

VII-28

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
科学技術振興事業団 黄 介辰
東北学院大学工学部 佐藤 拓弥 塚 清仁
東北学院大学工学部 正会員 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いるが、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* は、リプレッサーとアクチベーターの両方の機能を持つと考えられている。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遺伝子の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つの調節遺伝子 (*merR1*, *merR2*) がどのよう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 pHYB3Lux、発現の制御遺伝子として *merR1* を持つ $\Delta merB3$ -*luxAB*-*merR1* を挿入した pHYB3LuxR1、発現の制御遺伝子として *merR2* を持つ $\Delta merB3$ -*luxAB*-*merR2* を挿入した pHYB3LuxR2 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 α 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。

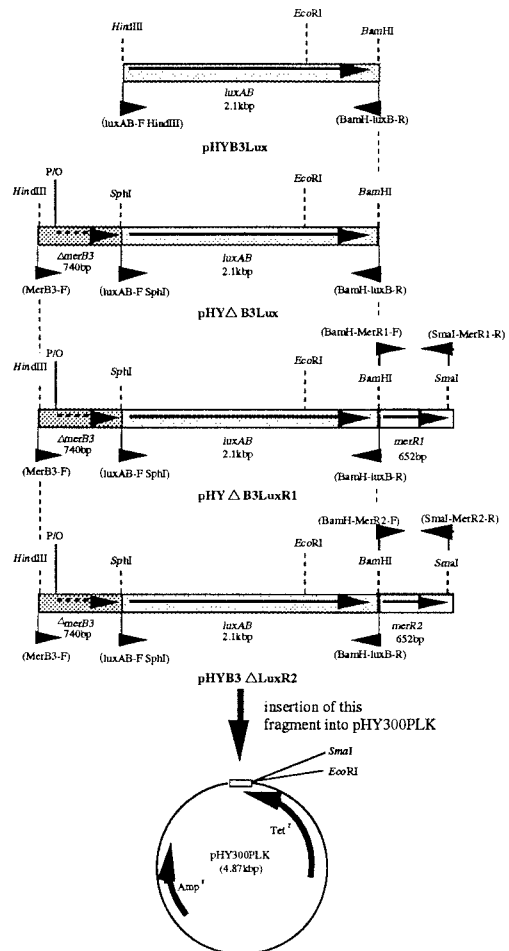


Fig.1 *merB* 遺伝子の発光検索性プラスミドの構築

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pHYB3LuxR1、pHYB3LuxR2によって形質転換した株では共にpHYB3Lux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12分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Table1に示した。Table1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pHYB3LuxR2保持株とpHYB3Lux保持株の発光量に大きな違いが見られなかった。一方、pHYB3LuxR1保持株はpHYB3Lux保持株とpHYB3LuxR2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。

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。

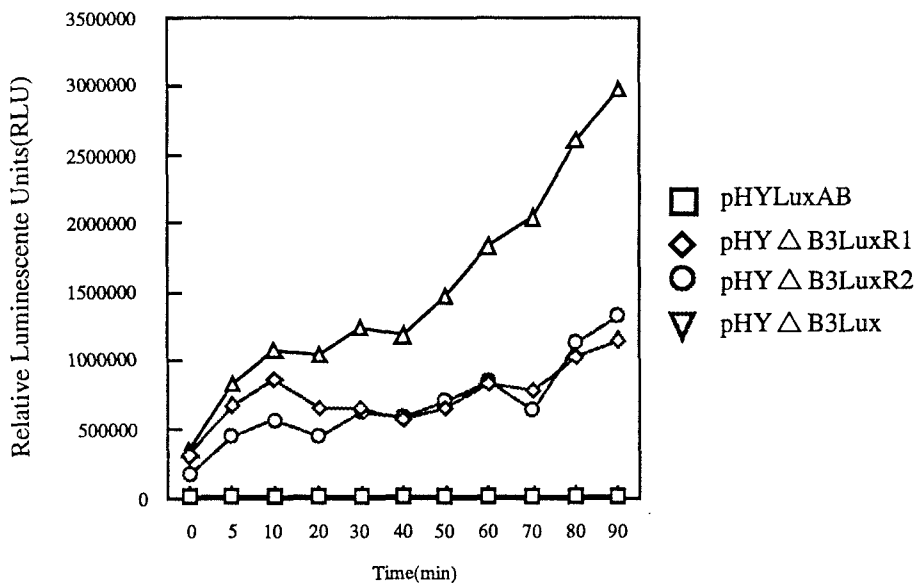


Fig.2 相対発光強度（RLU）の時間的変化
（水銀による誘導を行わなかった場合）

Table1 水銀誘導12分後の相対発光強度（RLU）

添加した水銀		pHYB3LuxR1	pHYB3LuxR2	pHYB3Lux
MC	5 μM	573112	239521	200766