

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ほとんど行われてこなかった。例えば、紫外線 B 放射は、水中の溶存態有機物の光化学的分解を促進する一方で、溶存態有機物を餌として増殖する浮遊性バクテリアの増殖を阻害し、また植物プランクトンからの有機物細胞外排出量の増加をもたらすことが示唆された。しかしながら、これら過程の定量的な議論は今までほとんどされてこなかった。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影響を及ぼすと考えられているが、今後の紫外線 B 放射の増加が、溶存態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である。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。

本研究グループでは、海洋微生物群集の構成種やその季節変化を把握することを最初の目的とし、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法) などの生化学的あるいは分子生物学的手法を導入し、西部北太平洋亜寒帯域において定期的な観測を行った。また、活性測定法および磁気ビーズを用いた特定 DNA の分離方法に DGGE 法を組合せ、細菌群集を構成する種毎の紫外線感受性の評価手法について検討を行ってきた。本稿では、調査対象としている北太平洋亜寒帯域で調査を行った活性の高い細菌、DNA 損傷を持つ細菌の時空間変化について報告を行う。

2. 調査地点及び方法

1) 調査地点

2003 年 7 月より、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 38°00.0'N 147°15.0'までに設置された 21 定点において、定期的に調査を行っている。表層 (0 m) の海水を採取し、0.2 μm ヌクレポアフィルターを用いて海水のろ過を行った。また、採取した海水の一部は細菌群集の増殖活性測定のために使い、プロモデオキシウリジン (以下、BrdU) を添加 (最終濃度 20 μM)、30 分間、暗所で培養を行った。また、2005 年 9 月の調査では、A21 地点において、3 時間おきに採水を行い、細菌群集の組成の昼夜変化を調べた。

2) 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、真性細菌に特異的なプライマーを用い PCR をおこない、DGGE に用いる二本鎖の 16SrDNA サンプルを作成した。DGGE は基本的に石井ら

(2000)の手法に従い行った。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、完全に単一な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) 磁気ビーズを用いた特定DNAの分離とDGGE法による海洋細菌群集の解析

抗BrdU抗体または抗Thymine dimer抗体を標識した磁気ビーズを用い、2003年7月および2005年9月に採取したサンプルより、BrdUおよびThymine dimer(以下、TD)を持つ細菌DNAの分画を行った。分画したDNAサンプルは、PCR-DGGE法による群集構造の解析に用い、BrdUおよびTDのバンドパターンの比較により、種ごとの紫外線感受性の評価を行った。

3. 結果と考察

1) Aラインにおける抗BrdUおよび抗TD抗体によって分離されたDNAのDGGEバンドパターンの水平変化

図1に2003年7月のAライン観測で測定したBrdUを多く取り込んだDNA、TD生成量が多いDNAのDGGEバンドパターンの比較結果を示した。全DNAを用いたPCR-DGGEの結果では、それぞれの地点で複数のバンドが検出されるが、地点間のバンドパターンの相同性は高く、細菌群集の差異を評価することが難しいと考えられた。

一方、BrdUまたはThymine dimerをターゲットとして分画しPCR-DGGEを行ったところ、検出されるバンド数は減少し、活性の高い種とDNA損傷量が多い種に分画することが出来た。BrdUのバンドパターンは、地点間における変動が大きい一方で、隣接する調査地点の間では、バンドの相同性が高いという傾向も見られ、沿岸から沖合にかけて、活性の高い細菌が連続的に入れ替わっていることが考えられた。また、抗チミンダイマー抗体で分離したDNAのDGGEバンドパターンは、地点間における変動が大きく、隣接した調査地点間での相同性は明瞭ではなかった。

2) 抗BrdUおよび抗TD抗体によって分離されたDNAのDGGEバンドパターンの昼夜変化

図2に、A21地点におけるBrdU(A)およびTD(B)を含むDNAのDGGEバンドパターンの昼夜変化を示した。BrdUのバンドパターンは、顕著な経時変化は見られなかったが、昼間に特異的に現れるバンド、また、昼間に消失するバンドが確認でき(図2A)、これらは、太陽光の昼夜変動にตอบสนองしている種と考えられる。一方、TDのバンドパターンは経時的に大きく変化し、正午から夕方にかけて、出現バンド数が増加した。このことから、紫外線は複数の種に影響を及ぼしていること、紫外線によるDNA損傷量が正午から夕方にかけて最大になることが考えられる。

3) 抗BrdUおよび抗TD抗体によって分離されたDNAの塩基配列決定

A1地点における、全DNAおよびBrdU、TDのDGGEバンドパターンについて、各バンドの塩基配列の決定を行い、FASTAにより相同性検索を行った(図3)。現在までに、未培養のプロテオバクテリアおよびプロテオバクテリアに属するバンドが複数見られ手いるが、今後も各バンドの塩基配列の決定を行い、各種の紫外線に対する感受性の評価を行う。

4. まとめ

本年度は、これまでに確立を試みてきた紫外線の影響評価の手法を用い、北太平洋亜寒帯域における時空間的な紫外線の影響評価を行った。その結果、磁気ビーズを用いた特定 DNA の分離法を用いることにより、群集における種毎の影響を時空間的にも捉えられることが確認できた。未だ細菌 DNA の回収率や非特異的な DNA の除去率の検証などの検討の余地があるが、これらの問題を解決できれば、バンド強度の評価により、各種の活性や紫外線の影響について定量的な評価が可能となると考えられる。また、これらの手法は、培養ボトルを用いた長期的な培養実験を行う必要が無く、ほぼ自然状態のまま細菌群集に対する紫外線の影響を評価できる利点がある。今後のデータの蓄積により、系統的または生態的な特性について、有用な情報が得られることが期待できる。

5. 2005 年度業績

1) 論文

- Hodoki, Yoshikuni and Ohbayashi, Kako (2005) Species-specific responses of freshwater diatoms to solar ultraviolet radiation. *Archive für Hydrobiologie* 162: 431-443.
- Hodoki, Yoshikuni (2005) Bacterial biofilm encourages algal immigration onto substrata in lotic systems. *Hydrobiologia*, 539:27-34.
- Hodoki, Yoshikuni (2005) Direct and indirect effects of solar ultraviolet radiation on attached bacteria and algae in lotic systems. *Hydrobiologia*, 549:259-266.
- Hodoki, Yoshikuni and Tetsuo Murakami (in press) Effects of Tidal Flat Reclamation on Sediment Quality and Hypoxia in Isahaya Bay. *Aquatic Conservation: marine and Freshwater Ecosystems*.
- 程木義邦 (2005 年 10 月) 有明海浅海定線調査データでみられる表層低塩分水輸送パターンの変化. 日本海洋学会編「有明海生態系の再生をめざして」恒星社厚生閣.
- 程木義邦・村上哲生 (2006 年 2 月) 球磨川・川辺川の水質・生物ならびに八代海への物質輸送. 月刊海洋 Vol. 38, p 79-85.
- 程木義邦・村上哲生 (投稿中) ダム・河口堰建設における水質予測の問題点. 応用生態工学.
- 岩館智寛・程木義邦・大林夏湖・村上哲生・小野有五 (投稿中) 天塩川水系岩尾内ダム直下流域におけるヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata* Navas) の優占. 陸水学雑誌.
- 長津恵・大林夏湖・程木義邦・小野有五・村野紀雄 (投稿中) 絶滅危惧種エゾホトケドジョウ *Lefua nikkinis* Jordan and Fowler の分布と生息環境. 保全生態学研究.
- Ohbayashi-Hodoki, Kako, Hodoki, Yoshikuni. & Masakazu Shimada (submitted) Seasonal dynamics of the body-size frequency distribution of a freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805)(Gastropoda: Physidae). *Malacologia*.

2) 学会発表

- 程木義邦・加藤由紀子・碓井利明・村上哲生. 熊本県・球磨川水系の湧水に生育するオキチモズクの水質特性 -特に光環境に注目して-. 日本陸水学会大阪大会 (2005 年 9 月).

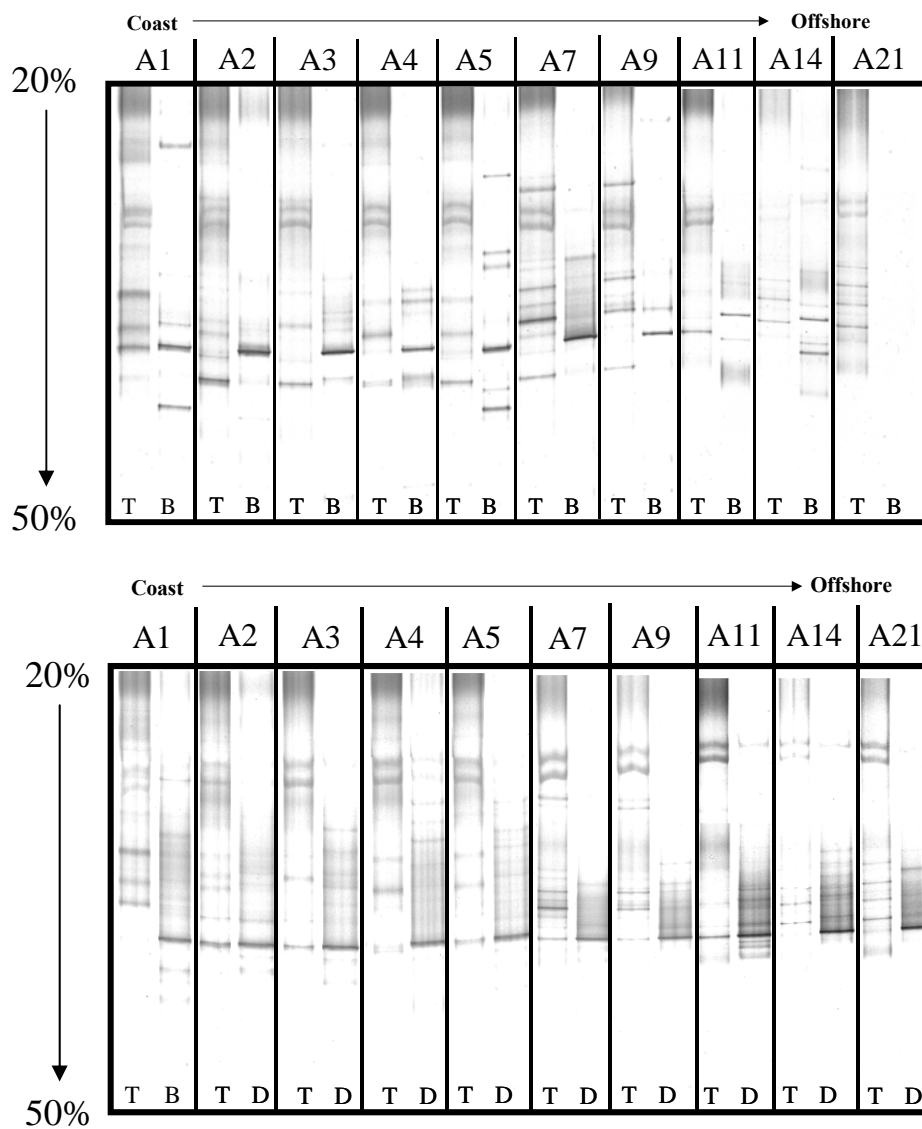


図1 . Aラインにおける全DNAおよびBrdU(上)、チミンダイマー(下)を含むDNAのDGGEバンドパターンの変化。図中のTは全DNA , BはBrdU、Dはチミンダイマーを示す。

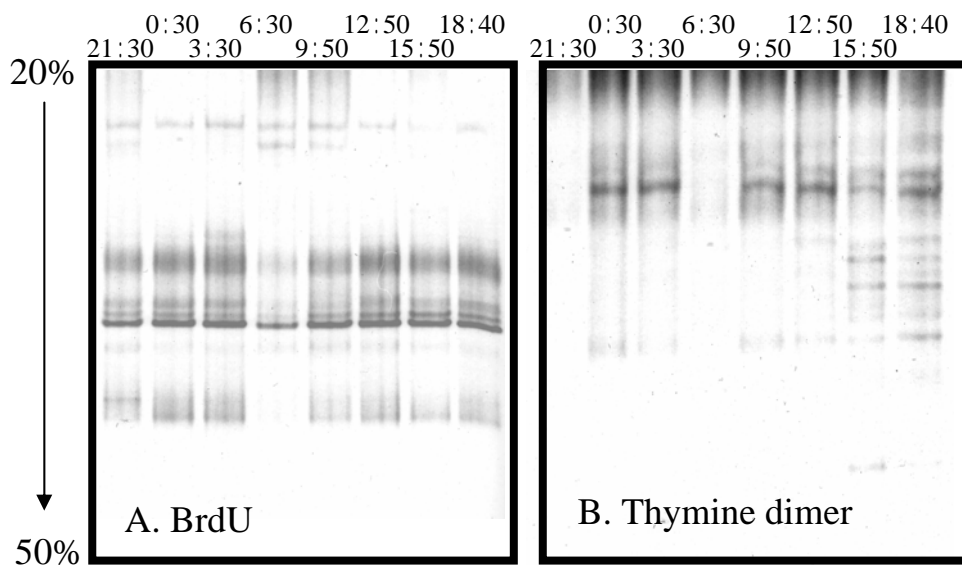


図2 . A21地点におけるBrdU(A) およびチミンダーマー(B) を含むDNAのDGGEバンドパターンの昼夜変化。

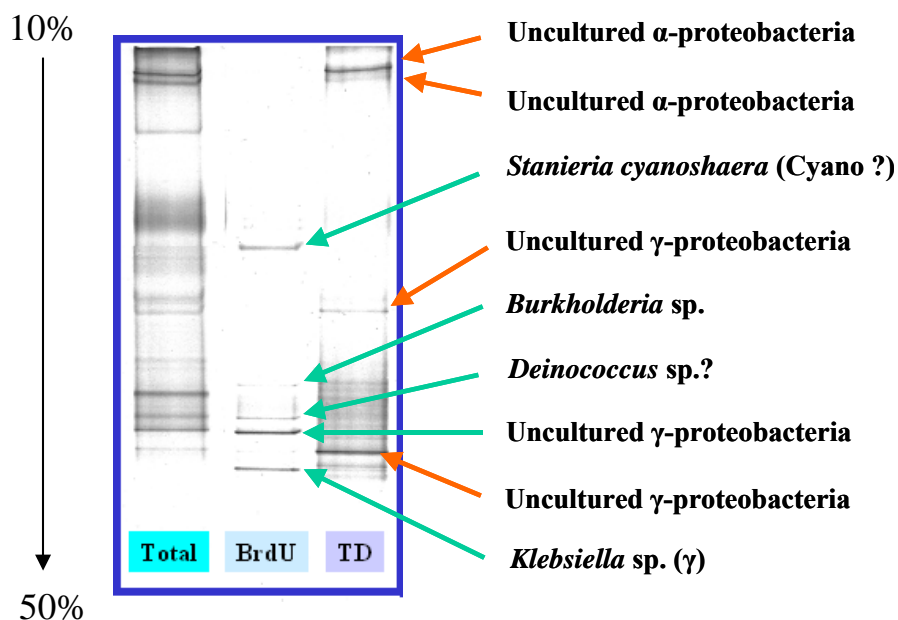


図3 . A1地点におけるBrdUおよびチミンダーマーを含むDNAのDGGEバンドパターンと各バンドの塩基配列決定結果。