

# 海洋生物科学科 2014 年研究業績

## A. 研究発表

### 1. 論文

- (1) Transferring *Gracilaria irregularis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Thailand to *Gracilariopsis* based on morphological and molecular analyses. Narongrit Muangmai, Yukimasa Yamagishi, Giuseppe C. Zuccarello, Anong Chirapart, and Khanjanapaj Lewmanomont  
*Phycological Research*, **62**, 29–35 (2014)

*Gracilaria irregularis*, endemic to Thailand, was originally described from Ao Len, Trat peninsula, Thailand, and was characterized by a short, succulent thallus with irregular branching, *verrucosa*-type spermatangia (a taxonomic criterion for *Gracilaria*) and the absence of nutritive filaments (a taxonomic criterion for *Gracilariopsis*). Due to the combination of characters diagnostic of both the genera *Gracilaria* and *Gracilariopsis*, the taxonomic status of this species is unclear. This present study reassesses the identity of *G. irregularis* based on morphological features and *rbcL* sequences. Newly collected samples from the type locality and KU collection were investigated. Our morphological re-examinations were relatively similar to the original type description, except that the male plants showed superficial *chorda*-type spermatangia, an important characteristic recognized in *Gracilariopsis*. Molecular analysis placed *G. irregularis* in the *Gracilariopsis* clade, forming a well-supported clade with *Gracilariopsis bailinae*. Detailed morphology and molecular phylogenetic analyses clearly showed that *G. irregularis* is congruous with the generic concept of *Gracilariopsis*, and consequently the new combination of *Gracilariopsis irregularis* is proposed. We believe that in the original description a heterogeneous holotype was used. Our data also shows the problems that can occur when collections are made of multiple plants, of similar external morphology, to describe new species.

- (2) *Dasya enomotoi* (Dasyaceae, Ceramiales), a new large *Dasya* from Japan  
Yukimasa Yamagishi, Yusuke Ohta, Michio Masuda, and Tsuyoshi Abe  
*Phycological Research*, **62**, 63–72 (2014)

A new red alga, *Dasya enomotoi*, is described from Japan. This species is characterized by having a large thallus consisting of an elongated axis and many, radially arranged, polysiphonous branches both of which are heavily corticated and densely covered with numerous, soft monosiphonous filaments. It is distinguished from several similar species by the combination of the following: (i) indistinct pericentral cells in transverse sections except near the apices, (ii) the presence of enlarged, inner cortical cells, (iii) radially arranged adventitious monosiphonous filaments, (iv) three-celled carpogonial branches, (v) six (sometimes five) tetrasporangia in each fertile segment of the stichidia, and (vi) three tetrasporangial cover cells that are not elongated longitudinally and usually not divided transversely. This species may have been identified as *D. villosa* Harvey by previous investigators in Japan.

- (3) *Neosiphonia thailandica* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Gulf of Thailand  
Narongrit Muangmai, Yukimasa Yamagishi, Sinchai Maneekat, and Chatcharee Kaewsuralikhit  
*Botanica Marina*, **57**, 459–467 (2014)

We describe a new epiphytic red alga *Neosiphonia thailandica* sp. nov. based on a sample collected from Sri Rasha Harbor in the eastern upper Gulf of Thailand. This species grows epiphytically on *Gracilaria fisheri*, and it is distinguished from other members of the genus by a combination of morphological features: large and slender thalli with narrow axes (up to 15 cm height and 0.5 mm wide), ecortication, well-developed erect habit, few trichoblasts, and abundant adventitious endogenous branchlets occurring in various positions on the thalli. The morphological distinction of *N. thailandica* is supported by molecular phylogenetic analyses using partial *rbcL* sequences. *Neosiphonia thailandica* is positioned within a major clade of the genus *Neosiphonia* and clustered with *Neosiphonia sphaerocarpa* and *Polysiphonia forfex*.

- (4) Characteristics of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp I10-1 for production of L-arabinose from corn hull arabinoxylan.  
Masahiro Kurakake, Yoshikazu Kanbara, and Yoshiki Murakami  
*Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**, 2650–2660 (2014)

*Streptomyces* sp I10-1  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase efficiently produced L-arabinose from high arabinose-content corn hull arabinoxylan (ratio of arabinose to xylose, 0.6). The

optimum pH at 40°C was around 6, and the enzyme was stable from pH 5 to 11. The optimum temperature was 50°C at pH 5, and the activity was stable at 40°C. The enzymatic activity against corn hull arabinoxylan was 2.3 times higher than towards *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside. Approximately 45% L-arabinose recovery was achieved from corn hull arabinoxylan. It was considered that L-arabinose residues not removed by the enzyme were attributable to those linked with ferulic acid. The open reading frame of the enzyme gene consisted of 1,224 bp, and the predicted peptide was 408 amino acids, which corresponded to a molecular size of 45, 248 Da. It was presumed that the smaller molecular size (31,000 Da) estimated on SDS-PAGE resulted from proteolysis by proteases. I10-1  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase belongs to the Alpha-L-AF C superfamily, which is associated with glycoside hydrolase family 51, but the properties were unique.

- (5) Early growth and development of reciprocal hybrids of the starry flounder *Platichthys stellatus* and stone flounder *Kareius bicoloratus*  
Yuho Yamashita, Masato Aritaki, Yutaka Kurita, and Masaru Tanaka  
*Journal of Fish Biology*, **84**, 1503–1518 (2014)

Larval growth and development of hybrid flounder were observed and compared with those of their parent species. The reciprocal hybrids of female starry flounder *Platichthys stellatus* and male stone flounder *Kareius bicoloratus* (hybrid Sb) and of female *K. bicoloratus* and male *P. stellatus* (hybrid Bs) both survived and grew to juveniles. Development was divided into nine stages (A–I). Many of the hybrids' traits were identical and intermediate to those of their parents. The position of the eye, however, was primarily sinistral in both hybrids (80% in Sb and 76% in Bs), a trait possessed by *P. stellatus* (80%) in the western Pacific Ocean. The daily growth rates of the larvae were similar. In the parent species, development was more rapid in *P. stellatus* than in *K. bicoloratus* whereas rate of development was intermediate in both Sb and Bs hybrids. The size at settlement [standard length ( $L_S$ ) at stage H (mean  $\pm$  s.d.)] was  $9.82 \pm 1.47$  mm for the hybrid Sb and  $9.99 \pm 0.90$  mm for the hybrid Bs, while the minimum age at metamorphosis (initial age at stage H) was 29 days after hatching (DAH) in both hybrids. In comparison,  $L_S$  at settlement in parent species was  $6.43 \pm 0.25$  mm for *P. stellatus* and  $12.87 \pm 1.29$  mm for *K. bicoloratus*. Minimum age at metamorphosis for the parents was 23 DAH at stage G in *P. stellatus* and 34 DAH at stage H in *K. bicoloratus*. Thus, the timing of settlement of hybrids was different from that of their parent species. These traits may occur with high frequency in a natural habitat.

(6) ウマヅラハギの個体と尾鰭細胞における温度耐性の関連性

阪本憲司、五十嵐真由

水産育種, **62**, 31-35 (2014)

We evaluated the correlation between the temperature tolerance of live fish in vivo and caudal fin cells in vitro in black scraper *Thamnaconus modestus*. Fish were reared at 17°C then exposed to high temperature (30°C) and the time to death was measured. In addition, we incubated black scraper caudal fin cells at 43°C for 2 h and measured cell viability using the trypan blue assay. There was a significant correlation between the in vivo and the in vitro tolerance to high temperature in this species ( $P < 0.05$ ). Our results suggest that the caudal fin cells from live fish may be used to evaluate high temperature tolerance traits in selective fish breeding programs.

## 2. 報文

(1) 発生研究のモデル動物としてのミズクラゲの有用性

高村克美

福山大学生命工学部年報 (13)、37-53 (2014)

刺胞動物ミズクラゲは、無性生殖するポリプ世代と有性生殖するクラゲ世代が切り替わる世代交代を行う動物としてよく知られている。ポリプは、温度変化や飢餓などの環境の変化に良く耐え、また条件さえ整えば出芽により半永久的に増え続け、しかも得られポリプ集団は遺伝的に単一なクローンであることから、モデル生物としての系統の作製と維持が容易である。また、無性世代から有性世代への切り替えも、飼育温度の低温下により、容易に起こすことができる。しかし一方で、その切り替えのメカニズムや、有性世代への移行に伴う生殖細胞の起源および性の決定に関してはまだ十分に明らかにされていない。本研究では、発生研究におけるモデル生物としてのミズクラゲを、もう一度見直し、基本的な実験方法の開発と、それに基づいて明らかにしたストロビレーションの誘導条件、その間の形態および内部タンパク質の変化について考察したので報告する。

(2) 広島県因島周辺における流れ藻の構成種

山岸幸正、小野天新、金子淳悟、三輪泰彦

福山大学内海生物資源研究所報告 (24)、1-7 (2014)

瀬戸内海中央部に位置する広島県因島周辺における流れ藻の構成種と季節的消長を明らかにするために、2013年4月から11月まで毎月船による流れ藻の採集調査を行い、得られた海藻類および海草類の種の同定を行った。その結果、因島周辺から褐藻ホンダワラ科12種、海草類4種、その他海藻類26種、その他陸上植物4種の流れ藻を確認した。調査期間において出現頻度が高かったアマモ(71%)、ヒジキ(49%)、ヨレモク(26%)、アカモク(25%)、シダモク(24%)は主要な流れ藻種と考えられる。ホンダワラ科の出現頻度の季節変化として、春にはアカモク、ヒジキ、タマハハキモクなどが多く、夏には多くの種が消失してヒジキのみ残存して流れ藻を形成した。秋以降には消失したホンダワラ科の種が再び出現し、ヨレモクの頻度が高かった。アマモは全期間にわたり高い頻度で存在していた。

### (3) 因島周辺海域におけるアオリイカの遺伝的集団構造

阪本憲司、東野明日翔

福山大学内海生物資源研究所報告(24)、8-13(2014)

尾道市因島周辺海域に生息する本種の遺伝的集団構造を明らかにするために、比較的変異が多く母系遺伝を解析する際に使用されるミトコンドリアDNAの非コード領域NC2に着目し遺伝的集団構造を調べた。

調査サンプルは、尾道市因島の4地点(大浜、七曲、鏡浦港、地蔵鼻)と島根県浜田市の浜田漁港円通寺および同市松原の計6地点で採取したものを使用した。採取したアオリイカから全DNAを抽出した後、ミトコンドリアの非コード領域NC2を増幅するためにDNAマーカー(SL-Ala及びSL-Trp)を用いてPCRを行った。増幅されたDNA断片はGenetic Analyzer 3500xLを用いて塩基配列を読み取り解析を行った。

因島周辺4地点(大浜、七曲、鏡浦、地蔵鼻)と島根県浜田市周辺の2地点(円通寺、松原)において全体で16個のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ多様度の値は大浜で0.396、七曲で0.207、鏡浦で0.119、地蔵鼻で0.396、円通寺で0.252、松原で0.308となり、平均が0.281であった。また、特異的なハプロタイプがわずかに検出された。本結果から、アオリイカにおいては特異的なハプロタイプが少なく、ハプロタイプ多様度がそれほど高い値ではなかった。また、ハプロタイプNo.1が各地点のハプロタイプ構成の7~9割程度を占めており、上記の全地点を構成する主要なハプロタイプであることが明らかとなった。その他にも共通するハプロタイプが検出されたことから、因島周辺海域に生息するアオリイカは1つの大きな母系集団を形成していると推察された。さらに、島根県浜田市周辺の地点では因島周辺と共通するハプロタイプ

が4つ検出され、因島周辺と同様の結果が得られた。

(4) アウトリーチプログラムを導入した学芸員養成教育

水上雅晴、河原栄二郎

福山大学内海生物資源研究所報告 (24)、14-31 (2014)

これまでに、筆者らは学芸員養成課程を履修する学生に対して、博物館実習の事前事後学習の一環として、ふれあい出前水族館を活用した社会人基礎力養成教育を実施し、山間部の小学校や介護老人福祉施設を含む計4施設で、学芸員養成課程履修者を中心とした4年生10名に対する教育活動を行った。出前水族館では、学生は学内生活だけでは接することのない小学生や要介護者と触れ合うことで、コミュニケーション能力や専門知識の必要性を改めて認識するとともに、それらの向上効果が認められた。そこで、筆者らは平成25年度にも同助成を受け、アウトリーチプログラムを導入した新たな学芸員養成教育の取り組みを実施した。本活動は、平成24年度に実施した教育内容をさらに発展させ、取り組み過程を通して学芸員としての資質を高める方式のPDCAサイクル形式を取り入れたアウトリーチプログラム教育を行うことで、新たな学芸員養成教育を図ることを目的に実施された。参加した学生は出前水族館や出張授業等のアウトリーチプログラムを実施する前に、事前学習としてグループディスカッションを積極的に取り入れながら同プログラム内容を立案し、また、同プログラム実施後に事後学習として問題点を取りまとめて整理して改善した同プログラムを構築した。

### 3. 学会発表

(1) 紅藻ケブカダジアの分類と新種セトウチダジア *Dasya enomotoi* について

山岸幸正、太田雄介、増田道夫、阿部剛史

日本藻類学会第38回大会(千葉)、講演要旨集、p.60 (2014-3)

ケブカダジア(紅藻イギス目ダジア科)は日本産ダジア属の中で最も大型の種で、高さ30-60cmになり、枝全体に毛状枝を密生するという特徴を持ち、学名にはタスマニアをタイプ産地とする *Dasya villosa* Harvey があてられていたが、詳しい特徴は調べられておらず、種の実体は不明であった。本研究では、広島県尾道市因島八重子島で採集した大型のダジア属藻体および北海道大学大学院理学研究科植物標本庫(SAP)の標本を観察し、ケブカダジアの分類について検討を行った。因島の種は、高さ8-60cm、直径1.5-3.0mmあり、主軸や枝は厚い皮層を持ち、

柔らかい毛状枝(pseudolateral および adventitious monosiphonous filaments)で密に覆われ、毛状枝は長さ 1200-3400  $\mu\text{m}$ 、直径 20-30  $\mu\text{m}$  あり、古くなると主軸基部付近の毛状枝は少なくなり、周軸細胞の周りに大型の皮層細胞や糸状細胞が発達し、断面で周軸細胞は不明瞭である。造果枝は 3 細胞からなり、四分孢子嚢は関節あたり 6 個ときに 5 個形成され、四分孢子嚢 cover cell は縦に長くならず四分孢子嚢あたり 3 個生じる。因島では夏期に生育する。一方、*D. villosa* は断面で 5 個の周軸細胞が明瞭であり、四分孢子嚢 cover cell が縦長になること等で本種と区別される。因島の種は、形態的特徴の比較および *rbcl* 解析の結果一致する種がないことから、新種セトウチダジア *Dasya enomotoi* Yamagishi, Masuda et Abe として記載した。これまで日本でケブカダジアと同定された標本には、セトウチダジアのほか、より密な毛状枝に覆われた種が認められた。後者の特徴も *D. villosa* とは一致せず、日本には *D. villosa* が存在しない可能性が高い。

## (2) 岡山県笠岡市におけるカブトガニの越冬行動

渡辺伸一、小山田早織、森信 敏、惣路紀通

第 61 回日本生態学会（広島）、講演要旨集、p. 68（2014-3）

かつて岡山県笠岡市は、カブトガニの代表的な生息地だったが、環境悪化により生息数が激減したため、生息地の保全が急務となっている。カブトガニの生息地保全のためには、生活史を通じた利用場所の把握が課題となるが、成体の行動については、産卵地周辺を除いてほとんど情報がない。本研究では、バイオロギングによって長期的にカブトガニの行動を調査し、繁殖期以降、越冬期にかけての行動と利用場所を推定した。カブトガニの活動期である 6 月から 10 月に温度・深度ロガーを装着して繁殖地である笠岡湾内で放流し、周辺の漁業活動で混獲された個体からロガーを回収した。ロガーを装着した 20 個体のうち、4 個体（雄 3、雌 1 個体）を再捕獲して、越冬期を含む 169-286 日間（計 906 日間）の行動データを得ることができた。深度変化のパターンから、活動時の行動を分析した結果、カブトガニの行動は日周サイクルと潮汐サイクルに同調した周期性を示した。その後、10 月下旬（水温 21℃）に雄 3 個体は活動を停止したが、雌は 11 月下旬（水温 18℃）まで活動した。休止中に記録された深度データから水深と干潮時刻を推定して、笠岡周辺の海底地形と推算潮時と比較した結果、越冬海域は湾口から西側の海域（水深 4-10m）であることが明らかになった。越冬中に 2 個体（雄 1、雌 1）は底引き網漁で捕獲され、ほかの雄 2 個体は越冬後に湾外の定置網で雌とつがった状態で捕獲された。越冬した雄 2 個体は 5 月中旬（16℃）に再び活動し、水深 10-30m に達する広範囲を移動し、産卵期の 7 月中に 5m 以浅の浅瀬を度々訪れた。越冬期間はそれぞれ 195 日、200 日間に及び、一年の約 55%に相当した。以上の結果から、笠岡湾周

辺の浅海域がカブトガニにとって越冬場所と越冬後の採餌場所として重要であり、湾外の環境も含めた生息地保全の対策を講じる必要があると考えられる。

(3) 八田原ダムでのアオコ発生に影響を及ぼす芦田川上流域におけるリン濃度の季節変動

藤井啓子、北口博隆、満谷 淳

第 48 回日本水環境学会年会（仙台）、講演集、p. 3（2014-3）

広島県南東部を流れる一級河川 芦田川の中流に位置する八田原ダムでは、毎年夏季に *Microcystis* 属シアノバクテリアによるアオコが発生している。これまでに同ダムでのアオコ発生規模を拡大させる要因について、出水時の無機リンの大量流入とその後の日照時間にあることが示されており、無機リンは主に上流の水田やその周辺の水路から芦田川を經由してダムに流入してきた可能性が考えられた。本研究はリンの負荷源を探ることを目的とし、芦田川源流から八田原ダムまでのリン濃度の季節変動と周辺環境の変化との関連を調査した。

芦田川上流域では、昨年度と同様に、無機リン濃度は源流（St. 1）から世羅町市街地（St. 5）まで下流になるにつれて段階的に上昇し、八田原ダムの約 3 km 上流に位置する三川ダム（St. 6）で一旦低下した後、7～9 月の調査時では三川ダムより放水された水（St. 7）で再度上昇した。また、大規模な出水時には高濃度の無機リンを含む水が三川ダムから下流へと放水されており、八田原ダムに流入する直前（St. 9）の河川水濃度と八田原ダム（St. 10）表層湖水の無機リン濃度はほぼ同じで、且つ AGP 値がほぼ同じであったことから、出水時に大量に流入した河川水によりダム湖水がほぼ完全に置き換えられていたと考えられる。一方、河川水のリン組成をみると、1～3 月にはリン濃度は全体的に低く、水田で代掻きが始まると周辺定点でのみ懸濁態リン濃度が著しく高くなったが、次の調査時には懸濁態リン濃度の割合は低下し、代わって無機リンが増加した。すなわち、代掻きによって水田、あるいはその周辺水路から流出した多量の懸濁態リンが水路内や芦田川の川底等で徐々に無機化されて継続的に下流の三川ダムに供給され、平水時にはそこで藻類によって消費されているが、梅雨どきの大規模出水時には高濃度の無機リンを含む河川水が三川ダムを素通りして下流の八田原ダムに流れ込み、そこでのアオコ発生を促進するのではないかと推察された。

(4) *Aspergillus oryzae* KB 株によるフルクトース転移酵素の生産条件

倉掛昌裕、兼国将一、古賀雅紀、芝田美幸、廣津紗弥

日本農芸化学会 2014 年度大会（東京）、講演要旨集、p. 1909（2014-3）



【目的】 *Aspergillus oryzae* KB 株は、2種のβ-フルクトフラノシダーゼ、F1 及び F2 を生産した。F1 は糖転移性の高い酵素でフルクトオリゴ糖合成に有効であるのに対し、F2 は加水分解性を有した。非イオン性界面活性剤 (Tween 等) を培地に添加し液体培養することで、KB 株の菌体ペレットの大きさや、個数は大きく変化した。F1 酵素生産性が改善された。今回は、界面活性剤添加等の培地条件により異なるペレット径を調製し、各酵素生産性との関係について調べた。また、F1 酵素の選択的生産性のための培地条件についての検討も行った。

【方法】 KB 株の液体培養は、1%シュクロース、0.5%酵母エキス、0.2%リン酸水素2ナトリウム12水和物の培地に、Tween 等の非イオン性界面活性剤を0.5~1.0%添加し、100ml 容三角フラスコにて液量30mlとして、30°C、150rpmで2~3日間行った。培養後、菌体ペレットをホモジナイズした懸濁液を1%シュクロースに、pH5、40°Cで10分間反応させ、生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼ法によって定量することで、β-フルクトフラノシダーゼ活性を求めた。この活性値を0.2U/mlにそろえ、20%シュクロースにpH5、40°Cにて1~2時間反応させ、HPLC (NH2-P50 カラム; 旭化成(株))にて生成糖を分析した。フルクトースおよびグルコースの生成量を測定することで糖転移活性 (F1 相当) 及び加水分解活性 (F2 相当) を求めた。それぞれ1分間に1μmolのフルクトースを転移および遊離させる酵素量を1Uと定義した。

【結果】 KB 株の液体培養において、シュクロース培地に HBL (hydrophile lipophile balance) 値の異なる非イオン性界面活性剤の Tween 20、40、および 80、または各種ポリオキシエチレンオレイル (POE 2~50) を添加することで菌体のペレット粒径は変化した。酵素生産性も異なることが認められた。また培地のシュクロース濃度を増加させることでペレット径は大きくなり、炭素源にシュクロースの代わりにグリセリンを添加することでペレット粒径は小さくなった。また培地の pH をクエン酸-リン酸緩衝液で調整し培養を行ったところ、酸性側で粒径は大きくなった。これら各粒径のペレットを調製し、F1 酵素生産性および F1 酵素の生産選択性 (F1/F2) について評価した。これら各培地条件の結果より F1 酵素のみを効率的に生産するための最適条件について検討を行った。

#### (5) クローンギンブナの高温耐性に及ぼす低線量放射線被曝の影響

阪本憲司、中嶋正道

平成 26 年度日本水産学会春季大会 (函館)、講演要旨集、p. 72 (2014-3)

2011 年 3 月 11 日に発生した東北太平洋沖地震に伴う東京電力福島第一原子力発

電所事故により多くの放射性物質が海洋をはじめ山林などの自然環境中に放出された。河川は山林に降下した放射性物質が濃縮されるところであり、このような環境に生息する淡水魚は放射性物質の影響を受けやすい環境に生息していると言える。これまでに魚類における放射性物質汚染の状況は食品としての安全性の観点から調べられてきたが、魚類そのものに対する影響評価は行われていない。そこで本研究では、低線量放射線被曝が高温耐性へ及ぼす影響を調べた。

岡山県児島湖に生息していた親魚から人工授精によって得られたクローンギンブナの飼育稚魚 20 尾（体長：8.7±1.0mm）を用いた。150 L 容量のガラス製水槽で、上面濾過による循環濾過飼育を行った。飼育水温を 23℃とし、各水槽に稚魚を 75 尾ずつ収容した。低線量放射線被曝実験は 4 つの実験区（餌料中の <sup>137</sup>Cs 濃度：100, 1000, 10000 Bq/kg および対照区）を設け、各線量に調製した配合飼料を与えた。90 日間飼育を行った後、各実験区から無作為に 5 尾ずつ採取し、高温耐性実験を行った。耐性実験は、20 L 容プラスチック容器に金属製の籠を沈め、この中に実験区別に供試魚を収容して行った。サーモスタットで温度コントロールが可能なヒーターを用いて、23℃から 10 分間に 1℃ずつ温度を上げ 36℃に達した時点で実験開始とし、死亡するまでの生存時間を記録した。

高温耐性実験の結果、各実験区の生存時間（分±標準偏差）は 100 Bq 区で 126.2 ±13.2、1000 Bq 区で 148±56.2、10000 Bq 区で 221±44.6、対照区で 186.4±72.4 であった。本結果から、低線量放射線被曝の程度によって高温耐性が変化することが明らかとなった。

#### (6) 緑藻類アオサの有効利用に関する研究

倉掛昌裕、古賀雅紀、兼国将一

日本食品科学工学会第 61 回大会（福岡）、講演要旨集、p.127（2014-8）

【目的】アオサはアオサ科アオサ属の海藻で、一般的に潮の満ち引きのある浅い海の岩などに付着して生息・繁殖している。海の富栄養化などが原因で大量繁殖するとグリーンタイドを発生させ、自然環境、漁業、観光での問題となっている。近年では、アオサの代用品、家畜の飼料や農作物の肥料として利用されており、メタン発酵などバイオマス利用の研究も行われている。本研究では、アオサの食品等への有効利用として、①アオサの抗酸化性および食品着色料としての利用性について、②土壌よりアオサ分解菌を分離し、その生産酵素によるアオサ含有多糖の分解性およびその生成物について調べた。

【方法】尾道市因島大浜町小浜で採取したアオサを水道水で洗浄し、70℃で 1 日乾燥させた後、乳鉢で粉末状にし、実験に供した。アオサ粉末 10g に 60%エタノールを 20ml 加え混ぜ、室温で 1 または 24 時間静置することで抽出を行い、遠心

分離(3000rpm、10 分間)した上清を実験に供し、SOD 様活性およびポリフェノール量を求めた。土壌からスクリーニング培地には 0.5 %アオサ粉末、1.5 %寒天の平板培地を用い、30℃で 3 日間培養した。得られた分離株を、0.5%アオサ粉末の液体培地にて 150 回/分レシプロ振とうで 30℃、3 日間培養し、培養液上清のアオサ分解酵素活性を測定した。酵素活性は 0.9 %アオサ粉末に pH5、40℃にて 30 分間反応させ、生成還元糖量を DNS 法 (3,5-ジニトロサリチル酸法) で測定することで求めた。1分間に 1  $\mu$  mol の還元糖を生成させる酵素量を 1 ユニットと定義した。

【結果および考察】アオサの抗酸化性およびポリフェノール量は低いものであったが、アオサ抽出液は光沢の良い黄緑色をしており、pH2~11.5 において色調の変化はほとんどなかった。また熱安定もあり、着色料への利用が期待できた。土壌からのアオサ分解菌のスクリーニングの結果、細菌 81 株、放線菌 18 株、カビ類 14 株の計 113 株を分離した。液体培養液上清のアオサ分解活性を測定し、比較的高活性を示す 3 菌株を得た。

(7) 魚類養殖場で分離された *Edwardsiella tarda* フェージの宿主特異性とゲノム型  
菅谷恵美、安池元重、西木一生、中村洋路、藤原篤志、菅谷琢磨、中井敏博  
平成26年度日本魚病学会秋季大会 (福岡)、講演要旨集、p. 20 (2014-9)

【目的】前報では、海産魚の養殖場 (魚および環境水) で分離した *E. tarda* 溶菌フェージを用いて *E. tarda* フェージ型別をおこなった結果、魚類病原性 *E. tarda* は数種類のフェージ型に分けられることを明らかにした。本研究では、これらの分離 *E. tarda* フェージのゲノム解析をおこない、本フェージのゲノム型と宿主特異性との関係を調べた。

【方法】試験には、ヒラメ、マダイ、およびクロダイの各養殖場で分離した計 86 株の *E. tarda* フェージ、ならびにこれら 3 魚種由来株にウナギ由来株を加えた計 36 株の *E. tarda* を使用した。まず、二重寒天スポット法によるフェージの感染性試験結果から、その類似性に基づいて UPGMA 法を用いたデンドログラムを作成した。次に、異なるクラスターから任意にフェージを 1 株ずつ選び、次世代シーケンサー Roche 454 GS FLX を用いてそれらのゲノム解析をおこなった。

【結果】*E. tarda* フェージ全 86 株の宿主菌への感染性は 35 の型 (感染型) に分けられた。これらは、感染性の類似度を示すデンドログラム上では 3 つの大きなクラスターを形成し、各クラスターはフェージの由来すなわちフェージが分離された魚種もしくはその飼育環境水と関連する傾向が認められた。各感染型から選んだ 35 株のフェージのゲノムサイズはすべて約 43kbp であった。全ゲノムの塩基配列の相同性 (99%以上) に基づき、これらのフェージは 3 つのゲノム型 (A、B、C) に分けられた。それらを上述のデンドログラム上にプロットした結果、感染型の類似するフェージは同じゲノム型に属する傾向がみられた。なお形態学上は、ゲノム型 A はポドウイルス、ゲノ

ム型 B と C は小型ミオウイルスに分類される。

(8) ファージの出現動向に基づくマダイのエドワジエラ症の発生予測-II

玉田拓斗、中井敏博、菅谷恵美、河東康彦、山下浩史

平成 26 年度日本魚病学会秋季大会（福岡）、講演要旨集、p. 20（2014-9）

【目的】前報では、研究施設におけるマダイ飼育群を対象として検討し、エドワジエラ症の発生と飼育環境海水での *Edwardsiella tarda* 溶菌ファージの出現との間に関連性が認められることを報告した。本報では、ファージを指標としたエドワジエラ症の発生予測の可能性を探るため、研究施設に加えて実際のマダイ養殖漁場において調査をおこなった。

【方法】調査は、愛媛県水産研究センター（宇和島市）のマダイ飼育海面小割りで 2012 年と 2013 年に、および同県愛南町の 2 カ所（A および B）のマダイ養殖漁場で 2013 年に実施した。4 月から 12 月の間、定期的に魚の保菌および抗体検査をおこなうとともに飼育筏の近傍海水から集菌培養法により *E. tarda* ファージを検出し、これらの結果をエドワジエラ症の発生状況と照合した。

【結果】水産研究センターでは、2012 年、2013 年ともにほぼ同様の傾向を示した。8 月から 10 月に小規模なエドワジエラ症の発生があり、ファージは病気発生前もしくは発生初期から検出され始め（ $10^1$  pfu/mL）、病気発生時にその存在量が高まり（ $10^2 \sim 10^3$  pfu/mL）、病気終息後に減少した。養殖漁場では 2013 年 6 月から 11 月にかけてエドワジエラ症の発生がみられ、8 月から 10 月が病気のピークであった。ファージは、養殖漁場 A では 4 月から  $10^2$  pfu/mL で、養殖漁場 B では 6 月から  $10^3$  pfu/mL で検出され始め、いずれも 8 月に最高濃度（ $10^4$  pfu/mL）に達し、その後も比較的高濃度で検出された。このように養殖漁場においても、*E. tarda* ファージが病気流行の 1 か月以上前から出現し、病気のピーク時にその存在量が最高値に達し、病気の終息につれて減少することが確認された。なお、試験期間中に病魚から分離された *E. tarda*（非定型）の多くの株は、海水分離 *E. tarda* ファージに感受性を示した。以上の結果から、養殖環境中のファージ量をモニタリングすることにより、本病流行の動向（発生、進行、終息）を予測することが可能であると考えられる。

(9) 新規 *Edwardsiella tarda* 溶菌バクテリオファージ株 FW-3 の全ゲノム配列解析

安池元重、西木一生、岩崎裕貴、中村洋路、藤原篤志、菅谷恵美、河東京彦、長井 敏、小林敬典、乙竹 充、中井敏博

平成26年度日本魚病学会秋季大会（福岡）、講演要旨集、p. 23（2014-9）

【目的】海水中の *Edwardsiella tarda* バクテリオファージ（ファージ）の出現動向は、養殖海域におけるエドワジエラ症の発生予測の指標になることが期待される。現在我々は、*E. tarda* ファージのリファレンスゲノム情報の収集を進めており、前回までに代表的な分離株 MSW-3(マイオウイルス科)、KF- 1および IW-1 (ポ

ドウイルス科) の全ゲノム配列について報告した。今回、既報とはゲノム構造が大きく異なる *E. tarda* フェージ分離株 FW-3 (クロダイ養殖場環境水由来) が得られたので、その全ゲノム配列解析について報告する。

【方法】 フェージ株 FW-3 からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー Roche 454 GS FLX+ を用いてショットガンシーケンスを行った。Newbler 2.9 でアセンブルを行った後、Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server を用いてオープンリーディングフレーム (ORF) を予測した。それら予測された ORF アミノ酸配列を GenBank 上のウイルスタンパク質データベースと比較し、遺伝子の機能予測を行った。

【結果】 次世代シーケンサーを用いて、FW-3 (43,29 bp) の全ゲノム塩基配列を得た。そのゲノム配列からは、81 個の ORF が予測され、この予測 ORF の内、54 個 (66.7%) はウイルス既知遺伝子との相同性が認められた。それら既知遺伝子中、22 個はマイオウイルス科、18 個はサイフォウイルス科、4 個はポドウイルス科、1 個はミミウイルス科および、9 個は未分類のウイルスの遺伝子と高い相同性を示した。さらに、FW-3 の構造タンパク質遺伝子 (head protein、baseplate protein および tail-fiber protein) は、マイオウイルス科に属するフェージのものと高い相向性が認められた。以上の結果から、FW-3 はマイオウイルス科に属する新規フェージであることが示唆された。また、FW-3 のゲノム上には、溶原化に関する遺伝子群 (integrase、repressor および anti-repressor) が存在していた。

(10) メバル複合種群における種間交雑

戸田慎平、阪本憲司、南 卓志

平成 26 年度日本水産学会秋季大会 (福岡)、講演要旨集、p. 29 (2014-9)

【目的】 従来 1 種とされてきたメバルは、Kai & Nakabou (2008) により *Sebastes inermis* (所謂アカメバル)、*S. ventricosus* (所謂クロメバル) 及び *S. cheni* (所謂シロメバル) の 3 種に分類された。しかし、これら 3 種には同所的な生息や繁殖時期の重なりも見られる。また、種判別の指標の一つとされている胸鰭軟条数では同一個体において左右差が見られることもあり、形態形質による種判別が困難である個体も存在している。このことから、これら 3 種における種間交雑の可能性が示唆される。そこで本研究では、これら 3 種の飼育下における自然交配と人工授精による種間交雑を試みた。

【方法】 広島県の因島および呉市音戸町周辺海域において雄親魚を 2013 年 5 月から同年 10 月、雌親魚を同年 5 月から 9 月までに採集し、10 月から雄雌を隔離飼育した全長 15cm 以上の個体を用いた。種判別は、体色と胸鰭軟条数によった。自然交配実験では、屋外に設けた 1t 掛け流し水槽を 3 面使用した。各水槽に 1 種の雌

を2個体と、3種の雄をそれぞれ1個体ずつ収容した。各水槽の中央に水槽底面から水面におよぶネットを張って雌雄を隔離した。29日後、隔離ネットを除去して観察を行なった。一方、人工授精実験には、腹部の膨らみが顕著な雌を用いた。また、雄は生殖突起が顕著に見られるものを用いた。開腹し精巢を取り出した後、シリンジで尿を採取した。精巢を解剖メスで刻んで尿と混合し、マイクロピペットを用いて混合液4 $\mu$ lを雌の生殖腔から7mmの辺りに注入した。雌親魚にタグを付け、個体識別が可能な状態で経過を観察した。なお、クロメバルは雌を採集できなかったため、雄のみとした。

【結果】自然交配実験の結果、隔離ネットを撤去した直後からアカメバルの雄のアカメバルの雌への求愛行動が観察された。しかし、交接行動は観察されなかった。また、他の組み合わせにおいては、求愛行動は観察されなかった。一方、人工授精実験の結果、シロメバルの同種間及びアカメバルの雌とシロメバルの雄との異種間において受精が確認され、産仔と仔魚の遊泳が確認された。

(11) 紅藻スサビノリのユビキチンカスケードに関与する遺伝子の解析

吉田拓音、山岸幸正、三輪泰彦

平成26年度日本水産学会秋季大会（福岡）、講演要旨集、p.124（2014-9）

【目的】タンパク質のユビキチン化はプロテアソームによる選択的タンパク質分解の目印として機能するだけでなく、細胞周期やシグナル伝達、DNA修復などさまざまな生命現象の制御にも関与している。我々はユビキチンカスケードによるタンパク質分解がスサビノリのリン欠乏応答に関わっていると考え、ユビキチンカスケードに関与する遺伝子の解析を行った。

【方法】サブトラクション法およびリン欠乏状態の葉状体から作製したcDNAライブラリーからユビキチン (*UB-1603*)、ユビキチン活性化酵素 E1、ユビキチンリガーゼ E3 (*UBL-1706*) と相同性のある EST クローンが単離されている。3'RACE法および5'RACE法により、cDNAクローニングを行った。pCol1d1発現ベクターによる大腸菌内での発現誘導実験を行った。発現された *UB-1603* および *UBL-1706* の遺伝子産物をそれぞれ精製し、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作製した。リン欠乏条件下の葉状体におけるユビキチン、ユビキチンリガーゼ遺伝子の発現をウエスタンブロット (WB) 法により解析した。

【結果】スサビノリのユビキチン、E1、E3の各遺伝子の塩基配列を決定した。抗ユビキチン抗体でWBの結果、構成的に合成される約9kDaの遊離のユビキチンタンパク質とリン欠乏によって誘導合成され、ユビキチン化されたと考えられるタンパク質 (約54kDa、65.5kDa、77kDa、100kDa) がそれぞれ検出された。抗 *UBL-1706* 抗体では予想される約20kDaの *UBL-1706* 遺伝子産物が検出され、その他にも約55kDaと63kDaの抗 *UBL-1706* 抗体と反応するタンパク質が検出された。*UBL-1706* の推定アミノ酸配列からタンパク質のドメイン検索を行った結果、

UBL-1706 遺伝子産物は RING 型 E3、SCF 複合体のアダプタータンパク質、Skp1 であることが推定された。Skp1 はさらにレセプタータンパク質である F-Box タンパク質と結合し、F-box タンパク質は標的分子と結合する。現在、スサビノリ EST ライブラリーから F-box タンパク質の遺伝子をスクリーニングしているところである。

(12) Vaccine development for atypical *Edwardsiella tarda* infection in red seabream *Pagrus major*

Indah Istiqomah, Yasuhiko Kawato, Emi Sugaya, Hirofumi Yamashita, and Toshihiro Nakai

9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, (Ho Chi Minh City, Vietnam), Abstracts, p. 146 (2014–11)

Atypical *Edwardsiella tarda*, a non-motile phenotype, is the causative agent of edwardsiellosis in cultured Red Sea bream (*Pagrus major*). The disease redominantly occurs in summer and fall seasons in Japan, causing severe losses in aquaculture. We investigated the efficacy of a formalin-inactivated atypical *E. tarda* vaccine in Red Sea bream, as a means to control the disease. LD<sub>50</sub> of the *E. tarda* strain used for vaccine preparation in Red Sea bream juveniles by intraperitoneal (IP) injection was approximately 10<sup>6</sup> cfu/fish. A single IP-injection of the vaccine (10<sup>8</sup> cells/fish) to Red Sea bream juveniles induced high antibody production at 3 weeks post-vaccination. High levels of protection was achieved by the vaccination, with RPS values greater than 60% when fish were IP challenged with the homologous strain. Reproducibility of the results was confirmed by 3 independent experiments. The protection conferred by the vaccine lasted at least up to 4 months post vaccination. This vaccine induced no apparent abnormalities in fish, with good growth recorded at 10-times dose rates. During challenge with atypical *E. tarda*, the numbers of the bacteria in blood, spleen and liver were lower in vaccinated fish compared to control fish. Studies using normal and immune sera of Red Sea bream revealed that atypical *E. tarda* strains were highly resistant to the serum complement-killing involving both classical and alternative pathways. Macrophage phagocytic and killing activities against atypical *E. tarda* were not significantly different between vaccinated and unvaccinated fish. This study demonstrates the effectiveness of an inactivated vaccine against Red Sea bream edwardsiellosis, although clearance mechanism for *E. tarda* in vaccinated fish remains unknown.

(13) Bacteriophages as an indicator for prediction of bacterial disease

occurrence in aquaculture

Takuto Tamada, Indah Istiqomah, Hirofumi Yamashita, Yasuhiko Kawato, Emi Sugaya, Shintaro Urasaki, Kohei Ohta and Toshihiro Nakai

9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, (Ho Chi Minh City, Vietnam), Abstracts, p. 251 (2014-11)

It is generally difficult to isolate/detect fish-pathogenic bacteria from fish culture environments by conventional culture techniques or even molecular ones, mainly due to their few numbers if present. Bacteriophages exhibit strong specificity to host bacteria and appear abundantly in natural environments after bacterial cell destruction, and thus phages are expected to be a good indicator for the presence of specific pathogen in fish culture environments that will lead to the prediction of disease occurrence. In order to search this possibility, we examined a relationship between appearance of specific phages in fish-rearing seawater and progress of the disease in cultured fish. The present study targeted atypical *Edwardsiella tarda* infection (edwardsiellosis) in red seabream *Pagrus major*. The study was conducted at Ehime Prefectural Fisheries Research Center (EPFRC) and two aquaculture grounds (A, B) in Ehime Prefecture, Japan, in 2012-2013. *E. tarda* phages were isolated from seawater using an enrichment culture method followed by a double-agar-layer method. In a net pen culture of EPFRC, *E. tarda* phages were first isolated ( $10^1$  pfu/L) in August and increased in the number ( $10^{2-3}$  pfu/L) in September and October when fish mortality due to edwardsiellosis was recorded, and decreased in the number ( $10^1$  pfu/L) with cessation of the disease. In both aquaculture grounds, edwardsiellosis prevailed intensively from August to September, and the phages were first detected in April (A) and June (B) at  $10^2$  pfu/L and  $10^3$  pfu/L, respectively. The highest concentration of phage reached  $10^4$  pfu/L in August and then slowly decreased. Most of the *E. tarda* isolates from diseased fish during the survey were susceptible to the phage isolates, suggesting that the phages were originated from disease causing *E. tarda* cells. The present results suggest that *E. tarda* specific phages are useful as an indicator for prediction of the initial occurrence, peak, or cessation of edwardsiellosis in red seabream culture.

- (14) 植物油添加ホルマリン不活化ノカルジア菌体を接種したヒラメの腹腔内浸出細胞の殺菌活性

加藤 典、河原栄二郎

平成26年度日本水産学会中国・四国支部例会（南国）、講演要旨集、p. 3 (2014-11)



- (15) アジュバント添加*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*ホルマリン不活化菌体に対するヒラメの免疫応答  
山口晋作、河原栄二郎  
平成 26 年度日本水産学会中国・四国支部例会（南国）、講演要旨集、p. 3（2014-11）
- (16) 愛媛県大三島および大島におけるメバル複合種群の遺伝的集団構造  
奥谷健太、阪本憲司、南 卓志  
平成 26 年度日本水産学会中国・四国支部例会（南国）、講演要旨集、p. 6（2014-11）
- (17) ガンテンイシヨウジ仔魚の飼育条件の検討  
水上雅晴、松本卓也  
平成 26 年度日本水産学会中国・四国支部例会（南国）、講演要旨集、p. 6（2014-11）
- (18) 福山市松永湾におけるトビハゼ個体数の季節変動  
横山勇一、阪本憲司、南 卓志  
平成26年度日本水産学会中国・四国支部例会（南国）、講演要旨集、p. 7（2014-11）

## C. 著書

## D. その他

- (1) 加速度センサーを利用した動物の行動計測システムの開発  
渡辺伸一  
第 28 回バイオテクノロジー研究成果発表会（広島）、講演要旨集、p. 2（2014-1）
- (2) 支部のページ、平成 25 年度日本水産学会中国・四国支部例会  
水上雅晴  
日本水産学会誌、80、389-390（2014）
- (3) 新たなブリ養殖の方向性 赤潮被害軽減から高付加価値種苗へ  
有瀧 真人  
月刊アクアネット、17、40-44（2014）
- (4) 瀬戸内海唯一の繁殖地である上関町宇和島のオオミズナギドリの繁殖生態

渡辺伸一

国際シンポジウム カンムリウミスズメと上関の生物多様性(山口、京都、東京)、  
講演要旨集、p.8-9 (2014-8)

- (5) Breeding ecology of the Streaked Shearwater (*Galonectris leucomelas*) in Seto-Inland sea, Japan.

Shinichi Watanabe

The RTD: Biodiversity and the rare Japanese Murrelet at Kaminoseki: "The Sea of Miracles" and Kaminoseki nuclear power plant planning in the 26th International Ornithological Congress (Tokyo), Abstracts, p.11 (2014-8)

- (6) ランチュウ病魚由来細菌の性状と病原性

河原栄二郎

平成 26 年度瀬戸内海・四国ブロック魚病検討会 (高知)、(2014-9)

- (7) 水産用イソジン液の *Cryptocaryon irritans* に対する殺虫効果および飼育生物に対する毒性

水上雅晴

平成 26 年度瀬戸内海・四国ブロック魚病検討会 (高知)、(2014-9)

- (8) 食の安全とHACCPについて

倉掛昌裕

平成 26 年度食品衛生講演会 (福山)、(2014-10)