

細菌を用いたヒ素検出システムの構築

東北学院大学 工学部 学生会員 ○庄司 有理

東北学院大学大学院 工学研究科 学生会員 平間 知之

東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤 銀朗

東北学院大学 工学部 正会員 宮内 啓介

1. 序論

ヒ素による土壤汚染、地下水汚染は、地球規模で大きな環境問題となっている。ヒ素は5~50 mg を摂取すると中毒症状を起こすだけでなく、数十 ppb の低濃度であっても長時間の摂取によって慢性中毒を引き起こし、発癌等の原因となる為、ヒ素による環境汚染実態の早急な解明が必要である。現在のヒ素濃度の測定には ICP-MS などが用いられている。しかし、これらの方法は大規模な施設や設備が必要だけでなく機械の維持費や薬品などの消耗品コストがかかる。そこで我々は細菌を利用した生物学的な検出方法の確立を目標として研究を行なっている。本研究では細菌のヒ素耐性機構(図-1)を用いてヒ素を検出するシステムの構築を行なうことを試みた。

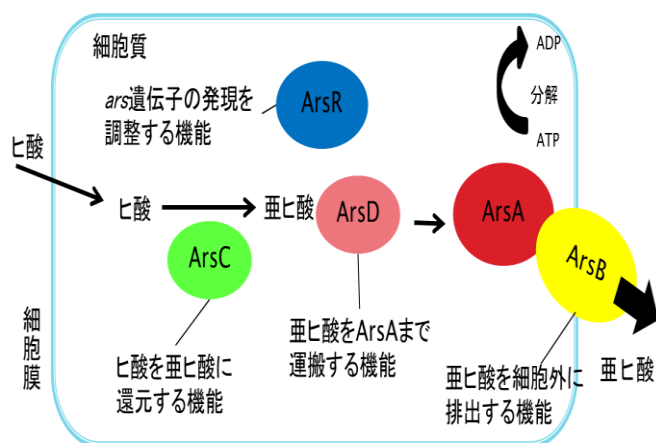


図-1. 細菌のヒ素耐性機構

2. 実験方法

2-1 レポータープラスミドの構築

ヒ素耐性を示す細菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 のヒ素耐性遺伝子群 *arsRBC* のうち、*ars* 遺伝子群の発現を調節する転写制御遺伝子 *arsR* とその上流の *ArsR* 結合領域を PCR で増幅し、発光タンパク質をコードする *luxAB* の上流に挿入してレポータープラスミドを構築した（図-2）。このプラスミドをエレクトロポレーション法により RHA1 株、*Rhodococcus erythropolis* IAM1399 株及びそれらのヒ素耐性遺伝子群破壊株（RHA1 Δ *arsRBC* 株、IAM1399 Δ *ars1* Δ *ars2* 株）に導入した。

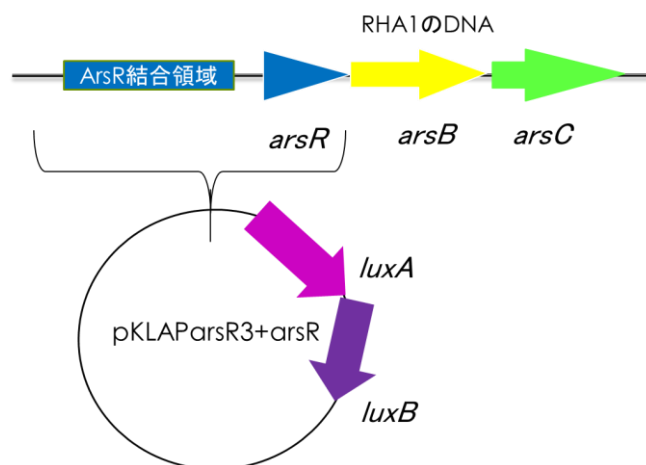


図-2. 構築したレポータープラスミド

2-2 ヒ酸および亜ヒ酸応答活性の測定

様々な濃度のヒ素を含むカナマイシン入り LB 培地を試験管に 5ml 用意し、菌液 100 μ l を植菌した。0,3,6 時間経過後に濁度 (OD₆₀₀) と発光量を測定した。発光量は 1 つのサンプルに対して 3 回計測した。発光量の平均値を OD₆₀₀ で割ったものを単位菌数あたりの発光

キーワード : arsenic detection system, bacteria

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 宮内啓介研究室

TEL : 022-368-7445 FAX: 022-368-7070

量とした。

3. 結果と考察

RHA1 株と IAM1399 株およびそれぞれのヒ素耐性遺伝子破壊株の4種類の菌株に構築したレポータープラスミドを導入し、亜ヒ酸およびヒ酸存在下で発光量を測定した。以下にその結果を示す。

3-1 亜ヒ酸に対する応答

亜ヒ酸に対する RHA1 株および RHA1 Δ arsRBC 株の応答(図-3)と、IAM1399 株および IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株の応答(図-4)を比較すると、両者ともに野生株に比べてヒ素耐性遺伝子破壊株の方が感度が高いことがわかった。図3と図4の縦軸の数値を比較すると IAM1399 株およびそのヒ素耐性遺伝子群破壊株の方が強い反応を示していることがわかる。IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株では 0.01 μ M の亜ヒ酸に対しても強く反応した。ヒ素耐性遺伝子破壊株はヒ素を体外に排出する機能がなくなったのでヒ素を体内にため込むため感度が高くなったと考えられる。

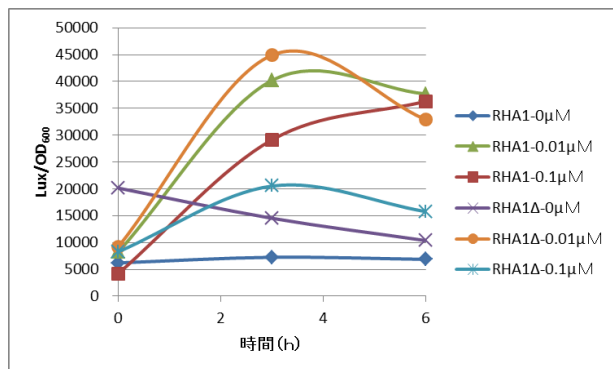


図-3. RHA1 株および RHA1 Δ arsRBC 株の亜ヒ酸に対する応答

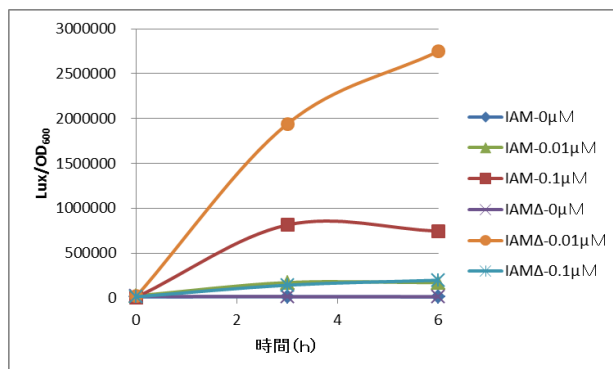


図-4. IAM1399 株および IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株の亜ヒ酸に対する応答

3-2 ヒ酸に対する応答

ヒ酸に対する RHA1 株および RHA1 Δ arsRBC 株の応

答(図-5)、IAM1399 株および IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株の応答(図-6)も亜ヒ酸と同様に、ヒ素耐性遺伝子群破壊株の方が野生株よりも強く反応を示し、IAM1399 株は RHA1 株よりも感度が高いことが明らかとなった。RHA1 Δ arsRBC 株および IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株ともに 10 μ M のヒ酸を検出可能であった。

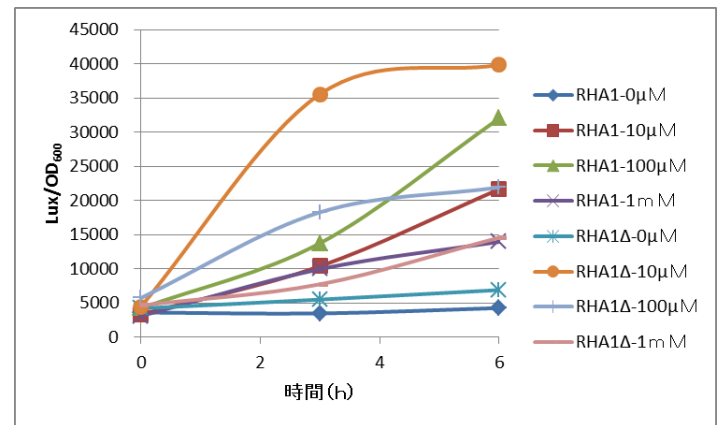


図-5. RHA1 株および RHA1 Δ arsRBC 株のヒ酸に対する応答

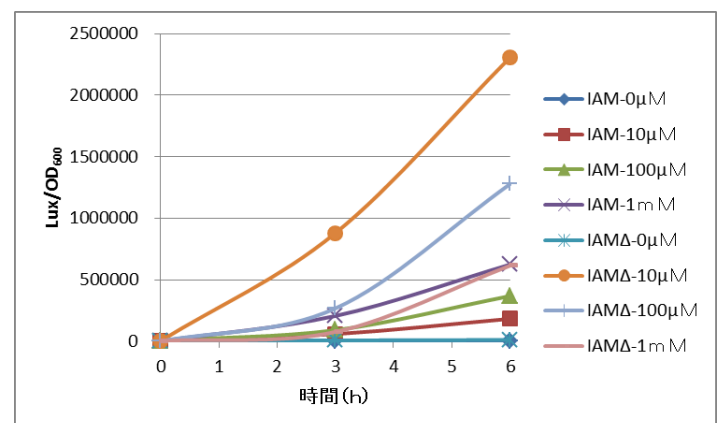


図-6. IAM1399 株および IAM1399 Δ ars1 Δ ars2 株のヒ酸に対する応答

4. まとめ

亜ヒ酸とヒ酸の両者ともに RHA1 株よりも IAM1399 株の方が感度がよい事が明らかとなった。また、野生株に比べてヒ素耐性遺伝子群破壊株の方が感度が高いことも明らかになった。以上の結果から亜ヒ酸およびヒ酸の検出に適している菌は IAM1399 株 Δ ars1 Δ ars2 株である。現在のところ、環境基準値の 10ppb を下回る 0.01 μ M (0.75ppb) までの亜ヒ酸が検出可能であった。