

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14796

研究課題名(和文)二枚貝を飛躍的に成長させるプレバイオティクス仮説の検証

研究課題名(英文)The role of prebiotics on the growth-promoting effect of marine bivalves

研究代表者

山崎 康裕 (Yamasaki, Yasuhiro)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：40598471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アサリなどの二枚貝種苗生産の安定化や低コスト化には、高機能餌料の安定供給技術が必要不可欠である。本研究では、餌料用微細藻類とアルギン酸の併用給餌による餌料効果の向上および餌料効果におけるアルギン酸の機能解明を目的とした。給餌試験の結果、餌料効果は低いが大規模生産可能なナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸を併用給餌することにより、高い餌料効果が認められた。また、消化管内の細菌叢解析により、飼育・餌料環境がアサリ消化管内の細菌叢に影響を与えることが示唆された。以上より、安価で大規模生産可能な餌料用微細藻類とアルギン酸の併用給餌は、二枚貝種苗生産の安定化や低コスト化に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The annual catch of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in coastal waters continues to decrease drastically. Thus, the conservation of the clam resource and a stable market supply depend on the development of a mass culture method for the clam. In this study, we examined the effects of alginate-hydrolysates (AHs) as a diet of juvenile Manila clams, and verify the role of AHs on the growth promotion of *R. philippinarum*. Our results indicate that supplementing a diet of *Nannochloropsis oculata* and/or *Eutreptiella* sp. with AHs can promote the growth of *R. philippinarum*. In addition, analysis of bacterial flora suggested that rearing conditions affected bacterial flora in digestive canal of clams. Thus, rearing clams on an algal diet supplemented with AHs may be an inexpensive way to shorten the rearing period of the juvenile clams and other bivalves, although we have not yet identified the underlying mechanisms behind these effects.

研究分野：水圏応用科学

キーワード：アサリ種苗生産 アルギン酸 餌料用微細藻類 成長促進 併用給餌 ナンノクロロプシス キートセロス プレバイオティクス

### 1. 研究開始当初の背景

1980年代まで年間10万トンを超えていた我が国のアサリ漁獲量は、近年3~4万トンにまで激減している。したがって、食の安心・安全が強く求められる昨今、国産アサリの資源回復や生産量の増大が切望されている。これまでに、アサリ資源の回復を目標に、人工的な種苗生産技術の開発が進められており、餌料用微細藻類の大量培養技術の開発や生産時期の見直しなどによって、種苗生産期間を大幅に短縮するアサリの飼育条件が見出されてきた<sup>1)</sup>。また、アサリに対して高い餌料効果を示す赤潮原因種ヘテロシグマ・アカシオの成分組成から、酸性糖が成長促進に關与する有効成分として推定された<sup>2)</sup>。酸性多糖の一種であるアルギン酸は、コンブやワカメなどの褐藻類に特有な酸性多糖(食物繊維)であり、食品や医薬品などをはじめとして、幅広い分野で利用されている。さらに、酸加水分解処理により低分子化したアルギン酸(以下、低分子化アルギン酸)と珪藻キートセロスの併用給餌により、アサリに対する成長促進効果が実証された<sup>3)</sup>。しかし、なぜ食物繊維である低分子化アルギン酸がアサリの栄養源として機能し得るのかについては、未だ不明である。また、キートセロスは餌料効果が高いものの、小規模室内培養主体であるため生産コストが高く、餌料供給不足に陥る可能性もある。以上のような背景から、アサリ資源の回復に必要な種苗生産の安定化、短期化や低コスト化を実現するためには、低分子化アルギン酸による成長促進メカニズムの解明および斬新な給餌技術の開発が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

激減したアサリ資源の回復を実現するためには、種苗生産の安定化や低コスト化に加え、高機能餌料の安定供給技術の開発が必須である。本研究では、餌料効果が低いものの、容易に屋外で大量培養できるナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸を併用給餌することにより、低コストでアサリに対する餌料効果を飛躍的に向上させる給餌法を見出すことを目的とした。さらに、アサリ消化管内の細菌叢解析結果から、低分子化アルギン酸の添加によるアサリの成長促進メカニズムの解明を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 0.5 L 容水槽を用いたナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用給餌試験

本課題では、春種苗と秋種苗の飼育水温を想定した25及び15の飼育条件下にて給餌試験を実施した。試験は、500 mL 容ビーカーに50個体のアサリ稚貝(平均殻長0.79-1.13 mm)を収容して行った。試験区は無給餌区、キートセロス給餌区( $4 \cdot 16 \times 10^4$  cells/mL)、ナンノクロロプシス給餌区( $20 \cdot 80 \times 10^4$  cells/mL)、およびナンノクロロ

プシスと低分子化アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区とし、換水と給餌は毎日行った。10日間の飼育後、アサリ稚貝の殻長および生残率を測定した。

(2) 30 L 容水槽を用いたナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用給餌試験

本課題では、25の飼育条件下にて給餌試験を実施した。試験は、30 L 容水槽に2000個体のアサリ稚貝(平均殻長1.09 mm)を収容して行った。試験区は無給餌区、キートセロス給餌区( $8 \times 10^4$  cells/mL)、ナンノクロロプシス給餌区( $30 \times 10^4$  cells/mL)、およびナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区とし、換水と給餌は毎日行った。20日間の飼育後、アサリ稚貝の殻長および生残率を測定した。

(3) 0.5 L 容水槽を用いた海産ミドリムシと低分子化アルギン酸の併用給餌試験

本課題では、25の飼育条件下にて給餌試験を実施した。試験は、500 mL 容ビーカーに50個体のアサリ稚貝(平均殻長1.22 mm)を収容して行った。試験区は無給餌区、キートセロス給餌区( $80 \times 10^3$  cells/mL)、海産ミドリムシ給餌区( $5 \times 10^3$  cells/mL)、海産ミドリムシと低分子化アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区、および海産ミドリムシと高分子アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区とし、換水と給餌は毎日行った。10日間の飼育後、アサリ稚貝の殻長および生残率を測定した。

(4) 蛍光標識グルコース(2-NBDLG)を用いたアサリ稚貝の糖類取り込み様式の解析

本課題では、200  $\mu$ M の蛍光標識グルコース(2-NBDLG)を含む1 mL の濾過海水をアサリ稚貝に2分間暴露し、蛍光顕微鏡下にて観察した。

(5) 異なる飼育環境や給餌条件で飼育したアサリ消化管内の細菌叢解析

平均殻長2.3 mmのアサリ15個体をゲージに収容し、現場海域(山口県周南市戸田)に設置した。14日間後、ゲージ内のアサリを回収し、消化管内に存在する桿晶体を複数個体から摘出した。なお、飼育前のアサリ消化管内における細菌叢を把握するために、試験開始日に供試予定個体群のアサリ複数個体から桿晶体を摘出した。

平均殻長2.3 mmのアサリ15個体用いて室内にて給餌試験を行った。試験には、15 L 容水槽を用いた。試験区は、キートセロス給餌区( $8 \times 10^4$  cells/mL)、キートセロスと低分子化アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区、ナンノクロロプシス給餌区( $20 \times 10^4$  cells/mL)、およびナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸(4 mg/L)の併用給餌区とし、換水と給餌は1日に4回行った。14日間の給餌後、各試験区のアサリから桿晶体を摘出した。なお、飼育前のアサリ消化管内における細菌叢を

把握するために、試験開始日に供試予定個体群のアサリ複数個体から桿晶体を抽出した。

各試験区のアサリより抽出した桿晶体試料(約 80mg)を用いて DNA 抽出した後、16S rRNA 領域増幅用プライマーにより PCR 増幅を行い Miseq 次世代シーケンサーによる 16S rRNA 細菌叢解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ナンクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用給餌がアサリ稚貝の成長与える影響

0.5 L 容水槽を用いて 25 条件下で 10 日間の給餌試験を行った結果、 $20\text{-}40 \times 10^4$  cells/mL のナンクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用により、キートセロス給餌区と同等の餌料効果が得られた(図 1)。また、ナンクロロプシス単独給餌では  $20 \times 10^4$  cells/mL 給餌区における殻長の成長が最も良く、給餌密度の増加に伴いアサリ稚貝の殻長の成長は低かった(図 1)。

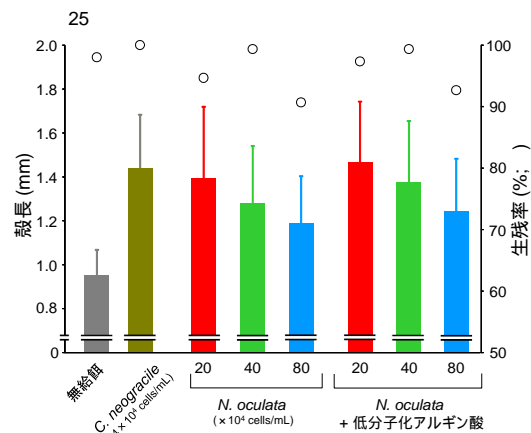


図 1. 25 条件下でのアサリ稚貝の殻長と生残率 (0.5 L 容水槽)

一方、25 条件下での給餌試験結果と比較して、15 条件下では全ての試験区においてアサリ稚貝の殻長の成長が低い傾向にあった(図 2)。しかし、 $20 \times 10^4$  cells/mL のナ

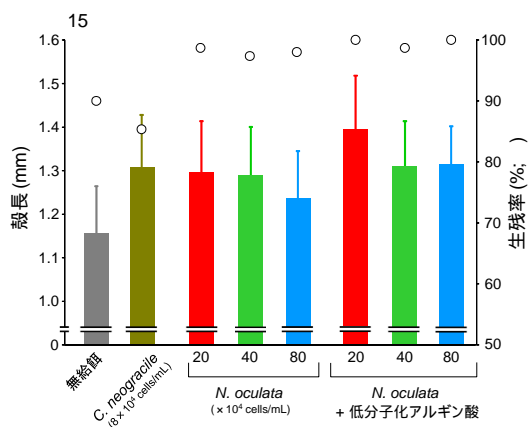


図 2. 15 条件下でのアサリ稚貝の殻長と生残率 (0.5 L 容水槽)

ンクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用により、キートセロス給餌区を若干上回る餌料効果が認められた(図 2)。

さらに、30 L 容水槽を用いて 25 条件下で 20 日間の給餌試験を行った結果、ナンクロロプシスに低分子化アルギン酸を添加した給餌区において、キートセロスと同等もしくは若干上回るアサリ稚貝に対する餌料効果が認められた(図 3)。しかしながら、ナンクロロプシスの単独給餌区では、キートセロスより顕著に成長が低下した(図 3)。

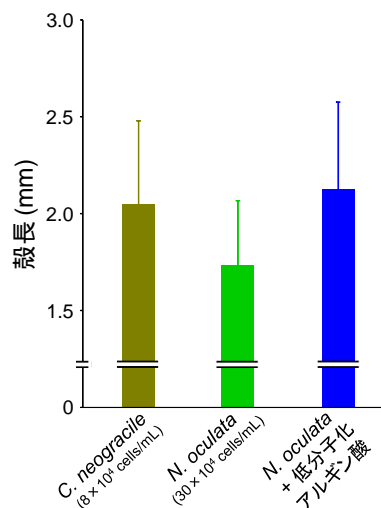


図 3. 25 条件下でのアサリ稚貝の殻長と生残率 (30 L 容水槽)

以上の結果より、安価に大量生産可能なナンクロロプシスと低分子化アルギン酸の併用給餌は、アサリ稚貝に対する十分な餌料効果を示すことが明らかになった。現段階では正確な試算を行うことはできないものの、本給餌法は、キートセロスやパプロバなどの餌料用微細藻類を給餌する場合と比べて、大きなコスト削減につながると期待できる。

(2) 海産ミドリムシと低分子化アルギン酸の併用給餌がアサリ稚貝の成長与える影響

海産ミドリムシの一種であるユートレプティエラ給餌区のアサリ稚貝の殻長の成長は、キートセロス給餌区と同等であった(図 4)。また、ユートレプティエラと低分子化アルギン酸の併用により、キートセロス給餌区と同等の餌料効果が得られた(図 4)。さらに、アルギン酸の加水分解の有無によりアサリ稚貝の殻長の成長に差異が認められなかったことから、アルギン酸の分子サイズはアサリ稚貝の殻長の成長に影響しないことが示唆された(図 4)。

以上の結果より、海産ミドリムシであるユートレプティエラは、アサリ稚貝に対する新たな餌料生物として期待されるとともに、本種と低分子化アルギン酸の併用給餌は、アサリ種苗生産の安定化、短期化や低コスト化に寄与する可能性がある。

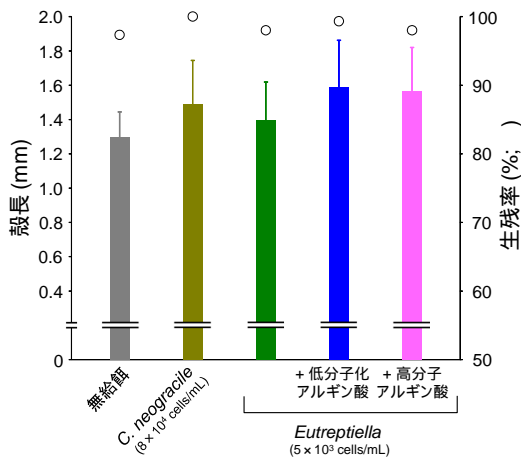


図4. 25 条件でのアサリ稚貝の殻長と生残率 (0.5 L 容水槽)

### (3) 蛍光標識グルコース (2-NBDLG) を用いたアサリ稚貝の糖類取り込み様式の解析

アサリ稚貝における糖類の取り込み様式を明らかにするために、蛍光標識グルコース (2-NBDLG) を用いた蛍光イメージングを行った。結果として、蛍光標識グルコースの添加直後から、アサリ稚貝の体内において局所的なシグナルが検出された<sup>4)</sup>。したがって、アサリ稚貝に摂取された糖類は、短時間で消化器官へ到達することが示唆された。

### (4) 異なる飼育環境や給餌条件で飼育したアサリ消化管内における細菌叢の変動

殻長 2.3mm 程度のアサリを現場海域および室内にて 14 日間飼育し、飼育の前後でアサリ消化管内の桿晶体における細菌叢の変化を調べた。アサリの桿晶体を抽出して次世代シーケンサーによる細菌叢解析を実施した結果、アサリ桿晶体の細菌叢は、現場海域で飼育した場合と室内で飼育した場合との間に大きな差異が認められた。まず、現場海域で飼育したアサリの細菌叢は、飼育開始前と比較して大きく変動した。特に、16S rRNA データベースとの同源性検索では同定できなかった未同定種の割合が最も高くなり、飼育開始前に高い割合で検出されたテネリクテス門に属する細菌の割合が低下した。

一方、室内で飼育したキートセロス給餌区 (8 × 10<sup>4</sup> cells/mL)、キートセロスと低分子化アルギン酸 (4 mg/L) の併用給餌区、ナンノクロロプシス給餌区 (20 × 10<sup>4</sup> cells/mL)、およびナンノクロロプシスと低分子化アルギン酸 (4 mg/L) の併用給餌区全ての試験区では、飼育開始前と同様にテネリクテス門に属する細菌が高い割合で検出された。また、餌料用微細藻類の種類や低分子化アルギン酸給餌の有無は、室内で飼育したアサリの細菌叢に大きく影響を与えなかった。ただし、テネリクテス門の細菌は細胞壁を欠損する種が多いこと、および、各試験区における DNA 抽出効率が大きく異なっていた。これらのことから、本研究で実施した細菌叢解析では、細胞壁を欠損する種などの DNA 抽出されやすか

った種を優先的に検出しており、アサリ消化管内における細菌叢を十分に確認できていない可能性がある。

今後、給餌する餌料用微細藻類の種類や低分子化アルギン酸の成長促進メカニズムを解明するためには、使用する DNA 抽出キットや抽出条件を変更することにより、細菌叢解析の精度を向上させる必要がある。

### < 引用文献 >

- 1) 岸岡正伸, 月刊養殖ビジネス 21-25 (2014)
- 2) Taga et al., Plankton & Benthos Res 8:102-105 (2013)
- 3) Yamasaki et al., Aquaculture Res 46:1013-1017 (2015)
- 4) Yamasaki et al., Scientific Reports 6: 29923, doi: 10.1038/srep29923 (2016)

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yasuhiro Yamasaki, Shigeru Taga, Masanobu Kishioka, Shuichi Kawano, A metabolic profile in *Ruditapes philippinarum* associated with growth-promoting effects of alginate hydrolysates, Scientific Reports, 査読有, 2016, 6: 29923 (doi: 10.1038/srep29923)

[学会発表](計 3 件)

山崎康裕, 多糖類アルギン酸のアサリ稚貝に対する成長促進効果, ミクロ生物若手研究者集会 2015 in 岩国, 2015 年 9 月 26 日, 山口県由宇青少年自然の家 (岩国)

山崎康裕, 石井慶太, 多賀茂, 岸岡正伸, 低分子化アルギン酸と *Nannochloropsis oculata* の併用がアサリ稚貝の成長に与える影響, 平成 28 年度日本水産学会秋季大会, 2016 年 9 月 10 日, 近畿大学農学部 (奈良)

山崎康裕, アサリの成長と代謝変動 ~ アサリ資源の回復を目指して ~, 第 14 回環境研究シンポジウム, 2016 年 11 月 22 日, 一橋大学一橋講堂 (東京)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

山崎 康裕 (YAMASAKI, Yasuhiro)  
国立研究開発法人水産研究・教育機構・  
水産大学校・講師  
研究者番号: 40598471

#### (2) 研究協力者

岸岡 正伸 (KISHIOKA, Masanobu)  
多賀 茂 (TAGA, Shigeru)