

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650152

研究課題名(和文)水生動物がアミノ酸を飲む -見落とされていた窒素循環プロセスの解明-

研究課題名(英文)Absorption of dissolved amino-acid by aquatic vertebrates from environmental water

研究代表者

岸田 治 (KISHIDA, Osamu)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：00545626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「水生動物が溶存アミノ酸をエネルギーとして利用する可能性」を孵化直後のエゾサンショウウオ幼生を用いて示すことである。実験の結果、アミノ酸を添加した環境水で飼育したエゾサンショウウオ幼生は、アミノ酸由来の窒素を体内に取り込み、成長を促進させることが分かった。細菌などの微生物が溶存アミノ酸を直接利用し増殖することは一般に認知されているが、脊椎動物による溶存アミノ酸の利用はこれまで想定されてこなかった。本研究の成果は、「これまでの慣習的な栄養伝達経路の有り様」の変更を促すものである。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to suggest a possibility of dissolved-amino-acid-usability for aquatic animals, by using larvae of *Hynobius retardatus* salamanders. As a result of multiple experiments, we show that the salamander larvae took in nitrogen from dissolved amino acids, and promoted their growth when they were kept in environmental water added to amino acids. Until now, aquatic prokaryotes such as bacteria are known to absorb dissolved amino acids directly from environmental water as an energy source for population growth. However, it has been assumed that aquatic vertebrates do not utilize them. The present finding may require the conventional view about energy flow in aquatic systems to be revised.

研究分野：動物生態学

キーワード：水生動物 溶存有機窒素 エネルギー流 栄養カスケード アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は生命体の維持や成長、繁殖に必須の栄養素である。植物と違い、動物は体内で合成できるアミノ酸が少ないため、餌を食うことでそこに含まれる必須アミノ酸を摂取するといわれる。実際に、畜産や魚類養殖の現場では、飼料に必須アミノ酸を強制添加することで生産性を上げている。

自然界においてアミノ酸は生体にのみ含まれるわけではなく、遺骸や排泄物の分解過程で溶出し、遊離アミノ酸として土壌中や水中に存在する。従来、環境中のアミノ酸は微生物によって利用されると言われてきたが、適応論者の視点に立てば、他の生物群による利用も十分に期待できる。事実、最近の研究では、植物が菌根菌との共生関係を通じて土壌中のアミノ酸を吸収し利用すること、その量が多い場合では成長に必要な窒素分の7割にも相当することがわかってきた。動物も環境中に遊離するアミノ酸を利用するのではないだろうか？特に水域では、動物個体が環境水に常に触れており、遊離アミノ酸を摂取しやすい状況にあるだろう。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「水生動物が環境中の溶存アミノ酸をエネルギーとして利用する可能性」をエゾサンショウウオの幼生を用いて示すことである。上記の目的達成のため、5つの実験を行った。

まず実験(1)で、サンショウウオ幼生の成長に影響するアミノ酸の探索を行った。実験(2)では、成長促進効果の高かったアミノ酸の安定同位体トレーサーを用いて、サンショウウオ幼生に対する溶存アミノ酸の利用可能性を調べた。溶存アミノ酸の利用可能性は、高濃度のアミノ酸を含む環境水で幼生を飼育した場合の(i)幼生の成長促進の程度と、(ii)幼生体内へのアミノ酸窒素の取り込みで評価した。実験(3)は、アミノ酸以外の溶存窒素でもサンショウウオ幼生の成長に影響するかについて知見を得るために実施した。これらの実験では、生物的な要因を極力取り除くため、濾過後に煮沸消毒した水を用いて環境水を作成し、1~2日おきに新しい環境水と交換した。

実験(4)は、実験(1)(2)(3)の状況下で、どの程度サンショウウオ以外の生物(細菌や原生動物)が取り除けたかを推論するために実施した。

実験(5)では自然の池から水を採取し、池水の違いがサンショウウオ幼生の成長に影響するかを調べた。自然の池ではエゾサンショウウオが孵化した直後には同種やエゾアカガエルの卵の残骸が多く存在する。実験(5)の目的は、卵の残骸が溶存有機物の供給源となり、エゾサンショウウオ幼生の成長に影響

するかを明らかにすることである。

全ての実験は、孵化直後のエゾサンショウウオ幼生を用いて実施した。本種の孵化直後の幼生は口が未発達で、固形物を食うことができない。孵化直後の幼生を用いることで、餌からの潜在的なエネルギーの取り込みの経路を除去できる。

3. 研究の方法

(1) 成長促進効果をもつアミノ酸の探索

8種類の主要なアミノ酸(チロシン、フェニルアラニン、リシン、セリン、トレオニン、グリシン、アラニン、プロリン)をそれぞれ0.5mMと1mMになるように調整した環境水でサンショウウオ幼生を8日間飼育し、水(コントロール)で飼育した時の成長速度と比較した。

(2) アミノ酸由来の窒素の幼生体内への取り込み

実験(1)で効果の高かったアミノ酸(フェニルアラニン)の安定同位体化合物を用いてアミノ酸由来の窒素の追跡を行った。窒素¹⁵Nで標識された1mMのフェニルアラニン溶液で幼生を6日間飼育し、幼生の成長速度と尾部組織へのアミノ酸窒素(窒素15)の取り込みを調べた。

(3) アミノ酸以外の溶存窒素の成長への影響

アミノ酸以外の溶存窒素として、3種類の無機態窒素(硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸カリウム)と1種類の有機態窒素(N-アセチルグルコサミン:アミノ糖の1種)に着目し、窒素濃度が1mMになるように環境水を作成した。それらの環境水でサンショウウオ幼生を6日間飼育し、水(コントロール)やアミノ酸溶液(本実験ではフェニルアラニン溶液)で飼育した時の成長速度と比較した。

(4) 環境水中の細菌や原生動物の密度

上記実験(1)(2)(3)と同様な方法で調整したアミノ酸溶液とコントロールの水でサンショウウオ幼生を飼育し、水替え前後の環境水中の細菌や原生動物の密度を調べた。

(5) 卵由来の溶存有機物によるサンショウウオ幼生の成長への影響

エゾサンショウウオやエゾアカガエルの卵の密度にばらつきができるように北海道大学天塩研究林内で15ヵ所の自然池を選び、池水を採取した。濾過処理によって非溶存物質や微生物を取り除いた池水を用いてサンショウウオ幼生を10日間飼育し、成長を比較した(本実験では、5日目に環境水を交換した)。

4. 研究成果

(1) 成長促進効果をもつアミノ酸の探索

テストした8種類のアミノ酸のうち、5種類のアミノ酸(チロシン, フェニルアラニン, リシン, セリン, トレオニン)で幼生の成長が著しく促進することを見つけた(図1)。グリシン, アラニン, プロリンで飼育した場合でも、有意差は見られないものの成長速度の平均値は、アミノ酸非添加の場合よりも高かった。この事実は、これらのアミノ酸も幼生の成長を阻害しないことを意味する。また、高濃度の時に高い成長促進効果を発揮するアミノ酸(アラニン, セリン, プロリン)はあったが、高濃度で成長を阻害するアミノ酸はなかった。アミノ酸の種類によって効果の大きさに違いがみられるが、本実験の結果は、概して、「高濃度の溶存アミノ酸はサンショウウオ幼生の成長を促進させる効果をもつ」ことを示す。

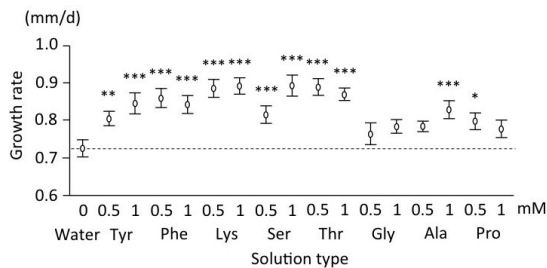


図1. エゾサンショウウオ幼生の成長速度。アスタリスクはアミノ酸非添加の場合(水)と比較した時の有意水準を示す(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

(2) アミノ酸由来の窒素の幼生体内への取り込み

アミノ酸非添加の環境水で飼育した幼生の尾部組織の窒素15の濃度は0.369%で一定だった。一方で、窒素15の標識フェニルアラニン添加の環境水で飼育した幼生では、尾部組織の窒素15の濃度は0.369%よりもはるかに高く、成長速度もアミノ酸非添加の場合より高かった(図2)。以上の結果は、サンショウウオ幼生は環境中のアミノ酸をエネルギーとして取り込むことを示唆する。

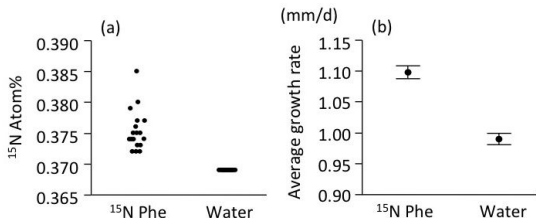


図2. エゾサンショウウオ幼生の尾部組織内の窒素15濃度(a)と成長速度(b)。

(3) アミノ酸以外の溶存窒素の成長への影響

実験(1)(2)と同様に、水で飼育した場合よりもアミノ酸添加の環境水で飼育した場合に、幼生の成長速度は大きかった。一

方で、無機態窒素やアミノ糖を添加した環境水で飼育した場合には、幼生の成長は水で飼育した場合と変わらない、あるいは阻害されていた(図3)。この結果は、本実験でテストしたアミノ酸以外の溶存窒素は、サンショウウオ幼生のエネルギーとして利用されない(少なくとも利用されにくい)ことを示唆する。

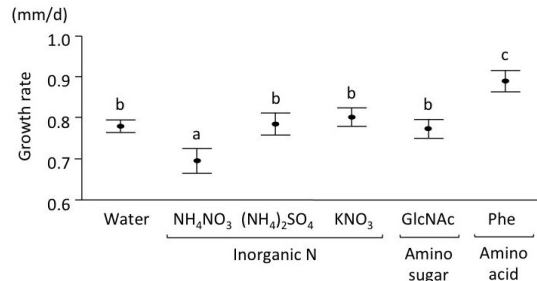


図3. エゾサンショウウオ幼生の成長速度。

(4) 環境水中の細菌や原生動物の密度

サンショウウオ幼生の飼育前の環境水には細菌や原生動物はほとんどいなかったが、2日間幼生を飼育した後の環境水では、高密度で細菌が検出された。一方で、原生動物は飼育後の環境水にもほとんどいなかった(図4)。この結果は、上記の実験(1)(2)(3)では、幼生の飼育中に増える細菌を環境水から取り除けてないものの、原生動物以上の動物は取り除けていたことを示唆する。研究開始当初は、溶存アミノ酸から水性動物へのエネルギー伝達には、動物が溶存アミノ酸を飲むといった直接的な経路を考えていたが、アミノ酸の添加によって増えた細菌を動物が捕食する間接的な経路も考えられる。

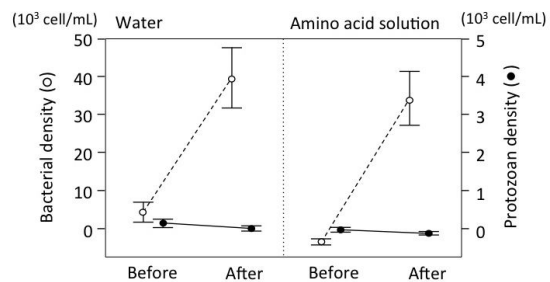


図4. エゾサンショウウオ幼生の飼育前後の環境水中の細菌と原生動物の密度。

本研究から、食物網理論に新しい考えを示すことができるかもしれない。現在の食物網理論では、溶存有機物から水性動物へのエネルギーの伝達は複数の動物が食う-食われる関係で繋がる生食連鎖のボトムアップカスケードを想定している。本研究では、腐食連鎖の初期の段階で放出されるエネルギー(溶存アミノ酸やそれを吸収して増える細菌)も水性動物は利用できるという、これまで見過ごされてきた経路の存在を提唱する。

(5) 卵由来の溶存有機物によるサンショウウオ幼生の成長への影響

サンショウウオ幼生の成長は池水の由来に影響されていたものの、卵が多くあった池水と卵が少ない(含まない)池水との間でサンショウウオ幼生の成長に対する有意な違いは認められなかった。当初の仮説では、「卵の残骸から滲出する溶存有機物が、エゾサンショウウオ幼生のエネルギー源となる」と期待していたが、この仮説は支持されなかった。自然の池においてサンショウウオ幼生のエネルギーとして利用可能な溶存有機物の供給源の特定は、今後の課題である。

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1件)

片山昇, 小林真, 岸田治 「孵化直後の両生類幼生は溶存アミノ酸を体組織に取り込む」日本生態学会第63回全国大会 2016年3月24日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://ok.fsc.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 治 (KISHIDA Osamu)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：00545626

(2) 研究分担者

小林 真 (KOBAYASHI Makoto)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・助教

研究者番号：60719798