

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：12614
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23658158
研究課題名（和文） イセエビフィロソーマ幼生における溶解アミノ酸の吸収機構の解明
研究課題名（英文） Uptake of dissolved free amino acids from sea water by Japanese spiny lobster <i>Panulirus japonicus</i> phyllosoma larvae
研究代表者 ストルスマン C.A. (STRÜSSMANN C.A.) 東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授 研究者番号：10231052

研究成果の概要（和文）：イセエビのフィロソーマ幼生が数種類の溶解アミノ酸を経皮的に吸収できることを確認し、その取り込みに及ぼす溶解アミノ酸の種類と濃度、さらに幼生の発生段階と脱皮間隔の影響を明らかにした。なお、単独と混合溶液を用いた実験で吸収におけるアミノ酸の相互作用の存在が明らかになった。また、初期幼生の短期飼育において定時的に溶解アミノ酸への浸漬処理を施し、フィロソーマ幼生の活性・成長率・生存率が向上することを確認した。

研究成果の概要（英文）：This study determined that the phyllosoma larvae of Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* are able to absorb through their integument several kinds of free amino acids dissolved in sea water. It also determined the effects of amino acid type and concentration and of larval stage and molting cycle on the rate of absorption and evidenced the presence of interactions between amino acids during absorption. Finally, periodical immersion treatment with dissolved amino acids clearly improved larval activity, survival, and growth rates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：イセエビ、フィロソーマ幼生、溶解アミノ酸、栄養摂取、経皮的吸収、成長、生残

1. 研究開始当初の背景

イセエビはわが国の主要な磯根資源であり、資源維持のための厳しい漁業管理が行われている。一方、積極的に養殖もしくは増殖を図るための研究は重ねられているが、稚仔育成技術が確立しておらず、種苗が確保できないのが現状である。稚仔の育成が円滑でない理由はいくつか考えられるが、イセエビの幼生期間が他の甲殻類に比べて非常に長いことに加えて、その期間中に用いる適当な幼生（フィロソーマ）用餌料が見いだされていない点が最大のネックとなっている。天然における本種の食性が明らかにされていない

いため、これまでに餌料となりそうな生物もしくはその一部が網羅的に試験され、人工餌料も試作されているが、まだ実用的レベルに至っていない。

申請代表者のグループは、自然生態系におけるイセエビフィロソーマ幼生の栄養摂取機構の解明および種苗生産における餌料系列開発に取り組んでおり、これまでに一連の研究を行って来た。まずは、消化管内における生物餌料の消化吸収過程を明らかにし、組織学的立場から餌料の栄養価値を評価するための基準を作成した [J.C. Rodriguez Souza, S. Sekine, Y. Shima, S. Suzuki, C.A.

Strüssmann, and F. Takashima (1996). Usefulness of histological criteria for assessing the adequacy of diets for *Panulirus japonicus* phyllosoma larvae. *Aquaculture Nutrition* 2:133-140]. また、本研究グループの最近の研究から、フィロゾーマ幼生の主なエネルギー源はタンパク質であること、ならびに幼生が周囲の溶解物質や懸濁物質を経口からのみならず、経皮からも摂取できることが見出された。さらに、その経皮的な摂取機構に着目し、アミノ酸の一種であるグリシンの吸収過程が明らかになった [J.C. Rodriguez Souza, S. Sekine, C.A. Strüssmann, Y. Shima, and F. Takashima (1999). Absorption of dissolved and dispersed nutrients from sea-water by *Panulirus japonicus* phyllosoma larvae, *Aquaculture Nutrition* 5:41-51; J.C. Rodriguez Souza, C.A. Strüssmann, H. Satoh, F. Takashima, S. Sekine, Y. Shima, and H. Matsuda (2010). Oral and integumental uptake of free exogenous glycine by the Japanese spiny lobster (*Panulirus japonicus*) phyllosoma larvae, *Journal of Experimental Biology* 213:1859-1867]. 以上のことから、イセエビフィロゾーマ幼生は主に経口摂餌により中腸腺内にて栄養成分を取り込むが、同時に体表から溶解性の成分を吸収する能力も持ち合わせていることが明確になった。なお、無脊椎動物における栄養成分の経皮的吸収については、軟体動物などの幼生で既に報告がなされていたが、節足動物の幼生では本研究が世界で初めてであった。

2. 研究の目的

以上のことから、申請代表者の研究グループはイセエビフィロゾーマ幼生が溶解物質や懸濁物質から栄養成分を摂取する能力を持っていることと、栄養の一部は体表を通じて体内へ吸収されることを見出した。これらの新知見を踏まえて、本研究では、イセエビフィロゾーマ幼生における溶解栄養成分、特にアミノ酸の経皮的吸収過程の吸収条件、各種アミノ酸の選択性・必要性を精査し、本種の栄養摂取機構を総合的に理解することはもとよりイセエビフィロゾーマ幼生育成技術開発の新しい道を切り開く。

本プロジェクトから得られる知見は将来的に、本種の増養殖技術の確立に大きく貢献する可能性を含んでいる。例えば、海水中に溶解している成分から必須の栄養成分や成長因子などを特定し、それらを飼育水に添加することによってフィロゾーマ幼生の活性が向上し、最も死亡率が高いとされる幼生期間の生存率を飛躍的に伸ばすことが期待できる。つまり、フィロゾーマ幼生固有の生物学的特性を最大限に利用することにより栄養摂取の効率化を促し、育成を容易にすることが申請者らの狙いである。イセエビフィ

ロゾーマ幼生の生物特性や種苗生産技術関連研究において、このような取り組みはユニークで、先述したように世界的に見ても先駆的な研究活動である。

3. 研究の方法

本研究では、イセエビフィロゾーマ幼生の栄養摂取機構を総合的に解明することにより種苗生産のための適切な餌料系列を見出すことを最終目標として、当面は本種のフィロゾーマ幼生の体表における栄養成分の吸収条件ならびに各種アミノ酸の選択性・必要性を明らかにする。具体的には、飼育水に溶解している各種アミノ酸の体内への取り込み速度や代謝・成長・生存への貢献度ならびに異なる日齢（発生段階）や脱皮ステージの幼生の吸収能力を検討する。これらの目的を達成するために、次の計画に従って研究を実施した。まず、平成 23 年度では、①溶解アミノ酸の経皮的吸収に及ぼすフィロゾーマ幼生の発生段階、アミノ酸の種類および濃度の影響について調査した。本課題では、0～30、70～80、140～150 および 240～250 日齢の脱皮間期のフィロゾーマ幼生を供試し、8種類のアミノ酸を混合した飼育水で0～5時間インキュベートした。アミノ酸は 0 (対照区)、5 および 20 マイクロモルを飼育水に添加した。フィロゾーマ幼生への取り込み量の定量は、経過時間ごとに飼育水中のアミノ酸残量を高速液体クロマトグラフィー (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) 法で測定し、試験開始時との差から求められた。さらに、②溶解アミノ酸の経皮的吸収に及ぼす脱皮周期の影響および吸収過程ダイナミクスの解明を目指した。本課題では、①の結果を踏まえて、20～30 および 140～150 日齢のフィロゾーマ幼生を一定量の溶解アミノ酸濃度において、脱皮前期・間期・後期幼生の吸収能力の経時的変化を調べた。さらに、一定量のアミノ酸を単独または混合した溶液にフィロゾーマ幼生を浸水処理し、アミノ酸の吸収過程における選択性や互いの相乗効果・拮抗効果を検証した。なお、それぞれの実験のアミノ酸の吸収の測定については①と同様な手法で調べた。

続いて、平成 24 年度では、①溶解アミノ酸の経皮的吸収に及ぼすフィロゾーマ幼生の発生段階、アミノ酸の特性および濃度の影響および②溶解アミノ酸の経皮的吸収に及ぼす脱皮周期の影響および吸収過程ダイナミクスの解明について継続する他、③代謝・成長・生存における溶解アミノ酸の経皮的吸収の重要性について調査した。本課題では、酸素消費量などのデータからフィロゾーマ幼生に必要なエネルギーを計算し、①と②で推定したフィロゾーマ幼生の単位重量当たりのアミノ酸の取り込み量と照らし合わ

せて、各種溶解アミノ酸のエネルギー源としての重要性を評価した。さらに、その結果を検証するために、吸収過程ダイナミクスなどのデータを踏まえて、短期（～30日）および長期（～250日）の飼育における溶解アミノ酸の定期的な浸漬処理がフィロゾーマ幼生の活性・成長・生存に及ぼす効果を検証した。

4. 研究成果

本研究では、イセエビフィロゾーマ幼生の栄養摂取機構を総合的に解明することにより種苗生産のための適切な餌料系列を見出すことを最終目標として、本種のフィロゾーマ幼生の体表における栄養成分の吸収条件ならびに各種アミノ酸の選択性・必要性を検討する。平成23年度では、溶解アミノ酸の経皮吸収過程ダイナミクスならびに吸収に及ぼすアミノ酸の種類および濃度の影響と吸収に及ぼすフィロゾーマ幼生の発生段階の影響について調べた。まず、前者では、240～250日齢の脱皮間期のフィロゾーマ幼生を供試し、7種類のL-タイプアミノ酸を混合した飼育水で0～5時間インキュベートした。アミノ酸は0（対照区）、1、2、5、10および20マイクロモルを飼育水に添加した。フィロゾーマ幼生への取り込み量の定量は、経過時間ごとに飼育水中のアミノ酸残量を高速液体クロマトグラフィー（High-Performance Liquid Chromatography, HPLC）法で測定し、試験開始時および対照区との差から求めた。その結果、幼生は7種類のアミノ酸を濃度依存的に吸収可能で、1～2時間で吸収率がピークすることが判明した。一方、後者では、I、II、III、XII、XIVとXXII齢のフィロゾーマ幼生を5と20マイクロモルに調整した8種類の溶解アミノ酸溶液で0～5時間インキュベートし、吸収能力の経時的変化を調べた。なお、本実験のアミノ酸の吸収の測定については先述と同様な手法を用いた。その結果、フィロゾーマ幼生の溶解アミノ酸吸収能力は孵化直後から最終齢まで認められたが、加齢が重なるとともに低下することが判明した。

平成24年度では、溶解アミノ酸の経皮吸収量および吸収ダイナミクスに及ぼすアミノ酸溶液の組成と濃度の影響と、初期フィロゾーマ幼生の活性・成長率・生存率に及ぼす定時的な溶解アミノ酸への浸漬処理の効果を検証した。まず、一定量の濃度（80 μ Mと320 μ M）の単独（8種類のアミノ酸：Glu・Ala・Met・Asp・Thr・Gly・Val・Ser）と混合したアミノ酸溶液（3種類：Glu・Ala・Met；8種類：先述の8アミノ酸）で初期のフィロゾーマ幼生をインキュベートし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法を用いてフィロゾーマ幼生への取り込み量を測定した。その結果、アミノ酸の吸収過程におけるフィロ

ゾーマ幼生の選択性ならびにアミノ酸の互いの相乗効果・拮抗効果の存在が明らかになった。続いて、フィロゾーマ幼生の成長・生存における溶解アミノ酸の経皮的吸収の影響を調べるためにこれまでの吸収過程ダイナミクスなどのデータを踏まえ、初期幼生の短期（～30日）飼育中に定期的に一定量の濃度（5, 20, 80 μ M）に調整した上記8種類アミノ酸混合液および22種類混合液（先述の8アミノ酸とCys・Ile・Leu・Phe・Pro・Trp・Cys-Hydrochloride・Trans-4-hydroxy-Pro・Asn・Tyr・Gln・Arg・Lys・His）で溶解アミノ酸の浸漬処理を施した。その結果、フィロゾーマ幼生の活性・成長率・生存率に著しい向上が確認された。以上、イセエビ幼生飼育における溶解アミノ酸浸漬処理の有効性が立証された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ストルスマン C.A. (STRÜSSMANN C.A.)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：10231052