

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19876

研究課題名（和文）堆積物コア環境DNAによる古代生態系の復元—古環境指標としての可能性を探る—

研究課題名（英文）Reconstruction of ancient ecosystems using sediment core environmental DNA

研究代表者

星野 辰彦（HOSHINO, Tatsuhiko）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門（高知コア研究所）・主任研究員

研究者番号：30386619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では海洋堆積物中に保存された環境DNA分析が古代の生態系の理解するためのツールになりうるかを評価した。まず、沿岸環境の堆積物である高知県浦ノ内湾の6サイトから得られた堆積物（最大4m程度の深さ）からDNAを抽出し、18S rRNA遺伝子、およびCOI遺伝子のアンプリコンシーケンスを行った。その結果、150cm以深の堆積物では陸上植物由来のDNAが多く検出された。また、より深い堆積物（最大深度海底下650m）として世界中から得られた300の海洋堆積物中の18S rRNAを分析した結果、年代が10万年以下の堆積物において、広く真核生物のDNAが残存していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海の底の泥には過去に地球上に存在した生物のDNAの一部が分解されずにそのまま残っていることが知られている。本研究では、これらのDNAが過去の地球の生態系を理解するためのツールとして使用できるかどうかを調査した。その結果、泥の深い部分で植物のDNAが検出されることが示された。また、バルト海の堆積物では氷河期に生息していた藻類のDNAが海底の堆積物から検出され、堆積物中のDNAが古代の生物相を理解するために利用可能であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：DNA was extracted from sediments (up to 4 m deep) from six sites in Uranouchi Bay, Kochi Prefecture, Japan, which are coastal sediments, and amplicon sequencing of the 18S rRNA gene and COI gene was performed. The results showed that although many current organisms were detected in the surface layer, many DNAs from terrestrial plants were detected in sediments deeper than 150 cm, suggesting that these DNAs are likely to reflect past vegetation. Analysis of 18S rRNA in 300 marine sediments from around the world from deeper sediments (maximum depth 650 m below the seafloor) showed that eukaryotic DNA is widely preserved in sediments less than 100,000 years old. DNA from freshwater diatom species was also detected in sediments from glacial freshwater lakes in the Baltic Sea, suggesting that environmental DNA analysis can be used to reconstruct ancient ecosystems.

研究分野：微生物生態学、環境生態学、地球微生物学

キーワード：環境DNA 堆積物 古代生態系

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

環境 DNA 分析は、環境試料から抽出した DNA を分析することで非侵襲に、また、実際の個体を確認、同定することなく、水や土壌をはじめさまざまな環境に生息する生物相の把握を可能にすることから、近年、急速に普及してきている。国内では主に、魚類や水生生物に対して適用されており水産資源量の把握や、絶滅危惧種の保全など幅広い分野への応用が行われつつある。

一方で、我々がこれまで研究を行ってきた海底下堆積物中の微生物 DNA の解析においては現生の微生物 DNA と混じって、葉緑体の遺伝子が多く検出されることが報告されている (Kirkpatrick et al, 2016)。これは、堆積同時に地球上に生息していた植物の花粉等がとりこまれ堆積物中に保存されているものである。また、湖沼や海洋の堆積物についてもプランクトンや、魚類、植物をはじめとした生物由来の環境 DNA が存在することが知られているが、海水や河川水などと比較すると堆積物中の環境 DNA 分析に関しては研究例が限られている。

堆積物の解析では、円石藻や珪藻、放散虫、あるいは有孔虫といった骨格を持つ生物の骨格化石（微化石）が、堆積物の年代決定のために広く用いられている。一方、その他の骨格を持たない生物についての情報は全く得られていない。もし堆積物中に DNA が残存していればその古代環境 DNA 解析を通じて、骨格を持たない生物、例えば、藻類や甲殻類、魚類や菌類等について当時の生態系、あるいは環境変動にともなう生態系の変化に関する理解を深めることが可能となる。

2. 研究の目的

研究の目的は、古代生態系解明のためのツールとしての古代環境 DNA 分析の可能性を示すことである。海底下の堆積物試料は、太古の時代の情報が閉じ込められたタイムカプセルである。これまで、主にプランクトン（円石藻、放散虫、珪藻など）の骨格化石で行われてきた古環境の復元に古代環境 DNA 分析を取り入れ、ツールとしての可能性を示す。古代環境 DNA 分析で、これまでに知られていない生物の分布や、それらが環境変動により受けた影響を明らかにすることが可能となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 堆積物サンプリング

高知大学海洋調査船「ネプチューン」を使用し、高知県土佐市にある浦ノ内湾の計 6 サイト（図 1）において、水中コアリングを行い、合計 36 の堆積物試料を取得した。また、外洋の堆積物については過去の研究で世界中の 40 の掘削地点の 300 の堆積物から抽出した DNA (Hoshino and Inagaki, 2019; Hoshino et al., 2020) を使用した。

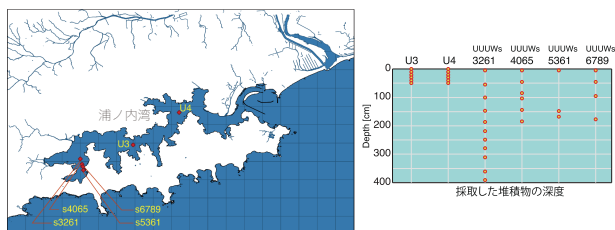


図 1 サンプリング地点

(2) DNA 分析

浦ノ内湾から採取した堆積物試料から 5g をサブサンプリングし、DNeasy PowerMax Soil Kit（キアゲン）を使用し、DNA を抽出した。そして、抽出で得られた DNA 溶液をエタノール沈殿で濃縮し DNA 試料とした。本研究では、堆積物中に残存する真核生物の DNA を標的とし、18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーセットとして Euk1391f-EukBr (Stoeck et al., 2010)、ミトコンドリアにコードされたシトクロム c オキシダーゼ I 遺伝子 (COI 遺伝子) を標的とする IntF-dgHCO2198 (Leray et al., 2013; Meyer, 2003) を使用した。PCR 後、Illumina Reagent kit V3 を使用し MiSeq (Illumina) によりシーケンシングを実施した。得られたシーケンスの QA/QC、クラスタリングおよび系統学的な同定には USEARCH, Mothur を使用した。また系統学的同定にあたっては 18S rRNA 遺伝子については SILVA 138SSU、COI 遺伝子については MIDORI2 GB248 データベースを使用した。

4. 研究成果

(1) 浦ノ内湾堆積物環境 DNA 分析

18S rRNA を標的としたアンプリコンシーケンスでは、大部分が unclassified Eukaryota に分類された一方で、主に陸上植物が含まれる Phragmoplastophyta が湾奥の 4 サイトで多く検出され、とくに s3261 サイトの 147cm 以深の堆積物では 40-80% 程度の割合を占めていた (図 2)。また渦鞭毛藻の DNA は湾奥 4 サイトの主に先負で多く検出され、とくに 5cm の深度の堆積物では 4 サイト全てで 80% 以上を占めていた。渦鞭毛藻は赤潮の原因ともなるプランクトンであり、浦ノ内湾の海水中で優占化していることから、これらは現生の渦鞭毛藻であることが推察された。また、一部の渦鞭毛藻はシストを形成して堆積物中で残存することがわかっているため、堆積物深部で検出される渦鞭毛藻の一部はそれらの DNA である可能性が高い。一方で湾の中央部のサイトである U3 および U4 では、湾奥部で検出された Phragmoplastophyta に属する配列はほとんど検出されなかった。湾奥部とこれらのサイト付近では陸地の植生はほとんど変わらないことから、

この違いは、潮の満ち引きに伴う海水の流れの強弱、あるいは海底を含めた地形の違いによる植物破片の堆積環境の差異に起因するものと推察される。

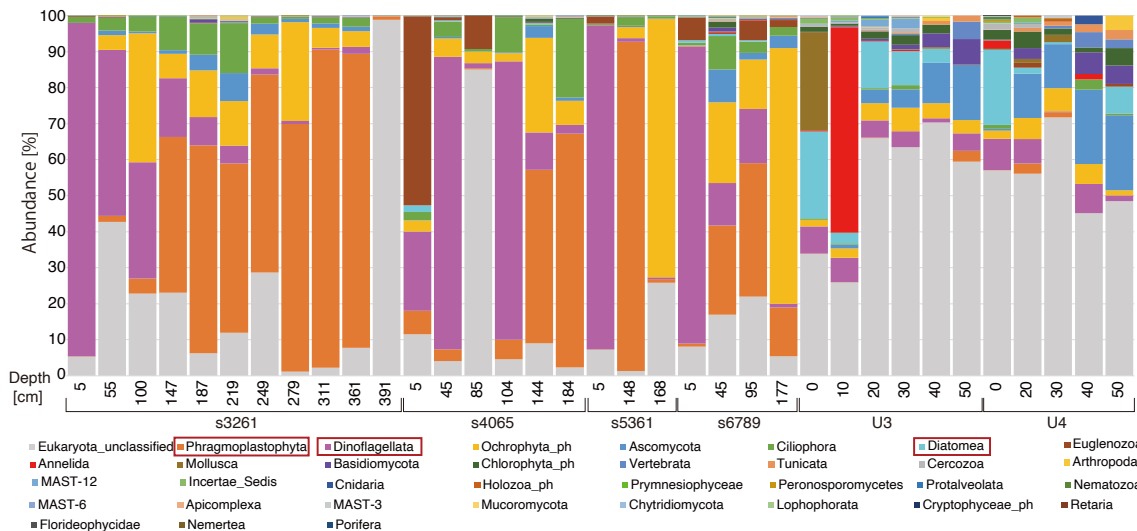


図2 18S rDNA遺伝子アンプリコンシーケンス結果

COI 遺伝子に基づく環境 DNA 解析では、全てのサイトにおいて大部分 (60-90%) を分類することができなかった。これは、データベース上に十分な数の配列が登録されていないことが原因だと考えられる。これらの配列を除くと、全てのサイトを通して多く検出されたのは Ascomycota (菌類) や Arthropoda (節足動物) であり、Arthropoda のほとんどはカイアシ類であった (図3)。これらは、過去の DNA ではなく原生の DNA が検出されている可能性が高い。18S rRNA 遺伝子に基づく解析で湾奥で優占化していた渦鞭毛藻に属する DNA は、COI 遺伝子でも検出されたがおもに湾奥の最表層サイト (深度 5cm) で検出され、その割合も 18S rRNA と比較するとかなり少なかった。

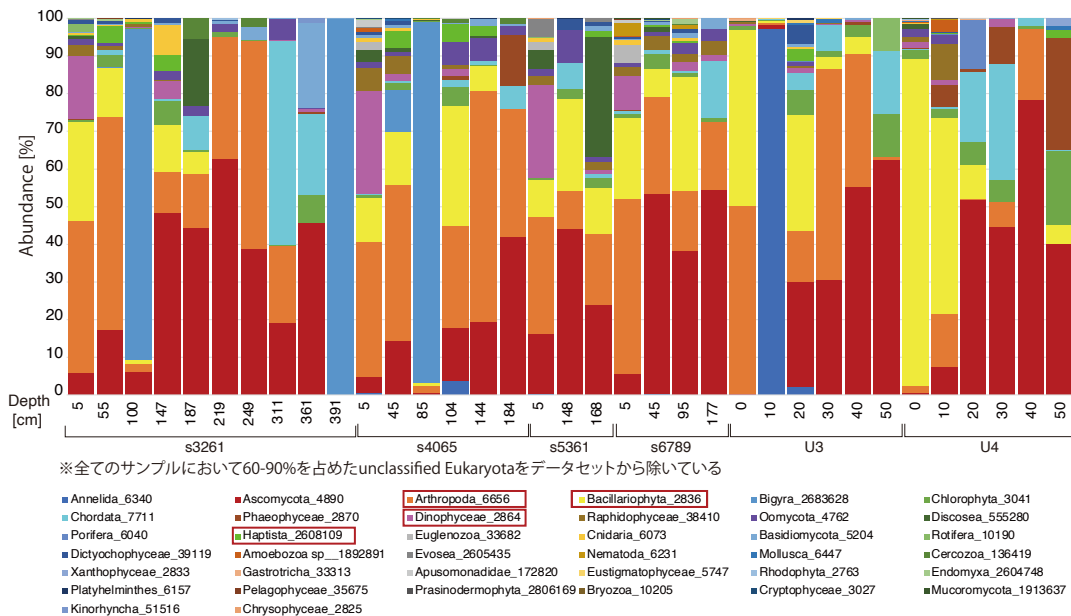


図3 COI遺伝子アンプリコンシーケンス結果

これらの浦ノ内湾堆積物の解析を通して、多くの真核生物の DNA が古環境 DNA として残っていることが分かった一方、深度が小さい堆積物に関しては現生の生物の DNA が多く検出されるため、古環境指標としての使用には注意が必要である。特に、シストや胞子を形成する渦鞭毛藻、珪藻、あるいは菌類などについては現生のものととの区別が難しいため、他の環境因子や堆積学的データを合わせて解析するなどの工夫が必要である。

(2) 世界の海底下堆積物中の環境 DNA の分布

世界中の 40 箇所の深度 0-678m の海洋堆積物から得られた 300 の DNA 試料について 18S rRNA のアンプリコンシーケンスを実施した。その結果、堆積物の年代が 10 万年以下の DNA 試料の 80%以上から 18S rRNA 遺伝子の増幅に成功し、海洋堆積物に広く古代環境 DNA が分布していることが示された (Hoshino and Inagaki, 2024)。また、好気的な堆積物と嫌気的な堆積物を比較した場合、18S rRNA 遺伝子の増幅成功率はそれぞれ、48%と 18%であり、嫌気的な堆積物において、環境 DNA がより保存されやすいことがわかった。

本研究で使用したバルト海の堆積物は、海洋性の堆積物と氷河期の淡水湖沼の堆積物が含まれている。これらの堆積物を分析したところ、多くの珪藻由来環境 DNA が検出された。中でも淡水種である *Aulacoseira* に分類される DNA が淡水由来の堆積物からのみ検出され、それらの DNA が古代環境 DNA であることが裏付けられた。これらの研究成果は、堆積物中の DNA が古代の生態系の理解に使用可能であることを示すものである。

<文献>

Kirkpatrick JB, Walsh EA, D'Hondt S. Fossil DNA persistence and decay in marine sediment over hundred-thousand-year to million-year time scales. *Geology*. 2016 Aug;44(8):615–8.

Hoshino T, Doi H, Uramoto G-I, Wörmer L, Adhikari RR, Xiao N, et al. Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2020 Nov 3;117(44):27587–97.

Hoshino T, Inagaki F. Abundance and distribution of Archaea in the subseafloor sedimentary biosphere. *ISME J*. Nature Publishing Group; 2019 Jan;13(1):227–31.

Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones MDM, Breiner H-W, et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*. 2010;19(s1):21–31.

Leray M, Yang JY, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front Zool*. 2013;10:34.

Meyer CP. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics: COWRIE SYSTEMATICS and DIVERSIFICATION PATTERNS. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2003 Jul 1;79(3):401–59.

Hoshino T, Inagaki F. Distribution of eukaryotic environmental DNA in global subseafloor sediments. *Prog Earth Planet Sci*. 2024 Apr 7;11(1):19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hoshino Tatsuhiko、Inagaki Fumio	4. 巻 11
2. 論文標題 Distribution of eukaryotic environmental DNA in global subseafloor sediments	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Progress in Earth and Planetary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40645-024-00621-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野辰彦、谷川亘、井尻暁、遠山早紀、村山雅史、神徳理沙
2. 発表標題 高知県浦ノ内湾堆積物中に残存する環境DNAによる生物相変遷の試み
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野辰彦、萩野恭子、氏家由利香
2. 発表標題 温暖化以前の海洋微生物群集復元の試み -PCR発明前のフィルターからの環境DNA分析-
3. 学会等名 環境DNA 学会オンラインワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野辰彦、遠山早紀、谷川亘、神徳理沙、村山雅史
2. 発表標題 高知県浦ノ内湾堆積物中の環境DNA解析による生物変遷分析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野辰彦, 肖楠、稲垣史生
2. 発表標題 全球規模の海底堆積物を用いた古環境DNA分析の予察と地球システム科学への適用可能性について
3. 学会等名 環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------