

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710019

研究課題名（和文） アイスコア中の微生物を環境指標とした古環境復元

研究課題名（英文） Reconstructions of past flora using DNA analysis from ice core samples

研究代表者 瀬川 高弘（SEGAWA TAKAHIRO）

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構（新領域融合研究センター及びライフサイエンス統合データベースセンター）・新領域融合研究センター・融合プロジェクト特任研究員  
研究者番号：90425835

研究成果の概要（和文）：アイスコア試料からコンタミネーションを極力排除した遺伝子解析や、生物種同定のプロトコルを確立するための解析をおこなった。南極アイスコア中に含まれるバクテリアの 16S rRNA 遺伝子解析をおこない、バクテリア群集構造解析をおこなった。その結果、間氷期と氷期で検出されるバクテリアの種類や起源に大きな違いがあり、南極氷床アイスコア中バクテリアを古環境指標として利用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Antarctic ice cores could preserve ancient airborne microorganisms. We examined bacteria in two Antarctic ice core samples, an interglacial age sample from Mizuho Base and a glacial age sample from the Yamato Mountains, by 16S rRNA gene sequencing analysis. The results suggest that these bacteria were past airborne bacteria that would vary in density, diversity and species composition depending on global environmental change. Our results imply that bacteria in ice cores could be used as new environmental markers for past environmental studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学，環境動態解析

キーワード：環境変動，アイスコア，微生物，バクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

氷河や氷床に長年にわたって堆積した雪や氷は、過去の環境情報を封印した、降水と大気の化石のようなものである。したがって、ボーリングによって深い部分からアイスコアを取り出して分析すれば、過去の環境変動について多くの情報を得ることができる。将

来の環境変動を予測するためには、過去の環境変動に関する理解が大きな手がかりとなるため、最近では、古環境復元を目的に、多くの地域で氷河ボーリングが行われ、アイスコア解析が行われるようになった。しかし、従来のアイスコア解析では、同位体比や化学成分、風送微粒子など、物理・化学的分析し

か行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

アイスコア中の微生物を環境指標として利用できるようなれば、従来得られなかった環境情報が復元できる可能性が高と考えられるため、分析手法の確立および、南極氷床アイスコア中細菌を古環境指標としての可能性の検討をおこなった。

## 3. 研究の方法

DNA分析などによる雪氷微生物分析法を確立するために、新鮮な試料が大量に得られる北アルプス内臓助雪渓で無菌的にサンプリングを行ない、その試料を用いて雪氷試料からのコンタミネーションを極力排除したDNA分析手法の確立をおこなった。技術的問題が残されていたごく少量の雪氷試料からのDNA抽出や、PCR増幅などの作業をおこなった。

確立した分析手法をもちいて、南極氷床コア中細菌の古環境指標としての可能性を検討するために、南極アイスコア（氷期のヤマト山脈の氷試料と間氷期のミズホの氷試料）に含まれる微生物解析をおこなった（図1）。

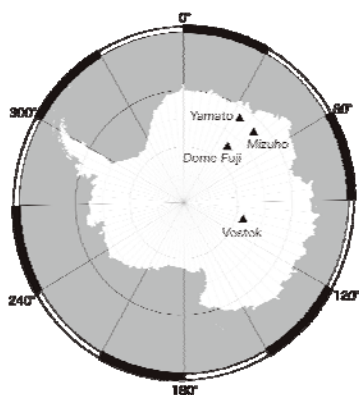


図1, 南極アイスコアボーリング地点（ヤマト山脈とミズホ基地）

約 1000cm<sup>3</sup> の氷試料に用いて、氷周囲に付着しているコンタミネーションを除去し、0.22μm のフィルター上に微生物を濾過し、DNA抽出試薬で懸濁させたのちに、マイクロチューブに入れDNA抽出をおこなった。原核生物の16SrRNA遺伝子のユニバーサルプライマーを用いたPCR増幅をおこない、ライゲーションおよびトランスフォーメーションをおこない、クローンライブラリーの作成をおこなった。コロニーPCR法によりインサートDNAを増幅させ、遺伝子シーケンサー

により塩基配列の解読をおこなった。得られた塩基配列に対し、キメラ配列の確認をおこなった後に、DNAデータベースとの相同性検索をおこなった。MOTHURプログラムを用いて塩基配列を各OTU (operational taxonomic unit) に98%以上の類似性でグループ化をおこなった。シン普森の多様性指数や、OTU数の推定をおこなった。

また、アイスコア中に含まれる微生物の定量的解析をおこなうために、融解させた氷試料を2%のホルマリンで固定し、SYBR GreenIで微生物を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各種微生物のDNA量とサイズ・形態の分析をおこなった。

## 4. 研究成果

雪氷微生物が季節変化することがわかっている北アルプス内臓助雪渓で雪氷試料のサンプリングをおこない、技術的問題が残されていたごく少量の雪氷試料からのDNA抽出や、PCR増幅などの作業を行った。アイスコア中の試料には古い時代の微生物が低密度で存在しているが、アイスコアの表面には現生の細菌や菌類などのコンタミネーションである微生物が多く付着しているため、それらを排除して分析する手法を確立した。各種ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールを用いて実験をおこない、確立したプロトコルの信頼性の確認をおこなった。また古代試料はDNAが断片化していることから、分析手法の改良や、PCRプライマーの検討をおこなった。

細胞数の少ない雪氷試料中の細菌の定量分析をおこなうために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各種微生物のDNA量とサイズ・形態の分析をおこない、アイスコア中の微生物の基礎的情報を得る分析をおこなった。また細菌を蛍光試薬で染め分ける手法を用いて、顕微鏡で撮影した画像を画像解析することによって微生物量の定量・解析をおこなった。

確立した手法をもちいて、南極氷床アイスコア中の細菌を古環境指標としての可能性を検討するために、南極アイスコア（氷期のヤマト山脈の試料と間氷期のミズホの氷試料）に含まれる微生物解析をおこなった。遺伝子解析の結果、全部で45 OTUの細菌が検出され、約半数(21 OTU)が単離株と98%以上の一致率であったが、残りは未記載種であった。間氷期のミズホのアイスコアからは33 OTU、氷期のヤマトのアイスコアからは20 OTUが検出され、OTU数はミ

ズホの方が多く検出された。また、8 OTU が両方のアイスコアから検出された。シンプソン指数 (1/D) はミズホ試料では 24.1, ヤマト試料では 5.7 となり, OTU 数とシンプソン指数 (1/D) はミズホ試料の方が高い結果となった。

アイスコア試料から検出された細菌グループは Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Delta-proteobacteria and Gamma-proteobacteria, および phylum Bacteroidetes, phylum Firmicutes, phylum Actinobacteria, phylum Cyanobacteria and phylum Deinococci であった。

ミズホ試料では Firmicutes が優占種であったが, 氷期のヤマト試料では Gamma-proteobacteria が優占種であった (図 2)。

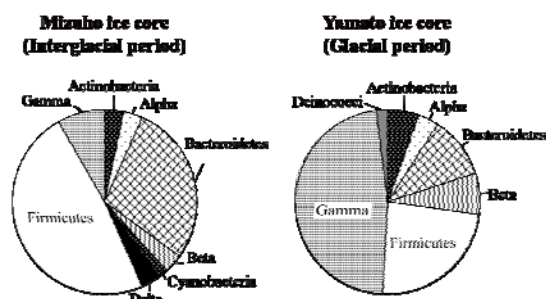


図 2, ミズホ基地およびヤマト山脈から掘削されたアイスコア中の細菌グループの割合

ヤマトの試料からは *Chryseobacterium*, *Clostridium*, *Kluyvera*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Propionibacterium*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Thauera*, *Thermus*, *Variovorax* 属が検出され, ミズホの試料からは *Abiotrophia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Succinivibrio*, *Sutterella*, *Variovorax* 属が検出された。

得られた遺伝子情報を DNA データベースと照合させ, アイスコア中にはどのような種類の微生物が含まれているかの推定をおこなった。36 OTU が 98% 以上の一致率で, データベースから近縁種が検出された。ヒットした細菌の生息環境を調べたところ, 土壌, 海水, 淡水, 雪氷, 腸内などの様々な環境からの記載があった。氷期のヤマトの試料は間氷期のミズホの試料にくらべ, 土壌, 淡水, 海水, 高熱, 氷河, 植物からの記載種の割合が高くなったが, 動物から記載

された割合のみ低くなった。

ミズホの試料 (間氷期) の方が細菌の密度も細菌の種類も多くなり, かつ動物起源の細菌が多く検出されたことは, 間氷期の方が海水の張り出しが少なく海に近く, 動物の生息域が近かったことが原因であると考えられる。鳥の腸内細菌はミズホの試料からのみ検出されたことは, 氷期のヤマト試料の方が腸内菌由来の細菌が少なくなったことにも反映されていると考えられる。その他の環境, 特に遠方の環境 (土壌, 淡水, 海水, 植物など) からの細菌種はヤマト (氷期) の方が多くなったことは, 間氷期には海が近く, 氷期には遠方からの輸送が大きかったことを示唆している。ミズホに動物起源菌が多く, ヤマトに遠距離輸送菌が多いことが細菌種のグループの違いにも反映されたと考えられる (図 2)。

本研究から間氷期と氷期で検出される細菌の種類や起源に大きな違いがあることがわかり, 南極氷床アイスコア中の細菌の古環境指標としての可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Takahiro Segawa, Kazunari Ushida, Hideki Narita, Hiroshi Kanda and Shiro Kohshima. Bacterial communities in two Antarctic ice cores analyzed by 16S rRNA gene sequencing analysis, *Polar Science*, 2010, in press, 査読有

② Takahiro Segawa, Nozomu Takeuchi, Kazunari Ushida, Hiroshi Kanda, and Shiro Kohshima. Altitudinal changes in bacterial community on the Gulkana Glacier in Alaska. *Microbes and Environments*, 2010, in press, 査読有

③ Kazunari Ushida, Takahiro Segawa, Shiro Kohshima, Nozomu Takeuchi, Kotaro Fukui, Zhongqin Li and Hiroshi Kanda, Application of real-time PCR array to the multiple detection of antibiotic resistant genes in glacier ice samples, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 26, 43-52, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① Takahiro Segawa, Jun Uetake, Andres Rivera, Hideaki Motoyama, Hiroshi Kanda, *Microbial*

analysis of subglacial samples drilling at Dome Fuji, Antarctica, The 2nd Dome Fuji ice core symposium, 2009 年 11 月

② Takahiro Segawa, Jun Uetake, Andres Rivera, Hideaki Motoyama, Hiroshi Kanda, MICROBIAL ANALYSIS OF SUBGLACIAL SAMPLES DRILLING AT DOME FUJI, ANTARCTICA, Xth SCAR International Biology Symposium 2009 年 7 月

③ 瀬川 高弘, 神田 啓史, 藤田耕史, 岡本祥子, 直木 和弘, 竹内望  
キルギス・グレゴリア氷河から掘削されたアイスコアの遺伝子解析による古環境復元, 地球惑星科学連合大会 2009 年 5 月

④ T. Segawa, T. Abe, H. Motoyama, S. Imura, S. Kohshima, H. Kanda, MICROBIAL ANALYSIS OF SUBGLACIAL SAMPLES DRILLING AT DOME FUJI, ANTARCTICAXXX, Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR) Science Week 2008, 2008 年 7 月

⑤ 瀬川 高弘, 植竹 淳, 本山 秀明, 神田 啓史, 南極氷床中に含まれる微生物解析, 地球惑星科学連合大会 2008 年 5 月