

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24121004

研究課題名（和文）分子生物地理からの新海洋区系

研究課題名（英文）Establishment of New Ecozones in the Oceans by Meta-genetic Community Analysis

研究代表者

津田 敦 (Tsuda, Atsushi)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：80217314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 102,100,000円

研究成果の概要（和文）：微生物、植物プランクトン、動物プランクトンを対象として、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、海洋生物の生物地理、多様性の解明を目的とした。細菌、古細菌、珪藻、ハプト藻、カイアシ類については、その手法が確立され、顕鏡などを用いた従来法に比べ、分析時間は1/10以下となり、分析者の経験などにも左右されない手法が開発された。この手法を用いて、広域太平洋の試料を分析した結果、植物プランクトン、動物プランクトンはほぼ海流系に一致する分布パターンが確認されたが、細菌、古細菌では、地理的な差よりは、付着性・自由生活性の差が大きく、他生物群とは異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to clarify the biogeography and biodiversity of micro-organisms, phytoplankton and zooplankton by meta-genomic method using a high throughput sequencer. The metagenomic methods have established for bacteria, archaea, diatoms, haptophytes and calanoid copepods, which were ten-times faster than classical method such as microscopic one without effects of individual's skills and experiences. Using these methods for samples collected from wide areas of the Pacific, we found that phytoplankton and zooplankton were distributed along with the surface current system. However, bacteria and archaea were more effected by their life styles (free-living and attached).

研究分野：生物海洋学

キーワード：生物多様性 メタゲノム 生物地理 プランクトン

## 1. 研究開始当初の背景

微生物を含むプランクトンは採集が容易で、環境変化や生物群集の特徴を把握するのに最も適した海洋生物群であるが、微小な生物であるため、形態による同定は不可能であったり、専門的な知識と多大な分析時間を要していた。近年、メタゲノミクスと呼ばれる環境DNA試料を対象とした網羅的な塩基配列解読によって、環境中の未培養微生物のゲノム情報が急速に蓄積されつつあり、一部では環境微生物ゲノムのデータベース構築も進められている。これまで、環境ゲノム情報は、他の環境情報に比べて高価なため、その蓄積速度は比較的遅かったが、近年、従来法の百倍の解析速度と低ランニングコストを実現し、現在でも日進月歩の進化を遂げている超並列シーケンス技術が登場したことによって状況は一変した。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、微生物、植物プランクトン、カイアシ類の3生物群を対象に、超並列シーケンサーを用いた大量遺伝子解読により、各生物群の群集解析、生物地理、生理活性の地理的変異を解明することを目的とした。微生物や一部の植物プランクトン分類群では、網羅的解析手法が開発されていたが、動物プランクトンでは開発されておらず、対象とする遺伝子領域の選定などの手法開発を、目標の第一段階とし、最終的には、広域太平洋における3分類群の生物地理をメタゲノミクスで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物プランクトン群集

カイアシ類群集では rRNA ラージサブユニット 28S の D2 領域を網羅的解析の候補遺伝子マーカーとし、形態分類に基づく結果を比較し検証を行った。この手法を用いて 97% の相同性で OTU (Operational Taxonomic Unit) への分類を行うと、形態分類と同レベルの分解能を維持しつつ、解析エラーを除去できることがわかった。蒼鷹丸 SY-11-5 航海および白鳳丸 KH-11-10、KH-12-1 航海で試料を採集し、確立された群集構造手法を用い、太平洋熱帯・亜熱帯を対象としたカイアシ類の群集構造解析を行った。さらに、白鳳丸 KH-13-7、KH-14-3 の太平洋縦断航海にて得られた西経 170 度線上 (40°S-68°N) の試料の解析を行った。採集は上記の目合い 100  $\mu\text{m}$  の VMPS ネットを用い、表層 (0-200 m) および中層 (200-500 m, 500-1000 m) の 3 層から試料を採集した。各試料から全 DNA を抽出し、PCR による 28S 領域の増幅後、Roche 454 FLX により配列を明らかにした。エラー配列の除去後、カイアシ類由来の 28S D2 配列が得られ

た、

### (2) 微生物群集

2011 年から 2014 年までに行われた白鳳丸航海 4 航海 (KH11-10, KH12-1, KH13-7, KH14-3) に参加し、北緯 68 度から南緯 40 度、水深 0 m から水深 5472 m の 128 の海水サンプルを採取した。細菌群集は 2 種類のフィルターをろ過して採取した。付着性細菌群集は孔径 3.0  $\mu\text{m}$  のフィルターで採取されたもの、自由生活性細菌群集は孔径 3.0  $\mu\text{m}$  のフィルターを抜け、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで採取されたものと定義し、合計 256 個の細菌群集サンプルについて解析を行った。細菌群集のフィルターサンプルから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V1V3 超可変領域を PCR によって増幅し PCR 産物を 454 パイロシーケンシングによって解読した。獲得した配列を相同性 97% でクラスタリングし、そのまとめられた配列群を OTU として便宜的な種とした。16S rRNA 遺伝子の配列数と OTU 数をもとに多様性解析および群集構造解析を行った。

### (3) 植物プランクトン群集

本研究では、学術研究船白鳳丸の KH-12-3 (2012 年 7 月 6 日-8 月 14 日)、KH-13-7 (2013 年 12 月 11 日-2014 年 2 月 12 日)、および KH-14-3 (2014 年 6 月 23 日-8 月 11 日) 次研究航海で採取した DNA 試料を用いて調査した。表層 (0-10 m) およびクロロフィル亜表層極大 (DCM) 層から得た海水試料を 10  $\mu\text{m}$  と 0.2  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて、サイズ分画濾過を行い、試料を得た。次世代シーケンサー (Ion Torrent PGM) を用いたアンプリコンシーケンス (メタバーコーディング) により、各系統 (珪藻類、ハプト藻類、単細胞性シアノバクテリア) の 18S rRNA 遺伝子 V4 領域の配列を取得した。得られた配列は DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録した (DRA004899-DRA004901)。配列の品質検査等は FASTX-Toolkit を用いた。その後、SILVAngs のパイプラインを用いて参照配列 (Release 119) との類似度 ( $\geq 97\%$ ) に基づき系統分類を行った。珪藻類とハプト藻類の多様性は、シャノンインデックス ( $H'$ ) より評価した。この際、属レベルに基づく評価とソフトウェア Mothur を用いて見積もった OTU 組成に基づく評価を実施した。また、クラスタ分析により各藻類群集の海域区分を、冗長性分析 (RDA) を用いて各海域の群集構造に与える環境要因を推定した。

## 4. 研究成果

### (1) 動物プランクトン群集

カイアシ類を用いた研究では、黒潮内側域は特有の群集構造を示し、沿岸性の生態系であることが示唆された(図1)。その他の測点は赤道・黒潮グループと亜熱帯循環グループに大別された。冗長分析による環境要因との比較により、クロロフィル a 濃度が影響していることが示され、生産性の違いがカイアシ類の群集構造に影響を与えていると考えられた。OTU 数、多様度指数は亜熱帯循環域で高く、多種の棲み分けにより多様性が維持されていると考えられ、過去の知見と一致した。

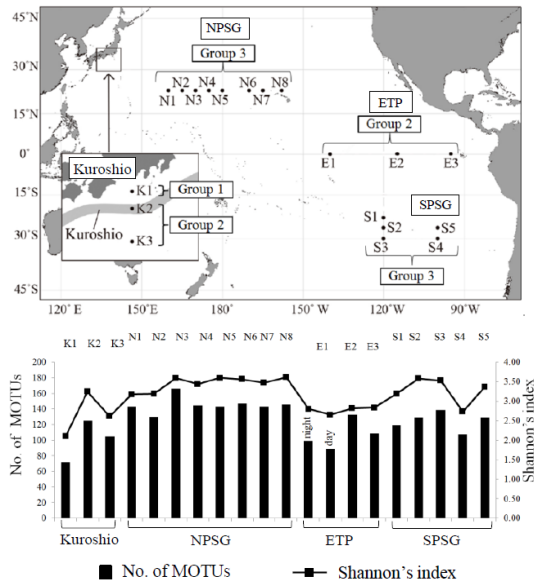


図1. 太平洋熱帯・亜熱帯海域の動物プランクトン群集を用いた網羅的解析による OTU 数、多様度指数、クラスター解析によるグループの分布

また、黒潮・赤道域の多くの OTU は、北太平洋亜熱帯循環内にも見られ、OTU 数は北太平洋亜熱帯循環で最大の値が示された。多様性解析の結果、表層では従来の知見の通りに熱帯亜熱帯の低緯度域で OTU 数が多く、高緯度域に向かうにつれて減少した(図2)。

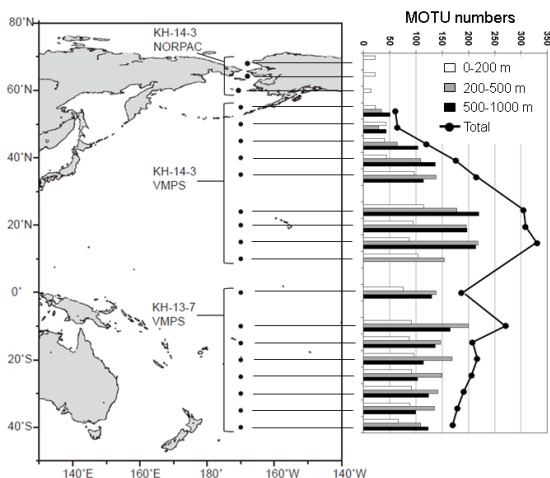


図2. カイアシ類 OTU 数の緯度変化

この変化は比較的環境の均一な中層でも観察され、中層は表層生態系の影響を受けてい

ると考えられた。多様度指数からも同様の緯度変化が示され、餌料の乏しい低緯度域では特定の種が優占せず、より複雑な生態系が形成されることが示唆された。最大の OTU 数は北太平洋亜熱帯循環で観察されたが、異なる中層水の存在などの複雑な水塊構造が南北亜熱帯域の多様性の差に表れていると考えられた。中層の OTU 数は表層よりも高い値が得られたが、塩基配列の多様度は表層に比べて低く、特定の分類群の適応放散により現在の高い種多様性が形成されたと考えられた。また、各 OTU の分布をもとにした群集構造解析では表層、中層ともに緯度変化に応じた群集の変移が見られた。中でも群集構造は亜熱帯循環を境とし、低緯度域と高緯度域で大きく分かれ、この差は暖水域に分布する OTU と冷水域の OTU の分布パターンに対応した。この分布パターンの結果を OTU の系統解析結果と比較したところ、各科内等の分類群の中で高緯度域のグループの分化が比較的新しく起こったことが明らかとなった(図3)。このことから、カイアシ類は数千万年単位の進化の歴史の中で、寒冷化に伴う環境の緯度勾配の形成に伴い高緯度域へ進出をしたと考えられる。一方、低緯度域は長い進化の歴史の中でニッチの細分化が起き、現在の複雑な生態系の中で高い多様性が維持されていると考えられた。以上の結果から、カイアシ類の多様性や分布は現在の海洋環境のみならず進化的な要素が大きく影響していることが示された。

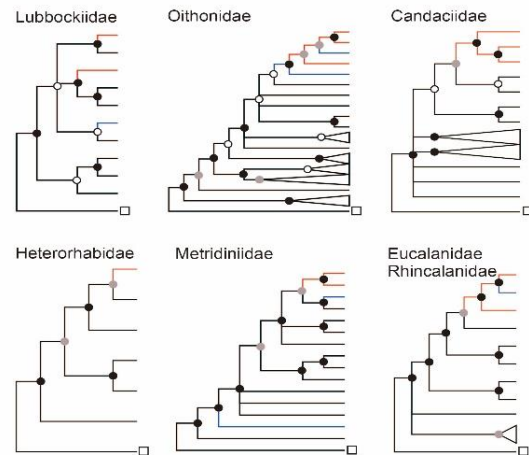


図3. ベイズ法による系統解析  
各科内の OTU の代表配列が使用され、冷水域、移行域に分布する OTU はそれぞれ赤、青色で表されている。

## (2) 微生物群集

本研究で、1,387,432 の細菌 16S rRNA 遺伝子の配列を得ることができた。OTU 数は 18,103 で太平洋には約 2 万種の細菌が生息していることが示された。シン普森指数によって多様度を見積もったところ、すべての観測点と深度において、付着性群集の方が自由生活性群集よりも多様性が高くなっていた。また、表層の付着性細菌群集の多様性は、低

緯度・高水温で高く高緯度・低水温で低い傾向が見られたが、自由生活群集ではそのようなパターンは見られなかった(図4)。さらに、深度別の解析を行ったいずれの点において

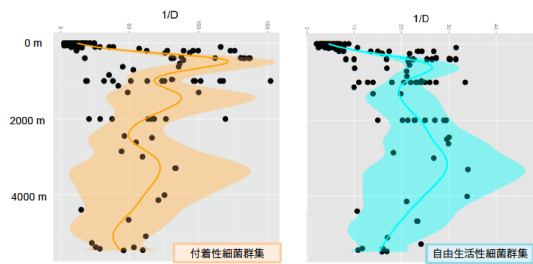


図4. 大太平洋南北トランセクトにおける細菌群集多様性の鉛直パターン

も、表層から400mまで多様性が増加し、さらに深層に向けて減少するか(付着)、ほぼ同程度の多様性(自由)となった。このような細菌群集多様性の鉛直パターンはこれまで報告されていない。細菌群集メタゲノム解析によって同定された遺伝子について、KEGGモジュール解析システム(MAPLE)を用いてモジュールの充足率、頻度、由来微生物種のデータを得た。充足されているモジュール(機能)の種類とヒット数をもとに、その機能プロファイルの類似度をサンプル間で比較したところ、海域の違いに関わらず浮遊生活群集と粒子付着性群集で有意に二分された。このことから、浮遊生活と付着生活では群集全体がもつ機能ポテンシャルが大きく異なることが分かった(図5)。さらに、この違いに大きく寄与した機能を調べるために、類似度百分率分析(SIMPER)を行ったところ、鉄、亜鉛、リン酸、アミノ酸、糖

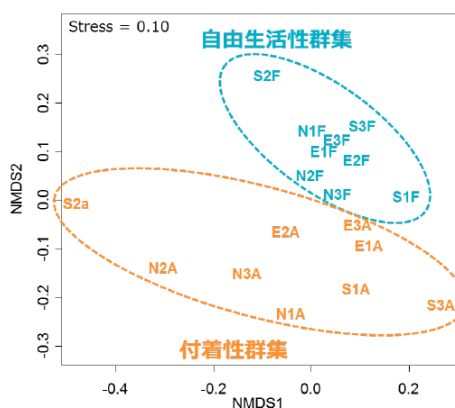


図5. 付着性と自由生活性細菌群集がもつ機能ポテンシャルの観測点間比較

などの膜輸送系モジュールのヒット数に大きな違いが見られた。

海洋の優占系統群である *Prochlorococcus* (24株)のゲノムデータへマッピングした結果を用いて、海域間の群集機能の違いについての詳細な解析を行った。得られた試料から

DNAを抽出し、MiSeqによる250bpペアードエンドシーケンスを行い、試料あたり1000~2000万(平均1360万)リードの配列情報を得た。遺伝子領域を推定した後、*Prochlorococcus* 系統群24株の既知ゲノム配列へのマッピングを行った。その結果、3海域で優占的に分布する *Prochlorococcus* の種類が異なることが示された(図6)。また、ゲ

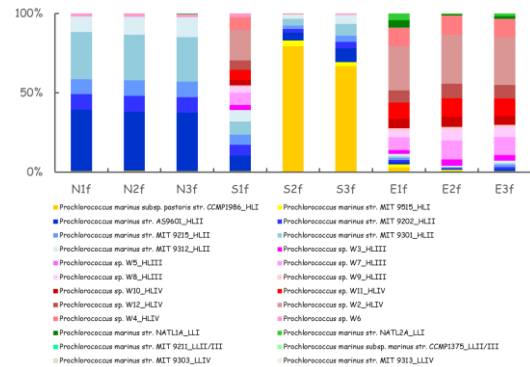


図6. 各観測点におけるメタゲノムリードを既知の *Prochlorococcus* ゲノムにマッピングした結果。異なる色で、一致した株の違いとそれぞれの割合を示している

ノム既知の株がこれらの海域にどの程度分布しているのかを、アンプリコン解析のデータから推定したところ、自由生活性群集のうち北太平洋の亜熱帯海域で40-50%、南太平洋亜熱帯海域で10-30%、赤道域で10-20%程度であった。さらに、付着性群集では、これらの値の半分程度であった。これらの結果は、実際の現場海中には未培養の株が多く分

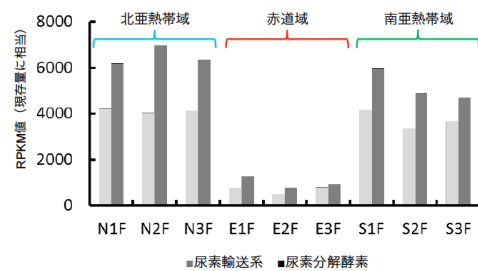


図7. *Prochlorococcus* のマッピングデータから尿素輸送タンパク質と同分解酵素のRPKM値を集計した値の海域間比較

布しており、特に南太平洋亜熱帯海域や赤道域、付着性群集に多いことを示唆している。次に、それぞれの海域で最も多くマッピングされた株のゲノム情報を比較し、それぞれに特徴的な機能を抽出した。得られたリードが最も多くマッピングされた株は、いずれも強光適応株であり、南太平洋亜熱帯海域では *P.marinus* MED4/CCMP1986株、北太平洋亜熱帯海域では *P.marinus* MIT9301株、赤道域では *Prochlorococcus* sp. W2株であった。機能比較の結果、MED4/CCMP1986株に特徴的な機能として窒素化合物の輸送タンパク質および同加水分解酵素、MIT9301株に特徴的な機能として TypeIV 分泌装置が抽出された。



さらに、メタゲノム全体の海域間比較から、尿素輸送に関わるモジュールが亜熱帯海域でより高頻度に存在することが示されたため、*Prochlorococcus* のマッピングデータから尿素輸送タンパク質と同分解酵素の RPKM 値を集計し、海域間で比較したところ、亜熱帯海域で高く赤道域で低いことがわかった (図 7)。このことは、亜熱帯のような貧栄養海域における代替窒素源として尿素が重要であることを示唆している。

### (3) 植物プランクトン群集

太平洋の広域から採集した縦・横断航海試料を解析した。解析には、開発した珪藻とハプト藻に対するメタゲノム解析に加え、検証のため顕鏡観察を加えた。珪藻群集に関しては、亜寒帯域と熱帯域で主に *Pseudo-nitzschia* 属が優占したが、温帯域では *Nitzschia* 属が、亜熱帯域では *Mastogloia* 属が最優占し、緯度帯毎に珪藻類の群集構造が明確に異なっていたことが示された (図 8, 9)。また、中低緯度域において相対的に珪藻類の多様性指数が高くなった。ハプト藻群集に関して暖海

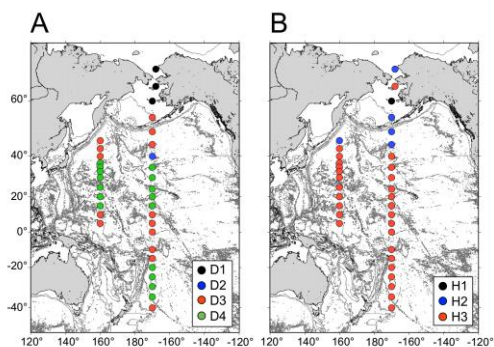


図 8. 表層における珪藻類 (A) とハプト藻類 (B) の群集組成の類似性に基づく観測点の分類。

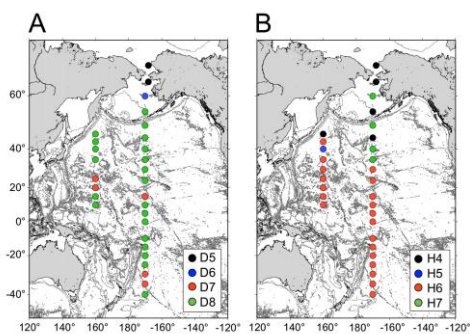


図 9. DCM 層における珪藻類 (A) とハプト藻類 (B) の群集組成の類似性に基づく観測点の分類。

域における詳細な分布を検討するため KH15-4 次航海において黒潮にそった台湾沖から本州に至る連続表層採集において解析を行い海域での同遺伝子断片数は、 $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  copy  $L^{-1}$  の範囲にあり、比較的一定で

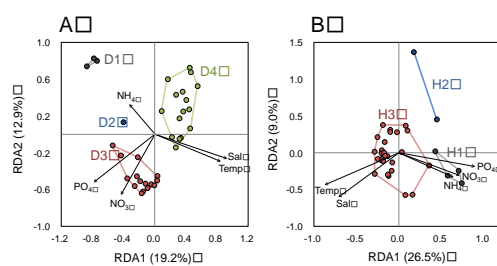


図 10. RDA による表層における珪藻類 (A) とハプト藻類 (B) の群集組成と環境因子との関係

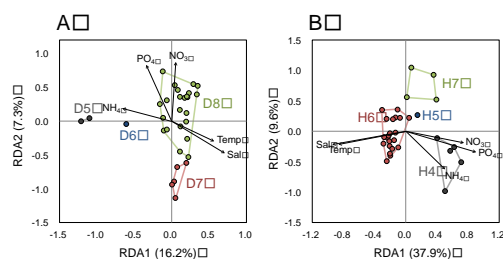


図 11. RDA による DCM 層における珪藻類 (A) とハプト藻類 (B) の群集組成と環境因子との関係。

あった。しかし、ハプト藻類組成は空間的に大きく変化し、黒潮上流では *Plymnesium* 属 (Clade B1) や *Chrysochromulina* 属 (Clade B2) が多く存在していたが、黒潮下流では *Phaeocystis* 属 (Clade A) が主に優占した。一方、円石藻が属する Clade C は、同航海期間中、非主要グループであったことが判明した。以上の結果から、珪藻とハプト藻では地理分布が大きく異なり、各生物群の生活様式が関係していることが示唆されたが、その地理分布はおおむね従来の海流系に依存した生物区と矛盾がないことが明らかになった。

また、RDA によって各藻類の群集構造の変動と最も関わりの強い環境因子を推定したところ、表層 (図 10A) の珪藻類組成は主に塩分とリン酸塩濃度、DCM 層 (図 11A) の珪藻類組成は主に塩分、硝酸塩、リン酸塩で説明された。一方、表層のハプト藻類組成は主にリン酸塩濃度、水温、アンモニア濃度 (図 10B)、DCM 層のハプト藻類組成は主にリン酸塩、塩分、硝酸塩濃度 (図 11B) で説明された。各藻類の生態学的特性の違いに加え、外部環境要因の変化に対する群集応答の違いが、珪藻類とハプト藻類の地理分布を規定していた可能性が考えられた。しかしながら、主要栄養塩や水温、塩分などの環境変数から説明できる群集構造の変動は両系統とも全体で 50% 未満であり、その他の要因が群集の形成に大きく寄与していたことが示唆された。特に、捕食や資源獲得競争などの生物間相互作用が植物プランクトンの多様性に与える影響は現在ほぼ知見がなく、今後明らかにするべき課題である。

## 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 57 件)

- ① Suzuki, K., A. Hattori-Saito, Y. Sekiguchi, J. Nishioka, M. Shigemitsu, T. Isada, H. Liu, and R. M. L. McKay (2014) Spatial variability in iron nutritional status of large diatoms in the Sea of Okhotsk with special reference to the Amur River discharge. *Biogeosciences*, 11, 2503-2514, doi: 10.5194/bg-11-2503-2014. (査読有)
- ② Endo, H., K. Sugie, T. Yoshimura, and K. Suzuki (2015) Effects of CO<sub>2</sub> and iron availability on rbcL gene expression in Bering Sea diatoms. *Biogeosciences*, 12, 2247-2259, doi: 10.5194/bg-12-2247-2015. (査読有)
- ③ Endo, H., K. Sugie, T. Yoshimura, and K. Suzuki (2016) Response of spring diatoms to CO<sub>2</sub> availability in the western North Pacific as determined by next-generation sequencing. *PLOS ONE*, 11, e0154291, doi:10.1371/journal.pone.0154291. (査読有)
- ④ Hamasaki, K., A. Taniguchi, Y. Tada, R. Kaneko, and T. Miki (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 (査読有)
- ⑤ Hirai J, and Tsuda A., (2015). Metagenetic community analysis of epipelagic planktonic copepods in the tropical and subtropical Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 534: 65-78, DOI: 10.3354/meps11404 (査読有)
- ⑥ Moore, C.M., Tsuda 20 番目他 20 名(2014) Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geoscience* 10., DOI: 10.1038/NNGEO1765 (査読有)
- ⑦ Tsuda, A. H. Saito, H. Kasai, (2014) Vertical distributions of large suspension-feeding copepods in the Oyashio region during their growing season. *J. Oceanogr.* 70:123-132. DOI: 10.1007/s10872-013-0214-4 (査読有)

[学会発表] (計 72 件)

- ① Hamasaki, K. Distribution and phylogeny of anaerobic ammonia-oxidizing (ANAMMOX) bacteria in a water column of the central Pacific Ocean. *International Symposium on Microbial Response to Ocean Deoxygenation*, National Institute of Oceanography Goa, India, 2016 年 12 月 3-5 日、(invited)
- ② Suzuki K., Toward the establishment of biogeography of phytoplankton groups in the

Pacific Ocean using high-throughput UHPLC pigment analysis and NGS technology. *Gordon Research Conferences 2015 – Marine Molecular Ecology*, 2015 年 8 月 4 日, 香港科技大学(invited)

- ③ Tsuda A. (2017) Research cruise coordination and MSR in AORI. 国際シンポジウム「国家管轄権外区域の海洋生物多様性の保全及び持続可能な利用と海洋法の将来」笹川平和財団ビル 2017 年 1 月 30 日、(invited)

[図書] (計 6 件)

- ① 津田敦・森田健太郎 編・著 (2016)「海洋生態学」共立出版 305pp

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 濾過採取装置

発明者: 鈴木光次、大江亮一、大廣洋

権利者: 東洋濾紙株式会社 (発明者: 大江亮一・寄与率 25%、大廣洋・寄与率 25%)・北海道大学 (発明者: 鈴木光次・寄与率 50%)

種類: 特願

番号: 2016-02768

出願年月日: 平成 28 年 2 月 16 日

国内外の別: 国内出願

[その他]

ホームページ等

<http://ocean.fs.a.u-tokyo.ac.jp/group01.html>

<http://ocean.fs.a.u-tokyo.ac.jp/forpublic3.html>

<http://ocean.fs.a.u-tokyo.ac.jp/essay2.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 敦 (TSUDA, Atsushi)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号: 80217314

(2) 研究分担者

鈴木 光次 (SUZUKI, Koji)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号: 40283452

(3) 研究分担者

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

(4) 研究協力者

平井 惇也 (HIRAI, Junya)

遠藤 寿 (ENDO, Hiroshi)

鈴木 翔太郎 (SUZUKI, Shotaro)

立花 愛子 (TACHIBANA, Aiko)