

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656308

研究課題名(和文) タニシの高度不飽和脂肪酸濃縮機構の解明と生物多様性保全への応用

研究課題名(英文) The mechanism of polyunsaturated fatty acid synthesis by pond snail and application for conservation of biodiversity.

研究代表者

西村 修 (NISHIMURA, Osamu)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80208214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：動物の成長や繁殖に欠くことのできない栄養素である必須脂肪酸が、マルタニシやゼブラフィッシュなどの淡水動物のフンから検出されることが明らかとなった。顕微鏡観察によってフンには多くの原生動物が確認されたが、フンに含まれる原生動物密度と必須脂肪酸含有量には有意な正の相関が検出された。フンに原生動物が集まることで、フンに必須脂肪酸が加わったものと考えられた。フンの元となった餌には原生動物が集まらなかったことから、フンとなることで原生動物を惹きつけるようになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Essential fatty acids including 20:5n3, 20:4n6 and 22:6n3 have been widely known as an important nutrient for animals. Generally, these fatty acids have been considered to be produced by algal species in aquatic ecosystems. In this study, we found that feces from freshwater snail and fish included these essential fatty acids even though these fatty acids were absent in their food sources. We also found that protozoa swarmed on the feces but almost no protozoa were detected on the food sources which was original of the feces in the laboratory experiments. Moreover, significant positive relationship between density of protozoa and concentration of essential fatty acid in the feces were confirmed. It indicates that essential fatty acid in feces would be attributed to the presence of protozoa. Swarm of protozoa on the feces seemed to enhance the nutritional quality of feces in detrital food web.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：腐食連鎖 必須脂肪酸 マルタニシ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪酸の 20:5n3, 20:4n6 そして 22:6n3 は動物の適切な成長や繁殖に欠くことのできない栄養素であり, 20:5n3 と 22:6n3 は 18:3n3 から, 20:4n6 は 18:2n6 から合成される。しかしながら, 動物は体内でこれらの脂肪酸の合成ができない, あるいは必要量を体内合成だけではまかなえないために, 動物はこれらの脂肪酸を餌から取り入れる必要がある。そのためこれらの脂肪酸は必須脂肪酸と呼ばれている。

これらの必須脂肪酸は淡水生態系では主に藻類によって合成される。そのため水生動物は直接・間接的に藻類が合成した必須脂肪酸に依存して生存している。

しかしながら, 著者らは淡水産巻貝マルタニシのフンに, これらの必須脂肪酸が含まれていることを発見した。このことは, マルタニシが体内でこれらの必須脂肪酸を合成し, フンとして排出している可能性がある。前述の通り, 動物が体内でこれらの必須脂肪酸を合成することは知られているものの, それをフンとして排出されているということは知られていない。

もしも, 動物が体内で必須脂肪酸を合成し, フンとして排出していれば, 腐食連鎖において動物のフンが必須脂肪酸の供給源としての役割を担っている可能性があり, 動物間相互作用を評価する上で重要な機構となりうる。しかし, これまで動物の餌とフンの脂肪酸組成について注目して行われた研究は極めて少なく, 水生動物が必須脂肪酸をフンとして供給しうるのか不明である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では動物のフンに含まれる必須脂肪酸に関して以下の点に注目して研究を行った。

(1) マルタニシが体内で必須脂肪酸を合成し, フンとして排泄するか明らかにする。

(2) さらに, マルタニシ以外の動物も同様に必須脂肪酸をフンとして排出する機構を備えているのか, 淡水魚のゼブラフィッシュを用いて検討する。

(3) そして, 必須脂肪酸がフンから検出された場合, その機構について検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マルタニシとゼブラフィッシュに対して, 20:5n3, 20:4n6 そして 22:6n3 を含まない餌を与えて, それぞれ同一の条件で 100 日間以上飼育した。

餌には市販されている緑藻のクロレラタブレットを用いた。また実験期間中, 与えた餌以外の餌を各動物が摂食することがないように, マルタニシの水槽はダンボールで覆うことで遮光し, 藻類の増殖を予防した。さらに, マルタニシの殻上には藻類が発達しているため, 飼育実験前にこれらの藻類をハブ

ラシで削り落とし, 除去した。ゼブラフィッシュの水槽も 2 日に 1 回水を交換して藻類の発生を防ぐとともに, 適宜水を顕微鏡で観察し, 珪藻などの 20:5n3 を含有する藻類の混入がないか確認した。

フンは排出後 24 時間以内に回収し, ファルコンチューブに入れ分析まで 30 で保存した。フンは, 個体数が多い実験前半では 1 日分のフンをひとつのサンプルとした。しかし後半になるにつれて個体数が減り, 1 回の回収では十分な量を確保することが困難になったためフンの量を見ながら 3~7 日間でひとつのサンプルとし, サンプル日はその期間の中間の日付とした。また採集したフンは適宜検鏡し, 必須脂肪酸を合成する藻類種のコンタミンがないか確認した。そして, これらの動物のフンの脂肪酸組成を分析し, 餌に含まれない必須脂肪酸が検出されるか検証した。

(2) 必須脂肪酸 20:5n3 や 22:6n3 は 18:3n3 から合成されることが知られている。そこで, 18:3n3 の炭素の一つを人為的に  $^{13}\text{C}$  に換えている特別なクロレラ ( $^{13}\text{C}$  標識リノレン酸含有粒状クロレラ, SI サイエンス株式会社) を餌としてタニシを 2 週間飼育し, 排泄されたフンに含まれる 20:5n3 および 22:6n3 の炭素安定同位体比を分析し, クロレラに由来する 18:3n3 からこれらの必須脂肪酸を合成しているか検証した。

飼育実験は他のマルタニシの殻上の藻類を食べないように 1 個体ずつ 100ml ビーカーに脱塩した水道水を入れ水温 20 ~ 22 に保ち 14 日間飼育した。実験開始前に体内のフンを十分に排出させマルタニシの殻上の藻類をブラシで除去した。藻類の発生を防ぐため暗条件で飼育し, 2 日に 1 回水を全量交換した。餌はラベルクロレラを 1 錠砕き 2 日に 1 回与えた。回収したフンに食べ残した餌が少量でも混入することを防ぐため, 餌を与えた日は 1 日餌を食べさせ, 翌日は水を全量換えて 1 日フンを排出させ, フンを回収するということを毎日繰り返した。フンは排出後 24 時間以内に回収し, ファルコンチューブに入れ 30 で保存した。

(3) これまでの飼育実験で, フンに多くの原生動物が集まることが観察されたため, ゼブラフィッシュを対象として, クロレラを摂食して排出されたフンを排泄後 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 日目に回収し, フンに存在する原生動物の個体数とフンの脂肪酸組成を測定した。原生動物の計測は 15ml 容の遠沈チューブに入れた。遠沈チューブに入った検体は超音波洗浄機にて 30 秒超音波処理を行った後ボルテックスで 10 から 30 秒ほど攪拌し, 検鏡のためにスライドグラスに滴下する前に 2, 3 回ピペティングを行った。検鏡には界線付スライドグラスを用い, 検鏡で観察される原生動物の種類と個体数を計測した。なお,

一回の検鏡には 0.3ml 採取し、少なくとも 3 回採取し、それぞれ計測を行った。  
 また餌として与えたクロレラも 6 日間、ゼブラフィッシュを飼育している水槽に沈め、回収後に原生動物個体数と脂肪酸の関係を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 餌として与えたクロレラからはごく少量であるが、20:4n6 および 22:6n3 が検出された。本来、緑藻にはこれらの脂肪酸が含まれていない。ごくわずかな量であったため、製造過程の混入などがあつたのかもしれない。マルタニシおよびゼブラフィッシュのフンからは、変動は大きかつたものの、餌として与えたクロレラより多くの 20:4n6 そして 22:6n3 が検出された(図 1, 図 2)。この必須脂肪酸が餌に含まれていたものか、動物が新たに合成したものか、本実験からは判断できないが、少なくとも餌に含まれるより多くの必須脂肪酸がフンから検出され、水生動物に何かしらの必須脂肪酸濃縮機構が備わっていることが示された。

マルタニシ、ゼブラフィッシュそれぞれのフン内における 20:5n3 含有率の経時変化を図 3 に示す。20:5n3 は餌として与えたクロレラからは検出されなかつたが、マルタニシ、ゼブラフィッシュそれぞれのフンからは検出された。含有率は 20:4n6 や 22:6n3 と同様にフンの採集時期によって変動が見られた。また、その存在量はそれぞれフンに含まれる全脂肪酸に対して 1%以下であり、量的にはわずかであつた。しかしながら、餌に含まれていない脂肪酸がフンから検出されたことにより、動物のフンは必須脂肪酸の供給源となり得ることが示唆された。

水生動物のフンは腐食連鎖を介して他の水生動物の餌として利用されることが想定され、今後は動物による必須脂肪酸のフンとしての供給が食物連鎖に果たす役割を解析することが求められる。

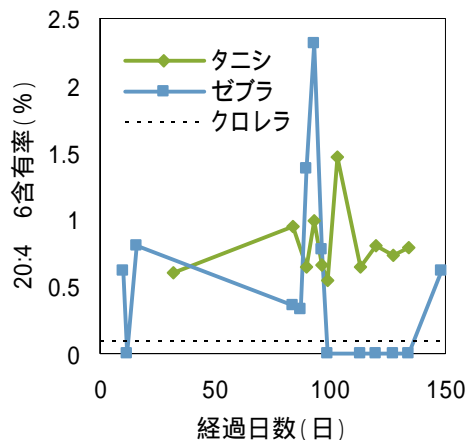


図 1 フンに含まれる 20:4n6 含有率の経時変化

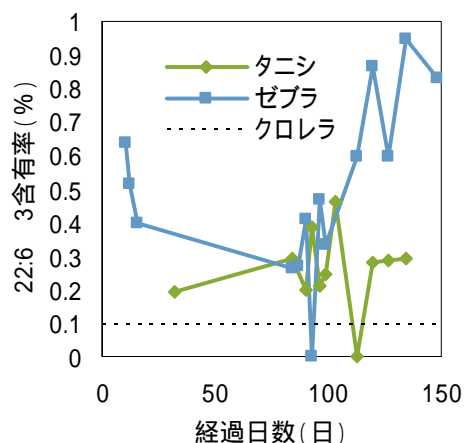


図 2 フンに含まれる 22:6n3 含有率の経時変化

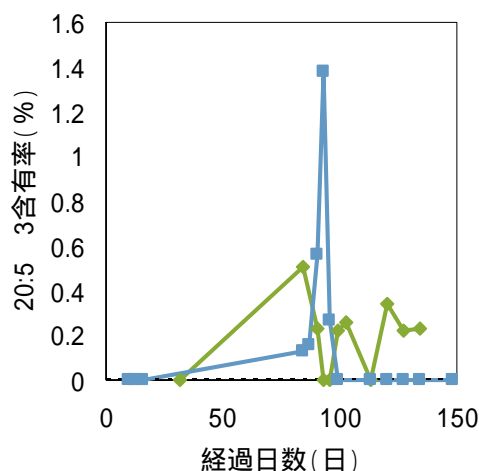


図 3 フンに含まれる 20:5n3 含有率の経時変化

(2)  $^{13}\text{C}$  でラベルした、餌として与えたクロレラの 18:3n3 の  $\delta^{13}\text{C}$  は約 1800‰ であつた。そして、マルタニシのフンに含まれる 18:3n3 の  $\delta^{13}\text{C}$  の値は約 1200‰ であり、おおむね餌に由来する 18:3n3 をフンとして排出していることが分かつた。しかし、マルタニシのフンに含まれての  $\delta^{13}\text{C}$  は 3‰ であつた。餌のクロレラの 18:3n3 から合成したと想定すると、合成の過程で質量数 12 の炭素を選択的に利用したとしても、1300‰ 程度になるはずである。そのため、マルタニシのフンに含まれる 22:6n3 は、直前に摂食した餌であるクロレラの 18:3n3 以外から合成されていることが示された。それが、実験前から体内に蓄えられていた脂肪酸なのか、餌として与えたクロレラに含まれる 18:3n3 以外の部分なのかは今後の検討課題である。

なお、マルタニシのフンに含まれる 20:5n3 の炭素安定同位体比は、脂肪酸の分離が不十分であつたため、本研究では定量することができなかった。

(3) ゼブラフィッシュのフンを、排泄直後のものから、6日後までのものを1日ごとに顕微鏡観察した結果、フンには肉質鞭毛虫、繊毛虫そして袋型動物などの原生動物が多く集まることが分かった。各動物は、実験開始から増え続け、肉質鞭毛虫および袋型動物は2日目、繊毛虫は3日目に個体数のピークがあり、それ以降は減少した(図4~6)。個体密度は繊毛虫がもっとも多く検出され、次いで肉質鞭毛虫、袋型動物であった。また、餌として与えたクロレラもフンと同様に水生動物の飼育水槽に沈めておいたが、原生動物が集まっていなかった。このことは、同じクロレラであっても動物の摂食を受けてフンとして排泄されることで、原生動物を惹きつけるようになるものと理解された。

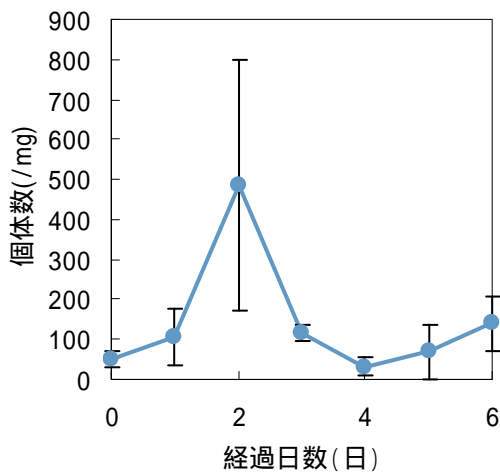


図4 フンにおける肉質鞭毛虫の個体密度の経時変化

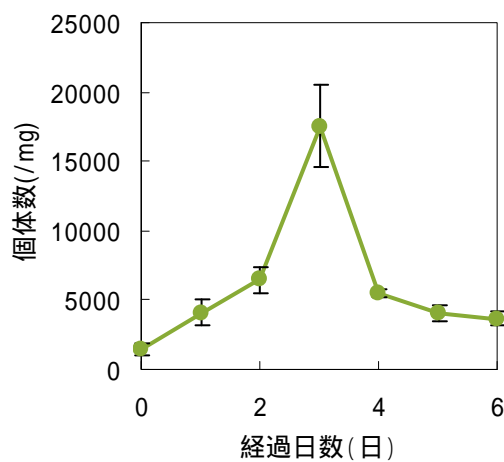


図5 フンにおける繊毛虫の個体密度の経時変化

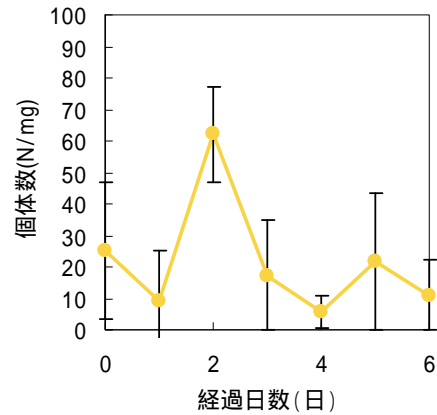


図6 フンにおける袋型動物の個体密度の経時変化

また、フンに含まれる原生動物個体密度と、フンから検出された20:4n6および20:5n3含有率との間には有意な正の相関が検出された(図7, 図8)。この結果を踏まえると、フンから餌に含まれない必須脂肪酸が検出された理由は、フンに原生動物が群がることに起因する可能性が高い。フンに原生動物が群がることで必須脂肪酸含有率が増えたとすれば、それはフンの他動物に対する餌としての栄養的な価値を高めていると解釈できるであろう。ただし、原生動物が実際にこれらの必須脂肪酸を含有しているかは不明な点が多い。そのため、今回の実験で確認された原生動物を、これらの必須脂肪酸を含まない餌で単独培養し、脂肪酸組成を分析することで、今回検出された原生動物がこれらの必須脂肪酸を含有しているか確認することが望まれる。

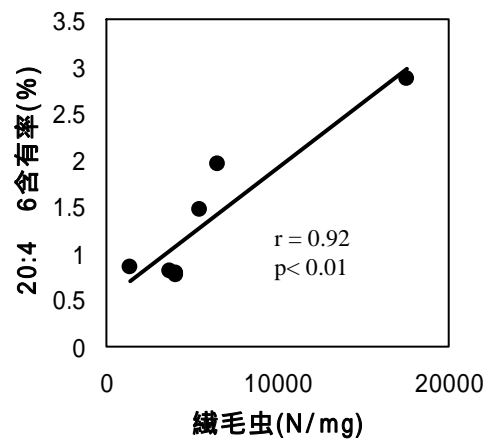


図7 フンにおける繊毛虫個体密度と20:4n6の関係

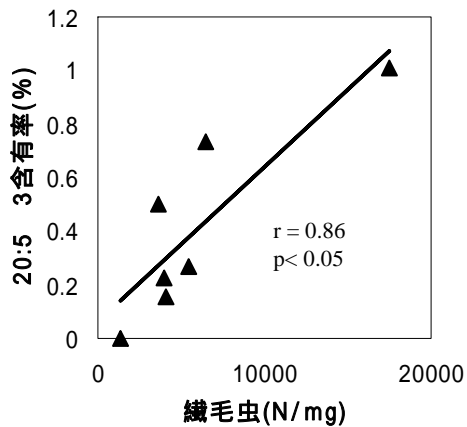


図8 フンにおける織毛虫個体密度と20:5n3の関係

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

高澤綾, 荻野修大, 藤林恵, 相川良雄, 西村修: 必須脂肪酸組成が異なる水生動物種間の同化・排泄特性, 土木学会東北支部技術研究発表会, 2013年3月9日, 仙台

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 修 (NISHIMURA, Osamu)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 80208214

(2)研究分担者

藤林 恵 (FUJIBAYASHI, Megumu)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 70552397