

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340055

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環境適応能の解析

研究課題名(英文) Analyses of the dynamics and adaptability 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)・教授

研究者番号：40360804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：富山県の立山浄土山山頂付近と富山大学屋上の2地点で採取した大気試料中の細菌群集と真核生物群集の特徴をPCR-DGGE法で比較した。その結果、立山と富山大学屋上の2地点の細菌群集構造は大きく異なっていると考えられたが、真核生物群集構造は類似している可能性が示された。また、大気から単離した赤色素産生細菌3株は、紫外線(UV-B, UV-C)、乾燥、過酸化水素などの環境ストレスに対して耐性を示し、大気環境中での生存に適した性質を持っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To characterize airborne bacterial and eukaryotic communities, the DGGE analysis of 16S rRNA and 18S rRNA genes amplified by PCR was performed for air samples collected at a suburban site (University of Toyama) and a high-altitude site (Mt. Jodo) in Toyama. The airborne bacterial communities were significantly different between suburban and high-altitude sites. In contrast, the eukaryotic communities appeared to be similar between the two sites. Moreover, three red-pigmented bacterial isolates from air showed resistance to ultraviolet (UV-B and UV-C), desiccation, and hydrogen peroxide. These bacteria could have a built-in advantage for survival in the atmosphere.

研究分野：環境影響評価

キーワード：大気 バイオエアロゾル 細菌 真菌 微生物群集構造 定量 動態 環境適応能

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、生物地理学的特性などに重要な影響を及ぼすことが指摘され、国内外で急速に関心が高まってきている。国内では、黄砂ダストに付着して長距離輸送される微生物の影響が懸念され、いくつかのグループが研究を進めてきている。しかし、黄砂飛来時以外の大気中の微生物群集に関しては十分研究されてきていない。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、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るが、大気中の微生物群集の時空間的動態を詳細に解析した報告は少ない。さらに、大気環境中の微生物は、太陽紫外線、乾燥、活性酸素種などの環境ストレスに晒されているが、このような環境で生存している微生物の環境適応能力についてはほとんど明らかとなっていない。

本研究開始前の研究では、孔径 0.2 μm のフィルターで濾過捕集した大気試料に含まれる細菌の遺伝子を PCR 法で増幅した後、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)に供し、細菌群集構造をバーコードのような形で捉えて解析してきた。その結果、富山県の大気中の細菌群集は、季節変化していること、*Pseudomonas* 属が一年を通じて優勢に検出されること、黄砂飛来時には *Bacillus* 属が比較的多く検出されることなどが明らかとなった。また、植物に影響を及ぼす可能性がある微生物が認められた。

本研究では、大気試料の捕集において、濾過捕集に加えて粒径別捕集も試みて PCR-DGGE 解析を行った。特に、粒径 2.5 μm 以下のエアロゾル(PM_{2.5})は、気管支や肺胞にまで達し、ヒトの健康に影響しやすいことから注目されている。さらに、リアルタイム PCR 法等により、微生物の存在量を調べた。また、大気環境中に存在する微生物の環境適応能として、紫外線、乾燥、活性酸素種に対する耐性が重要と考えられるので、それらの能力の把握を目指した。

2. 研究の目的

富山県は、日本列島のほぼ中央の日本海側に位置し、春季の黄砂現象、フェーン現象による急な気温上昇、冬季の降雪などの気象特性が見られる。本研究では、富山県の平地にある富山大学の屋上を中心定点とし、山岳高所にある立山にも定点を設け、大気試料を採取する。分子生物学的手法と培養法で、細菌や真菌などの微生物群集の時空間的動態を解析するとともに、検出した微生物種が生態系などに影響を及ぼす可能性を評価する。さらに、単離した大気由来細菌について、紫外線、乾燥、活性酸素種に対する耐性を調べ、大気環境での適応能力を評価することを本

研究の目的とした。

3. 研究の方法

富山県における大気中の微生物群集の時空間的動態を明らかにするために、富山大学理学部屋上で、月に 2~3 回大気中微生物をアンダーセンエアサンプラーを用いて粒径別捕集するとともに、これまで用いてきた孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターで濾過捕集も行った。これらの試料について、PCR-DGGE 法で、細菌の 16S rDNA と真核生物の 18S rDNA をそれぞれ標的とした微生物群集構造解析を行った。また、リアルタイム PCR 法を用いて全細菌と全真菌の定量も行った。全細菌の定量は、蛍光色素 DAPI を用いた蛍光顕微鏡観察でも行った。

立山浄土山山頂付近と富山大学理学部屋上で、同じ日時に同量の大気試料を濾過捕集した(入山できる 7 月~9 月の間に毎月 1~2 回実施)。これまでに捕集した試料について、PCR-DGGE 法とリアルタイム PCR 法で解析すると共に、次世代シーケンサー(Illumina MiSeq)と解析ソフトウェア QIIME を用いた微生物群集の網羅的解析も行った。

培養法による大気中微生物の検出は、バイオエアロゾルインパクター(BioStage 200, SKC 社)と、細菌用の R2A 寒天培地とニュートリント寒天培地、真菌用のポテトデキストロース寒天培地を用いて行った。単離した細菌と真菌の同定は、16S rDNA と ITS 領域(Internal Transcribed Spacer; 内部転写領域)の塩基配列をそれぞれ決定して行った。

さらに、単離した大気由来細菌について、紫外線(UV-B, UV-C)、乾燥、活性酸素種(H₂O₂)に対する耐性を調べた。

4. 研究成果

富山県の立山と富山大学屋上の 2 地点で同時に採取した大気試料中のバイオエアロゾルの特徴を PCR-DGGE 法で比較した(図 1)。その結果、細菌群集の DGGE バンドパターンはサンプル間の類似性が低く、立山と富山大学屋上の 2 地点の細菌群集構造は大きく異なっていると考えられた。さらに、主要なバンドの塩基配列を決定したところ、立山の大気からは α -Proteobacteria が特に多く検出されたが、富山大学屋上の大気からは α -、 β -、 γ -Proteobacteria、Actinobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Firmicutes などの様々な系統の細菌が検出された。一方、真核生物群集の PCR-DGGE 解析の結果、2 地点のバンドパターンの類似性が高い日が多かったため、大気中の真核生物群集構造は富山県の山岳地域と平野部で類似している可能性が示された。バンドの塩基配列を決定したところ、*Cladosporium* 属などの子嚢菌類、担子菌類、植物種が両地点から検出された。さらに、これらの試料について次世代シーケンサーで解析した。その結果、立山と富山大学屋上の 2 地点の細菌群集構造は大きく異なってい

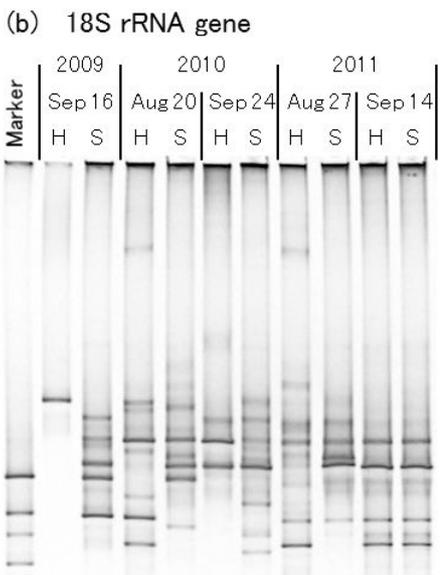
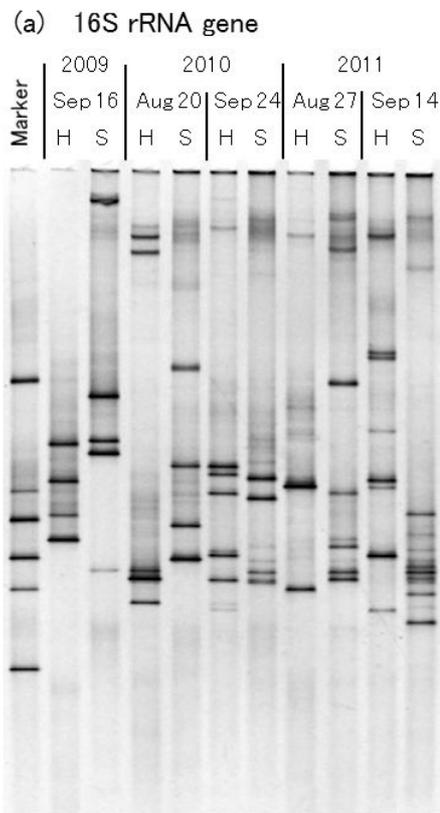


図 1 大気試料から PCR 増幅された 16S rDNA (a) と 18S rDNA (b) の DGGE 解析像。大気試料は、富山大学理学部屋上 (S) と立山浄土山山頂付近 (H) で採取した。

ると考えられ、Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria などの系統の細菌が検出された。真核生物群集構造は、標高が大きく異なる 2 地点である程度の違いが認められ、子囊菌類、担子菌類、植物種が両地点から検出された。

大気から単離された細菌は細胞内にカロテノイドなどの色素を有するものが多く、それらの色素は紫外線や乾燥などが原因となって生じる活性酸素種から細胞を保護していると考えられる。本研究では、大気から単離された赤色色素産生細菌 3 株について、紫外線、乾燥、活性酸素種の一つである過酸化水素に対する耐性を評価した。16S rRNA 遺伝子解析の結果、4-45 株は *Deinococcus* 属、5-12 株と 12-13 株は *Hymenobacter* 属で、いずれも既知細菌種の 16S rRNA 遺伝子塩基配列と 97% 未満の相同性を示し、新種の可能性が考えられた。また、紫外線、乾燥、過酸化水素に対する耐性を調べた結果、単離菌 3 株は太陽光に含まれる UV-B に対する耐性が高く、D10 値は 5,000 ~ 8,000 J/m² であった (図 2)。特に 4-45 株 (図 3) は UV-B に対して極めて高い耐性を示し、放射線、紫外線、乾燥などに対して極めて高い耐性を有する *Deinococcus radiodurans* R1 株より高い耐性を示した。さらに、赤色色素産生細菌 3 株は、UV-C に対しても比較的高い耐性を示し、乾燥と過酸化水素に対する耐性も認められた。

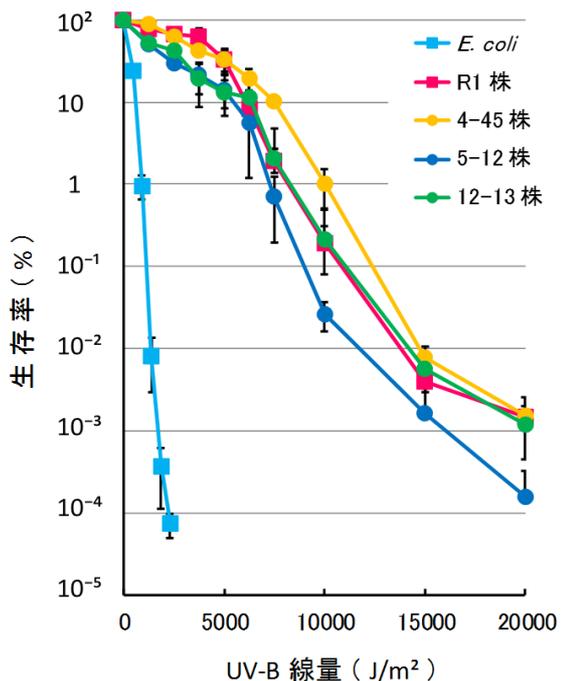


図 2 大気から単離した赤色色素産生細菌の生存に及ぼす UV-B の影響。

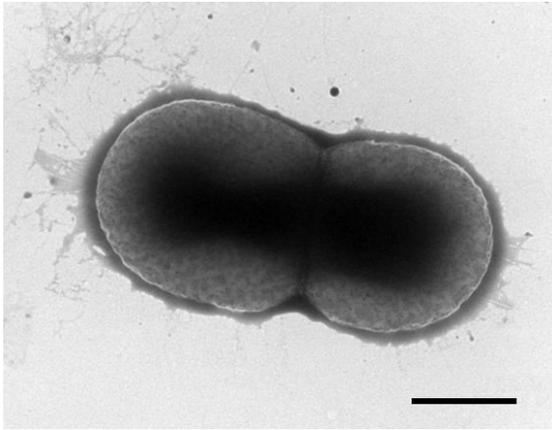


図3 *Deinococcus* sp. 4-45 の透過型電子顕微鏡像 (Bar, 1 μ m)。

富山大学屋上にて2011年4月~2013年10月に採取した大気試料について、細菌・真菌密度の定量とその季節変動の把握を目指した。リアルタイムPCR法による定量の結果、大気中の全細菌密度と全真菌密度はいずれも約 $10^2 \sim 10^6$ copies/m³であった。また、富山県で黄砂が観測された2011年の5月2日と13日に、全細菌密度は最も高い値を示し、全真菌密度も比較的高い値を示したことから、黄砂と共に運ばれた微生物を検出した可能性が高い。さらに、全細菌密度は3年間とも春に、全真菌密度は3年間とも秋に定量値が最大となり、季節変化が認められた。一方、培養法による定量では、細菌はリアルタイムPCR法の結果と異なり秋にやや高い値を示したが、真菌はリアルタイムPCR法と同様に秋に最大値を示した。

以上の結果から、標高が大きく異なる富山大学理学部屋上と立山の2地点で大気試料を採取して解析したところ、細菌群集構造は大きく異なるが、真核生物群集構造は類似している可能性が示された。また、富山大学理学部屋上の大気から単離した赤色色素産生細菌3株は、紫外線、乾燥、過酸化水素などの環境ストレスに対して耐性を示した。特に、これらの単離菌は太陽光に含まれるUV-Bに対して高い耐性を示し、大気環境中での生存に適した性質を持っていると考えられた。現在、アンダーセンエアサンプラー等で粒径別に捕集した大気試料を中心に、分子生物学的手法を用いた解析を進めている。

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)

Tanaka, D., Terada, Y., Nakashima, T., Sakatoku, A., and Nakamura, S., Seasonal variations in airborne bacterial community structures at a suburban site of central Japan over a 1-year time period using PCR-DGGE method. *Aerobiologia*, 査読有, Vol. 31, 2015, 143–157.
DOI: 10.1007/s10453-014-9353-3

〔学会発表〕(計8件)

高戸峻介, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中大祐 (2015年10月17日~20日)

富山大学屋上の大気中における細菌・真菌密度の定量とその季節変化

日本微生物生態学会第30回大会, 土浦亀城プラザ(茨城)

田中大祐, 佐藤 圭, 佐澤和人, 和田直也, 酒徳昭宏, 中村省吾 (2015年10月17日~20日)

立山地獄谷における火山性ガスが積雪中の細菌群集構造に及ぼす影響

日本微生物生態学会第30回大会, 土浦亀城プラザ(茨城)

Tanaka, H., Yonemochi, S., Tanaka, D., Lee, K. H., Kim, Y. J. (2015年10月15日)

Comparison of regional bioaerosols from Saitama, Toyama, and Jeju Island via PCR-DGGE.

The 11th Korea-Japan Environment Symposium, Jeju National University (Jeju, Korea)

Tanaka, D., Sato, K., Tiodjio, R. E., Sakatoku, A., Nakamura, S. (2015年6月24日~27日)

Characterization of airborne microbial communities at suburban and high-altitude sites in Toyama, Japan.

9th Asian Aerosol Conference, Kanazawa Tokyu Hotel (Ishikawa)

田中大祐, 佐藤圭, 島山友希, 中島拓也, 酒徳昭宏, 中村省吾 (2014年10月21日~24日)

富山県で採取したバイオエアロゾルに含まれる細菌の特徴とストレス耐性

環境微生物系合同大会2014, アクトシティ浜松(静岡)

島山友希, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中大祐 (2014年10月21日~24日)

大気から単離された赤色色素産生細菌の生存に及ぼす紫外線照射と酸化ストレスの影響

環境微生物系合同大会2014, アクトシティ浜松(静岡)

中島拓也, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中大祐 (2013年11月23日~25日)

富山県における大気中細菌のリアルタイムPCR法による定量とその季節変動について

第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島大学(鹿児島)

佐藤 圭, 寺田陽平, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中大祐 (2013年11月23日~25日)
立山と富山平野で採取したバイオエアロゾルの特徴

第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島大学(鹿児島)

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)・教授

研究者番号: 40360804

(2) 研究分担者

加賀谷 重浩 (KAGAYA, Shigehiro)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号: 50272894

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

酒徳 昭宏 (SAKATOKU, Akihiro)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教

研究者番号: 20713142

(平成27年度より研究分担者)