

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510026

研究課題名（和文） 富山県の大気におけるバイオエアロゾルの動態と影響の解析

研究課題名（英文） Analyses of the dynamics and influence of bioaerosols in the atmosphere of Toyama Prefecture, Japan

研究代表者

田中 大祐（TANAKA DAISUKE）

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・准教授

研究者番号：40360804

研究成果の概要（和文）：富山大学理学部屋上にて採取した大気試料を PCR-DGGE 法で解析したところ、細菌群集構造は試料採取日によって変動が大きいと考えられた。細菌由来のバンドでは、Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes の 3 門が全体の約 80% を占め、属レベルでより細かく分類すると *Pseudomonas* 属が多く検出された。また、立山における黄砂を含む積雪層中の細菌を培養法で調べたところ、同じ 16S rDNA 塩基配列を持つ *Bacillus* 属菌を 2 年連続して検出し、これらの細菌が黄砂と共に長距離輸送されていた可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Bacterial community structure was investigated by analyzing air samples collected almost weekly on the roof of the Faculty of Science, University of Toyama, Toyama Prefecture, Japan. PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) was used to analyze changes in the structure of the bacterial communities in the atmosphere. The DGGE profiles showed significant differences among sampling days. Overall, 106 bands were excised from the DGGE gels and subsequently sequenced. About 80% of sequences were affiliated with the phyla Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, and the most common genus was *Pseudomonas*. We also investigated bacterial communities in Asian dust-containing snow layers on Mt. Tateyama. Interestingly, we detected *Bacillus* isolates with identical 16S rDNA sequences (AB500941) over 2 consecutive years, and these results might reflect the long-distance transportation of microorganisms from dust source regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

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：陸圏・水圏・大気圏影響評価

1. 研究開始当初の背景

近年、大気中に存在する微生物（細菌や真菌など）や花粉などの生物粒子（バイオエアロゾル）は、生態系、ヒトの健康、農業などに影響を及ぼすことが懸念されている。国内では、黄砂ダストに付着して長距離輸送されると考えられている微生物に関する研究が報告されている。しかし、黄砂関連以外の大気中微生物に関する研究はほとんど報告されていなかった。一方、国外では、ヒトの健康に影響する微生物、氷晶核として降雨・降雪に影響する微生物、アフリカの砂漠のダストに付着して長距離輸送される微生物などが研究されてきていたが、分子生物学的手法を用いた研究報告は少なかった。

そこで、本研究では、富山県において経時的に大気中の微生物群集が変化している実態を分子生物学的手法等で明らかにしたいと考えた。予備的な研究として、本研究を申請した前年から富山大学理学部屋上で捕集した大気中の細菌について、その群集構造の変化を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法で解析してきた。その結果、大気中で優勢な細菌は、気温などの気象要因の変化に伴って数日間で大きく変動している場合があることや、季節毎に特徴的な菌種が存在する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

大気中のバイオエアロゾルは、様々な影響を及ぼすことが懸念されている。富山県は、日本列島のほぼ中央の日本海側に位置し、春季には黄砂現象、フェーン現象による急な気温上昇、冬季には降雪など特有の気象特性が見られる。このような気象の変化は、大気中の微生物群集構造に大きな影響を与えていることが考えられる。本研究では、富山県の平地にある富山大学理学部屋上を中心定点とし、一方で山岳高所にある立山でも定点として、各定点で大気中の微生物を捕集し、分子生物学的手法等で細菌などの微生物群集の動態を解析したい。その上で、気象との関連性や検出した微生物種による生態系などへの影響を検討・評価することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、大気試料を富山大学の理学部屋上を中心に、人為的影響が少ない立山でも採取した。そして、大気中の微生物群集を、分子生物学的手法と培養法で解析・比較した。気象データについては、自分達で気温や湿度を測定するとともに、大学から約 1km 離れた場所にある富山地方気象台の観測データや、気象庁からの黄砂情報などを利用した。

富山県の大気中における微生物群集構造の経時的変化を分子生物学的手法で明らか

にするために、富山大学理学部屋上で大気中の微生物の濾過捕集を口径 0.2 μ m のメンブレンフィルターを用いて流量 10L/min で 3 時間行った。黄砂現象が起きる春 (3 月~5 月) は、できるだけ毎日サンプリングを行った。夏~冬 (6 月~翌年 2 月) は、毎週 1 回サンプリングを行った (毎週水曜日 13:00~16:00 を基本とする)。また、立山浄土山山頂付近でも 8 月~9 月に毎月捕集を行った。これらの試料からビーズ法を利用したキットで抽出した DNA を鋳型として、nested-PCR 法で細菌の 16S rDNA の V3 領域を増幅した後に DGGE を行った。主要な DGGE バンドの一部を切り出し、ダイレクトシーケンス法あるいは TA クローニングを用いて塩基配列を決定後、BLAST による相同性検索を行って細菌種を同定した。

培養法による大気中の微生物の検出は、富山大学理学部屋上でメンブレンフィルターを使用して濾過捕集後、栄養成分濃度が異なる 2 種類の寒天培地である R2A 寒天培地とニュートリエント寒天培地にそれぞれ貼り付け、培養して行った。あるいは、BioStage Bioaerosol Impactor (SKC) を用い、2 種類の寒天培地にそれぞれ大気を衝突させて微生物を捕集後に、培養した。単離した細菌の同定は、16S rDNA の部分塩基配列を決定した後、BLAST 検索して行った。

最後に、分子生物学的手法と培養法で検出した細菌種の系統関係を整理すると共に、生態系、ヒトの健康、農業生産性に影響を及ぼす可能性の有無を、文献等を参考に検討・評価した。

4. 研究成果

富山大学理学部屋上で 2009 年 3 月~2010 年 2 月の 1 年間にほぼ毎週大気試料を採取し、季節毎 (3 ヶ月単位) に試料をそれぞれまとめて DGGE 解析した結果、バンドパターンは試料採取日毎に変化が大きかった (図 1)。さらに、この 1 年間の DGGE ゲルから、全部で 106 個の DGGE バンドの塩基配列を決定した。その結果、細菌由来のバンド 70 個 (66%) の他に、植物由来のバンドも 36 個 (34%) と比較的多く検出された。細菌由来のバンドを門レベルで分類すると、Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Acidobacteria が検出され、中でも Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes が順に多く検出され、これら 3 門で全体の約 80% を占めた。属レベルでより細かく分類すると、*Pseudomonas* 属が多く検出された。また、氷核活性細菌として雲の形成と発達に関わる可能性がある *Pantoea* 属の細菌や、マメ科植物の根に共生する根粒菌として知られる *Rhizobium* 属などの細菌が検出された。ヒトの健康に害を及ぼすと思われる細菌は検

出されなかった。一方、植物由来のバンドは、スギやマツなどの花粉が飛散する春から初夏にかけて多く検出された。大気試料の中に植物の花粉や破片を捕集し、それらに含まれる葉緑体の 16S rDNA を検出したと思われる。

また、培養法により大学屋上の大気から微生物の検出を試みたところ、これまでに約 200 株の細菌を分離し、同定を行ったところ、門レベルでは Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes が全体の約 90% と多かった。属

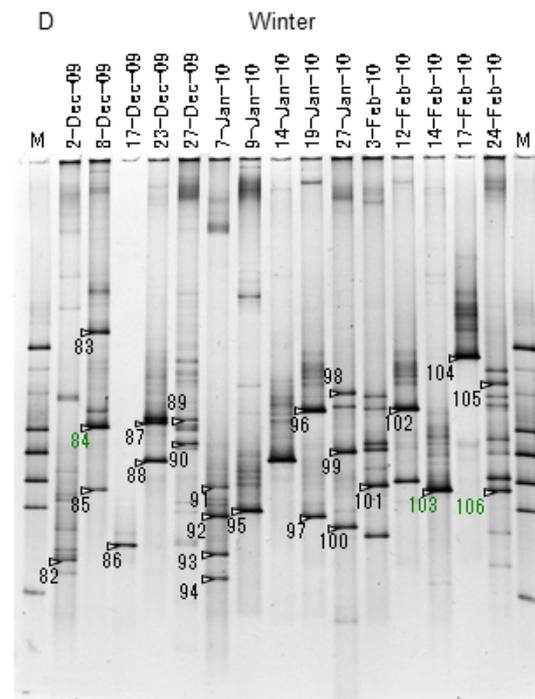
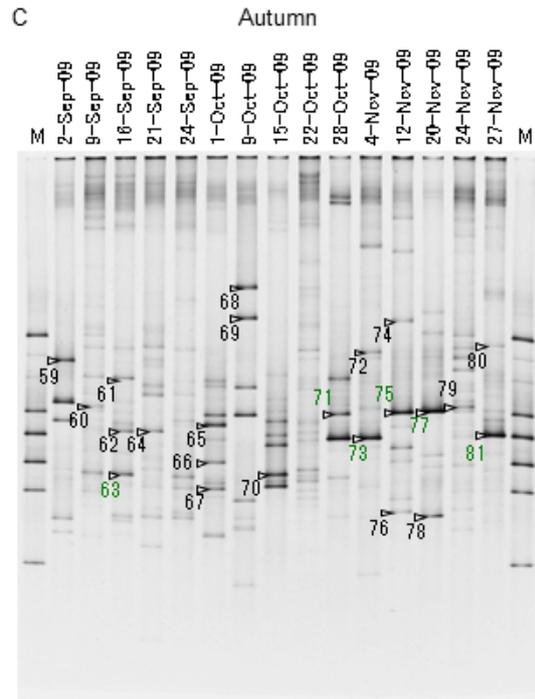
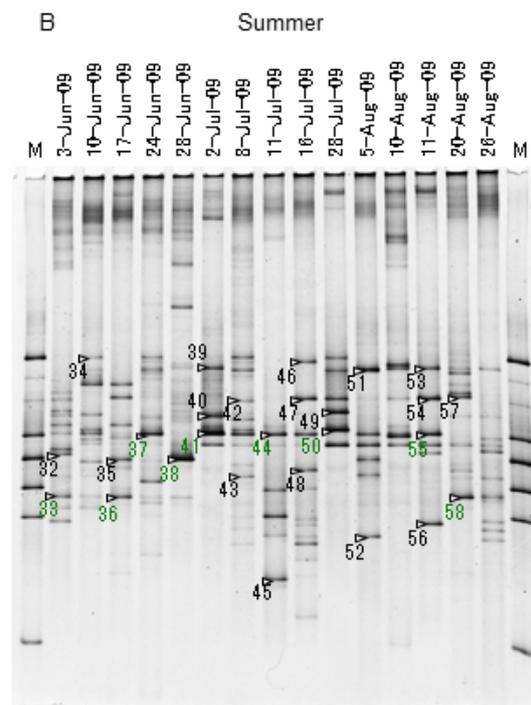
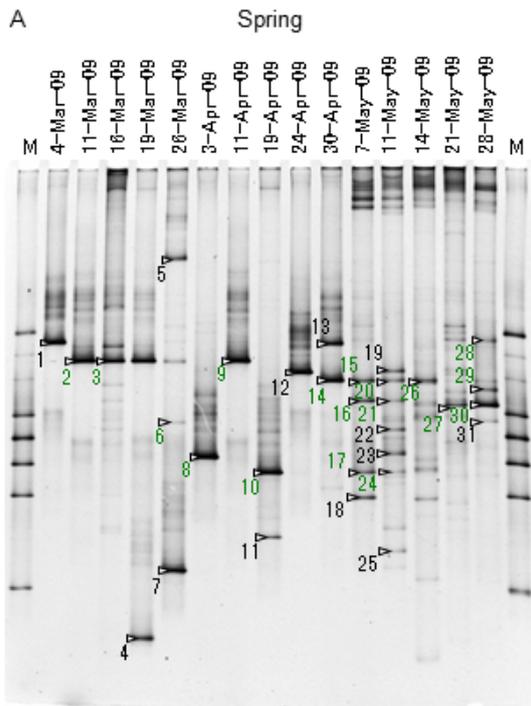


図 1 富山大学理学部屋上で春(A), 夏(B), 秋(C), 冬(D)に採取した大気試料から PCR 増幅された 16S rDNA の DGGE 解析。M はマーカーを示す。番号を付けたバンドは、塩基配列を決定し、BLAST による相同性検索を行った。その結果、黒色の数字で示す細菌由来のバンドと、緑色の数字で示す植物由来のバンドが認められた。

レベルでより細かく分類すると、*Methylobacterium* 属や *Sphingomonas* 属が多く認められた。

2009年～2011年の間の8月～9月に、富山大学理学部屋上と立山浄土山山頂付近にて、同日同時刻にサンプリングした大気試料について、PCR-DGGE法で比較解析を行った。両地点でバンドパターンにかなりの違いが認められ、大気中の細菌群集構造は富山県内の平野部と山岳部で異なることが示唆された。さらに、主要なバンドの塩基配列を解析したところ、立山の試料では未培養細菌由来と思われるバンドが多く検出された。

一方、黄砂に付着して長距離輸送される微生物の実態を把握することを目指して、立山における黄砂を含む積雪層と他の積雪層中の細菌群集構造を培養法とPCR-DGGE法によって解析した。培養法で単離することができた細菌は19株であった。その内、黄砂層からは11株単離され、*Bacillus* 属が7株と最も多かった。興味深いことに、16S rDNAの塩基配列が完全に一致し、*Bacillus subtilis* と推定される菌株が、2008年及び2009年の両年の黄砂層から検出された。

以上の結果から、富山大学理学部屋上を中心に立山でも試料を採取して解析したところ、細菌群集構造は試料採取日毎に大きく変化していると考えられ、主要な細菌種を大まかに把握することができた。また、花粉症の原因となるスギやマツの花粉の飛散状況もそれぞれ把握できることが分かった。さらに、黄砂と共に *Bacillus* 属の細菌が長距離輸送されてきていた可能性が示された。今後もDGGE法などの分子生物学的手法を用いて解析することにより、富山県の大気中における細菌などのバイオエアロゾルの動態や影響について知見が得られると期待している。

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1件)

- ① Tanaka, D., Tokuyama, Y., Terada, Y., Kunimochi, K., Mizumaki, C., Tamura, S., Wakabayashi, M., Aoki, K., Shimada, W., Tanaka, H., and Nakamura, S., Bacterial communities in Asian dust-containing snow layers on Mt. Tateyama, Japan. *Bulletin of Glaciological Research*, 査読有, Vol.29, 2011, 31-39.

[学会発表] (計5件)

- ① 田中大祐, 徳山祐美, 寺田陽平, 国持孝太, 青木一真, 島田 互, 中村省吾 (2010年8月4日)
黄砂を含む立山積雪中における細菌群集

構造の解析

第27回エアロゾル科学・技術研究討論会, 名古屋大学 (愛知)

- ② 青木一真, 島田 互, 田中大祐, 松木 篤 (2010年8月4日)

高低差3000mから観るエアロゾルの季節変化

第27回エアロゾル科学・技術研究討論会, 名古屋大学 (愛知)

- ③ 田中大祐, 田村尚子, 寺田陽平, 青木一真, 島田 互, 中村省吾 (2011年3月30日)

立山における黄砂を含む積雪層中の細菌の分離・同定

第5回大気バイオエアロゾルシンポジウム, 紙面 (要旨集)

- ④ 寺田陽平, 徳山祐美, 田中大祐, 中村省吾 (2011年10月8日)

富山県の大気中における細菌群集の季節動態

第27回日本微生物生態学会大会, 京都大学 (京都)

- ⑤ Yohei Mizuno, Daisuke Tanaka, Kota Kunimochi, Takuya Nakashima, Shogo Nakamura (2012年9月20日～21日)

Effects of Ultraviolet Radiation on Pigmented Airborne Bacterial Isolates from Toyama, Japan.

第28回日本微生物生態学会大会, 豊橋技術科学大学 (愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 大祐 (TANAKA DAISUKE)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・准教授

研究者番号: 40360804

(2) 研究分担者

中村 省吾 (NAKAMURA SHOGO)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・教授

研究者番号: 60134996