

13°Cから18°Cの水槽に移したときの3倍体 サクラマスのRNA/DNA比の変化

大 津 順

(1992年1月8日受理)

RNA/DNA ratio in triploid masu salmon, *Oncorhynchus masou*, kept in the tank from 13°C to 18°C water temperature changing

Jun OHTSU*

DNA and RNA concentration of white muscle in triploid and diploid of masu salmon, *Oncorhynchus masou*, was determined before and after change of the rearing tank with water temperature of 13 and 18°C. The DNA concentration in the triploid was not different from the diploid at 13°C of normal condition. The RNA/DNA ratio of the triploid was slightly lowered than that of the diploid but not significant at 13°C. The nuclear length of the white muscle cell of the triploid was significantly longer than that of the diploid. After 7 days of the temperature change, the RNA/DNA ratio of the diploid at 7 day was lowered significantly, however, the ratio of the triploid was not significantly different from initial ratio.

Key words: *Oncorhynchus masou*, RNA/DNA ratio, temperature, triploid.

Ribonucleic acid (RNA: リボ核酸) は蛋白を合成するための鋳型として細胞内に存在するものであり、RNA量が多いと言うことは蛋白合成が盛んであることを意味する。細胞1個あたりのDeoxyribonucleic acid (DNA: デオキシリボ核酸) 量は細胞分裂のある時期を除いて一定であり、各組織あたりのDNA量はその組織に含まれる細胞の数の指標となる。そのため、RNA/DNA比は1細胞あたりの蛋白合成活性の1指標とされている。さらに、RNA/DNA比はサケ・マスを含む多くの魚種で成長率と相関が認められ、成長率の1つの指標となることが示されている (Buckley 1984, Bulow *et al.* 1981, Wilder and Stanley 1983, Wright and Martin 1985)。

3倍体魚の赤血球は核と細胞の大きさの増加とともに血液の単位容積あたりの赤血球数の減少が多くの魚種で知られており (Benfey and Sutterlin 1984, Beck and Biggers 1983, Sezaki *et al.* 1983)、同様に、網膜細胞の大きさの増加と数の減少が認められている (Aliah *et al.* 1990)。一方、3倍体サクラマス (*Oncorhynchus masou*) の成長は通常のサクラマスと差がないことが報告されている (宮崎 1989)。しかし、3倍体サクラマスの蛋白合成

* 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Experiment Station,

Namerikawa, Toyama 936, Japan)

富山県水産試験場業績A第20号

能力をRNA/DNA比から調べた報告はない。

本研究は、3倍体サクラマス成長の特性を明らかにすることを目的とし、3倍体サクラマスの筋肉組織におけるDNA含量とRNA含量を調べ、RNA/DNA比を比べるとともに、生理的活性を変化させるために水温が5℃高い水槽に移動した場合のRNA/DNA比の変化を経時的に調べた。

材 料 と 方 法

材料は、富山県水産試験場で養成した性転換雄サクラマスから得た精液を神通川産雌サクラマスから得た卵に媒精し、10分間吸水させた後30℃6分間の高温処理により第2極体放出を阻止して作出した3倍体雌サクラマスを用いた。ふ化後約9ヶ月間は13±1℃の地下水で飼育し、8月中旬に実験に用いた。対照として同じ時期に通常雄と媒精し、同様に飼育したサクラマスの稚魚を用いた。

水温13±1℃で飼育した供試魚(体重7.1~13.3g)と対照魚(体重4.8~12.6g)のそれぞれ20尾を80ℓの個別の水槽に移し、水温18±1℃の飼育水を注入し、1日2回配合飼料を給餌して7日間飼育した。水温変化前(13℃)及び変化後1,3,7日目に各水槽から5尾を取り上げ、背側部体側筋を採取して-80℃で保存し、核酸の測定に供した。3倍体群からは血液の塗抹標本を作成し、赤血球の大きさが通常魚よりも大きいことにより3倍体であることを確認した。

核酸の抽出法 核酸の抽出はSchmit-Thanhauser-Schneider法を一部改変した水野(1969)の方法に準じた。筋肉組織を5倍量の冷水とともにホモジナイズし、その1mlあたり5ml 10%トリクロロ酢酸(TCA)を加え、3,000rpmで10分間遠心分離して沈澱を得た。沈澱に95%エタノール5mlを加え、懸濁した後再び遠心分離した。この沈澱にメタノール・エーテル(3:1)混液15mlを加え、90℃で3分間加熱して脂質を除去した。

脂質を除去した沈澱に5%過塩素酸(PCA)5mlを加え、90℃で15分間加熱して核酸を分解した。冷却後遠心分離して上清を分取し、さらに残渣に5%PCA2.5mlを加えて懸濁し、遠心分離して上清を得た。この上清を前の上清とあわせて核酸分画とした。

DNAの定量 DNAの定量はジフェニルアミン法によった。核酸分画2mlにジフェニルアミン試薬(ジフェニルアミン1.5gを氷酢酸100mlと濃硫酸2.8mlの混液に溶解したもの)4mlを加え、沸騰水中で10分間加熱した後冷却し、分光光度計(島津自記分光光度計UV-260)を用いて室温で695nmの吸収を測定した。サケ精巢DNA(和光純薬製)を用いて検量線を作成し、組織1gあたりのDNA量を計算した。

RNAの定量 RNAの定量はオルシノール法によった。核酸分画2mlにオルシノール試薬(オルシノール100mgを0.1%FeCl₃濃塩酸溶液に溶解したもの)2mlを加えて沸騰水中で20分間加熱し、冷却後分光光度計を用いて660nmの吸収を測定した。同様に、サケ精巢DNAによる発色を測定し、ジフェニルアミン法により測定したDNA量から核酸分画に含まれるDNAによるオルシノール試薬の発色を補正し、酵母RNA(和光純薬製)を用いて作成した検量線によりRNA量を計算した。

核径の測定 水温変化前の試験魚より採血し、常法により血液の塗抹標本を作成し、光学顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いて40個以上の赤血球の長径と短径を測定した。ま

た、筋肉組織細胞核の観察は、水温変化前の試験魚から筋肉組織を採取し、常法によりパラフィン切片を作成して光学顕微鏡を用いて切片の方向が筋繊維と平行なものから任意に40個の核を選び、接眼マイクロメーターにより長径を測定した。

結 果

水温13℃で飼育した試験魚の筋肉1g当りのDNA量をTable-1に示した。3倍体サクラマスの筋肉1gあたりのDNA量は通常サクラマスのそれと比較して有意な差は認められなかった。

DNAとRNA含量をTable-2に、RNA/DNA比の変化をFig.1に示した。水温変化前では3倍体サクラマスのRNA/DNA比は1.38と低かったが、変化1日目以後のRNA/DNA比の変化は通常サクラマスのそれと似た傾向を示した。通常サクラマスは高水温水槽への移動によりRNA/DNA比が減少し、7日目には水温変化前と比較して有意に減少した。一方、

Table-1 Mean DNA concentration in muscle of diploid and triploid masu salmon, fingerling kept in 13℃ water temperature.

	n	DNA ($\mu\text{g/g}$ wet weight)
Diploid	20	302.6 \pm 69.95
Triploid	20	326.6 \pm 70.45

mean \pm S.D.

Table-2 Mean DNA and RNA concentration in muscle of diploid and triploid masu salmon kept in the tank from 13℃ to 18℃ water temperature changing.

Days		0	1	3	7
Diploid	DNA	288.0 \pm 67.6	333.0 \pm 31.0	325.5 \pm 61.4	264.0 \pm 27.7
	RNA	523.5 \pm 87.7	512.0 \pm 64.1	372.5 \pm 65.8	297.0 \pm 59.3
	RNA/DNA ratio	1.82 \pm 0.37	1.54 \pm 0.16	1.18 \pm 0.31	1.14 \pm 0.30
Triploid	DNA	392.0 \pm 63.9	320.0 \pm 62.4	342.0 \pm 52.3	290.5 \pm 36.5
	RNA	520.0 \pm 59.4	449.0 \pm 50.0	380.0 \pm 16.3	299.0 \pm 36.2
	RNA/DNA ratio	1.38 \pm 0.40	1.40 \pm 0.19	1.13 \pm 0.16	1.05 \pm 0.24

mean \pm S.D.

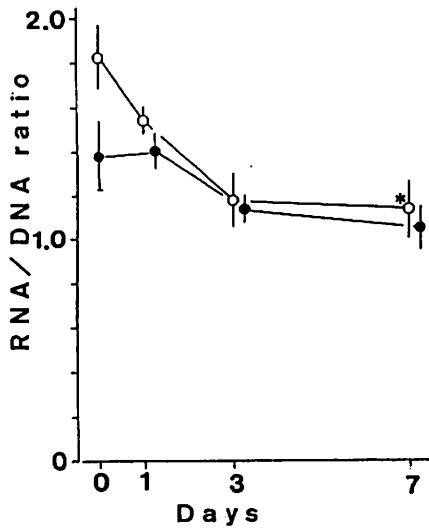


Fig.1 Change of RNA/DNA ratio of diploid and triploid masu salmon kept in the tank from 13°C(0 days) to 18°C water temperature changing.
Open circle:diploid, closed circle:triploid.
Bar:standard error,
astarisk:significantly different from 0 day.

3倍体サクラマスは水温変化後3日目より減少を示した。しかし、3倍体サクラマスでは水温変化前のRNA/DNA比が通常サクラマスよりも小さかったために変化前と後のRNA/DNA比に有意差は認められなかった。

赤血球細胞と核の短径と長径をTable-3に示した。3倍体サクラマスの赤血球細胞と核の短径と長径はともに通常サクラマスのそれらよりも有意に大きかった。

通常サクラマスと3倍体サクラマスの筋肉組織像をFig. 2, 3に示した。中央に核を見ることが出来る。この筋肉細胞核の長径の測定結果をTable-4に示した。3倍体サクラマスの筋肉細胞核の長径は通常サクラマスよりも有意に大きかった。

Table-3 Mean nuclear and cell size of erythrocytes in diploid and triploid masu salmon kept in 13°C water temperature condition.

	Nuclear		Erythrocyte	
	Width (μm)	Length (μm)	Width (μm)	Length (μm)
Diploid (A)	3.09 ± 0.05*	9.30 ± 0.05	7.75 ± 0.05	12.19 ± 0.06
Triploid (B)	3.33** ± 0.06	10.65** ± 0.07	9.25** ± 0.06	21.0** ± 0.17
B/A	1.08	1.15	1.19	1.72

* : mean ± S.E.

** : significant (P<0.01)

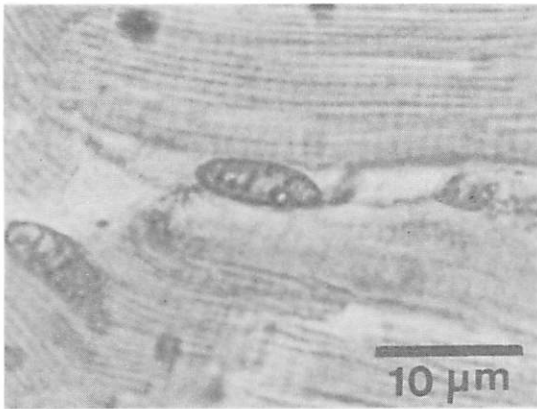


Fig. 2 Nuclear of muscle cell of diploid masu salmon, *Oncorhynchus masou*.

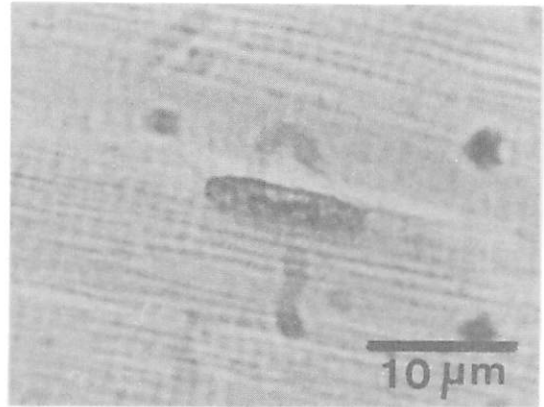


Fig. 3 Nuclear of muscle cell of triploid masu salmon, *Oncorhynchus masou*.

Table— 4 Mean nuclear length of white muscle in diploid and triploid masu salmon kept in 13°C water temperature condition.

Nuclear length	
Diploid (A)	10.36 ± 0.25*
Triploid (B)	11.51** ± 0.23
B/A	1.11

* : mean ± S.E. ** : significant (P < 0.01)

考 察

通常サクラマスと3倍体雌サクラマスの筋肉組織1gあたりのDNA量に有意差は認められなかった。

一方、3倍体雌サクラマスの筋肉細胞核の長径は通常サクラマスと比較して有意に大きく、その比は1.11で、3乗すると1.37となる。また、3倍体サクラマスの赤血球核の長径も有意に大きく、その比は1.15で、3乗すると1.52である。これらのことから、3倍体サクラマスの筋肉及び赤血球の核の容積は通常サクラマスの1.4~1.5倍と推定され、他の魚種の場合とほとんど同様である (Swarup 1959) ことが判明した。

筋肉細胞の核に含まれるDNA量が3倍体サクラマスでは通常サクラマスよりも多いと考えられるにもかかわらず、組織の単位重量あたりのDNA量に有意差が認められなかったことは、3倍体サクラマスにおいては核が大きくなると同時に核1個あたりの細胞の容積が増加していることを示している。3倍体魚の赤血球の核と細胞の容積が増加するが、一方

で赤血球数が減少することは、大西洋サケ (Benfey and Sutterlin 1984), ギンブナ (Sezaki *et al.* 1983) などでよく知られている。平均赤血球容積は大きくなるが赤血球数が減少することはサクラマスにおいても同様である (大津 1991)。細胞の大きさの増加と細胞数の減少は、3倍体のアユ (*Plecoglossus altivelis*) の網膜や腎臓の細胞においても報告されている (Aliah *et al.* 1990)。核の容積が増加する一方で組織1gあたりのDNA含量が変化しないことは、筋肉組織は多核であるために、正確には細胞数の減少を意味するものではないが、赤血球においてみられたと同様に、核と細胞の容積の増加及び細胞数の減少が3倍体サクラマスの筋肉組織においても起こっていると考えられる。

3倍体サクラマスでは核1個あたりのDNA量が多いと考えられるが、組織あたりのDNA量に差がないことから、DNAに対する細胞質の量は通常サクラマスと等しいと考えられる。RNA/DNA比は細胞あたりの蛋白合成活性、ひいては成長率の指標とされているが、細胞質あたりのDNA量に差がないならば、RNA/DNA比により3倍体サクラマスと通常サクラマスの成長を比較することができるものと考えられる。通常の飼育条件である水温13℃においてはRNA/DNA比が通常サクラマスよりも3倍体サクラマスの方が小さいことは、3倍体サクラマスにおいては蛋白合成活性が小さい傾向にあることを示唆するものと思われる。一方で、高水温水槽 (18℃) に移動した場合、3倍体サクラマスと通常サクラマスのRNA/DNA比に差がないことは、3倍体サクラマスの基本的な蛋白合成能力が通常魚と違いがないことを示していると思われる。3倍体サクラマスの成長は、通常魚と混養した場合には通常魚よりも劣るものの、分養した場合には差がないと報告されている (宮崎 1989)。また、3倍体ニジマスの飼料効率は通常のニジマスと差がないと報告されている (Oliva-Teles and Kaushik 1990)。しかし、3倍体アユでは刺激に対する反応が通常のアユよりも鈍いと報告されており (Aliah *et al.* 1990)、今回の実験において通常飼育状態における3倍体サクラマスのRNA/DNA比が低い傾向を示したことは、3倍体サクラマスの摂餌活性が低い可能性もあるように考えられる。

RNA/DNA比は重金属などの影響により減少することが報告されており (Kearns and Atchinson 1979)、また、高水温などのストレスによっても減少することが知られている (Spigaraelli and Smith 1976)。今回の実験において通常サクラマスでは7日目までRNA/DNA比が減少している。サクラマスにとっては18℃という水温は適水温の上限であり、13℃の適水温から18℃の水温に移した場合にはストレスを受けてRNA/DNA比、すなわち蛋白合成活性が減少し、7日目では回復していない。3倍体サクラマスも、通常サクラマスと同様に別水槽への移動と高水温によりストレスを受け、環境変化後少なくとも7日目までRNA/DNA比が減少する傾向が認められた。3倍体サクラマスのRNA/DNA比が通常サクラマスと異なり、7日目においても環境変化前と有意な差が認められないのは、水温13℃の条件下でのRNA/DNA比が通常魚のそれよりもやや小さいためであるが、3倍体サクラマスも、通常サクラマスと同様にストレスを受けて蛋白合成活性が減少していることは明らかである。ただし、3倍体サクラマスのRNA/DNA比が水温13℃の条件下で低いのは3倍体サクラマスの適水温が通常サクラマスと異なっている可能性も考えられる。

本実験より、3倍体サクラマスの成長能力はRNA/DNA比からみた場合には、通常サクラマスと大差ないことが明らかとなった。今後は、高水温や別水槽への移動によるストレスだけではなく、成長に影響を与える他の要素について検討するとともに、ストレスから

の回復についても研究を進める必要がある。

謝 辞

本研究の遂行に当たり様々な御協力、御支援をいただいた富山県水産試験場の研究員、職員の皆様に厚く御礼申し上げる。また、本論文をまとめるに当たり、御助言、御校閲をいただいた養殖研究所栄養代謝部長新井茂博士と当水産試験場長正木康昭博士に深謝の意を表する。

要 約

3倍体サクラマスと通常サクラマスの筋肉組織のDNA量とRNA量を測定し、単位組織重量あたりのDNA量とRNA/DNA比を計算した。また、筋肉組織の核の長径を測定した。その結果、筋肉組織1gあたりのDNA量に差がなかった。また、RNA/DNA比は3倍体サクラマスの方が通常サクラマスよりも低い傾向を示したが、有意差は認められなかった。筋肉細胞の核の長径は通常サクラマスのそれと比較して3倍体サクラマスの方が有意に大きかった。

試験魚を13℃から18℃の水温の水槽に移してRNA/DNA比を経時的に調べたところ、通常サクラマスは移動後7日目で、移動前と比較して、有意にRNA/DNA比が減少した。一方、3倍体サクラマスのRNA/DNA比は減少する傾向を示したが、移動前と比較して有意差は認められなかった。

文 献

- Aliah R. S., K. Yamaoka, Y. Inada, and N. Taniguchi 1990. Effects of triploidy on tissue structure of some organs in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 569-575.
- Beck M. L. and C. J. Biggers 1983. Erythrocyte measurements of diploid and triploid *Ctenopharyngodon idella* × *Hypophthalmichthys nobilis* hybrid. *J. Fish Biol.*, **22**, 497-502.
- Benfey T. J. and A. M. Sutterlin 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *ibid.*, **24**, 333-338.
- Buckley L. J. 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.*, **80**, 291-298.
- Bulow F. J., M. E. Zeman, J. R. Winningham and W. F. Hudson 1981. Seasonal variations in RNA-DNA ratios and in indicators of feeding, reproduction, energy storage, and condition in a population of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. *J. Fish Biol.*, **18**, 237-344.
- Kearns P. K. and G. J. Atchinson 1979. Effects of trace metals on growth of yellow perch (*Perca flavescens*) as measured by RNA-DNA ratios. *Environ. Biol. Fishes* **4**, 383-387.

- 宮崎統五 1989. 昭和63年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 染色体操作によるサクラマスの不稔3倍体大量生産技術開発研究 18pp. 富山県水産試験場.
- 水野重樹 1969. 核酸の一般的分離・定量法, 16-111. 東京大学出版会, 東京.
- 大津 順 1991. 平成2年度地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書 染色体操作によるサクラマスの不稔3倍体大量生産技術開発研究 34pp. 富山県水産試験場.
- Oliva-Teles A., and S. J. Kaushik 1990. Growth and nutrient utilization by 0+ and 1+ triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Fish Biol., **37**, 125-133.
- Sezaki K., S. Watabe and K. Kasimoto 1983. A comparison of chemical composition between diploid and triploid of "Ginbuna" *Carassius auratus langsdorfi*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **49**, 97-101.
- Spigaraelli S. A. and D. W. Smith 1976. Growth of salmonid fishes from heated and unheated areas of Lake Michigan measured by RNA-DNA ratios. In Thermal Ecology (G. W. Esch and R. W. McFarland, eds), Vol.II, pp.100-105. ERDA Symposium Series (Conf. 750425). Augusta, Georgia, U.S.A.
- Swarup H. 1959. Effect of triploidy on the size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus*(L.). J. Genet., **56**, 143-155.
- Wilder I. B. and J. G. Stanley 1983. RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fishes in the laboratory and in streams contaminated by carbaryl. J. Fish Biol., **22**, 165-172.
- Wright D. A. and F. D. Martin 1985. The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *ibid.*, **27**, 479-485.