

VII-20 高感度水銀検出用バイオセンサーの開発を目的とした水銀輸送系遺伝子の特性評価に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○五ノ井良和
 東北学院大学工学部 学生員 大通 優樹
 東北学院大学工学部 山岡 健史
 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 銀明

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。そのため水銀による環境の汚染は高感度に検出される必要がある。この高感度検出用のバイオセンサーシステムを開発するために、大腸菌細胞においてグラム陽性細菌の水銀耐性オペロンの水銀イオン輸送系遺伝子産物の機能の比較を行った。また、本研究では、グラム陰性細菌である *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の水銀輸送系遺伝子産物との機能の比較も行った。

2. 実験材料

バイオセンサーには、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、グラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 由来の調節遺伝子 (*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水銀輸送系遺伝子として、MB1 株由来の遺伝子 (*merE*, *merT*, *merP*) と K-62 株由来の遺伝子 (*merT*, *merP*) を組み込んだ (Fig. 1)。宿主細菌としては大腸菌株 (*Escherichia coli* DH5 α) を用いた。

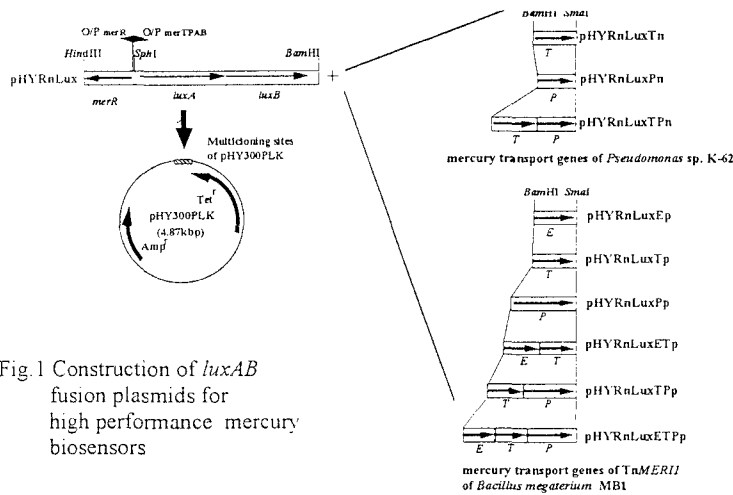


Fig.1 Construction of *luxAB* fusion plasmids for high performance mercury biosensors

以下に計9つの水銀検出用プラスミドを持つ組み換え大腸菌株を示す。

- 1 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxTn*
- 2 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxPn*
- 3 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxTPn*
- 4 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxEp*
- 5 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxTp*
- 6 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxPp*
- 7 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxETp*
- 8 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxTPp*
- 9 *Escherichia coli* DH5 α /*pHYRnLuxETPp*

3. 実験方法

構築したプラスミドの各保持株は、発光法を用いて発光発現量の測定によって水銀感受性能の評価を行い比較した。この実験では調製した菌液に、誘導のために無機水銀として塩化第二水銀(MC; 終濃度 0.5nM および 5.0nM)を使用して測定を行った。実験操作は各供試菌株の培養が 30 分経過するまでは 5 分毎に、30 分後は 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、データの比較を正確に行うために、水銀を添加した場合の測定データを水銀を添加しない場合の測定データで割ることで相対発光活性 (RLA)として数値化した。

4. 実験結果

グラム陰性細菌である *E. coli* DH5 α の生体内ではグラム陽性細菌由来の水銀輸送系遺伝子産物 MerP が水銀イオンの生体内への輸送を逆に阻害することを示した (Fig. 2A)。5.0nM 程度の水銀濃度になると水銀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* DH5 α の生体内に取り込まれていることが分かった (Fig. 2B)。

Fig. 3A に示したデータから、グラム陽性細菌の水銀輸送系遺伝子産物は極低濃度 (0.5nM) の MC ではその機能を示すことができないことが分かった。Fig. 3B に示したデータから、グラム陰性細菌の水銀輸送系遺伝子産物 (MerT, MerP) は *Escherichia coli* DH5 α の生体内で単独では機能することができないことが分かった。また、この水銀輸送系遺伝子産物は、MerT, MerP の両産物が揃うことによって *Escherichia coli* DH5 α の生体内で機能を示すことが分かった。

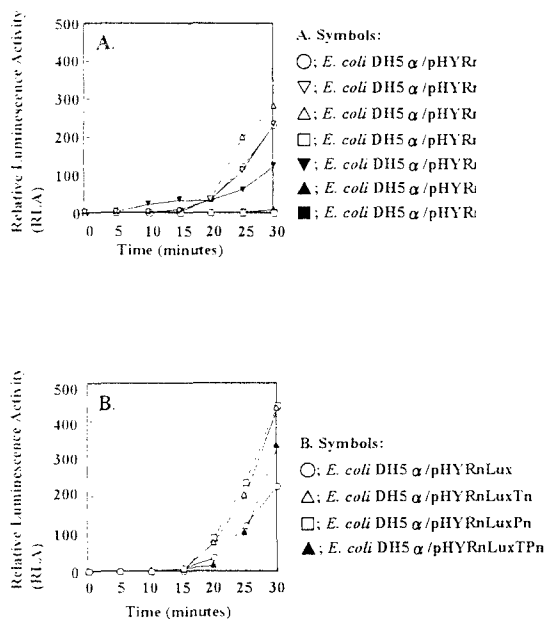


Fig. 2 Relative luminescence activities induction with 5.0nM mercury chloride (MC).

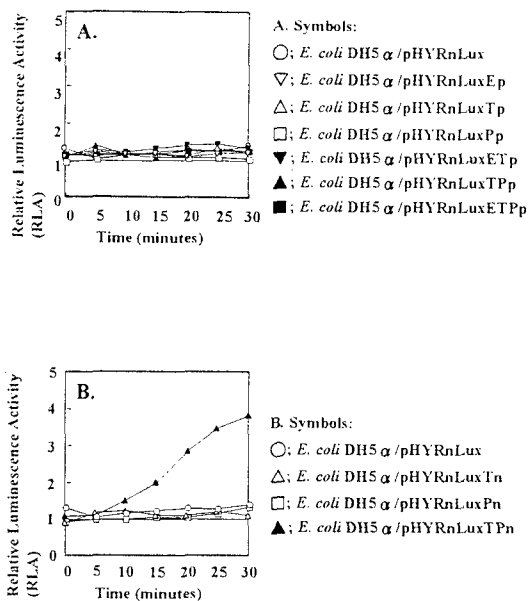


Fig. 3 Relative luminescence activities induction with 0.5nM mercury chloride (MC).

5. 結論

1. 大腸菌を宿主とした場合、グラム陽性細菌の水銀輸送系遺伝子が機能しているというデータは得られなかった。特に、MerPを有する大腸菌株はほとんど水銀輸送機能を示さず水銀輸送が阻害されていることを示した。
2. 水銀濃度 5nM では、グラム陰性細菌の水銀輸送系遺伝子を有しなくても水銀イオンを細胞内に取り込み、遺伝子を発現することが知られた。
3. グラム陰性細菌である大腸菌では、グラム陽性細菌の水銀輸送タンパク質は機能しないことが知られた。
4. グラム陰性細菌である大腸菌では、グラム陰性細菌が持っている MerT, MerP の2つを有することによって、高感受バイオセンサーとして機能を発揮できることが知られた。