

平成30年6月12日現在

機関番号：34316

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14792

研究課題名(和文) 粘液の安定同位体比分析で食性変化や移動をタイムラグなく把握する技術の確立

研究課題名(英文) Stable isotope analysis of epidermal mucus to estimate food habits and migration without time lag

研究代表者

丸山 敦 (Maruyama, Atsushi)

龍谷大学・理工学部・准教授

研究者番号：70368033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の安定同位体比分析では、体表粘液を分析する新手法を提案することが申請研究の大きな目標であった。計画立案時の到達目標としていた、複数魚種での濃縮係数と置換速度を示すこと、従来法(筋肉の分析)と比べて応答が早いことを示すこと、非致死的で反復可能な粘液採取手法を確立すること、の3点は到達された。また、置換速度の2つの決定要因である成長速度と代謝回転速度が相関することも示された。これによって、野外での測定が難しい代謝回転速度を成長速度から予測することで、同位体比の置換速度が予測できる可能性が示された。粘液の同位体分析は、早い応答または非致死的な分析が求められる状況下で有効な代替手段である。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project was to establish stable isotope analysis of fish epidermal mucus to estimate food habits and migration history without time lags. We measured trophic discrimination factors and turnover rates of epidermal mucus of several freshwater fish species by experiments and showed that mucus isotopes turnover more quickly than widely-used muscle tissues, and that epidermal mucus can be repeatedly collected from living fish. In addition, we found that the growth and catabolic turnover rates correlate with each other, which may enable estimation of isotopic change of quickly-responding mucus in the field, where growth rates are only available. Thus, we propose the use of fish epidermal mucus for the isotope studies which require quick response or non-lethal sample collections.

研究分野：魚類生態学

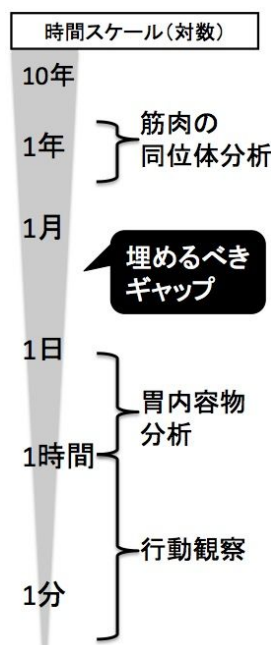
キーワード：安定同位体 粘液 置換速度 濃縮係数 淡水魚類

1. 研究開始当初の背景

野外生態系における生物間相互作用、中でも被食-捕食関係を読み解くことは、生物資源の管理や生態系機能の保全の基礎となる重要なステップである。水域では、トッププレデターとして生物群集にインパクトを持ち、水産資源として人間の食や文化を直接支える魚類の食性を理解することは、古くから重要視されてきた。行動観察、胃内容物分析、筋肉の安定同位体比分析など、様々な手法が魚類の食性把握のために開発されてきたのはそのためである。

しかし、食物網を定量的かつ動的に捉えることの重要性が指摘される昨今、上掲の既往手法によって明らかになる食性情報の時間スケールに注意を払うべきである。行動観察はある瞬間、胃内容物分析は僅か数時間の食性情報しか提供できない。一方の筋肉の安定同位体比分析は、過去の履歴を積分した情報を与える点では優れているが、成長も代謝回転も遅い魚類においては、食性や生息地に変化があった場合、応答に6ヶ月以上のタイムラグがあることが知られる。

従来の手法は、各々の情報が持つ時間スケールの違いを上手く活用することで、魚類の食性把握に大いに貢献してきた。しかし、胃



内容物分析の時間スケール(数時間)と安定同位体比分析の時間スケール(6ヶ月以上)の間にはあまりにも大きなギャップがある(右図)。このギャップを埋める手法を確立することは、手法間の相補性をより強固にして、魚類の食性把握、ひいては水

域の食物網構造の理解に必ずや貢献するものと思われる。

申請者および連携研究者は、Church et al (2009) や申請者(Maruyama et al 2014)の報告に基づき、体表粘液の安定同位体比分析を提案したい。粘液は頻繁に再生産されるために弛緩速度が速く、安定同位体比の半減期は1週間から1ヶ月程度と推定され、まさに上記のギャップを埋める可能性が期待される。にも関わらず粘液の分析例が論文2本に留まっているのは、筋肉を用いる従来の安定同位体比分析に比べて、分析結果を解釈するために必要な知見、すなわち濃縮率、置換速度、採取方法についての情報が蓄積されていないためであろう。

2. 研究の目的

本申請研究では、複数魚種での濃縮係数と置換速度を示し、従来法(筋肉の分析)と比べて応答が早いことを示すことを第一の目的とした。また、粘液はもともと体外に放出される性質のものであるから、非致死的な採取法も確立できうる。非致死的で反復可能な粘液採取法の確立を第二の目的とした。さらに、粘液の置換が早いことが分かれば、置換の遅い筋肉の分析と併用することで、移入個体を検出する手法も開発出来る。これを第三の目的とした。

3. 研究の方法

粘液の窒素、炭素安定同位体比を解釈する上で必須となる、濃縮係数と置換速度を把握するための飼育実験を行った。濃縮係数とは餌の安定同位体比との差分であり、十分に長い時間同じ餌を食べた時の安定同位体比より求まる。置換速度は、想定される同位体比変化のうちの何割が単位時間あたりに変化するかで示す。本研究の実験では、安定同位体比の異なることがあらかじめ分かっている餌を2タイプ用意し、1つ目の餌で十分に馴化した後に2つ目の餌を与え、その後の安

定同位体比変化を追跡することで、非線形回帰分析によって濃縮係数と置換速度の両方を一度に求めた。

飼育対象魚は、アユ(アユ科)、ギンブナ、コイ、タモロコ、カワムツ、アブラハヤ、モツゴ(コイ科)、ナマズ(ナマズ科)の淡水産8魚種に及んだ。異なる科から、かつ、最大サイズの異なる魚種を選定することで、淡水魚全般の傾向を広く把握することに成功した。飼育実験は連携研究者(米倉竜次)が所属する岐阜県水産研究所において行われた。



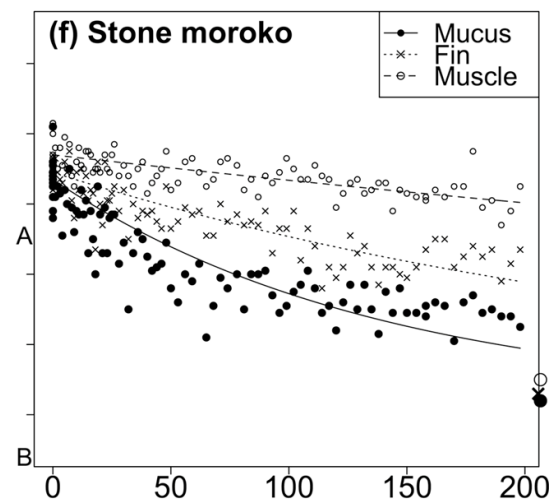
飼育実験では、筋肉と粘液の2つの安定同位体比を測定した。従来法で用いられてきた筋肉の同位体比変化との比較は、粘液の時間スケールが短いことを示す上で有効のみならず、移入個体を検出する手法の開発と検証のためにも欠かせない。飼育魚は水産研究所で随時冷凍保存され、研究代表者(丸山敦)が所属する龍谷大学に輸送された。粘液および筋肉の採取は、本研究の開始時にすでに確立していた手法に従って行った。同位体分析は、研究代表者が管理する Thermo Fisher Scientific 社の Delta V advantage に Flash EA を接続した質量分析システムによって行われた。

4. 研究成果

初年度、次年度に開始した計7系統の実験は、2つが国際学術誌に、1つが和文学術誌に受理され、残りは投稿準備中である。効率化で生じた残予算によって発展的に立ち上げた飼育実験の完了のために延長した最終年度の実験および分析も、予定どおりに完了し、現在は統計的な説明モデルを提案する論文を執筆中である。このモデルは、成長速

度だけをインプットすることで代謝の影響を加味した同位体比置換速度の予測ができる可能性がある興味深いものである。総じて、計画当初の目論見はすべて達成でき、その成果は着々と公表されている(下記5に明記)。

例えば上図は(Shigeta et al. 2017 *Ecol*



Resより抜粋)モツゴ(コイ科の小型淡水イ魚)の同位体比(縦軸、1目盛=2‰)変化を、粘液(Mucus)、背鰭(Fin)、筋肉(Muscle)で比較したものである。時間(横軸、単位=日)とともに、粘液が最も早く新しい餌に反応していることが一目瞭然であり、この傾向は統計学的解析によっても裏付けられている。同様に、(1)安定的な濃縮係数、(2)早い置換、(3)生体からの反復採取が可能であること、の3つは上掲の8魚種すべてで確認出来ており(Maruyama et al. 2015 *Ecol Freshw Fish*でも報告)申請当初の予測とほぼすべて合致した結果が得られたと言える。

また、琵琶湖産アユを用いた飼育実験では、筋肉や卵の分析では脱脂による補正を行わない限り、分析確度も分析精度ともに低いのに対し、脂肪を含まない粘液の分析では脱脂せずとも脱脂後の筋肉と同等の精度が得られることも示された(沢田 2018 魚類学雑誌に詳報)。

コイを用いた飼育実験では、粘液の反復採取が生体から何度でも問題なく行えること

はもちろん、反復採取が置換速度に与える影響についても統計的に検証することができた。端的に言えば、採取によって置換速度は早まるものの、反復頻度によって置換速度が早まることはないという結論になった。さらに、粘液における同位体比の変化は成長よりも代謝回転によって説明されることが定量的に示され、にも関わらず、代謝回転速度が成長速度と正相関するため、成長速度の情報によって同位体比の変化速度が推定出来る可能性も示された。これらの成果は、国際学術誌に投稿すべく、現在執筆作業中である。

この他に、申請研究から派生した発展的な興味に基づいて、既往研究が報告した濃縮係数を収集してメタ解析を行い、濃縮係数を左右する要因についても模索を試みた。遺伝的な距離や栄養段階などを考慮することで、同位体比の解釈に必要な濃縮係数を、飼育実験を行わずに類推することがある程度は可能であることが示された。この結果も、国際学術誌に投稿するための準備を進めている。

以上より、本研究は計画どおりの進捗し、かつ学術上の成果は当初目標に勝るものとなったと満足している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

沢田 隼, 米倉竜次, 丸山 敦 (2018) アユの炭素, 窒素安定同位体比分析のための脂質量補正式と筋肉, 卵巣, 粘液における濃縮係数. *魚類学雑誌*. 65: 1-7, 査読有

Shigeta, K., Tsuma, S., Yonekura, R, Kakamu H., Maruyama, A. (2017) Isotopic analysis of epidermal mucus in freshwater fishes can reveal short-time diet variations. *Ecological Research*. 32: 633-641, 査読有

Maruyama, A., Tanahashi, E., Hirayama, T., and Yonekura, R (2017) A comparison of changes in stable isotope ratios in the epidermal mucus and muscle tissue of slow-growing adult catfish. *Ecology of Freshwater Fish*. 26: 636-642, 査読有

Maruyama, A., Shimonaka, H., and Ito, T. (2015) Quick change in ^{15}N values of fish mucus confirmed in the field using a migratory goby. *Ecology of Freshwater Fish*. 24: 162-164, 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

重田環志, 米倉竜次, 丸山敦. 体表粘液の安定同位体分析は淡水魚の短期間の食性を明らかにする. 日本生態学会第 65 回全国大会, 2018 年 3 月, 札幌

丸山敦, 竹村潤市郎, 神松幸弘, 入口敦志. 古書籍に漉き混まれた毛髪 of 安定同位体分析による近世の庶民の食生活の推定. 龍谷大学里山学研究センターシンポジウム「里山学から考える防災・減災 ~ 琵琶湖水域圏の保全・再生に向けて ~」, 2018 年 3 月, 大津

沢田隼, 藤原壮平, 遊磨正秀, 丸山敦. 琵琶湖水系に陸封されたアユの安定同位体比からわかること ~ 異なる時間スケールの食性を示す複数組織を組み合わせる ~. 日本生態学会第 65 回全国大会, 2018 年 3 月, 札幌

植田誉規, 久布真幸, 重田環志, 沢田 隼, 米倉竜次, 丸山敦. 生きた魚からの粘液の反復採取と同位体比の変化速度. 日本生態学会第 65 回全国大会, 2018 年 3 月, 札幌

沢田隼, 藤原壮平, 遊磨正秀, 丸山敦. 安

定同位体比で判明した琵琶湖に生息するアユにおける各生活史型の産卵特性. 魚類自然史研究会, 2017年11月, 大津

重田環志, 津馬汐莉, 米倉竜次, 丸山敦. 淡水魚の粘液、鱗、筋肉の置換速度の比較: 応答の速い安定同位体分析法をめざして. 日本生態学会第64回全国大会, 2017年3月16日, 東京

沢田隼, 重田環志, 川上将樹, 遊磨正秀, 丸山敦. 安定同位体比によるアユの産着卵の生活史型と産卵回数の推定. 日本生態学会第64回全国大会, 2017年3月16日, 東京

Maruyama, A., Tanahashi E, Hirayama T, Yonekura, R. Change in stable isotope ratios in the epidermal mucus of slow-growing fish. 日本生態学会第63回全国大会, 2016年3月22日, 仙台市

沢田隼, 遊磨正秀, 丸山敦. 安定同位体比が示す琵琶湖水系に陸封されたアユの生活史変異とその産卵特性. 日本魚類学会, 2016年9月24-25日, 岐阜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 敦 (MARUYAMA, Atsushi)
龍谷大学・理工学部・准教授
研究者番号: 70368033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

米倉 竜次 (YONEKURA, Ryuji)
岐阜県水産研究所・研究員
研究者番号: 40455514

(4) 研究協力者

重田 環志 (SHIGETA, Kanji)

沢田 隼 (SAWADA, Hayato)

植田 誉規 (UEDA, Yoshiki)

平石 優美子 (HIRAISHI, Yumiko)