短 報

バナメイエビの視物質組成と最大吸収波長
及び若齢期と亜成体期の視物質質量について松田 圭史,^{1a} 長谷川英一,^{2b}マーシー・ワイルダー^{1*}

(2010年12月22日受付, 2011年3月16日受理)

¹国際農林水産業研究センター,²水産総合研究センター さけますセンター

Analysis of composition and absorption maximum of
visual pigment, and quantity of visual pigment
at representative stages in the whiteleg shrimp
Litopenaeus vannamei

KEISHI MATSUDA,^{1a} EIICHI HASEGAWA^{2b}
AND MARCY N. WILDER^{1*}

¹Japan International Research Center for Agricultural
Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, ²National Salmon
Resources Center, Fisheries Research Agency, Sapporo,
Hokkaido 062-0922, Japan

キーワード: *L. vannamei*, 甲殻類, 最大吸収波長, 視
物質

アミ類では、網膜電図による分光感度はそれぞれの生息する水深帯のスペクトル分布と一致することが知られている。¹⁾ バナメイエビ *Litopenaeus vannamei* においても生息水深帯が異なる若齢期と亜成体期では光受容能が異なり、最大応答振幅は両者とも 544 nm であるが、若齢期では 2 番目に応答振幅が高い波長が 568 nm であるのに対して、亜成体では 518 nm であり両者の分光応答には有意な差があることが網膜電図観察により報告されている。²⁾ 分光応答が両者で異なる原因の一つとして、視物質組成変動の関わりが考えられる。視物質は光化学反応物質であり、ロドプシン-ポルフィロプシンからなる 2 視物質系の視覚システムであるアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* は、水温や日長あるいは季節によって組成が変化することが知られている。³⁾ 本研究では網膜電図計測時と同様の飼育環境下にあるバナメイエビの視物質組成とその最大吸収波長を明らかにすると共に、成長に伴う視物質質量の変化についても調べた。

実験には屋内型エビ生産システム^{4,5)}で育成した若齢体(頭胸甲長 8.41 ± 0.45 mm (mean $\pm$ SD), 体重 0.317 ± 0.032 g : 生後 2 ヶ月以内)と亜成体(頭胸甲長 26.68

± 1.80 mm, 体重 13.86 ± 2.62 g : 生後 4–6 ヶ月以内)を用いた。若齢体は 1.5%, 亜成体は 0.5% の塩分濃度で飼育した。それぞれの左右眼柄を切り取り、アルミホイルで包み遮光し、実験まで -30°C で保存した。

視物質組成の解析には Hasegawa and Miyaguchi⁶⁾の手法による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。実験には亜成体 3 尾を用い、左右眼柄を一对として、一方にのみ太陽光を約 2 分間照射し、それぞれの 1 眼柄に 1M KOH 溶液と 1M NH_2OH 溶液を 1 : 2 に混合した溶液 0.2 mL と、メタノール 1 mL を加え、マルチビーズショッカー (安井器械 MB524TMA) でホモジナイズを行った。混合液にジクロロメタン 1 mL, 蒸留水 0.5 mL と n-ヘキサン 2 mL を加え、 4°C , $550 \times g$ で 5 分間遠心分離を行った。沈殿物にジクロロメタン 1 mL と n-ヘキサン 2 mL を加え、 4°C , $550 \times g$ で 5 分間遠心分離を行い再度抽出した。抽出は 3 度行い、抽出液をエバポレーターに約 1 時間かけ液部を飛ばした。残った結晶に移動相 (n-ヘキサン : エタノール : エーテル = 220 : 1 : 15) を 0.3 mL 加えて混合した。HPLC ポンプには LC-10AD (島津製作所) を用い、流量は 0.6 mL min^{-1} とした。なお、検出器は SPD-10AV (島津製作所), 検出ピークの記録はクロマトパック C-R6A (島津製作所), カラムは Zorbax SIL 4.6×150 mm (株式会社島津ジーエルシー) を用いた。

視物質の最大吸収スペクトルの解析は Hara and Hara⁷⁾の手法を参考に行った。バッファー液 (リン酸塩緩衝液 0.2 M, pH 7.5) 75 mL に亜成体の左右眼柄 (134 尾分) を入れてホモジナイズし、 4°C , $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った。沈殿物が懸濁する程度 36% ショ糖液を加えてホモジナイズし、 4°C , $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った。上澄み液に等量のバッファー液を加え、 4°C , $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った。沈殿物に 2% ジギトニンを 5 mL 加えて、静かに 1 時間ほど混合し視物質を抽出して 4°C , $22,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った後、上澄み液を分光光度計 (UV-2400PC, 島津製作所製) で測定し 300–700 nm の間で分光吸収カーブを描いた。測定後、その上澄み液を 5 分間太陽光に当てて抽出された視物質を人為的に光退色させて、再び分光光度計で測定し各波長における吸光度値の差をグラフに示した。なお、いずれの実験と

* Tel : 81-298-38-6630. Fax : 81-298-38-6316. Email : marwil@jircas.affrc.go.jp

^a 現所属 : 水産総合研究センター 増養殖研究所 志布志庁舎 (Shibushi Station, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Shibushi, Kagoshima 899-7101, Japan)

^b 現所属 : 水産総合研究センター 水産工学研究所 (National Research Institute of Fisheries Engineering, Fisheries Research Agency, Kamisu, Ibaraki 314-0408, Japan)

Fig. 1 Examples of chromatograms of the extracts obtained from a specimen at 360 nm absorbance. The right eye was not exposed to sunlight (a). The left eye was exposed to sunlight (b).

も暗赤色光下で行った。

視物質量の変化について若齢体（眼径 2.03 ± 0.10 mm, 眼柄重量 0.00295 ± 0.00047 g）と亜成体（眼径 5.57 ± 0.25 mm, 眼柄重量 0.0713 ± 0.0094 g）で比較した。眼径は最も長い方向で測定した。視物質量は分析器に示される各ピークの吸光度値と分子吸光係数から計算した。1 サンプル当たり若齢体は 10 眼, 亜成体は 2 眼をまとめて使用し, 上述の視物質組成の解析手法を用いて, 異なる 6 サンプルでそれぞれ実験を行った。

視物質組成の分析結果の一例を Fig. 1 に示す。各ピークのカラム保持時間は 11-*cis*-retinal と 11-*cis*-3-dehydroretinal の両発色団を持つサケ *Oncorhynchus keta* のロドプシンピークに一致していた。実験に用いた 3 個体とも光照射した場合に 1 のピークは減少し, 2 のピークは増加した。従って, Fig. 1 の 1 は 11-*cis*-retinaloxime, 2 は光照射によってそれが分解されて生じた all-*trans*-retinaloxime と考えられた。検出された他のピークの中で, 光照射の有無により同様の現象が観察されたものは認められない。よってバナメイエビは視物質として 1, 2 のピークに示されるロドプシンのみを持つと結論された。

視物質の最大吸収波長の解析結果を Fig. 2 に示す。抽出量が微量のためノイズがみられるが, 差吸光度値のピークは 500 nm 近傍に確認された。成長に伴う視物質

Fig. 2 (a) Series of absorption spectra obtained from visual pigment. The solid line shows 'before exposure', while the dotted line indicates 'after exposure'. (b) Differential spectrum of visual pigments obtained from the results of (a).

量の変化について Fig. 3 に示す。1 眼当たりの視物質量は若齢体で $1.15 \times 10^{-8} \pm 9.84 \times 10^{-9}$ mM, 亜成体で $1.89 \times 10^{-8} \pm 1.03 \times 10^{-8}$ mM であり, 約 1.6 倍の差異となった。

甲殻類ではアメリカザリガニ³⁾以外にも複数の視物質を持つ例が報告されており, シオマネキ類の *Uca thayeri* ではピークを 430 nm と 500–540 nm に持つ 2 つの視物質が知られている。⁸⁾ バナメイエビは若齢期と亜成体期の光受容能が異なるが,²⁾ 本実験結果から本種の視物質はロドプシンのみであることが明らかであり, 視物質の組成変化によるとは考え難い。

クルマエビ科は赤い波長帯域に感覚が鋭くないことが視物質から調べられており,⁹⁾ バナメイエビと近縁であるウシエビ *Penaeus monodon* の視物質は 400–550 nm を良く吸収し, 600 nm 以上はあまり吸収しないと報告されている。¹⁰⁾ バナメイエビの視物質においても, 最大吸収波長は 500 nm 近傍に確認されており, 600 nm 以

Fig. 3 Quantity of visual pigment at the juvenile and sub-adult stages in *L. vannamei*.

上の長波長域はあまり吸収しないことが Fig. 2 より確認された。

網膜電図ではバナメイエビの最大応答振幅は 544 nm と報告されているが,²⁾ 視物質の最大吸収波長と数 10 nm ずれる結果となった。アメリカザリガニでも視物質の最大吸収波長は網膜電図による感度ピークと 20 nm 程度ずれるとされており, 原因として感桿の遮光色素によるフィルター作用のためと考えられている。¹¹⁾ 同様にバナメイエビにおいても, 光学系の色素による影響が考えられた。シャコ類の光学系には生態と関連した様々な分光特性を持つ感桿内のフィルターが存在し, これらの色素はカロテノイド系であるとされている。¹²⁾

またシャコ類の *Pullosquilla litoralis* では周囲の光環境に合わせて分光特性を変化させる感桿内のフィルターを備えた個眼を持つことが報告されており,¹³⁾ 成長に伴い生息域を変えるバナメイエビにおいて, 若齢期と亜成体の光受容能力が異なる原因は成長に伴う光学系の色素の変化が一因と考察された。

両者の視物質について *t* 検定を行ったが有意な差は見られなかった ($p > 0.23$)。眼柄の平均重量は若齢体と亜成体で約 23.7 倍であるが, 平均視物質量は約 1.6 倍の違いであった。すなわち, 成長に伴い視物質量は増加するが眼柄全体の重量増加とは比例しない結果となった。視物質量の測定に関しては, 個体数を増やして検証するとともに定量分析精度の向上を図る必要があると考

える。

謝 辞

本論文のとりまとめにあたり, 多忙の中多くの有益な助言を頂いた国際農林水産業研究センターの奥津智之博士, V. Jayasankar 博士, S. Jasmani 博士に感謝いたします。本研究は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業 (発展型研究一般枠) による研究資金により行われた。

文 献

- 1) Lindstrom M. Eye function of Mysidacea (Crustacea) in the northern Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2000; **246**: 85–101.
- 2) Matsuda K, Wilder MN. Difference in light perception capability and spectral response between juveniles and sub-adults of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* as determined by electroretinogram. *Fish. Sci.* 2010; **76**: 633–641.
- 3) Suzuki T, Arikawa K and Eguchi E. The effect of light and temperature on the rhodopsin-porphyropsin visual system of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* 1985; **2**: 455–461.
- 4) 野原節雄. 屋内型閉鎖循環式技術によるエビ生産—日本初のエビ生産を実現. 日水誌 2006; **72**: 975–976.
- 5) 野原節雄. 全国 600 ヶ所での「屋内型エビ生産」を目指して. 農林水産技術研究ジャーナル 2008; **31**: 37–40.
- 6) Hasegawa E, Miyaguchi D. Changes in scotopic spectral sensitivity of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 509–513.
- 7) Hara T, Hara R. Cephalopod retinochrome. In: Dartnall HJA (ed). *Handbook of Sensory Physiology Vol. VII/1*. Springer-Verlag, Berlin. 1972; 720–746.
- 8) Horch K, Salmon M, Forward R. Evidence for a two pigment visual system in the fiddler crab, *Uca thayeri*. *J. Comp. Physiol. A*. 2002; **188**: 493–499.
- 9) Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ. The Biology of the Penaeidae. In: Blaxter JHS, Southward AJ (eds). *Marine Biology Vol. 27*. Academic Press, London. 1990; 187–193.
- 10) Nicol JAC, Yan H. The eye of the grass shrimp, *Penaeus monodon*: Reappraisal of the penaeid eye. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica*. 1982; **21**: 27–50.
- 11) Olivo RF, Chrismer KL. Spectral sensitivity of screening-pigment migration in retinula cells of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Vision Res.* 1980; **20**: 385–389.
- 12) Cronin TW, Marshall NJ, Caldwell RL. The intrarhabdomal filters in the retinas of mantis shrimps. *Vision Res.* 1994; **34**: 279–291.
- 13) Cheroske AG, Cronin TW, Caldwell RL. Adaptive color vision in *Pullosquilla litoralis* (Stomatopoda, Lysiosquilloidea) associated with spectral and intensity changes in light environment. *J. Exp. Biol.* 2003; **206**: 373–379.