

VII-20

ポリリン酸キナーゼ遺伝子と水銀還元酵素遺伝子を クローニングした細菌による水銀除去能の比較

東北学院大学工学部 学生員 ○石井 正憲 成田 勝

東北学院大学大学院 学生員 山肩 健史

東北学院大学工学部 フェロー員 遠藤 銀朗

1. はじめに

本研究室で単離し遺伝子の特性を解析しているグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株は、トランスポゾン TnMERII 上に水銀耐性遺伝子群 (*mer* オペロン) を保有していることが知られている。この *mer* オペロンの遺伝子産物である 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知られている。水銀還元遺伝子 *merA* は、水銀イオンを大気中に気化できる金属水銀に変えることができる水銀還元酵素をコードしている。*merA* 遺伝子産物の他にも水銀イオンを細菌細胞内でキレートし、その毒性を失わせる働きをもつポリリン酸が考えられる。しかし、そういった機能を持つ無機ポリマーとしてポリリン酸が水銀除去のためにどのように応用できるかについてはあまり知られていない。

本研究では、菌体内で発光する働きを持つ *luxA, B* 遺伝子をレポーターとして組み込んだ *mer* オペロン発現検出用プラスミドを構築し、発光実験をグラム陰性細菌内で行い、*merA* 遺伝子と *ppk* 遺伝子を保有する細菌の水銀除去能を解析するために、遺伝子発現実験のデータをもとに除去機能力の比較を行ったので報告をする。

2. 実験方法

まず、既に山肩らによって構築されているレポーター遺伝子として発光遺伝子を含む pHYB3Lux を制限酵素消化することで、レポーター遺伝子上流部の入れ替えを行った。これによって本研究独自の発光検出用プラスミド、*merR1* 直上流部のオペレーター/プロモーター領域と *merR1* を上流部にもつ *E. coli* DH5 α /pHYR1Lux を構築した。(Fig.1.A)次に、MerA を保有する細菌の存在下と感受性の関係を調べるために、高発現ベクター pUC119 を用いて MerA を高発現できるプラスミドを作成した。このプラスミドを pUCA と命名した(Fig.1.B)。また、pUCA プラスミドと同様にポリリン酸合成遺伝子 (*ppk*) を高発現させることができるプラスミドをベクター pUC119 を用いて構築し、構築されたプラスミドを pUCPPK と命名した。(Fig.1.B)pUC119 は pHY300PLK と不和合性グループが違うことから1つの細菌細胞内でトランスアクション的に発現させることが可能である。そこで、同時に大腸菌を形質転換することでこれらの遺伝子をトランスアクション的に発現させるために、*Escherichia. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCA と *E. coli* DH5 α /pHYR1lux+pUCPPK を構築した。

このようにして構築された菌体は、*luxA, B* の発現をレポー

ターとする発現実験によってその機能の解析を行った。*luxA, B* 遺伝子の発現による発光量の測定は実用面で用いる場合の簡素化を考え、発光培地での大腸菌クローンの培養が 30 分経過するまで 5 分毎に測定を行った。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, 5.0 μ M) 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、水銀添加による菌体の増殖量の違いを無くした。また、OD₆₀₀ 値で割った測定データの比較を正確に行うために、水銀を各水銀濃度で添加して測定した場合の発光量の測定データを水銀無添加の場合の発光量の測定データで割ることで相対発光活性値 (RLA) として数値化した。

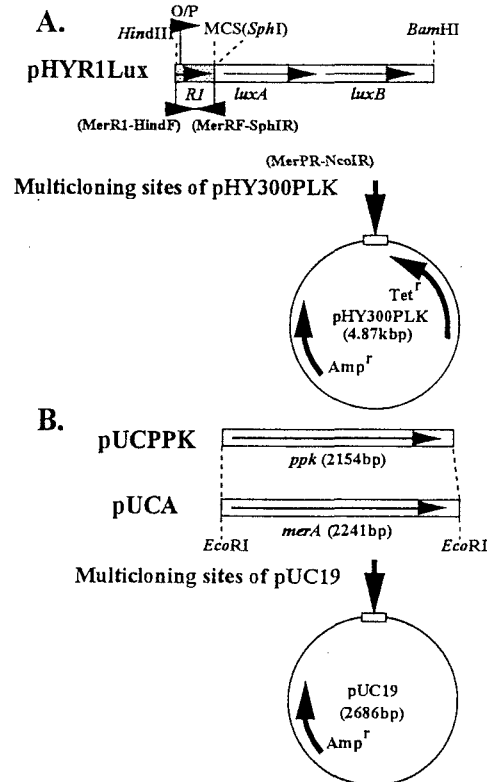


Fig. 1. Constitution and physical maps of plasmids constructed in this study.

A. pYHR1Lux and pYHR1PLux; B. pUCPPK and pUCA
The letters R, E, T, P, A and B are *mer* genes in the *B. megaterium* MB1.

3.実験結果及び考察

水銀発現検出用組換えプラスミドを用いた水銀の発光活性の測定値は水銀化合物の添加・無添加での発現の違いを知るために、同じOD値、同じ条件で培養した菌体を用いて、水銀化合物添加の条件での組換えプラスミド保持株の発光量、または、同様に水銀化合物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発光量の比を相対発光活性 (Relative Luminescence Activity RLA) として定義して、MerR1の無機水銀MC (MC:終濃度0.1,0.5,1.0,2.0,5.0 μ M) による発現制御の程度を評価し、Fig.2ABCに示した。また、これらの図に示した値は3回の測定結果の平均値である。

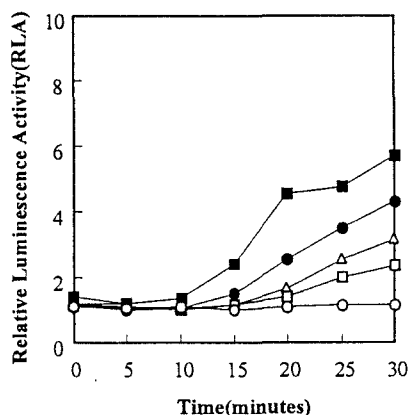
Fig.2Aに*E. coli* DH5 α /pHYR1Lux, Fig.2Bに *E. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCPPK, Fig.2Cに*E. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCA株を用いた場合の各組換えプラスミド保持株の発現誘導の状況を、発光検出法によって示した。Fig.2Bの結果は、ポリリン酸を高発現させることができるpUCPPK プラスミドをクローニングした株の生体内水銀イオンの吸着力について示した。その結果、Fig.2Bの結果はFig.2Aと比較すると格段的にRLA値が低い。よって生体内で発現したPPKによって細菌細胞内合成されたポリリン酸が水銀イオンを積極的に吸着し、それによって水銀濃度が低下したことで、*hucA,B*を含むオペロンの発現量も減少したと考えられる。また、測定20分あたりからRLA値に若干の上昇が見られる。この現象は菌の増殖のためにリンが消費された菌体と細胞分裂したばかりでリンを貯蓄していない菌体によって引き起こされたのではないかと推測される。Fig.2Cは水銀還元酵素MerAを高発現させることができる*E. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCA株の生体内の水銀除去能を解析した結果である。Fig.2Cにより、5 μ Mの水銀濃度で、5分~15分の間で水銀検出用オペロンの発現量が増加することが分かった。この現象はMerAが生体内の水銀を除去するのに時間がかかったことを示している。その後の発現量の減少は、MerAが調節タンパクMerRと結合する水銀イオンまでも除去しているためと考えられる。

これらの発光検出法によるRLAの測定結果から*ppk*遺伝子、*merA* 遺伝子共に細胞内の水銀を細胞質から除去していると考えられる。

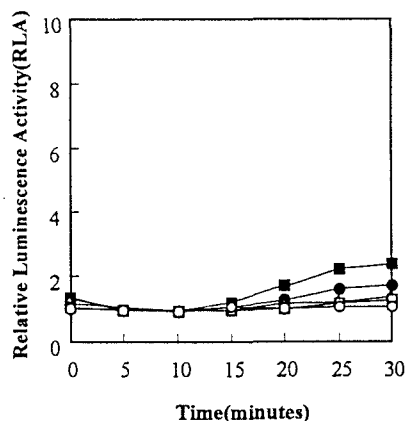
これらのことから、水銀の除去に*ppk*遺伝子、*merA* 遺伝子を使うことが有効であることが分かった。しかし、これらの遺伝子を実用面で用いるためには更なる研究が必要であると考える。

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一つとしてなされたことを付記し感謝する。

A.



B.



C.

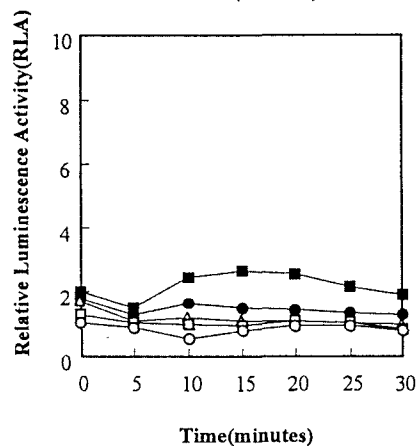


Fig.2. Relative luminescence activities induced with mercury chloride (MC).

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

B. *E. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCPPK was induced with MC.

C. *E. coli* DH5 α /pHYR1Lux+pUCA was induced with MC.

Symbols:

○; induced with 0.1 μ M MC, □; induced with 0.5 μ M MC

△; induced with 1.0 μ M MC, ●; induced with 2.0 μ M MC

■; induced with 5.0 μ M MC