

センサー細菌チップを用いた変異原物質の簡易計測システムの開発

谷 博文 [北海道大学大学院工学研究科／助教授]

背景・目的

近年、内分泌搅乱物質や変異原物質による環境汚染が大きな社会問題となっており、これらの物質を簡便かつ高感度に計測する技術の確立が必要とされている。レポーター遺伝子を用いたバイオアッセイはプロモーターの選択次第で、生体の様々な応答に基づく分析が可能であり、感度も高い反面、アッセイの際には微生物の培養が必要など特別な設備を必要とする。本研究では、レポーター遺伝子を組込んだ細菌をシリコンなどの基板上に固定化し、その取り扱いを容易にしたオンチップバイオアッセイの確立を目的に、変異原性試験用大腸菌の作成とシリコンチップへの固定化ならびに変異原物質のオンチップ検出を試みた。

内容・方法

変異原物質に応答するSOS遺伝子のプロモーター調節下に、レポーター遺伝子を融合したプラスミドを作製し、これを大腸菌に導入することで変異原性試験用菌株とした。試験菌株固定化用チップは、フォトリソグラフィーならびにウェットエッチングにより、 $3.0 \times 3.5 \text{ cm}^2$ のシリコン基板に $700 \mu\text{m}$ 角のマイクロウェルを縦5、横5の計25ヶ所貫通し、作製した。試料を導入する流路は、同様に加工したシリコン基板を鋳型として、幅 $700 \mu\text{m}$ 、深さ $200 \mu\text{m}$ の流路5本をポリジメチルシロキサン(PDMS)上に作製した。このPDMS流路は試験菌株固定化用チップの両面に流路が直交するように貼りあわせて使用した。試験菌株をアガロースゲルと混合し、PDMS流路を用いて固定化用チップの表面からマイクロウェルに導入し、固化した。マイクロウェル内の試験菌株に、別のPDMS流路を用いてチップの裏面から変異原性物質を導入したのち、ルシフェリンとATPの混合溶液を導入し、生じた生物発光をCCDカメラで測定した。

結果・成果

シリコン基板上に固定化される細菌はごく微量であるため、変異原物質に対して極めて高感度な試験菌株が要求される。本研究では、レポーター遺伝子にはホタルルシフェラーゼフェラーゼ(luc)を用い、SOS遺伝子の一つであるumuDC遺伝子のプロモーター下流にlucを融合したプラスミドpRSSLを作成した。また、大腸菌には菌体内物質の排出機能を欠損したKT1008 tolC⁻株を作成し、これにpRSSLを導入して試験菌株とした。従来法である試験管を用いて行った発現誘導の実験

結果から、この菌株はKT1008野生型と比較して、変異原物質であるマイトマイシンC(MMC)を100倍高感度に検出することができた。次に、オンチップバイオアッセイを行うためのチップのデザインならびにアッセイの方法について検討し、先に述べたデザインならびに方法とした。この場合、縦方向m列×横方向n行の格子状に複数の貫通微細孔を配列したシリコン基板と、m列およびn行の流路を作成した2枚のPDMSをチップの両面から直交するように張り合わせて、試験菌株と試料をそれぞれ導入することで、m種類の試験菌株とn種類の試料の掛け合わせた試験を一枚のチップで同時にを行うことが可能である。また、菌体の固定化には低融点アガロースを使用した。これにより、チップからの菌体の除去が容易になり、チップの再利用が可能となる。ここでは 5×5 の25個のマイクロウェルに一種類の試験菌株を導入し、作成したチップと本法の評価を行った。pRSSL導入KT1008 tolC⁻株をマイクロウェルに固定化し、変異原性物質であるマイトマイシンC(MMC)を用いてlucの発現誘導を試みた。その結果、各ウェルからlucの発現に伴う生物発光が観察された。また、同濃度のMMCを導入したウェル間の発光強度に大きな違いが見られなかったことから、試験菌株がマイクロウェル内に安定に固定化されていることが確認できた。つぎに、PDMS上の5つの流路から濃度の異なるMMCを導入し、luc発現量の違いについて検討した。MMC濃度の増加に伴い、発光強度は増大したのち減少した。高濃度のMMC誘導時における発現量の減少は菌体の死滅によるものであり、このような濃度依存性は試験管を用いた発現誘導実験の結果とよく一致した。したがって、本法が変異原性試験に適用可能であることが分かった。

今後の展望

本法では、同一チップ上に複数種の細胞を固定化し、それぞれに複数の試料を供することで同時に多項目の試験を行うことができる。またこの方法では、試験項目別にあらかじめ用意された小型の細胞固定化チップを使用することで、ユーザーは試料を流路内に供して、測定器に設置するだけで簡単にバイオアッセイを行うことが可能である。したがって分析時間の大大幅な短縮や試料採取現場での分析が容易となり、新規化学物質の毒性の簡易スクリーニングや環境分析などに応用が期待できる。そのためには、固定化細胞の安定性の向上やチップからの情報を読み出すための周辺デバイス、チップの品質やデータの信頼性に対する保証などに対処していくことが必要と考える。