

## 細菌の水銀膜輸送系遺伝子を用いた水銀高感度検出用 バイオセンサーの開発に関する基礎的研究

東北学院大学大学院 学生員 鈴木 大  
日本学術振興会 正 員 成田 勝  
東北学院大学工学部 フェロー 遠藤 銀朗

### 1. 序論

水銀化合物は人体にとって極めて有害な物質であり、その水質基準や排出基準は厳しいものになっている。一般に、水銀化合物は検出されるか否かといった定性的分析方法によって測定されることが多いが、環境汚染物質によるリスクの評価を精確に行うためには、より簡便で定量的な方法の開発が必要とされる。特に環境中の生物に有害な水銀の濃度を測定するには、微生物細胞等を用いた何らかのバイオアッセイ法を適用することが合理的であると考えられる。本研究においては、水銀に対して高感度に反応することのできるバイオセンサーシステムの開発を目的として研究を行っている。この高感度水銀検出用バイオセンサーシステムを開発するためには、細菌の水銀膜輸送系遺伝子を利用することが重要と考えられる。この水銀膜輸送系遺伝子の特性を詳細に解析できれば、今まで以上に高感度に水銀を検出できるバイオセンサーの開発が可能と考えられる。

本研究においては、大腸菌細胞においてグラム陽性細菌とグラム陰性細菌由来の水銀耐性オペロンの水銀膜輸送系遺伝子産物の機能の比較を行い、バイオセンサーへのそれらの利用可能性を調べた。

### 2. 実験材料

バイオセンサーの作製には、発光性海洋細菌 *Vibrio harveyi* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*luxA*, *luxB*) をレポーター遺伝子として用いた。また、グラム陰性水銀耐性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の転写調節遺伝子 (*merR*) とそのオペレーター/プロモーターを用い、その下流部にレポーター遺伝子を組み込んだ発光活性測定用プラスミドを構築した。その構築されたプラスミドにグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株由来の水銀膜輸送系遺伝子 (*merE*, *merT*, *merP*) と *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の水銀膜輸送系遺伝子 (*merT*, *merP*) を組み込んだ (Fig. 1)。宿主細菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* DH5a) を用いた。

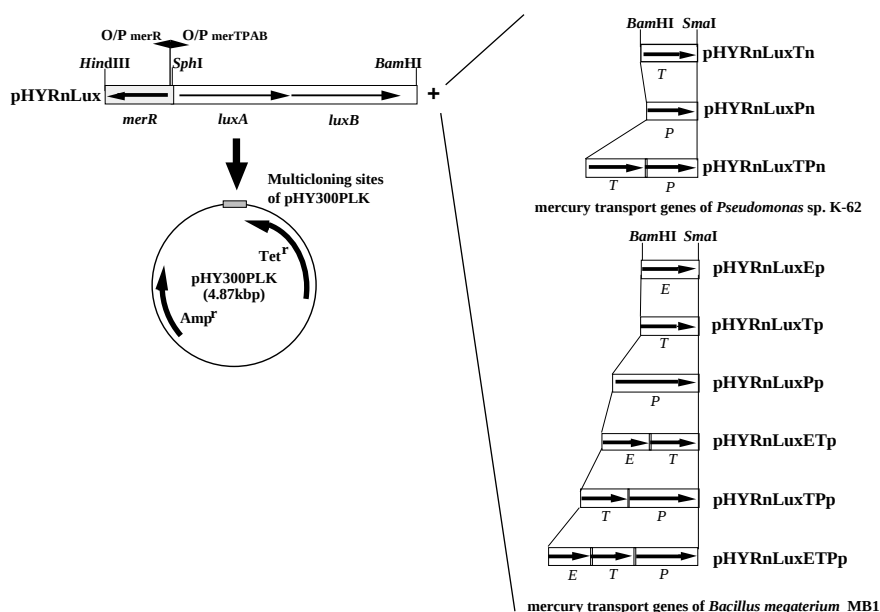


Fig. 1 Construction of *luxAB* fusion plasmids for high performance mercury biosensors.

キーワード：高感度水銀検出、バイオセンサー、ルシフェラーゼ遺伝子、水銀膜輸送系遺伝子  
連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1 丁目 13-1 (TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070)

### 3. 実験方法

構築した各プラスミド保持株は、発光法を用いて発光量を測定することによって水銀感受性能を評価した。誘導のための水銀化合物は塩化第二水銀（終濃度 0.5nM および 5.0nM）を使用した。実験操作は各プラスミド保持株の培養が 30 分経過するまでは 5 分毎に、30 分経過後は 10 分毎に測定した。測定によって得られた発光量の数値は、塩化第二水銀を添加して発光量を測定した場合のデータを、塩化第二水銀を添加しないで発光量を測定した場合のデータで割ることで相対発光活性(RLA)として表現した。

### 4. 実験結果

宿主細菌である *E. coli* DH5a の生体内ではグラム陽性細菌由来の水銀膜輸送系遺伝子産物 MerP が水銀イオンの生体内への輸送を阻害することを示した (Fig. 2A)。また、5.0nM の水銀濃度では水銀膜輸送系遺伝子産物の存在の有無に関わらず、水銀イオンは *E. coli* DH5a の生体内に取り込まれることが示された (Fig. 2B)。0.5nM の水銀濃度ではグラム陽性細菌由来の水銀膜輸送系遺伝子産物は機能を示さないことが知られた (Fig. 3A)。また、グラム陰性細菌由来の水銀膜輸送系遺伝子産物は *E. coli* DH5a の生体内では単独で機能できないことが明らかになった (Fig. 3B)。

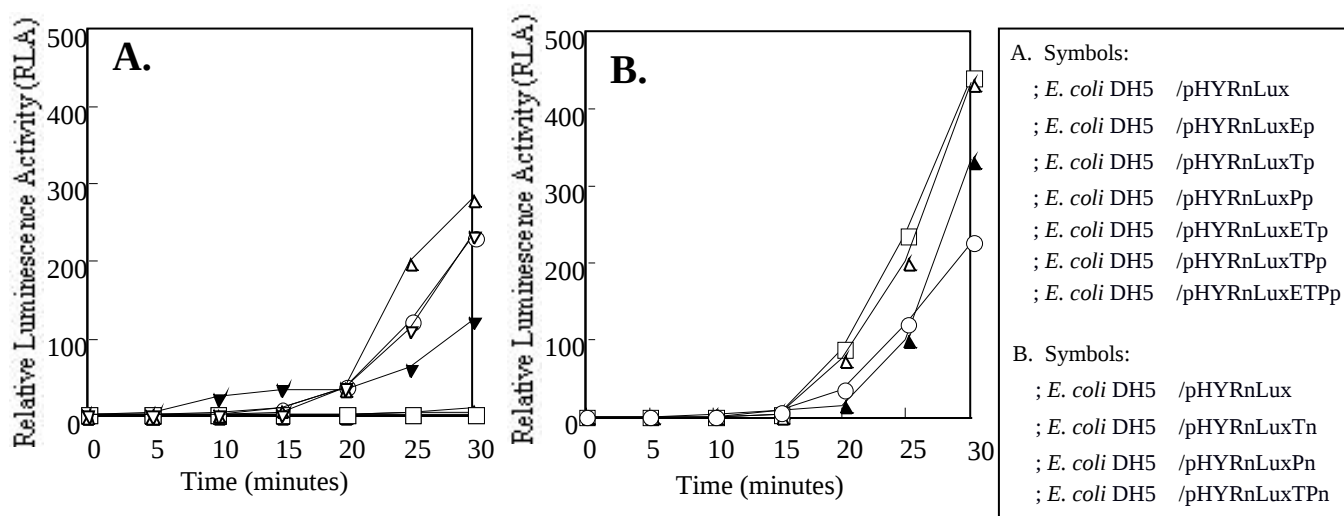


Fig. 2. Relative luminescence activities induction with 5.0nM mercury chloride (MC).

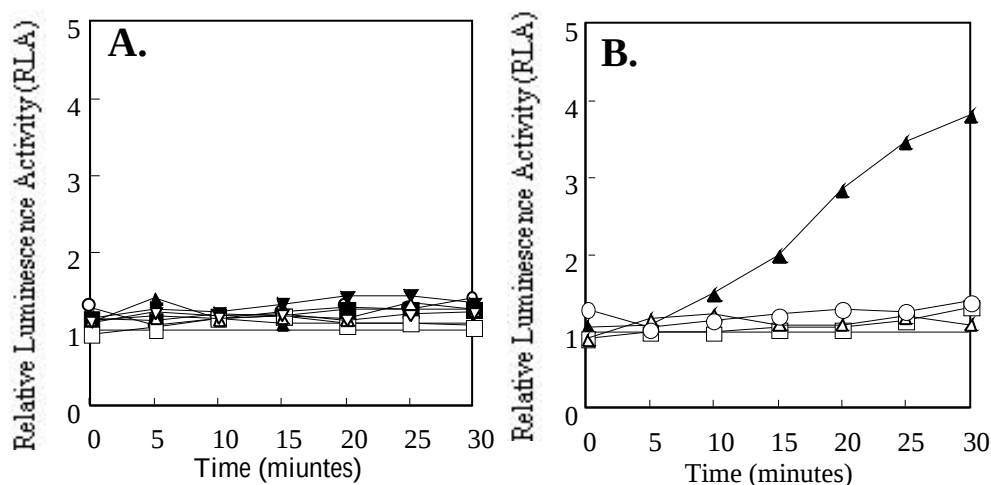


Fig. 3. Relative luminescence activities induction with 0.5nM mercury chloride (MC).

### 5. 結論

大腸菌株を宿主とした場合、グラム陽性細菌由来の水銀膜輸送系遺伝子産物は機能しないことが知られ、特に、MerP のみを有する大腸菌株は水銀イオンの生体内への輸送を阻害することを示した。一方、グラム陰性細菌由来の水銀輸送系遺伝子産物 MerT、MerP を 2 つ有することによって、高感度の水銀バイオセンサーとして発揮できることが知られた。