

(49) 水俣湾底泥からの嫌気性水銀耐性細菌の分離と
水銀耐性遺伝子の分子生物学的解析に関する研究

**Isolation of Anaerobic Mercury-Resistant Bacteria from Minamata Bay
Sediment and Molecular Analysis of Those Mercury-Resistance Gene**

成田勝*・黄介辰**・遠藤銀朗***

Masaru NARITA*, Chih-Chen HUANG**, Ginro ENDO***

ABSTRACT; Environmental pollution by heavy metal is a very serious problem. Especially, mercury pollution causes severe damage of human health like Minamata disease. Minamata Bay is known as the site where a very severe methylmercury-poisoning incident occurred. Some bacteria living in such a mercury polluted environment are often resistant to mercury compounds. Isolation and characterization of mercury-resistant bacteria have been done only for the aerobic microorganisms so far. In many cases, however, sites polluted by mercury compounds are anaerobic environments such as soil and sediment. These anaerobic mercury-resistant bacteria have possibility of development of new anaerobic treatment system and bioremediation in the polluted anaerobic sites.

In this study, we tried to isolate anaerobic mercury-resistant bacteria from the sea sediment of Minamata Bay, and to elucidate the mechanism of mercury-resistance of the isolated bacteria by using Polymerase Chain Reaction (PCR) method and Southern hybridization method.

Twenty-six strains of the anaerobic mercury-resistant bacteria were isolated from Minamata Bay sediment. Those were spore-forming and rod-shaped anaerobic bacteria. Therefore, those are classified as the genus *Clostridium*. The results of PCR analysis showed that the PCR products of the 26 isolates were not the same gene to *Bacillus* sp. *merA* gene in size. However, Southern hybridization analysis showed that only one strain named MN21 of the twenty-six strains has a highly homologous gene to the *Bacillus merA* gene whereas no signal was detected in the remaining strains.

KEYWORDS; Anaerobic mercury-resistant bacteria, Bacterial isolation, *merA* gene, PCR method, Southern hybridization method

1. はじめに

かつて熊本県の水俣湾周辺で発生した水俣病や、新潟県の阿賀野川流域で発生した第二水俣病のように、重金属による環境汚染は我々の生活圏を快適に維持する上で重大な問題となっている。なかでも特に被害が大きいとされる水銀による汚染は、環境ばかりではなく、人体に対して直接的な影響を与える物質として、その使用と排出に対しては厳しく規制がなされている。現在、水銀を含む廃水の処理には物理化学的方法もしくは生物処理と活性炭を併用した方法がとられている。¹⁾ 生物による水銀除去を目的として、水銀耐性のある細菌の生態や水銀の還元・気化といった耐性機構についての研究が進められている。しかし、これまでなされた水銀耐性細菌に関する研究のほとんどは、好気的条件下で生息する好気性水銀耐性細菌についてである。好気性水銀耐性細菌は、有機水銀化合物や無機水銀化合物を分解し比較的毒性の低い金属水銀に還元することがよく知られている。^{2) 3) 4) 5) 6)} しかしながら、嫌気的条件下で生息している嫌気性水銀耐性細菌についての研究はごく一部を除いてほとんどなされてい

* 東北学院大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Dept. of Civil Eng., Graduate school of Eng., Tohoku Gakuin University)

** 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

*** 東北学院大学工学部土木工学科 (Dept. of Civil Eng., Faculty of Eng., Tohoku Gakuin University)

いのが現状である。⁷⁾ 嫌気的条件下での細菌による水銀化合物の分解は、代謝のメカニズムが未知な部分が多いだけに、新しい浄化システムの基礎となる現象を見い出せると考えられることや、自然環境中での、特に嫌気的な場所でのバイオレメディエーション（生物による環境修復）への適用が考えられる。

本研究では、これら嫌気性水銀耐性細菌の耐性機構の解明が必要であると考え、長年にわたり高濃度の水銀に汚染されていた熊本県の水俣湾底泥をサンプルとして、嫌気性水銀耐性細菌の分離を試み、得られた分離株の水銀耐性遺伝子の分子生物学的解析を行ったので報告をする。

2. 実験方法

2.1 嫌気性水銀耐性細菌の純粋分離と耐性能の評価

(1) 水俣湾底泥からの嫌気性水銀耐性細菌の純粋分離

水俣湾底泥には、他の海域の底泥に比べて多くの好気性水銀耐性細菌が存在することが報告されている。^{3) 5) 6)} 本研究では、埋め立て以前のメチル水銀によって汚染されていた水俣湾底泥サンプル(1984年6月に採取し、風乾状態で冷蔵保存されていたもの。)を嫌気性水銀耐性細菌の分離源として用いた。細菌の分離方法は以下の手順で行った。なお、植菌作業は全て嫌気グローブボックス内で行った。

- a) 無酸素ガス噴射下で底泥を超音波破砕器で処理して分散させた細菌を、水銀濃度（塩化第二水銀： HgCl_2 ） $37 \mu\text{M}$ （ $10 \mu\text{g/ml}$ ）を含む嫌気性細菌培養用のガス噴射法によって脱酸素したPY培地に植菌して 30°C で培養を行った。⁸⁾ 菌の増殖の確認後、水銀濃度を $100 \mu\text{M}$ に調製したPY培地に植菌し、同様の条件で再度集積培養を行った。PY培地組成をTable 1に示す。
- b) 培養された嫌気性水銀耐性細菌は、水銀濃度 $100 \mu\text{M}$ を含むPY培地でロールチューブ法によって細菌のコロニーが形成されるまで 30°C で培養を行った。⁹⁾
- c) 形成された単一のコロニーを白金耳で釣菌し、水銀濃度 $100 \mu\text{M}$ を含むPY培地に植菌し 30°C で静置培養を行った。
- d) 嫌気性水銀耐性細菌が純粋分離されるまでb)、c)を繰り返した。
- e) 分離できた嫌気性水銀耐性細菌は、位相差光学顕微鏡（Nikon Optiphot、対物レンズ $\times 40$ 倍）によって形態観察を行った。

(2) 嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価

本研究によって純粋分離された嫌気性水銀耐性分離株を用いて、無機水銀による水銀耐性能の評価を試みた。評価実験は以下のように行った。なお、植菌作業は全て嫌気グローブボックス内で行った。

PY培地によって培養された分離株培養液 $100 \mu\text{l}$ を、水銀濃度（塩化第二水銀： HgCl_2 ） $30 \mu\text{M}$ 、 $70 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ とそれぞれ濃度の異なる新たに調製したPY培地（システイン塩酸塩を除いたもの）（Table 1参照） 10ml に植菌し、 30°C で培養を行い、目視によって培養結果を評価した。

Table 1 Composition of PY medium for anaerobic mercury-resistant bacteria.

Peptone	10.0g	10.0g	10.0g
Yeast extract	10.0g	10.0g	10.0g
Salts solution ^{*1}	40ml	40ml	40ml
0.1 % Sodium resazurin	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml
Cysteine-HCl · H ₂ O	0.5 g	0.5 g	—
CO ₂	100 %	100 %	100 %
10mM HgCl ₂	3.7 ml	10ml	3 ml / 7 ml / 10 ml
d- H ₂ O	up to 1000ml	1000ml	1000ml

^{*1} CaCl_2 0.2 g, MgSO_4 0.2 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaHCO_3 10.0 g, NaCl 2.0 g per 1000ml of distilled water

2.2 嫌気性水銀耐性細菌の分子生物学的手法による水銀耐性遺伝子の解析

(1) PCR法による水銀耐性遺伝子の解析

好気性水銀耐性細菌において、一般に知られているように、細菌の水銀(Hg^{2+})耐性は、水銀耐性(*mer*)オペロン中の水銀レダクターゼ（水銀還元酵素）をコードする *merA* 遺伝子に委ねられている。水銀レダクターゼは細胞内に入り込んだ有毒な水銀イオンを還元し金属水銀として毒性を下げる重要な役割を果たしている。また、この金属水銀は気化することによって細菌細胞から外界へと放出される。^{10) 11) 12) 13)}しかし、嫌気性水銀耐性細菌によるこのような水銀の変換については全く知られていない。本研究では、分離された嫌気性水銀耐性細菌が好気性水銀耐性細菌（代表として *Bacillus* sp. RC607）¹⁴⁾の *merA* 遺伝子と相同な遺伝子を持っているかどうか、また、水銀を気化放出するという機構によって水銀耐性能を得ているかどうかについて検討するために、PCR法によって水銀耐性遺伝子の解析を行った。PCR用のプライマーDNAは、すでに知られている好気性の水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子の塩基配列から作成したものを用いた。本研究で使用した2種のプライマーDNAは *merAF2*、*merAR1* と名付けた。それらの塩基配列を Table 2 に示す。実験は以下の手順で行った。

- a) 嫌気性水銀耐性分離株は、水銀濃度 100 μM を含む PY 培地によって、30℃で2日間培養を行った。
- b) 培養後のそれぞれの細菌培養液 10ml から染色体 DNA の調製を行った。^{15) 16) 17)}
- c) *Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子の塩基配列から作成した DNA プライマーを用いて、嫌気性水銀耐性分離株の染色体上にコードされていると思われる *merA* 遺伝子の領域を標的として PCR 増幅を行った。PCR 反応条件のアニーリング温度は 55℃、50℃、45℃、および 40℃ に設定して行った。Table 3 に PCR 反応液の調製、Table 4 に PCR 反応条件を示す。
- d) PCR 増幅後、0.8% 濃度アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅結果を評価した。

Table 2 Sequence of DNA primers for the PCR of targeted *merA* gene.

Primer	Direction	Sequence (5'→3')	Nucleotides (<i>mer</i>)
<i>merAF2</i>	forward	TTG AAT TCA TCG GTT CTG GTG GAG C	25
<i>merAR1</i>	reverse	CCG AAT TCT TAT CCA GCA CAG CAA G	25

Table 3 Composition of PCR reaction mixture.

Ingredients	Volume(μl)
1. DD- H_2O	68.5
2. 10x PCR reaction buffer	10.0
3. 1.25mM dNTP mixture	16.0
4. Primer <i>merAF2</i> (20 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	2.0
5. Primer <i>merAR1</i> (20 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	2.0
6. Template DNA ($\approx 100\text{ ng}/\mu\text{l}$)	1.0
7. <i>Taq</i> DNA polymerase (5unit/ μl)	0.5
Total	100.0

Table 4 PCR reaction conditions.

Reaction Step	Temperature(℃)	Duration Time(min)
Denaturing	95	0.5
Annealing	55/50/45/40	0.5
Extension	72	1.0

Cycle count: 20 Cycles

(2) 制限酵素消化によるPCR産物DNA断片の解析 (PCR-RFLP)

PCR法によって得られた嫌気性水銀耐性細菌のPCR産物DNA断片は、好気性水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子との類似性を検討するために2種類の制限酵素を使用してPCR産物DNA断片の制限酵素消化を行った。実験は以下の手順で行った。

- アニーリング温度を40℃として行ったPCR増幅液は、フェノール/クロロフォルム処理、エタノール沈殿によって精製した。
- 精製されたPCR産物を、4塩基認識制限酵素 *Hae* III、6塩基認識制限酵素 *Ssp* I の2種の制限酵素を用いて、37℃、2hrで反応させた。Table5に制限酵素の特徴、Table6に反応液組成を示す。
- 反応後、その一部量を用いて2.0%濃度アガロースゲル電気泳動を行い、制限酵素消化パターンの解析を行った。

Table 5 Restriction enzymes used in this study.

Restriction enzyme	Recognition site	Concentration (U/ μ l)	Reaction temperature ($^{\circ}$ C)
<i>Hae</i> III	GG↓CC	10	37
<i>Ssp</i> I	AAT↓ATT	12	37

Table 6 Composition of reaction mixture for digestion by restriction enzymes.

Ing redients	Volume(μ l)
1. DD- H_2O	17
2. 10x <i>Ssp</i> Basal buffer	3
3. DNA(PCR product DNA fragments) (≈ 700 ng/ μ l)	9
4. <i>Hae</i> III (10U/ μ l)	0.5
5. <i>Ssp</i> I (12U/ μ l)	0.5
Total	30
Reaction Temperature :37 $^{\circ}$ C	Reaction Time :2 hrs

(3) ハイブリダイゼーション法による水銀耐性遺伝子の解析

PCR法によって得られた嫌気性水銀耐性細菌の増幅産物DNA断片と好気性水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子の一部塩基配列 (約1370bp) をジゴキシゲニンで標識してDNAプローブ (プローブ名: *merA'*) としたのを用いて、サザンハイブリダイゼーション法によって *merA* 遺伝子の解析を行った。また、PCR増幅された嫌気性水銀耐性細菌(代表として菌株名 MN13 を選んだ。)のDNA断片をDNAプローブ (プローブ名: MN13) 化したものも使用して、他の嫌気性水銀耐性細菌のPCR産物との相同性を検討した。実験は以下の手順で行った。

- アニーリング温度40℃のPCR増幅液の適量を0.8%濃度アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、トランスイルミネーター上でUV照射によって増幅されたDNA断片を確認した。
- 上記のゲルをサザントランスファー法によってメンブランフィルターに一晚プロットさせた。
- メンブランフィルター上にプロットした変性DNAに、ジゴキシゲニンで標識した上記のそれぞれのDNAプローブを用いて、一晚ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション温度はそれぞれ40℃、45℃、50℃、55℃、60℃および65℃と設定して行った。
- 一晚ハイブリダイズした後、DIG-ELISA法による発色法でプロットDNAの検出を行い検出結果を評価した。

3. 実験結果および考察

3.1 嫌気性水銀耐性細菌の純粋分離

ロールチューブ法によって、水俣湾の底泥から26菌株のいずれも細胞形態が桿状の水銀耐性細菌の純粋培養を得ることができた。Fig. 1に単離された嫌気性水銀耐性細菌の一例を示す。これらの26菌株を好気的条件下で同様の培地と温度で振とう培養したところ、全ての菌株の増殖が確認されなかったことから、これらの細菌は絶対嫌気性の細菌と考えられた。また、顕微鏡によって観察した結果、成熟期には孢子形成を確認することができたことから、26菌株全てが*Clostridium* 属に含まれることが知られた。

3.2 嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価

Table 7に嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性能の評価結果を示す。水銀濃度（塩化第二水銀：HgCl₂）30 μM、70 μM の場合において、26菌株全ての細菌の増殖が確認された。100 μM の水銀を添加した場合には、1つの菌株を除いては増殖するという結果が得られたが、増殖速度に差が見られた。その中で12菌株は強い耐性を示し活発な増殖を示した。

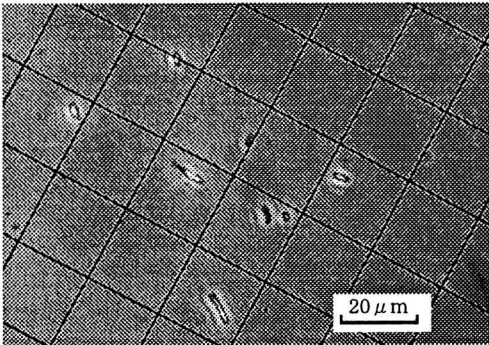


Fig. 1 Anaerobic mercury-resistant bacteria isolated from Minamata Bay sediment.

Table 7 Growth capability of anaerobic mercury-resistant isolates.

Strain	Mercury Concentration 30 μM	Mercury Concentration 70 μM	Mercury Concentration 100 μM
MN1	+++	+++	+++
MN1-1	+++	+++	+++
MN1-2	+++	+++	++
MN2	+++	+++	+++
MN2-1	+++	+++	-
MN3	+++	+++	+++
MN4	+++	+++	++
MN5	+++	+++	+++
MN6	+++	+++	+++
MN7	+++	+++	++
MN8	+++	+++	+
MN9	+++	+++	+++
MN10	+++	+++	+++
MN11	+++	+++	++
MN12	+++	+++	+
MN13	+++	+++	++
MN14	+++	+++	+++
MN15	+++	+++	++
MN16	+++	+++	+++
MN17	+++	+++	+
MN18	+++	+++	+++
MN19	+++	+++	++
MN20	+++	+++	+++
MN21	+++	+++	+
MN22	+++	+++	++
MN23	+++	+++	+

+++ : actively grown ++ : grown
+ : weakly grown - : not grown

3.3 PCR法による水銀耐性遺伝子の解析

Fig. 2、3に*merA*遺伝子を標的としたPCRの結果を示す。各Figのレーン③～⑮、(3)～(15)が嫌気性水銀耐性細菌26菌株の増幅結果である。アニーリング温度55℃(Fig. 2参照)、50℃、45℃と設定した場合、本研究で使用したプライマーDNAでは26菌株全てにおいてDNA断片は確認されなかった。アニーリング温度を40℃と設定した場合では、26菌株全てが約1900bp程度の同じDNAサイズ断片が検出された。しかしながら、このPCR産物DNA断片は、予測していた*Bacillus* sp.の*merA*遺伝子のDNA断片(約1370bp)のサイズとは異なっていた。これらの結果より、45℃といった低いアニーリング温度でもDNA断片が検出されなかったことや、40℃でサイズの異なるDNA断片が検出されたことか

ら、本研究で分離された 26 菌株の嫌気性水銀耐性細菌は *Bacillus* sp. の持つ *merA* 遺伝子と全く同一の遺伝子を持っていないと考えられた。また、アニーリング温度 40℃ で検出された DNA 断片は、*Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子を基にして作成したプライマー DNA とは塩基配列に違いがあることが推定された。

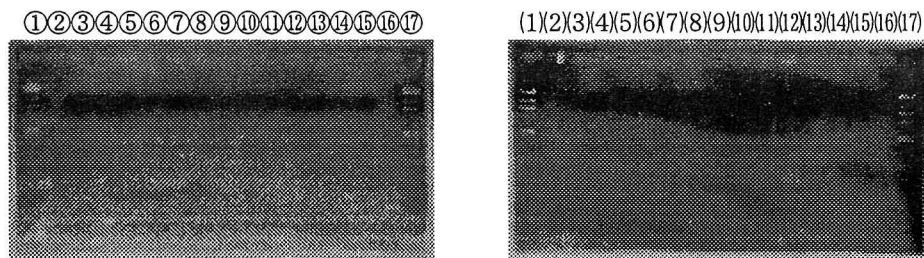


Fig. 2 PCR amplification of targeted *merA* gene of anaerobic mercury-resistant bacteria at 55℃ of annealing temperature.

Lanes ①, ⑦, (1), (17) are size markers, *Hind* III digested λ phage DNA.

Lanes ②, ⑩, (2), (16) are blank.

Lanes ③ through ⑤ are PCR amplified targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10.

Lanes (3) through (15) are PCR amplified targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

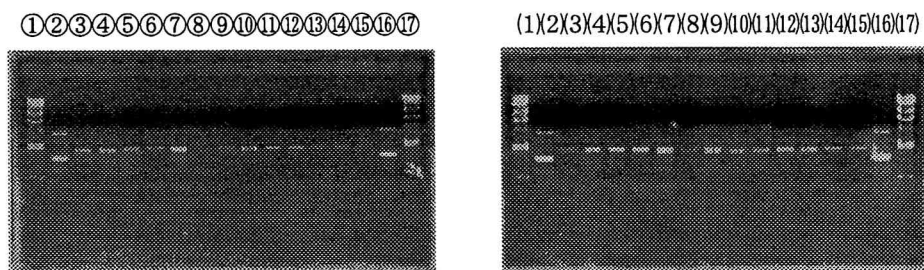


Fig. 3 PCR amplification of targeted *merA* gene of anaerobic mercury-resistant bacteria at 40℃ of annealing temperature.

Lanes ①, ⑦, (1), (17) are size markers of *Hind* III digest of λ phage DNA.

Lanes ②, ⑩, (2), (16) are PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp.

Lanes ③ through ⑤ are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10.

Lanes (3) through (15) are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

3.4 制限酵素消化による PCR 増幅産物 DNA 断片の解析 (PCR-RFLP)

Fig. 4 に *Hae* III と *Ssp* I の 2 種の制限酵素を使用して PCR 産物 DNA 断片の制限酵素消化を行った結果を示す。レーン ⑩、(16) はコントロールとして *Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子 PCR 産物 DNA 断片を切断したものである。上からの DNA サイズは、747bp、414bp、215bp である。本実験結果から 26 菌株全ての DNA 断片は同じ切断パターンを示し、3 つの DNA 断片が現れた。これは、コントロールの DNA 断片と断片数は同じであったが、各々の DNA 断片のサイズは異なることが知られた。この点からもこれらの 26 菌株の共通な PCR 産物は、*Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子と全く同一ではないと考えられた。

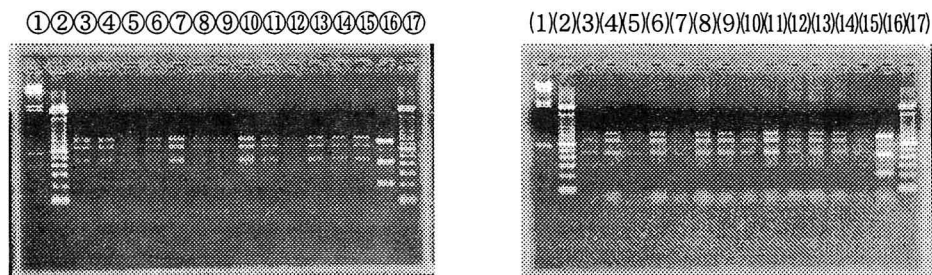


Fig. 4 Digestion of PCR fragments by restriction enzymes of *Hae* III and *Ssp* I.
 Lanes ①,(1) are size markers, *Hind* III digested of λ phage DNA.
 Lanes ②,(2),(17) are size markers of 100bp DNA Ladder.
 Lanes ⑬,(16) are PCR product DNA fragments of *merA* gene of *Bacillus* sp.
 Lanes ③ through ⑮ are PCR product DNA fragments of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10.
 Lanes (3) through (15) are PCR product DNA fragments of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

3.5 ハイブリダイゼーション法による水銀耐性遺伝子の解析

(1) *merA*'プローブを使用したハイブリダイゼーション法による水銀耐性遺伝子の解析

Fig. 5, 6 にアニーリング温度 40℃での 26 菌株の PCR 産物 DNA 断片と好気性水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子の DNA プローブである *merA*'プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション結果 (ハイブリダイゼーション温度 60℃, 65℃) を示す。各 Fig のレーン②~⑭、(2)~(14) は嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株のハイブリダイゼーション結果である。PCR 産物 DNA 断片は、ハイブリダイゼーション温度 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ (Fig. 5 参照)、および 65℃ (Fig. 6 参照) の全ての温度条件でハイブリダイズシグナルが検出された。高温の条件にもかかわらずプローブとハイブリダイズする DNA が検出されたことから、これらの PCR 産物 DNA 断片は *merA* 遺伝子とは断定できないが、*Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子とある程度の相同性を持つと考えられた。ただし、26 菌株のうち MN21 株だけは 60℃, 65℃においてポジティブコントロールである *Bacillus* sp. の PCR 産物 DNA 断片 (約 1370bp) と同サイズの位置に他のシグナルよりもかなり強い検出シグナルが確認された。この強い検出シグナルの位置の DNA 断片は、アガロースゲル電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色によって観察したことで検出されなかった。それにもかかわらずはっきりとした検出シグナルがサザンハイブリダイゼーション法で得られたことは、この DNA 断片が *Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子ときわめて相同性のある DNA の塩基配列を有することを示すものである。また、MN9 株、MN10 株においても *Bacillus* sp. と同サイズの検出シグナルが見られるが (Fig. 6, lanes ⑬ and ⑭)、これらについては *Bacillus* sp. の DNA 断片が誤って混入したものであることを確認した。したがって、この MN21 株だけは *Bacillus* sp. の持つ *merA* 遺伝子と同一の *merA* 遺伝子を持っている可能性が高いと考えられた。

(2) MN13 プローブを使用したハイブリダイゼーション法による水銀耐性遺伝子の解析

Fig. 7 にアニーリング温度 40℃での 26 菌株の PCR 産物 DNA 断片と MN13 株の PCR 産物 DNA 断片の DNA プローブである MN13 プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション結果 (ハイブリダイゼーション温度 65℃) を示す。各 Fig のレーン②~⑭、(2)~(14) は嫌気性水銀耐性細菌 26 菌株のハイブリダイゼーション結果である。ハイブリダイゼーション温度 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, および

65℃（Fig. 6 参照）の全ての温度条件でハイブリダイズし、かなり強い検出シグナルが確認された。このことから、26 菌株の PCR 産物 DNA 断片は、全て同一の DNA であると考えられた。

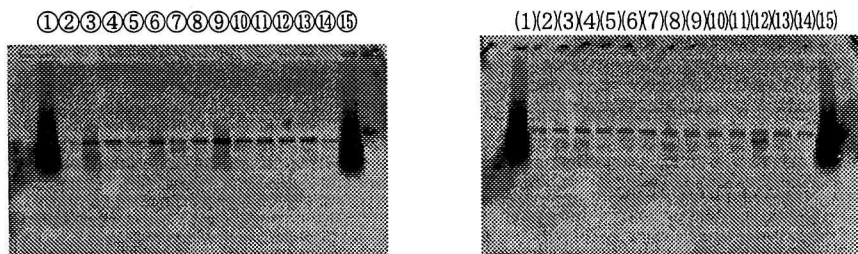


Fig. 5 Detection results of targeted *merA* gene of anaerobic mercury-resistant bacteria at 60℃ of hybridization temperature by Southern hybridization with *merA'* probe. Lanes ①, ⑮, (1), (15) are positive control, PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp. Lanes ② through ⑭ are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10. Lanes (2) through (14) are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

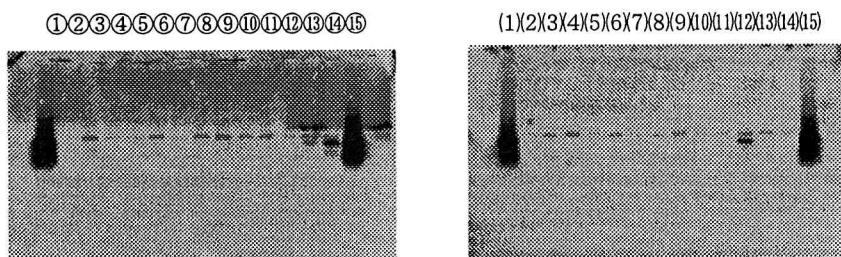


Fig. 6 Detection results of targeted *merA* gene of anaerobic mercury-resistant bacteria at 65℃ of hybridization temperature by Southern hybridization with *merA'* probe. Lanes ①, ⑮, (1), (15) are positive control, PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp. Lanes ② through ⑭ are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10. Lanes (2) through (14) are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

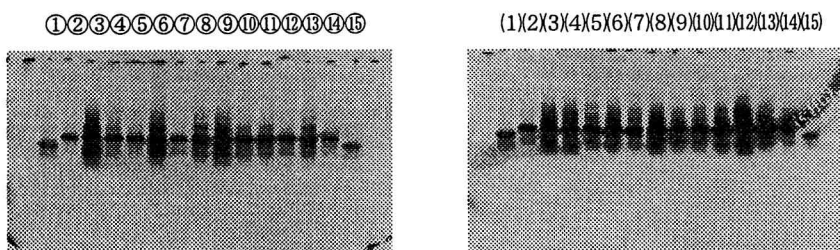


Fig. 7 Detection results of targeted *merA* gene of anaerobic mercury-resistant bacteria at 65℃ of hybridization temperature by Southern hybridization with MN13 probe. Lanes ①, ⑮, (1), (15) are positive control, PCR product of *merA* gene of *Bacillus* sp. Lanes ② through ⑭ are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN1 to MN10. Lanes (2) through (14) are PCR product of targeted *merA* gene of strain MN11 to MN23.

4. 結論

本研究によって得られた結論は以下の通りである。

- 1) 水俣湾底泥より 26 菌株の純粋な絶対嫌気性の水銀耐性細菌を得ることができた。これらの細菌は全て *Clostridium* 属の細菌に含まれることが知られた。
- 2) 純粋分離された 26 菌株の嫌気性水銀耐性細菌は、水銀濃度 70 μ M までは完全な耐性を示し増殖が可能であった。100 μ M の水銀を添加した場合は、増殖速度に差が見られ、そのうち 12 菌株は活発に増殖することが確認され、強い耐性能を示した。
- 3) P C R 法によって増幅された DNA 断片長の解析結果からは、26 菌株全ての嫌気性水銀耐性細菌は、*Bacillus* sp. の持つ *merA* 遺伝子と全く同一の *merA* 遺伝子を持っていないと推定された。
- 4) 26 菌株に共通な P C R 産物 DNA 断片は、同じ制限酵素切断パターンを示したが、*Bacillus* sp. の *merA* 遺伝子の制限酵素切断パターンとは異なっており、*Bacillus* sp. の持つ *merA* 遺伝子と全く同一ではないことを裏付けた。
- 5) 一方、*merA'* プローブを使用したハイブリダイゼーション法による解析結果より、この DNA プローブが上記の PCR 産物と高温度の条件でハイブリダイズしたことから、この DNA 断片は *Bacillus* sp. の保有する *merA* 遺伝子とある程度の相同性を持つと考えられた。
- 6) 26 菌株のうちの 1 菌株 (MN21 株) の P C R 産物は、*Bacillus* sp. と同一サイズの位置で *merA'* プローブとハイブリダイズする DNA 断片を有したことから、MN21 株は *Bacillus* sp. と同一の *merA* 遺伝子を持つ可能性が高いと考えられた。

【謝辞】

本研究を進めるに当たり、水俣湾の水銀汚染が進行していた当時に採取し保存してあった貴重な底泥サンプルと、*Bacillus* sp. の *mer* オペロンを分与下されました国立水俣病総合研究センターの中村邦彦博士に深く感謝いたします。また、実験の実施にあたり協力を頂きました大学院生博士前期課程（当時）松宮秀泰君、卒業研究生（当時）蒔苗靖子さん、亀井紀康君、棚橋謙一郎君、石神清隆君、現卒業研究生 岸田啓君、小泉卓哉君、伊藤有希博君、山肩健史君に謝意を表します。なお本研究は、科学技術振興事業団の戦略的基礎研究推進事業の研究プロジェクトとしてなされたことを付記します。

【参考文献】

- 1) 成田勝、遠藤銀朗：PCR 法による嫌気性水銀耐性細菌の水銀耐性遺伝子の解析、第 32 回日本水環境学会年会講演集、p.218、1998
- 2) サイモン・シルバー、遠藤銀朗、中村邦彦：水銀汚染に関する研究（フィールドと室内研究の現状）-抄訳-、水環境学会誌、Vol.17、No.4、p.26、1994
- 3) Nakamura, K., and Silver, S. : Molecular analysis of mercury-resistant *Bacillus* isolates from sediment of Minamata Bay, Japan, Appl. Environ. Microbiol., 60, 4596-4599, 1994
- 4) 遠藤銀朗、中村邦彦：IGE シリーズ 23 遺伝生態情報の可能性、東北大学遺伝生態研究センター、1996

- 5) Nakamura, K., T.Fujisaki and Y.Shibata. : Mercury-resistant bacteria in the sediment of Minamata Bay, Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1359-1363, 1988
- 6) Nakamura, K., M.Sakamoto, H.Uchiyama, and O.Yagi. : Organomercurial-volatilizing Bacteria in the mercury-polluted sediment of Minamata Bay, Japan, Appl. Environ. Microbiol., 56, 304-305, 1990
- 7) 芳生秀光、井村伸正：微生物による水銀変換反応機構とその意味、生態化学、Vol.5, No.4, pp.13-20, 1983
- 8) 上木勝司、永井史郎：嫌気微生物学、養賢堂、1993
- 9) 日本生化学会編：新生化学実験講座 第17巻 微生物実験法、東京化学同人、1992
- 10) 須藤隆一編：環境微生物実験法、講談社サイエンティフィク、1988
- 11) 末永泉二、福井昭三、藤田昌彦著：環境汚染分析法 5、大日本図書、1973
- 12) 有馬啓、田村学造編：生物による環境浄化、財団法人 東京大学出版会、1980
- 13) 高原義昌著：廃水の生物処理、地球社、1980
- 14) Wang, Y., Moore, M., Levinson, H.S., Silver, S., Walsh, C. and Mahler, I. : Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus* sp. with broad-spectrum mercury resistance, J. Bacteriol., 171, 83-92, 1989
- 15) 口野嘉幸、平井久丸、櫻林郁乃介編：遺伝子・タンパク質実験操作プロットティング法、ソフトサイエンス社、1987
- 16) 鈴木裕之、山本徳男：GRC版 遺伝子操作の基本手技、東北大学遺伝子実験施設特許より
- 17) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. : Molecular Cloning a laboratory manual 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989