

海洋性浮遊細菌に対する紫外線の影響評価

環境起学専攻 博士課程1年 片岡 剛文

指導教官 東 正剛

【はじめに】

海洋の従属栄養性細菌は微生物食物網の起点となり、海洋の生態系や物質循環において重要な働きをしている。成層圏オゾン層の減少に伴い、地上にとどく紫外線は増加し、特に 緯度地方では有害紫外線と言われる紫外線領域B(UVB)による生態系への影響が懸念されている。海洋域において紫外線が細菌に与える影響は1990年代後半から行なわれているが、これらはバクテリア群集全体を対象としているものであった。近年の分子生物学的手法の発達により、環境中における細菌の分布を知ることができるようになった。そこで、本研究では環境中の細菌の時空間的分布の解析を継続的に行なうとともに、環境中から単離した細菌を用いて室内実験により分類群ごとの紫外線耐性を評価することで、種に着目して紫外線が細菌群集に与える影響を評価することを目的とする。

【細菌群集の時空間的解析】

【試料及び方法】

2005年度は、5月 北光丸 と9月 若 丸 に、北海道・東北沖の観測定線、通称 A-Line 北緯42度50分東経144度50分から北緯38度東経147度25分 上の観測点において調査を行った。9月の調査では、3時間おきに8回海表面(水深0m)で採水し、ヌクレポアフィルター(孔径0.2μm)で濾過し、液体窒素中で保存した。同時にBrdU処理サンプルと、グルタルアルデヒド(最終濃度0.5%)による固定試料も得た。固定試料は DAPI(4' 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride)染色を行ない、蛍光顕微鏡による直接計数法で細胞密度を計測した。フィルター上に濃縮した懸濁粒子からはフェノール法によりDNAを抽出・精製した。このDNA溶液からチミンダイマーを抗原とした抗原抗体反応によりチミンダイマーを含むDNAを選抜した。同様の方法でBrdUを含むDNAも抽出した。これら3つのDNAサンプルは341F-GCおよび907RAプライマーを用いて、16S rDNA中の真正細菌に共通の領域をPCRで增幅し、その後、DGGE 変性剤濃度勾配電気泳動 法によりバンドパターンを比較した。

【結果と考察】

細胞密度は、正午近くで約 2.0×10^5 cells/mlと最小値を、夜明け前で約 5.0×10^5 cells/mlと最大値を示した。細胞密度の変化は夜明け前後が最も大きく、3時間で約

2.5分の1に減少した。3時間毎のDGGEのバンドパターンは連続的な変化を示した 図。細胞密度の変化と同様に、夜間に比べて昼間のバンド数が明らかに少なかった。3つのバンドについて夜明け前後での変化が顕著であった。これらのバンドを構成する細菌が細胞数の増減に関わっていることが示唆される。

チミンダイマーとBrdUを標的にして選抜したDNA鑄型を用いて、夜間と昼間のDGGEバンドパターンを比較した 図。チミンダイマーにより選抜したバンドは昼間に多く、BrdUにより選抜したバンドは夜間に多いと言う差が見られた。

【室内実験】

【はじめに】

有害紫外線領域B(280 nm – 320 nm)に暴露することで、細胞中のDNAにはチミンダイマーをはじめとするDNA損傷が形成され、これが蓄積するとDNA複製に障害が起こり細胞死を引き起こす。これに対して、細胞には、色素により紫外線を遮蔽するものや、DNA損傷を除去修復により取り除く応答があることが知られている 前者を防御、後者を修復と呼ぶ。細菌の紫外線耐性は防御と修復のバランスで決まると考えられる。本研究では環境中から得られた細菌を用いて、系統ごとの紫外線耐性を評価する。そのために、本年度は環境中に多く存在する分類群であるプロテオバクテリアを中心に単離培養することを目的とした。

【試料及び方法】

本研究は北光丸 北水研 の5月航海で行なった。A-line観測点A07とA13において単離培養を行なった。現場海水を用いたR2A寒天培地とそれを1/10に希釀したdR2A寒天培地を作成後、海水を孔径0.2 μm のスクレポアフィルターで濾過した海水を用いて1/100の濃度に希釀し、各寒天培地に100μl ずつ接種した。培養温度は5°C(現場温度)と20°Cとした。得られたコロニーは3回以上植え継いで精製した後、フェノール法によりDNAを抽出し、PCR-DGGE法により单一のコロニーであることを確認した。バンド位置の異なるものは塩基配列を決定し、DDBJ 日本DNAデータベース のBLASTにより同定した。得られた株のうち2系統を用いて紫外線照射実験を行なった。石英瓶で培養した2株に対して、人工光源を用いてUVBが0.5 w/m²となるように照射し、その後暗条件で培養を続けて細胞密度をDAPI染色による直接計数法で計測した。

【結果及び考察】

67個のコロニーがえられ、海洋域で優占していると考えられているα-プロテオバクテリア、γ-プロテオバクテリア、フラボバクテリアの3系統のバクテリアが得られた。dR2A 寒天培地からは *Alteromonas* 属, *Pseudalteromonas* 属, *Roseobacter* 属が単離された。これらは貧栄養性従属栄養性細菌であると考えられ、環境中で優占してい

ると考えられている系統に近縁と推測される。

紫外線照射実験を行なった 2 系統の細胞密度は異なる傾向を示した 図 。

Bacillales

は紫外線照射中も細胞密度が増加したが、 γ -プロテオバクテリアに属する *Colwellia* sp. は細胞密度を減少させた。

【まとめ】

本年度は環境中における細菌群集の紫外線に対する影響評価を行うための基礎的研究を中心に行なった。抗原抗体反応を用いた鑄型の選抜により、チミンダイマーの蓄積と細胞分裂の日周変化を検出することができ、全菌数の変化に沿った結果を得ることができた。また、単離培養実験では環境中に存在する主な系統を単離することに成功し、株による紫外線耐性の違いを確認することができた。今後は単離したすべての系統について紫外線耐性を評価する。

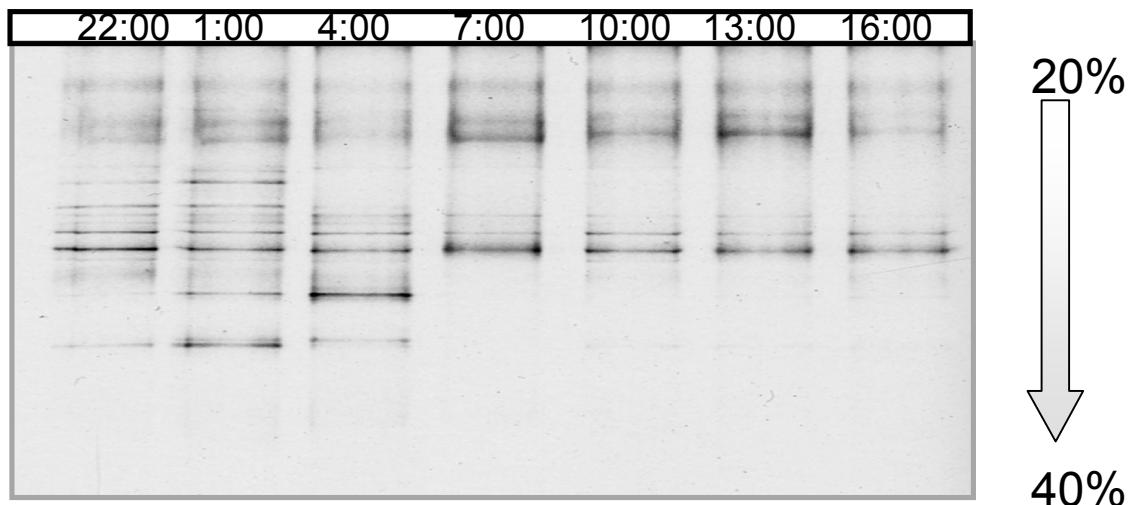


図1 2005年9月A21での真正細菌に共通な領域を用いた3時間毎のDGGE
バンドパターン(2005年9月A21)

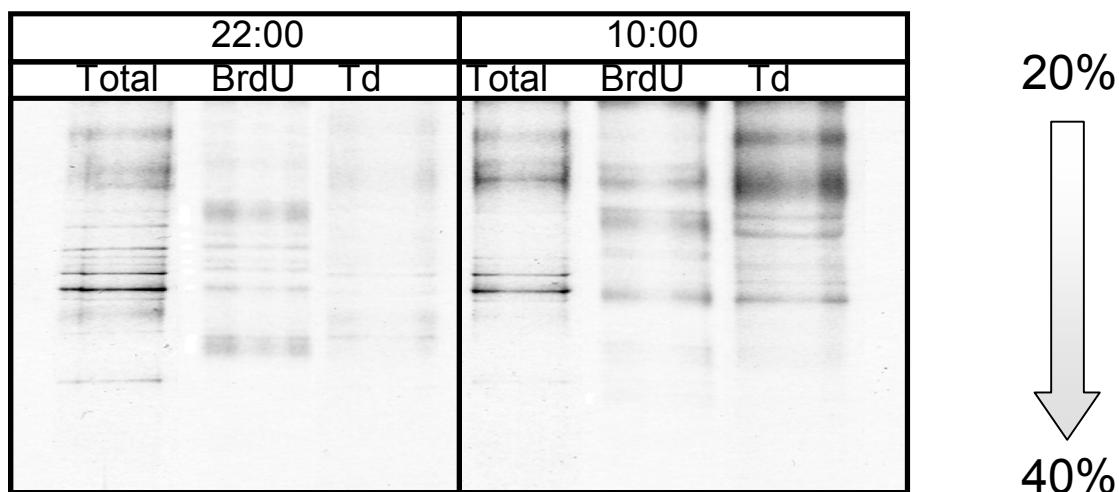


図2 無選抜(Total)と、BrdUとチミンダイマー(Td)を標的に選抜した鑄型を
、真正細菌に共通な領域を用いたDGGEバンドパターン(2005年9月A21)

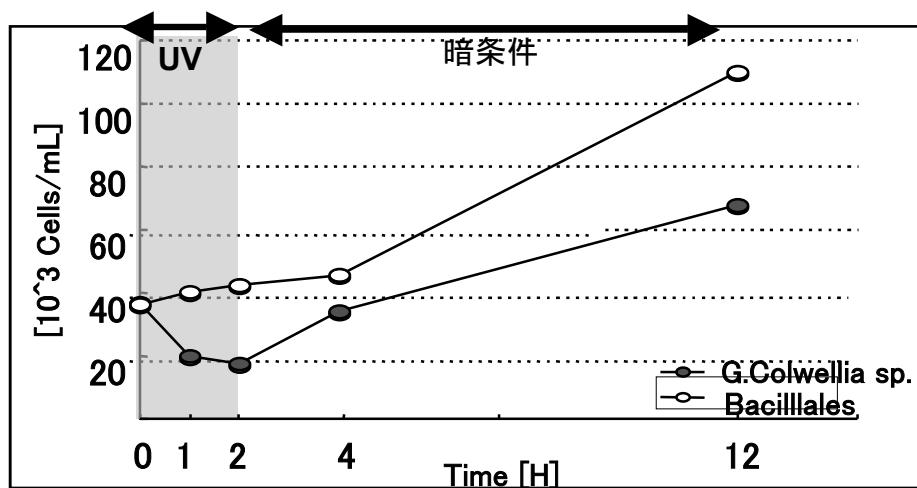


図3 Colwellia sp. (●)とBacillales(○)のUVB暴露下と暗条件下の細胞数の
変化(DAPI染色による直接計数法)