

課題名 D-1002 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発

課題代表者名 占部 城太郎 (東北大学大学院生命科学研究科群集生態学分野)

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 75,400千円(うち24年度24,700千円)
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 湖沼、集水域、近過去復元、食物網解析、生物モニタリング、分子マーカー、安定同位体比、元素分析、花粉分析
(5～10個 以下程度)

研究体制

- (1) 堆積物の動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元
(東北大学大学院生命科学研究科)
- (2) 堆積物の藻類・光合成色素を用いた湖沼の栄養・物理環境の復元
(愛媛大学上級研究員センター)
- (3) 堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元
(岡山大学異分野融合先端研究コア)

研究協力機関

総合地球環境学研究所、産業技術総合研究所、名古屋大学、静岡県立大学、京都府立大学、滋賀県琵琶湖博物館

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

過去100年の人間活動の高まりによる生態系変化は、人間社会の持続性に対する脅威になりつつある。この脅威を回避・緩和するために、生態系変化の迅速な検出と対策のための生態系モニタリングが必要であるが、現実には克服すべき3つの問題がある。

第1の問題は、すべての生態系を日常的に詳細にモニタリングすることは不可能なことである。生態系、特に生物に関する定期的な観測・観察には同定・計数などの熟練技術と人的労力が必要であり、人材や経済コスト面から、すべての生態系を常日頃からモニタリングすることは出来ない。このため、生物に関するモニタリングは、対象とする生態系の深刻な変化やその兆しが顕在化されてから開始されることが多く、事前データがないため、変化前のその生態系の様相や変化を引き起こした生態系過程がどのようなものであったかを確かな精度で把握できないことが多い。この現実的な問題を克服するためには、変化前の生態系を復元することで変化の様相とその過程を迅速かつ確に把握するためのレトロスペクティブ(事後回顧的)なモニタリング技術が必要である。

第2の問題は限られた生態系のモニタリングだけで環境変化要因を特定することは困難なことである。近年の人間活動の高まりは、生態系に対して様々な要因を介して影響を及ぼすため、対象とする生態系の深刻な変化が具体的にどのような環境変化要因(ドライバー)によって引き起こされたのか特定することは容易でない。例えば、本研究が対象とする湖沼生態系では、富栄養化問題のように、その変化は集水域の人間活動の問題とされることが多かったが、大気降下物、温暖化やそれに伴う季節性不順や降水量の変化、侵略的移入種の直接・間接効果など、実に多くの要因が生態系変化のドライバーとなりうる。生物の応答は、しばしば時間的遅れを伴うため、環境との時系列比較だけでは錯綜する要因を特定することが困難である。この問題を克服するためには、温暖化など広域的な環境要因と富栄養化など局所的な要因の影響を差分として識別できるプロキシ(代替指標)と、それを用い

た複数の生態系の比較モニタリングが有効である。

第3の問題として、生態系変化の兆しに対して迅速に対応するためには、様々な生態系で生物などを含む重要項目を常にリアルタイムで測定することが望ましいが、高山などの辺境地では実際的に不可能である。限られたコストの中で、社会ニーズに応えられる生態系（湖沼）管理のためには、これら3つの問題を克服する必要がある。しかし、我が国においては、そのようなモニタリング技術の開発は全く行われてこなかった。

2. 研究開発目的

湖沼堆積物には過去の生物群集や環境状態を物語る痕跡として、動植物プランクトンの遺骸や休眠卵、内生性や外来性の多様な有機物が年代ごとの層となって保存されている。この年代ごとに保存されている堆積物の生物・化学情報から過去の生物群集や環境状態を高度に復元することが出来れば、事前データのない湖沼に対しても、過去の状況と現在起こりつつある生態系変化をレトロスペクティブに把握することが可能となる。すなわち、湖沼堆積物の情報をモニタリングし、異なる湖沼間で比較出来るなら、これまでモニタリング対象外であった湖沼や、山岳湖沼のように日常的なモニタリングが困難な湖沼についても、生態系変化とその要因についての事後的なモニタリングが可能となる。本研究は、このような視点から、湖沼堆積物に残る生物・環境情報を高度に利用するレトロスペクティブ型のモニタリング技術を開発することを目的に行う。具体的には、

- ・最新の化学分析及び分子生物学的手法を古陸水学的アプローチに適用し、湖底堆積物コアが含む時間・化学・生物情報から近過去（100年程度）の湖沼環境と生物群集を復元する技術の開発を行う。
- ・その技術を複数の山岳湖沼と近隣の間活動が盛んな湖沼に適用することで、温暖化など広域的な要因と富栄養化など局所的な要因について湖沼生態系への影響評価を行い、環境モニタリング手法としての有効性を検証する。研究は、集水域の人為的影響のない3つの山岳湖沼（ニセコ大沼、羅臼湖、ミクリガ池）とそれら近隣にあり集水域の間活動が盛んな3つの低地湖沼（渡島大沼、阿寒湖、木崎湖）を対象に下記の3サブテーマについて解析し、その成果を比較統合する形で推進する。

サブテーマ（1）堆積物の動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元：湖沼食物網の鍵となる生物群である動物プランクトンを対象に、堆積物に残された遺骸の定量解析に加え、休眠卵のDNA解析を行うことで過去の群集構造とその変遷を高精度に復元するとともに、過去の生息環境復元のプロキシとして有効なDNA情報を抽出する。

サブテーマ（2）堆積物の藻類・光合成色素を用いた湖沼の栄養・物理環境の復元：動・植物プランクトン動態の高度復元と食物連鎖情報抽出に対する「SCEs色素」の有効性を検討し、低次生産動態解析の新たなプロキシの開発を行う。さらに湖沼生態系に対する大気由来栄養塩負荷の影響がどの程度の広がりを持つかを明らかにすることを課題目標の一つとし、湖沼特性の異なる北海道4湖沼（ニセコ大沼・羅臼湖・阿寒湖・渡島大沼）及び信州2湖沼（ミクリガ池・木崎湖）において、堆積物の年代を測定するとともに植物・動物プランクトン群集変化の復元と大気由来栄養塩負荷の影響評価を試みる。

サブテーマ（3）堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元：堆積物が含むリグニンなど陸上起源有機物を分析することで集水域からの有機物供給やその被覆・植生を復元する。また、 $\delta^{15}\text{N}$ を用いた人為起源窒素の負荷や $\delta^{34}\text{S}$ を用いた大気降下物、 $\delta^{13}\text{C}$ を用いた一次生産の変化、そして動物プランクトン遺骸の $\delta^{15}\text{N}$ ・ $\delta^{13}\text{C}$ 分析から過去の食物網の復元や $\delta^{18}\text{O}$ による温度変化評価など、湖沼生態系の高度復元のために最新の安定同位体科学の手法を開発・適用する。

3. 研究開発の方法

（1）堆積物の動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元

湖沼における動物プランクトン群集の集団変遷を調べるため、湖沼堆積物中のミジンコ（*Daphnia*）休眠卵鞘を利用した遺伝子解析方法（UltraSHOT法）の開発、およびその方法による各地の湖沼堆積物中のミジンコ休眠卵鞘の遺伝的解析を行った。遺伝子解析方法の開発は、生息する動物プランクトンに関する情報が既に得られていた山形県畑谷大沼のサンプルを利用して行った。卵鞘からのDNA抽出方法とPCRによるミトコンドリアDNAの増幅方法を、他の既存の方法と比較しその有用性を検討した。この方法を用いて、各地の山岳湖沼（羅臼湖・ニセコ大沼・ミクリガ池）および低地湖沼（阿寒湖・渡島大沼・木崎湖）の堆積物から採取したミジンコ休眠卵鞘の解析を行った。採取した湖底堆積物を深度別に切り分け、1cm毎に休眠卵鞘を採取した。これにより得た各深度における卵鞘数を用いフラックス（number/cm²/year）を算出した。さらにこれらの卵鞘および休眠卵を用いて、種判別および種内の遺伝子型の判別を行った。遺伝解析にあたっては、各湖沼の堆積物中から得た卵鞘でDNAを抽出し

た後、12SrRNA 遺伝子の増幅および配列決定を行い、遺伝子配列データベース (GenBank) の登録情報をもとに種の判別および現生個体と比較した。これらの解析により過去から現在に至るまでの群集構成の変遷解明を試みた。

ヒゲナガケンミジンコ類 (橈脚類) は、ミジンコ類 (枝角類) とともに、湖沼生態系の重要な動物プランクトンである。しかし古陸水学的な解析においては、堆積物中に遺骸が残らず、休眠卵を用いた種同定が極めて困難である、等のため、群集復元対象生物として扱われてこなかった。そこで本研究では、湖底堆積物に残存しているヒゲナガケンミジンコ類の休眠卵を、分子マーカーにより種判別する方法を開発した。最初に、日本各地からプランクトンとして採集されたヒゲナガケンミジンコ11種について28SリボソームDNAの部分塩基配列 (240bp) を決定し、配列ライブラリを作成した。続いて、日本各地の湖沼堆積物の最表層から単離したヒゲナガケンミジンコの休眠卵について、卵1粒から個別に抽出したDNAを鋳型に、上述の28SリボソームDNA部分配列をシーケンスし、配列ライブラリと比較し、種判別を試みた。

(2) 堆積物の藻類・光合成色素を用いた湖沼の栄養・物理環境の復元

北海道の4湖沼 (羅臼湖、阿寒湖、渡島大沼、ニセコ大沼) と信州の2湖沼 (ミクリガ池、木崎湖) の湖沼堆積物コアから過去100年にわたる動物・植物プランクトン群集の高度復元を行うため、 γ 線検出器を用いた ^{210}Pb 法による堆積物の年代決定、高速液体クロマトグラフィーによる光合成色素・カロテノイド補助色素の分析、動物プランクトン遺骸の分析を行った。SCEs色素については、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計による分析を行った。阿寒湖では、魚類の捕食圧についても検討するため、捕食圧の違いに応じて変化する*Daphnia*の個体サイズ (ここでは堆積物中に残存する尾爪サイズ) を調べた。阿寒湖・羅臼湖について栄養塩状態変遷を復元するため、一般に栄養状態に敏感に応答すると考えられる珪藻群集組成を分析した。*Daphnia*の尾爪サイズと珪藻の分析は生物顕微鏡下で行った。

(3) 堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元

過去100年間の人間活動による湖沼内部、集水域、そして広域の生態系の変遷を探るため、山岳湖沼 (羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池) と低地湖沼 (阿寒湖、渡島大沼、木崎湖) を対象とした。採集した堆積物は、凍結乾燥後、以下の分析に用いた。炭素・窒素 (C・N) 濃度及び同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$ 及び $\delta^{13}\text{C}$) は、元素分析計付き質量分析計によって測定した。炭素濃度及び炭素同位体比は、0.5N塩酸で除炭酸処理した試料について分析した。炭素・窒素濃度は、内部生産量や堆積物中の陸上有機物と内部生産の割合の指標となる。また、それらの同位体比は、プランクトンによる一次生産速度の変化や、窒素の起源や湖内の窒素循環の指標となる。リグニン由来フェノール分析は、窒素雰囲気下で試料の酸化銅酸化分解を行い、ガスクロマトグラフィーによって分離・定量した。リグニン由来フェノールは、堆積物中の有機物に占める陸上有機物の割合や、裸子植物と被子植物の比、リグニンの酸化分解の程度などを指標するバイオマーカーである。重金属元素は、試料を硝酸-フッ酸-過塩素酸によって分解、乾固させたのち、硝酸を加えてICP-MSによって各元素濃度、鉛同位体比を測定した。鉛同位体比は産地によって異なることが知られているため、鉛の由来の指標として用いた。また、酸分解後の試料の一部からクロマトグラフィーによってストロンチウムを分離し、TIMSによって、ストロンチウム同位体比を測定した。ストロンチウム同位体比は、鉛同様、鉱物に特異的であるため、湖内に流入する鉱物の起源の指標として用いた。周辺の植生を表す花粉の分析は、試料を分解後、水酸化カリウムとフッ化水素酸処理を行い、シリコンオイルに封入した。その後、顕微鏡下で、花粉の同定ならびに計数を行った。また、リグニン由来フェノールや花粉との対応関係を調べるため、各湖沼の周辺の植生をGISを用いて数値化した。

4. 結果及び考察

(1) 堆積物の動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元

動物プランクトンの情報が事前に得られていた畑谷大沼のミジンコ卵鞘を利用し、遺伝子解析方法の開発を行った。4つの条件で卵鞘からDNAが増幅される成功率を比べたところ、UltraSHOT法×PCR条件IIIによる卵鞘からの塩基配列決定が最も成功率が高かった。この手法を用いて、畑谷大沼の約100年前から現在までのミジンコ休眠卵鞘で遺伝子解析を行った。その結果、過去のミジンコは現在とは遺伝子組成が異なっていることが示された。続いて山岳・低地の各湖沼におけるミジンコ個体群動態の復元を行った。山岳湖沼 (羅臼湖・ニセコ大沼・ミクリガ池) ではミジンコがやや増加する傾向にあったが、いずれの山岳湖沼でも現在と過去の生息種の遺伝的組成に変化は確認されなかった。一方、低地湖沼 (阿寒湖・渡島大沼・木崎湖) のうち、阿寒湖と木崎湖ではミジンコが近年急速に増加して

おり、しかも阿寒湖では現在と過去で生息種が異なることが示された。木崎湖でも、現生の2遺伝子型のうち一方は、100年以上前と予想される層からは検出されなかった。渡島大沼では、休眠卵フラックスの年変動が著しく大きく、しかも年代によって種が入れ替わっていることが確認された。

ヒゲナガケンミジンコ類に関しては、11種から21パターンの28SリボソームDNAハプロタイプが得られた。それらの塩基配列は240bpと短い、同一の配列が複数種から得られることはなかった。よって、この塩基配列を用いて日本淡水産ヒゲナガケンミジンコ類の、二次DNAバーコードライブラリーを作成した。これを堆積物中のヒゲナガケンミジンコ類休眠卵に適用し、ヒゲナガケンミジンコ過去群集解析を試みたところ、山岳湖沼では、過去100年間の種組成に変化は認められなかったが、低地湖沼では、大型種から小型種へと出現種が交代していることが検出された。

(2) 堆積物の藻類・光合成色素を用いた湖沼の栄養・物理環境の復元

動・植物プランクトン動態の高度復元は、レトロスペクティブ型モニタリング技術開発の要の一つである。これらプランクトン変動には、食物連鎖におけるボトムアップ・トップダウン効果の両方が寄与している。しかし、従来の植物色素や動物プランクトン遺骸に基づく指標だけでは上位栄養段階の捕食量の情報が欠落していたために、プランクトン変動に対するボトムアップ・トップダウン効果の影響評価が困難であった。そこで、動物プランクトン捕食量の指標化が期待できる、クロロフィル誘導体ステリルクロリンエステル類、「SCEs色素」の有用性を検討した。ニセコ大沼で検討した結果、SCEs色素と植物色素及び動物プランクトン遺骸から、1)動物プランクトンの餌藻類の特定とその捕食量変化、2)動物プランクトン増加に対するボトムアップ効果の寄与を可視化できることがわかった。

近年、越境汚染による大気経路栄養塩負荷の山岳湖沼生態系に対する脅威が懸念されている。そこで、大気由来の栄養塩負荷による生態系シフトが、我が国においてどの程度の広がりを持つかを明らかにする解析を行った。過去100年の動植物プランクトン量を復元した結果、ニセコ大沼とミクリガ池、蓬萊沼の3つの山岳湖沼から、共通する1980年代後半以降の植物・動物プランクトン増加が明らかとなった。プランクトンが増加する時期は、窒素同位体比が減少する傾向にあることから、大気からの栄養塩負荷がプランクトン増加を引き起こした可能性が高いことがわかった。

保全目標となる生物相や栄養塩環境の過去から現在に至る変化情報は自然再生やそのための環境政策にとって必須である。近過去復元の結果、阿寒湖では、珪藻群集組成から1950年に富栄養化が始まり、同時に動物プランクトンは大型のミジンコ *Daphnia* から小型種である *Bosmina* へ推移していることがわかった。阿寒湖では2000年以降も、珪藻群集からは富栄養化の改善の兆しは見えず、*Daphnia* の堆積量も1950年以前のレベルにまで増加していなかった。また、渡島大沼でも、藻類全般に増加の一途をたどり、現在もなお富栄養化が進行していることがわかった。木崎湖は、1990年代以降、クロロフィルや珪藻・渦鞭毛藻由来色素、緑藻由来色素の堆積量は1960年以前と同程度にまで低下し、富栄養化が収束する傾向にあることがわかった。

(3) 堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元

羅臼湖では、測定項目の多くで過去100年間に大きな変動を示さなかった。一方、ニセコ大沼では、炭素・窒素濃度やその同位体比の変動、1910年以降の鉛などの重金属濃度の上昇などの変化が見られた。また、重金属濃度の変化と同時にストロンチウム同位体比の減少が見られた。ミクリガ池では、1960年以降に有機物の供給が一旦増加し、その後安定していた。また、鉛濃度の1980年以降の増加が確認された。これら山岳湖沼では、表層に窒素同位体比の減少が見られた。阿寒湖では、1910年頃から全有機炭素濃度や炭素窒素同位体比の増加、重金属濃度の増加、リグニン由来フェノール濃度の低下が見られた。渡島大沼では、1910年頃に窒素同位体比や重金属濃度の増加、1960年に炭素・窒素比の減少が見られた。木崎湖では、1930年頃に重金属濃度の増加やリグニン由来フェノール濃度の低下、1960年頃に炭素・窒素比の低下や窒素同位体比の低下が見られた。これら6湖沼に共通するパターンとして、鉛同位体比 ($^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$) が1910年頃から減少を始め、1970年頃から一定であった。植生のパラメーターであるリグニン由来フェノールの組成はこれら湖沼では大きな変化はなかったが、花粉分析から低地湖沼である渡島大沼や木崎湖でスギやカラマツの花粉の増加が見られた。

考察：

堆積物の動植物プランクトンや化学物質には、湖沼に対する集水域の人間活動の高まりによる富栄養化の影響、内水面漁業の影響、大気効降下物の影響など、湖沼の過去の生物群集とその変化ドライバーを特定する重要な情報が含まれていることが明らかとなった。例えば、ミジンコ類やヒゲナガケンミジンコ群集組成の時空間的変動には様々な人為的影響が関与しており、その影響の強さは山岳湖

沼と低地湖沼では異なっていた。特に、調査したすべての低地湖沼で、植物プランクトンの捕食者であり魚類の餌となる動物プランクトンが、生物量だけでなく過去から現在に至る種や遺伝子型の入れ替わりが生じていたことは、人間活動による湖沼食物網の影響が我が国全域にわたって生じていたこと、高度経済成長期とともに集水域の人間活動により多くの湖沼で富栄養化が進行したこと、しかし湖沼の生物群集変化は富栄養化によるものだけでなく、ワカサギ等の魚類の放流といった内水面漁業も強く関与していることが、今回の調査で明瞭に示された。一般に集水域の人間活動の高まりによる湖沼の水質悪化は、アオコなど植物プランクトンの繁茂によるとされてきた。しかし、今回調べた湖沼の過去復元で明らかになったように、魚類の放流とともに動物プランクトンが大型種から小型種へと変化したことは、動物プランクトンによる植物プランクトンへのグレージング圧が低下したことを示している。低地湖沼の水質悪化の一因には、これまで見過ごされがちであった、魚類放流による動物プランクトン群集の変化を介したトップダウン効果の影響も関与していたと考えられる。

このように、プランクトン群集の変動を年代測定とともに高度復元したところ、上述した魚類の放流や集水域人間活動による富栄養化の影響の他に、山岳湖沼では北陸から北海道西部までの広範囲にわたって、大気経由の栄養塩負荷に生態系シフトが1980年代後半に起こった可能性が示唆された。特に、日本海に近い地域の山岳湖沼が、アジア大陸起源の大気経由栄養塩負荷の影響を強く受けていることが伺われた。一方、北海道東部の羅臼湖では、生態系や栄養状態の変化はほとんど無くよく保全されていることがわかった。

上述した山岳湖沼の現況と変化は重金属の堆積速度からも裏付けられた。例えば、羅臼湖では、過去100年間、各種重金属濃度の堆積速度に変化はなかったが、同じ山岳湖沼のニセコ大沼やミクリガ池では、1910年頃から重金属濃度の増加し、1980年頃から窒素同位体比が低下するなど、大気降下物によると考えられる人為影響が確認された。重金属負荷の要因として、鉱山開発や観光地化の影響や、アジア大陸からの長距離輸送の可能性が考えられる。阿寒湖や渡島大沼、木崎湖などの低地湖沼では、その地理的違いにもかかわらず1960年頃から富栄養化しているが、山岳湖沼と同様、平地湖沼でも1910年頃に近代化工業化の影響によると思われる鉛や亜鉛などの重金属濃度の増加が確認された。また、対象とした6湖沼において見られた鉛同位体比の変化は、近年日本で観測された乾性湿性大気降下物に含まれる鉛の同位体比を反映している。これら降下物の主体の由来は現時点では断定出来ないが、日本の焼却炉起源の他に、日本海側ではアジア大陸からの長距離輸送による影響が考えられるため、西日本の湖沼での解析などを含めたさらなる監視が必要である。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

湖沼環境の近過去復元方法の開発に関して：

本研究で開発したミジンコ類の卵鞘から微量DNAを抽出する方法は、堆積物の生物遺骸から種の同定や遺伝子型の変遷を把握することを可能にするもので、湖沼の近過去復元精度を大きく向上させるものである。実際、この方法を適用し、これまで復元が困難であったミジンコの遺伝子型の変遷を堆積物から復元することが出来たことは、大きな成果と考えている。この分子生物学的手法により、さらなる展開、例えば生物遺骸そのものからのDNA情報の抽出や機能に関与する遺伝子をマーカーとすることで遺伝子を用いた環境モニタリングへの道筋が開けた。さらに本研究では、既存の研究ではほぼ不可能とされていた、ヒゲナガケンミジンコ類の過去の群集組成を復元する手法を開発し、湖のプランクトン群集の復元過程に、新しい効果的なツールを提供することができた。

従来用いられてきた植物色素や遺骸に基づく近過去復元では、変動の詳細を記述することは出来ても、その変動がボトムアップ効果とトップダウン効果のどちらの効果によるものなのか解明が困難であった。本研究では、植物色素と動物プランクトン遺骸とともにSCEs色素の情報と併用することで、植物プランクトン群集へのボトムアップ効果とトップダウン効果を解析できる手法について目処をつけることが出来た。さらに、微量金属類や従来の窒素・炭素安定同位体とともに鉛やストロンチウムなどの安定同位体を詳細に解析することで、湖沼への大気降下物への影響が把握できることも分かった。

これらの手法を組み合わせることにより、「富栄養化以前」から現在に到る生物群集や栄養塩環境の変遷を復元するとともに、その変化要因をも解明出来るようになった。例えば、日本の湖沼生態系への人為攪乱としては、高度経済成長期の富栄養化がよく引き合いにだされてきたが、今回の研究の結果、いくつかの湖では日本の近代化が本格化する1910年頃から既に重金属の流入や窒素源の変化などの人為影響が生じている可能性が示された。本研究で得られた近過去データは、現在の湖の状況との比較することで、湖沼生態系回復へ向けての指標を提供し、ひいては、どのような生態系を取り戻

すことが望ましいのか、保全目標を具体化する上で重要な役割を果たすと期待される。

また、頻繁な調査が困難な山岳湖沼においても、本研究で開発した手法を適用することで、近過去から現在に至る環境変遷を、高い精度で解析できるようになった。人為影響がない、これまで手つかずの生態系と考えられてきた山岳湖沼で、大気降下物による窒素負荷や重金属による汚染の進行が北米やヨーロッパで示唆されているが、我が国においても例外ではないことが判った。本研究で対象とした山岳湖沼のうち、羅臼湖を除く湖沼で大気降下物由来の汚染影響が現れていた（次項参照）。この人為影響は、各種元素分析、同位体分析、リグニン由来フェノールの分析など、多項目を測定する、複数生態系の比較モニタリングによって検出されるものであり、本研究手法の有効性を示すものである。なお、幸いなことに、世界遺産地域でもある知床の羅臼湖が大気降下物の影響を受けず、生物群集は良く保存されていた。羅臼湖は太平洋・オホーツク海に面しているため、大陸からの影響が小さいのであろう。

大気降下物の長期影響に関して：

アジア大陸からのエアロゾルの飛来は日本や周辺海域を含む広域で起こっているにもかかわらず、それに由来する窒素やリンの大気降下物の湖沼生態系への影響は全く判っていなかった。本研究では、湖沼に対する大気由来の栄養塩負荷の影響が、我が国においてどの程度の広がりを持つかを調べる事が出来た。今回及び我々の以前の研究から、調査したニセコ、立山、八幡平の3つの山岳域の湖沼で、1980年代からの植物・動物プランクトンが共通して増加していることが明らかとなった。この増加は、堆積物の窒素同位体比の減少と一致することから大気経由の栄養塩負荷に起因する。このことは、北陸から北海道西部までの広範囲にわたって、大気経由の栄養塩負荷による山岳湖沼の生態系シフトが起こっている可能性を示唆している。特に、日本海に近い地域の山岳湖沼が、アジア大陸起源の大気経由栄養塩負荷の影響が強く出ている可能性がある。ただし、本研究では手法の開発に主眼をおいたため、西日本や九州など、より大陸の影響を受けやすい地域の湖沼調査は行っていない。集水域を超えた大気降下物による湖沼生態系への影響は、今後ますます深刻になる懸念があることから、今回調査出来なかった湖沼での研究展開が必要である。

なお、本研究の学術的成果のうち、方法論に関する事項はすでに学術論文として国際誌に発表している。調査湖沼に関する環境変化に関する事項は、年代測定の見直しを行ったため、論文での発表が遅れているが、逐次国際誌に発表する予定である。また、本プロジェクト研究で開発した手法やアプローチは、他の多くの研究者やコンサルタント、調査機関でも容易に利用できるように、事例集を含めたマニュアルとして一般書籍「湖沼近過去調査法-環境評価と保全目標設定のために-（仮題）」として共立出版社よりH25年度中に出版を予定している。

（2）環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

特に記載すべき事項はない

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

本課題で開発されたレトロスペクティブ型モニタリング手法の開発により、モニタリグが出来なかった湖沼での環境変化を検出出来るようになった。一般に、生物モニタリングは時間や予算などの高いコストが必要となるため、限られた湖沼でしか実施されていない。今回開発した一連の手法は、過去に生じた生物群集の変化だけでなく、その変化要因をも解析することが可能である。これまで、過去の経緯がわからないために、例えば土地利用改変などによる影響評価や保全目標の設定が困難であったが、本手法によりそれら事業に対する影響評価や保全に際しての具体的な目標設定を行うことが可能となった。すなわち、レトロスペクティブ型モニタリング技術による湖沼の生態系監視を行うことで、モニタリグデータのない湖沼でも、集水域の土地利用変化やその他の人間活動に際して影響評価を行い環境行政に役立てることが出来る。今後、監視対象外である多くの湖沼の生態系についても、積極的にレトロスペクティブ型モニタリングを用いることで現状把握と生態系保全の目標設定が可能となるだろう。特に、本課題では対象としなかったが、アジア大陸に近い西日本の湖沼や、ダム湖における現状把握が急がれる。なお、本研究のデータの具体的な活用例を以下に示す。

低地湖沼での活用例としては、例えば阿寒湖は、周辺の観光地化に伴う湖の富栄養化が進んでいる湖沼である。近年の栄養塩負荷制限の取り組みにより富栄養化が一旦収束するものの、2000年以降再び藻類・動物プランクトンがこれまでになく増加傾向にあることが我々の成果から明らかとなった。

これは、排水処理など湖への栄養塩負荷対策が一定の効果があったものの、まだ十分ではないことを示している。

湖沼を保全していくためには、個々の湖沼ごとに望ましい姿を明らかにし、環境行政として具体的な保全目標をたてる必要である。しかし、我が国のほとんどすべての湖では富栄養化以前のモニタリングが実施されていなかったために、目標設定が不十分であった。本研究が開発したレトロスペクティブ型モニタリングを適用することで、それらの目標設定に不可欠な過去の生物相を把握することが可能となった。また、現在の生物相までに到る生態系変化の長期的なプロセスを明らかにすることで、具体的な保全対策の立案することが可能になるだろう。

山岳湖沼に関して、北海道東部の羅臼湖で得られた「過去100年間にわたり環境が保全されている」という今回の結果は、世界自然遺産である知床の希少性を強く支持するもので朗報と言える。一方、ニセコ大沼（北海道南西部）・ミクリガ池（北陸）と先行研究における蓬萊沼（東北）の結果から、我が国の貧栄養山岳湖沼では過去100年の間に大気経由の栄養塩等の負荷が高まり、生態系が大きく変化したことが示された。この事実は、湖沼生態系の保全には、集水域の対策だけでなく、地域や国際的な対策の必要性を意味している。集水域に人間活動のない山岳湖沼での生態系変化は、東アジアの越境汚染問題解決に向けた国際的コンセンサスを得る材料となりうるだろう。今後、排出量やモニタリングシステムのアジア地域について、環境政策として国が取り組むべき契機になると考えられる。

なお地域や自治体などでの保全事業の立案にもレトロスペクティブ型のモニタリングが容易に利用出来るように、本研究で開発した手法・アプローチは、上述したように、一般書籍としての出版を予定している。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) 林 竜馬、兵藤不二夫、占部城太郎、高原光：日本花粉学会会誌，58(1)，5-17(2012)。「琵琶湖湖底堆積物に記録された過去100年間のスギ花粉年間堆積量の変化」
- 2) S. Ishida, H. Ohtsuki, T. Awano, N. K. Tsugeki, W. Makino, Y. Suyama and J. Urabe: *Limnology*, 13, 261-267 (2012) “DNA extraction and amplification methods for ephippial cases of *Daphnia* resting eggs in lake sediments: a novel approach for reconstructing zooplankton population structure from the past”
- 3) N. K. Tsugeki, T. Agusa, S. Ueda, M. Kuwae, H. Oda, S. Tanabe, Y. Tani, K. Toyoda, W-L. Wang and J. Urabe: *Ecol. Res.*, 27, 1041-1052 (2012) “Eutrophication of mountain lakes in East Asia due to increasing deposition of anthropogenically-produced dust” [日本生態学会2013年度 Ecological Research 論文賞]
- 4) M. Kuwae, N. K. Tsugeki, T. Agusa, K. Toyoda, Y. Tani, S. Ueda, S. Tanabe and J. Urabe: *Sci. Tot. Environ.*, 442, 189-197 (2013) “Sedimentary records of metal depositions in Japanese alpine lakes for the last 250 years: Recent enrichments of airborne Sb and In in East Asia”
- 5) W. Makino, H. Ohtsuki and J. Urabe: *Limnology*, in press (2013) “Finding copepod footprints: a protocol for molecular identification of diapausing eggs in lake sediments”

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 石田聖二、牧野渡：吉田丈人、鏡味麻衣子、加藤元海（編）シリーズ現代の生態学 第9巻 淡水生態学のフロンティア。共立出版（2012）“1章：淡水動物プランクトン種の地理的構造を形成した歴史的プロセス”
- 2) 槻木玲美：吉田丈人、鏡味麻衣子、加藤元海（編）シリーズ現代の生態学 第9巻 淡水生態学のフロンティア。共立出版（2012）“18章：古陸水学的手法による近過去の湖沼生態系変動の解析”
- 3) N. K. TSUGEKI, J. URABE: *In: Goldman G., Kumagai M., Roberts R. (eds) Effects of Climate Change and Variability on Inland Water Systems of the World: what can be done to reduce negative impacts? Wiley Blackwell (2013) “Chapter 7: Eutrophication, warming and historical changes of the plankton community in Lake Biwa during the 20th century”*

(2) 主な口頭発表（学会等）

- 1) 槻木玲美、王婉琳、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、田辺信介、占部城太郎：地球惑星科学関連学会2010年合同大会（2010）「八幡平湖沼のプランクトン長期動態とその変動要因：山岳湖沼で何が起きているか？」

- 2) 槻木玲美、占部城太郎、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、王婉琳、田辺信介：
日本生態学会第58回全国大会(2011)「アジア大陸起源の大気降下物は日本の湖沼へどのような影響を与えているか？」
- 3) N. K. Tsugeki, T. Agusa, S. Ueda, M. Kuwae, H. Oda, S. Tanabe, Y. Tani, K. Toyoda, W-L. Wang and J. Urabe: ASLO Aquatic Sciences Meeting, Japan, 2012. “Eutrophication and increasing metal deposition of mountain lakes in East Asia due to anthropogenically-produced dust”
- 4) 占部城太郎：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「イントロダクション - 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング」
- 5) 槻木玲美、加三千宣：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「堆積物の色素・遺骸を用いた湖沼の植物プランクトン動態の復元」
- 6) 牧野渡、大槻朝、石田聖二、占部城太郎：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元」
- 7) 佐々木尚子、林竜馬：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「堆積物中の花粉を用いた湖沼・集水域植生の復元」
- 8) 兵藤不二夫、大元皓平：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元」

7. 研究者略歴

課題代表者：占部城太郎

東京都立大学大学院理学研究科博士課程単位取得中退、理学博士（都立大学）、
現在、東北大学大学院生命科学研究科教授

研究参画者

(1) 1) : 占部 城太郎 (同上)

2) : 牧野 渡

北海道大学水産学部卒業、博士（水産学）、現在、東北大学大学院生命科学研究科助教

(2) : 加 三千宣

大阪市立大学理学部卒業、博士（理学）、現在、愛媛大学上級研究員センター准教授

(3) : 兵藤 不二夫

京都大学理学部卒業、博士（理学）、現在、岡山大学異分野融合先端研究コア准教授

D-1002 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発

(1) 堆積物の動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元

東北大学
大学院生命科学研究科
占部 城太郎
牧野 渡

<研究協力者> 東北大学大学院生命科学研究科 石田 聖二・大槻 朝

平成22～24年度累計予算額：30,426千円

(うち、平成24年度予算額：10,272千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブテーマは、分子生物学的手法を用いて過去の動物プランクトン群集を高精度で復元する手法を開発し、その有用性を実証することを目的とした。ミジンコ類 (*Daphnia*) では生息に不適な時期を乗り越えるために産出する休眠卵が湖底泥に堆積するが、多くは孵化しており、休眠卵を包んでいる鞘 (卵鞘) だけが残されている場合が多い。そこで本サブテーマでは、まずこの卵鞘に残されている微量DNAを抽出・増幅する手法を探索した。その結果、UltraSHOT法という手法を開発し、休眠卵だけでなくこれまで困難とされてきた卵鞘からもDNAを抽出することに成功し、ミジンコ種や遺伝子型を同定することを可能にした。この手法は、他の動物プランクトン休眠卵や遺骸全般にも適用することが出来るため、これまで大雑把な復元しか出来なかった過去のプランクトン生物群集や個体群を種や遺伝子型といった高解像なレベルで復元を可能にすると考えられる。その具体例としてケンミジンコ類 (Copepoda) についても解析を行った。ケンミジンコ類はミジンコ類とならんで湖沼の主要な動物プランクトンであるが、遺骸が容易に分解するため、従来の群集復元では無視されてきた。そこでケンミジンコ類の休眠卵に注目し、UltraSHOT法によるDNA抽出を行い、遺伝解析を行うことで過去の個体群の変遷を復元することに成功した。これらの手法を自然湖沼に適用したところ、山岳湖沼 (阿寒湖、ニセコ大沼、ミクリガ池) では、どの湖沼においても、湖沼毎に単一の *Daphnia* 種の単一の遺伝子型、および単一のヒゲナガケンミジンコ種が継続して出現したのに対し、低地湖沼 (阿寒湖、渡島大沼、木崎湖) では、ミジンコ類でもヒゲナガケンミジンコ類でも、過去100年の間に優占する出現する種や遺伝子型が変化したことが判明した。このように、本サブテーマは、分子生物学的手法を適用する手法を開発し、それにより過去のプランクトン群集を高精度に復元することを可能にした。

[キーワード]

湖沼生態系、近過去復元、生物モニタリング、分子生物学的手法、動物プランクトン

1. はじめに

過去100年の人間活動の高まりによる生態系変化は、人間社会の持続性に対する脅威になりつつある。この脅威を回避・緩和するために、生態系変化の迅速な検出と対策のための生態系モニタリングが必要である。しかし、高山など貴重な自然が残されている生態系は辺境地であるため、それら生態系を常日頃からモニタリングすることは出来ない。また、我が国では、生物に関するモニタリングは、対象とする生態系の深刻な変化やその兆しが顕在化されてから開始されることが多く、事前データがないため、変化前のその生態系の様相や変化を引き起こした生態系過程がどのようなものであったかを確かな精度で把握できないことが多い。この現実的な問題を克服するためには、変化前の生態系を復元することで変化の様相とその過程を迅速かつ的確に把握するためのレトロスペクティブ（事後回顧的）なモニタリング技術が必要である。

湖沼堆積物には過去の生物群集や環境状態を物語る痕跡として、動植物プランクトンの遺骸や休眠卵、内生性や外来性の多様な有機物が年代ごとの層となって保存されている。この年代ごとに保存されている堆積物の生物・化学情報から過去の生物群集や環境状態を高度に復元することが出来れば、事前データのない湖沼に対しても、過去の状況と現在起こりつつある生態系変化を復元し把握することが可能となる。すなわち、湖沼堆積物の情報をモニタリングし、異なる湖沼間で比較出来るなら、これまでモニタリング対象外であった湖沼や、高山湖沼のように日常的なモニタリングが困難な湖沼についても、生態系変化とその要因についての事後的なモニタリングが可能となる。

しかし、堆積物のプランクトン遺骸や生物情報を用いたこれまでの生態系・生物群集復元、すなわち古陸水学的アプローチは解像度の点で大きく劣っている。第一に生物の遺骸は断片化されており、多くの場合その同定には経験と高度な熟練が必要であり、それでも限界があるため、定量的データとして問題が多い。第二に、堆積物に遺骸として残される分類群は限られており、遺骸が容易に分解されてしまうような分類群は復元対象として扱うことが出来ない。第三に、干上がりや越冬などプランクトン生物が生息に不適な時期を乗り越えるために生産するシストや休眠卵も湖底堆積物によく保存されるが、形態的な特徴がないため、およその分類群はわかっても種レベルでの同定が不可能な場合が多い。プランクトン生物は同じ分類群でも種によって、また同じ種でも系統や遺伝子型によって生息に適した環境や環境変化に対する耐性或応答が異なっている。したがって、属や科レベルでの大まかな分類群構成が同じでも、それら生物群集をとりまく生息環境は異なっている可能性がある。すなわち、生物遺骸や分類群を指標するシストや休眠卵の情報をもとに復元される生物群集は極めて大雑把であり、過去の変遷において重要な環境変化を見落とす可能性がある。

堆積物の生物情報を利用して生態系応答を高精度に解析するためには、過去の生物群集を高精度に復元するための新たな技術が必要である。

2. 研究開発目的

本サブテーマは、上述したこれまでの古陸水学的アプローチの問題点を克服するため、最新の分子生物学的手法を適用して過去の生物群集復元を高精度化することを目的とする。具体的には、湖沼食物網の鍵となる生物群である動物プランクトンを対象に、堆積物に残された休眠卵やそれ

を保護している卵鞘のDNA解析を行うことで、種レベルよりも詳しい解像度で生物個体群や群集の変遷を復元する技術を開発する。さらに、その技術を山岳湖沼や低地湖沼の堆積物に適用することで本技術の過去復元の有用性を検証するとともに、過去100年レベルの変遷を調べることで湖沼生態系に及ぼす集水域の人間活動の影響や、近年特に懸念されている温暖化や大気降下物の影響を把握する。

本研究は3年を研究期間としており、初年度にあたる平成22年度は分子生物学的手法の開発と検討を中心に研究を行った。この手法の検討は、平成22年春に山形県の山地湖沼（山辺町・畑谷大沼）で採集した試料を用いて行った。次いで本調査として、北海道と北陸地方の山岳湖沼（羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池）と、それら山岳湖沼に近隣の低地湖沼（阿寒湖、渡島大沼、木崎湖）を対象に、湖底堆積物を平成22-24年度にかけて採取し、新たに開発した手法を適用して動物プランクトン群集の過去から現在に至る変遷の復元とその変化要因の解析を行った。

3. 研究開発方法

(1) サンプリング

平成22年度は、夏季に道東の羅臼湖と阿寒湖及び道南のニセコ大沼で、また冬季に結氷を利用して阿寒湖と渡島大沼で、経12cmの重力式コアサンプラーを用い、以下の湖底堆積物コアを採集した。

- ・平成22年7月13日 羅臼湖 堆積物コア5本（深さ12-18cm）
- ・平成22年7月14日 阿寒湖 堆積物コア7本（深さ25-28cm）
- ・平成22年7月16日 ニセコ大沼 堆積物コア8本（深さ26-43cm）
- ・平成23年2月22日 渡島大沼 堆積物コア5本（深さ43-53cm）

平成23年度は、夏季にミクリガ池で、経12cmの重力式コアサンプラーを用い下記に示す湖底堆積物コアを採集し、また木崎湖にてダイバーを雇用してコア採集を行い、以下の湖底堆積物コアを採集した。

- ・平成23年9月9日 ミクリガ池 堆積物コア6本（深さ23.5-33cm）
- ・平成23年9月12日 木崎湖 堆積物コア5本（深さ100-105cm）

平成24年度は、前年度までに採集した堆積物コアの解析を行いつつ、データの補足を目的として、平成24年9月3日に、阿寒湖にてダイバーを雇用してコア採集を行い5本の湖底堆積物コア（いずれも直径は12cm、長さは80-100cm）を採集した。なお北海道南西部のニセコ神仙沼でも、9月6日に、経12cmの重力式コアサンプラーを使用して、ゴムボート上から堆積物の採集を試みたが、湖底一面に水生植物類が繁茂していたため、高精度な解析に耐えうる柱状堆積物を採取することができなかった。

いずれの年度においても、採集した堆積物試料は現場で1cm層ごとにスライスし遮光性の袋に入れ、クーラーボックスへ入れた状態で実験室に持ち帰り、各サブテーマに分与した。本サブテーマでは、各層に含まれる動物プランクトン休眠卵や卵鞘の抽出を行うとともに、その形態やDNA塩基配列からの同定を行った。またいずれの湖沼においても、プランクトンネットによる動物プランクトン採集を、堆積物採集とあわせて行った。得られた動物プランクトン試料は、直ちにエタ

ノールで固定して実験室に持ち帰った。各堆積物の年代については、いずれの湖沼についても、サブテーマ2のデータを用いた。

(2) 堆積物中に含まれるミジンコ卵鞘の遺伝子解析

1) ミジンコ休眠卵鞘を利用した遺伝子解析法の開発

a) 検討に用いた試料の採集

現世の動物プランクトン種組成及び遺伝的組成に関する情報が既に得られている畑谷大沼（山形県東村山郡山辺町）のサンプルを用いた実験により、休眠卵鞘を用いた遺伝子解析法の検討を行った。エクマン採泥器を用いて採集した湖底堆積物を180 μ mのメッシュでふるい、実体顕微鏡下で残存物を観察してミジンコ（*Daphnia*）卵鞘を集めた。この沼には2グループのミジンコが存在する。一つは*Daphnia pulex*で、その卵鞘の大きさは約0.7mmである。もう一つのグループは*D. dentifera*、*D. galeata* およびその雑種で、これらの卵鞘の大きさは約0.5mmである。今回の実験では卵鞘を実体顕微鏡下で区別し、*D. dentifera*と*D. galeata*のグループの卵鞘を用いた。

hataya12S_D1	CTTCAAGGCTTCAAATCCGTATTT-CTAAAGAAAATTGTAGCTCACCTCCACCTCTATAT	60
hataya12S_D2	CTTCAAGGCTTCAAATCCGTTTT-CTAAAGAAAATTGTAGCTCACCTCCACCTCTGTAT	
hataya12S_G	CTTCAGAGCTTAGAATCCGTATTTTCTAAAGAAAATTGTAGCTCACCTCCACCCCATAT	
hataya12S_D1	AAACTGCACCTTGACCTGAAGTAAAAAAGTCTTTTAACTTGAAAACATTCTCTAAAAGTA	120
hataya12S_D2	GAAGTGCACCTTGACCTGAAGTAGAAAAGTCTTTTAACTTGAAAACATTCTCTAAAAGTA	
hataya12S_G	AAACTGCACCTTGACCTGAAGTATATAAGTCTTTTAACTTGAAAACATTCTCTAAAAGTA	
hataya12S_D1	ATCTGACAACGGCGGTATACAAGGTTTACAAACAGAGGAAAGATAAAAACGGGGACTATCG	180
hataya12S_D2	ATCTGACAACGGCGGTATACAAGGTTTACAAACAGAGGAAAGATAAAAACGGGGACTATCG	
hataya12S_G	ATCTGACAACGGCGGTATACAAGGTTTACAAATGAGGAAAGATAAAAACGAGGACTATCG	
hataya12S_D1	ATTAAGGGACAAGCTCCTCTATTTGGATAAAGTGCCGCCAAAATCTTTGGGTTTGAAGAA	240
hataya12S_D2	ATTAAGGGACAAGCTCCTCTATTTGGATAAAGTGCCGCCAAAATCTTTGGGTTTGAAGAA	
hataya12S_G	ATTAAGGGACAAGCTCCTCTATTTGGATAAAGTGCCGCCAAAATCTTTGGGTTTGAAGAA	

図(1)-1 畑谷大沼（山形県）に生息するミジンコ（*Daphnia dentifera/galeata*）のミトコンドリアDNAの12SrRNA遺伝子の部分配列。3タイプの識別に使用した領域のみを示す。枠で囲まれた部分は畑谷大沼で確認された3タイプ（hataya12S_D1：D1、hataya12S_D2：D2、hataya12S_G：G）の識別部位、灰色部分はPCRに用いたプライマー（d5f、d7r）の部位を示す。

b) プライマー設計

予備実験から、この湖沼に生息する*D. deintifera*と*D. galeata*のグループのミジンコは12SリボソームRNA（rRNA）遺伝子で識別される3つのミトコンドリアDNA（mtDNA）のハプロタイプを持つことが分かっている。2つの*D. dentifera*のハプロタイプと1つの*D. galeata*のハプロタイプである。これら3つのハプロタイプの塩基配列をもとに、OLIGO 7 Primer Analysis Software¹⁾を用

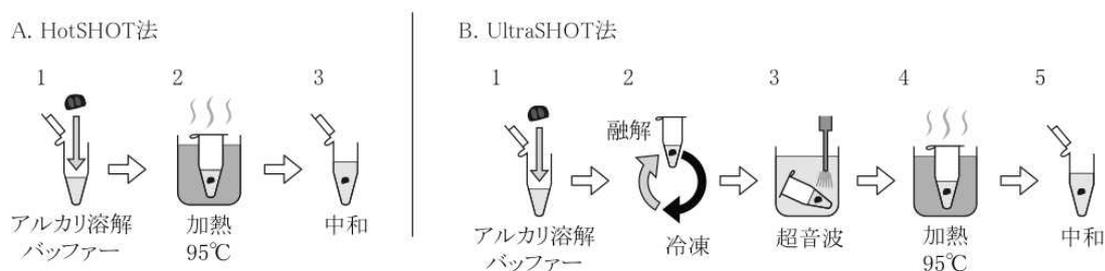
いてmtDNA・12SrRNA遺伝子の136塩基対 (bp) の断片を増幅するプライマーセット (d5f : 5'- CTC TAT ATA AAC TGC ACC TTG-3'、d7r : 5'-CCC TTA ATC GAT AGT CCC C-3') を設計した (図(1)-1)。

c) DNA抽出

ミジンコ卵鞘からのDNAを抽出する方法として、従来から様々な生物種のDNA抽出に用いられてきたHotSHOT法²⁻⁵⁾と、今回我々が開発したUltraSHOT法⁶⁾の二つを用いた (図(1)-2)。卵鞘内に休眠卵が残っていた場合は、ピンセットで卵を抜き取ってから以下の実験に使用した。

HotSHOT 法の手順は次の通りである。実体顕微鏡下で卵鞘を一個ずつ50 μ Lのアルカリ溶解バッファー (25mM NaOHと0.2mM disodium EDTAの溶液、pH12.0) の入ったチューブに入れる (図(1)-2 A.1)。それらのサンプルを95 $^{\circ}$ Cで30分間過熱した後に3分以上氷上に置く (図(1)-2 A.2)。軽く遠心をかけて50 μ Lの中和バッファー (40mM Tris-HCl溶液、pH5.0) を加える (図(1)-2 A.3)。さらに軽くボルテックスと遠心をかけてから、DNA増幅に使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

UltraSHOT法の手順は、HotSHOT法の手順に熱ショックと超音波破碎のステップを付け加えたもので、次の通りである。実体顕微鏡下で卵鞘を一個ずつ50 μ Lのアルカリ溶解バッファーの入ったチューブに入れる (図(1)-2 B.1)。それらのサンプルに対して5分間-80 $^{\circ}$ Cで凍結させ20秒間70 $^{\circ}$ Cで溶解させる熱ショックのサイクルを5回繰り返す (図(1)-2 B.2)。軽くボルテックスと遠心かけた後に、超音波破碎機 (USP-50、島津製作所) を用いて水中で20kHz 25Wの出力で1分間超音波をかける (図(1)-2 B.3)。95 $^{\circ}$ Cで30分間過熱して3分以上氷上に置く (図(1)-2 B.4)。軽く遠心をかけて、50 μ Lの中和バッファー (40mM Tris-HCl溶液、pH5.0) を加える (図(1)-2 B.5)。軽くボルテックスと遠心をかけてから、DNA増幅に使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存する。



図(1)-2 DNA抽出方法の流れ図。A : HotSHOT法²⁾、B : UltraSHOT法⁶⁾。

d) DNA増幅

前述のd5fとd7rのプライマーを用いたmtDNA 12SrRNA遺伝子のDNA断片 (136bp) の増幅を、次の3つの方法で行った。PCR 1: Takara Ex Taq^(R) Hot Start Version (以下Ex Taq、タカラバイオ) を用いた方法。PCR 2: Type-it^(R) Microsatellite PCR Kit (以下Type-it、キアゲン) を用いた方法。PCR 3: Type-it とEx Taqの両方を使った方法。HotSHOT法とUltraSHOT法のそれぞれで16サンプルずつ卵鞘からDNAを抽出し、得られたDNA抽出物でPCRを行った。HotSHOT法で抽出したサンプルについてはPCR 3の方法で増幅した。UltraSHOT法で抽出したサンプルについてはPCR 1-3の全ての方法で増幅した。それぞれのPCRに対してネガティブコントロールのためにDNA抽出物を含ま

ない8サンプルでもPCRを行った。

PCR 1: Ex Taqを用いた方法

1 μ LのDNA抽出物、0.5 μ Mの各プライマー、1 x PCR buffer、0.2mMのdNTPs、0.25 Unit のEx Taqが含まれた10 μ Lの溶液でPCRを行った。温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで1分間を1サイクル行った後に、95 $^{\circ}$ Cで30秒間・54 $^{\circ}$ Cで30秒間・72 $^{\circ}$ Cで30秒間を35サイクル行い、72 $^{\circ}$ Cで10分間を1サイクル行った。

PCR 2: Type-itを用いた方法

1 μ LのDNA抽出物、0.15 μ Mの各プライマー、0.8 x Type-it Multiplex PCR master mix、0.5 x Q-Solution (キアゲン) が含まれた10 μ Lの溶液でPCRを行った。温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで1分間を1サイクル行った後に、95 $^{\circ}$ Cで30秒間・52 $^{\circ}$ Cで90秒間・72 $^{\circ}$ Cで30秒間を35サイクル行い、72 $^{\circ}$ Cで10分間を1サイクル行った。

PCR 3: Type-itとEx Taqの両方を用いた方法

次の条件でType-itを用いたPCRを行った。1 μ LのDNA抽出物、0.15 μ Mの各プライマー、0.8 x Type-it Multiplex PCR master mix、0.5 x Q-Solutionが含まれた10 μ Lの溶液でPCRを行った。温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで1分間を1サイクル行った後に、95 $^{\circ}$ Cで30秒間・52 $^{\circ}$ Cで90秒間・72 $^{\circ}$ Cで30秒間を25サイクル行い、72 $^{\circ}$ Cで10分間を1サイクル行った。さらに次の条件でEx Taqを用いたPCRを行った。0.02 μ LのType-itによるPCR産物、0.05 μ Mの各プライマー、1 x PCR buffer、0.2mMのdNTPs、0.25 Unit のEx Taqが含まれた10 μ Lの溶液でPCRを行った。温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで1分間を1サイクル行った後に、95 $^{\circ}$ Cで30秒間・54 $^{\circ}$ Cで30秒間・72 $^{\circ}$ Cで30秒間を25サイクル行い、72 $^{\circ}$ Cで10分間を1サイクル行った。

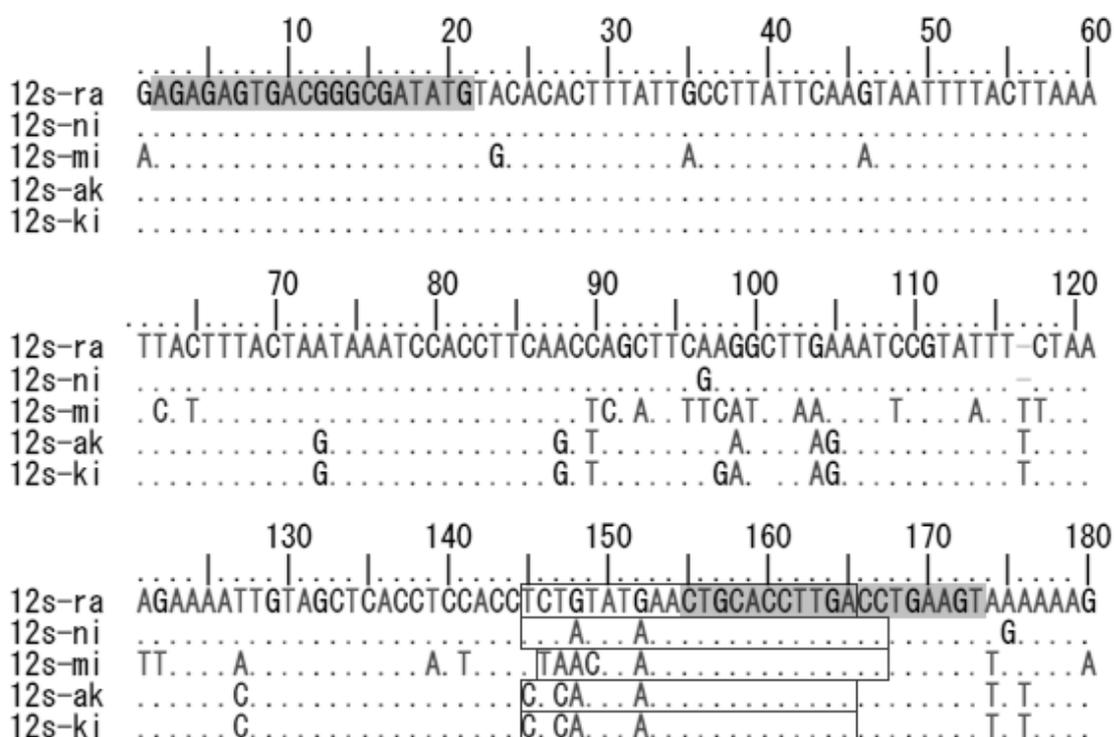
それぞれの方法で最終的に得られたPCR産物4 μ Lを1 x TBE バッファの泳動槽中の2.0% アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動したゲルをGelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) で染色しUVトランスイルミネーターを用いて DNA増幅の有無を確認した。HotSHOT + PCR 3およびUltraSHOT + PCR 3で増幅されたサンプルをBig Dye^(R) Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンシング反応を行い、ABI PRISM^(R) 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

2) 湖沼堆積物から得たミジンコ休眠卵鞘による過去群集の復元

a) 畑谷大沼

湖沼におけるミジンコ (*Daphnia*) 群集の遺伝的変遷を調べるため、堆積物中から採取したミジンコ休眠卵鞘のミトコンドリアDNA配列による解析を行った。現世の動物プランクトン種組成及び遺伝的組成に関する情報が既に得られている畑谷大沼のサンプルを用いた調査を最初に行った。畑谷大沼の堆積物は2010年4月22日に、重力式コアサンプラー (半径5.5cm) を用いて採取したものをを用いた。採取した堆積物はその場で速やかに表層から最深部まで1cmごとに切り出し、遮光袋に分けて4 $^{\circ}$ Cで保存した。これらの各層から約60-130gの泥を取り出し180 μ mメッシュでふるい、メッシュ上に残った堆積物を実体顕微鏡下で観察しミジンコ卵鞘を採取した。

畑谷大沼の調査には表層（1cm）から最深部（30cm）まで1cmごとの層から得たミジンコ卵鞘を任意に16個（得られた卵鞘がそれ以下の場合は全て）選び用いた。卵鞘内に卵が入っていた場合は除去してからDNA抽出を行った。前述した卵鞘の微量DNA解析方法でDNA抽出、PCR法でmtDNA・12SrRNA遺伝子領域の136 bpの増幅を行い、2%アガロースゲル電気泳動で増幅産物の有無を確認した。増幅が確認できたサンプルはシーケンスを行い、各個体の配列を決定した。解析によって得られた各サンプルの配列はデータベース検索により種を判別すると共に、*D. longispina*種群（*D. galeata/dentifera*）は畑谷大沼で確認されている3タイプ（図(1)-1）のいずれであるか判別を行った。



図(1)-3 各地の湖沼のミジンコ (*Daphnia*) のミトコンドリアDNAの12SrRNA遺伝子の部分配列（渡島大沼を除く）。種間または種内の違いを識別するために使用した領域のみを示す。12S-ra: 羅臼湖、12S-ni: ニセコ大沼、12S-mi: ミクリガ池、12S-ak: 阿寒湖、12S-ki: 木崎湖。羅臼湖の配列（12S-ra）を基準として、そのサイトが同じ塩基であれば点（.）で、異なる塩基であればA、T、G、Cのいずれかで各地点の配列を示す。灰色部分は全ての地点（種）に共通のプライマー（12S_BF1、12S_BR2）の部位を、線で囲んだ部分はその地点（種）に特異的なプライマー（12S_raR、12S_niR、12S_miR、12S_akR）の部位を示す。

b) 各地の山岳・低地湖沼

これに続いて、各地の山岳湖沼（羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池）および低地湖沼（阿寒湖、渡島大沼、木崎湖）で採取した堆積物から得たミジンコ休眠卵鞘を用いた調査を行った。採取した各地点の堆積物コアは、1cmごとに切り出した層を休眠卵鞘採取に使用した。堆積物は水とともに

に180 μ mメッシュでふるい、メッシュ上の残存物を実体顕微鏡下で観察しミジンコ卵鞘を層毎に採取するとともに得た数を記録した。

各地点のミジンコ (*Daphnia*) に特異的なプライマーを作成するため、現世の成体ミジンコを採集し、mtDNA上の12SリボソームRNA (12SrRNA) 遺伝子配列を決定した。これらの配列決定は*Daphnia pulex* のmtDNA配列⁷⁾ (GeneBank accession number: AF117817) および予備実験により得た*D. dgaleata/dentifera*の配列情報をもとにして行った。これにより決定した現世ミジンコの配列をもとに、各領域に存在する多型を検出可能で且つごく短い領域 (164~172 bp) を増幅するプライマー組を設計した (図(1)-3)。フォワード側は各地点 (種) に共通配列 (12S_BF1) となるものを設計し、リバーズ側は各地点 (種) 共通の配列 (12S_BR2) であるものと、地点 (種) 特異的な配列 (羅臼湖:12S_raR、ニセコ大沼:12S_niR、ミクリガ池:12S_miR、阿寒湖および木崎湖:12S_akR) であるものの両方を設計した。先行して行った畑谷大沼ミジンコ卵鞘の遺伝子解析と同様に、ミジンコ卵鞘からのDNA抽出、PCR法による各遺伝子領域の増幅を、(1) に記述のPCR3と同様の条件で行った。リバーズ側を共通配列のプライマーとしたものと特異的なプライマーとしたものの両方でPCRを行い、いずれか一方でも増幅に成功したサンプルを配列決定に用いた。渡島大沼のみ共通配列のプライマーだけでPCRを行った。増幅の有無は2%アガロースゲル電気泳動で確認し、産物をExoSAP-IT^(R) (USB) を用い精製した後、Big Dye^(R) Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンシング反応を行い、ABI PRISM^(R) 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

(3) 淡水ヒゲナガケンミジンコ休眠卵を種同定するための分子マーカーの開発と、湖沼堆積物試料への応用

ヒゲナガケンミジンコ類 (橈脚類) は、ミジンコ類 (枝角類) とともに、湖沼生態系の低次生産者として量的に卓越する動物プランクトンである⁸⁻¹⁰⁾。しかし、古陸水学的な湖沼プランクトン組成の復元においては、生物学的な制約 (堆積物中に遺骸が残らない、休眠卵を用いた種同定が極めて困難である、等) のため、群集復元対象生物としては、扱われてこなかった。そこで本研究課題では、今後日本列島の様々な湖沼において行われると期待されるレトロスペクティブ型モニタリングに、ヒゲナガケンミジンコ情報を組み込むことを念頭に置き、湖沼堆積物中に保存されているヒゲナガケンミジンコ休眠卵を種同定するための分子マーカー (DNAバーコード^{11,12)} の開発を行った。

1) プランクトン個体からの、DNAバーコードライブラリー作成

DNAバーコードライブラリー^{註*}作成に用いたプランクトン個体は、本研究課題 (D-1002) にて採集された試料に加えて、2005年から2010年にかけて日本列島各地 (図 (1) -4) で採集・エタノール固定し研究室にて保存されていた試料から、それぞれ適宜抜粋した。

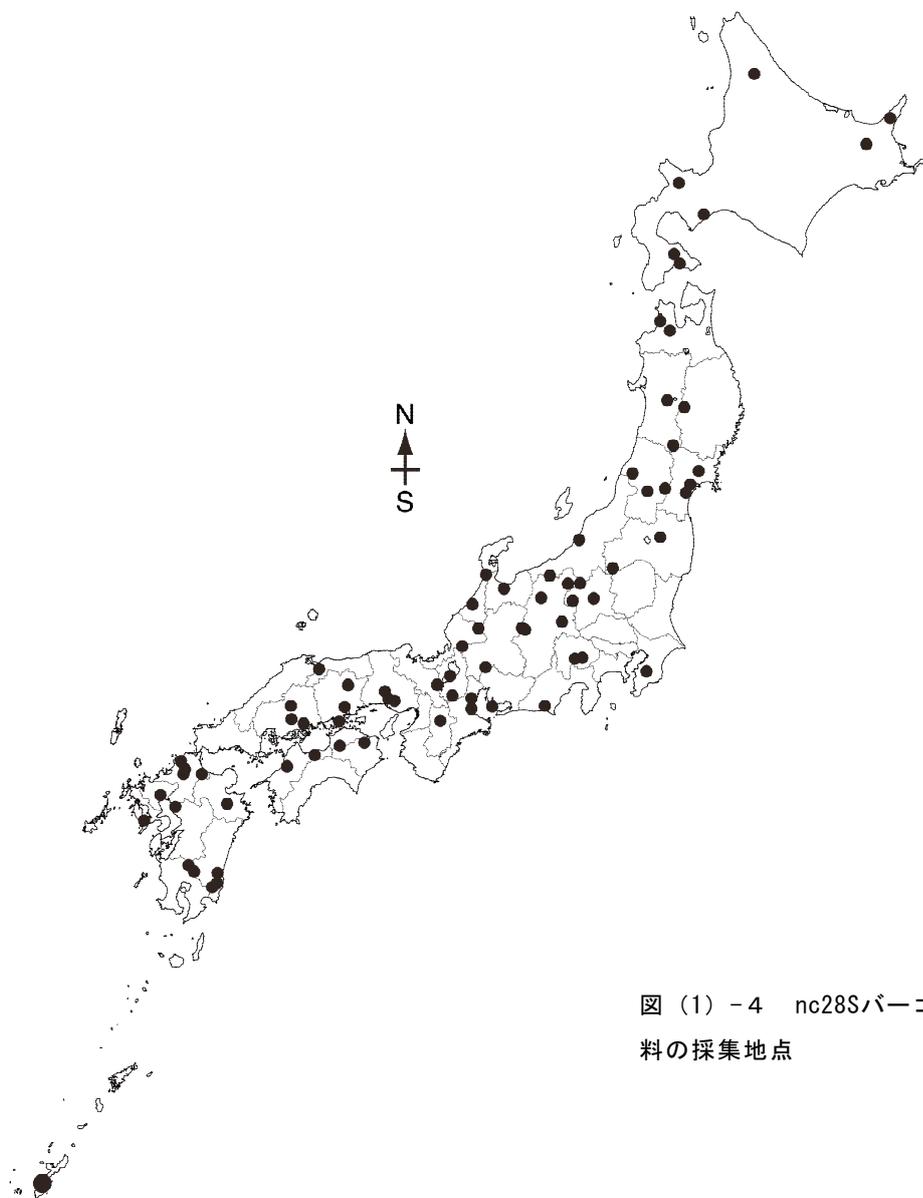
水野・高橋¹³⁾に従い同定されたヒゲナガケンミジンコ各種について、エタノール固定サンプル中から雌成体を1個体ずつ単離し、ゲノムDNAを抽出したのち、核DNA・28SrRNA遺伝子の部分配列約300bp (以下nc28Sと標記) をBissett et al.¹⁴⁾に記載されたプライマー (CopF2とCopR1) とPCR条件により増幅した。このPCR産物をExoSap ITキットにより精製した後、BigDyeターミネーターキッ

トを用いたサンガー法により塩基配列を決定した。

*注：DNAバーコードは、狭義にはConsortium for the Barcode of Life (CBOL) が主導する、ミトコンドリアDNAのCOI領域の部分配列であり、本研究のバーコードは、厳密には、CBOLの扱いでは二次的DNAバーコード^{11,12}と定義される情報である。

2) ヒゲナガケンミジンコ休眠卵へのnc28Sバーコード適用可能性の吟味

図(1)-4に示した採集地点のうち合計30カ所について、最表層堆積物に含まれていたヒゲナガケンミジンコ休眠卵を用いて、nc28SDNAバーコードによる種判別の可能性を検討した。



図(1)-4 nc28Sバーコード作成に用いた試料の採集地点

ヒゲナガケンミジンコの休眠卵は、シヨ糖溶液を用いた遠心分離法¹⁵⁾により堆積物中から単離

した。すなわち、それぞれ堆積物の少量（湿重量で5g程度）を80mLの蒸留水中に移し、80mLのショ糖水（67%溶液）を加えてよく攪拌したのち、遠心分離（900rpm、90秒）に供した。遠心後の上清をプランクトンネット（50 μ m）で捕集することで、休眠卵を回収した。

休眠卵のゲノムDNAは、前述したUltraSHOT法により抽出し、プランクトン個体の場合と同様にnc28S領域の塩基配列を決定した。そして、休眠卵からの塩基配列が、nc28Sバーコードライブラリー中のいずれかの種の配列と一致するか否かを調べた。

3) ヒゲナガケンミジンコ過去群集の復元

H22-24年度に採集した山岳湖沼（羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池）および低地湖沼（阿寒湖、渡島大沼、木崎湖）の堆積物サンプルを解析することで、各湖沼でのヒゲナガケンミジンコ類の過去群集の組成復元を試みた。

各湖沼において、採集直後に、1cmごとの深度別にスライス・遮光保存された堆積物から、ショ糖溶液を用いた遠心分離法により、ヒゲナガケンミジンコ休眠卵鞘を単離した。続いて、休眠卵1粒毎に、UltraSHOT法によるDNA抽出を行った。得られた抽出物は、nc28S領域の塩基配列に基づく種判別に供された。この分子解析と同時に休眠卵の出現数も見積もった。

これら種判別および出現卵数の結果と、サブテーマ2（後述）により求められた、堆積物各層の堆積年代および年代測定から得られた質量堆積速度から、ヒゲナガケンミジンコ種休眠卵のフラックスを、Kerfootら¹⁶⁾に従い下式、

$$\begin{aligned} & \text{ヒゲナガケンミジンコ種休眠卵のフラックス (eggs cm}^{-2} \text{ yr}^{-1}) \\ & = \text{質量堆積速度 (dry g cm}^{-2} \text{ yr}^{-1}) \times \text{堆積物乾燥重量あたりの卵数 (numbers dry g}^{-1}) \end{aligned}$$

にて、種別に見積もった。

4. 結果及び考察

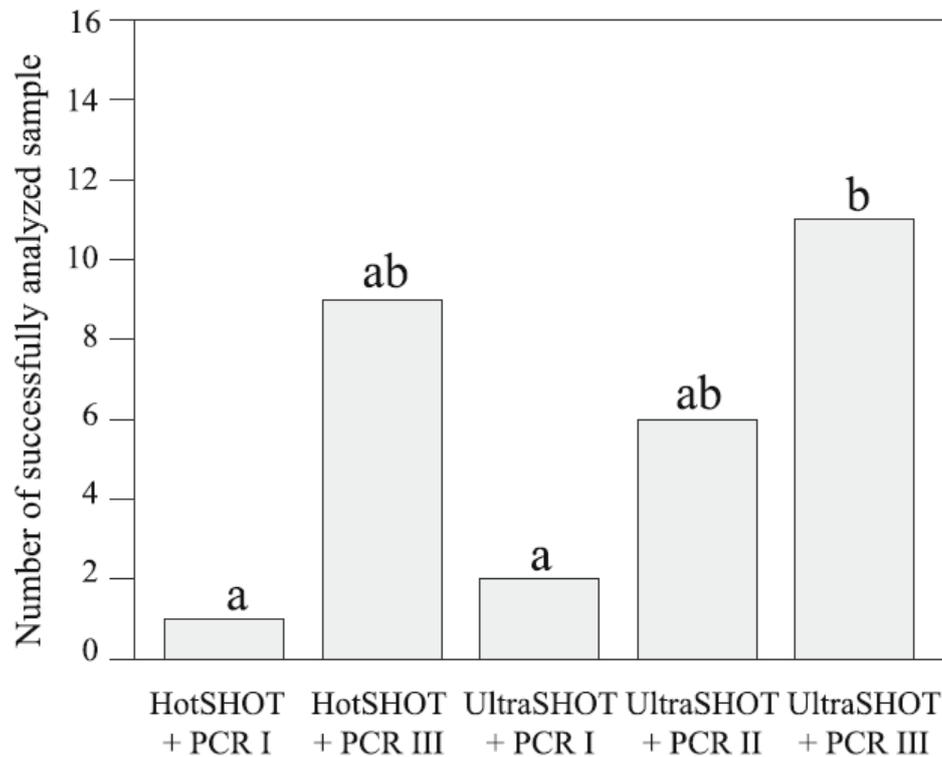
(1) 堆積物中に含まれるミジンコ卵鞘の遺伝子解析

1) ミジンコ休眠卵鞘を利用した遺伝子解析法の開発

HotSHOT + PCR 3、UltraSHOT + PCR 1、UltraSHOT + PCR 2、UltraSHOT + PCR 3の4つのDNA抽出方法と増幅方法の組み合わせで実験を行った結果、それぞれ16個中 9個、1個、6個、11個のサンプルでDNAの増幅に成功した。どの実験でもネガティブコントロールでは増幅が見られなかった。UltraSHOT + PCR 3が最も成功率が高く（69%）、一般的なPCR増幅方法（Ex Taq）を用いたUltraSHOT + PCR 1の成功率よりも有意（ $p=0.006$ ）に高かったが、HotSHOT + PCR 3およびUltraSHOT + PCR 2との成功率の違いは有意ではなかった（図(1)-5）。HotSHOT + PCR 3およびUltraSHOT + PCR 3で増幅されたサンプルの塩基配列を調べたところ、予備実験で得られた3つのハプロタイプのいずれかと同一であった。

本研究により初めてミジンコの卵鞘からDNAを抽出する技術が確立した。従来までの研究では湖底堆積物中のミジンコの休眠卵の遺伝解析することで、過去の湖沼環境の変動がミジンコ個体群構造の変遷と一致していることを明らかにしてきた¹⁷⁻²²⁾。しかしながら休眠卵の孵化率が高い湖沼

では、休眠卵の入っていない空の卵鞘のみが湖底堆積物中に数多く残されており、休眠卵を用いた遺伝解析を行うことは難しい。孵化率は湖沼間で異なるだけでなく^{23,24)}、同じ湖沼でも年ごとに異なる場合がある²⁵⁻²⁷⁾。光や温度条件がミジンコ休眠卵を孵化させる引き金となっており²⁸⁾、これらの条件が揃いやすい環境であれば孵化率が高くなると考えられる。本研究で開発した手法を用



図(1)-5 HotSHOT + PCR 3、UltraSHOT + PCR 1、UltraSHOT + PCR 2、UltraSHOT + PCR 3の4つのDNA抽出方法と増幅方法での成功率の比較。棒グラフの各棒の上にある文字は、同等の成功率をもつグループを示している（カイニ乗検定、 $p < 0.05$ (Bonferroni補正)）。

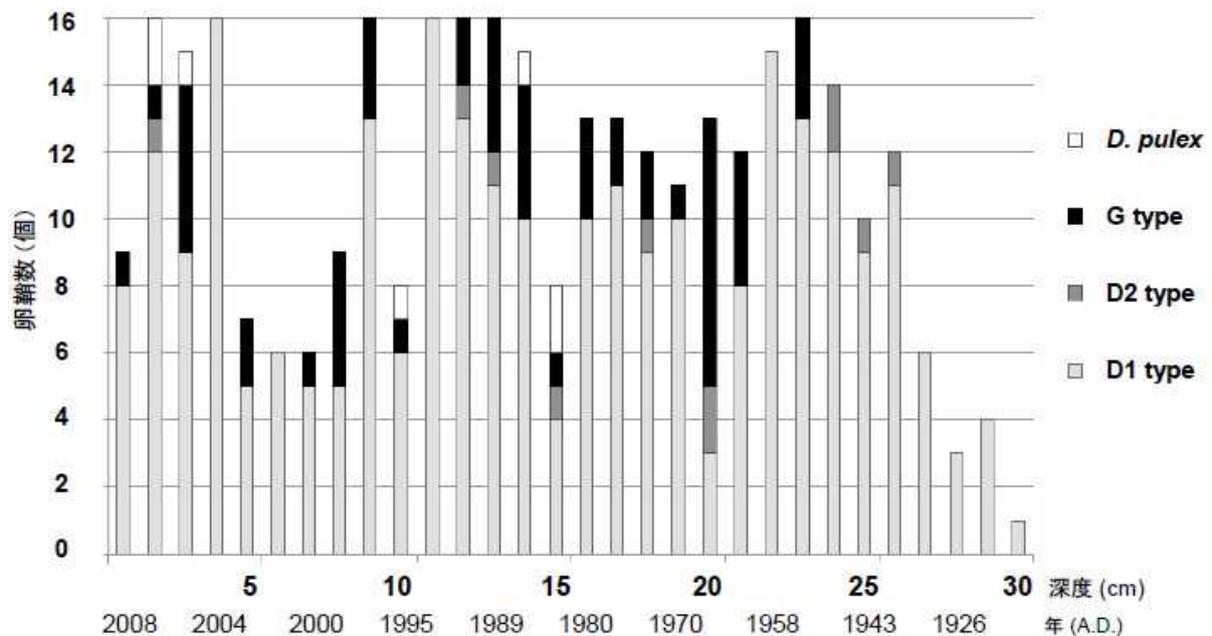
いることで、対象となる湖沼での孵化率の大小に関わりなく、過去の環境変動とミジンコの個体群構造の変遷の関係性について再現することができる。

2) 湖沼堆積物から得たミジンコ休眠卵鞘による過去群集の復元

a) 畑谷大沼

堆積物中から採取したミジンコ (*Daphnia*) 卵鞘から抽出した微量 DNA を用いた遺伝子解析を畑谷大沼のサンプルを用いて行った。卵鞘から抽出した微量 DNA から、PCR によって 12SrRNA 遺伝子の一部 (136bp) を増幅し、増幅に成功したサンプルの遺伝子配列を決定しタイプ組成の変遷を確かめた。12SrRNA 遺伝子による種判別の結果、*D. pulex* が少数検出された他は *D. galeata/dentifera* のいずれかであった (図(1)-6)。 *D. galeata/dentifera* は現在生息する 3 タイプと同じく、過去においても D1 型、D2 型、G 型が存在したことが卵鞘の遺伝子配列から示され

た。D1型は19-20cmを除く全ての層で、全体の50%以上を占めていた。一方D2型はいくつかの層から検出されたが、最も多い19-20cmの層でも全体の約10%であった。G型は23cmより上層（1950年代以降）で検出され、その後のほとんどの層で検出された。現在の畑谷大沼における *D. galeata/dentifera* は、一年を通じて全体の半分以上がD2型の個体で占められていることが過去の研究から確認されている²⁹⁾が、ミジンコ卵鞘を用いた過去群集の調査では、D2型がD1型に比べ非常に少ないという結果であった。通常ミジンコはメスのみの単為生殖を行い、環境条件の変

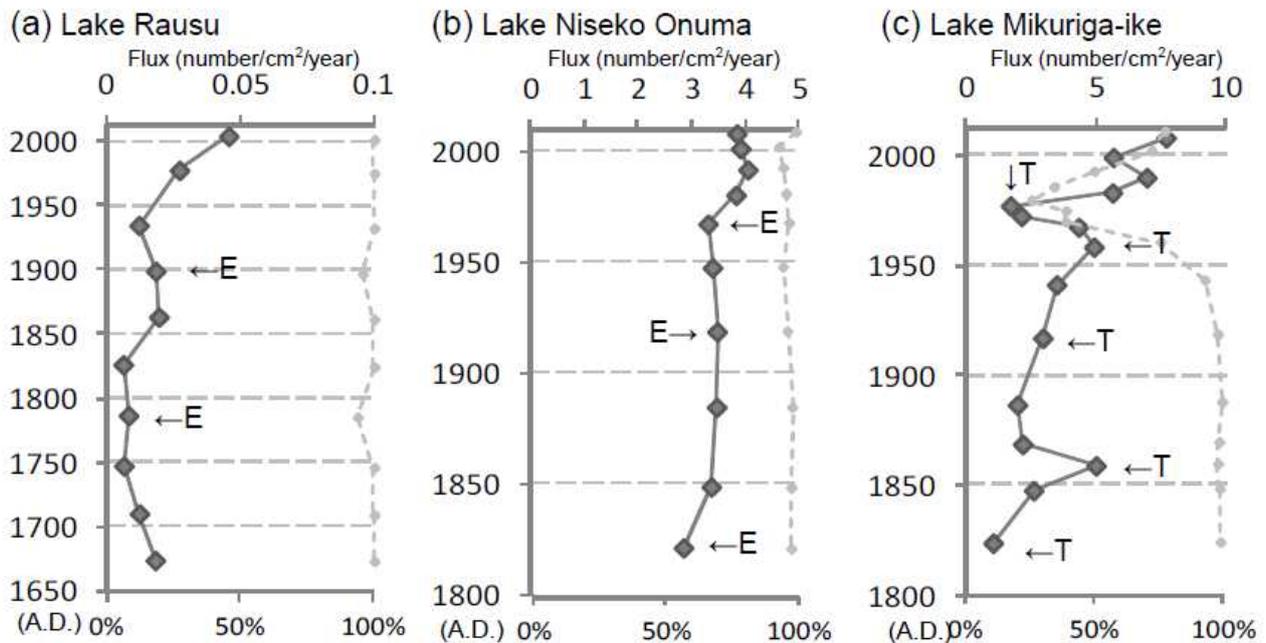


図(1)-6 畑谷大沼（山形県）で採取されたミジンコ (*Daphnia*) 卵鞘のDNA解析による、過去群集のミトコンドリアDNAの12SrRNA遺伝子に存在する各タイプの頻度変遷。深度は切り出した層の下端の数値（4-5cmの層であれば5cm）で示す。

化などに応じてオス個体が出現し有性生殖による休眠卵を生産する。しかし、D2型は他の2タイプが休眠卵を生産するような条件であっても休眠卵を生産することが少ないことが予想される。

なお、D2型が他の2タイプに対し集団中で優占しているのは、休眠卵を生産する代わりにそのコストを単為生殖に注ぐことで個体群密度を上げる戦略を採っているためではないかと考えられる。このような戦略の違いが存在する原因のひとつとして、休眠卵の生産に関わる遺伝子にD2型とそれ以外のタイプとでは違いが生じている可能性が挙げられる。ミジンコの休眠卵生産は餌条件や光条件など環境の変化に応じて起こることが知られる³⁰⁾が、休眠卵の生産性は遺伝的にも違いが生じ得るものであり、*D. pulicaria*では遺伝的に異なる地域集団どうしは互いに休眠卵の生産しやすさの違いが見られることが実験的に示されている³¹⁾。畑谷大沼の *D. galeata/dentifera*でも環境の変化に対する応答に遺伝的な違いがあるタイプが同所的に存在し

ていると考えられる。このことをより詳細に明らかにするためには、休眠卵生産に関する予想される機能遺伝子などを調べる必要がある。



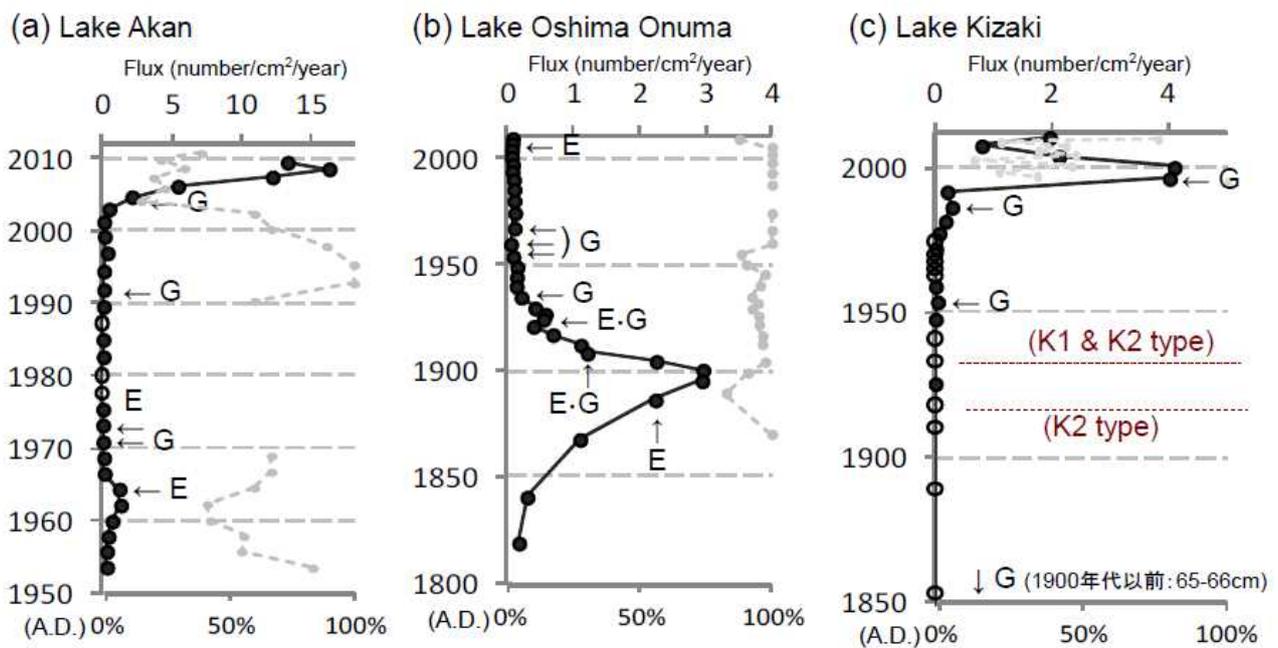
図(1)-7 各地の山岳湖沼におけるミジンコ (*Daphnia*) 休眠卵鞘の年間フラックス (実線、 $\text{number}/\text{cm}^2/\text{year}$) と、卵鞘内の卵の有無から判断した孵化率 (破線、 $(100 \times \text{空の卵鞘数}/\text{全卵鞘数})\%$)。それぞれ層の深度1cm毎にひとつの点で示す。矢印は12SrRNA遺伝子により決定したその年代における生息ミジンコ種の略称 (E: *Daphnia ezoensis*, T: *Daphnia tanakai*) を示す。(a): 羅臼湖 (現世種: E)、(b): ニセコ大沼 (現世種: E)、(c): ミクリガ池 (現世種: T)。

b) 各地の山岳・低地湖沼

東日本の山岳湖沼 (羅臼湖・ニセコ大沼・ミクリガ池) および低地湖沼 (阿寒湖・渡島大沼・木崎湖) の堆積物からミジンコ (*Daphnia*) 休眠卵鞘を採取した。各地点における各年代の休眠卵鞘から算出したフラックスおよび12SrRNA遺伝子による生息種判別の結果を図(1)-7、(1)-8に示す。山岳湖沼では、各地で密度増加傾向は見られたが、ミジンコの生息種や遺伝子型の変化は解析の結果からは現在まで見られなかった。僅かな増加傾向については、共通の広域的な要因の可能性もあるが、生息環境に影響を与え得る各地でのイベントが関係していると考えられる。しかしそれらのイベントでは、有利な遺伝子型の変化をもたらす環境変化に到らず、また外部からの移入は無かったものと考えられる。一方、低地湖沼では現在および過去における急激な個体密度の増減が見られ、また生息種や種内の遺伝子構成が過去と現在とで異なっていることが、遺伝子解析から明らかとなった。急激な増減は魚類等による捕食圧の変化や湖沼の富栄養化が反映された結果であると考えられる。生息種の変化は主に漁業活動に伴う外部からの移入、および環境変化等

による優占するタイプの変化によるものと予想され、生息種の絶滅や移入の時期を調査結果が示している。いずれの低地湖沼でも、ミジンコおよび湖沼環境が各種の人間活動による影響を受け変化してきたことが示されたと考えられる。以下で各湖沼での調査結果について述べる。

羅臼湖（図(1)-7a）は、近年ミジンコが僅かに増加はしているが、過去100年以上にわたり低密度の状態で大変動は無いことがわかった。湖の近くでは直接の開発は無いが、1961年に探検が行われた以降³²⁾、現在までに道路開発や世界遺産登録等、人間が訪れる機会が増えた影響が、近年の密度微増として現れている可能性がある。現世種は*Daphnia ezoensis*であり、12SrRNAの配列からほぼ単一の遺伝子型が優占していることが確認された。これをもとにした12SrRNAによる遺伝子解析から、配列決定に成功したのは2個体のみではあったが、過去ミジンコも現世種と同じ配列であることが確認され、生息種の変化も起きていないことが示された。これらのことからミジンコの生存に影響する変化は現在まで起きておらず、湖沼環境は長期的に安定した状態が続いてきたといえる。



図(1)-8 各地の低地湖沼におけるミジンコ (*Daphnia*) 休眠卵鞘の年間フラックス（実線、number/cm²/year）と、卵鞘内の卵の有無から判断した孵化率（破線、(100×空の卵鞘数/全卵鞘数) %）。それぞれ層の深度1cm毎にひとつの点で示す（木崎湖はタービタイト層を除いて表示しているため一致しない）。矢印は12SrRNA遺伝子により決定したその年代における生息ミジンコ種の略称（E: *Daphnia ezoensis*、G: *Daphnia galeata*）を示す。(a): 阿寒湖（現世種: G）、(b): 渡島大沼（現世種: 不明）、(c): 木崎湖（現世種: G）。

ニセコ大沼（図(1)-7b）も過去50年以前には個体数に大きな変動は見られなかった。しかし1950年代から現在にかけては、羅臼湖と同じく僅かな増加傾向にあった。また、付近にはかつて硫黄鉱山があったが1937年には閉山している³³⁾など周辺地域の利用の変化が環境に影響を与えていた可能性も考えられる。現世種は羅臼湖と同じく*Daphnia ezoensis*であり、12SrRNAの配列からほぼ単一の遺伝子型が優占していることが確認されたが、羅臼湖とは異なる配列であった。12SrRNAによる遺伝子解析から過去ミジンコも現世の優占するタイプと同じ配列であることが確認され、生息種の変化は起きていないことが示された。

ミクリガ池（図(1)-7c）ではこの約100年間でミジンコが徐々に増加していく傾向にあった。観光開発等に伴う富栄養化の影響があったものと考えられる。また1970年前後は一時的に大きく減少し、他年代ではほぼ全てが卵の無い卵鞘であったのに対しこの時期の卵鞘の半数以上は未孵化のままであった。交通整備等の工事が多く行われていた時期であったため³⁴⁾、付近の環境変化がミジンコの生存や孵化に悪影響を及ぼした可能性がある。現世種は*Daphnia tanakai*であり、12SrRNAの配列からほぼ単一の遺伝子型が優先していることが確認された。また12SrRNAによる遺伝子解析から過去ミジンコも現世の優占するタイプと同じ配列であることが確認され、環境変化による、有利な遺伝子型の変化や外部からの移入は起きていないことが示された。

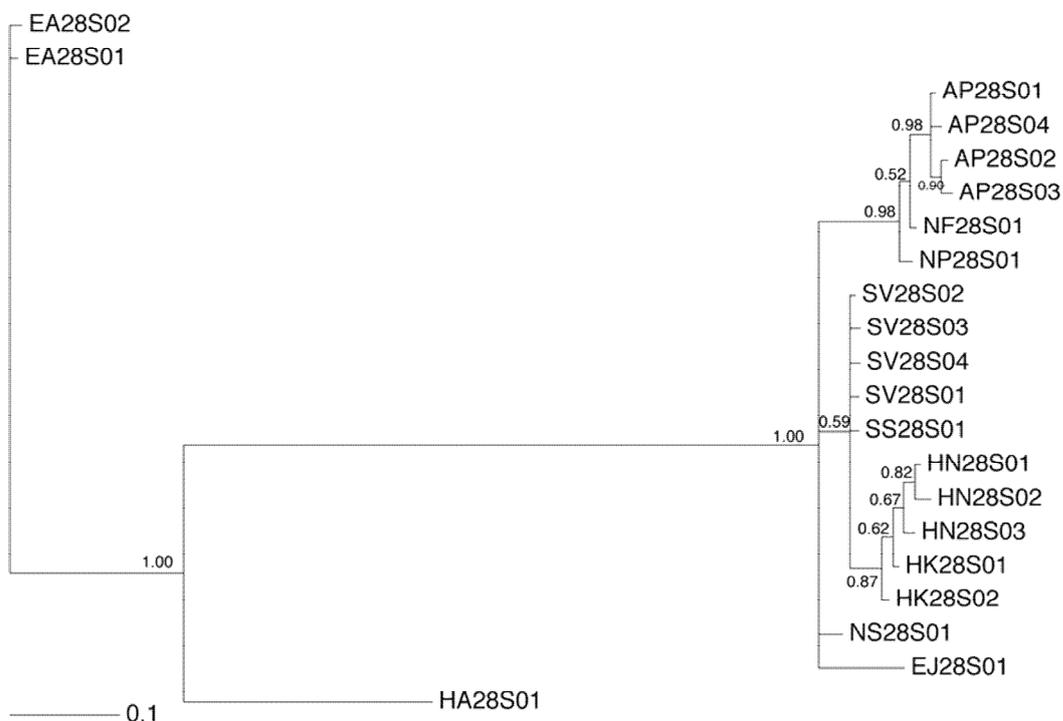
阿寒湖（図(1)-8a）は、約60年前から続いていた低密度で安定していた状態から、最近の10年程の間に急速な増加が起きていた。阿寒湖では以前からワカサギ養殖等の漁業活動が行われているが、近年はワカサギの漁獲量は減少している³⁵⁾。また、観光地でもあるため周辺の観光開発³⁶⁾が湖沼環境にも影響していることが予想される。急速な増加はミジンコに対する魚類の捕食圧の変化（減少）や水質の富栄養化が原因と予想される。さらに、現在の生息種は*Daphnia galeata*であり、12SrRNAによる遺伝子解析からはほぼ単一の遺伝子型が優占していたが、増加する前の1970年代以前には*D. ezoensis*が存在したことが確認された。ワカサギ養殖等の漁業活動に伴い、1970年までに*D. galeata*が侵入したと予想される。その後、魚類による捕食または他の何らかの生息環境変化により*D. ezoensis*が絶滅し、一方*D. galeata*は現在まで生き残り増加しているという入れ替わりが起きたことが考えられる。

渡島大沼（図(1)-8b）では約50年前から現在まではミジンコ休眠卵鞘が少ない状態が続いていた。しかし過去においては1900年頃をピークに密度が大きく増加していた時期があった。この後の1900年以降にマスやワカサギ等が移植され、漁獲量のピークは1930年代であった³⁷⁾。移植された魚類による捕食圧の増加が、1900年から1950年頃までのミジンコの密度減少の原因であったと考えられる。現世のミジンコ個体が得られなかったため、現在の生息種は不明である。堆積物中の休眠卵鞘を利用した12SrRNAによる遺伝子解析からは、*D. ezoensis*と*D. galeata*が存在したことが確認された。現在の種構成と比較できないため過去の変遷履歴も不明であるが、阿寒湖のように魚類の移植とともにミジンコの移入が起きた結果として2種が生息するようになったことも考えられる。

木崎湖（図(1)-8c）は1990年代から2000年にかけてミジンコの急速な増加が起きていたが、以前は休眠卵鞘が非常に少ないまたは得られない層が続いていた。しかし、休眠卵鞘が得られない時期にもミジンコ成体の採集記録は存在する^{38, 39)}ため、非常に低密度ながらミジンコは生息し続けていたはずである。木崎湖は1800年代後半から漁業に利用され³⁹⁾、ワカサギ等の移植は1910年頃に始まっており⁴⁰⁾、ミジンコが非常に少なかったこの時期には捕食圧が大きかったと考えられる。

1970年代には魚食魚であるバスの密放流があり⁴⁰⁾、これによりワカサギが減少したことからミジンコへの捕食圧も小さくなったと思われる。また周辺の開発も進んでいたことから、湖沼環境の変化も起きていたと予想される。これらの要因が近年のミジンコ密度の急速な変化をもたらしたことが考えられる。現在の生息種は*Daphnia galeata*であり、12SrRNAによる遺伝子解析から区別できる2つの遺伝子型であるK1とK2が存在することが確認された。それらの発見された比率はK1 : K2 = 3 : 1であった。休眠卵鞘を利用した遺伝子解析からは、1950年代から現在にかけてはK1とK2の両方の種内遺伝子型の存在が確認された。さらに古い層である年代未確定(100年以上前)の65cm、66cmの層からはK2のみが確認されている。2つの遺伝子型のうち、K2は長野県・山梨県・鹿児島県から発見されている局所的な分布のタイプであるが、K1はより日本の広い地域に生息する⁴¹⁾。遺伝子解析の結果から、局所的に生息するK2が木崎湖本来の遺伝子型であると考えられ、過去に存在しなかったK1は外部からの侵入によるものと予想される。木崎湖には魚類の移植が繰り返し行われているため、K1はそれに伴って外部から侵入し現在K2より多数を占めるに到っていると考えられる。

(2) 淡水ヒゲナガケンミジンコ休眠卵を種同定するための分子マーカーの開発と、湖沼堆積物試料への応用



図(1)-9 今回得られたnc28S DNAバーコード配列を用いてベイズ推定された系統樹。各ノードの数値は事後確率を示す。OUT名称のアルファベット2文字でヒゲナガケンミジンコ種名を示す(次ページ表中の表示方法と一致)。またOUT名称は、DDBJに登録の際に用いたisolate名と同一である。

1) プランクトン個体からの、DNAバーコードライブラリー作成

日本列島各地から採集されたヒゲナガケンミジンコ種は、テモラ科から *Eurytemora affinis* (Poppe 1880) と *Heterocope appendiculata* (Sars 1862) の2種、ディアプトムス科から *Acanthodiaptomus pacificus* (Burckhardt 1913)、*Eodiaptomus japonicus* (Burckhardt 1913)、*Heliodiaptomus kikuchii* Kiefer 1932、*Heliodiaptomus nipponicus* (Kokubo 1912)、*Neodiaptomus schmackeri* (Poppe and Richard 1892)、*Neutrodiaptomus formosus* (Kikuchi 1928)、*Neutrodiaptomus pachypoditus* (Rylov 1923)、*Sinodiaptomus sarsi* (Rylov 1923) および *Sinodiaptomus valkanovi* Kiefer 1938、の9種、合計11種にのぼった。

これら11種の合計109個体から、合計21パターンにのぼるnc28S領域のハプロタイプが得られた。今回配列決定した領域の塩基長は240bpと決して長くはないが、それでも同一の配列が複数種から得られることはなかった(図(1)-9)。

また、解析に供したヒゲナガケンミジンコ個体が全国各地から網羅的に採集されているため、今回得られたnc28S塩基配列は、種内での配列の地理的変異を、概ね反映しているだろう。よって、今回得られた21パターンのnc28S領域塩基配列をもって、日本淡水産ヒゲナガケンミジンコ類を対象とした、DNAバーコードライブラリーが完成した、と判断された。なお21パターンのnc28S領域塩基配列は、日本DNAデータバンクにおいて、AB699176からAB699196のアクセス番号で登録されている。

表(1)-1. 表層堆積物から単離した、ヒゲナガケンミジンコ休眠卵へのnc28Sバーコード適用結果。

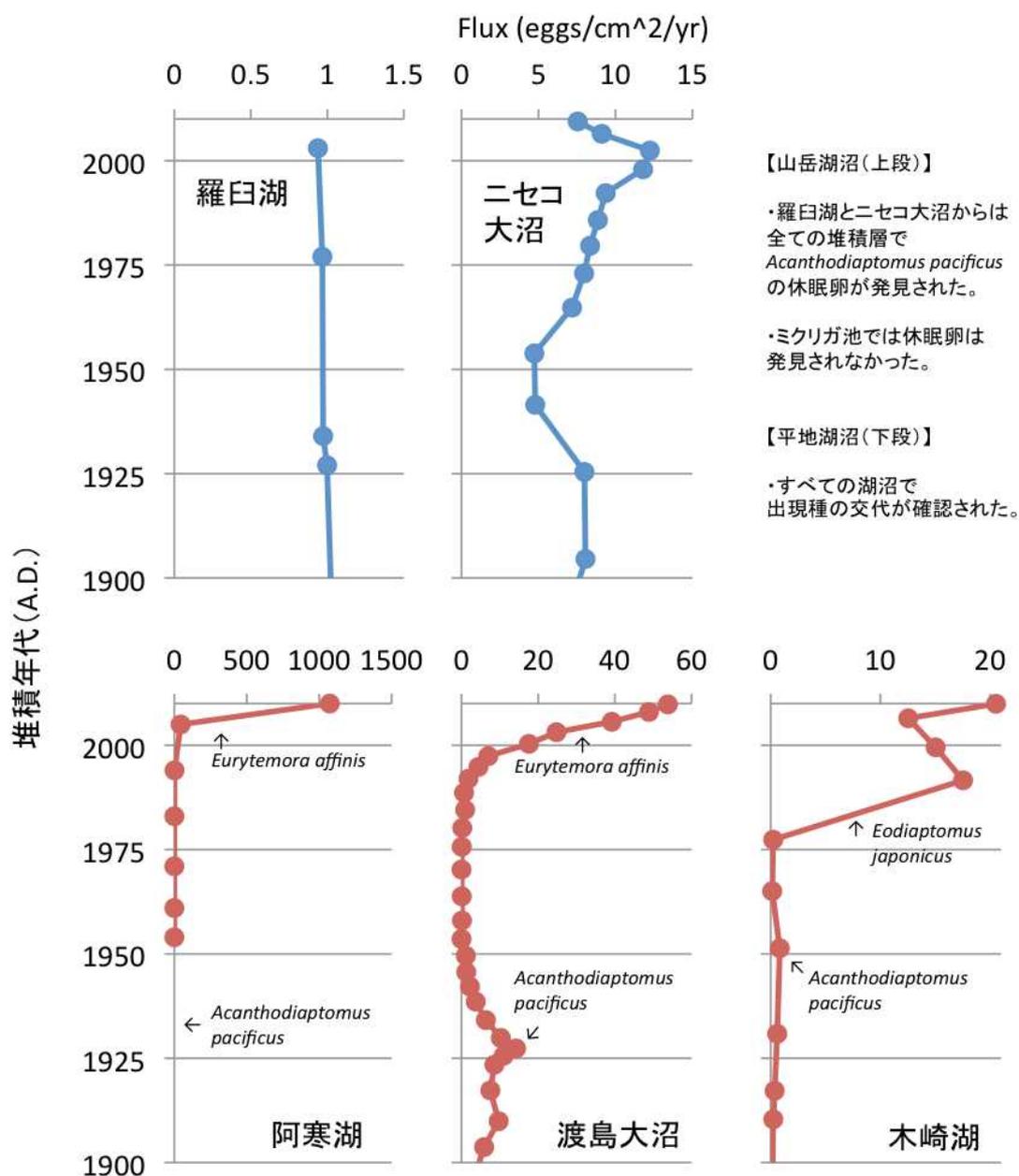
湖沼名	都道府県	解析した 休眠卵数	休眠卵から増幅した nc28Sの塩基配列 パターン	nc28Sバーコードに基づく ヒゲナガケンミジンコ 種名!
つつし沼	北海道	3	AP28S01	AP
羅臼湖	北海道	2	AP28S01	AP
阿寒湖	北海道	8	EA28S01	EA
ニセコ大沼	北海道	8	AP28S01	AP
渡島大沼	北海道	8	EA28S01	EA
横津岳の池	北海道	2	AP28S01	AP
伊豆沼	宮城県	3	EJ28S01	EJ
荒砥堤ため池	宮城県	3	AP28S01	AP
安達下沼	宮城県	3	EJ28S01	EJ
荒井堤ため池	宮城県	2	SV28S02	SV
		1	SV28S02+04	SV
猫ため池	宮城県	2	SV28S01	SV
		1	SV28S02	SV
		1	SV28S01+02	SV
畑谷大沼	山形県	3	AP28S02	AP
		1	AP28S02	AP
荒沼	山形県	3	EJ28S01	EJ
ウツボ沼	山形県	2	AP28S02	AP
駒ノ大池	福島県	3	AP28S02	AP
刈羽村のため池	新潟県	2	SV28S02	SV
		1	SS28S01	SS
		3	SS28S01	SS
平標山の池	新潟県	3	AP28S02	AP
四十八池	長野県	3	AP28S02	AP
木崎湖	長野県	4	EJ28S01	EJ
赤兔山の池	福井県	2	AP28S02	AP
琵琶湖	滋賀県	3	EJ28S01	EJ
小女郎が池	滋賀県	3	AP28S02	AP
古市大池	鳥取県	5	AP28S04	AP
		3	NS28S01	NS
福崎のため池	兵庫県	4	NF28S01	NF
小野町のため池	兵庫県	3	SV28S02	SV
中の池	兵庫県	2	HN28S03	HN
		2	HN28S02+03	HN
しだの下ため池	愛媛県	3	AP28S04+01	AP
甕岳の水たまり	宮崎県	1	AP28S04	AP
山田ため池	宮崎県	3	HK01+02	HK
清武町のため池	宮崎県	3	HK01+02	HK

1), AP: *Acanthodiaptomus pacificus* species complex, EA: *Eurytemora affinis*,
EJ: *Eodiaptomus japonicus*, HK: *Heliodiaptomus kikuchii*, HN: *Heliodiaptomus nipponicus*,
NF: *Neutrodiaptomus formosus*, NS: *Neodiaptomus schmackeri*, SS: *Sinodiaptomus sarsi*,
SV: *Sinodiaptomus valkanovi*.

2) ヒゲナガケンミジンコ休眠卵へのnc28S DNAバーコード適用可能性の吟味

次に、全国各地の30湖沼から得られた合計112個のヒゲナガケンミジンコ休眠卵に、nc28S DNAバーコードを適用した結果を、前ページの表(1)-1に示した。

すべての休眠卵についてシーケンスに成功したので、DNAバーコードライブラリーの塩基配列情報から種同定を行ったところ、決定された種名はその採集地でプランクトンとして出現していたヒゲナガケンミジンコ種の種名と一致した。ゆえに、今回開発したnc28S DNAバーコードを用いてジェのタイピングを行うことで、日本各地の湖沼堆積物中のヒゲナガケンミジンコ休眠卵から、その湖沼に棲息するヒゲナガケンミジンコ種を同定できることが、明瞭に示された。

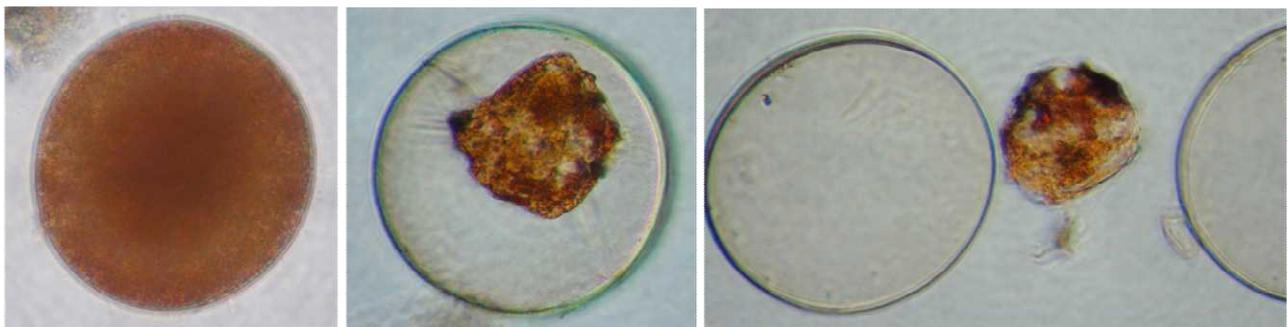


図(1)-10. 山岳湖沼(上段)と低地湖沼(下段)における、ヒゲナガケンミジンコ休眠卵フラックスの経年変化。低地湖沼では出現種が交代していることに注意。

また新潟県刈羽村のため池と鳥取県・古市大池の堆積物中からは、プランクトン試料中に出現したヒゲナガケンミジンコ種（それぞれ*S. valkanovi*と*N. schmackeri*）の休眠卵に加えて、プランクトン試料中には出現しなかったヒゲナガケンミジンコ種（それぞれ*S. sarsi*と*A. pacificus*）の休眠卵も発見されたが、後者は、採集時期以前に卓越していたが、採集時期には何らかの理由により消滅していた種なのだろう。

3) ヒゲナガケンミジンコ過去群集の復元

得られた結果は図(1)-10のとおりである。山岳湖沼の羅臼湖とニセコ大沼では、現世種である*Acanthodiaptomus pacificus*が、過去100年間、継続して出現していたことが分かった。これらの湖沼では、表層堆積物中では外形上「正常な」休眠卵（図(1)-11）ばかりであったが、堆積層が深くなるに伴い「死卵」と判断される卵が増えた。この「死卵」は、1) 外形上「正常な」休眠卵と同型・径であること、2) 「死卵」を分解・単離した「中身」を用いたnc28S DNAバーコード解析により*A. pacificus*と同定できたこと、3) 実験室にて*A. pacificus*のみを単離・飼育した場合にも、この「死卵」と酷似するものが、外形上「正常な」休眠卵とともに発見されること、から*A. pacificus*と種判別して差し支えない。



図(1)-11 堆積物中から回収した、*A. pacificus*の休眠卵。左) 正常な卵、中央) 死卵、右) 死卵を分解・中身を単離した状況。いずれも倍率200倍にて撮影。

低地湖沼である阿寒湖、渡島大沼および木崎湖では、山岳湖沼の場合とは異なり、現世種（阿寒湖と渡島大沼では*Eurytemora affinis*、木崎湖では*Eodiaptomus japonicus*）の出現は比較的最近であり、過去には別の種（*A. pacificus*）が分布していたことが分かった。

阿寒湖においては、1950年代以前には*A. pacificus*が出現していたと報告⁴²⁻⁴⁴⁾されているが、今回の結果はそれとよく一致した。一方、渡島大沼と木崎湖では、第二次世界大戦以前には*Diaptomus* sp. の出現が記録されているが⁴⁵⁻⁴⁷⁾、これはヒゲナガケンミジンコ種同定に関する文献資料が、当時は充実していなかったため、日本には出現しない*Diaptomus*属と記述したもので、実際には*Diaptomus*属ではなく*A. pacificus*が出現していた、と考えるべきである。

これらの低地湖沼において、過去種休眠卵が減少した時期に、湖内での基礎生産量が減少したことを示すデータは、本研究課題では得られていない（サブテーマ2の結果を参照）。他方、ヒゲナガケンミジンコ過去種の休眠卵が減少した時期は、内水面漁業にかかる魚の放流量が増加し

た時期と概ね一致する。例えば、北海道南西部の渡島大沼周辺では、表(1)-2に示すような変化が、過去100年間の間に起こった事が知られている^{33, 37, 48)}。

表(1)-2 渡島大沼およびその集水域の、近過去における出来事^{36, 37, 48)}。

年代（西暦）	イベント		
	内水面漁業関連	集水域開発	その他
1871	湖内へ初の魚類（コイ・フナ）放流	-	-
1896	-	硫黄・褐鉄鉱の採掘始まる	-
1900	初のヒメマス放流	-	-
1900-1920頃	-	湖周辺の開発整備（鉄道・工場・発電所）…第一次世界大戦では工場好況	-
1927	初のワカサギ放流	-	-
1936	漁獲高・過去最高値	-	-
1939-1944頃	-	金の採鉱	-
1950-60年代	各年のワカサギ放流量が1930年代の5-10倍	-	-
1958	-	-	国立公園指定
1965	-	湖水放水先を函館湾へ変更	-
1974	-	-	湖沼環境保全のため協議会設置
1980年代以降	-	牛の放牧急増	アオコ発生 水生植物の増加 →駆除・刈取り

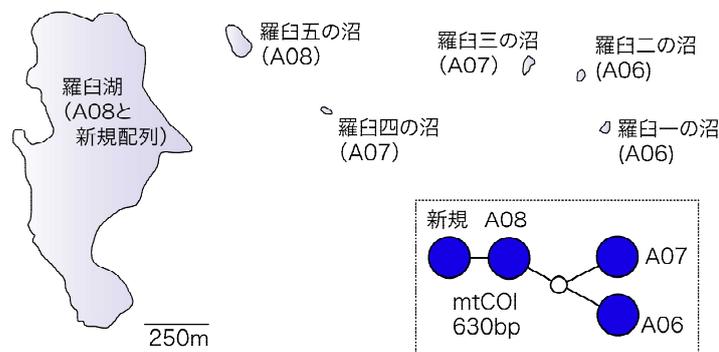
すなわち、渡島大沼において*A. pacificus*の休眠卵フラックスが低下する時期は、湖内へのワカサギの放流が始まり、漁獲高が増加した時期と、概ね、良く一致する。湖底への休眠卵フラックスが、当時の湖内のヒゲナガケンミジンコ個体の現存量を反映している⁴⁹⁾と仮定すれば、湖内での漁獲増加以降、*A. pacificus*の現存量が減少したことが推察される。興味深い事に、この時期には*A. pacificus*だけでなくミジンコ類(*Daphnia*)も減少したところが、前項のデータ(図(1)-8)から推察される。*A. pacificus*と*Daphnia*は、我が国の淡水動物プランクトンの中では大型の部類に入る。とりわけサイズの大きな抱卵個体は、いずれもワカサギやヒメマスといった、我が国の湖沼に繰り返し放流されてきた、プランクトン食性魚類に選択的に捕食されるため、*A. pacificus*と*Daphnia*の個体群は、魚類捕食によるトップダウン制御を受けやすい⁵⁰⁻⁵²⁾。また、渡島大沼でのヒゲナガケンミジンコ現世種*E. affinis*は、*A. pacificus*よりも小型である⁵³⁾ため、魚類捕食によるトップダウン制御の影響は、*A. pacificus*の場合よりも小さいだろう。以上のことから、渡島湖沼におけるヒゲナガケンミジンコ種交代は、ボトムアップ制御ではなく、トップダウン制御により説明できると推察され、ゆえに人為的な影響が色濃く反映されていると判断された。阿寒湖と木崎湖でも、ヒゲナガケンミジンコ種は大型種から小型種へと変化していたが、この種遷移も、渡島大沼の事例と同様に解釈できると思われる。

今回調査した山岳湖沼においても、若干の富栄養化や大気降下物の影響など、人為影響の兆し

が検出されている（サブテーマ2の結果を参照）が、幸いなことに、長期にわたる継続的な魚類の放流は行われていない。例えばニセコ大沼では、武田³⁶⁾によれば、昭和7年度にワカサギ（公魚）卵九百万粒が渡島大沼より移植され、また元田⁵⁴⁾によれば、コイが放養されたこともある、と記録されているが、いずれも湖内に定着しなかった模様である。上記の低地湖沼での事例をもとに考えると、羅臼湖とニセコ大沼では、人為的なトップダウン制御圧の増加が無視できるほど小さかったことが、現世種である*A. pacificus*が、過去100年間継続して出現していた主要な原因として挙げられるだろう。

4) 世界自然遺産「知床」のヒゲナガケンミジンコ

本研究では、羅臼湖堆積物中のヒゲナガケンミジンコ休眠卵を解析するにあたり、羅臼湖にプランクトンとして出現する*A. pacificus*について、nc28S DNAバーコードに加えて、ミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列（部分配列630bp、以後はmtCOIと記す）についても解析を行い、羅臼湖周辺の湖沼に出現する*A. pacificus*のデータ⁵⁵⁾と比較した。



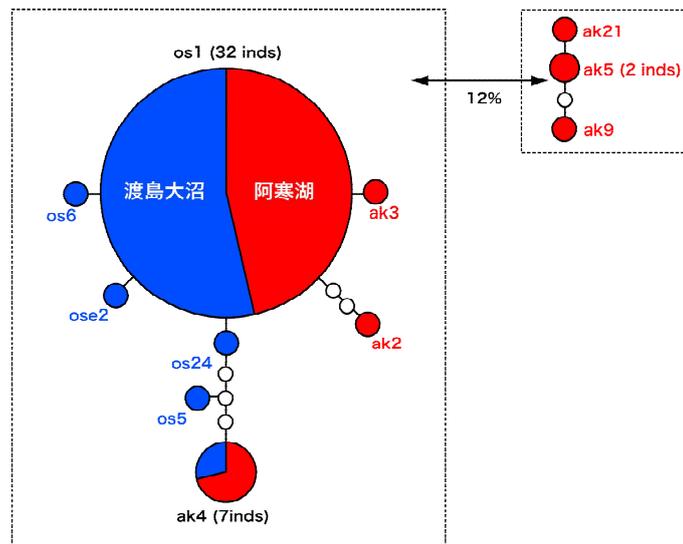
図(1)-12 羅臼湖およびその周辺の湖沼に分布する*A. pacificus*のmtCOIハプロタイプ組成。狭い範囲に湖沼が点在するにも関わらず、湖ごとに得られるハプロタイプには違いが認められる。点線内には、それぞれの湖で認められるmtCOIハプロタイプ同士の関係を、ネットワーク系統樹にて示した（白丸はミッシングハプロタイプ）。

羅臼湖から得た*A. pacificus*24個体のmtCOI塩基配列は、23個体が既報のハプロタイプA08⁵⁵⁾と一致し、残り1個体は新規配列（ただしA08とは1塩基違い）を示した（図(1)-12）。羅臼湖周辺には狭い範囲に湖沼が点在しているが、ハプロタイプA08は、羅臼湖から300m程度東に位置する「羅臼五の沼」から報告されたものである⁵⁵⁾。しかし羅臼湖周辺のその他の湖沼からは、距離的に近接するにもかかわらず、ハプロタイプA08は発見されておらず、また羅臼湖からもハプロタイプA06とA07は発見されなかった。このことから、*A. pacificus*の自然分散能力が極めて小さいことがわかる。

5) 阿寒湖と渡島大沼の*Eurytemora affinis*の遺伝的分化について

阿寒湖と渡島大沼のヒゲナガケンミジンコ現世種である*Eurytemora affinis*は沿岸・汽水域が元来の生息地であるが、北海道の淡水湖沼の本種は、網走湖等の汽水湖からのワカサギ移植にともない侵入した可能性が指摘されている⁵⁶⁾。ただし、この可能性は未だ詳細に検討されていない。渡島大沼へのワカサギ移植は1927年にまで遡るが、最初の移植は網走湖からであった³⁶⁾。以後も網走湖や阿寒湖から、ワカサギの移植が繰り返されてきた^{36, 48)}。ワカサギの移植が*E. affinis*のベクターとなるならば、阿寒湖と渡島大沼の*E. affinis*個体群は、遺伝的に互いに類似しているだろう。

本研究では、阿寒湖およびニセコ大沼堆積物中のヒゲナガケンミジンコ休眠卵を解析するにあたり、プランクトンとして出現する*E. affinis*について、nc28S DNAバーコードに加えて、nc28Sよりも進化速度の速いmtCOI（部分配列、630bp）についても解析を行い、阿寒湖と渡島大沼の*E. affinis*の間の遺伝的交流について検討を加えた。



図(1)-13 阿寒湖(赤色)、渡島大沼(青色)においてプランクトンネット採集で得られた*E. affinis*のmtCOIハプロタイプネットワーク系統樹。白丸はミッシングハプロタイプを示す。丸印のサイズは出現個体数を反映している。ハプロタイプos1とak4は、両方の湖で発見された。また阿寒湖では、配列のやや(12%)異なるハプログループ(as5, as9, as21)も観察された。

前項では、世界自然遺産「知床」の湖沼の*A. pacificus*では、距離的に近接した湖沼間ですら、遺伝的交流が殆ど認められないことを示したが、直線距離で322km離れている阿寒湖と渡島大沼から採集された*E. affinis*のmtCOI塩基配列には、両湖に共通して出現するハプロタイプ(図1-13のos1とak4)が見られ、どちらの湖でも、それらは個体群中で優占するハプロタイプであった。ま

たnc28S領域の配列も両湖で一致した。これらの結果は、両湖個体群間での遺伝的交流を強く示唆した。

つまり、*E. affinis*の分散は、*A. pacificus*よりも顕著であることが示された。上述のとおり、北海道の湖沼間でワカサギの移植を介した*E. affinis*の移動分散の可能性が指摘されていたが⁵⁶⁾、実際に遺伝子流動を検出した本解析結果は、この論議を支持するだろう。つまり*E. affinis*の顕著な分散の要因として、人為的な影響を指摘することができよう。

またどちらの湖でも、解析に供した*E. affinis*個体数は上述の*A. pacificus*と同じ24個体であるが、*E. affinis*では各湖から5個以上のハプロタイプが得られた。つまり渡島大沼と阿寒湖の*E. affinis*個体群の遺伝的多様性は、*A. pacificus*の場合よりも大きいことが示された。ただし、どちらの湖の*E. affinis*個体群も、ネットワーク系統樹が星形を示すことから、近年ボトルネックを受けたことがわかる。一般に移入個体群は強い遺伝的ボトルネックを受けることが多いが、*E. affinis*も移入種であるとされている。すなわち、元来沿岸性・汽水性種である*E. affinis*が、我が国においては、ワカサギの移植にともない、汽水湖から淡水湖へと移入したと類推されている⁵⁶⁾。実際に遺伝的ボトルネックの兆候を検出した本解析の結果からも、その可能性は支持される。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ミジンコ (*Daphnia*) は環境変化に応答して急速に進化する性質をもつため^{18, 20, 57-60)}、湖底堆積物中から収集できるミジンコ休眠卵は過去の湖沼環境変動を読み解く材料として有用である。休眠卵が孵化する条件が整いやすい湖沼では堆積物中から休眠卵を採集することは困難であるが、休眠卵の入っていない空の卵鞘を採集することは容易である。本研究により卵鞘から遺伝情報を得る手法が確立したことにより、休眠卵の孵化率に関わらずに、どの湖沼でも堆積物に含まれるミジンコ卵鞘を用いて湖沼環境変動を読み解くことが可能になった。

実際、この方法で過去群集の遺伝子組成を調査したところ、山形県の畑谷大沼では、現在の*Daphnia*群集で優占していると考えられる遺伝子のタイプが過去集団の卵鞘の遺伝子組成の中では少ないことが明らかとなった。これは遺伝的な違いにより異なる繁殖戦略が存在すること、現在と過去では*Daphnia*にとっての環境が異なることを示唆しており、これまで検出が困難であった過去に生じた小さな環境イベントをも抽出できる道筋を示すものである。また山岳湖沼（羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池）と低地湖沼（阿寒湖、渡島大沼、木崎湖）を比較することで、湖沼への人為影響の濃淡が、*Daphnia*群集組成の時空間的安定性に強い影響を与えるという、大きな環境イベントの影響をも抽出できた。山岳湖沼では比較的安定した環境が続いていると考えられるが、各地で過去の人間活動の影響と思われる増減が生じていたことが示された。特に、人間の生活圏に比較的近い低地湖沼では、増減だけでなく種または遺伝子のタイプが現在と過去で異なることが明らかとなった。同様の調査は堆積物中からミジンコ卵鞘を得られるならば他の湖沼でも可能であり、過去から現在までの環境変動を解明するために利用できると期待される。

また本サブテーマでは、既存の研究ではほぼ不可能とされていた、ヒゲナガケンミジンコ類の過去の群集組成を復元することにも成功し、湖のプランクトン群集の復元過程に、新しい、効果

的なツールを提供することができた。その結果本研究では、湖沼への人為影響の濃淡が、*Daphnia*類だけでなく、ヒゲナガケンミジンコ群集組成の時空間的安定性にも強い影響を与えることを見出した。湖沼の動物プランクトンとして量的に卓越する*Daphnia*類とヒゲナガケンミジンコ類とで、同様の結果が得られた事は、我が国の低地湖沼にかかってきた人為影響が、湖沼の食物網構造を極めて強い形に変質させていたことを、強く示唆するものである。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究が開発したレトロスペクティブ型モニタリング手法を用いることで、同種個体群の遺伝型の変化といった小さな環境変化をも検出できるようになり、過去の湖沼環境の変動を高解像度で読みとくための道筋がひらけた。本サブテーマで開発した方法は、時間や予算などの高いコストが必要となる継続的モニタリングが行われてこなかった湖沼でも、過去の生物群集の組成情報だけでなく、遺伝的情報を得ることを可能にする。したがって、これら一連の手法は、現在および将来の環境変動に対する生物群集の影響予測にも繋がり、土地利用改変などの政策にあたっての目標設定に科学的な情報を提供することができる。

例えば、本調査地の一つである羅臼湖周辺の知床国立公園は、ユネスコの世界遺産に選ばれた、文字通り世界的に貴重な生態系であるが、本研究からケンミジンコ類では他湖との間の遺伝子交流が制限されよく保存されていることがわかった。この結果は、阿寒湖など集水域の人間活動が大きな湖沼での結果とは対照的である。我が国では重要な自然生態系について過去のデータがないため現状評価がしにくい場合が多いが、本研究はそれら問題の克服に大きく貢献出来るだろう。

また本研究で得られた手法を多様な湖沼で比較することにより、各湖沼特有の環境変化要因を特定することが可能となった。例えば、低地湖沼と山岳湖沼とを比較すると、低地湖沼では集水域の人為的な負荷（なかでも魚類の放流）が、山岳湖沼は大気降水物（サブテーマ2と3を参照）が、それぞれ重要な生態系変化要因である。このように、生態系の環境変化要因は湖沼によって異なっており、その違いに応じた環境改善策を講じて行く上で、本研究の手法は有効となるだろう。

個別の湖沼について、具体的な保全目標を設定する際には、保全目標を正しく設定することが必要である。しかし、湖沼モニタリングが殆ど行われてこなかった湖沼では、保全目標を正しく設定することが困難である。本研究が開発したレトロスペクティブ型モニタリング手法は、比較的少ない予算で、保全目標の設定に必要なデータを得る事を可能とする。また、生態系変化の長期的なプロセスを解明できるので、どの時代の生態系を取り戻すのが望ましいのかといった、保全目標決定の際に極めて重要な科学的根拠を積み上げることができる。特に人為影響の大きな低地湖沼においては、保全目標の設定に際して、レトロスペクティブ型モニタリングを行い、生物相の経年変化を把握しておくことは、今後の保全や集水域の改変などの上でも役立つだろう。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) S. Ishida, H. Ohtsuki, T. Awano, N. K. Tsugeki, W. Makino, Y. Suyama and J. Urabe: *Limnology*, 13, 261-267 (2012) "DNA extraction and amplification methods for ephippial cases of *Daphnia* resting eggs in lake sediments: a novel approach for reconstructing zooplankton population structure from the past"
- 2) W. Makino, H. Ohtsuki and J. Urabe: *Limnology*, in press (2013) "Finding copepod footprints: a protocol for molecular identification of diapausing eggs in lake sediments"

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 石田聖二・牧野渡: 吉田丈人・鏡味麻衣子・加藤元海(編)シリーズ現代の生態学 第9巻 淡水生態学のフロンティア. 共立出版(2012) 「1章: 淡水動物プランクトン種の地理的構造を形成した歴史的プロセス」

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 石田聖二・大槻朝・陶山佳久・占部城太郎 第58回日本生態学会大会 2011.3 札幌 「湖底に堆積する動物プランクトン遺骸(ミジンコ休眠卵鞘)の遺伝解析手法の開発」
- 2) 槻木玲美、王婉琳、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、田辺信介、占部城太郎: 地球惑星科学関連学会2010年合同大会(2010) 「八幡平湖沼のプランクトン長期動態とその変動要因: 高山湖沼で何が起きているか?」
- 3) Tsugeki, N.K., Urabe, J., Tani, Y., Ueda, S., Agusa, T., Oda, H., and Tanabe, S.: ASLO Aquatic Sciences Meeting (2011) 「Does atmospheric dust transported from the Asian continent influence oligotrophic lakes in Japan?」
- 4) 槻木玲美、占部城太郎、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、王婉琳、田辺信介: 日本生態学会第58回全国大会(2011) 「アジア大陸起源の気象降下物は日本の湖沼へどのような影響を与えているか?」
- 5) W. Makino and J. Urabe: 日本生態学会第59回全国大会(2012) 「Finding copepod footprints: DNA barcoding for the resting eggs in lake sediments」
- 6) N. K. Tsugeki, T. Agusa, S. Ueda, M. Kuwae, H. Oda, S. Tanabe, Y. Tani, K. Toyoda, W-L. Wang and J. Urabe: ASLO Aquatic Sciences Meeting, Japan, 2012. "Eutrophication and increasing metal deposition of mountain lakes in East Asia due to anthropogenically-produced dust"

- 7) 占部城太郎：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「イントロダクション - 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング」
- 8) 牧野渡、大槻朝、石田聖二、占部城太郎：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「動物プランクトン情報を用いた湖沼生物群集の復元」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Rychlik W (2007) OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol* 402: 35-60.
- 2) Truett G, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52-54.
- 3) Alasaad S, Rossi L, Maione S, Sartore S, Soriguer RC, Pérez JM, Rasero R, Zhu XQ, Soglia D (2008) HotSHOT Plus ThermalSHOCK, a new and efficient technique for preparation of PCR-quality mite genomic DNA. *Parasitol Res* 103: 1455-1457.
- 4) Meeker N, Hutchinson S, Ho L, Trede N (2007) Methods for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques* 43: 610-614.
- 5) Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz JN (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction methods for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnol Oceanogr: Methods* 6: 218-222.
- 6) Ishid, S, Ohtsuki H, Awano T, Tsugeki NK, Makino W, Suyama Y, Urabe J (2012) DNA extraction and amplification methods for ephippial cases of *Daphnia* resting eggs in lake sediments: a novel approach for reconstructing zooplankton population structure from the past. *Limnology* 13: 261-267.
- 7) Crease TJ (1999) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* 233: 89-99.

- 8) Pace ML (1986) An empirical analysis of zooplankton community size structure across lake trophic gradients. *Limnol Oceanogr* 31: 45-55.
- 9) Auclair JC, Frenette JJ, Dodson J (1993) Zooplankton community structure in southwestern Quebec lakes: the roles of acidity and predation. *J Plankton Res* 15: 1103-1128.
- 10) Jeppesen E, Jensen JP, Søndergaard M, Lauridsen T, Landkildehus F (2000) Trophic structure, species richness and biodiversity in Danish lakes: changes along a phosphorus gradient. *Freshw Biol* 45: 201-218.
- 11) Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitefield JB, Hebert PDN (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6: 959-964.
- 12) Meusnier I, Singer GAC, Landry J-F, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M (2008) A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* 9: 214.
- 13) 水野寿彦・高橋栄治 (編) (2000) 日本淡水動物プランクトン検索図説. 東海大学出版会.
- 14) Bissett A, Gibson JAE, Jarman SN, Swadling KM, Cromer L (2005) Isolation, amplification, and identification of ancient copepod DNA from lake sediments. *Limnol Oceanogr Methods* 3: 533-542.
- 15) Ban S, Minoda T (1992) Hatching of diapause eggs of *Eurytemora affinis* (Copepoda: Calanoida) collected from lake-bottom sediments. *J Crust Biol* 12: 51-56.
- 16) Kerfoot WC, Robbins JA, Weider LJ (1999) A new approach to historical reconstruction: combining descriptive and experimental paleolimnology. *Limnol Oceanogr* 44: 1232-1247.
- 17) Decaestecker, E., S. Gaba, J. A. M. Raeymaekers, R. Stoks, L. Van Kerckhoven, D. Ebert and L. DeMeester. 2007. Host-parasite "Red Queen" dynamics archived in pond sediment. *Nature*, 450: 870-873.
- 18) Cousyn C, DeMeester L, Colbourne JK, Brendonck L, Verschuren D, and Volckaert FAM (2001) Rapid, local adaptation of zooplankton behavior to changes in predation pressure in the absence of neutral genetic changes. *Proc N Acad Sci USA* 98: 6256-6260.
- 19) Hairston NG Jr, Holtmeier CL, Lampert W (2001) Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity? *Evolution* 55: 2203-2214.
- 20) Hairston NG Jr, Lampert W, Cáceres CE, Holtmeier CL, Weider LJ, Gaedke U, Fischer JM, Fox JA, Post DM (1999) Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401: 446.
- 21) Brede N, Sandrock C, Straile D, Spaark P, Jankowski T, Streit B, Schwenk K (2009) The impact of human-made ecological changes on the genetic architecture of *Daphnia* species. *Proc N Acad Sc. USA* 106: 1613-1618.
- 22) Weider LJ, Lampert W, Wessels M, Colbourne JK, Limburg P (1997) Long-term genetic shifts in a microcrustacean egg bank associated with anthropogenic changes in the Lake Constance ecosystem. *Proc R Soc B* 264: 1613-1618.
- 23) Allen MR (2010) Genetic and environmental factors influence survival and hatching of diapausing eggs. *Limnol Oceanogr* 55: 549-559.
- 24) Cáceres CE, Tessier AJ (2003) How long to rest: the ecology of optimal dormancy and

- environmental constraint. *Ecology* 84: 1189-1198.
- 25) Faustova M, Petrusek A, Cerny M (2004) Status of *Daphnia* resting egg banks in Bohemian Forest lakes affected by acidification. *Hydrobiologia* 526: 23-31.
- 26) Jankowski T, Straile D (2003) A comparison of egg-bank and long-term plankton dynamics of two *Daphnia* species, *D. hyaline* and *D. galeata*: potentials and limits of reconstruction. *Limnol Oceanogr* 48: 1948-1955.
- 27) Marková S, Cerny M, Rees DJ, Stuchlík E (2006) Are they still viable? Physical conditions and abundance of *Daphnia pulicaria* resting eggs in sediment cores from lakes in the Tatra Mountains. *Biologia Bratislava* 61: S135-S146.
- 28) Schwartz SS, Hebert PDN (1987) Methods for the activation of resting eggs of *Daphnia*. *Freshwat Biol* 17: 373-379.
- 29) 阿部周 (2011) 山形県畑谷大沼におけるミジンコ個体群の遺伝構造とその季節変化. 東北大学修士学位論文. 東北大学.
- 30) Tessier AJ, Cáceres CE (2004) Differentiation in sex investment by clones and populations of *Daphnia*. *Ecol Lett* 7: 695-703.
- 31) Alekseev V, Lampert W (2001) Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature* 414: 899-901.
- 32) 田中正明 (1980) プランクトンから見た本邦湖沼の富栄養化の現状 (41) 再び北海道の湖沼 7. *水* 22: 64-68.
- 33) 倶知安町HP 近代化産業遺産 (http://www.town.kutchan.hokkaido.jp/town/kikakushinkou/industrial_modernization.jsp).
- 34) 福沢仁之 (2005) ミクリガ池年功堆積物からみた立山信仰の開始—なぜ人は立山に登ったのか? 安田喜憲編著 『山岳信仰と日本人』 NTT出版, 東京. pp. 125-146.
- 35) 安富亮平・渡辺智治・隼野寛史・眞野修一 (2008) 阿寒湖の水質環境の現状. *魚と水* 45: 8-15.
- 36) 武田重秀 (1954) 淡水魚の移植実績について. *魚と卵* 48: 29-36.
- 37) 石川靖 (2000) 北海道渡島大沼の環境の長期的変遷. 国立環境研究所研究報告 153: 98-123.
- 38) Sekino T, Hanazato T (2001) Zooplankton. In: Y. Saijo and H. Hayashi. (eds) pp. 301-312. Lake Kizaki. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- 39) 田中阿歌麿 (1930) 日本北アルプス湖沼の研究. 古今書院, 東京.
- 40) Hayashi H (2001) Disturbance of the lake ecosystem. In: Y. Saijo and H. Hayashi. (eds) pp. 371-382. Lake Kizaki. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- 41) Ishida S, Takahashi A, Matsushima N, Yokoyama J, Makino W, Urabe J, Kawata M (2011) The long-term consequences of hybridization between the two *Daphnia* species, *D. galeata* and *D. dentifera*, in mature habitats. *BMC Evol Biol* 11: 209.
- 42) Ueno M (1936) Bottom and plankton fauna of the Akan lake group of Hokkaido. *Trans Sapporo Nat Hist Soc* 14: 207-225.
- 43) 黒萩尚・長内稔 (1957) 最近における北海道阿寒湖の初夏及び秋のプランクトンについて. *水鱉研報* 12: 29-38.

- 44) 黒萩尚・三原健夫 (1961) 北海道陸水観察資料 I. 阿寒湖の昭和16年10月のプランクトン相について. 水産研報 16: 85-90.
- 45) 田中館秀三 (1925) 北海道火山湖研究概報. 北海道庁.
- 46) 半田芳男・荒木勝二 (1930) 湖沼調査 (大沼、小沼、蓴菜沼、阿寒湖、濤沸湖). 水産調査報告書 第21冊. 北海道水産試験場.
- 47) 川村正雄 (1928) 木崎湖水温及び浮遊生物調査. 水産研究誌 23: 248-265.
- 48) 北海道七飯町 (1976) 七飯町史. 北海道七飯町.
- 49) De Stasio BT Jr (1989) The seed bank of a freshwater crustacean: copepodology for the plant ecologist. Ecology 70: 1377-1389.
- 50) Takamura N, Mikami H, Mizutani H, Nagasaki K (1999) Did a drastic change in fish species from kokanee to pond smelt decrease the Secchi disc transparency in the oligotrophic Lake Towada, Japan? Arch Hydrobiol 144: 283-304.
- 51) Makino W, Kato H, Takamura N, Mizutani H, Katano N, Mikami H (2001) Did chironomid emergence release Daphnia from fish predation and lead to a *Daphnia*-driven clear-water phase in Lake Towada, Japan? Hydrobiologia 442: 309-317.
- 52) Ban S, Makino W, Sakano H, Haruna H, Ueda H (2013) Annual variation in biomass and the community structure of crustacean zooplankton over 5 years in Lake Toya, Japan. Limnology 14: 59-70.
- 53) Makino W, Ohtsuki A, Urabe J (2013) Finding copepod footprints: a protocol for molecular identification of diapausing eggs in lake sediments. Limnology (in press).
- 54) 元田茂 (1950) 北海道湖沼誌. 水産孵化場試験報告 5: 1-96.
- 55) Makino W, Tanabe AS (2009) Extreme population genetic differentiation and secondary contact in the freshwater copepod *Acanthodiaptomus pacificus* in the Japanese Archipelago. Mol Ecol 18: 3699-3713.
- 56) Ban S, Minoda T (1989) Seasonal distribution of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) (Copepoda; Calanoida) in freshwater Lake Ohnuma, Hokkaido. Bull Fac Fish Hokkaido Univ 40: 147-153.
- 57) Hairston NG Jr, Ellner S, Geber M, Yoshida T, Fox JA (2005) Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. Ecol Lett 8: 1114-1127.
- 58) Duffy MA, Hall SR, Cáceres CE, Ives AR (2009) Rapid evolution, seasonality, and the termination of parasite epidemics. Ecology 90: 1441-1448.
- 59) Fisk DL, Latta LC, Knapp RA, Pfrender ME (2007) Rapid evolution in response to introduced predators. I: rates and patterns of morphological and life-history traits divergence. BMC Evol Biol 7: 22.
- 60) Scoville AG, Pfrender ME (2010) Phenotypic plasticity facilitates recurrent rapid adaptation to introduced predators. Proc N Acad Sc. USA 107: 4260-4263.

(2) 堆積物の藻類・光合成色素を用いた湖沼の栄養・物理環境の復元

愛媛大学

上級研究員センター

加 三千宣

<研究協力者> 愛媛大学 上級研究員センター 槻木玲美
産業技術総合研究所 計測標準研究部門 伊藤信靖
静岡県立大学 環境科学研究所 谷幸則
名古屋大学 年代測定総合研究センター 小田寛貴

平成22～24年度累計予算額：29,637千円

(うち、平成24年度予算額：9,489千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

動・植物プランクトン動態の高度復元は、レトロスペクティブ型モニタリング技術開発の要の一つである。各生態系におけるプランクトン変動プロセスの解明は、食物連鎖におけるボトムアップ・トップダウン効果の両方の寄与を評価する必要がある。しかし、従来の植物色素や動物プランクトン遺骸に基づく指標だけでは上位栄養段階の捕食量の情報が欠落していたために、プランクトン変動に対するボトムアップ・トップダウン効果の寄与の評価が困難であった。サブテーマ2では、動物プランクトン捕食量の指標化が期待できる、クロロフィル誘導体ステリルクロリンエステル類、「SCEs色素」の有用性を検討した。ニセコ大沼で検討した結果、SCEs色素と植物色素及び動物プランクトン遺骸から、(1)動物プランクトンの餌藻類の特定とその捕食量変化、(2)動物プランクトン増加に対するボトムアップ効果の寄与を可視化できることがわかった。本サブテーマの技術開発によって、植物色素・動物プランクトン遺骸情報をSCEs色素の情報と併用することで、生態系変化のカギとなるプランクトンの変動要因について、ボトムアップ・トップダウン効果の両面から評価することができるようになった。

近年、越境汚染による大気経路栄養塩負荷の山岳湖沼生態系に対する脅威が懸念されている。本サブテーマでは、東北山岳湖沼で認められてきた大気由来の栄養塩負荷による生態系シフトが、我が国においてどの程度の広がりを持つかを明らかにすることを到達目標の一つとして解析を行った。過去100年の動植物プランクトン量を復元した結果、ニセコ大沼とミクリガ池、蓬萊沼の3つの山岳湖沼から、共通する1980年代後半以降の植物・動物プランクトン増加が明らかとなった。プランクトンが増加する時期は、窒素同位体比が減少する傾向にあることから、大気からの栄養塩負荷がプランクトン増加を引き起こした可能性が高い。以上の結果は、北陸から北海道西部までの広範囲にわたって、大気経路の栄養塩負荷による山岳湖沼の生態系シフトが1980年代後半に起こった可能性を示唆した。特に、日本海に近い地域の山岳湖沼が、アジア大陸起源の大気経路栄養塩負荷の影響が強く出ている可能性がある。一方、羅臼湖では栄養塩や藻類量、珪藻群集に大きな変化は検出されず、近年、生態系や栄養状態が変化した可能性は低いと考えられた。

[キーワード]

近過去、植物プランクトン、古陸水学、富栄養化、大気降下物、捕食量復元

1. はじめに

高度経済成長に象徴される戦後の経済発展によって、我が国の水域生態系は大きく変容してきた。例えば、周辺地域で宅地化が進む湖沼生態系では、集水域からの栄養塩供給の高まりによって赤潮やアオコが発生し、富栄養化が進行した¹⁻²⁾。これまで我が国の湖沼の環境政策は、集水域からの栄養塩負荷への対策を主眼としてきたが、近年、高山湖沼のような集水域に人間活動による攪乱を伴わない湖沼も大気からの栄養塩負荷等の脅威にさらされているという報告が増えている³⁻⁶⁾。こうした辺境地にある湖沼で、リアルタイムでモニタリングを行うことは現実的に不可能であり、深刻化する人為攪乱に対する生態系の影響評価は、事実上多くの湖沼でなされないまま放置されているのが現状である。レトロスペクティブ（事後評価的）モニタリングは、このような過去の情報が全くない湖沼でも、湖底堆積物に残された生物・化学情報から生物群集や集水域環境の復元を可能にし、生態系の影響評価を事後的に把握する上で極めて有効である。

本課題代表の占部を中心とした研究グループは、これまでに東北地方の八幡平国定公園内にある八幡湖沼を調査し（図(2)-1参照）、標高1300mの辺境地にある高山湖沼で栄養塩負荷が高まり、植物・動物プランクトンが増加し、富栄養化が進行しつつあること、さらに鉛フラックスやその起源を反映する鉛安定同位体の分析結果から、栄養塩濃度の増加が周辺地域及びアジア大陸由来の大気降下物の増加と深く関わっていることを突きとめた⁷⁾。しかし、こうした広範囲に及ぶと予想される大気由来の栄養塩負荷の影響がどの程度の広がりを持つかについては定かでない。概してモニタリング強度の低い辺境地の貧栄養湖沼において、大気由来栄養塩負荷がどのような広がり生態系シフトをもたらしたか、越境汚染の脅威を認識しつつある我が国の環境政策上、把握すべき重要な科学的知見の一つと考えられる。

従来の藻類や動物プランクトン群集・生産量の復元法は、種数が限られるが種レベルで復元できるものと、分類群レベルで復元可能なものがある。例えば、藻類は藍藻や緑藻類といった各分類群に特有の光合成補助色素カロテノイドを定量分析することで、各分類群の組成や生産量変動の復元が可能となる⁸⁻¹¹⁾。動物プランクトンのミジンコ類は、遺骸の一部が残存するため、それを顕微鏡下で計数することで、属レベルでの定量的復元が可能である¹²⁻¹³⁾。環境変化に対する湖沼生態系の応答を明らかにするためには、こういった手法により生物群集変動の把握が必要であるが、復元可能な生物種は限られており、十分な情報とは言い難い。近年、分析機器の飛躍的な向上に伴い、SCEs色素の有用性が注目されている¹⁴⁻¹⁵⁾。SCEs色素は動物プランクトンが植物プランクトンを捕食し、腸内で消化する過程で形成されるクロフィル誘導体物質で、結合しているステロールが食べた餌の種類に依存する¹⁶⁻¹⁷⁾。つまり、堆積物中のSCEs色素を分析することで、これまでカロテノイドでは分けることができなかった渦鞭毛藻や珪藻の動態だけでなく、遺骸が残らず復元の対象外とされてきたケンミジンコ類を含む動物プランクトン量全体を反映するプロキシとして利用できる可能性がある。さらに、従来より用いられてきた植物色素や動物プランクトン遺骸に基づく堆積量は、水柱で生産される藻類・動物プランクトン量を反映するが、上位栄養段階の捕食量、すなわちトップダウン効果にも強く影響を受ける。そのため、得られた藻類量や動物プランクトン変動が、ボトムアップ効果とトップダウン効果のどちらの効果に原因がある

のか、変動プロセスの解明が困難であった。SCEs色素は、動物プランクトンの捕食量そのものを反映し、しかも、ステロールの違いから動物プランクトンがどの藻類を主に餌として利用していたのかを知ることができるため、食物連鎖に関わるプランクトン変動プロセス解明の手掛かりが得られる可能性が高い。

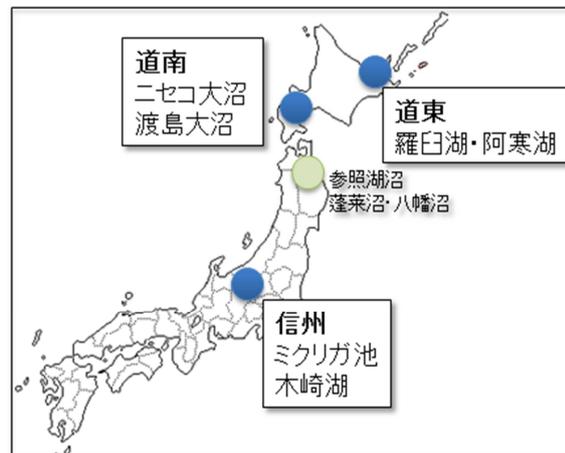
環境政策には、どの時代の生態系を取り戻すことがその湖沼にとって望ましいのかといった具体的な保全目標となる過去の生物相や栄養塩環境の情報が必要である。しかし、我が国のほとんどすべての湖では富栄養化以前のモニタリングが実施されていなかったために、目標設定が不十分であった。レトロスペクティブ型モニタリングは、過去100年程度の堆積物の解析ができれば、判断材料となる過去の生物相・栄養塩環境を容易に把握することができる。また、現在の生物相までに到る生態系変化の長期的なプロセスを明らかにすることができれば、具体的な保全対策に明確な根拠を与えることになるだろう。

2. 研究開発目的

サブテーマ2においては、動・植物プランクトン動態や栄養塩環境の高度復元と食物連鎖情報抽出に対する「SCEs色素」の有効性を検討し、低次生産動態解析の新たなプロキシの開発を行う。さらに湖沼生態系に対する大気由来栄養塩負荷の影響がどの程度の広がりを持つかを明らかにすることを課題目標の一つとし、湖沼特性の異なる北海道4湖沼（ニセコ大沼・羅臼湖・阿寒湖・渡島大沼）及び信州2湖沼（ミクリガ池・木崎湖）において、堆積物の年代を測定するとともに植物・動物プランクトン群集変化の復元と大気由来栄養塩負荷の影響評価を試みる。

3. 研究開発方法

本研究は北海道の4湖沼（羅臼湖、阿寒湖、渡島大沼、ニセコ大沼）と信州の2湖沼（ミクリガ池、木崎湖）を対象に、各沼の最深部にて湖底堆積物を採取した（図(2)-1）。木崎湖以外の湖沼については、2010年、2011年に重力式コアサンプラーにより約10～50cmの柱状試料を採取した。木崎湖は、ダイバーによる1.2mアクリルパイプ（内径11cm）を用いてコア採集を行った。阿寒湖に関しては、2010年に採取した30cmの堆積物では1950年以前の記録が得られなかったため、2012年に追加的にダイバーによる約80～90mのコア採集を行った。



図(2)-1 本課題対象湖沼

全ての堆積物は、現場で1cmずつの間隔でスライスした後（ミクリガ池については、表層15cmは0.5cm間隔）、遮光性の袋に入れ、クーラーボックスへ入れた状態で実験室に持ち帰り、分析するまで冷凍保存した。

なお、調査対象のニセコ大沼と羅臼湖は、それぞれニセコ積丹小樽海岸国定公園（1963年7月24日指定）と2005年に世界遺産に指定された地域内に位置するいずれも自然豊かな湖沼である。一

方、阿寒湖は、毎年100万人の観光客が訪れる北海道内でも屈指の観光地で、周辺には温泉街が広がっている¹⁸⁾。

(1) 年代測定

²¹⁰Pb法による堆積物の年代決定を行うため、²¹⁰Pb、²¹⁴Pb、¹³⁷Cの放射能強度を測定した。放射能強度は、γ線検出器(愛媛大学沿岸環境科学研究センター、GXM25P, SEIKO EG&G ORTEC, Tokyo, Japan ; 名古屋大学年代測定研究センター、GWL-120230-S, EG&G Ortec, Oak Ridge, TN, USA ; 総合地球環境研究所、GWM-90-15, 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²¹⁰Pb法のconstant initial concentration (CIC) モデル¹⁹⁾とConstant rate of supply (CRS)モデル²⁰⁻²²⁾に従って計算した。CICモデルは、堆積速度が一定の場合に用いられ、堆積速度が変化する場合にはCRSモデルが適用される。堆積年代は、大気由来の²¹⁰Pb放射能強度によって求まるが、測定された堆積物試料の²¹⁰Pb放射能強度は、大気由来の²¹⁰Pbの他に、堆積粒子中に元来ある²²⁶Ra起源の²¹⁰Pb (supported ²¹⁰Pb) も含まれる。したがって、大気由来の²¹⁰Pb放射能強度(以下、過剰²¹⁰Pb)を知るには、測定された²¹⁰Pb放射能強度から、supported ²¹⁰Pbの放射能強度を差し引く必要がある。堆積物中では、supported ²¹⁰Pbが、同じく²²⁶Raから生成する²¹⁴Pbと放射平衡になっているので(²¹⁴Pbは、²¹⁰Pbからは生成しない)、過剰²¹⁰Pbは測定された²¹⁰Pb放射能強度と²¹⁴Pb放射能強度の差によって求められる。CICあるいは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¹³⁷Cs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)²³⁾との整合性を確かめた。

(2) 植物プランクトン動態の復元

堆積物を用いて藻類群集の変遷を復元する方法は、堆積試料に残存する光合成色素のクロロフィルや、藻類の各分類群に特異的なカロテノイド補助色素を、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離定量することで、過去数百年にわたる藻類群集を分類群レベルで長期変化を再現できることが知られている⁸⁻¹¹⁾。そこで本研究においても、静岡県立大学環境科学研究所のフォトダイオードアレイ型検出器(Shimadzu SPD-M10AVP)付きのHPLCシステム(Shimadzu LC-10AD)を用いて、堆積試料中の色素類を定量することで、藻類群集の変遷を復元した。HPLCによって分離された各ピークは、保持時間や吸収スペクトル、既存の文献²⁴⁾に従って、色素の同定を行った¹¹⁻¹²⁾。本研究ではクロロフィル類のChlorophyll *a*、pheophytin *a*、pyropheophytin *a*、カロテノイド類のlutein(緑藻類)、fucoxanthin・diatoxanthin(珪藻類・鞭毛藻類)、alloxanthin(クリプト藻類)、echinenone・zeaxanthin(藍藻類)が検出された。

(3) SCEs色素による動物プランクトンの補食量の推定

本研究グループは、さらに従来の復元法では十分ではなかった生物群集情報を得るために、クロロフィルの誘導体ステリルクロリンエステル類(SCEs: Steryl Chlorin Esters)の分析を行った。SCEsは植物プランクトンが、動物プランクトンに捕食された後、動物プランクトンの腸内で消化する過程で形成され、糞として排出される¹⁴⁻¹⁵⁾。湖底に沈降したSCEsは、堆積物中に過去数万年という長期にわたって残存していることから¹¹⁾、動物プランクトンがどんな餌藻類を利用していたのか、過去の被食-捕食関係を知る手掛かりとなる。例えば、SCEsのうち、渦鞭毛藻類特有の

dinosterol、dinostanol などはC30ステロールが多いことから、C30ステロールが結合したSCEsは、主に捕食された渦鞭毛藻量を反映する指標として利用されている²⁵⁻²⁷)。本研究では、SCEsの分離定量は、産業技術総合研究所の液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (UPLC/Xevo TQ) を用いて行った。

(4) プランクトン食魚類の捕食圧の推定

動物プランクトンに関しては、主要なミジンコ類の遺骸(殻や尾爪)を光学顕微鏡100倍下で同定・計数した。また大型サイズのミジンコ*Daphnia*は魚類からの捕食圧が高まると*Daphnia*個体群のサイズが減少することが知られている²⁸)。そこで本研究では、阿寒湖でのワカサギ放流に伴う*Daphnia*への捕食圧の高まりの有無を検討するため、個体サイズを反映する尾爪サイズを調べた。

(5) 動物プランクトン遺骸による動物プランクトン量の復元

微小動物に関しては、主要な動物プランクトンのミジンコ類や原生動物のツボカムリは、堆積物中に殻が遺骸として残ることから(図(2)-2)、これら堆積物に残存する殻や尾爪を光学顕微鏡下で観察、計測することで過去の微小動物の動物プランクトン量変動を定量的に再現することが可能となる。本研究では、一般に用いられている手法²⁹)に従い各試料中の遺骸の同定・計数を行った。検鏡用の試料は、湿重量およそ0.8gの湿泥をバイアル瓶へ入れ、蒸留水50mlを加えて作成した。検鏡の際は、バイアル瓶を十分に攪拌させ、試料が均質になった状態で、素早くマイクロピペットで一定量を動物プランクトン計数用のプレパラートへ入れて、生物顕微鏡下(100倍)で観察し、計数した。また阿寒湖では微小動物を計数する際に、大型緑藻類の*Staurastrum*属の遺骸が確認されたため、合わせて顕微鏡下で計数した。

また本研究で用いた年間の生産量を反映するフラックスは、各試料の動物プランクトンの密度や色素濃度と、年代測定によって得られた質量堆積速度から以下の式によって算出した³⁰)。

動物プランクトンフラックス (numbers m⁻² yr⁻¹)

= 質量堆積速度 (dry g m⁻² yr⁻¹)×乾燥重量あたりの個体数(numbers dry g⁻¹)

色素フラックス(mg m⁻² yr⁻¹)

= 質量堆積速度 (dry g m⁻² yr⁻¹)×色素濃度 (mg dry g⁻¹)



Daphnia sp.

Bosmina longirostris

Tintinopsis sp.

図(2)-2 阿寒湖の堆積試料から確認された微小動物の遺骸

(6) 珪藻化石を用いた湖の栄養塩状態変遷の復元

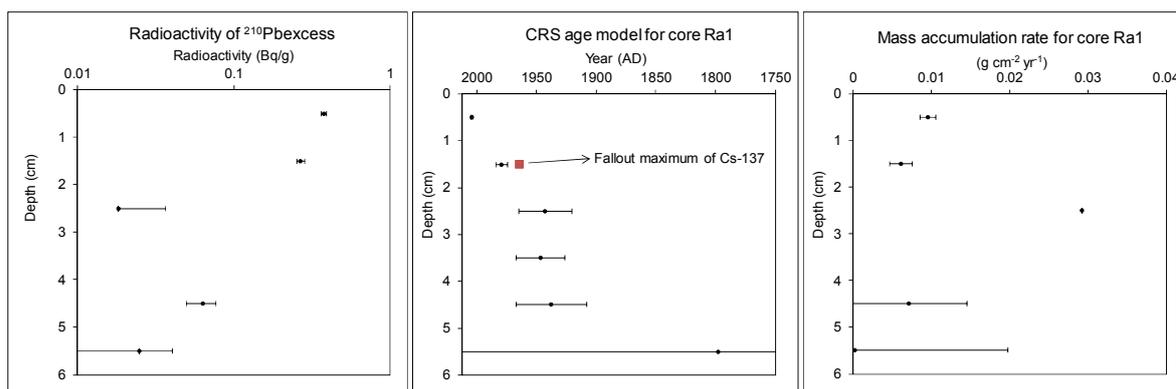
阿寒湖・羅臼湖について栄養塩状態の変遷を明らかにするため、珪藻群集組成を分析した。珪藻群集は、湖の栄養状態によって大きく左右されるため、古陸水学分野では過去の栄養状態の復元に古くから用いられている³¹⁾。分析は、重量測定された乾燥試料を過酸化水素で処理した後、懸濁液をプレパラートに定量して封入した。顕微鏡下(1000倍)で珪藻種を同定しながら300個になるまで計数した³²⁾。

4. 結果及び考察

(1) 年代測定結果

1) 羅臼湖

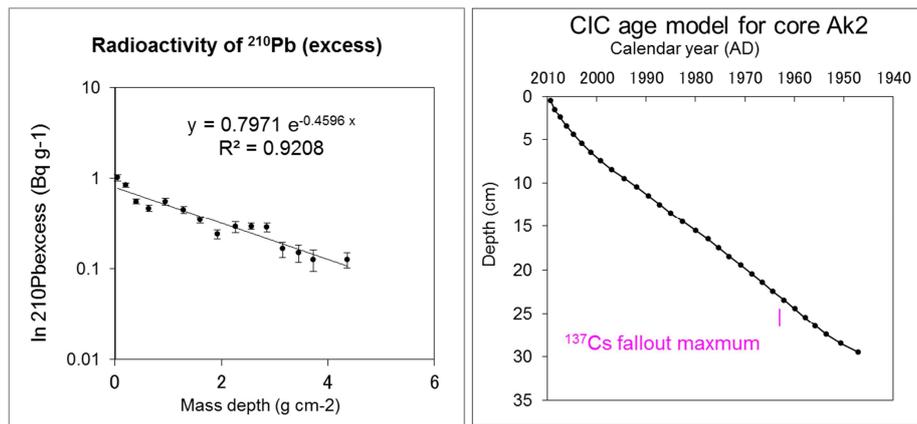
羅臼湖では、過剰²¹⁰Pbが5cm以下で検出限界以下となり、¹³⁷Csでは深度1.5cmに放射能強度のピークが認められた(図(2)-3)。²¹⁰Pb法に基づく年代推定の適用範囲は²¹⁰Pbの半減期(22.3年)の約6倍であり、検出限界を示す深度5.5cmの年代は約150年前であることがわかる。深度5.5cmまでの過剰²¹⁰Pbを用いてCRSモデルにより各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する¹³⁷Csのピークと調和的であった。羅臼湖コアの重量堆積速度は、0.01-0.03 g cm⁻² yr⁻¹と本課題で対象としている他の湖沼に比べ非常に遅い。



図(2)-3 羅臼湖コアRa1の過剰²¹⁰Pb放射能強度(左)、年代モデル(中央)、及び重量堆積速度(右)

2) 阿寒湖

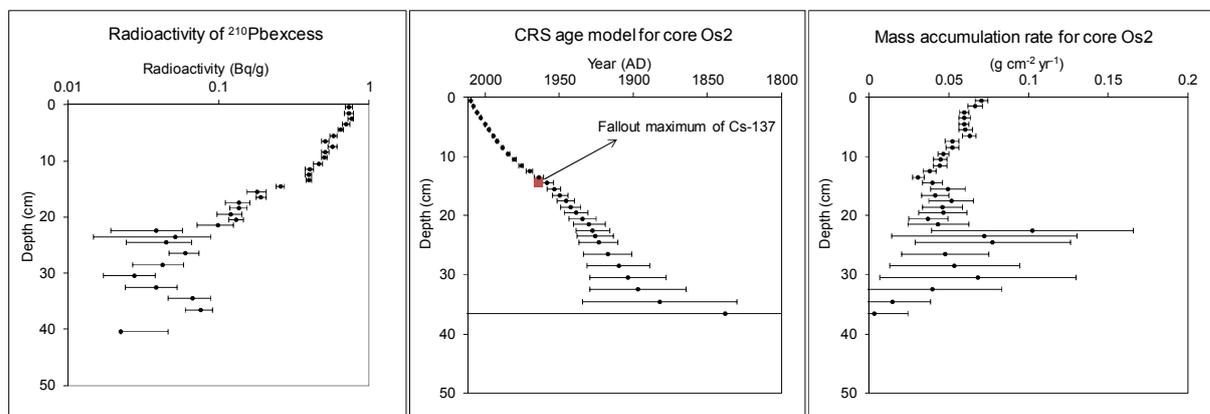
阿寒湖では、表層からコアの最下部深度30 cm(mass depth: 4.4 g cm⁻²)まで過剰²¹⁰Pbが指数関数的な減衰率がほぼ一定で(図(2)-4)、平均堆積速度が0.47cm/year(上部7cmは0.74cm/year)と、ほぼ安定していることがわかった。また、深度24.5-26.5cmで¹³⁷Cs放射能強度のピークが認められた。過剰²¹⁰Pbに基づいてCICモデルを適用し堆積物の各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する¹³⁷Csのピークと調和的であった。



図(2)-4 阿寒湖コアAk2の過剰 ^{210}Pb 放射能強度(左)と年代モデル(右)。

3) 渡島大沼

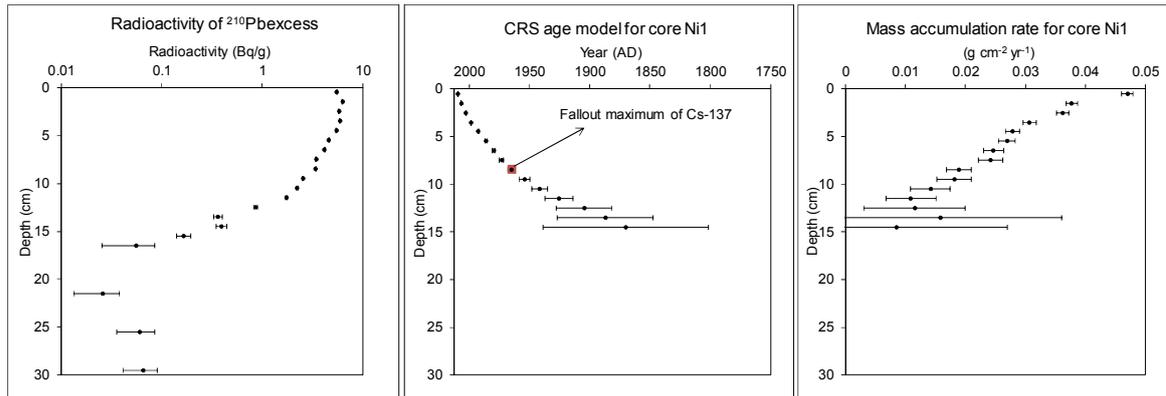
渡島大沼では、過剰 ^{210}Pb 放射能強度は深度40.5cmで検出限界を示し(図(2)-5)、この深度で約150年前であると推定された。深度12.5cmで過剰 ^{210}Pb が減衰曲線の傾きが大きくなり、ここで堆積速度が増加していることを示す。深度40.5cmまでの過剰 ^{210}Pb を用いて、CRSモデルにより各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する ^{137}Cs のピークと調和的であった。重量堆積速度は、深度0-6.5cmと22.5-30.5cmで高い傾向にある。



図(2)-5 渡島大沼コアOs2の過剰 ^{210}Pb 放射能強度(左)、年代モデル(中央)、及び重量堆積速度。

4) ニセコ大沼

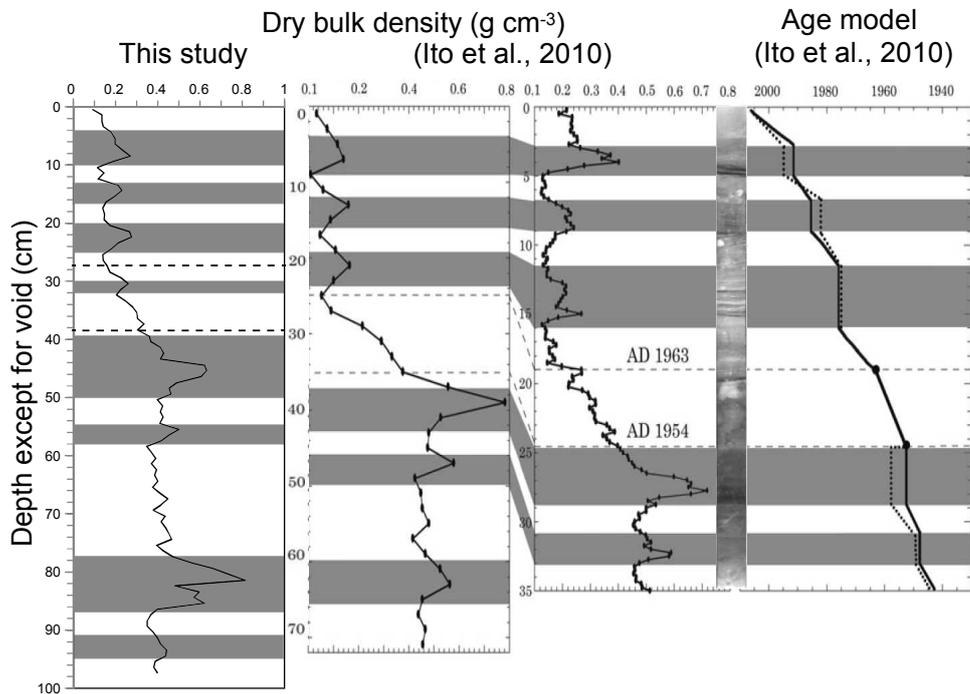
ニセコ大沼では、過剰 ^{210}Pb 放射能強度は深度16.5cmで検出限界を示し(図(2)-6)、この深度が約150年前と推定された。深度40.5cmまでの過剰 ^{210}Pb を用いてCRSモデルにより各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する ^{137}Cs のピークと調和的であった。重量堆積速度は、深度10.5cm以浅で急激に増加し、表層で最も高い値を示す。



図(2)-6 ニセコ大沼コアNi1の過剰 ^{210}Pb 放射能強度(左)、年代モデル(中央)、及び重量堆積速度。

5) 木崎湖

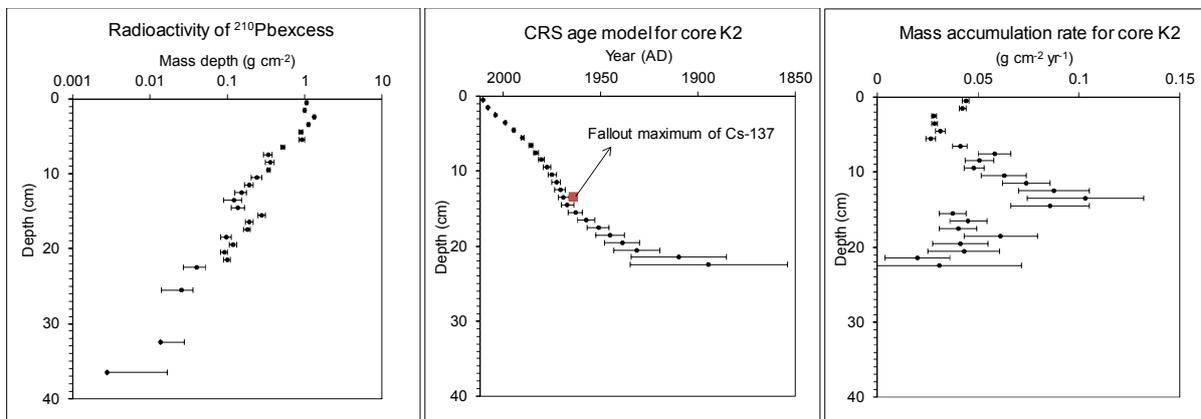
木崎湖コア(K2)には、高密度で特徴付けられる層が8層認められた(図(2)-7)。これらの高密度層は、Ito et al. (2010)³³⁾によってタービダイト層(洪水時に堆積した層)であることが報告されており、K2コアの上部5層の高密度層は既報のタービダイト層に対比できる。本コアの年代測定は、タービダイト層以外の通常堆積する層準のみを対象に放射能強度測定を行い、年代決定はタービダイト層を除いた深度で行った。



図(2)-7 木崎湖コアにおける乾燥かさ密度(左3列)、既存コアの軟X線画像、及び既存コアの年代モデル(右)。灰色は、タービダイト層に相当する。

木崎湖コア(K2)では、過剰 ^{210}Pb 放射能強度は深度25.5cm以深で検出限界を示し、この深度が約150年前と推定された(図(2)-8)。深度22.5cmまでの過剰 ^{210}Pb を用いてCRSモデルにより各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する ^{137}Cs のピークと調和的であった。重量堆

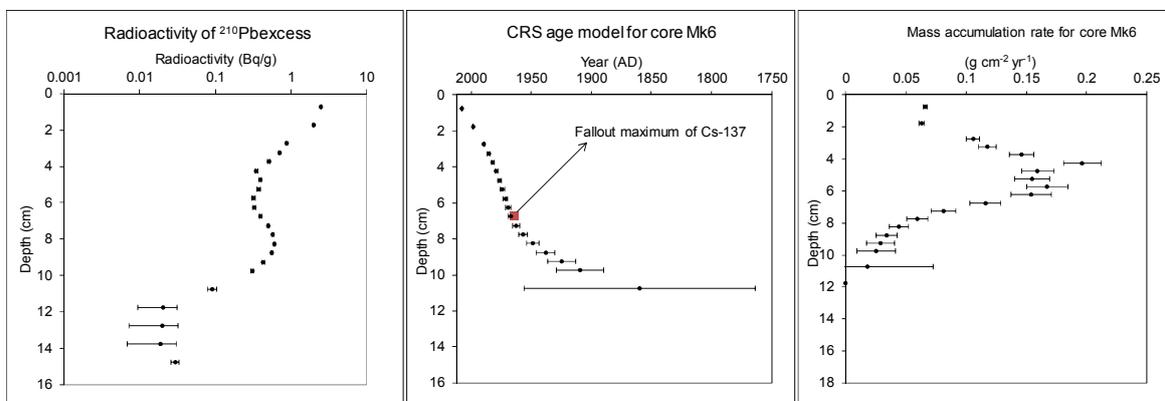
積速度は、深度7.5-14.5cmで高い傾向にある。



図(2)-8 木崎湖コア (K2) の放射能強度(左)と年代モデル(右)。深度は、タービダイト層を除いた深度。

6) ミクリガ池

ミクリガ池では、過剰 ^{210}Pb 放射能強度が深度11.75cmで検出限界を示し、この深度が約150年前と推定された(図(2)-9)。深度11.75cmまでの過剰 ^{210}Pb を用いてCRSモデルにより各深度の年代を推定すると、年代モデルは1964年に相当する ^{137}Cs のピークと調和的であった。重量堆積速度は、深度8.25から急激に増加し、6.25-3.75cmで高い値を示し、3.75cm以浅で減少する。



図(2)-9 ミクリガ池コアMk6の過剰 ^{210}Pb 放射能強度(左)、年代モデル(中央)、及び重量堆積速度。

(2) プランクトン由来の色素・遺骸から復元された動植物プランクトンの変動

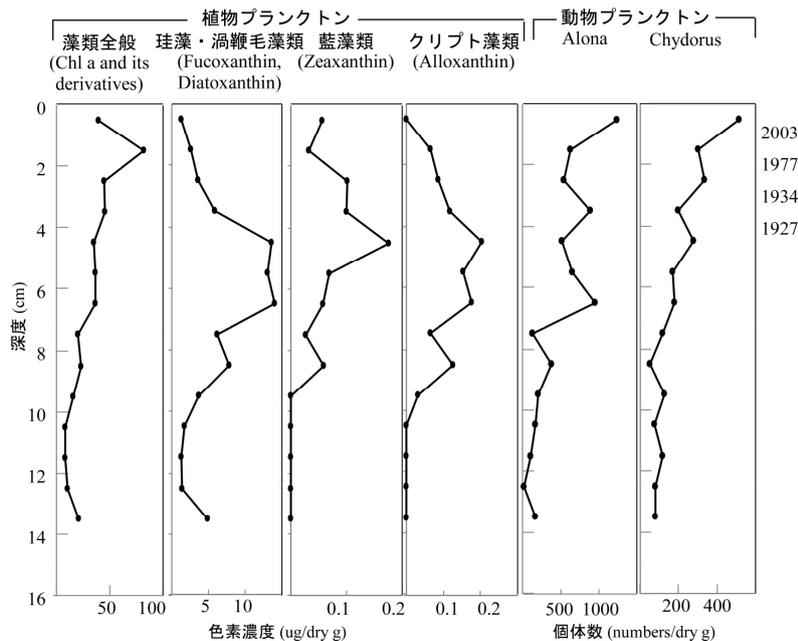
1) 山岳湖沼

a. 羅臼湖

羅臼湖では藻類全般を指標するChlorophyll a濃度は、深度7cm付近でやや増加、それ以浅ではほとんど変化は見られなかった(図(2)-10)。またカロテノイド色素は、珪藻類・鞭毛藻類を指標するfucoxanthin・diatoxanthin、クリプト藻類指標のalloxanthin、藍藻類指標のzeaxanthinが確認された(図2-13)。いずれのカロテノイド色素も深度7cm付近より深度4cmにかけて増加し、近年、減少傾向を示した。一方、動物プランクトンのミジンコは、*Daphnia*がほとんど確認されず、*Alona*、

*Chydorus*が多数確認された（図(2)-10）。*Alona*は深度7cm付近よりから約3-4倍増加し、それ以降も高い値が維持されていた。

羅臼湖では、堆積速度が予想以上に遅いことが判明し、 ^{210}Pb に基づく年代モデルでは生産量変化を正しく評価できるほどの年代精度は現段階では得られていない。しかしながら、深度4cm付近の人間活動が活発化する1900年頃より、植物プランクトン、動物プランクトン共に大きな変化は認められないことから、生態系が変化している兆候はないことを示唆しているのかもしれない。



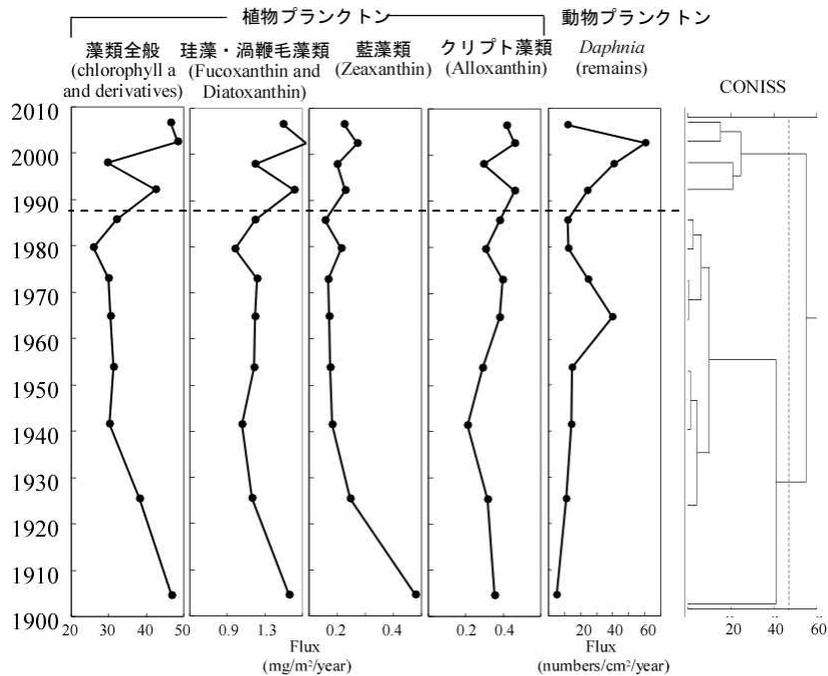
図(2)-10 羅臼湖における植物プランクトン・動物プランクトン(*Alona*, *Chydorus*)の変動。

b. ニセコ大沼

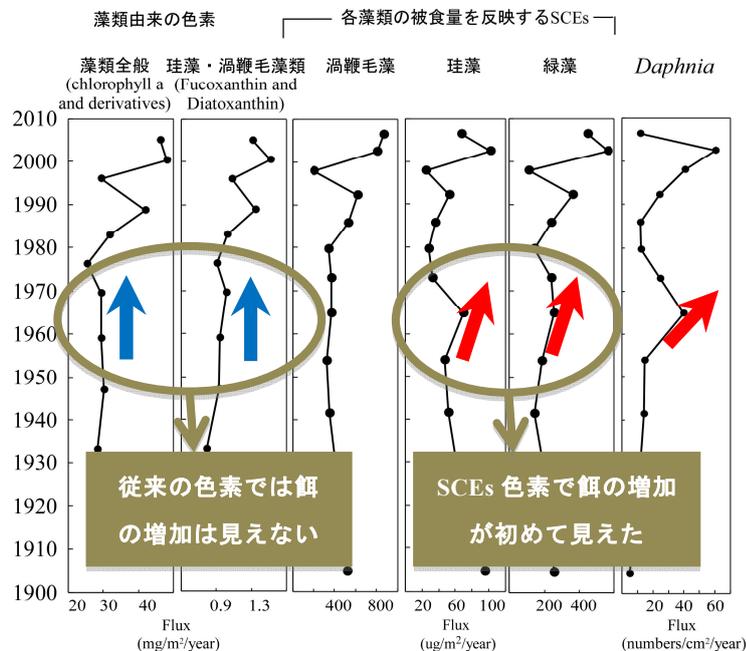
ニセコ大沼では、藻類全般を指標するChlorophyll *a*濃度は、1940年以前に多く、その後1980年頃まで、ほとんど変化がなく、1980年代後半以降、急速に増加した（図(2)-11）。中でも1980年代後半以降は珪藻、渦鞭毛藻類を指標するカロテノイド色素fucoxanthin・diatoxanthin濃度の増加が顕著であった。一方、各藻類の被食量を反映するSCEs色素は、珪藻・緑藻・渦鞭毛藻由来のものが確認された（図(2)-12）。

ニセコ大沼では、*Daphnia*が1960年頃、一時的に増加しているが、この増加の一つの要因として、餌藻類の増加が考えられる。しかし、カロテノイドやクロロフィル色素からは、この時期に藻類が増加した兆候は見られない。一方、藻類の被食量を反映するSCEs色素のうち、珪藻・緑藻由来のSCEs色素が1960年代に増加していることが判明した。これらの結果は、*Daphnia*の増加が餌の増加、すなわちボトムアップ効果に起因することを強く示唆している。また、カロテノイドやクロロフィル色素の堆積量が1960年代に増加しなかったのは、実際には餌藻類も増加したが増えた分だけ動物プランクトンに捕食され、糞粒沈降粒子としてSCEs色素へ移行したためかもしれない。一方、1980年代後半以降の動物プランクトンの増加時期は、鞭毛藻・珪藻・緑藻由来のカロテノイドおよびSCEs色素が増加し、動物プランクトン・植物プランクトン共に、上位栄養段階のトップダウン効果の減少ではなく、ボトムアップ効果によって増加したことを示している。このよう

に、SCEs色素の併用により、従来植物色素やカロテノイドだけでは把握できなかった、動植物プランクトン変動要因としてのトップダウン/ボトムアップ効果の寄与の評価が初めて可能となった。



図(2)-11 ニセコ大沼における植物プランクトン・動物プランクトン(*Daphnia*)の変動。右はCONISSによるクラスター解析による樹形図。

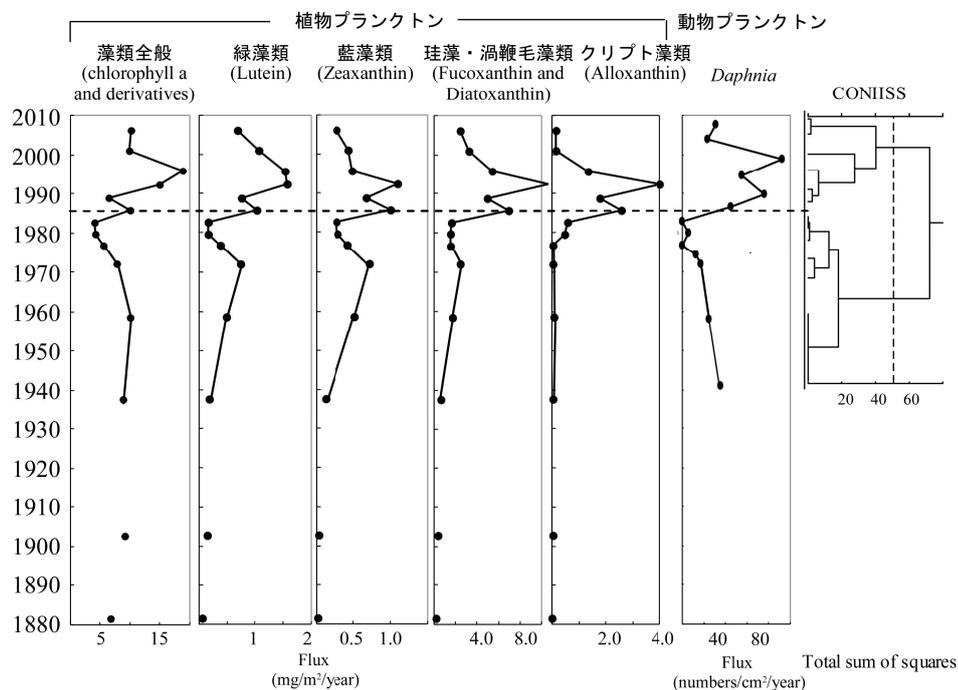


図(2)-12 ニセコ大沼におけるChlorophyll *a*, Fucoxanthin, Diatoxanthin, SCEs色素・動物プランクトン(*Daphnia*)の変動。

c. ミクリガ池

ミクリガ池のカロテノイド色素は、珪藻類・鞭毛藻類を指標する fucoxanthin, diatoxanthin、緑藻類を指標する lutein、クリプト藻類を指標する alloxanthin、藍藻類指標の zeaxanthin が確認された(図(2)-13)。

1980年代後半より、植物プランクトン全体を指標する Chlorophyll *a* が急速に増加し、各分類群を反映するカロテノイド色素もこの時期に全般に増加していた(図(2)-12)。さらに、動物プランクトンの *Daphnia* も急速にこの時期に増加していた。また各種色素および *Daphnia* のフラックスに基づいて CONISS を使ってクラスター解析した結果、1980年代後半に変化が認められた。このように、ミクリガ池では、1980年代後半時期に動植物プランクトンに変化が認められ、共に急速に増加する富栄養化の進行が示唆された。



図(2)-13 ミクリガ池における植物プランクトン・動物プランクトン(*Daphnia*)の変動。右は CONISSによるクラスター解析による樹形図。

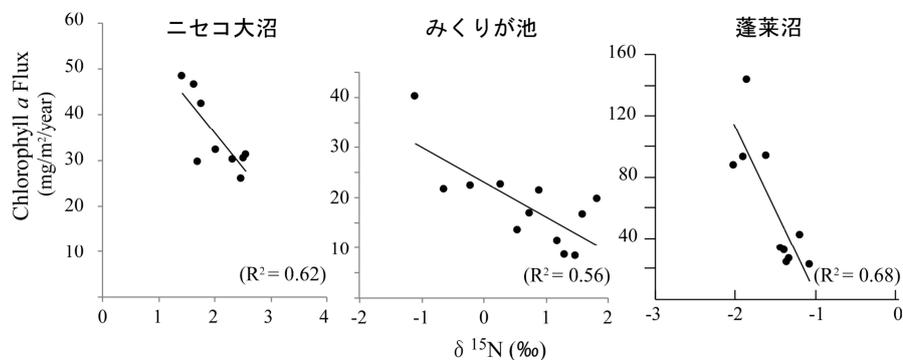
2) 山岳湖沼で捉えられた生態系変化：大気降下物の影響

ミクリガ池やニセコ大沼の山岳湖沼では、共通する植物・動物プランクトンの1980年代後半以降の増加が見られ、近年の富栄養化の進行が示唆された。いずれの湖沼も、栄養塩を供給する人為負荷は集水域にはなく、大気からの供給によって湖の栄養状態が高まりつつあると考えられる。同様な傾向は、秋田岩手県の県境に位置する八幡平国立公園の蓬莱沼でも報告されており⁷⁾、富栄養化現象は我が国の山岳湖沼で共通した広域的な現象であると捉えられる。

一方、近年、日本周辺の海域ではアジア大陸での化石燃料の燃焼によって、大気からの栄養塩(窒素)負荷の高まりが報告されている³⁴⁾。我が国で公表されている気象庁の観測地点、綾里(岩手県大船渡市)での硝酸イオン降下量の1976年以降の記録では、1988年以降の降下量がそれ以前と比べて1.7倍近く増加している。本研究では、こうした近年の大気降下物による栄養塩負荷

の増加が植物プランクトンの増加を誘因する主要因となっているか、その可能性を検証するため、以下の事を検討した。

湖底堆積物中の窒素同位体比は、大気からの軽い同位体比を持つ窒素負荷により、過去100年間で減少しているという報告が北米の広範囲の山岳湖沼で報告されており³⁵⁾、窒素大気降水量の有用な指標として利用できると考えられる。そこで、1950年以降のChlorophyll *a*量とサブテーマ3で分析された窒素同位体比の関係を検討した。その結果、いずれの湖沼も、Chlorophyll *a*量と窒素同位体比の間に負の相関関係があることが見いだされた(図(2)-14)。これは、1980年代後半以降の藻類増加が、大気からの栄養塩負荷に起因することを示している。以上の結果から、広範囲の手つかずの自然豊かな山岳湖沼で大気からの栄養負荷増大によって生態系が大きく変わりつつあることが示唆された。



図(2)-14 山岳湖沼、ニセコ大沼・ミクリガ池・蓬萊沼(参考湖沼)における1950年以降の植プラ量(Chlorophyll *a* and its derivatives)と $\delta^{15}\text{N}$ との関係。蓬萊沼は(Tsugeki et al. 2012⁷⁾)のデータに基づく。

3) 平地湖沼でのプランクトン変動

a. 阿寒湖

藻類全体を指標するクロロフィル *a* のフラックスは 1950 年代に急速に増加し、阿寒湖は 1950 年代に富栄養化が進行したことが示唆された(図(2)-15)。その後、1960 年代は大きな変化はなく 1970 年代に再び増加し、それ以降 2000 年頃まで大きな変化は見られなかったが 1950 年初頭と比べ高い値が維持されていた。しかし、2000 年以降、再び増加している。

カロテノイド色素は 6 種類(fucoxanthin・diatoxanthin:珪藻類・渦鞭毛藻、lutein: 緑藻、alloxanthin: クリプト藻、zeaxanthin・echinenone: 藍藻)が確認された(図(2)-15)。カロテノイド色素の結果からは富栄養化したと考えられる 1950 年代後半に特に藍藻類や緑藻類の増加が顕著であったことが明らかとなった。1970 年代に入るとこれまであまり増加していなかった珪藻類・鞭毛藻類が徐々に増加した。また緑藻やクリプト藻は、1990 年代後半以降、増加傾向をたどり、藍藻は 1990 年代後半まで増減を繰り返している。

さらに阿寒湖では、大型緑藻類の *Staurastrum* 属の遺骸が確認され、1950 年代と 1970 年代の 2 回、増加する時期が認められた。動物プランクトンに関しては、大型のミジンコ類 *Daphnia* と小型のミジンコ類ゾウミジンコ *Bosmina* が確認された(図(2)-15)。主要な植食者である *Daphnia* は過去 70 年の間に 4 回、1950 年代、1970 年前後と 1980 年代後半の増加、さらに現在にかけて、

これまでになく高い値に増加していた。小型ミジンコの *Bosmina* は *Daphnia* より遅れて 1960 年頃より増加、その後あまり変化しないが、1990 年以降、減少した。しかしながら、近年 *Daphnia*、*Bosmina* 共に増加していた。

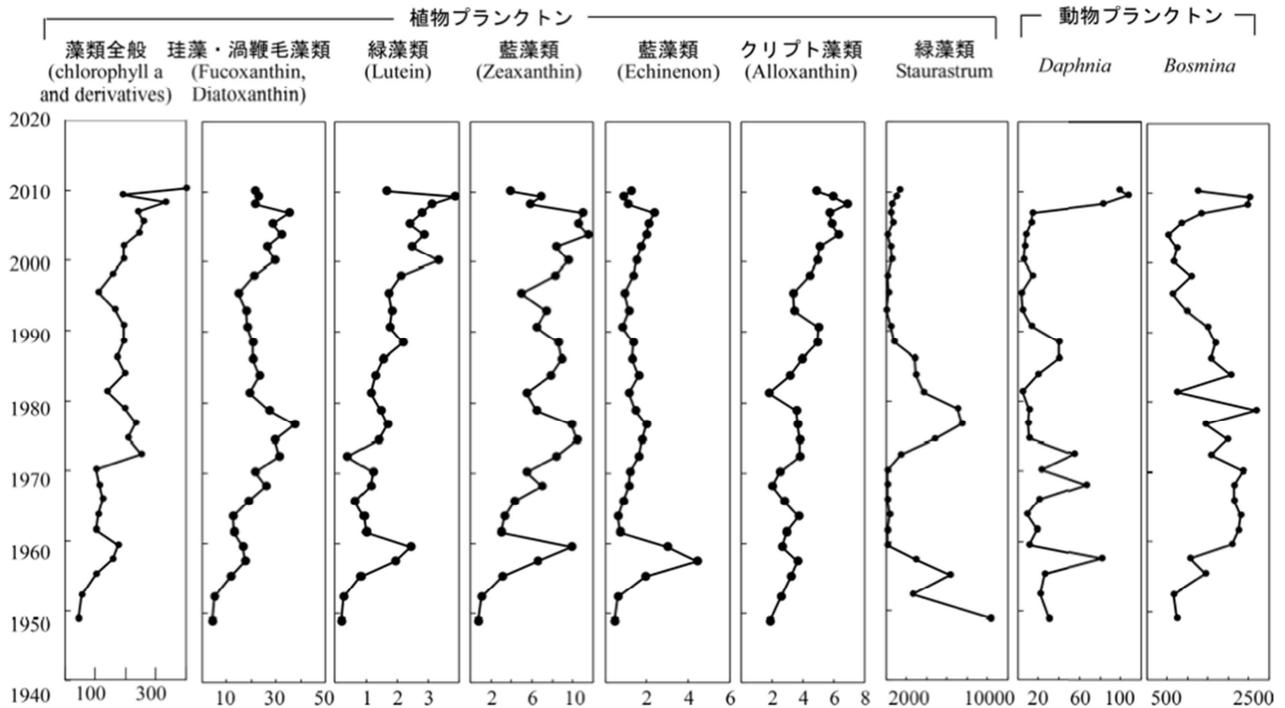
次に阿寒湖での富栄養化以前の生物群集を明らかにするため、2012 年度に新たに採取した約 80cm の堆積物を分析した。図 (2) -16 の動物プランクトンのデータは 2010 年・2012 年度に採取した堆積物コアの各々の分析結果を深度別に表記したもので、深度 30cm 以浅は 2010 年度コアの分析結果を、深度 30cm 以深は 2012 年度の結果を表している。クロロフィルの結果から、2012 年度採取コアについても、1950 年代頃と推定される深さ 30cm 付近より藻類全体を指標するクロロフィル *a* 量が急速に増加していた (図(2)-16)。動物プランクトンに関しては 1950 年以前の富栄養化前は、現在より大型サイズの *Daphnia* が非常に多く、逆に小型サイズの *Bosmina* は少なかったことが明らかとなった。これらの結果はこれまで不明だった富栄養化以前の生物群集に関する新知見であり、阿寒湖が富栄養化以前にどのような生態系を維持していたのか、その一旦を明らかにすることができた。このように保全という観点から、どのような生態系を取り戻すことが望ましいのか、保全目標を具体化する上で必須の課題である富栄養化以前の情報収集は、レトロスペクティブ (事後評価的) モニタリング手法の解析によって可能である。

阿寒湖では、プランクトン食魚類のワカサギは、1930 年代に放流されたことが知られており、漁獲量は 1950 年代まで増加傾向を示すが、富栄養化した 1950 年代半ば頃より、1960 年代初頭にかけて大幅に低下したことが報告されている。だが、なぜ 1950 年代にワカサギが低下していたのか、その原因は良く判っていない。本研究から、1950 年代はワカサギの餌である *Daphnia* が急速に減少する時期に一致していることから、ワカサギの低下は餌である *Daphnia* の低下に誘引された可能性が高い。

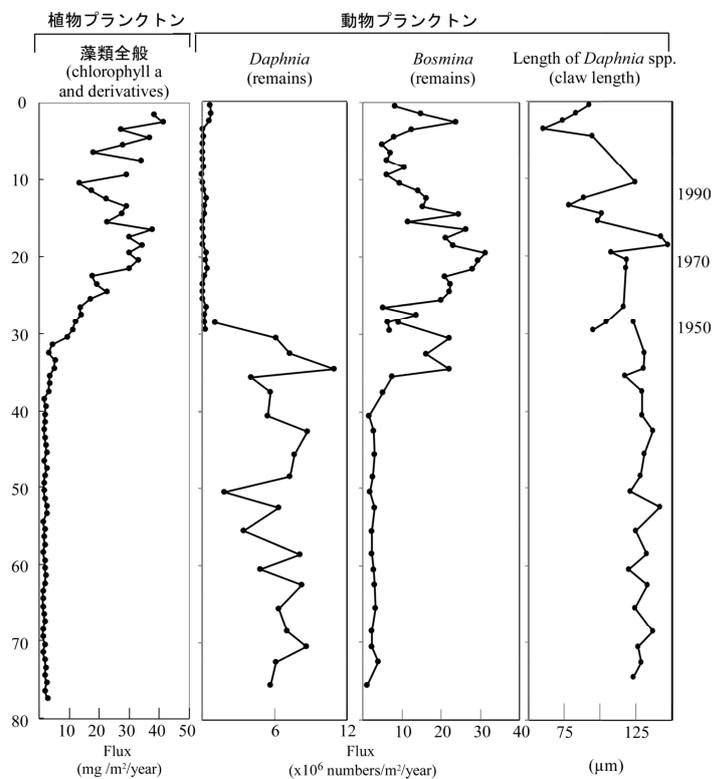
Daphnia は捕食圧の高まりによって、個体サイズが変動することが知られている²⁸⁾。そこで本研究では堆積物に残された *Daphnia* の尾爪サイズから、個体サイズの長期的な変化を明らかにすることを試みた。*Daphnia* の個体サイズは、尾爪サイズから推測する。阿寒湖では 1970 年前後で *Daphnia ezoensis* から *Daphnia galeata* へと種が置き換わったことがサブテーマ 1 による卵鞘の DNA 遺伝子解析により明らかにされている。そのため本研究では個体サイズを推測するために必要なこれら 2 種の尾爪と個体サイズの関係を各々明らかにした (図(2)-17)。尾爪サイズは、深度 30cm 以深の富栄養化以前が相対的に大きく 1970 年頃と思われる深度 20cm 以浅で減少傾向を示し、表層の 2000 年以降にかけて再び増加傾向を示した (図(2)-16)。これは富栄養化以前に優占する *Daphnia ezoensis* はサイズ変化が小さく、1970 年代以降優占する *Daphnia galeata* は捕食圧の影響で時代によって個体サイズを大きく変化させたことを示唆している。

以上のように、阿寒湖では 1950 年代に富栄養化が急速に進行し、この時期に植物プランクトンから動物プランクトンまで群集構造が大きく変化したことを明らかにした。阿寒湖では特別天然記念物に指定されている球状体のマリモ (緑藻の一種) が有名である。マリモは高度経済成長期の 1950-70 年代にかけて激減したことから、この時期に水質が悪化した可能性が指摘されており³⁶⁾、本研究結果と調和的である。一方、興味深いことに、2000 年以降 *Daphnia*、*Bosmina* の動物プランクトンが増加していることも明らかとなった。阿寒湖では 1990 年代以降、動物プランクトン食魚類のワカサギ漁獲量が低下していることから、魚類の捕食圧低下によりミジンコ類が増加したのかもしれない。このようにレトロスペクティブ (事後評価的) モニタリング手法を用いる

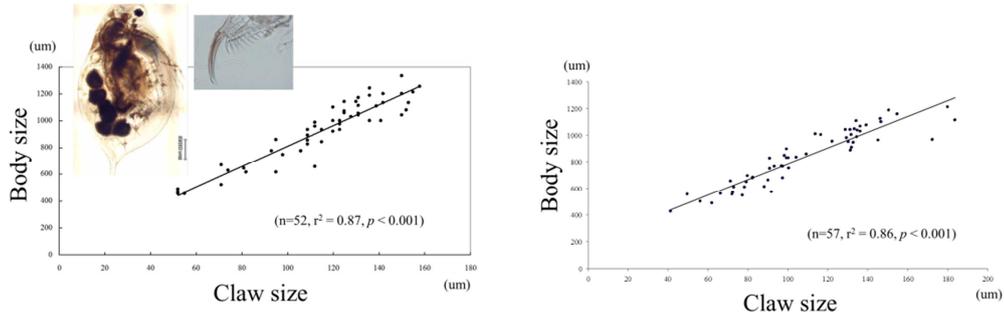
ことで、定期観測では得られない時代からの生態系変化を高い時間解像度で復元できることを示した。



図(2)-15 阿寒湖（2010年採取コア）における1950年代以降の植物・動物プランクトンの変動。



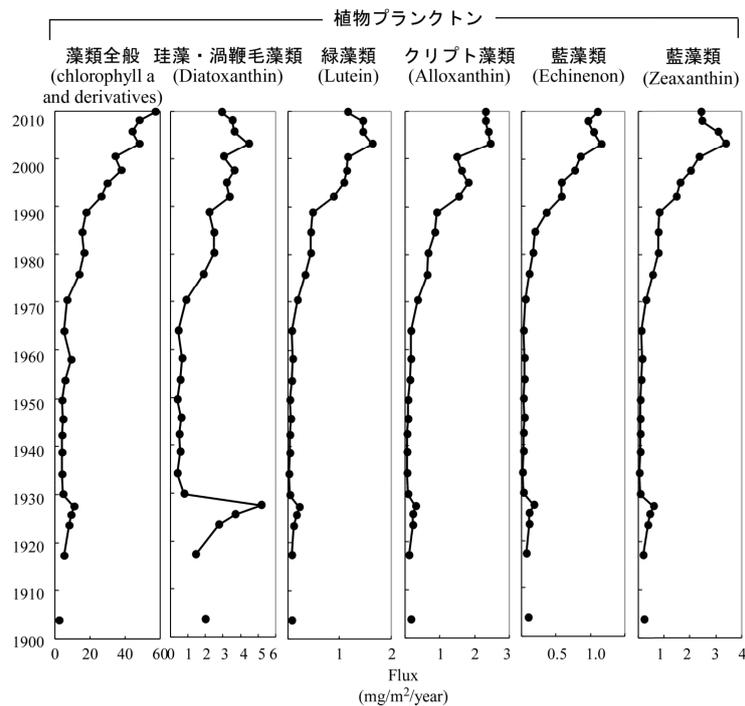
図(2)-16 阿寒湖（2012年・2010年採取コア）での1950年以前からの植物・動物プランクトンの変動。



図(2)-17 *Daphnia galeata* (左)の*Daphnia ezoensis* (右)の尾爪と個体サイズの関係。

b. 渡島大沼

カロテノイド色素は珪藻・渦鞭毛藻指標のdiatoxanthin、緑藻指標のlutein、クリプト藻指標のalloxanthin、藍藻指標のzeaxanthin, echinenonが確認された(図(2)-18)。藻類全体を指標するクロロフィル a および各分類群を反映するカロテノイドフラックスは共に1920年代にやや増加、中でも珪藻・渦鞭毛藻類を指標するdiatoxanthinは大幅に増加していた。それ以降、これらフラックスは大変低い値で推移していたが、1960年代頃より、全般に徐々に増加していることが判明した。特に1990年代以降はクロロフィル a およびカロテノイド共に増加が顕著で、現在に至るまでその増加傾向が続き、富栄養化が現在も進行中であることが示唆された。

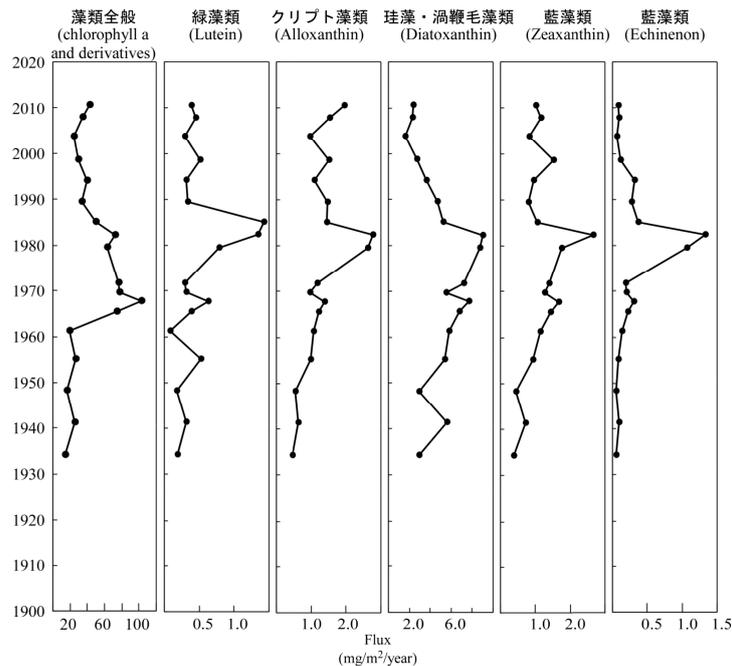


図(2)-18 渡島大沼における植物プランクトンの変動。

c. 木崎湖

カロテノイド色素は珪藻・渦鞭毛藻由来のdiatoxanthin、緑藻由来のlutein、クリプト藻由来のalloxanthin、藍藻由来のzeaxanthin, echinenonが確認された(図(2)-19)。藻類全体を指標するクロロフィル a フラックスは1960年代に増加、中でも珪藻・渦鞭毛藻(diatoxanthin)や藍藻類(zeaxanthin)

の増加が顕著であった。これらは1960年代以降、1980年代半ばまで高い値が維持されていた。しかし1990年代以降、クロロフィルや珪藻・渦鞭毛藻(diatoxanthin)、緑藻由来のluteinは1960年以前と同程度にまで低下した。一方、藍藻由来のzeaxanthinやクリプト藻類alloxanthinは1990年代以降も依然として1960年代以降と比べ高い値で推移している。これらの結果は木崎湖では富栄養化が1960年代初頭より進行し、1980年代以降、富栄養化は収束する傾向にあることがわかった。しかし、藍藻・クリプト藻は1960年と比べ高頻度で出現し、現在も富栄養化以前の状態に回復しているとは言い難いことを示している。

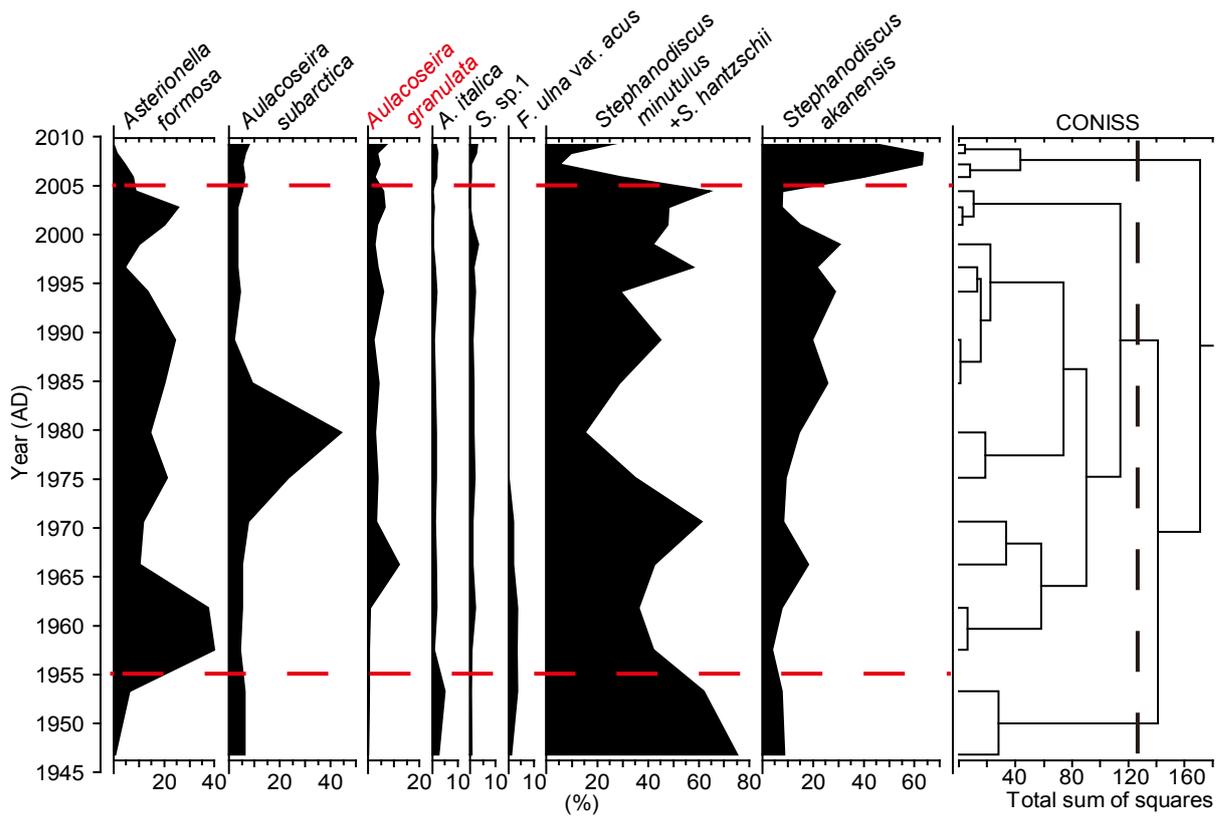


図(2)-19 木崎湖における植物プランクトンの変動。

(3) 珪藻化石を用いた湖の栄養塩状態の変遷

1) 阿寒湖

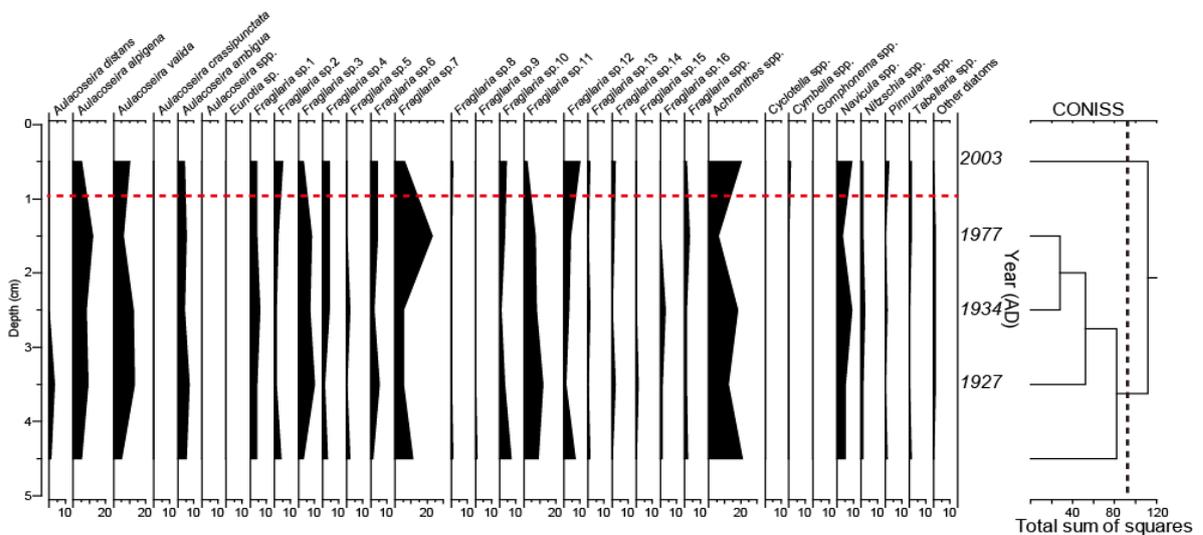
阿寒湖における珪藻群集は、主として9種が認められた(図(2)-18)。珪藻種の出現頻度に基づいてCONISSを使ってクラスター解析した結果、1955年と2005年に変化が認められた。富栄養性種である*Alucoseira granulata*に注目すると、1955年以降に阿寒湖は富栄養化が進行したことがわかった。2005年以降もなお、この種が認められるということは、湖の栄養状態は回復の兆しがまだ見えないということを意味する。一方、2005年における群集組成変化は、新たな生態系構造へと変化した可能性が示唆された。ミクリガ池・ニセコ小沼で認められた山岳湖沼での1980年代後半以降の生物量増加は、阿寒湖では認められなかった。



図(2)-20 阿寒湖における珪藻群集組成結果。左の折れ線グラフは出現率(%)、右はCONISSによるクラスター解析による樹形図。

2) 羅臼湖

羅臼湖について、過去約100年間の珪藻群集組成を図(2)-19に示した。クラスター解析結果によると、1977年から2003年の間に珪藻群集に変化が見られるが、過去100年間でみるとそれほど顕著な変化ではない。これは、湖の栄養状態が過去100年間程度維持してきたことを意味している。



図(2)-21 羅臼湖における珪藻群集組成結果。左の折れ線グラフは出現率(%)、右はCONISSによるクラスター解析による樹形図。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 山岳湖沼生態系に対するアジア大陸起源の大気由来栄養塩負荷の影響とその広がり

アジア大陸からのエアロゾル飛来に起因する大気からの窒素やリンの栄養塩負荷は、近年日本や周辺海域において、広域で起こっているにもかかわらず^{7, 34, 37-38}、その湖沼生態系に与える影響について長期的に明らかにされた研究例はほとんどない。本サブテーマでは、山岳湖沼に対する大気由来の栄養塩負荷の影響が、我が国においてどの程度の広がりを持つかを明らかにすることを到達目標の一つとして解析を行ってきた。本研究では、北陸から北海道東部までの広い範囲をカバーする湖沼について動物・植物プランクトン量復元と年代測定を含むレトロスペクティブ型モニタリングを実施した。その結果、ニセコ大沼とミクリガ池、蓬莱沼の3つの山岳湖沼から、共通する1980年代後半以降の植物・動物プランクトン増加が明らかとなった。この増加は、堆積物の窒素同位体比の減少と一致することから大気経由の栄養塩負荷に起因することがわかった。一方、羅臼湖では堆積速度が非常に遅いため、過去100年の変化を詳しく評価するのは困難であったが、1800年以降、栄養塩や藻類量、珪藻群集に大きな変化は検出されず、過去200年の間に生態系や栄養状態が変化した可能性は低いと考えられた。以上の結果は、北陸から北海道西部までの広範囲にわたって、大気経由の栄養塩負荷による山岳湖沼の生態系シフトが起こっている可能性を示唆した。特に、日本海に近い地域の山岳湖沼が、アジア大陸起源の大気経由栄養塩負荷の影響が強く出ている可能性がある。

2) 平地湖沼における富栄養化以前の生物相・栄養塩環境の復元とプランクトン変動要因

レトロスペクティブ型モニタリングのもう一つの科学的意義は、近過去(過去100~200年程度)の生物相や栄養塩環境の生態系保全目標設定に対する有効性である。阿寒湖では、1950年以前の富栄養化前は、現在より大型サイズの*Daphnia*が非常に多く、逆に小型サイズの*Bosmina*は少なかった。1950年という時期は、珪藻群集から富栄養化が始まった時期と考えられた。2000年以降も、珪藻群集からは富栄養化の改善の兆しは見え、*Daphnia*の堆積量も1950年以前のレベルにまで増加していない。渡島大沼では、藻類全般に増加の一途をたどり、現在もなお富栄養化が進行していることがわかった。また木崎湖は、1990年代以降、クロロフィルや珪藻・渦鞭毛藻由来色素、緑藻由来色素の堆積量は1960年以前と同程度にまで低下し、富栄養化が収束する傾向にあることがわかった。これらの結果は、従来のモニタリングでは不明であった富栄養化以前から現在までに到る生物群集や栄養塩環境の変遷過程に関する新知見であり、特に富栄養化以前と現在の生物量の情報は、湖沼生態系の回復のレベルを測るよい物差しとなることがわかる。湖沼生態系が富栄養化以前にどのような生態系だったのかといった情報は、どのような生態系を取り戻すことが望ましいのか、保全目標を具体化する上で必須の情報である。今回得られた近過去の生物相・栄養塩環境の高度復元によって、生態系保全目標に対するレトロスペクティブ型モニタリングの有効性を示すことができた。

従来より用いられてきた植物色素や動物プランクトン遺骸に基づく堆積量は、水柱の藻類・動物プランクトンの個々の生産量だけでなく、上位栄養段階のトップダウン効果にも強く影響を受ける。そのため、得られた藻類量や動物プランクトン変動が、ボトムアップ効果とトップダウン効果のどちらの効果によるものなのか、変動プロセスの解明が困難であった。サブテーマ2では、

動物プランクトン捕食量の指標化が期待できる、SCEs色素の有用性を検討した。ニセコ大沼で検討した結果、SCEs色素と植物色素及び動物プランクトン遺骸から、(1)動物プランクトンの餌藻類の特定とその捕食量変化、(2)従来では判別できなかった動物プランクトン増加に対する餌藻類のボトムアップ効果の可視化が可能となった。本サブテーマの技術開発によって、植物色素・動物プランクトン遺骸情報をSCEs色素の情報と併用することで、これまで得られなかった食物連鎖情報が得られ、生態系変化のカギを握るプランクトンの変動機構についてボトムアップ・トップダウン効果の両面から評価することができるようになった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

ニセコ大沼・ミクリガ池と先行研究における蓬莱沼の結果から、我が国の貧栄養山岳湖沼では過去100年の間に大気経由の栄養塩負荷が高まり、生態系が大きく変化したことを指摘した。これは、手つかずの自然豊かな湖沼に対する大気汚染の影響が広範囲に及んでいることを示唆している。一方、羅臼湖では過去200年の間に生態系が変化した可能性は低いことが推察され、大気経由の栄養塩負荷は、北海道東部にまでは影響が及んでいないことが伺える。この結果は、世界遺産に登録されている知床地域で保全に取り組む環境行政には朗報となったが、アジア大陸からの飛来量の増加が今後も続くとすれば、こうした地域の湖沼でも大気経由栄養塩負荷による生態系悪化が懸念される。環境行政は、今後もその生態系変化の兆しを注意深く見守って行く必要があるだろう。また、本課題で得られた成果は、東アジアからの越境汚染問題の深刻化が、酸性雨や光化学オキシダント・PM2.5だけでなく、近年まで清浄に保たれてきた山岳湖沼生態系にまで及んでいることを示唆した。我が国が誇る自然環境や生態系の悪化の問題も、東アジアの越境汚染問題解決に向けた国際的コンセンサスを得る材料となりうる。

本課題では、レトロスペクティブ型モニタリング技術が、生態系変化の兆しを簡便且つ低コストで捉える手段として生態系モニタリングに利用できることを示した。これは、レトロスペクティブ型モニタリング技術を用いれば、湖沼の生態系監視が環境行政として取り組むことが現実的に可能となったことを意味する。今後、まだ監視対象外である多くの湖沼の生態系について、行政が積極的にレトロスペクティブ型モニタリングを用いることで現状把握が可能となるだろう。特に、本課題では対象としなかったが、大陸に近い西日本の貧栄養湖沼や、飲み水として利用するダム湖における現状把握が急がれる。

阿寒湖は、周辺の観光地化に伴う湖の富栄養化が進んでいる湖沼である。近年の栄養塩負荷制限の取り組みにより富栄養化が一旦収束するものの、2000年以降再び藻類・動物プランクトンがこれまでになく増加傾向にあることが我々の成果から明らかとなった。これは、湖への負荷制限だけでなく、湖内の富栄養化対策が重要であることを示唆している。また、本研究ではそれぞれの湖沼で富栄養化以前の生物相、あるいは高山湖沼については栄養塩の高まりが起こる前の生物相を明らかにすることができた。環境政策には、どの時代の生態系を取り戻すことがその湖沼に

とって望ましいのかといった具体的な保全目標となる過去の生物相の情報が必要である。しかし、我が国のほとんどすべての湖では富栄養化以前のモニタリングが実施されていなかったために、目標設定が不十分であった。レトロスペクティブ型モニタリングは、過去100年程度の堆積物の解析ができれば、判断材料となる過去の生物相を容易に把握することができる。また、現在の生物相までに到る生態系変化の長期的なプロセスを明らかにすることで、具体的な保全対策に明確な根拠を与えることになるはずである。今回新たに技術開発したSCEs色素による餌藻類被食量の情報は、生態系変化プロセス解明に大いに役立つだろう。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) N. K. TSUGEKI, T. AGUSA, S. UEDA, M. KUWAE, H. ODA, S. TANABE, Y. TANI, K. TOYODA, W-L.WANG and J. URABE: *Ecol. Res.*, 27, 1041-1052 (2012)
“Eutrophication of mountain lakes in East Asia due to increasing deposition of anthropogenically-produced dust”
- 2) M. KUWAE, N. K. TSUGEKI, T. AGUSA, K. TOYODA, Y. TANI, S. UEDA, S. TANABE, and J. URABE: *Sci. Tot. Environ.*, 442, 189-197 (2013)
“Sedimentary records of metal depositions in Japanese alpine lakes for the last 250 years: Recent enrichments of airborne Sb and In in East Asia”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 槻木玲美: 吉田丈人, 鏡味麻衣子, 加藤元海 (編) シリーズ現代の生態学 第9巻 淡水生態学のフロンティア, 共立出版 (2012)
“18章: 古陸水学的手法による近過去の湖沼生態系変動の解析”
- 2) N. K. TSUGEKI, J. URABE: *In: Goldman C., Kumagai M., Robarts R. (eds) Effects of Climate Change and Variability on Inland Water Systems of the World: what can be done to reduce negative impacts?*, Wiley Blackwell (2013)
“Chapter 7: Eutrophication, warming and historical changes of the plankton community in Lake Biwa during the 20th century”

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 槻木玲美、王婉琳、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、田辺信介、占部城太郎：地球惑星科学関連学会 2010 年合同大会 (2010)
「八幡平湖沼のプランクトン長期動態とその変動要因：高山湖沼で何が起きているか？」
- 2) 槻木玲美、占部城太郎、谷幸則、上田眞吾、阿草哲郎、小田寛貴、王婉琳、田辺信介：日本生態学会第 58 回全国大会(2011)
「アジア大陸起源の大気降下物は日本の湖沼へどのような影響を与えているか？」
- 3) Tsugeki, N. K., Agusa, T., UEDA, S., Kuwae, M., Oda, H., Tanabe, S., Tani, Y., Toyoda, K., Wang W-L., Urabe, J.: ASLO Aquatic Sciences Meeting, Japan (2012)
「Eutrophication and increasing metal deposition of mountain lakes in East Asia due to anthropogenically-produced dust」
- 4) 槻木玲美、加三千宣：第 60 回日本生態学会 (2013) 企画集会 T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発
「堆積物の色素・遺骸を用いた湖沼の植物プランクトン動態の復元」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 秋田放送「秋田のニュース」 (2012 年 12 月 6 日、八幡平湖沼の富栄養化傾向と大気降下物の影響について報道)
- 2) NHK総合「おはよう四国」 (2013年1月12日、八幡平湖沼における越境汚染物質の長期飛来について2分ほど紹介)
- 3) 朝日新聞 (2013年1月21日、宮城版、「中国の大気汚染、東北にも影響」)
- 4) 朝日新聞 (2013年2月7日、東京版、「中国の大気汚染、東北にも」)
- 5) TBS 報道特集 (2013年2月16日、「中国からの汚染物質、東北の沼底から検出したのは」について2分ほど紹介)
- 6) 日本テレビ「ニュースエブリ」 (2013 年 2 月 21 日、八幡平湖沼の富栄養化傾向と大気降下物の影響について報道)

(6) その他

受賞： 槻木玲美、日本生態学会 第13回*Ecological Research*論文賞 (2013年度)、2013年3月8日

8. 引用文献

- 1) Schindler, D. W. 1978. Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 478-486

- 2) Schindler, D. W. 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 356-363
- 3) Interlandi, S. J., and S. S. Kilham. 1998. Assessing the effects of nitrogen deposition on mountain waters: a study of phytoplankton community dynamics. *Wat. Sci. Technol.*, 38: 139-146.
- 4) Neff, J. C., A. P. Ballantyne, G. L. Farmer, N. M. Mahowald, J. L. Conroy, C. C. Landry, J. T. Overpeck, T. H. Painter, C. R. Lawrence and R. L. Reynolds. 2008. Increasing eolian dust deposition in the western United States linked to human activity. *Nature Geosci.*, 1: 189-195.
- 5) Elser, J. J., T. Andersen, J. S. Baron, A. K. Bergström, M. Jansson, M. Kyle, K. R. Nydick, L. Steger and D. O. Hessen. 2009. Shifts in lake N:P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. *Science*, 326: 835-837.
- 6) Reche, I., E. Ortega-Retuerta, O. Romera, E. Pulido-Villena, R. Morales-Baquero and E. O. Casamayor. 2009. Effect of Saharan dust inputs on bacterial activity and community composition in Mediterranean lakes and reservoirs. *Limnol. Oceanogr.*, 54: 869-879.
- 7) Tsugeki, N. K., Agusa, T., UEDA, S., Kuwae, M., Oda, H., Tanabe, S., Tani, Y., Toyoda, K., Wang W-L., Urabe, J. 2012. Eutrophication of mountain lakes in East Asia due to increasing deposition of anthropogenically-produced dust. *Ecol. Res.*, 27: 1041-1052.
- 8) Leavitt, P. R., D. L. Findlay, R. I. Hall and J. P. Smol. 1999. Algal responses to dissolved organic carbon loss and pH decline during whole-lake acidification: evidence from paleolimnology. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 757-773.
- 9) Leavitt, P. R., and D. L. Findlay. 1994. Comparison of fossil pigment with 20 years of phytoplankton data from eutrophic Lake 227, Experimental Lakes Area, Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 2286-2299.
- 10) Tani, Y., K. Kurihara, F. Nara, N. Itoh, M. Soma, Y. Soma, A. Tanaka, M. Yoneda, M. Hirota and Y. Shibata. 2002. Temporal changes in the phytoplankton community of the southern basin of Lake Baikal over the last 24,000 years recorded by photosynthetic pigments in a sediment core. *Org. Geochem.*, 33: 1621-1634.
- 11) Tani, Y., G. I. Matsumoto, M. Soma, Y. Soma, S. Hashimoto and T. Kawai. 2009. Photosynthetic pigments in sediment core HDP-04 from Lake Hovsgol, Mongolia, and their implication for changes in algal productivity and lake environment for the last 1 Ma, *Quat. Internat.*, 205: 74-83.
- 12) Jeppesen, E., P. Leavitt, L. DeMeester and J. P. Jensen. 2001. Functional ecology and palaeolimnology: using cladoceran remains to reconstruct anthropogenic impact. *Trends Ecol. Evol.* 16: 191-198.
- 13) Tsugeki, N. K., S. Ishida and J. Urabe. 2009. Sedimentary records of reduction in resting egg production of *Daphnia galeata* in Lake Biwa during the 20th century: a possible effect of winter warming. *J. Paleolimnol.*, 42: 155-165.
- 14) Chikaraishi, Y., K. Matsumoto, H. Kitazato and N. Ohkouchi. 2007. Sources and transformation processes of pheopigments: stable carbon and hydrogen isotopic evidence from Lake Haruna, Japan. *Org. Geochem.*, 38: 985-1001.
- 15) Itoh, N., Y. Tani, Y. Soma and M. Soma. 2007. Accumulation of sedimentary photosynthetic pigments

- characterized by pyropheophytin a and steryl chlorine esters (SCEs) in a shallow eutrophic coastal lake (Lake Hamana, Japan). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 71: 283-300.
- 16) Talbot, H. M., R. N. Head, R. P. Harris and J. R. Maxwell. 1999. Distribution and stability of steryl chlorin esters in copepod faecal pellets from diatom grazing. *Org. Geochem.*, 30: 1163-1174.
 - 17) Soma, Y., N. Itoh, Y. Tani and M. Soma. 2005. Sterol composition of steryl chlorin esters (SCEs) formed through grazing of algae by freshwater crustaceans and its relevance to the composition of sedimentary SCEs. *Limnology*, 6: 45-51.
 - 18) 北海道環境科学研究センター. 2005. 北海道の湖沼. 北海道環境科学研究センター, 札幌.
 - 19) Robbins, J. A., and D. N. Edgington. 1975. Determination of recent sedimentation rates in Lake Michigan using Pb-210 and Cs-137. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 39: 285-304.
 - 20) Appleby, P.G., 2001. Chronostratigraphic techniques in recent sediments, Tracking environmental change using lake sediments, W. M. Last, J. P. Smol ed. Springer Netherlands, pp. 171-203.
 - 21) Appleby, P.G., Oldfield, F., 1978. The calculation of lead-210 dates assuming a constant rate of supply of unsupported 210Pb to the sediment. *CATENA*, 5: 1-8.
 - 22) Robbins, J.A., 1978. Geochemical and geophysical applications of radioactive lead, in: Nariagu, J.O. (Ed.), Biogeochemistry of Lead in the Environment. Elsevier Scientific, Amsterdam, pp. 285-393.
 - 23) 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.
 - 24) Jeffrey, S. W., and M. Vesk. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura and S. W. Wright (Eds.) *Phytoplankton pigments in oceanography*. UNESCO, Paris, pp. 37-84.
 - 25) Talbot, H. M., R. N. Head, R. P. Harris and J. R. Maxwell. 2000. Discrimination against 4-methyl sterol uptake during steryl chlorin ester production by copepods. *Org. Geochem.*, 31: 871-880.
 - 26) Dahl, K. A., D. J. Repeta and R. Goericke. 2004. Reconstructing the phytoplankton community of the Cariaco Basin during the Younger Dryas cold event using chlorin steryl esters. *Paleoceanography*, 19: PA1006.
 - 27) Volkman, J. K., S. M. Barrett, S. I. Blackburn, M. P. Mansour, E. L. Sikes and F. Gelin. 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Org. Geochem.*, 29: 1163-1179.
 - 28) Marie-Elodie Perga, Marc Desmet, Dirk Enters, and Jean-Louis. 2010. A century of bottom-up-and top-down-driven changes on a lake planktonic food web: A paleoecological and paleoisotopic study of Lake Annecy, France. *Limnol. Oceanogr.*, 55: 803-816.
 - 29) Frey, D. G. 1986. Cladocera analysis. In: Berglund, B. E. (Ed.) *Handbook of holocene palaeoecology and palaeohydrology*. Wiley, Chichester. pp. 667-692.
 - 30) Kerfoot, W. C., J. A. Robbins and L. J. Weider. 1999. A new approach to historical reconstruction: combining descriptive and experimental paleolimnology. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1232-1247.
 - 31) Interlandi, S. J., Kilham, S. S., Theriot, E. C. 2003. Diatom-chemistry relationships in Yellowstone Lake (Wyoming) sediments: implications for climatic and aquatic processes research. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 79-92.

- 32) Battarbee, R. W. 1986. Diatom analysis. *In*: Berglund BE (ed) Handbook of Holocene palaeoecology and palaeohydrology. Wiley, Chichester, pp 527-570
- 33) Ito, T., Iwamoto, H., Kamiya, K., Fukushima, T., Kumon, F., 2010. Use of flood chronology for detailed environmental analysis: a case study of Lake Kizaki in the northern Japanese Alps, central Japan. *Environ. Earth Sci.*, 60: 1607-1618.
- 34) Kim, T.W., Lee, K., Najjar, R.G., Jeong, H.D., Jeong, H.J. 2011. Increasing N abundance in the Northwestern Pacific Ocean due to atmospheric nitrogen deposition. *Science*, 334: 505-509.
- 35) Gordon W. Holtgrieve, Daniel E. Schindler, William O. Hobbs, Peter R. Leavitt, Eric J. Ward, Lynda Bunting, Guangjie Chen, Bruce P. Finney, Irene Gregory-Eaves, Sofia Holmgren, Mark J. Lisac, Peter J. Lisi, Koren Nydick, Lauren A. Rogers, Jasmine E. Saros, Daniel T. Selbie, Mark D. Shapley, Patrick B. Walsh, Alexander P. Wolfe. 2011. A Coherent Signature of Anthropogenic Nitrogen Deposition to Remote Watersheds of the Northern Hemisphere. *Science*, 334: 1545-1548.
- 36) 安富亮平, 渡辺智治, 隼野寛史, 眞野修一. 2008. 阿寒湖の水質環境の現状. *魚と水*, 45: 8-15.
- 37) Tsukuda, S., M. Sugiyama, Y. Harita and K. Nishimura. 2006. Atmospheric phosphorus deposition in Ashiu, Central Japan - Source apportionment for the estimation of true input to a terrestrial ecosystem. *Biogeochemistry*, 77: 117-138.
- 38) Furutani, H., A. Meguro, H. Iguchi and M. Uematsu. 2009. Geographical distribution and sources of phosphorus in atmospheric aerosol over the North Pacific Ocean. *Geophys. Res. Lett.*, 37: L03805

(3) 堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元

岡山大学 異分野融合先端研究コア 兵藤 不二夫

〈研究協力者〉 岡山大学大学院 自然科学研究科 千葉仁
総合地球環境学研究所 中野孝教
総合地球環境学研究所 申基澈
京都府立大学大学院生命環境科学研究科 林竜馬
総合地球環境学研究所 佐々木尚子

平成22～24年度累計予算額：15,337千円

(うち、平成24年度予算額：4,939千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

過去100年間の人間活動による湖沼内部、集水域、そして広域の生態系の変遷を探るため、山岳湖沼（羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池）と低地湖沼（阿寒湖、渡島大沼、木崎湖）を対象に、炭素窒素濃度及び同位体分析、リグニン由来フェノール分析、元素分析、ストロンチウム同位体分析、鉛同位体分析、花粉分析を行った。世界遺産に登録されている知床に位置する羅臼湖については、測定項目のほぼすべてにおいて一定であり過去100年間に顕著な人為影響は見られなかった。ニセコ大沼では、1900年始め頃から流入する鉱物の起源や重金属濃度、炭素窒素濃度やその同位体比の変化がみられ、大気降下物と鉱山開発に伴う何らかの攪乱があったことを示している。ミクリガ池においても、1960年頃に有機物の供給量の増加や大気降下物によると考えられる重金属濃度の増加が見られた。これら山岳3湖沼においては、表層において窒素同位体比の減少がみられ、大気性窒素降下物が増加した可能性を示唆している。一方、低地湖沼である阿寒湖、渡島大沼、木崎湖では、窒素同位体比や重金属濃度の増加、リグニン由来フェノール濃度の減少から、1910年頃から富栄養化や重金属の流入が始まっており、1980年以降はおおむね定常状態であることが示された。特に、鉛濃度やその同位体比の変化は、これら低地3湖沼は東京湾や大阪湾で確認されたものと同様のパターンを示している。また、渡島大沼と木崎湖で戦後の拡大造林を反映したスギやカラマツの拡大が見られた以外は、大きな植生の変化は見られなかった。今後、本研究でみられたパターンの一般性や、大気性降下物、特に鉛の由来を特定するため、アジア大陸における観測網の整備や、日本の焼却炉から排出される鉛同位体比の測定の重点化が必要であると考えられる。

[キーワード]

富栄養化、重金属汚染、大気性降下物、安定同位体、植生変化

1. はじめに

産業革命以降、特に過去100年の人間活動の高まりは、生態系変化を引き起こしている。例えば、産業革命以降、大気中二酸化炭素濃度は約30パーセント増加し、地球表面の淡水の半分以上が人間によって利用され、多くの湖沼で富栄養化が報告されている。これら急激な生態系変化は、持続的な人間社会を脅かしつつある¹⁾。生態系の中には、都市部に近く人間環境の影響を強く受けているような生態系もあれば、遠隔地にあるためほとんど影響を受けていない生態系もある。これら複数の生態系の変化を迅速に捕らえ、また回復に向けた具体的数値目標を提供できるモニタリング技術の開発が必要である。

湖沼の堆積物は、湖内の植物プランクトン生産や生物相だけではなく、集水域やさらに広域からの物質供給の変化も記録している^{2, 3)}。堆積物の炭素・窒素含量やその同位体比は、湖底に堆積する有機物の起源や、植物プランクトンの生産速度、窒素負荷の変遷の指標として用いられている⁴⁻⁶⁾。しかしながら、湖沼堆積物は植物プランクトンと陸上植物起源の有機物で構成されており、過去の集水域レベルでの変化を捕らえるには、リグニンなどの陸上植物特異的なバイオマーカーや、分類群レベルでの情報を与えてくれる花粉分析が必要である^{4, 7)}。さらに、近年、集水域や国境を越えた広域、特にアジア大陸由来大気降下物の生態系への影響が懸念されており、この変化の特定には、湖沼堆積物の微量元素濃度やその起源を特定する鉛などの同位体比分析が有効である^{8, 9)}。これら堆積物中の重金属濃度の変化は、日本の主要な湖沼については十分に研究されているとは言い難い。我が国のみならず、世界的に見ても、これら湖内、集水域、広域という3つのレベルにおける環境変化について、湖沼堆積物を対象として同時に評価した研究例は皆無である。

2. 研究開発目的

本研究では、人間活動の近年の影響の程度やその種類（生活排水や大気降下物など）が異なると考えられる山岳及び低地湖沼を対象として、湖内の植物プランクトン生産速度や窒素負荷の指標として炭素・窒素同位体比、集水域からの陸上有機物供給やその植生の指標として、リグニン由来フェノールや花粉分析、広域レベルの変化を捉えるため元素分析、特に鉛など微量元素や同位体分析を行う。本サブテーマでは、これらの手法を用いて、湖沼生態系の高度復元のための最新の安定同位体科学の手法を開発・適用する。

3. 研究開発方法

(1) 試料採集

対象とした湖沼は、アジア大陸からの距離や人為影響の大きさを考慮して、低地湖沼と山岳湖沼を選別した。具体的には、アジア大陸から離れている道東で、世界遺産にも登録されている羅臼に位置する山岳湖沼の羅臼湖、そして低地湖沼である阿寒湖、北海道南部の山岳湖沼であるニセコ大沼、低地湖沼である渡島大沼、本州中部の低地湖沼である木崎湖、山岳湖沼であるミクリガ池の6つを対象としている。



図(3) - 1 本研究の調査地点。白抜きは低地湖沼、灰色は山岳湖沼である

2010年7月11日から18日に渡り、東北大学・愛媛大学のグループとともに北海道の3つの湖沼（羅臼湖、阿寒湖、ニセコ大沼）を対象に堆積物の採集を行った。得られたコアを1cmごとにスライスし、その試料を東北大学、愛媛大学、岡山大学の3つのグループに分けた。また、2011年2月22日に、東北大学・愛媛大学のグループとともに北海道・渡島大沼の湖沼を対象に経12cmの重力式コアサンプラーを用い湖底堆積物コアを採集した。また、2011年9月9日に、同様に本州・立山に位置する山岳湖沼・ミクリガ池のコアを採集し、0.5cmごとにスライスした。2011年9月12日には、木崎湖にてダイバーを雇用してコア採集を行い、1cmごとにスライスした。その試料を東北大学、愛媛大学、岡山大学の3つのグループに分けた。2012年9月には、東北大学・愛媛大学のグループとともに、初年度30cm程度のコアしか得られなかった北海道・阿寒湖を対象に経12cmの重力式コアサンプラーを用いダイバーを雇用してコア採集を行い、得られたコアを1cmごとにスライスした。道南のニセコ大沼においても、初年度得られたデータの参考データとして、湖沼周辺の土壌を20地点採取した。道南ニセコ大沼近くの神仙沼の湖沼も湖底堆積物コアの採集を試みた。しかしながら、湖底が藻類に覆われており、十分なコアを得ることはできなかった。

岡山大学が担当する堆積物試料については、冷凍し、調査地から岡山大学の実験室まで郵送した。その後、実験室において、凍結乾燥機によって48時間以上凍結乾燥し、以下の分析に供した。なお、堆積物の年代及び堆積速度は、サブグループ(2)愛媛大グループによって推定された値に従った。

(2) 窒素・炭素分析及び安定同位体比

乾燥した堆積物は、元素分析計付き同位体比質量分析計によって炭素窒素安定同位体比を測定した。また、炭酸塩の影響を除くため、0.5N塩酸に一晩つけて、その後純水で塩酸を取り除いた。この試料は、全有機炭素含量および炭素同位体比の測定に用いた。試料をスズカップに包み、元素分析計 (EuroEA 3000) に接続した同位体比質量分析計 (Isoprime Limited, UK) によって、 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ の値を求めた。 $\delta^{15}\text{N}$ or $\delta^{13}\text{C} = (R_{\text{サンプル}}/R_{\text{標準物質}} - 1) \times 1000$, ここで R は $\delta^{13}\text{C}$ あるいは $\delta^{15}\text{N}$ それぞれについて、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ を表す。Pee Dee Belemnite (PDB)と大気中窒素が炭素窒素の国際的標準物質である。 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ ともにその測定精度は0.2‰以下であった。

(3) リグニンフェノール分析

リグニンフェノールはGoni and Hedges (1992)^{10, 11)}と Goni and Montgomery (2000)によって修正されたHedges and Ertel (1982)¹²⁾の手法に基づき酸化銅酸化分解法によって得た⁴⁾。約10mg Cを含む堆積物試料を、窒素ガスでバブリングし酸素を除いたNaOH (2N) 7mL及び酸化銅1g、硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物75mgとともに、テフロン圧力分解容器に入れた。その後、この容器を窒素ガスで大気と置換したグローブボックス内で密封した。この反応容器を、155°Cに設定した乾燥機に入れ、3時間加熱した。反応後、水道水で冷却し、その内容物をNaOH (1N) でプラスチック製遠心沈殿管 (50mL)に移し、遠心分離 (3000rpm、10分)した。その後、上澄みを新しいガラス製遠心沈殿管 (30mL)に移した。完全にフェノール類を移すため、再度NaOH (1N) 5mLで遠心分離し、上澄みを遠心沈殿管に移した。この上澄み液に、濃塩酸3mLを加え、pHを1以下にした。ここに、酢酸エチル7mLを加え、激しく振って、リグニン由来フェノール成分が含まれる有機層と水層を分離した。これを遠心分離 (3000rpm、10分)し、有機層 (上層) をパストゥールピペットを用いて、新しいガラス管 (20mL)に移した。完全にフェノールを抽出するために、この作業をもう一度繰り返した。その後、ガラス管に硫酸ナトリウムを加えて脱水した。脱水した酢酸エチル溶液を再び新しいガラス管 (20mL)に移し、窒素ガスを吹き付けて酢酸エチルを蒸発させ、ピリジン50 μL を加えてガスクロ分析試料とした。

得られたリグニン由来フェノール試料30 μL 、BSTFA30 μL をガスクロバイアルに加えてヒートブロックで60°C、10分で反応させ誘導化した。その後、ガスクロマトグラフィー (Shimadzu、GC-2014)を用いて分析した。リグニンフェノール濃度は100mg有機炭素量に対するバニルフェノール (V ; バニリン・アセトバニロン・バニリン酸)、シリングルフェノール (S) (シリングアルデヒド・アセトシリングン・シリング酸) 及びシナミルフェノール (C) (*p*-クマル酸・フェルラ酸)の合計ミリグラム量として表した (mg/100mg TOC)³⁾。S/VとC/V比はシリングルフェノール : バニルフェノール比、シナミルフェノール : バニルフェノール比を表す。(Ad/Al)_vと(Ad/Al)_sはそれぞれ、バニリン酸とバニリンの比、シリング酸とシリングアルデヒドの比を表す。リグニンの各パラメーターの分析精度は10%以下であった。

(4) 元素分析及びストロンチウム同位体分析

総合地球環境学研究所 (京都市左京区) で微量元素濃度、ストロンチウム安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) 測定を行った。各試料をテフロンバイアルに約0.1gを秤量後、ドラフト内で多摩化学工業社製pure HNO_3 (AA-10) 1.0mL、2回蒸留済濃HF 0.7mL、多摩化学工業社製70%pure HClO_4 0.5mLの順に加えた。

試薬をすべて投入後、テフロンバイアルの蓋を閉め、ホットプレート上で120-130℃で一晩加熱し、分解した。その後、バイアルの蓋を開けて試料を乾固させた後、HCl (6N) 3mL加え、再び蓋を閉めて100℃で一晩加熱し、酸分解した。その後、120-130℃でバイアル内の試料を再び乾固させて、HCl (1.5N) 2mLを加えて10分間加熱した。加熱後は10分以上冷却し、洗浄済2mLエッペンチューブに試料溶液を移し、遠心分離(3000rpm、5分)して試料溶液を作成した。その後、各酸分解済試料溶液を0.5mL採り、洗浄済14mLバイアルに入れてICP - MS用HCl (7N) 9.5mLを加えて測定用試料溶液を調整した。測定には、アジレント・テクノロジー社製ICP - MS (誘導結合プラズマ質量分析装置) 7500cxを使用した。今回測定した元素は、Li、B、Na、Mg、Al、Si、P、K、Ca、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、As、Se、Rb、Sr、Y、Zr、Mo、Ag、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Lu、W、Pb、Uの51成分である。今回の報告では、微量元素 (Cu、Cd、Zn、Pb、Pb/Zr) 及び鉛同位体 ($^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$) について報告する。実験結果はmg/gあるいはppmで表記しており、堆積物コアサンプルの重量に対する濃度である。

また、酸分解溶液からのPb・Sr・REE (希土類元素) の抽出は以下のようにして行った。抽出には、ムロマチテクノス社製Muromac Column、同社製Muromac AG 50W-X8 (200 - 400mesh) を使用した。実験手順は以下のようである。カラムに2回蒸留済カラム洗浄用HCl (6N) 9mLを加えて洗浄した。洗浄後もう一度同工程を行った。2回目の洗浄が終了した後、HCl (1.5N) 5mLを加え、イオン交換膜のpHを調節した。その後、カラムの下に洗浄済Pb回収用7mLバイアルを置き、作成した試料溶液を1mLカラムに加える。引き続きHCl (1.5N) 2mLをカラムに加え、Pbを回収する。その後、HCl (1.5N) 10mLを投下し、カラムを洗浄した。その後、カラムの下に洗浄済Sr回収用7mLテフロンバイアルを置き、HCl (1.5N) 7mLをカラムに加えてSrを回収した。その後、HCl (6N) 1mLを通し、カラムを洗浄した。最後に、カラムの下に洗浄済REE回収用7mLバイアルをセットし、HCl (6N) 4mLを加えてREEを回収した。

イオン交換樹脂は上記のもの、カラムは総合地球環境学研究所作成のものを使用する。上述のように回収したSr試料が入ったバイアルの蓋を開けて蒸発乾固させたのち、2N HCl 0.5mlを加える。バイアルの蓋を閉め100℃前後で10分加熱の後、10分以上冷却する。また、カラムに2回蒸留済カラム洗浄用6.0N HCl 4mlを加えて洗浄し、HClが落ち切ったら同工程をもう2回行う。HClでの洗浄後、超純水3mlをカラムに加えて洗浄する。洗浄が終了したら、2.0N HCl 3mlを加えてイオン交換膜のpHを調節する。HClでの洗浄が終わったのち、冷却済の試料溶液0.5mlをカラムに加えて完全に落ち切るまで放置する。その後2.0N HCl 7mlをカラムに加えて洗浄する。洗浄用HClが落ち切ったのち、カラムの下に洗浄済精製Sr回収用7mlテフロンバイアルをセットし、2.0N HCl 4mlをカラムに加えて、完全に落ち切ったらバイアルを回収する。バイアルはホットプレート上に静置し、蒸発乾固させる。

ストロンチウム安定同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) 測定には、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 表面電離型質量分析装置TRITONを利用する。 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ 測定に際して、Sr測定用フィラメント

を以下の実験手順に従って作成した。フィラメントホルダーにSr測定用のW singleフィラメントを取り付け、電圧と電流値をそれぞれ4.8V, 2.0Aに設定し、フィラメントの両端にパラフィルムを貼り付けて土手を作成する。作成した土手の内側に、TaO activatorを1 μ ml塗布して乾燥させる。乾燥したら、フィラメントホルダーの電流値を1.0Aに設定し、②で蒸発乾固させた精製済Srを1.0N HNO₃ 1 μ mlで溶かした後にフィラメント上に塗布する。塗布したサンプルが白色に変化して乾燥したら、電流値を2.0A→2.5A (5~10s) →0Aに変えた後に、スイッチを切って終了する。上記の手順で作成したフィラメントはブランクホルダーにセット後、TRITONにセットして測定した。今回の⁸⁷Sr/⁸⁶Sr測定にはSr standardとしてNIST SRM 987 (n=12, (⁸⁷Sr/⁸⁶Sr)ave. = 0.710250)を使用し、測定誤差は±0.0000047であった。Pb濃度が判明した各酸分解済試料溶液を、1% HNO₃を用いて希釈後のPb濃度が数ppbになるように希釈する。希釈後の溶液はICP-MS (Perkin-Elmer NexION 300)を用いて測定した。SRDはそれぞれ ± 0.003 and ± 0.009 (²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb/²⁰⁷Pb (2 σ , n = 45)) である。

(5) 花粉分析

花粉分析については、試料0.04-0.14g程度をはかり取り、既知量のマイクロスフィア（直径15 μ m）を添加した後、水酸化カリウム処理、フッ化水素酸処理、アセトリシス処理を行って化石花粉を抽出し、シリコンオイルに封入した引用）。400倍または600倍の光学顕微鏡下で、花粉・孢子総数が300個以上になるまで、プレパラートの全面を走査して、花粉の同定ならびに計数を行った。同定した花粉・孢子の総数を基数として、各花粉・孢子分類群の出現率を算出した。検鏡時にはマイクロスフィアも同時に計数し、堆積物1gあたりの花粉含有量を算出した。

また現在の植生を反映すると考えられる堆積物表層の花粉組成と比較するため、環境省の自然環境GISデータを利用して、各湖沼の集水域について、植生の組成を計算した。各湖沼の集水域界は、国土地理院作成の基盤地図情報を利用し、10mメッシュの数値標高モデル（DEM: Digital Elevation Model）を元にしてArcGISにより作成した。これを環境省作成の植生図に重ね合わせ、集水域内にある各植生型ごとにその面積を計算した。なお、羅臼湖ならびに阿寒湖については第6回・第7回植生調査に基づく現存植生図（1/25000縮尺）、ニセコ大沼、渡島大沼、木崎湖、ミクリガ池については第2-5回植生調査に基づく現存植生図（1/50000縮尺）を用いた。環境省植生図で用いられている詳細な植生区分は、各植生区分を代表する植物種ごとに、花粉分類群と対応しやすい形にまとめて計算した。

4. 結果及び考察

全有機炭素濃度及びCN比の変動

堆積物の炭素・窒素比はその有機物が湖沼内部生産（植物プランクトン）由来か外部生産（陸上植物）由来かの指標として利用でき、植物プランクトンの場合はその値が4から10、陸上植物の場合は20以上であるとされている^{2, 13)}。図（3）-2に山岳湖沼である羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の全有機炭素濃度、CN比（モル比）を示す。羅臼湖では、1900年以降、全有機炭素濃度、CN比、同位体比ともに、顕著な変化は見られなかった。このことは、世界遺産に登録されている知床に位置する羅臼湖に過去100年間、大きな周辺環境が生じなかったことを意味している。一方、ニセコ大沼では、全有機炭素が1910年以降減少しており、何らかの変化が生じたことが示されている。ただし、そのC/N比に大きな変化がないことから、内部生産や陸上有機物の供給量のバランスが変化したわけではなく、後述するストロンチウム同位体比の変化からも推測されるように、鉱物の供給が増加したことによるものだと考えられる。ニセコ大沼は、かつてのイワオヌプリ硫黄鉱山周辺に位置している。この鉱山は1800年後半から硫黄の採掘が始まり1937年の閉山に至った。その周辺には鉱山で働く人々の集落があり、周辺の沼から生活用水を引いていた（北海道新聞 2010年3月13日）。このような鉱山やその周辺での人々の活動が何らかの集水域レベルでの鉱物供給量の変化につながったと考えられる。ミクリガ池においては、1960年に全有機炭素の変化やCN比の変化が見られた。この時期には、堆積速度の急激な増加も見られたことから（サブテーマ2 報告書参照）、登山道の開設のための工事に伴う陸上有機物の供給があったと考えられる。

図（3）- 3に阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の全有機炭素濃度とC/N比を示す。阿寒湖では、1910年頃から全有機炭素濃度の増加がみられ、1960年以降はその増加傾向が顕著であった。また、そのCN比は10以下と低く、湖底堆積物への有機物供給は内部生産（植物プランクトン）起源のものが多くを示している。渡島大沼においては、1960年以降、全有機炭素濃度が上昇し、同時にCN比の減少も見られた。このことは渡島大沼における富栄養化が1960年以降進行していることを示している。分析した堆積物層がタービダイト層¹⁴⁾を含んでいたため、年変化の明瞭なパターンは見られないが、木崎湖においても1960年以降に全有機炭素濃度の増加とCN比の減少が見られ、富栄養化し内部生産が増加したことが考えられる。

炭素・窒素安定同位体比

湖沼堆積物の炭素同位体比は、その有機物の起源や植物プランクトンの生産速度、そして栄養塩の利用可能性の復元に用いることができる^{5, 15)}。炭素同位体比は光合成過程における炭素同化プロセスや炭素源の同位体組成を反映する¹⁶⁾。C3植物は炭素同化過程において、¹²Cより¹³Cに対して大きな分別（-20‰）を示す結果、大気中の二酸化炭素（-7‰）を利用する植物の炭素同位体比は約-27‰程度となる。一方、C4植物は、C3植物に比べて小さい同位体分別（約-7‰）を示すため、その植物は約-14‰を示す¹⁷⁾。また、湖沼の植物プランクトンが利用する溶存態二酸化炭素は、通常は大気中二酸化炭素と同位体平衡に達しており、陸上植物と同じ同位体比を持つ。したがって、炭素同位体比からだけでは、溶存態重炭酸（炭素同位体比=約0‰）を利用する海洋のプランクトンの場合と異なり、湖沼のプランクトン由来の有機物と陸上植物由来の有機物とを区別することは困難である¹³⁾。ただし、湖内が富栄養化し植物プランクトンの生産が高くなった場合、湖沼プ

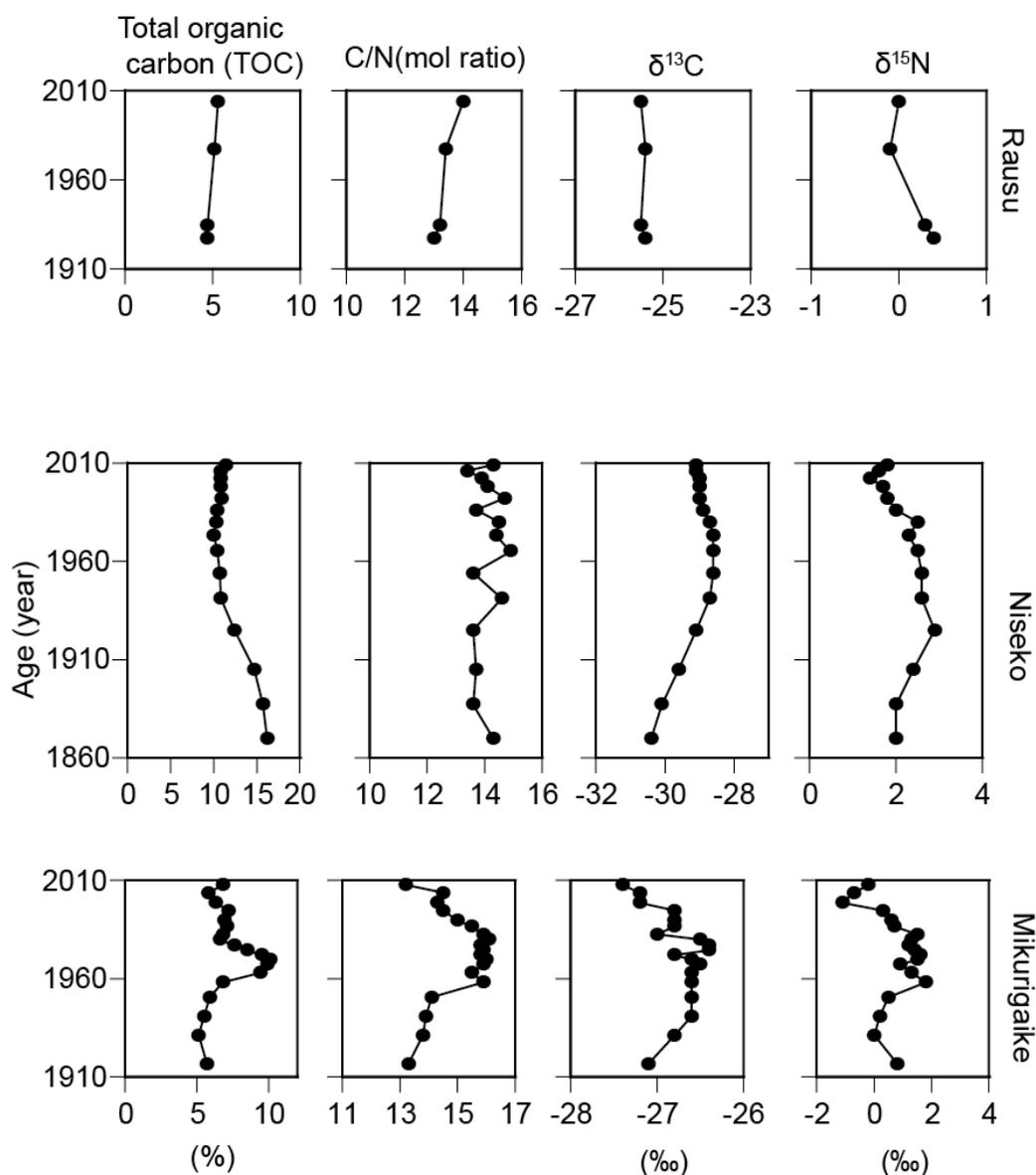


図 (3) - 2 羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の全有機炭素濃度、CN比（モル比）、炭素・窒素安定同位体比の変化

ランクトンが溶存態無機炭素から ^{12}C を選択的に取り込み湖底に堆積する結果、湖内の溶存態無機炭素の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ の値は上昇する。そのため、その溶存態無機炭素を用いた植物プランクトンの生産は、高い炭素同位体比を持つ有機物を作り出す。さらに、一次生産速度が高まることにより、二酸化炭素の取り込み時の同位体分別は減少することによって、新たに生産された有機物の炭素同位体比の値は上昇する。このメカニズムのため、堆積物の窒素やリンなどの濃度によって示される富栄養化と、炭素同位体比が非常によい相関関係を持つことが先行研究によって示されている^{6, 18)}。

一方、堆積物の窒素安定同位体比は、湖内に流入する窒素の供給源（大気降水物や生活排水、下水）や湖内の窒素循環（脱窒など）を反映することが知られている^{19, 20)}。大気降水物の窒素同位体比は一般的に低い（0から-10‰）、生活排水や下水由来の窒素同位体比（6から20‰）は高いことが知られている²¹⁾。また、窒素の供給量が増えた結果、富栄養化し湖底が嫌気的狀態になって

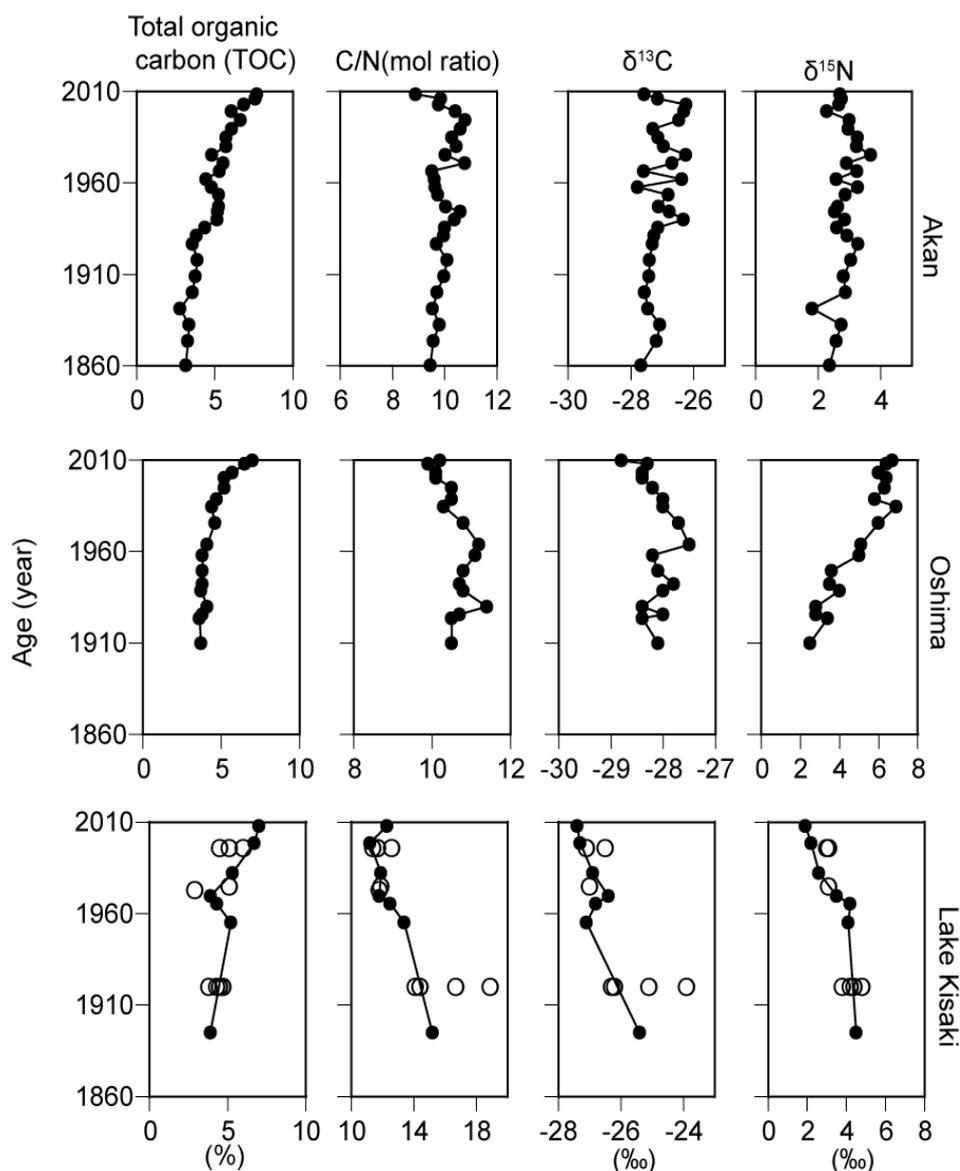


図 (3) - 3阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の全有機炭素濃度、CN比（モル比）、炭素・窒素同位体比の変化（木崎湖の白抜きはタービダイト層）

いる湖沼では、脱窒過程に伴い堆積物の窒素同位体比の上昇が見られることが知られている。これらは流域から人為起源の窒素の湖内への負荷が上昇した場合、窒素同位体比が増加することを意味している。一方、北米大陸の流域からの負荷がないような遠隔地の湖沼の窒素同位体分析の結果から、1900年以降、工業的に固定した大気中窒素の増加や化石燃料によるNO_xガスの排出など、大気降下物として全球レベルでの窒素負荷が生じていることが指摘されている²²⁾。ただし、湖底に堆積した後の化学反応（続成作用）によって、窒素同位体比が減少する可能性があることも近年報告されており、その解釈には注意を要する²⁰⁾。

山岳湖沼である羅臼湖では、炭素同位体比が約-25‰、全有機炭素濃度やCN比の結果と同様、過去100年間に明瞭な変化はなかったことを示している。ただし、窒素同位体比が0.5‰から0‰へと測定誤差（0.2‰）を上回る減少がみられた。また、ニセコ大沼では、炭素同位体比は1860年以降増加傾向を示し、1960年からは一定かやや減少傾向に転じた。一方、窒素同位体比は、1900年頃に2‰から3‰まで増加し、その後特に1960年以降顕著な減少傾向を示した。炭素・窒素同位体比の明確な変動理由はわからないが、上述した流域からの土砂に含まれる栄養塩の供給などによって、内部生産が上昇した可能性がある。また、1960年以降の窒素同位体比の減少は先行研究と同

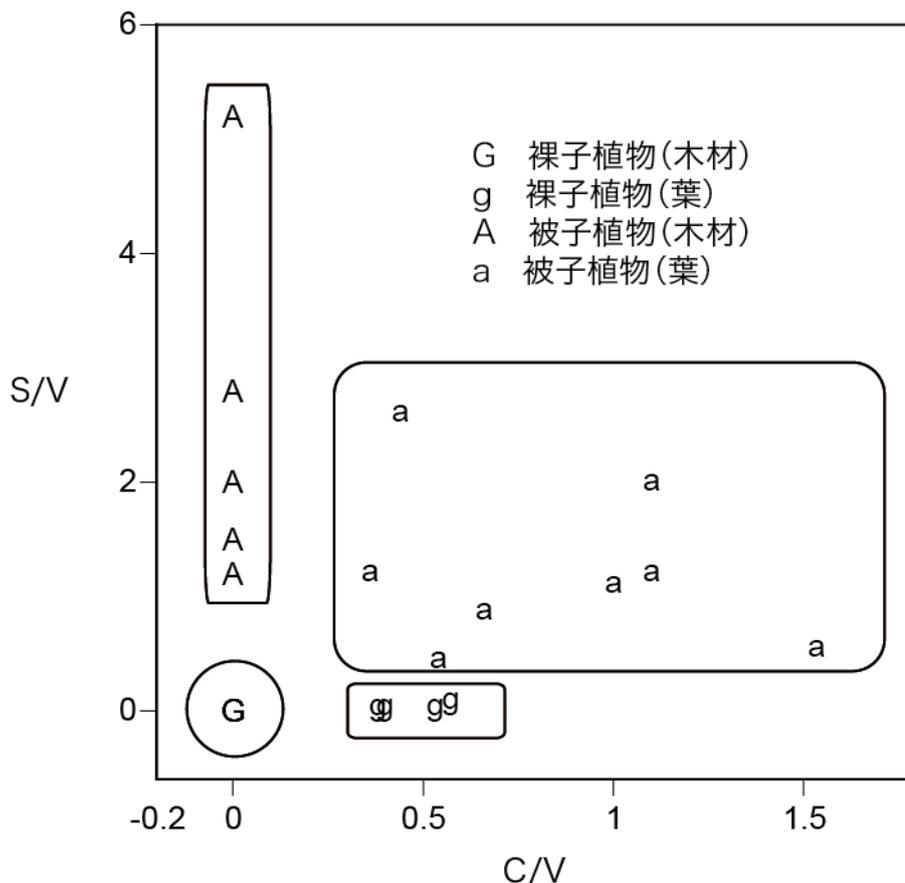
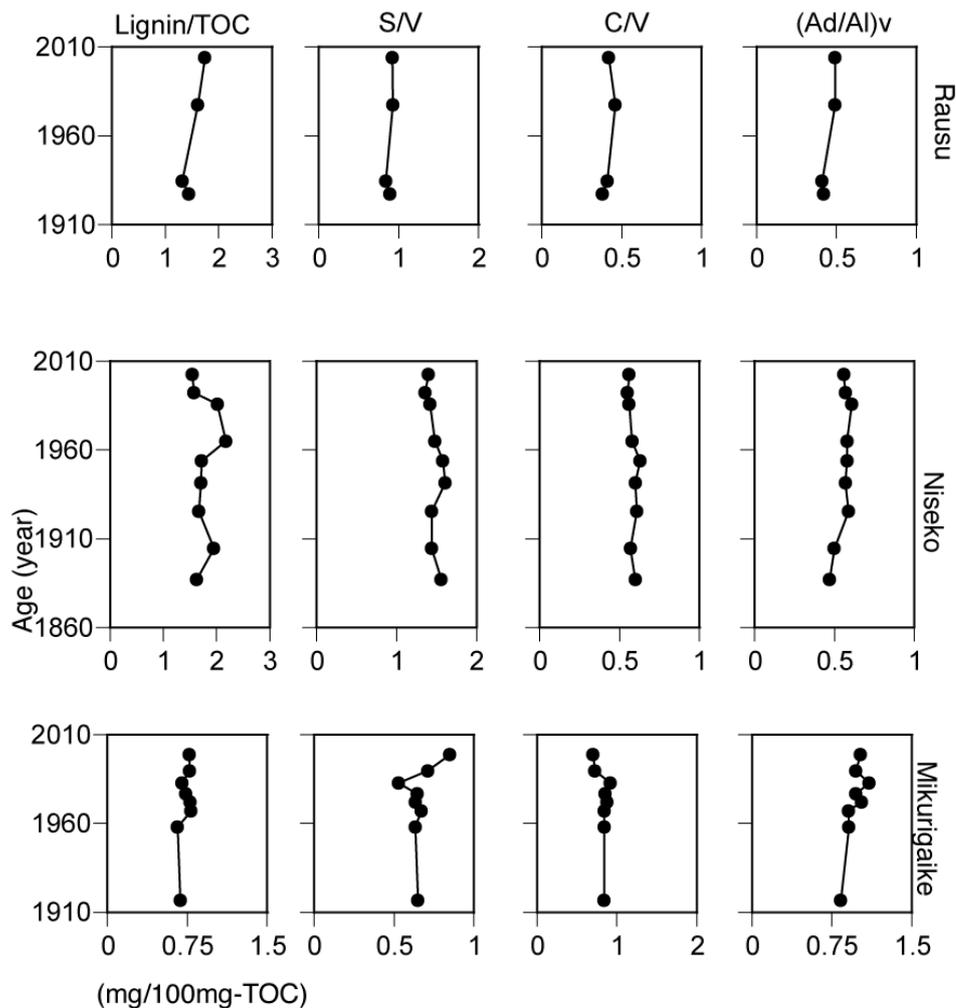


図 (3) - 4 阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の全有機炭素濃度、CN比（モル比）、炭素・窒素同位体比の変化（木崎湖の白抜きはタービダイト層）植物とニセコ大沼堆積物のリグニン由来フェノールパラメーターの特徴。植物の値はHedges and Mann (1979)による。

様、1960年以降の減少は大気性窒素降下物による影響が考えられる。ミクリガ池については、CN比と同様、1910年からやや上昇傾向を示し、1970年以降、減少するというパターンが見られた。窒素同位体比についても、やや変動を示すが、1910年以降上昇し、1970年以降減少するという炭素同位体比と同様の傾向を示した。炭素同位体比が-27.5から-26.5‰と比較的小さな幅で変動しているため、陸上有機物の供給があったかどうかの検証は炭素窒素同位体比からは難しいが、全有機炭素濃度だけでは見られない変化を同位体比は検出していると言える。また、他の二つの湖沼と同様、表層部で見られる窒素同位体比の低下は、大気窒素降下物の影響なのかもしれない^{23, 24}。

低地湖沼である阿寒湖では、変動が見られるものの、炭素同位体は-27‰とほぼ一定であった(図(3) - 3)。一方、窒素同位体比は、その変動幅は小さいものの、1860年以降2‰から上昇し、1920年頃に一旦減少後、再び1940年頃から4‰近くまで上昇傾向を示し、1980年頃から減少傾向に転じた。この窒素同位体比上昇は、阿寒湖周辺における人口増加や、特に阿寒国立公園指定(1934年)後、観光地化が進んだ時期([http:// www.gakujoken. or. jp/ marimo/ learning/ 4-5-2. html](http://www.gakujoken.or.jp/marimo/learning/4-5-2.html))と対応しており、集水域からの下水などの人為起源窒素が流入したことを意味して



図(3) - 5 羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池における全有機炭素あたりのリグニン由来フェノール、シリングルフェノールとバニルルフェノールの比 (S/V)、シリングルフェノールとバニルルフェノールの比 (C/V)、バニリン酸とバニリンの比 (Ad/Alv)

いるのであろう。また、その後の減少は下水道整備を反映していると推測される。渡島大沼において、炭素同位体比は1960年以降、一旦増加するものの、その後は継続して減少傾向を示している。通常、富栄養化が進行した場合、炭素同位体比は増加傾向をしめすが、そのような傾向は必ずしも見られなかった。一つの要因は、森林伐採や化石燃料の大量消費によって、炭素同位体比が軽い二酸化炭素が大気に供給され、全球レベルで大気中二酸化炭素の同位体比が1‰ほど下がる減少（Suess効果）^{4, 25)}を反映している可能性がある。あるいは、湖内で生産された有機物が分解し、それが再利用されるような減少が生じたのかもしれない。一方で、窒素同位体比は1910年以降、単調に増加している。1910年以降の窒素同位体比の増加は、明治や大正から渡島大沼周辺で急速に近代化が進み多くの工場が稼働し始めたこと（七飯町史）を反映していると考えられる。この窒素同位体比の変化は、CN比などでは検出されておらず、流域からの人為起源窒素負荷の評価に対する窒素同位体比の有用性を示している。

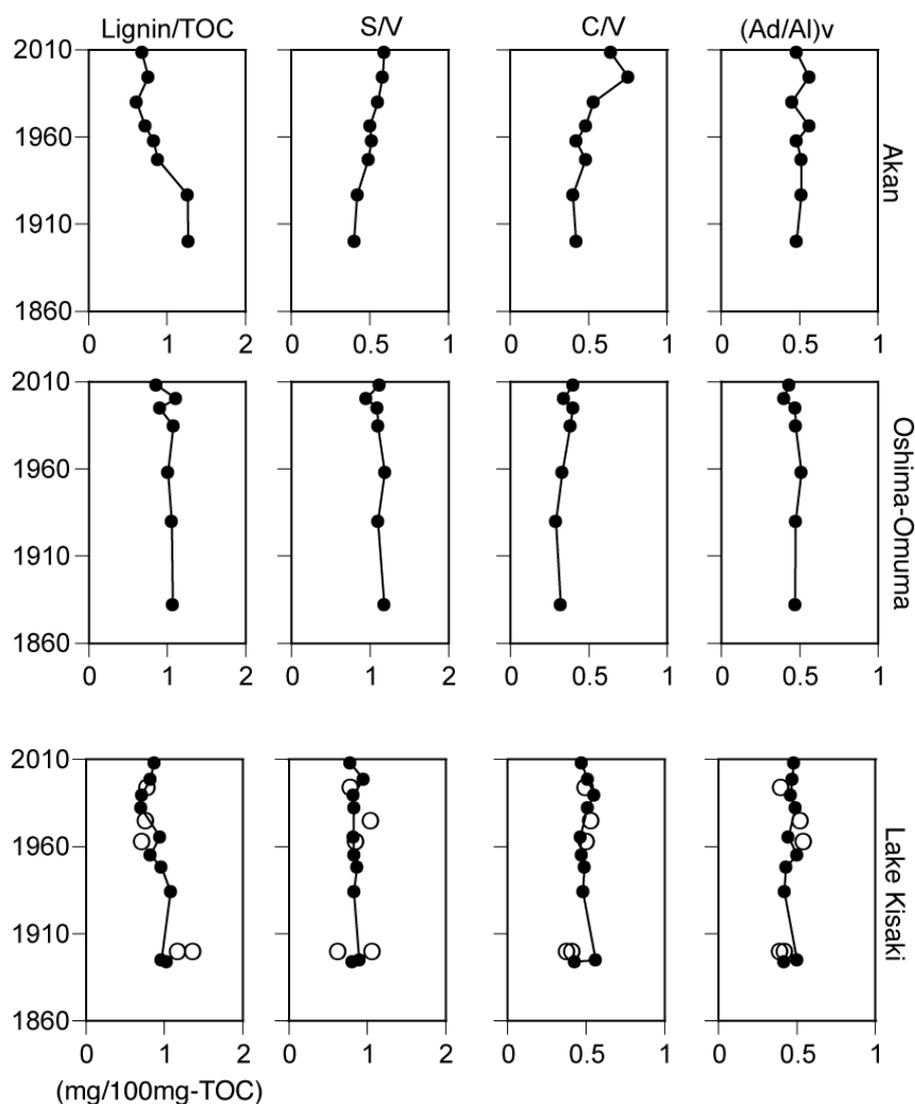


図 (3) - 6 阿寒湖、渡島大沼、木崎湖における全有機炭素あたりのリグニン由来フェノール、シリングルフェノールとバニルルフェノールの比 (S/V)、シリングルフェノールとバニルルフェノールの比 (C/V)、バニリン酸とバニリンの比 (Ad/Al)v

リグニン由来フェノール

リグニンは維管束植物の細胞壁の主要成分として存在するフェノール高分子化合物である^{12, 26, 27)}。その難分解の性質から、堆積物や土壤に多く存在している。また、維管束を持たない植物プランクトンはこのリグニンを作り出さないことから、湖沼や海洋の堆積物や溶存態有機物のリグニン由来フェノールは、陸上起源有機物のバイオマーカーとして利用されている^{28, 29)}。さらに、維管束植物の分類群によっても、作り出すフェノールの種類が異なるという特徴がある。バニルフェノール(V)は維管束植物全般に存在するが、シリングルフェノール(S)は被子植物にのみ、またシナミルフェノール(C)は非木材組織にのみ存在する。よって、S/VとC/V比は高等植物の分類群の違い(裸子植物と被子植物)と組織の違い(木材組織と非木材組織)を表す(図(3)-5)。さらに、バニリン酸とバニリンの比(Ad/Al)_v及びシリング酸とシリングアルデヒドの比(Ad/Al)_sは酸化リグニン分解の指標として用いられている^{30, 31)}。Tiesserencら(2010)らはアメリカ12の湖沼を対象に、湖沼堆積物のリグニン由来フェノール組成(S・V比)とGISから推定される流域あたりの被子植物の被覆の割合に相関があることを示している³²⁾。

図(3)-5に山岳湖沼である羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池のリグニン由来フェノールの結果を示した。羅臼湖は、炭素窒素濃度や同位体比と同様、全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールは1mg/TOC100mg、S/V比は1、C/V比は0.5、Ad/Al_vは0.5程度と過去100年間に顕著な変動は見られなかった。ニセコは全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールは変動はあるものの、2mg/TOC100mg程度、S/V比は1.5、C/V比は0.5、Ad/Al_vは0.5程度と比較的安定していた。このことは、上記の全有機炭素濃度や同位体比の変動と対照的である。おそらく、ニセコ大沼の流域の改変には、植生の変化や陸上有機物供給と内部生産の割合の変化を伴わないものだったことが推測される。陸上有機物供給と内部生産の割合が変化しなかったということは、CN比が一定であったということとも一致している。ミクリガ池では、全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールは0.75mg/TOC100mgで、1960年にやや増加し、その後ほぼ一定であった。S/V比は0.5、C/V比は1、Ad/Al_vは0.75程度であった。全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールが他の湖沼に比べて低いことは、湖内生産が堆積物への炭素の供給に重要な役割を果たしていることを示している。また、上述のように1960年代に全有機炭素濃度の顕著な変化が見られたにもかかわらず、全有機炭素あたりのリグニン由来フェノール濃度が一定であることは、ニセコ同様、内部生産と外部生産の相対的重要性が一定であったことを示している。ただし、S/V比は1980年以降上昇傾向を示しているため、ミクリガ池の集水域で優占するタカネヤハズハハコーアオノツガザクラ群集の面積が相対的に増えたのかもしれない。また酸化分解の程度を示すAd/Al_v比は、0.75と今回調査した全湖沼で最も高い値を示した。このことは、流域面積が小さく山岳地帯のため陸上生産性の乏しいミクリガ池へは分解の進んだ陸上有機物が供給されていることを意味している。

低地湖沼堆積物のリグニン由来フェノールの分析結果を図(3)-6に示す。阿寒湖の全有機炭素あたりのリグニン由来フェノール濃度は、1930年頃から1mg/100mgTOCから減少を始め、1960年頃には約半分の0.5 mg/100mgTOCとなった。S/V比は約0.4から0.6へ、C/V比は0.4から表層では0.7へと上昇し、周辺で広葉樹の面積が増加した可能性を示している。また、Ad/Al_vは0.5程度と過去100年間に顕著な変動は見られなかった。阿寒湖で確認されたリグニン由来フェノール濃度の低下は、一部は富栄養化によって内部生産が増大し、その結果、堆積物に占める陸上起源物質の

割合が減少したと考えられる。このパターンは富栄養化が進んだ1960年にリグニン由来フェノール濃度の低下した報告例と一致している。ただし、富栄養化が進行しクロロフィル量が増加する時期は、1950年頃（サブテーマ2 愛媛大学グループ）であるため、リグニン由来フェノール濃度の低下には、1900年以降行われた森林伐採の影響もあったのかもしれない (<http://www.gakujoken.or.jp/marimo/learning/4-5-2.html>)。渡島大沼では、全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールは1mg/TOC100mg、S/V比は1、C/V比は0.3、Ad/Alvは0.5程度と過去100年間に顕著な変動は見られなかった。渡島大沼では1960年以降の堆積物のCN比が減少したが、これはリグニン由来フェノール濃度の変化としては現れていない。この理由は不明であるが、内部生産と陸上由来有機物の割合の違いを検出するためには、CN比とリグニン由来フェノール濃度を共に評価する必要があることを示している。木崎湖では、全有機炭素あたりのリグニン由来フェノールは約1mg/TOC100mgから、1940年頃には減少し始め、1960年頃からは0.6 mg/TOC100mg程度まで減少した。これはCN比の減少と一致しており、富栄養化が進行し、内部生産が卓越したことを意味している。木崎湖固体堆積物のS/V比は1、C/V比は0.5、Ad/Alvは0.5程度と過去100年間に顕著な

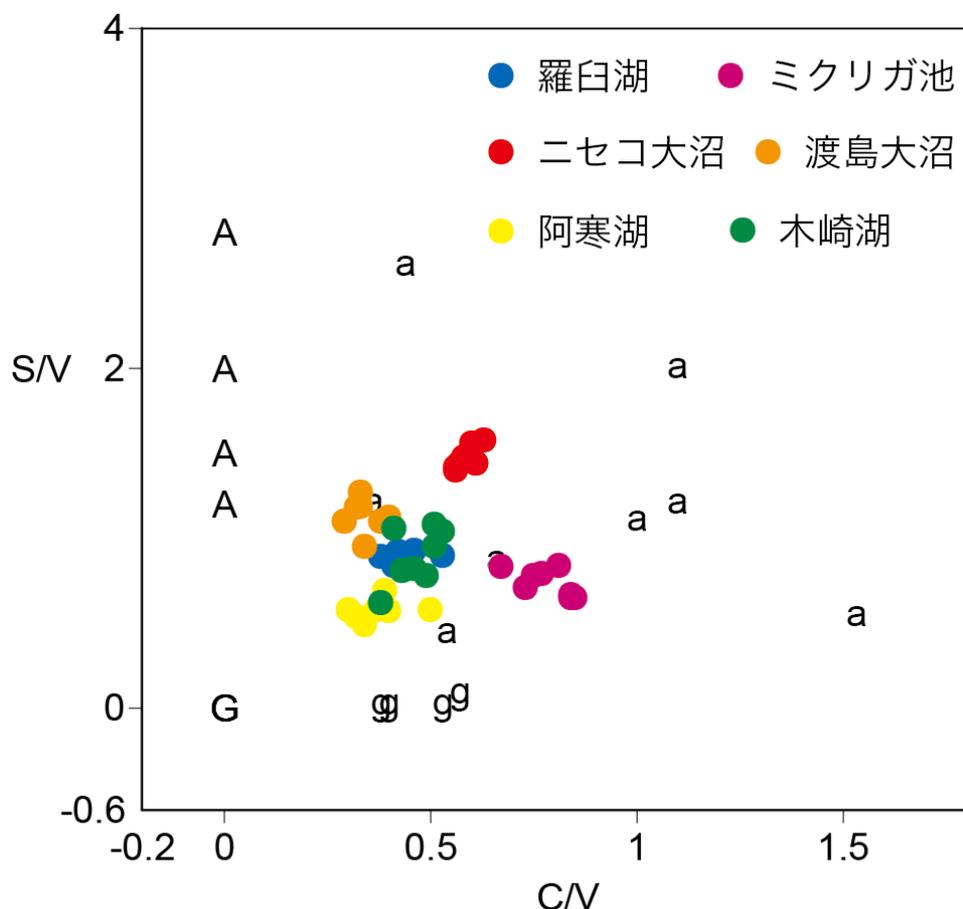


図 (3) - 7 阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の全有機炭素濃度、CN比（モル比）、炭素・窒素同位体比の変化（木崎湖の白抜きはタービダイト層）

羅臼湖、阿寒湖、ニセコ大沼、渡島大沼、ミクリガ池、木崎湖のS/V比とC/V比。G：裸子植物の木部組織、g：裸子植物の非木部組織、A：被子植物の木部組織、a：被子植物の非木部組織

変動は見られなかった。木崎湖では、タービダイト層が含まれているが（図（3）- 6の白抜き）、それらのリグニン由来フェノールの濃度や組成は、通常の堆積層と明瞭な違いはなかった。このことは、この集水域の陸上有機物における植生やそこに含まれるリグニン由来フェノールの含量が比較的均一であることを示唆している。

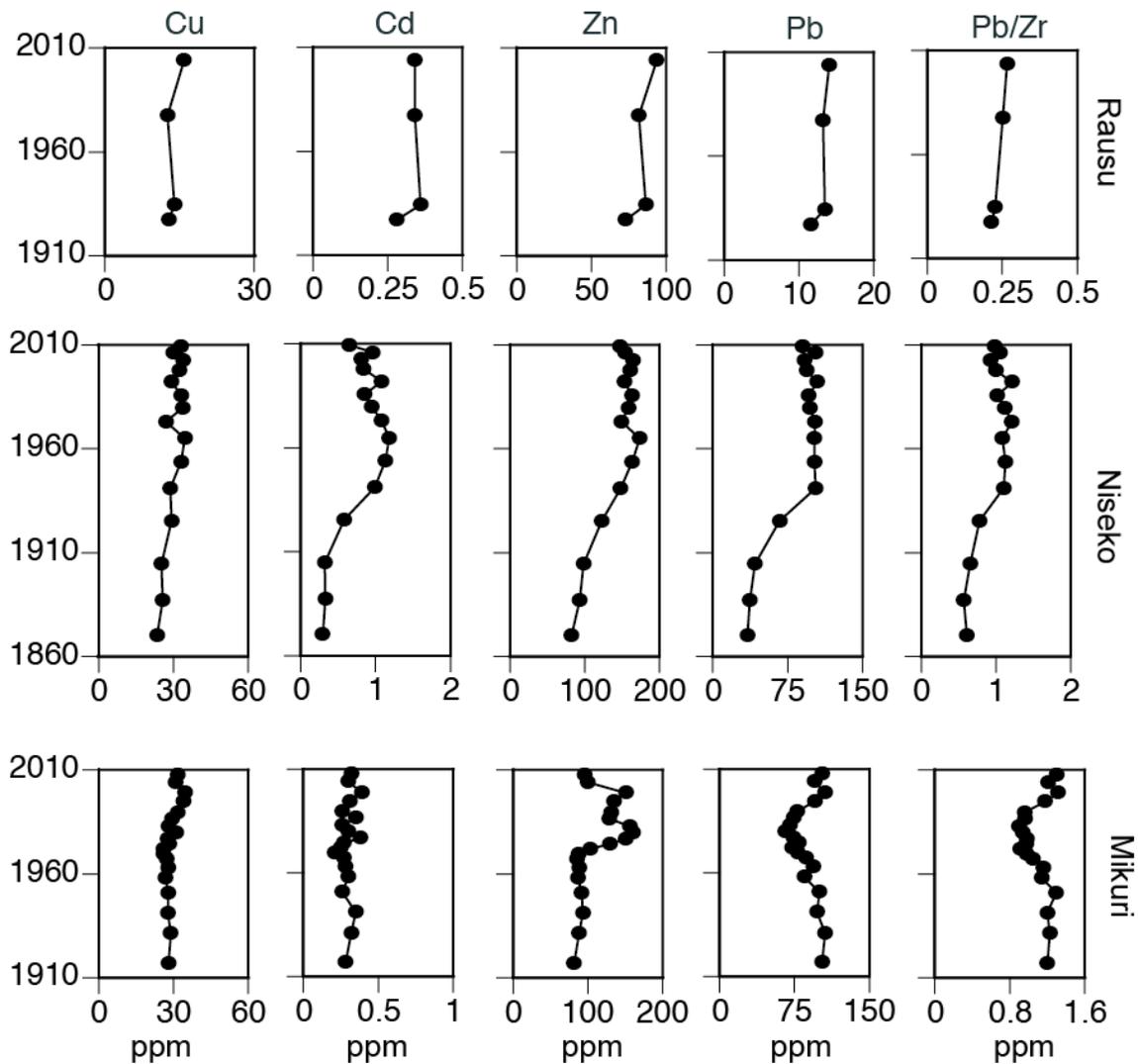
図（3）- 7に、今回の研究で対象とした6湖沼のS/V比とC/V比をプロットしたものを示す。湖沼間では、S/V比とC/V比では湖沼ごとに違うことがわかる。このプロットからは、多くの湖沼の植生は、被子植物の影響を強く受けていることがわかる。中でも、阿寒湖は裸子植物（針葉樹）、ニセコ大沼やミクリガ池は被子植物（広葉樹）がその集水域の主要な植生であることを示している。湖沼ごとのS/V比とC/V比と、湖沼ごとの植生との対応については、以下、花粉分析の項目で検討する。

重金属分析

近年の人間活動の影響は、窒素やリンなどの栄養塩のみならず、化石燃料の燃焼や鉱物資源の工業利用によって重金属の湖沼生態系への汚染を招いていることは広く知られている^{33, 34)}。一方で、排出規制によって重金属汚染が緩和されていることも知られている。例えば、Mahlerらはアメリカの35の湖沼の堆積物中の重金属濃度の変化を調べている³⁵⁾。その結果、アメリカの都市部の湖沼の多くで1970年から1990年にかけて、湖沼堆積物における鉛などの微量元素の濃度の減少が報告されており、その減少は法的規制による排出削減によるためであると考えられている。Mahlerらは、重金属ごとにその濃度変化のパターンが異なることを示し、アメリカやヨーロッパの湖沼で一般に見られる現象として、都市部では、鉛の主要な汚染源は、ガソリンに含まれる鉛であったが、1970年以降無鉛ガソリンの普及により、その排出量は激減し、堆積物中の鉛濃度の減少を報告している³⁵⁾。一方、カドミウム、クロム、銅、ニッケルは、工業過程に伴う排水や、廃棄物の燃焼、製鉄過程、化石燃料の燃焼などの過程で排出さ、多くの北米の湖沼で減少傾向にあるとしている。ただし、亜鉛については、タイヤやメッキ、製鉄、石炭燃焼、廃棄物焼却、塗装などが汚染源とされ、必ずしも減少傾向にあるとは言えないようである。また、これらの重金属は、流域から直接湖沼に流れ込むだけでなく、大気降下物として長距離輸送された後、堆積物に供給されることがヨーロッパや北米、日本を対象とした研究によって明らかになっている^{36, 37)}。

図（3）- 8に、本研究で対象とした山岳湖沼である羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の堆積物中の銅濃度、カドミウム濃度、亜鉛濃度、鉛濃度、鉛/ジルコン比の変化を示した。ここで、ジルコンは、風化に強く安定で人為由来の影響が少ない元素であるため、鉛/ジルコン比の変化は人為起源の鉛の供給量の変化の指標として広く用いられている³⁸⁾。羅臼湖では、銅濃度は約15ppm、カドミウム濃度は0.3ppm、亜鉛濃度は約80ppm、鉛濃度は10ppm、鉛/ジルコン比は0.25と、ほぼ一定であった。これは、上述の炭素窒素濃度、炭素窒素同位体比、リグニン由来フェノールの結果と一致して、過去100年間その環境が安定であったことを意味している。次に、ニセコ大沼では、銅濃度は約30ppmと比較的安定であったが、カドミウム濃度は1910年以降増加し、1960年の1ppmをピークに減少傾向を示している。亜鉛濃度もほぼ同様の傾向をしめし、1960年以降、微減している。鉛濃度も同様であり、1940年頃にピークを迎え、その後微減傾向を示している。これを反映して、鉛/ジルコン比は1910年から高まり、1940年頃からほぼ一定か微減傾向である。これらの元素については、約二倍程度の大きな濃度変化が見られたが、その理由はよくわかっていない。ニ

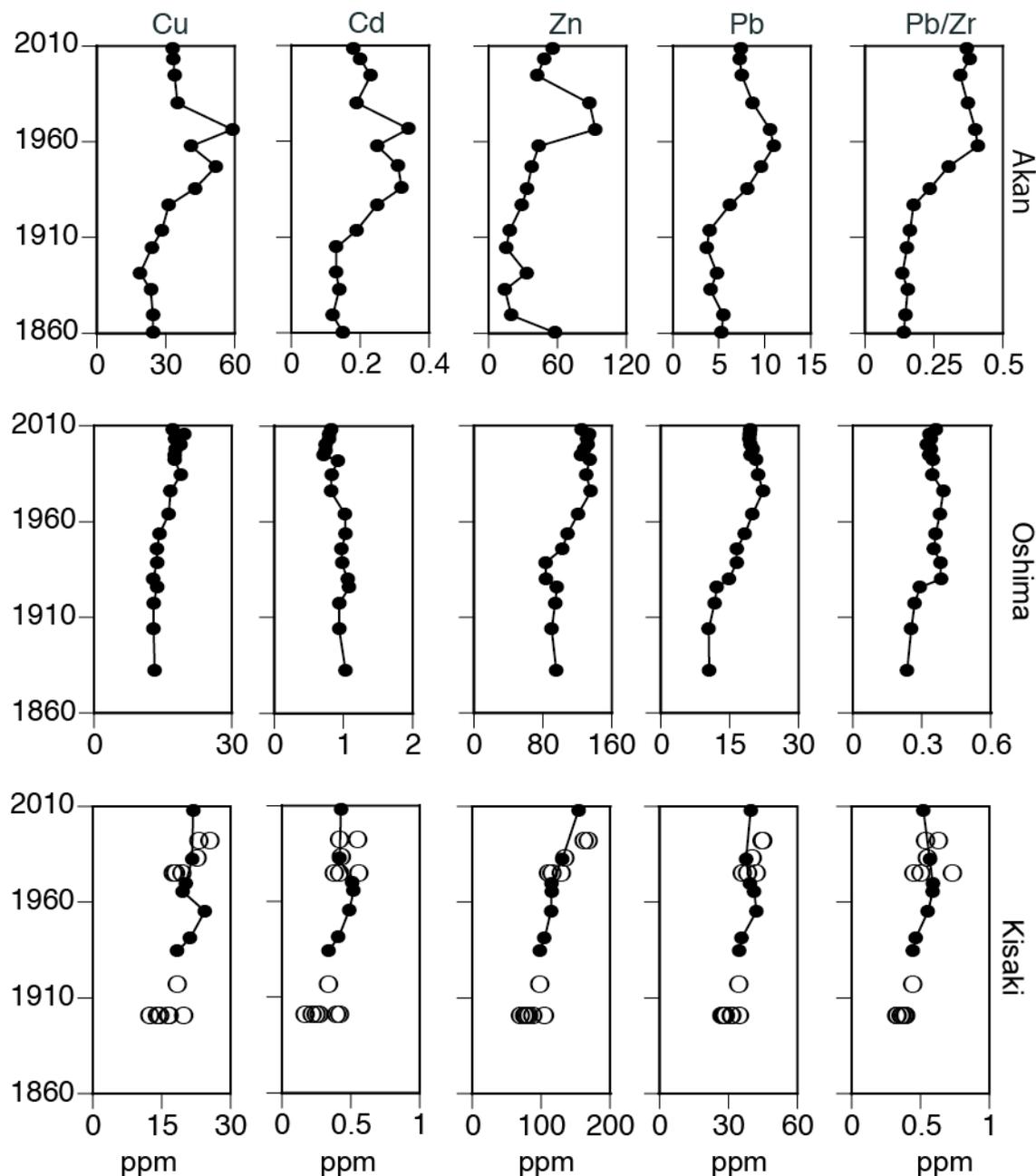
セコ大沼の集水域には、工場や都市などの重金属のソースがあるわけでもない。大気性降下物による変化も一要因ではあるが、Sr同位体比の項目で述べるように、流入する鉱物の供給源の大きな変化が確認されており、記録に残されていないような何らかの大きな流域レベルでの変化があったと考えられる。ミクリガ池の同濃度は約30ppmと一定、カドミウム濃度は0.3ppmとほぼ一定であった。しかし、亜鉛濃度は1960年を境に急激に90ppm程度から180ppm程度まで上昇し、表層で減少した。鉛濃度は80ppm程度であったが、1960年に減少し、その後1980年頃から再び上昇傾向に転じている。鉛/ジルコン比も同様の傾向を示している。ニセコ大沼同様、ミクリガ池も、流域に大きな人間活動の影響が見当たらない。しかし、ミクリガ池は、中部山岳国立公園の立山黒部アルペンルートに位置し、1964年の立山・黒部アルペンルートの全線開通以来、路線バスなどの乗り入れが行われている。上述したように、亜鉛は、タイヤなどの成分として道路周辺で鉛濃度が見られることが知られている³⁵⁾。そのため、この道路開設と何らかの関係が考えられる。また、1970年頃の鉛濃度の減少の要因に関しては、無鉛ガソリンの普及が要因と考えられるが、よくわからない。鉛/ジルコン比も同様の傾向を示すことから、外部からの鉛供給が減少したと考えられる。



図(3)-8 羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の堆積物におけるCu濃度、Cd濃度、Zn濃度、Pb濃度、Pb/Zr比の変化

一つの要因は、1970年頃から普及が始まった無鉛ガソリンの影響であろう。ただし、1900年から高い鉛濃度が継続して続いていたのかは、よくわからない。その減少に引き続き、ミクリガ池の堆積物では1980年以降、鉛濃度が増加している。1980年以降の鉛濃度の変化は、小笠原の珊瑚の鉛濃度にも見られており、Inoue and Tanimizu(2008)では、アジア大陸起源の大気降下物をその要因としている⁹⁾。ミクリガ池も日本海に面しており、同様の要因による鉛濃度の変動の可能性が考えられる。

図(3)-9に、低地湖沼である阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の堆積物中の銅濃度、カドミウム濃度、亜鉛濃度、鉛濃度、鉛/ジルコン比の変化を示した。阿寒湖では、1910年以降、銅濃度

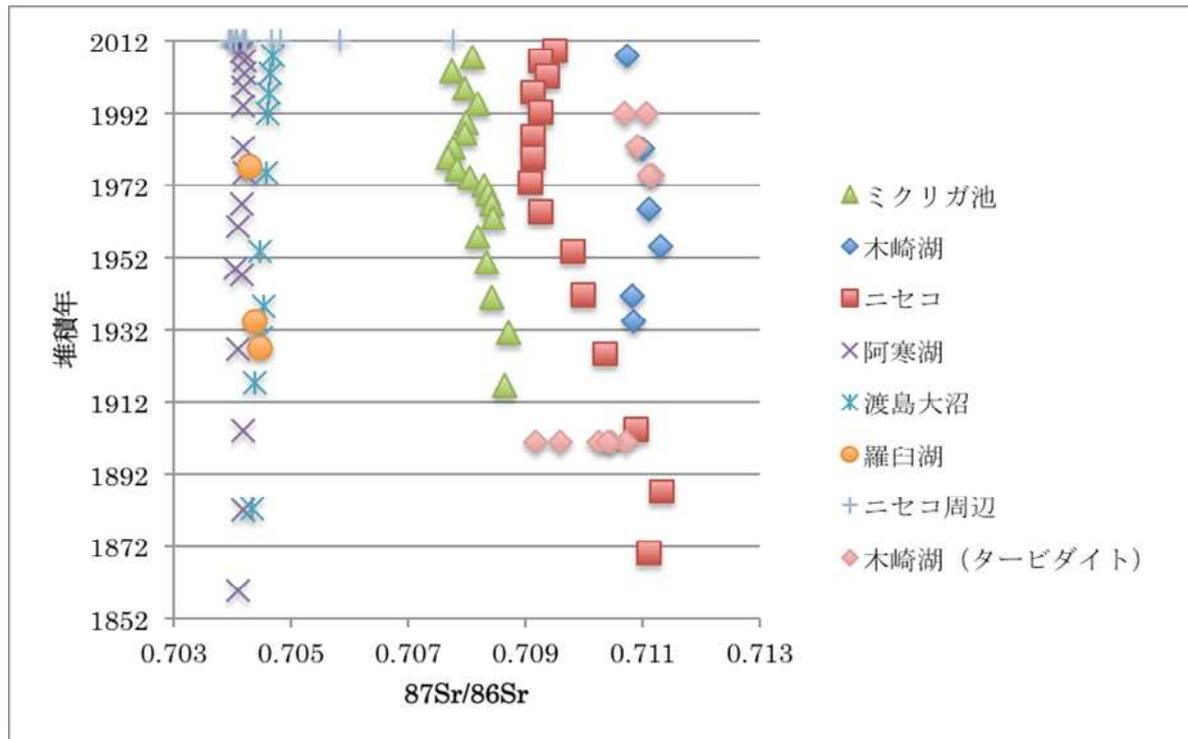


図(3)-9 阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の堆積物におけるCu濃度、Cd濃度、Zn濃度、Pb濃度、Pb/Zr比の変化

が30ppmから1930年頃に上昇し、1960年頃には60ppmとなった。その後、減少を始め、1980年頃には30ppm程度まで減少し一定となった。カドミウム濃度は、0.2ppmから0.4ppm、亜鉛濃度は20ppmから80ppmまで増加し、そのパターンは銅濃度と同様であった。鉛濃度は、1910年頃から上昇を始め、1960年を境に減少し最表層で8ppm程度となった。鉛/ジルコン比も鉛濃度と同様の变化を示した。銅、カドミウム、亜鉛濃度の变化は、上述したように周辺の人口増加や観光地化などの影響があると考えられる。鉛濃度の变化については、東京湾や大阪湾で見られる変化と類似している^{39, 40)}。これは戦前の日本の工業化とその後の無鉛ガソリンの普及による変化であると解釈されている。渡島大沼においては、銅濃度は15ppm、カドミウム濃度は1ppmでほぼ一定であった。亜鉛濃度は80ppm程度であったのが、1945年頃から上昇を始め、1980年以降、約150ppmで一定か微減の傾向を示した。鉛濃度も同様の傾向を示し、1945年頃に10ppmから上昇を始め、1980年頃に20ppmになった。その後、表層に向かい減少傾向を示した。この傾向は鉛/ジルコン比にも反映されている。この変化は、窒素同位体比の変化にも見られるような、周辺環境の工業化などの影響が大きいのであろう。ここで注目すべきは、亜鉛や鉛濃度の变化は窒素同位体比の変化よりも遅いことである。重金属濃度に変化を与えるような工業化は、窒素同位体比の変化を引き起こした変化要因（流域の人口増加）と比べて時間的な遅れが生じたということであろう。このあたりは、七飯町の人口統計などを精査すれば検証できるはずである。木崎湖では、下層部がタービダイト層となってしまったため、詳細はわからない。1945年頃に銅濃度が15ppmから増加し、その後1960年以降は一定であった。カドミウム濃度も同様に、0.3ppmから増加を始め、1960年をピークにやや減少して0.4ppm程度を保っている。亜鉛濃度は100ppmから増加し、減少傾向を示すことなく表層で150ppmであった。鉛濃度は30ppmから増加し、1960年頃から40ppmで一定、その後やや減少傾向を示し表層に至っている。鉛/ジルコン比でもこの傾向が見られ、何らかの鉛の供給がその時期に合ったことを示している。これら木崎湖で見られたような銅濃度やカドミウム濃度の減少、亜鉛濃度が減少傾向を示さない、鉛濃度は1960年頃を境にやや減少というパターンは、北米の湖沼で見られたパターンと一致している。以上、道東、道南、本州中部という地理的な違いはあるが、低地湖沼で見られた重金属濃度の变化は、共通しているパターンが多いと言える。

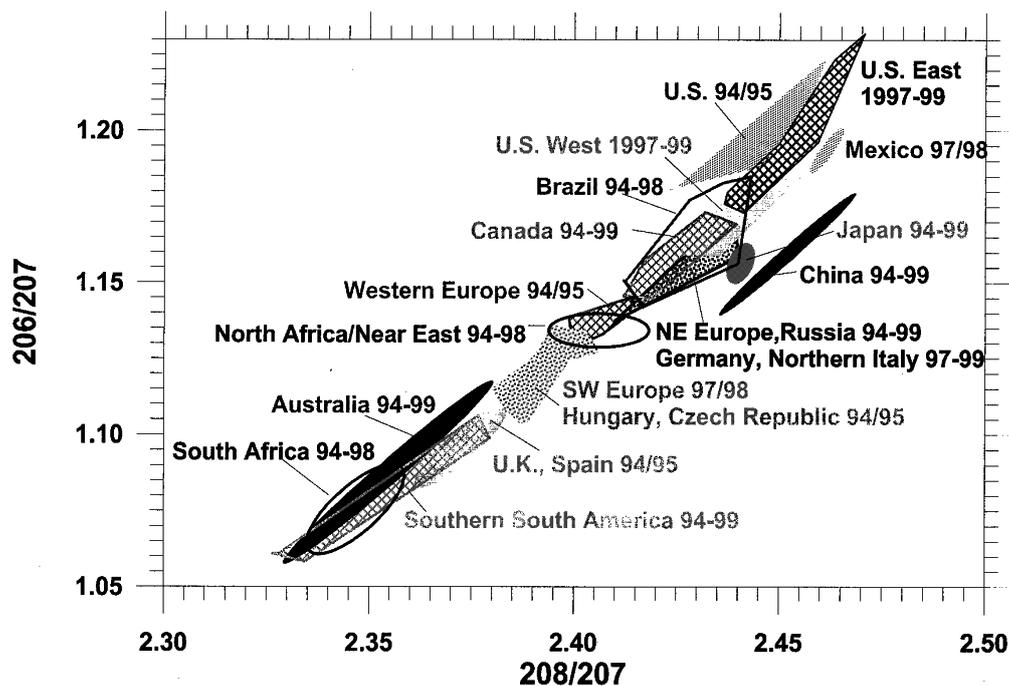
ストロンチウム同位体比の変化

ストロンチウムは原子番号が38であり、アルカリ土類金属の一つである。質量数84、86、87、88の4つの安定同位体を持ち、その同位体比は通常 $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ として表される。 ^{87}Sr はルビジウム(^{87}Rb)のベータ壊変によって生成される⁴¹⁾。岩石のストロンチウム同位体比は、岩石が形成された年代、その形成当時におけるSr同位体比（初生値）、Rb/Sr比によって決まる。従って、地質が異なる地域間の岩石では、ストロンチウム同位体比が異なる可能性がある。そのため、湖底堆積物のストロンチウム同位体比を測定することで、堆積物を構成する鉱物の供給源に変化があったかどうか分かる。一般に、大陸地殻を構成する深成岩である花崗岩や堆積岩は、Rbに富む鉱物からなり、ストロンチウム同位体比は高く(>0.710)、海底地殻を構成する火山岩である玄武岩や、日本のような島弧を構成する安山岩のストロンチウム同位体比は低い(0.703~0.706)。

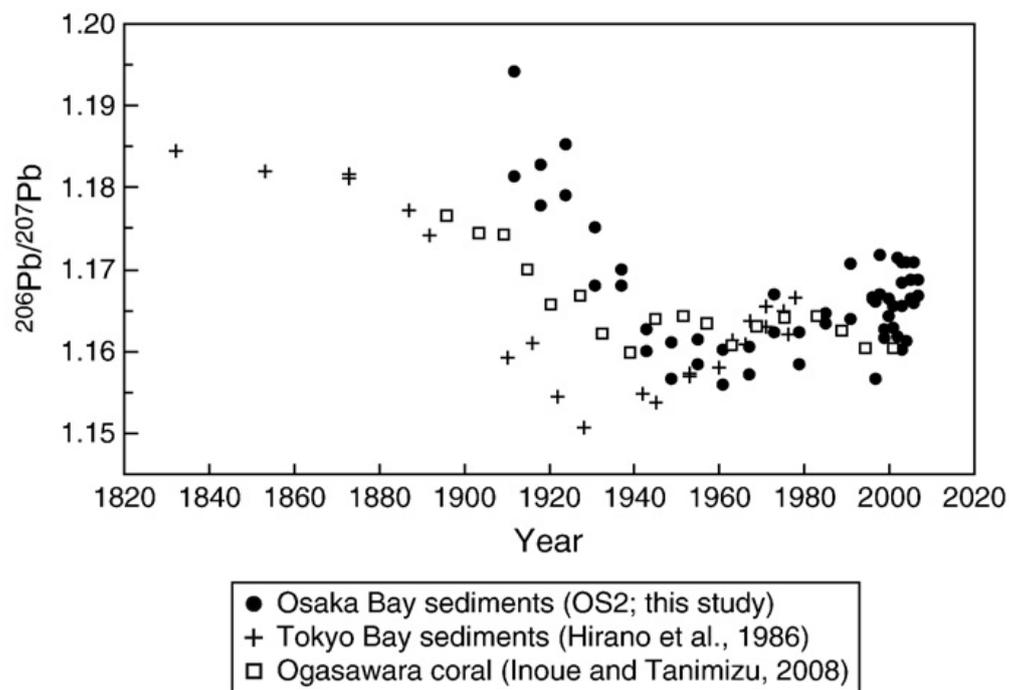


図(3)-10 羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池、阿寒湖、渡島大沼、木崎湖(及びタービダイト層)、ニセコ大沼湖沼周辺土壌のストロンチウム同位体比($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$)

図(3)-10に羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池、阿寒湖、渡島大沼、木崎湖、ニセコ大沼、ニセコ大沼湖岸土壌のストロンチウム同位体比を示す。羅臼湖、阿寒湖などのカルデラ湖の地質は火山岩からなり、若い火山岩特有の低いストロンチウム同位体比(0.704)を持つ。堰き止め湖である渡島大沼も同様にその地質に火山岩を持ち、低いストロンチウム同位体比を示す(0.704)。一方、地質図(<http://www.gsj.jp/researches/geodb/geonavi.html>)に依れば、ミクリガ池の周辺は花崗岩であり、予想された比較的高い値(0.709)を示す。木崎湖の周辺は堆積岩からなりこれも高い値(0.711)を示している。1900年頃のタービダイト層については、0.709と低いストロンチウムを持ち、流域からの鉱物の供給源に変化があったことを示している。特に興味深いことに、ニセコ大沼のストロンチウム同位体比の値は1900年頃の0.711から大きく減少し、1960年頃から0.709とほぼ一定の値を示した。特にニセコ大沼の地質は火山岩であり、低いストロンチウム同位体比を持つと考えられるが、その値は深成岩のように高い値をもつ。実際、湖沼の周辺で採取した土壌のストロンチウム同位体比は0.704から0.707と分布している。従って、今回見られたストロンチウム同位体比の変化は、過去に高いストロンチウム同位体比をもつ鉱物が多く供給され、現在はその影響が弱まっていると考えられる。現在のところ、その要因はわからないが、例えば0.715から0.720と高い値をもつ黄砂の影響も考えられる⁴²⁻⁴⁴。また、上述したように、硫黄鉱山の本格的採掘の時期とストロンチウム同位体比の変化の時期は一致しているようであり、その影響が推測されるものの、周辺にストロンチウム同位体比が高い地質は見られないことから、どれほどの影響があったのかはわからない。ただし、ストロンチウム同位体比が変化したという知見は重要である。なぜならニセコ大沼の堆積物で見られた鉛や亜鉛などの重金属濃度の変化は、これら特定の元素が人為影響によって湖内に負荷されたわけではなく、流域の鉱物の供給源が変化し



図(3)-11 1994年から1999年に採集された大気浮遊粒子の鉛同位体組成マップ。Bollhöfer and Rosman より。

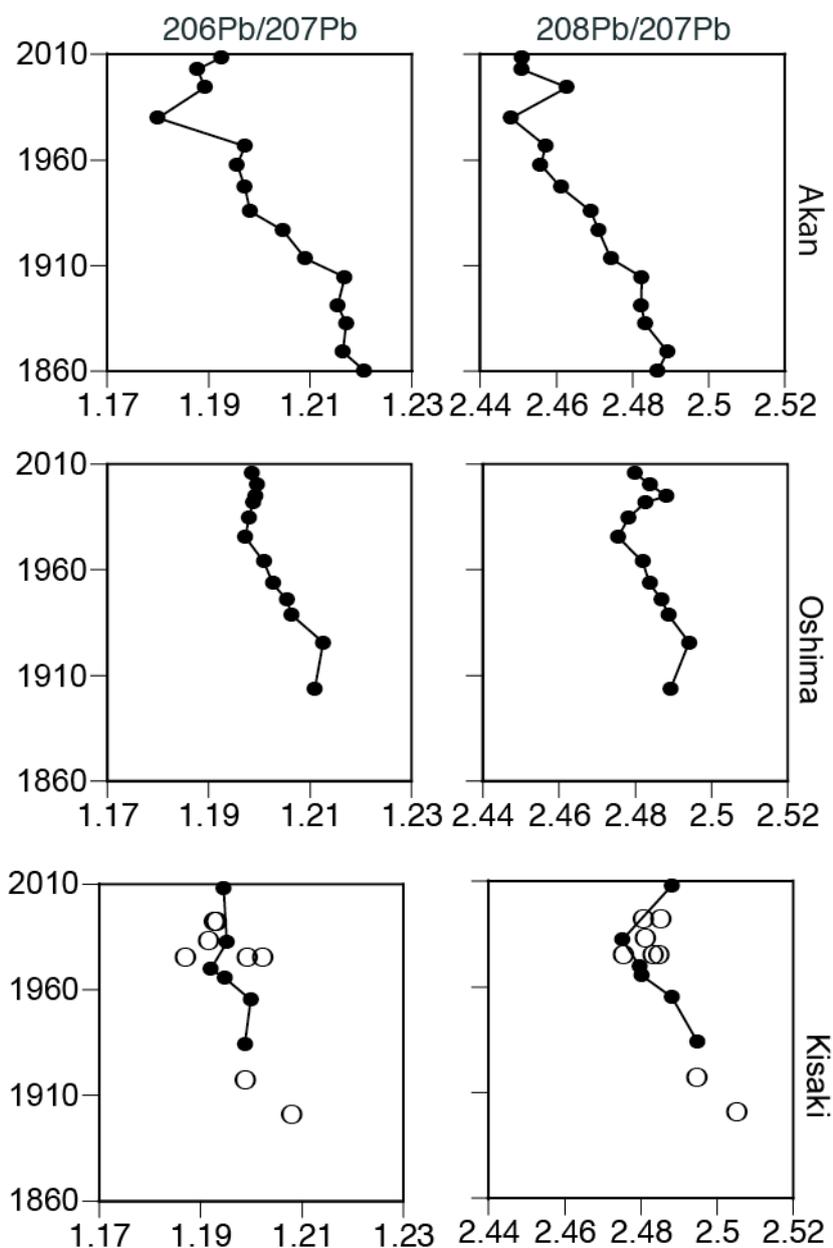


図(3)-12 東京湾と大阪湾の堆積物、小笠原の珊瑚の鉛同位体比($^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$)の変化。Hosono 他より。

た結果による可能性を示唆しているからである。

鉛同位体

鉛同位体比は、鉛鉱物が生成した年齢や、そのときの地質条件によって決まってくる。鉛同位体の ^{206}Pb 、 ^{207}Pb 、 ^{208}Pb は、それぞれ ^{238}U 、 ^{235}U 、 ^{232}Th の放射壊変によって生成される。よって、その初生値やUやThの存在量、年代によって鉛同位体の組成は決まる。そのため、ストロンチウム同位体比と同様に、鉛鉱物はその産地ごとに特徴的な鉛同位体比を持つことが知られている(図(3)-11⁴⁵⁾)。このことを利用して、環境科学の分野では、鉛汚染を引き起こす鉛の由来を探るのに用いられてきた。例えば、Hirao他(1986)は東京湾の堆積物の鉛濃度や同位体比の変化から、日



図(3)-13 阿寒湖、渡島大沼、木崎湖における鉛同位体比($^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$)の変化

本で利用される鉛の由来の変遷を明らかにした⁴⁰⁾。また、Hosono 他 (2010) では、大阪湾を対象に同様の研究を行い、類似した鉛同位体比の変化を報告している (図 (3) - 1 2)³⁹⁾。この変動は以下のように説明できる。1900年までは主に²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pbが1.176から1.190の国産鉛を利用していたため、高い値を示していた。次に、1900年から1940年には1.077から1.127まで減少したがこれは輸入鉛 (1.05) の値を反映していると考えている。次に、1940年から1980年には鉛の輸入元が変化するため1.158から1.170に上昇した。このように鉛は流域の都市や工場から排出されるだけではない。長距離輸送によって鉛汚染が国境を越え広がるのが、大気中浮遊粒子や降水中に含まれる重金属の組成や鉛の同位体比から報告されている⁴⁶⁻⁵⁰⁾。

図 (3) - 1 3 に、羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の堆積物の鉛同位体比 (²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb、²⁰⁸Pb/²⁰⁷Pb) の変化を示す。羅臼湖の²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb比は約1.20、²⁰⁸Pb/²⁰⁷Pb比は2.47と大きな変化はなく、本研究における他の測定項目と同様に、過去100年間に大きな変化は見られないことを意味している。一方、ニセコ大沼では、²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb比は1860年頃の1.22から1910年に1.19まで低下しその後、1960年頃から1.18程度で一定であった。²⁰⁸Pb/²⁰⁷Pb比は、2.48から1910年頃から低下を始め、²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb

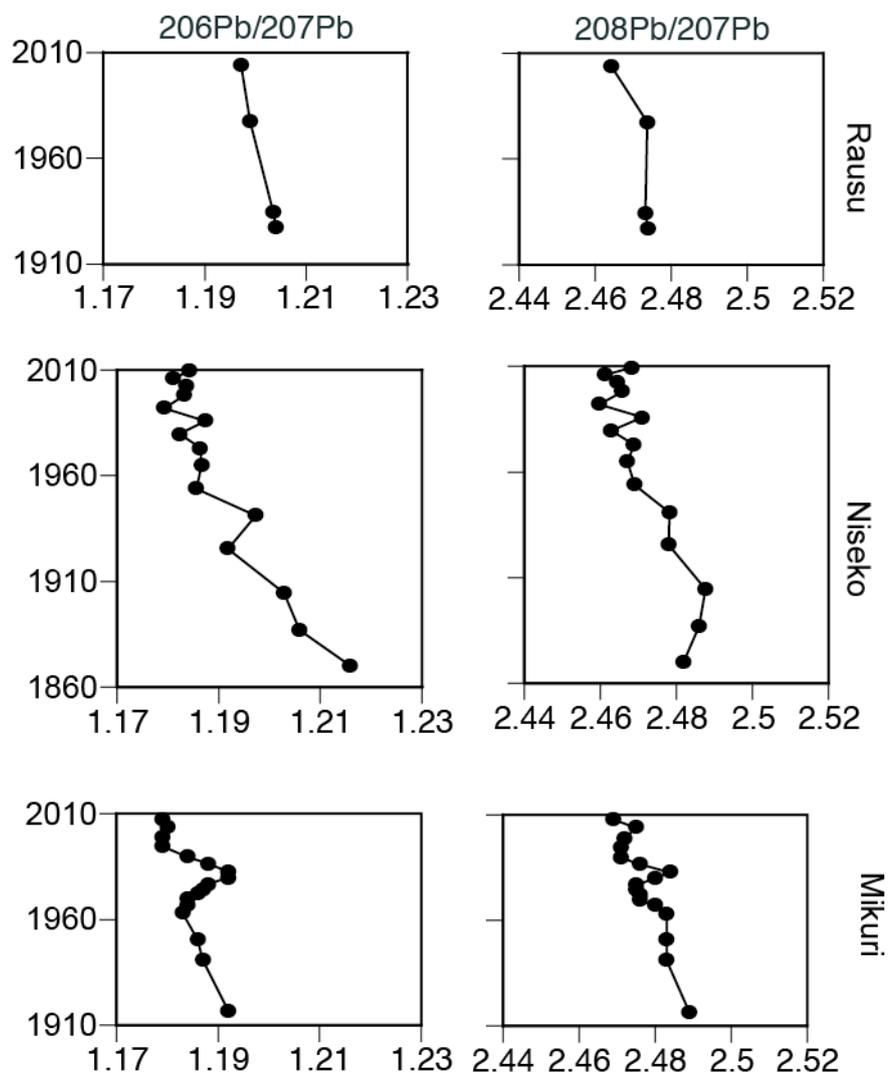
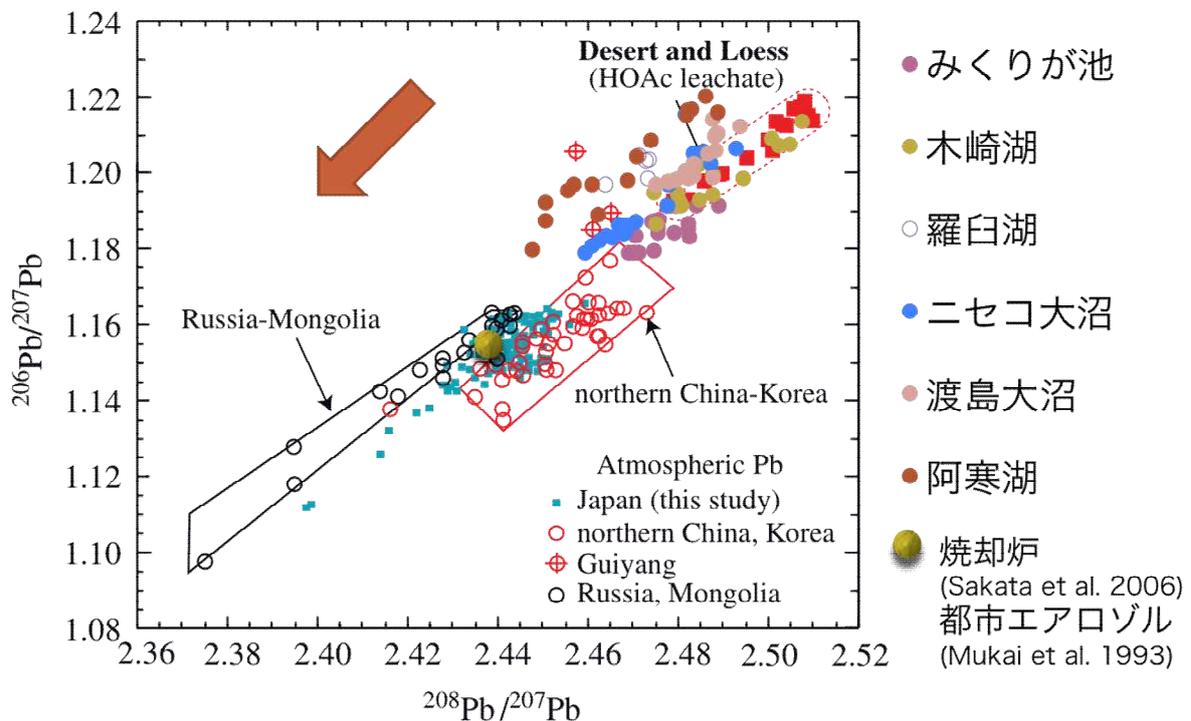


図 (3) - 1 4 羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の堆積物における鉛同位体比 (²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb、²⁰⁸Pb/²⁰⁷Pb) の変化

比と同様に1960年頃から2.47でほぼ一定となった。このニセコ大沼の $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ は、上記の都市部の湾や小笠原珊瑚に見られたパターンと非常によく似ている。ニセコ大沼の集水域には、住宅街や都市などの鉛の供給源がないため、この鉛同位体比の変化は大気性降水によるものであると考えられる。次に、ミクリガ池の $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比は1910年の1.19から1960年にかけて1.18へと減少し、1980年頃に1.19に再び戻った後、1.18に減少した。 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比は2.49から1960年にかけて2.47まで減少した後、ほぼ一定であった。この $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比が上昇する時期は、上述の鉛濃度が減少する時期に一致しており、 $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比が低い鉛の流入が減少したことを意味しているのであろう。これらの結果から、集水域に人家や工場がない山岳湖沼であっても、大気降水物として、鉛鉱物の起源あるいは工業用鉛の輸入先を変えつつ鉛などの重金属が流入していることを意味している。

図(3)-14に低地湖沼の阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の堆積物の鉛同位体比($^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$)の変化を示す。阿寒湖では、1860年から1910年まで $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ は1.22で一定であったが、1910年頃から減少し始め、1945年頃には1.19となった。その後1960年まで一定であり、それ以降やや減少した。 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ についても、同様に1910年に2.49から減少を始め、1960年頃には2.45程度となった。渡島大沼でも同様のパターンが見られた。1910年頃から $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ が1.21から減少し始め、1960年以降は1.20とほぼ一定になった。 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ もほぼ同様の値を示し、2.49から1960年には2.48まで減少し、その後やや上昇傾向をしめした。木崎湖では、タービダイト層の影響で1910年以前の $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比は不明瞭であるが、1910年頃から減少を始め、1960年頃にやや上昇しその後



図(3)-15 日本で採集されたエアロゾルや降水の鉛の同位体比(Nakano 他 2006より)に本研究の湖沼堆積物の鉛同位体比を重ねた。日本の都市やその焼却炉で採集された採集で見られる鉛の同位体比も合わせて示した。

一定であった。 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ についても、同様の変化が見られ1910年から減少し、1960年以降、やや上昇傾向を示した。これらの変化は、1910年頃からの $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 比の減少や上述の堆積物中の鉛濃度の増加、1980年以降の鉛濃度の減少は東京湾や大阪湾で見られたパターンと一致している（図（3）- 1 2）。これらの結果は、過去100年間日本の東京湾や大阪湾の堆積物で見られた鉛の負荷やその起源の変化は、東京や大阪のような大都市だけではなく、日本の多くの低地で見られた一般的な減少である可能性を示している。

図（3）- 1 5⁴⁶⁾には、今回の研究で対象とした6湖沼堆積物の $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ 、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ を示した。また、先行研究で採集されたロシアやモンゴル、中国や韓国、そして日本で採集された浮遊微粒子や降水中に含まれる鉛の同位体比も示している。さらに、日本の焼却炉や都市部で採集された浮遊微粒子の鉛同位体比も表示している。上述したように、羅臼湖を除く5つの湖沼で、その鉛同位体比は $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ や $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ が減少する傾向を示している。このことは、図（3）- 1 5で示している日本で観察される降水や浮遊微粒子などの大気降下物の影響を受け続けていることを反映していると考えられる。いくつかの研究では、隠岐島や新潟、盛岡など日本海側の都市について、大気降下物の鉛の起源は、特に冬場にアジア大陸からの影響が強いことを鉛同位体比の変動から指摘している⁴⁶⁾。特に中国や韓国での大気降下物の鉛同位体比は、 ^{208}Pb の存在比が高い特徴がある。その観点でみると、今回観察された湖沼の堆積物も日本海側に位置する湖沼、ミクリガ池で、 $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ の比が相対的に高く、1980年度の以降の堆積物中の鉛濃度の上昇と合わせて、中国からの鉛の影響をより強く受けている可能性がある。ただし、以下の点から、鉛同位体比から、その由来の推定を行うには注意が必要であると考えられる。まず、比較対象である中国やロシアの鉛同位体比は1990年代はじめに報告された値を用いており、試料採集の当時の鉛同位体比がその値であったかどうかかわからない。また、日本で使用される鉛関連質（石油や石炭、バッテリー、溶剤など）の同位体比にも大きなばらつきが報告されており⁸⁾、日本で観察される鉛の由来の推定に必須であるべき「日本が排出する鉛の同位体比」の把握が不十分である。日本で観察される大気性降下物の鉛同位体比の多くが、焼却炉から排出される灰と非常に近い鉛同位体比を持つことが知られている^{48, 51)}。今後、日本各地の焼却炉など鉛の排出源と考えられる箇所からの多くの試料を採集し、その鉛同位体比を決定する作業が必要であろう。

花粉分析

堆積物中のリグニン由来フェノールによる植生の解析は、対象とする集水域の裸子植物や被子植物などの大まかな植生を対象とする。花粉分析はより細かい分類群（時によっては種まで）に関する情報をもたらすが、花粉が風によって運ばれるため集水域を超えたより広域の植生を反映する²⁸⁾。

図（3）- 1 6、1 7、1 8に山岳湖沼である羅臼湖、ニセコ大沼、ミクリガ池の花粉分析の結果を示す。ハイマツ群落に囲まれた羅臼湖では、カバノキ属、ハンノキ属、コナラ亜属の花粉が優占するものの、マツ属単維管束亜属花粉が比較的高い出現率を示した。時系列的にみる

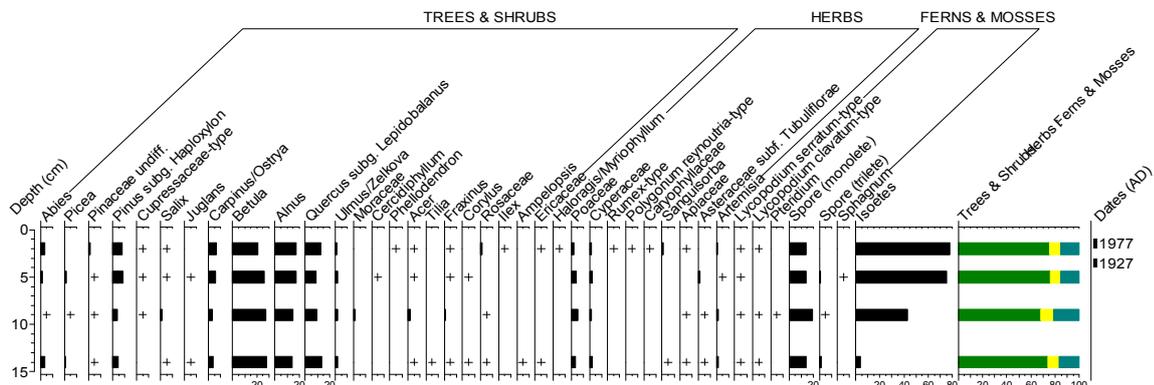


図 (3) - 1 6 羅臼湖の花粉分析の結果

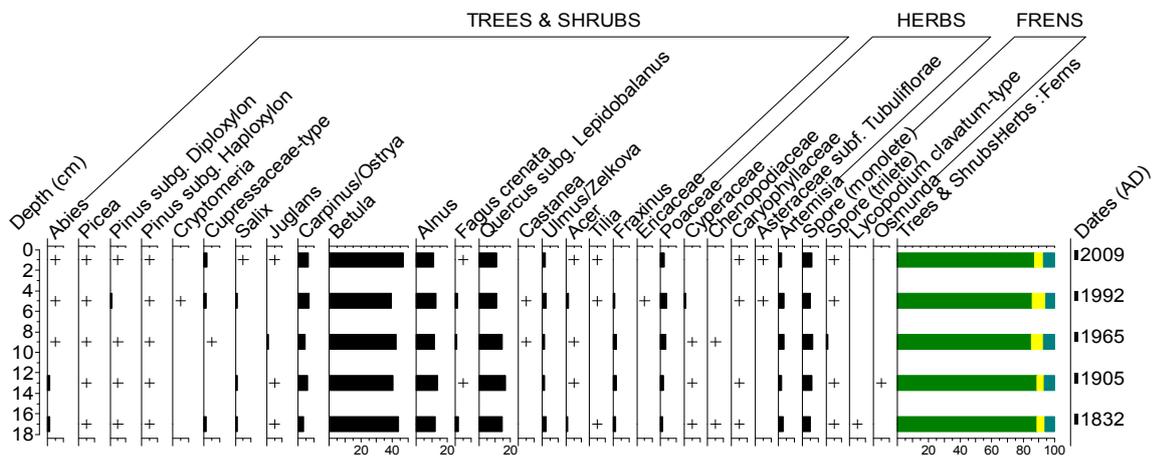


図 (3) - 1 7 ニセコ大沼の花粉分析の結果

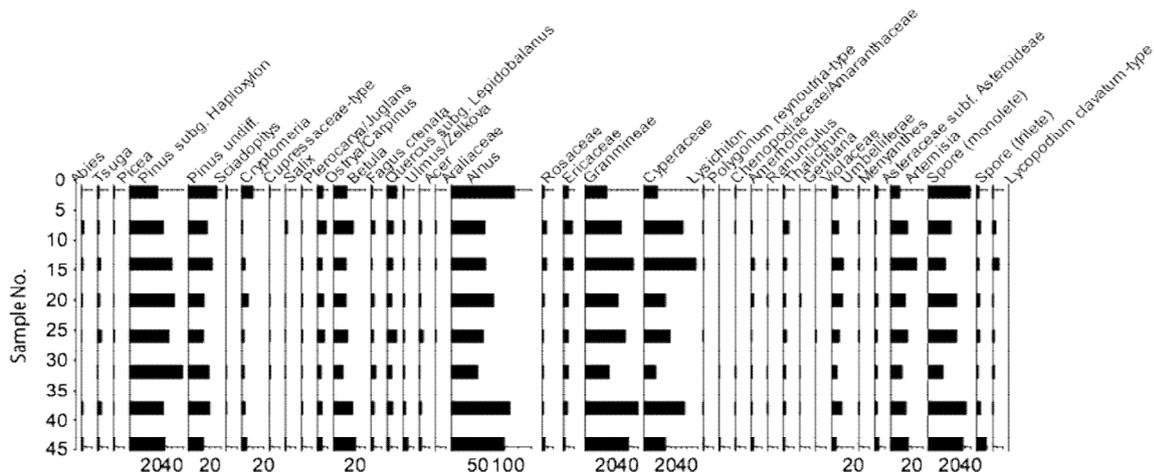


図 (3) - 1 8 ミクリガ池の花粉分析の結果

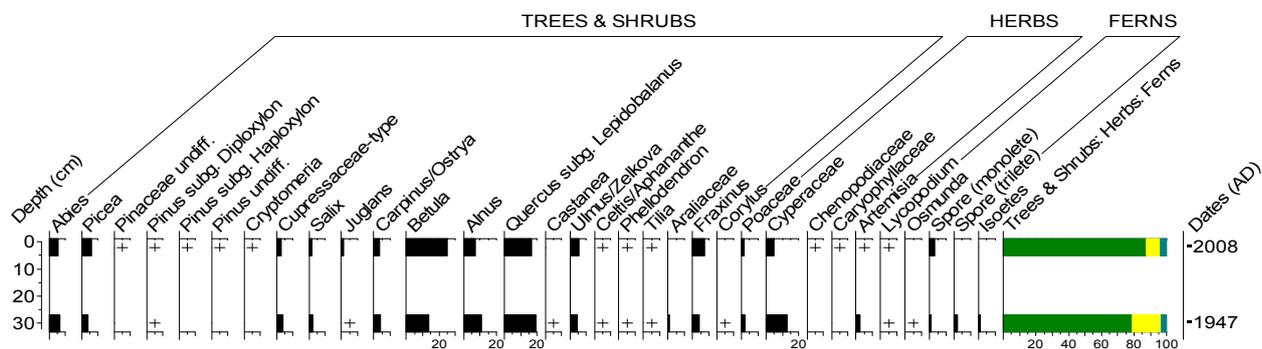


図 (3) - 1 9 阿 寒 湖 の 花 粉 分 析 の 結 果

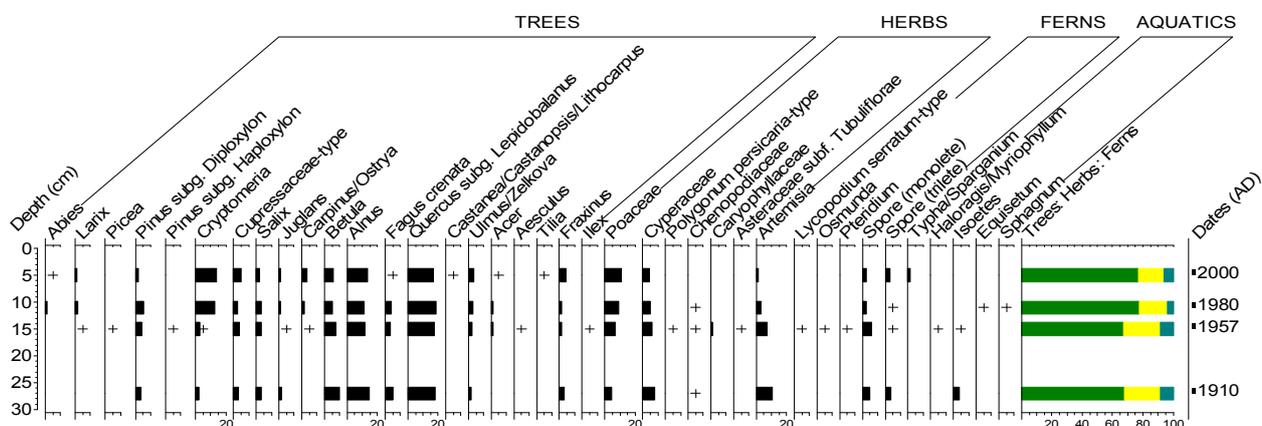


図 (3) - 2 0 渡 島 大 沼 の 花 粉 分 析 結 果

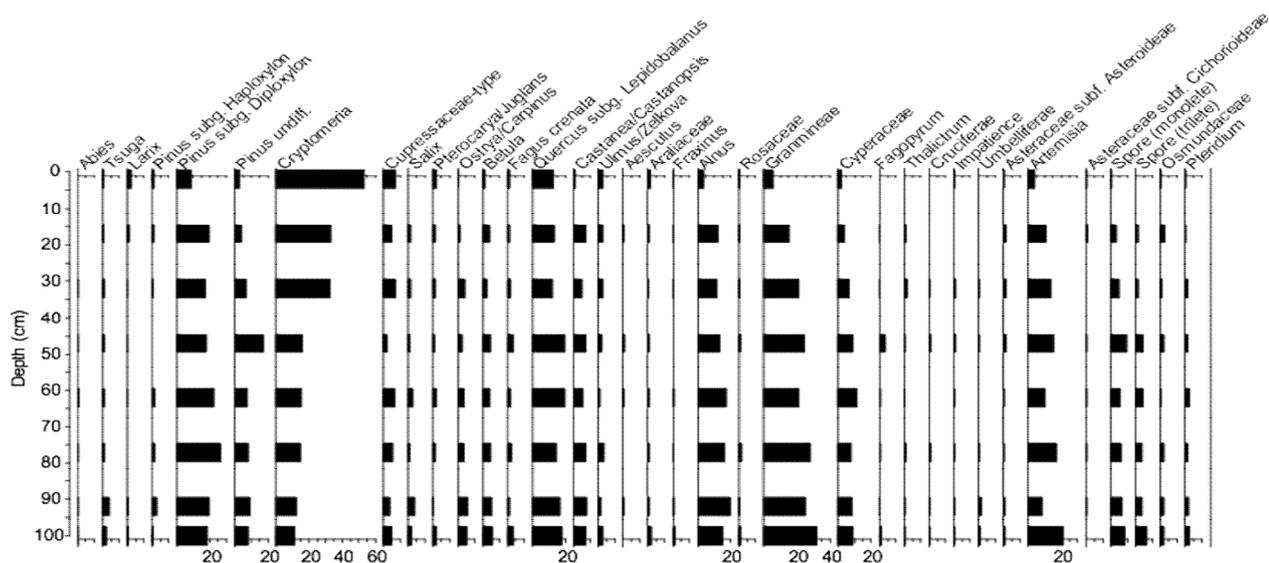
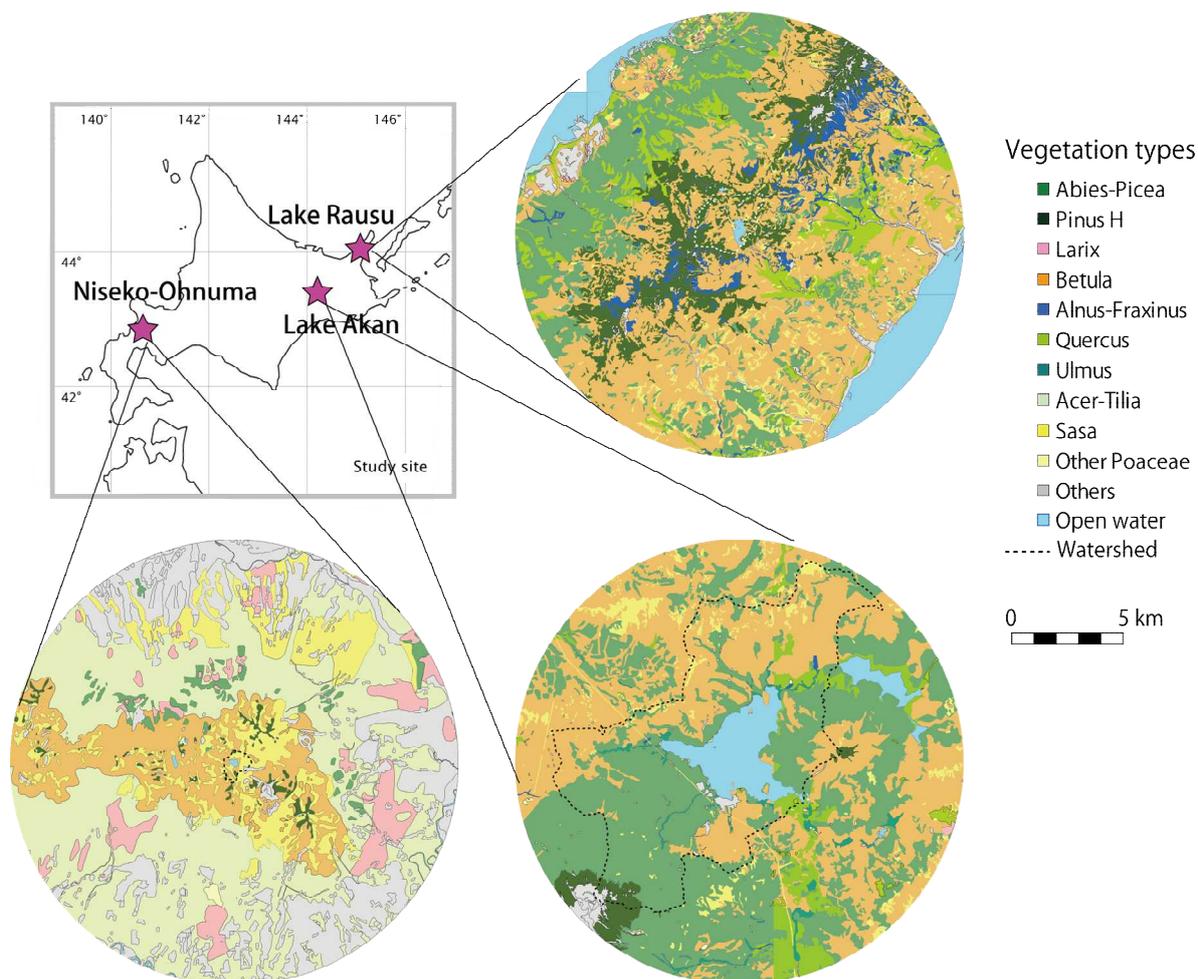


図 (3) - 2 1 木 崎 湖 の 花 粉 分 析 の 結 果

と、陸上植物の花粉組成に大きな変化はみとめられないが、水生植物であるミズナラ胞子が表層に向かって増加しており、長期的な水位変化があった可能性が示唆された。周辺にダケカンバ林の多いニセコ大沼では、カバノキ属花粉が卓越し、これにコナラ亜属、ハンノキ属、クマシデ属/アサダ属花粉などの落葉広葉樹花粉をともなった。針葉樹花粉は非常に低率であった。時系列的な変化はみられなかった。ハイマツやアオノツガザクラなどの高山植生に覆われたミクリガ池では、マツ属単維管束亜属やハンノキ属花粉が優占し、これにカバノキ属、クマシデ属/アサダ属、ツツジ科、バラ科花粉をともなう花粉組成が得られた。時系列的には、大きな変化はみられなかった。

図(3) - 19、20、21に低地湖沼である阿寒湖、渡島大沼、木崎湖の花粉分析の結果を示す。集水域にトドマツ・エゾマツ林が多い阿寒湖(2010年採取)では、カバノキ属、コナラ亜属花粉が優占するものの、モミ属ならびにトウヒ属花粉が5%以上の比較的高い出現率を示した。少なくとも過去50年間については、時系列的な変化はみられなかった。一方、ミズナラ林やカラマツ・スギ植林地が多い渡島大沼では、堆積物下層ではコナラ亜属やハンノキ属花粉が優占し、カバノキ属やブナ花粉をともなう花粉組成であったが、1960年頃の層準以降、ブナ花粉が減少する一方、スギ並びにカラマツ属の花粉が増加する傾向がみられた。アカマツ・コナラ二次林が多い木崎湖でも、堆積物下層ではマツ属複維管束亜属やコナラ亜属が優占する花粉組成であったが、1960年頃の層準以降、これらが減少する一方、カラマツ属ならびにスギ花粉が増加するという変化がみられた。

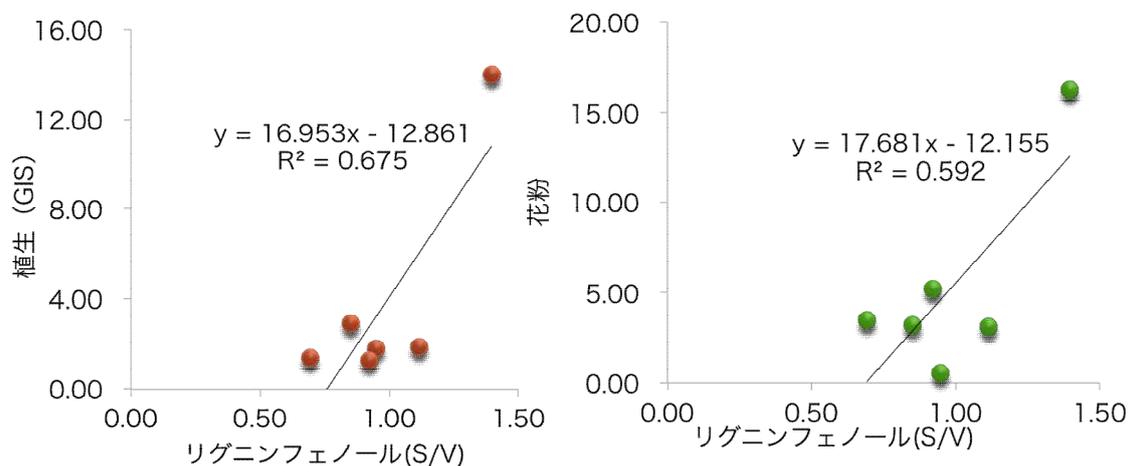


図(3) - 22 羅臼、阿寒湖、ニセコ大沼とその周辺の植生

以上から、過去100年という近過去に、山岳湖沼の周辺では、大きな植生変化がなかったこと、低地湖沼では、道南や本州中部では、1960年頃からスギやカラマツの花粉が多く見られ、戦後のスギを中心とした拡大造林の影響を強く反映している。この現象は、琵琶湖など西日本の湖沼でも既に報告されている。これは日本の多くの湖沼で観察されるパターンであると考えられる。

リグニン由来フェノールと植生GISと花粉組成の関係

リグニン由来フェノールがその集水域の植生（図（3）- 2 2）をどれほど正確にしているのか、これまで検討した例は、ほとんどない。図（3）- 2 3に、今回リグニン由来フェノールで得られたS/V比（裸子植物/被子植物比）と植生GISから求めた集水域の被子植物と裸子植物の被覆の比、そして花粉の組成から求められる被子植物と裸子植物の比との関係を示す。これら2つとも大まかには、正の相関は見られる。しかし、シラカバやササに覆われているニセコのような極端な集水域を含むため、それ以外では関係性は明確ではない。この要因として、針葉樹や広葉樹など樹種ごとに一時生産性が異なることがあげられる。また、花粉との対応についてもニセコのような極端な例を除き、その関係性は不明瞭である。これは上述したように、花粉の飛散距離と、リグニン由来フェノールによって評価される植物遺体の輸送の空間スケールが異なることを反映していると考えられる。今後、対象とする地点数を増やすことで、これらの指標同士に関係性が見られるのかどうかの検証を行う必要がある。



図（3）- 2 3 本研究で対象とした6湖沼の堆積物中のリグニン由来フェノール組成（S/V比）と植生GISから求めた被子植物/裸子植物比、花粉から求めた被子植物・裸子植物の比の関係

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

人為影響がほとんどない、手つかずの生態系 (pristine ecosystem) とこれまで考えられてきた山岳湖沼で、大気降水物によって窒素負荷や重金属による汚染が進行していることが海外の研究によって報告されている。我が国においても、その可能性を指摘する成果が本研究グループから出されている。本研究で対象とした山岳湖沼においても、羅臼湖以外においては、何らかの人為影響が現れている。この人為影響は、各種元素分析、同位体分析、リグニン由来フェノールの分析など、多項目を測定することによって検出されるものであり、本研究手法の有効性を示すものである。また、道東や道南、本州中部と地理的には大きく異なる低地湖沼で共に富栄養化や重金属濃度の上昇など共通した変化が生じていることがわかった。さらに、これまで日本の湖沼生態系への人為攪乱としては、高度経済成長期の富栄養化がよく引き合いにだされている。しかし、今回の研究の結果、日本の近代化が本格化する1910年頃から既に重金属の流入や窒素源の変化などの人為影響が生じている可能性があることがわかった。

(2) 環境政策への貢献

羅臼湖で得られた過去100年間、環境が保全されているという今回の結果は、世界自然遺産である知床の希少性をより確かなものにする。一方、日本の人里離れた湖沼においても、大気性降水物として人為影響を与えているという今回の結果は、汚染源として工場などのポイントソース、そして近年では農地などの面源源負荷への対策を取ってきた環境保全政策だけでは、不十分であることを意味している。今後、排出量やモニタリングシステムのアジア地域について、環境政策として国が取り組むべき課題であると考えられる。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

羅臼湖では過去100年間、環境が保全されているという成果は、世界自然遺産である知床を保全する上で根拠となる科学的知見である。

6. 国際共同研究等の状況

現時点では、特に記載すべき事項はない。しかしながら、湖沼堆積物を対象とした窒素同位体比のデータベースを作成し、グローバルスケールでの窒素負荷の状況を調べた研究が開始されている (McLauchlan et al. 2013)。そのデータベースには、本研究課題の基礎となった研究 (Hyodo et al. 2008) も日本の湖沼の唯一のデータとして含まれており、今後の国際共同研究へとつなげていきたい。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

1) 林 竜馬、兵藤不二夫、占部城太郎、高原光：日本花粉学会会誌，58(1)，5-17(2012)。「琵琶湖湖底堆積物に記録された過去100年間のスギ花粉年間堆積量の変化」

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

1) 兵藤不二夫、大元皓平：第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発「堆積物の有機物・安定同位体を用いた湖沼と集水域環境の復元」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

1) 第60回日本生態学会（2013）企画集会T02 湖沼生態系のレトロスペクティブ型モニタリング技術の開発(2013年3月6日、静岡県コンベンションアーツセンター（グランシップ静岡）、観客50名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) P. Vitousek, Ecosystem science and human-environment interactions in the Hawaiian archipelago. *Journal of Ecology* 2006, 94, 510.
- 2) P. A. Meyers, R. Ishiwatari, Lacustrine organic geochemistry - an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 1993, 20, 867.
- 3) P. A. Meyers, Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. *Organic Geochemistry* 2003, 261.

- 4) F. Hyodo, N. Tsugeki, J. Azuma, J. Urabe, M. Nakanishi, E. Wada, Changes in stable isotopes, lignin-derived phenols, and fossil pigments in sediments of Lake Biwa, Japan: Implications for anthropogenic effects over the last 100 years. *Science of the Total Environment* 2008, 403, 139.
- 5) D. A. Hodell, C. L. Schelske, Production, sedimentation, and isotopic composition of organic matter in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography* 1998, 43, 200.
- 6) C. L. Schelske, D. A. Hodell, Recent changes in productivity and climate of Lake Ontario detected by isotopic analysis of sediments. *Limnology and Oceanography* 1991, 36, 961.
- 7) N. Sasaki, H. Takahara, Late Holocene human impact on the vegetation around Mizorogaike Pond in northern Kyoto Basin, Japan: a comparison of pollen and charcoal records with archaeological and historical data. *Journal of Archaeological Science* 2011, 38, 1199.
- 8) H. Mukai, N. Furuta, T. Fujii, Y. Ambe, K. Sakamoto, Y. Hashimoto, Characterization of sources of lead in the urban air of Asia using ratios of stable lead isotopes. *Environmental Science & Technology* 1993, 27, 1347.
- 9) M. Inoue, M. Tanimizu, Anthropogenic lead inputs to the western Pacific during the 20th century. *Science of the Total Environment* 2008, 406, 123.
- 10) M. A. Goni, J. I. Hedges, Lignin dimers: structures, distribution, and potential geochemical applications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1992, 56, 4025.
- 11) M. A. Goni, S. Montgomery, Alkaline CuO oxidation with a microwave digestion system: Lignin analyses of geochemical samples. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 3116.
- 12) J. I. Hedges, J. R. Ertel, Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 1982, 54, 174.
- 13) P. A. Meyers, Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry* 1997, 27, 213.
- 14) T. Ito, H. Iwamoto, K. Kamiya, T. Fukushima, F. Kumon, Use of flood chronology for detailed environmental analysis: a case study of Lake Kizaki in the northern Japanese Alps, central Japan. *Environmental Earth Sciences* 2009, 60, 1607.
- 15) D. A. Hodell, C. L. Schelske, G. L. Fahnenstiel, L. L. Robbins, Biologically induced calcite and its isotopic composition in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography* 1998, 43, 187.
- 16) J. M. Hayes, Factors Controlling C-13 Contents of Sedimentary Organic-Compounds - Principles and Evidence. *Marine Geology* 1993, 113, 111.
- 17) G. D. Farquhar, J. R. Ehleringer, K. T. Hubick, Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1989, 40, 503.
- 18) C. L. Schelske, D. A. Hodell, Using carbon isotopes of bulk sedimentary organic matter to reconstruct the history of nutrient loading and eutrophication in Lake Erie.

- Limnology and Oceanography* 1995, 40, 918.
- 19) N. O. Ogawa, T. Koitabashi, H. Oda, T. Nakamura, N. Ohkouchi, E. Wada, Fluctuations of nitrogen isotope ratio of gobiid fish (*Isaza*) specimens and sediments in Lake Biwa, Japan, during the 20th century. *Limnology and Oceanography* 2001, 46, 1228.
 - 20) A. Kohzu, A. Imai, T. Miyajima, T. Fukushima, K. Matsushige, K. Komatsu, N. Kawasaki, S. Miura, T. Sato, Direct evidence for nitrogen isotope discrimination during sedimentation and early diagenesis in Lake Kasumigaura, Japan. *Organic Geochemistry* 2011, 42, 173.
 - 21) C. Kendall, Tracing nitrogen sources and cycles in catchments. in *Isotope tracers in catchment hydrology* (Eds.: C. Kendall, J. J. McDonnell), Elsevier Science, Amsterdam, 1998, pp. 519.
 - 22) G. W. Holtgrieve, D. E. Schindler, W. O. Hobbs, P. R. Leavitt, E. J. Ward, L. Bunting, G. Chen, B. P. Finney, I. Gregory-Eaves, S. Holmgren, M. J. Lisac, P. J. Lisi, K. Nydick, L. A. Rogers, J. E. Saros, D. T. Selbie, M. D. Shapley, P. B. Walsh, A. P. Wolfe, A Coherent Signature of Anthropogenic Nitrogen Deposition to Remote Watersheds of the Northern Hemisphere. *Science* 2011, 334, 1545.
 - 23) A. Wolfe, C. Cooke, W. Hobbs, Are Current Rates of Atmospheric Nitrogen Deposition Influencing Lakes in the Eastern Canadian Arctic? *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 2006, 38, 465.
 - 24) A. P. Wolfe, J. S. Baron, R. J. Cornett, Anthropogenic nitrogen deposition induces rapid ecological changes in alpine lakes of the Colorado Front Range (USA). *Journal of Paleolimnology* 2001, 25, 1.
 - 25) J. Routh, P. A. Meyers, O. Gustafsson, M. Baskaran, R. Hallberg, A. Scholdstrom, Sedimentary geochemical record of human-induced environmental changes in the Lake Brunnsviken watershed, Sweden. *Limnology and Oceanography* 2004, 49, 1560.
 - 26) J. I. Hedges, J. R. Ertel, E. B. Leopold, Lignin geochemistry of a Late Quaternary sediment core from Lake Washington. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1982, 46, 1869.
 - 27) J. I. Hedges, D. C. Mann, The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1979, 43, 1803.
 - 28) E. B. Leopold, R. Nickmann, J. I. Hedges, J. R. Ertel, Pollen and lignin records of late quaternary vegetation, Lake Washington. *Science* 1982, 218, 1305.
 - 29) N. Farella, M. Lucotte, P. Louchouart, M. Roulet, Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajos, Brazilian Amazon. *Organic Geochemistry* 2001, 32, 1443.
 - 30) S. Opsahl, R. Benner, Early diagenesis of vascular plant tissues: lignin and cutin decomposition and biogeochemical implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1995, 59, 4889.
 - 31) J. I. Hedges, R. A. Blanchette, K. Weliky, A. H. Devol, Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochimica*

- et Cosmochimica Acta* 1988, 52, 2717.
- 32) R. Teisserenc, M. Lucotte, S. Houel, J. Carreau, Integrated transfers of terrigenous organic matter to lakes at their watershed level: A combined biomarker and GIS analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2010, 74, 6375.
- 33) J. O. Nriagu, A. L. W. Kemp, H. K. T. Wong, N. Harper, Sedimentary record of heavy metal pollution in Lake Erie. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1979, 43, 247.
- 34) N. K. Tsugeki, T. Agusa, S. Ueda, M. Kuwae, H. Oda, S. Tanabe, Y. Tani, K. Toyoda, W.-l. Wang, J. Urabe, Eutrophication of mountain lakes in Japan due to increasing deposition of anthropogenically produced dust. *Ecological Research* 2012, 27, 1041.
- 35) B. J. Mahler, P. C. van Metre, E. Callender, Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006, 25, 1698.
- 36) M. Kuwae, N. K. Tsugeki, T. Agusa, K. Toyoda, Y. Tani, S. Ueda, S. Tanabe, J. Urabe, Sedimentary records of metal deposition in Japanese alpine lakes for the last 250years: Recent enrichment of airborne Sb and In in East Asia. *The Science of the Total Environment* 2013, 442, 189.
- 37) L. Camarero, I. Botev, G. Muri, R. Psenner, N. Rose, E. Stuchlik, Trace elements in alpine and arctic lake sediments as a record of diffuse atmospheric contamination across Europe. *Freshwater Biology* 2009, 54, 2518.
- 38) X. Boës, J. Rydberg, A. Martinez-Cortizas, R. Bindler, I. Renberg, Evaluation of conservative lithogenic elements (Ti, Zr, Al, and Rb) to study anthropogenic element enrichments in lake sediments. *Journal of Paleolimnology* 2011, 46, 75.
- 39) T. Hosono, C.-C. Su, K. Okamura, M. Taniguchi, Historical record of heavy metal pollution deduced by lead isotope ratios in core sediments from the Osaka Bay, Japan. *Journal of Geochemical Exploration* 2010, 107, 1.
- 40) Y. Hirao, H. Mabuchi, E. Fukada, H. Tanaka, T. Imamura, H. Todoroki, K. Kimura, E. Matsumoto, Lead isotope ratios in Tokyo Bay sediments and their implications in the lead consumption of Japanese industries. *Geochemical Journal* 1986, 20, 1.
- 41) Y. Yokoo, in *Electronic Monograph, Vol. 2* (Ed.: T. Yamanaka), Center for Research in Isotopes and Environmental Dynamics, Tsukuba University, 2006, pp. 54.
- 42) T. Nakano, Y. Yokoo, M. Nishikawa, H. Koyanagi, Regional Sr-Nd isotopic ratios of soil minerals in northern China as Asian dust fingerprints. *Atmospheric Environment* 2004, 38, 3061.
- 43) Y. Yokoo, T. Nakano, M. Nishikawa, H. Quan, The importance of Sr isotopic compositions as an indicator of acid-soluble minerals in arid soils in China. *Water Air and Soil Pollution* 2001, 130, 763.
- 44) Y. Yokoo, T. Nakano, M. Nishikawa, H. Quan, Mineralogical variation of Sr-Nd isotopic and elemental compositions in loess and desert sand from the central Loess Plateau in China as a provenance tracer of wet and dry deposition in the northwestern Pacific.

- Chemical Geology* 2004, 204, 45.
- 45) H. Mukai, A. Tanaka, T. Fujii, Lead isotope ratios in snow collected in Japan and thier relations to long-range transport of air pollutants. *Journal of Jananese Society for Atmospheric Environment* 1999, 34, 86.
- 46) T. Nakano, S. Morohashi, H. Yasuda, M. Sakai, S. Aizawa, K. Shichi, T. Morisawa, M. Takahashi, M. Sanada, Y. Matsuura, H. Sakai, A. Akama, N. Okada, Determination of seasonal and regional variation in the provenance of dissolved cations in rain in Japan based on Sr and Pb isotopes. *Atmospheric Environment* 2006, 40, 7409.
- 47) H. Mukai, A. Tanaka, T. Fujii, M. Nakao, Lead isotope ratios of airborne particulate matter as tracers of long-range transport of air pollutants around Japan. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 1994, 99, 3717.
- 48) M. Sakata, K. Marumoto, M. Narukawa, K. Asakura, Regional variations in wet and dry deposition fluxes of trace elements in Japan. *Atmospheric Environment* 2006, 40, 521.
- 49) C. C. Patterson, D. M. Settle, Review of data on eolian fluxes of industrial and natural lead to the lands and seas in remote regions on a global scale. *Marine Chemistry* 1987, 22, 137.
- 50) R. W. Battarbee, M. Kernan, N. Rose, Threatened and stressed mountain lakes of Europe: Assessment and progress. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 2009, 12, 118.
- 51) M. Sakata, M. Kurata, N. Tanaka, Estimating contribution from municipal solid waste incineration to trace metal concentrations in Japanese urban atmosphere using lead as a marker element. *Geochemical Journal* 2000, 34, 23.

Development of Retrospective Monitoring Techniques for Lake Ecosystems

Principal Investigator: Jotaro URABE
Institution: Graduate School of Life Sciences, Tohoku
University
Aoba 6-3, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, 980-8578
JAPAN
Tel: +81-22-795-6681 / Fax: +81-22-795-6686
E-mail: urabe@m.tohoku.ac.jp
Cooperated by: Ehime University, Okayama University

[Abstract]

Key Words : Lake ecosystems, Paleolimnology, Biological monitoring, Molecular biology, Biogeochemical analysis

Monitoring data are essential to detect ecosystem changes. However, few data are in general available because routine monitoring is laborious. To overcome the lack of monitoring data, a series of methods for detecting changes in lake ecosystems for the past several decades have been developed using biological and chemical information accumulated and preserved in lake sediments.

We first developed an inventive method for using DNA from *Daphnia ephippia* (carapace of diapausing eggs) and copepod diapausing eggs in lake sediments. We also tested usefulness of plankton remains, algal pigments, organic matters, stable isotopes, trace metals and pollens in lake sediments for reconstructing details of historical changes in lake ecosystems and for clarifying environmental drivers causing these changes. Analyses with these methods showed that species and even genetic compositions of zooplankton changed in the early 20th century due to introductions of fish species in lowland lakes examined (Lake Akan, Lake Oshima-Onuma and Lake Kizaki). Trophic conditions and thus plankton communities have also changed in these lakes in the 1960s due to eutrophication by increase in anthropogenic activities in the watersheds. In Lake Akan, changes in plankton communities have been observed even for the past 20 years due to complex interactions between algae and herbivores as indicated by Steryl Chlorin Esters in the sediments. Additionally, changes in vegetation of watersheds have been detected by the pollen analyses in some lowland lakes.

In mountain lakes such as Lake Niseko-Onuma and Lake Mikuriga-ike, increase in heavy metals was found in 1910, indicating that the wide spread of heavy metal

pollution occurred in the early 20th century presumably due to the rapid industrialization in Japan. In these lakes, algal and herbivore abundances increased since the late 1980s when decreases in nitrogen isotope ratio were observed, indicating that these lakes are exposed to the risk of eutrophication due to the increased nutrient inputs through atmospheric deposition. The exception was Lake Rausu located at the world natural heritage Shiretoko. In this alpine lake, no significant environmental changes were detected in the present analyses, indicating that the lake is well preserved and protected from any anthropogenic activities. As such, the retrospective methods developed in this study are proven to be useful for detecting changes in the past ecosystem conditions and identifying environmental drivers to these changes. These are useful to retrospectively monitor the lake ecosystems where no monitoring data are available.

堆積物の化学・生物情報から近過去を読み取り、過去データの無い湖沼生態系の環境監視に利用する技術

