

# プロジェクト名： 地球環境変動の解析と地球生命システム学の構築 (地球・環境システム)

プロジェクトディレクター： 本山 秀明 教授 (国立極地研究所)

サブプロジェクトディレクター： 伊村 智 教授 (国立極地研究所)

## [1] 研究計画・研究内容について

### (1) 目的・目標

地球環境は地球上の気水圏、地圏、生物圏、そして、人間圏の相互のバランスの上で形成されてきた。地球環境変動と現代への影響を地球生命システムとの関わりの上で解明することを目標とする。これまでの遺伝子解析で得られた微生物多様性のデータを、氷床コア情報から得られた氷期、間氷期を含む気候変動と照合し、大規模な地球環境変動と微生物の進化・多様化の相互作用を理解し、さらに環境変動下での生命の適応戦略のメカニズムを明らかにすることで、地球生命システム学の構築を目指す。そのために本プロジェクトでは、南極および北部グリーンランドの氷床コア等、環境の変動が大きい極域を中心に、環境データの取得と微生物解析を中心に研究を行う。

### (2) 必要性・重要性 (緊急性)

本研究はわが国では本機構における融合的研究においてしかできないと思われるユニークさがある。南極ドームふじ基地から採取した 72 万年の歴史を保存している氷床コアを用いた解析により、これまでの地球生命システムの多様化・進化と相互作用の関係解明の手がかりが解明されるとともに、今後の地球生命システムをシミュレートする上で必須の情報が得られてきた。これを核として、多くの大学等の研究者が参画することにより、新分野の創成が可能となるであろう。また、産業革命以後、地球環境は大きな変動をしており、昨今の地球温暖化の進行とこれに纏わる国際情勢は、人類、地球生命に対しての驚異となっている。地球の生命多様性や分布が、今後の地球環境の変動の中でどのように変動していくのかを、過去数十万年の環境復元と地球生命との相互作用を解明することにより明らかに出来る。今こそが、地球環境変動と地球生命システム、そして人間社会への関わりを考え、環境変動下における地球生命システム学という新しい領域を切り開くチャンスである。本プロジェクトでは地球環境変動と生物適応を課題にしているコミュニティーやコンソーシアムに対しても社会のニーズにこたえられる準備が十分に整っている。

氷床コアの微生物解析に関しては、南極ボストーク湖をはじめとする氷床下湖（氷底湖）の掘削が実施され、まさにその成果が待たれている状況である。ロシアによるボストーク湖の掘削成功、イギリスによるエルスワース湖での失敗、アメリカによるウィランス・アイスストリームでの掘削成功と、各国に大きな動きがあった。一方、ドームふじ基地下には氷床下湖は無いが氷床底面の融解水が存在していて、我が国ではこれを採取している。氷床コア底部の微生物の予備的観測により、まさに極限環境の“進化が遅れた”過去の微生物が生き残っている可能性が濃厚となっている。ドームふじ基地深層掘削氷床コアは、地球上ではこの場所以外では入手できない貴重な“生きた微生物化石”の宝庫ともいえ、一刻も早い、氷床コア中の微生物の時系列的解明が急がれる。

### (3) 期待される成果等 (学問的効果、社会的効果、改善効果等)

極限環境に順応した多様な微生物試料が得られ、生命システムのメカニズムの理解に資するとともに、貴重な遺伝子資源の取得が期待される。これまでに確立された地球生命の遺伝学的手法を基盤にして、地球環境変動の下で、多様な地球環境から南極に飛来した生物の過去数十万年前のタイムカプセルの復

元、及び生命がどのように進化、多様性を得たかを極地において解明することが期待できる。さらに、極地の自然環境下ではどのような微生物・ウイルスが存在し、どのような振る舞いをするのかについてはこれまで、ほとんど分かっていなかった。また、グリーンランド、ヨーロッパアルプス、南極半島、南極等からのアイスコアから時系列的に微生物・ウイルスを検出し、進化のメカニズムを解明することで新しい分野が期待される。これらの研究により、地球環境の変動と微生物の進化・多様化の相互作用を理解することができ、極限環境下の地球環境変動と生命システムのメカニズムの解明が期待できる。

新領域融合研究センター（TRIC: Transdisciplinary Research Integration Center）の方法論としての「融合」の意味を徹底的に吟味し検証することにより、融合研究の真の方法論を見いだすことが出来る。本プロジェクトでは他に例のないリスクを背負った氷床微生物の解明をかかげるが、「融合」の方法論で解明することにより、多様性、進化、研究開発等多様な課題を解決することが期待でき、社会的波及効果も大きいと考えられる。フィールドサイエンスとしての氷床コアの解析を基盤として、過去の地球環境及び生命との関わりを取得したデータで示すことは、その特異な方法論において大学教育研究活動にも大きな影響をもたらすであろう。

#### (4) 独創性・新規性等

本研究の独創的な部分は極限域からの生物、特に微生物の無菌的検出・解析法である。これにより、現場で試料を無菌的に採取しその処理ができる半恒久的な現場実験施設の可能性、現地から日本に持ち帰った後の施設、試料の保存、抽出、検出法、全菌数計数、特定遺伝子等による概略的な群集解析のみならず、一細胞からの種の確定を実現させることが期待できる。このような方法を用いた「人間圏創始の環境復元」及び「極限環境での微生物・ウイルス検出」のテーマには依然として顕著な新規性が認められる。また、極域環境は氷床コアをはじめとして、湖底及び海底堆積物コアの解析により、地域特異的に時間軸が濃縮された形で生物由来試料の採取が可能であることが特徴である。第Ⅰ期のプロジェクトで準備された氷床年代の特定、気候変動要因解析、化学組成、同位体組成、構成生物種の構成や変動に関わるゲノム情報等の手法から、次々に得られるデータを統合して解析を行うことにより、地球全体の変動を反映した極域環境の変化と、極限環境における生命活動との相互作用による環境形成プロセスについての時系列的な解明が期待できる。

本プロジェクトの特徴の一つは極地研が中心となって、遺伝研、情報研、統数研が一体となって初めて目的が果たせることにある。すなわち、極地研は試料提供、極域生物相の生態と分類、気候・環境、地形・地質などのさまざまな環境情報と、第Ⅰ期計画で培った極地研—遺伝研の遺伝子解析システムを駆使して解析を実施することにより目的の達成を目指す。遺伝研は新型シーケンサーを駆使したメタゲノム、1細胞からのゲノムを特定することにより、環境中に存在する全生物を一体としてとらえるための解析手法、実験手法、情報処理手法を開発し、ゲノム、遺伝子解析を中心とした世界に類を見ない研究を実施する。統数研は氷床コアから解析された物理、化学、及び生物遺伝子データの解析を行う。特に新型 DNA シーケンサーにより出てくるテラバイトに及ぶ膨大なデータの解析をコンピュータ処理により解析する。情報研においては、すでに蓄積されている学術標本データを中心に、さまざまなデータの所在等についての調査を行い、メタデータデータベースを作成する。これをもとに、第Ⅱ期目のデータベースの構築支援と統合化データベースの構築を行う。また、最終目標であるデータベースの学術ポータル（バイオポータル）による提供、開発研究を行い、最終的には共同利用機関が提供する共同研究資料として広く公開し、利用に供するシステムを構築するまでを視野に入れていることが独創的である。

#### (5) これまでの取り組み内容の概要及び実績

・地球環境変動下の生命の進化、多様性の解明は環境の変化に大きく依存する。地球生命システムを環

境・遺伝基盤の上で解明してきた第 I 期プロジェクトではドームふじ基地の深層掘削コアの微生物解析を中心に、氷床・雪氷域の生命について多面的に研究を行ってきた。

- ・ドームふじ氷床コアの微生物解明はコンタミ対策のために開発研究を重ね、多くの経費と年月を費やしてきた。しかしながら、これまでに一部の氷床コアを用いて、16rDNA の解析はほぼ終了している。遺伝子は断片的になっていることがわかり、新型 DNA シーケンサー解析が最良の方法であるという結論に達し、解析作業を開始した。
- ・氷床底面付近に見いだされたシアノバクテリアは現生している種とは大きく異なることが示唆された。南極大陸氷床下の極限環境に適応しているか、あるいは既に絶滅してしまった特殊な系統の遺骸であるかが推測された。
- ・難培養微生物がほとんどである氷床コア微生物の研究において、1 細胞遺伝子解析の開発研究を行った。開発は、微生物を 1 細胞毎に分取、ゲノム DNA の増幅、新型 DNA シーケンサーによる塩基配列の決定にまで至っている。
- ・氷床コアから見いだされる微生物の起源の知識を得るためのバックグラウンドとして、昭和基地沿岸域の微生物について、16S, 18rDNA, ITS 領域での遺伝子解析を実施した。先行研究が少ない南極では遺伝学的に未記載、未研究な生物が多いため、この情報は必須である。近隣では極地の中でも生物の宝庫である沿岸域、湖沼域の生物相を、遠方では熱帯アマゾン域の空中生物相の遺伝子解析を通じて解明してきた。これらの遺伝子データは一部、新型 DNA シーケンサー (454) を駆使し、これまでに膨大なデータが集積されている。
- ・南極の湖沼群に見つかったコケ植物群集であるコケ坊主の解明は、単に分類・生態学的解明を超え、遺伝子解析による湖沼植物群集のマイクロシステム生態系、モデル生物の開発研究に及んだ。
- ・極地研所蔵の多様性生物画像データベースは地理的データによって他分野データである 3D 画像解析データ、遺伝子データがとの連動が可能となり、学術標本データベースの新しい領域が見えてきた。
- ・低緯度高山性氷河の古生態系解明としてのキルギスタンでのアイスコアの微生物解析において、植物・微生物の 16S, 18rDNA, ITS 解析を行い、年代を推定した。現在の氷河表面と比較すると、氷河底部の環境は現在の高山植物地帯に類似していることが予測される。これらの研究はグリーンランド氷床底部、南極ドームふじ基地氷床底部の環境推定に応用される。
- ・世界の様々な地域の雪氷環境中の微生物培養 (1200 株) を通じた遺伝子解析を行った。極限環境に見いだされる多くの微生物が難培養生物であるが、これらの遺伝子解析と同時に、培養可能な微生物の遺伝子解析および培養株の保存は、将来的には多くの利用や新分野の構築が期待される。
- ・花粉分析は、植生変遷・気候・環境の復元研究において広く使われている手法である。氷河・氷床に封じ込められた花粉に着目して予備実験を重ねてきた。氷河表層に含まれていたマツ属花粉を対象として花粉一粒ごとの DNA 分析技術の開発を進め、花粉の形態観察からでは困難な亜種レベルでの識別にも成功した。

## (6) 国内外における関連分野の学術研究の動向

氷床コアからの微生物解析の研究は現在、国内外で見あたらぬ。国内での類似する研究には南極観測の湖沼生態系のプロジェクトである REGAL (Research on Ecology and Geohistory of Antarctic Lakes) がある。さらに南極研究科学委員会 (SCAR) のワーキンググループである SALE (Subglacial Antarctic Lake Environments) ではロシア、ドイツ、ベルギー、アメリカなど 9 カ国が参加し、南極氷床下湖の物理、化学、生物、地学などの総合的な問題を検討してきた。ここでも、日本のドームふじ基地の氷床コアの微生物解析について注目されてきた。平成 23 年度には NEEM アイスコアが基盤岩付近まで掘削され、参加各国で基盤岩由来である粒子が多く含まれるアイスコアの生物解析に関するミー

ティングが行われた。これらの動きの中での我が国のドームふじ基地での掘削は、氷床底部に湖がないという環境で特徴付けられており、このような環境での氷床コアの微生物解析では日本が最も進んでいるのが現状である。

国際極年 IPY2007-2008 の主導的なプロジェクトとして、MERGE (Microbiological and Ecological Responses to Global Environmental Changes in polar regions) があるが、研究方法、研究地域、研究者において類似している。しかし、MERGE は予算が伴わない研究プログラムであり、将来的には SALE、EBA (Evolution and biodiversity in Antarctica)、PAME (Polar Aquatic Microbial Ecology)、さらに我々のプログラムと合流していく計画である。

## [2] 研究計画

### (1) 全体計画

地球環境は地球上の気水圏、地圏、生物圏、そして、人間圏の相互のバランスの上で形成されてきた。地球環境変動と現代への影響を、地球生命システムとの関わりの上で解明することを目標とする。これまでの遺伝子解析で得られた微生物多様性のデータを、氷床コア情報から得られた氷期、間氷期を含む気候変動と照合し、地球環境変動と微生物の進化・多様化の相互作用を理解し、環境変動下での生命の適応戦略のメカニズムを明らかにし、地球生命システム学の構築を目指す。そのために本プロジェクトでは、南極およびグリーンランドなど環境の変動の大きい極域を中心に、環境データの取得と微生物解析などについて研究を行う。

平成 22 年度と平成 23 年度は 6 つの研究テーマを中心に 4 研究チームで研究を進めた。研究の進捗状況に応じて柔軟に研究計画を変更することとしていた。その後研究チームを見直し、平成 24 年度以降は以下の 3 研究テーマに組織を変更して研究を進めることとした。

#### サブテーマ 1 「氷河、氷床コアに見る地球環境の変遷と生物の変動、人間圏との関わり」

氷河、氷床のコア解析によって地球環境変動を復元し、アイスコア中の微生物・ウイルスなどの環境変動への対応や進化メカニズムの時系列解明等の研究課題を遂行する。細胞濃度が極めて低く難培養微生物がほとんどである氷床コア微生物の研究において、1 細胞遺伝子解析とメタゲノム解析を軸に研究を行う。アイスコアから時系列的に微生物・ウイルスを検出し、人間圏との関わりを明らかにすることに挑む。また、古環境復元と生物の変動についての新たな手法開発に着手する。

#### サブテーマ 2 「極限環境における生物多様性とそのパターン」

南極沿岸域の氷床、氷河、湖沼生態系から見た地球環境の変遷およびそこに見られる極限生物の多様性と分布パターンの解明を行う。これまでに極域湖沼底のコケ坊主について行ってきた 16S/18S rRNA 遺伝子、及び、物質生産・物質循環に関与する酵素遺伝子について大規模解析を行う。また沿岸域の氷床末端、氷床上、氷床下などの境界領域を、氷床を取り巻く自由水環境と位置づけ、そこに存在する生物圏を探索する。レーダ、サーマルドリル、熱水ドリルを導入し、氷床下水系の水文学的研究、微生物生態系研究を面的に展開する。

#### サブテーマ 3 「極限生物の環境適応メカニズムと進化」

極限微生物の多様性と環境への適応メカニズムおよび進化プロセスの解明を行う。メタゲノム解析、ゲノム解析、一細胞からの遺伝子解析等の幅広い手法を応用し、堆積物や氷床コア中の微生物生態系を明らかにする。特に機能遺伝子解析からの生態系内物質代謝メカニズムの解明、環境耐性遺伝子からの適応機構の解明を目指す。

## (2) 各年度の計画

### 平成 25 年度

#### (全 体)

南極ドームふじ氷床コアや北極グリーンランド氷床コアから詳細な気候・環境変動を復元し、その変動の中での微生物の対応・進化の解析のために、物理・化学的・生物的解析システムのインフラを整備しつつ、第 I 期計画で研究成果が上がった研究テーマのとりまとめを行ってきた。世界各地から得られた氷河生態系における微生物試料及び、氷床コア中の微生物及び生物起源物質の解明、極限微生物の多様性と進化メカニズムに焦点を合わせた研究を進めてきた。

平成 25 年度は、極域の氷床コアより取得された環境変動と生命情報、微生物・ウイルスの進化メカニズムについて研究を継続する。さらに、湖底や堆積物から得られた環境および生命情報を引き続き取得する。極地の大規模な環境変動（温暖化、海水準変動、海洋大循環等）を把握し、生命の進化、多様性について検討し、地球環境の変動と微生物の進化・多様化の相互作用を理解し、変動する極限環境下での生命システムのメカニズムを解明する。

#### (サブテーマ 1)

##### 1-1) 氷床、氷河コアの総合解析による地球環境変動の解明

ドームふじ深層コアの基本解析データセット作成を継続する。気候変動イベントについての研究を継続する。氷床底面付近の氷と、底面に存在する水の物理・化学的研究、微生物学的研究を継続する。また、アイスコアの固体微粒子と水安定同位体比の自動分析法を確立し、実際のサンプルの分析を開始する。さらに、アイスコア自動融解・分注装置に ICP 質量分析装置を接続し、アイスコアの自動 ICP 質量分析法の開発に着手する。

##### 1-2) 氷床アイスコアに見る地球環境変動と生物との時系列解明

氷床アイスコア中の微生物、ウイルス、植物等の大規模なメタゲノム解析に取り組むと共に、得られた膨大なゲノムデータから生物種に特異的なプライマーを作り出し、リアルタイム qPCR や digital PCR で生物種の定量的データの取得や、自動細胞解析分離装置を用いた微生物細胞から 16SrRNA 遺伝子配列解析に取り組む。数サイクル分の氷期-間氷期サイクルや、最終氷期 (LGM) からの気候変動イベントと生物情報に着目した解析をおこなう。

##### 1-3) アイスコア中の微生物と環境変動

北極域で行われているアイスコア掘削の試料を用いて、過去十数万年スケールでの微生物の変動を明らかにして、南北両極における微生物の変動を明らかにする。また、これらの違いから微生物の全球的、もしくは地域的な変動の原因をアイスコア解析から得られる過去の気候復元データから検討する。

##### 1-4) 氷河・氷床中の花粉 1 粒ずつの DNA 分析-遺伝情報を利用した古環境復元-

平成 24 年度で開発した手法を南極表層雪試料中のマツ花粉に適用し、南極に飛来するマツ花粉の起源を明らかにする。そして、この実験的結果を数値実験による結果と比較・検討し、南極における物質循環の理解を深める。また、北極域氷河で掘削されたアイスコアをもちいて、そこに含まれるマツ花粉の DNA 分析に着手する。アイスコアの各時代に含まれるマツ花粉を種レベルで同定し、その変遷を明らかにする。この地域では氷河に含まれるマツ花粉は長距離輸送によるものなので、その種の情報から花粉起源の変遷についても明らかにする。

#### (サブテーマ 2)

##### 2-1) コケ坊主生態系の微生物種組成と物質循環構造

コケ坊主を構成する蘚類種の分子系統学的解析により、その分類学的位置と分布の期限を明らかにする。これまでに得られた微生物組成と物質循環系、および内部環境データを元に、地球生態系のミ

ニチュアとしてのコケ坊主生態系モデルを構築する。

## 2-2) 南極沿岸生態系の生物多様性と地史的変遷

地衣類共生微生物相の解析を開始するとともに、湖底堆積物コア中の生物相解析による地史的変遷を復元し、古環境復元データとの関連を明らかにする。

## 2-3) 周氷生態系における生物圏探索

氷河、氷床上、および氷床下という特異環境下の生物相を解明する。

(サブテーマ3)

### 3-1) 南極コケ坊主生態系を構成する微生物のゲノムおよびメタゲノム解析

コケ坊主試料からの微生物を中心とした大規模なゲノム解析およびメタゲノム解析に取り組むと共に、平成 24 年度までに得られた知見を基に、個々の微生物における環境（低温、貧栄養）適応のメカニズムや、微生物間での相互作用（窒素固定、炭酸固定を中心とした代謝関連の共生関係）についてゲノムレベルでの解明を行う。

### 3-2) 南極線虫を用いた比較ゲノム解析

標準状態、低温・乾燥状態、およびこれらからの回復状態においた南極線虫からタンパク質の抽出を行い、発現パターンの比較を行う。これらのストレス下において発現が変化するタンパク質を同定し、質量分析装置により耐性遺伝子候補を決定する。また cDNA、およびタンパク質の発現パターンの比較から得られた耐性候補遺伝子について、タンパク質を大量に精製し、生化学的な機能解析を行う。

### 3-3) 微量試料（氷床コア、地殻コアなど）における遺伝子解析技術の開発

コケ細胞近傍において物理的相互作用が認められた微生物-微生物、微生物-コケのうち、コケの生育に積極的な関与が示唆される微生物についてさらに解析をすすめる。そのような微生物として例えば、細胞内共生菌や菌根様を形成する微生物、細胞壁や仮根など特定の部位に局在するものを想定している。

## 平成 26 年度

(全 体)

極域の氷床コアより取得された環境変動と生命情報と、湖底や堆積物から得られた環境および生命情報を引き続き取得する。氷床コアから時系列的に微生物・ウイルスなどを検出し、人間圏との関わりを明らかにすることに挑む。地球環境の変動と微生物の進化・多様化の相互作用のとりまとめを行い、変動する極限環境下での生命システムのメカニズムを解明する。

(サブテーマ1)

### 1-1) 氷床、氷河コアの総合解析による地球環境変動の解明

ドームふじ深層コアの基本解析データセット作成を継続する。気候イベントについての研究を継続する。また、グリーンランド北西氷床にて計画されている 200m 氷床掘削コアを用いた北極域での地球環境変動を明らかにする研究を行う。25 年度に引き続き、アイスコアの ICP 質量分析の自動化を完成させる。

### 1-2) 氷床アイスコアに見る地球環境変動と生物との時系列解明

平成 25 年度までに得られた知見を基に、複数のアイスコア試料からメタゲノム解析や 1 細胞ゲノムの解析をおこなう。氷床アイスコアに刻まれている各種気候学的なイベントや、宇宙線強度変動や太陽活動変動要素と、生物やウイルスとの関係性や進化的視点に着目した解析をおこなう。

### 1-3) アイスコア中の微生物と環境変動

人為起源の影響を非常に受けやすい山岳地域アイスコア試料から数千年スケールでの微生物の変動

を明らかにする。極域アイスコアからの長期的な微生物変動データと比較し、特に人為起源の影響が強く現れると考えられる、文明圏成立後の環境変動を着目する。

#### 1-4) 氷河・氷床中の花粉 1 粒ずつの DNA 分析—遺伝情報を利用した古環境復元—

引き続き北極アイスコアの解析を進める。そして、本研究より明らかになる花粉起源の情報と数値実験による結果を比較・検討し、北極域の物質循環の変遷について考察する。また、ロシアの山岳氷河で掘削されたアイスコアをもちいて、そこに含まれるマツ花粉の DNA 分析をおこない、気候・環境変動にともなうマツ種の変遷の研究に着手する。DNA の分析は平成 24 年度に開発した全ゲノム増幅法をもちいる。

#### (サブテーマ 2)

##### 2-1) コケ坊主生態系の微生物種組成と物質循環構造

地球生態系のミニチュアとしてのコケ坊主生態系モデルを完成するとともに、南極湖沼生態系のサブユニットとしての位置付けから、研究対象を南極湖沼生態系全体の多様性・物質循環系に拡大する。

##### 2-2) 南極沿岸生態系の生物多様性と地史的変遷

生物多様性と物質循環に基づくネットワークを明らかにし、沿岸生態系の動的なシステムを解明する。これと地史的変遷モデルとを組み合わせることにより、ネットワークの変遷という新たな次元へと展開させる。

##### 2-3) 周氷生態系における生物圏探索

大陸氷床上、氷床中、氷床下全体を周氷生態系と位置付け、生物相と物質循環系を明らかにする。

#### (サブテーマ 3)

##### 3-1) 南極コケ坊主生態系を構成する微生物のゲノムおよびメタゲノム解析

平成 25 年度までに得られた知見を基に、コケ坊主生態系を構成する微生物の起源（由来）を解明するために、他の環境由来ゲノム関連データ（湖沼底堆積物、氷床下水系、氷床コア、地殻コアなどのメタゲノム解析データ）との比較を行い、必要に応じて詳細なゲノム解析比較を行う。

##### 3-2) 南極線虫を用いた比較ゲノム解析

南極線虫の体内での機能解析を行うため、コントロール遺伝子（致死率が高いなど、効果の観察が容易な遺伝子）を使って RNAi（RNA 干渉）法の確立を試みる。また、モデル線虫 *C. elegans* への南極線虫遺伝子の導入による耐性機能の獲得実験を試みる。

##### 3-3) 微量試料（氷床コア、地殻コアなど）における遺伝子解析技術の開発

前年までに同定できる微生物は難培養性であることが予想され、そのゲノムを解析するには LMD を使った 1 細胞分取と全ゲノム増幅法の確立が必須である。その技術が確立されていない場合、コケ細胞近傍の微生物をまとめて取得し、“メタ”ゲノムを行うことを検討する。

### 平成 27 年度

#### (全 体)

3 つの研究課題「氷河、氷床コアに見る地球環境の変遷と生物の変動、人間圏との関わり」、「極限環境における生物多様性とそのパターン」、「極限生物の環境適応メカニズムと進化」について研究を遂行し、これらを融合的に取りまとめ、地球生命システム学の構築を目指す。研究成果を公開するとともに、地球生命システム学についての国際共同研究を進める。

#### (サブテーマ 1)

##### 1-1) 氷床、氷河コアの総合解析による地球環境変動の解明

ドームふじ深層コアの基本解析データセット作成を完了する。学際的に行われている地球環境変動研究の現状をまとめるとともに、将来に実施すべき研究の方向を検討する。データベースを作成し、

これを公開することで地球環境変動史などの研究進展に貢献する。また、アイスコア自動融解・分注装置に LC/MS を接続し、アイスコアの自動 LC/MS 分析法の開発を行う。

#### 1-2) 氷床アイスコアに見る地球環境変動と生物との時系列解明

環境変動とそれに伴う氷床生物および微生物・ウイルスの変化を時系列ごとに解析することで、地球環境変動に対する地球生命システムの環境適応のメカニズムの解明をめざす。

#### 1-3) アイスコア中の微生物と環境変動

これまで得られた様々な地域のアイスコア中の微生物変動データから、過去数万年から数千年にわたる変動を総合的に整理する。様々な年代スケールでの微生物量変動より、これまでになかった視点からの環境復元法の確立を目指す。

#### 1-4) 氷河・氷床中の花粉 1 粒ずつの DNA 分析—遺伝情報を利用した古環境復元—

引き続き山岳氷河のアイスコア解析を進める。周辺植生由来と考えられる氷河中の花粉分析により、各時代のマツ種の変遷を明らかにし、先行研究により明らかにされている気候・環境変動との関係を考察する。

### (サブテーマ 2)

#### 2-1) コケ坊主生態系の微生物種組成と物質循環構造

コケ坊主を中心とした南極湖沼生態系の生物多様性の全容、および各生物種が生態系の中に占める栄養的地位に基づくネットワークモデルを完成させる。

#### 2-2) 南極沿岸生態系の生物多様性と地史的変遷

南極沿岸生態系の生物多様性と物質循環に基づくネットワークを明らかにし、その地史的変遷を明らかにする。

#### 2-3) 周氷生態系における生物圏探索

周氷生態系における生物相を明らかにすると共に、その物質循環からの特性を解明する。

### (サブテーマ 3)

#### 3-1) 南極コケ坊主生態系を構成する微生物のゲノムおよびメタゲノム解析

本プロジェクトの集大成として、南極環境（低温、貧栄養、紫外線照射など）における個々の微生物および共生関係について、ゲノムレベルでコケ坊主生態系を評価することで、地球環境変動に対する生命システムの環境適応のメカニズムの解明をめざす。

#### 3-2) 南極線虫を用いた比較ゲノム解析

乾燥、凍結耐性を持たない南極線虫の近縁種の cDNA、タンパク質の発現パターンの比較から、耐性遺伝子の同定を試みる。また、耐性候補遺伝子について、RNAi (RNA 干渉法) を使って遺伝子機能阻害を試みる。

#### 3-3) 微量試料（氷床コア、地殻コアなど）における遺伝子解析技術の開発

前年まで主にコケボウズ試料を解析の中心とするが、適宜その他の試料（氷床コア、地殻コアなど）についても LMD による 1 細胞ゲノム分析の対象としていく。それらの解析を通して、本プロジェクトで培った LMD による 1 細胞ゲノム解析技術の技術的な適応範囲、例えば解析可能な試料形態、菌種、精度などを明らかにし、次代の研究のために役立てる。

## 平成 28 年度以降の展開

### (全 体)

南極及び北極の氷床コア、極限環境より取得された環境と生命情報をとりまとめ、これまでの地球環境変動および今日生起している環境変動（温暖化、海水準変動、海洋大循環等）と地球生命圏の相互作用について考察し、地球生命システム学として構築する。



(サブテーマ1)

南極及び北極の氷河、氷床コアと、極限環境より取得された環境情報と生命情報を空間軸と時間軸に沿って、地球規模にとりまとめる。過去と現在の地球環境変動と生物の相互作用について考察する。

(サブテーマ2)

南極湖沼を含む沿岸生態系、氷床を巡る周氷生態系を統一的に理解するため、極限環境下での生物多様性の全体像および物質循環のネットワークを明らかにする。さらに、堆積物からの過去の変動、および数値モデルからの将来変動の予測と、時間軸に沿った南極生態系の動態を明らかにする。

(サブテーマ3)

本プロジェクトで取得された貴重な遺伝資源に対して、人類に有用な遺伝資源の活用および機能未知遺伝子の機能解明をめざす。南極線虫から見つかった耐性候補遺伝子の培養細胞への導入、トランスジェニックマウスなどの作成を行い、高等生物での凍結・乾燥耐性の付加を試みる。1 細胞ゲノム解析技術の適応を様々な試料に対して行う。

### [3] 研究推進・実施体制

サブテーマ1：氷河、氷床コアに見る地球環境の変遷と生物の変動、人間圏との関わり

・研究代表者

〔国立極地研究所〕 本山秀明

・共同研究者

〔国立極地研究所〕 東久美子、藤田秀二、川村賢二

〔国立遺伝学研究所〕 小原雄治、仁木宏典

〔国立遺伝学研究所・国立情報学研究所〕 藤山秋佐夫

〔新領域融合研究センター〕 瀬川高弘、植竹 淳、中澤文男、近藤伸二、馬場知哉、柳原克彦

〔北海道大学〕 福井 学、的場澄人、飯塚芳徳、石井 聡

〔京都府立大学〕 牛田一成

〔玉川大学〕 吉村義孝

〔東京工業大学〕 黒川 顕、本郷裕一

〔京都大学〕 幸島司郎

〔長浜バイオ大学〕 池村淑道

〔新潟大学〕 阿部貴志

〔筑波大学〕 川口敦史

〔千葉大学〕 竹内 望

〔琉球大学〕 植村 立

〔国立感染症研究所〕 内藤忠相

サブテーマ2：極限環境における生物多様性とそのパターン

・研究代表者

〔国立極地研究所〕 伊村 智

・共同研究者

〔国立極地研究所〕 工藤 栄、内田雅己、神田啓史、三浦英樹、菅沼悠介、福地光男

〔国立遺伝学研究所〕 小原雄治、中井亮佑

〔新領域融合研究センター〕 植竹 淳、瀬川高弘、中澤文男、鹿兒島浩

〔京都大学〕 幸島司郎

〔広島大学〕	長沼 毅
〔北海道大学〕	福井 学
〔海洋研究開発機構〕	高野淑識
〔東京大学大気海洋研究所〕	金子 亮
〔札幌医科大学〕	鬼頭研二
〔慶應義塾大学〕	鈴木 忠

### サブテーマ3：極限生物の環境適応メカニズムと進化

#### ・研究代表者

〔国立遺伝学研究所〕 仁木宏典

#### ・共同研究者

〔国立情報学研究所〕 佐藤真一、丸山多恵子

〔統計数理研究所〕 曹 纓、足立 淳

〔国立遺伝学研究所〕 小原雄治、豊田 敦、中井亮佑、菅原秀明

〔国立遺伝学研究所・国立情報学研究所〕 藤山秋佐夫

〔新領域融合研究センター〕 近藤伸二、瀬川高弘、馬場知哉、柳原克彦、鹿児島浩、増本博司

〔新潟大学〕 阿部貴志

〔広島大学〕 長沼 毅

〔長浜バイオ大学〕 池村淑道

〔千葉大学〕 竹内 望

〔札幌医科大学〕 鬼頭研二

〔British Antarctic Survey〕 Peter Convey、Rolf Maslen

〔Otago University〕 David Wharton

〔復旦大学〕 米澤隆弘

## 〔4〕 研究の進捗状況

平成 25 年度の研究の進捗状況をサブテーマ毎にまとめた。なお、各年度の計画とサブタイトルが一部一致しないが、研究内容がわかりやすいサブタイトルとした。

### サブテーマ1「氷河、氷床コアに見る地球環境の変遷と生物の変動、人間圏との関わり」

#### I) 氷床、氷河コアの総合解析による地球環境変動の解明

##### (1) ドームふじコア研究と、関連の気候システム研究

- ・第二期ドームふじコア (DF2 コア) のダストデータについて、新しいキャリブレーション方法によるデータの再計算を実施するとともに深度データを修正し、ダストの基本解析データ (50cm 毎に 10cm) の最終データセットを作成した。また、DF2 コアのイオンの基本解析データ (50cm 毎に 10cm) のチェックを実施し、一部のサンプルについて再測定を実施した。
- ・ドームふじのアイスコア研究から、氷期の硫酸イオンの起源として、従来考えられていた海洋生物起源のものだけでなく、ダスト起源のものが多かった可能性が高いことを示した。この仮定に基づき、全硫酸イオンからダスト起源の硫酸イオンを差し引いて海洋生物起源の硫酸イオンのフラックスを計算すると、間氷期に高く、氷期に低かった。このことは、ヨーロッパの研究グループが提唱していた「南極海の海洋一次生産は 80 万年間を通じて一定だった」という説に反し、「南極海の一次生産は間氷期に高く氷期に低かった」ことを示唆する。

(2) 氷床の表面・内部・底面に関する研究

- ・ JARE54 で広域にサンプリングした積雪ピットと表面積雪の分析を進め、堆積環境に関する研究発表をおこなった。また JARE54 にて掘削した多点浅層コアの分析を開始した。ドームふじ基地の深層掘削孔の温度測定に基づいた地殻熱流量の下限を推定した。

II) 南極アイスコア・氷河サンプル群より採取された細菌叢のメタゲノム及び単離された微生物のゲノム解析研究

約 70 万年前に形成された南極氷床ドームふじ深層アイスコア最深部から採取されたサンプル群より採取された細菌叢のゲノム DNA について、ILLUMINA HiSeq シークエンサを用いて得られた大量の DNA 配列のアセンブルを基にメタゲノム手法を用いて解析した。シアノバクテリアを中心に存在する細菌種の同定、ゲノム上にコードされている遺伝子群の決定、それら遺伝子群の機能の予測、及びそれら細菌叢で支配的に行われている代謝経路を同定する解析パイプラインを構築し、複数の DNA 抽出法の比較による解析法の最適化を行い、シアノバクテリア由来の配列を検出した。

ただ、これら ILLUMINA HiSeq シークエンサの短い (100 塩基) 配列データ中のシアノバクテリア由来の配列量は 0.1%以下と非常に少ないため、アセンブルによる遺伝子機能解析には限界があったので、長い配列 (250 塩基) を産出する極地研 HiSeq シークエンサによりドームふじ深層 2 地点 (912、914) から採られたサンプルから DNA 配列データを産出し、比較的ノイズの少ないシアノバクテリアに焦点を絞った解析手法を開発した。同ドームふじ深層 2 地点 (912,914) それぞれのサンプルから、約 6000、8000 のシアノバクテリア由来とみられる遺伝子配列を検出した。それらのシアノバクテリア由来の遺伝子配列群より、約 100 種のシアノバクテリア候補 (図 1、2) を同定した。現在、同一サイトから採られたサンプルに対する複数のライブラリ・シークエンスラン間の解析結果の再現性の評価、及び永久凍土、氷河、海水、土壌等公共データベースにあるメタゲノム配列データとの比較を行い、ノイズフィルタリング及びそれらのシアノバクテリア種の由来の推定、遺伝子機能解析を行っている。



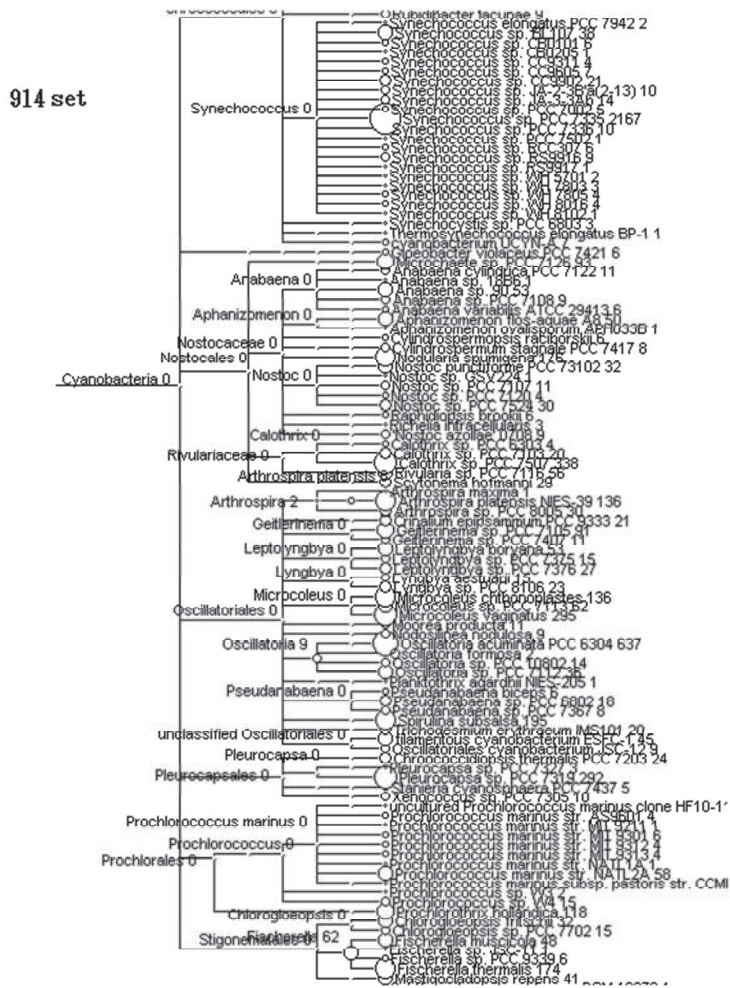


図2 ドームふじ深層 DNA サンプル 914 より検出されたシアノバクテリア種の分布

### III) 石筍内部及び外部の細菌叢のメタゲノム解析研究

沖縄地方の地下洞窟の石筍の内部及び外から採取された細菌叢のゲノム DNA を次世代シーケンサ (454 及び ILLUMINA HISEQ シーケンサ) を用いて得た大量の DNA 及び、複数の異なるプロトコルで得た RNA 配列群をメタゲノム手法を用いて解析し、存在する細菌種の同定、ゲノム上にコードされている遺伝子群の決定、それら遺伝子群の機能の予測、及びそれら細菌叢で支配的に行われている代謝経路の同定作業を行った。前年度に DNA 配列の第一次解析結果を報告したが、本年度は異なるプロトコルを用いた DNA データ及び微生物の生存を検証する目的で RNA 配列データを産出し、存在する微生物群と遺伝子発現活動との関係を調べる為に DNA と RNA 配列間の比較解析を行った。総 250 GB を超える大量の配列データを効率的かつ迅速に処理・解析 (配列アセンブリ、遺伝子予測、既存のデータベース上の存在する大量の遺伝子情報との照合による機能予測及びタンパク質代謝経路の推定) するコンピュータ解析パイプラインを遺伝研スーパーコンピュータ上に構築した。微量の資料からの DNA 採取によるシーケンスの問題点の評価、同問題点を補填する解析方法の開発・改良にも取り組んだ。こうした密閉された極限環境内で微生物種が生存しているか否かを RNA データより検出する解析法を開発し、石筍内部の微生物の生存・活動を調べる為に、同内部 2 サンプル箇所に対して RNA データを複数のライブラリ作成法を使い MiSeq シーケンサにより 4 ランの配列セットを解析した。しかし、同 RNA 配列データでは実験ノイズが多くまた少量の遺伝子配列及び rRNA の解析からは、石筍内

部の微生物の生存・活動を示す証拠は得られなかった。

#### IV) NEEM アイスコア中における微生物濃度の測定

蛍光顕微鏡を用いて NEEM コア中の微生物数を計測した。これまで分析の行われていなかった深度 602 m から 1483 m、2094m–2176 m のアイスコアを対象に蛍光染色試薬で染色された微生物を、直径 1  $\mu\text{m}$  未満、直径 1–2  $\mu\text{m}$ 、直径 2  $\mu\text{m}$  以上の 3 種類に分別した。この結果、深度 1300 m 以上では、それ以深に比べて微生物濃度が均一に低い事が示された。この深度では鉱物粒子やいくつかの化学成分 (Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup>) も顕著に濃度が低い事から、アイスコア中に含まれる微生物の多くは鉱物粒子と同様に飛来してきている事が示された。一方で、濃度の高い時期でも微生物と鉱物粒子や化学成分の高濃度層は完全には一致しない事から、おおまかには鉱物粒子等の他の物質と共に輸送されてくるものの、微生物の氷床上への飛来・堆積の詳細なプロセスは鉱物粒子とは異なる事が示された。

#### V) 氷河・氷床中の花粉 1 粒ずつの DNA 分析—遺伝情報を利用した古環境復元—

本研究の目的は、1)南極氷床中のマツ属花粉 1 粒ずつを DNA 分析し、種を同定したのち、その分布域をもとに花粉の起源を推定すること。さらに、2)南極氷床で広域的に採取した表層雪氷試料を 1)の方法で解析し、氷床へ輸送される固体微粒子の起源を時空間的に明らかにし、数値実験による結果と本研究から明らかになる室内実験の結果との比較から、南極における物質循環の理解を深めることにある。

本研究ではこれまで、ロシア・アルタイ山脈にあるベルーハ氷河の積雪試料中のマツ属花粉をもちいて、種を同定するための手法開発に取り組んできた。マツ属の下位の階級には、2 亜属、4 節、17 亜節、約 111 種が存在する。これまでの研究成果として、全ゲノム増幅 (WGA) 法により、氷河中の花粉 1 粒ずつのゲノム DNA 増幅に成功したことが挙げられる。この成功により、WGA 増幅産物をもちいて、複数の遺伝子領域を調べることが可能になった。得られた塩基配列情報の解析から、氷河周辺に分布するシベリアマツ (*Pinus sibirica*) の花粉が含まれていることを突き止めた。すなわち、従来の花粉分析では成し得なかった花粉種の同定に成功した。また、種の同定に至らなかったものでも、その候補を数種まで絞ることができた。WGA の反応条件、最適なプライマーの設計など細部の検討は残っているものの、花粉 1 粒ずつの DNA 分析から種を同定するための基本的な技術を確立できた。

#### VI) フィールド蛍光顕微鏡の開発

昨年度までに、顕微鏡の設計 (図 1)、レーザーダイオードを用いた光源装置の製作、X 軸・ $\theta$  軸・Z 軸装置駆動機構、顕微鏡を収納する外筒、ダイクロイックミラーホイールを製作してきた。本年度は、昨年度同様、元静岡大学・宮川厚夫氏の協力を得て、X 軸・ $\theta$  軸・Z 軸装置駆動機構に取り付ける「ボールねじ」と「ノーバックラッシュ歯車」を製作し、機構内に組み込み、正常に動作することを確認した。ボールねじは、リニアガイド (図 2 (a). 左側の青色部分に一部が見えている) と組み合わせて、Z 軸と X 軸方向に 1  $\mu\text{m}$  以下の精度で対物レンズを移動させるためのものである。ノーバックラッシュ歯車は、内歯歯車 (図 2 (b). 上部の黄色の歯車) と組み合わせ、 $\theta$  軸方向へ移動させるためのものである。これにより、X 軸・ $\theta$  軸・Z 軸装置駆動機構の機械部分は完成し、試料面に対して直径 64.0 mm の円内の任意の位置に対物レンズを動かすことが可能となった。来年度は、「励起、反射照明用コンデンサーと鏡筒部」の設計と製作を行う予定である。

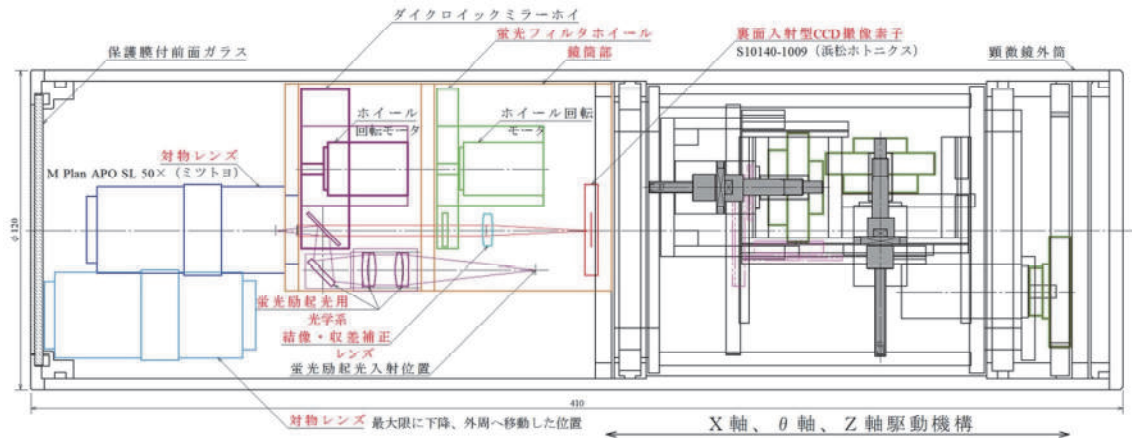


図1 本顕微鏡の構造概念図。本年度は、X軸・θ軸・Z軸装置駆動機構用のボールねじ(図中の灰色部分)とノーバックラッシュ歯車(深緑の線で示した部品)を製作し、機構に組み込んだ。

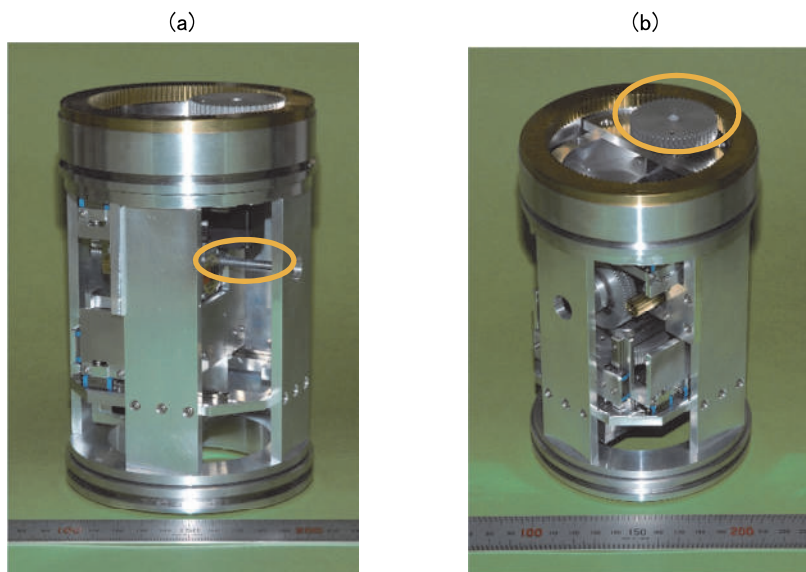


図2 X軸・θ軸・Z軸装置駆動機構。丸で囲んだ部分が、今年度製作し組み込んだボールねじ(a)とノーバックラッシュ歯車(b)。両方とも一部分のみ見えている。

## サブテーマ2 「極限環境における生物多様性とそのパターン」

### I) ウガンダ・ルウェンゾリ山の氷河上に分布する塊状の蘚苔類(コケ植物)(融合シーズ)

平成 26 年 2 月にウガンダ、ルウェンゾリ山において雪氷生物試料の採取と観測を行った。氷河上には直径約 1・3 cm、厚さ約 1・2 cm の蘚類 *Ceratodon purpureus* の無性芽の集合体(Glacial Moss Gemmae Aggregation: GMGA) が多く分布しており、氷河上での空間分布を把握する為に、幅約 200・300 m、長さ約 1 km の氷河 (Stanley Plateau) 上の計 18 カ所で、直径が 2 cm 以上に発達した GMGA の重量測定をおこなった。その結果、これらの構造が氷河末端部、または側面部から約 140 m 以内の場所が多いのに対して、それ以上の場所では全く観察されない事が明らかとなった。GMGA や雪氷微生物の増殖のため、氷河の表面アルベドが顕著に低下する事が知られているが、GMGA が高密度で存在する末端部付近では特に低く、アルベド=0.05(±0.01, n=5)であった。氷河上のリン酸塩濃度は、グリーンランドなどの他の氷河に比べて値が高かった(平均約 27 ppb)。また、氷河上流に残っていた積雪の硝酸塩、アンモニウム塩濃度は、微生物が多く生息する氷表面に比べて、それぞれ約 12.7 倍、24.8 倍(それぞれ 395 ppb, 345 ppb) 高く、これの氷河上への供給源が氷河外部にある事が示唆された。また、これらコケ植物の生育に関連する現地の環境情報を取得する為に、氷河上に簡易気象ステーション(気温、光