

氏 名	かみ さか ゆう こ 上 坂 裕 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1501 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Gastrointestinal hormone cholecystokinin (CCK) in teleosts: the spatial and temporal distribution in the digestive tract of larvae and juveniles (硬骨魚の消化管ホルモン CCK: 仔稚魚消化管における産生細胞の発現と分布)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 克 教 授 矢 野 秀 雄 助 教 授 田 川 正 朋

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では仔稚魚期の消化生理を解明する一環として、主要な消化管ホルモンの一種であるコレシストキニン (CCK) に注目した。これまでに仔魚期の CCK 産生動態を調べた研究はわずかに存在するが、多くは哺乳類の抗体を用いたため、C 末ペンタペプチドが同一のガストリンと交差反応を起こす可能性が残されてきた。近年、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) CCK がクローニングされ、その配列を基に作られた抗ヒラメ CCK 血清を一次抗体として用いることにより、硬骨魚類での CCK 産生動態を詳細に調べる道が大きく開かれた。本研究で明らかにした主な内容は以下のとおりである。

第 1 章 各種硬骨魚類仔稚魚の消化管における CCK 免疫陽性細胞の発現過程

ヒラメ CCK 抗体を用いて、個体発生に伴う CCK の発現と分布様式の変化を、大西洋オヒョウ (*Hippoglossus hippoglossus*)、クロマグロ (*Thunnus thynnus*)、ならびにアユ (*Plecoglossus altivelis*) の三種について調べた。

捻転した腸を持つオヒョウとクロマグロでは、小腸の前半部に CCK 陽性細胞が見られ、直線状のアユでは小腸の全体に散在していた。摂餌された餌は、捻転した腸では小腸前半部にたまりやすく、直線状の腸では直腸部まですばやく移動することや、CCK 産生細胞が細胞の先端から刺激を受け取り基底部分からホルモンを分泌する受容分泌細胞であることから、餌の留まりやすい部位に産生細胞が存在することは、情報学的に受容しホルモンを効率的に分泌する上で合理的である。このため CCK 産生細胞の分布様式と腸の形態には密接な関連がある可能性が推定された。

第 2 章 大西洋ニシン (*Clupea harengus*) 稚魚における CCK のクローニングと消化管組織における発現

次に、仔魚期には直線状の消化管を持つニシンについて CCK 産生細胞の消化管組織における発現を調べた。しかし、前章と同様に免疫染色を行ったところ、内分泌細胞ではなく杯細胞が染色され、抗ヒラメ CCK 血清をニシンに用いることは不適切であることが明らかになった。そこで、ニシンより CCK mRNA をクローニングし、ニシン CCK に特異的なプローブを用いた *in situ* hybridization 法 (ISH) の確立を試みた。

ニシン稚魚の脳と腸よりクローニングした CCK 遺伝子は 137 個のアミノ酸をコードしていた。ニシン CCK に対する RNA プローブを用いて稚魚の消化管における ISH を行ったところ、CCK 反応は典型的な内分泌細胞に見られた。またそれらの細胞は主に幽門垂に存在したが、直腸や小腸、胃の幽門部でも確認され、正しく CCK 産生細胞を検出している可能性が極めて高いと考えられた。

第 3 章 ニシン仔魚の消化管における CCK の発現様式と飢餓による影響

第 2 章で確立された ISH を用いて、仔魚期には直線状の腸を持つニシン仔魚における CCK 産生細胞の発現時期と分布を個体発生を追って調べた。また数日間の絶食が CCK の産生状況に及ぼす影響についても検討した。

CCK 産生細胞はふ化日より小腸全体に広く散在していたが、胃と直腸には全く確認されなかった。この分布様式は成長に伴い細胞数が増えても変わらなかった。この結果は直線状の腸をもつアユと同様であり、CCK 産生細胞の分布様式と消

化管の形態との関連の可能性をさらに裏付ける結果となった。

ふ化後2, 8, 及び30日目より3日間の絶食を行ったところ, ふ化後2, 8日目から始めた実験では, CCKの産生状態にあまり変化は見られなかったが, 30日目からの実験では, 絶食3日目には産生細胞がほとんど見られなくなった。ふ化後2日目及び8日目から始めた実験群では, 卵黄が残っていたために飢餓状態とはならず, 影響が出なかった可能性がある。一方, ふ化後30日から始めた群では, 卵黄を完全に吸収している上に成長に大きなエネルギーを必要とするため, 飢餓への反応が卵黄仔魚よりも敏感に現れ, 産生細胞の顕著な減少をもたらしたと推測された。すなわち, 卵黄仔魚期では餌の有無に関わらずCCKを常に産生して摂餌に備えているものの, 外部栄養への転換後は餌条件によりCCKの産生量が影響を受けることが推測された。

論文審査の結果の要旨

海産魚類の多くは多産性(小卵多産の繁殖戦略)であり, 体長数mmで生まれた仔魚の大多数は様々な要因により初期の短期間に死亡する。特にふ化数日後に生じる内部栄養から外部栄養への転換後の個体発生初期過程では, 摂食や消化吸収が生き残りに深く関わると考えられている。しかし, 仔稚魚の消化生理, とりわけ消化ホルモンの関与についてはほとんど明らかにされていない。本論文は, 膵酵素の分泌や胆嚢収縮を促す消化ホルモンコレシストキニン(CCK)に注目し, 性質の異なった4種 of 海産魚を対象に, 仔稚魚期における産生動態を調べたものである。評価される主な点は以下のとおりである。

- 1) 水産業上重要な大西洋産オヒョウ, 太平洋産クロマグロならびにアユ仔稚魚を実験材料に, ヒラメCCK抗体を用いて消化管におけるCCK免疫陽性細胞の発現時期を調べたところ, オヒョウとクロマグロでは摂餌開始時には発現していないかその数が極めて少なく, 多数の免疫陽性細胞が確認されるまでに時間を要した。一方, アユではふ化日には多数の免疫陽性細胞が確認された。前2種は分離浮性卵, アユは沈性粘着卵から生まれることより, 卵のタイプが発現時期に深く関わることを示した。
- 2) 上記3種の仔稚魚におけるCCK免疫陽性細胞の発現部位は魚種間で異なり, オヒョウとクロマグロでは小腸前半部や幽門垂に限られたのに対し, アユでは小腸全域にわたって分布が認められた。前2種では初期から消化管が回転しているのに対し, アユでは直線状であるという消化管形状に分布特性が深く関連することを示した。
- 3) ヒラメCCK抗体はニシンCCK細胞に反応しなかったため, CCK mRNAをクローニングし, ニシンCCKに特異的なプローブを用いた *in situ* hybridization 法の確立を試みた。脳と小腸よりクローニングしたCCK遺伝子は137個のアミノ酸配列をコードすることや軟骨魚ならびに四足動物と同様にCCK-8はC末端から6番目にメチオニンを有し, 硬骨魚ではこれまでに無いタイプであることを明らかにした。
- 4) 上で得られたCCKのRNAプローブを用いて *in situ* hybridization 法によりニシン仔稚魚のCCK産生細胞の発現過程を調べた結果, アユと同様にふ化日から小腸全域に分布することを確認した。また, ニシン仔魚のCCK産生細胞は絶食に敏感に反応し, ふ化後30日目の仔魚では3日間の絶食で激減することを確認した。

以上のように, 本論文はこれまでほとんど知見のなかった硬骨魚類の個体発生初期におけるCCK産生細胞の動態を詳細に調べ, 魚種間での違いや共通性を明らかにしたものであり, 今後の種苗生産技術の高度化に重要な知見を与えるとともに, 魚類生理学ならびに水産増殖学の進歩に寄与するものである。

よって, 本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成17年2月15日, 論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。