

VII-30

有機水銀分解酵素遺伝子を用いた
有機水銀検出手法の高感度化に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○和田伸也
東北学院大学工学部		遠藤善也
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、熊本県で発生した水俣病のように人体に対して多大な悪影響を与えることが知られており、その環境基準などについては非常に厳しく定められている。一方、この有害な水銀化合物に対して耐性を持つ微生物の存在が知られている。このような水銀耐性細菌は、自らの細胞内に取り入れた水銀化合物を水銀イオン (Hg^{2+}) に分解し、比較的毒性の低い金属水銀 (Hg^0) へと還元させ、細胞外に気化放出させるメカニズムを持つことが知られている。この耐性機構を用いた水銀の検出技術と生物学的処理技術の開発は、従来の方法に比べ、より経済的で簡便な環境汚染防止技術につながると考えられている。

本研究においては、無機水銀化合物と同様に毒性の高い有機水銀化合物に着目し、水銀耐性細菌が持つ有機水銀化合物の分解に関与する遺伝子である有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を用いることによって、低濃度の有機水銀化合物を選択的に検出する分析方法として期待される高感度有機水銀検出用バイオセンサーの開発を目的とした。本研究ではグラム陰性水銀耐性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merB* 遺伝子を用いて、有機水銀検出用バイオセンサープラスミドを構築し、高感度有機水銀検出用組換え大腸菌株を作製することを試みた。

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株およびプラスミド

供試細菌株は *E. coli* DH5 α /pMRA17 株 (*Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merB1* 遺伝子を含む *mer* オペロンをコードしたプラスミド保持株) および *E. coli* DH5 α /pMRB01 株 (*Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merB2* 遺伝子を含む *mer* オペロンをコードしたプラスミド保持株) を用いた。また、供試プラスミドは昨年度に本研究室で構築した3つの水銀検出用プラスミド pHYRnLux、pHYRnLuxTPn および pHYRnLuxETPp を用いた。

2-2 有機分解酵素遺伝子のクローニング

プラスミド pMRA17 と pMRB01 を *E. coli* DH5 α 株からそれぞれ回収し、各プラスミド DNA を鋳型として *merB1* 遺伝子および *merB2* 遺伝子のみをそれぞれ PCR で増幅させた。得られた PCR 産物をアガロースゲルから回収し、回収した DNA を pGEM-T Easy Vector (Promega Madison, WI, USA) とライゲーションを行った後、*E. coli* DH5 α によってサブクローニングを行った。

2-3 高感度有機水銀検出用バイオセンサーの開発

2-2 で構築した各プラスミドを含む組換え *E. coli* DH5 α 株を用いて、pHYRnLux、pHYRnLuxTPn および pHYRnLuxETPp をそれぞれ形質転換させた。

3. 実験結果

3-1 有機分解酵素遺伝子のクローニングの結果

各 *merB* 遺伝子を含んだプラスミドを構築することができた。構築したプラスミドのうち、*merB1* 遺伝子を組込んだプラスミドを pGB1、*merB2* 遺伝子を組込んだものを pGB2 とそれぞれ命名した (Fig.1)。

3-2 高感度有機水銀検出用バイオセンサーの開発結果

E.coli DH5 α /pGB1 株および *E.coli* DH5 α /pGB2 株に 3 つの水銀検出用プラスミド pHYRnLux、pHYRnLuxTPn および pHYRnLuxETPp をそれぞれ形質転換させた結果、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プラスミド保持株を作製することに成功した。Fig. 1 に有機水銀検出用バイオセンサープラスミドの構築図を示す。

- 1) *E.coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB1 株
- 2) *E.coli* DH5 α /pHYRnLuxTPn+pGB1 株
- 3) *E.coli* DH5 α /pHYRnLuxETPp+pGB1 株
- 4) *E.coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB2 株
- 5) *E.coli* DH5 α /pHYRnLuxTPn+pGB2 株
- 6) *E.coli* DH5 α /pHYRnLuxETPp+pGB1 株

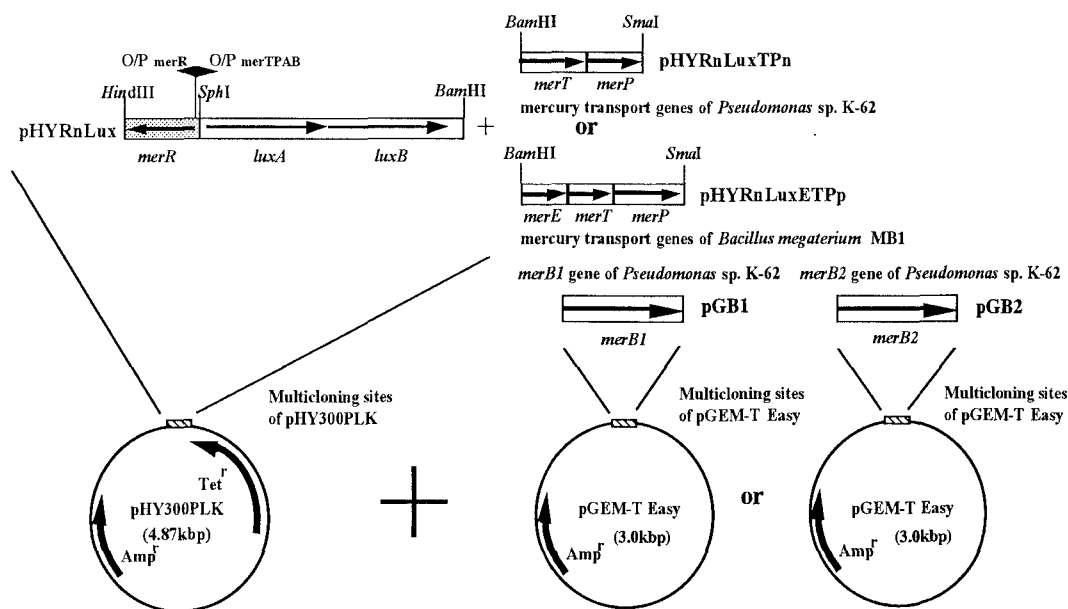


Fig. 1 Construction of plasmids for high performance organomercurial detection biosensors

4. おわりに

本研究では、合計 6 つの有機水銀検出用バイオセンサープラスミドの構築に成功したが、有機水銀検出感度についての評価の実験についてはまだ行っていない。今後はこれらのバイオセンサーの発光強度を測定するとともに、高感度有機水銀検出方法を確認させることが望まれる。