

課題番号：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

体系的番号： JPMEERF20S20730

研究代表機関：東京大学

研究代表者： 浜崎恒二

研究実施期間：令和2年度～令和4年度

研究分担機関：東京大学・熊本大学

1. 研究開発背景等

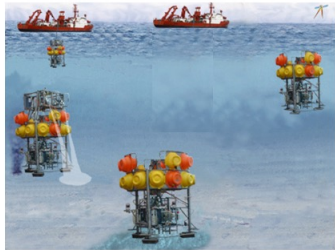
全体目標

深海の生物多様性や環境を低コストで簡便にモニタリングできる方法を構築し、沖合海底自然環境保全地域（海洋保護区）指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえた生物情報等を取付すること

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

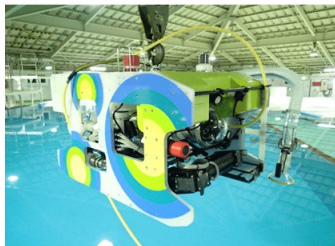
フィールド調査方法



フリーフォール式現場観測装置

→
サンプル提供

→
画像提供



無人探査機ROV

対象生物群と分析方法

原核生物	メタゲノム
メイオファウナ	画像解析
	メタゲノム
脊椎動物（魚類）	画像解析
	環境DNA
大型無脊椎動物	画像解析
	環境DNA

重要海域の抽出基準

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

1. 研究開発背景等

原核生物（細菌，古細菌）

- 圧倒的な生物量と機能的多様性を有する
- 生態系の維持に主要な役割を担う
- 組成や機能の変動が環境変化の指標となる
- 多様性や機能を把握する手法としてメタゲノム解析法が主流になりつつある
- 表層域の微生物についてデータベースが充実しつつある一方で、深海域の微生物データは圧倒的に不足している

公共データベース（DDBJ）のメタゲノムデータ登録件数（キーワード検索）

海洋メタゲノムデータ： 1,986件（metagenome, metagenomics, ocean, marine, sea）

深海メタゲノムデータ： 97件（deep sea 33件, deep ocean 65件）

小型底生生物

- 深海の底生真核生物個体の大部分を占める
- 高い種多様性（海産の自由生活性種を含む30の動物門に、メイオベントスのみから成る2門、ほぼメイオベントスのみから成る4門がある）
- 膨大な時間と手間がかかるため分類研究が進まず、定量的な比較研究がない
- 遺伝子解析技術により、形態分類を補完する様な多様性の推定が可能

2.研究開発目的

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を構築をする

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
（代表：浜崎 恒二 参画機関：東京大）

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
（代表：小島 茂明 参画機関：東京大・熊本大）

3.研究目標

全体目標：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

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

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

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

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. 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し、その作業に必要なデータベースを整備する

4.研究開発内容

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

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）の取得を可能とする

- 堆積物タイプ別のDNA抽出と効果的な抽出方法の選定
- DNA抽出方法等の違いによるrRNA 遺伝子ベースの多様性推定への影響を調べた
- 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評価を行った

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）取得技術の確立

- 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）を構築、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

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する

- 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
- 海山周辺堆積物から抽出したメタゲノムDNA を用い、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

4. 研究開発内容

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

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

- 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

2. 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

- 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. 小型底生生物群集の種多様性を評価する指標を開発、指標値を推定する手法を確立、データベースを整備する

- 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
- 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：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

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）の取得を可能とする

- 市販DNA抽出キット5種を比較し推奨キットを決定した
- 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、コア深度での多様性の違いを明らかにした
- 保護区ではない堆積物を含めた比較で、海山ごとに独自種の存在が示唆された

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）取得技術の確立

- 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
- 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する

- 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
- 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
- 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示した

5.研究成果【5-1.成果の概要】

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

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

- 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
- 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

2. 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

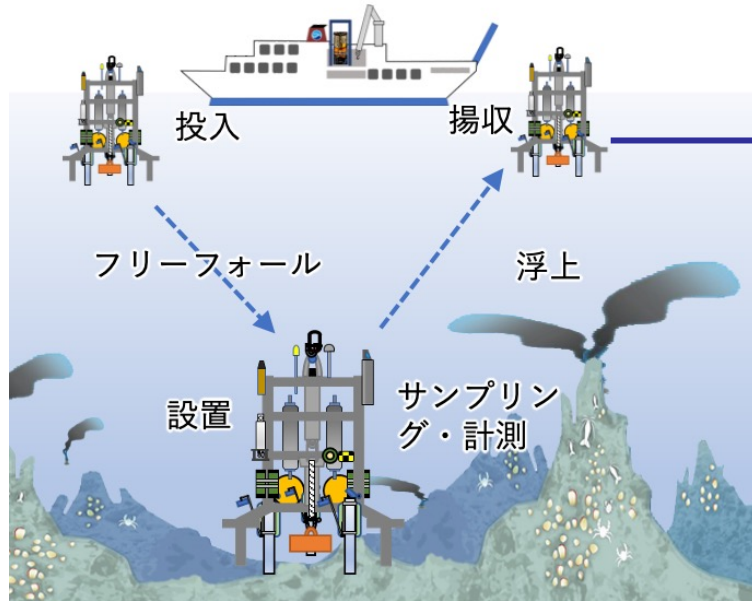
- 環境DNAからDNAバーコード領域をPCR法により効率的に増幅するための方法を確立
- 小型底生生物のDNAのメタゲノム解析により特定の遺伝子領域の塩基配列を効率的に取得する方法を確立

3. 小型底生生物群集の種多様性評価指標を開発、指標値の推定手法を確立、データベースを整備する

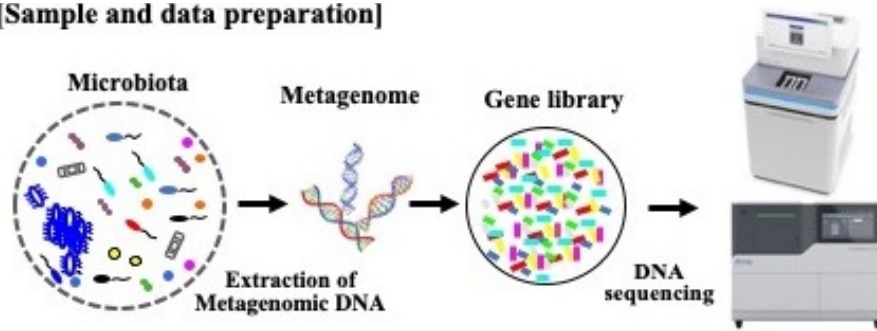
- 深海小型底生生物のうち線虫類に次ぐ優占動物群であるソコミジンコ類を対象として、ミトコンドリアDNA・COI遺伝子およびDNAバーコード領域（同遺伝子内のFolmer領域）の塩基配列の分子系統解析用データセットを整備した
- メタゲノムデータからソコミジンコ類のDNAバーコード領域の塩基配列を選別し、データセットを用いた分子系統解析により、サンプルに含まれていたソコミジンコ類の種数およびそれぞれの種の個体数を推定する手法を確立

5.研究成果【5-2.環境政策等への貢献】

沖合海底自然環境保全地域（深海底の海洋保護区）「指定書及び保全計画書」に基づく保全地域の管理に貢献

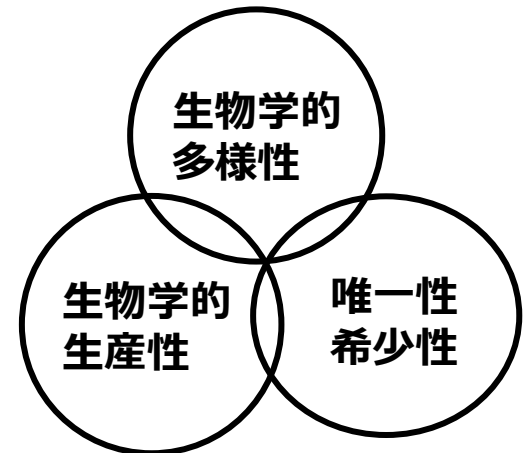


[Sample and data preparation]



原核生物群集
メイオバントス群集

保護区指定条件（重要海域の抽出基準）
の評価

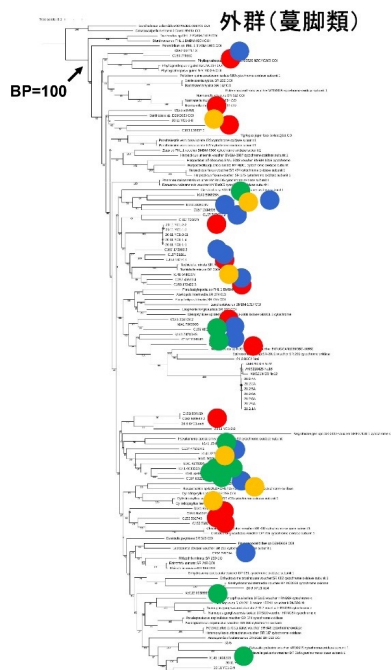


5.研究成果【5-3.研究目標の達成状況】

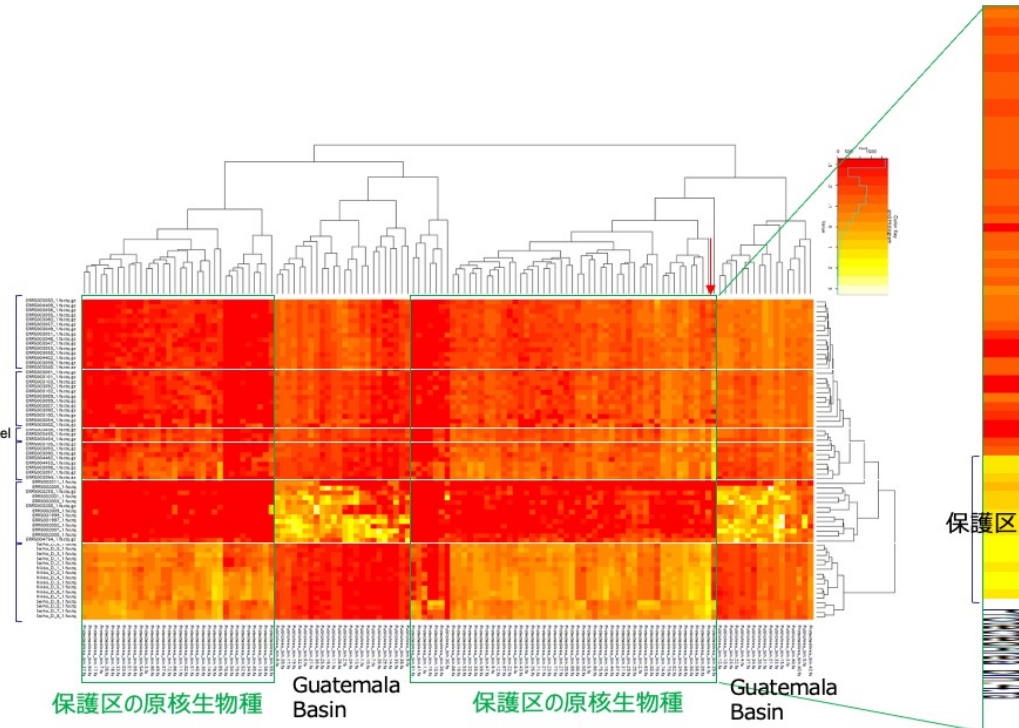
全体目標：原核生物や小型底生生物を対象とした深海生態系モニタリング技術の確立

目標どおりの成果をあげた

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



- ソコムジコ目
- 元禄海山 12種 ●
- 安永海山 12種 ●
- 正保海山 10種 ●
- 日光海山 6種 ●
- 塩性湿地 Plum Island, MA, USA
- 亜熱帯浅海 ~20m Western English Channel
- 沿岸 ~700m, San Diego coastal
- 深海 ~3600m Guatemala Basin
- 保護区



ソコムジコ目の固有性を示すデータ

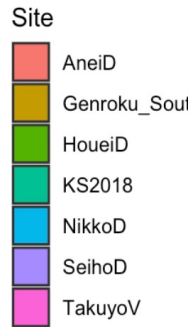
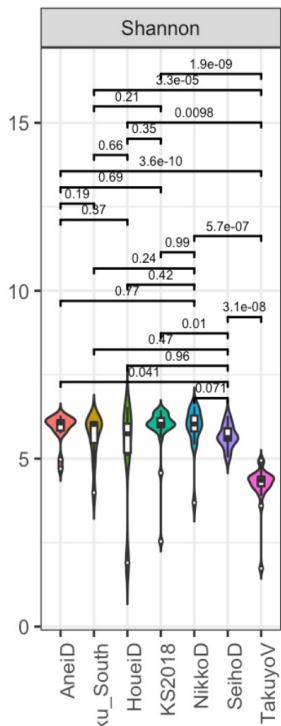
保護区原核生物種の唯一性、希少性を示すデータ

5.研究成果【5-3.研究目標の達成状況】

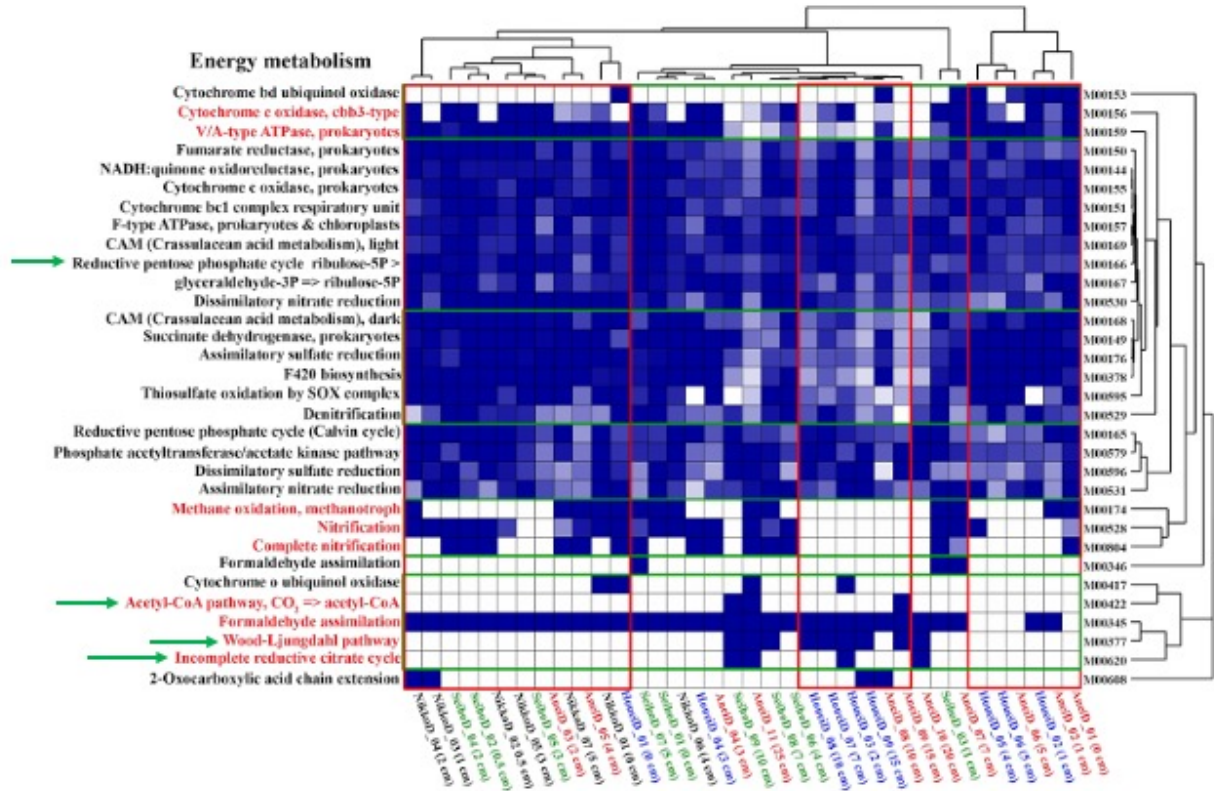
サブテーマ1：深海原核生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発

目標どおりの成果をあげた

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
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）取得技術の確立
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



原核生物群集の種多様性



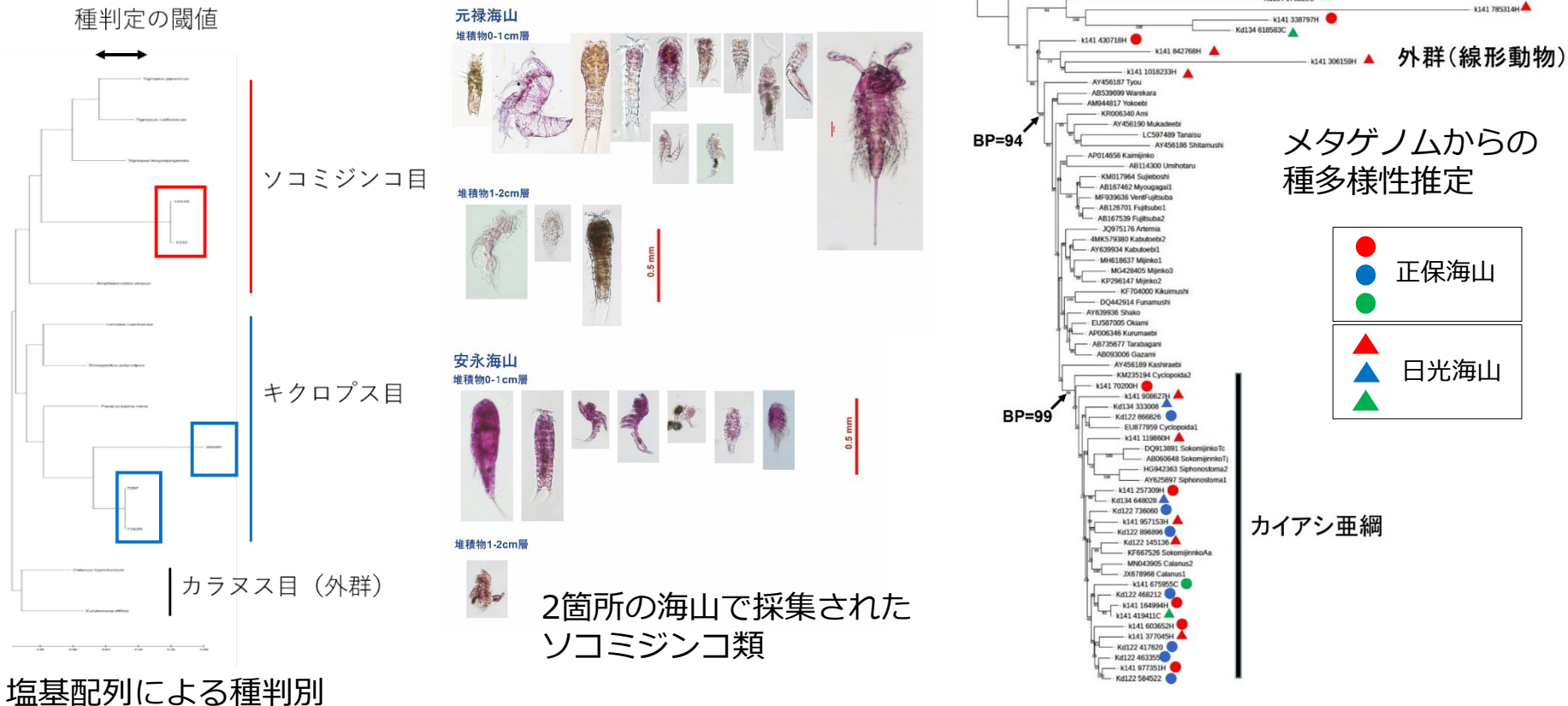
メタゲノム解析による原核生物群集の機能的多様性

5.研究成果【5-3.研究目標の達成状況】

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

目標どおりの成果をあげた

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した
2. 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した
3. 小型底生生物群集の種多様性評価指標を開発、指標値の推定手法を確立、データベースを整備した



6. 研究成果の発表状況

口頭発表

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

「国民との科学・技術対話」の実施

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「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
5. 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
6. 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
7. 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