

# 硬骨魚類の脊椎骨の切片分析による、軽元素同位体比の履歴復元 手法の開発

## 概要

炭素・窒素安定同位体をはじめとする同位体分析手法は、動物の食性や生息地など、その生態を調べる手法として定着しています。さらに、一つの個体の分析から複数の成長ステージにおける同位体比の”履歴”を復元することができれば、同位体比の応用幅が大きく広がると考えられます。硬骨魚類では、耳石を使うことで酸素やストロンチウムなど一部の同位体元素において履歴を復元することが可能ですが、炭素や窒素といった生態学上で重要な軽元素同位体比の履歴を復元する手法は開発されていませんでした。本研究では、軟骨魚類で適用されていた分析手法に着想を得て、硬骨魚類の脊椎骨を用いた分析をすることで、この軽元素同位体比の履歴を復元する手法を提案し、その妥当性の検証を行いました。

この研究成果は、英国生態学会の学会誌「*Methods in Ecology and Evolution*」誌（電子版）に2017年6月15日付けにて掲載されました。

## 1. 背景

安定同位体分析は、魚類の回遊行動や食性、寿命など、観察が難しい野生下での生理・生態を調べる手法として広く活用されています。そして、近年注目されているのが、一つの個体の組織の分析から異なる成長段階における同位体比の”履歴”を復元する新しい同位体分析手法です。この分析で最も有名なのは、硬骨魚類の頭蓋骨内で形成される耳石を用いた方法です。耳石は二次的な代謝の影響がほとんど及ばず、また一定期間ごとに年輪が形成されるため、酸素やストロンチウムといった元素の同位体比の履歴を復元する上で理想的な器官です。しかし、耳石は炭酸カルシウムが主成分であるため、食性や移動の指標として重要な有機炭素や窒素といった軽元素同位体比の分析ができないという問題点がありました。

一方で、耳石を持たないサメなどの軟骨魚類の間では、脊椎骨を用いた分析により軽元素同位体比の履歴を復元する手法が提案されています。著者らはこの手法を硬骨魚類に適用することで、軽元素同位体比の履歴を復元できるのではないかと考えました。軟骨魚類は大型の脊椎骨を持つため、一つの骨を複数の切片に分割しても分析に必要な量の骨粉を採取することができます。しかし、脊椎骨が小さい一般的な硬骨魚類では、一つの脊椎骨で複数の切片を分析することはできませんでした。そこで、複数の脊椎骨を使って同じ位置の切片を集めて同位体分析を行う手法を考案しました。さらに、この手法の妥当性を検証するため、遡河性魚類であるサクラマス<sup>1</sup>の脊椎骨にこの手法を適用し、軽元素の同位体比により降海の履歴を復元できるかどうか検討しました。

## 2. 脊椎骨分析のプロトコル

骨の分析では、タンパク質成分であるコラーゲンを抽出してから同位体比の測定を行います。本研究で画、以下のようなプロトコルで脊椎骨からコラーゲン抽出を行いました。

1. 魚から脊椎骨を取り出し、ハサミやメスを用いて筋肉や軟骨を取り除く

2. 図 1-A のように脊椎骨をばらばらにして、クロロホルム：メタノール=1：1 混合溶液に一晩浸し、脂肪を取り除く。全ての脂肪分が除去できるまで繰り返す
3. 0.1N の NaOH に一晩浸して、脊椎骨に付着している有機酸を除去する
4. マイクログラインダーを用いて脊椎骨からスポンジ状の部分を削り取り、図 1-B のように脊椎骨椎体のみを取り出す
5. マイクロメーターを用いて全ての脊椎骨椎体の高さを測定し、高さがほぼ同じ脊椎骨椎体を一まとめにする
6. 凍結式マイクロトームの台座に同じ高さの脊椎骨椎体を並べて固定し、マイクロトームで任意の数に切り分ける
7. 同じポジションの脊椎骨切片を一つの遠沈管に集めて、1.2N の HCL を加えて一晩脱灰する
8. 円沈管をブロックヒーターにセットし、92℃程度で約 12 時間加熱する
9. 溶液をガラスフィルター(GF-F)でろ過し、残った液体を凍結乾燥してコラーゲンを得る

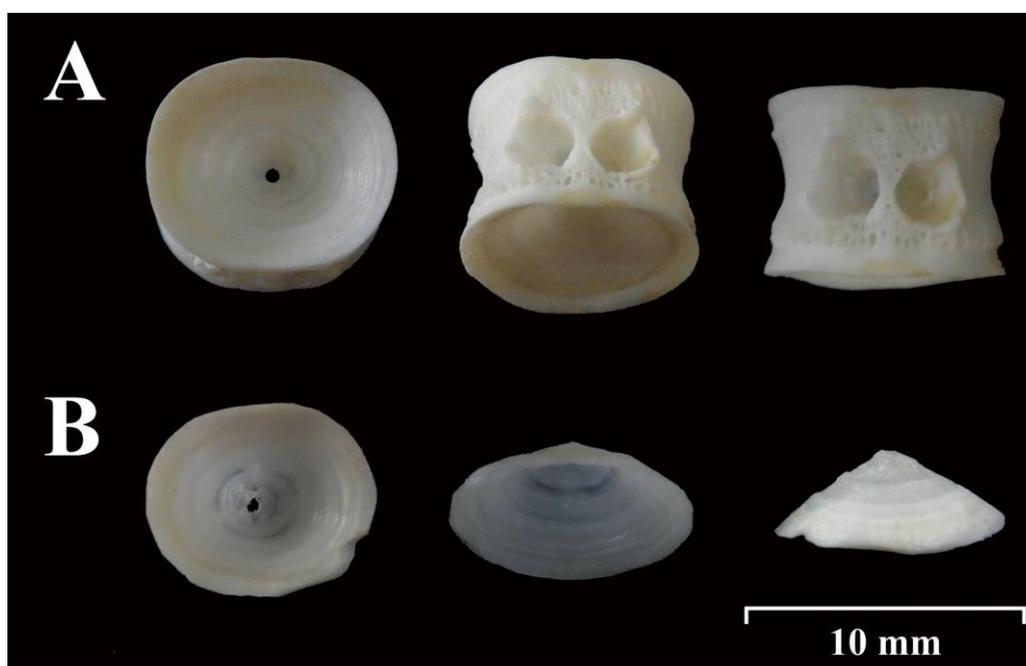


図 1：サケの脊椎骨(A)と、余分な骨を削り取った後の脊椎骨椎体(B)

### 3. 研究の方法と結果

本分析手法の有効性を検証するため、北海道東部地域標津町の忠類川でサクラマスへのサンプリングを行いました。サクラマスは他の遡河性のサケの仲間と比べて河川生活期が長いため、本研究の材料として適しています。また、忠類川ではサクラマスの人工孵化放流事業は行われていないため、人工的な餌の影響もありません。2016年7月に忠類川で3匹のサクラマスを採捕し、脊椎骨の切片ごとにイオウ安定同位体比分析を行いました。イオウ安定同位体比は陸域と海域で大きく値が変わりますが、栄養段階ごとの値の変化は極めて小さいという特徴があります。従って、サクラマスの脊椎骨に軽元素同位体比の履歴情報が保存されていれば、脊椎骨の中心部の切片からは河川のシグナルが、外側の切片からは海のシグナルが検出されるはずですが。

分析の結果、想定していた通り中心部に近い切片からは低いイオウ安定同位体比が、外側の切片からは高いイオウ安定同位体比が検出されました（図 2）。また、2 個体では脊椎骨の外側に向かうにつれてイオウ安定同位体比が上昇していますが、1 個体（OM-01）では値が上昇し始めてから 4 番目の切片で一度減少し、その後再び上昇していました。これらの個体で耳石の Sr 安定同位体分析を併せて実施したところ、OM-01 ではイオウ安定同位体比と同様に Sr 安定同位体比でも値が増加し始めてから一度減少するという、同じパターンが検出されました。これらの結果から、脊椎骨の切片分析は硬骨魚類の軽元素同位体比の履歴を復元する手法として有効であることが示されました。

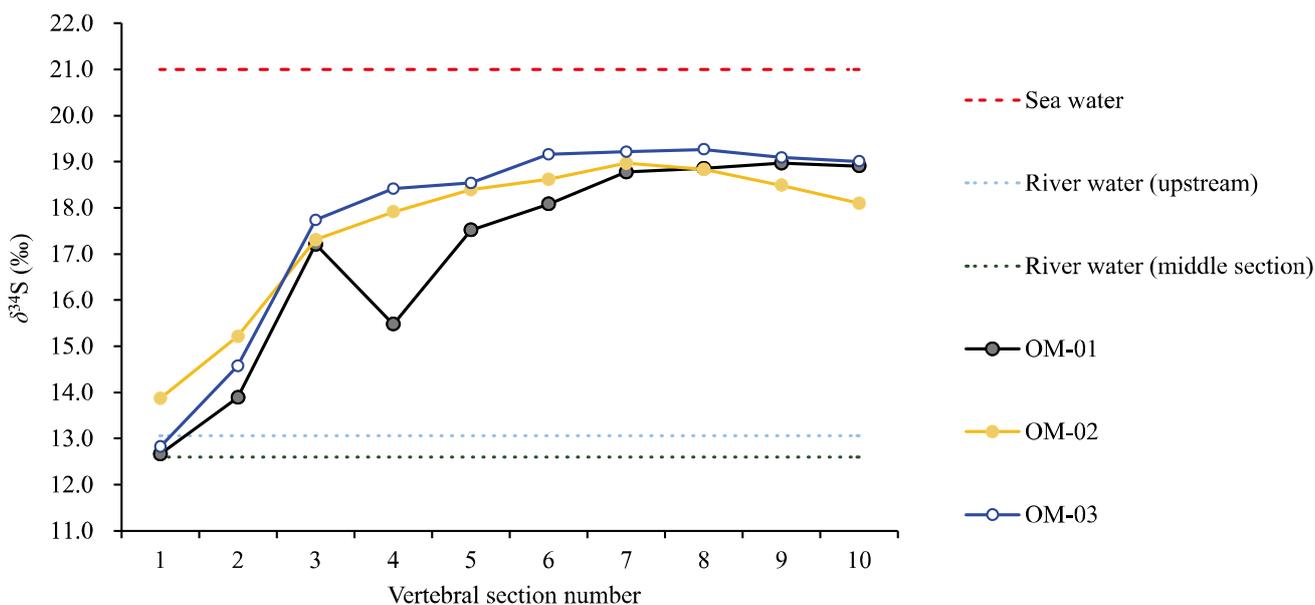


図 2：脊椎骨切片と河川水、海水のイオウ安定同位体比。横軸は脊椎骨切片の番号を示しており、小さい番号が中心部に近い（古い）切片で、外側に行くほど番号が大きくなる

#### 4. まとめ

本研究では、硬骨魚類の脊椎骨椎体の切片分析により、彼らの複数の成長段階における軽元素同位体比の履歴を復元できることを明らかにしました。この研究成果は、魚類の回遊経路や成長段階に伴う食性の変化など、生態学や海洋学における幅広い分野で応用可能だと考えられます。しかし、脊椎骨椎体における骨の二次代謝が及ぼす影響など、今後検討していく必要のある課題も残されており、今後この手法を一般的なものにするためにはさらなる研究が求められます。

#### <論文タイトルと著者>

表題：Incremental analysis of vertebral centra can reconstruct the stable isotope chronology of teleost fishes  
(脊椎骨椎体の切片分析により、硬骨魚類の安定同位体比履歴が復元できる)

著者：Jun Matsubayashi<sup>1,2</sup>, Yu Saitoh<sup>1</sup>, Yutaka Osada<sup>1</sup>, Yoshitoshi Uehara<sup>1</sup>, Junko Habu<sup>1,3</sup>, Tsuyoshi Sasaki<sup>4</sup>, Ichiro Tayasu<sup>1</sup>

(松林 順<sup>1,2</sup>, 斉藤 有<sup>1</sup>, 長田 穰<sup>1</sup>, 上原佳敏<sup>1</sup>, 羽生淳子<sup>1,3</sup>, 佐々木剛<sup>4</sup>, 陀安一郎<sup>1</sup>)

所属：<sup>1</sup> Research Institute for Humanity and Nature, <sup>2</sup> Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,

<sup>3</sup> University of California, Berkeley, <sup>4</sup> Tokyo University of Marine Science and Technology

(<sup>1</sup>総合地球環境学研究所、<sup>2</sup>海洋研究開発機構、<sup>3</sup>カリフォルニア大学バークレー校、<sup>2</sup>東京海洋大学)  
掲載誌：Methods in Ecology and Evolution