

## 平成 30 年度 研究報告書

### テーマ②産業・教育支援

#### 1. 課題名：②-1 養殖業

##### 1) 目的

シロギスの養殖では、①生態系の解明で得られた生息海域の物理・生物環境のデータを採卵や飼育技術にフィードバックし、効率的かつ先駆的な養殖技術を開発する。その中で、人工知能を用いた自発給餌システムや環境シミュレーションに基づく養殖環境制御システムを活用し、最終的にはシロギスとしては大型である 25 cm、150g の養殖魚を 1 年半で 2 万尾生産する技術を確立する。大型シロギスの単価は 3000 円/kg と高価であり（通常単価 1500 円/kg）、2 万尾の生産により 900 万円の水揚げとなる。その 5 倍の末端価格である 4500 万円が経済効果として予想される。

##### 2) 30 年度の実施目標及び実施計画

昨年度に検討した種苗生産技術を確立し、完全養殖の手法を小型水槽で検討する。また、人工知能自発給餌の有効性を評価するとともに、温度・照度に基づき、水槽環境を数値モデル化する。

##### 3) 成果

##### 3) -1 シロギス養殖技術の開発

###### (1) 目的と方法

魚類の種苗生産において、質の良い卵が生産の効率向上や健全な種苗の安定的生産に寄与することは明白である。しかし、それには適切な卵質評価指標の把握と評価手法の確立が不可欠である。これまでの卵質の一般的な指標として、卵の受精率、発眼率、孵化率、大きさ、比重、pH、色調、孵化仔魚の絶食生残指率（SAI）などが用いられていた（岩井ら 1989、清野 1974）が、飼育結果に直結するメルクマールは明らかにされていない。そこで、我々は産卵期の長いシロギスをモデルに親魚の由来（天然魚群及び人工養成した 1 歳魚の大型群、人工 1 歳魚の小型群、人工 2 歳魚の通常採卵群、人工 2 歳魚の早期採卵群）やそれぞれの産卵期ごとに受精率、孵化率及び SAI を指標として卵質を検討した。

本研究には釣獲したシロギス *Sillago japonica* の天然親魚群（平均 20.5±1.5mm）、人工種苗を養成した 1 歳魚大群（平均 13.1±1.6mm）、人工 1 歳小群

(平均 9.7±1.2mm)、人工 2 歳通常採卵群 (平均 16.3±1.4mm)、人工 2 歳早期採卵群 (平均 15.9±10.0mm) の 5 親魚群を用いた (表 1)。早期採卵群は、3 月から飼育水温を自然水温に対し 5℃を目安に昇温し、他の 4 親魚群は無加温で養成した。餌としてオキアミ *Euphausia supereba* とおとひめ (日清丸紅飼料株式会社製) を 1 日 1 回 (10 時) に飽食するまで給餌した。天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群は 5tFRP 角形水槽 (アース株式会社製) に人工 2 歳通常採卵群は 3tFRP 丸形水槽 (アース株式会社製)、人工 2 歳早期採卵群は 2tFRP 丸形水槽 (アース株式会社製) に収容した。水槽からの排水を採卵槽 (天然親魚群および人工 1 歳大群、人工 1 歳小群は 100ℓパンライト水槽 : モリマーサム樹脂工業株式会社製、人工 2 歳通常群および人工 2 歳早期採卵群は 500ℓダイライト水槽 : ダイライト株式会社製) に設置したゴース地製ネット (30 cm 径 × 30 cm、60 cm 径 × 80 cm、60cm 径 × 60cm) で受け採卵した。卵は 17 時にネットを設置し、翌朝 10 時に回収した。観察、測定項目は受精率、孵化率、SAI で産卵期間中毎日実施した。上記で得られた卵は 10ℓバケツ (8ℓ) に入れ攪拌した後、1mℓ中の受精卵数、死卵数を顕微鏡下で計数し、受精率 (浮上卵数/観察卵数 × 100) を算出した。受精卵を約 100 粒、500mℓポリエチレン蓋付瓶に収容し、翌日に孵化仔魚、死卵数を計数し孵化率 (孵化仔魚数/収容数 × 100) とした。SAI は孵化仔魚を 500mℓポリエチレン蓋付瓶に 30 尾収容し、23℃に調温した条件下で毎日の死亡個体数を計数し求めた。算出方法は以下である。

$$\frac{\sum_{i=1}^k (N-h_i) \times x_i}{N} = \text{SAI}$$

※i…経過日数      N…サンプル数      hi…i 日目の累積へい死尾数

得られた受精率、孵化率、SAI を用いて卵質の評価指数 (評価する項目の平均値を全親魚群の平均値 : 受精率 71%、孵化率 49%、SAI0.99 で除した値) を算出した。また卵質を評価するにあたり、親魚群の産卵期間を 3 等分し、それぞれ前期、中期、後期とした。

## (2) 研究成果

### 受精率と孵化率 (図 1, 2)

#### 天然魚群

産卵期間中の平均受精率は 74±20%となった。

前期 (5 月 24 日～7 月 7 日)、中期 (7 月 8 日～8 月 21 日)、後期 (8 月 22 日～10 月 6 日) の受精率は、65±29%、80±12%、75±16%と中期に増加した。期間中の 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 24 日～6 月 2 日の間で 49±42%と低調であった。6 月 3～12 日の間では 72±24%と増加した。その後、6 月 23

日～8月31日の間で緩やかに増加した。それ以降は、産卵終了まで減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は  $48 \pm 19\%$  となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $54 \pm 19\%$ 、 $44 \pm 20\%$ 、 $45 \pm 15\%$  と中期に低下した。期間中10日ごとの平均値の推移は、5月28日～7月26日までの間は一定であった。しかし、7月26日～9月3日の間では  $52 \pm 14\%$ 、 $40 \pm 31\%$ 、 $38 \pm 17\%$ 、 $29 \pm 9\%$  と減少していった。その後は緩やかに増加していった。

#### 人工1歳魚大群

産卵期間中の平均受精率は  $83 \pm 13\%$  となった。

前期（5月31日～7月13日）、中期（7月14日～8月24日）、後期（8月25日～10月6日）の受精率は  $80 \pm 19\%$ 、 $85 \pm 9\%$ 、 $85 \pm 9\%$  と中期に増加した。期間中の10日ごとの平均値の推移は、6月20日～6月29日の間は  $75 \pm 9\%$  であった。6月30日～7月9日の間では  $88 \pm 3\%$  と増加した。その後の7月10日～8月8日の間では  $84 \pm 9\%$ 、 $90 \pm 4\%$ 、 $82 \pm 6\%$  と一定になった。それ以降も一定になる傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は  $53 \pm 19\%$  となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $55 \pm 20\%$ 、 $53 \pm 19\%$ 、 $51 \pm 18\%$  と徐々に減少した。期間中10日間ごとの平均値の推移は5月31日～6月29日の間では  $55 \pm 33\%$ 、 $55 \pm 23\%$ 、 $52 \pm 21\%$  と一定になった。その傾向が8月9日まで続いた。その後の8月19日～8月28日の間で  $43 \pm 18\%$  と減少した。それ以降の9月8日で  $63 \pm 10\%$  と増加したが、9月18日から産卵終了まで減少傾向にあった。

#### 人工1歳魚小群

産卵期間中の平均受精率は  $76 \pm 17\%$  となった。

前期（7月1日～7月29日）、中期（7月30日～8月27日）、後期（8月28日～9月26日）の受精率は  $76 \pm 18\%$ 、 $74 \pm 17\%$ 、 $78 \pm 17\%$  となり、期間を通して一定になる傾向を示した。期間中10日間ごとの平均値の推移は、7月1日～7月30の間では  $75 \pm 20\%$ 、 $73 \pm 23\%$ 、 $79 \pm 8\%$  と一定になった。それ以降も一定になる傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は  $56 \pm 19\%$  となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $61 \pm 15\%$ 、 $51 \pm 21\%$ 、 $56 \pm 19\%$  と中期に低下した。期間中10日ごとの平均値の推移は、7月1日～7月10日の間の平均値は  $53 \pm 20\%$  であった。その後の7月11日～7月20日の間の平均値は  $63 \pm 7\%$  と増加した。その後の7月30日～8月8日の間では、 $48 \pm 27\%$  と減少した。8月19日～9月17日の間の平均孵化率は  $45 \pm 15\%$ 、 $54 \pm 12\%$ 、 $69 \pm 5\%$  と増加していった。その後は減少傾向にあった。

### 人工 2 歳魚通常採卵群

産卵期間中の平均受精率は  $73 \pm 19\%$  となった。

前期 (5 月 23 日～7 月 5 日)、中期 (7 月 6 日～8 月 18 日)、後期 (8 月 19 日～10 月 2 日) の受精率は  $74 \pm 22\%$ 、 $77 \pm 19\%$ 、 $68 \pm 16\%$  と後期に減少した。期間中の 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 23 日～6 月 1 日の間で  $57 \pm 36\%$  と低調であったが、6 月 2 日～6 月 11 日の間では  $78 \pm 15\%$  増加した。その後、9 月 10 日まで一定になる傾向を示した。それ以降は、減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は  $57 \pm 19\%$  となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $61 \pm 15\%$ 、 $58 \pm 17\%$ 、 $51 \pm 22\%$  と実験開始から減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、6 月 2 日、7 月 1 日の間では  $69 \pm 15\%$ 、 $57 \pm 14\%$ 、 $49 \pm 13\%$  と減少していった。その後も減少傾向にあった。

### 人工 2 歳魚早期採卵群

産卵期間中の平均受精率は  $58 \pm 18\%$  となった。

前期 (5 月 1 日～6 月 24 日)、中期 (6 月 25 日～8 月 18 日)、後期 (8 月 19 日～10 月 12 日) の受精率は  $65 \pm 16\%$ 、 $61 \pm 20\%$ 、 $50 \pm 16\%$  と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中の 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 1 日～5 月 10 日の間で  $44 \pm 19\%$  と低調であったが、5 月 11 日～5 月 20 日の間では  $70 \pm 10\%$  増加した。その後の 6 月 10 日から産卵終了まで減少傾向を示した。全般的に受精率は、実験開始から徐々に減少傾向にあった。

産卵期間中の平均孵化率は  $28 \pm 20\%$  となった。

前期、中期、後期の孵化率は、 $39 \pm 23\%$ 、 $26 \pm 14\%$ 、 $19 \pm 16\%$  と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 11 日～5 月 20 日の間では  $51 \pm 23\%$  であった。5 月 21 日～6 月 9 日の間は  $37 \pm 20\%$ 、 $27 \pm 14\%$  と低下していった。その後は、一定になった。

### 絶食生残指数 (SAI : 図 3)

#### 天然魚群

SAI の平均値は  $0.88 \pm 0.80$  であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ  $1.18 \pm 1.12$ 、 $0.90 \pm 0.65$ 、 $0.61 \pm 0.44$  となり徐々に減少した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、実験開始の 5 月 28 日～6 月 27 日の期間は減少傾向であった。7 月 17～27 日の間、一旦上昇したが、その後は 8 月 26 日～9 月 4 日の間再び減少したものの、それ以降は増加傾向にあった。

#### 人工 1 歳魚大群

SAI の平均値は  $0.92 \pm 0.69$  であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ  $1.23 \pm 0.89$ 、 $0.88 \pm 0.50$ 、 $0.62 \pm 0.47$  となり、徐々に減少した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は 7 月 1 日～7 月 10 日の間の平均値は  $0.65 \pm 0.54$  と低迷した。7 月 11 日～7 月 20 日の間では、 $1.31 \pm 0.80$  と増加した。その後は 8 月 20 日～8 月 29 日の間まで減少傾向が続いた。それ以降は産卵終了まで増加した。

#### 人工 1 歳魚小群

SAI の平均値は  $0.83 \pm 0.76$  であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ  $1.44 \pm 0.88$ 、 $0.53 \pm 0.51$ 、 $0.51 \pm 0.43$  と中期に減少した。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、7 月 1 日～7 月 10 日の間の平均値は  $1.07 \pm 0.69$  となったが、7 月 11 日からの期間では  $1.72 \pm 1.01$  と増加した。その後は 8 月 19 日～8 月 28 日の間まで減少したが、8 月 29 日から産卵期間終了まで増加し続けた。

#### 人工 2 歳魚通常採卵群

SAI の平均値は  $1.01 \pm 0.99$  であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ  $1.55 \pm 1.29$ 、 $0.97 \pm 0.67$ 、 $0.41 \pm 0.41$  と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 23 日～6 月 12 日の間まで著しく低下した。7 月 2 日～7 月 11 日の間で増加し、8 月 11 日まで一定になった。その後は 8 月 21 日～8 月 30 日の期間で著しく低下したが、産卵期間が終了するまで、緩やかに増加した。

#### 人工 2 歳魚早期採卵群

SAI の平均値は  $1.15 \pm 1.26$  であった。

前期、中期、後期の平均値はそれぞれ  $2.05 \pm 1.67$ 、 $0.76 \pm 0.48$ 、 $0.49 \pm 0.45$  と産卵期間を通して減少傾向にあった。期間中 10 日ごとの平均値の推移は、5 月 11 日～5 月 20 日の間の平均値は  $2.13 \pm 1.64$  となり、5 月 21 日～5 月 30 日の間では  $3.32 \pm 1.69$  と増加した。その後は 6 月 20 日～6 月 29 日の間まで急激に低下した。それ以降は一定になった。

以上の結果から今回、親魚の由来ならびに産卵期ごとの卵質を評価する指標としてそれぞれの対象となる受精率、孵化率、SAI の平均値を各項目の全親魚群・全期間の平均値で除した値の平均値（卵質評価指数）を用いた。

#### 親魚群ごとの卵質評価（図 4）

各親魚群の卵質評価指数は人工 2 歳魚通常採卵群  $1.04 \geq$  人工 1 歳魚小群  $0.99 \geq$  人工 1 歳魚大群  $0.97 >$  天然魚群  $0.89 >$  人工 2 歳魚早期採卵群  $0.82$  の順となった。

一般に卵の質は天然魚で高く、人工魚で低いとされ、事実昨年、シロギスの卵

質評価を試みた末石（2016）は人工魚群の方が天然魚より卵質評価は低いことを報告している。しかし、今回人工 2 歳魚早期採卵群を除く人工魚 3 群の卵質は天然魚群より明らかに高くなった。今年度試験に供した天然魚は、昨年釣獲後試験に使用した親魚群を 1 年間継続飼育したものである。同親魚の昨年における卵質評価指数は 1.19 となっており、今回の 0.89 より高く、同じ親魚群で卵質が低下したことを示している。一方、昨年度の結果においてもシロギスの天然親魚の卵質は釣獲後、直ちに親魚として使用した群より 1 年間養成した群で低下している（末石 2016）。このことから、今回も 1 年間継続飼育したことにより卵質が低下したと推察される。また、キジハタ *Epinephelus akaara* では、年齢の若い親魚で卵質が良いと報告されており（萱野ら 1998）、イシダイ *oplegnathus fasciatus* でも同様の事例が明らかになっている（伊藤 1978）。このように、魚類では加齢によって卵質が低下する可能性も考慮しなくてはならない。今後は、シロギスにおいても年齢の明らかな人工親魚群を用いて、加齢による卵質への影響の有無やどのように発現するかを検討する必要がある。

人工 1 歳魚 2 群と人工 2 歳魚通常採卵群ならびに人工 1 歳魚 2 群間を比較して年齢やサイズによる卵質の差異を検討した。しかし、先に示したようにいずれの群の評価指数にも大きな差異が認められなかった。一方、昨年使用していた人工 1 歳魚群の卵質評価指数は 0.75 であり、今回用いた人工 1 歳魚群の値よりかなり低い値であった（末石 2016）。卵質は、親魚の養成状況や経代数（昨年は F1、今年度は F2）によっても異なると思われるが、今年度具体的に何が影響したのかは不明である。今後この点についても再度検討する必要がある。

シロギスの産卵開始は水温、産卵終了は日長時間に強く影響されることが示唆されており（末石 2016）、人工的な環境操作により成熟及び産卵のコントロールが可能となっている（瀬戸熊ら 2014）。マダイ *Pagrus major* やブリ *Seriola quinqueradiata* では類似の技術によって早期採卵が確立され、前者では良質の卵が安定して確保できている（小牧ら 1995）。加えて後者でも得られた大型種苗による養殖技術への応用が進められている（堀田ら 2015）。シロギスでは地域に根ざした養殖技術を開発するため、早期採卵による大型種苗の生産が強く求められている。今年度、人工 2 歳魚を用いて、水温操作による産卵コントロールを試みた。その結果、約 1 ヶ月早く採卵が開始され、大型の種苗も生産することができた。しかし、今年度卵質の評価指数が最も低かったのは早期採卵群であり、良質の卵が安定して得られなかった。シロギス養殖には大型種苗を用いた大型ギスの安定生産が欠かせない条件であり、今後早期採卵はますます重要度が高まると考える。一方で、今回明らかになった卵質の低下は種苗生産の安定化にとって大きなリスクになるため、その要因と対策の確立は急務であろう。

産卵期ごとの卵質評価 (図 5)

各親魚群における産卵期、前期、中期、後期の卵質評価指数を示した。天然魚群、人工1歳魚大群、人工2歳魚通常採卵群は前期=中期>後期、人工1歳魚小群は前期>後期>中期、人工2歳魚早期採卵群は前期>中期>後期となり、いずれの群でも産卵期が進むにつれ低下する傾向にあった。過去の取り組みでは天然魚群は後期が最も良いとされている(白井 2015、末石 2016)。しかし、今回は天然魚群を含むすべての群で前期が最も卵質が良くなった。シマアジでは、産卵期が進行するに連れてSAIの値が低下し、飼育状況も悪化したことから初期の卵質が高いことが報告されている(虫明・関谷 1993)。またマダイにおいても産卵期の進行とともに受精卵に含まれる粗タンパクやリン脂質の含有量が有意に減少していく(瀬岡 1998)。一般に飼育現場では産卵回数が増えるにしたがって仔魚や幼生の活力が低下していくことが報告されている(虫明 2010)。これらは、親魚の産卵疲弊が大きな要因と推察されているが、実際の飼育結果と併せて検討されたことはない。今後、このような卵質の変化が仔稚魚の生残や成長、形態異常の発現等、飼育状況へどのように影響するのか明らかにする必要がある。

表.1 シロギス親魚の概要

	天然魚群	人工1歳魚大群	人工1歳魚小群	人工2歳魚通常採卵群	人工2歳魚早期採卵群
養成期間	1年	1年	1年	2年	2年
年齢	?	1歳	1歳	2歳	2歳
尾数	30	200	150	80	60
全長±標準偏差(cm)	20.5±1.5	13.1±1.6	9.7±1.2	16.3±1.4	15.9±1.0
体重±標準偏差(g)	80.0±18.1	19.6±6.9	8.7±3.6	38.7±10.4	31.5±7.9

図 1 産卵期ごとの受精率

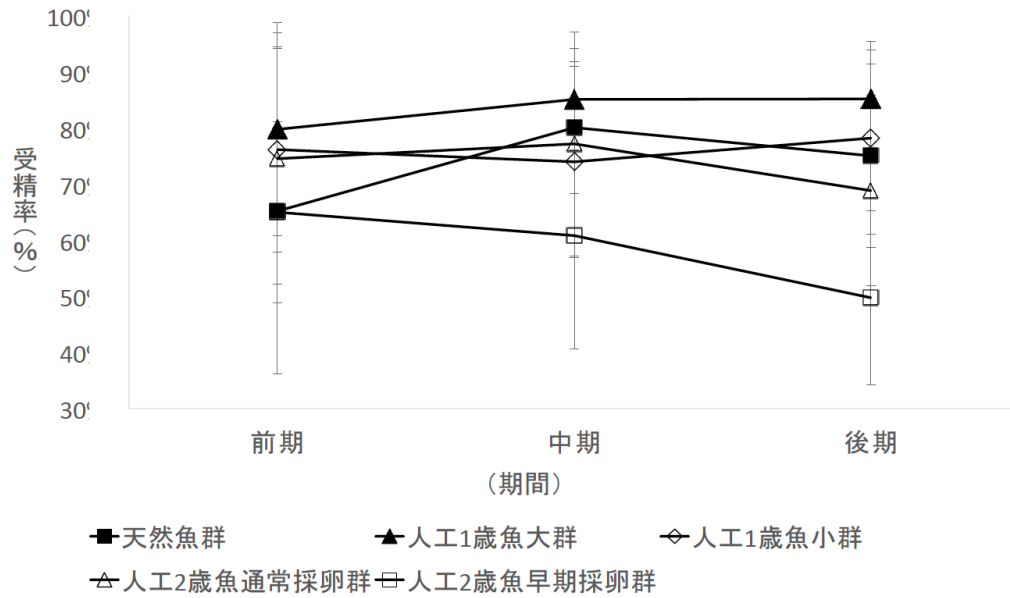
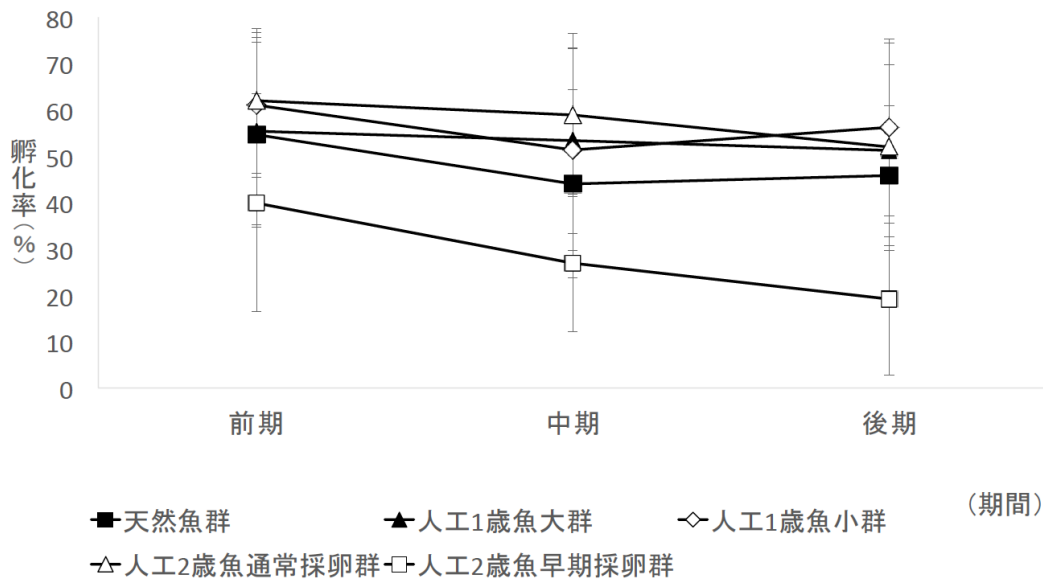
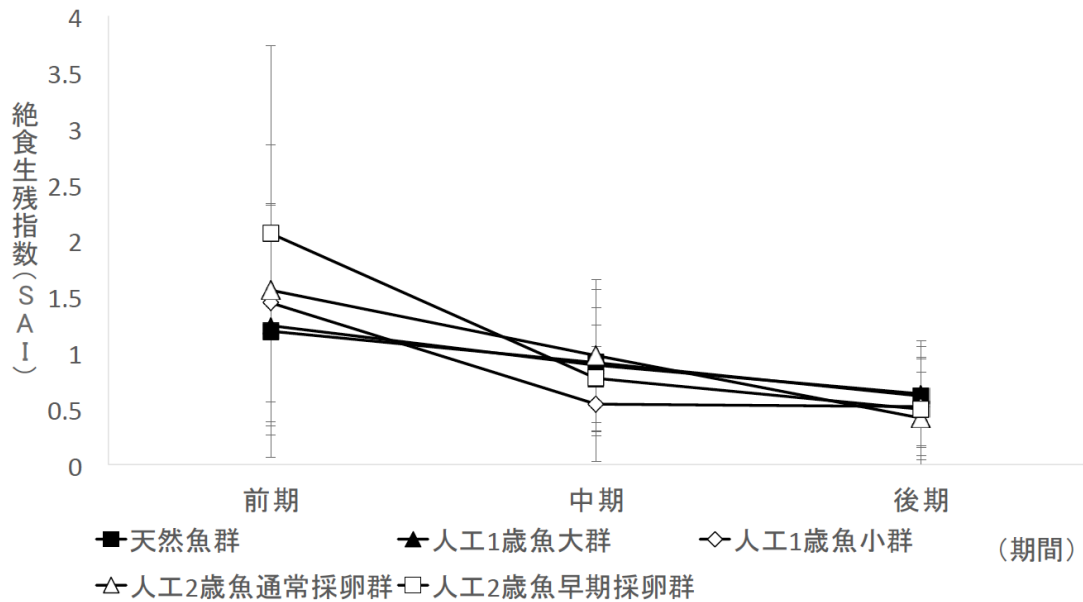


図 2 産卵期ごとの孵化率





### 図 3 産卵期ごとのSAI



### 図. 4 卵質評価(親魚群)

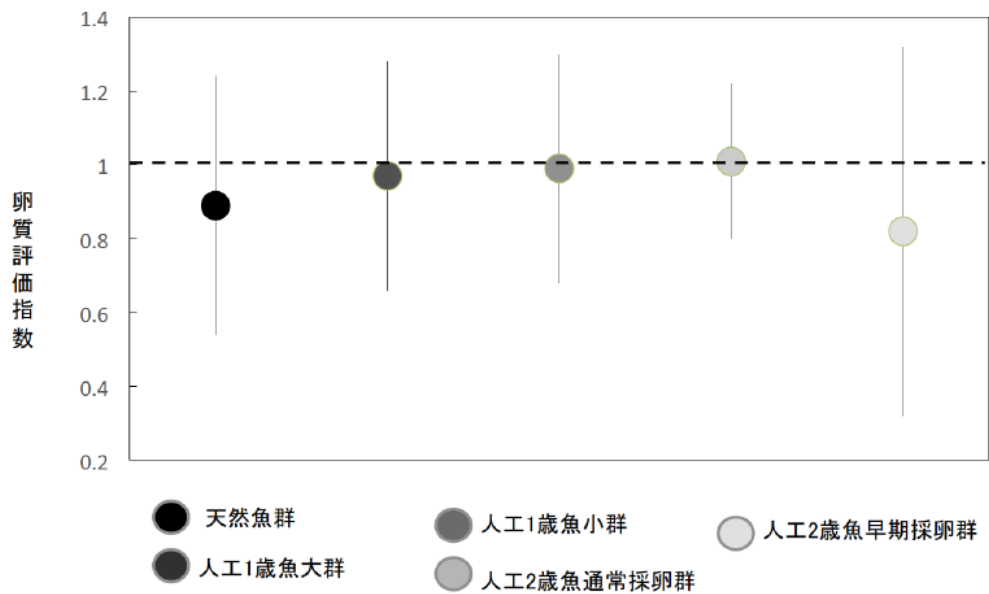
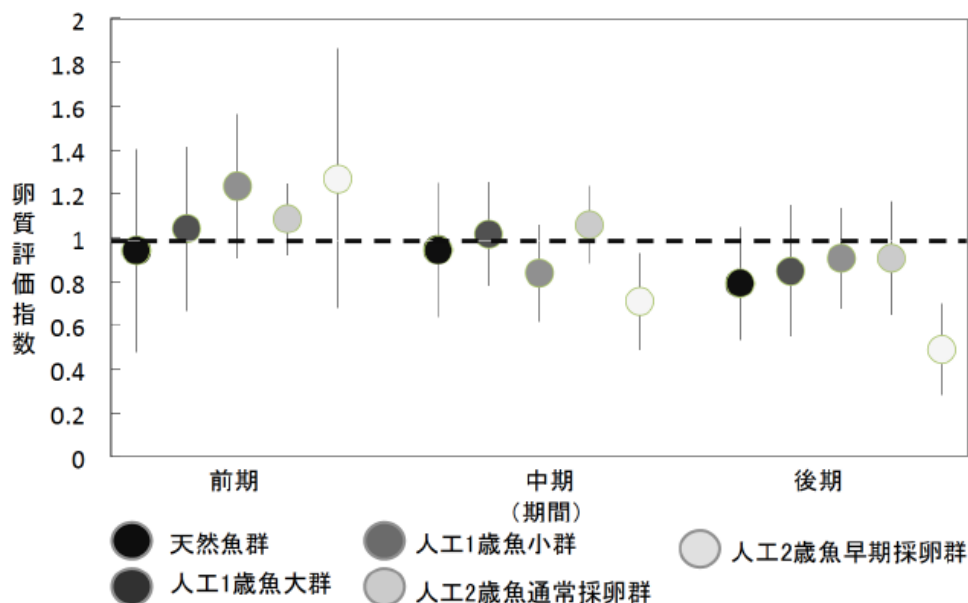


図.5 卵質評価(産卵期)



3) -2 シロギス養殖システムの開発

現在、水産業は「獲れない、食べない、獲りにいけない」の三重苦で窮地に立ち、**「獲れない」**の打開策の1つとして、健全な魚の子供を育て、放流や養殖へ安定的に供給する技術の確立が求められている。そのことから養殖は**「里海」**の取り組みの1つとして位置付けられると考える。

開発課題としては、「質」(体長 25cm 以上のテッポウギス)と「量」(稚魚期減耗解消)の双方に加えて、給餌量の必要最小化が求められている。本研究プロジェクトでは、それらの課題を「自発給餌システム」と「環境制御システム」によって解決することに着目している。

<サブタスク A> 自発給餌システム

人工知能を使って、魚が餌を“食べたいときに・食べただけ・食べることができる”**「自発給餌システム」**を構築する。本研究では、自発給餌用の人工知能開発に際し、まずは学習失敗の実害を出さず効率よく学習を進めるためのシミュレーション環境を用意し、その上である程度の学習を進めることが大切である。現在シミュレーション環境の構築を終え、人工知能の学習に必要な報酬設計を進めている。加えて、本システムの画像認識部については実環境で利用できるソフトウェアを別途開発進める必要があるが、その為に必要な実画像データを異なるライティング環境、撮影アングル、撮影機材で取得し、最適な撮影方法を模索した。

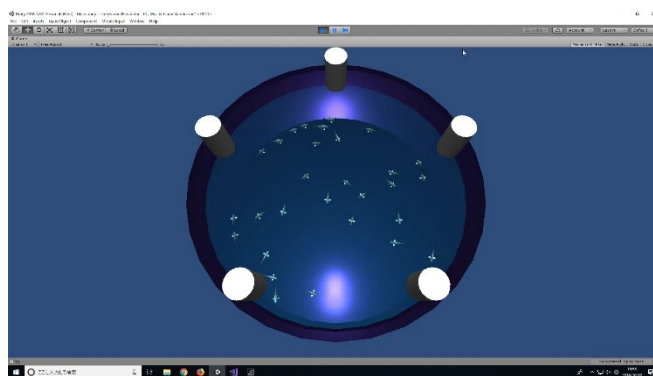


図1 人工知能学習用シミュレーション環境

### <サブタスク B> 環境制御システム

本研究では、将来的に、魚の成長に合わせて、餌の粒径を小さいものから大きなものへ変更しながら与える「グラデーション給餌」のアイデアを試行するための準備として、餌の粒径ごとの重力沈降速度や拡散性状を、数値解析によって明らかにすることを目的とした。

一般に、まず大きめの魚が餌を食べ、次に小さめの魚が餌を食べる。それにより、一部の魚のみが大型化し共喰いの原因となると言われている。そこで、小さな餌を与える期間を長くすることで、小さめの魚が餌にありつける状況をつくり、一部の魚が大型化することの抑制（稚魚期減耗解消）を狙う。

図2に、水中 CCD カメラによる給餌時の撮影画像を示す。市販の「自動給餌装置」によって水槽水面に播かれた餌は、水中内をある程度の時間を J-かけて重力沈降していた。シロギスは、水面の餌を食べるものもいれば、水中の餌を食べるものもいた。いずれにしても、シロギスに餌を食べてもらうには、餌が一定時間水中に滞留（重力沈降）する必要があると考えられる。なお、水中用 CCD カメラに装備されている LED ライトの点灯時と消灯時とでは魚の振る舞いが異なっていたので、人工知能学習では LED 消灯の条件で撮影する必要がある。



図2 水中 CDD カメラ画像

図3に、餌の粒径と重力沈降速度の関係を示す。これは、ストークスの式を用いて算出した。餌の粒径範囲は 0.1~10mm とし、餌の密度は $1.1\text{g}/\text{m}^3$ 、 $1.6\text{g}/\text{m}^3$ 、

2.6g/m<sup>3</sup> の 3 ケースを計算した。例えば、2.6g/m<sup>3</sup> の密度で 1mm の粒径の場合では、重力沈降速度は約 100cm/s であり、餌は 1 秒で水槽底面へ沈降してしまう。重力沈降速度を 1cm/s にするには、密度 2.6g/m<sup>3</sup> では粒径 0.1mm、密度 1.6g/m<sup>3</sup> では粒径約 0.2mm、密度 1.1g/m<sup>3</sup> では粒径約 0.4mm にする必要がある。餌の粒径は、0.1～0.4mm 程度が妥当であると考ええる。

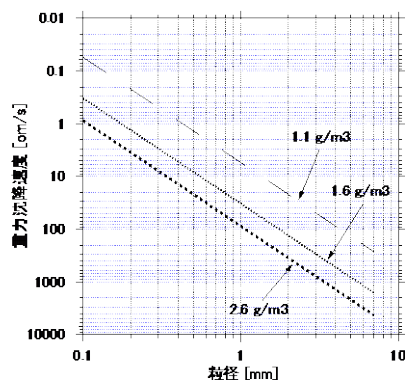


図 3 餌の粒径と重力沈降速度の関係

図 4 に、CFD (Computational Fluid Dynamics) 解析結果を示す。重力沈降速度が 1cm/s の条件で解析した。その他の解析条件は、実運用条件を概ね反映したものとした。コンターは暖色系が高濃度であり寒色系が低濃度を意味する。注水口 2 個と排水口 1 個によって換水が行なわれているが、注水の勢いだけでは餌が十分には水槽内に拡散していない。「自動給餌装置」の直下付近の水槽底面へ餌が重力沈降して溜まっている。この餌をうまく拡散させる工夫が必要と考える。注水の勢いを利用しやすい位置に給餌装置を設置したり、給餌装置を複数台設置したりすることなどが有効かもしれない。実際の養殖水槽の運用状況をより反映して今後検討していく必要があると考える。

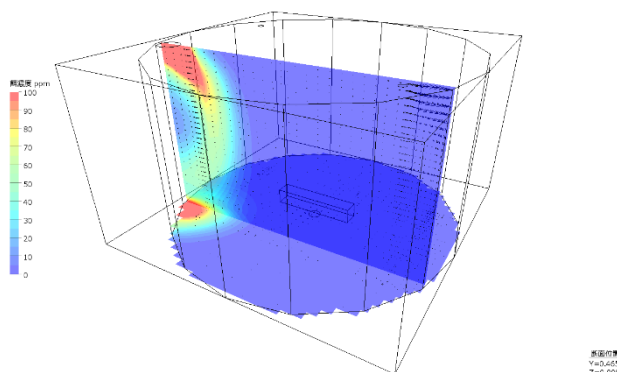


図 4 CFD 非定常解析

#### 4) 今後の計画

#### 4) -1 シロギス養殖技術の開発

今回の結果で、シロギスは産卵前期の卵を使用するのが良いとの結論を得た。次年度はこれら、産卵期ごとの卵の質と飼育結果にどのような関連性があるかを確認する。

#### 4) -2 シロギス養殖システムの開発

次年度は、人工知能学習の結果を踏まえて、「リアルタイムで魚の位置等を推測する実験」から試みる予定である。「教師データ」を使って人工知能学習を進め、魚が餌を“食べたいときに・食べたいだけ・食べることができる”「自発給餌システム」を構築する。

その後、「対照区実験」を実施し、それと同時に水温・水中照度等の環境パラメータも実測し、シロギスが減耗せずに餌を良く食べ体長が大きくなるような“好条件”の環境パラメータを明らかにする。

また、将来的に、魚の成長に合わせて、餌の粒径を小さいものから大きなものへ変更しながら与える「グラデーション給餌」のアイデアを試行する。

#### 5) 研究成果発表

原著論文（和文1報）、著書（2冊）

(1) テッポウギスの安定生産に向けての現状と課題～産卵状況～、藤川稔晃・末石芳幸・岩佐海斗・有瀧真人、福山大学生命工学部年報、17、33-47、2018年12月。

(1) 「しまなみテッポウギス」の種苗生産と養殖試験、有瀧真人・大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃、養殖ビジネス、緑書房 東京、P50-54、2019年1月。

(2) 「しまなみテッポウギス」の商品開発と販売、有瀧真人・大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃、養殖ビジネス、緑書房 東京、P53-56、2019年2月。

学会発表（口頭発表7件）

(1) 養殖でシロギスを瀬戸内の名産に  
～しまなみテッポウギスプロジェクト～

有瀧真人

平成30年度第2回日本水産学会水産増殖懇話会講演会（2018年9月東広島）

我々は、仔稚魚飼育の過程で多発する形態異常の機序解明及び防除技術の開発に携わってきた。シロギス *Sillago japonica* は、我が国では北海道南部から沖縄までの浅海域に広く分布するなじみ深い魚である。本種は釣で生きたまま入手できる上、産卵期が長いなど、飼育実験をする上で扱いやすい魚種であることから、形態異常のモデルとして取り上げた。その過程で、飼育魚は天然魚に

比べ2～3倍と極めて早く成長することを把握した。15cm前後のシロギスは、天ぷらやフライの材料として比較的安価で多量に取引されるが、25cm以上の個体は流通量も少なく、刺身や寿司ネタとして3000円/kgを越える高級魚として扱われている。このことから、飼育下での高成長を利用して、1.5～2年で大型のシロギスを安定的に供給する養殖技術の開発に着手した。取り組みは当初から、地域に根ざした産業に直結することを目指し、技術開発（福山大学）、養殖技術の実証（カネキ水産）、商品開発・評価（廻鮮寿司しまなみ）の3者が連携する「しまなみテッポウギスプロジェクト」として2016年にスタートした。現在3年目を迎えた同プロジェクトでは、これまで2017年12月に商品開発および試食会を、2018年4月には試食会での評価を元に、店舗での販売を実施した結果、瀬戸内海における新たな養殖種としてマスコミにも大きく取り上げられた。

このように、ある程度の技術とマーケットを開発したテッポウギスプロジェクトではあるが、1) 通常の飼育・養殖スケジュールでは目標とした1.5～2年間で25cmに達しない、2) ごく初期の減耗、形態異常、共喰い等、効率的な飼育には技術的に課題が残る、3) 福山大学の種苗生産レベルでは、地域にインパクトを与えられる種苗を供給できない、など大きな課題も見え始めている。1) 及び2) については京都大学や長崎大学と共同研究を立ち上げ、成熟や卵質という面から課題の解決に取り組んでいる。一方、3) については、開発した技術の受け皿となる新たな企業と連携も始まっており、今後量産規模での展開も検討していきたい。

## (2) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (1)～養殖シロギス大型化への取り組みと課題～

藤川稔晃・大瀧一登・占部侑子・有瀧真人

平成30年度日本水産学会秋季大会（2018年9月東広島）

【目的】シロギスの大型個体は3000円/kgと非常に高値で取引される。我々は、飼育下でシロギスが高成長である点に着目し、1年半で全長25cmの「しまなみテッポウギス」を安定的に生産する技術開発に着手した。今回は、その現状の紹介と今後の課題について報告する。

【方法】本研究には、飼育開始時期（5月、6月、7月）の異なる3群の人工種苗を用いて成長を比較した。また1年間の連続的な成長記録から、本種の成長特性を把握するとともに、成長促進の手法を検討した。加えて、これまでに得られたデータから、種苗生産時の課題を整理した。

【結果】人工種苗の飼育開始時期別に、11月時点でのサイズを比較すると5月群14cm、6月群11cm、8月群6cmと生産時期が早いほど、大型の種苗を確保で

きた。一方、6～8月に生産開始した飼育群は、約1年6ヶ月の養殖期間では、目標の25cmには届かないことも確認された。その原因として、冬季の水温低下や産卵期の成長停滞が強く示唆された。以上のことから、テッポウギスの養殖を成功させるには、1) 本種の成熟・産卵機構を解明した上で早期採卵・生産の技術を確立し、より大型の種苗を安定供給する、2) 成長停滞の原因となる成熟・産卵の制御技術を開発する必要がある。一方、これまで得られた飼育結果から、シロギスの種苗生産では、5日齢までの初期減耗、30日齢以降の共喰い、短軀を主体とした形態異常が大きな課題であることが明らかとなっている。効率的な種苗生産及び養殖には、これらの原因を把握するとともに防除技術の確立が急務である。

(3) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (1)～飼育シロギス仔稚魚の骨格異常におけるストレス－コルチゾル系関与の可能性～

鶴巻祐介、藤川稔晃、南 卓志、有瀧真人、田川正朋

平成30年度日本水産学会秋季大会（2018年9月東広島）

【目的】我々は大型シロギス *Sillago japonica* の効率的な生産を目指し、天然と飼育の仔稚魚を比較研究する共同研究を行っている。この過程で飼育個体には骨格異常が頻発することがシロギスでも確認された。飼育魚における骨格異常は、飼育下の何らかの要因がストレスとして作用し、分泌されたコルチゾルが悪影響を与えたためではないかと考え、コルチゾルと骨格異常との関連性を検討した。

【方法】(1) 受精卵から飼育した仔稚魚と天然海域より採捕した仔稚魚について、全長と頭長、発達ステージを調べた。特に発達段階の類似した個体については、硬骨・軟骨二重染色によって脊椎骨や顎骨の異常を比較した。また体コルチゾル濃度を比較した。(2) 飼育仔魚へのコルチゾル投与実験を行った。3日齢からDMSOに溶解してコルチゾルを飼育水に添加し、生残状況および体長や発達ステージを対照区やDMSO区と比較した。

【結果】(1) 飼育魚は天然魚よりも短軀傾向を示した。特に変態後では脊椎骨や顎骨に異常が見られた。また飼育魚は天然魚よりも有意に体コルチゾル濃度が高く、飼育環境下では天然海域よりも強いストレスを受けていることが示唆された。(2) コルチゾル濃度として10、3、および1  $\mu\text{g/ml}$  を用いたが、投与濃度が高いほど早期に全滅した。なお、対照区やDMSO区では大規模な斃死は見られなかった。1  $\mu\text{g/ml}$  でも20日齢には全滅したが、投与区の仔魚は対照区よりも11および18日齢では成長や発達が遅れていた。以上より、飼育環境下では天然よりも強いストレスを受けている可能性が初めて示された他、コルチゾルが成長や発達に悪影響を及ぼすことがシロギス仔魚でも示唆された。一方、コ

ルチゾルが骨格異常を直接誘起するか明らかではないため、今後、引き続き検討を行う。

(4) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (3) ～天然シロギスの血中コルチゾル濃度解析～

加瀬俊平・田川正朋・有瀧真人・苅平裕次・征矢野清

平成 30 年度日本水産学会秋季大会 (2018 年 9 月東広島)

【目的】我々は大型シロギス *Sillago japonica* の養殖に向けた研究に取り組んでいるが、天然と異なる環境で飼育されたシロギスは、慢性的なストレスに晒されている可能性がある。そこで、ストレスによって血中濃度が増加するストレス応答ホルモンであるコルチゾル (F) を指標とし、運搬や飼育におけるストレスの影響解析を開始した。本研究では、養殖ストレスを考える上で基準となる天然魚の血中 F 濃度および運搬ストレスによる F 濃度の変化を調べた。

【方法】①長崎市周辺で 4 - 10 月に毎月釣獲したシロギスを供試魚とした。釣獲後 2 分以内に採血し、その後体長・体重の測定と生殖腺の採取を行った。得られた血液は F 濃度の測定、生殖腺は組織学的観察に供した。②長崎県時津町子々川郷で釣獲した本種を車で飼育施設まで運搬し、屋外水槽で 2 週間飼育した。釣獲直後、運搬直後、および飼育開始から 1、3、5、7、14 日後に 7 尾ずつサンプリングし、実験 1 と同様に解析した。

【結果】①天然魚の血中 F 濃度は 7 月に約 20 ng/ml の高い値を示す個体が一部見られたが、その他の個体は調査期間を通して 10 ng/ml 以下を示し、体長・体重や生殖腺発達段階による違いも見られなかった。②血中 F 濃度は運搬直後に天然魚と比べ 30 - 93 ng/ml と高値を示したが、その後減少し 5 - 7 日目にはすべての個体で 10 ng/ml 以下となった。しかし、14 日後には再び高い血中 F 濃度 (22 - 53 ng/ml) を示す個体が出現した。以上の結果から、本種の天然での血中 F 濃度の基礎レベルは 10 ng/ml 以下であることが明らかになった。また、運搬ストレスにより急増した血中 F 濃度は 5 日~7 日で基礎レベルに戻ることが示された。しかし、飼育中にも要因は不明であるが F 濃度が急増する事ことが示唆された。

(5) 大型シロギスの効率的な養殖にむけて (4) ～しまなみテッポウギスを社会へ届けるために～

大瀧一登・占部侑子・藤川稔晃・有瀧真人

平成 30 年度日本水産学会秋季大会 (2018 年 9 月東広島)

【目的】これまでシロギスの養殖技術を開発する目的で卵質や成長促進、共食い、形態異常等の課題を検討してきた。その結果、一定の規模・品質のシロギ



スを生産することが可能となった。そこで、本種の商品化を企画するとともに、市場での評価を調査したので報告する。

【方法】本研究では、2017年12月7日に試食会を、2018年4月27～29日に試験販売を行い、それぞれ提供する商品を企画するとともに来店者に食味等のアンケートを実施した。前者にはふ化後16～18ヶ月のシロギスを244尾、後者では同20～22ヶ月のシロギスを569尾使用した。

【結果】試食会には34人（男：22人、女：12人）が参加した。商品は活魚のにぎり寿司、鮮魚のにぎり寿司7種、南蛮漬、天ぷら等を提供した結果、活魚のにぎり寿司に高い評価を受けた。参加者は、活け造りの食味や食材の透明感を、今までにない点として評価していた。試験販売では、評価の高かった寿司を商品として企画し、4種類を提供した。販売数は3日間の総数で371食であり、活魚の握り（48.7%）、酢<sup>メ</sup>炙り握り（20.0%）、糸作り軍艦（14.3%）糸作り握り（17.0%）の順となった。ここでも試食会同様、養殖シロギスの生きた魚を提供できる点が評価された。なお、商品単価は330～550円であり、1,500円～2,500円/kgでの流通が見込めると考えられた。一方、握り寿司に使用する場合、20cmサイズが目安となることから、大型の養殖ギス、いわゆる「テッポウギス」の安定供給が喫緊の課題であることも明らかとなった。

#### (6) コウライアカシタビラメの発育と変態異常

有瀧真人・原田 樹・山本隼也・坂井美律

平成31年度日本水産学会春季大会（2019年3月東京）

【目的】異体類では、眼位や体色の異常、すなわち変態異常が発現し、大きな問題となっている。ヒラメやカレイ科魚類では仔稚魚期の発育速度が変態異常の発現に影響することが強く示唆されているが、ウシノシタ類では未検討である。そこで、本研究ではコウライアカシタビラメの発育速度と変態異常の発現状況に着目し飼育試験および観察を行った。

【方法】コウライアカシタビラメを1) 自然水温区（平均20.2℃）、2) 高水温区（平均21.6℃）、3) 低水温区（平均19.0℃）の3つの試験区で飼育した。それぞれ3日ごとに各水槽から仔稚魚30個体をランダムに取り上げ、発育段階を観察するとともに全長を測定した。着底を確認した後は、概ね1～5日間隔で取り上げた。着底した稚魚は眼位および体色を基準に正常個体と異常個体に類別した。

【結果】仔魚の発育・成長速度は、高水温区で最も速く、低水温区で最も遅かった。試験区ごとの変態異常の発現率は、低水温区で最も高く（22.9%）、高水温区で最も低かった（7.3%）。すなわち、本種が正常に変態するためには自然水温、またはそれを超える水温条件下での発育速度が適しており、それを下回る

と変態に伴う体色及び眼位などの形態変化に大きな影響を及ぼす可能性が示された。このことを裏付けるように取り上げまでの積算水温と正常率には一定の傾向が認められ、積算水温 700℃・日を越えると 90%を下回り大きく低下した。各試験区の異常のタイプに着目すると、自然水温区では眼位異常率が低いのに対し、その他 2 つの試験区では高く、特に低水温区でこの傾向が顕著であった。

(7) シロギス人工種苗における鰾及び脊椎骨の形成と形態異常  
藤川稔晃・森川 将大・有瀧真人

平成 31 年度日本水産学会春季大会 (2019 年 3 月東京)

【目的】 多くの人工種苗では短軀などを伴う脊椎骨の異常がみられ、大きな問題となっている。これら、脊椎骨の異常は鰾の発達と化骨状況が関係しているといわれている。しかし、シロギスにおいてこの点は検討されていない。そこで本研究では、シロギス人工種苗の鰾及び脊椎骨の発達過程と異常の発現について観察した。

【方法】 観察には 2 日齢～40 日齢の人工種苗を用い、因島大浜で採取されたシロギス天然個体を比較対象とした。サンプルは体長、頭長を計測後、トリプシンによる透明化とアリザリンレッドによる硬骨染色をおこない、鰾長と椎骨の形成を測定・観察した。

【結果および考察】 シロギス人工種苗は天然個体に比べると明らかに短軀であった。また日齢が進むにつれその差が顕著となった。鰾も人工種苗は天然個体に比べて小型化していた。この事からシロギスでも鰾のサイズが体型に影響をおよぼす可能性が強く示唆された。鰾の開腔は 3 日齢から確認でき、日数が経過するにつれてその割合は上昇した。また同じ日齢では魚体サイズの大きな個体の開腔率が高かった。人工種苗における脊椎骨の化骨は、早い個体で 16 日齢から確認できた。25 日齢では一部が、30 日齢には全ての個体で形成が終了していた。一方、脊椎骨の異常は、形成途中の 21 日齢から発現していることが明らかとなった。

特許、新聞発表など

・みなと新聞：9 月 11 日「大型シロギス周年供給へ沖縄県の漁協福山大と連携 20 年春にも初出荷」

・じばさんフェア 2018：11 月 18 日 しまなみテッポウギスプロジェクトの紹介

2. 課題名：②-2 有用物質の探索

1) 目的

藻場・干潟生態系で大量に生産される種を対象に、その生物とそれを栄養源として利用する微生物が産生する物質を探索する。従来の培養ベースの分析に加えて、次世代シーケンサーを利用した“培養を必要としない分析”を行い、新規有用物質を発見する。具体的には、主にアオサとその周辺微生物が産生する物質を調査し(①)、抗酸化性物質や糖質等の機能性成分の有効利用法を探る。また、植物プランクトンを効率的に食べるバクテリアを探索し(①)、赤潮やノリの色落ちを防除する効率的な殺藻細菌とその有用物質を見つける。有用物質の構造解析や成分の網羅的分析・同定には、質量分析計(研究設備 3)を使う。

## 2) 30 年度の実施目標及び実施計画

有用物質 アオサからの有用物質の抽出法の検討を行い、ポリフェノールや SOD 活性から抗酸化機能を検討する。また、能力の高い殺藻細菌のリストを作成する。

## 3) 成果

### 3) -1 アオサ等からの有用物質の探索

#### (1) 目的

アオサはアオサ科アオサ属の海藻であり、海の富栄養化などが原因で大量繁殖することで緑潮（グリーンタイド）を発生させ、自然環境、漁業、観光へ影響を及ぼす。アオサはアオノリの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料、バイオマス等へ利用できるが、その多くは未利用の状況である。アオサ等の藻類の成分の有効利用としてポリフェノールなどの抗酸化性や緑色の食品用色素としての利用性、蛋白質の分解物ペプチドの機能性、多糖類の分解による生成糖類の利用性について検討する。今回は瀬戸内海において生産される海苔の機能性について検討した。

#### 糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1,4 結合した多糖である。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを探索し、新規のオリゴ糖の合成について検討する。今回は分離菌 CH11 株の生産する  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性について検討した。

#### 酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

海藻由来の多糖類は陸上植物と異なりウロン酸等を含みヘテロなものが多い。アルギン酸、カラギーナン、フコイジン等の高活性分解酵素を探索し、多糖類からのオリゴ糖等の糖類の生産能および生成糖類について検討する。今回はアルギン酸リアーゼ生産菌の分離を行い、その酵素生産のための培養条件について検討した。

## (2) 研究成果

### 海藻類等からの有用物質の探索

昨年アオサの機能性について調べたが、今回は瀬戸内海でも多く生産される海苔について検討した。紅藻類アマノリ属のスサビノリやアサクサノリは国内で広く食される焼き海苔の原料となっている。海苔の風味や食感は地域の生育環境により特徴づけられる。また保存状態が悪いと変色が起こり、その品質は低下する。それら各品質の海苔の抗酸化性等の機能性についてはほとんど調べられていない。

広島産を含む各産地の海苔試料に 60%エタノールを加え 50 mg/ml、または蒸留水を加え 25 mg/ml としホモジナイズした後、4°Cで 24 時間保持することで成分の抽出を行い、抗酸化性評価のため SOD 様活性およびポリフェノール量を測定した。焼き海苔のポリフェノール含量は高いもので 100g 当たり 700~800 mg 程度であるのに対し、変色し品質劣化した海苔はその半分程度となった。また SOD 様活性の IC<sub>50</sub> 値はポリフェノール含量と相関し、品質の良い焼海苔では抗酸化性が高いことがわかった。図 1 に広島産を含む各産地海苔の SOD 様活性を示した。

食品用酵素のプロテアーゼアマノ SD (天野エンザイム(株)) を、25 mg/ml の試料に対し pH 6、40°Cで作用させタンパク質を分解し、その生成ペプチドの血圧上昇抑制効果を示すアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性調べた。プロテアーゼ処理した時の遊離ペプチド量は 200~400 mg/g 程度と試料によって大きく異なった。しかし、いずれの品質の海苔からの遊離ペプチドとも ACE 阻害活性を有することがわかった。

1%スクロースおよびマルトースを基質とし、33 vol%となるように海苔抽出液を加え、ラット小腸酵素を作用させ生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法により測定することでスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を測定した。いずれの海苔抽出液とも大きくはないがスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を有することが認められた。

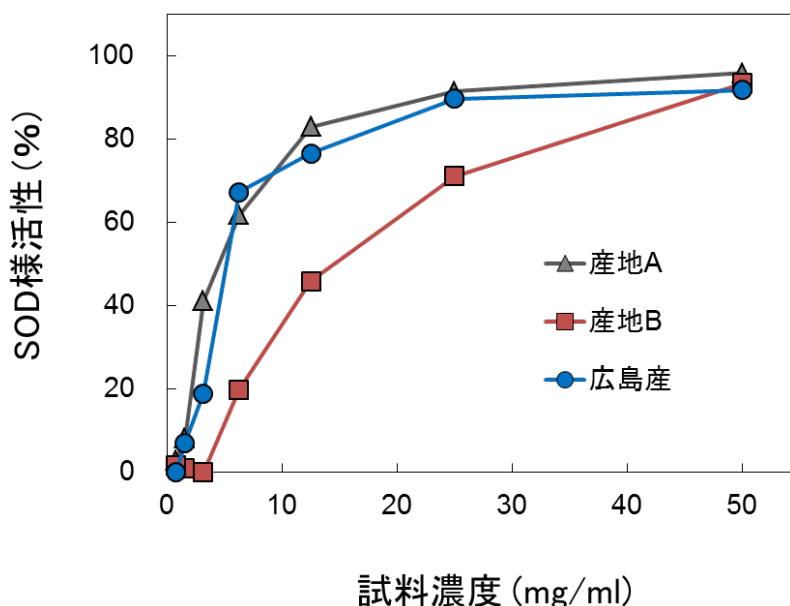


図1 SOD 様活性と試料濃度との関係

#### N-アセチルヘキササミニダーゼの糖転移作用について

以前、研究室で分離した *Bacillus* sp. CH11 株は糖転移性の高い  $\beta$ -N-アセチルヘキササミニダーゼを生産した。今回は酵素の精製を行い、この糖転移性について詳細に調べた。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml (500ml 三角フラスコ) にて、130rpm、30°Cで 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム (ファルマシア株) および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム (東ソー株) により酵素精製を行った。表 1 は、CH11 酵素の基質特異性について示したもので、*p*-ニトロフェノール誘導体の *p*NP- $\beta$ -N-アセチルグルコサミドの他に、*p*NP- $\beta$ -N-アセチルガラクトサミドにも作用しその相対活性は 17%となった。またアミノ糖でないグルコシドやガラクトシドには作用しなかった。

酵素の分子量は 90kDa と見積もられ、最適 pH は 7 付近で、各 pH にて 40°Cで 60 分間保持させたときの安定 pH は 6~8 となった。最適温度は 40°C付近であった。各温度にて pH7 で 30 分間保持させたときの安定温度は 40°C以下であった。

図 2 は CH11 株精製酵素を 2%ジアセチルキトビオースに 24 時間反応させた時の反応液の HPLC チャートを示したものである。反応前の基質 2 糖類のジアセチルキトビオースの分解により、反応後では遊離した単糖の N-アセチルグルコサミンの他に、基質に糖転移した 3 糖のトリアセチルキトリオースが検出された。受容体としてエチレングリコールを加えたとき、N-アセチルグルコサミンが糖転移した転移糖ピークが N-アセチルグルコサミンおよびエチレングリコールのピークの間を検出された。

表 2 は、ジアセチルキトビオースに受容体として各アルコール類および糖アルコールを添加し反応させたときの糖転移反応性についてまとめたものである。高さ 2000  $\mu$  V 以上の比較的大きな転移糖ピークが検出された場合には○印、それ以下のわずかなものには△印とした。表 2 に示すように、1 価アルコール類では、炭素数 2 までのメタノールおよびエタノールへの糖転移が認められたが、両末端に水酸基をもつ 2 価アルコール類では、炭素数 5 のペンタンジオールまで高い糖転移性を示した。糖アルコールでは、エリスリトールおよびキシリトールに糖転移性が認められたが、キシリトールへの転移性は低いものであった。また単糖、2 糖類およびポリフェノール類では、いずれも糖転移はほとんど認められなかった。今後は糖類、ポリフェノール等への糖転移性についても詳細に検討したい。

表 1 CH11 株酵素の基質特異性

基質	活性 (U/ml)	相対活性 (%)
$p$ NP- $\beta$ -GlcNAc	0.68 $\pm$ 0.02	100
$p$ NP- $\beta$ -GalNAc	0.11 $\pm$ 0.00	17
$p$ NP- $\beta$ -Glc	0	0
$p$ NP- $\beta$ -Gal	0	0

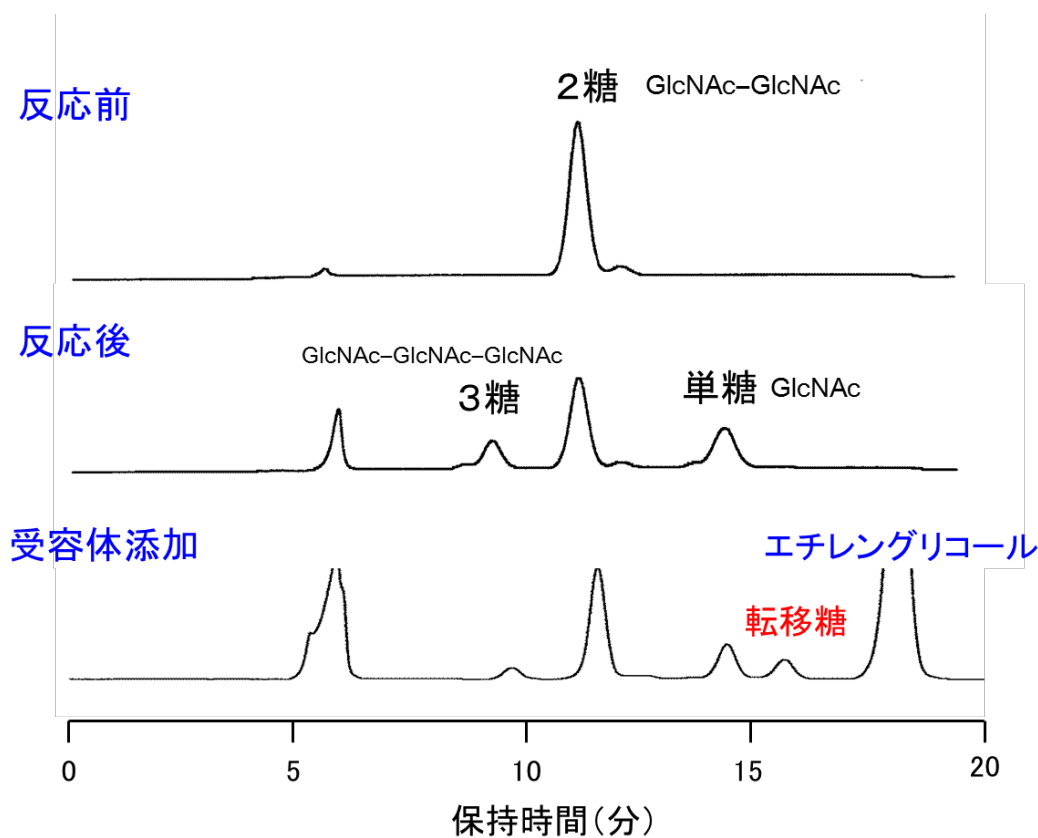


図2 CH11 株酵素の糖転移反応性

表2 CH11 株酵素の糖転移反応における受容体特異性

1価アルコール類		2価アルコール類		糖アルコール類	
受容体	糖転移	受容体	糖転移	受容体	糖転移
メタノール	○	エチレングリコール	○	エリスリトール	○
エタノール	○	プロパンジオール	○	キシリトール	△
1-プロパノール	×	ブタンジオール	○	ソルビトール	×
2-プロパノール	×	ペンタンジオール	○	マンニトール	×
n-ブタノール	×	グリセリン	△		

酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

前回は研究室で分離した *Paenibacillus* sp. S29 株が生産するアルギン酸リアーゼの性質について調べた。今回はオリゴ糖生成能等の新規の反応性を有する酵素の探索を行った。土壌からアルギン酸分解菌の分離を行った結果、細菌 30 株、放線菌 165 株、カビ 7 株の計 202 株を分離した。1%アルギン酸培地での液体培養において多くの菌株培養液に酵素活性が認められたが、比較的高活性である 0.2U/ml 以上の放線菌 H137、かび H148、放線菌 H149、放線菌 H159、放線菌 H160 株の計 5 株を選択した。アルギン酸、グルクロン酸、マンノース、グルコースを炭素源として液体培養を行ったところ、5 株の中でより酵素生産性の高い H159 (0.697U/ml) および H160 (0.875U/ml) 株ではアルギン酸培地にて高い活性が認められたが、各単糖類においても少ないが酵素生産が認められた(図 3)。なお、グルクロン酸、マンノース、グルコースはアルギン酸の構成単糖のグルロン酸、マンヌロン酸と構造と関連するものとして選択した。H159 および H160 株のアルギン酸培地での液体培養が酵素生産に適していることがわかったが、H137、H148、H149 株ではアルギン酸による生産性は大きくなかった。今後、さらに培養条件について検討し、生産性の高い菌株のアルギン酸リアーゼの性質について検討する予定である。

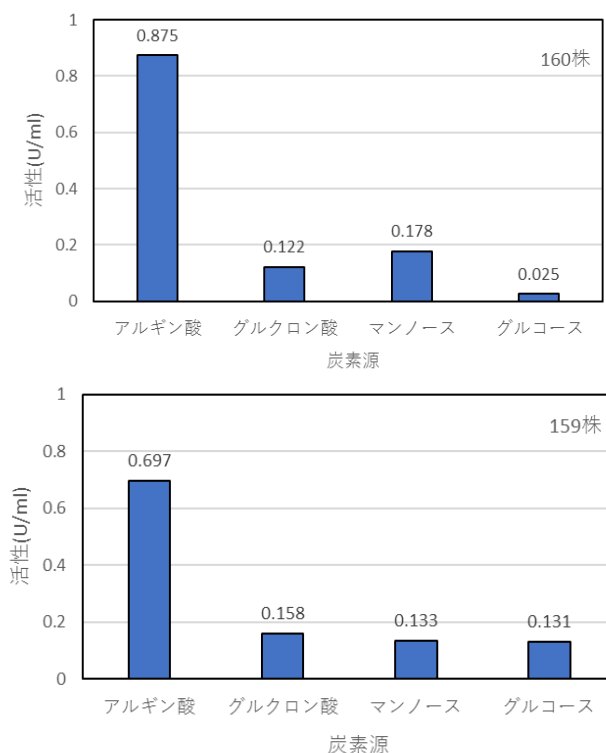


図 3 分離菌の液体培養における株のアルギン酸リアーゼ生産に及ぼす炭素源の影響



### 3) -2 里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明

赤潮の発生は里海の生物生息環境悪化に繋がるが、赤潮原因藻を殺滅する細菌（殺藻細菌）が環境中に存在することが知られており、殺藻細菌は赤潮の消長に関わる生物的要因として注目される。本研究では、藻場、干潟等の沿岸域から殺藻細菌を分離し、これらの場が水質浄化だけではなく生物的にも赤潮の発生抑制に寄与していることを明らかにすることを目的とする。さらに、分離した殺藻細菌の殺藻機構を解析し、殺藻細菌を活用した赤潮の防除方の検討を行う。これらにより、藻場・干潟生態系における微生物の重要性と、里海の維持への微生物利用に関する新たな知見が得られることが期待される。

今年度は、沿岸域及び沖合における水産重要種の移動に重要な働きを持つことが知られる流れ藻を対象に、細菌などさらに微小な生物の生息・移流・拡散に重要な場であるかについて検討するとともに、赤潮防除に利用可能な新奇な殺藻細菌を取得することを目的に、流れ藻からの殺藻細菌の分離を行った。

4月から11月の間に因島および伯方島、生口島周辺海域で調査船爽風丸を用いて計6回流れ藻の採取を実施した。採取した流れ藻の構成海藻13種51個体について付着細菌の計数・分離を行った。得られた分離細菌約2,000株について、赤潮原因渦鞭毛藻カレニア・ミキモトイおよびヘテロカプサ・サーキュラリスマ、赤潮原因ラフィド藻シャットネラ・アンティカに対する殺藻活性を二者培養により判定した。殺藻活性を示す分離株について、16SrDNAに基づく分子分類を行った。

その結果、採取した流れ藻51個体の内7個体（約14%）から赤潮原因藻を殺藻する細菌が得られ、そのうちカレニアを殺藻するものは2菌株、ヘテロカプサを殺藻するものは3菌株、シャットネラを殺藻するものは9菌株で、すべてを殺藻するものは1菌株であった（表1）。分離菌の16SrDNAによる分子分類を行ったところ、本研究により分離した殺藻細菌12菌株には、これまでに殺藻細菌として報告があるガンマプロテオバクテリア綱アルテロモナス属、シュードアルテロモナス属、ビブリオ属細菌に近縁な菌株に加え、これまでに殺藻細菌としての報告のないアルファプロテオバクテリア綱ナウテラ属およびブレオガニア属細菌に近縁な菌株が存在することが明らかとなった。

これらの結果より、赤潮非発生海域では流れ藻に付着する殺藻細菌は低密度であると考えられたが、流れ藻には多様な細菌が付着しているため、未知の殺藻細菌の分離源として利用できることが示唆された。

表1 採取した流れ藻から分離した殺藻細菌株

調査日	海藻種名・海草種名	個体番号	株番号	最も相同性の高かった種	殺藻性		
					Km	Hc	Ca
6月18日	シダモク	6-9	Sfi-6-1	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	○	○	○
8月3日	ヒジキ	8-2	Sfu-8-1	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-2	<i>Vibrio</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-3	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○
			Sfu-8-4	ND	×	×	○
	8-3	Sfu-8-5	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○	
		Sfu-8-6	<i>Pseudoalteromonas</i> 属	×	×	○	
		Sfu-8-7	<i>Vibrio</i> 属	×	×	○	
	ミル	8-5	Cfr-8-1	<i>Alteromonas</i> 属	×	○	×
		8-6	Cfr-8-2	<i>Nautella</i> 属	×	○	×
ウミトラノオ	8-9	Sth-8-1	<i>Alteromonas</i> 属	×	×	○	
9月27日	アマモ	9-1	Zma-9-1	<i>Breoghania</i> 属	○	×	ND

ND: Not Determined

#### 4) 来年度の研究計画

##### 4)-1 「海洋資源の有効利用性の検討」

##### (1)アオサ等からの有用物質の探索

高活性のアオサ分解酵素の探索を続け、その酵素分解物の分析を行う。

アオサ以外の海藻類についても抗酸化性、タンパク質分解ペプチド等の機能性について調べ、有用性について評価する。

##### (2)糖転移酵素によるキチンからのオリゴ糖の合成

キチン関連の糖転移酵素の探索を続け、高活性や糖転移反応での受容体特異性を有する酵素を開発する。また糖転移反応を利用したオリゴ糖や配糖体の合成について検討する。

##### (3)酵素法による海藻類多糖類からの有用糖質の生産

アルギン酸等多糖類の分解酵素の探索を続け、その糖生産性等について評価する。

##### 4)-2 里海で発生する赤潮原因藻を殺滅する細菌の分離と殺藻機構の解明

次年度は流れ藻に加えて藻場を形成する海藻・海草からの殺藻細菌の分離を試みる。また、今年度分離した殺藻細菌について、赤潮原因藻の殺藻メカニズムの解析を行う。一方で、包括固定化法など現場への応用技術に関する検討を進め、殺藻細菌を活用した赤潮防除法の開発の基礎を確立する。

#### 5) 研究成果発表

論文 (1 件)

(1) Characteristics of an  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from *Bacillus* sp. CH11, including its transglycosylation activity.

Masahiro Kurakake, Yukari Amai, Mizuki Konishi, Kaho Ikehira

*Journal of Food Science*, **83**, 1208-1214 (2018)

学会発表

国内口頭発表 (2 件)

(1) 糖転移作用を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼの探索

天井 裕可里、倉掛 昌裕

日本農芸化学会 2018 年度大会 (名古屋)、講演要旨集 p.831 (2018-3-16)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンが  $\beta$ -1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産する *Bacillus* sp. CH11 株を得た。本研究では CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性等の酵素的性質について調べた。

【方法】0.5%キチン (カニ由来)、0.2%酵母エキス、1.5%寒天の平板培地を用い土壌よりキチン分解菌の分離を行った。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml (500ml 三角フラスコ) にて、130rpm、30°C で 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム (ファルマシア(株)) および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム (東ソー(株)) により酵素精製を行った。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40°C にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1 $\mu$ mol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース (東京化成(株)) を用い、pH7、40°C で 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体への糖転移性について検討した。生成糖の分析には GL-C610 カラム (日立化成(株)) を有する HPLC (流速 1.0ml/min、キャリアー 蒸留水、カラム温度 60°C) を用いた。

【結果および考察】CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの最適 pH は 7 付近で、最適温度は 40°C であった。当該酵素をジアセチルキトビオースに上記最適条件にて 24 時間作用させたところ、分解物の N-アセチルグルコサミンと共に、

糖転移した 3 糖のトリアセチルキトトリオーストを生成した。糖転移反応での受容体特異性では、メタノールやエタノール等のモノアルコールへの糖転移が認められたが単糖および 2 糖類への転移はなかった。また、3 価アルコールのグリセリンや糖アルコールのキシリトールへの糖転移性が高いとがわかった。ポリフェノール等の水酸基を有する有機酸類への糖転移性についても検討を行った。

(2) 品質の異なる海苔の機能性について

中野茉優子, 板倉圭佑, 倉掛昌裕

日本食品科学工学会 第 65 回大会 (仙台)、講演要旨集、p.112 (2018-8-24)

【目的】紅藻類アマノリ属のスサビノリやアサクサノリは国内で広く食される焼き海苔の原料となっている。海苔の風味や食感は地域の生育環境により特徴づけられる。また保存状態が悪いと変色が起き、その品質は低下する。それら各品質の海苔の抗酸化性等の機能性についてはほとんど調べられていない。ここでは、各産地で価格が異なる市販焼き海苔および変色した乾海苔を試料として用い、各種機能性の違いについて調べた。なお青海苔等に用いられる緑藻類のアオサも比較対照として分析した。

【方法】各試料に 60%エタノールを加え 50 mg/ml、または蒸留水を加え 25 mg/ml としホモジナイズした後、4°C で 24 時間保持することで成分の抽出を行った。抗酸化性としては SOD 様活性およびポリフェノール量を測定した。食品用酵素のプロテアーゼアマノ SD (天野エンザイム(株)) を、25 mg/ml の試料に対し pH 6、40°C で作用させタンパク質を分解し、その生成ペプチドの血圧上昇抑制効果を示すアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性調べた。測定には(株)同仁化学研究所の ACE kit-WST を用いた。スクラーゼおよびマルターゼ阻害性の測定では 1%スクロースおよびマルトースを基質とし、33 vol%となるように抽出液を加え、ラット小腸酵素を作用させ生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ法により測定することで求めた。

【結果および考察】焼き海苔のポリフェノール含量は高いもので 100g 当たり 700 ~ 820 mg 程度であるのに対し、変色した海苔はその半分程度となった。SOD 様活性の IC50 値はポリフェノール含量と相関し、品質の良い焼き海苔では変色海苔の 14%程度となり、すなわち抗酸化性が約 7 倍高いことがわかった。プロテアーゼ処理した時の遊離ペプチド量は 200~410 mg/g 程度と試料によって大きく異なった。しかし、いずれの品質の海苔からの遊離ペプチドとも ACE 阻害活性を有することがわかった。またいずれの海苔抽出液とも大きくはないがスクラーゼおよびマルターゼ阻害性を有することが認められた。

特許、新聞発表など

該当なし

### 3. 課題名：②-3 教育

#### 1) 目的

藻場や干潟の生態系解明や産業支援に関する研究に焦点を当て、水族館を活用した展示活動だけでなく出前水族館や ICT を用いた遠隔授業などの情報発信活動を行い、プロジェクトの成果やホットな話題について社会一般に周知することで（科学コミュニケーション）、瀬戸内海の豊かな環境資源を次世代に引き継ぐ活動へと発展させる。また、内海生物資源研究所周辺の藻場や干潟を利用した実体験型環境学習を、小中学校や高校、一般対象に行うこと、そして、福山駅前 福山大学宮路茂記念館でセミナーを行うことで、地域資源の重要性と魅力を発信する。最終的には、瀬戸内海 しまなみ沿岸生態系研究の教材化により、本学の特色ある教育の一つとすることで、地域資源を活用した本学学生の成長につなげる。

#### 2) 30 年度の実施目標及び実施計画

藻場・干潟に関する企画展示や地域社会連携教育の実施。

#### 3) 成果

平成 30 年 9 月 10 日に尾道市環境学習推進事業「ふるさと海辺教室」の一環として、瀬戸内海のどのような環境にどのような生物が生息しているのかを水族館での生物観察を交えて学ぶ環境学習を実施した（図 1）。活動は学芸員養成課程を履修する海洋生物科学科 4 年次生 14 名が企画し、尾道市立山波小学校 4 年生児童 50 名を対象に、水族館での観察を含めた午前の 1 時間 45 分間の授業を実施した。また、事前に児童を対象としたアンケートを実施して「尾道の海について知っていること」、「家庭で環境を守るために気を付けていること」について調査し、活動後の意識変化についても調査した。授業ではホワイトボードに磯、岩場、藻場、砂地の 4 つの環境をイメージしたイラストを作製しておき、水族館で観察できるイトマキヒトデ、ホシガレイ、マダコ、アミメハギの 4 種の生物がそれぞれどのような環境に生息するかを予想させた。その後、児童はグループごとに水族館で生物を観察してから講義室に戻り、予想と比較しながら観察結果を発表し合った。午後には施設前の大浜海岸の干潟と磯で野外観察を行い、最後に海岸の清掃活動を行ってから活動を終了した。事前に調査した「家庭で環境を守るために気を付けていること」と活動後の「環境を守るために自分たちができること」のアンケート結果は図 2、3 に示した。事前調査では、節水、油の処理など 4 年生の学校行事で実施された浄水場見学で学習した

内容に関する記述が多かったのに対して、活動後にそれらはほとんど無くなり、ポイ捨てしない、ゴミ拾いなど当日午後の海岸清掃活動の影響が強く認められた。また、生き物を守る、外来種を放さないなど講義中に解説した内容も新たに記述されていた。さらに、事後の担任教諭へのアンケートからは、「以前に比べ尾道の海に興味を持つようになった」、「教室や教科書での学習内容と現場での学びが結びつき、現場で実感したことで知識が確実なものとなった」との意見が聞き取れ、水族館を活用した里海学習の有効性が示唆された。

平成 30 年度海洋生物科学科卒業研究のテーマとして、4 年次男子学生 1 名が、福山大学「里海里山プロジェクト」の展示開発のテーマで、水族館内での展示活動を行った様子は図 4 に示した。展示を通して里海の生物多様性については伝えることができていたが、解説パネルを主とした提示構成であったことから、体験的な活動を取り入れることでより効果的な情報発信ができると考えられた。

水族館 3 トン研究水槽を用いて設計した干満を定期的に繰り返す潮汐水槽は、8 月から水槽に植え付けたアマモやコアマモなどの海草類を、展示する小型のテッポウエビやヤドカリ類が引き抜いたり切断したりするなど、イメージしていた生物群の行動展示と環境展示の両立が難航したが、冬季に入り天然海域での繁茂が再び認められるようになったアマモを数回に渡り水槽内に移植したところ、気泡の発生により光合成が確認でき葉部も伸長するなど、テッポウエビやヤドカリ類の除去と並行し、少ない面積ではあるが水槽内に定着するようになった。しかし、干潮時に砂地で活動するトビハゼ、ハクセンシオマネ、コメツキガニなどは安定した飼育に至らなかった。

東京大学三崎臨海実験所で実施した調査研究では、小型船を用いたドレッジによる底生生物の調査、ソーティング、記録と撮影までの一連の手法を習得し、身近な海辺の多様な生物の紹介やガイドブックの制作など、次年度の活動に関連する科学コミュニケーションツール開発のアイデアにつながった。





図 1. ふるさと海辺教室の様子.

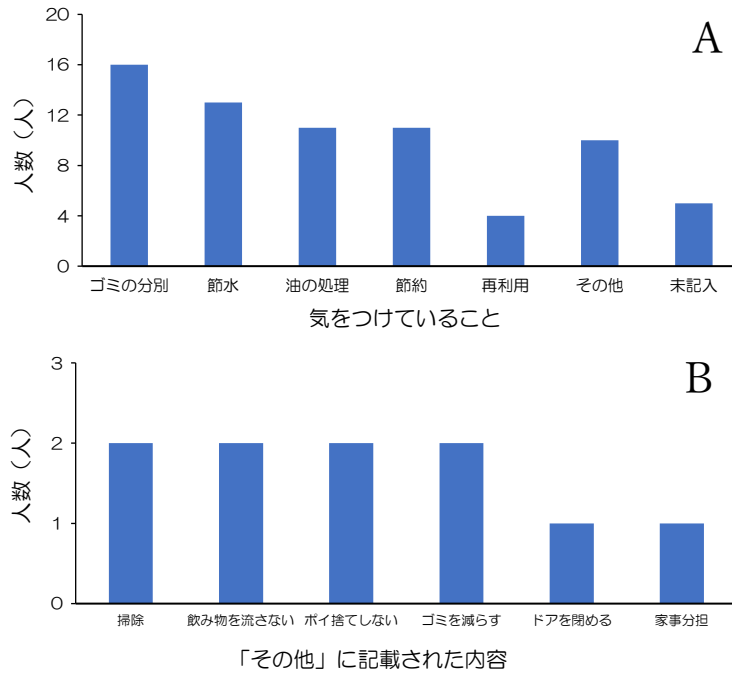
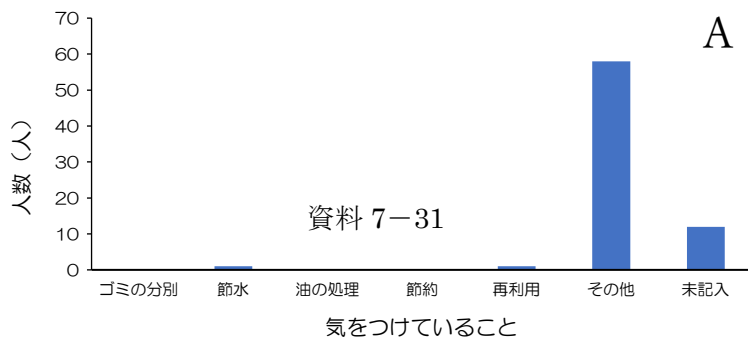


図 2. 児童が家庭で環境を守るために気を付けていること (活動前).  
A: 記述された主な意見, B: その他の意見.





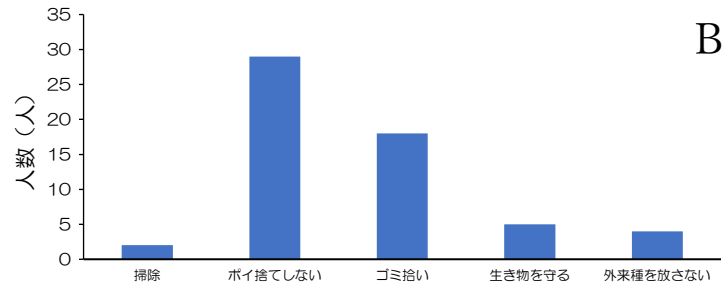


図 3. 環境を守るために自分たちができること（活動後）.

A : 記述された主な意見, B : その他の意見内容.



図 4. 4 年次生による卒業研究展示.  
福山大学「里海里山プロジェクト」の展示開発.





図 5. 水族館 3 トン研究水槽を用いた干満を定期的に繰り返す潮汐水槽.

#### 4) 今後の計画

##### 1) 内海生物資源研究所水族館に設置した潮汐水槽（アマモ場・干潟水槽）とシロギス水槽を活用したブランディング研究展示の実施

大学附属内海生物資源研究所水族館の 3 トン研究水槽を用いて、4 年生の卒業研究テーマと関連させた藻場・干潟およびシロギスに関する企画展示を開催し、大学で取り組むブランディング研究について社会一般に周知しながら、アンケート調査を実施して各展示効果について検証する。また、今年度に引き続きアマモ飼育に適した水槽環境について調査、検討する。さらに、天然アマモから種子を採取し、人工下で発芽させた苗の水槽内育成についても検討する。

##### 2) 地域社会連携教育の実施

今年度に引き続き、里海生態系サービスをテーマにした地域の小中学校との連携授業や遠隔授業もしくは体験型学習を実施する。活動では参加者らへ事前・事後のアンケート調査を実施し、里海に対する意識の変化をモニタリングすることで、展示や活動の学習効果について検証しながら、より効果的な科学コミュニケーション手法について検討する。

#### 5) 研究成果発表

##### (1) 大学附属水族館を活用した学芸員養成教育と学生が主体となった里山・里海教育プログラムの実施

水上雅晴・高田浩二（福山大生命工）

平成 31 年度日本水産学会春季大会（東京）講演要旨集 p.64（2019.3.26-29）

【目的】我々は、尾道市因島にある福山大学内海生物資源研究所附属マリンバイオセンター水族館を活用し、海洋生物科学科の卒業研究指導や学芸員養成課程のなかで水族館を地域の生涯学習施設として捉え、新たな展示手法や地域連携型学習プログラムの開発に取り組んでいる。ここでは、本大学で取り組む私立大学研究ブランディング事業「瀬戸内海しまなみ沿岸生態系に眠る多面的機能の解明と産業支援・教育」に関連して、学生が主体となって実施した里山・里海教育に関連する展示活動や教材を開発してその実践に取り組んだ概要について紹介する。

【方法】本研究では、学芸員養成課程履修する本学科 4 年次生の博物館実習における学内実習の一環として、小学校で使用されている教科書から海洋教育に関連する単元を抽出し、提供できる学習プログラムを地域の小学校と連携しながら、学習指導要領に沿った内容で作成する手法について学習させた。さらに学習の実践的評価を目的に、平成 29 年度は福山駅前の商業施設で開催された「じばさんフェア 2017」会場と水族館を Skype で中継した遠隔講座を、平成 30 年度は尾道市環境学習推進事業「ふるさと海辺教室」で来館した尾道市立山波小学校 4 年生児童を対象とした環境学習を実施した。プログラムの評価は参加者へのアンケートや児童の活動事前・事後の意識変化を調査して行った。

【結果】遠隔講座からは、研究所内での飼育体験やバックヤードツアーなど、普段触れる機会の無い大学施設での体験活動に高い関心をもつ事が伺えた。学生らは開発したプログラムの内容が、児童の海に対する関心の向上に繋がり、水族館における教育活動の有効性を実感し