

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510011

研究課題名（和文）発光細菌固定化チップによるマルチ環境計測システムの開発

研究課題名（英文）Development of multiple eco-monitoring system with chip-based system that arrayed luminous bacterial cells

研究代表者

阪口 利文（SAKAGUCHI TOSHIFUMI）

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：10272999

研究成果の概要：多検体分析型バイオチップの作製を目的として、芳香族化合物や毒性アニオンに対する応答遺伝子に発光遺伝子を融合することを試みた。その結果、セレン酸に応答能を有すると思われる遺伝子断片をセレン酸還元菌から大腸菌にクローニングすることに成功し、プロモーター配列の存在を確認した。しかし大腸菌内での安定性が問題となったため、セレン酸還元菌への遺伝子導入法を開発し、広域宿主ベクターを接合伝達によって安定に遺伝子導入、発現をさせることができた。次にチップ上に固定化した微生物の活性を保持・制御できるような菌体の包埋法・再活性化方法の開発を行い、シリカゲルによる固定化、レスティングセルの利用によって4°Cで約1ヶ月の保存ができた。また、1週間保存したチップでBOD計測が可能であった。更に、測定装置を市販のデジタルカメラなど携帯可能なデバイスに改良してオンサイト計測が可能な測定システムを提案した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：環境計測、チップセンサー

1. 研究開始当初の背景

土壤汚染対策法などのような環境関連法規の公布に伴って、汚染修復前後の改良効果や汚染水の処理状況の検証などの場面において、迅速かつ多項目に環境汚染を検出する分析システムが求められている。そこで、本研究では迅速、オンサイト、多項目計測を達成するために、いわゆるマイクロ・ナノテクノロジーやオンチップテクノロジーに使用さ

れる微細加工技術と光微生物を用いたチップ型環境計測システムを着想した。

国内外において、質量分析装置や液体クロマトグラフィーを用いた有害化学物質の超高度測定技術が提案されている。しかしながら、これらの測定法は、ppt オーダーに及ぶ検出感度を有するが計測に至る前処理が必要であり、これらの研究によって開発された技術では計測のオンサイト化は極めて困

難である。また、光微生物を用いた環境計測に関する研究では、Microtoxに見られるようなキット化によるオンサイト計測が達成されているが、計測項目のマルチ（多項目化）が不十分である。これに対して、本研究によって開発される技術は、生物発光による高感度な計測と多種類の発光微生物のアレイ化チップによってオンサイトにおけるマルチ環境計測が期待できるものである。これらの諸課題の解決と達成のためにバイオチップ技術をベースとした簡便なオンサイト環境モニタリングセンサーの開発を着手するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、有害重金属や芳香族有機化合物に反応する様々な遺伝子に発光遺伝子を融合、大腸菌など微生物に導入し、多種類の光応答性微生物を新たに創製することでアレイ化用微生物素材を多様化させ、マルチ（多項目）環境計測型の微生物チップの開発についての研究を遂行した。加えてオンサイト計測の実用化を進捗させるため発光微生物固定化チップの長期保存法を開発し、オンサイトにおけるマルチ環境計測システムの実現化に向けた研究を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では環境水質試料における計測内容の多項目化、現場（オンサイト）におけるスピーディーな検出応答能を実現するために、発光能を有する多種類の微生物細胞をアレイ、固定化したチップを作製した（図1）。

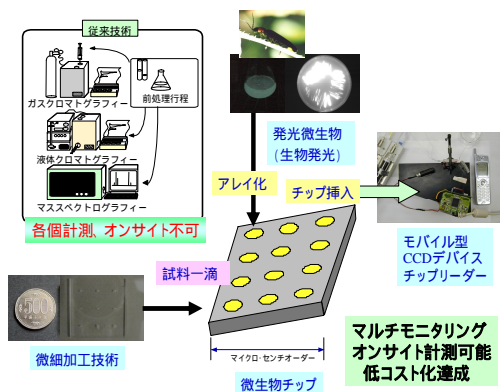


図1 開発技術の概要（発光微生物チップシステム）

固定化チップにはアクリル製(3x4cm)のものを用い、海洋由来の発光微生物 *Photobacterium phosphoreum* もしくは、研究室独自の分離株を固定化微生物として用いた。(1) 所属機関の現有施設である遺伝子組換え取り扱い施設などを利用し、アレイ化に供する微生物素材を新たに創製するため実験を行った。特に、環境修復現場において検出が要望される芳香族化合物及びカドミウム

などの重金属、セレン酸などの毒性アニオンに対する代謝遺伝子を遺伝子工学的手法によって、代謝関連遺伝子の調節部位下流域に発光遺伝子を融合することで、各種汚染物質に対して応答能を付与させた機能遺伝子の構築について検討した。また、同時に、大腸菌を宿主として lacZ-Xgal などをレポーターとして用いたプロモーターアッセイベクターを利用したランダムクローニングアッセイを行った。簡便に宿主株に遺伝子を導入、発現させることができるベクター系の構築についても検討した。短時間で毒性アニオン、重金属、芳香族化合物などの計測項目に反応する遺伝子を申請者が所有する微生物株から新たに見出し、見出したプロモーター性遺伝子を大腸菌などの微生物に導入、発光遺伝子をレポーター遺伝子とすることで、アレイ化に供する光微生物素材を新たに創製することを検討した。加えて、得られたプロモーター性遺伝子のシーケンス解析、既知プロモーター性遺伝子配列との比較などの研究を行い、発光遺伝子の上流域に挿入する遺伝子の素性、特性について調査した。

(2) 加えて1週間から1ヶ月程度の長期にわたる活性維持が可能なチップの開発を目的として、菌体の包埋にアルギン酸ゲルをはじめとする各種保水性高分子・無機シリカゲルを利用して固定化素材の最適化や再活性化プロセスの改良を行った。また、申請者がこれまで開発した簡易測定システム（図2）

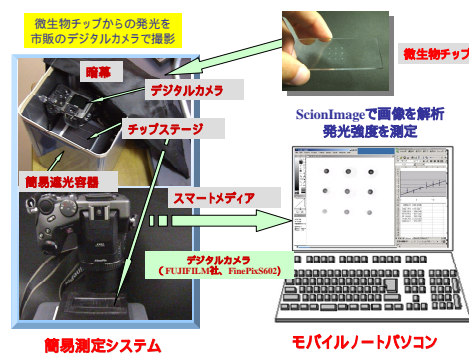


図2 発光微生物チップを用いたオンサイト型簡易測定システム

を小型携帯化が可能なものに改良し、保存チップの活性化がオンサイトで可能なようにウォーマーなどを備えた実用型改良システムを提案した。

4. 研究成果

(1) アレイ化に供する微生物素材の創製について研究を行った。特に、土壌修復現場において検出が要望される芳香族化合物（ナフタレン類）、カドミウムのような重金属、セレン酸などの毒性アニオンに対する代謝遺伝子を遺伝子工学的手法によって代謝関連

遺伝子の調節部位下流域に発光遺伝子を融合することを試みた。本実験においては、大腸菌を宿主として lacZ-Xgal、発光遺伝子、gfp などをレポーターとして用いたプロモーターアッセイベクターを利用したランダムクローニングアッセイによって目的遺伝子の探索、スクリーニングを実施した。その結果、セレン酸還元菌 JSA 株からセレン酸などに対して応答能を有する遺伝子断片を発光遺伝子をレポーターとするプロモーターレスプラスミド phRG-B へのクローニングに成功した。Sep-5 と名付けられたクローニング株はセレン酸添加時、特異的に発光強度の上昇が認められた (図 3)。この株からは発光

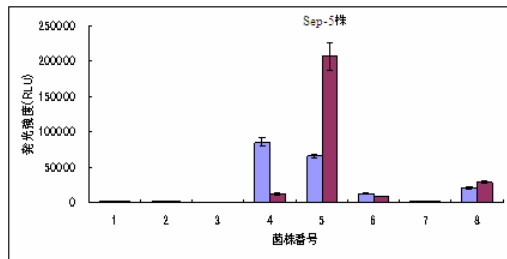


図3 発光遺伝子をレポーターとするプロモーターレスプラスミド phRG-B へのランダムクローニングアッセイによるセレン酸ナトリウムの添加による遺伝子発現の比較

検出装置には感知できる発光が認められたものの肉眼やシャッター速度の速い市販のデジタルカメラでは発光を捉えることが出来なかった。また、大腸菌内では安定な発光が再現しづらい問題点があった。なお、データベースから得られたプロモーター性遺伝子約 6kb のシーケンス解析、既知プロモーター性遺伝子配列との比較などの研究を行い、発光遺伝子の近流域に挿入された遺伝子の素性、特性についての調査をおこなった。これまでのところ、プロモーター性の遺伝子配列の存在をいくつか確認でき、セレン酸還元に関与すると考えられるモリブドプテリタンパク質が構造遺伝子として確認された (図 4)。現在、更に解析を進行している状

ORF-2	1	MNNEPGLNERSFLNGLVALGVAALPGGLTTRCALAQPFIPFNKTYIWRNACFPNC	60
Mob	1	MNNEPGLNERSFLNGLVALGVAALPGGLTTRCALAQPFIPFNKTYIWRNACFPNC	60
ORF-2	61	YITCSLITWVDDIIIFVEGAPESSTFTHGIFCVHGLTYFRVVSDFRIKYMVQVDRSGG	120
Mob	61	YITCSLITWVDDIIIFVEGAPESSTFTHGIFCVHGLTYFRVVSDFRIKYMVQVDRSGG	120
ORF-2	121	NWRFSWDEAMQRIATMLETIKKMDGMLGLALSKYSNFGVMGYAVEGMSLGYTRF	180
Mob	121	NWRFSWDEAMQRIATMLETIKKMDGMLGLALSKYSNFGVMGYAVEGMSLGYTRF	180
ORF-2	181	AGTFCWAGIDAQNYDMSDMGCHDFEDFYAKYIILWGANFANCSMHTMGYIYQARENGA	240
Mob	181	AGTFCWAGIDAQNYDMSDMGCHDFEDFYAKYIILWGANFANCSMHTMGYIYQARENGA	240
ORF-2	241	KVVVIDELITQAAKALDLVLRVPSGDLALGMAHLYDGLVLDQDFUNYSHGYEPEE	300
Mob	241	KVVVIDELITQAAKALDLVLRVPSGDLALGMAHLYDGLVLDQDFUNYSHGYEPEE	300
ORF-2	301	AMRSPFADAV*	
Mob	301	AYLNRVTVFAAEICGLSAQVQ.....-> 759aa	

図4 モリブデン酵素(Mob) (Gene bank accession number : gi|56128509|gb|AAV78015.1|) と pSEP-5 のクローニング遺伝子にみられる ORF-2 のアミノ酸配列の比較

ORF-2とMobの間には一致したアミノ酸配列を記載(青色)、性質が類似のアミノ酸配列は+で記載した。一致したアミノ酸配列は92%で性質が類似のアミノ酸配列は96%であった。

況である。更にプロモーターレスレポーター遺伝子を含むトランスポゾン (mini-Tn5) を接合伝達を介してランダムインサートアッセイを実施した。これまでのところ、大腸菌、セレン酸還元菌に対してプロモーターレスの発光遺伝子を含んだミニトランスポゾン (mini-Tn5) 挿入変異によって応答遺伝子の探索をランダムアッセイに基づいて実施してきたが、有機系化合物、重金属イオン、毒性オキシアニオンに対して明確に反応するような遺伝子を見出すまでには至らなかった。特に大腸菌内での発現安定性が問題となったため、セレン酸還元菌株への遺伝子導入、発現を目的として、エレクトロポレーションや広域宿主ベクターによる異種遺伝子の導入について検討したところ、RSF1010 を骨格とするグラム陰性菌広域宿主ベクター (pKT230, pKT240) を接合伝達によって安定に宿主株 (セレン酸還元菌 JSA 株) に導入、遺伝子発現をさせることが可能であった。導入 (形質転換) 効率は 10^{-6} から 10^{-5} であることが明らかとなった。今後、この導入系を用いてアレイ化に供する光微生物素材を新たに創製できる可能性が示された。また、本研究の遂行を通じて、トランスコンジュガントの形成法が確立されたことから、本課題終了後もランダム法によるミニトランスポゾン (mini-Tn5) 挿入変異による関連応答遺伝子の探索は継続して行っている。

(2) 次に、細胞の活性を保持できるアレイ化技術の開発については、アレイ化などの物理的因子よりもアレイ化される微生物株の生物的特性に依存することが大きいことが判明し、新たなスクリーニングによって長期保存可能な株 (KN5 株) を海洋魚類から獲得できた (図 5)。また、チップ上に固定化し

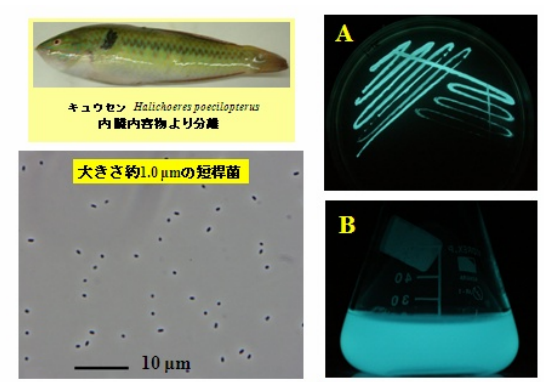


図5 キュウセイン属から分離された発光細菌KN-5株の位相差光学顕微鏡写真、生物発光の外観(A:プレート、B:液体培養)

た微生物の生体活性を安定に保持・制御できる技術開発を目的として微生物細胞の包埋にアルギン酸ゲルをはじめとする各種保水性高分子ゲルの利用、凍結乾燥技術の応用や

無機塩類などを含む活性化溶液の添加などによる細胞活性保持・再活性化方法の開発について検討した。その結果、KN5株のシリカゲルによる固定化、レスティングセルの利用によって4°Cで約1ヶ月の保存が可能であり、1週間保存したチップによるBOD計測が可能であることが確認された(図6)。また、

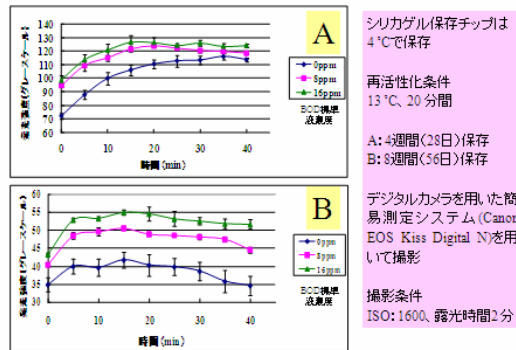


図6 KN-5株をシリカゲルで固定化して作製された保存チップの発光強度変化

これらと同時に、市販のデジタルカメラなど携帯可能な受光用 CCD デバイスの改良、さらに微生物チップの活性化を目的としたウォーマーなどを備えたオンサイト計測が可能な測定システムを提案できた(図7)。

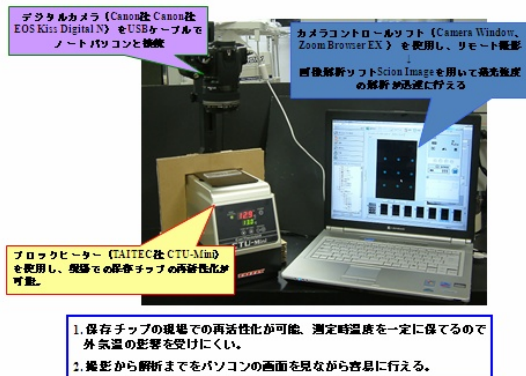


図7 ブロッキングヒーターとデジタルカメラなどを用いた改良型オンサイトBOD測定用簡易測定システム

これらの研究を通じて、最終的には、オンサイトでの多項目環境計測が可能なセンシングシステムのプロトタイプの開発を進展させることができた。

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1件)

Conjugal transformation and transposon and chemical mutagenesis of gram-negative selenate-respiring *Citrobacter* sp. strain JSA (2009), *Current Microbiology* (in press)

Toshifumi Sakaguchi, Masaki Kato, Naoki Kuriyama, Harutaka Niiyama, Shougo

Hamada, Yasutaka Morita and Eiichi Tamiya (査読有)

[学会発表](計6件)

Isolation and phylogenetic analysis of marine *Vibrio* spp. capable of respiring selenium oxyanions, 7th International Symposium for Subsurface Microbiology (ISSM 2008), 平成20年11月17日、静岡市、グランシップ静岡, Japan, Toshifumi Sakaguchi, Yukiko Kadowaki, Katsuya Doi and Yuuki Doi

冷蔵保存可能な微生物チップによるオンサイト有機汚濁測定、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(日本化学会)、平成20年9月19日、東京工業大学、すずかけキャンパス、神奈川、阪口利文、溝口宏明

長期保存可能な発光細菌固定化チップによるオンサイト有機汚濁計測、日本化学会第88回春季年会、平成20年3月28日、東京都立教大学、阪口利文、溝口宏明

発光微生物チップを用いたオンサイト環境におけるBOD計測、第59回日本生物工学会大会、平成19年9月26日、広島大学東広島キャンパス、東広島、阪口利文、山崎真博、溝口宏明

発光微生物固定化チップを用いたオンサイト有機汚濁、毒物検出システムの開発、第10回マリンバイオテクノロジー学会大会、平成19年5月27日、山形大学小白川キャンパス、山形、阪口利文、山崎真博、溝口宏明

発光微生物固定化チップを用いたオンサイトBOD計測、日本農芸化学会中四国支部第18回講演会、平成19年5月12日、県立広島大学広島キャンパス、広島、阪口利文、山崎真博、溝口宏明

[図書](計3件)

阪口利文、江頭直義、化学発光検出(バイオチップ実用化ハンドブック)、エヌティーエス(NTS)出版、編集・印刷中、2009年

阪口利文、微生物によるテルル化カドミウム微粒子の合成(メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収)、シーエムシー(CMC)出版、9ページ(pp. 157-165)、2009年

阪口利文、バイオセンサーの先端科学技術と応用(第III編、第8章:微生物チップ

による環境汚染センサー)、シーエムシー
(CMC) 出版、14 ページ(pp. 289-302)、2007
年

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：発光微生物固定化チップ及びそれを用
いる有機汚濁、環境測定法

発明者：阪口利文、森田資隆

権利者：北九州 TLO、学校法人近畿大学

種類：特願

番号：2008-228700

出願年月日：平成 20 年 9 月 5 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪口 利文 (SAKAGUCHI TOSHIFUMI)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：10272999

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし