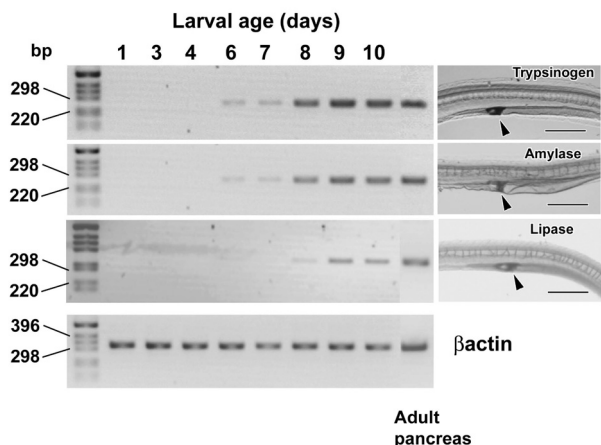


Fig. 1. RT-PCR analysis to expression of pancreatic enzymes in eel larvae and adult pancreas (left photo) and whole mount *in situ* hybridization of 10 dph eel larvae with antisense probes of pancreatic digestive enzyme genes (right photo). (a) trypsinogen, (b) amylase, (c) lipase. Arrowheads indicate the positive signals in the larval pancreas. Scale bars indicate 1 mm. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2002).

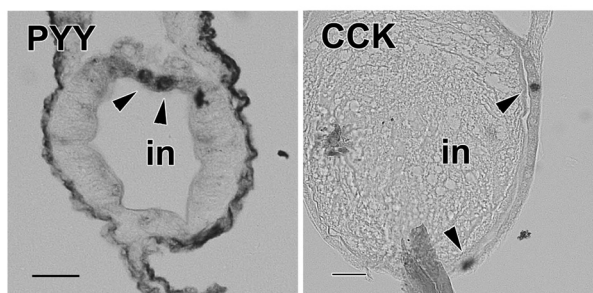


Fig. 2. Distribution of CCK and PYY cells in Japanese eel larvae at 8 dph. Arrowheads indicate positive signals. br, brain; ey, eye; in, intestine. Scale bars indicate 25 μ m.

対する消化試験を行った。ウナギ膵臓をアセトン処理して風乾したもの0.05 gを5 mLの10mM Tris-HCl (pH8.0) bufferで抽出したものを、原液とした。

この膵臓抽出液で、まずマーカータンパク質および仔魚用飼料の主成分である鮫卵の凍結乾燥品アクアランのタンパク質を25°Cで消化し、タンパク質に対する消化特性を解析した。その結果、マーカータンパク質は、10分以内に高分子は低分子に分解され、幅広いタンパク分子に対する消化能を有していた (Fig. 3)。一方、アクアランにはビテロゲンと推察される2種類のタンパク質が主成分となっており、ウナギ膵臓抽出

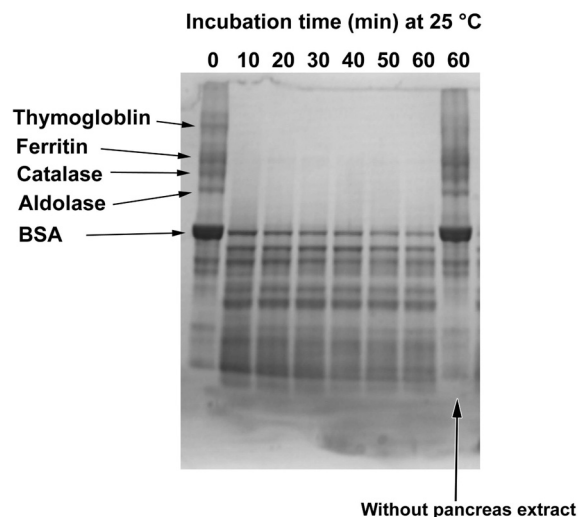


Fig. 3. Digestion of marker proteins by eel pancreatic extract.

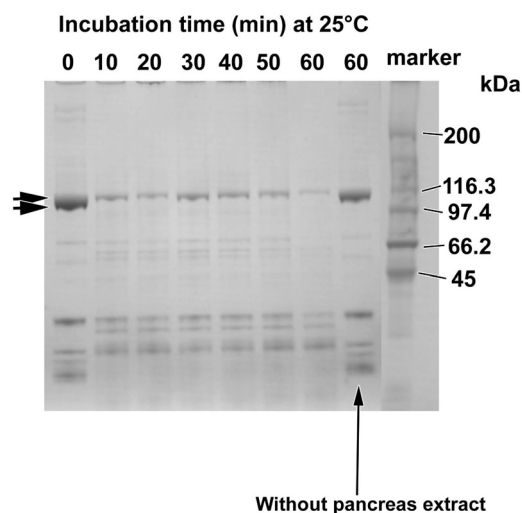


Fig. 4. Digestion of Aquaran proteins by eel pancreatic extract. Arrowheads indicate the two types of vitellogenin.

液により一方は10分以内に分解されたが、もう一種類は60分後も残存していた (Fig. 4)。

次に、レプトケファルスの体成分の特徴であるムコ多糖類に対する消化特性を検討した。ウナギ膵臓抽出液で、各種標品ムコ多糖類を消化した結果、タンパク質と異なり60分後でもいずれの分子も分解されなかった (Fig. 5)。

これらのことから、ウナギ仔魚の消化管における消化能力は、タンパク質の分解能力は高いが、ムコ多糖類の分解能力は低いものと推察された。

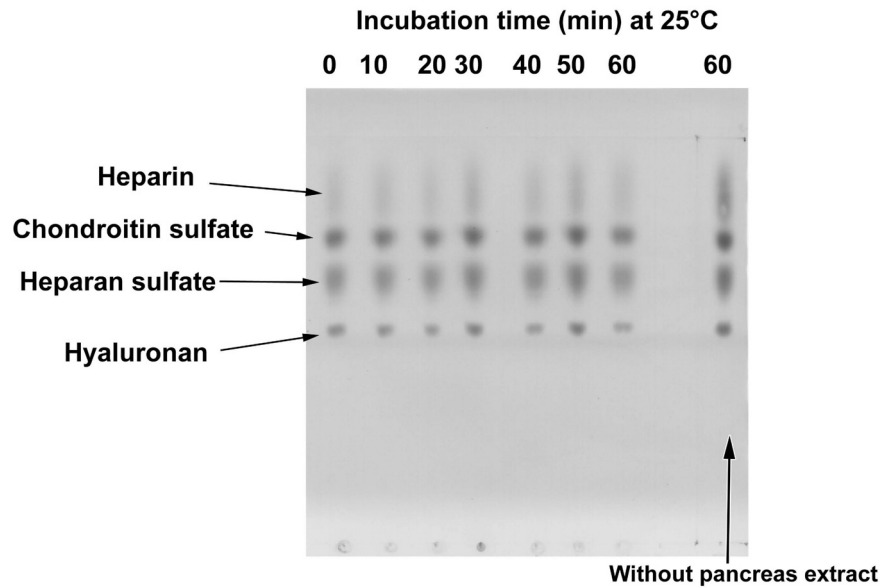


Fig. 5. Digestion of marker mucopolysaccharides by eel pancreatic extract.

ウナギ仔魚の摂餌特性

ウナギ仔魚の摂餌量を把握することができれば、仔魚用飼料の改良をより効率的に進めることができると考えられる。しかし、仔魚の摂餌量を求める手法は、ウナギに限らずいづれの魚種においても確立されていない。そこでまず、ウナギ仔魚の摂餌速度を推定する手法を検討した(Kurokawa *et al.*, 2004)。

飼料原料のアクアランをFITCで蛍光標識し、FITCの蛍光量からアクアランの量を算出できるように回帰式を作製した。次に、FITC標識アクアラン飼料を10日齢のウナギ仔魚に摂餌させ、摂餌後の時間経過による体内のFITC量の変化を測定し、取り込まれたアクアランの量を推定した。その結果、仔魚の摂餌速度は、アクアラン乾重量 $0.04 \mu\text{g}/\text{min}$ と推定された。このときの仔魚に含まれるトリプシン活性を、膵臓が含まれる領域と腸管が含まれる領域に分割してそれぞれ測定したところ、仔魚の摂餌後の腸管側のトリプシン活性は摂餌前に比較して約4.2倍に上昇していたが、膵臓側のトリプシン活性は有意な上昇はみられなかった。

これらのことから、10日齢頃の仔魚は、アクアラン乾重量で $0.04 \mu\text{g}/\text{min}$ 程度の摂餌速度で摂餌をする能力があり、仔魚の腸管内で人工飼料が栄養物として識別されて、膵臓から腸管にトリプシンなどの消化酵素が分泌されることが明らかになった。

おわりに

本研究によって、ウナギ仔魚期の消化器官やその機能の発達過程の概要を明らかにすることができた。ウナギ受精卵を 22°C で飼育した場合、ふ化後8日目から仔魚は摂餌を開始する。この時点までに、仔魚の消化の中心的役割を果たす膵臓の消化酵素合成能および、その内分泌的制御機構が整うことが明らかになった。また、仔魚用人工飼料の主成分であるアクアランを摂餌することにより、仔魚の消化システムに栄養物として認識され、膵臓から腸管への消化酵素の分泌が起こることも観察された。さらに、ウナギ膵臓の消化液により、アクアランのタンパク質が分解され高度に利用されていることも予想された。

一方、ウナギの良質卵と不良卵との違いを遺伝子レベルで明らかにする試みは、十分な成果を得るには至らなかった。ロットによっては、摂餌開始時点で形態異常魚が高い頻度で観察される場合が少なくない(養殖研 黒川ら、未発表)。今後、良質卵と不良卵の違いを明らかにするためには、受精率やふ化率だけでなく形態異常魚の出現状況などさらに幅広い観点からの検討が必要と考えられる。

文 献

Kagawa H., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K. and Hirose K., 1995: *In vitro* effects of 17β -hydro-

xyprogesterone and $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **61**, 1012-1051.

Kagawa H., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K. and Iinuma N., 1997: Induce ovulation by injection of $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Sci.*, **63**, 365-367.

Kurokawa T. and Pedersen B.H., 2001: Digestive system of eel larvae. Proceedings of the international symposium of Advances in eel biology, pp.92-94.

Kurokawa T., Suzuki T., Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., and Unuma T., 2002: Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*.

Fisheries Science, **68**, 736-744.

Kurokawa T. and Pedersen B.H., 2003: The digestive system of eel larvae. in "Eel Biology" (eds. by Aida K., Tsukamoto K., and Yamauchi K.), Springer, Tokyo, pp.435-444.

Kurokawa T., Iinuma N., Unuma T., Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., and Suzuki T., 2004: Development of endocrine system regulating exocrine pancreas and estimation of feeding and digestive ability in Japanese eel larvae. *Aquaculture*, **234**, 513-525.

Pedersen B.H., Ueberschär B. and Kurokawa T., 2003: Digestive response and rates of growth in pre-leptocephalus larvae of the Japanese eel *Anguilla japonica* reared on artificial diets. *Aquaculture*, **215**, 321-338.

Tanaka H, Kagawa H, and Ohta H, 2001: Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture*, **201**, 51-60.