

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550023

研究課題名(和文) 海洋深層熱塩循環と深海微生物地理の関係を探る

研究課題名(英文) Exploration for the impacts of halosaline circulation on microbial geography

研究代表者

布浦 拓郎 (NUNOURA, Takuro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究開発センター長代理

研究者番号：60359164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋熱塩循環と微生物分布の関係を明らかにするため、千島列島に沿って北上し北太平洋亜寒帯域を横断する測線にて、海洋表層から海底までの高密度微生物計数及び分子生態解析を実施した。更に、ゲノムレベルでの解析を実施する為、微量DNAからのショットガンメタゲノム解析技術の検討を実施した。その結果、海底から1000-2000mの深層において、微生物数の顕著な増加が観測され、海洋表層の一次生産だけでなく、熱塩循環を含む深海潮流が深層水塊の微生物マスを支配していることが示唆された。また、微量DNA(10pg)からのショットガンメタゲノム解析技術を確立した。現在、分子生態解析データの詳細な解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：To know the relationship between microbial distribution and thermohaline circulation, we conducted high-resolution microbial sampling and ecological analyses on an observatory transect across north Pacific subarctic zone. Moreover, we tried to construct a method of shotgun metagenomic library construction from less than 1 ng of DNA to apply the genome level identification of the deep waters along with the observatory transect. As a result, we found anomalous increasing of microbial biomass 1000-2000 m above the seafloor that are not simply explained by the effects of sinking organic matters. We conclude that the thermohaline circulation likely influenced the microbial ecosystem in deep waters. In addition, we successfully constructed shotgun metagenomic libraries from 10 pg of DNA. We are processing molecular data sets to clarify the relationship between microbial distribution and thermohaline circulation.

研究分野：微生物生態学

キーワード：海洋微生物 熱塩循環 海洋循環 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

微生物は海洋表層から深海底迄、海水中のあらゆる場所に棲息するが、その分布は決して一様ではない。有光層から深海底まで、温度や塩分濃度、そして特定深度を流れる潮流等、物理化学的性質による成層構造が形成される。そして、微生物の分布は、それぞれの水塊におけるエネルギー源、炭素源や栄養塩等の物理化学的条件により規定される。従来、深海の微生物生態系は、分解と再生産を経つつ供給される海洋表層から沈降する有機物に支えられるとする線形の単純なモデルとして捉えられていた。しかし、近年の微生物生態研究の進展は、この微生物生態系と物質循環のモデルに大きなパラダイムシフトをもたらしつつある。即ち、有機物の分解(副)産物であるアンモニア、硫黄化合物をエネルギー源とし、二酸化炭素を固定する化学合成菌(アーキア・バクテリア両界に広く分布する)が、暗黒の深海環境において広く分布し、物質循環に重要な影響を及ぼしている可能性を強く示す知見が続いて報告されているのである。

一方、深海環境における微生物分布の遺伝的な拡がりについては、依然として、極めて知見が乏しい状況にあった。先駆的な研究としては、Ghiglioneらが次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子多様性解析によって北極と南極の海洋微生物相を比較し、表層の微生物相では両極域で相違が大きいものの、水深200m以深の深海微生物相では両極の微生物相に共通性が見られることを示していた(2012)。また、Galandらも、北極海において水深200-1200m程度までの微生物相が海流により支配されている可能性を示唆している(2009)。申請者らも日本海溝、マリアナ海溝において、水塊の成層構造に対応して微生物相が変化することを明らかにした(Nunoura et al.2015,2016)。特に、アンモニア酸化アーキアにおいては、マリアナ海溝域と日本海溝域において、水塊構造毎に相当程度類似するSSU rRNA遺伝子が検出されたことは、西太平洋域における水塊構造に支配された微生物分布の存在を示唆している。しかし、これらは相当程度に局所的な観察に過ぎず、深海微生物の地球規模の分布拡大・集団交流に対する海流や水塊構造の役割を裏付けるには十分なデータは得られていない状況にあった。

2. 研究の目的

全球規模での深海微生物集団の交流が存在するならば、千年スケールで北大西洋極域から南極・北太平洋に至る深層熱塩循環が最も有力な交流経路として考えられる。これまでの、深海微生物の地球規模の生物地理については、上述の通り、限られた調査地点から採取した試料中の微生物群集構造(16S rRNA遺伝子多様性解析)比較が報告されている他は、限られた単離菌株の16S rRNA遺

伝子の類似性に基づく議論が行われてきたに過ぎず、具体的な深海微生物の分布拡大・集団交流が生じる場についての十分な検証、議論は行われてこなかった。本研究においては、深層熱塩循環と微生物分布の関係を明らかにする為、深層熱塩循環の深層流に沿った複数の調査地点と、その深層流から外れた調査地点にて観測・調査を実施し、この深層流固有の微生物相が存在するのか、特定の系統群にのみ深層流固有集団が存在するのか、あるいは、深層流固有の微生物相は存在しないのか明らかにする。本研究により、深層熱塩循環に固有の微生物群集が存在・維持されることが明らかになれば、全球規模における深海微生物の生物地理・遺伝子多様性を解明する上での重要な基礎的知見を得ることとなる。

3. 研究の方法

熱塩循環観測する測線：千島列島に沿って北上し北太平洋亜寒帯域を横断する測線(WOCE P01)及び日本東方沖測線(WOCP10N)の再観測を目的としたMR14-04航海に参加し、約100の測点にて、海洋表層から海底まで高密度微生物計数試料を採取した他、約20の測点において、同様に分子生態解析用試料を採取した。なお、各航海の概要は以下のホームページにまとめられている。

(http://www.godac.jamstec.go.jp/darwin/cruise/mirai/mr14-04_leg1/j)(http://www.godac.jamstec.go.jp/darwin/cruise/mirai/mr14-04_leg2/j)。

微生物細胞数測定は、船上にてグルタルアルデヒド等固定後、超低温にて凍結保管を行った。そして、研究室にて、フローサイトメトリーによる自動計測により計数を実施した。

分子生態学解析においては、観測点毎に10-15試料を対象に、PCR増幅したSSU rRNA遺伝子に対する次世代シーケンサーによるタグシーケンス解析を実施した他、観測点毎に5-7試料を対象に、同様に次世代シーケンサーによるショットガンメタゲノム解析も実施した。なお、このSSU rRNA遺伝子タグ解析には、一度に真核生物・アーキア・バクテリアの全ての配列情報を取得できる混合プライマー(Nunoura et al. 2012)を用いている。

本計画の立案時においては、海外研究機関との共同研究による最先端のシングルセルゲノム解析による海域間・水塊間のゲノム配列比較を想定していたが、その後、シングルセルゲノム解析におけるゲノムカバー率が必ずしも高くないこと、また、シーケンスコストが通常の微生物ゲノム解析に比べ、極めて高額に上がることが明らかになったこと、更に、ショットガンメタゲノム解析におけるin silicoのゲノム再構築技術が著しく向上したことから、本研究においては、メタゲノム

解析によるゲノム情報の比較解析を実施するべく方針を変更した。

更に、この航海では従来の深海水塊を対象としたショットガンメタゲノム解析で用いられてきた海水量(10-100L)を得ることができず、最大でも 3-4L の海水を濾過して捕集した微生物細胞からの解析フローを検討する必要が生じた。そこで、高効率の核酸抽出法、抽出した微量核酸の適切な保管法、微量核酸からのショットガンメタゲノムライブラリー構築法の検討を併せて進め、新たに検討した手法を用いたショットガンメタゲノム解析を実施することとなった。

4. 研究成果

微生物細胞数の計数の結果、多くの観測点において、海底から 500-2000m 上から海底直上に至る水塊において、微生物マスの上昇が認められた(図 1)。海洋表層から分解・再生産を繰り返しながら沈降する有機物に支えられるとする線形の単純なモデルでは、このような深層での微生物数の増加を説明することは出来ない。また、海底から遠い深度においても微生物数の増加が見られることから、海底直上で観察される沈降有機物が滞留するネフロイド層の影響として説明することも難しい。従って、この微生物プロファイルは、深層における熱塩循環等の深層での潮流に依存した横からの有機物供給の兆候として解釈される。

この他、共同研究者が、同じ試料を用い、放射性標識された基質を用いた微生物活性の測定を実施した他、微生物活性をある程度反映すると考えられるウイルス粒子の分布量についてもフローサイトメーターによる計数を進めている。

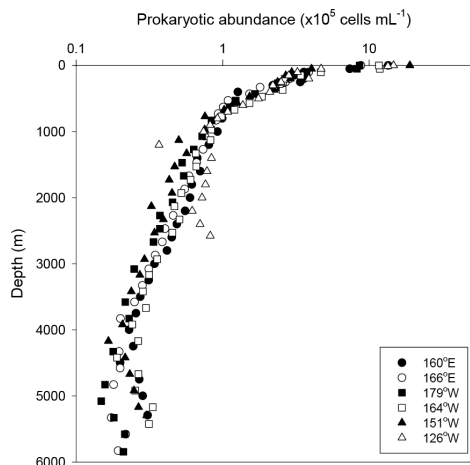


図 1. 海洋表層から海底直上までの微生物数の分布。海底面から 500-2000m の高さにおいて、微生物マス分布のパターンがその上の水塊と比べ変動が大きくなる。

一方、分子生態解析においては、SSU rRNA 遺伝子の次世代シーケンサー MiSeq によるタグ解析、メタゲノム解析を進めている。また、その準備として、限られた環境微生物試料からの核酸抽出法、核酸保管法、そして微量核

酸からのショットガンメタゲノムライブラリー構築手法の検討を実施した。

微生物試料からの DNA 抽出は、微量な核酸試料の実験環境における生物的汚染を避ける為、用いる試薬は全て市販キットあるいは、オーダーメイドにて試薬メーカーにて調製された品を利用した。また、全ての操作は卓上クリーンシステム下にて実施した。核酸抽出及び保管の実際は以下の通りである。フィルターに捕集した微生物試料から効率良く核酸抽出を行う市販キットが存在しないため、細胞分解は、SDS を含む溶菌バッファーを用いた。その後、DNA の粗精製液を市販の DNA 抽出キットのバッファーと混合し、以降の精製は市販キットのシリカカラムを用いる DNA 精製システムを利用することとした。得られた核酸は DNA が壁面に吸着しないプラスチックチューブ DNA LoBind チューブにて保管を行った。なお、この保管チューブを用いることで、超低温でも長期保存が出来なかった低濃度の DNA を 1 年以上安定して保存することに成功している。

更に、微量核酸を初発とするショットガンメタゲノム解析を実施する為、市販の MiSeq 対応のライブラリー構築キット、即ち物理切断・リンカーライゲーション法に基づく KAPA Hyper Prep キット、トランスポゼースを用いたタグメンテーションに基づく Nextera XT キットについて、それぞれのキットにおける推奨最低 DNA 量である 1ng を下回る DNA からのライブラリー構築条件を検討した。その結果、それぞれにおいてタグ配列と核酸の混合モル比や PCR サイクル数等を改変することで、10pg の微量核酸からの安定したショットガンメタゲノムライブラリーの構築が可能であることを示した。また、この解析から得られた情報を解析した結果、ライブラリー構築手法が、初発核酸量の差異よりも、ライブラリー組成 (GC 含量や SSU rRNA 遺伝子群集組成) に与える影響の方が大きいことが示された(図 2)。なお、一連の核酸精製手法及び微量核酸からのメタゲノムライブラリー構築手法については、論文として取りまとめ、Hirai et al. として投稿中である。

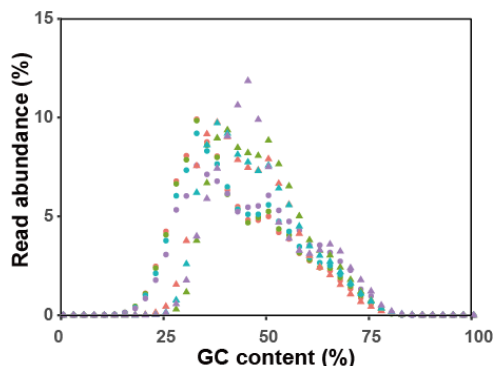


図 2. KAPA Hyper Prep キット (丸) Nextera XT キット (三角) を用い、1pg から 1ng までの初発 DNA (海洋微生物群集から抽出した DNA) から構築したショットガンメタゲノムライブラリーから得たシーケンスリー

ドの GC 含量分布。GC 含量の高い領域ではある程度の共通性が存在するが、GC 含量の低い領域では、キット間の差が大きくなる(Hirai et al. 投稿中より)。

最終的に、新たに構築した微量核酸からのメタゲノムライブラリー構築手法を用い、ゲノムレベルでの地域間、水塊間の多様性を評価する為、約 10 の観測点において、それぞれ 5-7 の深度から採取した微生物試料を用いてショットガンメタゲノムライブラリーの構築に成功し、シーケンス解析を実施した。いずれも、ラボでの生物学的汚染の程度が軽微な良好なデータの取得を確認している。現在、SSU rRNA 遺伝子タグ解析及びショットガンメタゲノム解析から得られた分子生態学データの情報解析を進めており、深海熱塩循環の微生物分布に与える影響を SSU rRNA 遺伝子配列によるリボタイプだけでなく、多様な機能遺伝子を対象とした多形解析から明らかにすることを目指している。今後、一連の成果は、複数の論文に取りまとめられる。

<引用文献>

- Ghiglione Jean-Francois ら、Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Science United States of America、2012、109、17633-17638
- Galand E Pierre ら、Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. The ISME Journal、2009、4、564-576
- Nunoura Takuro ら、Hadal biosphere: insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on Earth. Proceedings of the National Academy of Science United States of America、112、E1230-E1236
- Nunoura Takuro ら、Distribution and niche separation of planktonic microbial communities in the water columns from the surface to the hadal waters of the Japan Trench under the eutrophic ocean. Frontiers in Microbiology、7、1261
- Nunoura Takuro ら、Microbial diversity in deep-sea methane seep sediments presented by SSU rRNA gene tag sequencing. Microbes and Environments、27、382-390.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

平井美穂、西真郎、津田美和子、高木善弘、布浦拓郎、超微量環境 DNA からのメタゲノムライブラリー構築に関する技術的検討、日本微生物生態学会第 31 回大会 2016 年 10 月 23-25 日、神奈川県横須賀市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

布浦 拓郎 (NUNOURA, Takuro)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究開発センター長代理
研究者番号：60359164

(2)研究分担者

高木 善弘 (TAKAKI, Yoshihiro)
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任技術研究員
研究者番号：10399561