

有機水銀検出用バイオセンサーの発光特性に関する研究

東北学院大学大学院工学研究科 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. はじめに

水銀による環境汚染は現在も世界各地で報告されており、我々の健康な生活や生態系を維持するうえで重要な問題を提起している。そのため、これらの水銀の濃度を測定し環境中でのリスク評価を精確に行うことが早急に求められており、我々は微生物の持つ水銀耐性遺伝子と発光遺伝子を用いた新しい生物学的検出方法の開発を試みている。本研究室では、熊本県水俣湾周辺で発生した水俣病の原因物質である毒性の高い有機水銀化合物に着目し、グラム陰性水銀耐性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株が保有する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を導入した有機水銀検出用バイオセンサーを開発している。本研究においては、これらのバイオセンサーの有機水銀化合物検出への利用可能性について検討した。

2. 実験材料

バイオセンサーの作製には、pMRA17 および pMRB01 (*Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merB1*、*merB2* 遺伝子をそれぞれ含む *mer* オペロンをコードしたプラスミド) の 2 つの水銀耐性プラスミドと、pHYRnLux、pHYRnLuxTPn および pHYRnLuxETPp の 3 つの水銀検出用プラスミドを使用した。はじめに、プラスミド pMRA17 と pMRB01 を鋳型として PCR 法により *merB1*、*merB2* 遺伝子のみを増幅させた。各 PCR 産物は、pGEM-T Easy Vector (Promega Madison, WI, USA) とライゲーションを行い、*E. coli* DH5 α によってサブクローニングを行った (*merB1* 遺伝子を含むプラスミドを pGB1、*merB2* 遺伝子を含むプラスミドを pGB2 と命名した)。続いて、前述で構築された各プラスミドを含む組換え *E. coli* DH5 α /pGB1 株および *E. coli* DH5 α /pGB2 株を用いて、水銀検出用プラスミド pYHRnLux、pYHRnLuxTPn および pYHRnLuxETPp をそれぞれ形質転換させた。その結果、以下に示すような合計 6 つの有機水銀検出用バイオセンサーを作製した。

- 1) *E. coli* DH5 α /pYHRnLux+pGB1 株
- 2) *E. coli* DH5 α /pYHRnLuxTPn+pGB1 株
- 3) *E. coli* DH5 α /pYHRnLuxETPp+pGB1 株
- 4) *E. coli* DH5 α /pYHRnLux+pGB2 株
- 5) *E. coli* DH5 α /pYHRnLuxTPn+pGB2 株
- 6) *E. coli* DH5 α /pYHRnLuxETPp+pGB2 株

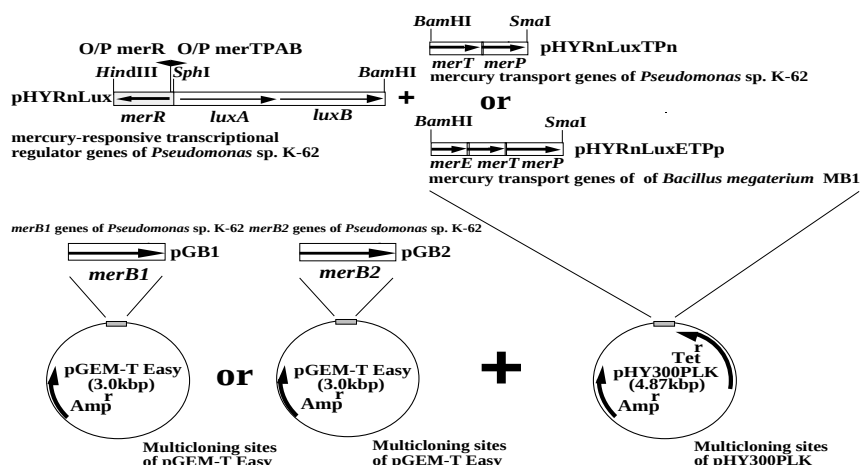


Fig. 1 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors.

キーワード：有機水銀検出、バイオセンサー、有機水銀分解酵素遺伝子、酢酸フェニル水銀、水銀膜輸送系遺伝子

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部環境土木工学科(TEL : 022-368-7493 FAX : 022-368-7070)

3. 実験方法

各有機水銀検出用プラスミド保持株を用いて、発光法による有機水銀の検出とその感度の評価を行った。使用した有機水銀化合物は酢酸フェニル水銀 ($C_6H_5HgOCOCH_3$; PMA、終濃度 $0.5 \mu M$) である。各細菌株は、抗生物質入りの LB 液体培地で一晩前培養し、その培養液 1ml を抗生物質入りの LB 液体培地で 10 倍に希釈した後、 OD_{600} の値が $0.55 \sim 0.60$ になるまで培養した。培養後、その培養液 100 μl を抗生物質と PMA を含んだ発光アッセイ培地 (TF II 培地) 10ml に添加した。培養開始後、30 分経過まで 5 分ごとに発光量を測定した。発光量は培養液 290 μl にエタノールで 10 倍希釈した 1-デカナル (n-デシルアルデヒド) を 10 μl 添加することで測定した。発光量の測定は Lumat LB 9507 (EG Σ G Berthold, Germany) を使用し、測定時間は 6 秒とした。また、測定によって得られた発光量の数値 (RLU) は、PMA を添加した場合のデータを無添加の場合のデータで割ることで得られる相対発光強度 (RLA) として表現した (RLA は 3 回の測定結果の平均値とした)。

4. 実験結果および考察

有機水銀分解酵素遺伝子産物である MerB を保有していない *E. coli* DH5 α /pHYRnLuxTPn 株の RLA は、今回使用した各プラスミド保持株の中で最も高い値を示した (Fig. 2)。よって、*Pseudomonas* sp. K-62 株由来の水銀膜輸送系遺伝子産物 MerT、MerP が PMA の取り込みを積極的に行っているとともに、水銀転写調節遺伝子産物 MerR も酢酸フェニル水銀のような有機水銀化合物に対して応答し、レポーター遺伝子 (発光性海洋細菌 *Vibrio harveyi* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luxA*, *luxB*) の発現を活性化させることが示唆された。また、MerB を保有している細菌株においては、MerT、MerP を有しない *E. coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB1 株および *E. coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB2 株で RLA 値の増加が見られた。

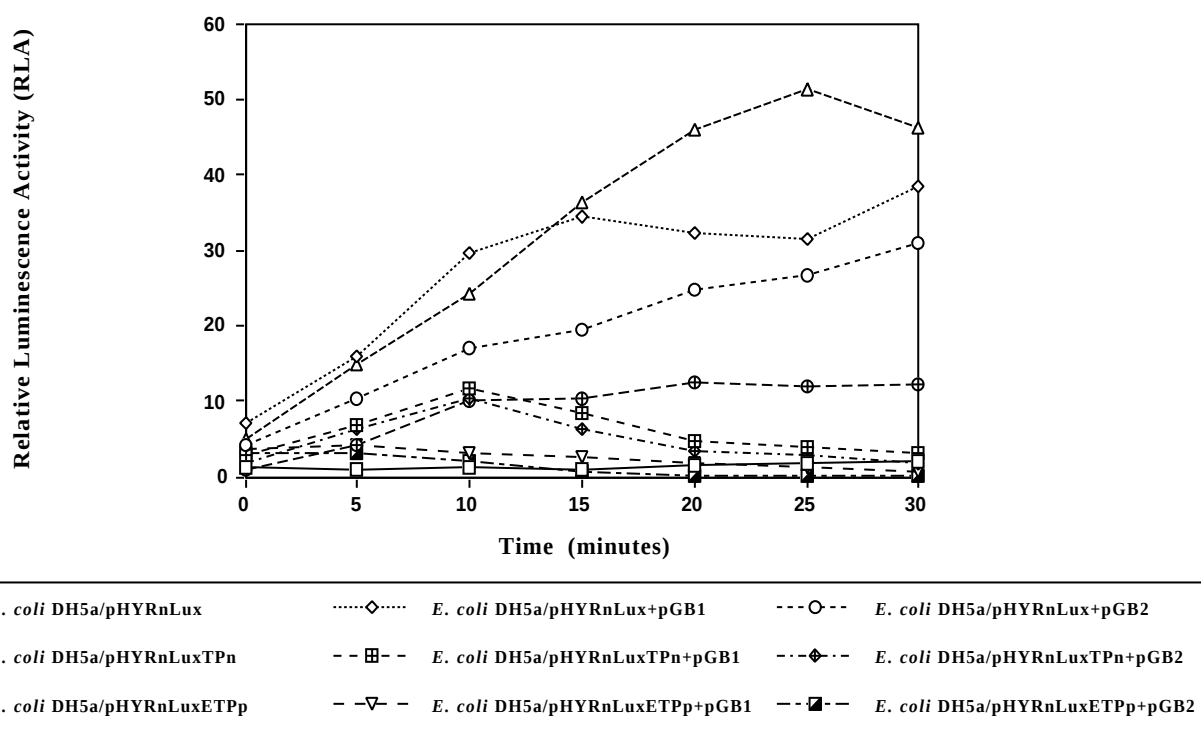


Fig. 2 Relative luminescence activities induction with $0.5 \mu M$ phenylmercury acetate (PMA).

5. おわりに

大腸菌株を宿主とした場合、酢酸フェニル水銀に関してはグラム陰性水銀耐性細菌由来の MerR、MerT および MerP のみを有する (すなわち MerB を有しない) プラスミドを使用した際に、高感度の有機水銀検出用バイオセンサーとして機能を発揮することが知られた。今後は、他の有機水銀化合物を用いて同様の実験を行い、それぞれの有機水銀に応じたバイオセンサーを開発する必要がある。