

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 ○佐藤 舜

東北学院大学 工学部 荒井 祐哉

東北学院大学 工学部 富田 尚樹

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

ヒ素による土壌汚染、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、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なだけでなく機械の維持費やガス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ヒ素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。

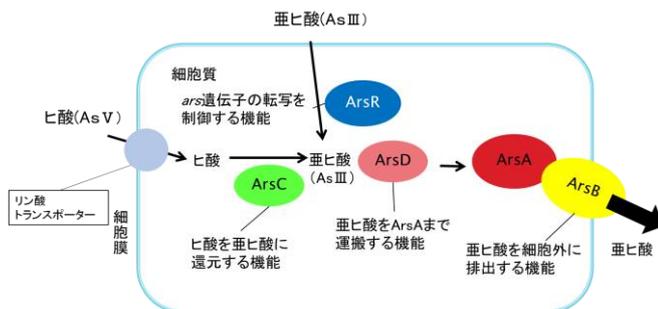


図-1. 細菌のヒ素耐性機構

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 (pKLAParsR3+arsR) 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、*R. erythropolis* IAM1399 のヒ素耐性遺伝子群破壊株 IAM1399 Δ *ars1* Δ *ars2* 株に導入した。

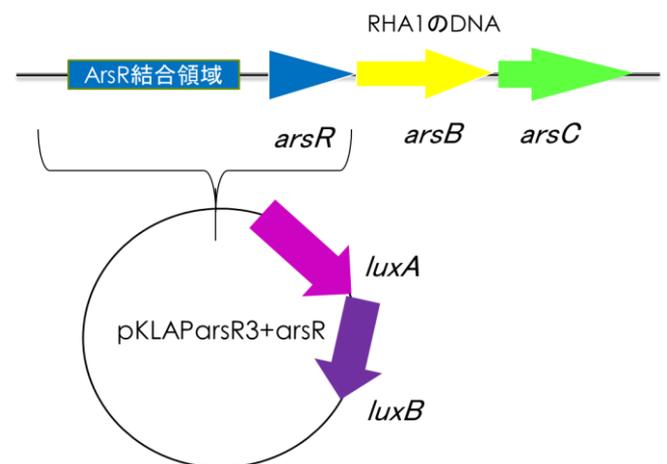


図-2. 構築したレポータープラスミド

2-2 亜ヒ酸及びヒ酸に対する応答活性の測定

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, 2, 4 時間経過後に濁度 (OD₆₀₀) と発光量を測定した。リン酸を加えて測定を行う場合は、作製した液体培地に 1M リン酸-Na バッファー (pH 7.0) を 1/10 量加えた。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 (Lux/OD₆₀₀) を単位菌数あたりの発光量とした。

キーワード: arsenic, detection, bacteria, biosensor

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

3. 結果と考察

作製した IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ 株 (pKLAParsR3+arsR) 株が亜ヒ酸・ヒ酸に対しどの程度反応をするか測定するために、 $100 \mu\text{M}$ から $0.01 \mu\text{M}$ の亜ヒ酸及びヒ酸存在下で測定を行った。

3-1 亜ヒ酸・ヒ酸に対する応答

IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株の亜ヒ酸 (図-3) および、ヒ酸に対する応答 (図-4) を比較すると、4時間経過後最も高い値を示したのは亜ヒ酸では $0.01 \mu\text{M}$ と $1 \mu\text{M}$ で 4×10^6 という結果であった。ヒ酸では、 $100 \mu\text{M}$ で 4×10^6 という結果であった。亜ヒ酸は環境基準値である 10ppb を下回る $0.01 \mu\text{M}$ (0.75ppb) まで検出が可能であったが、ヒ酸は、 $10 \mu\text{M}$ 未満の検出が難しいことが示された。

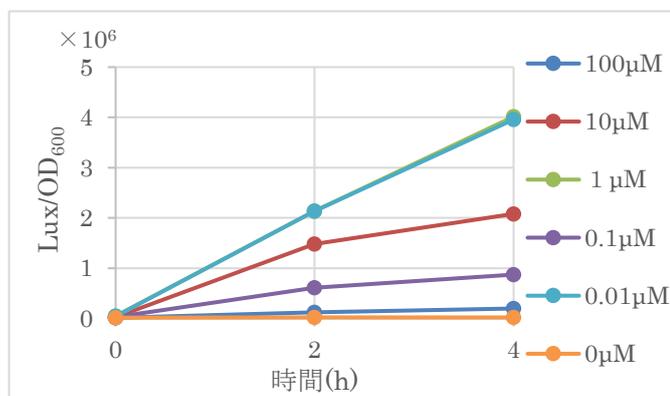


図-3. IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株の亜ヒ酸に対する応答

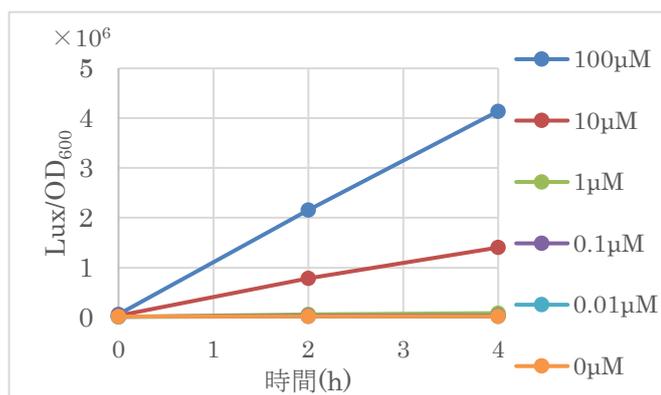


図-4. IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株のヒ酸に対する応答

3-2 リン酸存在下での亜ヒ酸・ヒ酸に対する応答

3-1 では、亜ヒ酸・ヒ酸どちらにも反応を示した。亜ヒ酸とヒ酸の区別を行う為、リン酸を加える事でヒ酸の取り込みを抑えることが可能であるか実験を行った。

リン酸存在下での亜ヒ酸に対する応答 (図-5) とリン酸非存在下でのそれに対する応答 (図-3) を比較すると、リン酸存在下での応答は、非存在下よりも減少しているが、同様の反応を示していることが分かる。次にリン酸存在下でのヒ酸の応答 (図-6) とリン酸非存在下でのそれに対する応答 (図-4) で比較すると、4時間経過後の $100 \mu\text{M}$ では、リン酸非存在下では、 4×10^6 に対し、リン酸存在下では 8×10^4 という結果であり、その他の濃度でも反応が抑えられていることが明らかになった。以上の結果から、リン酸によってヒ酸に対する反応が抑えられたことが明らかとなった。

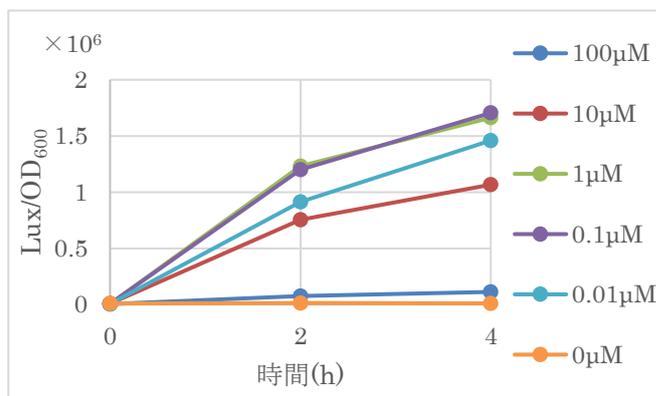


図-5. IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株の亜ヒ酸+リン酸に対する応答

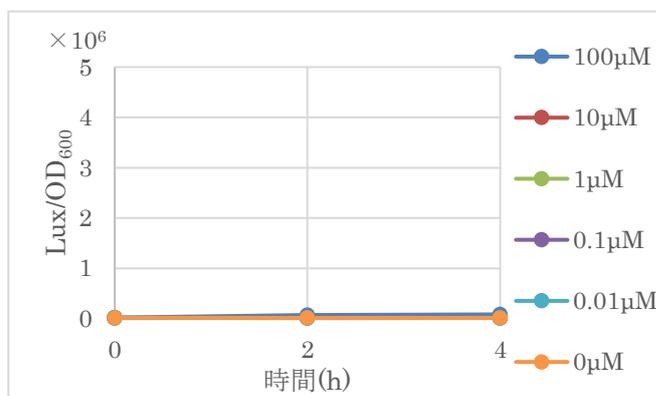


図-6. IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株のヒ酸+リン酸に対する応答

3-3 まとめ

IAM1399 $\Delta ars1 \Delta ars2$ (pKLAParsR3+arsR) 株を用いることで、亜ヒ酸・ヒ酸とも検出可能であることが明らかとなった。リン酸を加えることでヒ酸に対する応答が抑えられることが明らかとなり、これを利用することで、亜ヒ酸・ヒ酸の区別を行うことが可能であると考えられる。