

鉄道一般

車両

軌道

構造物

防災

電力

信号通信  
情報

材料

環境

人間科学

浮上式鉄道

## 地下水の環境モニタリングに微生物を利用する

地下水汚染は自然環境や人体などに影響を及ぼすため、汚染物質を扱う箇所では地下水を常時モニタリングすることが重要です。そこで、比較的 low コストで実現性がある微生物センサーを用いた汚染検知方法について検討しました。本稿ではセンサー微生物について概説するとともに、これを用いた地下水汚染、特にトルエンをモデル物質として、その検知方法について紹介します。



志村 稔  
Minoru Shimura  
人間科学研究部  
生物工学研究室  
主任研究員  
[専門分野] 微生物遺伝

### 地下水利用

私たちは地下水を、生活用水、農業用水、工業用水としてさまざまな場面で利用しています。ミネラルウォーターとして販売されている水の多くは地下水ですし、温泉も地下水です。そのため、日常生活や企業活動に密接な関係のある地下水を上手に利用していかなければなりません。地下水は無限にあるわけではないので、過剰に使用してしまったり、また汚染させて利用できなくなってしまうたら大変なことになります。そのため、事業活動が地下水に与える影響を抑える努力とともに、安全性確保のためのモニタリングは大切です。

### 微生物を利用したモニタリング

これまでも、微生物は種々の物質のモニタリングに利用されてきました。例えば、藻類、ミジンコ類などを用いた毒性試験や、遺伝子工学的手法を用いたヒ素を検知するセンサー微生物などが開発されています。微生物を用いる利点としては、モニタリングする対象物を前処理すること無く、そのままの状態で評価できることがあげられま

す。また、急性および慢性影響を評価することができ、化学分析では得ることができない情報を得ることができま

### 地下水のモニタリング

私たちの周りにはたくさんの微生物が生息し、たとえば1gの土壌中には数千万、河川水では1ml中に数百万の細菌が存在するといわれます。そこでこれらを地下水のモニタリングに利用することができないかと考え研究を行いました。

モニタリングの対象としては、地下水汚染の恐れがある化学物質を念頭に研究を開始しました。地下水の汚染は、その周辺土壌が汚染されることによって生じることがありますので、土壌中の微生物をモニタリングに利用することを考えました<sup>1)</sup>。

土壌中の細菌は人間が落とし込んだものや動物の排泄物、植物の落ち葉などさまざま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い

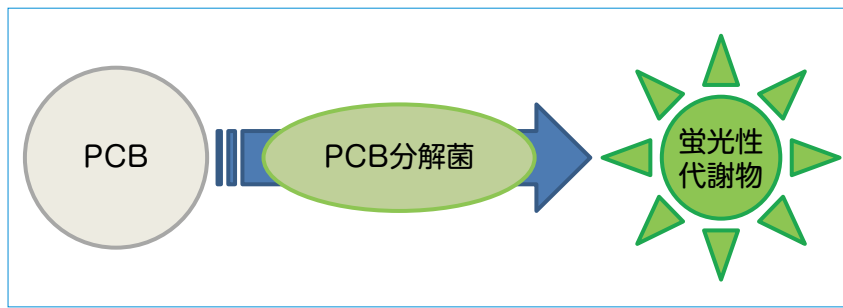


図1 PCB分解代謝物の蛍光を放つ性質を利用したモニタリング

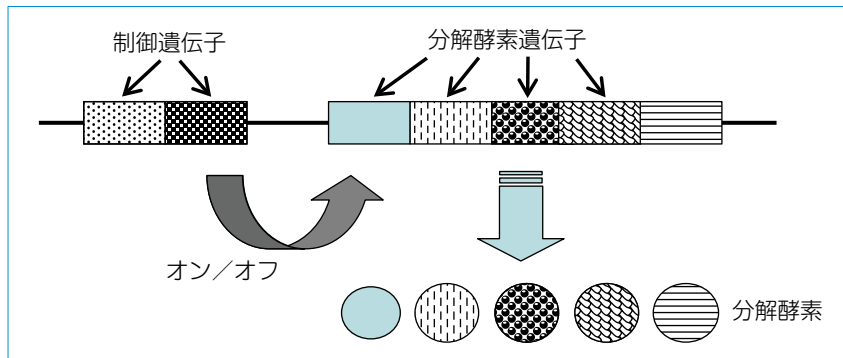


図2 トルエン分解遺伝子の模式図  
トルエン分解酵素を生産するための遺伝子ユニットと分解酵素の生産を制御する遺伝子ユニットの2つから成る。

ます。このような特殊な能力を持っている微生物をモニタリングに利用しようと考えました。

### 代謝物を利用したモニタリング

鉄道総研では土壤中のバクテリアを利用したPCB(☞参照)分解処理方法を開発しましたが、その研究の一環として、バクテリア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、この現象を利用したPCB分解モニタリング手法を開発しました。PCB保管場所周辺の地下水がPCBによって汚染されていないかのモニタリング

#### ☞ PCB

ポリ塩化ビフェニルの略称。カネミ油症の原因物質であり、特定化学物質として使用・保管・廃棄が厳しく規制されています。絶縁油として変圧器、安定器などに数多く使用され、一部は現在も使用されています。

に利用することが可能です(図1)。地下水にPCB分解菌を入れて数時間培養し、蛍光の発生を観察するという簡便な方法であり、一般的な分析に必要な前処理や分析装置を必要としないので、連続的な長期間のモニタリングへの応用が可能だと考えられます。

### 遺伝子工学的手法を用いたセンサー微生物の創出

PCBの分解処理の研究で開発した技術が他の物質にも適用できるのではないかと考え応用研究を行いました。土壌中には多種の汚染物質を分解するさまざまなバクテリアが生息しています。これらのバクテリアに遺伝子工学的手法を用いて改良を加えることによってさまざまな物質のモニタリングに利用できると考えられます。そこで、地下水へ混入した報告があるトルエンを例として微生物を用いたモニタリ

ング手法の開発を試みました。トルエンは地下水における要監視物質のひとつで、0.6mg/lという指針値が環境省により設定されています。

トルエンの検知には、土壌中に生息するトルエンを分解するバクテリアを利用するのですが、PCBの場合とは異なり、トルエンの分解物は蛍光を出しません。そこで、トルエンがあるときにバクテリア自体が蛍光を放つように遺伝子操作を行いました<sup>2)</sup>。まず、バクテリアからトルエンを分解する酵素の遺伝子を獲得しました。その模式図を図2に示します。バクテリアが生息する環境(土や地下水)がトルエンによって汚染されるとバクテリアがそれを検知し、制御遺伝子によりトルエン分解酵素の生産が開始されます。その結果として分解酵素によって環境中のトルエンが分解除去されます。この仕組みを利用して、トルエン分解酵素

遺伝子の代わりに、緑色蛍光タンパク質遺伝子や加水分解酵素遺伝子などの、いわゆるレポーター遺伝子（☞参照）を挿入し、トルエンが存在するとレポーター遺伝子が働くように遺伝子を合成しました（図3）。この遺伝子操作により、トルエン分解酵素の生産を視覚的に確認することができるようになり、間接的にトルエンの存在を検知することができるようになりました。トルエンが無い環境で生息している時はなにもシグナルを出しませんが、トルエンを含む水中に移して培養すると、図4、図5のようにトルエンを検知してシグナルを発生することを確認できました。

### センサー微生物の性能確認

前述したとおり、トルエンは地下水における要監視物質で指針値がありません。微生物をトルエンのモニタリングに使用するためには、指針値よりも低いトルエンを検知できる必要があります。そこで、0.001~0.1mg/ℓのトルエンを含む水でセンサー微生物を培養しました。この試験には、青色色素を作るように遺伝子操作をしたセンサー微生物を使いました。その結果を図6に示します。0.01mg/ℓ以上の濃度では色素の生産が確認されました。このことから微生物を使ったモニタリングは要求される能力を有することが確認できました。

#### ☞ レポーター遺伝子

ある遺伝子が働いているかを判別するために、その遺伝子と組み換える別の遺伝子。緑色蛍光タンパク質が有名で、このタンパク質の発見・開発によって下村博士がノーベル賞を受賞しました。

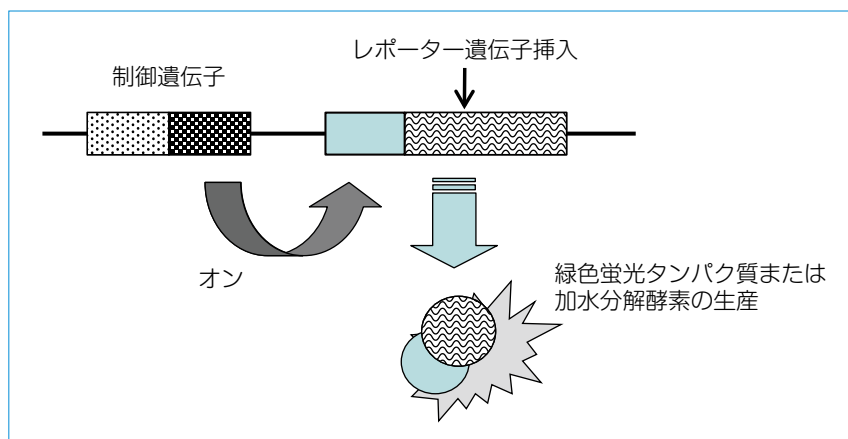


図3 レポーター遺伝子の作用概念  
トルエンが存在すると、トルエン分解酵素遺伝子と置き換えたレポーター遺伝子が働き緑色蛍光タンパク質が生産される。その結果、蛍光または色素が生産され、トルエンの存在を検知できる。

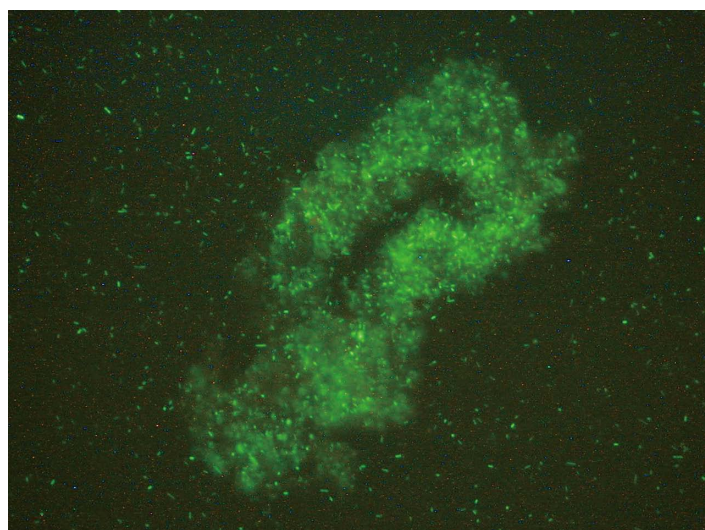


図4 緑色蛍光を放つセンサー微生物  
緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだ微生物は水中のトルエンを検知して緑色蛍光を放つ。

### トルエン濃度の推定

作成したセンサー微生物を用いてトルエン濃度の測定ができるのではないかと考え試験を行いました。

トルエン濃度が0, 1, 5, 10mg/ℓとなるように調整し、センサー微生物を入れて1週間培養しました。青色色素は、波長が620nmの光を吸収する性質があるので、光の吸収（吸光度）を測定することによって色素生産量を

評価することができます。測定結果を図7に示しますが、トルエン濃度が高いほど吸光度が大きく、つまり、色素生産量が多くなっていることがわかりました。しかしながら、1mg/ℓ以下では測定が難しいこともわかりました。その理由としては、色素がバクテリアの表面に吸着してしまうのではないと考えました。このため他の方法を検討することにしました。



図5 色素を生産するセンサー微生物  
トルエンが存在するときは色素を生産する(左)。  
トルエンが無いときは無色透明(右)。



図6 トルエン検知能力  
水中のトルエン濃度を下げ、微生物の検知能力を調査した。0.01 mg/l のトルエンを検知して色素が生産された。

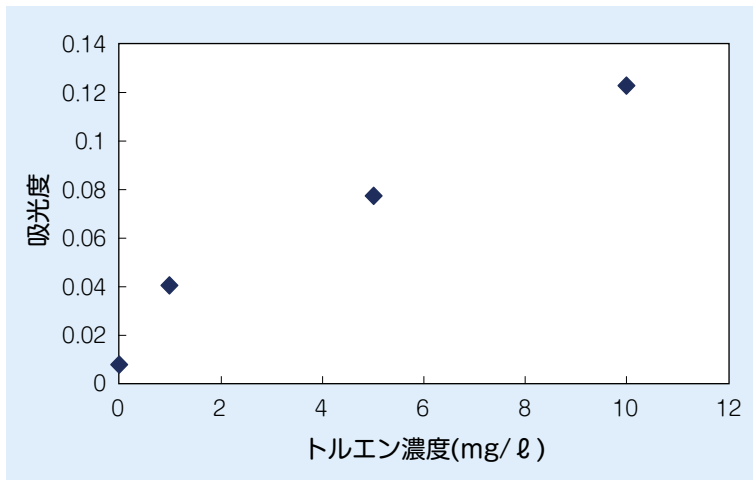


図7 トルエン濃度と色素生産量の対比  
水中のトルエン濃度が高くなると吸光度が高くなる傾向が確認された。

地下水中のトルエン指針値0.6mg/l以下よりも低い濃度での濃度推定を目標に手法の変更を行いました。センサー微生物がトルエンを検知したら色素を作るのではなく、光を出すように薬品を変更しました。するとトルエン濃度が0.01mg/lから1.0mg/lの範囲で、濃度上昇に相関した発光量の増加を確認することができました。色素生

産量から推定する場合よりも低い濃度域の推定に利用でき、地下水の指針値よりも低いトルエンの濃度推定ができることを確認しました。また、水道水のトルエン濃度の水質管理目標値は0.2mg/lですが、それよりも低い濃度を検知する能力があり、トルエンのモニタリングに十分な能力を有していることがわかりました。

## おわりに

微生物を利用する試みは盛んに行われていて、モニタリング以外の目的では微生物を利用した環境汚染の浄化や微生物燃料電池の開発などさまざまな分野での取り組みがなされています。

なお、本研究で利用した組み換え微生物の取り扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」や施行規則に基づき、環境中に放出しないように措置をして行いました。また、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

## 文献

- 1) 志村稔：微生物を使って環境をモニタリングする, RRR, Vol.66, No.12, pp26-29, 2009
- 2) 志村稔, 池畑政輝, 潮木知良, 吉江幸子, 早川敏雄：地下水汚染検知微生物センサーの開発, 鉄道総研報告, Vol.24, No.9, pp39-44, 2010