

VII-46

水銀耐性遺伝子の発現調節メカニズムを利用した有機水銀化合物の生物学的検出手法に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○遊佐清孝
 東北学院大学大学院工学研究科 学生員 鈴木 大
 独立行政法人日本学術振興会 正員 成田 勝
 独立行政法人日本学術振興会 松井一彰
 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世界各地で報告されており、現在も深刻な社会問題として捉えられている。なかでも、メチル水銀をはじめとした有機水銀化合物による汚染地域では、これらの汚染が原因で地域住民の健康や生態系が多大な被害を受けている。そこで、有機水銀化合物による環境汚染を監視するための方法として、これらの汚染状況を正確に把握する環境モニタリング技術の開発が求められている。

本研究においては、現在の物理・化学的手法に代わる高精度のモニタリング法として、水銀耐性細菌が保有する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を導入した分子生物学的手法による有機水銀化合物高感度検出システム（バイオセンサー）を開発することを目的とした（Fig. 1）。

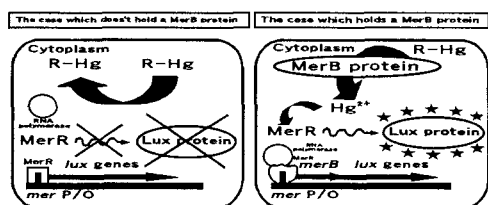


Fig. 1 Principle of biosensor for organomercurial detection.

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

発光性海洋細菌 *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 株とグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株由来の水銀転写調節遺伝子 (*merR*、*merI*)、水銀膜輸送系遺伝子 (*merE*、*merT* および *merP*)、そして有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1*、*merB2* および *merB3*) 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、プラスミドベクターとして pHY300PLK と pGEM-T Easy を使用し、宿主には大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株を用いた。

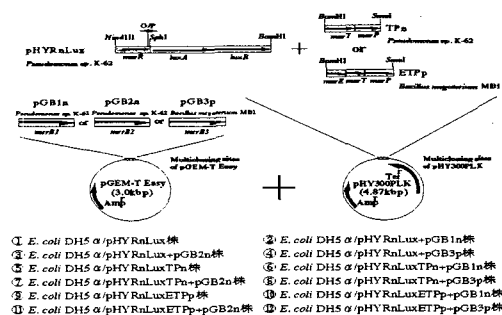
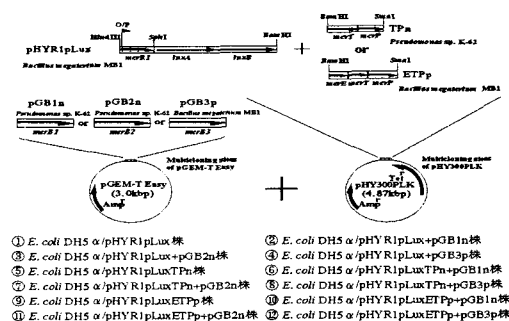
(2) 各種有機水銀化合物に対する検出感度の評価

(1) で構築し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 0.5~0.6 となるまで培養した。培養後、その培養液 100 μ l を酢酸フェニ

ル水銀 (PMA)、塩化メチル水銀 (MMC) およびパラクロロ安息香酸水銀 (PCMB) (いずれも終濃度 0.5 μ M) 入りの TF II 培地に添加し、5 分間隔で 30 分経過まで発光量 (LU) を測定した。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で決定した。

3. 実験結果および考察

Fig. 2 および Fig. 3 に示すような、合計 24 株の有機水銀化合物検出用プラスミド保持株の構築に成功した。

Fig. 2 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors (The case which used a *merR* gene from *Pseudomonas* sp. K-62).Fig. 3 Construction of fusion plasmids for organomercurial detection biosensors (The case which used a *merRI* gene from *B. megaterium* MB1).

構築した各種有機水銀化合物検出用プラスミド保持株に PMA、MMC および PCMB を添加した際の RLA 結果を Fig. 4 (A)~(C) および Fig. 5 (A)~(C) に示す。

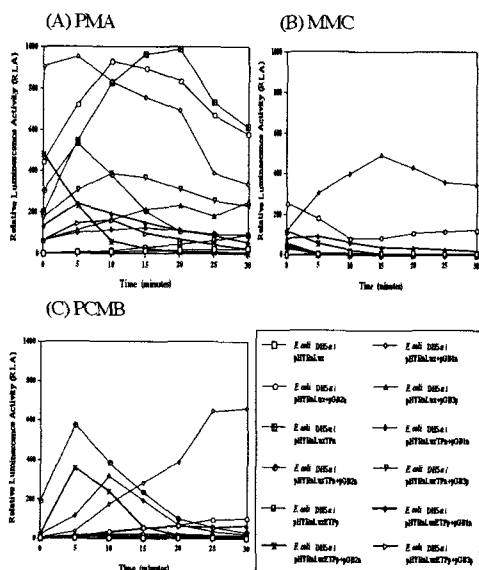


Fig. 4 Relative luminescence activities induction with 0.5 μ M organomercurials (The case which used a *merR* gene from *Pseudomonas* sp. K-62).

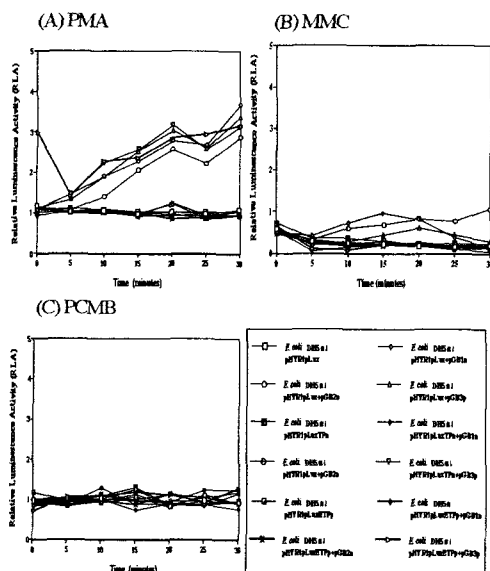


Fig. 5 Relative luminescence activities induction with 0.5 μ M organomercurials (The case which used a *merR1* gene from *B. megaterium* MB1).

(1) *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merR* 遺伝子を用いた場合の RLA 結果

PMA を添加した場合、水銀膜輸送系遺伝子産物 MerT および MerP を保有し、有機水銀分解酵素遺伝子産物 MerB を保有しない *E. coli* DH5 α /pHYRnLuxTPn 株が最も高い RLA 値を示した。また、MerT および MerP を保有せず、MerB2 または MerB1 を保有する *E. coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB2n 株と *E. coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB1n 株でも比較的高い RLA 値を示した。これらの結果から、MerT と MerP は PMA の細菌細胞内への取り込みを能動的に行っているとともに、水銀転写調節遺伝子産物 MerR も PMA に対して応答し、*lux* 遺伝子の発現を活性化させることが考えられた。

一方、MMC または PCMB を添加した場合、MerT および MerP を保有せず、MerB1 を保有する *E. coli* DH5 α /pHYRnLux+pGB1n 株が最も高い RLA 値を示した。この結果から、MerT と MerP が MMC および PCMB の細菌細胞内への取り込みに直接関与しないという現象と、MerB1 の存在の重要性が考えられた。

以上の実験結果から、各 RLA 値はいずれも 400~1000 と高いため、これらは各種有機水銀化合物に対するバイオセンサーとしての機能を十分に備えていると考えられた。

(2) *B. megaterium* MB1 株由来の *merR1* 遺伝子を用いた場合の RLA 結果

PMA を添加した場合、*E. coli* DH5 α /pHYR1pLux+pGB3p 株、*E. coli* DH5 α /pHYR1pLuxTPn+pGB3p 株および *E. coli* DH5 α /pHYR1pLuxEIPp+pGB3p 株である MerB3 保有の 3 細菌株で高い RLA 値を示した。また、MerT および MerP を保有せず、MerB1 または MerB2 を保有する *E. coli* DH5 α /pHYR1pLux+pGB1n 株と *E. coli* DH5 α /pHYR1pLux+pGB2n 株でも同様に高い RLA 値を示した。しかしながら、いずれの場合も RLA 値は 5 以下であることから、*merB3* 遺伝子の発現が抑制されていることや *lux* 遺伝子の発現を活性化させていないことが考えられた。

一方、MMC を添加した場合は全ての細菌株において RLA 値の増加は見られなかった。また、PCMB を添加した場合も全細菌株で RLA 値の増加は見られなかった。

以上の実験結果から、*E. coli* DH5 α 株を宿主とした場合、グラム陽性細菌由来の *merR1* 遺伝子を保持する細菌株はバイオセンサーとしての機能を十分に活かすことができないと考えられる。

4. おわりに

E. coli DH5 α 株を宿主とした場合、グラム陰性細菌由来の *merR* 遺伝子を導入した細菌株が有機水銀化合物検出用バイオセンサーとして有効であることが明らかになり、MMC および PCMB 検出用のバイオセンサーには、グラム陰性細菌由来の *merB1* 遺伝子の適用が有効であることが明らかになった。