

平成 2 7 年 6 月 1 6 日現在

機関番号：8 5 4 0 3

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：2 5 8 9 1 0 1 3

研究課題名（和文）分子レベル安定同位体比解析を用いた水生昆虫による微生物利用の可視化

研究課題名（英文）Microbial food sources of aquatic insects analyzed by using compound-specific stable isotopes

研究代表者

赤松 史一（Akamatsu, Fumikazu）

独立行政法人酒類総合研究所・品質・安全性研究部門・研究員

研究者番号：5 0 4 6 8 1 4 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、河川生態系における微生物が駆動する物質循環を解明するため、分子レベル安定同位体比分析を用いて、水生昆虫の餌資源利用を調査した。水生昆虫が同化している微生物由来物質は、摂食機能群によって異なっていた。礫上の付着物を餌資源として利用している刈取食者は付着物の安定同位体比を反映していた。河川を流下する粒状有機物を餌資源としている濾過食者は、粒状有機物に含まれる陸上植物由来物質の安定同位体比を反映しており、河川へ流入した外部生産有機物は、微生物を介して水域の食物網に取り込まれていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Microbial food sources of aquatic insects were estimated by using compound-specific stable isotope analysis to reveal microbial driven material cycles in river ecosystems. The origin of microbes assimilated by aquatic insects that varied depending on the feeding function. The compound-specific carbon stable isotope analysis showed that grazers used autochthonous organic materials derived from biofilm on cobbles, while filter feeders assimilated allochthonous organic materials in the particulate organic matter via the use of microorganisms. These results suggest that riverine food webs may take in allochthonous organic matters through use of the microbial food sources by aquatic consumers.

研究分野：生態学

キーワード：水生昆虫 微生物 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

水生昆虫の主要な餌資源の一つである河川水中の粒状有機物は、陸上生産物（陸上植物由来）と河川生産物（付着物由来）の混合物であり、流程を通して主に陸上植物由来物質で構成されている。粒状有機物は、山・川・海をつなぐ主要な物質の一つであり、集水域レベルの物質循環を明らかにする上で欠かせない構成要素である。粒状有機物を構成する物質の起源とその含有率の流程変化は、河川連続体仮説に則って解釈され、河川の上流から中流域にかけては付着藻類の生産力の増加とともに粒状有機物中の付着藻類由来物質の含有率が上昇し、中流域から下流域にかけては付着藻類の生産力の低下とともにその含有率が低下するとされている。水生昆虫の付着藻類由来物質利用もこの流程パターンに対応した形になっているとされている。河川連続体仮説は、欧米諸国の河床勾配の緩い大陸河川での研究を基に検証されてきた。しかし、日本のような急勾配の礫床河川では、下流域でも河床に光が届いており付着藻類の生産がある。このため、粒状有機物への付着藻類の寄与は下流域でも相対的に大きく、日本の河川における水生昆虫の餌資源利用の流程変化は、大陸河川とは異なるメカニズムが介在している可能性がある。

複数の国内河川において河川流程を通して粒状有機物が炭素：窒素比（C/N）の高い陸上植物由来物質主体で構成されているのにも関わらず、粒状有機物のC/Nが低下していることが報告されている。加えて、水生昆虫の刈り取り食者が、流程を通して付着藻類由来物質に依存していた一方で、粒状有機物を餌資源としている濾過食者は、中流から下流にかけて付着藻類由来物質への依存度が低下している現象をバルクの炭素安定同位体比分析により明らかにされている。粒状有機物に利用しやすい付着藻類由来物質が含まれているのにも関わらず、河川の中流域から下流域にかけて濾過食者による付着藻類由来物質の利用低下は、どのようなメカニズムで起きているのか不明である。

粒状有機物中の付着藻類由来物質を主な餌資源としている濾過食者にとって、陸上植物由来物質が主体の粒状有機物のC/Nの低下は、従来はほとんど使われていないとされてきた陸上植物由来物質の同化に寄与している可能性がある。生態学化学量論では、消費者と同程度のC/Nを持つ餌資源が良好な資源であることを示唆している。流域からの栄養塩負荷量の増加にともなって流下有機物上に低いC/Nを持つ微生物が増殖した結果、濾過食者が低いC/Nを持つ微生物を利用可能になり、微生物経由で陸上植物由来物質を取り込んでいる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、分子レベル安定同位体比分析を用いて、水生昆虫による微生物利用を明ら

かにすることにより、従来の全有機態試料を用いた安定同位体比分析では困難だった河川生態系における微生物を介した物質循環を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

琵琶湖流入河川である安曇川及び野洲川の上流と下流を調査地とし、各調査地で河川を流下している粒状有機物を餌資源としている濾過食者のヒゲナガカワトビケラ（*Stenopsyche marmorata*）礫上の付着物を餌資源として利用している刈り取り食者のエルモンヒラタカゲロウ（*Epeorus latifolium*）及びそれらの餌資源である粒状有機物、付着物、陸上植物の葉を採集した。ヒゲナガカワトビケラとエルモンヒラタカゲロウは、日本の河川に広く分布する普通種である。(1)長鎖脂肪酸の分子レベル炭素安定同位体比分析のための試料の前処理方法について、凍結乾燥処理と恒温乾燥処理の検討を行った。野洲川上流地点から採集したヒゲナガカワトビケラとヒラタカゲロウを対象にして、各5個体の胃内容物を除去後、各個体を均等に分割し、一方を-30℃で凍結後、凍結乾燥処理し、残りを60℃24時間の恒温乾燥処理を行った。それぞれの乾燥処理試料を粉末化し秤量後、ヘキサンと2.5%硫酸メタノール溶液を用いて脂肪酸を抽出、メチルエステル化し、各脂肪酸の炭素安定同位体比をガスクロマトグラフ付安定同位体比質量分析計で測定した。その後、(2)野外調査で得た試料の微生物由来長鎖脂肪酸の分子レベル炭素安定同位体比分析を行い、水生昆虫の微生物利用の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 前処理方法

凍結乾燥処理と恒温乾燥処理を行った水生昆虫の試料から抽出した各長鎖脂肪酸の炭素安定同位体比は、2つの乾燥処理間で有意差は検出されなかった。この結果から、水生昆虫の長鎖脂肪酸の炭素安定同位体比分析には、試料の前処理に凍結乾燥処理と恒温乾燥処理のどちらを用いても、適切な同位体比が得られることが明らかになった（図1）。長鎖脂肪酸の沸点は、そのほとんどが200℃以上であるため、60℃の恒温乾燥処理では、蒸発による損失は無視でき、熱変性も起こりにくいのだろう。このため、恒温乾燥処理でも試料に含まれている脂肪酸の炭素安定同位体比を変化させることなく、測定することが可能であったと考えられる。

生態学分野では、野外で採集された生物試料は、一つの試料から乾重量などの複数項目の測定を行うことが多く、多くの場合、60℃前後の恒温乾燥処理が用いられる。このような試料が全有機態の安定同位体比分析にも用いられている。一方、地球化学などの分野で用いられている分子レベル安定同位体比分析では、凍結乾燥処理が主体のため、乾燥

処理の違いによる長鎖脂肪酸の炭素安定同位体比への影響は不明であった。本研究結果は、恒温乾燥処理を行った試料でも、全有機態の安定同位体比分析と同様に、長鎖脂肪酸の分子レベル炭素安定同位体比分析に供することが可能であることを示唆している。全有機態の安定同位体比を得るために恒温乾燥処理された生物試料からも長鎖脂肪酸の炭素安定同位体比が得ることができるため、同一の生物試料から複数の同位体情報を得られ、餌資源利用や栄養段階の詳細な解析に寄与するだろう。

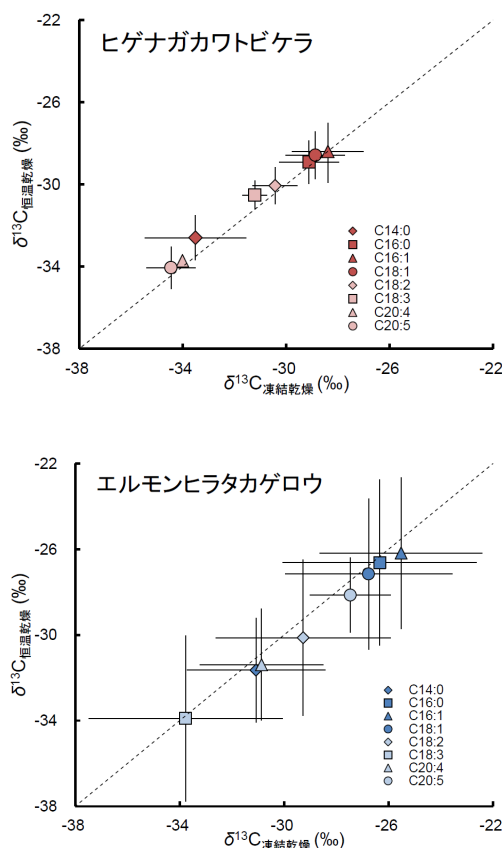


図1．凍結乾燥処理と恒温乾燥処理をしたヒゲナガカワトビケラ及びエルモンヒラタカゲロウからそれぞれ抽出した各長鎖脂肪酸の炭素安定同位体比。1:1の直線上に値が集まっている。

(2) 水生昆虫の微生物利用

琵琶湖流入河川である安曇川と野洲川の上流と下流から刈取食者のエルモンヒラタカゲロウ、濾過食者のヒゲナガカワトビケラ、それぞれの餌資源である付着物、粒状有機物、及び陸上植物の葉を採集し、微生物が主として生産する脂肪酸（パルミトレイン酸）の炭素安定同位体比分析を行って水生昆虫による微生物利用を評価した。

エルモンヒラタカゲロウに含まれている

微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比の平均値は、安曇川では上流地点では-25.0 ‰、下流地点では-25.9 ‰を示し、上流よりも下流側で0.9 ‰低かった。一方、野洲川では上流地点では-33.8 ‰、下流地点では-27.7 ‰を示し、上流よりも下流地点で6 ‰程度高い値を示した（図2）。エルモンヒラタカゲロウの餌資源である付着物の脂肪酸の炭素安定同位体比は、両河川でヒラタカゲロウの炭素安定同位体比と同様の変動を示しており、エルモンヒラタカゲロウの微生物脂肪酸は、付着物由来脂肪酸が起源となっていることが炭素安定同位体比から明らかになった。一方、ヒゲナガカワトビケラの微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比は、安曇川の上流地点では-27.7 ‰、下流地点では-30.1 ‰を示し、エルモンヒラタカゲロウと同様に上流よりも下流の方が低い値を示した。しかし、野洲川ではヒゲナガカワトビケラの微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比は、エルモンヒラタカゲロウとは異なり、上流と下流に大きな違いは見られなかった（図2）。ヒゲナガカワトビケラの餌資源となっている粒状有機物から抽出した微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比は、ヒゲナガカワトビケラの脂肪酸の炭素安定同位体比と同様の変動を示していた。ヒゲナガカワトビケラとエルモンヒラタカゲロウの脂肪酸の炭素安定同位体の河川間の変動の違いは、餌資源の脂肪酸の炭素安定同位体比の違いに起因していた。

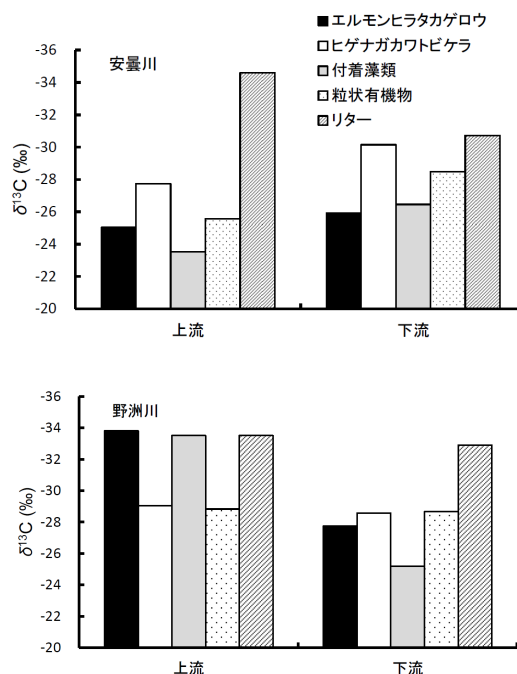


図2．ヒゲナガカワトビケラとエルモンヒラタカゲロウ、それぞれの餌資源である付着藻類、粒状有機物、リターから抽出した微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比。

粒状有機物に含まれている微生物由来脂肪酸は、陸上生産物であるリターと河川生産物である付着物の炭素安定同位体比の両方を反映しており、この結果は、粒状有機物が陸上植物由来物質と付着物由来物質の混合物であることと一致する。また、粒状有機物に付着している微生物は、森林土壌などと同様に、河川水中でも、陸上植物由来物質を基質として代謝していることが示唆される。濾過食者であるヒゲナガカワトビケラは、網に引っかかった粒状有機物を餌資源として利用しているが、微生物由来脂肪酸の炭素安定同位体比の結果から、粒状有機物上の微生物も同時に同化しており、この微生物を介して陸上植物由来炭素を取り込んでいることが明らかになった。これらの成果は、陸上生産物という河川生態系にとって外来性有機物由来炭素が、微生物を介して河川性消費者に同化され、水域食物網に取り込まれていることを示唆するものである。外来性有機物の水域生態系への流入は、微生物が重要な役割を担っている可能性がある。

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)

〔学会発表〕(計2件)

赤松史一、鈴木彌生子、加藤義和、由水千景、陀安一郎「乾燥処理の違いによる脂肪酸の炭素安定同位体比への影響」日本陸水学会甲信越支部会第40回、2014年11月30日、すずむし荘(長野県北安曇野郡松川村)

赤松史一、岡野淳一、藤永承平、加藤義和、由水千景、中野伸一、陀安一郎「脂肪酸分析によるヒゲナガカワトビケラの微生物利用評価」日本陸水学会第79回大会、2014年9月12日、筑波大学(茨城県つくば市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/fumikazuakamatsu/>

6．研究組織

(1)研究代表者

赤松 史一 (AKAMATSU, Fumikazu)

独立行政法人酒類総合研究所・品質・安全性研究部門・研究員

研究者番号：50468146