

センサーバクテリアの固定化による水銀検出用バイオセンサーデバイスの開発に関する研究

東北学院大学工学部 学生会員○大久保 亮
東北学院大学大学院工学研究科 非会員 矢萩 紀雄
東北学院大学工学部 正会員 宮内 啓介
東北学院大学工学部 フェロー 遠藤 銀朗

1. はじめに

水銀汚染は現在もなお世界的に深刻な環境汚染の一つであり、その影響は人体以外にも土壌や水域など広範囲にわたっている。常温で唯一の液体状金属である水銀および水銀化合物は、水銀の特性を生かした工業製品に広く利用されているが、これらの製品の使用等を通して微量ながらも常時水銀が環境中に排出されているのが現状である。このように水銀による環境汚染は、水俣病などの公害に代表される「高濃度で局所的な汚染」から「低濃度ではあるが広範囲にわたる汚染」へと変遷してきており、我々の日常生活と密接に関わりだした環境問題であるといっても過言ではない。

上記のような環境を汚染している水銀の検出には、現在の水銀検出法は吸光光度法、原子吸光法などの物理・化学的方法が主に用いられているが、分析コストが高く、汚染現場で測定することができないといった問題が残されている。そのため、これらの方法に変わる検出法として微生物による水銀検出法の開発が期待されている。

我々の研究室では、水銀応答遺伝子と生物発光レポータ遺伝子を大腸菌内に共存させた水銀検出用バイオセンサーを開発する研究を行ってきた。本発表では、この水銀センサーバクテリアをゲルによって包括固定化した固定化バイオセンサーを開発したので報告する。

2. 実験方法

2-1 レポータプラスミドを持つ組換え大腸菌の固定化

水銀イオン(Hg^{2+})に応答してルシフェラーゼタンパク質を発現させるグラム陰性細菌 *Pseudomonas* sp. K-62 株由来の *merR* 遺伝子と発光細菌 *Vibrio harveyi* のルシフェラーゼ遺伝子 *luxA*, *luxB* で構成されるレポータプラスミド pHYRnLux(図 1)を持つ大腸菌を、包括固定化剤であるアルギン酸ナトリウムを用いて固定化し、固定化バイオセンサー(ビーズ)を作製した。一晚培養した菌液を抗生物質入り LB 培地で 10 倍希釈し、 OD_{600} が 0.8 にな

るまで $37^{\circ}C$ で培養し、菌液と等量の 4%アルギン酸ナトリウムを加えて混ぜ合わせ、攪拌条件下で 0.1M 塩化カルシウム溶液に滴下し、2 時間反応させて固定させた。得られたビーズはミリキュー処理水で 2 回洗浄して用いた。

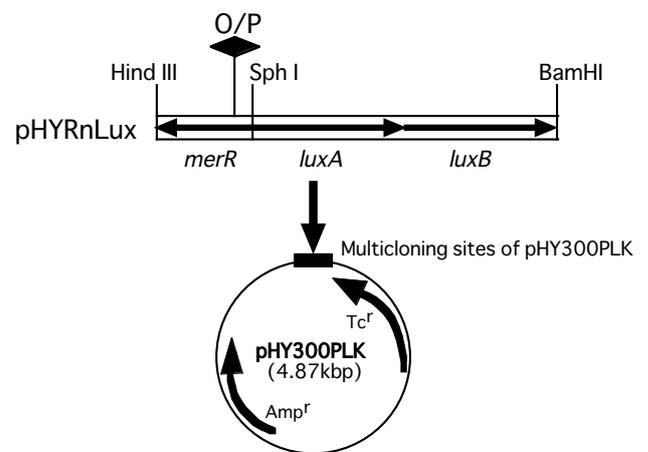


図 1 レポータプラスミド pHYRnLux の構成

2-2 固定化バイオセンサーの水銀検出能の評価

2-1 で作製した固定化バイオセンサーに、塩化第二水銀入り LB 培地を加えて $37^{\circ}C$ で培養し、0-30 分までの 10 分ごとにルシフェラーゼによる発光量を測定し、固定化バイオセンサーの水銀検出能を評価した。発光量の測定はマイクロプレートリーダー (MicroLumimat Plus LB96 V-H, Berthold) を使用し、測定時間は 5 秒とした。

水銀検出能は、水銀を加えたときの発光量を水銀を加えないときの発光量で割り、発光誘発係数(Luminescent Induction Coefficients: LIC)として評価した。

また、検出限界を併せて検討するため、終濃度は 100nM、10nM、1nM の 3 種類に設定して実験を行った。

3. 実験結果および考察

作製した固定化水銀センサーバクテリアによる塩化第二水銀検出能を評価した結果を以下に示す。図 2 は、塩化第二水銀が終濃度 100nM となるようにして行った実

験の LIC の時間変化を示したものである。図 3 は、塩化第二水銀が終濃度 10nM となるようにして行った実験の LIC の時間変化を示したものである。図 4 は、塩化第二水銀が終濃度 1nM となるようにして行った実験の LIC の時間変化を示したものである。

作製した固定化水銀センサーバクテリアは、100nM 塩化第二水銀を用いた場合、および 10nM 塩化第二水銀を用いた場合に、安定した LIC の上昇が見られ、100nM のときは 30 分で LIC が 400 まで上昇した。10nM のときは 30 分で LIC が 70 まで上昇した。このことから、固定化水銀センサーバクテリアは 10nM の塩化第二水銀まで高感度に検出できることが知られた。一方、1nM 塩化第二水銀を用いた場合は 30 分で LIC が 2 までしか上昇しなかったが、測定時間を延ばすことによって、さらに水銀を検出できるものと考えられた。これらのことから、固定化水銀センサーバクテリアは、1nM 程度の水銀を検出できることが考えられた。

4. おわりに

固定化水銀センサーバクテリアは、10nM 程度の水銀を高感度に検出できることが明らかになったが、今後は環境を広く薄く汚染しているような、さらに低濃度の水銀を検出できる固定化バイオセンサーについて研究を行う必要があると考えられる。

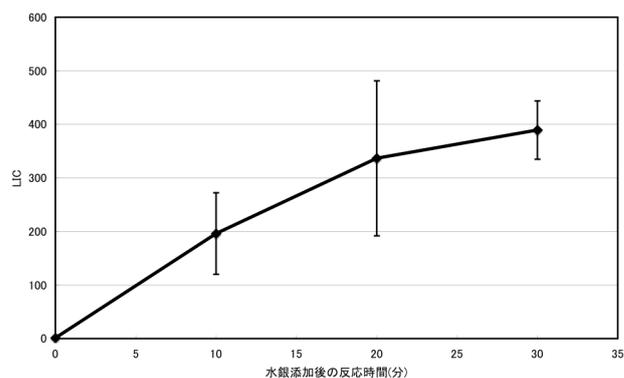


図 2 100nM の塩化第二水銀検出した場合の LIC の時間変化

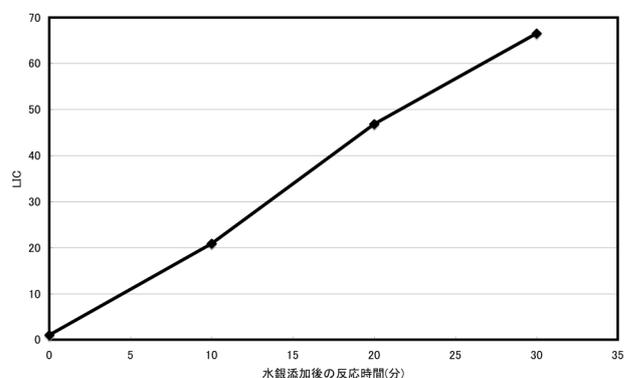


図 3 10nM の塩化第二水銀検出した場合の LIC の時間変化

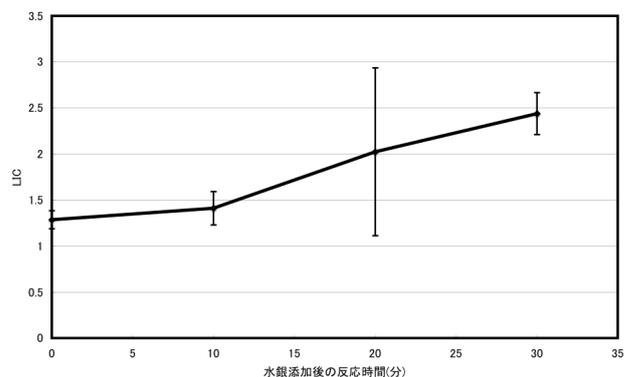


図 4 1nM の塩化第二水銀検出した場合の LIC の時間変化