

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32657

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780096

研究課題名（和文）低磁場印加により制御可能な微生物および酵素の探索

研究課題名（英文）Control of bacterial growth and enzymatic activity by an applied magnetic field

研究代表者

安部 智子 (ABE TOMOKO)

東京電機大学・理工学部・助教

研究者番号：40553524

研究成果の概要（和文）：

土壌から単離した数種の菌株を、磁場を人為的に印加した場合と通常の地磁気下とでそれぞれ純粋培養し、増殖量を比較した。その結果、いくつかの株で地磁気下培養と比較して増殖量や菌の凝集体が有意に増加することが分かった。磁場印加環境下での遺伝子発現を解析するため、経時的に培養菌体を回収して細胞内タンパク質を二次元電気泳動および TOF-MS 分析に供した。分析結果をもとに、磁場印加により生成量が増加したと考えられるタンパク質の遺伝子配列とその周辺配列を決定した。

研究成果の概要（英文）：

Magnetic fields may induce multiple effects in biological systems, including change in DNA replication or transcriptional levels and modifications of ion and protein flow across membranes. However, effects of the magnetic field on organisms are still controversial. In this study, we focused on growth changes of environmental microbes caused by the applied magnetic field (hundreds of mT range of a magnetic flux density). Some microbes that should be susceptible to the applied magnetic field were isolated from the soil. To reveal the species or strain of these microbes and these mechanisms, we investigated changes of these microbial metabolisms caused by the applied magnetic field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：応用微生物学、磁場、環境

## 1. 研究開始当初の背景

本研究に用いる磁場は、一般的に微弱エネ

ルギーと呼ばれる大きさのエネルギーである。微弱なエネルギーを用いて代謝調節・反応調節が可能な微生物あるいは酵素を工業

生産等のプロセスに応用すれば、環境にも低負荷である。しかも、永久磁石は天然の残留エネルギーである。

生物は実際に磁場を利用している。体内に磁性微粒子（マグネタイト）を生成する磁性細菌の走磁性がよく知られているが、他にもある種の鳥類（ハト、渡り鳥）、魚類（マグロ、サケ）や昆虫（ミツバチ）が体内にマグネタイトを有し、磁場が行動に影響することが報告されている [生体と電磁界 (2003) ; Nature, 406, 299-302 (2000)]。非常に微弱な磁力（地磁気：35~70  $\mu\text{T}$ ）を感知し、利用しているのである。にもかかわらず、生体に対するその微弱なエネルギー制御が応用されている例はあまりにも少ない。一方で、人類による医療診断のための強磁界の開発・利用は進んでおり、また、電力や通信に付随する電磁波に曝される機会も増加している。そのため、健康被害に関しては多くの実験が成されて来た。健康リスクを評価するのにこれらの結果のみでは充分ではないが、これまでに明らかな致死などの影響が報告されていないのも事実である。即ち、磁力エネルギーは人間にとって安全性の高いエネルギーであると言って良いだろう。もし、低磁場でも顕著な阻害を受ける微生物が存在していたなら、その応答を明らかにすることは、印加磁場環境における生体や生態系への影響を考える場合の見識ともなる。また、遺伝子発現や酵素反応レベルで磁場印加が影響する仕組み（機構）の詳細を明らかにすることが出来れば、細胞レベル、生物個体レベルでの影響も予測することが可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 土壌あるいは湖沼から採取した微生物群を用いて磁場印加条件下で集積培養を行い、微生物を単離する。その後、地場印加培養と通常地磁気下培養でそれぞれの増殖速度を調べ、顕著に増殖の早い株や増殖量の多い株等、磁場印加により増殖の仕方が異なる株が存在するかどうかを確認する。また、高透磁率のシールド材料を用いて遮蔽磁場環境を作成し、本環境下においても通常環境下と比較した場合に増殖の仕方が異なる株が存在するかどうかを確認する。即ち、通常地磁気環境下とは異なる人為的な磁場を導入した環境下で、自然環境中から単離してきた微生物に増殖の仕方が異なる微生物がどのくらい存在するか、また、どのような種類の微生物がどの程度の影響を受けるのかを調べるのが本研究の第一の目的である。

(2) 次に、人為的な磁場を導入した環境下で

増殖の仕方が異なる微生物が存在した場合、その原因を調べる。増殖の仕方が異なるということは、磁場が遺伝子発現に影響を及ぼしていると考えられる。そのため、遺伝子の発現、すなわちタンパク質の生成量に注目する。磁場印可により発現量が変化するタンパク質の遺伝子を同定し、その関連を推定する。また、それらの遺伝子発現を調節する転写制御因子やオペレーター配列、プロモーター配列等の制御領域を特定し、磁場環境への微生物の環境応答機構について調べる。遺伝子発現の解析には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) や二次元電気泳動を用いてタンパク質を分離し、分離したタンパク質は MALDI-TOF-MS 分析によって同定し、さらに Real-time PCR 等を用いて実際に遺伝子発現がどのように変化するかを詳細に調べる。タンパク質や遺伝子レベルで、磁場が生物に与える影響を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 磁場の印加は永久磁石を用いて行った。スクリーニング源は主に土壌あるいは湖沼とし、大学近辺からだけではなく、地磁気よりも高い磁場に曝されていると考えられる土壌、例えば郊外の大規模電波送信所付近の土壌からもスクリーニングを試みた。培養中の印加には、0.5 テスラ (T) までの磁場を印加できるネオジウム磁石をフラスコの上下に取り付けて用いた。

土壌あるいは湖沼から採取したサンプルを 28~32°C・常圧下でフラスコの上部および底面に磁石を設置し、磁場を印加しながら集積培養（液体培養）を行った。3日から1週間程度培養した後に寒天培地に培養液を塗り広げ、微生物（主に細菌）を単離した。集積培養および平板培養に用いる培地は、より多くの微生物をターゲットと出来るようにブイヨン培地（細菌用）、YM 培地（カビ・酵母用）、YEME 培地（放線菌用）等の栄養培地を用いた。

(2) 単離した菌株を、それぞれ地場を印加した状態と通常培養状態（地磁気下）に分けて培養した。培養には単離に用いた液体培地を用いた。経時的に培養液をサンプリングし、濁度 (O.D. 600 nm) を測定することで菌の増殖量を測定した。地場印加培養と地磁気下培養での増殖量を比較した結果、増殖量や増殖速度に違いが見られたいくつかの株に関しては、栄養培地以外にも M9 培地や、ツアペック培地、Spizizen 培地などに炭素源・窒素源を少量加えた、最少培地に近い培地なども（ストレスを与えるために）使用

して、地場印加培養と地磁気下培養での増殖量を比較した。

(3) 地場印加培養と地磁気下培養での増殖量を比較して差が見られた菌株に関して、細菌 16S rRNA あるいは真菌 rRNA ITS 領域の遺伝子配列解析を行い、菌種を同定した。

(4) 高透磁率のシールド材料で覆うことにより、遮蔽磁場領域 (15  $\mu$ T: シールド内) も作製した。地場印加培養と地磁気下培養での増殖量を比較して有意な差が見られた菌株に関しては、遮蔽磁場下による培養も行い、地磁気下培養と増殖量を比較した。

(5) 生物資源バンクから培養に用いた菌株の標準株を取り寄せ、同条件で地場印加培養および遮蔽磁場下での培養を行った。単離株と同様に経時的に培養液をサンプリングして濁度を測定し、地場印加培養あるいは遮蔽地場下での培養と地磁気下培養での増殖量や増殖速度を比較した。

(6) 地場印加培養あるいは遮蔽磁場下での培養において増殖量に差が見られた菌株において、生成されるタンパク質量の変化を解析するため、培養した菌体のタンパク質を SDS-PAGE 電気泳動に供した。経時的に培養液をサンプリングし、培養菌体をトータルタンパク質および細胞内タンパク質に分けて試料を作成した。SDS-PAGE 電気泳動の結果、地磁気下培養の試料と比較して明らかに生成量に差のあるタンパク質のバンドが見られた試料に関しては、さらに二次元電気泳動に供し、タンパク質の分離を行った。分離したゲルから目的のタンパク質を抽出し、MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Autoflex II) を用いて目的タンパク質の質量を解析し、(遺伝子解析が行われている) 類縁種が持つタンパク質量を参考に目的タンパク質を推定した。タンパク質の推定には Mascot search や BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) などのプログラムを用いた。

その後、類似する遺伝子の情報を用いて、解析に用いた菌株の目的遺伝子領域の部分配列、あるいは全配列および周辺配列を含む領域を増幅するためのプライマーを作成し、そのプライマーを用いて PCR を行った。PCR によって増幅された DNA 断片のシーケンス解析を行い、増幅された遺伝子領域の塩基配列を決定した。

#### 4. 研究成果

(1) 大学敷地内から採取した土壌を様々な液体培地に数グラム添加し、25 $^{\circ}$ C で振盪培

養を行った。その際、永久磁石 (0.3 テスラ程度) を培養フラスコ底面と周辺部に設置した (集積培養)。数日間培養した後、平板培地でコロニー形成を観察した。磁場印加有りの培養と印加無しの培養とを比較し、コロニー数や形態等を観察して磁場による影響が示唆される菌株数種を選別した。その後、集積培養で単離した菌株を数種の培地を用いて磁場印加環境下と通常地磁気環境下 (約 50  $\mu$  テスラ、コントロール群) でそれぞれ純粋培養を行い、濁度を測定することにより菌の増殖速度を比較した。磁場印加をせずに培養したコントロール群と比較して、培養初期に濁度の上昇、あるいは減少傾向が見られた株や、培養後期に濁度の上昇、あるいは減少傾向が見られた株など、いくつかの菌株で再現性のある培養結果が得られた。さらに、これらの株について、培地の種類、温度、光など、異なる培養条件で磁場印加培養を行い地磁気下と比較した結果、培地の種類によっても増殖速度の変化の仕方が異なることがわかった。また、菌体の凝集が見られる期間に関しても地磁気下と比較して違いがあることがわかった。

また、磁場印加培養で地磁気下と比較して一番増殖量に差が見られた株 (NM2) および本株の類縁種の標準株 (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) に関しては、高透磁率のシールド材料で覆うことにより作成した遮蔽磁場環境下での培養も行い、地磁気環境下 (コントロール群) と増殖量を比較した。その結果、磁場印加で有意な増殖速度の増加が見られた NM2 株と、標準株である *Bacillus subtilis* 株において、遮蔽磁場環境下でも増殖速度に違いが見られた。これら 2 株に関しては磁場印加培養の場合と同様に、培地の種類、温度、光など、異なる培養条件で遮蔽磁場での培養を行い地磁気下と比較した結果、培地の種類によっても増殖速度の変化の仕方が異なることがわかった。

NM2 株を磁場印加環境下あるいは遮蔽磁場環境下で培養し、地磁気環境下と濁度を比較した時の結果を下図に示した。Spizizen 培地に 0.05% カザミノ酸を加えた培地を用いた時の結果である。

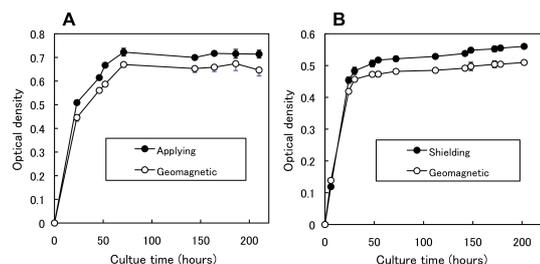


図. 磁場印加培養 (A) および遮蔽磁場下 (B) での増殖曲線の比較 (NM2 株)

磁場印加培養では、地磁気下と比較して培養 24 時間後以降に印加磁場下で濁度が高くなる傾向にあった。また、遮蔽磁場下での培養でも同様に、地磁気下と比較して培養 24 時間後以降に遮蔽磁場下でも濁度が高くなることが分かった。

(2) 磁場印加培養や遮蔽磁場下での培養において、地磁気下と比較して一番増殖量に差が見られた、即ち、単離した菌株のうち磁場による増殖（成長）への影響が最も大きいと考えられる NM2 株の細胞内のタンパク質生成量（遺伝子発現量）について調べた。

磁場印可環境下で培養し、経時的に培養液をサンプリングし、細胞内タンパク質を抽出し、それぞれのタンパク質の経時的な生成量変化が分かるように試料を作成した。SDS-PAGE に供した結果、地磁気下での培養と比較して生成量に差のあるバンドがいくつか確認された。また、それらのタンパク質生成量の経時変化と濁度の経時変化との間に相関があることもわかった。これらのバンドがどのタンパク質であるかを同定するために、さらに本試料を二次元電気泳動に供して分離した。泳動結果に対して画像解析を行って有意差を得るとともに、明確な差異（2 倍～49 倍）が確認されたタンパク質のスポット（6 スポット）を切り出し、タンパク質を抽出して酵素消化した後、MALDI-TOF-MS に供した。

rRNA 遺伝子を用いた系統解析の結果、磁場印加により増殖が促進された菌株 NM2 は *Bacillus thuringiensis* の近縁種であることが分かった。そのため、MALDI-TOF-MS 分析の結果得られた質量より、BLAST を用いて *Bacillus* 属で類似の遺伝子を検索し、目的遺伝子の全配列および周辺配列を含む領域を解析するためのプライマーを作成して PCR を行い、それらの DNA 断片の塩基配列を解析した。遺伝子解析の結果、磁場印加により生成量が増加したと考えられるタンパク質は、リボソームタンパク質のアセチル化酵素や、Crp および ArsR family の転写制御因子、DNA 複製に関わるプライモソームのタンパク質などであった。これらのタンパク質が持つ機能は遺伝子発現や染色体 DNA の複製に関与するものであり、磁場印加環境下の培養で、これらのタンパク質の発現量が増加することにより増殖速度や増殖量が増大したと考えられる。また、これらの解析された遺伝子のいくつかは共通の転写制御因子に制御されるプロモーター配列を有していることも分かった。今後は、予測された遺伝子を対象として培養経時的に Real-time PCR を行い、磁場印加あるいは遮蔽することにより遺伝子発現が実際にどのように変化するかを詳細に調べていく予定である。転写制御因子と磁

場の関連を解析することで、磁場が与える微生物への影響が明らかにされるとともに、本プロモーターを利用した遺伝子発現制御システムへの応用が期待される。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 安部 智子、鳥井眸、半田浩一、山名昌男、QCM バイオセンサーを用いた閉鎖系環境下での微生物の増殖速度測定法、日本地球惑星科学連合 2013 年大会、2013 年 5 月 19 日、幕張メッセ国際会議場
- ② 椿原賢太、安部智子、磁場印加が環境微生物に与える影響の解析、日本地球惑星科学連合 2011 年大会、2011 年 5 月 22 日、幕張メッセ国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安部 智子 (ABE TOMOKO)

東京電機大学・理工学部・助教

研究者番号：40553524