水銀耐性 *Nocardia* 属細菌からの水銀耐性遺伝子の単離と解析

東北学院大学　工学部　学生会員　羽場　祥太
東北学院大学　工学部　非会員　渡邉　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たものが残留している。しかしながら、処理方法や管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り、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。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。また、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。これらのことから、水銀に対する汚染には適切な対処技術が必要不可欠である。

一方でナイジェリア等の開発途上国ではまだ前者の汚染が残っており、その解決策として、近年研究がなされている生物学的水銀除去法が期待されている。生物学的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。

本研究では、ナイジェリアのラゴスのラグーン底泥から取得した水銀耐性細菌の水銀イオン還元酵素遺伝子(*merA*)の単離を目的として研究を行った。

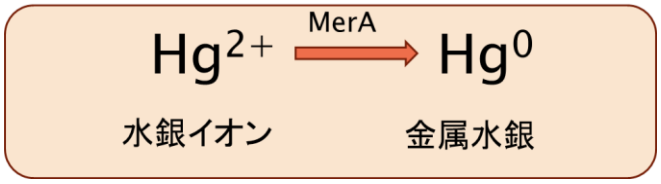

Fig. 1 水銀イオン還元酵素の働き

2. 材料と方法

2.1 水銀耐性菌株

水銀で汚染されたナイジェリアのラゴスのラグーン底泥から単離した *Nocardia* 属細菌(*Nocardia* sp. SAHg4E5)を用いて実験を行った。

2.2 PCR による *merA* の増幅

merA 遺伝子の増幅には ExTaq(タカラバイオ)を用い、プライマーは Act-Fw3(5'-TCGGCCATGGTCAGGTA-3')と Act-Rv3(5'- TCCACCACCGCGATGGA-3')を用いた。

2.3 Inverse PCR による *merA* 周辺領域の増幅

merA1 と *merA2* の周辺領域を取得するために Inverse PCR を行った。Total DNA を制限酵素で切り、ligation した後に、それを鋳型として PCR を行った。PCR に使用したプライマーは
4E5_*merA1*_F(5'-CAAGGAAGCCAACGAGG-3')、
4E5_*merA1*_R(5'-TCCACCATCAGGGTTCC-3')、
4E5_*merA2*_F(5'-CTGGTCAACCGCGATAC-3')、
4E5_*merA2*_R(5'-ATTGCTGCTGCGCTG-3')である。
PCR 産物を鋳型として 2 回目の PCR を行った。PCR に使用したプライマーは
4E5_*merA1*_F(5'-CAAGGAAGCCAACGAGG-3')、
4E5_*merA1*_R2(5'-AGTGTGCTCTCGACCAG-3')、
4E5_*merA2*_F(5'-CTGGTCAACCGCGATAC-3')、
4E5_*merA2*_R2(5'-AGTGTGCTCTCGACCAG-3')
である。

キーワード:水銀汚染　ナイジェリア　水銀耐性細菌　　*merA* 遺伝子
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

3.結果と考察

3.1 水銀耐性細菌の単離

ナイジェリアのラゴスのラグーン低泥から単離された水銀耐性細菌のうち、*Nocardia* 属に属する菌が 4 種類を同定した。水銀耐性を持つ *Nocardia* 属に関する知見は少ないため、これらの細菌について解析を行うことにした。

まず、$HgCl_2$ を加えた LB 寒天培地を用いた無機水銀耐性試験を行った。$HgCl_2$ の濃度はそれぞれ 40μM、80μM、160μM、320μM である。SAHg4E5 株以外の株は、今回用いた濃度では水銀耐性を示さなかった。SAHg4E5 株は $HgCl_2$ 濃度が 160μM まで耐性を示した。その結果を Fig. 2 に示す。他の 3 株は 40μM より低い Hg 濃度では耐性を示した。このことから、以降の実験では SAHg4E5 株を用いることにした。

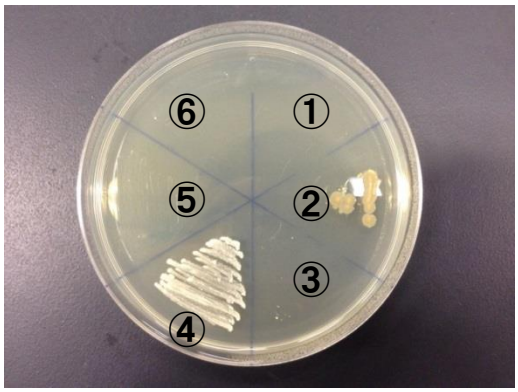

Fig. 2 $HgCl_2$160μM での水銀耐性試験結果
①*E.coli*(ネガティブコントロール)、②Bacillus megaterium MB1 株(ポジティブコントロール)、③SAHg4E4、④SAHg4E5、⑤SAHg4-1、⑥SA4E8

3.2 PCR による *merA* 遺伝子の増幅

Nocardia 属が属する放線菌の既知の *merA* 遺伝子配列を元に Act-Fw3、Act-Rv3 のプライマーを設計した。これらを用いて SAHg4E5 株の PCR を行った結果、予想された 800～900 bp の DNA の増幅が確認された(Fig. 3)。

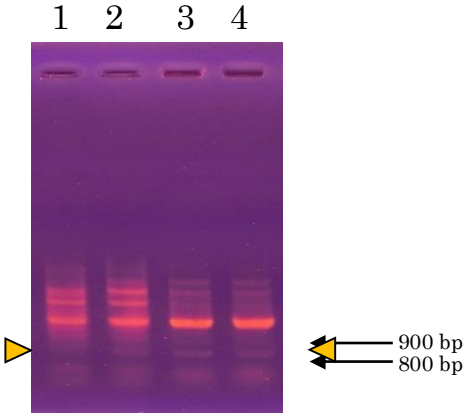

Fig. 3 Act-Fw3、Act-Rv3 を用いた SAHg4E5 株の *merA* の増幅。レーン 1～4 はそれぞれアニーリング温度 50℃、55℃、60℃、65℃である。

3.3 増幅した DNA 断片の解析

3.2 で増幅した DNA を、pMD20 (タカラバイオ) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、*merA* に相同性を示す配列が 2 種類存在することが明らかとなり、それぞれを *merA1*、*merA2* と命名した。*merA1* と *merA2* は DNA レベルで約 70%の相同性を示した。*merA1* の部分配列のアミノ酸配列は *Corynebacterium* の MerA と、*merA2* 部分配列のそれは *Arthrobacter* の MerA とそれぞれ 99%、88%の相同性を示した。

3.4 Inverse PCR による *merA*2 周辺領域の増幅と解析

3.3 で解析した DNA の上流、下流の領域を取得するために、Total DNA を制限酵素 *Bam*Hl で消化して、ligation し、2.3 にしたがって PCR を行った。*merA1* に関しては増幅断片を得ることはできなかった。しかし、*merA2* に関しては約 2.5kb の DNA 増幅に成功した。この断片の塩基配列を決定したところ、*merA*2 の上流に *merA*2 と逆向きに転写制御タンパク質の遺伝子が存在することが明らかとなった。

4. おわりに

ナイジェリアのラゴスラグーン底泥から単離した *Nocardia* 属の水銀耐性細菌は、2 つの水銀イオン還元酵素(*merA*)を有していることが知られた。また、この *merA* 遺伝子の 1 つは、放線菌以外の *merA* とも高い相同性を示し、細菌間で水平伝播した可能性が考えられた。