

## 令和 2 年度戦略的研究開発課題 (S II-7) の公募方針

### 1. プロジェクト名：

新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を対象とした生物多様性モニタリング技術開発

### 2. 研究プロジェクトリーダー：

国立研究開発法人 海洋研究開発機構 海洋生物環境影響研究センター センター長 藤倉克則

### 3. 研究予算：

年間総額 1 億円以内

※予算規模は、直接経費及び間接経費、税込み。なお、委託の消費税は、総額（直接経費＋間接経費等）に掛かる。

### 4. 研究期間：

3 年間 （令和 2～4 年度）

※研究 2 年目に中間評価を行う。

### 5. プロジェクトの概要

#### (1) 背景と目的

四方を海に囲まれた日本は、国土面積の約 12 倍に相当する世界有数の広大な管轄海域を有する。そこには多様な環境や生態系が形成されており、既知のバクテリアから哺乳類まで合わせると世界の全海洋生物種数の約 14%にあたる計 3 万種以上が分布する等、生物多様性が極めて高い海域となっている。

国際的には 2020 年までに沿岸域及び海域の 10%を保全する旨の目標が掲げられているが、しかしながら、現在、我が国における海洋保護区（下記注参照）は、管轄権内の海域のうち沿岸域（内水及び領海かつ水深 200m 以浅の場所）を中心に 8.3%にとどまっている。また、沖合域（内水及び領海のうち沿岸域を除いた場所のほか、排他的経済水域（EEZ）及び延長大陸棚）に関して、海洋生物多様性保全戦略において記載はあるものの、具体的な施策は一部を除き講じられておらず、沖合域の海洋保護区の設定も十分とは言えなかった。

このため環境省では、各種施策の推進の基礎資料とすることを目的として、我が国が環境を保全し得る領海及び EEZ の生物多様性の中で重要度が高い海域を抽出し、2016 年に「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（以下、重要海域）として公表した。なお、この時に用いた抽出の基準は、「生態学的・生物学的に重要な海域（EBSA）」選定のための基準も参照しつつ、生態学的及び生物学的観点から、1. 唯一性又は希少性、2. 種の生活史における重要性、3. 絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地、4. 脆弱性、感受性又は低回復性、5. 生物学的生産性、6. 生物学的多様性、7. 自然性、8. 典型性・代表性の 8 項目であった。

さらに環境省では、沖合域における海洋保護区の設定について中央環境審議会に諮問し、同

審議会の答申を踏まえて改正法案を国会に提出した。その結果、改正自然環境保全法が 2019 年 4 月に成立した。今後、沖合海底域に着目して抽出された重要海域を基礎として、同法に基づく沖合海底自然環境保全地域を指定する予定となっている。なお、同審議会の答申において、優先的・先行的に保全を図る海域としては、我が国の EEZ 内で最も深い海溝や最も高密度に海山が存在する重要海域を含み、脆弱な生態系タイプが多様に存在していること等を勘案すれば、小笠原方面の沖合域が有望な選択肢に該当すると考えられるとされた。

テクトニクスに伴う海底変動や、漁業、資源開発などによって深海生態系は変動する。また、同審議会の答申においても、保護区の見直しを行うことも想定されている。このため、設定した海洋保護区での生物多様性の変動がどの程度あるのか、開発等により自然環境が劣化してしまっていないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているか等を評価するべく、継続的にモニタリングする必要がある。

しかし、深海を対象とした海洋保護区では、沿岸域・表層に比べて調査観測が難しく、大がかりな調査機器と予算が必要となる。例えば、沿岸域の海洋調査はアクセスが容易で、徒歩、シュノーケリング、スクーバ潜水、小型船舶などによる調査が高頻度かつ容易に実施できる。一方で、通常、沖合海底域（深海底）の調査には、大型調査船、無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなどが必要であり、深海調査の機会は限られている。このような大がかりな調査機器と高額な予算は、沖合海底域における海洋保護区の継続的なモニタリングを実施するにあたり、大きな制約となることが懸念される。最近では、浅海域では分子生物学的な手法を用い生物多様性や生態系の研究ができるようになってきた。そこで、本研究開発では、沖合海底域（深海底）の海洋保護区において、今後、継続的かつ多地点でのモニタリングを実現するため、海洋科学分野において開発されている技術及びデータ解析手法を用いながら低コストで実施できる簡便なモニタリング法の構築を目的とする。そして、本研究により開発される低コストかつ簡便なモニタリング技術を、海洋保護区の実効的管理の第一歩とし、今後の継続的な実施に向けた土台とすることとする。

（注） 我が国の海洋生物多様性保全戦略（2011 年環境省策定）によれば、海洋保護区は「海洋生態系の健全な構造と機能を支える生物多様性の保全及び生態系サービスの持続可能な利用を目的として、利用形態を考慮し、法律又はその他の効果的な手法により管理される明確に特定された区域」と定義されている。

## （2）研究概要

沖合海底域（深海）を対象とした海洋保護区の管理のためには、生物多様性の変動等に関するモニタリングを効率的かつ継続的に進めることが必要不可欠であるが、現在、深海における効率的なモニタリング法が確立されていない。そのために、簡便に深海の生物多様性に関わるモニタリングを可能とする技術開発を行う。

沖合海底域（深海）で想定されるかく乱は、底曳き網などによる漁業や海底資源採取といった人間活動と、地震や海底火山噴火といった自然変動があり、それらに伴う生物多様性の変化、地形や底質の改変、海底下からの化学物質噴出などが想定され、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえて、生物情報等を取得することが重要になる。また、（1）で述べたとおり、低コストで実施できる簡便なモニタリング法の構築が重要である

そこで、生物個体の採取に偏重せず、かつ大型観測機器への依存を可能な限り軽減しながらデータ収集ができることを考慮する。そのためには、近年めざましい進歩が見られる画像解析技術・環境DNA・メタゲノム解析といった技術の取り入れが有効である。具体的には、①画像や環境解析によるモニタリング法及び以下の②③のためのサンプリング法、②環境DNAによるモニタリング法、③メタゲノム解析によるモニタリング法について、それぞれ技術・方法を構築する。すなわち、実際の深海において、海水・堆積物・映像・環境データの取得のみでモニタリングできる方法の構築を目指す。

海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）については、最も高密度に海山が存在する重要海域を含むことなどから、小笠原方面の沖合域が優先的・先行的に保全を図る海域とされている。また、日本で計画されている熱水鉱床資源開発は水深2,000m以浅であり、沖合漁業の平均水深は約水深500mで底曳きトロールの最大水深は約1,500mである。そこで、本課題における対象海域は、小笠原方面で海山が高密度にある西七島海嶺の複数の海山とし、主に水深2,000m以浅とする。

本研究により、法制度の運用執行に役立つ実用的モニタリング技術が開発され、当該技術が海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の実効的管理の第一歩となることが期待される。今後の継続的な運用に向け、研究期間中に大深度域で実施する際の問題点も洗い出しながら、その後の方法改善、向上につなげていく。

### (3) 成果目標

#### 1) 全体目標

深海の生物多様性や環境に関して、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を構築し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえて生物情報等を取得できることを目標とする。なお、本課題では沖合深海底を対象としていることに鑑み、重要海域の抽出基準のうち、主に唯一性・希少性、絶滅危惧種の生育・生息地、脆弱性・感受性又は低回復性、生物学的生産性、生物学的多様性に関する生物情報等をモニタリング項目とする。

#### 2) 個別目標

- 無人探査機 ROV などの映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、重要海域の抽出基準を踏まえた、映像によるモニタリング法を構築する。また、映像からは判別できない堆積物中の小型底生生物組成をサンプルの画像から解析できる方法を開発し、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を構築する。さらに、深海用調査機器が充実した大型研究船を用いなくても、環境データや以下の解析などに用いるサンプルを取得できるようにする。
- 環境 DNA を用いたメタバーコーディング法（同時並列多種検出法）を深海性の脊椎動物（魚類等）と無脊椎動物（刺胞動物・甲殻類・環形動物・棘皮動物・軟体動物等）で構築する。実験手法の構築と並行して、種判定に用いるリファレンスデータを充実させることで、重要海域の抽出基準を踏まえた、採水により簡便にできるモニタリング法を構築する。
- メタゲノム解析技術（環境微生物群集に由来する全ゲノム混合物からの遺伝子解析技

術)を用いて、沖合海底域の海水、堆積物中の微生物群集の変動を把握する手法を構築する。特に、原核生物、および小型底生生物を対象として、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を構築する。



## 6. プロジェクトの研究テーマ構成及びサブテーマ構成

本プロジェクトは、以下の3つのテーマ構成により、適宜、テーマの下にサブテーマを設けて、各テーマ及びサブテーマ研究者が一体的に研究を実施する。全体構成及びテーマ・サブテーマ間の関係については、概要資料も参照のこと。

URL : <http://www.erca.go.jp/suishinhi/koubo/>

研究提案の公募は、各テーマのサブテーマ(2)について行う。サブテーマは、原則として一つの研究機関で行う。

(留意事項)

- ・サブテーマのうち、各テーマの「サブテーマ(1)」は、テーマリーダーが担当し、テーマの総括を行うため公募は行わない。
- ・テーマリーダーが担当する【総括】サブテーマ(1)は各テーマ全体の総括班として機能し、サブテーマ間の研究調整・進捗管理を担当する。
- ・研究提案は、【総括】サブテーマ及びその他の【公募】サブテーマと研究内容が連携するものであることが必要である。
- ・各サブテーマのリーダーは、研究プロジェクトリーダー及びテーマリーダーの指示のもとで、他テーマ、サブテーマの研究者と緊密に連携し、一つの研究プロジェクトを構成する研究活動として研究を実施する。
- ・サブテーマリーダーは、応募したサブテーマの内容及びヒアリングの審査過程での連絡・対応について、総括的な責任を持つ。

研究提案を行う申請者は、研究提案の提出前にテーマリーダーに連絡をして提案内容(申請書)についてテーマに相応しい内容かどうか確認することができる(公募〆切の1週間前まで(厳守))。確認のあった提案内容(申請書)について、テーマリーダーはプロジェクトリーダーと相談の上、申請者にコメントを回答する。テーマリーダーの連絡先は、環境省自然環境局自然環境計画課(shizen-keikaku@env.go.jp)までメールにて問い合わせること。

各テーマ及び公募するサブテーマの構成

テーマ名 及び テーマリーダーの担当するサブテーマ	公募を行うサブテーマ
テーマ1 : 深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発 サブテーマ(1) : 深海大型生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案	サブテーマ(2) : 深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

<p>テーマ 2 : 深海大型生物相の環境 DNA によるモニタリング法の開発</p> <p>サブテーマ (1) : 脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備</p>	<p>サブテーマ (2) : 無脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備</p>
<p>テーマ 3 : 深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発</p> <p>サブテーマ (1) : 深海原核生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発</p>	<p>サブテーマ (2) : 深海小型底生生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発</p>

### (1) テーマ 1 : 深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発

テーマリーダー: 藤倉 克則 (国立研究開発法人 海洋研究開発機構 海洋生物環境影響研究センター センター長)

#### ① 成果目標

- ▶ ROV 等で取得した現場画像から抽出した生物情報による、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法の提案。低コストかつ簡便な深海生物多様性評価のためのサンプリング法や環境データ取得の提案。(担当: サブテーマ (1))
- ▶ ROV などの映像からは判別できない堆積物中の小型底生生物組成について、画像解析による重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案。(担当: サブテーマ (2))
- ▶ プロジェクト全体を総括し、海洋保護区 (沖合海底自然環境保全地域) 管理のための深海を対象とした生物多様性モニタリング技術開発に関する包括的提案。

#### ② 研究概要

生物多様性条約や国連 SDGs といった国際的な動向や海洋基本計画等も踏まえ、推進すべき環境政策として、日本の沖合海底域 (深海) において自然環境保全法に基づき、沖合海底域に着目して抽出された重要海域を基礎として、海洋保護区 (沖合海底自然環境保全地域) が指定される予定である。これは、海底における鉱物掘採や海底に生息する生物に漁具が接した状態でのえい航行為等を許可制又は届出制により規制し、沖合海底域の生態系を保全するものである。

海洋保護区 (沖合海底自然環境保全地域) では、海洋保護区内での将来的な資源開発・利用との関係で海洋保護区自体の見直しを行うことも想定されている。また、海底火山活動や地震など自然変動により、深海生態系は変動する。このため、設定した海洋保護区での生物多様性の変動がどの程度あるのか、自然変動や人間活動等により自然環境が劣化していないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているか等を評価するべく、継続的なモニタリングが必要となる。しかし、深海の調査観測には、大型の調査機器が必要で予算コストも高くなり、沿岸域・表層に比べて簡便なモニタリング法が確立されていない。そこで、これまで開発されている調査研究の技術及びデータ解析手法を応用し、沖合海底域 (深海) の海洋保護区における実用的なモニタリングを実現する必要がある。

そこで、本課題全体では、沖合海底域（深海）における継続的なモニタリングが実行できるようにするため、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を確立すべく、

- ・重要海域抽出基準を踏まえたモニタリング項目とすること、
  - ・可能な限り広範囲の生物群を対象にすること、
  - ・実際の海底観察のみならず、分子生物学的手法により海水や堆積物から観察しなくても情報が得られること、
  - ・深海用調査機器が充実した大型研究船を用いなくても情報が得られること、
- を基本方針とし、各テーマやサブテーマが連携して研究開発を進める。

テーマ 1 では、観察可能な大型生物については実際の海底観察画像により、観察では見えない堆積物中の生物については堆積物中から抽出した生物サンプルをベースに、画像解析から生物組成や分布量を算出し、重要海域の抽出基準を踏まえて設定したモニタリング項目についての情報を得ることとする。唯一性・希少性については、希少性（特定の地域にのみ分布）を持つ種、又は生物群集、特異な生息地、生態系を画像から解析する。また、独特な地形学的又は海洋学的特徴を持つ場所を、画像や音響調査機器、環境計測センサーで解析する。絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地については、画像で確認された種を海洋生物レッドリストと比較する。脆弱性、感受性又は低回復性については、低成長種や長寿命種（深海性サンゴ類や海綿動物類など）の分布を画像で解析し、回復に時間がかかる場所を評価する。生物学的生産性については、生物量が大きい場所を生産性が高い場所と仮定し、そのような場所があるかどうかを判別する。生物学的多様性では、深海性脊椎動物と無脊椎動物を対象に分布量を加味しながら多様度指数などを算出し、他海域における知見と比較しながら種多様性の高低を評価する。

また、本テーマのみならずテーマ 2、3 で用いる堆積物や海水サンプルを深海で低コストかつ簡便にサンプリングする手法を開発する。さらに、自然変動に伴う環境変動を想定し、地形や環境情報の取得方法も提示する。そして、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深において、これらの手法を用い実データが取得できるようにする。

テーマ 1 のサンプリング法の開発は、テーマ 2、3 の分析サンプル獲得につなげる。テーマ 1 で得られる生物組成データは、テーマ 2 の環境 DNA データやテーマ 3 のメタゲノムデータを検証データに用いる。テーマ 2 と 3 では実験手法の情報共有を行い DNA 分析手法の効率化を進める。各テーマで得られたモニタリング項目やコストなどの情報を共有し、原核生物から脊椎動物にわたる広範囲の生物群について、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

以上の研究開発課題を実施し、テーマ 2 および 3 の成果も取り入れることで、深海における生物多様性のモニタリングを低コストかつ簡便に行えるようする。そして、将来、このモニタリング法が展開され、海洋保護区での生物多様性の変動がどの程度あるのか、開発等により自然環境が劣化してしまっていないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているか、新たな海洋保護区の設定などを評価するなど、海洋保護区の管理政策に活かされるようにする。

### ③ 【総括】 サブテーマ(1)：深海大型生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モ

## ニタリング法の提案

- イ) テーマ 1、2、3 を総括し、新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を対象とした多角的な生物多様性モニタリング技術開発に関する提案を行う。
  - ロ) ROV などにより、深海底の大型生物や底質について映像を取得する。映像から可能な限り生物を同定し、画像解析データベースに蓄積する。それらを画像解析ソフトの教師データとして、映像から分類群の同定と個体数の計数を行い、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深においてリファレンス情報を取得する。
  - ハ) 海底火山活動や地震による変動を想定し、マルチビームによる精密な海底地形（場合によっては自律型無人探査機 AUV の使用も考慮）や現場の海洋環境（濁度や水温など）を生物データとあわせて解析する。
- ニ) データから重要海域の抽出基準を踏まえて情報を取得する。
- ホ) フリーフォール観測装置や ROVなどで、海水の大量サンプリングや現場ろ過、コアラーによる堆積物サンプリングができる装置を開発運用し、サンプルを他のテーマやサブテーマに提供する。なお、初年度から既存法で海水や堆積物サンプルは採取し、他のテーマやサブテーマに提供する。フリーフォール観測装置によるサンプル提供は、2年目以降を予定する。

## ④ 【公募】サブテーマ

以下のサブテーマ(2)について研究を公募する。

### 【公募】サブテーマ(2)：深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

- イ) ROV などにより、深海底の堆積物を取得する。堆積物中の底生生物について、イメージングフローサイトメトリー法などを用いて映像化して可能な限り種判別を行う。
  - ロ) 種判別した情報を画像データベースに蓄積しながらリファレンス情報を取得する。
  - ハ) それらを画像解析ソフトの教師データとして、映像から分類群の同定精度を向上させながら、同定と個体数の計数を行う。また、堆積物の環境（粒度や化学成分）を加味しながら、底生生物分布と環境因子の関係を解析する。
- ニ) 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される海域から得られたデータから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

## (2)テーマ 2：深海大型生物相の環境 DNA によるモニタリング法の開発

テーマリーダー：宮 正樹（千葉県立中央博物館 生態・環境研究部長）

### ① 成果目標

- 魚類を中心とした深海性脊椎動物を対象に環境DNAメタバーコーディング法（同時並列多種分析法）を用いた重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案（担当：サブテーマ（1））。
- 刺胞動物・甲殻類・環形動物・棘皮動物・軟体動物等の深海性無脊椎動物を対象に環境DNAメタバーコーディング法（同時並列多種分析法）を用いた重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案（担当：サブテーマ（2））。

## ② 研究概要（全体の研究テーマの説明と各サブテーマの関係性を記載）

環境DNAとは、大型生物から水中に放出されたDNAのことで、2012年に相前後して魚類環境DNA論文が出版されて以来、環境DNA調査は魚類生態をモニタリングする画期的な手法として大きな注目を集めている。本テーマリーダーが中心となって開発した魚類を対象とした環境DNA手法の一つである環境DNAメタバーコーディング法（以下MiFish法、2015年に公表）は、世界各国で魚類群集調査に用いられている。これは、個体サンプルの分析をせずに、海水から現場環境に生息する生物の出現状況を網羅的に把握できるため、深海のような調査の機会が少ない環境における生物多様性に関する情報を取得するためには有益な手法である。

そこで、本研究テーマでは、MiFish法で確立された環境DNAメタバーコーディング法を、魚類を中心とする深海性脊椎動物と、刺胞動物・甲殻類・環形動物・棘皮動物・軟体動物等の深海性無脊椎動物に分けて確立し、取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とする。本テーマでは、環境DNAから出現生物データを取得することにより、テーマ1の映像では検出できない種、例えば逃避する種、短時間の観察では検出できない種などについても情報を取得する。唯一性・希少性については、希少性（特定の地域にのみ分布）を持つ種を環境DNAから解析する。絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地については、環境DNAで確認された種を海洋生物レッドリストと比較する。脆弱性、感受性又は低回復性については、低成長種や長寿命種（深海性サンゴ類や海綿動物類など）の分布を環境DNAで解析し、回復に時間がかかる場所を評価する。生物学的多様性では、深海性脊椎動物と無脊椎動物を対象に多様度指数などを算出し、他海域における知見と比較しながら種多様性の高低を評価する。

魚類については、他の分類群に先行して技術開発が進んでいるが、深海性魚類については未だ最適化が十分になされていない。サブテーマ（1）では、代表的な深海性魚類に対するプライマーの最適化を行うと共に、表層と比べて希薄な魚類環境DNAをどのような過法で集めてくるのか、国内の海洋深層水汲み上げ施設の海水を用いて予備実験を進める。

サブテーマ（2）の無脊椎動物に対しては、プライマーの開発から取り組む。開発したプライマーの性能については、組織抽出DNAや海洋深層水から集められた環境DNAを用いて検証する。また、個別分類群では環境DNAの絶対量が少ないことが予想されるため、複数の分類群を同時並行的に増幅するマルチプレックス法についても検討する。

サブテーマ（1）と（2）で環境DNAメタバーコーディング法を各分類群で確立するのと並行して、標本とDNA塩基配列が紐付けられたリファレンスデータを充実させる。また、次世代シーケンサから出力される大量データを処理する既存の解析パイプラインをアップデートし、リファレンスデータの充実と並行して種判定精度を高める。そして、各分類群に対して確立された環境DNAメタバーコーディング法を、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深における調査で適用し、重要海域の抽出基準を踏まえて設定したモニタリング項目についての情報を取得する。

なお、テーマ1には、サンプル取得条件の提示などを行いながら、効果的な分析サンプルの取得につなげるとともに、実サンプルの提供を受ける。また、テーマ1で得られる実分布データと環境DNAデータを照らし合わせ、環境DNAデータ検証を行う。テーマ3とは実験手法の情報共有を行いDNA分析手法の効率化を進める。なお、得られた情報は汎用的なデー



データベースに登録し公表する。

### ③ 【総括】サブテーマ(1)：脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備

- イ) 既存のPCRプライマーを深海性分類群に対して最適化すると共に、海洋深層水を利用して採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験法を確立する。
  - ロ) 標本とDNA塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実させる。
  - ハ) 次世代シーケンサから出力される大量データを処理する解析パイプラインを構築し、種判定精度を高める。
- ニ) 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深から得られた環境DNAを本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

### ④ 【公募】サブテーマ

以下のサブテーマ(2)について研究提案を公募する。

### 【公募】サブテーマ(2)：無脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備

- イ) 新たなPCRプライマーを刺胞動物、甲殻類、棘皮動物、主要分類群に対して設計するとともに、その性能を海洋深層水を利用して検証する。脊椎動物で得られた結果をもとに、採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験手法を確立する。
- ロ) 標本とDNA塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実することで解析結果の精度を向上させる。
- ハ) 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深から得られた環境DNAを本研究で確立された手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

### (3)テーマ3：深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発

テーマリーダー：濱崎 恒二（東京大学 大気海洋研究所 教授）

#### ① 成果目標

- 沖合海底域（深海）の海水、堆積物中の原核生物群集を対象とした、メタゲノム解析技術を用いた重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案（担当：サブテーマ(1)）。
- 沖合海底域（深海）の小型底生生物群集を対象とした、メタゲノム解析技術を用いた重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案（担当：サブテーマ(2)）。

#### ② 研究概要

環境中に生息する微生物、特に細菌や古細菌といった原核生物は、圧倒的な生物量と機能的な多様性を有し、生態系における物質循環や環境維持に主要な役割を果たしている

共に、環境の変化に素早く応答し組成や機能が変動する。原核生物の多様性や群集組成を把握する手法として、海水や堆積物などに含まれる微生物細胞から直接 DNA を抽出し、DNA の配列情報から微生物種数や出現頻度を推定するメタゲノム解析法が、近年の DNA 配列解読技術（シーケンス技術）の飛躍的な進展により広く用いられている。

堆積物中には、多くの小型底生生物も生息し、これらも環境の変化に素早く応答し組成が変動する。これら埋在性小型底生生物の多様性を把握するためには、生物のソーティング作業や種同定に高度な専門知識が必要なため、ルーチン的な解析が困難となっており、沖合海底域の小型底生生物の多様性を簡便かつ効率的に把握する手法が求められている。したがって、小型底生生物を堆積物から効率的に選別する手法を開発すると共に、生物サンプルから丸ごと DNA を抽出するメタゲノム解析手法を確立することにより、その多様性や分布、生物量などモニタリング評価に必要な情報を得られると考えられる。

そして、重要海域の抽出基準を踏まえて設定したモニタリング項目についての情報を得ることとする。本テーマでは、メタゲノムから出現生物データを取得することにより、テーマ 1 の映像やテーマ 2 の環境 DNA では検出できない微生物やその機能などについてデータを取得する。唯一性・希少性については、希少性（特定の地域にのみ分布）を持つ種、又は生物群集、生態系を解析する。脆弱性、感受性又は低回復性については、環境にセンシティブな微生物種の生息地かどうかを解析する。生物学的生産性については、微生物量の高低や機能を解析する。生物学的多様性では、微生物を対象に多様度指数などを算出し、他海域における知見と比較しながら種多様性の高低を評価する。

具体的には、メタゲノム解析手法を沖合海底域（深海）の原核生物や小型底生生物に適用するための開発要素として、(1) ベースラインデータやリファレンスデータの充実、(2) モニタリング項目の情報を得るためのデータ解析手法の効率化が挙げられる。

(1) については、将来的な変化をとらえるために、海水、堆積物サンプルから原核生物群集 DNA を抽出し、既存のデータ解析ツールを用いて俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報を取得し、ベースラインデータを整備する（サブテーマ 1-イ）。堆積物中の小型底生生物については、形態観察と rRNA 遺伝子解析により分子系統および分類学的情報を得る（サブテーマ 2-イ、テーマ 1 のサブテーマ 2 と連携）。沖合海底域（深海）では、公共データベースに十分な遺伝子データがないことが予想され、データが得られても生物多様性と機能を俯瞰的に把握できない可能性が高い。そこで本テーマでは、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深で優占的に生息する未培養原核生物系統群の個別ゲノム情報を取得する技術の確立とゲノム情報の獲得（サブテーマ 1-ロ）、優占する小型底生生物のゲノム情報の獲得を行い（サブテーマ 2-ロ）、配列情報の網羅的なアノテーション（注釈付け）を推進する。(2) については、メタゲノムの俯瞰的な汎用解析ツール（MG-RAST、MEGAN、MAPLE 等）による解析に加えて、本テーマでは、沖合海底域の原核生物における特徴的な機能遺伝子を選別し、それらに特化した解析手法を構築（サブテーマ 1-ハ）、小型底生生物の多様性を評価するためのマーカー遺伝子を選別とその解析手法を構築する（サブテーマ 2-ハ）。

なお、テーマ 1 には、サンプル取得条件の提示などを行いながら、効果的な分析サンプルの取得につなげるとともに、実サンプルの提供を受ける。また、テーマ 1 で得られる実分布データと本テーマのサブテーマ 2 の DNA データを照らし合わせ、データ検証を行う。

テーマ 2 とは実験手法の情報共有を行い DNA 分析手法の効率化を進める。なお、得られた情報は汎用的なデータベースに登録し公表する。

③ **【総括】サブテーマ(1)：深海原核生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発**

- イ) 沖合海底域（深海）における海水、堆積物サンプルから原核生物群集 DNA を抽出し、既存のデータ解析ツールを用いて俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報を得る。
- ロ) 沖合海底域（深海）で優占する未培養原核生物系統群のゲノム情報を取得する技術を確立し、メタゲノム配列情報を解析するためのリファレンスデータの充実を図る。
- ハ) 沖合海底域における特徴的な機能遺伝子を選別し、それらに特化した解析手法を構築することにより、手法の効率化と簡便化を図りながら、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

④ **【公募】サブテーマ**

以下のサブテーマ(2)について研究提案を公募する。

**【公募】サブテーマ(2)：深海小型底生生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発**

- イ) 堆積物中の小型底生生物に分子系統・分類学的情報を付与する（テーマ 1 サブテーマ 2 と連携）。
- ロ) 沖合海底域（深海）で優占する小型底生生物のゲノム情報を取得し、メタゲノム配列情報を解析するためのリファレンスデータの充実を図る。
- ハ) 沖合海底域に（深海）における小型底生生物の多様性を評価するためのマーカー遺伝子を選別し、それらに特化した解析手法を構築することにより、手法の効率化と簡便化を図りながら、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。