

発光微生物センサーによる有機水銀化合物の検出に関する研究

東北学院大学大学院 学生員 遊佐 清孝
 東北学院大学大学院 学生員 菅原 宏幸
 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、人体に対し直接的な影響を与える物質として、その使用と排出に対しては厳しく規制がなされている。一般に、水銀化合物は原子吸光法等の物理化学的方法によって総水銀として測定されるが、このような方法では、前処理操作が煩雑であること、測定可能濃度の限界値が存在することや、化合物種ごとに測定できない等の欠点がある。そのため、水銀化合物を高感度にかつ化合物種ごとに測定が可能と考えられる生物学的検出・定量方法の開発の研究が進められてきている。

本研究では、現在の物理化学的手法に代わり、水銀耐性細菌が保有する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* と発光遺伝子を大腸菌に導入し、有機水銀検出用バイオセンサーを開発することを目的として研究を行った。

2. 実験材料および実験方法

(1) 有機水銀化合物検出用プラスミド保持株の作製

海洋性発光細菌 *Vibrio harveyi* 由来のルシフェラーゼ遺伝子 *luxA*、*luxB*、グラム陰性水銀耐性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の水銀耐性オペロン転写調節遺伝子 (*merR*)、*Pseudomonas* sp. K-62 株とグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株由来の有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1n* および *merB3p*)を用いて、有機水銀化合物検出用プラスミドを構築した。なお、大腸菌に導入するためのプラスミドベクターは pHY300PLK と pGEM-T Easy を使用し、宿主には大腸菌 *Escherichia coli* DH5 株を用いた (Fig.1)。

(2) 供試細菌株

- 1) *Escherichia coli* DH5 / pHYRnLux
- 2) *Escherichia coli* DH5 / pHYRnLux+pGB1n
- 3) *Escherichia coli* DH5 / pHYRnLux+pGB3p

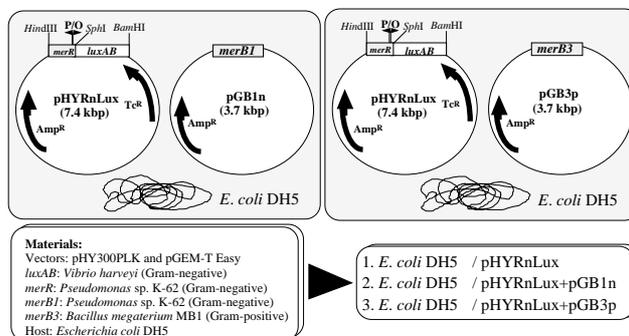


Fig.1 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors.

(3) 発光微生物センサーの各種有機水銀化合物に対する応答活性の評価

有機水銀検出用プラスミド保持株を用いて、発光法による各種有機水銀化合物に対する応答活性の評価を行った。各有機水銀化合物検出用

プラスミド保持株の前培養液 1ml を 10 倍に希釈後、OD_{600nm} が 0.5 となるまで培養した。培養後、TF II 培地によって OD_{600nm} が 0.05 になるまで希釈し用いた。この希釈培養液に各有機水銀化合物を添加後、各時間毎にサンプリングして発光量 (LU) を測定した。LU は、培養が 30 分経過するまでの 5 分毎に測定した。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として求めた。使用した有機水銀化合物は塩化メチル水銀 (MMC)、塩化エチル水銀 (EMC)、チメロサル (TH)、酢酸フェニル水銀 (PMA) およびパラクロロ安息香酸水銀 (PCMB) の 5 種である。終濃度はそれぞれ 0.1μM となるように調製した。

(4) 発光微生物センサーの各種有機水銀化合物に対する検出限界の評価

有機水銀検出用プラスミド保持株を用いて、発光法による各種有機水銀化合物に対する検出限界の評価を

キーワード：微生物発光センサー、有機水銀化合物、水銀耐性オペロン
 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)

行った。用いた有機水銀化合物は塩化メチル水銀（MMC）および酢酸フェニル水銀（PMA）である。終濃度はそれぞれ 0.001 μ M、0.01 μ M および 1.0 μ M となるように調製した。発光量の測定方法は 2.（3）と同様の方法で行った。

3. 実験結果および考察

（1）発光微生物センサーの各種有機水銀化合物に対する応答活性の評価結果

Fig. 2 に各種有機水銀化合物による応答活性結果を示した。

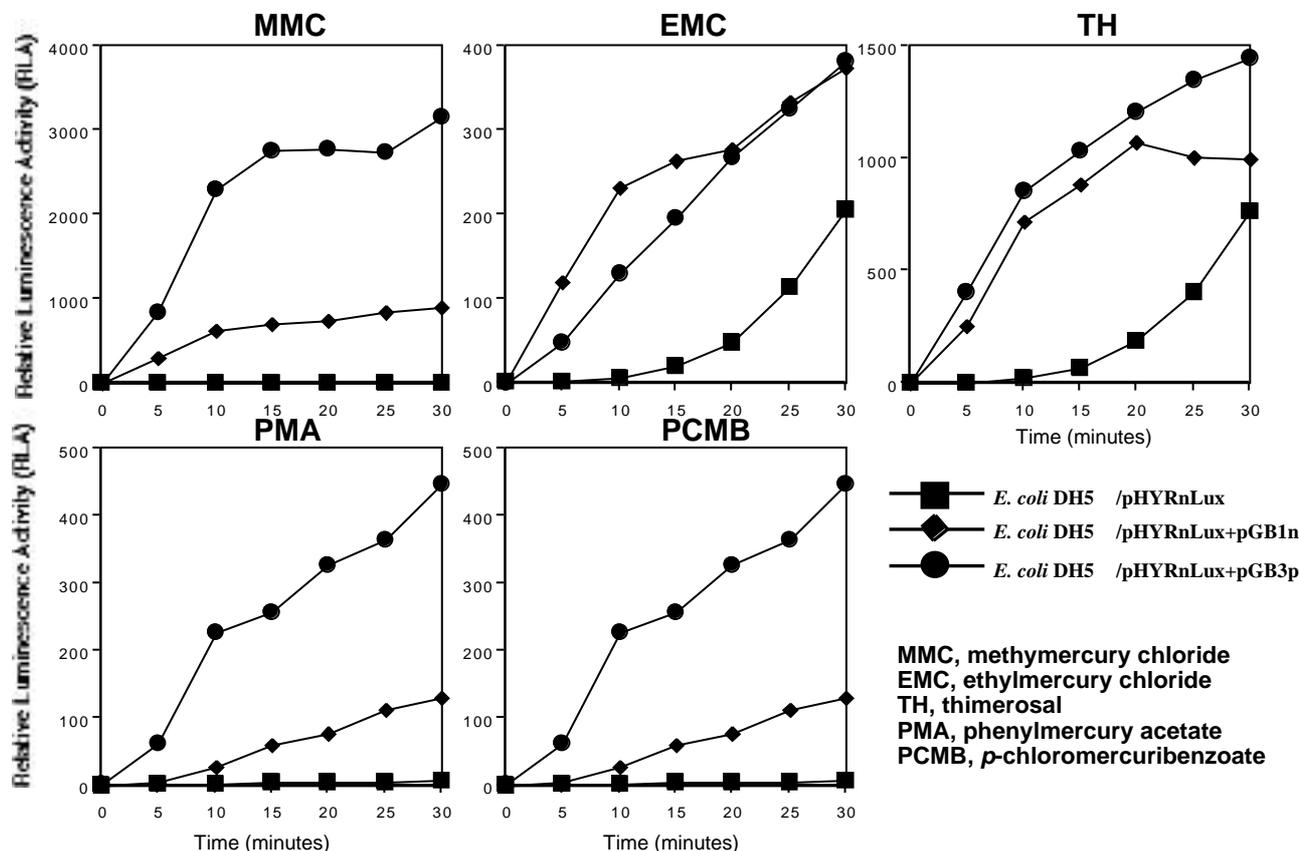


Fig. 2 Relative luminescence activities induction with 0.1 μ M organic mercury compounds

解析結果から、有機水銀化合物検出用プラスミド保持株を用いることで、パラクロロ安息香酸水銀以外の4種の有機水銀化合物を検出できることが明らかとなった。特に *E. coli* DH5 / pHYRnLux+pGB3p 株は、*E. coli* DH5 / pHYRnLux+pGB1n 株よりも高感度に有機水銀化合物を検出できることが明らかとなった。

（2）発光微生物センサーの各種有機水銀化合物に対する検出限界の評価結果

解析結果から、塩化メチル水銀に対する検出範囲濃度は 0.001 μ M ~ 0.1 μ M であり、1.0 μ M の濃度は検出することができなかった。また、酢酸フェニル水銀に対する検出範囲濃度は 0.01 μ M ~ 1.0 μ M であり、0.001 μ M の濃度は検出することができなかった。

4. おわりに

以上の結果より、有機水銀化合物検出用プラスミド保持株を用いることで、パラクロロ安息香酸水銀以外の4種の有機水銀化合物を検出できることが明らかとなった。特に、*E. coli* DH5 / pHYRnLux+pGB3p 株は最も高感度に有機水銀化合物を検出することができた。また、塩化メチル水銀に対する検出可能範囲は 0.001 μ M ~ 0.1 μ M、酢酸フェニル水銀に対する検出可能範囲は 0.01 μ M ~ 1.0 μ M であり、極低濃度の有機水銀化合物を検出することが明らかとなった。