

VII-13

水俣湾底泥より分離された嫌気性水銀耐性細菌 の水銀耐性機構に関する研究

東北学院大学大学院 学生員 ○成田 勝

東北学院大学工学部 正会員 遠藤銀朗

1. はじめに

かつて熊本県水俣湾周辺で水俣病が発生したように、重金属による環境汚染は我々の生活圏を快適に維持する上で重大な問題である。なかでも特に被害が大きいとされる水銀による汚染は、環境ばかりではなく、人体に対して直接的な影響を与える物質として、その使用と排出に対しては厳しく規制がなされている。現在、水銀の処理には物理化学的もしくは生物処理と活性炭を併用した方法がとられている。そのため、水銀耐性能のある細菌についての研究が進められているが、このような水銀耐性細菌に関する研究のほとんどは好気的条件下で生息する好気性水銀耐性細菌についてである。好気性水銀耐性細菌は、水銀を比較的毒性の低い金属水銀に還元することがよく知られている。しかしながら、嫌気的条件下で生息している嫌気性水銀耐性細菌についての研究はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、これらの嫌気性水銀耐性細菌の耐性機構の解明が必要であると考え、水俣湾底泥より分離した嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株を用いて、水銀耐性機構の実験的検討を行った。

2. 実験方法

1) 嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価

本研究によって水俣湾の底泥より純粋分離された嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株を用いて、水銀耐性能の評価を行った。実験は次の方法で行った。M9 培地によって、水銀濃度（塩化第二水銀： HgCl_2 ）を 100 μM 、300 μM および 500 μM とそれぞれ濃度を変えて 30℃ で静置培養を行い、培養結果を評価した。

2) PCR 法による水銀耐性遺伝子の解析

嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株の染色体 DNA と好気性水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子の塩基配列から作成した DNA プライマーを用いて、PCR 法によりこれら 26 菌株の染色体 DNA 上にコードされている *merA* 遺伝子が *Bacillus* sp. の持つ *merA* 遺伝子と類似性があるかどうかを検討した。実験は以下の方法で行った。

- 嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株は、嫌気性細菌培養用の PY 培地（水銀濃度 100 μM を含む）によって、30℃、48 時間静置培養を行った。
- 培養後のそれぞれの細菌培養液 10ml から染色体 DNA の調製を行った。
- Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子の塩基配列から作成した DNA プライマーを用いて、嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株の *merA* 遺伝子の領域を標的として PCR 増幅を行った。PCR 反応条件のアニーリング温度は 55℃、50℃、45℃、および 40℃ とそれぞれ温度を変えて行った。

3. 実験結果および考察

1) 嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価結果および考察

水銀濃度（塩化第二水銀： HgCl_2 ）100 μM 、300 μM の場合において、26 菌株の全ての細菌の増殖が確認された。500 μM の場合においては、全ての菌株は明らかに十分耐えうるという結果が得られたが、耐性能に差がみられた。特に MN4 と MN13 と名付けた 2 つの菌株は、水銀濃度が 500 μM においても活

キーワード：嫌気性水銀耐性細菌、PCR 法、アニーリング温度、*merA* 遺伝子

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 土木工学科 環境生物工学研究室

Tel : 022-368-1115 (ex.294) Fax : 022-368-7070

発に増殖が確認された。Table.1 に嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価結果を示す。

2) P C R 法による水銀耐性遺伝子の解析結果 および考察

P C R 法におけるアニーリング温度を 55℃、50℃、45℃とそれぞれ設定した場合では、26 菌株の全ての嫌気性水銀耐性細菌において、*merA* 遺伝子の領域の DNA 断片は確認されなかった。よって、好気性水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の持つ水銀耐性遺伝子 *merA* と全く同一の遺伝子を持っていないと考えられた。

アニーリング温度を 40℃と設定した場合では、26 菌株の全ての嫌気性水銀耐性細菌において、*merA* 遺伝子の DNA 断片を確認することができた。しかしながら、*Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子の DNA 断片とは DNA サイズが異なることがわかった。Fig.1 にアニーリング温度 40℃と設定した場合の P C R 増幅結果を示す。

Table.1 Growth capability of anaerobic mercury resistant isolates in the presence of mercury ion.

Strain	Mercury Concentration 100 μ M	Mercury Concentration 300 μ M	Mercury Concentration 500 μ M
MN1	++++	++++	++
MN1-1	++++	++++	+
MN1-2	++++	++++	+++
MN2	++++	++++	+++
MN2-1	++++	++++	+++
MN3	++++	++++	++
MN4	++++	++++	++++
MN5	++++	++++	++
MN6	++++	++++	+++
MN7	++++	++++	++
MN8	++++	++++	+++
MN9	++++	++++	++
MN10	++++	++++	+++
MN11	++++	++++	++
MN12	++++	++++	+++
MN13	++++	++++	++++
MN14	++++	++++	++
MN15	++++	++++	+
MN16	++++	++++	++
MN17	++++	++++	+
MN18	++++	++++	+
MN19	++++	++++	+++
MN20	++++	++++	++
MN21	++++	++++	+
MN22	++++	++++	++
MN23	++++	++++	++

++++: Perfectly grown ++: Grown

+++ : A activity grown +: Weakly grown



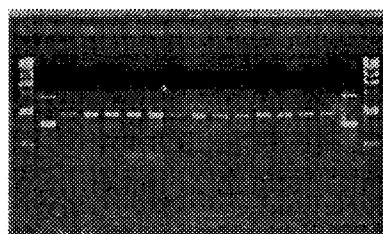
Lane

①,①⑦: λ phage DNA/*Hind*III

②,①⑥: PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp.

③~①⑤: PCR product of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10

(1)X(2)X(3)X(4)X(5)X(6)X(7)X(8)X(9)X(10)X(11)X(12)X(13)X(14)X(15)X(16)X(17)



Lane

(1),(17): λ phage DNA/*Hind*III

(2),(16): PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp.

(3)~(15): PCR product of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23

Fig.1 PCR amplification of targeted *merA* gene of anaerobic mercury resistant bacteria at 40℃ of annealing temperature.

4. 結論

本実験より、得られた結論は以下の通りである。

- 1) 水俣湾底泥より純粋分離された 26 菌株の嫌気性水銀耐性細菌は、水銀濃度 300 μ M までは十分な耐性を示し増殖が可能であった。500 μ M では耐性能に差が見られ、なかでも 2 つの菌株は活発に増殖が確認され、強い耐性能を示した。
- 2) PCR 法による水銀耐性遺伝子の解析では、26 菌株の全ての嫌気性水銀耐性細菌は、*Bacillus* sp. と全く同一の *merA* 遺伝子を持っていないということがわかった。しかし、*merA* 遺伝子に相同する遺伝子を持っていることが示唆された。

なお本研究は、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。