

トカラ列島周辺の深海域における表層堆積物の微生物群集構造

池内 絵里^{1,*}・鈴木 克明¹・井口 亮¹・鈴木 淳¹

IKEUCHI Eri, SUZUKI Yoshiaki, IGUCHI Akira and SUZUKI Atsushi (2022) Microbial community structure of surface sediments in the deep-sea area around the Tokara Islands, Japan. *Bulletin of the Geological Survey of Japan*, vol. 73(5/6), p. 323–328, 2 figs, 1 table.

Abstract: To accumulate distribution information for microbes around Japan, we analyzed the microbial community in the surface sediments of the marine geological survey in the waters surrounding the Tokara Islands, Japan (GB21-1). DNA was successfully obtained from 42 of 47 samples collected, sequenced by high-throughput sequencer, and analyzed by R. The results of the analysis showed that many DNA sequences were identified as belonging to *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* of the phylum *Proteobacteria*, followed by *Actinobacteria* of the phylum *Actinobacteriota*. Microbial community structure tends to be grouped according to the depth zone and the type of substrate. It may be possible to compare geographical differences in microbial communities by increasing the number of sites. This study is the first comprehensive and quantitative assessment of the microbial community structure in the Tokara Islands and is expected to be used as basic information for future understanding of deep-sea communities and environmental impact assessment.

Keywords: Tokara Islands, Deep-sea, Microbial communities, Metabarcoding, Sediments

要 旨

日本周辺の深海域における表層堆積物の微生物分布情報の蓄積のため、トカラ列島周辺海域で実施した海域地質調査(GB21-1)において、表層堆積物の微生物の群集解析を行った。採取した表層堆積物47試料のうち42試料からのDNA抽出に成功し、ハイスループットシーケンサーによる塩基配列の決定、R(R Core Team, 2021)による解析を行った。解析の結果、*Proteobacteria*門の*Gammaproteobacteria*綱と*Alphaproteobacteria*綱、次いで*Actinobacteriota*門の*Actinobacteria*綱に同定されるDNA配列が多く検出された。微生物群集構造は水深帯及び底質の種類でグループが分かれる傾向にあることが示され、水深と底質に影響を受ける可能性が示唆された。今後調査地点を増やすことで微生物群集の地理的な違いも比較できる可能性がある。本研究はトカラ列島海域において初めて網羅的かつ定量的に底質の微生物群集構造を評価した点で貴重な知見であり、今後の深海域の生物多様性の把握や、環境影響評価を行う上で基礎的な情報として活用されることが期待される。

1. はじめに

環境中の生物群集構造や種多様性を把握することは、生態学や生物地理学、保全生物学的な観点からも重要な課題である。深海域においても、様々な生物種から構成される生態系が成り立っており、その現状把握や環境影響評価には主に底生生物が用いられてきた。しかし、深海域での底生生物の目視による形態学的同定は時間がかかり、高度な専門知識が必要である。近年の遺伝子解析技術の進展により、海水や表層堆積物などの環境試料に残存するDNAを抽出し解析することで、環境中に生息している生物種の存在を把握可能な、いわゆる環境DNA解析が注目されている(Jackson *et al.*, 2016; Pawlowski *et al.*, 2020ほか)。細菌等の微生物においても、環境DNA解析を通じて深海域における多様性評価が世界各地で進んでいる(Wu *et al.*, 2013; Lindh *et al.*, 2017ほか)。我々はこの手法を、コバルトリッチクラストや表層メタンハイドレートなどの海洋エネルギー・鉱物資源の開発に係る環境ベースライン調査及び影響評価手法へ応用する研究を進めているが、日本周辺海域における深海域の表層堆積物の微生物の多様性情報の蓄積はほとんどなく、地域間での比較を実施する上での障害となっている。海域

¹ 産業技術総合研究所 地質調査総合センター 地質情報研究部門 (AIST, Geological Survey of Japan, Research Institute of Geology and Geoinformation)

* Corresponding author: IKEUCHI, E., Central 7, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8567, Japan. Email: e.ikeuchi@aist.go.jp

地質図プロジェクトで実施している海底表層堆積物採取調査では、稠密な採泥点の配置、不攪乱の試料の採取、水深・水温・粒度・堆積物組成等の充実した随伴情報など、環境DNA解析に最適な試料が得られる。本研究では、戦略的な知的基盤整備の一環として、トカラ列島周辺海域を対象に、深海域における表層堆積物の微生物の多様性情報の収集を目的とした調査を行った。

2. 方法

2.1 表層採泥

東海大学所有の望星丸を備船し、2021年3月6日から3月25日にかけてトカラ列島周辺海域において海域地質調査航海GB21-1を実施した。本調査での表層採泥は第1表及び第1図に示す61地点において木下式グラブ採泥器(K-グラブ)を用いて行った(鈴木ほか, 2022)。DNA解析用の試料は、充分量の底質試料が回収できた47地点において、使い捨ての滅菌済みプラスチックスプーンを用いてユニパックに湿重量10 g程度を採取した。底質は船上でのグラブ試料表面の肉眼観察に基づき礫、砂、泥の3種類に簡易的に分類した。採取した試料は船内の-60℃の冷凍庫内で保存、下船時に-15℃以下で保冷して輸送し研究室に持ち帰った。

2.2 DNA抽出

研究室にて底質試料のDNA抽出は、DNAeasy Power Soil Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いた。抽出の主な操作はキットの手順書に従った。細胞等の破碎はキット付属のPowerBeadと、FastPrep Beads Beater (FastPrep-24 5G, M. P. Biomedicals, CA, USA)を用いた。底質を破碎後、遠心分離により上澄みを回収して、タンパク質変性、フミン等の除去操作を行い、スピнкаラムフィルターによる精製を行った。得られたDNAは10 µLのTE溶液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTAの混合液:pH 8.0)に溶出した。Qubit 2.0フルオロメーター(Invitrogen, Carlsbad, USA)及びQubitアッセイ(dsDNA用, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA)を使い、キット付属の手順書に従って二本鎖DNA濃度を測定した。濃度測定の結果、得られた値をもとに、0.5 ng/µLのDNA濃度として調整し、後述するPCR用の水で希釈して0.5 ng/µL濃度のDNA溶液として調製した。

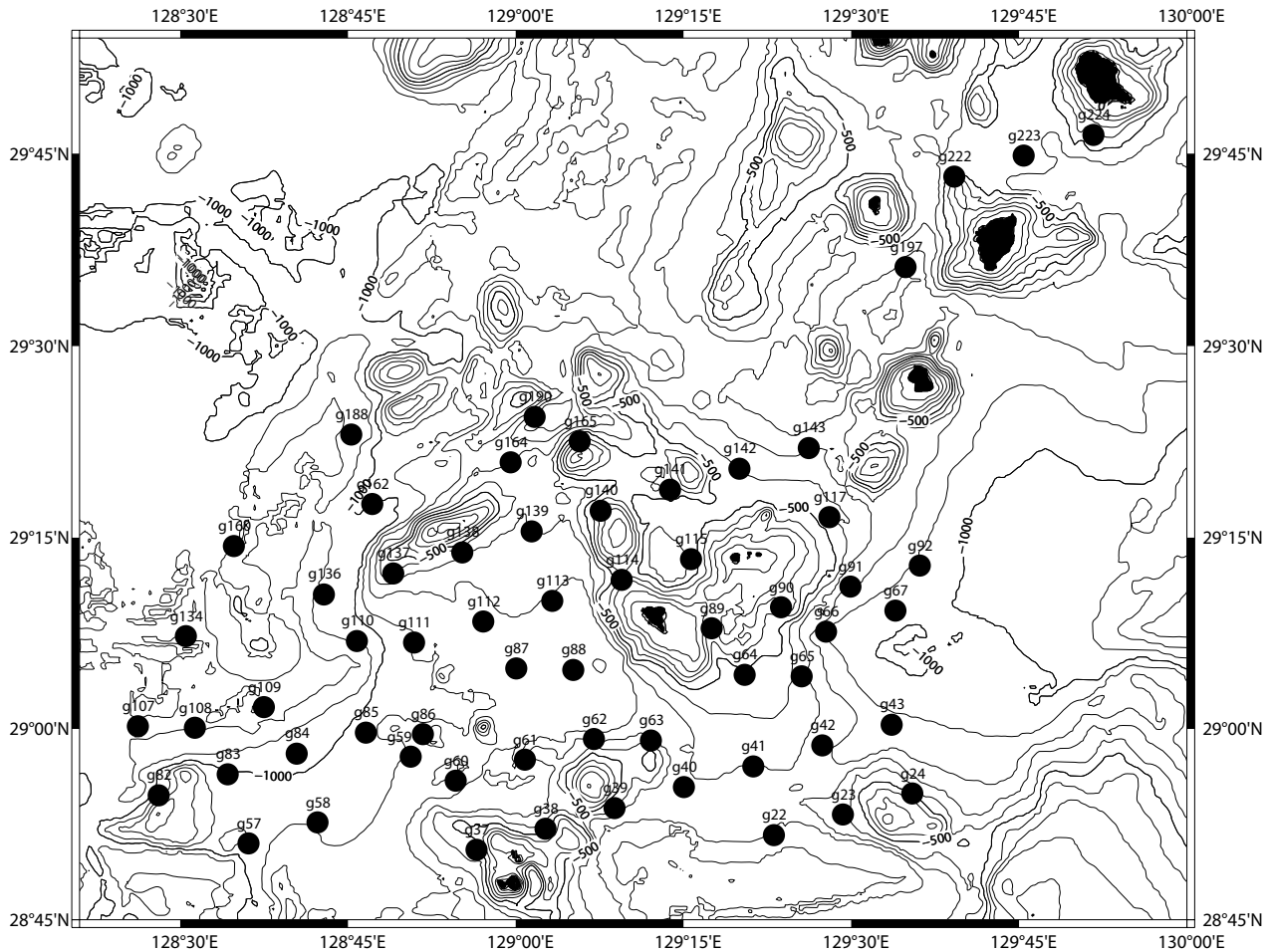
2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR操作からハイスループットシーケンサーによる解析までの主な手法はTakahashi *et al.* (2014)によった。細菌及び古細菌の16S rRNA遺伝子塩基配列V3領域を増幅する、イルミナ社Miseqシーケンサー用アダプター配列を付属したプライマーである、フォワードプライマー Pro341F (5'-ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTACGGGNBGCASCAG)とリバースプライマー

第1表 本調査(GB21-1)でK-グラブを用いて表層採泥を実施した地点の緯度経度と水深。

Table 1 Latitude/longitude and water depth of the sites where surface sediment sampling was carried out using K-grabs in this survey (GB21-1).

Site	latitude (°N)	longitude (°E)	Depth (m)
g22	28.515995	129.231519	823
g23	28.533643	129.294443	572
g24	28.544605	129.354605	473
g37	28.504589	128.564466	543
g38	28.52545	129.27093	489
g39	28.537013	129.89014	657
g40	28.554893	129.15624	702
g41	28.57398	129.212051	705
g42	28.586501	129.272013	735
g43	29.03873	129.335522	861
g57	28.5151	128.361302	1005
g58	28.526583	128.422701	960
g59	28.578635	128.506561	849
g60	28.559058	128.547102	841
g61	28.576100	129.07988	759
g62	28.592091	129.7376	746
g63	28.59953	129.121000	587
g64	29.42796	129.203852	524
g65	29.41381	129.254945	638
g66	29.76533	129.277371	896
g67	29.92860	129.338176	943
g82	28.547817	128.28658	942
g83	28.564046	128.341743	852
g84	28.58798	128.403693	958
g85	28.597399	128.465112	942
g86	28.595391	128.517776	847
g87	29.48281	128.599481	883
g88	29.46494	129.51060	699
g89	29.79615	129.174972	248
g90	29.95475	129.237009	353
g91	29.11639	129.298061	808
g92	29.128182	129.361468	924
g107	29.01751	128.261948	1077
g108	29.0568	128.313265	1169
g109	29.16820	128.375274	1163
g110	29.67410	128.456022	1071
g111	29.67940	128.507253	915
g112	29.84644	128.57307	836
g113	29.10701	129.32352	828
g114	29.117201	129.94828	323
g115	29.133392	129.156489	614
g117	29.165603	129.288117	576
g134	29.72858	128.306054	1151
g136	29.105208	128.428744	1034
g137	29.122520	128.49771	677
g138	29.138414	128.553223	714
g139	29.154348	129.14751	709
g140	29.17461	129.75794	222
g141	29.186921	129.138600	475
g142	29.203808	129.199290	583
g143	29.219974	129.262133	669
g160	29.144154	128.349465	1125
g162	29.176520	128.472356	1003
g164	29.209138	128.595821	682
g165	29.225597	129.57507	173
g188	29.23617	128.452755	1145
g190	29.244932	129.17208	932
g197	29.361061	129.349611	868
g222	29.432350	129.392688	509
g223	29.446310	129.454393	563
g224	29.463369	129.518721	416



第1図 各試料採取地点の位置関係を示す地図。各試料採取地点の位置関係を示す地図。岸本 (2000) より改訂。

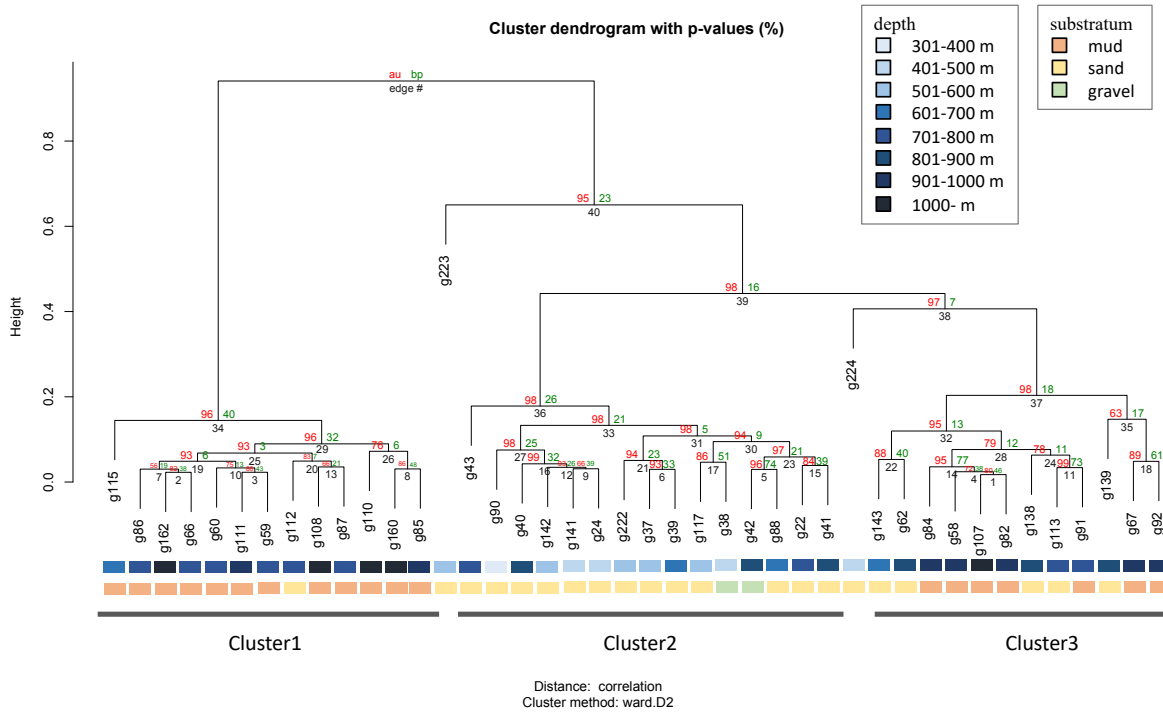
Fig. 1 Map showing the location of each sampling site. Map showing the location of each sampling site. Modified from Kishimoto (2000).

Pro805R (5' -GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACN VGGGTATCTAATCC) を用いた (Takahashi *et al.*, 2014). PCR用の酵素としては, Mighty Amp[®] DNA Polymerase Ver.2 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用い, 1 ngの鋳型DNA及び0.25 mMのプライマーセットを加えた (Takahashi *et al.*, 2014). 1st PCRのサーマルサイクルの条件として, タッチダウンPCR法を用いた (Muyzer *et al.*, 1993). 具体的には98℃, 2分間で酵素を活性化させたのち, 熱変性 (98℃, 10秒), アニール (15秒), 伸長反応 (68℃, 30秒) のサイクルのうち, 最初のサイクルをアニール温度65℃で開始し, 以降1サイクルごとに1℃下げながら56℃まで行い, 次いで55℃で25サイクルを実施した. PCR増幅によるバイアスを把握する目的で1st PCR反応は1試料あたり2本を用いて行い, 増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で確認後, 2本分の試料を1本にまとめて取り扱った. さらに磁気ビーズ試薬Agencourt AMPure XP (Beckman-Coulter, Villepinte, France) により精製し, それを2nd PCRのための鋳型DNA

溶液とした. 2nd PCRでは, ハイスループットシーケンサーで並列解析する際に必要な試料ごとに個別のタグ配列 (Index) を付加した. 2nd PCRの諸条件は, 1st PCRのときと同様とした. なお, 本調査では, アンプリコンのフォワード側及びリバース側の両方にタグ配列を付与するペアエンド解析とし, タグ配列はフォワード側及びリバース側の両方で完全に異なるように組み合わせた. 2nd PCR産物は, 磁気ビーズ試薬Agencourt AMPure XP (Beckman-Coulter, Villepinte, France) により精製し, 各ライブラリを4 nMになるように濃度調整して, 1本のマイクロチューブにまとめた.

2. 4 ハイスループットシーケンサー解析

ハイスループットシーケンサー用に調製したアンプリコンをプールしたライブラリを用いて, イルミナMiSeqによる塩基配列解析を実施した. 解析用のキットはMiseq Reagent Kit V3 (600サイクル; Illumina) を用い, ランクオリティーの改善のためにPhix Control V3 (Illumina,



第2図 地点ごとの微生物群集構造の類似度から作成した樹形図。採泥地点の水深、グラブ表面の状態を色で分けて表示している。各エッジの上の数値は、右の緑はマルチスケールでのブートストラップ値 (BP)、左の赤は近似的に普遍的ブートストラップ値 (AU) を示す。各エッジの下の灰色の数値はエッジ番号を示す。

Fig. 2 Dendrogram based on the similarity of microbial community composition between sites. The water depths at the condition of the grab surface are indicated by different colors. Numbers above each edge indicate multi-scale bootstrap values (BP; green on the right) and approximately unbiased P-values (AU; red on the left). Gray numbers below each edge indicate the edge number.

San Diego, CA) を調製したアンプリコンプールと等量混合した。これを塩基長301 bpのペアードエンドシーケンスとしてIllumina Miseq Sequence System (Illumina, San Diego, CA) で配列を取得した。

2. 3 データ解析

イルミナMiSeqによって、塩基配列とそのクオリティスコアが記述されたfastqファイルを試料毎に出力した。フォワード配列のfastqファイルについて、ソフトウェアパッケージQiime2 2021.4 (Bolyen *et al.*, 2019) に実装されたCutadapt (Martin, 2011) を用いてプライマー配列の除去を行った後、DADA2 (Callahan, 2016) を用いてエラー配列・低品質配列 (Q値 < 20) ・キメラ配列・重複配列の除去を行った。得られたアンプリコン配列変異体 (amplicon sequence variant, ASV) に対して、16S rRNA遺伝子の配列データベース Silva 138 SSURef NR99 full-length sequences (Quast *et al.*, 2013 ; Yilmaz *et al.*, 2014 ; Robeson *et al.*, 2020) を参照し、単純バイズ分類器 (Bokulich *et al.*, 2018) を用いて生物名の割り当てを行った。QIIME2で出力された各地点とASVをまとめたcsvファイルを用いて、ソフトウェアR (R Core team, 2021) によるデータ処理を

行った。各群集データについて希薄化曲線を描き、同じもしくは同等のサンプリングエフォートの下で群集間の比較可能性を確認した上で、低頻度 (0.1%) のASVを削除した。群集の類似度を比較するために、Ward法によるクラスター解析を実施した。また、水深を100 mごとにカテゴリー分けし、水深と底質を説明変数としたPermutational analysis of variance (PERMANOVA) による検定を行った。

3. 結果と考察

配列が決定した42試料から、4,479,105のASVが得られた。解析の結果、全ての地点でProteobacteria門のGammaproteobacteria綱とAlphaproteobacteria綱、次いでActinobacteriota門のActinobacteria綱に同定されるDNA配列が多く検出された。Actinobacteria門及びGammaproteobacteria綱は海洋でもよく見られているバクテリアを含む分類群である (Blackall *et al.*, 2015 ; Ainsworth *et al.*, 2015 ; Bourne *et al.*, 2016) 。Rによるクラスター解析を行った結果、非階層クラスターとして検出すると2つのグループが確認されたが、階層クラスターの場合はおよそ3つのクラスターに分かれた (第2

図). なお, 調査地点g223とg224はこれら3つのクラスターのどれにも属さない位置にあった. また, クラスタ1はg112を除き全ての底質試料は泥質であり, クラスタ2は砂質と礫質であった. また, クラスタ1は比較的水深が深く, クラスタ2は比較的水深が浅かった. 非階層クラスタ解析で抽出されたグループ1には *Gammaproteobacteria*綱が, グループ2 (主に第2図のクラスタ2) には *Actinobacteriota*門が比較的多く見られた. PERMANOVAによる検定を行った結果, 微生物群集は水深と底質で有意な差異が検出された ($p < 0.01$) が, 水深と底質の交互作用項は有意ではなかった ($p > 0.1$). 以上の結果より, 深海の表層堆積物の微生物群集構造は, 水深や底質に影響を受けている可能性が示唆された. さらにg223とg224は他の調査地域と比べて北側に位置しており, 今後周辺の調査地点を増やすことで微生物群集の地理的な違いも比較できる可能性がある.

水深200 m以上の深海は, 地球上で体積・面積ともに最大の生物の生息地であるが, アクセスの困難さから微生物群集を把握するための十分なデータの蓄積ができていない. 本研究はトカラ列島海域において初めて網羅的かつ定量的に底質の微生物群集構造を評価した点で貴重な知見である. 今回の研究成果は, 今後の深海生物群集の把握や, 環境影響評価を行う上で基礎的な情報として活用されることが期待される.

謝辞: 本研究は, 国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センターによる「海域地質図プロジェクト」の一環として, また, 国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境調和型産業技術研究ラボ (E-code) の支援を受けて実施されたものである. 調査航海にあたって, 団長である井上卓彦研究グループ長には多大なるご協力, ご支援をいただいた. 東海大学の海洋調査研修船「望星丸」の船長ならびに乗組員, 練習生, 乗船研究者の方々には安全な調査の実施及び快適な船内生活を送る上でたいへんお世話になった. また, 遺伝子実験の手法について産総研テクニカルスタッフの西島美由紀博士, データの解析には産総研特別研究員の水山 克博士にご指導いただいた. この場を借りて厚く御礼申し上げる.

文 献

- Ainsworth, T. D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J. B., Zakrzewski, M., Gates, R. D., Padilla-Gamiño, J. L., Spalding, H. L., Smith, C., Woolsey, E. S., Bourne, D. G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O. and Leggat, W. (2015) The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME journal*, **9**, 2261–2274.
- Blackall, L. L., Wilson, B. and van Oppen, M. J. (2015) Coral—the world's most diverse symbiotic ecosystem. *Molecular Ecology*, **24**, 5330–5347.
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A. and Caporaso, J. G. (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, **6**, 90.
- Bolyen, E., Rideout J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Silva, R. D., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J., Melnik, A. V., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A., Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse, E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson II, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., van der Hoof, J. J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R. and Caporaso, J. G. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, **37**, 852–857.
- Bourne, D. G., Morrow, K. M. and Webster, N. S. (2016) Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, **70**, 317–340.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. and Holmes, S. P. (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, **13**, 581–583.
- Jackson, M. C., Weyl, O. L. F., Altermatt, F., Durance, I., Friberg, N., Dumbrell, A. J., Piggott, J. J., Tiegs, S. D., Tockner, K., Krug, C. B., Leadley, P. W. and Woodward, G. (2016) Recommendations for the next generation of

- global freshwater biological monitoring tools. *Advances in ecological research*, **55**, 615–636.
- 岸本清行 (2000) 海陸を合わせた日本周辺のメッシュ地形データの作成 : Japan250m.grd. 地質調査所研究資料集, no. 353 (CD).
- Lindh, M. V., Maillot, B. M., Shulze, C. N., Gooday, A. J., Amon, D. J., Smith, C. R. and Church, M. J. (2017) From the surface to the deep-sea: bacterial distributions across polymetallic nodule fields in the clarion-clipperton zone of the Pacific Ocean. *Frontiers in microbiology*, **8**, 1696.
- Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, **17**, 10–12.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. and Uitterlinden, A. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 695–700.
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L. and Altermatt, F. (2020) Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, **29**, 4258–4264.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Opens external link in new windowNucl. *Nucleic acids research*. **41**, D590–D596.
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (閲覧日:2021年9月25日).
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T. and Bokulich, N. A. (2020) RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses. bioRxiv. 2020.10.05.326504. doi: 10.1101/2020.10.05.326504
- 鈴木克明・板木拓也・片山 肇・兼子尚知・山崎 誠・徳田悠希・千徳明日香 (2022) 宝島及び諏訪之瀬島周辺海域の底質分布とその制御要因. 地質調査研究報告, **73**, 275–299.
- Takahashi, Y., Nagata, N. and Kawata, M. (2014) Antagonistic selection factors induce a continuous population divergence in a polymorphism. *Heredity*, **112**, 391–398.
- Wu, Y. H., Liao, L., Wang, C. S., Ma, W. L., Meng, F. X., Wu, M. and Xu, X. W. (2013) A comparison of microbial communities in deep-sea polymetallic nodules and the surrounding sediments in the Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **79**, 40–49.
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. and Glöckner, F. O. (2014) The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, **42**, D643–D648.

(受付 : 2021年12月22日 ; 受理 : 2022年9月6日)