

### 3. 研究内容

#### 1) 研究概要・目的

近年、懸念されている感染症の拡大は、地球温暖化のような人為的な環境変化との関連性が指摘されている(e.g., Daszak et al. 2001, *Acta tropica*78:103)。今後さらなる温暖化の進行に伴い環境悪化が懸念されている今日、環境の変化が病原体と宿主の動態・両者の相互作用に及ぼす影響を明らかにしていくことが求められている。しかし、その解明には実際に野外で病原体・宿主が環境変化と共にどのように変化してきたのか、その長期動態の情報が不可欠であるが、野外での長期間にわたる観測例は殆どない。

一方、近年の分子生物学の技術革新によって、堆積物コアに残る DNA 情報から生物の長期変化を再現する技術は大きく進展しつつある。従来の方法では、生物遺骸等が残る特定の分類群しか復元できないという問題点があったが、分析技術の進展で、これまで復元できなかった主要な動・植物プランクトンおよび感染ウイルスを再現することが可能となってきた。特に湖沼では、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、過去に遡って宿主ミジンコと感染ウイルスの動態を再現することが可能となる。そこで本研究は、世界有数の古代湖である琵琶湖を対象に、遺伝子解析技術を古生物学的手法に応用させ、湖底堆積物に残る生物情報に基づき、宿主プランクトンと感染ウイルスの過去 100 年にわたる長期動態を明らかにすることを目的とし、研究を行ってきた。

#### 2) 分析方法

##### ①年代測定

本研究は、これまでに 2013 年と 2017 年に琵琶湖北湖の最も堆積速度が速いと推定されている和邇沖地点にて、数本の湖底堆積物を採取した。堆積物の年代は、一般的に用いられている  $^{210}\text{Pb}$ 、 $^{214}\text{Pb}$ 、 $^{137}\text{C}$  の放射能強度に基づく、 $^{210}\text{Pb}$  法の Constant Rate of Supply (CRS)モデル(Appleby, and Oldfield 1978)に従って年代軸を決定する。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、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。

Appleby, P.G., Oldfield, F., 1978. The calculation of lead-210 dates assuming a constant rate of supply of unsupported  $^{210}\text{Pb}$  to the sediment. *CATENA*, 5: 1-8.

Hirose, K., Igarashi, Y., Aoyama, M., 2008. Analysis of the 50-year records of the atmospheric deposition of long-lived radionuclides in Japan. *Applied Radiation and Isotopes*, 66: 1675-1678.

## ②プランクトンの復元

動物プランクトンの長期動態を復元するため、主要な動物プランクトンであるミジンコ類の遺骸を顕微鏡下で計測した。顕鏡で得られた乾燥重量当たりの遺骸密度と年代測定によって求めた質量堆積速度を用いて、1年間当たりの生産量を反映するフラックスに換算する。

## ③ウイルス相の復元

堆積物中の遺伝子情報からウイルス相を復元する試みは、未だ研究例が非常に少ない。そこで本研究では、まずウイルス由来の遺伝情報を効率良く抽出する方法の検討を実施した。琵琶湖では、2004年にコイヘルペスウイルスによるコイの大量死が生じたが、本庄研究員は Beef extract 法を用いてこれまでに琵琶湖の沿岸堆積物からコイヘルペスウイルス (KHV) の検出に成功している (Honjo et al. 2012)。そこで、本研究では Beef extract 法と新たに SM 法 (Yoshida et al. 2013)、ピロリン酸法 (Wommack et al. 2009) の 3 つの方法で、コイヘルペスウイルスの大量死が生じた時期に相当する堆積試料を用いて、KHV の抽出を行った。

一方、湖底堆積物に残るウイルスを網羅的に検出する研究は、世界的に見ても少なく、確立された手法はない。そこで、本研究は海洋堆積物で実績のある SM 法 (Yoshida et al. 2013) とピロリン酸法 (Wommack et al. 2009) を一部改変し、比較・検討した。

## 3) 結果と考察

### ①年代測定結果

2013年に採取した堆積物中の放射性同位体の測定結果を図1に示す。過剰  $^{210}\text{Pb}$  ( $^{210}\text{Pb}_{\text{excess}}$ ) の減衰率は、表層から深度 5 cm まで、僅かな減少であったが、それ以深では顕著に一定の割合で減衰していた (図 1 左)。また、 $^{137}\text{Cs}$  放射能強度のピークが深度 17-18cm 付近で認められた。このことから過剰  $^{210}\text{Pb}$  による CRS モデルから推定された堆積物の年代は、 $^{137}\text{Cs}$  のピークから推定される年代と調和的であった (図 1 右)。一方、過剰  $^{210}\text{Pb}$  の強度が深度 30cm で検出限界を示したことから、この深度が約 150 年前頃と推察され、堆積深度約 24-25cm の層準が 1900 年頃、深度 16-17cm 層が 1960 年代初頭と推測された。

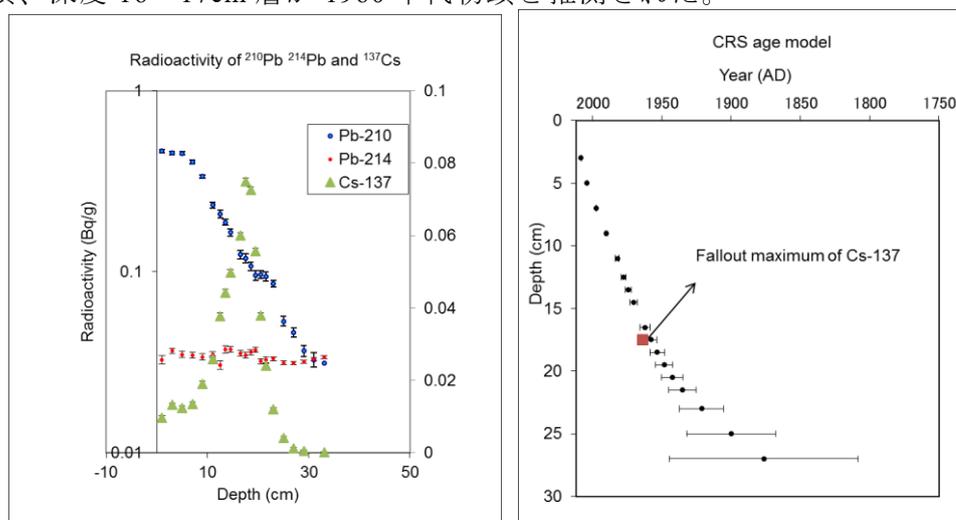


図 1.琵琶湖北湖堆積物における  $^{210}\text{Pb}$ ・ $^{137}\text{Cs}$  の放射能強度(左)と年代モデル(右)。

## ②動物プランクトンの変動

遺骸の観察結果から、これまで生息が確認されていた *Daphnia galeata* 以外に、別種の *Daphnia pulicaria* が 1990 年代後半から検出された。その後、*D. pulicaria* は現在にかけて増加し、逆に、以前から生息していた *Daphnia galeata* は減少傾向にあることが明らかとなった。興味深いことに、ミジンコの餌である植物プランクトンは、2000 年頃より減少傾向を示していた（早川ら 2012）。またミジンコにとって捕食者であるホンモロコなどプランクトン食魚類が 1990 年代に大幅に減少していた（水野ら 2013）。一般に *D. pulicaria* は、*D. galeata* と比べ、体サイズが大きく、魚類の捕食圧が高いような環境下では、生息しにくいことが指摘されている。つまり、*D. pulicaria* が近年、増えられるようになったのは、餌の増加というより捕食圧の低下に起因すると考えられた。

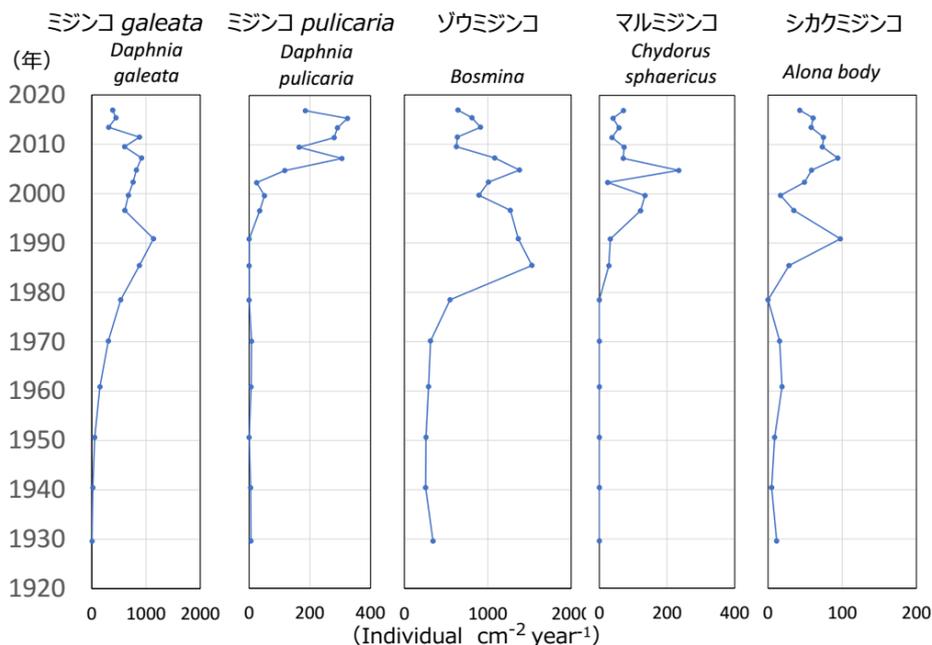


図 2. 遺骸分析に基づく過去 100 年にわたる琵琶湖のミジンコ類の変動

## ③ウイルス相復元のための DNA 抽出法の検討

Beef extract 法と SM 法(Yoshida et al. 2013)、ピロリン酸法(Wommack et al. 2009)の 3 つの方法で、堆積試料から KHV の抽出を行った。しかしながら、いずれのサンプルでもコイヘルペスウイルス KHV は検出できなかった。今回、KHV を検出できなかった原因について、前回成功した beef extract 法は、沿岸域で採取した堆積物で、今回使用した堆積物は沖合から採取したもので採取場所に違いがある。沖合で採取した堆積泥には非常に細かな粘土鉱物を多く含まれるためこういった鉱物がウイルス回収を妨げた可能性がある。また KHV によるコイの死亡個体は沿岸帯で多く見つかっていることから沿岸帯の堆積物には KHV がより濃縮され、沖合の堆積物には低濃度しか含まれていない可能性が高い。これらの結果は堆積物から特定のウイルスを検出することの難しさを示す。

一方、本研究では、湖底堆積物からウイルスを網羅的に検出する試みを海洋堆

積物で実績のある SM 法(Yoshida et al. 2013)とピロリン酸法(Wommack et al. 2009)を一部改変し、下記の方法で比較・検討した(図 3)。その結果、33g の堆積物から次世代シーケンスに供するに十分量のウイルスが回収できること、またシーケンス解析の結果、分類された配列の約半数 (SM 法: 55%, ピロリン酸法: 35%) がウイルス配列にヒットしたことから、いずれの方法でもウイルスを選択的に回収できることが明らかになった(図 4)。特に、超遠心機を用いた CsCl 密度勾配を介することで取得できるウイルス配列が約 45 倍増加することが示された。現在、サンプルの反復を増やしデータを追加しており、解析を進めている。

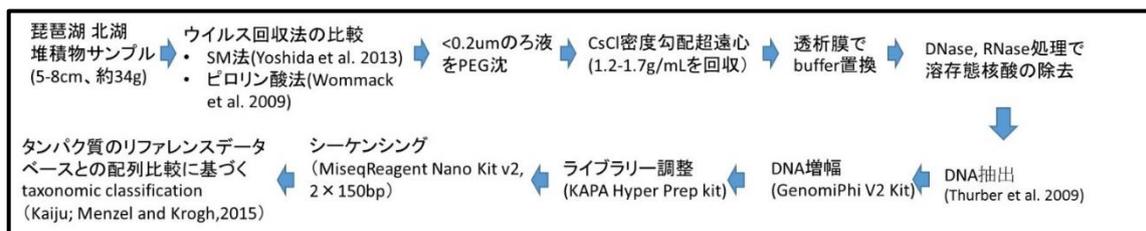


図 3. 堆積物コアからのウイルスメタゲノム解析法

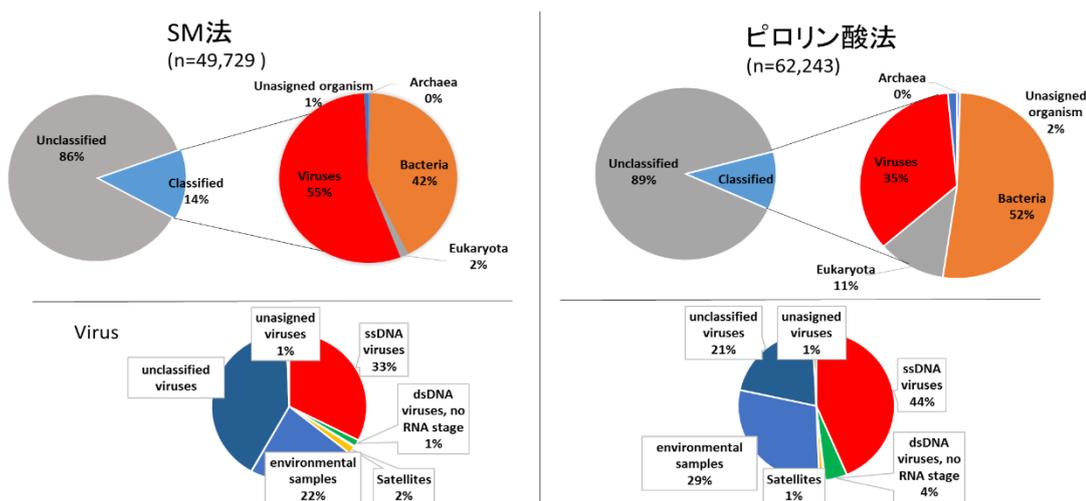


図 4. 堆積物コアからの得られた配列 (リード) 数とその割合

#### 4) 今後の課題と展望

ウイルスメタゲノム解析については現在までに過去 100 年分に相当する堆積層分から SM 法によりウイルスの回収が完了した。今後、さらに解析を進め、世界でも報告例が限られている過去 100 年にわたるウイルス相復元を試み、琵琶湖の水質変化が著しかった 1960-80 年台を境にウイルス相がどのように変化したかを明らかにしていく。また大型ミジンコ種 *D. pulicaria* の増加時に捕食者であるホンモロコが、治水対策の水位操作と大渇水の影響で急速に減少したことが明らかにされている。また植物プランクトンも減少していることから、*D. pulicaria* が増えられたのは、餌の増加というより捕食圧の低下によるものと推察された。今後、さらに解析を進め、治水といった政策が生物同士の食う食われる生物間相互作用を通じて、生態系にどのような波及効果を及ぼすのかを検証していく予定である。