

H-6 地下水利用に伴う広域的ヒ素汚染に対する地球環境保全のための環境計画に関する研究
(5) - 2 飲料井戸等の小規模飲料水におけるヒ素除去手法の開発

東北学院大学

工学部 環境土木工学科 石橋 良信

平成 12~14 年度合計予算額 8,971 千円
(うち、平成 14 年度予算額 2,077 千円)

[要旨] ヒ素は物理的処理で除去するのが一般的である。一方、環境修復にみられるように微生物のもつ能力は多様であるにもかかわらず、生物によるヒ素除去の試みは少ない。エネルギーや技術に乏しいバングラディッシュでのヒ素除去の一助として、遺伝子組換え微生物の適用しながら、細胞表層工学によるヒ素除去特性の考察とヒ素感知バイオセンサーを作製した。また、ヒ素除去のための簡易装置を普及させるには、衛生教育は重要であり、前段として衛生状況、衛生観念、風習、社会性等調査した。植物等によるヒ素吸着・吸収についても若干検討している。

細胞表層工学による、ヒ素除去を試みた結果から、ヒ素との接触時間を二日間とした培養液の除去では、pTV+lamb に比べ pTV+lamb-arsR で菌体の沈降量が多くなった。現在まで、リプレッサータンパク質が細胞表層に提示されたことによる重金属除去が試みられた例はなく、他のリプレッサータンパク質を微生物の細胞表層工学による重金属除去への応用も示唆された。

ヒ素発光バイオセンサーに関しては、大腸菌細胞にヒ素が取り込まれる現象をリアルタイムにバイオイメージング可能なヒ素発光センサーを構築できた。3 価ヒ素濃度 $1 \mu\text{g/l} \sim 1 \text{mg/l}$ で定量性が確認され、現在、水道試験方法で用いられるジエチルジチオカルバミン酸銀吸光光度法の定量限界と同等以上の検出感度を得ることができた。3 価ヒ素と 5 価ヒ素の発光時間、発光量の比較では、3 価ヒ素は大量にかつ 5 価より速く細胞内へ取り込まれ、3 価ヒ素と 5 価ヒ素を同時に検出できる可能性を示した。また、ヒ素の膜輸送機構についての仮説を提案した。

一方、衛生観念の認識と衛生教育の必要性がみられたが、最近では就学率も向上している。現在は支援活動が活発化しているが、依然としてコミュニティ・リーダー（地主・男性社会）の支配力は強く、この現状を打開しなければ女性の進出と社会開発は望めないと結論づけた。

[キーワード]

細胞表層工学、新機能細胞、ヒ素発光バイオセンサー、ファイトリメディエーション、衛生教育

1. はじめに

生物を使用した環境修復技術は大規模な施設やエネルギーを必要とせず、環境への負荷が少ないために微生物の働きを上手くコントロールすることでできれば、有効な環境修復のツールとして利用することが可能になる。

本研究では、細胞表層工学の面から新しいヒ素除方法を提案した。細胞表層工学は細胞の表層に目的の分子を組み込んで細胞に新しい機能を持たせる技術である。すべての生物細胞にとって、最外層である細胞表層は、外界環境からの刺激に対する反応と栄養源などの物質を選択するため

の分子認識の場であり、また細胞内部からの情報や物質の放出の場であることから、反応と情報のインターフェイスと捉えることができる。この細胞表層に輸送されるタンパク質のターゲティング情報も判明してきた。この情報を用いて、細胞表層に目的の分子を組み込むことにより、従来にはない新しい付加価値をもった新機能細胞 (Arming Cell) を作り出すことができるようになった¹⁾。

一方、本実験で対象とするヒ素の測定方法は原子吸光光度法やジエチルジチオカルバミン酸銀による吸光光度法など物理化学的な手法によって行われている。これらの物理化学的な手法は検出する感度は高いが、一般的な物理化学的な測定方法と同様に、高価な機器が求められること、測定に熟練した技術が求められることや測定時間が長いことなどの問題があり、より簡便で短時間で測定を行なうことのできる手法・装置が求められる²⁾。

現在、これらの問題を解決するため、化学物質を測定する方法において、物理化学的な手法から、生物学的な微生物センサーが注目されている。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。酵素は微生物から抽出、精製される場合が多く、微生物菌体中には多数の酵素を含んでいる。したがって、酵素の代わりに微生物自身を分子識別素子として利用する微生物センサーが考案された。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応用され、注目されている。また、微生物センサーは生物の持つ遺伝子の働きを、扱いやすく、わかりやすい形で示すバイオイメージングの一面も持ち合わせている。そのため、測定対象となる化学物質の有無だけでなく、普段働きの見ることできない遺伝子の働きや発光など、わかりやすく表すことができる。また、本来のセンサーとしての働きだけでなく、微生物の持つ遺伝子の働きや、膜透過性など、微生物の生態的な特徴を調査・研究することができ、生物の根本的な生態の原理究明に非常に有効な手段となる。

バングラディッシュでは、5歳以下の子供の死亡率や病気になる割合は世界的にも高い。GDPに表れる経済的貧しさ、慢性的医師不足、安全な水の供給不足、健康に対する意識の低さ、風習等で衛生状態は悪く、衛生に対する意識の高揚と衛生教育が必要な状況にある。

2. 研究目的

遺伝子工学的観点から微生物を用いたヒ素除去方法および測定技術 (バイオセンサー) の開発を試みた。具体的には ArsR リプレッサータンパク質の誘導物質に対する特異的結合性を用いたヒ素除去方法である細胞表層工学の適用および ArsR リプレッサータンパク質の遺伝子調節機能を用いたヒ素発光センサーの開発である。とくに、ヒ素発光センサーはバイオイメージング機能を持ち合わせており、5価ヒ素と3価ヒ素の発光の特性から価数の異なるヒ素の膜輸送挙動を解析することが可能であり、このヒ素発光センサーを用いて大腸菌のヒ素細胞内膜輸送メカニズムの解釈も合わせて行った。

また、入手しやすい身近な物質でのヒ素吸着能、またファイトリメディエーションの一環としてヒ素吸収能の高い植物の抽出を試みている。

一方、衛生教育に関してバングラディッシュの実情と問題点を以前に遂行した研究とその後のヒアリングから再検討している。

3. 研究方法

3-1 細胞表面工学によるヒ素除去方法の検討

3-1-1 細胞表面工学の原理

細胞表面工学はバイオ産業で酵母細胞の細胞表面に本来有している機能の他に新たな機能をもたせるために研究開発され、細胞表面に物質生産や重金属吸着能のあるタンパク質やペプチドを提示させ Arming Cell を作り出す技術である。物質生産を目的とした実験では、麹菌の持つアミラーゼ（デンプンを分解してぶどう糖を生成する酵素）を酵母菌の細胞表面に導入して酵母菌のみでアルコール生成する能力を持たせることに成功した例が報告されている。³⁾ 重金属除去を目的とした実験で細胞表面に導入されたタンパク質は、植物や微生物のメタロチオネインや植物のファイトケラチンや6残基のヒスチジンペプチド等である。とくに、近年発見されたファイトケラチンはシロイヌナズナ⁴⁾や大腸菌⁵⁾の細胞表面に導入された例が報告されている。

生物を用いた環境修復（バイオレメディエーション）の分野でも細胞表面工学は応用されている。微生物を用い水圏から重金属を回収するバイオソルベントは大量のエネルギーを必要としない環境に優しい技術といわれている。大腸菌を用いた細胞表面工学では一般に大腸菌の細胞表面の最外層を構築する LamB タンパク質が用いられる。LamB タンパク質のアミノ酸 153-154 アミノ基や 253-254 アミノ基をコードする部位は他のタンパク質を導入しても膜構造に悪影響を与えないことが知られている。

このことから、*lamB* 遺伝子と働きを持たせたい遺伝子を融合させた *lamB* キメラ遺伝子を作製し、これを挿入したプラスミド・ベクターを用いて大腸菌を形質転換して目的のタンパク質が細胞表面に作り出すことが可能となる。(図-1)

スペインの C.Sousa ら⁶⁾のグループは、His リピートやメタルチオネインを大腸菌細胞表面の LamB タンパク質 153-154 アミノ基に挿入した。His リピートは2価の金属イオンと結合してタンパク質に金属イオンアフィニティーカラムへの親和性を与え、メタルチオネインはヒトや酵母にあり、分子内に多数の Cys 残基を有するため Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{2+} などの遷移金属イオンと結合する。いずれのキメラタンパク質も野生型の LamB タンパク質に匹敵する量が細胞表面の外膜部分に安定して存在し、金属結合ドメインが外界に露出していることが確認された。キメラタンパク質が組み込まれた大腸菌は希薄な重金属イオンを含む溶液中での培養では Cd^{2+} の吸着量は His リピートでは11倍、メタロチオネインでは20倍に増加した。細胞表面に金属吸着能を持つタンパク質を作ることによって金属が除去できることが確認されている。

(1) ヒ素耐性遺伝子 *arsR* とオペロン⁷⁾

ヒ素耐性を持つ細菌は、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Yersinia enterocolitica*、*Acidiphilium multivorum*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Saccharomyces cerevisiae* など、数多く確認されている。このようなヒ素耐性を持つ細菌は染色体やプラスミド上にヒ素耐性遺伝子群 *ars* オペロンがコードされている。*ars* オペロンは現在、*arsR*、*arsD*、*arsA*、*arsB*、*arsC*、*arsH*の遺伝子が確認され、主に染色体上に3つ、プラスミド上に5つのいずれかの遺伝子があり、染色体上には *arsD* と *arsA* の遺伝子が存在しない株もある。本実験で使用した *E.coli* DH5a 株の染色体上には *arsD* と *arsA* の遺伝子が存在しない。この *ars* オペロンにより、ヒ素を亜ヒ酸に変換して細胞外へ排出することやメチル化してヒ素耐性を得ている。

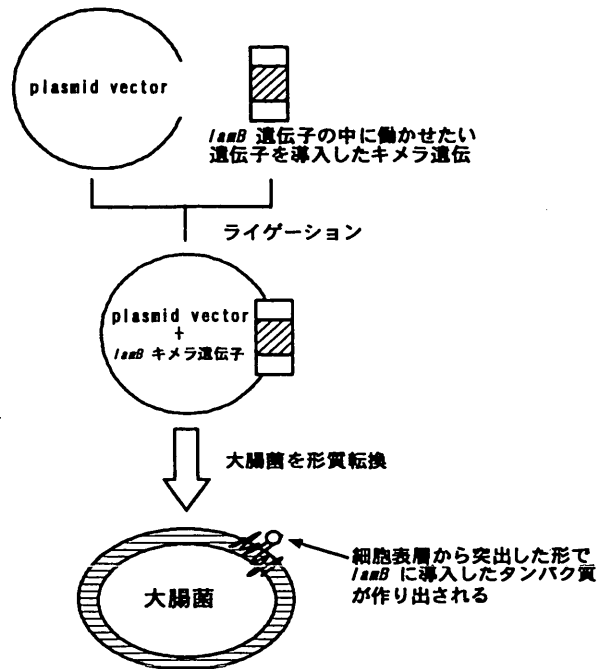


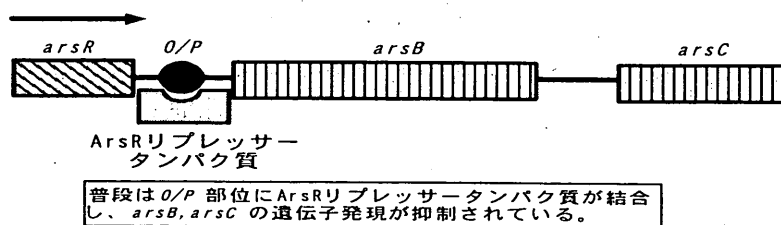
図-1 細胞表面工学の原理

オペロンとは、原核生物や最近見つかった一部の酵母菌に存在し、遺伝子を有効に働かせるための遺伝子群である。オペロンはリプレッサーの遺伝子と遺伝子群との間に遺伝子を調節するオペレーターや転写を開始するプロモーターがあり、オペレーターにリプレッサーが結合しているとプロモーターからの転写が抑制される。誘導物質を添加するとプロモータータンパク質は添加された誘導物質に対して、親和性が高いため、オペレーター領域より結合が解かれ新たにリプレッサーは誘導物質と結合するようになる。この結果、プロモーターから転写がはじまり mRNA が合成され下流に存在する遺伝子群が発現する。本実験で使用する *arsR* はヒ素耐性の発現を調節するリプレッサー遺伝子であることからヒ素と親和性が高い。*ars* オペロンを図-2 に示す。

(2) LamB タンパク質の働き

LamB タンパク質、は3層に分かれるペリプラズム層でも最も外側で存在する3量体のマルトース受容体である。ペリプラズム層とは *E. coli* などのグラム陰性菌の細胞膜と細胞壁との間に一定に存在する空間である。アルカリ性フォスファターゼ、リポヌク素（ペリプラズム酵素）やアミノ酸、その他の物質に対する結合タンパクが存在し、機能的にも極めて重要な空間である。LamB タンパク質は膜通過のドメインを5つ持ち、膜通過ドメインは外界に接している。その領域に目的の遺伝子を挿入すれば、N末端とC末端の両方を外膜にアンカーさせた形で外界に露出させることができる。LamB タンパク質の外界ドメイン中のアミノ酸 153-154 間とアミノ酸 253-254 間の2ヶ所はタンパク質の全体構成や3量体形成に悪影響を与えることなく、長鎖の遺伝子を挿入することができる。そのため、目的となる遺伝子を発現させる際のキャリアーとして最も良く研究されている。⁹⁾

遺伝子発現抑制状態



5価Asが添加されると

遺伝子発現状態

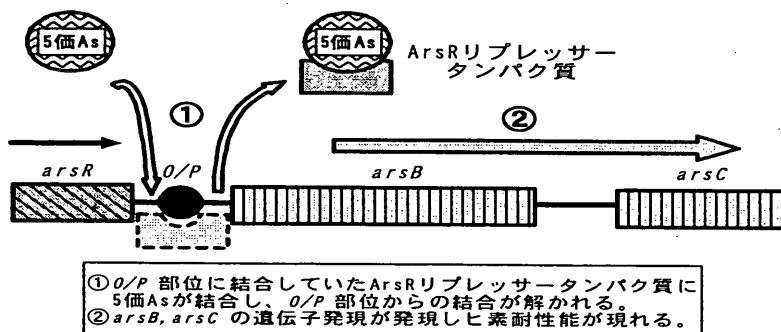


図-2 *ars* オペロン⁸⁾

LamB タンパク質がペリプラズム層へ移動するメカニズムは、N 末端部に 7-15 個の疎水性アミノ酸のクラスターであるシグナル配列（シグナルペプチド）に従っている。LamB タンパク質はペリプラズム層に移動するシグナルペプチドを持つペリプラズム層へ移動するとシグナルペプチドがシグナルペプチターゼと呼ばれる酵素で切断され成熟したタンパク質となる。¹⁾

(3) pTV + *lamB* + *arsR* の構築¹⁰⁾ 紀要

細胞表面工学ではオペロンのリプレッサータンパク質を用いてヒ素を吸着させた例は未だない。本研究では、大腸菌 DH5 α 株の染色体由来の *lamB* 遺伝子と大腸菌 DH5 α 株由来の *arsR* 遺伝子を PCR クローニングにより単離し、組換え体の構築に用いた。LamB タンパク質の 153-154 アミノ基をコードする部位 *Bam*HI 制限酵素サイトを導入し、同様に *arsR* 遺伝子の N 末端、C 末端にも *Bam*HI 制限酵素サイトを導入して *lamB-arsR* キメラ遺伝子を作製し、プラスミドベクター pTV118N にライゲーションした。この最終的遺伝子操作から得られたプラスミドを大腸菌に形質転換した。図-3 に *lamB* 遺伝子に *arsR* 遺伝子を導入した模式図を、図-4 にヒ素除去実験に供した pTV118N+*lamB-arsR* プラスミドを示す。

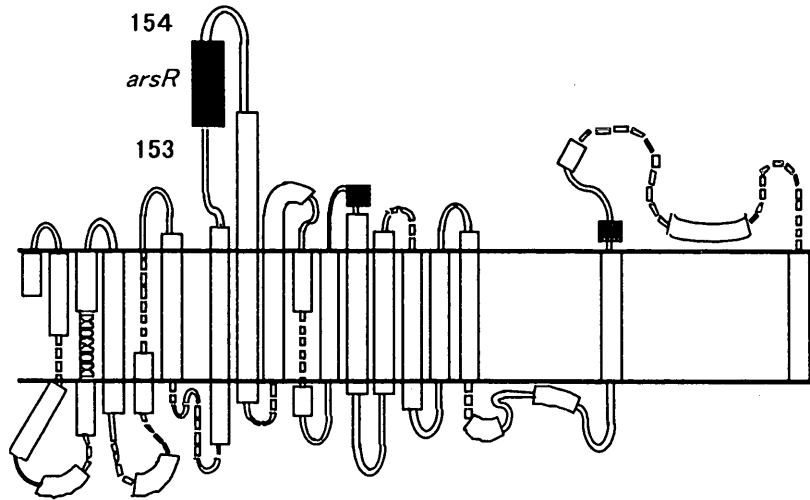


図-3 *lamB* に *arsR* を導入した図¹⁾

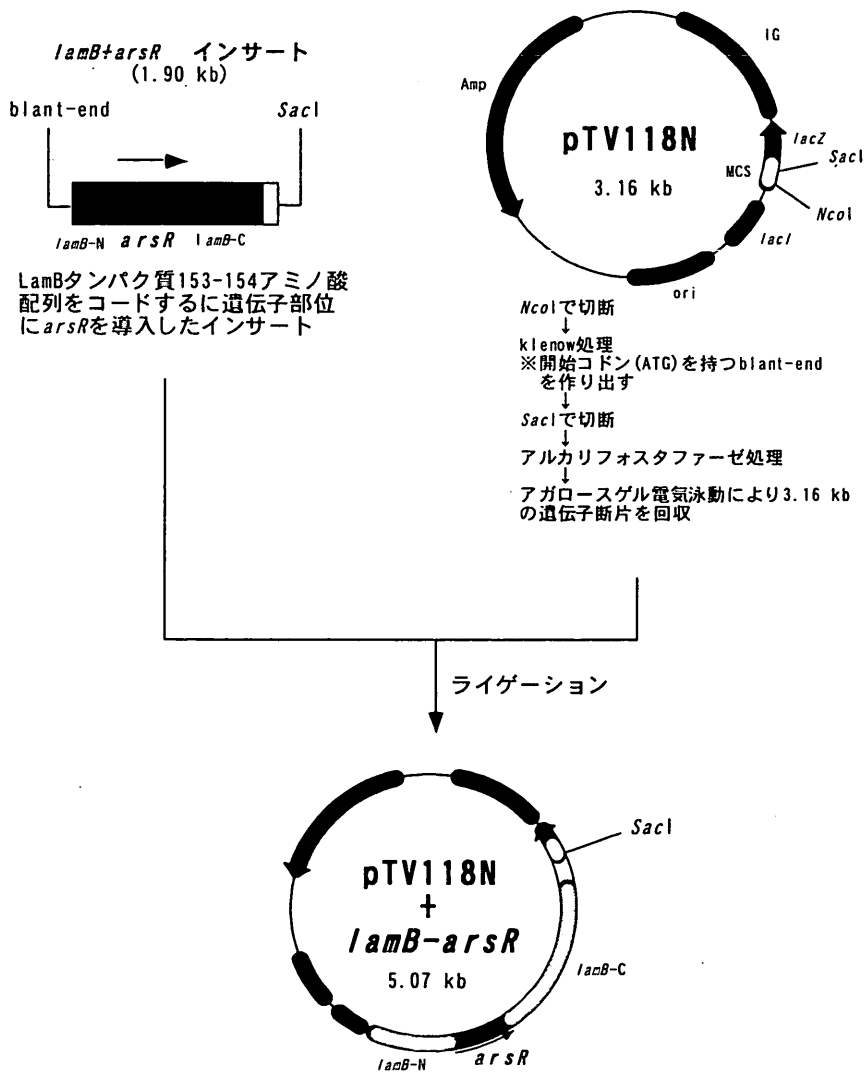


図-4 pTV118N+*lamB-arsR* の構築

3-1-2 実験方法

細胞表面工学をもとに、遺伝子工学を駆使し、*E. coli* 細胞表面に *ArsR* リプレッサータンパク質を導入した。細胞表面に作り出した *lamB-arsR* 融合タンパク質と *lamB* タンパク質の培養液にヒ素を添加し、その除去能を評価した。本研究では pTV ベクターを適用した組換え体についてヒ素除去を行い、コントロール（菌無し）、pTV+*lamB* と TV+*lamB-arsR*、pTV+*lamB-His taggedarsR* の4つを比較した。

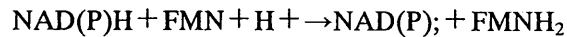
3-2 ヒ素発光バイオセンサー

3-2-1 発光バイオセンサーの原理²⁾

実験には、Kado 研究室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 *lux C, D, B, E* がコードされている。

lux C, D, E はアルデヒドを合成する脂肪酸リグターゼをコードしており、*lux* オペロンは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、発光酵素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、図-5 のようなサイクルで進行すると考えられている。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。¹²⁾¹³⁾

(1) フラビン還元酵素



(2) ルシフェラーゼ（光生産）

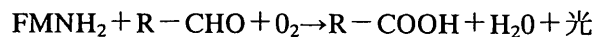


図-5 原核生物の発光反応

この *lux C, D, B, E* の上流に *E. coli* DH5 α から回収した *arsR* 遺伝子と *arsR* オペロンのオペレーター・プロモーターを導入した pUCD615 + *ars* O.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。*lux C, 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* 遺伝子の転写がはじまり、ルシフェラーゼ発光する。このプラスミドで *E. coli* DH5 α 形質転換した。

(図-6)

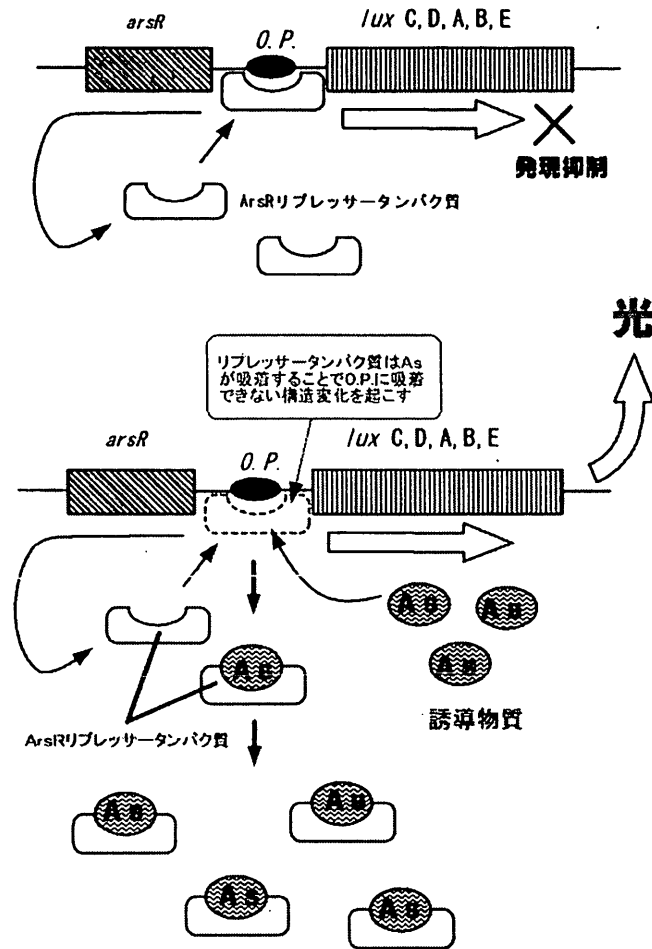


図-6 ヒ素発光センサーの原理

3-2-2 実験方法

(1) ヒ素発光センサー

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した。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 を植菌した。30 □のインキュベーターで浸とう培養し、培養液の吸光度 OD₆₀₀ が 0.2 になるまで培養し、各濃度の 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発光強度(RLU)を測定した。

4. 結果・考察

4-1 細胞表面工学による結果

(1) ヒ素吸着による菌体の沈降

30℃で培養した組換え体の培養液を 13 ml 容プラスチックチューブに分注し、の終濃度が 0.5 mg/l となるように 5 価ヒ素を添加した。この培養液を 4℃で 48 時間静置し、様子を確認したところ pTV+lamb に比べ pTV+lamb-arsR の培養液で菌体が多く沈降していることが確認された。これは、pTV+lamb に比べ、pTV+lamb-arsR の細胞表面層に作り出された ArsR リプレッサータンパク質に 5 価ヒ素が吸着し、比重が重くなったことで沈降したと考えられる。(図-7)

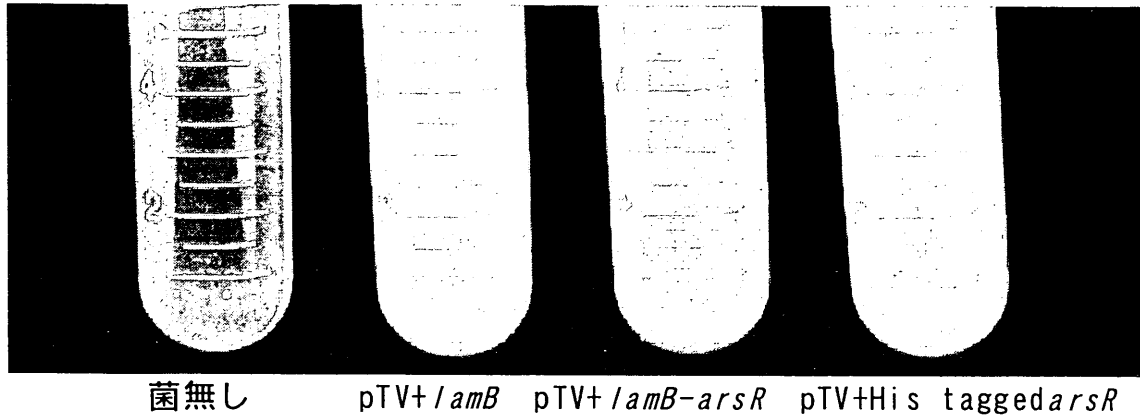


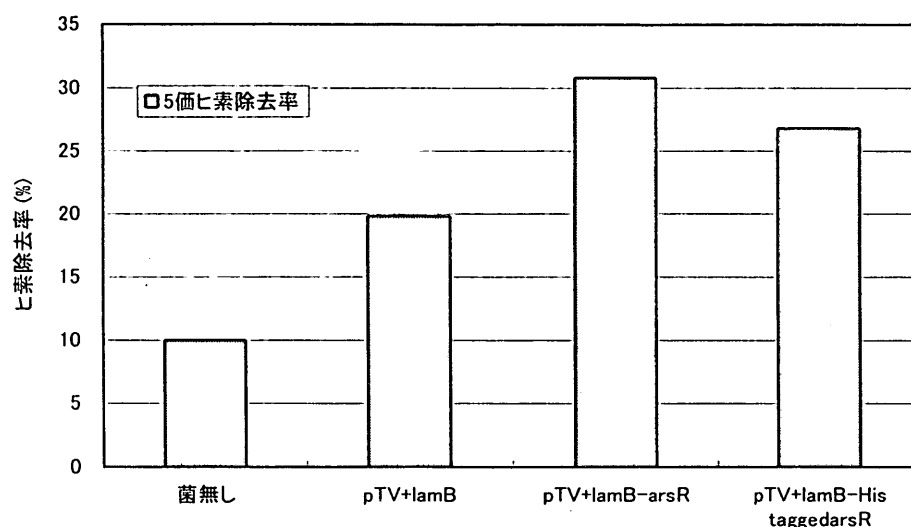
図-7 ヒ素吸着による大腸菌の沈降

(2) ヒ素除去量の測定結果

pTV+lamb-arsR でヒ素除去量を表-1、ヒ素除去率を図-8に示す。表-1から、pTV+lamb では 0.99 μg 、pTV+lamb-arsR では 1.54 μg 、pTV+lamb-His taggedarsR では 1.343 μg のヒ素が除去できた。pTV+lamb-arsR の方が pTV+lamb より 0.55 μg 多く、pTV+lamb-His taggedarsR より 0.197 μg 多く除去ができた。pTV+lamb-arsR と pTV+lamb-His taggedarsR を比較し、pTV+lamb-His taggedarsR で除去量が落ちた理由として、His tag を導入することで、ArsR リプレッサータンパク質の立体構造が変化したためと考えられる。図-8 から、最もヒ素が除去できた pTV+lamb-arsR では約 30 % のヒ素が除去の確認ができた。

表-1 5価ヒ素除去量

	初期濃度	除去後濃度	除去率	除去量
		(mg/l)	%	(μg)
菌無し	0.5	0.450	10.0	0.500
pTV+lamb	0.5	0.401	19.8	0.990
pTV+lamb-arsR	0.5	0.346	30.8	1.540
pTV+lamb-His taggedarsR	0.5	0.366	26.8	1.343



図－8 5 価ヒ素除去率

4-2 5 価ヒ素と 3 価ヒ素のヒ素発光センサーにおける発光特性の比較

4-2-1 ヒ素発光センサーに関する結果

(1) 全体

3 価ヒ素を添加して 2 時間目の発光量を測定したところ、 $1 \mu\text{g/l} \sim 1 \text{mg/l}$ の濃度範囲で定量性が確認できた。 $10 \text{ng/l} \sim 100 \text{ng/l}$ の低濃度時においてもヒ素による発光の検出が可能であり、定性的検出限界は 10ng/l 以上であった。5 価と 3 価のヒ素濃度 1mg/l で発光量および最大発光時間が訪れる時間を比較した。3 価ヒ素は急激な山型のグラフ形を取り 1 時間 30 分に最大発光強度が訪れ、5 価ヒ素では緩やかな山型を取りながら約 4 時間で最大発光強度が現れた。また、5 価と 3 価の最大発光強度を各種濃度別に比較するとすべての濃度において 3 価ヒ素の方が高い発光を示した。

(2) 発光時間の比較

5 価ヒ素と 3 価ヒ素を添加し 30°C の温度条件で培養した培養液の最大発光強度に到達する時間を比較したグラフを図-9 に示す。同図より、5 価ヒ素と 3 価ヒ素は 1mg/l までのヒ素濃度で最大発光強度に到達する時間が速くなるが、 10mg/l の高濃度ヒ素になると、逆に時間が遅くなることが確認された。これは 3 価ヒ素の方がより顕著である。5 価ヒ素は発光時間が 3.5~5 時間の間に収まり比較的安定していることに対し、3 価ヒ素では 1 時間~6 時間とピークが訪れる時間に幅があることが確認された。これは、ヒ素の生体内への膜輸送の差異による差であると考察される。これについては、後述する。また、5 価ヒ素において、 $1 \sim 100 \mu\text{g/l}$ までの濃度はヒ素を添加しないバックグラウンドとの発光強度に差異を確認することはできなかった。しかし、発光時間で比較すると濃度が濃いほどピーク時間が短くなることが確認された。理由として、ヒ素が ArsR リプレッサータンパク質に働きかけることにより、発光時間が早くなったと考えられる。

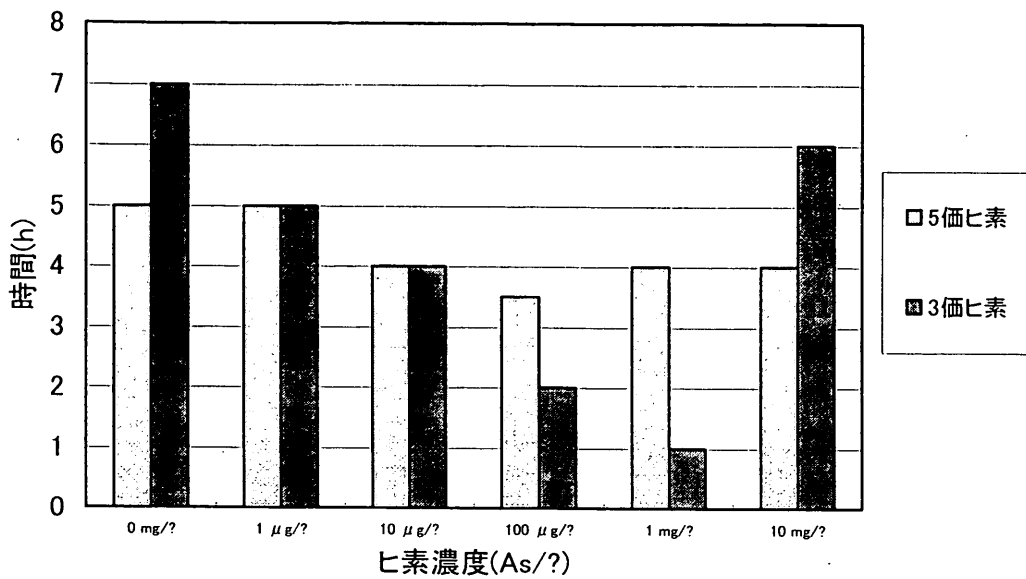


図-9 5価ヒ素と3価ヒ素の最大発光時間の比較

(2) 発光強度の比較

図-10に3価ヒ素と5価ヒ素の最大発光強度を示す。5価ヒ素と3価ヒ素では10 μg/l以上の濃度において、3価ヒ素のほうが強い発光を示すことが確認された。発光強度の違いは10 μg/lから大きく現れ100 μg/lでは3価ヒ素に5価ヒ素の約100倍もの強い発光強度が検出された。

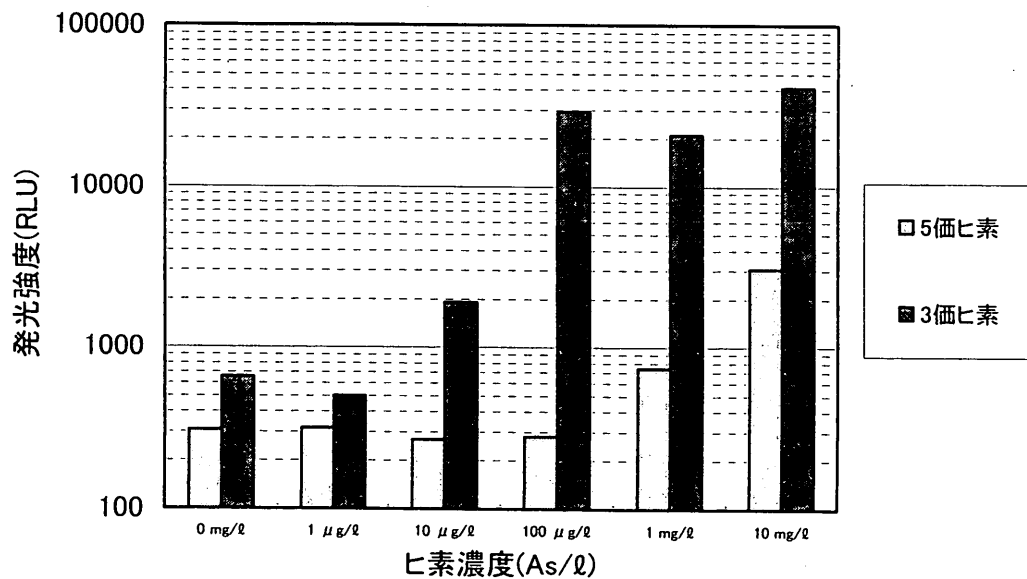


図-10 5価ヒ素と3価ヒ素の最大発光強度比較

4-2-2 ヒ素の膜輸送に関する仮説

5価ヒ素と3価ヒ素で発光時間が異なって原因がヒ素の膜輸送に関係すると考え、以下の仮説を立てて考察した。

同じヒ素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現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、大腸菌のヒ素輸送に係わる2つの仮説を立てた。1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取り込むのではなく、不必要な重金属も認識し、生体内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と考察した。(図-11) 2つ目は、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、変性される働きがある。そのため、3価ヒ素が吸着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に導入されたと考えられる。(図-12)

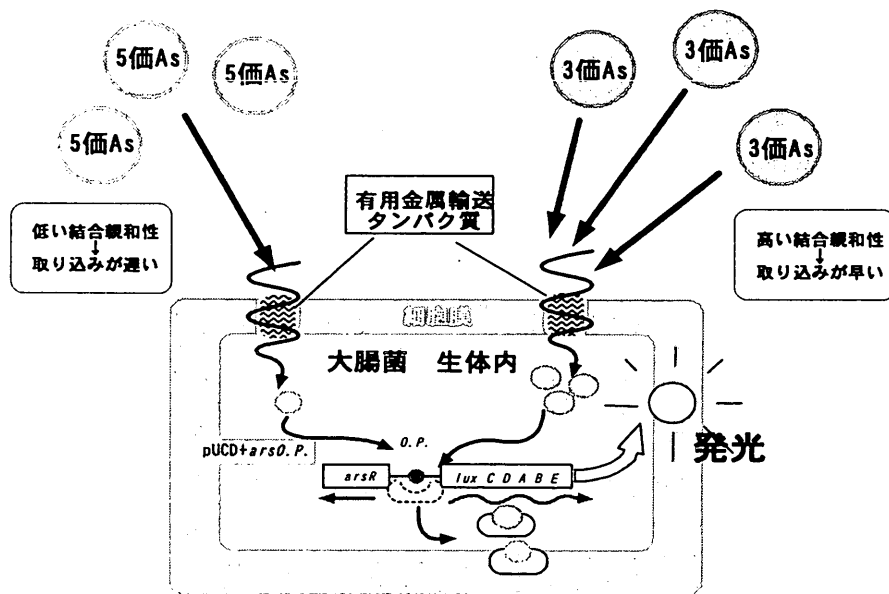


図-11 有用金属輸送タンパク質の誤認識によるヒ素導入メカニズム

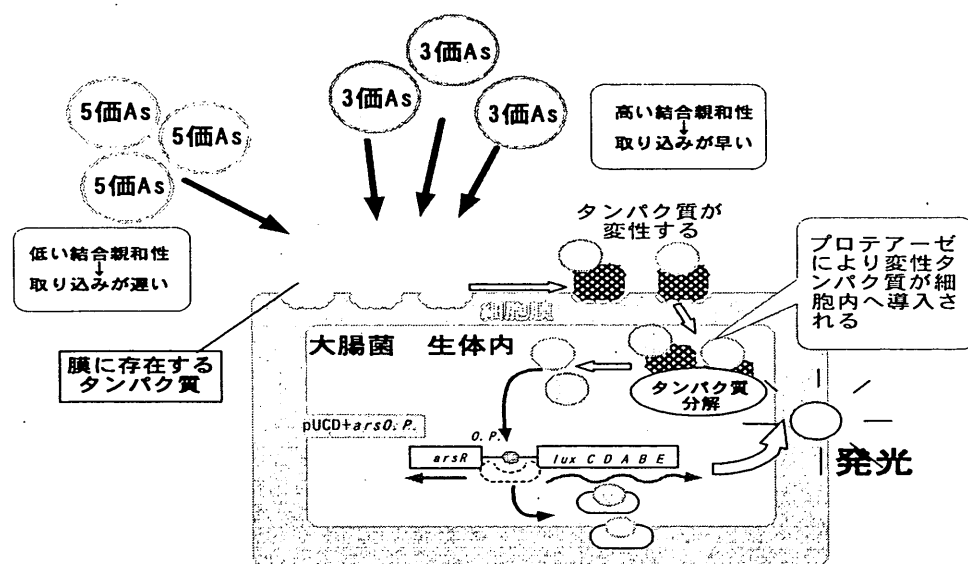


図-12 プロテアーゼ機構によるヒ素導入メカニズム

4-2-3 既存の生物ヒ素センサーとの比較

本研究以外にも *arsR* を用いた生物ヒ素センサーが3件開発されている。

Tauriainen S¹⁴⁾ が開発した生物ヒ素センサーは *S.aureus*(ブドウ球菌)由来の *arsR* を用いてホタル由来の *lucFF* の発光遺伝子を制御する系である。定量限界については、Tauriainen S らの組換え体は5価が4.58 mg/lで3価が353.8 μg/lであった。本研究の定量限界は5価が1 mg/lでTauriainen Sらと同程度であるが、3価は10 μg/lで本研究の方が1オーダー優れた検出限界であることが確認された。

Scott¹⁵⁾ の開発した生物ヒ素センサーはβ-ガラクトシダーゼを *ArsR* リプレッサータンパク質により制御した系である。本研究と同様に *ArsR* は5価ヒ素に対する反応性は3価ヒ素に対して劣っている。

Cai¹⁶⁾ の開発した生物ヒ素センサーは大腸菌由来の *ars* オペロンを *arsR*、*O.P.*領域を含ませた *arsB* に *luxA,B* を融合させる系である。5価ヒ素に対する定量限界が10 μg/lであることから5価ヒ素に関しては本研究より感度が優れているが、3価ヒ素に関する知見は得られていない。

価数の異なるヒ素を添加した際に生物内の輸送時間を追うことが出来るのは本研究で構築した *pUCD615+arsO.P.*のみである。

4-3 その他の検討事項

椰子繊維などの身近な物質のヒ素吸着能、植物吸収能、またバン格拉ディシュにおける衛生教育の必要性については次節の成果に要約して記載する。

5. 本研究により得られた成果

(1) 細胞表層工学によるヒ素除去方法

ArsR リプレッサータンパク質はヒ素と特異的に結合すると考えられる。大腸菌の細胞表層の最

外層を構築する LamB タンパク質には機能を付加したいタンパク質を組み込んでも膜構成に悪影響を与えず、細胞内から外界に突出している部位（アミノ酸 153-154）があることが知られている。アミノ酸 153-154 を構築する *lamB* 遺伝子に *arsR* 遺伝子を組み込み、いくつかの *lamB-arsR* キメラ遺伝子を作成した。

検討の結果、*pTV+lamB-arsR* と *pTV+lamB* の除去量を比較すると *lamB-arsR* でより多くのヒ素が除去できた。最もヒ素が除去できた *pTV+lamB-arsR* では 0.5 mg/l のヒ素濃度の培養液で最大 1.54 μ g のヒ素除去が確認された。

(2) ヒ素発光センサーの開発

供試プラスミド *pUCD615* にはルシフェラーゼ発光を示す *lux* オペロン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ダ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。この *lux* オペロンの上流に大腸菌から回収した *arsR* 遺伝子と *ars* オペロンの *O/P* 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、誘導物質のヒ素が添加されると *lux* 遺伝子の転写が始まり、発光反応する。

実験の結果、3 価ヒ素濃度 1 μ g/l ~ 1 mg/l で定量性が確認され、現在、水道試験方法で用いられるジエチルジチオカルバミン酸銀吸光光度法の定量限界と同等以上の検出感度を得ることができた。また、5 価と 3 価のヒ素測定では、発光パターンに違いがみられ、すべての濃度において 3 価ヒ素の方が高く、かつ速く発光することが分かった。このことより、5 価と 3 価のヒ素濃度を同時に測定できる可能性が示唆された。

また、3 価ヒ素と 5 価ヒ素の発光時間、発光量を比較することで 3 価ヒ素が大量にかつ 5 価より早く細胞内へ取り込まれる膜輸送の機構に関する仮定を提案した。対象の仮定は、3 価が膜タンパク質に非特異的に結合する説、プロテアーゼ作用によるヒ素導入説、ArsB タンパク質によるヒ素代謝機構説である。

(3) 植物のヒ素吸収能

現地において入手可能な素材のヒ素吸着能力を調べた結果、加工しない椰子繊維とシュロ竹の毛での吸着能が卓越していた。また、ファイトリメディエーションとして現地でよく見かけるシダ植物のタニワタリのヒ素吸収量が多かった。

(4) 衛生教育と社会性

バングラディッシュの衛生状況は；・衛生観念の重要性についての教育および意識の欠乏、・水道施設に関する立案、政策のための政府組織、民間組織、増資者組織、衛生支援活動（WSS）間の調整と協力の不足、・WSS 設備需給の欠乏、・不適切な資金運用と貧弱な経済ステータス、・適正なテクノロジー不足、・既存の技術についての理解の不足、・モニタリングシステムの評価能力不足、・適切なトレーニングと教育プログラムの不足、・NGO、政府やその他の組織からの支援不足、・女性に与えられた権限不足などである。¹⁸⁾ とくに、バングラディッシュではコミュニティ・リーダーの支配力が強く、指導者（多くは地主）あるいは家長（男性）の意見に従わねばならない。高学歴でも家族計画性のない男社会である。この現状を打開しなければ女性の進出と社会開発は望めないと結論した。¹⁹⁾

6. 引用文献

- 1) 米田悦啓、中野明彦共編：細胞内物質輸送のダイナミズム、シュプリンガー・フェアラーク東京
- 2) 辻 聰：分子進化工学的手法による臭気バイオセンサーに関する研究、東北学院大学修士論文、1997.
- 3) 高 潤、茂地寿頼他：アミラーゼ細胞表層・分泌発現酵母を用いた無蒸煮デンプンからのエタノール発光、日本生物工学会講演概要集、pp.125, 2002.
- 4) Sauge-Merle S.*et al*:Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase., *Appl. Environ Microbiol.*, Vol.69, 1, pp.490-494(2003)
- 5) Bae W.,*et al*:Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin., *Biotechnol Bioeng.*, Vol.70, 5, pp.518-524, 2000.
- 6) Carolia sousa; metalloadsorption by escherichia coil cells displaying Yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein lamB, *Journal of Bacteriology*, Vol.180, pp.2280-2284, 1998.
- 7) 伊藤淑子、丹野 幸：ヒ素耐性菌の分類・同定とヒ素耐性遺伝子に関する研究、東北学院大学卒業論文、2000.
- 8) 大友公房、伊藤 実：ヒ素除去のための細胞表層工学およびヒスチジン吸着法の検討、東北学院大学卒業論文、2001.
- 9) 植田充美、田中渥夫：細胞表層工学による新育種法の開発、日本農芸化学会公演概要集、Mar. 73 巻臨時増刊号、1999.
- 10) 大友公房、及川栄作、石橋良信：微生物学的ヒ素除去としての細胞表層工学の適用、東北学院大学環境防災工学研究所紀要、pp.39-47, 2003.
- 11) Alain Charbit; probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface, *The EMBO Journal*, Vol.5, no.11, pp.3029-3037, (1986)
- 12) 広岡 卓、Shaw J.J.and Kado C.I：植物病理学における生物発光の利用、植物防疫、Vol.42,No.10,pp1-6, 1988.
- 13) 小堀俊郎、田之倉優：発光細菌 *Vibro fischeri* のフラビン還元酵素の結晶構造、構造生物、Vol.5 No.1, 1999.
- 14) Tauriainen S,Karp M,Chang W,Virta M:Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite., *Appl Environ Microbiol.*, Vol.63, pp.4456-4461, 1997.
- 15) Scott DL, Ramanathan S,Shi W、Rosen BP, Daunert S:Genetically engineered bacteria : electrochemikalsensing systems for antimonite and arsenite., *Anal Chem.*, Vol.69, pp.16-20, 1997.
- 16) Cai J, DuBow MS : Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate(CCA)., *Biodegradation.*, Vol.8, pp.105-111, 1997.
- 17) Ishibashi Y., Yuemei Y., Luxmy B. S. and Soma D. : Present Situation on Water Supply and Sanitation and the Necessity of Hygiene Education in Developing Countries, *Environmental Systems information Center, Asian Institute of Technology*, 1998.
- 18) 岩本直美 (日本キリスト教海外医療協力会) : Private Communication

7. 国際共同研究等の状況

調査研究初期には、ラシャヒ大学 M. Hamidur Rahman 教授、バングラディシュ工科大学 M. Ferose Ahmed 教授、Public Health Engineering Department (PHDE) Mr. Md.Nurulislam Khan との交流のもとで遂行した。

衛生も宇内に関しては、バングラディシュでの医療活動を行っている岩本直美氏（日本キリスト教海外医療協力会）から情報を得ている。

今後の活動として、元東北大学災害制御研究センター研究員 Dr. Wahiduzzaman と一緒に、災害ポテンシャル研究分野真野 明教授との共同研究を計画している。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表（学術書・書籍）

<学術誌（査読あり）>

なし

<学術誌（査読なし）>

- ①及川栄作、梅津 洋、石橋良信「バイオによりかび臭を光や色で表す方法について」東北学院大学環境防災工学研究所紀要、第 13 号、pp.36-45（2002）
- ②大友公房、及川栄作、石橋良信「微生物学的ヒ素除去としての細胞表層工学の適用」東北学院大学環境防災工学研究所紀要、第 14 号、pp.39-47、（2003）

<書籍>

- ①Yoshinobu Ishibashi, Yu Yuemei, Begum Shaila Luxmy znd dor Soma 「The Present Situation of Water Supply and Sanitaion and the Necessity of Hygienic Education in Developing Countries」Environmental Systems Information Center, Asian Institute of Technology, No.44/45（1998）

<報告書類等>

- ①本プロジェクト報告 真柄泰基、亀井 翼、石橋良信、佐藤裕子他「バングラディシュヒ素中毒汚染問題・調査報告書」（1998）

(2) 口頭発表

- ①及川栄作、梅津 洋、石橋良信「バイオによりかび臭を光や色で表す方法について」東北学院大学環境防災工学研究所発表会（2001）
- ②大友公房、及川栄作、石橋良信「ArsR タンパク質を細胞表層に導入した組換え大腸菌によるヒ素除去法の検討」平成 13 年度土木学会東北支部技術研究発表会、pp.726-727（2002）
- ③大友公房、及川栄作、石橋良信「微生物学的ヒ素除去としての細胞表層工学の適用」東北学院大学環境防災工学研究所発表会（2002）
- ④大友公房、及川栄作、石橋良信「細胞表層工学を適用したヒ素除去法の検討」土木学会第 57 回年次学術講演会、VII-279, 557-558（2002）

⑤大友公房、及川栄作、石橋良信「発光型ヒ素センサー」平成 14 年度土木学会東北支部技術研究発表会、pp.778-779 (2003)

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

今後、平成 15 年度から文部科学省科学研究費の海外学術調査「バングラディッシュのヒ素溶出機構と地下水塩分濃度の相互作用」(課題番号 15404005) により引き続き調査することになっており、地下水の水理を踏まえてヒ素溶出と塩害調査、またタンパク工学を適用したセンサーやヒ素除去方法等を確立していく予定である。