

地下水汚染検知微生物センサの開発

志村 稔* 池畑 政輝* 潮木 知良*

吉江 幸子* 早川 敏雄*

Development of a Biosensor for the Detection of Underground Water Pollutions

Minoru SHIMURA Masateru IKEHATA Tomoyoshi USHIOGI

Sachiko YOSHIE Toshio HAYAKAWA

Anaerobic bacteria seem to be superior for biosensors to monitor anoxic circumstances as those in underground water because they are able to maintain their cells under anaerobic conditions and subsist for a long time under poor nutrient conditions. Therefore, we tried to develop a biosensor using an anaerobic bacterium for toluene in underground water. In this study, we subjected an anaerobic toluene degrader, *Azoarcus* sp. DSM9506, to the gene engineering, and designed to produce enzymes in the presence of toluene under anaerobic conditions. The resulting bacterium proved a toluene biosensor detecting in the range from 0.1 mg/l to 10 mg/l.

キーワード：バイオセンサ, 微生物, 汚染検知, 地下水

1. はじめに

平成15年に国民の健康の保護を図ることを目的とした“土壌汚染対策法”が施行された。これにより、土地所有者は、土壌の汚染状況の把握と土壌の汚染による人の健康被害の防止に関する措置等の土壌汚染対策を実施することが要求されるようになった。また、平成21年4月には「土壌汚染対策法の一部を改正する法律」が公布され、汚染土壌の適切かつ適正な処理を図るための制度の拡充がなされた。これらの法整備により、企業活動で使用されていた工場跡地等の再開発・売却時には汚染調査を行わなければならない、規制値の超過が確認された場合には何らかの対応をしなければならなくなった。環境省の調査によると、鉄道業における基準値超過件数は平成17、18、19、20年度にそれぞれ3、2、0、4件と少数ながら引き続き報告されている¹⁾。

土壌が汚染されると、汚染土壌を吸い込むことによる健康への影響や、土壌から溶け出した有害物質による地下水汚染が心配される。地下水の汚染は工場・事業所からの有害物質の漏洩が原因となっていることが多い。有害物質の中でも、有機溶剤等の埋設型貯蔵タンクや地下配管からの漏洩は発見しづらく、そのため土壌を介して漏洩が地下水にまでおよび、広範囲の汚染を引き起こすと考えられる。鉄道では、件数は少ないものの軽油やボイラー燃料タンクからの漏洩事例がある。このような漏

洩によって影響を受ける範囲を最小限に留めるためには、定期的な、もしくは常時のモニタリングが有効である。しかし、そのためには大きなコストが必要になることが懸念される。そこで、微生物を利用した地下水のモニタリング技術が開発できれば、長期間にわたって低コストで運用可能なモニタリングシステムが構築できると考え、微生物を地下水汚染のセンサとして利用することを検討した。

2. センサ微生物の選定と検討課題

本研究では、溶媒として一般的で、地下水への混入報告例があるトルエンをモデル物質として選定し、これを検知できる微生物を作り出すことを目標とした。微生物の選定に当たっては、地下水は一般的に溶存酸素濃度が低いことを考慮して、嫌気性細菌をセンサとすることにした。また、嫌気性細菌は地下水のような低栄養状態でも細胞を維持し機能することができることから、地下水中の化学物質を検知するセンサとして優れていると考えられる。しかしその一方で、嫌気性細菌は増殖が遅く、研究に必要な菌体量を確保するには時間を要することから、こうした用途に利用しようという試みは今までにはなかったようである。そのため、嫌気性細菌を利用したトルエンセンサの開発に必要な要素技術の確立を目指して、嫌気性細菌の培養方法の改良、遺伝子導入法の検討などを行った。さらに、遺伝子組換え技術を用いて、嫌気性細菌のトルエン分解関連遺伝子とレポーター遺伝子

* 環境工学研究部 (生物工学)

特集：環境技術

とを結合させた人工遺伝子を作成した。この人工遺伝子を導入した嫌気性細菌がトルエンを検知すると、蛍光、色素生産、発光のような人間が視覚的にとらえることが出来る信号を発するようになることを確認した。また、トルエンは地下水における要監視物質のひとつであり、その指針値は0.6 mg/l以下となっている。一方、水道水の水質管理目標値が0.2 mg/l以下と定められている。このことから、これらの濃度のトルエンを検知できるか否かでセンサとしての可能性を評価した。

3. 嫌気性細菌培養条件

トルエン分解能力を有する嫌気性細菌のうち純粋培養が可能なのは限られている。その中から *Azoarcus* sp DSM9506株（以下DSM9506株と略す）を選択して実験に用いた。一般的に、嫌気性細菌は大腸菌など酸素を利用する好気性細菌に比べると増殖に時間がかかる。実際にDSM9506株を通常条件で培養してみたところ、試験に利用できる状態になるまでに1週間以上を要した。そこで培地組成の改良により増殖速度を改善することを目的として、培地に添加する炭素源の探索等を試みた。まず最初に101種類の炭素源に対する利用能力を確認したところ、D-キシロース、D-リボース、D-アラビノース、L-アラビノース、乳酸など21種類が炭素源として利用できることが明らかになった。このうち乳酸が最も良い増殖を示したため、乳酸を炭素源とすることにした。次に、培地に添加する乳酸濃度の検討を行ったところ、培地中の乳酸濃度は0.21%が最適であることが分かった。

微生物種によっては培養開始時の菌数が少ないと増殖しない場合がある。このため培養開始時の微生物添加量が増殖に与える効果を検討した。乳酸を0.21%添加した培地で24時間培養して得た菌体を、新鮮な培地に対して1~10%の範囲で量を変えて添加し、増殖量を調べた。その結果、24時間経過時点では添加した菌体量が多いほど増殖量が多くなったが、48時間後には添加量の多寡に関係なく、ほぼ同じ量の微生物体が得られることが分かった。したがって、初期添加量が1~10%の範囲内であれば増殖に差はなく、試験内容によって適宜に設定しても問題ないと考えた。

4. トルエン分解遺伝子の分離とレポーター遺伝子の作成

DSM9506株と同様にトルエン分解能力を有する近縁の微生物が数種類報告されており^{2, 3, 4)}、それらの微生物からはトルエン分解遺伝子群が同定、分離されている⁵⁾。これらの遺伝子情報を利用してDSM9506株から

トルエン分解遺伝子群の分離を行った。次に、分離した遺伝子群中の適当な部位にレポーター遺伝子を挿入した。レポーター遺伝子とは、ある遺伝子が発現しているかどうかを容易に判別するために、その遺伝子と置き換える別の遺伝子を指し、通常は色素生産や発光に関与する遺伝子を用いる。ここでは、蛍光を発するタンパク質、または色素を生産する酵素の遺伝子をレポーター遺伝子として使用した。これにより、DSM9506株がトルエンを分解している時には、そのことが視覚的に認識できるようになると考えた。

4.1 トルエン分解遺伝子の分離

DSM9506株に近縁の微生物の研究から、トルエン分解に関与する遺伝子は図1に示すような構造をしていることが分かっている⁶⁾。トルエン分解酵素を作るための遺伝子ユニットと分解酵素の生産を制御する遺伝子ユニットの2つから成る。トルエンを検知すると制御遺伝子が分解酵素の生産を誘導し、生産された酵素によってトルエンが分解される。

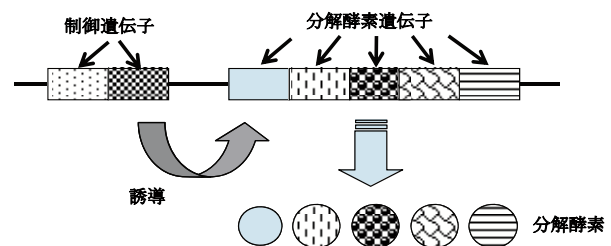


図1 トルエン分解に関与する遺伝子群の模式図

DSM9506株からトルエン分解に関与する遺伝子群を分離するためにはポリメラーゼ連鎖反応法（Polymerase Chain Reaction：PCR）を用いた。PCRは、高温で安定なDNA複製酵素と高温になるとDNAの二本鎖が一本鎖に解離する性質を利用して目的のDNA断片を増幅する方法であり、DSM9506株のゲノムDNAを鋳型としてPCR反応することによって、nサイクルの反応で目的遺伝子を2ⁿ倍に増幅させることができる（20サイクルの反応によって目的遺伝子は100万倍以上に増幅される）。U.S. National Library of Medicineのデータベースより得たトルエン分解酵素遺伝子の塩基配列情報を基に、トルエン分解に関与する遺伝子領域の両末端と同一の塩基配列となるDNAを合成し、PCRを行った。増幅したDNA断片の一部をDNAシーケンサーで解析し、トルエン分解遺伝子群を含むDNA断片であることを確認した。このDNA断片は嫌気性細菌中で機能するベクターDNAであるpBBR1MCS2に挿入し、大腸菌JM109株に形質転換して保存した。なお、pBBR1MCS2は東北大学大学院生命科学研究所永田裕二准教授より分譲頂いた。

4.2 レポーター遺伝子作成および嫌気性細菌への導入
レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパク質遺伝子とガラクトース加水分解酵素遺伝子を用いることとした。緑色蛍光タンパク質遺伝子はEGFP（クロンテック社）、evoglow（フナコシ株式会社）を使用した。ガラクトース加水分解酵素（ β -Galactosidase）遺伝子はpSV- β -Galactosidase Vector（プロメガ社）を使用した。

これらレポーター遺伝子を、遺伝子組換え手法を用いてトルエン分解遺伝子群中に挿入した。挿入した部分が設計通りに連結されていることは、DNAシーケンサを用いて確認した。この人工遺伝子をDSM9506株に導入することによって、トルエンを分解する条件下ではレポーター遺伝子が働き、緑色蛍光タンパク質やガラクトース加水分解酵素を生産することが期待される（図2）。トルエンが存在すると、トルエン分解酵素遺伝子と置き換えたレポーター遺伝子が働き緑色蛍光タンパク質、または加水分解酵素が生産される。その結果、蛍光または色素生産が生じ、トルエンの存在を検知できる。

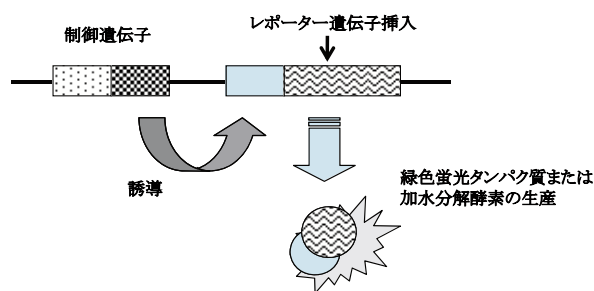


図2 レポーター遺伝子の作用概念

嫌気性細菌は研究例が少なく、遺伝子導入方法に関する情報が乏しかったために、まず遺伝子導入方法の検討を行った。遺伝子導入方法として、すでに大腸菌で利用されている、微生物を化学的に処理する化学方法、パルス電圧によって遺伝子を取り込ませる電子穿孔法、カーボンナノチューブを用いて細胞膜に孔をあけて遺伝子を取り込ませる方法、および細菌間での遺伝子伝播現象を利用した接合伝達法を試行した。遺伝子導入の成否は、レポーター遺伝子に連結した抗生物質（カナマイシン）耐性遺伝子を利用して判断した。すなわち、それぞれの遺伝子導入法を試みた後、カナマイシンを含む培地で培養し、良好に増殖する個体には人工遺伝子が導入されていると考えた。その結果、接合伝達法で遺伝子導入を試みたものから良好な増殖を示す個体を数個得ることができた。その他の方法では増殖を示す個体を獲得することは出来なかった。

5. レポーター遺伝子導入株のセンサとしての性能評価

5.1 レポーター遺伝子導入株の評価法

接合伝達法によって得られたレポーター遺伝子導入株のトルエンセンサとしての性能評価を行った。DSM 9506株は酸素濃度が低い地下水中でガソリン汚染などに由来するトルエンを分解する性質を持っている。従って、センサとしての性能評価には、低酸素環境を作り出すことが出来る嫌気グローブボックスを利用した。嫌気グローブボックスは内部を窒素で満たし、さらに付属の銅触媒装置によって酸素を除去することで、酸素濃度が大気中の約1/10万という嫌気状態を維持することができる。培地の調製や植菌などの操作はすべてグローブボックス内部で行い、ガラス容器に分注した後、酸素を通さないブチルゴム栓で密封した。ガラス容器をグローブボックスから取り出し、30℃の培養器中で培養を行った。ガラス容器には酸素除去剤として酸化チタン-クエン酸ナトリウム溶液や硫化ナトリウム九水和物を添加して嫌気環境を維持した。また、嫌気指示薬として、嫌気環境では透明で、酸素の混入によりピンク色に変色する性質を持つレザズリンを培地に添加しておいた。ガラス容器の液体がピンク色に変色した場合には酸素が混入したものと破棄した。

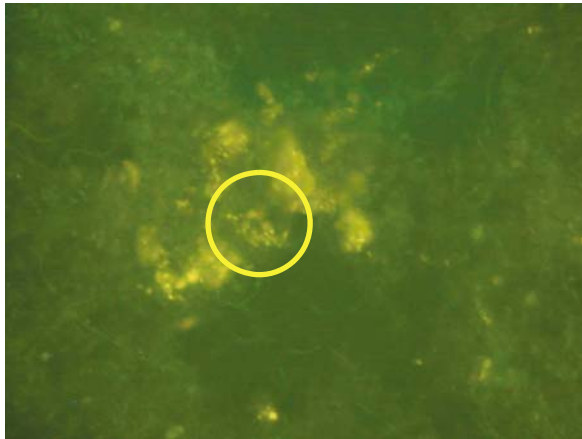
センサとしての性能評価には、①緑色蛍光タンパク質であるEGFPの遺伝子、②緑色蛍光タンパク質であるevoglowの遺伝子、③ガラクトース加水分解酵素の遺伝子、それぞれを持つ3種類のレポーター遺伝子導入株を用いた。この3種類すべてにおいてトルエン存在下でレポーター遺伝子の発現を確認することが出来た。しかしながら、evoglowをレポーター遺伝子とする場合は、安定した緑色蛍光を得ることが出来ず、蛍光顕微鏡で観察している最中に蛍光が減少した。このため、以降はEGFP、またはガラクトース加水分解酵素をレポーター遺伝子として有する2種類のレポーター遺伝子導入株を用いてトルエンセンサとしての評価を行った。

5.2 緑色蛍光タンパク質遺伝子導入株の評価

EGFP 遺伝子導入株を栄養培地で増殖させ、遠心器で集め、基本培地で洗浄後、トルエン検知試験を行った。基本培地に菌を移し、トルエンを添加して嫌気状態で培養したところ、菌体が緑色の蛍光を発していることを確認できた（図3）。

また、この緑色蛍光を発する菌体は、酸素がある環境に移すと蛍光が消え、さらにその後嫌気環境に戻すことによって再び蛍光を発することを確認した。この結果は、トルエンが存在する嫌気環境下においてのみ、レポーター遺伝子導入株の細胞内でEGFPが生産されてい

特集：環境技術



トルエンによってEGFPの生産が誘導されて緑色蛍光を発する(円の内部).

図3 緑色蛍光を発する遺伝子導入株

ることを示している。また、この細菌がトルエンを分解することができない好気環境に移すと蛍光が消失したことから、トルエン分解が起きないと蛍光を発しないということ、生産されたEGFPは長期間存在し続けないことがわかる。つまり、トルエンがすべて分解されて汚染が無くなれば蛍光も消えることが期待される。以上の結果から、緑色蛍光の有無を指標としてトルエンの存在を検知できる、すなわちバイオセンサとして利用できると考えられる。

5.3 ガラクトース加水分解酵素遺伝子導入株の評価

ガラクトース加水分解酵素遺伝子導入株を栄養培地で増殖させ、遠心器で集め、基本培地で洗浄後、トルエン検知試験を行った。基本培地にトルエンまたはベンゼンを10mg/lとなるように添加し、菌体と発色基質(X-gal)を加えて静置した。X-galはガラクトース加水分解酵素の作用によって青色の色素へ変換される化学物質である(図4)。トルエンが存在すると制御遺伝子が働き、ガラクトース加水分解酵素遺伝子の発現を促す。その結果、加水分解酵素が生産されて発色基質を青色色素に変換する。1週間後に観察したところ、トルエンを含む培地中の菌体だけが青色色素を生産していた(図5)。ベンゼンを含む場合、あるいは基本培地のみの場合には色素は生

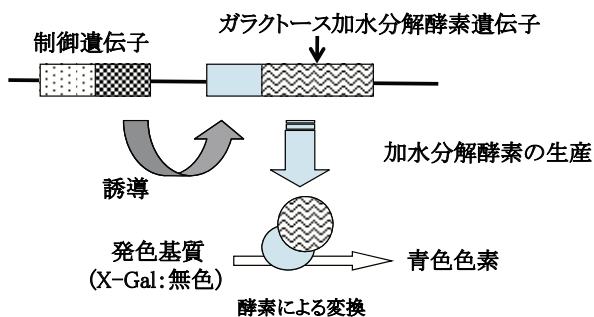


図4 青色色素によるトルエン検知



図5 ガラクトース加水分解酵素を利用したトルエンセンサ

産されなかった。このことより、青色色素を指標としてトルエンの存在を検知できることが示唆された。

5.4 ガラクトース加水分解酵素遺伝子の発現と色素生産の関係

ガラクトース加水分解酵素遺伝子導入株による色素生産は、トルエン検知とそれに続く酵素生産の結果生じていると考えられる。このことを確認するために次の試験を行った。

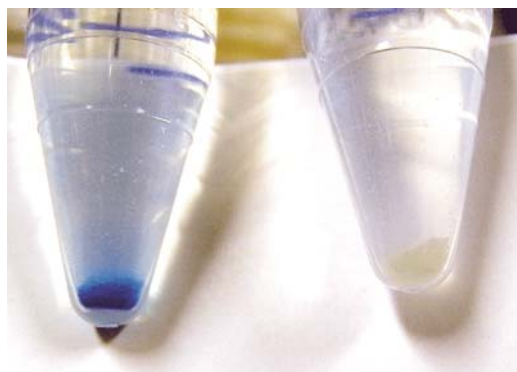
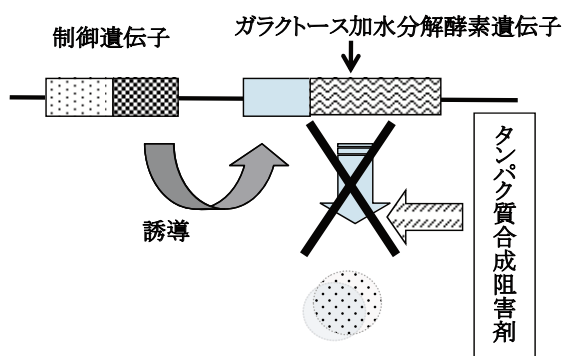
遺伝子導入株をトルエン含有培地に懸濁し、回転式振盪培養を行った。すると、色素生産は認められなくなった。これは振盪によって培地中の酸素濃度が上昇したことで、嫌気性細菌はトルエン分解を停止するとともに、加水分解酵素も生産されなくなったために青色色素が生じなくなったと考えられる。

次に、トルエン検知試験液にタンパク質合成阻害剤(遺伝子からタンパク質が作られる段階を阻害する薬剤)を添加する試験を行った。その結果、遺伝子導入株は加水分解酵素を生産できず、青色色素を生産できなくなった。このことから色素生産がガラクトース加水分解酵素遺伝子の発現の結果であることが証明された(図6)。

以上のことから、ガラクトース加水分解酵素遺伝子導入株を用いることでも嫌気環境下でのトルエン検知が出来ることが明らかになった。

6. トルエン濃度とガラクトース加水分解酵素活性の相関性

次に、トルエンによって誘導される青色色素生産量とトルエン濃度との相関を調べた。トルエンを0, 1, 5, 10mg/lの濃度で含む培地を作成し、それぞれ遺伝子導入株を植菌して、1週間静置培養を行った。青色色素は、波長620nm付近に吸収極大を持つため、吸光度を利用して



タンパク質合成阻害剤を添加したものと(右:白色)添加しないもの(左:青色).

図6 タンパク質合成阻害剤による色素生産抑制

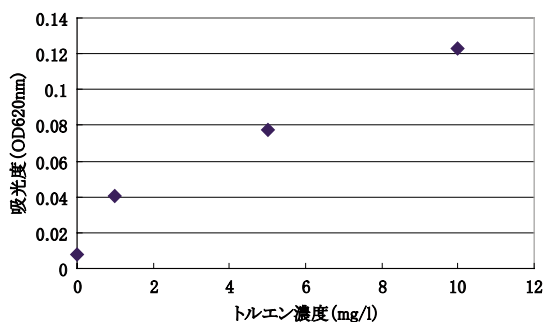


図7 トルエン濃度と色素生産量の対比

色素生産量を知ることができる。吸光度の測定結果から、トルエン濃度に比例して色素生産量も高くなることが分かった(図7)。しかし、色素が水溶性ではないため、細胞表面に吸着してしまい、吸光度が必ずしも色素量を正確に反映していないと考えられた。

そこで、3種類の水溶性化合物(o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside:ONPG, 3',4'-Dihydroxyflavone-β-D-galactopyranoside:DHF-Gal, 6-O-β-galactopyranosyl-luciferin:Luc-Gal)をX-galの代替物として使用することを検討した。遺伝子導入株の作用によってONPGとDHF-Galは色素に変化し、Luc-Galからは発光性化合物(ルシフェリン)が遊離し、あらかじめ反応液中に添加してあるルシフェラーゼと反応することによって発光する(図8)。トルエンが存在する時には、遺伝子導入株はLuc-Galを発光性化合物に変化させる。この化合物は反応液中にあらかじめ添加されているルシフェラーゼと化学反応をおこし、その際に発光が生じる。この発光量を測定することによってトルエンの検出・定量が可能になる。

試験の結果、ONPGとDHF-Galは色素が反応液中に均一に分散しなかったため定量には利用できないことが分かった。しかし、Luc-Galを利用した場合は反応液から安定した発光が得られ、発光量の測定が可能であ

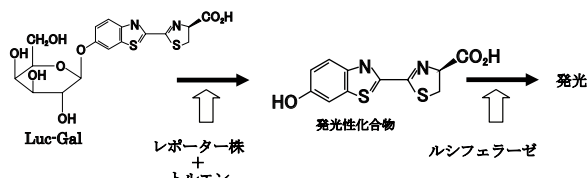


図8 発光によるトルエン検知の原理

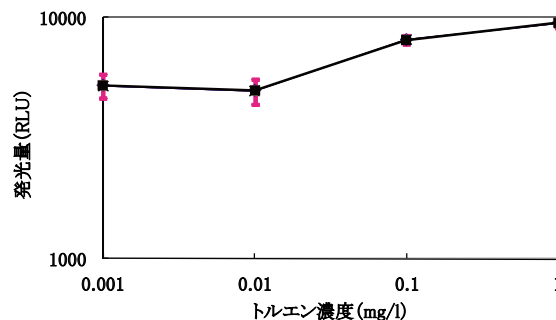


図9 トルエン濃度と発光量との相関

た。この結果を受け、Luc-Galを用いて様々なトルエン濃度における発光量を調べたところ、トルエン濃度0.01mg/l以上のときに発光を確認できることがわかった。また、その発光量は、トルエン濃度0.01~1.0mg/lの範囲においては、トルエン濃度と相関を示すことを確認した(図9)。この結果より、この遺伝子導入株とLuc-Galの組み合わせによって、トルエンの有無だけでなく、その濃度についても情報を得られると考えられる。

7. まとめ

本研究では嫌気細菌を利用したトルエンセンサの開発を行った。センサ候補として嫌気性細菌 *Azoarcus* sp DSM9506株を選定し、増殖条件の改良、遺伝子導入法の改善を行い、レポーター遺伝子を保持、機能させることができた。EGFP遺伝子をレポーター遺伝子として使

特集：環境技術

用すると、トルエンの存在を蛍光として検知できることを示した。一方、ガラクトース加水分解遺伝子をレポーター遺伝子とすると、検出薬に Luc-Gal を用いることによって、発光量からトルエン濃度が推定できることを確認した。これらの結果から、遺伝子組み換え技術を用いて嫌気性細菌に適当なレポーター遺伝子を導入することによって、化学物質に対するバイオセンサとして利用できることが明らかになった。

トルエンは地下水における要監視項目のひとつで、水道水の水質管理目標値が0.2mg/l以下と定められている。本研究で開発した遺伝子導入株は水質管理目標値よりも低い濃度を検知する能力があり、トルエンセンサとして十分な能力を有していると考えられる。微生物をセンサとして利用する試みは、好気性細菌を用いた報告例は多数あるが、嫌気性細菌を利用したものについての報告例は見受けられない。嫌気性細菌をセンサとして利用できること、トルエン濃度と関連した反応性が確認できたことは画期的なことであると考えられる。

今回用いた手法を応用すれば、他の物質を検知するセンサの開発も可能だと考える。嫌気性細菌には、トルエン、油やトリクロロエチレンを分解する細菌、砒素などの重金属を還元する能力を有するものがある。これらの細菌を遺伝子操作することによってそれぞれの物質についてのセンサとして利用することが考えられる。一方、自然環境中には、様々な物質が存在し、それらの物質が遺伝子導入株にどのような影響を及ぼすのかは未知である。また、長期にわたる安定性を確認することも必要である。これらの課題を克服することで実用的なバイオセンサの開発につながると考えている。

本研究の一部は新エネルギー・産業技術総合開発機構

の委託による生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発の一環として行った。

文献

- 1) 水・大気環境局：土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果，環境省，2007，2008，2009，2010
- 2) Biegert, T., Fuchs, G. and Heider, J.: Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* Vol.238, pp.661-668, 1996.
- 3) Beller, H.R. and Spormann, A.M.: Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* Vol.179, pp.670-676, 1997.
- 4) Rabus, R. and Heider, J.: Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* Vol.170, pp.377-384, 1998.
- 5) Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H. and Heider, J.: Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycol radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* Vol.28, pp.615-628, 1998.
- 6) Gypsy R.A., Ana M.R. and Alfred M.S.: Benzylsuccinate Synthase of *Azoarcus* sp. Strain T: Cloning, Sequencing, Transcriptional Organization, and Its Role in Anaerobic Toluene and m-Xylene Mineralization. *J. Bacteriol.* Vol. 183, pp. 6763-6770, 2001.