

水俣湾底泥から分離した通性嫌気性芽胞形成水銀耐性細菌の水銀耐性トランスポゾンの解析に関する研究

東北学院大学大学院工学研究科	学生員	佐藤充則
日本学術振興会	正 員	成田勝
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、人間への健康や生態系を維持する上で極めて重大な問題となっている。このため水銀耐性細菌を利用した生物学的環境浄化技術の開発を目的として研究が進められてきている。以前、本研究室では水俣湾底泥から芽胞を形成するの好気性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株と絶対嫌気性水銀耐性細菌 *Clostridium butyricum* Mersaru 株を分離し、水銀耐性決定因子の解析を行った。その結果、両細菌株は全く同一の水銀耐性遺伝子群 *mer* オペロンを保有することが明らかになった。さらに、*B. megaterium* MB1 株の *mer* オペロンは TnMERI1 と命名されたクラス II トランスポゾン上にコードされていることが知られた。しかしながら、水俣湾底泥に生息すると考えられる通性嫌気性の芽胞形成水銀耐性細菌の *mer* オペロンやトランスポゾンの保有についてはまだ明らかにされていない。よって、本研究では水俣湾底泥から通性嫌気性の芽胞形成水銀耐性細菌を分離することを試み、得られた細菌株の同定と *mer* オペロンおよび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 通性嫌気性芽胞形成水銀耐性細菌の分離と同定

水俣湾の底泥を 80 で 30 分間ヒーティングし、塩化水銀を含む嫌氣的 ZoBell 液体培地および寒天培地を用いて通性嫌気性の芽胞形成水銀耐性細菌の分離を試みた。得られた分離株の中から 1 細菌株を選び、16S rDNA の塩基配列を決定することにより種の同定を試みた。

2-2 水銀除去能の評価

分離した細菌株を用いて、フレイムレス原子吸光計 (SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan) によって一晚培養後の培養液中の水銀残存量を測定した。使用した水銀化合物は塩化水銀 (初期濃度 10mM) と酢酸フェニル水銀 (初期濃度 0.2mM) である。

2-3 *mer* オペロンの探索と解析

分離した細菌株から全 DNA を抽出し、PCR 法によって *mer* オペロン領域の増幅を試みた。また、得られた PCR 産物の制限酵素地図を作製し相同性を解析した。

2-4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

分離した細菌株から全 DNA を抽出し、単一プライマーを用いる Long PCR 法によってクラス II 水銀耐性トランスポゾン領域の増幅を試みた。また、得られた PCR 産物の制限酵素地図を作製し相同性を解析した。

3. 実験結果および考察

3-1 通性嫌気性芽胞形成水銀耐性細菌の分離と同定結果

得られた分離株のうち、1 細菌株を選び MB24 株と命名した。MB24 株は桿菌で芽胞を形成した。また、16S rDNA シーケンスの相同性検索の結果から、*Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus* および *Bacillus thuringiensis* の 16S rDNA シーケンスと 100% の相同性を示した。

3-2 水銀除去能の評価結果

Fig. 1 に *Bacillus* sp. MB24 株の各水銀化合物に対する除去能の評価結果を示す。24 時間培養後の各水銀残存率は、それぞれ 20% (塩化水銀を用いた場合) および 31% (酢酸フェニル水銀を用いた場合) であった。よ

キーワード：通性嫌気性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)

て、この細菌株は効率よく水銀を除去することが知られた。

3-3 *mer* オペロンの探索と解析結果

Bacillus sp. MB24 株は、*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* オペロンを保有していた (data not shown)。

3-4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

Long PCR 増幅を行った結果、*Bacillus* sp. MB24 株からは以前知られているクラス II トランスポゾンの TnMERI1 や Tn5084 の各 PCR 産物よりも大きいサイズの PCR 産物が得られた (約 25 ~ 26kbp)(data not shown)。また、この PCR 産物は *mer* オペロンプローブとハイブリダイズした (data not shown)。Fig. 2 に PCR 産物の制限酵素地図の作製結果を示す。*Bacillus* sp. MB24 株の PCR 産物は *tnp* 遺伝子群と *mer* オペロンと推測される領域の間に 13 ~ 14kbp の長さの介在配列が存在すると考えられた。よって、今まで知られているトランスポゾンとは大きさの異なる新規の水銀耐性トランスポゾンを保有することが明らかになった。

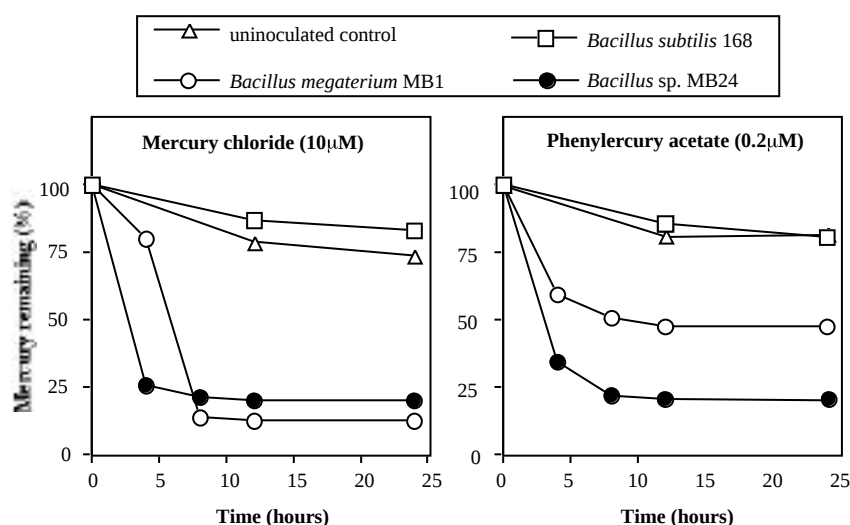


Fig. 1 *Bacillus* sp. MB24 株の各水銀化合物に対する除去能の評価結果

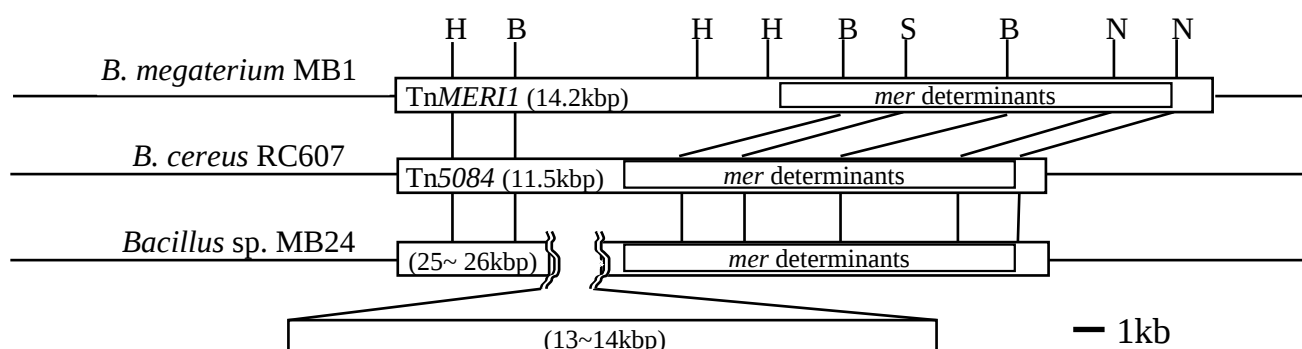


Fig. 2 *Bacillus* sp. MB24 株の PCR 産物の制限酵素地図作成結果

4. おわりに

通性嫌気性の芽胞形成水銀耐性細菌である *Bacillus* sp. MB24 株の保有する *mer* オペロンは、クラス II トランスポゾン上に存在していることが明らかになった。しかしながら、そのトランスポゾンは、従来から知られている水銀耐性トランスポゾン TnMERI1 や Tn5084 と大きさや構造が異なるものであった。このことは、水俣湾底泥に生息する芽胞形成細菌間で、様々な種類の転移因子によって全く同一の *mer* オペロンが水平伝達されたことを示している。以上の結果から、細菌の転移因子を利用した自然伝播メカニズムによる生物学的水銀除去技術への応用の可能性が考えられた。