

氏名	菅原 巧太朗
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	淡水二枚貝タテボシガイの藍藻資化能の評価と環境 DNA を用いた湖沼におけるモニタリング手法に関する研究
指導教員	教授 宮田 直幸
論文審査委員	主査 教授 宮田 直幸 副査 教授 高橋 正, 准教授 岡野 邦宏 学外 教授 清 和成 (北里大学)

## 論文内容要旨

淡水環境でのアオコ形成藍藻類の発生は水質悪化を引き起こし、利水障害や健康被害、生態系の劣化など様々な影響を及ぼす。近年、アオコの生態工学的抑制手法として、ろ過摂食動物を用いて藍藻類を除去するバイオマニピュレーションが注目されている。淡水二枚貝は植物プランクトンをろ過摂食するが、藍藻類に対する資化能力は十分に明らかにされていない。また、湖沼等で淡水二枚貝の定着や生息区域の拡大を図るためには、生息密度の観測や生息区域の特定が不可欠であり、従来の採捕調査に代わる効率的なモニタリング手法の構築が課題である。本研究では、淡水二枚貝を利用したアオコ抑制手法の構築に向けて、日本の淡水域の主要な二枚貝であるタテボシガイ (*Nodularia nipponensis*) を対象として藍藻資化能力を明らかにすること、及びタテボシガイを特異的に検出する環境 DNA (以下、eDNA) 手法を構築し、湖沼環境でのモニタリング調査に適用することを目的とした。

### (1) 室内水槽実験によるタテボシガイの藍藻資化能力の評価

室内での短時間 (33 時間) の水槽実験において、藍藻 *Microcystis aeruginosa* NIES-44 株及び緑藻 *Chlorella vulgaris* をそれぞれ給餌して摂食速度と排泄速度を測定し、さらに炭素量を熱量に変換して資化速度を算出した。*C. vulgaris* は比較対象として用いた。両藻類ともに 15°C と 25°C の温度条件では、餌料濃度を低濃度 ( $\sim 5 \text{ mg C L}^{-1}$ ) から高濃度 ( $\sim 21 \text{ mg C L}^{-1}$ ) に増加させると、摂食速度は増加するが、排泄速度は有意には増加しないことが示された (図 1)。摂食速度と排泄速度の差から求めた資化速度は摂食速度の影響を強く受けており (図 2)、25°C の高水温条件でも餌料となる藻類濃度に依存して資化能力を発揮するとの結果が得られた。

$^{15}\text{N}$  標識した上記 2 種の藻類を単一餌料として、2 日おきに長期間 (80 日) タテボシガイに与え、タテボシガイ筋組織中の  $^{15}\text{N}$  含有量を安定同位体比質量分析装置で定量した。試験期間におけるタテボシガイ個体当りの餌料総負荷量は、*M. aeruginosa* で  $516 \pm 38 \text{ mg}$ 、*C. vulgaris* で  $451 \pm 46 \text{ mg}$  となり、各水槽の藻類の除去率から摂食した藻類量を算出すると、1 個体当り *M. aeruginosa* で  $332 \pm 20 \text{ mg}$ 、*C. vulgaris* で  $300 \pm 36 \text{ mg}$  であった。タテボシガイ筋組織中の窒素安定同位体比は、実験開始時に天然存在比に相当する  $8.1\text{‰} \pm 0.2\text{‰}$  であったが、80 日後には *M. aeruginosa* で  $151\text{‰} \pm 86\text{‰}$ 、*C. vulgaris* で  $153\text{‰} \pm 35\text{‰}$  まで増加し、 $^{15}\text{N}$  標識した各藻類を資化したことが明らかになった (図 3)。 $^{15}\text{N}$  積算摂取量に対するタテボシガイ筋組織の  $^{15}\text{N}$  蓄積量の比をとって資化効率を求めた

結果、*M. aeruginosa* では少なくとも 60 日間にわたって一定の効率 (47%) で資化していたことが判明した (図 4)。緑藻 *C. vulgaris* の資化効率は 37% と算出され、藍藻に対する資化能力が低いとは認められなかった。さらに、タテボシガイ筋組織に移行した藍藻・緑藻由来脂肪酸 (リノール酸及び  $\alpha$ -リノレン酸) の含有率は飼育期間中、微増傾向にあり、一方で試験中に供給されなかった珪藻由来脂肪酸 (エイコサペンタエン酸) の含有率は減少傾向にあることが示された (図 5)。これらの結果から、藍藻・緑藻由来脂肪酸の珪藻由来脂肪酸に対する比をとることで、藍藻・緑藻の資化を追跡できると推察された (図 5)。

*M. aeruginosa* を摂食させて回収された排泄物中の *M. aeruginosa* の生細胞をフルオレセインジアセテート法で計数した結果、摂食した藍藻細胞のうち、糞または偽糞中に排泄されたものは 3% に留まり (生細胞 2%、死細胞 1%; 表 1)、多くが消化・資化されたと見なされた。残存した生細胞が再増殖できるかは不明であり、今後明らかにする必要がある。

#### (2) 湖沼環境におけるタテボシガイの藍藻資化能力の評価

湖沼環境中での藍藻資化を調査するため、秋田県八郎湖の沿岸部に面積 0.36 m<sup>2</sup> の区画を設けてタテボシガイを放流した。2017 年 7 月～11 月及び 2018 年 7 月～9 月まで 2 週間おきにタテボシガイ筋組織中の藍藻由来脂肪酸及び珪藻由来脂肪酸を定量した。調査の結果、藍藻細胞数が増加する夏季から秋季にかけて、タテボシガイ筋組織中の藍藻由来脂肪酸含有率が増加傾向にあることが示された (図 6, 7)。藍藻由来脂肪酸の珪藻由来脂肪酸に対する比率は 2017 年では 0.70、2018 年では 0.77 まで増加し、これらの値は室内水槽実験で得られた比率とよく一致していた。脂肪酸組成に着目することで湖沼でのタテボシガイによる藍藻資化を評価できることが示された。本調査結果により、アオコが発生した湖沼環境中においてタテボシガイが藍藻を資化することが明らかになった。本研究ではさらに、八郎湖沿岸部の水深 1 m 以下の浅い水域で調査を行い、*Microcystis* 属藍藻が鉛直移動によりタテボシガイが生息する底層部に移動している実態を明らかにした。

#### (3) タテボシガイの eDNA 検出定量法と eDNA 放出特性

タテボシガイに特異的な DNA 配列 (ミトコンドリアシトクロム *c* 酸化酵素サブユニット I 遺伝子領域) を基にオリゴヌクレオチドプライマーを設計した (表 2)。このプライマーセットにより、2 地点 (八郎湖と琵琶湖) で採取されたタテボシガイの標的 DNA 領域は PCR 増幅されたが、他のイシガイ科二枚貝、シジミ類、汽水域に生息する二枚貝、巻貝類では増幅されず、タテボシガイを特異的に検出できることが示された。

水槽実験でタテボシガイから放出される eDNA の平衡濃度とタテボシガイを取り除いた後の eDNA の減衰速度を基に eDNA 放出速度を求めた結果 (図 8)、eDNA 放出速度は水槽内のバイオマスと相関関係が見られたが、分散が大きいことが明らかになった (図 9)。一方で eDNA 放出速度は、溶存無機窒素及び溶存無機リンの放出速度と各々高い相関関係にあることが示され (図 9)、タテボシガイから放出される eDNA は主に排泄物に由来することが判明した。

#### (4) 湖沼環境でのタテボシガイ eDNA の定量と分布調査への適用

2019 年 6 月に八郎湖全域の 8 地点で底層水を採取し、タテボシガイ eDNA の定量を試みたが、全ての地点で標的とする eDNA を検出できず、従来手法では検出感度の点で適用が困難であると推察された。そこで、タテボシガイ成貝が放出するグロキディウム幼生を紐状担体で捕集することで eDNA を回収・定量する、新規手法を提案した。2020 年の夏季に八郎湖南岸部の 10 地点で底層水を採取したほか、湖底に紐状担体を 8 時間設置し (図 10)、引き上げた紐状担体から DNA を回収・定量した。その結果、グロキディウム幼生の放出時期である 6～7 月に全地点でタテボシガイの eDNA を検出定量することができた (図 11)。この時期では湖水の濃縮試料でもいくつかの地点で eDNA が検出され、一部の湖水試料にグロキディウム幼生が混入していたと考えられた。顕微鏡観察により紐状担体への幼生付着が確認された (図 12)。さらに 2021 年には、八郎湖沿岸部全域で紐状担体を用いた eDNA の検出定量を検討し、採捕調査による成貝密

度との比較を行った。その結果、少なくとも観測地点を多く設定した南岸部では、成員の生息が確認された地点付近で eDNA が検出され、グロキディウム幼生由来 eDNA が成員の生息密度を概ね反映しているものと推察された (図 13, 14)。

以上より、本研究ではタテボシガイの短期及び長期の室内飼育実験、並びに八郎湖沿岸部での飼育実験によって、これまで不明であったタテボシガイの藍藻資化能力を明らかにすることができた。さらに、タテボシガイ eDNA を特異的に検出するオリゴヌクレオチドプライマーを作製して eDNA 放出特性を調査し、タテボシガイでは排泄物が主な eDNA 源であることを特定した。さらに、成員から放出されるグロキディウム幼生を捕集する新規の eDNA 検出・定量法を提案し、八郎湖での現地試験においてその有用性を示すことができた。本研究によって、アオコ防除におけるタテボシガイの有用性が明らかになったが、加えて、藍藻資化の評価方法や新たに提案した eDNA 回収手法は他のイシガイ科二枚貝にも適用可能であり、淡水二枚貝を利用したバイオマニピュレーション研究での今後の展開が期待された。

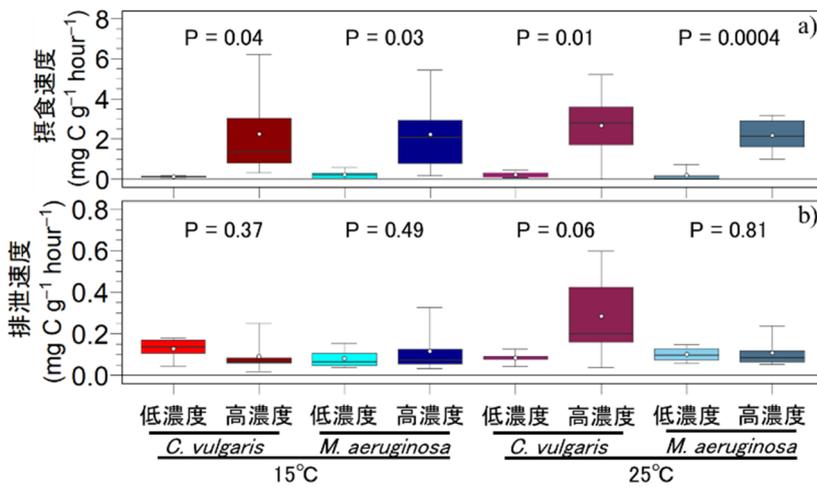


図 1. 水槽実験により得られたタテボシガイの藻類摂食 (a) 及び排泄速度 (b)

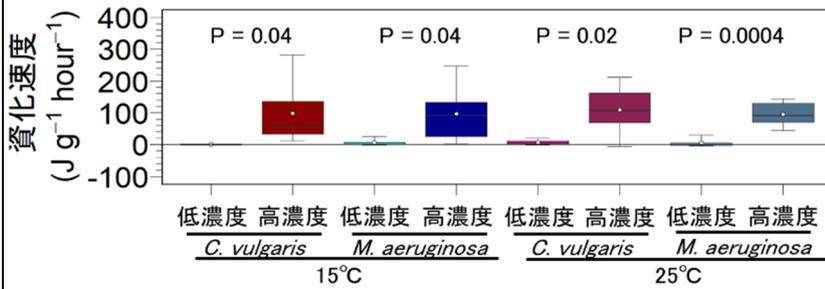


図 2. 水槽実験により得られたタテボシガイの藻類資化速度

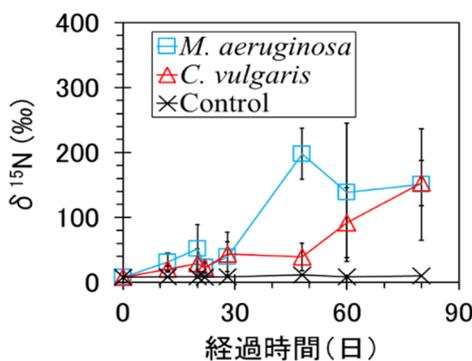


図 3. 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイ筋組織の  $\delta^{15}\text{N}$  値の経時変化

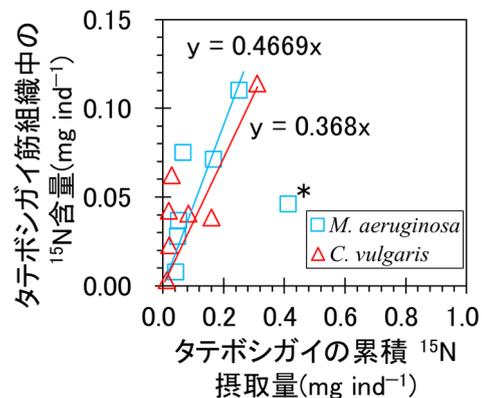


図 4. タテボシガイ個体あたりの累積  $^{15}\text{N}$  摂取量と筋組織での  $^{15}\text{N}$  蓄積量の関係 (\*このデータを除いて線形回帰した)

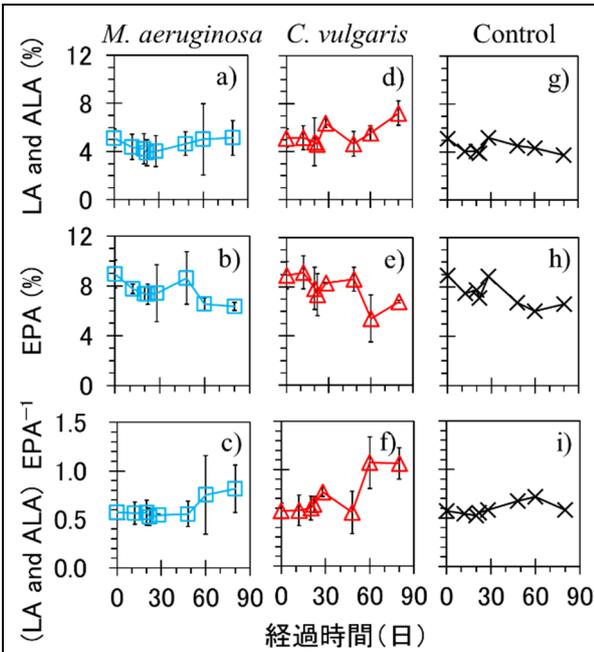


表 1. タテボシガイに摂取された藍藻 *M. aeruginosa* の排泄物中の生残量 (n = 4)

		細胞数/個体・12時間	相対量(%)
投入細胞数 (100%)	摂取	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	74
	未摂取	$(5.0 \pm 0.2) \times 10^5$	26
摂取細胞数 (100%)	生細胞	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^4$	2
	死細胞	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^4$	1
	不明分*	$1.3 \times 10^6$	97

\*消化・資化された細胞及び未排泄の細胞

図 5. 80 日間の飼育実験におけるタテボシガイ中の藍藻・珪藻由来脂肪酸(リノール酸(LA)及び  $\alpha$ -リノレン酸(ALA))含有率、珪藻由来脂肪酸(エイコサペンタエン酸(EPA))含有率、及び LA 及び ALA の EPA に対する存在比の経時変化

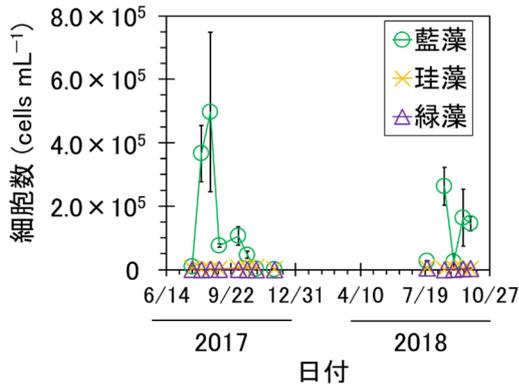


図 6. 2017 年及び 2018 年の八郎湖底層における藻類細胞数の経時変化

表 2. 本研究で作製したタテボシガイ eDNA 検出用オリゴヌクレオチドプライマー

オリゴヌクレオチドプライマーの名称	配列(5'-3')
NN_F	GTT-ACT-TGT-TCC-TGC-TTT-G
NN_R	CAA-AAC-AGC-AGT-TAC-TGT-A
NN_probe	(FAM) AAT-GTC-GCT-CAT-TCT-GG (TAMRA)

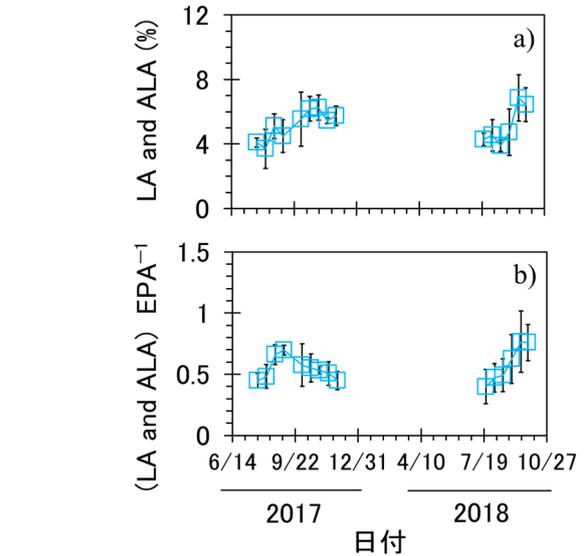
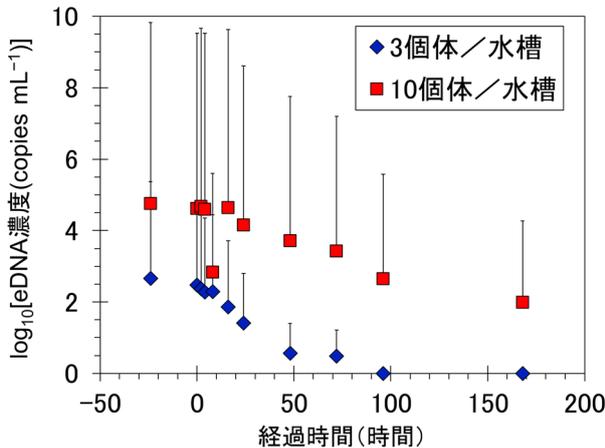


図 7. 2017 年及び 2018 年の八郎湖におけるタテボシガイ筋組織の藍藻由来脂肪酸(LA 及び ALA)含有率(a)及び LA 及び ALA の珪藻由来脂肪酸(EPA)に対する存在比(b)の経時変化

図 8. 時間 0 でタテボシガイを取り除いた後の水槽内の eDNA 濃度の経時変化

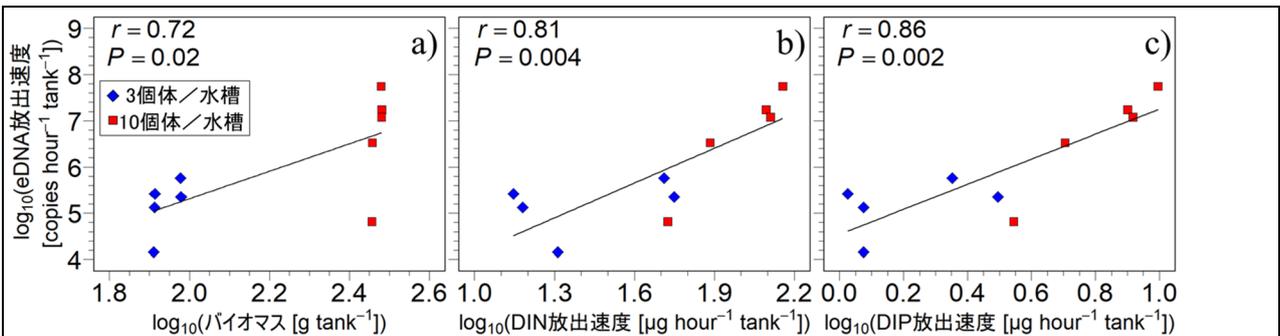


図 9. 水槽実験におけるタテボシガイの eDNA 放出速度とバイオマス(a)、溶存無機窒素 (DIN) (b) 及び溶存無機リン (DIP) (c) の関係

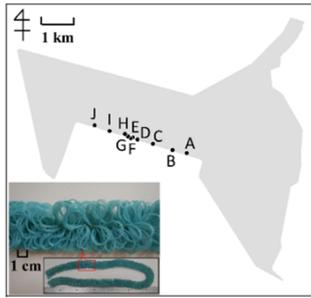


図 10. 八郎湖南岸部における調査地点 (10 地点) と湖底に設置した紐状担体

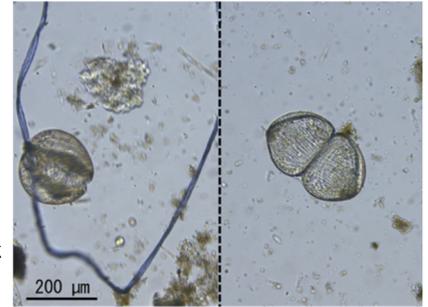


図 12. 八郎湖において紐状担体を用いて回収されたグロキディウム幼生

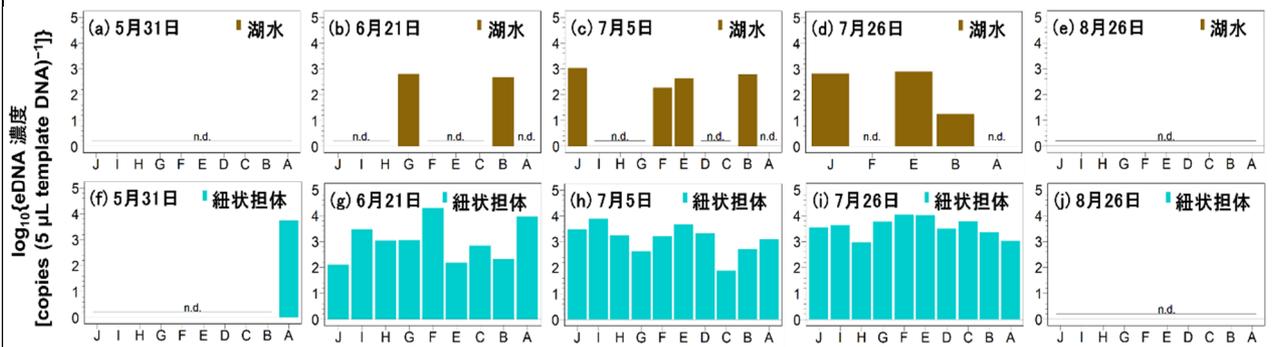


図 11. 八郎湖南岸部の 10 地点の湖水試料と(a~e) 及び担体試料 (f~j) におけるタテボシガイ eDNA 濃度 (n.d.は非検出を表す)

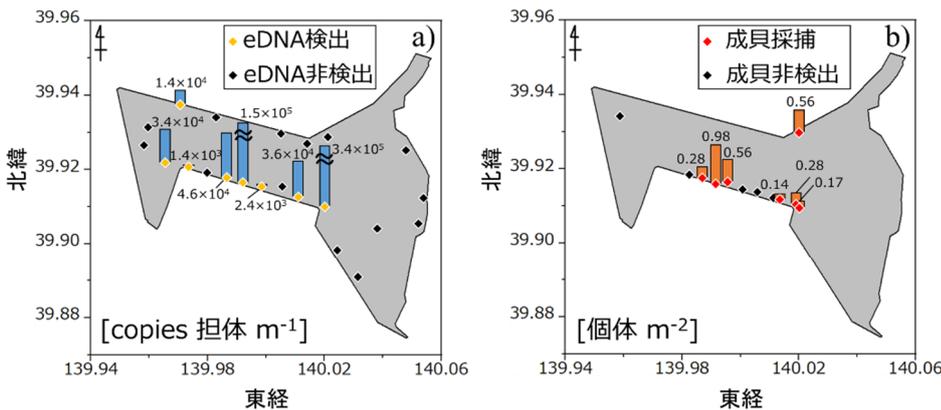
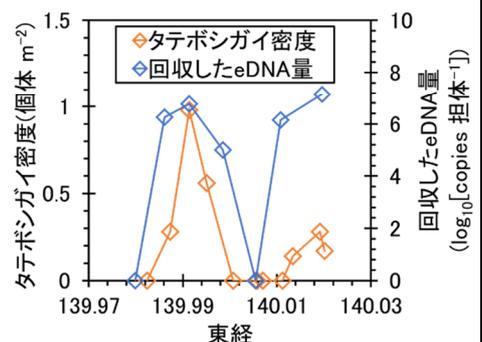


図 13. 紐状担体から回収されたタテボシガイの eDNA 濃度 (a)と採捕調査で得られたタテボシガイの成員密度 (b)

図 14. 八郎湖南岸部で観測された eDNA 濃度と成員密度



## 論文審査結果要旨

淡水環境において、藍藻類の異常増殖によって発生するアオコの生態工学的抑制手法として、藍藻類のろ過摂食動物に着目したバイオマニピュレーションが注目されている。淡水二枚貝は植物プランクトンをろ過摂食するが、藍藻類に対する資化能力は十分に明らかにされていない。また、湖沼等で淡水二枚貝の定着や生息区域の拡大を図るためには、生息密度の観測や生息区域の特定が不可欠であり、従来の採捕調査に代わる効率的なモニタリング手法の構築が課題である。本研究では、淡水二枚貝を利用したアオコ抑制手法の構築に向けて、日本の淡水域の主要な二枚貝であるタテボシガイ (*Nodularia nipponensis*) を対象として藍藻資化能力を明らかにすること、及びタテボシガイを特異的に検出する環境DNA (以下、eDNA) 手法を構築し、湖沼環境でのモニタリング調査に適用することを目的としている。本研究の成果は次のように要約できる。

- 1) タテボシガイの室内飼育試験で窒素安定同位体標識した藍藻を給餌し、60日にわたって一定の資化効率で摂取できることを明らかにした。また、藍藻資化の評価指標として、筋組織の藍藻由来脂肪酸の存在比率が有用であることを示した。さらに、異なる温度、餌料濃度で短期間の飼育試験を行い、藍藻資化能力を特徴付けた。
- 2) 秋田県八郎湖沿岸部で飼育試験を行い、藍藻由来脂肪酸を指標としてタテボシガイがアオコ発生時期に藍藻類を資化している実態を明らかにした。さらに八郎湖沿岸部の浅い水域で、*Microcystis*属藍藻が鉛直移動により底層部に移動している実態も明らかにした。
- 3) タテボシガイeDNAを特異的に検出するオリゴヌクレオチドプライマーを新規に作製し、eDNA検出・定量のためのPCR法を確立した。また水槽試験でeDNA放出特性を解析し、排泄物がeDNA源であることを特定した。
- 4) タテボシガイ成貝が夏季に放出するグロキディウム幼生をeDNA源として捕集・分析する新規手法を提案した。八郎湖南岸部において、グロキディウム幼生放出時期である6～7月に観測した全地点でタテボシガイeDNAを検出定量することに成功した。さらに採捕調査を実施し、観測したグロキディウム幼生由来eDNA濃度が成貝の生息密度を概ね反映していることを示し、本手法の有用性を提示した。

本研究において、長期の室内・現地試験で藍藻資化能力を多面的に評価したこと、及びグロキディウム幼生に着目したeDNA手法を提案して有効性を示したことは、淡水二枚貝では他に報告事例がなく、独自の成果と評価できる。本研究の藍藻資化能力の評価法やeDNA手法は他のイシガイ科二枚貝にも適用でき、二枚貝を利用したアオコ抑制研究における幅広い波及効果が見込まれる。以上より、本研究では学位論文として提出するに足る成果が得られている。

先の予備審査会では調査データの解釈の妥当性、二枚貝を利用したアオコ抑制技術の実現性や湖沼生態系に及ぼす影響への懸念、二枚貝生息調査へのeDNA手法の適用可否など、様々な観点の質問・意見が出された。審査会では、それらを踏まえて丁寧かつ適切に学位論文の改訂が行われたことを確認した。また学位論文発表会では、研究成果を分かり易く説明し、質疑に対して十分な回答ができていた。

以上より、審査会では博士の学位を授与するに値すると判定した。