

水銀汚染環境モニタリングのためのバイオテクノロジー

清野正子¹⁾ 坂部 貢¹⁾ 芳生秀光²⁾

1) 北里大学薬学部公衆衛生学教室

2) 摂南大学薬学部衛生分析化学研究室

Construction of a new biotechnology for mercury monitoring

Masako Kiyono¹⁾ Kou Sakabe¹⁾ Hidemitsu Pan-Hou²⁾

1) Department of Public Health, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

2) Department of Analytical Chemistry in Hygiene, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University

Abstract

A new bacterial sensor for the detection of low concentration of mercury in environment was constructed by gene fusion between a *merR-o/p-merT* gene from pMR26 of *Pseudomonas* strain K-62 and a promoterless *luxAB* gene from *Vibrio harveyi*. The constructed biosensor was then evaluated for the selectivity and sensitivity of the detection of mercury. Cadmium, lead, chromium and zinc ions did not interfere with the assay even at same concentration compared to Hg^{2+} . Methylmercury and phenylmercury also did not affect the biosensor. These results reveal that the specificity of the construct is restricted to bioavailable Hg^{2+} . In optimized conditions, the detection threshold of this biosensor was 2 pM with 1 ml sample. This detection limit is enough to detect Hg^{2+} in many contaminated and some pristine environmental samples.

《Key words》 Bioluminescence, *merR*, *merT*, *luxAB*, mercury, mercury biosensor

I. はじめに

石油、化石燃料あるいは鉱石などに封じ込められていた微量金属化合物が、近代化学工業の発展に伴う資源の濫掘と濫用により加速度的に生活環境に放出されている。その結果、それらによる環境汚染およびヒト健康への悪影響が懸念されてい

る。しかも極微量で強力な生理作用を有するこれら無機金属化合物が生体自身の関与により、さらに毒性の高い有機金属化合物に変換されることが既に明らかにされている。このことから、微量金属化合物による環境汚染はわれわれにとって重要な問題である。

別刷請求宛先：清野正子

〒108-8641 港区白金5-9-1 北里大学薬学部公衆衛生学教室

Reprint Requests to Masako Kiyono, Department of Public Health, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641 Japan

水銀化合物は極微量で生体成分、特にタンパク質のSH基と極めて容易に反応し、これと結合することによってその機能を妨げる性質を有するため、現在、その使用と廃棄に対して厳しく規制がなされている。しかし、近年のIT革命や化石燃料の消費や医療行為などの人間の社会活動により、微量ながらも水銀化合物が持続的に環境に排出され続けている。現在、わが国や先進国における水銀化合物の汚染問題は、すでに水俣地区等で代表されるような高濃度で局所的な汚染の段階から、微量ではあるが長期間にわたり汚染されることによる人体への影響が問題とされる段階へと進んできている。微量水銀の有効な除去方法がない現状では、生活環境に蓄積された水銀化合物の量は、低濃度ながらも増加するだけでなく、その汚染が広範囲に及んでいる。この状態のまま放置すると、水銀による環境汚染はさらに拡大し、わが国が経験した水銀公害で再度苦しむことが危惧される。このような状況下、環境中の水銀化合物の安全かつ有効な浄化法および水銀汚染を監視するための簡便な水銀検出法の開発が待ち望まれている。本稿では、まず、水銀利用のされ方を用途別に紹介し、国内外の水銀汚染の現状について簡単に述べる。また、汚染に対する法的規制や浄化技術の現状にふれる。次に、廃液中または環境に放出される水銀化合物の検出法についての筆者らがこれまで行った研究を簡単に紹介する。

II. 水銀の用途と汚染の現状

水銀化合物は、有用な化学的・物理的性質をもつため古くから利用されてきた。近代産業の発達に伴い水銀の用途は、医薬品、農薬、生活必需品や化学触媒などとしてさらに広がった。図1に示すように、水銀化合物の使用例を用途別に簡単に述べる。医薬品として用いられた水銀化合物の中には、時代の変遷に伴って盛衰があった。過去に汎用された水銀製剤の例をあげると、抗スピロヘータ剤（駆梅剤）として黄色酸化水銀、外用殺菌消毒剤として塩化第二水銀、マーキュロクロム、チメロサルや酢酸フェニル水銀などが使用された。これらのほとんどは毒性が強いために医薬品とし

て使用されなくなったが、現在でもチメロサルは一部のワクチンの防腐剤として使用されている。また、国内外の歯科医療活動において現在でも水銀アマルガムが使用されている。次に、農薬としての利用例としては、戦後間もない時期の稲イモチ病予防のために用いられた酢酸フェニル水銀があげられる。農薬としての酢酸フェニル水銀の使用量は膨大で、1968年にその使用が中止されるまでの間、約2300トンの水銀農薬が狭いわが国土に散布された。一方、生活必需品の使用例としては、乾電池、水銀灯、蛍光灯、体温計などがあげられる。これらは現在でも使用されており、誤飲や廃棄する際のゴミの分別には注意を要する。化学工業での化学触媒としての使用例としては、アセトアルデヒド製造過程で使用された硫酸水銀があげられる。その製造過程で副生したメチル水銀が水俣病の原因物質であることは周知の事実である。1932年から1971年頃まで水俣湾には約80トンに及ぶ水銀化合物が投棄され、その結果、数十年間周辺住民に多大の苦痛を与えたことは記憶に新しい。水俣湾内の水銀含有ヘドロは、その後、多額の費用をかけて埋め立てられたが、現在、埋め立てられた地区からの水銀流出が懸念されている。同様の水銀公害は阿賀野川流域でも起こった。わが国の悲劇が教訓として生かされず、水俣湾と同様の水銀汚染が世界各地で起こっていた。中国貴州省貴陽地方では1971年から2000年までの約30年の間に、約130トンに及ぶ水銀化合物が投棄された¹⁾。中国以外にも、ブラジル、ロシア、タンザニア、東南アジア地域などでは、金の採掘・工場排水等による高濃度の水銀化合物による環境汚染が依然として進行しており、わが国の悲劇が繰り返されようとしている。

以上のように国内外を問わず、水銀農薬の濫用あるいは化学工業で使われた水銀化合物の廃棄・漏出により、土壌・地下水などの生活環境が汚染された地域は多数存在する。環境中に放出された水銀化合物の安全かつ有効な浄化法およびその汚染を監視するための簡便な水銀の検出法の開発は全世界的な要望である。

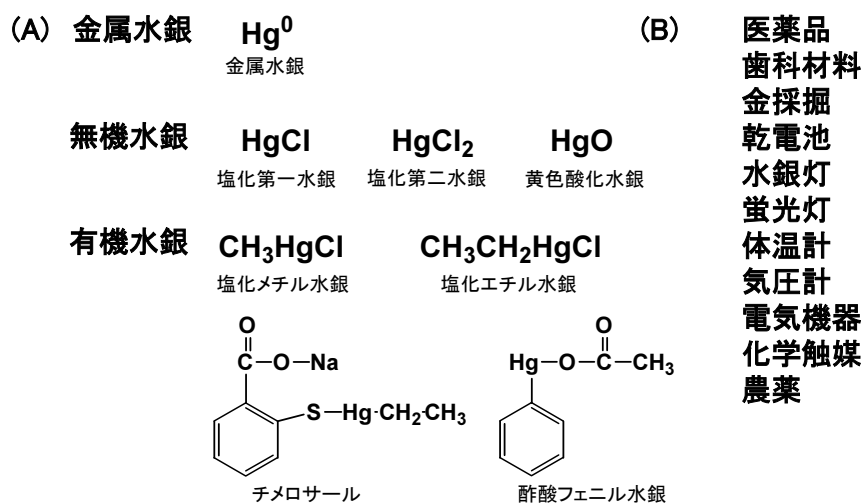


図1 水銀化合物の構造 (A) と用途 (B)

Ⅲ. 汚染に対する法規制と浄化技術

1. 汚染に対する法規制

米国では1980年に環境資源に対する包括的な補償と義務に関する、通称、スーパーファンド法が施行されたのをきっかけに土壌・地下水汚染の修復・浄化ビジネスが活発になった。その規模は1996年には61億ドルにも昇っている。わが国では土壌汚染対策法が2003年5月に施行された。この法律は、過去の汚染への対策を目的とし、汚染原因者よりも土地所有者に措置義務責任を負わせるという特徴をもつ。土壌対策防止法は、水質汚濁防止法で唱われる水質汚染の未然防止を目的とするのに対し、過去に汚染された土壌による人の健康被害を防止することを目的とする法律である。有害物質を取り扱った履歴のある工場跡地を有効に利用するためには、土壌環境における有害物質の除去が経済的な問題としても、また健康被害対策の問題としても、今後ますます重要性を増すものと思われる。

2. 浄化技術の現状

水銀を含む重金属汚染土壌は、従来掘削除去・良質土による置換（客土）、除去した土壌の固形化・不溶化処理（中間処理）、さらに処理土壌の最終処分場での埋め立て処分という流れでほとんど対応されてきたのが実態である。原位置におい

て、不溶化あるいは固形化処理の後に封じ込める方法を施されることは少なく、むしろ掘削・搬出・客土などの処理が非常に多い。その主な理由としては、有害物質を効率的に除去する方法が未整備であること、また原位置で固形化・不溶化後に封じ込める方法を取ったとした場合には、汚染物質が原位置に存在し続けるために、半永久的なモニタリングが必要であることがあげられる²⁾。上記の方法の他、オンサイトの浄化法としては、熱脱着法や土壌洗浄法などの方法があげられる。熱脱着法は汚染土壌を加熱することにより、土壌から水銀を含む重金属を脱着・分離する技術である³⁾。一方、土壌洗浄法は、土壌を機械的に洗浄して有害物質を除去する方法である⁴⁾。これらの方法を施す際に処理途中で汚染物質が再度環境中に放出していないかどうかを常にモニタリングする必要がある。

以上述べた物理化学的な処理法を用いて、水銀等の重金属を環境基準値以下にまで処理することは困難である上、莫大な費用を要する。このような状況の中で、経済的かつ効率的な微量有害重金属の浄化を行うためには、従来の物理化学的な処理法よりも生物活性を利用したバイオレメディエーション法の方が適していると考えられる。

IV. バイオレメディエーションとは

近年、金属などの化学物質汚染の浄化にバイオレメディエーション技術が特に注目されている。バイオレメディエーションとは、一般に、生物機能を活用して汚染環境を修復する技術である。この技術は、手ごろなコストで環境汚染を浄化できる、また、物理化学的処理では対応が困難な比較的低濃度で広範囲な汚染に対して有効だという特徴をもつ。

水銀のバイオレメディエーション法は大きく分けて二つに分類される。一つは、水銀のバイオボライゼーションに基づく方法であり、もう一つは水銀のバイオアキュミュレーションを利用する方法である。われわれはこれまでに水銀のバイオアキュミュレーションに基づく新規な水銀浄化法の開発を行ってきた。その詳細についてはファルマシア⁵⁾(39: 841-845; 2003) および環境バイオテクノロジー⁶⁾(2: 95-102; 2003)を参照されたい。

さて、環境に放出された水銀化合物による環境リスクや健康障害を未然に防止するためには、環境中の水銀量を早期に把握することが重要である。そのためには、簡便かつ高感度で水銀化合物を検出・測定できる水銀バイオセンサーの開発が望まれる。

以下は筆者らが開発した水銀モニタリング法の結果について述べる。

V. 水銀バイオセンサーの開発

1. はじめに

バイオセンサーには従来の物理化学的な方法と比較すると、煩雑な試料の前処理を必要とせず、さらにその汚染物質の中で人体などの生物に摂取可能であり、さらに、生物に対して生理作用を示すバイオアベイラブルな数量として検出できるという利点をもつ。バイオセンサーの中で歴史が古く、かつ多用されているものは、酵素センサーである。酵素センサーの一つであるグルコースセンサーは多くの医療の現場で実際に使用されている。しかし、酵素は一般に高価であり、常温で不安定なものが多いため利用しにくい面がある。一方、

酵素の起源である生体、特に微生物をセンサーの識別素子として利用する微生物センサーが近年注目されるようになってきた。微生物を用いる利点としては、①微生物が自発的に増殖するので経済的であること、②寿命が酵素より長く、機能面での安定性が高いこと、③菌体内の複数の酵素反応系、補酵素の再生系が利用できることがあげられる。しかし、このような利点がある反面、微生物は一般に多種類の化学物質をエネルギー源として利用する(資化する)ため、基質特異性や選択性が悪いという欠点がある。そこで、筆者らは、水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62の水銀耐性遺伝子の一部を利用して、基質特異性と検出感度がともに高い水銀バイオセンサーの開発を試みた。

2. 水銀バイオセンサーの構築に用いる遺伝子の探索について

水銀化合物は一般に微生物に対し強い殺菌力を持っており、ある特定の環境においてはしばしば水銀濃度が微生物を死に至らしめる程のレベルにまで増加することがある。しかし、その環境には水銀の毒性に耐え抜いた耐性菌が存在する。

1968年に外村らは、水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62の水銀耐性機序は水銀の還元・気化反応によるものであることを報告した⁷⁾。本菌株は無機水銀のみならず、メチル水銀をはじめとする多種類の有機水銀に対しても強い耐性を有した。本菌株の有機水銀耐性は有機水銀を無機水銀に分解するリアーゼおよび無機水銀を金属水銀に還元するレダクターゼの2つの酵素系の働きにより獲得されていることが報告されていた^{8, 9)}。このように水銀耐性獲得の生化学的機序は一早く解析されたにも拘わらず、その遺伝学的研究は行われていなかった。筆者らは、本菌株のもつ水銀代謝能を利用した水銀汚染地域の浄化および水銀バイオセンサーの構築を目指して、まず、本菌株の水銀耐性遺伝子の解析を行った。その結果、本菌株の水銀耐性は、プラスミド pMR26により支配されていることが判明した¹⁰⁾。また、pMR26上の水銀耐性遺伝子の機能を解析した結果、図2 Aに示すように、菌体内に取り込まれた有機水銀が MerB (リアーゼ) および MerA (レダクターゼ) の作

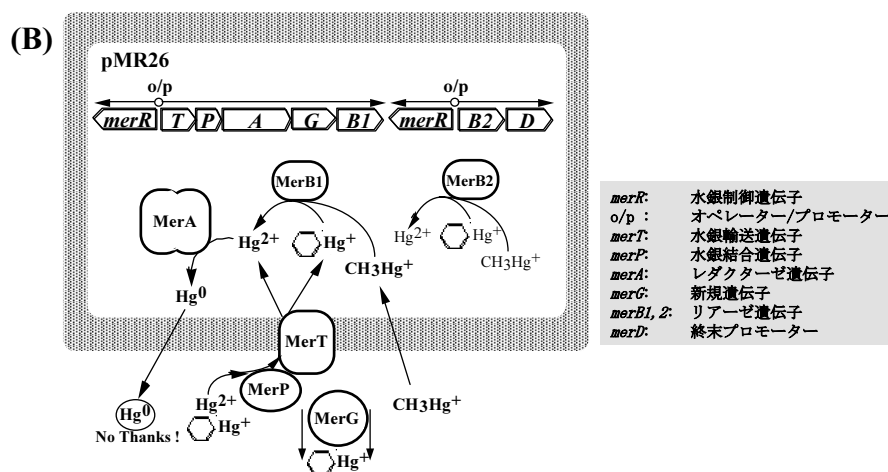
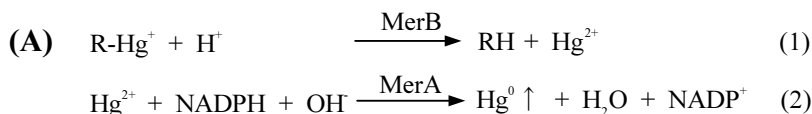


図2 *Pseudomonas* K-62の水銀耐性機構

用によって、最終的に Hg^0 となって菌体外へ放出されることで、有機水銀耐性を獲得していることが判明した。また、pMR26上の水銀耐性遺伝子を検索した結果、図2 Bに示すように、有機水銀の分解を司る二組の水銀耐性オペロン (*mer* operon) から構成されることが判明した^{11,12)}。本菌株の *mer* operon は、*mer* operon の発現を制御する制御遺伝子 (*merR*)、細胞間隙で水銀との結合に関与する遺伝子 (*merP*)、水銀の膜透過に関与する輸送遺伝子 (*merT*)、無機水銀を金属水銀へ還元するレダクターゼ遺伝子 (*merA*) および有機水銀を無機水銀へ変換するリアーゼ遺伝子 (*merB*) などから構成されていた^{11,12)}。

環境中の水銀化合物が微生物により解毒される場合、まず第一段階として水銀化合物を菌体内に取り込まれる必要がある。これまで *mer* operon 上の *merT-merP* 遺伝子が Hg^{2+} の取り込みに関与していることはすでに多くの水銀耐性菌において報告されている。しかし、有機水銀の菌体内への取り込みにおける MerT-MerP の関与については全く不明であった。そこで著者らは有機水銀の菌体内への取り込みについて検討した結果、

MerT-MerPは無機水銀だけでなくフェニル水銀の取り込み・輸送にも関与することなどを明らかにした^{13~15)}。この輸送系により菌体内に取り込まれた水銀は、図2に示すように、最終的に MerA により還元され、金属水銀に解毒される。この MerT の持つ水銀化合物の菌体内へ取り込む作用が、水銀バイオセンサーの高感度化に寄与できると考えた。また、MerR は微量の無機水銀を特異的に認識するタンパク質であり、無機水銀と結合することにより、*mer* operon 上に存在する構造遺伝子の転写を促している¹⁶⁾。したがって、基質特異性の高い水銀バイオセンサーを構築するためには *merR-o/p* 遺伝子は不可欠であると考えた。

3. 水銀バイオセンサーの特異性と感度

筆者らは、図3 Aに示すように、*P.K-62* の *mer* operon 由来の *merR-o/p-merT* の下流に、レポーターとして発光細菌由来のルシフェラーゼ遺伝子 (*lux* 遺伝子) を組換えたプラスミド (pQFT) を構築し、大腸菌に形質転換しセンサー微生物を分子育種した。レポーターアッセイの原理は図3 Bに示すように、光産生反応はアルデヒドがルシフェラーゼにより酸化されて蛍光と脂肪酸を産生する。

この蛍光発生量はルシフェラーゼ活性の強さに比例し、すなわち、菌体内で水銀耐性プロモーター活性を調節する水銀量に依存するので蛍光強度をルミノメータを用いて測定することによって、水銀量を知ることができる。これまでに *mer-lux* 系水銀バイオセンサーがすでにいくつか報告されていた。しかし、多くの場合その検出感度は nM レベルであり、比較的高濃度の水銀汚染に対しては有効ではあるが、微量の水銀検出には適用できない。そこで、筆者らはより高感度の水銀バイオセンサーを構築するために *merT* の利用を試みた。

pMQT をもつ大腸菌（センサー微生物）は表 1 に示すように、pQF70 をもつ対照菌よりも有意に水銀の取り込み量が上昇した。また、この MerT をもつセンサー微生物は Hg^{2+} に対して超感受性を示した。この超感受性は毒性の強い

Hg^{2+} が MerT により菌体内に積極的に取り込んだことに起因するものと考えられる。このように MerT をもたせることにより、菌体内で *mer* operon を活性化する水銀量が上昇し、水銀バイオセンサーの高感度に寄与できると期待された¹⁷⁾。

次に、水銀化合物をより高感度に検出するため、諸条件の検討を行った。まず、用いたセンサー微生物数について検討した結果、細胞数が 5×10^8 個で最も大きな発光量が観察された。次に水銀との共存時間について検討した結果、センサー微生物と Hg^{2+} の反応時間は 20~60 分程度が適当であり、これより短いと良好な発光は認められなかった¹⁷⁾。

以上の結果より得られた至適条件において、種々の重金属 (200 pM) に対する本センサーの応答性を検討した。図 4 A に示すように、 Hg^{2+} と同濃度のフェニル水銀またはメチル水銀を用いても、発光は全く認められなかった。また同様に、 Hg^{2+}

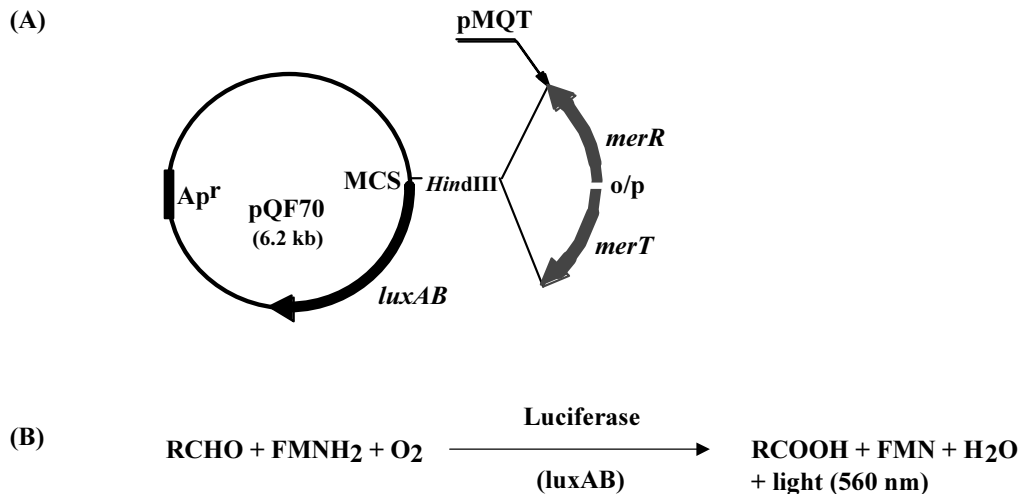


図 3 水銀バイオセンサーの構造 (A) と反応原理 (B)

表 1 *mer-lux* バイオセンサーの水銀の取り込みと水銀耐性

プラスミド	遺伝子型	取り込み量	阻止円
		nmol Hg/ 1×10^8 cells	mm
pQF70	<i>luxAB</i>	3.4 ± 0.15	18 ± 0.16
pMQT	<i>merR-o/p-T-luxAB</i>	5.5 ± 0.11	28 ± 0.33

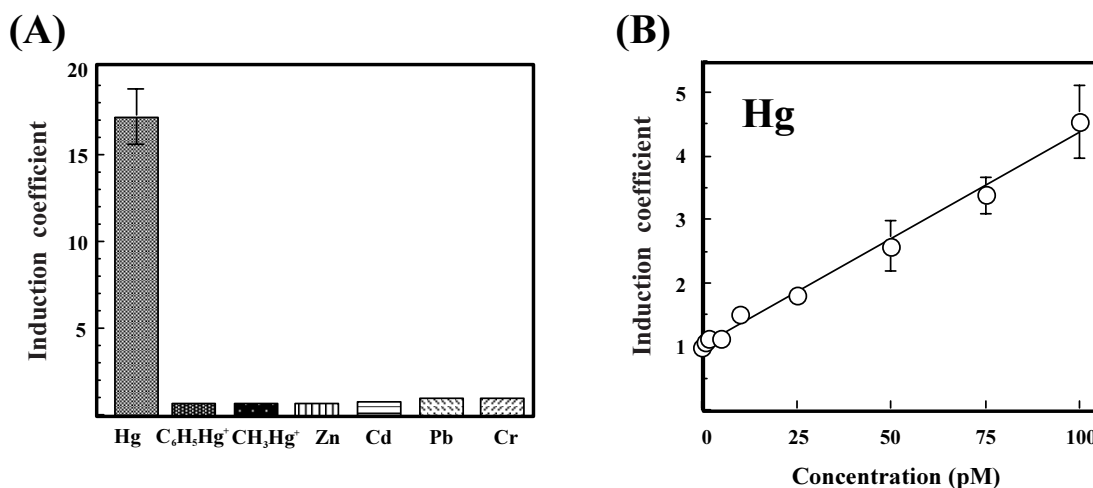


図4 水銀バイオセンサーの分子種特異性 (A) と検量線 (B)

と同濃度の Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} または Cr^{6+} に対しても本センサーは全く応答しなかった。この結果より、本バイオセンサーは Hg^{2+} に特異的に反応することが判明した¹⁷⁾。

次に、本バイオセンサーの検出感度について検討した結果を図4 Bに示した。 Hg^{2+} 濃度が100 pMまで、水銀濃度と発光量との間に直線関係を示した。また、 Hg^{2+} の検出限界は約5 pM (10 ppt)であった。試料水1 mL中に Hg^{2+} として1 pg存在すれば検出できる。現行の原子吸光度法による水銀化合物の検出限界はフレイムレス法で約1 nMである。従って、本バイオセンサーは、従来の物理化学的な方法に比べて約200倍高感度であるといえる¹⁷⁾。

以上の結果から、筆者らが開発した水銀バイオセンサーは、 Hg^{2+} の検出に非常に優れていることが明らかになった。しかしながら、本バイオセンサーは Hg^{2+} に特異的であるので、メチル水銀をはじめとする有機水銀を検出することはできない。今後は、有機水銀を検出できるバイオセンサーの開発に取り組む予定である。

VI. おわりに

環境水や土壌などの試料中に含まれる水銀化合物の測定法として一般的なのは原子吸光度法である。この方法は再現性が高く、優れた方法とし

て汎用されている。しかし、設備投資費が高い、ランニングコストがかかる、その上試料の前処理が煩雑、汚染現場での即時測定には向かないなどのデメリットもある。水銀バイオセンサーを開発することで、①測定試料の前処理が不必要、②人体などの生物に摂取されて、生物細胞に毒性を示すバイオアベイラブルな水銀量を測定できる、③汚染の現場で即時に測定できる、④コストが安いというメリットがある。今後、ますます重要な問題となってきている微量あるいは低濃度の水銀汚染に対して、筆者らの考案する水銀バイオセンサーがさらに改良されて実用化されることに期待したい。

また、バイオアベイラブルな水銀量を測定できるという水銀センサーの利点は、将来、食物連鎖を通じてマグロやカジキなどの大型魚に蓄積するメチル水銀量を評価する際に生かされるといいのではないかと筆者らは考えている。

謝辞

本稿の研究内容は、摂南大学薬学部衛生分析化学研究室のご指導によって行われたものである。摂南大学薬学部衛生分析化学研究室諸氏に深謝いたします。

文献

1) Matsuyama A, Liya Q, et al: Distribution

- of methylmercury in an area polluted by mercury containing wastewater from an organic chemical factory in China. Bull Environ Contam Toxicol 73: 846-852, 2004
- 2) 藤原靖: 土壤汚染対策法と重金属汚染土壤の浄化技術の現状と課題 環境バイオテクノロジー 2 : 117-126, 2002
 - 3) 松山明人、岡田和夫: 水銀汚染土壤の低温加熱による浄化処理技術 基礎工 2 : 32-34, 1999
 - 4) 齋藤章: 重金属汚染土壤の洗浄処理システム 土壤環境センター技術ニュース 2 : 52-53, 2001
 - 5) 清野正子、芳生秀光: 水銀耐性遺伝子を利用した水銀のバイオレメディエーション フェルマシア 39 : 841-845, 2003
 - 6) 芳生秀光、清野正子: 水銀汚染浄化のための新規バイオテクノロジー 環境バイオテクノロジー 2 : 95-102, 2002
 - 7) Tonomura K, Maeda K, et al: Stimulative vaporization of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. Nature 217: 644-646, 1968
 - 8) Furukawa K, Tonomura K: Metallic mercury releasing enzyme in mercury resistant *Pseudomonas*. Agric Biol Chem 36: 217-226, 1972
 - 9) Tezuka T, Tonomura K: Purification and properties of an enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury-resistant *Pseudomonas* K-62 strain. I. Splitting enzyme I. J Biochem 80: 79-87, 1976
 - 10) Kiyono M, Omura T, et al: Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. Arch Microbiol 163: 242-247, 1995
 - 11) Kiyono M, Omura T, et al: Nucleotide sequence and expression of the organomercurial-resistance determinants from a *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Gene 189: 151-157, 1997
 - 12) Kiyono M, Pan-Hou H: DNA sequence and expression of a defective *mer* operon from *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Biol Pharm Bull 22: 910-914, 1999
 - 13) Kiyono M, Omura T, et al: Lack of involvement of *merT* and *merP* in methylmercury transport in mercury resistant *Pseudomonas* K-62. FEMS Microbiol Letts 128: 301-306, 1995
 - 14) Uno Y, Kiyono M, et al: Phenylmercury transport mediated by *merT-merP* genes of *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Biol Pharm Bull 20: 107-109, 1997
 - 15) Kiyono M, Uno Y, et al: Role of MerT and MerP from *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26 in the transport of phenylmercury. Biol Pharm Bull 23: 279-282, 2000
 - 16) Kiyono M, Uno Y, et al: Involvement of *merB* in the expression of the pMR26 *mer* operon induced by organomercurials. J Health Sci 46: 142-145, 2000
 - 17) Omura T, Kiyono M, et al: Development of a specific and sensitive bacteria sensor for detection of mercury at picomolar levels in environment. J Health Sci 50: 379-383, 2004