

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02747

研究課題名(和文) 藍藻の異常増殖が常態化する太湖の食物網解析と生物多様性維持機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of food web and biodiversity mechanism of Lake Taihu where the occurrence of water bloom is normalized

研究代表者

西村 修 (Nishimura, Osamu)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：80208214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では超富栄養湖である太湖等において、シアノバクテリアが他の藻類に比較して圧倒的に優占する中で、動物が生残や繁殖に必要な必須脂肪酸をどのように獲得しているのかが明らかにすることを目的として研究を行った。

その結果、太湖に出現するすべての動物にとってシアノバクテリアは重要な食物源ではないものの、エビにとっては重要である可能性が示唆された。また、八郎湖ではアオコ発生時にワカサギ等の出現する魚がシアノバクテリアの炭素を摂取していることが明らかになった。さらに、微小後生動物Aeolosomaはエイコサペンタエン酸などの必須脂肪酸を自ら合成して再生産が可能であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微小後生動物Aeolosomaが自ら必須脂肪酸EPAを合成して再生産可能であることが明らかになった。EPAは珪藻のバイオマーカーであることが示すよう、生態系においては珪藻のみが合成可能であり、高次捕食者は珪藻を直接あるいは間接に捕食してEPAを摂取する必要があると考えられてきた。しかし、このような動物の存在が藍藻優占下での生物多様性保全のキースpeciesとして機能している可能性が考えられ、生物多様性を保全するための情報として有用である。地球温暖化により湖沼は藍藻の異常増殖が常態化すると予想され、本知見の活用によって湖沼生態系サービスの持続的な利用の可能性を拡大することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is to clarify how aquatic animals acquire essential fatty acids necessary for survival and reproduction while cyanobacteria predominately over other algae in Lake Taihu.

As a result, it was suggested that cyanobacteria might not be an important food source for all aquatic animals appearing in Lake Taihu, but it was important for shrimp. In addition, it was revealed that fish such as *Hypomesus nipponensis* ingested carbon of cyanobacteria at Lake Hachiro during the occurrence of water bloom. Furthermore, it was revealed that the micrometazoan *Aeolosoma* can reproduce itself by synthesizing essential fatty acids such as eicosapentaenoic acid.

研究分野：環境生態工学

キーワード：食物連鎖 藍藻 富栄養化 湖沼 必須脂肪酸 微小後生動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中国江蘇省にある太湖は3,000万人の水源地であると同時に漁業や養殖が活発に行われており、地域住民の生活にとって非常に重要な湖である。しかし周辺地域の発展に伴い富栄養化が深刻化し、藍藻類の異常増殖が毎年発生している。富栄養化による底質の有機汚濁化、それによる内部負荷の増加が相対的に重みを増している中で、我々は炭素安定同位体比や脂肪酸バイオマーカーを用いて太湖底泥中の有機物起源解析に取り組んだ。その結果、藍藻が大量発生した年であっても底質の有機物起源は藍藻ではなく、主に陸上植物に由来することを明らかにした。また、底質に藍藻由来の有機物が蓄積しないのは、バクテリアによる藍藻の分解、および底生動物による藍藻の摂食・同化が生じるためであり、藍藻が優占化する湖沼では特有の食物連鎖が見られることを明らかにした。

これまで藍藻は必須脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 EPA20:5₃ やドコサヘキサエン酸 DHA22:6₃ の欠損のために動物の食物として不適とされてきた。実際、我々は藍藻の異常増殖している太湖において底生動物の潜在食物源である底質や水中懸濁物の脂肪酸組成を調べたが、20:5₃ や 22:6₃ が検出されなかった。これらの栄養素は動物の生存や繁殖に不可欠であるが自身で合成できないため食物から摂取する必要がある。したがって、20:5₃ や 22:6₃ を合成する珪藻は動物の食物源としての価値が高く、一方でこれらの栄養素を含まない藍藻が優占化した場合、生物生産の低下、生物多様性の減少などの深刻な生態系影響が生じると考えられてきた。

しかし、我々は藍藻が異常増殖した太湖で採取した巻貝、二枚貝、甲殻類などの底生動物から 20:5₃ や 22:6₃ を検出した。この結果を説明する仮説として、藍藻から獲得した脂肪酸を用いて体内で自ら合成している、20:5₃ 合成能のある原生動物や細菌を介して間接的に藍藻から摂取している、と考えられ、これらの検証を行う事で藍藻の異常増殖が常態化する太湖の食物網解析と生物多様性維持機構の解明が可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では超富栄養湖である太湖において藍藻が他の藻類に比較して圧倒的に優占する中で、動物が生残や繁殖に必要な栄養素、すなわち必須脂肪酸の 20:5₃ および 22:6₃ をどのように獲得しているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 富栄養湖太湖における高次栄養段階へのシアノバクテリアの炭素移動

湖沼の有機物は、一般的に流入河川によってもたらされる陸上植物由来のものと、湖沼において増殖した植物プランクトン由来のものに大別される。それらは消費者に炭素源とエネルギー源を提供し、多様な食物網の基盤を形成し、残渣は最終的に堆積物に保存される。有機物の沈降は底生動物群集の成長を促す一方で、沈降フラックスが増加すると栄養素の放出と関連して底層の低酸素または無酸素状態を引き起こし、底生動物の生息環境を悪化させる。したがって、湖沼における有機物の運命、あるいは堆積有機物の起源を含む有機物の動態を知ることが、湖沼生態系の管理において極めて重要である。

水柱から底質への有機物の移動過程は、さまざまな生物学的および非生物的要因によって影響を受ける。深い湖では、風や波や熱対流によって引き起こされる水温躍層より上の垂直方向の混合が、有機物の酸化・分解の曝露時間を長くする結果、表水層で有機炭素の85%近くが失われるという報告もある (Eadie et al. 1984)。動物プランクトンまたはフィルターフィーダー魚による植物プランクトンの利用および水柱内の従属栄養微生物による分解は、有機粒子の沈降フラックスを減少させるのに重要な役割を果たしている。一方、沈降フラックスは水柱の溶解有機物質の光媒介ならびに微生物誘導による凝集で有意に増加し得る。これらの知見は深い湖の中で長い滞留時間で表水層から沈む有機粒子が、必ずしも堆積物の有機物含有量に比例しないことを意味している。しかし、深い湖の生態系とは対照的に浅い湖、特に富栄養湖における有機粒子の挙動はほとんど知られていない。そこで、浅い富栄養湖における有機物の挙動を追跡するために、水柱の浮遊性粒子状有機物 (SPOM) と堆積有機物 (SOM) を系統的に中国の太湖で調査した。SPOM と SOM の起源と組成を分析し、それらの関係を脂肪酸バイオマーカーにより比較した。水生動物と底生細菌の調査も行った。浅い富栄養湖では有機粒子の沈降時間が短くなり、その結果水柱での酸化・分解の時間は短くなる。したがって大きく浅い富栄養湖沼では、表層水中の有機物動態に対する動物の消費と微生物利用の影響はわずかで、水柱の存在量は堆積物の含有量に比例すると仮定して研究を進めた。

(2) 微小動物の必須脂肪酸合成

本実験では、後生動物 *Aeolosoma* を対象に実験を行った。*Aeolosoma* は実験前に AE 培地 (必須脂肪酸を含む) で培養しているため、これを必須脂肪酸を持たない餌細菌 (*Alcaligenes faecalis*) を添加した無機培地 (ABD 培地) に移し替える植継を繰り返した。一度の植継により AE 培地由来の必須脂肪酸を 1/5 倍にすることができる。実験は 3 系で行った。実験用培地 150mL のうち 30mL を植継に、20mL を個体数調査に、100mL を脂肪酸分析用に使用した。このような植継 (2 週間培養後) を計 4 回行った。

供試動物の *Aeolosoma* は環形動物門貧毛綱に属する水生ミミズである。体長は約 1 mm ほどであり、紅色の油脂を皮下に持っている。有性生殖もするが、通常横分裂による無性生殖で増殖

する．活動性が高く，細菌フロックを摂食し，ペレット状の糞塊を排泄する．分裂が盛んな時は複数個体が団子状に絡まるのが散見された．

Aeolosoma の個体数測定は各実験系から採取したサンプルの残りのうち，1mL をスライドガラスに移して行った．この計測を各系 3 回行い，1mL 中での個体数である生息密度を 3 回の平均をとって算出した．また，得られたデータより比増殖速度 (μ) を算出した．

分析用サンプルを Whatman ガラス繊維ろ紙 (GF/D) で濾過した後，そのろ紙を冷凍保存，凍結乾燥させた．脂肪酸の分析は Abdulkadir S., and Tsuchiya M. (2008) の方法を用いて脂肪酸抽出を行った．サンプルをヘキサンに浸し，BF3 および内部標準液 (23:0) を添加後，100 のウォーターバスで 2 時間加熱し脂質を抽出，メチルエステル化した．その後，脂肪酸メチルエステルを含むヘキサンを回収し，キャピラリーカラム (Agilent 社，Select FAME，内径 0.25mm，膜厚 0.25 μ m，長さ 100m) を装填したガスクロマトグラフ GC-2014 (SHIMADZU) で分析した．キャリアガスにはヘリウムを用い，注入口温度 260 ，検出器温度 280 ，カラム条件は 150 5min, 150-230 /min, 230 10min, 230-250 -4 /min の昇温プログラムで分析した．標準物質としてスペルコ社製の spelco37, bacterial FA, PUFA-3, i-17:0,a-17:0 を用いてリテンションタイムから脂肪酸の同定を行った．なお，本研究においては，標準物質内のリテンションタイムに該当しないピークは全て除外した．

4. 研究成果

(1) 富栄養湖太湖における高次栄養段階へのシアノバクテリアの炭素移動

シアノバクテリアと陸上植物の SPOM と SOM の間に非対称の現象が見られた (Fig. 1) . 珪藻

や渦鞭毛藻類のような他の起源の有機物は表層水および堆積物への寄与がわずかであり，シアノバクテリアと陸上植物を主要な有機物として考慮することができる．表層水中ではシアノバクテリアが優占し，空間的パターンは Chl-a 濃度によって示された太湖の植物プランクトン分布と一致した．シアノバクテリアと比較して陸上植物起源の有機物は比較的低い濃度レベルを示したが，それらは空間的に変動した．底質では比較的低レベルのシアノバクテリアが検出されたが，時空間的な変動は小さいことがわかった．一般に水生動物による摂取や微生物分解による影響を受けるために，沈降時に有機物が失われる．しかしながら陸上植物は変化しないと仮定し，湖全体を代表するために有機物の最大濃度を使用すると，Fig.2 に示す通りシアノバクテリアは沈降時に減少する．これらの非対称現象は，表層水から堆積物への移動過程で陸上植物と比較してシアノバクテリアがかなり損失することを意味する．これはおそらく生物学的存在量と群集構造の空間的不均一性に関連している．例えば，湖中のシアノバクテリアの最大濃度は，沈降の間に西部の淡水の入口から Zhushan 湾にシフトした (Fig.1(a)と(c)) . 西部の淡水入口におけるシアノバクテリアの広範な消失は，栄養状態，風による擾乱およびヒビタットの複雑さの影響により，Zhushan 湾と比較してより多く存在する大型無脊椎動物のバイオマスによって消費された可能性がある．シアノバクテリアと比較して底質に堆積する陸上植物は，それらの難分解性のために生物地球化学的プロセスによる改変の影響を受けず表層水に比例する．

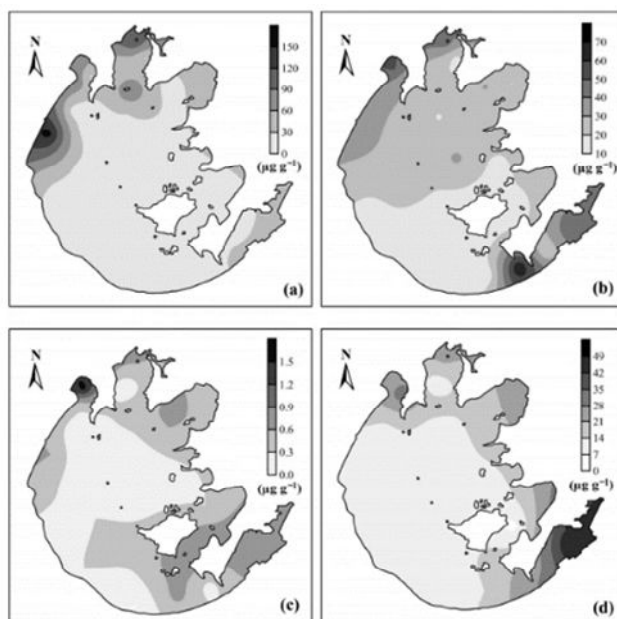


Fig.1 Spatial concentration variations in (a) cyanobacteria in suspended particles (μ g/g), (b) terrestrial plants in suspended particles (μ g/g), (c) cyanobacteria in sediments (μ g/g), (d) terrestrial plants in sediments (μ g/g) from Lake Taihu, China.

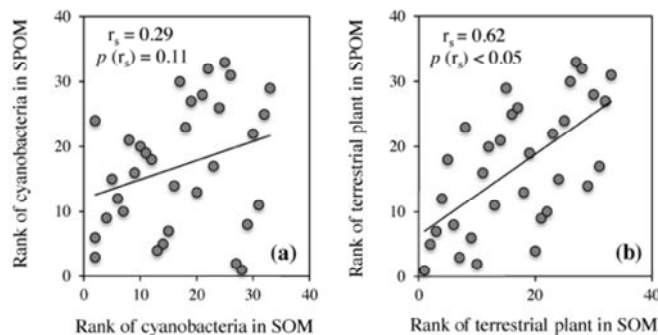


Fig. 2 Spearman's rank correlations between (a) cyanobacteria in SPOM and SOM, (b) terrestrial plants in SPOM and SOM from Lake Taihu. SPOM: suspended particulate organic matter, SOM: sedimentary organic matter.

有機物の動態に対する動物の摂取の影響としては、直接の食物源としての陸上植物とシアノバクテリアの寄与は高くはなかったが (Fig. 3), シアノバクテリアは陸上植物よりも優れた食物源であることがわかった。この現象のさらなる証拠は、 ^{13}C および ^{15}N によると陸上植物ではなく、シアノバクテリアとすべての種類の消費者との間に密接な関係があったことから示された。特に、本研究で調査されたカタツムリ、二枚貝、エビ、魚の全てが植物プランクトン由来の有機物を食物源としていることが明らかになった。底生消費者は沈降したシアノバクテリアデトリタスの炭素を利用するが、エネルギーを引き出すためのそれらの経路は、水柱のシアノバクテリアを直接過するエビおよび魚類のそれらの経路とは異なり得る。多くの研究により植物プランクトン、特にシアノバクテリアがエビや魚類の食物源であることが明らかにされているが、シアノバクテリアと陸上植物はエビにとって同様に重要な食物源である可能性が示唆された。

(2) 微小動物の必須脂肪酸合成

植継を重ねても安定的に個体数密度が回復し、3つの系で約 10 匹/ml 程度を維持した。植継の間隔は 2 週間で固定したが、これは以前の我々の研究で個体数密度が約 20 日前後で元の値近くまで戻ることをもとにしている。以前のデータと比較して類似した結果が得られたため再現性を認めることができ、培地内の必須脂肪酸が薄くなっていく環境下においても *Aeolosoma* が安定的に生育・増殖可能であることが分かった。

植継 4 回までにおける比増殖速度 (μ) は、どの系においても平均して約 0.1 (/日) となった。この値は特段小さいものでないものの、培養環境に制約がない条件下における *Aeolosoma* の μ が 0.3~0.4 (/日) であることを考慮すると、決して速いということとはできない。しかしながら、死滅個体も少なく個体数密度は毎回の植継で増加していることから、生育が阻害された可能性がある。これは与えた餌細菌懸濁液の質や環境への馴化の問題に加えて、培地の濃度がどんどん薄くなるという環境変化自体が *Aeolosoma* の生育に影響を及ぼしたことも考えられる。

脂肪酸分析は 1 回目~4 回目までの植継時に行った。植継による必須脂肪酸の濃度変化についてリノール酸(18:2 6), リノレン酸(18:3 3), アラキドン酸(20:4 6)の3つの必須脂肪酸では1回の植継で元の AE 培地に含まれる必須脂肪酸量が 1/5 倍になる中で 検出した必須脂肪酸量が理論的に考えられる必須脂肪酸の含有量を超えていることが明らかになった。すなわち必須脂肪酸が薄苦なる環境下で *Aeolosoma* 自らが必須脂肪酸を合成していることが示唆される。特に 6 系統のリノール酸とアラキドン酸については 4 回目の植継における EFA の実測値と理論値の差が 10 倍~20 倍以上という結果であった。リノール酸とリノレン酸は後生動物が合成しえないと考えられている必須脂肪酸であるが、このような結果は必須脂肪酸が希薄な環境下で後生動物 *Aeolosoma* が環境中に必須脂肪酸を供給するポテンシャルを有することを示している。

一方、エイコサペンタエン酸(22:5 3)やドコサヘキサエン酸(22:6 3)といった炭素鎖が長い脂肪酸や他の脂肪酸は検出されなかった。これはもともと AE 培地に含まれている量が少なかったために、検出されなかったのであろう。しかし、AE 培地にドコサヘキサエン酸は比較的豊富に存在していたにもかかわらず、1 回目の植継時の分析結果では検出されなかった。これは、*Aeolosoma* が早い段階でドコサヘキサエン酸を同化したためと考えられるが、にもかかわらず増殖可能であることは、*Aeolosoma* にとってドコサヘキサエン酸が高い重要性を持つ必須脂肪酸ではない可能性がある。つまり、上記の3つの必須脂肪酸さえ合成できれば、安定的な生育・増殖が可能なのかもしれない。

今回の実験結果は、リノール酸とアラキドン酸の合成が示唆された以前の研究結果と比較しても合致する点が多い。しかしながら、植継を経るにつれて、合成割合が落ちている。これより、これらの脂肪酸は合成可能であるもののその量には限界があることがわかる。持続的な成長・増殖のためには環境から必須脂肪酸を取り込むことが効果的であると考えられる。

脂肪酸の合成には二重結合をもたらずデザチュラーゼ(不飽和化酵素)やエロンガーゼ(炭素鎖延長酵素)が必要である。従来 12, 15 デサチュラーゼは植物や藻類しか保有しておらず、そのため、リノール酸やリノレン酸は体外から摂取する必要があると考えられてきた。しかしながら、近年の遺伝子解析技術の向上等により、これら酵素を持つ種の解明やこれら酵素の人為的発現により必須脂肪酸合成を強化する研究なども見受けられる (Domenichiello et al. 2016)。現在、数十種類の必須脂肪酸合成能を有する原生動物や後生動物の報告がされている。しかしながら、これらの研究はその酵素を持つか否かなど系統発生解析に焦点が当てられることが多く、培養実験系で必須脂肪酸合成能を確認する研究は少ない。もちろん、そのような酵素の有無は必須脂肪酸合成を考える上で重要なことに違いはないが、実環境中ではそのような酵素の有無にかかわらず、必須脂肪酸が合成され、供給されることで生態系にどのようなプラ

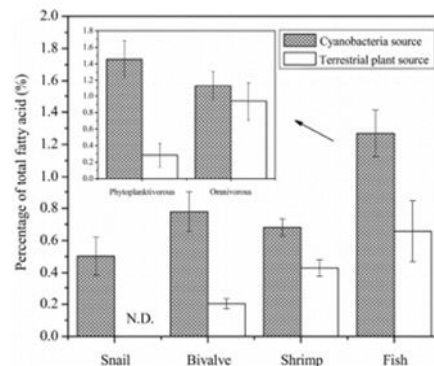


Fig. 3 Contributing percentage of cyanobacteria and terrestrial plants as food sources for aquatic animals including snails (n = 8), bivalves (n = 8), shrimps (n = 3), fishes (n = 7; therein, phytoplanktivorous (n = 3) and omnivorous (n = 4)) from Lake Taihu. ND: not detected.

スをもたらすか否かについて重点が置かれるはずである。中でも、今回取り上げた必須脂肪酸の供給が考えにくい環境中の生態系・食物連鎖網を脂肪酸という観点から研究している例はほとんどない。

今回の実験では、リノール酸とアラキドン酸さらに、リノレン酸について *Aeolosoma* 自身による合成が示唆された。つまり、5, 6, 12, 15 デサチュラーゼ及び、 ω -リノレン酸(18:3 6)からジホモ- ω -リノレン酸(20:3 6)に鎖長する 6 エロンガーゼを保有している可能性がある。しかしながら、6 系統の ω -リノレン酸やジホモ- ω -リノレン酸といった、リノール酸からアラキドン酸が作られる中間生成物は検出されなかった。これは元々AE 培地に含有する量が少ないことが考えられるが、アラキドン酸が生成されていることを考えると、これら中間生成物が検出されてもおかしくないはずである。脂肪酸合成はこれら酵素が存在しない限りはできないはずであるため、*Aeolosoma* の量を増やし脂肪酸検出量をあげた実験をする必要がある。3 系統の脂肪酸の合成はリノレン酸以外に可能性はないと考えられ、実験においてもリノレン酸以外検出されなかった。これより、*Aeolosoma* は炭素数 20 以上の脂肪酸を生成するエロンガーゼ及び 4, 19 デサチュラーゼを保有していないと考えられる。遺伝子解析により特定酵素の保有の有無を調べることは可能であるので、こうした複合的な観点から、*Aeolosoma* がどの脂肪酸を合成し、合成できないのか検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Fujibayashi Megumu, Tanaka Nobuyuki, Hashido Shun, Takasawa Aya, Nishimura Osamu, Nutritional quality of fish faeces is enhanced by highly unsaturated fatty acid-producing heterotrophic protozoa, *Acta Oecologica*, 89, 21-26, 2018 (査読有り) DOI:10.1016/j.actao.2018.04.003

2. Megumu Fujibayashi, Kunihiro Okano, Yoshihiro Takada, Hitoshi Mizutani, Noriko Uchida, Osamu Nishimura, Naoyuki Miyata, Transfer of cyanobacterial carbon to a higher trophic-level fish community in a eutrophic lake food web: fatty acid and stable isotope analyses, *Oecologia*, 188, 901-912, 2018 (査読有り) DOI:10.1007/s00442-018-4257-5

3. Xian Cao, Hui Wang, Shuai Zhang, Osamu Nishimura, Xianning Li, Azo dye degradation pathway and bacterial community structure in biofilm electrode reactors, *Chemosphere*, 208, 219-225, 2018 (査読有り) DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.05.190

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Xian Cao, Xiaoguang Xu, Megumu Fujibayashi, Osamu Nishimura, Takashi Sakamaki, Munehiro Nomura, Cyanobacterial carbon transfer to higher trophic level in eutrophic lake Taihu, 17th World Lake Conference, 2018

2. 関谷大河、林恭平、田中伸幸、野村宗弘、西村修、後生動物 *Aeolosoma* による必須脂肪酸合成能の検討, 土木学会東北支部技術研究発表会, 2017

3. 藤林恵、岡野邦宏、荒木美穂、菅原幸太郎、野村宗弘、西村修、宮田直幸、アオコの発生する富栄養湖における底質有機物の起源と分解過程の評価, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮田 直幸
ローマ字氏名：Miyata Naoyuki
所属研究機関名：秋田県立大学
部局名：生物資源科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：20285191

研究分担者氏名：坂巻 隆史
ローマ字氏名：Sakamaki Takashi
所属研究機関名：東北大学
部局名：工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60542074

研究分担者氏名：野村 宗弘
ローマ字氏名：Nomura Munehiro
所属研究機関名：東北大学
部局名：工学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：70359537

研究分担者氏名：藤林 恵
ローマ字氏名：Fujibayashi Megumu
所属研究機関名：秋田県立大学
部局名：生物資源科学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：70552397

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡野 邦宏
ローマ字氏名：Okano Kunihiro

研究協力者氏名：丸尾 知佳子
ローマ字氏名：Maruo Chikako

研究協力者氏名：田中 伸幸
ローマ字氏名：Tanaka Nobuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。