

カンパチ仔魚期の体成分および消化酵素活性

瀬岡 学・高岡 治・滝井健二・中村元二・熊井英水

Chemical Constituents and Digestive Enzyme Activities in Developing Larvae of Purplish Amberjack, *Seriola dumerili*

Manabu SEOKA*¹, Osamu TAKAOKA*¹, Kenji TAKII*¹,
Motoji NAKAMURA*^{1,2}, and Hidemi KUMAI*¹

Developing larvae of laboratory-reared purplish amberjack, *Seriola dumerili*, were measured for growth, chemical constituents, and digestive enzyme activities. The larvae attained at the yolk sac stage on 0-3 days after hatching (DAH), at the pre-flexion stage on 4-14 DAH, at the flexion stage on 15-21 DAH, at the post-flexion stage on 21-27 DAH, and at the transitional stage on 28-30 DAH, under the present rearing condition. Average body length (BL) of newly hatched larvae was 3.19 mm, the larvae growing to an average of 3.39 mm BL by 3 DAH, 5.45-7.44 mm BL by 15-21 DAH, and 12.81-15.10 mm BL by 28-30 DAH. The oil globule disappeared on 5 DAH when the BL reached 3.54 mm. Moisture fell rapidly until the post-flexion stage and decreased gradually thereafter. Crude protein and crude ash contents and RNA/DNA ratio showed the contrary changes to crude protein, although these reached a plateau at the post-flexion stage. Steep incline in DNA content was recognized during the endogenous period, but then the content continued decreasing gradually thereafter. Protein/DNA ratio rose linearly throughout the post-larval period. A minimum content of triacylglycerol was detected on 5 DAH, but the content as well as phospholipid content slightly increased until the post-flexion stage and then decreased sequentially. During the flexion stage, the body proportion measured in the present study changed and trypsin-like and pepsin-like enzyme activities began respectively to decrease and to increase. These results indicate that the early growth of purplish amberjack is mainly supported 1) by hyperplasia during the endogenous period, 2) by hypertrophy with progressive synthesis and accumulation of protein during the pre-flexion and flexion stages, and 3) by further hypertrophy with active protein synthesis, which makes larval tissues and organs attain to the adult ones.

Key words: purplish amberjack, *Seriola dumerili*, larvae; proximate composition, DNA, RNA, digestive enzyme

*¹ 浦神実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Urugami, Nachikatsuura, Wakayama 649-5145, Japan)

*² 現所属: 中辺路研究分室 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Nakahechi, Wakayama 646-1402, Japan)

カンパチ, *Seriola dumerili* は美味で市場価格も高く, 成長も同属のブリ, *Seriola quinqueradiata* より優れている。したがって, 古くから有用養殖対象魚種の1つとして認識され, その種苗生産に関する研究が行われてきた。例えば, 近畿大学水産研究所では昭和44年(1969年)に日本で初めて養成親魚からの採卵に成功し, その後も人工孵化や仔稚魚の飼育方法に関する応用知見を集積している¹⁾。また, 各都県の水産試験場や(社)日本栽培漁業協会も積極的に研究を実施しており, 産卵行動は同属のヒラマサ, *Seriola lalandi* とよく似ているが産卵時刻は異なること, また親魚の人為催熟法や仔稚魚の成長に伴う形態変化など, 本種の種苗生産を行うために有益な生物学的基礎知見も多く得られてきた^{1,2)}。しかし, 現在でもマダイ, *Pagrus major* やヒラメ, *Paralichthys olivaceus* などの場合と比べ沖だしまでの生残率は著しく低く, 種苗生産技術の確立には至っていない。これは, これらの魚種よりも本種の初期発育に関する基礎知見が未だ極めて乏しいことに原因すると考えられる。そこで, まず本研究では, カンパチ仔魚の発育に伴う体化学成分およびペプシン・トリプシン様酵素活性の変動を調べ, 種苗生産技術の向上に資する生化学的基礎知見を得ようとした。今日, 鹿児島県を中心とした九州四国地方において, 中国海南島やベトナムの沿岸域で捕獲・養成された後に輸入された外国産種苗を用いたカンパチ養殖が活発に行われているが, 捕獲海域における資源量の変動や枯渇さらには魚病移入の可能性なども憂慮されることから, 今後は自国内で健全な種苗を安定供給する必要性がさらに高まるものと思われる¹⁾。

材料および方法

供試魚および飼育方法 本学水産研究所白浜実験場すさみ分室でカンパチ親魚群が自然産出した受精卵40万粒を40m³容コンクリート水槽に収容し, 孵化後3~24日, 12~29日および20~30日にはそれぞれワムシ, *Artemia* および配合飼料を給与して水温22.7~25.4℃, 溶存酸素6.2~7.5mg/lで31日間飼育した(Fig. 1)。その間, 毎日午前8~9時にサンプリングを行い, その一部を脊索上屈過程および相対成長の測定用に5~10%ホルマリンで固定するとともに, 残りを化学分析用に氷冷脱イオン水で洗浄し液体窒素で瞬間凍結した後, -80℃のフリーザーで保存した。なお, 本研究では孵化日を孵化後0日とする。

測定および分析方法 脊索上屈過程および体長に対する吻長, 頭長, 前肛門長, 尾柄高, 全長, 眼径, 頭高, 体高, 上顎長などの量的形質の相対成長をデジタル計測器を備えた実体顕微鏡を用いて測定した。

全魚体の水分, 粗蛋白質および粗灰分をAOAC法³⁾で, トリアシルグリセロール(TAG)およびリン脂質(PL)を市販のキット(協和メディックおよび和光純薬)を使用した酵素法で, そしてDNAおよびRNAをSTS変法⁴⁾で定量した。また, 消化酵素としてペプシン様およびトリプシン様酵素活性をKawai and Ikeda⁵⁾に準じたMiyashita *et al.*⁶⁾の方法で測定し, 各反応条件下で30分間に1μgのチロシンを遊離させる活性を1unitと定義して, 魚体重1mg当たりの活性に換算し表示した。なお, TAGおよびPLの定量には仔魚をエタノール:エーテル(3:1)と共に磨砕して得たホモジネートを, また消化酵素活性の測定には氷冷脱イオン水とともに磨砕

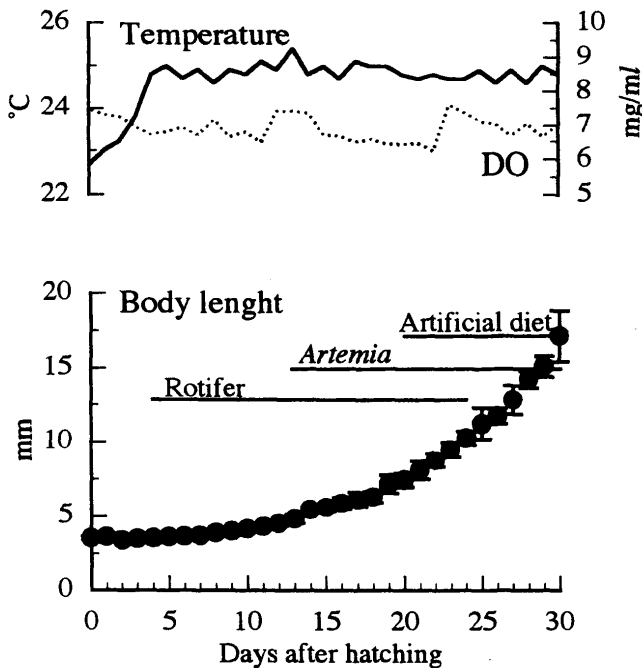


Fig. 1. Changes in body length of purplish amberjack larvae, water temperature, and dissolved oxygen (DO) and feeding schedule for larval rearing during the experiment.

で脊索の上屈が終了した。脊索の上屈は孵化後22日、平均体長8.10 mmに達するとほぼ完了し、孵化後28~30日、平均体長が12.81~15.10 mmにまで成長すると多くの個体で仔魚膜が消失し、各鰭条数は定数化した。

Fig. 2には吻長、頭長、前肛門長、尾柄高、全長、眼径、頭高、体高、上顎長などの量的形質の体長に対する割合の変化を片対数グラフで示した。吻長、頭長、眼径、頭高、体高および上顎長が体長に占める割合は、体長6~8 mmに達するまで増加した後、その後はほぼ一定あるいは緩やかに減少する傾向が認められた。一方、体長に対する全長の割合は5~6 mmまではほぼ一定の値で推移したが、その後は急激に増加した。前肛門長および尾柄高の体長に占める割合は、それぞれ体長5.5~8 mmおよび5~6 mmの間で一時的に増加したが、その前後では比較的一定した値で推移した。

水分、粗タンパク質、TAG、PL および粗灰分含量 飼育日数の経過に伴う魚体の水分、粗タンパク質、TAG、PL および粗灰分含量の変化を Fig. 3 に示した。孵化後1日における水分含量は約87%であり、孵化後4日にかけて約90%にまで増加した後、孵化後15日にかけて84%にまで急激に低下した。一方、粗タンパク質含量は孵化後4日まで5~7%の低い値で推移した後、孵化後15日にかけて約12%にまで急増し、孵化後21日まで緩やかに増加し続けた。それ以後、水分含量は81~84%の範囲で緩やかに減少し、逆に粗タンパク質含量は10~14%の範囲で推移した。脂質についてみると、TAG含量は孵化後急激に低下して孵化後5~6日にはほとんど認められなくなった。しかし、その後はTAGおよびPL含量とも孵化後18~21日まで徐々に増加した後、緩やかに低下した。また、孵化後1日で約1%であった粗灰分含量は孵化後21日にかけ

して得たホモジネートを、それぞれ1,200×g および12,000×g で15分間、4℃で遠心分離して得た上澄みを使用した。

結果

成長 Fig. 1には飼育日数の経過に伴う平均体長の変化を示した。孵化仔魚の平均体長は3.19 mmであり、孵化後3日には卵黄をほぼ完全に吸収して平均体長3.39 mmに達した。油球は孵化後5日の平均体長3.54 mmの個体では認められず、孵化後14日に平均体長が4.83 mmに達すると一部の個体では脊索の上屈が始まっていた。その後、体長は急激に伸びて孵化後15~17日の平均体長が5.45~5.90 mmの個体ではほぼ全てで脊索の上屈を開始するとともに、孵化後20日の平均体長7.19~7.44 mmの個体では、その一部

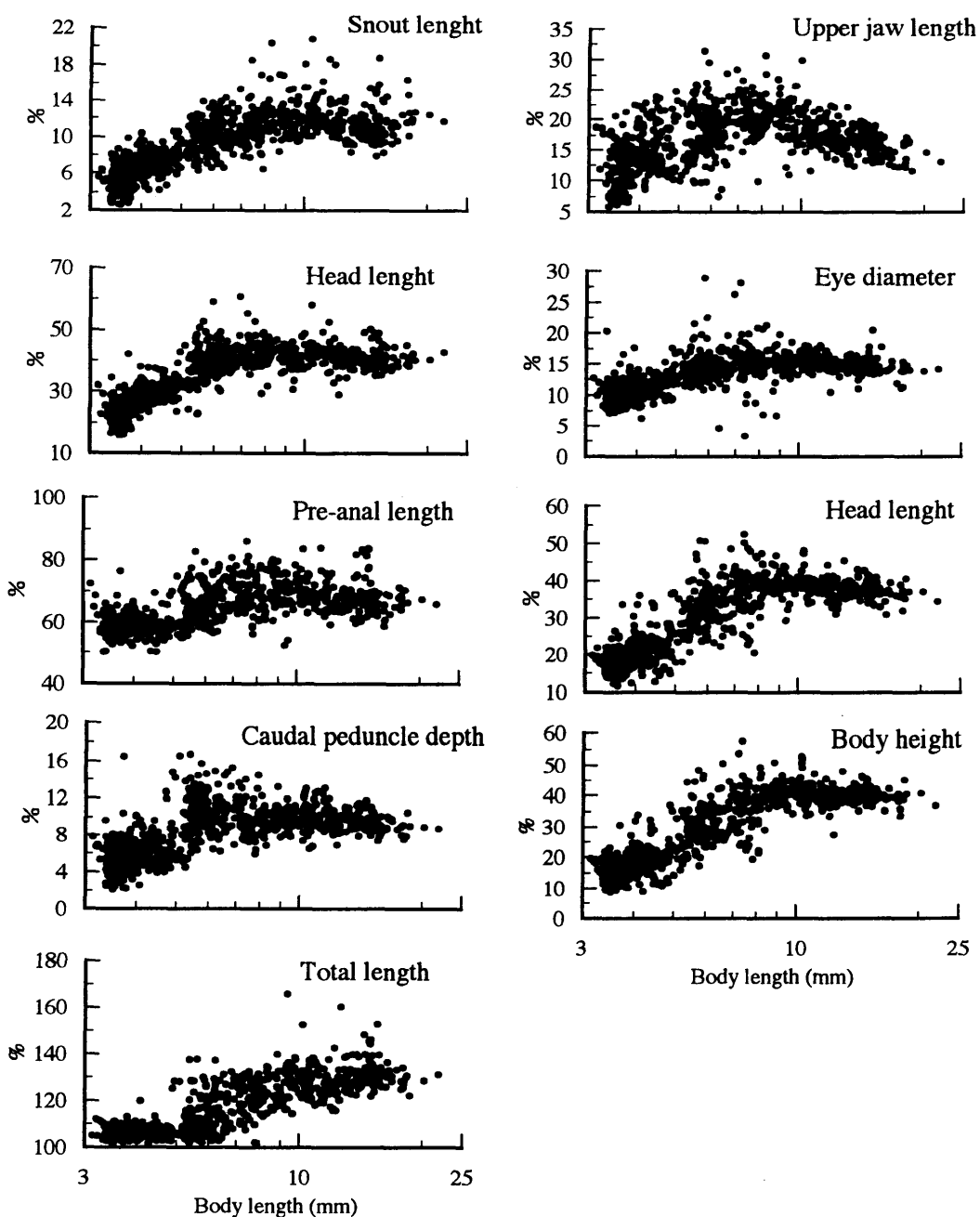


Fig. 2. Some body proportions of purplish amberjack larvae, shown as percentages of body length.

て2.2%にまで急増したが、その後は孵化後30日までほぼ一定の値で推移した。

RNA, DNA, RNA/DNA および粗タンパク質/DNA 飼育日数の経過に伴う魚体の RNA および DNA 含量と RNA/DNA 比および粗タンパク質/DNA 比の経日変化を Fig. 4 に示した。DNA 含量は孵化後5日まで著増したが、それ以後は孵化後30日にかけて徐々に低下した。一方、RNA 含量は孵化後3日まで僅かに減少した後、孵化後15日まで急激に増加して孵化後21日までほぼ一定の高い値で推移した。しかし、その後は DNA 含量の変化と同様に孵化後30日まで低下し続けた。

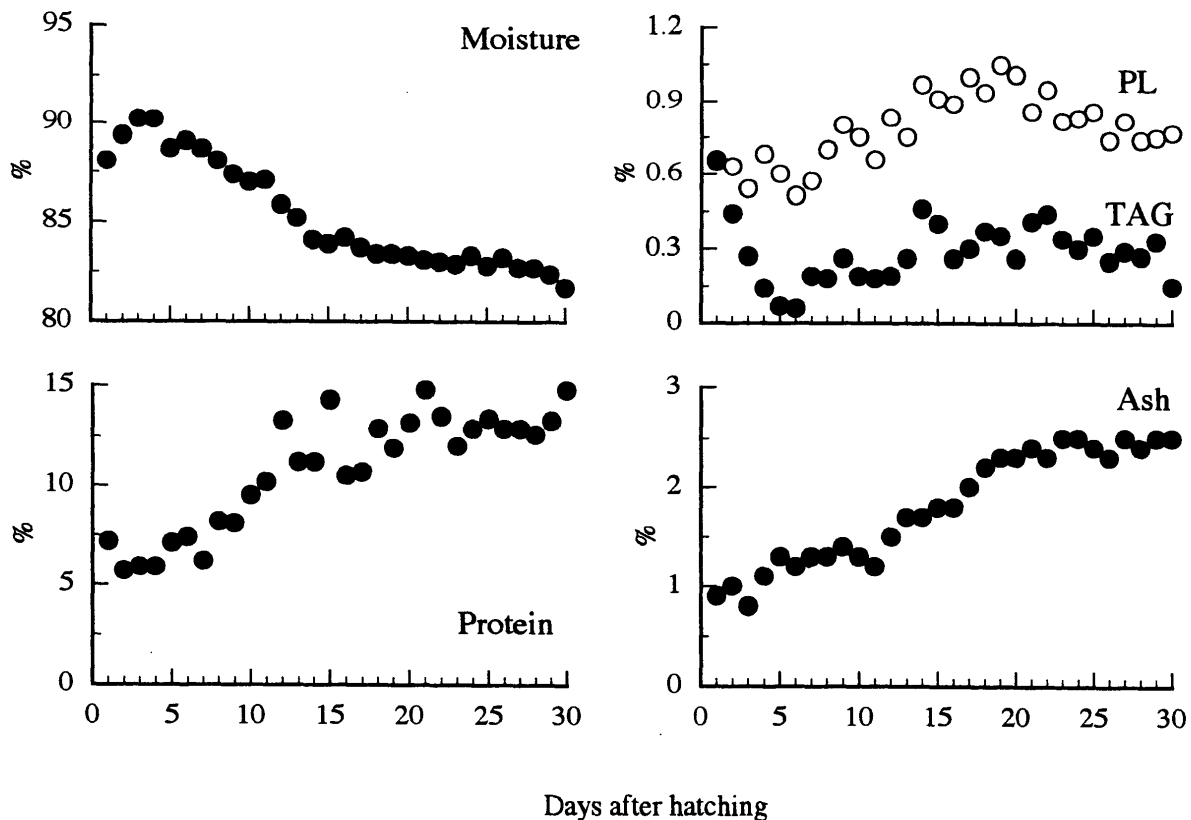


Fig. 3. Changes in moisture, crude protein, triacylglycerol (TAG), phospholipid (PL), and crude ash contents in developing purplish amberjack larvae.

RNA/DNA および粗タンパク質/DNA の両比についてみると、いずれも孵化後 1 日にはそれぞれ約 3 および 45 の高い値を示したが、孵化後 5 日には最低値のそれぞれ 1.8 および 19.0 に達した。しかし、その後、粗タンパク質/DNA 比は直線的に増加し続け、孵化後 30 日には約 60 の高値に達し、また RNA/DNA 比は孵化後 20 日まで著増した後、3.5 前後のほぼ一定値で推移した。

ペプシン様およびトリプシン様酵素活性 魚体 1mg 当たりのペプシン様およびトリプシン様酵素活性の経日変化を Fig. 5 に示した。ペプシン様酵素活性は孵化後 16 日まで極めて低い値で推移したが、孵化後 16~20 日で僅かに増大した後、孵化後 30 日にかけて急増した。一方、トリプシン様酵素活性は孵化後 4 日から急増して孵化後 15 日には最高値に達したが、それ以後はペプシン様酵素活性とは逆に急激に低下し、孵化後 24 日目以降には極めて低いレベルで推移した。

考 察

本研究では、飼育期間中に毎日サンプリングを行ったため、供試したカンパチ仔魚群の生残率を求めることはできなかったが、特定の疾病は認められず、仔魚は順調に成長した (Fig. 1)。

卵黄囊の消失時期、脊索の上屈過程および鰭条数などを考慮すると⁷⁾、本研究で供試したカン

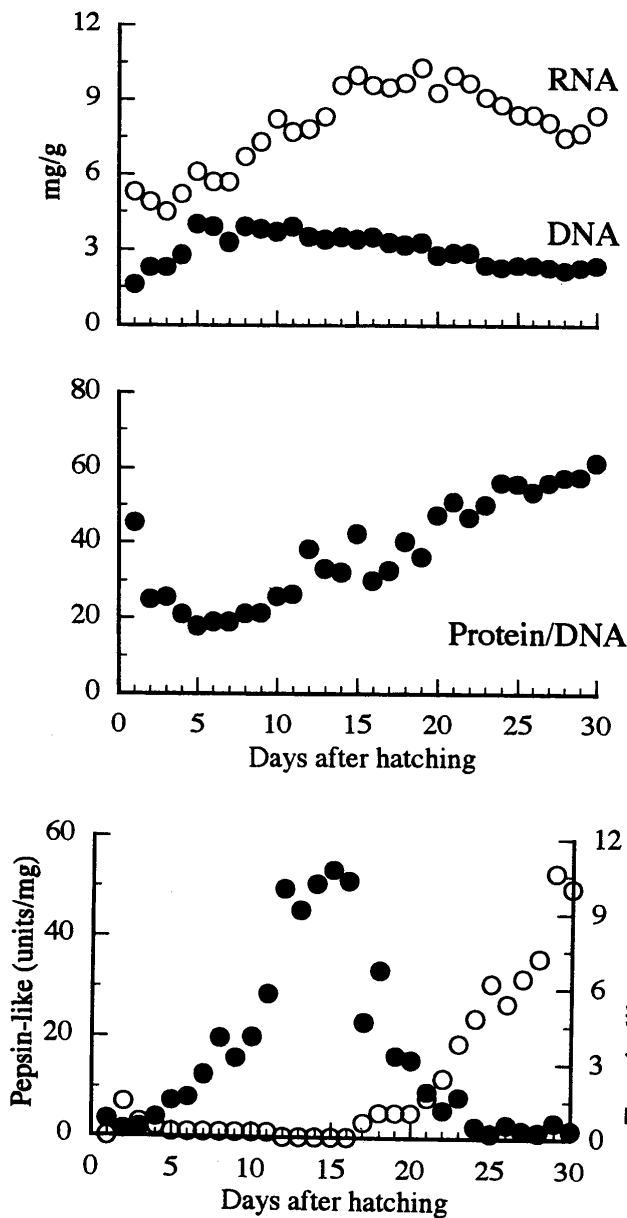


Fig. 5. Changes in trypsin-like (●) and pepsin-like (○) enzyme activities in developing purplish amberjack larvae. The activity was expressed as units, μ g of tyrosine liberated per 30 min per mg of body weight under the assay condition.

3.9~4.7 mm, 4.75 mmおよび4.8~8.5 mmとした。この結果と比較すると本研究でのカンパチ仔魚は flexion および post-flexion 期に達するサイズが大きかったのに加え、pre-flexion 期と flexion 期の期間が長く、逆に post-flexion 期が短かった。このように発育段階にズレや遅延が認められた原因については不明であるが、近年 Sato *et al.*⁸⁾ や Gapasin *et al.*⁹⁾ は仔稚魚の発育や骨格の発達に飼育水温や餌飼料中のビタミンおよび必須脂肪酸含量が深く関与すること、また Divanach *et al.*¹⁰⁾ は飼育水の流速が sea bass, *Dicentrarchus labrax* の骨形成に大きく影響することを示している。本研究と立原ら²⁾の餌飼料系列や飼育環境を厳密に比較することは困難であるが、恐らく、

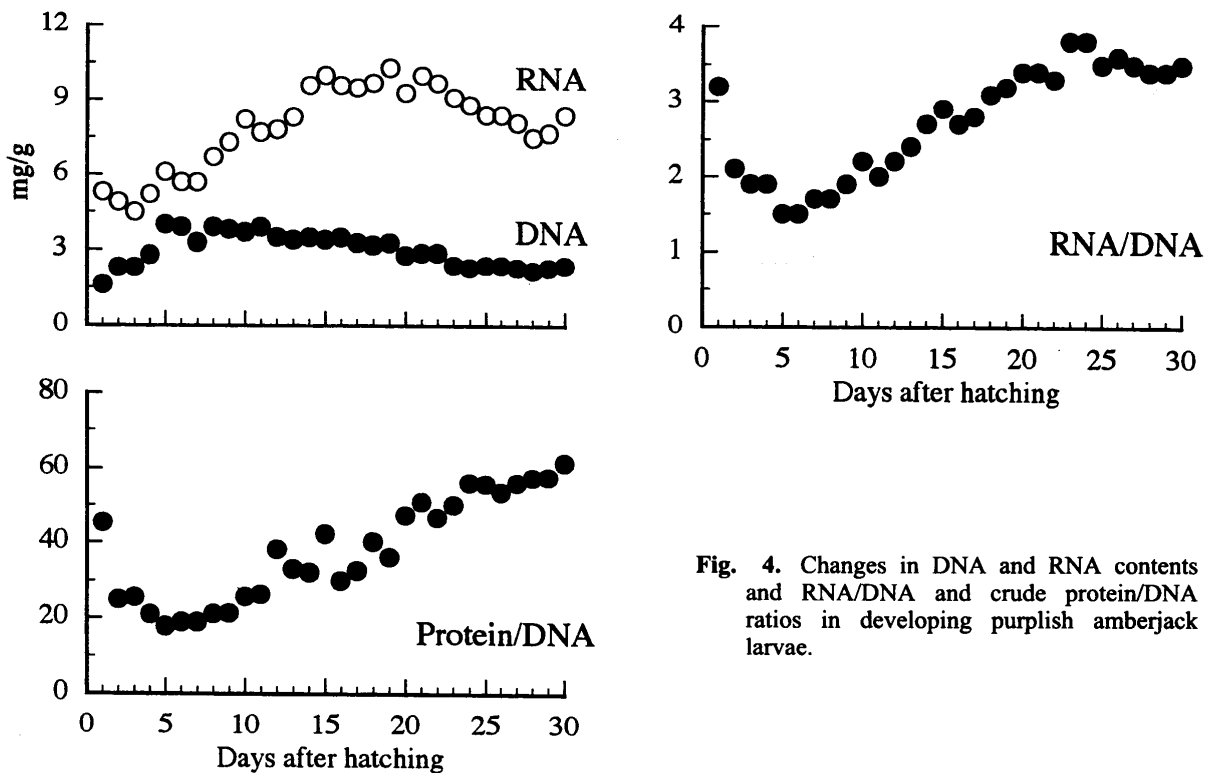


Fig. 4. Changes in DNA and RNA contents and RNA/DNA and crude protein/DNA ratios in developing purplish amberjack larvae.

パチ仔魚の発育段階を孵化後0~3日・平均体長3.19~3.39 mmの前期仔魚期、孵化後4~14日・平均体長3.48~4.83 mmの脊索上屈前期 (pre-flexion 期)、孵化後15~21日・平均体長5.45~7.44 mmの脊索上屈期 (flexion 期)、孵化後22~27日・平均体長8.10~11.73 mmの脊索上屈後期 (post-flexion 期) および孵化後28~30日・平均体長12.81~15.10 mmの稚魚への移行期の5段階に区分することが出来た。また、内部栄養から外部栄養へ転換期は油球が消失した孵化後5日で、平均体長は3.54 mmであった。立原ら²⁾はカンパチ仔魚の発育過程を調べた結果、pre-flexion 期、flexion 期および post-flexion 期における体長を、それぞれ

魚類の初期発育は本来備わっている遺伝的要因以外にも、物理的および栄養的要因の影響を複合的に受けながら進行すると考えられ、他魚種の種苗生産を行う上でも非常に興味深い。

一方、体長に対する各量的形質の相対成長は立原ら²⁾の観察結果と同様に flexion 期を境に急変した。なかでも、摂餌や視覚に関わる形質はその前後で増加から低下あるいはほぼ一定の値になったことから、カンパチ仔魚の摂餌能力は pre-flexion 期で著しく発達すると考えられる。また、前肛門長、尾柄長および全長が post-flexion 期で高い値を保ったことは、この時期に消化器官を備えた躯幹部の発育や尾部および尾鰭の形成が急激に進んだことを示唆しており、摂餌だけでなく補食や遊泳、さらには逃避など自然界での生き残りに必要な組織・器官の機能が稚魚期に向けて急速に整えられると考えられる。Pre-flexion 期でトリプシン様酵素活性が高かったのに対して、post-flexion 期ではペプシン様酵素活性が著増したことも、他の海産魚種^{5,6,11)}でも認められているように、カンパチ仔魚は flexion 期において成魚と同様の胃と腸を介した高度な消化吸收機構を獲得し、post-flexion 期においてその機構をさらに発達させていくことを示唆するものであろう。したがって、本研究結果とこれらの知見から、カンパチの初期発育過程は必ずしも絶対成長に対応して進行するものではないが、組織・器官を形成・分化させるための生化学的変動とは密接な関係のあることが充分に考えられる。

DNA 含量および RNA/DNA 比の増加は、それぞれ細胞数および細胞当たりのタンパク質合成能の増大を間接的に表すと考えられている¹²⁾。しかし、前期仔魚期における RNA/DNA 比の低下はタンパク質合成の低下を示唆するものではなく、Seoka *et al.*¹³⁾がマダイで示したように、この時期においては RNA の合成よりも急激な器官・組織の形成に伴う細胞数の増加、すなわち DNA の合成速度が優ることを示しているのであろう。また、タンパク質/DNA 比は細胞容積を表す指標¹²⁾であるが、卵黄蛋白を有する前期仔魚に対してこの指標を適用することは困難であると思われる。一方、pre-flexion 期では粗タンパク質および RNA 含量と RNA/DNA および粗タンパク質/DNA 比の増加がほぼ平行して認められたことから、pre-flexion 期におけるカンパチ仔魚の発育は活発なタンパク質の蓄積・合成とそれに伴う細胞容積の肥大に基づくことが示唆された。また、flexion 期において RNA 含量はほぼ一定のレベルで推移したが、粗タンパク質含量は若干変動しながらも増加し、逆に DNA 含量は更に減少し続けた。さらに、post-flexion 期では RNA 含量も減少したものの、粗タンパク質および RNA/DNA 比はほぼ一定の値で推移し、タンパク質/DNA 比は増大し続けた。これらの結果から flexion 期では pre-flexion 期と同様に発育は主に細胞容積の増大によって進行するが、post-flexion 期では細胞容積の増大に加え、稚魚への移行に備えて器官・組織の分化を活発化するために細胞当たりのタンパク質合成能を高く保つことが示唆された。Takii *et al.*¹⁴⁾は本研究結果と同様にシマアジ、*Pseudocaranx dentex* 仔魚も細胞数の増加と細胞容積の増大を繰り返し発育することを示している。

TAG 含量は内部栄養期および post-flexion 期で著減した。また、pre-flexion 期および flexion 期では僅かに増加したものの、その変動量は粗タンパク質含量で認められたような急激な上昇ではなかった。これらの結果は、カンパチ仔魚がタンパク質を効率的に利用・蓄積し体成長するため、専ら TAG をエネルギー源として消費することを示唆するものと思われる。一方、PL 含量は post-flexion 期に入るまで増加し続けたが、その後は TAG と同様に減少した。恐らく、pre-flexion 期および flexion 期において PL はタンパク質とともに、専ら細胞構築に利用されていたのであろう。しかし、post-flexion 期における低下は、本成分がこの時期における活発な器官・組織の

分化・形成過程を維持する上で、何らかの大きな生化学的役割を担うことを示唆するものかも知れない。海産仔稚魚の多くは食餌性 PL を要求する¹⁵⁾。魚類、特にその初期発育過程における PL の役割については不明な点も多いが¹⁶⁾、post-flexion 期におけるカンパチ仔魚の PL 要求量はそれ以前の発育段階のものより高いのかもしれない。

以上の本研究結果から、カンパチ仔魚の成長は内部栄養期においては細胞数の増加、また pre-および flexion 期においては主に継続的なタンパク質の合成・蓄積と細胞容積の肥大によって進行するが、post-flexion 期においては組織・器官の分化を活発化するため細胞当たりのタンパク質合成能を高く維持すること、さらに形態学的発育段階は必ずしも絶対成長に対応して進行するものではないが、成長に伴う生化学成分の変動と形態学的発育段階の間には密接な関係の存在することが示唆された。今後はこれらの結果をふまえ、初期発育期におけるカンパチの栄養要求ならびに餌飼料栄養価の改善に関する研究を行って、本種種苗生産技術の確立を目指したいと考える。

要 約

カンパチ孵化仔魚の平均体長 (BL) は 3.19 mm であり、孵化後 4 日・3.48 mm BL に達すると前期仔魚期から後期仔魚期の pre-flexion 期に移行した。外部栄養への転換は孵化後 5 日・3.54 mm BL で完了し、仔魚は孵化後 15~21 日・5.45~7.44 mm BL の flexion 期を経て、孵化後 22 日・8.10 mm BL には post-flexion 期に、そして孵化後 28~30 日・13.83~16.16 mm BL には稚魚への移行期に達した。水分含量は卵黄仔魚期で増加し、その後 flexion 期に達するまで著減した後は緩やかに低下したが、粗タンパク質および粗灰分含量と RNA/DNA 比は post-flexion 期まで著増しプラトウに達した。また、トリグリセリド含量は内部栄養期で激減し、その後はリン脂質と同様に僅かに増加して、post-flexion 期に達すると再び減少した。一方、DNA および RNA 含量はそれぞれ外部栄養への転換期および flexion 期でピークに達し、タンパク質/DNA は稚魚への移行期まで増加し続けた。さらに、体長に対する各量的形質の相対成長が急変した flexion 期でトリプシン様酵素活性は激減し、逆にペプシン様酵素活性が増加し始めた。以上の結果から、カンパチ仔魚の発育は内部栄養期では細胞数の増加、またその後は flexion 期にかけてタンパク質の合成・蓄積の高進に基づく細胞容積の肥大によって進行するが、post-flexion 期に入ると組織・器官の分化を活発化するためにタンパク質合成能を高く維持することが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、水産研究所浦神実験場および水産種苗センター浦神事業場各位と本学農学部水産学科水産増殖学専攻卒業生の吉田和大氏には多大なご助力を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 宮下 盛・熊井英水 (2000) : カンパチ. 最新 海産魚の養殖 (熊井英水編), 湊文社, 東京, pp. 78-88.
- 2) 立原一憲・蛭子亮制・塚島康生 (1993) : カンパチの産卵, 卵内発生および仔稚魚の形態変化. 日水誌, **59**, 1479-1488.
- 3) AOAC (1984): Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, 1141p.
- 4) 中野 広 (1988) : 仔稚魚研究のための核酸の定量法. 海洋と生物, **54**, 23-26.
- 5) Kawai, S. and S. Ikeda (1975): Studies on digestive enzymes of fishes-IV. Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **39**, 877-881.
- 6) Miyashita, S., K. Kato, Y. Sawada, O. Murata, Y. Ishitani, K. Shimizu, S. Yamamoto, and H. Kumai (1998): Development of digestive system and digestive enzyme activities of larval and juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, reared in the laboratory. *SUISANZOSHOKU*, **43**, 111-120.
- 7) Kendall, Jr. A. W., E. H. Ahlstrom, and H. G. Moser (1984): Early life history stages of fishes and their characters, in "Ontogeny and Systematics of Fishes" (ed. by H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, Jr., and S. L. Richardson), Am. Soc. Ichthyol. Herpetol., Spec. Publ. No. 1, Allen Press, Lawrence, KS, pp. 11-22.
- 8) Sato, M., T. Kondo, R. Yoshinaka, and S. Ikeda (1983): Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid-deficient rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 443-446.
- 9) Gapasin, R. S. J., R. Bombeo, P. Lavens, P. Sorgeloos, and H. Nelis (1998): Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, **162**, 269-286.
- 10) Divanach, P., N. Papandroulakis, P. Anastasiadis, G. Koumoundouros, and M. Kentouri (1997): Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture*, **156**, 145-155.
- 11) Kurokawa, T. and T. Suzuki (1996): Formation of diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **414**, 267-276.
- 12) Buckley, L. J. (1980): Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and effect of starvation. *Fish. Bull., U.S.*, **77**, 703-708.
- 13) Seoka, M., K. Takii, O. Takaoka, M. Nakamura, and H. Kumai (1997): Biochemical phases in embryonic red sea bream development. *Fisheries Sci.*, **63**, 122-127.
- 14) Takii, K., M. Seoka, O. Takaoka, S. Furuta, M. Nakamura, and H. Kumai (1994): Biochemical

composition , RNA and DNA contents, and alkaline phosphatase activity with growth of striped jack larvae through juveniles. *Fisheries Sci.*, **60**, 73-76.

- 15) 金沢昭夫 (1993) : 水産動物における高度不飽和脂肪酸およびリン脂質の生理効果. 水産脂質 その特性と生理活性 (藤本建四郎編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 69-79.
- 16) Tocher, D. R. A. J. Fraser, J. R. Sargent, and J. C. Gamble (1985): Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*, **20**, 84-89.