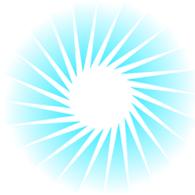


発光バクテリアを用いたバイオアッセイによる環境汚染物質のモニタリングに関する新展開



山 田 悦

1 はじめに

2008年の下村 脩博士のノーベル賞受賞などを契機として、生命科学、医療診断、環境評価などに生物発光を利用しようという機運が高まっている。大気や水における環境評価では、汚染物質の有害性によっては、緊急の警告を発して対処することが求められる。環境モニタリングでは、通常、化学的あるいは物理的分析によりサンプルの正確な組成を高感度に定量するが、これらの方法では汚染物質の生態系への影響に関するデータは得られない。水環境変化を迅速に捉える方法として、生物応答に基づく全排水毒性（whole effluent toxicity）評価法、WET法が提案されている。緊急時の毒性試験方法としては、魚類、ミジンコ、藻類及び発光バクテリアを用いる方法が欧米諸国で採用されているが、日本では発光バクテリアを用いる方法はまだ採用されていない¹⁾。

発光バクテリアを用いる方法は、簡便性、迅速性、低コストの面で他の方法より優れていると考えられる。発光バクテリアを用いる方法も、他の生物を利用する方法と同様に、環境毒性により発光バクテリアが死滅する過程で発光強度の低下をモニターするものである。しかし、近年は、成長速度が速い大腸菌などに対し、遺伝子組換えにより発光バクテリア由来の発光機能を付与して環境毒性を検出し、さらには毒性原因物質の同定への適用も一部検討されており、本稿ではこれらの研究の現状と新展開について紹介したい。

2 生物応答を利用した WET 法

現行の化学物質の規制は、物質を特定した上でその物質の濃度規制を行う「物質規制」であるが、WET法は多種多様な化学物質を総体としてバイオアッセイを行い、その影響結果を数値化して評価を行う「影響規制」のシステムである。

Development of Environmental Pollutants Monitoring Using Bacterial Bioluminescence.

水生生物への化学物質の影響を調べるためには、生態系の機能と構造を考え、①生産者（藻類など）、②1次消費者（動物プランクトン）及び③2次消費者（魚類など）から供試生物が選択される。環境省などで導入が検討されている試験は次の3種類である。①から緑藻類のムレミカツキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*）を用いた生長阻害試験（試験期間72時間）、②からミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いた繁殖試験（8日間）や急性遊泳阻害試験（48時間）、③から魚類のメダカやゼブラフィッシュを用いた急性毒性試験（96時間）を実施している^{1) 2)}。いずれの毒性試験も、試験生物の死亡や異常、産仔数の低下、あるいは成長速度の低下等の悪影響が観測された排水の濃度などにより、排水の生物への影響を評価する。これらの方法では結果が出るまでに数日から1週間とかなり長時間を要する。

3 発光バクテリアの発光阻害を用いる毒性物質モニタリング

発光バクテリアを用いる毒性物質評価としては、ISO 11348で規格化されている海洋性発光バクテリア（*Vibrio fischeri* NRRLB-11177）を用いる方法がある。このバクテリアは490 nm付近で極大を示す青緑色の光を発する性質があり、重金属等の妨害物質と一定時間接触することにより活性が失われ、発光強度が減衰するので、この発光阻害率を測定し毒性を評価する。荒川ら³⁾はこの方法を水中のシアン化物イオン、Cr(VI)イオン及びCu(II)イオンの毒性試験に適用し、発光バクテリアとの接触時間をそれぞれ5、15及び30分間とすると、それぞれのイオンに対し10 mg/L、数 mg/L及び1 mg/Lレベルの感度を有することを明らかにした。池田ら⁴⁾は大気中浮遊粒子状物質（SPM）やPM2.5などを対象として、この発光バクテリアに対する生物発光阻害性を評価し、低濃度領域におけるstimulation現象を定量的に評価できることを報告している。発光バクテリアを用いる毒性物質のモニタリングは、我が国においてはあまり活用されていないが、今後、水や大気環境汚染物質の評価方法として展開すると考えられる。

4 遺伝子組換え生物発光バクテリアの発光シグナルを用いる毒性物質モニタリング

大腸菌や蛍光菌などバクテリアに*lux*遺伝子を導入し、有害化学物質の暴露量を発光シグナルとして検出できるように設計した遺伝子組換え生物発光バクテリアに関する研究も近年増えてきている。

細胞の代謝変化が発光により迅速に把握可能な性質を利用して、特定基質を分解するバクテリアを導入し、基質の分解量を発光によりモニタリングする研究が行われ、オンライン迅速測定の可能性も報告されている。この方法の有用性は、重金属⁵⁾⁶⁾、BTEX（ベンゼン、ト

ルエン, エチルベンゼン, キシレン)⁷⁾, 多環芳香族炭化水素 (ナフタレン)⁸⁾などの毒性物質で実証されている。例えば, 蛍光菌である *Pseudomonas putida* F1 に *tod-luxCDABE* 遺伝子を導入し, ジェット燃料を含む水溶液中の BTEX 分析に適用している。トルエンでは濃度 30 µg/L から 50 mg/L の間で発光シグナルが増加し, *o*-キシレン以外のキシレン, ベンゼン, エチルベンゼンとも反応して十分な発光シグナルが得られると報告している⁷⁾。

大腸菌に色々なストレスに反応する遺伝子プロモーターと *lux CDABE* を付与した生物発光バクテリアも設計され, 温度変化⁹⁾, 酸化ストレス¹⁰⁾¹¹⁾, 化学物質¹²⁾¹³⁾などの細胞が感じるストレスに依存して発光シグナルを検出している。

反応の迅速性, 高感度化などがさらに得られると, 遺伝子組換え生物発光バクテリアを用いる方法は, 毒物モニタリングや生態影響の評価法として実用化できると考えられる。しかし, この方法では発光シグナルが得られても含有する化学物質を同定することができず, 同定は従来の分析法で行う必要がある。この欠点の解決法として, *lux CDABE* に選択した五つの遺伝子プロモーター (*grpE*, *nhoA*, *oraA*, *lacZ*, *mipA*) を付与した大腸菌レポーターを用い, パラコートやシアン化合物など五つのモデル毒物とコントロールに暴露し, パターン分類アルゴリズムを適用して良い結果を得ている¹³⁾。遺伝子組換え生物発光バクテリアによるバイオアッセイと数学的手法の組み合わせによる多種類の化学物質の検出と同定は, 本法による新展開が期待できる。また, 柄谷ら¹⁴⁾は, 琉球海溝より採取した発光細菌の *lux* 遺伝子をベースに, 目的の毒性物質が導入されたときだけスイッチが入り, 迅速に反応して強く発光する新規の組換え生物発光バクテリアの開発を大腸菌で行っている。有害物質の摂取により呼吸障害が起こり, 発生する過酸化水素を遺伝子プロモーター (*katG*) がセンシングして発光し, その光の強さや発光挙動から毒性評価 (量や種類) を行っており (図 1), 反応の迅速性, 高感度化が期待される。

5 まとめ

2006年に水生生物への影響を考慮して亜鉛の排水基準が 5 ppm から 2 ppm に厳しくなったように, 人の健康への影響だけでなく他の生物も含めた生態系全体への影響を評価することが重要となっている。大腸菌や蛍光菌などバクテリアに *lux* 遺伝子を導入し, 化学物質の暴露量を発光シグナルとして検出できるよう設計した遺伝子組換え生物発光バクテリアは, 形質転換後 -80 °C で冷凍保存していれば, 要時解凍し毒物モニタリングへの応用が可能であり, またその操作も容易である。今後, 反応の迅速性, 高感度化, 特異性などが得られれば, 環境汚染物質の新しいモニタリング法としての発展が大い

H₂O₂ 誘導発現プラスミドベクター概念

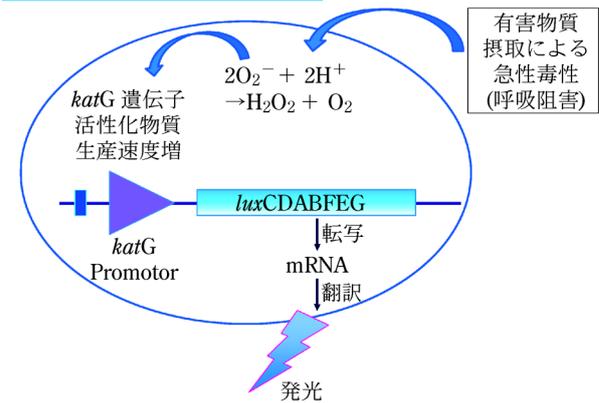


図 1 遺伝子組換え生物発光大腸菌を用いる毒性物質モニタリングの概念図

に期待される。

文 献

- 1) 国立環境研究所：環境儀 (No. 38), (2010)。
- 2) 鐘迫典久：資源環境対策, 47, 58 (2011)。
- 3) 荒川 豊, 野々村 誠, 栗田恵子, 杉村博和：東京都立産業技術研究センター研究報告, 2, 110 (2007)。
- 4) 池田四郎, 関根嘉香, 関根嗣晃, 本橋一真, 平成 24 年神奈川県ものづくり技術交流会予稿集, (2012)。
- 5) P. Corbisier, D. van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csoregi, G. Johansson, B. Mattiasson : *Anal. Chim. Acta* : 387, 235 (1999)。
- 6) J. Cai, M.S. DuBow : *Biodegradation*, 8, 105 (1997)。
- 7) B. M. Applegate, S. R. Kehrmeier, G. S. Sayler : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2730 (1998)。
- 8) A. Heltzer, O. F. Webb, J. E. Thonnard, G.S. Sayler : *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1839 (1992)。
- 9) T. K. VanDyk, W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, R. A. LaRossa : *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1414 (1994)。
- 10) S. Belkin, D. R. Smulski, A. C. Vollmer, T. K. VanDyk, R. A. LaRossa : *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2252 (1996)。
- 11) J. H. Lee, C. H. Youn, B. C. Kim, M. B. Gu : *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2223 (2007)。
- 12) O. Ben-Israel, H. Ben-Israel, S. Ulitzur : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4346 (1998)。
- 13) T. Elad, E. Benovich, S. Magrisso, S. Belkin : *Environ. Sci. Technol.*, 42, 8486 (2008)。
- 14) 柄谷 肇, 市村直也：第 8 回 KRI 萌芽研究成果報告書, (2014)。



山田 悦 (Etsu YAMADA)

京都工芸繊維大学環境科学センター (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)。京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了。京都大学理学博士。《現在の研究テーマ》フミン物質及び藻類由来有機物など難分解性有機物の環境動態解析。《主な著書》“環境分析ガイドブック” (分担執筆) (丸善)。《趣味》読書, スポーツ鑑賞, 音楽鑑賞。
E-mail : eyamada@kit.ac.jp