

論文の内容の要旨

氏名：宮地 俊作

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：炭素・窒素安定同位体分析によるカタクチイワシとマイワシの栄養段階に関する研究

序論

カタクチイワシ *Engraulis japonicus* およびマイワシ *Sardinops melanostictus* は、漁業資源として重要であるとともに、魚や鳥などの大型捕食者に捕食される海洋食物網の主要な中間構成種でもある。したがって、バイオマスが大きい両種の摂餌生態に関する知見は、海洋生態系における捕食と被捕食の関係を考える上で重要といえ、それらの栄養段階（以後 TL）を解明することが望まれる。

これまで、鰓耙の構造と胃内容物の観察とから、マイワシは主に植物プランクトン食、カタクチイワシは動物プランクトン食といわれてきた。しかしながら、胃内容物の査定計量は多大な労力を要し、しかも、捕獲直前に捕食した餌の情報しか得られないために、仮に摂餌対象が明確化できたとしても、栄養分として同化されたか否かは分からないといった問題がある。

ここで、食性を知る別の方法に、生体中に含まれる窒素の同位体比を用いるものがある。これは、窒素含有化合物の代謝にともなう同位体効果に基づいており、「捕食者の同位体比と被捕食者の同位体比との差が一定」という経験的な事実を利用している。この方法で、個体全体や組織中の窒素安定同位体比（以後 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ ）から TL を推定するのがバルク法と呼ばれる食性解析手法である。バルク法は、胃内容物調査ではわかりにくかった食性情報が得られることから、近年、水産研究において注目されている。なお、個体全体や組織中の炭素安定同位体比（以後 $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ ）は、窒素の安定同位体比と較べて食物連鎖において大きな変化を示さないことから、食物網の起点を推察することに広く用いられている。

一般に、生物由来の炭素や窒素の同位体比は、その生物が属する食物連鎖上の一次生産者の同位体比に栄養段階ごとの同位体効果が加わったものになる。したがって、研究対象となる生物の TL をバルク法で確定するには、当該食物連鎖上で TL が明らかな生物（たとえば一次生産者）の $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ を知る事が不可欠である。しかしながら、これは多くの場合、容易ではない。

特に水系生態系においては一次生産者である植物プランクトンと一次消費者である動物プランクトンを分取すること自体が困難であると同時に、その同位体比が時間と空間で変動する。特に沿岸域においては、同所個体群中に他海域由来の個体が混在していることが考えられ、「TL の変化」と「異なる食物網に属する個体群の混在」との分別が難しく、カタクチイワシやマイワシのような海洋生態系間を移動する回遊性浮魚類の TL に関する同位体比を用いた知見はいまだ少ない。このため、カタクチイワシの $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ が相模湾では大きい変動を示すことは知られているものの、成魚の TL および食源が異なる個体群の混在するダイナミックスについては解明が進んでいない。

このような状況下、一次生産者など TL の明らかな生物の同位体基準を必要とせず、捕食者の組織に含まれるアミノ酸（グルタミン酸とフェニルアラニン）の窒素同位体比を分析することで TL を求める方法が最近、開発された。そこで本研究は、このアミノ酸法と呼ばれる手法に基づいて得られる TL を、親潮外洋域のカタクチイワシとマイワシおよび相模湾のカタクチイワシについて求め、アミノ酸法の適用可能性を吟味するとともに、バルク法と組み合わせて、親潮外洋域と相模湾における食物網の違いの解明に資することを目的とした。

材料および方法

・採集地および時期

相模湾における試料の捕獲は 2006 年から 2008 年にわたっておこなわれた。カタクチイワシは江ノ島沖約 1km の定置網で、シラスは 7 月、10 月、11 月に片瀬・江ノ島漁業協同組合の協力を得て沿岸船曳漁で採取した。得られた試料は保冷して研究室に持ち帰り -80℃ で凍結保存した。また、鹿島灘では 2006 年 12 月と 2007 年 10 月に大洗町漁業協同組合の協力を得て採取した。伊東沖の未成魚と成魚は 2007 年 12 月に静浦漁業協同組合の協力を得て採取した。採取された鮮魚は冷凍保存し研究室に運搬された。相模湾食物網の起点に関する現地性指標として潮間帯の転石の石面付着藻類（以後 EOM）を 2103 年 5 月と 10 月に江ノ島の磯で採集した。外洋域におけるカタクチイワシおよびマイワシの試料は、2010 年 9 月～10 月に水産総合研究センター中央水産研究所の調査用船北鳳丸の中層トロールにより北西太平洋の親潮外洋域で捕獲され、直ちに冷凍保存され研究室に運搬された。試料はすべて前処理まで凍結保存された。

・前処理およびバルク安定同位体分析

集められた個体試料はサイズにより区分し、シラス: 標準体長（以後 SL）17mm から 40mm 未満（その内で SL が 25mm までのものを後期仔魚とする）、未成魚: SL40 mm から 90mm 未満、成魚: SL90mm 以上とした。カタクチイワシおよびマイワシは SL を測定後、成魚と未成魚は胸びれ後ろの背側白色筋を摘出し、前処理をするまですべて凍結保存（-30℃あるいは -80℃）した。脱脂は Folch *et al.*(1957)の方法に準じクロロフォルム-メタノール液（2:1）を用いた。シラスの内、後期仔魚については 1 個体だけでは分析に必要な量が得られなかったため数個体をまとめて 1 試料とした。その結果、33 個体から 5 つの試料を得た。後期仔魚に該当しないものは 1 個体で 1 試料とした。EOM は炭酸塩を取り除くために 1 日間濃塩酸の蒸気に晒し、脱灰処理した。すべての試料は粉末化し、分析するまで乾燥状態で保存した。試料の $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ と $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ は、日本大学生物資源科学部生物環境科学研究センターの全自動窒素炭素安定同位体比質量分析計 (EA/IRMS) ANCA-SL(PDZ Europa)を用い、筋肉組織は炭素と窒素を同時に、付着藻類は別々に、測定した。測定精度は $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} \leq 0.1\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}} \leq 0.2\text{‰}$ である。

・アミノ酸の窒素安定同位体分析

アミノ酸の窒素安定同位体比は海洋研究開発機構において測定した。機器の構成は、GC-C/TC III インターフェイスで Thermo Fischer Scientific Deltaplus XP IRMS に連結された Agilent Technologies 689N GC(GC/C/IRMS)であり、分析精度は 0.4‰ である。

アミノ酸法による栄養段階（以後、 $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ ）は、得られた窒素安定同位体比から以下に示す Chikaraishi *et al.* (2009)による式で求めた。

$$\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4)/7.6 + 1$$

ここで $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ および $\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$ は、それぞれ試料中のグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比である。

・統計処理

サンプルの正規性は χ^2 適合度検定、等分散性は F 検定、2 群の差の検定は Student's t -test または Mann-Whitney U -test を Satcel2 (柳井, 2007)を用いて実施した。正規性および等分散性の検定は $P > 0.05$ で判断した。群間の差は $P < 0.05$ のとき有意と判断した。

相模湾で採取されたカタクチイワシのバルク法による栄養段階

北西太平洋親潮外洋域で得られたカタクチイワシ成魚の $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ は $-19.8 \pm 0.4\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ は $8.9 \pm 0.9\text{‰}$ であった。一方、相模湾では $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ は $-17.4 \pm 1.5\text{‰}$ であったのに対し、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$ は $11.2 \pm 2.0\text{‰}$ であった。

外洋域での成魚について、Aita *et al.* (2011)による親潮域の植食性動物プランクトン *Eucalanus bungii* ($\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}} = 5.1\text{‰}$) を食源と仮定し TL をバルク法で推定した値（以後 TL_{bulk} ）は 2.9 から 3.3 の範囲であり、

単純平均は3.1であった。一方、相模湾については、現地性の後期仔魚のTLが3であると仮定して成魚の TL_{bulk} を84個体について求めると単純平均で3.0であり、最小値は2.2、最大値は5.2であった。

相模湾における TL_{bulk} の単純平均値は外洋域と同様であったものの、個体ごとの違いが余りに大きく、これが実際のTLを反映しているとは考え難い。この点について、Tanaka *et al.*(2008)は様々な個体群の混在を示唆しており、さらに宮地他(2013)は春～初夏にかけて相模湾で採取した大型個体群では $\delta^{15}N_{bulk}$ も $\delta^{13}C_{bulk}$ も低いことを報告し、鹿島灘、駿河湾など周辺海域の大型個体の値に近いこともあわせて、湾外からの個体群の来遊の可能性を推察した。

アミノ酸法に基づくカタクチイワシとマイワシの個体ごとの $TL_{Glu/Phe}$ の決定と食物連鎖の再構築

相模湾個体群に周辺海域からのものが混在している可能性を確認するために、季節変動を排除した5月に一回の採取で得た試料の中から、 $\delta^{15}N_{bulk}$ が最も低い値を示す試料M-01($\delta^{15}N_{bulk}=9.1\text{‰}$)と最高値を示す試料M-05($\delta^{15}N_{bulk}=16.2\text{‰}$)を選び、アミノ酸法により $TL_{Glu/Phe}$ を求めた。また、比較のために、典型的な外洋域である北西太平洋親潮外洋域で得られたカタクチイワシの中で、その $\delta^{15}N_{bulk}$ が最も低い値(8.1‰)を示したもの(試料名T23k-04)、マイワシでも同様に最低値(7.9‰)を示したもの(試料名T23M-04)についても、 $TL_{Glu/Phe}$ を求めた。

その結果、外洋域のカタクチイワシでは*E. bungii*を食源と仮定したバルク法での推定値に近い値である $TL_{Glu/Phe}=2.8$ が得られ、これから推定される食源の $\delta^{13}C_{bulk}$ と $\delta^{15}N_{bulk}$ は栄養段階2で-20.7‰と5.4‰、栄養段階1では-21.7‰と2.0‰となった。栄養段階1の推定値は、Aita *et al.*(2011)による親潮域の植物プランクトンの実測値($\delta^{13}C_{bulk}=-21.8$, $\delta^{15}N_{bulk}=2.5\text{‰}$)に近く、これら外洋域のカタクチイワシの食源は外洋域の現地性食源と判断された。

また、相模湾のカタクチイワシM-01は $TL_{Glu/Phe}=3.2$ 、M-05では $TL_{Glu/Phe}$ 3.1となり、同じTLであることが示された。このことから、M-01とM-05は異なった食物網に属していると考えられる。すなわち、M-05が属する食物連鎖の一次生産者の同位体比は $\delta^{13}C_{bulk}=-16.8\text{‰}$ 、 $\delta^{15}N_{bulk}=9.0\text{‰}$ と求められ、これは相模湾の現地性指標である江ノ島のEOMの値($\delta^{13}C_{bulk}=-16.9\text{‰}$ 、 $\delta^{15}N_{bulk}=7.1\text{‰}$)に近い。一方、M-01では一次生産者の同位体比は $\delta^{13}C_{bulk}=-20.9\text{‰}$ 、 $\delta^{15}N_{bulk}=1.5\text{‰}$ と求められ、Takai *et al.* (2007)による伊豆半島沖の3月の粒子状有機物質(POM; TL 1に相当する)の実測値($\delta^{13}C_{bulk}=-20.8\text{‰}$ 、 $\delta^{15}N_{bulk}=0.7\text{‰}$)に近い。相模湾外を食物連鎖の起点にしていると考えられる伊豆半島沖の後期仔魚の $\delta^{15}N_{bulk}$ はTakai *et al.*(2007)によると8.6‰であるが、この後期仔魚のTLが3であるとしてM-01のTLを求めると3.1となる。これは、M-01が相模湾外から流入した個体であることを強く示唆し、相模湾では食物網の起点が異なる個体が混在していることが示されたと言える。

一方、既に述べたように外洋域のカタクチイワシ(T23k-04)の $TL_{Glu/Phe}$ は2.8であったが、同所で同時に捕獲されたマイワシ(T23M-04)の $TL_{Glu/Phe}$ についても2.8が得られた。このことから、親潮海域において年間を通して卓越している*E. bungii*などが、鰓耙の構造が粗いカタクチイワシでも細かいマイワシでも共通して、主要な餌となっていたことが推察される。

以上から、バルク法によるTL推定は試料内変動が小さい場合は有効であるものの、試料内変動が大きい場合には誤った結果を導いてしまうことが示された。その一方でアミノ酸法は、試料内変動が大きい場合、回遊魚の摂餌履歴が異なる場合でも、TLについて矛盾のない結果を与えた。

今後の展望

今回、アミノ酸法によって食物連鎖の起点の違いを明らかにすることができたことから、アミノ酸法が、生態系間を移動する個体の存在などのために困難であった沿岸域などでの捕食と被捕食の関係を理解する

のに有用なツールであることが示された。今後、固相抽出などによる試料調整法の改良と、多くの関連するデータが蓄積されることとで、アミノ酸法は、海洋生態系における食物網構造解明の発展に寄与することだろう。