

VII-18

グラム陽性水銀耐性細菌のクラスⅡ水銀耐性 トランスポゾンの解析と水銀除去能に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○鈴木 大
東北学院大学工学部 千葉 一行
日本学術振興会 正会員 成田 勝
東北学院大学工学部 フェロー 遠藤 銀朗

1. はじめに

近年の旺盛な産業活動に伴い、有害物質を含んだ廃水や廃棄物などによる著しい環境汚染が深刻となっている。そのなかでも有害重金属である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。本研究室では、これらの解決のために水銀耐性細菌を利用した生物学的環境汚染修復技術の開発を目的として研究を進めてきたが、水銀に汚染されていた当時の水俣湾底泥からグラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株を分離した。この *B. megaterium* MB1 株の保有する水銀耐性オペロン (*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グラム陽性水銀耐性細菌 *Bacillus cereus* RC607 株の保有する *mer* オペロンと全く同一のオペロンを保有することが明らかとなった。さらに、*B. megaterium* MB1 株や *B. cereus* RC607 株の *mer* オペロンは、転移因子であるクラスⅡ水銀耐性トランスポゾン上にコードされていることが明らかとなった。このことから、細菌間における水銀耐性遺伝子の水平伝達の可能性が考えられた。しかしながら、*B. megaterium* MB1 株と全く同一の *mer* オペロンを保有している他のグラム陽性水銀耐性細菌が、この *mer* オペロンをクラスⅡ水銀耐性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解明されていない。

本研究では、以前に水俣湾底泥から分離したグラム陽性水銀耐性細菌である *Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB26 株および *Bacillus* sp. MB29 株の 3 細菌株を用いて、クラスⅡ水銀耐性トランスポゾンの探索と解析ならびにこれらの各細菌株を用いた水銀除去能の評価に関する研究を行ったので報告する。

2. 実験材料および実験方法

(1) 供試細菌株

以前、水俣湾底泥から分離したグラム陽性水銀耐性細菌株の中から *Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB26 株、*Bacillus* sp. MB29 株の 3 細菌株を選び、使用した。

(2) クラスⅡ水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

Bacillus sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB26 株および *Bacillus* sp. MB29 株の保有する *mer* オペロンがクラスⅡ水銀耐性トランスポゾン上にコードされているかを知るために、これらのトータルDNAを鋳型とした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た増幅を試みた。また、得られた PCR 産物の制限酵素地図を作成することにより、*mer* オペロンの保有とそれらの相同性を解析した。

(3) 各水銀化合物に対する水銀耐性能の評価

無機水銀化合物である塩化第二水銀 (HgCl_2) (初期濃度 $10 \mu\text{M}$) を用いて、各細菌株の水銀除去能を評価した。水銀除去能の評価においては、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した。測定は、水銀を添加した LB 液体培地での培養開始時 (0 時間) および 4、8、12、16、24 の各培養経過時間において行った。

3. 実験結果および考察

(1) 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、*Bacillus* sp. 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、*Bacillus* sp. MB26 株と *Bacillus* sp. MB29 株の 2 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。以上のことから、水俣湾底泥に生息している水銀耐性細菌株には、少なくとも 2 つのタイプのクラスⅡ水銀耐性トランスポゾンが存在していることが考えられた。また、これらの増幅された PCR 産物の制限酵素地図を作成した結果 (Fig. 1)、この 3 細菌株の保有している *mer* オペロンはいずれもこれらのクラスⅡ水銀耐性トランスポゾン上にコードされていることが明らかとなった。

(2) 各水銀化合物に対する水銀除去能の評価結果

各細菌株の塩化第二水銀 (MC) に対する水銀除去能の評価結果を Fig. 2 に示す。*Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB26 株および *Bacillus* sp. MB29 株の 4 時間後の水銀残存率はそれぞれ 85%、20%、20% であり、水銀の除去効率に差が見られた。しかしながら、24 時間後の各細菌株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た。

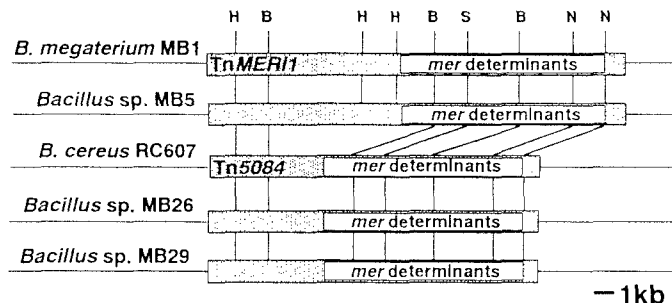


Fig. 1 *Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB26 株および *Bacillus* sp. MB29 株のクラスⅡ水銀耐性トランスポゾン領域の制限酵素地図

略語表記 : B; *Bgl* II, H; *Hind* III, S; *Sma* I, N; *Nco* I

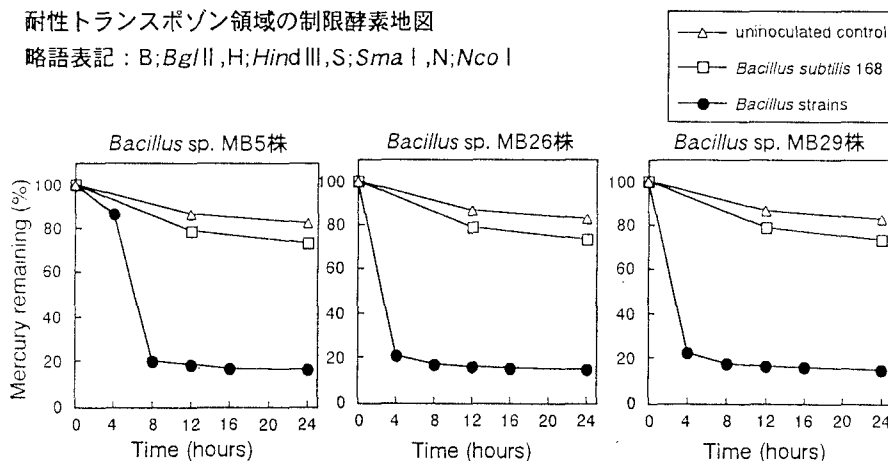


Fig. 2 塩化第二水銀 (初期水銀濃度は $10 \mu\text{M}$) の水銀除去能の評価結果

4. おわりに

各 3 細菌株の *mer* オペロンは、*B. megaterium* MB1 株や *B. cereus* RC607 株の *mer* オペロンと全く同一であることが明らかとなった。しかしながら、*Bacillus* sp. MB5 株は TnMERI1 と同一のクラスⅡ水銀耐性トランスポゾンを保有し、*Bacillus* sp. MB26 株と *Bacillus* sp. MB29 株は Tn5084 と同一のクラスⅡ水銀耐性トランスポゾンを保有していることが知られた。この結果は、水俣湾に生息する細菌のクラスⅡ水銀耐性トランスポゾンには少なくとも 2 つのタイプがあり、細菌種および株を越えて水平伝達されたことを示すものと考えられる。また、これら 3 細菌株が無機水銀化合物を効率的に除去できたことから、これらの細菌は生物学的に水銀除去する上で有用であると考えられる。