

水銀耐性菌が保有する水銀耐性遺伝子の水平伝播の直接的検証に関する研究

東北学院大学	工学部	環境建設工学科	学生会員	大友 俊介
	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

水銀及び種々の水銀化合物は様々な産業に使われてきた。しかし、水銀化合物の持つ高い生物毒性は、環境中の残留や生態系での生物濃縮を通して、世界的に深刻な健康被害及び環境公害問題を引き起こしている。一方、環境中には水銀化合物を分解し毒性の低い金属水銀に変換する微生物が存在しており、これらの水銀耐性細菌を利用する生物学的水銀除去の可能性が研究されてきている。

微生物由来の水銀耐性機構は、水銀化合物を水銀イオンに分解する水銀分解酵素遺伝子の *merB* や、水銀イオンを金属水銀に還元する水銀還元酵素遺伝子の *merA* など、一連の水銀耐性関連遺伝子からなる水銀耐性オペロン (*mer* オペロン) の働きが担っている。これまで世界各地で発見された様々な水銀耐性細菌は一般に *mer* オペロンを保有していることと、*mer* オペロンはトランスポゾンや、プラスミドなど、遺伝子の水平伝播能のある転移因子 (mobile element) にコードされていることが明らかになりつつある。これらの遺伝的因子の水平伝播により、*mer* オペロンは異なる微生物間で伝播され、その結果水銀耐性細菌の分布が広められたと考えられる。

遺伝子の水平伝播は、外来の DNA やプラスミドが微生物の細胞内に取り込まれる「形質転換」、遺伝子がウイルスやファージの感染を介して細胞に持ち込まれる「形質導入」、DNA が接合伝達性プラスミドにより細胞に持ち込まれる「接合伝達」がある。本研究では、「形質転換」と「接合伝達」に着目し、これらの遺伝子水平伝播による微生物への水銀耐性の付与を直接に検証したので報告する。

2. 実験材料と実験方法

2-1 試供菌株と培養条件

使用した試供菌株は以下表 1 に示す。

表 1 本研究で使われた試供菌株

菌名	形質	略称
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Hg ^S ,Tc ^S ,Cm ^S	168 株
<i>Bacillus cereus</i> RC607	Hg ^R ,Tc ^S ,Cm ^S	RC607 株
<i>Bacillus megaterium</i> MB1	Hg ^R ,Tc ^S ,Cm ^S	MB1 株
<i>Bacillus subtilis</i> RM125 (pLS20cat)	Hg ^S ,Tc ^S ,Cm ^R	BEST 40401 株
<i>Bacillus subtilis</i> RM125	Hg ^S ,Tc ^R ,Cm ^S	BEST2215 株

(Hg : 水銀、Tc : テトラサイクリン、Cm : クロラムフェニコール、^R : 耐性、^S : 感受性)

使用した試薬と使用濃度は以下表 2 に示す。

表 2 本研究で使用した試薬と使用濃度

試薬名 (略式)	使用濃度
塩化水銀 (HgCl ₂)	40 μM
テトラサイクリン (Tc)	25 μg/ml
クロラムフェニコール (Cm)	6 μg/ml

2-2 形質転換による水銀耐性形質獲得実験

水銀感受性の 168 株を遺伝子受容細菌として使用し、水銀耐性トランスポゾンの持つ RC607 株と MB1 株の total DNA を用いて 168 株に形質転換することを試みた。

2-3 微生物間の接合による水銀耐性形質転移の実験

RC607 株を水銀耐性遺伝子の供与細菌として使用し、遺伝子受容細菌は 168 株に抗生物質テトラサイクリン耐性を示すプラスミド pPHY300PLK 保持させたものを使用した (Hg^S,Tc^R)。接合試験は、フィルター接合法(以下 Filter 法と呼ぶ)とメンブレンを利用した Sandwich 接合法(以下 Sandwich 法と呼ぶ)を用いて行った。

キーワード : 水銀耐性細菌、*mer* オペロン、トランスポゾン、遺伝子の水平伝播、接合

連絡先 : 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1 丁目 13-1 (TEL:022-368-7493 FAX:022-368-7070)

2-4 接合伝達性プラスミド pLS20cat による細菌間における遺伝形質の水平伝播の実験

接合伝達性プラスミド pLS20cat を細胞間遺伝子転移因子として使用した。プラスミド pLS20cat を持つ BEST40401 株を供与細菌として、それを持たない BEST2125 株、168 (pHY300PLK)株、RC607 株と MB1 株 pLS20cat プラスミドの受容細菌として使用した。前期対数増殖期に培養した供与菌株とそれぞれの受容菌株を 37℃にて 30 分間静置で共存させた後、必要に応じて抗生物質 Tc、Cm、または水銀入りの寒天平板培地に塗布し、37℃にて 24 時間静置培養してコロニーを観察し、記録した。

3. 結果と考察

3-1 形質転換による水銀耐性形質の獲得

水銀感受性の 168 株を用いて作製したコンピテントセル (DNA を細胞内に取り込める状態の細胞を指す) のコンピテンシー (DNA を細胞内に取り込む能力) は、 6×10^2 CFU/ μ gDNA があったことが確認できた。しかし、RC607 株及び MB1 株の totalDNA を 3 μ g 以上入れても水銀耐性 168 株のコロニーは確認できなかった。この結果から、形質転換により水銀耐性形質の獲得は極めて難しいと考えられた。

3-2 微生物間の接合による水銀耐性形質転移の実験結果

水銀耐性の RC607 株と感受性の 168(pHY300PLK)株を用いて、接合試験を行った。Filter 法では、両株を Filter に濃縮し二日間接触させた。Sandwich 法では、両株を塗布したメンブレンを三日間重ね合わせて接触させた。接触を終えた菌を段階希釈して寒天平板培地に塗布し、1 日培養した後、水銀及び Tc に耐性を示すコロニーを自然接合した菌とみなし、接合伝達の頻度(F)は以下のように算出した。

$F = \text{出現した水銀及び Tc 耐性細菌のコロニー数} / \text{使用した給与菌株のコロニー数}$

両接合実験の接合頻度の平均値を表 3 に示す。

表 3 各接合法による微生物間の形質転移頻度

手法	Filter 接合法	Sandwich 接合法
接合頻度 F	2.2×10^{-6}	6.7×10^{-10}

得られた結果から自然接合による伝達頻度は極めて低いことが知られた。また、転移した遺伝形質がゲノムに定着して安定に存在できるかを確認する必要がある

と考えられた。

3-3 接合伝達性プラスミドによる細菌間における遺伝形質の水平伝播の検証

BEST40401 株と BEST2125 株を用いて接合伝達を行い、Tc と Cm 両抗生物質に耐性を示すコロニーを接合した細菌とみなし、接合伝達の頻度(F)は以下のように算出した。

$F = \text{接合伝達した菌の細胞数} / \text{供与細菌株の細胞数}$

両菌株の増殖曲線及び接合伝達のコロニー数の結果を以下図 1 に示す。接合伝達性プラスミド pLS20cat の転移の特徴として、供与細菌株と受容細菌株の生育状態に大きく関係し、早期対数増殖期において最大の接合伝達頻度 (8×10^{-4}) が観察された。また伝達性プラスミド由来の Cm 耐性は、接合した菌株において安定していることが確認されたため、接合伝達により転移した形質は受容細菌に定着して発現できていることが分かった。

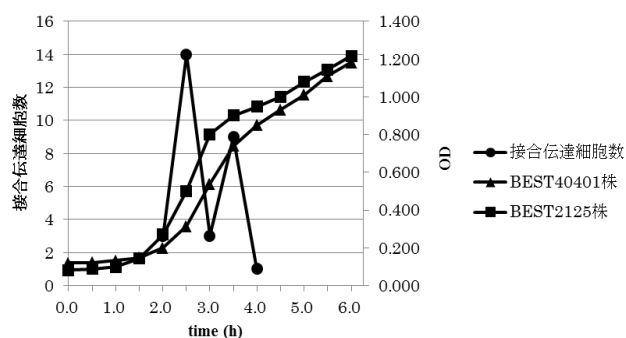


図 1 両株の増殖曲線と接合伝達した細胞数

4. おわりに

以上の実験結果から、水銀オペロンは、形質転換または自然接合により微生物間において伝播されることは極めて難しいことが考えられる。一方、接合伝達性プラスミドによる遺伝形質の伝播は、伝達頻度や、接合伝達した菌株の遺伝形質の発現が安定していることから、自然界では接合伝達性プラスミドを介して水銀耐性 mer オペロンや水銀耐性トランスポゾンが微生物間において伝播された可能性が高いと考えられる。今後は、異種細菌間の接合伝達性プラスミドによる水銀耐性遺伝子の水平伝播の直接的検証について検討することが必要であると考えられる。