

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770030

研究課題名(和文) アミノ酸窒素安定同位体比分析による野生動物の新しい食生態研究法の開発

研究課題名(英文) A new application of compound specific nitrogen isotope ratios analysis of amino acids on feeding ecology study of wildlife

研究代表者

中下 留美子 (NAKASHITA, Rumiko)

独立行政法人森林総合研究所・野生動物研究領域・主任研究員

研究者番号：00457839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸窒素安定同位体比解析は、正確な食物網の解明に役立つツールとして注目されている。本研究では、陸上の野生動物(ツキノワグマおよびヒグマ)に本手法を適用し、精度の高い食生態情報の復元を試みた。その結果、餌が管理された飼育個体と餌が明らかでない野生個体のどちらも、従来のバルク(有機物全体)同位体比分析よりも、本手法が正確かつ詳細な食生態情報を得られることが示された。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the compound specific nitrogen isotope ratios (d15NAA) of amino acids to reconstruct feeding habits of captive Asiatic black bears (food known) and free-ranging black bears and brown bears (food unknown). The results determined by d15Nbulk as a conventional method and by d15NAA method strongly suggested that the d15NAA method revealed more precise feeding habit of animals than the d15Nbulk method. The d15NAA method is a reliable and useful tool for reconstructing feeding habit of wildlife.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生態・環境

キーワード：野生動物 食性 安定同位体比 アミノ酸

1 . 研究開始当初の背景

野生動物の食生態研究

野生動物の食生態研究は、これまで直接観察や GPS による行動追跡といった野外調査研究が主な手段であった。そして 1990 年代半ば以降には、安定同位体比 (主に、炭素： $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、窒素： $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) という化学的手法が用いられるようになった。安定同位体比は、体毛や骨にも保存されるため、剥製標本などからの動物の食性履歴も復元することができる。研究代表者はこれまでツキノワグマなど野生動物の保護管理・被害管理に役立てるため、捕獲個体の同位体分析を行い、食性履歴の推定を行ってきた。

従来の安定同位体比分析の問題点

動物の窒素安定同位体比は、その動物が食べた餌に比べ約 3.3‰ 高い値になる (^{15}N が濃縮する)。これは動物の代謝活動に伴い、 ^{14}N の排出が優先的に起こるためである。そして、この関係を利用することで、動物の栄養段階、すなわち食物連鎖ピラミッドにおける位置を知ることができる。しかし実際には、餌である植物の同位体比の変動 (ときには 10‰ 以上) と、動物の種間 (同じ栄養段階でも餌と組織の同位体分別率が異なる) や体組織間 (筋肉・骨・血液・体毛) の同位体比の不均一性 (ときには 5‰ 以上) が、常に得られる結果の確度と精度を低下させてしまうという大きな問題があった。

新手法・アミノ酸窒素同位体比分析

近年、水棲動物においては、バルク (試料中の有機物全体) としてではなく、試料に含まれる個々のアミノ酸の窒素安定同位体比を用いることで、この問題を解決できることがわかってきた。水棲動物のアミノ酸の窒素同位体比は、餌に対して、非必須アミノ酸であるグルタミン酸で約 8.0‰ 高くなり、一方で必須アミノ酸のフェニルアラニンほとんど変化しない。すなわち、生物に含まれる両者のアミノ酸の窒素同位体比を比較することで、栄養段階や一次生産者の窒素同位体比を推定することができる。このアミノ酸を用いた分析法は、生物の栄養段階を推定するうえで、一次生産者の同位体比を必要としない点と、より正確に栄養段階を推定することができるという点で優れている。しかし、この手法が陸上動物に適用可能かどうかの知見は皆無であった。そのため、陸上生態系や水陸混合系の研究が著しく遅れている主因になっている。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、アミノ酸の窒素安定同位体比解析法を陸上生態系の野生動物に適用し、陸上野生動物の食生態を高い精度で推定できるかどうか検証することである。特にツキノワグマとヒグマを対象とした。クマ類は様々な生息地で多様な食性を示すジェネラリスト種である。本手法をクマ類で検証することにより、他の陸上哺乳類の食性研究への

適用可能性を広げたい。

3 . 研究の方法

本研究は、基礎研究 (1) と応用研究 (2) で構成される。

(1) 飼育個体のアミノ酸窒素同位体比分析

餌をコントロールした飼育ツキノワグマを用いて、試料となる組織や分析方法の検討を行う。また、アミノ酸窒素同位体比から栄養段階を算出し、本手法の妥当性を検討する。

(2) 野生動物の食性解析への応用

野生のクマ類にアミノ酸窒素同位体比分析を適用し、信頼度の高い食性情報の復元を試みる。また、従来のバルク (有機物全体) 同位体比分析と比較し、アミノ酸窒素同位体比分析の有用性を検討する。

4 . 研究成果

(1) 飼育個体のアミノ酸窒素同位体比分析

長期にわたり、トウモロコシ主体の餌で飼育されたツキノワグマ 3 個体の血液 (血漿) を試料とし、各アミノ酸窒素同位体比分析を行った。具体的には、Chikaraishi et al. (2009) の手順にならい、アミノ酸・ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体化を行い、アミノ酸抽出を行った。ガスクロマトグラフィー (GC/MS) を用いて各アミノ酸の同定を行った後、ガスクロマトグラフ燃焼質量分析計 (GC/IRMS) により各アミノ酸の窒素同位体比を測定した。測定したアミノ酸のうち、グルタミン酸 \square $^{15}\text{N}_{\text{glu}}$ とフェニルアラニン \square $^{15}\text{N}_{\text{phe}}$ に着目し、以下の式 [1] に代入し、飼育個体の栄養段階 TP_{AA} を算出した。その結果、飼育個体の餌であるトウモロコシは栄養段階 TP が 0.9 (1)、そのトウモロコシを給餌されたツキノワグマ個体の栄養段階 TP は 1.7 ~ 1.9 (2) という妥当な結果が得られた (図 1)。

$$\text{TP}_{\text{AA}} = (^{15}\text{N}_{\text{glu}} - ^{15}\text{N}_{\text{phe}} - 0.4) / 7.6 + 1 \quad [1]$$

(Chikaraishi et al. 2010)

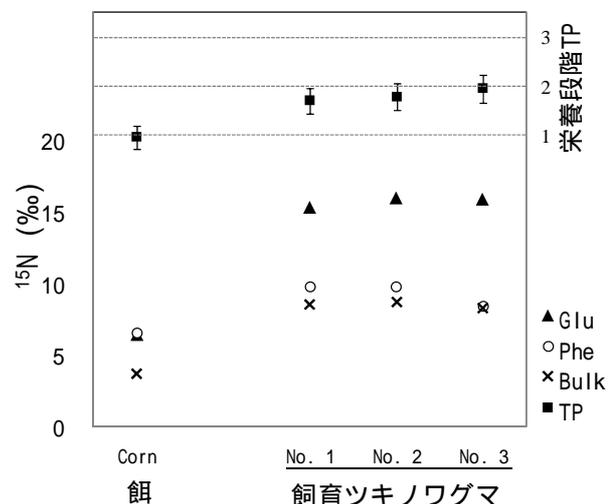


図 1 . 飼育ツキノワグマと餌のアミノ酸窒素同位体比と栄養段階

また、組織の違いや代謝の影響を検討するためにツキノワグマの活動期と冬眠期の血漿と赤血球成分を比較したところ、TP_{AA}は、血漿では1.9~2.0とほぼ正確な結果が得られたが、赤血球では、1.1~1.4と実際より低い値となった。今のところその理由は不明だが、血液を試料として用いる場合は、血漿を対象とするほうがよさそうである。またツキノワグマの活動期と冬眠期の血漿の窒素同位体比を比較したところ、バルク窒素同位体比は餌を絶つ冬眠期に上昇がみられたが、アミノ酸窒素のTP_{AA}は変化がなく、年間を通してほぼ2であった。アミノ酸窒素同位体比による栄養段階の推定は、バルク分析よりも代謝の影響を受けにくいことが確かめられた。

(2) 野生動物の食性解析への応用
野生のツキノワグマとヒグマにアミノ酸窒素同位体比分析を適用し、その有用性を検証した。

ツキノワグマの事例
長野県宮田村にある養魚場にて、ニジマス被害との関連が疑われたツキノワグマ3個体

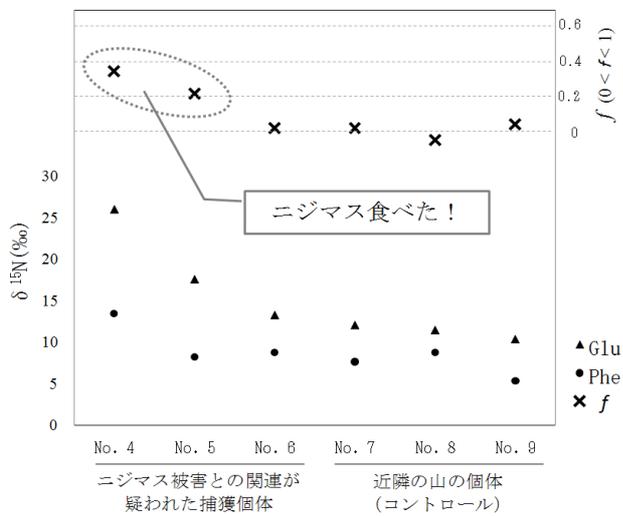


図2. 野生ツキノワグマのグルタミン酸 (Glu) とフェニルアラニン (Phe) の窒素同位体比と各個体のニジマス摂取割合(f)。

ニジマスの寄与率 (f, 0 < f < 1) を推定

$$\delta^{15}N_{\text{bear_Glu}} = (1-f) \times \delta^{15}N_{\text{food_Glu}} + f \times \delta^{15}N_{\text{trout_Glu}} + 8.0 \quad (1)$$

$$\delta^{15}N_{\text{bear_Phe}} = (1-f) \times \delta^{15}N_{\text{food_Phe}} + f \times \delta^{15}N_{\text{trout_Phe}} + 0.4 \quad (2)$$

$$\delta^{15}N_{\text{food_Glu}} = \delta^{15}N_{\text{PP_Glu}} + 8.0 \times (TP - 1) \quad (3)$$

$$\delta^{15}N_{\text{food_Phe}} = \delta^{15}N_{\text{PP_Phe}} + 0.4 \times (TP - 1) \quad (4)$$

$$\delta^{15}N_{\text{PP_Glu}} = \delta^{15}N_{\text{PP_Phe}} - 8.4(R_{C3}) + 0.4(R_{C4}) + 3.4(R_{\text{aquatic}}) \quad (5)$$

$$R_{C3} + R_{C4} + R_{\text{aquatic}} = 1 \quad (6)$$

f : クマが食物として摂取したニジマス由来のタンパク質のフラックス
TP : クマの食物の栄養段階
R : クマの食資源の一次生産者 (i.e. C₃, C₄, aquatic plants)

(1) - (6)の式から、

$$f = (\delta^{15}N_{\text{bear_Glu}} - \delta^{15}N_{\text{bear_Phe}} - X) / (\delta^{15}N_{\text{trout_Glu}} - \delta^{15}N_{\text{trout_Phe}} - X + 7.6) \quad (7)$$

$$X = 7.6TP - 8.4(R_{C3}) + 0.4(R_{C4}) + 3.4(R_{\text{aquatic}}) \quad (8)$$

クマとニジマスのGluとPheは測定値を代入。
No.7-9(コントロール)のf値は0(ニジマスは一切摂取せず)とすると、
X=4.0(式8)となり、式(7)は

$$f = (\delta^{15}N_{\text{bear_Glu}} - \delta^{15}N_{\text{bear_Phe}} - 4.0) / (\delta^{15}N_{\text{trout_Glu}} - \delta^{15}N_{\text{trout_Phe}} + 3.6) \quad (9)$$

式(9)より、No.4-6のニジマス推定摂取割合を算出。

のアミノ酸窒素安定同位体比解析を行い、捕獲個体が実際に加害個体であったかを推定した。コントロールとして養魚場に出没したことのない近隣の中央アルプスに生息するツキノワグマ3個体の血漿と、当該養魚場のニジマスの筋肉も合わせて分析し、個体毎に食性におけるニジマスの寄与率を算出した(図2)。その結果、加害個体と疑われた3個体のうち、1個体は加害個体である可能性が低いことが明らかとなった。残りの2個体は、実際に当該養魚場のニジマスを摂取しており、個体毎にその依存度(それぞれ35%, 22%)を推定することができた(図2)。

ヒグマの事例
国後島に生息するヒグマの信頼度の高い食生態情報を読みとることを試みた。

国後島には世界でも稀な白い体毛のヒグマが存在する。白いヒグマが一定数生息するのは、世界でもこの地域のみとみられているが、その理由は不明である。カナダのブリテイッシュコロンビア州には、白い体毛をもつ個体が約1割いるアメリカクロクマの個体群が存在し、この白いクマは黒いクマよりも魚から見えにくく、効率的にサケを捕食できることから、一定数生息し続けてきたのでは、と報告されている。そこで、国後島の白いヒグマと黒いヒグマの体毛のバルク窒素とアミノ酸窒素同位体比分析を行い、春から秋までの食性を推定した。その結果、バルク分析では両者ともに春から秋に向け、陸上の植物からサケマス類に移行していく食性を示し、その違いはほとんど見られなかった。一方、アミノ酸分析では、どちらも初夏までは陸上生態系の植物食であったが、夏から秋になるにつれ、白い体毛のほうが海洋生態系のサケマスをより豊富に摂取していたことが推測された。バルク分析では、試料に含まれる全窒素の同位体比を測定しているため、食性だけでなく、代謝等、様々な影響を受けたアミノ酸の集合体が含まれる。そのため、食性情報が希釈されてしまい、詳細な食性の違いが検出できなかったと考えられる。一方、アミノ酸窒素同位体比分析では、食性の情報を保持しているアミノ酸を抽出して解析することができるため、より明確に食性の違いが検出できたと考えられる。今回の結果が一般的であるかは、今後試料数を増やし更なる検討が必要だが、食性が多様である野生下においても、アミノ酸窒素同位体比分析は、バルク分析よりも精度よく食性の個体差や季節変化を検出することができた。

まとめ
以上より、アミノ酸窒素安定同位体比解析による食性解析法は、水界生態系だけでなく、陸上の野生動物においても適用可能であり、従来行われてきた生元素安定同位体比分析よりも、精度の高い食生態情報を復元できる有用な手法であることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

中下留美子, 林秀剛, 岸元良輔, 鈴木彌生子, 瀧井暁子, 泉山茂之. 2014. 長野県塩尻市における閉鎖牛舎での捕獲ツキノワグマの家畜飼料依存度. 信州大学農学部 AFC 報告. 12.85-90. 査読有

中下留美子. 2013. 捕まったツキノワグマは何を食べていた? - ツキノワグマの体毛に記録された食性履歴を生元素の同位体比でよみとる - 菌蕈. 59.9-15. 査読無

中下留美子. 2013. 森の研究 わたしのテーマ第32回「体毛から読み解くツキノワグマの食性履歴」グリーンパワー. 417.12. 査読無

R. Nakashita, Y. Suzuki, F. Akamatsu, Y. I. Naito, M. Hashimoto, T. Tsubota 2011. Ecological application of compound-specific stable nitrogen isotope analysis of amino acids - A case study for captive and wild bears. 2011. Researches in Organic Geochemistry. 27:73-79. 査読有

〔学会発表〕(計 6件)

R. Nakashita, Y. Suzuki, K. Kobayashi, T. Ito, H. Nakamura, Y. Masuda, K. Kawai, A. Loguntsev, N. Ohtaishi, Y. Sato, Feeding habits of brown bears (*Ursus arctos*) of the Southern Kurils islands revealed by multi-stable isotope analysis. International Association for Ecology. 2013.8.22. London, UK.

R. Nakashita, Y. Suzuki, K. Kobayashi, T. Ito, H. Nakamura, Y. Masuda, K. Kawai, A. Loguntsev, N. Ohtaishi, Y. Sato, 「生元素安定同位体比解析からみた国後島および択捉島のヒグマの食生態」 Japan Geoscience Union Meeting 2013. 2013.5.23. 千葉県幕張メッセ.

R. Nakashita, Y. Suzuki, M. Shimozuru, Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi, T. Tsubota, Estimation of the trophic position based on stable nitrogen isotopic composition of amino acids - Evaluation of hibernation effect for Asiatic black bears. International Conference on Bear Research and Management. 2012.11.26, Deli, India.

R. Nakashita, Y. Suzuki, K. Kobayashi, T. Ito, H. Nakamura, Y. Masuda, K. Kawai, A. Loguntsev, N. Ohtaishi, Y. Sato, Feeding ecology of brown bears of the Southern Kurils revealed by stable isotope analysis. The 8th International Conference on Applications of Stable Isotope Techniques to Ecological Studies, 2012.8.22, Brest, France.

中下留美子, 小林喬子, 鈴木彌生子, 伊藤

哲治, 中村秀次, 増田泰, 河合久仁子, Andrey Loguntsev, 大泰司紀之, 佐藤喜和「生元素安定同位体比分析を用いて国後島白いヒグマの生態を探る」第72回分析化学討論会. 2012.5.20. 鹿児島大学.

中下留美子, 鈴木彌生子, 佐藤美穂, 坪田敏男「アミノ酸窒素安定同位体比によるツキノワグマの食性解析」日本哺乳類学会 2011年度大会. 2011.9.9-10 宮崎市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中下 留美子 (NAKASHITA Rumiko)
独立行政法人森林総合研究所・野生動物
研究領域・主任研究員
研究者番号: 00457839