

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658168

研究課題名（和文）クロマグロ養殖とサンゴの共存・共栄への第一歩

研究課題名（英文）The first step towards coexistence and co-prosperity of bluefin tuna farm and natural coral

研究代表者

江口 充 (EGUCHI MITSURU)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40176764

研究成果の概要（和文）：近畿大学のクロマグロ養殖イケスは、奄美大島の花天湾にある。このイケスロープには、美しいサンゴが育っている。このクロマグロ養殖とサンゴ共存のメカニズムを物質循環の駆動力となる海洋細菌の動態とサンゴが大量に放出する粘液に注目して調べた。イケス周辺の「海水のみ」と「海水+粘液」を一定時間培養し、比較すると、「海水のみ」ではあまり細菌群集構造が変化しなかったが、「海水+粘液」ではその質も量も大きく変化した。

研究成果の概要（英文）：Many beautiful corals are living on the ropes of tuna cages in Amami Experimental Station of Kinki University. This suggests that the appropriate aquaculture activities would be done in this area. Such co-existence between aquaculture and coral is very rare in the world. In this study, we focused on the ecological functions of marine bacteria and coral mucus as the first step to understand the wonderful balance of the ecosystem. The mucus was collected from *Acropora* sp. which was a dominant species on ropes of the tuna cages. Bacterial abundance in the “mucus+seawater” sample during 10-h-incubation increased, while that in the seawater sample (control) was lower and constant. Bacterial composition changed drastically in the “mucus+seawater” sample, but not in the seawater sample.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：水圏環境・保全、クロマグロ養殖

## 1. 研究開始当初の背景

(1) サンゴは“きれいな海”の代表的な生物として扱われることが多い。事実、透明度が高く、貧栄養な海域でのみサンゴは生育する。有機物負荷が大きく、富栄養化の進行しやすい海域でサンゴは生育しないのである。一方、海へ多大な有機物負荷をかける経済活動の代表格は、養殖である。自家汚染という言葉が示すように、イケス養殖はサンゴの「敵」となることが多い (Capturing the cornerstones of coral reef resilience: linking theory to practice. Nystrom et al.,

Coral Reefs 27: 795-809, 2008)。そもそも養魚イケスの近くにサンゴは生育できないのが常識なのである。養魚イケスの有機物負荷とそれに伴う富栄養化を中心とした、サンゴへの影響を評価する場合でも、イケスから数百メートルから数キロメートル離れた海域に存在するサンゴ礁などが対象になっている (Gradients of coastal fish farm effluents and their effect on coral reef microbes. Garren et al., Environmental Microbiology 10: 2299-2312, 2008)。

奄美大島花天湾のクロマグロ養殖イケスを

設置した水域では、そのイクスロープに大量のサンゴが生育しているのである。これは、極めて希有な状況といえる。この希有な状況を生み出している生態系のメカニズムを解明できれば、今後新たにクロマグロ養殖が予定される海域でも、サンゴとの共存・共栄の予測が可能になる。

(2) 日本人は大量のマグロを消費する。中でもクロマグロは高級魚として好まれるが、その天然の資源量は極めて限られている。近畿大学が世界に先駆けて成功したクロマグロの完全養殖（養殖親魚→採卵→人工授精→孵化→（種苗生産）→仔稚魚の育成→成魚の育成→出荷と養殖親魚、このサイクルを完全に人為的なコントロール下で回すこと）は、天然資源に負荷をかけない理想的な養殖技術である。このクロマグロの完全養殖技術の確立に伴い、クロマグロ養殖も活発化し、奄美大島はクロマグロ養殖の日本のメッカになりつつある。

ただし、クロマグロの完全養殖にも未だに大きな弱点がある。完全養殖は天然のクロマグロ資源に負荷をかけないが、環境には多大な有機物負荷をかけるのである。最近では、様々な環境低負荷型の配合飼料が開発されてきており、残餌による有機物負荷は相当改善されているが、クロマグロ養殖では未だ決定的な配合飼料は開発されておらず、生餌を必要としているのである。

イクス養殖の中でも、最も環境への有機物負荷が高いクロマグロ養殖と清澄な海の代表格であるサンゴ。この両者が共存・共栄する奄美大島の花天湾は、環境調和型クロマグロ養殖のモデルケースとなり得る。

## 2. 研究の目的

奄美大島花天湾のクロマグロ養殖場水域の有機物・栄養塩と細菌群の環境動態を明らかにする。この養魚水域での有機物の加入は、養殖での残餌や排泄物とサンゴの光合成代謝産物であるサンゴ粘液になる。それら有機物の分解・無機化過程を主に担う海洋細菌群の量（活性を含む）と質（群集組成）を明らかにし、クロマグロ養殖とサンゴの共存を可能する環境条件を明らかにする。

従来の研究は、魚類養殖のサンゴへの（悪）影響、といった視点が中心である。これが、本研究ではクロマグロ養殖とサンゴとの相互関係の解明となる。サンゴからクロマグロ養殖への影響も評価する。これは、いままでなかったアイデアである。何故、なかったのか？それは、そもそも養殖水域とサンゴとの物理的な距離が、有る程度離れていたことが大きな要因である（数 100 メートルから数キロメートル）。イクス養殖の中心地点から遠ざかるに従い、サンゴが生育し始めるというのが今までのパターンである。そのため、潮

流により養殖場水域の海水がどれくらいサンゴ礁帯へ流れ込んでいるのか（養殖⇒サンゴ）を調べた研究が多い（*Environmental Microbiology* 10: 2299-2312, 2008）。しかし、奄美大島花天湾のクロマグロ養殖場水域は、根本的に異なる。イクス網の中のクロマグロがサンゴから 2~3 m のところを泳いでいるのである。これは今までなかった養殖クロマグロとサンゴとの相互関係の解明を目指す、新たなチャレンジといえる。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料の採取と培養

2011~2012年の5月と10月に、近畿大学水産研究所奄美大島実験場のクロマグロ養殖場（花天湾）のイクスロープに棲息するサンゴ *Acropora* sp. の極近傍から 50 mL 容シリンジを用いて、粘液を含む海水試料（MuS 試料）を採取した。対照区として、そのサンゴから離れた海水試料（SW 試料）も、同様に採取した。また、MuS 試料と SW 試料を 1:1 の割合で混合したもの（MuS: SW）も用意した。それぞれ、5 L 茶褐色ビンに採取し、クーラーに入れ、陸上施設に持ち帰った。陸上施設にて、各試料に BrdU を終濃度 1  $\mu$ M になるように加え、現場海水温付近で 1、3、5、10 時間培養した。なお、定量的解析は 2010 年 10 月にも予備実験として実施した。培養終了時に、50 mL 遠沈管に 50 mL 試料を取り、100 mM チミジン 500  $\mu$ L 加え、BrdU の取り込みを終えた。

### (2) 海洋細菌群の定性的解析

上記(1)の各試料を培養後、孔径 0.22  $\mu$ m ステリベクスフィルター（MILLIPORE）で濾過し、細菌細胞を集めた。これらの試料は、解析まで冷凍保存した。

**PCR 増幅**：上記のフィルターから、キサントゲン酸 SDS 抽出法で DNA を抽出・精製した。PCR により、細菌分類の汎用遺伝子 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて、およそ 566 塩基の遺伝子断片を増幅した。使用したプライマーは、フォワードプライマー 341F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'、下線は GC クランプ) とリバースプライマー 907R

(5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') である。DNA 量が 20 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> になるように調節し、DNA 1  $\mu$ L を 0.2 mL PCR チューブに取り、PCR マスターミックス 49  $\mu$ L (1 試料あたり)、10 $\times$ buffer [2 mM MgCl<sub>2</sub>] 5  $\mu$ L、2.5 mM dNTP 4  $\mu$ L、1.0  $\mu$ M 341F-GC 0.25  $\mu$ L、1.0  $\mu$ M 907R 0.25  $\mu$ L、0.8 mg mL<sup>-1</sup> Bovine Serum Albumin 2  $\mu$ L、TaKaRa *E<sub>x</sub>* Taq 0.025 units 0.25  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 37.25  $\mu$ L) を加えてよく混合し、BIO-RAD の C1000 サーマルサイクラーを使用し、PCR 増幅を行った。PCR 増幅を、タッチダウン法で

行い、そのサイクルは、95°C : 5 分、(95°C : 1 分、65°C[-1°C/cycle] : 1 分、72°C : 1 分) × 10 サイクル、(95°C : 1 分、55°C : 1 分、72°C : 1 分) × 25 サイクル、72°C : 10 分である。この PCR 増幅産物を 2% アガロースゲルによる電気泳動で確認した。

**DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) :** 変性剤の濃度が 0% solution (6% アクリルアミド、0.5 × TAE buffer) と 100% solution (6% アクリルアミド、0.5 × TAE buffer、7M Urea、40% 脱イオンホルムアミド) を混合し、変性剤 70% solution (0% solution 7.2 mL、100% solution 16.8 mL) と変性剤 25% solution (0% solution 18 mL、100% solution 6 mL) をつくった。それぞれに 20% APS 各 100 μL と TEMED 各 10 μL を加え、変性剤濃度勾配が 25%~70% のポリアクリルアミドゲルを調製した。およそ 1 時間放置してゲルが固まるのを確認した後、スタッキングゲル (0% solution 8 mL、20% APS 80 μL、TEMED 8 μL) をゲル上部に調製した。Ingeny International BV 社の INGENY phorU-2 を使用して、85 V、60°C、16 時間で DGGE を行った。DGGE にアプライした PCR 増幅産物量を、画像解析ソフト ImageJ を使用して、アガロース電気泳動画像の蛍光強度から 50ng になるようにした。泳動後、E-Graph WUV-M20 (ATTO 社) を用いて、ゲルの撮影を行った。

**クラスター解析 :** DGGE のゲルを撮影した写真から各試料のバンド数および位置を確認後、2 値化した。Jaccard 指数を用いて、類似度を求めた。

Jaccard 指数 =  $N_{AB} / (N_A + N_B - N_{AB})$ 、ここで  $N_A$  と  $N_B$  は A レーンあるいは B レーンの各バンド数、 $N_{AB}$  は両レーンに共通のバンド数である。この類似度を求めて、統計ソフト「R」を用いて群平均法でクラスター解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細菌群の量的解析

2010 年 10 月と 2011 年 5 月、11 月の試料を全て処理し、その実験結果を解析した。培養 10 時間の積算細菌生産量は、2011 年 11 月が最も高く、2010 年 10 月が最も低い値となった。2010 年 10 月の培養 10 時間の積算細菌生産量は、SW 試料、MuS 試料で、それぞれ  $7.92 \pm 1.72 \mu\text{g C/L}$ 、 $105 \pm 13.7 \mu\text{g C/L}$  となった。2011 年 5 月の培養 10 時間の積算細菌生産量は、SW 試料、MuS : SW 試料、MuS 試料で、それぞれ  $147 \pm 83.4 \mu\text{g C/L}$ 、 $494 \pm 52.7 \mu\text{g C/L}$ 、 $592 \pm 24.8 \mu\text{g C/L}$  となった (図 1)。2011 年 11 月の培養 10 時間の積算細菌生産量は、 $40.75 \pm 24.1 \mu\text{g C/L}$ 、 $214 \pm 20 \mu\text{g C/L}$ 、 $283 \pm 23.7 \mu\text{g C/L}$  となった。全ての月において、MuS 試料は、SW 試料を大きく上回る結果となった ( $p < 0.01$ )。また、

2011 年 5 月、11 月の MuS : SW 試料も SW 試料を上回る結果となった ( $p < 0.01$ )。

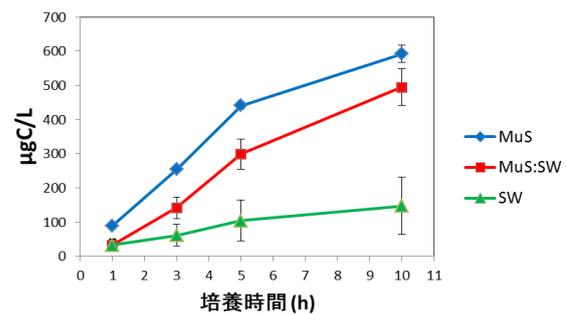


図 1. 2011 年 5 月奄美大島実験場のサンゴ粘液が促進する細菌生産量の経時変化

各月の細菌生産量の違いでは、2011 年 5 月が一番高く、2010 年 10 月が低い結果となった。これは、天候によるものと考えられる。2011 年 5 月の細菌生産量が高いのは、5 月は梅雨の時期である。実際に、サンプリング前日には、雨が降っていた。雨が降ると、山からの有機物が海に流れ込む。その結果、有機物が増え、細菌生産量が高くなったのではないかと考えられる。2011 年 11 月のサンプリングも前日まで雨は降っていた。しかし、2010 年 10 月は、晴れであった。どの月においても、MuS 試料は、SW 試料よりも大幅に増加していた。また、MuS 試料の濃度を半分にした MuS : SW 試料でも SW 試料を上回る結果となっている。このことから、クロマグロ養殖場のサンゴが粘液を放出すると、周辺の細菌群の増殖を促しているものではないかと考えられる。

本研究では、サンゴの放出する粘液は、細菌生産量を大幅に向上させ、養殖場の浄化機能に影響を与えていることが示唆された。

##### (2) 細菌群の質的解析

海水には、培養前後において蛍光強度が強いバンド A-1 が存在していた (図 2)。しかし、培養前の粘液試料、1:1 混合試料では確認できたこのバンドが、培養後には確認できなくなった。粘液試料において確認できた蛍光強度の強いバンド A-2 は、1:1 混合試料でも確認できた (図 2)。海水試料でも、このバンドは確認できるが、蛍光強度は弱かった。

DGGE のバンドパターンの類似度をクラスター解析によって比較したところ、大きく分けて二つのクラスターに分けることができ、海水試料、粘液試料で構成されたクラスターが形成された (図 3)。培養前の 1:1 混合試料は、海水試料で構成されたクラスターに含まれていたが、培養後には粘液試料で構成されたクラスターに含まれていた。

海水試料における全細菌群の群集構造は、培養前と 10 時間の培養後でも類似していた (図 3)。一方、粘液試料と 1:1 混合試料にお

ける全細菌群の群集構造は、培養前後で全く異なっていた。培養前の 1:1 混合試料は、海水試料の群集構造に似ていたが、培養後には粘液試料に類似するようになった。これらの結果は、海水のみでは起こらない細菌群の変化を促すポテンシャルをサンゴ粘液が持つことを示唆する。

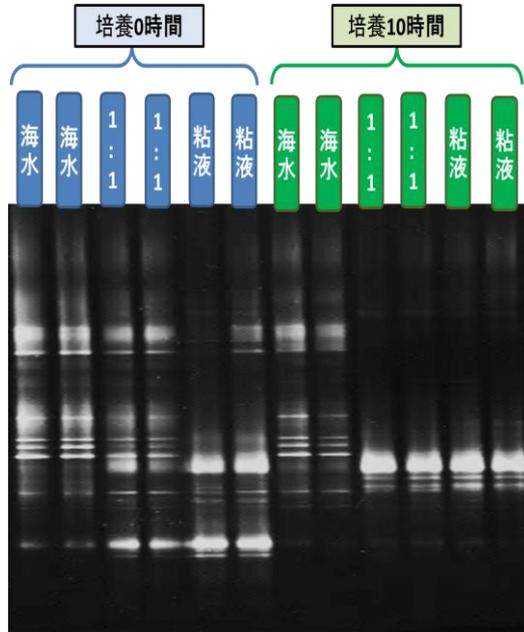


図 2. 16S rRNA 遺伝子断片の DGGE バンドパターン

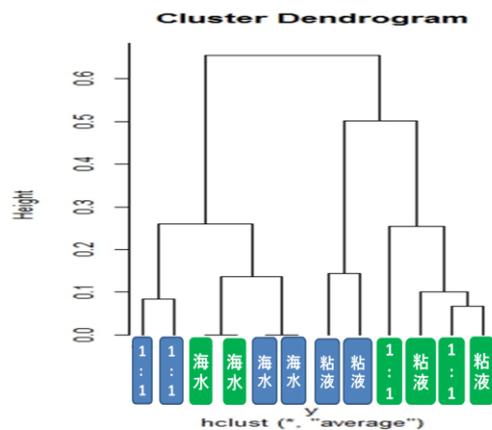


図 3. DGGE バンドパターンのクラスター解析  
■ 培養 0 時間； ■ 培養 10 時間

海水試料には、培養前後において蛍光強度が強いバンド A-1 が確認できた (図 2)。このバンドは、クロマグロ養殖場水域で活発に増殖しており、有機物をより多く分解・利用している細菌種であることが考えられる。つまり、物質循環に影響を与えている細菌種である可能性がある。しかし、興味深いことに、培養前の粘液試料、1:1 混合試料では確認できたバンド A-1 が、培養後には確認できなく

なった。既報研究で、サンゴの放出する粘液が、増殖基質として働くのみならず、ある種の細菌にとって忌避物質あるいは増殖阻害物質となるという報告がある。培養後に確認できなくなったバンド A-1 は、サンゴ粘液の持つ抗菌作用により、増殖が抑制された細菌種なのかもしれない。また、粘液試料において蛍光強度が強かったバンド A-2 は、海水試料で蛍光強度が強かったバンド A-1 とは別であった (図 2)。バンド A-2 は、培養後の 1:1 混合試料でも優占していた。これらの結果は、クロマグロ養殖場いけすロープ上のサンゴ周辺では、海水のみの場合と異なり、粘液の影響を受けた独自の細菌群集構造が形成されていることを示唆する。本養殖場には、サンゴ粘液の影響を受けた細菌群と受けていない細菌群によって複雑な細菌群集構造が形成されている。それは、高次の生物にも影響を与え、物質循環が複雑になることを意味する。本研究では、サンゴが存在しない養殖場水域の物質循環とは異なる特別な物質循環が、本クロマグロ養殖場水域には存在していることを示唆した。その結果、クロマグロ養殖場にサンゴが生息しているという、理想的な光景が成り立っているのではないだろうか。

研究調査の対象とする奄美大島瀬戸内町は、いわば日本のクロマグロ養殖のメッカである。それと同時に、奄美大島は世界有数のサンゴの生育地である。クロマグロ養殖は過疎化の進む奄美大島では、今後も力を入れて行くべき重要な産業である。しかし、そのために世界有数の美しいサンゴを失うわけにはいかない。サンゴを失うことなく、クロマグロ養殖を繁栄させることが、奄美大島の重要な命題となる。本研究で得られた成果は、クロマグロ養殖とサンゴの共存・共栄への道へのほんの第一歩に過ぎない。しかし、絶妙なバランスでクロマグロ養殖とサンゴの生育が両立する生態系の解明は、過疎化が深刻な離島などの環境を守りつつ、経済の活性化を促す地域おこしや雇用促進につながる。今後も引き続き、本研究を深化させ、奄美大島花天湾の生態系を物質循環・エネルギー流・食物網といった観点から明らかにしていく必要がある。

### 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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉田隆志・西村翔太・中西 健・谷口亮人・江口 充、サンゴ生息域における物質循環の駆動力となるサンゴ粘液、平成 24 年度日本水産学会近畿支部後期例会、大阪市立大学文化交流センター (大阪府大阪市)、2012 年 12 月 1 日

- ②Yoshida T., Taniguchi A. and Eguchi M.、  
Coral mucus as an enhancer of  
prokaryotic productivity, The 4<sup>th</sup>  
Japan-Korea International Symposium on  
Microbial Ecology, 2012年9月20~22日、  
豊橋科学技術大学 (愛知県豊橋市)
- ③谷口亮人・吉田隆志・青木隆一郎・中西  
健・西村翔太・江口 充、クロマグロ養殖  
場のサンゴが促進する細菌生産、平成 24  
年度日本水産学会秋季大会、2012 年 9 月  
13~16 日、下関水産大学校 (山口県下関市)
- ④Taniguchi A., Yoshida Y. and Eguchi M.、  
Coral mucus enhances prokaryotic  
productivity in surrounding seawater、  
2012 年 8 月 19~24 日、Bella Center (コ  
ペンハーゲン、デンマーク)
- ⑤日比野紘大・濱中貴士・吉田隆志・瀧井彰  
吾・谷口亮人・江口 充、サンゴ粘液が放  
出されてから起こり得る細菌群の変化、平  
成 23 年度日本水産学会近畿支部後期例会、  
2011 年 11 月 26 日、大阪市立大学文化交  
流センター (大阪府大阪市)
- ⑥谷口亮人・日比野紘大・濱中貴士・江口 充、  
クロマグロ養殖場のサンゴがもたらす海  
水細菌群の変化、平成 23 年度日本水産学  
会秋季大会、2011 年 9 月 29~10 月 1 日、  
長崎大学 (長崎県長崎市)

[その他]

ホームページ等

近畿大学農学部水産学科 水族環境学研究  
室 <http://kindai-suizoku.daa.jp/>; 近畿大  
学農学部 <http://nara-kindai.univ.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江口 充 (EGUCHI MITSURU)

近畿大学農学部・教授

研究者番号：40176764

### (2) 研究分担者

谷口亮人 (TANIGUCHI AKITO)

近畿大学農学部・助教

研究者番号：10548837

永田恵里奈 (NAGATA ERINA)

近畿大学農学部・助教

研究者番号：20399116