

「海洋生物多様性および生態系の保全・再生に資する基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

五條堀 孝

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所
生命情報研究センター・教授

Digital DNA chip による生物多様性評価と環境予測法の開発

§1. 研究実施体制

(1)「五條堀」グループ

- ① 研究代表者:五條堀 孝 (国立遺伝学研究所 生命情報研究センター、教授)
- ② 研究項目
 - ・メタゲノムデータベースの構築、改良
 - ・Digital DNA chip システムを用いたデータ解析

(2)「山川」グループ

- ① 主たる共同研究者:山川 武廣 (日本ソフトウェアマネジメント株式会社、グループリーダー)
- ② 研究項目
 - ・メタゲノムデータベースの構築、改良
 - ・Digital DNA chip システムの構築、改良

(3)「浅川」グループ

- ① 主たる共同研究者:浅川 修一 (東京大学大学院 農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻 水圏生物工学講座、教授)
- ② 研究項目
 - ・次世代シーケンサーを用いた海洋微生物 DNA データの解析

(4)「石野」グループ

- ① 主たる共同研究者:石野 良純 (九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門、教授)
- ② 研究項目

- ・海洋環境水からの微生物採取機器開発
- ・海洋環境水からの DNA 抽出

(5)「桑田」グループ

- ③ 主たる共同研究者: 桑田 晃 (水産総合研究センター 東北区水産研究所、主任研究員)
- ④ 研究項目
 - ・海洋環境のモニタリングおよび海洋環境水の採取
 - ・微小プランクトン群集の変動機構の解析

(6)「河地」グループ

- ① 主たる共同研究者: 河地 正伸 (国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター、主任研究員)
- ② 研究項目
 - ・フローサイトメトリを用いたピコ植物プランクトンの多様性解析

§ 2. 研究実施内容

本研究は、微生物 DNA の塩基配列に基づく海洋環境の時系列モニタリングシステムを構築することを目的としている。

本年度は、採水・微生物叢 DNA 抽出・塩基配列決定・データベースの構築・データ登録に至る一連の流れを構築し、微生物採集装置の設計・試作までを目標とした。これらの目標に対して、代表機関と分担機関は有機的な連携をしながら順調に研究を進め、予定通り目標が達成できた。

具体的な進捗・成果内容および今後の予定は以下の通りである。

(A. 五條堀グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

本研究では、先の大規模震災で海洋環境の変化が顕著と予想される東北沿岸域の養殖漁場を中心に定点を定め、経時的なメタゲノム解析と物理化学環境の観測を行い、震災により激変した海洋環境の現在状況、沿岸海域の漁場環境の修復動態と遷移方向の予測を目的としている。本研究では、経時的にモニタリングを行い、海洋環境中の微生物叢の動態の把握を行う。

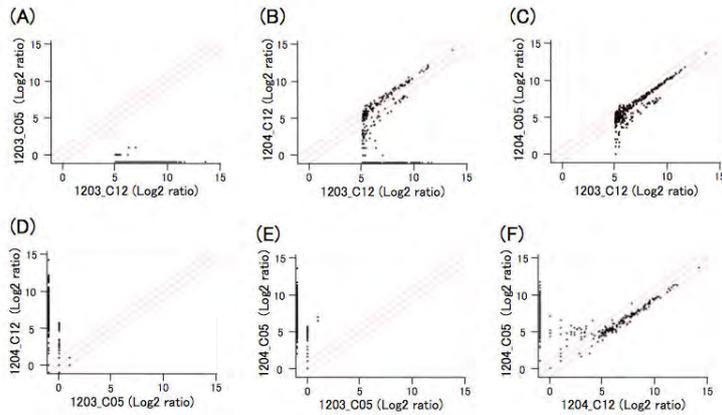
具体的には、海水に生息する微生物を混在した状態で一括して採取し、微生物から DNA を抽出、シーケンシングしてデータ化し、特定の場所を定めてモニタリングすることで基礎情報を収集する。このシステムを用いることで、震災後や温暖化などの環境変化に相関する特異的 DNA を抽出することができるようになり、DNA の変化で環境変異を予測可能とし、さらに、その DNA がどの種に属する生物であるかなどを研究することで、環境の改善などの研究へ応用するものである。

平成 24 年度は、メタゲノム解析による海洋生態の動態把握を行うために必要な基本データの検討を進めた。今年度採集されたメタゲノム配列データを用いて、試験的な比較解析を進めメタゲノム配列データによる多様性動態把握のための基礎データの蓄積と試験的な比較解析を行った。

この結果、海域を代表する種、季節を表す種等多様な生物指標が利用できる可能性が示唆されてきている。今後は、これらをより、精査し、精度の高い指標セットを開発していくことができると考えられる。

また、海洋多様性モニタリングに利用できる微生物 DNA 配列の解析システムについては、既存のデータベースやアノテーションフローの調査結果に加えて今年度得られたメタゲノム配列データに基づき、デジタル DNA チップのために必要なデータ作成の条件検討を昨年度に引き続き進めた。

デジタルDNAハイブリダイゼーションの結果の比較



2012年3月仙台湾における代表的な海洋微生物叢(科)の一覧 (上位120、科名のわかるもの)

No.1 SAR11 cluster	No.31 Bacteroidia	No.61 Annonellaceae	No.91 Sphaeriales
No.2 Flavobacteriia	No.32 Burkholderia	No.62 Leptothricaceae	No.92 Halomonadaceae
No.3 Pseudoalteromonadaceae	No.33 Ligulidaceae	No.63 Mollusculiniales	No.93 Trichodesmium erythraeum
No.4 Alteromonadaceae	No.34 Rhizocyclonellaceae	No.64 Chromatiaceae	No.94 Methylohalobium
No.5 Oceanospirillaceae	No.35 Rhodocyclaceae	No.65 Sphaerulobacterales	No.95 Rhodocyclaceae
No.6 Colwelliaceae	No.36 Thaumarchaeota	No.66 Desulfobacteraceae	No.96 Caulobacteraceae
No.7 Enterobacteriaceae	No.37 Serratulaceae	No.67 Sphaerulobacterales	No.97 Hydrocarbonocyclops
No.8 Rhodocyclaceae	No.38 Methylohalobium	No.68 Nitrospiraceae	No.98 Sphaerulobacterales
No.9 Rhodocyclaceae	No.39 Thaumarchaeota/Bacteroidia Far	No.69 Labyrinthaceae	No.99 unclassified Colwelliaceae
No.10 Comamonadaceae	No.40 Brevitrichaceae	No.70 Comamonadaceae	No.100 Nitrospiraceae
No.11 Cytophagales	No.41 Alkaliphilaceae	No.71 Rhizocyclaceae	No.101 Halobacteriaceae
No.12 Rhodocyclaceae	No.42 Thaumarchaeota	No.72 Chloroflexi	No.102 Thaumarchaeota
No.13 Sphaerulobacterales	No.43 Desulfobacteraceae	No.73 Annonellaceae	No.103 unclassified Sphaerulobacterales
No.14 Sphaerulobacterales	No.44 Leptothricaceae	No.74 Thaumarchaeota/Bacteroidia	No.104 Nitrospiraceae
No.15 Nitrospiraceae	No.45 Picrophilaceae	No.75 Chloroflexi/Chloroflexi	No.105 Enterobacteriaceae
No.16 Flavobacteriia	No.46 Enterobacteriaceae	No.76 Nitrospiraceae	No.106 Halobacteriaceae
No.17 Bacteroidia	No.47 Lintulaceae	No.77 Rhizocyclaceae	No.107 Enterobacteriaceae
No.18 Pasteurellales	No.48 SAR11 cluster	No.78 Nitrospiraceae	No.108 Desulfobacteraceae
No.19 Rhizocyclaceae	No.49 Nitrospiraceae	No.79 Nitrospiraceae	No.109 Sphaerulobacterales
No.20 Rhizocyclaceae	No.50 Hydrocarbonocyclops	No.80 Cyanobacteriales	No.110 Nitrospiraceae
No.21 Annonellaceae	No.51 Hydrocarbonocyclops	No.81 Cyanobacteria Annonellales	No.111 OMP group
No.22 Methylohalobium	No.52 Formicellaceae	No.82 Formicellaceae	No.112 Methylohalobium
No.23 Methylohalobium	No.53 Chromatiales	No.83 Alteromonadaceae/gamma proteob	No.113 Sphaerulobacterales
No.24 Flavobacteriia	No.54 Actinobacteriales	No.84 Sphaerulobacterales	No.114 Caulobacteriaceae
No.25 Nitrospiraceae	No.55 Alteromonadaceae	No.85 Nitrospiraceae/gamma proteobact	No.115 Sphaerulobacterales
No.26 Sphaerulobacterales	No.56 Thaumarchaeota/Bacteroidia	No.86 Nitrospiraceae	No.116 Caulobacteriaceae
No.27 sulfur-reducing symbionts	No.57 Sphaerulobacterales	No.87 Sphaerulobacterales	No.117 Cyanobacteria ATCC 31442
No.28 SAR11 cluster	No.58 Picrophilaceae	No.88 Desulfobacteraceae	No.118 Picrophilaceae
No.29 Leptothricaceae	No.59 Sphaerulobacterales	No.89 Thaumarchaeota	No.119 Rhodocyclaceae
No.30 Annonellaceae	No.60 Leptothricaceae	No.90 Annonellaceae	No.120 Rhizocyclaceae

(2) 今後の予定

25年度以降は、今後追加されるメタゲノム配列データを用いて、より精度の高い環境指標となるような DNA 配列プローブの設計を進めるとともに、実データに基づき、地域、時間軸等、より詳細なデータを集め、メタゲノム配列からみた実際の海洋環境動態を明らかにしていく。また、引き続き、生物多様性のモニタリングと環境変動予測を実現する為のプローブセットの設計を進める。更に、得られたプローブセットをデジタル DNA チップの試験に用い、チップの精度向上に努めるとともに、実際のデータに適用し更なる開発を進める予定である。これまでの研究により、方法論としての基礎的な部分の確認ができたと考えており、今後は、より具体的なシステムの開発を行う事により、目標達成に向けて研究を進める。

(B. 山川グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

①メタゲノムデータベース(以下、「DB」と表記する)の構築、改良

本年度は、DB の構築に関して本課題の他グループにヒヤリングを行い、五條堀グループと共同で実用に即した DB を設計し、以下の機能項目の開発を行った。

1) DB の設計・開発

- ・トップページ、プロジェクトデータ登録状況、成果情報表示
- ・海水の物理化学的環境データ、大型植物プランクトン及びピコ植物プランクトン生物情報、DNA 抽出情報等の閲覧機能
- ・DNA 配列データの閲覧、ダウンロード機能

2) DNA 配列データを登録するためのクライアントソフトウェアの開発

DNA 配列データを他機関から登録するためのソフトウェアの開発を行った。

②Digital DNA chip システムの構築、改良

「Digital DNA chip 解析システム」パッケージソフトウェアを国立遺伝学研究所のサーバにインストールし、各解析の動作確認を行った。また、解析スピードの性能向上、より大量のデータ解析に対応出来るような改良計画を立案した。

(2) 今後の予定

1) DB の設計・開発

DB の最適化を行い、より大量データに対応できるような構造改良、チューニング、機能追加等に着手する。また、DB を本課題内部へ公開し、構成・機能等に関して各グループへのヒヤリングを行い、五條堀グループと共同で評価結果を精査し、順次改良対応を行う。

2) Digital DNA chip システムの改良

Digital DNA chip システムの改良計画に基づき、システムの改良と評価を五條堀グループと共同で行う。

(C. 浅川グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

東北沿岸域の微生物由来の DNA 断片の網羅的配列決定を行った。複数水深で採取した試料海水から抽出された DNA を用い、長さ約 100~250bp の single-end のメタゲノム DNA ライブラリーを構築した。79 サンプルのメタゲノム DNA ライブラリーにつき、Life Technologies 社の Ion PGM シーケンサを用いて 15 サンプル、同社および Ion Proton シーケンサで 64 サンプルのシーケンシングを行い、海洋微生物叢メタゲノムデータを得た。Ion PGM については、Ion 318 チップを用いて、1 チップあたり 1 サンプルのシーケンシングを行った結果、399Mb~1.07Gb のデータを得た。一方、Ion Proton では、Ion PI チップを用いて、1 チップあたり 16 サンプルのマルチプレックスシーケンシングを行った結果、1 チップあたり 4.9~6.7Gb、1 サンプルあたり 300~415 Mb のデータが得られた。シーケンシングに要する時間は両機種で違いがなく、Ion Proton を用いることで解析効率を大幅に加速することが出来た。

(2) 今後の予定

Illumina、Ion Proton シーケンサを用いて同一サンプルを解読、データを比較、特性を評価し、リファレンスとなる塩基配列をデータベース化する。引き続き東北海域の種々の環境に生息する微生物のゲノムを調べ、長期観察しているそれぞれの海域での系統的微生物集団と遺伝的変異や微生物組成の時間変動等を解析し、東日本大震災の影響評価や東北沿岸の環境状態の変化

の予測等を行うための基礎的知見を得る。

(D. 石野グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

・海洋環境水からの DNA 抽出

本年度は、海水サンプルから細菌由来 DNA を網羅的に抽出する方法を確立するため抽出キットの比較検討を行った。市販の 4 キットを用いた比較実験をデザインし、収量、純度、所用時間等を比較した結果、Power Water DNA Isolation Kit が DNA 収量および操作性、コスト面においてこのプロジェクトに最も適しているという結論に至った。本年度から、東北沿岸海域のサンプル(海水ろ過フィルター)が桑田グループより提供され、処理を開始した。3 月～10 月までにサンプリングされた 164 サンプルを処理し、10～11,058 ng の DNA が得られた。調製した DNA サンプルのうち配列解析が行えると判断した(DNA 収量が 100 ng 以上ある DNA サンプル)計 120 サンプルを、配列解析のため浅川グループに提供した。また、エアサンプラー(フランス Bertin 社製 コリオリス μ)を用いて、海上大気の微生物を収集して、陸上との比較を行う実験を進めた。

・海洋環境水からの微生物採取機器開発

本研究目的を達成するために、既設の水質自動観測ブイの利用を視察等も含め検討した。五條堀代表と共に水産総合研究センター西海区水産研究所へ協力を要請し、有明海の既設ブイを使って本研究を進める協力を得る事ができた。既設ブイへ搭載する自動採取・ろ過装置の設計および試作を行い、H25 年 2 月に試作機を設置、サンプリングおよびサンプル処理開始した。現在までに 880～2,477 ng の DNA が得られている。また、自動サンプリングに海中顕微鏡像リアルタイム観察システムの導入も計画しており、試作機の設計、作成まで行った。さらに、機器開発と平行してサンプリングフィルター保存方法の検討も開始した。現在、海水ろ過後フィルターの室温保存で約 50%程度の DNA 回収が可能である事を確認できた。

(2) 今後の予定

・海洋環境水からの DNA 抽出

本年度に引き続き、東北沿岸海域でサンプリングおよびろ過されたフィルターを随時 DNA 調製し、DNA 収量を測定した上で、浅川グループに提供して配列解析を進める。コリオリスを用いた空気中の微生物・ウイルスの捕集については、装置の改良を含めどのように利用していくか検討を進める。

・海洋環境水からの微生物採取機器開発

微生物採取機器開発については、本年度作成した試作機を運転しながら、問題点を解決して行く。ろ過部分については、さらに難しい問題が山積しているため、多くの工夫と実践を必要とする。

海水サンプルをろ過した後のフィルターの保存条件の検討については、乾燥フィルターの処理法として最適条件を探る。

(E. 桑田グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

東北海域の海洋環境の季節変動を把握するため、仙台湾の沿岸定線、親潮域と親潮・黒潮移

行域の沖合定線(Aライン)上の海洋観測をメタゲノム解析用 DNA 試料採水とカップリングして1年間、集中的に(仙台湾 9 回、A ライン 5 回)行った。沿岸定線、沖合定線それぞれに代表測点 2 点を設置し、微生物群集の多様性・動態解析用の試料およびメタゲノム解析用のサイズ別 DNA 試料を採取した。海洋観測では、環境データとして、水温、塩分、溶存酸素 (DO) の鉛直分布を測定し、栄養塩濃度、アルカリ度、クロロフィル a 量の分析用試料を各層採水した。さらに、これまでに取得したデータによる東北海域の物理環境の変動の解析に着手した^{1) 2)}。植物プランクトン群集については、大型植物プランクトン、微小植物プランクトン群集解析のための試料を採取し、植物プランクトン群集の構造、動態及び多様性の解析を着手した³⁾。東北海域の生態系の植物プランクトンの鍵種であるブルーム形成性の珪藻類については、多様性解析のためのバーコーディング法の検討を開始した。細菌群集の解析については、直接計数法による現存量(細菌数)分布解析、16SrRNA 遺伝子の多型による群集組成解析を進め、仙台湾の細菌群集が、湾内の細菌群集組成が水温や栄養塩などの環境因子と有為な関係を持って変化しており、また その関係性が季節によって異なることを明らかにした。

(2) 今後の予定

今年度の海洋観測で採取した栄養塩等の試料の分析と海洋環境データのとりまとめを行い、東北海域の海洋環境の季節変動の解析を進める。大型植物プランクトン及び微小植物プランクトン群集解析用の試料の分析を進め、群集構造・多様性の季節変動、鍵種の動態の解析を進める。鍵種については、現場から培養株の単離に着手する。細菌群集については、今年度の解析を引き続き行うとともに、さらに16S rRNA 遺伝子のNGS解析を行い、沿岸環境と強い関係を持つ細菌の種類(遺伝子情報)を明らかにする。また、メタゲノム解析用DNA試料採取とカップリングした海洋観測も継続して季節的に行う。

(F. 河地グループ)

(1) 研究進捗状況、研究成果

東北沿岸海域におけるピコ植物プランクトンの多様性の実態を明らかにすることを目的として、次世代シーケンサー(NGS)を用いた環境試料中の多様性解析と同試料から確立した培養株の種同定を行った。仙台湾の定点、C12地点で、4月と7月に採取された試料のフローサイトメトリ(FCM)分取細胞について、全ゲノム増幅を行い、NGS(Roche GS junior)で18S rDNAの部分配列を解析した結果、非光合成プランクトンの占める割合の高いことが判明した。そこでFCMの細胞分取条件について検討を行い、前方散乱光と側方散乱光、そしてクロロフィルと側方散乱光の2組のパラメータで分取細胞のリージョン設定を行うことで、非光合成生物の割合を低減させ、なおかつ細胞回収率を向上させることに成功した。同分取条件で、C12地点の4月、7月、9月、11月の試料を分取し、NGSで解析した結果、合計で約15万リードを取得することができた。複数プログラムを用いて、プライマーのない配列やQ-scoreの低い配列の除去、アライメント及びクラスタリング(97% identity)、相同性検索、分類群のグループ分けを行なった。その結果、未知・未培養性の配列等の多様な生物群の存在や優占的に存在する珪藻等の藻類グループ、そして特定試料で優占的に存在する種や試料間で共通する種を特定できた。またこれまでに約100株に及ぶ培

養株を確立でき、そのうち34株の形態観察と18S rDNA配列の分子系統解析から、8分類群、19種を特定した。このうち6種はNGSでも存在が確認された。

(2) 今後の予定

FCMで植物プランクトンを選択的に分取した試料についてNGS解析を行うことで、網羅的かつ効率的にピコ植物プランクトンの多様性を解析することが可能になった。今回のNGS解析で特定された優占種や環境指標種をターゲットとして、今後更に培養株を拡充する。また他の定点、異なる時期の試料について同様の解析を進めるとともに、取得したDNA情報と解析結果に基づいて、ピコ植物プランクトンの多様性データベースの整備に取り組む。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 笥茂穂 伊藤進一 八木宏 和川拓, 仙台湾における淡水および海水の平均滞留時間の推定, 土木学会論文集 B2(海岸工学), Vol. 68, No. 2, 951-955, 2012,
2. 八木宏 杉松宏一 西敬和 中山哲巖 藤井良昭 伊藤進一 笥茂穂, 2011 年成層期における仙台湾沿岸域の流れと水質変動, 土木学会論文集 B2(海岸工学), Vol. 68, No. 2, 1106-1110, 2012
3. Mutsuo Ichinomiya, Miwa Nakamachi, Yugo Shimizu and Akira Kuwata, “Growth characteristics and vertical distribution of *Triparma laevis* (Parmales) during summer in the Oyashio region, western North Pacific”, Aquatic Microbial Ecology, vol. 68, pp.107-116, 2013 (DOI: 10.3354/ame01606)