

Bacillus megaterium MB1 株に存在するイントロンの転写と それによる水銀浄化遺伝子群の発現に関する研究

東北学院大学工学部 学生会員 ○浅野 諒
東北大学大学院生命科学研究科 簡 梅芳
東北学院大学工学部 正会員 宮内 啓介
東北学院大学工学部 正会員 遠藤 銀朗

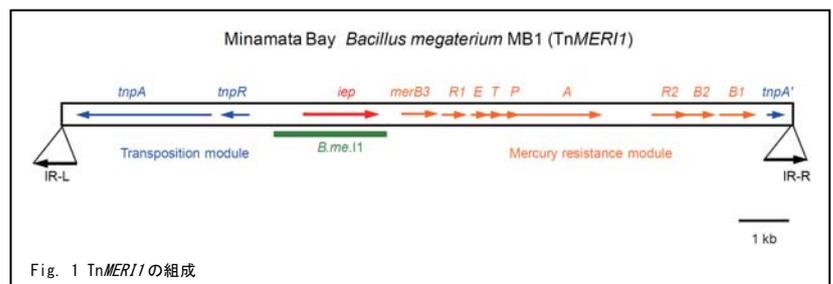
1. はじめに

人類の産業活動の活発化に伴い、地球規模の環境破壊が進行し深刻な社会問題となっている。現在、地球上に多くの環境負荷が存在し、その有害物質の中でも重金属類は生物への影響が大きく、環境中での蓄積性が高いことから、その汚染による社会的影響は重大である。重金属の一つである水銀は、過去に熊本県水俣湾周辺で起きた水俣病の原因物質であり、人体以外にも土壌や水域など広範囲にわたって存在している。水銀汚染の浄化方法については、現在は物理・化学的方法が主流となっているが、簡便性やコストの面で必ずしも十分とは言えない。

そこで、微生物を利用した水銀汚染浄化方法が提案できる。これまでに発見された水銀耐性細菌は一般に水銀耐性オペロン (*mer operon*) を保有しており、その構造は類似性と多様性があることが知られ、共通の構造とそれぞれの水銀化合物に対応して必要とされる特異な遺伝子がある。それは細菌の生息している環境においてどのような水銀化合物に曝されたかにより、オペロン構造が変化して多様性が生まれたものと考えられる。

以前、本研究室では、水俣湾底泥より水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株を分離した。*B. megaterium* MB1 株は水銀耐性トランスポゾン Tn*MER11* を保有しており、Tn*MER11* の遺伝子構造解析を行った結果、Tn*MER11* には有機水銀と無機水銀に対する耐性遺伝子群からなる *mer operon* を保有していることが明らかになった。

また、Tn*MER11* の転移に関する遺伝子群と水銀耐性遺伝子群 *mer operon* の間に、細菌性グループ II イントロンの *B. me. I1* が存在し、Tn*MER11* の転移に関与する遺伝子 *tnpR* の中に *B. me. I1* を転写させるプロモーターが存在していることが明らかになった。これまで明らかになっている Tn*MER11* の遺伝子構成を Fig. 1 に示す。



水銀への耐性メカニズムについて、水銀イオンがない場合には *mer operon* の発現は調整タンパク質 MerR により抑えられており、無機水銀イオンが存在する場合だけに活性化される。そのため、*mer operon* の発現を制御するため MerR タンパク質が存在する。一方、有機水銀しか存在しない場合は、有機水銀分解酵素 MerB3 が発現してそれを分解するが、それは *operon* の上流領域から漏れて転写されたことによると考えられる。よって、本研究では、*B. megaterium* MB1 株が保有する *mer operon* の上流域に存在する細菌性グループ II イントロン *B. me. I1* の転写と、その転写によって下流に存在する水銀耐性遺伝子群が発現されるかどうかを調べたので報告する。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. プラスミド及び組換え菌株

B. me. I1 と下流に存在する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB3* の転写レベルを評価するために、Fig. 2A に示した領域を pHY300PLK ベクターに組み込み、pHYRB3 と命名した。この pHYRB3 をグラム陽性細菌の *Bacillus*

subtilis 168 株に形質転換し、組換え菌株を作製した。

2-2. 供試細菌株及び実験方法

グループ II イントロン *B. me. I1* 領域の転写レベルの定量は、グラム陽性細菌の *B. subtilis* 168 株を使用して評価した。*B. me. I1* の有無による水銀耐性遺伝子群の発現の影響について、ゲノムに *B. me. I1* を持つ *B. megaterium* MB1 株と持たない *Bacillus cereus* RC607 株を使用して評価した。転写レベルの定量は real time 定量 RT-PCR 法を用いて行った。RT-PCR 用のプライマーとして *B. me. I1* 領域の配列と *B. me. I1* の下流配列に相補できる二組みのプライマーを設計し使用した。

3. 実験結果及び考察

3-1. real time RT-PCR による *B. me. I1* 領域の転写レベルの定量

プラスミド pHYRB3 を持つ組換え菌株 *B. subtilis* 168 株を用いて、*B. me. I1* 領域の転写レベルは real time 定量 RT-PCR 法により調べた結果を Fig. 2B に示した。解析結果より、*B. me. I1* 領域の転写レベルは mid-log 増殖 phase において一番高いが、*B. me. I1* の転写は構成的になされていることが分った。また、二組のプライマーから同程度の転写レベルが検出されたため、*B. me. I1* のプロモーターから転写が始まり、その転写は *B. me. I1* の下流まで伸長していると考えられる。

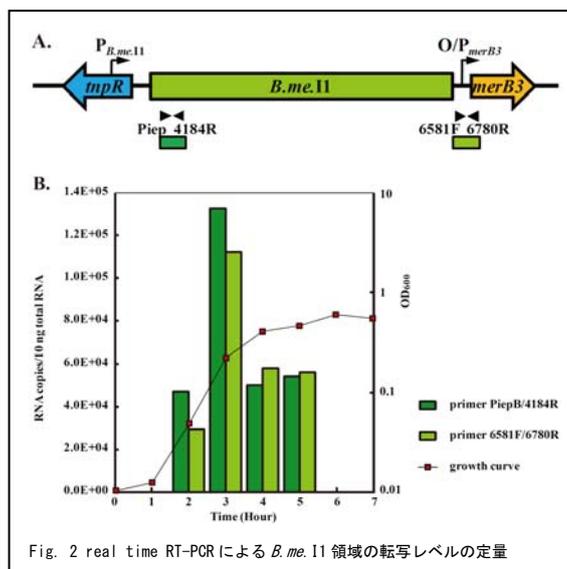


Fig. 2 real time RT-PCR による *B. me. I1* 領域の転写レベルの定量

3-2. *B. me. I1* の有無による有機水銀分解酵素遺伝子 *merB3* の転写レベルの比較

B. me. I1 領域の下流にある有機水銀分解酵素遺伝子 *merB3* の配列を標的にし、*B. megaterium* MB1 株と *B. cereus* RC607 株において、real time 定量 RT-PCR を行った結果を Fig. 3 に示す。MB1 株において、*merB3* の転写レベルは *B. me. I1* の転写レベルと一致することが分かった。この転写レベルの一致は *B. me. I1* を持たない RC607 株では見られなかった。また、1 nM の $HgCl_2$ の添加による水銀存在下の試験では、MB1 株の *merB3* 転写量が early-log 増殖 phase から増大したが、late-log 増殖 phase では減少することが知られた。一方、RC607 株の *merB3* では常に高い転写量が観察された。これらの結果から、*B. me. I1* の有無によって *merB3* の転写は影響を受けると考えられた。

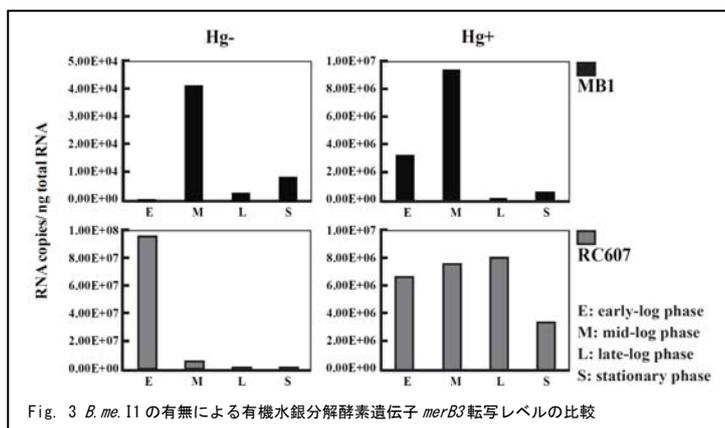


Fig. 3 *B. me. I1* の有無による有機水銀分解酵素遺伝子 *merB3* 転写レベルの比較

4. おわりに

本研究により得られた知見を以下にまとめる。(1) グラム陽性細菌において、細菌性グループ II イントロン *B. me. I1* 領域は構成的に転写される。(2) *B. megaterium* MB1 株において、*B. me. I1* の転写が下流に存在する *mer* オペロンの有機水銀分解遺伝子 *merB3* の基底的な発現を引き起こす。(3) 無機水銀イオンが存在する場合には、*B. me. I1* の転写が下流に存在する *mer* オペロンの発現をさらに活性化させると考えられる。