

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24241002

研究課題名(和文) 時系列メタゲノミクスでみる西部北太平洋亜寒帯・亜熱帯海域の微生物群集動態

研究課題名(英文) Dynamics of microbial community genomes at time-series stations in the subarctic and subtropical gyres of the western North Pacific

研究代表者

浜崎 恒二 (HAMASAKI, KOJI)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：80277871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：西部北太平洋海域は、世界でも有数の漁場であり、活発な生物ポンプ作用による二酸化炭素吸収海域でもある。本研究は、西部北太平洋の亜寒帯及び亜熱帯海域に設置された時系列観測点において、微生物群集構造および代謝機能の網羅的解析を行うことにより、亜寒帯及び亜熱帯外洋域における微生物機能の時系列変動を比較解析した初めての例として、貴重なデータと成果を得ることができた。さらに、次世代型のメタゲノム解析・評価システム Metabolic And Physiological potential Evaluator (MAPLE) の開発に貢献し、新しい生態系解析ツールとしての有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：The western North Pacific is one of the most productive area in the ocean and thus important for carbon sequestration by strong activity of the Biological Carbon Pump. Here, we report temporal variability of structures and metabolic potentials of surface seawater microbial communities collected from two contrasting time-series stations, K2 and S1, in the subarctic and subtropical gyres, respectively. This is the first report of metagenomic comparison of temporal dynamics in open ocean microbial communities of subtropical and subarctic areas, which has provided invaluable data and fruitful outcomes. We have also contributed to develop a next generation bioinformatics tool of metagenomics, so-called Metabolic And Physiological potential Evaluator (MAPLE), and presented usefulness of this system as a novel tool in analyzing ecosystem dynamics.

研究分野：微生物海洋学

キーワード：微生物 メタゲノム 西部北太平洋

1. 研究開始当初の背景

海水中には、マイクロサイズのゲル状粒子から巨視的サイズのマリンスノーまで、大小様々な有機物粒子が浮遊し、微生物の増殖に適した生息場所となっている。これらの有機物粒子について、微生物群集構造や活性、相互作用を明らかにすることが、生態系における物質循環変動機構の理解につながると期待されている。例えば、珪藻類に付着する細菌は、藻類によって分泌される粘液物質を分解することによって、ブルームに伴う凝集、沈降を抑制し、有光層への滞留時間を延長させるため、ブルームの消長を制御する一因となる。こうした作用は、微生物群集組成や各種の活性によって大きく変動するはずだが、従来の海洋観測では、海洋微生物群集はそれ自体が一つの機能集団(ブラックボックス)として捉えられ、全体の生物量や活性が測定されるに止まってきた。一方、近年新しい方法論(分子微生物生態学、微生物群集ゲノミクス通称“メタゲノミクス”)によって、その中身(種組成や各種の生物量と機能)がダイナミックに変動する様子を捉えることが可能となってきた。従来のようにブラックボックスへの物質の出入りを記述するだけでなく、その中身を解析することによって物質の出入りをコントロールするしくみを知ることができる。

代表者の研究グループは、ヌクレオシドトレーサー法*という独自開発の手法を用いて、有機物分解に関わる微生物鍵種の特定を進めてきた。西部北太平洋トランセクト観測では、南北方向の水塊の違いにより表層微生物群集の組成及び活発に増殖する鍵種が変化することを明らかにした。また、国際海洋微生物センサスの一環として行った南太平洋トランセクト観測においては、次世代シーケンス技術を用いた大量遺伝子解析により、海洋表層における微生物群集の半分以上が出現頻度 0.01%以下の稀少種によって構成され、その群集構造が南北方向に大きく変化することを明らかにした。一連の研究によって、大洋スケールでの微生物群集のダイナミックな変動の様子が明らかになってきたが、一方でこれらの観測は表層でのスナップショット的な記述に止まっているため、中深層の微生物群集の季節的・経年的なダイナミクスを解析するには至っていない。米国における、HOT や BATS と

いった長期時系列観測においても、中深層微生物システムの季節的・経年的な動態解析は十分にされていないのが現状である。また、これまでの研究によって様々な環境における主要微生物種が明らかとなり、環境要因と多様性との関係も少しずつ解析されつつある一方で、環境要因に応答するための具体的な機能にまで踏み込んだ解析はほとんど行われていない。

【*ヌクレオシドトレーサー法:DNA 合成の前駆物質チミジンの同族体である BrdU を海水中に添加すると、細菌の増殖に伴って、DNA に同化される。BrdU 標識された DNA を免疫学的に分取し、16SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析すると、活発に増殖している細菌種を特定できる。】

2. 研究の目的

本研究では、季節風による大気や海洋の物理場の季節的・経年的な変動が顕著にみられるアジアモンスーン海域(亜寒帯及び亜熱帯の時系列観測点)において、最新の分子生態学及びメタゲノミクスの手法を駆使して、微生物群集構造の季節的な変動を明らかにすると共に、これら微生物群集が持つ代謝機能の多様性や特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

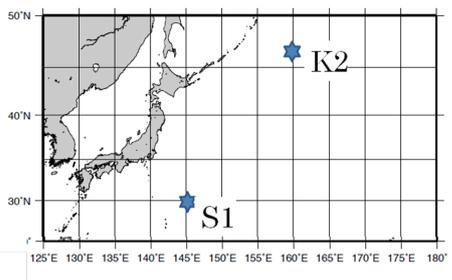
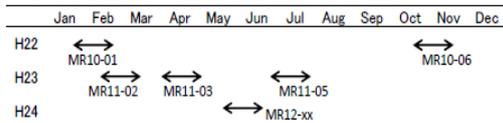
サンプリング

本研究で使用する試料は、JAMSTEC 物質循環研究グループとの共同研究として実施してきた「みらい」複数航海による時系列定点観測「気候変動に対する生態系変動を介した物質循環の変動とフォードバック」によって得られたものである(下表)。亜寒帯 K2(北緯 47 度 - 東経 160 度)と亜熱帯 S1(北緯 30 度 - 東経 145 度)に観測点が設定されている(下観測点図)。それぞれの点に、大型セグメントトラップ 4 基を搭載した BGC 係留系(沈降フラックス計測用)と、自動昇降式の高速度フラッシュ励起蛍光光度計(光合成活性計測用)を搭載した POPPS 係留系が設置されている。これらの観測点をくり返し訪れ、係留系の設置回収を行うと共に、CTD 観測、採水、プランクトンネット採集、光計測、基礎生産測定などを実施し、物理、化学、生物パラメータを取

得する総合的な観測を行った。

表層から海底直上まで11層(0, 10, 50, 100, 150, 200, 300, 500, 1000, 2000, 5000m)からサンプル水(各層約4L, 5000mのみ10L)を採水。通常の海洋細菌, 古細菌の細胞サイズは0.2~1 μm程度であるため, 孔径3.0μm のものを用いて有機物粒子に付着したもの(付着生活性)を集め, さらにこのフィルターを通過した画分を0.2μmのフィルターでトラップし単独で浮遊している(自由生活性)細胞を集めた。フィルターは, -80℃で保存, 研究室にてDNA抽出, 遺伝子解析に供した。

「みらい」による西部北太平洋亜寒帯・亜熱帯海域の時系列観測



16SrRNA遺伝子による群集構造解析

微生物細胞が捕集されたフィルターから抽出した全ゲノム DNA を鋳型として細菌 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V1-V3 領域(約 400 塩基対)の PCR 増幅を行った後, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)による DNA フィンガープリント法を用いて細菌群集構造を解析した。また, PCR-クローニング法により, 16S rRNA 遺伝子の全長(約 1500 塩基対)に基づく海洋細菌群集の分子系統解析も行った。PCR-DGGE 及びクローニング法では, 2011 年冬期(MR11-02 航海)と夏期(MR11-05 航海)における細菌群集構造を比較した。

次に, 2010~2011 年 4 回の「みらい」航海 MR10-01 (19 January–24 February 2010), MR10-06 (18 October–16 November 2010), MR11-03(14 April–5 May 2011), MR11-05(27

June–4 August 2011)において, 観測点 S1, K2 の水深 0, 300, 1000, 2000, 5000 m から 80 ライブラリーを作成し, 454 パイロシーケンサー GS FLX Titanium (Roche Applied Science) により細菌および古細菌の 16SrRNA 遺伝子可変領域 V1-V3 領域(約 400 塩基対)をターゲットとしたディープシーケンシングを行った。

メタゲノム KEGG 代謝・複合モジュール解析

上記 2010~2011 年 4 回の「みらい」航海にて採取した表層海水の DNA 抽出液について, 8 ライブラリーを作成し, GS FLX Titanium (Roche Applied Science) により塩基配列を決定した。全 8 試料(4 航海 x2 観測点)で約 480 万リードの配列情報を得て遺伝子予測と KEGG オースログ解析を行った。さらに, KEGG モジュール解析システム Metabolic And Physiological potential Evaluator (MAPLE)を用いて, KEGG モジュールで定義された各種の遺伝子セットの充足率と由来微生物種を調べた。

【*KEGG 代謝・複合モジュール:ある代謝を行うために必要な遺伝子群やタンパク質複合体を構成する遺伝子群のセットで, 遺伝子, タンパク質, 分子間ネットワークに関する情報を統合したデータベース Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) によって提供されている。】

4. 研究成果

16SrRNA 遺伝子による群集構造解析

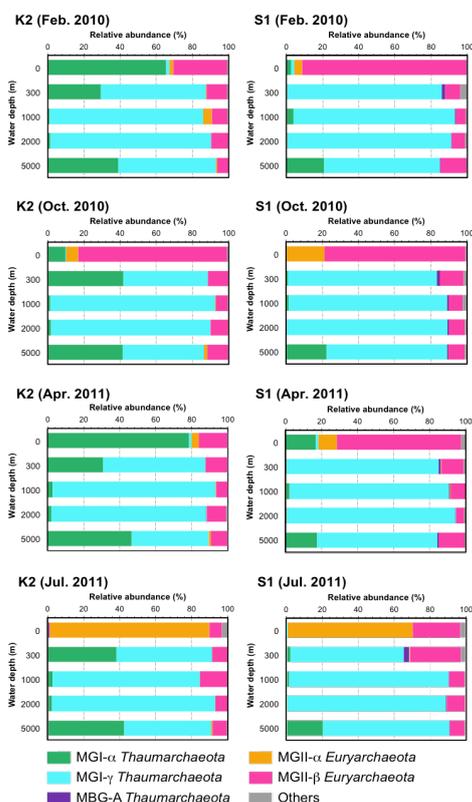
西部北太平洋亜寒帯域(K2)と亜熱帯域(S1)の水深 0, 50, 300, 1000 m における細菌群集構造を解析した結果, K2 と S1 の細菌群集構造が全く異なること, 細菌の多様性は冬期・夏期のいずれにおいても K2 の方が高いことが示された。また, 細菌多様性の鉛直分布パターンが南北で異なっており, K2 では水深 50, 300 m で細菌多様性が特に高くなる一方で, S1 では水深に伴って多様性が減少する傾向が見られた。冬期と夏期における細菌群集構造を比較したところ, K2 と S1 の全水深において細菌群集構造の変化が確認された。これらの結果により, 環境の季節的な変化が乏しいと思われる外洋域中深層におい

て、細菌群集構造が季節的に変化する事が明らかとなった。

細菌 16SrRNA 遺伝子ディープシーケンシングでは、合計 961419 リードの配列が得られた。得られた配列を DNA データベースに登録されている塩基配列と比較したところ 27 門(Phylum)に分類された。自由生活画分では、S1 と K2 の両観測点の全水深からアルファプロテオバクテリア綱に属する SAR11 と呼ばれるグループに近縁な配列が検出され、特に表層海水中では全配列の 15-40%が SAR11 によって占められていた。しかし、水深が深くなるに従い、デルタプロテオバクテリア綱とデフェリバクテラーレス門に属する配列の存在割合が次第に多くなる傾向が見られた。一方、付着画分性の細菌群集構造は、自由生活性細菌群集以上に水深に伴う違いが大きく、海洋表層ではバクテロイデス門、ガンマプロテオバクテリア綱の存在割合が多いのに対して、中層から深層ではデルタプロテオバクテリア綱、プランクトミケーテス門に属する系統群によって占められた。また、細菌群集構造の類似度をクラスター解析によって調べたところ、細菌群集構造は表層だけでなく深海においても季節的な変化を示すことが明らかとなった。とりわけ、沈降粒子に付着している深海細菌群集の変動が顕著に見られた。このような深海の細菌群集の動態は、沈降粒子の量や質の変動と連動していると考えられる。

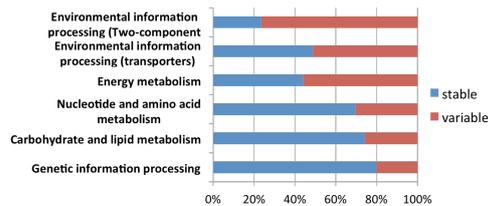
古細菌 16SrRNA 遺伝子ディープシーケンシングでは、合計 285103 リードの配列が得られた。これらのリードを、97% 相同性でクラスタリングした結果、593 種の便宜的分類単位 (OTU) が得られた。得られた OTU の配列を DNA データベースに登録されている塩基配列と比較したところ、83.7% がタウムアーキオータ門の MGI- α 、もしくは MGI- γ タイプに、15.6% がユーリアーキオータ門の MGII- α 、もしくは MGII- β タイプに分類された。下の図は、それぞれの観測点、季節における各分類群の深度別割合を示している。各分類群の割

合は深度によって変化する事、南北いずれの観測点でも表層 (0, 300m) では明瞭な季節変動がみられるのに対して、中層から深層 (1000, 2000, 5000 m) では明瞭な変動が見られなかった。さらに、従来の報告では堆積物にのみ見られた系統が深層水中にも生息することがわかった。



メタゲノム KEGG 代謝・複合モジュール解析

KEGG モジュール解析システム Metabolic And Physiological potential Evaluator (MAPLE) を用いて、KEGG モジュールで定義された各種の遺伝子セットの充足率と由来微生物種を調べた。下の図は、各機能カテゴリーに属する遺伝子セットの中で、季節と観測点の違いにかかわらずすべてのサンプルで充足率が 100% であるモジュールの割合を stable (青) として示し、そうでないものを variable (赤) として示している。その結果、糖や脂質代謝といった基本的なモジュールは季節や海域による大きな充足率の変動は見られなかったが、膜輸送系や二成分制御系のような環境応答に関わるモジュールについては大きな変動が見られた。



さらに、太平洋の熱帯・亜熱帯海域の表層海水 18 試料のメタゲノムデータを加えて特徴的な代謝プロセスの抽出法として類似度百分率 (SIMPER) 分析や環境パラメータとの統合解析のための多変量解析手法の検討を行った結果、硝酸・亜硝酸輸送系は亜熱帯海域にのみ、グルタミン酸・アスパラギン酸輸送系は亜寒帯海域にのみ見られる機能であることや、超貧栄養海域でも窒素利用能(輸送系や代謝酵素)に特徴が見られることなどがわかった。こうした違いは海域によって異なる窒素供給の質と量を反映したものであり、細菌群集の環境適応の鍵となる機能の一つと考えられる。本研究により、西部北太平洋における微生物群集の変動が、どのような微生物機能の変動に反映されているかが初めて示された。同時に、KEGG モジュール充足率を指標とした時系列解析が、生態学的に重要な機能を推定し微生物群集構造と生態系機能との関係を理解するための強力なツールとなることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

- ① Hamasaki, K., Taniguchi, A., Tada, Y., Kaneko, R. and Miki, T. (2016) Active populations of rare microbes in oceanic environments as revealed by bromodeoxyuridine incorporation and 454 tag sequencing. *Gene* 576:650-656
doi:10.1016/j.gene.2015.10.016
- ② Kaneko, R., Nagata, T., Suzuki, S. and Hamasaki, K. (2016) Depth-dependent and seasonal variability in archaeal community structure in the subarctic and subtropical western North Pacific. *J. Oceanogr.* 72:

427-438

doi:10.1007/s10872-016-0372-2

- ③ Takami, H., Arai, W., Takemoto, K., Uchiyama, I., and Taniguchi, T. (2015). Functional Classification of Uncultured “*Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*” Using the Maple System. *PloS one*, 10(7)
doi:10.1371/journal.pone.0132994

[学会発表](計 23 件)

- ① Kaneko, R., Suzuki, S., Nagata, T., Honda, M., Hamasaki, K. (2015) Spatiotemporal dynamics of planktonic archaea in the western North Pacific Ocean. ASLO meeting, Granada, Feb.22-27
- ② 浜崎恒二, 金子亮, 荒井渉, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 本多牧生, 高見英人「時系列メタゲノミクスでみる西部北太平洋の微生物群集代謝機能」環境微生物学会合同大会, 浜松アクトシティコンgresセンター, 2014.10.23
- ③ Hamasaki, K., Kaneko, R., Arai, W., Toyoda, A., Fujiyama, A., Honda, M., Takami, H. (2014) Variability of bacterioplankton metabolic potentials in the western North Pacific time-series stations, K2 and S1. 15th ISME meeting, Soul, Aug.24-29
- ④ Hamasaki, K., Kaneko, R., Hideto Takami, (2013) Metagenomic evaluation of metabolic potential in microbial communities: stability and variability in the western North Pacific, International Symposium on Aquatic Metagenomics, Tokyo, 2013.11.23
- ⑤ Kaneko, R., Uchimiya, M., Hideki, F., Suzuki, S., Ogawa, H., Nagata, T., Honda M., Hamasaki, K. (2013) Comparison of particle-associated and free-living archaeal communities in the western North Pacific

Ocean. The 13th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Stresa in Italy, Sept.

- ⑥ Kaneko, R., Uchimiyu, M., Fukuda, H., Suzuki, S., Ogawa, H., Nagata, T., Honda, M., Hamasaki, K. (2012) Temporal dynamics of the microbial community structure in dark ocean of the western north pacific. 14th ISME meeting , Copenhagen, Aug.

[図書](計2件)

- ① 浜崎恒二・木暮一啓 編(2015)『水圏微生物学の基礎』恒星社厚生閣 pp.280 (分担執筆と編集) 濱崎 恒二, 木暮 一啓, 澤 辺智雄, 澤辺 桃子, 鈴木聡, 砂村 倫成, 永田 俊, 春田 伸, 福田 秀樹, 美野 さやか, 和田 実
- ② 浜崎恒二 (2014) 「59 微生物ループ」 「66 磯の香りと微生物」日本微生物生態学会(編)『環境と微生物の事典』朝倉書店 pp. 432 (分担執筆と編集)

[その他]

ホームページ等

次世代メタゲノム解析システム

Metabolic And Physiological potential Evaluator

MAPLE-2.1.0 無料公開サイト

<http://www.genome.jp/tools/maple/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜崎 恒二 (HAMASAKI, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号: 80277871

(2) 研究分担者

高見 英人 (TAKAMI, Hideto)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海

底資源研究開発センター・上席研究員

研究者番号: 70359165