

世界各地の環境中から分離した芽胞形成水銀耐性細菌の水銀耐性トランスポゾンの探索と解析に関する研究

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	佐藤充則
東北大学大学院生命科学研究科		石井秀学
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今なお続発しており、極めて重大な環境問題を引き起こしている。そのため、当研究室では水銀耐性細菌を利用した水銀の生物学的環境浄化技術の開発を目的として、水俣湾底泥から分離した芽胞形成水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株の水銀耐性決定因子の解析を行ってきた。解析を行った結果、*B. megaterium* MB1 株の水銀耐性遺伝子群 (*mer* オペロン)は、アメリカのボストン港底泥から分離された芽胞形成水銀耐性細菌 *Bacillus cereus* RC607 株の保有する *mer* オペロンと全く同一であることが知られ、*B. megaterium* MB1 株と *B. cereus* RC607 株の保有する *mer* オペロンは、それぞれ TnMER11 および Tn5084 と命名されたクラス II トランスポゾン上に存在することが明らかにされた。このことから、芽胞形成細菌間でトランスポゾンを介した *mer* オペロンの水平伝達の可能性が示唆された。よって、水俣湾やボストン湾以外にも芽胞形成水銀耐性細菌が生息し、それらの細菌株が TnMER11 や Tn5084 と全く同一のトランスポゾンを保有し広域的に分布していることが考えられる。本研究においては世界各地の環境サンプルを用いて数多くの芽胞形成水銀耐性細菌を分離を試み、得られた分離株からの水銀耐性トランスポゾンの探索と解析を行った。

2. 実験材料および実験方法

2-1 芽胞形成水銀耐性細菌の探索

世界各地から採取した15地点の環境サンプル(海岸砂、川砂、土壌および底泥)を用いて、塩化水銀を含んだZoBell培地もしくはLB培地によって芽胞形成水銀耐性細菌の分離を試みた。

2-2 *mer* オペロンの探索と解析

上記 2-1 で分離できた細菌株を用いて、各細菌株から抽出したトータル DNA を鋳型として、サザンハイブリダイゼーション法、PCR 法および RFLP 法によって *B. megaterium* MB1 株と全く同一の *mer* オペロンを保有するかどうかの探索と解析を行った。

2-3 水銀除去能の評価

上記 2-2 の *mer* オペロンを保有する細菌株を用いて、水銀除去能の評価を行った。水銀除去能の評価はフレイムレス原子吸光計 (SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan)を使用して、一晚培養後の培養液中の水銀残存量を測定することによって行った。用いた水銀化合物は無機水銀として塩化水銀 (初期濃度 10mM)、有機水銀として塩化メチル水銀 (初期濃度 0.1mM)である。

2-4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

上記 2-2 の *mer* オペロンを保有する細菌株を用いて、各細菌株から抽出したトータル DNA を鋳型として、PCR 法、サザンハイブリダイゼーション法および RFLP 法によって TnMER11 や Tn5084 などと全く同一の水銀耐性トランスポゾンを保有するかどうかについて解析を行った。

3. 実験結果および考察

3-1 芽胞形成水銀耐性細菌の探索結果

Table 1 に芽胞形成水銀耐性細菌の探索結果を示す。得られた細菌株の全ては桿菌で芽胞を形成した(data not shown)。よって、合計 57 株の芽胞形成水銀耐性細菌を分離することに成功した。

キーワード：芽胞形成水銀耐性細菌、水銀除去能、*mer* オペロン、水銀耐性トランスポゾン

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 mer オペロンの探索と解析結果

分離した 57 細菌株のうち、22 細菌株が *B. megaterium* MB1 株の mer オペロンと全く同一の mer オペロンを保有していた (data not shown)。

3-3 水銀除去能の評価結果

上記の 22 細菌株の全ては、塩化水銀および塩化メチル水銀の 2 種の水銀化合物を効率よく除去した (data not shown)。

3-4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

PCR 増幅によって水銀耐性トランスポゾンの探索を行った結果、上記 22 細菌株のうち、20 細菌株からは Tn5084 と同じサイズの PCR 産物 (11.5kbp) が得られ、2 細菌株からは TnMER11 と同じサイズの PCR 産物 (14.2kbp) が得られた (data not shown)。また、各 PCR 産物は mer オペロンプローブとハイブリダイズされた (data not shown)。続いて、各 PCR 産物の制限酵素地図を作製した結果 (Fig. 1)、11.5kbp の PCR 産物が得られた 20 細菌株のうちの 16 細菌株は、Tn5084 と全く同一のトランスポゾンに保有し、残りの 4 細菌株は Tn5084 と部分的に異なる塩基配列のトランスポゾンに保有すると考えられた。また、14.2kbp の PCR 産物が得られた 2 細菌株は、TnMER11 と全く同一のトランスポゾンに保有すると考えられた。以上の結果から、同一のまたは類似するトランスポゾンが世界規模で分布していることが知られた。

Table 1 各地点からの芽胞形成水銀耐性細菌の探索結果

各分離地点	分離株数
1. アメリカ・ハワイ・ワイキキビーチの砂 (HW)	3株
2. タイ・パタヤビーチの砂 (TH)	5株
3. オーストラリア・マンリービーチの砂 (AUE)	1株
4. アメリカ・フロリダ・オーモンドビーチの砂 (FL)	0株
5. アメリカ・サンフランシスコ・オーシャンビーチの砂 (SF)	0株
6. 韓国・松島海水浴場の砂 (KR)	4株
7. イタリア・タリメント川の川砂 (ITA)	3株
8. スイス・ライン川の川砂 (SWI)	8株
9. オーストラリア・トムソン湾の砂 (AUW)	0株
10. オランダ・アムステルダム川の土壌 (NET)	10株
11. 台湾・台中港近くの防風林の土壌 (TW)	18株
12. 南アフリカ・ディアズビーチの砂 (SAFR)	0株
13. アイルランド・バルコネリービーチの砂 (IRE)	0株
14. スウェーデン・Lund近くのビーチの砂 (SWE)	3株
15. メキシコ・ボカデルリオビーチの砂 (MEX)	2株
合計 57 株	

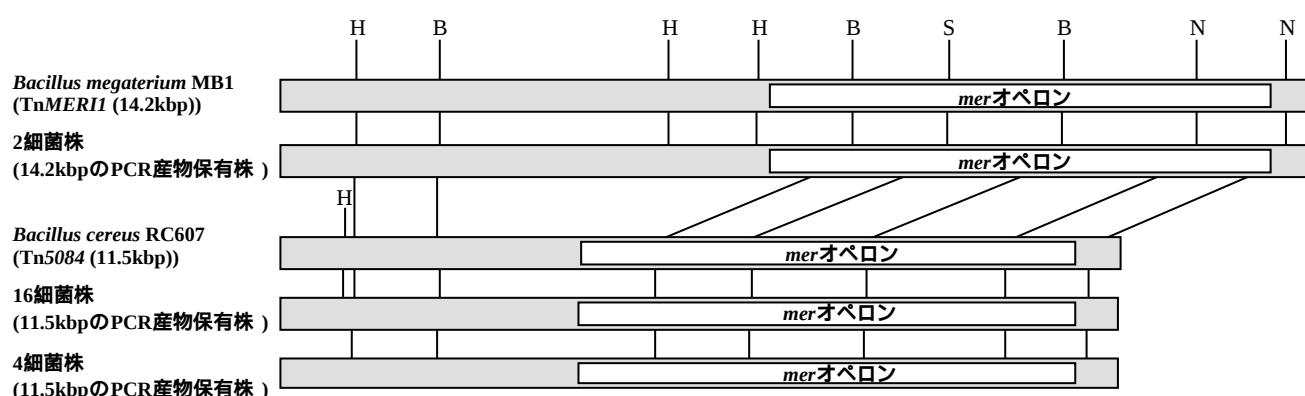


Fig. 1 各 PCR 産物の制限酵素地図の作製結果

記号：B, *Bgl*III、E, *Eco*RI、H, *Hind*III、N, *Nco*I、S, *Sma*I

4. おわりに

世界各地の環境サンプルから分離された 57 株の芽胞形成水銀耐性細菌のうち、22 細菌株は *B. megaterium* MB1 株の mer オペロンと全く同一の mer オペロンを保有していた。また、それぞれの mer オペロンは Tn5084 や TnMER11 などの水銀耐性トランスポゾン上に存在することが明らかになり、同一のトランスポゾンが世界規模で分布されていることが明らかになった。よって、芽胞形成細菌間において、これらのトランスポゾンが mer オペロンの水平伝達に大きく貢献していると考えられた。