

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82657

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710020

研究課題名(和文)南極氷床底面から検出された72万年以上前の微生物探査

研究課題名(英文)Microbial analysis of subglacial samples drilling at Dome Fuji, Antarctica

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・大学共同利用機関等の部局等・助教)

研究者番号：90425835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：南極氷床ドームふじ基地でのアイスコア掘削により、南極氷床下の氷試料と岩盤由来の粒状物試料が得られた。これらは少なくとも72万年以上に封じ込められた可能性が高く、南極氷床下の環境を推定される試料の中で、最も優れた試料の一つである。次世代シーケンサーによるメタゲノム解析をおこなった結果、DNAデータベースや現在の南極の雪氷、土壌、湖沼等の分析結果とは高い相同性を示さない、既知のものとは大きく異なる配列を持つ微生物が検出された。

研究成果の概要(英文)： The ice cores from Antarctica could preserve microorganisms in the ancient atmosphere trapped in the snow and ice from the ice sheet. Subglacial environment are thought to be contained ancient ecosystems. We examine microorganisms in the ice core samples near the bedrock by molecular DNA techniques. We extracted the inner part of ice core samples using the melting device special designed for biological analysis. Small DNA fragments were extracted from ice samples and sequenced using Illumina HiSeq and Miseq sequencers. We carried out taxonomic and functional binning of the metagenomic DNA, and attempted to reconstruct the organisms. Our data support that microorganism have existed in this subglacial environment.

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：アイスコア 微生物 極限環境 古代試料

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、降水と大気のタイムカプセルのようなものである。南極の氷床の下には145個かそれ以上の氷床下湖があると考えられている。この中でも最大のVostok湖はかなり長い間外界と隔離されていると推測されており、その生態系に期待が集るようになった。南極氷床下の水層と岩盤は、人類に残された最後のフロンティアのひとつ(Pearce, *ISME*, 877-880, 2009)とされ、その生態系の解明に、世界的な期待が集まっている。

南極ドームふじ基地でのアイスコア掘削により(図1)、南極氷床下の氷試料と岩盤由来の粒状物試料が得られた。氷床下の環境は少なくとも72万年以上に封じ込められた可能性が強いことが明らかとなった。ドームふじ基地周辺は平坦な雪原であり、氷床は最深部まで年代を追ってほぼ水平に重なっているため、ドームふじアイスコア試料は時代を遡るには最適な試料あり、さらにその氷床下から採取されたサンプルは、南極氷床下の環境を推定される試料の中で、最も優れた試料の一つであると言える。

この氷床底面から採取された試料の蛍光顕微鏡観察から微生物の存在は確認されたが、同細菌の分離培養は低温・高圧下の極限環境に生息していること、試料年代が古いことから困難が予想され成功していない。この氷床下には、進化が止まった過去の微生物が残っている可能性があり、貴重な微生物化石であるといえる。

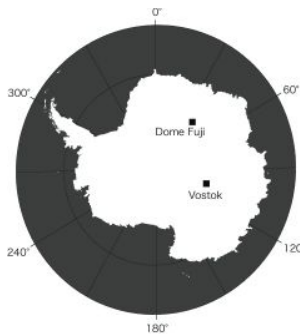


図1 南極ドームふじ基地のアイスコア掘削地点

2. 研究の目的

南極氷床下という特異な極限環境から採取された試料中ゲノム解析をおこなう。コンタミネーションを排除した小数細胞からのDNA抽出・遺伝子増幅手法の確立をおこない、メタゲノム解析をおこなうことで、南極

氷床下に存在する微生物群集や生態系を解き明かす。

3. 研究の方法

(1) 古代試料のため、実験室内や作業中からのコンタミネーションには細心の注意を払う必要がある。コンタミネーションを排除した小数細胞からのDNA抽出・遺伝子増幅手法の改良や、予めクリーンルームや試薬などから既存微生物の塩基配列を採取し、コンタミネーション配列のデータベース化を図る。

(2) 微量細胞から全ゲノム増幅をおこなうために、自動細胞解析分離装置(セルソーター)を使用した細胞の分離や、集積流体回路チップを用いた全ゲノム反応系を実地する。酵素反応は、培養不能細菌の少数細胞からのゲノム完全長取得法を応用してゲノム増幅をおこなう。ゲノム・ライブラリーの作成し、次世代シーケンサーでの遺伝子解読を試みる。

(3) 得られたメタゲノム配列からバイオフィォマティクス解析をおこなう。

4. 研究成果

南極氷床底部の試料年代は72万年以上と非常に古いうえ、アイスコア中には微生物細胞がごく少量のみしか含まれていないため、全ゲノム増幅法による少数細胞からのゲノム解析をおこなうためのプロトコル確立をおこなった。

アイスコア中の試料には古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バクテリアや菌類などの、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、それらを排除するための作業をおこなった。アイスコア表面に付着しているコンタミネーション微生物を排除するために、微生物分析用に作成したアイスコア融解装置を用いて、氷試料内部のみを無菌的に採取した。氷試料の周囲にポジティブコントロールとして人工的に合成したDNAを塗布し、採取の信頼性の確認をおこなった。

コンタミネーションを排除した小数細胞からのDNA抽出や、標的細胞以外のDNAの混入(コンタミネーション)を抑えたゲノム増幅手法の改良をおこなった。開発した微量細胞からの全ゲノム増幅手法を用いて、南極氷床下の微生物からゲノム増幅産物を取得し、ゲノム産物はハイスループット・シーケ

ンサー（ILLUMINA社のHiSeqおよびMiSeq）によって大量配列を得ることに成功した。

ILLUMINAのHiSeq得られた大量のDNA配列からアセンブルをおこない、メタゲノム手法を用いて解析し、各種微生物種の同定、ゲノム上にコードされている遺伝子群の推定および遺伝子群の機能予測や代謝経路を推定するための解析パイプラインを構築した。これらを用いることで、古代氷試料からのDNA抽出手法、ゲノム増幅手法およびゲノムライブラリー構築手法の最適化をおこなった。また、ILLUMINA・HiSeqシーケンサーの短い配列（約100bp）からのアセンブルは古代試料のため難しく、遺伝子機能解析には限界があったので、比較的長い配列（約250bp）を得られるILLUMINA・MiSeqをもちいたDNA解読もおこなった。

南極氷床底部から得られた2つの試料からメタゲノム解析をおこなった結果、これまでの既知配列とは大きく異なるシアノバクテリアを含む各種バクテリアおよびアーキアなどの配列の取得に成功し、南極氷床下には多様な微生物群が存在している事が明らかになった。

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)

瀬川高弘, 牛田一成, 幸島司郎. 2014. 雪氷中のバクテリアが語るもの, 雪氷, 76, 59-67, 査読有

Takahiro Segawa, Nozomu Takeuchi, Andres Rivera, Akinori Yamada, Yoshitaka Yoshimura, Gonzalo Barcaza, Kunio Shinbori, Hideaki Motoyama, Shiro Kohshima and Kazunari Ushida. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. Environmental Microbiology Report, 2013, 5 (1), 127-134, 査読有

Fumio NAKAZAWA, Takahiro SEGAWA, Shiro KOHSHIMA, Lobzang GYENDEN, Toshiyuki FUJIKI and Karma TOEB. Recent melting status at the upstream part of the Gangjoe La Glacier, Bhutan Himalayas, determined by pollen analysis of an ice core. Bulletin of Glaciological Research, 2013, 31, 1-7,

査読有

〔学会発表〕(計7件)

Takahiro Segawa, Shinji Kondo and Hideaki Motoyama. Reconstructions of past flora using DNA analysis from Greenland icecore samples. The 4th Symposium on Polar Science. 2013年11月12-15日

近藤伸二, 瀬川高弘, 本山秀明, 南極氷床底面から検出された微生物解析. 極域科学シンポジウム 2013年11月12-15日

Takahiro Segawa, Satoshi Ishii, Nobuto Ohte, Zhongqin Li, Yuichi Hongoh, Nozomu Takeuchi. Nitrogen cycle in cryoconites: naturally-occurring nitrification-denitrification granules on a glacier in Central Asia. 3rd International conference on Nitrification 2013年9月2-5日

瀬川高弘, 近藤伸二, 竹内望, キルギス・グレゴリア氷河のアイスコア試料を用いたメタゲノム解析による古環境復元, 地球惑星科学連合大会 2013年5月19-24日

Takahiro Segawa, Satoshi Ishii, Dylan Bodington, Yuichi Hongoh, Fumito Maruyama, Nozomu Takeuchi, Impact of microbial communities on nitrogen cycles on Urumqi Glacier No.1 in China, AGU 2012 Fall Meeting, 2012年12月

瀬川高弘, 近藤伸二, 本山秀明, 氷床アイスコア中の微生物解析 日本細菌学会細菌学若手コロッセウム 2012年8月8日

Takahiro Segawa, Distribution of cyanobacteria in glacier environment, International Workshop on Glacial Ecology, 2012年4月9日

〔図書〕(計1件)

瀬川高弘, (2012) 極限環境生物の産業展開, 「第5章 アイスコア中の微生物解析」, 分担, シーエムシー出版, 137-144

6 . 研究組織

(1)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 ,
DBCLS)・特任助教

研究者番号 : 90425835