

「海洋アライアンス・イニシャティブ報告書」

採択課題名：海洋の環境 DNA と化石 DNA を対象としたデータベースの構築

主提案者名：鈴木庸平・理学研究科院 地球惑星科学専攻・准教授

共同案者名：幸塚麻里子・理学研究科院 地球惑星科学専攻・特任研究員

報告書の提出日：2018年2月28日

研究の目的

生態系調査はこれまで生き物を直接サンプリングして、生物の多様性や希少で絶滅が危惧される生物種の空間分布や、経時変化を明らかにしてきた。しかし、多様性を十分に網羅することや、存在度の低い生物種を採取することは困難であった。その一方で、生き物の細胞から放出された環境 DNA を用いて、生物採取の技術的問題を解決しようと試みがなされている。DNA はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により 100 万倍に信号を増幅して、その増幅した DNA から次世代シーケンサーを用いた大量配列データの取得が容易になった。現在、絶滅危惧種（例えばうなぎ）の生態系調査に利用されて、膨大な海域から環境 DNA 配列の取得に成功している (Coolen et al. 2013)。

目に見える生物と共に、環境中の微生物（プランクトンやバクテリア）を対象に多様性調査が行われており、大型生物を頂点とする食物連鎖の全貌を解明することも上記の技術革新により可能になった。特に、地球温暖化による海洋生態系の変動は、基礎生産に関わる微生物の変化から起こると予想されるが、現在の生態系の理解が精一杯であり、変動の予測には十年程度の観測データを積み重ねて判断する必要がある。このような状況の中、鈴木研究室では過去の生態系の変動を長期間に渡り記録する海洋堆積物中に保存された環境 DNA（化石 DNA）から、過去の気候変動に応答した生態系の変化を検出することに成功した (Kouduka et al., 2017)。近過去の生態系の歴史から将来を予測できる画期的な成果であるが、過去と現在をつなぎ将来を予測するためには、既存データベースに登録される膨大な環境 DNA の配列を収集して、過去と比較する必要がある。本イニシャティブは、専門の研究者と共に、将来の重要なユーザーである水産や環境関連の事業者にも活用可能なデータベースの構築を目指す。

手法

海洋生態系に関する情報として幅広く活用できるデータベースを構築するために、国際塩基配列データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) で海底堆積物及び海水中に生息するプランクトン由来の 18S rRNA 遺伝子（環境 DNA）の塩基配列を検索した。また、化石 DNA として海底堆積物から検出されたプランクトン由来の 18S rRNA 遺伝子も検索した。検索した塩基配列は、検出された場所や生物情報等も合わせたジェンバンクファイルとしてダウンロードした。国際塩基配列データベースから収集した配列情報は分子系統解析ソフト (ARB) で作成した系統樹に加え、系統解析を行って生物種の同定を行い、データベースの構築を行った。また、

異なる海域の生態系を比較するために、系統樹の配列情報を元に各生物群の出現頻度を示した表と帯グラフを作成した。既存のソフトウェアでは系統樹から配列の分類情報を出力して表に変換する機能がなかったので、ソフトウェアの改良を行い作業を効率化した。

作成したデータベースとソフトウェアを用いて、環境変動に伴って変化する生態系の解析を行った。対象とする試料には、約1万年前に起きた急激な温暖化の際に堆積した日本海の海底堆積物を選んだ。その当時の堆積物には葉理を伴う暗色層(TL-1)が形成し、急激な地球温暖化による底層の無酸素化が示唆される。この日本海堆積物の葉理層を鉛直方向に横断して地球温暖化の海洋生態系への影響を復元するために、市販の抽出キットを用いてDNAを抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって18S rRNA遺伝子を増幅した後、次世代シーケンス解析を実施して化石DNAの配列情報を取得した。取得した配列はMouthierプログラムを用いて同じ生物種を由来とする配列毎にグループ化して、ファイロタイプを作成した。得られたファイロタイプの配列は、系統樹に加えて種の同定を行った後、表とグラフの作成を行った。国際塩基配列データベースを対象に相同性検索(BLASTn)を行って、系統樹に含まれていない近縁種が見つかった際には改めてダウンロードしてデータベースに追加した。

成果

生物群集組成の解析手法の効率化

DNAの配列情報を用いた生物種の同定は、既知の生物が登録されたデータベースを対象にリボソームRNA遺伝子の配列間の相同性を計算するBlast解析を行う。生物は界・門・綱・目・科・属・種のように階層に基づいて分類されるが、一般的に97%以上の相同性で同一生物種とし、95%、93%および90%程度でそれぞれ属、科および綱を分類する上での目安となっている。しかし、深海や海底堆積物から検出される生物は既知の生物との相同性が著しく低い、すなわち未同定生物(Unclassified eukaryotes)が優占するため、近縁な環境DNAを検出して棲息場の環境情報を取得することが重要である。

本イニシヤティブでは、未同定種でも解析可能な系統樹を用いて行う系統分類解析用のデータベースを構築した。そのために、系統樹に国際塩基配列データベースからダウンロードした日本海や黒海を中心とした海域の環境DNAや海底堆積物から検出された化石DNAの情報を入れ、データベースを拡張した(図1)。

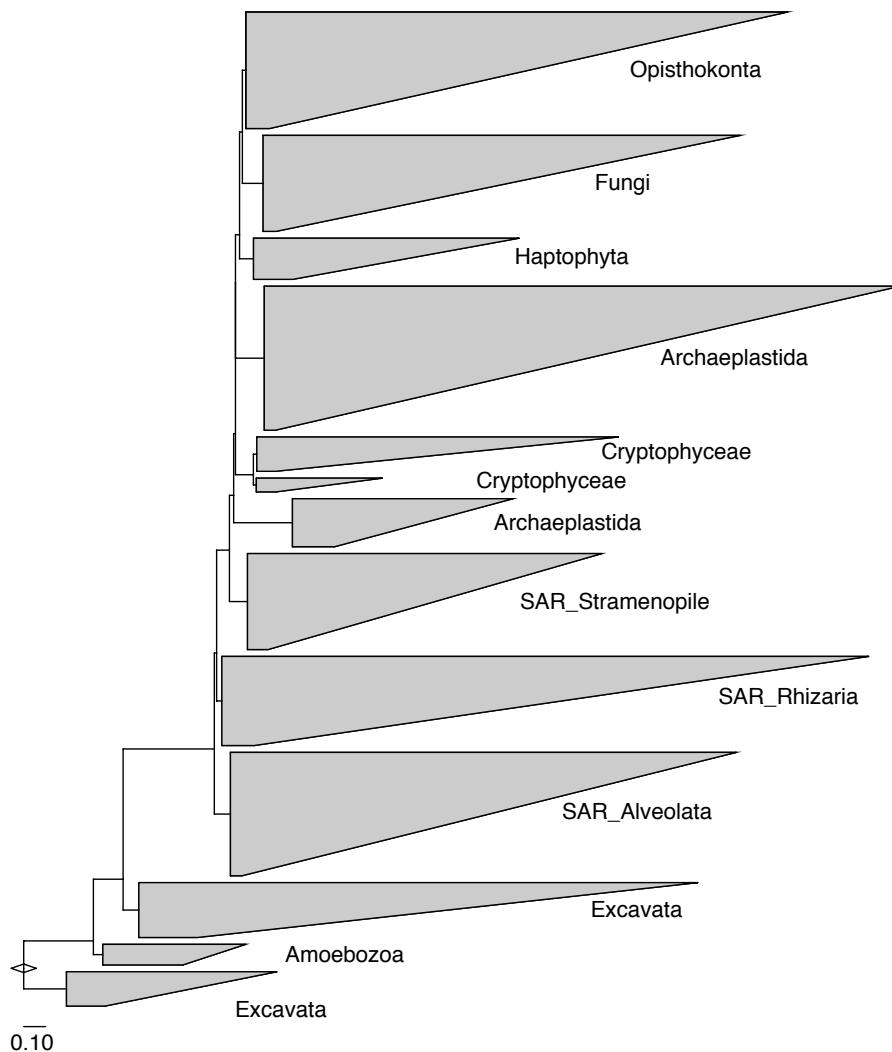


図 1. 海洋の環境 DNA と化石 DNA を含む原生生物のデータベース。界から科レベルでの階層を示す。

DNA 情報を用いた生物群衆構造解析

上述したデータベースを用いて、取得した日本海堆積物中の真核生物の DNA 配列を解析して、環境変動に対して生物相がどのように応答するのかを調べた。底層が無酸素化する前と後の堆積物 3 試料を対象に、次世代シーケンサーによる解析で、多量の塩基配列データを取得し、起源生物の同定を行った。その結果、検出された配列の大部分はアルベオラータ界やストラメノピルス界、リザリア界を中心とする海洋性のプランクトンに分類された。図 2 に、今回最も優占率が高いファイロタイプ 1 と近縁の環境 DNA を含む生物群の系統樹を結果の一例として示した。基本的には、その他の生物群についても同様な解析を行った。

表 2 に分子系統解析の結果と優占率の高い生物群を示した。無酸素化する前の堆積物では *Acantharia* を中心とした放散虫に分類されるファイロタイプ 4 が多く検出され、無酸素化した時期の堆積物では放散虫が激減して、ストラメノピルスの

Thalassiosirales 目に属する珪藻に近縁のに分類されるファイロタイプ 3 が増えた。これらの珪藻は、無酸素水塊が発達するノルウェー南部の海域から検出された環境 DNA とも近縁であることがわかった。次の時期に増えたのはファイロタイプ 1 で、近縁な既知生物がなく同定ができない”Unclassified Stramenopiles”だった。環境 DNA と比べたところ、ベネズエラ沖カリアコ海盆など無酸素水塊を伴う海域由来の配列と近縁なため、無酸素水塊に固有な生物群と推定される。これらの生態が明らかになった生物群をデータベースで中では、新たに Marine Anoxic Water Group として分類した。

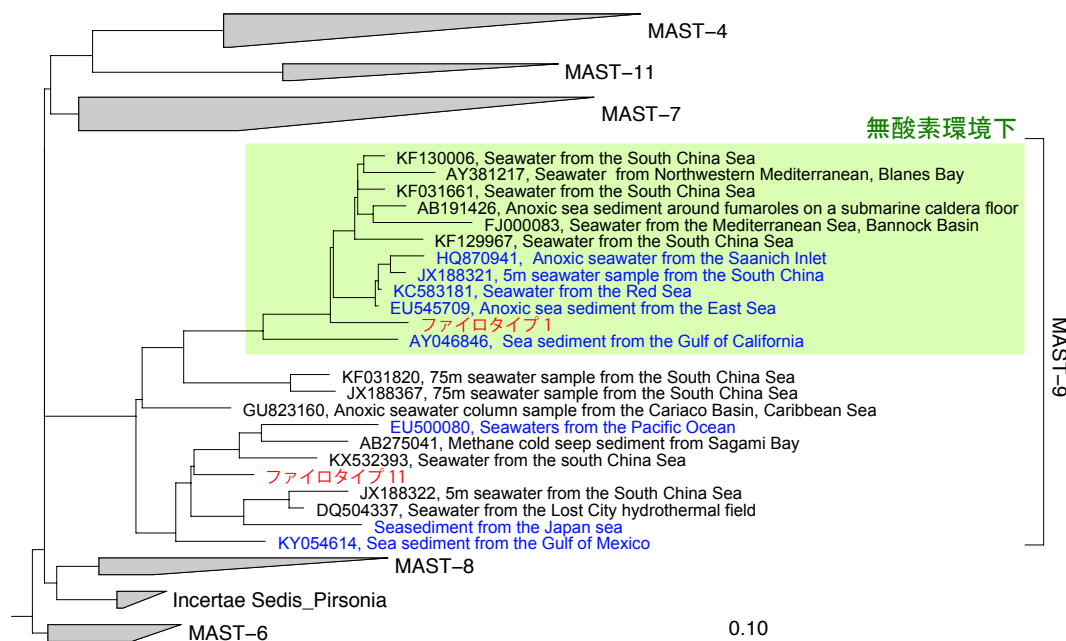


図 2. ファイロタイプ 1 をストラメノパイル界の MAST9 に分類した際の系統樹。青は国際塩基配列データベースからダウンロードして系統樹に登録した配列、赤は本イニシヤティブで日本海の海底堆積物から検出したファイロタイプをそれぞれ示す。無酸素環境下で検出された配列が緑で示すようにグループになっている。

表 1. 系統樹から抜き出した各ファイロタイプの分類情報と各サンプルにおける優占率

	底層の無酸素化前		底層の無酸素化後	Putative affiliation (Tree)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
ファイロタイプ1	9.0%	7.4%	49.1%	Stramenopiles;MAST-9
ファイロタイプ2	0.0%	2.1%	15.5%	Stramenopiles;Pirsonia
ファイロタイプ3	11.1%	37.8%	0.9%	Stramenopiles;Bacillariophyta;Coscinodiscophyceae;Thalassiosirales
ファイロタイプ4	26.9%	3.3%	1.7%	Rhizaria;Retaria;Acantharia;Chaunocanthida
ファイロタイプ5	6.1%	14.4%	5.6%	Stramenopiles;Dictyochophyceae;Pedinellales

検出された生物種のうち、Alveolata 界の Dinophyceae、Rhizaria 界の

Radiolaria(Polycystinea)、Stramenopiles 界の Bacillariophyta は、シリカ等の生体鉱物の殻を持ち、化石として残りやすいことで知られている。本研究では、化石としては残りにくい生物由来の DNA も検出されている。

図 3 は、系統樹の分類情報から、群集組成を構築するための新たに拡張したソフトウェアを用いて作成した帯グラフである。本ソフトウェアの拡張により、多量に取得される配列情報を効率的にまとめることが可能となった。日本海の堆積物に適用したところ、底層の無酸素化によって優占する生物種はそれぞれ明瞭な違いを示し、環境変動に対して生態系が激変していることが明らかとなった。

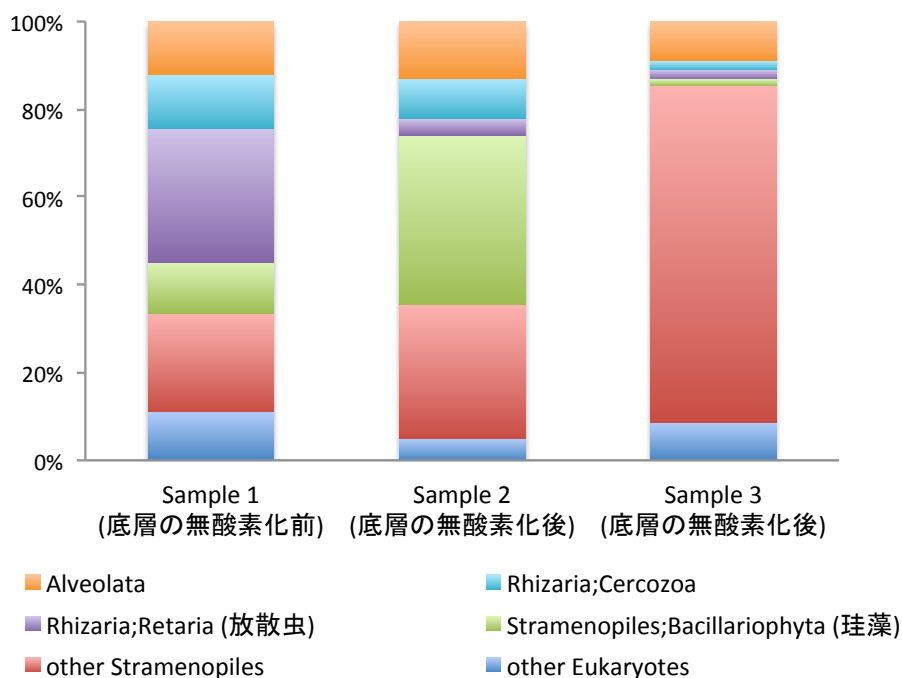


図 3. 系統樹の情報を元に作成した原生生物の群集組成。界および門レベルで色分けし、サンプル毎に生物群の割合を示した。

まとめと今後の展開

本イニシヤティブでは、データベースの系統樹化によって環境ごとに分かれる生物群を容易に判定できるようになった。また、系統樹上の情報をグラフ化するプログラムを作成し、環境 DNA の情報を用いて過去に起きた急激な環境変動に対する生態系の応答を調べることに成功した。今後の展開としては、水産や環境関連の事業者にも活用可能なデータベースの充実を目指す。

参考文献

- Coolen M.J. et al. (2013) *PNAS*, **110**, 8609-8614.
 Kouduka M. et al. (2017) *Geobiology*, in press.