

クロマグロの消化酵素遺伝子のクローニングと 仔稚魚における発現解析

家戸敬太郎

(人工種苗グループ)

近畿大学水産研究所

近年、クロマグロの天然種苗を用いた養殖生産量が急激に増加したことで、資源減少が国際問題となっており、人工種苗生産技術の開発が急務となっている。これまでの研究で、クロマグロでは仔魚期にアルテミアの栄養素を利用できず、また稚魚期においても配合飼料の主原料である、加熱処理した魚粉の利用能が他魚種に比べて低いことが明らかとなっている。そこで本研究では、クロマグロの種苗生産技術向上を目的として、消化酵素遺伝子をクローニングしてそれらの発現パターンを解析し、代表的な種苗生産対象魚種であるマダイと比較することで、クロマグロの栄養素利用能の特徴を明らかにしようとした。クローニングする消化酵素は、ペプシン(pepsin)、トリプシン(trypsin)、キモトリプシン(chymotrypsin)、アミラーゼ(amylase)、およびキチナーゼ(chitinase)とした。

材料および方法

クロマグロの消化酵素遺伝子のクローニング

完全養殖クロマグロの胃、幽門垂および肝臓、ならびに孵化後 18 日の人工孵化クロマグロの全魚体から Total RNA を抽出し、他魚種の各消化酵素遺伝子の配列を基に作成した degenerate プライマーを用いて、degeneratePCR 法によって各消化酵素遺伝子の断片をクローニングした。また、マダイ稚魚から胃および肝臓をサンプリングし、

同様にクローニングした。

孵化仔魚の発育段階における消化酵素遺伝子の発現解析 クロマグロを孵化後 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 および 30 日にサンプリングし、total RNA を抽出した後、各消化酵素遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。参考としてマダイの各発育段階における消化酵素遺伝子の発現も同時に解析した。

結果

クロマグロの消化酵素は、Trypsin-A および B, Chymotrypsin-A, Amylase-A および B, Chitinase-A および B の合計 7 種類、マダイは、Pepsin-A および B, Trypsin-A および B, Chymotrypsin-A および B, Amylase-A, Chitinase-A の合計 8 種類の遺伝子がクローニングできた。クロマグロの Trypsin-B, Chymotrypsin-A, Amylase-A および B, Chitinase-A および B はいずれも孵化後 1~30 日の全てのサンプルで遺伝子が発現していた。クロマグロの Trypsin-A は孵化後 3 日から、Pepsin 1, 2 および 3 はそれぞれ孵化後 15 日から発現を確認した。マダイの Trypsin-B, Chymotrypsin-B, Amylase-A はいずれも孵化後 1~30 日齢で発現し、Trypsin-A,

Chymotrypsin-A は孵化後 3 日から, Pepsin-A と Chitinase-A は孵化後 20 日から, Pepsin-B は孵化後 30 日のみの発現をそれぞれ確認した。

クロマグロとマダイで各消化酵素遺伝子の発現を比較したところ, 膵臓酵素である Trypsin, Chymotrypsin および Amylase では同じような発

現パターンを示したのに対し, 胃で発現する Chitinase と Pepsin はクロマグロがマダイよりも早い時期から発現し, 消化系の発達に関する過去の報告と一致した。今後は, 酵素活性と遺伝子発現との関係を詳細に検討し, クロマグロの栄養素利用能について解明する必要がある。