

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
[1年追加支援期間分]

研究期間 2018年 4月～2019年3月

研究代表者:竹山春子
(早稲田大学、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

H29 年度までの CREST 研究では、サンゴ礁の保全を目的として、沖縄浅海域サンゴ礁生態系を対象に、生物データ、化学および物理的環境データを継続的に取得してきた。それらの成果から、ウスエダミドリイシ (*Acropora tenuis*) 共生細菌として特に *Endozoicomonas* 属細菌の多様性、存在量が地点によって大きく異なることが見出された。さらに、CREST 研究で確立したシングルセル解析技術や、ミニメタゲノム解析等の成果より、それらの共生細菌としての分子生物学的特徴が次第に明らかになり、サンゴ複合系(ホロビオン)における *Endozoicomonas* 属細菌の重要性が明確化してきた。

また、人工的な環境下でサンゴ養殖に成功している読谷村では高温耐性サンゴが見出されており、天然の *Acropora tenuis* では見られない *Endozoicomonas* 属細菌が検出された。

平成 30 年度、1 年追加支援によって、今まで行ってきたモニタリング手法とは異なるオンサイト実験を上記の高温耐性サンゴを用い行うことで、環境変動における *Endozoicomonas* 属の共生相互関係の変化を解析し、高温耐性株のメカニズムの一端をひも解くことを目的とした。

本研究では、琉球大学グループが環境データの取得と飼育実験水槽の管理等を担当し、早稲田大学がサンプル処理と解析を主に担当した。4-7 月毎月 2 度水温の加温を行う実験を遂行し、細菌叢解析等を進めた。良好な生育状態を維持している読谷養殖池の物理的、化学的環境は、天然の海洋環境とはかけ離れたものでありサンゴの環境適応の幅が示された。養殖池から高温耐性を示してきた green モルフ、それよりは耐性が低い purple モルフの *Acropora tenuis* を用いた加温実験では、7 月において purple モルフでの細菌叢変動が確認された。同条件下における green モルフおよび purple モルフを比較した結果、カラーモルフ間の細菌組成の安定性に差異があることが示唆された。また、シングルセルゲノム解析の結果も踏まえ、*Endozoicomonas* 属細菌の宿主への伝播様式に違いがある可能性が示唆され、サンゴ生物学だけでなく、サンゴの環境変動へのロバストネス評価の指標になりうると考えられ、サンゴ礁保全への貢献も期待できる成果が得られた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

概要：サンゴ生物学においてはホロビオンの構成員である褐虫藻と宿主との相互作用に関する研究が中心であった。最近細菌の存在が注目されており、特に *Endozoicomonas* 属は、ゲノムも一部明らかになってきており宿主との密接な関係が注目されてきている。本研究からは、*Endozoicomonas* の存在量、系統による宿主内での役割に関して明らかとなり、*Endozoicomonas* は宿主制御にかかわる生存戦略を持つことが示唆された。サンゴ生物学への大きなインパクトがあるだけでなく、サンゴ礁のロバストネスの評価指標にもなる可能性があり、今後の新たな展開につながる研究成果である。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

概要：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。その中で、ドロップレットをベースとし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。特に、微生物を対象としたドロップレットシングルセル解析システムでは、その超ハイスループット性だけでなく様々な多様な工程を自在に足し合わせるプラットフォーム設計が可能であり本事業で高い技術を具現化した。すでに国際的にも高い評価を得ている。幅広い分野で活用されることが確実となっていることからここで得られた成果は、科学技術イノベーションとなることは間違いない。

<代表的な成果>

特許出願： 特願 2018-89259 出願日： 2018/05/07「ゲノムライブラリーの作製方法及びゲノムライブラリーの作製装置」

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 早稲田グループ

研究代表者: 竹山 春子 (早稲田大学理工学術院 教授)

研究項目: 次世代型マリンメタオミックス解析と支援技術開発

- ・シングルセルメタゲノム解析

シングルセルゲノム解析の手法の最適化とその応用

- ・次世代型マリンメタオミックス解析

対象細菌叢のメタゲノム解析、シングルセルゲノム解析、情報解析

② 沖縄グループ

主たる共同研究者: 須田 彰一郎 (琉球大学理学部 教授)

研究項目: 沖縄サンゴ礁生態系評価と変動予測研究

- ・観測サンゴ礁域の環境因子・生物因子等の生態系基礎情報調査と評価

読谷養殖池、地先海域における環境因子の基礎的情報の取得

- ・合同生物相調査

読谷における水槽飼育実験のセットアップと管理、移植実験とともに定期的なサンプリング

(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

2-1) CREST 領域内連携

「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」

昨年度から継続的に、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。すでに、昨年年度に採集したトゲサンゴの細菌叢解析から *Acropora tenuis* とは異なる OUT の *Endozoicomonas* を有することが見出されている。本年度 8 月の調査でも以前同様な OUT の *Endozoicomonas* を確認した。

2-1) 国内外アカデミアとの連携研究

シングルセルゲノム解析に関しては、腸内細菌の解析等で共同研究が複数件進んでいる。また、ドロップレット技術の展開としてハイスループットの微生物培養への共同研究もスタートしている。

海外との共同研究は、スイスの ETH とは継続的に進めているほか、シンガポールの Nanyang Technological University とも本年度共同研究がスタートしている。これらをきっかけに、10 月 25 日にシンガポールでシンポジウム「Biotechnology Towards Next Generation Single Cell Analysis」を主宰した。また、ベルギー、ブリュッセル自由大学の研究グループとの共同研究を視野に 11 月 5、6 日にブリュッセル自由大学にてワークショップ「Advanced techniques to study and exploit the sponge and coral microbiomes」を主催した。

2-3) 産業界・民間団体との連携

- ・シングルセルゲノム解析プラットフォームは、昨年来複数の企業と共同研究を行っている。

- ・平成 28 年度より、読谷村の(有)海の種が運営する「さんご畑」の人工池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が、本年度は同社との連携を中心に研究活動を進めた。