

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760646

研究課題名(和文)磁気微粒子合成に基づく高選択的な検出が可能な磁気計測バイオセンサの創出

研究課題名(英文) Fabrication of biosensor for specific pollutant detection based on the biological magnetic particle synthesis

研究代表者

田中 祐圭 (Tanaka, Masayoshi)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60533958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内に磁気微粒子を合成する微生物(磁性細菌)を利用したバイオセンサ開発を推進した。まず様々な重金属などの磁性細菌に対する影響を評価し、培養条件に応じた生育能並びに磁気微粒子合成能に影響が現れることが明らかとなった。またこれまでに報告例のない濃度の金属イオンが磁気微粒子内に導入され、得られる磁気微粒子の磁気特性に顕著な影響を及ぼすことが示された。さらにセレンのオキソアニオン添加時はセレン顆粒蓄積が、磁性細菌内でみられることが初めて観察された。現在までにメンブラン上に微生物を固定したセンサシステムを構築しており、ここで得られた知見を基に新たな高選択的バイオセンサが開発できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, to develop a magnetic biosensor for specific pollutant detection, magnetotactic bacteria was investigated, because of their activity of magnetic particle production. Here we evaluated minimum inhibitory concentration (MIC) and magnetite productivity profiles of the magnetotactic bacteria grown in the presence of various transition metal ions and metalloids. As a result, the highest doping of Co, Mn and Cu in bacterial magnetite were successfully found and the MIC profiles were also metal ion dependents. In addition, magnetic measurements of these bacteria grown in different condition revealed the difference of the magnetic property. Based on these information, a prototype of microbial biosensor system has been fabricated. Using the results and information in this study, novel biosensing system for highly specific detection of pollutant will be developed in near future.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：磁性細菌 磁気微粒子 環境モニタリング 重金属 バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

(1) 微生物センサに関する国内外の研究動向
水質モニタリングは世界中で需要が高まっている産業分野の一つである。人体や生態系への化学物質のリスク評価には、従来より水生生物を用いたモニタリングや微生物を用いたバイオセンサの利用が進められてきた。しかしながら特定物質をセンシングする技術には未だ課題が多い。

(2) 磁気計測に基づく検出系の現状

磁気計測に基づいた検出系は、その感度の高さが着目され、様々なバイオアッセイへの応用が展開されている。磁気計測の最大の長は、検出マーカーが磁気微粒子であることから、共雑物の存在や測定条件によらず、安定したシグナルが得られる点にある。さらに、高感度磁気センサである SQUID (Superconductive quantum interference device) や GMR (Giant magneto-resistive) を用いた系においては、1 磁性粒子レベルで検出できることが検証・実証されており、次世代のバイオ計測技術として大変注目されている。

(3) 磁性細菌に関する既往の知見

磁性細菌は菌体内に 20 個程度の磁気微粒子を生成する。これにより外部磁場によって容易に菌体を回収が可能であり、さらに培地中に存在するイオンの存在によって、磁性細菌のマグネタイト合成に様々な影響を与えることが明らかとなってきた。例えば、 TeO_3^{2-} 存在化で生育した磁性細菌は磁気微粒子チェーン上にテルル結晶が観察される。これにより磁気微粒子結晶間の距離の増加が見られた。またニッケルは磁気微粒子内に蓄積(されると共に磁気微粒子の磁気特性に変化が見られた。これらの研究を通じて以下の事が見出されている。

- ① 磁性細菌は、細胞外膜、細胞内膜、磁気微粒子膜という複雑な膜系を利用して様々なイオンを輸送し、場合によっては蓄積する。
- ② この輸送・蓄積に伴い、生成される磁気微粒子合成に様々な影響を与える。

2. 研究の目的

磁性細菌によるイオン輸送・蓄積機構を詳細に理解し、それを応用することで磁気微粒子合成という新たな生物活性に基づくバイオセンサの基盤技術を提供することを目的とした。具体的には磁性細菌の重金属などの標的物質に対する選択的な応答を詳細に評価し、バイオセンサに適用するための基礎情報を取得する。また磁気バイオセンサのプロトタイプを作成し、重金属などの選択的な検出が可能システム開発の基盤技術を創製する。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究代表者らの研究から、磁気微粒子合成が培地中の物質により様々な影響を受けることが明らかとなっていた。しかし、それらの影響が体系的に理解された例は無いため、金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオンなどが存在する条件下で培養した磁性細菌を詳細に評価する。方法としては得られた細胞を各画分に分画後、ICP 発光分光装置によりイオン量の定量解析を行い、さらに各条件における磁気微粒子合成を透過型電子顕微鏡により詳細に評価する。これにより様々なイオンがどのように磁気微粒子合成に影響を与えるかをイオン半径や電荷状態などの情報から体系的に理解する。

(2) 上記の研究によって様々なイオンと磁気微粒子合成の関連性の概要が得られ、数種のイオンに対する選択的バイオセンサの構築は可能であると期待されるが、いくつか(もしくは多く)のイオンに関しては、それらの磁気微粒子合成に対する影響が類似している可能性が想定される。そのため、より高選択的な検出が可能バイオセンサを作成するために、合成される磁気微粒子の元素解析や磁気特性解析を TEM-エネルギー分散型 X 線分光法(EDX)や試料振動型磁力計(Vibrating Sample Magnetometer)を用いて評価する。

(3) これまでに創出されたイオン応答に伴う磁気微粒子合成による基礎情報を基にバイオセンサを構築する。具体的には長期的に保存及び運用可能なシステムの構築に向けた磁性細菌固定化メンブランフィルターを作成する。これを用いて生物磁気バイオセンサのプロトタイプを作成し、その基盤技術を創製する。

4. 研究成果

金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオンに対する磁性細菌への影響を評価した。その結果、図 1 に示す通り重金属や半金属それぞれに対して特異的な磁性細菌の生育や磁気微粒子合成能への影響が観察された。

具体的には磁性細菌はマンガンに対して耐性を強く持ち、1 mM という高濃度条件においても生育並びに磁気微粒子合成に大きな影響は観察されなかった。次に亜鉛、セレン、ニッケル、コバルト、銅の順で濃度の高い条件まで生育や磁気微粒子合成が確認された。多くのイオンは生育と磁気微粒子合成の濃度依存性が一致したが、銅に関しては、生育に強い影響は無い条件においても、磁気微粒子合成に顕著な影響が観察された。

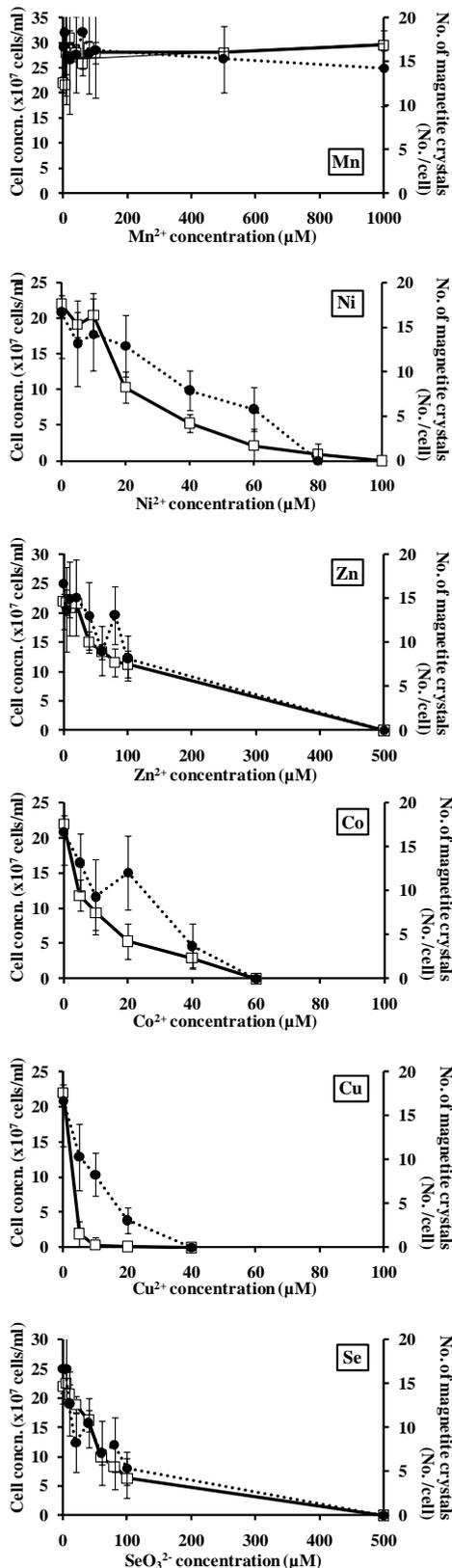


図 1. 金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオンに対する磁性細菌の生育(□, black line)と磁気微粒子合成(●, dashed line)の影響評価

磁気微粒子合成能は 25 細胞内にある磁気微粒子数を計数することで評価した。全て独立した 3 回の実験により評価した。エラーバーは標準偏差に基づく。

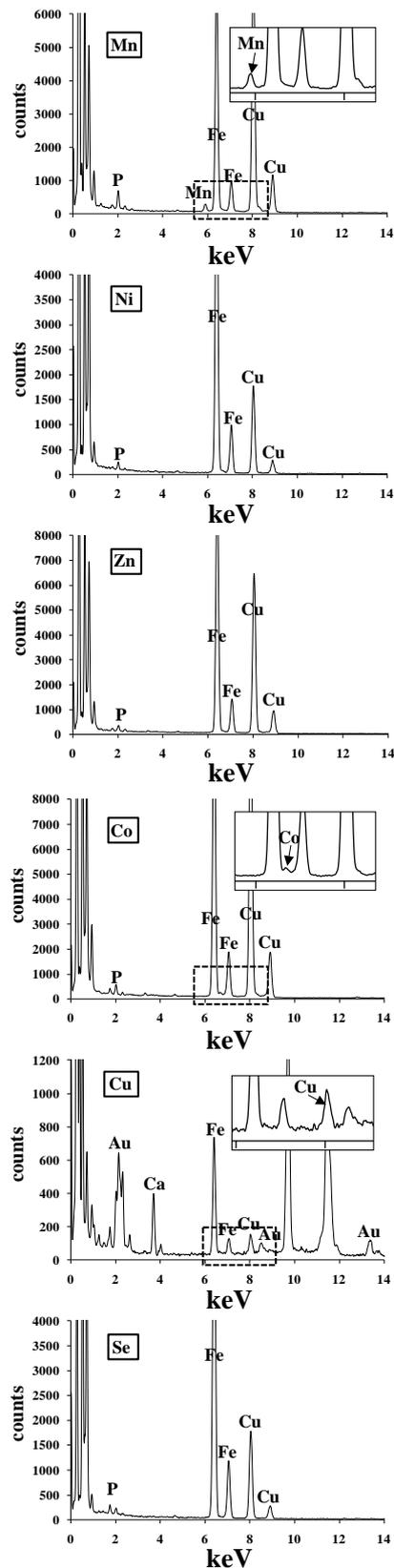


図 2. 金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオン存在下で培養された磁性細菌が合成した磁気微粒子の構成元素の評価

測定は TEM-EDX により分析した。銅の検出には金からなるグリッドを用いた。

各条件で培養された磁性細菌が合成する磁

気微粒子の元素解析を行った(図2)。その結果、これまでに報告のあるコバルトやマンガンに加えて、銅も当該株が合成する磁気微粒子にドーピングされることが明らかとなった。またここでドーピングされたコバルトやマンガンは既報に比べて非常に濃度の高いものであり、今後環境に優しい新たな磁気材料創出に向け、生物が合成する新規な磁気微粒子として今後の詳細な解析が期待される。様々な金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオンを用いたにも関わらず選択的なイオンのドーピングが観察されたことは、高選択的な水質センサを開発する上で重要な知見である。

これらの情報を基に重金属の磁気微粒子へのドーピングについて、透過型電子顕微鏡を用いたエネルギー分散型X線分光法により確認し、合成される磁気微粒子の磁気特性を試料振動型磁力計(Vibrating Sample Magnetometer)により評価した(図3)。一般に純粋なマグネタイトであった場合、Verwey 遷移温度 (T_v) は 110K 程度になることが知られる。しかしながら今回の結果から、他の元素がドーピングされている磁気微粒子はその T_v が低温側にシフトしていることが明らかとなった。これは各イオンがドーピングされることによって生成される磁気微粒子の磁気特性に対して変化を与えることを示している。

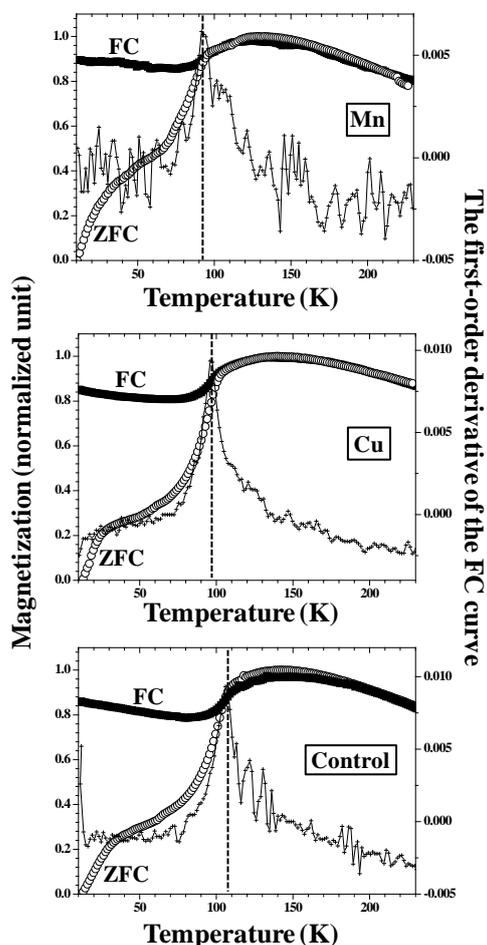


図 3. 重金属存在下で培養された磁性細菌が生成する磁気微粒子の磁気特性評価
無磁場冷却 (ZFC, ○), 磁場冷却 (FC, ●) 曲線を 10~250K で測定。予測された Verwey 遷移温度(T_v)は dashed line で表記

一方でセレン存在下で培養した磁性細菌の TEM 像を観察したところ、細胞内に顆粒状の構造体が存在することが明らかとなった(図4)。これを元素マップ、点分析を行ったところ、当該株を磁気微粒子にセレンをドーピングすることは無いが、磁気微粒子合成と並行して、セレン顆粒を蓄積することが明らかとなった。これはこれまでに報告の無い新たな発見である。

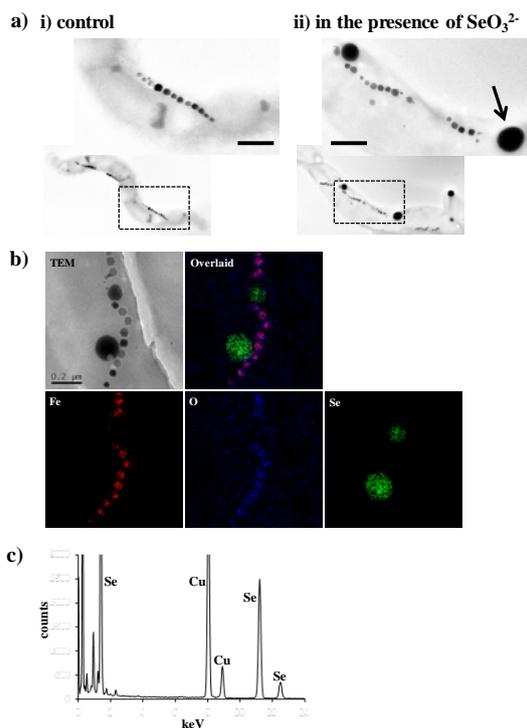


図 4. セレニウム顆粒を蓄積した磁性細菌の TEM 及び EDX 解析
(A) 透過型電子顕微鏡像
(i)通常の MSGM 培地
(ii) SeO_3^{2-} (40 μM) 存在下で培養
スケールバーは 0.2 μm 。
(B) SeO_3^{2-} 存在下で培養した磁性細菌が保持するセレン顆粒と磁気微粒子の TEM-EDX による元素マッピング
スケールバーは 0.2 μm 。
(C) セレン顆粒の TEM-EDX 点分析

以上のように磁性細菌に対する金属イオン、重金属イオン、カルコゲンのオキソアニオンの影響を生育並びに磁気微粒子合成能という観点から統合的に評価した。またそれに付随して、当該条件で培養された磁性細菌はこれまでに報告の無い高濃度の金属のドーピングが可能であることが示された。またこのドーピングによって、得られる磁気微粒子の磁気特性に顕著な影響が見られた。これらの知見を基に現在メンブランフィルター

上に細菌を固定し、流路中にメンブランを配置した上で培養液を変化させることによる影響を評価している。本研究がさらに発展することで、選択的な水質汚染を検出可能なバイオセンサシステムが開発されることが期待される。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Tanaka, M., Brown, R., Hondow, N., Arakaki, A., Matsunaga, T. and Staniland, S.: Highest levels of Cu, Mn and Co doped into nanomagnetic magnetosomes through optimized biomineralisation. (2012) Vol.22 (24), p11919-11921, J. Mater. Chem. DOI: 10.1039/C2JM31520C (査読有)

2) Tanaka, M., Critchley, K., Matsunaga, T., Evans, S., Staniland, S.; Fabrication of quantum dots embedded lipid tubules by membrane tubulation protein. (2012) Vol.8 (10), p1590-1595, Small. DOI: 10.1002/sml.201102446 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1) 菅村百合子、佐伯達也、細川正人、田中祐圭、林泰圭、原田学、松永是、田中剛 “二次元フォトセンサを利用した広視野細胞蛍光イメージングシステムの開発”、電気化学会、2014年3月29日、関西大学千里山キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 祐圭 (Tanaka, Masayoshi)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：60533958