

北太平洋亜寒帯域の浮遊性バクテリアおよび微生物ループに及ぼす

紫外線の影響

COE 研究員 程木 義邦

担当教官 東 正剛

1. はじめに

水界生態系を対象とした太陽紫外放射の影響に関するこれまでの研究は、単一の生物群や要因を対象としたものが多く、物質循環的観点の研究は行われていない。例えば、紫外線 B は、溶存対有機物の光化学的分解を促進することが明らかとなっている一方で、浮遊性バクテリアの増殖を阻害（溶存対有機物消費速度の低下）し、植物プランクトンからの有機物細胞外排出量の増加（溶存対有機物供給量の増加）をもたらす。溶存態有機物量の挙動は海洋における炭素収支、ひいては大気中二酸化炭素濃度に大きく影響すると考えられているが、今後の紫外線 B の増加が、溶存対有機物プールを縮小する方向に働くか、または、拡大する方向に働くかについては未だ研究が不十分と言える。このような背景には、植物プランクトン・バクテリアなど多種の生物群により構成される微生物ループの研究について、その全体像を定性的・定量的に把握する手法が未だ十分に確立されていないことが挙げられる。本稿では、本究プロジェクトで見据えている海洋微生物ループに対する紫外線の影響を包括的に解析するための前段階として、分子生物学的手法を用いた海洋細菌群集の解析および太陽紫外線が浮遊性細菌群集に与える影響について解析を行った。

2. 調査地点及び方法

1) 現場観測

調査は北太平洋亜寒帯域、通称 A ラインと呼ばれる厚岸沖 (42°50.0'N 144°50.0') より仙台沖 (38°00.0'N 147°15.0') に設置された 21 定点において、2003 年 7 月、9 月および 2004 年 2 月に行った。表層 (0 m) および任意の水深で採水、採取した海水はポアサイズ 0.2 μ m のヌクレポアフィルターによりろ過処理を行い、フィルターを液体窒素中で凍結保存し研究室に持ち帰った。

2) 海洋微生物群集に対する紫外線の影響の評価

2003 年 9 月の調査において採取した海水を用い、海洋微生物群集に対する紫外線の影響の評価を行った。A7 地点 (41°30.0'N 145°30.0') において 0m, 10m, 50m および 100m の海水を採水し、それぞれを 1 L の石英ビンに注入、一昼夜、調査船の甲板上でインキュベートを行った。なお、サンプルは、石英ビン（太陽光条件）および石英ビンに紫外領域 (< 400nm) の波長を吸収する紫外線除去

フィルム (PTFE, CI-Kasei Co.) を巻いた条件 (紫外線除去条件) でインキュベートを行った。また、A13 (40°00.0'N 146°15.0') 地点では、表層 0m の採水を行い、太陽光条件、紫外線除去条件および暗条件で一昼夜インキュベートを行い、太陽紫外線の影響を評価した。

3) DGGE 法 (編成剤濃度勾配ゲル電気泳動法) を用いた海洋細菌群集の解析

海洋細菌群集の解析手法として、Muyzer et al. (1993) によって確立された PCR-DGGE 法を用いた。本手法の概要を簡単に説明すると、DNA 変性剤 (尿素とホルムアミド) の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により、複数の 2 本鎖 DNA が混合しているサンプルより、それぞれの塩基配列が変性する変性剤濃度の違いを利用し、単一種を単一のバンドとして分離する手法である。

ろ過処理をした海水サンプルは Katano and Fukui (2003) の手法により DNA の抽出をおこなった。その後、真性細菌は Muyzer et al. (1993)、古細菌は Rolfe et al. (1998) の手法により PCR をおこない、DGGE に用いる二本鎖の 16S rDNA サンプルを作成した。DGGE は基本的に石井ら (2000) の手法に従って行った。DGGE で確認されたバンドをゲル中より切り出し、再度 PCR と DGGE を行い、完全に単一のバンドとなっていることを確認したのちに、シーケンスを行い塩基配列の決定を行った。塩基配列は FASTA により相同性検索を行った。

3. 結果

1) A ラインにおける表層の細菌群集

2003 年 7 月および 9 月に行った A ラインの調査により、これまでに 19 種類の真性細菌および 6 種類の古細菌の塩基配列を決定している。DGGE によるバンドパターンの例を図 1 および図 2 に示した。真性細菌については、全ての調査地点において 10~12 程度のバンドが確認でき、そのほとんどが共通して見られる (図 1)。しかし、例えばバンド a および b は、A2~A14 の地点では見られるものの、A17 および A21 では見られないなどの若干の変化が見られる。また、これまでに塩基配列を決定したバンドのうち、76% が プロテオバクテリア、18% が プロテオバクテリアであった。

古細菌については、真性細菌と比べると出現バンド数は少ないが、表層にも数種類出現していること、また、沿岸から沖帯にかけてバンドパターンが変化することがわかる (図 2)。

2) 海洋微生物群集に対する紫外線の影響の評価

2003 年 9 月に行った海洋微生物群集に対する紫外線の影響の解析結果を図 3 および図 4 に示した。A7 地点でおこなった真性細菌群集の解析結果では、0m お

よび 10m で採取したサンプルでは、太陽光条件および紫外線除去条件の間に明瞭なバンドパターンの変化は見られなかった。一方、水深 50m および 100m で採取したサンプルでは、両光条件の間に明瞭な差が見られ、太陽光条件ではバンド数が減少し、かつバンドの蛍光強度も弱くなる傾向が見られた。また、A13 地点において行った実験においても、表層の海水サンプルでは暗条件、太陽光条件、紫外線除去条件の間で明瞭な差は見られなかった。

古細菌の解析結果も真性細菌とほぼ同じ傾向が見られ、表層で採取したサンプルでは両光条件の間で明瞭な差は見られないが、水深 50m および 100m のサンプルでは、太陽光条件でバンド数が減少した。

4 . 考察

2003 年度の研究では、本題の海洋浮遊性細菌および微生物ループに与える太陽紫外線の影響の基礎的に先立ち、基礎データおよび予備的実験を中心としたため、主として細菌群集解析のための分子生物学的手法の検討と確立、紫外線の影響の実験的解析を行った。その結果、真性細菌と古細菌を合わせ、20 数種類の群衆構成細菌の塩基配列を決定した。本稿では、これらの細菌について十分に議論をすることが出来なかったが、これまでの知見と比較すると、A ラインの特性として以下の 3 点が示唆されている。1) 北極域と温暖域で確認されている細菌の塩基配列の両方が混在して見られる、2) 他の海域と比べ、プロテオバクテリアの出現種数が多い、3) Marine Group に含まれる古細菌が表層でも確認される。しかし、未だ DGGE における出現バンドの 7 割程度しか網羅していないこと、また、DGGE は定性的な手法として感度が良いが、定量的情報が得られないため、今後も構成細菌の解析を進めると共に、FISH 法を用いた定量的解析を行う必要があると考えられた。

海洋細菌群集に対する紫外線の影響については、表層 0 ~ 10m の海水では、紫外線の有無に関わらず群集組成に明瞭な差は見られなかった。一方、有光層下層部および無光層 (50 ~ 100m) の細菌群集では、紫外線の影響により、出現種数が減少する傾向が見られた。これは、海洋表層の細菌群集は既に紫外線に順応していること、または、比較的紫外線に強い種のみが生息していることが考えられる。一方、50 ~ 100m の海水をでは、紫外線除去条件と比べ太陽光条件で出現バンド数が減少しているが、太陽光条件で確認できるバンドを見ると、それらは表層でもみられるバンドと良く一致していることが分かり、細菌の種により、太陽紫外線に対する耐性が異なることが示唆される。今後、これらのバンドパターンの比較から、紫外線に強いと考えられる細菌と弱いと考えられる細菌の配列を決定し、系統的または生態的な共通性について解析を行う。また、DGGE の結果では、表層の細菌群集は紫外線の影響によって群集構造が変化しないと思われるが、今後は活性の変化などでも更なる解析を行う予定である。

5 . 投稿中の論文

- Hodoki, Y. (submitted) Effects of solar UVR on periphyton community in lotic systems: Comparison of the effects on attached algae and bacteria during their development. *Hydrobiologia*.
- Hodoki, Y. (submitted) Bacterial biofilm encourages algal immigration onto substrata in lotic systems. *Freshwater Biology*.
- Hodoki, Y. (submitted) Direct and indirect effects of solar ultraviolet radiation on attached bacteria and algae in lotic systems. *Aquatic Microbial Ecology*.
- Hodoki, Y. and Ohbayashi, K. (submitted) Adaptation strategies of algae to solar ultraviolet radiation. *Ecology*.

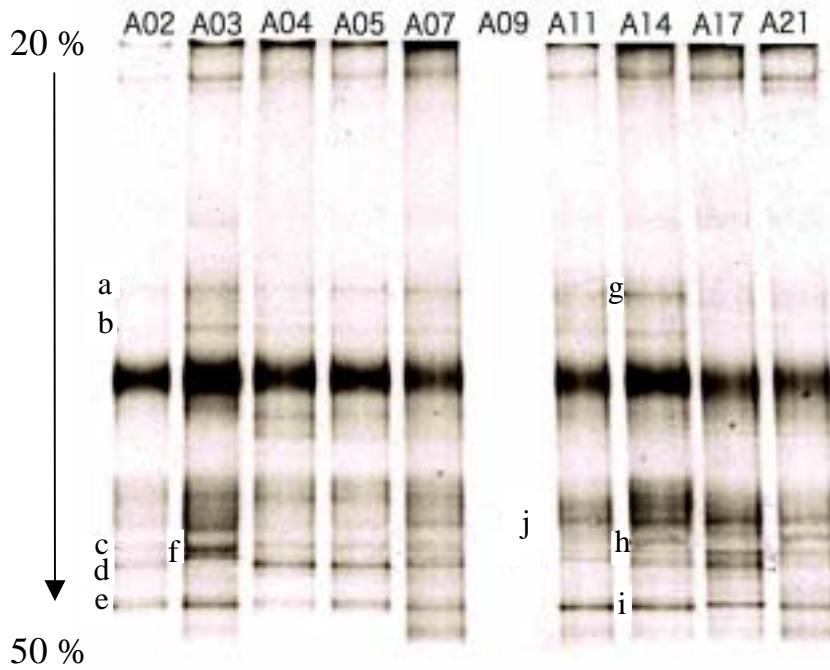


図1. Aラインにおける表層(0 m)真性細菌群集のDGGEパターン
(2003年7月調査)

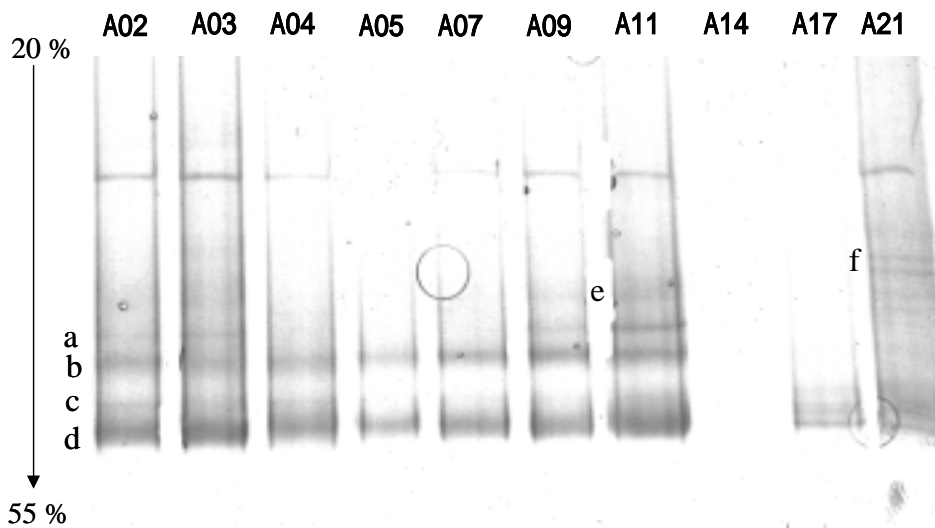


図2. Aラインにおける表層(0 m)古細菌群集のDGGEパターン
(2003年7月調査)

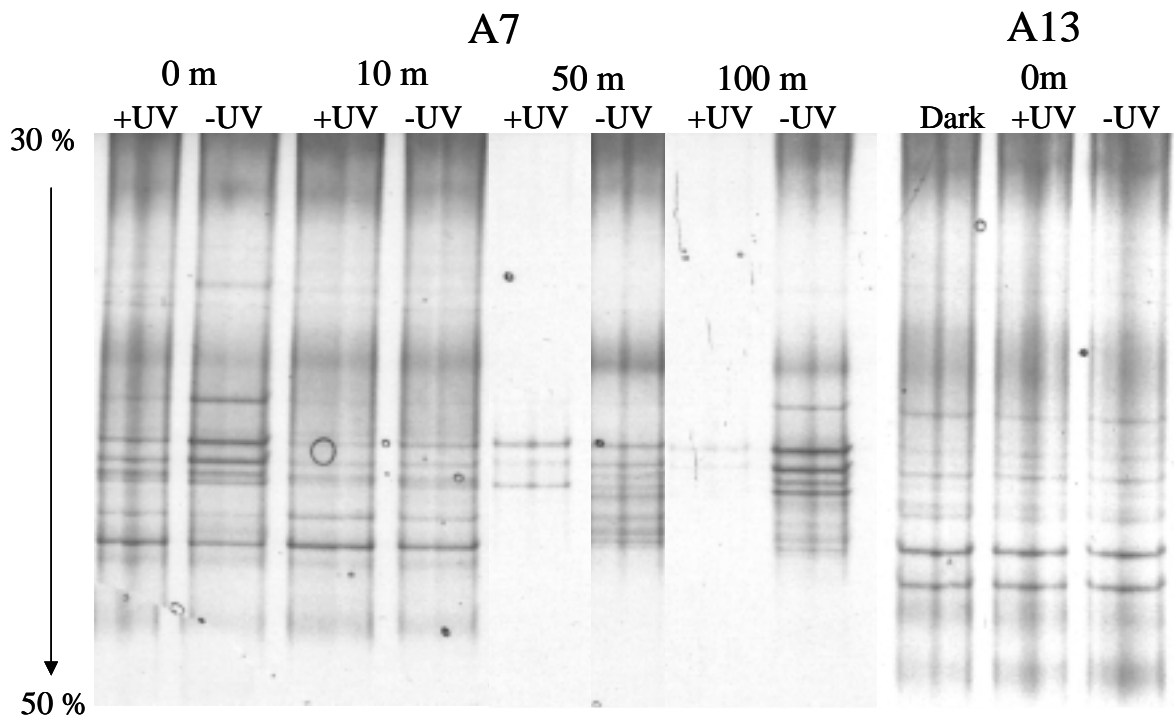


図3. 各水深の海水を太陽光条件(+UV)および紫外線除去条件(-UV)でインキュベートした後の真性細菌群集のDGGEパターンの変化 (2003年9月調査)

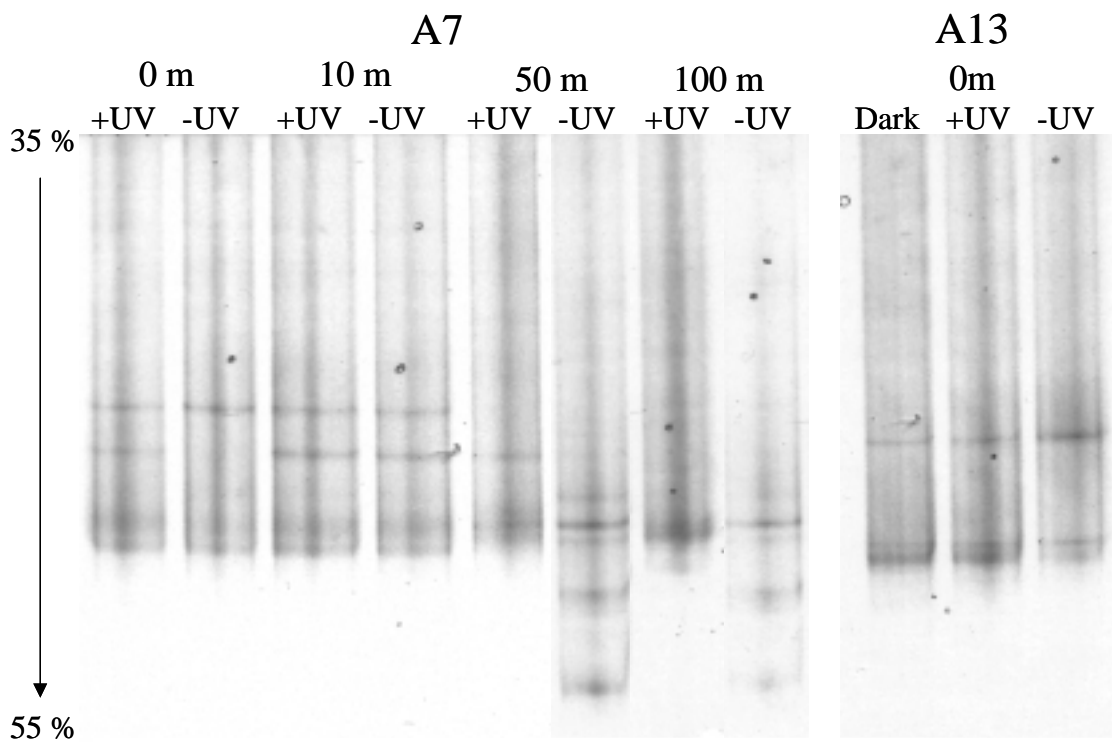


図4. 各水深の海水を太陽光条件(+UV)および紫外線除去条件(-UV)でインキュベートした後の古性細菌群集のDGGEパターンの変化 (2003年9月調査)