

遺伝子解析法と培養法による水銀汚染土壌環境中の水銀還元酵素遺伝子保有微生物に関する研究

東北学院大学	工学部	環境建設工学科	学生会員	小山 雅之
	同上		非会員	簡 梅芳
	同上		正会員	宮内 啓介
	同上		フェロー会員	遠藤 銀朗

1. はじめに

重金属の一つである水銀は古くから有用な元素として認識されており、現在でも体温計や電池など様々な産業製品に広く利用されている。一方、使用方法や処理方法を誤れば人間や生態系に深刻な影響を与える危険物質でもある。水銀による影響は人体のみならず土壌や水域等広範囲にわたっており、その環境基準は現在環境省によって厳しく定められている。火山活動等の自然現象を除いても、水銀の特性を生かし、産業製品に広く利用されているが、医療行為や化石燃料の消費などの日常生活を通じて微量ながらも持続的に水銀が環境中に排出されており、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のが現状である。

水銀の生物毒性にもかかわらず、環境中では水銀化合物に対する耐性能と分解能を持つ微生物が存在しており、これらの微生物による水銀浄化の可能性が研究されてきている。本研究では、水銀汚染環境土壌の7つのサンプルを対象として遺伝子解析法により水銀還元酵素 (MerA) を標的として、アミノ酸配列による系統解析を行い、酵素とその遺伝子の多様性を調べるために実験を行った。さらに培養法により土壌中にどのような水銀耐性細菌が存在するかをDNAレベルで調べ、それらの細菌による水銀汚染浄化のポテンシャルを明らかにするための実験を行った。

2. 実験材料および実験方法

2-1 材料

水銀に汚染された地域及び周辺の地域7地点から土壌サンプルを採取して用いた。これら7つの土壌サンプルは Sample No. 1~7 と名付けた。

2-2 DNA の抽出と取得 DNA の確認

キーワード: 水銀 微生物 水銀還元酵素遺伝子(*merA*)

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室 TEL 022-368-7493

MP Biomedicals 社の Fast DNA SPIN kit for Soil 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、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅して、微生物染色体 DNA の存在を確認した。

2-3 水銀還元酵素遺伝子 *merA* 部分配列の PCR による増幅

Oregaard らの論文 (The ISME Journal (2007) 1, 453-467) に記載されている4種類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。使用したプライマーを以下に記載する。

(5'-3')

Firmicutes の *merA* 増幅用プライマー

Firm-Fw : (GTTTATGTWGCWGCYTATGA)

Firm-Rv : (CCTGCACARCAAGATAATTTBGA)

β/γ -Proteobacteria の *merA* 増幅用プライマー

β/γ -Fw : (CGATCCGCAAGTGGCIACBGT)

β/γ -Rv : (ACCATCGTCAGRTARGGRA)

Actinobacteria の *merA* 増幅用プライマー

Act-Fw : (CSGAVTTCGTSTACGTCGC)

Act-Rv : (GCCATGAGGTASGGG)

α -Proteobacteria の *merA* 増幅用プライマー

α -Pro-Fw : (TCCAAGGCGMTGATCCGCGC)

α -Pro-Rv : (TAGGCGGCCATGTAGACGAACTGGTC)

遺伝子の増幅はアガロースゲルを用いた電気泳動により確認を行った。

2-4 系統樹の作成

Firmicutes の *merA* 増幅用プライマーセットで増幅された PCR 産物を大腸菌にクローニングし、配列決定を行った。決定した塩基配列を元に、CLASTAL 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

メントを行い、系統樹を作成した。

2-5 水銀汚染土壌サンプルから水銀耐性菌の培養とゲノム DNA の抽出

水銀汚染土壌サンプルから水銀耐性菌の培養を行い、単離した。単離した水銀耐性菌のゲノム DNA を抽出し、遺伝子解析に提供した。

2-6 16S rRNA 遺伝子と水銀還元酵素遺伝子 *merA* の系統解析

抽出したゲノム DNA から 16S rRNA 遺伝子配列の PCR により増幅し、単離菌の同定を行った。また、*merA* 部分配列の PCR 法を用いて *merA* を検出し、増幅が確認できたものについて塩基配列を決定した。

3. 実験結果および考察

3-1 水銀汚染土壌サンプルからの DNA 抽出

土壌から抽出した DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR による増幅を行った。その結果全サンプルにおいて 16S rRNA 遺伝子の増幅が見られたので、DNA は解析に用いるのに十分な純度であることが確認できた。

3-2 PCR による *merA* 部分配列の増幅

Firmicutes(Firm)の *merA* 増幅用プライマーセットを用いて PCR を行った結果、Fig.1 に示したように、土壌サンプル 2,3,5,6 からは *merA* 遺伝子が増幅できた。また、 β/γ -Proteobacteria(β/γ)の *merA* 増幅用プライマーセットを用いて PCR を行った結果では、土壌サンプル 1,2,3,4,5,7 からは *merA* 遺伝子が増幅できた。

Actinobacteria(Act)および α -Proteobacteria(α -Pro) 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。

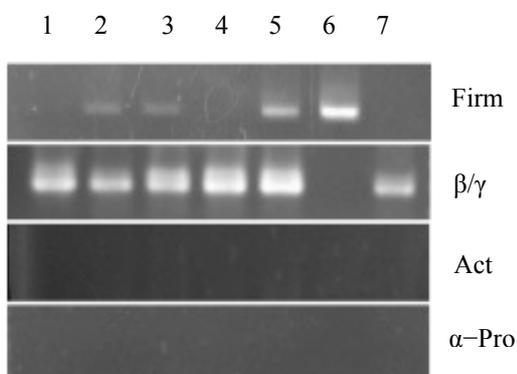


Fig.1 PCR による *merA* 部分配列の増幅結果
Lane 1~7 は、土壌サンプル 1~7 に対応する。

3-3 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、既知の *merA* と相同性が高いものが存在するとともに、新規の *merA* も多く含まれており、多様であることが確認できた。

3-4 水銀汚染土壌サンプルから水銀耐性菌の培養

水銀耐性菌の培養を行い、培養可能な水銀耐性菌は全細菌数の 0.24~6.33%存在することが分かった。また、水銀耐性菌を 19 株単離することに成功した。

3-5 16S rRNA 遺伝子と水銀還元酵素遺伝子 *merA* の系統解析結果

各ゲノム DNA から、16S rRNA 遺伝子と水銀還元酵素遺伝子 *merA* の系統解析を行った。その結果、単離できた 19 株の水銀耐性菌のうち 17 株が *Bacillus* 属、2 株が *Paracoccus* 属であることが確認できた。

4. 結論

本研究では、水銀汚染が見られる 7 種の土壌サンプルから、水銀還元酵素 (MerA) を標的としてアミノ酸配列による系統解析を行い、その遺伝子である *merA* 遺伝子の多様性を調べた。また培養法により土壌中にどのような水銀耐性細菌が存在するかを DNA レベルで調べ、単離することのできた水銀耐性細菌の水銀還元酵素遺伝子 (*merA*) の解析を行った。

その結果、遺伝子解析法では、Firmicutes と β/γ -Proteobacteria の *merA* が多くのサンプルから検出され、そのうち Firmicutes の *merA* は既知の *merA* と相同性が高いものが存在しているとともに、新規の *merA* も多く含まれており、多様であることが確認できた。培養法では、単離できた 19 株の水銀耐性菌のうち 17 株が Firmicutes 門 に属する *Bacillus*、2 株が α -Proteobacteria 亜門に属する *Paracoccus* であることがわかった。

従来の遺伝子解析法では α -Proteobacteria 亜門の *merA* 遺伝子が検出できなかったため、今後の課題として、培養法で単離した α -Proteobacteria に属する菌を用いて、 α -Proteobacteria 亜門の *merA* 遺伝子の検出法を確立したい。