

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：21301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15898

研究課題名(和文)陸域植物を利用する水棲無脊椎動物の代謝メカニズムの解明

研究課題名(英文)Relationship between Food and Metabolites in aquatic invertebrates

研究代表者

片山 亜優 (KATAYAMA, AYU)

宮城大学・食産業学群・助教

研究者番号：00740218

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)：本研究では、水棲無脊椎動物における餌となり得る陸上植物から体成分への物質の流れを明らかにした。品質に関わる代謝産物を網羅的に検出することができ、さらに前処理が簡易であるDART-MS装置(JEOL社製)を用いて検討した。ウニ類およびヤマトシジミにおいて陸上植物由来の成分が体内へと取り込まれ、体成分(ステアリン酸など)へと反映されていることを確認した。物質の特定に至らなかった成分も多く検出されたため、今後もさらに検討を続けていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は餌となる陸上植物から体成分への物質の流れを一部明らかにすることができた。陸上植物由来の成分が体内へ取り込まれ、同じ餌料であってもヤマトシジミとウニ類では検出される成分が異なっていた。検出された成分の中には機能性を持つものも検出されたことから、付加価値向上へも繋がる知見を得ることが出来た。餌確保が問題となっている漁業、養殖業の現場において新しい餌料の開発にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the flow of substances from terrestrial plants that serve as food for invertebrates. In this study, we used a Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry that can be analyzed with simple pretreatment. In sea urchins and brackish-water clam, terrestrial plant-derived components were taken into the body and reflected in body components (e.g., stearic acid). We were unable to identify some of the substances detected in this study and will continue to analyze the data.

研究分野：水産増殖学

キーワード：キタムラサキウニ ヤマトシジミ 陸上植物 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

2006年に炭素安定同位体比分析によりヤマトシジミの餌として陸上植物由来有機物(以下、陸上植物とする)の寄与が高いことが示され(Kasai et al., 2006)、翌年にヤマトシジミ自身がセルラーゼを持つことが明らかとなった(Sakamoto et al., 2007)。さらに、その後も次々とセルラーゼ活性を持つ海洋生物が発見されており、海洋生物にとって陸上植物が餌として直接的に重要な役割を果たしている可能性が示唆されてきた。しかし、陸上植物が海洋生物にとって、どのような役割を果たしているのか科学的な証明には至っていない。従って、本研究では、陸上植物がどのような役割を果たしているのかを明らかにする必要があると考え、陸上植物の利用可能性が示唆されるヤマトシジミに焦点を当て、飼育実験を行ってきた。

飼育実験により珪藻給餌では成長するが、落葉した陸上植物のみを餌として与えた場合には成長が認められず、水域に流入する陸上植物は実際にヤマトシジミが餌として利用しているのか解明されていなかった。本研究では、珪藻(微細藻類)と牧草粉末(陸上植物)を餌として用いた飼育実験によりヤマトシジミの成長には微細藻類が不可欠であるが、微細藻類のみを給餌するより、微細藻類と陸上植物を混合させることで成長が増すことを明らかにした。加えて、餌料の炭素、窒素に注目し、ヤマトシジミの成長には多くの炭素を必要とすることがわかってきた。さらに、陸上植物は微細藻類のみでは不足する炭素を補給する重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、なぜヤマトシジミは多くの炭素を必要とするのか明らかにできず、これを明らかにするには、代謝特性を解明する必要がある。

陸域は海域の生態系において重要であるという報告は数多くあるが、陸上有機物が海洋生物に直接的な役割があることは、科学的な証明には至っていない。この直接的な陸域からの物質の流れのメカニズム解明は今後の生態系を考える上での基礎知見になるだけでなく、近年、資源の減少が続くウニや有用二枚貝の養殖餌料への応用が期待される。

代謝メカニズムの解明は生態系の解明に向けた基礎研究に留まらず、応用研究においても学術的に大きな意味を持つものである。アサリを始めとする沿岸生物の資源の減少や、海藻類を主に餌とするウニの食害が沿岸漁業において喫緊の課題となっている。いずれも、餌の確保や餌となる藻類の培養に多額の費用がかかることが問題となっている。一方で、耕作放棄地等においては雑草と言われるマメ科やイネ科植物の処理が問題となっており、これらの陸上植物の餌としての利用が可能となれば、産業界においても大きな影響を与えるものと考えられる。

従って、陸上植物を餌として利用した際の品質に関わる代謝産物への影響をも模索する必要がある。すでにヤマトシジミだけでなく、市場価値の高いウニでも陸上植物の摂食は確認している。ヤマトシジミやウニでの代謝メカニズムが解明されることは、今後の養殖における餌確保に大きな成果となると考える。

2. 研究の目的

安価かつ容易に入手可能な陸上植物を有用水産資源(ウニ類、ヤマトシジミ)の飼料として用いる次世代型陸上養殖を目指すとともに、より付加価値の高い水産物の生産を目指すための基礎知見を得ることを目的とした。陸域と海域を結ぶ新しい物質循環メカニズムの解明は、今後の水産養殖における餌確保に向けて、重要な知見となる。本研究は、餌である陸上植物からの物質の流れを突き止めることで、水域における陸上植物の役割を明らかにする。品質に関わる代謝産物を網羅的に検出することができるメタボローム解析に注目し、陸上植物を餌として利用できるヤマトシジミやウニ類において、陸上植物が生理的のどのような役割を果たしているのかを検討した。メタボローム解析の手法として、本研究ではDART-MS(JEOL社製)による解析を試み、DART-MSによる解析方法についても検討した。

3. 研究の方法

1. 飼育実験による陸上植物由来成分の代謝産物への影響解明

(1) キタムラサキウニの餌料と代謝産物

キタムラサキウニを対象として、陸上植物(マメ科植物:クローバ)および海藻(乾燥コンブ)を給餌したウニが陸上植物を消化・吸収しているのか、炭素・窒素安定同位体比を用いて陸上植物の消化・吸収の有無を調べた。その後、吸収が認められた個体において、脂肪酸組成を比較し、ウニへの餌料の影響を検討した。

消化・吸収が認められたため、代謝産物に差が生じるのか、飼育試験における代謝産物の網羅的解析を行った。2020年度には宮城県石巻市渡波海域にて採取されたキタムラサキウニを用いて飼育試験を行った。水温16°Cに設定した閉鎖型濾過水槽710Lに60個体を収容した。飼料はコントロール区として海藻の塩蔵ワカメを、陸上植物としてクローバを用いた。710L水槽に野菜カゴを浮かべ、51日間飽食となるように餌を給餌させた。飼料による体成分への影響を検討するため、DART-MS装置による網羅的解析を行った。生殖巣を試料として、メタノール0.8mLを用いて抽出した後、遠心分離後、上清を分析に供した。ノンターゲット分析及び主成分分析を行った。2020年度の試験結果を基に2021年度に再試験を行った。2021年度はアカウニを用い

た。コントロール区として海藻のアオサを、陸上植物としてクローバとタケノコを用いた。30日間飽食状態で給餌させた。調温海水かけ流し(19.9~22.9°C)とし、110L水槽でそれぞれ飼育した。3日間隔で3個体ずつ採取し、炭素安定同位体比により陸上植物の吸収の有無を確認後にDART-MSを用いて代謝成分の網羅的解析を行った。

(2) ヤマトシジミの餌料と代謝産物

キタムラサキウニと同様にヤマトシジミを対象として飼育試験を行った。コントロール区として珪藻(*Chaetoceros gracilis*)を陸上植物としてクローバを給餌した。60日間給餌し、成長および軟体部の炭素安定同位体比から消化・吸収の有無を調べた。さらに、軟体部の脂肪酸を分析し、餌料由来の脂肪酸の有無を検討した。

2. フィールドにおける陸上植物由来成分の代謝産物への影響解明

(3) フィールドにおけるキタムラサキウニの代謝産物

宮城県石巻市渡波海域の磯焼けが進行する海域で採取されたウニおよび宮城県女川湾海域で採取された身入りが良いウニを用いてフィールドにおける代謝産物の比較を行った。さらに、天然海域で採取されたウニと飼育試験で陸上植物を摂取させたウニの代謝産物を比較した。これらの代謝産物の比較にはDART-MS装置を用いた。ウニは飼育試験と同様に生殖巣を試料として用いた。前処理方法は上記と同様の手法を用いた。得られた結果はDiablo Analytical製の多変量解析ソフトMass Mountaineerで主成分分析を行った。

(4) フィールドにおけるヤマトシジミの代謝産物

ヤマトシジミは産地や生息環境によって餌料が異なることが言われている。河川および湖に生息するヤマトシジミ(河川:長良川,国分川,高瀬川,増田川,石狩川,名取川,涸沼川,北上川,天塩川,サロベツ川,淀川,湖沼:網走湖,生花苗沼,小川原湖)を採取し、炭素安定同位体比の分析結果から陸上植物由来の餌の寄与が高いヤマトシジミと微細藻類由来の餌の寄与が高いヤマトシジミの分け、それらのヤマトシジミを用いて、代謝産物を比較しフィールドにおけるヤマトシジミの餌と代謝産物の関係を検討した。本分析には餌の影響を最小限にするため足部筋肉のみを試料としてDART-MS分析に供した。ヤマトシジミはウニとは異なり、水抽出を行った。得られた結果はDiablo Analytical製の多変量解析ソフトMass Mountaineerで主成分分析を行った。

4. 研究成果

1. 飼育実験による陸上植物由来成分の代謝産物への影響解明

(1) キタムラサキウニの餌料と代謝産物

キタムラサキウニに海藻および陸上植物を与えて飼育し、飼育後のウニの生殖巣の炭素安定同位体比を分析した。餌料に用いたコンブの炭素安定同位体比は-19.6‰,クローバは-28.6‰であった。コンブ給餌ウニの生殖巣の炭素安定同位体比は-16.5‰を示し、クローバ給餌ウニの生殖巣の炭素安定同位体比は-24.3‰を示した。コンブ給餌区,クローバ給餌区ともにウニの生殖巣の炭素安定同位体比の値は与えた餌料の炭素安定同位体比の値に近づくことが確認された。従って、キタムラサキウニは海藻であるコンブおよび陸上植物であるクローバともに消化・吸収していると考えられた。キタムラサキウニ生殖巣の脂肪酸組成と陸上植物であるクローバの脂肪酸組成を比較したところ、陸上植物由来の脂肪酸である α -リノレン酸がウニの生殖巣へ蓄積することが明らかとなった。さらに、EPAなどの脂肪酸にも影響があることが分かった。

2020年度のキタムラサキウニを対象とした飼育実験では十分に餌の給餌を行うことが出来ず、餌料と体成分との関係を見ることができなかった。2021年度アカウニを対象として試験を行った結果、炭素安定同位体比の結果から陸上植物であるタケノコ給餌区群において餌料として与えたタケノコに近い値にシフトしていることが示され、タケノコ由来の栄養成分が吸収されていることが確認できた。DART-MS分析により陸上植物に特異的なC16, C18が検出された。

(2) ヤマトシジミの餌料と代謝産物

ヤマトシジミにおいても陸上植物給餌区において成長は認められた。一方で、陸上植物由来の脂肪酸 α -リノレン酸などの特異的な脂肪酸はキタムラサキウニと比較し検出量は非常に少なかった。キタムラサキウニとヤマトシジミとでは陸上植物の消化・吸収において脂肪酸の代謝が異なる可能性が示唆された。

2. フィールドにおける陸上植物由来成分の代謝産物への影響解明

(3) フィールドにおけるキタムラサキウニの代謝産物

磯焼け海域個体と天然海域個体で検出された代謝産物に有意な差が認められた。磯焼け海域のウニでは、低分子量範囲(0~400)において質量109.1が減少する傾向にあり、餌料環境が良い環境であったウニでは質量251.1,242.2などの物質に高い傾向がみられた。餌不足であるとうニの生殖巣の成分に影響があることがわかった。これらの検出された物質の推定分子式を求めたものの物質の特定には至らなかった。また2020年度の飼育試験で得られた試料を用いて、天然ウニの代謝産物と比較したが成分に差が表れなかった。その要因として、給餌方法が不十分であり十分に摂餌できる状態になかったと考えられた。

(4) フィールドにおけるヤマトシジミの代謝産物

河川と汽水湖の物理環境の違いにより代謝産物が異なる可能性が考えられるため、河川と汽

水湖の2群に分け,検出された全ての代謝産物を主成分分析に供した.しかし,生息場の違いでは群が分かれなかった.これは河川や湖内においても場所により利用している餌が異なるためであると考えられた.炭素安定同位体比を用いて,陸上植物由来有機物の寄与が高いヤマトシジミ(生花苗沼産)と微細藻類の寄与が高い(国分川産)ヤマトシジミの2群に分け,主成分分析を行った結果,群が分かれた(図).群が分かれた要因を検討するため,国分川産ヤマトシジミと生花苗沼産ヤマトシジミの2群にて因子分析を実施し,寄与が高いと考えられるイオンについて物質の特定を試みた.陸上植物由来有機物の寄与が高いヤマトシジミから陸上植物に多く含まれる成分(質量852.8)などが検出された.

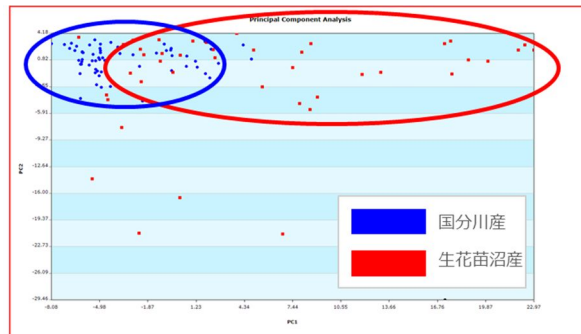


図 国分川産ヤマトシジミおよび生花苗沼産ヤマトシジミの主成分分析結果

ウニ類およびヤマトシジミにおいて,陸上植物を餌として取り込み,体成分へ取り込まれることを明らかにすることができた.今回検出された物質において物質の特定に至らなかった成分も多く検出されたため,今後もさらに検討を続けていく.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川聖裕・栗田喜久（九大院水産実験所）・色川七瀬・庄子真樹・片山亜優（宮城大食産）
2. 発表標題 アカウニ養殖における代替餌料としてのタケノコの有用性
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長沢茜(宮城大食産)・中村幹雄(シジミ研)・庄子真樹・片山亜優(宮城大食産)
2. 発表標題 宍道湖におけるヤマトシジミの食性
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------