

「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24年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

竹山春子

早稲田大学理工学術院・教授

シングルセルゲノム情報に基づいた海洋難培養微生物メタオミックス解析による環境リ
スク数理モデルの構築

§1. 研究実施体制

(1) バイオ計測グループ(早稲田大学)

- ① 研究代表者: 竹山 春子 (早稲田大学理工学術院、教授)
- ② 研究項目
 - ・次世代型マリンメタオミックス解析と支援技術開発

(2) 沖縄グループ(琉球大学)

- ① 主たる共同研究者: 須田 彰一郎 (琉球大学 理学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・沖縄サンゴ礁生態系評価と変動予測研究

(3) 計算機解析グループ(京都大学)

- ① 主たる共同研究者: 藤渕 航 (京都大学 iPS 細胞研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・海洋微生物ゲノムと環境データのインフォマティクス解析

§ 2. 研究実施内容

サンゴ礁域は生物多様性の高い地域であることは良く知られている。一方、近年の地球温暖化の影響による高水温に伴うサンゴの白化現象や、おもに人為活動による陸域からの赤土流入などによりサンゴの生育環境が大きく攪乱している。サンゴ礁は非常に脆弱な環境であり、透明度高く貧栄養の環境が必要とされているが、その詳しい成り立ちと環境の理解、保全・再生の方法は確立していない。

サンゴには多様な微生物が生息しているが、共生・共在バクテリアも重要な役割を担っている。しかしながら、宿主であるサンゴや環境との相互関係がどのように成り立っているかはまだ理解されていない。本研究では、サンゴ礁環境のより正確な理解と、その理解に基づくリスク変動予測をおこなうことにある。その目的のために、サンゴ共生・共在バクテリア等を分子生物学的手法により解析し、環境指標となる情報を取得することを目指す。また、それらを可能とするシングルセル解析手法、オミックス解析手法開発を行う。

(1) バイオ計測グループ(早稲田大学)

初年度は、琉球グループと連携を取り、沖縄島北部本部町の瀬底島にある琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設を利用し、対象とする海域、サンゴ種の決定を行った。対象サンゴ共生・共在バクテリアの解析手法の確定に先立ち、サンプル処理条件の検討を行った。対象サンゴであるミドリイシを入手し、現地で調整したサンゴのポリプ、骨格、粘液からのバクテリア画分と東京に運搬後、調整したバクテリア画分を FACS を用いてシングルセル分取すると同時にそれぞれの画分のメタゲノムを調整し、バクテリア叢の変化を 16SrDNA 解析によって評価した。16SrDNA 多様性解析は、本研究で購入した GS Junior 454 シークエンシングシステムを用いて行った。サンプルごとに 7×10^3 - 1×10^4 リード数を解析し、Operational Taxonomic Unit (OTU) 数を算出した。獲得したそれぞれの OTU から代表配列を BLAST で解析したところ、両サンプルにおいて、>90%以上が gamma-proteobacteria 綱に分類された。しかしながら、運搬によって、ミドリイシの劣化が観察されており、多様性解析の結果も多くの変動が観察され、様々なストレスによって共生・共在バクテリア叢の変化が起こることが示された。今回の評価結果を踏まえて、今後バクテリア画分の調整はサンプリングサイトである沖縄で行うこととした。

今後は、沖縄グループとともに選定した海域からの実サンプルを用いて、解析を進めるとともに計算機解析グループとシングルセルゲノム解析のデータベースの構築を行って行く。

(2) 沖縄グループ(琉球大学)

本研究の野外調査の中心は、沖縄島北部本部町の瀬底島にある琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設で、モニタリング定点は過去 10 年以上にわたり当施設と沖縄美ら島財団の共同研究によりサンゴ礁環境の変遷が調査されてきた瀬底島周辺海域から選定することにした(図1)。サンゴ被度が高い瀬底南と被度が低い竜宮か浜本の 2 か所にデータロガーを設置することにした。できるだけ多くの環境データを継続的に収集する目的で、水温、塩分、溶存酸素、pH、濁度、蛍光溶存有機物、クロロフィルの各項目の自動計測が可能な機種を選定し、加えて光強度の測定に光量子センサーを取付けることとした。また、海中にデータロガーを設置するにあたり、沖縄に来襲する台風による波浪に耐えられる架台を作る必要がある。事実、台風の影響で直径1メートルもの岩塊が大きく移動することが知られており、堅固で強靱な作りとした。

今後は、上記のように初年度に選定した 2 定点における環境データの継時計測データの回収を行ないつつ、機器の保守点検を実施しながら、作業の最適化を図り筒長期継続データにつな

げていく。定点を代表するサンゴ(ミドリイシの仲間)からの粘液、骨格サンプル、周囲の海水サンプル、堆積物サンプルの前処理方法と移送方法の最適化を早大グループと共同で行ない、安定的方法を目指していく。さらに、シアノバクテリアについても海水、堆積物、サンゴ骨格と可能であれば岩盤からの分離作業とメタゲノム解析を早大グループと協力して開始する。



図1. サンゴモニタリング地点
琉球大学瀬底研究施設と沖縄
美ら島財団の共同研究による。

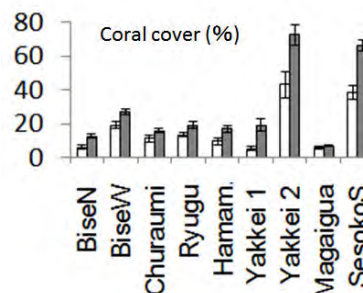


図2. 造礁サンゴ被度比較
白抜き 2005年, 灰色 2010年

3) 計算機解析グループ(京都大学)

大量に産生される海洋生態系の物理化学的データと海洋微生物の分子生物学的データを登録するための計算機設備およびソフトウェアを整備した。計算機設備としてメニーコア型クラスター計算機システムおよび Web サーバを設置した。また、ソフトウェアとして多種多様な配列解析や大規模データからのデータマイニングを行うことができるプログラムを収集しインストールした。現時点では、ペアワイズアライメント、マルチプルアライメント、系統樹解析、ピークコール、モチーフ検索、de-novo アセンブリ、マッピングツール、類似構造検索、フォーマット変換/編集、発現量 RPKM 計算、ゲノムブラウザ、クオリティコントローラ、遺伝子モジュール探索、遺伝子予測、RNA-seq 解析、統計解析、Protein ソーティング、メタゲノム統合解析、分子生物学統合解析、配列統計解析、パスウェイ解析データベースのカテゴリから、いくつかのソフトウェアをインストールし使用可能な状態となっている。

また、初年度は、メタゲノム解析ソフトウェアについての情報を収集し、代表的な統合解析ソフトである MEGAN4、MG-RAST、KEGG について調査した。今後の解析で予定される大量のゲノムシーケンシングデータへのアノテーションを自動的に行う解析パイプライン構築の第1段階として、機能モジュールのデータベースである KEGG MODULE を用いたゲノムやメタゲノムの機能評価方法を開発し、既存のゲノムやメタゲノムに適用して評価した。また、様々なバイオインフォマティクス解析法について新手法を検討し、データ圧縮による予測精度の影響、遺伝子ネットワーク解析の高度化について研究を行った。