

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12133

研究課題名(和文)化石DNAのゲノム情報から復元する急激な地球温暖化の海洋生態系への影響

研究課題名(英文) Effects of rapid global warming on marine ecosystems reconstructed from genomic analysis of fossil DNA

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本海における海洋生態系の変化を調べるために、海洋堆積物から化石DNAを抽出し次世代DNA配列解析を実施した。本研究では、山形県沖の海洋堆積物に適用した。山形県沖の海洋掘削コアには、約1万年前の急激な温暖化で無酸素化した際に形成した暗色の葉理層が含まれる。山形県沖の海洋堆積物を用いた。DNA解析では、暗色の葉理層から珪藻で赤潮の原因として知られている分類群が増えていることが明らかになった。また、プライマーの偏りのない生物相復元の試みを行うため、プロテオーム解析とメタゲノム解析の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本海は過去に何度も海底環境が無酸素化したイベントを繰り返してきており、無酸素条件時に形成した葉理を伴う堆積物の方がDNAの保存性が高まると期待された。本研究では、最も近過去の無酸素条件で形成した暗色の葉理層から抽出した化石DNAを用いることで、気候の変動と共に変化する生物相を復元した。表層から深部まで、化石DNA解析による生物相の復元が可能である可能性を広げた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we extracted fossil DNA from marine sediments and performed next-generation DNA sequence analysis to investigate changes in marine ecosystems in the Sea of Japan. In this study, we analyzed marine sediments off the coast of Yamagata Prefecture, which contained dark laminated layers that formed during anoxia due to rapid warming about 10,000 years ago. DNA analysis revealed that the dark lamination layers was enriched with diatom taxa known to cause red tide.

研究分野：分子生物学

キーワード：化石DNA メタゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

海洋堆積物は水塊中に生息する生物が死滅後に降り積もって形成するため、堆積物には連続的に過去の海洋生態系の変遷が記録されている。大陸縁辺の閉鎖的な海域は、底層の無酸素化により生物擾乱(底生生物による堆積物のかき乱し)がないため、堆積物に縞状の葉理が形成される。葉理一枚一枚に含まれる化石や生物分類群に特徴的なバイオマーカーを調べて、環境変動にตอบสนองした生態系の変遷が復元されてきた。しかし、化石やバイオマーカーが堆積物に残る生物の種類が限定的で、化石生物の生活環、代謝、進化等の情報を得ることはほぼ不可能であった(Armstrong & Brasier, 2004)。次世代シーケンサーによるゲノム配列の取得とゲノム編集技術の急速な進展により、現生生物については、比較的容易に代謝や進化を解明可能になった(Sharon et al. 2013)。仮に環境変動を記録した堆積物中に、当時の海洋で生息した生物のゲノムがタイムカプセルのように保存されていれば、ゲノム解析技術を駆使して、環境変動にตอบสนองした生態系の変化と、過去の生物の代謝と進化を解明できる。応募者の先行研究により、半閉鎖的な海域である日本海の新潟県沖の堆積物中に、10 万年前に生息した生物の DNA が保存されているのを発見し国際誌(Geobiology)で発表した(図 1, Kouduka, Suzuki et al. 2017; 日本地球惑星科学連合ニュースレターと日本経済新聞 web 版 2017 年 10 月 12 日付に取り上げられた)。

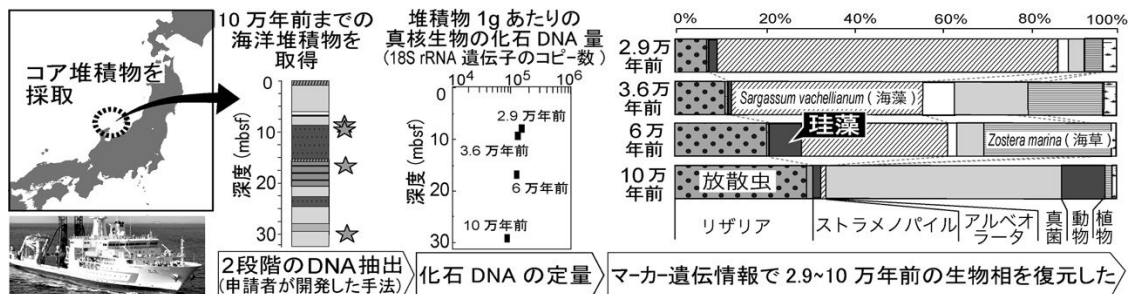


図 1. 日本海の過去 10 万年に堆積した試料中の化石 DNA 研究の結果(Kouduka, Suzuki et al. 2017)。

最終氷期 2 万年前の日本海は、海水準が現在より 130 メートル低く、海峡を通じた外海からの海水の出入りが停止した。その後、陸からの淡水流入で水塊が成層し、還元的な海底環境だったことが知られている。

最終氷期以降の温暖化により海水準が上昇し、対馬海峡と津軽海峡が開いたため、北太平洋と東シナ海から親潮と黒潮が流入した。ヤンガードリアス期で知られる約 1 万年前の寒冷化イベントを経験した直

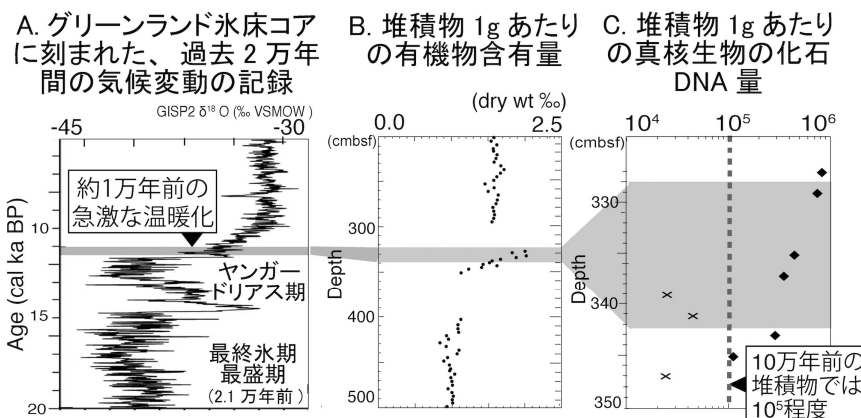


図 2. 山形県沖から採取した堆積物の形成当時の気候変動の特徴 (A)、有機物含有量の変化(B)、真核生物由来の化石 DNA 量の変化 (C)。

後に、急激な全球規模の温暖化が起きたことが、グリーンランドの氷床コアの酸素同位体組成や日本海の堆積物中の有孔虫の殻の酸素同位体組成から支持されている(図2A)。応募者が約1万年前に形成した日本海の海洋堆積物を調べた結果、急激な温暖化に伴って堆積物中に含まれている有機物量が大きく変化していた(図2B)。さらに、真核生物由来の化石 DNA が保存されていることを確認した(図2C; Kouduka, Suzuki et al. 2019)。

急激に進行する地球温暖化は、貧酸素水塊の増加を伴うと予測されており、海洋生態系に大きな影響を及ぼすことが危惧される。Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) の第5次報告書は、地球温暖化は沿岸域の漁獲量を激減させ、水産業に大打撃を与えると警告している。本研究の問いである「近過去の急激な地球温暖化でどのように海洋生態系が変化するか？」について理解することは、現在進行する地球温暖化に対する海洋生態系の応答を予測する上で非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本申請の目的は、最も近過去に起きた急激な温暖化に応答して海洋生態系がどのように変遷したのかを、次世代 DNA 配列決定装置を用いた化石 DNA の解析により明らかにすることである。急激な地球温暖化の影響を受けた生物相を明らかにし、生活環や代謝様式の推定からなぜ地球温暖化の影響を受けやすいのかを考察する。

これまでは古環境分野で、生物の形態が鉱物の殻により残る生物相(有孔虫、珪藻、ハプト藻類)、生物相に固有の有機化合物であるバイオマーカー(ポルフィリン環や脂質)が用いられてきた(Itaki et al. 2004, Volkman et al. 1998)。しかし、これらの記録が堆積物中に残らない生物相については情報が皆無であった。近年、海水中の環境 DNA を用いて水塊に生息する魚類を含む生物相全般の解析が可能になったが、長い時間軸での生物相の変遷の追跡には堆積物に積み重なった記録を紐解く必要がある。これらの知見は生物の分布や生物多様性の変化と共に、水産資源の漁獲量に地球温暖化が与える影響を復元できる可能性があり、地球温暖化に対する海洋生態系の応答を多角的に研究する新しい学術体系の構築が期待される。

## 3. 研究の方法

DNA 抽出及びリボソーム RNA 遺伝子アンプリコン解析による解析

岩石試料からの DNA 抽出は、申請者らが開発したアルカリ加熱抽出法(Kouduka, Suzuki et al 2012)を用いて行った。試料から抽出した DNA 溶液をテンプレートに、ユニバーサルプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、リボソーム RNA 遺伝子を増幅した。リボソーム RNA 遺伝子の増幅反応には、Ampdirect(島津製作所)および LA taq ポリメラーゼ(タカラバイオ社)を用いた。PCR 反応産物は、1.5 % アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、SYBR green 用いて蛍光染色して、得られた DNA 断片の長さを確認した。増幅したリボソーム RNA 遺伝子の次世代シーケンス解析は、イルミナ社の Miseq300PE を用いてペアエンドシーケンシング法にて実施した。得られた配列情報は、denoising を行った後、DADA2 がパッケージされた Qiime2 を用いて、群集構造解析を行った。また、ゲノム解析を実施するために、抽出したゲノム DNA を用いて、KAPA Hyper Prep kit for Illumina (KAPA Biosystems)によるショットガンライブラリ構築を行ったが、DNA 量が少なく、解析不可能だった。

プロテオーム解析のためのタンパク抽出

海洋堆積物試料からのタンパク質は、界面活性剤の細胞溶解と細胞膜の物理的破碎を組み合わせた手法にて行った。はじめに、破碎した海洋堆積物試料中の細胞を破壊するために界面活性剤を含むバッファーを加えた。次に、超音波ホモジナイザーにより物理的破碎を行った後、遠心分離により沈殿物を除去し、上澄みをタンパク質抽出物とした。抽出したタンパク質は、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にて解析、濃度は BCA 法により測定した。濃度を確認したタンパク質溶液は、還元、アルキル化、酵素消化、脱塩のプロテオーム解析用の前処理を行い、再度、濃度の測定を行った。

#### 4. 研究成果

先行研究にて、新潟県沖の堆積物を対象に、10 万年前までの海洋生態系の魚類を含む生物相の種レベルでの復元に成功していたので (Kouduka, Suzuki et al. 2017)、本研究では、同様の手法を平成 26 年度に海洋資源調査船「白嶺丸」で取得済みの山形県沖の海洋堆積物に適用した。山形県沖の海洋掘削コアには、約 1 万年前の急激な温暖化で無酸素化した際に形成した暗色の葉理層が、その前後の生物擾乱を受けた堆積物と連続して含まれる。

令和 2 年度は、18S rRNA 遺伝子を用いた約 1 万年前の生物相の復元を実施した。試料には、約 1 万年前の山形県沖の海洋堆積物に対し、1 cm 間隔で暗色の葉理層とその上下の堆積物をサブサンプリングしたものをを用いた。同サンプルから抽出した化石 DNA を対象に、真核生物全般を網羅したユニバーサルプライマーを用いて 18S rRNA 遺伝子を増幅し、ライブラリーを調整した後、次世代 DNA 配列決定装置(Illumina 社製 MiSeq)を用いた解析を実施した。次に、得られた Raw データを対象に、バイオインフォマティクス解析(キメラチェック、クラスタリング処理、種分類解析)を行い、過去の海水中の生物相を復元した。暗色の葉理層に入る直前から終わるまで調べたところ、暗色の葉理層の中では一次生産者の珪藻で赤潮の原因として知られている分類群が増えており、葉理層が終わる境目では、無酸素水塊に生息する藻類が増加していた。

令和 3 年度は、令和 2 年度に取得した DNA 情報を用いたバイオインフォマティクス解析を行った。バイオインフォマティクス解析は、複数のプログラムソフトを用いて解析し、結果の比較を行った。他に令和 3 年度は、令和 4 年度に予定している「プライマーの偏りのない生物相復元の試みを行う準備」として、メタゲノム解析とプロテオーム解析の検討を始めている。メタゲノムを行うために実施した化石 DNA 抽出では、代表者が開発したアルカリ加熱法(Kouduka, Suzuki et al.2012)と市販の土壌試料を対象にした DNA 抽出キットを用いて、最適化を行った。また、プロテオーム解析のために、海底堆積物を破碎して、タンパク抽出を行った。抽出物をポリアクリルアミド電気泳動により確認し、BCA 法により濃度を測定した結果、タンパク質が抽出されていることが確認できた。

令和 4 年度は、令和 4 年度は「プライマーの偏りのない生物相復元の試みを行う準備」を行った。令和 3 年度に抽出したタンパク質をプロテオーム解析のために、還元、アルキル化、酵素消化、脱塩の処理を行った。しかし、処理したタンパク質を濃度測定したところ、解析に必要な濃度が得られなかった。BCA 法で測定した濃度が高かった理由としては、サンプル中の硫黄化合物(還元物質など)に影響を受けている可能性が考えられる。そこで、抽出するタンパク質量を増やすために、抽出方法の条件検討を行った。具体的には、界面活性剤を含むバッファーの添加量、試料の加熱処理の有無で実験を行い、ポリアクリルアミド電気泳動による確認と

抽出物の濃度測定を行った。加熱処理を行うと、抽出物が茶色く染まり、BAC 法で正確に濃度測定することが困難だった。条件を検討した方法でタンパク質を再度抽出し、還元、アルキル化、酵素消化、脱塩の処理を行った後に濃度測定したところ、測定に十分な量のタンパクを得ていることが確認できた。

ゲノム解析を行うためには、16S rRNA アンプリコン解析に比べ、DNA 量が必要となる。そこで、代表者が開発したアルカリ加熱法(Kouduka, Suzuki et al.2012)と市販の土壌試料を対象にしたDNA 抽出効率を比較した。堆積物からのDNA 抽出に関しては、表層と深部で条件を検討する必要性が確認された。現在、データに関しては取りまとめ中である。

- Armstrong HA & Brasier MD (2004) *Foraminifera. Microfossils*, 142-187.
- Sharon I, Banfield JF et al.(2013) *Genome research*, 23(1) 111-120.
- Kouduka M, Suzuki Y\* et al. (2017) *Geobiology*, 15:715-727.
- 鈴木庸平\* (2017) *Japan Geoscience Letter* 13 No.2.
- Kouduka M, Suzuki Y\*. *Japan. Geoscience Union MEETING2019*, BCG06-P03, 2019.
- Itaki T et al. (2004) *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 208(3-4), 263-278.
- Volkman J et al. (1998) *Organic Geochemistry*, 29(5-7), 1163-1179.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究で検討した海洋堆積物からのDNA抽出法は、バクテリアを対象にした解析にも有効であり、Takamiya, H., Kouduka, M., Suzuki, Y. (2022). Copper-Nanocoated Ultra-Small Cells in Grain Boundaries Inside an Extinct Vent Chimney. *Frontiers in Microbiology*, 13.でも用いている。化石DNAに関する成果は、現在取りまとめ中である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 庸平  (Suzuki Yohey)  (00359168)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関