

ナイジェリアの水銀汚染ラグーン底泥から単離された水銀耐性細菌に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○渡邊 広明

University of Lagos 非会員 Oyetibo Ganiyu Oladunjoye

東北学院大学 工学部 正会員 宮内 啓介

東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤 銀朗

1. はじめに

水銀およびその化合物は、非常に有用な化学的性質を持っているため、現在でも産業製品や農薬など様々な形で広く利用されている。しかしながら、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ある。かつて熊本県で水俣病を、新潟県では第二水俣病を引き起こした原因物質でもある。したがって、水銀に対する汚染には適切な処理および汚染除去技術が必要不可欠である。水銀は産業活動のみならず、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継続的に水銀が環境中に排出されているのが現状である。このように水銀による環境汚染は、水俣病などの公害に代表される「高濃度で局所的な汚染」から「低濃度ではあるが広範囲にわたる汚染」へと変遷している。

現在、水銀化合物を含む廃水の処理には主に物理化学的浄化方法が利用されている。しかし、この方法はコストや処理能力の面で問題が多く存在しており、効率的に除去を行うのは難しい。近年研究がなされている生物学的水銀除去法は、従来の物理化学的方法に比べて低コストで、かつ、後処理なども行う必要がないため効率的に水銀除去を行うことができると考えられる。また、「低濃度ではあるが広範囲にわたる汚染」にもこの方法は有効である。

本研究では、ナイジェリアの水銀汚染ラグーン底泥から単離された水銀耐性細菌のうち16株を対象として、各細菌株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、相同性解析によって同定した。また、各菌株の水銀耐性及び水銀還元酵素遺伝子(*merA*)の有無を調べるとともに、*merA* 遺伝子を保有する既知の水銀耐性トランスポゾンとの比較を行った。

2. 実験材料と方法

2.1 材料

水銀に汚染されたナイジェリアのラゴス・ラグーンの南西部の地点より単離された細菌株のうち16株を用いた。これら16株のサンプルは Sample No.1～16 と名付けた。

2.2 16S rRNA 遺伝子の解析

関東化学株式会社の Cica Geneus DNA Extraction Reagent を用いて単離細菌から total DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。増幅が確認されたサンプルについては塩基配列を決定し Blast N を用いて相同性解析を行った。

2.3 水銀還元酵素遺伝子 *merA* の解析

Oregaard らの論文¹⁾に記載されている3種類のプライマーを用い、抽出した total DNA を鋳型として、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 : (ACCATCGTCAGRRTARGGRA)

Actinobacteria の *merA* 増幅用プライマー

Act-Fw : (CSGAVTTCGTSTACGTCGC)

Act-Rv : (GCCATGAGGTASGGG)

2.4 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析

抽出した total DNA を鋳型として、単一プライマー用いる Long PCR 法によって水銀耐性トランスポ

キーワード: 水銀汚染 ナイジェリア 水銀耐性細菌 16S rRNA 遺伝子 *merA* 遺伝子 水銀耐性トランスポゾン

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

ゾン領域を標的として増幅を試みた。使用したプライマーを以下に記載する。

(5'-3')

水銀耐性トランスポゾン増幅用プライマー

merposon : (GGGGTATTACCAACAAAACGCG
GAAAACATACGC)

また、増幅が確認できたサンプルについては制限酵素 *EcoRI*、*HindIII*、*NcoI*、*BglII* を用いた RFLP 法によって *TnMERI1* や *Tn5084* と同様の水銀耐性トランスポゾンを保有するかどうかについての解析を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 16S rRNA 遺伝子の解析結果

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。全サンプルにおいて 16S rRNA 遺伝子の増幅が確認できたので、塩基配列を決定し相同性解析を行った。その結果、単離した水銀耐性細菌 16 株のうち 9 株が *Bacillus* 属、4 株が *Nocardia* 属、3 株が *Pantoea* 属とそれぞれ相同性が高いことが確認できた。

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、Sample No.1,2,3,4,9,10,11,12,13,14,15,16 からは *merA* 遺伝子の増幅が確認できた。

β/γ -Proteobacteria(β/γ)および Actinobacteria(Act)の *merA* 増幅用プライマーセットを用いて PCR を行った結果、PCR 産物の増幅は確認されなかった。

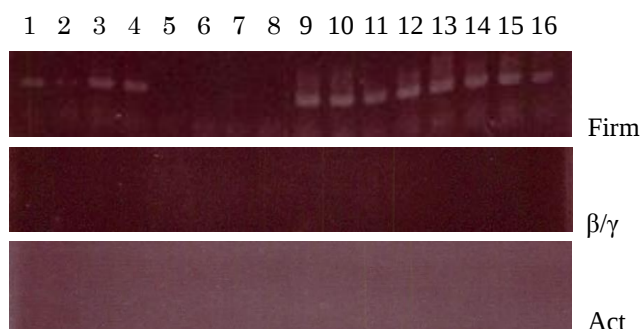


Fig.1 PCR による *merA* 部分配列の増幅結果
Lane 1～16 は、Sample No.1～16 に対応する。

3.3 水銀耐性トランスポゾンの探索と解析結果

PCR によって水銀耐性トランスポゾンの増幅を試みた結果、16 株のうち 11 株からは 12kbp 以上の長さの PCR 産物が得られた。また、RFLP 法による解析では 16 株のうち 10 株が *Tn5084* と同様あるいは類似のトランスポゾンを保有しており、1 株が *TnMERI1* や *Tn5084* とは全く別のトランスポゾンを保有していることが確認できた。(data not shown)

4. 結論

本研究では、水銀汚染がみられるナイジェリアのラゴス・ラグーン底泥から単離された水銀耐性細菌のうち 16 株を対象として、各菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、相同性解析によってそれぞれの菌株を同定した。また、各菌株の水銀耐性及び水銀還元酵素遺伝子(*merA*)の多様性を調べるとともに、*merA* 遺伝子を保有する既知の水銀耐性トランスポゾンとの比較を行った。

その結果、16S rRNA 遺伝子の解析では、単離された水銀耐性細菌 16 株のうち 9 株が Firmicutes 門に属する *Bacillus*、4 株が Actinobacteria 門に属する *Nocardia*、3 株が Proteobacteria 門に属する *Pantoea* とそれぞれ相同性が高いことが分かった。

merA 遺伝子の解析では、 β/γ -Proteobacteria(β/γ)および Actinobacteria(Act)の *merA* 増幅用プライマーセットを用いた場合では PCR 産物の増幅は確認できなかったが、Firmicutes の *merA* 増幅用プライマーを用いると 16 株のうち 10 株からは *merA* 遺伝子の増幅が確認できた。

水銀耐性トランスポゾンの解析では、16 株のうち 10 株が *Tn5084* と同様あるいは類似のトランスポゾンを保有しており、1 株が *TnMERI1* や *Tn5084* とは全く別のトランスポゾンを保有していることを確認することができた。

(参考文献)

¹⁾ Oregaard et al. : The ISME Journal, 1, 453-467(2007)