

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。この様な背景には、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。そこで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。これらの結果の一部は、先の中間報告書に記した。そこで本稿では、1) 細菌群集の増殖活性および DNA 損傷量の測定を行い、太陽紫外線が海洋浮遊性細菌群集に与える影響について、2) これら活性測定に 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を試みたので、報告する。

2. 調査地点及び方法

1) 海洋表層における細菌群集の増殖活性と DNA 損傷量の評価

調査は 2003 年 7 月に北太平洋亜寒帯域、通称 A ラインと呼ばれる厚岸沖 (42°05'0.0"N 144°05'0.0"E) より 38°00'0.0"N 147°15'0.0"E までに設置された 21 定点において行った。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用い、プロモデオキシウリジン (BrdU) を添加 (最終濃度 20 μM)、30 分間、暗所で培養を行った。ろ過処理を行ったフィルターからフェノール法により核酸を抽出、RNase 処理を行い、DNA を精製した。DNA 損傷量と BrdU 取り込み量は、Thymine dimer または BrdU に特異的なモノクローナル抗体を用い定量を行った。

2) 現場実験による海洋細菌群集の増殖活性と紫外線の影響の評価

2003 年 7 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°30'0.0"N 145°30'0.0"E) において表層 0m 海水を採水し、これを 1 L の石英ビン (太陽光条件) および紫外領域 (< 400nm)

の波長を吸収するフィルム（PTFE，CI-Kasei Co.）を巻いた石英ビン（紫外線除去条件）に満たし、2日間、調査船の甲板上で培養を行った。培養期間中、サンプルを6時間おきに回収し、DNA 損傷量および BrdU 取り込み速度の測定を行った。

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 月に行った実験サンプルより BrdU および Thymine dimer 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、種ごとの紫外線感受性の評価を試みた。

3. 結果と考察

1) 海洋表層における細菌群集の増殖活性と DNA 損傷量

図 1 に 2003 年 7 月の A ライン観測で測定した、海洋表層(0m)の細菌群集の BrdU 取り込み速度と DNA 損傷量を示した。BrdU 取り込み速度は、沿岸域で高く、外洋で低くなる傾向が見られた。その一方で、DNA 損傷量には一定の傾向が見られず、観測地点により大きく変動した。そこで、BrdU 取り込み速度と DNA 損傷量のデータを用いて相関分析を行ったところ、 $r^2=0.36$ の有意な負の相関関係 ($P < 0.01$) が見られた。この結果は海洋表層における細菌群集増殖速度の変動の 36% が紫外線の影響で説明できることを示唆している。

2) DNA 損傷量の鉛直変化

図 2 に A4 地点で測定を行った、微生物の各サイズフラクションにおける DNA 損傷量の鉛直変化を示した。全てのサイズフラクションにおいて DNA 損傷量は表層で高く、水深と共に指数関数的に減衰した。また、 $0.2-2\mu\text{m}$ のフラクション（従属栄養細菌およびピコ植物プランクトンが含まれる）において最も DNA 損傷量が大きく、全ての水深において全体の 50%以上を占めていた。

3) 海洋細菌群集の増殖活性と DNA 損傷量の経時変化

太陽光条件および紫外線除去条件で行った培養実験の結果、細菌群集の増殖速度と DNA 損傷量は一日の間に大きく変動した（図 3）。紫外線除去条件では、太陽光の変動に関わらず BrdU 取り込み速度および DNA 損傷量はほぼ一定の値を示した。一方、太陽光条件における DNA 損傷量は、紫外線強度が上昇する 8:00 頃から増加し夕方付近で最大となった（図 3-B）。また、夜間に向け DNA 損傷量は減少する傾向が見られるが、これは、紫外線強度の低下に伴い、損傷部位の修復が卓越したためと考えられる。一方、BrdU 取り込み速度は、DNA 損傷量とは逆に、昼間は低下し、夜間に上昇する傾向が見られ（図 3-C）た。この結果からも細菌群集は紫外線の阻害的影響を強く受けていることが示唆された。

4) DGGE 法による活性細菌および DNA 損傷細菌の検出

磁気ビーズを用い、BrdU を多く取り込んだ活性の高い種、DNA 損傷部位が多い種の分離を行い、PCR-DGGE 法によるバンドパターンで出現種の比較を行った

(図4) 全 DNA を用いた PCR-DGGE の結果では、複数のバンドが検出されるが、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 (バンド A, B, C, D) と DNA 損傷量が多い種 (バンド D, E) に分画することが出来た。

4. まとめ

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を評価するに先立ち、基礎データおよび予備的実験を中心に行った。具体的には、主に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、BrdU 取り込み速度や DNA 損傷量の測定により、太陽紫外線が海洋細菌群集に与える影響についての時空間変化を評価することができるようになった。また、これら活性の測定に DGGE 法などの分子生物学的手法を組み合わせることにより、細菌群集における種毎の感受性の評価も可能となった。本稿で示した磁気ビーズを用いた特定 DNA の分離法は、DNA の回収率や非特異的な DNA の除去率の検証など、未だ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. 業績

1) 論文

- Hodoki, Y. (in press) 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. (in press) Bacterial biofilm encourages algal immigration onto substrata in lotic systems. *Hydrobiologia*.

2) 学会発表

- 程木義邦. 藻類の増殖に対する太陽紫外線の影響 - サイズ依存説のみで説明可能か? - . 日本陸水学会新潟大会 (2004 年 9 月).

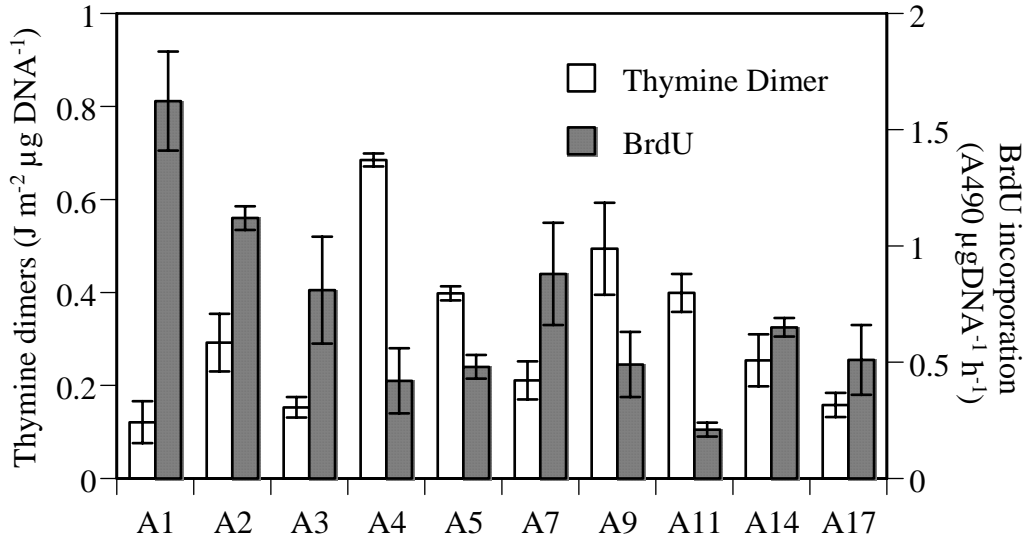


図1．海洋表層における細菌群集の増殖速度とDNA損傷量（2003年7月）。

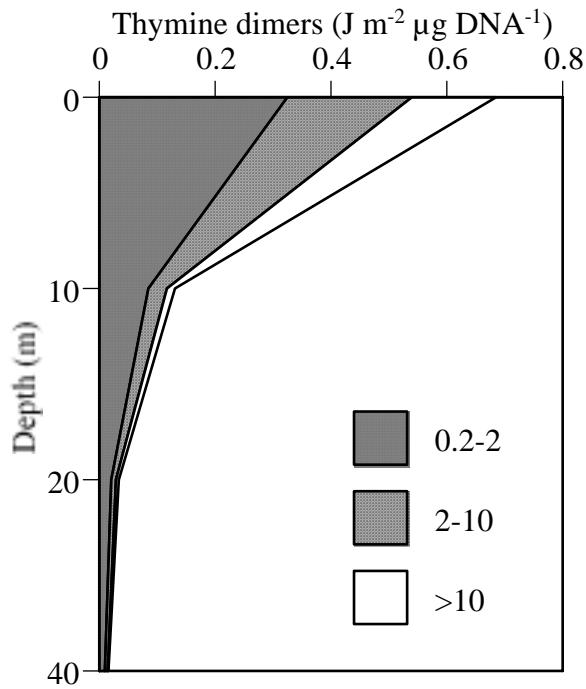


図2．各サイズフラクションにおけるDNA損傷量の鉛直変化（2003年7月）。

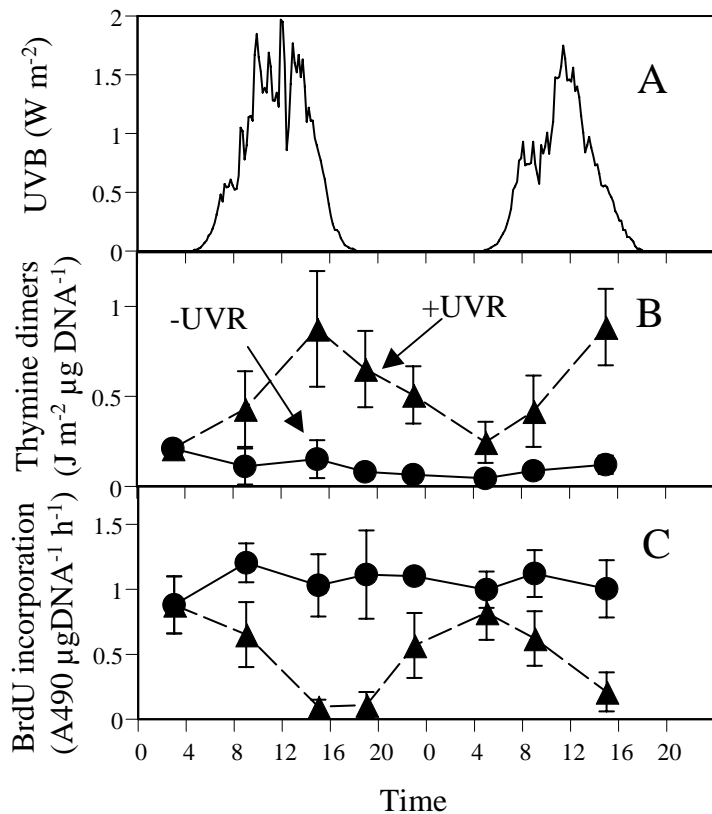


図3. インキュベート実験における太陽UVB強度の変化(A)とDNA損傷量(B)およびBrdU取り込み速度(C)の変化

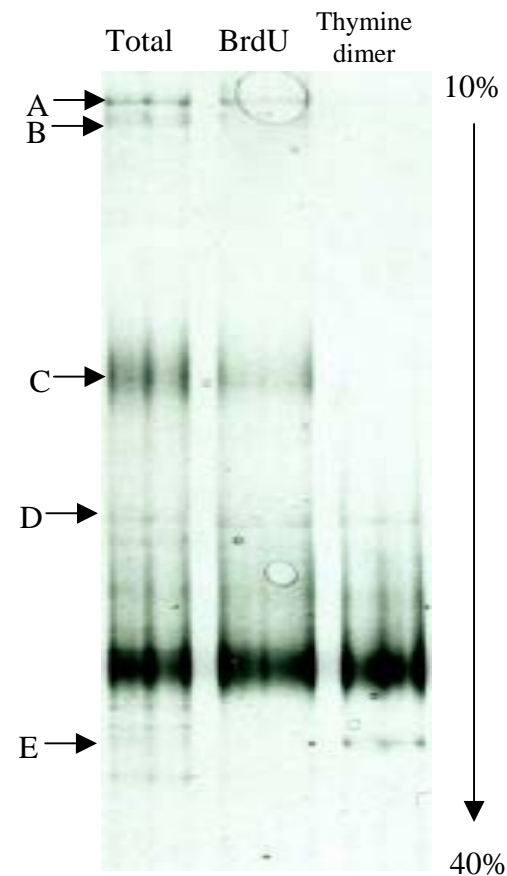


図4. 磁気ビーズを用いた特定DNAの分離前後におけるPCR-DGGE法のバンドパターンの変化(2003年7月, A7地点0m)。