アサリエキス中のウナギ誘引物質—I.

Omission test による有効物質の検索*

橋本芳郎・鴻巣章二・伏谷伸宏・能勢健嗣

(1967 年 9 月 21 日受理)

Attractants for Eels in the Extracts of Short-necked Clam—I.

Survey of Constituents Eliciting Feeding Behavior
by the Omission TestYoshiro HASHIMOTO, Shoji KONOSU, Nobuhiro FUSETANI**,
and Takeshi NOSE***

From our observation that the extracts of short-necked clam, *Tapes japonica*, evoke exploratory and feeding response in eels, *Anguilla japonica*, attempts were made to locate the active components.

Various kinds of test solution were prepared by mixing the authentic reagents so as to reproduce partly or wholly the natural extracts (Table 1) and examined on their activity.

As shown in Table 2, amino acids are responsible for the activity, while the other constituents, such as nucleotides, their related compounds, organic acids and quaternary ammonium bases, make little contribution, if any. When tested individually, each of 18 amino acids, however, is not effective at the concentration tested. These results suggest that the stimulating activity of the extracts is attributable mainly to the synergistic or additive interaction between amino acids.

Eels, which had been kept respectively on the beef liver, aquatic oligochaete worms, *Tubifex spp.*, and frozen saury for 4 weeks, did not show any difference in response to test solutions.

魚貝類の餌に対する嗜好性に影響する因子としては、餌の形、大きさ、色などの物理的要因のほかに、カイコの例¹⁾にみられるような attractant (誘引物質), biting factor (嚙咬因子) あるいは swallowing factor (嚥下因子) などの化学的要因を考慮する必要がある。物理的要因に関してはかなり研究も行なわれ、養殖関係者の経験に基づく知識が現場で活用されている例が少なくないが、化学的要因についての知識および応用例は極めて乏しいようである。

われわれはわが国の主要養殖対象魚の一種であるウナギを選び、その配合飼料の開発ないしは改良に役立たせたいと考え、アサリエキスがウナギを強く誘引する事実に着目してエキスを存在すると考えられる誘引物質の同定を企図した。方法としてはまずエキス成分の分析結果に基づいて純品を混合した合成エキスをを用い、いわゆる omission test により誘引物質を検索した。その結果、アミノ酸が著しく有効なことがわかったので、エキに含まれる 18 種のアミノ酸の誘引効果について調べるとともに、維持餌料のウナギの反応に及ぼす影響についても検討した。以下それらの結果を報告する。

* 淡水区水産研究所業績第 213 号

** 東京大学農学部水産化学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo)

*** 淡水区水産研究所 (Freshwater Fisheries Research Laboratory, Hino, Tokyo)

実験方法

供試魚および誘引試験用水槽 浜名湖で採集したシラスウナギ (*Anguilla japonica*) を走流性がなくなるまで約 40 日間牛肝臓で飼育し、ついで飼料を日本配合飼料 K. K. 製のマス稚魚用クランブル No. 3 に変え、Fig. 1 に示す試験用水槽の A 部で摂餌するように約 2 週間訓練した。実験には体長 15 cm 前後の個体 50 尾を用いた。飼育水は地下水を 22~27°C に加温し、給水管 I より A 部に注入し、B および C 部を経て排水口 O より流出させた。この水槽は縦 100 cm、横 50 cm、深さ 30 cm で中枠によつて 4 つの水路を作り、各水路には途中 2 個所に隔壁を置き、それぞれ直径 1 cm の小孔を 1 つ設けた。C 部の大部分をふたでおおい、給餌時以外はウナギが C 部に集まるようにした。

Fig. 1. A tank to test the response of eels.

Ten ml of test sample solidified with 4% gelatin is put in a cylinder (S) which is placed in a compartment (A). Water is introduced onto the top of the cylinder from a pipe (I) and runs out through outlets (O). h_1 and h_2 are holes (each 1 cm in diameter) provided on the septa. The number of eels entering into B from C in 10 min. after immersion of test sample into S is counted.

試験用試料の調製 先に著者らが報告したアサリむき身のエキス成分の分析結果²⁾に基づいて合成エキスを調製した。各エキスは水酸化ナトリウムあるいは塩酸でそれぞれ pH 6.8 に調整した。その組成を Table 1 に示す。

直径約 1.5 cm の試験管にむき身 10 g 相当量の試料水溶液 10 ml およびゼラチン 0.4 g を入れ、温湯中でよく攪拌しながらゼラチンを溶かした後、冷水中で固化させた。その際攪拌用ガラス棒を試験管中央に立てたまま冷却して試料を固化させ、さらにフリーザー中で凍結し、試験管からの試料の抜き取りを容易にした。

誘引効果判定法 下部に小孔をあけた円筒 S を試験用水槽の A 部に立て、水が円筒 S を通りその小孔から A 部に流入するようにした。各円筒当たり、流量は 1 分間 200~300 ml に調節した。つぎに試験管から抜き取った上記の試料をガラス棒ごと円筒 S に入れた。誘引性のある試料では、B 部に入ったウナギのほとんど全部が小孔 h_2 を通つて A 部に入り、試料の入った円筒をつつき、明らかな索餌行動を示した。また A 部には長く滞留せず、比較的速やかに C 部に戻り、再び B 部を通り A 部に入る活発な往復の運動をした。そこで試料投入後 10 分以内に隔壁に設けた小孔 h_1 を通つて C 部から B 部に入るウナギの尾数を数えた。その結果をラテン方格法³⁾により統計的に処理し、危険率 5% における有意差の有無を検定して誘引性を判定した。なおゼラチンだけを固めたものを対照として用いた。

Table 1. Composition of the synthetic extracts.
(mg in 10 ml of test solution*)

Amino acids:		Quaternary ammonium bases:	
Taurine	66.4	Glycine betaine	67.9
Aspartic acid	2.1	Homarine	6.3
Threonine	1.3	Nucleotides and their related compounds**:	
Serine	2.4		
Glutamic acid	10.3		
Proline	1.6		
Glycine	32.9		
Alanine	13.0		
Cystine	0.5	Hypoxanthine	1.0
Valine	1.4	Inosine	2.9
Methionine	1.1	AMP	0.5
Isoleucine	1.1	UMP	1.5
Leucine	2.0	IMP	3.6
Tyrosine	1.6	ADP	0.6
Phenylalanine	2.0	Organic acids:	
Histidine	0.9		
Lysine	2.5		
Arginine	9.4	pH	6.8

* The concentration of each constituent corresponds to that in 10 g of the soft part of clam²⁾.

** AMP: Adenosine-5'-phosphate, UMP: Uridine-5'-phosphate, IMP: Inosine-5'-phosphate, ADP: Adenosine diphosphate.

実験前 24 時間は投餌せず, 1 日の実験終了時に前記のクランブルを与え, 実験を行なわない日は朝投餌した。1 日 2 回以上試験する場合は 2 時間ごとに行ない, 試験と試験の間は流量を増して水槽中に拡散した試料をできるだけ除去するようにした。またウナギの学習を避けるため, 試験は 1 日最高 3 回, 週 2 回以内とした。

実験結果

むき身 10 g 相当量の合成エキスがむき身のホモジネートと同様にウナギを強く誘引することを確認した後, Table 2 に示す組合せで核酸関連化合物, 有機酸, 第 4 級アンモニウム塩基およびアミノ酸の効果を調べた。その結果は Table 2 に示すとおりで, 核酸関連化合物, 有機酸および第 4 級アンモニウム塩基ともに単独では対照との間に有意差はなく, また前 2 者を合成エキスから除いた試料の誘引性は合成エキスのそれとほとんど差はなかった。一方, 第 4 級アンモニウム塩基を除いた試料では合成エキスよりかえって誘引性が増すという結果が得られた。アミノ酸は合成エキスと同様の効果を示し, これを合成エキスから除くとその誘引力は著しく低下した。

このように合成エキスの誘引性が主としてアミノ酸に基づくことが明らかになったので, つぎに各アミノ酸の誘引力を調べた。試験法は前述のとおりで, 個々のアミノ酸と対照の 2 試料について比較し, C 部より B 部に入るウナギの数が対照より明らかに多く (10 分間の数が 30 以上), かつ A 部に入ったウナギが試料の入った円筒をつつく索餌行動を示した場合を有効 (+) とし, 対照と差がなくかつ索餌行動がみられない場合を無効 (-) とした。その結果を Table 3 に示した。表の右欄には Table 1 に掲げた各アミノ酸の濃度を示したが, この濃度ではすべてのアミノ酸が無効で, 0.3 ミリモル以上でアルギニンが, 0.6 ミリモ

Table 2. Response of eels to nucleotides, their related compounds, organic acids, quaternary ammonium bases and amino acids*.

1. Nucleotides and their related compounds (N).

Test No.	Control§	(SE)§§	(SE)-(N)	(N)
1	7 (IV)	154 (I)	192 (II)	24 (III)
2	12 (I)	83 (IV)	37 (III)	12 (II)
3	5 (II)	53 (III)	50 (I)	24 (IV)
4	15 (III)	69 (II)	58 (IV)	9 (I)
Total	39	359**	337**	79

2. Organic acids (O).

Test No.	Control	(SE)	(SE)-(O)	(O)
1	5 (III)	47 (I)	47 (II)	11 (IV)
2	13 (I)	142 (II)	145 (IV)	12 (III)
3	6 (IV)	59 (III)	71 (I)	13 (II)
4	15 (II)	56 (IV)	55 (III)	8 (I)
Total	39	308**	318**	44

3. Quaternary ammonium bases (Q).

Test No.	Control	(SE)	(SE)-(Q)	(Q)
1	4 (III)	72 (I)	104 (II)	1 (IV)
2	11 (I)	65 (II)	77 (IV)	16 (III)
3	8 (IV)	66 (III)	108 (I)	7 (II)
4	6 (II)	56 (IV)	73 (III)	10 (I)
Total	29	259**	362**	34

4. Amino acids (A).

Test No.	Control	(SE)	(SE)-(A)	(A)
1	14 (III)	50 (I)	18 (II)	49 (IV)
2	3 (I)	26 (II)	18 (IV)	50 (III)
3	5 (IV)	55 (III)	14 (I)	51 (II)
4	5 (II)	44 (IV)	24 (III)	28 (I)
Total	27	175**	74	178**

* The figures indicate the number of eels which entered into the compartment B from C, and the Roman numerals in parentheses the section where test samples were placed.

** Significant at a 5% level.

§ Four percent gelatin.

§§ Synthetic extracts containing all constituents given in Table 1.

Table 3. Response of eels to amino acids.

Amino acids	mM/10 ml				mM/10 g soft part ²⁾
	0.2	0.3	0.6	1.0	
Taurine	—	—	—	—	0.531
Aspartic acid	—	—	—	—	0.016
Threonine	—	—	—	—	0.011
Serine	—	—	—	—	0.023
Glutamic acid	—	—	—	—	0.009
Proline	—	—	—	—	0.014
Glycine	—	—	—	+	0.439
Alanine	—	—	+	+	0.127
Cystine	—	—	—	—	0.002
Valine	—	—	—	—	0.012
Methionine	—	—	—	—	0.007
Isoleucine	—	—	—	—	0.008
Leucine	—	—	—	—	0.016
Tyrosine	—	—	—	—	0.009
Phenylalanine	—	—	—	—	0.012
Histidine	—	—	—	—	0.006
Lysine	—	—	—	—	0.017
Arginine	—	+	+	+	0.054

(+) : Positive, (—) : Negative.

ル以上でアラニンが、1.0 ミリモル以上でグリシンがそれぞれ誘引効果を示すにすぎなかつた。なお無効の場合は、わずかのウナギしか C 部より B 部に入らないのが普通であるが、セリン 1.0, グリシン 0.6 ミリモルの場合には試験、対照の両区ともかなりの数が入り、多少ウナギは刺激されたように見受けられたが、両方の区でウナギの数に差がないこと、および試験区に入つたウナギに円筒をつつく行動が見られなかつたので無効とした。誘引性を示す試料では、ウナギは試料投入後 15~20 秒で反応を示すので、上記 3 種のアミノ酸の大略の閾値を調べるため、誘引試験用試料と同様にゼラチンで固めたエオシン溶液を用いて、20 秒後の C 部の h_1 付近におけるエオシンの濃度を吸光度を指標として調べた。その結果から算出すると、アルギニン、アラニンおよびグリシンはそれぞれ 5×10^{-8} , 1×10^{-7} および 2×10^{-7} ミリモル程度の濃度でウナギに索餌行動を起こさせることがわかつた。

維持餌料の影響 牛肝臓、イトミミズあるいは冷凍サンマを与えて 4 週間飼育したウナギを供試魚とし、それぞれアミノ酸、核酸関連化合物、第 4 級アンモニウム塩基および有機酸の誘引効果を調べたが、いずれの群も上述の試験結果と同様に、アミノ酸だけに誘引され、その他の成分には反応しなかつた。

考 察

合成エキスからアミノ酸を除いた試験液はなお弱い誘引力を示したが、合成エキスに比べると著しく効果が弱まること、およびアミノ酸だけの試験液が合成エキスとほぼ同等の誘引性を示すことなどから、エキスの誘引性が主としてアミノ酸に基因していることは明らかである。しかしながらここで試験したむき身 10 g 相当量の濃度においては、18 種のアミノ酸は単独ではいずれも誘引効果を示さなかつた。試料の濃度を増して 50 g 相当量の試験液を用いた場合には Table 3 に示したようにグリシンおよびアラニンがそれぞれ単独で誘引効果を示したが、10 g 相当量程度の濃度では少なくとも 2 種以上のアミノ酸の協同作用（相乗あるいは付加）によつて効果を示すものと考えるのが妥当である。一方、アミノ酸だけの試験液と合成エキ

スの間の誘引力に大差がないことから、アミノ酸とここに用いた他の成分との間には協同効果はほとんどないと考えられ、アサリエキスのウナギに対する誘引性を解明するためには今後アミノ酸相互の協同作用を中心に追求すべきものと判断された。

IDLER⁴⁾ および TESTER⁵⁾ はそれぞれサケおよびサメがセリンを忌避すると報告しているが、ウナギではこのような徴候はみられなかった。他方、合成エキスから第4級アンモニウム塩基を除くと誘引性が増すことから、これがアミノ酸の誘引効果を減殺する作用をもつとも考えられ、この点は今後なお検討を要する。

魚類に対する誘引性が餌料による条件づけによつて変ることが報告されている。たとえば MCBRIDE⁶⁾ は牛肝臓を加えたペレットで予備飼育したベニザケは牛肝臓の抽出液には反応を示すが、動物プランクトンやイカの抽出液には反応しない、しかし動物プランクトンを与えた魚では約 10 日間でその抽出液に反応を示すようになったと述べている。そこで本研究でもウナギを牛肝臓、イトミミズおよび冷凍サンマの3種の餌料で4週間予備飼育した後試験してみたが、いずれの場合も第4級アンモニウム塩基、有機酸および核酸関連化合物には誘引されず、アミノ酸のみに反応し、上記3種の維持餌料の相違による影響はみられなかった。

要 約

アサリエキス中のウナギに対する誘引物質を検索する目的で、エキス成分の分析結果に基づいて調製した合成エキスを用いて、omission test を行なうとともに 18 種のアミノ酸の誘引効果を調べ、エキスの誘引性が主としてアミノ酸相互の協同作用に基因することを明らかにした。なお維持餌料の相違による影響は認められなかった。

本研究費の一部は文部省科学研究費（試験研究）によつた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 浜村保次：化学と生物，**1**，364～370 (1963).
- 2) 鴻巣章二・藤本健四郎・高島良子・松下輝子・橋本芳郎：本誌，**31**，680～686 (1965).
- 3) 寺田一彦：推測統計法，朝倉書店，東京 (1964).
- 4) D. R. IDLER, U. H. M. FAGERLUND, and H. MAYOH: *J. Gen. Physiol.*, **39**, 889～892 (1956).
- 5) A. L. TESTER: *Pacific Sci.*, **17**, 145～170 (1963).
- 6) J. R. MCBRIDE, D. R. IDLER, R. E. E. JONAS, and N. TOMLINSON: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **19**, 327～334 (1962).