

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04666

研究課題名(和文) 原生動物による高度不飽和脂肪酸合成と原生動物食物網解析手法の確立

研究課題名(英文) Production of essential fatty acids by protozoa and development of the tool for protozoan food web analysis

研究代表者

藤林 恵 (Fujibayashi, Megumu)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：70552397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物の生存に不可欠な栄養素であるエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸といった高度不飽和脂肪酸はおもに藻類によって合成され、食物連鎖を介して水圏生態系の高次の動物に利用される。本研究では原生動物の繊毛虫にも高度不飽和脂肪酸合成および供給する役割があることを示すために、純粋培養した原生動物の脂肪酸組成を調べるとともに、湖沼において、高次の水生動物に対する原生動物の餌としての寄与を推定するための手法の開発を目的に研究を行った。その結果、繊毛虫1種においてエイコサペンタエン酸の合成能が認められた。また、脂肪酸の炭素安定同位体比を指標とすることによって、湖沼での繊毛虫の餌としての寄与を推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで藻類が担っていると考えられてきた水圏生態系における高度不飽和脂肪酸供給の役割を原生動物も担っている可能性を示した。さらに、申告な湖沼環境問題を引き起こす藍藻を餌とした場合でも、高度不飽和脂肪酸を合成できることが示された。このことは、湖沼の水質改善や生物多様性に対する原生動物の役割が大きいことを示しており、今後は原生動物の機能を活用した生態工学的な湖沼環境改善技術の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Highly unsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid are important nutrients for animal growth, reproduction, and survival. These fatty acids are synthesized by algal species and transferred to higher trophic level through food chain. Here, we aimed to demonstrate that protozoa also have the role of HUFA synthesis and supply to aquatic food webs. In addition, the new methods for evaluation of dietary contribution of protozoa in aquatic ecosystems was developed. We found one ciliate species could synthesize essential fatty acids and EPA. Moreover, we demonstrated that stable carbon isotope ratios of essential fatty acids can be a tracer of ciliate in an aquatic food web.

研究分野：水環境生態工学

キーワード：食物連鎖 脂肪酸動態 湖沼 高度不飽和脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高度不飽和脂肪酸 (HUFA) であるエイコサペンタエン酸 (20:5 3, EPA) やドコサヘキサエン酸 (22:6 3, DHA) は、細胞膜の構成要素やホルモン前駆物質として、あらゆる動物にとって不可欠な栄養素である。水圏生態系において EPA は珪藻、DHA は渦鞭毛藻が主に生産しており、食物連鎖を介して水生動物は直接・間接的にこれらの藻類を摂食・同化し EPA や DHA を獲得している。対して、藍藻は EPA や DHA を含まないため、藍藻が優占しアオコとなり、他の藻類が消滅すると、HUFA の供給路が絶たれる。そのような中、申請者は原生動物繊毛虫が EPA や DHA を体内合成できることを発見した (Fujibayashi et al. 2018) ことで、水圏生態系において、原生動物が食物連鎖を介して高次の動物に HUFA を供給する役割 (特にアオコのように HUFA の供給者が不在の状況で) を果たしている、とする仮説に想到した。この仮説が正しければ、湖沼の水質安定や生物多様性に果たす原生動物の役割は極めて重要であり、原生動物に注目した湖沼環境モニタリングの有効性の提言や、原生動物の機能を活用した生態工学的な湖沼環境の改善技術開発へ資することが期待される。この仮説を検証するためには、アオコ発生時に検出される様々な原生動物にも HUFA の合成能力があることを明らかにし、さらに、それら原生動物が食物連鎖を介して高次の動物に同化されていることを定量的に示す必要がある。しかし、原生動物による HUFA の体内合成に関する研究は海洋の繊毛虫に例があるものの (Johns and Perry 1977; Jøstensen and Landfald 1997; Yazawa et al. 1988)、富栄養湖沼における研究はない。また、原生動物の食物連鎖をトレースする方法も確立されていない。

食物連鎖解析手法として生物に特異的な脂肪酸、すなわち脂肪酸バイオマーカーをトレースする方法が知られている。例えば細菌には i17:0 という他の動物は合成しない特異的な脂肪酸が含まれているため、もし動物サンプルの脂肪酸から、i17:0 が検出されれば、その動物は細菌を餌として同化したと判断される。原生動物に特異的な脂肪酸は報告されていないが、もし原生動物に共通して含まれるが、他の生物には含まれない未知の脂肪酸を検出できれば、原生動物のバイオマーカーとして利用することで、原生動物の食物連鎖を解析する手法開発の端緒となる。

2. 研究の目的

本研究では、様々な原生動物の脂肪酸組成を分析することで HUFA 合成が普遍的な現象であるかを明らかにする。また、HUFA を合成できる原生動物の HUFA 合成量について検討する。そして、原生動物に関する食物連鎖を実環境で調べるためのツールを開発することを目的として、原生動物に特有な脂肪酸マーカーの特定することを目的とした。

3. 研究の方法

原生動物による HUFA 合成の検討

本研究では HUFA として主に EPA、DHA、アラキドン酸 (ARA) に注目した。餌からリノレン酸を得ることができれば、動物によってはリノレン酸を材料として、EPA や DHA を合成することが可能である。また、餌からリノール酸を得ることができれば、リノール酸を材料として ARA を合成することができる。しかし、リノール酸やリノレン酸については一部の例外を除き、動物は合成することができないとされている。

繊毛虫 5 種、鞭毛虫 1 種をリノール酸やリノレン酸を含まない細菌 *Alcaligenes faecalis* を餌として与え、純粋培養した。培養後、原生動物の脂肪酸組成を分析し、リノール酸やリノレン酸が供給されない状況下でも HUFA を合成しているか検討した。

また、HUFA を合成している種については遺伝子解析を行い、種同定を試みた。

高度不飽和脂肪酸合成量の検討

の実験により EPA を合成していることが示された原生動物を対象として、アオコを形成し問題となることが多い藍藻の *Microcystis aeruginosa* を餌として暗条件で培養した。培養後に原生動物の脂肪酸組成を分析し、餌として藍藻を利用した場合でも HUFA を合成可能か検討するとともに、合成が確認された場合は細胞当たりの含有量について検討した。

原生動物の新規トレーサーの検討

の培養実験で分析した各原生動物のクロマトグラム上に未知の共通ピークがあるか検討した。

さらに、秋田県八郎湖において藍藻が優占している 2019 年 6 月に藍藻、原生動物、および水生動物群集を採取し、脂肪酸組成および脂肪酸の炭素安定同位体比を分析した。

4. 研究成果

原生動物による HUFA 合成の検討

1種の繊毛虫においてリノール酸、リノレン酸、EPA、DHAの合成が確認された(表1)。遺伝子の解析の結果、*Uronema rignicans*との相同性が100%であった。

餌として与えた細菌の *A. faecalis* には含まれていない脂肪酸が *U. rignicans* には含まれており、これらの脂肪酸を *U. rignicans* 自身で合成していたと考えられる。ただし、リノール酸、リノレン酸、HUFAの他にも i15:0、a15:0、15:0、a17:0といった脂肪酸が *U. rignicans* から検出されている点に注意が必要である。これらの脂肪酸は主に細菌によって合成されることが知られている。餌として与えた *A. faecalis* には含まれていないことから、*U. rignicans* に共生細菌がいたことを示唆している。深海のように藻類が不在な領域では、共生細菌がHUFAを合成し、宿主の動物に与えている事例も報告されている。のそのため、本実験で確認されたリノール酸、リノレン酸、およびHUFAの合成は共生細菌が担っている可能性も排除できず、今後の課題となった。本研究では合成を担っている主体を特定できなかったものの、繊毛虫が高次の動物に捕食・同化されれば、HUFAが水圏食物網に組み込まれることには変わりなく、*U. rignicans* がHUFA合成と生態系に対する供給機能を有しているとみなすことは可能である。

高度不飽和脂肪酸合成量の検討

藍藻の *M. aeruginosa* を餌として *U. rignicans* を培養した際の両者の細胞濃度の経時変化を図1に示す。暗条件で培養したため、*U. rignicans* を加えなかった対照系でも *M. aeruginosa* 細胞数が低下したが、*U. rignicans* を加えた系の方が減少量が大きかった。*U. rignicans* による摂食の効果によって、*M. aeruginosa* の細胞減少量が大きくなったと考えられた。*U. rignicans* の細胞密度は実験初期に増加したものの、その後は減少する傾向が認められた。*M. aeruginosa* のみを餌とすると安定した増殖が困難である可能性が示唆された。あるいは、餌となる *M. aeruginosa* 細胞数が減少したために、餌不足によって *U. rignicans* が減少した可能性が考えられた。

培養実験最終日に脂肪酸組成を分析した結果、*U. rignicans* から $0.68 \text{ pg cell}^{-1}$ のEPAが検出された。以上の結果は、アオコを引き起こす藍藻を *U. rignicans* が摂食によって細胞密度を抑制するとともに、高次の動物に必要なEPAを生態系に供給する役割を有していることを示している。ただし、餌として *A. faecalis* を与えた *U. rignicans* からは $2.09 \text{ pg cell}^{-1}$ のEPAが検出されたため、餌によってEPA合成の効率が異なることが示唆された。藍藻にはリノレン酸が含まれるが、*A. faecalis* にはリノレン酸が含まれない。そのため、EPAを合成するためには藍藻の方が有利であると考えられたが、藍藻を餌とした *U. rignicans* の方がEPAの含有量は小さかった。

A. faecalis を餌とした *U. rignicans* のEPA含有量を乾燥重量当たりで表すと 2.3 mg g^{-1} となった。水圏生態系においてEPAの主要な生産者である珪藻のEPA含有量が $0.5 \sim 23.1 \text{ mg g}^{-1}$ であり (Peltonmaa et al 2019)、やや低いものの珪藻の生産範囲内にあることが明らかとなった。

原生動物トレーサーの検討

本研究で対象とした繊毛虫、鞭毛虫に共通する未知の脂肪酸ピークは認められなかったが、個々の原生動物からは、同定できなかった複数の未知のピークがクロマトグラムに確認された。今後はさらに分析対象種を増やし、種間で重複する未知ピークが存在を検討するとともに、動態作業を進めていくことが望ましい。

表1 餌として与えた細菌 *A. faecalis* と培養後の繊毛虫 *U. rignicans* の脂肪酸組成 (全体の脂肪酸に対する各脂肪酸の含有率%)

	<i>A. faecalis</i>	<i>U. rignicans</i>
14:0		5.0
i15:0	0.0	2.5
a15:0	0.0	1.2
15:0	0.0	1.5
16:0	51.4	19.4
i17	0.0	6.1
16:1n7c	17.2	5.3
a17:0	0.0	0.8
17:0	0.6	0.0
18:0	1.4	2.4
18:1n9c	0.0	0.4
18:1n7	23.1	27.3
18:2n6c	0.0	3.8
20:0	1.2	0.0
18:3n3	0.0	5.7
18:4n3	0.0	11.0
20:5n3	0.0	8.4
22:6n3	0.0	0.9
Total	100	100

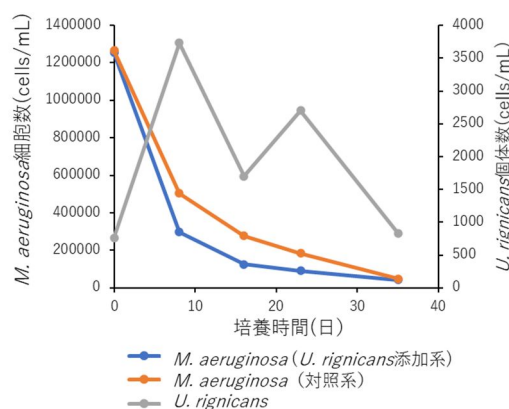


図1 培養実験期間中の *M. aeruginosa* 細胞数および *U. rignicans* 個体数の経時変化

本研究では、秋田県八郎湖で採取した繊毛虫と藍藻類をそれぞれに含まれるリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比を測定した。その結果、繊毛虫と藍藻類のリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比は有意に異なった(図2)。水生動物のリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比は藍藻類と繊毛虫の値の範囲の中に納まっていた。リノール酸やリノレン酸の炭素安定同位体比は食物連鎖の過程でほとんど変化しないと考えられているため(Fujibayashi et al. 2016)、動物間のリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比の相違は、餌としての藍藻および繊毛虫の依存率を表している可能性がある。すなわち、比較的繊毛虫に近い炭素安定同位体比を示した、アミ類、ユスリカは繊毛虫を主な餌として利用しているのに対して、藍藻の値に近いカイアシ類、オナガミジンコ、ワカサギは藍藻を主な餌として直接・間接的に利用している可能性が考えられる。

本研究ではトレーサーとなる物質の特定には至らなかったものの、繊毛虫と藍藻に含まれるリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比に注目することで、繊毛虫類の餌としての寄与を推定することができる可能性が示された。

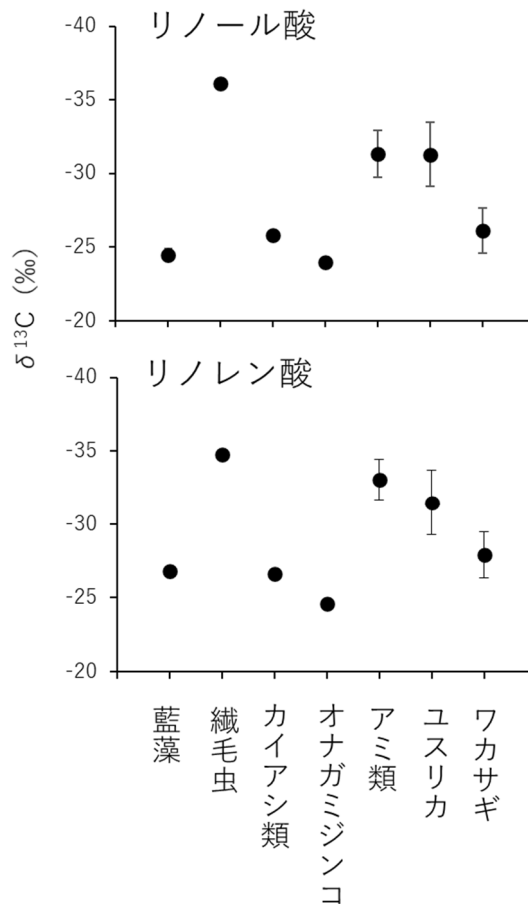


図2 八郎湖で採取した各生物のリノール酸およびリノレン酸の炭素安定同位体比

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李瑞寧、藤林恵、田中伸幸、久場隆広
2. 発表標題 織毛虫による <i>Microcystis aeruginosa</i> の 増殖抑制とエイコサペンタエン酸の合成
3. 学会等名 令和3年度土木学会西部支部研究発表会
4. 発表年 2022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	宮田 直幸 (Miyata Naoyuki) (20285191)	秋田県立大学・生物資源科学部・教授 (21401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------