

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710024  
 研究課題名（和文） 黄砂バイオエアロゾルにおける耐塩細菌の長距離輸送とその微生物生態への影響  
 研究課題名（英文） Long-range transport of halotolerant bacteria in KOSA bioaerosol

研究代表者  
 牧 輝弥 (MAKI TERUYA)  
 金沢大学・物質化学系・准教授  
 研究者番号：70345601

研究成果の概要（和文）：黄砂とともに微生物群（黄砂バイオエアロゾル）が中国大陸から日本へ運ばれ、生態系やヒト健康へおよぼす影響に社会的かつ学術的関心が集まりつつある。これまで、中国敦煌および日本珠洲の上空 1000m で係留気球による大気調査を実施し、耐塩細菌の長距離輸送を実証した。さらに、細菌分離株の遺伝子情報を駆使して、輸送細菌株の病原性の解明や輸送細菌の遺伝識別検出系を構築した。

研究成果の概要（英文）：The microbial communities transported by Asian desert dust (KOSA) events have attracted much attention as bioaerosols, because the transported microorganisms are thought to influence the downwind ecosystems in Japan. In this study, halotolerant bacteria which are known to tolerant to atmospheric environmental stresses were detected as the long-range transport of microorganisms by KOSA. Bioaerosol samples were collected at high altitudes within the KOSA source area (Dunhuang City, China) and the KOSA arrival area (Suzu City, Japan) belonged to *Bacillus subtilis* group. Moreover, a bacterial detection technique was established for supporting the monitors of the long-range transport bacteria.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：微生物生態学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：黄砂，長距離輸送，バイオエアロゾル，極限微生物，耐塩細菌，健康影響

## 1. 研究開始当初の背景

中国大陸北部の砂漠地帯で巻き上がった  
 鉱物粒子は、偏西風によってアジア一円に数

日間で運ばれ、黄砂を発生させる。黄砂は「微生物の箱船」とも言われ、黄砂粒子とともに微生物を運搬し、ヒト健康や微生物生態系に影響を及ぼす可能性がある。エアロゾルには、無機物質の他に、ウイルスや細菌、カビ、花粉などの有機物粒子も含まれ、こうした生物由来の粒子は「バイオエアロゾル」と呼ばれている。黄砂の発生源であるタクラマカン砂漠（敦煌市）上空の鉱物粒子からも、細菌やカビなどの微生物が多数分離され、病原性微生物種のリボソーム RNA 遺伝子塩基配列と100%の相同性で一致する分離株も得られており、ヒト健康への被害も懸念される。マウスを用いた動物アッセイでは、黄砂粒子に付着する微生物が、黄砂粒子自体が引き起こすアレルギー疾患をさらに悪化させることが実証されている。また、アフリカ起源の砂塵が飛来した大西洋やヨーロッパでとらえたエアロゾルからも、病原性微生物の近縁種が分離されており、バイオエアロゾルによる健康影響は世界レベルで問題となりつつある。一方、一部のバイオエアロゾルは氷晶核や雲凝結核としての高い活性を有しているため、放射収支に対する間接的効果が調査されている。こうしたバイオエアロゾルへの学術的および社会的関心の高まりから、近年、大気中の微生物研究が飛躍的に進みつつある。しかし、黄砂に関わるバイオエアロゾルの研究は発展途上にあり、大気中の微生物群を黄砂発生地と飛来地で比較検討した研究報告は皆無である。

一方、大気中を輸送される微生物群は、気温変化や、乾燥、酸素制限、紫外線照射などの過酷な環境ストレスへ順応し耐えなければならない。日本海を越えて飛来する黄砂鉱物粒子のうち、過半数の粒子には塩分が35% (w/w) 以上の高濃度で含まれることがあり、高い塩分に耐えられる耐塩細菌が大気中で生残しつづけると予想できる。また、耐塩細菌は、pH 及び気温変化や乾燥などのストレス因子にも耐えうる膜構造を有する。従って、『耐塩細菌は、大気中で生存しやすく、黄砂とともに長距離輸送され、生息域を広げる』という仮説を立てた。実際に、日本における耐塩細菌群が、黄砂によって大気中を運搬されている可能性を示唆した報告もある。

よって、大気中に浮遊する耐塩細菌に焦点を絞って集積培養すれば、エアロゾル中に生残する微生物群の数種を効率的に検出でき、長距離輸送される細菌群の生理生態を解明する着想に至った。

## 2. 研究の目的

バイオエアロゾルに含まれる耐塩細菌群の生物学的分析手法を確立し、タクラマカン

砂漠（敦煌市）および珠洲市上空の細菌種組成を解析し、黄砂による微生物の長距離輸送の可能性を検証する。さらに、長距離輸送される細菌種の検出系 (FISH 法) の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

敦煌市 (40.0°N, 94.5°E) (2007年8月17日13時15分実施) および珠洲市 (37.5°N, 137.4°E) (2008年5月7日11時00分実施) において、エアポンプを搭載した係留気球を上空800m および600mにまであげ、直径47 mmの孔径0.2 μmのセルロースアセテート親水性フィルター (LABODISC50CP020AS: ADVANTEC MFS, Inc., California, U.S.A.) 上にエアロゾルを1時間吸引捕集した (大気量700 L) (Fig. 1)。また、地上試料として、高度10mのエア

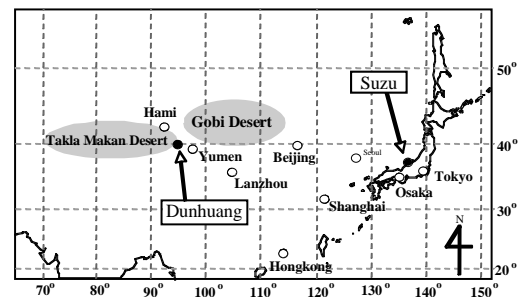


図1 観測地点。黄砂発生地（タクラマカン砂漠：敦煌市）と黄砂飛来地（能登半島：珠洲市）

ロゾルも同様の手法で採取した。大気中の粒径分布は、Particle counter (KR-12A: RION CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。気象データは、Thermometer (EX-501: EMPEX Instruments, Inc., Tokyo, Japan) で測定した。敦煌市では、上空及び地上の平均気温は、それぞれ14.7 °C および22.5 °C となり、平均RH 値はそれぞれ92.1% および56.3% となった。珠洲市では、上空及び地上の平均気温は、それぞれ15.7 °C および14.7 °C となり、平均RH 値はそれぞれ58.3% および80.6% となった。エアロゾルを捕集した後、フィルターを0.9% NaCl を含む滅菌水10 mL に入れ、200rpm (5cmの振幅で200回/分) で10分間振とうすることで十分に粒子を懸濁させた。

バイオエアロゾル試料の懸濁液を、NaCl 濃度を0%, 3%, 10% 及び15% に変えた細菌用 (Trypticase-soy-broth: TS) 液体培地 [4] に接種した後、14日間培養し、微生物生長量を確認した。さらに、「生長の見られた培養」および「エアロゾル試料」に含まれる細菌種を同定するため、PCR-DGGE 解析を施行した。まず、培養からフェノール・クロロホルム処

理を用いて抽出したゲノム DNA を鋳型として、DGGE 用プライマーを用いた PCR 法[5, 6, 7]により 16S rDNA を増幅した。この PCR 増幅産物を、DNA 変性剤 (尿素) で濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル上に電気泳動した後、ゲル上に展開したバンドパターンを確認した。バンドに含まれる核酸の塩基配列を用いて、微生物培養に含まれる細菌群の種組成を系統分類学的に解析した。

敦煌市上空、珠洲市上空および立山積雪中から採取したバイオエアロゾル懸濁液を、TS 寒天培地に塗抹し、数日間常温で培養し、コロニー形成を確認することで、*B. subtilis* 及び *B. pumilus* の細菌株が得られた。細菌株の液体培養を、終濃度 1% のグルタルアルデヒドで固定した後、細菌細胞を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のスクレポアフィルター上に濾過捕集し、フィルターごとマイクロチューブに入れた。エタノールでフィルター上の細菌細胞を洗浄し、ハイブリダイゼーション溶液 (Hybridization Solution:HS) に浸し、馴染ませた後、核酸プローブ 1  $\mu\text{L}$  を含むハイブリダイゼーション混合溶液を加え、20°C で 4 時間ハイブリダイズした。今回使用した核酸プローブは、細菌株の全塩基配列を用いて、特異的に *B. subtilis* の DNA のみに結合するように設計した。ハイブリダイゼーション終了後、未反応のプローブを除去し、DAPI 溶液を加え、全細菌細胞を染色した。濾過によって乾燥させたフィルターを、イメージングオイルを用いて、プレパラートとスライドガラスの間に密閉し、落射型蛍光顕微鏡を用いて DAPI 染色された細胞は UV 励起で、核酸プローブ染色された細胞は B2 励起で観察した。

#### 4. 研究成果

2008 年の珠洲市調査時には、流跡線は、タクラマカン砂漠から能登半島までの大気中の移送を示しており、黄砂の飛来が確認された。この時期に上空 600m で採取したエアロゾル試料に含まれる微生物群は、0% から 15% の NaCl 濃度の培地中で顕著な増殖を示した。一方、2009 年では、黄砂の飛来が認められず、エアロゾル試料からは、0% 及び 3% の NaCl 濃度で生長する微生物のみで、10% 及び 15% の NaCl 濃度の培地での増殖に耐えうる微生物は検出されなかった。従って、黄砂飛来とともに耐塩細菌が大気中に増大したと考えられる。さらに、「2007 年夏期および 2008 年秋期に敦煌市上空 600m (黄砂発生源)」で採取した黄砂鉍物試料からも、0% から 15% の NaCl 濃度の培地で増殖する耐塩微生物が確認された。また、立山積雪中で黄砂が含まれない場合は、耐塩微生物は検出されなかった。従って、黄砂鉍物粒子とともに耐塩細菌が、大

気中の厳しい環境ストレスに耐え、大気中で生残し続けていることが実証された。

次に、微生物培養を、PCR-DGGE 解析に供した結果、黄砂鉍物粒子を含むいずれの試料からもグラム陽性の細菌群が優占して検出され、各調査地点での垂直混合も認められた (Fig. 2)。グラム陽性細菌は、芽胞を形成し、環境

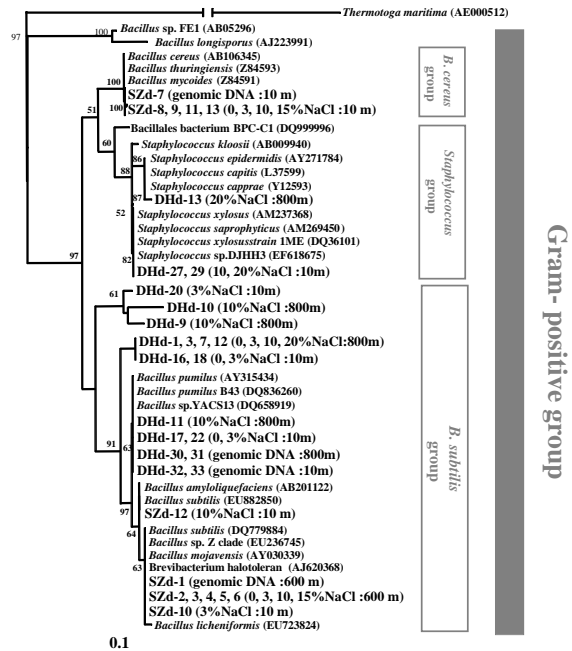


図 2 DGGE ゲルのバンドから得られた 16S rRNA 遺伝子の核酸塩基配列 (約 380 bp ; *Escherichia coli* の 421 から 828 番目に対応) の系統分類学的位置づけ。SZd および DHd は、それぞれ珠洲市および敦煌市から採取した試料のゲルイメージ上のバンド番号を示し、括弧内はそれぞれのバンドが得られた培地に含まれる NaCl 濃度を示す。

ストレスに強い耐性を持ち、一般的に大気中の優占細菌種として知られている。乾燥や紫外線照射等のストレスの多い大気中では、環境ストレスに耐性をもつ細菌群が選択的に生残でき、*Bacillus* 属あるいは *Staphylococcus* 属などの限られた細菌種が優占していると考えられる。特に、今回、それぞれの黄砂バイオエアロゾル試料から共通して検出された核酸塩基配列は、*B. subtilis* グループに属した。従って、*B. subtilis* グループの細菌種が、黄砂発生地域で鉍物粒子とともに巻き上げられ、黄砂鉍物粒子に付着し、長距離輸送されている高い可能性が示された。

しかし、細菌群の長距離輸送を実証するには、16S rRNA 遺伝子以外にも、耐塩機能や抗ストレス機能をコードする保存性の低い遺伝子配列の解析を施行し、細菌種の地域間比較を行うべきである。今後、黄砂発生時のバ

イオエアロゾルから分離した耐塩細菌株で機能性遺伝子を用いた解析を行い、黄砂にともなった微生物の長距離輸送を詳細に解析した。今回、黄砂発生地(中国タクラマカン砂漠：敦煌市)および黄砂飛来地(株洲市)から捕集したバイオエアロゾルを含む試料から多数の細菌株を分離することに成功し、その 16S rDNA の核酸塩基配列の全長を決定し比較した結果、全ての細菌株の核酸塩基配列が、*B. subtilis* グループに属し、「種」レベルでほぼ一致した。さらに、*B. subtilis* グループに属す細菌株の DNA gyrase 核酸塩基配列を決定し解析したところ、黄砂発生地と黄砂飛来地の分離株が、数ある *B. subtilis* の既知配列の中で、隣接するクラスターを形成し、近縁となった。従って、黄砂発生地と黄砂飛来地から分離された細菌株が、「株」レベルにおいて非常に近縁であったことから、今回分離した細菌株である *B. subtilis* は越境輸送されている可能性が高い。*Bacillus* 属は細胞内に孢子を形成し、塩度や乾燥などのストレス因子に耐性を持つ通性好気性のグラム陽性桿菌であるため、エアロゾルとして伝播されやすく、優占種となることから大気中を往来することは充分考えられる。

また、越境輸送細菌の可能性が高い *B. subtilis* を蛍光顕微鏡下で視覚的に検出することを目的に、立山積雪試料から採取した黄砂鉱物粒子を用いて FISH 法を試行したところ、黄砂鉱物粒子に付着した *B. subtilis* が特異的に検出された(Fig. 3)。特に、黄砂

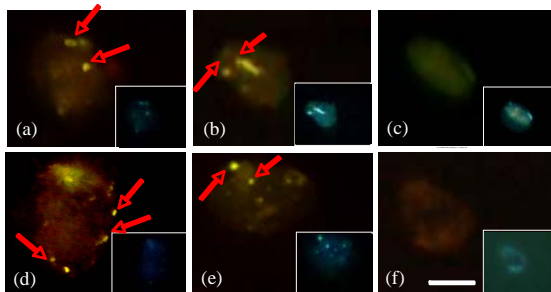


図 3. エアロゾル試料に含まれる鉱物粒子に対して、DNA プローブを用いて 20 °C (a, b, c) および 30 °C (d, e, f) の温浴中でハイブリダイゼーションした際の蛍光顕微鏡写真。DNA プローブは Eub 338R (a, d)、PB-BS 28 (b, e)、Euca 502R (c, f) をそれぞれ使用した。倍率は 1000 倍で、図中の白棒は 10µm を示す。

鉱物粒子に付着した微生物の多くが、*B. subtilis* であったことから、系統分類解析では優占種を対象に解析を進めていたことを裏付ける。今回、FISH 法を用いることで、環境試料中の黄砂鉱物粒子上から、長距離輸送細菌種と考えられる *B. subtilis* の細胞を検出できた。従って、環境中の混合微生物の

中から、単一の微生物種を検出できるよう、FISH 法の確立は、黄砂粒子に付着し、長距離輸送される特定の細菌粒子(*Bacillus* 属の種)を遺伝子レベルで識別するのに大いに役立つであろう。様々な環境中で捕集した黄砂粒子上の微生物を、顕微鏡下において視覚的に迅速かつ簡便に検出できれば、長距離輸送細菌種に関して、飛来量と飛来時期、環境中での分布状態、黄砂粒子あたりの細胞数、人や動植物への付着状態に関する情報入手に拍車がかかるであろう。

今後、黄砂発生時のバイオエアロゾルに含まれる耐塩細菌のデータベースを構築することで、黄砂にともなった微生物の長距離輸送の実態が明かされるであろう。今回の *gyrB* 解析や FISH 法のような遺伝学的識別手法を、環境試料を対象に使用すれば、黄砂による越境輸送細菌の地理的分散などもより明確にできよう。さらに、黄砂バイオエアロゾルの分散状態を迅速かつ簡便にモニタリングできると、環境の微生物生態系への影響が解明され、自然生態系、農作牧畜養殖業および人健康への影響についても対策を講じることができる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, Y. Tobo, M. Yamada, T. Higashi, A. Matsuki, C. Hong, H. Hasegawa, Y. Iwasaka, Phylogenetic analysis of atmospheric halotolerant bacterial communities at high altitude in an Asian dust (KOSA) arrival region, Suzu City, *Science of the Total Environment* (2010) in press 査読有
2. T. Maki, K. Aoki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, Y. Tobo, A. Matsuki, H. Hasegawa, Y. Iwasaka, PCR-DGGE analysis of Asian dust (KOSA) bioaerosol recorded in snow cover at Mount Tateyama, Central Japan. *Journal of Ecotechnology Research* (2010) in press 査読有
3. 柿川真紀子, 岩坂泰信, 小林史尚, 牧輝弥, バイオエアロゾルのメタゲノム解析, Molecular identification of microorganisms in bioaerosols, エアロゾル研究 25 巻 1 号 29-34 (2010 年 3 月 20 日発行) 査読有
4. 小林史尚, 小谷口久美子, 柿川真紀子, 牧輝弥, 山田丸, 當房豊, 洪天祥, 松木篤, 岩坂泰信能登半島株洲市上空における黄砂バイオエアロゾルの直接採集および分離培養・同定, エアロゾル研究 25 巻 1 号 23-28

- (2010年3月20日発行) 査読有
5. 牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 鈴木振二, 當房豊, 山田丸, 松木篤, 洪天祥, 長谷川浩, 岩坂泰信, 黄砂バイオエアロゾルに含まれる耐塩細菌群の種組成解析, エアロゾル研究 25巻1号35-42 (2010年3月20日発行) 査読有
  6. T. Maki, W. Hirota, K. Ueda, H. Hasegawa, M.A. Rahman, Seasonal dynamics of biodegradation activities for dimethylarsinic acid (DMA) in Lake Kahokugata, *Chemosphere* 77(1) 2009 36-42 査読有
  7. T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, A. Matsuki, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka, Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) arrival region, Suzu City. *Journal of Ecotechnology Research* 14(4), 255-259 (2009) 査読有
  8. Y. Iwasaka, G-Y. Shi, M. Yamada, F. Kobayashi, M. Kakikawa, T. Maki, T. Naganuma, B. Chen, Y. Tobo, C. Hong, Mixture of Kosa (Asian dust) and bioaerosols detected in the atmosphere over the Kosa particles source regions with balloon-borne measurements: possibility of long-range transport *Air Quality, Atmosphere and Health*, 2(1), 29-38 (2009) 査読有
  9. M. Kakikawa, F. Kobayashi, T. Maki, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G. Shi, C. Hong, Y. Tobo, Y. Iwasaka, Dustborne microorganisms in the atmosphere over Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang. *Air Quality, Atmosphere and Health* 1(4), 195-202 2009 査読有
  10. 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, Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City. *Air Quality, Atmosphere and Health* 1 81-89 (2008) 査読有
  11. T. Maki, T. Suzuki, K. Kido, A. Nakahara, T. Higashi, H. Hasegawa, K. Ueda and K. Saijoh, Effect of iron stress on gene expression in harmful microalga

*Prymnesium parvum*. *Journal of Ecotechnology Research* (14) 13-16 2008 査読有

[学会発表] (計13件)

1. 牧輝弥, 能登半島上空で採取した黄砂バイオエアロゾル: PCR-DGGE 解析, 第4回大気ハイオエアロゾルシンポジウム, 2010年3月14日, 名古屋ポートビル
2. 牧輝弥, 大気バイオエアロゾル中に生残する耐塩細菌群の分散状態, 第4回大気ハイオエアロゾルシンポジウム, 2010年3月14日, 名古屋ポートビル
3. 牧輝弥, 三重県沖の海洋調査と黄砂バイオエアロゾルに関する今後の展望, 第4回大気ハイオエアロゾルシンポジウム, 2010年3月14日, 名古屋ポートビル
4. 牧輝弥, 黄砂バイオエアロゾルに含まれる核酸塩基配列を用いた微生物の長距離輸送の検証, 京都化学者クラブ 234回, 2009年12月5日(土) 京都
5. 鈴木振二, 牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 當房豊, 小林真理子, 長谷川浩, 岩坂泰信, 能登半島上空で採取したバイオエアロゾルの細菌由来核酸断片を用いたPCR-DGGE 解析, 第1回能登総合シンポジウム, 2009年11月30日 珠洲市 珠洲商工会議所会館
6. T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, Y. Tobo, A. Matsuki, C. Hong, H. Hasegawa, Y. Iwasaka, Comparison of atmospheric bacterial composition in Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang city, and arrival region, Suzu city, Asian Aerosol Conference AAC09, Nov 24-27, 2009, Bangkok, Thailand
7. T. Maki, S. Susuki, K. Kazuma, F. Kobayashi, M. Kakikawa, H. Hasegawa, Y. Iwasaka, PCR-DGGE Analysis of Asian Dust (KOSA) Bioaerosol Recorded in Snow Cover at Mount Tateyama, Central Japan, 16th Asian Symposium on Ecotechnology, Oct 21-23, 2009, Dalian Neusoft Institute of Information Dalian, China
8. 牧輝弥・鈴木振二・青木一真・小林史尚・

柿川真紀子・小林真理子・長谷川浩・岩坂泰信，立山積雪断面に含まれる黄砂バイオエアロゾルの核酸塩基配列を用いた細菌組成種組成の解析，日本分析化学会第 58 年，2009 年 9 月 24 日-26 日，札幌

9. 牧輝弥・鈴木振二・小林史尚・柿川真紀子・當房豊・小林真理子・長谷川浩・岩坂泰信，能登半島上空で採取したバイオエアロゾルの細菌由来核酸断片を用いた PCR-DGGE 解析，日本分析化学会第 58 年，2009 年 9 月 24 日-26 日，札幌

10. 牧輝弥，大気バイオエアロゾル中に生残する耐塩細菌群の種組成の解明，第3回大気ハイオエアロゾルシンポジウム，2009年1月11日，仙台KKRホテル

11. 牧輝弥，鈴木振二，小林史尚，柿川真紀子，山田丸，東朋美，長谷川浩，上田一正，岩坂泰信，珠洲市上空のバイオエアロゾルにおける耐塩細菌群の種組成解析，第 24 回日本微生物生態学会，2008 年 11 月 26 日，北海道大学学術交流会館

12. 牧輝弥，鈴木振二，青木一真，小林史尚，柿川真紀子，山田丸，東朋美，長谷川浩，上田一正，岩坂泰信，立山積雪断面に含まれる黄砂バイオエアロゾルからの細菌群の検出，日本分析化学会第 57 年会，2008 年 9 月 10 日，福岡大学

13. T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa., M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G. Shi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda and Y. Iwasaka, Halotolerant bacterial community survived in atmosphere of Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City, The fifth international workshop on sand and dust storms, 21-24 May 2008, Urumqi, Xinjiang, China

[図書] (計 1 件)

1. 牧輝弥，黄砂は微生物を運ぶ箱船か，展望とトピックス p.4 解説 日本分析化学第 58 年会 (2009)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧 輝弥 (MAKI TERUYA)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号：70345601