

学位論文審査結果報告書

報告番号	北里大 乙 第1426号	氏 名	曾 根 有 香
論文審査担当者	(主査) 北里大学 教授 (副査) 北里大学 教授 (副査) 北里大学 准教授 (副査) 北里大学 専任講師 岡 田 信 彦 今 井 浩 孝 清 野 正 子 飯 田 直 幸    		
〔論文題目〕 水銀耐性菌の <i>merE</i> 遺伝子の機能解析および水銀浄化への応用 〔論文審査結果の要旨〕 水銀化合物は有用な化学的・物理学的性質を有するため、工業産物や医薬品、農薬などに利用されてきた。しかし、日本を含む世界 27 カ国以上で水銀による環境汚染が確認されており、ヒトへの健康被害が懸念されている。 自然界には、水銀化合物に対して耐性を示す細菌が存在する。その細菌が示す水銀耐性は、水銀耐性オペロン (<i>mer operon</i>) により支配される。<i>Shigella flexneri</i> 由来の NR1 (R100) のトランスポソン Tn21 上に存在する <i>mer operon</i> は、<i>merR-o/p-merT-merP-merC-merA-merD-merE</i> から構成される。MerR は転写抑制因子であり、無機水銀 (Hg^{2+}) が MerR と結合すると抑制が解除され下流の遺伝子の転写が開始される。一方、MerD は上流の構造遺伝子の転写を終了させる調節因子である。菌体外の Hg^{2+} は、水銀結合因子 MerP に結合した後、水銀トランスポーターである MerT や MerC を介して、菌体内に取り込まれ、レダクターゼである MerA により還元され、金属水銀 (Hg^0) として菌体外に放出される。一方、<i>mer operon</i> を構成する遺伝子のなかで <i>merE</i> 遺伝子の機能については未だ不明のままである。 本研究では、MerE の水銀耐性に関わる機能解析を行うと共に、重金属による低濃度・広範囲の土壌汚染に適した浄化法の一つとして、植物の生理機能を利用したファイトレメディエーションへの応用を試みた。 第1章 トランスポソン Tn21 由来 MerE の機能解析 トランスポソン Tn21 挿入大腸菌における <i>merE</i> 遺伝子産物の菌体内局在を明らかにする目的で、Hg^{2+} による発現誘導条件下で大腸菌を培養後、菌体を破碎し遠心分離、得られた粗抽出画分を可溶性画分と膜画分に分画した。各画分に対して MerE タンパク質の局在を Western blotting 法により検出した結果、MerE は膜画分に局在することがわかった。			

次に、MerE の機能を検討するために水銀応答調節遺伝子 (*merR-o/p*) の下流に *merE* を組換えたプラスミド pE4 を構築し、大腸菌に形質転換した。まず、pE4 保有大腸菌の CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および蓄積性を検討した結果、pE4 保有大腸菌はコントロールに比べ、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対して耐性低下および取り込み増加がみられた。さらに、MerE の水銀化合物の認識部位を明らかにするため、MerE に対して部位特異的のアミノ酸置換法によりアミノ酸変異を導入し、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} 取り込み量を野生型 MerE 発現大腸菌株と変異型 MerE 発現大腸菌株を比較し、 CH_3Hg^+ 輸送には MerE アミノ酸の 30 番目の Cys および 51 番目の His が関与し、 Hg^{2+} 輸送には 28 と 30 番目の Cys および 31 番目の His が関与することが示唆された。

また、MerE の水銀化合物取り込み活性に対する MerT および MerP の影響について検討した。まず、プラスミド pTP4 (*merR-o/p-merT-merP*) および pTPE21 (*merR-o/p-merT-merP-merE*) を作製し、水銀化合物取り込み活性を比較し、MerE は CH_3Hg^+ の取り込みを、MerT-MerP は Hg^{2+} の取り込みを担うことが示唆された。

第2章 MerE を利用したファイトレメディエーション

CH_3Hg^+ および Hg^{2+} を輸送する broad type の水銀トランスポーターである MerE を植物に高発現させることで、環境からの水銀の浄化効率が上昇することが期待された。そこで本章では、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} の浄化を目的に、MerE トランスジェニック植物を作出し、ファイトレメディエーションへの応用を試みた。

merE 遺伝子を植物ベクター pMAT137 に組換え、常法に従い *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) に形質転換し、 T_1 種子を収穫した。 T_1 種子をカナマイシン培地で選抜したところ、11 株の形質転換体を獲得した。その後、 T_2 および T_3 世代の種子を収穫するとともに、各段階の植物体を用いて、*merE* 遺伝子のゲノムへの組換えおよび mRNA の発現を調べた。その結果、*merE* 遺伝子を植物ゲノムに保持し、mRNA の発現が確認され、野生株と同様の発生・分化・生育を示した系統を 6 株獲得した。

MerE 発現シロイヌナズナ E2 株における MerE は膜画分に局在し、また、*gfp-merE* 融合遺伝子を発現するシロイヌナズナを作製し、MerE の細胞内局在について検討した結果、シロイヌナズナ培養細胞内において GFP-MerE は細胞膜および小胞体に発現していることを明らかにした。

次に、E2 株の CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および蓄積性について検討した。根の長さとし生重量を指標とした耐性評価から、E2 株は野生株に比べ、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対して耐性を示した。また、E2 株は野生株に比べて有意に高い CH_3Hg^+ 蓄積量および Hg^{2+} 蓄積量を示した。以上の結果より、MerE を植物に発現させることにより、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性が向上し総水銀蓄積量が増加したと考えられた。

本研究は、水銀耐性大腸菌における MerE タンパク質の役割を明らかにし、さらに MerE トランスジェニック植物を作出し、ファイトレメディエーションへの応用を試みた応用研究として高く評価でき、その内容は、独創性の高いものである。したがって、博士 (薬学) の学位に十分値するものであると判断し、学位審査を合格と判定した。