

グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌由来の水銀耐性オペロンを用いた有機水銀化合物検出用バイオセンサーの性能比較

東北学院大学大学院 学生員 遊佐清孝
 東北学院大学環境防災工学研究所 正員 成田 勝
 日本学術振興会 松井一彰
 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世界各地で報告されており、現在も深刻な社会問題として捉えられている。なかでも、メチル水銀をはじめとした有機水銀化合物による汚染地域では、地域住民の健康や生態系が多大な被害を受けている。そのため、有機水銀化合物による環境汚染を監視するための方法として、環境モニタリング技術の開発が求められている。本研究においては、物理・化学的手法に代わる高精度のモニタリング法として期待される水銀耐性細菌が保有する水銀耐性遺伝子群（水銀耐性オペロン）を用いた有機水銀化合物の高感度検出システム（有機水銀化合物検出用バイオセンサー）を開発することを目的とした。

2. 実験材料および実験方法

(1) 有機水銀化合物検出用バイオセンサーの作製

発光性海洋細菌 *Vibrio harveyi* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*luxA* および *luxB*)、グラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株とグラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株由来の水銀転写調節遺伝子 (*merR* および *merR1*)、水銀膜輸送系遺伝子 (*merE*, *merT* および *merP*)、および有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1*, *merB2* および *merB3*)を用いて有機水銀化合物検出用プラスミドを構築し、バイオセンサーを作製した。なお、プラスミドベクターとして pHY300PLK と pGEM-T Easy を使用し、宿主には大腸菌 *Escherichia coli* DH5 株を用いた。

(2) 各種有機水銀化合物に対する検出の評価

(1)で構築した有機水銀化合物検出用バイオセンサーの前培養液を 10 倍に希釈後、OD_{600nm} が 0.5~0.6 となるまで培養した。培養後、その培養液 100 μ l を酢酸フェニル水銀 (PMA)、塩化メチル水銀 (MMC)およびパラクロロ安息香酸水銀 (PCMB) (いずれも終濃度 0.5 μ M)入りの TF II 培地に添加し、5 分間隔で 30 分経過まで発光量 (LU) を測定した。なお、LU は相対発光強度 RLA (RLA=各種有機水銀化合物添加の場合の LU / 無添加の場合の LU) として表現し、RLA は 3 回の測定結果の平均値で決定した。

3. 実験結果および考察

Fig. 1 および Fig. 2 に示すような、合計 24 株の有機水銀化合物検出用バイオセンサーの作製に成功した。

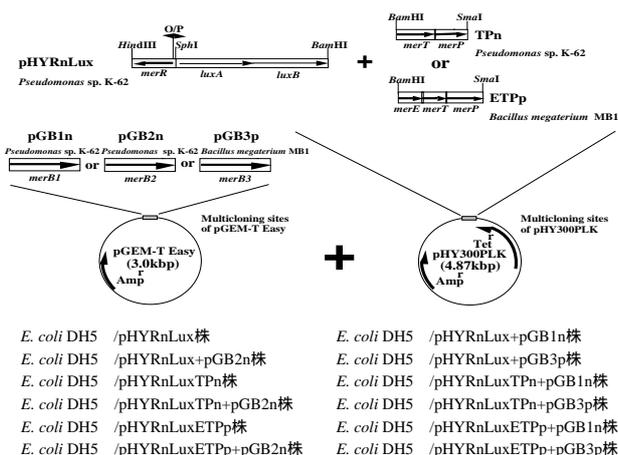


Fig. 1 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors (The case which used a *merR* gene from *Pseudomonas* sp. K-62).

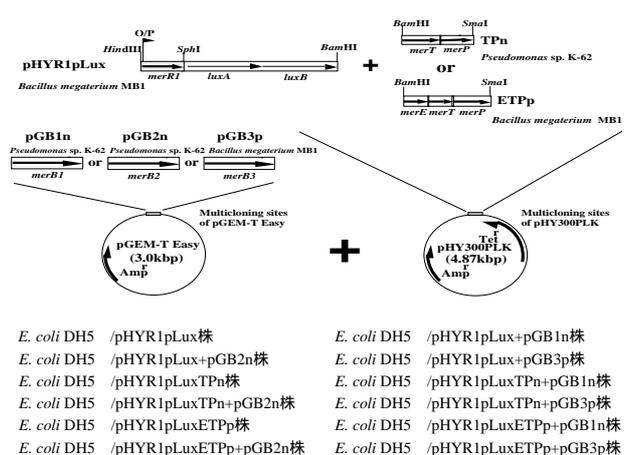


Fig. 2 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors (The case which used a *merR1* gene from *B. megaterium* MB1).

キーワード：有機水銀化合物、水銀耐性オペロン、バイオセンサー、有機水銀検出

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)

(1) *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merR* 遺伝子を用いた場合の RLA 結果

PMA を添加した場合 (Fig. 3 (A))、水銀膜輸送系遺伝子 *merT* および *merP* を保有し、有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を保有しない *E. coli* DH5 /pHYRnLuxTPn 株が最も高い RLA 値を示した。また、*merT* および *merP* を保有せず、*merB2* または *merB1* を保有する *E. coli* DH5 /pHYRnLux+pGB2n 株と *E. coli* DH5 /pHYRnLux+pGB1n 株も比較的高い RLA 値を示した。これらの結果から、MerT (*merT* 遺伝子産物) と MerP (*merP* 遺伝子産物) は PMA の細菌細胞内への取り込みを能動的に行っているとともに、MerR (*merR* 遺伝子産物) も PMA に対して応答し、*lux* 遺伝子の発現を活性化させることが考えられた。

一方、MMC または PCMB を添加した場合 (Fig. 3 (B) および (C))、*merT* および *merP* を保有せず、*merB1* を保有する *E. coli* DH5 /pHYRnLux+pGB1n 株が最も高い RLA 値を示した。この結果から、*merT* と *merP* が MMC および PCMB の細菌細胞内への取り込みに直接関与しないことや、*merB1* の存在の重要性が考えられた。

以上の実験結果から、各 RLA 値はいずれも 400~1000 と高いため、これらは各種有機水銀化合物に対するバイオセンサーとしての機能を十分に備えていると考えられた。

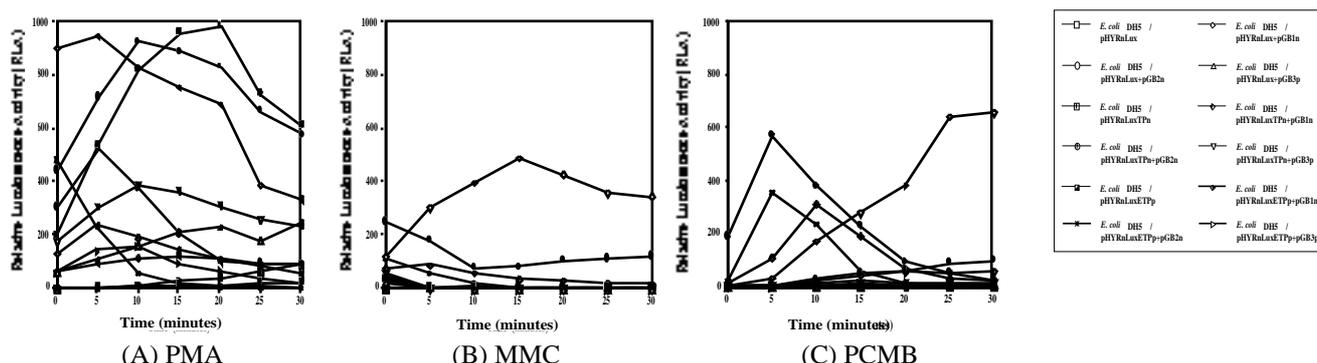


Fig. 3 Relative luminescence activities induction with 0.5µM organomercurials (The case which used a *merR* gene from *Pseudomonas* sp. K-62).

(2) *B. megaterium* MB1 株由来の *merR1* 遺伝子を用いた場合の RLA 結果

PMA を添加した場合 (Fig. 4 (A))、*E. coli* DH5 /pHYR1pLux+pGB3p 株、*E. coli* DH5 /pHYR1pLuxTPn+pGB3p 株および *E. coli* DH5 /pHYR1pLuxETP+pGB3p 株である *merB3* 保有の 3 細菌株で高い RLA 値を示した。また、*merT* および *merP* を保有せず、*merB1* または *merB2* を保有する *E. coli* DH5 /pHYR1pLux+pGB1n 株と *E. coli* DH5 /pHYR1pLux+pGB2n 株でも同様に高い RLA 値を示した。しかしながら、いずれの場合も RLA 値は 5 以下であることから、*merB3* 遺伝子の発現が抑制されていることや *lux* 遺伝子の発現を活性化させていないことが考えられた。

一方、MMC を添加した場合は全ての細菌株において RLA 値の増加は見られなかった (Fig. 4 (B))。また、PCMB を添加した場合も全細菌株において RLA 値の増加は見られなかった (Fig. 4 (C))。

以上の実験結果から、*E. coli* DH5 株を宿主とした場合、グラム陽性細菌由来の *merR1* 遺伝子を保持する細菌株はバイオセンサーとしての機能を備えていないと考えられた。

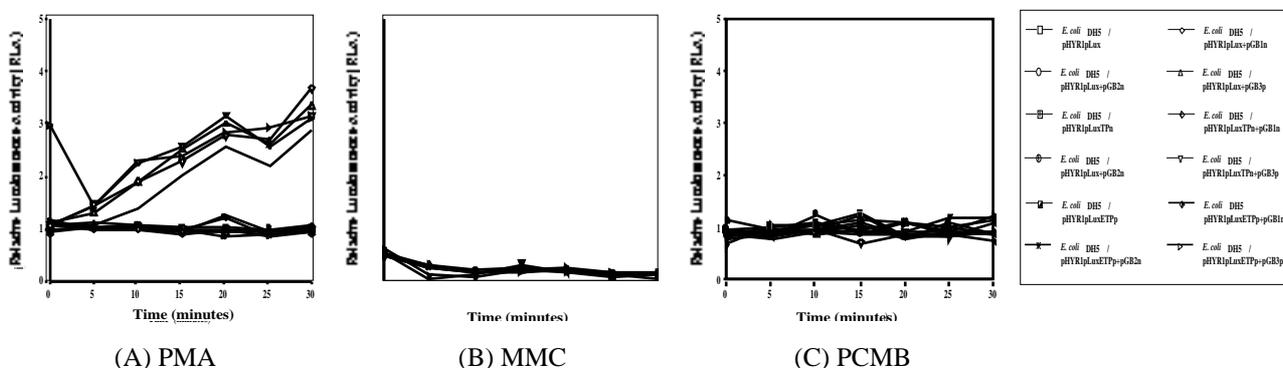


Fig. 4 Relative luminescence activities induction with 0.5µM organomercurials (The case which used a *merR1* gene from *B. megaterium* MB1).

4. おわりに

E. coli DH5 株を宿主とした場合、グラム陰性細菌由来の *merR* 遺伝子を導入した細菌株が有機水銀化合物検出用バイオセンサーとして有効であることが明らかになり、MMC および PCMB 検出用のバイオセンサーには、グラム陰性細菌由来の *merB1* 遺伝子の適用が有効であることが明らかになった。