

# グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1由来の 有機水銀分解遺伝子 *merB* の発現調節機構に関する研究

東北学院大学大学院 学生会員 ○山肩健史 成田勝 石井秀学 熊谷康  
科学技術振興事業団 黄介辰  
東北学院大学工学部 F会員 遠藤銀朗

## 1. はじめに

有機水銀化合物を分解し、さらには水銀イオンを毒性の低い金属水銀に還元して気化することにより、水銀に対する耐性を獲得している水銀耐性細菌の存在が知られている。この水銀耐性細菌の生態や耐性機構については多くの基礎研究が行われてきており、この耐性に関する遺伝子およびオペロンについて明らかにされてきている。その中でも、水銀耐性細菌の耐性遺伝子オペロンである *mer operon* の発現調節遺伝子の *merR* の遺伝子産物については、リプレッサーとアクチベーターの両方の機能を持つ事が知られるようになってきた。これは菌体内に水銀が存在しない場合にはリプレッサーとして働き、そして水銀の存在によってアクチベーターとして働くというもので、他の調節遺伝子と比べ異なるメカニズムによって発現を調節している事が知られている。

本研究では、グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 の染色体上のトランスポゾン TnMER11 から発見された2つの水銀耐性オペロンの調節遺伝子 (*merR1*, *merR2*) が、どの様にしてその上流に存在する有機水銀分解遺伝子である *merB3* の発現を制御しているかを、*lux* 遺伝子が発現のレポーターとして用いて解析を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

*B. megaterium* MB1 のトランスポゾン TnMER11 上に存在する *merB3* 遺伝子の直上流部に存在するプロモーターの発現についての研究はまだ行われていない。そのため、本研究では独自のプロモーターを持つ *merB3* 遺伝子の発現を下流に *lux* 遺伝子を入れることによって解析した。PCR法によって2つの調整遺伝子と、レポーター遺伝子としての *Vibrio harveyi* 由来の *lux* 遺伝子のDNA領域を作製した。続いてプロモーターを残した *merB3* の削除変異遺伝子  $\Delta merB3$  遺伝子断片を制限酵素によって作製した。これらのDNA断片をpHY300PLKをベクターとしてクローニングして、 $\Delta merB3$  と *lux* の融合オペロンの構築を行った。

上記の方法によって、発光をしないコントロールプラスミドとしてプロモーター領域を持たない *luxAB* 遺伝子のみを挿入したプラスミド pHYLuxAB、発現の制御機能を持たないと考えられる  $\Delta merB3$ -*luxAB* を挿入したものを pHY $\Delta B3$ Lux、発現の制御遺伝子として *merR1* を持つ  $\Delta merB3$ -*luxAB*-*merR1* を挿入した pHY $\Delta B3$ LuxR1、発現の制御遺伝子として *merR2* を持つ  $\Delta merB3$ -*luxAB*-*merR2* を挿入した pHY $\Delta B3$ LuxR2 を作製した。(Fig.1) これらのプラスミドは、構築後宿主 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  に形質転換して実験に用いた。無機水銀である塩化第二水銀 (MC) を5 $\mu$ M加えて、生物発光量を測定した。生物発光の測定はBerthold社のLumat 9507を使用し、測定時間は6秒とした。

## 3. 実験結果及び考察

水銀無添加の状態で上記のプラスミドを持つ4つの形質転換株の発光量を測定した結果をFig.2に示した。この場合の生物発光量はpHY $\Delta B3$ LuxR1、pHY $\Delta B3$ LuxR2によって形質転換した株では共にpHY $\Delta B3$ Lux保持株による発光量を下回った。このことは、*merR1*及び*merR2*遺伝子産物は水銀による発現の誘導を行わない場合には抑制因子(レプレッサー)として機能しているを示している。

次に、水銀添加後の形質発現の程度を*lux*遺伝子の発現によって評価した結果をFig.3に示した。Fig.3に示した結果では、MCを用いて誘導を行ったにも拘わらずpHY $\Delta B3$ LuxR2保持株とpHY $\Delta B3$ Lux保持株の発光量に大きな違いが見られなかった。一方、pHY $\Delta B3$ LuxR1保持株はpHYB3Lux保持株とpHY $\Delta B3$ LuxR2保持株に比べ高い発光量を示した。このことから*merR1*遺伝子産物が水銀により誘導され、*merB3*遺伝子の転写のアクチベーターとして作用していることが分かった。しかし、有機水銀であるPMA添加後の形質発現の違いを示したFig.4の結果からは、pHY $\Delta B3$ LuxR1保持株、pHY $\Delta B3$ Lux保持株共に添加、無添加による発光量の違いは見られなかった。

キーワード：好気性水銀耐性細菌、*lux operon*、*mer operon*、*mer R*、*mer B*

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土木工学科 環境生物工学研究室

Tel : 022-368-7493 Fax : 022-368-7070

これらの結果から、*merB3*遺伝子のプロモーターが転写の調節に機能している事と、水銀による誘導を行わない場合には*merR1*遺伝子産物、*merR2*遺伝子産物共に*merB3*遺伝子の発現のリプレッサーとしての機能を果たしていることが明らかになった。さらに、*merR1*遺伝子産物のみが水銀により*merB3*の発現を誘導し、*merB3*遺伝子の転写のアクチベーターとしての役割を果たしていることが明らかになった。これらのことから、*B. megaterium* MB1の*merB3*遺伝子は水銀耐性モジュールの*merR2*遺伝子産物ではなく*merR1*遺伝子産物によってその発現が調節されていると考えられた。また、有機水銀での形質発現を調べるには有機水銀を分解できるように*merB3*遺伝子を完全な形でクローニングする必要があると考えられる。

本研究は、科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業の一つとなされた。

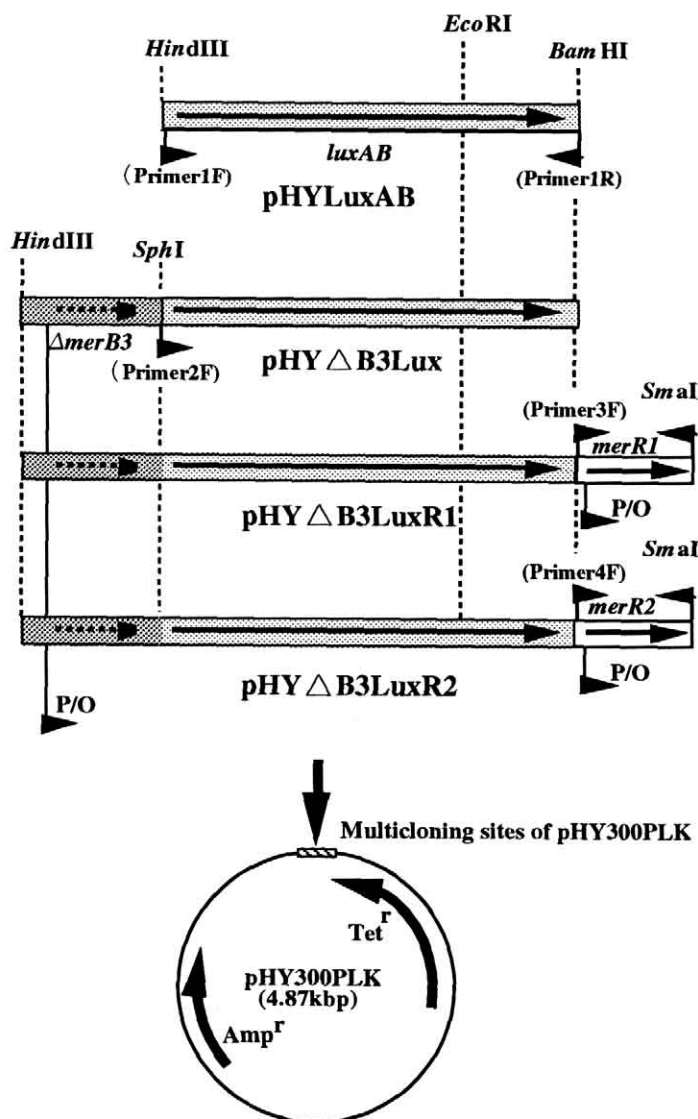


Fig.1 *merB*遺伝子の発光検索用プラスミドの構築

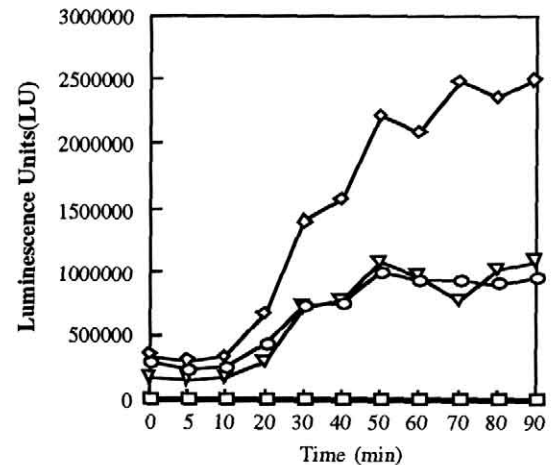


fig.2 発光実験測定結果(無添加)

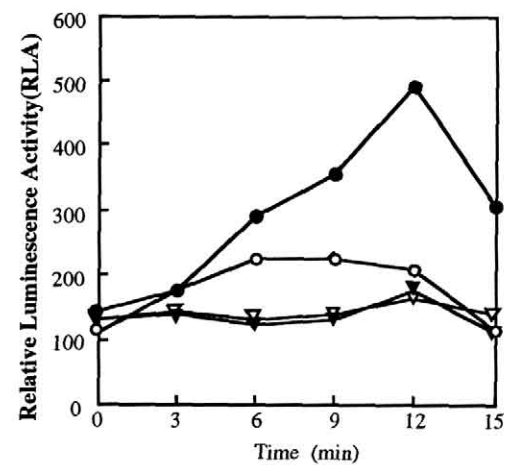


fig.3 発光実験測定結果 (MC 添加)

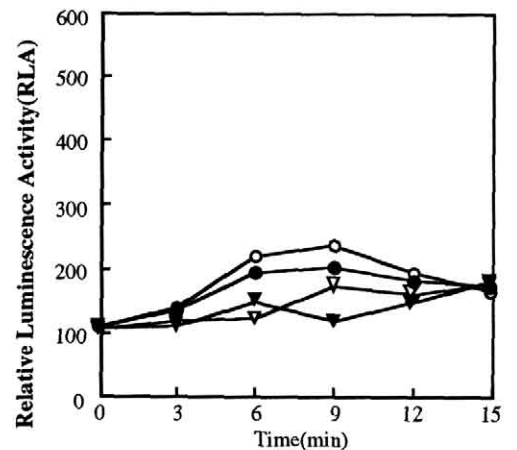


fig.4 発光実験測定結果 (PMA 添加)

- *pHY Δ B3LuxR1(N)*      ● *pHY Δ B3LuxR1(N)*
- ▽ *pHY Δ B3LuxR2(N)*      ▼ *pHY Δ B3LuxR2*
- ◇ *pHY Δ B3Lux(N)*      ◆ *pHY Δ B3Lux*