

嫌気性水銀耐性細菌による水銀の還元気化と 遺伝子解析に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○大谷貴宏 我妻仁 佐藤奏子 松宮 秀泰
東北学院大学工学部 正 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、水俣病の原因物質である水銀による汚染は環境ばかりではなく、我々人体に対して直接的な被害を与える物質として現在でもその使用と排出に対して厳しい制限がある。水銀の処理は現在物理化学的または生物処理と活性炭との併用が一般的である。そのため現在知られている水銀の除去能力を持った好気性水銀耐性細菌について、研究が世界的に進められている。しかし嫌気的な条件下で生息している水銀耐性細菌についての研究はほとんど行われていないのが現状である、そのため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、その解明ため実験的な検討を行った。

【2.実験方法】

(1) 嫌気性水銀耐性細菌の純粋分離

水俣湾埋め立て以前の水銀によって汚染されていた頃の水俣湾の低泥より、松宮らにより純粋培養された嫌気性水銀耐性細菌を。本研究の供試細菌として用いる。細菌の分離は以下の方法で行った。

- (a) 底泥を超音波で処理し剥離した細菌を嫌気性細菌培養用のPY培地を水銀濃度（無機水銀：塩化第二水銀） $100\mu\text{M}$ になるように調整した培地によって培養を行った。
- (b) 培養した嫌気性水銀耐性細菌を海水をろ過、滅菌したもので10倍希釈法により希釈しロールチューブ法によりコロニーを形成させ、単一のコロニーを嫌気グローブボックス内で釣菌し新たに培地に植菌し培養する。
- (c) 上記の操作を嫌気性水銀耐性細菌が純粋培養になるまで繰り返す。これらの操作はすべて嫌気的条件のもとで行う。
- (2) 水銀の還元気化能力の評価

X線フィルム法による水銀の耐性機構の解明では、嫌気性水銀耐性細菌の水銀

の気化機構を中村らによって開発されたX線フィルム法を用いて以下の手順によって解明する。

- (a) ロールチューブ法によって得られた嫌気性水銀耐性細菌23株をマイクロプレートのウェルに水銀気化バッファーと共にいれよく懸濁する。
- (b) 暗室内で上記のマイクロプレートとマイクロプレートと同じ大きさの厚紙の間にマイクロプレートと同じ大きさのX線フィルムを挟み、両端をクリップで保持したものを4つ作製しブリキ缶の様な遮光容器内で水銀蒸気に暴露する。
- (c) 遮光容器ごと 30°C に保ち、24時間、48時間、96時間、120時間暴露させたX線フィルムを 現像の後、それらを比較検討する。
- (3) 水銀耐性の分子生物学的機構に関する検討
- (a) 嫌気性水銀耐性細菌を大量に培養し染色体を回収する。
- (b) 回収した嫌気性水銀耐性細菌23株の染色体DNAと *Bacillus* の *merA*、*merB* の塩基配列から作製したプライマーを用いPCR法によって、23株の染色体の特定の領域である *merA* 領域と *merB* 領域を増幅させる。
- (c) プローブを作製するため大腸菌に *Minamata Bacillus* からDNAを抽出し必要なDNA断片である *merA* 遺伝子、*merB* 遺伝子を制限酵素によって切り出したものを取り込ませた *merA* 遺伝子を持つ *Minamata Bacillus JM109(p46)* と *merB* 遺伝子を持つ *Minamata Bacillus JM109(p47)* から *merA* 遺伝子、*merB* 遺伝子を取り出しDNA Labeling Kitを用い抗原標識を行いDNAプローブとして用いる。
- (d) 上記のDNAプローブを用いサザンハイブリダイゼーションを行い、その発色反応により、我々が回収した嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性機構と、現在広く知られている水銀耐性細菌の耐性機構である *merA*、*merB* との相同性を比較検討を行う。

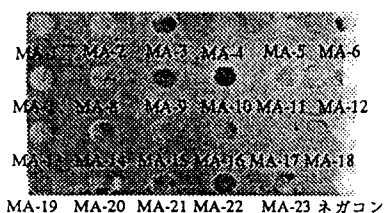


図-1 96時間反応後のX線フィルム

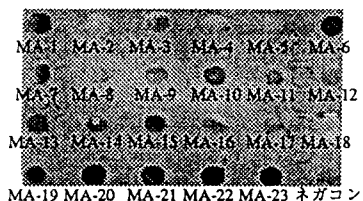


図-2 120時間反応後のX線フィルム

【3.実験結果】

- (1) 水俣湾の底泥より23株の純粋な菌体(MA-1~MA-23)を得ることができた。
- (2) X線フィルムを用いた耐性機構の解明では、23株の菌体のうち24時間、48時間反応させたものでは、変色を確認できなかった。96時間反応では、菌株MA-3、MA-6、MA-7、MA-9、MA-10、MA-11、MA-12、MA-14、MA-19、MA-20、MA-21、MA-22、MA-23 で水銀気化を確認できた。(図-1)。120時間反応では、さらにMA-1、MA-13、MA-17で変色を確認できた。(図-2)
- (3) 水銀耐性の分子生物学的機構に関する検討の結果は以下の通りであった。
- (a) PCR法によって、回収した23株の染色体の*merA*領域の増幅のFowardプライマーを2種類用い実験を行った。No.1のFowardプライマーを用いた実験ではMA-4、MA-8以外*merA*領域の増幅が確認できた(図-3)。No.2のFowardプライマーを用いた実験ではMA-5、MA-6以外*merA*領域の増幅が確認できた。*merB*領域のPCR増幅において、MA-1、MA-2、MA-4、MA-5、MA-7、MA-9、MA-10、MA-13、MA-14で*merB*領域の増幅を確認できた。
- (b) サザンハイブリダイゼーションの発色反応の結果より、PCR法によって*merA*領域*merB*領域を増幅できた菌株について、DNAプローブとハイブリダイズしたメンブレンフィルターの発色を確認することができた。(図-4)

【4.考察】

本実験の結果水俣湾の底泥より23株の純粋な嫌気性水銀耐性細菌を得ることができた。これら23の細菌のなかに水銀化合物(塩化第二水銀)を金属水銀に還元する細菌を確認できた。また、反応時間に差があることが確認できた、これらの中でも反応の遅いものは、水銀イオンをメチル水銀に置換するものと、生成したメチル水銀を金属水銀に還元する可能性が考えられる。またPCR法による増幅結果より、これらの嫌気性水銀耐性細菌は*Bacillus*の*merA*および*merB*と相同性のある水銀耐性遺伝子を持つことが知られた。しかしサザンハイブリダイゼーションの発色反応の結果反応領域のバンドが本来の*merA*や*merB*と異なることや、ハイブリダイゼーション条件をより緩いものにしなければ発色反応の結果が得られなかった事より、我々が水俣湾の底泥より得た23株の嫌気性水銀耐性細菌の耐性を司る*mer*オペロン領域は、現在広く知られている好気性の細菌とやや異なることも知られた。

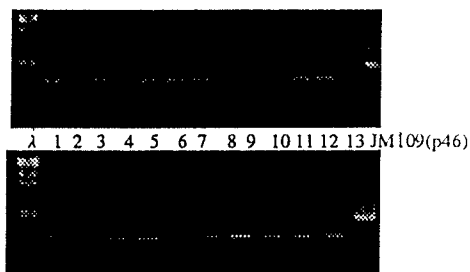


図-3 merAP1merAPR1によるPCR増幅結果
写真ではMA-4、MA-8以外でも確認できない領域が有るが実物では確認することができる

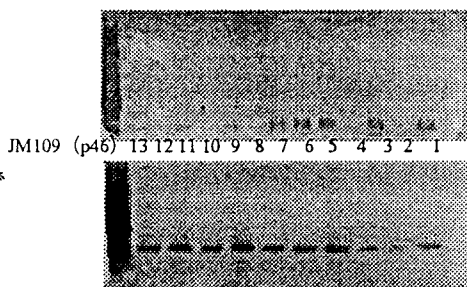


図-4 merAP1merAPR1のPCR産物のサザンハイブリダイゼーションの結果