

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00528

研究課題名（和文）琵琶湖におけるプランクトンとウイルスの過去100年にわたる相互作用解明への挑戦

研究課題名（英文）Challenge for the evaluation of the interaction between host plankton and its parasite in Lake Biwa during the past century

研究代表者

槻木 玲美（加玲美）（Tsugeki, Narumi）

松山大学・法学部・教授

研究者番号：20423618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は世界有数の古代湖、琵琶湖がこの100年間で宿主プランクトンと寄生者がどのように変化してきたのかを堆積試料を用いて明らかにすることを目的としている。解析結果から、琵琶湖はこの100年でプランクトン相に大きな変化が2回生じ、1回目が富栄養化した1970年代、2回目が現在にかけての時期であることが判明した。変動要因について解析を進めた結果、気象条件、人為的活動に関連した環境条件の変化や生物同士のつながりを介しての影響が明らかとなってきた。寄生者についてもウイルス叢が時期により変化することを見出した。つまり琵琶湖は自然・人為的環境変化と共に生物相も変化し、現在も大きな転換点にあると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の動向を予測する上で、長期にわたる宿主・寄生者の動態把握が不可欠であるが、実際に野外での長期観測例は殆どない。本研究により復元された琵琶湖での宿主と寄生者の長期動態の復元は、自然環境下で気候条件や人間活動の活発化により、両者がどのように推移してきたのかを示したものである。今後さらに研究を進めさせ両者の動態がより明らかになれば、感染症の動向を予測する際の手がかりとして稀有な知見となるであろう。

研究成果の概要（英文）：This study has examined remains and sedimentary DNA derived from plankton and its parasite reserved in the sediment core at Lake Biwa, which is one of the ancient lakes in the world, to clarify interactions between a host plankton and its parasite in the past century under changing environmental conditions. As a result, big changes were detected in host plankton community at the 1970s and at around after 2010 connecting to the present. The changes were attributed to nutrient and meteorological conditions in addition to the trophic coupling such as top down-control. Also, reconstructed viral community based on sedimentary DNA temporally changed. The results indicate that biological shifts in Lake Biwa has been processing due to changes in environmental condition and related to food web dynamics probably partly due to anthropogenic control.

研究分野：古生物学・水域生態学

キーワード：宿主プランクトン 過去100年 生物間相互作用 感染症 琵琶湖 環境変化 人間活動 水環境

1. 研究開始当初の背景

大きな社会問題となりうる新興感染症の発生・拡大は、グローバル化や環境変化との関連性が指摘されている(Daszak et al. 2001)。さらなる温暖化の進行に伴い環境悪化が懸念されている今日、環境変化が宿主 - 寄生者の動態に及ぼす影響を明らかにしていくことは、感染症の動向を予測する上で不可欠な知見である。しかし、実際に野外で病原体・宿主が環境変化と共にどのように推移してきたのか、長期にわたる観測例は殆どない。

一方、近年の技術革新により、過去情報が残る堆積物コアから過去の生物相変化を再現する技術は大きく進展しつつあり、これまで復元できなかった宿主と寄生者を再現することが可能となってきた。近畿地方 1400 万人の水がめである琵琶湖は、赤潮やアオコの発生、侵入種と疑われるプランクトンの大増殖、ウイルスによるコイの大量死に象徴されるように、人間活動の活発化が生態系に与える影響が危惧されている。琵琶湖は世界有数の古代湖であり、湖底には時間解像度の高い泥質堆積物が連続的に堆積していることから、これまで地質学的観点から数万年にわたる気候変動の周期性や気候の変化が生物に及ぼす影響を明らかにする古陸水学研究が世界に先駆けて実施されてきた。しかし、人間活動が活発となった過去 100 年程の新しい時代における環境変化が琵琶湖の生物相に与えてきた影響は注目されてこなかった。さらに近年の環境変化が食う食われるといった生物同士のつながりを介して生物相に及ぼした波及効果は、ほとんど判っていない。

2. 研究の目的

本研究は、近年技術的進展が著しい遺伝子解析や、蛍光顕微鏡観察を古生物学的手法に応用させ、宿主プランクトンと寄生者(ツボカビ・ウイルス)の過去 100 年にわたる動態を明らかにし、環境変化が宿主 - 寄生者間の変動にどのような影響を与えてきたのかを解明することを目的とする。最大の特色は、過去 100 年の環境変化と宿主プランクトン動態の関係について観測データが豊富な琵琶湖を対象に、湖底堆積物に残る動物プランクトン、ウイルスの遺伝子情報や残存する藻類の殻に付着する寄生性真菌類を顕微鏡観察し、宿主プランクトンと寄生者の長期動態を再現し、環境条件 - 宿主・寄生者の動態との対応関係を検証することで、人間活動の活発化が生物間相互作用に及ぼしてきた波及効果を解明しようとする点にある。

3. 研究の方法

- (1) 堆積物の採取・年代: 2017 年に琵琶湖北湖の安曇川沖(N35°15'017", E136°04'013")にて、京大大学生態学研究センターの調査船、はすに搭載されている重力式コアサンプラーを用いて長さ約 30cm の堆積物コア試料を採取した。得られた堆積物は 1cm 間隔にスライスし、放射性鉛同位体の CRS 年代モデルに従って年代推定を行った。
- (2) 宿主プランクトン相の復元: 植物プランクトンの大型緑藻類や珪藻類は堆積試料に殻が遺骸として残り、動物プランクトンのミジンコ類や原生生物の *Diffugia* 類も殻や尾爪が残るため、これらを光学顕微鏡下で一定数になるまで観察、計数した。この観察結果から、各堆積試料中の乾燥重量当たりの各生物毎に濃度を算出し、この濃度と上記の年代モデルにより推測される重量堆積速度を用いて、年間の生産量を反映する沈積フラックス(Flux)を以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} & \text{プランクトン沈積フラックス (Flux: numbers/m}^2\text{/year)} \\ & = \text{重量堆積速度 (dry g/m}^2\text{/year)} \times \text{乾燥重量当たりの個体数 (numbers/dry g)} \end{aligned}$$

- (3) 寄生者の復元:

ウイルスは鉱物粒子に吸着するため、水中に比べ長期に残存することが知られている。そこで、過去のウイルス叢を復元するため、堆積物コアを計 12 層に分け、塩化セシウム密度勾配超遠心によりウイルスの濃縮・精製後、主に 1 本鎖環状 DNA ウイルスを対象に次世代シーケンサー(Miseq)で DNA 配列を取得した。さらに、ミジンコ感染ウイルスの探索のため、琵琶湖から採取したミジンコ 1412 個体について消化管内容物を排出させ、上記の方法でウイルスを濃縮・精製し、次世代シーケンサーで DNA と RNA の配列を取得した。

大型緑藻類に寄生する真菌類(ツボカビ)は、殻が堆積試料に残る *Staurastrum* や *Micrasterias hardyi* に寄生性ツボカビ類が付着しているか否かを蛍光顕微鏡観察により計数することで付着率の推移を算出し復元した。

4. 研究成果

- (1) 堆積物の年代:

2017年に採取した堆積物試料(LB7 コア)の放射性同位体に関する測定結果を図1に示す。 ^{210}Pb の放射能は、表層から深度8cm付近までほぼ一定の割合で減衰し、それ以降、深度20cm付近まで急速に減少し、深度34cm付近で検出限界となる(図1左図)。このように減衰率が一定でない場合、CRSモデルによる年代推定が一般的に用いられることから(Appleby and Oldfield, 1978)、本研究においてもCRSモデルに従った。一方、 ^{137}Cs 放射能のピークが深度19-20cm付近であった(図1右図)。 ^{210}Pb によるCRSモデルから推定された堆積物の年代は、堆積深度約30-31cmの層準が約1890年頃、深度20cm付近が1960年代初頭と推測され、 ^{137}Cs のピークから推定される年代と調和的であった(図1右)。

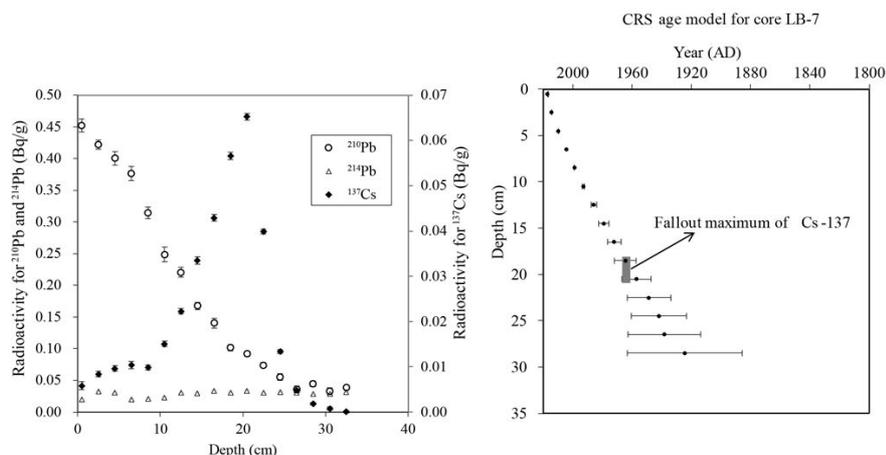


図1.本研究で用いた堆積物コア(LB-7)の ^{210}Pb , ^{214}Pb , ^{137}Cs 濃度(左図)とCRSモデルによる推定年代(右図)

(2) 宿主プランクトン相の復元:

本研究により、琵琶湖のプランクトン相はこの100年で大きな変化が2回生じていることが判明した。1回目が富栄養化した1970年代、2回目が2010年頃から現在に至る時期であった。また、近年、大増殖が問題となっている大型植物プランクトン *Micrasterias hardyi* は1960年頃から現在までの堆積試料から僅かな量ながらほぼ連続的に見いだされ、想定されていた時期よりはるか前に侵入していた可能性が浮かび上がってきた(図2-a,b)。同じ大型緑藻類の *Staurastrum dorsidentiferum* も2010年頃より急速に増加するが(図2)、逆に、琵琶湖固有種の珪藻 *Aulacoseira nipponica* は1980年代以降、減少の一途をたどっていた(図3)。一方、主要な動物プランクトンであるミジンコ群集も大きく変化した(図4)。大型種 *Daphnia pulicaria* は2000年頃出現し、その後、増加するのに対し、元々生息していた在来種 *Daphnia galeata* はやや減少傾向を示す。つまり、琵琶湖では動・植物プランクトン共に現在の生物相に至る変化が2000年代頃より進行しつつあることが明らかとなってきた。

なぜ琵琶湖で2000年代以降、顕著にプランクトン群集が変化したのかについて、さらにその要因について生物間相互作用・環境条件との関係について解析を進めた。その結果、植物プランクトン群集の変動には、気温上昇や風速・日照条件と言った気象条件の変化と大型ミジンコ、*D. pulicaria* の増加が強い影響を与えてきたことが明らかとなってきた。

一方、動物プランクトン、ミジンコ類の変動には、魚類資源の変動といったトップダウン効果の影響が大きいことが判明した。現在、動・植物プランクトン全体とその変動要因について、気象条件や栄養塩等の環境条件・魚類・後述する寄生者の変動を含めて解析を試みており、従来から、検討されてきた環境条件に加え、生物同士のつながりを介した影響を含めて可視化する作業を進めている。

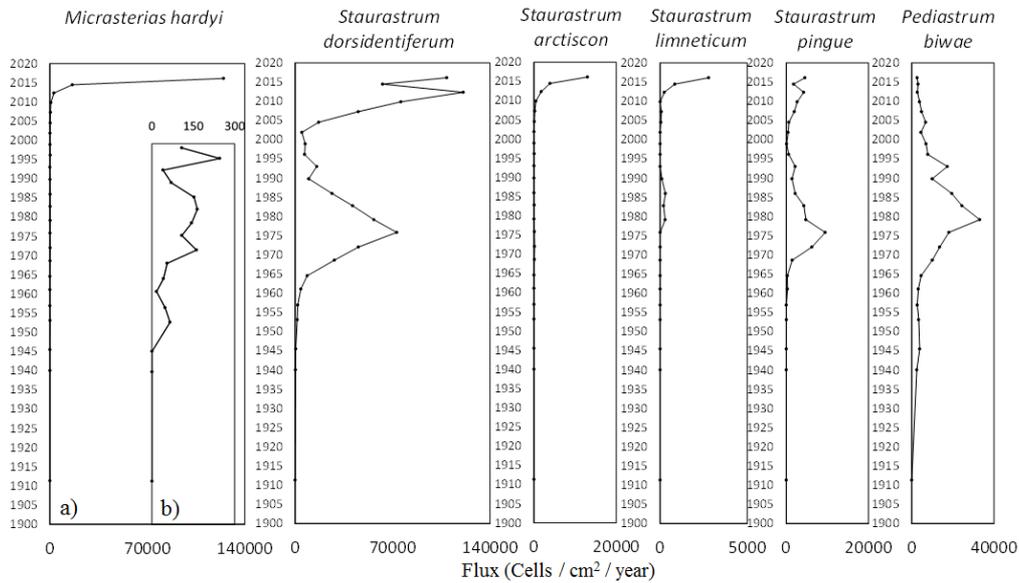


図2. 琵琶湖の過去100年にわたる大型緑藻類の変遷
 なお*Micrasterias hardyi*のみ、a) 2000年以降を含めた場合、b) 2000年以前に限定した場合を明記

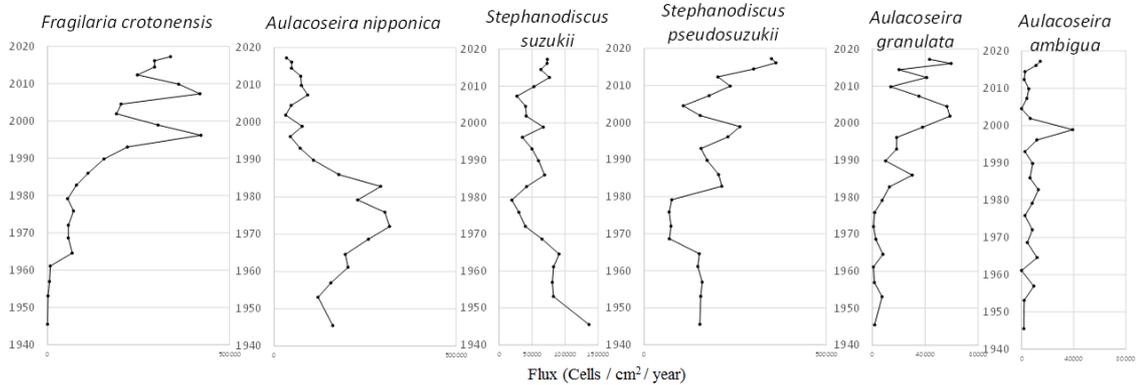


図3. 琵琶湖の過去100年にわたる珪藻類の変遷

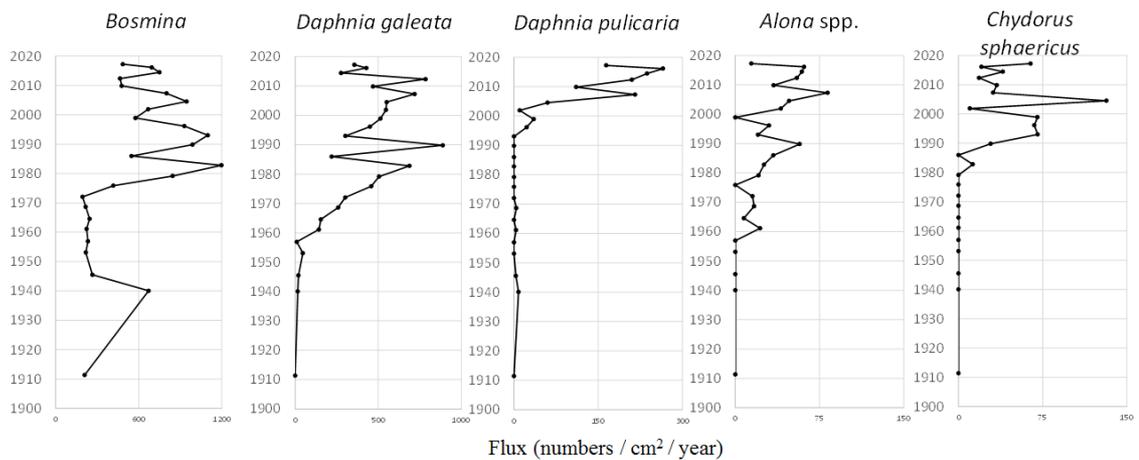


図4. 琵琶湖の過去100年にわたる動物プランクトンの変遷

(3) 寄生者の復元:

これまでに過去 100 年分に相当する堆積試料 12 層からウイルス配列の取得に成功した。これらの堆積層から得られたウイルス配列の平均リード数は、 1.6×10^5 、その約半数が ssDNA であり、ターゲットとするウイルスの検出に成功した(図 5)。また、琵琶湖のミジンコ(*Daphnia galeata*・*D. pulicaria*)に感染するウイルスの探索では、現時点で、複製タンパク質と外皮タンパク質をコードする環状 DNA 構造の複数のコンティグが得られ、既知のミジンコ感染ウイルスに類似した配列が検出された。この他、有力な新

規ミジンコウイルスの候補配列を取得できている。今後、ミジンコ感染(関連)ウイルスを特定した後、各時代のミジンコ感染ウイルスの推移を復元するために堆積試料に残る休眠卵から感染ウイルスを検出する作業を実施していく。

一方、本研究から *Micrasterias hardyi* が現在にかけて大増殖する変動過程を初めて明らかにしたが、本種が大増殖できるようになった要因の一つに、寄生性ツボカビの影響が考えられた。実は、植物プランクトンはツボカビに寄生されるとほぼ確実に死亡し、その死滅量が時には膨大となることが知られている。琵琶湖では、優占する植物プランクトンはツボカビに寄生され、時期によっては基礎生産量の20%が消費されるという(Kagami et al. 2006)。琵琶湖で大増殖している *Micrasterias hardyi* に関して、実際にツボカビ感染が確認されている(Hodoki et al. 2019)。そこで本研究では *Micrasterias hardyi* の大増殖が可能になってきた要因の一つに、ツボカビ類による寄生率が減少し、その結果、大増殖が可能になったという仮説を立て、堆積試料中の *Micrasterias hardyi* にツボカビ類の付着があるか否かを計数観察した。

観察の結果、*Micrasterias hardyi* の個体数が急増する時代にもツボカビ付着率は、現場で観察された寄生率とほぼ同じ、3 - 7%程度(Hodoki et al. 2019)で推移していた(図6)。この結果は *Micrasterias hardyi* の増加と共にツボカビの量も増加するが、寄生率はほぼ変わらないことを示唆している。従って、感染率の低下が本種の2000年頃以降の増加に寄与したという説は考えにくいことが明らかとなってきた。しかしながら、寄生性ツボカビの復元は、これまで世界的にも報告例がほとんどないため、ツボカビが湖底に沈降後、堆積試料中に分解されずに長期保存されるのかといった点などを今後、もう少し丁寧に評価検証していく必要があるだろう。

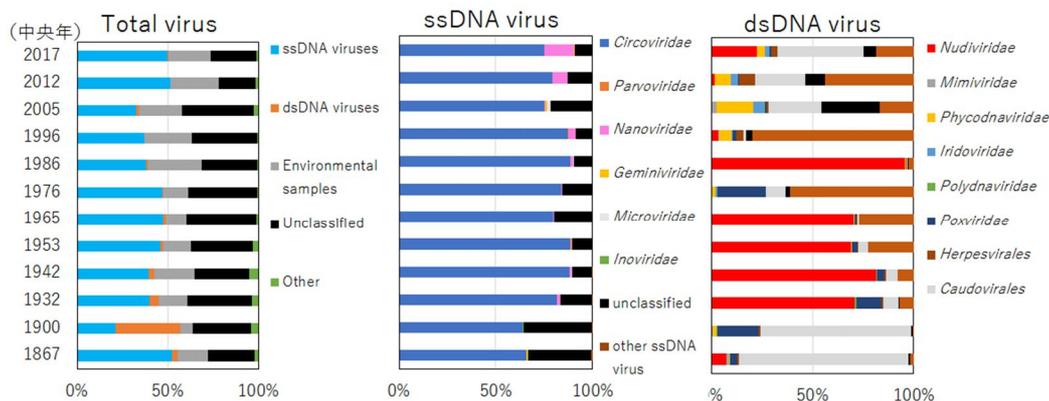


図5. 琵琶湖の過去100年にわたるウイルス叢の変遷

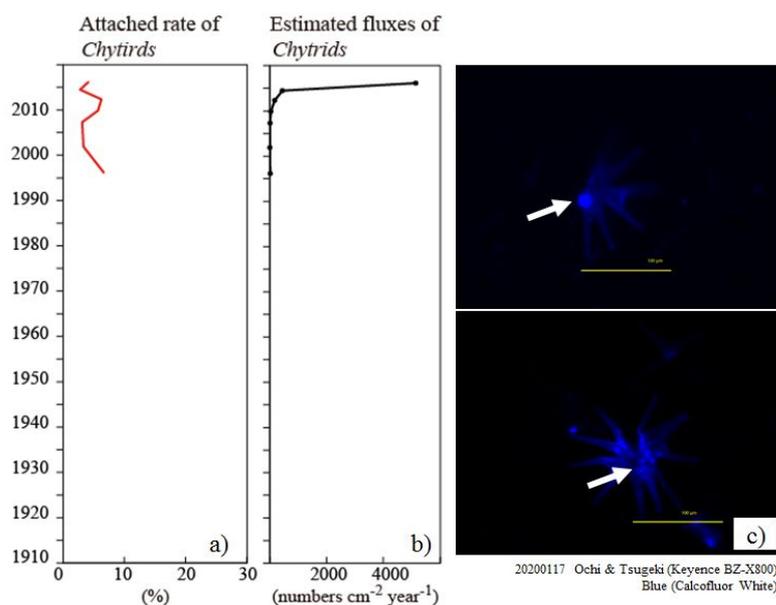


図6 a) *Micrasterias hardyi* に付着していたツボカビ(*Chytrids*)の割合、
b) 付着率から復元されたツボカビフラックスとc) 殻に残るツボカビ(白の矢印箇所)

< 引用文献 >

Appleby and Oldfield (1978) Catena 5: 1-8; Daszak et al. (2001) Acta tropica 78:103-116; Hodoki et al. (2019) Limnology 21: 67-72; Kagami et al. (2006) Limnology and Oceanography 51: 2775-2786

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Michinobu Kuwae, Hiromichi Tamai, Hideyuki Doi, Masayuki K. Sakata, Toshifumi Minamoto, and Yoshiaki Suzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish species abundance 【掲載確定】	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Honjo MN, Emura N, Kawagoe T, Sugisaka J, Kamitani M, Nagano AJ, Kudoh H	4. 巻 14
2. 論文標題 Seasonality of interactions between a plant virus and its host during persistent infection in a natural environment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 506 - 518.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41396-019-0519-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 槻木玲美
2. 発表標題 古代湖・琵琶湖における宿主プランクトンと寄生者の長期変動解析
3. 学会等名 北海道大学低温科学研究所・共同利用 研究集会「環境微生物学における革新的手法および生態系保全における活用法」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本庄三恵、槻木玲美、加三千宣、岡崎友輔、木村成子、吉田天土、左子芳彦、工藤洋
2. 発表標題 琵琶湖堆積物からの過去100年のウイルス叢復元の試み
3. 学会等名 日本生態学会 第66回全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 槻木玲美、本庄 三恵、加 三千宣、早川 和秀、工藤 洋
2. 発表標題 ミジンコ遺骸・DNA情報から紐解く琵琶湖生態系の変化：栄養カスケードに着目して
3. 学会等名 日本生態学会 第66回全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 槻木玲美、本庄三恵、加三千宣
2. 発表標題 琵琶湖の過去100年にわたるミジンコ・ウイルス相解析の試み
3. 学会等名 日本生態学会 第65回全国大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	本庄 三恵 (Honjo Mie) (30450208)	京都大学・生態学研究センター・研究員 (14301)	
研究 分担者	加 三千宣 (Kuwaie Michinobu) (70448380)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授 (16301)	