

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12578

研究課題名(和文) 燃える氷：メタンハイドレートが作りだす生命フロンティアの開拓

研究課題名(英文) Research for the Frontier of Life Sciences by Methane hydrate

研究代表者

幸塚 麻里子 (Kouduka, Mariko)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：60706365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、燃える氷で知られるメタンハイドレート中で過去の生物が長期保存されているかの検証とメタンハイドレートが周囲に作り出す高塩分環境に適応した微生物群集の解明である。最初に申請者らは、顕微鏡観察とメタゲノム解析によって、メタンハイドレートには微細粒子状の鉱物が封じ込められており、外側から遮断された鉱物内には微生物群集が存在していることが明らかにした。さらにメタンハイドレート周辺の海洋堆積物には、過去の水塊に生息したプランクトン由来の化石DNAが状態良く保存されていることも本研究では明らかにし、過去の環境変動に影響を受けて変化した生態系の復元を復元することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、地質学・地球化学・微生物学・分子生物学を専門分野とする研究者が協力することにより、メタンハイドレートに封じ込められた微粒子状の鉱物内に微生物生態系が存在することを明らかにした。研究者らは、メタンハイドレート付近の海洋堆積物から過去の水塊に生息した生物由来の化石DNAを取得し、環境変動の影響によって変化した生態系を明らかにすることにも成功した。メタンハイドレートに着目することによって、古生物学や古環境学を調べる新たなツールとして化石DNAを提案できる状態にした。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was aimed to demonstrate the preservation of biological entities in methane hydrate and halophilic microbial communities thriving under high salt conditions formed by hydrate formation. We demonstrated dolomite nodules trapped in methane hydrate are internally vacant where microbe-like cells were detected by fluorescence microscopy. In addition, we demonstrated ancient DNA originated from eukaryotic communities was preserved in methane-hydrate-bearing marine sediments. Taken together, it is evident that methane hydrate and its associated sediments are great archives for the past marine ecosystem.

研究分野：分子生物学

キーワード：メタンハイドレート ドロマイト 化石DNA 海洋堆積物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本海のメタンハイドレートは、生産試験が行われた太平洋側の海底下 300 メートル付近の砂層に胚胎するのと異なり、表層堆積物に集積することが代表者らの調査で明らかになっていた。掘削や孔内検層の結果からは、日本海のメタンハイドレートは粒状に形成し、堆積物を内部に取り込むことが明らかになっていた。それまで資源量評価と共に行われてきた学術研究では、主に堆積物を用いて有機物や微化石等のプロキシを用いた古環境復元や海底下生命権の研究が行われており、前者についてはメタンハイドレートを伴うサイトでは 10 万年前の堆積物から微化石由来の DNA が状態良く保存されていることを代表者らは明らかにしていた(Kouduka, Suzuki et al., Goldschmidt2014)。後者に関しても、メタンハイドレートに未培養で新規な系統群に属する原核生物が生息しており、メタンハイドレートを伴う堆積物中では未知の生命現象が起きている可能性が指摘されていた(Yanagawa, Kouduka, Suzuki et al., JAES. 2014)。

### 2. 研究の目的

燃える氷で知られるメタンハイドレートは、低温で高水圧な深海や海底下深部で安定なため、メタンハイドレートを手にすることは困難であった。次世代国産燃料としての期待から、日本海におけるメタンハイドレートの資源量調査が進むにつれて、海底面から海底下 100 メートルの安定領域内でハイドレートが大量に存在し、メタンハイドレートを塊のままサンプリングすることが可能となった。本研究は世界で初めて、水の氷と同様にメタンハイドレート中で生物が長期間保存されているか検証する。また我々が着想したアイデアである、メタンハイドレートが水分子を結晶構造に取り込むことで形成する高塩分環境に適応した微生物群集の生息と、「塩漬け」効果による生物の長期保存性の可能性について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 蛍光トレーサーを用いた徹底した汚染の評価

平成 27 年度に実施した日本海の海底掘削調査で、掘削流体に蛍光トレーサーを添加して、メタンハイドレート、メタンハイドレートに含まれる堆積物及び近傍の堆積物を複数の深度で取得した。得られたコア試料内部から蛍光トレーサーの濃度を高感度に測定するために、交雑する有機物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により除去し、蛍光高度計で定量する。一方、メタンハイドレートの塊については外側は掘削流体において汚染しているので、液体窒素で保存した試料を融解する前にエタノールで掘削流体を取り除き、汚染のレベルを提言する。また、掘削流体だけでなく、サンプル保存中の大気もサンプリングして汚染源の評価も実施する。サンプル保存後はクリーンベンチやクリーンルーム内で DNA 抽出を行い、汚染を完全に排除する。

#### 試料中に含まれる全生物相の網羅的解析

汚染の検出されないことを確認した試料中の生物相を調べるために、本研究では原核生物は 16S rRNA 遺伝子配列、真核生物は 18S rRNA 遺伝子配列を用いる解析を行なった。そのために、代表者が開発した 0.5M NaOH と TE バッファーの混合液中で熱を加えながらインキュベーションして DNA を取り出すアルカリ加熱法(Kouduka, Suzuki et al., FEMS, 2011)によって、堆積物試料及びメタンハイドレートからの DNA 抽出を行なった。

鉱物からの DNA 抽出は内側と外側を分けて処理するために、最初に抽出溶液を加えて低温で処理を行った後、反応溶液を取り出し Tris-HCl を用いた中和溶液を加えることで鉱物の外側を洗った。最初の溶液を除去した後に、再びアルカリ溶液を加えて加熱処理を行って中和処理したものを内部からの DNA 溶液として実験に用いた。メタンハイドレートは塊の外側をエタノールで融解させながら洗い流した後、内側を試料として用いた。DNA を抽出するために、滅菌済みのチューブ内でメタンハイドレートは融解させた後、遠心機を用いて内側に封じ込められていた微生物細胞を沈殿させて回収した。遠心後の試料に、アルカリ溶液を加えて加熱処理し、中和処理とエタノール沈殿による濃縮を行ったものを DNA 溶液として次の作業に用いた。

抽出した DNA から 16S rRNA 遺伝子及び 18S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅し、試料ごとに Tag 付けを行い、配列決定の準備をした。配列決定は Miseq で行い、試料ごとに数万配列以上を取得する。取得した配列は配列処理用プログラム(Mothure)を用いて、キメラチェック、アノテーション等のパイオインフォマティクス処理を行った後、97%の類似度の配列同士でグルーピングを行い OTU (operational taxonomic unit) にまとめた。OTUs を Blast 解析及び系統解析して、鉱物内部で検出された微生物の生物種情報や生息環境に関する情報をまとめた。

### 4. 研究成果

#### 海洋堆積物中に保存された化石 DNA から過去の生態系を復元

本研究では初めに、申請者が先行研究で微化石由来の DNA が状態良く保存されている上越沖の海鷹海脚のメタンハイドレートを伴うサイトの堆積物を対象に、過去の生物相の復元を行った。また、メタンハイドレートを伴わないサイトの堆積物と DNA の保存性について比較した。

掘削や作業中の汚染を低減するために、本研究では船上で掘削コアの内側からサブコアリングしたものを冷凍保存した試料を用いた。さらに、クリーンベンチ内でサブコアリングした試料の外側を除去したのから DNA 抽出を行った。

まず、各サイトで 8.7 mbsf(29 ka)から 31 mbsf(10 ka)から掘削した堆積物を対象に、化石 DNA の保存性について検証した。堆積物から抽出した DNA を対象に、18S rRNA 遺伝子を用いた定量 PCR をおこなった結果、メタンハイドレードを伴うサイトでは伴わないサイトに対して DNA の保存性が高いことが確認された。さらに、検出された 18S rRNA 遺伝子をサンプル毎に次世代シーケンサーによって配列解析を実施した。得られた配列を OTUs にまとめ、Blasta 解析及び分子系統解析によって近縁の生物種を同定したところ、現在の堆積物中には存在し得ない水塊中に生息する植物プランクトンや珪藻が検出されていた。さらに、微化石としては残らないことで知られる放散虫のアカンタリアも、化石 DNA 解析によって検出することに成功した(図)。この結果は論文としてまとめ、国際誌 (*Geobiology*) に掲載した。

次に本研究では化石 DNA によって、環境変動に影響を受けた海洋生態系の変化を評価可能か調べた。対象とする試料には、日本海の最上トラフで約 1 万年前の海底堆積物を用いた。結果、1 万年前に起きた急激な温暖化に影響を受けた生態系の変化を数千年単位で調べることに成功した。1 万年前の堆積物からも珪藻など微化石としても検出される生物種の他に、硫酸ストロンチウムの殻を持ち微化石としては保存されないことで知られる放散虫のアカンタリアが検出されている。さらに、分子系統解析に検出された放散虫や珪藻と近縁の環境 DNA を調べることによって生息環境についても明らかにした。これらのプランクトンは、現在の最上トラフ付近には生息していない種で、1 万年前の海面上昇で日本海に海水が流れ込んだ際に、運ばれてきた可能性が高い。本結果は、化石 DNA が当時の生態系だけでなく海流の流れなど環境を復元するための重要な情報を持つことを示している。

#### メタンハイドレート中に微生物が封じ込められている鉱物を発見

堆積物を用いて化石 DNA を抽出及び解析する技術が確立されたので、日本海海底下のメタンハイドレートへの適応を試みた。最初にメタンハイドレートから直接 DNA を抽出し調べた結果、原核生物の好塩性メタン生成古細菌を検出することに成功した。しかし、検出された好塩性メタン生成古細菌を系統解析により、周囲の堆積物と比較したが、高塩分環境に適応したと考えられる固有の系統をメタンハイドレート中では発見することができなかった。次に、メタンハイドレートに取り込まれていたドロマイト鉱物に注目した。ドロマイトは、メタンハイドレートを融解した際に微量に採取できる粒状の鉱物である。採取されたドロマイト鉱物を顕微鏡観察した結果、粒状の鉱物内に空間があることが確認された。そこで、内部を細胞観察したところ外側とは明らかに異なる数の微生物細胞を確認することに成功した。これらの微生物細胞は、鉱物が形成した時に閉じ込められたもので、当時の環境に適応した種の可能性がある。

そこで、鉱物内部の微生物群衆を調べるために、16S rRNA 遺伝子プライマーを用いたメタゲノム解析を行った。しかし、通常の DNA 抽出法では内側に閉じ込められている鉱物が形成した当時の細胞だけでなく、外側に付着した細胞由来の DNA も区別なく抽出され分けることが困難だった。そこで、本研究では 2 段階アルカリ加熱法によって、鉱物の外側と内部で分けて DNA を抽出した。抽出した DNA に対し、原核生物の 16S rRNA 遺伝子を用いた定量 PCR で定量した結果、内側に比べて外側は DNA 量が多いことが確認された。また、確認された原核生物の DNA の由来を調べるために、抽出した DNA に対し 16S rRNA 遺伝子プライマーを用いてメタゲノム解析を実施した。得られた配列情報を処理した結果、鉱物の内部には外部と

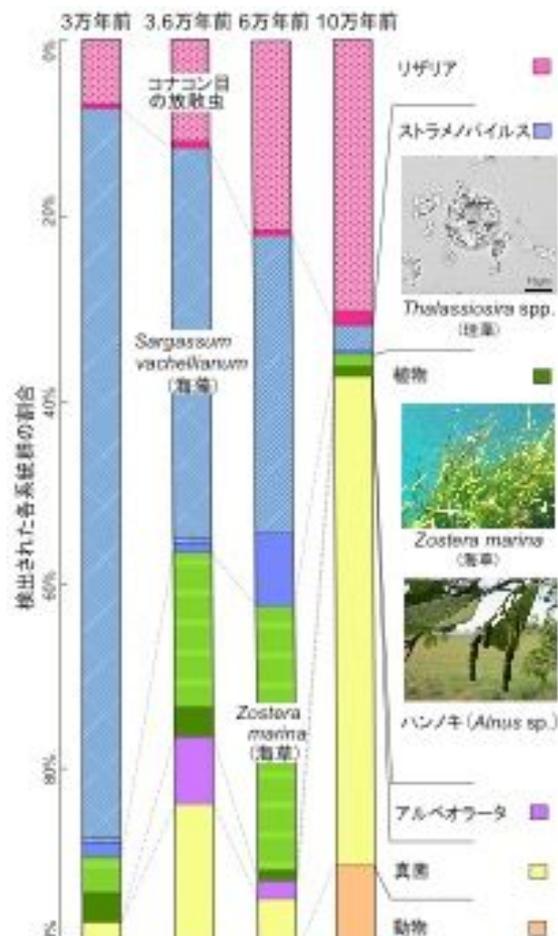


図. 日本海上越沖冷水湧出帯の化石 DNA 配列から復元した 3~10 万年前の生物相。帯グラフは各年代で検出された起源生物の系統群の割合で、右の写真は検出された生物の写真(珪藻の化石は秋葉氏撮影により、その他は著作権フリーサイト pixabay: <https://pixabay.com> から引用)。

は異なる微生物群衆が存在していることが解明された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

下線は研究代表者及び研究分担者、\*は筆頭著者、#責任著者

1. Yamazaki T, Suzuki Y, Kouduka M, Kawamura N (2019) Dependence of bacterial magnetosome morphology on chemical conditions in deep-sea sediments. *Earth and Planetary Science Letters*. 513, 135-143.<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.02.015>[査読あり]
2. Kouduka M\*, Tanabe SA, Yamamoto S, Yanagawa K, Nakamura Y, Akiba F, Tomaru H, Toju H, Suzuki Y#. (2017) Eukaryotic diversity in late Pleistocene marine sediments around a shallow methane hydrate deposit in the Japan Sea. *Geobiology*. 15(5), 717-725.DOI: 10.1111/gbi.12233.[査読あり]
3. 鈴木庸平\* (2017) 急激な地球温暖化は海洋生態系に何をもたらすのか? ~化石 DNA による近過去の復元と将来予測への挑戦.*Japan Geoscience Letter*. 13(2), 20-23. [依頼, 査読あり]

[学会発表](計 5 件)

下線は研究代表者及び研究分担者、\*は筆頭著者、#責任著者

1. Kouduka M\*, Suzuki Y. Reconstruction of key ecological responses leading to the most recent dead zone formations in Japan Sea through ancient DNA metabarcoding. Japan. Geoscience Union MEETING2019,BCG06-P03,Makuhari, 2019.
2. Snyder G, Suzuki Y, Kouduka M, et al. Microdolomitic evidence for deep biosphere contained inside of the saline inclusions within Japan Sea massive gas hydrate. Geoscience Union MEETING2018, BCG07-06,Makuhari, 2019.\_
3. Kouduka M\*, Suzuki Y. Reconstructing Ecological Responses to Last Global Warming Recorded in Japan Sea Sediment through Ancient DNA Analysis Japan. Geoscience Union MEETING2018, BCG07-P02,Makuhari, 2018.
4. Kouduka M\*, Suzuki Y. Eukaryotic diversity in late Pleistocene marine sediments around a shallow methane hydrate deposit in Japan Sea.JpGU-AGU Joint Meeting 2017, MIS22-P11, Makuhari[国際学会]
5. 鈴木庸平\*, 微生物細胞の局在化で解明する地球規模で進行する鉱物-水反応のフロント, 日本鉱物科学会年会, 2017 年

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 庸平

ローマ字氏名：(SUZUKI, Yohey)

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院理学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00359168

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、研究者個人に帰属されます。