

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651005

研究課題名(和文) 深海底堆積物に残存する化石DNAによる古生態系復元の試み

研究課題名(英文) Reconstruction of past environmental conditions and ecosystems using ancient DNA in deep marine seimdimets

研究代表者

鈴木 庸平 (SUZUKI, Yohey)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00359168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：古環境復元は、主に脂質バイオマーカー、生体化石の形態による分類および化石に含まれる化学成分・同位体分析によって行われてきた。本申請では、海洋堆積物中の鉱物や固体有機物に保存されている化石DNAに着目し、堆積物中の化石DNA抽出法と次世代シーケンサーを用いた手法の確立と、分子系統解析による環境指標になる生物種の特定によって、古環境復元が可能になる新たな手法開発を目指した。結果、表層から深部まで連続した日本海海底下堆積物(約3千～10万年前)から、生体化石で寒冷期の指標になる珪藻や温暖な気候を示す植物の化石DNAの検出に成功し、化石DNA解析が海洋および陸域の生態系復元にも適応可能である事を示した。

研究成果の概要(英文)：For the reconstruction of paleoenvironments, the morphology of fossilized organisms, lipid biomarkers and their chemical and isotopic compositions have been used as proxies. In this research project, we developed a new proxy based on ancient eukaryotic DNA preserved in deep-sea marine sediments. We successfully developed a new method to extract ancient DNA from marine sediments from Japan Sea, where abrupt climate changes including Last Glacial Maximum were recorded. From extracted DNA, pyrosequencing was used to retrieve 18S rRNA sequences affiliated within a diatom species of *T. nordenskiöldii*, diagnostic to cold climate from 29-ka sediments deposited during the last glacial period (MIS-2). Plant species of the genus *Alnus* was detected from 36-ka sediments deposited during the interstadial period (MIS-3). It is therefore concluded that our developed method can be applied to the study of paleoenvironments as a new proxy.

研究分野：地球微生物学

キーワード：日本海 海底堆積物 化石DNA DNA抽出法 遺伝子配列決定 古環境 古生態系 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

統合海底掘削計画 (IODP) でも重要視される古環境復元 (文献 1) は、主に生体化石の形態による記載と化石に含まれる化学成分・同位体分析によって行われていた (文献 2,3,4)。しかし、この分析方法は、保存性の良い生体化石からの情報に制限されるという問題点があった。本申請者は、DNA がシリカ鉱物に強く収着する特性と堆積後の続成作用によるシリカ鉱物の形成の普遍性から、海洋堆積物中の化石生物の DNA がシリカ鉱物中にトラップされて保存されている可能性に着目した。そこで、海洋堆積物中で化石生物の DNA が保存の有無を調べるために 329 次統合海底掘削計画調査にて環流域と遠洋域の掘削コア、および日本海沿岸域からジャイアントピストンコア (0~40m) を採取した。化石生物の DNA を用いた古生態系の復元は、強力なツールとして、古環境学・古生物学・古気候学の新展開として期待された。

### 2. 研究の目的

(1) 海底に堆積した多様な生物群の DNA が、どのように分解・保存されるかを、新規に開発した DNA 抽出技術により、沿岸・遠洋・寒流域に堆積した様々な深度のコア試料を対象に地球規模で明らかにする。

(2) 得られた DNA に基づく観察結果とどのように創刊するか、および形態観察で生えられない古生態系を復元する上で鍵となる情報の有無を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 沿岸堆積物中の化石 DNA 抽出法および包括的解析方法の確立として、DNA 抽出条件の最適化および包括的解析方法の確立を行った。

#### ①「試料」

試料には、沿岸・遠洋・環流域で、どの深度まで化石 DNA が回収可能かを評価するために、試料には、南太平洋環流下の堆積物 (IODP Esp. 329 にて採取)、および、日本海海底下の表層から深部まで連続したコア (海底下 8~40 メートルの堆積物、日本海東縁ガスハイドレード調査 M179 にて採取) を用いた。各試料は、掘削後、DNA を抽出するまで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### ②「DNA 抽出法の最適化」

堆積物中の生きた生物由来の DNA を除去し、シリカ鉱物にトラップされた化石由来の DNA を取得するために、DNA 抽出法の最適化を行った。最適化した DNA 抽出法では、先行研究で開発したアルカリ加熱抽出法 (アルカリ溶液中で 0.1 g の堆積物試料を加熱して、堆積物中のシリカ鉱物と微生物の細胞膜等を溶解して DNA を抽出する方法) を改良して、2 段階のアルカリ加熱抽出 (図 1) を行った (文献 5,6,7)。さらに抽出物は、DNA 分析を妨げる腐食物質を除去するために

PVPP を用いて精製した。抽出した DNA 量は、定量 PCR 法によって測定した。

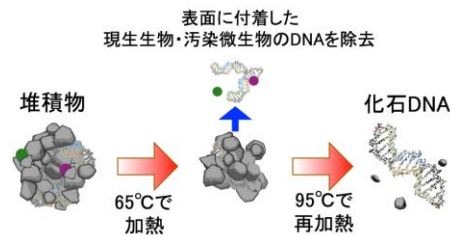


図 1 2 段階アルカリ加熱抽出法

1 段階目の抽出で、原核生物など生きた生物由来の DNA を除去した後、2 段階目の抽出で化石 DNA を取得する。

③表層から深部まで連続したコアから DNA 抽出・分析し、環境変動に呼応した古生態系の変化がどの深度まで記録されているかを調べた。

(2) 化石 DNA の配列決定による古生態系の復元として、得られた化石 DNA の配列決定により起源生物を特定し、生体化石の生物群との比較を行い、古生態系復元で有益な情報を抽出した。

#### ①「DNA 配列に基づく起源生物の特定」

化石 DNA の配列情報を取得するために、抽出した化石 DNA から真核生物の 18S rRNA 遺伝子(V4)を PCR にて増幅した後、Sanger 法および次世代シーケンス法により塩基配列の決定を行った。得られた DNA 配列に関して公的機関のデータベースを用いて近縁種の特定および分子系統樹の作成を行い、起源生物種と産地の特定を行った。

#### ②「化石 DNA と生体化石の分析で得られる生態系の比較」

化石 DNA の配列に基づく起源生物の特定の結果と従来の形態により分類された生体化石の情報を比較して、化石 DNA からのみ得られる情報がないか調べる。

### 4. 研究成果

(1) 沿岸堆積物中の化石 DNA 抽出法および包括的解析方法の確立

①南太平洋環流下の深海堆積物を用いて化石 DNA の抽出法の検討を行った結果、複数の堆積物試料から化石 DNA を抽出することに成功し、DNA の起源生物の同定により、化石由来と考えられる珪藻やカビ等を抽出することに成功した。しかし、手法と結果の信頼性を確認するために、再度同じ試料を用いて、分析を行った所、当初得られていた結果を再現することができなかった。原因を調べた結果、堆積物試料の劣化が確認されたため、再び化石 DNA を取得することが困難であると判断された。化石 DNA 解析の再現性を確認するために、日本海の下海底堆積物を対象とした解析を行った (図 2)。日本海コア試料には、最終氷期の環境変動を記録されており、環境変動が生態系に与えた影響につ

いて明らかにする古環境復元の研究に適していると考えられる。

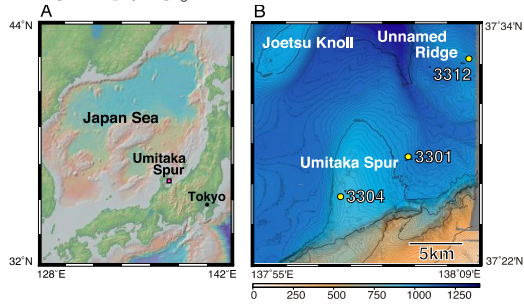


図2 サンプルングサイト

②日本海の堆積物を用いて、「DNA 配列に基づく起源生物の特定」、「生体化石との比較」、「古生態系の復元」を実施した。結果、表層から深部まで連続した堆積物（約 3 千～10 万年前に堆積）から、再現よく DNA を抽出することに成功した（図 3）。

Sampling Site	Sediment Age	Depth (mbsf)	Alveolates	Amoebozoa	Fungi	Metazoa	Ceratophyceae	Radiolaria	Stramenopiles	Viridiplantae	Sample volume (g)	Nucleotides extraction method	Ref.
Japan Sea													
MD3301	29 ka	8.7			●	●	●	●	●	●	0.1	Two-step alkaline method	
	85–93 ka	27.0			●	●	●	●	●	●	0.1	Two-step alkaline method	
MD3304	36 ka	8.8			●	●	●	●	●	●	0.1	Two-step alkaline method	
	61 ka	17.6			●	●	●	●	●	●	0.1	Two-step alkaline method	
MD3312	36 ka	8.2			●	●	●	●	●	●	0.1	Two-step alkaline method	
Eastern Mediterranean	125 ka	5.8	●	●	●	●	●	●	●	●	5–10	DNA extraction kit (MOBIO)	[1]
Black Sea	9.0–11.4 ka		●	●	●	●	●	●	●	●	8–10	DNA extraction kit (MOBIO)	[2]
Peru Margin 1228A		35.1	●	●	●	●	●	●	●	●	1.0	DNA extraction kit (MOBIO)	[3]
North Pond	0.1–2.0 Ma	1.6	●	●	●	●	●	●	●	●	25	RNA extraction kit (MP Biomedicals)	[4]
Hydrate Ridge	0.1 Ma	1.8	●	●	●	●	●	●	●	●	25	RNA extraction kit (MP Biomedicals)	[4]
Eastern Equatorial	2.8 Ma	45.3	●	●	●	●	●	●	●	●	25	RNA extraction kit (MP Biomedicals)	[4]

図3 化石 DNA の分析で検出された生物種

(2) 化石 DNA の配列決定による古生態系の復元

① 「DNA 配列に基づく起源生物の特定」

抽出した化石 DNA を分析し、DNA 配列に基づく起源生物の特定を行った（図 3）。先行研究と比較した結果の他のサイトで分析された化石 DNA の結果とも矛盾しないことが示された（図 3）。

② 「化石 DNA と生体化石の分析で得られる生態系の比較」

抽出した化石を分析（塩基配列決定）し、生体化石としても分析されている海洋性プランクトン（珪藻や放射虫）の他、陸上の植物由来の化石 DNA を再現性良く検出することに成功した。また、最終氷期中の亜氷期と亜間氷期の堆積物からは、それぞれ異なる生物種が検出された。また、生体化石では検出されない海洋性プランクトンなども多数検出された。

化石 DNA の分析によって検出された生物種をさらに詳しく調べるために、分子系統樹を作成した（図 4, 5）。結果、3 万年前（MIS-2）の堆積物から検出された珪藻は、生体化石と

しても分析されている寒冷種の *T. nordenskiöldii* に近縁だった（図 4）。また、3 万 6 千年（MIS-3）の堆積物から検出された植物は、陸域の植物で、花粉化石が分析されている温暖期に棲息する *Alnus*（ハンノキ）に近縁だった（図 5）。これらの結果は、化石 DNA 解析で検出された生物情報は、過去の生態系および過去の環境を復元するための情報を含んでいることを示している。

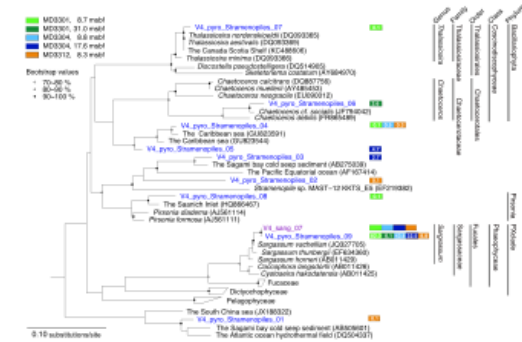


図4 化石 DNA の分析で検出された珪藻の系統樹

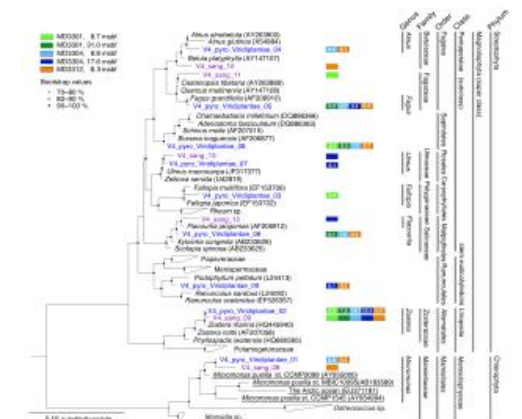


図5 化石 DNA の分析で検出された植物の系統樹

(3) まとめ

本研究では、新規に改良した DNA 抽出法（2 段階のアルカリ加熱抽出法）によって、0.1 の堆積物から化石 DNA 抽出し、分析する事を可能にした。この手法によって、表層から深部まで連続した堆積物を細かく連続的に解析して、古環境変動が連続的に記録されている海底堆積物を用いて古生態系復元を展開することができる可能性が示された。また、化石 DNA 解析は、過去の生態系や古環境を復元出来るツールとして用いることができる可能性が示された。（現在、結果は論文としてまとめ投稿中である。）

<引用文献>

- 1 <http://www.iodp.org/>
- 2 F. Akiba (1986) Init. Repts. DSDP, 87, 393-481.
- 3 J. Doua et al., (2014) PLoS ONE, 9, e88709.
- 4 J. Volkman (2003) Appl. Microbiol. Biot.,

- 60, 495-506.
- 5 M. Kouduka et al.,(2006) BMC Genomics, 7, 135.
  - 6 M. Kouduka et al., (2012) FEMS Microbiol. Lett., 326, 47-54.
  - 7 M. Kouduka et al., Geobiology 投稿中

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① M. Kouduka, A.S. Tanabe, S. Yamamoto, Y. Yamamoto, K. Yanagawa, Y. Nakamura, H. Toju, Y. Suzuki、Preservation of ancient eukaryotic DNA in methane hydrate-associated marine sediments、Goldshmit 2014、2014年6月13日、Sacramento(アメリカ)
- ② 幸塚 麻里子、柳川 勝紀、鈴木 庸平、燃える氷メタンハイドレートに保存される化石 DNA に基づく古生態系復元の可能性、2013年度古海洋・古気候に関するシンポジウム、2014年1月7日、東京大学大気海洋研究所(千葉県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 庸平 (SUZUKI, Yohey)

東京大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：00359168