

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200029

研究課題名（和文）超並列シーケンサーが描く未知の海洋微生物圏の多様性とダイナミクス

研究課題名（英文）Diversity and dynamics of unexplored marine microbiome described by massively parallel sequencing

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、従来法の百倍の解析速度を有する 454 パイロシーケンス法及びハロゲン化ヌクレオシドをトレーサーとする増殖活性測定法を利用するなどして、大洋スケールでの海洋細菌群集構造のダイナミクスを明らかにした。現状では、系統解析を行うには短すぎるリード長や、シーケンスエラーによる見かけの多様度増大の問題など、さらに検討すべき課題も指摘されているが、16SrRNA 遺伝子の大量リードによって、予想以上に多様かつ活発に増殖する稀少細菌グループの存在が明らかとなってきた。

研究成果の概要（英文）：In this study, ocean basin-scale dynamics of microbial communities has been revealed with the use of 454 pyrosequencing technology and nucleoside tracer techniques. Although there are some caveats against insufficient read length and diversity inflation due to sequencing errors, deep sequencing of 16S rRNA genes shows the presence of diverse rare taxa and their active growth in seawater environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2010 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
年度			
総計	24,600,000	7,380,000	31,980,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：微生物・多様性

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト全ゲノム解読に象徴される近年のゲノム解析及びその周辺技術の急速な進展によって、ゲノム解析そのものよりも大量のゲノム情報から必要な情報を抽出するアルゴリズムや、データベースに蓄積された情報を有効に利用した新しい研究アプローチの重要性が高まっている。環境中に生息する微生物は、そのほとんど（おそらく99%以上）が難培養であるため、環境試料から微生物群集DNAを直接回収することによって種組成や分布が明らかにされてきた<sup>(1)</sup>。最近では、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<sup>(2)</sup>。これら環境ゲノムデータベースの特徴は、ゲノムデータだけでなくそれに付随する環境情報（日時、緯度、経度、その他物理・化学・生物環境パラメータ等）いわゆるメタデータが整備されようとしている点である。また、近年の衛星観測網や全海洋に整備されつつあるフロート観測網<sup>(3)</sup>によって、ほぼリアルタイムで海洋環境の基本情報を居ながらにして得ることができるようになりつつある。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、数年前に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<sup>(4)</sup>。超並列シーケンス技術は、生命科学や医療に一大変革をもたらすと同時に、環境ゲノムデータの情報量を爆発的に増大させると予想される。つまり、生物あるいは生物の遺伝情報とその生息環境との関係について理解しようとする場合、少なくとも海洋微生物に関しては全地球規模の生態系システムの中で比較解析してゆく時代が到来しつつある。さらに、テーラーメイド医療が実現するような時代となれば、多くの海洋生物のゲノム配列データがメタデータとセットで利用可能となるだろう。そうなれ

ば、ゲノムから生態系システムまでをも包含する全く新しい境界学問領域が出現することとなる。これまでとは全く異なる研究アプローチが可能となるであろうし、そのための基盤を整えることが必要となる。

- (1) <http://www.nature.com/nrmicro/focus/marinemicrobiology/index.html>
- (2) <http://camera.calit2.net/>
- (3) <http://www-argo.ucsd.edu/>
- (4) <http://www.sciencemag.org/cgi/content/summary/311/5767/1544>

### 2. 研究の目的

本研究では、従来法の百倍の解析速度を有する新しい遺伝子塩基配列決定技術、超並列シーケンスを利用することによって、技術的に困難とされてきた稀少細菌種を含む海洋細菌群集の多様性を網羅的に明らかにする。まず、南北両極域を含む太平洋全海域をカバーする環境DNAコレクションを解析対象として、未知の微生物圏の大洋スケールでのダイナミクスを明らかにする。さらに、独自開発の解析技術（ヌクレオシドトレーサー法）を駆使することによって、稀少細菌種の多様性のみならず、その環境変化に応じた増殖応答や鍵種、優占種の動態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

2004年12月～2005年3月の白鳳丸KH04-5次航海における南太平洋赤道域、亜熱帯域、亜寒帯域及び南極海域の17観測点で採取された試料を用いた。表面海水をバケツ採水したものにBrdU (20 nM) を添加し、現場温度で5～10時間インキュベートすることによって活発に増殖しDNA合成を行っている細菌群の標識を行った。標識後ただちに、孔径0.2µmのメンブレンフィルターを用いて濾過を行い、試料海水中の細菌群集を捕集した。捕集したフィルターは、冷凍状態(-20℃)で研究室に持ち帰った。分析にあたっては、冷凍状態のフィルターを直接処理し、フィルター上に捕集された細菌群集由来の

DNA を抽出、精製した。さらに、抗 BrdU 抗体と磁気ビーズを用いた免疫学的手法により、この抽出 DNA から BrdU 標識 DNA を分取した。

環境パラメータとして、水温、塩分、溶存酸素、栄養塩、クロロフィル a 濃度、細菌数、細菌生産速度の測定を行った。また、抽出した DNA 試料について、16S rRNA gene PCR-DGGE 法による群集構造解析を行った。DGGE バンドパターンのクラスター解析の結果から、熱帯、亜熱帯、亜寒帯、南大洋に類別し、各 1 地点について 454 パイロシーケンス法による稀少微生物圏の解析を行った。同時に、データトリミング、アラインメント、クラスタリングなど、一連の解析に必要なツールの検討を行い、16Sr RNA 遺伝子大量リードに使用するパイプラインの構築を行った。さらに、得られた環境データと微生物種 (OTU) の出現頻度データを合わせて、多変量解析による群集構造変動要因の推定を行った。

#### 4. 研究成果

南太平洋南北縦断観測によって採集されたトランセクト試料の PCR-DGGE 解析により、表層海水中の細菌群集構造は、赤道、亜熱帯、亜寒帯、南大洋の 4 パターンにクラスタリングできることがわかった (図 1)。

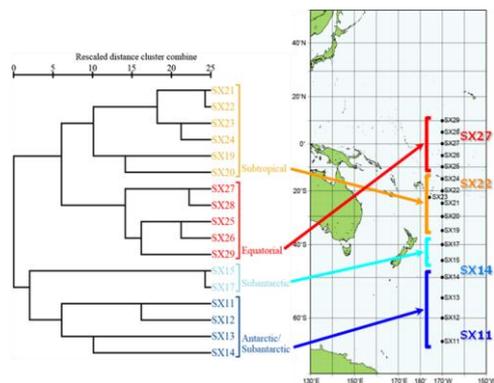


図 1. 観測点位置と PCR-DGGE 法による細菌群集構造のクラスタリング

赤道、亜熱帯、亜寒帯、南大洋 4 点の海水試料につき、約 17 万リードに及ぶ 16SrRNA 遺伝子 V6 領域の配列情報を取得し多様性解析を行ったところ、各点につき 300-1000 のユニークな OTU (Operational Taxonomic Unit) を見出すことができた。見出された

OTU の約 70%は、出現頻度が 0.015%以下の稀少な細菌グループによって構成されており、ハロゲン化ヌクレオシドをトレーサーとする増殖活性解析によって、これら稀少細菌グループの少なくとも約 20-50%は、休眠状態ではなく活発に増殖していることがわかった (図 2)。現状では、系統解析を行うには短すぎるリード長や、シーケンスエラーによる見かけの多様度増大の問題など、さらに検討すべき課題も指摘されているが、454 パイロシーケンス法を利用した 16SrRNA 遺伝子の大量リードによって、予想以上に多様な稀少細菌グループの存在が明らかとなってきた。

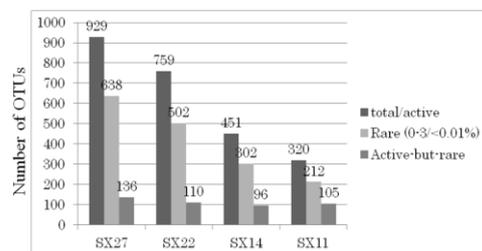


図 2. 各観測点における細菌群種の OTU 数。棒グラフの左から順に全 OTU 数、出現頻度 0.015%以下の稀少種の OTU 数、稀少種の中で増殖活性をもつ OTU 数

各観測点における群集構造の変動に対して、得られた環境データを制約条件とする冗長性解析を行ったところ、水温及び溶存酸素濃度と最も良い相関を示すことがわかった。溶存酸素濃度は水温に依存することから、群集構造の変動と水温が直接的な相関関係にあるものと考えられる (図 3)。

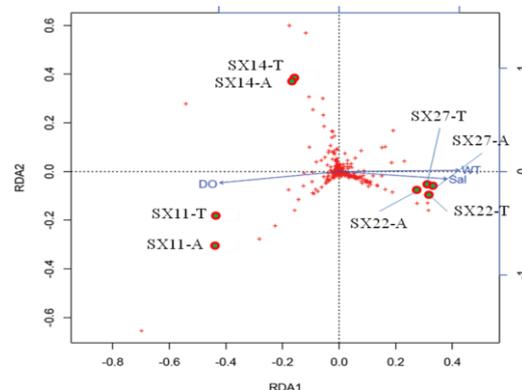


図3. 細菌群集構造と環境パラメータの冗長性分析による主成分プロット. WT: 水温, DO: 溶存酸素濃度

さらに、物理的な分散の効果と環境適応の効果を比較するために、観測点間の距離を制約条件に加えて回帰分析を行い、variation partitioning による解析を行ったところ、環境適応の効果で8割の回帰を説明でき、残りの2割は未知の要因によって決定されていることが示された(図4)。以上のことから、赤道、亜熱帯、亜寒帯、南大洋では、地理的に大きく離れた点であり、有機物濃度や栄養塩濃度にも大きな変動があるが、水温が細菌群集構造の変動に最も強く影響する要因であることが示唆された。

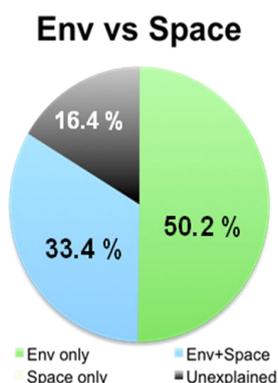


図4. Variation partitioningによる群集構造決定要因の解析. チャート内の数字は、環境のみ、環境と空間、未知要因によって群集構造がどの程度回帰できるかの割合を示す。空間のみでは有意な回帰はできない。

#### 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 10 件)

英文のものは査読有、和文は査読無し

1. Tada, Y., Taniguchi, A. and Hamasaki, K. (2009) "Phylotype-specific productivity of marine bacterial populations in eutrophic seawater, as revealed by bromodeoxyuridine immunocytochemistry combined with fluorescence in situ hybridization" *Microb. Environ.* 24:315-321
2. Yoshida, N., Nishimura, M., Inoue, K.,

Yoshizawa, S., Kamiya, E., Taniguchi, A., Hamasaki, K. and Kogure, K. (2009) "Analysis of nanoplankton community structure using flow sorting and molecular techniques." *Microb. Environ.* 24:297-304

3. Tada, Y., A. Taniguchi, and K. Hamasaki (2010). Phylotype-specific growth rates of marine bacteria measured by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. *Aquat. Microb. Ecol.* 59:229-238
4. 谷口亮人, 金子亮, 浜崎恒二 (2011) 「メタゲノミクスで見る微生物多様性」遺伝 65 巻 第3号 61-67
5. Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Koji Hamasaki, Kazuhiro Kogure, Akira Yokota. (2010). *Psychrosphaera saromensis* gen. nov., sp. nov., within the family Pseudalteromonadaceae, isolated from Lake Saroma Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 56:475-480
6. Tada, Y., A. Taniguchi, I. Nagao, T. Miki, M. Uematsu, A. Tsuda, and K. Hamasaki. (2011) Differing Growth Responses of Major Phylogenetic Groups of Marine Bacteria to Natural Phytoplankton Blooms in the Western North Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 77:4055-4065
7. Taniguchi, A., Tada, Y. and Hamasaki, K. (2011) Seasonal variations in the community structure of actively growing bacteria in neritic waters of Hiroshima Bay, western Japan. *Microb. Environ.* 26(4):339-46
8. Idichi, M. and Hamasaki K. (2011) Community structure of ammonia-oxidizing marine archaea differs by depth of collection and temperature of cultivation. *J. Oceanogr.* 67:739-745
9. Tada, Y., Taniguchi, A., Sato-Takabe, Y. and Hamasaki, K. (2012) Growth and succession patterns of major phylogenetic groups of marine bacteria during a mesocosm diatom bloom. *J. Oceanogr.* in press
10. 浜崎恒二 (2012) 「光エネルギーをめぐる複雑系: 海洋における微生物群集の動態と光栄養」遺伝 66 巻 第4号

[学会発表] (計 17 件)

1. Hamasaki, K., K. Watanabe, Y. Tada, K. Takahashi, H. Saito, T. Miki (2012) Bacterial community structures in relation to multiple environmental factors in the Kuroshio-Oyashio transition of the western North Pacific. *ASLO aquatic science*

- meeting, Shiga, July12
2. Ijichi, M. and K. Hamasaki (2011) Phylogenetic Position of Oceanic Nitrifiers Demonstrated by Enrichment Cultures. Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology, Gwandju, May12
  3. Okamoto, A., Y. Tada, N. Kasamatsu-Takasawa, R. Kaneko, K. Hamasaki (2011) Bacterial community response to the supply of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the Southern Ocean. Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology, Gwandju, May 12
  4. Hamasaki, K. (2010) Active growth of rare microbes in the ocean. ISME meeting , seattle, Aug 25
  5. Hamasaki, K., Sugimoto, Y., Tada Y. and J. Nishikawa (2010) Microbial degradation and the fate of salps carcasses in the western North Pacific . Asia Oceania Geoscience Society 2010 meeting, Hyderabad July 7
  6. Tada, Y., A. Taniguchi, and K. Hamasaki (2010). Phylotype-specific productivity of marine bacteria in the western North Pacific, measured by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. Asia Oceania Geoscience Society 2010 meeting, Hyderabad, July 7
  7. Tada, Y, Taniguchi A, Hamasaki, K (2009) “Drastic change of the biomass and productivity of major subgroups of bacteria along a steep environmental gradient in the Southern Ocean frontal systems.” SCAR Biology Symposium, Sapporo, July 27
  8. Okamoto, A, Tada, Y, Kasamatsu, N, Hamasaki, K (2009) “Identification of actively growing bacteria in seawater supplemented with dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the Southern Ocean.” SCAR Biology Symposium, Sapporo, July 27
  9. Hamasaki, K., Taniguchi, A “Massively Parallel Sequencing of 16S rRNA V6 Regions Revealed the Diversity of Active-but-Rare Microbial Populations in Oceanic Pelagic Ecosystems” 1st Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology, Jeju, 2009,5.29
  10. Hamasaki, K., Taniguchi, A “Diversity of active microbial communities in surface seawaters along a north-south transect in the South Pacific Ocean” International Census of Marine Microbes 454 Users Spring Meeting, Woods Hole, 2009,4.6-9
  11. 金子亮・内宮万里央・福田秀樹・鈴木翔太郎・渡辺敬吾・小川浩史・永田俊・本多牧生・濱崎恒二「西部北太平洋の生態系／物質循環南北比較研究：観測地点K2、S1の中深層における細菌群集の季節変動」日本海洋学会春季大会2012年3月29日つくば
  12. 渡辺敬吾・多田雄哉・神谷英里子・西部悠太・古谷研・高橋一生・斎藤宏明・濱崎恒二「黒潮続流域における細菌群集構造」日本海洋学会春季大会2012年3月29日つくば
  13. 濱崎恒二・多田雄哉・神谷英里子・西部悠太・古谷研・高橋一生・一宮陸雄・中町美和・笈茂穂・斎藤宏明「黒潮続流域における微生物群集の動態（1）—微生物現存量と有機物量—」日本水産学会秋季大会2011.9月30日長崎
  14. 濱崎恒二・多田雄哉・神谷英里子・西部悠太・古谷研・高橋一生・一宮陸雄・中町美和・笈茂穂・斎藤宏明「黒潮続流域における微生物群集の動態（2）—細菌生産と被捕食速度—」日本水産学会秋季大会2011.9月30日長崎
  15. 濱崎恒二, 佐藤由季, 谷口亮人「海洋における微生物群集の動態と光栄養」日本地球惑星科学連合大会, 幕張,2011,5.26
  16. 伊知地稔・濱崎恒二「集積培養で明らかになった海洋性アンモニア酸化古細菌の生理・生態的特徴」日本海洋学会春季大会, 東京, 2010, 3.28
  17. 濱崎恒二, 谷口亮人「南太平洋から南大洋における稀少微生物圏の多様性」日本微生物生態学会, 広島,2009,11.15
- [その他]  
招待講演 6 件
1. 濱崎恒二「超並列シーケンスによる海洋微生物の多様性解析」CBD ポスト 2010 年に向けた微生物多様性研究（第 58 回日本生態学会企画集会）札幌, 2011.3.12
  2. 濱崎恒二「海洋生態系における微生物の役割：微生物海洋学への展望」微生物群集と生態系をむすぶ：微生物多様性と生態系の多様性の視点から（第 57 回日本生態学会企画集会）東京, 2010 3.16.
  3. 濱崎恒二「微生物多様性研究の新展開：稀少微生物圏の解析と群集形成の要因について」新しい海洋区分の創設に向けた生物地球化学と生態学の統合研究 東京, 2009 12.21.
  4. 濱崎恒二「超並列シーケンスが描く海洋微生物圏の多様性とダイナミクス」環境細菌の動態研究から見える新しい微生物機能（東京大学生物生産工学研究センターシンポジウム）東京, 2009 12.11.
  5. 濱崎恒二「ハロゲン化ヌクレオシドを用

いた海洋微生物の生態研究」宇宙・地球化学と分析化学（第58回日本分析化学会年会特別シンポジウム）札幌，2009.9.24.

6. Hamasaki, K, Taniguchi, A “Diversity of active microbial communities in the South Pacific Ocean revealed by bromodeoxyuridine labeling and 454 tag sequencing technology” DNA Barcoding of Marine Biodiversity (MarBOL), Tokyo, 2009,5.21

## 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) 研究協力者

三木健 (MIKI TAKESHI)

国立台湾大学・海洋研究所・准教授

研究者番号：