

平成26年度 鹿児島大学大学院連合農学研究科

先進的研究推進事業報告書

鹿児島大学大学院連合農学研究科

平成27年6月30日

## 平成 26 年度鹿児島大学大学院連合農学研究科

### 先進的研究推進事業報告書

#### 【事業一覧】

1. 「アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための環境修復技術開発及び人材の育成」
2. 「フィールドにおける高度農学研究のための飛行型 3 次元（3D）ICT プラットフォームの開発」
3. 「焼酎・泡盛もろみに生息する野生酵母と乳酸菌の同定と特性解明」
4. 「効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立にむけた経営と技術の学融的実証研究」
5. 「昆虫工場（難生産性有用タンパク質生産システム）を用いた生体防御関連タンパク質の生産」
6. 「水圏環境化学物質に対するヒトおよび魚類の細胞応答」

## 目 次

はじめに	大学院連合農学研究科長 杉元 康志	1
【1】「アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための 環境修復技術開発及び人材の育成」		2
1. 研究課題名		
2. 研究組織と役割分担		
3. 研究内容		
3-1 研究目的		
3-2 研究の成果		
【環境汚染調査修復グループ】		
【循環型農業技術開発グループ】		
【農業経営評価及び人材育成グループ】		
【国際シンポジウム】の開催		
3-3 研究の総括と今後の課題・展望		
4. 支援金額の執行内訳		
5. 資料等		
【2】「フィールドにおける高度農学研究のための 飛行型3次元（3D）ICTプラットフォームの開発」		19
1. 研究の目的と概要		
2. 研究の成果		
(1) 3D-ICT 農業研究高度化のためのプラットフォームの構築		
(2) 3D-ICT 農業研究：3D モニタリング・光センシング		
(3) 小型無人ヘリへの道のり		
(4) 海外研究における 3D-ICT 農業技術の利用		
(5) 3D-ICT 農業の一形態としての植物工場		
3. 研究の総括と今後の課題・展望		
4. 支援金額の執行内訳		
5. 資料等なし		
【3】「焼酎・泡盛もろみに生息する野生酵母と乳酸菌の同定と特性解明」		31
1. 研究の目的と概要		
2. 研究の成果		
2.1 焼酎もろみ中の野生酵母の起源の解明とその菌数変化		
2.2 焼酎もろみ中の野生酵母の起源の解明とその菌数変化		
2.3 麴・差し酏・もろみからの乳酸菌のスクリーニング及び、焼酎もろみ中の乳酸菌の 起源の解明とその菌数変化		
2.4 泡盛もろみ中の乳酸菌のスクリーニング及び、もろみ中の乳酸菌の特性解明		

3. 研究の総括と今後の課題・展望
4. 支援金額の執行内訳
5. 資料等なし

【4】「効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立にむけた経営と技術の学融的実証研究」・・・56

1. 研究の目的と概要
2. 研究の成果
  - 課題1：小規模水槽を用いた種苗生産技術の開発
  - 課題2：仔魚期の生残率改善
  - 課題3：育成中の生残率改善
  - 課題4：餌料効率の改善
  - 課題5：経営コスト削減の検証
  - 課題6：漁業者ネットワーク構築にむけた基礎的情報の収集
  - 課題7：高付加価値販売に向けた課題分析
3. 研究の総括と今後の課題・展望
4. 支援金額の執行内訳
5. 資料等

【5】「昆虫工場（難生産性有用タンパク質生産システム）を用いた生態防御関連タンパク質の生産」・・・75

1. 研究の目的と概要
2. 研究の成果
  - ①各種生体防御関連タンパク質のカイコ発現用分子構築
  - ②昆虫工場を用いた各種タンパク質の発現
  - ③昆虫工場で発現された各種タンパク質の精製、生化学的および機能性解析
3. 研究の総括と今後の課題・展望
4. 支援金額の執行内訳
5. 資料等なし

【6】「水圏環境化学物質に対するヒトおよび魚類の細胞応答」・・・85

1. 研究の目的と概要
2. 研究の成果
  - ①検討項目1:水圏環境化学物質の培養細胞および魚卵に対する毒性
  - ②検討項目2:水圏環境化学物質により誘導される魚類薬物代謝酵素群
  - ③検討項目3:ニホンウナギの新規緑色蛍光タンパク質 UnaG 発現細胞の酸化ストレス応答
3. 研究の総括と今後の課題・展望
4. 支援金額の執行内訳
5. 資料等

## はじめに

大学院連合農学研究科長

杉 元 康 志

鹿児島大学大学院連合農学研究科では、平成26年度に先進的研究事業を推進するために研究科長裁量経費の一部を研究支援費に充てて募集を行いました。本研究事業に応募頂きました先生方に深く感謝申し上げます。

その結果、申請研究13件の応募があり、慎重な審査により佐賀大学から1件、琉球大学から2件、鹿児島大学（農）から1件、鹿児島大学（水産）から2件の計6件の事業を採択しました。また、研究分野は生物生産科学系1件、応用生命科学系3件、農水圏資源環境系2件とそれぞれの分野で先進的な研究事業と思われるものを選び、総額2,000万円の事業となりました。

研究内容は「アジア環太平洋地域における農業生産環境の開発・整備と人材養成」、「高度農業システム飛行型3次元ICTプラットフォームの開発」、「有用タンパク質の生産を目指した昆虫工場の創設」、「焼酎製造に関わる野生酵母・乳酸菌の役割」、「効率的クロマグロ養殖経営と技術の基盤研究」、「ヒトと魚類の水圏環境化学物質の免疫応答」に関する研究であり、農水産学にとって欠かせない課題に取り組んだものになりました。

事業決定後から8ヶ月程の研究期間しかなく大変研究遂行が難しかったと思われませんが、提出された報告者を見ますとそれぞれ多くの成果を上げられており、本研究推進事業は順調に進んだと判断できます。今後、これらの研究が益々発展して、連合農学研究科の柱となって外部資金の獲得に繋がっていくことや連大生の人材養成に大いに貢献することを期待しております。

連大の優れた研究成果を世界に発信するという使命を元に本研究事業を始めたわけですが、今後ともこのような先進的研究事業に支援を行い、連大の評価を上げることは勿論ですが、先生方の財産となるように活用して頂くことを願っております。

予算削減の中、平成27年度も同様の支援を継続することにしていきますので、先生方からの多くの申請を期待しております。

平成 26 年度 連合農学研究科先進的研究推進事業

アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための  
環境修復技術開発及び人材の育成

研究代表者 佐賀大学農学部・教授・長 裕幸

2015年3月

## 1. 研究課題名

アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための環境修復技術開発及び人材の育成

## 2. 研究組織と役割分担

### 研究構成メンバー

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	長裕幸・教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	企画と取りまとめ
分担者	白武治義・教授	佐賀大学・生物生産科学	農業経営評価担当
	稲岡司・教授	佐賀大学・生物生産科学	農業経営評価担当
	田中宗浩・教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	循環型農業技術開発担当
	鄭紹輝・教授	佐賀大学・生物生産科学	循環型農業技術開発担当
	上埜喜八・准教授	佐賀大学・生物生産科学	循環型農業技術開発担当
	原口智和・准教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	環境汚染調査及び修復担当
	徳田誠・准教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	循環型農業技術開発担当
	宮本英揮・准教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	環境汚染調査及び修復担当
	辻一成・准教授	佐賀大学・農学部	農業経営評価担当

## 3. 研究内容

### 3-1 研究目的

アジア環太平洋地域では、急速な経済発展に伴い、塩害、水害、生活汚染、過耕作などによる環境汚染や農地の疲弊が深刻な問題が地域の農業生産の妨げになっており、地域内の国際的連携と技術協力による解決策が待たれている。一方、国内では安い輸入農産物が市場に入ってくることにより、国内農業は衰退している状況下では、アジア諸国との連携により、遺伝資源の共同開発利用、農業技術の輸出など国内農業の活性化にもつながると考えられる。佐賀大学環黄海環境修復研究グループでは、これまで中国における塩害畑地圃場の土壌塩類蓄積現状調査、アイスプラントを用いた汚染土壌の除塩処理、新型野菜バラフの開発、畜産廃棄物由来の液肥利用技術の展開、インドネシアにおける沿岸マングローブ林の生産性評価システムの構築、ベトナムメコンデルタ地域の水田保全調査な

ど多くの研究プロジェクトを実施してきた実績を有している。本研究プロジェクトは、申請者らのこれまでの経験と技術をもとに、地域各国の農業関連研究機関との連携により、アジア環太平洋沿岸地域の農業生産を阻害する環境問題を調査・整理し、各地域の気候・風土・文化に適合した、長期的持続可能な環境修復技術を提案し、日本を含むアジア太平洋沿岸地域全体の農業活性化を図る目的で実施した。

### 3-2 研究の成果（研究の役割分担者ごとに記載）

本研究プロジェクトは、アジア環太平洋地域の持続的農業生産のための環境修復及び人材育成を行い、地域の農業及び農業関連産業の振興を目指すため、以下の3つのグループに分けて研究を実施した。また、2015年3月には、インドネシア及びベトナムにおける農業開発と環境保全に関する国際シンポジウムを開催した。

#### 【環境汚染調査修復グループ】（担当者：長教授、原口准教授、宮本准教授）

これまでに中国西北部で実施してきた塩類集積土壌調査経験を活用し、日本の沿岸農地を含む環太平洋各国の環境被害の実態を明らかにするとともに、農学的なバイオレメディエーション手法を駆使して最終的に各地域に適した長期的持続可能な環境修復技術の提案を行うため、耐塩性・塩分吸収作物栽培下における土壌中の水分・塩分の同時移動シミュレーションを行い、各国の気象条件、土壌条件に適した栽培方法、栽培条件の開発を目指して、現地での実証栽培実験を実施し、結果の検証と実用的方法の提案及びデータベースの構築を行った。

#### 平成26年度の主な研究成果

作物栽培下における土壌中の水分・塩分の同時移動シミュレーションのモデル構築のため、ミニトマトの塩水灌漑栽培条件下において、TDTセンサーを利用した土壌水分・塩分モニタリングおよび下方浸透水（土壌水）のEC、pH、各種イオン濃度の測定を行い、これらの時間変動特性を明らかにした。次に、中国の畑地圃場において、作物栽培がNa<sup>+</sup>の作土層への集積の進行に及ぼす影響を明らかにするために、ヒマワリ、ビート、コムギ、トウモロコシの栽培を実施し、土壌、植物体におけるNa<sup>+</sup>集積量の経時変化を調べた。その結果、栽培期間終了時の土壌のNa<sup>+</sup>集積量は、植物体のNa<sup>+</sup>吸収量が大きいビートよりも、ヒマワリやコムギの方が低い値を示した。

また、重粘土の水分・間隙比構造の新たな測定法として時間領域透過法を提案し、誘電分散を示す重粘土の水分計測法として、センサー感知部を被覆した時間領域透過法(TDT)センサーの適用を提案し、その有効性について実験的に検討した。SDI-12プロトコルに対応した新しい土壌水分・電気伝導度センサーとして脚光を浴びるSDI-12型TDTセンサーの性能を実験的に評価し、その感度・適用限界などを明らかにした。

東日本大震災津波被災農地土壌の除塩を効率的に行うための基礎データを得るために、高動水勾配条件下で透水特性を測定可能な特殊チャンバーを開発し、塩分リーチング実験を通じてその有効性を明らかにした。

これらの成果は、アジア沿岸地域の環境保全・修復に応用できるものと期待される。

主な研究論文（下線はプロジェクト担当者）

M.Mojid, H.Cho, H.Miyamoto, 2015

Estimating some properties of unconsolidated sand clay from spectral-Induced polarization.

Soil Science and Plant nutrition, submitted

D.Yasutake, M.Mori, M. Kitano, R. Nomiya, Y. Miyoshi, D. Hisaeda, H. Cho, K Tagawa, Y. Wu, W. Wang, 2015

Night-time leaf wetting process and its effect on the morning humidity gradient as a driving force of transpirational water loss in a semi-arid cornfield.

Biologia, submitted

上村将彰, 宮本英揮 2014

見かけの誘電率および電気伝導度計測法としての SDI-12 型時間領域透過法(TDT)センサーの性能評価  
佐賀大学農学部彙報, 100: 43 - 53.

学会発表（下線はプロジェクト担当者）

田川堅太, 長裕幸, 北野雅治, 王維真 2014

中国塩類化圃場における作物と作土層への Na<sup>+</sup>集積

土壌物理学会大会, 宮城大学

永野一輝, 徳本家康, 千葉克己, 長裕幸 2014

TDT センサーによる高水分・高塩分測定の評価 -津波被災農地への適用と課題-

土壌物理学会大会, 宮城大学

M. Kitano, D. Yasutake, M.Nonoshita, S. Yoshizawa, Y. Miyoshi, M. Mori, H. Cho, K. Tagawa, Y. Wu, W. Wang, 2015

Air irrigation effects of leaf wetting on crop water relations and photosynthesis I. A hypothesis of air irrigation effects

International symposium of agricultural meteorology 2015. つくば市

D. Yasutake, M. Kitano, M.Nonoshita, S. Yoshizawa, Y. Miyoshi, M. Mori, H. Cho, K. Tagawa, Y. Wu, W. Wang, 2015

Air irrigation effects of leaf wetting on crop water relations and photosynthesis II. Nighttime leaf wetting and morning humidity gradient.

International symposium of agricultural meteorology 2015. つくば市

原口智和・宗達也 2015

ミニトマトの塩水灌漑栽培における土壌及び排水の塩分変化

平成 27 年度農業農村工学会全国大会

Masaaki Uemura, Hideki Miyamoto, Markus Tuller, 2014

Application of Time Domain Transmissiometry for Measurement of Moisture Content and Void Ratio in a Heavy Paddy Clay Soil

ASA meeting, Long Beach, 2014. 11.

Masaaki Uemura, Hideki Miyamoto, Markus Tuller, Ty P.A. Ferre, 2014

Application of Coated Time Domain Transmission (TDT) Sensors for Measurement of Moisture Content in Dielectrically Lossy Clay Slurries,

ASA meeting, Long Beach, 2014. 11.

Yuta Hirashima, Hideki Miyamoto, Markus Tuller, Ty P.A. Ferre, 2014

Time Domain Transmissiometry for Measurement of Soil Moisture and Bulk Electrical Conductivity

ASA meeting, Long Beach, 2014. 11.

上村将彰, 宮本英揮, 登尾浩助 2014

土壌水分計測法としての TDR と TDT の比較

土壌物理学学会, 仙台市, 2014. 10.

上村将彰, Ty P. A. Ferre, Markus Tuller, 畑本珠実, 宮本英揮 2014

粘土スラリーの含水比計測に対する被覆型 TDT センサーの適用

土壌物理学学会, 仙台市, 2014. 10.

高木恭平, 田口明伸, 宮本英揮 2014

NaCl 溶液の飽和浸透に伴うベントナイトの透水性変化

土壌物理学学会, 仙台市, 2014. 10.

吉田莉恵, 渡邊真子, 平嶋雄太, 宮本英揮 2014

重粘土水田における土壌水分モニタリング

土壌物理学学会, 仙台市, 2014. 10.

平嶋雄太, 松本 薫, 上村将彰, Ty P. A. Ferre, Markus Tuller, 宮本英揮 2014

デジタル TDT センサーを用いた不飽和土壌の電気伝導度計測

土壌物理学学会, 仙台市, 2014. 10.

【循環型農業技術開発グループ】（担当者：鄭教授、田中教授、上埜准教授、徳田准教授）

沿岸地域環境に適する新しい植物資源の開発利用、耐塩性植物の吸塩メカニズムの解明、有機廃棄物の農業利用技術の確立、保全型作物栽培様式の開発、病虫害の総合的防除技術の確立に関する研究を行うと同時に、中国、韓国、インドネシア、ベトナムなどの海外機関と連携し、土壌劣化が深刻な農業地域でモデル実験を行い、循環型農業生産システムの開発普及を図った。また、現地で発生する有機物を資源として活用するための技術開発に関する研究を進め、各地の状況に合致した資源循環システムの構築支援のあり方を検討した。

#### 平成 26 年度の主な成果

有機廃棄物の農業利用技術の確立を目指して、メタン発酵消化液を使用した養液栽培を検討し、消化液と無機培地を使用した栽培に成功した。この成果を、農業食料工学会において有機廃棄物由来の液体肥料利用技術についての3課題を発表した。このメタン発酵消化液の有効利用開発目的で、福岡県みやま市と協力をして、液肥散布技術の有効性を確認するための現場実証試験を実施し、液肥は慣行法より短時間で低労働負荷の散布が可能であることを確認した。このような技術をアジア地域全体での普及を図るため、現在中国とベトナムでモデル事業展開を準備している。その関連事業として JICA 草の根技術協力事業（地域活性化特別枠）による「都市し尿のバイオマス液肥化による環境改善ならびに農家支援事業」もスタートさせた。

アジア諸国では、古くからダイズ食品を多く摂取しているが、ダイズ生産は少なくアジア全域で輸入に頼っている。その原因は、アジア地域でのダイズ単収が低く、品種改良や効率的な作付け体系の開発が望まれている。この状況を改善するために、低緯度（短日条件）に適するダイズ品種のスクリーニングや、ダイズ収量性向上のための窒素追肥条件の検討を行った。また、ベトナム及びインドネシアにおける稲作地域にイネとダイズの輪作体系導入の検討も入っており、国際シンポジウムでは有益な情報交換を行い、次年度の現地試験に向けて準備を進めている。

さらに、熱帯地域に多発の病虫害問題についても、アジア地域でイネ科作物の重要害虫となっている相変異を示すバッタ類やフタテンチビヨコバイの防除手段を検討し、オオムギに含まれるトノサマバッタ摂食阻害物質の性状を明らかにするとともに、フタテンチビヨコバイによる萎縮症と虫えい形成に関与するイネ遺伝子を絞り込んだ。

研究論文（下線はプロジェクト担当者）

X. Zhao, S.H. Zheng, Fatichin, A. Suzuki, S. Arima, 2014

Varietal difference in nitrogen redistribution from leaves and its contribution to seed yield in soybean

Plant Production Science, 17: 103-108

X. Zhao, S.H. Zheng, S. Arima, 2014

Influence of nitrogen enrichment on leaf nitrogen accumulation and seed yield during reproductive growth stage in soybean

Plant Production Science, 17: 209-217

西澤優、仲村一郎、モハメド アムザド ホサイン、赤嶺光、鄭紹輝 2015

塩ストレス下における野生稲 *Oryza officinalis* Wall ex Watt の乾物生産および光合成能力

日本作物学会紀事 84 : 49-55

Kumashiro, S., Ogawa, R., Matsukura, K., Matsumura, M. and Tokuda, M. (2014)

Occurrence of *Cicadulina bipunctata* (Hemiptera: Cicadellidae) in southwestern Shikoku, Japan and comparisons of gall-inducing ability between Kyushu and Shikoku populations.

Appl. Entomol. Zool. 49: 325-330.

Fujii, T., Matsuo, K., Abe, Y., Yukawa, J. and Tokuda, M. (2014)

An endoparasitoid avoids hyperparasitism by manipulating immobile host herbivore to modify plant morphology

PLoS ONE 9: e102508.

徳田 誠・望岡佑佳里・小西令子・湯川淳一 (2014)

マテバシイタマバエの福岡県における採集記録

PULEX (93): 641-642.

安達修平・徳田 誠 (2014)

九州におけるヨモギツブセンチュウ *Subanguina moxae* の確認記録

PULEX (93): 642-643.

塩見宜久・大橋英純・徳田 誠 (2015)

クスノキ精油のカ類に対する忌避効果

佐賀大学農学部彙報(100): 27-31.

Yamawo, A., Tokuda, M., Katayama, N., Yahara, T. and Tagawa, J. 2015

nt-attendance in the extrafloral nectar-bearing plant, *Mallotus japonicus*, favours growth by lowering the expression of high-cost, direct defence.

Evol. Biol. (in press)

Kim, W., Tokuda, M. and Yukawa, J. 2015

Cecidomyiid galls found on Tsushima, a stepping stone island between the Korean Peninsula and Kyushu, Japan.

Makunagi

Acta Dipterologica(in press)

Pan, L. Y., Chiang, T. C., Weng, Y. C., Chen, W. N., Hsiao, S. C., Tokuda, M., Tsai, C. L. and Yang, M. M. 2015

Taxonomy and biology of a new ambrosia gall midge *Daphnephila urmicola* sp. nov. (Diptera: Cecidomyiidae) inducing urn-shaped leaf galls on two species of *Machilus* (Lauraceae) in Taiwan.

Zootaxa(in press)

学会発表（下線はプロジェクト担当者）

田中 宗浩, 高山 洸翔, 王 鵬, 太田 美加 2014

九州における地域資源 6 次産業化技術—大分県日田市及び熊本県山鹿市におけるメタン発酵消化液の肥培かんがい利用—

農業食料工学会 2014 年次大会

田中 宗浩, 高山 洸翔, 王 鵬, 太田 美加 2014

九州における地域資源 6 次産業化技術—メタン発酵消化液の畑地利用—

農業食料工学会 2014 年次大会

石垣当貴, 石垣克治, 岩下幸司, 田中宗浩 2014

石垣島バイオマスの活用と 6 次産業化の戦略—農林水産業からの新たな地域づくりと産業の創出—

農業食料工学会 2014 年次大会

Elsayed, A. K. and Tokuda, M. (2014)

Taxonomic position of a gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) infesting *Suaeda vermiculata* in Alexandria, Egypt.

8th International Congress of Dipterology, Germany. [Poster] (p. 91)

Tokuda, M. and Yukawa, J. (2014)

Taxonomic study of the subtribe Schizomyiina (Diptera: Cecidomyiidae: Asphondyliini) in the eastern Palaearctic

Region. 8th International Congress of Dipterology, Germany. [Oral] (p. 372)

徳田 誠 (2014)

[特別講演] 植物昆虫間相互作用の一側面:昆虫による虫えい形成のメカニズムと適応的意義.

植物微生物研究会第 24 回研究交流会.

徳田 誠・甲斐進也・神代 瞬・塩見宜久・松永紀代子・行徳直久 (2014)

冬に見られるクロキの奇形花はヒゲブトトガリキジラミの吸汁により咲く虫えいである

昆虫学会 (講演要旨) 74: 59.

白濱祥平・山尾 僚・徳田 誠 (2014)

オオイヌタデのトリコームのハムシ類に対する防御効果

昆虫学会（講演要旨）74: 59.

金 旺奎・南 常雄・徳田 誠・松尾和典・湯川淳一（2014）

日本と韓国におけるセリミタマバエ *Kiefferia pericarpicola*（ハエ目：タマバエ科）の発見と寄主範囲および生活史.

昆虫学会（講演要旨）74: 61.

藤井智久・松尾和典・湯川淳一・桐谷圭治・阿部芳久・徳田 誠（2014）

環境要因および虫えいの形質がイヌツゲタマバエ（ハエ目：タマバエ科）の寄生蜂群集に及ぼす影響

昆虫学会（講演要旨）74: 62.

小西令子・上野大介・田中誠二・川浦香奈子・徳田 誠（2014）

オオムギ品種間におけるトノサマバッタ摂食阻害活性の比較および摂食阻害物質の探索

昆虫学会（講演要旨）74: 68.

安達修平・白濱祥平・徳田 誠（2014）

標高の異なる地点におけるセイタカアワダチソウヒゲナガアブラムシの発消長

昆虫学会（講演要旨）74: 71.

松尾和典・徳田 誠・安田慶次・上地奈美・湯川淳一（2014）

デイゴヒメコバチの生物的防除資材、*Eurytoma erythrinae*（ハチ目：カタビロコバチ科）の寄主範囲の検討  
第24回天敵利用研究会福岡大会プログラム 3.

甲斐進也・神代 瞬・安達修平・鈴木義人・塩見宜久・徳田 誠（2014）

ヒゲブトトガリキジラミの生活史および虫えい形成機構

日本昆虫学会九州支部第 62 回大会（講演要旨 PULEX No. 93: 628）

那須翔太・今坂正一・鈴木邦雄・保科英人・菅野紘男・須山知香・徳田 誠（2014）

イチゴハムシの翅多形の地理的分布と遺伝様式

日本昆虫学会九州支部第 62 回大会（講演要旨 PULEX No. 93: 629）

松尾忠彦・田中弘毅・徳田 誠（2014）

半寄生性アリ散布植物ママコナの種子散布アリおよび周辺植生が生育に及ぼす影響

日本昆虫学会九州支部第 62 回大会（講演要旨 PULEX No. 93: 630）

望岡佑佳里・大橋英純・小西令子・安達修平・木下智章・徳田 誠（2014）

ムラサキツバメとムラサキシジミの産卵戦略

日本昆虫学会九州支部第 62 回大会（講演要旨 PULEX No. 93: 631）

本間智己・安達修平・八坂亮祐・大島一里・徳田 誠 (2015)

カブモザイクウイルス感染および非感染カブにおける2種のアブラムシの増殖特性の比較

第89回九病虫

徳田 誠・中嶋ひかる・木下智章・副島和則・安田雅俊 (2015)

多良山系および背振山系東部の佐賀県側におけるヤマネの分布状況

第22回佐自研

田中弘毅・徳田 誠 (2015)

可愛い子にはどれだけ旅をさせるか：アリ散布植物2種におけるパートナー選択の適応意義

生態学会

神代 瞬・安井 秀・松倉啓一郎・松村正哉・徳田 誠 (2015)

昆虫によるゴール形成に関連するイネ遺伝子領域の網羅的な探索

応動昆 59: 139.

安達修平・本間智己・八坂亮祐・大島一里・徳田 誠 (2015)

非永続伝搬型植物病原性ウイルスは、媒介アブラムシの敵か味方か？

応動昆 59: 148.

徳田 誠・松尾和典・湯川淳一・桐谷圭治 (2015)

伊豆諸島の虫えい形成タマバエ相. 応動昆 59: 187.

**【農業経営評価及び人材育成グループ】** (担当者：白武教授、稲岡教授、辻准教授)

環境汚染調査修復グループ及び循環型農業技術開発グループが解明した新規技術の環太平洋諸国での適応可能性について、現地調査を通じて農業経営の側面から生産性や収益性を指標とする経済学的検証を行った。また、新規技術の適用・導入にあたって、現地の農業生産基盤の水準の違いによって生じると想定される技術的課題や農業者の技術習得にかかる能力的課題を明らかにし、それら課題を克服するための地域農業者の組織化、技術普及機関の役割や効果的な技術普及の方法について検討を行った。なお、現地調査やデータ分析は、現地の大学等の研究者と連携して実施した。

**平成26年度の主な成果：**

経済成長の著しいベトナムにおいて、特に2000年代以降の食料・農産物市場の変化を分析した。国内の食料安全保障に危機感を生じ、従前の農業の多角化の推進から「米回帰」ともいえる政策に再転換を図っている。ベトナム

ムでは、米の1人当たり消費量が減少しつつある一方で、肉類や飲料（酒類）の消費量は急激に増加し、食料消費構造が大きく変化している。その背景には国民所得の増加や女性の社会進出に伴う食の高級化や簡便化などを消費者の嗜好の変化がある。

また、「米回帰」の政策のもとで稲作農業の新しい主体形成が推進されていることを分析した。農民にとって米の収益性が低下するなかで、国内に安定した稲作生産を維持するために、米ビジネスに携わる大企業主導による稲作農民の組織化を通じた生産の効率化と販売ルートの確保が政策的に推進されている。そこでは稲作農民の組織の運営管理を効果的にマネジメントする人材の育成が急務になっている。

研究論文（下線はプロジェクト担当者）

辻 一成, 2014年

ベトナムにおける経済成長と食料・農産物市場—食料消費構造変化の分析を中心に—  
農業市場研究 23 : 26-35.

辻 一成, 2014年

ベトナムの食料・農業  
都市と農村をむすぶ 64 : 45-49.

辻 一成, 2015年

大企業の農業参入と大規模稲作モデルの形成 - アンザン植物防疫会社（AGPPS）の事例 -  
アジア研ワールド・トレンド 21 : 10-13.

#### 【国際シンポジウム】の開催（プロジェクト担当者全員）

アジア環太平洋地域の農業環境問題解決のために、アジア各国の研究者との情報交換、技術普及、及び人材育成を図る目的で、平成27年3月17日に、佐賀大学において、環太平洋諸国における農業環境問題とその対策に関する国際シンポジウムを開催した。日本、ベトナム、インドネシア、バングラデシュ、ネパールなどアジア諸国から約50名の研究者が参加した。

本シンポジウムでは、アジアの農業生産環境、とりわけベトナム南部メコンデルタ地域の塩類集積土壌や作付け体系の改善、インドネシアにおいては、海水侵食を防ぐ役割を果たす海岸林としてのマングローブ林の再生問題、開発遅れの農村地域の営農支援問題などを中心に、現地の情報を元に議論を展開した。シンポジウムは本研究プロジェクトの成果をアジア環太平洋地域の環境問題解決に活かせるきっかけになるものと期待できる。

シンポジウム内容：

**International Symposium on  
Current Agricultural Environmental Issues in the Pacific Rim Nations  
and their Countermeasures – II**

(環太平洋諸国における農業環境問題とその対策に関する国際シンポジウム)

**March 17, 2015**

**Venue: Hishinomi Kaikan (Conference Hall of Alumni Association), Saga University**

9:00 – Registration desk open

9:45 – 09:50 Opening Greetings

9:50 – 10:00 Welcome address

**Session 1: Environmental Remediation and Sustainable Agricultural Production in Mekong Delta of Vietnam**

10:00 – 10:30 Dr. Duong Van Nha (An Giang University, Vietnam)

**Prospects and Challenges for Soybean Development in An Giang Province, Vietnam**

10:30 – 11:00 Mr. Pham Bao Loc (Department of science and technology of An Giang province, Vietnam)

**Present State and Future Prediction of Agricultural Production on Salt Accumulation Soil in Mekong Delta, Specifically in An Giang Province**

11:00 – 11:15 Coffee break

11:15 – 11:45 Dr. Nguyen Duy Can (College of Rural Development, Can Tho University, Vietnam)

**Adaptation to Salinity Intrusion: An Economic Assessment of Diversified Farming Systems in Saline Affected Area of Coastal Ben Tre Province of the Mekong Delta, Vietnam**

11:45 – 13:00 Luncheon

**Session 2: Agricultural Development and Environmental Conservation in Indonesia**

13:00 – 13:30 Dr. Eng. Admi Syarif (Research Center, University of Lampung, Indonesia)

**Lampung Province: Opportunity and Challenge**

13:30 – 14:00 Dr. Melya Riniarti (Coastal and Marine Res. Cent., University of Lampung, Indonesia)

**Quantification of Mangrove Ecosystem Productivity as an Environment Services at Mangrove Educational Forest Margasari, East Lampung, Indonesia**

14:00 – 14:30 Dr. Asihing Kustanti (Faculty of Agriculture, University of Lampung, Indonesia)

**Stakeholders Analysis on The Sustainable Mangrove Forest Management of Lampung Mangrove Center – A Case from Indonesia**

14:30 – 15:00 Coffee break

15:00 – 15:30 Dr. Kuntoro Boga Andri (BPTP East Java, Indonesian Agency for Agricultural Research and Development, Indonesia)

**The Empirical Study of On-farm Conservation of Tropical Fruit Trees Diversity for Sustainable Livelihoods and Food Security in Indonesia**

15:30 – 16:00 Dr. Anton Setyo Nugroho (Directorate of Coastal Community Empowerment and Business Development, Ministry of Marine Affairs Fisheries, Indonesia)

**Empowering the Indigenous Fishermen Based on Community Resources Management in Merauke District, Papua Island**

16:00 – 16:30 Dr. Fatichin (Faculty of Agriculture, Jenderal Soedirman University, Indonesia)

**Soybean Production System in Indonesia**

16:30 – 17:00 **General Discussion**

17:00 – 17:10 **Closing address**

なお、本シンポジウムにおける各々の発表の詳細については、末尾に参考資料として添付したプロシーディングズを参照してください。



シンポジウム写真1 代表者による挨拶



シンポジウム写真2 ベトナムからの招待講演



シンポジウム写真3 組織者と招待演者一同

### 3-3 研究の総括と今後の課題・展望（代表者）

#### ・研究の総括

今年度、「アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための環境修復技術開発及び人材の育成」というタイトルで連合農学研究科長裁量経費・先進的研究推進事業の支援を受け、限られた期間ではあったが、最終的に連大の修了生を中心に9名の大学関係者と研究者を集めたシンポジウムを開催し、本研究のタイトルにふさわしいディスカッションと情報の交換を実施し、プロシーディングズにまとめることができたのは大きな成果であったと思われる。

今年度のプロジェクトに至るまでに、本研究グループとしては2011年から2013年まで、「環黄海地域におけるアグリビジネスと環境修復技術の開発を支える人材の育成」を佐賀大学の学長経費プロジェクトで推進し、2013年に中国および韓国の連合農学研究科の修了生を中心にシンポジウムを開催しプロジェクト成果の発表を行った。また、2014年には「環太平洋地域における農業環境問題とその対策」について、連合農学研究科長裁量経費プロジェクトの支援を受け、中国、ベトナム、マレーシアより連合農学研究科の修了生を中心にしたシンポジウムを開催し、修了生・指導教員間の交流と各国における問題点と解決法に関する情報の交換を推進してきた。

「研究の目的」の項でも記載したが、アジア環太平洋沿岸地域では、立地環境的に塩害や水害の自然災害のほか、過度の人口集中や経済開発による環境汚染、及び過耕作による農地の疲弊が地域の農業生産を圧迫している。また、TPPに代表されるような、近年の農業の急速なグローバル化に対応するには、アジア環太平洋地域における食料生産及び農業関連産業の連携と技術協力が望まれている。現在、鹿児島大連合農学研究科で博士号を取得した修了生達の多くは、母国に戻り、農業・環境関連の職業に従事し、指導的立場で中心的な役割を演じている。今後、想定されるアジア環太平洋地域における農業環境問題の解決にあたって、鹿児島大連合農学研究科の母校リーダーシップとしての役割は増大しており、国際的にも高く評価される立場にあると考えられる。そのためにも、修了生との定期的な意見交換の場を設け、機能的な研究者ネットワークを構築していくことは、今後の大きな目標であり、先進的な課題であると思われる。

今回のプロジェクトでは、10名の教員に参加してもらい、「環境汚染調査修復グループ」、「循環型農業技術開発グループ」、「農業経営評価及び人材育成グループ」に分かれ、現地調査に基づき、農業・環境に関する諸問題に関する解決法の研究、連大修了生との交流、ネットワーク構築に向けての修了生の組織化に対して、有効な成果を得ることができたと考える。この報告書に記載している今年度の研究成果は、プロジェクトに参加された各教員の日常的な研究活動の成果を示したものであり、これら個々の研究成果を基盤として、本研究プロジェクト「アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための環境修復技術開発及び人材の育成」という壮大な目標を達成するために、単年度ではあるが、着実なステップを刻むことができたと確信する。

これらの研究活動に対して、鹿児島大連合農学研究科におかれましては、多大なご支援を頂き、プロジェクトを

代表して深く感謝の意を表したいと思います。

・次年度に向けての課題・計画・展望等

今回のプロジェクトで各グループが掲げた以下の課題：

「環境汚染調査修復グループ」各国の気象条件、土壌条件に適した栽培方法、栽培条件の開発を目指すと共に、連大卒業生の研究者ネットを活用し、現地での実証栽培実験を実施し、結果の検証と実用的方法の提案及びデータベースの構築を目指す。

「循環型農業技術開発グループ」土壌劣化が深刻な農業地域でモデル実験を行い、循環型農業生産システムの開発普及を図っていく。また、現地で発生する有機物を資源として活用するための技術開発に関する研究を進め、各地の状況に合致した資源循環システムの構築支援のあり方を検討する。

「農業経営評価及び人材育成グループ」現地の農業生産基盤の水準の違いによって生じると想定される技術的課題や農業者の技術習得にかかる能力的課題を明らかにし、それら課題を克服するための地域農業者の組織化、技術普及機関の役割や効果的な技術普及の方法について検討を行う。

に関しては、未だ道半ばであり、今後の展開が期待される場所である。「アジア環太平洋地域における農業生産と関連産業振興のための環境修復技術開発及び人材の育成」といった、総合的、戦略的な課題は、個々の研究者が独力で解決できる問題ではなく、連合農学研究科が組織的に解決していくべきものであり、連大の存在価値を国際的に高めていく有効な手段であると思われる。しかし、単年度ではその成果は限られており、今後とも、機会ある毎に科研を初め、各プロジェクトへの挑戦を行い、継続的に研究を行っていく予定である。

#### 4 支援金額の執行内訳

項目	金額(円)	内訳等
機器・備品	102,652	GPS
消耗品	2,697,348	シンポジウム開催に係る消耗品および印刷費他
旅費	700,000	中国現地圃場における観測旅費及びアジア環太平洋プロジェクトシンポジウム招聘者への旅費
合計	3,500,000	

#### 5 資料等

##### 5-1 国際シンポジウム要旨集

「フィールドにおける高度農学研究のための  
飛行型 3 次元 (3D) ICT プラットフォームの開発」

研究代表者 琉球大学農学部 上野 正実

2015年 3月

## 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	上野正実・教授	琉球大学・農水圏資源環境科学	総括・飛行プラットフォームの開発
分担者	川満芳信・教授	琉球大学・生物生産科学	作物群落光合成等センシング
	平良英三・助教	琉球大学・農水圏資源環境科学	光センシングシステムの開発 無人ヘリの運用
	芝 正己・教授	琉球大学・農水圏資源環境科学	森林リモセンにおける利用法の検討
	パムラザフィン ラベ・准教授	琉球大学・農水圏資源環境科学	ハザードリスクマネジメントへの応用の検討
	芝山道郎・教授	鹿児島大学・農水圏資源環境科学	圃場リモセンへの利用の検討
	田中宗浩・教授	佐賀大学・農水圏資源環境科学	分光データの利用の検討
	藪田伸・特任助教	琉球大学農学部・SATREPS	ヤトロファ圃場のセンシング
	上原直子・特任助教	琉球大学農学部	植物工場の研究
	岡田正三・院生	鹿児島連大・農水圏資源環境科学	サトウキビ圃場のセンシング
	富永 淳・院生	鹿児島連大・生物生産科学	植物生理現象のセンシング 圃場プロファイルの検討
	河崎 俊一郎	鹿児島連大・生物生産科学	植物工場の研究
外部協力	岩崎浩一・教授	鹿児島大学・農水圏資源環境科学	GPS 飛行情報の解析のアドバイス
外部協力	岡安崇史・准教授	九州大学・農学研究院	データ収集システム、無人ヘリ導入のアドバイス

# 1 研究の目的と概要

## 1-1 研究の目的

今日および今後の農業生産・食料の安定供給は、地球人口が急速に増大している中であって、極めて重要な課題となりつつあるが、厳しさを増す地球規模の環境問題（温暖化問題・汚染問題など）やエネルギー問題に加えて、農家の高齢化やTPPなどの問題にも効果的に対処する必要がある。これを効果的に推進するには、農林水産業が行われているフィールドの情報を迅速かつ正確に収集・分析して、適切な作業などを適期に実施する必要がある。広大なフィールドから効率的に情報収集を行う手法として、①衛星・航空機リモートセンシング、②フィールドサーバー、③気象ロボット、④モバイルサーバー、⑤モバイル近接センサーなどがあり、その活用に関する研究も進みつつある。①は広域の情報収集に適しているが、天候とりわけ雲の影響を受けやすく、生物生産過程におけるリアルタイムあるいは実用化レベルの情報収集にはまったく不向きで、コスト的にも問題があって使えない。

そこで、本研究では、最近話題になっている小型4翼ヘリコプターを組み合わせた飛行プラットフォームをベースに、各種の光センシングシステム、モバイルサーバー、その他のセンサーを搭載して、0m～数百mから3次元的にフィールドをセンシングするICTシステムを開発する。これは、農林水産業支援、大気環境モニタリング、植生・生態系モニタリング、海洋モニタリング、災害モニタリング・防災支援など広範な分野への活用が期待でき、農学研究の飛躍的高度化や実用レベルの利用、さらには連大修士のいる海外での利用も可能である。

本研究では、

- 1) 玩具として市販されている小型4翼ヘリコプター複数機（4機を標準とする）と必要に応じて気球を組み合わせてペイロードを向上させた飛行プラットフォームの開発
- 2) プラットフォームの飛行制御と各種センサーからのデータ収集・送信にスマートフォンを用いた情報通信システムの開発
- 3) フィールドにおけるセンシングデータの収集・解析システムの開発
- 4) 各種フィールドにおけるセンシングの実施
- 5) 各種の利用アプリケーションの検討

を行い、農学研究の高度化および実用化に資する。

## 1-2 研究計画

- 1) 飛行プラットフォームの開発：小型4翼ヘリコプター複数機（4機を標準とする）をフレーム構造体に装着し、飛行プラットフォームを開発する。搭載センサーの重量および安全確保などに応じて気球（ヘリウムガス使用）を飛行隊のフレームに装着する。ペイロードを向上させた低価格飛行プラットフォームによって、本格的なセンシングやモニタリングが可能になる。
- 2) プラットフォームの飛行制御および情報通信システムの開発：市販されているスマートフォンによる4翼ヘリコプターの飛行制御システムを活かして、上記飛行プラットフォームの制御を行う。各種センサーからのデータ収集・送信のために飛行プラットフォームにスマート

フォンを搭載して、地上基地とのデータ通信を行う情報通信システムを開発する。

- 3) フィールドにおけるセンシングデータの収集・解析システムの開発：収集したデータの解析・表示システムを開発する。特にリアルタイムで収集される大規模データ（ビッグデータ）の解析の効率化を図る。予算の関係で計上できないが、3Dプリンターとの連携も検討する。
- 4) 各種フィールドにおけるセンシングの実施：開発したシステムの試験を実施する。
- 5) 各種の利用アプリケーションの検討：開発したシステムの用途開発を行う。

### 1-3 方法

#### 1) プラットフォームの開発

4翼ヘリをフレームに装着した図1のような飛行プラットフォームを開発する。

- ・必要に応じて浮揚体（気球）を装着
- ・4翼ヘリを装着するフレームは組み立て式として可搬性を向上させる
- ・センサーは目区的に合わせて取り付ける

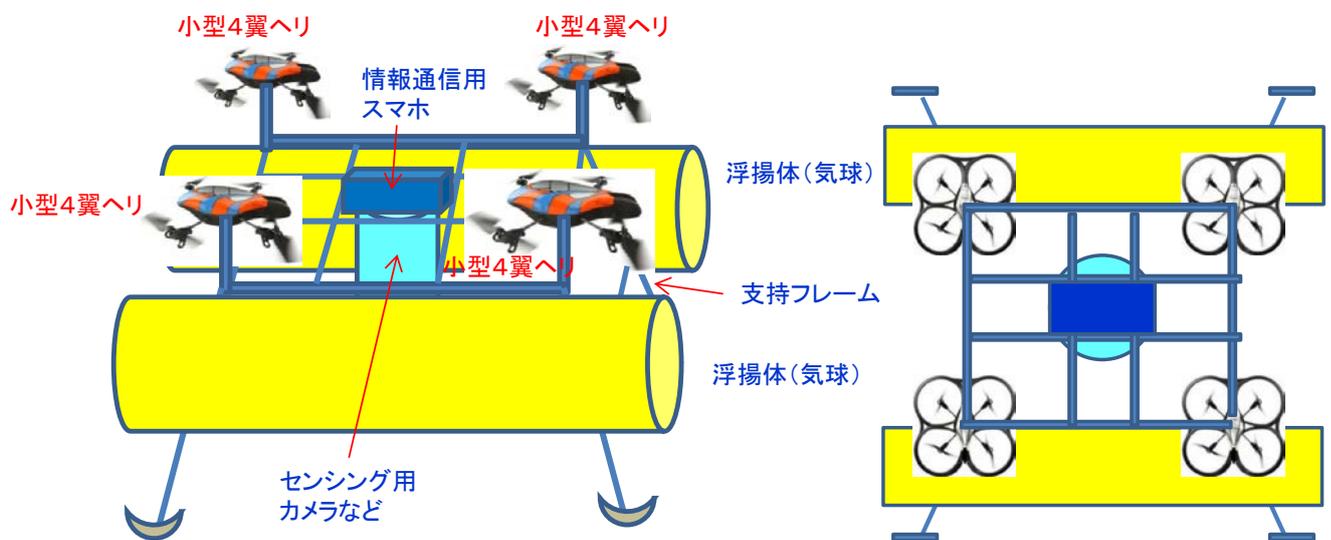


図1 飛行プラットフォームのイメージ；浮揚体は必要に応じて増設（形状は未定），4翼ヘリは脱着式にして単独でも利用可能とする。

#### 2) プラットフォームの飛行制御および情報通信システムの開発

2台のスマートフォンを利用して、飛行制御とデータ収集・通信を行う。



図2 制御系の構成

3) フィールドにおけるセンシングデータの収集・解析システムの開発

- ・ GIS および画像処理ソフト（最初は自作）との連携
- ・ VBA による Excel でのグラフ作成，処理ソフトとの連携
- ・ 市販画像処理ソフトによるデータ処理

4) 各種フィールドにおけるセンシングの実施

サトウキビ圃場，ヤトロファ圃場，マンゴーハウス，森林などでセンシングを実施する。

5) 各種の利用アプリケーションの検討

圃場，林地，海岸，海洋などでのセンシングおよび解析方法の開発を検討する。

本研究で開発するセンシングプラットフォームの活用によって次のような成果・効果が期待できる。

- ・ 超低コストで高度なセンシングに使えるプラットフォームが構築できる
- ・ 衛星リモセンに比べて天候への影響が少なく，データ収集の期間や範囲に大きな幅が出る
- ・ 低高度からのセンシングを行うので，高精度のデータが得られる
- ・ 産業用無人ヘリなどに比べて，安全性・安定性に優れ，操作性がよい
- ・ 多種多様な分野で利用でき，農学研究の高度化に貢献できる
- ・ 組立が容易なため遠隔地への運搬が容易で，利用できる場所が拡大する
- ・ 室内やハウス内など狭い空間でもセンシングができる
- ・ 組み合わせ技術で開発できるので，開発コストの抑制ができる
- ・ 農学部 Web サイト制作に動画を利用できる
- ・ 以上のことから，連大修士生の多い東南アジアなどでも利用でき，研究支援や共同研究のツールとなり得る

1年間でシステムを構築した後に，次の内容について研究，国際協力などを推進する。

- ① 研究計画4) および5) に関する研究を継続する
- ② 農林水産業支援のためのセンシングから、環境モニタリング、防災支援など幅広い分野への
- ③ 適用を試み、連大学生の研究への利用に取り組む
- ④ 飛行制御システムの高度化、搭載センサーの多様化を図る
- ⑤ 海外の連大修士生との共同研究の推進に本システムを活用するとともに、連大へのリクルート活動のツールとして活用する
- ⑥ 製品化を検討する

## 2 研究の成果

### (1) 3D-ICT 農業研究高度化のためのプラットフォームの構築

(平良, 上野, 川満, 岡安, その他)

今期は情報収集プラットフォームの構築, 具体的には, 小型無人ヘリを中心とする機器類の整備に重点をおいた。計画時に出回っていた小型無人ヘリは, ほとんどがホビー用で非常に小さいために, ペイロードも小さく小型カメラがようやく搭載できるかどうかであった。このため, 4台の機体を連結して一体型とし, ペイロードを増加させるプランを検討した。小型無人ヘリは, 世界的に注目され, 本格的なビジネスの対象としてホンダなどの大手企業も乗りだし, 技術革新も目覚ましい。そこで, 様々な機種に関する情報収集と検討を行った結果, 次に示すラジコンマルチコプタ S1000 を採用することにした。当初案に比べて1台である程度のセンサーを搭載可能であり, 飛行の安定性も高いメリットもある。

情報収集プラットフォームを構築するために, 購入した機器は次の通りである。

#### 1) ラジコンマルチコプタ 1

品名: マルチコプタ

型式: DJI 社 S1000

仕様: 最大積載量 約 10kg

#### 2) ラジコンマルチコプタ 2

品名: マルチコプタ

型式: DJI 社 Phantom2 Vision+

仕様: 積載量 約 500g

#### 3) 赤外線カメラ

品名: 赤外線サーモグラフィ

型式: Optris 社 PI230

仕様: 解像度 160×120pixel

フレームレート 128Hz

#### 4) 3Dプリンタ

品名: 卓上型 3Dプリンタ

型式: XYZprinting 社 da Vinci 1.0Ai0

仕様: 印刷技術 熱溶解フィラメント製法

最大印刷 20\*20\*19cm (奥行\*幅\*高さ)

小型無人ヘリは, 誰にでも簡単に飛ばせるというのが謳い文句である。搭載してある GPS とプログラムで自動運転が可能とされている。しかしながら, GPS にも若干の不安定さがあるために, 機体をロストする事故も報告されている。さらに, 希望する画像を安定的に取得するには操縦にかなりの熟練を要することもわかってきた。現在, このためのトレーニングを実施している。赤外線カメラと 3Dプリンタに関しても同様の状況である。

(2) 3D-ICT 農業研究；3D モニタリング・光センシング

(平良，川満，上野，上原，河崎，富永，藪田，岡田，その他)

ハイパースペクトルカメラによるモニタリング，マンゴー生産高度化のためのセンシング，マンゴー品質の光センシング，沖縄型植物工場の開発、植物工場野菜の分光イメージング・画像処理，作物群落・土壌の CO<sub>2</sub> プロファイルの測定などに関する研究を取りまとめて，3D-ICT 農業の展開可能性を検討した。

(3) 小型無人ヘリへの道のり (上野，川満，平良その他)

研究代表者らが十数年にわたって実施してきた ICT 農業（精密農業）における情報収集システムとして研究してきた光センシング・リモートセンシングの取り組みから，衛星リモセンから無人ヘリにたどり着くまでの経緯を整理し，無人ヘリを活用した研究テーマ，および，今回の情報収集プラットフォーム開発の意義について述べた。

(4) 海外研究における 3D-ICT 農業技術の利用 (上野，川満，藪田，富永，その他)

3D-ICT 農業技術の利用例としてボツワナ国で実施している JST-JICA SATREPS プロジェクトで取り組んでいる研究の一部を紹介した。これは，ボツワナの厳しい乾燥・低温（冬）条件の中でヤトロファを栽培して BDF を製造・综合利用するプロジェクトである。これを実現するために，最も効果があるのは ICT 農業の展開で，気象条件と生育状況を正確に把握して合理的に水を利用することによって栽培を可能にする技術開発を行っている。本研究で開発した技術をこのプロジェクトにも適用している。

(5) 3D-ICT 農業の一形態としての植物工場（上野，川満，河崎，上原，その他）

先端技術を駆使した植物工場は，次世代の生産システムすなわち究極の 3D-ICT 農業システムとして期待され，急速に導入が進んでいるが，コスト面などで多くの課題を抱えている。人工環境を活用した生物生産システムではあるが，気象を始めとする地域環境に大きく左右される。このため，沖縄の気象条件に適した沖縄型植物工場の開発を行っている。ここでは開発プロジェクトにおける本事業の関連研究を取りまとめた。

### 3 研究の総括と今後の課題・展望

#### 3-1 研究の総括

本研究によって、長年夢見た小型無人ヘリを中心とする3D-ICT 農業研究のプラットフォームの構想が実現する見込みがでてきた。とりわけ、これまでは数千万円～数億円の予算が必要であった大がかりなシステムから、数百万以下でコンパクトかつ取扱い性に優れたシステムが構築できるようになった意義は極めて大きい。小型無人ヘリの活用は、現在多くの分野で導入されつつあり、フィールド研究分野でも注目されている。その意味でいち早く導入に踏み切ることができたのはひとえに本事業のおかげである。

とは言え、本システムの本格的運用には、ある程度の時間と熟練、経費が必要である。これは、すべての研究用機器について言えることではあるが、無人ヘリは空を飛ばすので、難しさを殊の外実感している。このため、研究に参加いただいた先生方の一部には、プラットフォームを活用したデータ取得のサービスを提供するまでにはいたらなかった。

取得した画像データが物語っているように、本システムはフィールド研究のツールとして限りない可能性を秘めている。私たちが目指すべき3D-ICT 農業の方向性とそれに必要な研究テーマは整理できている。その実現に向けてプラットフォームを活かしていく予定である。

### 3D-ICT農業高度化のための情報収集プラットフォーム 活用の流れと今後の展開

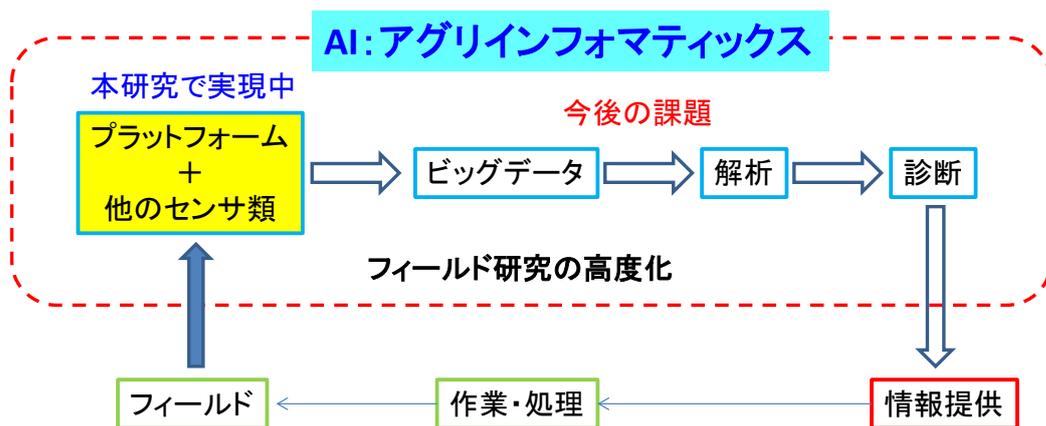


図3 今後の研究の展開

### 3-2 次年度に向けての課題・計画・展望等

#### (1) 購入機器の活用

まず、情報収集プラットフォームを構成する購入機器については、次のような利用を検討している。

##### ①小型無人ヘリ（2機種）：

- ・オペレーションの習熟
- ・サトウキビ圃場からの情報収集
- ・森林や海浜での情報取得方法の検討
- ・同様な機器を有する他機関の研究者との情報交換
- ・ボツワナにおけるヤトロファの画像取得
- ・その他

##### ②赤外線カメラ：

- ・水ストレスや光合成などによる植物の応答解析（サトウキビ、マンゴー、その他）
- ・植物種類の判別
- ・無人ヘリへの搭載
- ・分光カメラなどとの連携利用
- ・その他

##### ③3Dプリンタ：

- ・農産物の形状研究
- ・教材の製作，教育用ツール
- ・その他

#### (2) 具体的な研究申請など

大学の運営交付金による研究費は年々縮減され、特に平成27年度からは、予算枠組みが大きく変更され、一段と厳しい状況に置かれることになった。これは一過性のものではなく、われわれは厳しい予算制限の中で、博士を養成する責務を負うことになる。このため、何らかの方法でこれを補う必要がある。具体的にできることは、内部の研究経費に加えて、積極的に外部資金獲得にチャレンジしなければならない。

しかしながら、厳しい競争環境の中で、単独での申請では弱く、外部資金の獲得は極めて困難である。連大は多くの研究者を擁しているが、従来、外部資金獲得を目指したプロジェクトはほとんどなかったと言える（文科省概算要求は除く）。連大のメリットは内部研究者の数だけでなく、修了生の多くが国内外の大学や研究機関で活躍していることである。このような人的ネットワークを活かしていけば、外部資金獲得も決して夢ではないと思われる。要は、意欲と戦略の問題である。本情報プラットフォームをこのような用途に積極的に活かしていきたい。

現時点（平成 27 年 3 月）で取り組んでいる、本研究に関連する提案もしくは申請中・計画中のプロジェクトは次の通りである。

- 1) 平成 27 年度学長裁量経費（鹿児島大学）  
「先進 AI（アグリインフォマテックス）による南方系農作物の生産性（土地，労働，品質，商品，環境）の飛躍的向上に関する研究」
- 2) 平成 27 年度中期計画達成プロジェクト経費（教育・学生支援等プロジェクト）（琉球大学）  
「沖縄型植物工場を用いた実践的農学教育および起業家育成プログラムの開発」
- 3) 農林水産省：平成 27 年度「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」  
[実用技術開発ステージ]＜現場ニーズ対応型・重要施策対応型＞  
「効率的で省力・低炭素アオコ抑制のための統合運用システム開発」
- 4) 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）：平成 27 年度「新エネルギーベンチャー技術革新事業」（フェーズ B）  
「水素・熱貯蔵併用ユーザーオンデマンド独立型再生可能エネルギー供給システムの開発」

### （3）展望

これらは、琉大内でのプロジェクトであるので、引き続き、連大内でのプロジェクトを検討する予定である。さらには、ボツワナで行っている JST-JICA SATREPS プロジェクトなどにも成果を適用し、次のステップを目指したい。連大を修了した外国人とのネットワークを活かした共同研究への展開を企画したい。

#### 4 支援金額の執行内訳

(千円)

項目	金額	内訳・算出根拠・備品の設置場所
機器・備品	1,638	赤外線サーモUSB2.0カメラ PI-230 マルチコプター DJI PHANTOM2 Vision+ DJI S1000 GPS, ジンバルセット Lightbridge (デジタルビデオダウンリンク) 卓上型3Dプリンタ: da Vinci 1.0 Ai0 葉緑素計
消耗品	1018	PHANTOM2用5200mAh リポバッテリー PHANTOM2用プロペラガード vision No28 送受信機 T14SG 2.4GHz FASSTest T/Rセット 送受信機 T10J 2.4GHz T-FHSS AIR T/Rセット DJI Z15 NO.1 CAN-Bus HUB HDMI入力対応7インチ FPV用モニター リポバッテリー その他 文具等
旅費	543	研究打合せ等 つくば市 東京都 福岡市 その他
その他	301	DJI S1000 組立及び飛行調整作業 その他 送料等
合計金額	3,500	

#### 5 資料等

なし

# 焼酎・泡盛もろみに生息する野生酵母と 乳酸菌の同定と特性解明

研究代表者 鹿児島大学農学部 高峯 和則

2015年 3月

## 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	研究の役割分担等
代表者	高峯 和則・教授 (鹿児島大学・応用生命科学)	研究の統括

### 研究分担グループ 1

	氏名及び職名	研究の役割分担等
分担者	玉置 尚徳・教授 (鹿児島大学・応用生命科学)	野生焼酎酵母の同定
協力者	二神 泰基・准教授 (鹿児島大学・農学部)	野生焼酎酵母の同定
分担者	吉崎 由美子・助教 (鹿児島大学・応用生命科学)	差し酏より単離した酵母の生育特性解析
協力者	奥津 果優・特任助教	種麹または米麹からの酵母の探索

### 研究分担グループ 2

	氏名及び職名	研究の役割分担等
協力者	瀬戸口 眞治・部長 (鹿児島県工業技術センター)	差し酏のサンプリングと野生焼酎酵母の同定・特性解明
協力者	安藤 義則・主任研究員 (鹿児島県工業技術センター)	差し酏のサンプリングと野生焼酎酵母の同定・特性解明

### 研究分担グループ 3

	氏名及び職名	研究の役割分担等
分担者	石橋 松二郎・准教授 (鹿児島大学・応用生命科学)	差し酏からの乳酸菌のスクリーニング及び、焼酎もろみ中の乳酸菌の
分担者	藤田 清貴・准教授 (鹿児島大学・農学部)	起源の解明とその菌数変化

研究分担グループ 4

	氏名及び職名	研究の役割分担等
分担者	外山 博英・教授 (琉球大学・応用生命科学)	泡盛乳酸菌の同定
協力者	平良 東紀・准教授 (琉球大学・応用生命科学)	泡盛乳酸菌の特性解明

# 1 研究の目的と概要

## 1.1 研究の目的

焼酎・泡盛の発酵スターターとして使用される差し酏は、繰り返すことで培養酵母が野生酵母に入れ替わるが、野生酵母の起源は不明である。また、差し酏の中で、酵母と乳酸菌は共生関係を形成している。この乳酸菌は、培養酵母が野生酵母に入れ替わるプロセスや、それに伴う差し酏の品質変化のプロセスに影響を与えているはずである。乳酸菌は、酵母が作るアルコールと乳酸菌自身が作る乳酸の濃度が高まると死滅してしまう。このため、野生酵母と乳酸菌の共生関係を維持することで、安定した差し酏の維持管理が可能になると予想される。また、入れ替わるプロセスや、酵母と乳酸菌の種類は企業毎に大きく異なることが予想される。

そこで、本研究においては、1) 麴・差し酏・もろみからの焼酎・泡盛の野生酵母・乳酸菌のスクリーニング、2) 野生酵母と乳酸菌の起源の解明と差し酏の繰り返しが焼酎・泡盛の野生酵母・乳酸菌の種類とその菌数変化に及ぼす影響、3) 差し酏の繰り返しが焼酎の酒質に及ぼす影響を調査する。これにより各酒造会社における焼酎・泡盛の品質安定化に貢献すると共に生産性の拡大につながることを目的とする。

## 1.2 研究の概要

### 1) 麴・差し酏・もろみからの焼酎・泡盛の野生酵母と乳酸菌のスクリーニング(各研究分担グループ)

鹿児島本土及び沖縄本島を中心とした焼酎・泡盛の酒造会社からのサンプリングを実施し、野生酵母・乳酸菌を分離と収集を進める。菌株の同定は、リボソーム DNA、ITS、NTS 領域の塩基配列解読と菌株に由来したタンパク質成分の質量分析解析(Autoflex speed TOF/TOF (BRUKER)を用い、MALDI Biotyper ver. 3.0で解析)を組み合わせで行う。

### 2) もろみ中の焼酎・泡盛の野生酵母と乳酸菌の起源の解明とその菌数変化に及ぼす影響(各研究分担グループ)

野生酵母と乳酸菌が分離された酒造会社(A)の協力を得て、培養酵母を添加した1回目から継続的にサンプリングを実施し、酵母の種類と菌数を継続的に調べ、差し酏の繰り返しに伴う野生酵母への変化を明らかにする(サンプリング計画を図1に示す)。同時に、乳酸菌の種類と菌数を継続的に調べ、酵母の変化に与える乳酸菌の影響を調査する。乳酸菌の菌数変化は平板寒天培養法を用い

て行う。また、鹿児島 2 号酵母と 5 号酵母など代表的な培養酵母と野生酵母のもろみ中に占める割合の変化を調査することで、菌叢変化に与える酵母の種類の影響を明らかにする。

**3) 差し酀の繰り返しが焼酎の酒質に及ぼす影響（研究分担グループ1及び2）**

培養酵母、安定期の差し酀、酒質の低下をもたらした段階の差し酀を用いて小仕込み発酵試験を行い、二次もろみの酒質及び菌叢に与える影響を明らかにする。

		11月11日	11月12日	11月13日	11月14日	11月15日	11月16日	11月17日	11月18日	11月19日	11月20日	11月21日	11月22日	
純粋酵母	イ-87	87-種麹	→	87-麹						87-1次もろみ 87-1次試留液	→	87-2次-3日目	→	※1
差しもと1	イ-89			89-種麹	→	89-麹						89-1次もろみ 89-1次試留液	→	※2
差しもと2	イ-91					91-種麹	→	91-麹						※3
差しもと3	イ-93							93-種麹	→	93-麹				※4
差しもと4	イ-95									95-種麹	→	95-麹		※5
差しもと5	イ-97											97-種麹	→	※6
差しもと8	イ-103													

		11月23日	11月24日	11月25日	11月26日	11月27日	11月28日	11月29日	11月30日	12月1日	12月2日	12月3日	12月4日	
純粋酵母	イ-87	※1		87-2次-7日目 87-2次試留液	87-原酒									
差しもと1	イ-89	※2	89-2次-3日目			89-2次-7日目 89-2次試留液	89-原酒							
差しもと2	イ-91	※3	91-1次もろみ 91-1次試留液					91-2次試留液	91-原酒					
差しもと3	イ-93	※4		93-1次もろみ 93-1次試留液						93-2次試留液	93-原酒			
差しもと4	イ-95	※5				95-1次もろみ 95-1次試留液						95-2次試留液	95-原酒	
差しもと5	イ-97	※6	97-麹					97-1次もろみ 97-1次試留液	→	97-2次-3日目	→			※7
差しもと8	イ-103					103-種麹	→	103-麹						※8

			12月5日	12月6日	12月7日	12月8日	12月9日	12月10日	12月11日	12月12日	12月13日	12月14日	12月15日	
差しもと5	イ-97	※7		97-2次-7日目 97-2次試留液	97-原酒									
差しもと8	イ-103	※8		103-1次もろみ 103-1次試留液					103-2次試留液	103-原酒				
差しもと12	イ-111		111-種麹	→	111-麹						111-1次もろみ 111-1次試留液	→		※9
差しもと14	イ-115							115-種麹	→	115-麹				※10

		12月16日	12月17日	12月18日	12月19日	12月20日	12月21日	12月22日	12月23日	12月24日	12月25日	12月26日	
差しもと5	イ-97												
差しもと8	イ-103												
差しもと12	イ-111	※9			111-2次試留液	111-原酒							
差しもと14	イ-115	※10	115-1次もろみ 115-1次試留液	→	115-2次-3日目	→			115-2次-7日目 115-2次試留液	115-原酒			

サンプル	目的	採取時期	保存方法	容器	本数
種麹: 次さじ1杯程度	酵母・乳酸菌の分離	毎回	冷蔵	50mlワルコンチューブ	9
麹: 一握り程度	酵母・乳酸菌の分離	毎回	冷蔵	50mlワルコンチューブ	9
1次もろみ: 40ml	酵母純度、酵母分離	7日目(毎回)	冷蔵	50mlワルコンチューブ	9
2次もろみ: 40ml	乳酸菌の分離	3日目、6日目(純粋、差しもと: 1, 5, 14回目)	冷蔵	50mlワルコンチューブ	8
1次試留液: 80ml	揮発酸度測定、高級アルコール分析	1次7日目(毎回)、2次7日目(毎回)	冷蔵	100mlサンプル瓶	18
2次試留液: 80ml	揮発酸度測定、高級アルコール分析	1次7日目(毎回)、2次7日目(毎回)	冷蔵	100mlサンプル瓶	18
原酒: 450ml	揮発成分分析、きき酒	毎回	暗室	900mlマヨ瓶	9

図1 焼酎もろみのサンプリング計画

## 2 研究の成果

### 2.1 焼酎もろみ中の野生酵母の起源の解明とその菌数変化 (研究分担グループ 1)

鹿児島県の焼酎醸造会社 (A) で使用している麴及び種麴から野生酵母の分離を試みた。麴 1 g に滅菌水 10 ml を添加し、懸濁後遠心分離を行い、上清を除いた。沈殿物に再度滅菌水を 1 ml 添加、懸濁し、1 ml を YPD medium 2% agar (カビの成育を抑えるために 0.2% プロピオン酸ナトリウム、細菌の成育を抑えるため 0.01% クロラムフェニコールを添加) 培地に塗布した。それを 25°C で嫌気培養 (アネロパック使用) し、5 日後酵母様コロニーを観察した。

結果、培地中に酵母様コロニーは観察されず、麴中から野生酵母を分離することが出来なかった。そこで上記の方法で実際に酵母が検出できているか否かを確認するために、酵母を  $10\text{-}10^4$  cells 含む酵母培養液を麴懸濁液に混合し、同様の実験を行ったところ、 $10^4$  cells の酵母を混合した場合でも酵母を検出することができなかった。よって、本方法で麴中から少数の酵母を単離することは難しく、方法の改善が必要であることが示された。また、麴及び種麴における酵母の存在を確認するために DGGE による解析を行う必要がある。

鹿児島県の焼酎製造会社 11 社から分離された計 43 株の野生焼酎酵母の同定を行った。まず、真核微生物の分子系統解析に一般的に使用される rDNA の ITS 領域の配列を解析した。各野生焼酎酵母を YPD 液体培地で培養し、得られた菌体からフェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。これを鋳型として、ITS 領域を ITS1 プライマー (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS4 プライマー (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いて PCR により増幅した。増幅産物を pGEM-T Eazy ベクター (プロメガ) にクローニングし、DNA シーケンス解析を行った。得られた塩基配列を NCBI の BLASTN により解析した。その結果、41 株は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と 99~100% の相同率を示した。また、2 株は *Candida parapsilosis* と 99% の相同性を示した。鹿児島県において焼酎酵母として広く使用される鹿児島 2 号酵母と 5 号酵母は、同様に *S. cerevisiae* と 100% の相同性を示すため、ITS 配列で焼酎酵母と野生焼酎酵母を区別することは困難であることが分かった。そこで、*S. cerevisiae* を菌株レベルで分類する新規手法の開発として、系統分類に適した遺伝子の探索を試みた。まず、NCBI にゲノム配列が登録されており、かつ、遺伝子予測までされている 18 株の *S. cerevisiae* の情報を使用して、全てのゲノムにおいてドメイン分割がなく、かつ各ゲノムに 1 コピーの遺伝子をオルソロググループとして同定した。次に、オルソロググループごとにマルチプルアラインメントを作成し、連結したもので

NJ 法により系統樹を作成した。これと各遺伝子で描いた系統樹との距離を比較して、トポロジーが一致し、かつすべて正の枝長を持つオルソロググループを 15 抽出した。これらの 15 遺伝子は、*S. cerevisiae* の菌株レベルでの系統分類に使用できる可能性があり、野生焼酎酵母の分類に応用できることが期待できる。

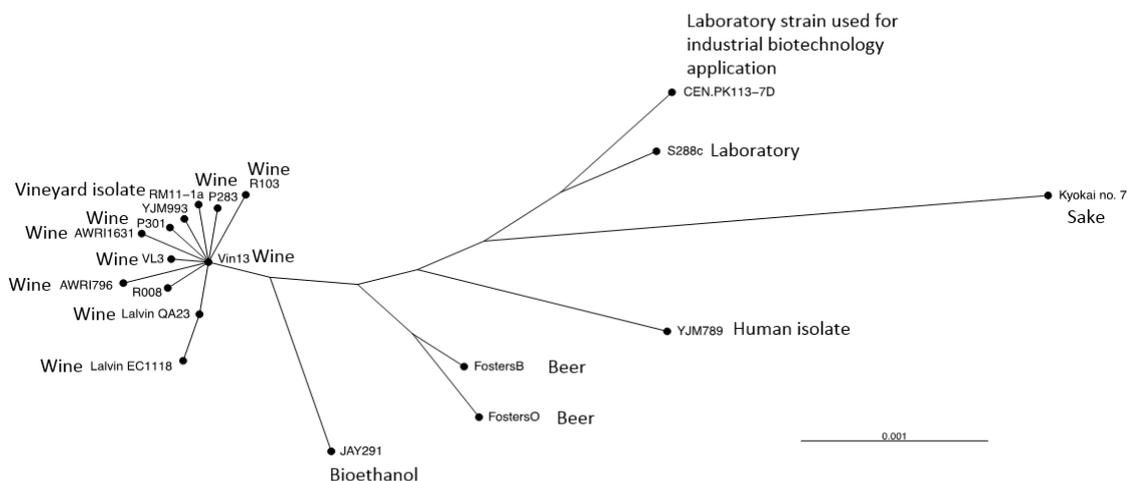


図 *S. cerevisiae* のもつ全オルソロググループで描いた系統樹

### 差し酏の繰り返し焼酎と泡盛の酒質に及ぼす影響 (研究分担グループ 1)

#### 【揮発酸度及びアルコール濃度】

差し酏の繰り返しによる酒質の変化を調べるために、純粋培養した酵母で製造したもろみ及び差し酏を添加して製造したもろみについて試留液の揮発酸度とアルコール濃度を測定し、繰り返しによる変化を調べた。結果を図 1, 2 に示す。差し酏を 2 回繰り返した段階で、一次もろみの揮発酸度が 5.6 から 2.4 に低下し、二次もろみでも 2.7 から 1.6 まで低下することが分かった。差し酏の繰り返しによる揮発酸度の低下は先の実験室における差し酏試験の結果とも一致していた (安藤ら, 鹿児島県工業技術センター研究成果発表会予稿集, 2010)。しかしながら、既報の実験室における小仕込試験では、差し酏 10 回目で揮発酸度の低下が起こっており、現場ではより早い段階で揮発酸度の低下が起こることが示唆された。アルコール濃度については、純粋酵母及び差し酏一回目では、14%前後であったが、差し酏 2 回目以降、16-17%にまで上昇した。この結果についても前回の結果と一致していた。

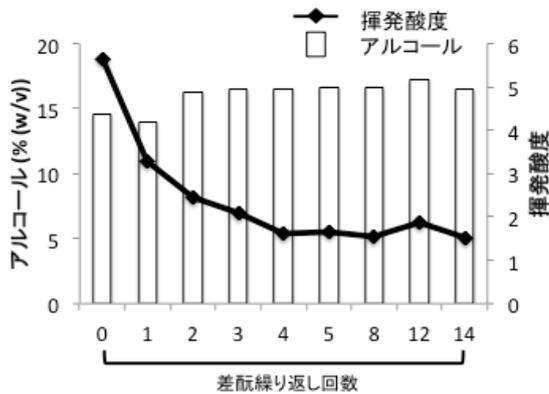


図1. 一次もろみの揮発酸度及びアルコール濃度

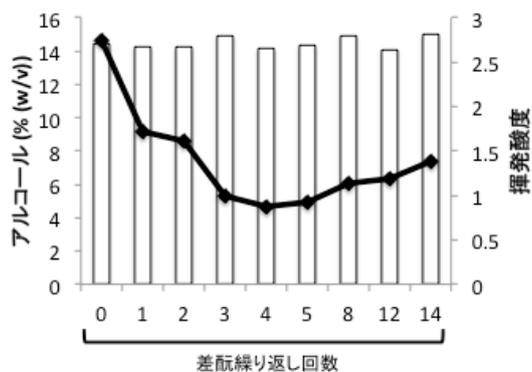


図2. 二次もろみの揮発酸度及びアルコール濃度

差し酏回数の異なるもろみを用いて製造した焼酎について官能評価を行った。差し酏回数は、0回、2回、4回、8回、14回目である。パネル6名（男性5名、女性1名）にサンプル名を伏せたブラインドテストにより、5つの焼酎に対する香りと味について自由にコメントを求めた。同時に同じ香味傾向を有する焼酎をグループに分けてもらった。その結果、差し酏0回、つまり純粋培養酵母を用いて製造された焼酎に対してフルーティー、甘香、甘味という、一般的な芋焼酎の利き酒用語が得られた（表）。また差し酏2、4回目により製造された焼酎でも同様の香味表現が認められた。しかしながら、差し酏8回目により製造された焼酎では、漬物臭や草様などの欠点臭の指摘が認められた。差し酏14回目により製造された焼酎では、差し酏8回目の官能評価に類似した酸臭に加えて、発酵臭やハーブなどの特徴的な表現が認められた。

表 差し酏回数の異なるもろみを用いて製造した焼酎の官能評価

差し酏	香り	味
0回	フルーティー、甘香	甘味、穀物
2回	フルーティー、甘香、軽快、華やか	甘味、穀物
4回	軽快、フローラル、草、華やか	甘味、スツキリ
8回	漬物臭、草臭、発酵臭	スツキリ、濃い、酸味
14回	酸臭、やや発酵臭、甘香	甘味、まろやか

またグループ分けの結果より、差し酏回数が近い焼酎間で同じグループに分け



酸-リン酸ナトリウム溶液 (pH 2.6) および 99.9% エタノールを用いて、pH 4.5 および 4.5% エタノール含有の YPD 培地を作製した。これらの培養条件における培養温度は 30°C とした。また 0.2 M リン酸-リン酸ナトリウム溶液 (pH 2.3) を用いて pH 4.0 の YPD 培地を調製し、培養温度 40°C にて培養を行った。培地 4.0 ml 中に酵母の数が 500 cells/ml となるように前培養液 (15~40  $\mu$ L) を植菌し、経時的に濁度 (OD) (660 nm) を測定した。前培養液は、YPD 培地にて保存用スラントより 1 白金耳分を植菌し、30°C にて 2 日間静置培養したものを用いた。

pH 3.0 における酵母の増殖能は、焼酎用酵母 H5 および K2 の増殖速度が速いことが分かった (図 4)。しかしながら、最終的な菌体濃度においては No.4 および No. 6, 7, 8, 9 において高い値を示していた。4.5% エタノール存在下における酵母の増殖能は、K2 および No. 2, No. 5 が優れていた (図 5)。40°C における増殖能を調べた結果、すべての酵母において著しい増殖抑制が確認されたが、No. 4 および No. 7 において優れた増殖能が確認された (図 6)。もろみより単離された酵母菌 10 株は、それぞれ異なる増殖能を有していることから、異なる株であることが強く示唆された。また各環境における増殖能において違いが認められ、焼酎製造時のもろみの複雑な環境変化にそれぞれが異なる様式で対応し、増殖していることが示唆された。

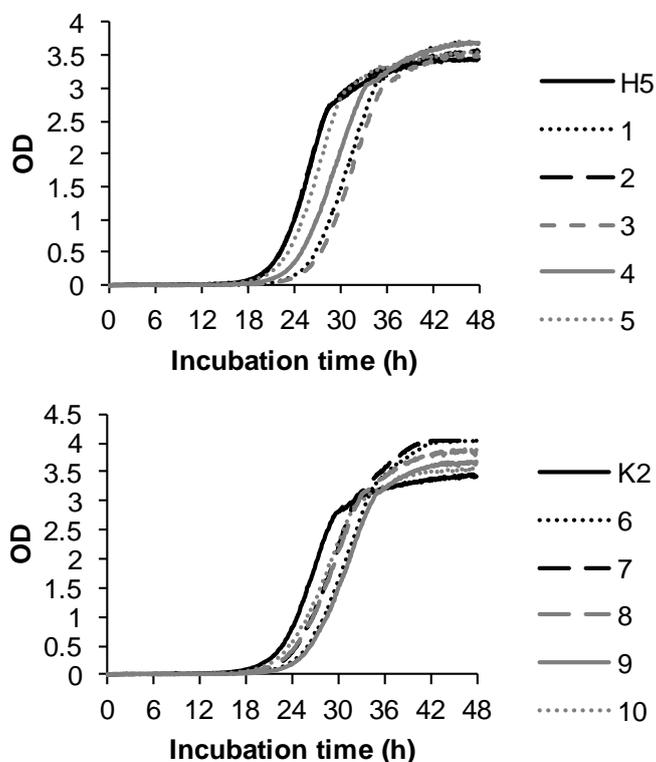


図 4. pH 3.0 における各酵母の増殖曲線

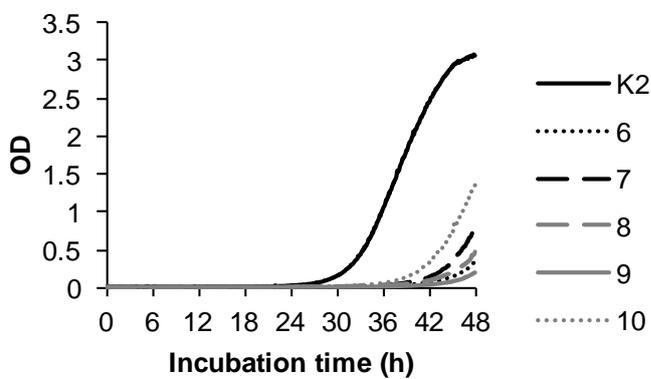
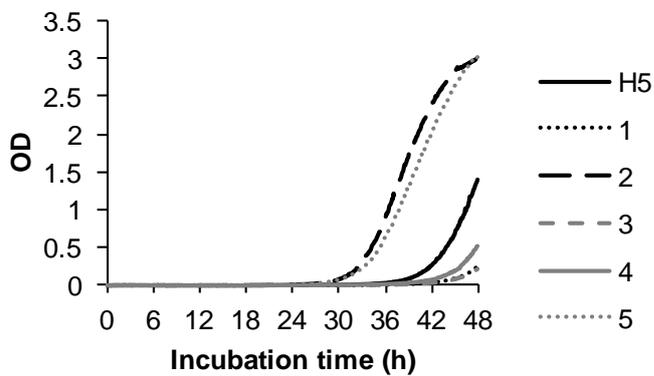


図5. エタノール4.5%  
における各酵母の増殖

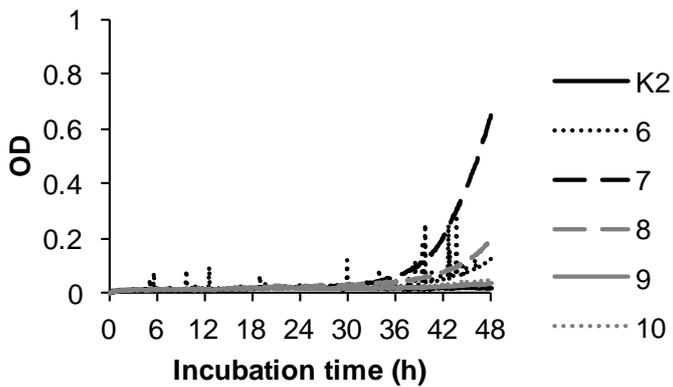
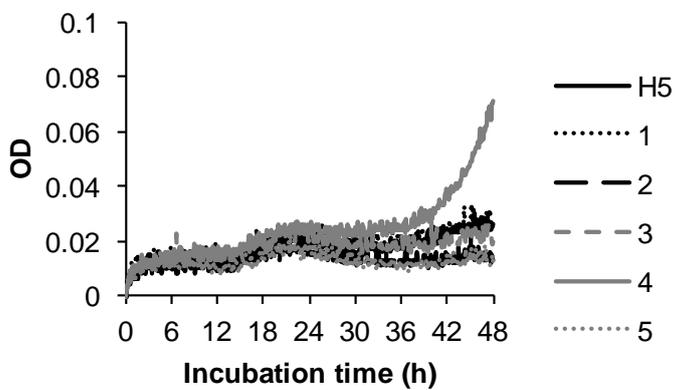


図6. pH 4.0, 培養温度 40°C に  
おける各酵母の増殖曲線.

## 2.2 焼酎もろみ中の野生酵母の起源の解明とその菌数変化（研究分担グループ 2）

### ① 焼酎野生酵母の分離

鹿児島県の焼酎醸造会社（A）の1次もろみ7日目について、野生酵母の分離と酵母純度の推定を行った。野生酵母の分離と純度推定は、 $\alpha$ MGを炭素源とするTTC染色法にて培養酵母（K2）と野生酵母とをコロニーの大きさと色調から分別することで行った。その後、染色したコロニーを白金耳にて直接かき取ることで採取、斜面培地に保存し、小仕込みなど以降の試験に供した。

その結果、酵母純度は差し酏1回目で約60%、2回目30%、3回目20%と差し酏が進むに従い低下しており、差し酏の早い段階から野生酵母の影響を受けていると推察された（図1-1）。

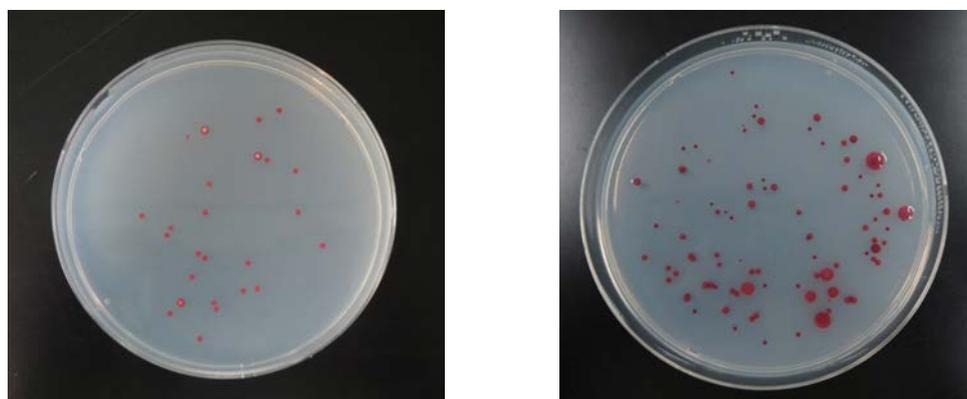


図1-1 TTC染色による酵母の分別

（左：純粋培養もろみ，右：差し酏2回目もろみ）

### ② 差し酏の中で働く野生酵母の特性解明

もろみから分離した酵母6株，すなわちK2酵母と推定された1株，野生酵母と推定された5株を用い，麴米0.2 kg，サツマイモ1 kg規模の芋焼酎製造試験を行った。

炭酸ガス発生量を指標とした発酵経過では，酵母1（K2）の立ち上がりが遅れたものの，そのほかの酵母はほぼ同等であった（データは示さない）。試留酸度では，酵母1（K2）と比べそのほかの酵母は低かった（表1-1）。なお，K2は他の焼酎用酵母と比べ試留酸度すなわち酢酸生成能の高いことが特徴である。

酵母総菌数や生菌数では，酵母1（K2）とそのほかの酵母との間で値が大きく異なっていた。さらに，焼酎の揮発成分では，酵母1（K2）と比べ，そのほかの酵母は*i*-butanolや*i*-amyl alcoholなどの高級アルコール類が高く（表1-2），野生酵母と判定された酵母2～6はK2とは異なる性質を有していることがわかった。これらのことから，差し酏が進み野生酵母が優勢となることで，酢酸や

高級アルコール含量が変化するなど酒質の変化が起こりえると推察された。

表 1-1 熟成もろみの性状

	酵母1 (K2)	酵母2	酵母3	酵母4	酵母5	酵母6
アルコール分(度)	14.5	14.2	14.5	14.8	14.7	14.5
試留酸度	2.8	1.0	1.0	1.2	1.0	0.9
総菌数(×10 <sup>7</sup> cells/g)	26	61	56	51	66	51
生菌数(×10 <sup>7</sup> cells/g)	4.5	1.3	2.0	1.4	1.1	1.6

表 1-2 試醸した焼酎の揮発成分

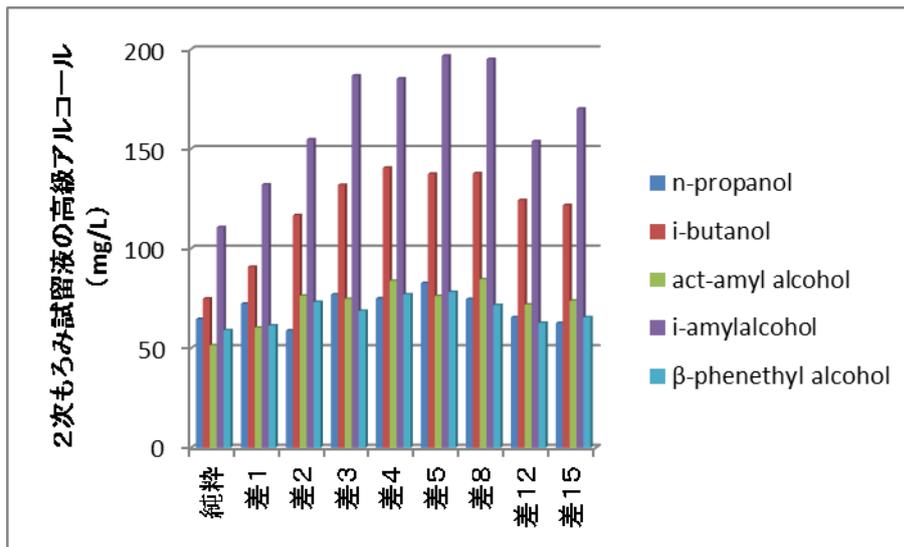
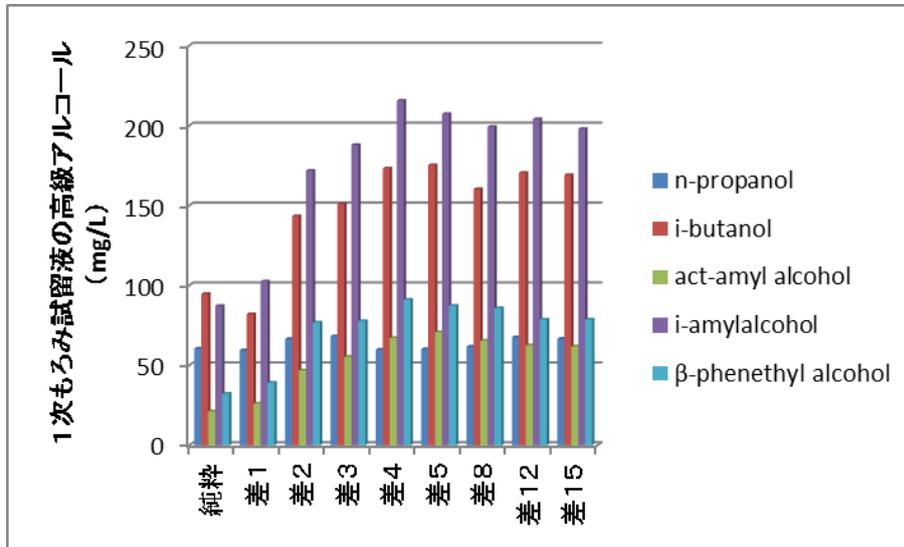
	(mg/L at 25%EtOH)					
	酵母1 (K2)	酵母2	酵母3	酵母4	酵母5	酵母6
ethyl acetate	71.1	45.0	55.6	52.1	57.9	46.9
1-propanol	121.6	145.0	124.6	147.7	162.6	148.9
i-butanol	144.1	233.0	246.1	236.8	255.1	239.7
i-amyl acetate	4.1	4.5	5.8	4.7	4.3	3.8
1-butanol	5.0	4.5	3.9	4.7	5.2	5.1
act-amyl alcohol	101.1	161.6	149.4	161.9	167.5	160.8
i-amyl alcohol	270.6	397.6	361.5	394.1	392.0	387.9
$\beta$ -phenethyl acetate	3.2	3.2	3.6	3.7	3.5	3.2
$\beta$ -phenethyl alcohol	76.7	88.4	75.9	87.2	88.9	79.7
製品酸度(at 25%EtOH)	1.9	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5

### ③ 酵母が生産する高級アルコール類の変化

1次もろみ7日目及び蒸留前もろみをサンプリングし、試留液中の高級アルコール類を測定することで、もろみ中に存在した酵母による同成分の生産性を推定した。

その結果、1次、蒸留前もろみ共に、純粋培養から差し酏が進むに従い、高級アルコール類の生成量が増加し、差し酏4回目以降では安定した(図1-2)。酵母の株により、高級アルコールの生成量は異なることが知られている。今回の結果から、差し酏が進むに従いもろみ中の酵母が野生酵母へと入れ替わっていることが示唆された。

図 1-2 試留液の高級アルコール類 (上：1次7日目,下：蒸留前)



### 2.3 麴・差し酏・もろみからの乳酸菌のスクリーニング及び、焼酎もろみ中の乳酸菌の起源の解明とその菌数変化（研究分担グループ3）

鹿児島県の焼酎醸造会社（A）の麴、1次もろみ、2次もろみ中からサンプリングを実施し、野生乳酸菌の分離と収集を行った。2次もろみは、酵母を純粋培養もしくは差し酏1回目、5回目、15回目を使用して製造された2次もろみを3日、6日目にサンプリングした。分離は、サンプリングしたもろみ、もしくは麴を0.05% Triton X-100で原液、10倍、50倍、100倍に希釈し、その100  $\mu$ lをMRS medium 1.5% agar（酵母の生育を抑えるため10ppmのシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを添加）培地に塗布した。それを30°Cで嫌気培養（アネロパック使用）し、生菌数をカウントすると共に、数種類のコロニーをピックアップし、菌株の同定を行った。菌株の同定には、菌株に由来したタンパク質成分の質量分析解析(Autoflex speed TOF/TOF (BRUKER))を行い、MALDI Biotyper ver. 3.0で解析した。

今回、麴中からは *Bacillus subtilis* を分離することが出来たが、野生乳酸菌を分離することが出来なかった。この事から焼酎もろみ中の乳酸菌は麴由来ではないことが推察された。また、差し酏1回6日目の1次もろみ中からも *B. subtilis* のみで乳酸菌を分離することが出来なかった。これは恐らく6日目のもろみ中のアルコール濃度が高いため、乳酸菌は検出出来ないほど減少しており、孢子形成菌である *Bacillus* のみが検出されたと考えられる。既に、1次もろみ中の乳酸菌検出割合は低いことが知られている(田邊ら、鹿大学術報告, 32, 69 (1982))。1次もろみからの乳酸菌の検出を行うためには、サンプル数とサンプリング日の再検討が必要と考えられる。

今回の野生乳酸菌の分離では、2次もろみ中のみで乳酸菌を分離することが出来た。2次もろみ中では、分離されたコロニーはほとんど全てが *Lactobacillus* 属であった。その生菌数は差し酏1回目、5回目使用2次もろみ3日目が最も多く、それぞれ  $16 \times 10^3$  cell/ml,  $81 \times 10^3$  cell/mlであった。しかし、6日目は減少しており、それぞれ  $2.7 \times 10^3$  cell/ml,  $4.1 \times 10^3$  cell/mlであった。純粋培養、差し酏15回目使用2次もろみ3日目の生菌数は、それぞれ  $8.6 \times 10^3$  cell/ml,  $6.8 \times 10^3$  cell/mlであった。これも6日目は減少しており、それぞれ  $1.3 \times 10^3$  cell/ml,  $1.0 \times 10^3$  cell/mlであった。この事から多くの野生乳酸菌は2次もろみ中では増殖できないことが分かった。野生乳酸菌は、原料であるサツマイモに付着している乳酸菌や1次もろみ中で僅かに生き残ったアルコール耐性の乳酸菌由来だと考えられる。菌叢に関しては、純粋培養使用2次もろみ3日目は、*Lactobacillus paracasei*や*L. plantarum*が検出された。6日目ではそれに加えて*L. fermentum*も分

離された。差配 1 回目使用 2 次もろみ 3 日目は、*L. fermentum*が分離され、6 日目も同様に*L. fermentum*が分離された。差配 5 回目使用 2 次もろみ 3 日目は、*L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*が分離されたが、6 日目は*L. fermentum*の他、炭酸カルシウムの溶解環を作ることが出来るがBiotyperでは同定できない菌株が分離された。差配 15 回目使用 2 次もろみ 3 日目は、*L. paracasei*, *L. plantarum*と今回初めて*L. hilgardii*が分離された。*L. paracasei*や*L. hilgardii*の一部にはアルコール耐性が高く、日本酒醸造において火落菌となる場合がある。また、差配 5 回目使用 2 次もろみと同様、炭酸カルシウムの溶解環を作る同定できない菌株が分離された。6 日目は、*L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*、炭酸カルシウムの溶解環を作る同定できない菌株が分離された。

今回 2 次もろみ 6 日目から分離された *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* また炭酸カルシウムの溶解環を作る同定できない菌株はアルコール耐性が高いと考えられる。また、差配が繰り返されたものを使うと 2 次もろみ中にアルコール耐性が高いと考えられる乳酸菌の出現率が増えるので、差配の繰り返しがアルコール耐性乳酸菌の増殖を招いていると考えられる。このことから、差配の繰り返しには限度があると推察される。一方で、*L. hilgardii* の一部には、火落菌となる菌株もいるが、これらの中には GABA を高生産するものも存在する。焼酎製造過程には蒸留という工程があり、これら野生乳酸菌が製品中にコンタミする可能性は低く、腐敗菌として働く可能性も低い。今後、これら野生乳酸菌が焼酎製造にどの様に関与するかを検討することで、安定した品質の高い焼酎製造法の確立やアルコール耐性乳酸菌を利用した付加価値の高い焼酎製造が出来る可能性がある。

表 2次もろみ中の生菌数と種類

使用差配	生菌数 ( $\times 10^3$ cell/ml)	3日目 属 種	生菌数 ( $\times 10^3$ cell/ml)	6日目 属 種
純粋培養	8.6	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	1.3	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Candida</i>
差配1	16	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	2.7	<i>Lactobacillus fermentum</i>
差配5	81	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	4.1	<i>Lactobacillus fermentum</i> not reliable identification
差配15	6.8	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> not reliable identification	1.0	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> not reliable identification

## 2.4 泡盛もろみ中の乳酸菌のスクリーニング及び、もろみ中の乳酸菌の特性解明 (研究分担グループ 4)

麴汁を蒸留水で Brix 2 % に調製し、Bacto Yeast Extract を 0.4 % になるよう加えて麴汁培地とした。これにシクロヘキシミド、アジ化ナトリウムをそれぞれ 0.001 % 加え、NaOH にて pH を 3.5, 4.5, 6.4 に調製後に炭酸カルシウムを 1 % 加えたものを炭酸カルシウム加麴汁寒天培地とした。県内酒造会社の仕込み日数の異なるもろみをサンプリングし、炭酸カルシウム加麴汁寒天培地にて 30 °C で 3 日間混積培養を行った。ハローを形成したコロニーを釣り上げ、単離菌株として MRS 高層培地にて保存した。菌株は GTG 5 プライマーを用いた Rep-PCR によって重複する多型をもつ株を排除した。16S rDNA シーケンシング後、Blast 検索によって種の同定を行った。

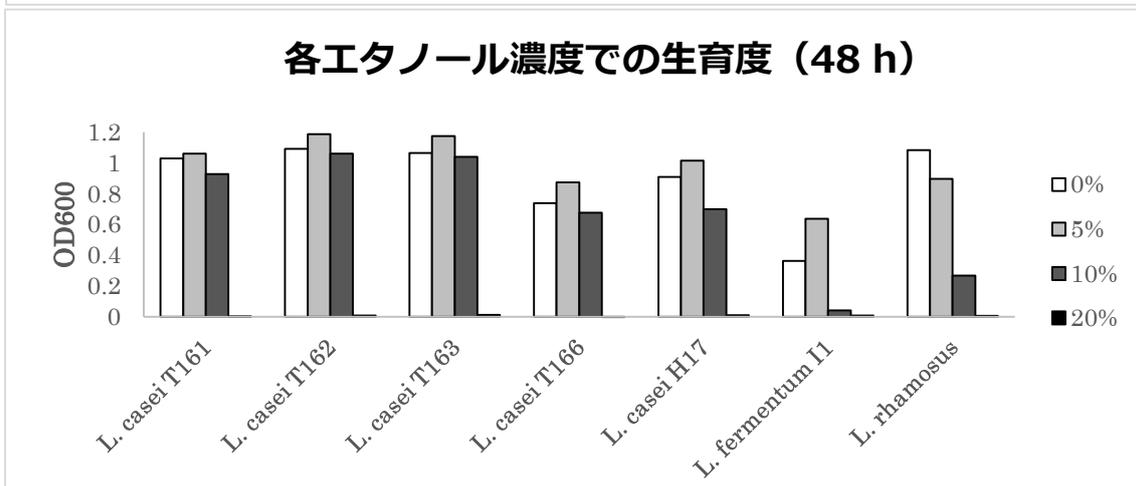
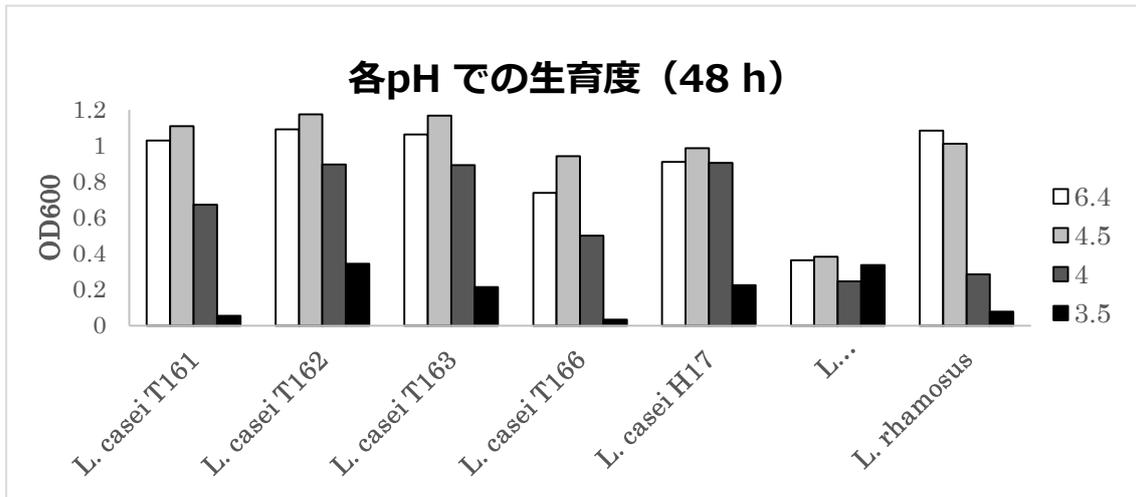
表 泡盛もろみ中より単離された乳酸菌の種名

酒造会社	仕込み後日数	種名
T	16	<i>Lactobacillus casei</i>
T	16	<i>L. casei</i>
T	16	<i>L. casei</i>
T	16	<i>L. casei</i>
H	17	<i>L. casei</i>
I	1	<i>L. fermentum</i>

仕込み日数 16, 17 日のもろみサンプルからは *Lactobacillus casei* のみが分離でき、I 酒造会社では仕込み当日のもろみサンプルから *L. fermentum* が分離できた。

分離菌株を MRS 培地にて 30 °C, 12 時間全培養し、pH 3.5, 4.0, 4.5, 6.4, エタノール濃度を 5, 10, 20 % に調製した麴汁培地に植菌し、30 °C で 24, 48 時間培養した生育度を OD600 値にて表した。コントロールとして研究室保存菌の *L. rhamnosus* AOK 1291 株 (以下 *L. rhamnosus*) を用いた。

H 酒造会社 17 日目もろみから分離された *L. casei* H17 は、pH 4 まで pH 6.4 とほぼ同程度の生育を示した。T 酒造会社の 16 日目もろみから分離された T161, T162, T163, T166 は pH 6.4 と比較すると pH 4.5 でやや生育度の上昇が見られるが、pH 4 以下では生育度が大きく低下した。I 酒造会社の 1 日目もろみから分離された *L. fermentum* I1 は pH 3.5 でもほとんど生育度の低下が見られなかった。



20 %エタノールに対し耐性を持つ株はいなかった。10 %エタノールに対し、*L. fermentum* は耐性を持たなかったが、*L. casei* は全て耐性を持っていた。*L. fermentum* は0 %と比較して、5 %エタノール存在下での生育度が約 1.8 倍に上昇した。

泡盛もろみより得られた *L. casei* はいずれも pH4.0 でも十分に生育し、また pH 3.5 でもある程度の生育が見られた。*L. fermentum* II は pH3.5 でも中性から弱酸性下と同程度の生育が見られたが、10%以上のアルコール存在下で急激に生育度が低下した。泡盛もろみより得られた *L. casei* は *L. fermentum* や *L. rhamnosus* と比較してアルコール耐性が高かった。仕込み後 16, 17 日目はアルコール発酵が進んでいる影響でもろみ中のエタノール濃度は 16~18 %になっており、*L. casei* が単離されたのはエタノールによって死滅せず、pH 3.5 付近のもろみ中でも増殖できたためだと思われる。一方、仕込み直後のもろみ中にはエタノールはほぼ生産されておらず、かつ麴の生産するクエン酸の影響で pH 3.5 付近の環境と

なっている。*L. fermentum* は仕込み初期で検出され、その後、アルコールの上昇に伴い死滅したものと思われる。このように各発酵段階から取れた菌株はその環境にあった特性を持っている事が示唆された。今後、これら野生乳酸菌が泡盛製造にどの様に関与するかを検討することで、安定した品質の高い泡盛製造法の確立やアルコール耐性乳酸菌を利用した付加価値の高い泡盛製造が出来る可能性がある。

### 3 研究の総括と今後の課題・展望

#### 3.1 研究の総括

本研究課題の遂行により、差し酏の繰り返しにおける酵母の入れ替わりを改めて証明するとともに、入れ替わりに伴い乳酸菌の変化も同時に観察することができた。これにより、これまで未知であった焼酎発酵における酵母と乳酸菌の共生関係の維持と破綻のメカニズムの一端を明らかにすることができた。詳細を以下に示す。

焼酎もろみ中の野生酵母と乳酸菌の起源の解明を行った結果、麴及び種麴からの野生酵母及び乳酸菌の分離はできなかった(研究分担グループ1及び3)。酵母に関しては、蔵つき酵母と呼ばれる、古くからその酒造・酒造場に住み着いている酵母が差し酏やもろみ中に混入し増加するためと考えられている。微生物の場合は適切な環境下で爆発的に増加するため、その起源を正しく特定することは容易なことでは無い。このため、今回の結果から麴を起源とする酵母及び乳酸菌は存在しないことを断言することはできない。起源を特定するためには、麴の量を増やす他、高感度な測定法の開発が必要であろう。また、蔵つきかどうかの特定には、落下細菌や蔵の壁、タンク、道具類からのスクリーニングを行うことで、その起源を特定することができるものと考えられる。

野生酵母と培養酵母の分別をコロニーの大きさと TTC 染色法の色調から推定した結果、差し酏1回目で酵母純度60%から差し酏3回目で20%まで低下した(研究分担グループ2)。このため、差し酏の早い段階から野生酵母の影響を受けていると推定された。さらに、野生酵母と培養酵母の違いを確実に区別することを目的として、ITS領域の配列解析を行ったが、99-100%の同一性のため区別することはできなかった。このため、区別するために有効な領域を探索した結果、15遺伝子のオルソロググループを見いだした(研究分担グループ1)。これらの遺伝子は酵母の菌株レベルでの系統分類への利用が期待できる。また、差し酏から単離された酵母10株と鹿児島5号酵母及び2号酵母との増殖能をYPD培地のpH・温度・アルコール濃度を変えて比較検討した。その結果、差し酏から単離された酵母10株は、それぞれ異なる増殖能を有していたことから、それぞれが異なる株の野生酵母であることが強く示唆された(研究分担グループ1)。差し酏回数異なるもろみを用いて製造した焼酎の官能評価を行った結果、差し酏回数4回と5回の間には揮発酸度と酒質の大きな変化があることを確認した(研究分担グループ1)。また、試留液中の高級アルコール類の測定からもろみ中に存在した酵母による高級アルコールの生産性を推定した結果、純粋培養から差し酏が進むに従い、高級アルコール類の生産性が増加し、差し酏4回目以降では

安定した(研究分担グループ 2)。これらの結果より、4 回程度の差し酏の繰り返しにより野生酵母に完全に入れ替わり、それに伴い酒質が安定化されると考えられる。

差し酏の回数と焼酎もろみ中の乳酸菌の菌数変化を調べたところ、差し酏 5 回目の 2 次もろみの 3 日目で最も生菌数が多く、差し酏 15 回目で最も少なかった。また、2 次もろみ中では日数が経つと生菌数が減少した(研究分担グループ 3)。分離されたコロニーのほとんど全てが *Lactobacillus* 属細菌であった。純粋酵母を用いた 2 次もろみの 3 日目でも  $8.6 \times 10^3$  cell/ml の菌数を観測したことから、焼酎乳酸菌は純粋酵母の 1 次もろみ中に既に存在しており、2 次もろみにおけるアルコール濃度の低下に伴い増殖したものと考えられる。菌数が最も多い差し酏 5 回目は野生酵母と培養酵母が完全に入れ替わり安定化した差し酏回数と同じである。差し酏 1 回目以降のもろみ中で純粋培養のもろみでは少ない *L. fermentum* の検出割合が高まっていることから、酵母の入れ替わりと乳酸菌には関連性があるものと考えられる。また、差し酏 15 回では、アルコール耐性が高いと予想される乳酸菌の出現率が高まる事が確認された。この結果より、差し酏の繰り返しの限界を規定しているものは乳酸菌である可能性も示唆される。乳酸菌と酵母が共生関係にあることが知られているため、蔵付き酵母と同環境に生息しているものと考えられる。乳酸菌を適切にコントロールすることで差し酏を繰り返し安定的に利用できる可能性があると考えられる。

泡盛もろみ中の乳酸菌のスクリーニングを行った結果、*Lactobacillus casei* が高い割合で検出された(研究分担グループ 3)。泡盛より単離された *L. casei* は全て 10% のアルコールに対して耐性を示した。ただし、菌株によって各 pH 及びエタノール濃度で若干異なる生育度を示したことから株レベルで違いも無視できないものであると考えられる。*L. fermentum* は 1 日目のもろみから分離されたが、10% 以上のアルコール濃度で急速に生育度が低下した。仕込み後 16 日目のもろみ中のアルコール濃度は 16-18% になっていることから、この環境で耐性を有する *L. casei* が高い割合を示すものと考えられた。アルコール耐性乳酸菌を選抜して添加することにより、安定した品質の高い泡盛製造の確立ができる可能性がある。

### 3.2 次年度に向けての課題・計画・展望等

本研究課題により差し酏中の野生酵母やそれと共生する乳酸菌をゲノムレベルで理解し、焼酎酵母・乳酸菌の特性を解明する事で、もろみ中の菌叢の維持とコントロールを可能にする。つまり、これまで経験や勘で管理されていた焼酎・泡盛のもろみの品質管理において科学的根拠に基づいた管理方法や問題解

決方法の確立することができる。これにより品質が安定化され、焼酎・泡盛の生産性拡大につながる。また好ましい味と香りを持つ蔵癖を再現することや、さらには、新たな酒質の開発方法として消費者のニーズに合わせた多様な商品を生産販売することができるものと期待される。詳細を以下に示す。

### 1) 差し酏のサンプリング範囲の拡大とライブラリーの構築

鹿児島本土及び沖縄本島を中心とした焼酎蔵からのサンプリング範囲を拡大し、種子島・屋久島の芋焼酎、奄美の黒糖焼酎、沖縄諸島全域の泡盛に対する調査・サンプリングを継続して行い、多様な個性を持つ野生酵母と乳酸菌のライブラリーを構築すると共に、分離した野生酵母と乳酸菌をゲノムレベルで理解し、維持管理して広く焼酎・泡盛の研究開発に活用できる基盤を整える。さらに、平成26年度の研究計画により解明された野生酵母と乳酸菌の菌叢変化の情報を基に、常温環境での長期間の最適条件の差し酏を維持するための酸度・アルコール度数の管理方法の検討を行う。また、差し酏の変化を迅速に評価できる方法を開発する。具体的には、顕微鏡による形態検察、プレート上でのTTC染色、バイオマーカーによる菌叢解析などを組み合わせる。さらに、差し酏中の菌叢変化を抑えるための対処法として、もろみへの酸素通気処理、乳酸菌の添加、pH調整剤の添加、冷蔵もしくは冷凍保存した差し酏の添加などを比較検討する。その結果得られる個性的な酒質を持つ安定した差し酏の普及による焼酎・泡盛の品質と生産性の向上を目指す。

### 2) 単離菌株の新用途開発

野生酵母と乳酸菌の中で、優良酵母は市販酵母として利用でき、酒質に良い影響を及ぼす乳酸菌については、その菌を利用した醸造を実施することにより酒質の多様化を図ることができる。また、野生酵母の高い生育能力の理由を解明することで、醸造用やバイオエタノール生産における新たな酵母スクリーニングの指標を与えることができる。

### 3) 乳酸菌と酵母の共生関係の維持を担う物質の解明

乳酸菌と酵母の共生関係の維持を担う物質の解明を目指し、酵母と乳酸菌から分泌される特徴的なタンパク質やペプチドを調べる。差し酏中に分泌される乳酸菌由来の物質はほとんど調べられていないため、他の分離源由来の乳酸菌と比較することで、差し酏中での乳酸菌の役割を詳細に検討することができる。またその過程でアルコールに耐性である新規な加水分解酵素や食品添加物として利用できるバクテリオシンを見いだせる可能性もある。

## 4 支援金額の執行内訳

支援金額の総額 3,500,000 円の各研究分担グループの執行内訳を以下に示す。

### 研究代表者（高峯）

項目	金額（円）	内訳等
機器・備品	0	
消耗品	250,000	一般生化学試薬等（アネロパックなど）
合計	250,000	

### 研究分担グループ 1(吉崎)

項目	金額（円）	内訳等
機器・備品	0	
消耗品	245,000	一般生化学試薬，ガラス器具等
送料	5,000	サンプル送付
合計	250,000	

### 研究分担グループ 1(玉置・二神)

項目	金額（円）	内訳等
機器・備品	410,400	PCR 装置（タカラバイオ TP600）
消耗品	89,600	一般生化学試薬等
合計	500,000	

研究分担グループ 3 (石橋)

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	199,344	小型機器 (シェーカーや修理代)
消耗品	199,231	機器分析用の備品代・消耗品・利用料
	101,425	試薬・カラム・ガラス・プラスチック器具
合計	500,000	

研究分担グループ 3 (藤田)

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	0	
消耗品	586,306	一般生化学試薬等
	412,938	小型機器 (ピペットマン等)
送料	756	
合計	1,000,000	

研究分担グループ 4 (外山)

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	0	
消耗品	1,000,000	一般生化学試薬、DNA 合成等
合計	1,000,000	

## 5 資料等

なし

効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立にむけた  
経営と技術の学融的実証研究

研究代表者 鹿児島大学水産学部 鳥居享司

2015年3月

## I 研究テーマ

効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立にむけた経営と技術の学融的実証研究

## II 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	所属大学・専攻	研究の役割分担等
代表者	鳥居享司 (准教授)	鹿児島大学 生物生産科学専攻	研究の統括, 経営コスト分析, 市場分析 漁業者ネットワークの分析
分担者	小谷知也 (准教授)	鹿児島大学 農水圏資源環境科学	効率的種苗生産技術の開発
分担者	安楽和彦 (准教授)	鹿児島大学 農水圏資源環境科学	LED 電照装置を応用した斃死率の 低減技術の確立
分担者	宇野誠一 (准教授)	鹿児島大学 農水圏資源環境科学	漁場環境モニタリング
分担者	横山佐一郎 (助教)	鹿児島大学	高効率な配合餌料の開発
分担者	米山和良 (助教)	鹿児島大学	クロマグロの行動分析による斃死 低減技術の開発
協力者	荒木亨介 (助教)	鹿児島大学	魚病対策

### Ⅲ 研究内容

#### 1. 研究の目的と概要

##### ① 研究の目的

###### <プロジェクト全体の達成目標>

本研究の目的は、「効率的なクロマグロ養殖経営モデルを確立すること」である。

1990年代中盤以降、クロマグロ養殖は鹿児島県奄美地域を中心に広がりを見せ、養殖生産量は飛躍的に増加した。しかし、クロマグロ養殖は、①漁獲規制強化による天然種苗確保の不安定性、②餌料価格の上昇と低い餌料効率、③育成中の斃死率の高止まり、④市場における価格の下落、など生産から販売まで数多くの「非効率性」を抱えている。こうした課題に対して、一部の研究機関や大手資本による研究が進められているが、課題の解消には至っていない。

また、鹿児島大学においても複数の教員がクロマグロ養殖に関係する研究を遂行しており、その成果を各学会において報告してきた。但し、それらは個別研究の域に留まっており、産業界が求める「クロマグロ養殖経営の効率化」へ体系的な貢献をするには至っていない。

そこで、本プロジェクトでは「効率的なクロマグロ養殖経営モデルの開発」という共通目標を掲げ、社会科学と自然科学の知見を融合させる。さらに、マグロ養殖を営む民間業者の協力を得ながら、効率的経営モデルを実証的に確立する。研究期間は平成26年から28年までの3カ年を予定している。具体的には、①効率的な人工種苗生産技術の確立、②餌料効率の改善、③育成中の生残率改善、④販売方法の再検討による販売価格の維持・改善、⑤経営コスト削減の検証により、新しい「効率的なクロマグロ養殖経営モデル」を提示することを達成目標とする。

なお、プロジェクトの推進にあたり、クロマグロ養殖を行う民間企業および漁協などの協力も既に取り付けており、研究成果の産業界への還元を強く意識している。また、鹿児島県水産技術開発センターや南さつま市と連携することで、施設面での不足を補う体制を整えている。

##### ② 研究の概要

###### <2014年度の研究課題>

2014年度は、「効率的な人工種苗生産の実現」、「仔魚期の生残率改善」、「育成中の生残率改善」、「餌料効率の改善」、「経営コスト削減の効果検証」、「高付加価値販売に向けた課題分析」を課題として掲げた。また、安定的な人工種苗を実現するには、クロマグロ受精卵を確実に確保することが必要であるため、「漁業者ネットワークの構築」にむけた基礎的情報を収集することとした。

###### 課題1：効率的な人工種苗生産技術の開発（小谷知也）

技術的課題：人工種苗生産には大型設備が必要であり、多大な費用が必要とされる

解決する手法：小型水槽内における水流解析、水流発生装置の開発、水槽内病原体の探索、  
最適生物餌料の生産および探索

**課題2：仔魚期の生残率改善（安楽和彦）**

技術的課題：夜間における突発的行動による斃死を回避できる技術が未確立

解決する手法：仔魚期の分光視感度の推定による光反応の分析，LED 電照装置による斃死回避

**課題3：育成中の生残率改善（米山和良）**

技術的課題：沖出し過程，中間育成時に斃死を低減できる技術が未確立

解決する手法：生け簀内の魚群行動分析と環境変動の解析

**課題4：餌料効率の改善（横山佐一郎）**

技術的課題：人工餌料開発，給餌内容と頻度の最適化

解決する手法：低コスト飼料の開発，給餌方法の検討

**課題5：経営コスト削減の検証（鳥居享司）**

本プロジェクトによる成果を検証し，経営コスト削減の効果と課題を抽出

**課題6：高付加価値販売に向けた課題分析（鳥居享司）**

技術的課題：九州圏内の小規模需要者，アジア市場などでの販路拡大

解決する手法：国内市場およびアジア市場などでのニーズ把握と販売対応

**課題7：漁業者ネットワーク構築にむけた基礎的情報の収集（鳥居享司）**

技術的課題：安定的な人工種苗生産を実現するには，クロマグロ受精卵の安定確保が不可欠

解決する手法：複数地区の漁業者をネットワーク化，受精卵の安定確保を目指す

研究項目	平成26年度												平成27年度以降
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	継続の有無
1. 効率的な人工種苗生産技術の確立													
実験水槽の手配・準備													
小型水槽内における水流の解析													
水流発生装置の開発													
水槽内病原体の探索													
最適生物餌料の生産および探索													
2. 餌料効率の改善													
現在の餌料効率の把握													
低コスト飼料の開発													
給餌方法の検討													
3. 育成中の生残率改善													
現在の生残率の把握													
生け簀内の斃死と環境変動の解析													
海面生け簀で使用する照明装置開発													
4. 国内外市場への対応													
現在の販売体制の把握													
国内市場でのニーズ把握と販売対応													
アジア市場でのニーズ把握と販売対応													
5. 普及支援業務													
事業報告書の作成													
研究報告会の開催													

## 2. 研究の成果

### 課題1：小規模水槽を用いた種苗生産技術の開発（小谷知也）

クロマグロ天然資源の減少によって、中小規模クロマグロ養殖経営体では養殖用種苗の確保も困難になっており、経営規模に見合った人工種苗生産の技術開発が求められている。本年度は既存の養魚用施設に設置されている18m<sup>3</sup>水槽を用いて、クロマグロ種苗の人工生産を試みた。

今回使用した水槽は、1～1.2m深の18m<sup>3</sup>水槽で、飼育水には水槽近辺の沿岸海水を汲み上げて使用した。使用海水には殺菌、濾過を施さず、温度調整も行わなかった。水槽には排水設備のみ施し、約400 $\mu$ m目合ネットを塩ビ管に貼付、水槽中央部に設置した。クロマグロ種苗生産の初期段階で重大な死亡となる沈降死を防ぐため、水槽底面には底層水流発生装置を設置した。底層水流発生用の水は、排水用塩ビ管内から確保した。同じく沈降死防止として、ふ化から10日齢までは24時間照明を行った。11～23日齢は共食い防止のため14L10Dの光周期とし、24日齢からは衝突死防止のため再び24時間照明を行った。水質の維持を図るため7日齢に通気を利用した水流発生装置を水槽の4隅に設置した。通気および水流発生装置は成長とともに強くした。餌料としてはL型海産ツボワムシ類（以下ワムシ；2～22日齢）、*Artemia*ノープリウス幼生（以下アルテミア；12～26日齢）、スジアラおよびサバヒーふ化仔魚（12～28日齢）、市販仔魚用配合飼料（7～38日齢）を用いた。ワムシおよびアルテミアには市販栄養強化剤で栄養強化を施した後、給餌した。配合飼料は魚体サイズが大きくなるに従い、粒径を大きくした。

クロマグロ受精卵は7月24日に奄美大島から輸送され、飼育水槽に收容された。翌日ふ化を確認し、38日齢まで飼育水槽内で飼育した。30万粒を收容したうち、52個体が生残し、生残率は0.017%であった。孵化時には2.43 $\pm$ 0.33 mm (n=11)であったものが、38日齢時点で54.3 $\pm$ 6.7 mm (n=6)となった。20日齢までは目立った斃死も見られず、共食いなどの行動も観察されなかった。20日齢から成長停滞が見られ、この頃から共食いあるいは大型魚による小型魚への攻撃行動が観察されるようになった。20日齢以降の成長停滞は餌不足によるものであると考えられ、同時に観察されるようになった共食い・攻撃行動もこれに起因するものであると考えられる。餌不足となったのは、スジアラおよびサバヒーふ化仔魚が20日齢までのマグロ仔魚にとって適正な餌でなかったのと同時に使用していた配合飼料をクロマグロ仔魚が利用できなかったためであると考えられる。また、成長とともに強くした水流が過剰であったことも考えられ、水流に適応出来なかった個体が衰弱して死亡したと推測される。

今回実施したような濾過、殺菌、温調設備がなく、さらに20m<sup>3</sup>以下の規模の水槽その後、クロマグロ種苗生産を実現した例は過去にない。今回の試験からは数多くの課題が見つかり、これらを解消することで、10m<sup>3</sup>レベルの小規模水槽を用いたクロマグロ種苗生産が実現し、中小規模クロマグロ養殖経営体が自前で種苗生産を実施することが可能になると期待できる。

### 課題2：仔魚期の生残率改善（安楽和彦）

#### 1) はじめに

飼養環境下でのクロマグロの高い斃死率は、同魚種の養殖技術における改善課題とされている。成魚の斃死要因は既に明らかにされた点もあり、特に夜間における突発的な遊泳行動の誘発とその行動ともなつて生じる生簀への衝突に起因した脊椎骨折が生じ斃死に至ることが知られている。これへの対策

として夜間照明等が試みられ一定の成果を挙げている。一方、最大の減耗が生じる孵化直後から稚魚期に成長する間の斃死は、表面張力による水面への張り付き、鰓未拡張個体の沈降死等、その事象は明らかにされつつあるものの定性的な改善手段は開発されていない。また、仔魚期における適正餌料、飼育環境についても未解明な点が多く、個体レベルでの行動生理学的知見が求められている。特に、個体の摂餌や遊泳行動には視覚機能および光に対する行動が強く関係していると考えられており、クロマグロにおいても近年、視覚に関する研究成果が報告されるようになってきている。

本課題では、クロマグロ仔魚期の視覚の機能的発達について明らかにすることを目的とした。視覚は個体の摂餌や遊泳に強く関与する。これまでに、形態学的、分子生物学的、電気生理学的な実験技術により明らかにされた、仔・稚魚および幼・成魚の視覚に関する知見が報告されているものの、特に仔魚期の視覚機能についての知見は不足している。後述に、それらの過去の研究成果をレビューするとともに、本課題で取り組んだクロマグロ仔魚の分光視感度について得られた知見を記述する。

## 2) 過去の知見のレビュー

### (1) 魚類視覚に関する基礎知見

本報告内容の理解を深めるために、魚類視覚に関する基礎知見を以下に整理する。

ヒトと同じ脊椎動物の魚類は我々と類似した視覚器を持つ。水中を透過した光は角膜、レンズ、硝子体を通過して眼底部に広がる網膜中の視細胞により受容される。多くの魚類においては人と同じく錐体視細胞および桿体視細胞を持つ。錐体視細胞は色の認識、さらに高感度な桿体視細胞は明暗の認識に寄与する。魚類が色覚を有すか否かはその魚種が網膜に異なる波長の光を吸収する複数種類の視細胞を有するか否かで判定できる。ヒトにおいては、赤-錐体、緑-錐体、青-錐体を持つことで多様な色の認識を可能にしている。一方、生息環境が多様な魚類においては種による相違がみられる。海水の光学的特性によって水面から入射した太陽光は透過距離の増加にともなって青~緑色（概ね波長 470-520 nm）の透過性が高く、それより短波長の紫色、長波長の黄~橙~赤色の波長帯の光は消散する。海水魚の内、比較的浅海域に生息する魚類では複数の錐体を持ち多様な色を認識可能な一方、深海魚では1種類の錐体のみを持つ、あるいは錐体を持たずに僅かな光だけを効率的に利用するために桿体視細胞のみを持つ魚種もいる。視覚は孵化以前の段階で卵膜内において発達が進み、孵化時あるいは孵化後直ぐに光受容可能となる。ただし、上述した錐体視細胞、桿体視細胞ごとに発達機序は異なり、孵化後の初期仔魚が摂餌や遊泳に機能的な視覚を持つか否かはその感覚器官の発達を調べる必要がある。

魚類視覚に関する研究は他の脊椎動物等の研究と同様に、行動学、形態学、神経生理学の研究技術が多用される。また近年では、分子生物学的な研究技術が用いられ、視細胞中に分布する光を吸収するタンパク質（オプシン）の遺伝子解析も行われるようになり、各魚種が持つ視細胞種類の同定の精度を増している。それぞれの研究技術から得られる結果が示すことはそれぞれ相違し、形態学研究は視覚器や視細胞の分布および構造、神経生理学研究は対象細胞の活動や機能、行動学研究は視覚器により受容された光の中枢での情報処理と行動への出力が解明される。クロマグロの視覚研究においても様々な手法が用いられている。次節に、過去の研究報告に基づき、クロマグロの視覚に関する知見を整理する。

## (2) クロマグロ仔・稚魚の視覚に関する知見

Kawamura *et al.* (2003)は孵化後のクロマグロ仔魚の感覚器官の発達について報告している。視覚に関しては、13h 後にレンズおよび網膜層構造が形成され、孵化後 3 日には形態的（機能とは異なる）には視覚器は完成と見なせ、16 日に視運動反応（移動する対象物への追従反応）が見られるようになり、18 日に網膜中に感覚細胞層である水平細胞層が形成され、19 日に桿体視細胞が出現することを見出している。さらに、Matsuura *et al.* (2010)は孵化仔魚の視細胞の発達を免疫組織学的に研究し、摂餌を開始する孵化後 60 時間に視細胞に Rh2（緑感受型錐体オプシンと推測）遺伝子が発現すること、15 日には Rh1（桿体の視物質オプシン遺伝子）が検出され、21 日にはその Rh1 が光を受容する視細胞外節部にも検出されることを明らかにしている。感覚器官の発達速度の若干の相違は飼育環境の相違によると判断でき、上記の 2 つの研究結果が示した錐体及び桿体の発達はともに共通していると思わせる。要約すると、孵化後に当初に機能的になる視細胞は感度の低い錐体視細胞であり、その種類は緑感受型と推測され、高感度な桿体視細胞は形態的にも受容タンパクの出現から判断して孵化後 15-19 日頃に機能的になることを示している。

## (3) クロマグロ幼・成魚の視覚に関する知見

Matsumoto *et al.* (2009)はクロマグロ幼魚（SL 150-175mm, 52-64 dph）を用い電気生理学的に単波長光刺激に対する網膜電図を記録しその応答強度から相対分光感度を求め、最大感度波長を 479 nm と報告している。さらに、Matsumoto *et al.* (2011)は小型幼魚（SL 77-167mm, 38-62 dph）を対象に同様の実験を行い、小型幼魚が 490 nm 付近に最大感度を示し、成長にともなって 474 nm にまで最大感度波長帯をシフトさせることを見出し、外洋表層域の光環境への適応であることを推測している。クロマグロ幼魚の視細胞に関する分子生物学的研究も行なわれており、Miyazaki *et al.* (2008)は幼魚（SL 50-85 mm）の視細胞の遺伝的解析を行い、視細胞に SWS2（青感受型錐体オプシン）、Rh2（緑感受型錐体オプシン）、Rh1（桿体視細胞オプシン）を見出し、幼魚が分光吸収波長の異なる 2 種の錐体視細胞と 1 種の桿体視細胞を持つことを示した。Nakamura *et al.* (2013)はクロマグロ成魚の視細胞に M/LWS（赤感受型錐体オプシン）、SWS1（紫外感受型錐体オプシン）、SWS2（青感受型錐体オプシン）、RH2（緑感受型錐体オプシン）、RH1（桿体視細胞オプシン）が見いだされたことを報告している。すなわち、深い層に生息するクロマグロ成魚が意外にも幼魚が持たない赤および紫に対する受容能力を持つことを示唆した。成長にともない視覚の分光感度特性を変化させることはウナギ類、サケ科魚類、アユの様な回遊性魚類においても知られておりクロマグロ特有の現象ではないが、成長にともなって深い水深層に移動すると考えられるクロマグロにおいて成魚期に海水中を透過しにくい赤や紫の波長帯に対応する錐体細胞が出現することは回遊性魚類の進化生物学的にも興味深い。

高度回遊性魚類であるクロマグロの仔魚期から成魚の視覚について上述の様な知見が得られている。一方、本研究課題の目標とする仔魚期の視覚については、視細胞の形態学および分子生物学的な知見は得られつつあるものの、機能的な知見は極めて少ない。最適な飼育光環境や摂餌を促進し得る光環境を設計するには感覚器官の機能に関する知見は不可欠である。

### 3) 本課題の成果

本プロジェクトで孵化育成されたクロマグロ仔魚 3 個体を用い、筆者が研究代表者である科研費（基盤 C）課題で製作した魚類網膜分光吸収計測装置（spectrophotometer）を利用して網膜の光の波長に対する感度推定を試みた。すなわち、摘出網膜に広い波長帯に放射照度を分布する光を照射し、網膜を透過した光の分光エネルギーを計測することで網膜中の視細胞に吸収された光エネルギーを波長別（1 nm 毎）に吸光度として求めた。

実験は、各個体を 2 時間以上暗箱内の水槽に放置して網膜を暗順応状態にした後に暗室内で眼球を摘出し、近赤外線照明下で暗視装置を装着した顕微鏡下で網膜を剥離し、剥離網膜をプレパラートに載せ標本とし、標本を製作した分光吸収計測装置にセットし計測を行った。仔魚の眼球は小さく、摘出網膜も微量なため、左右の眼球から摘出した全網膜を混合し標本とした。

Fig.1 は 3 個体の網膜の吸光度を示す。孵化後 17 日および 19 日の個体を用い計測した結果、2 つの異なる吸光度曲線を得た。1 群は 524 nm を最大分光吸収波長とし、他群は 499 nm をピークとした。この結果はそれぞれの群ごとに異なる視細胞の特徴を示すと考えられる。通常、魚類の桿体視細胞の分光吸収は 485-510 nm の範囲にピークが見られることを考慮すると、499 nm にピークを示した結果は桿体視細胞の特徴を大きく反映し、524 nm にピークを示す結果は高感度な桿体視細胞が未形成で、孵化直後から早い段階で発達した錐体視細胞（緑感受型）の分光吸収特性を示していると推測した。

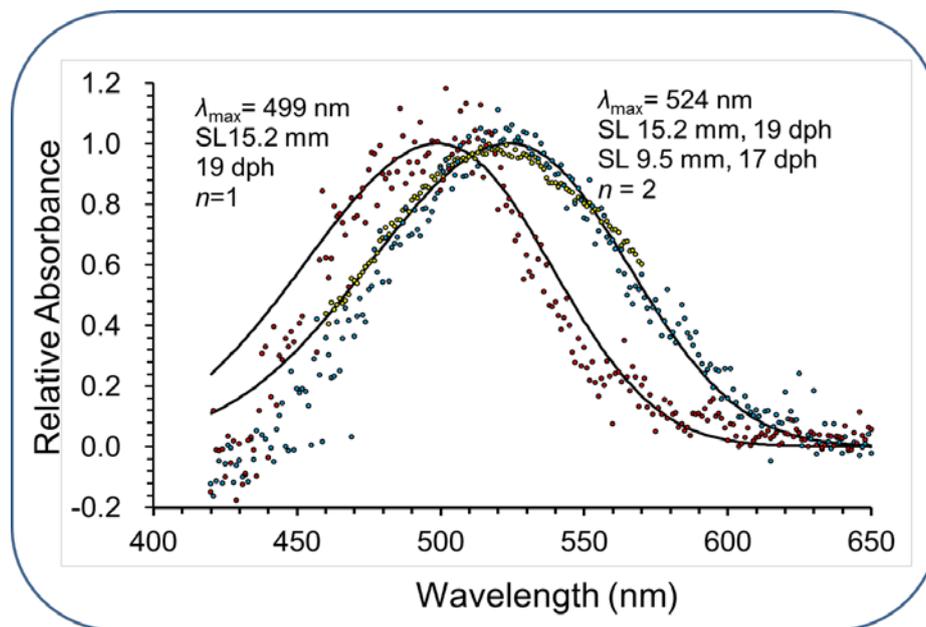


Fig.1 Relative absorbance of photoreceptors in bluefin larvae.

### 4) まとめおよび今後の展望

本課題の研究により明らかにされたことは下記の通りである。

- ① これまでに未解明な仔魚期の視細胞の分光吸収についての知見を得た
- ② 既往の形態学的研究（免疫組織学的研究を含む）および行動学的研究により示された孵化後 17-19

日の網膜に、524 nm を最大分光吸収波長とする錐体（緑感受型）と推測される細胞、および 499 nm を最大分光吸収波長とする桿体と推測される細胞が分布することを明らかにした

上記はこれまでに得られていない新たな知見であり、孵化仔魚の飼育環境を考える上で重要な知見である。ただし、現状では標本数は十分ではなく次年度に試みるクロマグロ種苗生産（農水省事業として採択）において計測例を増やす必要がある。また、単一の視細胞を対象とした分光吸収計測を行える顕微分光計測システムを用い、さらに詳細に、仔魚期に持つ視細胞種類とその分光吸収特性を解明する必要がある。顕微分光計測システムは筆者の研究室で本年度開発を終えており（科研費による）、次年度には取り組める環境を構築している。本年度の研究成果を次年度の種苗生産に活用する点としては、①孵化直後の網膜には高感度な桿体視細胞は形成されていないことが過去の研究および本研究により強く示唆されるので、波長 520 nm 付近に放射波長をもつ照明器具での飼育環境の照明を行う事、②孵化後 20 日頃の桿体が機能化した後には環境照度を低減させる事が挙げられ、本プロジェクトグループ内で今後検討することとしたい。

### 課題 3：育成中の生残率改善（米山和良）

本プロジェクトの最終目的である効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立には、課題 1「効率的な人工種苗生産技術の確立」、課題 2「餌料効率の改善（餌料コストの 10%削減）」、課題 3「育成中の生残率改善（活け込み後の生残率 60%達成）」の 3 課題に取り組むことが不可欠である。本研究では、課題 3 の「育成中の生残率改善」に焦点を絞り、クロマグロの行動分析による斃死低減技術の開発を目的とした、「養魚の行動計測技術」、および、「成長モニタリング技術の確立」を行った。

#### <養魚の行動計測技術>

クロマグロ養殖における孵化仔魚から成魚までの生残率は他の養殖魚類に比べて著しく低く、生残率の向上は急務である。クロマグロの種苗生産過程では、陸上水槽で養成された種苗を海上の中間育成生簀に移送する「沖出し」が行われる。沖出しの直後に大量死がみられる(Tsuda et al. 2012)。主な原因に、移送過程で生じる体表面の損傷や養成環境の変化が考えられている。

種苗を中間育成場に移送するには中間育成に使用する生簀を曳航することで沖出しが簡便になる。種苗の遊泳能力が曳速に劣る場合、種苗生簀壁面に接触し体表面を損傷することで、大量斃死を招く可能性がある。27 日齢以降の日中の遊泳速度はおおよそ  $2\text{--}4 \text{ BL s}^{-1}$  とされている (Fukuda et al. 2010)。当該研究の行動計測は 2 次元空間に限定されていたため、3 次元空間における遊泳速度はさらに高い可能性があり、適切な曳速の設定には 3 次元遊泳速度を計測する必要がある。

種苗の中間育成では、光、音、潮汐の変化などの環境刺激による影響を受けると考えられている (Ishibashi et al. 2009, Tsuda et al. 2012)。月齢は斃死率に関連するとされるが両者に相関は確認されておらず(Tsuda et al. 2012)、新月、満月時の大潮による流れの変化による影響は考慮されていない。

本研究では、クロマグロ種苗の生残率向上を目標とした、沖出し過程、及び中間育成時における斃死原因を明らかにすることを目的とした。

鹿児島県水産技術開発センターの飼育水槽（直径 4 m, 深さ 1.7 m, 容積 20 m<sup>3</sup>）内を遊泳するクロマグロ種苗 21 個体（34 日齢, 体長約 7 cm）を対象に行動計測実験を行った。水槽内壁にカメラ（HERO3+, GoPro）を 2 台設置し, クロマグロ種苗の遊泳の様子を 1980×1020p, 23 fps の画質で撮影した。複数台のカメラで記録される対象物の 2 次元位置情報を 3 次元位置情報に変換する Direct Linear Transform 法（以下, DLT 法）に必要なカメラ変数を, 1 辺 54 cm の立方体フレームを水中で撮影することで推定した。撮影した 2 映像を, 動画編集ソフトで音声記録を基準に時間の同期を行った。映像から種苗の吻端を検出し, 画面上の 2 次元位置の時系列記録を取得した。これらの時系列記録を DLT 法によって変換し, 3 次元遊泳行動記録を取得した。

南さつま市笠沙町の陸上水槽と鹿児島県水産技術開発センターにて人工生産されたクロマグロ種苗 56 個体（体長 4~7 cm）を使用した。2014 年 9 月 1 日に鹿児島県南さつま市笠沙町にて, 陸上水槽で人工生産したクロマグロ種苗の中間育成生簀への沖だしを行った。移送には幅 7 m, 奥行 7 m, 深さ 3.5 m の生簀を使用した。陸上水槽から生簀への種苗の輸送はビニール袋で種苗を海水ごとすくい行った。中間育成生簀に種苗を活け込み, 船舶で約 60 分かけて生簀を中間育成場に曳航した。曳航生簀に流速計（Compact-EM, JFE アドバンテック）と深度計（DST-comptilt, Star-Oddi）を取り付け, 曳速と底網深度を記録した。

沖出しが行われた 9 月 1 日から 2 ヶ月間の周辺海域の水温, 透明度, 天候, 月齢, 月面の輝面比と, 斃死個体数の経日変化を記録することで, クロマグロ種苗の中間育成モニタリングを行った。

データの取得に成功した 8 個体（BT1-8）の平均遊泳速力を算出し, クロマグロ種苗の 3 次元遊泳速力を算出した。3 次元空間における種苗の遊泳速力は 2.6 –8.2 BL s<sup>-1</sup>であった。計測時間の短い BT1-4 で高い速力を計測したが, 突発遊泳をとらえた可能性がある。一方で BT5-7 は計測時間が長く, 推定された遊泳速力には信頼性がある。したがって, 3 次元の遊泳速力は巡航速度でおおよそ 3 BL s<sup>-1</sup>と推定される。従来, 2 次元空間で計測されてきたクロマグロ種苗の遊泳速力を 3 次元空間の速力で算出できた。沖出し時の生簀曳航の適切な曳速設定への活用が期待できる。クロマグロ種苗の移送時, 曳速は徐々に上昇し, 最大で 29.2 cm s<sup>-1</sup>まで上昇した。底網深度は曳速が増加するに連れて上昇し最大で 80 cm 上昇した。種苗の平均速力が 3 BL s<sup>-1</sup>とすると, 体長 7 cm に満たない沖出し個体は巡航速度 4 BL s<sup>-1</sup>以上の遊泳速力が必要であり, 遊泳能力が不十分だった可能性が高い。これを原因に生簀に接触し, 体表面の擦れを生じさせたと考えられ, 後述する中間育成初期の大量の減耗の一因になっていると推察される。また, 曳速の上昇に伴って底網が上昇し遊泳可能な空間が減少したことや, 水槽から生簀まで人の作業で運搬したこともストレスを与えたと考えられる。

クロマグロ種苗の中間育成では, 種苗の初期減耗が確認され, その後斃死数は減少した。活け込み直後には大型個体が小型個体を攻撃する共食いが目視観察された。新月付近に斃死が確認された。満月付近に顕著な斃死が確認されないことから, 斃死に潮汐流の影響は少ないと考えられる。沖出し後の照度環境を改善する必要があると推察された。共食いが確認されたことから種苗サイズの統一が望まれる。

## <成長モニタリング技術の確立>

クロマグロ養魚の体重把握は出荷や試験中の成長過程を把握するために重要だが、実現には2つの問題がある。ひとつは、クロマグロは大きく成長し、擦れに弱いため、無刺激かつ非接触な体測が必要である。ふたつ目に、従来用いられる体重推定式の確度が低いことである。現在、クロマグロの体サイズを非接触にモニタリングするステレオ画像計測システムが提案されている(Harvey et al. 2003, Torisawa et al. 2011)。しかし、ステレオカメラおよび解析ソフトは高価で容易に導入できない。Torisawa et al. 2011 は防水のホームビデオカメラで、Direct Linear Transform 法(以下、DLT 法)を用いたステレオ画像計測を行い、クロマグロの尾叉長推定に成功した。システムは安価になったが解析ソフトは依然高価であった。DLT 法は難度の高い手法ではなく、自作の解析プロシージャで十分対応でき、コスト低減が期待できる。体重推定モデルに関しては、尾叉長から体重推定するモデルが複数報告されている(Hsu et al. 2000, Shimose et al. 2009)。これらのモデルはアロメトリー式の性質から尾叉長の増加に伴い体重の誤差も相対的に増加する問題がある。また、使用する体重には鰓・内臓重量を含めるものや抜いたものが混在し、実用性の改善が必要である。

本研究では市販のカメラを用いたステレオ画像計測と体重推定モデルの改良により、非接触な養魚の体重推定システムを構築することを目的とした。

2014年2月18日～2015年1月7日にかけて鹿児島県南さつま市笠沙町片浦野間池沖にて養殖されているクロマグロの出荷に立ち会い、295個体の体重と内臓重量、幾何学的に独立成分の尾叉長、体高、体幅を記録した。体測値から体重推定モデル(アロメトリー式および重回帰式)を非線形最小自乗法および最小自乗法で構築し、赤池情報量基準(AIC)を用いて、統計学的に最も適合度の高いモデルを選択した。ステレオ画像計測にはビデオカメラ(HERO3+, Gopro)2台を使用し、時刻同期、レンズ歪み補正、位置較正を行い、2014年11月12日、26日に水揚げされたクロマグロ(15個体)を対象にステレオ画像計測による体測を行って体重推定を実施した。

体重推定モデルを構築しAICでモデル選択した結果、尾叉長と体高を用いたモデルが選択された。推定式は $M=152 \cdot X^{1.43}$ (M: 体重(kg), X: 線形予測子(尾叉長(m) × H: 体高(m))となった。対象個体にステレオ画像計測を行った結果、確度(誤差)の最大値は尾叉長で2.8 cm、体高で1.9 cmであった。ステレオ撮影システムの時刻同期、レンズ歪み補正、位置較正、位置較正点とクロマグロの位置関係が誤差に影響すると考えられた。より正確な計測値を得るためには撮影条件に留意する必要がある。体重推定を行った結果、その確度平均は $1.14 \pm 0.3$  kgで推定された。尾叉長のみを使用した従来の体重推定モデルの推定結果( $1.66 \pm 0.4$  kg)よりも確度が向上した。また、本研究で体重に対する内臓重量の推定モデルも構築できたことから、鰓・内臓を除いた出荷重量の推定も可能となった。

## <成果物>

本研究による成果物として3編を添付する。

- 1) 米山和良, 國澤慎太郎, 外菌博人, 小谷知也, 今村昭則, 松岡達郎, 画像解析による水槽内を遊泳するクロマグロ稚魚の3次元位置の検出, 数理水産科学, Vol.12, pp.51-61 (2015).
- 2) 國澤慎太郎 沖出し時におけるクロマグロ人工種苗の斃死原因に関する研究, 鹿児島大学水産学部

卒業論文, (2015).

- 3) 森田竜作 3次元ステレオ画像計測による養殖クロマグロの魚体重推定, 鹿児島大学水産学部卒業論文, (2015)

#### <参考文献>

- Fukuda, H., S. Torisawa, Y. Sawada, T. Takagi 2010. Ontogenetic changes in schooling behaviour during larval and early juvenile stages of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Journal of Fish Biology* 76:1841-1847
- Harvey, E., M. Cappel, M. Shortis, S. Robson, J. Buchanan, P. Speare 2003. The accuracy and precision of underwater measurements of length and maximum body depth of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) with a stereo-video camera system. *Fisheries Research* 63:315-326
- Hsu, C.-C., H.-C. Liu, C.-L. Wu, S.-T. Huang, H.-K. Liao 2000. New information on age composition and length-weight relationship of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, in the southwestern North Pacific. *Fisheries Science* 66:485-493
- Ishibashi, Y., T. Honryo, K. Saida, A. Hagiwara, S. Miyashita, Y. Sawada, T. Okada, M. Kurata 2009. Artificial lighting prevents high night-time mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, caused by poor scotopic vision. *Aquaculture* 293:157-163
- Shimose, T., T. Tanabe, K.-S. Chen, C.-C. Hsu 2009. Age determination and growth of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, off Japan and Taiwan. *Fisheries Research* 100:134-139
- Torisawa, S., M. Kadota, K. Komeyama, K. Suzuki, T. Takagi 2011. A digital stereo-video camera system for three-dimensional monitoring of free-swimming Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, cultured in a net cage. *Aquat Living Resour* 24:107-112
- Tsuda, Y., W. Sakamoto, S. Yamamoto, O. Murata 2012. Effect of environmental fluctuations on mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in closed life-cycle aquaculture. *Aquaculture* 330:142-147

#### 課題4：餌料効率の改善（横山佐一郎）

陸上小型水槽を用いて生産された全長約40mm以上のクロマグロ稚魚を、沖合に設置したイケスに移動させ、生餌および市販配合飼料を用いた中間育成を試みた。これらのクロマグロ稚魚は沖出し直後より活発に遊泳したが、同時に個体間での追尾や噛み合い行動が観察されたことから、沖出し作業の影響による死亡を除き、噛み合い行動が陸上水槽と同様に生残率を低下させると示唆された。

また、移動直後よりアジやサバをミンチ状に裁断した生餌を給餌したところ、活発な摂餌が確認されたことから、種苗生産後期または中間育成に導入されている従来の餌料系列が、本試験漁場においても応用可能と考えられた。

また、本研究ではクロマグロ稚魚を沖合イケスへ移動させた後、数日間に渡る生餌給餌を経て、飼料メーカーや水産総合研究センターと共同開発した、ゲル状の市販マグロ稚魚用配合飼料（直径4.0mm、

林兼産業)を給餌する餌料系列を導入した。

その結果、クロマグロ稚魚は配合飼料給餌の初日より与えられた配合飼料を活発に摂餌したことから、ゲル状の市販マグロ稚魚用配合飼料を用いれば、生餌に一旦馴致したクロマグロ稚魚であっても、配合飼料への切り替えが可能であると考えられた。その後、本配合飼料のみの給餌によりクロマグロ稚魚は全長 200mm 程度まで成長したことから、この時期のクロマグロ人工種苗は配合飼料の単独給餌による育成が可能であると思われた。これらの稚魚は遊泳能力の発達に従い、中間育成イケスから大型の育成用イケスに収容されたが、事前に収容されていたより大型の天然種苗の噛み合い行動により、死亡する個体が多く見られた。

以上の結果より、中間育成期のクロマグロ人工種苗は、ゲル状の市販マグロ稚魚用配合飼料を単独で用いた育成が可能であり、餌料の変更にも柔軟に対応可能であったが、配合飼料の適切な給餌回数、いけすの変更およびサイズ組成の異なる個体との共存に課題が残された。

#### **課題5：経営コスト削減の検証（鳥居享司）**

本年度は受精卵 30 万粒を用いて、人工種苗 46 尾（生残率：約 0.015%）を沖出しすることに成功した。46 尾の人工種苗を生産するにかかった費用は 1,472,573 円であった。

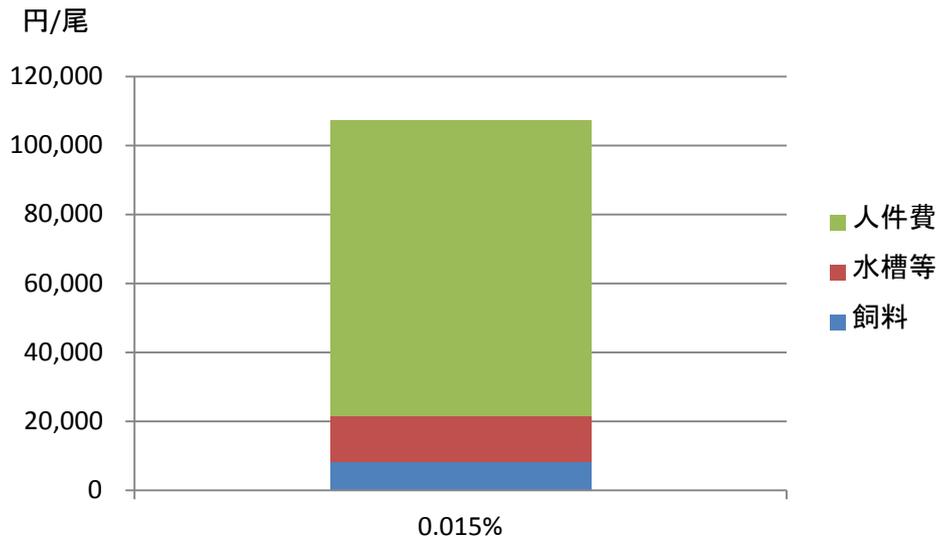
人工種苗の生産を将来的には美代丸水産が行うことから、実験に携わった教員や学生の作業内容を「日当 1 万円、宿泊費 1 万円」と仮定、人工種苗に必要な人件費についても産出を試みた。その結果、人件費は 3,944,000 円相当であり、合計 4,936,945 円の生産費用がかかった。

これを人工種苗 46 尾で除すると、1 尾あたり 107,325 円の生産費用がかかっていることが明らかとなった。なお、内訳については、餌料 8,231 円/尾、水槽等 13,354 円/尾、人件費 85,739 円/尾である。

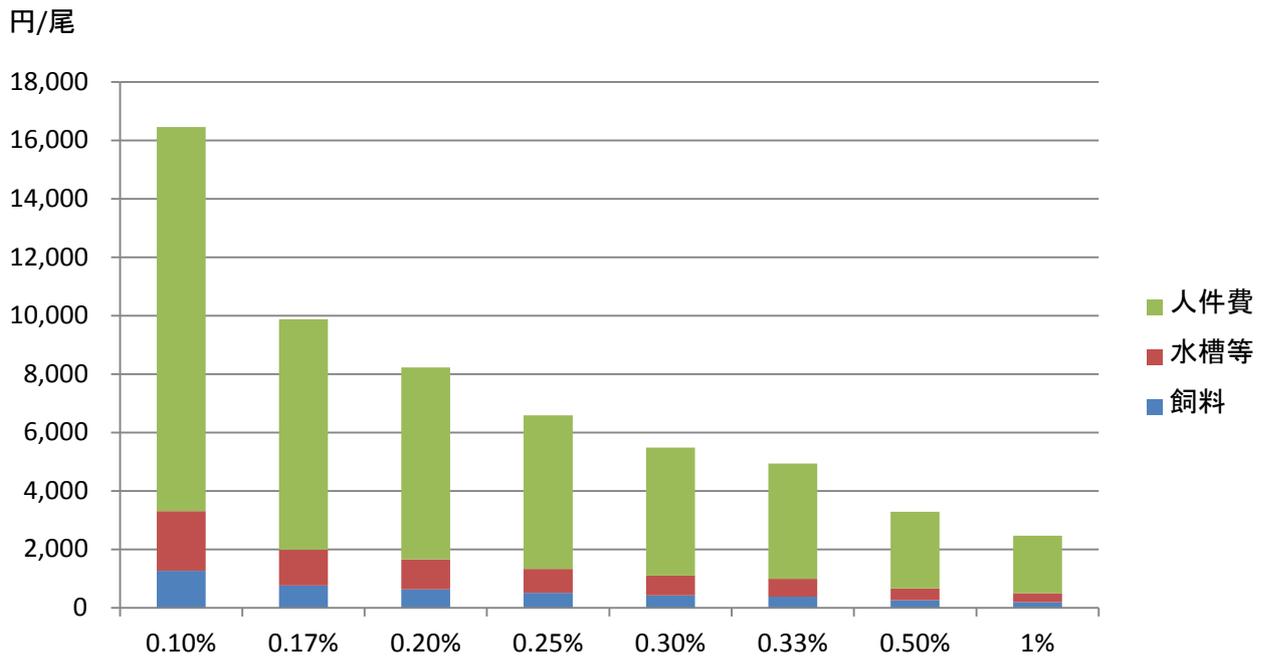
美代丸水産がマルハから購入する人工種苗は 13,000 円/尾（別途、輸送量）、野間池近海で採捕するヨコワは 3,500 円/尾であることから、今年度の生産費用では全く競争力がない。

今後の課題としては、受精卵から沖出しまでの生残率を高めることであることが明らかとなった。生残率をシミュレーションした結果、0.20%から 0.30%の生残率を確保できれば、1 尾あたり 5,485 円から 8,228 円で生産することができ、他社から人工種苗を購入するよりも安価に生産可能であることが判明した。

## 2014年度の人工種苗生産コストの内訳



シミュレーション



### 課題6：漁業者ネットワーク構築にむけた基礎的情報の収集（鳥居享司）

本年度は、人工種苗生産を安定化するために必要なマグロの受精卵ネットワーク構築にむけた基礎的条件の収集を行った。まず、クロマグロ養殖を営むA社（長崎県対馬市）、B社（長崎県新上五島町）を対象に、基礎的経営情報、受精卵ネットワークへの対応姿勢、受精卵を生み出す可能性のあるマグロの個体数、受精卵を生み出した経験の有無、ネットワーク構築上の課題などについて検討した。

その結果、いずれの経営体においても種苗確保の不安定性が増しており、人工種苗生産に関心を抱いていることが明らかとなった。そのため、人工種苗生産技術の確立を目指す本研究に前向きな対応を示しており、ネットワーク参加について前向きな回答が得られた。対馬市の A 社においては、養殖中のマグロが受精卵を生み出す経験を有しており、受精卵の確保先として有力であることが明らかとなった。B 社ではこうした経験はないものの、今後の取り組みに期待を示した。また、A 社、B 社から鹿児島県への受精卵輸送についてもシミュレーションした。輸送中の温度管理を適切に行えば、十分に孵化を期待できる状態での輸送が可能であることが明らかとなった。なお、温度管理を可能とする容器の開発は 2015 年度の課題であり、安楽が担当することとなった。

つぎに、鹿児島県屋久島漁協を対象に、種苗供給の可能性について調査した。屋久島では 2014 年より、養殖種苗の採捕を目的としたヨコワ曳き縄釣りが始まり、新たな種苗供給地としての期待が高まった。しかしながら、近年の資源減少の影響のためか、全く釣果を得ることなく 2014 年度のヨコワ漁は終了した。2015 年以降もヨコワの採捕が試みられる予定であるが、中西部太平洋におけるクロマグロ資源水準は歴史的低位にあることが指摘されていることから、大きな期待を抱くことはできない。安定的なクロマグロ養殖経営の確立には、人工種苗生産技術の安定化と低コスト化が必要であることが改めて浮き彫りとなった。

## 課題 7：高付加価値販売に向けた課題分析（鳥居享司）

本年度は、マグロの販売方法の検討にむけた国内外の情報収集に努めた。まず、本プロジェクトの実証先である美代丸水産と取り引きする香川県漁連を対象に、近年の養殖マグロの取り扱い状況やマーケットの動向について聞き取り調査を実施した。ついで、養殖マグロの有望な市場とみられる一方で、その実態がほとんど明らかにされてこなかった中国市場について、大手商社・双日の協力を得ながら実態解明に努めた。

## 3. 研究の統括と今後の課題・展望（鳥居享司）

### 1) 研究の総括

本研究は「効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立」を目的として、種苗生産学、漁業工学、魚類行動学、水産栄養学、魚病学、水産経済学など多分野の教員が集結したプロジェクトである。

初年度にあたる 2014 年度は、「効率的なクロマグロ養殖経営モデルの確立」を達成するため、「生産コストの引き下げによる経営効率化」、「生産物の高付加価値販売による経営効率化」のふたつの視点より取り組んだ。

#### (1) 生産コスト引き下げによる経営効率化の視点

まず、「生産コストの引き下げによる経営効率化」の視点から、効率的な人工種苗生産技術の確立にむけ、小規模水槽を用いた種苗生産技術の開発、仔魚期・育成中の生残率改善、育成中の生残率改善、餌料効率の改善、漁業者ネットワークの構築に取り組んだ。

その結果、これまでのクロマグロ種苗生産では用いられることのなかった小型水槽（20トン級）により、46尾の人工種苗を生産することに成功した（生残率0.015%）。従来までの人工種苗生産では50トンから100トンほどの大型水槽が用いられてきたことから、本研究によって生産施設の大幅な小型化に成功したと評価できよう。

さらに、仔魚期の分光視感度の推定により、夜間における突発的遊泳行動を緩和できる照明環境について明らかにできた。さらに、養魚の行動計測技術の計測によって、沖出し時の最適な曳航速度についても明らかにできた。次年度はこうした研究成果を適用することにより、仔魚期・育成中の生残率を改善できるものと考えられる。

そして、クロマグロ受精卵の安定確保を目指した漁業者ネットワーク構築に向けた基礎的情報を収集した。経営体間で受精卵を安定的に融通する仕組み、費用、課題などについて分析した。その結果、受精卵の融通は時間的にも費用的にも十分に成立することが明らかとなった。次年度以降、受精卵を融通しながら人工種苗の安定生産を目指すこととなった。

こうした取り組みによる経営コスト削減を検証した結果、人工種苗1尾あたりの生産費用は10.7万円であることが明らかとなった。美代丸水産がマルハから購入する人工種苗は13,000円/尾（別途、輸送量）、野間池近海で採捕するヨコワは3,500円/尾であることから、現在の生産費用では全く競争力がない。今後、受精卵から沖出しまでの生残率を高めることが課題である。0.2%から0.3%の生残率を確保できれば、他社から人工種苗を購入するよりも安価に確保することが可能であり、経営コストを削減できることを明らかにすることができた。

## **(2) 生産物の高付加価値販売による経営効率化の視点**

本プロジェクトの実証先である美代丸水産と取引する香川県漁連を対象に、近年の養殖マグロの取り扱い状況やマーケットの動向について聞き取り調査を実施した。ついで、養殖マグロの有望な市場とみられる一方で、その実態がほとんど明らかにされてこなかった中国市場について、大手商社・双日の協力を得ながら実態解明に努めた。

その結果、国内市場では下げ相場であり、人工種苗を用いた生産規模増大によって更なる価格低下が引き起こされる可能性が明らかとなった。魚類養殖業界は生産調整不在の業界であり、このままではブリ類やマダイの二の舞になる可能性もある。「有機 JAS」のような高付加価値ニーズも現段階では見当たらず、価格のみが競争点となる可能性が否定できない。人工種苗技術の導入、育成中の生残率改善、餌料効率の改善などを通じた生産コスト削減の取り組みが重要であることが浮き彫りとなった。

ただし、海外市場においては可能性が示された。中国市場では、日本産養殖クロマグロは超高級品として取り扱われており、徐々にではあるが市場規模も拡大している。現在は上級マグロ市場のみが存在するという我が国とは異なる市場構造となっているが、中国人の平均所得向上により中級市場が成立すれば、需要が一気に拡大する可能性はある。その一方で、中国までの販路、輸出手続きの煩雑さ、決済の安全性などに課題が残されている。これらを漁業者経営体のみで解決するのは不可能であり、輸出実務や海外市場での販売経験のあるパートナーとの提携が不可欠であるものと考えられる。

## 2) 次年度の向けての課題・計画・展望

### (1) 課題および計画

本支援プロジェクトの研究成果をもとに、農林水産省技術会議「革新的技術緊急展開事業」へ事業申請（研究計画名：漁業者経営体によるクロマグロ種苗生産を実現できる養殖システムと受精卵ネットワークの構築）したところ、交付が決定した（総額 2,157 万円，単年度）。

2015 年度は、農林水産省技術会議からの交付金をもとに、2014 年度までの研究内容を深化させる。2015 年度以降のおもな研究課題は、「クロマグロ受精卵ネットワークの構築」、「人工種苗生産の安定化と低コスト化の実現」である。

まず、「クロマグロ受精卵のネットワークの構築」では、クロマグロ養成環境の異なる南さつま市、対馬市、上五島町においてクロマグロ養殖を営む漁業者経営体を対象とする。それぞれの経営体では 6 月から 8 月にかけてクロマグロ養魚が生簀内で受精卵を生み出す。マグロの人工種苗を必要とする経営体へ受精卵を分配するとともに、小規模水槽を用いた人工種苗生産の安定化・低コスト化を図る。

次に、「人工種苗生産の安定化と低コスト化の実現」では、多くの漁業者経営体が種苗生産できるよう、様々なタイプの小型水槽で孵化実験を行う。現在のところ、鹿児島県南さつま市笠沙町（10 m<sup>3</sup>水槽）、鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センター（8 m<sup>3</sup>水槽，30 m<sup>3</sup>水槽）、鹿児島県水産技術開発センター（20 m<sup>3</sup>水槽）を予定している。そして 2014 年度に取り組んだ「仔魚期の分光視感度の推定」と「養魚の行動計測技術の計測」から得られた知見を援用し、沖出しまでの生残率改善を図る。

また、地域を越えてクロマグロの受精卵を融通することから、魚病対策にかかる研究を推進する。

### (2) 展望

2015 年度の取り組みによって、受精卵を安定的に確保できるネットワークが構築でき、マグロ養殖が抱える種苗確保の不安定性から脱却することができる。そして、2014 年度の研究成果と 2015 年度の取り組みによって、受精卵からの生残率は 0.2%から 0.3%を想定している。人工種苗 1 尾あたりの生産原価は 5,485 円から 8,228 円であり、従来までの種苗確保方法に比べて 36.7%から 57.8%の費用低減を図ることができる。

本事業により、クロマグロ養殖経営体が安定的に種苗を確保することができ、漁業経営の持続性を確保することができる。種苗確保の不安定性に喘ぐ経営者は数多いことから、養殖マグロ生産者からの期待は高まっている。既に、複数県の生産者や技術者より問い合わせが寄せられている。将来的には、新技術を必要とする複数の生産者をネットワークに迎え、本研究成果の普及を通じて養殖生産の安定化と消費者ニーズの充足を目指す。

また、人工種苗の普及を推進できることから、天然種苗に依存した養殖生産から脱却することができる。太平洋クロマグロの資源水準は歴史的低位に留まっていることが指摘されていることから、世界的なマグロ資源管理へも寄与できると考えている。

## 4 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内 訳 等
機器・備品	704,674	実験用 PE ムケツイケース (400,000) 画像解析用パソコン (304,674)
消耗品	1,826,378	文献 (134,585) イケース関連消耗品 (374,718) マグロ用餌料 (919,631) 電池・インク等 (188,785) 報告書製本 (49,258) 英文校正 (64,401) ノートパソコン (95,000)
旅費	968,948	野間池・水技センター(361,400) 熊本 (15,680) 水産庁 (198,120) 対馬 (120,328) 上五島 (159,420) 中国・大連 (114,000)
合計	3,500,000	

## 5 資料等

## (1) 2014 年度：クロマグロ育成日誌

2014 年 7 月 4 日：第 1 回受精卵受け入れ～2015 年 3 月 18 日：大連調査報告

## (2) 本プロジェクトに関連した研究

### <論文等>

- 米山和良ほか：画像解析による水槽内を遊泳するクロマグロ稚魚の 3 次元位置の検出
- 鳥居享司：国産養殖クロマグロ産地ごとの資源管理への対応

### <卒業論文>

- 小林宏至：コンパクトなクロマグロ種苗生産の技術開発
- 國澤慎太郎：沖出し時におけるクロマグロ人工種苗の斃死原因に関する研究
- 森田竜作：3 次元ステレオ画像計測による養殖クロマグロの魚体重推定
- 阿久根亮：国際的マグロ漁業管理の影響と漁業者マグロ養殖経営体の対応
- 塘美菜：マグロ養殖業の労働実態

昆虫工場（難生産性有用タンパク質生産システム）を  
用いた生体防御関連タンパク質の生産

研究代表者 琉球大学農学部 平良 東紀  
2015年 3月

## 研究の組織と役割分担者

	氏名及び職名	研究の役割分担等
代表者	平良東紀 准教授 (琉球大学・応用生命科学専攻)	研究総括および研究分担 植物由来機能性物質の評価 各種分子デザインの基礎設計と構築
分担者	杉元康志 教授 (鹿児島大学・応用生命科学専攻)	研究分担：動物由来機能性物質の評価
	イブラヒム ヒッサム ラドワン教授 (鹿児島大学・応用生命科学専攻)	研究分担：食品由来機能性物質の評価
	光富 勝 教授 (佐賀大学・応用生命科学専攻)	研究分担：真菌由来機能性物質の評価
協力者	宮田 健 助教 (鹿児島大学・農学部)	研究協力：各種分子デザインと改良型分子の構築
	新川 健 准教授 (琉球大学熱帯生物圏研究センター)	研究協力：各由来機能性物質の免疫賦活機能評価
	関 清彦 講師 (佐賀大学・農学部)	研究協力：抗真菌ペプチドの評価
外部研究者	日下部宜宏 教授 (九州大学農学院・蚕学教室)	研究協力：カイコ発現系によるタンパク質発現

## 1 研究の目的と概要

### ① 研究の目的

機能性は高いが、生産性が低いことで利用価値が低くなっている潜在的有用タンパク質の大量生産を目指すことが最大の目的である。申請者らの標的分子は幅広く真核生物が保有している生体防御関連タンパク質およびその分解産物としてのペプチドである。これらは様々な有用機能性があると期待されている。しかし、複雑な高次構造やアミノ酸配列の電荷的な偏りが大きい等の特質によって、微生物を発現宿主とした組換えタンパク質では、大量に確保することは困難である。そこで、本申請研究ではカイコーバキュロウイルス発現系による昆虫工場を利用することで、それら難生産性の生体防御関連タンパク質の大量発現を実現させ、その機能評価をすることで、様々なソースからの有用タンパク質を昆虫工場で発現させるための知見および技術基盤を構築する。

### ② 研究の概要

各研究拠点による連携を進めながら、カイコにおける真核生物由来有用タンパク質の大量生産の技術基盤を確立した。詳細を以下に示す。

#### 1) 各種生体防御関連タンパク質のカイコ発現用分子構築（琉球大学 平良，鹿児島大学 宮田，佐賀大学 光富・関）

カイコで目的タンパク質を発現させるための組換えバキュロウイルスベクターの作製を進める。具体的には発現させる長さ（全長発現もしくは機能性ドメインだけ）についての検討，シグナルペプチドの有無または種類（カイコ由来もしくは目的タンパク質オリジナル）の検討，精製タグの有無および導入位置（生理活性の阻害となる可能性があるならば，内部にタグを導入するなど）について検討し，各種立体構造データの利用または立体構造予測解析をしながら，分子デザインを決定する。デザインした分子はカイコで発現させるためのエントリーベクターにクローニングを完了させた時点で九州大学での実験に供する。

#### 2) 昆虫工場を用いた各種タンパク質の発現（九州大学 日下部）

鹿児島大学で構築されたエントリーベクターを相同組換え機構およびトランスポゾン機構を利用して，目的タンパク質発現用バクミドへと変換する。このバクミドをカイコ由来細胞へ感染させることで組換えバキュロウイルスが増幅される。この増幅時にカイコ由来細胞での目的タンパク質発現が確認できるので，必要に応じて，タンパク質の発現レベル検証やウエスタンブロット等による抗原性の確認を実施する。（このカイコ由来細胞での発現レベルをひとつの目安として，感染させるカイコの量（使用頭数）についても検討する。）次に，増幅したバキュロウイルスをカイコに感染させ，感染期間をモニタリングすることで

最適な目的タンパク質回収時期を決定し、分泌タンパク質ならばカイコ血清、蓄積タンパク質ならばカイコ脂肪体を回収し、目的タンパク質を含む画分を回収する。

### 3) 昆虫工場で発現された各種タンパク質の精製, 生化学的および機能性解析 (各研究拠点)

各拠点において、カイコによって発現された目的タンパク質発現画分からの精製を実施し、研究拠点が保有する独自技術による機能性評価を進める。

主な標的タンパク質の候補およびその機能性評価は以下の通り

- ・植物由来キチナーゼ→抗真菌機能性評価 (琉球大学 平良)
- ・ヒトおよびダニ由来リゾチーム並びにワクチン抗原→感染症の原因となる病原体 (細菌や寄生虫) に対する感染防御機能, 抗腫瘍作用, 薬剤に対する抗炎症性機能並びにワクチンとしての抗原性評価 (鹿児島大学 ヒッシヤム・杉元・宮田, 琉球大学 新川)
- ・植物由来抗真菌ペプチドおよび真菌由来キトサナーゼ→抗真菌機能性評価, 稀少オリゴ糖生成 (佐賀大学 光富)

## 2 研究の成果

### ① 各種生体防御関連タンパク質のカイコ発現用分子構築 (琉球大学 平良, 鹿児島大学 宮田, 佐賀大学 光富・関)

琉球大学拠点 (平良) では抗真菌性タンパク質の候補としてヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (*Physcomitrella patens* chitinase: PpChi) の 3 種, PpChi-Ib, -IIa, IIc についてカイコ発現用分子構築を実施した。上記 3 種のキチナーゼは大腸菌, 枯草菌, 酵母の発現系では可溶化したタンパク質として発現しない。カイコでは可溶性タンパク質としての発現を期待した。そこで、コンストラクトデザインとしては、PpChi 由来のシグナル配列をカイコ用シグナル配列に置換した。また、酵素活性への影響も考慮し、精製タグとして利用する (His タグ、Strept タグ) を N または C 末端いずれかに導入したコンストラクトデザインも実施した。これらすべてをカイコ発現用エントリーベクターへ導入し、昆虫工場での発現段階へ移行した。

鹿児島大学拠点 (杉元・ヒッシヤム・宮田) および琉球大学拠点 (新川) では生体防御関連タンパク質の候補としてヒトリゾチーム (hLz) およびダニリゾチーム (tLz)、また、感染症に対するワクチン抗原 (マラリア原虫表層抗原 (Pvs25) と豚感染症用抗原 X (知的財産に關係するため情報は伏せる)) についてもカイコ発現用分子構築を実施した。

リゾチームは大腸菌発現系では自身のジスルフィド結合によって適切なフォールディングがなされず、封入体として発現される。カイコでは可溶性タンパ

ク質としての発現を期待した。そこで、コンストラクトデザインとしては、Lz由来のシグナル配列をカイコ用シグナル配列に置換した。さらにシグナルペプチドを除去したコンストラクトについても構築した。また、リゾチーム酵素活性への影響も考慮し、精製タグとして利用する (His タグ、Strept タグ) を N または C 末端いずれかに導入したコンストラクトデザインも実施した。

Pvs25 ワクチン抗原のコンストラクトデザインとしては、Pvs25 は酵母発現系で酵母のシグナルペプチドを利用して分泌することが分かっているので、カイコ用シグナル配列に置換したコンストラクトに精製タグを N または C 末端に導入するデザインとした。

豚感染症用抗原 X については X 由来のシグナルペプチド、カイコ由来シグナルペプチド、シグナルペプチドなしのデザイン、精製タグの有無による網羅的なコンストラクトデザインを実施した。これらすべてをカイコ発現用エンターベクターへ導入し、昆虫工場での発現段階へ移行した。

佐賀大学拠点 (光富・関) では、糸状菌由来 GH75 キトサナーゼ及びヘベイン様抗真菌ペプチド発現用のエンターベクター構築のため、目的遺伝子の増幅及び変異導入を行った。また、組換えタンパク質及び組換えペプチドの精製法を確立した。今後、カイコ 30k6G シグナルペプチド下流に His8-Tag、目的タンパクを、あるいは 30k6G シグナルペプチド下流に目的タンパク、His8-Tag をコードするようにエンターベクターを構築し、九州大学にてバクミド構築後、カイコで発現させる予定である。

## ② 昆虫工場を用いた各種タンパク質の発現 (九州大学 日下部)

各種拠点大学で構築されたエンターベクターを相同組換え機構およびトランスポゾン機構を利用して、目的タンパク質発現用バクミドへと変換し、カイコ感染用バキュロウイルスを構築した。このバキュロウイルスをカイコ由来細胞へ感染させることで組換えバキュロウイルスが増幅される。この増幅時にカイコ由来細胞での目的タンパク質発現が確認できるので、ウエスタンブロットによる各候補分子のタンパク質の発現検証を実施した。さらにカイコ由来細胞で発現が確認できた候補に関してはカイコに感染し、カイコにおけるタンパク質生産の検証を実施した。

琉球大学拠点 (平良) で構築したキチナーゼに関しては、PpChi-Ib では N 末および C 末タグの何れにおいてもカイコでの高い分泌発現が確認された。PpChi-IIa は C 末タグでは発現レベルが著しく低く、デザインおよび発現条件の検討が必要であることが分かった。N 末タグの PpChi-IIa は C 末タグに比較するとやや高い発現レベルを示した。PpChi-IIc では C 末タグよりも N 末タグの方が分泌発現レベルが高かった。今後大規模な頭数のカイコで発現実験を予定して

いる。

鹿児島大学拠点で構築したリゾチームに関しては、hLz では発現レベルは低い  
がカイコでの分泌発現が確認されたが、hLz 変異体に関しては発現レベルが著し  
く低く、デザインおよび発現条件の検討が必要であることが分かった。tLz に関  
しては、どのコンストラクトでも不溶性タンパク質として発現した。tLz は hLz  
と構造予測においてかなり相同性が高いにもかかわらず、発現結果が顕著に異  
なることが分かった。リゾチームコンストラクトについては今後のデザインお  
よび発現条件検討を進めることとする。

Pvs25 コンストラクトではカイコ由来細胞において、いずれのコンストラクトに  
おいても顕著な発現が確認できたので、今後カイコを用いた発現検証を進める  
予定である。豚感染症用抗原 X についてはカイコ由来細胞でシグナルペプチド  
を除去したコンストラクトにおいて発現が確認でき、小規模のカイコ頭数を用  
いて、タンパク質発現と精製を実施した。今後大規模な頭数のカイコで発現実  
験を予定している。

### ③ 昆虫工場で発現された各種タンパク質の精製、生化学的および機能性解析 (各研究拠点)

琉球大学拠点(平良)ではカイコで発現させたキチナーゼを Ni-キレートカラム  
でアフィニティー精製し、キチン分解活性を調べたところ、PpChi-Ib におい  
ては活性が確認されたが、PpChi-IIa および IIc においては活性が認められな  
かった。キチン分解活性の確認された PpChi-Ib の *Trichoderma viride* に対する  
抗真菌活性を調べたところ、若干の抗真菌活性が認められた。しかしながら、  
本活性は同じクラスのキチナーゼに比較して弱かった。タグおよび翻訳後修飾  
が本活性に影響を与えている可能性が考えられたため、タグおよび N 型結合糖  
鎖の除去を試みた。タグの除去は TEV プロテアーゼ処理によって、N 型結合糖鎖  
の除去は PNGase 処理によって行った。何れも、処理により分子量の低下が確認  
されたため、タグおよび N 型結合糖鎖の少なくとも一部は除去されたことが示  
唆された。しかしながら、これらの処理によっても抗真菌活性の増加は見られ  
なかった。糖染色によって、PNGase 処理後もカイコで発現させた PpChi-Ib に糖  
質が検出されたことから、本キチナーゼには O 型結合糖鎖が付加されているこ  
とが示唆された。低い抗真菌活性の原因が糖鎖付加によると考えら得るため、  
今後、シグナル配列(小胞輸送シグナル)を除去したコンストラクトを作成し、  
カイコ細胞質内でキチナーゼを発現させ、糖鎖付加の無いキチナーゼを作成し、  
その抗真菌活性を検証する予定である。

鹿児島大学拠点(杉元・ヒッシヤム・宮田)では昆虫工場では不溶性タンパク  
質として発現した tLZ の巻き戻しおよびその機能解析を実施しており、一部で

はあるが巻き戻しおよびその酵素活性について確認している。現在、大腸菌からの巻き戻し tLZ との比較検証を進めている。

琉球大学拠点（新川）ではカイコで発現させた豚感染症用抗原 X について、分子量解析（ゲル濾過クロマトグラフィー、SDS-PAGE）と抗原性（ELISA）によるそのワクチン抗原としての機能性について現在、検証中である。この抗原性解析が終了した時点で、動物を用いた抗原特異的免疫応答機能について検証予定である。

### 3 研究の総括と今後の課題・展望

#### ・研究の総括

本事業において、昆虫工場（難生産性有用タンパク質生産システム）を用いて数種の生体防御関連タンパク質の生産系が確立された。シグナル配列や、精製タグの種類や位置を変えることなどの分子デザインにより、発現系の最適化を行った。本発現系により得られたタンパク質の一部が生理活性を有することを確認できた。以下に詳細を示す。

まず、以下のような昆虫工場を用いた発現系のプラットフォームが構築できた。各拠点で、カイコ 30k6G シグナルペプチド下流に目的タンパク質を、あるいは 30k6G シグナルペプチド下流に目的タンパク質、His タグ・Strept タグをコードするようにエントリーベクターを構築した。構築されたエントリーベクターを相同組換え機構およびトランスポゾン機構を利用して、目的タンパク質発現用バクミドへと変換し、カイコ感染用バキュロウイルスを作成した。このバキュロウイルスをカイコ由来細胞へ感染させた後、His タグプローブを用いたウエスタンブロットによって各候補分子のタンパク質の発現検証を実施した。カイコ由来細胞で発現が確認できた候補に関してはカイコに感染させ、カイコにおけるタンパク質生産の検証を実施した。

抗真菌性が期待されたキチナーゼ 3 種のキチナーゼ（PpChi-Ib, -IIa, -IIc）は大腸菌、枯草菌、酵母の発現系では可溶化したタンパク質として発現しない。オリジナルのシグナル配列をカイコ用シグナル配列に置換し、カイコでの発現系に供与したところ、カイコ血清中に可溶化したタンパク質として検出され、本発現系の有効性が確認された。また、タグの位置を変えることによっても、発現量に増減が見られたため、設計が重要であることが分かった。カイコで発現させたキチナーゼをアフィニティー精製後、キチン分解活性を調べたところ、PpChi-Ib においては活性が確認されたが、PpChi-IIa および IIc においては活性が認められなかった。キチン分解活性の確認された PpChi-Ib に若干の抗真菌

活性が認められた。しかしながら、本活性は同じクラスのキチナーゼに比較して弱かった。低い抗真菌活性の原因が糖鎖付加によると考えられたため、今後、シグナル配列を除去したコンストラクトを作成し、カイコ細胞質内でキチナーゼを発現させ、糖鎖付加の無いキチナーゼを作成し、その抗真菌活性を検証する予定である。

ヒトリゾチーム (hLz) では発現レベルは低いがかイコでの分泌発現が確認されたが、その変異体に関しては発現レベルが著しく低かった。ダニリゾチーム (tLz) に関しては、どのコンストラクトでも不溶性タンパク質として発現した。リゾチームコンストラクトについては今後のデザインおよび発現条件検討を進める予定である。昆虫工場で不溶性タンパク質として発現した tLZ の巻き戻しおよびその機能解析を実施しており、一部ではあるが巻き戻しおよびその酵素活性について確認している。現在、大腸菌からの巻き戻し tLZ との比較検証を進めている。

Pvs25 コンストラクトではカイコ由来細胞において、いずれのコンストラクトにおいても顕著な発現が確認できたので、今後カイコを用いた発現検証を進める予定である。豚感染症用抗原 X についてはカイコ由来細胞でシグナルペプチドを除去したコンストラクトにおいて発現が確認でき、小規模のカイコ頭数を用いて、タンパク質発現と精製を実施した。現在、カイコで発現させた豚感染症用抗原 X について、分子量解析 (ゲル濾過クロマトグラフィー、SDS-PAGE) と抗原性 (ELISA) によるそのワクチン抗原としての機能性について検証中である。この抗原性解析が終了した時点で、動物を用いた抗原特異的免疫応答機能について検証予定である。

#### ・次年度に向けての課題・計画・展望等

今回の事業において、昆虫工場を用いた発現系のプラットフォームが構築できたため、本プラットフォームを用いて様々な生体防御関連タンパク質の生産が可能となり、今までは活性を有する立体構造の保持が困難であったり、生産量が少なかつたりしたために解析が出来なかったタンパク質の機能解析スピードが格段に向上することが期待される。シグナル配列の有無やタグの位置などにより目的タンパク質の生産性や活性が大きく異なる事が分かったため、様々な組み合わせの分子デザインを行う必要がある。また、カイコ生体における翻訳後修飾がタンパク質の活性に影響を与えている可能性が示唆されたため、シグナル配列を削って小胞体およびゴルジ体を通過させないなどの工夫も必要である。

本申請研究事業では有用物質のモデルとして生体防御関連タンパク質をカイコで大量に発現させ、その機能解析を行い、カイコにおける異種タンパク質発

現プラットフォームの基盤構築をした。次の段階としては、このプラットフォームを利用した更なる有用タンパク質の発現を試みることである。今年度は生体防御関連タンパク質の全長発現から試みたが、今後は全長発現に成功したタンパク質の機能ドメインだけの発現や、複数の機能ドメインの融合タンパク質などをデザインし、これまで容易にできなかった分子改変による機能性タンパク質の創出を昆虫工場を試みる。

また、生体防御関連タンパク質の一つとして抗病原体ペプチドの発現を試み、これは感染症治療において有望なツールとなると期待される。感染症においては治療と同時に予防が重要であるので、将来的には、生体防御関連タンパク質として難生産性ワクチン抗原を選択し、昆虫工場で発現させることを計画している。

本研究の成果に基づき、生体防御関連タンパク質の大量発現系構築により、以下のような医薬・研究用および産業用タンパク質としての利用が期待される。

- ・ 医薬・研究用タンパク質として、単独または抗生物質との併用による病原性細菌・真菌の増殖抑制剤や、真菌の遺伝子操作に必須なプロトプラスト化酵素剤としての利用
- ・ 産業用酵素として、キチン質を含む食品および飼料の加工用酵素剤、細菌・真菌の増殖抑制剤として洗剤用酵素への利用
- ・ 様々な生理活性を有するグルコサミンおよび *N*-アセチルグルコサミンを含む希少糖の大量生産への利用

#### 4 支援金額の執行内訳

琉球大学

項目	金額(円)	内訳等
機器・備品	280,800	テーブルトップクリーンベンチ
消耗品	183,560	消耗品
旅費	35,640	沖縄-福岡
合計	500,000	

鹿児島大学

項目	金額(円)	内訳等
機器・備品	1,500,000	振盪培養器
消耗品	650,000	遺伝子工学・蛋白質実験用試薬, その他器具類
旅費	0	
合計	2,150,000	

佐賀大学

項目	金額(円)	内訳等
機器・備品	0	
消耗品	311,260	遺伝子工学・蛋白質実験用試薬, カラム等
旅費	38,740	佐賀-沖縄
合計	350,000	

#### 5 資料等

なし

#### 4 . 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内訳等
機器・備品	1,099,980 817,560	EVOS Flويد Cell Imaging Station (Thermo) C-DiGiT プロットスキャナー (Li-Core)
消耗品	1,082,460	分子細胞生物学実験用試薬 魚類飼育費 他
旅費	0	
合計	3,000,000	

## 5 .資料等

### 原著論文

Takumi, S., Ikema, S., Hanyu, T., Shima, Y., Kurimoto, T., Shiozaki, K., Sugiyama, Y., Park, H., Ando, S., Furukawa, T., Komatsu, M.

Naringin attenuates the cytotoxicity of hepatotoxin microcystin-LR by the curious mechanisms to OATP1B1- and OATP1B3-expressing cells.

*Environ Toxicol Pharmacol*, 39, 974-981, 2015.

Takano, H., Takumi, S., Ikema, S., Mizoue, N., Hotta, Y., Shiozaki, K., Sugiyama, Y., Furukawa, T., Komatsu, M.

Microcystin-LR Induces Anoikis Resistance to the Hepatocyte Uptake Transporter OATP1B3-expressing Cell Lines.

*Toxicology*, 326, 53-61, 2014

Liqiang Xie, Tamami Hanyu, Noriko Futatsugi, Masaharu Komatsu, Alan D. Steinman, Ho-Dong Park

Inhibitory effect of naringin on microcystin-LR uptake in the freshwater snail *Sinotaia histrica*.

*Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, 430-437, 2014

Tuan T., Y. Kaminishi, A. Funahashi, M.A.H. El-Kady, A.A.I.Hassanin, and T. Itakura. cDNA cloning, characterization and expression of cytochrome P450 family 1(CYP1A) from Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, by environmental conditions.

*African Journal of Biotechnology*, 13, 1898-1909, 2014.

Tuan T., Y. Kaminishi, A. Funahashi, A.A.I.Hassanin and T. Itakura.

Cloning and tissue expression of cytochrome P450 1B1 and 1C1 genes from Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, under environmental stress conditions.

*African Journal of Biotechnology*, 13, 2028-2040, 2014.

# 水圏環境化学物質に対するヒトおよび魚類の細胞応答

研究代表者 鹿児島大学水産学部 小松正治

2015年 3月

## 研究の組織と役割分担者

代表者	小松正治 准教授	鹿児島大学水産学部・ 応用生命科学専攻	研究統括、 重金属や毒性化合物の機能解析、培養細胞におけるレドックス解析
分担者	板倉隆夫 教授	鹿児島大学水産学部・ 応用生命科学専攻	魚類薬物代謝酵素遺伝子の解析
	上西由翁 教授	鹿児島大学水産学部・ 応用生命科学専攻	ウナギ GFP 遺伝子の解析、 魚類の視神経の解析
	石川学 准教授	鹿児島大学水産学部・ 農水圏資源環境科学専攻	魚類の飼育、産卵、解剖
	塩崎一弘 助教	鹿児島大学水産学部・ 応用生命科学専攻	ヒトおよび魚類の糖鎖解析と レドックス解析

## 1. 研究の目的と概要

### ① 研究の目的

ヒトや魚類を含めて生物は、環境中に存在する生体外異物に曝されて棲息している。生物はこれらの生体外異物に対する生体防御機構を発達させて進化してきた。また、生体外異物の摂取経路は食品を介する経口経路によるものが多く存在する。そこで食品のなかでも魚介類を介してヒト体内に摂取される生体外異物に着目し、魚介類への生体外異物の蓄積機構、そしてヒトがこのような魚介類を摂取した際の細胞応答について解析する。また、魚類への酸化ストレス曝露時の応答についても解析する。すなわち、生理活性を示す生体異物について以下の3点について解析する。(1) 魚介類に含まれる既知および未知を問わず化合物のヒトに対する新規な機能性の発見をめざす。(2) 棲息環境水中に含有されている化合物の魚類への影響について薬物動態学的に分子レベルで解析する。(3) ニホンウナギ筋肉に発現しているビリルビン結合性新規 GFP の抗酸化能を主とした酸化ストレス応答を解析する。以上の解析により、魚類養殖の発展、環境保全、ならびに人々の健康の保持・増進に繋がる礎となることを期待し、目的とする。

### ② 研究の概要

ヒトや魚類を含めて生物は、環境中に存在する生体外異物に曝されて棲息している。生物はこれらの生体外異物に対する生体防御機構を発達させて進化してきた。本研究では、生理活性を示す生体外異物の曝露に対する生物の細胞応答を以下の3点について解析する。すなわち、

(1) 魚類に生物濃縮されている重金属類ならびにアオコが産生する毒性化合物のヒト培養細胞への影響について酸化ストレス応答を指標に解析する。また、ゼブラフィッシュの受精卵を用いて同様の解析を行う。さらに、これらの毒性発現におけるタンパク質糖鎖の役割についても検討を加える。

(2) 棲息環境水中に含有されている化合物のモデルとしてダイオキシンに代表される多環芳香族炭化水素の魚類に対する影響をジャワメダカ、ヒメダカ、ゼブラフィッシュの成魚ならびに受精卵、および魚類培養細胞を用いて、薬物代謝酵素を中心に解析する。

(3) ニホンウナギの長距離回遊における筋細胞への酸化ストレスの軽減メカニズムについて新規ビリルビン結合性 GFP を中心に解析する。

以上のケミカルバイオロジー解析により、魚類養殖の発展に寄与するとともに人々の健康の保持・増進と環境保全に貢献する。

## 2. 研究の成果

### ① 検討項目1：水圏環境化学物質の培養細胞および魚卵に対する毒性

マイクロシスチンLRは、ある種の藍藻が産生する環状ペプチド構造の肝臓毒である。マイクロシスチンLRはセリン/スレオニン型タンパク質脱リン酸化酵素PP1およびPP2Aを特異的、かつ不可逆的に阻害し、高濃度曝露で肝不全を誘発し、低濃度慢性曝露で肝がんの発がんプロモーターとして機能する。また、マイクロシスチンLRの細胞毒性の発現に活性酸素種の関与も示唆されている。これまでに我々は、マイクロシスチンLRの肝細胞への選択取り込み機構を明らかにし、毒性発現機序を明らかにしてきた。すなわち、マイクロシスチンLRは、肝細胞に特異的に発現している有機陰イオン輸送体タンパク質OATP1B1およびOATP1B3を介して肝細胞内に選択的に取り込まれる。我々は、OATP1B1またはOATP1B3を強制発現させた培養細胞をすでに作製・樹立し、実験に供している。本研究において、マイクロシスチンLRの新規な機能性としてアノキス抵抗性の誘導能を見出し、その分子機序を部分的に明らかにした。解析の結果、マイクロシスチンLR曝露により足場からはがれ浮遊した細胞がアノキス抵抗性を示し、さらに、マイクロシスチンLR耐性を獲得することが明らかになった。この細胞をHEK293-OATP1B3-FL細胞と命名した。HEK293-OATP1B3-FL細胞は細胞接着分子であるEカドヘリンの発現が低下していることが判明した。一方、マイクロシスチン曝露に耐えて接着し続けた細胞をHEK293-OATP1B3-AD細胞と命名した。HEK293-OATP1B3-AD細胞もシスプラチンLR耐性を獲得して、細胞骨格タンパク質の発現が上昇していた。さらにEカドヘリンの発現が上昇し、Eカドヘリンの発現を負に制御する転写調節因子ZEB-1の発現が低下していた。

また、マイクロシスチンLRの細胞毒性を減弱し得る化合物の探索を試み、マイクロシスチンLR中毒の化学予防ならびに対処法の確立をめざした。すなわち、実験動物のラットにおいてマイクロシスチンLRの細胞毒性を減弱することが報告されている柑橘類フラボノイドであるナリンジンについて、ヒトの肝細胞に対してマイクロシスチンLRの細胞毒性抑制能を発揮する可能性について検討した結果、OATP1B1またはOATP1B3を強制発現させた培養細胞において、ナリンジンはOATP1B1またはOATP1B3を介したマイクロシスチンLRの細胞内取り込みを阻害し、マイクロシスチンLRによるPP活性阻害を抑制し、リン酸化タンパク質の細胞内蓄積を低下させた。これらの分子機序を介してナリンジンはマイクロシスチンLRの細胞毒性を減弱することが明らかになった。

マイクロシスチンLRおよびオカダ酸ならびにカリクリンAは、セリン/スレオニンホスファターゼPP1およびPP2Aを特異的に阻害することにより細胞毒性を発揮する。肝臓毒であるマイクロシスチンLRとは異なり、オカダ酸およびカリクリンAの毒性には臓器特異性が存在しないと従来は考えられていたが、本研究により、オカダ酸についても肝臓に対して比較的高い選択

毒性を有することが示唆された。また、オカダ酸の肝細胞への選択的取り込み機構に関するより詳細な解析を試みた。すなわち、ヒト胎児腎臓由来のHEK293細胞にマイクロシチンLRの肝細胞への取り込み責任分子であるOATP1B3遺伝子(SLCO1B3)をトランスフェクトしたHEK293-OATP1B3細胞を実験に供した。対照にはHEK293細胞にコントロールベクター(pcDNA3.1(+))をトランスフェクトしたHEK293-CV細胞を用いた。細胞毒性試験ならびに細胞毒性抑制試験にはMTT法を用いた。HEK293-OATP1B3細胞へのMC-LRの取り込み量の測定にはELISA法を用いて解析を行った。実験の結果、肝細胞に特異的に発現し、マイクロシチンLRの肝毒性発現の責任分子であるOATP1B3の輸送基質として知られるブロムスルファレイン、タウロコール酸、およびデヒドロエピアンドロステロン硫酸塩、ならびにOATP1B3を介したマイクロシチンLRの細胞毒性の抑制化合物であるセラミドアミノエチルホスホン酸などの各種化合物により、HEK293-OATP1B3細胞に対するオカダ酸の細胞毒性が抑制された。さらに、肝機能改善に有効とされる生薬ウコンと複合曝露によりマイクロシチンLRおよびオカダ酸の細胞毒性が共に減弱した。また、HEK293-OATP1B3細胞へのマイクロシチンLRの取り込みは、オカダ酸との複合曝露により顕著に競合阻害的に抑制された。以上の結果から、オカダ酸はマイクロシチンLRと同様のOATP1B3を介する共通機序により細胞内へ取り込まれ、細胞毒性を発現し、原因不明の肝疾患や肝がんの発症に関わっている可能性が示唆された。

重金属類の毒性評価については、頭足類に豊富に含有されている銅に着目した。銅輸送体タンパク質ATP7Bを強制発現させた培養細胞KB-ATP7Bが対照細胞の親株KB-3-1またはKB-CV細胞に対して塩化銅および硫酸銅に対して約2倍の耐性を示すばかりでなく、白金錯体のシスプラチンに対して約8倍の耐性を示すことをすでに明らかにしている。そこで、銅またはシスプラチンの作用に影響を与える食品や生物資源に由来する成分または化合物の探索を試みた結果、生薬ウコンは濃度依存的にATP7Bの発現の有無に関わらずシスプラチンの毒性を抑制した。ウコンの主成分であるクルクミンはKB-ATP7B細胞においてシスプラチンの毒性を抑制したが、対照細胞には影響しなかった。以上の結果から、生薬ウコンは、シスプラチンの副作用を軽減する可能性があると同時に抗がん活性を低下させる可能性が示唆された。また、クルクミンはシスプラチン耐性がん細胞の耐性度を高め治療抵抗性を強める可能性が示唆された。

魚卵毒性については現在、ゼブラフィッシュ受精卵を利用した毒性評価系を構築中である。

② 検討項目 2 : 水圏環境化学物質により誘導される魚類薬物代謝酵素群

ヒトをはじめとする哺乳類と同様に魚類においても薬毒物代謝機構が存在することが知られている。本研究では魚類の第 I 相薬毒物代謝酵素群のうちアルド-ケト還元酵素およびシクロム P450 に着目して解析を行った。アルド-ケト還元酵素は生体内に取り込まれた脂肪族や芳香族アルデヒド・ケトン類、その他の生体外異物のカルボニル基を可逆的にアルコール基に還元する。その働きにより、生体内の脂溶性物質が水溶性物質に還元される。近年の研究では、多環芳香族炭化水素によるアルド-ケト還元酵素の亜分子種の AKR1A1 遺伝子の誘導的発現も確認されている。また、薬毒物代謝酵素シクロム P450 の中で CYP1 ファミリーの遺伝子は、多環芳香族炭化水素により誘導的に発現することが知られている。そこで、ティラピア、ジャワメダカ、およびニホンウナギにベンゾピレンまたは重油を曝露し、各種薬毒物代謝酵素の発現誘導について解析した。ティラピアにベンゾピレンを腹腔内投与曝露した結果、AKR1A1 の遺伝子は、鰓での発現が高く、腸で僅かながら誘導的な発現が認められた。ジャワメダカに比較的高濃度の重油を環境水曝露した結果、成魚の各臓器において CYP1A の転写活性が CYP1B1 および CYP1C1 よりも高かった。今後、曝露条件の統一化を含めて条件の再検討が必要であるが、生物進化と分子進化の関係を踏まえて、生物進化とストレス応答における規則性を見出すことが期待される。

③ 検討項目 3 : ニホンウナギの新規緑色蛍光タンパク質 UnaG 発現細胞の酸化ストレス  
応答

ニホンウナギ筋肉由来の新規緑色蛍光タンパク質 UnaG の蛍光発現においてビリルビンが発色団として機能しているが、筋肉組織内での蛍光強度は不均一であり、その生理機能も未解明である。そこで本研究ではビリルビンの抗酸化能に着目し、UnaG の生理機能について解析した。

まず、UnaG 遺伝子をヒト胎児腎臓由来株化培養細胞の HEK293 細胞にトランスフェクトし UnaG を安定に強制発現させた HEK293-UnaG 細胞を実験に供した。対照として、コントロールベクターを HEK293 細胞にトランスフェクトした HEK293-CV 細胞を用いた。これらの細胞の過酸化水素感受性を MTT 法により解析した。過酸化水素とは反応せず過酸化水素の中間代謝産物であるヒドロキシラジカルなどの高酸化能活性酸素種 (hROS) と細胞質中で反応して蛍光を発するアミノフェニルフルオレセイン (APF) を用いて hROS の検出を試みた。また、抗酸化能を有するフェノールレッド含有培地と非含有培地を用いて細胞形態ならびに細胞増殖の変化を位相差型顕微鏡および蛍光イメージングシステムを用いて解析した。

解析の結果、HEK293-UnaG は、HEK293-CV より約 2 倍過酸化水素に対して耐性を示した。HEK293-CV 細胞に過酸化水素曝露することにより APF を用いて hROS が検出された。過酸化水素を曝露した HEK293-CV はフェノールレッド含有条件に比べて、非含有条件でより強く細胞毒性を示した。一方、HEK293-UnaG はフェノールレッド含有および非含有の両条件間で細胞増殖活性に大きな差異は認められなかった。また、HEK293-UnaG は、フェノールレッド含有条件に比べて非含有条件での蛍光強度が低下し、蛍光発現細胞数が減少した。以上の結果から、UnaG はビリルビンの酸化還元状態の変化に伴う結合親和性の変化により、蛍光強度が変動することが示唆された。

### 3. 研究の総括と今後の課題・展望

#### 研究の総括

マイクロシスチン LR の細胞毒性の発現機構が解明され、非常にユニークな生理活性物質であることが明らかになった。今後、その全貌の解明が期待される。すなわち、比較的高濃度で細胞死を、比較的低濃度で細胞増殖活性を示すマイクロシスチン LR の新機能としてアノキス抵抗性を発見した。突然変異が誘発された肝細胞にマイクロシスチン LR が曝露されると、その細胞増殖活性から発がんプロモーターとして機能する。そして、比較的高濃度で曝露されると基底膜から遊離し、アノキス抵抗性を獲得することにより、肝がんの浸潤・転移に関与する可能性が示唆される。今後、より詳細な病態との関連を明らかにする必要がある。また、体内動態の詳細が未解明のオカダ酸が、比較的優先的に肝毒性を発揮する可能性を示唆する解析結果を *in vitro* 解析により得た。この点に関しても、病態との関連について検討することが望まれる。さらに、これらの毒性化合物による中毒を未然に防ぐための化学予防ならびに中毒発症後の対処策を講じるための礎となる研究成果を得た。OATP1B1 および OATP1B3 は胆汁酸をはじめとして内因性物質の輸送にも係る重要分子であることから、これらの輸送活性に影響を与えず、毒性発現を抑制し得る化合物の発見が期待される。

重金属の毒性に関する解析では、抗がん剤シスプラチンに対する耐性を克服し得る化合物の探索を試みたが、理想的な化合物の発見には至らなかった。今後、抗がん剤に限らず水産物に生物濃縮されている重金属に対する細胞応答を解析し、その毒性発現機序を明らかにする。例えば、ヒジキに豊富に含有されている砒素や亜砒酸に対する細胞応答、特に肝臓におけるコレステロール代謝に関わる亜鉛タンパク質として知られる転写因子群への砒素・亜砒酸曝露の影響を解析する。

UnaG の機能解析において、ビリルビンの細胞内および体内動態について解析する。すなわち、血中アルブミンに結合しているビリルビンが筋細胞に取り込まれ、筋細胞特異的に発現しているアポ UnaG と結合し、ホロ UnaG を形成し、緑色蛍光を発現する。筋細胞が酸化ストレスを受けるとビリルビンが酸化され、ビリベルジンに代謝されると同時にアポ UnaG と解離し蛍光発現を失う。そしてビリベルジンは血中移行する。このように推測されるビリルビン代謝の分子機序を解明し、本仮説を証明すると同時に、ウナギ特有の血中ビリベルジン含量の多さを生化学的に裏付けることが期待される。

## 次年度に向けての課題・計画・展望等

食と水の安全は、我々人間の健康の保持・増進にとって環境衛生学的に最も重要な概念の一つである。申請者は、これまでにアオコを形成するシアノバクテリアの垂種が産生する肝臓毒マイクロシスチンLRの肝臓選択毒性の発現機序を明らかにしてきた。動物実験によりマイクロシスチンLRは比較的低濃度曝露により細胞増殖活性を発揮し、突然変異が誘発された肝細胞に対して発がんプロモーターとして機能する。また比較的高濃度曝露により細胞毒性を示し、肝細胞にアポトーシスを誘導し、肝機能不全を引き起こすことが知られている。ヒトに対しても同様の毒性を発揮することが予想されることから飲料水への混入ならびに魚介類への生物濃縮を経てヒトが摂取することにより発症する中毒が危惧されている。そこで、マイクロシスチンLRの細胞毒性の発現機序、特に細胞増殖と細胞死の分岐機構ならびに平成26年度事業で明らかにしたマイクロシスチンLRの新機能であるアノキス抵抗性の分子機序を詳細に解析し、明らかにする必要がある。また、その他の化合物および水産物に比較的豊富に含まれる砒素をはじめとした重金属類についても、毒性発現機序および解毒機構について解析する。

マイクロシスチンLRの新機能であるアノキス抵抗性の誘導条件の詳細な検討、がんの悪性化に関与するNF- $\kappa$ B等の炎症性転写因子やシアリダーゼ等の糖鎖分解酵素のアノキス抵抗性獲得における関与について解析する。また、OATP1B1またはOATP1B3の輸送基質として輸送されずに、マイクロシスチンLRの細胞毒性を抑制し得る化合物の探索を試み、副作用の少ない化学予防および対処策を構築する礎を築く。また、ヒト細胞および魚類成魚ならびに魚類細胞を用いて、マイクロシスチンLR等の化合物の代謝機構を解析する。重金属毒性については、UnaG発現細胞の重金属毒性に対する耐性に関与するか否かについても検討を加える。

以上の解析により、ヒトの臓器・組織のがん化やその治療抵抗性、ならびにその他の生活習慣病等の発症または予防に水圏生物に由来する化学物質や元素がどれほど関わっているかを明らかにし、人々の健康の保持・増進に寄与する。また、魚類成魚および魚類細胞ならびにUnaGを用いた解析により、養殖業への貢献が期待される。

#### 4 . 支援金額の執行内訳

項目	金額 (円)	内訳等
機器・備品	1,099,980 817,560	EVOS Flويد Cell Imaging Station (Thermo) C-DiGiT プロットスキャナー (Li-Core)
消耗品	1,082,460	分子細胞生物学実験用試薬 魚類飼育費 他
旅費	0	
合計	3,000,000	

## 5 .資料等

### 原著論文

Takumi, S., Ikema, S., Hanyu, T., Shima, Y., Kurimoto, T., Shiozaki, K., Sugiyama, Y., Park, H., Ando, S., Furukawa, T., Komatsu, M.

Naringin attenuates the cytotoxicity of hepatotoxin microcystin-LR by the curious mechanisms to OATP1B1- and OATP1B3-expressing cells.

*Environ Toxicol Pharmacol*, 39, 974-981, 2015.

Takano, H., Takumi, S., Ikema, S., Mizoue, N., Hotta, Y., Shiozaki, K., Sugiyama, Y., Furukawa, T., Komatsu, M.

Microcystin-LR Induces Anoikis Resistance to the Hepatocyte Uptake Transporter OATP1B3-expressing Cell Lines.

*Toxicology*, 326, 53-61, 2014

Liqiang Xie, Tamami Hanyu, Noriko Futatsugi, Masaharu Komatsu, Alan D. Steinman, Ho-Dong Park

Inhibitory effect of naringin on microcystin-LR uptake in the freshwater snail *Sinotaia histrica*.

*Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38, 430-437, 2014

Tuan T., Y. Kaminishi, A. Funahashi, M.A.H. El-Kady, A.A.I.Hassanin, and T. Itakura. cDNA cloning, characterization and expression of cytochrome P450 family 1(CYP1A) from Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, by environmental conditions.

*African Journal of Biotechnology*, 13, 1898-1909, 2014.

Tuan T., Y. Kaminishi, A. Funahashi, A.A.I.Hassanin and T. Itakura.

Cloning and tissue expression of cytochrome P450 1B1 and 1C1 genes from Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, under environmental stress conditions.

*African Journal of Biotechnology*, 13, 2028-2040, 2014.

El-Kady M.A.H., Y. Kaminishi and T. Itakura

Molecular characterization and organs expression of cytochrome P450 1B1 from Japanese eel (*Anguilla japonica*).

Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish, 18, 103-113, 2014.

El-Kady M.A.H., Y. Kaminishi and T. Itakura

Molecular characterization and organs expression of cytochrome P450 1C1 from Japanese eel (*Anguilla japonica*).

Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish., 18, 115-124, 2014.

Asami Ikeda, Hayato Ichino, Kiguchiya, S., Chigwechokha, P., Masaharu Komatsu, Kazuhiro Shiozaki.

Evaluation and identification of potent angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from dwarf gulper shark (*Centrophorus atromarginatus*).

J. Food Process Pres. 39, 107-115, 2015

Shiozaki, K., Takahashi, K., Hosono, M., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, M., Bassi, R., Prinetti, A., Sonnino, S., Nitta, K., Miyagi, T.

Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration.

FASEB J. 2015 in press

Yamamoto, K., Takahashi, K., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Moriya, S., Hosono, M., Shima, H., Miyagi, T.,

Potential of epidermal growth factor -mediated oncogenic transformation by sialidase NEU3 leading to Src activation.

PLoS One 2015, in press

Hata, K., Tochigi, T., Sato, I., Kawamura, S., Shiozaki, K., Wada, T., Takahashi, K., Moriya, S., Yamaguchi, K., Hosono, M., Miyagi, T.

Increased sialidase activity in serum of cancer patients: identification of sialidase and inhibitor activities in human serum.

Cancer Sci, 2015, in press

Miyagi, T., Takahashi, K., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Hosono, M.  
Plasma membrane-associated sialidase confers cancer initiation, promotion and progression.

Adv. Exp. Med. Biol, 842, 139-45, 2015

Chigwechokha, P., Komatsu, M., Itakura, T., Shiozaki, K.  
Nile Tilapia Neu3 sialidases: molecular cloning, functional characterization and expression in *Oreochromis niloticus*.

Gene, 552, 155-64, 2014

Shiozaki, K., Ryuzono, S., Matsushita, N., Ikeda, A., Takeshita, K., Chigwechokha, P., Komatsu, M., Miyagi, T.

Molecular cloning and biochemical characterization of medaka (*Oryzias latipes*) lysosomal neu4 sialidase.

Fish Physiol Biochem, 40, 1461-1472, 2014

Saw Mya Linn, Manabu Ishikawa, Shunsuke Koshio and Saichiro Yokoyama.  
Effect of Dietary Vitamin E Supplementation on Growth Performance and Oxidative Condition of Red Sea Bream *Pagrus major* ,  
Aquaculture Science, 62(4), 329-339, 2014.

Saw Mya Linn, Manabu Ishikawa, Shunsuke Koshio, Saichiro Yokoyama, Takuya Murata, Yuta Hamasaki and Leo Nankervis.

Effects of Replacing Fish Meal with Plant Protein on Growth Performance, Feed Utilization and Oxidative Condition of Red Sea Bream *Pagrus major*.

Aquaculture Science, 62(4), 341-352, 2014.

学会発表

池間 智、橋本海里、堀田夕貴、杉山靖正、塩崎一弘、内匠正太、小松正治

生薬ウコンによるマイクロシスチン LR およびオカダ酸の毒性抑制.

平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 福岡, 2014.9

舟橋亞希・小松正治・吉園優樹・居川康博・板倉隆夫・林 征一・上西由翁

培養細胞を用いたウナギ G F P の機能解析

日本水産学会, 2014 年 9 月 (福岡).

塩崎一弘

鹿児島県特産品を利用した機能性食品の開発.

機能性食と健康シンポジウム, 鹿児島, 2015.1

塩崎一弘

鹿児島県近海の未利用資源をターゲットにした機能性研究.

第 19 回フードファクター学会, 鹿児島, 2014.11

吉永綾奈、原崎裕介、小松正治、塩崎一弘

がん糖脂質を標的にしたカンキツ類の細胞増殖抑制効果.

第 19 回フードファクター学会, 鹿児島, 2014.11

Chigwechokha, P., Itakura T., Komatsu, M., Shiozaki, K.

Molecular cloning and characterization of gaglioside specific sialidase in tilapia.

平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 福岡, 2014.9

原崎裕介、池田麻美、龍園せな、吉川みのり、大石一樹、小松正治、塩崎一弘

筋分化におけるメダカシアリダーゼ Neu3b の機能解析.

平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 福岡, 2014.9

龍園せな、池田麻美、原崎裕介、大石一樹、小松正治、宮城妙子、塩崎一弘

ニホンメダカ *Oryzias latipes* のシアリダーゼ研究におけるモデル動物としての有用性.

第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋, 2014.8