

ヒラメの生化学的分析について

野口昌之¹⁾・古田晋平²⁾・長沢トシ子¹⁾

(¹⁾ 日本海区水産研究所・²⁾ 鳥取県水産試験場)

1. はじめに

ヒラメの種苗生産は大量に行われ、種苗放流も盛んに行われている。日本海区内の放流実績は1990年で400万尾を越えている(水産庁・社団法人日本栽培漁業協会1992)。しかし、ヒラメの放流効果が明らかになっている例は少ないのが現状である。このような原因の一つとして一般的に人工種苗は天然魚に比較すると質的に劣るという考え方がある(福原1989)。この種苗の質の問題を捉えるための一つの試みとして、種苗の生化学的な側面からのアプローチが考えられる。生化学的分析は水産の分野では様々な稚魚の発育の解析等に用いられており(福田ら1986 a, 1986 b, 中野1991)、最近ではいくつかの種について健苗性に関する研究も見られている(中野・白旗1988, 中野ら1989)。ここでは核酸比(RNA/DNA)、C/N比、酵素活性について天然ヒラメとヒラメ人工種苗の比較、ヒラメ人工種苗での行動の違い、中間育成中の経時変化について検討した。

なお、今回の実験については鳥取県水産試験場及び鳥取県栽培漁業センターの多くの方々にお世話になり、御助言を頂いた。分析については中央水産研究所生物機能部中野広博士(現水産庁研究課)及び日本海区水産研究所藤井徹生研究員に丁寧な御助言、御指導を頂いた。また、分析の補助として窪田和代嬢の協力を得た。これらの方々に深謝する。

2. 材料と方法

(1) 天然ヒラメとヒラメ人工種苗の核酸比、C/N比の違い

天然魚として鳥取県東伯郡泊村石脇地先で91年6月11・12日に採集した体長32.7-66.7mmの29個体を用いた。ヒラメ人工種苗として鳥取県栽培漁業センターで飼育中の個体を91年5月31日、6月7日に採集した体長31.6-49.5mmの47個体を用いた。核酸比及びC/N比の測定には有眼側の背部の筋肉組織を用いた。

(2) ヒラメ人工種苗の水槽内における位置による核酸比、C/N比、酵素活性の違い

鳥取県栽培漁業センターで91年5、6月に飼育中の個体を使用した。水槽内で水面近くにいる個体(S)、底にいる個体(B)と壁にいる個体(W)の3つのグループに分けた。サンプリングは91年5月31日、6月7日の2回行った。S・B・Wの各グループから24個体ずつ、有眼側の背部の筋肉組織を用い、核酸比及びC/N比を測定を、また肝臓組織を用いて酸性プロテアーゼ活性の測定を行った。

(3) 中間育成中の核酸比、C/N比、酵素活性の経時変化

中間育成時のヒラメ種苗の核酸比、C/N比、酵素活性の経時変化を調べるため、鳥取県が

東伯郡泊村宇谷の海岸に作った中間育成の予備実験用の池(10×10mの矢板打ち素堀池)で、91年6月26日から7月6日までヒラメ種苗を飼育した。中間育成開始当日、1、3、5、7、10日後に12個体ずつサンプリングを行った。核酸比及びC/N比の測定には有眼側の背部の筋肉組織を用いた。酸性プロテアーゼ、G6PDH、ICDH活性の測定には肝臓組織を用いた。

RNA及びDNAの定量はSTS変法(中野1988)によった。C(炭素)及びN(窒素)はCHNコーダー(柳本MT-5)を用いた。

酵素抽出液は組織に約10倍量の0.25 M Sucrose-1mM EDTA-20mM Tris-HCl(pH7.5)溶液を加え、ホモジナイズし、2500rpmで20分間遠心分離して得た上澄みを用いた。

酸性プロテアーゼ活性は上記の上澄み0.2mlにAcetate buffer(pH2.5)0.2ml、1%酸変性ヘモグロビン0.6mlを加え、30℃で60分反応させた。このとき生成したペプチドをLowry法で測定した。

G6PDH(グルコース6リン酸脱水素酵素)活性は上記の上澄み0.1mlに0.5M Tris-HCl(pH7.5)1.0ml、0.1M MgCl₂ 0.5ml、5mg/ml Glucose-6-Phosphate 0.3ml、5mg/ml NADP 0.1ml、H₂O 1.15mlを25℃のセル内で加え、340nmでの吸光度の減少より求めた。

ICDH(イソクエン酸脱水素酵素)活性は上記の上澄み0.05mlに0.1M Tris-HCl(pH8.5)2.5ml、0.1M MgCl₂ 0.15ml、0.1M Isocitrate 0.1ml、10mg/30ml NADP 0.1mlを25℃のセル内で加え、340nmでの吸光度の減少より求めた。

3. 結果と考察

(1) 天然ヒラメとヒラメ人工種苗の核酸比、C/N比の違い

核酸比と体長の関係を図1に示した。天然ヒラメでは、体長33-45mm(以下魚の大きさは体長とする)の個体で平均4.4、45-50mmで4.1、50-67mmで3.5と小さい個体ほど高い傾向が見られた。ヒラメ人工種苗ではこの傾向は見られず、32-35mmの個体で5.4、35-40mmで5.5、40-45mmで5.3、45-50mmで5.6であった。また、人工種苗と天然魚を比較すると30-50mmの全ての範囲で人工種苗が天然魚よりも高い傾向がみられた。

C/N比と体長の関係を図2に示した。天然魚では33-45mmの個体で平均3.23、45-50mmで3.20、

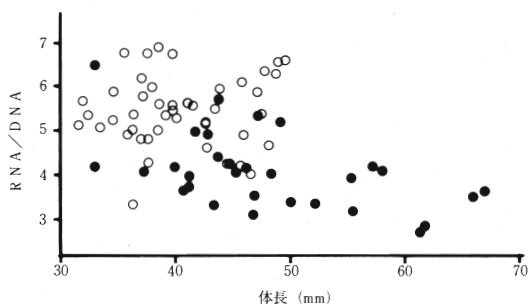


図1. RNA/DNAと体長の関係

●:天然魚 ○:人工種苗

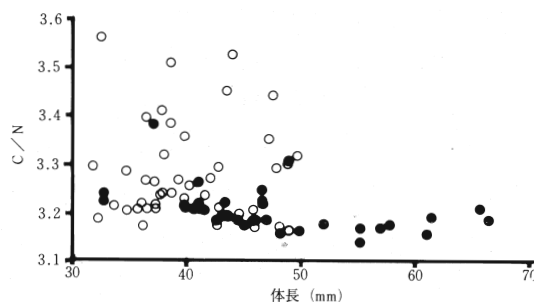


図2. C/Nと体長の関係

●:天然魚 ○:人工種苗

50-67mmで3.17と小さい個体ほど高い傾向が見られた。人工種苗でもこの傾向は見られ、32-35mmの個体で3.29、35-40mmで3.28、40-45mmで3.28、45-50mmで3.26であった。また、人工種苗と天然魚を比較すると、30-50mmの全ての体長範囲で人工種苗の方が天然魚よりも高い傾向が見られた。また、人工種苗の中には天然魚と同程度の3.3以下の値を示す個体も多いが、天然種苗には見られない3.4以上の値を示す個体があり、結果として平均値が高く、ばらつきが大きいことが特徴であった。

DNA (deoxyribonucleic acid) は遺伝子本体で、核の中に含まれ、1細胞当りの量が一定で、DNA量は細胞数の指標となることが知られている (HOLM-HANSEN 1969・REGNAULT and LUQUET 1974)。RNA (ribonucleic acid) はDNAの遺伝情報を細胞質中に伝える働きをしており、タンパク質の合成が活発な組織ではRNA量が高く、飢餓等ではRNA量が低い等、条件により著しく変化する。このことから核酸比は1細胞当りのタンパク合成能の良い指標となる (BULOW 1970, BUCKLEY 1984)。今回の分析では、前述のように同じ大きさと比較すると天然魚より人工種苗の方が核酸比が高いことから、天然魚より人工種苗の方がタンパク質の合成能が高く成長が早いことが伺える。

C/N比は炭素(C)と窒素(N)の比であり、体の主要な構成物であるタンパク質と脂肪に含まれるこれらの元素の割合が異なることから脂肪含量が多いとC/N比が増大し、少ないと減少することが知られており、脂肪含有量の指標となる。首藤ら(1983)はマダイの脂肪含有量とC/N比が高い相関を持つことを示し、マアジの摂餌量とC/N比が比例関係にあること(畔田・木村 1971)およびマダイのC/N比が絶食により低下すること(安楽・畔田1973)と考え合わせ脂肪含有量の指標としてC/N比が好ましいとしている。今回の分析では、前述のように同じ大きさと比較すると天然魚より人工種苗の方がC/N比が高いことから、天然魚より人工種苗の方が脂肪含有量も高い傾向が伺える。一般に人工種苗の方が摂餌量や運動量の関係で脂肪含量が多い(福原1989)。

ヒラメの人工種苗と天然種苗の体成分を比較した藤井(1990)の報告では、天然魚で40mm以上、飼育魚では30mm以上で核酸比及びC/N比は体長によらずほぼ一定で、核酸比は天然魚では4前後、C/N比は飼育魚では1個体を除き3.20以上なのに対し、天然魚では大部分の個体が3.20以下であるとしている。今回の結果の値はこれらの値とほぼ一致する。しかし、今回分析を行った体長範囲(33-67mm)では核酸比およびC/N比に体長との関係が存在し、藤井の結果と異った。さらに藤井(1990)は飼育魚の30mm以下の個体では核酸比が高いと述べており、いろいろな飼育条件における核酸比およびC/N比と体長の関係について詳しく調べる必要がある。

(2) ヒラメ人工種苗の水槽内における位置による核酸比、C/N比、酵素活性の違い

水面近くにいる個体(S)は底にいる個体(B)や壁にいる個体(W)に比べて、体長が明らかに小さかった(図3)。核酸比では各々の値に差はなかったが(図4)、天然魚では小さい方が核酸比が大きいこと、SはBやWに比べて小さいことを考慮するとSはBやWに比べてタンパク質の合成能が低いと考えられる。また、数は少ないが体長の重なる範囲(32-35mm)で比較してもやや低い。C/N比も各々の値に差はないが(図5)、核酸比と同様のことがいえる。酸性プ

ロテアーゼ活性はSがBやWに比べて高い(図6)。体長の小さい個体が活性が高い傾向にあるが、体長の重なる範囲(32~38mm)で比較してもSが高い。また、BとWの間には差はみられなかった。

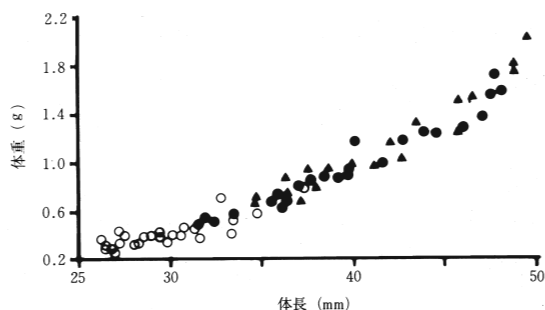


図3. 体長と体重の関係

- ：水面近くにいる個体 (S)
- ：底にいる個体 (B)
- ▲：壁にいる個体 (W)

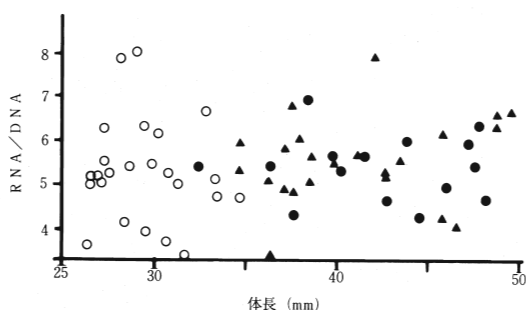


図4. RNA/DNAと体長の関係

- ：水面近くにいる個体 (S)
- ：底にいる個体 (B)
- ▲：壁にいる個体 (W)

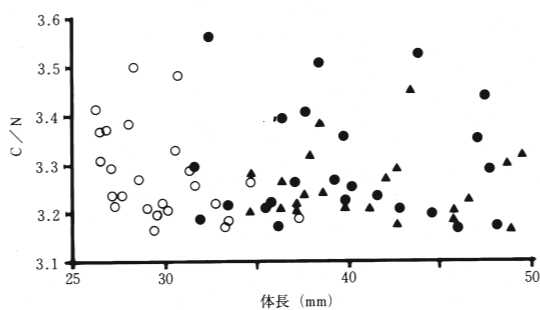


図5. C/Nと体長の関係

- ：水面近くにいる個体 (S)
- ：底にいる個体 (B)
- ▲：壁にいる個体 (W)

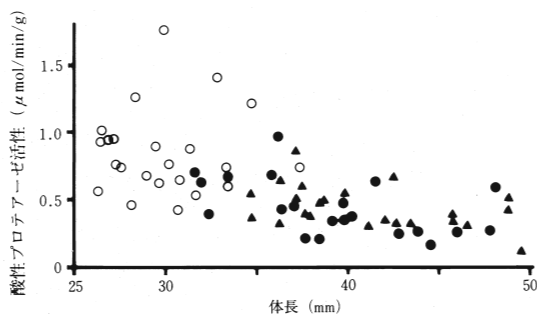


図6. 酸性プロテアーゼ活性と体長の関係

- ：水面近くにいる個体 (S)
- ：底にいる個体 (B)
- ▲：壁にいる個体 (W)

酸性プロテアーゼには胃内に含まれる細胞外消化酵素のペプシンとライソゾームに含まれ細胞内でタンパク分解に係わるとされているカテプシンD等がある。ここでいう酸性プロテアーゼは肝臓を分析したものであるため後者のカテプシンD等である。今回の分析結果からSがBやWに比べて高く、タンパク質の分解がより活性化していることが伺える。

上記の結果からSはBやWに比較して明らかに体が小さいこと、核酸比の結果からタンパク質の合成能が劣ること、C/N比の結果から脂肪含有量が少ないこと、酸性プロテアーゼ活性の結果からタンパク質の分解が活性化していることなどが伺われ、健全な成長をしているとは言えず、健苗性に問題があると考えられる。

一般に水槽中で浮いているヒラメ種苗は小型の個体で、水槽中の密度が高く他の種苗に追い出

されて底にすることができず、水面近くでふらふらしていると考えられている。また、密度が高い場合には取り除いても後からまた浮いてくることが知られている。今回このような種苗は他の種苗とどの様な差があるのかをみるために生化学的な分析を行ったが、体長の差が大きかったため、他の試験の結果から体長による増減傾向を求めて比較したり、体長範囲の重なる少数の個体を比較せざるを得なかった。体長範囲がより重なるようにサンプリングの回数を多くすることで、この差はより明瞭になると考えられる。

(3) 中間育成中の核酸比、C/N比、酵素活性の経時変化

開始時と終了時の値を比較すると核酸比は開始時4.5、終了時4.0と低くなった(図7)。C/N比は開始時3.24、終了時3.19と低くなった(図8)。酸性プロテアーゼは開始時0.4、終了時1.0と高くなった(図9)。G6PDH活性およびICDH活性(図10・11)は各々低くなった。

実験魚の体長は平均で実験開始時に49mm、10日後の終了時に53mmと大きな差はなく(4mm)、この間の測定結果に及ぼす成長による影響はほぼ無視できると考えられる。

G6PDHはペントースサイクルの律速酵素でNADPHが生産されることにより脂質の合成に、またペントースを生産することにより核酸の合成に関与するとされている。ICDHは細胞のミトコンドリアに存在する酵素で、クエン酸サイクルの反応速度を決める重要な役割を持つ。今回の分析結果からG6PDH活性、ICDH活性とも開始時と終了時を比較して活性は低下しており代謝系の機能が低下していることが伺える。

上記の結果から開始時と終了時の比較を行うと核酸比からタンパク質の合成能は低くなり、酸性プロテアーゼ活性の結果からタンパク質の分解は活性化し、C/N比から脂肪含有量は減り、代謝も普通に行われていないことが考えられた。ただし、核酸比、C/N比とも低下はするものの終了時の値が天然の値よりも高いことから、これらの値は天然魚の値に近づいている、言い換えると馴致しているとみることが出来る。しかし、酸性プロテアーゼ活性は終了時に飼育魚の値より高いことから、タンパク質の分解の活性化が示唆され、この中間育成中の種苗は健全には成長していると言えず、中間育成はうまく行われていないと考えられる。

鳥取県で行われた同時に採集したサンプルの摂餌離底時間の実験結果からもこの中間育成中に馴致の傾向がみられず(古田未発表)、中間育成がうまく行われなかったことが示唆され、今回行われた生化学的な分析結果と一致した。原因としては今回実験を行った中間育成池は予備実験用の中間育成池のため水の交換がほとんどなかったこと、植物プランクトンの影響で溶存酵素が昼間は過飽和、夜は貧酸素となったことなどが考えられる。

天然ヒラメとヒラメ人工種苗との核酸比、C/N比の比較、ヒラメ人工種苗の水槽内における位置による核酸比、C/N比、酵素活性の違い、中間育成中の核酸比、C/N比、酵素活性の変化について論議した。さらに種苗の質について論議するためにはより一層の生化学的な分析結果と生態的、機能的、形態的な分析との結び付きが重要であろう。

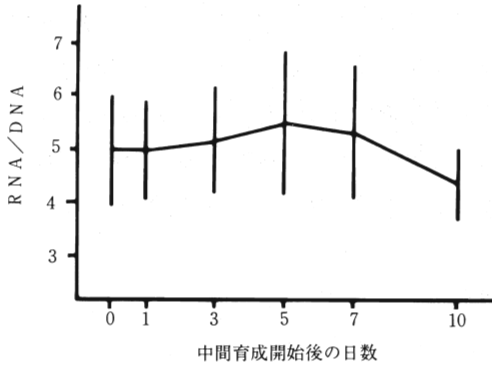


図7. 中間育成中のRNA/DNAの変化
縦棒は標準偏差

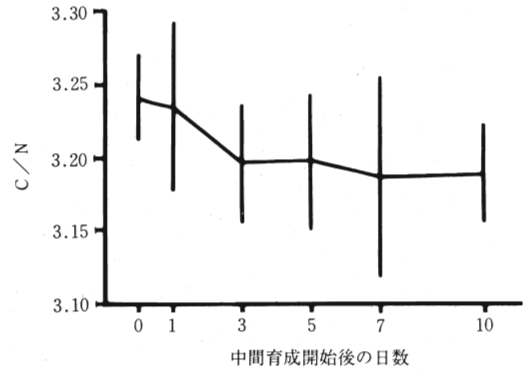


図8. 中間育成中のC/Nの変化
縦棒は標準偏差

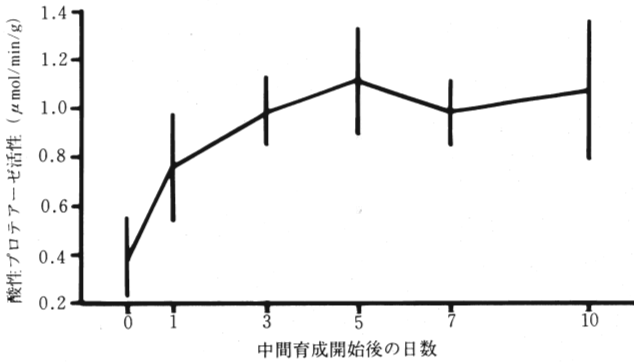


図9. 中間育成中の酸性プロテアーゼ活性の変化
縦棒は標準偏差

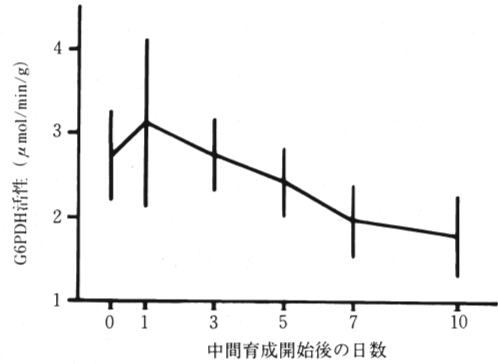


図10. 中間育成中のG6PDH活性の変化
縦棒は標準偏差

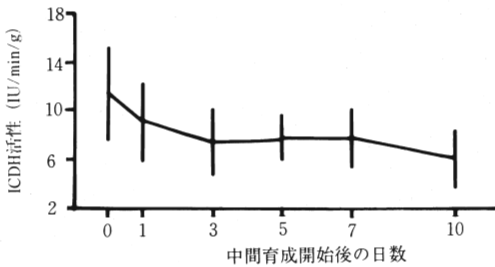


図11. 中間育成中のICDH活性の変化
縦棒は標準偏差

文 献

- 畔田正格・木村重人 (1971) マアジ幼魚の摂餌量の推定. 西水研研報, (39), 15-31.
- 安楽正照・畔田正格 (1973) 天然および養成マダイ幼稚魚の体成分の差異. 西水研研報, (43), 117-131.
- BULOW, F. J. (1970) RNA-DNA ratios as indicators of recent growth of a fish, J. Fish. Res. Bd. Canada 27, 2343-2349.
- BUCKLEY, L. J. (1984) RNA-DNA ratio : an index of larval fish growth in the sea, Marine Biology 80, 291-298.
- 藤井徹生 (1990) 飼育条件によるヒラメ稚魚の体成分の変化について. 日本海ブロック試験研究集録 (19), 45-53.
- 福田雅明・中野 広・山本和久 (1986 a) 北大水産彙報37(1), 30-37.
- 福田雅明・矢野 豊・中野 広・杉山元彦 (1986 b) クロガシラガレイ稚仔魚の成長に伴うタンパク質量と核酸量の変化, 日水誌52(6), 951-955.
- 福原 修 (1989) 人工種苗の質的問題点-天然魚と人工魚はちがうか-. 水産の研究 8(3), 67-72.
- HOLM-HANSEN, O. (1969) Algae: amounts of DNA and organic carbon in single cells, Science, N. Y., 163, 87-88.
- 中野 広 (1991) 生体成分の生化学的分析. 魚類の初期発育, 恒星社厚生閣, 60-70.
- 中野 広 (1988) 稚仔魚研究のための核酸の定量法. 海洋と生物10(1), 23-26.
- 中野 広・白旗総一郎 (1988) サケの健苗性について. 日水誌54(8), 1263-1269.
- 中野 広・小野木博一・大橋誠之・丸山敬悟 (1989) マダイの空中乾出時の生化学的变化に関する研究 粗放的生産魚と集約的生産魚との比較-I. 栽培技研17(2), 107-113.
- REGNAULT, M. and P. LUQUET (1974) Study by evolution of nucleic acids content of prepuberal growth in the shrimp *Crangon vulgaris*, Mar. Biol., 25, 291-298.
- 水産庁・社団法人日本栽培漁業協会 (1992) 平成2年度栽培漁業種苗生産. 入手・放流実績 (全国), 1-441.
- 首藤弘幸・池本麗子・畔田正格 (1983) 志々伎湾における若魚期マダイの生息場所の評価. 西水研研報 (59), 71-84.