

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：85502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780208

研究課題名(和文)アレロパシーを用いた水産養殖初期餌料生物の増殖と栄養価の改善

研究課題名(英文)Improvement of growth and nutritional value in diet microalgae for aquaculture by utilization of allelopathy

研究代表者

山崎 康裕 (Yamasaki, Yasuhiro)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・助教

研究者番号：40598471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：水産増養殖の現場では、栄養価の高い微細藻の大量生産と安定供給が強く求められている。一方、アレロパシー物質は、ある植物が産生する他種の増殖抑制・促進に作用する生化学的シグナル物質であり、自然界の個体群動態に重要な役割を果たしている。本研究では、アレロパシーを用いた餌料用微細藻の増殖改善技術の開発を目的とし、数種微細藻のアレロパシー効果を調べた。結果として、珪藻キートセロスのアレロパシーが高い栄養価を持つパプロバの増殖を改善できることに加え、パプロバは自己増殖阻害物質を産生していた。以上より、アレロパシー物質の利用や濃度管理は、餌料用微細藻の安定した大量培養技術の開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Better understanding of the factors that affect the growth of microalgae used as feed in the aquaculture industry will help to improve the mass-cultivation methods. On the other hand, allelopathy refers to any direct or indirect inhibitory or stimulatory effect of one plant on another through the secretion of chemicals into the growth medium. For developing the mass-culture method of diet microalgae, in this study, we investigated the allelopathic effects of several microalgae on the growth of diet microalgae. Results indicated that growth of the haptophyte *Pavlova lutheri* was significantly improved by the addition of filtrate prepared from the diatom *Chaetoceros neogracile*, and growth inhibition of *P. lutheri* was induced by a self-growth inhibitor. Thus, control of concentration and utilization of allelochemicals will contribute to improving the mass-culture methodology of diet microalgae such as *P. lutheri*.

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：アレロパシー 水産養殖 生物餌料 増殖促進効果 増殖制御 多糖 タンパク質 餌料用微細藻類

### 1. 研究開始当初の背景

食糧問題解決の重要性が認識され、その早期解決法の開発が世界中で求められている。昨今、その解決法のひとつとして注目されている水産増養殖の重要性が広く認識されつつある。一方、消費者への安全・安心な食の供給のためには、生産性の向上だけでなく、生産過程における薬剤使用量の削減や環境負荷の軽減への努力が、今後さらに強く求められると考えられる。このような状況の中で、魚介類生産の現場では、様々な種類の餌料用微細藻が使用されている。しかし、単独給餌では魚介類の飼育が不可能であることから配合飼料との併用が行われており、その結果、飼育水や周辺環境への負荷が問題となっている。また、栄養価（タンパク質および高度不飽和脂肪酸）、サイズなどの点で餌料価値の高い藻類は安定培養が難しく、逆に、安定培養の容易な藻類は餌料価値が低い傾向にある。したがって、安全・安心な食の供給には、水産増養殖の現場へ環境負荷の少ない高機能生物餌料の安定供給を行うための技術開発が急務であると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまでに、我々は数種海産微細藻類のアレロパシー（化学物質の放出により他種の増殖を抑制・促進する現象）と作用関連物質に関する研究を行い、精製した新規アレロパシー物質が現場における微細藻類の消長に深く関与していることを実証した。さらに、アレロパシー物質は種特異的あるいは細胞密度依存的に対象種の増殖を促進・抑制することを明らかにしている。

そこで本研究では、高機能生物餌料の安定供給を最終目的として、アレロパシーという本来実環境中で起こっている生物間の相互作用を用いることにより、餌料用微細藻類の増殖および栄養価の改善技術の開発のための基礎的知見を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 餌料用微細藻類パブロバの増殖に与える3種微細藻類のアレロパシー効果

アレロパシー効果を有することが明らかになっている珪藻 *Skeletonema* sp. (スケルトネマ) とラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* (ヘテロシグマ) に加え、広く二枚貝類の餌料として用いられる珪藻 *Chaetoceros neogracile* (キートセロス) の培養液を用いて、ハプト藻 *Pavlova lutheri* (パブロバ) と *Isochrysis* sp. (イソクリシス)、真正眼点藻 *Nannochloropsis* sp. (ナンノクロロプシス)、およびキートセロスに対する3種のアレロパシー効果を調べた。定常期に達した3種の培養液を常圧ろ過し、栄養塩を補充した後、孔径 0.2 μm のシリンジフィルターを用いてろ過滅菌した。アレロパシー効果の判定は、試験管を用いた培養試験により行

った。異なる培養液濃度と各微細藻類の初期細胞密度の組み合わせで複数の試験区を設定し、20-25℃、12時間毎の明暗周期で培養を行った。また、各微細藻類の増殖は、コロフィル測定装置（ターナーデザイン社製）を用いて調べた。

(2) アレロパシーによって増殖改善されたパブロバのシオミズツボウムシに対する餌料効果

パブロバは、25℃でキートセロス培養液を添加して増殖改善した区、および増殖速度が最も早い20℃培養区を設けて培養した。各条件で一定期間培養したパブロバをそれぞれ細胞密度が  $1 \times 10^6$  cells/ml になるように希釈し、ガラス試験管に 3.9 ml 添加した。次に、実体顕微鏡下でシオミズツボウムシを採取して初期個体密度が 3 個体/ml となるよう 0.1 ml 添加し、試験液量を 4.0 ml とした。なお、改変 SWM-3 培地のみで培養したものを対照区とし、培養開始から7日後、各試験管のシオミズツボウムシ全個体を実体顕微鏡下で計数した。

(3) 飼育水中に共存する海洋細菌に対するキートセロス培養液の影響

48 well-plate に各条件で培養したパブロバ培養液を 5, 10, 25, 50, および 100 μl 添加し、各試験区の液量が合計 1 ml になる様に Marine Broth 2216 液体培地を添加した。また、培養は 25℃ および 12 時間毎の明暗周期で行った。24 時間経過後、48 well-plate で培養した各試験区の培養液を 100 μl ずつ 96 well-plate に移した後、濁度を測定することにより各試験区の海洋細菌の増殖を推定した。濁度の測定は、マイクロプレートスペクトロフォトメーターを用いて行い、600 nm の吸光度を測定した。

(4) キートセロスが産生するアレロパシー物質によって増殖改善されたパブロバの栄養価

200 ml 容の三角フラスコで培養したパブロバ培養液を遠心分離し、細胞ペレットを回収した。得られたパブロバ細胞のペレットを糖およびタンパク質定量用試料とした。糖画分は水抽出した後、エタノール沈殿法により回収した。一方、タンパク質画分は、抽出バッファー (Tris (pH8.5) 30 mM, Urea 7 M, Thiourea 2 M, CHAPS 4%, Magnesium acetate 5 mM) により抽出した後、アセトン沈殿法により回収した。なお、糖およびタンパク質濃度は、それぞれピシンコニン酸 (BCA) 法およびフェノール硫酸法により定量した。

(5) キートセロス由来アレロパシー物質の化学的性状とパブロバに対する増殖改善効果

アレロパシー物質の熱安定性を調べるために、パブロバの増殖に対する加熱処理 (121℃, 15 分) したキートセロスの培養液の影響を調べた。また、分画分子量 3500 Da の透析膜を用いた透析により得られたキートセロス培養液の高分子画分に含有する

タンパク質および糖濃度は、それぞれピシニコニン酸 (BCA) 法およびフェノール硫酸法により定量した。さらに、蛍光 HPLC 法によって中性糖濃度を分析し、高分子画分の糖組成を調べた。

高分子画分のパプロバに対する増殖改善効果は、以下の培養実験にて調べた。まず、高分子画分の濃度が 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, および 40 µg/ml となるように改変 SWM-3 培地で調製した各試験液 3.9 ml をガラス試験管に添加し、そこへ初期細胞密度が 500 cells/ml となるようパプロバ培養液を 0.1 ml 添加した。また、改変 SWM-3 培地のみでパプロバを培養した試験区と、25%に希釈したキートセロス培養液を添加して培養した試験区を対照区として設けた。培養は、25℃, 12 時間毎の明暗周期で行った。なお、各試験区のパプロバの増殖は、クロロフィル測定装置 (ターナーデザイン社製) を用いて調べた。

(6) 餌料用微細藻パプロバが産生する自己増殖阻害物質

500 ml 容の三角フラスコに改変 SWM-3 培地を 400 ml 入れてパプロバを培養し、細胞数が  $12 \times 10^5$  cells/ml に到達した時点で孔径 5.0 µm のメンブレンフィルターを用いて常圧ろ過を行った。その後、pH の調整および栄養塩の補充を行い、孔径 0.2 µm のメンブレンフィルターを用いてろ過滅菌したものを培養液とした。次に、パプロバの産生する自己阻害物質の化学的性状を調べるために、オートクレーブを用いて加熱処理 (121℃, 15 分) を行った培養液試料、および限外ろ過 (分画分子量: 10 kDa) により高分子画分と低分子画分に分画した試料を調製した。培養試験は、ガラス試験管に各試料溶液を 3.9 ml ずつ添加し、初期細胞密度が 500 cells/ml になるように改変 SWM-3 培地で調整したパプロバの細胞浮遊液を 0.1 ml ずつ各試験液に添加して開始した。なお、パプロバの増殖は、クロロフィル測定装置 (ターナーデザイン社製) を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 餌料用微細藻類の増殖に与える 3 種微細藻類のアレロパシー効果

ヘテロシグマ、スケルトネマおよびキートセロスのパプロバに対するアレロパシー効果を調べた結果 (図 1), ヘテロシグマやキートセロスの培養液はパプロバの増殖を促進した。特に、パプロバが増殖不良を起こす 25% 条件において、25-30%に希釈したキートセロスの培養液を暴露されたパプロバの増殖は、対照区の約 140%まで増殖が促進された。さらに、試験管からフラスコに培養スケールを拡大しても、同様の増殖改善効果が得られた (図 2)。したがって、キートセロスが産生するアレロパシー物質の利用は、高水温環境下におけるパプロバの増殖を改善し、培養期間の短

期化や安定化に寄与できる可能性がある。

また、ヘテロシグマのアレロパシーは、パプロバに加えてナンノクロロプシスなどの増殖を促進する傾向にあり、その最大増殖促進効果は、アレロパシー物質を含む培養液の濃度と各微細藻類の初期細胞密度が高い場合に観察された。一方、スケルトネマのアレロパシーは、各微細藻類の増殖を抑制する傾向が観察された。なお、3 種のアレロパシーは、種特異的に各微細藻類の増殖を促進あるいは抑制するだけでなく、アレロパシー物質を含む培養液の濃度や対象種の初期細胞密度によっても大きく変化した。よって、3 種のアレロパシーは、その特異的な増殖促進および抑制効果を通して、水産養殖に用いられる微細藻類の増殖制御に有効である可能性が示唆された。

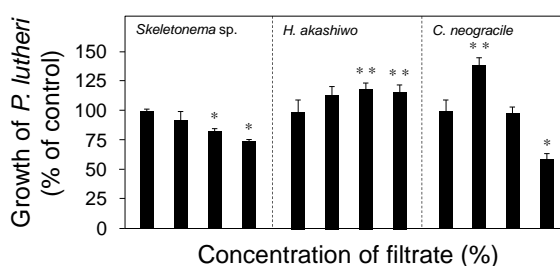


図 1. ヘテロシグマ、スケルトネマおよびキートセロスのパプロバに対するアレロパシー効果 (\*\* 増殖促進効果  $P < 0.05$ , \* 増殖抑制効果  $P < 0.05$ )

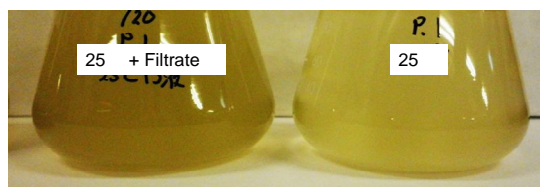


図 2. キートセロス培養液のパプロバに対する増殖改善効果  
左: キートセロス培養液添加区 右: 対照区

(2) アレロパシーによって増殖改善されたパプロバのシオミズツボウムシに対する餌料効果

低濃度のキートセロス培養液をパプロバに添加した結果、25% 条件下におけるパプロバの増殖が促進され、パプロバの至適培養温度である 20℃での増殖と比較して 80%程度まで増殖を改善した。これら培養条件の異なるパプロバを餌料生物として、シオミズツボウムシ用いた給餌試験を行った結果、25% でアレロパシーによる増殖改善を行ったパプロバを給餌した区のシオミズツボウムシの増殖は、至適水温で培養したパプロバを給餌した対照区のシオミズツボウムシより良好

な餌料効果を示した（図3）。

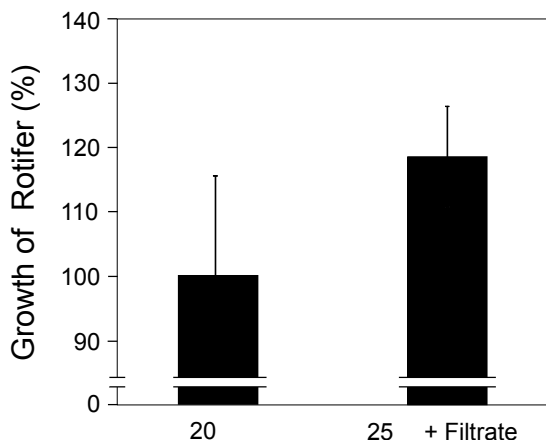


図3. アレロパシーによって増殖改善されたパプロバのシオミズツボウムシに対する餌料効果

(3) 飼育水中に共存する海洋細菌に対するキートセロス培養液の影響

海洋細菌の増殖に対するキートセロス培養液の影響を調べた結果、キートセロスのアレロパシー物質添加の有無に関わらず、パプロバ培養液中の海洋細菌の増殖に影響を与えなかった。したがって、キートセロス培養液は、培養液中に共存する海洋細菌の増殖を抑制しないものの、海洋細菌の顕著な増殖を助長しないことから、餌料用微細藻類の大量培養系における増殖促進・改善剤として有効であることが明らかとなった。

(4) キートセロス由来アレロパシー物質によって増殖改善されたパプロバの栄養価

キートセロス培養液で培養したパプロバのタンパク質および糖質含量を調べた結果（図4）、20 で培養したパプロバと比較して、キートセロス培養液を添加して培養したパプロバのタンパク質含量は増加しており、糖質含量はほとんど差異が認められなかった。以上の結果から、キートセロスの培養液は、培養不良を引き起こす25においてパプロバの増殖を改善するだけでなく、タンパク質含量を増加させる傾向にあることから、現状より栄養価の高い餌料生物を安定して生産できる可能性が示唆された。

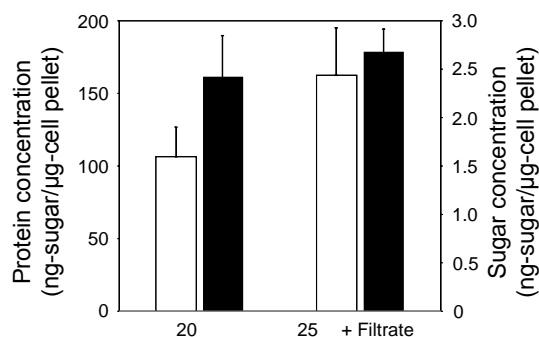


図4. アレロパシー物質によって増殖改善されたパプロバのタンパク質および糖濃度変化

(5) キートセロスが産生するアレロパシー物質の化学的性状とパプロバに対する増殖改善効果

加熱処理（121℃, 15分）したキートセロスの培養液は、未処理の培養液と同様にパプロバの増殖を促進したことから、アレロパシー物質の熱安定性が示唆された。また、透析により得られたキートセロス培養液の高分子画分に含有する成分の分析を行った結果、タンパク質およびフコースやガラクトースなどを主成分とする中性糖類が検出された。さらに、上記高分子画分がパプロバの増殖に与える影響を調べた結果、培養8日目から高分子画分の添加濃度依存的なパプロバに対する増殖改善効果が認められた（図5）。以上のことから、キートセロスの高分子アレロパシー物質は、二枚貝に対して高い餌料効果を有するパプロバの大量培養や安定共有に寄与できることが示唆された。

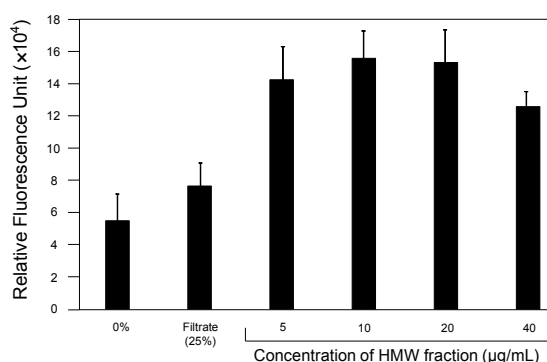


図5. キートセロスが産生するアレロパシー物質のパプロバに対する濃度依存的増殖改善効果

(6) 餌料用微細藻パプロバが産生する自己増殖阻害物質

パプロバ自身の増殖に与える培養液の影響を調べた結果、培養液濃度に依存的な自己増殖阻害効果が認められ、最も強い抑制を受けた100%濃度区での最大蛍光強度は対照区の45%であった。また、数段階の温度帯で培養したパプロバの培養液を用いて自己増殖阻害効果を調べた結果、培養温度の上昇に伴う自己増殖阻害物質産生量の増加が示唆された（図6）。一方、増殖阻害物質の化学的性状を調べた結果、加熱処理を行ったパプロバ培養液は、自己の増殖を強く抑制することが明らかとなり、最大蛍光強度は対照区の約8%であった。さらに、限外ろ過によって得られたパプロバ培養液の低分子画分試料はパプロバの増殖を対照区の約65%まで抑制したが、高分子画分試料はパプロバの増殖に影響を与えなかった。以上のことから、パプロバが産生する自己増殖阻害物質は熱に安定な分子量10 kDa以下の物質であり、高水温時に起こるパプロバの培養不良に対する自己増殖阻害物質の関与が示唆された。

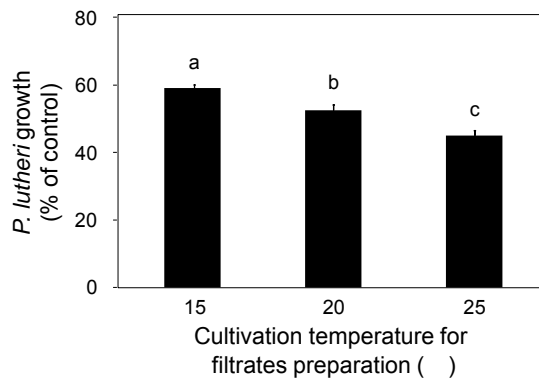


図 6. 培養温度依存的なパプロバの自己増殖阻害効果 ( $P < 0.05$ : 図中に示す小文字アルファベットは、異符号間に有意差があることを示す)

#### 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)

山崎康裕, 疋田拓也, 海産微細藻類の培養液を用いた餌料用微細藻 *Pavlova lutheri* の増殖改善, 日本水産学会誌, 79: 875-877 (2013)

〔学会発表〕(計 2 件)

疋田拓也, 三井俊作, 藤田雅紀, 山崎康裕, 微細藻類のアレロパシーが餌料用微細藻類 *Pavlova lutheri* の増殖に与える影響, 日本水産学会中国・四国支部例会, 2012 年 12 月 1 日, 福山大学 (福山)

山崎康裕, 池田至, 島崎洋平, 大嶋雄治, 上野俊士郎, 本城凡夫, 植物プランクトンによるアレロパシーが餌料用微細藻類の増殖に与える影響, 日本水産学会中国・四国支部例会, 2011 年 12 月 3 日, 水産大学校 (下関)

〔その他〕

ホームページ

<http://www2.fish-u.ac.jp/jellies/index1.htm>

日本水産学会中国・四国支部例会  
優秀発表賞受賞 (2011 年 12 月 3 日)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 康裕 (YASUHIRO YAMASAKI)

研究者番号: 40598471