

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23654179

研究課題名(和文) 海生生物における化石DNA研究の可能性

研究課題名(英文) Possibility of the research on ancient DNA for marine eukaryotes

研究代表者

北里 洋 (KITAZATO, Hiroshi)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・領域長

研究者番号：00115445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：嫌気的な海成堆積物中には化石化したDNAが保存されることがある。本研究では、深海掘削コア中から採取したDNA抽出物から、真核生物遺伝子断片の塩基配列を解析し、ゲノムレベルで海洋生物進化を検討した。

地球深部探査船「ちきゅう」で採取した掘削コアから、コンタミネーションのない遺伝子サンプリングを行い、数100bpから数1000bpの遺伝子断片を得た。DNA量は最小で0.6ng/ul/mg堆積物乾重量であった。BLAST検索にかけた結果、真核生物およびHypothetical geneで登録されている未知遺伝子が検出された。このことは、化石DNAが嫌気的環境下で保存されてきた可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Fossilized DNA are sometimes preserved in anaerobic marine strata. This study is attempted to find fossilised DNA from deep-sea drill core beneath sea floor. Genome-level evolutionary biology for marine organisms are probably made with fossil DNA.

We tried to amplify DNA fragments from core samples collected by deep-sea drill vessel CHIKYU. We found DNA fragments with 100s to 1,000s bp from the core. Amounts of DNA are more than 0.6ng/ul/mg dry weighted sediments. Two to four marine eukaryotic groups were identified in the DNA fragments. We believe that we have gotten a proof that fossilized DNA are certainly preserved in anaerobic environmental conditions which are created in the deep-sea sediments.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・ 層位・古生物学

キーワード：系統 進化 多様性 深海 堆積物 化石DNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝子は、生物の情報中心である。すべての生物は、遺伝子中に含まれた情報に基づいて機能する。したがって、遺伝子解析を行うことは、生物間の系統関係、代謝機能など生物の歴史と機能を直接、理解することにつながる。化石になった遺伝子を解析し化石生物の系統と機能を解明しようとする試みは、Abelson(1956)が化石硬組織からアミノ酸を見つけたときから行われてきた。しかし、遺伝子は極めて分解されやすく、大気に触れた状態では断片化して数年以内でほぼ分解されてしまうために残らない。大気に触れない状態だと分解速度がかなり遅くなるために、化石化した DNA が残る。

最近の遺伝子解析技術は、ごくわずかの遺伝子断片から解析に足るだけの量の遺伝子断片を増幅することができるようになった。理論的には一本の遺伝子断片が残っていれば化石化した生物の遺伝子情報を解読できる。この手法を用いて極めて乾燥した洞窟中のほ乳類の骨や歯などに残る遺伝子情報を解読する試みがなされるようになった。ネアンデルタール人のゲノム解読が試みられ (Green et al., 2006)、現代人類とネアンデルタール人との混血の可能性の検討まで行われるようになった (Green et al., 2009)。水棲生物の場合、遺伝子は硬組織中にはなかなか保存されにくい。深海サンゴの緻密な硬組織から遺伝子抽出 (Wallen et al., 2008)、南極や地中海の嫌氣的な堆積物に遺伝子がよく保存されることの発見 (Coolen et al., 2004) などの研究がある。2013 年の報告では数万年前まで化石 DNA 探索の試行が続いている (Lejzerowicz et al., 2013)。

2005 年に下北沖で行われた地球深部探査船「ちきゅう」の慣熟航海の折りに、珪藻質泥岩を海底下 600m にわたってコアとして採取する機会があった。コアは船上でその芯の部分のみを取り出し、全ゲノムの抽出を行った (Kobayashi et al., 2008)。真核生物についてシーケンスを行った結果、50 万年前の地層まで、かなりの量の海生真核生物を中心とする遺伝子断片が残っている可能性が明らかとなった。しかし、これらの遺伝子断片が、どの生物のどのような情報を保存しているのかについては解析をしていない。

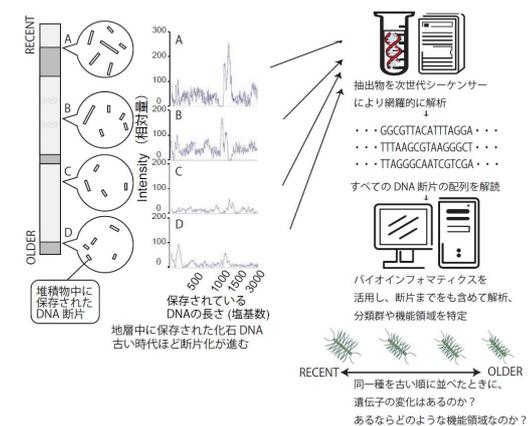
化石 DNA の研究は、DNA の分解とさまざまな DNA の混入との戦いである。分解とコンタミネーション双方を評価するためには、遺伝子断片がどのように切れていくのかを追跡することと、断片がどの生物に由来するのかを解析することが直接的な検証法である。本研究では、浮遊珪藻類、線虫など、現在の遺伝子データベースが整っている海棲種に注目して、メタゲノム解析およびバイオフィオマティクス解析を行い、地層中の遺伝子断片が、どのような生物に由来するどのような部分であるのか？ そして、断片はどのような情報を保存しているのかを解読する。この

ようなアプローチを通じて、分解過程とコンタミネーションの評価ができ、混入した DNA を除いた、化石 DNA に基づいた議論に使えるデータベースができる。その上で、さまざまな時代の同一グループの近縁種の遺伝子について、同一部位の塩基配列を比較し、ゲノムの時間的な変化を検討する。極めて手間のかかる保守的なアプローチであるが、このような方法で、化石化した遺伝子に残された遺伝子レベルでの進化を議論することができる。

挑戦的萌芽研究である最大の理由は、上記のコンタミネーションの有無の解決と、遺伝子変異の見極めである。化石 DNA の研究は、極めて分解されやすい DNA が特異的に保存される化石“鉍脈”の発見と、現在からのコンタミネーションからの区別が成功の鍵を握る。

海底堆積環境が嫌氣的であることは、高い海洋表層生物生産による多量な遺伝子の堆積と酸素極小層における分解の遅延という、遺伝子が地層中に残りやすい“鉍脈”形成環境にあると考えている。また、コンタミネーションの検討は、対象とする生物を海産浮遊生真核生物に絞り、海底でのコンタミネーションの有無を最小限に抑えることができる。さらに、先端的な生物情報解析 (バイオフィオマティクス) を用いて、遺伝子断片に記録される遺伝子情報を直接読むことを通じて、それがどの生物に由来するのかを特定し、現在の既知の遺伝子であるのかどうかを区別することができるかと期待される。こういったダブルチェックが、コンタミネーションをチェックする王道である。

これらの手法については、すでに先端的な遺伝子科学分野では実用化されており、高い解析能力を持った Bioinformatics 研究室と共同研究を行えば、化石 DNA 分野にも導入することができる。一方、化石 DNA の生物種の同定と遺伝子変異の見極めは次の理由から大変に難しい。それらは、海洋生物の種の多様性は陸上以上であり未知生物は既知の何倍にもなること、底生生物はその探索が極めて難しい上に深海では探索方法も限られることである。さらに、コントロールや既知配列のデータ不足も研究が進んでいない要因である。



伝統的な生命史研究は、地層中に残された化石生物の形態情報に基づいて行われている。最近の地球化学分析技術は、硬組織中の無機および有機化合物の元素組成、同位体情報を用いた解析を行い、生息環境の復元、食性の理解などができるようになってきた。しかし、生物の本質である遺伝子を抽出して、残された遺伝子情報を読み出すことを通じて、生物の進化や代謝機能を論ずる研究は、夢としては語られるものの、今までほとんど成功しなかった。

本研究の結果、海の生物について、化石 DNA 解析ができるようになると、これは全く新しい生命史研究が拓ける。また、この研究を通じて蓄積される、マッシュシーケンシング手法、メタゲノム解析と遺伝子データベースの構築による生物情報学環境の整備は、環境 DNA 解析による環境評価という全く新しい研究分野を創出することに繋がると考えている。

#### (引用文献)

Coolen MJ, et al. *Earth Planet Sci Lett* 223:225-239, 2004

Green RE, et al. *EMBO* 28:2494-502, 2009

Green RE, et al. *Nature* 444:330-36, 2006

Kobayashi T, *Extremophiles* 12:519-27, 2008

Lejzerowicz F, et al. *Biol Lett* 9: 2013

Wallen J, *The Plymouth Student Sci* 1:315-24, 2008

## 2. 研究の目的

嫌気的な海成堆積物中には化石化した DNA 断片がわずかに保存される。深海掘削コア中から採取した DNA 抽出物から、海洋プランクトンである珪藻類を中心とした遺伝子断片の塩基配列を解析し、ゲノムレベルでの海洋生物進化を検討することを提案する。本研究を通じて、

(1) どの時代まで DNA 断片は保存されているのか？

(2) その DNA 断片にはどれくらいの生物情報が保存されているのか？

(3) 特定の機能領域に注目することによって遺伝子レベルでの時間を追った進化を解読できるのか？

という、海洋生物に於ける化石 DNA 研究の実例を示し、その可能性を見極める。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料

2005年に地球深部探査船「ちきゅう」の慣熟航海で採取した掘削コアから作成した DNA 抽出液を使用した。「ちきゅう」はライザー掘削技術を利用した貴重な研究船で、海底下の深いところまでドリルで掘り進むことができる。この技術は、掘り進むと浸潤してくる外部の堆積物や間隙水がコア内に入ることを防ぐことができるため、コンタミネーションの極めて少ない方法として、堆積物中の

生物や本研究の化石 DNA の探索に好適である (Kobayashi et al., 2009)。

### (2) コンタミネーション

公開されている化石 DNA の取り扱いに基づき研究を進めた (Cooper and Poinar, 2011)。それらは、作業場の物理的隔離、PCR のコントロール使用、PCR 増幅の最適性、再現性、増幅エラーの除去。実験手順の独立性。試料中の生体物質混入の有無。競合 PCR の実施。生物種への考慮である。実験では滅菌済みチューブ・フィルター付チップを使用した。酵素や試薬は本研究専用とした。

### (3) 抽出と DNA 断片増幅

堆積物サンプルから市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、使用まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。一部は液体窒素中に保存した。抽出試料はプライマーチェックを含めて予察的な研究を行った。真核生物共通のプライマーを利用したところ、深部での DNA を検出できなかったことから (Tsuchiya, 私信)、特定の生物を標的とすることにし、有孔虫あるいは線虫に特異性の高いプライマーを選定した。線虫のプライマーはリボソーム小サブユニット (Small Subunit ribosomal RNA, SSU-rRNA) を使用した (Bhadury et al., 2006; Floyd et al., 2005)。予備実験後に PCR 増幅をした。また、現生の真核生物のバーコード化用にデザインされた COI の遺伝子断片を増幅するプライマーも記載論文の配列で使用した (Boyer et al., 2012; Nagy et al., 2012, Meusnier et al., 2008)。

### (4) 塩基配列の解読と相同性解析

PCR 産物から得たクローンの配列を読み、数 100bp から数 1000bp のさまざまな長さの遺伝子断片を得た。それらの長さごとの画分の頻度分布とそれぞれのサイズクラスごとの遺伝子の特徴化を行った。配列は BLAST 検索と UniGene 検索によりデータベース上の登録遺伝子との比較を行った。

### (5) DNA 断片の存在確認

得られた DNA 断片の配列から特異的なプライマーを複数作成し、断片が存在した堆積層および他の堆積層の試料に対して PCR を行った。コントロールとして、表層試料を使用した。プライマーは深部の DNA 断片の配列の比較から、約 100bp およびその内側の検出を可能とするように 1 配列で 2 種類の特異的プライマーをデザインし使用した。

#### (引用文献)

Bhadury et al. *Mar Biol* 154:509-18, 2006

Floyd et al. *Mol Ecol Notes* 5:511-12, 2005

Boyer et al. *PLoS One* 7:e38215, 2012

Nagy et al. *PLoS One* 7:e34506, 2012

Meusnier et al. *BMC Genomics* 9:214, 2008

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA 抽出

堆積物から抽出した DNA 量は最小で 0.6ng/ul/mg 堆積物乾重であった。微量の核酸泳動装置（コロナ製）を使った DNA の長さは 1000~1500bp とそれ以下の長さとなり、後者はゲル電気泳動でスミア状を示した。長い DNA は生きた細菌と一緒に抽出されて含有され、DNA 量に生細菌の DNA が含まれている可能性がある。このことから、抽出前に生細胞の核染色 DAPI で堆積物中の生細胞の有無を確認することが考えられた。本研究は真核生物の化石 DNA 探索を目的とし、生きた細菌は増幅しない PCR を実施したので問題はないと考えられるが、今後は試料採取時に DAPI 染色をして、確認したい。なお、本研究の結果は、論文および学会発表で未発表であるため、研究成果の項での具体的数字を部分的に省略した。

##### (2) PCR と遺伝子配列

線虫間の相同性を基にデザインした SSU-rRNA のプライマーを使って PCR を実施し、試料として使った堆積物全体では 300 個以上の遺伝子断片を得た。DNA 長は短い、BLAST 検索にかけた結果、線虫以外の真核生物および Hypothetical gene で登録されている未知遺伝子が検出された。線虫 SSU-rRNA の断片が BLAST 検索で検出されず、プライマーデザインとは異なる結果となったが、これは化石 DNA が残っていなかった可能性が高いと考えられる。また、海底表層からも検出されなかったことは嫌気的環境で線虫の数が少なかった可能性も考えられる。有孔虫用プライマーと真核生物のバーコード化用 COI プライマーは、すべてが深部では PCR 増幅が見られなかった。

##### (3) DNA 断片配列の解析

最深部から DNA 断片は得られなかったが、深部での DNA 断片からの生物グループ数は 2-4 種であった。100m 以深で DNA 断片が得られた試料でも生物グループ種は 2-3 種であった。このことは、DNA の分解と消失から残った化石 DNA は、その後嫌気的環境下に置かれることで保存されてきた可能性が考えられた。生物グループ全体は、原生生物を含む 5 グループと未知配列に分けられ、脊椎動物や後口動物は含まれなかったことから、海底堆積物中の化石 DNA は小型で潜行性や間隙性の底生生物のものが残っている可能性が考えられた。

##### (4) 本研究のまとめと今後の課題

化石 DNA 断片が短く希少であることと試料の貴重さから、実験の再現が困難であったが、海底深部の化石 DNA を検出できた。今回の試料は嫌気的環境が維持されて化石 DNA が保存されていたと考えられ、海洋堆積物中の化石 DNA の存在が過去の生物相の研究に利用でき

る可能性が示された。

本研究での化石 DNA の地質年代は、数十塩基にわたる遺伝子変異が検出されるほど過去の地質年代ではないため、現生生物の配列を利用できた。しかし、プライマー設計は既知配列とその相同配列からデザインするため、試料中に残存する化石 DNA のすべてを解析できるわけではない。すべての DNA 配列を解析するには次世代シーケンサーによる網羅的解析が必要となる。

本研究の開始時の計画ではこの網羅的解析が盛り込まれていたが、現在の配列解析のシステムでは実施しなかった。最小でも 1 リードで 400bp を 10 万配列を読める次世代シーケンサーの利点が、堆積層 1 つ当たりの DNA 断片数が極端に少なく、さらに堆積層の数は 300 以上であって、複数回実施するとさらにシーケンス回数が増える本研究には不向きであった。解決策としては堆積層毎に DNA タグを付ける方法を検討したが、タグ設計が現実的ではないため実施には至らなかった。その代りに、現生生物の配列を基にしたプライマーを工夫して複数用意することで、堆積物の深部まで化石 DNA が存在するかどうか、また存在する場合の生物を同定できるか、という本研究の目的は達成できたと考えている。

今後の課題は、解析した DNA 断片の配列の検証である。これらの配列からデザインしたプライマーを使用し、どの堆積層から検出されるかどうかを確認する実験を行う予定である。

##### (5) 将来の展望

化石 DNA が海底堆積物の深部まで残っている可能性は高く、その検出を様々な海域の様々な深度で試みていくことが必要である。それらの結果は化石 DNA 検出の精度を高めることになり、将来的には化石 DNA が、生物相の変動や環境変化の指標となる可能性まで検討していくことが期待される。また、堆積物中の生きた微生物の存在は、生きた真核生物の存在の可能性も無視できなくなっていることから、DAPI 染色や RNA 検出による検討をしていくことが必要である。

海底堆積物中の化石 DNA 研究はアプローチが困難であるために、陸上や湖沼と比較して研究が遅れているが、今後は生命科学の手法を利用した研究への進展が期待され、本研究はその端緒になったと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

論文投稿準備中である。

学会発表は平成 26 年度に行う。

〔その他〕

独立行政法人海洋研究開発機構 地球深部探査センター

<http://www.jamstec.go.jp/chikyujp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北里 洋 (KITAZATO, Hiroshi)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極  
限環境生物圏領域・領域長  
研究者番号：00115445

(2) 研究分担者

窪川 かおる (KUBOKAWA, Kaoru)  
東京大学・理学系研究科・特任教授  
研究者番号：30240740

(3) 研究協力者

新村 芳人 (NIIMURA, Yoshito)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教  
授  
研究者番号：90396979

倉沢 篤史 (KURASAWA, Atsushi)  
独立行政法人海洋研究開発機構・地球環境  
変動領域・物質循環研究プログラム・古海  
洋環境研究チーム・研究支援パートタイマ  
ー