

VII-30

発光遺伝子と水銀(mer)オペロンを用いた 水銀バイオセンサーの開発に関する研究

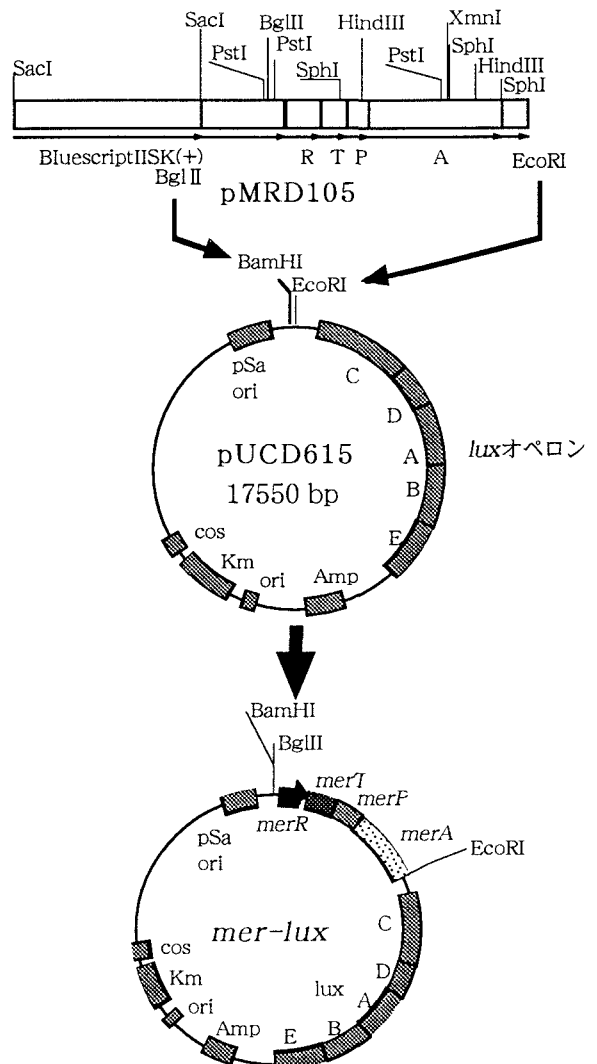
東北学院大学 学生員 ○門間 京介
東北学院大学 学生員 大槻 文弘
東北学院大学 学生員 玉山 健児
東北学院大学 正会員 遠藤 銀朗

【1】 はじめに

我々は、現在問題視されている環境汚染の中でも特に被害が大きいとされる水銀による汚染に注目し、かつて熊本県の水俣湾周辺で発生した水俣病や新潟県の阿賀野川流域で発生した第二水俣病が、世界的に見ても今なお続発している現状に鑑み、これらの問題の解決のために必要とされる安定した経済的な浄化プロセスの開発が重要であると考え本研究を行った。

とくに神通川の汚染の発見は、水俣病の未然防止を果たしたと当該要領の基準とその運営は公衆衛生学者によって高く評価されており、内容についても国際的評価のきわめて高いものであった。このように環境水中の水銀の早期発見は水銀中毒を未然に防ぐうえで重要視されるものである。

現在環境水中における水銀の測定方法は、ガスクロマト質量分析器、原子吸光法を用いた物理化学的な分析方法である。機器分析による測定法は再現性があり感度が高いが試料水の純度、濃縮効率操作の複雑さに問題がある。近年、環境中に放出された難分解性の物質を含め各種の環境汚染物質に対して耐性や分解する細菌の遺伝子群が単離され、これらの遺伝子と生物発光遺伝子を連結することにより環境汚染物質モニタリング型バイオセンサーが開発されている。そこで我々は、現在解明されている水銀耐性株遺伝子(pMRD105)と生物発光遺伝子(pUCD615)を遺伝子工学的に組み換えて、環境水中の水銀化合物を定量・検出するための水銀バイオセンサーを構築した。本発表は水銀センサーの開発行程を報告するものである。



【2】 実験方法

本研究では、*mer* オペロンのリプレッサーである *merR* と *mer* オペロンのプロモーター、オペレーター部位(P.O)、Hg(II)の転送に関する *merTF* の産物、水銀耐性をコードする *merA* と遺伝子を連結した plasmid を構築し *in vivo* (生体内) 反応の大腸菌発現によって水銀による誘導レベルをX線および発光検出機(βミューター)で光量の測定を試み、大腸菌発現における反応に影響する因子の分析さらに光量を水銀量に換算することによって定量分析の方法についても検討し、総合的に水銀を生物学的に分析するためのバイオルミネッセントセンサーとしての実用性を評価した。

1) 水銀バイオルミネッセントセンサープラスミドの構築

水銀バイオルミネッセントセンサー-plasmidの構築手順を図-1に示す。pUCD615をEcoRIおよびBamHIで切断しベクターとし、Bluescript II SK(+)に *mer* オペロンが組み込まれているpMRD105をEcoRIおよびBglIIで切断しインサートとして結合し、組み換えプラスミド *mer-lux* を構築した。

図-1 水銀バイオルミネッセントセンサープラスミドの構築

(2) *mer*オペロンを使用した水銀の生物学的検出法

a) X線造影法による水銀の検出

- 1) 1×LB寒天培地（アンピシリン、カナマイシン入り）のシャーレに水銀センサープラスミドの組み込まれている菌体を白金耳で画線し、37℃で一晩培養する。
- 2) 菌体の生えたシャーレ上にナイロンメンブランフィルターを載せ菌を吸着させる。この時シャーレとメンブランフィルターに記しを付けておく。
- 3) あらかじめ1×LB寒天培地に水銀を塗布しておいたシャーレを用意しておき、菌を吸着させたナイロンメンブランフィルターを載せ水銀誘導をかける。この状態で30分から1時間置く。
- 4) 上記のシャーレからメンブランフィルターを取り出し、X線照射の時位置がずれないようにX線フィルムと同じ大きさの画用紙に張り付けサララップで包み、暗室の中で光が漏れないようにして、X線フィルムに30分間感光させる。
- 5) 暗室の中で現像をする。まず、Developerに5分浸けておき、次にFixerに10分間浸ける。その後水洗いをする。
- 6) X線フィルムとフィルターを張り付けた画用紙とを照らし合わせ発光した菌体を確認し、メンブランフィルターに付けた記しとシャーレとの記しで、もとのシャーレ上の菌体を確認する。

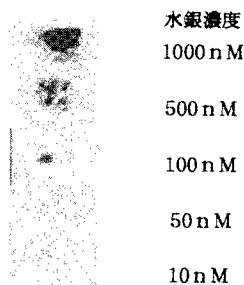


図-2 X線フィルムによる水銀検出限界

b) ルミノメーターによる水銀の検出

- 1) -85℃でグリセロール溶液に保存しておいた水銀センサープラスミドの組み込まれている菌体を50 μg/mlのAmp（アンピシリン）とKnm（カナマイシン）入りの1×LB寒天培地に白金耳で画線し37℃で一晩培養する。
- 2) 単一のコロニーを白金耳でかき取りを50 μg/mlのAmp（アンピシリン）とKnm（カナマイシン）入りの1×LB液体培地に植菌し37℃、18～22時間培養する。
- 3) 培液200 μlをM9最小培地20 mlに植え継ぎ培養温度20℃で140 rpmでOD600nmが0.8～0.9になるまで培養を続けた。
- 4) 滅菌水に溶解した塩化第二水銀を誘導物質として添加し、30～60分おきに発光強度をルミノメータによって測定した。

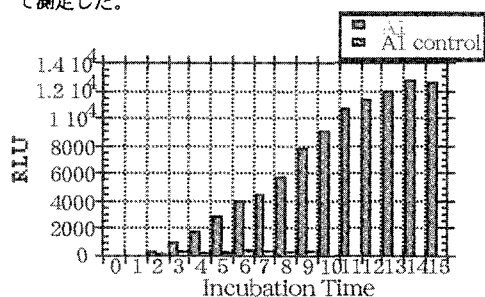


図-3 20℃における発光強度の変化

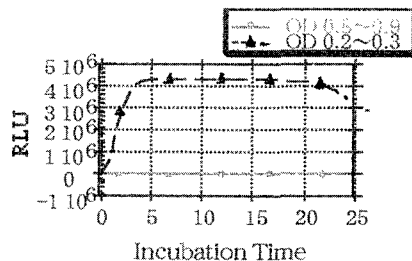


図-4 ODの違いによる発光強度試験結果

[3] 実験結果

- (1) この組み換え体は、水銀誘導をかけていない状態では発光せず、誘導をかけると発光した。つまり、目的としていた水銀バイオセンサーを開発することが出来た。
- (2) 本研究で得られた水銀バイオセンサーは、水銀の濃度に応じて発光強度が比例的に変化し、その比例範囲は10 nM～1000 nMである。（図-2）
- (3) M9培地による発光強度の変化を20、30、37℃で測定した結果、20℃のみで高い発光強度を示した。またその場合の発光強度は培養時間の増大に伴って増加した。（図-3）
- (4) 菌の増殖度OD600nmが0.2～0.9の間で発光強度を比較すると、0.2～0.3のときが一番高い発光強度を示した。コントロールとの発光強度の違いは約150～160倍である。（図-4）

[4] 結論および考察

本研究で作られた組み換え体 *mer-lux* は汚染水や産業排水中の水銀の半定量的な検出のための簡単な生物定量化に利用可能である。しかしこれはまだ不完全なものであり安定した結果は得られていない。従って今後さらにスクリーニングを行い、さらに感度の高い組換え体に改良することにより、広範囲の水銀濃度でも精巧に検出するものや、水銀を取り込むことのできるような優秀なものを得る必要がある。しかし、このバイオセンサーがさらに改良され水銀汚染の測定や監視に応用できる可能性は大きいといえる。