

VII — 34

発光型ヒ素センサーによる 3 価と 5 価ヒ素の反応特性

東北学院大学大学院

東北学院大学防災工学研究所、NEDO フェロー

東北学院大学工学部

○大友 公房

及川 栄作

石橋 良信

1. はじめに

化学物質などを識別する分子識別素子として、酵素を用いる方法があるが、酵素は一般的に高価で不安定なものが多い。微生物体内には多数の酵素を含んでいるものが多く、微生物自身を分子識別素子として用いたセンサーを開発することが可能である。これを微生物センサーと呼ぶ。微生物センサーは経済的で安定性にも優れているため、工業プロセスや環境計画に広く応用され注目されている。さらに、微生物センサーを用いることでホストとなる微生物の生体機構を発光や発色などわかりやすい形で表現するパイオイメージングが可能となる。本研究では海洋微生物の持つルシフェラーゼ発光遺伝子：lux operon とヒ素耐性遺伝子：ars operon の発現調節遺伝子を用いて生物ヒ素センサーを構築した。このセンサーを用いて、5 価ヒ素と 3 価ヒ素を検出するヒ素発光センサーを構築すると共に、大腸菌の 5 価ヒ素と 3 価ヒ素に対する膜透過性の解明を行った。

2. 実験原理

本研究では Kado らが作製したプラスミド pUCD615 を用いた。pUCD615 にはルシフェラーゼ発光を示す luxC, D, B, E がコードされている。luxC, D, E はアルデヒドを合成する脂肪酸リグクターゼをコードしており、発光に必要な遺伝子をすべて含んでいる。lux オペロンは、ホタルなどの真核生物が持つ発光系とは異なり、ルシフェリンや ATP を必要としない。発光細菌において、フラビン還元酵素の生成物である FMNH₂ が発光ルシフェラーゼの基質になると考えられている。発光細菌における発光反応は、現在のところ、フラビン酸還元酵素がルシフェラーゼと結合し、NAD(P)H:FMN oxidoreductase で還元された FMNH₂ がルシフェラーゼと結合し、これが酵素と反応すると、中間体である C(4a)-hydroperoxy-FMN が生成される。このフラビン中間体とアルデヒドが反応して C(4a)-hydroxy-FMN ができ、これが基底状態に戻る際に光が放射される。

この luxC, D, B, E の上流に E. coli DH5 α から回収した arsR 遺伝子と ars オペロンのオペレーター・プロモーターを導入した pUCD615 + arsO, P. プラスミドを作製した。このプラスミドは、発光をヒ素により調節する機能がある。luxC, D, B, E によるルシフェラーゼ発光は普段、オペレーター・プロモーター部位に ArsR リプレッサータンパク質が結合することで ArsR の下流に存在する lux 遺伝子の転写が抑制されている。ここに、誘導物質のヒ素が添加されると、ヒ素は ArsR リプレッサータンパク質と結合し、ArsR リプレッサータンパク質はオペレーター・プロモーター部位と結合できないような構造変化を起こす。その結果 lux 遺伝子の転写が始まり、ルシフェラーゼ発光する。このプラスミドで E. coli DH5 α を形質転換した。(Fig. 1)

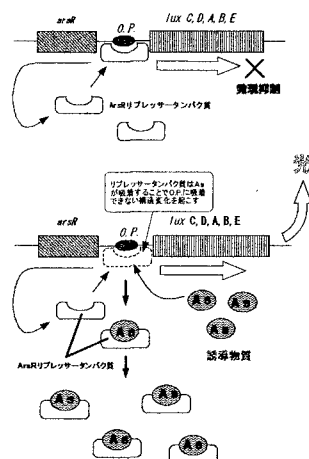


Fig. 1 ヒ素発光センサーの原理

3. 実験方法

1×LB 寒天培地に画線植菌で培養しシングルコロニーを選択する。1×LB+Amp,Km 培地で一晩前培養を行い、M9+Amp,Km 培地 50 ml に前培養液を 500 μl を植次した。30 °C のインキュベーターで浸とう培養し、吸光度 OD₆₀₀ が 0.2 ままで培養し 0, 1 μg, 10 μg, 100 μg, 1 mg, 10 mg/l の濃度となるように 5 価ヒ素と 3 価ヒ素を添加した。培養液 300 μl をマイクロプレートに分注し、1 時間ごとにルミノメーターで相対発光量(RLU)を測定した。

4. 実験結果および考察

5価ヒ素と3価ヒ素では10 $\mu\text{g/l}$ 以上の濃度において、Fig.2より、100 $\mu\text{g/l}$ と1 mg/l で3価ヒ素の方が早く最大発光強度が訪れた。Fig.3より強い発光を示すことが確認された。実験結果を下図に示す。

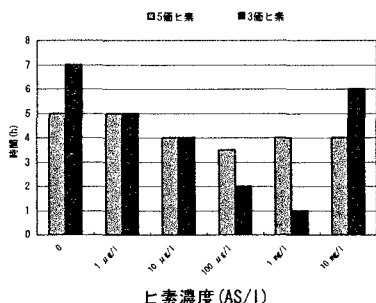


Fig. 2 5価と3価の最大発光時間の比較

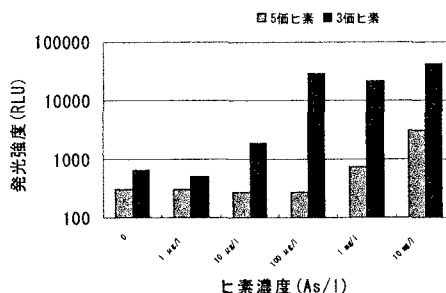


Fig. 3 5価と3価の最大発光強度比較

同濃度で同じ時間に最大発光強度が得られたなら、反応速度論的に ArsR リプレッサータンパク質に対する結合親和性の違いと考えられる。しかし、これでは最大発光が訪れる時間の違いを説明することはできない。これは、大腸菌のヒ素の細胞内への輸送経路の差異に起因している可能性が考えられる。上記の最大発光時間と最大発光強度より、大腸菌のヒ素膜輸送に関わる2つの仮説を立てた。一つ目として、微生物は有用金属イオンを生体内へ取り込むために細胞膜に輸送タンパク質を有している。しかし、この有用金属識別タンパク質は確実に必要な金属のみを取り込むものではなく、不必要な重金属も認識し生体内へ輸送されることが知られている。そのため、有用金属とヒ素を誤認識したことにより生体内へ取り込まれたものと考察した。(Fig.4)。二つ目として、変性タンパク質はプロテアーゼにより、生体内へ導入し分解され、新生タンパク質の合成にリサイクルされる。3価ヒ素は不特定のタンパク質に非特異的な結合を示し、変性させる働きがある。そのため、3価ヒ素が吸着した変性したタンパク質がプロテリシスに体内へ輸送されたと考察した。どちらの仮説も5価ヒ素に比べ非特異的にタンパク質に結合しやすい3価ヒ素が多く生体内へ導入されたと考えられる(Fig.5)。

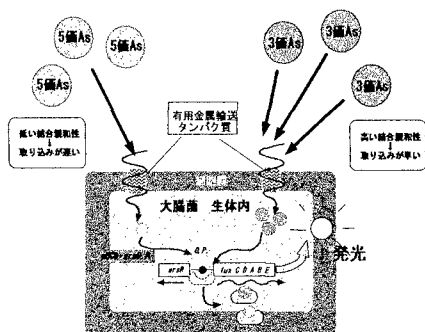


Fig. 4 有用金属輸送タンパク質の誤認識によるヒ素導入メカニズム

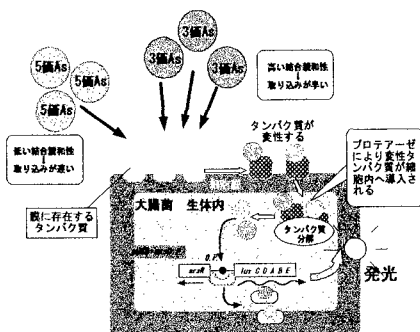


Fig. 5 プロテアーゼによるヒ素導入メカニズム

5. おわりに

pUCD+arsO.P. で形質転換した E. coli DH5 α に誘導物質であるヒ素を添加することで発光が確認され、発光型のバイオセンサーを構築することができた。

3価ヒ素は細胞質膜に存在するさまざまなタンパク質と結合して大量に細胞内に取り込まれる機構を提案した。この提案はこれまでいろいろな生物で3価ヒ素の方が5価ヒ素より細胞内に取り込みやすい現象と一致したものである。