

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 30 年 2 月 28 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者） 槻木 玲美

所属機関 松山大学

職 教授

氏名 槻木 玲美

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

湖底堆積物を用いた過去 100 年にわたるプランクトン-ウイルス間の相互作用解明に関する研究

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 槻木 玲美	松山大学法学部	教授	湖底堆積物を用いた過去 100 年にわたるプランクトン-ウイルス間の相互作用解明に関する研究
分担者 本庄 三恵	京都大学・生態学研究センター	研究員	
加 三千宣	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	准教授	
拠点対応教員 加 三千宣	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	准教授	湖底堆積物を用いた過去 100 年にわたるプランクトン-ウイルス間の相互作用解明に関する研究

3 研究内容 （別紙）

### 3. 研究内容

#### 3-1. 研究概要・目的

湖沼生態系は、近年、環境変化により大きく変化してきていることが明らかにされつつある。46 万年の歴史を有する世界有数の古代湖、琵琶湖においても、近年、赤潮やアオコの発生、新規ウイルスによるコイの大量死に象徴される変調が報告されているが、具体的に琵琶湖がどのように変化してきたのかはよく判っていなかった。そこで申請者らは、これまでに戦後の高度経済成長期に琵琶湖は植物プランクトンが急速に増加し富栄養化したこと、さらに、その捕食者で食物網の中心的役割を担う動物プランクトン、ミジンコ(*Daphnia*)も急増してきたことを明らかにしてきた(Tsugeki et al. 2013, 2010, 2009, 2003)。しかしながら、こういった近年の環境変化が湖沼の生物同士のつながり、生物間相互作用にどのような影響を及ぼしたのか、未だほとんどわかっていない。

一方、湖沼では、近年、ミジンコの死亡率増加にウイルスが大きく寄与した可能性が見いだされ、しかも、30 年以上前に堆積した湖底泥に含まれるミジンコ休眠卵から感染ウイルスが検出できることが報告された(Hewston et al. 2013. *Limnol. Oceanogr.* 58:1605)。休眠卵に残るウイルスの存在は、当時の宿主生物への感染履歴を反映する。つまり、休眠卵に残るウイルスを検出できれば、過去に遡ってミジンコと感染ウイルスの動態を再現できる。

また大型のミジンコを選択的に捕食する（Kawabata et al. 2002）鮎が、2017 年琵琶湖でかつてない程の不漁に陥ったという。特に、琵琶湖産の稚アユは、全国の河川に放流する稚アユとして出荷されていることから、内水面養殖業において重要な魚種となっている。従って、本申請課題で取り組む大型種の *Daphnia pulicaria* が 2000 年以降どのように推移してきたのか明らかにしていくことは、鮎不漁の原因を突き止めるためにも重要な知見となる。

そこで本研究は、近年技術的進展が著しい遺伝子解析技術を、堆積物を用いた古生物学的手法に応用させ、環境変化と共にミジンコ種がどのように推移して生きたのか、さらにミジンコ対ウイルスの相互作用がどのように変化してきたのかを明らかにすることを目的とし、研究を行ってきた。

#### 3-2. 分析方法

##### 1) 堆積物の年代

$^{210}\text{Pb}$  法による堆積物の年代決定を行うため、 $^{210}\text{Pb}$ 、 $^{214}\text{Pb}$ 、 $^{137}\text{C}$  の放射能強度を測定した。放射能強度は、 $\gamma$ 線検出器（GXM25P, SEIKO EG&G ORTEC, Tokyo, Japan）を用いて測定した。堆積年代は、一般的に用いられている  $^{210}\text{Pb}$  法の Constant Rate of Supply (CRS)モデル(Appleby, and Oldfield 1978)に従って計算した。堆積年代は、大気由来の  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度によって求まるが、測定された堆積物試料の  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度は、大気由来の  $^{210}\text{Pb}$  の他に、堆積粒子中に元来ある  $^{226}\text{Ra}$  起源の  $^{210}\text{Pb}$  (supported  $^{210}\text{Pb}$ ) も含まれる。したがって、大気由来の  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度（以下、過剰  $^{210}\text{Pb}$ ）を知るには、測定された  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度から、supported  $^{210}\text{Pb}$  の放射能強度を差し引く必要がある。堆積物中では、supported  $^{210}\text{Pb}$  が、同じく  $^{226}\text{Ra}$  から生成する  $^{214}\text{Pb}$  と放射平衡になっているので（ $^{214}\text{Pb}$  は、 $^{210}\text{Pb}$  からは生成しない）、過剰  $^{210}\text{Pb}$  ( $^{210}\text{Pb}_{\text{excess}}$ )は測定された  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度と  $^{214}\text{Pb}$  放射能強度の差によって求められる。CRS モデルによって得られた年代モデルの確からしさを評価するため、核実験由来の  $^{137}\text{Cs}$  放射能強度鉛直プロファイルのピークから推定される年代（1964 年, Hirose et al. 2008）との整合性を確かめた。

##### 2) ミジンコ感染ウイルス・休眠卵の形態的特徴

ミジンコに感染するウイルスを抽出するため、6 月と 8 月に琵琶湖からミジンコを採取した。ミジンコの消化管内容物にはミジンコが採餌した生物とそれに感染するウイルスが濃縮されているため、これらを除くため消化管内容物を吐き出させる実験を行った。また、2000 年以降、

琵琶湖には少なくとも 2 種類のみジンコ種が生息している可能性が高いことから(Urabe et al. 2003)、各種の休眠卵の形態的特徴を整理するため、HotSHOT 法 (Ishida et al. 2012, 占部編 2014) を用いて、表層堆積物に含まる休眠卵から DNA を抽出し、遺伝解析を実施した。

### 3-3. 結果と考察

#### 1) 琵琶湖堆積物の年代

2017 年度は、8 月中旬に、琵琶湖で最も高い時間解像度で解析が可能な和邇沖にて、8 本の堆積物と表層泥のサンプリングを実施した。このうち 1 本の堆積物を他項目との共通分析コアとして、重点的に年代を確定するため、 $^{210}\text{Pb}$ 、 $^{214}\text{Pb}$ 、 $^{137}\text{Cs}$  の放射能強度を測定した。現時点では、7 サンプルの計測結果から、琵琶湖では、多少の変動はあるものの、表層から深度 25 cm まで、過剰  $^{210}\text{Pb}$  ( $^{210}\text{Pb}_{\text{excess}}$ ) は減衰率がほぼ一定であった (図 1 左)。また、 $^{137}\text{Cs}$  放射能強度のピークが深度 20cm 付近で認められた。これらの結果から、過剰  $^{210}\text{Pb}$  を用いた CRS モデルより推定された堆積物の年代は、深度約 16-17cm (mass depth:  $3.54 \text{ g cm}^{-2}$ ) の層準が 1960 年頃、深度 8-9cm (mass depth:  $1.46 \text{ g cm}^{-2}$ ) 層が 2000 年頃と推測され、 $^{137}\text{Cs}$  のピークから推定される年代と調和的であった (図 1 右)。

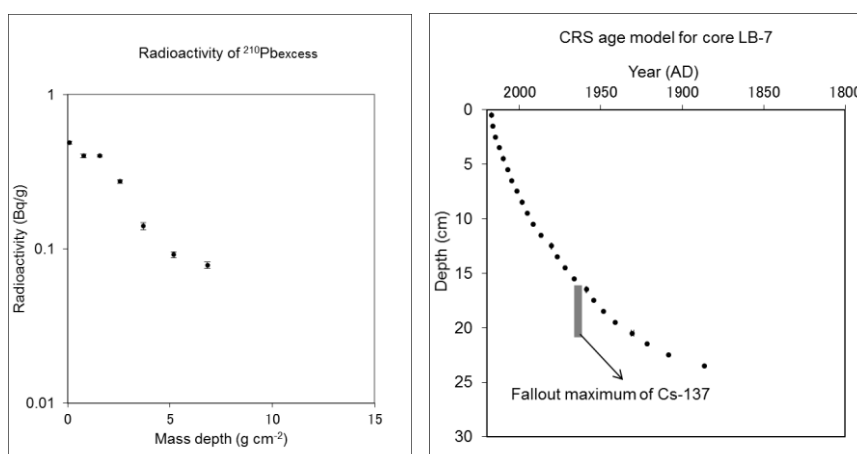


図 1 琵琶湖堆積物の過剰  $^{210}\text{Pb}$  放射能強度(左)と年代モデル(右)。

#### 2) 優占するみジンコ種と休眠卵サイズの関係

6 月と 8 月はみジンコに感染するウイルスを抽出するため、採取したみジンコの胃内容物を吐き出させる実験を行った。これまでの観察や分析から、興味深いことに 6 月に採取したみジンコは 2000 年頃、突然、琵琶湖に出現したとされる大型種の *Daphnia pulex* (Urabe et al. 2003) が優占していることが判明した。一方で、8 月に採取した個体は、従来の優占種である中型種の *Daphnia galeata* であったことから、琵琶湖では、近年これら大型種と中型種のみジンコが共存するようになった可能性が高い。

実際、HotSHOT 法 (Ishida et al. 2012, 占部編 2014) を用いて、表層堆積物に含まる休眠卵から DNA を抽出する遺伝解析を進めた結果、2 種が混在していることが明らかとなった。そこで、休眠卵のサイズ (図 2) を調べた結果、分布が 2 群に分かれることが判明し (図 3)、大型種と中型種の休眠卵は、サイズにより種判別できる可能性が 12s rDNA とミトコンドリア DNA の配列解析から明らかとなった (図 4)。現在、サンプル数を増やして検証を進めている。

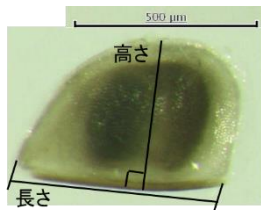


図2. 休眠卵の計測部位

高さ(mm)

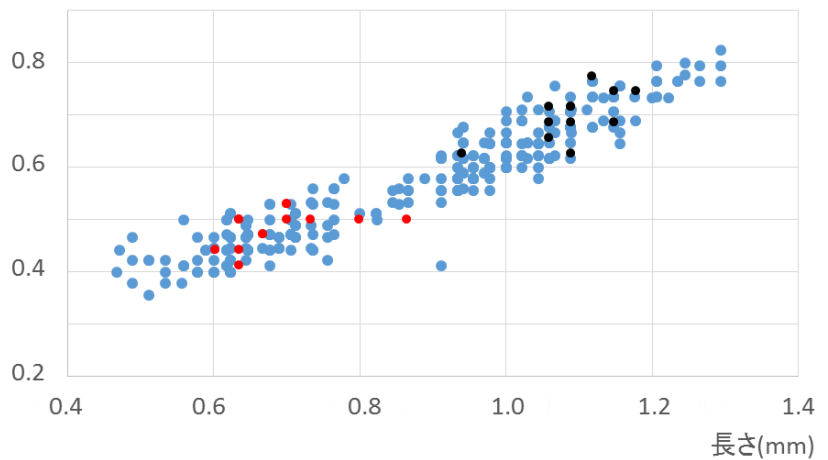


図3. ミジコ休眠卵のサイズ分布

これまでに赤丸と黒丸の休眠卵について、DNA解析を行った。その結果、赤丸は中型種 *Daphnia galeata* の既知塩基配列に黒丸はより大型種の *Daphnia pulex* と *Daphnia pulicaria* の配列に高い確率で一致 (99%) した。この結果は休眠卵サイズから両種の判別ができる可能性を示唆している。

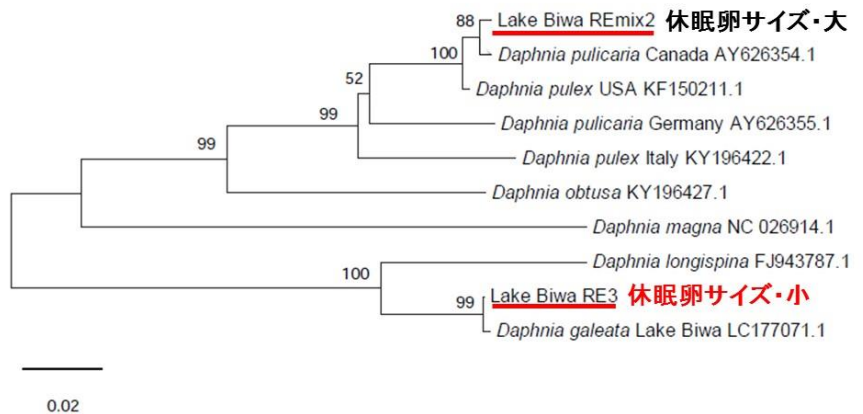


図4 ミジコ休眠卵の12s rDNA領域の系統樹

### 3) ミジコ感染ウイルスの解析

現在、ミジコ個体から感染ウイルス DMClHV (Hewston et al. 2013. Limnol. Oecologia. 58: 1605) を抽出する解析を進めており、現時点までに CsCl 密度勾配遠心により、ウイルスを選択的に濃縮し、抽出した段階である。今後、ウイルスの検出には、京大大学生態学研究センター所有の 384 同時検出可能な qPCR マシン (QuantStudio7) を用いる。一部のサンプルは、すでに解析済みで、上記の既知ウイルスに加え、琵琶湖のミジコ親個体から、新規ミジコ感染ウイルスの検出を行う。特に、今年度の調査から 2 種の親個体の出現時期が異なることが分かったので、それぞれの出現時期に合わせて、琵琶湖調査船はすにより、琵琶湖に生息するミジコ個体をサンプリングし、ウイルスを回収する。新規ウイルスの配列は次世代シーケンサー (Miseq, Illumina 社) を用いて網羅的に取得する予定である。