

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

SII-7-3 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

(JPMEERF20S20730)

令和2年度～令和4年度

Development of the metagenome-based methodology for monitoring deep-sea microbial and meiofaunal communities

〈研究代表機関〉
東京大学

〈研究分担機関〉
熊本大学

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和5年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	7
II-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 （東京大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-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 （東京大学、熊本大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	35
IV. 英文Abstract	36

I. 成果の概要

課題名 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

課題代表者名 浜崎 恒二 (東京大学 教授)

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

77,493千円 (合計額)

(各年度の内訳：2020年度：25,831千円、2021年度：25,831千円、2022年度：25,831千円)

研究体制

(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 (東京大学)
(JPMEERF20S20705)

(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 (東京大学)
(JPMEERF20S20706)

研究協力機関

研究協力機関はない

本研究のキーワード 深海、堆積物、メタゲノム解析、原核生物、マイオベントス、種多様性

1. はじめに (研究背景等)

第10回生物多様性条約締約国会議にて合意されたAichi Targetでは、2020年までに沿岸域及び海域の少なくとも10%を適切に管理・保全する旨の目標が掲げられている。現在、我が国の海洋保護区は、沿岸域を中心に8.3%に止まっている。今後、Aichi Targetに向けて、2019年4月に成立した改正自然環境保全法により、沖合海底自然環境保全地域(海洋保護区)が指定されたが、こうした海洋保護区の管理には、生物多様性の変動等に関する継続的なモニタリングが不可欠である。

今世紀に入って、陸から遠く離れた深海にも人間活動に起因する気候変動の影響が及んでいることが明らかになってきた。また、熱水鉱床やメタンハイドレートなどの海底資源開発、深海底曳き網漁業、深層循環の停滞による溶在酸素濃度の低下、プラスチックなどのゴミの蓄積など、様々な人為的要因が深海の生態系と生物多様性の劣化を招くことが危惧されている。こうした人間活動による深海環境の悪化を軽減するため、海洋保護区の設立が進められているが、その有効性を評価するためには、生物多様性の経年変化をモニタリングすることが必要である。しかし、沖合海底域(深海)は沿岸域や沖合表層域に比べて調査観測が難しく、現状ではそうした変動を効率的に捉えることが難しい。

環境中に生息する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、生態系の維持に主要な役割を果たしている。また、その組成や機能の変動は環境変化の良い指標ともなる。さらに、深海の真核生物では、マイオベントスと呼ばれる体長1mm以下の小型底生生物が数量ともに大型底生生物を凌駕しているが、その圧倒的な種多様性に対して、その微細構造の解剖・観察などにより形態分類をおこなえる専門家が世界的に不足しているため、大部分が未記載種のまま取り残され深海に生息する種の桁数すら分からないのが現状である。近年、それらの多様性や機能を把握する手法として、海水や堆積物などに含まれる生物細胞から直接DNAを抽出し、その配列情報から生物種数や機能を推定するメタゲノム解析法が広く用いられつつある。特に、表層域の原核生物については急速なデータ蓄積により、分類群や機能を特定するためのデータベースが充実しつつある。一方で、深海域のデータは圧倒的に不足しており、現状を示すベースラインデータや、個々の種を識別する遺伝子配列などのリファレンスデータの整備が遅れている。さらに、深海マイオベントスには多くの固有分類群が含まれており、

データベース上に塩基配列の存在しない分類群が大部分である。DNA情報を多様性評価に活用するには、その基盤となる情報の蓄積と整備（形態とDNA情報の対応づけ）が不可欠である。

2. 研究開発目的

本課題では、沖合海底域（深海域）の海洋保護区において継続的かつ多地点での生物多様性モニタリングを実現するための低コストかつ効率的な手法開発の一環として、メタゲノム解析手法を深海域の微小生物群集に適用する方法論の構築を目的とする。

3. 研究目標

全体目標	<p>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た生物情報等の取得に資することを目標とする。特に本テーマでは、深海生物相の画像解析（テーマ1）によるモニタリングや深海大型生物相の環境DNAによるモニタリング（テーマ2）では検出できない原核生物や小型底生生物を対象とした技術開発を行うことにより、微生物から魚類までを含めた総合的な深海生態系モニタリングが可能となる技術の確立を目指す。</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
サブテーマリーダー /所属機関	浜崎恒二/東京大学
目標	<p>本テーマでは以下の3つの達成目標を設定する。</p> <p>(1) 深海の海水、堆積物サンプルから原核生物群集DNAを抽出し、俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報（ベースラインデータ）の取得を可能とする</p> <p>(2) 深海で優占する未培養原核生物系統群のゲノム情報（リファレンスデータ）を取得する技術を確立する</p> <p>(3) 深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築、モニタリング項目についての情報取得を可能とする</p> <p>テーマ1に対して、本テーマから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取得につなげ、実サンプルの提供を受ける。また、テーマ2とのDNA解析技術の共有を通じて効率的な技術開発が期待できる他、テーマ1やテーマ2で得られる大型生物分布データと本テーマの小型生物分布データを統合した解析を進め、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。</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
サブテーマリーダー /所属機関	小島茂明/東京大学
目標	<p>本テーマでは以下の3つの達成目標を設定する。</p> <p>(1) 深海底の堆積物から効率的にDNAを抽出する手法を確立する</p> <p>(2) 抽出したDNAから種多様性評価に有効な塩基配列情報を効率的に取得する手法を確立する</p> <p>(3) 上記(2)で得られた塩基配列から小型底生生物群集の種多様性を評価する指標を開発し、指標の値を推定する手法を確立する。また、その作業に必要なデータベースを整備する。</p> <p>以上の目標を達成し、テーマ1の映像や画像による底生生物の多様性評価手法、テーマ2の海水中環境DNAによる生物多様性評価手法、テーマ3・サブテーマ1の原核生物の多様性評価手法と合わせて深海底生物群集の多様性を網羅的に評価し、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。</p>

4. 研究開発内容

サブテーマ1では、堆積物タイプ別のDNA抽出と効果的な抽出方法の選定を行い、DNA抽出方法等の違いによる16S rRNA 遺伝子ベースの多様性推定への影響を調べた。また、堆積物の原核生物多様性について、保護区の海山堆積物を対象としたrRNA遺伝子アンプリコン解析による種多様性評価、メタゲノム解析による多様性の評価を行った。保護区海山堆積物のショットガンメタゲノムデータから個別種のゲノム(MAG: Metagenome Assembled Genome)を構築し、他の深海堆積物のデータと比較することにより、特徴的な種を特定した。メタゲノム解析のためのDNA抽出プロトコルとして、海山堆積物の原核生物から断片化の少ないDNAを高効率で抽出するためのプロトコルを作成した。海山周辺堆積物から抽出したメタゲノムDNAを用いて、サンプルあたり5~10 Gbの塩基配列を産出、そのうち100万配列からGenomapeシステムを使って原核生物遺伝子を解析し、生物機能(機能モジュール)情報を取得した。

サブテーマ2では、八代海の海底堆積物を用いて堆積物から小型底生生物を選別し、そのDNAを抽出する手法の実効性と条件を検討した。メイオベントスのモデル動物群を対象にミトコンドリアDNAデータを用いた種多様性評価手法の検討をおこなった。令和2年度に学術研究船「新青丸」の研究航海を実施し、十勝沖で深海底堆積物を採集して、環境DNAおよびメタゲノム解析手法を検討した。令和2年度および令和3年度の研究船「かいめい」航海で採集された正保海山、日光海山、元禄海山、安永海山の海底堆積物からメイオベントスを選別し、メタゲノムデータを取得した。深海メイオベントス群集で線虫類に次ぐ優占動物群であるソコミジンコ目甲殻類をモデルとして、メタゲノムデータからその種多様性を評価する手法を開発し、形態分類結果と照合することで有効性を検討した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

サブテーマ1では、第一の目標である俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報の取得を可能とするため、市販DNA抽出キット5種を比較し推奨キットを決定した。さらに、深海保護区の原核生物の多様性評価(α 多様性、分類群組成)プロトコルを作成し、サンプルタイプ、地点、コア深度で多様性を比較した。また、保護区ではない堆積物(釧路沖、拓洋第五海山)を含めた比較で、海山ごとに独自種の存在が示唆された。第二の目標である優占未培養原核生物系統群のゲノム情報取得技術を確認するため、保護区海山堆積物のメタゲノムデータから89個の個別種のゲノムを構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルを作成した。さらに、他の海域の堆積物のデータと比較することにより、他ではほとんど存在しない特徴的な最優占種(Methylomirabilaceae科の新規細菌種)を特定した。第三の目標である機能遺伝子の選別と解析手法構築、モニタリング項目の情報取得を可能とするため、海山堆積物の原核生物から高品質のDNAを高効率で抽出するためのプロトコル、得られた塩基配列から機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成した。さらに、実サンプルの解析から、宝永・安永海山の群集に対して、日光・正保海山の群集は機能的に区別されることが示された。また、化学合成原核生物の指標となる4種類のCO₂固定経路のアバンダンスから生産性を評価する方法を考案した。

サブテーマ2では、コアサンプラーで採集した深海底の堆積物サンプルから効率的にメタゲノム解析および環境DNA解析をするために有効な船上処理およびサンプルの保存方法を確立した。メタゲノム解析のために保存サンプルから小型底生生物のDNAを効率的に抽出する方法を確立した。深海小型底生生物のうち線形動物(線虫類)に次ぐ優占動物群であるソコミジンコ目甲殻類(ソコミジンコ類)を例として、まず既存および新規に決定したソコミジンコ類および外群のミトコンドリアDNA・COI遺伝子およびDNAバーコード領域(同遺伝子内のFolmer領域)の塩基配列の分子系統解析用データセットを整備した。次に次世代シーケンズにより網羅的に決定したメタゲノムデータからソコミジンコ類のDNAバーコード領域の塩基配列を選別し、データセットを用いた分子系統解析によりサンプルに含まれていたソコミジンコ類の種数およびそれぞれの種の個体数を推定する手法を確立し、同時に採集したソコミジンコ類

の形態分類結果と比較する事で手法の有効性を検証した。環境DNAからDNAバーコード領域をPCR法により増幅するための条件検討をおこない、効率的にPCR産物を得る方法を確立した。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

サブテーマ1で作成したプロトコルを参照して解析することにより、海山周辺の海底堆積物中の原核生物群集の種多様性と機能的な多様性、唯一性、希少性を評価することができる。また、最優占種を含む個別種のゲノム情報は、継続的なモニタリングのリファレンスデータとして利用できる。サブテーマ2では海底堆積物のメタゲノム解析を用いて小型底生生物の種多様性を評価することができることが示された。こうしたメタゲノム解析による小型底生生物の分子分類は、伝統的な形態分類によるデータと同じ様に取り扱うことが出来る。また分子分類は、破損個体や形態形質が乏しい幼体等にも適応可能であり、十分なサンプル数を確保することで正確な生物多様性の推定が可能となる。海域間のデータ比較により対象海域の唯一性、希少性を評価することも可能である。以上の本研究で得られた成果を活用することで、沖合海底自然環境保全地域の「指定書及び保全計画書」にある条件の評価に必要なデータを取得し、保全状況を継続的にモニタリングできると見込まれる。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
<p>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た生物情報等の取得に資することを目標とする。特に本テーマでは、深海生物相の画像解析(テーマ1)によるモニタリングや深海大型生物相の環境DNAによるモニタリング(テーマ2)では検出できない原核生物や小型底生生物を対象とした技術開発を行うことにより、微生物から魚類までを含めた総合的な深海生態系モニタリングが可能となる技術の確立を目指す。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u> 原核生物や小型底生生物を対象として、海洋保護区に指定された海山周辺の堆積物サンプルのメタゲノム解析を可能とし、保護区指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえた多様性評価指標(多様性、唯一性、希少性、生産性)を取得する技術を確立した。</p>

サブテーマ1目標	目標の達成状況
<p>本テーマでは以下の3つの達成目標を設定する。 (1) 深海の海水、堆積物サンプルから原核生物群集DNAを抽出し、俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報(ベースラインデータ)の取得を可能とする (2) 深海で優占する未培養原核生物系統群のゲノム情報(リファレンスデータ)を取得する技術を確立する (3) 深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築、モニタリング項目についての情報取得を可能とする</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u> (1) 市販DNA抽出キットから推奨キットを決定した。さらに、深海保護区の原核生物の多様性評価プロトコルを作成し、サンプルタイプ、地点、コア深度で多様性を比較することができた。 (2) 保護区海山堆積物から89個の個別種のゲノムを構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルを作成した。さらに、特徴的な最優占種を特定することができた。</p>

<p>テーマ1に対して、本テーマから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取得につなげ、実サンプルの提供を受ける。また、テーマ2とのDNA解析技術の共有を通じて効率的な技術開発が期待できる他、テーマ1やテーマ2で得られる大型生物分布データと本テーマの小型生物分布データを統合した解析を進め、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。</p>	<p>(3)海山堆積物の原核生物から高品質のDNAを高効率で抽出するためのプロトコル、得られた塩基配列から機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成し、実サンプルを用いた機能的な比較ができた。また、機能遺伝子の解析から生産性を評価する方法を考案することができた。</p>
---	---

サブテーマ2目標	目標の達成状況
<p>本テーマでは以下の3つの達成目標を設定する。</p> <p>(1) 深海底の堆積物から効率的にDNAを抽出する手法を確立する</p> <p>(2) 抽出したDNAから種多様性評価に有効な塩基配列情報を効率的に取得する手法を確立する</p> <p>(3) 上記(2)で得られた塩基配列から小型底生生物群集の種多様性を評価する指標を開発し、指標の値を推定する手法を確立する。また、その作業に必要なデータベースを整備する。</p> <p>以上の目標を達成し、テーマ1の映像や画像による底生生物の多様性評価手法、テーマ2の海水中環境DNAによる生物多様性評価手法、テーマ3・サブテーマ1の原核生物の多様性評価手法と合わせて深海底生物群集の多様性を網羅的に評価し、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>(1) 深海底の堆積物から小型底生生物の種多様性評価に十分な量のDNAを抽出する方法を確立できた。</p> <p>(2) 抽出したDNAから小型底生生物の種多様性評価に十分な量の塩基配列データをメタゲノム解析により得ることができることを示すことができた。</p> <p>(3) 深海メイオベントス群集で優占するソコミジンコ類を例にして、整備したデータベースを用いて、従来の形態分類と同等の多様性データ(種組成と各種の個体数)を得ることができると示された。同じ方法で他の分類群についても解析することが可能であることから、沖合海底域の小型底生生物群集の多様性を評価し、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることが可能となった。</p>

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

0件

<主な査読付き論文>

特に記載すべき事項はない。

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表(査読なし)	0件
口頭発表(学会等)	1件
「国民との科学・技術対話」の実施	7件

マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究費の研究成果による受賞	0件
その他の成果発表	0件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

サブテーマ 1

研究代表者

浜崎 恒二

東京大学農学部卒業、博士（農学）、現在、東京大学大気海洋研究所教授

研究分担者

1) 砂村 倫成

東京大学農学部卒業、博士（農学）、現在、東京大学理学系研究科助教

2) 吉武 和敏

東京大学工部卒業、博士（生命科学）、現在、東京大学農学生命科学研究科助教

サブテーマ 2

研究代表者

小島 茂明

東京大学理学部卒業、理学博士、現在、東京大学大学院新領域創成科学研究科教授

研究分担者

1) 嶋永 元裕

東京大学理学部卒業、博士（理学）、現在、熊本大学くまもと水循環・減災研究教育センター教授

2) 新里 宙也

京都大学農学部卒業、Ph.D (Biochemistry)、現在、東京大学大気海洋研究所准教授

3) 峰岸 有紀

東邦大学理学部卒業、博士（農学）、現在、東京大学大気海洋研究所准教授

II. 成果の詳細

II-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

東京大学大気海洋研究所

海洋生命システム研究系 海洋生態系科学部門 浜崎 恒二

東京大学理学系研究科

地球惑星科学専攻 地球生命圏科学講座 砂村 倫成

東京大学農学生命科学研究科

水圏生物学専攻 水圏工学研究室 吉武 和敏

<研究協力者>

東京大学大気海洋研究所

海洋生命システム研究系 海洋生態系科学部門 高見 英人

[要旨]

本サブテーマでは、沖合海底域（深海域）の海洋保護区において継続的かつ多地点での生物多様性モニタリングを実現するための低コストかつ効率的な手法開発の一環として、メタゲノム解析手法を深海域の微生物群集に適用する方法論の構築を目的とし、以下の3つの研究目標を設定した。（1）深海の海水、堆積物サンプルから原核生物群集DNAを抽出し、俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報（ベースラインデータ）の取得を可能とする。（2）深海で優占する未培養原核生物系統群のゲノム情報（リファレンスデータ）を取得する技術を確立する。（3）深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築、モニタリング項目についての情報取得を可能とする。これらの目標を達成するために、以下の研究を実施した。シルトや泥など沿岸性の泥質からなる釧路沖や三陸沖堆積物、火山砕破物やサンゴ片を含む伊豆小笠原背弧の西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域と中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部沖合海底自然環境保全地域の堆積物および海底面付近の海水を複数の研究航海で採取した。研究目標（1）に対して、まずDNA収量、PCR増幅の成功率、得られる群集組成の多様性指数を数種の市販DNA抽出キットで比較し、最適なDNA抽出手法についての検討を実施した。その結果、国産のIsoSpinsoil DNAキット（ニッポンジーン）を推奨することとした。次に、16SrRNA遺伝子アンプリコン解析による深海保護区の原核生物の多様性（ α 多様性、分類群組成）を評価するためのプロトコルを作成し、保護区ではない堆積物（釧路沖、拓洋第五海山）を含めた解析により、海山ごとに独自種（ASV）の存在することを示唆すると共に、多様性評価ができることを示した。また、海山堆積物メタゲノム解析のための新たなプロトコルを作成した。このプロトコルを使用して、各航海で得られた海山堆積物からDNAを抽出し、メタゲノム配列データを取得した。得られた塩基配列は100万配列のアミノ酸のmulti-FASTAに成形し、メタゲノム中の生理代謝機能の評価と、リボソームタンパク質遺伝子に基づく菌叢組成の評価が可能なGenomaple™に供試することで、機能遺伝子情報を取得することができた。研究目標（2）に対して、まず既存の深海堆積物のメタゲノムデータを用いて個別種のゲノム（MAG: Metagenome Assembled Genome）を再構築する手法について比較検討した。次に、上記と同じ深海保護区のショットガンメタゲノムデータから89個の個別種のゲノム（MAG: Metagenome Assembled Genome）を構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルを作成した。さらに、他の海域の堆積物のデータと比較することにより、他ではほとんど存在しない特徴的な最優占種（Methylomirabilaceae科の新規細菌種）を特定した。研究目標（3）に対して、Genomaple™システムで得られた機能遺伝子モジュールのアバンダンスデータを用いて、生物機能の多様性に基づくクラスタリングとサンプル間の比較を行った。その結果、糖質代謝に関わる機能ポテンシャルの比較から、宝永・安永海山の群集に対して、日光・正保海山の群集は完全なTCAサイクルを持たないことで区別されることを示した。さらに、エネルギー合成に関わる機能ポテンシャルの解析から、化学合成原核生物の指標となる4種類のCO₂固定経路のアバンダンスを比較できることを示し、化学合成原核生物の生産性を評価できる可能性を示した。また、原核生物群集の機能的多様性に基づくク

ラストリングは、各海山の菌叢組成に基づくクラスタリングと必ずしも一致しないことから、種多様性だけでなく、機能的多様性も合わせて評価することが重要と考えられる。

以上の研究により、上に掲げた3つの目標どおりの成果をあげることができた。

1. 研究開発目的

本課題では、沖合海底域（深海域）の海洋保護区において継続的かつ多地点での生物多様性モニタリングを実現するための低コストかつ効率的な手法開発の一環として、メタゲノム解析手法を深海域の微小生物群集に適用する方法論の構築を目的とする。

2. 研究目標

- (1) 深海の海水、堆積物サンプルから原核生物群集DNAを抽出し、俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報（ベースラインデータ）の取得を可能とする
- (2) 深海で優占する未培養原核生物系統群のゲノム情報（リファレンスデータ）を取得する技術確立する
- (3) 深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築、モニタリング項目についての情報取得を可能とする

テーマ1に対して、本テーマから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取得につなげ、実サンプルの提供を受ける。また、テーマ2とのDNA解析技術の共有を通じて効率的な技術開発が期待できる他、テーマ1やテーマ2で得られる大型生物分布データと本テーマの小型生物分布データを統合した解析を進め、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。

3. 研究開発内容

3-1. 深海原核生物ベースラインデータの取得

3-1-1. 堆積物タイプ別のDNA抽出と効果的な抽出方法の選定

水深1,000mを超える深海域の海底面は、シルト等の破砕物、火山砕破物、玄武岩質など様々な固相から成り立っている。シルトや泥など沿岸性の泥質からなる釧路沖や三陸沖でのKS20-18, 15航海（サブテーマ2と連携して実施）、および火山砕破物やサンゴ片を含む伊豆小笠原背弧の西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域と中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部沖合海底自然環境保全地域でのKM20-10, KM21-E04C, YK22-17C航海に参加し、堆積物および海底面付近の海水を採取した。土壌や堆積物からのDNA抽出では、シリカメンブレンカラムを用いた市販のDNA抽出キットによる抽出法が広く用いられている。土壌や堆積物からのDNA抽出キットは数種類市販されているが、最も用いられてきたMOBio社のPower soil DNAキットは、Qiagen, Thermoへの買収を経て、土壌に特化したPower soil pro DNAキットに受け継がれたが、ビーズやバッファー類の変化に伴い外洋堆積物でのDNA収量が減少した。DNA収量、PCR増幅の成功率、得られる群集組成の多様性指数を他の数種の市販DNA抽出キット(MOBio Power soil DNA, Nucleospin soil, Thermo Powersoil pro, ニッポンジーン ISOIL, ニッポンジーン ISOSPIN soil DNA)について検討した。PCR増幅には、Bacteriaだけでなく広範なArchaeaやEukaryaも増幅可能なv4, v5領域を対象とする530-907プライマーセットを用いた(Nunoura2012)。堆積物から抽出したDNAの一部は、テーマ2の大型生物相の環境DNA解析のための予備検討試料として提供した。

3-1-2. 堆積物の微生物多様性

得られたPCR増幅産物を鋳型として2ndPCRにより試料標識indexとイルミナ社シーケンサー用のアダプ

ター配列を付与し、イルミナ社のMiSeqシーケンサーにて300bps両端解析を実施した。得られた16SrRNA 遺伝子配列は、QIIME2-DADA2によるOTU作成ののち、R上でveganおよびphyloseq packageにより α 多様性を評価した。また、得られた解析結果から反復サンプルの必要性や、堆積物の適正な深さについても検討した。

3-1-3. メタゲノム解析のためのDNA抽出プロトコルの作成

メタゲノム解析のためのDNA抽出プロトコルを海山堆積物用に改変し、新たなプロトコルを作成した。このプロトコルを使用して、各航海で得られた海山堆積物からDNAを抽出し、メタゲノム配列データを取得した。

メタゲノム解析を行うには、ターゲットとなる環境サンプルに生息する全ての原核生物のゲノムDNAが満遍なく抽出されていなければならない。その一方、過度に断片化されたDNAでは、メタゲノム解析用ライブラリーの作成に支障をきたし、配列のスループットにも大きく影響するため、網羅的ではあるが、出来るだけ断片化の少ないDNA抽出法を模索する必要がある。特に堆積物の場合は、サンプルによって土質に大きな違いがあるため、一律に市販のキットを用いるだけでは、この要件を満たすことができない。堆積物からのメタゲノムDNA抽出にはビーズビーティング法が広く用いられているが、本課題ではこれに溶菌酵素法を組み合わせた方法を新たに考案した。両者が組み合わせやすいニッポンジーン社製の土壤用 DNA抽出キット (SOIL for beads beating for Large ver. 2: Code No. 312-06791) を用いて DNA抽出条件を検討した。

採取された堆積物サンプル5gをジルコニアシリカビーズが入ったチューブに入れ、1/5希釈した。その後、以下の手順で抽出を行なった。

- Lysis buffer BB を加え、Bio Medical Science 社製の Shake Master にセットし、1100 rpm で 1～5 分間振盪
- 各振盪時間のサンプルにリゾチームを 100 mg 加え 37° C で 1 時間インキュベート
- 10 mg の Proteinase K と 20%-SDS 溶液を 0.6 ml 加え 55° C で 1 時間インキュベート
- 反応後のサンプルを 8000rpm, 4°C で 30 分間遠心後、上澄み液を回収
- キット付随の purification 溶液とクロロフォルムを加え、ゆっくり混合
- 8000rpm, 4°C で 15 分間遠心後上澄みを回収
- 上澄み液と等量のキット付随の precipitation 溶液を加え 4°C で 1 時間遠心後上澄みを捨て、wash 溶液 5 ml でチューブの管壁をリンスした後再度同条件で遠心
- 上澄みを捨て 5 ml の 70%エタノールとキット付随のエタチンメイトを 10 μ l 加えて沈殿を形成させ同条件で遠心後沈殿を回収
- 沈殿は風乾後 0.5 ml の TE 溶液に溶解した後、エタノールとエタチンメイトを 2 μ l 加えて再度沈殿を形成
- 15000 rpm, 4°C で 10 分間遠心を行なって沈殿を回収
- 風乾後 50 μ l の TE 溶液を加えた
- 沈殿に着色がなければそのまま、着色がある場合は、Zymo Research 社の PCR inhibitor removal kit を使って精製

QubitのHigh sensitive (HS) DNA detection kitを使ってDNAの定量を行なった。抽出DNAの質の評価は、16S rRNA用のプライマーを用いた PCR産物の有無とアガロース電気泳動による DNA断片化状態に基づいて行なった。

3-1-4. 海山周辺堆積物のメタゲノム解析

海洋保護区の海底海山のモニタリングに当たり、ベースラインとなる各海山の菌叢組成、機能的特徴を把握し、各海山の原核生物群集の群集構造や機能的な特徴が維持されているか、どのような変化が生じているかを判別するための解析手法を構築した。機能的特徴付けには、世界的に頻繁に用いられている

KEGGデータベースで定義されている、代謝パスウェイモジュール(解糖系、TCAサイクル、炭素・窒素固定など)や各種トランスポータモジュールの充足率とアバンダンスを指標として用いることとした。菌叢組成は、コピー数やPCRバイアスの影響がないリボソームタンパク質遺伝子群を指標として用いた。抽出したメタゲノムDNAの配列決定は、MGI Tech社製のMGISEQ-200RS DNA sequencerを用いて行い、1サンプルあたり5~10 Gbの塩基配列を産出した。得られた塩基配列は、MAPLE Submission Data Maker (MSDM)でfastqファイルから100万配列のアミノ酸のmulti-FASTAに成形し、メタゲノム中の生理代謝機能と菌叢組成の評価が可能なGenomable™に供試した。この解析結果から、俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報(ベースラインデータ)を取得した(図1.1)。

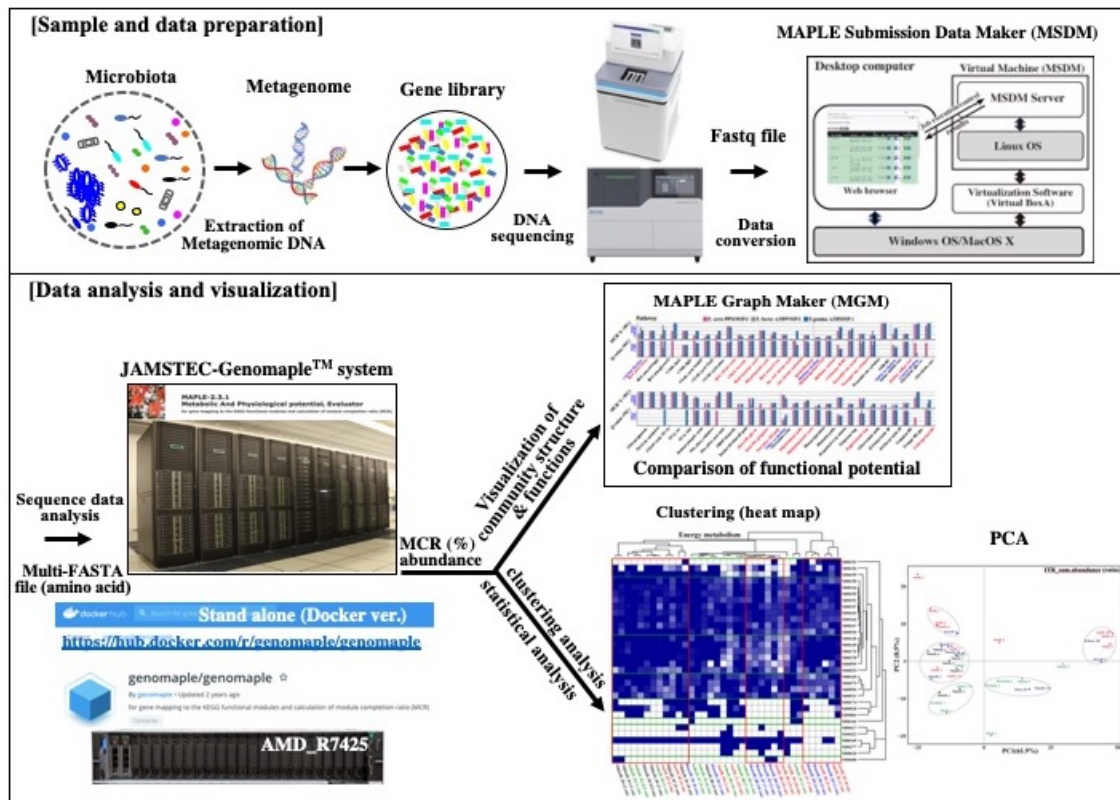


図1.1. Genomable™システムを用いたメタゲノム解析の流れ

3-2. 深海原核生物リファレンスデータ取得技術の確立と取得

メタゲノムデータから個別種のゲノム(MAG: Metagenome Assembled Genome)を得る手法について検討するため、これまで得られている深海微生物のメタゲノムデータをデータベース上で検索、収集し、そのうちEarth Microbiome Project Multi-omics (EMP500)の深海底下のメタゲノムプロジェクト(PRJEB42019)からショットガンメタゲノムデータ56個をダウンロードした(表1.1)。MetaWRAP, Metagenome-Atlas, Metagenome Orchestraの3つ既存のショットガンメタゲノム解析パイプラインを実行し、実行時間、取得MAG数、各MAGの完成率を比較した。どのパイプラインも基本的なワークフローは似ており、リードのトリミングなどの前処理、MEGAHITによるアセンブル、MetaBAT, MaxBin2などによるビンニング、CheckMというMAGの完成度・コンタミ度を評価するツールによる評価、種名・機能アノテーションを行うフローになっている。データ解析を行ったサーバのスペックは、16コア32スレッドのIntel Xeon CPU E5-2690、搭載メモリ容量は768GB、OSはCentOS7である。

上記比較によって最適とされたMetaWRAPを用いて、3-1-4で得られたメタゲノムDNA配列データのうち、日光海山と正保海山の外縁部、水深2000mの堆積物データからMAGの構築を行なった。さらに、得られたMAGについて、Earth Microbiome Projectの堆積物メタゲノムデータ41件(表1から重複サンプルを除いたもの)に参照し、安永海山と宝永海山のメタゲノムデータも加えて他の海域での出現頻度を調べた。

表1.1. パイプライン比較のために使用したショットガンメタゲノムデータ56個

Sampe ID	Latitude	Longitude	Seafloor depth (m)	Depth below seafloor (m)	Data size (base)
ERR5004755	46.68323333	-11.6042	5036.8	11.1	636,969,001
ERR5003276					1,306,476,665
ERR5003968					599,152,290
ERR5001997				30.4	1,277,588,583
ERR5004757					571,727,002
ERR5003278				49.6	1,168,946,992
ERR5003970					543,499,866
ERR5001999					1,147,159,451
ERR5004759				64.5	798,179,827
ERR5003280					300,225,073
ERR5003972					745,657,352
ERR5002001				74.1	292,155,221
ERR5004760					821,649,954
ERR5003281					250,059,955
ERR5003973				83.7	779,303,619
ERR5002002					244,561,761
ERR5004761					52,672,825
ERR5003974				112.7	50,262,198
ERR5004762					10,898
ERR5003975					8,594
ERR5004763				141.6	11,895,873
ERR5003976					10,572,711
ERR5004764					740,267,394
ERR5003282				218.8	301,390,729
ERR5003977					676,240,195
ERR5002003					289,871,964
ERR5004766				305.6	6,700,297
ERR5003979					6,210,281
ERR5004768					43,401
ERR5003981				402.3	36,932
ERR5004769					672,731,419
ERR5003284					1,262,148,469
ERR5003982				518	607,439,442
ERR5002005					1,208,274,192
ERR5004770					2,997,495
ERR5003983				701.1	2,868,467
ERR5004772					816,104,895
ERR5003286					1,157,684,228
ERR5003985				739.4	770,892,579
ERR5002007					1,132,448,747
ERR5004773					749,412,808
ERR5003287				0	400,872,649
ERR5003986					710,820,792
ERR5002008					392,856,958
ERR5004774				72.6	18,498,969
ERR5003288					86,938,620
ERR5003987					16,949,096
ERR5002009	110.6	85,993,881			
ERR5004776		1,183,259			
ERR5003290		7,065,181			
ERR5003989	174.8	1,130,297			
ERR5002011		7,107,499			
ERR5004778		8,686,401			
ERR5003991		8,230,627			
ERR5004780		74,345,353			
ERR5003993		71,445,595			

3-3. 深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築

3-1-4で得られたベースラインデータ（各サンプルのモジュール充足率とモジュールアバンドンス）から、クラスター解析によって原核生物群集の機能的な特徴に基づく類型化を行なった。また、主成分分析によって、これらのクラスタリングにどのような機能が寄与しているかを調べた。さらに、各海山の特徴の違いを可視化するために、ヒートマップを作成した。

4. 結果及び考察

4-1. 深海原核生物ベースラインデータの取得

4-1-1. 堆積物タイプ別のDNA抽出と効果的な抽出方法の選定

海洋堆積物試料に対して市販DNA抽出キットによるDNA抽出量を比較した結果、DNA量が少ない場合はキットによる差が大きい。DNA収量、PCR増幅の成功率、得られる多様性指数などからIsoSpinsoil DNAキット（ニッポンジーン）を推奨することとした。

4-1-2. 堆積物の微生物多様性

KS20-15, 18航海で得られた三陸沖および釧路沖の4測点から得られた深海堆積物について、堆積物深度毎に分別し、多様性解析を実施した。各試料あたり20,000reads以上の配列データに基づきzOTUのChao多様性指数は、7-1289(平均819, 標準偏差319)OTUであり、堆積物深度に応じて減少する傾向が認められた。得られたOTUについて、測点間での独自性と共通性を調査した結果、各測点ごとに共通OTUの数に比べ、極めて多数の独自OTUが検出された。PCRアンプリコンに基づく解析でのバイアスを減少させる配列処理を実施したが、複数回のPCRとtag付与を実施した試料でも単独種のほとんどは、同じサンプル間でも共通していなかったことから、解析過程のPCRエラーやMiseqシーケンス過程等で間違ったOTUが出現している可能性が示唆された。こうしたエラーの影響を排除するために、PCRを介した多様性検証では、同一サンプルでの複数回の解析や複数サンプルの結果を合わせるなどして、例えば一回の解析や一サンプルのみでしか出現しないOUTを除くといった何らかの対策が必要と結論づけた。

上記試料に海洋保護区の海山試料を加えて、 α 多様性(シャノン指数)の比較を行ったところ、海水よりも堆積物の方が多様性が高い結果となった(図1.2a)。また、コア深度の比較においては、表層から少なくとも20cmの深度までは α 多様性の違いはなかったことから、表層堆積物の α 多様性評価においては層別分析の必要はないことが示唆された(図1.2b)。保護区の海山間の比較では顕著な差は見られず、保護区ではない釧路沖堆積物とも差がなかった(図1.2c)。さらに、場所の異なるサンプル間で、共通する種と独自の種の割合を調べたところ、高い割合(11-67%)で独自種が存在することが示唆された(図1.3)。本研究で整備したプロトコルを用いて、このような形で、独自種の割合を調べ特定の場所の原核生物群集の独自性を示すことができる。これらの独自種は現存量の低い希少種によって構成されているが、原核生物は、分裂によってクローン増殖するため、動植物のように個体(細胞)数の減少が直接的に種の絶滅につながることはない。しかし、こうした希少種の存在は群集としての遺伝的な多様性を高め、遺伝子プールとして環境変化への適応度を高める役割があり、生態系の安定性や頑強性につながることから、独自種を含む群集全体の多様性を維持することは重要と考えられる。

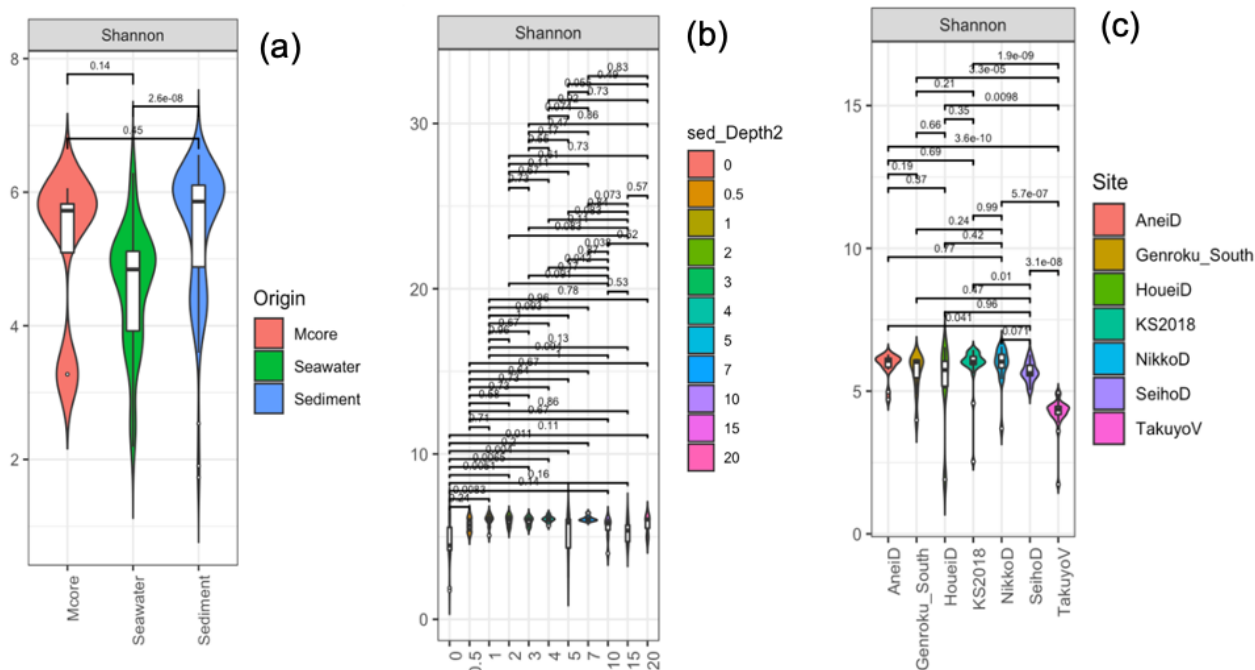


図1.2. 深海海洋保護区の海山試料の α 多様性(シャノン指数)の比較 (a) 海底直上海水、堆積物コア試料、M式採泥器による砂質堆積物の比較 (b) コア深度による比較(数字はcm) (c) 場所(安永海山、元禄海山、宝永海山、日光海山、正保海山、拓洋第五海山、釧路・三陸沖)間の比較

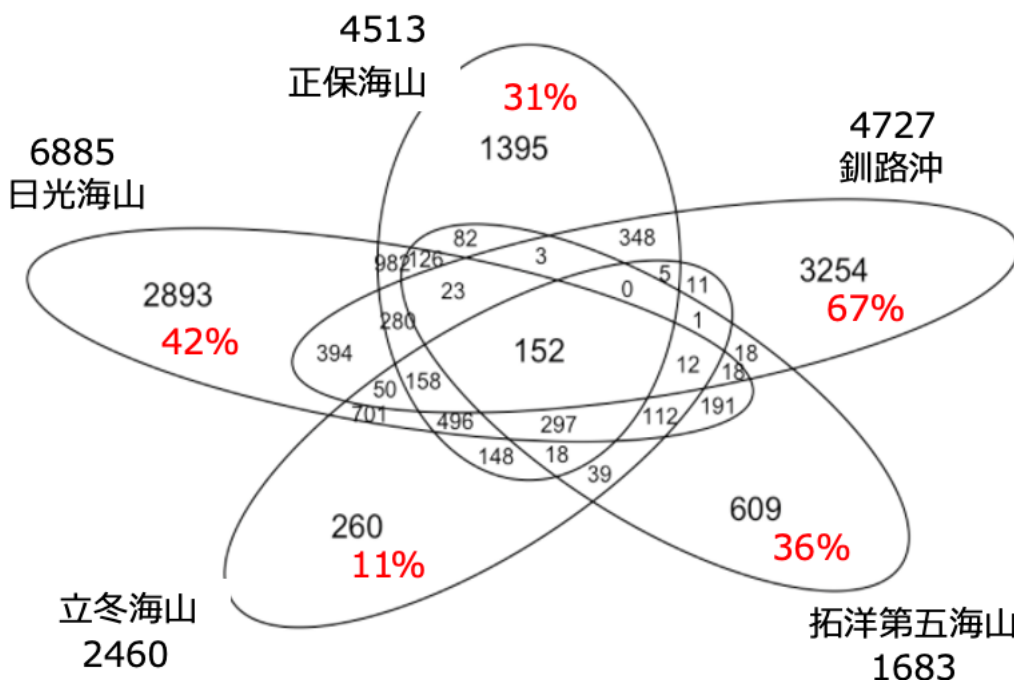


図1.3. 深海海洋保護区の海山試料の共通ASVと独自ASVの数と割合 ASV (amplicon sequence variant) は塩基配列の違いに基づく種の違いを反映する単位で、ASV数≒種数と考える

4-1-3. メタゲノム解析のためのDNA抽出プロトコルの作成

ビーズビーティングが抽出DNAの断片化に及ぼす影響については、まず振盪時間が1分の場合には、抽出されたDNA量が非常に低く、十分に菌体が破碎されていないと考えられた。振盪時間を2分、3分、5分と長くしてもDNA量は増加しなかった。また、振盪時間2分では太いバンドが見られたが(図1.4)、5分ではより断片化が進んでいた。正保海山の一部のサンプルでは、過度のビーズビーティングにより堆積物からPCR反応を阻害するフミン酸などの阻害物質が抽出された。このDNAサンプルについては、PCR inhibitor removal kitで精製したところ、PCRによる増幅バンドが確認された。また、同業他社の類似キットとのDNA回収率の比較を行なったところ、Zymo Research社製のキットでは他社と比べ回収率が70~90%と高く、精製後のDNAの損失も少ないことがわかった。堆積物に砂が含まれている場合はDNAが断片化する可能性があるが、今回の振盪条件では断片化は見られなかったことから、本課題での海山堆積物のDNA抽出条件を以下のように設定した。

- ビーズビーティング：2分間
- リゾチーム処理：1時間
- Proteinase K/SDS 処理：1時間
- DNAの精製および回収：ニッポンジーン社製 / ISOIL for beads beating for Large ver.2
- 着色がある場合の阻害物質の除去：Zymo Research社製/PCR inhibitor removal kit

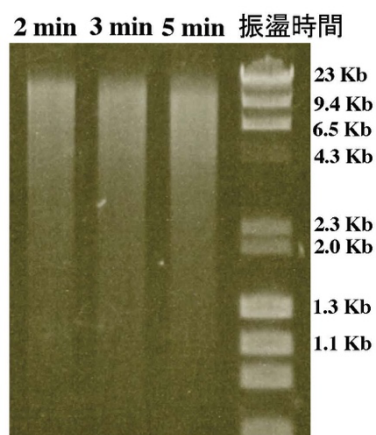


図1.4. 堆積物から抽出したDNAの電気泳動像。ビーズビーティング振盪時間によって断片化の程度が異なる。数字は抽出DNA全量

4-1-4. 海山周辺堆積物のメタゲノム解析

海山堆積物から抽出したメタゲノムDNAの塩基配列から、Genomaple™システムを使って俯瞰的な多様

性および機能遺伝子情報（ベースラインデータ）を取得するためのプロトコルを作成した。

リボソームタンパク質の配列からサンプル毎の生物種組成を解析したところ、得られたシーケンスリードの大部分は原核生物種（バクテリア74.5～86.1%、アーキア13.6～25.4%）に由来するものであり、真核生物種に由来するものはごくわずか（0.09～0.3%）であった。このことから、メイオベントスのメタゲノム解析のためには、堆積物からのソーティングが必要と考えられた。リボソームタンパク質遺伝子の配列から原核生物の分類群組成を推定し、ヒートマップとして可視化したところ、場所とコア深度である程度まとまることがわかった（図1.5）。同様に、機能的な多様性についてもヒートマップ化によって俯瞰的に示すことができた（図1.9, 1.10）。

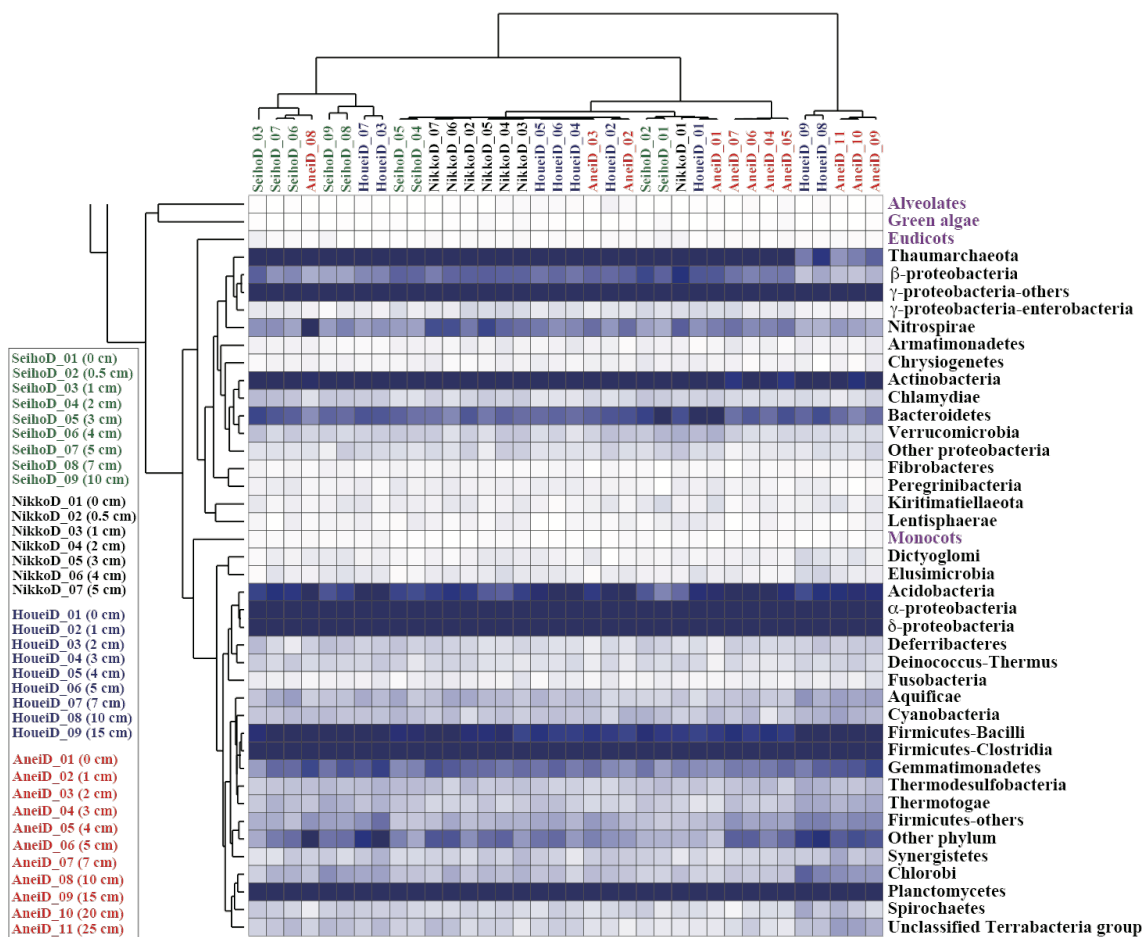


図1.5. ショットガンメタゲノム解析による深海保護区の原核生物群集の多様性評価（リボソームタンパク質遺伝子に基づく分類群組成のサンプル間比較）縦軸は分類群名、横軸はサンプル名、紺色が濃いほど相対出現頻度が高い

4-2. 深海原核生物リファレンスデータ取得技術の確立と取得

Earth Microbiome Project Multi-omics (EMP500)の深海堆積物などのメタゲノムプロジェクト (PRJEB42019)からショットガンメタゲノムデータ56個をダウンロードした。ダウンロードしたシーケンスデータは合計160 Mリード（23.9 Gbase）であり、平均2.86 Mリード（427 Mbase）であった。MetaWRAP, Metagenome-Atlas, Metagenome Orchestraの3つ既存のショットガンメタゲノム解析パイプラインを実行し、実行時間、取得MAG数、各MAGの完成率を比較した（表1.4）。

表1.4 各ショットガンメタゲノム解析パイプラインの結果比較

	Process time (h)	No.of MAGs	No.of MAGs of >50% completeness	Average completeness (%)
MetaWRAP	10	40	40	87.84
Metagenome-Atlas	185	12	12	89.98
Metagenome Orchestra	436	1,008	150	18.97

実行時間は、MetaWRAPが最も速く、Metagenome-Atlas, Metagenome Orchestraの順であった。Metagenome-Atlasはリード数の少ない小さなファイルがあると、パイプラインの最後のほうでエラーが出てしまい、エラーが出た小さなファイルを除去して再度実行し、エラーが出なくなるまで繰り返す必要があった。そのため、手動で操作する時間はMetagenome-Atlasが最も長かった。MAGの数は、Metagenome Orchestraが最も多く、次いでMetaWRAP, Metagenome-Atlasの順であった。ただし、Metagenome Orchestraは出力されるMAGの重複除去は行われておらず、ほぼ同じ組成のMAGが約5回ずつ出現する傾向があった。そのためMetagenome Orchestraから出力されるユニークなMAGは大体200個程度であると推定される。完成度 (Completeness) 50%以上のMAGの数はMetagenome Orchestraが最も多いが、重複も多いため、MAGに含まれるユニークなコンティグの数はMetaWRAPのせいぜい1.5倍程度であった(図1.6)。また、Metagenome Orchestraの完成度の平均値はMetaWRAP, Metagenome-Atlasと比較すると極めて低く、不完全なMAGもすべて出力していると示唆された。本研究では完成度の高いMAGを取得し、リファレンスゲノムを構築することが目標であるため、重複がなく、完成度の高いMAGを構築可能なMetaWRAPを採用することとした。

MetaWRAPを用いて、3-1-4で得られたメタゲノムDNA配列データのうち、日光海山と正保海山の外縁部、水深2000mの堆積物データからMAGの構築を行い、89個のMAG (ハウスキーピング遺伝子の数から推定された完全性が50%以上のゲノム) を得ることができた。平均サイズは 1.97 ± 0.22 Mb、完全性の平均は $65.1 \pm 2.1\%$ 、平均コンタミ率は $3.95 \pm 0.56\%$ であった。得られたMAGの多くは、既知種との配列相同性が低くこれまで知られていない微生物種に由来するものと考えられた。今回の堆積物中で比較的多く存在する種の多くが未培養の未知種であることが示唆される(表1.5)。さらに、得られたMAGについて、Earth Microbiome Projectの堆積物メタゲノムデータ41件(表1から重複サンプルを除いたもの)に参照し、安永海山と宝永海山のメタゲノムデータも加えて他の海域での出現頻度を調べた。その結果、日光海山と正保海山の細菌種(MAG)は安永海山や宝永海山でも高頻度で出現したのに対して、他の海域では出現頻度が低いかほとんど見られない種が多く存在した。一方で、グアテマラ海盆の深海堆積物から構築したMAGは、今回の保護区のメタゲノムデータからはほとんど検出されなかった。これらの結果から、今回の保護区の原核生物群集は、群集全体として固有性が高いことが示唆された(図1.7)。また、最優占種(1%程度のDNA占有率)は、Methylomirabilaceae科の細菌種だったが、本種は既知のバクテリアで類似したゲノムを持つ種は登録されておらず、図1-6右端のヒートマップで示されているように、今回の海山サンプルに特徴的な種と言える。こうした特徴的な種の変動をモニタリングすることで、環境変化の指標とすることができると考えられ、そのための解析プロトコルも作成した。

表1.5 日光海山と正保海山外縁部の深海堆積物から構築されたMAGの分類群名

MAG ID	Taxonomic Identity					Similarity
	Phylum	Class	Order	Family	Genus/species	
Bacteria						
bin.12	Actinobacteria	Thermoleophilia	Miltoncostaeales	Miltoncostaeaceae	Miltoncostaea_marina	35%
			Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium_sp._PSBB068	102%
					Rhodopseudomonas_sp._AAP120	19%
bin.40	Proteobacteria	Alphaproteobacteria			Nitrobacter_hamburgensis	11%
			Hyphomicrobiales	Nitrobacteraceae	Afipia_sp._GAS231	36%
					Tardiphaga_sp._vice154	19%
bin.42	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Azospirillaceae	Inquilinus_sp._Marseille-Q2685	18%
				Rhodospirillaceae	Skermanella_sp._TT6	13%
					Azospirillum_sp._TSO22-1	12%
	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium_sp._KBS0706	16%
bin.70	Actinobacteria	Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	Conexibacter_arvalis	11%
bin.85	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira_moscoviensis	14%
					<u>Candidatus Nitrospira nitrificans</u>	13%
bin.4	Methylomirabilota	Methylomirabilia	Methylomirabiales	<u>Methylomirabilaceae</u>		
bin.41	Patescibacteria	Dojkabacteria				
Archaea						
bin.55	Thermoplasmatota	Thermoplasmata				
bin.61	<u>Aenigmarchaeota</u>	Aenigmarchaeia	Aenigmarchaeales			

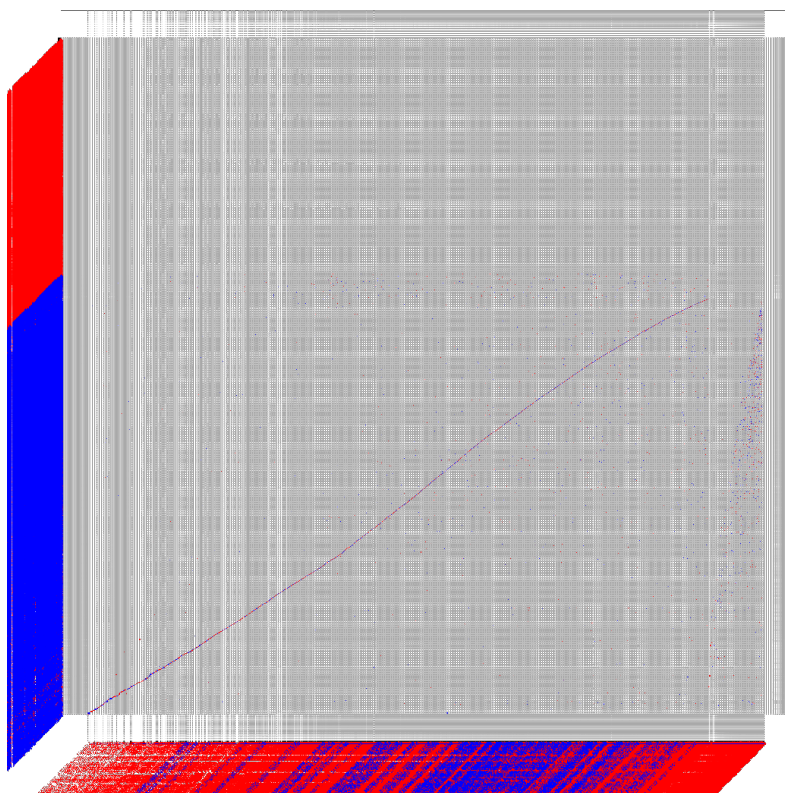


図1.6. MetaWRAPとMetagenome Orchestraで構築されたMAGに含まれるコンティグのドットプロットによる比較。X軸がMetaWRAP, Y軸がMetagenome Orchestraのコンティグ。MetaWRAPとMetagenome Orchestraのコンティグに相同性があれば、対角線上に赤もしくは青で線が引かれる。Y軸のMetagenome OrchestraのコンティグにはMetaWRAPと相同性のないコンティグが40%ほど存在する

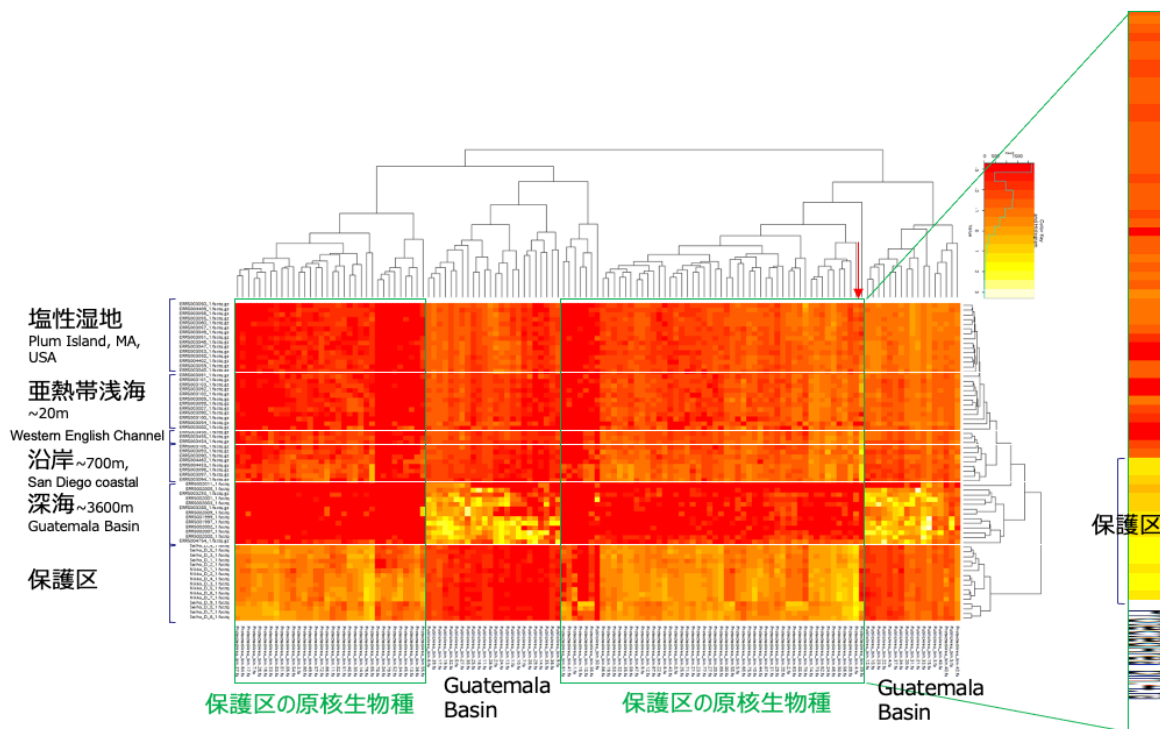


図1.7. 日光海山と正保海山外縁部の深海堆積物から構築されたMAGの他の海域での出現頻度. 横軸はMAGのID、縦軸は堆積物サンプル名と採取場所、赤矢印のMAGがMethylomirabilaceae科の最優占種で右端のバーはそのヒートマップを拡大したもの

4-3. 深海における特徴的な機能遺伝子の選別と解析手法の構築

正保、日光、宝永、安永の4海山の外縁部堆積物について、抽出したメタゲノムDNA からサンプルあたり5~10 Gbの塩基配列を産出、そのうち100万配列の機能遺伝子をGenomagle™システムを使って解析し、各サンプルのモジュール充足率とモジュールアバンダンスから、原核生物群集の機能的な特徴に基づく類型化を行なった結果、海山ごとに類型化され、コアの表層と下層でも分かれることが示された(図1.8)。さらに、糖質代謝に関わる機能群のヒートマップから、機能クラスタリングによって区別された海山間で、具体的にどのような機能に違いがあるのかを比較したところ、宝永・安永海山の群集に対して、日光・正保海山の群集は完全なTCAサイクルを持たないことで区別されることがわかった(図1.9)。エネルギー合成に関わる代謝機能の違いを示したヒートマップ(図1.10)は、4種類のCO₂固定経路のアバンダンスを比較することで、化学合成原核生物の相対的な量の指標として用いることができる。

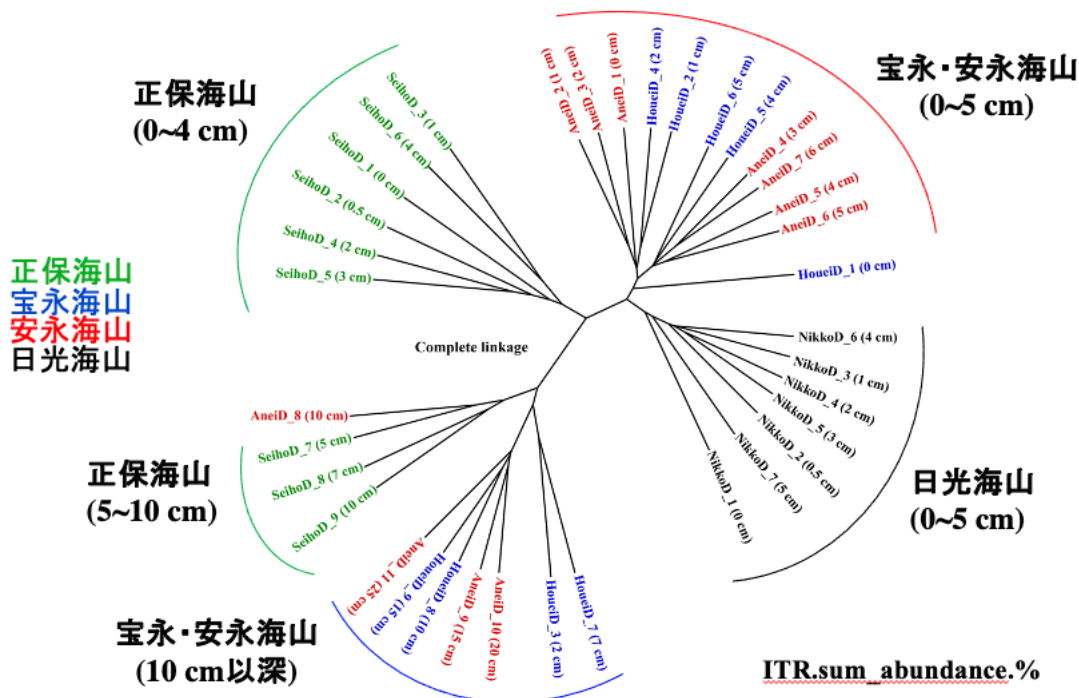


図1.8. ショットガンメタゲノム解析による深海保護区の原核生物群集の機能的な多様性評価（個別生物種のモジュールアブダンスに基づくサンプル間比較）

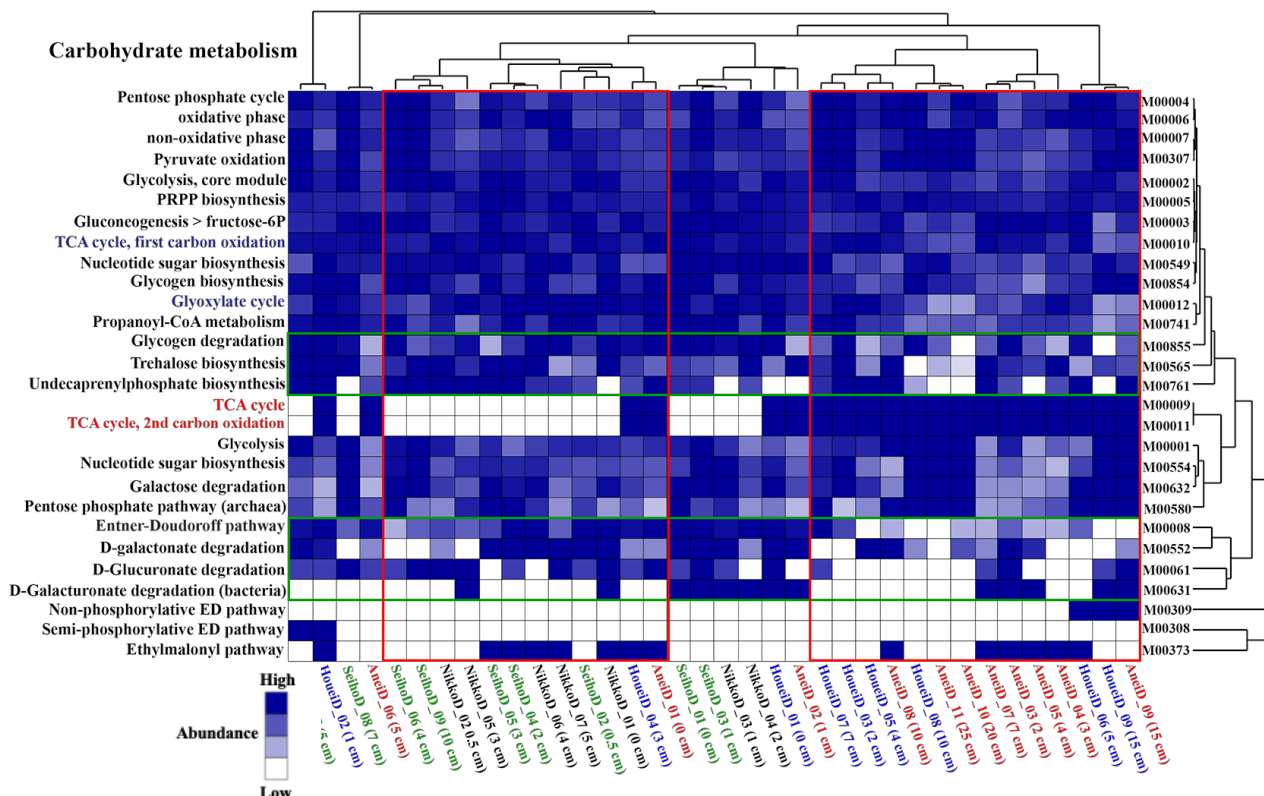


図1.9. ショットガンメタゲノム解析による深海保護区の原核生物群集の機能的な多様性評価（糖質代謝に関わるモジュールアブダンスに基づくサンプル間比較）縦軸は代謝経路、横軸はサンプル名、紺色が濃いほどアブダンスが高い

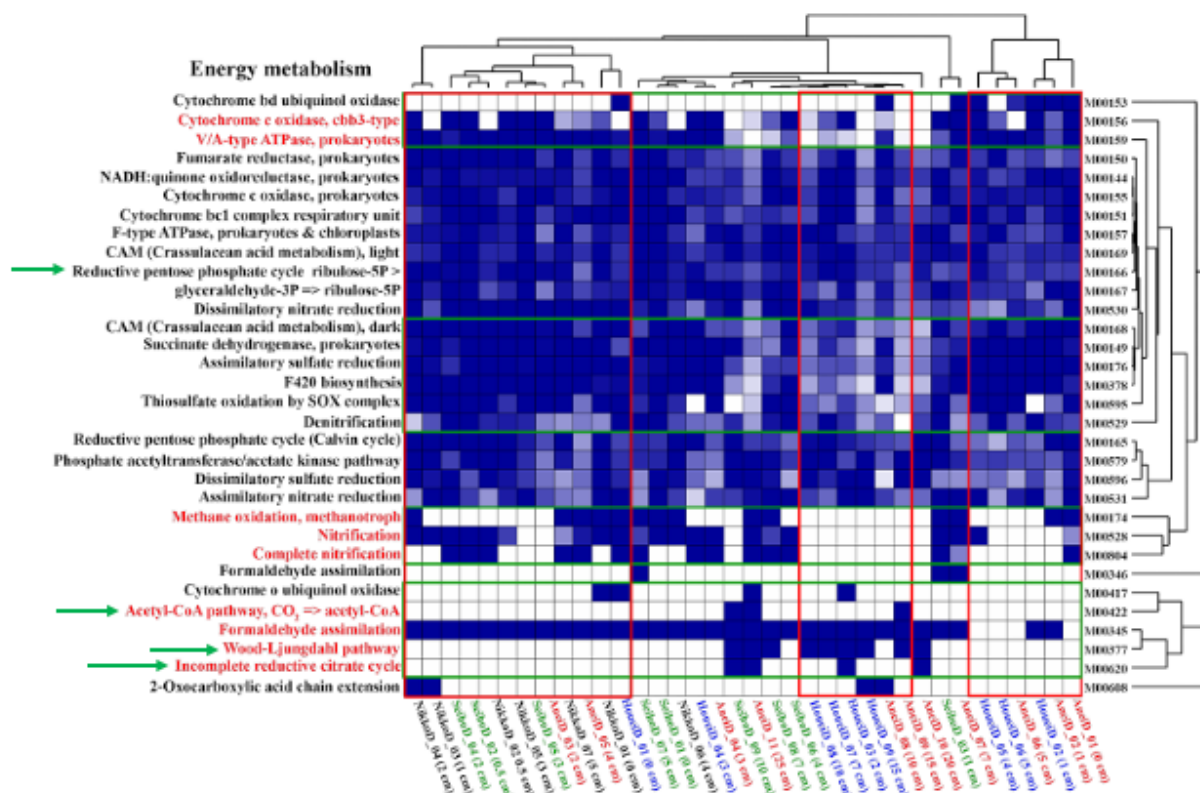


図1.10. ショットガンメタゲノム解析による深海保護区の原核生物群集の機能的な多様性評価（エネルギー合成に関わるモジュールアバundanceに基づくサンプル間比較）縦軸は代謝経路、横軸はサンプル名、紺色が濃いほどアバundanceが高い。緑矢印は、原核生物が持つ4種類のCO₂固定経路

4-4. 重要海域選定基準に関わる原核生物の情報

深海堆積物の16SrRNA遺伝子及び、ショットガンメタゲノム解析によって、深海保護区の原核生物の多様性評価（ α 多様性、分類群組成）ができるプロトコルを整備し、実際の深海保護区海山周辺堆積物を用いて評価ができることを示した。さらに、ショットガンメタゲノムデータから89個の個別種のゲノム（MAG）を構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルも作成した。分類群組成データ、あるいはMAGの出現頻度をサンプル間や海域間で比較することにより、当該地域に生息する原核生物種の唯一性又は希少性を評価できることも示した。また、Genomape™システムを使って機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成し、4種類のCO₂固定経路のアバundanceを比較できることを示した。これを用いて原核生物の化学合成による生産性の違いを評価できると考えられる。

5. 研究目標の達成状況

(1) 俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報（ベースラインデータ）の取得を可能とした

市販DNA抽出キット5種のうち、DNA収量、PCR増幅の成功率、得られる多様性指数などから国産のIsoSpinsoil DNAキット（ニッポンジーン）を推奨することとした。16SrRNA遺伝子アンプリコン解析、ショットガンメタゲノム解析による深海保護区の原核生物の多様性（ α 多様性、分類群組成）を評価するためのプロトコルを作成し、保護区ではない堆積物（釧路沖、拓洋第五海山）を含めた解析により、海山ごとに独自種（ASV）の存在することを示唆すると共に、多様性評価ができることを示した。

(2) 優占未培養原核生物系統群のゲノム情報（リファレンスデータ）取得技術を確立した

保護区海山堆積物のショットガンメタゲノムデータから89個の個別種のゲノム（MAG）を構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルを作成した。さらに、他の海域の堆積物のデータと比較することにより、他ではほとんど存在しない特徴的な最優占種（Methylomirabilaceae科の新規細菌種）を特定した

（3） 機能遺伝子の選別と解析手法構築、モニタリング項目の情報取得を可能とした

海山堆積物の原核生物から断片化の少ないDNAを高効率で抽出するためのプロトコル、得られた塩基配列から、Genomaple™システムを使って機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成した。これらの手法を用いて、生物機能の多様性に基づく海山間の原核生物群集のクラスタリングとサンプル間の比較を行い、糖質代謝に関わる機能ポテンシャルの比較から、宝永・安永海山の群集に対して、日光・正保海山の群集は完全なTCAサイクルを持たないことで区別されることを示した。さらに、エネルギー合成に関わる機能ポテンシャルの解析から、化学合成原核生物の指標となる4種類のCO₂固定経路のアバンダンスを比較できることを示し、化学合成原核生物の生産性を評価できる可能性を示した。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

II-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

東京大学大学院新領域創成科学研究科

自然環境学専攻 地球海洋環境学分野

小島 茂明

熊本大学くまもと水循環・減災研究教育センター

嶋永 元裕

東京大学大気海洋研究所

海洋生命システム研究系 海洋生命科学部門

新里 宙也

国際・地域連携研究センター 地域連携研究部門

峰岸 有紀

【要旨】

本サブテーマは、深海生態系の保全や深海開発の影響評価など様々な局面で必要とされている小型底生生物群集の生物多様性データを簡便に取得する手法の開発を目的とし、以下の目標を設定した。1) 深海底の堆積物から効率的にDNAを抽出する手法の確立、2) 抽出したDNAから種多様性評価に有効な塩基配列情報を効率的に取得する手法の確立、3) 塩基配列から小型底生生物群集の種多様性を評価する指標を推定する手法の確立と必要なデータベースの整備。

これらの目標を達成するため以下の研究を実施した。1) 八代海の海底堆積物を用いて、堆積物から小型底生生物を選別し、そのDNAを抽出する手法の実効性と条件を検討した。2) メイオベントスのモデル動物群を対象にミトコンドリアDNAデータを用いた種多様性評価手法の検討をおこなった。3) 令和2年度に学術研究船「新青丸」の研究航海を実施し、十勝沖で深海底堆積物を採集して、環境DNAおよびメタゲノム解析手法を検討した。4) 令和2年度および令和3年度の研究船「かいめい」航海で採集された正保海山、日光海山、元禄海山、安永海山の海底堆積物からメイオベントスを選別し、メタゲノムデータを取得した。深海メイオベントス群集で線虫類に次ぐ優占動物群であるソコムジンコ目甲殻類をモデルとして、メタゲノムデータからその種多様性を評価する手法を開発し、形態分類結果と照合することで有効性を検討した。

研究1)で、コアサンプラーで採集した深海底の堆積物サンプルから効率的にメタゲノム解析および環境DNA解析をするために有効な船上処理および保存方法を確立した。メタゲノム解析のために保存サンプルから小型底生生物のDNAを効率的に抽出する方法を確立した。研究2)で、深海小型底生生物のうち線形動物(線虫類)に次ぐ優占動物群であるソコムジンコ目甲殻類(ソコムジンコ類)をモデル動物群として、既存および新規に決定したソコムジンコ類および外群のDNAバーコード領域(ミトコンドリアDNA・COI遺伝子内のFolmer領域)のデータセットを整備した。また、ミズムシ亜目59種を選別してミトコンドリアDNA・COI遺伝子の塩基配列を決定し、カザリミズムシ科未記載種のミトゲノムの部分塩基配列と外群になるウオノエ亜目スナホリムシ科ヤマトスナホリムシのミトゲノムの全塩基配列を決定した。研究3)および4)で、次世代シーケンスにより網羅的に決定したメタゲノムデータからソコムジンコ類のDNAバーコード領域の塩基配列を再構成し、データセットを用いた分子系統解析によりサンプルに含まれていたソコムジンコ類の種数およびそれぞれの種の個体数を推定する手法を確立し、同時に採集したソコムジンコ類の形態分類結果と比較する事で手法の有効性を確認した。環境DNAからDNAバーコード領域をPCR法により増幅するための条件検討をおこない、効率的にPCR産物を得る方法を確立した。

以上の研究により、上に掲げた3つの目標どおりの成果をあげることができた。

1. 研究開発目的

深海生態系の保全や深海開発の影響評価など様々な局面で必要とされている小型底生生物群集の生物多様性データを簡便に取得する手法を開発する。現状の高度な専門性と多大な時間を要する形態分類による生物多様性評価に先立って生物多様性を標準的なプロトコルによるルーチン作業で低コストかつ簡便に評価し、その経年的な変化を迅速に把握することで、結果を政策に反映できる様にするを目的とする。

2. 研究目標

- (1) 深海底の堆積物から効率的にDNAを抽出する手法を確立する
- (2) 抽出したDNAから種多様性評価に有効な塩基配列情報を効率的に取得する手法を確立する
- (3) 上記(2)で得られた塩基配列から小型底生生物群集の種多様性を評価する指標を開発し、指標の値を推定する手法を確立する。また、その作業に必要なデータベースを整備する。

以上の目標を達成し、テーマ1の映像や画像による底生生物の多様性評価手法、テーマ2の海水中環境DNAによる生物多様性評価手法、テーマ3・サブテーマ1の原核生物の多様性評価手法と合わせて深海底生物群集の多様性を網羅的に評価し、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることを可能とする。

3. 研究開発内容

3-1. メイオVENTスDNA抽出方法の検討（令和2年度）

小型底生生物のメタゲノム解析手法の開発を目的として、ルドックス(コロイド状シリカ粒子)の溶媒付加により生じる密度勾配を用いた遠心分離による堆積物から小型底生生物を選別し、そのDNAを抽出する手法の実効性と条件を検討した。令和2年5月に予定されていた学術研究船「新青丸」航海が、新型コロナウイルス感染拡大の影響で延期されたため、研究分担者の嶋永の勤務地に近い八代海中央部海底（深海底同様の高泥分率）から、7月以降数回にわたって堆積物サンプルを採集し、生物抽出方法を検討した。深海底で最も優占する分類群の1つであるが推定種数の95%が未記載種であるソコミジンコ類（ソコミジンコ目甲殻類）を対象として、堆積物から選別されたソコミジンコ類のうち、深海底でも優占するクレトデス科とフネガタソコミジンコ科などに注目して標本の形態分類を行った。これは、形態と遺伝子情報両方を入手可能な標本を元に、ソコミジンコ類同種内レベルの遺伝子配列の差異、同属別種間レベルの遺伝子配列の差異、別属間レベルの差異を、複数の高次分類群で数値化・平均化することにより、将来「遺伝子情報のみのメタゲノム解析」から、対象保護区内の種多様性や群集の固有性を概算可能にするためのプロセスの第一歩である。

3-2. モデル動物群の分子系統解析（令和2年度）

日本周辺の漸深海性小型底生生物群集で優占する動物群について、既知のミトコンドリアDNAの情報を整理した。ミトゲノム(ミトコンドリアDNA)を解析対象とすることで目的を達成できる見通しとなったため、リボソームRNA遺伝子に関する情報整理は中止した。

メイオVENTスを構成する主要な動物群のうち、ソコミジンコ目、ミズムシ亜目、タナイス目をモデル動物群として、ミトゲノムデータを用いた種多様性評価手法の検討をおこなった。

3-3. 学術研究船「新青丸」による深海底堆積物の採集と環境DNA・メタゲノム解析手法の検討（令和2～4年度）

学術研究船「新青丸」KS-20-18次航海（令和2年5月4日（函館出港）～5月8日（釧路入港）の予定を新型コロナウイルス感染拡大の影響で令和2年8月16日（釧路出港）～8月20日（函館入港）に延期して実施）で、以下の3測点で、マルチプルコアラー型採泥器を用いて海底堆積物を採集し、環境DNAおよびメタゲノム解析手法の検討をおこなった。

St. T7（十勝沖）42°19.49' N, 144°23.02' E 水深1407 m; 16 Aug 2020

St. T5（十勝沖）42°23.00' N, 144°12.00' E 水深1012 m; 16 Aug 2020

St. T9（十勝沖）42°16.00' N, 144°34.97' E 水深1713 m; 17 Aug 2020

直前にサンプリング用の円柱コアの内部表面からハイターでDNAを除き、各8本のコアサンプルのうち

4本を環境DNA解析用として、海底直上水を孔径0.45 μm のステリベクスのみで濾過、またはガラスファイバーフィルターGF/C（粒子保持能：1.2 μm ）によるプレ濾過後に孔径0.45 μm のステリベクスにより濾過し、それぞれ -80°C で保存した。海底表面、海底下10cm、海底下20cm（T5のみ）、最下層から堆積物を5-10 g程度取り、 -80°C で保存した。1本からサブテーマ1用の微生物用サンプルを無菌的に採取した。残った堆積物はメタゲノム解析用とし、層別（0-1cm、1-2 cm、2-3 cm、3-5cm）に -80°C で保存した。各2本のコアをメタゲノム解析用とし、0-1cm、1-2 cm、2-3 cm、3-5cmの層に切り分け、100%エタノールで固定し、 -30°C で保存した。なお9月の「新青丸」航海では、マルチプルコアラー型採泥器の故障のためサンプリングが実施できなかった。

メタゲノム解析では、アルコール固定または冷凍保存した海底堆積物にシリカゲル溶媒（商品名Ludox）付加による密度勾配遠心分離を適用して選別したメイオベントス（1000 μm 篩を通過し、38 μm 篩上に残る小型底生生物）および遠心分離で沈殿した堆積物からBlood & Tissue kit（Enzymatic digestion）、Power Soil Pro kit（Beads beating）およびPlant Pro kit（Beads beating）を用いてDNAを抽出した。抽出されたDNAからKAPA HyperPlus Library Preparation Kitを用いてシーケンスライブラリを2種（ショットガンライブラリおよびインプットDNAをPCR増幅したショットガンライブラリ）作成し、次世代シーケンサー HiSeq X（Illumina）を用いて150 bp paired-endでシーケンスし、プログラム Megahitを用いて *de novo* アセンブリ、MitoFinderを用いてミトコンドリアDNA様配列の検出をおこなった。得られたミトコンドリアDNA様配列について、NCBIデータベースの全塩基配列データに対して相溶性検索（BLASTN, e-value cut off: $1e^{-1}$ ）をおこない、節足動物と最も高い相溶性を示した配列を用いて、分子系統解析をおこなった。

海洋堆積物中の環境DNAの解析では、大型および小型深海生物で共通の生物多様性モニタリング手法を確立するため、サブテーマ2-2と同じ抽出方法を用いることを考えた。そのために、サブテーマ2-2を担当する源 利文准教授と事前にコンタクトを取り、源准教授らが発表した手法（Sakata et al. (2020) ¹⁾）について詳細な議論を行った。この手法はアルカリ抽出法とエタノール沈殿法を組み合わせ、さらに、続けて市販のDNA抽出キット（PowerSoil DNA Isolation Kit, MO Bio Laboratories）を使用してDNAを抽出するものである。合わせてアルカリ抽出をおこなわず、PowerSoil DNA Isolation KitでDNAを抽出することもおこなった。また、PowerSoil DNA Isolation Kitが販売中止となったことに対応して、単品が販売されているPowerSoil DNA Isolation KitのBuffer類のみを用いる方法やFavorPrep Soil DNA Isolation kit（FAVORGEN）を用いた抽出もおこなった。抽出したDNAを鋳型として、PCR法でミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域の増幅をおこなった。

3-4. 研究船「かいめい」による深海底堆積物の採集とメタゲノム解析手法の検討（令和3, 4年度）

令和3年度は、テーマ1から提供されたアルコール固定された正保海山と日光海山の海底堆積物各1サンプル（令和2年度研究船「かいめい」航海で採集）の0-1cm層を用いて、Ludoxによる密度勾配遠心分離により選別したメイオベントスからBlood & Tissue kitでDNAを抽出し、3）と同じ方法でメタゲノムデータを取得した。その際、3）で十分な数の長いミトコンドリアDNA配列が得られなかったことに対応して、次世代シーケンスで得られた塩基配列のうち同じ種に由来すると考えられる配列群を、類似度98%を基準として選別し、それらから長い配列を再構成した。ミトコンドリアDNA様配列を検出し。得られたミトコンドリアDNA様配列について、相溶性検索で節足動物と最も高い相溶性を示した塩基配列を用いて、分子系統解析をおこなった。日光海山で同時に採集され、ホルマリン固定された海底堆積物（0-1cm層）からソコミジンコ類を選別し、形態分類した結果をメタゲノム解析結果と比較した。

令和4年度は、テーマ1から提供されたアルコール固定された元禄海山と安永海山の海底堆積物各1サンプル（令和3年度研究船「かいめい」航海で採集）の0-1cm層を、ステンレス篩を用いて38-125, 125-250, 250-500, 500-1000 μm にサイズ分画し、Ludoxによる密度勾配遠心分離によりメイオベントスを選別した。それぞれの1-2 cm、2-3 cm、3-5cm層については全量についてLudoxによる密度勾配遠心分離をおこないメイオベントスを選別した。各サンプルをプランクトンディバイダーで2つに分け、前年度と

同じ方法によるメタゲノム解析と形態分類に使用した。

4. 結果及び考察

4-1. メイオベントスDNA抽出方法の検討

100%エタノール固定されているDNA抽出用サンプルの形態分類について検討した。エタノールは揮発性が高く1000倍の微分干渉顕微鏡下による検体には不向きであったが、蒸留水下でのソーティング・検体作業によるDNA抽出効率の検討など試行錯誤の結果、分類作業をすべてエタノール下でおこなった場合に最も抽出効率が高いことが判明した。以上の成果を踏まえて、実際に深海底から採集された標本群の解析をおこなうこととした。

4-2. モデル動物群の分子系統解析

学術研究船「新青丸」などの航海で既に採集・保管されていたサンプルからミズムシ亜目59種を選別して、ミトコンドリアDNA・COI遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統樹を構築した。ミズムシ亜目のカザリミズムシ科未記載種のミトゲノム部分塩基配列（9081塩基対）と外群のウオノエ亜目スナホリムシ科ヤマトスナホリムシのミトゲノムの全塩基配列（16245塩基対）を決定した（図2. 1）。タナイス目については、国内での研究状況の情報収集をおこなったところ、ミトゲノムデータが既に決定され、論文が投稿されている⁴⁾ことが判明したため、新たなミトゲノム解析はおこなわなかった。ソコミジンコ目については、1) で選別した個体から13種についてミトコンドリアDNA・COI遺伝子の塩基配列を決定した。これらの配列とデータベースに登録されているソコミジンコ目および近縁な分類群（その他の節足動物、脱皮動物）および外群の塩基配列に基づき同分類群の多様性を包括する分子系統樹を構築し、ソコミジンコ目が高い支持率で支持される単系統群となることを確認した。既知のソコミジンコ目のミトゲノムを比較検討したところ、同分類群では頻繁に遺伝子配列の変化が起きていることが判明し、後述する様に民間業者などによるメタゲノム解析を容易にするために単一の遺伝子領域を基準とするのが有効であると判断したのに伴い、ソコミジンコ目のミトゲノム解析はおこなわなかった。

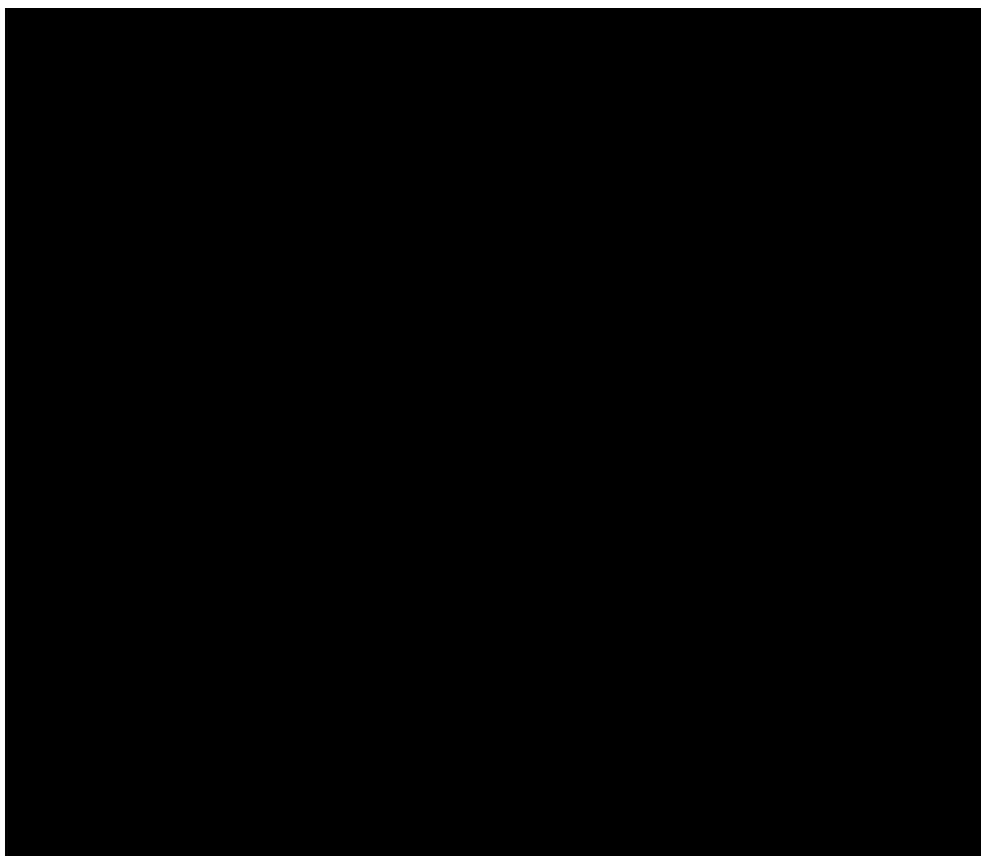


図2.1 ヤマトスナホリムシのミトゲノム

4-3. 学術研究船「新青丸」による深海底堆積物の採集と環境DNA・メタゲノム解析手法の検討

海底直上水の濾過では、ステリベクスのみでは200 mL程度が濾過の限度である一方、プレ濾過を実施した場合でも濾過量は500 mL程度が限度で、いずれの方法でも海水の環境DNA分析で実施されるような1～数リットルの多量の濾過量を確保することが極めて困難であることが明らかとなった。このことから、海底直上水のサンプリングについては、濾過方法について検討の余地があると考えられた。具体的には、ステリベクスを使用せずに、ガラスファイバーフィルターGF/F（粒子保持能：0.7 μm）を複数枚使用する¹⁾、または海底直上水からのDNA抽出は、既報の方法^{2), 3)}を検討するとよいと思われる。

海底堆積物からのDNA抽出を、① Sakata et al. (2020)の方法、② Sakata et al. (2020)の方法からアルカリ処理を除いた方法、③ PowerSoil DNA Isolation Kitのプロトコルを用いる方法（アルカリ処理なし）、④ FavorPrep Soil DNA Isolation kitのプロトコルを用いる方法（アルカリ処理なし）で試みた。その結果、いずれの方法でもDNAを抽出できたが、①ではPCRが成功せず、②ではPCR結果が安定しなかったのに対して、③と④では安定したPCR産物が得られた（図2. 2）。DNA抽出後のサンプルの顕微鏡観察ではメイオベントスが認められず、一般に海底下10cmより下にはメイオベントスほとんど分布していないことから、抽出されたDNAは堆積物中に長期間保持されていた環境DNAであると思われる。

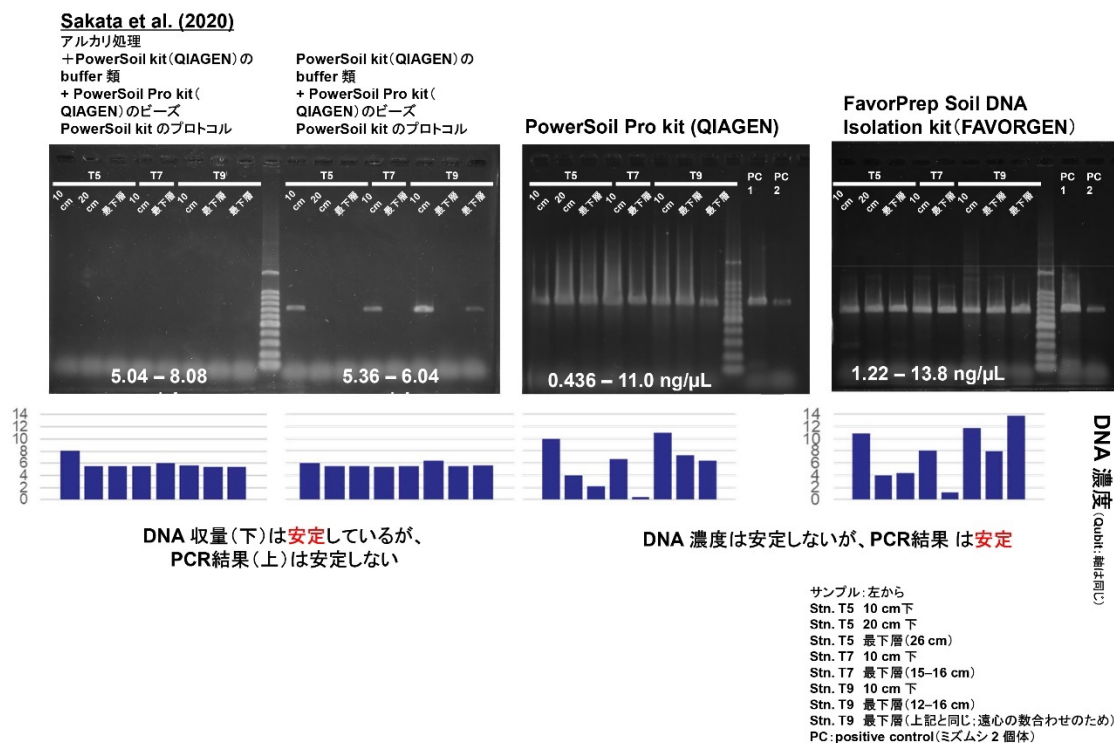


図2.2 海底堆積物から抽出したDNAの収量とPCR結果

抽出方法によって DNA 収量が異なった理由は不明であるが、動物のミトコンドリアDNAについては市販の土壌サンプル用DNA 抽出キットのプロトコルが有効で、これらを使うことで個々の実験の条件検討を最小限に止め、実験を効率化することができると考えられる。アルカリ処理および市販キットのカスタマイズは必ずしも効果的ではなさそうであるが、これは作業工程が減る点で寧ろ好ましい。また、必要な試料の初期量が少量で済むため(最大でも 0.4 g 程度)、他の解析と土壌サンプルの分譲がしやすく、総合的な研究が可能になると期待される。ただし、DNA 収量がばらつくため、生物量をモニタリング・考慮する場合には注意が必要である。なお、市販の土壌サンプル用のDNA抽出キットは、今後も頻繁に変更、終売、新規開発されていくことが容易に予想されるので、小型底生生物のDNAを抽出できるキットを可能であれば複数確保しつつ、新しいキットも試して、DNA抽出の継続性を維持することが重要だと考えられる。

メタゲノム解析では、アルコール固定したメイオベントスに対してBlood & Tissue kitを用いた場合に最も効率よく、高純度のDNAが抽出された。Ludoxによる密度勾配遠心でメイオベントスを選別した残渣(表のMud)から抽出されるDNA量は方法によらずメイオベントスより抽出した場合より少なかった。

表2.1 抽出されたDNAの濃度と純度 (A260/280, A260/A230)

Sample source	Preserved in	Blood & Tissue kit (Enzymatic digestion)	Power Soil Pro kit (Beads beating)	Plant Pro kit (Beads beating)
Meiobenthos	EtOH	6.6 ng/ul, 1.80, 1.21	4.5 ng/ul, 1.82, 0.09	5.2 ng/ul, 1.81, 0.11
Meiobenthos	Freezer (-20C)	5.8 ng/ul, 1.69, 0.84	1 ng/ul, 1.72, 0.58	5.5 ng/ul, 1.78, 0.07
Mud	EtOH	0.2 ng/ul, 0.77, 0.13	NA	2.3 ng/ul, 2.3, 0.03
Mud	Freezer (-20C)	2.9 ng/ul, 1.65, 0.48	NA	NA

次世代シーケンサーで得られた塩基配列のうち同じ個体由来とされる配列群をつなぎ合わせた長いコンセンサス配列から、ミトコンドリアDNA様配列を選別したところ、アルコール固定し

たサンプルから最も多くのミトコンドリアDNA様配列が得られた一方で、密度勾配遠心の残渣から得られたミトコンドリアDNA様配列は少なかった（表2. 2）。

表2.2 検出されたミトコンドリアDNA様配列

	Sample ID	Mf_Et	Mf_Et_P	Mf_Fr	Mf_Fr_P	Mu_Et_P
	Sample source	Meio	Meio	Meio	Meio	Mud
	Preserved in	EtOH	EtOH	Freezer (-20C)	Freezer (-20C)	EtOH
	PCR amplification	No	Yes	No	Yes	Yes
	Input data (Gb)	27.7	43.1	18.3	76.0	63.6
<i>de novo</i> assembly	No. of contigs	2,494,600	1,313,427	531,343	3,302,716	3,433,687
	Total Bases (Mb)	1,293	1,097	436	2,940	3,166
	Avg. length	518	836	821	890	921
	Max length	312,802	227,590	54,165	111,247	124,017
	N50	509	780	783	863	908
Mito-like	No. of contigs	508	632	289	772	184
	Avg. length	3,074	3,524	3,322	3,843	2,628
	Max length	23,222	19,634	20,257	23,715	14,221
	No. of contigs/ input data	18.4	14.7	15.8	10.2	2.9

得られたミトコンドリアDNA様配列について、相同性検索をおこなったところ、97~100%の配列について由来する動物群を推定することができた。ただし後述する様に、動物群によって分子進化速度が大きく異なる場合や既知のデータ数が限られている場合には誤った動物群が選ばれる可能性があるため、分子系統解析による確認が必須である。メイオベントスサンプルから得た配列が多く動物由来のミトコンドリアDNAを含んでいたのに対し、密度勾配遠心の残渣から得られた配列の多くは細菌に由来するものであった。したがって、メタゲノム解析で種多様性を評価するためには、Ludox密度勾配遠心で選別されるメイオベントス分画の解析のみで十分であると考えられた。

以上の結果からメタゲノム解析で十分量のミトコンドリアDNA塩基配列を取得する目的が立ったので、動物種によるPCR増幅効率の差異により結果にバイアスがかかる可能性があるアンプリコン解析はおこなわないこととした。一方で、ミトコンドリアDNA様配列を精査したところ、ソコミジンコ目を含むカイアシ亜綱甲殻類の配列は5つしかなく、期待を大きく下回った。これは1回の次世代シーケンスで十分な数の長いミトコンドリアDNA配列が得られないためと考えられた。シーケンス量を増やせば改善が可能であるが、サンプリングの時間的制約や解析コストの面から現実的でない。コストを増やさずに問題を解決するため、次年度以降のメタゲノム解析では、次世代シーケンスで得られた塩基配列のうち同じ種に由来すると考えられる配列群から長いコンセンサス配列を再構成することとした。

個体毎におこなう塩基配列決定とメタゲノム解析のいずれについても、アルコール固定したサンプルで冷凍サンプルより良い結果が得られることが示された。これは、冷凍サンプルを解凍する際に細胞膜などが損傷し、ソーティングや密度勾配遠心分離中にDNAが分解されたり、液中に溶出したりするのが原因であると思われる。したがって、今回の目的のためにはサンプルを船上でアルコール固定し、サンプルが凍結しない-30℃程度で保管することで、効率良くDNAが抽出できると結論した。一方で、形態観察にもとづく種分類のためには、アルコール固定標本は必ずしも適していない。この問題は形態分類用のサンプルをホルマリン固定することで解決するが、必要に応じて後で遺伝子解析をおこなうことが困難になる。この点で、形態観察後にDNA抽出が可能なルゴール液による固定⁵⁾が最も好ましいと考えられる。

予察的にデータベースに登録されているカイアシ亜綱甲殻類のミトゲノムデータを用いて、メイオベントスを含む2つの分類群ソコミジンコ目（近縁同属種ペアを含む）4種とキクロプス目2種のミトコ

ンドリアDNAの全タンパク遺伝子とリボゾームRNA遺伝子の塩基配列に基づき、カラヌス目2種を外群として最尤法で分子系統樹を構築し、メタゲノム解析で得られた5つのカイアシ亜綱甲殻類のミトコンドリアDNA配列を用いて確立を目指している種多様性解析手法の有効性を確認したところ、1種のソコムジンコ目と2種のキクロプス目と判定された(図2.3)。

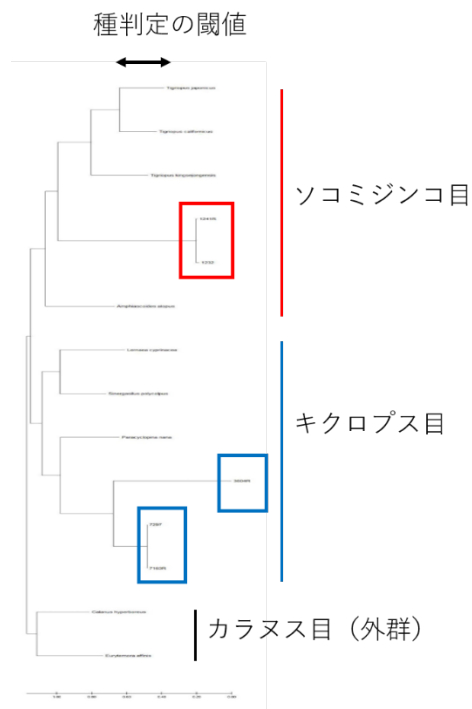


図2.3 ミトゲノムの基づくカイアシ亜綱の分子系統樹(最尤樹)

カイアシ亜綱甲殻類のミトゲノムデータを用いた予察的な種多様性解析から、本手法を実用段階(環境アセスメント会社などで実施可能なプロトコルの作成)に進める際に、以下の2点が問題となることが明らかになった。

1. カイアシ亜綱の中で遺伝子配列の変化が頻繁(同属内でのタンパク遺伝子の位置変化も確認)に起きており、既存のミトゲノム解析プログラムを使うにしても、アライメントなどの解析に、かなりの時間と経験を要する点
2. メタゲノム解析で得られるミトコンドリアDNAが短いと、分子進化速度の異なる遺伝子の影響が大きくなり、系統解析でレファレンスとなる配列間の系統関係が崩れる可能性がある点

これらの問題は、上で述べた方法により、より長いミトコンドリアDNAのコンセンサス配列を再構成し、その中に含まれる特定の遺伝子領域(COIなど)の配列のみを解析対象とすることで解決できる。その場合、対象とする遺伝子領域をあらかじめPCRで増幅するアンプリコン解析も考えられるが、バイアス(系統群による増幅率の違い)の問題が残るので、メタゲノムデータから十分量の特定の遺伝子領域データが取得できる様を目指すこととした。

4-4. 研究船「かいめい」による深海底堆積物の採集とメタゲノム解析手法の検討

令和3年度は、正保海山と日光海山の海底堆積物から得られた次世代シーケンズデータから、同じ種に由来すると考えられる配列群を、類似度98%を基準として選別し、それらを用いて長いコンセンサス配列を再構成した。その結果、それぞれ216と194のミトコンドリアDNA様配列が得られた。それらのうち相同性検索によって節足動物のCOI遺伝子を含むと判定された配列はそれぞれ25配列と20配列であったが、実際にCOIを含んでいたのはそれぞれ17配列と13配列であった。2)で構築した系統樹にこれらの配列を追加したところ、それぞれ15配列と6配列がカイアシ亜綱の配列であり、DNAバーコードとして

世界的に使われているFolmer領域⁶⁾の配列を含む16配列全てがソコミジンコ目の配列であると判定された。カイアシ亜綱以外の配列はメイオベントス中で最も個体数の多い線形動物であることが示された(図2. 4)。これは、線形動物は一般的に分子進化速度が速いため、近縁な線形動物間より節足動物の配列に対して、より相同性が高くなることが原因であると考えられる。このことは相同性検索のみで配列の由来する動物群を判断すると大きな誤差を生じる危険があることを示している。以上の結果に基づき正保海山と日光海山の海底堆積物サンプルには、それぞれ10種と6種のソコミジンコ類が含まれていると判定した。

日光海山で同時に採集された別の堆積物サンプルから得られたメイオベントスの形態分類では、30個体のカイアシ類が見いだされ、成体15個体中1個体がケンミジンコ目、残りはソコミジンコ目に分類された。15個体の幼体については形態形質に乏しいため、分類が困難であった。ソコミジンコ目の成体は更に8科9種に分類された。日光海山のメイオベントスは非常に低密度であるが、ソコミジンコ類については均衡度が高い(優占種が存在しない)ため、種多様性が比較的高いことが示された。メタゲノム解析で得られた日光海山のソコミジンコ類6種は系統解析によりそれぞれ異なる科であることが示唆されており、うち2科が形態分類と一致していた。深海メイオベントスは深海底にパッチ上に分布することが多く、同時に採集したサンプル間(例えばマルチプルコアラーのコア間)でも種組成がしばしば異なる⁷⁾ことを考えると、両手法の解析結果は概ね整合的であると考えられる。

メタゲノムデータから種間の個体数比を推定する方法として、種のコンセンサス配列を構成するのに使用したread数をコンセンサス配列の長さで補正した値を用いることを考えた。表2. 3にその結果を示す。得られた値は同一サンプル中の種間で1ケタ異なっているが、日光海山のソコミジンコ個体の形態分類が優占種がないことを示しているのと整合しない(ただし半数を占める幼体が同一種または少数の種である可能性は否定できない)。実際にはRead数は個体数でなくバイオマスを反映していると考えられるので、38 μ m から1000 μ mのサイズレンジを持つメイオベントスを一括して取り扱うのは無理がある。篩を用いて、より細かくサイズ分画(最大5段階)することで、相対的な出現頻度をより正確に推定するのが妥当であると考えられる。その際、サンプル処理の手間は多少増えるが、次世代シーケンス費用はほとんど変わらない。また令和2~3年度は1cmまでのサンプルのみ解析したが、より深い層まで一緒に解析することもできる。サンプル処理の手間は多少増えるが、次世代シーケンス費用は2~数倍程度に増える。採集されるコアの長さが一定でないので正確な比較のためには深さを決める、または層別に解析する必要があるが、この場合、サンプル処理の手間も増える。次世代シーケンス量でより多くのCOIデータを得るために、抽出したDNAからアルカリ変性法によりミトコンドリアDNAを分別してからシーケンスするのも有効かもしれない。

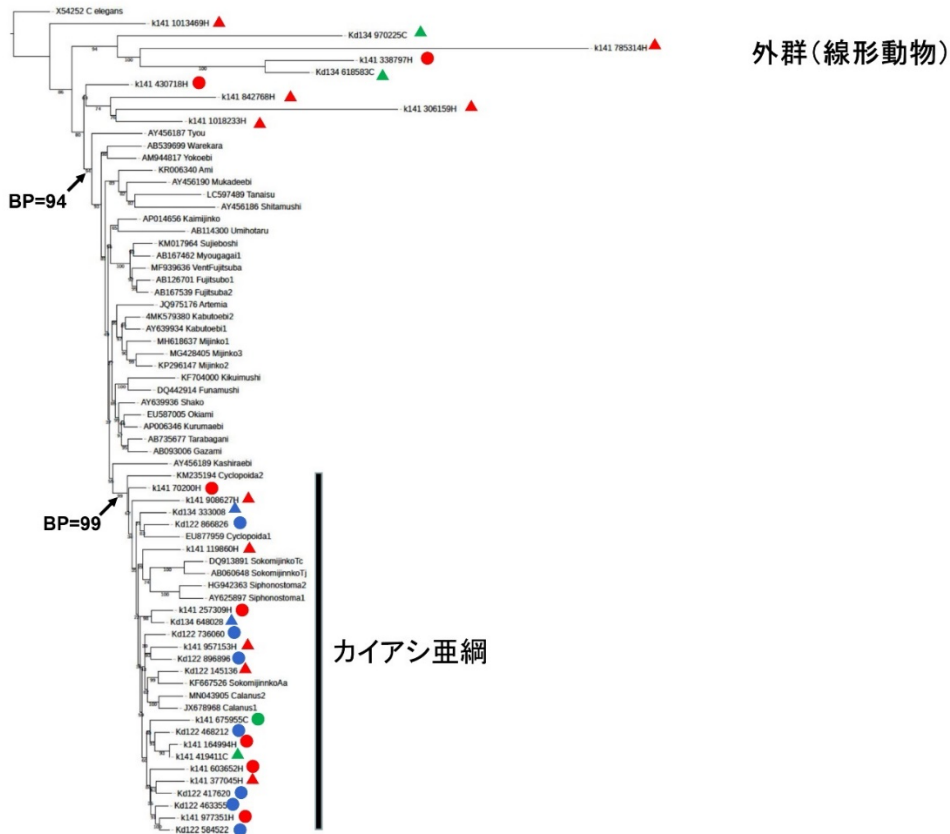


図2.4 COI全塩基配列に基づく節足動物の系統解析結果(最尤法)。丸は正保海山、三角は日光海山、青、緑、赤はそれぞれ相動性検索により甲殻亜門、鋏角亜門、六脚亜門と推定された配列

表2.3 Read数による個体数比推定

採集場所	順位	read数	配列長(bp)	read数/配列長
正保海山	1	2137	17905	0.11935
	2	341	8943	0.03813
	3	79	2163	0.03652
	4	226	6787	0.03330
	5	33	1339	0.02465
	6	24	1043	0.02301
	7	17	807	0.02107
	8	21	1042	0.02015
	9	37	1880	0.01968
	10	15	880	0.01705
日光海山	1	1817	12970	0.14009
	2	1699	14096	0.12053
	3	1204	14349	0.08391
	4	918	14128	0.06498
	5	205	5529	0.03708
	6	8	514	0.01556

令和4年度は元禄海山と安永海山の海底堆積物各1サンプルをサイズ分画し、1-2 cm、2-3 cm、3-5cm層の各サンプルから選別したメイオベントスをプランクトンディバイダーで2つに分け、それぞれメタゲノム解析と形態分類に用いた。

メタゲノム解析では、2つの海山からそれぞれ計264と325のミトコンドリアDNA様配列が得られた。それらのうち、相同性検索により節足動物のCOI遺伝子を含むと判定された配列はそれぞれ154配列と183配列であったが、実際にCOIを含んでいたのはそれぞれ49配列と54配列であった。2)で構築した系統樹にこれらの配列を追加したところ、それぞれ13配列と12配列がソコムジンコ目の配列で、元禄海山の2配列のみが同じ種から得られた配列であると判定された。ソコムジンコ目以外の配列は、その他の節足動物4配列、線形動物67配列、その他の脱皮動物12配列であった。令和3年度の結果に比べて線形動物の配列の割合が増えているのは、線形動物が堆積物中でソコムジンコ類と比べて、より深い層まで分布している⁷⁾ことを反映していると考えられる。実際、形態分類でもそうした傾向がみられている(表2.4)また、節足動物と相動性の高いコンセンサス配列に占めるCOIバーコード領域を含む配列の割合からメイオベントスの種数を推定すると、元禄海山が84種、安永海山が105種と推定された。ただし、分子進化速度の速い線形動物の推定値が過大評価となることが予想されるので、実際の種数はこれより低いものと考えられる。

表2.4 形態分類による高次分類群組成

元禄海山

サンプル名	カイアシ類	幼生	端脚類	等脚類	クマ類	タナイス類	貝形虫類	多毛類	貧毛類	線虫類	ダニ類	動物	その他	不明	合計
#153 0-1cm 500µm-1mm 合計		0													0
#153 0-1cm 250µm-500µm 合計		7						1		4			1		13
#153 0-1cm 125µm-250µm 合計		3								3			1		7
#153 0-1cm 38µm-125µm 合計		2	1							5			1		9
#153 1-2cm 38µm 合計		3	4							4			0		11
#153 2-3cm 38µm 合計			1							2			0		3
#153 3-4cm 38µm 合計										3			0		3
#153 4-5cm 38µm 合計										4			1		5
合計		15	6	0	0	0	0	1	0	25	0	0	4	0	51

安永海山

サンプル名	カイアシ類	幼生	端脚類	等脚類	クマ類	タナイス類	貝形虫類	多毛類	貧毛類	線虫類	ダニ類	動物	その他	不明	合計
#157 0-1cm 500µm-1mm 合計		0					1								1
#157 0-1cm 250µm-500µm 合計		1						3		2					6
#157 0-1cm 125µm-250µm 合計		1	1				1			6					9
#157 0-1cm 38µm-125µm 合計		5	2							5					12
#157 1-2cm 38µm 合計		1						3		9					13
#157 2-3cm 38µm 合計								1						1	2
#157 3-4cm 38µm 合計										2					2
#157 4-5cm 38µm 合計															0
合計		8	3	0	0	0	1	1	7	0	24	0	0	0	45

ソコムジンコ目の25配列それぞれを構成したreadを使い、3)と同じ方法で由来する個体の数を推定したところ、いずれについても単一の個体に由来することが示された。以上の結果に基づき元禄海山と安永海山の海底堆積物サンプルには、それぞれ12種13個体と12種12個体のソコムジンコ類が含まれていたと判定した。形態分類では、元禄海山からソコムジンコ類11種12個体(他に破損等により同定不能3個体)とノープリウス幼生6個体、安永海山からソコムジンコ類4種4個体(他に同定不能4個体)、ノープリウス幼生3個体が得られており(図2.5)、メタゲノム解析結果と概ね整合的であった。

2)で構築した系統樹に4つの海山から得られたソコムジンコ類の配列を追加したところ(図2.6)、複数の海山で出現した種はなく、海山による系統的な偏りも認められなかった。各海山のソコムジンコ群集が長期間隔離された固有性の高いものである可能性が考えられる。



図2.5 元禄海山と安永海山で採集されたソコミジンコ類

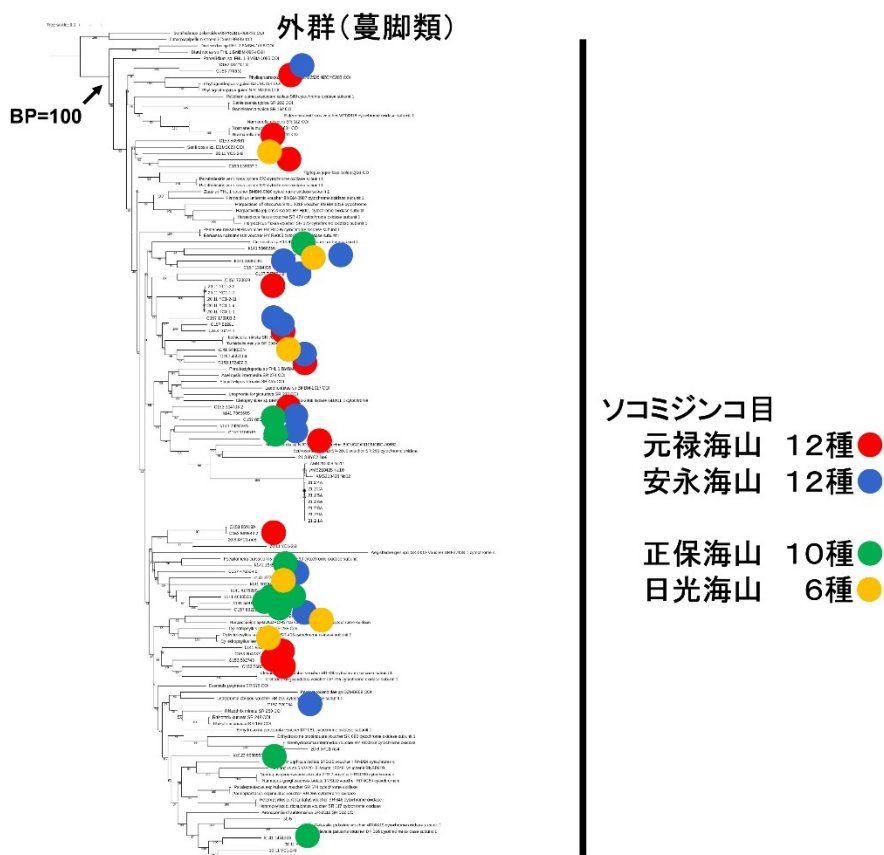


図2.6 DNAバーコードによる4つの海山のソコミジンコ類の系統解析結果（最尤法）

ミトゲノム解析で検出されたソコミジンコ類24種25個体のコンセンサス配列を構成するreadは1個体を除き、ほぼ特定のサイズ分画と深度層のみから得られていた。内訳は海底下1cmまでに分布していた小型種（38-125 μ m）が最も多く9種、表層1cmに分布していた中型種（125-500 μ m）が3種、表層1cmに分布していた大型種（500-1000 μ m）が1種で、それ以外に元禄海山から2個体が得られた種ではいずれも表層1cmに分布していたが、1個体は小型（38-125 μ m）、1個体は中型（250-500 μ m）であった。これらは同じ種の幼体と成体なのかもしれない。海底下1-2cm層には4種、海底下2-3cm層には4種海底下3-4cm層には1種が分布していた。例外的に1個体のみ全てのサイズ分画と深度層からreadで得られていたが、これは採集した堆積物コアを層別に切り分ける際、海底下1cm付近にいた個体が破壊され、破片が全てのサンプルに混入したためである可能性が高い。この個体を含めると24種中15種、25個体中16個体

が表層1cmに分布し、1種を除き表層から3cmまでに分布していたことになり、ソコムジンコ類が海底表面付近に集中的に分布しているという知見⁷⁾とも、形態分類結果(表2. 4)とも整合的であった。

メタゲノム解析による分子分類と形態分類のいずれからも2つの海山のソコムジンコ群集の低い密度、高い均衡度、高い種多様性が示された。一方で、2つの手法で科レベルで対応付けられたのは分子24種、形態15種中6種に留まった。元々個体数の少ないサンプルをプランクトンディバイダーで分割する場合、確率的な影響が強くなりサブサンプル間の組成の差異が無視できないほど大きくなることが予想される。こうした問題を解決するためには、より多くの個体を採集するのが有効であるが、一般に深海でのサンプリングは時間や装備の制約が大きいため、現実には容易ではない。採集したサンプルを無駄なく使うために、ルゴール液で固定したサンプルを用いて、テーマ1の画像解析で高次分類群ごとに個体数を計数した後、全量を使ってメタゲノム解析をおこなうことを推奨したい。また、令和4年度の解析では、各コンセンサス配列を構成したreadを使い、類似度の制限を掛けずに再解析することで個体数を推定した。この方法は種数が少ない場合には有効であるが、種数が多くなるにつれて解析時間と手間が増加し、実用的でなくなるかもしれない。そうした場合は令和3年度におこなった方法とサンプルのサイズ分画を組み合わせ、以下の方法で個体数を推定するのがよいだろう。

1) 種ごとに、contigを形成するread数 / 対象分類群の全read数

× 1 / contigの配列長

× NGS解析に使用したDNA量 / 抽出した総DNA量

× サイズ係数

の値を計算する。ここでサイズ係数は、500 μm篩に残る種を1、同250 μmを8、125 μmを64、63 μmを512、38 μmを4096とする。

2) 形態分類による対象分類群の個体数 × 対象種の値 / 対象分類群の全ての種の値の合計

5. 研究目標の達成状況

- (1) 深海底の堆積物から小型底生生物の種多様性評価に十分な量のDNAを抽出する方法を確立できた。
 - (2) 抽出したDNAから小型底生生物の種多様性評価に十分な量の塩基配列データをメタゲノム解析により得ることができることを示すことができた。
 - (3) 深海メイオベントス群集で優占するソコムジンコ類を例にして、整備したデータベースを用いて、従来の形態分類と同等の多様性データ(種組成と各種の個体数)を得ることができると示された。同じ方法で他の分類群についても解析することが可能であることから、沖合海底域の小型底生生物群集の多様性を評価し、重要海域の抽出基準を踏まえてモニタリングすることが可能となった。
- 以上の様に、目標どおりの成果をあげることができた。

6. 引用文献

- 1) Sakata MK, Yamamoto S, Gotoh RO, Miya M, Yamanaka H, Minamoto T: Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2, 505-518 (2020)
- 2) Yamamoto S et al.: Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE*, 11, e0149786 (2016)
- 3) Wong MKS, Nakao M, Hyodo S: Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports*, 10, 21531(2020)
- 4) Kakui K, Kano Y: First complete mitochondrial genome of a tanaidacean crustacean (*Arctotanais alascensis*). *Zoological Science*, 38, 267-272 (2021)
- 5) Sano M, Makabe R, Kurosawa N, Moteki M, Odate T: Effects of Lugol's iodine on long-term preservation of marine plankton samples for molecular and stable carbon and nitrogen isotope analyses. *Limnology and Oceanography: Methods*, 18, 635-643 (2020)

- 6) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz RA, Vrijenhoek RC: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299 (1994)
- 7) Itoh M, Kawamura K, Kitahashi T, Kojima S, Katagiri H, Shimanaga M: Bathymetric patterns of meiofaunal abundance and biomass associated with the Kuril and Ryukyu trenches, western North Pacific Ocean. *Deep-Sea Research I*, 58, 86-97 (2011)

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 砂村倫成、濱崎恒二：第35回日本微生物生態学会（2022）「海底面境界における深海水～海底の微生物相」10/31-11/3 北海道大学

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 千葉県立柏高等学校における特別授業「海洋研究への招待：環境DNAで探る海の生態系」（令和2年11月16日、17日 聴講生4クラス約160名）濱崎恒二
- 2) 一般公開イベント「OceanDNAテック2021」（主催：東京大学大気海洋研究所、令和3年6月30日、SHIBUYA QWS、参加者300名）にて講演 吉武和敏
- 3) 川崎朝鮮初級学校における特別授業「海の生き物を研究する」（令和3年11月6日、聴講者数約50名）濱崎恒二
- 4) 東京大学大気海洋研究所インターン実習「海洋微生物の新種を探そう！」（令和3年8月、令和4年4月、8月、令和5年3月 参加者各4～7名）濱崎恒二
- 5) 川崎朝鮮初級学校生徒と教員による東京大学大気海洋研究所見学（令和4年6月30日、参加者数15名）濱崎恒二
- 6) 春日部共栄中学校生徒と教員による東京大学大気海洋研究所見学（令和4年11月14日、参加者数50名）濱崎恒二

【サブテーマ2】

- 7) 東京大学大気海洋研究所サマーインターン実習「深海近底層の生物多様性を探る」（令和3年8月、参加者6名）小島茂明

(4) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

(6) その他の成果発表

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Development of the metagenome-based methodology for monitoring deep-sea microbial and meiofaunal communities

Principal Investigator: Koji HAMASAKI, Michinari SUNAMURA, Kazutoshi YOSHITAKE, Hideto TAKAMI, Shigeaki KOJIMA, Chuya SHINZATO, Yuki MINEGISHI, Motohiro SHIMANAGA

Institution: The University of Tokyo, Kashiwa City, Kashiwa, JAPAN

Tel: 04-7136-6171 / Fax: 04-7136-6171

E-mail: hamasaki@aori.u-tokyo.ac.jp

Cooperated by: Kumamoto University

[Abstract]

Key Words: Deep-sea, Sediment, Metagenomics, Prokaryote, Meiobenthos, Species diversity

The purpose of this study is to develop the metagenome-based methodology that can be applied to the communities of micrometer-size organisms in deep-sea sediment samples, as part of the development of low-cost and efficient methods for continuous multipoint biodiversity monitoring in offshore seafloor (deep-sea) marine protected areas.

In subtheme 1, we developed prokaryotic diversity assessment protocols for deep-sea reserves using 16SrRNA gene amplicon sequencing and metagenome shotgun sequencing in order to enable the acquisition of comprehensive species diversity and functional gene information. A comparison and evaluation were performed using sediment and water samples collected from seamount areas during several cruises. We also evaluated the method to reconstruct genome information of unculturable species from metagenome sequence reads, constructed the genomes of 89 individual species and identified a novel bacterial species of the family Methylophilaceae as a characteristic dominant species in the protected area seamount sediments that rarely exists elsewhere. In order to characterize prokaryotic community in terms of functional diversity, a protocol for functional gene analysis based on the completion ratio of KEGG modules and their abundance using the Genomape system was developed.

In subtheme 2, we established methods to process on board and preserve bottom-sediment samples collected by core samplers for metagenomic and environmental DNA analyses of deep-sea meiobenthic organisms. We further established methods to extract DNAs of meiobenthos from sediment samples and obtain their metagenomic data efficiently. We provided dataset of the DNA barcode (the Folmer region within mitochondrial COI gene) to construct molecular phylogenetic trees of the second dominant deep-sea meiobenthos, harpacticoides as a model, and showed their species diversity and a number of individuals of each species within sediment samples can be estimated based on a molecular phylogenetic tree re-constructed using metagenomic data. By comparison with results of traditional morphological classification, the variability of the present methods was confirmed. We also established methods to obtain PCR products of metazoan DNA barcodes from environmental DNA within bottom-sediment samples. The present results of the molecular classification can be used as with those by the morphological classification and it can apply larva and broken individuals as well.

Overall, the methodologies and protocols we developed here are useful to obtain diversity information required for the EBSA criteria such as species richness, evenness, uniqueness, rarity and productivity of deep-sea benthic prokaryotes and meiofauna, which can contribute for routine monitoring of benthic organisms in offshore deep-sea marine protected areas.