

2021年度学生論文賞 第2次審査用論文

環境中のアミノ酸が
3種のサンショウウオの孵化幼生
に及ぼす成長促進効果

2021年12月提出

小樽商科大学商学部

2017219 谷村恵奈（商学科）

目次

要旨	1
緒言	2
材料と方法	3
材料	
実験：アミノ酸効果の比較	
統計処理	
結果	4
考察	5
水生生物による溶存アミノ酸の利用	
アミノ酸の効果の違い	
本研究の応用的意義と今後の課題	
謝辞	9
引用文献	10
表	11
図	12

要旨

細菌などの微生物は環境中の遊離アミノ酸（溶存アミノ酸）を利用し増殖するが、脊椎動物のような大型の動物は一般に、環境中のアミノ酸を直接利用することはなく餌を食べることでしか外部からアミノ酸を摂取できないと考えられてきた。しかし近年、水生脊椎動物も環境中のアミノ酸を利用できる可能性が指摘されている。この現象が多く生物に当てはまる一般的な事象なら、従来の生態学の理論は再構築される可能性があり、さらに、希少動物の保全や養殖技術の進展などの応用面においても大きな発展が期待できる。本研究の目的は、北日本に生息する3種のサンショウウオ（エゾサンショウウオ [*Hynobius retardatus*]、トウホクサンショウウオ [*H. lichenatus*] とクロサンショウウオ [*H. nigrescens*]）の孵化幼生を対象にして、「水生脊椎動物による環境中の溶存アミノ酸の利用可能性」を示すことである。そのため、環境水として2種類のアミノ酸（フェニルアラニンとグリシン）を各1mMの濃度で調整した溶液を準備し、水中にアミノ酸を加えた場合と加えなかった場合で、これら3種の幼生の成長速度を調べた。

実験開始時の幼生の全長に処理間で有意な差はみられなかったが、実験期間（1～7日目）を通しての幼生の成長速度にはアミノ酸の効果がみられた。エゾサンショウウオでは水で飼育したときよりもフェニルアラニン溶液で飼育したときのほうが成長は速く、クロサンショウウオでもグリシンおよびフェニルアラニン溶液で飼育した時の方が成長は速かった。トウホクサンショウウオでは、実験期間中の成長速度に関してグリシンおよびフェニルアラニンの効果はみられなかった。しかし、発育段階を前期（1～5日目）と後期（5～7日目）に分けて解析してみると、トウホクサンショウウオでも発育前期の成長はアミノ酸に影響され、事後検定の結果からも水で飼育したときよりもフェニルアラニン溶液で飼育したときのほうが成長は速かった。

以上の結果から、アミノ酸の種類やサンショウウオの種類、発育段階によって効果の大きさに違いはみられるものの、「高濃度の溶存アミノ酸環境下ではサンショウウオ類の孵化幼生の成長は促進される」ことが判明した。本実験系では細菌を完全には取り除けていないが、環境水中にはサンショウウオ以外の他の真核生物は存在しないことを確認している。したがって本研究の結果は、他の真核生物の媒介がなくても「水生脊椎動物が溶存アミノ酸を取り込む」という、見過ごされてきた栄養伝達経路の存在を示唆する。

キーワード：栄養伝達経路・食物連鎖・水生脊椎動物・成長速度・発育段階・溶存アミノ酸

緒言

アミノ酸は生物の成長や繁殖に必要な栄養素である。植物は無機物から多くのアミノ酸を自ら合成し、栄養素として利用する。生態系では、植物が合成して動物が摂取したアミノ酸の集合体（タンパク質）が分解する過程で、環境中に溶存アミノ酸が放出される。細菌などの微生物は、この溶存アミノ酸を吸収し増殖できる。しかし、「動物は環境中の溶存アミノ酸を直接吸収することはなく、そのため餌を食べることで外部からアミノ酸を摂取する必要がある」と考えられてきた。したがって、現代の生態学の理論は、食物連鎖（すなわち、溶存アミノ酸が微生物を増やし、その微生物を原生動物が食ひ、その原生動物を動物プランクトンが食うと続いて「食う-食われる関係」の連続体）を介して、「動物は間接的に溶存アミノ酸を利用する」ことが前提となっている（Li et al. 2014）。

しかし近年、水域生態系でこの前提を覆しうる事例（脊椎動物による溶存アミノ酸の利用）が報告された（Glover et al. 2011, 2013 ; Katayama et al. 2016）。たとえば、ヌタウナギ（*Eptatretus burgeri*）は、鰓と皮膚上皮に環境水から溶存アミノ酸を取り込む能力があり（Glover et al. 2011, 2013）、エゾサンショウウオ（*Hynobius retardatus*）の幼生にもまた、溶存アミノ酸を利用し成長する可能性が指摘されている（Katayama et al. 2016）。これらの事象が真実なら、従来の食物網理論は再構築される可能性があり、さらに希少動物の保全や養殖技術の進展など実学的にも大きな発展が期待できる。しかし現在でも、水生脊椎動物による溶存アミノ酸の利用を示した例は極めて少ない。そのため、この現象を一般化するには、さまざまな生物（系）での検証が必要となる。本研究の目的は、エゾサンショウウオに加えて北日本に生息する2種のサンショウウオ（トウホクサンショウウオ [*H. lichenatus*] とクロサンショウウオ [*H. nigrescens*]) の孵化幼生を用いて、「水生脊椎動物による環境中の溶存アミノ酸の利用可能性」を示すことである。そのために水中にアミノ酸を加えた場合と加えなかった場合で、これら3種の孵化幼生の成長速度を調べた。

サンショウウオは両生綱・有尾目・サンショウウオ上科に属する動物の総称である。サンショウウオは幼生時期を森林の水たまり（池）や溪流などの水中で過ごし、成体になると上陸する。北日本に生息するサンショウウオ（エゾサンショウウオは北海道に広く分布し、トウホクサンショウウオとクロサンショウウオは東北地方に分布する）は、一般に雪解け直後に繁殖・産卵が行われ、幼生は産卵後数週間で孵化する。孵化後は通常、小さな水生節足動物やカエルのオタマジャクシ、あるいは同種の幼生などを捕食し成長する（Nosaka et al. 2015 ; Takatsu and Kishida 2015）。しかし、生まれてすぐの幼生は口が未発達で固形物の餌を食べることができない（Kishida et al. 2015）。本研究では、口からの栄養の獲得を制限するため、口が未発達な孵化幼生を用いた飼育実験を実施した。

エゾサンショウウオを用いた先行研究（Katayama et al. 2016）では、あらゆる真核生物を除去した水（濾過後にオートクレーブした滅菌水）で調整した8種類の高濃度（1 mM）のアミノ酸溶液（チロシン、フェニルアラニン、リジン、セリン、トレオニン、グリシン、アラニンおよびプロリン）で孵化幼生を飼育した。この実験で、チロシン、フェニルアラニン、リジン、セリンおよびトレオニンは幼生の成長を促進させる効果の高いアミノ酸で、グリシン、アラニンおよびプロリンは効果の低いアミノ酸であることが示されている。さらに、上記の実験で、溶存アミノ酸によるサンショウウオ幼生の成長の促進効果は、幼生の発育後期

よりも発育前期で強く発現することも示唆されている。これらの状況を踏まえ、本研究では、溶存アミノ酸として先行研究で最も効果が高かったフェニルアラニンと最も効果が低かったグリシンに焦点を当て、これら2種類のアミノ酸溶液とコントロールの水でエゾサンショウウオ、トウホクサンショウウオ、クロサンショウウオの孵化幼生を小型水槽内で単独で飼育する実験を実施した。個体ごとに幼生の成長速度を計測し、サンショウウオの種、あるいはアミノ酸の種類によって、幼生の成長にどのような違いがあるかを比較した。加えて、幼生の発育段階を前期と後期に分け、それぞれの期間で幼生の成長速度に対するアミノ酸の効果を検証した。これらの結果をもとに、サンショウウオをはじめとした「水生脊椎動物による環境中の溶存アミノ酸の利用可能性」を提示し、本現象の応用的意義（波及効果）について考察した。

材料と方法

材料

実験には、2020年4月に小樽市の最上公園（北海道小樽市；北緯 43.18°，東経 140.98°）で採取した1個の卵塊由来のエゾサンショウウオ幼生と、弘前市の弘前市民の森（青森県弘前市；北緯 40.53°，東経 140.45°）で採取した3個の卵塊由来のトウホクサンショウウオ幼生および青森市県道2号線沿いの雑木林（青森県青森市；北緯 40.90°，東経 140.60°）で採取した3個の卵塊由来のクロサンショウウオ幼生を使用した。採取した卵塊を小樽商科大学（北海道小樽市；北緯 43.19°，東経 140.97°）に持ち帰り、卵塊ごとに1Lの脱塩素水道水を加えたポリプロピレン製の水槽（15.4×11.8×8.0 cm）に入れて実験に使用するまでガラス製冷蔵ショーケース（5°C，自然日長）で保管した。実験開始前にこれらの卵塊は、温度 15°C（自然日長）に設定したインキュベーター内に水槽ごと移し、実験開始に合わせて孵化タイミングを調整した。

実験：アミノ酸効果の比較

本実験では、高濃度の溶存アミノ酸環境下でサンショウウオ類の孵化幼生の成長が影響されるか、もし影響されるならその効果の大きさはサンショウウオの種によってどのように異なるかを確認することを主な目的とし、室内での飼育実験を実施した。2020年5月に、幼生の環境水として2種類のアミノ酸（フェニルアラニンとグリシン）をそれぞれ1mMの濃度で調整したアミノ酸溶液を準備した。アミノ酸溶液の調整は汲み置き水道水を用いた。汲み置き水道水は調整前に121°Cで20分間オートクレーブ処理し、水中のすべての生物を殺した。

水温が室温（20°C）に戻った後、それぞれのアミノ酸6ミリモル（mmol）を6Lのオートクレーブ処理した汲み置き水に溶解し（フェニルアラニン；971mg/6L，グリシン；451mg/6L），各アミノ酸の1mM溶液を得た。本実験では、飼育期間中の環境水の溶存アミノ酸の変性を最小限に抑えるために、3日目、5日目および7日目に飼育容器内の環境水を交換し、その際に上記の手順に従って環境水を新たに準備した。

全ての実験には、孵化後5時間以内のサンショウウオ幼生（孵化幼生）を用いた。実験開

始日に孵化幼生の周りに付着した卵殻を慎重に取り除き、実験水槽に卵塊由来の有機物が入らないように新しい水で孵化幼生を2回リンスした。リンス後の孵化幼生を卵塊由来ごとに改めて1Lの脱塩素水道水を加えた水槽（15.4×11.8×8.0 cm）に入れ、幼生の奇形の有無を確認した。おおよそ2時間後、奇形ではない個体を実験に応じてそれぞれのサンショウウオの卵塊から12～72個体選抜した（エゾサンショウウオ：卵塊A_{エゾ} [72個体]；トウホクサンショウウオ：卵塊A_{トウ} [36個体]，卵塊B_{トウ} [12個体]，卵塊C_{トウ} [24個体]；クロサンショウウオ：卵塊A_{クロ} [30個体]，卵塊B_{クロ} [30個体]，卵塊C_{クロ} [12個体]）。本実験は、同じ卵塊由来の孵化幼生からほぼ同サイズの幼生3個体を組にし、各処理に1個体ずつ割り当てた。つまり、各サンショウウオに対し24ブロックを用意した。

幼生の成長に及ぼす各処理の影響を評価するため、孵化幼生を80 mLの脱塩素水道水あるいはアミノ酸溶液を加えたポリプロピレン製の小型水槽（8×5×4cm）に移し、インキュベーター内（15°C，自然日長）で飼育した。実験個体は1日目（実験開始日），5日目と7日目にスキャナー（Canon 9000F Mark II）で腹部側から撮影し、ImageJを用いて全長を計測した（図1）。これらの全長データを用いて以下の式から幼生の1日当たりの成長速度を計算した（Katayama et al. 2016を参照）；

$$\text{成長速度 (mm/日)} = (L_y - L_x) / (t_y - t_x)$$

ここで、 L_x と L_y はそれぞれ x 日目（ t_x ）と y 日目（ t_y ）の幼生の全長である。なお、孵化幼生は口が未発達で餌を食べることができないため、実験期間中は幼生に餌を与えなかった。

統計処理

本実験では、実験期間を通してのサンショウウオ幼生の成長速度に対するアミノ酸の効果を検出するため、ブロックをランダム効果、サンショウウオの種（種）とアミノ酸の種類（処理）を主効果とする正規分布を仮定した一般線形混合モデル（general linear mixed model; GLMM）を実施した。加えて、サンショウウオの発育段階に応じて成長速度に対するアミノ酸の効果異なるのかを検出するため、孵化直後（1日目）から5日目までを発育前期，5日目から7日目までを発育後期に分け、発育段階も主効果に加えたGLMMを実施した。これらのモデルでは、主効果の間に存在するすべての交互作用を組み込んだ。なお、事後検定として、ボンフェローニ補正後のGLMM（有意水準 $\alpha/N < 0.05$ ）を実行した。

結果

1日目（実験開始日）のサンショウウオ幼生の全長は種間で有意に異なったが、処理間では有意差はみられなかった（種： $F_{2,69} = 898.6, P < 0.001$ ；処理： $F_{2,138} = 2.270, P = 0.107$ ；種×処理： $F_{4,138} = 0.688, P = 0.602$ ）（図2）。実験期間（6日間）を通しての幼生の成長速度はサンショウウオの種間で違いがみられ（ $F_{2,69,3} = 705.1, P < 0.001$ ），エゾサンショウウオの成長速度はトウホクサンショウウオの1.9倍，クロサンショウウオの1.8倍だった。さらに、実験期間を通しての成長速度には、処理の効果（ $F_{2,138} = 9.937, P < 0.001$ ）と「種×処理」の

交互作用 ($F_{4,138} = 2.566, P = 0.041$) がみられた。エゾサンショウウオでは水で飼育したときよりもフェニルアラニン溶液で飼育したときのほうが成長は速かった (図 3 a)。トウホクサンショウウオでは成長速度に関してグリシンおよびフェニルアラニンの効果はみられなかったが、クロサンショウウオではグリシンおよびフェニルアラニンともに成長促進の効果がみられた。

発育段階を独立変数に組み込んだ一般線形混合モデルでは、幼生の成長速度に対してサンショウウオの種 (エゾ vs トウホク vs クロ) と処理 (水 vs グリシン vs フェニルアラニン) だけではなく、発育段階 (発育前期 [1 ~ 5 日目] vs 後期 [5 ~ 7 日目]) の効果もみられ、「処理 × 発育段階」以外のすべての交互作用も検出された (表 1)。本解析において「種 × 処理 × 発育段階」に有意な交互作用がみられたことは、「サンショウウオの種間でみられる『幼生の成長に及ぼすアミノ酸の効果の大きさ』の違いは、各サンショウウオの発育段階で異なる」ことを意味する。エゾサンショウウオの発育前期においては、成長速度に処理間で違いが検出されたが ($F_{2,45.7} = 3.664, P = 0.033$)、事後検定の結果では水と各アミノ酸処理の間に有意差は検出されなかった (図 3 b)。トウホクサンショウウオの発育前期の成長にはアミノ酸の効果がみられ ($F_{2,46} = 3.928, P = 0.027$)、事後検定の結果からも水で飼育したときよりもフェニルアラニン溶液で飼育したときのほうが成長は速かった (図 3 b)。クロサンショウウオでは発育前期の成長にアミノ酸の効果はみられなかった ($F_{2,46} = 0.081, P = 0.923$)。一方、発育後期では、トウホクサンショウウオの成長にアミノ酸の効果はみられなかったが ($F_{2,46} = 0.689, P = 0.507$)、エゾサンショウウオ ($F_{2,45.7} = 5.869, P = 0.005$) とクロサンショウウオ ($F_{2,46} = 10.31, P < 0.001$) では顕著な成長促進の効果がみられた (図 3 c)。エゾサンショウウオでは、水で飼育したときに比べてフェニルアラニン溶液で飼育したときのほうが成長は速かった。クロサンショウウオでは、グリシン溶液とフェニルアラニン溶液ともに成長促進の効果がみられた。

考察

本研究では、水生脊椎動物の成長に及ぼす溶存アミノ酸の効果を 3 種のサンショウウオの幼生を用いて検証した。実験開始前のサンショウウオの幼生の全長は処理間で違いがみられなかったにも関わらず (図 2)、実験期間中の成長速度は溶存アミノ酸によって促進された。また、その効果はアミノ酸とサンショウウオの種類によって有意に異なった (図 3 a)。エゾサンショウウオは、フェニルアラニンを添加して飼育したときに添加しなかったときよりも有意に速く成長した。加えて、統計的には有意な差はみられなかったものの、グリシンを添加した場合のエゾサンショウウオの成長速度は添加しなかったときよりも速かった。クロサンショウウオでも、フェニルアラニンやグリシンを添加したときに添加しなかったときよりも成長が速かった。一方、トウホクサンショウウオでは実験期間を通しての成長に及ぼす溶存アミノ酸の有意な効果はみられなかったが、発育前期 (1 ~ 5 日目) では溶存アミノ酸の効果がみられ、フェニルアラニンを添加したときは添加しなかったときよりも速く成長した。このように、アミノ酸の種類やサンショウウオの種類によって効果の大きさに違いはみられるものの、高濃度の溶存アミノ酸環境下ではサンショウウオ類の幼生の成長は促進されることが判明した。

水生生物による溶存アミノ酸の利用

高濃度の溶存アミノ酸環境下でのサンショウウオ幼生の成長の促進は、それらが環境水から溶存アミノ酸を栄養として利用した結果と考えられる (Katayama et al. 2016). 多くの海洋性無脊椎動物では、溶存アミノ酸をエネルギー源として利用することは古くから仮定されてきた (Pütter 1908). たとえば, Jaeckle and Manahan (1989) は, 炭素の放射性同位体 (炭素 14) で標識したアミノ酸を用いたトレース実験により, 粒子状の食物を捕獲できない段階のアカネアワビ (*Haliotis rufescens*) の幼生が海水中の溶存アミノ酸 (アラニン) を取り込み体内に輸送することを実証している. アカネアワビ以外にも, 海綿動物, コケムシ, 環形動物, 軟体動物, 棘皮動物などの海洋性無脊椎動物で, 海水中の溶存アミノ酸を利用することが指摘されている (Stephens and Schinske 1961 ; Berman and Bronk 2003). この研究分野の黎明期では, 実験システムから細菌などの微生物を取り除くことが困難だったため, 海洋性無脊椎動物が溶存アミノ酸を直接取り込んだのか, それとも溶存アミノ酸を利用して増えた微生物を介して (たとえば細菌を捕食することで) 間接的に取り込んだのかについて, 長い間議論されてきた. しかし, 無菌卵から細菌を含まない幼生を育てる技術が確立されたことで (Manahan et al. 1983), 無脊椎動物が溶存アミノ酸を利用することは広く受け入れられている.

一方で, 現在でも脊椎動物による溶存アミノ酸の利用の報告例は極めて少ない. その少ない実証例の1つが, Glover の研究グループによるヌタウナギを用いた研究である (Glover et al. 2011, 2013). 彼らはヌタウナギから摘出した鰓と皮膚にトリチウムで標識したアラニン溶液とグリシン溶液を灌流させ, 本種の鰓と皮膚の上皮に環境水から溶存アミノ酸を取り込む能力があることを示した. また, Katayama et al. (2016) は, 8つの高濃度のアミノ酸溶液で孵化直後のエゾサンショウウオ幼生を飼育する実験を行い, 幼生の成長を促進する可能性がある5つのアミノ酸 (チロシン, フェニルアラニン, リジン, セリンおよびトレオニン) を特定した. 加えて Katayama et al. (2016) は, その論文で窒素の安定同位体 (^{15}N) で標識したフェニルアラニン溶液を用いたトレース実験を行い, 幼生の組織内に溶存アミノ酸が取り込まれることを実証している. 本研究では同位体を用いたトレース実験を行っていないが, これらの先行研究を考慮すると, 上記の脊椎動物以外にも, 少なくとも2種のサンショウウオ (トウホクサンショウウオとクロサンショウウオ) の幼生に, 環境水から溶存アミノ酸を利用し成長を促進させる能力があることが示唆される.

溶存アミノ酸が環境中に存在する場合にサンショウウオ類の孵化幼生の成長が促進される理由として, 2つの仮説が挙げられる. 1つ目は, 「サンショウウオがアミノ酸を直接吸収した」という仮説である. 今回用いた幼生は口が未発達のため固形物を食べることはできないが, 口は開いている. そのため, 水を飲むことで水中のアミノ酸を吸収したのかもしれない. 2つ目は, 「水中のアミノ酸によって細菌が増殖し, その効果で幼生の成長が促進された」という仮説である. たとえば, 幼生が水と一緒に細菌を摂取して栄養として取り込んだ, あるいは摂取した細菌が幼生の腸内環境を改善したことなどが考えられる. 本研究では実験系から細菌を完全に取り除くことはできなかったが, 細菌以外の生物はいないことを確認している. したがって, サンショウウオの幼生は従来想定されていたよりも短い経路

(真核生物による食物連鎖を介さない経路) で水中のアミノ酸を利用できると考えられる(図4).

アミノ酸の効果の違い

サンショウウオ類の孵化幼生の成長に及ぼす溶存アミノ酸の効果は、アミノ酸やサンショウウオの種類、幼生の発育段階によって異なっていた。たとえば、フェニルアラニンは発育前期(孵化後1~5日目)のエゾサンショウウオとトウホクサンショウウオの幼生、あるいは発育後期(孵化後5~7日目)のクロサンショウウオの幼生の成長を促進させるアミノ酸であったのに対し、グリシンはクロサンショウウオの幼生の発育後期に高い成長促進効果を持つアミノ酸であった。エゾサンショウウオの幼生を用いた先行研究(Katayama et al. 2016)では、孵化後1~8日目のエゾサンショウウオの幼生に対してフェニルアラニンは成長を促進させる効果が強くみられ、グリシンは成長を促進させる効果は弱かった。この先行研究の結果は本研究の結果ともおおよそ一致する。Katayama et al. (2016)は、エゾサンショウウオの幼生の成長に対してフェニルアラニンが高い効果を持つ理由について、フェニルアラニンが飢餓ストレスのある生物の体内で脂肪酸に変換されるケト原性の必須アミノ酸であることを挙げている。しかし、ケト原性でも必須アミノ酸でもないグリシンでも、クロサンショウウオの成長を促進させたという本研究の結果は、Katayama et al. (2016)が提唱した仮説と適合しない。そこで本稿では、サンショウウオの種によってアミノ酸の効果の大きさが異なる理由について、4つのプロセス(1:共有派生形質の効果, 2:幼生の体サイズの効果, 3:アミノ酸の要求性の違い, および4:生息環境におけるアミノ酸の利用可能性の違い)を検討する。

まず、本研究で用いた3種のサンショウウオの系統関係をみると、トウホクサンショウウオとクロサンショウウオは系統的に近い近縁種であり、それら2種の関係に比べると、エゾサンショウウオは系統的に離れた種である(Tominaga et al. 2019)。もし進化のある過程でアミノ酸を利用する能力を獲得しその形質を保存しているのであれば、系統が近い種ほど似た反応を示す(共有派生形質の効果がある)はずである。しかし、3種のサンショウウオはそれぞれのアミノ酸に対して異なる強さで反応しているため、本研究では上記の1(共有派生形質の効果)を支持しない。2つ目のプロセスである「幼生の体サイズの効果」は、「体サイズが小さいほど体の体積に対する表面積の割合が大きく、周囲から取り込む栄養(すなわちアミノ酸)の割合が大きくなる」ことを前提とする(Katayama et al. 2016)。このプロセスが正しいなら、「3種の中で体サイズが最も小さいクロサンショウウオにおいて、あるいは発育後期よりも体サイズが小さい発育前期で、アミノ酸の効果は大きくなる」はずである。しかし、実際にはアミノ酸による成長促進の効果が比較的大きかったエゾサンショウウオのほうがクロサンショウウオ(やトウホクサンショウウオ)よりも体サイズは大きく、またアミノ酸の効果が発現化する時期もサンショウウオの種によって特異的であった。そのため、このプロセスも支持されない。

一方で、発育段階に応じて必要とするアミノ酸の種類はサンショウウオの種によって異なることは十分にありうる(上記の3)。それぞれのアミノ酸は生体内で重要な役割を持っており、生物に与える効果も異なる。たとえば、フェニルアラニンは神経伝達物質の基本構

造を形成するカテコールアミンの誘導物質として利用され (Flatmark 2000), グリシンは生体内でメチオニンの毒性を緩和させる効果があると報告されている (Luka et al. 2009). このようなアミノ酸の機能の違いは, 生物の種や発育段階に応じて変わり, その結果, アミノ酸の要求性も変化する可能性がある. また, それぞれのサンショウウオが生息する環境によって「利用しやすい」あるいは「利用しにくい」アミノ酸があり, そのようなアミノ酸の利用可能性の違いが, アミノ酸に対するサンショウウオの種の反応の違いを生み出す可能性もある (上記の4). 本研究で焦点を当てたサンショウウオは北日本に生息し, それらが住む環境は寒冷である. 特に, 幼生が孵化する時期 (早春) の池には生物が少なく貧栄養の状態に陥りやすい. しかし, サンショウウオはしばしば閉鎖的な狭い地域 (森林の池) に大量の卵塊を産卵するため, 一時的に多くの物質が生態系に投入された状態が起こる. やがて腐敗した大量の胚や卵殻から多様な溶存有機物が溶け出すだろうし, その際の溶存有機物の組成は, 各種のサンショウウオの生息環境で異なると予想される. その環境の溶存有機物の中から, 「多量にあるもの」あるいは「普段は不足しがちで成長の律速要因となりうるもの」をうまく栄養として利用できる能力は, 貧栄養になりがちな生息環境で孵化幼生が生き抜く上の適応となるかもしれない. これらの仮定的なプロセスを積極的に支持するデータはまだないが, 本プロセスを証明するために, サンショウウオの種による「アミノ酸の要求性の違い」や「生息環境におけるアミノ酸の利用可能性の違い」について今後調べる必要がある.

本研究の応用的意義と今後の課題

これまでは一般に, 脊椎動物が溶存アミノ酸を利用することは想定されてこなかった. そのため, 生態学における従来の理論は「溶存アミノ酸のエネルギーを脊椎動物が利用するまでには, 複数の真核生物種を介した長い経路をたどる」ことを前提に構築されている (Li et al. 2014). それに対して, 本研究の成果は, 水生脊椎動物が他の真核生物種の媒介なしに栄養源として溶存アミノ酸を利用できるという新しい視点を提供する.

サンショウウオをはじめとする多くの脊椎動物は, さまざまな獲物 (餌) を利用するキーストン捕食者である. そのため, 溶存有機物の利用による彼らの成長や生存の改善は, その後の水域生態系において多大な影響をもたらさう. たとえば, 成長したサンショウウオの幼生はオタマジャクシを捕食することがある (Nosaka et al. 2015) が, サンショウウオが溶存有機物を利用してより速く・より大きく成長できた場合, 早い段階からオタマジャクシの被食量は増えるかもしれない. オタマジャクシが減ると, オタマジャクシによって消費されるはずの落葉が環境に残り, その結果, 物質循環の流れが遅くなることが想像できる. このように「水生脊椎動物が溶存アミノ酸を利用する経路」を考慮することで, 真の物質循環の流れを解明できるかもしれない.

さらに, 水生脊椎動物に対するアミノ酸の効果を検証した本研究の成果は, 将来, 養殖業の現場でも応用できるかもしれない. 養殖現場では, 栄養不足で稚魚の生存や成長が悪いという問題があり, 稚魚の栄養状態を改善することは重要な研究課題である. 稚魚が環境水から溶存アミノ酸を吸収できる能力があるならば, 環境水の中にアミノ酸を混ぜることで稚魚の生存や成長を改善できる可能性がある. またこの方法は, 希少生物の保全においても幼

生時の生存率を改善させる上で有効な方法を提供するだろう。特に、多くのサンショウウオは現在絶滅の危機に瀕しており、効果的な保全方法の開発が求められている。本研究の成果を実学としてより活かすためにも、本研究で用いた3種以外のサンショウウオも含めた多くの水生脊椎動物を対象にして、それらが環境中のアミノ酸を利用できるかどうかを検証することが必要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、弘前大学の山尾僚博士にはトウホクサンショウウオとクロサンショウウオの卵塊の採取にご協力して頂きました。また、北海道大学苫小牧研究林の岸田治博士には研究の実施方法に関してご助言を頂きました。本実験に関わって頂いた方々に深くお礼を申し上げます。

引用文献

- Berman T, Bronk DA (2003): Dissolved organic nitrogen: a dynamic participant in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* **31**: 279–305.
- Flatmark T (2000): Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **168**: 1– 17
- Glover CN, Bucking C, Wood CM (2011): Adaptations to in situ feeding: novel nutrient acquisition pathways in an ancient vertebrate. *Proceedings of the Royal Society B* **278**: 3096–3101.
- Glover CN, Bucking C, Wood CM (2013): The skin of fish as a transport epithelium: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **183**: 877–891.
- Jaeckle WB, Manahan DT (1989): Feeding by a ‘nonfeeding larva’: uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. *Marine Biology* **103**: 87–94.
- Katayama N, Kobayashi M, Kishida O (2016): An aquatic vertebrate can use amino acids from environmental water. *Proceedings of the Royal Society B* **283**: 20160996.
- Kishida O, Tezuka A, Ikeda A, Takatsu K, Michimae H (2015): Adaptive acceleration in growth and development of salamander hatchlings in cannibalistic situations. *Functional Ecology* **29**: 469–478.
- Li Y, Gal G, Makler-Pick V, Waite AM, Bruce LC, Hipsey MR (2014): Examination of the role of the microbial loop in regulating lake nutrient stoichiometry and phytoplankton dynamics. *Biogeosciences* **11**: 2939–2960.
- Luka Z, Mudd SH, Wagner C (2009): Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 22507–22511.
- Manahan DT, Davis JP, Stephens GC (1983): Bacteriafree sea urchin larvae: selective uptake of neutral amino acids from seawater. *Science* **220**: 204–206.
- Nosaka M, Katayama N, Kishida O (2015): Feedback between size balance and consumption strongly affects the consequences of hatching phenology in size-dependent predator–prey interactions. *Oikos* **124**: 225–234.
- Pütter A (1908): Die Ernährung der Wassertiere. *Zeitschrift für allgemeine Physiologie* **7**: 283
- Stephens GC, Schinske RA (1961): Uptake of amino acids by marine invertebrates. *Limnology and Oceanography* **6**: 175–181.
- Takatsu K, Kishida O (2015): Predator cannibalism can intensify negative impacts on heterospecific prey. *Ecology* **96**: 1887–1898.
- Tominaga A, Matsui M, Nishikawa K (2019): Two new species of lotic breeding salamanders (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) from western Japan. *Zootaxa* **4550**: 525–544.

表 1. 発育段階を独立変数に組み込んだ孵化幼生の成長に対する一般線形混合モデルの結果.

要因	自由度	分母自由度	<i>F</i> 値	<i>P</i> 値
種	2	69.31	701.90	<0.001
処理	2	344.8	6.41	0.002
種 × 処理	4	344.8	2.47	0.044
発育段階	1	343.6	52.44	<0.001
種 × 発育段階	2	343.6	33.10	<0.001
処理 × 発育段階	2	343.6	0.66	0.520
種 × 処理 × 発育段階	4	343.6	3.38	0.010

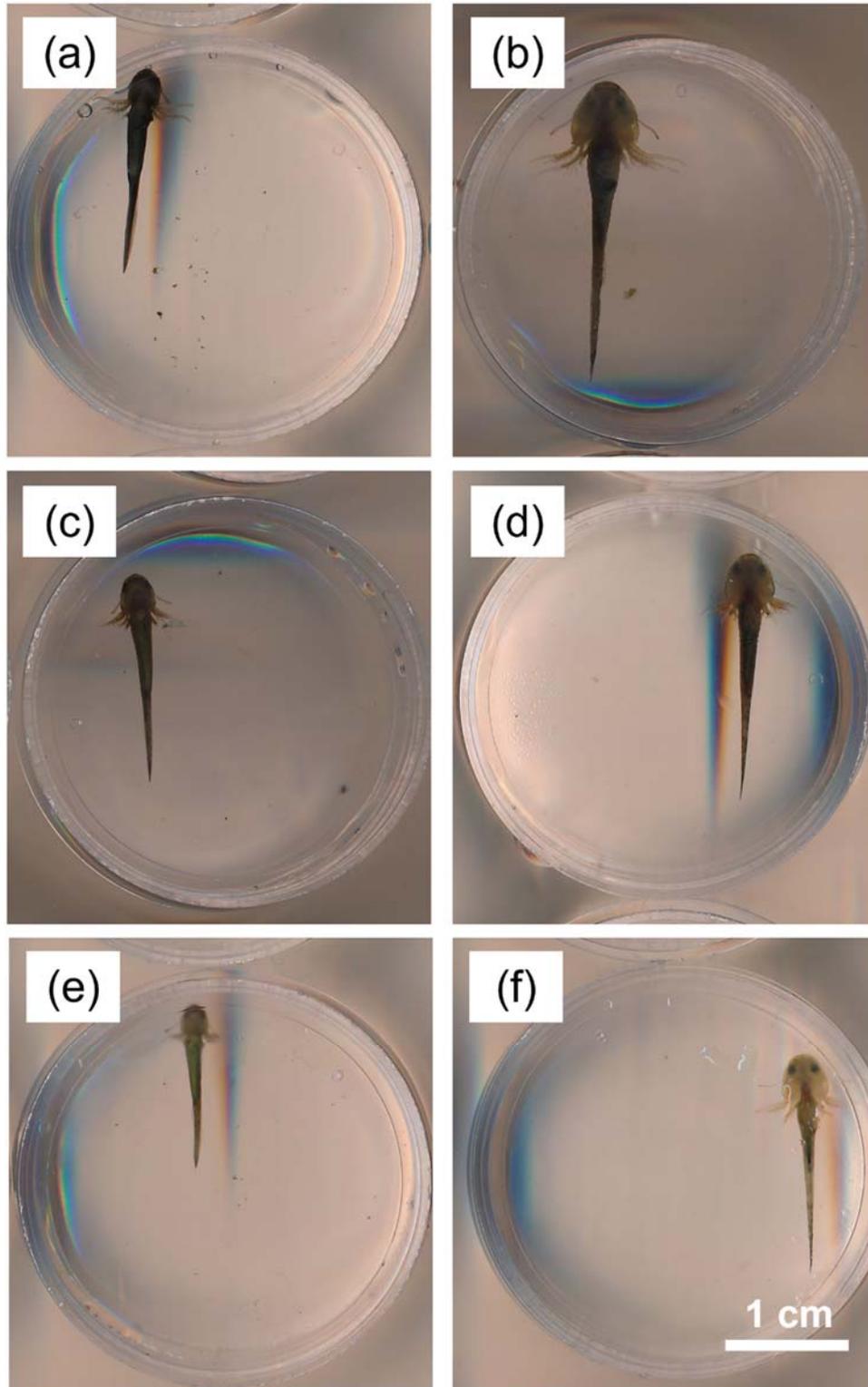


図1. 実験個体の写真. (a)実験開始時(1日目)と(b)実験終了時(7日目)のエゾサンショウウオ. (c)実験開始時と(d)実験終了時のトウホクサンショウウオ. (e)実験開始時と(f)実験終了時のクロサンショウウオ.

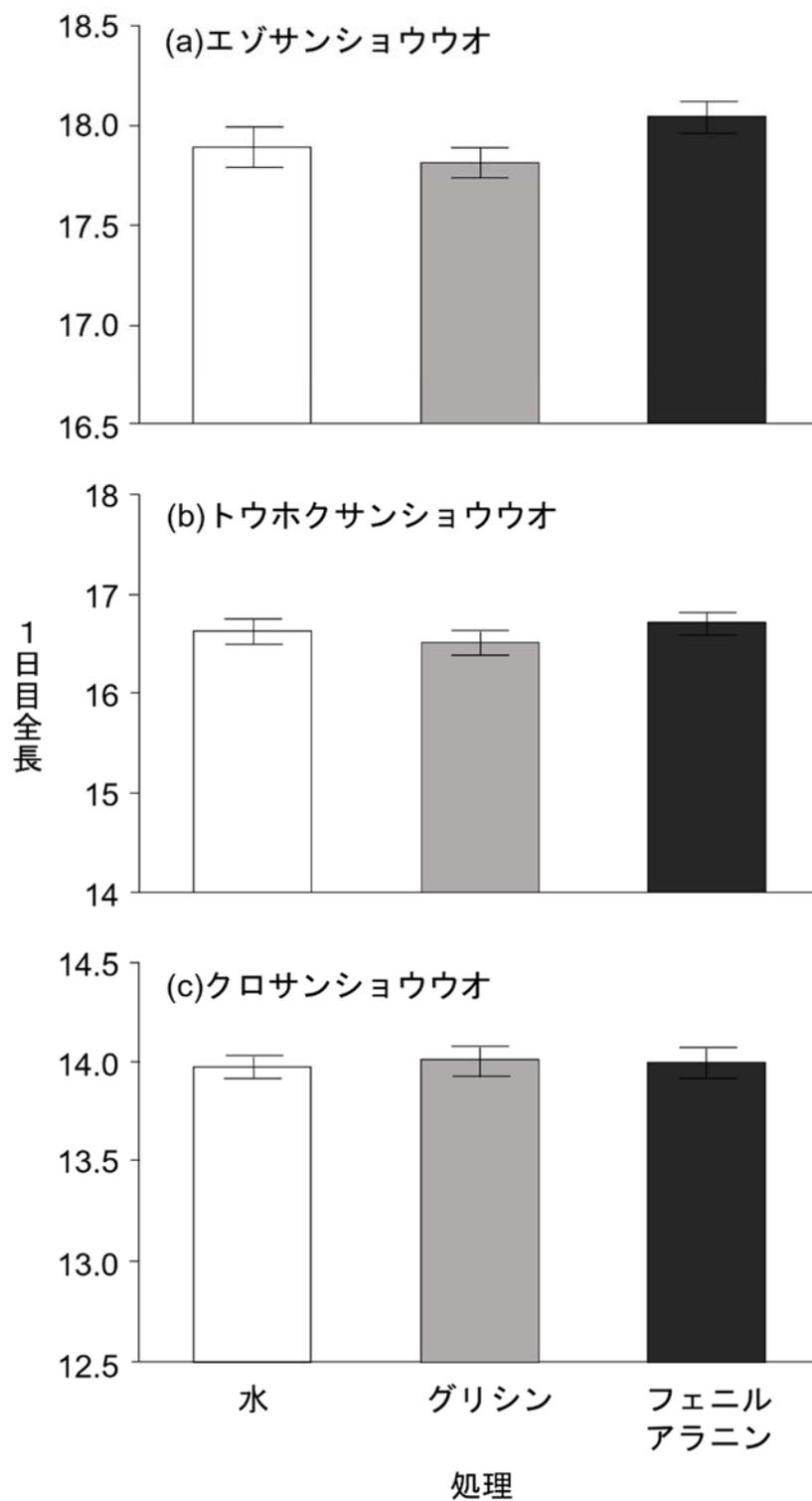


図2. 実験開始時（1日目）におけるサンショウウオ類の全長（エラーバーは標準誤差）.
 (a)エゾサンショウウオ, (b)トウホクサンショウウオ, および(c)クロサンショウウオ.

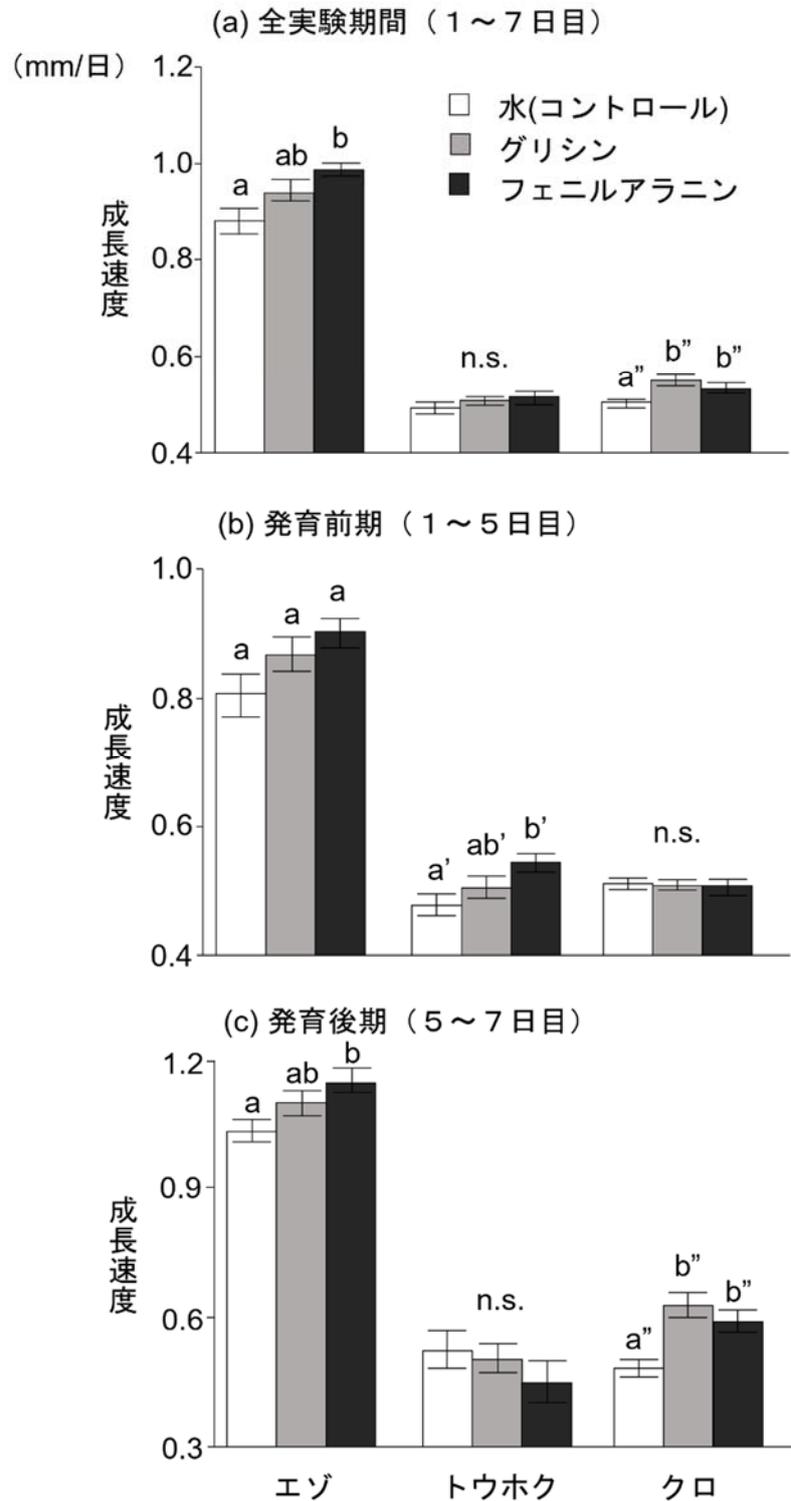


図3. 実験期間中のサンショウウオ類の成長速度(エラーバーは標準誤差)。(a)全実験期間(1~7日目)、(b)発育前期(1~5日目)および(c)発育後期(5~7日目)。図中の異なる文字(aとb, a'とb'およびa''とb'')は、同種内における処理間の事後検定の結果を示す(ボンフェローニ補正後のGLMM, $\alpha/N < 0.05$)。

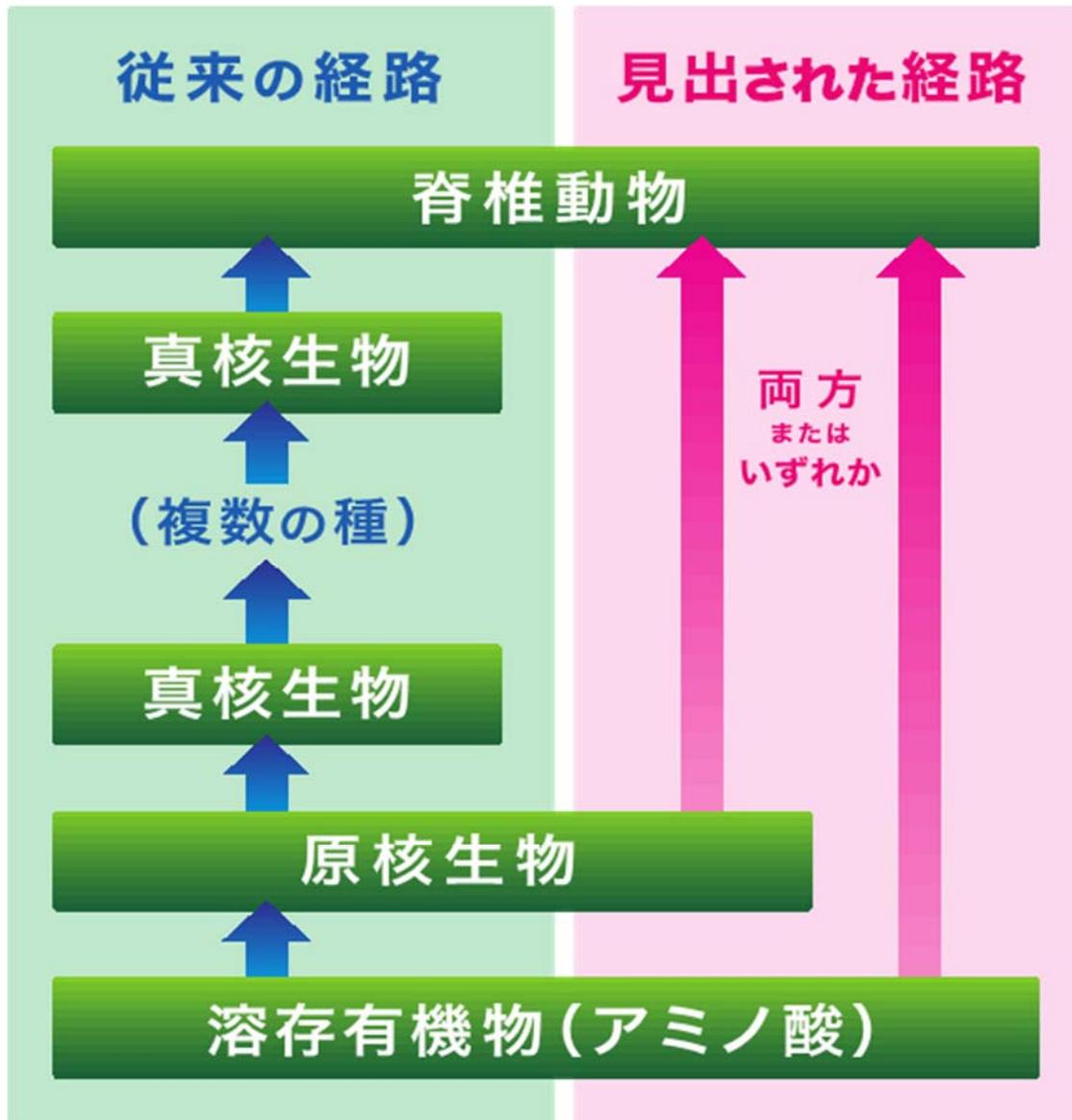


図4. 環境中の溶存アミノ酸の伝達経路. 従来の生態学の考え方では, 溶存アミノ酸由来のエネルギーは複数の真核生物が食う-食われる関係で連続的に繋がることで運ばれる. 新たに見出された経路では, 直接溶存アミノ酸を吸収する, あるいは溶存アミノ酸によって増えた原核生物を介して, 脊椎動物は溶存アミノ酸のエネルギーを利用する.