

メタゲノム解析による生物多様性の把握と サンゴ礁レジリエンス過程の観察

サブテーマ2: 水産総合研究センター中央水産研究所 長井 敏

研究目的およびその内容 (他のサブテーマと連携)

石西礁湖内外における島嶼からの陸源負荷が分布密度・種組成等の生物多様性に及ぼす影響解明(栄養塩増加、非増加海域における生物多様性の詳細比較)

オニヒトデ幼生の捕獲調査による分布域および出現密度の推定と幼生胃内容物の分析による好適餌料生物の特定(クローニング・メタゲノム解析)

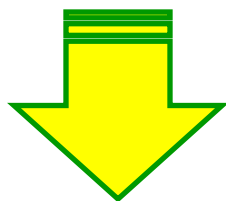
白化現象により死滅したサンゴ群落のレジリエンス過程を観察するため、着底板上の生物叢の把握および経時変化の解析

サンゴに一般的に共生しているクレードC褐虫藻の単離・培養と、サンゴ共生藻のストレス応答遺伝子の定量を行う。

膨大な量の塩基配列データを簡単に取得可能

シーケンス革命の到来！

シーケンスとは塩基配列を読むこと



水産業、海洋・沿岸・漁場環境の研究や生物多様性研究に活用できないか？

第2世代シーケンサーの開発と商品化

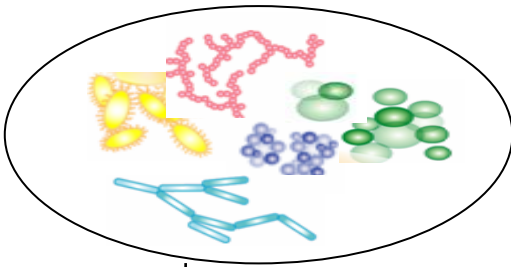
タイプ	従来型	次世代型		
会社名	Life technology社	Illumina社	Illumina社	Roche社
機種名	ABI3750xL	HiSeq2000	GAIIx	GS-FLX
1データあたりの読取塩基長	1,000塩基	50-100塩基	35-150塩基	800塩基
1ランあたりの読取配列数	1,500	20億	1.5億	100万
1ランあたりの読取データ量	1Mb	150-200Gb	85-95Gb	400Mb

数千～数十万倍の量のゲノムを一度に読むことが可能



従来のゲノム解析とメタゲノム解析

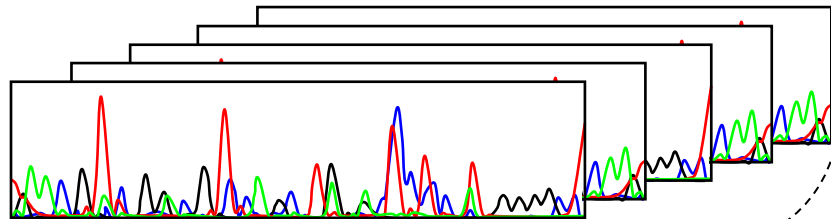
微生物群



従来法による解析



種や株ごとに解析



メタゲノム解析

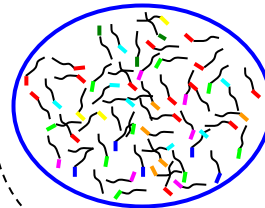
1種ずつではなく、混在する多数の生物種をまとめて検出することが可能な新しい手法

新しいテクノロジー
遺伝子解析技術の進歩

天然環境から
一度に数百種
の検出が可能



複数種のDNA混在



```
TGCATGCCAGTTTCATATGTGACATGTGATTACCTTTGCCATGAATGATAAGTCTCCT
TGTGTRCCMGTTTTATGTGGACATTTGRTTACCTKGGCCATGAATGGTAATTTTCCT
TGTGTGCCAG---CTTTTACACATTTGAACATGGCATTGGCCATGAATGGTATTATTCT
TGTGTGTAS---TTATTTGTGCATGTGCTGACCATTTGCCATGAATGGTAATATTCT
TGTTCGCCAGTTTCATATGTGACATTTGATTACCTTTGCCATGAATGGTAATTTTCCT
TGGGGGT-GGATTGCCATGTGCATGTAATGATTTGTGT-TTGGATAAATGTGTGTGGTG
CGGGGTGT-GGATTGCCATGTGCATGTAATGATTTGTGT-TTGGATAAATGTGTGTGGTG
TGGGGGTGT-GGATTGCCATGTGCATGTAATGATTTGTGT-TTGGATAAATGTGTGTGGTG
CGGGGTGT-GGATTGCCATGTGCATGTAATGATTTGTGT-TTGGATAAATGTGTGTGGTG
CGGGGTGT-GGATTGCCATGTGCATGTAATGATTTGTGT-TTGGATAAATGTGTGTGGTG
```

メタゲノム解析導入のメリット

従来法 → 様々な環境から個別の細菌や
プランクトンを単離培養

→ 顕微鏡による形態の違いにより種判定
形態で種判定ができない場合

→ 遺伝子解析により種判定

天然環境では、培養が困難なプランクトンや細菌が多く、
室内で培養できる種の方が少ないとも言われている。

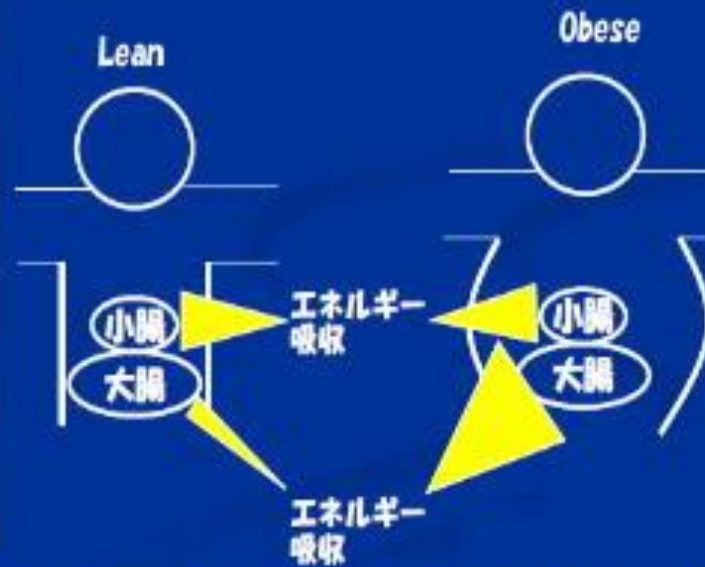
メタゲノム技術の開発 → 分離培養不要

出現種の遺伝子情報をムラなく取得可能

→ 一度に数百種のオーダーで検出できる手法

(例)ヒト腸内細菌相をメタゲノム解析 健康な人と病気の人との細菌相の違いから病気を予測

腸内細菌叢の崩れが、肥満に 関係しているとの 報告がある



ネイチャー: イギリスの最も著名な科学研究論文誌

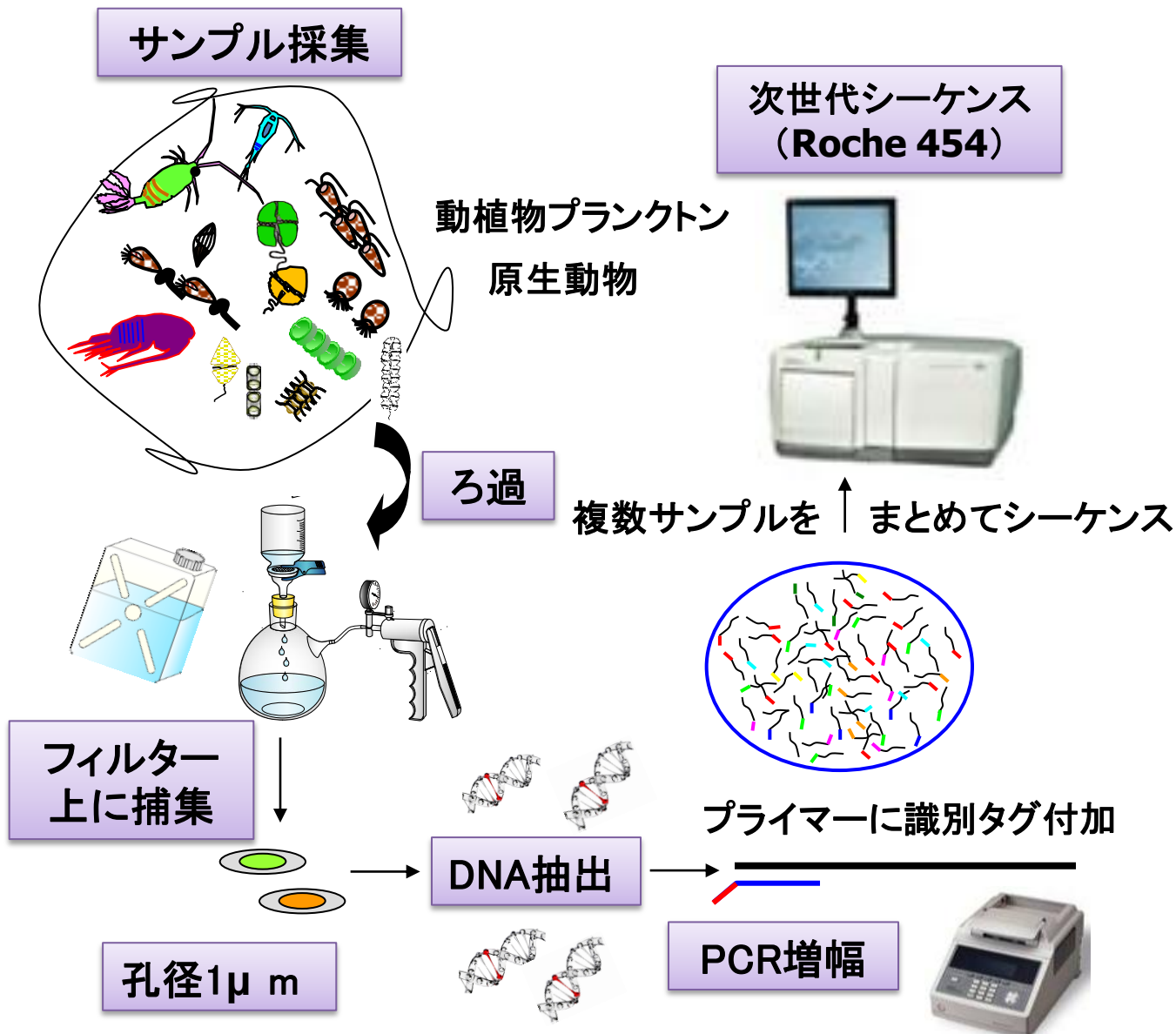
メタゲノム解析による生物多様性の把握と サンゴ礁レジリエンス過程の観察

サブテーマ2: 水産総合研究センター中央水産研究所 長井 敏

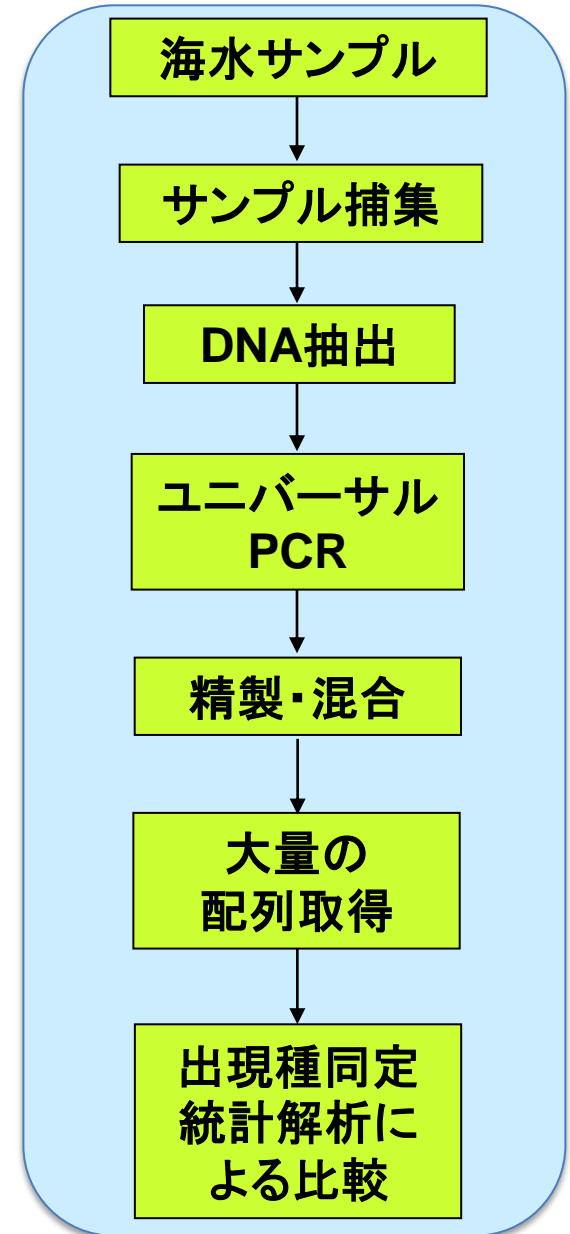
石西礁湖内外における島嶼からの陸源負荷が分布密度・種組成等の生物多様性に及ぼす影響解明(栄養塩増加、非増加海域における生物多様性の詳細比較)

- プランクトン多様性はどの程度か？
- プランクトンがたくさんいる場所はどこか？
- サンゴ劣化の原因となる栄養塩の供給源はどこか？

プランクトンメタゲノム解析手法の概念図



メタゲノム解析フロー



広島湾と石垣島における出現種の比較

● サンプルング

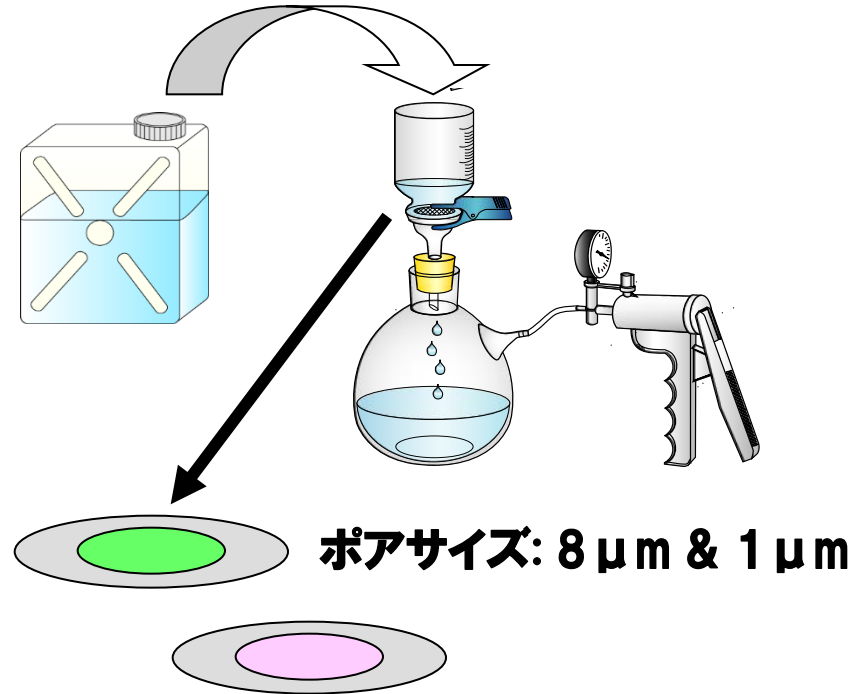
国土地理院承認 平13総復 第367号

2009年5-10月
広島湾5サンプル

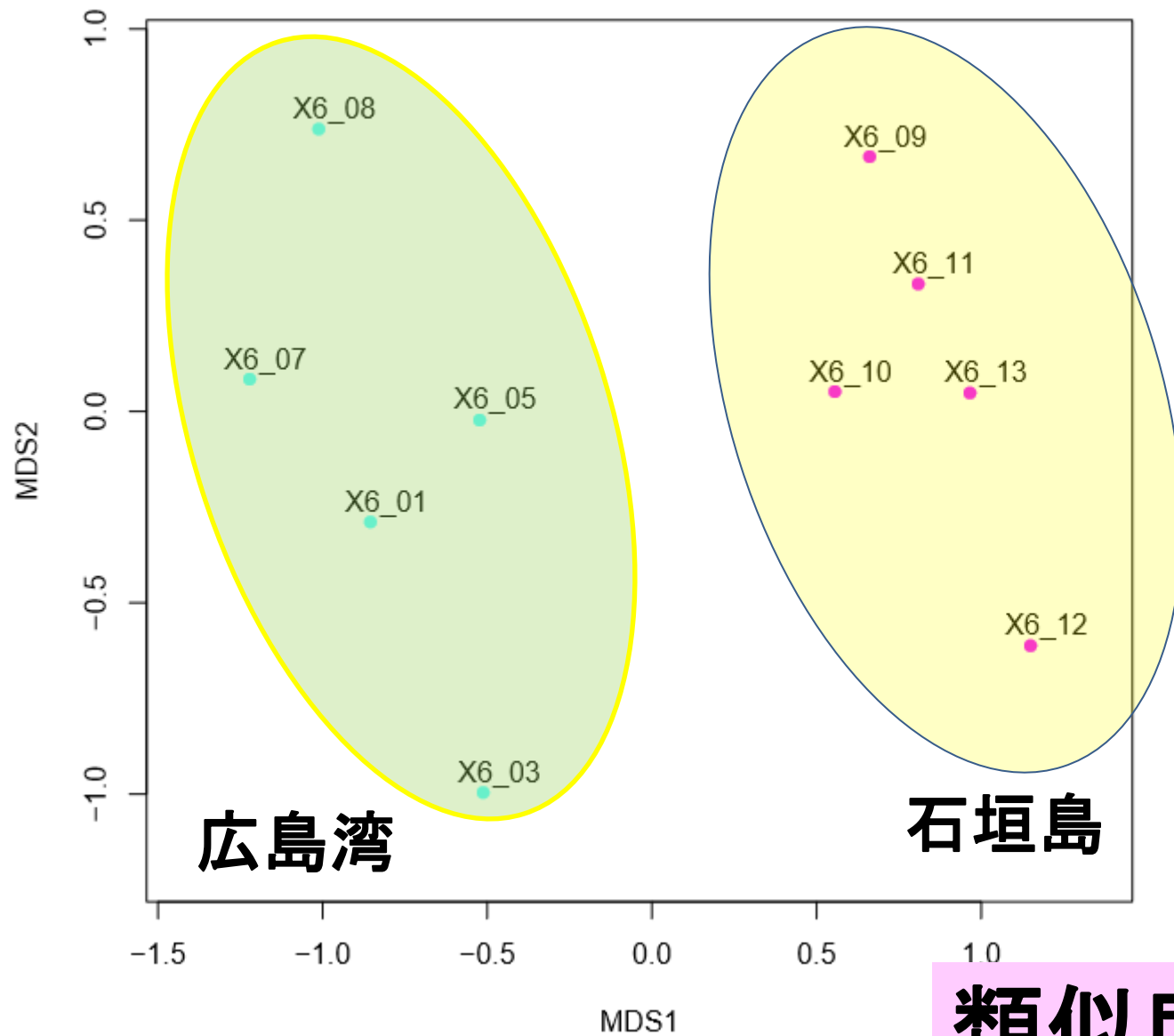
2009年5-10月
石垣島5サンプル

● 捕集

500 mLをナイロンメッシュでろ過($\Phi 75\mu\text{m}$)



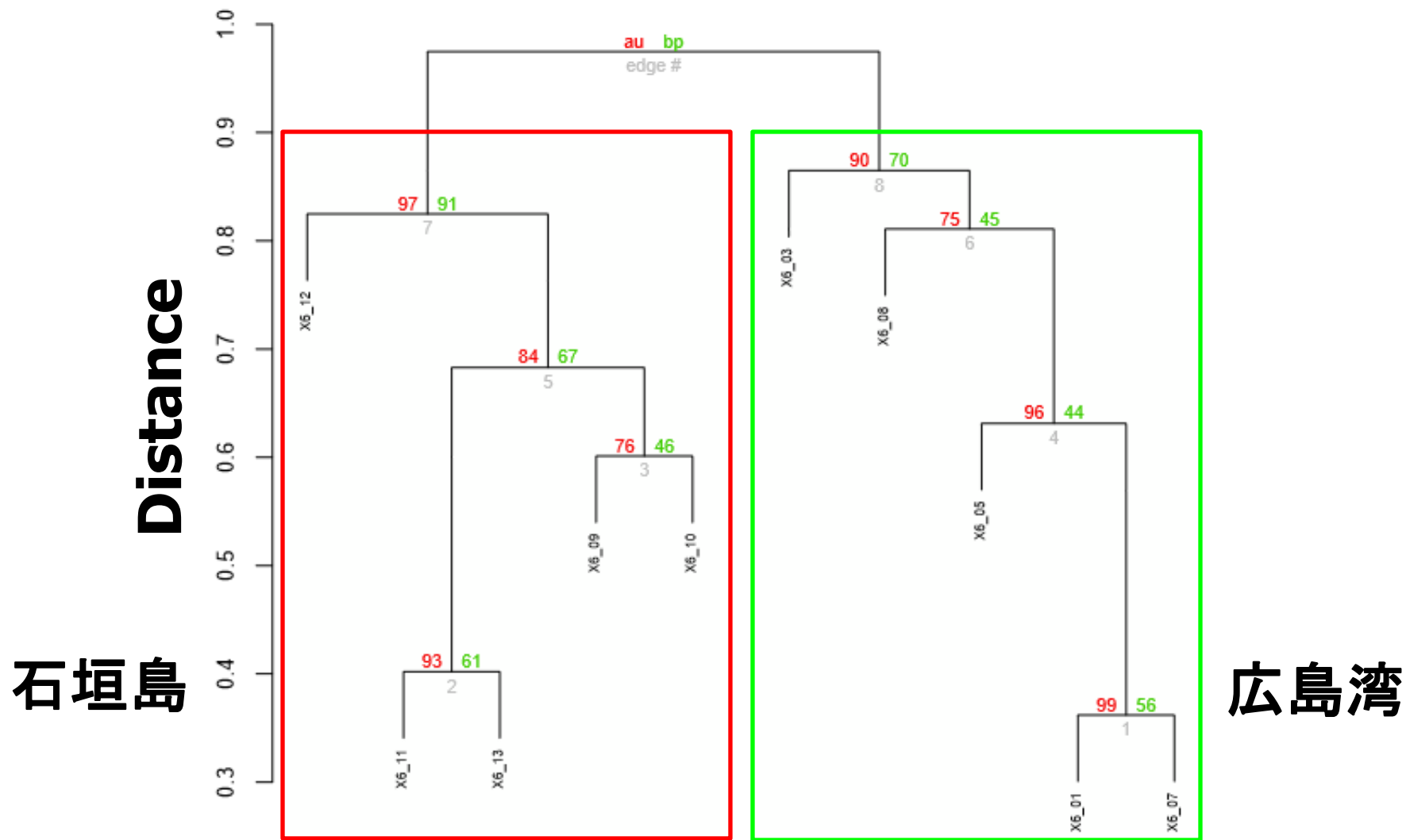
フィルター上にプランクトンを捕集
DNAを抽出



類似度指数

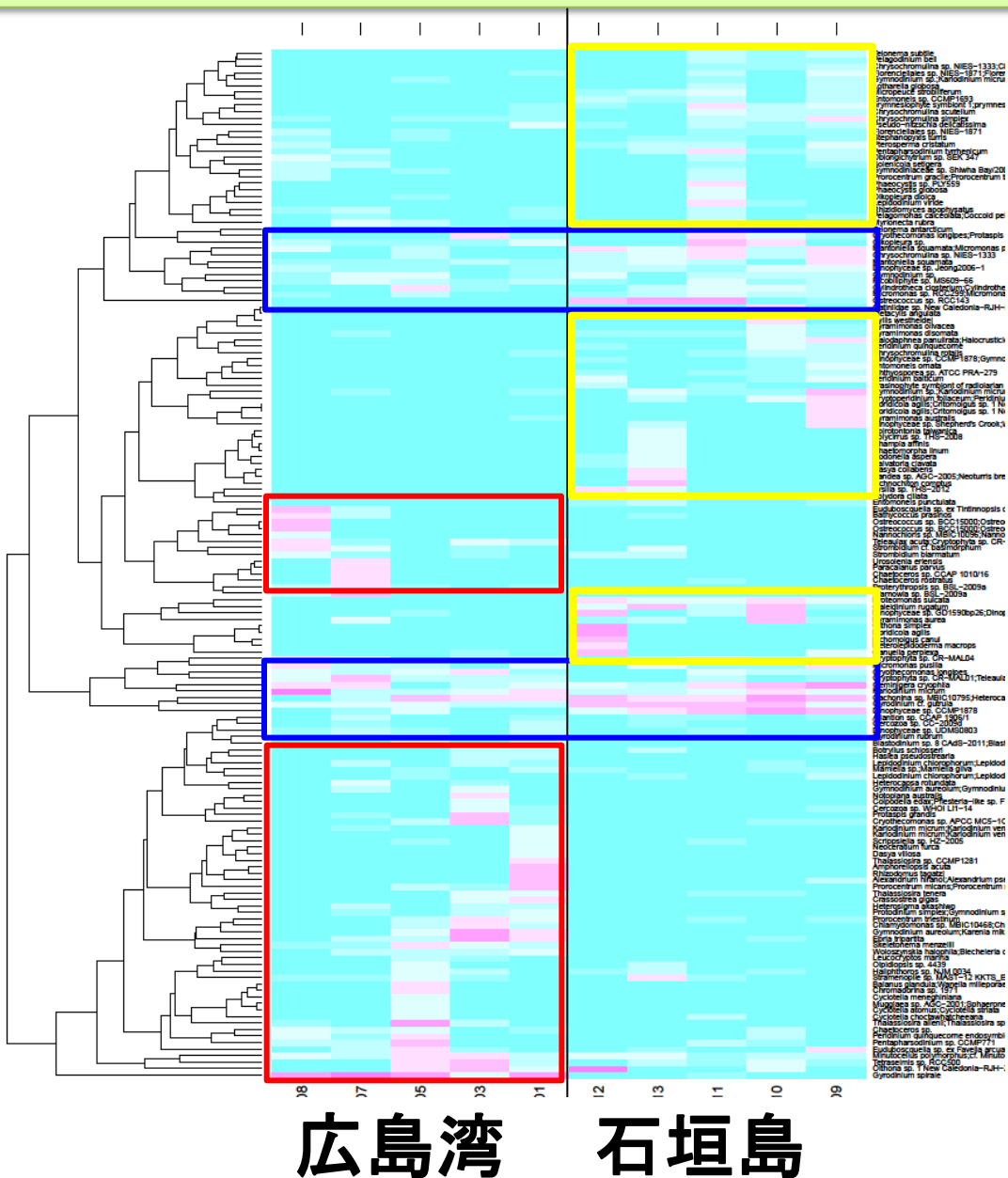
NMDSプロット解析 (by cor distance)

Cluster dendrogram with AU/BP values (%)

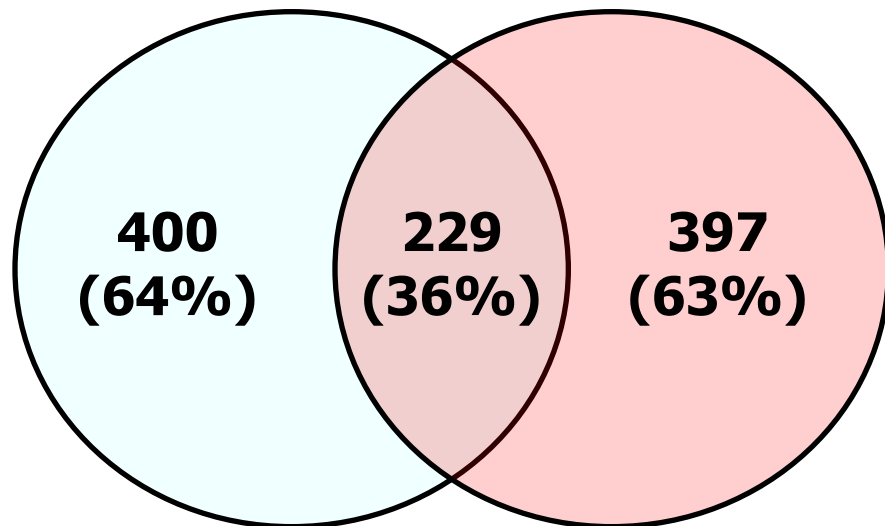


類似度指数を用いたクラスタリング解析
(by cor distance)

広島湾と石垣島における多様性比較



36% match



広島湾

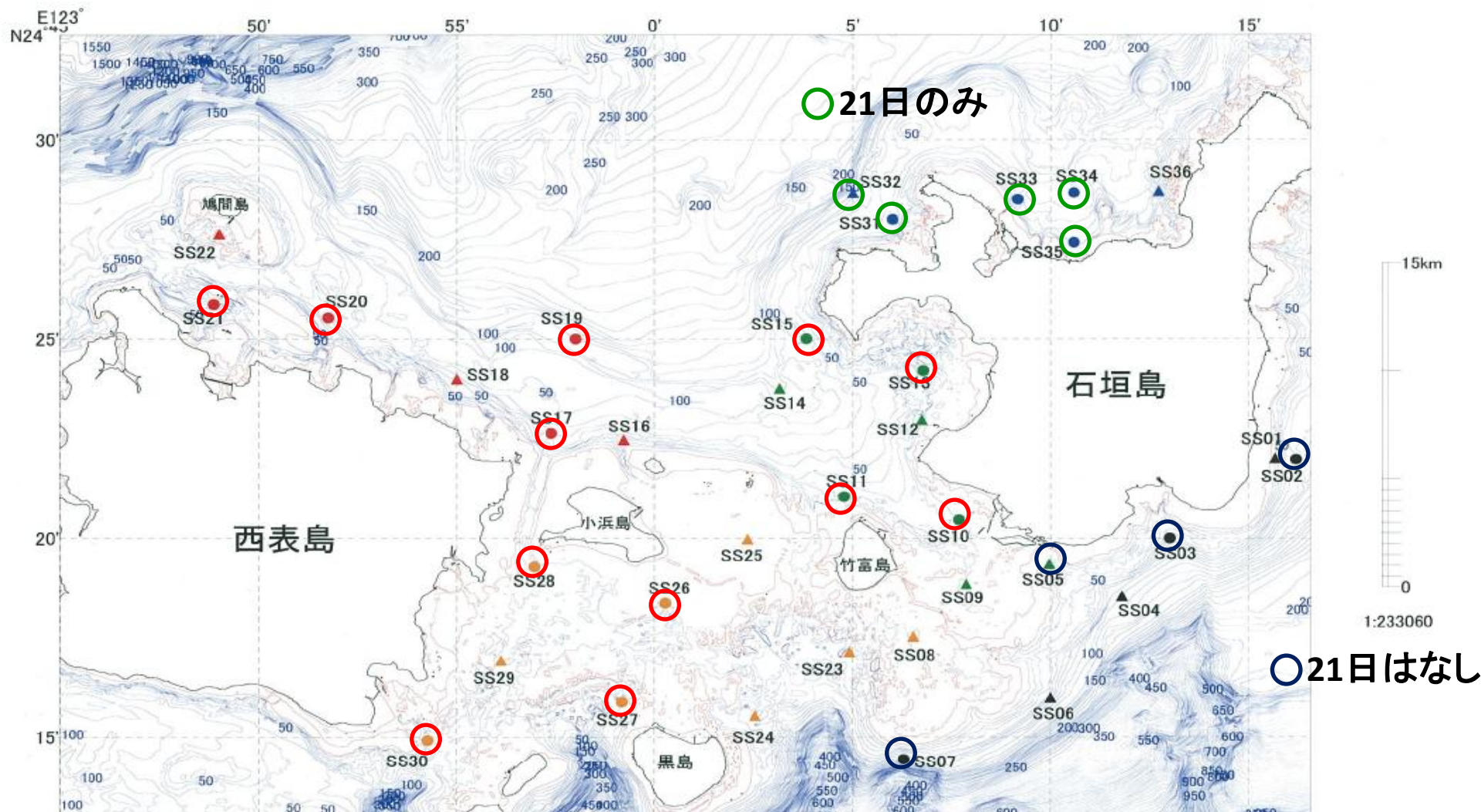
石垣島

石垣島のごく内湾からサンプリング
→ もっと差が出せる。

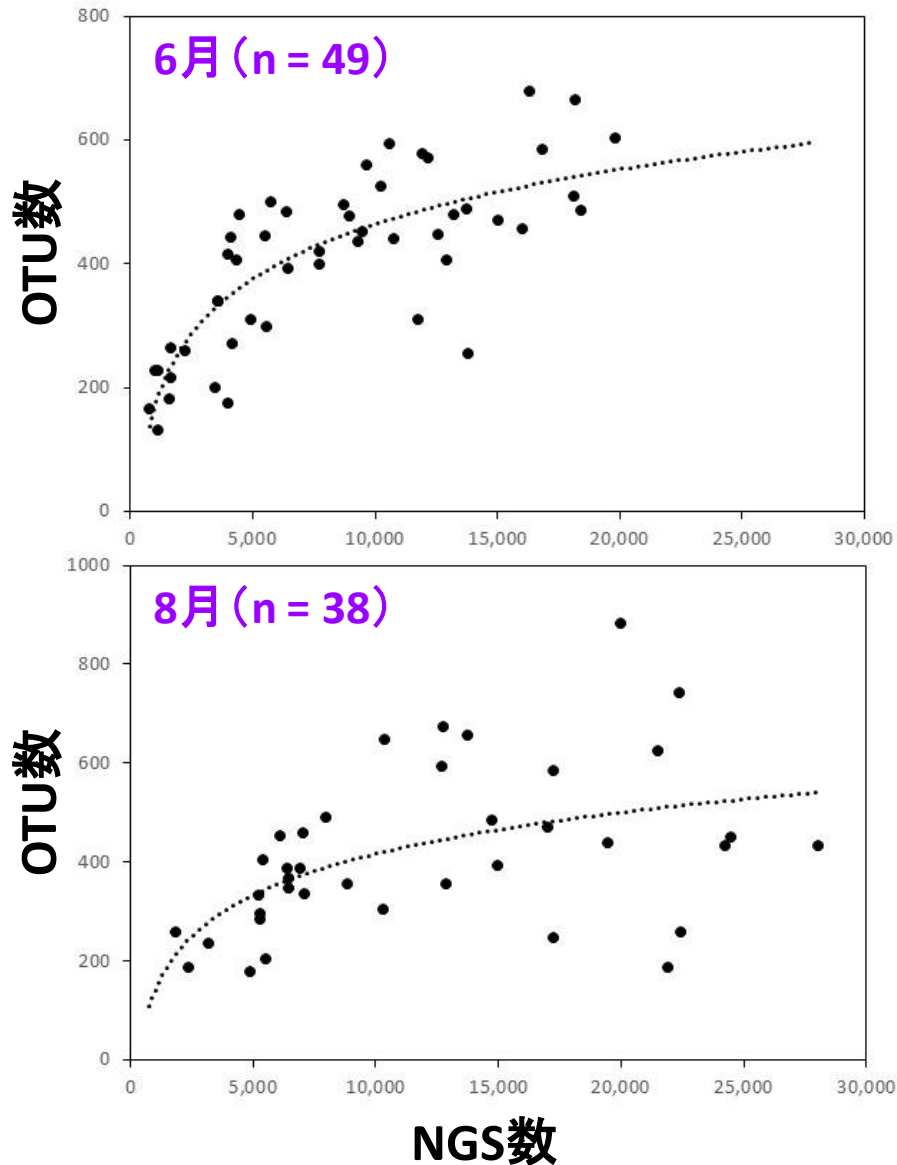
b) 2013年6月調査の概要説明とデータ分析結果の速報

メタゲノム解析用海水+オニヒトデ幼生胃内容物解析用サンプリング

2013/6/17, 6/18の平常時、6/21の台風直後に実施



OTU数とNGS数のXYプロット



右上がりの指数曲線に近似
スピアマン検定の結果、
相関係数は有意と判定

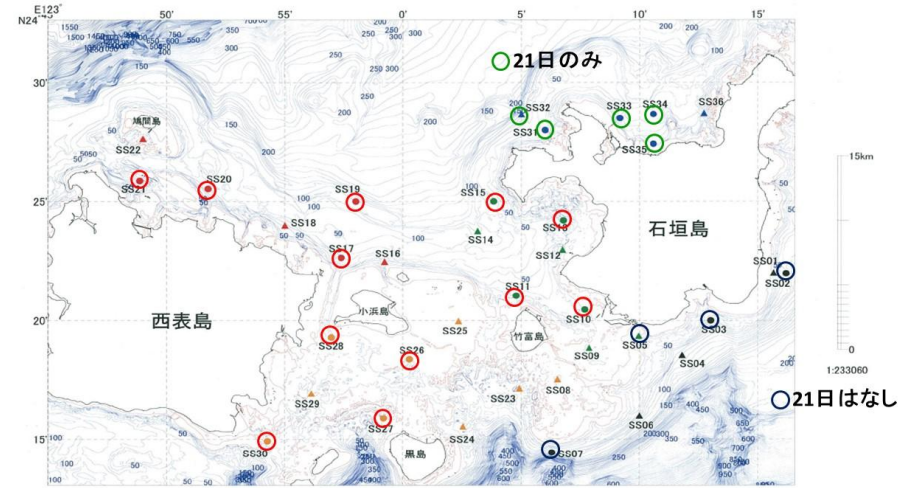
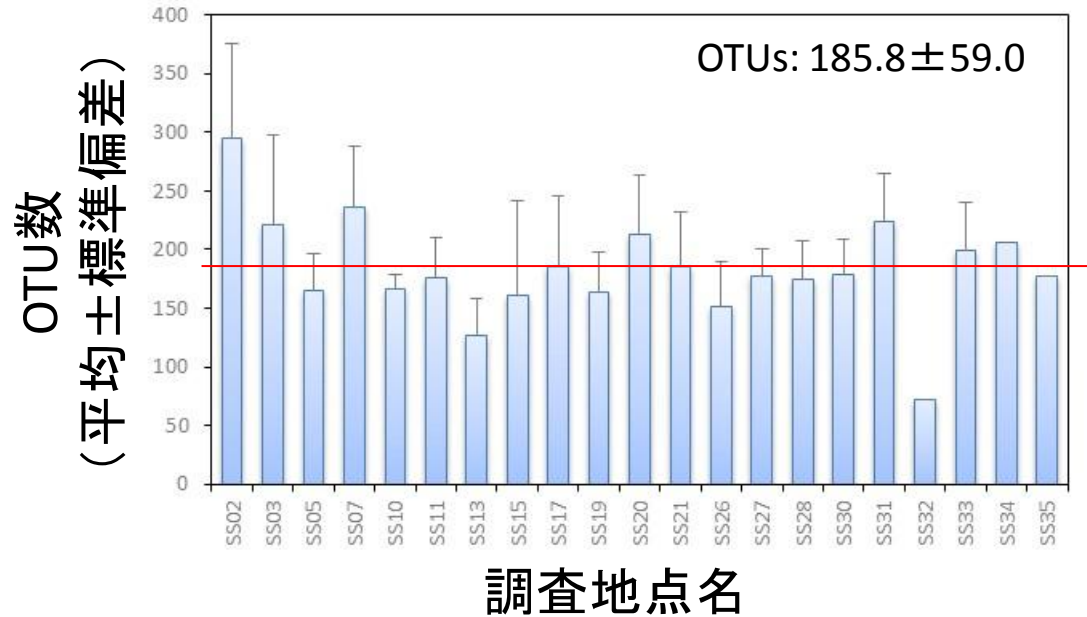


取得したNGS数が多いと
OTU数も多めに検出される！



石西礁湖周辺海域では、
1サンプル当たり25,000配列
取得すれば、だいたい生物叢
の網羅的な検出が可能！

石西礁湖周辺域における生物多様性の比較

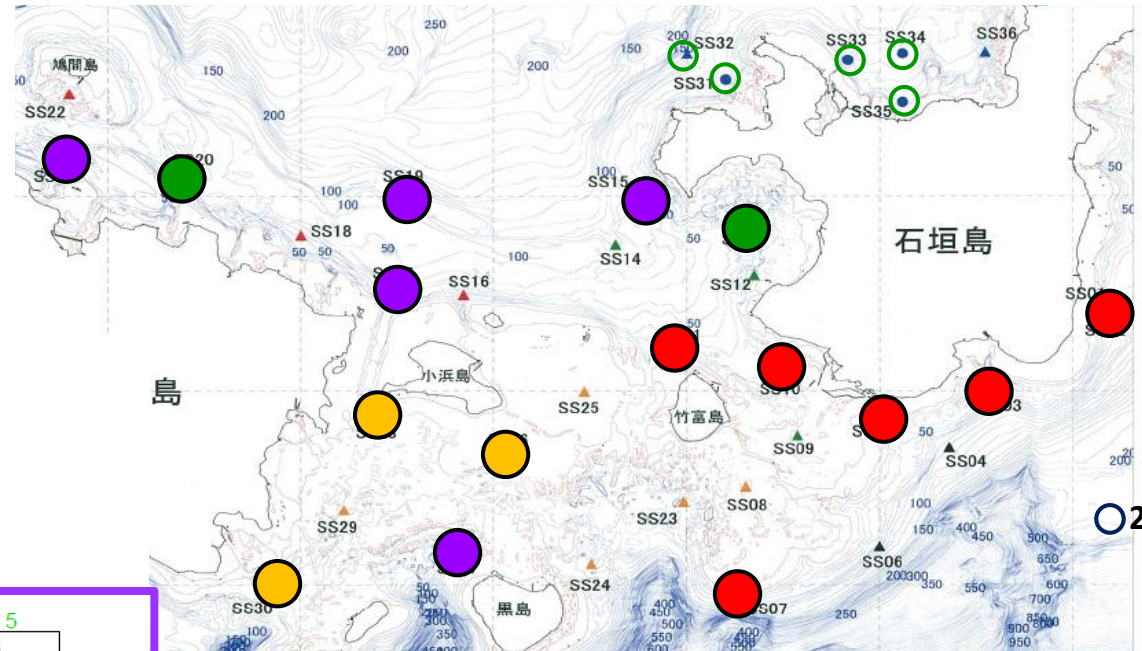
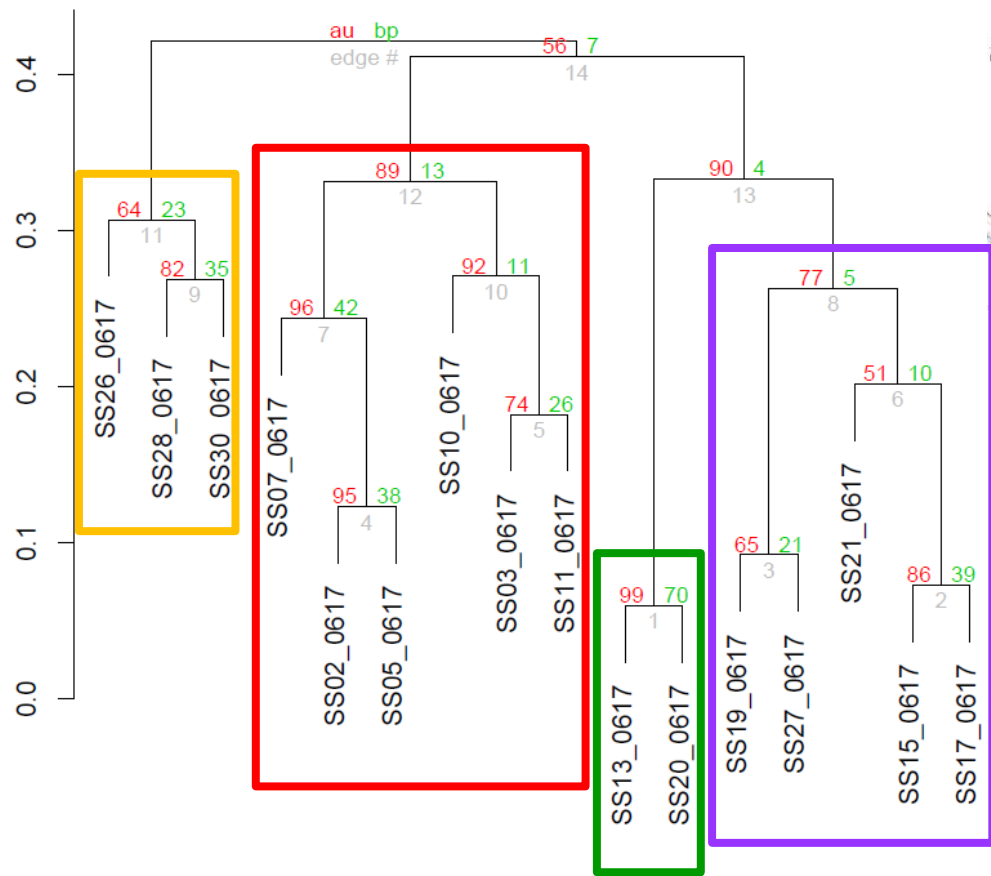


調査地点間で、検出された種類数が大きく異なる。
多い地点と少ない地点がある。
石垣島南部が多い傾向を示す。

メタゲノム解析結果Ⅱ

6月17日広域多点調査

類似度によるクラスタリング



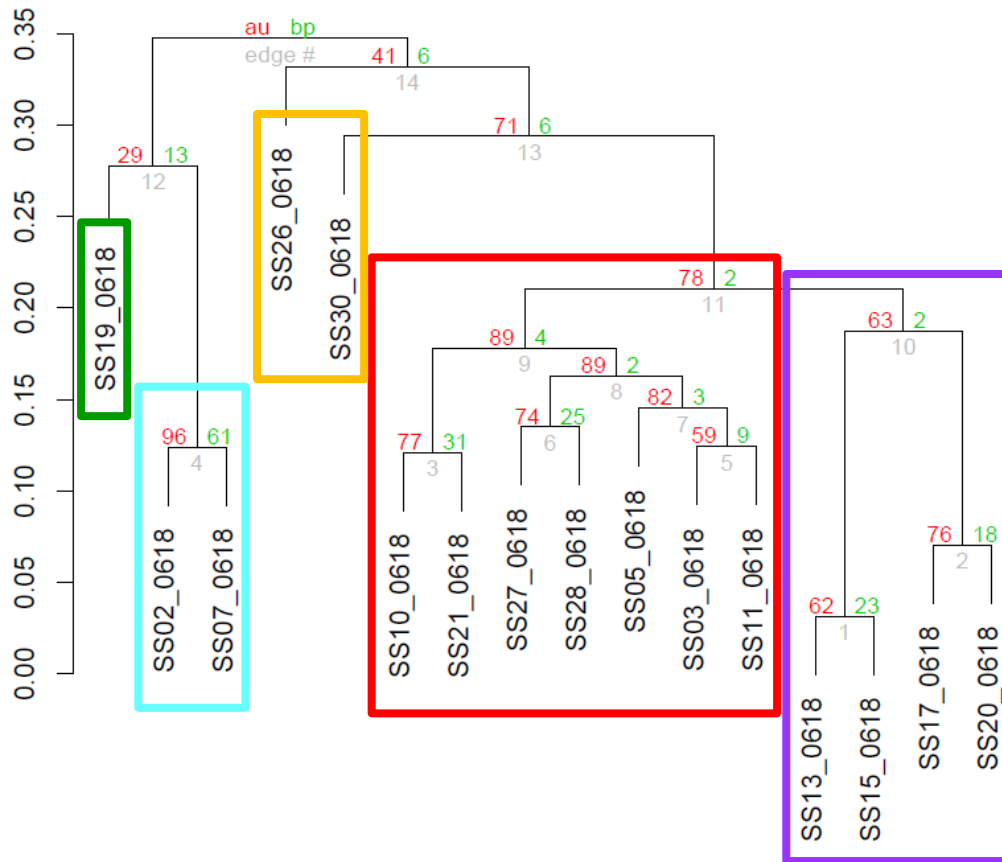
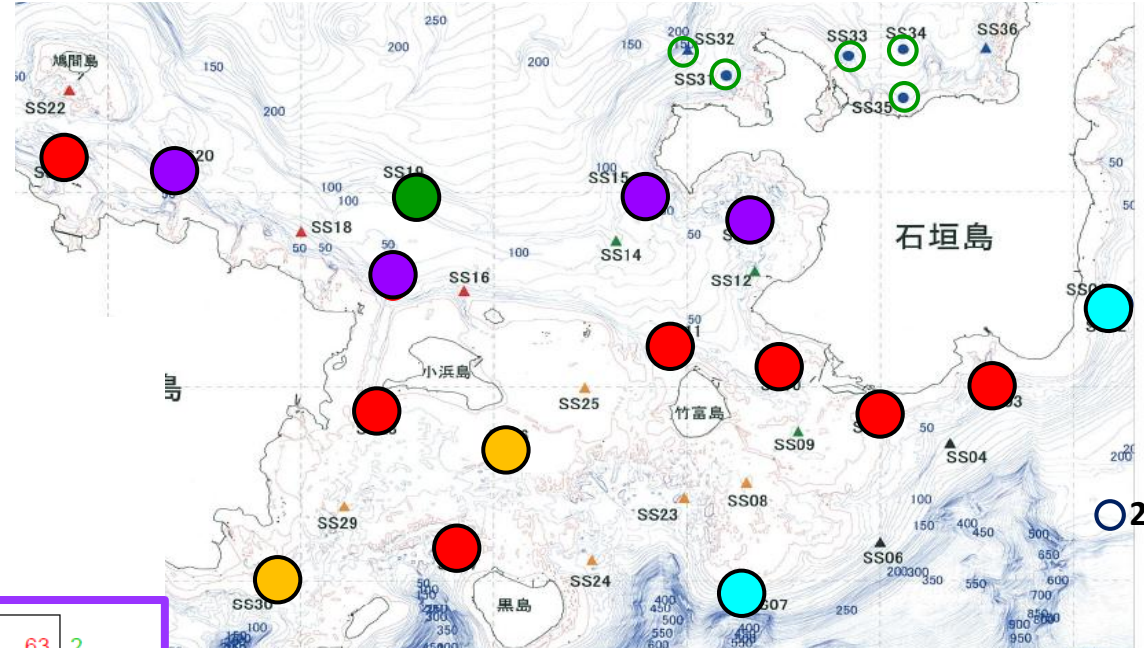
数個のパターンに分類された。

水深浅い地点は、サンゴに付着する藻類の影響が大きくなるので、パターン解析時に注意が必要。

メタゲノム解析結果Ⅱ

6月18日広域多点調査

類似度によるクラスタリング

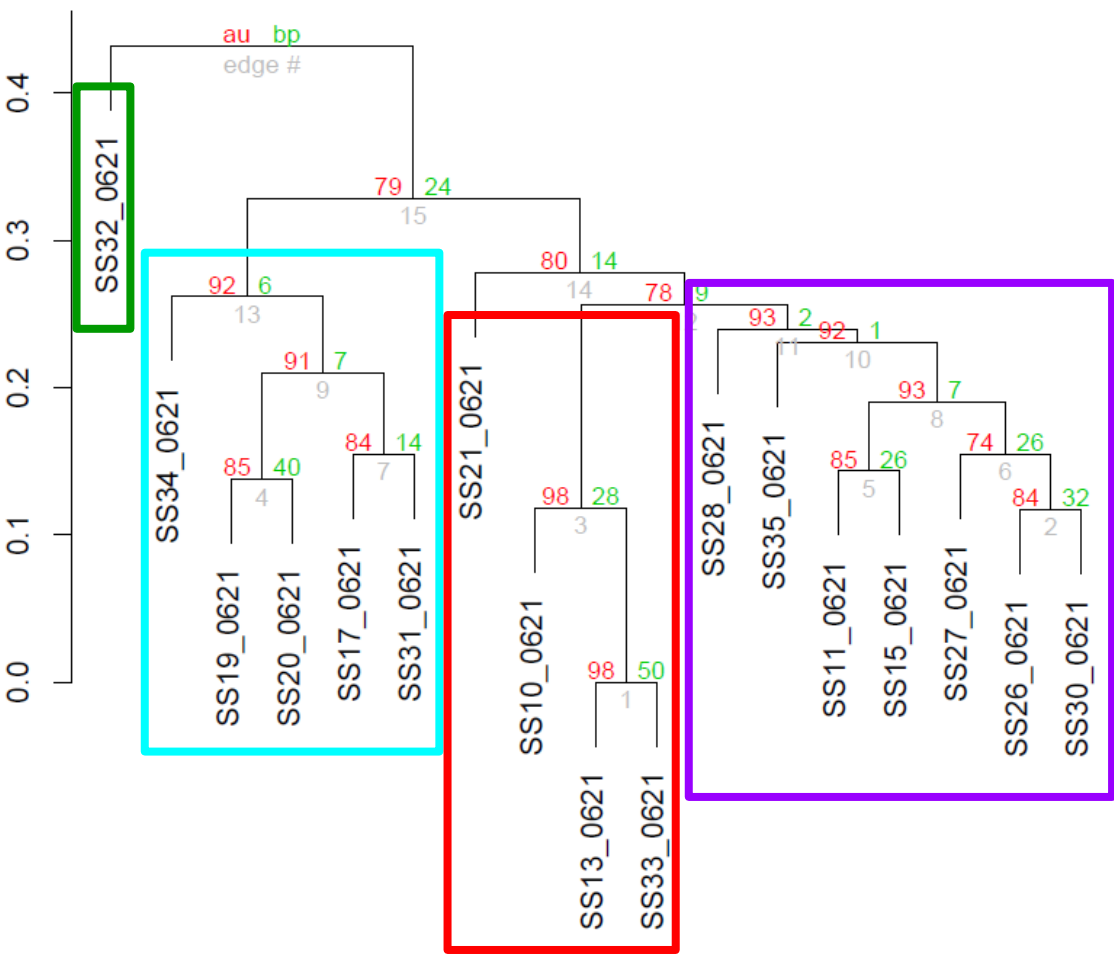
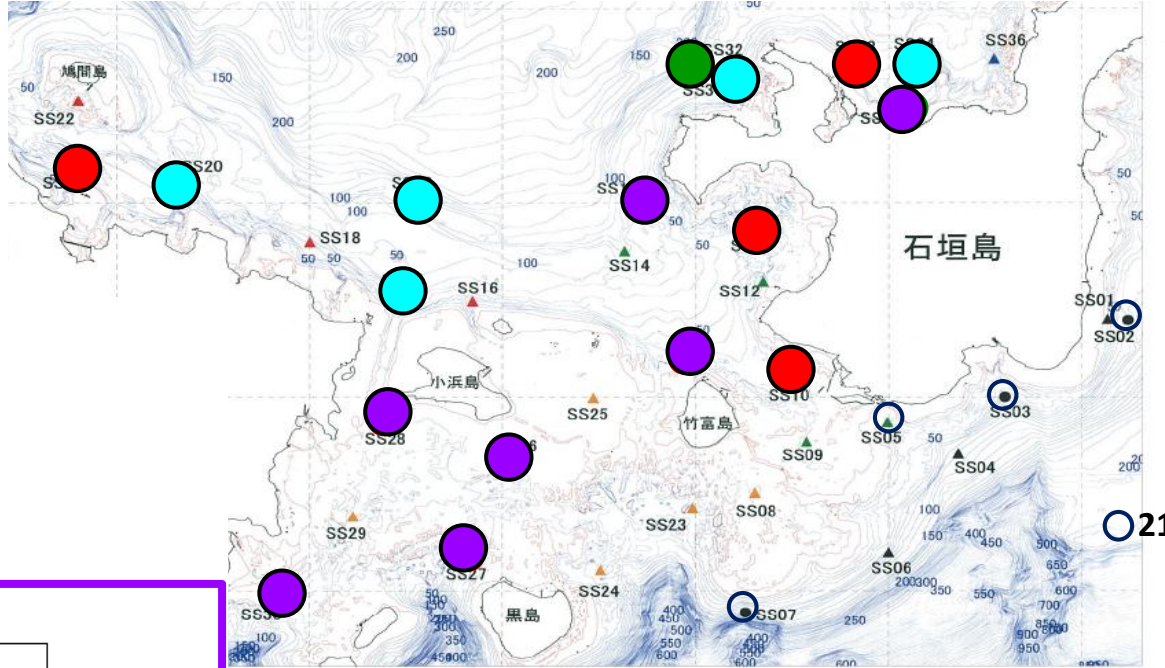


17、18日は平常時のサンプル
前日とほぼ似たパターンが
観察された。

メタゲノム解析結果Ⅱ

6月21日広域多点調査

類似度によるクラスタリング

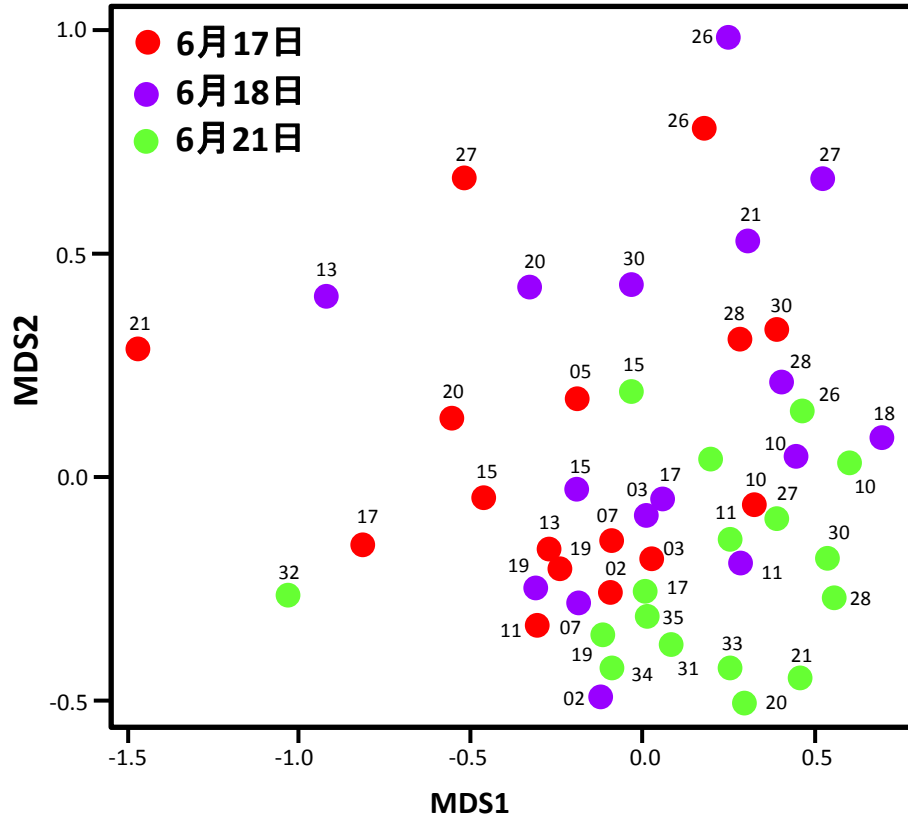


17、18日と少しパターンが異なる。

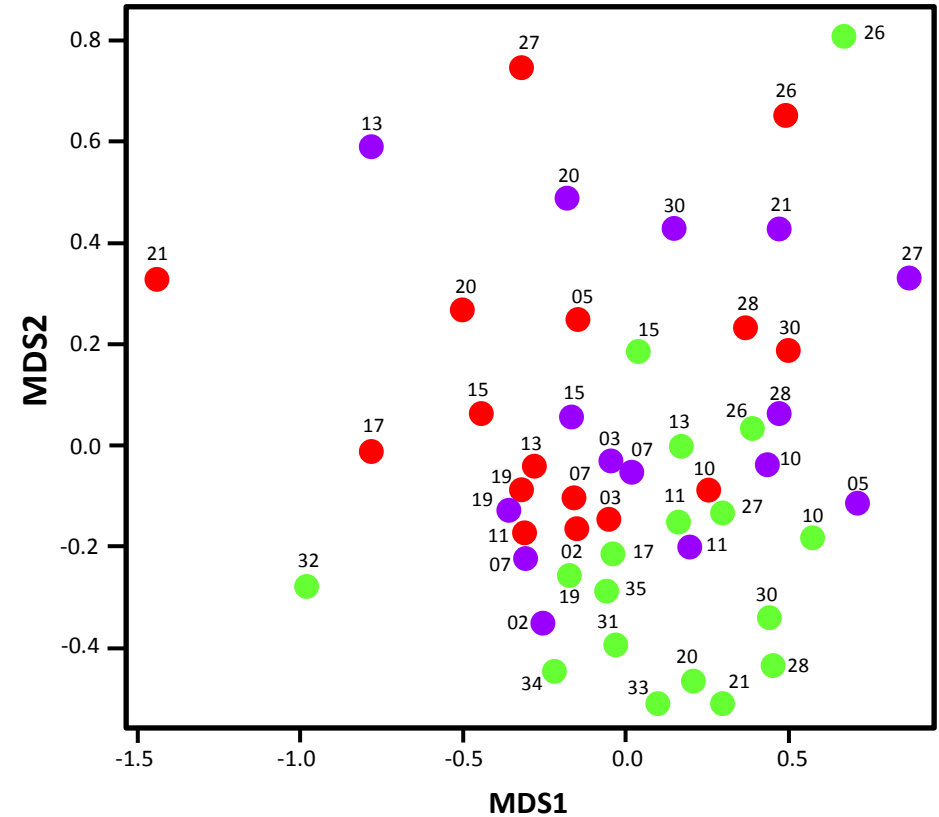
陸源負荷の原因となる可能性のある河川の河口付近のデータを取得しておく、解析結果をより深く考察することが可能かもしれない。

広域多点調査6月時のNMDSプロット

By Jaccard index



By Chao index



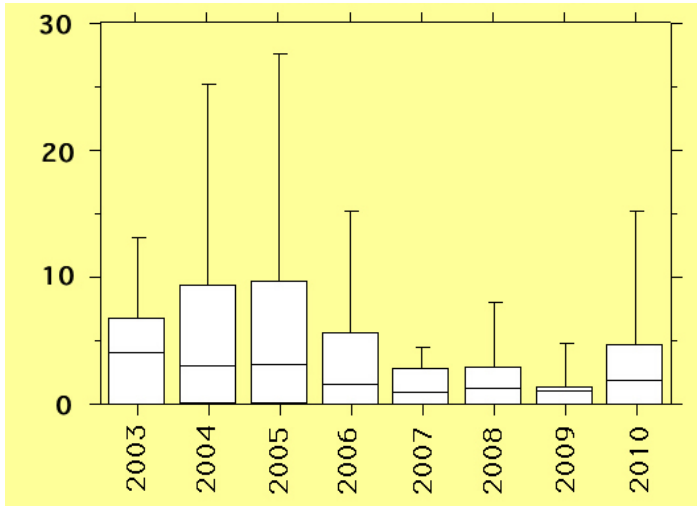
17、18日のサンプルは分散した分布を示すことに対して、台風通過後の21日のサンプルは端に位置する傾向にあり、台風による降雨や擾乱の影響があったことを示す。

まず、陸原負荷の起源を明らかにするため、台風通過後（降雨後）に、珪藻の出現密度や種類数の多いところはその起源である可能性が高い。



珪藻の種組成、配列数を解析し、出現密度や種類数の多いところを調べることにした。

石西礁湖の稚サンゴ量の経年変化

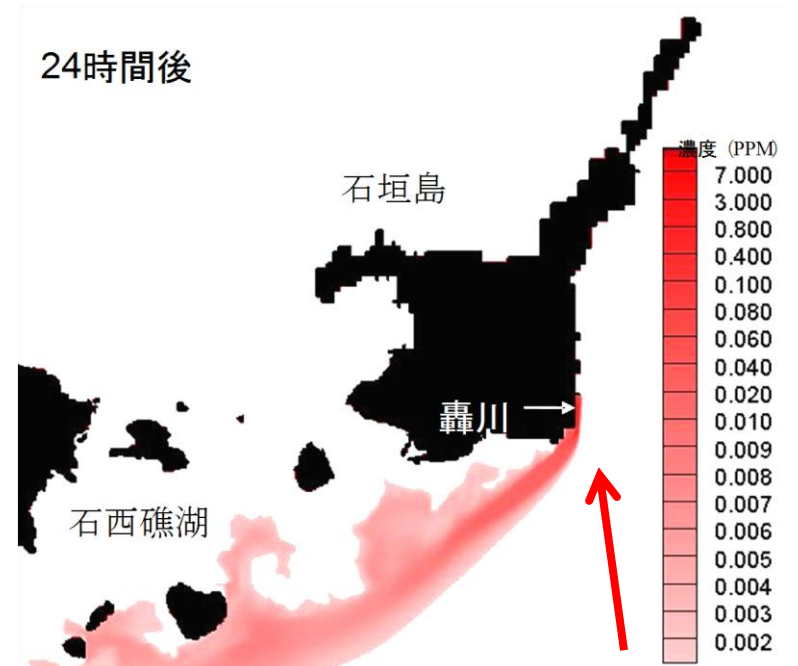


§

- ・供給側(source)の幼生供給能力の減退？
- ・加入先(sink)の環境劣化の影響？
- ・加入後の初期生残率の減少？

source-sink連結構造がサンゴ群集の維持に十分機能しない状況 → レジリエンス劣化？

赤土の移流拡散に関する予備的 数値シミュレーション結果の例



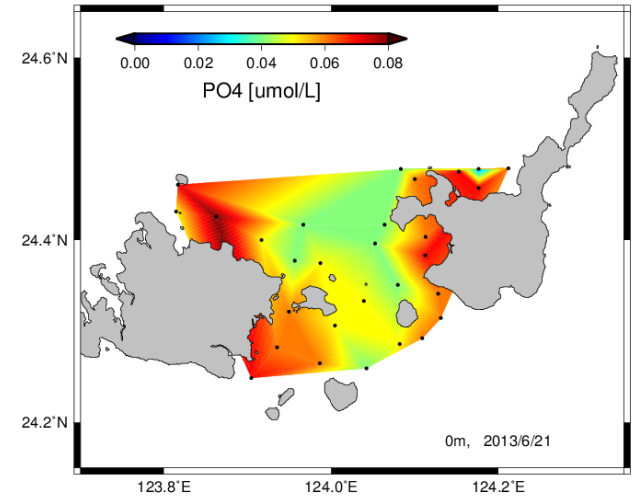
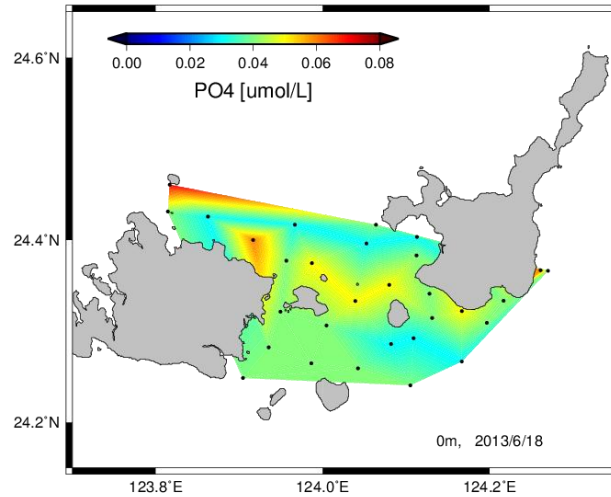
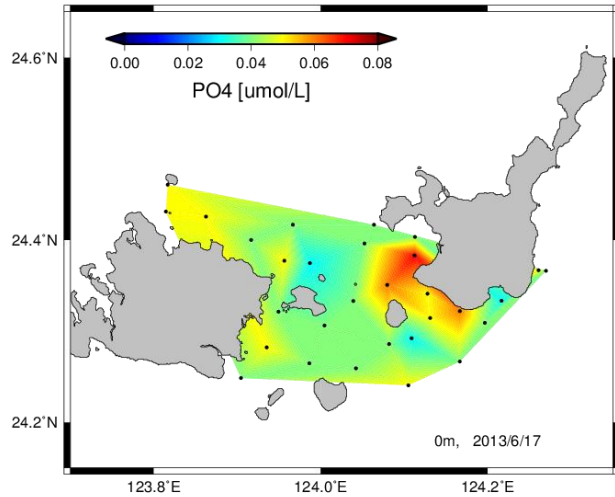
§

赤土・栄養塩等の
陸源負荷の影響？

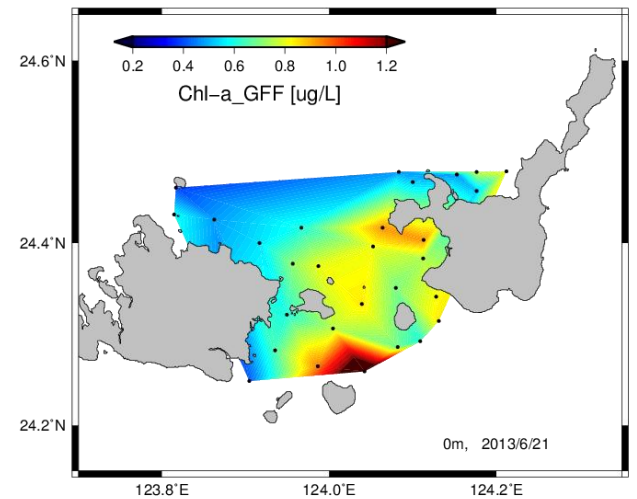
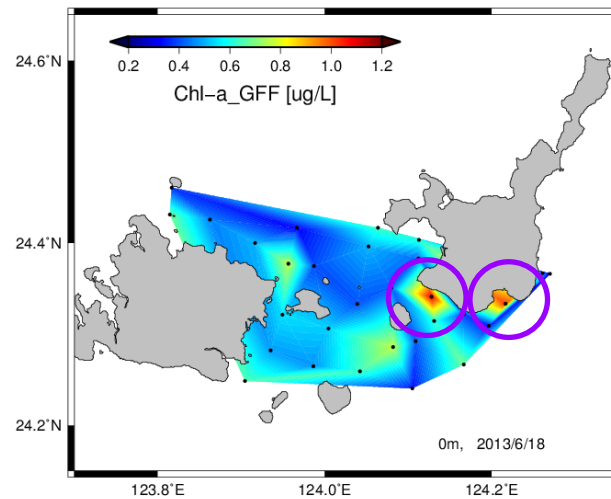
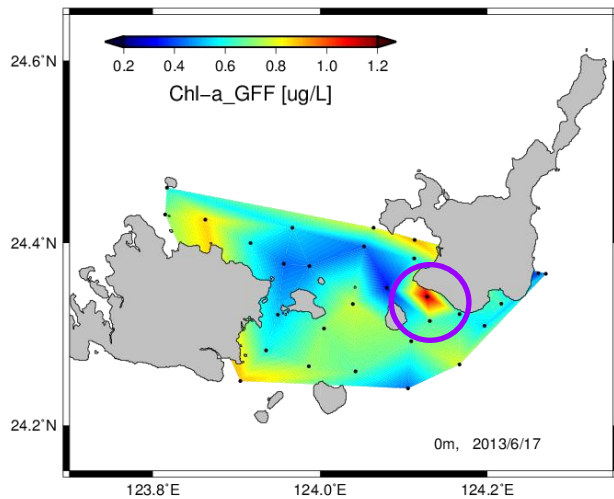
環境ストレス自体の
connectivityの存在

「島嶼－サンゴ礁－外洋統合ネットワーク系」
としての実態解明の必要性

PO₄濃度 (表層)

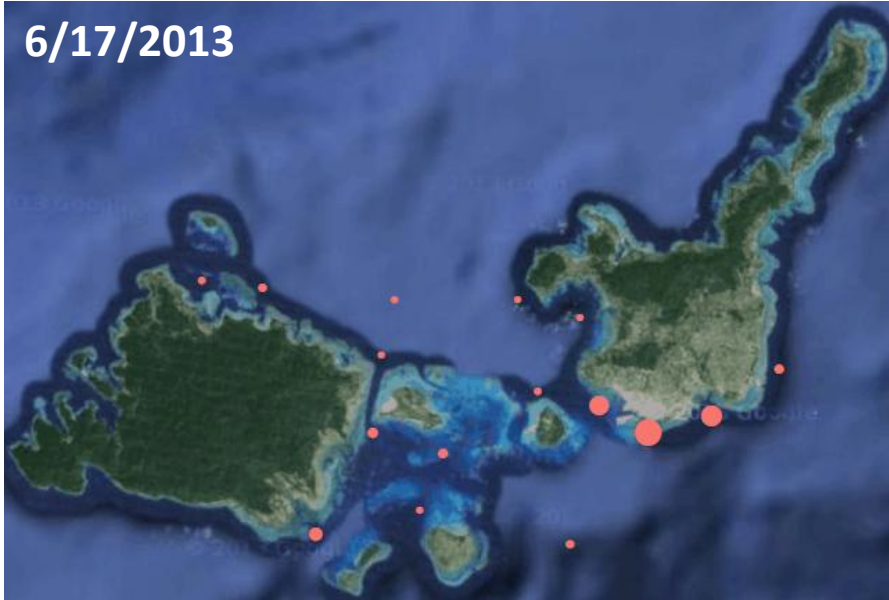


Chl-a (表層)

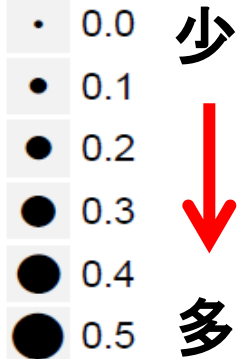
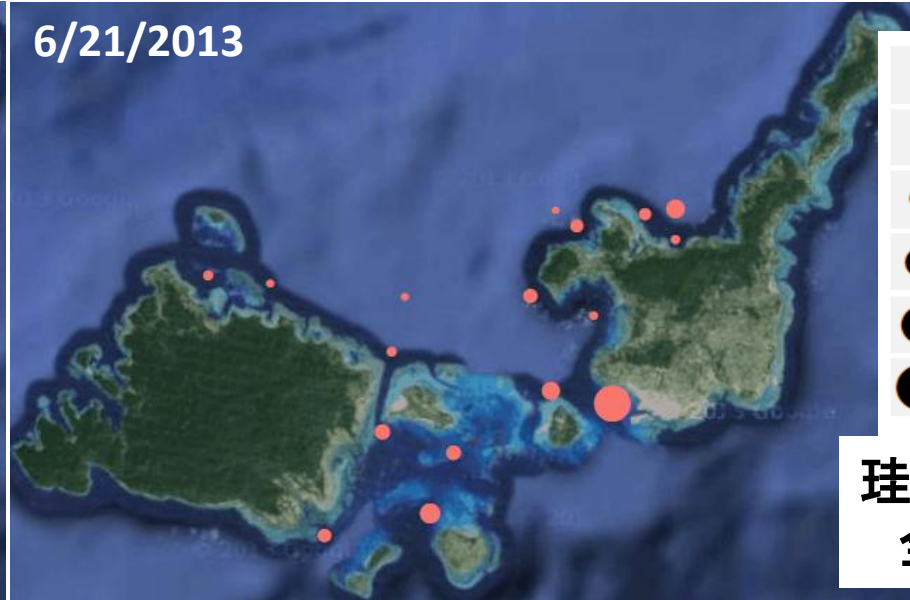


珪藻出現量の推定(珪藻の配列数/全配列数)

6/17/2013

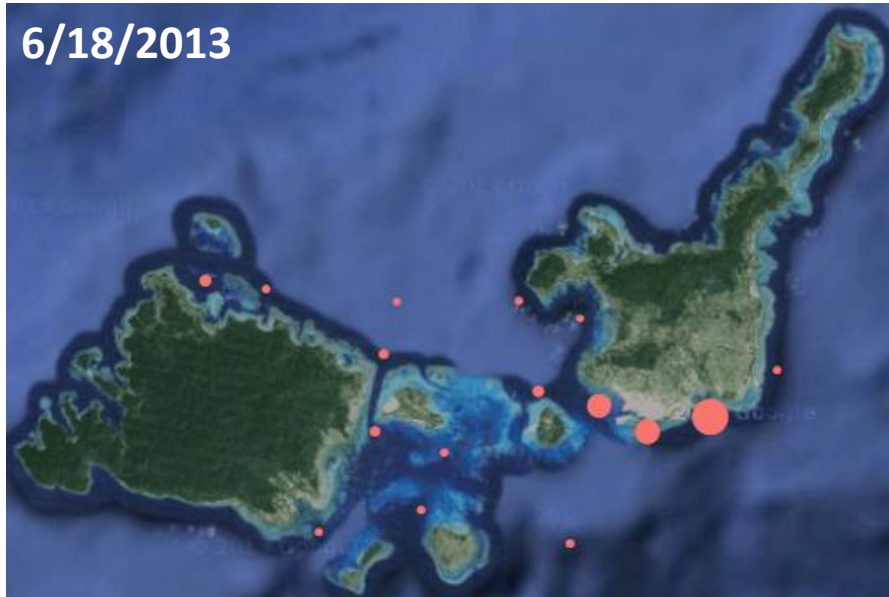


6/21/2013



珪藻配列数/
全配列数

6/18/2013



珪藻の出現量から、
石西礁湖の陸源負荷
の起源は石垣島南部
にあることが判明!

石西礁湖周辺海域から検出された珪藻

Representative_Sequence	length	similarity	name
ID078DJ01CLHL9	442	0.984	Bacillariophyta sp. Z211 Peridinium foliaceum endosymbiont
IDW74G101B6PC6	442	0.985	Chaetoceros decipiens
IDW74G101A0FOA	440	0.912	Chaetoceros muellerii
IDW74G101AIPUC	439	0.928	Chaetoceros muellerii
IDW74G101AZUR1	438	0.930	Chaetoceros muellerii
IDW74G101DIHRE	437	0.902	Chaetoceros muellerii
IEM6WPI02GNVOL	443	0.949	Chaetoceros rostratus
IDW74G101A9IFO	440	1.000	Chaetoceros sp.
IEM6WPI02JVGAW	441	0.993	Chaetoceros sp. CCAP 1010/16
ID078DJ01DN7GR	440	0.982	Convoluta convoluta diatom endosymbiont
IDW74G101C50LJ	444	0.998	Cyclotella choctawhatcheeana
IDW74G101A1ZUR	441	0.993	Cylindrotheca closterium Cylindrotheca sp. GSL005
IEM6WPI02GTWX2	441	0.993	Cylindrotheca fusiformis Nitzschia closterium
IDW74G101AHD03	442	0.993	Cymbella cistuliformis
ID078DJ01AGCNO	439	0.975	Entomoneis punctulata
ID078DJ01BKR8K	443	0.975	Fragilariopsis curta
ID078DJ01DWMR1	448	0.953	Fragilariopsis curta
IDW74G101B1EUF	444	0.989	Fragilariopsis curta
IDW74G101DI1OP	439	0.963	Grammatophora marina Grammatophora gibberula
IEM6WPI02IRCOH	444	0.959	Haslea ostrearia Haslea pseudostrearia
IDW74G101BKCL5	442	0.944	Haslea spicula
ID078DJ01C90RL	443	0.998	Leptocylindrus danicus
ID078DJ01BR8RR	444	0.927	Leptocylindrus minimus
IDW74G101A6FP0	443	0.997	Minidiscus trioculatus Minidiscus sp. CCL-2009a
IEM6WPI02G1TC0	444	1.000	Minutocellus polymorphus cf. Minutocellus sp. CCMP1701
IDW74G101AO836	443	0.970	Navicula sp. s0020 Navicula radiosa Navicula tripunctata

Representative_Sequence	length	similarity	name
IDW74G101BXXRN	441	0.979	Nitzschia dubiiformis Nitzschia longissima Nitzschia sigma
IDW74G101C62LX	440	0.986	Nitzschia dubiiformis Nitzschia sp. AnM0026
IDW74G101AQEI6	443	0.982	Nitzschia sigma
ID078DJ01B0W6Z	446	0.969	Pleurosigma planktonicum
IEM6WPI02G5L6C	444	0.973	Pleurosigma sp. LM-2002
IDW74G101C4V5Z	444	0.984	Psammodictyon constrictum
IDW74G101D4394	442	1.000	Psammodictyon constrictum
IEM6WPI02GNGN0	445	0.984	Psammodictyon constrictum
ID078DJ01BKSNA	440	0.984	Pseudo-nitzschia delicatissima
IEM6WPI02F0VQE	441	0.993	Pseudo-nitzschia delicatissima
IDW74G101CWJX8	438	0.984	Sellaphora laevisima
ID078DJ01A50DG	444	0.998	Skeletonema grevillei
ID078DJ01BG8OQ	444	0.993	Skeletonema menzellii
ID078DJ01AJXS6	439	0.964	Stephanopyxis turris
ID078DJ01B8J7W	439	0.971	Stephanopyxis turris
ID078DJ01BZEX7	439	0.977	Stephanopyxis turris
IDW74G101AQNZO	439	0.955	Stephanopyxis turris
IDW74G101DIJSO	439	0.957	Stephanopyxis turris
IDW74G101C1PQ0	443	0.966	Synedra sp. NTDMN01
IDW74G101A809R	441	0.962	Thalassionema bacillare
IDW74G101AHQ4Z	442	0.991	Thalassionema bacillare
IDW74G101DZO6H	443	0.981	Thalassionema bacillare Thalassionema sp. CCMP1100
ID078DJ01AWGDD	444	0.995	Thalassiosira allenii Thalassiosira sp. DDZ-2010a
IEM6WPI02IC1WR	444	0.971	Thalassiosira hendeyi
IDW74G101DKVOI	444	0.993	Thalassiosira minima Thalassiosira antarctica
ID078DJ01D69M6	444	0.989	Thalassiosira tenera
ID078DJ01B50VU	442	0.975	Thalassiothrix longissima Thalassionema sp. p474

メタゲノム解析による生物多様性の把握と サンゴ礁レジリエンス過程の観察

サブテーマ2: 水産総合研究センター中央水産研究所 長井 敏

本年度の研究計画

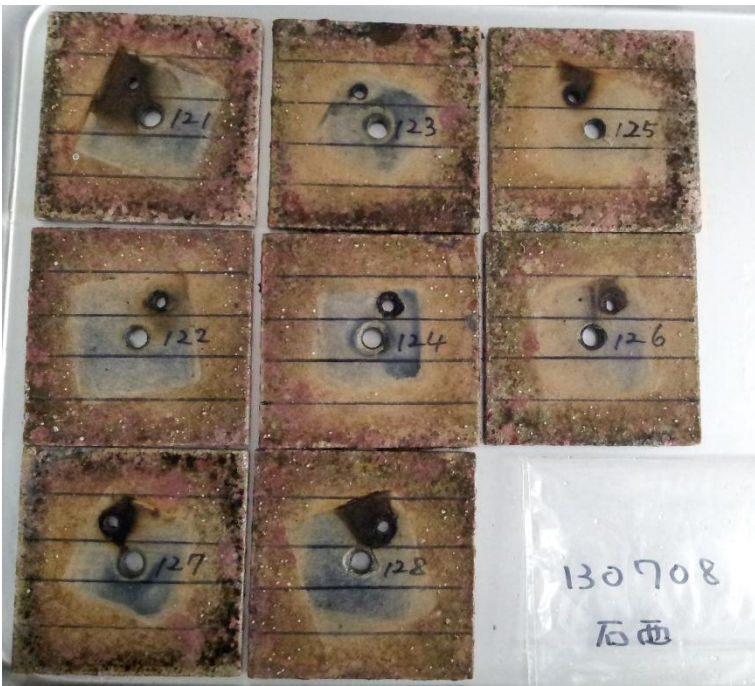
白化現象により死滅したサンゴ群落のレジリエンス過程を観察するため、**着底板上の生物叢の把握および経時変化の解析**

西海区水研による設置してもらった着底板を年2、3回収し、
着底板上に出現する生物叢をメタゲノム解析

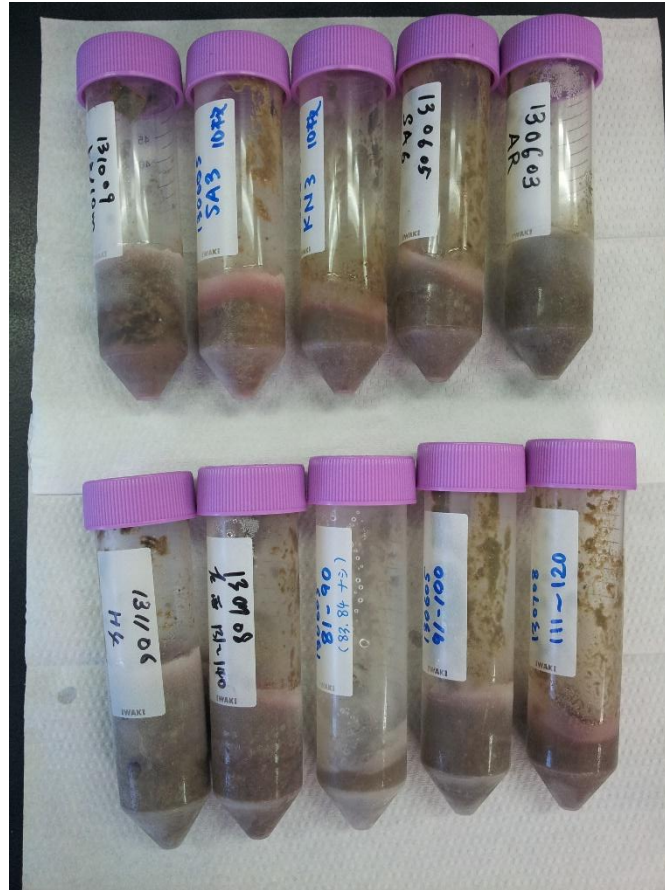
現在、着底板から付着生物を回収中。2月中にメタゲノム解析を終了予定。

2013年度における着定板サンプルの情報

基盤設置日	日付 (基盤回収日)	基盤 (or袋) 記号	場所詳細	サンゴ情報
2013年3月中旬	130603	AR	石垣島浦底湾・魚礁・水深2m	3年前まで枝状のミドリイシ属サンゴの優占地帯であったが、2年前にオニヒトデによってほぼ全滅。
2013年3月中旬	130605	KN3	嘉弥間島北・水深3m	石西礁湖の北側、いわゆる「北礁」。サンゴは、様々な種類が高被度に分布。この水深はミドリイシが一番多い。
2013年3月中旬	〃	KN6	嘉弥間島北・水深6m	この水深では、ミドリイシと他のサンゴが半々くらい。
2013年3月中旬	〃	KN10	嘉弥間島北・水深10m	この水深では、ミドリイシ以外のサンゴが多くなる。
2013年3月中旬	〃	SA3	サクラグチ(石垣港南側)・水深3m	港からの航路出口に近い。1998年の白化以降は、ソフトコーラルが優占して、造礁サンゴの回復はまばら。
2013年3月中旬	〃	SA6	サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m	この水深(6~15m)は、特にソフトコーラルが多い。
2013年4月上旬	130708	石西A	小浜東の礁湖内東寄り(D1)・水深3m	生サンゴほとんどなし。太枝の死サンゴ原型留める。
2013年4月上旬	〃	石西B	小浜東の礁湖内中央(D2)・水深4m	生サンゴほとんどなし。砂地にハマサンゴの根が点在
2013年4月上旬	〃	石西C	嘉弥間島南西側(D3)・水深3m	水路わきのパッチリーフ。この2、3年でミドリイシが増えてきた。
2013年4月上旬	〃	石西D	小浜東の礁湖内西寄り(D4)・水深2~3m	生サンゴほとんどなし。枝は原型留めず散乱。基質は海藻に覆われている。
2013年4月上旬	〃	石西E	小浜東の礁湖南端(内側)・水深3m	生サンゴほとんどなし。太枝の死サンゴ原型留める。
2013年4月上旬	〃	石西F	小浜東の礁湖南東端(H1)・水深6m	枝状ミドリイシがまばらに分布。
2013年4月上旬	〃	石西G	小浜東の礁湖南端(外側)・水深4.5m	生サンゴわずかに残る。太枝の死サンゴ原型留める。スズメダイモドキの縄張りあり
2013年4月上旬	〃	石西H	黒島北側のパッチリーフ(H4)・水深7m	枝状ミドリイシが高被度に分布。
130605	〃	111~120	嘉弥間島北・水深3m	上記のKN3と同じ場所。
130605	〃	121~130	嘉弥間島北・水深6m	上記のKN6と同じ場所。
130605	〃	81~90	嘉弥間島北・水深10m	上記のKN10と同じ場所。
130605	〃	131~140	サクラグチ(石垣港南側)・水深3m	上記のSA3と同じ場所
130605	〃	91~100	サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m	上記のSA6と同じ場所
130710	131009	トミノ2m(袋に記載)	石垣島浦底湾アウトリーフ・水深2m	3年前までサンゴ高被度。2年前のオニヒトデで全滅。かつてはテーブル状ミドリイシが優占。
130710	〃	トミノ5m(袋に記載)	石垣島浦底湾アウトリーフ・水深5m	かつては枝状ミドリイシが優占。
130710	〃	トミノ10m(袋に記載)	石垣島浦底湾アウトリーフ・水深10m	かつては枝状ミドリイシとその他のサンゴが半々。
130708	131106	D1(袋に記載)	小浜東の礁湖内東寄り(D1)・水深3m	上記の石西Aと同じ場所。
130708	〃	D4(袋に記載)	小浜東の礁湖内西寄り(D4)・水深2~3m	上記の石西Dと同じ場所。
130708	〃	H4(袋に記載)	黒島北側のパッチリーフ(H4)・水深7m	上記の石西Hと同じ場所。
130708	〃	KN3(袋に記載)	嘉弥間島北・水深3m	上記のKN3と同じ場所。
130708	〃	KN6(袋に記載)	嘉弥間島北・水深6m	上記のKN6と同じ場所。
130708	〃	KN10(袋に記載)	嘉弥間島北・水深10m	上記のKN10と同じ場所。
130708	〃	サクラグチ3m(袋に記載)	サクラグチ(石垣港南側)・水深3m	上記のSA3と同じ場所
130708	〃	サクラグチ6m(袋に記載)	サクラグチ(石垣港南側)・水深7~8m	上記のSA6と同じ場所

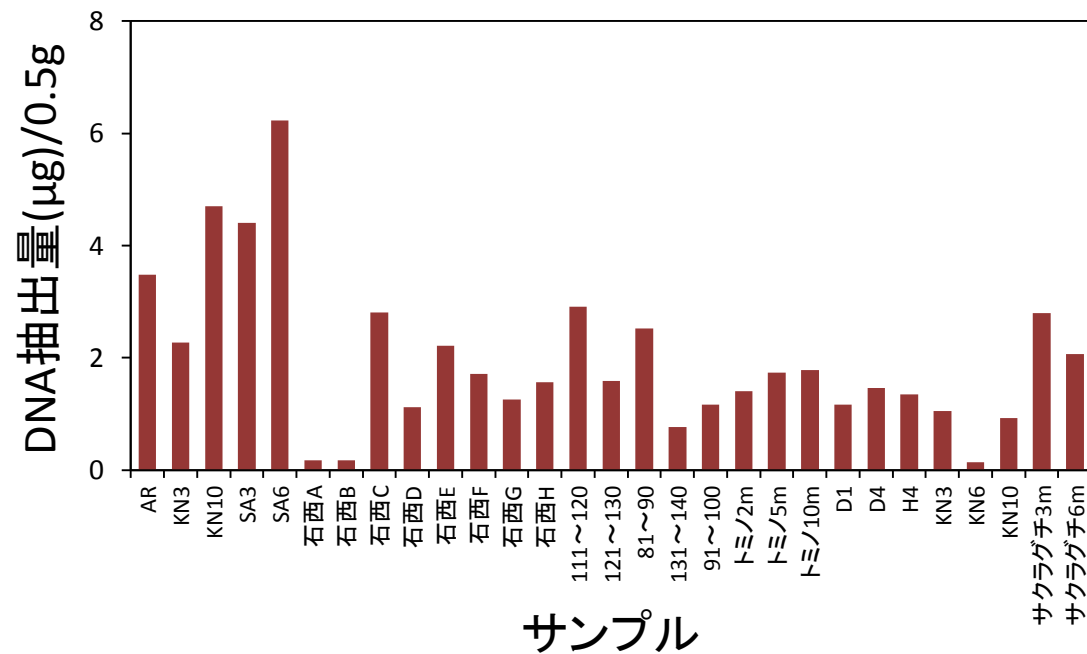
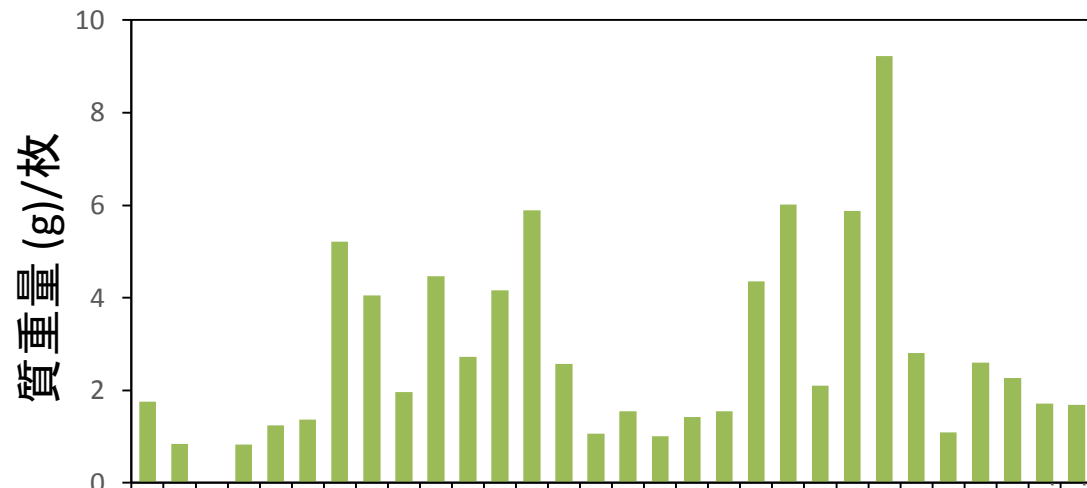


着定板付着物サンプル

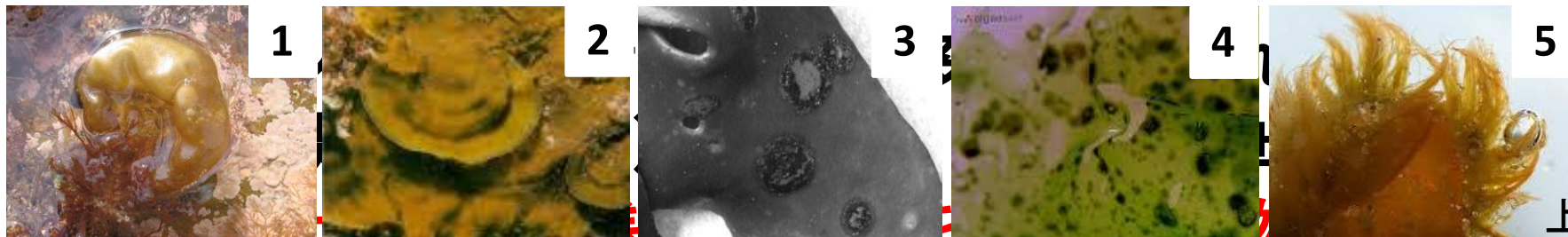


着定板への付着状況(サンプル回収)

番号	設置期間	基盤番号	質重量(g)	枚数	質重量/枚
1	3	AR	17.6	10	1.8
2	3	KN3	8.5	10	0.8
3	3	KN6			
4	3	KN10	8.3	10	0.8
5	3	SA3	12.5	10	1.2
6	3	SA6	13.7	10	1.4
7	3	石西A	52.2	10	5.2
8	3	石西B	40.6	10	4.1
9	3	石西C	15.7	8	2.0
10	3	石西D	35.7	8	4.5
11	3	石西E	27.2	10	2.7
12	3	石西F	41.6	10	4.2
13	3	石西G	58.8	10	5.9
14	3	石西H	25.7	10	2.6
15	1	111~120	10.7	10	1.1
16	1	121~130	12.4	8	1.6
17	1	81~90	8.1	8	1.0
18	1	131~140	14.2	10	1.4
19	1	91~100	15.5	10	1.6
20	3	トミノ2m	34.9	8	4.4
21	3	トミノ5m	60.2	10	6.0
22	3	トミノ10m	21.0	10	2.1
23	4	D1	58.8	10	5.9
24	4	D4	92.2	10	9.2
25	4	H4	28.1	10	2.8
26	4	KN3	4.4	4	1.1
27	4	KN6	18.2	7	2.6
28	4	KN10	22.7	10	2.3
29	4	サクラグチ3m	6.9	4	1.7
30	4	サクラグチ6m	13.5	8	1.7



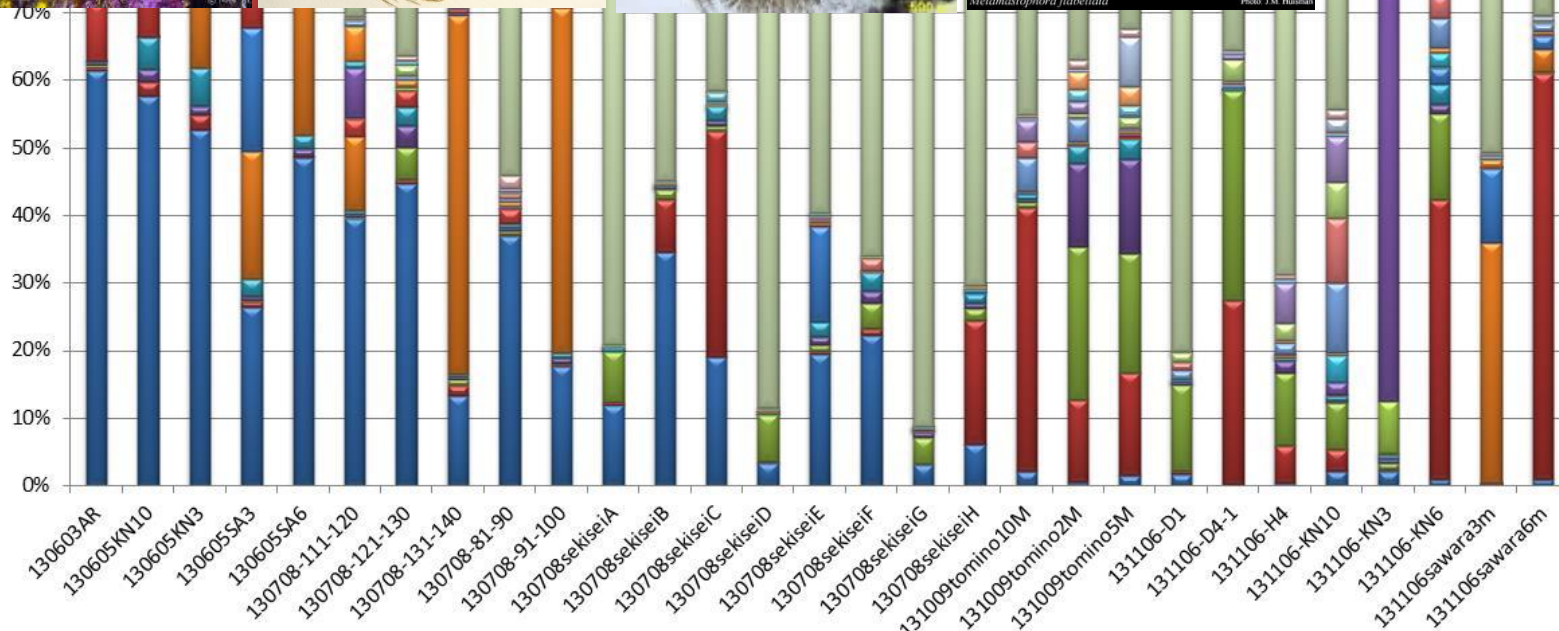
サンゴ着底板の付着生物メタゲノム解析



上位20位の生物種

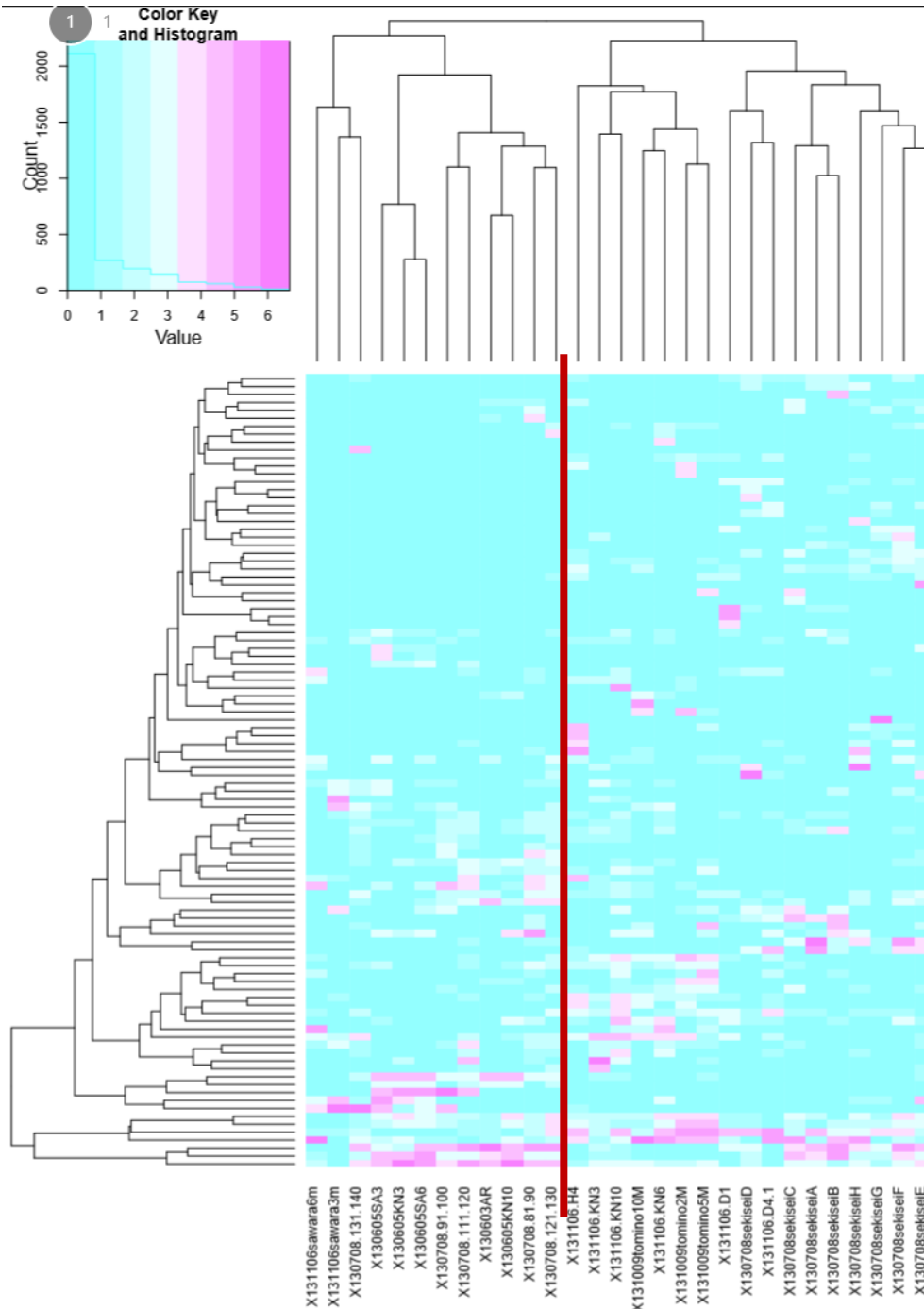
- 1 2
- 3 4
- 5 6
- 7 8
- 9 10
- 11 12
- 13 14
- 15 16
- 17 18
- 19 20

出現頻度



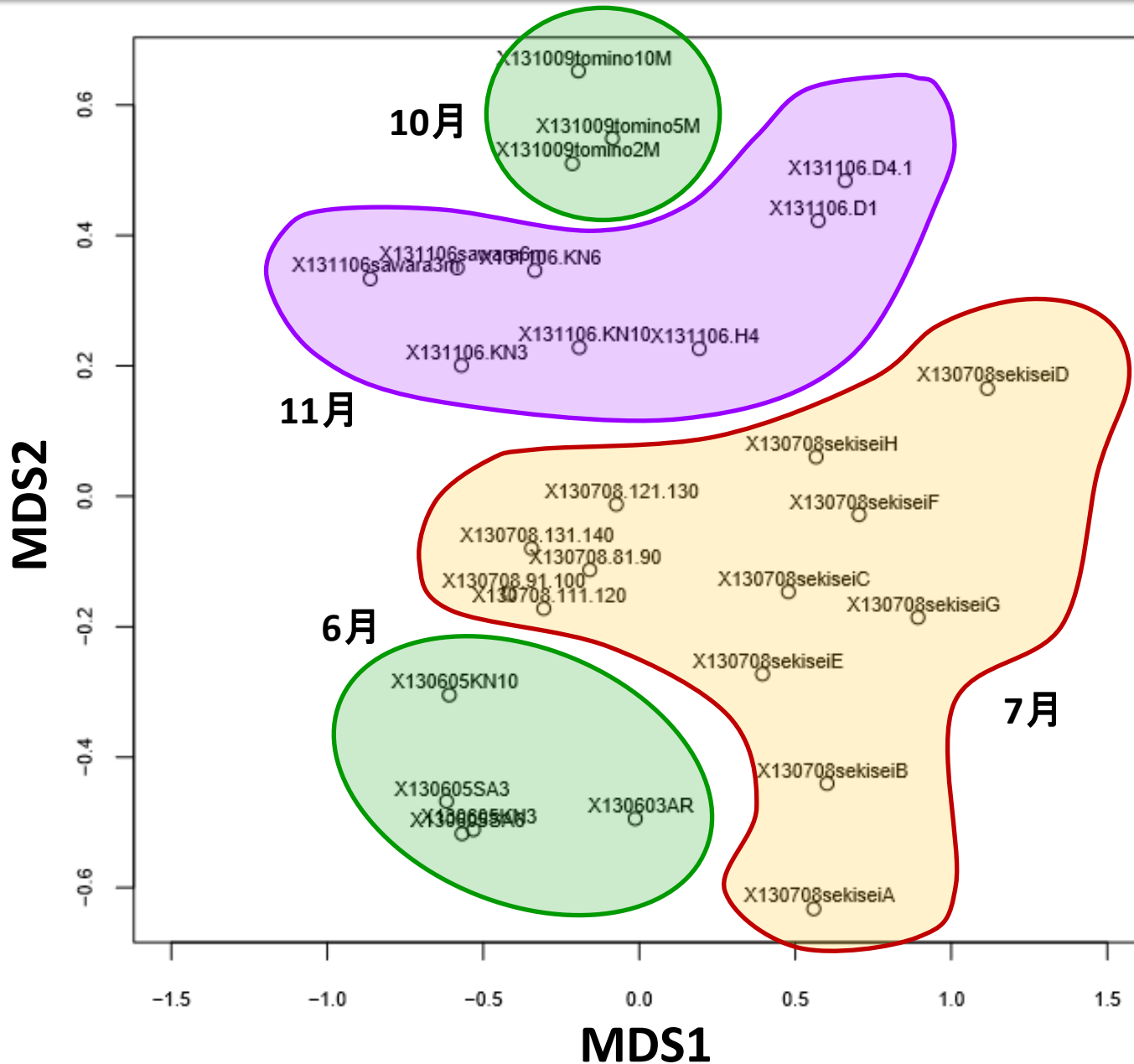
サンプル番号

ヒートマップ + クラスターリング解析



着底版に付着する生物は、時期・場所によって異なる。

サンゴ着底板メタゲノムデータのNMDSプロット

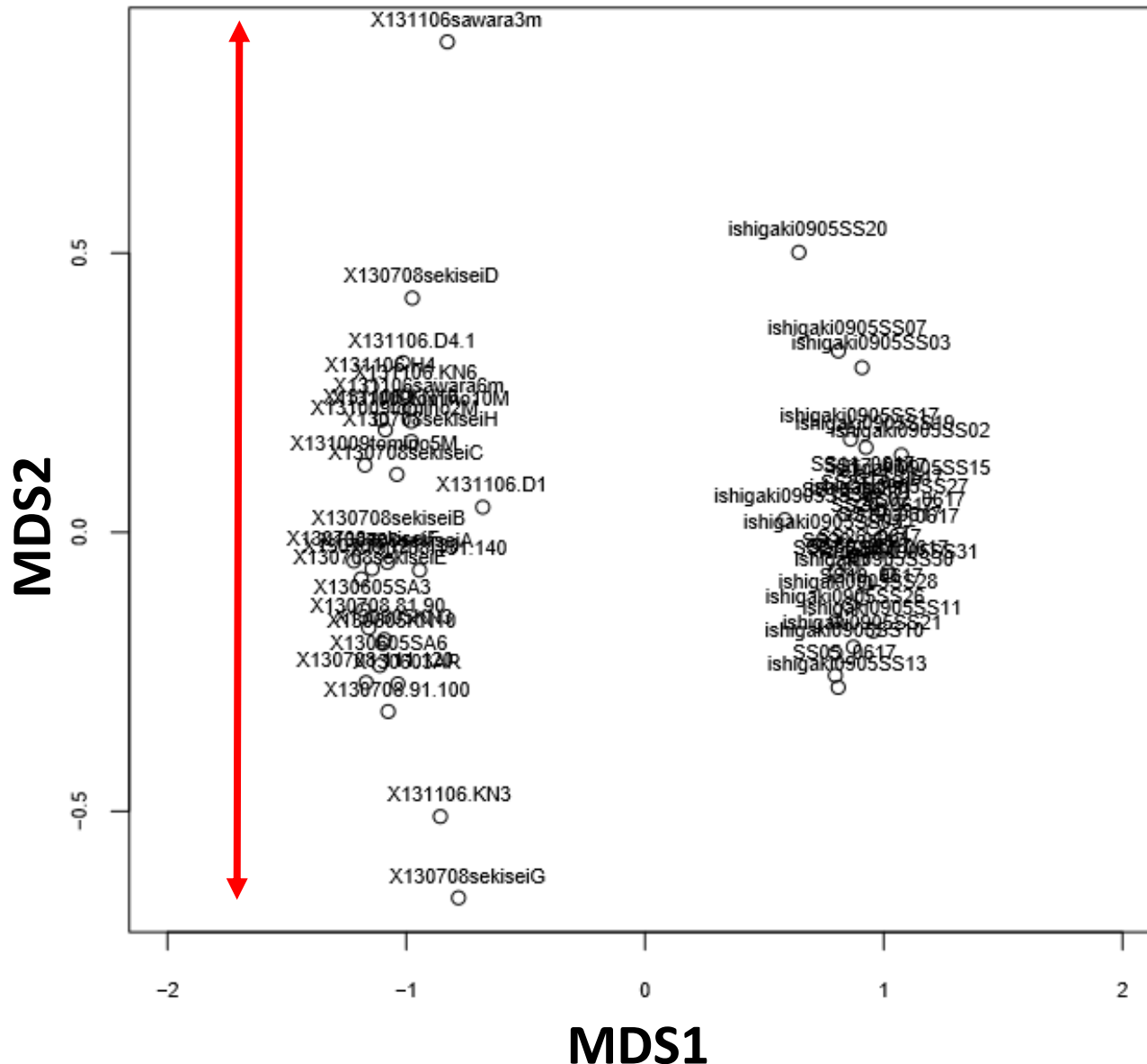


生物多様性は
時期によって
異なる。



サンゴの回復と
関係を見るには
どういう解析を
すべきか？

海水 VS 着底坂 類似度指数のNMDSプロット

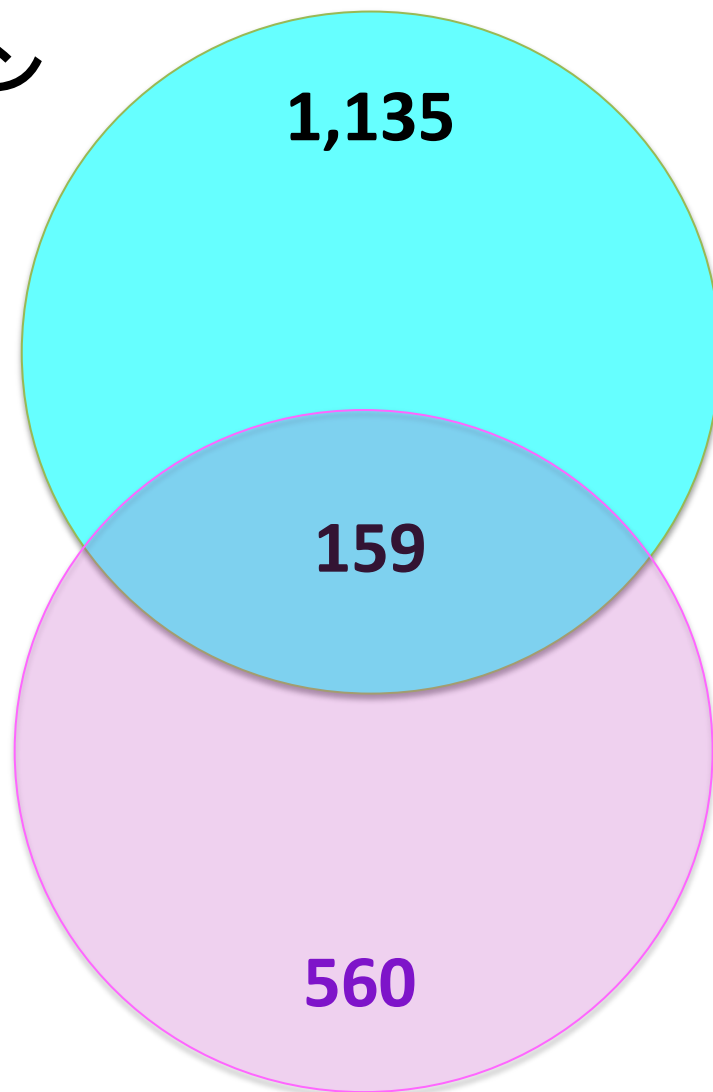


海水中のプランクトンと着底坂上の生物群は大きく異なる。

着底板上の生物多様性はサンプル間の差が大きい。

海水 VS 着底坂 出現種の類似性

海水プランクトン
3リットル



着底坂生物
0.5g

海水とサンゴ表面と
では生存する生物
群が大きく異なる
ことが判明

メタゲノム解析結果の要約と課題

- プランクトンの多さは地点により異なる
石垣島南部に多い
- 陸源負荷の指標として珪藻が有効
石垣島南部の河川からの栄養塩負荷が大きい。
- 着定板から多くの生物群の検出に成功
サンゴの生残・成長に影響する生物との関係は不明
- 海水メタゲノム解析の継続
プランクトンの生物多様性に関する情報の蓄積
- 着定板メタゲノム解析の継続
サンゴの生残・成長と付着生物の関係解明