

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：64303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650146

研究課題名(和文)代謝マップ同位体比からみた生態系解析研究

研究課題名(英文)Ecosystem structure analysis based on metabolic isotope mapping

研究代表者

陀安 一郎(Tayasu, Ichiro)

総合地球環境学研究所・研究高度化支援センター・教授

研究者番号：80353449

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)：本研究は、従来までの研究で明らかになっていたアミノ酸窒素同位体比を用いた生食連鎖栄養段階推定方法に関して、微生物が介在する腐食連鎖の観点を入れた「代謝マップ」の概念で整理することを目的とした。具体的には、陸上生態系においては植物遺体 - 菌類 - 土壌動物の系について、水域生態系においては湖沼における粒状有機物の分解系について、その動態を調べた。その結果、微生物の関わる腐食連鎖系においては、フェニルアラニンとグルタミン酸の窒素同位体比の動態が異なることがわかり、食物網構造の研究については十分な注意が必要ながわかった。

研究成果の概要(英文)：The project aimed at testing the use of nitrogen isotope ratios of individual amino acids for studying ecosystem structure focusing on detritus food chain. Previous studies have shown that nitrogen isotope ratios of individual amino acids can provide trophic positions of living organisms without referring to the food bases. However, change in nitrogen isotope ratios of amino acids on the trophic transfer has mostly studied in the grazing chain, but not well been studied in the detritus chain. In this study, we showed the behavior of nitrogen isotope ratios of amino acids in model systems both terrestrial and aquatic ecosystems. The results indicated that nitrogen isotope ratios of phenylalanine and glutamic acid behave differently in decomposition process, and suggest that the potential usefulness of the approach on the study of ecosystems.

研究分野：同位体生態学

キーワード：安定同位体 微生物 アミノ酸 土壌 粒状有機物

1. 研究開始当初の背景

本研究が着目とするのは「代謝マップ」である。代謝マップとは、生物における代謝の経路あるいはそれらからなるネットワークを図式化したものをいう。代謝マップ上に記述される反応は酵素で触媒されるため、反応速度論で記述される。反応速度論に最も影響を受けるのは、基質と代謝産物の安定同位体比の関係である。例えば、窒素固定では、本来 $N \equiv N$ の三重結合を切断しなければいけないので大きな同位体分別（生成物のアンモニア(NH_4)の窒素同位体比が著しく低くなる）が起きるはずだが、生物学的窒素固定においては酵素反応の影響で 0~2‰程度の変化しか起きない。このように、「代謝マップ同位体比」からみた生態系を見ると、その分子がたどってきた道筋が見える。本研究では、特に生物体をつくる基本単位であるアミノ酸に着目し、生態系解析の新しい手法を開発することを目指した。

アミノ酸同位体比の解析手法は、近年開発された方法である。Chikaraishi *et al.* (2009: *Limnol. Oceanogr. Method* 7: 740-750)は、対象生物のグルタミン酸(Glu)とフェニルアラニン(Phe)の窒素同位体比の差をとるだけで「アミノ酸栄養段階 ($TL_{Glu/Phe}$)」が求められることを報告した。すなわち、 $TL_{Glu/Phe} = (\delta^{15}N_{Glu} - \delta^{15}N_{Phe} + \beta) / 7.6 + 1$ (式 1: ここで β は、水域生産者で-3.4‰、陸上 C3 植物で+8.4‰)。これは、栄養段階によって Glu の $\delta^{15}N$ は 8.0‰上昇するが、Phe の $\delta^{15}N$ はわずか 0.4‰しか上昇せず、その差が 1 栄養段階について 7.6‰ずつ開くことに基づく。しかし、この式は「必須アミノ酸」が存在する動物のみの連鎖に基づいており、微生物が介在する系ではどのように変化するかについて明らかにならなかった。

2. 研究の目的

アミノ酸窒素同位体比には、生物の代謝の根本にある「アミノ酸代謝」の特徴が込められている。しかしながら、近年急速に進んでいるアミノ酸窒素同位体比を用いた生態系の研究では、基本的に、生きた植物を動物が食べる「生食連鎖」を扱っている。しかし、「腐食連鎖」では、バクテリアや菌類といった微生物の代謝も織り込んだ「生態系の代謝」を考える必要がある。本研究においては、これらを考える上で基本となる腐食連鎖に関わる事象について研究を行う。代謝マップに着目することにより、アミノ酸窒素同位体比を用いた研究を地球上のすべての生き物に適用することができる可能性について検討する。

具体的には、陸上生態系においては植物遺体-菌類-土壤動物の系について、また水域生態系においては湖沼における粒状有機物(POM)の分解系についてその動態を調べることにより、微生物の関わる系においてアミノ酸窒素同位体比の動態に関する基本的知識

を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

研究に関しては以下の3項目を中心とし、さらに追加的に関連する研究を行った。

(1) 水域研究に関しては、琵琶湖における粒状有機物の分解過程について研究を行った。海洋や大型湖沼においては、粒子状有機物の窒素安定同位体比が、表層から深層にかけて深度とともに上昇するという現象が知られている。本研究では、琵琶湖で採取した湖沼有機物の分解実験を行い、アミノ酸窒素安定同位体比を分析することで、湖沼深水層での有機物分解過程における窒素同位体比の変動要因の解明を試みた。

有機物分解実験用の湖水は、琵琶湖北湖近江舞子沖の定点（水深 76 m）にて深度 2.5m ならびに 50m から採取した。得られた湖水は実験室に持ち帰った後、ポリカーボネートタンクに分注し、暗条件下、現場温度に近い温度で培養した。培養期間中（42~96 日間）の懸濁態窒素濃度とその安定同位体比、ならびに懸濁態アミノ酸濃度とその安定同位体比の経時変化を調べた。

(2) 陸上生態系で生産された有機物のうち、生食連鎖で動物に利用される以外の大部分は腐植分解プロセスを経て土壤有機物として蓄積される。土壤圏に生息する動物は、枯死したばかりのリターから、分解プロセスの中間段階の有機物、また土壤そのものを利用することで生存している。一方、土壤動物の餌となる資源は目視することが難しいため、何らかの指標を用いて特定することが必要となる。いままで、炭素・窒素安定同位体比や放射性炭素 14 などの手法を用いて研究が行われてきたが、本研究では、アフリカ及びアジア熱帯の C3 植物からなる森林及び C4 植物からなる草原で採取された、食性の異なるシロアリとミミズを用い、アミノ酸窒素安定同位体比（特にフェニルアラニンとグルタミン酸）分析を行なった。

(3) 陸上生態系における腐食連鎖は、微生物による植物の分解から始まる。本研究は、白色腐朽菌を含む腐食連鎖(木材-白色腐朽菌-菌食昆虫)に関して、アミノ酸窒素安定同位体解析による栄養段階上位置 (TP) の推定を行うことを目指した。具体的には、生物間の関係が明らかな、京都市左京区瓜生山で採集した木材（コナラ *Quercus serrate*、アベマキ *Quercus variabilis*）、白色腐朽菌(クジラタケ *Trametes orientalis*)および菌食昆虫 (ルリオオキノコ *Aulacochilus sibiricus*) のアミノ酸窒素安定同位体比を測定した。

クジラタケは倒木から出ている子実体を採集した。木材に関しては、クジラタケが生えている倒木を腐朽材としてのこぎりによりディスク状で採集し、倒木のそばに生えている腐朽材と同種の生木の枝、あるいは辺材

をナイフで削り取り採集した。腐朽材は 17 サンプルを採集し、それぞれの腐朽材から生えているクジラタケを 24 サンプル（同一腐朽材から 2 サンプル採集したものを含む）、さらにそれぞれのクジラタケ内部にいるルリオオキノコを 57 サンプル（同一クジラタケから複数サンプル採集したものを含む）採集し、生木は 10 サンプル（一部、異なる腐朽材に対し同一の生木サンプルを採集対象とした）を採集した。

4. 研究成果

(1)実験中の各種アミノ酸濃度の変化は、ほとんどの場合全窒素と同様の傾向を示した。各種アミノ酸の窒素安定同位体比は、総じては全窒素安定同位体比と同様の変化を示した。しかし、一部の実験では、ほとんどのアミノ酸の同位体比が全窒素と同様に実験開始初期から増加したのに対して、グリシンとセリンは 28 日目までは大きな変化は見られなかった。

ほとんどのアミノ酸は、代謝の初期反応がアミノ基の脱離反応であるため、代謝にともない ^{15}N が濃縮、同位体比が増加する。一方で、メチオニンやフェニルアラニンなど、代謝反応の初期反応にアミノ基が関わらないアミノ酸では、代謝にともなう同位体分別が起こらず、同位体比の変動がほとんどみられない。深水層において窒素同位体比が高くなる要因として、捕食による ^{15}N 濃縮の寄与が指摘されているが、琵琶湖北湖沖帯においては、代謝の影響を受けないアミノ酸であるフェニルアラニンは、時空間的に、全窒素と同様の変動を示していることから、琵琶湖深水層における窒素安定同位体比の上昇要因として、捕食の効果はほとんど寄与していないことが示唆された。

有機物分解過程においては、ほとんどのアミノ酸の同位体比は、全窒素と同様の変動パターンを示し、また、相対的に軽い同位体比を持つアミノ酸（グリシン、セリン）は易分解性ではないことから、琵琶湖においては、分解にともなう ^{15}N が濃縮する要因として、相対的に軽い値を持つ易分解性の成分による効果はほとんどないことが示唆された。しかしながら、懸濁物を採取した季節や深度によって、分解に伴う全窒素安定同位体比の変動パターンは異なっており、また各種アミノ酸の同位体比の変動パターンも異なることがあった。微生物分解過程における窒素同位体比の変動機構を明らかにする上では、有機物の性質や環境、微生物の懸濁物への寄与率なども含めて、より詳細に検討する必要があるだろう。

(2)食性の異なるシロアリとミミズに関して、バルク窒素同位体比の大きく異なる分解初期利用種と分解後期利用種でアミノ酸間の窒素同位体比の差はほとんどなかった（図 1）。これは、腐植食性の土壤動物に特有の

パターンかもしれない。また、キノコと共生するキノコシロアリについて測定したところ、餌となる植物リターからキノコへの変換パターンは、グルタミン酸の窒素同位体比の上昇を伴わないものであった。

これらのデータは、代謝マップ上に位置付けられる陸域分解系における土壤動物の資源利用は、新たなパターンを示すことを示唆する。今後は分解パターンとアミノ酸同位体比の挙動を研究する必要があると考えられる。

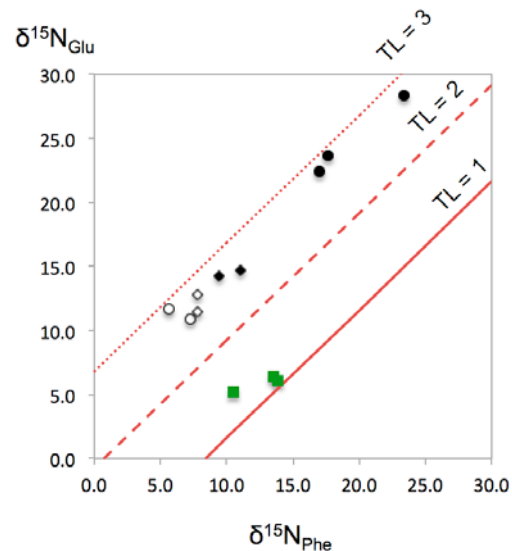


図 1 食性の異なるシロアリとミミズのプロットと材のデータ

(3)アミノ酸窒素安定同位体比によって求めた TP の結果（Chikaraishi *et al.* 2009 により計算）は、生木について 0.5 と低い値をとり、生木からクジラタケにかけて TP が約 2.0 と大きく上昇した。一方、クジラタケからルリオオキノコにかけては TP が約 0.6 とあまり上昇しなかった。各アミノ酸別に示すと、木材-クジラタケ-ルリオオキノコの順にフェニルアラニンの窒素安定同位体比が減少し、グルタミン酸の窒素安定同位体比についても上昇量が低いという、Chikaraishi *et al.* (2009, 2011) の結果と異なった、今までに報告例のない特異な変動パターンが得られた。しかし一方で、アミノ酸窒素安定同位体比から推定した TP の種内のばらつきはとても小さく、腐食連鎖においてもアミノ酸窒素安定同位体解析による TP 推定を行える可能性が示される結果となった。

これらの特殊な関係が見られたことについての理由については、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ の動態に関係すると考えられる。生木からクジラタケにかけて $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ の値が減少していた。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ を減少させる可能性のある要因としてフェニルアラニンの合成があげられる。フェニルアラニンは、フェニルピルビン酸から複数の段階経路を経て、最終経路でフェニルピルビン酸にグルタミン酸由来のアミノ基が転移されることで合成される。この最終経路のアミノ

基転移反応において、動的同位体効果によって $\delta^{15}\text{N}$ の低いアミノ基をグルタミン酸から受け取った $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ の値は、体内の $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ よりも低いものとなると考えられる。本研究の結果では、生木の $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ よりもクジラタケの $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ の方が低くなっており、仮にフェニルアラニンがクジラタケ体内で合成されているならば、その $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ は生木の $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ よりも低くなると考えられ、フェニルアラニンの合成は今回のクジラタケの $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ の減少の理由となりえると考えられる。しかし、クジラタケによるフェニルアラニンの合成を示した研究はなく、仮説の検証が必要であり、クジラタケの培養実験により、始めに与えた培地のフェニルアラニン量を、残った培地とクジラタケ体内のフェニルアラニンの合計量が上回るかどうか調べることでこの仮説を検証できると考えられる。

これらより、アミノ酸窒素安定同位体解析により、微生物の介する代謝系では特異なパターンを示すことが明らかになり、生食連鎖のみを想定した栄養段階上位位置 (TP) の計算では腐食連鎖も含めた TP の見積もりに関してはさらなる検討の必要があることが示された。

(4)その他、生食連鎖と腐食連鎖が混合する森林生態系や河川生態系に関する研究、アミノ酸や脂肪酸分析を用いて生態系の構造解析を行う研究などを行い、同位体比手法を元にした生態系構造解析についての研究成果を発表した。

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 3 件)

- (1) Ishikawa, N.F., Kato, Y., Togashi, H., Yoshimura, M., Yoshimizu, C., Okuda, N. and Tayasu, I. (2014) Stable nitrogen isotopic composition of amino acids reveals food web structure in stream ecosystems. *Oecologia* 175: 911-922.
doi: 10.1007/s00442-014-2936-4
- (2) 加藤義和, 陀安一郎 (2014) 「安定同位体分析が拓く環境科学の地平」(Horizons of environmental science broadened by stable isotope analysis) *環境技術* 43(4):209-214.
- (3) Haraguchi, T.F., Uchida, M., Shibata, Y. and Tayasu, I. (2013) Contributions of detrital subsidies to aboveground spiders during secondary succession, revealed by radiocarbon and stable isotope signatures. *Oecologia* 171: 935-944.
doi:10.1007/s00442-012-2446-1

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 後藤洋加, 梅澤有, 天野雅男, 山口敦子, 由水千景, 陀安一郎, 原田一孝, 石橋敏章

「アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値を用いたスナメリの栄養段階推定式の改良と長崎周辺個体群の摂餌生態」2014年度日本海洋学会秋季大会, 長崎大学, 長崎, 2014.09.14

- (2) 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, 筑波大学, つくば, 2014.09.12
- (3) 原口岳, 陀安一郎 「同位体分析における測定誤差の解析: 較正直線による補正を行なった場合の誤差の表記と計算について」日本生態学会第61回大会, 広島国際会議場 2014.03.17
- (4) 原口岳, 陀安一郎 「同位元素を用いた食物網の記述」個体群生態学会, 大阪府立大学, 中百舌鳥, 2013.10.12
- (5) 由水千景, 陀安一郎 「微生物分解に伴う湖沼有機物の窒素安定同位体比の変動」日本陸水学会第78回大会, 龍谷大学 2013.09.11
- (6) 原口岳, 太田藍乃, 中森泰三, 藤井佐織, 萩原佑亮, 菱拓雄, 森章, 水町衣里, 大園享司, 陀安一郎 「羅臼岳における標高傾度に沿った地表性クモ類の群集変化」日本蜘蛛学会第45回大会, 高知大学 2013.08.24
- (7) 陀安一郎 「生物の同位体比から得られる生態系・生物多様性情報について」“On the information of ecosystem and biodiversity obtained from isotope ratios of living organisms” 日本地球惑星科学連合2013年大会、幕張メッセ、千葉 2013.05.23

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

陀安 一郎 (TAYASU ICHIRO)

総合地球環境学研究所・研究高度化支援センター・教授

研究者番号: 80353449