

VII－18 環境中からの芽胞形成水銀耐性細菌の分離と水銀耐性遺伝子の探索に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○小野 健児
東北学院大学工学部	正 員	成田 勝
日本学術振興会		松井 一彰
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に影響を及ぼすなど多くの被害を与えている。そのため、水銀汚染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。当研究室では水銀耐性細菌による環境汚染の浄化能力に注目して、水銀耐性細菌の水銀耐性メカニズムを利用した環境浄化技術を開発する研究を行ってきた。そのための基礎的研究として、世界各地の環境サンプルから数多くの水銀耐性細菌を分離し、水銀耐性遺伝子の分子生物学的解析を行った。その解析の結果、ある種の細菌株は *Bacillus megaterium* MB1 株の保有する水銀耐性遺伝子と全く同一の耐性遺伝子を持つことが明らかとなった。しかしながら、残る細菌株については、どのような水銀耐性遺伝子を保有するかについては全く調べられていない。これらの細菌株が持つ水銀耐性遺伝子の機能を用いた生物学的環境浄化技術を開発するためには、水銀耐性遺伝子の探索と解析を行うことが必要であると考えられる。

上記の理由により、本研究においては、以前当研究室で分離し未だ解析のなされていない 62 株の水銀耐性細菌を用いて、水銀耐性の特性と水銀耐性遺伝子の探索と解析について研究を行ったので報告する。

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株

世界各地の環境サンプルから分離した 62 株の芽胞形成水銀耐性細菌を用いた。

2-2 水銀耐性能の評価

上記 2-1 の 62 細菌株を用いて、無機と有機の水銀化合物に対する耐性能の評価を行った。耐性能の評価は、最小阻害濃度 (MICs, minimum inhibitory concentrations) を決定することによって行った。使用した水銀化合物は、無機水銀化合物として塩化水銀、有機水銀化合物として酢酸フェニル水銀とした。この耐性能評価テストは 4 回繰り返し行った。

2-3 水銀気化能の評価

上記 2-1 の 62 細菌株を用いて、無機と有機の水銀化合物に対する除去能の評価を行った。除去能の評価は、フレイムレス原子吸光法による水銀濃度検出器 (SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan) を使用して、各細菌株の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、無機水銀化合物として塩化水銀 (濃度は 1.0 μM)、有機水銀化合物として塩化メチル水銀 (濃度は 0.1 μM) とした。

2-4 水銀耐性遺伝子の探索

上記 2-1 の 62 細菌株からそれぞれ抽出したトータル DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーション法によって各水銀耐性遺伝子の探索を行った。プローブ DNA には、*B. megaterium* MB1 株由来の *merA* 遺伝子 (水銀還元酵素遺伝子) と 3 つの *merB* 遺伝子 (有機水銀分解酵素遺伝子) を用いた。

3. 実験結果および考察

3-1 水銀耐性能の評価結果

水銀耐性能の評価結果から、62 細菌株のうち、無機と有機の両方の水銀化合物に耐性を示した細菌株は 24 株、有機水銀化合物

には耐性を示さず無機水銀化合物にだけ耐性を示した細菌株は 35 株、無機と有機の両方の水銀化合物に耐性を示さなかった細菌株は 3 株であった。

3-2 水銀除去能の評価結果

水銀気化能の評価結果から、62 細菌株のうち、無機と有機の両方の水銀化合物を気化できた細菌株は 9 株、有機水銀化合物を気化せず、無機水銀化合物にだけ気化した細菌株は 53 株であった。

3-3 水銀耐性遺伝子の探索結果

水銀耐性遺伝子の探索結果から、62 細菌株のうち、*merA* 遺伝子と 3 つの *merB* 遺伝子全てにハイブリダイズシグナルを示した細菌株は 2 株、*merA* 遺伝子と *merB3* 遺伝子のみにハイブリダイズシグナルを示した細菌株は 5 株、*merA* 遺伝子のみにハイブリダイズシグナルを示した細菌株は 31 株、*merA* 遺伝子と *merB* 遺伝子全てにハイブリダイズシグナルを示さない細菌株は 24 株であった。Table 1 に各細菌株の水銀耐性能、水銀気化能および水銀耐性遺伝子の探索結果をまとめて示す。

Table 1 各細菌株の水銀耐性能、水銀気化能および水銀耐性遺伝子の探索結果

Strain	MIC (μM)		Volatilization		Hybridization with DNA probes ^j			
	IM ^a	OM ^b	IM	OM	<i>merA</i>	<i>merB3</i>	<i>merB2</i>	<i>merB1</i>
<i>Bacillus subtilis</i> 168 ^b	S ^f	S	NV ^h	NV	— ^k	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i> TA32-5 ^c	R ^g	S	V ⁱ	NV	+ ^l	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i> MB1 ^d	R	R	V	V	+	+	+	+
Broad-spectrum Hg-resistant strains (8):								
・ 2 細菌株	R	R	V	V	+	+	+	+
・ 5 細菌株	R	R	V	V	+	±	—	—
・ 1 細菌株	R	R	V	V	+	—	—	—
Narrow-spectrum Hg-resistant strains (35):								
・ 16 細菌株	R	S	V	NV	+	—	—	—
・ 5 細菌株	R	S	V	NV	± ^m	—	—	—
・ 14 細菌株	R	S	V	NV	—	—	—	—
Unidentified Hg-resistant strains (19):								
・ 2 細菌株	R	R	V	NV	+	—	—	—
・ 6 細菌株	R	R	V	NV	±	—	—	—
・ 8 細菌株	R	R	V	NV	—	—	—	—
・ 1 細菌株	R	S	V	V	±	—	—	—
・ 2 細菌株	S	S	V	NV	—	—	—	—

^a inorganic mercury, ^b organomercury, ^c mercury-sensitive strain, ^d narrow-spectrum mercury-resistant strain, ^e broad-spectrum mercury-resistant strain, ^f S: Sensitive, ^g R: Resistant, ^h NV: No volatilization, ⁱ V: Volatilization, ^j *merA*, *merB3*, *merB2*, and *merB1* fragments from *Bacillus megaterium* MB1, ^k not hybridized, ^l positively hybridized, ^m weakly hybridized.

4. おわりに

本研究によって得られた結果から、今まで知られている芽胞形成水銀耐性細菌が保有する水銀耐性遺伝子とは異なる新規の *merA* 遺伝子や *merB* 遺伝子が同じ芽胞形成細菌に存在することが示唆された。また、同一地域から分離された同属の細菌間においても、水銀耐性遺伝子の多様性があることと、一方では世界的規模で同一の水銀耐性遺伝子が広く伝播し分散していることが明らかとなった。今後は各細菌株が保有すると考えられるまだ知られていない水銀耐性遺伝子を同定し、それらの遺伝子機能を詳細に解明することにより、水銀による環境汚染を解決するための新規な生物学的環境浄化技術の開発が期待できると考えられる。