

## 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

牧 輝 弥\*

### 1. はじめに

中国大陸の砂漠で巻き上がった砂粒子は、偏西風によってアジア全域に運ばれ、黄砂となる。一方、黄砂は「微生物の箱船」とも呼ばれ、黄砂とともに微生物（黄砂バイオエアロゾル）も日本にまで飛来している可能性がある<sup>1)</sup>。越境輸送された微生物は、ヒトへの健康被害を引き起こし、畜産農作物や微生物生態にも影響を及ぼすと予想される。そこで、微生物の長距離輸送を明らかにするため、富山県立山に降り積もる雪に着目した。日本海を臨む立山の積雪中には、降雪とともに堆積した黄砂粒子が、融雪期を迎える春まで、飛来した状態で保存される<sup>2)</sup>。従って、日本上空に飛来した黄砂鉍物粒子を積雪中から高純度で捕集でき、黄砂粒子に付着した微生物細胞およびその核酸（DNA）を効率よく解析できる（図1）。

立山室堂の積雪中から黄砂鉍物粒子に付着する微生物群を採取し、集積培養によって活性化させ、微生物由来の核酸（DNA）塩基配列をもとに細菌種組成を積雪層間で比較検討し、黄砂とともに飛来する細菌群に関する考察を行った。

### 2. 立山積雪からの黄砂採取

2009年4月に富山県立山・室堂平（2,450m）において、積雪表面より地表表面まで垂直方向に深さ5m95cmの雪壁面を整形した。雪壁面の断面層において、2008年秋（10月）から2009年春（4月）まで降り積もった積雪層中の「鉍物粒子が確認された3層（黄砂層）」および「鉍物粒子が見られない2層（対照区）」の合計5層から積雪試料100mlを滅菌ポリプロピレンチューブに採取した。なお、黄砂鉍物粒子の指

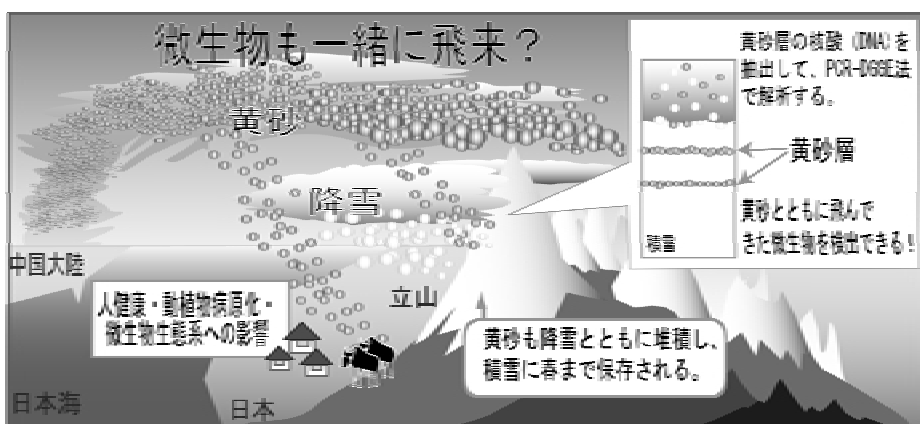


図1 立山積雪中の黄砂粒子から長距離微生物の検出

\*金沢大学大学院理工研究域物質化学系准教授

第234回京都化学者クラブ例会（平成21年12月5日）講演

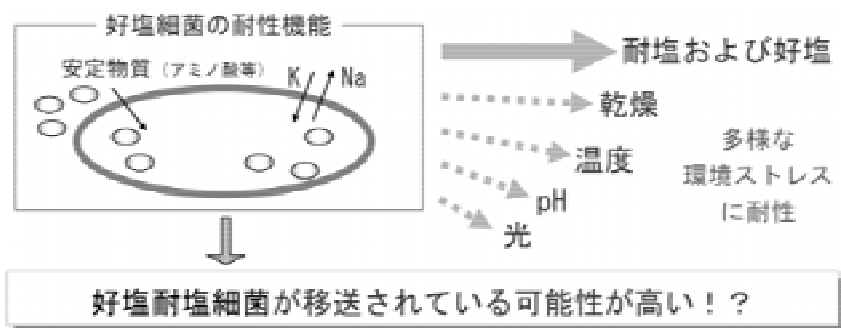


図2 好塩および耐塩細菌に着目する理由

標となる Ca を測定したところ、鉍物粒子を含む積雪試料からのみ約 $80\mu\text{mol/L}$ の Ca が検出された。従って、積雪層に含まれる鉍物粒子は、黄砂に起因すると考えられる。

### 3. 好塩細菌に注目

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<sup>3)</sup>。細菌の中でも、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る膜構造を有する (図2)。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<sup>4)</sup>。そこで、大気中に浮遊する耐塩細菌に焦点を絞って集積培養するため、積雪試水の融解水を、NaCl 濃度を 0%、3%、10%及び15%に変えた細菌用液体培地で培養した結果、黄砂層3層の融解試水では、0%及び3%の NaCl 濃度の培地で微生物の生長が見られた (図3)。さらに、3層の黄砂層のうち1層では、10%の濃度の培地でも増殖が見られ、高い耐塩能力をもつ細菌の存在が示唆された。なお、対照区では生長が確認されなかった。従って、「黄砂層」

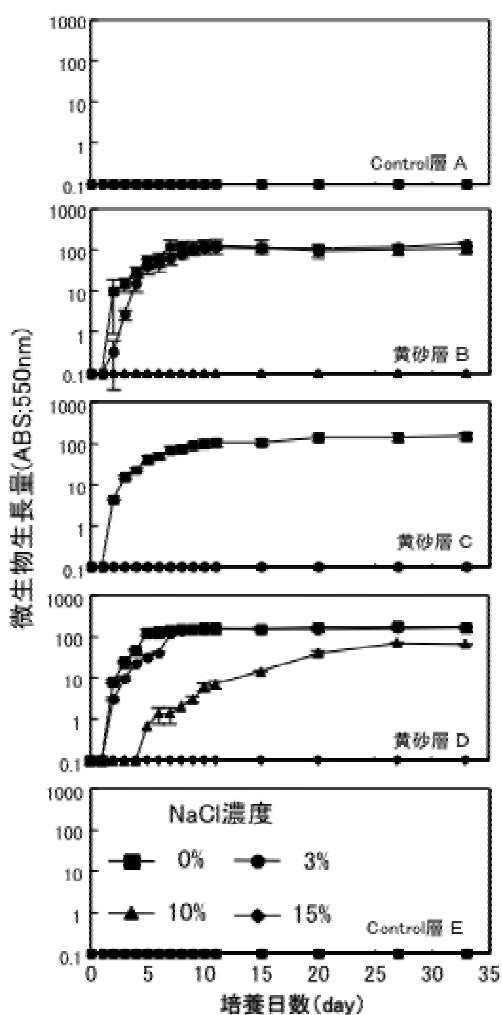


図3 積雪試料を接種した NaCl を含む培地中における微生物の生長量

には、耐塩細菌が生残していたと推察できる。

#### 4. PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法

積雪の融解試水および耐塩微生物培養からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を増幅させ、PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法を用いて<sup>5)</sup> 各層ごとの細菌種組成を比較した。その結果、各層の積雪融解試水から直接抽出した DNA からは、全 5 層で PCR 産物が得られ、EGGE ゲルイメージ上では、特に黄砂層 (C 層及び D 層) でバンド数が多くなった (図 4)。従って、黄砂層の積雪試料には、比較的多様な細菌の核酸が含まれていたと考えられる。また、NaCl を含む培地で集積培養した試料では、各黄砂層において異なるバンドと共通のバンドが見られたため、黄砂ごとに異なる種組成の細菌群が飛来し、積雪層中に堆積した可能性が高い。また、NaCl 濃度によってバンドパターンが異なることから、NaCl 濃度の要

求性が異なる細菌種 (好塩細菌) が黄砂層に含まれていたと推察できる。

#### 5. 核酸塩基情報による長距離輸送種の探索

各積雪層において積雪試料のバンドに含まれる核酸塩基配列を決定し、比較したところ、全 11 系統タイプに大別され、すべてグラム陽性細菌群に属した。特に、黄砂層間の優占細菌種は、*Bacillus* 属あるいは *Paenibacillus* 属の細菌種と近縁となった (図 5)。*Bacillus* 属の細菌種は、芽胞を形成し、環境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<sup>9)</sup>。2007 年 8 月の敦煌市の高度 800m<sup>7)</sup> あるいは 2008 年 5 月黄砂飛来時の珠洲市上空 800m<sup>8)</sup> で捕集したエアロゾル試料からも、*Bacillus* 属の細菌種が検出されている。*Bacillus* 属に属する細菌は、高度 20,000m でも検出され、地球の対流圏を越えて垂直輸送され得る<sup>9)</sup>。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

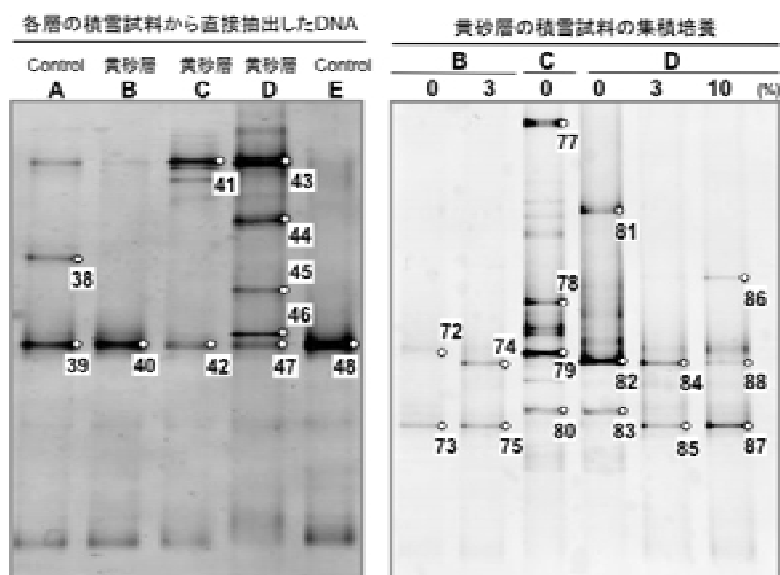


図 4 DGGE ゲル・イメージ

が選択的に生残でき、黄砂層にのみ、*Bacillus* 属あるいは *Paenibacillus* 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、多くのバンドで検出された核酸塩基配列は、*B. subtilis* グループに属した。この細菌グループの細菌群は、砂塵が発生した大西洋海上<sup>10)</sup> や黄砂発生地の大クラマカン砂漠<sup>7)</sup> のエアロゾルからも分離された。広島市と敦煌市とで分離された *B. subtilis* の近縁細菌群の16S rRNA 遺伝子の核酸塩基配列が100%一致することが実証され、黄砂による細菌輸送を示唆する報告がある<sup>11)</sup>。従って、*B. subtilis* グループの細菌種が、黄砂発生地域で鉱物粒子とともに巻き上げられ、黄砂鉱物粒子に付着し、立山山麓に降雪とともに堆積した可能性は高い。これらの細菌群は、日和見感染細菌であるため毒性は低いものの、アレルギーの増悪などの健康影響を及ぼすかもしれない。

## 5. おわりに

立山において黄砂鉱物粒子を含む積雪層には、*Bacillus* 属の細菌種をはじめとするグラム陽性細菌群が優占し、高い耐塩機能を持ち、積雪中あるいは大気中の環境ストレスにも耐えて生残していることが分かった。従って、耐塩細菌が、黄砂鉱物粒子とともに立山にまで飛来して、降雪として積雪中に堆積した可能性はある。

今回、バイオエアロゾル試料の細菌種は、敦煌市の上空でも検出されているものの、16S rRNA 遺伝子配列で100%の一致しているのみである。将来、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、立山積雪中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

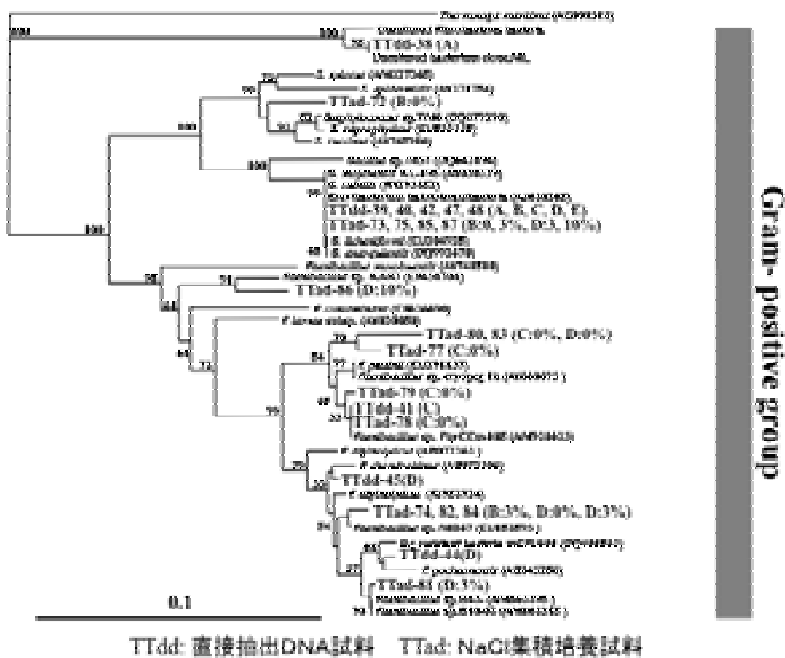


図5 16S rDNA 塩基配列を用いた系統分類学的位置付け

長距離輸送の実態が明かされるであろう。

## 謝 辞

本研究の施行にあたり、岩坂泰信教授（金沢大学フロンティアサイエンス機構）および小林史尚准教授（金沢大学理工研究域）、青木真一准教授（富山大学理学部）には、試料収集では多大なるご助力をいただき感謝いたします。環境省地球環境推進費（C-091）および文部科学省科学研究助成金（20710024）の助成を頂きました。深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 岩坂泰信. 黄砂：その謎を追う. 紀伊國屋書店 (2006).
- 2) 青木一真, 渡辺幸一. 立山連峰における大気エアロゾル観測. *エアロゾル研究*. **24** (2009) 112-116.
- 3) Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L.: Life in extreme environments. *Nature*. **409** (2001) 1092-1100.
- 4) Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R.: Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline System*. **2005** (2005) 1-8.
- 5) Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (1993) 695-700.
- 6) Riesenman, P.J., Nicholson, L.: Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (2000) 620-626.
- 7) Kakikawa, M., Kobayashi, F., Maki, T., Yamada, M., Higashi, T., Chen, B., Shi, G., Hong, C., Tobo, Y., Iwasaka, Y. Dustborne microorganisms in the atmosphere over Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang. *Air Qual. Atmos. Health*, **1** (2009) 195-202.
- 8) 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** (2010) 35-42.
- 9) Griffin, D.W.: Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000m in Earth's atmosphere. *Aerobiologia*. **20** (2004) 135-140.
- 10) Kellogg, C.A., Griffin, D.W., Garrison, V.H., Peak, K.K., Royal, N., Smith, R.R., Shinn, E.A.: Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia*. **20** (2004) 99-110.
- 11) Hua, N.P., Kobayashi, F., Iwasaka, Y., Shi, G.Y., Naganuma, T.: Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan. *Aerobiologia*. **23** (2007) 291-298.