

水俣湾底泥から分離されたグラム陽性水銀耐性細菌の水銀除去能と水銀耐性トランスポゾンの解析

日本学術振興会	正 員	○成田 勝
東北学院大学大学院工学研究科	学生員	鈴木 大
東北大学大学院生命科学研究科		石井秀学
国立中興大学生命科学部（台湾）		黄 介辰
東北学院大学工学部	フェロー	遠藤銀朗

1. はじめに

水銀による環境汚染は、かつて熊本県の水俣湾周辺で発生した水俣病のようにきわめて重大な水銀中毒事件を引き起こしており、我々の健康な生活や生態系を維持する上で大きな問題を提起している。本研究ではこのような問題解決のために水銀耐性細菌を利用した生物学的水銀除去技術の開発を目的として研究を進めている。以前、当研究室では水銀に汚染された当時の熊本県の水俣湾底泥から数多くのグラム陽性水銀耐性細菌を分離し、これらの分離株の保有する水銀耐性オペロン（*mer* オペロン）がグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus cereus* RC607 株や *Bacillus megaterium* MB1 株の保有する *mer* オペロンと全く同一であることを明らかにしてきた。また、*B. cereus* RC607 株や *B. megaterium* MB1 株の保有する *mer* オペロンは転移因子であるクラス II トランスポゾン上にコードしていることが知られている。このことから、細菌間における *mer* オペロンの水平伝達の可能性が考えられた。しかしながら、当研究室で分離した全く同一の *mer* オペロンを保有する各細菌株が、*mer* オペロンをクラス II トランスポゾン上にコードしているかどうかについては調べられていない。

よって、本研究では水俣湾底泥から分離した全く同一の *mer* オペロンを保有する 5 細菌株を用いて、水銀除去能の評価とクラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索および解析を行った。

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株

B. cereus RC607 株や *B. megaterium* MB1 株の保有する *mer* オペロンと全く同一の *mer* オペロンを保有するグラム陽性水銀耐性細菌 MB5 株、MB23 株、MB26 株、MB29 株、MB31 株の 5 細菌株を用いた。

2-2 無機水銀に対する水銀除去能の評価

塩化第二水銀（初期濃度 10mM）を用いて各細菌株の水銀除去能を評価した。水銀除去能の評価は、還元・気化法によるフレイムレス原子吸光計（SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan）を使用して培養液中の水銀残存量を測定することによって行った。

2-3 クラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

各細菌株からトータル DNA を抽出し、抽出したトータル DNA を鋳型として Long PCR 法によってクラス II 水銀耐性トランスポゾン領域を標的として増幅を試みた。また、得られた各 PCR 産物の制限酵素地図を作成し相同性を解析した。

3. 実験結果および考察

3-1 無機水銀に対する水銀除去能の評価結果

Fig. 1 に各細菌株の塩化第二水銀に対する水銀除去能の評価結果を示す。MB5 株、MB23 株、MB26 株、MB29 株および MB31 株の 4 時間後の水銀残存率はそれぞれ 85%、20%、20%、20%および 70%であり除去効率に差が見られた。しかしながら、各細菌株の 24 時間後の水銀残存率はそれぞれ 15%であり、ほぼ同じ除去率を示し効率よく水銀を除去することが明らかになった。

キーワード：グラム陽性水銀耐性細菌、*mer* オペロン、水銀耐性トランスポゾン、水銀除去能

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1 丁目 13-1 (TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070)

3-2 クラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

クラス II 水銀耐性トランスポゾン領域を標的として Long PCR 増幅を行った結果、MB5 株は *B. megaterium* MB1 株の保有する 14.2kbp のクラス II 水銀耐性トランスポゾン *TnMERI1* と同じ DNA サイズで増幅され、MB23 株、MB26 株および MB29 株の 3 細菌株は *B. cereus* RC607 株の保有する 11.5kbp のクラス II 水銀耐性トランスポゾン *Tn5084* と同じ DNA サイズで増幅された。また、MB31 株のトータル DNA から PCR 増幅がなされなかった。続いて、各 PCR 産物の制限酵素地図を作成した結果 (Fig. 2)、MB5 株の PCR 産物は *TnMERI1* の制限酵素地図と全く同一で、MB23 株、MB26 株および MB29 株の 3 細菌株の各 PCR 産物は *Tn5084* の制限酵素地図と全く同一であった。以上の結果より、水俣湾底泥に生息するグラム陽性水銀耐性細菌株の保有する水銀耐性トランスポゾンには、少なくとも大きさの異なる 2 つのタイプが存在することが明らかになった。

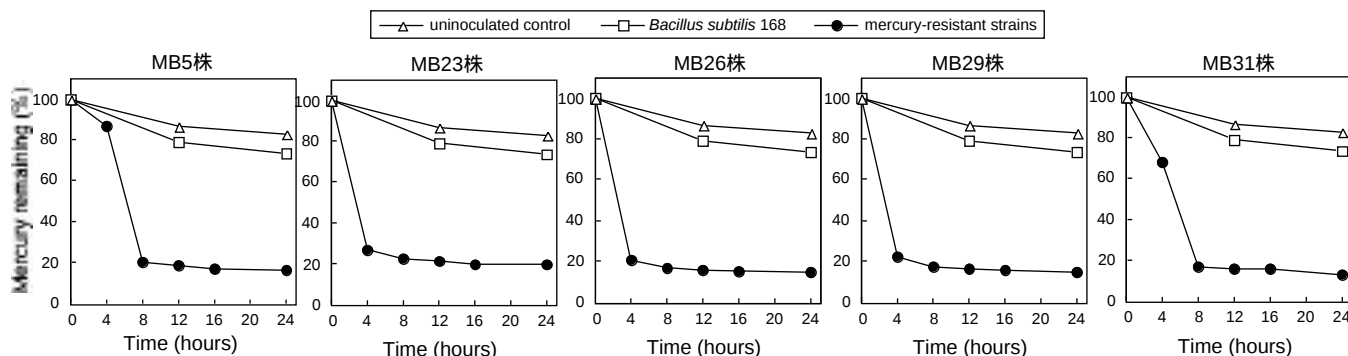


Fig. 1 塩化第二水銀 (初期濃度 10 μ M) に対する水銀除去能の評価結果

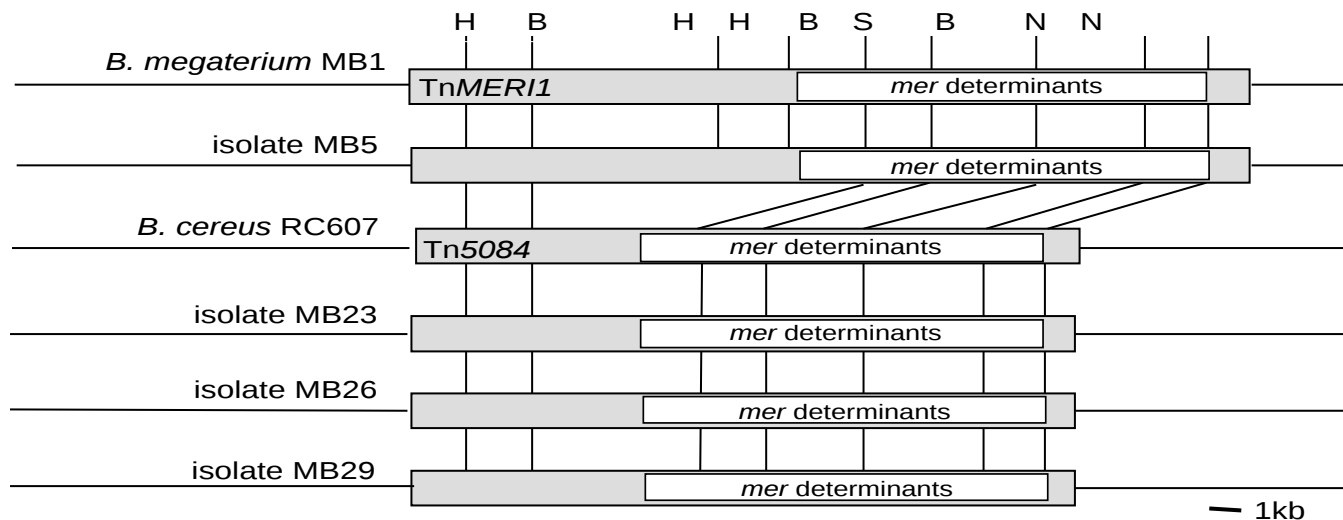


Fig. 2 MB5 株、MB23 株、MB26 株および MB29 株の各 PCR 産物の制限酵素地図作成結果
略語表記: B; *Bgl* II, H; *Hind* III, S; *Sma* I, N; *Nco* I

4. おわりに

水俣湾底泥に生息するグラム陽性水銀耐性細菌株の保有する *mer* オペロンのほとんどは、クラス II トランスポゾン上に存在することが明らかになった。この現象は細菌種および株を越えて *mer* オペロンの水平伝達が行われた結果であると考えられる。さらに、各細菌株が効率よく水銀を除去したことは、水平伝達された *mer* オペロンが各細菌株において発現し、水銀除去活性を持っていることを示している。以上の得られた結果から、細菌の転移因子による水平伝達の機能を詳細に明らかにすることによって、自然伝播のメカニズムを利用した生物学的水銀除去技術への応用が考えられた。