

# 微生物を使って環境をモニタリングする

志村 稔

環境工学研究部(生物工学 主任研究員)



しむら みのる

## はじめに

土の中にはたくさんの微生物が生息しています。土1gの中には数千万もいるといわれています。人間が落としたゴミや動物の排泄物、植物の落ち葉など様々なものを分解して栄養として増殖しています。なかにはガソリン、ポリ塩化ビフェニル(PCB)、テトラクロロエチレンなどの環境汚染物質を分解することができるものがあります。このような特殊な能力を持つ微生物の力を利用して環境汚染を浄化する方法をバイオレメディエーションと呼びます。汚染が見つかったその場所で浄化ができることや建物の下の土など簡単に取り出すことができない場所に利用できることが長所です。微生物は汚染物質を分解しながら増殖して、長期間にわたって浄化が進行することが期待されています。浄化が順調に進んでいるのかを判断するためには、微生物が分解しているかどうかを確認する必要があります。鉄道総研では微生物を利用したPCBの分解処理方法を開発

しましたが、その研究の途上で微生物によって分解されたPCBが緑色の蛍光を放つことを発見しました。この現象を利用して微生物がPCBを分解していることを確認する方法を開発しました。他の汚染物質でも蛍光を利用して分解を確認するための手法が開発出来ると考えました。またガソリンなどの汚染物質は地中深いところまで到達することから、地下の酸素が少ない環境で生息する微生物に着目して、汚染物質を分解しているときに蛍光を発する微生物を利用した汚染物質分解モニタリング方法の開発を試みることにしました。

## 土壌中の微生物検出手法の検討

土は様々な物質から構成され、それらの中には多くの蛍光を発する物質も含まれています。蛍光を発する微生物を観察するためにはこれらの物質と区別する方法が必要だと考え、まずその方法を検討しました。

土壌由来の蛍光を発する物質は、鉱物や鉱物の表面に吸着している、動植物が分解されて出来た有機物質です。

そこで、鉱物の発する蛍光の特徴を調べてみました。細かく砕いた鉱物をスライドガラスに載せ、鉱物が放つ蛍光(赤, オレンジ, 緑)の割合を比較しました。15種類の鉱物について調べた結果を図1に示します。それぞれの物質によって蛍光の割合が違ってくるのが分かりましたが、概してオレンジ色と赤色の蛍光が8割近くを占め、緑色の割合が小さいことが分かりました。このことから、微生物を緑色で標識することによって、鉱物との区別は容易に出来ると考えました。そこで、実際に微生物を蛍光物質で染色して、鉱物との比較を試みました。

微生物の染色には、緑色蛍光を放つものと赤色蛍光を放つものの2種類を使用しました。染色した微生物を、鉱物を観察したときと同様にスライドガラスに載せて蛍光を測定しました。これより、オレンジと緑の比率および赤と緑の比率を計算した結果を図2に示します。鉱物由来の蛍光

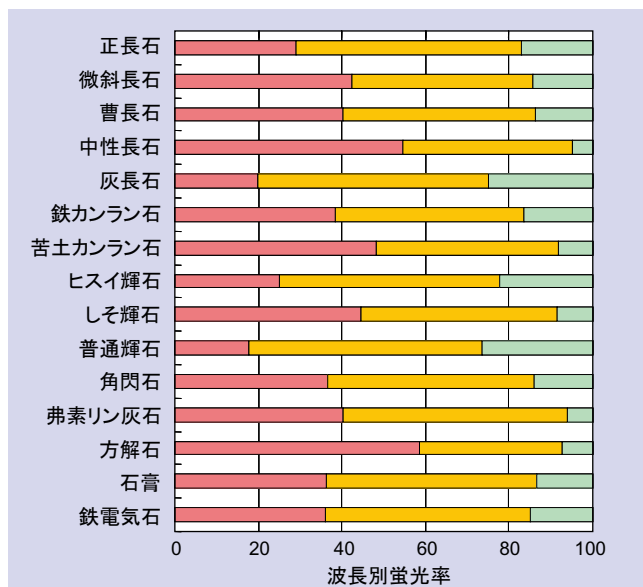


図1 鉱物の蛍光波長の割合  
(各鉱物が放つ蛍光(赤, オレンジ, 緑)の割合を示す)

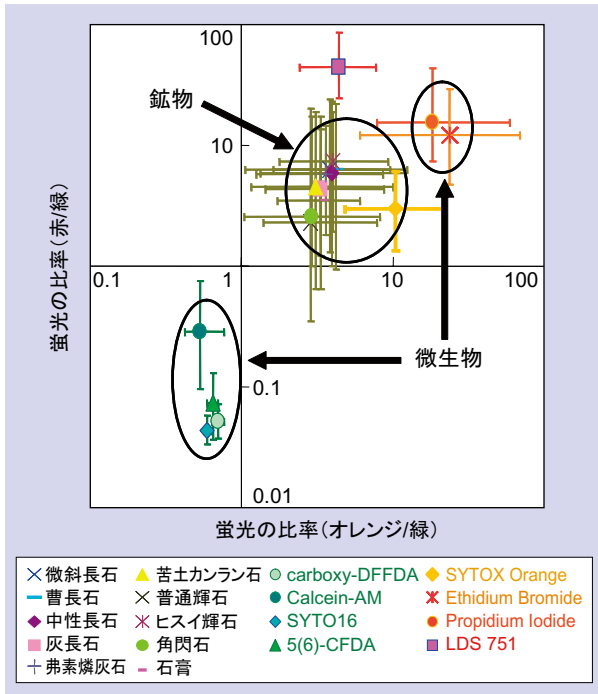


図2 微生物と鉱物の蛍光特性

は赤やオレンジが多いために比率が大きくなり、グラフでは右上の領域に集まります。微生物を赤色蛍光を放つ試薬で染色した場合には、鉱物の近くにプロットされました。一方、緑色蛍光を放つ試薬で染色すると、左下の領域にプロットされ、鉱物とは離れた場所に集まることが分かりました。緑色蛍光を放つ試薬で染色することによって鉱物と微生物との識別が容易に出来ることが分かりました。図2より、オレンジ蛍光と緑蛍光の比が1以下の集団を選択することによって、鉱物を排除して、微生物だけを選択できることが分かりました。実際に、緑色蛍光物質で染色した微生物を土壤に混ぜて測定してみました。先に確認した条件で観察を行ったところ、微生物と同程度の大きさの土壤構成粒子5,000個中、微生物として誤って認識された粒子は10個以下で、精度良く微生物を検出することが出来ました。図3に検出例を示します。

さらに、微生物検出の精度を向上させることを

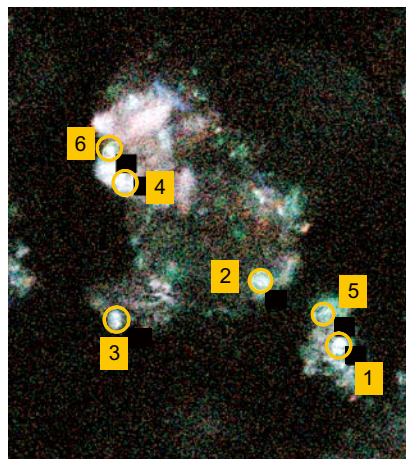


図4 土壤のレーザー蛍光顕微鏡観察像 (1~6の場所の蛍光スペクトルを解析した。)

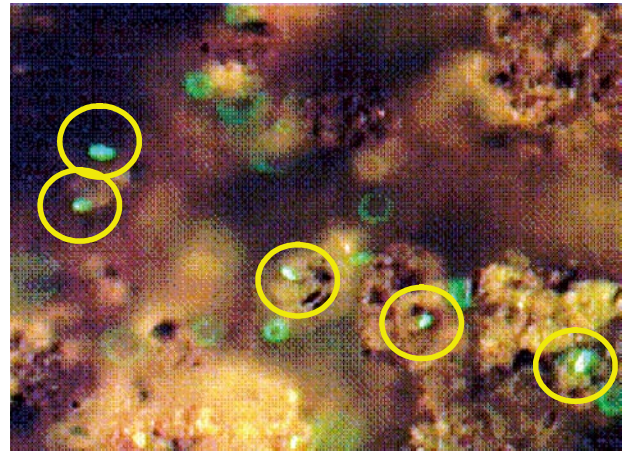


図3 土壤中の微生物検出例(○の中が微生物)

目標に、緑 (515~540nm) やオレンジ (570~630nm) といった個別の蛍光を観察するのではなく、得られる蛍光全て (410nm~740nm) のスペクトル解析を行って微生物を検出する方法を検討しました。先に示した結果より、緑色蛍光染色が土壤中の微生物検出に有効なことが分かったので、緑色蛍光タンパク質を産生する微生物を用いて実験を行いました。この微生物には緑色蛍光タンパク質遺伝子が導入されていて、蛍光染色しなくても常に緑色蛍光を発します。土を入れた液体培地にこの微生物を添加し、30℃で静置しました。1ヶ月後に土壤の一部を採取して、レーザー蛍光顕微鏡による観察を行いました。図4に示すように、目視によって確認された強い蛍光を放つスポット6点について蛍光スペクトルを解析しました。図5に示す通りに、これら6点の蛍光スペクトルには違いがあることが分かりました。1番は510~550nm付近の蛍光が強いという特徴がある

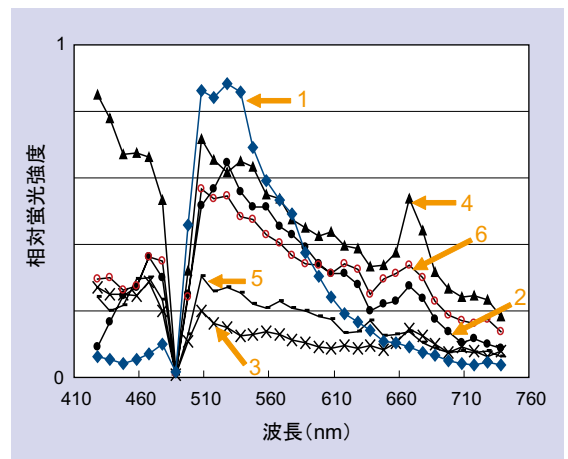


図5 蛍光スペクトル解析結果

(レーザー蛍光顕微鏡写真の1~6の場所の蛍光スペクトル。緑色蛍光タンパク質のスペクトルとの比較から1が微生物であることが分かった。)

ります。2, 4, 6番にも同じ領域に比較的強い蛍光が観察されましたが、660nm付近にもう一つ蛍光の強い領域を持つ点が異なります。3番と5番は全体的に蛍光強度が低く、510nmをピークになだらかに減少していることが分かりました。この実験に用いた緑色蛍光蛋白質を生産する微生物の観察結果との比較から、1番のピークがそれと大変よく似ていることが確認され、1番だけが微生物であると推定されました。他の5点については、肉眼では同じように見えたものが、解析によって違うものであることが分かりました。蛍光スペクトルを解析することは、土壤中の微生物検出にとっても有効な手法であることが分かりました。

### 嫌気性細菌からの汚染物質分解遺伝子の分離

多量の液体による土壌の汚染では、広い範囲の土地が深いところまで汚染されることがあります。一般的に地中は地表に比べて酸素濃度が低く、地下水を測ると酸素が検出されないこともあります。このように酸素濃度が極端に低い環境でも生育することが出来る微生物を嫌気性細菌と呼びます。嫌気性細菌の中には環境汚染物質を分解することが出来るものがいて、環境の浄化に貢献しています。一般的に、嫌気性細菌は、地表面付近に生息して酸素を利用する細菌に比べて増殖が遅く、培養が難しいことが多いことから研究例がそれほど多くありません。そのために試験に利用できる細菌の種類も限られています。数少ない純粋培養が可能な菌株の中から、トルエン分解菌を選んで試験に用いました。

嫌気性細菌は通常大気中では増殖することが出来ないのので、試験をするときには酸素を除去して嫌気的な環境を作り出すことが出来る嫌気培養装置を利用しました。この装置の内部は、空気を出来る限り除いた後に窒素で満たして、更に付属の銅触媒装置で酸素を除去し、大気酸素濃度のおよそ1/10万という嫌気状態を維持することができるようになっています。培地の調製や細菌の植え付けなどの操作は装置内部で行い、ガラス容器に入れて酸素を通さないブチルゴム栓でシールした後に装置から取り出して培養を行いました。装置から取り出した後で酸素が入り込んでしまうことがしばしばあります。そのためレサズリンという指示薬を利用しました。レサズリンは嫌気的な環境では透明ですが、酸素が混入するとピンク色に変色する性質を持ちます。ガラス容器に酸素が混入した時には液体がピンク色に変色するのですぐに分かります。静置しておくとも液体が濁るので細菌が増えたことが分かります。

細菌からトルエン分解遺伝子を得るためには、まず菌体から全DNAを分離します。そしてこのDNAを鋳型にして、PCRという酵素反応をすることによってトルエン分解遺伝子群を増幅しました。PCRは犯罪捜査や医療にも利用されているDNA増幅手法です。これは、高温で安定なDNA複製酵素と、高温になるとDNAの二本鎖がほどける性質とを利用して、50℃から95℃の間で温度変化を繰り返すことによって目的の遺伝子を増幅する方法です。トルエン分解遺伝子の両端と同じDNA配列をもつ一組の短いDNAを化学合成し、全DNAを鋳型として酵素反応を行い、目的とする遺伝子を増幅することが出来ました。確認のため、増幅した遺伝子の一部を、DNA配列解析装置を用いて解析して、目的の遺伝子であることを確認しました。

トルエン分解遺伝子は分解酵素を作るスイッチの役割をする制御遺伝子と分解酵素遺伝子から構成されています(図6)。制御遺伝子から作られた蛋白質が細菌周辺環境中のトルエンを検知すると、トルエン分解酵素遺伝子からトルエン分解蛋白質が生産されて、トルエンが分解されます。そこで、分解遺伝子にあらかじめ緑色蛍光蛋白質遺伝子を結合しておけば、トルエン分解をするときに細菌が緑色蛍光蛋白質を生産し、顕微鏡観察によって検出できる、つまり分解活性の可視化が達成可能になると考えました(図7)。

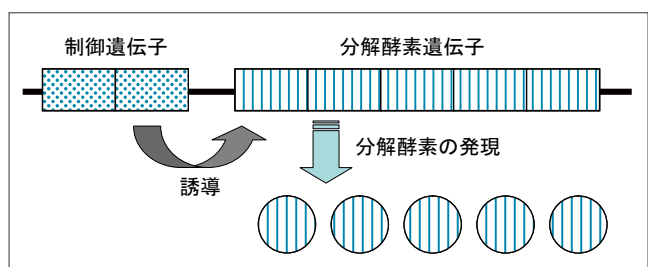


図6 分解酵素の発現制御

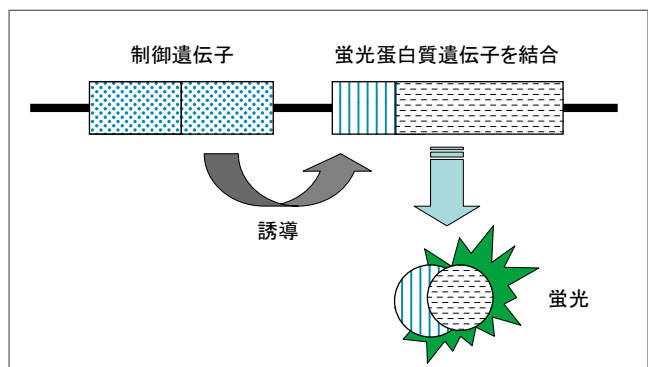


図7 蛍光蛋白質を利用した分解能力の可視化

## 蛍光発色性細菌の作成

トルエン分解が行われていることを可視化するために、まずトルエン分解酵素遺伝子に緑色蛍光蛋白質遺伝子を結合した人工遺伝子を作成しました。緑色蛍光蛋白質はオワンクラゲというクラゲが生産する蛋白質で、紫外光を照射すると緑色の蛍光を発します。この蛍光蛋白質は、下村脩博士のノーベル賞受賞によって一般の方にも広く知られるようになったと思います。人工遺伝子が設計通りに作られたことはDNA配列の解析によって確認しました。この人工遺伝子を導入することによって、トルエン分解酵素が作られる環境下においては緑色蛍光蛋白質が生産され、結果として微生物が緑色蛍光を発するようになると期待されます。前述したように、緑色蛍光を発する微生物は土壌粒子と容易に区別できるため、土壌中でトルエンを分解中の微生物だけを検出できると期待されます。

細菌は土壌などの環境中で遺伝子のやり取りをして多様性を獲得しています。この現象を研究室で自由に操作出来るようにしたのがいわゆる遺伝子操作技術です。嫌気性細菌ではこの技術がまだ十分に確立していません。作成した人工遺伝子をトルエン分解菌に導入するためには、まず遺伝子導入方法の検討が必要でした。そこで大腸菌の研究に使用されている幾つかの方法の適用を検討しました。すなわち、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ました。遺伝子導入が成功したことは、人工遺伝子に連結させた抗生物質（カナマイシン）耐性遺伝子に由来する、カナマイシン耐性の有無によって判断しました。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たところ、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細菌を数個得ることができました。その他の方法では細菌を獲得することが出来ませんでした。

次に遺伝子導入した細菌で設計通りに緑色蛍光蛋白質が生産されるかを確認するための実験を行いました。細菌をグローブボックス内の嫌気的な条件に移し、トルエンを含む培地に植え付けて静置培養しました。細菌の増殖を確認することが出来たので、その一部を取り出して顕微鏡観察をしたところ、緑色の蛍光が発せられていることが確認できました(図8)。この緑色蛍光を発する細菌を取り出して、酸素がある環境に移すと蛍光が消え、その後トルエンのあ

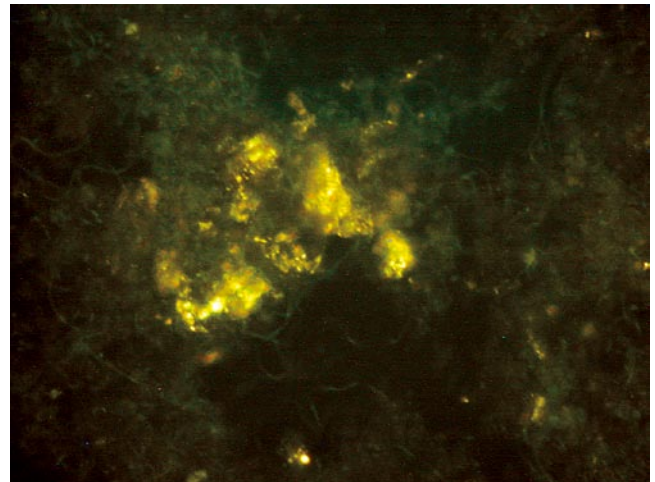


図8 緑色蛍光を発するトルエン分解菌

る嫌気環境に戻すことによって再び蛍光が発せられることを確認しました。このことから、緑色蛍光蛋白質は嫌気的な条件下でトルエンが存在する時にだけ発現が誘導されることが分かりました。つまり人工遺伝子が当初の計画通りに機能することが確認できました。この微生物はトルエン分解が進んでいるかどうかを確認するためのセンサーとしての役割を果たすと期待されます。

## おわりに

細菌が環境汚染物質を分解していることを可視的にとらえることは、ここに示した手法を応用することによってトルエン以外にも様々な物質に適応可能だと考えています。近年、多様な蛍光を発する蛋白質の開発がなされているので、将来的には複数の物質を同時に検出することが出来るようになると思われます。今後はトルエン濃度と蛍光強度との相関関係を調べることによって、トルエン濃度の推定が出来るようにしてゆきたいと考えています。

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いました。RRR