

Effects of solar UV radiation and iron on bacterial community composition in western North Pacific

(西部北太平洋における細菌群集構造に対する太陽光紫外線と鉄の影響)

学位論文内容の要旨

海洋の表層には1mLあたり、約 10^5 から 10^6 細胞の細菌が存在している。外洋域では、これら細菌が占めるバイオマスは、一次生産者である植物プランクトンと同等かそれ以上であり、従属栄養性細菌は海洋生態系の重要な構成要素である。また、溶存態有機物を利用できるため、自身は粒状有機物として原生生物などに被食される連鎖系が存在する。これを、一次生産者に始まり補食と被食の関係を通じてエネルギー段階が上がる生食物連鎖に対し、微生物ループと呼ぶ。海洋において微生物ループを通じて従属栄養性細菌が果たす役割は、溶存態有機物を介した地球規模の炭素循環とつながっているために重要である。

海洋における微生物ループの研究では細菌群集を一つの機能と捉え、細菌群集組成は考慮されなかった。1980年代以降、16S rRNA遺伝子の塩基配列の違いから細菌を系統的に分類する事が可能となることで、海洋中の細菌群集は従来考えられてたよりも多様で、未知であった6系統群を含む9系統群に分類されることが明らかとなった。しかし、細菌群集構造が海域を通じて均一かどうかや、群集構造変化の要因について不明な点が多い。近年では変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法などのフィンガープリンティング法により細菌群集構造を時空間的に解析する事が可能となっている。

本研究では、高栄養塩-クロロフィル(HNLC)海域である西部北太平洋において細菌群集構造をPCR-DGGE法により調査した。また、細菌群集構造が変化する要因としてHNLC海域の要因と考えられている鉄欠乏と成層圏オゾンの減少に伴い増加している紫外線を挙げ、これらが細菌群集構造に及ぼす影響を評価する。

Chapter 1 Tempo-spatial patterns of bacterial phylotype composition in the western North Pacific Ocean

西部北太平洋は、亜熱帯起源の黒潮と北太平洋亜寒帯流起源の親潮が混ざりあい、黒潮親潮移行域を形成している。本海域は時空間的に変動の大きな海域である。過去に、春期ブルーム期を除いて微生物食物網が卓越することが示唆されている。しかし、従属栄養性細菌群集の組成や分布に関する報告は無い。ここでは親潮水、黒潮水、親潮黒潮移行域の間の従属栄養性細菌群集組成を比較調査した。

100 m深の水温と塩分濃度を同時に測定し、定点を親潮域、混合域、黒潮域に分けた。平均細胞密度は 0.2×10^5 cells/mLから 1.4×10^5 cells/mLであり、9月には親潮域で高かったが、他の季節は海域間に差は認められなかった。PCR-DGGE法を用いて群集組成を比較したところ、海域毎に特徴的な組成を示した。DGGEバンドから31型の塩基配列が同定され、 γ -proteobacteriaが22型、 α -proteobacteriaが4型、Cyanobacteriaが2型、

クロロプラストが1型、不明な細菌が2型得られた。耐冷性細菌の*Psychrobacter glacicola*とSAR92が親潮で、 α -proteobacteriaの2種が深層に特徴的であった。本研究により西部北太平洋での細菌群集の種組成が水塊に強く影響を受けていることが示唆された。

Chapter 2 Effects of UV radiation on bacterial community composition

近年、成層圏オゾンが減少することで、生物に有害な紫外線領域(UVB)が増加し、海洋生態系に影響を及ぼすことが懸念されている。一般に、細菌はUVBによりDNAに構造異常(DNA損傷)が形成され易いと考えられており、DNA損傷が蓄積された細菌群集は増殖が阻害されることが知られている。しかし、環境中では、UVBは難分解性の溶存態有機物を従属栄養性細菌が利用可能な低分子に分解するなど、従属栄養性細菌の生存率を増加させる間接的な影響も存在する。

紫外線が細菌群集構造に与える影響を種レベルで評価するには、従来のPCR-DGGE法では限界がある。つまり、ゲノムDNAを標的に16S rDNAをPCRによって増幅する方法は、細菌群集構造を網羅的に解析する点で優れた手法であるが、活性の有無やUVBの影響など環境中での細胞の状態を知る事はできない。本研究では免疫選抜法とPCR-DGGE法を合わせてUVBが細菌群集に与える影響を評価した。調査海域は親潮黒潮移行域とした。

本手法では活性を持つ細菌由来のDNAとUVBにより損傷が蓄積したDNAをそれぞれ分離し、DGGE法によって細菌群集を比較した。DNA損傷を蓄積しない種として*Erythrobacter* sp.を、DNA損傷を蓄積し易い種として*Pseudalteromonas* sp.を検出した。本手法により環境中での細菌群集に対するUVBの影響を評価する事が可能となった。

Chapter 3 Temporal changes in community composition of heterotrophic bacteria during in situ iron enrichment in the western subarctic Pacific (SEEDS-II)

鉄は生物にとって必須の元素である。しかし、外洋域では水溶性の2価鉄は直ちに不溶性の3価鉄に酸化されて沈降するので鉄が欠乏している。北太平洋亜寒帯域、東部赤道域、南極海は、栄養塩は豊富だが、クロロフィル(植物プランクトン)が十分に成育しないHNLC海域であり、この原因は鉄不足によると考えられている。HNLC海域では鉄を添加することで、クロロフィル濃度や従属栄養性細菌の細胞密度の増加が報告されているが、細菌群集組成についての知見は僅少である。本研究では西部北太平洋で行われた鉄散布実験(SEEDS-II)において、鉄散布後の細菌群集組成の変化をPCR-DGGE法によって調査した。2004年7月から8月にかけて北緯48度50分、東経165度00分において、溶存態鉄(FeSO_4)と生物不活性物質の SF_6 を海水中に散布し、 SF_6 をトレーサーとして散布した鉄を含む水塊を追跡した。鉄散布後、2,4,7,10,12,25日後に鉄を含む水塊(鉄パッチ)内から、5,8,11,31,32日後に鉄パッチの外から、5 m 深の海水を採取した。DGGEバンドパターンに基づくクラスター解析により、細菌群集構造は鉄パッチ内外で異なった。DGGEバンドに含まれる塩基配列を同定した結果、*Roseobacter*、*Cytophata-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB)、 γ -proteobacteriaとActinobacteriaが鉄パッチ内に特徴的に現れた。特に*Roseobacter*とCFBの出現が顕著であり、鉄の添加による影響と考えられた。CFBは糸藻菌として知られる*Saprospira*と最も近縁であった。これらの結果からSEEDS-IIにおける鉄の添加に対する従属栄養性細菌の応答は系統型毎に異なることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	東	正剛
副査	教授	岩熊	敏夫
副査	教授	森川	正章
副査	教授	福井	学
副査	准教授	鈴木	光次

学位論文題名

Effects of solar UV radiation and iron on bacterial community composition in western North Pacific

(西部北太平洋における細菌群集構造に対する太陽光紫外線と鉄の影響)

南極周辺海域におけるナンキョクオキアミの激減に代表されるように、地球環境の変動とともに海洋における生産力の異変が指摘されるようになってきた。その主な原因を地球温暖化にもとめる研究は数多くなされているが、ナンキョクオキアミの激減は南極オゾンホールが発生・拡大の時期とも同調しており、オゾン層破壊に伴う紫外線の増加が海洋における生産力の異変に関わっている可能性も否定できない。申請者は、特に外洋域における物質循環に深く関わっている微生物ループの中で最も重要な役割を果たしている細菌類の紫外線耐性が低いことに着目し、本研究を立ち上げた。また、申請者は、海洋への鉄散布が生産力に及ぼす影響を探る研究プロジェクト SEEDS-II に参加する機会を得、鉄散布が海洋細菌群集に及ぼす影響の解明を担当している。本論文はこれらの研究成果をまとめたものである。

申請者は、まず、北海道・厚岸沖の A ラインにおける細菌群集構造を解析している。PCR-DGGE 法により 61 本のバンドを判別し、調査地点間のバンド組成類似度からクラスター解析を行い、黒潮域と親潮域は異なるクラスターを形成すること、親潮域は主にクロロフィル量に規定され、黒潮域は水温と塩分濃度に規定されることなどを明らかにしている。また、これら 61 バンドのうち 41 バンドで 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列判読に成功し、これまでに行われた海洋細菌群集研究結果に比べて α プロテオバクテリアと CFB の種数が少なく、 γ プロテオバクテリアの割合が多いこと、遺伝子型 ALN_gm17, 18 や ALN_gm11, 12 などのように親潮特異的遺伝子型がいくつか見られるのに対し、

黒潮特異的遺伝子型は少ないこと、既報のバクテリアとの相同性が97%以下で、新種と見られるバクテリアが6種含まれることなどを明らかにした。

A ライン調査では、細菌群集構造解析と並行して紫外線耐性の種間比較を行っている。まず、UV-B 量が最も多い時間帯に海表面水から採取した DNA より、免疫学的方法でチミンダイマーを含む DNA を抽出した。また、採水直後に BrdU を添加して 1 時間放置した海表面水から採取した DNA より、免疫学的方法で BrdU を含む DNA (細胞分裂時に複製された DNA) を抽出した。これら 2 種類の DNA と無処理の DNA (コントロール) を DGGE 法によって同時に電気泳動し、1) チミンダイマーのみを含むバンド (紫外線感受性型バクテリア)、2) BrdU のみを含むバンド (紫外線耐性型バクテリア)、3) チミンダイマーと BrdU の両方を含むバンド (中間型バクテリア) の 3 種類に分け、各バンドの 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列より、ファイロタイプを判定した。その結果、紫外線感受性型として *Erythrobacter* sp.、紫外線耐性型として *Pseudoalteromonas* sp.、中間型として *Roseobacter* sp. が同定され、紫外線への感受性や耐性は種によって大きな差があることを明らかにした。これまで医学の分野で利用されてきた紫外線損傷 DNA 量評価法を PCR-DGGE 法と組み合わせる生態学分野に応用したのは本研究が初めてであり、研究の結果だけでなく、研究方法にも独創性を認めうる。

カムチャッカ半島沖で行われた SEEDS-II では、鉄散布時から鉄パッチの内と外で交互に表層水を採水し、DGGE 法によって菌群集組成を明らかにした。鉄パッチ内 6 回、鉄パッチ外 5 回の調査により、調査あたり 10~20、計 46 のバンドを得てクラスター解析を行ったところ、鉄パッチ内グループと鉄パッチ外グループにほぼ 2 分され、鉄散布が細菌群集組成に大きな影響を及ぼしたことが示された。さらに、35 バンドで 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列判読に成功し、A ラインでの調査結果と異なり、 α プロテオバクテリアと CFB が優占し、 γ プロテオバクテリアが比較的少ないことを明らかにしている。鉄パッチ内を特徴付けるバクテリアは *Roseobacter* sp. や *Saprospira* sp. などであったが、例えば *Saprospira* sp. は利藻菌の一種とされており、鉄散布の直接的影響よりも、植物プランクトンの増加がこれらの細菌類の増加を促した可能性が高い。鉄散布によってまずクロロフィル量が増え、その後に細菌類が増えることは SEEDS-II における他の研究でも示唆されており、鉄散布による細菌群集組成の変化は鉄の直接的な効果よりも植物プランクトンの増加に伴う間接的な効果に大きく依存することが本研究によって示された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせて、申請者が博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。