

## 水銀耐性遺伝子を利用した葉緑体形質転換水銀感知植物の作出

(応用生物学研究室) 馬場 朋哉

### 1. 序論

現在、世界的に水俣病を代表とした水銀汚染の危険性が認識され、水銀の使用は強く規制されている。しかし、かつての汚染地域からの漏出により、周辺の土壌・地下水などの生活環境が水銀によって汚染された地域は現在でも多数存在する。環境中に存在する水銀を安全かつ効果的に除去するために、水銀によって汚染した土壌を検出することが必要であるが、汚染地域の同定には、膨大な時間やコストを費やす網羅的な調査が必要である。私は、この問題を解決するために、*Pseudomonas* K-62 が持つ水銀耐性遺伝子のプロモーター領域と水銀感受性リプレッサータンパク質 MerR を利用した水銀感知植物の開発を試みた。このような植物を環境中に播種し、生育させることで、太陽光と水という低コストな材料で水銀汚染地域の検出が可能になると期待している。

本卒業論文では、その作成過程と結果を報告する。

### 2. 材料と実験方法

水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 は、水銀耐性を付与する遺伝子をコードする mer オペロンを持つ。mer オペロンには、水銀と結合することにより水銀耐性タンパク質の合成を開始する水銀制御遺伝子 MerR と水銀応答オペレータープロモーター O/P が存在する。mer オペロンは、恒常的に水銀制御タンパク質 MerR を合成しており、合成された MerR は O/P の-35 領域と-10 領域の間に二量体として結合し O/P の転

写を抑制する。二量体 MerR は水銀イオン(Hg<sup>2+</sup>)と結合することにより立体構造を変化させ、O/P に O/P の下流に存在する遺伝子の転写を開始させる。私は、O/P の下流にルシフェラーゼ (Luciferase) を合成する遺伝子を配置させた (図 1)。その後、作成したコンストラクトを大腸菌に組み込み、水銀感知大腸菌を作出した。対数増殖期まで培養した水銀感知大腸菌へ濃度別に水銀標準溶液(HgCl<sub>2</sub> 溶液)を加え、三時間振盪培養しルシフェラーゼを合成させた後、ルシフェリンを加え、酵素基質反応により生じる発光をルミノメーターを用いて発光量を測定した。

また、葉緑体形質転換植物を作成するためにパーティクルガンを用いて、このコンストラクトをタバコの葉に打ち込んだ後、葉を抗生物質スペクチノマイシンで選抜し、コンストラクトが葉緑体ゲノムへ導入されたか否かを、PCR 法によって確認した。

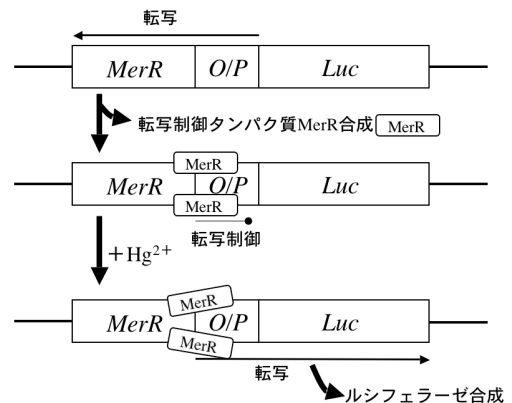


図1. 水銀感知システム。  
MerRが合成され、MerRによってO/Pによる転写開始が抑制される。水銀の結合によりMerRの立体構造が変化し、O/Pの転写によってルシフェラーゼが合成される。

### 3. 結果と考察

ルミノメーターで測定した発光量は水銀濃度が  $0\mu\text{M}$  から  $5\mu\text{M}$  まで非常に小さかったが、水銀濃度  $20\mu\text{M}$  の時、発光量は最大となる事が分かった。また、大腸菌 OD600 の値は水銀濃度が  $0\mu\text{M}$  から  $5\mu\text{M}$  まで、1.6 から 1.8 の間であったが、水銀濃度  $10\mu\text{M}$  以降減少した (図2)。つまり、大腸菌は水銀の影響により生育しにくくなり、また水銀溶液を加えたことによる培養液の薄化により、濁度が、急激に減少したと思われる。

また、パーティクルガンでタバコの葉に水銀感知大腸菌の遺伝子を導入し、抗生物質スペクチノマイシンにより選抜した。その結果、#A, #B, #C という3個のシュートを得た。#A, #B, #C と WT (野生型) のシュートより DNA を抽出し、その DNA をテンプレートとした PCR 法を用いて葉緑体に水銀感知遺伝子が導入されたか確認した。①、③は遺伝子導入部分より外側に存在するプライマーであり、②は水銀感知遺伝子に特異的なプライマーである。①+②プライマーによる PCR では、#A, #B, #C で目的とするバンドが得られ、葉緑体に水銀感知遺伝子が導入されたことが分かった。また、#A, #B, #C では、WT と同じバンドが #A, #B, #C でも得られた。#A では、目的とするバンドも得られた。これにより、#A, #B, #C は導入遺伝子 DNA と野生型 DNA を持つヘテロ体であることが分かった。①+③プライマーによる PCR で #B, #C に目的遺伝子のバンドが得られなかったのは、野生型 DNA テンプレートの方が多く、PCR により増幅されにくかったと考えられる。

### 4. 展望

野生型の葉緑体ゲノムと遺伝子導入された葉緑体ゲノムが混在する葉緑体形質転換ヘテロ体を形質転換葉緑体ゲノムのホモ体になるまで抗生物質含有培地で選抜し、得られたホモ体の種子を濃度別の水銀含有土壌に播種・生育させる。そして、生育した植物体を回収し、合成されたルシフェラーゼがルシフェリンとの反応でどれだけ発光するか水銀濃度別に詳しく検証する。また、どの成長段階でどれだけ発光するか、根・葉・茎のどの部位でどれだけ発光するか検証し、環境中で水銀感知植物として利用する際の最適な測定条件を確立する予定である。

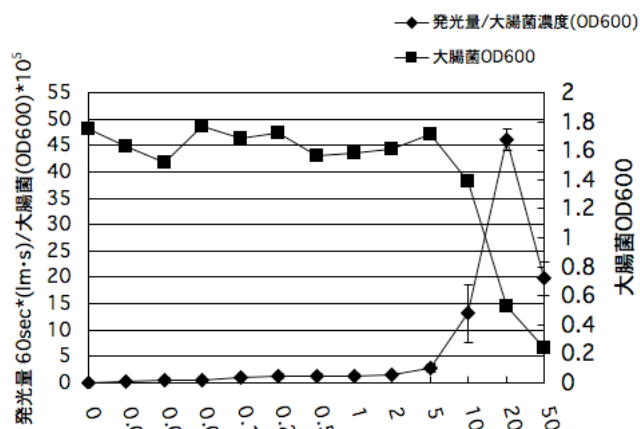


図2. 各水銀濃度における発光量と大腸菌OD600。大腸菌OD600は、OD600における吸光度である。発光量は、大腸菌対数増殖期に水銀を加え、三時間培養した後、ルシフェリンを加えルミノメーターで測定した値である。

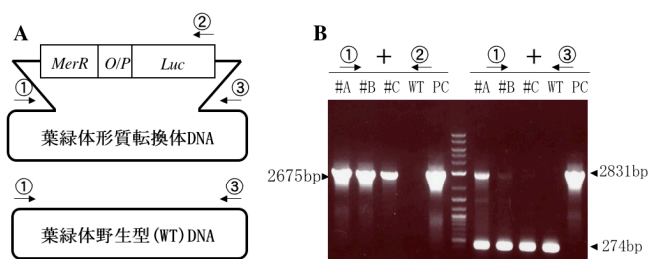


図3. PCR法による葉緑体形質転換体の確認。A:①、②、③はPCR法に用いるプライマーの位置。B:WTは野生型を意味し、PCはポジティブコントロールを意味する。