

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「Digital DNA chip による生物多様性  
評価と環境予測法の開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成23年12月～平成29年3月

研究代表者：五條堀 孝  
（情報システム研究機構  
国立遺伝学研究所、特任教授）

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

海洋環境の変化をモニタリングの多くは、これまで海洋の物理化学的情報や顕微鏡観察による微生物群集の多様性情報などを収集して行ってきた。本研究開発では、このような既存のモニタリング技術に加えて、海水中の微生物 DNA を直接に単離し、その塩基配列直ちに決定して、海洋微生物多様性の変化を捉える技術を導入し、海洋環境の時系列モニタリングの新たなシステムを構築することを目標として研究開発を行った。行った。

特に、東北沿岸域に観測位置としての定点を定め、従来の海洋の物理環境のモニタリングを行いつつ、海洋生態系の基礎となる海中のメタゲノム解析による微生物叢の長期間にわたるモニタリングを行った。これにより海洋微生物多様性としての微生物叢の現況や今後の遷移方向、さらに赤潮における養殖場のように産業的に海洋環境が被害を受けた場合の環境の回復や修復される状況等を、海洋微生物多様性の観点から研究評価を行い、本研究開発を具体的に進めた。

このような開発目標に対して、①東北海域からの海水試料とその物理化学的情報収集(桑田グループ)、②階層別微生物叢 DNA 抽出法(石野グループ)、③次世代シーケンサーを用いた網羅的な塩基配列決定法(浅川グループ、石野グループ)、④データベースの構築(五條堀グループ、山川グループ)、⑤Digital DNA Chip 解析法(五條堀グループ、山川グループ)、⑥継続的自動海水サンプリング装置の開発(石野グループ、五條堀グループ)、⑦従来法での植物プランクトン分析によるモニタリングとの比較(桑田グループ、河地グループ)、について重点的に研究開発を進めた。このように、これまでに全く無かった新しい手法による環境モニタリング法の開発に向かって、各グループが有機的に連携することによって、海洋メタゲノムデータベース、Digital DNA chip 解析システム、そして自動微生物採集装置が開発構築され、海洋低次生態系の動態や海洋微生物多様性を量的に推定できるプラットフォームが整備された。

以上の成果を用いて、取得されたメタゲノムデータから海洋環境 DNA マーカー選定のための解析を行い、季節変動、水温等の物理情報、微生物分画等と相関がある DNA マーカーの選定に成功した。

最終的には、総リード数 4,622,091,795、総塩基数 693,496,023,218 の塩基配列データを格納した統合的なデータベースを構築した。今後、DNA 配列データの蓄積とその解析により、海洋環境の評価に有用な新たな海洋 DNA マーカーの更なる発見や DNA マーカーの精度向上への加速が期待されるとともに、本研究開発の成果が具体的な海洋環境時間的なモニタリングに役に立つことが明らかになった。

### (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 桑田グループ、石野グループおよび浅川グループの互いの連携により、海水試料を調査船上にてろ過してサイズ分画した後、そこから調製した DNA を直接丸ごと回収して次世代配列解析装置により直ちに解読する手法を開発した。これにより、海洋上に定めた定点より経時的にサンプリングを行い、その海水中に含まれる微生物の DNA の塩基配列を解析するための技術基盤が整った。この技術開発の成功により、五條堀グループによるデータベース構築や Digital DNA Chip 解析法の開発が一つプラットフォームとして繋がった。メタゲノム解析は、現在盛んに行われている手法の一つであるが、本研究のような経時的定点観測に基づいた解析は現時点で世界初のものであると言える。
2. 海洋環境モニタリングのために必要なデータベース構築を行った。特に、時系列の大規模な DNA 配列情報を格納しても問題ない構造をもち、かつ利用者が必要な情報を柔軟に検索し、性能要件の中で容易に必要な情報を抽出できる性能を備えた優れたデータベースが構築された。海水試料採取点の物理化学的データ、海水中に含まれる微生物を大

きさで分画した DNA 配列情報などを整備し、そこから推定される微生物の情報等も、容易に検索ができるデータベースが構築された。

また、本研究領域の木暮チーム、竹山チームとのチーム間連携により、塩基配列データを中心に情報を統合したデータベースへ発展させた。

今後、このデータベースのデータ量を含めてさらに充実させていくことによって、地球環境保全のための有用な基本資産となり、日本国内における海洋データベースのパイオニアとなりうるデータベースを開発した。

3. 全グループから得られたデータおよび知見を集約し、五條堀グループを中心に微生物群集と季節変化の関係を機能遺伝子構成の観点で解析し、山川グループを中心にメタゲノムデータを解析して海洋環境 DNA マーカー (Digital DNA chip) を選定した。これらのメタゲノム解析にて得られた基礎知見や DNA マーカーは、より詳細な微生物群集の変化を捉えることができるので、今後の海洋モニタリング技術の発展へ貢献する。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 本研究で開発している、メタゲノム解析による環境モニタリング手法は、その使用目的に限定されることなく汎用的に利用できる技術提供を目指している。本解析技術は海洋環境モニタリングには直接使えるものではあるが、実は海洋に限らず、サンプル収集部分さえ変えれば種々の陸上環境のモニタリングにも応用できるようになっている。そのような開発を目指して、現在までに環境サンプルからの DNA 採取法とその塩基配列解析法、そしてそれらの保存と活用についての技術的基盤が整った。
2. 本研究開発で得られる成果の活用について、国への提言と各種地方公共団体の試験場や関連企業への技術移転が実現すると、そこから得られてくる多くのデータは、本研究で構築されたデータベースに格納することができ、さらら充実したデータベースとなる。それは、地球上の各種環境保全をサステナビリティとして目指したモニタリングにとっては、極めて重要な知的資産となる。

## § 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### ①「五條堀」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
五條堀 孝	大学共同利用機関法人 情報・システム研究機 構 国立遺伝学研究所	特任教授	H23.12～
池尾 一穂	同上	准教授	H23.12～
明石 裕	同上	教授	H23.12～
松本 薫	同上	研究員	H26.5～
森 隆久	同上	研究員	H24.4～H26.8
岩本 智恵	同上	技術補佐員	H26.4～H26.10
佐藤 行人	同上	研究員	H24.10～H25.1
上原 重之	同上	技術補佐員	H24.10～H25.3
辻本 敦美	日本ソフトウェアマネ ジメント株式会社	主管研究員	H23.12～H24.3
山本 顕次	株式会社日立ソリュー ションズ	部長	H23.12～H24.3

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「石野」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
石野 良純	九州大学大学院農学研 究院	教授	H23.12～
久原 哲	同上	学術特任教員	H24.4～
田代 康介	同上	准教授	H24.4～
金田 敏枝	同上	テクニカルスタ ッフ	H24.5～
今井 奈美子	同上	テクニカルスタ ッフ	H26.4～
石野 園子	同上	研究員	H26.11～
山上 健	同上	助教	H23.12～
峯田 勝彦	アブドラ王立科学技術 大学	研究員	H28.9～
長崎 慶三	国立研究開発法人水 産・教育研究機構 水 産総合研究センター西 海区水産研究所	有明海・八代海 漁場環境研究セ ンター長	H27.4～H28.3
木元 克則	同上	環境保全グルー プ長	H25.4～H27.3
南雲 吉代	九州大学大学院 農学 研究院	テクニカルスタ ッフ	H24.2～H26.3

藤兼 亜耶	同上	テクニカルスタッフ	H24.2～H24.3
-------	----	-----------	-------------

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

③「山川」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
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	H24.7～
辻本 敦美	同上	主管研究員	H24.7～
小野 浩明	同上	社員	H24.7～
吉武 和敏	同上	社員	H25.5～
窪田 俊介	同上	社員	H26.4～
黒瀧 沙英	同上	社員	H25.5～H28.12
松野 恭兵	同上	社員	H28.4～
石森 哲太	同上	社員	H28.4～
長洞 美鹿	同上	社員	H27.4～H28.3
神山 春風	同上	社員	H27.5～H28.3
木村 学	同上	社員	H24.7～H25.3
相場 厚輝	同上	社員	H24.7～H27.1
松野 恭兵	同上	社員	H24.7～H25.3
岩井 孝之	同上	社員	H24.11～H26.3
吉田 裕子	同上	社員	H24.11～H27.2
山崎 久美子	同上	社員	H25.5～H26.3
秋山 聖登	同上	社員	H26.9～H27.2
前田 隼輔	同上	社員	H27.4～H28.3

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
- ・チーム間連携(五條堀チーム、木暮チーム、竹山チーム)の統合データベース構築、開発

④「浅川」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
浅川 修一	東京大学大学院農学生命科学研究科	教授	H23.12～
渡部 終五	北里大学海洋生命科学部	教授	H23.12～
木下 滋晴	東京大学大学院農学生命科学研究科	准教授	H23.12～
服部 正平	早稲田大学理工学術院	教授	H23.12～
五十嵐 洋治	東京大学大学院新領域学術科学創成研究科	研究員	H28.3～

陳 インコン	東京大学大学院農学生命科学研究科	研究員	H23.12～H27.6
金 相完	東京大学大学院新領域学術科学創成研究科	研究員	H24.4～H27.3

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

⑤「桑田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
桑田 晃	国立研究開発法人水産研究・教育機構 東北区水産研究所	グループ長	H23.12～
坂見 知子	同上	グループ長	H23.12～
笥 茂穂	同上	主任研究員	H23.12～
渡辺 剛	同上	研究支援職員	H24.4～
谷内 由貴子	国立研究開発法人水産研究・教育機構 北海道区水産研究所	任期付き研究員	H24.4～
小林 敬典	国立研究開発法人水産研究・教育機構 センター本部	研究コーディネーター	H23.12～
石川 智美	国立研究開発法人水産研究・教育機構 北海道区水産研究所	研究 補助職員	H28.4～
杉崎 宏哉	国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所	グループ長	H24.1～H24.3
加賀 新之助	岩手県水産技術センター	主査専門研究員	H28.3～H28.3
内記 公明	同上	主任専門研究員	H28.3～
加賀 克昌	同上	主査専門研究員	H28.4～

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

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
河地 正伸	国立環境研究所	室長	H23.12～
山口 晴代	同上	研究員	H23.12～
Mary-Helene Noel Kawachi	同上	高度技能専門員	H24.4～H25.3
鈴木 重勝	同上	特別研究員	H28.4～H29.1
片岡 剛文	福井県立大学	講師	H28.4～H29.3

片岡 剛文	国立環境研究所	特別研究員	H26.4～H28.3
出村 幹英	同上	特別研究員	H24.4～H24.6

#### 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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ① 理化学研究所と、本研究にて構築したデータベースを利用した共同研究を開始した。ショットガンメタゲノムデータから新たな遺伝子探索を主軸としたデータ解析を行い、良好な結果が得られている。特に、新たなロドプシン型のタンパク質の発見に至っている。
- ② サウジアラビアの紅海におけるメタゲノム解析による海洋環境のモニタリングの研究開発が、本 CREST の研究開発から 3 年遅れて開始された。紅海は、海水温が非常に高く塩分も高濃度であることから、地球温暖化の影響を強く受けた海洋の有様のモデルとして考えられることが多く、本プロジェクトの交流を行った。特に、紅海の海洋微生物多様性はかなり仙台湾のような日本の海とは異なっており、とくに本 CREST 研究開発で明らかになった四季の季節変動に連動した海洋微生物多様性の時間変化はみられないなど、この研究交流により新たな知見の導出がさかんに行われた。  
また、収集された DNAn の塩基配列データも、本 CREST 研究開発で構築されたデータベースへの統合も準備されつつあり、本研究開発の終了後もその統合化の方向に向かって走り出している。このような国際的な連携が実現した。
- ③ 産業界との連携については、農林水産技術会議委託プロジェクト研究「海洋微生物解析による沿岸漁業被害の予測・抑制技術の開発」との連携が図られて、特に日本近海の養殖業者で結成される組合の要望などが本 CREST 研究開発プロジェクトに伝えられ、それに有用な応用も視野に入れての本 CREST 研究開発が行われた。直接的な産業界との協働には至らなかったが、それを行う素地の醸成には成功したものと考えている。

## § 3 研究実施内容及び成果

3. 1 Digital DNA chip システムによる海洋 DNA マーカーの研究開発(国立遺伝学研究所 五條堀グループ、日本ソフトウェアマネジメント株式会社 山川グループ)

### ①メタゲノムデータベースの開発および運用

#### (1)研究実施内容及び成果

##### ・研究実施内容

本研究のデータベースには、時系列の大規模な次世代シーケンサー情報を格納しても問題ない構造であることや、利用者が必要な情報を柔軟に検索し性能要件の中で情報抽出できる性能が求められるため、要件を満たす外部機能・内部構造の設計を行い、国内における海洋データベースのパイオニアとなりうるデータベースを開発した。

更に、本研究領域の木暮チーム、竹山チームとのチーム間連携により、塩基配列データを中心に統合データベースを開発し、研究終了後もデータを活用するため、早稲田大学へデータベースを移設した。

##### ・研究成果

本研究におけるデータベースを、「1) 各種データを蓄積するデータバンクとしてのメタゲノムデータベース」と、「2) 登録されたデータを利用することを目的とした海洋モニタリングデータベース」の2つに分けて構築する設計とした。

データバンクとしてのメタゲノムデータベースについては、各種項目による情報の絞込み機能を有し、データ一覧ファイルダウンロード機能等の実装を行うとともに、格納するデータ量の規模を年間10テラバイト(2,000 サンプル/年)程度と想定して、以下の通り設計を実施した。

##### [データ調査]

各グループから、登録されるデータの内容や種類およびデータ利用の要望等についてのヒヤリング調査を実施。

##### [メタゲノムデータベース設計]

データ調査の結果に基づき、異なるデータの関連等を精査。各データのリンクやレイアウトイメージの基本設計を行った。

##### [登録するデータ項目]

1) サンプル情報(登録データ作成: 桑田グループ)

採水日、海域、観測点、水深、水深種別(表層、亜表層クロロフィル a 極大)の5項目。

2) 環境情報

サンプル情報に対応した物理化学情報。具体的には、水温、塩分濃度、硝酸態窒素濃度、濾過重量等の27項目。

3) 大型植物プランクトン組成情報(登録データ作成: 桑田グループ)

サンプル情報に対応した大型植物プランクトンの組成情報。顕微鏡により、200種類程度の植物プランクトン細胞数を計測した結果情報。

4) ピコ植物プランクトン組成情報(登録データ作成: 河地グループ)

サンプル情報に対応したピコ植物プランクトンの組成情報。フローサイトメトリにて物理的に分類し、配列解析による多様性解析を行った結果の情報。

5) DNA 抽出情報(登録データ作成: 石野グループ)

サンプル情報に対応した DNA 抽出情報。海水サンプルはフィルターにて4つのフラクションに分離され、各フィルターから抽出された DNA の濃度、回収量等の3項目。

6) メタゲノム塩基配列データ(登録データ作成: 浅川グループ、石野グループ)

サンプル情報に対応したメタゲノム塩基配列データ。

7) その他、塩基配列データ(桑田グループ、河地グループ)

サンプル情報に対応した、多様性解析に使用したアンプリコン塩基配列データ。16S rRNA、18S rDNA、2種類のアンプリコンデータ。



[データバンクとしてのメタゲノムデータベース開発]

データベースは、国際化対応のため日本語・英語の両言語に対応し、前項の項目を一覧で閲覧可能なデータベースを構築した。(図 3.1-1、図 3.1-2、図 3.1-3)

**データベースストップ画面(日英表示)**

**CREST** 研究領域 「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」  
研究課題 「Digital DNA chipによる生物多様性評価と環境予測法の開発」  
戦略的  
創造研究  
事業推進

**海洋モニタリングデータベース**

ログイン情報 : jsmtestuser (JSM)

HOME ホーム DATABASE データベース DDCA デジタルDNAチップ解析 PRIVATE 関係者専用

データベースストップ

海洋モニタリングデータベース

海域評価DNAマーカーデータベース

サンプル処理状況

**CREST - Core Research for Evolutionary Science and Technology - Ocean Monitoring Database**

Login Info. : jsmtestuser (JSM)

HOME ホーム DATABASE データベース DDCA デジタルDNAチップ解析 PRIVATE 関係者専用

Database Top

Monitoring Database	Physicochemical environment and microorganism information of seawater samples
DNA marker Database	Information of DNA markers for sea area evaluation
Samples in processing	The list of samples in processing

図 3.1-1 データベースストップ画面

**CREST** 研究領域 「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」  
 研究課題 「Digital DNA chipによる生物多様性評価と環境予測法の開発」  
 戦略的創造研究事業推進 **海洋モニタリングデータベース**

ログイン情報: jsmtestuser (ISM)

HOME ホーム DATABASE データベース DDCA デジタルDNAチップ解析 PRIVATE 関係者専用

海洋モニタリングデータベース

モニタリング情報

絞り込みオプション 東北海域モニタリングデータ (XLSX) 機器開発サンプルデータ (XLSX) データファイルダウンロードボタン

採水日 From: 2012/04/01 To: 2013/12/31  
 海域 Aline  
 採水地点 A21  
 水深 surface

情報絞り込み機能

一画面表示件数 1000 < 1 > 1 ~ 7件目 / 全7件 絞り込み

Sequence Data the graph of Microbial Populations the raw data of Microbial Populations

採水日	採水時刻	海域	採水地点	水深(m)	水深種別	大型植物プランクトン		Shotgun (filter size (μm))						
						Microscope	18S	ピコ植物プランクトン		< 0.2	0.2 - 0.8	0.8 - 5	5 - 20	20 - 100
2012/05/15		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳		
2012/07/27		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳		
2012/10/06		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳		
2013/01/28		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳	☰ ☱ ☲ ☳			
2013/05/11		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳				
2013/07/20		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳				
2013/10/07		Aline	A21	10	surface					☰ ☱ ☲ ☳				

図 3.1-2 データ絞り込み機能

CREST 研究領域 「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」  
 研究課題 「Digital DNA chipによる生物多様性評価と環境予測法の開発」  
 戦略的創造研究事業推進 **海洋モニタリングデータベース**

ログイン情報: yoshitake (五枝曜チー)

HOME ホーム DATABASE データベース DDCA デジタルDNAチップ解析 PRIVATE 関係者専用

五枝曜チー海洋モニタリングデータベース

モニタリング情報

絞り込みオプション 一画面表示件数 300 < 1 > 1 ~ 161件目 / 全161件 絞り込み

Sequence Data the graph of Microbial Populations the raw data of Microbial Populations the digital DNA chip data

シーケンスデータ (FASTQ)

digital DNAチップデータ

微生物叢データ

採水日	採水時刻	海域	採水地点	水深(m)	水深種別	大型植物プランクトン		ピコ植物プランクトン		Shotgun (filter size (μm))					
						Non Frozen	Frozen	18S (< 5μm)	Bacteria 16S	0.2 - 0.8 μm	over 0.2 μm	0.2 - 0.8	0.8 - 5	5 - 20	20 - 100
2012/03/04															
2012/03/04															
2012/03/11															
2012/03/13															
2012/03/13															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															
2012/04/16															

図 3.1-3 データ一覧画面

[海洋モニタリングデータベース開発]

データ調査結果およびデータ利用上参考となる補足情報等を検討し、メタゲノムデータベースに追加する設計を行った。収集したモニタリングデータの時系列変動パターンや、多地点データから特異的な地点把握できるデータベースを開発した。また、階層が

深い微生物叢データの全情報を視覚化するため、動的な情報表示もできるデータベースを開発した。(図 3.1-4、図 3.1-5)

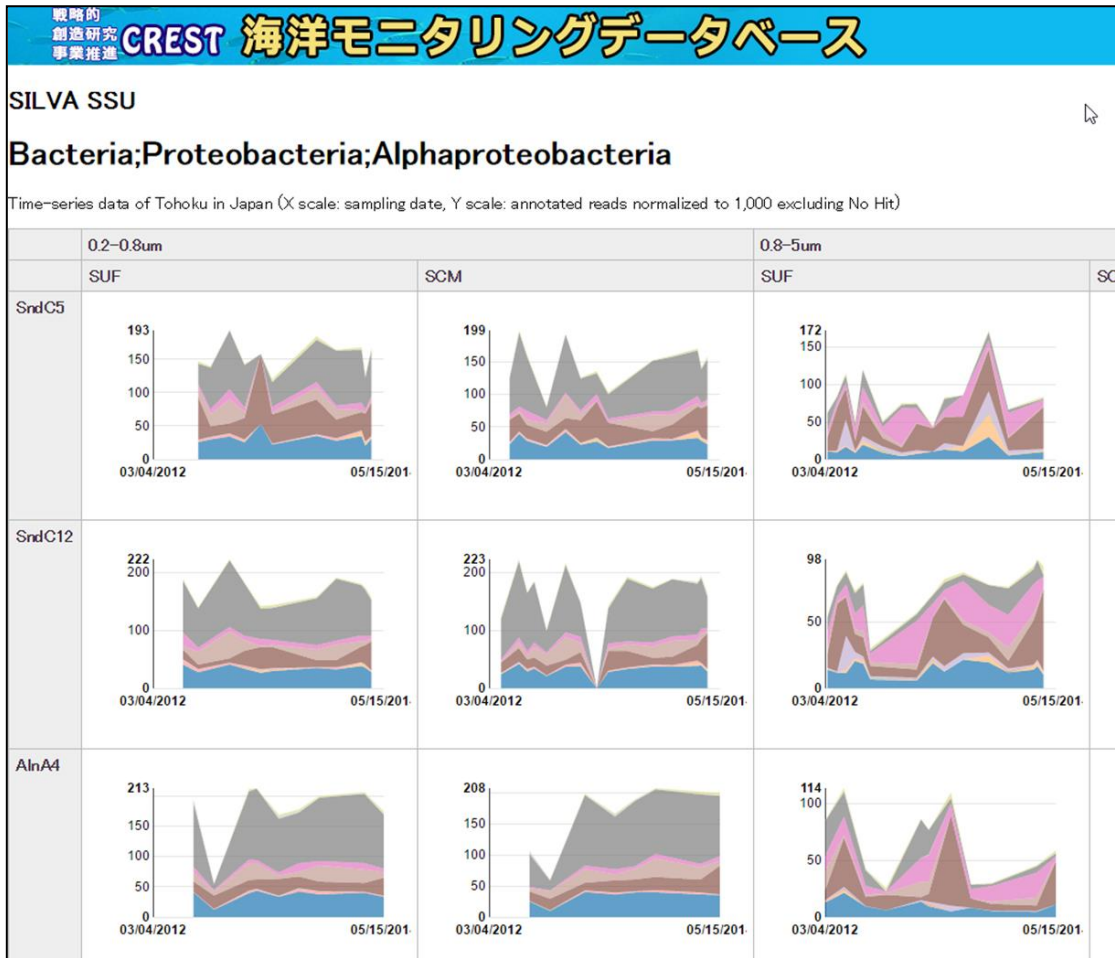


図 3.1-4 時系列データ表示画面

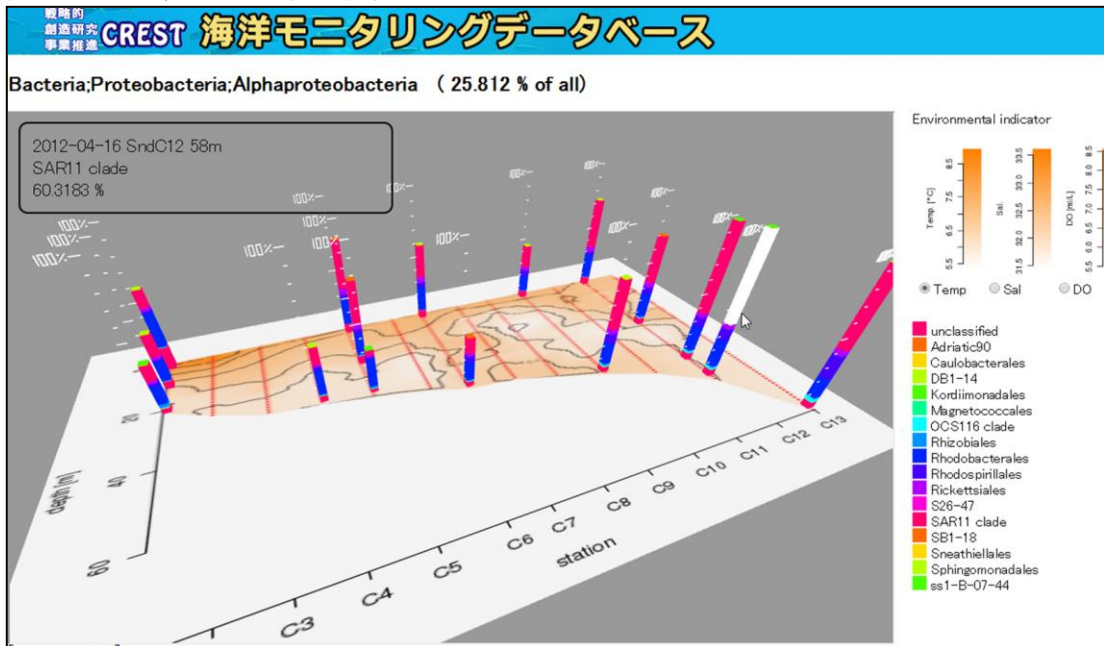


図 3.1-5 多地点データ表示画面

## ②デジタル DNA チップシステムの改良およびシステムによるデータ解析

### (1)研究実施内容及び成果

#### ・研究実施内容

本研究では、様々な微生物が混在した状態で DNA を抽出し、それらの DNA 断片の特徴および存在量で生態系の変化を時系列でモニタリングするため、デジタル DNA チップ解析システム(以降、「DDCA」と表記する)(\*1)を導入し、本研究に最適化した。また、デジタル DNA チップを作成(DNA マーカーの選定)するシステムとして、NGS データのトリミング、アダプタ配列除去などの配列データ前処理等、総合的な NGS データの解析ツールを実装した。

DDCA にて選定した海洋環境 DNA マーカーを用いた時系列解析にて良好な結果が得られ、新規海洋モニタリングシステム開発の目標を達成した。また、公共データを用いてシステム評価を行い、本モニタリングシステムの汎用性を検証している。

\*1:デジタル DNA チップ解析システムとは、独立した DNA マーカー(特異的 DNA 断片配列)セットをデジタル DNA チップとし、NGS データから各 DNA マーカーの存在量を計算する(デジタルハイブリダイゼーション)解析ソフトウェアで構成され、各 DNA マーカーの時系列変動(解析結果)を視覚的に表示できるシステムである。

#### ・研究成果

デジタル DNA チップの改良として、従来のチップ上の全プローブを閲覧する画面に加えて、マウスホイールで拡大表示することで、プローブごとに、デジタルハイブリダイゼーションされた位置を把握することが可能になった。さらに拡大すると一塩基単位でプローブ、リードを閲覧することが可能となるゲノムブラウザ機能を搭載した。(図 3.1-6)

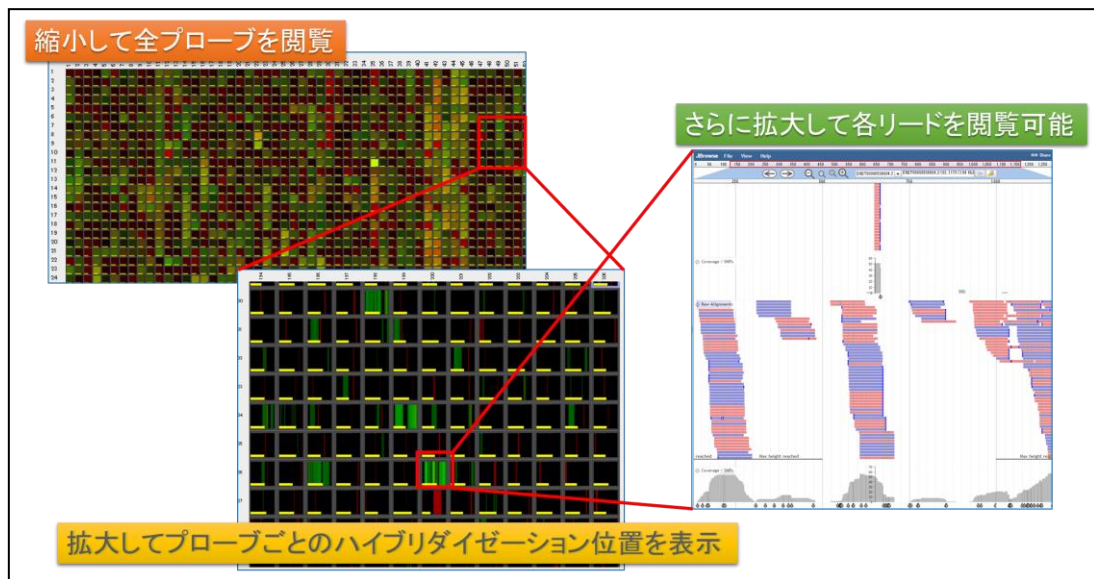


図 3.1-6 デジタル DNA チップ解析結果画面

また、DDCA の機能追加、改良を行い、NGS データ解析に馴染みのない研究者でも WEB ブラウザとマウス操作を用いて、簡単にデータの前処理からデジタルハイブリダイゼーションまでを行うことが可能となった。低クオリティリードの除去、アダプタ配列の除去、MiSeq ペアエンド FASTQ ファイルのシングルエンド化、リードのクオリティ確認などといった前処理ツールや、SILVA や NCBI NT データベースを用いた微生物叢解析ツールなど、合計 100 種類以上の解析メニューを追加した。(図 3.1-7)

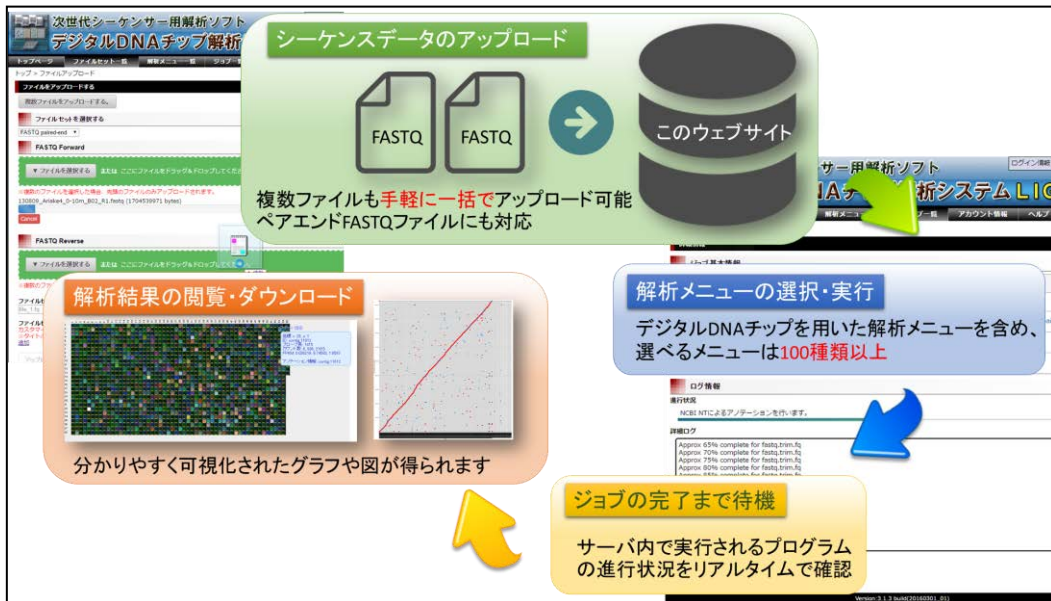


図 3.1-7 DDCA の操作イメージ

DDCA によって本プロジェクトで得られたシーケンスデータを解析し、水温、塩分濃度、栄養塩濃度、クロロフィル濃度の大小を判定する DNA マーカーや、フィルターサイズを推定する DNA マーカー、海域・季節を推定する DNA マーカーを抽出した。(図 3.1-8)

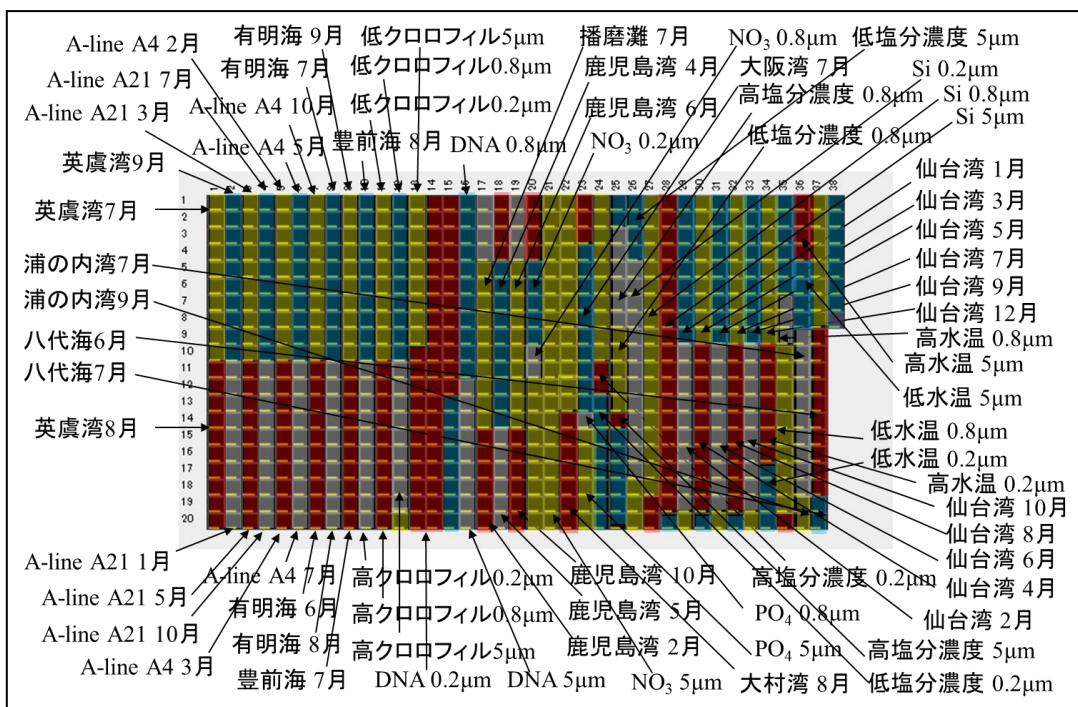


図 3.1-8 本プロジェクトで得られた DNA マーカーを搭載したデジタル DNA チップ

得られた DNA マーカーの汎用性を調べるために TARA Oceans プロジェクトのデータをランダムに抽出し、日本近海以外のデータに対しても DNA マーカーが適用可能か調べた。南アフリカ沖合サンプル(7 月採水、低クロロフィル、高水温、バクテリア分画、ACCN: ERX552266)のデータを用い、デジタル DNA チップにデジタルハイブリダイゼーションを行ったところ、「低クロロフィル」、「高水温」に関しては正しく判定することが可能であることが

示され、日本の東北海域で取得した環境モニタリング用 DNA マーカーが世界規模に適用できる可能性が示された。(図 3.1-9)

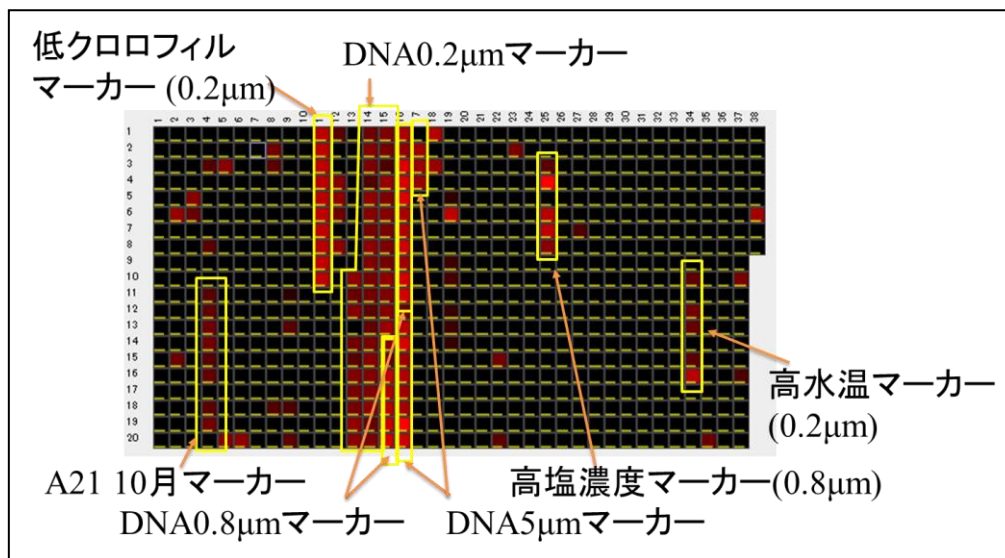


図 3.1-9 南アフリカ沖合サンプル(ACCN: ERX552266)のデジタルハイブリダイゼーション結果

### ③メタゲノム解析による海洋 DNA マーカーの選定および由来生物、機能の同定

#### (1)研究実施内容及び成果

##### ・研究実施内容

環境中の微生物群集の調査では 16S rDNA 等のマーカー遺伝子がよく用いられるが、マーカー遺伝子配列による分類群構成とその群集の生態的機能との関連は明確でない場合も多い。そこで、マーカー遺伝子に限らないメタゲノムデータを用いた機能遺伝子群の解析が、環境と微生物群集の生態的機能との関連を理解するための手法のひとつとなっている。

本研究では、細菌群集に注目してメタゲノムデータを用いた分類群・機能遺伝子群解析を行うことで基礎データを蓄積し、海洋環境と微生物群集の関連の理解、および環境変化モニタリングに向けた DNA マーカーの作成に貢献する。細菌群集はメタゲノムデータにおいてアノテーションが比較的容易であり、また海洋表層において特に一次生産者に由来する溶解有機物質を取り込み動物プランクトン等へ循環する微生物ループの構成員として生態的に重要な役割を担っている。本研究では1)仙台湾における細菌群集の季節変動調査、2)親潮域と親潮黒潮移行域の細菌・古細菌群集の比較を行った。

##### ・研究成果

1)仙台湾における細菌群集の季節変動では、仙台湾観測定点(C5とC12)における2深度(表層、surface chlorophyll maxima; SCM)からの0.8-5.0 μm分画、約1年分の40サンプルを用いた。メタゲノムデータは、クオリティーコントロール後 ORF 予測を行い、ncbi nr データベースに対する blastp 結果に基づきアノテーションソフト MEGAN を用いて分類群・機能遺伝子群 (KEGG orthology) のアノテーションを行った。分類群については、予測 ORF の 32-53%に界以下のアノテーションがつけられ、そのうち 55-98%が真正細菌と同定された。

シアノバクテリアを除く細菌と同定されたリードを抽出してサンプル間の比較を行ったところ、分類群構成は採集地点・深さに比べて採集時期による違いが大きく、2013年春は2012年春と類似の構成であった(図 3.1-10 左)。このような季節性の強さおよび主な分類群とその季節変動は先行研究からの知見に沿うものであったことから、仙台湾の細菌群集は妥当な季節変動をしており、今回のメタゲノムデータでそれを捉えることができていると言える。機能遺伝子群については、抽出した細菌 ORF のうち 31-40%にアノテーションが

けられた。機能遺伝子群構成は分類群構成に比べてサンプル間の違いが小さいものの、同様に季節的な変動傾向が見られた(図 3.1-10 右)。季節で特徴的な機能遺伝子群を抽出するため、高クロロフィル濃度の春(4,5 月)と低クロロフィル濃度の秋(9,11 月)のサンプル間で 2 群間比較を行ったところ、春にはアミノ酸代謝や ABC transporters、秋には糖代謝・転写翻訳・細菌型炭素固定経路などに関連する遺伝子頻度が高い傾向が見られた(図 3.1-11)。

2) 親潮域と親潮黒潮移行域の細菌・古細菌群集の比較では、A ライン観測定点(親潮域:A04 と親潮黒潮混合域:A21)における2深度(表層、surface chlorophyll maxima; SCM)からの約 2 年半分の時系列サンプルを用いた。4 サイズの分画(0.2-0.8  $\mu\text{m}$ 、0.2-0.8  $\mu\text{m}$ 、0.2-0.8  $\mu\text{m}$ 、0.2-0.8  $\mu\text{m}$ )を含む 140 サンプルを用いてアセンブル・ORF 予測を行い参照遺伝子カタログを作成した後、遺伝子カタログに対するマッピング結果に基づいて、主に 0.2-0.8  $\mu\text{m}$  分画の 40 サンプルを用いてサンプル間の比較を行った。参照遺伝子の分類群・機能遺伝子群(KEGG orthology)アノテーションは、ncbi nr データベースに対する blastp およびアノテーションソフト MEGAN と、Web サービス GhostKOALA を用いた。

分類群構成・遺伝子群構成の両方において、地点間および各地点内の季節間(混合域の7月-10月間を除く)で有意差が見られた(PERMANOVA:  $p < 0.05$ 、図 3.1-12)。また、親潮域では比較的安定した季節変化が見られた一方で、混合域では採集年による違いが大きく、親潮・黒潮の複雑な混合パターンを反映していると考えられた(図 3.1-12)。主要な分類群および機能遺伝子群について変動パターンに基づくクラスタリング解析を行い、地点・季節による傾向を調べたところ、顕著な春季ブルームが見られる親潮域と低クロロフィル濃度の夏期や混合域に特徴的な機能遺伝子群について、仙台湾と同様の傾向が見られた(図 3.1-13)。さらに機能遺伝子の多様度を評価したところ、親潮域は混合域に比べ機能遺伝子全体やアミノ酸代謝関連遺伝子は多様度が高い傾向が見られた(図 3.1-14)。

仙台湾のおよび親潮域・親潮黒潮移行域の解析において、分類群構成の相違度と機能遺伝子群の相違度に相関が見られたことから、本海域の細菌(・古細菌)群集の季節変化や地点間の違いは、環境変化に応じた生態的機能の異なる群集への変化であることが示唆された。また、春季ブルーム時に特徴的な機能遺伝子群について、仙台湾および親潮域・親潮黒潮移行域で共通の結果が得られ、細菌群集が利用できる有機物の性質の違いを反映している可能性が示唆された。本研究では、先行研究の少ない東北海域の細菌・古細菌群集について分類群・機能遺伝子群両方からの基礎知見が得られたこと、また海洋表層のメタゲノムデータの時系列サンプリング例は少ないため、機能遺伝子群の構成や多様度について季節変動パターンを確認できたことが特徴である。

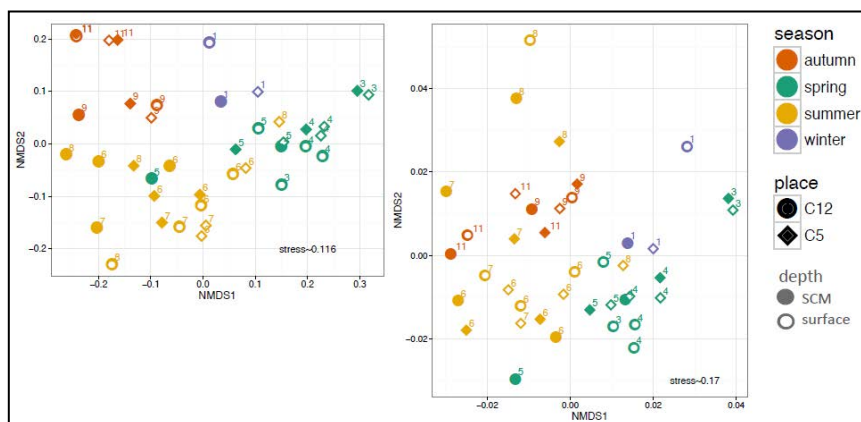


図 3.1-10. 仙台湾サンプルにおいて分類群構成(左)および機能遺伝子群構成(右)の Bray-Curtis dissimilarity に基づいた nMDS(non metric multidimensional scaling)プロット。数字は採集月。

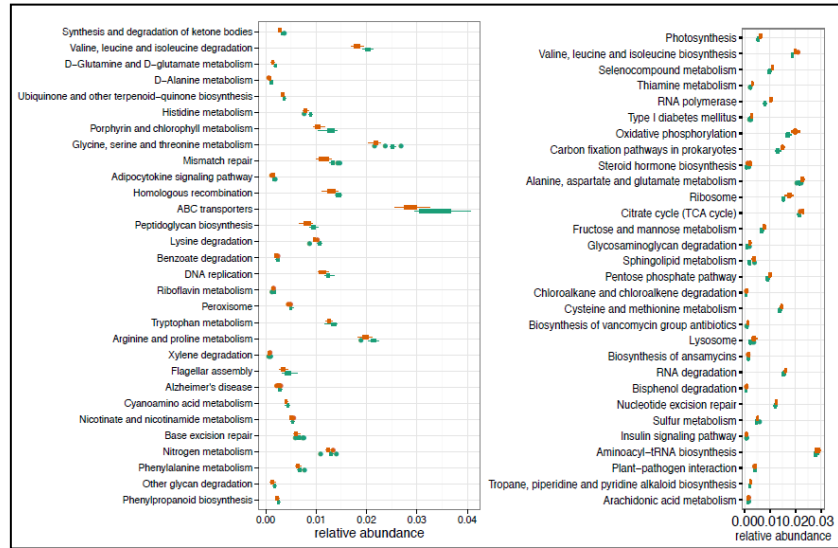


図 3.1-11. 仙台湾サンプルにおいて春季と秋期で頻度の異なる機能遺伝子群。左図は春季に多いもの、右図は秋期に多いもので、上から t 検定で p 値の低かった順。ボックスプロットは赤(上)が秋季サンプル、緑(下)が春季サンプルにおける相対頻度。

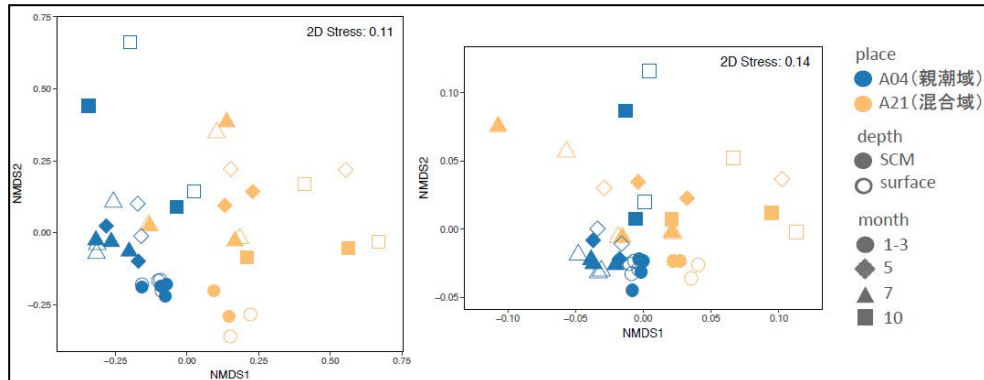


図 3.1-12. 親潮域(A04)・親潮黒潮混合域(A21)サンプルにおいて分類群構成(左)および機能遺伝子群構成(右)の Bray-Curtis dissimilarity に基づいた nMDS(non metric multidimensional scaling)プロット。

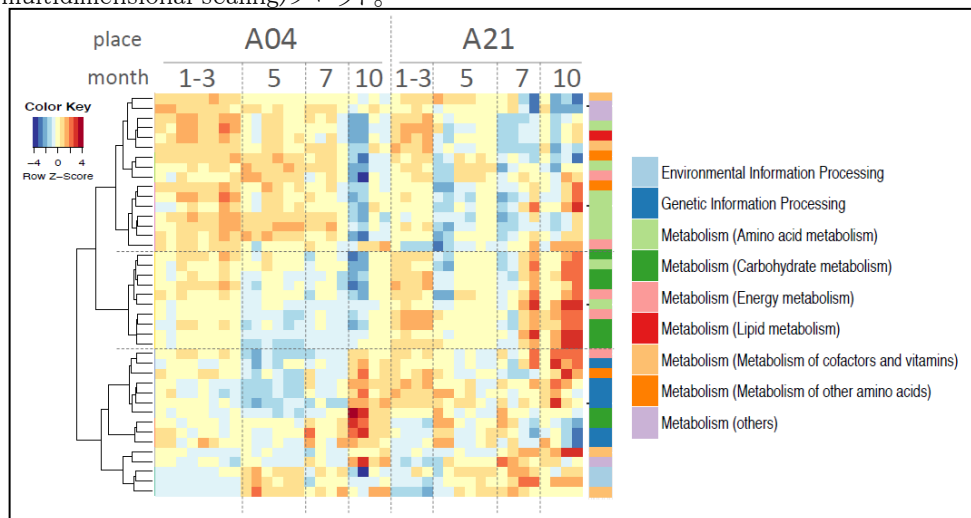


図 3.1-13. 主な機能遺伝子群(kegg pathway)についてサンプル間の頻度相関に基づくクラスタリングと、相対頻度の z-score を示したヒートマップ。右のカラーラベルはそれぞれの kegg pathway が含まれるカテゴリーを示す。



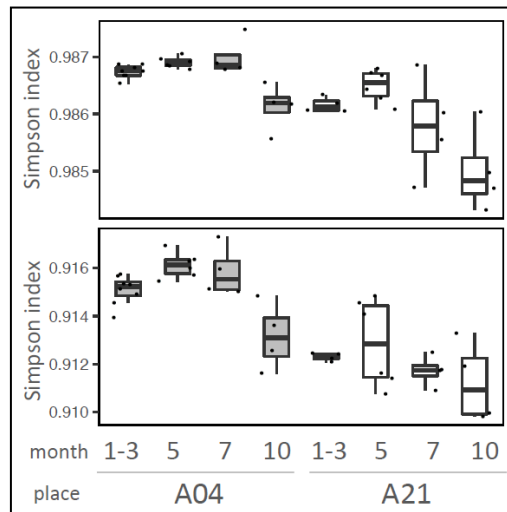


図 3.1-14. 機能遺伝子群全体(上)およびアミノ酸代謝関連遺伝子群(下)の多様度。

### 3. 2 東北沿岸海域の海洋微生物叢のモニタリング解析(東京大学 浅川グループ、九州大学 石野グループ、水産研究・教育機構 桑田グループ、国立環境研究所 河地グループ)

#### ①海洋環境水からの網羅的 DNA 抽出法の検討及び次世代シーケンサーを用いた配列決定

##### (1)研究実施内容及び成果

##### 1)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

###### ・研究実施内容

本課題は、海洋のメタゲノム解析技術を活用して、海水中の微生物叢の多様性の動態を DNA の配列を基に解析し、微生物生態系の変化からの環境変化の予測を可能とする技術の基盤とすることを目的としている。難培養性のために、海水中の微生物には未知の種も多い。そこで、従来の微生物を特定して研究する手法に加え、微生物を特定せず、海中に生息する全ての微生物が混在した状態で DNA 抽出し、その配列の特徴や含まれる遺伝子の構造、またそれらの存在量で生態系の変化を探索する、いわゆるメタゲノム解析を行う。解析には、短時間で数 Gbp の配列を得ることができる次世代シーケンサーを用いる。次世代シーケンサーは、検出反応系の違い等によって、エラー率、一ランで得られるリード数、リード長など、機種により特性が異なるため、目的とする解析に最適な機種を選定する必要がある。担当課題では、上述の海洋メタゲノム解析に適した次世代シーケンサーの選定を行うと共に、選定した次世代シーケンサーを用いて、東北沿岸の定点の微生物叢から得られた DNA 断片のシーケンシングを行い、海洋環境と関連した微生物叢のメタゲノム基礎情報を収集する。

###### ・研究成果

当初の計画では、1. 次世代シーケンサーの機種を選定し、2. 連携課題から提供される試料につき順次シーケンシングを進めることを予定していた。これまでに、仙台湾の二地点(C5、C12)と三陸沖の二地点(A4、A21)につき、各地点においてそれぞれ異なる時期、異なる4種類のフィルター(0.2-0.8 $\mu$ m、0.8-5 $\mu$ m、5-20 $\mu$ m、および20 $\mu$ m以上)で回収された海洋微生物由来のゲノムDNAを試料とし、4つのシーケンサー(Ion PGM、Ion Proton、Hiseq2000、および Miseq)で配列解読を行い、微生物叢のメタゲノムデータの収集とシーケンサーの特性比較を行なった。得られた成果は以下の通りである。

##### Ion PGMと Ion Proton によるシーケンシング

Ion Xpress DNA fragment kit を用いて長さ約 100-270bp の single-end DNA ライブラリーを構築してシーケンシングを行なった。98 サンプルから調製したメタゲノムライブラリーに

つき、Ion PGM および Ion Proton を用いてシーケンシングを行った。Ion PGM については1 ランあたり3-4 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 サンプルあたり平均クオリティスコアが約 28 の 253Mb~1.07Gb の配列データを得た。一方、Ion Proton では、1 ランあたり14~16 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、平均クオリティスコアが約 24 の 2.8Gb~6.7Gb (1 サンプルあたり 200Mb~415 Mb) の配列データを得た。

#### Hiseq2000 と Miseq によるシーケンシング

Hiseq2000 については、illumina Nextera DNA sample prep kit を用いて pair-end ライブラリーを構築した。92 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 サンプルあたり 18Mb~7120Mb、平均クオリティスコアが約 35 のデータが得られた。また、Miseq については、Miseq シーケンシング試薬 v3 で 300bp の pair-end ライブラリーを調製し、92 サンプルのマルチプレックスシーケンシングを行った。その結果、平均クオリティスコア約 34、1 サンプルあたり 3.6~625Mb のデータを得た。

#### 次世代シーケンサー各機種の特長比較と評価

Life Technologies 社の Ion PGM は迅速にサンプル調整が可能であり、1ランのコストが安く時間も短い。Ion Proton ではこれら特長に加えて、1 ラン当り Ion PGM の 10 倍のデータ量を得られる。当初 Ion Proton を解析機種として期待していたが、Ion Proton で解読したデータの精度が低く、また、解析データ量が大きく増加するとされる新チップの発売が予定より遅れているため、現時点で解析機種とするには適当でないと考えられた。illumina 社の Hiseq2000 シーケンサーは解析データ量が多く、今回の解析でも 92 サンプルのマルチプレックスシーケンシングが可能であった。また、データの平均クオリティスコアは 35 であり、Ion PGM や Proton のデータと比べて精度が高かった。Miseq で解読した配列の精度も Hiseq2000 と同程度であったが、一ランで得られるデータ量を考えると、Hiseq2000 が解析機種として適当である。ただし、現時点で得られている Miseq のデータは改善の余地が大きいと見られ、引き続き検討する。

一方で、本研究により最適な次世代シーケンサーの機種を選定することができ、試料 DNA ライブラリー調製の標準プロトコルが確立された。これらの成果は、今後のシーケンスの安定度の向上に寄与し、生物多様性評価と環境予測がより精度の高いものになると考えられる。

#### タンパク質モチーフ情報に基づく新規メタゲノム解析法の確立

現状の相同性検索に基づくメタゲノム解析ではまったく有効な情報の得られない配列が多数を占めている。塩基配列、アミノ酸配列による相同性検索では有効な情報が得られない配列であっても、モチーフ検索で、保持するモチーフなどが見出される場合がある。そこで、得られたシーケンスからコードしているタンパク質の中に含まれるモチーフ・ドメインを検索して各メタゲノムデータ中にその程度それらのモチーフ・ドメインが含まれるかをカウントし、メタゲノムの性格付けを行うためのソフトの設計、開発を行った。得られたモチーフ情報のカウントデータをクラスター分析および主成分分析に供したところ、5  $\mu$ m フィルターの一部サンプルを除き、フィルターのサイズごとにクラスタリングされた。さらに、0.8  $\mu$ m フィルターのクラスターが分岐したことについては水温が関与していることが示され、海洋微生物の生息水温の違いがモチーフ群に反映されることが示唆された(図 3.2-1,2)。この解析方法では、約 8000 種存在するモチーフの出現頻度という形にデータを落としこめる。したがって、ひとたびモチーフの出現頻度が得られれば、以後の解析が迅速にできると考えられる。

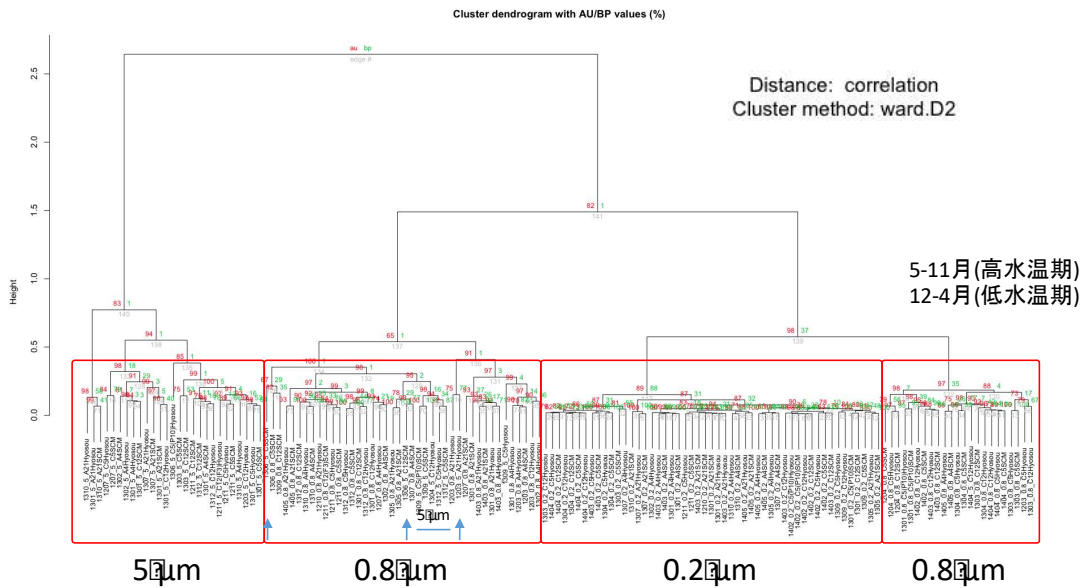


図 3.2-1, タンパク質モチーフ情報に基づくクラスター分析の結果。

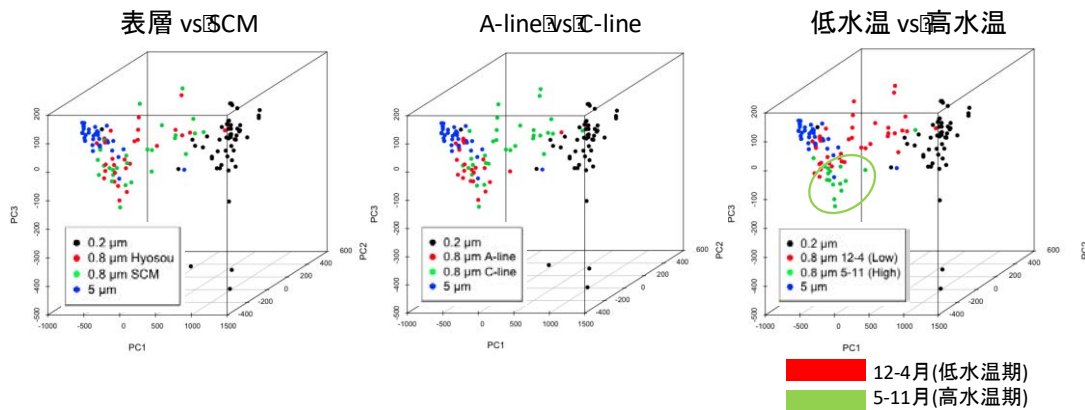


図 3.2-2, タンパク質モチーフ情報に基づく主成分分析の結果。

## 2) 海洋環境水からの DNA 抽出、配列解析、DNA マーカーの検証

### ・研究実施内容

#### 海洋環境水からの網羅的 DNA 抽出法の検討

九州大学の主とする使命は、採取された海水試料および海水ろ過フィルターから、いかに効率よく配列解析に供することができる質と量を備えた DNA を抽出することができるか、さらに、得られた DNA を次世代シーケンサーに供してデータベース作成のための配列情報を提供することであった。ポアサイズの異なるフィルターを階層して、サイズの異なる微生物を分画収集し、そこから直接 DNA を調製するという実験設計で、実用的なメタゲノム解析用 DNA 調製法開発を目指した。検討項目はフィルターの種類、ろ過の方法、ろ過後のフィルターからの DNA 調製法である。さらに、DNA 調製の収量を基に、本プロジェクトの目的にはサンプリングする海水の量がどのくらい必要であるかを決定した。DNA 調製実験方法を評価するために、モデル実験として、人工海水に既知量の大腸菌を加え、それを出発材料として、何グラムの DNA が調製できるかを調べ、回収率を求めた。また、考案した方法を基に、サンプリングからろ過過程まで自動化するポータブル装置を設計し、順次試作機を作成して使用しながら改良を加えて本プロジェクトに最適な装置開

発を行なった。

以上のようにして、海水試料から調製したDNAについて、人工的に特定の遺伝子領域を増幅することなしに、そのまま網羅的に配列解析を行って、それぞれの海水サンプル中に存在するDNA配列をデータベース化し、試料中のDNAの増減によって海水環境をモニタリングする方法の開発に成功した。調製したDNAを、次世代シーケンサーを用いて配列解析する作業は、当初東京大学の担当で始めたが、H27年度以降は九州大学が担当することになった。配列解析装置、条件を検討した結果、一定の方法を決定した。プロジェクト期間中に得られたサンプルを通して、この方法により配列データを取得し、データベースを構築して格納した。

また、最終年度に別途提案して受理されたディープシーケンス解析を行った。仙台湾、A-ラインの2箇所からそれぞれ2サンプルを選択してディープシーケンスを実施して得られた結果を、上記のように決定した通常条件での解析結果と比較した。

これまでに得られた配列データについて、解析グループが詳細に調べた結果、5-20 µm フィルターから得られた配列の中で、3塩基(TAG)のリピータ配列が検出されることが特徴の一つであることに気づいた。このリピータ配列が次世代シーケンシングのアーティファクトによるものではなく、海水中に含まれる微生物に実際に存在するものであることを確かめるために、海水から調製したDNAを用いて、TAGのリピータ配列の検出を行うことにした。海水サンプルからは、次世代シーケンサーでショットガンシーケンスして、配列データが得られる最小量しか調製していないので、まずは電気泳動で分画するサザンブロット法ではなく、サンプルDNAをナイロン膜にスポットするドットハイブリダイゼーションによって、検討実験を行った。配列のわかっているpTV118NプラスミドのHindIIIサイトにTAGのリピータ配列を有する108bpの人工合成DNA断片を挿入し(計算上、pTV118Nの配列の約3.3%に相当する)、これをポジティブコントロールとして用いることで、まずドットハイブリ、サザンハイブリ法で、TAGリピータ配列が特異的に検出される実験条件を検討した。海水サンプルDNAをアルカリ溶液で希釈→ナイロン膜にスポット→ナイロン膜の中和→非特異的DNAでプレハイブリしてブロッキング→TAGリピータ配列プローブとハイブリ→洗浄→検出、という順である。実験条件が決定できれば、残量と濃度が足りるサンプルは、制限酵素で処理、電気泳動分画した後、ナイロン膜に転写するサザンブロットハイブリダイゼーション法を行なった。

#### ・研究成果

DNA抽出法について検討した結果、海水試料からDNA抽出を行なう際は、ろ紙フィルターにてゴミを取り除いた後、8 µm、1 µm、0.2 µmのポアサイズの混合セルロース製膜フィルターを用いて順次減圧ろ過し、ろ過後のフィルターを細かく切り刻んで、MOBIO社製PowerWater DNA Isolation Kitを用いてDNA抽出を行なうという操作方法を決定した。ウイルス画分のDNA抽出法についても検討を重ねた結果、0.2 µmフィルターろ過後のろ液から鉄凝集でウイルス粒子を集め、MOBIO社製PowerViral Environmental RNA/DNA Isolation Kitを用いてDNA抽出を行なうことに決定した。

桑田グループより提供された東北沿岸海域のサンプル(海水ろ過フィルター)から、網羅的にDNA調製を行なった。本プロジェクトにおいて、これまで九大グループで調製したDNAサンプル数は、H24年度218、H25年度120、H26年度24、H27年度は通常のサンプル63に加え、これまでの予備フィルターから再調製したDNAサンプル214である。H28年度は機器開発関連の約100サンプルのDNA調製を行なった。当グループで決定した次世代シーケンサーによる配列解析のためのDNAサンプルの基準として、DNA濃度が0.5 ng/µl、DNA収量が80 ng以上という数値を決定した。その際、できる限り正確なDNA収量が測定できるように、種々のDNA定量法を検討して最適化した。この結果、九大で調製したDNAについてはほぼ全てこの基準を満たすDNAが得られた。これらのDNAサンプルは、当初は配列解析を担当する東大グループに提供していたが、H27年度からは九州大学で配列解析を行なうことになった。この役割変更にあたり、配列解析の仕方について、それまでの東大法と九大法を比較検討し、配列結果に差異がないことを慎

重に確認したうえで、実サンプルの配列解析を行なった。Hiseq による配列解析サンプル数は、東北サンプル約 350、機器開発のための定期サンプリング 114 サンプルについて配列解析を行なった。

最終年度の追加提案として実施したディープシーケンスについては、選択した 4 サンプルを解析した結果、サンプルあたり平均 580,000 千リード、58,000,000 千塩基数のデータが得られ、これは本プロジェクトで決定、実施した通常条件での解析と比較して、100 倍のデータ(リード数および配列数)が取得できたことになる。解析データは、本プロジェクトで構築したデータベースに格納した。16Sリボソーム DNA 配列比較による生物種含有率を比較してみたところ、通常条件で得られた比率と同様の結果が得られた。この結果は、本プロジェクトで設定した条件によって取得された配列データが、それぞれのサンプル中の DNA 含有率を求める目的にとって妥当であることを支持するものである。ディープシーケンスによってのみ得られる情報がどれだけあるかについては、今後詳細に解析を続ける予定である。

海水サンプル中の TAG リピート配列含有の検証実験については、ポジティブコントロールに用いた DNA 中の TAG リピート含有率が約 3.4%であり、それを用いてハイブリダイゼーション条件の検討を行った。決定した条件のもと実際にドットハイブリダイゼーション実験を行った結果、海水からの実サンプルの配列解析から得られているデータで、TAG リピート含有率 7.5%(最高値)~0.7%含んでいるものに関しては、ポジティブシグナルが得られた(図 3.2-3)。また、TAG リピート含有率が 0.02%以下の少ないものは、まったくシグナルが検出されなかった(図 3.2-4)。各海水サンプルから得られたシグナル強度と TAG リピート含有率の関係は比例しており、ポジティブコントロールの TAG リピート含有率(3.4%)と比較しても妥当な結果であった。

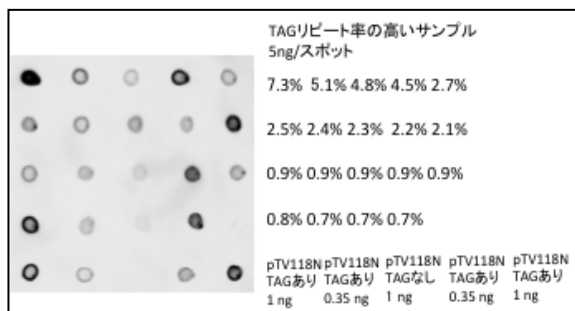


図 3.2-3. TAG リピート率が高いサンプル

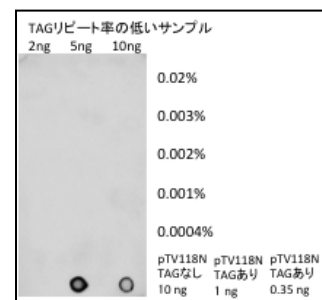


図 3.2-4. TAG リピート率が低いサンプル

## ②東北周辺海洋環境における微小プランクトン群集のモニタリングと変動機構の把握

### (1)研究実施内容及び成果

#### ・研究実施内容

#### 1) 東北沿岸域における海洋モニタリング

これまでの観測結果を検討し、仙台湾定線の及び東北沿岸・沖合域の観測定線(A-line)における海洋観測の観測項目、試料の採取法、代表測点の選定等モニタリングデザインを検討し、仙台湾の沿岸定線には沿岸と沖合の 2 点、東北沿岸域の沖合観測定線(A ライン)上に親潮域と親潮・黒潮移行域の代表測点 2 点を設置した。(図 3.2-5)各海洋観測では、定線上で水温、塩分、溶存酸素(DO)、栄養塩濃度、クロロフィル a 量等の環境パラメータの鉛直分布を観測し、代表測点の表層およびクロロフィル極大の層で微小プランクトン群集の群集構造解析用の試料およびメタゲノム解析用のサイズ別 DNA 試料を採集した。

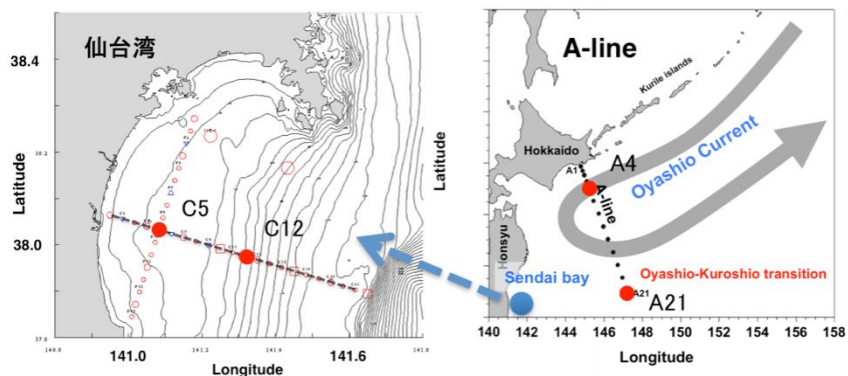


図 3.2-5 東北沿岸域観測定線(仙台湾 C-line と沖合定線 A-line) とそれぞれの代表測点

### 2) 微小プランクトン群集のメタゲノム解析用 DNA サンプルの採集

EU で現行の海洋メタゲノムプロジェクト(Tara, BioMarks)のプロトコルを参考に、送液ポンプと 142mm フィルター用ステンレスフィルターフォルダーで構成される、船内でも作業可能でサイズ別に微小プランクトン群集の DNA サンプルを採取が可能なる過システムを構築し、試料採集を行った。(図 3.2-6)

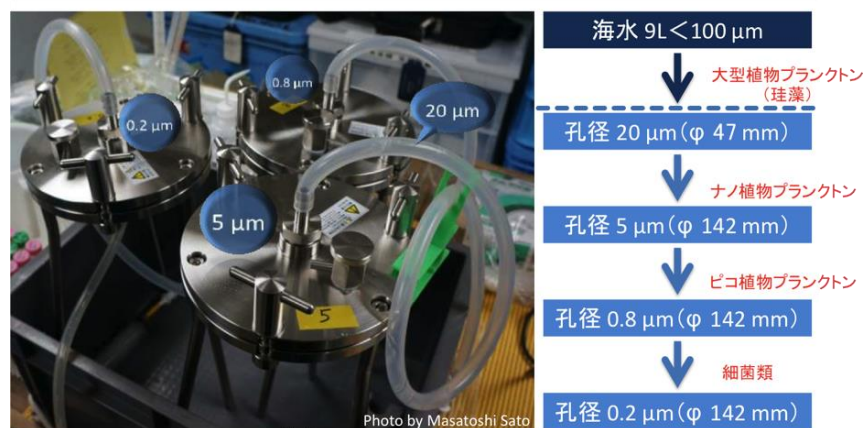


図 3.2-6 メタゲノム解析用サイズ別 DNA サンプルろ過システム

### 3) 微小プランクトンの群集の解析

大型植物プランクトン群集については顕微鏡下の計数、微小植物プランクトンについてはフローサイトメータによる計数を行った。また、大型植物プランクトン、微小プランクトンそれぞれの主要なグループである珪藻類、シアノバクテリアの遺伝子情報、動態の解析のため、多数の単離培養株を確立した。細菌群集については、細菌数の直接計数、16S rRNA 遺伝子の多型に基づく群集組成解析、さらにメタゲノム解析用 DNA 試料(0.2-0.8 μm画分)を用いた16S rRNA 遺伝子(PCR-amplicon)の次世代シーケンサーによるシーケンス解析を進めた。

#### ・研究成果

#### 1) 仙台湾における海洋環境および微小プランクトン群集の季節変動

仙台湾において植物プランクトンの現存量は冬の水塊の混合期から成層が開始する春にかけて増加し最大となり、成層化の進む夏に最低となることが明らかとなった。植物プランクトン組成は、年間を通して珪藻が優占しており、夏と秋には渦鞭毛藻やピコサイズの微小植物プランクトンが増加することが明らかとなった。微小植物プランクトン群集は、夏以外は 50%以上をピコ真核藻類が占め、夏にはシアノバクテリアの増加が見られた。また、6月

の梅雨の時期には、河川水の流入がみられ、珧藻類の減少が見られた(図 3.2-7)。

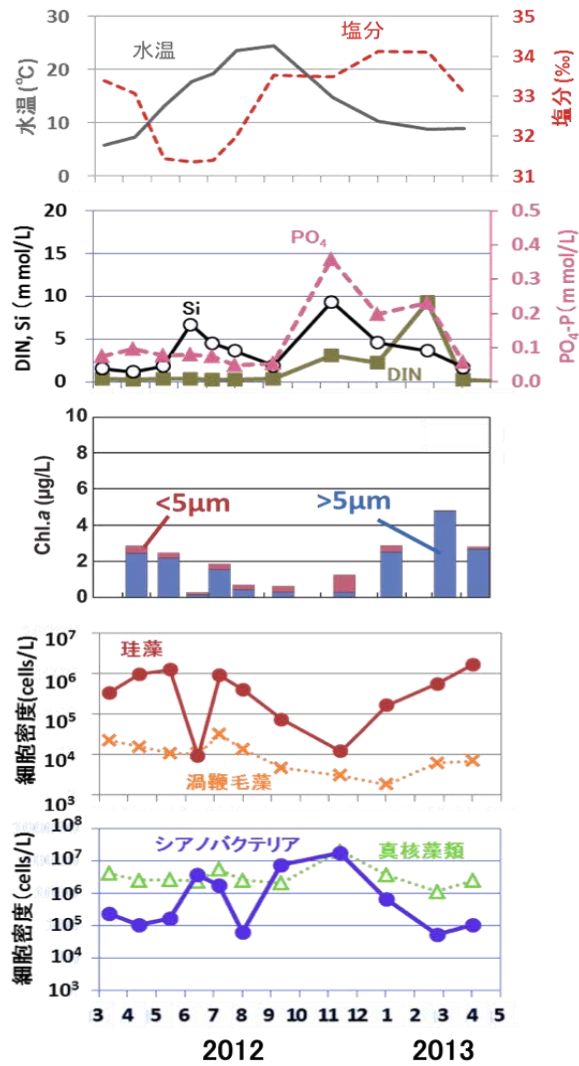


図 3.2-7. 仙台湾測点C5表層における海洋環境、植物プランクトン群集の季節変化

さらに、仙台湾では、冬季・浅海域に大規模な珧藻ブルームが発生することが明らかとなった(図 3.2-8)。物理環境と植物プランクトンの動態をカップリングしたモデル解析により、冬季・浅海域のブルーム形成機構を解明した。

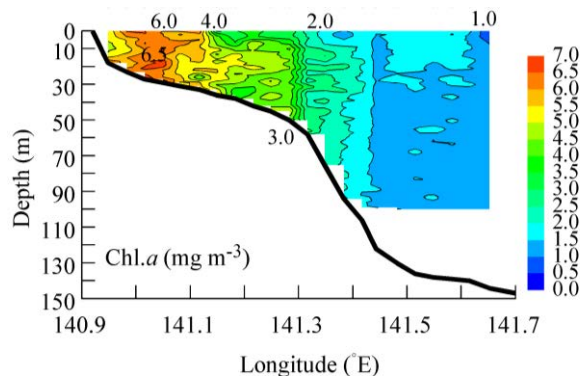


図 3.2-8 冬季仙台湾の浅海域に形成される高クロロフィル a の分布

珪藻群集に関しては、種組成データの多変量解析により各種の出現パターンを解析し、各季節の指標となる珪藻種をグルーピングした (図 3.2-9)。その結果、珪藻群集は、春季ブルームは *Chaetoceros* 属から開始され、*Skeletonema costatum* s. l. を中心とした群集に遷移した。夏は *Leptocylindrus danicus*、秋から冬にかけ、*Thalassiosira* cf. *mala* が優占することが明らかとなった。次に、仙台湾の珪藻群集と海洋環境データを用いた多変量解析を行った結果、珪藻群集の変動の 70%以上が環境要因で説明されることが明らかとなった。そこで、津波前後の海洋環境データを用いて、多変量解析により津波前後の珪藻群集を推定し、珪藻群集への津波の影響を評価した。推定された珪藻群集のプロットは、津波前後に関わらず月ごとに近い位置に配置され、珪藻群集への津波の影響は小さかったことが示唆された。(図 3.2-10)。

またシアノバクテリア群集については、メタゲノム解析の結果との照合により、クレードレベルでの組成の季節変動が示唆された。

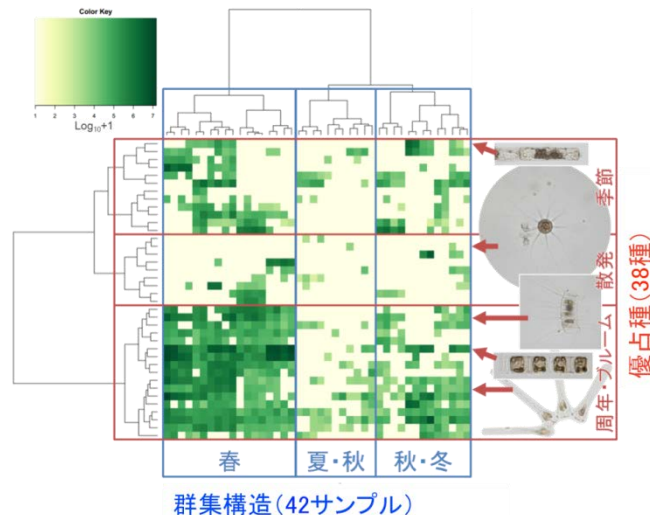


図 3.2-9. 仙台湾における珪藻種の出現パターンによるグルーピング



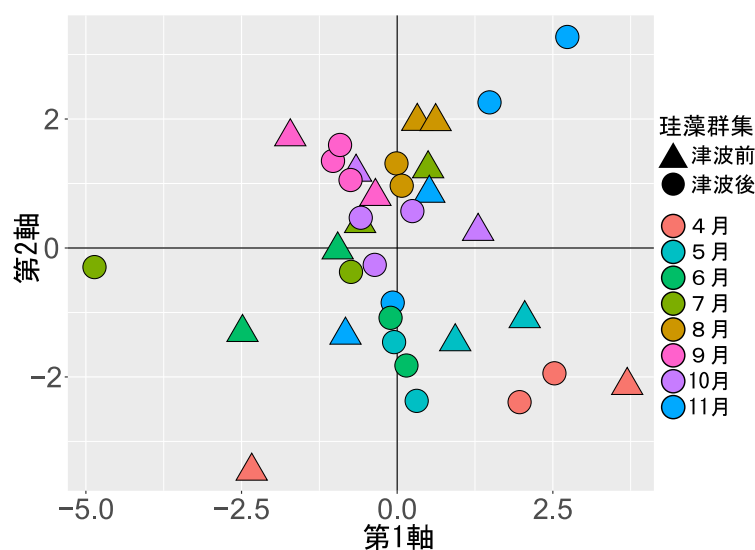


図 3.2-10 仙台湾における津波前後の月別の珪藻群集の予測プロット

仙台湾内における細菌群集について、空間的な変動と環境因子との関係を明らかにするために、湾内で成層が形成される時期(4、6月)と鉛直混合が起こる時期(9、12月)に、C-line 鉛直断面での細菌群集組成の変化をフラグメント解析と主成分分析により調べ、各種環境因子との相関を見た。その結果、細菌群集組成の変化は7月を除き水温、塩分と有意な相関があり、湾内の物理的な海洋環境変化が細菌群集組成に影響を与えていると考えられた(表 3.2-1)。また植物プランクトンや栄養塩濃度とも多くの場合に関係が見られた。

表 3.2-1 細菌群集(16S rRNA 遺伝子フラグメント)組成の主成分分析スコアと環境因子との相関係数(p<0.05)

主成分 (寄与率)	Apr		Jul		Sep		Dec	
	PC1 (0.32)	PC2 (0.22)	PC1 (0.26)	PC2 (0.17)	PC1 (0.34)	PC2 (0.21)	PC1 (0.35)	PC2 (0.15)
水温		0.59			0.73		-0.94	
塩分		-0.58			-0.69	0.5	-0.84	
NO <sub>3</sub> -N		-0.8			-0.52			0.49
NO <sub>2</sub> -N		-0.64			-0.8		0.75	
NH <sub>4</sub> -N		-0.53	-0.53		-0.58	-0.58		
PO <sub>4</sub> -P		-0.75			-0.8		0.73	
SiO <sub>2</sub> -Si		-0.78			-0.78		0.86	
Chl-a						-0.6	0.62	

湾内細菌群集の季節変動を明らかにするために、測点 C5 における 0.2-0.8um 画分について 16S rRNA に基づく菌群集組成をしらべ各種環境因子との関係を見た。その結果、湾内の主要出現 OTU (Operational Taxonomic Unit) は、外洋性の SAR11 に属する OTU (図 3.2-11-OTU1) が最も多く(平均 33%)、またブルーム形成期(1-4月)には Rhodobacteraceae (図 3.2-11-OTU2) が、ブルーム終息後の高水温期(6-9月)にはラン

藻(図 3.2-11-OTU3,4,6)が多いなどの特徴がみられた。RDA 解析の結果、細菌群集の季節変動には水温とクロロフィル濃度が有意に関係していた(図 3.2-12)。

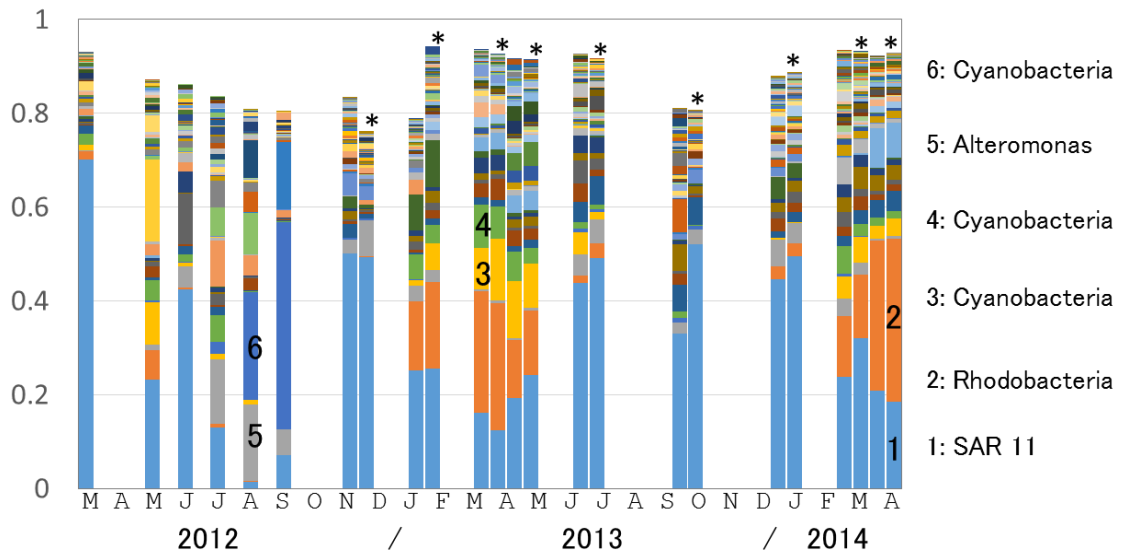


図 3.2-11 測点 C5 において 0.2-0.8um 画分中出现するの細菌の上位 100OTU の組成, \*: クロロフィル極大層水、無印: 表層水

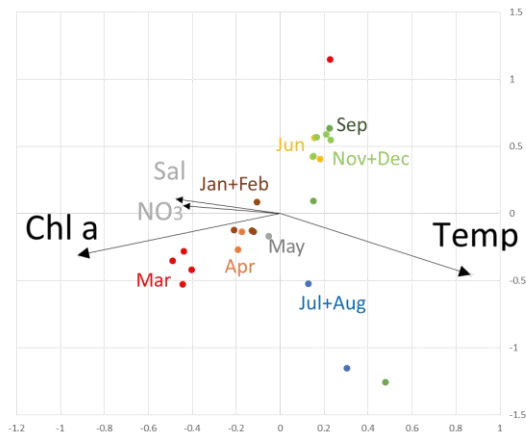


図 3.2-12 RDA 解析による細菌群集組成変化と水温、塩分、クロロフィル及び硝酸濃度の関係

出現上位 20 OTU について環境因子との相関係数をみると、低水温、高クロロフィル期に多く春季ブルームに特徴的な 4 個の OTU が全体の 16% (図 3.2-13-A)、低水温とのみ相関が見られる 4 OTU が 7% (図 3.2-13-B)、高水温、低クロロフィル期に多い 4 OTU が 8% (図 3.2-13-C)、及び低塩分時に多い 3 OTU が 3% (図 3.2-13-D) の頻度を占めた。一方、最も優先した OTU1 (SAR11) を含む 10 個の OTU (全体の 37%) は出現頻度と環境因子との関係が見られなかった。OTU1 (SAR11) は海水交換に伴って湾外から侵入するものと考えられ、沿岸での細菌群集組成の変化には、沖合からの海水の流入が大きな影響を与えていることが示唆された。以上の結果から、細菌群集を沿岸環境の生物モニタリング指標として活用する場合には、海洋構造変化を踏まえた分析と、沿岸性種に限った変動解析が必要であると考えられる。

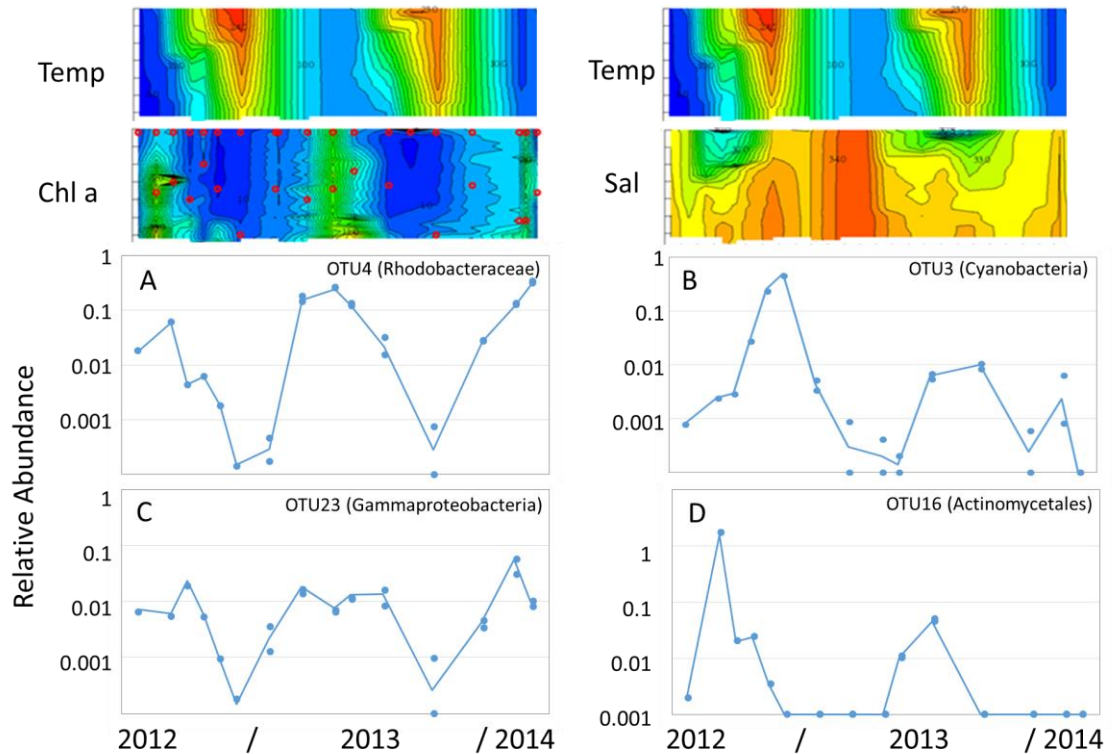


図 3.2-13 測点 C5 における水温、塩分、クロロフィル濃度と主要 OTU 出現頻度の季節変化

## 2) A ラインにおける海洋環境および微小プランクトン群集の季節変動

A ラインにおける海洋調査に関しては、これまでに得られた海洋環境データおよび微小プランクトン群集のとりまとめを行い、データ解析により親潮域と親潮・黒潮移行域における海洋環境と微小プランクトン群集季節変動の解明を進めた。主要なピコ植物プランクトン *Synechococcus* に着目し、従来のフローサイトメータによる現存量の変動の解析に加え、メタゲノム解析により *Synechococcus* のグループ組成を調べ、当海域の海洋環境と *Synechococcus* のグループ組成の季節変動を解析した(図 3.2-14)。

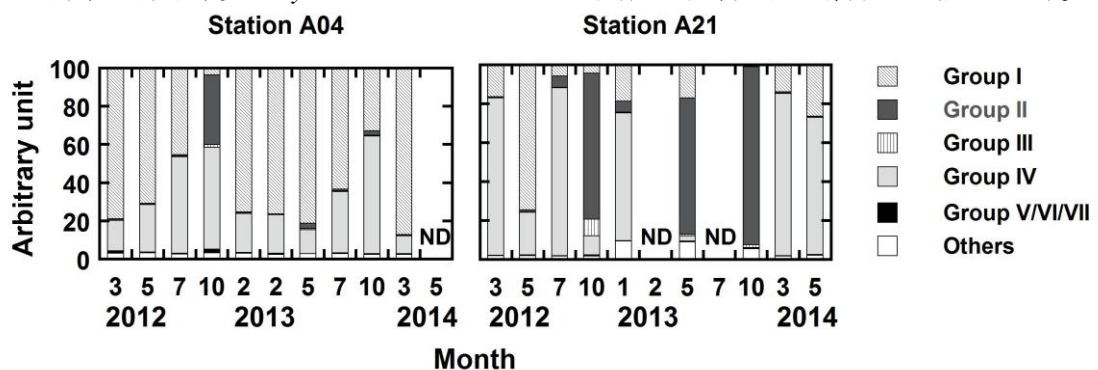


図 3.2-14 A ラインにおける *Synechococcus* グループ組成の季節変動

## メタゲノム解析による植物プランクトン群集の種同定法の珪藻群集による検証

顕微鏡による形態観察に基づき正確な種同定が可能な珪藻の特徴を利用して、植物プランクトンのメタゲノム解析における種同定の正確さや定量性の問題点を明らかにし、種組成を構築するための解決策を提案した。仙台湾の春季ブルームでは珪藻が優占したが、メタゲノムに含まれる珪藻の配列数はごくわずか(<3%)で、珪藻ゲノムの大半(>50%)は葉

緑体ゲノムだった。検鏡とメタゲノムの種組成は一致せず(図 3.2-15)、原因として①PCRバイアスによる組成の変化、②全ゲノム解読種の過大評価、③ゲノム中の塩基配列(18S rDNA)数の不足、が考えられた。現状では、メタゲノム中の 18S rDNA から種組成を構築することが最も実用的で、そのためには十分なリード数( $>10^7$  配列)が必要だと考えられた。

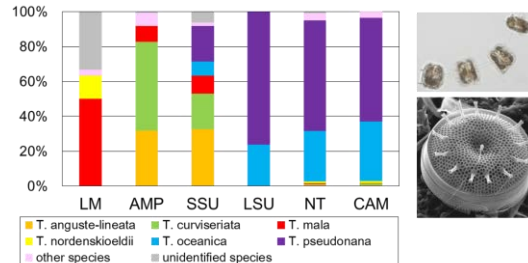


図 3.2-15. *Thalassiosira* 属の種組成の比較

### ③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

#### (1)研究実施内容及び成果

##### ・研究実施内容

ピコサイズの植物プランクトンは海洋環境の基礎生産者としての重要性に加えて、進化系統的に極めて多様性が高く、未知未培養性の種を多く含むことが知られている。そのため、ピコサイズの植物プランクトンは、海洋微生物の動態解析を行う上で重要なターゲットと位置づけられる。ピコ植物プランクトンの多様性解析を行い、優占種を培養株として確立することは、当該海域の生物多様性の実体を明らかにする上で、必須の研究である。また培養株のゲノム情報は、デジタル DNA チップに収納される膨大な DNA 情報を補完する上でのレファレンスゲノムとしての利用が期待できる。本研究では、環境中のピコ植物プランクトンの多様性解析と培養株の確立を行うことで基礎データを蓄積し、微生物叢の多様性ならびに環境変化をモニタリングするための DNA マーカーの作成に貢献する研究を遂行する。

天然海水中には、ピコ植物プランクトンに加えて、非光合成真核プランクトンや細胞構造の脆い種類が混在しているため、環境中のピコ植物プランクトンの群集構造を維持したままでの試料採集が困難である。また、微生物叢の環境変化には植物プランクトンの遺伝子発現が大きく寄与している。本研究では、1) 凍結保存した環境試料を用いたフローサイトメトリによるピコ植物プランクトンの選択的分取手法の開発、2) 上記手法により分離したピコ植物プランクトンの 18S rRNA アンプリコン解析による群集解析、3) メタトランスクリプトームを利用した珪藻春期ブルームの比較トランスクリプトーム解析、4) 優占種の培養株作成と種同定を行った。

##### ・研究成果

フローサイトメトリ(FCM)を用いて、凍結保存試料から光合成真核プランクトンを分取し、NGS により 18S rDNA アンプリコンを分析する手法を確立した。桑田グループから提供された仙台湾観測地点 C5 および C12 の海水試料を用いて、ピコ植物プランクトンが含まれる分画の細胞凍結を行った。この細胞凍結サンプルおよび非細胞凍結サンプルを用いて、セルソーターを備えたフローサイトメトリによる細胞分取条件を検討し、凍結保存の影響を次世代シーケンス解析により評価した。各試料中の OTU 組成は

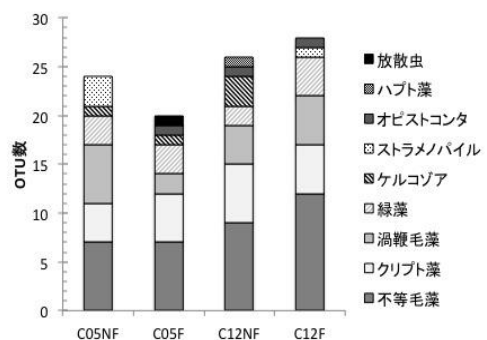


図 3.2-16. 各試料中の OTU 数。C05 と C12 は観測点を、F と NF はそれぞれ凍結、非凍結処理を表す。

おおむね類似していたが、凍結処理の有無と比べて観測地点間の違いの方が大きい結果となった(図 3.2-16)。クラスター解析でも同様の結果が得られたことから、凍結保存サンプルを用いたフローサイトメトリが次世代シーケンス解析結果に与える影響は僅かなものであり、本手法を用いることで効率的にピコ植物プランクトンの多様性解析を行うことが可能である。

本手法を用いて、仙台湾観測地点 C5 と C12 および沖合の観測地点 A4 と A21 における、44 の時系列試料を分析し、18S rDNA アンプリコン比較分析のための大量塩基配列を得た。仙台湾 (C5 と C12)、親潮域 (A4) と親潮黒潮移行域 (移行域: A21) の 4 観測点について、5 季節 (2012 年 4-5 月、7-8 月、10 月、2013 年 1-2 月と 4-5 月) の真核ピコ植物プランクトンを対象とした OTU 組成の分布パターンを比較したところ、C5 と C12 は A21 と類似しており、仙台湾の真核ピコ植物プランクトン組成は移行域と類似していることが示された。さらに、非計量多次元尺度法 (nMDS) 解析ではいずれの観測点においても、OTU 組成は季節変化とともに変動しており、真核ピコ植物プランクトン群集組成に季節変化があることが示された。Similarity profile (SIMPROF) 解析を用いて相対的存在量を考慮して OTU 組成をグループ分けしたところ、外洋域の観測点 (A4 と A21) が多く含まれる Group1、沿岸の観測点 (C5 と C12) が多く含まれる Group3、淡水の流入が考えられた沿岸の夏に特異的な Group2 と、海域に関わらず冬期で構成される Group4 の 4 つのグループに分けられた ( $p < 0.05$ )。つまり、本海域に於けるピコ植物プランクトン組成変化に関与する環境変化は、沿岸、外洋の差異に加えて、淡水の流入や冬期に特徴的であることが示唆された。similarity percentage (SIMPER) 解析によって、これらのグループ分けに特徴的な OTU を見出すことができた(図 3.2-17)。

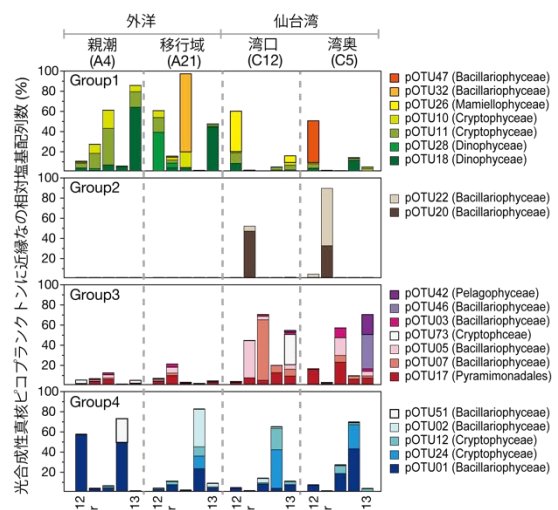


図 3.2-17. SIMPER によるグループ特異的な分類群の相対量

観測地点 A4 で見られる珪藻春期ブルームの優占種の RNA 配列から、環境変化に鋭敏な遺伝子を探索するため、メタトランスクリプトーム解析を行い、得られたデータをメタゲノムデータベースに登録した。桑田グループと共同で 2016 年 5 月に A4 で珪藻ブルームの海水試料を採集し、表層 (10 m) と SCM (30 m) の比較トランスクリプトームを行った。得られた mRNA 配列のおよそ 35% 以上が珪藻に由来する配列であり、18S rRNA の配列情報から、ブルームは主に 4 種の珪藻で構成されていることが明らかとなった。そのうち *Thalassiosira nordenskiöldii* と *Chaetoceros debilis* に着目して解析を行った。大西洋ナラガンセット湾における先行研究と同様に、本研究においても表層において異なる栄養塩を用いることで、ニッチの住み分けを行っていることが示唆された。*T. nordenskiöldii* では表層で硝酸トランスポーターの発現量が上昇しており、対して *C. debilis* ではアンモニウムトランスポーターの発現量が上昇していた。

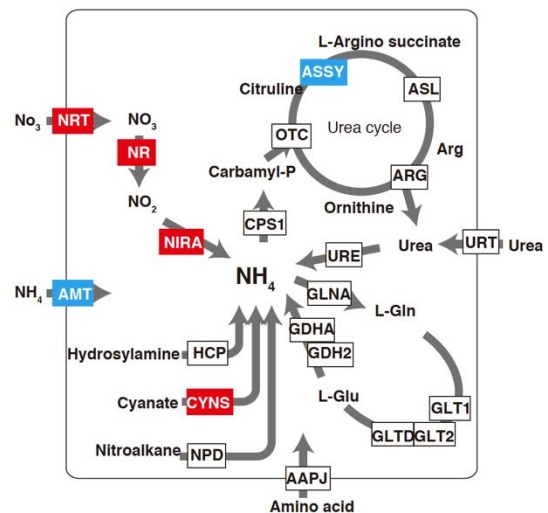


図 3.2-18. *T. nordenskiöldii* の窒素代謝関連連伝子の発現量変化。赤色、青色で示した遺伝子がそれぞれ表層、SCM で発現上昇する。

興味深いことに、*T. nordenskiöldii*ではSCMにおいてアンモニウムトランスポーターの発現上昇が見られ(図 3.2-18)、表層とSCMとの間で異なる栄養塩を用いていることが本研究において新たに示唆された。

また、これまでに4つの観測定点で得られた海水から微小プランクトンの培養株を作成し、最終的に計42株を国立環境研究所微生物系統保存施設に寄託した。今後は、メタ情報の整備をし、培養株とともに公開していく予定である。

### 3.3 自律式海洋微生物採取装置の検討(九州大学 石野グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

##### ・研究実施内容

船舶を用いた定点海水サンプリングは、航海の予定や作業員の確保などに依存するところが多く、また、水温や潮目などにも大きく影響されるので、正確な定点経時解析は容易なことではない。そのため、環境評価用DNAマーカーの開発及び海洋微生物叢のモニタリング解析を目的とする本プロジェクトにおいては、DNA調製に供するサンプルを海水中から均等に収集するための簡便な方法を開発することが極めて重要であると言える。「定点から経時的に一定量の海水を採取する」作業を実践的に行なうために、サンプル回収に作業者が海上に出て行かなくても良いような自立式自動採水装置を開発することが計画された。これを担当する九州大学が九州海域を利用して実施した。完成後に任意の場所に設置可能(トランスポートブル)なように設計し、東北海域の環境モニタリングに使用する計画であった。

本装置開発にあたっては、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、西海区水研が所有している海上ブイ上に試作装置を設置して、試運転しながら開発を進めた。西海区水研が所有する観測ブイは、海水温度、pH、溶存酸素、クロロフィル濃度などの海水の物理化学的データを取得するためのものであり、それに海水採取装置試作機を設置して、評価しながら実用的なものを作り上げた。観測ブイは主に、八代海の大多尾沖に設置されたものを利用した。

##### ・研究成果

自律式海洋微生物採取装置の機器開発については、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考え、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、八代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1号機を設置、サンプリングおよびサンプル処理を開始した。それによる定期的なサンプリングおよびサンプル処理を継続した。サンプリングは2週に1回行い、1回あたりのサンプリングで、15分おきに4連続採水を行なった。ろ紙を含む吸引ろ過後、DNA抽出を行なった。平成25年3月から平成26年2月までで、計92サンプルを処理し、288~5,820 ngのDNAが得られた。調製したDNAサンプルのうち配列解析を行うことができると判断したものについては、実際に配列解析に供した。定期サンプリングにより得られた様々な情報を参考に、配列解析可能なDNAを得るための機器開発の改良を続け、順次試作機をバージョンアップした。

1号機では自動採水はできたものの、ブイ上での自動ろ過システムに問題があり、実用的でなかったため、採取した海水を水中保存し、定期的に回収する方法の妥当性を検討した。採取した海水を、海水中に沈めたタンクに注ぎ、海水中で保存した場合に、DNA収量にどのくらいの違いが出るかについてモデル実験を行なった結果、少なくとも一週間の保存では、採取直後と変わらない収量でDNAが得られた。そこで、この方法を採用した2号機を設計して試作した。モデル実験では1ヶ月まで保存してDNA調製したが、18日目くらいから明らかにDNA収量が落ち、海中保存に問題があると判断された。その後の配列解析結果から、海水状態での保存では徐々にDNA組成に変化が見られることがわかり、やはり海水採取後直ぐにろ過までをブイ上で行なうことが望まれた。ろ過部分の改良を重点的に施した3号機では、多段階ろ過システム(図 3.3-1)での自動ろ過を完成させ、電力

消費と小型化に対応するため、出来る限りの見直しと改良を行なった。同時に、海水サンプルをろ過した後のフィルター保存状態について、どの程度の影響がでるのかについてモデル実験によって調査した。その結果、保存温度の影響はあまり出ずに、長期間の保存ができることが分かった。3号機を試作した結果、実海水では、ろ過途中につまりが生じてしまい、ろ過システムのさらなる改良が必要であった。3号機は小型ではあるが、圧力欠損が起こってしまう多段階ろ過方式を採用していたので、1段ごとにろ過する間欠式システム(図 3.3-2)に経路自体を大幅に改良して4号機を試作した。これを実際に作動させて、実験室での手動ろ過法と差異がないことを確認した。さらに改良を加え、ろ過部分をユニット方式にして、ユニット毎に取り出し可能にすることで、あらゆる場面に応じて現場作業が簡単にできるような構造に変更した。作成した4号機をH27年度に東北沿岸域へ設置し、実際にサンプリングを行なった。回収したフィルターサンプルからDNA抽出を行ない、配列解析へ進めることができた。これまでの結果を統合し、さらに小型化を図って、H28年度は最終版を完成させて、東北海域で稼働させる準備が整った(図 3.3-3)。完成した最終機を「微生物収集装置」として特許出願した(特願 2017-055138号 出願日 2017.3.21.)。



図 3.3-1. 多段階ろ過システム



図 3.3-2. 間欠式ろ過システム



図 3.3-3. 4号機(改良後)全体写真

DNA 調製に関しては、モデル実験による詳細な条件検討の結果、少なくとも細菌画分、ウイルス画分からのものは、十分にショットガンメタゲノム配列解析に使えるものが調製できている。PCR で特定の遺伝子を増幅して解読するのではなく、調製した DNA を丸ごと読むショットガンメタゲノムがルーチンに稼動しているプロジェクトはこれまでに存在しないので、本プロジェクトの成果は極めて大きいと判定できる。DNA 調製を含む配列解析の実験操作手順を確立したので、これは多方面に応用が可能であり、本プロジェクトの成果として特筆すべきことであると言える。

装置開発については、試作機の評価と平行して行なってきたモデル実験によって、これまで未知であった多くのデータを蓄積することができ、最終的に実用的な簡易型、移動型、自動採水・自動ろ過装置開発が実現できた。無からスタートして、5年間で簡易型・移動型自動採水・ろ過装置を完成させたことも、本プロジェクトの成果として明白に示されることである。本装置は、最終版を基にして、実際に機器開発メーカーが取り組めば、いつでも商品化が可能な状態である。



## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 3件、国際(欧文)誌 16件)

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), 68(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), 68(2), 1106-1110, 2012
3. I Ichinomiya, M., Nakamachi, M., Shimizu, Y. and Kuwata, A., “Growth characteristics and vertical distribution of *Triparma laevis* (Parmales) during summer in the Oyashio region, western North Pacific”, *Aquatic Microbial Ecology*, 68, 107-116, 2013 (DOI:10.3354/ame01606)
4. 笥茂穂, 伊藤進一, 和川拓, 仙台湾におけるセイシュの特性および発生機構に関する研究, 土木学会論文集 B2, 70, I\_456-I\_460, 2014
5. Karim Honein, Jagoda S S S De S, Arulkanthan A, Ushio H, Asakawa S. 2016. Draft genome sequences of *Citrobacter freundii* strains CF04 and A41 isolated from moribund, septicaemic giant gourami (*Osphronemus goramy*) in Sri Lanka. *Genome Announc.* 4(4):e00820-16. doi:10.1128/genomeA.00820-16.
6. Tan E, Chen Y, Kuan J, Lin C, Jagoda S S S De S, Lin F, Tzou W, Kinoshita S, Watabe S, Asakawa S, Liu S. 2014. Draft genome sequence of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain NTOU1, a thermophilic bacterium isolated from marine shallow hydrothermal vents. *Genome Announc.* 2(5):e01019-14. doi:10.1128/genomeA.01019-14.
7. Kakehi, S., Ito, S. I., Kuwata, A., Saito, H. and Tadokoro, K., “Phytoplankton distribution during the winter convective season in Sendai Bay, Japan.” *Continental Shelf Research*, 97, 43-53, 2015. (DOI:10.1016/j.csr.2015.02.005)
8. Ichinomiya, M. and Kuwata, A. “Seasonal variation in the abundance and species composition of the Parmales community in the Oyashio region, western North Pacific.”, *Aquatic Microbial Ecology*, 75, 207-223, 2015. (DOI:10.3354/ame01756)
9. Taniuchi, Y., Watanabe, T., Kakehi, S., Sakami, T. and Kuwata, A. “Seasonal dynamics of the phytoplankton community in Sendai Bay, northern Japan.” *Journal of Oceanography*, 2015. (DOI:10.1007/s10872-015-0334-0)
10. Sakami, T., Watanabe, T., Kakehi, S., Taniuchi, Y., Kuwata, A., “Spatial variation of bacterial community composition at the expiry of spring phytoplankton bloom in Sendai Bay, Japan.” *Gene*, 576, 610-617, 2016. (DOI:10.1016/j.gene.2015.10.011)
11. Yamagami, T., Matsukawa, H., Tsunekawa, S., Kawarabayasi, Y., Ishino, S. and Ishino, Y. “A longer finger-subdomain of family A DNA polymerases found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities”, *Gene*, 576, 690-695, 2016. (DOI:10.1016/j.gene.2015.10.030)
12. Kawachi, M., Kataoka, T., Sato, M., Noël, M., Kuwata, A. and Yamaguchi, H., “Application of cryopreservation to genetic analyses of a photosynthetic picoeukaryote community”, *Gene*, 576, 708-716, 2016 (DOI:10.1016/j.gene.2015.10.033)
13. Nagai, S., Hida, K., Urushizaki, S., Onitsuka, G., Yasuike, M., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Tajimi, S., Kimoto, K., Kobayashi, T., Gojobori, T., Otake, M. (2015) Influences of diurnal sampling bias on fixed-point monitoring of plankton biodiversity determined using a massively parallel sequencing-based technique., *Gene* 576 (2): 667-675.
14. Mineta, K. and Gojobori, T. (2015) Databases of the marine metagenomics., *Gene* 576 (2): 724-728.

15. Kataoka, T., Yamaguchi, H., Sato, M., Watanabe, T., Taniuchi, Y., Kuwata, A. and Kawachi, M., "Spatiotemporal distribution of small eukaryotic phytoplankton in the western North Pacific determined by pyrosequencing of 18S rDNA". FEMS Microbial Ecology, in press
16. Ichinomiya, M., Lopes dos Santos, A., Gourvil, P., Yoshikawa, S., Kamiya, M., Ohki, K., Audic, S., Colombari de Vargas, Mary-Hélène Noël, Vaultot, D. and Kuwata, A., "Diversity and oceanic distribution of the Parmales (Bolidophyceae), a picoplanktonic group closely related to diatoms", The ISME Journal 10:2419-2434,2016
17. Watanabe, T., Taniuchi, Y., Kakehi, S., Sakami, T. and Kuwata, A. (2017) "Seasonal succession in the diatom community of Sendai Bay, northern Japan, after the 2011 off the Pacific coast of Tohoku earthquake", Journal of Oceanography 73: 133-144,2017
18. Jagoda S S S De S, Tan E, Arulkanthan A, Kinoshita S, Watabe S, Asakawa S. 2014. Draft genome sequence of *Aeromonas hydrophila* strain Ae34, isolated from a septicemic and moribund koi carp (*Cyprinus carpio koi*), a freshwater aquarium fish. Genome Announc. 2(3):e00572-14.doi:10.1128/genomeA.00572-14.
19. Karim Honein , Jagoda S S S De S, Arulkanthan A, Ushio H, Asakawa S. 2017. Genome sequencing and annotation of *Aeromonas veronii* strain Ae52, a multidrug- resistant isolate from septicemic gold fish (*Carassius auratus*) in Sri Lanka. Genomics Data. 11:46-48. 10.1016/j.gdata.2016.11.011

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 河地正伸, "2-3-1-1. 採取・分離法 微細藻類", 藻類ハンドブック, NTS, 320-324, 2012 (ISBN: 9784864690027)
2. 河地正伸, "2-3-1-8. ピコ植物プランクトン", 藻類ハンドブック, NTS, 426-428, 2012 (ISBN: 9784864690027)
3. 河地正伸, "2-4-1. 微細藻類の凍結保存", 藻類ハンドブック, NTS, 334-337, 2012 (ISBN: 9784864690027)
4. 河地正伸, "藻類の多様性研究と種判別法の開発 ピコ植物プランクトンを例に", 国立環境研究所ニュース, 31(6), 4-5, 2013 (ISSN: 0916-6262)
5. 河地正伸, "第 7 章 微生物の凍結と乾燥 7-2-3 微細藻の凍結保存", 日本冷凍空調学会編冷凍空調便覧 IV 巻食品・生物編, 318-320, 2013 (ISBN: 9784889671209)
6. 桑田 晃, "海洋水産資源を支える珪藻の成功の秘密を未知の藻類:パルマ藻で探る", 東北水産研究レター, 29, 2, 2013 (ISSN:1881-4557)
7. 渡辺剛, 谷内由貴子, "仙台湾の植物プランクトン群集の季節変動ー東日本大震災が基礎生産者に与えた影響の解明に向けてー", 東北水産研究レター, 31, 2, 2014 (ISSN:1881-4557)
8. 桑田 晃, "海洋の珪藻", 環境と微生物の事典, 日本微生物生態学会編, 朝倉書店, pp.108-109. 2014 (ISBN: 9784254171587)
9. 谷内由貴子, "海の窒素固定", 環境と微生物の事典, 日本微生物生態学会編, 朝倉書店, 129-130, 2014 (ISBN: 9784254171587)
10. Kuwata, A. and Jewson, D. "Ecology and evolution of marine diatoms and Parmales." In Marine Protists: Diversity and Dynamics. 251-275. 2015

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 5 件、国際会議 2 件)
1. 渡辺 剛. "形態や微細構造からみた珪藻の種", 珪藻学会第 36 回大会, 東京大学, 2015.5.10.
  2. 吉武和敏. "Digital DNA chip による生物多様性評価と環境予測法の開発", マリンバイオテクノロジー学会, 東京海洋大学品川キャンパス, 2015.5.30.

3. 桑田 晃. “珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類:パルマ藻の生物学”, 2015 年微生物学リファレンスセンター研究集会, 東北大学, 2015.8.9.
4. 桑田 晃. “Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems.”, Gordon Research Conference “Marine Molecular Ecology”, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China., 2015.8.15.
5. 坂見知子. “デジタル DNA チップを用いた海洋の低次生態系における生物多様性の評価”, 公開シンポジウム「海洋の多様性保全と次世代水産業を拓く新技術」, 笹川平和財団ビル, 2016.3.12.
6. 桑田 晃. “春季親潮周辺海域における珪藻のブルーム形成とその長期変動”, 2016 年度水産海洋シンポジウム, 東京大学, 2016.3.14.
7. Takashi Gojobori, Keynote Speech “Dynamic Changes of Marine Microbial Communities over Time”, The 50th Anniversary of World Data Center for Microorganisms, Beijing Friendship Hotel, Beijing, China, 2016.9.6.
- ② 口頭発表 (国内会議 26 件、国際会議 11 件)
  1. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Ohki K, Kamiya M, Takaichi S, Kawachi M, Saitoh K, Sato N, Sawada K. “PARMALES, AN INSIGHT INTO DIATOM ANCESTRY?”, 米国藻類学会, 米国チャールストン, 2012.6.21.
  2. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Ohki K, Takaichi S, Kawachi M, Saitoh K, Sato N, Sawada K. “Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems.”, EMBO workshop “The molecular life of diatoms”, Paris, 2013.6.28.
  3. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Ohki K, Kamiya M, Takaichi S, Kawachi M, Saitoh K, Sato N, Sawada K. “EXPLORING THE EVOLUTIONARY LINK BETWEEN PARMALES AND THE SUCCESS OF DIATOMS IN MARINE ECOSYSTEMS”, 先進陸水海洋学会, 大津, 2013.7.11.
  4. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Ohki K, Kamiya M, Takaichi S, Kawachi M, Saitoh K, Sato N, Sawada K. “Parmales: an insight into the origin and evolutionary success of diatoms.”, 国際珪藻シンポジウム, ベルギー, ゲント大学, 2013.8.31.
  5. 笥茂穂, 伊藤進一, 八木宏, 和川拓. “仙台湾における ADCP 調査と残差流の推定”, 2012 年度日本海洋学会秋季大会, 静岡, 2013.9.14.
  6. 陳盈光, 他 15 名. “次世代シーケンサーを用いた東北沿岸海洋微生物叢のメタゲノム解析”, 2013 年度日本水産学会秋季大会, 三重, 2013.9.20.
  7. Kawachi, M., “Algae and Protist Culture Collection at NIES and related projects.”, 5th Meeting of Asian Network of Research Resource, Hayama, 2013.11.1
  8. 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”, 第 59 回海岸工学講演会, 広島, 2013.11.14.
  9. 笥茂穂, 佐々木浩一, 伊藤進一, 和川拓. “台湾における ADCP 往復調査による残差流の推定”, 水産海洋学会創立 50 周年記念大会, 東京, 2013.11.17.
  10. Kuwata, A., “Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems.”, International Symposium on Aquatic Metagenomics, Tokyo, 2013.11.23.
  11. 笥茂穂, 伊藤進一, 八木宏, 和川拓. “仙台湾における海水平均滞留時間の推定”, 第 62 回東北海区海洋調査技術連絡会, むつ, 2013.12.11.
  12. 森隆久, 池尾一穂, 五條堀孝. “仙台湾における海洋微生物叢のメタゲノム解析”, DNA 鑑定学会第6回大会, 東京, 2013.12.11.
  13. Mori T, Ikeo K, Gojobori T. “Metagenomics to capture dynamics of marine microorganisms in Sendai bay.”, International Symposium on Aquatic Metagenomics., Tokyo, 2013.

14. 谷内由貴子, 渡辺剛, 笥茂穂, 坂見知子, 桑田晃. “仙台湾における植物プランクトンの群集構造の季節変動”, 2014 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2014.3.28.
15. 渡辺剛, 谷内由貴子, 笥茂穂, 坂見知子, 桑田晃. “仙台湾における珪藻群集の種組成と季節変動”, 2014 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2014.3.28.
16. 桑田晃, 田所和明, 富樫博幸, 高野宏之, 緑川貴. “北海道沖観測定線の長期観測データによる親潮域のプランクトン珪藻群集の季節変動と長期変動解析”, 2014 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2014.3.29.
17. 笥茂穂, 伊藤進一, 和川拓.”仙台湾におけるセイシュの特性および発生機構に関する研究”, 第 61 回海岸工学講演会, 名古屋, 2014.11.13.
18. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Yamada K, Kawachi M, Saitoh K, Nakamura Y, Sato N, Tajima N, Sawada K, Vaultot D, Lopes A, Audic S, de Vargas C. “Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems.”, ASLO 2015 Aquatic science meeting, Granada (Spain), 2015.2.25.
19. 桑田 晃. “親潮域・黒潮親潮移行域における植物プランクトン群集の基礎生産と群集構造”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.25.
20. 渡辺 剛. “A-line における珪藻類の群集構造の季節変動および経年変動”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.25.
21. 谷内由貴子. “A-line におけるピコ植物プランクトン群集構造の季節変動と経年変動および今後の展望”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.25.
22. 一宮睦雄, 清水勇吾, 桑田 晃. “A-line における海洋ピコ植物プランクトンパルマ藻群集の季節変動”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.25.
23. 渡辺 剛. “仙台湾における浮遊性珪藻群集の種組成と季節変動”, 珪藻学会第 36 回大会, 東京大学, 2015.5.10.
24. 片岡剛文. “親潮黒潮移行域における真核ピコ植物プランクトンの系統群組成”, 日本地球惑星連合, 幕張メッセ, 2015.5.28.
25. 桑田 晃. “パルマ藻から珪藻の進化の秘密を探る”, 第 17 回日本進化学会大会, 中央大学後楽園キャンパス, 2015.8.20.
26. 桑田 晃. “珪藻の姉妹群パルマ藻とボリド藻の多様性と全球分布”, 日本海洋学会 2015 年度秋季大会, 愛媛大学, 2015.9.29.
27. 西部裕一郎, 渡辺 剛, 谷内由貴子, 神山孝史, 桑田 晃, 立花愛子, 津田 敦. “東北沿岸域のプランクトン群集に対する津波の影響”, 平成 27 年度日本水産学会理事会特別シンポジウム, 東北大学, 2015.9.21.
28. 松本薫.”Seasonal change of surface layer bacterial community in Sendai Bay”, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ, 2015.10.19.
29. 笥 茂穂. “冬季仙台湾におけるブルーム発生メカニズムの解明”, 平成27年度東北ブロック水産海洋連絡会, 仙台, 2015.11.24.
30. 笥 茂穂. “冬季仙台湾における植物プランクトンブルーム形成メカニズム”, 第 65 回東北海区海洋調査技術連絡会, 塩釜, 2016.1.21.
31. Watanabe, T., Kasai, H., Taniuchi, Y., Kuroda, H., Kuwata, A. “Comparison with phytoplankton communities of different water mass in the southwestern Okhotsk Sea in summer”, The 31th International Symposium on Okhotsk Sea and Sea ice, 紋別市博物館, 2016.2.23.
32. 笥 茂穂. “冬季仙台湾におけるブルーム発生メカニズム”, 日本海洋学会 2016 年度春季大会, 東京大学, 2016.3.17.
33. 渡辺 剛, 葛西広海, 谷内由貴子, 黒田 寛, 桑田 晃. “夏季のオホーツク海における植物プランクトン群集と水塊構造の関係”, 日本海洋学会 2016 年度春季大会, 東京大学, 2016.3.17.

34. 渡辺 剛, 葛西広海, 谷内由貴子, 黒田 寛, 桑田 晃. “夏季オホーツク海南西域の異なる水塊における植物プランクトン群集”, 日本藻類学会第 40 回大会, 日本歯科大学, 2016.3.20.
35. Watanabe, T., Taniuchi, Y., Sakami, T., Yoshitake, K., Kakehi, S., Kuwata, A. “Seasonal dynamics of phytoplankton communities in Sendai Bay, Japan: Comparison of microscopic and metagenomic approaches”, Kitasato-KAUST Joint International Workshop Marine Metagenomics: Comparative Study among Different Marine Resources, 大船渡, 2016.8.25.
36. Sakami, T., Watanabe, T., Taniuchi, Y., Kuwata, A, Kakehi, S., Yoshitake, K., Gojobori, T. “Variation of bacterial community composition in relation to hydrographical profiles in Sendai Bay”, Kitasato-KAUST Joint International Workshop Marine Metagenomics: Comparative Study among Different Marine Resources, 大船渡, 2016.8.25.
37. 渡辺 剛, 柳澤和明. “宮城県砂押川における汽水・海産珪藻の遡上に関する研究”, 日本珪藻学会第 36 回研究集会, 山形, 2016.10.22.

③ ポスター発表 (国内会議 17 件、国際会議 9 件)

1. 山口晴代, 出村幹英, 杉崎宏哉, 河地正伸. “黒潮周辺海域における真核性ピコプランクトンの多様性”, 第 11 回日本植物分類学会, 大阪学院大学, 2012.3.23-25.
2. 山口晴代, 出村幹英, 杉崎宏哉, 河地正伸. “黒潮周辺海域における真核ピコプランクトンのメタ 18S rDNA 解析”, 日本藻類学会第 36 回大会, 札幌, 2012.7.
3. Kawachi, M., Demura, M. and Noel, M., “Cryopreservation techniques applied to the analysis of oceanic picoplankton diversity”, The 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, 2012.8.
4. Yamaguchi, H., Demura, M. and Kawachi, M., “Huge diversity of marine eukaryotic picoplankton in Sendai Bay, Japan: using next-generation sequencing approach for meta 18S rDNA analyses”, The 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, 2012.8.
5. 金田敏枝. “環境モニタリングを目的とした海洋微生物メタゲノム解析のための DNA 抽出法の確立”, 環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会, 北九州国際会議場, 2013.5.30.
6. 陳盈光, 木下滋晴, 浅川修一, 金 相完, 服部正平, 石野良純, 小野浩明, 坂見知子, 桑田晃, 渡辺 剛, 谷内由貴子, 小林敬典, 渡部終五, 森 隆久, 池尾一穂, 五條堀孝. “NGS を用いた日本東北沿岸海洋微生物叢のメタゲノム解析”, 第3回 NGS 現場の会, 神戸, 2013.9.4.
7. 笈茂穂, 齊藤宏明, 佐々木裕愛, 伊藤進一, 奥西武, 和川拓, 大野創介, 田所和明, 奥村裕, 神山孝史. “成層期における仙台湾への外洋水による栄養塩供給”, 2013 年度日本海洋学会秋季大会, 札幌, 2013.9.18
8. Taniuchi, Y., Kodama, T., Sakamoto, K., Nakagawa, M., Yoshie, N., Hasegawa, T., Hidaka, K., Ichikawa, T. and Kuwata, A. “Distribution of marine diazotrophic cyanobacteria around Japan in the western North Pacific Ocean in summer.”, 18th International Congress on Nitrogen Fixation, 宮崎, 2013.10.16.
9. 笈茂穂, 伊藤進一, 奥西武, 和川拓, 奥田邦明. “親潮前線の季節的な変動について”, 2013 年度水産海洋学会研究発表大会, 京都, 2013.11.16.
10. 陳盈光, 他 15 名. “Sequencing and metagenomic analysis of sea microorganisms in coastal areas of Sanriku, Japan.”, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2014.12.3.
11. 山口晴代, 佐藤真由美, 谷内由貴子, 渡辺剛, 桑田晃, 河地正伸. “フローサイトメトリーを用いた真核ピコプランクトンの多様性解析”, 第 38 回日本藻類学会, 船橋, 2016.3.15
12. 森隆久, 池尾一穂, 五條堀孝. “仙台湾における海洋微生物叢のメタゲノム解析”, 第

- 87 回日本細菌学会総会, 東京, 2014.3.26.
13. Sakami, T., Kakehi, S. and Ito, S. “Distribution of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the coastal sediments of the Sendai Bay in Japan.”, 15th International Symposium of Microbial Ecology (ISME15), Seoul, 2014.8.24-29.
  14. Kataoka, T., Yamaguchi, H., Kuwata, A., Kawachi, M. “Community compositional analysis using 454 sequencing applying cryopreserved eukaryotic picophytoplankton originated from marine environments”, NIES, Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies Symposium: Unraveling Biodiversity from DNA -From the management of database to the use of next generation sequencers-, NIES, Tsukuba, 2014.9.19.
  15. 片岡剛文, 山口晴代, 桑田晃, 河地正伸. “454 シーケンスによる真核ピコ植物プランクトン群集構造解析における試料保存法の有効性”, 2014 環境微生物系学会合同大会, 浜松, 2014.10.22.
  16. Engkong Tan, Shigeharu Kinoshita, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe, Sangwan Kim, Masahira Hattori, Kazutoshi Yoshitake, Takahisa Mori, Kazuho Ikee, Tsuyoshi Watanabe, Yukiko Taniuchi, Tomoko Sakami, Akira Kuwata, Takanori Kobayashi, Yoshizumi Ishino, Takashi Gojobori. “Evaluation of biodiversity of sea microorganisms in Sendai Bay, Japan, using metagenomic analysis.”, 第 37 回日本分子生物学会, 横浜, 2014.11.25.
  17. 吉武和敏, 前田隼輔, 相場厚輝, 山川武廣, 辻本敦美. “DDCA を利用した未知の微生物を含むメタゲノム解析”, 分子生物学会, パシフィコ横浜, 2014.11.26.
  18. 片岡剛文, 山口晴代, 桑田晃, 河地正伸. “次世代シーケンス法と凍結保存法を用いた仙台湾における真核ピコ植物プランクトン群集の季節変動解析”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.23.
  19. 谷内由貴子, 渡辺剛, 桑田晃. “A-line におけるピコ植物プランクトンの群集構造と生理生態”, 2015 年度日本海洋学会春季大会, 東京, 2015.3.24.
  20. 片岡剛文. “次世代シーケンス法による仙台湾の真核ピコ植物プランクトン群集の季節変動解析”, NGS 現場の会第4回研究会, つくば国際会議場, 2015.7.3.
  21. 片岡剛文. “454 シーケンスを用いた三陸沖における微小真核植物プランクトンの季節変動解析”, 2015 日本微生物生態学会第 30 回大会 7th JTK 合同シンポジウム, 土浦市 亀城プラザ, 2015.10.19.
  22. Kuwata, A. “Biology of a picoeukaryotic phytoplankton, Parmales, a sister group of diatoms”, EMBO | EMBL Symposium: A New Age of Discovery for Aquatic Microeukaryotes, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg, Germany, 2016.1.27.
  23. Yoji Igarashi, Engkong Tan, Daisuke Mori, Yusuke Osaki, Susumu Mitsuyama, Shigeharu Kinoshita, Shugo Watabe, Shuichi Asakawa. “Characterization of marine metagenome based on the protein motif”, Ofunato international workshop 2016, 三陸臨海教育研究センター, 2016.8.24.
  24. 片岡剛文, 山口晴代, 佐藤真由美, 渡辺剛, 谷内由貴子, 桑田晃, 河地正伸. “Seasonal and geographical distribution of near-surface small photosynthetic-eukaryotes in the western North Pacific determined by pyrosequencing of 18S rDNA”, 海洋微生物メタゲノム解析国際ワークショップ-紅海と三陸沿岸の接点-, 北里大学 三陸臨海教育研究センター, 2016.8.24.
  25. Kuwata A, Ichinomiya M, Yoshikawa S, Yamada K, Kawachi M, Saitoh K, Nakamura Y, Sato N, Tajima N, Sawada K, Lopes A, Vaultot D. “The evolutionary link between parmales and the success of diatoms in marine ecosystems” KITASATO-KAUST Joint International Workshop Marine Metagenomics: Comparative Study among Different Marine Resources, 大船渡, 2016.8.25.
  26. 片岡剛文, 山口晴代, 桑田晃, 河地正伸. “春期ブルーム中の親潮黒潮移行域において活発に分裂する細菌群集 (Active growing bacteria: AGB) の組成比較”, 日本微生物

生態学会横須賀大会, 横須賀市文化会館, 2016.10.23.

(4)受賞

①受賞

1. 第2回青田昌秋賞(海洋生物部門)、谷内由貴子、2015.2.18.

§5 研究期間中の活動

5.1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013年11月 23-24日	国際水圏メタゲノムシン ポジウム	北里大学薬 学部コンベ ンションホ ール	349名	海洋メタゲノム研究の最前 線で活躍中の海外・国内の 研究者を召集したシンポジ ウム。五條堀チーム・小暮チ ーム・竹山チームの遺伝子 関係チームにて発表・運営 協力を行った。
2015年11月 28日	講義(東京大学教養学 部)	東京大学農 学部	100名	CREST 研究内容を紹介
2015年12月 11日	講義(東京大学教養学 部)	東京大学農 学部	150名	CREST 研究内容を紹介
2016年6月 10日	講義(大阪大学大学院 工学系研究科)	大阪大学工 学部	80名	CREST 研究内容を紹介
2016年6月 10日	講義(大阪市立大学大 学院工学系研究科)	大阪市立大 学工学部	12名	CREST 研究内容を紹介
2016年7月 22日	講義(三重大学大学院 生物資源学研究科)	三重大学生 物資源学部	3名	CREST 研究内容を紹介
2016年11月 25日	講義(岐阜大学大学院 工学系)	岐阜大学工 学部	30名	CREST 研究内容を紹介
2016年12月 14日	講義(東京大学大学院 理学系)	東京大学理 学部	30名	CREST 研究内容を紹介