

VII - 28

環境中からの芽胞形成水銀耐性細菌の分離と水銀耐性トランスポゾンの世界規模での分布に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○安食裕治
東北学院大学工学部		下妻由典
東北学院大学工学部		高島純平
日本学術振興会	正 員	成田 勝
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今なお続発しており、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、水俣湾底泥から芽胞形成水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株を分離し、水銀耐性決定因子の分子生物学的解析を行っている。解析した結果、*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明らかになった。さらに、*B. megaterium* MB1 株と *B. cereus* RC607 株の保有する *mer* オペロンは、それぞれ *TnMERII* 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なった。このことから、芽胞形成細菌間で水銀耐性遺伝子のトランスポゾンを介した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 *TnMERII* 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。そこで本研究においては、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することを試み、得られた分離株のクラス II 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 16 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

得られた細菌株を用いて、*B. megaterium* MB1 株と全く同一の *mer* オペロンを保有するかどうかを調べるために、各細菌株から抽出したトータル DNA を鋳型として、PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法によって *mer* オペロンの探索と解析を行った。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。

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、各水銀化合物に対する除去能を評価した。水銀除去能の評価は、フレームス原子吸光計 (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。使用した水銀化合物は、無機水銀として塩化水銀 (濃度は 20 μ M)、有機水銀として塩化メチル水銀 (濃度は 0.1 μ M) 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、クラス II 水銀耐性トランスポゾンを保有するかどうかを調べるために、各細菌株から抽出したトータル DNA を鋳型として、PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法によってクラス II 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析を行った。また、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 芽胞形成水銀耐性細菌の探索結果

世界各地の環境サンプルから、合計 71 株の芽胞形成水銀耐性細菌を分離することに成功した。

3-2 *mer* オペロンの探索と解析結果

上記 71 細菌株のうち、24 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。

3-3 水銀除去能の評価結果

上記の 24 細菌株全ては本研究で使った塩化水銀および塩化メチル水銀の 2 種の水銀化合物を除去できた。

3-4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

Fig. 1 に Long PCR 増幅による水銀耐性トランスポゾンの探索結果を示す。上記 24 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、3 細菌株からは TnMERII と同じサイズの PCR 産物 (14.2kbp) が得られた。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。しかしながら、1 細菌株 (KR1 株) の PCR 産物は Tn5084 や TnMERII と異なるサイズであり、*mer* オペロンプローブとハイブリダイズされなかった。各 PCR 産物の RFLP 解析結果から、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を保有し、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を保有すると考えられた。また、14.2kbp の PCR 産物が得られた 3 細菌株は、TnMERII と全く同一のトランスポゾンを保有すると考えられた。

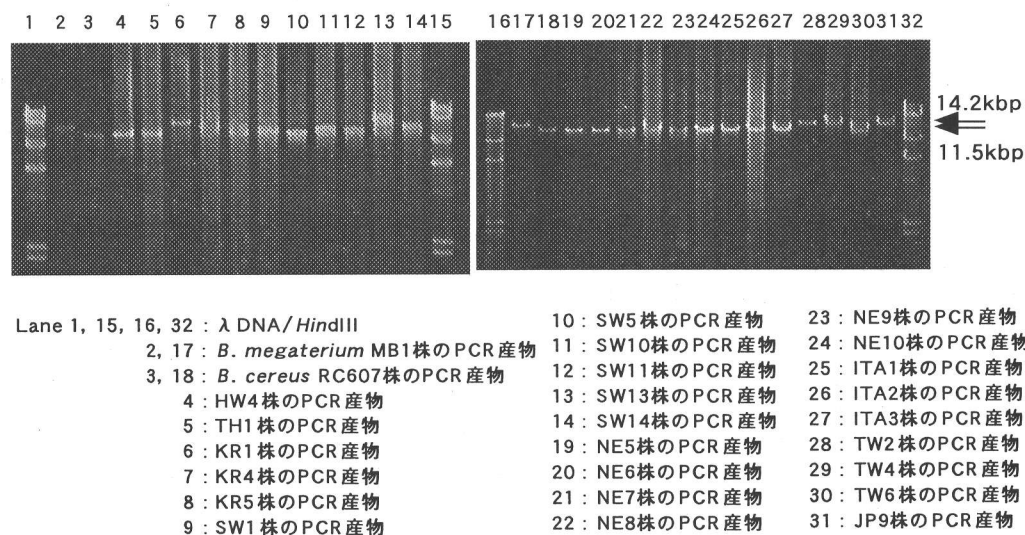


Fig. 1 クラス II 水銀耐性トランスポゾンを標的とした Long PCR 増幅結果

4. おわりに

世界各地の環境サンプルから分離された 71 株の芽胞形成水銀耐性細菌のうち、24 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。それら 24 細菌株のうち、16 細菌株は Tn5084 を保有し、4 細菌株は Tn5084 と塩基配列の部分的に異なるトランスポゾンを保有すると考えられた。また、3 細菌株は TnMERII を保有すると考えられた。以上の結果から、芽胞形成水銀耐性細菌間において、全く同一のクラス II 水銀耐性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、これらの転移因子は *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、これら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。