

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4384465号
(P4384465)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 2 F	1/00	(2006.01)	C O 2 F 1/00 V
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q	1/66	(2006.01)	C 1 2 Q 1/66
G O 1 N	21/76	(2006.01)	G O 1 N 21/76

請求項の数 3 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-339540 (P2003-339540)
 (22) 出願日 平成15年9月30日(2003.9.30)
 (65) 公開番号 特開2005-102575 (P2005-102575A)
 (43) 公開日 平成17年4月21日(2005.4.21)
 審査請求日 平成18年8月30日(2006.8.30)

(73) 特許権者 501273886
 独立行政法人国立環境研究所
 茨城県つくば市小野川16-2
 (73) 特許権者 503351744
 山田 正人
 千葉県柏市新柏1-18 新柏住宅5-4
 07
 (73) 特許権者 503352361
 井上 雄三
 東京都北区浮間2丁目16番11-805
 (73) 特許権者 503352372
 毛利 紫乃
 茨城県つくば市稲荷前24番10号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有害物質検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子損傷性物質によりDNAが損傷を受けたときに発現されるSOS遺伝子と、その下流に配置されたルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子と、そのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子により形質転換された遺伝子損傷性物質検出用微生物と、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換された生育阻害物質検出用微生物とを用いて試料水中の有害物質を検出する方法において、

前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、16~24に保持しつつ、16~24に保持した前記試料水を接触させて、前記各固定化微生物膜の発光状態を光検出器で連続的に測定し、前記試料水中の有害物質を連続的にモニタリングすることを特徴とする有害物質検出方法。

【請求項2】

前記遺伝子損傷性物質検出用微生物として、プラスミドpSK1002由来のumuD,C遺伝子の下流に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用い、

前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターに、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いる、請求項1に記載の有害物質検出方法。

【請求項3】

前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターpBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子のORF内に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibriofischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いる、請求項2に記載の有害物質検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水中の有害物質の検出方法に関し、例えば、上下水道の各処理プロセスの処理水、河川及び湖沼等の環境水、廃棄物埋立最終処分場の浸出水、工業排水等に含まれる有害物質を連続的にモニタリングするのに好適な方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

環境中には6～10万種もの人為的に合成された化学物質や、トリハロメタン等の消毒副生成物、ダイオキシン等の燃焼副生成物といった非意図的生成物質、更には環境中での変化体等の数多くの化学物質が存在しており、これらの化学物質の中には、急性毒性、発ガン性、変異原性等を有する有害物質が数多くある。

【0003】

通常、環境水中における上記のような化学物質の濃度は、ごく微量であると考えられるが、このような環境水を水道原水とする浄水場においては、人体への影響の観点からより高度な水質の連続監視が求められている。

20

【0004】

また、下水処理場、廃棄物最終処分場、化学薬品を使用する工場等から排出される廃水には様々な化学物質が含まれているが、最終的には河川等の環境中に排出されるため、通常、オゾン処理や生物処理、活性炭処理等により、安全基準値以下にまで化学物質を分解あるいは除去してから放流されている。そのため、廃水処理プロセスが適切に稼働し、水中の有害物質が除去されているかどうかを監視する必要がある。

【0005】

従来より、水中の有害物質を監視する手段として、魚類の活動電位又は異常行動を監視する方法や、硝化細菌を利用した急性毒物モニタ等の有害物質検出方法が知られているが、これらの方法では、発ガン性、変異原性等を有する有害物質(本発明では、このような有害物質を遺伝子損傷性物質という。)の蓄積による発ガン性、遺伝毒性、慢性毒性までは評価することができなかった。

30

【0006】

また、発ガン性物質の一次選別法として、例えば、umuテストやSOSクロモテスト等の微生物を用いた遺伝子損傷性試験法が知られているが、操作が煩雑である、検出感度が低い、高価な発色試薬が必要である等の問題があり、環境水等に含まれる有害物質を検出する方法としてはあまり実用的であるとは言えなかった。

【0007】

そのため、下記特許文献1には、DNAの損傷に対して感受性のSOS遺伝子の下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子を配置した組換え遺伝子により形質転換された微生物を利用して、遺伝子損傷性物質を検出する方法が開示されている。

40

【0008】

また、下記特許文献2には、その一面に鉄バクテリアを保持した微生物膜が設けられるとともに内部液を有するケースと、ケース内に配置された一对の電極とを有する検出電極部と、ケースに隣接して設けられるとともに微生物膜に接する検出流路と、この検出流路内に被測定液を供給する被測定液供給装置と、検出流路内に第1鉄含有液を供給する第1鉄含有液供給装置と、検出流路内にPH調整用緩衝液を供給して、検出電極部における被測定液と第1鉄含有液とPH調整用緩衝液との混合液のPHを一定の値に定めるPH調整

50

用緩衝液供給装置と、検出電極部の一对の電極間を流れる電流値を測定して被測定液の異常水質を検出する演算部と、を備えたことを特徴とする異常水質検出装置が開示されている。

【0009】

また、下記特許文献3には、導入口を有する測定槽と、導入口に接続され、導入口に被測定液を導入する導入管と、導入管に接続され、導入管内に第1鉄含有溶液を導入する試薬配管と、測定槽内に、導入管から導入口を経て測定槽内に導入される被測定液の流れ方向に沿って設けられた、鉄バクテリアを保持する微生物膜と、微生物膜に接続された電極装置と、を備えたことを特徴とする異常水質検出装置が開示されている。

【特許文献1】特許第3277426号公報

【特許文献2】特開平11-37969号公報

【特許文献3】特開2000-321233号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかしながら、上記特許文献1に開示された方法では、試験操作において微生物の培養や分注、希釈等を行う必要があるため、連続的なモニタリングに適していないだけでなく、前記形質転換された微生物は遺伝子損傷性物質が存在する場合に発光するが、微生物に対して生育阻害作用を示し、発光反応を阻害するような有害物質（本発明では、このような有害物質を生育阻害物質という。）、例えば、呼吸阻害物質等が共存すると該微生物の代謝が低下して発光しない場合もあるため、試料水の異常を見逃してしまう恐れもあった。

【0011】

また、上記特許文献2、3に開示された方法においては、発ガン性、遺伝毒性、慢性毒性と関連のある遺伝子損傷性物質までは評価することができなかった。

【0012】

上記のような問題点を鑑み、本発明者らは、SOS遺伝子と発光遺伝子からなる組換え遺伝子により形質転換した遺伝子損傷性物質検出用微生物と、常時ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子により形質転換された生育阻害物質検知用微生物をそれぞれ微孔性膜上に固定化した2種類の固定化微生物膜を用い、各微生物の発光の有無を測定することにより、試料水中の遺伝子損傷性物質及び生育阻害物質を検出する方法を提案している（特願2002-341764号）。

【0013】

しかしながら、上記の遺伝子損傷性物質検出用微生物と生育阻害物質検知用微生物を用いた方法においても、より長時間にわたって安定した連続的なモニタリングを可能とすることが求められていた。

【0014】

したがって、本発明の目的は、水中に含まれる遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を、正確、迅速かつ簡便に検出できると共に、長時間にわたって安定した連続的なモニタリングが可能な有害物質検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記目的を達成するため、本発明の有害物質検出方法は、遺伝子損傷性物質によりDNAが損傷を受けたときに発現されるSOS遺伝子と、その下流に配置されたルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子と、そのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子により形質転換された遺伝子損傷性物質検出用微生物と、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換された生育阻害物質検出用微生物とを用いて試料水中の有害物質を検出する方法において、前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、

10

20

30

40

50

~ 24 に保持しつつ、16 ~ 24 に保持した前記試料水を接触させて、前記各固定化微生物膜の発光状態を光検出器で連続的に測定し、前記試料水中の有害物質を連続的にモニタリングすることを特徴とする。

【0016】

本発明の有害物質検出方法によれば、遺伝子損傷性物質検出用微生物と、生育阻害物質検出用微生物とを用いて試料水中の有害物質を検出する際に、前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を16 ~ 24 に保持しつつ、16 ~ 24 に保持した前記試料水を接触させることにより、前記生育阻害物質検出用微生物の増殖速度を低下させることができるので、前記固定化微生物膜の透過性を長時間にわたって良好に維持することができ、発光反応に必要な酸素及び補酵素等や微生物の生育に必要な栄養分等の不足による発光量の低下を防ぐことができる。その結果、試料水中の遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を、正確、迅速かつ簡便に検出できると共に、長時間にわたって安定した連続的なモニタリングが可能となる。

10

【0018】

また、前記遺伝子損傷性物質検出用微生物として、プラスミドpSK1002由来のumuD,C遺伝子の下流に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用い、

前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターに、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いることが好ましい。

20

【0019】

また、前記生育阻害物質検出用微生物として、プラスミドベクターpBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子のORF内に、ビブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) 由来の発光遺伝子群を連結したプラスミドを導入して形質転換したサルモネラ菌を用いることがより好ましい。

【0020】

これらによれば、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物を簡単に作成することができる。

【発明の効果】

【0021】

本発明によれば、遺伝子損傷性物質検出用微生物と、生育阻害物質検出用微生物とを用いて試料水中の有害物質を検出する際に、前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、前記生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度よりも低い温度に保持しつつ、前記至適生育温度よりも低い温度に保持した前記試料水を接触させることにより、前記生育阻害物質検出用微生物の増殖速度を低下させることができるので、前記固定化微生物膜の透過性を長時間にわたって良好に維持することができ、発光反応に必要な酸素及び補酵素等や微生物の生育に必要な栄養分等の不足による発光量の低下を防ぐことができる。その結果、試料水中の遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を、正確、迅速かつ簡便に検出できると共に、長時間にわたって安定した連続的なモニタリングが可能となる。

30

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明で用いられる遺伝子損傷性物質検出用微生物は、DNAの損傷に対して感受性のSOS遺伝子の下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子を配置した組換え遺伝子により形質転換されているので、遺伝子損傷性物質により該微生物のDNAが損傷を受けると、SOS遺伝子の発現と同時にルシフェラーゼ活性を有する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子も発現される。その結果、ルシフェラーゼ活性の基質が菌体内で連続的に供給される条件が達成され、ルシフェラーゼによる連続的な発光反応が起こるので、この発光を測定することにより、遺伝子損傷性物質、例えば、4 -

50

ニトロキノリン - N - オキサイド、2 - アミノアントラセン、ベンゾ (a) ピレン、1 - ニトロピレン、2 - (2 - フリル) - 3 - (5 - ニトロ - 2 - フリル) アクリルアミド等を検出、測定することができる。

【 0 0 2 3 】

すなわち、本発明で用いられる遺伝子損傷性物質検出用微生物においては、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子をDNAの損傷に依存して発現させるための発現制御手段としてSOS遺伝子を利用するものである。したがって、SOS遺伝子はDNA損傷時に発現されるものであればよく、SOSボックスと称する制御部分を含有するものであればよい。なお、本発明においてDNA損傷時に発現されるSOS遺伝子とは、前記SOSボックスと称される

10

【 0 0 2 4 】

SOS遺伝子としては、umu遺伝子、例えばumuD遺伝子及びumuC遺伝子、並びにsfiA遺伝子等が例示できるがこれらに限定されない。例えば、umuD、umuC遺伝子は、Pro. Natl. Acad. Sci. USA Vol.82, 4336-4340 (1985)に記載されており、その記載に基づいて容易に入手することができる。本発明においては、umuD遺伝子並びにumuC遺伝子の一部とlacZ遺伝子との融合遺伝子を、プラスミドベクターpBR322に導入したプラスミドpSK1002由来のSOS遺伝子が好ましく用いられる。プラスミドpSK1002は、H. Shinagawaら、Gene, 23, 167 (1983)に記載されており、その記載に基づいて容易に入手することができる。

20

【 0 0 2 5 】

一方、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子としては、SOS遺伝子の制御下でその両遺伝子群が発現されるものであればよく、特に限定されないが、例えば、海洋細菌の生物発光遺伝子群を用いることができる。上記性質を有する生物発光遺伝子群を持つ海洋細菌としては、ビブリオ (*Vibrio*) 群のビブリオ (*Vibrio*) 属では、ビブリオ・ハーベイ (*V. harveyi*)、ビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*)、ビブリオ・スプレンドイドゥス (*V. splendidus*)、ビブリオ・コレラ (*V. cholerae*) 等が挙げられる。また、フォトバクテリウム (*Photobacterium*) 属では、フォトバクテリウム・ホスホリウム (*P. phosphoreum*)、フォトバクテリウム・レイノクナシ (*P. leiognathi*) 等が挙げられる。本発明においては、ビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*) 由来の生物発光遺伝子群 (luxA,B,C,D,E) が好ましく用いられる。このビブリオ・フィシェリ (*V. fischeri*) 由来の生物発光遺伝子群は、リポーター遺伝子として使い易くするために、生物発光遺伝子群のオペレーター領域を取り除き、構造遺伝子部分 (ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子群及びその基質であるアルデヒドの生産を触媒する酵素である脂肪酸リダクターゼ活性を発現する遺伝子群) だけを含む種々のカセットベクター、例えば、pUCD320, pUCD613, pUCD614, pUCD618, pUCD620, pUCD623, pUCD1111等が報告されている。これらのカセットベクターについては、Clarence I. Kadoら、Plant Molecular Biology Reporter, 5, 225 (1987)に記載されており、これらのベクターから生物発光遺伝子群の構造遺伝子部分を容易に入手することができる。

30

【 0 0 2 6 】

なお、本発明において、ルシフェラーゼ活性の基質とは長鎖アルデヒド等を意味し、これらの生産を触媒する酵素とは、NAD(P)H-FMN還元酵素、脂肪酸リダクターゼ等を意味する。なお、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素の遺伝子は同一の起源のものを用いてもよく、異なる起源のこれらの遺伝子を連結して用いてもよい。

40

【 0 0 2 7 】

SOS遺伝子と、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含んでなる組換え遺伝子は、SOS遺伝子のSOSボックスを少なくとも含有するDNA断片の該SOSボックスより下流に、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する

50

酵素を発現する遺伝子群を連結することにより作製することができる。この連結は、DNAリガーゼを用いて常法にしたがって行うことができる。また、この組換え遺伝子を宿主微生物に導入するためには、上記組換え遺伝子はベクター中に存在する必要があるが、例えば、プラスミドベクターとしては、pBR系プラスミド、pUC系プラスミド等を利用することができる。

【0028】

宿主微生物としては、該微生物のDNAが遺伝子損傷性物質により損傷された際に SOS 遺伝子が発現させることができる微生物、すなわち SOS 機能を有する微生物であれば特に制限されないが、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。本発明においては、TA1535株、TA1538株等のサルモネラ菌が好ましく用いられる。

10

【0029】

発現ベクターにより宿主微生物を形質転換する方法は、例えば細菌の形質転換に用いられる常法にしたがって該組換え遺伝子を含む発現ベクターを宿主微生物に導入すればよい。

【0030】

次に、本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物について説明する。本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物は、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子により形質転換されているので、通常の状態ではルシフェラーゼによる連続的な発光反応が起こっている。したがって、生育阻害物質によって、該微生物の代謝活性が低下すると、ルシフェラーゼによる発光反応が低下するので、この発光状態を測定することにより、生育阻害物質、例えば、シアン化カリウム、フェノール、2, 4 - ジクロロフェノール、塩化水銀等を検出、測定することができる。

20

【0031】

すなわち、本発明で用いられる生育阻害物質検出用微生物においては、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子は、これらの遺伝子が常時発現するような発現制御手段の下に配置されている。このような発現制御手段としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の微生物内でタンパク質を発現させるために用いられる種々の発現ベクターを用いることができ、例えば、プラスミドベクターとしては、pBR系プラスミド、pUC系プラスミド等を利用することができる。本発明においては、プラスミドベクターpBR322が好ましく用いられる。プラスミドベクターpBR322は、例えばタカラバイオ株式会社、東洋紡株式会社等から入手することができる。

30

【0032】

また、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子は、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物で説明したものと同様のものが用いられる。

【0033】

ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子とを含み、常時ルシフェラーゼ活性を発現する組換え遺伝子は、常法にしたがって上記のような発現ベクターのクローニングサイトに、上記ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子とそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子群を組み込むことにより作製することができる。本発明においては、pBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子のORF内に組み込むことが好ましい。

40

【0034】

このようにして作製された組換え発現ベクターは、常法にしたがって、宿主微生物に導入すればよい。なお、宿主微生物としては、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物で説明したものと同様のものが用いられ、TA1535株、TA1538株等のサルモネラ菌が好ましく用いられる。

50

【0035】

本発明の有害物質検出方法においては、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物は、これらの微生物が漏出せず、かつ少なくとも試料水中の溶解化学物質、栄養成分及び酸素が透過できるポアサイズと親水性を有する微孔性膜と、該微生物からの発光を透過できる光透過性膜との間に薄膜状に固定化して、固定化微生物膜として用いられる。

【0036】

図1には、固定化微生物膜の一例が示されている。この固定化微生物膜5は、微孔性膜2と光透過性膜3がドーナツ状の両面テープ4によって張り合わされたものであり、その中心部には、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物又は生育阻害物質検出用微生物1が薄膜状に固定化されている。

10

【0037】

上記微孔性膜としては、ポアサイズ0.2~0.4 μm のセルロース、ニトロセルロース、ポリカーボネート等の材質からなる膜を用いることができ、その厚さは、通常、厚さ10 μm 程度のものが用いられる。

【0038】

また、上記光透過性膜としては、ポリエチレン、塩化ビニル等の材質からなり、厚さが30~100 μm である透明又はそれに近い膜が用いられる。

【0039】

このような固定化微生物膜は、例えば以下のようにして作製することができる。すなわち、上記遺伝子損傷性物質検出用微生物又は生育阻害物質検出用微生物を常法にしたがって培養し、得られた培養液を遠心して上澄み液を除去した後、1%アルギン酸ナトリウム水溶液を適量加えて懸濁し、菌体懸濁液を得る。

20

【0040】

次いで、微孔性膜2の中心部に、上記菌体懸濁液を滴下して、余剰のアルギン酸ナトリウム水溶液を吸引除去した後、更に塩化カルシウム水溶液(30g/L)を適量滴下して、余剰の塩化カルシウム水溶液を吸引除去し、菌体を固定化した面を内側にして、ドーナツ状の両面テープ4を介して光透過性膜3と張り合わせる。

【0041】

そして、最後に塩化カルシウム水溶液(30g/L)に浸漬し、アルギン酸ナトリウムを完全にゲル化させて菌体を固定化することにより、固定化微生物膜を作製することができる。

30

【0042】

このようにして作製した遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜、及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜は、使用するときまで、保存液(TGA培地85%、グリセロール15%)に浸漬し、-20以下で凍結保存すればよい。

【0043】

本発明の有害物質検出方法は、上記遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜及び生育阻害物質検出用固定化微生物膜を、試料水に接触させる際に、前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、前記生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度よりも低い温度に保持しつつ、前記至適生育温度よりも低い温度に保持した前記試料水を接触させ、前記各固定化微生物膜の発光状態を測定することにより、試料水中の有害物質を連続的にモニタリングするものである。

40

【0044】

本発明において、前記生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度よりも低い温度とは、該生育阻害物質検出用微生物の代謝活性を維持しつつ、その増殖速度を抑制できる温度を意味する。例えばサルモネラ菌、大腸菌、酵母の至適生育温度は37付近にあるため、これらの微生物を用いる場合、固定化微生物膜及び試料水を16~24に保持することが好ましく、19~21に保持することがより好ましい。

【0045】

50

上記のような温度範囲に保持することにより、生育阻害物質検出用微生物の代謝活性を損なうことなく、増殖速度を低下させることができ、生育阻害物質検出用の固定化微生物膜の寿命を延ばすことができる。更に、前記生育阻害物質検出用微生物に導入する発光遺伝子として、上記の海洋細菌由来の生物発光遺伝子群を用いた場合、これらの海洋細菌の生育温度が20～26 であることから、発光酵素(ルシフェラーゼ)の活性を最も高い状態に維持することができ、より正確に試料水中の生育阻害物質を検出することができる。

【0046】

以下、図2、3に基づいて本発明の有害物質検出方法を具体的に説明する。

図2には、本発明の有害物質検出方法を行う際に用いられる、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを備えた有害物質モニタリング装置の概略構成図が示されている。

10

【0047】

この有害物質モニタリング装置10は、遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と該固定化微生物膜の発光状態を測定するための光検出器とからなる遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11と、生育阻害物質検出用固定化微生物膜と該固定化微生物膜の発光状態を測定するための光検出器とからなる生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12と、これらのバイオセンサに試料水を供給するための手段(送液ポンプ15)と、前記固定化微生物膜に酸素を供給するための手段(エアポンプ16)と、前記発光検出型バイオセンサからの出力を増幅する手段(アンプ17)と、その出力データを表示する手段(コンピュータ18)とから構成されている。なお、アンプ17は、後述する光検出器30の電源も兼ねている。

20

【0048】

前記遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11と前記生育阻害物質検出用発光検出型12は、外界からの光を遮断すると共に固定化微生物膜の微生物の代謝活性を維持するために、それぞれ所定の温度に保持された恒温器13、14の中に設置されており、前記生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12が設置された前記恒温器14は、上記のように生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度より低い温度に保持されている。

【0049】

また、図示しない手段により、試料水中に固定化微生物膜の微生物の活性を維持するための栄養成分を連続的に添加できるようになっている。上記栄養成分としては、例えば、TGA培地(バクトトリプトン1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.2%、アンピシリンナトリウム20 μ g/mL)等を用いることができる。栄養成分の添加量は、通常、試料水中に、上記培地が10(v/v)%以上となるように添加すればよい。

30

【0050】

一方、図3には、前記生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12の断面の模式図が示されている。なお、生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12と遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ11は、固定化微生物膜の種類が異なるだけで基本的な構造は同じであるので、以下の説明においては、生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12について説明する。

40

【0051】

生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ12は、フローセル上部12aとフローセル下部12bとからなるフローセル内に、生育阻害物質検出用固定化微生物膜5aと光検出器30とを有している。

【0052】

前記光検出器としては、例えば、光電子倍增管、高感度CCDカメラ等を用いることができる。

【0053】

前記固定化微生物膜5aは、微孔性膜側を上にして固定化微生物膜支持用ガラス板22上に載置され、これらは2個のOリング23によって挟み込まれた状態で、該固定化微生物

50

物膜 5 a の微孔性膜が試料水の流路に面するように、フローセル下部 1 2 b 内に収納されている。そして、前記フローセル上部 1 2 a を前記フローセル下部 1 2 b に装着することにより、2 個のリング 2 3 によって前記固定化微生物膜 5 a 及び固定化微生物膜支持用ガラス板 2 2 がフローセル内に固定されるようになっている。

【 0 0 5 4 】

また、前記フローセル上部 1 2 a の前記フローセル下部 1 2 b と接する側の面には、底面に貫通孔 2 1 a、2 1 b を有する凹部 2 1 c が形成されており、前記フローセル上部 1 2 a を前記フローセル下部 1 2 b に装着した際に、前記凹部 2 1 c の開口部が前記固定化微生物膜 5 a によって塞がれてシールされ、試料水の流路 (2 1 a、2 1 c、2 1 b) が形成されるようになっている。

【 0 0 5 5 】

一方、フローセル内の固定化微生物膜支持用ガラス板 2 2 側には光検出器 3 0 が設置されており、前記固定化微生物膜 5 a の光透過性膜及び前記固定化微生物膜支持用ガラス板 2 2 越しに前記固定化微生物膜 5 a の発光量を検出し、電圧値等として出力できるようになっている。

【 0 0 5 6 】

この有害物質モニタリング装置 1 0 によれば、図示しない手段により固定化微生物膜の微生物の活性を維持するための栄養成分が添加された試料水は、エアポンプ 1 6 により空気を送り込まれながら、送液ポンプ 1 5 によって、所定の温度 (通常 2 5 ~ 3 0) に保持された恒温室 1 3 内に設置された遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ 1 1、及び生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度より低い温度に保持された恒温室 1 4 内に設置された生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ 1 2 に送液され、各バイオセンサ内の固定化微生物膜と接触した後、排出される。そして、各固定化微生物膜の発光状態は光検出器 3 0 によって電圧値等として出力され、コンピュータ 1 8 に表示される。

【 0 0 5 7 】

なお、前記恒温室 1 4 は、上記のように生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度より低い温度に保持されているので、恒温室内で適当な長さの流路を確保してやることにより、試料水を生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度より低い温度に保持することもできるが、流路の途中に冷却器等を設置して試料水の温度を調整することもできる。また、培地タンクを恒温槽内に入れて温度を保持することもできる。

【 0 0 5 8 】

本発明の有害物質検出方法によれば、前記遺伝子損傷性物質検出用微生物は、試料水中の遺伝子損傷性物質によって微生物の DNA が損傷を受けると、S O S 応答と共にルシフェラーゼ及びその基質が合成されて発光し、前記生育阻害物質検出用微生物は、試料水中の生育阻害物質によって、その代謝活性が低下すると、ルシフェラーゼ活性が低下して発光が弱くなる (あるいは消光する)。すなわち、試料水中に有害物質が含まれず正常な場合は、生育阻害物質検出用微生物のみが発光し、遺伝子損傷性物質が混入したときは、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の両方が発光し、生育阻害物質が混入したときは、遺伝子損傷性物質検出用微生物及び生育阻害物質検出用微生物の両方が消光するため、試料水中に含まれる遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を正確、迅速かつ簡便に検出することができる。

【 0 0 5 9 】

また、前記生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、前記生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度よりも低い温度に保持しつつ、前記至適生育温度よりも低い温度に保持した前記試料水を接触させているので、前記生育阻害物質検出用微生物の増殖速度を低下させて、前記固定化微生物膜の透過性を長時間にわたって良好に維持することができ、発光反応に必要な酸素及び補酵素等や微生物の生育に必要な栄養分等の不足による発光量の低下を防ぐことができる。その結果、試料水中の遺伝子損傷性物質や生育阻害物質等の有害物質を、長時間にわたって安定して連続的にモニタリングすることができる。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0060】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0061】

実施例

(1) 遺伝子損傷性物質検出用微生物

上記特許文献1(特許第3277426号)に記載された方法により、遺伝子損傷性物質検出用微生物を作製した。

【0062】

すなわち、SOS遺伝子として、大腸菌(CSH26「Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972」:F-ara del(lac-pro)thi)に導入されたプラスミドpSK1002のumuD,C遺伝子を利用した。

【0063】

また、ルシフェラーゼ活性を発現する遺伝子及びそのルシフェラーゼ活性の基質の生産を触媒する酵素を発現する遺伝子としては、大腸菌(HB101:hsd20(rB-, mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44)に導入されたプラスミドpUCD620(Clarence I. Kadoら、Plant Molecular Biology Reporter, 5, 225 (1987))の発光遺伝子群を利用した。

【0064】

導入する微生物として、サルモネラ菌(TA1535「Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki, Mutation Res., 31, 347, 1975」:hisG46, gal, chl, bio, uvrB, rfa-, SJ10002:r-, m+)を利用した。

【0065】

(i) SOS遺伝子の調製

プラスミドpSK1002を含む大腸菌(CSH26)を、アンピシリンを含むLB培地(Bactotripton 1%、Bacto酵母エキス0.5%、NaCl 1%)で培養し、アルカリ抽出法「Birnboim, H. C., Doly, J., Nucl. Acids Res., 11, 1513, 1979」によって、pSK1002を大量に調製した。このプラスミドpSK1002をSalI及びSmaIで切断し、umuD,C遺伝子を含む約7.5kbのSalI-SmaI DNA断片を得、このDNA断片を、T4 DNAリガーゼにより連結し、常法に従い大腸菌(DH5)を形質転換した。

【0066】

得られた形質転換体からアルカリ抽出法によりプラスミドを単離し、このプラスミドをMluIで切断後、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。

【0067】

一方、umuCに対して終止コドンとして働き、かつBamHIサイトを持つ配列番号1に示すDNAリンカーを化学合成した。

【0068】

そして、上記DNAリンカーと、前記MluI DNA断片をT4 DNAリガーゼにより連結し、常法に従い大腸菌(DH5)を形質転換した。得られた形質転換体からアルカリ抽出法によりプラスミドを抽出し、このプラスミドをBamHI及びSalIで切断して、umuD,C遺伝子を含む約7.4kbのBamHI-SalI DNA断片を得た。

【0069】

(ii) 発光遺伝子群の調製

プラスミドpUCD620を含む大腸菌(HB101)を、アンピシリンを含むLB培地で培養後、アルカリ抽出法によってpUCD620を大量に調製した。プラスミドpUCD620をBamHI及びSalIで切断し、発光遺伝子群を含む約7.5kbのBamHI-SalI DNA断片を得た。

【0070】

(iii) SOS遺伝子と発光遺伝子群との連結及び発光ベクターのクローニング

上記発光遺伝子群を含むBamHI-SalI DNA断片(約7.5kb)と、前記umuD,C遺伝子を含むBamHI-SalI DNA断片(約7.4kb)をT4 DNAリガーゼにより連結し、

10

20

30

40

50

発光ベクター (pTL210) を構築した。

【 0 0 7 1 】

大腸菌 (SJ10002) を L B 培地で一夜培養し、L B 培地に、1 / 1 0 0 容量の前記培養液を加え、6 0 0 n mにおける濁度 (O D _{6 0 0}) が約 0 . 4 になるまで培養した。

【 0 0 7 2 】

この培養液 5 m l を遠心分離し、沈澱画分を 5 m l の 3 0 m M C a C l ₂ 水溶液に懸濁し、4 5 分間水中に放置した後、再度遠心分離を行い、菌体を 0 . 4 m l の 3 0 m M C a C l ₂ 水溶液に懸濁し、大腸菌 (SJ10002) のコンピテントセルを調製した。

【 0 0 7 3 】

大腸菌 (SJ10002) のコンピテントセル 1 0 0 μ l に、前記発光ベクター (pTL210) 約 2 0 0 n g を加え、3 0 分間水中に放置した。4 2 °C で 2 分間処理した後、室温にて 5 分間放置した。L B 培地 1 m l を加え、3 7 °C で 1 時間インキュベートした。この液を、アンピシリン 5 0 μ g / m l を含む L B プレートに播種して得られた SJ10002 の形質転換体から、前記発光ベクター (pTL210) をアルカリ抽出法で調製した。

10

【 0 0 7 4 】

(i v) 形質転換体の調製

サルモネラ菌 (TA1535) を L B 培地で一夜培養し、L B 培地に、1 / 1 0 0 容量の前記培養液を加え、O D _{6 0 0} が約 0 . 4 になるまで培養した。この培養液 5 m l を遠心分離し、沈澱画分を 5 m l の 1 0 m M C a C l ₂、1 0 m M M n C l ₂、1 0 m M M g C l ₂ 水溶液に懸濁し、4 5 分間水中に放置した後、再度遠心分離を行い、菌体を 0 . 4 m l の 1 0 m M C a C l ₂、1 0 m M M n C l ₂、1 0 m M M g C l ₂ 水溶液に懸濁し、サルモネラ菌 (TA1535) のコンピテントセルを調製した。

20

【 0 0 7 5 】

そして、前記と同様の方法で、サルモネラ菌 (TA1535) に前記発光ベクター (pTL210) を導入し、形質転換体 (遺伝子損傷性物質検出用微生物) を得た。

【 0 0 7 6 】

(2) 生育阻害物質検出用微生物

プラスミド pBR322 (株式会社ニッポンジーン製) を、BamHI 及び SalI (いずれの切断部位もテトラサイクリン耐性遺伝子の O R F 内にある) で切断し、アンピシリン耐性遺伝子を含む約 4 . 1 k b の D N A 断片を得た。

30

【 0 0 7 7 】

この D N A 断片と、上記 (1) (i i) で調製した発光遺伝子群を含む約 7 . 5 k b の BamHI - SalI D N A 断片とを T 4 D N A リガーゼにより連結し、発光ベクター (pTL210ctI) を構築した。

【 0 0 7 8 】

この発光ベクター (pTL210ctI) を上記 (1) と同様の方法で大腸菌 (SJ10002) に導入して形質転換体を得、この形質転換体からアルカリ抽出法によって、発光ベクター (pTL210ctI) を調製した。

【 0 0 7 9 】

そして、上記 (1) と同様の方法で、サルモネラ菌 (TA1535) に発光ベクター (pTL210ctI) を導入し、形質転換体 (生育阻害物質検出用微生物) を得た。

40

【 0 0 8 0 】

(3) 固定化微生物膜の作製

- 8 0 °C で凍結保存した上記 (1) で得られた遺伝子損傷性物質検出用微生物を解凍し、T G A 培地に 1 / 1 0 0 0 容量植菌し、3 0 °C で一晚、旋回振とう培養を行い、この培養液を新しい T G A に 1 / 5 0 容量植菌して、さらに 3 0 °C で 1 . 5 時間、旋回振とう培養を行い、濁度 (O D _{6 0 0}) を測定し、O D _{6 0 0} = 0 . 1 になるように T G A 培地で希釈して、固定化微生物膜作成用培養液を調製した。

【 0 0 8 1 】

この固定化微生物膜作成用培養液 1 m l (菌体数約 2 . 5 × 1 0 ⁷ 個) を用いて常法に

50

したがって遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜を作製した。なお、微孔性膜として、商品名「メンブレンフィルター・セルロース混合エステル」（ミリポア社製）、光透過性膜として、商品名「LDPEローデンポリ」（大倉工業株式会社製）を用いた。

【0082】

また、上記（2）で得られた生育阻害物質検出用微生物を用いた以外は上記と同様にして生育阻害物質検出用固定化微生物膜を作製した。

【0083】

なお、作製したこれらの固定化微生物膜は、使用するときまで保存液（TGA培地85%、グリセロール15%）に浸漬し、-20℃で凍結保存した。

【0084】

（4）測定温度による生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサ（生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ）の出力の比較

上記（3）で作製した生育阻害物質検出用固定化微生物膜を用いて、測定温度を30℃、25℃、20℃、15℃にそれぞれ設定して、図3に示す構造を有する生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサの出力の経時変化を測定した。なお、前記生育阻害物質検出用微生物（サルモネラ菌）の至適生育温度は37℃付近である。図4に各測定温度におけるセンサ出力の経時変化を示す。

【0085】

図4から、測定温度が30℃及び25℃の場合は、運転開始直後から、生育阻害物質検出用微生物の発光量が増加してセンサ出力が上昇しているが、30℃では約10時間後、25℃では約20時間後からセンサ出力が低下していることが分かる。センサ出力が5mV以上あるときに生育阻害物質のモニタリングに使用可能であるとすると、生育阻害物質のモニタリングに使用可能な時間は測定温度30℃では約10時間、測定温度が25℃では約30時間となる。

【0086】

一方、測定温度が20℃の場合、生育阻害物質のモニタリングに使用可能な時間は約110時間となることが分かる。また、測定温度が15℃の場合、生育阻害物質検出用微生物の代謝活性が低下し過ぎたため、発光反応が低下して、生育阻害物質のモニタリングに必要な発光量が得られなくなっていることが分かる。

【0087】

以上の結果から、生育阻害物質検出用微生物を固定化した固定化微生物膜を、前記生育阻害物質検出用微生物の至適生育温度よりも低い温度に保持しつつ、前記至適生育温度よりも低い温度に保持した前記試料水を接触させることにより、安定した発光を長時間持続できることが分かった。

【配列表フリーテキスト】

【0088】

配列番号1：umu Cに対して終始コドンとして働き、かつBamHI サイトを持つDNAリナー

【産業上の利用可能性】

【0089】

本発明によれば、例えば、上下水道の各処理プロセスの処理水、河川及び湖沼等の環境水、廃棄物埋立最終処分場の浸出水、工業排水等に含まれる有害物質を連続的にモニタリングするのに好適な方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】本発明における固定化微生物膜の一例を示す概略構成図である。

【図2】遺伝子損傷性物質検出用固定化微生物膜と生育阻害物質検出用固定化微生物膜を利用した発光検出型バイオセンサを備えた有害物質モニタリング装置の概略構成図である。

【図3】生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサの断面模式図である。

10

20

30

40

50

【図4】測定温度を30、25、20、15にそれぞれ変えた場合の生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサの出力の経時変化を測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

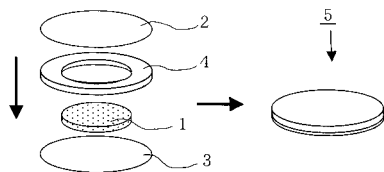
【0091】

- 1 . 微生物
- 2 . 微孔性膜
- 3 . 光透過性膜
- 4 . 両面テープ
- 5 . 固定化微生物膜
- 5 a . 生育阻害物質検出用固定化微生物膜
- 10 . 有害物質モニタリング装置
- 11 . 遺伝子損傷性物質検出用発光検出型バイオセンサ
- 12 . 生育阻害物質検出用発光検出型バイオセンサ
- 12 a . フローセル上部
- 12 b . フローセル下部
- 13、14 . 恒温器
- 15 . 送液ポンプ
- 16 . エアポンプ
- 17 . アンプ兼光検出器の電源
- 18 . コンピュータ
- 22 . 固定化微生物膜支持用ガラス板
- 23 . Oリング
- 30 . 光検出器

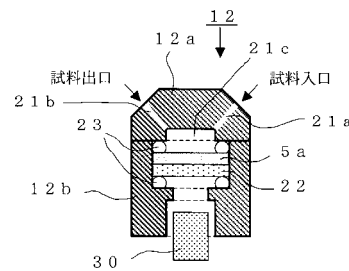
10

20

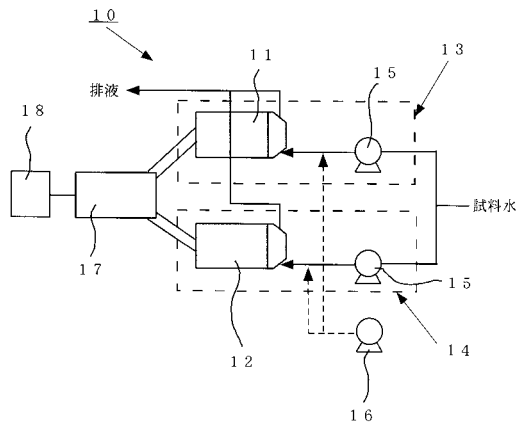
【図1】



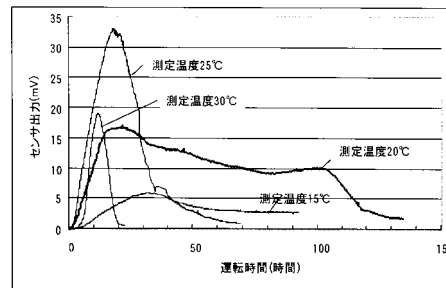
【図3】



【図2】



【図4】



【配列表】

0004384465000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/78 (2006.01) G 0 1 N 21/78 C

(73)特許権者 000003609

株式会社豊田中央研究所
 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1

(73)特許権者 507214083

メタウォーター株式会社
 東京都港区虎ノ門四丁目3 番1 号

(74)代理人 100086689

弁理士 松井 茂

(72)発明者 山田 正人

千葉県柏市新柏1 - 1 8 新柏住宅5 - 4 0 7

(72)発明者 井上 雄三

東京都北区浮間2 丁目1 6 番1 1 - 8 0 5

(72)発明者 毛利 紫乃

茨城県つくば市稲荷前2 4 番1 0 号

(72)発明者 平井 正名

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 今枝 孝夫

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道4 1 番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 田口 和之

神奈川県川崎市川崎区田辺新田1 番1 号 富士電機株式会社内

(72)発明者 田中 良春

神奈川県川崎市川崎区田辺新田1 番1 号 富士電機株式会社内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2 0 0 0 - 0 7 4 8 7 0 (J P , A)

特開2 0 0 1 - 2 3 1 5 9 8 (J P , A)

特開2 0 0 1 - 1 6 5 8 9 3 (J P , A)

特開平0 7 - 2 2 7 2 8 5 (J P , A)

特開2 0 0 3 - 0 0 4 7 2 3 (J P , A)

環境化学, 2001, Vol.11, No.4, pp.841-848

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 2 F 1 / 0 0 - 1 / 7 8

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0

P u b M e d

J S T P l u s (J D r e a m I I)