

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「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者:竹山 春子  
(早稲田大学理工学術院 教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

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、主に人為活動による陸域からの赤土流入などにより、サンゴの生育環境は大きく攪乱している。サンゴ礁は生物多様性が高いが、非常に脆弱な環境であり、透明度が高く貧栄養の環境が必要とされている。その詳しい成り立ちと環境の理解、保全・再生の方法はまだ確立されていない。

サンゴには褐虫藻をはじめとする多種多様な微生物が生息しているが、細菌も重要な役割を担っている。しかしながら、それら微生物と、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。本研究の目的は、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行うことにある。その目的のために、サンゴ共生・共在細菌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した。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の開発を行うのと同時にサンゴ礁の水温などの環境データを継続的に計測し、分子生物学的データと環境データとを有機的に統合することで、環境リスク予測モデルの構築を推進した。

2017年8月までに、バイオ計測グループと沖縄グループでサンプリングを実施し、主要サンプリングサイトである、瀬底の周辺海域から石川原、瀬底南、さらには2016年には、恩納村漁港、読谷村も追加して、種々のデータの蓄積を行った。サンゴおよび海水のバイオデータはバイオ計測グループが取得し、観測定点におけるサンゴ共在細菌群の変動を解明した。また、同グループが微小液滴を用いたシングルセル解析技術、および微量サンプルを用いたオミックス解析技術の開発を大きく進展させた。環境の物理・化学的データおよび観測定点の地形情報は沖縄グループが取得し、定点を詳細に把握した。計算機解析グループは解析基盤となるデータベースおよび解析ツール・手法を整備した。さらにバイオデータと環境データを統合した数理モデルを構築した。

### (2) 顕著な成果

#### <優れた基礎研究としての成果>

1. サンゴ共在微生物のゲノム情報を取得することは重要であるが、分離培養に依存した手法では各 OTU に相当した細菌叢の分離は困難なため、より包括的で確実なゲノム情報の取得に最適であるマイクロ流体デバイスを用いたシングルセルゲノム解析プラットフォームの構築ができた。そこでは、液滴を用いてコンタミネーションを押さえたシングルセルゲノムを増幅する手法、超並列的にゲノム増幅を行う手法を完成させた。さらに、これらのデータを束ねることによる新たなバイオインフォマティクス解析技術も開発し、非常に精度の高いゲノム情報の取得プラットフォームが完成した。これらの手法により、サンゴの健康状況と関わりが深いと考えられる共在細菌として注目すべき *Endozoicomonas* 属のゲノム情報取得に至った。本技術はシングルセルを基礎としたゲノムデータベース構築の基盤技術としての貢献とともに、様々な応用研究へと繋がった。論文・学会での発表、学術誌の表紙や QIAGEN 社の研究紹介 (WEB) で取り上げられるなど、多くの注目を集め、国内外の大学、企業との共同研究に至っている。

2. サンゴ礁研究におけるオミックス解析は、世界的に進められているが、経年でのビックデータ解析が進められているところはまだ少ない。日本では初めての成果でもあり地域的な比較データとして今後非常に重要な情報となる。特に、本研究では、サンゴ宿主とサンゴ内の褐虫藻や細菌との相互関係の解析をすすめているが、特に細菌のなかでも特徴的な *Endozoicomonas* 属のゲノム多様性やその機能に関して新たな考え方を提唱している。また、これらの分子生物学的な側面から、共生、複合系における相互関係に関して、より進化的な示唆を示すことができ、生物学的なインパクトは大きい。

#### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 現在市場にあるマイクロ流体デバイスの多くは使用用途が限定されており、研究者ユーザーのアイデアを具現化するためには大きな障害がある。とくに液滴を用いた反応系は昨今のシング

ルセル解析分野の盛り上がりを受け、非常に大きな注目を集めている。我々は、オープンサイエンスの考えで、広く技術提供や個々のニーズに合わせた設計相談を行い、共同研究を実施している。これらが CREST 課題の目標を超え、幅広い分野で活用され将来の科学技術イノベーションへつながるものと考えられる。

2. 本研究チームでは、昨年度終了した五條掘チーム、木暮チームの海洋ビッグデータも取りまとめ、日本を代表する海洋 DB が完成しつつあり、一部は公開した。これは、世界レベルでも類をみない時系列データのあるビッグ DB となり、今後の AI 時代において環境科学、水産業等への波及効果のある DB となる。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「バイオ計測・早稲田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
竹山 春子	早稲田大学理工学術院	教授	H24.10～
五條堀孝	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	招聘研究教授	H29.4～
庄子 習一	早稲田大学理工学術院	教授	H24.10～
神原 秀記	早稲田大学理工学術院	招聘研究院教授	H24.10～
細川正人	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	招聘研究員	H25.7～
丸山 徹	早稲田大学理工学術院	D3	H25.1～
西川洋平	早稲田大学理工学術院	D2	H25.7～
吉田雅駿	早稲田大学理工学術院	M2	H27.4～
竹田裕貴	早稲田大学理工学術院	M2	H27.4～
岡田直子	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	研究助手	H26.4～
佐藤 矩行	沖縄科学技術大学院大学	教授	H26.4～
新里 宙也	東京大学大気海洋研究所	教授	H26.4～
井出圭吾	早稲田大学理工学術院	M1	H29.4～
小川雅人	早稲田大学理工学術院	M2	H29.4～
伊藤 遥	早稲田大学理工学術院	M1	H29.4～
常田 聡	早稲田大学理工学術院	教授	H24.10～H26.3
モリ テツシ	早稲田大学理工学術院	講師	H24.10～H29.1
白井 正敬	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	招聘研究員	H24.10～H27.3
馬場 健史	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	招聘研究員	H25.4～H27.3
伊藤通浩	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	次席研究員	H25.4～H29.3
鈴木 明香	早稲田大学理工学術院	D3	H25.4～H26.3
Muhammad Wahyudin Lewaru	早稲田大学理工学術院	D3	H25.1～H28.3
若王子 智史	早稲田大学理工学術院	D3	H25.3～H27.3
依田 卓也	早稲田大学理工学術院	M2	H25.1～H27.3
和田 倭	早稲田大学理工学術院	M2	H25.1～H27.3
宮岡理美	早稲田大学理工学術院	M2	H25.7～H27.3
山岸恵輔	早稲田大学理工学術院	M2	H25.7～H28.3
石橋蓉子	早稲田大学先端科学・ 健康医療融合研究機構	研究補助員	H25.9～H26.3
藤田雅子	早稲田大学ナノ・ライフ フ創新研究機構	研究助手	H27.4～H28.3
大久保悠介	早稲田大学理工学術院	M2	H26.4～H29.3

研究項目

- ・シングルセルメタゲノム解析
- ・メタトランスクリプトーム解析
- ・生体機能情報チップと活用
- ・統合データベースの構築

②「沖縄」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
須田 彰一郎	琉球大学 理学部	教授	H24.10～
立原 一憲	琉球大学 理学部	准教授	H24.10～H26.3
藤村 弘行	琉球大学 理学部	准教授	H24.10～
酒井 一彦	琉球大学 熱帯生物圏 研究センター瀬底研究施設	教授・センター長	H24.10～
波利井 佐紀	琉球大学 熱帯生物圏 研究センター瀬底研究施設	准教授	H25.4～H26.3
中野 義勝	琉球大学 熱帯生物圏 研究センター瀬底研究施設	技術専門職員	H25.4～
嘉手納 丞平	琉球大学 熱帯生物圏 研究センター瀬底研究施設	技術職員	H25.4～
伊藤 通浩	琉球大学 熱帯生物圏 研究センター分子生命科学 科学研究施設	助教	H29.4～ (H25.4-H29.3 は バイオ計測グル ープで参加)
池松 真也	沖縄工業高等専門学校	教授	H24.10～H26.3
山城 秀之	沖縄工業高等専門学校 (現 琉球大学 熱帯生 物圏研究センター瀬底研 究施設)	教授	H24.10～H26.3
大慈彌みち子	琉球大学 理工学研究 科	博士研究員	H25.4～H26.9
澄本 晋平	琉球大学 理工学研究 科	M2	H25,4～H26.3
瀬戸 雄飛	琉球大学 理工学研究 科	M2	H25,4～H26.3
中村 将平	琉球大学 理工学研究 科	M2	H27,4～H29,3
五十嵐 雅明	琉球大学 理工学研究 科	M2	H27,4～H29,3
Handung Nuryadi	琉球大学 理工学研究 科	M1, 2	H28,10～

研究項目

- ・シアノバクテリア生態研究・調査
- ・魚類生態研究・調査

- ・海洋水質研究・データ収集・解析
- ・サンゴ礁生態研究・調査・データ収集・解析

### ③「計算機解析・京都」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
藤渕 航	京都大学	教授	H24.10～
五斗 進 (平成29年度よりDBCLS異動のため連携研究者)	情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター (京都大学・ライフサイエンス統合データベースセンター)	教授  (准教授)	H24.10～
山根 順子	京都大学	特定研究員	H28.4～
森 智弥	京都大学	特定研究員	H28.4～
加藤 毅 (連携研究者)	群馬大学	准教授	H28.12～
谷山 暢子	京都大学	教務補佐員	H29.4～
陳 影	京都大学	オフィス・アシスタント(技術)	H29.5～
田中 道廣	京都大学	特定拠点助教	H24.10～H.26.3
山根 順子	京都大学	特定研究員	H24.10～H26.3
小林 健太	京都大学	技術補佐員	H25.1～H29.3
田中 健一	京都大学	研究員	H25.4～H26.3
KIRWAN, Gemma May	京都大学	研究員	H25.1～H25.2
JOANNIN, Nicolas	京都大学	研究員	H25.4～H25.6
丸山 徹	京都大学	M1	H25.4～H27.3
松島 正知	京都大学	技術補佐員	H25.9～H25.9
加藤 有己	京都大学	特定拠点助教	H26.5～H28.3
清水 祐吾	京都大学	技術補佐員	H27.12～H28.9
岡西孝真	京都大学	技術補佐員	H27.4～H29.3
湯地みどり	京都大学	研究員	H27.7～H28.12
桜井 都衣	京都大学	特定研究員	H28.4～H29.3

研究項目

- ・海洋微生物のオミックスデータベースの構築
- ・海洋微生物グランドゲノム解析法の構築
- ・海洋汚染度・生物多様性・カタストロフィー-予測法の開発

### ④「木暮」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
木暮一啓	東京大学大気海洋研究所	教授	H29.4～

研究項目

- ・統合データベース構築およびデータ検証

⑤「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	H29.4～
田代 康介	九州大学大学院農学研究院	准教授	H29.4～
金田 敏枝	九州大学大学院農学研究院	テクニカルスタッフ	H29.4～

研究項目

- ・統合データベース実証およびマニュアル作成

⑥「木村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
木村学	日本ソフトウェアマネジメント (株)	グループリーダー	H29.4～
辻本敦美	日本ソフトウェアマネジメント (株)	主管研究員	H29.4～
小野浩明	日本ソフトウェアマネジメント (株)	社員	H29.4～
松野 恭兵	日本ソフトウェアマネジメント (株)	社員	H29.4～
庄司 健人	日本ソフトウェアマネジメント (株)	社員	H29.4～

研究項目

- ・統合データベース構築および改良

(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) CREST 本領域内チーム間連携研究

- ・「五條堀チーム・木暮チーム・竹山チーム統合データベースの構築」(バイオ計測・早稲田グループ)

海洋微生物群を共通の研究対象とするデータベース構築の連携研究が推進された。竹山チームでは、サンゴ礁海域の菌種組成データおよびメタトランスクリプトームデータを当該データベースに登録している。29年度に、五條堀チーム・木暮チームが、竹山チームに参画し、統合データベースを完成させ、一部を公開した。

- ・「酸性化応答現場実験・観測システム」(バイオ計測・早稲田グループ)

茅根チームおよび仲岡チームとの連携研究である。サンゴ礁海域において、仲岡チームの二酸化炭素濃度を増加させる野外操作実験を取り入れ、炭酸系の変化と群集代謝の変化を観測するとともに(茅根チーム)、操作に伴うサンゴ共在微生物群集の変化を把握する(竹山チーム)などを目的とした。これにより、沿岸生態系の海洋酸性化応答の総合的評価システムの開発を目指した。連携したシンポジウムを行い、国際的な討議を進めた。

- ・「CREST 成果を用いたフィールドキャンペーン：深場サンゴ礁の生物群集調査」

茅根、近藤、浦、赤松チームと連携して深場サンゴ礁の生物相と環境を明らかにすることとした。調査地点として、瀬底島北方のシゲオリーフ(水深40m)と、水納島西方の水納曾根南(水深65-75m)を選定し平成29年度は8月14-19日に合同調査を行なった。(バイオ計測・早稲田グループ、沖縄グループ)平成30年夏に再度行う計画である。

## 2) 国内外アカデミアとの連携研究

### 「国際共同研究」

- ・スイスチューリッヒ工科大学 (ETH) の Joern Piel 教授とはカイメン共在微生物に関する研究連携を進めており国際共著論文を Nature (2014)、Nature chemical biology (2015)をすでに発表している。現在、本研究で開発したマイクロドロップレットを用いたシングルセルゲノム解析技術の共同研究を展開している。(バイオ計測・早稲田グループ)。その他、シンガポール NTU 等との共同研究で多様なサンプルにおけるシングルセル解析を進めている。(バイオ計測・早稲田グループ)

### 「国内共同研究」

- ・マイクロドロップレットを用いたシングルセル解析の応用として複数の大学とメタボローム解析、ゲノム解析を目的とした連携が進んでいる。環境サンプルから腸内細菌まで幅広い対象での研究展開が進んでいる(バイオ計測・早稲田グループ)
- ・国立環境研究所と京都大学 iPS 細胞研究所間との合意により、協力して環境因子のベイジアンネットワーク解析を行う体制を整え、国立環境研究所で開発した高性能ベイジアンネットワーク解析ソフトウェア RX-TAOgen の無償利用契約を締結し、本 CREST 研究に活用した。(計算機解析・京都グループ)

## 3) 産業界・民間団体との連携

- ・マイクロドロップレットを用いたシングルセル解析システムの開発や、それらを利用した応用研究で民間企業との共同研究をスタートしている。(バイオ計測・早稲田グループ)
- ・平成 28 年度より、H28 年度より、恩納村漁港との連携で恩納漁港前のサンゴ養殖場と、読谷村の(有)海の種が運営する「さんご畑」の水槽およびその地先のサンゴ植え付け場をサンプリングポイントとして、サンゴ共在細菌叢解析等を進めている。(バイオ計測・早稲田グループ、沖縄グループ)

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3. 1次世代型マリンメタオミックス解析と支援技術開発 (早稲田大学 バイオ計測グループ)

##### (1) シングルセルメタゲノム解析

##### サブテーマ 1: サンゴ共生細菌叢の菌種組成解析 (バイオ計測グループ、沖縄グループ)

環境評価および予測にサンゴ共生微生物情報を用いる上では、i) 観測定点に棲息するサンゴ群体における優占種、ii) 観測定点において特徴的に出現する種、および iii) 環境変動に対して特徴的に変動する種、のi) -iii) の情報を得ることが重要である。そこで、サンゴ礁海域に棲息する難培養性微生物を含めた微生物群の環境変動に伴う動態を解明することを目的として、サンゴ共生細菌の菌種組成解析を行った。

##### 1) 定点観測

沖縄県瀬底島周辺の、ミドリイシ属サンゴの被度が高い「瀬底南」と、その被度が低い「石川原」を観測定点とし、これら2定点に生息するウスエダミドリイシの特定 5 群体をモニタリング群体とした (図 1A)。石川原では H26 年 7 月以降、瀬底南では H26 年 9 月以降にモニタリング群体を GPS 定位し固定している。

加えて、H28年度より、恩納村の恩納漁港前のサンゴ養殖場(「恩納村」とする)と、読谷村の(有)海の種が運営する「さんご畑」の水槽(「読谷・水槽」とする)およびその地先のサンゴ植え付け場(「読谷・地先」とする)を定点とした (図1B)。



図 1 (A) 沖縄県瀬底島周辺の「石川原」「瀬底南」の 2 定点 (B) 恩納漁港前、読谷さんご畑、瀬底島の位置関係

サンプリングは、石川原・瀬底南では毎月の12回、恩納漁港前で6回、さんご畑前で7回、さんご畑水槽で6回実施した。サンプリング群体を固定して以降のサンプリング回数は石川原、瀬底南では通算35回となった。

##### 2) 16S rRNA遺伝子を指標にしたサンゴ共生細菌の菌種組成解析

対象群体のそれぞれからウスエダミドリイシの枝をサンプリングし、枝全体から組織をウォーターピック法にて回収した。この組織画分からメタゲノムDNAを抽出後、16S rRNA遺伝子V1-V2領域をターゲットとしてPCR増幅したのち、次世代シーケンサーIon PGM(ライフテクノロジーズ社)を用いて増幅産物の解析を行った。

以上のサンゴ共生細菌の菌種組成解析とともに、対象群体の周辺海水をサンプリングし、同様に菌種組成解析を行った。サンゴのサンプリングと同日に、観測定点に設置した多項目水質ロガーの近傍から海水を採水した。真核生物を除去する目的で、いったん上記海水サンプルをGFA(孔径1.6  $\mu\text{m}$ )で濾過した。次に、得られた濾液1 Lをメンブレンフィルター(孔径0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過することで、海水1 L中のバクテリアをメンブレンフィルター上に回収した。これ以降の操作は共生細菌の菌種組成解析と同様に行った。

2014年7月から2018年8月までのサンゴ共生細菌叢の動態を示す。次の三点が示された。

- (i) サンゴ共生細菌叢は周辺海水中の細菌群と全く異なる菌種組成を示すことが確認された(図 2A)。この結果から、特定の細菌群がサンゴに濃縮する何らかの生物学的・物理化学的要因があることが示唆された。

- (ii) サンゴ共生細菌叢の組成は地点ごとに大きく異なることが見出された(図 2A)。直線距離にしてわずか5キロメートルほどしか離れていない石川原・瀬底南の両定点の同一サンゴ種の共生細菌叢に明瞭な差異が検出された。また、石川原、恩納村、読谷・水槽のサンゴでは総じて *Endozoicomonas* 属細菌が優先的であったが、地点ごとに異なる種(OTU)が共生していることが確認された(図 2B)。
- (iii) 特定の群体にのみ定着している細菌群の存在が確認された。同一地点に生息する同一サンゴ種であっても、群体ごとに菌種組成とその変化のしやすさに差異があるという、“群体の個性”とも言うべき興味深い知見を得た。

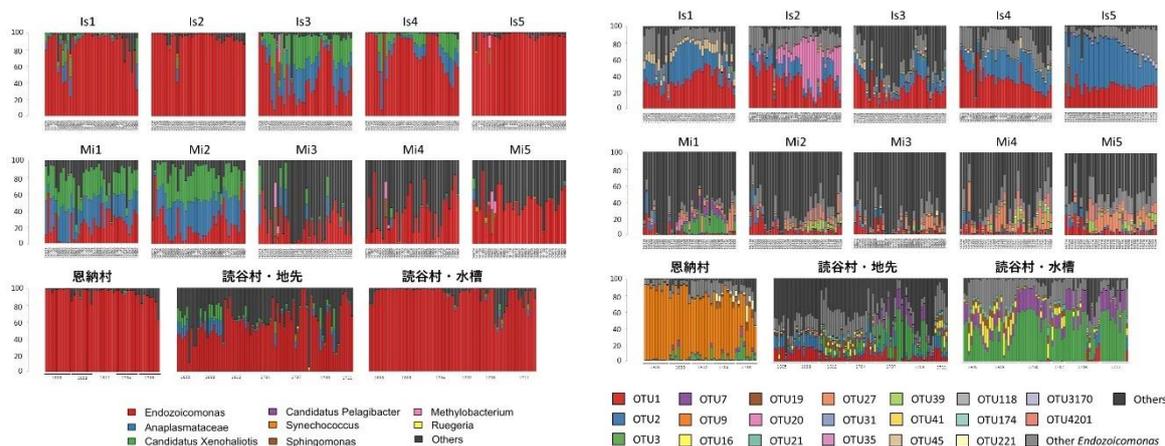


図 2 2014 年 7 月から 2017 年 8 月までのサンゴ共生細菌叢と海水中細菌叢の動態 (左) 属レベルで表現した菌叢組成 (右) *Endozoicomonas* 属 OTU の占有率(*Endozoicomonas* 以外は Others としている)

### 3) 対象サンゴ種の集団遺伝学的解析

上記 2)に記載した通り、サンゴ共生細菌叢に当該2定点間で明瞭な差異が検出された。この差異の原因として、2定点の環境の違いと、2定点のそれぞれに生息する対象サンゴ種の集団の違いの 2 つの可能性が考えられた。そこで、2 定点と、その間に位置する第 3 地点「旧棧橋」ポイントのウスエダミドリイシ集団の差異を、マイクロサテライト 13 座位の解析により検討した。その結果、「これら 2 地点に生息するウスエダミドリイシ集団が異なる」との帰無仮説は棄却され ( $\alpha = 0.05$ )、2 地点のウスエダミドリイシは同一集団であるとみなすことの妥当性が確認された。以上から、サンゴ共生細菌叢の地点間差異は、両定点それぞれの宿主サンゴの遺伝的背景の差異ではなく、両定点の環境の差異に起因すると考えられた。

### サブテーマ 2: フローサイトメーターを用いたシングルセル細菌の単離およびゲノム解析技術の開発 (バイオ計測グループ)

本研究では、サンゴ共生細菌の役割を解明するために、微生物をシングルセルレベルで単離・解析できる、フローサイトメーターおよびマイクロ流体デバイスを用いた方法に着目した。我々は、本手法を用いて、難培養微生物叢から新規な細菌の単離を行い、ゲノム解析に成功している (Nature 2014)。また、ターゲットとなる微生物を大量に分取することができるため、シングルセルだけに限らず、ミニメタゲノム等の研究にも応用できる。そこで、フローサイトメーターの長所を活かし、本研究では、様々なサンゴの共生細菌のシングルセルゲノムの解析を試みた。まずサンゴの共生細菌画分を取得するためには、簡易な遠心分離法により、共生細菌をサンゴの組織から分離した。その後、得られた微生物を膜透過性を持つ DNA 染色試薬である Syto9 で染色し、フローサイトメーターを用いて解析を行った。次に、分離した細菌に対し、MDA 法により全ゲノム増幅を行った。増幅が確認されたウェルをデブランチング処理を行った後、次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) によりゲノムのシーケンスを行った。本研究では、まずモデル細菌の *Anabaena* sp. PCC7120 および *Vibrio alginolyticus* NBRC15620 に対し、シングルセルゲノム解析を行い、その後、実際にサンゴ共生細菌の解析を実証した。

モデル細菌として選択した *Anabaena* sp. PCC7120 および *Vibrio alginolyticus* NBRC15620 のシ

シングルセルゲノム解析の結果、ゲノムカバー率はそれぞれ96.43%および98.21%となり、高いカバー率を示した。実際の環境サンプルを解析したところ、18種類の異なるシングルセル由来のゲノム配列を取得した。また、得られた全ての環境ゲノムのカバー率を算出したところ、88.9%と高い値を得られるサンプルもあった。しかしながら、モデル細菌のゲノムを解析した際に、本来のゲノム塩基配列には存在しないキメラ配列が多く検出された。これはMDA法による全ゲノム増幅のバイアスによる問題と考えられ、より正確なゲノム情報を得ることができる手法が必要であることが強く示唆された。

### サブテーマ 3: シングルセルゲノムデータのクオリティコントロール法の開発(バイオ計測グループ)

微量のサンプルを対象とするシングルセルゲノム解析は僅かなコンタミネーションに大きく影響を受ける。よって、細菌のシングルセルゲノム解析において、目的外 DNA 配列の混入は大きな障壁となる。そこで本研究では、シングルセルゲノムデータから目的外配列を除外するクオリティコントロールを行うための手法・ソフトウェア開発を行った。

本研究で開発した手法は、通常通りに得られるシングルセルゲノムデータに加えて、テンプレート DNA を含めずに実験を行うことで得られる目的外 DNA の配列データを用いる(図 3A)。以下の工程で、目的外配列と配列組成を比較し、シングルセルゲノムデータから標的細菌の配列を抽出する。(1)配列組成を元に配列を散布図に投影する(図 3B)。(2)目的外配列の分布を差し引き、標的細菌の配列の分布を推定する(図 3C)。(3)標的配列と目的外配列の分布を元に散布図上の領域の”信頼度”を算出する(図 3D)。(4)高い信頼度の領域に位置する配列を抽出する。

仮想的に目的外配列を混入させたゲノムデータや、実際に大腸菌から獲得したシングルセルゲノムデータを用いて本手法のテストを行ったところ、高い精度で標的細菌の配列を抽出できることが確認された。また、本手法を実装したソフトウェア SAG-QC を一般公開した(<https://sourceforge.net/projects/sag-qc/>)。本ソフトウェアはコマンドライン上での操作を必要としない GUI を備えており、幅広いユーザーによる利用が可能である。本成果は BMC Bioinformatics に発表された(Maruyama et al., *BMC Bioinformatics* 18(1), 152, 2017)。

### サブテーマ4: マイクロドロップレットを用いたシングルセルゲノムの増幅(バイオ計測グループ)

従来の全ゲノム増幅法の問題点であったコンタミネーションと増幅バイアスの最小化を実現するために、マイクロ流体デバイスを用いた新たな全ゲノム増幅手法の開発を進めた。本手法では、シングルセルDNAを液滴内に網羅的に封入し、全ゲノム増幅反応を同時多並行に行う。モデル微生物として、*E. coli* K12株を用いた。1細胞はFACSによりソーティングし、加熱処理により溶解した。マイクロ流体デバイスを用いて形成した10<sup>5</sup>個のピコリットル容量の微小液滴内に単一細胞ゲノムを分配封入し、互いに独立した微小環境中でMDA増幅を行った。MDA後に増幅産物を回収し、増幅精度評価として次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

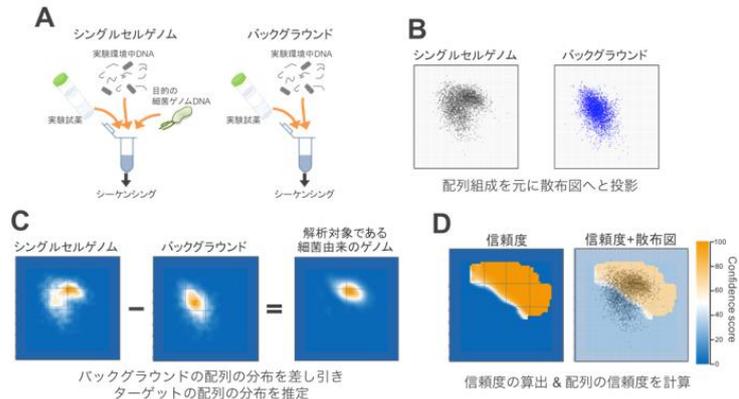


図 3 シングルセルゲノムデータのクオリティ法の概要. (A) バックグラウンドの配列情報の収集過程 (B) 配列組成に基づく散布図の作成 (C) 標的細菌に由来する配列の分布の推定 (D) 信頼度の推定

DNA結合性色素を用いた観察から、微小液滴内においてMDAを行うことで1分子DNAからゲノム増幅が可能であることを確認した。また、反応場をピコリットル容量までに微小化することにより、標的外のDNA断片との増幅競合および増幅バイアスが大幅に低減できる事を実証した(Nishikawa et al. PLoS one, 2015)。本手法では、シングルセルから精度よくゲノムを増幅することにより、ゲノム全体の90%以上をカバーした増幅産物が得られることが明らかとなった(図4)。

開発したシステムにより、大腸がんや乳がんの細胞、バクテリアを対象として、数万個の1細胞ゲノムDNAを3時間で並列的に増幅することができる。これは、従来のマイクロ流体デバイスを利用した全ゲノム増幅システムの100倍以上のスループットを持つことになる。本システムでは、1細胞全ゲノム増幅の反応工程がピコリットルサイズの液滴内部で完了するため、コンタミネーションがきわめて少ない高精度なゲノム情報を獲得することが示された(Hosokawa et al. Sci. Rep, 2017)。

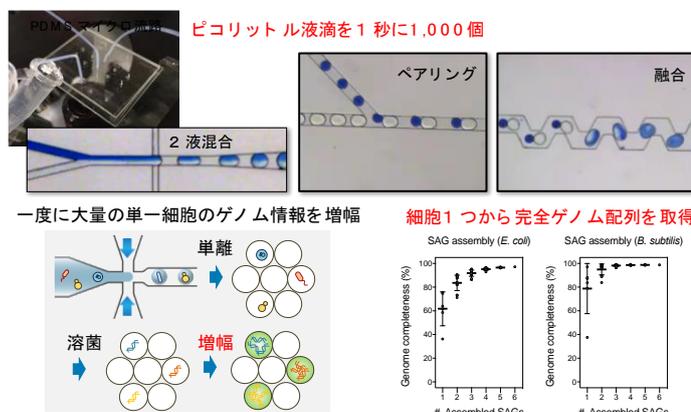


図4:融合式ドロプレットデバイスを用いた超並列的なシングルセル増幅ゲノムの調製法

#### サブテーマ5：シングルセルゲノムデータの相互参照解析による未培養細菌の完全ゲノムデータの取得(バイオ計測グループ)

ピコリットルサイズの微小液滴を用いたシングルセルゲノムの並列取得技術では液滴内にシングルセルを包埋することによって1分間に約一万の細胞を分離可能であり、各微小液滴内で個別にゲノム増幅を行うことでコンタミネーションの少ないゲノム情報が並列的に取得される。当技術を用いて、モデル微生物として大腸菌および枯草菌、環境サンプルとしてマウス腸内細菌のシングルセルゲノムを増幅した。増幅ゲノムをIllumina Miseqでシーケンスを行い、得られたシーケンスリードを独自開発したリードクリーニングツールにて処理し、データを統合することで得られたゲノム配列の完全性について評価した。

本解析技術では、並列取得したシングルセル情報の相互参照によってキメラ配列および混入DNA配列が除去される。まずモデル微生物のシングルセルデータに対して相互参照ゲノム解析を行ったところ、キメラ配列の減少に伴い *de novo* アセンブリ結果の向上が確認された。さらに十分量のデータを用いた相互参照の結果、培養菌体から取得したものに匹敵する精度のゲノム情報がシングルセルベースのデータから取得された。続いてマウス腸内細菌データを用いて相互参照ゲノム解析を行うことで、推定ゲノムカバー率95%以上かつコンタミネーション1.5%未満の、バクテロイデス門に属する2種類の高精度な新規ゲノムが取得された。本手法は、従来の配列クリーニングプロトコルに比べても、高い効果があり、キメラ配列やコンタミネーション配列を効率的に除き、長く正確なコンティグをアセンブリできることが示された(Kogawa et al. Sci. Rep, 2018)。微小液滴を用いたシングルセルゲノムの並列取得と相互参照ゲノム解析によって、種々の微生物の機能について的高速かつ詳細な解析が期待される。

#### サブテーマ6：Endozoicomonas属細菌の比較ゲノム解析(バイオ計測グループ)

*Endozoicomonas*属はサンゴとの共在が世界中で確認されている細菌群である。白化や病気に伴い占有率が低下するという既往研究から、*Endozoicomonas*属はサンゴへ何らかの有益な影響を与えることが予想されているが、必ずしもそれらを明確に証明する宿主との相互作用のメカニズムはわかっていない。

既往研究において、*Endozoicomonas*属細菌のゲノムは、Mobile genetic elementを豊富に含むなど、宿主適応の初期段階にいる細菌(FS: Facultative symbiont)と類似した性質を持つことが明らかになっている。従って、他のFSと同じように、*Endozoicomonas*属細菌も宿主への適応に向けてゲノムを高頻度で変化させることが予想されている。

本研究では、*Endozoicomonas*属細菌の既知ゲノム情報の統合解析によって、以下の二点を検証した。(i) *Endozoicomonas*属細菌の普遍的な性質の理解を目指し、株間で安定して保存され

ている機能的特徴を抽出した。(ii) *Endozoicomonas*属細菌の宿主適応に向けた進化戦略の理解を目指し、株間で変化が著しい遺伝的特徴の抽出を試みた。

RefSeqに登録されている*Endozoicomonas*属細菌8株の既知ゲノム情報と、ウスエダミドリイシから分離した*Endozoicomonas*属細菌1株のゲノム情報の統合解析を行った。OrthoFinderを用いて9株の遺伝子のレパートリーを比較した。9株全てに保存されているコア遺伝子の機能アノテーションを行い、*Endozoicomonas*属で安定して保存されている機能的特徴を推定した。加えて、一部の株にしか存在しないマイナーな遺伝子や、ゲノム上での顕著な重複が認められる遺伝子の機能を調べることで、宿主適応に向けて大きく変化している遺伝的特徴を推定した。

遺伝子レパートリーの比較解析によって全ての株で保存されている*Endozoicomonas*属のコア遺伝子を同定した。コア遺伝子の機能を調べると、III型分泌装置などの宿主との相互作用に関わる複合体や、二成分制御系・トランスポーターなどの物質輸送・環境応答に関連する複合体を構成する遺伝子が多く存在していた。

一部の株にのみ存在しないマイナーな遺伝子が*Endozoicomonas*属細菌には非常に多く存在することが示唆された。このマイナーな遺伝子に着目すると、他の細菌遺伝子に全く相同性を示さない遺伝子が多く含まれていた。

本研究では*Endozoicomonas*属細菌のゲノム情報を統合的に解析することで次の三点を明らかにした。(i) *Endozoicomonas*属で安定して保存されている機能的特徴を抽出した。物質輸送・環境応答に関わる機能や、III型分泌装置のような宿主との相互作用に関わる機能が、*Endozoicomonas*属の核となる機能的特徴であることを明らかにした。(ii) *Endozoicomonas*属には各株が単独で持つ遺伝子が数多く存在することを見出した。これは株ごとに機能が多様化していることを示唆している。(iii) *Endozoicomonas*属の株間で多様化・変化しているゲノム上の特徴を抽出した。

### サブテーマ 7: *Acropora tenuis*に共存する*Endozoicomonas*属細菌のミニメタゲノム解析

「サブテーマ 1」では地点ごとに異なる種の*Endozoicomonas*属細菌が共存していることが示された。「サブテーマ 6」では*Endozoicomonas*属細菌の遺伝子組成が株ごとに大きく異なることが示唆された。そこで本研究では、各地点のサンゴ共存細菌叢のミニメタゲノム解析を行い、地点ごとに異なる種の*Endozoicomonas*属細菌が共存することの意義を理解することを目指した。

*Endozoicomonas*属細菌が高い占有率で存在する石川原・恩納村・読谷水槽のサンゴ共存細菌叢を対象に、マイクロ流体デバイスを用いたミニメタゲノム解析を実施した。

サンゴ枝より収集した菌体を20個ずつ微小液滴へ封入し、液滴内でMDAによるゲノム増幅を行った。増幅産物を含む液滴を50個回収し、MDAによる二次増幅を行った。

*Endozoicomonas*属細菌の16S rRNA遺伝子を含む二次増幅産物の配列解読を行い、ミニメタゲノムデータを獲得した(図5)。

ミニメタゲノム解析によって、瀬底のサンゴに共存する種と、読谷水槽・恩納村に存在する種は遺伝子組成が大きく異なることを見出した。この結果は、それぞれの種が宿主に対して異なる影響を与える可能性を示唆している。遺伝子組成の違いが何を意味するかは未だ明らかでないが、今後さらに充実したゲノム情報を収集することにより、この違いがサンゴに与える影響を理解できると考える。

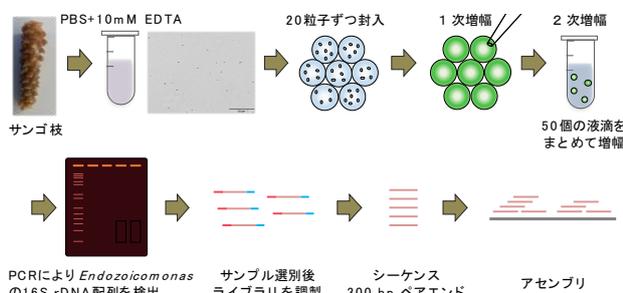


図5 ミニメタゲノム解析概要

### サブテーマ 8: サンゴ共存細菌数、褐虫藻数の変動の解析(バイオ計測グループ)

サンゴに共存する褐虫藻や細菌は海域環境の影響の中で宿主であるサンゴと相互関係を保持していると考えられ、それらの存在量は、今後の研究の中で環境評価の指標となる可能性がある。

細菌数の評価は、16S rRNA遺伝子数をもとに推測することができる。しかし、サンゴ由来のDNAには様々なPCR阻害物質が含まれ、qPCR(定量PCR)による特定遺伝子数定量の正確性

を低下させる。そこで、ピコリットルサイズの液滴にサンゴ組織メタゲノムDNAを1分子レベルで封入し、PCR阻害物質の影響を抑えて、サンゴ組織中の16S rRNA遺伝子数を絶対定量するドロップレットデジタルPCR法 (ddPCR法) について検討した。

沖縄県瀬底島周辺の3地点においてサンゴ枝 (*Acropora tenuis*) を定期採取し、分離した細菌画分からDNAを抽出した。液滴形成用デバイスはPDMSを利用しin houseで作製した。サンゴ組織DNAは菌種組成解析と同一のサンプルを用い、PCR条件についてもDNAポリメラーゼ以外については基本的に菌種組成解析と同様とした。以上の条件にて、サンゴ抽出DNAを封入した液滴を作製し、ユニバーサルおよび*Endozoicomonas*属特異的16S rRNA遺伝子を標的としたdPCRを行い、抽出DNA中の16S rRNA遺伝子数を定量した。また、サンゴ共生細菌の16S rRNA遺伝子数の計測と併せ、同一サンプル中の褐虫藻密度も計測した。

#### 1) サンゴ共生細菌数の季節変動

2014年11月から2016年9月までの期間における、サンゴ共生細菌数の季節変動を16SrRNA遺伝子数の変化から評価した。まず、16S rRNA遺伝子数は、石川原・瀬底南のサンゴ生息地点間で10-100倍の差異が観測された。石川原のサンゴでは*Endozoicomonas*属細菌が共生細菌叢の中で圧倒的多数を占めており、この*Endozoicomonas*属細菌の増減が共生細菌総数の増減変動と一致していることが明らかとなった。また、サンゴ白化時期においては、サンゴ中の褐虫藻数の減少が確認されたが、細菌数・組成は石川原では、*Endozoicomonas*属細菌も減少する傾向が見られた。しかし、瀬底南においては大きな変動は見られなかった。特に、石川原では、*Endozoicomonas*属が $10^6$ 以上存在している状態で水温が上昇し、褐虫藻数が減少する時には、同様に減少することが確認された。なお、いずれのサンゴも白化からの回復(褐虫藻数の増加)が確認されている。以上の結果から、遺伝的にも相同とされるサンゴにおいても共生細菌の組成・存在数が大きく異なっており、長期的にも維持されていることが明らかとなった。

#### 2) 天然サンゴと養殖サンゴにおける共生細菌叢の比較

読谷村サンゴ畑の水槽・外海、恩納村養殖場の養殖サンゴと瀬底島周辺海域の天然サンゴの共生細菌の比較を行った。いずれのサンゴにおいても*Endozoicomonas*属が含まれる事が明らかとなった。特に、石川原のサンゴ、読谷村の水槽内養殖サンゴ、恩納村養殖サンゴでは*Endozoicomonas*属が圧倒的多数を占めていた。一方、瀬底南のサンゴ、読谷村の地先移植サンゴでは、*Endozoicomonas*属数、総細菌数ともに、他地点のサンゴに比べて10-100倍少ないことが明らかになった。加えて、これらの*Endozoicomonas*属は石川原、瀬底南、読谷外海移植サンゴ由来でグループを形成し、恩納村、読谷水槽サンゴ由来ではそれぞれのグループを別に形成することが示された。これらの3つの遺伝的系統は、サブテーマ 7での比較解析からも明らかとなり、それぞれの持つ機能面での比較が重要であると考えられた。特に、読谷の水槽サンゴを親として、外海に移植後に、どのように*Endozoicomonas*属の組成、数が変化するかをモニタリングすることは重要な実験である。環境条件と関連する*Endozoicomonas*属の同定を行うことによって、そのゲノム情報とともに*Endozoicomonas*属の役割を明らかにすることが可能になると考えられる。

### (2) 次世代型マリンメタオミックス解析

#### サブテーマ1: メタトランスクリプトーム解析

サンゴは多様な微生物と共同体”ホロビオン”を形成している。細胞内には褐虫藻という微細藻類を共生させており、体表・体内には海水中とは異なる種類の細菌を共生させている。近年、共生藻・共生細菌によるサンゴの生理状態への寄与を示唆する報告が相次いでおり、サンゴの保全に向けてホロビオンレベルでシステムを理解する重要性が認識され始めている。しかしながら、サンゴという生物の実験的制約の多さから、ホロビオンにおける生物間相互作用の全容解明は程遠い現状にある。本研究では、サンゴ・共生藻・共生細菌のマルチオミックス情報を利用したデータ駆動型のアプローチによって、生物間相互作用を網羅的・俯瞰的に理解することを目指す。

石川原エリア、瀬底南エリア、旧棧橋エリアに生息するウスエダミドリイシ 7 群体から約 1 年半に亘って計 48 本の枝を採取した。採取した枝から「1.サンゴ・トランスクリプトーム」「2.褐虫藻・トランスクリプトーム」「3.共生細菌叢・メタ 16S」の 3 種類のオミックス情報を獲得した。加えて、サンゴ共生細菌の単離培養を行い、「4.共生細菌・ゲノム」情報を獲得した。得られたマルチオミックスデータの統合的解析を行うことで、サンゴホロビオンにおける生物間相互作用に関する知見の獲

得を試みた。

はじめに「サンゴ・トランスクリプトーム」と「褐虫藻・トランスクリプトーム」の統合解析を行いサンゴ-褐虫藻間の相互作用を推定した。共発現情報に基づいてサンゴと褐虫藻の遺伝子をクラスタリングしたところ、サンゴの遺伝子は 31 個、褐虫藻の遺伝子は 7 個の共発現遺伝子群に分類された。得られた共発現遺伝子群の発現パターンをもとに、サンゴ-褐虫藻の共発現遺伝子ネットワークを記述した。

二者間で協調して発現していた遺伝子群から、サンゴと褐虫藻の相互作用に関する情報を抽出することに成功した。例えば、褐虫藻の光合成関連遺伝子はサンゴの成長関連遺伝子と相関する一方で、褐虫藻自身の増殖関連遺伝子とは逆相関を示すことがわかった。この結果は、多くの研究で報告されているように、褐虫藻の産生する光合成産物の大部分が宿主の成長に利用されていることを反映したものであると考えられる。このような既知の関係性が捉えられたことに加えて、メカニズムの解明されていなかった二者間の関係に関する知見も得られた。褐虫藻の細胞周期に関連する遺伝子の発現上昇に伴って、サンゴのリソソーム・エクソサイトーシスなどの遺伝子発現が亢進することを見出した。この結果から、メカニズムが明らかにされていなかったサンゴ細胞内の褐虫藻数の異常増殖を制御する機構に、細胞内消化・細胞外放出が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

### サブテーマ 2：生態機能情報チップの作成と活用

海水やサンゴ共生細菌、微小ポリプのメタトランスクリプトーム解析においては、採集できる RNA が微量であることから、シーケンス実施可能量まで cDNA を増幅する必要が生じる。また、得られた mRNA の保存と再利用が可能な技術として、本研究では beads-RNA-seq を検討した。この手法では、各ステップ間において磁気洗浄を行うため、余剰試薬や副産物を除去されることにより増幅バイアスを低減して本来の遺伝子発現量比率を乱さずに十分な DNA 収量が得られることが検証されている。

本法では、磁気ビーズ上に固相化したオリゴ dT プローブを用いて mRNA をキャプチャーし、磁気ビーズ上に cDNA を構築し、磁気微粒子上の cDNA を鋳型として線形的な遺伝子増幅を行うものである。まずは、一度ビーズ状に捕獲した mRNA の安定性に関して検討した。モデル系として、真核生物の mRNA を用いた。磁気ビーズ上に形成した cDNA は PCR 等の熱サイクル印加によっても安定であり、保管及び繰り返し増幅操作が可能である。真核細胞(ヒト結腸腺癌細胞 HCT116)から形成した cDNA を対象として、繰り返し利用によって得られた増幅産物と 1 次産物のシーケンス結果は相関関係を示しており、安定的な保存と再増幅が可能であることが示された。

これらの方法を用いて、単一ポリプレベルでのトランスクリプトーム解析を行ったところ、単一ポリプから mRNA が問題なく増幅され、先端と根本で発現の相対量に差のある遺伝子が検出することが可能であった。一方、サンゴ内の細菌の mRNA 回収においては、微量しか得られないこと、ホストのサンゴ由来の RNA が大量に含まれることから、それらの種々の方法によって、サブトラクションを行ったが、微量サンプルでの安定した細菌 mRNA の取得は困難であった。今後、シングルセル解析に準じた方法を活用することが必要である。

### サブテーマ 3：メタメタボローム解析

海水中に存在する微生物群の脂質をターゲットとしたメタメタボローム解析を行った。2014 年 2 月にサンプリングした石川原および瀬底南の両地点の海水をポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  のろ紙に通液し、トラップされた画分の脂質を LC-MS/MS を用いて分析した。分析は共同研究者である大阪大学の馬場健史先生に依頼した。その結果、138 種の脂質が同定され、うち 89 種で両地点の存在量に有意差が検出された (t 検定、 $p < 0.05$ )。データの詳細を検討したところ、瀬底南において存在量が大きかった脂質は 4 種 (脂肪酸類の 1 種、フォスファチジルコリン類の 2 種、モノアシルグリセロール類の 1 種) であり、その他 85 種は石川原で存在量が大きかった。石川原において存在量の大きかった脂質が多数を占めたことは、石川原で微生物存在量が大きかったことを示唆する。一方で、少数ながら瀬底南において存在量の大きかった脂質の存在は、瀬底南に特徴づけられる微生物叢を反映していることが考えられる。このように、塩基配列に依存しない生体情報を用いることによっても環境を特徴づけられる可能性が示唆された。

解析対象は、上記海水だけでなくサンゴ、褐虫藻、細菌が望ましい状況であったが、サンゴ内の各構成生物を分画してメタボローム解析を行うには、分画が難しいこと、生物量が非常に少な

いことから解析が困難であること、海水だけのデータでは有効活用が不明瞭なことから、研究を平成26年度で中止とし、他の研究項目に集中することとした。

### 3. 2 沖縄サンゴ礁生態系評価と変動予測研究（沖縄グループ）

#### サブテーマ: サンゴ礁海域の環境因子等の生態系基礎情報調査と収集（沖縄グループ）

沖縄グループは、本研究プロジェクトの基盤情報となる観測現場での経時的環境情報の計測と定期採水、サンゴの定期採取が主な実施内容となる。遮蔽的な環境の石川原と開放的な瀬底南の2地点に多項目水質データロガーおよび単項目のデータロガーを設置し、15分間隔で物理・化学的環境因子（水温、pH、DO、濁度、塩分、クロロフィル量、シアノバクテリアのフィコシアニン量、蛍光性溶存有機物量、光量、流向流速）の収集を行った。H26年度までにロガーの運用とメンテナンス方法を改善し、生物付着によるデータへの影響を最小限にしながらロガーの器差校正およびドリフト補正を行い、高精度に2週間の連続データを取得する方法を確立した。H27年度はロガーによる高精度のデータ取得を行いながら、定期採水および周辺海域での採水で得られた海水の栄養塩分析を進めた。また、H26年度に報告した溶存酸素の振幅の違いについて、2地点のサンゴ群集規模の違いによるものなのか、それとも酸素生産量の違いによるものなのかを明らかにするために、新たな手法「三角法」を開発して一次生産量の見積もりを行った。さらに、自然状態ではサンゴの生育が認められないものの、人為的にサンゴを植え付けて生育を維持している恩納村漁港地先および陸上のサンゴ水槽で生育が良く、その地先に植え付けを行っている読谷村サンゴ畑およびその地先からサンゴ、海水などを採集し、比較研究を行った。加えて、世界的なサンゴの白化が観測されたことから、白化現象の起こった夏場前後には採集と環境要素の観測を集約し、データの収集に努めた。

#### 1) モニタリング定点の選定とその地形と固着生物群集の特徴

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)。沖縄県国頭郡本部町の瀬底島周辺海域の瀬底南と石川原を野外調査のモニタリング定点に設定した。瀬底南地点は、外洋に面しており、陸に近いもの人為的影響を与えるような建築物などがなく、サンゴも比較的健全な地点である。一方、石川原地点は、閉鎖的な環境で河川の影響もあり、近くに生け簀が存在するなど、瀬底南とは対照的な環境であるが、サンゴが散在してみられる地点である。

瀬底南では、地形は幅の狭い頑強な石灰岩性の基盤構造を持った裾礁で、礁池はなく測線基点から70m付近までは水深1.3m程の礁原が続き、その後90mまで水深2~3mの平坦な礁縁部が発達した後、ほぼ垂直に落ち込む礁斜面を水深15m程まで形成する。固着生物群集の構造では出現単位数は29で、礁原では卓状またはコリンボース状のミドリイシ属(*Acropora*-t/c)が優占し高い被度を示す(図6)。礁縁の平坦部ではこれに加えて3ないし4種からなるハナヤサイ属(*Pocillopora verrucosa/meandrina*, *P. eydouxi*, *P. damicornis*)が混在することで、この一帯の裾礁に波浪の影響の強い開放的な環境に見られる帯状構造の存在が見られる。このような開放環境の礁縁の帯状構造で、礁斜面の最上部付近でしばしば見られるアナ

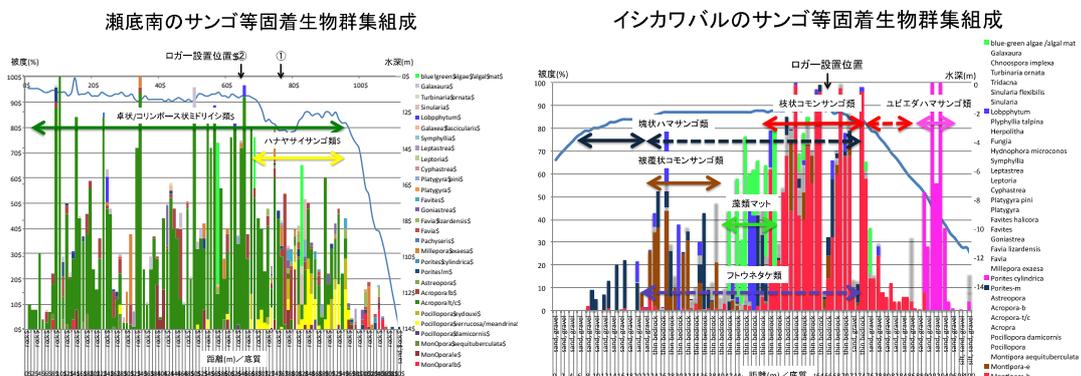


図6 瀬底南とイシカワバルの群集組成の違い

サンゴモドキ属を欠いており、僅かにカンボクアナサンゴモドキ (*Millepora exaesa*) が散見されるのみである。

石川原は、渡久地港に注ぐ満名川河口域を取り囲む離礁群の内湾側に位置する一つで、ナガズネ(長曾根)と呼ばれる離礁上にサイトが設定されている。ナガズネはサンゴ礫の堆積によって形成された砂礫性の離礁で、離礁上部の水深1.8~2mの礁原は一部で厚さ数センチ~十センチの薄く脆い岩盤を形成している。砂礫性の緩やかな礁斜面は、周辺の水深30m内外の河川流入による堆積性の砂泥底に続いている。固着生物群集の構造では、出現単位数は35と瀬底南よりも多様である(図2)。側線起点から20mまでの離礁の礁原の陸側砂礫底では塊状ハマサンゴ属(*Porites-m*)が優占するが被度は高くない。塊状ハマサンゴ属は礁原全体に分布が見られる。続く薄い岩盤上には被覆状コモンサンゴ属(*Motipora-e*)が出現し優占するが、30m付近から藻類のマット(cyanobacteria/algal mat)に置き換わり、50mを過ぎると枝状コモンサンゴ属(*Montipora-b*)が優占し高い被度を示す。礁原一帯には八放サンゴの属するフトウネタケ属(*Lobophytum*)や大型の卓状ミドリイシ属(*Acropora-t/c*)が散在し、塊状ハマサンゴ属とともに大型の群体に成長し居所的に高い被度を示す。80m付近で岩盤は消失し礁斜面が始まり、斜面下部ではコビエダハマサンゴ(*Porites cylindrica*)の群落が高い被度を示すが、海底が平坦になり堆積物が増えると減少する。離礁の規模は大きくはないが、岸側から沖に向かって遮蔽性の環境に見られる帯状構造が群落の形で形成されていることが分かる。

## 2) データロガー設置と測定各種環境因子の特徴

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。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(図7)。



図7. 海中設置架台の様子(瀬底南ポイント)

環境因子については、多項目水質データロガーによる長期モニタリングを2013年4月から2014年7月までの約1年半行った結果、センサー部への生物付着とドリフトの問題が顕在化し、信頼できる経時的なデータとはならないことが判明した。そのため、現在の2週間置きの運用サイクルに改善を行った。これにより、継続的な信頼性の高い環境データを収集できるようになった。

物理的環境因子については石川原の濁度が瀬底南に比べてわずかに高く、遮蔽的な石川原の特徴を示した。風速が4m以上になると堆積物の巻き上げなどによりどちらも急激に濁りを生じるが、石川原のほうがより長い時間濁っていることが分かった。また、瀬底南サンゴ礁では風速が4m以上になると溶存酸素が100%となる傾向があり、砕波帯での攪拌によるガス交換や外洋水の流入が石川原よりも頻繁に生じていることが明らかとなった。

化学的環境因子については、pHと溶存酸素は光合成-呼吸による日周変動の振幅が石川原より瀬底南で大きいことがわかった。瀬底南は外洋に向けて開けているため、pHと溶存酸素(DO)の変動は小さいと予想されたが、実際にはその逆の結果となり瀬底南のサンゴ礁群集の光合成-呼吸量は石川原に比べて非常に高いことが示唆された。水中のクロロフィルは0~1 µg/Lの低濃度で変動しており、2地点による違いは見られなかった。また、水中のシアノバクテリアを表すフィコシアニン量はどちらの地点も常に検出限界以下であり、イベント的に増加することは観測されなかった。蛍光性溶存有機物はどちらも非常に低く、わずかな濁りの違いはあるが、観測対象の2地点の海水は基本的に清浄であることが分かった。

瀬底南と石川原の比較では、約3年にわたってロガーで取得したこれらの物理的・化学的環境因子に大きな差は見られなかった。唯一の大きな違いは流速であり、石川原の平均流速は2.4cm/sであったのに対して、瀬底南では4.3cm/sであった。遮蔽的環境の石川原に比べて外洋に面した瀬底南は約2倍の流速下にあることが分かった。

## 3) 栄養塩の特徴

海水中のリンや窒素は海洋生物にとって必須の栄養元素であり、一次生産量を制限する因子

として重要な役割を果たしている。その一方で、これらの元素が過剰に供給されると植物プランクトンの異常繁殖およびその後の有機物分解に伴う酸素濃度の低下によって、生態系を攪乱する。本研究の観測地点であるイシワバルは内湾の閉鎖性海域であり、自然および人為起源による陸域からの影響を受けやすい環境にある。したがって、内湾の石川原と外洋に向かって開けた瀬底南における栄養塩環境の違いを明らかにし、観測された栄養塩濃度がサンゴの生育に影響をおよぼすレベルであるのかを評価した。

採水は2地点で月2回および周辺海域の53箇所で夏季に行い、採取した海水は速やかに冷凍し測定まで保存した。栄養塩は、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素(カドミウム-銅カラム法)、アンモニア態窒素(インドフェノール法)およびリン酸態リン(リンモリブデン錯体法)を気泡分節連続フロー式装置(AACS-III, Bran+Ruebbe)により測定した。また、ケイ酸態ケイ素(モリブデン青法)は手分析により測定した。

石川原周辺にはマグロの養殖場や下水処理場、河川の河口など栄養塩を増加させる要因が存在する。これらの海域を含む広域の分布調査では、栄養塩濃度の高い分布域が発生源の海域とほぼ一致した。栄養塩類ごとに、マグロ養殖場の影響による亜硝酸塩の負荷、下水処理場排水の影響によるアンモニア負荷、河川からの硝酸負荷、本部半島西岸部のリン酸塩負荷などが判明した。しかしながら、いずれも測定された濃度は一般的な富栄養化というレベルの濃度と比較するときわめて低く、発生源から少し離れると急激に減少する。またサンゴの生育に影響をおよぼすとされる栄養塩濃度(10  $\mu\text{M}$ )よりもはるかに低い値であった。観測地点における定期的な栄養塩の濃度も石川原が比較的高い傾向を示した。毎月の栄養塩濃度をそれぞれ比較すると、必ずしも毎回有意差が生じるわけではないが、有意な差があるときはほぼ石川原で高いことが分かった。これは、石川原周辺の発生源から時々流れる水塊によって、瀬底南に比べてわずかに高い濃度にさらされていることを示唆している。このように、2地点の継続的な観測と周辺海域分布調査から通常時のバックグラウンドの挙動が明らかとなった。

#### 4) 一次生産量の2地点の違い

石川原と瀬底南における環境データのうち、最も顕著な違いは溶存酸素の振幅である。瀬底南は外洋に向けて開けた環境下にありながら、石川原に比べて溶存酸素の変動幅が2倍以上になることもある。この溶存酸素の振幅の違いについて、2地点のサンゴ群集規模の違いによるものなのか、それともサンゴを含む光合成生物の酸素生産力の違いによるものなのかを明らかにするために、新たな手法「三角法」を開発して一次生産量の見積もりを行った。

石川原と瀬底南の既存ロガーの設置点を起点に、サンゴ礁群集を取り囲むように一辺約60mの三角形を設定し、2つの溶存酸素計を新たに設けた2頂点の位置にそれぞれ設置した。15分毎の頂点における溶存酸素と既存ロガーの位置にある流向流速計のデータから、三角形内を通過する海水中の酸素濃度変化量を算出し、サンゴ礁群集による酸素フラックスを求めた。得られた酸素フラックスとそのときの光量から光-光合成曲線を作成し、単位面積当たりの一次生産速度および呼吸速度を見積もった。

その結果、瀬底南のサンゴ礁群集は一次生産量が高く、呼吸量が小さいことが明らかとなった。一方、石川原は一次生産量と呼吸量がほぼ釣り合っていた。三角形内のサンゴの被度は石川原が瀬底南よりも高いことから、サンゴ被度ではむしろ石川原の生産量が高くなるはずである。しかし、今回の三角法による結果では明らかに瀬底南の単位面積当たりの純生産量が圧倒的に高く、このことが高い溶存酸素の振幅の要因であると考えられる。また、これまで石川原では目視による定性的な観測では、様々な種のサンゴにヒトゲヤクウニ、ナマコなどの従属栄養生物が多いことが分かっていた。一方で瀬底南は底質が岩盤で、流れが強いため固着しない移動性の生物はあまり見られていなかった。今回のこの一次生産量の結果は、このような従属栄養生物の多い石川原とそれらが比較的少ない瀬底南のサンゴ礁群集の特性を数値によって裏付ける結果となった。また、2016年と2017年の夏季にはサンゴの白化現象が生じており、8月の一次生産量を比較すると、2015年に比べて大きく減少していることが分かった。白化現象は、主に夏の高水温と強光によりサンゴに共生する褐虫藻の光合成系が破損し、共生関係が崩壊する現象である。そのため、今回の結果は2016年と2017年の大規模白化現象を群集レベルの一次生産量として定量的に捉えることができたと考えられる。

## 5) 観測海域の白化の状況

2016年には世界的な白化現象が観測されるなか、瀬底島周辺でも高海水温を記録し、水深20mを超えてなお平年値を上回っていた(図8)。瀬底南と石川原の1日の平均水温はどちらも2016年の7、8月に30℃を超えていた。最大水温は7月に観測され、瀬底南で31.3℃、石川原で31.1℃であった。2015年の平均水温と比較すると、2016年は7月に約2℃高く、8月に約1℃高い値であった。

この高水温への感受性はサンゴの種によって異なり、ミドリイシ類で顕著であることから、ミドリイシ類の群集構成比の高いセソコミナミで白化が顕在化した(図9)。しかしながら、両サイトとも白化したミドリイシで死亡した群体はごく僅かであり、ほとんどは回復した。

両サイトの水温の通年記録から、夏季の水温上昇のストレスは潮汐周期に同期して起こっており、石川原では1潮汐周期分早く高温ストレスが解消したものと思われる。夏季のサンゴの白化は一義的に高水温によって引き起こされることが分かっており、ストレスの強度と暴露期間がその程度に影響する。昨夏の水温ストレスは、両サイトでミドリイシのみに白化を起こさせたものの、死亡に至るほどではなかった。

ミドリイシ類を主に海域養殖を行う恩納村では、ほぼ全ての群体に白化が見られたが(図10)、これらもまた回復した。環境省が慶良間諸島で実施した調査においても、広範に白化が観測されたにもかかわらず死亡被害は軽微であった。対照的に、同省が行った石西礁湖の調査では、ミドリイシを中心に多くの死亡被害を記録しており、将来的にサンゴ礁生態系の衰退が現実のものとして危惧されるに至った。

沖縄本島においても、環境によって白化の程度はまちまちで、読谷村で陸上養殖され前面の礁原上に移植されたウスエダミドリイシでは白化が観測され、一部は死亡するに至った。2016年8月の4地点の水温を比較すると、日中の低潮時に海水温が高くなる傾向を示し、読谷村の観測地点が最も大きな振幅を示した。水温が30℃を超える1日当たりの平均時間は石川原で5.4h/d、恩納村で7.9h/d、瀬底南で8.3h/dであるのに対して、読谷村は15.5h/dであった。読谷村は瀬底南に比べて約2倍長く30℃以上の高温に曝されており、このような環境であることが死亡に至った一因であると推察される。

しかし、そのような環境においても、野外に移植された同種の養殖群体では、白化の起こらないものが見いだされた。これらの群体は養殖池内で強光耐性のあるものを選抜した結果作出されており、白化耐性種苗の育種学的な可能性を示唆している。また、白化を引き起こす主要因である高水温と強光は複合的に作用していることを示唆しており、この過程を遺伝学的に解明することで、耐性種苗の作出を加速することも期待され、プロジェクトの今後の展開を検討中である。

また、分析対象となるサンゴはウスエダミドリイシが主であるが、同所的に出現するハナヤサイサンゴ類および樹枝状コモンサンゴ類も本プロジェクトでは予備的に追跡調査を行ってきた。これらの種のうちハナヤサイサンゴ類について、伊是名村具志川島から国内最大級の群落を発見するに至り、遺伝子解析の結果、クローンとして数百年に亘って形成されたものであることが推測された。さらに、昨年夏季には、同生息地に見られるミドリイシ他のサンゴにも白化現象が観測されて居らず、今後は同所に見られるウスエダミドリイシを指標に、白化の起こりにくい環境と菌相の検討を行うことも可能となった。

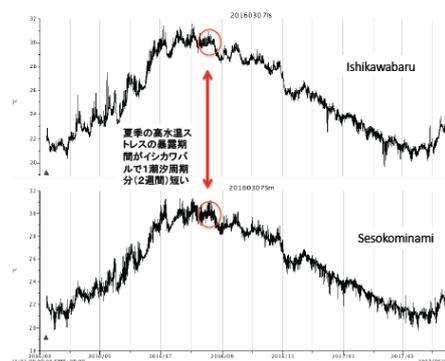


図8 2016年夏季の水温状況

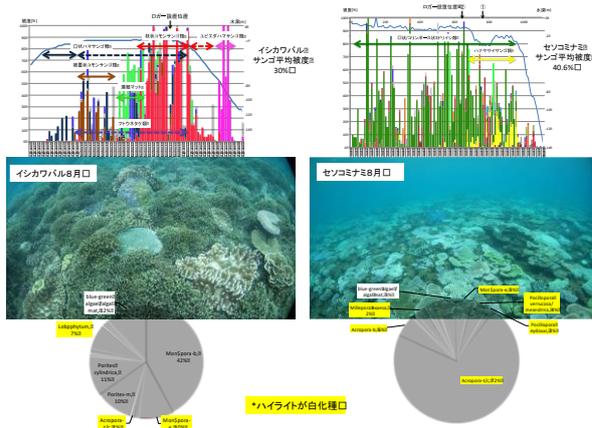


図9 瀬底南・イシカワバルサイトの群衆構造と2016年白化状況



図10 2016年夏季恩納村サンゴ状況

### 3.3 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(京都大学 計算機解析グループ)

#### サブテーマ 1: 海洋微生物のオミックスデータベースの構築 (計算機解析グループ)

本研究で継続的に産生される沖縄グループからの環境データ、またバイオ計測グループからのオミックスデータの属性情報を明確にしてデータを統合的に保管・維持し、また研究者間でデータを共有できるようにした。また、生のゲノムリードデータをアセンブリし、遺伝子推定するパイプラインを提供することで円滑なサンゴとその海域の状態解析を可能にする研究環境の提供を行った。初年度に導入した計算サーバ、前倒し予算で平成25年度に導入したNASストレージを用いて、本研究で生じた各種オミックスデータの搭載を継続した。また、情報共有が円滑に行えるよう、coralecosystem.orgというドメイン名を取得し、サーバのホームページをチーム内に公開した。さらに、1細胞データにも適用可能なゲノムリードデータをアセンブリし遺伝子推定するソフトウェア及び世界最高速・高精度のデータマッピングを可能とするDIAMONDを搭載した一次解析計算パイプラインを完成させ、チームに公開した(図11)。



図11: サンゴ解析データを共有する班内WWWサイト

#### サブテーマ 2: 海洋微生物グランドゲノム解析法の構築 (計算機解析グループ)

海洋微生物のメタゲノムデータとシングルセルゲノムデータをお互いに補完して解析し、より高解像度にゲノム解析するための方法を構築し、公開データとともに機能アノテーションした結果をゲノムネットのポータルサイトから公開した(<http://www.genome.jp/projects/coral/>)。具体的には、ゲノム・メタゲノムデータに対してKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) のパスウェイデータや機能分類データをアノテーションし、その結果を比較できるようにした。本プロジェクトでサンゴから抽出・分離した36のバクテリアゲノム配列とその機能アノテーション結果(早稲田グループ)に加え、既に公開されているサンゴゲノム、褐虫藻ゲノム、サンゴ礁メタゲノム(Global Ocean Sampling プロジェクト)、サンゴ共在菌のアノテーションデータを検索、比較することができる。また、プロジェクトで産出したゲノム配列データに対してホモロジー検索するための

サイトも構築し、プロジェクトメンバー向けに公開した

### サブテーマ 3: 海洋汚染度・生物多様性の開発 (計算機解析グループ・沖縄グループ)

過去4年間に渡り、ベイジアンネットワーク手法を多数の環境因子に適用させるための手法の最適化及びパラメーターの選別を行ってきた。中間報告書までに、欠損値補完、規格化、ネットワーク計算収束判断手法を確立し、これを用いて溶存酸素、pH、水中光量等の8因子を用いた徹底的な検証で手法の妥当性と感受性の高さが確認できたため、最終的に15因子を用いた最終解析を行った。サンゴ海域由来の大量の環境データを入力として使い、ベイズ法による海洋環境因子の因果ネットワーク解析を行った。環境因子を測定した地点・データ点は石川原と瀬底南の2015年6月から2017年8月の23点である。環境因子としては期間毎に項目が一部異なるが、物理環境因子・生物化学環境因子を含む約20項目について検討した。これまでに検討した項目を次に記載する。物理パラメーターとして水中光量(Quantum)、水温(Temp)、塩分(Sal)、水深(Depth)、濁度(Turbidity)、流速(Velo)、流速の東西成分(Vel EW)、流速の南北成分(Vel NS)、流向(Dir)、風速X成分(Wind X)、風速Y成分(Wind Y)、雨量(Rain)等。化学パラメーターとして溶存酸素(ODO)、pH、蛍光性溶存有機物(fDOM)等。生物パラメーターとしてクロロフィル量(Chlorophyll)、シアノバクテリア色素フィコシアニン(BGA-PC)等である。これらを用いて各因子の因果関係を検討し絞り込みを行った結果、上記の中で相互に関連性が認められた15因子を選別した。ネットワーク解析に用いた15因子は水中光量(Quantum)、水温(Sea Temp)、塩分(Sal)、水深(Depth)、濁度(Turbidity)、流速の東西成分(Vel EW)、流速の南北成分(Vel NS)の物理パラメーター7因子と、溶存酸素(ODO)、pH、蛍光性溶存有機物(fDOM)の化学パラメーター3因子、そして気圧(Pressure)、気温(Air Temp)、風速の東西成分(Wind EW)、風速の南北成分(Wind NS)、雨量(Rain)の気象パラメーター5因子である。これらの環境因子のデータ取得状況により、石川原12点、瀬底南11点のデータを解析に使用した。

#### 1) 石川原での環境因子ネットワーク解析

解析に用いたデータは月毎の約2週間分のデータをまとめ、ネットワーク解析を行った。図12は12点のデータの内、6点の月毎のデータを用い、15因子をノードとして、各因子間の因果関係を解析した。エッジの色は環境因子Aから環境因子Bへの相互作用を示す重みを表す。赤色が正の相関、青色が負の相関を示す。

次に、12点のネットワーク解析結果をまとめ、図13に示す。石川原ではQuantumからODO、Air TempからODO、fDOMからpHへの正の相関、そして、fDOMからODOへの負の相関が見られた。

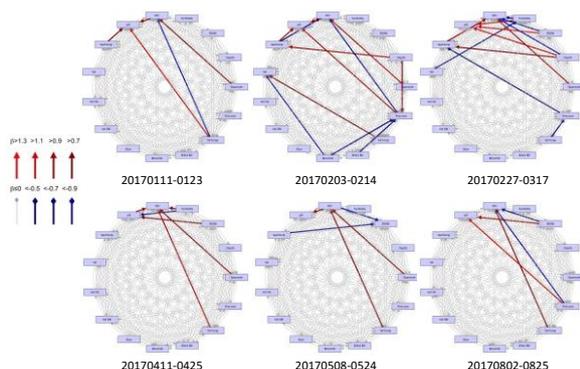


図12 石川原6点データ

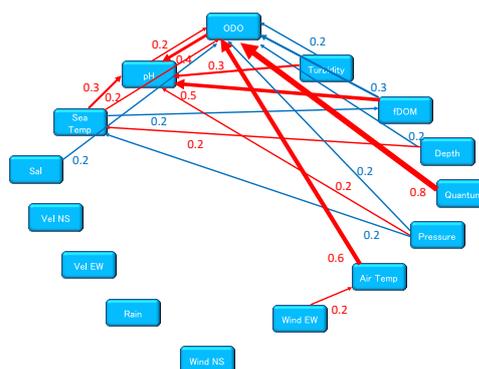


図13 石川原15因子ネットワーク

#### 2) 瀬底南での環境因子ネットワーク解析

同様に瀬底南での結果を以下に示す。瀬底南は上述した通り取得できたデータ点は11点である。図14は11点のデータの内、6点の月毎のデータを示している。

11点のネットワーク解析結果をまとめ、図15に示す。瀬底南でも石川原と同様にQuantumからODOへの正の相関が見られた。また、石川原とは逆にpHからODOへの正の相関が見られた。

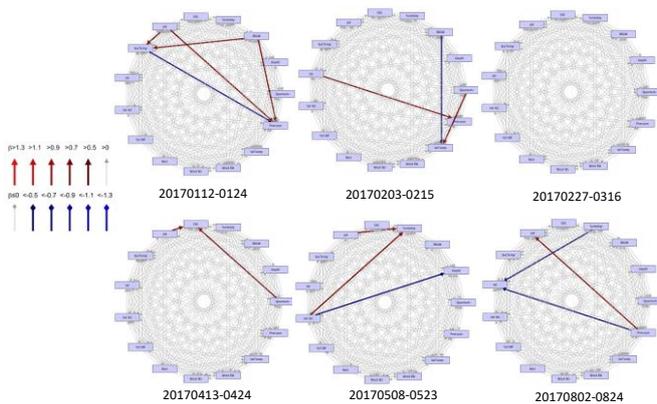


図 14 瀬底南 6 点データ

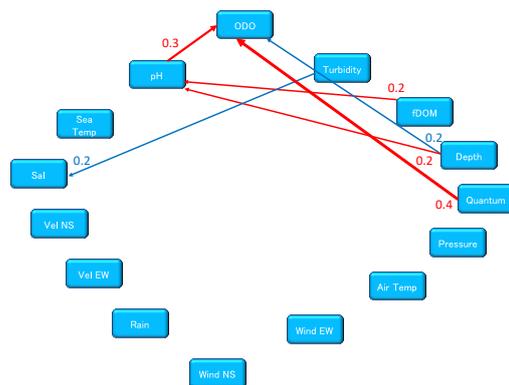


図 15 瀬底南 15 因子ネットワーク

### 3) 地点間での比較

図 13 及び図 15 において、各地点での 15 因子のまとめを示したが、共通点としては Quantum から ODO、fDOM から pH への正の相関が見られたことが挙げられる。そこで、次は各地点で特徴的な因果関係を調べた(図 16)。それぞれ石川原 12 点、瀬底南 11 点の結果について季節を通じて図示したものになる。図 16 では各パラメーターをカテゴリー毎に色分けを行った。

石川原と瀬底南の地点間を比較する上で重要となる環境因子の中で、特に顕著に現れた因子は Turbidity であり、石川原でのみ因果関係が見られた。次に影響が見られた因子は fDOM である。こちらは瀬底南でも共通して因果関係は見られたが、石川原でより強く因果関係が示された。石川原は河口、リゾートホテルからの排水、内湾性などの条件から、瀬底南と比較した場合に海洋の環境としては良いとは言い難いが、ロガーから得られた数値は両地点では大きな差が見られない。しかしながら、今回行った海洋データを用いた 15 因子の環境因子ネットワーク解析により、石川原でのみ顕著な Turbidity の因果関係が見られたことは、実データをネットワーク解析することでより他の因子に供与する関係性が見られるようになった。

また、fDOM については光化学反応により蛍光の消失がされやすいことが示されているが、無機化の程度など、不明な点が多い物質である。ネットワーク解析結果では、特に石川原において、fDOM から pH への強い正の相関、そして ODO への負の相関が見られた。

今回、中間報告以降に、海水のシグナルを発生させるために必要な流向流速 (Vel EW, Vel NS) や気象パラメーター等を追加した。

全体的に述べられることとしては、石川原と瀬底南の二地点を比較した場合、明らかに各環境因子の関係性が如実に現れるのが石川原である。これは、通常の各地点の環境を考えると推察は容易である。瀬底南は外洋に面していることから、常に環境の変化にさらされており、一方石川原は内湾であるため、環境変化は瀬底南と比較すると小さい。よって、環境変化に対する影響は瀬底南より石川原が顕著に出現しやすいと考えられる。今回の解析結果は、実際の海洋で起こりうる環境をネットワーク図とすることでより顕著に関係性を見出した点が非常に興味深く、今後他の環境で取得したデータが蓄積された場合、これらの解析を行うことで更なる海洋のより精緻な環境因子の因果関係を示すことが出来るのではないかと期待される。

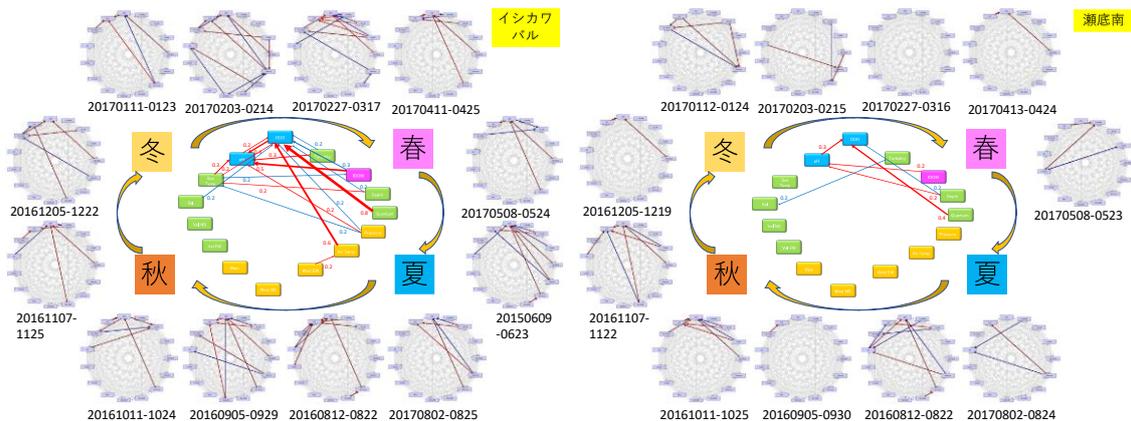


図 16 地点間における環境因子の因果関係比較

#### サブテーマ 4: カタストロフィー予測法の開発 (計算機開発グループ)

当初は主成分分析や対応分析を用いて、2地点データでの概観を解析していたが、観測データが11点揃った段階で多重カーネルサポートベクター回帰を導入し、サンゴの状態のモニターとなる可能性が高い褐虫藻密度やサンゴ共在細菌叢 16S データの予測をおこなった。特に、環境によってサンゴ細菌叢に特徴が見られたことから、それらに注力したところ海水の細菌叢との相関が一番高いことが示された。このことから、海水中の細菌叢解析を行うことで、サンゴ細菌叢の予測が出来る可能性が高いことが示された。そして、次に採集時の画像からサンゴ白化の段階を確定し、過学習を抑えながら学習可能なリッジ回帰を用いて予測する手法を適用した。内部微生物要因、環境物理要因、人的要因の3つの要因からサンゴの健康状態を予測する数理モデルの構築を行った。さらに、カタストロフィー予測として実用的な白化の事前予測の可能性を検討し、最終的に白化する1ヶ月前予測実現の可能性を示唆する良好な結果を得た。

内部微生物要因としてサンゴ 16S、環境物理要因として海水の温度、pH、溶存酸素、水深、水中光量、そして人的要因として海水中の栄養塩(硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素、リン酸態リン、ケイ酸態ケイ素)をそれぞれの指標として用いた。

##### 1) サンゴの白化度

本解析では、サンゴの白化度を健康状態の指標として用いた。瀬底南、石川原の各期間におけるそれぞれ5群体のサンゴについて、これまでの白化状況の記録(写真)に基づき、白化していない場合は0、部分的な白化が見られる場合は1、ほとんど白化している場合は2として3段階により白化度を定義した。ただし、各期間におけるデータの総評は5群体の白化度の平均値を用いている。本解析では、1ヶ月前の内部微生物要因、環境物理要因、そして人的要因のデータがともに測定されていた2015年2月から2017年1月までの39期間のデータの白化度を用いた。

##### 2) 白化度予測に用いる入力データ

内部微生物要因としてはサンゴ 16S の OTU 量(シーケンス解析によって得られるリードカウント値)を用いた。ただし、リードカウント値は全サンプルを通じてカウント数が100未満の OTU を除去した後、log10によるスケールアップとサンプル内、間の順に標準化を行った。環境物理要因は温度、pH、溶存酸素、水深、水中光量の各月における全観測地点の平均値と分散、そして栄養塩については硝酸態窒素、亜硝酸態窒素、アンモニア態窒素、リン酸態リン、ケイ酸態ケイ素の存在量を用いた。

##### 3) サンゴ白化度の2値分類予測

サンゴに白化が見られない場合(白化度が0の場合)を「0」、少しでも白化が見られる場合(白化度が0より大きい場合)を「1」としてラベル付けを行い、そのラベルを予測する2値分類予測を行った。予測にはサポートベクターマシン(SVM)による学習を行った。サンゴの白化には海水の温度やpHが大きく影響することが一般的に知られているが、本解析結果からも温度の係数が環境物理要因の中で最も大きく、白化における重要な因子の1つであることが確かめられた。また人的要因の係数については水質汚染の指標でも使用されている亜硝酸態窒素が最も大きい値

を示した。

#### 4) サンゴ白化度の数値予測

1)ではサンゴの白化度の2値分類予測を行ったが、ここではサンゴの白化度を連続値として扱い、内部微生物要因、環境物理要因、人的要因の複合要因を用いて、サポートベクター回帰によりサンゴの1か月後の白化度を予測した。全ての3要因を用いて予測した場合、単独で要因を用いた場合より実測値と予測値の相関係数が大きく0.748と最大値を示したが、これはサンゴの健康状態が様々な要因の複合的な影響を受けると密接に関連しており、モデルの係数からサンゴの白化状態を温度・水中光量と海水中の16Sゲノムから推測できることを示唆している。特に白化の原因とされている温度については平均値より分散すなわち期間変動量が白化に影響を与えている可能性が示唆された。

サンゴは微生物叢による内部要因、温度などの環境物理要因、そして人的要因の3つの要因から影響を受けることで白化が起こることが推察されるが、これら3つの要因に基づいた予測を行った点が類似研究と比べて新しい点である。

サポートベクターマシンによる2値分類では、上記3つの複合要因からサンゴの白化状態を97%以上の精度で予測可能であった。白化度の数値予測では、予測値が0.1以上になると1ヶ月後に白化が見られるサンゴがあり警戒が必要で、0.5以上になると100%のサンゴが1ヶ月後に白化すると予測された。

今回の解析では白化度が0の期間が33データ、0より大きい期間が6データであったが、今後、白化度の高い地点・期間の学習データが増加することによって、さらなる予測精度の向上が期待される。

### 3.4 統合データベースの開発

#### サブテーマ1: 統合データベースの構築(バイオ計測グループ)

##### 1) データベース環境整備

統合データベース運用環境の構築と整備を行った。木村グループと連携し、研究終了後のデータベース運用およびバックアップを考慮したシステム全体の再構築を行い、データベースの運用を木村グループから引き継いだ。

一般公開への対応として、ドメイン名、問い合わせメーリングリスト等の公開時に必要な条件を満たす対応を行い、2月末に一般公開を開始した。

##### 2) データ整理

塩基配列データおよび付随する情報を整理し、最終更新した。

石川原(瀬底島北部沿岸)、瀬底南(瀬底島)における2014年～2017年までの時系列データ(微生物叢メタゲノム、メタトランスクリプトーム、16S rRNA 遺伝子)について、データ数115、総リード数1,367,094,954、総塩基数314,087,482,694のデータを登録した。

#### サブテーマ2: 統合データベース構築およびデータ検証(木暮グループ)

統合データベースに登録するデータの情報精査及び整理を行った。

統合データベースの一般公開のため、木暮グループデータの紹介や各データに付随する情報として手法を纏め、データベースへ登録した。

木村グループと連携してデータベース登録データ等の情報整理および更新を行い、塩基配列データ(OT-line、ON-line、KM-line、三崎、北太平洋亜寒帯・亜熱帯の一部)として、データ数304、総リード数735,598,532、総塩基数76,264,230,808を登録した。

#### サブテーマ3: 統合データベース実証およびマニュアル作成(石野グループ)

木村グループと連携して統合データベースの改良および五條堀チーム(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」H23～H28)におけるデータベース利用のためのマニュアルの整備を行った。また、統合データベースの一般公開に向けてコンテンツの英語対応を行った。

データベースの改良においては、木村グループにて設計されたコンテンツや構成変更案のレビ

ユー、統合データベース利用者の観点でデータベースが利用しやすく仕上がっていること(構成や記号説明など)の確認を行った。また、五條堀チームにおいて実施し、開発した塩基配列データ取得のための操作法についてもマニュアル化し、それを精査・整理した。

#### サブテーマ4: 統合データベース構築および改良(木村グループ)

##### 1) データベース環境の整備

バイオ計測グループと連携し、統合データベース運用環境の整備(ハードウェア)を行った。また、バックアップシステム等の将来的な運用を見据えた環境構築も行った。

プロジェクト終了後のデータベース運用として、データ追加も見据えた運用マニュアルを作成し、早稲田大学へ引継いだ。

##### 2) 統合データベースの改良と運用

一般公開へ向けた対応として、下記の作業を行い、2月末に海洋モニタリングデータベース(統合データベース)の一般公開を開始した。(図17)

- ・データベースのセキュリティ環境の見直しと再整備
- ・サーバ環境変更に伴うデータベース動作確認と修正
- ・石野グループと連携し、コンテンツの修正および英語化対応
- ・一般公開へ向け、五條堀チームの登録済データの再整理として、ファイル名の修正、データ圧縮等の登録情報の再構築

木暮グループ、バイオ計測グループのデータおよび情報を更新し、最終的にサンプル数 877、総リード数 6,683,039,589、総塩基数 1,074,906,479,686 のデータを登録した。(図18海洋モニタリングデータベース画面)

The image shows two screenshots of the CREST Ocean Monitoring Database website. The left screenshot displays the 'Summary' page, which includes a welcome message, a brief description of the database, and a list of research subjects. The right screenshot displays the 'Database Menu' page, which provides information on how to use the database and lists the data available from three research teams.

Database	
Team Gojobori Data	A time series data obtained from metagenomic analysis of the seawater samples in the Tohoku area
Team Kogure Data	Physicochemical environment and microorganism information of seawater samples
Team Takeyama Data	Physicochemical environment and microorganism information of seawater samples

図17 海洋モニタリングデータベース

Number of registered nucleotide sequences			
Team	Number of data	Total amount of nucleotide sequences	Total amount of nucleotides
Team Gojobori	458	4,580,346,103	684,554,766,184
Team Kogure	304	735,598,532	76,264,230,808
Team Takeyama	115	1,367,094,954	314,087,482,694
<b>Total</b>	<b>877</b>	<b>6,683,039,589</b>	<b>1,074,906,479,686</b>

図18 データファイル照合表

## § 4 成果発表等

### (1)原著論文発表 (国際 (欧文) 誌 9 件)

1. Miyaoka R, Hosokawa M, Ando M, Mori T, Hamaguchi H, Takeyama H, “In situ detection of antibiotics Amphotericin B produced in *Streptomyces nodosus* using Raman microspectroscopy” *Marine Drugs* 12(5), 2014 (DOI: 10.3390/md12052827.)
2. Nurdiani D, Ito M, Maruyama T, Terahara T, Mori T, Ugawa S, Takeyama H, “Analysis of the bacterial xylose isomerase gene diversity with gene targeted metagenomics” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120, 2, 2015 (DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.12.022 2015.)
3. Hosokawa M, Hoshino Y, Nishikawa Y, Hirose T, Yoon DH, Mori T, Sekiguchi T, Shoji S, Takeyama H. “Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes” *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 2015 (DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.059.)
4. Nishikawa Y, Hosokawa M, Maruyama T, Yamagishi K, Mori T, Takeyama H. “Monodisperse picoliter droplets for low bias and contamination free reactions in single-cell whole genome amplification.” *PLoS One*, 10, e0138733, 2015. (DOI:10.1371/journal.pone.0138733)
5. Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H., "Droplet microfluidics for precise and high throughput whole genome amplification toward single-cell genome sequencing", 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2016, 178-179 201
6. Maruyama T, Mori T, Yamagishi K, Takeyama H. 2017. SAG-QC: Quality control of single amplified genome by subtracting non-target sequences based on sequence compositions. *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/s12859-017-1572-5.
7. Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H. 2017. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. *Scientific reports*. doi: 10.1038/s41598-017-05436-4.
8. Kogawa M, Hosokawa M, Nishikawa Y, Mori K, Takeyama H. Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes. *Scientific Reports*. 2018. 8. 2059.
9. Nuryadi H, Thi Tra My N, Ito M, Okada N, Wakaoji S, Maruyama T, Nakano Y, Fujimura H, Takeyama H, Suda S. 2018. A metabarcoding survey for seasonal picophytoplankton composition in two coral reefs around Sesoko Island, Okinawa, Japan. *Journal of Applied Phycology*.(in revision) .

### (2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 中野義勝、大慈彌みち子、手納丞平、須田彰一郎、“観測機器の海中設置に伴う固定具の金属腐食”*臨海・臨湖*、30:10-14、2013
2. 竹山春子、モリテツシ、伊藤通浩、細川正人、“海洋遺伝子資源の新しいオミクス解析への挑戦”、「生命のビッグデータ利用の最前線」第4章 CMC 出版、138-146、2014
3. 竹山春子、分担執筆「第4章 海洋産業の振興と創出 第5節 さらに海洋産業の振興・創出に向けて 2. 海洋バイオ産業」、「海洋白書 2014」海洋政策研究財団 編集、成山堂書店、2014
4. 岡西孝真、加藤有己、藤村弘行、中野義勝、須田彰一郎、曾根秀子、藤渕航、“MCMC サンプリングに基づく海洋環境因子ネットワーク解析”、情報処理学会研究報告、Vol.2015-BIO-42 No.35、2015
5. 小林健太、加藤有己、谷口丈晃、丸山徹、伊藤通浩、五斗進、竹山春子、藤渕航、“海洋環境解析に向けたメタゲノムおよび 1 細胞配列データ解析用パイプラインの開発”、情報処理学会研究報告、Vol.2015-BIO-42 No.58、2015
6. Mori T, Takeyama H, 分担執筆「Chapter 19: Marine Metagenome and

Supporting Technology」 *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, Springer, 2015

7. 細川正人、西川洋平、竹山春子、“難培養微生物を対象としたシングルセルゲノミクスの課題と展望”の項、生体の科学 特集 細菌叢解析の光と影、2017年04月号(通常号)(Vol.68 No.2)、2017
8. 細川正人、丸山徹、西川洋平、竹山春子「BIOINDUSTRY 2017年6月号 環境微生物のシングルセル解析に向けた技術基盤」、シーエムシー出版、2017
9. 細川正人、丸山徹、西川洋平、竹山春子「実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ シングルセル解析プロトコール 分担執筆:微生物のシングルセルゲノム解析」菅野純夫編、羊土社、2017

(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 24 件、国際会議 9 件)

1. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋生物・遺伝子資源の解析と利活用への挑戦”、電気化学会、仙台、2013年3月29日
2. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋遺伝子資源の新しいオミックス解析への挑戦”、京都バイオ計測センターシンポジウム「生命のビッグデータの解釈とその社会への展開」、京都、2013年7月29日
3. 竹山春子(早稲田大学)、“マリンメタゲノムへの応用～海洋遺伝子資源としてマリンメタゲノム解析と展開～”、Roche Scientific Symposium 2013「マイクロバイオーム研究の最前線～次世代シーケンサーによって開拓される新境地～」、東京、2013年10月25日
4. 竹山春子(早稲田大学)、“Treasure from the ocean: Marine useful bio/genome resources”、ゲノムテクノロジー第164委員会第42回研究会、東京、2013年11月8日
5. Takeyama H (Waseda Univ.), “Metagenome analysis of marine invertebrate-associated bacteria and its supporting technologies”, International symposium on Aquatic Metagenomics, Tokyo, 2013/11/23
6. Takeyama H (Waseda Univ.), “Metagenomic Analysis of Invertebrate Holobionts and Their Application”、第16回日本サンゴ礁学会、沖縄科学技術大学院大学、沖縄、2013年12月15日
7. Takeyama H (Waseda Univ.), “Treasure from the Ocean: Marine useful bio/genome resources”, Halal Science Symposium, Brunei, 2014/2/12
8. Takeyama H (Waseda Univ.), “Metagenomic analysis of invertebrate holobionts and supporting technologies”, The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Taipei, 2014/5/6
9. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋遺伝子資源解析と応用”、産学官若手交流会(さんわか)第21回ワークショップ、名古屋大学野依記念学術交流会館、愛知、2014年6月3日
10. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋遺伝子資源利用と解析ツール開発”、「生合成マシナリー:生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」第7回公開シンポジウム、東工大蔵前会館くらまえホール、東京、2014年6月21日
11. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋無脊椎動物共在微生物の遺伝子情報の解析と利活用”、2014年生物工学フォーラム「先端技術による新たなバイオテクノロジー」、理化学研究所大河内記念ホール、埼玉、2014年7月25日
12. Takeyama H (Waseda Univ.), “Analysis of marine invertebrate holobionts and supporting single-cell analysis technologies”, The 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi, 2014/9/10
13. Goto S (Kyoto Univ.), “KEGG for Functional Annotation of Metagenomes”, International Symposium for Frontier of Bioinformatics, Tokyo, 2015/4/16
14. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋環境からの有用資源のスクリーニングとそれをサポートする技術開発”、酵素工学研究会、大阪府立大学 I-site なんば、大阪、2015年4月24日
15. 竹山春子(早稲田大学)、“シングルセルを解析するための様々な試み”、日本生物工学

- 会「未来へのバイオ技術」勉強会、バイオインダストリー協会会議室、東京、2015年5月11日
16. 竹山春子(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、モリテツシ(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、山岸恵輔(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、藤村弘行(所属)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、五斗進(京都大学)、藤渕航(京都大学)、“サンゴ礁環境評価のためのマリンメタオミックス解析と支援技術開発”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月30日
  17. 竹山春子(早稲田大学)、“環境遺伝子資源の利活用のための技術開発”、システムナノ技術に関する時限研究専門委員会第2回研究会、東京、2015年6月19日
  18. 竹山春子(早稲田大学)、“シングルセルを解析するための様々な試み: 海洋環境からの有用資源のスクリーニングとそれをサポートする技術開発”、鶴岡慶應 訪問講演、山形、2015年10月14日
  19. 竹山春子(早稲田大学)、“海洋有用遺伝子資源とマリンバイオテクノロジー”、海洋政策研究セミナー『日本の選択を考える – 海洋遺伝資源をめぐる国連の動きにどう対処するか –』、東京、2016年2月29日
  20. 竹山春子(早稲田大学)、“Microbiome analysis: Challenges in single cell technology”、ウプサラ大学 訪問講演、ウプサラ、2016年3月4日
  21. 竹山春子(早稲田大学)、“シングルセル解析・生体分子の精密計測へ向けた様々な試み、私立大学戦略的基盤形成支援事業ストレス応答制御に基づく次世代型健康寿命科学の研究拠点形成” 第四回成果報告会、東京、2016年3月12日
  22. 竹山春子(早稲田大学)、“生物遺伝子資源を活用した新しいバイオエンジニアリングへの挑戦:ロバストな環境・社会へ”、日本セラミックス協会男女共同参画委員会、東京、2016年3月15日
  23. 竹山春子(早稲田大学)、“シングルセルゲノム解析が開く生命科学へのアプローチ:微生物から動物細胞まで”、早稲田大学-産総研連携生命情報ビッグデータ解析研究開発ワークショップ、東京、2016年3月27日
  24. Takayama H (Waseda Univ.), “Metagenomic analysis of invertebrate holobionts and supporting technologies”, Ofunato International Workshop 2016, Iwate, 2016/8/25
  25. Takayama H (Waseda Univ.), “Microbiome analysis: challenges in single cell technology”, IMBC 2016, Baltimore, 2016/9/1
  26. Takayama H (Waseda Univ.), “Droplet microfluidics for precise and high throughput whole genome amplification toward single-cell genome sequencing, microTAS 2016, Ireland, 2016/10/12
  27. Takayama H (Waseda Univ.), “Marine microbiome analysis with the technologies for single-cell microbiology”, Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2017, Hawaii, 2017/5/23
  28. 竹山春子(早稲田大学)、“腸内細菌解析へのシングルセルテクノロジーの展開、BioJapan2017 セミナー マイクロバイオームが導く健康革命、横浜、2017年10月13日
  29. 竹山春子(早稲田大学)、“異分野の研究をブリッジして新たなサイエンスを展開する～1細胞レベルのゲノム解析法の開発と応用～”、第5回なでしこ Scientistトーク、神戸、2017年11月5日
  30. 竹山春子(早稲田大学)、“微生物1細胞を解読する技術から開かれる新しいバイオリギー”、第27回インテリジェント材料/システムシンポジウム、東京、2018年1月15日
  31. 竹山春子(早稲田大学)、“空間的な遺伝子発現解析に向けた微小組織採取システムとシングルセル解析手法の開発”、CREST 植物頑健性第3回領域会議、東京、2018年1月19日
  32. 竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ礁研究—沖縄をフィールドとした現場からの報告と提言”、海洋政策研究所公開シンポジウム「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」、東京、2018年1月29日

33. 竹山春子(早稲田大学)、“Microbiome 解析への新しいアプローチ: Single cell 解析の進展”、第4回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会、大阪、2018年2月26日

②口頭発表 (国内会議 23 件、国際会議 8 件)

1. Mori T (Waseda Univ.), Wilson MC (ETH), Miyaoka R (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Matsunaga S (Univ. Tokyo), Piel P (ETH), Takeyama H (Waseda Univ.), “Discovery of novel marine natural compound producers from marine sponges using single-cell techniques” The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Humanities & Social Sciences Building, Academia Sinica, Taipei (Taiwan), 2014/5/6
2. 伊藤通浩(早稲田大学)、大慈彌みち子(琉球大学)、丸山徹(早稲田大学)、鈴木明香(早稲田大学)、岡田直子(早稲田大学)、モリテツシ(早稲田大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄浅海域におけるミドリイシ属サンゴ共生細菌叢の動態解析”、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、三重、2014年5月31日
3. Mori T (Waseda Univ.), Wilson MC (ETH), Miyaoka R (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Matsunaga S (Univ. Tokyo), Piel J (ETH), Takeyama H (Waseda Univ.), “Single-cell analytical approach in the identification of producers to marine natural compounds”, 第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、三重、2014年5月31日
4. Mori T (Waseda Univ.), Wilson MC (ETH), Miyaoka R (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Matsunaga S (Univ. Tokyo), Piel J (ETH), Takeyama H (Waseda Univ.), “Implementing single-cell approaches for the elucidation of marine natural compound producers in marine sponges” International Union of Microbiological Societies 2014, Montreal (Canada), 2014/7/28
5. Hosokawa M (Waseda Univ.), Nishikawa Y (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Droplet-based microfluidics for single-cell analysis”, The 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi (Kenya), 2014/9/10
6. 伊藤通浩(早稲田大学)、大慈彌みち子(琉球大学)、丸山徹(早稲田大学)、岡田直子(早稲田大学)、モリテツシ(早稲田大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄浅海域におけるミドリイシ属サンゴ共生細菌叢の年変動”、環境微生物系合同大会 2014、浜松アクティビティコンgresセンター、静岡、2014年10月24日
7. 細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、川井聡子(早稲田大学)、横田(恒次)恭子(感染研)、竹山春子(早稲田大学)、“マイクロドロップレットを反応場とした1分子DNA増幅法の応用”、電気化学学会第82回大会、横浜国立大学、神奈川、2015年3月1日
8. 西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“単一細胞ゲノム解析に向けた Droplet-based multiple displacement amplification 法の開発”、日本化学会第95春季年会、日本大学薬学部キャンパス(千葉)、2015年3月27日
9. 須田彰一郎(琉球大学)、XH Nguyen (琉球大学)、TH Vu (琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、岡田直子(早稲田大学)、若王子智志(早稲田大学)、山岸恵輔(早稲田大学)、大久保佑介(早稲田大学)、藤渕航(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、“ウスエダミドリイシ骨格から分離したシアノバクテリア株について”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月31日

10. 細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴によるシングルセルの超並列ゲノム増幅”、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学、熊本、2015年9月10日
11. Okubo Y (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Shinzato C (OIST), Goto S (Kyoto Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Genomic analysis of coral-associated bacteria to understand coral-bacteria interactions”, 日本微生物生態学会第30回大会, 土浦亀城プラザ, 茨城, 2015年10月17日
12. 中野義勝(琉球大学)、案納昭則(ヴィアマール)、北野裕子(宮崎大学)、安田仁奈(宮崎大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“伊是名村具志川島で発見されたハナヤサイサンゴ属の最大級群落”、沖縄生物学会第53回大会、琉球大学、沖縄、2016年5月28日
13. 竹山春子(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、丸山徹(早稲田大学)、岡田直子(早稲田大学)、新里宙也(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、“サンゴ礁環境評価のためのサンゴ-共生微生物ホロバイオームの変動解析”、第18回マリンバイオテクノロジー学会大会、函館、2016年5月28日
14. 須田彰一郎(琉球大学)、Hutabarat PUB(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、岡田直子(早稲田大学)、若王子智史(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、藤渕航(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄サンゴ礁環境をシアノバクテリアで評価する”、第18回マリンバイオテクノロジー学会、北海道大学水産学部(北海道)、2016年5月28日
15. 西川洋平(早稲田大学)、“単一微生物からの高精度な全ゲノム解析に向けたマイクロ流体デバイスの活用”、日本生物工学会東日本支部第11回学生発表討論会、東京、2016年11月5日
16. 中野義勝(琉球大学)、金城浩二(海の種)、新里宙也(OIST)、座安佑奈(OIST)、藤村弘行(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“2016年のサンゴ白化から、気象災害として今後の対応を考える”、日本サンゴ礁学会第19回大会、沖縄タイムスビル、那覇市、沖縄、2016年12月4日
17. 藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、萱嶋翔太(琉球大学)、五十嵐雅明(琉球大学)、中村将平(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“3点溶存酸素法によるサンゴ礁生物群集の一次生産量の見積もり”、日本サンゴ礁学会第19回大会、沖縄タイムスビル、那覇市、沖縄、2016年12月3日
18. 伊藤遼(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、新里宙也(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、油谷幸代(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ-共生藻の相互作用解明に向けたトランスクリプトーム解析”、第6回生物物理学会関東支部会、東京、2017年3月14日
19. 小川雅人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、森一樹(産総研)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴を用いた1細胞ゲノムデータの並列取得と相互参照解析法の開発”、日本化学会第97春季年会、慶應・日吉キャンパス、神奈川、2017年3月18日
20. Ito H (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Univ. Ryukyus), Shinzato C (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Aburatani S (AIST), Takeyama H (Waseda Univ.), “Gene Expression Analysis for Corals/Zooxanthellae under High Seawater Temperature Stress”, International conference on systems biology, Dubai, 2017/5/19
21. Ide K (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Aburatani S (AIST), Takeyama H (Waseda Univ.), “Network Analysis to Reveal Microbial Community Dynamics in the Coral Reef Ocean、

- International conference on systems biology, Dubi, 2017/5/19
22. Kogawa M (Waseda Univ.), Nishikawa Y (Waseda Univ.), Mori K (AIST), Hosokawa M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Development of technique for parallel single cell genome amplification of bacteria and sequence read cleaning for de novo assembly”, Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference 2017, Hawaii, 2017/5/23
  23. 岡西孝真(京都大学)、加藤有己(京都大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、曾根秀子(国立環境研)、藤渕航(京都大学)、“MCMC サンプリングに基づく海洋環境因子ネットワーク解析”、情報処理学会バイオ情報学研究会、沖縄、2017年6月23日
  24. 小林健太(京都大学)、加藤有己(京都大学)、谷口丈晃(三菱総研)、丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、五斗進(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、藤渕航(京都大学)、海洋環境解析に向けたメタゲノムおよび1細胞配列データ解析用パイプラインの開発、情報処理学会バイオ情報学研究会、沖縄、2017年6月23日
  25. Takeyama H (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Nishikawa Y (Waseda Univ.), Kogawa M (Waseda Univ.), ”Droplit-based Massively Parallel Whole Genome Amplification for Single-cell Microbiology“, IUMS2017, Singapore, 2017/7/17
  26. 伊藤通浩(琉球大学)、岡田直子(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、新里宙也(OIST)、座安佑奈(OIST)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ共在細菌叢のロバストネス:白化のなかった2015年と白化のあった2016年のサンゴ礁定点モニタリング”、環境微生物系学会合同大会2017、東北大学川内キャンパス、仙台、2017年8月30日
  27. 中野義勝(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“大規模白化後の開放性環境と遮蔽性環境でのサンゴ群集の変遷と価値評価”、日本サンゴ礁学会第20回大会、東京工業大学、目黒、東京、2017年11月23日
  28. 伊藤通浩(琉球大学)、岡田直子(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、新里宙也(東京大学)、座安佑奈(OIST)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“Acropora tenuis 共在細菌叢の長期定点観”、日本サンゴ礁学会第20回大会、東京工業大学、目黒、東京、2017年11月24日
  29. Takeyama H (Waseda Univ.), “Development of novel technology for microbial community analyses by the meta-omics analyses of marine unculturable microbes based on single cell genome information.” Promotion of global network studies on seagrass ecosystem based on innovative new technology, Tokyo, 2018/2/1
  30. 小川雅人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、森一樹(産総研)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“超並列シングルセルゲノム増幅産物の相互比較による高精度ゲノム解析法の開発”、日本農芸化学会2018年度大会、名古屋、2018年3月17日
  31. Nishikawa Y (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Kogawa M (Waseda Univ.), Takahashi K (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Droplet microfluidics toward accurate genome sequencing of environmental bacteria at the single-cell level”, The 2018 Annual Meeting of The Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, Chiba, 2018/3/22

③ ポスター発表 (国内会議 51 件、国際会議 16 件)

1. Hosokawa M (Waseda Univ.), Miyaoka R (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “In situ detection of antibiotics Amphotericin B (AmB) produced in actinomycetes by using Raman microspectroscopy”, The 10th Asia-Pacific

- Marine Biotechnology Conference, Humanities & Social Sciences Buliding, Academia Sinica (Taiwan), 2014/5/6
2. Wakaoji S (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Suzuki S (Waseda Univ.), Ojimi MC (Univ. Ryukyus), Mori T (Waseda Univ.), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.) “Monitoring the bacterial community and their metatranscriptome in coral reef sea water in Okinawa, Japan” The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, Humanities & Social Sciences Buliding, Academia Sinica (Taiwan) 2014/5/6
  3. 大慈彌みち子(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、嘉手納丞平(琉球大学)、田中健一(京都大学)、酒井一彦(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、藤渕航(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄県瀬底島近海の2地点における長期的海水モニタリング”、第51回沖縄生物学会、琉球大学、沖縄、2014年5月24日
  4. Hosokawa M (Waseda Univ.), Hoshino Y (Waseda Univ.), Nishikawa Y (Waseda Univ.), Hirose T (Waseda Univ.), Hyun D (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Sekiguchi T (Waseda Univ.), Shoji S (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of metagenomic library” Biosensors 2014, Melbourne, 2014/5/28
  5. 若王子智史(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、大慈彌みち子(琉球大学)、モリテツシ(早稲田大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄サンゴ礁海域に生息する海洋細菌群のメタトランスクリプトーム解析”、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、三重、2014年5月31日
  6. Lewaru MW (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ojimi MC (Univ. Ryukyus), Mori T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “Diversity of bacterial nitrogen fixation genes within a reef coral *Acropora tenuis* in shallow reef, Okinawa, Japan”, 第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、三重、2014年5月31日
  7. 丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、五斗進(京都大学)、藤渕航(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ共生微生物叢の変化がサンゴの代謝に与える影響”、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会、三重大学、三重、2014年5月31日
  8. Miyaoka R (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “In situ detection of secondary metabolites in antibiotic-producing bacteria”, The Second Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 国立東華大学, 台湾, 2014/6/23
  9. Miyaoka R (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “In situ Raman imaging of secondary metabolites in antibiotic-producing bacteria” International Union of Microbiological Societies 2014, Montreal, 2014/7/31
  10. Ito M (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ojimi MC (Univ. Ryukyus), Suzuki S (Waseda Univ.), Ishibashi Y (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “Coral microflora dynamics under different environmental conditions in Okinawa shallow reef, Japan” 15th International Symposium on Microbial Ecology, Coex Convention Center, Korea, 2014/8/26
  11. Nishikawa Y (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “シングルセルゲノミクスに向けた Droplet-based Multiple Displacement Amplification 法の開発”、第4回CSJ化学フェスタ2014、タワーホール船堀、東京、2014年10月15日
  12. Hosokawa M (Waseda Univ.), Hoshino Y (Waseda Univ.), Nishikawa Y (Waseda Univ.), Hirose T (Waseda Univ.), Yoon DH (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Sekiguchi T (Waseda Univ.), Shoji S (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a

- metagenomic library”, EMNT2014, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2014年11月6日
13. Nishikawa Y (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Droplet-based multiple displacement amplification method for single-cell genomics using microfluidic device”, EMNT2014, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2014年11月6日
  14. 須田彰一郎(琉球大学)、大慈彌みち子(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、嘉手納丞平(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、酒井一彦(琉球大学)、加藤有己(京都大学)、藤渕航(京都大学)、五斗進(京都大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“瀬底島周辺の異なるサンゴ礁景観 2 定点の環境長期モニタリング”、第17回日本サンゴ礁学会、高知、2014年11月29日
  15. Taniguchi T (Kyoto Univ.), Kato Y (Kyoto Univ.), Goto S (Kyoto Univ.), Fujibuchi Y (Kyoto Univ.), “Development of a pipeline for analysis of meta- and single cell genomic sequences”, GIW/ISCB-Asia 2014, Tokyo, 2014/12/15
  16. Yamane J (Kyoto Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), Fujibuchi W (Kyoto Univ.), “Kernel CCA for microbial meta-transcriptome data to investigate coral survivability in Ryukyu Sea”, GIW/ISCB-Asia 2014, Tokyo, 2014/12/16
  17. 西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“マイクロ流体デバイスを用いた単一細胞解析に向けた Multiple displacement amplification (MDA) 法の開発”、第3回日本生物工学会東日本支部コロキウム、東京工業大学すずかけホール、神奈川、2015年3月4日
  18. 伊藤通浩(早稲田大学)、大久保悠介(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、五斗進(京都大学)、藤渕航(京都大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ共生細菌群の遺伝的特性”、第9回日本ゲノム微生物学会、神戸大学、兵庫、2015年3月7日
  19. 丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、大久保悠介(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴにおける共生細菌叢の成立・維持機構の推定”、第9回日本ゲノム微生物学会、神戸大学、兵庫、2015年3月7日
  20. 山岸恵輔(所属)、モリテツシ(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、中野義勝(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“シングルセルゲノム増幅技術の評価と環境細菌種への応用”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月30日
  21. 西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“単一細胞レベルでの微生物ゲノム解析に向けた、Droplet-based multiple displacement amplification 法の開発”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月30日
  22. 丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ共生細菌叢の形成・維持機構の推定”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月30日
  23. Lewaru MW (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Ojimi MC (Univ. Ryukyus), Mori T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ.), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “Bacterial diazotrophic community dynamics within the corals *Acropora tenuis* and *Pocillopora verrucosa* in Okinawa shallow reef, Japan.”、第17回マリンバイオテクノロジー学会、東京海洋大学、東京、2015年5月30日
  24. Miyaoka R (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Ando M (Waseda Univ.), Hosokawa M (Waseda Univ.), Hamaguchi H (Waseda Univ.), Piel J (ETH), Takeyama H (Waseda Univ.). “Detection of the producers of bioactive compounds from marine sponge *Theonella swinhoei* by using Raman microspectroscopy”, The 3rd Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, 南投, 台湾, 2015/7/1

25. 丸山徹 (早稲田大学)、伊藤通浩 (早稲田大学)、大久保悠介 (早稲田大学)、竹山春子 (早稲田大学)、“宿主共在細菌叢の形成機構の推定”、NGS 現場の会第 4 回研究会、筑波国際会議場、茨城、2015 年 7 月 2~3 日
26. Ito M (Waseda Univ.), Okada N (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Shinzato C (OIST), Zayasu Y (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “Structure, plasticity and robustness of microbiome in the colonies of a reef coral *Acropora tenuis*”, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ, 茨城, 2015 年 10 月 17-20 日
27. Lewaru MW (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ojimi MC (Univ. Ryukyus), Mori T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “The dynamics of bacterial diazotrophic communities within the corals *Acropora tenuis* and *Pocillopora verrucosa* in Okinawa Shallow reef, Japan”, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ, 茨城, 2015 年 10 月 17-20 日
28. Maruyama T (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Yamagishi K (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Quality control of bacterial single-amplified genome sequences”, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ, 茨城, 2015 年 10 月 17-20 日
29. Yamagishi K (Waseda Univ.), Mori T (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), “Evaluation of whole genome amplification methods for bacterial single-cell genomics”, 日本微生物生態学会第 30 回大会, 土浦亀城プラザ, 茨城, 2015 年 10 月 17-20 日
30. 細川 正人 (早稲田大学)、西川 洋平 (早稲田大学)、小川 雅人 (早稲田大学)、竹山 春子 (早稲田大学)、“微小液滴を用いた単一細胞の超並列ゲノム増幅法の開発”、第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル、鹿児島、2015 年 10 月 26 日
31. Kobayashi K (Kyoto Univ.), Yuji M (Kyoto Univ.), Kato Y (Kyoto Univ.), Taniguchi T (Mitsubishi Res. Inst.), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Goto S (Kyoto Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), Fujibuchi W (Kyoto Univ.), “Development of a pipeline for analysis of meta- and single-cell genomic sequences”, IIBMP2015, Tokyo, 2015/10/29-31
32. Okanishi T (Kyoto Univ.), Kato Y (Kyoto Univ.), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Sone H (Natl. Inst. Environmental Studies), Fujibuchi W (Kyoto Univ.), “Network analysis of marine environmental factors based on MCMC sampling”, IIBMP2015, Tokyo, 2015/10/29-31
33. Nishikawa Y, Hosokawa M, Kogawa M, Takeyama H, “Picoliter-sized droplets for low-bias and contamination-free reactions in whole genome amplification of single bacterial cells”, Biosensors 2016, Sweden, 2016/5/25
34. 小川雅人 (早稲田大学)、西川洋平 (早稲田大学)、細川正人 (早稲田大学)、竹山春子 (早稲田大学)、“微生物のシングルセルゲノム解析に向けた微小液滴を用いた全ゲノム増幅法の開発”、第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、函館、2016 年 5 月 28 日  
竹田裕貴 (早稲田大学)、細川正人 (早稲田大学)、西川洋平 (早稲田大学)、小川雅人 (早稲田大学)、伊藤通浩 (琉球大学)、中野義勝 (琉球大学)、須田彰一郎 (琉球大学)、竹山春子 (早稲田大学) “ドロップレットデジタル PCR によるサンゴ共在微生物由来 16S rRNA 遺伝子数の精密定量”、第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会、函館、2016 年 5 月 28 日
35. Igarashi M (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Kayashima S (Univ. Ryukyus), Nakamura S (Univ. Ryukyus), Ito M (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “Nutrients distribution at two different coral reef sites around Sesoko Island

- Okinawa, Japan”, 13th International Coral Reef Symposium, Honolulu, Hawaii, 2016/6/19-24
36. Nakano Y (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Ito M (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), “The impact extent regional environmental factors in the recovery process of the coral community in terrains established via different geological histories”, 13th International Coral Reef Symposium, Honolulu, U.S.A., 2016/6/19-24
  37. 細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学) “超並列シングルセルゲノム解析に向けた微小液滴制御技術の開発”、第10回バイオ関連化学シンポジウム、石川、2016年9月7日
  38. 竹田裕貴(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“デジタル PCR によるサンゴ共生微生物由来 16S rRNA 遺伝子数の精密定量”、第68回日本生物工学会大会、富山、2016年9月28日
  39. 西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“ピコリットル容量の微小液滴を用いた単一微生物からの網羅的な全ゲノム増幅”、第68回日本生物工学会大会、富山、2016年9月28日
  40. Maruyama T(Waseda Univ.), Mori T(Waseda Univ.), Yamagishi K, Takeyama H(Waseda Univ.), “Software for quality control of single amplified genome information”, International Conference on single cell Research 2016, Tokyo, 2016/11/16
  41. Nishikawa Y(Waseda Univ.), Hosokawa M(Waseda Univ.), Kogawa M(Waseda Univ.), Takeyama H(Waseda Univ.), “Droplet microfluidics for massively parallel and accurate genome amplification of single cells” International Conference on single cell Research 2016, Tokyo, 2016/11/17
  42. 岡西孝真(京都大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、曾根秀子(国立環境研究所)、藤渕航(京都大学)、“カーネル法を用いたサポートベクトル回帰による海洋統合解析”、第19回情報論的学習理論ワークショップ (IBIS2016)、京都、2016年11月16日~17日
  43. 伊藤通浩 (琉球大学)、岡田直子(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、新里宙也(OIST)、座安佑奈(OIST)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“2016年の沖縄島周辺海域における *Acropora tenuis* 共生細菌叢の変動”、日本サンゴ礁学会第19回大会、沖縄タイムスビル、那覇、沖縄、2016年12月1日~4日
  44. 五十嵐雅明(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、萱嶋翔太(琉球大学)、伊藤道浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“沖縄島周辺サンゴ礁海域における水環境”、日本サンゴ礁学会第19回大会、沖縄タイムスビル、那覇、沖縄、2016年12月1日~4日
  45. Nguyen TTM (Univ. Ryukyus), Anahara T (Univ. Ryukyus), Ito M (Univ. Ryukyus), Okada N (Waseda Univ.), Wakaoji S (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda Univ.), Suda S (Univ. Ryukyus), “Seasonal picoplankton composition in Sesoko Island, Okinawa, with emphasis on the genus *Micromonas*”, 日本藻類学会第41回大会、高知大学朝倉キャンパス、高知、2017年3月23日~25日
  46. 西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“マイクロ流体デバイスによる高精度な超並列1細胞ゲノム増幅技術の開発”、NGS現場の会・第五回研究会、仙台、2017年5月22日~24日
  47. 竹田裕貴(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、

- 竹山春子(早稲田大学)、“ドロップレットデジタル PCR を用いたサンゴ生息地点間、採取季節間におけるサンゴ共生細菌量変動の追跡”、第 19 回マリンバイオテクノロジー学会、仙台、2017 年 6 月 3 日
48. 伊藤遼(早稲田大学)、丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、新里宙也(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、油谷幸代(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“高水温ストレス条件下におけるサンゴ・褐虫藻の遺伝子発現解析”、第 19 回マリンバイオテクノロジー学会、仙台、2017 年 6 月 3 日
49. 高橋海(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“プレートデバイスによる 1 細胞レベルでの特異的遺伝子配列検出法の開発”、第 19 回マリンバイオテクノロジー学会、仙台、2017 年 6 月 3 日
50. 井手圭吾(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、中野義勝、油谷幸代(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“環境微生物群集ダイナミクス解明に向けた海洋環境ネットワーク解析” 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会、仙台、2017 年 6 月 3 日
51. 小川雅人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、森一樹(産総研)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子、“一細胞ゲノムデータの相互比較による高精度ゲノムの取得”、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京 2017 年 9 月 7 日
52. 井手圭吾(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、油谷幸代(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“珊瑚礁海域における環境微生物群集ダイナミクス解明に向けた海洋環境解析”、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京 2017 年 9 月 7 日
53. 竹田裕貴(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、須田彰一郎(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ生息地点・季節間における共生細菌叢と細菌量変動の追跡”、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京 2017 年 9 月 7 日
54. 西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“マイクロドロップレットを用いた高精度な超並列 1 細胞ゲノム解析技術の開発”、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京 2017 年 9 月 7 日
55. 伊藤遼(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、大久保悠介(早稲田大学)、森一樹(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴ共生細菌の機能予測に向けた細菌叢解析及びゲノム解析”、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京 2017 年 9 月 7 日
56. 伊藤遼(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、大久保悠介(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“サンゴと共生細菌叢の構造解明に向けた細菌叢解析及び関連遺伝子群の推定”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
57. 丸山徹(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、若王子智史(早稲田大学)、大久保悠介(琉球大学)、新里宙也(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“生物間相互作用の俯瞰的理解に向けた統合オミクス解析”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
58. 竹田裕貴(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、須田彰一郎(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、伊藤通浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“ドロップレットデジタル PCR によるサンゴ共生細菌量の地点間・季節間変動の追跡”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
59. 井手圭吾(早稲田大学)、伊藤通浩(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、油谷幸代(産総研)、竹山春子(早稲田大学)、“珊瑚礁海域における環境微生物群集ダイナミクス解明及び機能に向けた海洋環境解析”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日

60. 小川雅人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、森一樹(産総研)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴を用いて並列取得した微生物シングルセルゲノムデータに対する相互参照ゲノム解析法の開発”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
61. 西川洋平(早稲田大学)、小川雅人(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴を用いた単一細胞からの超並列ゲノム解析技術の開発”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
62. 高橋海(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴の融合・分割機構を利用した 1 細胞レベルでのゲノム増幅と特異的遺伝子配列検出法の開発”、第 69 回日本生物工学会大会、東京 2017 年 9 月 12 日～14 日
63. Cheng Y (Kyoto Univ.), Mori T (Kyoto Univ.), Kato T (Kyoto Univ.), Yamane J (Kyoto Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Suda S (Univ. Ryukyus), Maruyama T (Waseda Univ.), Ito M (Waseda Univ.), Takeyama H (Waseda Univ.), Fujibuchi W (Kyoto Univ.), “Forecasting coral reef system through multiple-kernel support vector regression”, IIBMP2017, Sapporo, 2017/9/27-29
64. Nuryadi H (Univ. Ryukyus), Nguyen TTM (Univ. Ryukyus), Anahara T (Univ. Ryukyus), Ito M (Univ. Ryukyus), Okada N (Waseda Univ.), Wakaoji S (Waseda Univ.), Maruyama T (Waseda Univ.), Nakano Y (Univ. Ryukyus), Fujimura H (Univ. Ryukyus), Takeyama H (Waseda-u), Suda S (Univ. Ryukyus), A metabarcoding survey for seasonal pico-phytoplankton composition in Sesoko Island, Okinawa, Japan, The 8th Asian Pacific Phycological Forum, Pullman Hotel, Bangsar, Kuala Lumpur, 2017/10/8-13
65. 小川雅人(早稲田大学)、西川洋平(早稲田大学)、森一樹(産総研)、細川正人(早稲田大学)、竹山春子(早稲田大学)、“微小液滴を用いた 1 細胞ゲノムの並列取得と相互比較解析による高精度ゲノムの獲得”、第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017、東京、2017 年 10 月 17 日
66. 藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、伊藤道浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“異なるサンゴ礁生物群集における一次生産量の比較”、日本サンゴ礁学会第 20 回大会、東京工業大学、目黒、東京、2017 年 11 月 23 日～26 日
67. 宮里亜子(琉球大学)、藤村弘行(琉球大学)、中野義勝(琉球大学)、須田彰一郎(琉球大学)、伊藤道浩(琉球大学)、竹山春子(早稲田大学)、“ウスエダミドリイシの白化による抗酸化酵素活性の変動”、日本サンゴ礁学会第 20 回大会、東京工業大学、目黒、東京、2017 年 11 月 23 日～26 日

#### (4)受賞・報道等

##### ① 受賞

1. 10th International Symposium in Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies STUDENT BEST POSTER AWARD 西川洋平(竹山春子)2014 年 11 月 8 日
2. 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014 優秀ポスター発表賞 西川洋平(竹山春子)2014 年 11 月 11 日
3. 生物工学会東日本支部コロキウム ポスター発表賞 西川洋平(竹山春子) 2015 年 3 月 4 日
4. 第 67 回日本生物工学会大会 飛翔賞 西川洋平(竹山春子) 2016 年 6 月 27 日
5. 第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017 優秀ポスター発表賞 小川雅人(竹山春子)2017 年 11 月 17 日
6. 第 70 回日本生物工学会大会 飛翔賞 小川雅人(竹山春子)2018 年 3 月 2 日選出

(2018年9月受賞予定)

② マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 沖縄タイムス 「ハナヤサイサンゴ大群落国際最大級 伊是名・具志川島」 2016/5/13
2. 琉球新報 「サンゴ 130メートル大群落 伊是名・具志川島海域で確認」 2016/5/13
3. 日経産業新聞にて竹山の研究が『DNAを高速コピー 早大など 水滴中に細胞閉じ込め』として紹介。2016/11/25
4. NHK おはようニッポン 特集「海の異変の救世主? ”白化しないサンゴ”」2017/2/16 OA
5. 読売テレビ ウェークアップ! プラス サンゴ保全企画 2017/9/2 OA

③ その他

1. Journal of Bioscience and Bioengineering(2017 Vol123. No. 1-6)の表紙に竹山グループのドロップレットの画像が使用された
2. QIAGEN 社 Single Cell Group のメールマガジン(2017年7月26日)にて竹山グループの研究が紹介された

(5)成果展開事例

①実用化に向けての展開

本研究で得られた液滴を利用した分析技術について、国内外の2大学、1研究機関と共同研究を開始、民間企業3社(守秘義務有り)と共同研究契約を締結した。このうち数社はターゲットのスクリーニングにシステムを用いるための共同研究FSをスタートした。それ以外にも共同研究希望企業との打ち合わせが予定されている。

②社会還元的な展開活動

1)学会活動

- ・第17回マリンバイオテクノロジー学会(2015年5月30日、東京海洋大学)にて公開シンポジウムを開催した。CREST本領域の竹山チーム、木暮チーム、五條堀チームと本領域アドバイザーの黒川顕先生がシンポジストを務め、本領域遺伝子解析3チームの目的と成果を広く一般に発表した。小池総括にもご参加いただき、本領域の研究開発について概説していただいた。
- ・第39回日本分子生物学会年会(2016年12月1日、パシフィコ横浜)にて、五條堀チームリーダー・五條堀孝先生と竹山にて、海洋メタゲノミクス研究の最前線と題したシンポジウムを開催した。本シンポジウムには木暮チームも参加した。
- ・竹山がオーガナイザーとしてシングルセル国際会議2016を開催した(2016年11月16-17、東京大学)。竹山チームの研究成果を報告するとともに、シングルセル解析の国際動向の周知と国内の研究領域の活性を図った。
- ・竹山が大会長を務めた第69回日本生物工学会大会にて、バイオインフォマティクスおよびシングルセル解析に関するシンポジウム2件を開催し、両解析の必要性について参加者らと議論した。

2)アウトリーチ活動

サイエンスアゴラ2015(2015年11月13-15日、東京未来科学館)にてブースを出展。中高生も含めた一般に向け、サンゴ礁生態系およびサンゴ共在微生物群の重要性を説明した。また、竹山チームの研究成果の一部を分かりやすく公開した。

3)開発プログラム・データベース等の公開

- ・研究成果をインターネット(URL; <http://www.genome.jp/projects/coral/>)で公開し、一般に情報提供している。本サイトでは主に以下の4点について公開(一部予定)している。

- ▶ 既にパブリッシュされたサンゴ礁関連のゲノム・メタゲノムアノテーション。
- ▶ 複数のゲノムデータやメタゲノムデータを比較し、機能の違いを解析するためのツール。
- ▶ メタゲノム・シングルセルゲノムのリードを読み込み、アセンブル、遺伝子構造予測、遺伝子機能予測をウェブ上で行うためのパイプライン(最終年度に公開予定)。
- ▶ 本プロジェクトで生産される配列データのアノテーション結果(論文化後に公開予定)。
- シングルセルゲノムの解析ツールとしてソフトウェア SAG-QC を一般公開した (<https://sourceforge.net/projects/sag-qc/>)

## § 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
2015年11月 13-15日	サイエンスアゴラ	日本科学未来館	10人	サイエンスアゴラ「みんなの仮想研究所」にブース出展
2015年 5月30日	マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム	東京海洋大学	約50名	マリンバイオテクノロジー学会大会でのシンポジウムとして企画。小池総括から御挨拶いただいた後、五條堀 T, 木暮 T, 竹山 T から1名ずつ、CRESTでの研究内容を発表した。また、本領域アドバイザーの黒川顕先生にもご発表いただいた。

## § 6 最後に

本研究では、各機関が独自の強みを最大限に生かし、新しい研究分野の立ち上げを行った。

### 1) バイオ計測・早稲田グループ:

当初の計画では、サンプリングを H28年度までに終了し、最終年度は解析に集中することになっていたが、本年度の夏までサンプリングを継続することになった。遅れが出た理由として、

- ロッシュ社の次世代シーケンサーのサポート中止によるシーケンス解析の立ち上げの遅延
- 精度の高い情報解析を行うためのサンプル数の増加の必要性

があった。一方、28年度に設定した新規のサンプリング地点(読谷、恩納村)から多様な *Endozoicomonas* が発見されたことをきっかけに、それらの役割に新たな考え方を提唱できる可能性が生まれ、共生細菌とサンゴとの生物学に新しい知見を与える可能性が期待できる。また、サンゴホロバイオントのオミックス解析では、さまざまな生物学的な基礎知見が集積できており、本年度あと半年弱で更なる解析結果も期待できる。

また、これらを支える細菌のシングルセル解析技術に関しては、国際レベルでも高い完成度で展開できており、国内外からも高く評価もされている。

以上のことを総合すると、研究成果は高いと評価できる。

1点、強調したいこととして、バイオインフォマティクス解析は、ビッグデータを生む研究者自ら習得、発展させることが必須という信念から、早稲田グループ内で解析等が出来る博士、修士課程の学生の養成を行いながらオミックス解析を進展させた。また、平成28年7月に産業総合研究所と早稲田大学とによって早稲田大学キャンパス内に「生体システムビッグデータ解析ラボ(CBBD-OIL)」が設置され、竹山がラボ長として推進することになり、本 CRESTでの解析もより進めやすい

環境が整った。また、本事業で確立した技術を基に、次の大型予算獲得につながった。

#### 2) 沖縄グループ:

琉球大学のグループは、瀬底を中心としたサンゴ礁研究に長く従事し、環境モニタリングにも精通しているエキスパートである。本研究では、長期期間連続モニタリングに挑戦した。当初、ロガーのメンテナンス不良で、安定したデータの取得に至らないケースがあったが、校正等のインターバルを導入することで、それらの課題を解決し、安定したデータ蓄積が可能となった。栄養塩等の個別のデータも長期間測定した。これらの多様な環境データは、今までにはなかった大きなデータでもあり、今後のサンゴ礁海域の研究に大いに資するものであり、研究は順調に推進されたと評価できる。また、ほぼ毎月のサンプリングも中心的に推し進め、研究の重要な役割を担ったことでも貢献度は高い。

#### 3) 計算機解析・京都グループ:

多階層のビックデータをさまざまな手法論から解析をして環境予測を行うには、当初予想していたよりもデータ量が必要であった。そのため、それらが蓄積するまでは、解析システムやデータ公開のためのデータベースプラットフォームを先に勧めてきた。その後、多重カーネルサポートベクター回帰や一般化線形モデルを用いたロジスティック回帰を適応し、求める解にあわせた予測手法を試みた。チーム内での、健康な状態というのがどのようなものなのか、それを示すパラメーターは何か、という論議の中で簡単なモデルとしては白化であり、生物学的な観点からはサンゴ細菌叢もあった。その中で、興味深いことに、それらの解に一番寄与する因子が海水の細菌叢であることが導き出された。それらの意味をさらに深く掘り下げる解析を進めることにより、予測の詳細が見出せる可能性が高まった。データ提供が遅れたこともあり、解析に十分な時間がかけられていなかったが、最後の半年間で、白化を1か月前に予測することが可能であることを示唆した。白化のタイムポイント数が増加することでより精度の高い予測モデルになることが考えられた。

#### 4) 統合データベース

統合データベースについて、環境整備が終了し公開の準備が進んだ。特に、統合データベースのうち五條堀チーム(平成23年度~28年度)のデータについては、2018年5月までに完全一般公開する予定である。統合データベースの特長として、広く有効活用される塩基配列データについて、データを得るための手法等も付随情報として提供している。よって、データ解析時に大変参考となる情報提供も含んだデータベースを開発することができ、順調に成果をあげることができた。

