

## ちきゅう CK05-04 Leg.2 および CK06-06 で採取された下北沖堆積物柱状試料の化石 DNA 解析

### Search for ancient DNA in sediments collected off Shimokita during the CK05-04 Leg.2 and CK06-06 cruises

# 土屋 正史 [1]; 大村 亜希子 [2]; 飯島 耕一 [3]; 布浦 拓郎 [4]; 高木 善弘 [4]; 島村 繁 [4]; 眞砂 英樹 [5]; 青池 寛 [6]; 井町 寛之 [4]; 稲垣 史生 [7]; 高井 研 [8]; 坂本 竜彦 [9]; 窪川 かおる [10]; 北里 洋 [11]

# Masashi Tsuchiya[1]; Akiko Omura[2]; Koichi Iijima[3]; Takuro Nunoura[4]; Yoshihiro Takaki[4]; Shigeru Shimamura[4]; Hideki Masago[5]; Kan Aoike[6]; Hiroyuki Imachi[4]; Fumio Inagaki[7]; Ken Takai[8]; Tatsuhiko Sakamoto[9]; Kaoru Kubokawa[10]; Hiroshi Kitazato[11]

[1] 海洋研究開発機構・IFREE; [2] 東大・海洋研; [3] 海洋研究開発機構、IFREE; [4] 海研機構・極限環境生物; [5] JAMSTEC/CDEX; [6] C D E X / J A M S T E C; [7] 海洋研究開発機構・地殻内微生物; [8] 海洋研究開発機構極限; [9] IFREE, JAMSTEC; [10] 東大・海洋研; [11] 海洋研究開発機構・IFREE

[1] IFREE4, JAMSTEC; [2] ORI, Univ. Tokyo; [3] IFREE, JAMSTEC; [4] XBR, JAMSTEC; [5] JAMSTEC/CDEX; [6] CDEX / JAMSTEC; [7] JAMSTEC; [8] SUGAR Program, JAMSTEC; [9] IFREE, JAMSTEC; [10] ORI, Univ.Tokyo; [11] IFREE, JAMSTEC

本研究では、堆積物に保存された浮遊性微細藻類を含む単細胞真核生物の化石 DNA の解析法の確立を目的とし、古海洋環境変動に伴う水塊構造の変化と遺伝的集団の分化の関係を時系列的に追跡することを目標とする。これまでの単細胞真核生物の化石 DNA 解析例は少なく、1 万 5 千年前後まで遡る程度である。下北沖の海底は溶存酸素濃度が低く有機物の分解が遅いことから、DNA も分解を免れて堆積物中に保存されている可能性が高い。また、浮遊性微細藻類を用いることで、堆積物内で生存している微細藻類を分離して解析できるという点が有利である。

試料は、ちきゅう CK05-04 Leg.2 (C9001A および C9002A/B コア) および CK06-06 (C9001C コア) 試験掘削で採取された堆積物柱状試料を用いた。解析には、C9001A コアから葉理の発達した 2 層準、C9002A/B コアから 13 層準、さらに、C9001C コアから 44 層準の堆積物内の DNA 抽出を行うとともに、抽出法の検討を行った。さらに、真核生物ユニバーサルおよび珪藻・ハプト藻類の特異的なプライマーを用いて PCR を行い、核内小サブユニットリボソーム DNA および葉緑体 16S rDNA を増幅した。増幅した DNA 断片は、プラスミドベクターにクローニングし、クローン解析を行った。クローンは 1 試料につき少なくとも 10 クローンを選び、塩基配列を決定するとともに、浮遊性藻類 DNA の存在とどの深度まで保存されているかを確かめ、堆積物柱状試料下部からどのような真核生物 DNA が得られるのか、全体の傾向を明らかにした。

抽出法の検討の結果と得られた塩基配列の結果から、堆積物内の DNA は、休眠胞子の状態で保存されている可能性が高いことが示唆された。抽出法はビードビーターもしくはミルの強度を変えることで検討した。その結果、堆積物から DNA を抽出するには、緩やかな破碎 (1200rpm) もしくは、破碎の前処理として懸濁させた後、その上清を回収し抽出を行うことが必要である。強い破碎を行った場合には、休眠胞子の細胞壁を破壊することはできるが、細胞壁に保護されている DNA をも破碎されるため、DNA の断片化が起こる。一方、弱い破碎では、細胞壁は破碎されないことから、DNA の抽出効率は著しく低下した。

分子系統解析の結果、表層より約 45m (コア 5, セクション 4) まで、主に珪藻を含む DNA を増幅し、約 5 万年までの DNA を得ることができた。堆積物表層付近 (コア 1) では様々な単細胞真核生物を含むものの、コア 2 以深では珪藻を主とする DNA クローンが見いだされる。一方、菌類 DNA はコア 40 まで存在した。微細藻類由来の DNA と菌類 DNA の存在形態が異なることが予想される。

得られた珪藻種に近縁な塩基配列は、*Chaetoceros socialis* の 18S ribosomal RNA gene (AY485446) との間に 97% の相同性を持つ配列であった。*Chaetoceros* 属の珪藻は、休眠胞子を形成する種が知られており、抽出法の検討で示唆された結果と一致する。得られた珪藻 DNA は、C9001C のコア 1~5 に類似した珪藻種 DNA が連続的に産出し、少なくとも 4 遺伝型が存在している可能性がある。これらの遺伝型は、高い信頼度 (100%) で支持される 1 つの遺伝的なクラスターにまとまるが、*C. socialis* のクラスターとは異なる遺伝的なクラスターを形成する。比較に用いた *Chaetoceros* 属の珪藻種間では、数塩基の違いが異なる種に対応していることから、層準ごとに *Chaetoceros* 属の異なる種 (個体群) が存在している可能性が高い。