

# merA 遺伝子を標的とした水銀汚染土壤中に存在する水銀耐性細菌の解析

東北学院大学 工学部 環境建設工学科	○学生会員	石堂 里英
〃	学生会員	棚木 優子
〃	非会員	大坪 和香子
〃	正会員	宮内 啓介
〃	フェロー会員	遠藤 銀朗

## 1. はじめに

水銀による環境汚染は、世界的に深刻な問題であり、その影響は人体のみならず土壌や水域等広範囲にわたっている。また、日常生活等を通じて微量ながらも常時水銀が環境中に排出されているのが現状であり、それによる環境汚染は「低濃度で広範囲にわたる汚染」へと変遷してきている。しかし世界的に見ると、未だ高濃度の水銀に汚染されている地域もある。その例として、台湾の台南市安順地区が挙げられる。台南市沿海部の安順地区には、世界でも例のない高濃度の水銀およびダイオキシンやペンタクロロフェノール (PCP, 5 塩素化フェノール) などによる深刻な複合汚染地域があることが明らかにされている。この汚染は、過去に稼働していた化学工場の排水等に由来するものである。

本研究では、安順地区の 7 か所から土壌をサンプリングし、水銀イオン還元酵素遺伝子 (*merA*) の存在を調べることによって、水銀汚染のバイオ浄化のポテンシャルを明らかにすることを目的とした。そのために、各土壌サンプルから DNA を抽出し、土壌中の微生物の *merA* 部分配列の PCR による増幅を行い解析した。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2-1 サンプル採取地点について

土壌サンプルとして、安順地区の NaOH 工場跡地の各地点から 4 サンプル、単一植生区内から 1 サンプル、PCP 工場跡地から 1 サンプル、コントロールとして非

汚染地域内から 1 サンプルをそれぞれ採取した。

### 2-2 DNA の抽出と取得 DNA の確認

MO BIO Laboratories 社の Power Soil DNA Kit を用いて、土壌から DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 増幅を行い (Fig. 1)、得られた DNA が PCR 増幅の鋳型として用いるのに十分な純度であることを確認した。

### 2-3 水銀耐性遺伝子 *merA* 部分配列の PCR 増幅

Oregaard らの論文 (The ISME Journal (2007) 1,453-467) に記載されている以下のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 条件もこの論文に従った。

<用いたプライマー>

*Actinobacteria* の *merA* 増幅用プライマーとして Act-Fw (5'-CSGAVTTCGTSTACGTCGC-3') と Act-Rv (5'-GCCATGAGGTASGGG-3') を用いた。

*Firmicutes* の *merA* 増幅用プライマーとして Fir-Fw (5'-GTTTATGTWGCWGCYTATGAAGG-3') と Fir-Rv1892 (5'-CCTGCACARCAAGATAATTTBGA-3') を用いた。

$\alpha$ -*Proteobacteria* の *merA* 増幅用プライマーとして Al-Fw (5'-TCCAAGGCGMTGATCCGCGC-3') と Al-Rv (5'-TAGGCGGCCATGTAGACGAAGTGGTC-3') を用いた。

$\beta/\gamma$ -*Proteobacteria* の *merA* 増幅用プライマーとして #91 (5'-CGATCCGCAAGTGGCIACBGT-3') と #54 (5'-ACCATCGTCAGRTARGGRAAVA-3') を用いた。

キーワード 微生物 水銀 環境浄化 遺伝子

連絡先 遠藤銀朗 (宮城県多賀城市中央 1-13-1)

TEL 022-368-7493

## 2-4 系統樹の作成

2-3 で増幅した *merA* 部分配列をクローニングし、ABI 社 Genetic Analyzer を用いて塩基配列の決定を行った。その塩基配列を元にして、CLUSTAL W を用いて *merA* の DNA 塩基配列およびアミノ酸配列のアライメント解析により系統樹を作成した。

## 3. 実験結果および考察

### 3-1 台湾安順地区の土壌からの DNA の抽出

土壌から DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 増幅を試みた。その結果を Fig. 1 に示す。今回用いたプライマーセットの場合、約 1500 bp が増幅されるが、全サンプルにおいて 16S rRNA 遺伝子の増幅が見られたので、実験に用いるのに十分な純度であることが確認できた。

1 2 3 4 5 6 7

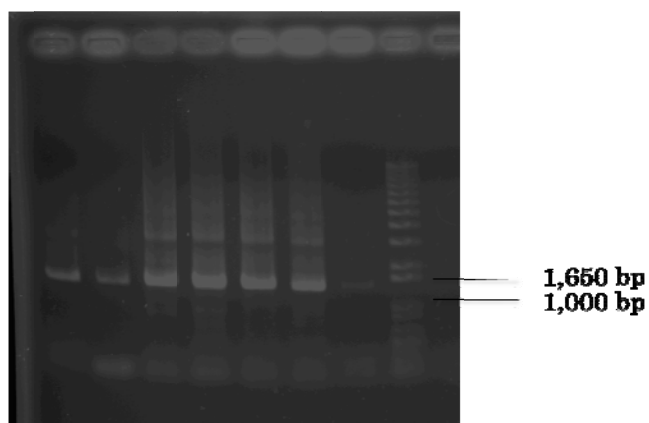


Fig. 1 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅結果

### 3-2 PCR による *merA* 部分配列の増幅

2-3 で行った、*merA* 部分配列の PCR 増幅の結果を Table 1 に示す。4 種類のプライマーを用いて *merA* 部分配列の PCR 増幅を行った結果、*Firmicutes* (Fir) および  $\beta/\gamma$ -*Proteobacteria* ( $\beta/\gamma$ ) の *merA* 増幅用プライマーで PCR 産物の増幅が確認され、*Actinobacteria* (Act) と  $\alpha$ -*Proteobacteria* ( $\alpha$ ) の *merA* 増幅用プライマーでは PCR 産物の増幅は確認されなかった。また、比較的水銀濃度の低い地点と非汚染地点(⑦)の土壌サンプルでは、全てのプライマーにおいて PCR 産物の増幅は確認されなかった。

Table 1 PCR による *merA* 部分配列の増幅結果

土壌	水銀濃度 (ppm)	Act	Fir	$\alpha$	$\beta/\gamma$
①	0.995	-	-	-	-
②	146.849	-	-	-	+
③	1.987	-	+	-	+
④	1.173	-	-	-	+
⑤	17.5	-	+	-	+
⑥	67.0	-	+	-	+
⑦	0.063	-	-	-	-

+: 増幅あり    -: 増幅なし

### 3-2 塩基配列の決定および系統解析の結果

2-3 で増幅した *merA* 部分配列をクローニングし、各クローンの塩基配列の決定を行い、その塩基配列をもとにして系統解析を行った結果、本土壌サンプルには既知の *merA* とは異なる新規の *merA* が多く存在していることが分かった。既知の *merA* との相同性が高いものも存在するものの、それはごく一部であり、各土壌に存在する *merA* の大部分が新規のものであることが判明した。

## 4. 結論

本研究では、台湾台南市安順地区の 7 か所から土壌をサンプリングし、*merA* 遺伝子を標的とした水銀汚染土壌中に存在する水銀耐性細菌の解析を行った。また、台南市安順地区の土壌サンプルの *merA* の相同性について解析した。その結果、これまでには知られていなかった新規の *merA* 遺伝子が多く存在することが分かった。

今後の課題として、土壌サンプルによってはクローニングした *merA* の数が十分に多くないものもあったので、それらについてはさらにクローンを取得して系統解析を行う必要がある。また、安順地区の水銀浄化を図るため、その *merA* が土壌中でどのような働きをするのかを解明し、その働きを安順地区の水銀汚染の浄化にどのように活用するかについて明らかにする必要がある。