

年間特集「空」：報 文

大気中を風送される細菌叢の 16S rDNA-クローンライブラリー解析

牧 輝 弥^{®1}, 福島 理英¹, 小林 史尚¹, 山田 丸², 長谷川 浩¹, 岩坂 泰信³

近年、黄砂や汚染大気と挙動をともにするカビや細菌（黄砂バイオエアロゾル）にも強い関心が寄せられ、そのヒト健康や環境生態系への影響が危惧される。しかし、大気に含まれる微生物群を定性定量する十分な分析手法は確立されておらず、大気中での微生物の動態には不明な点が多い。本研究では、大型の黄砂が見られた2011年5月上旬に、石川県金沢大学のテラス（高度10 m）において、大気試料を採取し、16S rDNAクローン解析によって細菌種組成を調べ、蛍光顕微鏡観察を用いた直接計数法によって細菌細胞濃度を定量した。黄砂現象中盤では、*Bacillus* 属の細菌種が優占し、黄砂発生地（タクラマカン砂漠）で検出された種と近縁になった。黄砂初期と終盤には、海洋に生息する細菌種が多く検出され、黄砂と混合した日本海の海水に起因すると推察できる。蛍光顕微鏡観察での計数では、細菌細胞濃度は黄砂時に100倍に増え、特に、黄砂発生時には海洋由来のグラム陰性細菌も風送され、全細菌数の40%を占めることが分かった。

1 緒言・目的

中国大陸北部の乾燥地帯で大気中へ巻き上がった鉱物粒子は、東アジア一円に風送され、黄砂粒子となり黄砂現象を引き起こす¹⁾。黄砂粒子は、微生物を伴った状態で大気中を移送拡散することがあるため、「微生物の箱舟」といわれ、ヒト健康や微生物生態系へ影響を及ぼす可能性が危惧される²⁾³⁾。こうした細菌、カビ、花粉などの生物に由来するエアロゾルは、「バイオエアロゾル (bioaerosol)」と呼ばれ⁴⁾、黄砂とともに風送されるバイオエアロゾルは「黄砂バイオエアロゾル」となる²⁾³⁾。バイオエアロゾルからは、ヒト疾病や動植物病害にかかわる病原菌種と同種の菌が多く分離検出されてきた⁵⁾。実際、動物実験レベルでは、黄砂粒子に付着した微生物が、黄砂粒子に起因するアレルギー疾患を増悪させることが実証されており、ヒト健康にも悪影響を及ぼす可能性も十分ある⁶⁾。一方、動植物の生長を補助あるいは促進させる有用微生物も含み、その生理生態に及ぼす影響は多岐にわたる²⁾。

これまで、黄砂発生源である中国大陸の乾燥地帯（敦煌市⁷⁾）及び黄砂現象が見られた能登半島（珠洲市⁸⁾）の上空において、鉱物粒子を捕集し、その鉱物粒子から多数の微生物株が分離されてきた。さらに、両地点の上空で耐塩性の *Bacillus* 属の細菌群が生存したまま浮遊していることが明

らかになり、黄砂による微生物の長距離輸送が示唆される⁹⁾¹⁰⁾。黄砂沈着地であるアジア各地では、黄砂粒子の飛来とともに、大気中の微生物バイオマスが増える現象が認められ¹¹⁾、バイオエアロゾルがアジア一円へ拡散することも実証されつつある。

本研究では、黄砂現象時におけるバイオエアロゾルの細菌種組成の動態を明らかにするため、黄砂現象が見られた2011年5月1日から5月7日にかけて、金沢大学の建物5階（高度10 m）でエアロゾルを捕集し、16S ribosomal RNA 遺伝子（16S rDNA）を標的としたクローン解析を施行した。また、DAPI染色を用いた蛍光顕微鏡観察も併用し、大気中の細菌細胞濃度を求め、細菌数の変化を測定した。

2 方 法

2・1 調 査

黄砂が観測された2011年5月1日から7日の間（このうち黄砂イベントは5月1日から5月4日）、石川県金沢大学の自然科学研究科1号館（36.6°N, 136.7°E）5階のテラス（地表から10 m）において、エアロゾルを、孔径0.22 μmのポリカーボネート製フィルター（アイソポア：MERCK製、東京、日本）上にエアポンプを用いて吸引捕集した。朝と夕方にフィルターを交換し、約12時間間隔で連続してサンプリングすることで、合計12試料を得た。5月1日のみ1時間に0～1 mm程度の降雨が観測されたが、その後のサンプリングでは降雨は観測されなかった。また、風速は、5月1日に10～15 m s⁻¹の風速があったものの、他日は10 m s⁻¹を越える風速はなく、風は穏やかで

[®] E-mail: makiteru@t.kanazawa-u.ac.jp

¹ 金沢大学理工研究域物質化学系: 920-1192 石川県金沢市角間町

² 独立行政法人労働安全衛生総合研究所: 214-8585 神奈川県川崎市多摩区長尾 6-21-1

³ 滋賀県立大学: 522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500

あった。エアロゾルを捕集したフィルターを、ゲノム DNA の抽出に使用するまで -30°C で 1 週間から 2 週間保存した。

2・2 16S rDNA を標的としたクローン・ライブラリーの構築

エアロゾル粒子懸濁液の 1 mL に、 100 g L^{-1} ドデシル硫酸ナトリウム溶液、及びタンパク質分解酵素溶液 (10 g L^{-1} lysozyme 溶液及び 1 g L^{-1} proteinase k 溶液) をそれぞれ 120 μL 加え、緩やかに攪拌し、 50°C で 30 分間保温することで、微生物細胞を溶解させた。試料に含まれるゲノム DNA を、フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって精製した。次に、得られたゲノム DNA を鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によって 16S rRNA 遺伝子を増幅するため、抽出したゲノム DNA 1.0 μL ($100\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$)、 $10\times$ buffer (TaKaRa 製、大津、日本) 1.0 μL 、dNTP 0.8 μL 、核酸プライマー 27F 及び 1492R ($2\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$) 各 1.5 μL ずつ及び Taq polymerase (TaKaRa 製、大津、日本) 0.1 μL を加え、滅菌水で全量 10 μL に調整した。プライマー 27F 及び 1492R は、細菌全般の 16S rDNA を認識し、それぞれの配列は、5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' 及び 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' である¹²⁾。混合液を含むマイクロチューブを、PCR 用の核酸増幅装置 PCR プログラムテンプレートコントロールシステム PC-700 (ASTEC 製、福岡、日本) に設置し、16S rDNA を増幅した。反応条件は、 94°C 5 分間でゲノム DNA を変性させた後、 94°C で 1 分間、 55°C で 2 分間、 72°C で 2 分間の反応を 30 回繰り返す、 72°C 10 分間反応させた後、 4°C で保存した。得られた PCR 産物を、低融点アガロースゲル上に電気泳動した後、エチジウムブロマイドを用いて染色し、254 nm UV 励起で PCR 増幅産物のバンドをゲル上で確認した。検出されたゲル状のバンドを切り出した後、PCR 増幅産物を精製した。

精製した PCR 産物 1.0 μL を、ベクタープラスミド (Life Technologies 製、CA, USA) 1.0 μL 、生理食塩水 1.0 μL 及び滅菌超純水 3.0 μL と混合し、室温で 30 分間反応させ、PCR 産物をプラスミドに組み込んだ。プラスミドの混合溶液を、コンピタントセル (遺伝子組み換え用の大腸菌) 50 μL と穏やかに混合した後、氷上にて 30 分間保冷し、温度 42°C で正確に 30 秒間保温することで、大腸菌にプラスミドを取り込ませた。さらに、大腸菌の混合液に、賦活用細菌培地を 200 μL 加えた後、温度 37°C 、200 rpm で 1 時間振とう培養した。培養した混合液を、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド溶液とイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド溶液を塗抹した Lysogeny Broth (LB) 寒天培地上 (アンピシリン含有) に塗抹し、 37°C で 18 時間静置培養した。寒天培地上から、16S rDNA

を組み込まれたコロニー (白コロニー) を爪楊枝で掻き取り、LB 液体培地に接種し、 37°C で 12 時間振とう培養した。培養 1 mL を、 $20000\times g$ 、10 分間、 4°C で遠心し、大腸菌細胞を集菌した。次に、プラスミド抽出キット (Promega 製、Wisconsin, USA) を用いて大腸菌に含まれるプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA に含まれる 16S rDNA の核酸塩基配列を、Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Life Technologies 製、CA, USA) を用いて決定した。シーケンス primer として M13R を使い、その配列は 5'-TGT AAA ACG ACG GCC-3' である。決定した塩基配列を DDBJ データベース (DNA Data Bank of Japan) 上の既知配列と BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムを用いて比較し、細菌の種組成を解析した。また、クローンライブラリーが試料に含まれる細菌種を網羅する程度を示す指標である coverage を計算した。coverage の計算式は、 $(1-n/N)\times 100$ であり、 n は一回のみ検出されたクローンの個数を示し、 N は全クローン数である¹³⁾。優占して見られる核酸塩基配列については、TreeViewPPC を用いた近隣結合法によって、近縁の細菌種の配列を含む系統樹を作成した¹⁴⁾。

2・3 エアロゾル試料中の粒子成分の測定

フィルターホルダー (ポリプロピレン製 13 mm フィルターホルダースウィネクス: MERCK 製、東京、日本) に取り付けられた孔径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のポリカーボネート製フィルター上にエアロゾルを、エアポンプを用いて吸引捕集した⁵⁾。捕集した後、フィルターホルダーの吸引口から、ホルムアルデヒド溶液 (濃度 1%) を注ぎ、フィルターの捕集面と溶液を接触させ、エアロゾル試料を 1 時間固定した。ホルムアルデヒド溶液を吸引通過した後、4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) 溶液 ($0.05\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) を注ぎ、フィルターと接触させ染色した¹⁵⁾。DAPI 溶液を通過して除き、染色したフィルターをフィルターホルダーから外し、蛍光顕微鏡観察用のイメージンオイルを滴下したスライドガラス上に置き、さらにオイルを上から滴下した後、カバーガラスを被せプレパラートを作製した。プレパラートを落射型蛍光顕微鏡にセットし、波長 340 nm の紫外線によって励起させながら、試料中の蛍光粒子を観察した。

一般的に、黄砂粒子において直径 $5.0\text{ }\mu\text{m}$ 以上のサイズ粒子の含有率が高く、黄砂粒子は DAPI で染色すると薄い青色の蛍光を発生し、蛍光顕微鏡下で観察できる¹⁰⁾¹⁶⁾。また、DAPI によって細菌細胞に含まれる DNA が染色され、細菌細胞全体が強い青色の蛍光を発生する。そこで、細菌細胞粒子を数えた。計数するにあたり、接眼レンズに 10×10 の方眼接眼マイクロメーターを入れて、10 視野の粒子を計数し、格子の面積をもとにフィルター上の総粒子数を求めた

後, その総粒子数を沓過試水量 (0.5 mL) で割り, 大気中に含まれる細菌細胞濃度 (particles m^{-3}) を求めた. なお, 細菌細胞は, 大型粒子に付着した状態と単体の状態で観察された. 付着した細菌細胞については, 大型粒子の裏側にも同程度の細菌細胞が存在すると考え, 計数値を 2 倍にした.

3 結 果

3.1 大気バイオエアロゾルの細菌種組成

黄砂が観測された 2011 年 5 月 9 日から 11 日の間, 金沢大学の建物 5 階 (高度 10 m) において, エアロゾル試料を採取し, 合計 12 試料を得た. エアロゾル試料からゲノム DNA を抽出し, 16S rDNA クローンライブラリーを作成した. その結果, 12 試料ごとに, それぞれ 30 クローン以上を分析し, 合計で 411 クローンの核酸塩基配列を決定した. 各試料のクローンライブラリーの coverage は, 80 % から 93 % の範囲になり, 試料に含まれる細菌種の多くを網羅していることを示す高い値となった. クローンライブラリーの核酸塩基配列の大部分は, *Cyanobacteria* 門, *Proteobacteria* 門及び *Firmicutes* 門に属し (Table 1), その種組成は経時的に変動した (Fig. 1).

Cyanobacteria 門に属す核酸塩基配列は, すべてのエアロゾル試料から検出され, 各試料において全クローン数の 3 % から 70 % の割合を占め, 調査期間を通じて大きく変動した (Fig. 1). 特に黄砂発生初期に採取した試料 1 から 3 において, 全クローン数の 53 % 以上が *Cyanobacteria* 門に属し, その 90 % 以上が *Shynechococcus* sp. と 95 % 以上の相同性で近縁となり, 優占した (Table 1). クローンの核酸塩基配列と *Shynechococcus* sp. に近縁な既知配列を用いて, 系統樹を作成したところ, 淡水と海水由来の *Shynechococcus* sp. で形成されるクラスターの間で, 全 12 試料から得られたクローン (Kzp1-1, 2-11, 3-1, 20, 4-25, 5-27, 6-20, 7-5, 8-15, 9-24, 10-30, 12-9) が, 単独のクラスターを成した (Fig. 2). 一方, 黄砂飛来時中盤に検出された配列 (Kzp3-6, 3-16, 6-29) は, *Shynechococcus* sp. と 99.9 % の相同性で近縁となり (Table 1), 海洋由来の *Shynechococcus* sp. のクラスターに属した.

Proteobacteria 門に属す核酸塩基配列は, 観測期間を通じて検出され, 特に, 黄砂収束時に採取された試料 5, 7 及び 9 から比較的多く検出され, *Alpha proteobacterium* に属し, それぞれ各試料の全クローン数の 23 %, 38 % 及び 48 % を占めた (Fig. 1). *Alpha proteobacterium* の配列は, 系統樹上で *Alpha proteobacterium* SCGC AAA series 及び *Sphingomonas* 属に属す 2 タイプに大別された (Fig. 3). *Alpha proteobacterium* SCGC AAA series は, 海洋から多く検出される細菌群であり, 黄砂発生時に見られたクローン Kzp2-23, 3-3, 4-20 と黄砂収束時に見られたクローン Kzp8-27, 9-14, 10-7 をク

ラスターに含んだ. 特に, 黄砂収束時の試料 9 の全クローンの 37 % は, SCGC AAA series に属し, 外洋で生息する SAR11 グループや深海で採取された細菌群の配列と 95.2 % から 98.7 % の相同性で近縁となった (Table 1). ただし, 同種と判断できる基準値 (99.7 %) よりも, 相同性が低いため, 新種の細菌であると見させる.

Firmicutes 門に属す核酸塩基配列は, 観測期間全体を通じて, 試料ごとの全クローン数に対する割合は 3.4 % から 87 % の範囲となり, 経時的に大きく変動した (Fig. 1). *Firmicutes* 門に属すクローンは, 系統樹上において, 主に *Bacillus subtilis* group, *B. pumilus* group, *B. megaterium* group 及び *Staphylococcus* 属の 4 グループに大別された (Fig. 4). 黄砂発生時の試料から検出されたクローン Kzp-2-5, 4-6 及び 9-16 は, *B. subtilis* と 99.7 % 以上の相同性で一致し, 同種であると判断できる (Table 1, Fig. 4). また, 黄砂発生時に見られたクローン Kzp-6-32, 6-42 及び 8-33 は, *B. pumilus* と 99.7 % 以上の相同性を示し, 同種となった. *B. subtilis* と *B. pumilus* の核酸塩基配列は, 黄砂期間の夜に採取した試料 4, 6 及び 8 で多く見られ, それぞれの全クローン数の 33 %, 51 % 及び 58 % を占め, 黄砂時期にのみ特異的に検出された (Fig. 1). 一方, 黄砂発生時及び収束時の試料から検出されたクローン Kzp-5-8, 5-20, 12-5, 12-28, 12-18, 12-10, 11-9, 11-19, 7-43, 11-27 は, *B. megaterium* と 99.6 % から 100 % の相同性を示し, 近縁となった (Table 1, Fig. 4). *B. megaterium* のクローンの割合は, 黄砂発生時の日中に得られた試料 5 及び 7 では, それぞれ 53 % 及び 24 % となり, 黄砂収束時に採取した試料 10, 11 及び 12 ではそれぞれ 48 %, 87 % 及び 86 % と高くなった (Fig. 1). 黄砂飛来時の日中は, 放射熱による地上大気の舞い上がりが大きく, 黄砂収束時は, 大気中よりも地上からの粒子の供給が増える傾向にある. したがって, *B. megaterium* は地上からの舞い上がり起因する可能性が高い.

3.2 大気バイオエアロゾルの細胞密度

全 12 試料に含まれるエアロゾル粒子を DAPI 染色した後, 蛍光顕微鏡下で観察したところ, 細菌細胞粒子は濃い青色の小粒子として見られ, 鉱物粒子である白色 (水色) の大粒子, あるいは有機物粒子である黄色粒子と区別して検出された (Fig. 5). さらに, 細菌細胞数を計数した結果, 大気中の細菌細胞密度は 5 月 1 日の昼から夜にかけて 1.62×10^5 particles m^{-3} から 1.72×10^7 particles m^{-3} にまで 100 倍に増大し, 5 月 3 日の夜まで 10^7 particles m^{-3} のオーダーで推移した (Fig. 6). 5 月 4 日の昼には, 6.37×10^5 particles m^{-3} まで 1 度減少した後, 5 月 4 日の夜に 3.34×10^7 particles m^{-3} まで再度増え, 黄砂の収束とともに 5 月 5 日の昼には減少し, 10^5 particles m^{-3} オーダーを観測終了時まで維持した. また, 5 月 1 日の日中には降水

Table 1 Phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene sequences obtained from clone libraries

Numbers of clones	Sampling period ^{a)}	Category	Closest relative	Length/ bp	Similarity/ % ^{b)}
1	1	<i>Acidobacteria</i>	Acidobacteriaceae bacterium	597	89.6
4	1,2,12	<i>Actinobacteria</i>	Actinobacterium SCGC AAA015-N09	624	95.2
55	1,2,3,4,6,7,8,9,10,11	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	697	95.1
41	1,2,3,4,5,6,8,9,10,11,12		<i>Synechococcus</i> sp. CC9902	674	99.3
5	3,6		<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	698	99.4
5	1,2,7		<i>Synechococcus</i> sp. MH305	454	92.0
4	1,7,10		<i>Synechococcus</i> sp. CC9311	445	97.7
1	7		<i>Synechococcus</i> sp. WH 8017	598	82.9
1	4		<i>Synechococcus</i> sp. CC9908	649	99.8
1	4		<i>Synechococcus</i> sp. CC9907	609	99.3
1	4		Cyanobacterium MS-M-7	595	93.3
80	2,4,5,7,10,11,12	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	698	100
49	6,8		<i>Bacillus</i> sp. 4115	595	99.8
16	6,8		<i>Bacillus pumilus</i>	594	99.8
13	1,2,4,6,8,9,10		<i>Bacillus subtilis</i>	691	100
8	11,12		<i>Bacillus</i> sp. A2095	601	99.8
8	7		<i>Bacillus</i> sp. 1127	600	99.8
4	2,3		<i>Bacillus cereus</i>	713	100
2	5,7		<i>Bacillus</i> sp. SoA2	613	100
2	4		<i>Bacillus</i> sp. ET	587	79.1
2	7		<i>Bacillus</i> sp. 6014	600	99.3
2	6		<i>Bacillus</i> sp. 4042	596	99.8
2	6,8		<i>Staphylococcus hominis</i>	696	99.9
1	6		<i>Staphylococcus</i> sp. SRC DSF7	524	100
1	5		<i>Bacillus</i> sp. KR076	621	99.8
1	2		<i>Bacillus</i> sp. Asd2	716	100
1	6		<i>Lepilemur dorsalis</i>	545	99.6
11	1,4,9	<i>Eukaryota</i>	<i>Quercus nigra</i>	544	98.7
7	2,3,4,5		<i>Alnus incana</i> chloroplast	694	99.7
3	2,6,7		<i>Pinus caribaea</i> chloroplast	457	97.8
3	7		<i>Pinus pinaster</i> chloroplast	598	100
2	7,8		<i>Pinus merkusii</i> chloroplast	603	100
1	12		<i>Pinus yecorensis</i> chloroplast	599	100
1	7		<i>Pinus brutia</i> chloroplast	722	99.9
1	6		<i>Pinus arizonica</i> chloroplast	567	99.8
1	6		<i>Ostreococcus tauri</i> chloroplast	329	92.4
1	3		<i>Micromonas</i> sp. RCC299 chloroplast	717	99.3
18	5,7,11	<i>Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. SKJH-30	620	99.8
13	2,4,9		Candidatus Pelagibacter ubique	689	98.7
5	2,4,8,9		Alpha proteobacterium SCGC AAA001-C06	631	95.2
5	1,3,10		Alpha proteobacterium SCGC AAA288-E22	713	97.1
4	7,11		<i>Sphingomonas wittichii</i>	483	99.8
2	6		<i>Microbulbifer</i> sp. Y226	717	99.3
2	4		<i>Escherichia coli</i>	740	99.9
1	5		<i>Sphingomonas</i> sp. DCY44	622	98.7
1	1		<i>Sneathiella chinensis</i>	696	89.4
1	7		Rhizobiales bacterium CCBAU 25323	620	89.7
1	3		<i>Neisseria animaloris</i>	357	99.6
1	5		<i>Herbaspirillum</i> sp. SUEMI08	622	99.5
1	5		<i>Cupriavidus pauculus</i>	691	98.6
1	7		Bacterium SH1-7	591	90.9
1	6		<i>Alteromonas macleodii</i>	536	92.5
1	1		<i>Acinetobacter</i> sp. JH250-8	624	95.2
4	9	no rank	Bacterium WHC5-1	600	99.5
3	7,10		Bacterium SH1-7	525	90.1
1	4		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	593	94.8
1	3		Micromonosporaceae bacterium YIM 65646	357	99.6
1	7		Bacterium 2-3	616	99.5
1	4		Endophytic bacterium sh291	710	95.5

a) Numbering of the sampling periods is referred as the numbers in Fig. 1. b) Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

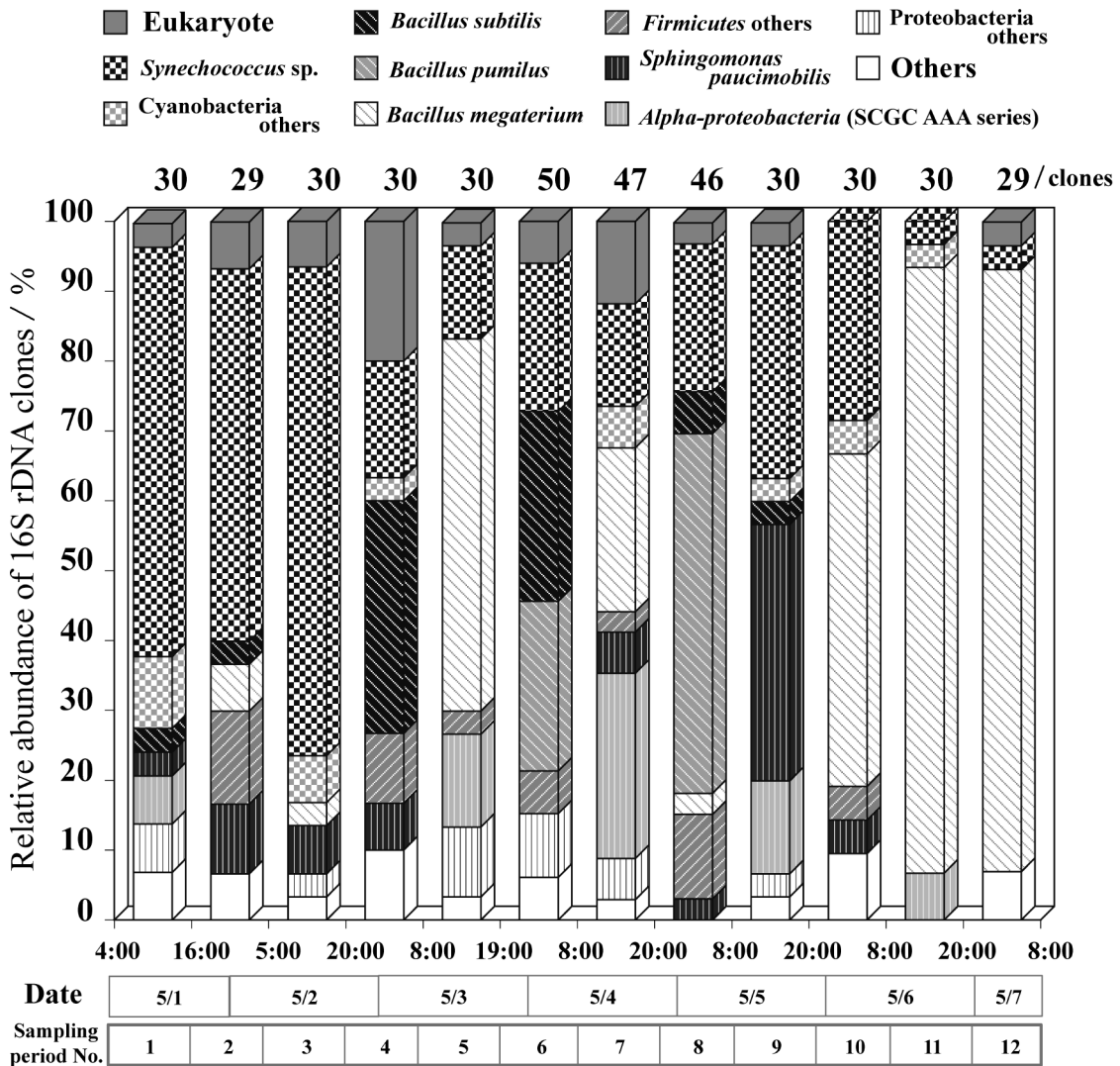


Fig. 1 Change in the compositions of partial sequences of 16S rDNA clones (ca. 400 bp) obtained from bioaerosol samples collected at 10 m altitude in Kanazawa City from May 1 to May 7

があったため、大気中の粒子が湿性沈着し、粒子数がいったん減少した後、黄砂の飛来とともに粒子が増大したとみなせる。さらに、クローン解析の結果をもとに、全細菌数におけるグラム陽性細菌とグラム陰性細菌の割合を求め、それぞれの細菌細胞密度の変化も示した (Fig. 6)。その結果、両細菌の細胞濃度は、黄砂発生時には、全細菌数と同様の変動を示したものの、黄砂収束時にはグラム陽性細菌の方がグラム陰性よりも高くなった。特に、5月7日では、グラム陽性細菌の細胞濃度はグラム陰性細菌の100倍以上になった。

4 考 察

黄砂の飛来とともに大気中のエアロゾル粒子全般が増大し、同調してバイオエアロゾル粒子の量も増える¹¹⁾。中国では黄砂が発生すると、大気に含まれる微生物の種組成が変動し、特に *Firmicutes* 属に属する細菌群の割合が増えるこ

とが報告されている¹⁷⁾。本研究は、大気中の細菌群のクローン解析法を駆使して、黄砂が飛来した金沢市の大気における細菌叢の動態を調査した。黄砂発生を含む観測期間 (2011年5月9日から11日) では、大気中の細菌種組成は、主に *Cyanobacteria* 門、*Proteobacteria* 門及び *Firmicutes* 門に属す種で構成されていた (Table 1)、黄砂飛来の経過とともに経時的に変動した (Fig. 1)。なお、各試料から得られたクローンライブラリーの coverage は、80% から93% と高い値となり¹³⁾、今回、解析したクローン数で、各試料に含まれる優占種の種組成を把握できると見なせる。

Cyanobacteria 門に属すクローンの大部分は、*Shynechococcus* sp. と近縁となり、互いに高い相同性を示した (Table 1)。*Shynechococcus* は、海洋に多く生息する藍藻であり、黄海、日本海及び地中海などの世界中の海域から分離されてきた¹⁸⁾¹⁹⁾。一方、淡水に生息する *Shynechococcus* も分離され、海洋と淡水の種では異なるクラスターを形成する。今回、

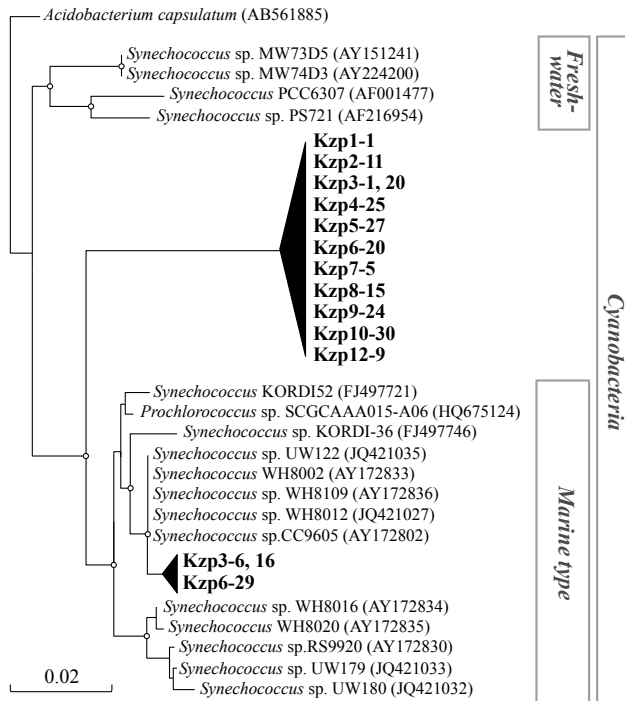


Fig. 2 Phylogenetic tree including partial sequences of 16S rDNA amplicons obtained from clone libraries (Kzp series) of bioaerosol samples collected in Kanazawa City, and known members of *Cyanobacteria*. The phylogenetic tree was calculated from a dissimilarity matrix of an approximately 330-bp alignment (*Escherichia coli* numbering 153 to 482) using a neighbor-joining algorithm. The sample information and the accession number of each reference sequence are given in parentheses. Open circles at branch points indicate that bootstrap values obtained by neighbor-joining analysis exceeded 50 % (after 1000 resamplings).

黄砂のエアロゾル試料から得られたクローンの大部分は、海洋と淡水のクラスターに属さず、単独のクラスターを形成した (Fig. 2)。新奇の *Shynechococcus* が黄砂とともに風送されていたと考えられる。一方、海洋に生息する *Shynechococcus* のクラスターに属するクローンも得られた。世界中の海洋に生息する *Shynechococcus* の 16r DNA の核酸塩基配列を地域別に比較したところ、その地域特異性は低いと考えられている²⁰⁾。 *Shynechococcus* を含む藍藻は、酸化ストレスに耐性があり、通常の微生物では生存に適さない悪環境でも生き抜くことが知られている²¹⁾。したがって、 *Shynechococcus* は、大気中の乾燥に耐え、風送されていると十分考えられる。中国大陸から日本海に入り込んだ黄砂を含む大気は、乾燥しており、日本海を通過する際に多くの海水を巻き上げ、含有する¹⁾。そのため、日本に飛来した黄砂は、降水をとまないと、海洋に生息する *Cyanobacteria* 門の微生物群を多く含んでいたと推察できる。

Cyanobacteria 門の種は、黄砂発生初期に多く見られたのに

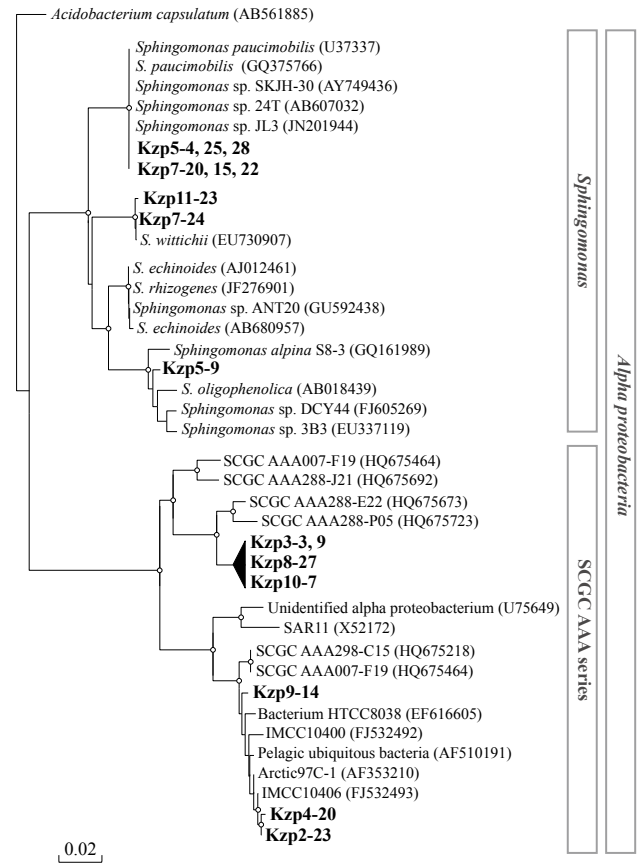


Fig. 3 Phylogenetic tree including partial sequences of 16S rDNA amplicons obtained from clone libraries (Kzp series) obtained from bioaerosol samples collected in Kanazawa City, and the known members of *Alpha-proteobacteria*. The phylogenetic tree was calculated from a dissimilarity matrix of an approximately 330-bp alignment (*Escherichia coli* numbering 153 to 482) using a neighbor-joining algorithm. The sample information and the accession number of each reference sequence are given in parentheses. Open circles at branch points indicate that bootstrap values obtained by neighbor-joining analysis exceeded 50 % (after 1000 resamplings).

対し、 *Alpha proteobacterium* SCGC AAA series 及び *Shingomonas* 属に属すクローンは、黄砂の収束時に多く検出され、試料 7 及び 9 ではクローン全体のそれぞれ 33 % 及び 50 % を占めた (Fig. 1)。 *Alpha proteobacterium* SCGC AAA series は、外洋で生息する SAR11 グループの細菌群も含み、日本海からも近縁種が検出されている²²⁾²³⁾。また、 *Alpha proteobacteria* 門に属す細菌群は、シベリアや北極など寒冷地の土壌において優占種となることがあり、特に、黄砂収束時期に検出された *Shingomonas* 属の細菌は寒冷地に多く見られる²⁴⁾。先述のとおり、試料 7 及び 9 からは、海洋由来の *Synechococcus* の核酸塩基配列も多く検出された。試料 7 及び 9 を採取した調査時期には、北風が卓越しており、北方の海洋あるい

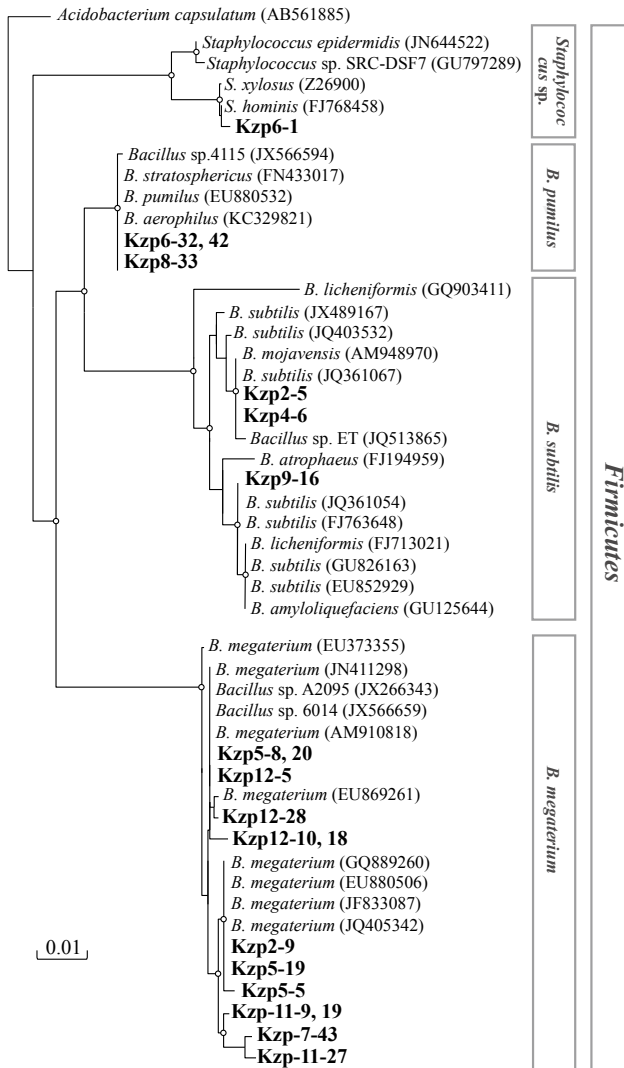


Fig. 4 Phylogenetic tree including partial sequences of 16S rDNA amplicons obtained from clone libraries (Kzp series) of bioaerosol samples collected in Kanazawa City, and the known members of *Firmicutes*. The phylogenetic tree was calculated from a dissimilarity matrix of an approximately 330-bp alignment (*Escherichia coli* numbering 153 to 482) using a neighbor-joining algorithm. The sample information and the accession number of each reference sequence are given in parentheses. Open circles at branch points indicate that bootstrap values obtained by neighbor-joining analysis exceeded 50 % (after 1000 resamplings).

はシベリアから巻き上がった細菌群が輸送されてきた可能性が高い。一方で、*Sphingomonas* 属の細菌群は、日本の土壌や水田にも生息する²⁵⁾²⁶⁾。本種は、黄砂時期の昼間に採集した試料 5, 7 及び 9 に多く検出されたため、上昇気流が強まる日中に地上から巻き上がったとも推測できる。

Firmicutes 門に属すクローンは、観測期間全体を通じて検出され (Fig. 1), *B. subtilis* group, *B. pumilus* group, *B. megaterium* group 及び *Staphylococcus* 属の 4 グループに分か

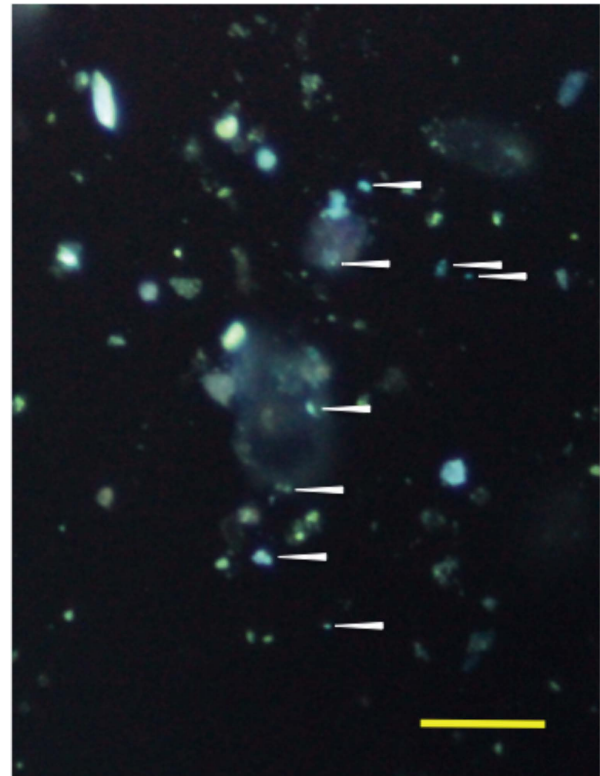


Fig. 5 Epifluorescence micrograph of aerosols in an air sample collected at 10 m from 19:00 on May 2 to 7:00 on May 3. Arrows indicate bacterial particles, and the bar scale is 10 μ m

れ (Fig. 3), それぞれのグループは期間を通じて割合が変動した。*B. subtilis* と *B. pumilus* の核酸塩基配列は、黄砂発生時の夜に採取した試料 4, 6 及び 8 に特異的に出現した。*Bacillus* 属は、土壌中に多く生息し、芽胞を形成することで環境ストレスに強い耐性を示す⁷⁾⁸⁾。先行研究でも、*B. subtilis* と *B. pumilus* は、黄砂の発生地 (タクラマカン砂漠) の上空でも優占種として検出され、黄砂飛来時の能登上空 3000 m でも優占していた⁷⁾⁸⁾。したがって、これらの細菌種は、黄砂とともに長距離輸送されると考えられる。*B. subtilis* の細菌群は人への感染力は低く、病原性はほとんどないが、日和見感染することで知られる²⁷⁾²⁸⁾。また、*B. subtilis* は納豆菌としても知られており²⁹⁾、能登上空 3000 m から分離した *B. subtilis* でも大豆を発酵させ納豆を作ることができた³⁾。*B. pumilus* は、赤血球を溶解させ、腸炎の原因となる株が存在する一方³⁰⁾、海洋性病原体の増殖を阻害する働きから養殖漁業の防菌への使用が試行されている³¹⁾。よって、黄砂バイオエアロゾルは、ヒト健康へ影響を及ぼす反面、食品製造や微生物生態にかかわる細菌も含んでいるといえる。

一方、*B. megaterium* は、黄砂発生時の日中と黄砂収束時に採取した試料 5, 7, 10, 11 及び 12 で高い割合を占めた (Fig. 1)。黄砂発生時の日中では、日中の放射によって地上

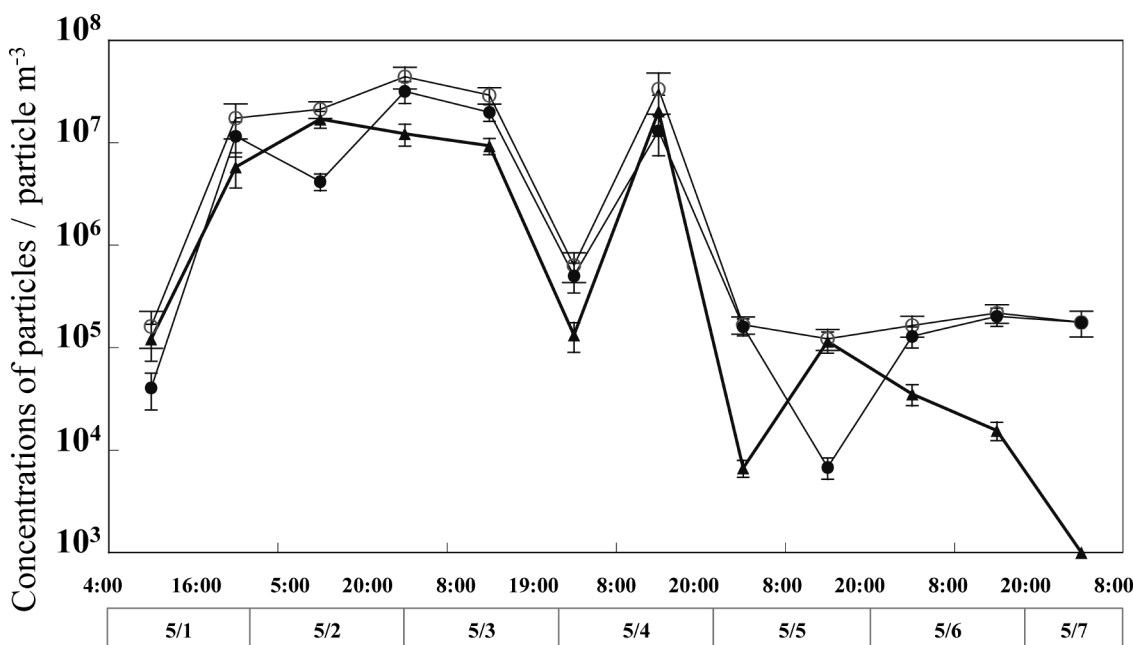


Fig. 6 Temporal variations of the concentrations of all bacterial particles (open circles), Gram-negative bacterial particles (closed triangles), and Gram-positive bacterial particles (closed squares) in bioaerosol samples collected at 10 m altitude in Kanazawa City from May 1 to May 7, 2011

からの対流が生じ、地上からの巻き上りが大気中に混合しやすいと考えられる。これまでの観測調査において、*B. megaterium*は、地上観測でよく観察され、数百 m 以上の大気中からは検出されなかった⁷⁾⁸⁾³²⁾。*B. megaterium*は、金沢市の土壌からの巻き上がり起因する可能性が高い。

さらに、エアロゾル試料を蛍光顕微鏡下で観察し、細菌細胞を計数した。その結果、黄砂現象の間、細菌細胞の粒子濃度は、 10^7 particles m^{-3} のオーダーまで 100 倍に増大し、黄砂が続く限り高濃度を維持した (Fig. 6)。これまでも、鉱物粒子とともに微生物が長距離輸送され、ヨーロッパ³³⁾やアジア¹¹⁾³⁴⁾各地では砂塵の時期に大気中の微生物量が増大するという報告があり、今回の結果とも合致する。さらに、本研究では、クローン解析の結果を併用し、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の細胞濃度を区別して求め、その経時的変動も明らかにした。グラム陽性細菌の大部分は、*B. subtilis* 及び *B. megaterium* などのヒト健康への悪影響の少ない種であった。これに対し、グラム陰性細菌全般は、細胞壁に Lipopolysaccharide (LPS; リポ多糖) を含み、アレルギー増悪の原因になることが知られている (市瀬ら、論文準備中)。今回の計数結果では、グラム陰性細菌の割合は、特に黄砂飛来時に多くなったため、黄砂とともに風送される細菌群がアレルギー増悪を引き起こす可能性がある。

5 結言・結論

2011 年 5 月上旬に大気エアロゾル試料を採取し、16S

rDNA のクローンライブラリーを作成することで、黄砂発生時の細菌種組成の動態を分析した。黄砂発生初期には、乾燥した大気が日本海の海水を含み日本へと上陸するため、海洋起源である藍藻が多く見られた。黄砂現象中盤では、特定細菌種 *B. subtilis* 及び *B. pumilus* が大気から検出され、黄砂発生地 (タクラマカン砂漠) 及び黄砂飛来時の上空数千 m で採取した種と高い相同性を示した。したがって、地上大気中の細菌種組成は黄砂の影響を受けると言える。また、蛍光顕微鏡観察を駆使した計数法では、細菌細胞粒子の濃度が、黄砂発生時には 100 倍 (10^7 particles m^{-3}) に増大することが分かった。よって、本手法で、黄砂飛来前後での微生物濃度を比較し、バイオエアロゾルの動態を定量的に調べることができる。さらには、蛍光顕微鏡による計数法とクローン解析を併用すれば、大気バイオエアロゾルに含まれる特定微生物の動態解析が可能となる。今後、大気微生物の動態を定量的にモニタリングし、アレルギー増悪の疫学的調査結果と比較検討することで、公衆衛生学的情報の提供に繋がる。

謝 辞

本研究の施行にあたり、環境省地球環境推進費 (B-0901, C-1155)、文部科学省科学研究助成金 (22681005)、三井物産環境基金 2011 年度一般助成、JST 国際科学技術協力共同研究推進事業「黄砂によって風送される病害バイオエアロゾルのヒト健康影響とその東アジア防疫体制の構築」の助成をいただきました。深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 岩坂泰信 : “黄砂その謎を追う”, p. 32, (2006), (紀伊國屋書店).
- 2) Y. Iwasaka, G. Y. Shi, M. Yamada, F. Kobayashi, M. Kakikawa, T. Maki, B. Chen, Y. Tobo, C. Hong : *Air Qual. Atmos. Health*, **2**, 29 (2009).
- 3) 岩坂泰信 : “空飛ぶ納豆菌”, p. 106, (2012), (PHPサイエンスワールド新書).
- 4) R. Jaenicke : *Science*, **308**, 73 (2005).
- 5) 小林史尚, 柿川真紀子, 山田 丸, 陳 彬, 石廣玉, 岩坂泰信 : エアロゾル研究, **22**, 218 (2007).
- 6) T. Ichinose, M. Nishikawa, H. Takano, N. Sera, K. Sadakane, I. Mori, R. Yanagisawa, T. Oda, H. Tamura, K. Hiyoshi, H. Quan, S. Tomura, T. Shibamoto : *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **20**, 48 (2005).
- 7) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G. Shi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : *Air Qual. Atmos. Health*, **1**, 81 (2008).
- 8) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, Y. Tobo, M. Yamada, T. Higashi, A. Matsuki, C. Hong, H. Hasegawa, Y. Iwasaka : *Sci. Total Environ.*, **408**, 4556 (2010).
- 9) N. P. Hua, F. Kobayashi, Y. Iwasaka, G. Y. Shi, T. Naganuma : *Aerobiologia*, **23**, 291 (2007).
- 10) 牧 輝弥, 原 和崇, 山田 丸, 小林史尚, 長谷川浩, 岩坂泰信 : エアロゾル研究, (印刷中).
- 11) K. Hara, D. Zhang : *Atmos. Environ.*, **47**, 20 (2012).
- 12) B. L. Maidak, G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, C. Woese : *Nucleic Acids Res.*, **25**, 109 (1997).
- 13) W. F. Röling, I. M. Head : “*Molecular Microbial Ecology (Advanced Methods)*”, p. 21, (2005), (Taylor & Francis).
- 14) N. Saitou, M. Nei : *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406 (1987).
- 15) K. G. Porter, Y. S. Feig : *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943 (1980).
- 16) R. M. Bowers, I. B. McCubbin, A. G. Hallar, N. Fierer : *Atmos. Environ.*, **50**, 41 (2012).
- 17) E. M. Jeon, H. J. Kim, K. Jung, J. H. Kim, M. Y. Kim, Y. P. Kim, J. O. Ka : *Atmos. Environ.*, **45**, 4313 (2011).
- 18) N. J. Fuller, D. Marie, F. Partensky, D. Vaultot, A. F. Post, D. J. Scanlan : *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2430 (2003).
- 19) N. A. Ahlgren, G. Rocap : *Front Microbiol.*, **3**, 213 (2012).
- 20) N. D. Crosbie, M. Pockl, T. Weisse : *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5716 (2003).
- 21) A. Latifi, M. Ruiz, C. C. Zhang : *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 258 (2009).
- 22) J. Song, H. M. Oh, J. C. Cho : *FEMS Microbiol. Lett.*, **295**, 141 (2009).
- 23) M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, S. J. Giovannoni : *Nature*, **418**, 630 (2002).
- 24) A. Sessitsch, B. Reiter, G. Berg : *Can. J. Microbiol.*, **50**, 239 (2004).
- 25) H. Ohta, R. Hattori, Y. Ushiba, H. Mitsui, M. Ito, H. Watanabe, A. Tonosaki, T. Hattori : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2185 (2004).
- 26) K. Inoue, H. Habe, H. Yamane, T. Otori, H. Nojiri : *FEMS Microbiol. Lett.*, **245**, 145 (2005).
- 27) V. Richard, P. Van der Auwera, R. Snoeck, D. Daneau, F. Meunier : *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 783 (1988).
- 28) E. Velasco, C. A. Martins, D. Tabak, L. F. Bouzas : *Reve. Paul. Med.*, **110**, 116 (1992).
- 29) M. Ashiuchi, K. Tani, K. Soda, H. Misono : *J. Biochem.*, **123**, 1156 (1998).
- 30) B. Hoult, A. F. Tuxford : *J. Clin. Pathol.*, **44**, 455 (1991).
- 31) J. E. Hill, J. C. F. Baiano, A. C. Barnes : *J. Fish Dis.*, **32**, 1007 (2009).
- 32) T. Maki, M. Kakikawa, F. Kobayashi, M. Yamada, A. Matsuki, H. Hasegawa, Y. Iwasaka : *Atmos. Environ.*, **74**, 73 (2013).
- 33) C. A. Kellogg, D. W. Griffin, V. H. Garrison, K. K. Peak, N. Royal, R. R. Smith, E. A. Shinn : *Aerobiologia*, **20**, 99 (2004).
- 34) H. G. Yeo, J. H. Kim : *Atmos. Environ.*, **36**, 5437 (2002).

Analysis of Airborne-bacterial Compositions Using 16S rDNA Clone Library Technique

Teruya MAKI^{®1}, Rie FUKUSHIMA¹, Fumihisa KOBAYASHI¹,
Maromu YAMADA², Hiroshi HASEGAWA¹ and Yasunobu IWASAKA³

[®] E-mail : makiteru@t.kanazawa-u.ac.jp

¹ College of Science and Engineering, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

² National Institute of Occupational Safety and Health, 6-21-1, Nagao, Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 214-8585

³ Community Research Service Group, University of Shiga Prefecture, 2500, Yasaka-machi, Hikone-shi, Shiga 522-8533

(Received August 9, 2013; Accepted October 11, 2013)

Microbial communities transported by Asian desert dust (KOSA) events have attracted much attention as bioaerosols, because the transported microorganisms are thought to influence biological ecosystems, and human life as well as atmospheric processes in downwind areas. However, the microbial dynamics in Japan during a KOSA dust event are unclear. In this study, sequential air sampling was performed on the top of a building (10 m altitude) within the KOSA arrival area (Kanazawa City, Japan: 36.6°N, 136.7°E) from May 1 to May 7, 2013, when a dust event occurred. A 16S rDNA clone library prepared from air samples mainly belonged to three phyla, such as *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, and *Alpha-proteobacteria*. Some clones of *Firmicutes* appeared specifically during the midst of a dust event, and consisted primarily of *Bacillus subtilis* and *B. pumilus*, which are known to dominantly inhabit atmospheric area in the KOSA source area (Chinese desert). The clones belonging to *Cyanobacteria* and *Alpha-proteobacteria* were mainly detected at the initial and last periods of dust events; they are relatives to marine bacterial species. Our results suggest that airborne bacterial communities on the surface of ground during a dust event are composed of terrestrial and pelagic bacterial populations, and that the dust event influences the dynamics of airborne bacterial communities on the ground surface of a downwind area.

Keywords: bioaerosol; asian dust; *Bacillus*; cloning; 16S rRNA gene.