

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24403002

研究課題名(和文)自由大気圏を長距離移動するバイオエアロゾルが遺伝子の水平伝播に及ぼす影響

研究課題名(英文)Molecular analysis of bioaerosols in the atmosphere over China and Japan

## 研究代表者

柿川 真紀子(Kakikawa, Makiko)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10359713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では黄砂発生源地の一つであるタクラマカン砂漠の東端にある敦煌市と石川県上空において、エアロゾル(大気浮遊物質)を採集後、DNA抽出し、DNA濃度から微生物濃度を明らかにした。また、rRNA遺伝子や組み換え遺伝子の配列解析により微生物の多様性や同定を行なった。その結果、大気中のDNA濃度は黄砂飛来時には高くなること、地上付近になるほどDNA濃度は高くなること、生物の多様性は上空になるほど低くなる傾向が見出された。

研究成果の概要(英文)：In recent years, many epidemiological studies have shown that dust events are associated with an increase in risk of mortality and patients of cardiovascular and respiratory illness. However, there are few data about airborne bacteria. In this study, we investigated the airborne bacteria in the atmosphere over Taklimakan Desert in China, Asian dust source, and over Ishikawa prefecture in Japan. The airborne bacteria were collected on 0.45  $\mu$ m-pore size filter by vacuum pump, and their DNA were extracted from the filter and analyzed by their DNA sequence. The results suggested that DNA concentrations in the atmosphere over Ishikawa in Japan had been higher after dust storm in the deserts of China. Some airborne bacteria were identified by matching to the sequences of DNA database. Some results suggested that the diversity of airborne bacteria in the higher atmosphere was lower than that near the ground surface.

研究分野：生物情報工学

キーワード：微生物 DNA配列 エアロゾル

### 1. 研究開始当初の背景

近年、中国大陸由来の大気浮遊物質 (PM2.5 や、春に多く日本へ飛来する黄砂など) が日本の空気質に影響を与えることが注目されている。また、生物由来の大気浮遊物質の飛来により花粉症患者やアレルギー、気管支炎患者の症状を憎悪することが指摘されている。

これまでに大気中の黄砂粒子を捕集し、DAPI 染色にて DNA を染色した実験において、黄砂粒子上に DNA が付着している、つまり微生物が黄砂粒子状に存在することが報告されている。しかしながら、生物由来の大気浮遊物質についての知見は少なく、大気中にはどのような微生物が含まれるのか、また、その濃度はどの程度であるのか、気象条件によりどのようにその濃度や微生物の種類が変動するのかなど、不明な点が多い。なお、微生物分析にあたり、従来の培養法では培養条件により検出できる微生物が選択され、実在の 1% の分析となるといわれているため、本研究では培養過程を経ず、直接 DNA 抽出し、その配列より微生物同定を行なうこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では黄砂発生源地の一つである、中国タクラマカン砂漠東端の敦煌市と日本上空で自由大気圏を長距離移動する黄砂などのエアロゾル (気体中に浮遊する微小物質) を採集し、エアロゾルに含まれる DNA を抽出し、DNA 濃度から微生物濃度を明らかにすること、また 16S rRNA 遺伝子配列による微生物の同定と遺伝子組み換え遺伝子の水平伝播を評価するため DNA 組み換え遺伝子の解析を行なうことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) エアロゾル採集

中国敦煌市では、砂漠地帯 (N40°02'47.49" E094°29'38.25") で 18 L/min のエアポンプにより 2 時間半、空気を吸引し、0.45 μm ポアサイズの滅菌フィルターにエアロゾルを捕集した。

日本上空では中国から飛来するエアロゾルを捕らえるため、中国でダストストームの起きた後 (約 2.3 日後) 日本への黄砂飛来状況を確認し、エアロゾル採集を行なった。日本側で採集したエアロゾルも DNA 抽出し、rRNA 遺伝子配列解析により微生物種の同定や組み換え遺伝子配列解析を進めた。

#### (2) 遺伝子配列解析

エアロゾルを捕集したフィルターより、リゾチームなど溶菌酵素、タンパク質分解酵素を使用して、DNA 抽出を行なった。抽出した DNA 濃度は分光光度計にて測定した。各 DNA 試料より 16S rRNA 遺伝子および integron 遺伝子領域を PCR 増幅し、増幅産物を大腸菌ベクターにクローニング後、各ク

ローンの DNA 配列をシーケンスした。得られた DNA 配列を国際公的 DNA データベースで BLAST プログラム (相同性検索) により、配列の一致から微生物種の同定等を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) エアロゾルにおける DNA 濃度

中国敦煌市の地上約 1 m におけるエアロゾルから抽出された DNA は 0.037 ~ 0.185 ug/m<sup>3</sup> ほどであり、気象条件特に風の影響により変動することや、高度が地上付近になるほど DNA 濃度が高くなることが明らかとなった。

また石川県上空ではエアロゾル中の DNA 濃度は 0.025 ~ 0.125 ug/m<sup>3</sup> ほどであり、黄砂飛来時には高くなることが明らかとなった。なお、微生物ゲノム (バクテリア、真菌類含む) サイズから少なめに見積って、1 ug の DNA は約 2×10<sup>7</sup> 個のゲノム量に相当するため、中国敦煌市では 7.4×10<sup>5</sup> ~ 3.7×10<sup>6</sup> cells/m<sup>3</sup> ほどの微生物 DNA が、石川県上空では 5×10<sup>5</sup> ~ 2.5×10<sup>6</sup> cells/m<sup>3</sup> ほどの微生物 DNA の存在が推定された。

#### (2) DNA 配列解析による結果

中国敦煌市の砂漠地帯の地上約 1 m 付近のエアロゾルサンプル (2014.8.15 採取) の DNA 配列解析による微生物同定結果を図 1 に示す。このサンプルの特徴としては、地上付近ということもあり、様々な種が採取されていることがわかる。

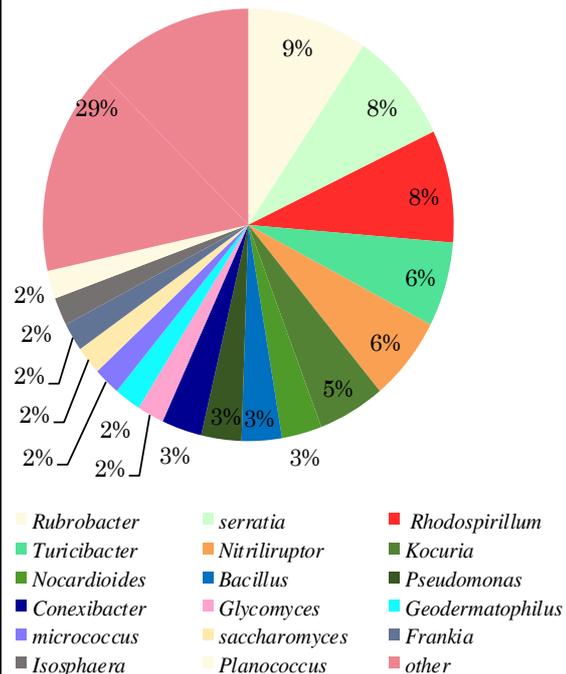


図 1. 中国敦煌市 (2014.Aug.) の砂漠地帯における地上約 1 m のエアロゾルに含まれる微生物種

最も多く存在したのは全体の10%を占める *Rubrobactor* である。*Rubrobactor* は Actinobacteria の属であり、*Deinococcus radiodurans* に匹敵する、強力な放射線耐性をもつ菌である。紫外線の強い大気上空においても生存していることが予想される。*Serratia* 属は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌である。土壌、水中などに分布し、多剤耐性株が多く、敗血症、尿路感染症、肺炎、膿瘍などの起炎菌である。この細菌については、過去に日本上空で採取したサンプル中に存在したという報告もある。*Rhodospirillum* 属は赤色の放射菌であり、空気がない嫌気的条件下で、光エネルギーを利用して、酸素を発生しない光合成を行って生育している細菌である。

*Turicibacter* や、*Nitriliruptor* は、放射菌で水田などに生息している菌である。

*Kocuria* 属は、放線菌類 Actinobacteria のグラム陽性細菌に分類され、土壌由来の報告がある。*Nocardioideis* 属は放射菌であり、麦栽培土壌からの採取が報告されている。

*Bacillus* 属は グラム陽性桿菌のモデル生物として重要である枯草菌 (*B. subtilis*) が含まれるほか、病原菌のセレウス菌 (*B. cereus*)、BT 剤の殺虫成分生産菌である卒倒病菌 (*B. thuringiensis*) などの種も含まれ、土壌や水中など普遍的に存在し、非常に多くの種を含む属である。*Pseudomonas* 属の生息域は土壌、淡水、海水など幅広く、自然界における重要分解者で、様々な有機化合物を分解する能力があるため、地球上の炭素循環に大きく貢献していると考えられている。*Glycomyces* 属はグラム陽性菌に分類され、植物の根や農場の土などから分離される比較的マイナーな放線菌である。*Geodermatophilus* 属は、放射菌である。*Micrococcus* 属は、分類上は放線菌に含まれるが、菌糸形成能力はなく、土壌や多様な水系に広く分布する。

*Sccharomyces* 属は、菌類の一種であり、酵母の多くの種類を含む。*Frankia* 属は、2011年にオランダの土壌で採取された報告があり、放線菌に分類される真正細菌の一属で、窒素固定を行う能力を持つ。*Isosphaera* 属は、バクテリアで過去にオーストラリアの砂の中から発見されている土壌由来の菌である。*Planococcus* 属は、運動性を有する球菌である。

図2に敦煌市砂漠地帯での地上約10mのエアロゾルサンプル(2012.Sep. 採取)における配列解析による微生物同定結果を図2に示す。2014年と同じ *Bacillus* 属、*Kocuria* 属、*Frankia* 属が検出され、その他、*Microbacterium* や *Pontibacter*, *Trichococcus*, *Flavisolibacter*, *Blastococcus*, *Adhaeribacter*, *Condylura*, *Gaiella*, *Brevibacterium*, *paenibacillu* などが存在していた。また、DNA データベース内の配列と全く一致しない DNA 配列が中国敦煌サンプルに含まれており、これらは新規微生物の

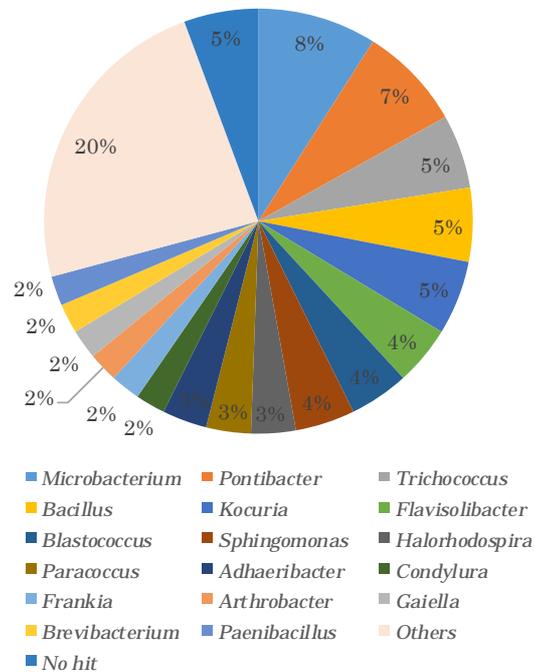


図2. 中国敦煌市(2012.Sep.)の砂漠地帯における地上約10mのエアロゾルに含まれる微生物種

DNA 配列と考えられる。多様性の点について敦煌砂漠地帯の地上1~10mサンプルの2014年および2012年ともにサンプルの漸近種数の計算を行なったところ、推定種数とともに約60種となり同程度の多様性を示した。なお、敦煌市気象局にて気球により上空約800mのエアロゾルを採取し、DNA配列により微生物種を調べた結果では、*Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属の菌は共に23%存在し、これら2種で全体の半数近くを占め上空では多様性が低いことが示唆された。

これらの結果より、高度が高くなるほどエアロゾルに含まれる微生物DNA濃度は低くなり、生物種の多様性も低くなることが明らかとなった。なお、同じ高度でも気象条件により、DNA濃度は1桁ほど変動することや生物種にも違いが見られることが明らかとなってきた。

本研究において、気球使用の際、気象条件に左右され、雨天ではエアロゾルは雨とともに降下してしまい、風速が大きいとサンプリングすることが出来ず、やむを得ず地上付近のサンプル採取を行なったシーズンもあり、上空1kmサンプルデータは少なくなっている。そのため、今後も継続的に上空1kmのエアロゾルサンプルの解析を続け、データを蓄積し、中国上空と日本上空の大気微生物の比較や気象による微生物濃度の変動などを明らかにしていく必要があると考えている。

## 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 11 件)

Kobayashi F., Iwata K., Maki T., Kakikawa M., Higashi T., Yamada M., Ichinose T., Iwasaka Y., Evaluation of the toxicity of a Kosa (Asian duststorm) event from view of food poisoning: observation of Kosa cloud behavior and real-time PCR analyses of Kosa bioaerosols during May 2011 in Kanazawa, Japan, Air Quality, Atmosphere and health, (in press, 2015) 査読有.

Kobayashi F., Maki T., Kakikawa M., Yamada M., Puspitasari F., Iwasaka Y., Bioprocess of Kosa bioaerosols: effect of ultraviolet radiation on airborne bacteria within Kosa (Asian dust), Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 199, pp. 570-579 (2015). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.015, 査読有.

Kakikawa M., Imai, S., Yamada S., Effect of Extremely Low-Frequency (ELF) magnetic fields on the potency of drugs in bacterial cells, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 50, No.4, pp. 1-4 (2014). DOI: 10.1109/TMAG.2013.2286781, 査読有.

Yamada S., Ikehata Y., Ueno T., Kakikawa M., Control of exciting frequency of pancake applicator having wireless transmission for hyperthermia therapy, J. Magn. Soc. Jpn., Vol. 38, pp. 37-41 (2014). DOI: 10.3379/msjmag.1402R004, 査読有.

Hoang H., Kakikawa M., Yamada S., High spatial resolution Non-contact measurement of low current signal by needle-type GMR probe, 日本 AEM 学会誌, Vol. 21, pp. 386-390 (2013). DOI: 10.14243/jsaem.21.386, 査読有.

Yamada S., Nakamura S., Kakikawa M., Ueno T., Sterilization Action on Cavitation Phenomenon Generated by Magnetostrictive, 日本 AEM 学会誌, Vol.21, pp.20-23 (2013). DOI: 10.14243/jsaem.21.352, 査読有.

柿川真紀子, 山田外史, 池畑芳雄, 培養細胞における薬剤増強評価のための磁場曝露システム, 電気学会誌 Vol. 133, pp. 385-386 (2013). DOI: 10.1541/ieejfms.133.385, 査読有.

Maki T., Kakikawa M., Kobayashi F., Yamada M., Matsuki A., Hasegawa H., Iwasaka Y., Assessment of composition

and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan, Atmospheric Environment, Vol. 74, pp. 73-82 (2013). DOI: 10.1016/j.atmosenv.2013.03.029, 査読有.

Kakikawa M., Yamada S., Effect of extremely low-frequency (ELF) magnetic fields on anticancer drugs potency, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. 48, pp.2869-2872 (2012). DOI: 10.1109/TMAG.2012.2200881, 査読有.

Kakikawa M., Yamamoto T., Satoh Y., Kitamura K-I., Sekiguchi T., Chowdhury VS., Funahashi H., Omori K., Endo M., Yano S., Yamada S., Hayakawa K., Chiba A., Srivastav AK., Ijiri K., Hattori A., Suzuki N., Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading, Biological Sciences in Space, Vol. 26, pp. 26-31 (2012). DOI: 10.2187/bss.26.26, 査読有.

Suzuki N., Sekiguchi T., Satake H., Kato, K., Nishiyama Y., Takahashi H., Danks JA., Martin TJ., Hattori A., Nakano M., Kakikawa M., Yamada S., Ogoshi M., Hyodo S., Yamaguchi Y., Chowdhury VS., Hayakawa K., Funahashi H., Sakamoto T., Sasayama Y., Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation, Gene, Vol. 499, pp. 326-331 (2012). DOI:10.1016/j.gene.2012.03.042, 査読有.

〔学会発表〕(計 15 件)

Maki T., Kobayashi F., Chen B., Puspitasari F., Kakikawa M., Matsuki A., Shi G., Hasegawa H., Iwasaka Y., Bacterial structures in atmosphere and sand dunes of Taklamakan Desert, 8th Atmospheric Bioaerosol Symposium, 大阪市北区, 2014年1月20-21日.

小林史尚, 牧輝弥, 柿川真紀子, 山田丸, 松木篤, 長沼毅, 岩坂泰信, 南極域における大気バイオエアロゾル直接採集, 第8回大気バイオエアロゾルシンポジウム, 大阪市北区, 2014年1月20-21日.

Maki T., Kobayashi F., Chen B., Puspitasari F., Kakikawa M., Matsuki A., Shi G., Hasegawa H., Iwasaka Y., Diversity and structure dynamics of airborne bacteria (bioaerosols) in Dunhuang City during a dust event, 7th

International Workshop on Sand/Duststorms and Associated Dustfall, Frascati, Italy, 2-4 Dec. 2013.

Kobayashi F., Maki T., Kakikawa M., Yamada M., Matsuki A., Naganuma T., Iwasaka Y., Direct sampling of atmospheric bioaerosol using a tethered balloon on the Antarctic” The 7th International Workshop on Sand/Duststorms and Associated Dustfall, Frascati, Italy, 2-4 Dec. 2013.

牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 岩坂泰信, 自由対流圏を風送されるバイオエアロゾルの細菌種組成解析, 第 29 回日本微生物生態学会, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市, 2013 年 11 月 22-25 日

牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 岩坂泰信, 高高度を風送されるバイオエアロゾルの細菌種組成解析, 日本気象学会 2013 年度秋季大会, 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 2013 年 11 月 19-21 日.

早川遼, 岩田佳奈, 熊本洋平, 牧輝弥, 柿川真紀子, 岩坂泰信, 小林史尚, 黄砂バイオエアロゾルの種組成解析と影響評価, 第 65 回日本生物工学会, 広島国際会議場, 広島県広島市, 2013 年 9 月 18-20 日.

小林史尚, 牧輝弥, 柿川真紀子, 山田丸, 松木篤, 長沼毅, 岩坂泰信, 南極域の風送バイオエアロゾル実相調査, 第 65 回日本生物工学会広島国際会議場, 広島県広島市, 2013 年 9 月 18-20 日.

牧輝弥, 柿川真紀子, 小林史尚, 山田丸, 長谷川浩, 岩坂泰信, 能登上空に風送される細菌群の 16S rDNA クローンライブラリーを用いた種組成解析, 第 73 回分析化学討論会, 北海道大学, 北海道函館市, 2013 年 5 月 18-19 日.

牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 山田丸, 松木篤, 岩坂泰信, 黄砂によって変動する大気バイオエアロゾル」第 7 回大気バイオエアロゾルシンポジウム, 滋賀県立大学, 滋賀県彦根市, 2013 年 1 月  
柿川真紀子, 非培養法で同定した能登上空に浮遊する微生物, 2008 ~ 2010 春季」第 3 回能登総合シンポジウム, 石川県珠洲市, 2012 年 3 月 16-17 日.

牧輝弥, 小林史尚, 柿川真紀子, 諸澤真治, 山田丸, 松木篤, 岩坂泰信, 能登半島上空に風送される大気バイオエアロゾル ~ 西からの旅人と北からの旅人 ~ , 第 3 回能登総合シンポジウム, 石川県珠洲市, 2012 年 3 月 16-17 日.

Kobayashi F., Maki T., Kakikawa M., Yamada M., Matsuki A., Naganuma T., Higashi T., Iwasaka Y., The research of atmosphere bioaerosol over Antarctica, 5th International

Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions, Kanazawa, 3-4 Feb. 2012.

Maki T., Kobayashi F., Kakikawa M., Aoki K., Matsuki A., Yamada M., Iwasaka Y., Japanese fermented food produced by long-range transported bacteria in Asian dust (KOSA) bioaerosols, 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions, Kanazawa, 3-4 Feb. 2012.

Kakikawa M., Kobayashi F., Maki T., Matsuki A., Yamada M., Iwasaka Y., The characteristics of airborne microorganisms in the atmosphere over an Asian dust arrival region, Noto peninsula, 5th International Symposium on the Environment of the Rim-Japan Sea Regions, Kanazawa, 3-4 Feb. 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿川 真紀子 (KAKIKAWA, Makiko)  
金沢大学・環日本海域環境研究センター・  
助教  
研究者番号: 10359713

### (2) 研究分担者

牧 輝弥 (MAKI, Teruya)  
金沢大学・物質化学系・准教授  
研究者番号: 70345601

(3)研究分担者

小林 史尚 (KOBAYASHI, Fumihisa)  
金沢大学・自然システム化学系・准教授  
研究者番号： 60293370

(4)研究分担者

張 代洲 (ZHANG, Daizhou)  
熊本県立大学・環境共生学部・教授  
研究者番号： 90322726