ルシフェラーゼ遺伝子を用いた生体内でのポリリン酸と水銀還元酵素の生体内水銀除去能の比較

1. はじめに

本研究室で単離し遺伝的形質を解析しているグラム陽性細菌 Bacillus megaterium MB1 株の染色体に存在するトランスポゾン TnMERII は水銀耐性遺伝子群 (mer オペロン)を保有している. このmerオペロンの遺伝子産物であMerA, MerB, MerR はグラ ム陽性細菌, グラム陰性細菌の両細胞内において, 機能を果たし ていることが明らかとなっている.また,水銀還元酵素である MerA は,水銀イオンを金属水銀に変え,金属水銀を大気中に放 出させる働きを持つことが知られている.一方,重金属イオンを 細胞質内に存在するリンの重合体によりキレートさせることで、 その毒性を失わせる働きを持つポリリン酸の存在が知られている. しかしながら,ポリリン酸が水銀イオンをキレートし,水銀除去 に役立つかどうかについては明らかにされていない.また,生体 内で水銀イオンを除去する機能が働くことで,水銀イオンに対し て耐性を増すことが知られている.これはMerAを持つことで, 菌体内に存在する水銀イオンの濃度がそれを持たないものに比べ 低くなり, mer オペロンの転写調節タンパクであるMerR の転 写の活性化が妨げられることによって起こる現象である.本研究 では,発光性海洋細菌Vibrio harveyi 由来のルシフェラーゼ遺伝子 (lux 遺伝子)をレポーターとして merR1 直上流部に存在するオ ペレータープロモーターの下流部に組み込んだ発光検出用プラス ミドを構築し,そのプラスミドで大腸菌を形質転換することで MerA とポリリン酸の水銀を除去する機能の比較を行ったので報 告をする.

2. 実験方法

レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子 (luxA, luxB) の上流部に、PCR で増幅したTnMERII 上のmerRI 直上流部のオ ペレータ / プロモーター領域を含むmerR1 遺伝子をpHY300PLK ベクターにクローニングすることで,発光検出用プラスミド pHYR1Lux を構築した(Fig.1.A).次に,MerA と水銀イオン感受 性の関係を調べるために,高発現用ベクターpUC119 に MB1 株の merA 遺伝子を PCR 増幅し,ベクターpUC119 に連結する ことで, プラスミドpUCA を構築した(Fig.1.B). また, 細胞内に ポリリン酸が存在する場合の水銀感受性を調べるために, Klebsiella aerogenes 由来のポリリン酸キナーゼ遺伝子(ppk)を PCR で増幅し,ベクターDUC119 と連結することで,プラスミド pUCPPK を構築した(Fig.1.B).また,この構築したプラスミドの 発現によってポリリン酸がつくられていかどうかをDAPI 染色 によって確認した merA 遺伝子とppk 遺伝子のクローニングに用 いた pUC119 ベクターはpHY300PLK ベクターとは異なる不和合 性グループに属しているため pUCA と pUCPPK は pHYR1Lux と同一の大腸菌内に共存させることができ,2つのプラスミドの 遺伝的形質をトランスアクション的に作用させることが可能であ る.したがって最終的にはプラスミ FpUCA を持つ大腸菌 E. coli

東北学院大学大学院	学生会員	山肩	健史
東北学院大学工学部		成田	勝
東北学院大学工学部	フェロー会員	遠藤	銀朗



Fig. 1. Constitution and physical maps of plasmids constructed in this study.
A. pHYR1Lux and pHYR1PLux
B. pUCPPK and pUCA

DH5 /pUCA,またはプラスミドpUCPPK を持つ大腸菌 E. coli DH5 /pUCPPK に前述のプラスミドpHYR1Lux を各々形質転換 することによって,水銀イオン除去機能を持つ2つの大腸菌クロ ーン E. coli DH5 / pHYR1Lux + pUCA と E. coli DH5 /pHYR1Lux+pUCPPK 株を取得し,水銀還元酵素とポリリン酸に よる生体内水銀除去能の比較を行った.このようにして構築され た菌体は,発現量の測定によって,その機能を解析した.検出実 験は生物発光用培地を用い,大腸菌クローンの培養が 30 分経 過するまで5 分毎に測定した.ここで用いた水銀は無機水銀であ る塩化第二水銀 (MC,終濃度0.1,0.5,1.0,2.0,5.0µM)である. 測定によって得られた発光量の数値は OD₆₀₀ 値で割ることで, 水銀濃度による生体影響の違いを無くした.また QD₆₀₀ 値で割 られた測定データはデータの比較を正確に行うために,水銀を添 加した測定データを水銀無添加の測定データで割ることで相対発 光強度(RLA)として数値化した.

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

Key words: ppk, merA, gene expression, mer operon, lux operon,

3. 実験結果及び考察

DAPI 染色法によるポリリン酸の生成の確認によって ppk 遺 伝子が大腸菌細胞で発現していることが確認された(Fig.2). 発現検出用組換え大腸菌の水銀イオンによる誘導発現の違いを知 るために,単位細菌OD 当たりの組換えプラスミド保持株の発光 量を,水銀化合物添加の条件および無添加の条件下で測定した. また,水銀無添加の条件での組換えプラスミド保持株の発光量に 対する添加時の発光量の比を相対発光活性値(Relative Luminescence Activity, RLA)として求めた. 無機水銀 MC (MC, 終濃度0.1,0.5,1.0,2.0,5.0µM)による発現の活性化の程度を評価し, Fig.3.A.B.C に示した .Fig.3.A に E. coli DH5 / pHYR1Lux, Fig.3.B C E. coli DH5 /pHYR1Lux+pUCA , Fig.3.C C E. coli DH5 /pHYR1Lux +pUCPPK 株を用いた場合の各組換えプラスミド保持 株の水銀による発現誘導の状況を,発光検出法によって示した. Fig.3.B は水銀還元酵素MerA を高発現させることができる E. coli DH5 /pHYR1Lux +pUCA 株の生体内の水銀除去能を解析した 結果である .Fig.3.A と比較すると格段的に発現量が低く MerA によって細胞内の水銀濃度が低下し,発光遺伝子の誘導発現量も 低下していたことを示している.しかし5µMの高水銀濃度で, 発光遺伝子の誘導発現量が増加することが分かった.この現象は 高濃度の水銀では、MerA が生体内の水銀を除去するのに時間が かかることを示している .Fig.3.C の結果は ,Fig.3.A と比較する と格段的に発現量が低く,ポリリン酸によって細胞内の水銀濃度 が低下していることを示している.この結果から,E. coli DH5 /pHYR1Lux +pUCPPK 株のポリリン酸が水銀イオンを積極的に キレートして吸着し,転写調節タンパクであるMerR と結合し て発現を誘導する水銀イオンが不足し,転写の活性が抑制された と考えられる.また Fig.3.C では20分あたりからRLA 値に若干 の上昇が見られる.この現象は,菌の生息のためにエネルギー源 としてポリリンが消費され,それによって放出された水銀イオン によって発現が誘導されたのではないかと推測される.



Fig.2. E. col DH5 /pUCPPK observed by a phase-contrust microscope.



Fig.3. Relative luminescence activities induced with mercury chloride (MC).

C. E. coli DH5 /pHYR1Lux+pUCPPK was induced with MC. Symbols:

; induced with 0.1 µ M M	IC, ; induced with 0.5	μΜΜС
; induced with 1.0 µ M M	IC, ; induced with 2.0	μ М МС
; induced with 5.0 µ M M	IC	

4. まとめ

以上の結果から,水銀の除去に*nerA* 遺伝子,*ppk* 遺伝子を保 有し,発現できる微生物を用いることが,水銀汚染の浄化に有効 であることが分かった.そして,これらの遺伝子産物による水銀 除去機構の違いは,水銀汚染物の状況,および処理方法に応じた 浄化を考えるうえで,選択肢を増やすものであると考える.

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研究 プロジェクト,および笹川科学研究助成金による研究として行われたことを付記し,感謝いたします.

A. E. coli DH5 /pHYR1Lux was induced with MC.

B. E. coli DH5 /pHYR1Lux+pUCA was induced with MC.