

# 令和3年度養殖業成長産業化技術開発事業

## 報告書 (概要版)

令和4年3月

養殖業成長産業化技術開発共同研究機関



## (1) 養殖魚の低価格・高効率飼料の開発

### 【目的】

近年の養殖生産の世界的な増大により飼料原料である魚粉への需要が高まって価格が高騰し、国内の養殖業者にとって厳しい経営状況となっている。給餌養殖において生産コストの6～7割が飼料代であり、飼料代の削減は養殖業者の経営安定と日本の養殖業の国際競争力向上に必須である。そのため、養殖業界からは、より低価格な飼料の開発が求められている。しかし、低価格のために大豆油かすなどの代替飼料原料の比率を上げて魚粉を減らすと、成長が悪くなることが問題になっている。

本課題では、代替飼料原料の使用で価格を抑えながら成長効率のよい飼料の開発を目的とする。養殖重要種であるブリとマダイを用い、代謝産物と遺伝子発現の網羅的解析により代替飼料原料の消化吸收を生理的に評価し、消化生理に基づいて飼料原料配合と成分調整をすることで成長効率のよい飼料を開発する。

### 【主な成果と今後の見通し】

#### ア ブリ類及びマダイ用高効率飼料の開発

##### 1) 飼料原料の消化率及びアミノ酸吸収率の評価

植物性飼料原料、動物性飼料原料と魚粉の配合比を変えた試験飼料を作製してマダイ稚魚に4週間給餌したところ、魚粉主体飼料区と植物性飼料原料主体で動物性原料と魚粉を配合した飼料区が最も成長が良く、植物性飼料原料と動物性原料を組み合わせた飼料区が続き、植物性飼料原料のみの飼料区が最も成長が悪かった。植物性原料は消化酵素分泌誘導が低い（前年度結果）、動物性原料を配合することで成長が改善されたと考えられた。

ブリ稚魚で代替飼料原料の消化吸収率を求めたところ、粗タンパク質とアミノ酸の消化吸収率については、濃縮大豆タンパクは魚粉より高く、大豆油かす、コーングルテンミールとチキンミールは魚粉よりやや低く、フェザーミールは魚粉より低かった。粗脂肪の消化吸収率も粗タンパク質と同じ傾向だったが、チキンミールが一番低い値だった。また、上記の代替飼料原料を3割配合した飼料を2週間給餌したブリ稚魚の肝臓に対して遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、共通して魚粉飼料よりステロール代謝関連の遺伝子発現が増加し、フェザーミール給餌区では核酸代謝関連遺伝子の発現が減少していた。また、肝臓の代謝産物の網羅的解析を行った結果、濃縮大豆タンパク給餌区では各種アセチルカルニチンの増加、フェザーミール区では核酸の増加が確認された。

##### 2) 消化・栄養代謝に関わる生理指標を用いた飼料原料の評価

1) で4週間給餌飼育したマダイ稚魚の直腸上皮の組織像を観察したところ、植物性飼料原料のみの飼料区では組織変性が見られたが、動物性飼料原料を配合した飼料区ではみられなかった。肝臓のステロール代謝関連とグルタミン酸代謝関連の遺伝子発現を調べたところ、植物性飼料原料のみの飼料区では魚粉主体飼料区より高かったが、動物性飼料原料を配合した飼料区では低くなっていた。植物性飼料原料に動物性飼料原料を配合することで改善が見られた。

ブリ稚魚の胃へ代替飼料原料（大豆油かす、コーングルテンミール、濃縮大豆タンパク、チキンミール、フェザーミール）を直接投与して消化誘導性を魚粉投与区と比較したところ、脂質の消化吸収に働く胆汁分泌はチキンミール投与区が魚粉投与区に次いで高かったが、それ以外は低かった。タンパク質分解酵素の腸管への分泌は、フェザーミール投与区で高く、

それ以外は魚粉投与区と同等であった。

魚粉主体飼料と大豆主体飼料を給餌してブリ稚魚を6週間飼育した結果、大豆主体飼料区で成長の遅れがあり、直腸上皮細胞に組織変性が観察された。肝臓の遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、大豆主体飼料区では魚粉飼料区より脂質代謝関連の遺伝子発現が増加傾向を示した。また、肝臓の代謝産物の網羅的解析を行った結果、大豆主体飼料区では脂溶性物質の減少や分岐鎖アミノ酸の増加が確認された。

### 3) 可消化成分含量による飼料原料の評価と消化性の改善方法の検討

育成サイズのブリ1歳魚で代替飼料原料の粗タンパク質消化吸収率を求めたところ、濃縮大豆タンパクと大豆油かすが魚粉に近く、コーングルテンミール、チキンミール、フェザーミールでは低かった。また、消化管の滞留時間を調べたところ、魚粉40%飼料給餌区に比べ魚粉20%飼料給餌区では胃での滞留時間が短かった。発酵処理した大豆油かすの消化吸収率をマダイで調べたところ、炭水化物の消化吸収率が改善されることが示唆された。

植物性原料、魚油、アミノ酸などを配合して魚粉含量15%にした超低魚粉飼料をブリ1歳魚に与えて20週間飼育し、魚粉含量52%の市販飼料と比較した。超低魚粉飼料区の成長は市販飼料区に劣ったが、飼料コストと飼料効率から求める増肉コストは低減された。

マダイ(320g程度)でも同様に魚粉含量5%の超低魚粉飼料を作製し、8週間給餌飼育して魚粉含量40%の市販飼料と比較した。超低魚粉飼料区の成長は市販飼料区と同等であり、増肉コストは低減された。

### 4) 人工消化系による飼料原料の有効性評価手法の開発

ブリの胃及び幽門垂の抽出液を消化液として用いる消化条件を検討し、抽出液の希釈率、反応液のpH、反応温度の適正範囲を求めた。求めた消化条件を用いて飼料原料の消化性をしらべたところ、胃抽出液に対しては、魚粉>大豆油かす、チキンミール>濃縮大豆タンパク>コーングルテンミール、フェザーミールの順に消化性が良かった。幽門垂抽出液に対しては、大豆油かす、コーングルテンミール、濃縮大豆タンパク、チキンミールは魚粉に近い消化性だったが、フェザーミールは劣った。

ブリの胃と幽門垂の抽出液を冷凍保存する条件を検討するため、そのまま冷凍、グリセロール溶液、凍結乾燥と冷凍温度-20℃、-80℃を組み合わせて保存し、4か月後に解凍して抽出液の消化活性を調べた。どの条件も消化活性を保持していたが、抽出液を-80℃でそのまま冷凍した場合が安定的に活性を維持していた。

以上の結果から、各代替飼料原料の消化吸収性と消化誘導性が明らかになり、消化生理に基づいて効率的な飼料を作製する基盤的情報が得られた。また、代謝産物と遺伝子発現の網羅的解析により代替飼料原料の摂餌時における生理的変化が明らかになり、生理的変化を指標に飼料原料の評価ができる可能性が示された。また、飼料組成の調整により低魚粉でも成長に大差なく飼料効率がよい飼料を作製できることが示された。さらに、人工消化系による飼料原料評価が可能であることが示された。

今後は、消化吸収性と消化誘導性を指標に用いて、成長を維持しながら低コストの飼料の開発を行うとともに、遺伝子発現などの生理的指標を用いて迅速な飼育評価を行えるようにする必要がある。また、人工消化系を用いて、飼料原料を大量・迅速にスクリーニングする評価手法を確立する必要がある。

## (2)水素細菌を原料とする純国産養魚飼料開発

### 【目的】

養魚飼料の主要な原料である輸入魚粉の供給不安や価格高騰が問題視されるようになってから久しい。天然由来かつ輸入品である魚粉に依存した現状から脱却し、今後も養殖業が持続的発展を続けていくためには養魚飼料の低魚粉化技術の高度化とともに新規飼料原料の開発が急務である。新規飼料原料としては細菌類（単細胞タンパク質）、微細藻類、昆虫などいくつか候補が知られ、世界的にも開発が進められている。本課題ではそのうち細菌類、特に無機物（水素・酸素・二酸化炭素および無機塩類）から有機物(菌体)を合成できる独立栄養生物としての性質を持つ水素細菌類を有力な候補と考え、生産特性、利用特性および産業的量产化の可能性を明らかにし、将来的な養魚飼料の国産化に寄与することを目的としている。

### 【主な成果と今後の見通し】

#### ア) 単細胞飼料候補細菌の成分・生産特性の解明

水素細菌の特徴として二酸化炭素を同化して有機物(菌体)を合成することが挙げられる。産業利用を前提とした場合、合成されるものが有機物であることが必須であり、養魚飼料としての利用であれば二酸化炭素を炭素骨格として培地中の無機窒素を用いてタンパク質(菌体成分)を合成するのが理想的である。一方、*Hydrogenophilus thermoluteolus* などある種の水素細菌では細胞中にポリβヒドロキシ酪酸(PHB)を蓄積することが知られている。PHBはそれ自体、バイオプラスチックとして有用な物質ではあるが、魚類にとっては栄養的価値に乏しく、過度の蓄積は飼料価値を低下させることとなる。これまでの研究で*H. thermoluteolus*では窒素飢餓条件によりPHB蓄積が誘導できることが明らかとなっており、それを実験系に用いて、ここまで炭素固定やPHB蓄積を中心とした代謝機構の解明とその制御に取り組んでいる。

昨年度までに、PHB蓄積抑制を目的とした基盤研究として、転写産物解析によりPHB合成時の遺伝子発現の特徴を明らかにした。それに加えて、本年度から合成機構における主要酵素の生化学的分析や代謝産物のメタボローム解析も実施し、より包括的にPHB合成機構の解析を進めている。研究の端緒としてPHB合成系と炭素骨格の供給(基質アセチルCoA)において競合する可能性のあるTCA回路との相互関係を主に解析している。本年度はPHB合成系やTCA回路の構成酵素における翻訳後修飾も含めた活性制御機構の解明、およびアセチルCoAやNADPHなど基質や補酵素の蓄積動態とPHB合成の関係を明らかにした。今後こうした知見を積み重ね、水素細菌における生物機能の解明と応用につなげる考えである。

また、この項目では、水素細菌における遺伝子操作技術の確立にも取り組んでいる。これまでのところ主に機能解析のための遺伝子破壊や変異株作製を進めているが、遺伝子組換え技術は応用性の高い技術であり、将来に向けて引き続き技術の確立を目指す予定である。

#### イ) 養魚飼料としての利用技術の開発

この項目では菌体の養魚飼料化に向けた研究を担当している。昨年度までに、水素細菌*H. thermoluteolus*および*Hydrogenovibrio marinus*について、成分分析や飼料への配合効果について検討してきた。こうした解析では菌体本来の性質をまず把握するため、できるだけ成分変性の少ない凍結乾燥品を用いてきたが、実際に養魚飼料に用いる場合、手間やコストのかかる凍結乾燥を用いることは考えにくい。本年度から、実用化を見据えて加工法の検討も開始

するとともに、引き続きここまでの成分分析や飼育結果に基づく改善検討も実施した。

細菌類を飼料に用いる場合、成分の安定、環境影響、消費者心理などを考え合わせると、菌体は不活化(死滅)させて用いるのが望ましい。そのため、まず、水素細菌 *H. marinus* 菌体の不活化法について検討した。当該菌は凍結や凍結乾燥で死滅することはないが、70℃以上の加熱処理や高圧蒸気滅菌で死滅し増殖能を失うことが分かった。通常の配合飼料作製においても70℃程度の加熱乾燥処理は行われるため、不活化に関しては常法通りの飼料作製時の処理だけで十分と考えられた。次に菌体中に多く含まれ、栄養価の低い多糖類を除去するための処理として、熱水抽出処理を行い、成分への影響を検討した。水に懸濁した *H. marinus* 菌体を高圧蒸気滅菌処理し、水分と固形分に遠心分離した。各画分の成分を分析したところ、中性多糖や過剰な塩分は水溶性画分に移行して除去される一方、窒素分は沈殿に多く含まれるため、タンパク質などは固形物として保留されると考えられた。いまだ十分な条件検討には至っていないものの、加工法に関して一応の方向性は示したと考えており、今後より効果的な処理方法の開発が望まれる。

その他の検討として昨年度の分析で明らかとなった培養法に起因する残留鉄分の影響を調べた。マダイ飼料に硫酸鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) を添加し給餌したところ、42日間の飼育で成長に有意な影響(遅滞)が見られたのは12,000ppm程度の高濃度の試験区であった。通常の培養菌体でこれほどの高濃度の鉄分が含まれることはなく、また鉄自体が経時的に空気中で酸化されて不溶性(吸収されにくい)の  $\text{Fe}^{3+}$  になることから、養殖魚に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

#### ウ) 産業化に向けた生産技術及び生産体制の確立

養魚飼料として水素細菌を利用するには、成分など菌体自体の性質だけでなく、大量生産できることが絶対条件である。この項目では、分離菌体を人為培養環境に移行させる初期培養、および移行させた菌体をラボスケールから実証規模へステップアップするための培養技術の高度化、の二つを軸に検討している。水素細菌は独立栄養生物であり、その系統を維持するためにはガス培養など特別な機器や技術を要する。もし通性独立栄養性、すなわち有機・無機条件ともに増殖できれば、簡易な有機培養を維持管理に、安価な無機培養を生産に、と使い分けることも可能となる。また、水素細菌の場合は微好気性、すなわち低濃度の酸素は必要とするが高濃度になると生育が阻害される性質を持つ。産業的に水素細菌を培養する場合、少なくとも大気レベル(20%)での酸素分圧には耐性を持つことが望ましい。こうしたことを勘案し、本研究では自然界から分離した新規水素細菌株の初期培養条件として、取り扱いやすさの観点から、有機培養適性および酸素分圧耐性の二点から検討した。

昨年度までに特性解析を進め酸素耐性の確認されている新規株(FM)に関して有機培養適性を検討したところ、基質としてLBやフルクトースなど幅広い有機物を利用できることが明らかとなった。また、追加検討した4種の新規株のうち一種(KP)は酸素分圧40%までの耐性が確認され、産業利用に向けたさらなる解析の進展が期待される。さらなる新規株の探索も続けており、着実に研究の裾野は広がりつつある。

また、すでに実験室レベルでの培養法が確立した *H. marinus* に関しては産業的生産に向けてガス閉鎖循環機構の予備検討や培養時のガス消費の算出など、産業化に向けた技術的な検討を進めているところである。

### (3)スジアラ用高効率飼料の開発

#### 【目的】

スジアラは南方系のハタ科魚類であり、鹿児島県や沖縄県では高級魚として取引されている。また、アジア地域、特に中華圏では鮮やかな赤い体色は付加価値が高く、高値で取引されるため水産重要種として注目されている。スジアラは近年の需要の増加に伴い、世界中で天然資源が減少しているため、効率的かつ安定的な養殖生産へのニーズが高まっている。しかしながら、現在のスジアラ養殖においては最適な飼料がないため、成長が遅い、内臓脂肪が多いなどの問題が発生し、効率的な養殖生産が困難な状況にある。これらの問題点を解決し、より効率的かつ安定的なスジアラ養殖を行うためには、スジアラの消化生理特性や栄養要求性に合致した配合飼料の開発が必要不可欠である。また、魚類養殖業において飼料代が経営支出の大部分を占めるため、効率的に成長する飼料の開発により、魚類養殖業全体の成長産業化の促進も期待される。

本課題は、国立研究開発法人水産研究・教育機構と特定国立研究開発法人理化学研究所から組織される共同研究機関が最先端技術を駆使し、科学的根拠に基づいてスジアラ養殖用の高成長、低内臓脂肪等の効率性の高い配合飼料を開発することを目的とする。

そのため、中課題アにおいては、これまで生理学的知見の乏しいスジアラの消化吸収に関する基礎的知見を解明するとともに、異なる水温下における消化吸収動態を解明することで試験飼料の消化吸収特性を評価する。中課題イにおいては、他魚種と比較して成長が遅いことや、内臓脂肪及び筋肉中の脂肪蓄積が目立つ個体や背側が隆起する個体が成魚で出現することなどが問題となっているため、網羅的な代謝産物解析（メタボローム解析）技術及び遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）技術を利用し、スジアラの栄養特性に合った適切な飼料成分の配合及びアミノ酸等を添加することにより、生産効率の良い飼料を開発する。また中課題ウでは、スジアラのメタボローム等の分析データ及び成長等の表現型解析について AI 解析技術を高度化することにより、AI を用いた育成飼料中の有効成分に関する情報を中課題イにフィードバックすることで新規飼料の栄養成分等の最適化に貢献する。

#### 【主な成果と今後の見通し】

##### ア スジアラの消化生理機構の解明

消化吸収動態の解明のために、20、25、30℃で飼育したスジアラ 1 歳魚を用いて摂餌後経時的に消化酵素等の各種指標を解析した。その結果、貯蔵量の目安である胃組織中のペプシン活性は、摂餌後に一時的に低下し、その後摂餌前の水準に戻る傾向が示されたが、摂餌前の水準に戻る時間は 25℃<30℃<20℃の順に長くなった。また、分泌量の目安である胃内容物のペプシン活性は、25℃及び 30℃では摂餌直後と比較して 9 時間後で有意に低下した一方で、20℃ではほとんど活性が下がらず、長時間に渡って高い水準の分泌が続くことが示唆された。以上から、スジアラの胃の消化において、20℃においては他の水温よりも消化酵素の分泌が長時間続き、組織中の貯蔵量の回復が遅くなる傾向があることが示唆された。

タンパク質及び脂質組成が異なる飼料の消化率を調べた結果、飼料中の各成分含量と消化率との間に明確な相関は見られなかった。また、異なる水温間（24.7℃と 20.7℃）で消化率を比較したところ、有意な差は見られなかったことから、試験飼料の組成の範囲では低水温期でも消化率は大きく低下しないことが示唆された。

以上のように、スジアラの消化生理メカニズムに関する新たな知見を継続的に集積し、中課題イの給餌試験やサンプリング等に反映させていることから、効率的な飼料開発に寄与し

ていると考えられる。

## イ メタボローム解析等によるスジアラ育成飼料の評価

令和2年度の中課題ウの成果として、高成長に関わるアミノ酸等を含む複数の栄養素が選出された。そこで、令和3年度は選出された栄養素を添加した飼料を用いた給餌試験を行った。その結果、一部の栄養素については特定濃度の添加によって飼料効率が高くなる傾向が示された。

さらに、上記の栄養素を添加した飼料による給餌試験から得られた糞便のメタボローム解析を行った結果、添加した一部の栄養素は糞便中では減少傾向にあったことから、これらの代謝物は体内に吸収されている可能性が示唆された。また、一部の栄養素添加区では、添加した栄養素が筋肉中で増加していた。

網羅的遺伝子発現解析の結果、一部の栄養素添加区においては核酸関連やコレステロール生合成関連の遺伝子や代謝に関する遺伝子の発現量が高い傾向が示されるなど、添加した栄養素の効果によると考えられる結果を得ることができた。

一般成分分析や血液生化学分析等も実施しているほか、中課題アから提供されたスジアラの消化生理メカニズムに基づいた知見及び中課題ウで得られたAIを用いたスジアラの成長に有効な栄養素の選出結果を活用した給餌試験の実施により添加効果の検証を進めており、効率的な育成飼料の開発に向けて順調に進捗していると考えられる。

## ウ AI を利用した育成飼料の開発の高度化

独自に開発したアルゴリズムを用いたスジアラの実体重とメタボローム解析による重要因子の関係の精密化のための解析を行った結果、実体重と予測体重の間で極めて高い相関を持つ成長モデルを構築することができた。

モデル構築において重要度が高いと考えられる物質について選択した結果、複数の栄養素を選ぶことができた。これらの栄養素の詳細な機序は不明だが、体重に対して影響を与える成分の可能性があると考えられる。

また、飼料成分最適化のための成長予測モデル構築に向けて、これまでの給餌試験から得られたデータを用いたモデル構築及びベイズ最適化の推薦の検証を行った。その結果、栄養素成分と配合量、成長データから3,136通りの組み合わせを選定し、この中から令和4年度に実施を想定する給餌試験で用いる栄養素と配合量を検討することとした。

さらに、飼料効率及び日間成長率それぞれの値を改善する可能性のある配合をベイズ最適化の枠組みに基づいて推薦した。

以上のように、AIを用いた有用な栄養成分の選定や配合量などの推薦等の成果は、今後中課題イにおいて実施している給餌試験に活用され有効性を検証することとしており、効率的な飼料開発に向けて順調に進捗していると考えられる。

#### (4) サーモン養殖推進技術開発

##### 【目的】

近年さけます類は、国民が最もよく食べる魚介類となり、大型の生食サーモン商材の輸入額が大きく伸びている。さけます類は淡水中より海水中で大きく成長することが知られ、現在国内においても大型サーモン類の海水養殖の取り組みが進められている。ニジマスでは、海水移行時に生じる減耗や成長停滞個体の出現が生産上の問題となっている。また国内ではこれまでニジマス、サクラマスは淡水養殖に限定されてきたため、海水養殖用種苗の育種が行われず、国産種苗は海外種苗に比べて成長が遅いことも問題となっている。一方、新たなサーモン養殖種としてベニザケが注目されているが、天然魚より身色が紅くならないことが問題となっている。

そこで本課題では、サーモン養殖の推進に必要な技術開発として、中課題アにおいて、淡水育成種苗の海水馴致技術の開発を行う。中課題イにおいては、海水養殖に適した優れた国産種苗の開発をすすめるため、ニジマスおよび在来マス類（サクラマス、サツキマス）について、国内に残された遺伝資源を活用して、海水養殖に適した大型優良系統を効率的に作出するための基礎集団の作成を行う。中課題ウにおいて、ベニザケの身色を向上させるため、様々な飼料の投与・給餌方法の開発を行う。

##### 【主な成果と今後の見通し】

#### ア サーモン養殖における海水馴致技術の開発

##### 1) 種苗供給および海水成長試験

長野県水産試験場において、ニジマス種苗 5 群を作出して、以下の各試験に試験魚を供給した。香川県水産試験場において、R2 年度群により、系統によっては馴致なしでも、生残率や海水移行後の成長率からは問題なく飼育出来る可能性が示された。また海水飼育後の成長優良個体を系統内選抜することで、海面養殖に適した種苗が生産できる可能性が示唆された。また R3 年度群についても、同様の結果の再現性が示された。一方、愛媛県農林水産研究所水産研究センターでは、R2 年度群においては、各系統内における海水馴致方法間と系統間における瞬間成長率に有意差はみられなかった。R3 年度群については、海水飼育直後の 5 日目まで生残率が過年度と比較して低くなり、その後の成長不良個体も多く出現した。その理由は、海水飼育直後の 5 日目までの平均水温は 19℃前後で推移し、馴致の適水温とされる 18℃以下を保てなかったことが影響したと考えられた。

##### 2) 海水浸漬時のストレス物質

海水浸漬ストレスを非侵襲的に測定・評価できる指標物質の探索を目的に、淡水から海水への移行や、淡水から 10℃高い海水水槽に移すことによるストレスを与え、ニジマス体表から分泌される揮発成分の網羅的解析を行った。その結果、海水投入時にはアルデヒドやアルコール類がニジマス体表から放出されることが示唆された。また、系統によって時間経過に伴って検出されるストレス物質の傾向に相違が観察され、ストレス物質の放出反応は系統により異なる可能性が示唆された。さらに、体表試料に認められたストレス候補物質 4 種が海水試料においても認められたことから、海水の分析によりストレスの度合いを推測可能であることが示唆された。

##### 3) 海水経験による海水適応向上試験

ニジマスでは稚魚期に海水に浸漬（海水経験）することでその後の海水適応能が高まることが知られている。海水順応能が比較的低いとされている系統のニジマスを用い、海水飼育に移

行後の生残率を調べたところ、7日間の海水経験処理を行った場合に生残率の改善が確認された。海水経験群の血漿浸透圧を調べたところ、海水移行5日目の時点で低下傾向が顕著となり十分に海水に順応していたと判断された。しかしながら、7日間海水経験群においても、その生残率は70%と低く、十分な海水順応能とは認められなかった。

以上のように、系群の違いにより海水適応能力が異なる可能性や、海水飼育優良個体の選抜により海面養殖に適した種苗が生産できる可能性、海水浸漬時のストレス物質に関する知見、海水経験による海水適応の知見など、複数年にわたり継続的に集積させていることから、海水馴致技術の開発に寄与していると考えられる。

## イ サーモン養殖のための優れた系統の作出

### 1) ニジマス

令和元年度に1対1交配で作出した静岡由来の基礎集団の子供495尾とその親魚のDNAに対して、海外で開発された親子鑑定マーカーを用いて、全個体で親子判別ができることを明らかにした。今後国産ニジマスの育種や家系管理等に使用されることが期待される。R元年、R2年に引き続き、新たに北海道のスチールヘッド系を中心に第3回目の基礎集団を作出した。淡水期の成長の遺伝率は、体重(0.18)より体長(0.33)の方が高く、体長を指標にした選抜がより効率的であることが示唆された。

### 2) サクラマス

最適な凍結精子の受精方法を明らかにするため、解凍後の精子を用いて、解凍後精子運動率と精子生存率を示す凍結精子の発眼率を調べたところ、解凍後の精子運動率が良くても発眼率が良いというわけではないことが明らかとなった。今後安定的に高い発眼率を得るための受精方法を開発する必要性が示された。令和2年度は、①北海道の父系母系の要因交配による「北海道基礎集団」を作出したが、令和3年度は初めて本州集団を父系に加え、②「東北基礎集団」と③「全国基礎集団」を作出した。各群とも今後、海水飼育における高成長系統の選抜育種に活用する予定である。

### 3) サツキマス

要因交配選抜第一世代における飼育試験から、0+の6~12月の平均日間成長率は海水飼育開始時(満1歳時)の平均体重に相関しており、平均卵重量とは関係が無いことが示唆された。今後、海水飼育試験開始時に大きい個体を選べば、その後の海水飼育時の成長も良い個体を選ぶことになるか確認する予定である。一方、近大系1集団の卵、各地由来の5集団の精子または凍結保存精子を用いて、1対1の総当たり交配で基礎集団となる計138区作出した。この交配集団は混合飼育して特性を調査する予定である。本集団を親子鑑定することによって、次世代の作出に貢献した親魚の詳細情報が得られるとともに、親が異なる個体を選別することにより、遺伝的多様性の高い基礎集団とすることが期待される。

これまで人工授精技術の高度化に取り組むとともに、R元から3年度にかけて各地より収集したサクラマスの凍結精子バンクを用いて、育種を進める元となる基礎集団を複数年にわたり継続的に作出している。さらに海水飼育時の高成長個体の選抜育種効果の飼育試験を実施するなど、国産サーモンの優良系統の作出に向けて順調に進捗していると考えられる。

## ウ ベニザケ養殖実証技術開発

①長期給餌試験から、法令上限(100ppm)の合成アスタキサンチン(Ax)を添加した配合飼料よりも、ナンキョクオキアミを与えたほうが身色は向上することが明らかになった。また、②淡水飼育期において、配合飼料とナンキョクオキアミの乾物中Ax濃度は同程度であったが、ナンキ

ヨクオキアミのほうが筋肉中の AX 濃度が高くなると示唆され、ベニザケの色揚げにとってナンキョクオキアミは優れた餌料であることがわかった。淡水期の配合飼料給餌による色揚げ効果については、体重の増加に伴い直線的に赤みが増すことが確認された。③AX のフィードオイルへの添加試験については、カロテノイドの吸収が終わっていない内容物が含まれた可能性などから更なる試験が必要と考えられた。

以上のように、身色を改善するために、様々な飼料の投与条件について継続的に検討が進められており、ベニザケ養殖の実証技術の開発に寄与していると考えられる。

## (5) 養殖業の成長産業化のための優良系統の開発事業

### 【目的】

この課題では、輸出商材として適している魚種スジアラの高成長で赤い系統を育種することおよびカンパチ人工種苗の安定供給に資する親魚養成・管理手法の開発を目的とする。

養殖業の成長産業化のためには国外で価値の高い魚種を特に経済成長著しい東南アジア圏、中華圏の各国に輸出する産業の創出を目指すのは合理的であり、その戦略の中でスジアラは最適な輸出商材である。しかしながら、成長が遅く生産コストがかかり、また、国外のマーケットでは価値がない“体色が黒い”スジアラが養殖下では非常に多いことも問題となっている。そのため本事業では、中課題ア「高成長で赤いスジアラ系統作出のための基盤整備」において、天然集団から広くスジアラの親魚候補を採集し、長期に渡って選抜に耐え得る遺伝的多様性に富んだ育種基礎集団を作出するとともに、中課題イ「スジアラゲノム育種技術の開発」において、育種のためのゲノム情報の整備、精度の高いゲノム予測法の開発を行い、中課題ウ「スジアラ世代交代時間短縮技術の開発」において、世代交代時間を短縮する技術の開発および遺伝資源保存システムを構築することで、高成長で赤いスジアラ系統を生産する基盤を整備し、新たな輸出品目を開発する。

さらに中課題エ「カンパチ人工種苗の安定生産体制の構築」において、カンパチの親子鑑定マーカーを開発するとともに、国内で種苗生産を実施している4機関で使用した親魚と生産した種苗の血縁関係を調べる。また、種苗生産の過程で形態異常が発生した場合には異常個体の家系について調査を行う。さらに、GRAS-Di法により使用した親魚群の血縁度を調べる。

### 【主な成果と今後の見通し】

#### ア. 高成長で赤いスジアラ系統作出のための基盤整備

高成長で赤いスジアラ系統を育種するためには、遺伝的多様性が高い育種基礎集団を作出することが必須である。そのためには国内のスジアラの遺伝的集団構造を把握し、どの地域集団を使えば最も遺伝的多様性が高い育種基礎集団を作出できるかを検討する必要がある。小課題1)「親魚収集および育種基礎集団の作出」では、育種基礎集団の作出に着手し、雌3個体、雄10個体を使用した1対1交配により14家系を作出した。また育種基礎集団を作出するために必須である性ホルモン処理等による計画的1対1交配技術の開発を行い、これまでの黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ(LHRHa)の単独投与に加え、ドーパミン拮抗薬ピモジドと卵成熟誘起ホルモン前駆体(OHP)を併用する方法を検討し、良好な成績を得た。次年度も引き続き、育種基礎集団の作出を行うとともに、1対1交配技術開発ではLHRHaによる排卵誘導を行う際に、ピモジドおよびOHPを併用する場合の投与後の排卵時間と卵質の関係について精査し、高ふ化率となる条件を検討する。

小課題2)「親魚の遺伝的多様性調査」では、昨年度までに沖縄県(石垣島)、鹿児島県(奄美大島と甬島)、長崎県(五島列島)、高知県(土佐清水市)から収集した合計128個体のデータに加え、今年度新たに高知県からの44個体を含む141個体のサンプルを入手しGRAS-Di法により多型情報を取得した。これまでに得た全269個体の多型情報により日本国内におけるスジアラの遺伝的集団構造を解析した。その結果、日本国内には石垣から奄美海域に生息する集団と九州から四国に生息する集団が存在することが明らかとなった。また、石垣から奄美海域に生息するスジアラの遺伝的多様性の指標である有効集団サイズが大きいことが示唆された。そのため、スジアラで育種基礎集団を作出するには種苗生産拠点である石垣島

周辺で採捕できるスジアラを用いることが適切と考えられた。

#### イ. スジアラゲノム育種技術の開発

正確なゲノム情報を利用することで高品質な一塩基多型 (SNP) 情報の取得が可能となり、高精度のゲノム育種価推定および優良親魚の選抜が可能となる。そこで、小課題 1) 「ゲノム情報、遺伝子地図情報の整備」では、これまで取得したスジアラ 16 組織の RNA-Seq (遺伝子発現) データ、公共のデータベースより収集したハタ科魚のタンパク質配列および条鰭綱魚類において種を越えて共通なタンパク質配列を用いて、スジアラ遺伝子の学習モデルを作成した。その学習モデルにより、昨年度構築した最終版のゲノム配列について、遺伝子領域の予測を行った。その結果、24,617 個の遺伝子を予測し、その情報を付加することで、ゲノム情報の整備は完了した。

小課題 2) 「多型解析とゲノム予測手法の開発」では、今年度作出した育種基礎集団全 1,306 個体の全長・体重を測定しゲノム DNA を抽出した。また体色とリンクする遺伝子候補を収集するため、アスタキサンチン含有餌料を与えた集団のうち、黒、赤黒および赤い体色の個体各 5 尾ずつより皮膚などの組織をサンプリングし、網羅的な発現遺伝子の収集を行った。小課題イ-1) で整備した遺伝子情報を利用して、すべての遺伝子の発現量を算出した。解析の結果、赤い体色の個体特有に発現が多い遺伝子が特定され、これが赤い体色のマーカーとして使用できる可能性が示唆された。来年度は、引き続きゲノム予測に使用するデータを集めるため、来年度に作出する育種基礎集団の 0 歳時での表現型を測定しゲノム DNA を採取する。さらに令和 3 年度に作出した育種基礎集団の親子判別を行い、測定した表現型の遺伝率を求める。さらに、体色とリンクする遺伝子マーカーの探索を血清と鱗を用いて行う。

#### ウ. スジアラ世代交代時間短縮技術の開発

スジアラの場合、雌として成熟するまでに 3~5 年、雄に性転換するのに 5~7 年を要すると言われており、選抜・交配のサイクルを循環させ世代を回す必要のある育種においては大きな問題となる。そのため、性ステロイドホルモンやエストロゲンの合成阻害剤 (AI) 等をスジアラ雌個体に投与し性転換させる世代交代時間短縮技術を開発することが重要である。そこで小課題 1) 「早期成熟技術の開発」では、スジアラ未成熟 0 歳魚へのメチルテストステロン (MT)、11-ケトテストステロン (11KT)、レトロゾール (LZ) の腹腔内埋込および MT、LZ 添加飼料の経口投与による 5 ヶ月間の雄化試験を実施した。解析の結果、腹腔内埋込では、雄化誘導の効果は低いと考えられた。一方で、経口投与試験では、MT 投与区のすべての個体および LZ 投与区の処理後 3 か月目の 5 尾中 2 尾に精子形成が確認された。さらに MT 投与区の処理後 5 か月目のすべての個体の組織切片において排精像が確認された。以上より、スジアラ未成熟 0 歳魚の雄化においては MT の経口投与が有効と考えられた。来年度は、1 歳魚での MT および AI の投与効果を明らかにする。

小課題 2) 「遺伝資源保存システムの構築」では、精子の長期保存の影響を調査する目的で、約 30 か月間凍結保存した精子の活性を評価した。凍結前の精子の活性を 100% として解凍後精子の活性を算出したところ、5 個体の平均は約 90% と非常に高い値であった。また過去に調査した約 2、6、12 ヶ月間凍結保存した精子の活性との差も見られなかったことから、凍結した精子は育種プロジェクトにおいて半永久的に利用できるものと考えられた。また、今年度天然由来の親魚候補 11 尾の精子凍結を実施し、4 尾分の凍結精子を今年度の育種基礎集団作出のために利用した。また、これまでの成果を活用して適宜凍結精子を作製し、中課題アで実施する育種基礎集団の作出に利用する。

## エ. カンパチ人工種苗の安定生産体制の構築

先行研究で収集したカンパチの遺伝情報等から、利便性に優れ高精度に親子鑑定できる一塩基多型 (SNP) マーカーを開発した。カンパチの種苗生産を実施している 4 機関から使用した親魚 (計 114 個体) と取り上げた種苗 (各機関につき約 200 個体、計 785 個体) の魚体の一部をサンプリングし、開発した SNP マーカーを用いて親子鑑定を実施した。解析の結果、4 機関中 3 機関で種苗は全て 1 個体の雌由来であること、残る 1 機関でも 4 個体の雌が関与したものの、大型群の 81.0%、小型群の 90.9% が同一の雌由来であることが分かった。

使用した親魚群 (計 114 個体) に関しては、GRAS-Di 法による多型データを取得した。令和 4 年度は令和 3 年度に入手した 4 機関の親魚群の多型データから、親魚群の血縁度を明らかにする。また令和 3 年度に引き続き、使用した親魚と生産した種苗のサンプリングと親子鑑定を行い、種苗の家系組成を明らかにする。各機関の親魚群の血縁度が極めて高い場合や、特定の親魚が奇形の発生に関与していることが示唆された場合には、望ましい親魚群の構成や、機関間の親魚の入れ替え等を提案する。

## (6)環境変化に適応したノリ養殖技術の開発

### 【目的】

秋季の海水温の上昇及び冬季の色落ちの発生は、ノリ養殖に多大な影響を及ぼすことから、ノリ養殖の安定した生産を図るため、抜本的な対策が業界等から強く望まれている。そこで、本課題では、農林水産技術会議委託プロジェクト研究等で育成された高水温に適応したノリ育種素材を活用して各海域で養殖試験を行うことにより、それぞれの漁場環境やニーズに即した高水温適応品種の選抜と実用化を進めるとともに、ノリと栄養塩を競合する植物プランクトンを消費し、栄養塩を添加（排出）する二枚貝の増養殖を組み合わせたノリ色落ち対策技術を開発することで、高品質なノリの安定的な生産に資することを目的とする。

### 【主な成果と今後の見通し】

#### ア ノリ高水温適応素材を用いた養殖試験

熊本県では、野外水槽での培養により上記の育種素材の高水温耐性調査と再選抜を行った。10-12月（最初の9日間は25℃前後）に実施した野外培養試験では、育種素材4C株と熊本県が選抜した高水温耐性候補株AH株で形態異常（藻体のくびれ）が標準品種U51より少ない傾向にあった。また、高水温下での室内培養試験では、育種素材の再選抜株4C1株は、元株4Cに比べくびれ数は増加していたが、生長性は向上していた。

岡山県海域では、4C株から室内培養下で生長性により再選抜した4C-6株について養殖試験を実施した。4C-6株の生長（葉長）は育苗期、養成期とも標準品種U51より良く、育苗期の形態異常の発生も少なかった。漁場環境が異なるので単純比較は出来ないが、令和2年度に養殖試験を行った4C株より葉長の伸びが良く、生長性が付加されていることが示された。

福岡県の有明海漁場に適合した高水温耐性品種の開発のため、育種素材6C株と同株から選抜した6C-1株、6C-2株、および標準品種U51の漁場養殖試験を行った。育苗期における生長は6C株が最も良かったが、生産期には株間で明確な差異はみられなかった。養殖試験中は漁場水温がほぼ平年並みで推移し、株間の差が出にくかったためと推測された。6C-1株からさらに生長の早い6C選抜1-1株を選抜し、室内試験で特性評価を行った。高水温下で培養したところ、生長は6C株や6C株からの選抜株で速く、特に6C選抜1-1株は速かった。しかし、形態異常発生率についてはいずれの株も高く、実用化に向けて課題が残った。

愛知県の浮き流し養殖漁場に適合した付着力の強い高水温耐性品種の開発のため、育種素材6C株から高温選抜した6C愛知株、および4C株から高温選抜した株と付着力の強い愛知県保有株とを交雑させた4Cシゲカズ株の野外養殖試験を実施した。野外では、付着力は比較対照のU51の方が強かったが、6C愛知株、4Cシゲカズ株とも育種素材の短所であった付着力は芽落ちしない程度にまで改善されていた。また高温条件下で行った室内培養試験では、4Cシゲカズ株で他の株よりも単孢子放出量が多く、6C愛知株、4Cシゲカズ株の奇形率はU51より低かった。これらの選抜株の室内試験下での付着力は、U51と同等以上であった。

育種素材と同様の手法（プロトプラスチック化による高水温選抜等）で作出された複数の派生株について、室内試験による高水温耐性調査を行った。高水温培養（24℃で2週間、その後18℃で1週間）を行った結果、多くの派生株で元株と比較して藻体のくびれ等高水温による形態異常（藻体のくびれ）の発生が少なく、高水温耐性が向上する傾向がみられた。

育種素材について、野外養殖試験、野外培養試験等で栽培された葉状体の遊離アミノ酸組成を分析した結果、主要呈味成分である遊離アミノ酸の含量に低下はみられず、味の面でも養殖品種としての適性を有していると考えられた。

以上のように、共通の育種素材を用いてそれぞれの海域（県）において養殖・育成試験を実施し、生長性や付着力等において優れた特性を持つ候補株が再選抜されている。今後は、さらに育種素材からの再選抜株や独自選抜株について養殖・培養試験を継続して実施し、収量や品質等において安定した特性を示す優良品種の実用化を進める必要がある。

## イ 二枚貝の増養殖等を組み合わせたノリ色落ち軽減技術の開発

二枚貝増養殖の併用によるノリへの施肥効果の把握のため、窒素安定同位体比を指標としてアサリ及びマガキの窒素排泄物（アンモニウム塩）のノリの生長への寄与率を推定する手法を開発した。同手法を福岡県、佐賀県及び熊本県の地先漁場で実施された実証試験に適用したところ、二枚貝から排泄された DIN のノリによる吸収・利用がみとめられたが、ノリと二枚貝間の距離等によっては効果が限定されること等が示唆された。色落ちリスクにつながる窒素などの栄養塩制限を診断するノリの生理状態評価手法として、（１）窒素添加とパルス振幅変調（PAM）クロロフィル蛍光測定法によるノリ葉状体の蛍光値の測定を組み合わせた診断手法、（２）ノリ葉状体の色調（L\*）と生体吸収スペクトルを指標とした診断手法を開発するとともに、（３）さまざまな栄養塩（窒素）環境下のノリ葉状体の網羅的な遺伝子発現解析（RNA-Seq）やパスウェイ解析により、窒素制限の指標となる遺伝子候補を同定し、簡便な方法で評価する技術基盤を構築した。

二枚貝増養殖との組み合わせによるノリの高品質化については、有明海及び八代海の現地漁場試験等で技術開発に取り組んだ。有明海地先では、低 DIN 濃度時に漁場にマガキを設置することにより、ノリの生長が維持される一定の効果を見出した。しかし、色落ちを軽減するためにはノリ養殖施設の単位面積あたり約 900kg/m<sup>2</sup>のマガキの設置が必要であると試算されたことから、並行して干出中のノリに栄養塩を噴霧し補填供給する方法についても検討し、対象区と比べて養殖ノリの色調が保持される効果を確認した。また、八代海での試験においても、マガキによる赤潮プランクトンの除去効果とマガキ養殖との併用による養殖ノリの色調保持効果がみとめられ、その効果はノリ葉状体が小さい育苗期の方が大きいことが示された。さらに、低栄養条件に適応したノリ養殖品種の開発のために、一定の低栄養耐性がみとめられたフタマタスサビノリと、これからさらに低栄養条件下で選抜した FU-A 株について、室内培養および養殖による特性評価試験を行った。いずれの試験でもフタマタスサビノリと FU-A 株には、標準品種 U51 との比較において低 DIN 濃度下での色調保持能がみとめられ、特に養殖試験での 1 月中下旬の低栄養環境下において FU-A 株は最も高い黒み度を示した。

酸処理剤の影響調査については、今年度も有明海のノリ漁場内及び八代海、大村湾（ノリ養殖が行われていない対照海域）に設けた観測定点において、酸処理の実施前と実施中に海水及び底泥間隙水中に含まれる有機酸濃度のモニタリング調査を実施した。その結果、表層水および底層水については、いずれの観測定点においても有機酸は検出されなかった。また、底泥間隙水中からは、酸処理実施前に有明海の 1 定点で、酸処理実施中に対照海域の大村湾を含む全ての定点で乳酸が検出されたが、いずれも定量限界に近い値であった。

以上から、二枚貝増養殖の併用によりノリの生長や色調が保持される一定の効果はみとめられたものの、ノリの生産・品質を向上させるためには相当量の二枚貝類が必要であることなど現実的な限界があることも示唆された。したがって、ノリ栄養塩を競合する赤潮の抑制やノリ養殖のための栄養塩環境の改善のためには、あわせて二枚貝類の天然資源回復や、海域レベルでの物質循環への理解、さらには貧栄養化対策をはかること等が必要である。また、酸処理剤に含まれる有機酸濃度等の調査を継続して実施し、酸処理剤の使用が生態系や生物に及ぼす影響を評価する上で基盤となる情報を蓄積する必要がある。