

イ 二枚貝の増養殖を組み合わせた ノリ色落ち軽減技術開発

イ 二枚貝の増養殖を組み合わせたノリ色落ち軽減技術開発

1) 二枚貝を用いたノリ高品質化効果の評価手法開発

①二枚貝からノリへの栄養塩供給量の推定手法の開発

実施機関・担当者名：

水産研究・教育機構水産技術研究所 渡部諭史、西本篤史

協力機関：

佐賀県有明水産振興センター、熊本県水産研究センター、福岡県水産海洋技術センター有明海研究所

【背景・目的】

ノリ養殖業は我が国水産業の基幹産業の一つとして大きな発展を遂げてきた。しかし、農林水産統計によると令和元年のノリ類養殖生産量は25万トンで、平成6年の48万トンと比較して48%減少している。生産額で見ると平成7年の9億8千万円から、令和1年の4億9千万円まで、50%減少しており、生産量・額ともに長期的な減少傾向が続いている。

ノリ養殖の問題として、2000年代初頭から毎年のように発生するノリ葉状体の色落ちが挙げられる。色落ちは、海水中の窒素やリンなどといったノリにとって必要栄養素である無機栄養塩濃度が不足することが原因で、植物色素を十分に作るができなくなるために、葉状体の色が薄くなり商品価値が下がることである。養殖海域の栄養塩不足は、養殖海域の環境収容力を超えるノリを栽培した場合や、陸水の過剰利用や水質総量規制などによる陸域からの栄養塩負荷の減少や、ユーカンピアなどの大型珪藻類のブルーム（珪藻赤潮）による栄養塩の消費でノリが利用できる栄養塩が枯渇することなどが原因と考えられている。小型珪藻類は食物連鎖の基礎生産者として重要な藻類であり、小型珪藻類のブルームが発生しても短期間で収束するが、大型珪藻類は栄養塩レベルが比較的低いときに小型珪藻類を抑えて大発生し栄養塩を使い尽くす傾向があり、これによりノリ生産が打撃を受けると考えられている。

ノリの色落ち対策として、硝酸アンモニウムなどの化学肥料を用いた施肥（栄養塩添加）が行われているが、海洋の流動環境下での施肥は陸上の農地に肥料を施すのと比較して移流拡散のために高濃度が必要とされるため、特に潮位差が大きく潮汐流の強い有明海では効果的な管理が困難である。また、植物プランクトンが多いときには効果が期待できないことや、周辺海域への環境負荷も問題となる。このため、従来の施肥法の改良や代替法の検討が望まれる。

本事業及び、先行事業では化学肥料を用いた施肥の代替法として、アサリやマガキなどの水産有用二枚貝類にノリ色落ちの原因となる珪藻類等を餌料として利用させることで現存量を減らすことで、ノリとこれらの植物プランクトンの栄養塩競合を緩和させるとともに、二枚貝類が排泄するアンモニア態窒素をノリに供給する手法の検討が行われてきた。この複合養殖的手法には二枚貝類の生産が漁業所得を向上させるという経済的メリットもあり、養殖現場での実用化に期待がかかっている。海藻類は様々な形態の窒素を吸収、貯

蔵、利用することが知られているが (Syrett 1981)、ノリは、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アミノ酸態窒素、尿素と比較して、アンモニア態窒素を最も速く吸収する (Amano and Noda 1987; 山本 1992)。二枚貝類は主にアンモニア態窒素と少量のアミノ酸態窒素を排泄すると考えられており (Gosling 2004)、ノリへの効率的な栄養塩添加効果が期待される。また、藻類細胞内でのアミノ酸合成には、アンモニア態窒素が前駆体として利用されるので、取り込まれた硝酸態窒素および亜硝酸態窒素は、一度アンモニア態窒素まで還元される必要があり、これには大きなエネルギーを消費することから (Lea and Morot-Gaudry 2001) 二枚貝類からノリへアンモニア態窒素が直接供給されることはノリの生長にとって有利であると考えられる。

本事業に先行して平成 19 年度～23 年度に実施された「新たなノリ色落ち対策事業のうち二枚貝増養殖技術の開発」では、各県のノリ色落ち状況に関して情報を整理するとともに、アサリ、サルボウガイ、ウチムラサキガイ、シカメガキなどの二枚貝類に関して濾水速度、プランクトン除去能力、アンモニア排泄などに関する知見を詳細な実験により収集し、これらの情報を元に数値モデル解析を行うことで、ノリ色落ち防止効果の試算などを行った。しかし、この事業は二枚貝類やノリの基礎的な知見の収集を主な目的とし、養殖現場での実証試験は実施されなかった (増養殖研究所 2012)。

本事業は、ノリ養殖漁場の海域において二枚貝類による珪藻等植物プランクトンの除去効果を評価するとともに、二枚貝類の増養殖を併用することによる養殖ノリの品質向上効果等を実証規模で確認し、実施上の問題点、注意点等を明らかにすることを目的としており、先行事業での室内飼育実験等から得られた基礎的な知見を参考に、養殖現場での実証試験を行うことが求められている。また、現場実証試験を可能にするための評価ツールの開発も必要である。

本課題では、二枚貝類が持つ色落ち防止効果のうち、ノリへの栄養塩供給 (施肥) 効果に注目し、栄養塩供給量の推定手法を開発することを目的とした。二枚貝養殖のノリの高品質化の現場実証試験のためには、二枚貝類からノリへの栄養塩の供給量を推定することが必要であるが、測定手法は確立されていない。二枚貝の摂餌や代謝物排泄特性の環境要因との関係水槽試験等で定量的に明らかにすることで、環境水中に放出される栄養塩の量を試算することは可能であるが、排泄された栄養塩のノリによる取り込み量を物質収支のみから推定することはできない。そこで、窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) を指標とした二枚貝類 (マガキおよびアサリ) からノリへの溶存態無機窒素 (DIN) 供給量の推定手法を水槽飼育実験および野外調査で確立し、これを利用して環境水中の DIN と二枚貝が排泄するアンモニア態窒素のノリへの寄与率を推定する手法を確立することを目標とする。

窒素の安定同位体である ^{14}N と ^{15}N の化学反応速度の違いから、窒素化合物の ^{15}N は特有の値を持つことが知られている。また、窒素化合物が基礎生産に利用されたり、食物連鎖の中で窒素化合物が高次の捕食者に利用されたりするときに ^{15}N の値が変化 (同位体分別) することが知られており、この変化値を同位体分別 (濃縮) 係数と呼ぶ。例えば、一般的に捕食者の ^{15}N は餌のそれよりも 3～4‰ 高くなることが知られている。

図 2-1-1 に、カキが異なる ^{15}N 値を持つ 2 種類の餌を利用して成長した場合の、餌とカキの ^{15}N の関係を表す計算例を示す。餌 A と餌 B の ^{15}N がそれぞれ 10‰ と 50‰ とし、餌 A と餌 B のカキの成長への寄与率をそれぞれ 70% と 30% とした場合 (カキの軟体部に含ま

れる窒素の 70%が餌 A 由来という意味)、カキの $\delta^{15}\text{N}$ は単純にそれぞれの餌の寄与率の比例配分で求めることができる。しかし、餌の $\delta^{15}\text{N}$ 値とそれを食べた生物の $\delta^{15}\text{N}$ 値は前述の

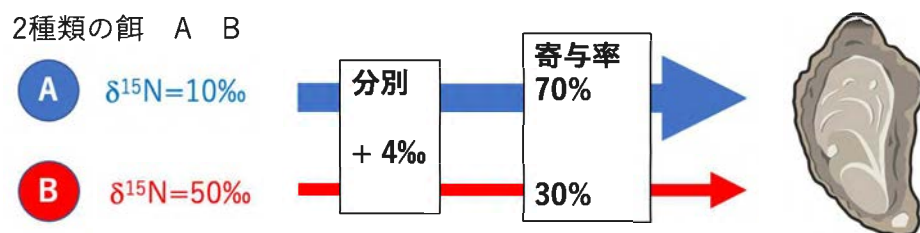


図 2-1-1. 2 種の餌とそれを食べたカキの窒素安定同位体比の関係

濃縮計数の値分異なるので（この例では+4‰）、これを計算に入れて、カキの $\delta^{15}\text{N}$ は、図 2-1-1 に示した式で求めることができる。以上が、安定同位体比を用いた餌の寄与率の古典的な求め方である。

これまで、安定同位体比のこの性質を利用し、ノリが海水中の栄養塩（栄養＝餌）を利用する場合とそれに加えて二枚貝の排泄物を利用する場合の安定同位体比の差から、二枚貝排泄物のノリの生長への寄与率を推定する手法の確立を試みてきた。また、化学肥料の施肥効果に関しても同様な検討を行ってきた。さらに、確立した手法を用いて有明海でのノリ養殖現場における実証試験の検証を行うことで、効率的な複合養殖技術開発に資する情報を提供することを目指してきた。本報告書では、実証試験の事例を追加して紹介するとともに、本事業を通しての取りまとめを行う。

【方法】

（１）本手法の推定誤差の試算

窒素安定同位体の分析にこれまでとは異なる質量分析計（Elementar 社 IsoPrime 100）を用いたため、L-アラニン標準試薬（ $\delta^{15}\text{N}$: $9.97 \pm 0.2\text{‰}$ ）の反復測定値から、装置の繰り返し精度を求め、測定誤差から貝類及び施肥剤のノリの生長への寄与率推定値のバラつきを求める方法を検討した。

（２）佐賀県におけるカキとノリとの複合養殖及び干出施肥試験

佐賀県有明水産振興センターとの共同で、ノリ養殖場でのノリとマガキの複合養殖試験および干出施肥法の効果を定量するための実験デザインを検討し、施肥効果の評価を行ってきた。令和 3 年度も同様な試験を行い、ノリ、マガキ、施肥剤の標本を得た。

カキからノリへの窒素供給および干出施肥の効果を調べるために、太良町地先の潮間帯のノリ漁場に以下の 3 つの実験区を設け、令和 3 年 1 月 14 日～20 日にかけて試験を行った（図 2-1-2）。二枚貝区：ノリ網の下にカキ養殖カゴを設置した区。カキは約 2 kg/m^2 になるように養殖カゴに封入した。干出施肥区：干出施肥船を用いて市販施肥剤ワンダーL をノリに添加した区。対照区：干出施肥もマガキの設置もしなかった区。試験条件の詳細は、

本事業令和 2 年度報告書を参照。

それぞれの区からマガキ及びノリ葉状体また施肥剤の標本を採集し、窒素安定同位体比および窒素含量分析に供した。分析結果から、施肥剤およびマガキ排泄 DIN のノリの生長への寄与率を推定した。ワンダーLの窒素組成は佐賀県有明水産振興センターが解析した。

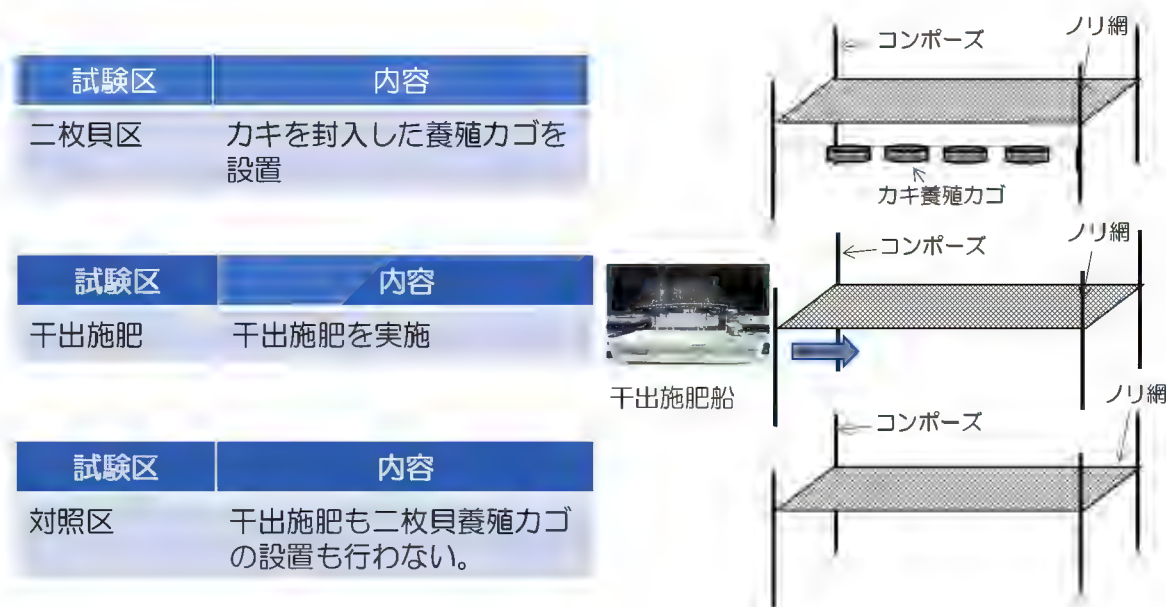


図 2-1-2. 佐賀県における複合養殖及び干出施肥試験

(3) 熊本県におけるマガキとノリの海面イカダ複合養殖試験

熊本県水産研究センターとの共同でマガキ養殖イカダを用いたノリとマガキの複合養殖試験の実験デザインを検討し、令和 2 年度に引き続きノリおよびマガキの標本を得た。

令和 3 年 1 月に八代市鏡町地先に設置したマガキ養殖イカダ (22 m × 11 m、カキ生産規模 2～3 t) でマガキとノリの複合養殖試験を行った。図 2-1-3 に示した条件で 10 日間の複合養殖試験を実施した。



図 2-1-3. 熊本県におけるマガキとノリの複合養殖試験

1 月 5 日に黄色塗の場所に 45 カゴ (約 5 kg/カゴ) のマガキを垂下し、北側の表層 30

cm の深度にノリ網を設置した。試験に使用したノリは、正常な色調のノリ（黒み度 47.1）に加えて、貧栄養条件下の培養で軽度色落ち（黒み度 42.3）および重度色落ち（黒み度 27.7）に処理したものをを用いた。また、イカダから 3 km 離れた地点（三角町ノリベタ漁場）を対照区として 1 月 15 日にノリを採集した。試験条件の詳細は、本事業令和 2 年度報告書を参照。

本試験で採集したノリ及びマガキ標本は冷凍保存して水産技術研究所に輸送し、安定同位体比分析を行い、マガキからノリへの DIN 供給を推定した。

（４） 安定同位体測定法及び二枚貝排泄物の寄与率推定式

ノリ標本は、蒸留水で塩分を洗い流して凍結乾燥した後に粉砕して乾燥保存した。アサリ及びマガキ標本は、軟体部を取り出して凍結乾燥して後に粉砕した。粉砕した標本は脱脂処理を施さずに、窒素含有用および $\delta^{15}\text{N}$ 分析に供した。ノリに関しては分析試料約 2 mg、アサリ及びマガキに関しては約 0.8 mg をスズ箔に詰め、質量分析計（Elementar 社 IsoPrime 100）を用いて、 $\delta^{15}\text{N}$ を測定した。

二枚貝類の排泄窒素および施肥剤のノリの生長への寄与率は、令和 2 年度と同様に次式を用いて求める。

$$k = (X' - X)/(-X + C - 3.9) \quad (\text{式 1})$$

$$k = (X' - X)/(-X + F - 2.4) \quad \text{硝酸態窒素} \quad (\text{式 2})$$

$$k = (X' - X)/(-X + F + 0.4) \quad \text{アンモニア態窒素} \quad (\text{式 3})$$

ここで、

X' ：試験区（二枚貝尿が含まれる環境水）のノリ葉状体の $\delta^{15}\text{N}$

X ：対照区（二枚貝尿が含まれない環境水）のノリ葉状体の $\delta^{15}\text{N}$

C ：マガキ軟体部の $\delta^{15}\text{N}$

F ：施肥剤 $\delta^{15}\text{N}$

k ：マガキ窒素排泄物あるいは施肥剤のノリの生長への寄与率を示す。

【結果および考察】

（１） 本手法の推定誤差の試算

L-アラニン標準試薬の $\delta^{15}\text{N}$ 反復測定結果は、 $9.99 \pm 0.10\text{‰}$ ($\pm\text{SD}$, $n=10$)であった。この $\pm 0.10\text{‰}$ というバラつきについて、マガキ窒素排泄物のノリの生長への寄与率推定値への影響を計算してみた。海水 DIN の $\delta^{15}\text{N}$ を 10‰ 、カキ軟体部 $\delta^{15}\text{N}$ を 5‰ と仮定して、本事業でこれまで得られた以下の濃縮係数を用いて計算すると、カキ窒素排泄物寄与率 100%の場合、ノリ $\delta^{15}\text{N}$ は $5\text{‰} - 4.3\text{‰} + 0.4\text{‰}$ で 1.10‰ 、海水 DIN の寄与率が 100%の場合（カキ窒素排泄物寄与率が 0%）のノリ $\delta^{15}\text{N}$ は $10\text{‰} - 2.4\text{‰}$ で 7.6‰ となる。

濃縮係数

- ・ 海水 $\text{NO}_3\text{-N}$ をノリが利用するとき： -2.4‰
- ・ カキ軟体部と排泄 $\text{NH}_4\text{-N}$ の差： -4.3‰
- ・ $\text{NH}_4\text{-N}$ をノリが利用するとき： $+0.4\text{‰}$

これらの 2 点から、ノリ $\delta^{15}\text{N}$ (x) とカキ窒素排泄物寄与率 (y) の関係は直線回帰で求めることができる（図 2-1-4 左、 $y = -0.15x + 1.17$ ）。この回帰式を使って x 方向のバラつき（ノ

リ測定誤差 $\pm 0.10\%$) から y 方向のバラつき (カキ窒素排泄物寄与率推定値誤差) を求めることができる。この回帰式は、条件を仮定した場合の結果であって、ノリとカキの一般的な関係を表すものではないことに注意されたい。

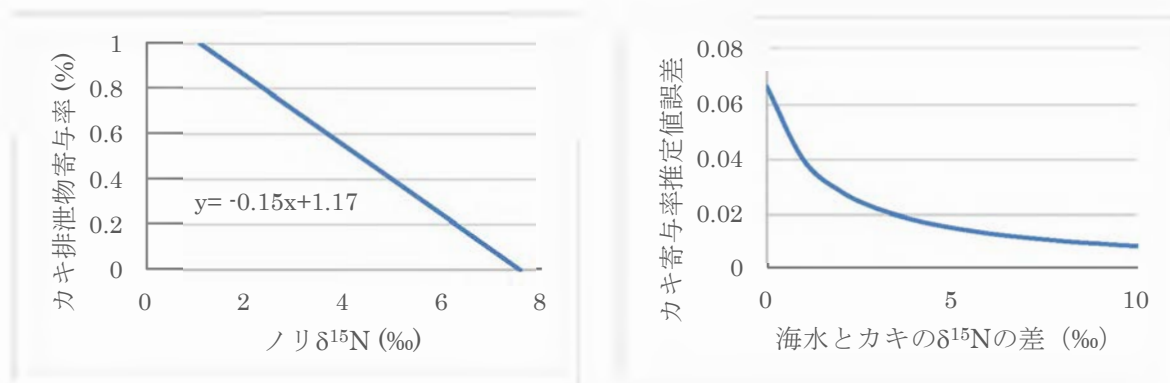


図 2-1-4. (左)ノリ $\delta^{15}\text{N}$ とカキ窒素排泄物のノリ生長への寄与率の関係および、(右)海水 DIN とカキ軟体部の $\delta^{15}\text{N}$ の差とカキ窒素排泄物のノリ成長への寄与率推定値誤差の関係

回帰式の傾きと y 切片の値は海水 DIN とカキ軟体部の $\delta^{15}\text{N}$ 値で変化するが、これらの値に関係なく、海水 DIN とカキ軟体部 $\delta^{15}\text{N}$ の差とカキ排泄物寄与率推定値誤差 (回帰式の x 軸方向の 0.10 の変化に相当する y 軸方向の変化) の間に一定の関係があることが求められた (図 2-1-4 右)。この図を見るとわかるように、エンドメンバーである海水 DIN とカキ窒素排泄物の $\delta^{15}\text{N}$ の値の差が大きいほど、ノリ生長への寄与率の推定精度が高くなることは、直感的にも理解しやすいだろう。海水 DIN とカキ窒素排泄物の差が 5‰の場合で、寄与率推定値の誤差が 1.5%、差が 2‰では誤差が 2.9%である。

本課題でのカキ窒素排泄物のノリ成長への寄与率は、海水 DIN の $\delta^{15}\text{N}$ の測定が困難であることから、上記の方法ではなく、実験区と対照区との比較から求める方法を採用した。 $\delta^{15}\text{N}$ の測定は、カキ軟体部、実験区と対照区のノリの 3 項目であり、それぞれが $\pm 0.10\%$ の測定誤差を持つことから、それぞれの測定値に $\pm 0.10\%$ した値の組み合わせで最大値と最小値を計算し、その差の 1/2 を誤差として計算した。

実際のカキ窒素排泄物寄与率推定値の誤差は、ここに示したいずれの装置の測定誤差よりも、実験区と対照区の設定や標本の測定部位による影響や養殖魚場内のバリエーションなどの方が大きいと思われるので、本手法で得られた推定値を詳細に論じるのではなく、大まかな傾向をつかむ程度に利用すべきである。

(2) 佐賀県におけるカキとノリとの複合養殖及び干出施肥試験

二枚貝区のマガキ軟体部とノリの $\delta^{15}\text{N}$ は、それぞれ 9.2‰と 9.3‰であった。対照区のノリの $\delta^{15}\text{N}$ は 10.3‰であった。これらの値から式 1 を用いてマガキ排泄 DIN のノリ生長への寄与率は $18.5 \pm 4.1\%$ と求められた。

干出施肥区のノリの $\delta^{15}\text{N}$ は、10.1‰、施肥剤に用いたワンダーL 原液の $\delta^{15}\text{N}$ は、3.3‰であった。ワンダーL の含有窒素が硝酸態であることを仮定した場合、式 2 からワンダーL 由来 N のノリ生長への寄与率は $1.5 \pm 1.9\%$ と求められ、アンモニア態であると仮定すると、式 3 から寄与率は $2.1 \pm 1.9\%$ と求められた。ワンダーL 原液の無機態窒素組成は、硝酸態が

31.6%、亜硝酸態が 0.3%、アンモニア態が 68.2%であった。硝酸態窒素とアンモニア態窒素がどのような比率でノリに取り込まれたかは不明であるため成分比に比例して取り込まれたとして計算すると（ $\text{NO}_2\text{-N}$ は微量のため無視）、ワンダーL のノリ生長への寄与率は 1.9%と求められた。

推定値に対して誤差が大きかったことから、今回の結果からは、施肥剤のノリによる利用は少なかつたろうという程度の結論にとどめたい。利用が少なかった理由としてノリの生長状態が悪かったことが考えられる。実験開始時（1月14日）と終了時（1月20日）のノリの C/N 比（図 2-1-5）を見ると、干出施肥区で終了時の C/N 比が大きく増加しており、窒素含量がカキ区と比較して大きく減少していたと考えられた。また、成長率もカキ区のほうが干出施肥区よりも大きかった（令和 2 年度報告書）ことから、何らかの理由で施肥の効果が薄かった可能性が考えられる。

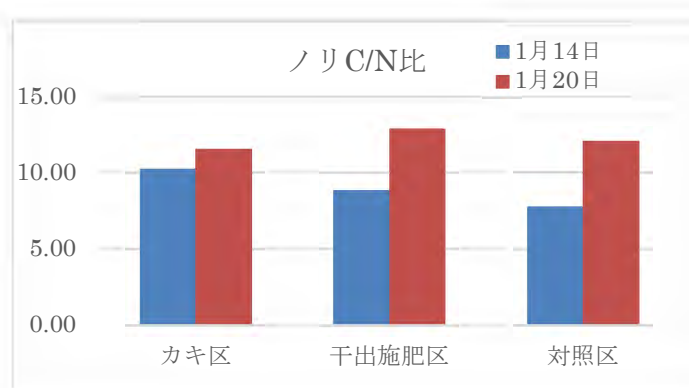


図 2-1-5. 試験開始時と終了時のノリの C/N 比

（3）熊本県におけるマガキとノリの海面イカダ複合養殖試験

八代市鏡町地先で行ったイカダ飼育実験について、マガキ軟体部の $\delta^{15}\text{N}$ は 5.3‰、実験区のノリ $\delta^{15}\text{N}$ は、正常（8.4‰）、軽度色落ち（3.5‰）、重度色落ち（4.1‰）であった。また、実験区から湾奥方向に 3km ほど離れた対照区のノリの $\delta^{15}\text{N}$ は、8.0‰であった。これらの値から、式 1 で求めたマガキ排泄物のノリの生長への寄与率は、正常（ $-5.4 \pm 3.1\%$ ）、軽度色落ち（ $67.3 \pm 3.1\%$ ）、重度色落ち（ $58.9 \pm 3.1\%$ ）と求められた。

実験区と対照区は南南西-北北東方向に 3km 離れており、本実験中は南北方向の海流が卓越しており潮流の速さは最大 1.1 ノット程度であったので（令和 2 年度報告書）、実験区と対照区は同じ水塊に位置すると考えられるが、1.5 時間以上も離れていた計算になり、寄与率の推定値の信頼性は低い可能性がある。

このことから、絶対値の詳細を議論することはせず、色落ち状態間の比較を行った。カキ窒素排泄物の正常ノリの成長への寄与率は $-5.4 \pm 3.1\%$ であり、ほとんど利用されていなかったと考えられる。正常ノリの黒み度は試験期間中に 47.1 から 45.1 に減少しており、冷凍傷みで状態が悪くなく、試験期間中に葉長はほとんど生長しなかったとのことなので、寄与率の推定と矛盾しないと考えられる。

一方で、軽度色落ちおよび重度色落ちノリの黒み度は、それぞれ 42.3 から 45.5、27.7 から 42.8 に増加しており（令和 2 年度報告書）、窒素の吸収があったと考えられることから、

軽度色落ち ($67.3 \pm 3.1\%$)、重度色落ち ($58.9 \pm 3.1\%$) ノリの生長にカキ排泄物の寄与があったと考えられる。

【4 年間のまとめ】

本事業を通して、ノリと二枚貝の複合養殖における二枚貝からノリへの窒素供給および新しい施肥手法の効果を評価するための窒素安定同位比を指標としたツールの開発と現地試験の結果の解析を行ってきた。

当初は、海水中の 3 態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ とアサリ及びカキが排泄するアンモニア態窒素の $\delta^{15}\text{N}$ の差からノリがそれぞれの窒素を利用した比率を求めることを目的に課題を開始したが、海水の DIN を改良アンモニア拡散法 (Holmes et al 1998) で回収して $\delta^{15}\text{N}$ を測定することは非常に時間と手間がかかる上に失敗が多いこと、ノリが海水中の 3 態窒素を取り込むときの比率が推定できないことから、ノリと二枚貝との複合養殖区と対照区のノリの $\delta^{15}\text{N}$ の差を用いる手法を採用した。

本手法で福岡県柳川市地先の矢部川河口付近のノリ養殖漁場でのノリとアサリの複合養殖試験、熊本県八代市鏡町地先のカキ養殖施設内でのマガキとノリの複合養殖試験、佐賀県藤津郡太良町地先のノリ養殖漁場でのマガキとノリの複合養殖および干出施肥試験において窒素供給の評価を行ってきたが、対照区の設定が難しいこと、貝類の寄与率がマイナスと計算されるなど正しい結果が得られなかった時に試験条件設定に誤りがあったのか複合養殖の施肥効果がなかったのかの解釈が難しいこと、寄与率の推定値は近距離の調査点間の相対的な検討程度にしか使えないことなどが今後の課題として考えられた。また、安定同位体比を用いた手法全般に言えることだが、エンドポイント (ノリが取り込んだ海水由来の N と二枚貝由来の N) の $\delta^{15}\text{N}$ に差がない場合は使用できないこと、差が小さいほど推定精度が下がることなども留意点としてあげられる。

熊本県で行ったカキ筏内でのノリの設置場所と潮流との関係の試験や、佐賀県で行った塩ビ管内でのカキとノリの複合養殖試験では明瞭な結果が得られたことから、小さいスケールでの相対的傾向の評価には本手法が有効だと思われた。一方で、福岡県のノリ養殖漁場での試験のように底質中のアサリとノリ網が 2~3m 鉛直方向に離れているケースでは、寄与率の推定値が一定せず、おそらく先行事業で報告があるように (増養殖研究所 2012)、アサリによる施肥効果が限定的であった可能性がある。

本手法の結果の解釈で注意が必要なのは、貝類の寄与率が高いことが必ずしも貝類の施肥効果が十分であることを意味しないことである。寄与率は環境水 DIN と二枚貝窒素排泄物の相対的な比較であり、ノリへ栄養が十分に供給されているかどうかは、ノリの生長や黒み度や窒素含量から判断する必要がある。各県での複合養殖試験の結果には、二枚貝の効果が見られたものの色落ち進行が軽減された、窒素含量減少が軽減されたといった限定的な効果が多く見られた。

ノリ色落ちの一因は低栄養環境で増殖する大型珪藻類との栄養塩獲得競争にノリが負けることであるから、貝との複合養殖においても、貝の窒素排泄物がノリよりも珪藻類に先に利用されてしまう可能性があり、本事業で実施したノリと *Chaetoceros neogracile* の同一フラスコ内での培養試験でも窒素重量ベースでの増殖速度は後者のほうが早いことを確認している (平成 29 年度報告書)。二枚貝からノリへの効果的な窒素供給には、二枚貝の飼

育規模を大きくすることに加え、二枚貝とノリが至近距離にあることが必要である。

アサリやタイラギなど多くの二枚貝資源が有明海に限らず各地で減少傾向にあることが問題となっており、養殖カキの大量斃死が問題になっている海域もある。その要因の一つがノリの色落ちと同じく海水の貧栄養化による栄養不足であり、貧栄養のために基礎生産が低下したことで二枚貝類の餌が減り二枚貝資源が減少していると考えられている(山本・花里 2015)。このことから、二枚貝との複合養殖によるノリ色落ち防止効果は局所的かつ短期的な制約があると思われる。ノリ漁期後期という限られた期間の大型藻類のブルームの軽減とノリへの栄養塩供給に二枚貝が効果的としても、より長いスパンで見た場合に二枚貝類の餌となる微細藻類が不足している状況を見ると、二枚貝資源の維持自体が困難な状況にあると考えられる。

有明海のノリによる窒素除去量(=ノリ生産量)は、552 t/6 ヶ月(10月~3月)と試算されている(渡辺ら 2004)。先行事業の実験結果(増養殖研究, 2012)から得られた数値を用いて計算すると、殻長 3 cm のアサリに 6 ヶ月で 552 t の窒素を排泄させるには、1,707,687 t のアサリが必要と試算される。有明海干潟面積は、236.1 km² であるので、単純計算で有明海の干潟全体で平均 7.23 kg/m² のアサリの排泄窒素を 100% 供給できればノリに必要な窒素が賄える計算になる。令和元年の有明 4 県のアサリ漁獲量の合計は 503t(農林水産統計)であったことを考えると、ノリ色落ちの抜本的な解決のためには、二枚貝類の資源復活と海域レベルでの物質循環の理解や貧栄養化対策が必要であろう。

【参考文献】

- Amano, H. and H. Noda (1987) Effects of nitrogenous fertilizers on the recovery of discolored fronds of *Porphyra yezoensis*. *Botanica Marina* 30: 467-473.
- Gosling, E. (2004) *Bivalve Molluscs, Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, U.K., pp.443.
- Holmes, R.M., J.W. McClelland, D.M. Sigman, B. Fry and B.J. Peterson (1998) Measuring ¹⁵N-NH₄⁺ in marine, estuarine and fresh waters: An adaptation of the ammonia diffusion method for samples with low ammonium concentrations. *Marine Chemistry* 60: 235-243.
- Lea, P.J. and J.F. Morot-Gaudry (Eds.) (2001) *Plant Nitrogen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp. 407.
- 渡辺康憲・川村嘉応・半田亮司 (2004) ノリ養殖と栄養塩ダイナミクス.沿岸海洋研究. 42: 47-54.
- 山本民次 (1992) スサビノリ *Porphyra yezoensis* 葉体によるアンモニア態窒素および硝酸態窒素の定速度取り込み. *Journal of Faculty of Applied Science Hiroshima University*. 31: 155-159.
- 山本民治・花里孝幸編 (2015) 海と湖の貧栄養化問題-水清ければ魚棲まず-.地人館 Pp195
- 水産研究・教育機構 (2021) 平成 29 年度二枚貝の養殖等を併用した高品質なノリの養殖技術の開発委託事業、有明海・八代海における二枚貝増養殖を併用したノリ用章句の高品質化技術の開発、pp76
- 水産研究・教育機構 (2021) 令和 2 年度養殖業成長産業化技術開発事業 (6) 環境変化に適応したノリ養殖技術の開発報告書、pp96

増養殖研究所（2012）ノリ色落ち対策に寄与する二枚貝増養殖技術ガイドライン、pp203

【成果の公表】

なし

1) 二枚貝を用いたノリの高品質化効果の評価手法の開発

②養殖現場でのノリの生理状態評価手法の開発

実施機関・担当者名：

水産研究・教育機構水産資源研究所 長谷川夏樹、安池元重

水産研究・教育機構水産大学校 阿部真比古、村瀬 昇

協力機関：

三重県水産研究所

【背景・目的】

栄養塩環境の変化は、養殖ノリの光合成色素の成分・量の変化、葉緑体の拡大・縮小、液胞の収縮・膨潤および細胞間隙の縮小・拡大などの細胞状態の変化を生じさせ、生理状態や成長に変化が生じる。さらに、製品としてのノリの品質にも大きな影響を及ぼし、栄養塩制限による光合成色素量の低下は、色落ちとしてノリの変化となって現れ、等級そして単価の低下に直結する。漁場の栄養塩環境の把握や、色落ちリスクの見極めは、生産者の大きな関心事である。栄養塩環境のモニタリング結果や気象条件および経験にもとづく推測に加え、ノリ自体から色落ちリスクを事前に予測することができれば、養殖管理の一助となることが期待される。

本事業では、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クロロフィル蛍光の測定によって、栄養塩制限化ではノリに色落ちが生じる前にこれらに変化が生じることを見出した（国立研究開発法人水産研究・教育機構 2021）。ただし、ノリでは、渡邊（2017）がクロロフィル蛍光からストレス応答を評価する手法を報告しており、さまざまなストレスによっても蛍光の変化は生じる。そこで、栄養塩添加に伴って誘導されるクロロフィル蛍光の応答（Nutrients-induced fluorescent transient; NIFT、Holland et al. 2004、den Haan et al. 2013）を用いて、クロロフィル蛍光の変化が栄養塩制限によるものであるかを確定させる技術の適用や、栄養塩制限を高精度に検出できるクロロフィル蛍光のパラメーターの選択を進め、広く用いられるパラメーターの F_v/F_m （最大収率）ではなく NPQ（熱エネルギー放散「非光学消光」）や qP （蛍光エネルギー放散「光学消光」）を採用し、PAM測定を用いた生理状態評価手法を開発した。本年度は、これらのパラメーター測定を漁場から摘採したノリで正確に評価するために、(i)測定前に必要な暗馴致時間を最適化する試験を実施し、生理状態評価手法を確立に資した。また、このような評価手法の有効性を確認する一環として、(ii)異なる養殖品種における PAM 測定比較試験を実施した。

また、本事業では、分光光度計を用いてノリ葉状体（室内培養）の生体吸収スペクトル（334 および 298nm の吸光度の差： $ABS_{334-298}$ ）が、 L^* と組み合わせることにより色落ち予測の指標となる可能性を見出した（国立研究開発法人水産研究・教育機構 2021）。ただし、野外養殖ノリでは、 $ABS_{334-298}$ 値が室内培養ノリよりも高くなることが確認され、334nm は紫外線吸収物質の吸収極大であることから、光源の波長組成や光源に含まれる紫外線の影響が推察された。そこで、本年度は、室内培養における光源を太陽光と同様の波長組成を持つ人工太陽照明や屋外培養によって、波長組成、紫外線の有無、光量の面から $ABS_{334-298}$

値の変動を精査した。また、人工太陽照明下において、栄養塩制限試験を実施し、ABS₃₃₄₋₂₉₈ 値の有効性についても検討した。

さらに、本事業では、栄養塩環境の変化によってノリに生じる様々な変化を理解する一助として、網羅的な遺伝子発現解析（RNA-Seq）を行い、栄養塩制限あるいは栄養塩添加（供給）により大きく発現量が増減する遺伝子群を同定するとともに、植物のモデル生物であり、遺伝子機能に関する情報が充実しているシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の情報を利用して、栄養不足あるいは栄養強化により、どのような生理的なパスウェイが関わっているのか推定し、栄養塩環境の変化とノリの生理的応答の分子メカニズムについての一端の解明を進めてきた（国立研究開発法人水産研究・教育機構 2021）。本年度は、低栄養塩耐性が期待される品種のフタマタスサビノリについて、栄養塩制限下においてこれまで対象としてきた標準品種の U-51 と同様な応答を示すかどうかについての解析を進めた。さらに、これまでのデータを統一的精査し、栄養塩制限の指標となる遺伝子候補の絞り込みを行った。

【方法】

（１）PAM 測定

（i）暗馴致時間最適化試験

試験には、冷凍保存ナラワスサビノリ品種 U-51 の葉状体ディスク（φ8 mm）を使用した。冷凍後の培養には、2021 年 9 月上旬に釧路市桂恋地先から取水、10 μm のカートリッジフィルターでろ過した海水（塩分：32.9、硝酸+亜硝酸塩（NO₃⁻+NO₂⁻）：濃度約 5 μM、リン酸塩（PO₄⁻）濃度：約 0.6 μM）を用いた。

冷凍保存したディスクは、試験測定前に最終 NO₃ 濃度 10 μM 相当の硝酸ナトリウム溶液および 1 μM 相当のリン酸水素ナトリウム溶液を添加（以後、硝酸塩添加、リン酸塩添加）した培養水を満たした 2 器の 2L 枝付き球形フラスコ（40 枚 / フラスコ）で換水を行いながら 3 日間の予備培養を行った（図 2-1-6）。試験測定を実施した本培養は、硝酸塩とリン酸塩添加を行った海水を満たした「対照区」のフラスコ 1 器とリン酸塩のみ添加した「N 制限区」のフラスコ 1 器に各 40 枚のディスクを収容して実施した。対照区では硝酸塩とリン酸塩を、制限区ではリン酸塩のみを毎日追加添加した。一連の培養は、水温 18℃、光周期 10L：14D、明期の PFD 100 μmol m⁻² s⁻¹ に調整したインキュベーターにおいて通気条件で行った。

クロロフィル蛍光の測定は、光合成クロロフィル蛍光測定器（AquaPen-PAP-P 100；Photon Systems Instruments）を用いて、明期終了の約 2 時間前から開始し、明期終了後の暗期の約 7 時間目まで断続的に実施した。

測定に際しては、フラスコから少量の培養水を測定ごとに採取し、それを満たしたキューベットにディスクを投入し速やかに PAM 測定；機器によって明条件（励起光 150 μmol m⁻² s⁻¹）と暗条件下での測定を自動的に実施する NPQ1 プロトコル、を実施した。

PAM 測定後のディスクは、ハンディ型分光色彩・色差計（NR-12；日本電色工業（株））を用いて湿潤状態のディスクの L*a*b*表色系の測定、写真撮影による各ディスクの最大直径を推定に供した。

(ii) 品種比較

試験には、18°Cの調温し硝酸塩とリン酸塩を添加したろ海水を用いて自然光下で培養した U-51 および貧栄養耐性があるとされる品種「フタマタスサビノリ（以後、フタマタ）」の葉状体ディスク（φ5 mm）を使用した。フタマタのディスクにはφ1 mm の生検トレパンで標識を行った。冷凍保存後のディスクを(i)と同様に予備培養した後に、両品種のディスク 12 枚ずつ計 24 枚を収容した 6 器の 1L 枝付き球形フラスコを用いて本培養を行った(図 2-1-7)。この際、3 器は硝酸塩とリン酸塩添加を行った海水を満たした「対照区」、残りの 3 器はリン酸塩のみ添加した「N 制限区」とした。対照区では硝酸塩とリン酸塩を、制限区ではリン酸塩のみを毎日追加添加した。栄養塩濃度や培養条件は(i)と同様とした。

クロロフィル蛍光の測定は、本培養開始時 (Day 0-0)、3 時間後 (Day 0-3)、6 時間後 (Day 0-6)、本培養 1~3 日後の暗期に(i)と同様に実施し、測定後のディスクは L*a*b*表色系および直径の測定後に RNA 安定化試薬 (RNAlater ; Thermo Fisher Scientific) で固定・冷凍し、RNA-Seq 解析用サンプルとした。各試験の予備培養および本培養では断続的に栄養塩分析サンプル水の採取を行い、冷凍保存後に比色測定法を用いた自動分析機 (AACSII ; BRAN+LUEBEE) により $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ 濃度および PO_4^- 濃度を測定した。

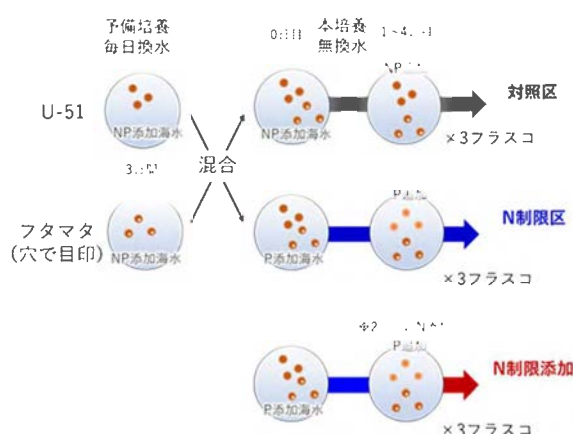


図 2-1-6. U-51 およびフタマタスサビノリを用いた品種比較試験の概要

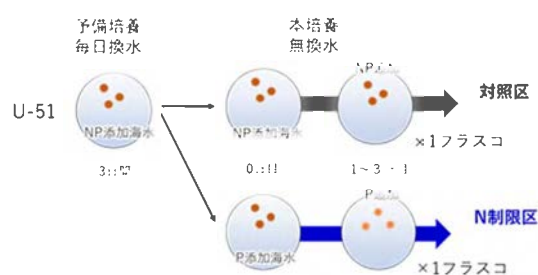


図 2-1-7. U-51 を用いた暗馴化時間最適化試験の概要

(2) 遺伝子発現解析

品種比較で得られたサンプルのうち、解析には本培養 2 日目の両試験区のサンプルを用いた。葉状体ディスクより TRIzol Reagent (Invitrogen) および Direct-zol RNA Kit MiniPrep Plus (ZYMO RESEARCH) を用いて全 RNA を抽出した。1 μg の全 RNA から、Illumina Stranded mRNA Prep、Ligation (Illumina)を用いて、RNA-Seq 用のライブラリーを作製した。なお、各ディスクのサンプルのライブラリーを識別するために、サンプル毎に個別のバーコード配列を付加した。作製したライブラリーについては、TapeStation (Agilent Technologie) および Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) により品質評価および定量を行った。次世代シーケンサー NextSeq 500 (Illumina) により、RNA-Seq ライブラリーの配列情報を解読し、発現遺伝子の配列データを取得した。次世代シーケンス解析ソフトウェア CLC genomics workbench (QIAGEN) を用いて、取得した発現遺伝子の配列データをスサビノリ参照ゲノム配列にマッピングし、各遺伝子の発現量 (TPM: Transcripts Per Million) を算出

した。なお、2 倍以上発現量が変化し、かつ False positive rate が 0.05 未満 (FDR p-value < 0.05) の遺伝子を発現変動遺伝子と判断した。シロイヌナズナの遺伝子機能情報を利用するために、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990) を行い (閾値を E-value : 1.0e-4 とした)、遺伝子 ID の対応表を作成した。その情報をもとにして、パスウェイ解析ソフトウェア iDEP (Ge et al. 2018) を用いて、RNA-Seq 解析のデータから活性化されているパスウェイを推定した。

(3) 生体吸収スペクトル測定

本試験に用いたノリ葉状体は、三波長型昼白色蛍光灯下において殻胞子から生長させた後、葉状体ディスクをくり抜き、光源を人工太陽照明または太陽光に変更し、以下の実験を行った。

(i) 実験 1 : 人工太陽照明下での紫外線の有無による $ABS_{334-298}$ 値の変動

U-51 株の葉状体ディスクを用い、温度 18°C、光量 $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ と $650\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期 10L : 14D の条件下で 1/2SWM-III 改変培地を用いて通気培養した。光源に含まれる紫外線を 3mm のアクリル板を用いて 350nm 以下の紫外線をカットし紫外線なし区、紫外線を透過する 3mm のガラス板を設置した紫外線あり区を設定した。培養期間は 15 日間とし、3 日毎に換水とヘッドオンフォトマル装置 (130-6031、HITACHI 社) を装着した分光光度計 (U-3000、HITACHI 社) による測定を実施し、 $ABS_{334-298}$ 値を求めた。

(ii) 実験 2 : 太陽光下での紫外線の有無による $ABS_{334-298}$ 値の変動

水産大学校内屋外に設置したポリカーボネート製 4.1L 円柱容器に 1/2SWM-III 改変培地 4L を満たし、U-51 株の葉状体ディスクの通気培養を行った。容器上部に 3mm アクリル板のフタを設置し紫外線をカットした紫外線なし区、紫外線を透過するラップでフタをした紫外線あり区を設定した。円柱容器は、水を満たした大型容器に浸し、水温の急激な変動が起こらないようにした。2022 年 1 月 14 日から培養液を 3~4 日毎に換水し、13 日間の培養を行い 13 日目に測定を行った。

(iii) 実験 3 : 栄養塩制限下における L^* と $ABS_{334-298}$ 値の変動の品種比較

U-51 株および色落ち耐性があるとされるフタマタスサビノリ (フタマタ) の葉状体ディスクを用い、温度 18°C、光量 $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期 10L : 14D の条件下でそれぞれ通気培養した。光源には人工太陽照明を用いており紫外線が葉状体に照射される状態にした。栄養塩制限区の培養液には滅菌海水を、栄養塩強化の培養液には 1/2SWM-III 改変培地を使用した。培養期間は 6 日間とし、毎日換水と測定を行った。測定には、分光光度計と分光測色計 (CM-2600d、KONICA MINOLTA 社) を使用し、 $ABS_{334-298}$ 値と L^* を求めた。

(iv) 実験 4 : 色調回復過程における L^* と $ABS_{334-298}$ 値の変動の品種比較

U-51 株およびフタマタの葉状体ディスクを滅菌海水で 7 日間培養し、 L^* が 65 以上の色落ち葉状体を培養しそれらを 1/2SWM-III 改変培地に移し、温度 18°C、光量 $60\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (人工太陽照明)、光周期 10L : 14D、の条件下で通気培養した。実験期間は 5 日間とし、毎日換水と $ABS_{334-298}$ 値と L^* の測定を行った。

(v) 実験 5 : 太陽光下での栄養塩制限下における L^* と $ABS_{334-298}$ 値の変動

13 日間太陽光下 (紫外線あり) で培養した U-51 株の葉状体ディスクを用いた。実験 2 と同様に、水産大学校内屋外において、ポリカーボネート製 4.1L 円柱容器を使用し、栄養

塩制限区の培養液には滅菌海水を、栄養塩強化の培養液には 1/2SWM-III 改変培地を使用した。培養期間は 4 日間とし、換水は 2 日毎に行った。測定は毎日行い、 $ABS_{334-298}$ 値と L^* を求めた。

(vi) 実験 6：太陽光下での色調回復過程における L^* と $ABS_{334-298}$ 値の変動

太陽光下（紫外線あり）において、滅菌海水で 5 日間培養し、 L^* 値が 70 を超えた U-51 株の葉状体ディスクを用いた。実験 5 と同様に、水産大学校内屋外において、ポリカーボネート製 4.1L 円柱容器を使用し、栄養塩強化の培養液として 1/2SWM-III 改変培地を使用した。培養期間は 7 日間とし、換水は 2～3 日毎に行った。測定は毎日行い、 $ABS_{334-298}$ 値と L^* を求めた。

【結果および考察】

(1) PAM 測定

(i) 暗馴致時間最適化試験

いずれの培養日（1～3 日）および試験区（対照区と N 制限区）の測定においても、明期と暗期の PAM 測定によるクロロフィル蛍光のパラメーターに明瞭な差が確認され、明期終了後に徐々にパラメーターが変化し、その後数値が安定する傾向が確認された（図 2-1-8）。このうち、 F_v / F_m と NPQ は明期終了後の 1 時間後には安定化したのに対して、 qP はやや遅れて 2 時間後以降に安定化したと判断された。また、これらの傾向は異なる窒素制限状態にある培養日および対照区でも類似していた。これらの結果から、PAM 測定による漁場から摘採したノリ葉状体の栄養塩制限の診断は、2 時間の暗馴致後に実施することが最適であると判断された。

本結果およびこれまでの事業における検討結果にもとづく養殖現場におけるノリの窒素制限の有無を診断する生理状態評価手法の一例を以下のように提案する（図 2-1-9）。

1. 葉状体の採集

漁場で 1 L の保存ボトル 3 本（初期区：I、対照区：C、添加区 N）に採水を行い、ノリ葉状体（各 5 枚程度）を採集・収容する。大型の葉状体の場合は、ボトル海水の栄養塩濃度の変化が懸念されるため、海水中の葉状体の比率が高くなりすぎないように留意する（場合によってはボトルの分散やボトル容量変更を行う）。

2. 葉状体の保管

水温変化もクロロフィル蛍光に影響を及ぼすため、保存ボトルをクーラーボックス等で漁場水温に維持するとともに暗馴化の一環として遮光する。場合によっては、予備の海水ボトルなども同封し、温度を維持する。

3. 葉状体の暗馴致

持ち帰ったボトルを漁場水温に調温してある恒温庫（インキュベーター等）に移し、2 時間の暗馴致を行う。漁場採集後に暗条件で保持した場合には、その時間も暗馴致に含める。

4. 初期区の PAM 測定

2 時間の暗馴致後に測定用の恒温庫にボトル I の海水を満たした測定皿を設置し、葉状体を 1 枚入れ PAM を固定し NPQ1 プロトコルでの測定を行う。葉状体を入れ替え 5

枚の測定を行う。

5. 硝酸塩の添加

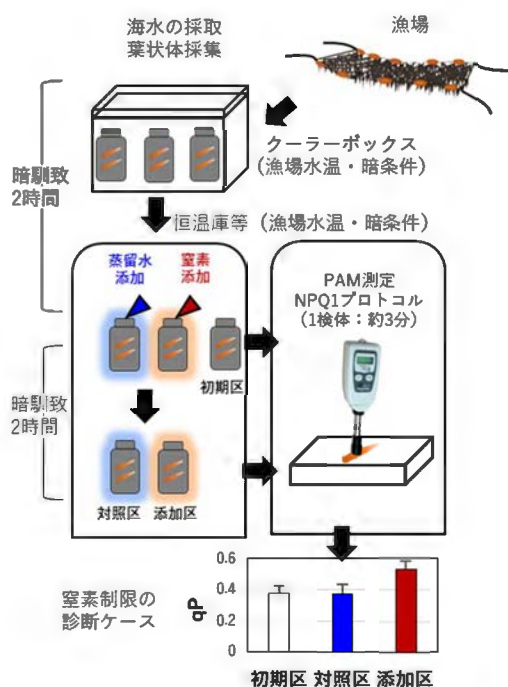
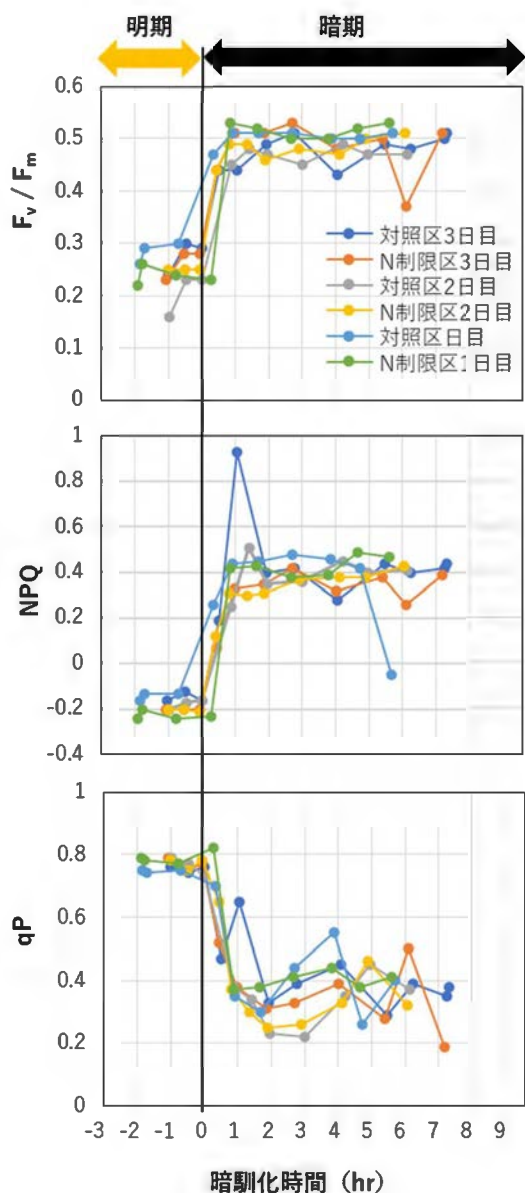
ボトル N に最終濃度 10 μ M 相当の硝酸塩溶液、ボトル C に同量の蒸留水を添加・攪拌を行い、再び恒温庫で 2 時間馴致する。

6. 対照区と添加区の PAM 測定

恒温庫にボトル C と N の海水を満たし測定皿を設置し、葉状体を 1 枚入れ PAM 測定を行う。葉状体を入れ替えそれぞれ 5 枚の測定を行う。

7. PAM 測定による窒素制限の診断

初期区、対照区および添加区の葉状体のクロロフィル蛍光パラメーター（NPQ および qP）の平均値を算出し比較を行う。添加区のいずれかのパラメーターが他区と明瞭に異なる場合は、ノリは窒素制限にあり、色落ちなどの色調の低下が進む可能性があるとして評価される。明瞭な差や変化が確認されなかった場合には、強い窒素制限を受けていないと評価される。対照区のパラメーターにも変化した場合には、馴致などが影響し正確な評価ができていないと判断する。



↑ 図 2-1-9. 養殖現場におけるノリの窒素制限の有無を診断する生理状態評価手法の一例

← 図 2-1-8. 暗馴致時間最適化試験における光合成活性パラメーターの推移

(ii) 品種比較

培養開始時に 5 mm であったディスク直径は、本培養開始時にはフタマタでは 7.6 ± 0.5 mm (平均 $\pm$ 標準偏差)、U-51 では 7.2 ± 0.5 mm であり、本培養終了の 4 日目には対照区のフタマタで 13.6 ± 0.4 、U-51 で 13.1 ± 3.8 、N 制限区のフタマタで 14.2 ± 2.5 mm、U-51 で 10.6 ± 1.1 mm となり、N 制限区の U-51 は成長が劣っていた。

本培養中の PO_4 濃度は $0.19 \sim 1.07 \mu\text{M}$ で推移したが、 $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ 濃度は N 制限区では 0 日目は $13.4 \mu\text{M}$ 、1 日目以降は $0.1 \mu\text{M}$ 程度で推移し強い窒素制限下にあったのに対して、対照区では 1 日目以降も追加の硝酸塩の添加前でも $3 \mu\text{M}$ 以上残存していた。

L^* は本培養開始時にフタマタで 44.4 ± 1.0 、U-51 で 43.2 ± 1.9 であったが、4 日目には N 制限区では平均値が両品種とも 65 にまで上昇したのに対して、対照区では 47.9 ± 1.9 、U-51 では 42.5 ± 1.9 となり、N 制限区のディスクでは色落ちが生じた (図 2-1-10)。PAM 測定によるクロロフィル蛍光パラメーターの NPQ や qP は本培養開始の 2 日目以降に対照区に比べ N 制限区で低い傾向にあった。ただし、対照区のフタマタの NPQ は、3~4 日目は低位で推移し、その水準は N 制限区よりも低かった。フタマタは U-51 に比べ低栄養塩耐性が高いことが期待されているが、本品種比較試験では L^* やクロロフィル蛍光のパラメーターの推移に明瞭な品種差は確認されなかった。ただし、窒素制限にともなう NPQ や qP の変化は両種で生じており、PAM 測定による窒素制限の診断は品種横断的に使用できるものと判断した。

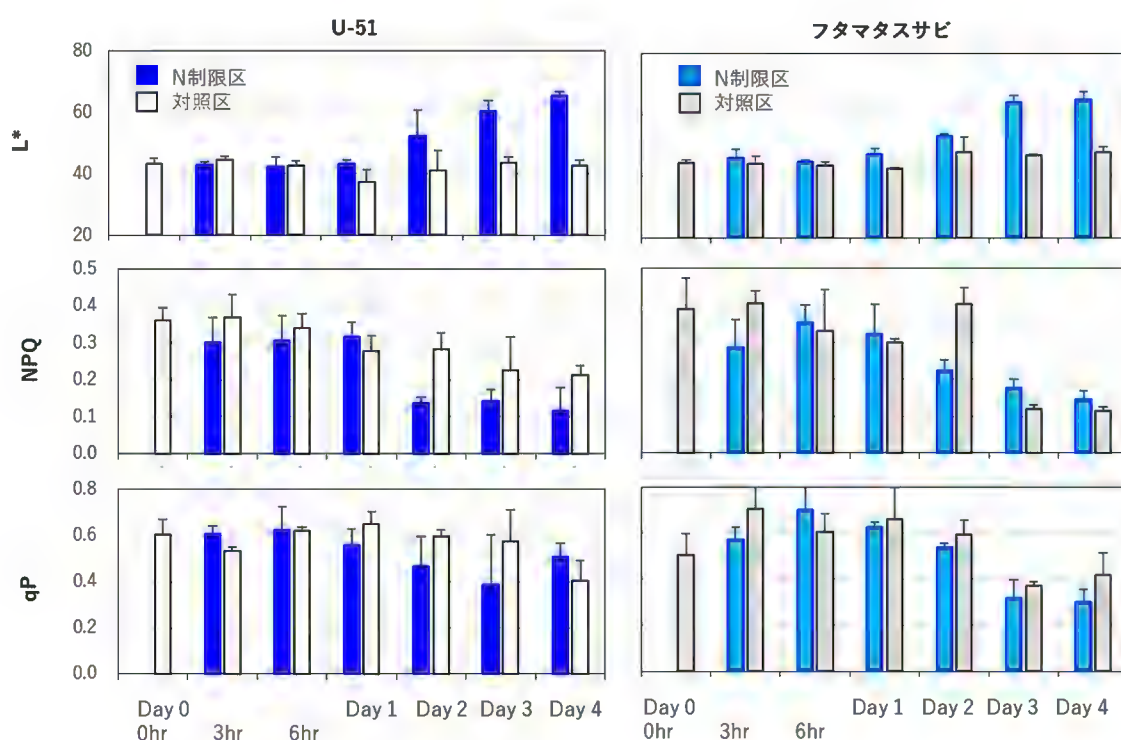


図 2-1-10. 窒素制限下での品種比較試験におけるノリ葉状体の L^* 値と光合成活性パラメーターの推移. カラムとバーは平均値+標準偏差を示す

さらに、本培養 2 日目の N 制限区のフラスコに最終濃度 $10 \mu\text{M}$ 相当の硝酸塩を添加し (N 制限添加区)、その後のパラメーターの推移を無添加の N 制限区と比較したところナラワ

では添加 2 時間後以降、U-51 では 5 時間後以降に qP が N 制限区にくらべ顕著に高く推移した（図 2-1-11）。また、NPQ に明瞭な差は確認されなかった。これらの結果からも窒素添加への応答を利用した窒素制限の診断は品種横断的に使用できるものと判断した。

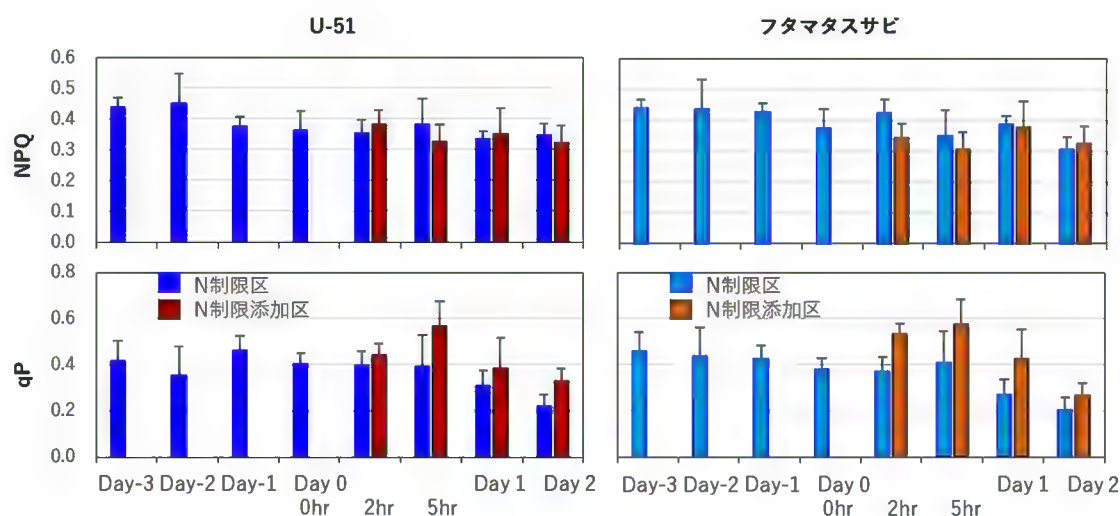


図 2-1-11. 窒素添加を伴う品種比較試験におけるノリ葉状体の L*値と光合成活性パラメーターの推移. カラムとバーは平均値+標準偏差を示す

(2) 遺伝子解析

品種比較試験で得られたサンプルの RNA-Seq 解析の結果、窒素制限により U-51 および Futamata において、それぞれ 653 個と 920 個の遺伝子の発現量に変化が見られた。それら発現変動した遺伝子のクラスター解析（発現パターンの分類）を行ったところ、栄養制限と関係のある遺伝子群が含まれるクラスター（クラスターC）が見つかり（図 2-1-12）、このクラスターCに着目すると両品種の発現パターンは類似しており、窒素制限に対する生理的な応答が共通していることが示唆された。

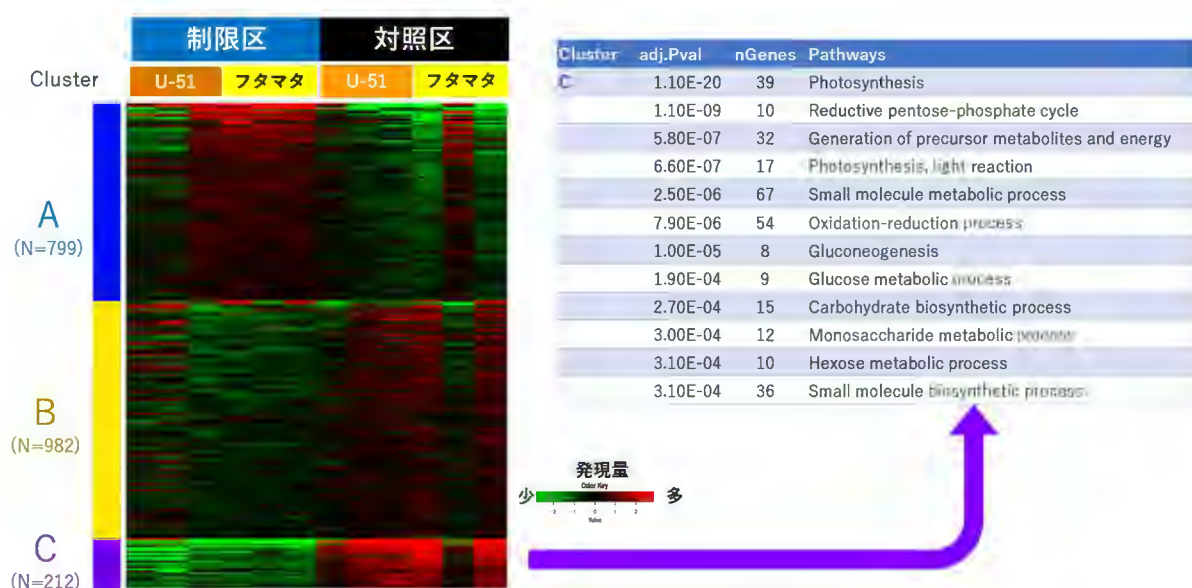
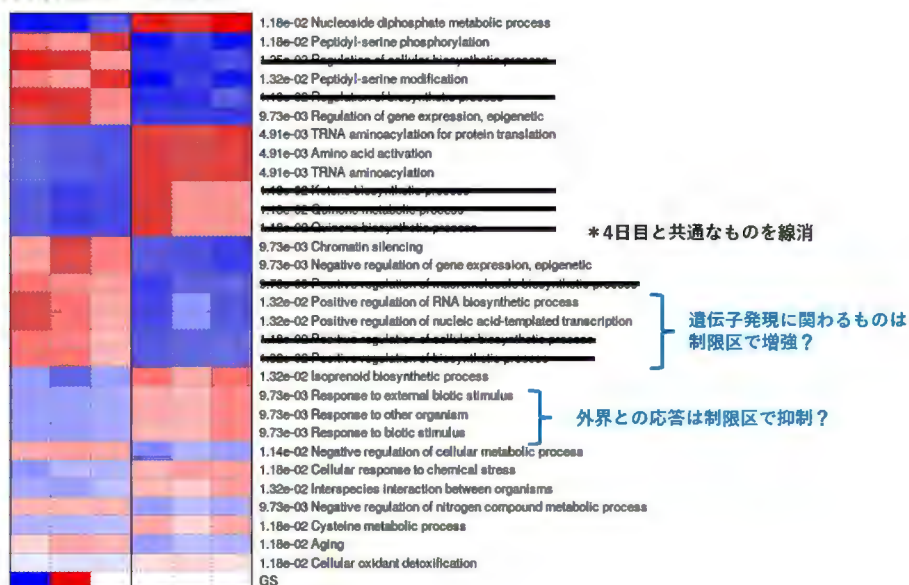


図 2-1-12. クラスター解析（発現パターンによるグループ分け）による窒素制限により変動する遺伝子群の探索結果

クラスターC のパスウェイ解析の結果、窒素制限区において光合成関連 (Photosynthesis、light reaction、Reductive pentose-phosphate cycle)、糖代謝 (Gluconeogenesis、Glucose metabolic process、Carbohydrate biosynthetic process、Monosaccharide metabolic process、Hexose metabolic process) やその他の代謝 (Generation of precursor metabolites and energy、Small molecule biosynthetic process) に関わるパスウェイが抑制されていることが推定され、昨年度までの結果と同様な傾向を示した (図 2-1-13)。したがって、U-51 とフタマタ共に、貧栄養の状況下では光合成が抑制され、細胞内のタンパク質合成やエネルギー代謝も低下することが分子レベルで再確認することができた。

2日目制限区 対照区



4日目制限区 対照区

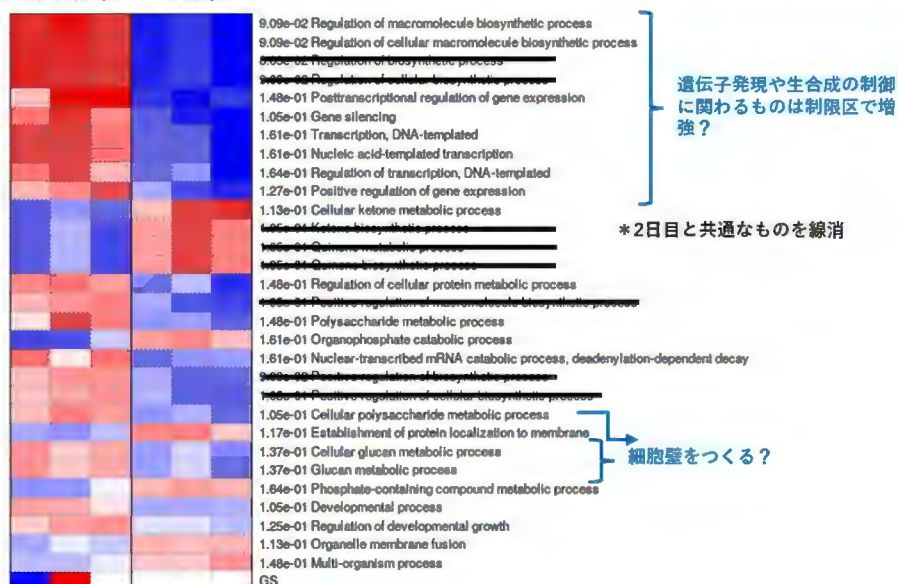


図 2-1-13. パスウェイ解析によって明らかとなった窒素制限で増強・抑制されるパスウェイ
 制限区 2 日目は遺伝子発現にポジティブに働くパスウェイが増強される一方で外界の刺激に対する応答系が抑制され、4 日目は遺伝子発現や生合成の“制御”に関わるものと細胞壁の合成に関わるものが制限区で増強される可能性を読み取ることができる

今年度の結果とこれまでのデータを精査した結果、栄養制限により発現量が顕著に増加し、逆に栄養塩添加で発現量が減少する 5 つの栄養塩制限の指標となる遺伝子候補を同定した（表 2-1-1）。本遺伝子候補を用いて、RNA-Seq のような網羅的な解析をしなくとも、qPCR など簡便な方法で評価することが可能になることが期待できる。なお、qPCR 用のプライマーは設計済みである。

表 2-1-1. 窒素制限の指標となる遺伝子候補.

数字は対照区に対して発現量が何倍 (fold change) 異なるのかを表す

遺伝子番号	R3(本年度)		R2・R3年度		予測される遺伝子産物
	U51	フタマタ	栄養制限	栄養強化	
1 g14642	21.2	6.5	18.1	-22.6	Purine permease
2 g1892	19.4	21.1	83.6	-5.8	High light inducible protein
3 g1891	10.3	7.3	37.9	-7.2	Methyltransferase
4 g1580	11.0	8.0	35.9	-20.5	High light inducible protein
5 g3855	13.5	7.0	33.5	-20.4	High light inducible protein

(3) 生体吸収スペクトル測定

培養に用いた光源による波長の違いおよびアクリル板等の有無による紫外域の波長の違いを図 2-1-14 に示す。

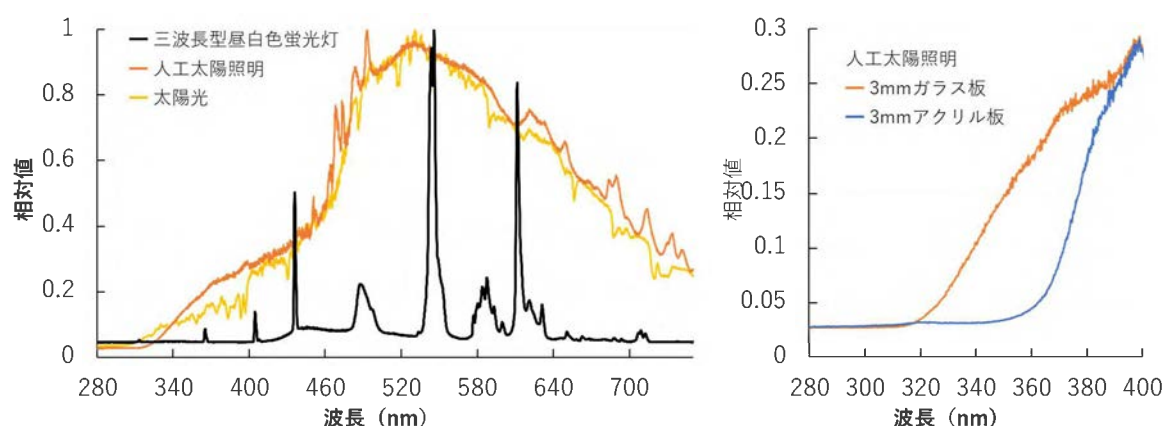


図 2-1-14. 三波長型昼白色蛍光灯、人工太陽照明および太陽光の波長の違い(左)とアクリル板およびガラス板を透過した紫外域の波長の違い(右)

実験 1 において人工太陽照明の $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量で培養した葉状体ディスクの $\text{ABS}_{334-298}$ 値は、紫外線の有無に関わらず $0.38\pm 0.02\sim 0.53\pm 0.04$ の範囲にあり、差は認められなかった（図 2-1-15）。また、 $650\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光量下では、葉片に照射される紫外域のエネルギー量も増加するが、紫外線の有無に関わらず $\text{ABS}_{334-298}$ 値は $0.38\pm 0.04\sim 0.68\pm 0.10$ の範囲にあり、差は認められなかった。さらに実験 2 の太陽光下（最大約 $2000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）における異なる紫外線照射下で培養したノリ葉状体においても、紫外線の有無に関わらず $\text{ABS}_{334-298}$ 値は $0.97\pm 0.07\sim 1.13\pm 0.10$ の範囲にあり（図 2-1-16）、差は認められなかった。図 2-1-15 では、光源、光量、紫外線の有無によるノリ葉状体の $\text{ABS}_{334-298}$ 値の変化をまとめた。

同光量では、紫外線の有無による $ABS_{334-298}$ 値の差は認められなかったが、光量が強くなると $ABS_{334-298}$ 値は高くなっており、太陽光下の $ABS_{334-298}$ 値は人工太陽照明装置の 2 倍程度高い値を示した。培養したノリ葉状体では、他の紅藻類に比べ元々保持している紫外線吸収物質が多いことが報告されており（前川 1997）、ノリの紫外線吸収物質であるマイコスポリン様アミノ酸は、抗酸化能も有しているとされている（田口・平良（宿里）2012）。一般に、光量が強くなっていくとクロロフィル蛍光も高くなり、細胞内に活性酸素も増加すると考えられる。人工太陽照明での $60 \cdot 650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光量では、光源に含まれる紫外線および光合成活性による活性酸素に対して、すでに保持しているマイコスポリン様アミノ酸で概ね対応できた一方で、太陽光の強光下では、さらにマイコスポリン様アミノ酸を合成する必要があるとあり、 $ABS_{334-298}$ 値が上昇したと考えられる。したがって、国立研究開発法人水産研究・教育機構（2021）で報告した室内培養ノリにくらべ漁場養殖ノリの $ABS_{334-298}$ 値が高い理由は、太陽光によるものと判断した。

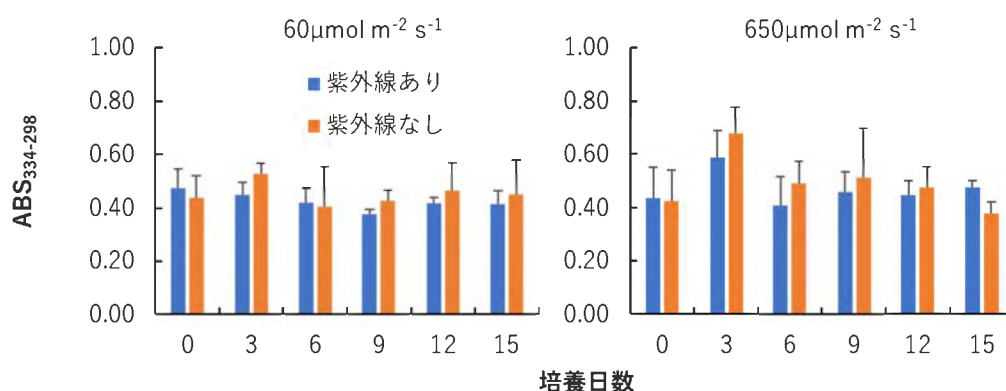


図 2-1-15. 紫外線の有無によるノリ葉状体の $ABS_{334-298}$ の変化

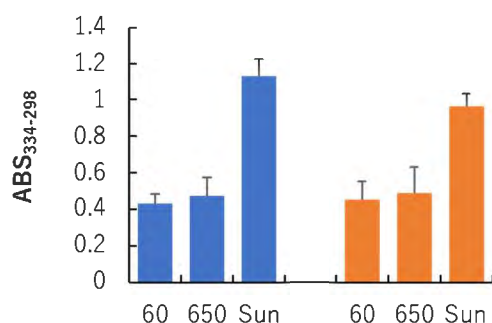


図 2-1-16. 光源・光量・紫外線の有無によるノリ葉状体の $ABS_{334-298}$ の違い

実験 3 における栄養塩制限下での U-51 およびフタマタの培養では、3 日目に U-51 の L^* が 60 近くなり、6 日目には L^* が 65 を超えたのに対して、フタマタは U-51 株同様に 3 日目に L^* が 60 近くになるものの、6 日目でも L^* は 62.5 ± 1.8 に留まった（図 2-1-17 上）。このような両品種の栄養塩制限下での色調の変化は、（国立研究開発法人水産研究・教育機構 2021）の報告と同様であった。栄養塩制限下での両種の $ABS_{334-298}$ 値と L^* の関係を比較すると、両種で L^* の上昇に伴い、 $ABS_{334-298}$ 値が低下したが、U-51 では L^* が 65 以上の場合は $ABS_{334-298}$ 値が 0.2 程度となったのに対して、フタマタでは L^* が 65 以下で停滞したが $ABS_{334-298}$ 値は 0.1 程度まで低下した。また、実験 4 における色調回復過程における変化では、開始時に L^* は 65 で $ABS_{334-298}$ は 0.16~0.18 であった U-51 は、栄養塩強化培地での培養 1 日目には、 L^* には変化がないものの $ABS_{334-298}$ 値が 0.29~0.32 に上昇、2 日目には

L*が63～65にまで低下し、 $ABS_{334-298}$ 値はさらに緩やかに上昇、培養4日目にはL*は60程度まで低下し $ABS_{334-298}$ 値も0.4付近まで上昇した(図2-1-17下)。一方、開始時にL*が75以上、 $ABS_{334-298}$ 値は0.1以下であったフタマタは、栄養塩強化培地での培養によってL*は徐々に低下し培養4日目には65付近となったが、 $ABS_{334-298}$ 値はほとんど変化しなかった。

実験5における栄養塩制限下でのU-51の培養では、実験開始時のL*値が55～60と高い数値であった。培養期間中は、栄養強化培地における葉状体ディスクのL*も54～59の範囲であり、室内培養の葉状体に比べると高い傾向にあった。栄養塩制限下では、 $ABS_{334-298}$ 値が0.75を下回るとL*が60を上回り、色落ちが起こった(図2-1-18)。太陽光下では、室内培養時とは異なり、 $ABS_{334-298}$ 値が0.75に近い、またはそれを下回ると色落ちリスクが高くなることが考えられた。

実験6での色落ちしたU-51の葉状体ディスクの色調回復過程においては、実験開始時のL*値は72～75、 $ABS_{334-298}$ 値は0.36～0.43の範囲にあった(図2-1-18)。栄養強化培地に移して2日後には、L*は75程度と変化していないものの、 $ABS_{334-298}$ 値が0.66～0.75と増加した。その後も、 $ABS_{334-298}$ 値は緩やかに上昇し、培養7日目には0.95～1.00となった。L*は培養4日目に70～73、培養7日目には68～71と低下し、徐々に色調が回復していった。太陽光下での $ABS_{334-298}$ 値とL*の関係は、室内培養と同様に色落ち過程と色調回復過程において異なる変遷を示した。

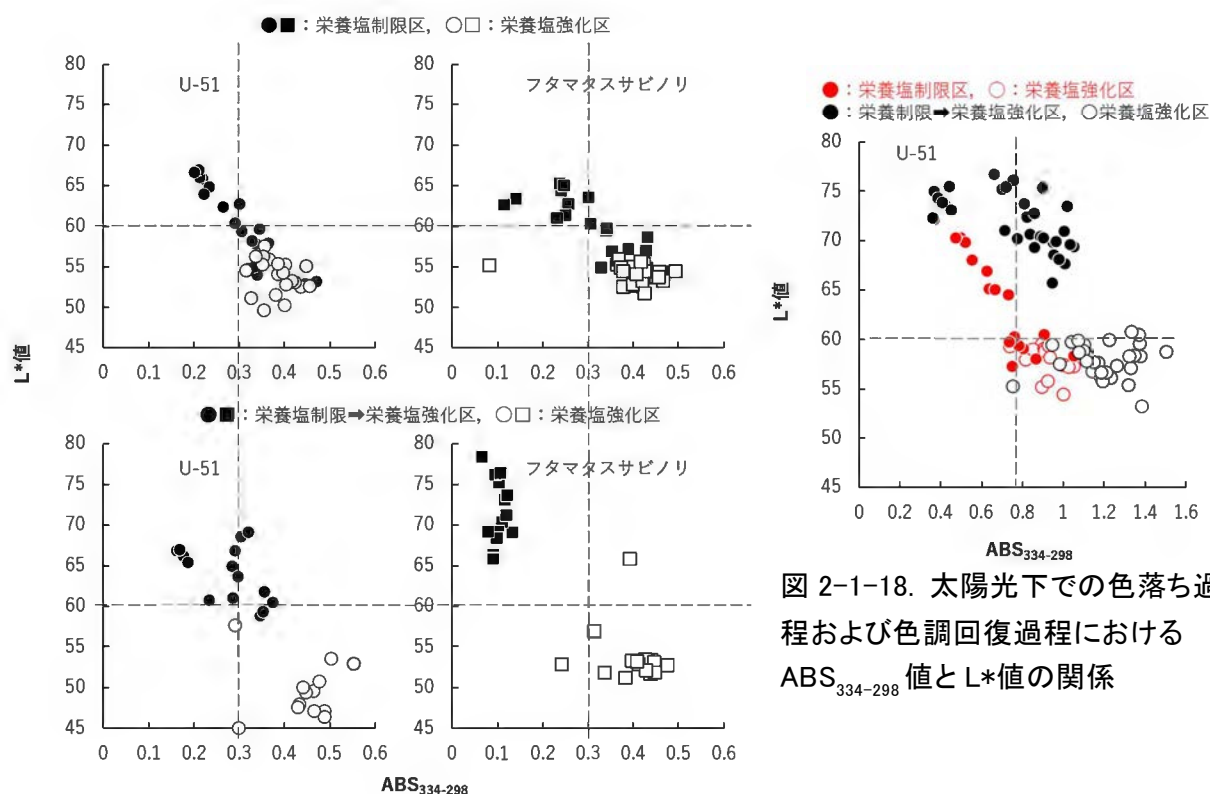


図2-1-18. 太陽光下での色落ち過程および色調回復過程における $ABS_{334-298}$ 値とL*値の関係

図2-1-17. 色落ち過程(上)および色調回復(下)過程における $ABS_{334-298}$ 値とL*値の関係

これまでの研究において、室内培養では $ABS_{334-298}$ 値が0.3に近い、または下回ると色落ちリスクが高いことを報告した(国立研究開発法人水産研究・教育機構 2021)一方で、

太陽光下では、 $ABS_{334-298}$ 値が 1 程度まで上昇するため、 $ABS_{334-298}$ 値が 0.75 に近い、またはそれを下回ると色落ちリスクが高くなることが考えられた。本研究の両品種でも同様の結果を得られたが、U-51 とフタマタでは色落ち過程や回復過程において異なる応答が確認され、品種特性の解明や評価への応用も期待されることが考えられた。

【4 力年のまとめ】

窒素をはじめとする栄養塩制限にともなうノリ葉状体の光合成色素量の低下は、色落ちとしてノリの色の変化となって現れ、製品の等級そして単価の低下に直結する。栄養塩環境のモニタリング結果や気象条件および経験にもとづく推測に加え、ノリ自体から色落ちリスクを事前に予測することができれば、養殖管理の一助となることが期待される。また、このような栄養塩環境の変化によってノリに生じる様々な変化を遺伝子発現レベルで解析することができれば、色落ち対策技術開発などノリ養殖の高度化に資することが期待される。

本事業では、ノリの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クロロフィル蛍光値の測定・算出を組み合わせた診断手法、(2) ノリ葉状体の色調測定 (L^*) と分光光度計による生体吸収スペクトルを指標とした色落ちリスクの診断手法を開発するとともに、(3) 栄養塩 (窒素) 環境の変動下におけるノリ葉状体の網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-Seq) とパスウェイ解析および窒素制限の指標となる遺伝子候補の同定を行った。

(1) 窒素添加と PAM 測定法による窒素制限診断手法

漁場での養殖や室内培養のノリ葉状体を対象とした調査・試験によって、PAM によって測定・算出されるさまざまなクロロフィル蛍光パラメーターが窒素をはじめとする栄養塩制限下では変化することが確認された。また、このような変化は、 L^* や黒み度など葉状体の色調の指標値が大きく変動する前に生じるケースも確認された。ただし、測定・算出が容易で PAM 測定において広く用いられるパラメーター： F_v/F_m (最大収率) の変化は不安定であったことから、PAM 自体の照明 (励起光) 機能によって暗期と明期の活性を測定して算出する NPQ (熱エネルギー放散「非光学消光」) や qP (蛍光エネルギー放散「光学消光」) を診断に用いることが診断性の向上に寄与すると判断した。さらに、これらのパラメーターは、窒素制限下にある場合には、硝酸態やアンモニア態窒素の栄養塩添加によってわずか数時間で変化する NIFT 現象がノリ葉状体でも確認された。クロロフィル蛍光は、栄養塩以外にも様々な環境変化やストレスによって変化しやすいため、このような窒素の添加への応答の有無を PAM 測定によって測定し窒素制限を診断する手法を生理状態評価手法として定め、提案した。

ただし、NPQ や qP の算出のための測定には 3 分程度の時間を要するため、養殖現場でのノリの生産管理に活用するには必ずしも使いやすい診断手法ではない。今後もクロロフィル蛍光測定法の進化や測定機器の普及・低価格化が進んでいくことが期待されることから、本手法の発展に向け新たなパラメーターの探索などさらなる研究開発も重要であろう。

(2) 生体吸収スペクトルを指標とした色落ちリスクの診断

ヘッドオンフォトマル装置を装着した分光光度計を用いることで石英セルに張り付けたノリ葉状体の生体吸収スペクトルを測定することができる。既往の知見において、生体吸収スペクトルは栄養塩環境の変動に応じて変化することが報告されていたが、本事業では、紫外線吸収物質の吸収極大の 334nm の吸光度と変動が小さい 229nm の吸光度の差: $ABS_{334-298}$ 値を指標とする色落ち診断手法を提案した。具体的には、 $ABS_{334-298}$ 値が室内培養では 0.3、漁場等の太陽光下での育成では 0.75 に近い、または下回ると色落ちリスクが高い可能性があり、さらに、 $ABS_{334-298}$ 値と L^* の関係は色落ち過程と色調回復過程において異なる変遷を示すことから、ノリ葉状体の動態の推定に活用することができる。

ただし、指標となる数値が異なることからわかるように、紫外線量が大きく異なる太陽光下で育ったノリと蛍光灯などを光源として培養ノリでは、 $ABS_{334-298}$ 値の水準が大きく異なるので注意が必要である。一方で、ナラワスサビノリの標準品種である U-51 と貧栄養に耐性があるとされるフタマタスサビノリでは、色落ち過程や回復過程において $ABS_{334-298}$ 値と L^* の関係の推移が異なったことから、品種特性の解明や評価への応用も期待される。

(3) 栄養塩（窒素）環境の変動下におけるノリ葉状体の網羅的な遺伝子発現解析

窒素制限や添加によるナラワスサビノリの標準品種である U-51 の培養試験で得られたサンプルを用いてノリ葉状体の網羅的な遺伝子発現解析、発現変動した遺伝子のクラスター解析や特定クラスターのパスウェイ解析を実施した。その結果、窒素制限下では光合成が抑制され、細胞内のタンパク質合成やエネルギー代謝も低下することが分子レベルで確認された。さらに、制限により発現量が顕著に増加し、逆に窒素添加で発現量が減少する 5 つの制限指標となる遺伝子候補を同定、これらを qPCR など簡便な方法で評価する基盤を構築した。なお、これらの遺伝子の発現変動は、U-51 だけでなく貧栄養耐性を有するとされるフタマタスサビノリとも共通であり、品種横断的に活用できると考えられる。

【参考文献】

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- den Haan J., J. Huisman, F. Dekker, J. L. ten Brinke, A. K. Ford, Amanda, J. van Ooijen, F. C. van Duyl, M. J. A. Vermeij, P. M. Visser (2013) Fast detection of nutrient limitation in macroalgae and seagrass with nutrient-induced fluorescence. *PLOS ONE*, 8:1-11 (e68834).
- Ge, S.X., Son, E.W., and Yao, R. (2018) iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 19, 534.
- Holland D., S. Roberts, J. Beardall (2004) Assessment of the nutrient status of phytoplankton: A comparison between conventional bioassays and nutrient-induced fluorescence transients (NIFTs). *Ecological Indicator*, 4:149-159.
- 国立研究開発法人水産研究・教育機構 (2021) 令和 2 年度養殖業成長産業化技術開発事業 (6) 環境変化に適応したノリ養殖技術の開発報告書. pp. 96.
- 前川行幸 (1997) III. 有用物質の探査および利用 12. 紫外線吸収物質. 有用海藻のバイオテクノロジー. 能登谷正浩 (編)、恒星社厚生閣、東京、pp135-141.

田口哲、平良（宿里）ひとみ（2012）紫外線吸収物質-マイコスポリン様アミノ酸. 藻類ハンドブック. 株式会社エヌ・ティー・エス、東京、pp298-302.

渡邊裕基（2017）クロロフィル蛍光を利用したアマノリ類のストレス応答測定とその可能性. 藻類 65:149-152.

【成果の公表】

なし

