

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281017

研究課題名(和文) アイスコアから解き明かす過去2万年間の微生物変遷と気候変動

研究課題名(英文) Microbial analysis from an ice core

研究代表者

瀬川 高弘 (SEGAWA, Takahiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：90425835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：過去約2万年から約千年毎のアイスコア試料を用いて、次世代シーケンサーによるゲノム配列の取得をおこなった。その結果、過去からの微生物群集の変遷を明らかにするなどの成果が得られた。また、アイスコア試料から検出されたシアノバクテリアの遺伝子配列から突然変異率を算出し、集団サイズの変動を推定した結果、現在の氷河上に生息しているシアノバクテリアは、1万年前から急激に集団サイズを増大させていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Ice cores drilled from glaciers can provide a means of direct analysis of microbes that grew in the past. The species composition of microorganisms in the ice cores could reflect the environmental condition at that time. Despite the ecological importance in glacial environments, the phylogeographic distributions and genetic structures of microorganisms in ice cores are still highly limited. We reconstruct the microorganisms by molecular DNA analysis collected from the ice core samples and their interactions within the community and with the environment on the sampled sites. We also detected two cyanobacterial species from the ancient ice core samples, and these OTUs are shared with those from the modern glacier surface. These OTUs detected from the ice core have been revealed to be distributed on glaciers all over Asia and in polar regions, and they also show regional adaptations shaped by dispersal limitations.

研究分野：生物学

キーワード：古代DNA アイスコア 微生物 環境変動

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タイムカプセルである。したがって、氷河の深い部分から採取した氷サンプル(アイスコア)を取り出して分析すれば、過去の環境変動について多くの情報を得ることができる。過去の環境変動に関するデータは将来の環境変動予測に不可欠な情報であることから、南極やグリーンランドなどで氷床アイスコア解析がおこなわれ、過去数十万年の地球環境が明らかになってきた。

アイスコア中の DNA 情報を時系列的に解析することで、微生物情報と環境変動や気候イベントとの関連性や人間活動との因果関係を解析できる可能性がある。近年、アイスコア中の微生物は海外でも注目されつつあるが、アイスコア中の DNA は量的に少ないだけでなく、断片化しているため、無菌的な全ゲノム増幅手法に加え、生物の系統推定を行うための配列比較解析が難しく、これまでゲノム解析をおこなった前例はない。そこで、アイスコア中のゲノム情報を用いた古環境復元を可能にする方法を確立し、時系列毎にアイスコア試料からゲノム解析をおこなうことで微生物群集の解明や、過去の微生物の遺伝子情報を用いた分子進化的な解析をおこなう。

2. 研究の目的

時系列的に採取したアイスコア試料を用いた遺伝子解析により、過去の遺伝的情報を直接取得し、産出される DNA データを解析し、生物種および遺伝子の機能分布の同定を行う。微生物情報と過去の環境変動との関連性や、アイスコア試料中に含まれる過去の DNA 情報を用いて分子進化的解析をおこない、分子進化的解析や過去から現在に至る微生物の集団サイズの変動の推定をおこなう。

3. 研究の方法

アイスコア試料に含まれる微生物密度は低く(おおむね 100 細胞/ml 以下)、かつ古代試料であるため、融解装置をもちいたアイスコア内部の無菌的採取や、コンタミネーションを極力排除した小数細胞からの DNA 抽出法、全ゲノム増幅手法、および新しいメタゲノムライブラリー構築手法の確立をおこなった。特に、古代試料から抽出した DNA 配列は断片化しているために、各種ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールを用いた予備的な実験をおこない、短かく断片化された DNA ライブラリー構築に優れたゲノムライブラリー作成の確立をおこなった。また、予め酵素類や実験室内などに含まれる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っ

た。ハイスループットシーケンサーから算出される大量のメタゲノムデータから様々な微生物配列の取得、種同定および遺伝子機能の解明をおこなう情報解析のパイプラインの構築や、大量の DNA データ処理及び大規模データベース検索を迅速に行う為にコンピュータ解析作業の最適化をおこなった。

構築した手法を用いて、過去約 2 万年から約千年毎のアイスコア試料や、世界各地の氷河から採取された雪氷試料からのメタゲノム分析や、16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域を PCR 法で増幅させ、クローニングおよびサンガーシーケンサーを用いた解読をおこない遺伝子解析を実地した。

4. 研究成果

微生物情報と環境変動との関連性を明らかにするために、先ず現生微生物群集の構成に環境要因が与える影響を評価し、次いで時系列的に採取したアイスコア試料分析により過去の微生物群集の遺伝的情報を直接取得し生物種および種内変異の継時的な遷移を解析した。

現在微生物群集の環境要因の影響に関しては、世界各地の氷河から採取された氷河表面のシアノバクテリアの集団構造の詳細な解析により評価した。南極や北極、アジア域から採取したシアノバクテリアから進化速度の速い ITS 領域の解析を行い、地理的に明瞭な遺伝的構造があることが示された(図 1)。

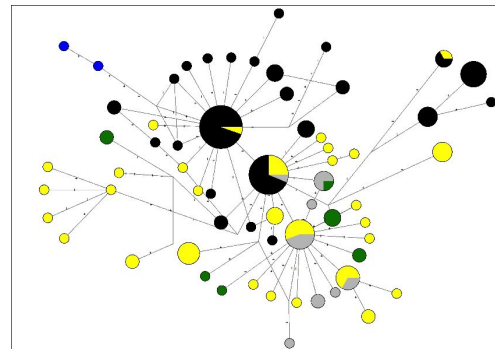


図 1 シアノバクテリア OTU0 のネットワーク図。各色は地域を表す。青：南極，緑：グリーンランド，灰色：アラスカ，黒：北アジア，黄：南アジア。

地理的な遺伝的構造が形成される要因を評価するために、地理的距離に基づく遺伝的分化度と環境要因に基づく遺伝的分化度を分散分析により抽出し、シアノバクテリア種間の比較を行った。その結果、地理的移動能力と環境適応性の違いで多様な遺伝的構造が出来ていることが示唆され、以下の 3 グループに分かれることが明らかとなった。

第 1 のグループは、地域間での明瞭な遺伝的構造が見られつつ、同一地域内の様々な氷河間では遺伝的分化がほとんど見られないグループである。これは地理的移動能力が低

いため地域間での遺伝的分化が起きており、その一方で環境の違いに対する感受性も低い。そのため、地域内での氷河間では遺伝的分化度が低いと解釈される。第2のグループは地域間での遺伝的構造が見られ、かつ地域内の氷河間でも遺伝的構造が見られるグループである。これは地理的移動能力が低いが、環境への感受性も高く地域内での環境要因によっても遺伝的構造が形成されるグループと解釈される。地理的距離と環境の違いという二つの要因の影響を受けて集団構造ができるため、遺伝的分化が最も顕著に起きている。第3のグループは地理的移動能力が高く、地域間で遺伝的な違いが見られないコスモポリタンの分布を示す一方、環境の違いに対する感受性が高く、地域内の異なる氷河で遺伝的分化が見られるグループである。

時系列的変動に関しては過去約2万年間の遷移を約千年毎にサンプルされたアイスコア試料を用いてゲノム解析を実地した。アイスコアから抽出したDNA断片からゲノムライブラリーの作成をおこない、イルミナ社の次世代シーケンサー（HiSeq および MiSeq）を用いてゲノム配列の取得をおこなった。サンガーシーケンサーを用いた16SrRNA遺伝子および16S-23S ITS領域の配列取得も同時におこなった。

その結果、過去からの微生物群集の系統組成の変動を解明し、過去の気候に応じて微生物相が変遷してきたことが明らかになってきた。また、6000年前や12500年前のアイスコア試料から、現在の氷河表面にも生息しているシアノバクテリア種の検出に成功した。検出に成功した2種のシアノバクテリアは、上述の第1のグループに属し、地域間の遺伝的構造を持ち地域内の氷河に幅広く生息するタイプであった。同細菌の配列は、古代由来であるものか、それとも現生からのコンタミネーション配列であるかどうかを検討するために、分子統計モデルを用いた検定法を考案した。その結果、アイスコアから採取された遺伝子配列は、コンタミネーションではなく古代由来である事を示すことが支持された。これは古代DNA解析において、配列の信憑性を獲得する上で画期的な成果である。さらに、突然変異率を算出し、Bayesian Skyline Plotによる集団サイズの変動を推定した結果、現在の氷河上に生息しているシアノバクテリアは、1万年前から急激に集団サイズを増大させていることが明らかとなった。

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5件）

Takumi Murakami, Takahiro Segawa, Roman Dial, Nozomu Takeuchi, Shiro Kohshima, Yuichi Hongoh (2017) Bacterial

microbiota associated with the glacier ice worm is dominated by both worm-specific and glacier-derived facultative lineages. *Microbes and Environments* 32(1):32-39. doi: 10.1264/jsme2.ME16158. (査読有)
瀬川高弘, 竹内望. 氷河・積雪上の微生物の生態. *日本微生物生態学会誌*. 2016. 21(2). 57-64. (査読有)

Jun Uetake, Sota Tanaka, Takahiro Segawa, Nozomu Takeuchi, Naoko Nagatsuka, Hideaki Motoyama and Teruo Aoki (2016) Microbial community variation in cryoconite granules on Qaanaaq Glacier, NW Greenland. *FEMS Microbiology Ecology*. 92 (9). fiw127. DOI:10.1093/femsec/fiw127. (査読有)

Takumi Murakami, Takahiro Segawa, Dylan Bodington, Roman Dial, Nozomu Takeuchi, Shiro Kohshima, Yuichi Hongoh (2015) Census of bacterial microbiota associated with the glacier ice worm *Mesenchytraeus solifugus*. *FEMS Microbiology Ecology*. 91 (3). fiv003. DOI: 10.1093/femsec/fiv003. (査読有)

Victoria Shcherbakova, Yoshitaka Yoshimura, Yana Ryzhmanova, Yukihiro Taguchi, Takahiro Segawa, Victoria Oshurkova and Elizaveta Rivkina (2016) Archaeal communities of Arctic methane-containing permafrost. *FEMS Microbiology Ecology*. 92(10). fiw135. DOI: 10.1093/femsec/fiw135(査読有)

〔学会発表〕（計7件）

牛田一成, 瀬川高弘. 大気を介した薬剤耐性菌の越境移動 氷河雪氷中の耐性遺伝子. 第90回日本細菌学会総会 2017年3月19日. 仙台国際センター(宮城県仙台市)

植竹淳, 瀬川高弘, 本山秀明, 内田雅己. 熱帯氷河のバクテリア群集:ウガンダとケニアの氷河の比較から. 日本微生物生態学会第31回大会. 2016年10月23日-10月25日. 横須賀市文化会館(神奈川県横須賀市)

竹内望, 田中聡太, 大手信人, 植竹淳, 永塚尚子, 瀬川高弘. 氷河生態系と氷河の暗色化 -アジアと北極の氷河の生態系比較. 2016年雪氷学会全国大会. 2016年9月28日-10月2日. 名古屋大学(愛知県名古屋市)

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. 26th Goldschmidt Conference. 2016年6月28日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Nozomu TAKEUCHI, Nobuhito Ote, Takahiro Segawa, Jun Uetake, Naoko Nagatsuka, Zhongqin Li. Distinctive nitrogen cycles between Asian and polar glaciers. 26th Goldschmidt Conference 2016年6月28日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Takahiro Segawa, Satoshi Ishii, Nobuhito Ohte, Zhongqin Li, Yuichi Hongoh, and Nozomu Takeuchi. The nitrogen cycle in cryoconites: naturally occurring nitrification-denitrification granules on a glacier. 6th International Conference on Polar and Alpine Microbiology. 2015年9月6日-10日. Ceske Budejovice (チェコ共和国)

瀬川 高弘, 竹内望, 米澤隆弘. キルギス・グレゴリア氷河のアイスコア試料を用いたシアノバクテリアの遺伝子解析. 地球惑星科学連合大会 2015年5月26日. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

東 久美子 (AZUMA, Kumiko)
国立極地研究所・気水圏研究グループ・教授

研究者番号: 80202620

川村 賢二 (KAWAMURA, Kenji)
国立極地研究所・気水圏研究グループ・准教授

研究者番号: 90431478

〔図書〕(計1件)

Takahiro Segawa and Kazunari Ushida. Evaluation of Anthropogenic Impacts on Nature by Analyzing the Distribution of Antibiotic Resistance Genes in a Glacier Environment (2017). In Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments and Long-Term Effects. Nova Science publishers. Chapter6.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬川 高弘 (SEGAWA, Takahiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 90425835

(2)研究分担者

石井 聡 (ISHII, Satoshi)

北海道大学・工学研究科・助教

研究者番号: 10612674

近藤 伸二 (Kondo Shinji)

情報・システム研究機構・新領域融合研究センター・特任研究員

研究者番号: 30415161

(平成26年度のみ研究分担者)

(3)連携研究者

牛田 一成 (USHIDA, Kazunari)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 50183017