

(4) 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における水銀耐性遺伝子の
普遍的保有と重金属耐性スペクトラムの評価に関する研究

Study on Ubiquity of Mercury Resistance Genes and
Multi Heavy-Metal Resistance of *Clostridia*, Strictly Anaerobic Bacteria

成田勝*・黄介辰**・小泉卓哉*・山肩健史*・遠藤銀朗***

Masaru NARITA*, Chieh-Chen HUANG**, Takuya KOIZUMI*, Takeshi YAMAGATA*, Ginro ENDO***

ABSTRACT; Because anaerobic mercury-resistant microorganisms have not been surveyed sufficiently and those biological features remain to be understood while anaerobic environments are common as mercury-contaminated sites such as soil and sediments, anaerobic mercury-resistant bacterial strains were isolated from Minamata Bay, Kumamoto, and characterized. We also reported identification of a mercury-resistant bacterium of the isolated strains. The genetic components for mercury resistance of the five strictly anaerobic bacterial strains including the bacterium isolated from Minamata Bay were analyzed. The resistance to mercurial compounds and to other heavy metals by the five strictly anaerobic bacterial strains were also tested. The results showed that the anaerobic mercury-resistant bacterium isolated from Minamata Bay was identified as *Clostridium butyricum* Mersaru. Nucleotide sequence analysis of the mercury resistance determinant showed that *C. butyricum* Mersaru has *merB* gene (an organomercury lyase gene), identical to that of the aerobic mercury-resistant *Bacillus cereus* RC607. PCR-Southern hybridization showed that the two PCR products, which are amplified from chromosomal DNA of the four strictly anaerobic bacterial strains, were highly homologous to *merA* gene (a mercury reductase gene) and *merB* gene from the aerobic mercury-resistant *Bacillus*, respectively. The resistance spectrums to mercurial compounds and other heavy metals indicated that all *Clostridia* tested in this study were broad-spectrum mercury-resistant and broad-spectrum heavy-metal-resistant.

KEYWORDS; Anaerobic mercury-resistant bacterium, *Clostridium butyricum*,

Minimum inhibitory concentrations (MICs), Mercury resistance genes (*merA* gene, *merB* gene), PCR-Southern hybridization

1. はじめに

水銀による環境汚染は、日本のみならずカナダ、イギリス、ブラジルなど世界的に問題視されており、人間への健康や生態系に影響を与えるなど多くの被害を与えている¹⁾。現在、水銀の使用と排出に関する規制は厳しくなされており、水銀を含んだ廃水の処理は、イオン交換樹脂や活性炭などによる物理化学的方法がとられている²⁾。また、生物処理による水銀除去を目的として、水銀耐性能のある細菌の生態や耐性機構についての研究が進められている³⁾。好気性的水銀耐性細菌による水銀化合物の分解や化学的形態変化といった水銀の耐性機構と生物学的除去に関する研究は、分子生物学レベルにおいて詳しく研究がなされている⁴⁾⁵⁾。それらの研究によれば、好気性水銀耐性細菌の水銀耐性機構は水銀の化学種を変換する2つの酵素作用からなり、有機水銀のメチル基を水銀から切り離す有機水銀リアーゼ(有機水銀分解酵素)と水銀イオンを毒性の低い金属水銀(Hg^0)に変換させる水銀レダクターゼ(水銀還元酵素)の関与が知られている⁴⁾⁵⁾⁶⁾。また、還元された Hg^0 は細菌細胞外へと気化放出される。かつて高濃度の水銀に汚染された熊本県の水俣湾の底泥からも、好気性的 *Bacillus* 属と *Pseudomonas* 属の水銀耐性細菌が多数分離され、様々な水銀化合物を分解し還元することによって水銀を気化していることが報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。

* 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)

一方、嫌気性細菌の水銀耐性に関する研究は、*Clostridium cochlearium* T-2P¹⁰⁾¹¹⁾ や *Desulfovibrio desulfuricans* API¹²⁾ などに見られる有機水銀からの不溶性の硫化水銀を生成するという水銀化合物の変換機構が知られているが、それ以外の嫌気性水銀耐性細菌の生態や変換機構に関する知見はまだ十分であるとはいえない。嫌気性細菌による水銀耐性が好気性細菌と同様の耐性機構を持っているとすれば、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)の可能性や、嫌気性細菌による水銀の廃水処理システムへの応用の可能性などが考えられる。従って、嫌気性細菌による水銀耐性機構をより詳細に理解することは、水銀汚染を浄化するための環境技術上極めて重要であると考えられる。

これまで我々は、水俣湾底泥から分離した26菌株の嫌気性水銀耐性細菌 *Clostridium* 属が好気性細菌の水銀還元酵素をコードする遺伝子 (*merA* 遺伝子) と相同する遺伝子を保有していることを明らかにしてきた¹³⁾。本研究においては、さらに嫌気性水銀耐性細菌の耐性機構の全体像を解明するために、以前水俣湾から分離した嫌気性水銀耐性分離株の中の1菌株を用いて、この菌株の同定と有機水銀分解酵素をコードする遺伝子である *merB* 遺伝子の分子生物学的解析を行った。また、絶対嫌気性細菌における水銀耐性遺伝子の普遍性に関する知見を得るために、本研究で用いた嫌気性水銀耐性分離株と同属のカルチャーコレクション保存株の *Clostridium* 属4株を用いて、水銀耐性遺伝子の分子生物学的解析を行った。さらに、絶対嫌気性細菌における重金属化合物に対するスペクトラムを知るために、各水銀化合物に対する耐性能の評価と水銀以外の重金属に対する耐性能についても評価を行った。

2. 実験材料および方法

2.1 嫌気性水銀耐性分離株の同定と水銀耐性遺伝子 (*merB* 遺伝子) の分子生物学的解析

(1) 嫌気性水銀耐性分離株の表現型および遺伝子型による同定

以前我々が水俣湾底泥から分離した嫌気性水銀耐性分離株は、Bergey's Manual により *Clostridium* 属の細菌であることを報告した³⁾¹³⁾。このうち、MN13と名付けられた1細菌株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し種の同定を行った。16S rRNA 遺伝子は、戸辺らの方法¹⁴⁾に従って抽出した分離株 MN13 の染色体 DNA からユニバーサルプライマー (forward; 5'-GCCACG(A/C)GCCGCCGT-3' と reverse; 5'-ACGGCGGTGTGT(G/A)C-3') を使って、PCR により 0.9kb の DNA 領域を増幅させた。増幅された PCR 産物は、0.8% アガロースゲルによる電気泳動後、GENECLEAN II KIT (Bio101) により回収し、pGEM-T Easy ベクター (Promega) とライゲーションを行った後、*Escherichia coli* DH5 α によってサブクローニングを行った。サブクローニングされたプラスミド DNA は、FlexiPrep Kit (Pharmacia) により回収し、ジデオキシシークエンシング法によって PCR 産物の塩基配列を決定した。

(2) 水銀耐性遺伝子 (*merB* 遺伝子) の PCR 増幅と塩基配列の決定

分離株 MN13 が有機水銀分解遺伝子である *merB* 遺伝子を保有しているかどうかを探索するために、PCR 法によってこの遺伝子の検出を試みた。また、増幅された PCR 産物の塩基配列を決定するとともに、好気性水銀耐性細菌の持つ *merB* 遺伝子産物 (MerB) とアミノ酸配列により比較した。

分離株 MN13 は、PY 液体培地³⁾ により 30℃ で 1 晩培養後、染色体 DNA を抽出した。染色体 DNA は、PCR 増幅に使用した。PCR 増幅のためのプライマー-DNA は、好気性水銀耐性細菌 *Bacillus cereus* RC607¹⁵⁾ の保有する *merB* 遺伝子の塩基配列から設計した。*merB* 遺伝子増幅用のプライマー-DNA の塩基配列は、forward; 5'-AATTCAGGAAATCGTAACCC-3' と reverse; 5'-CAGTCAAAGGCATCTTCTA-3' である。PCR 条件は、95℃、9 分の最初の熱変性反応の後、95℃、30sec の熱変性、48℃、1 分のアニーリング、72℃、1 分 30 秒の伸長ステップを 35 サイクル行った。その後、72℃、10 分の最後の伸長反応を行った。増幅 PCR 産物の塩基配列の決定方法は、2.1 の(1)に記載した方法と同様に行った。

2.2 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における水銀耐性遺伝子 (*merA* および *merB* 遺伝子) の分子生物学的解析

好気性水銀耐性細菌のもつ水銀耐性遺伝子と相同する遺伝子が水銀ストレスを受けていない環境から分離された絶対嫌気性細菌でも普遍的に保有しているかどうかを検索するために、本研究で用いた嫌気性水銀耐性分離株 MN13 と同種異株および同属異種の絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属 4 株を用いて、水銀耐性遺伝子 (*merA* および *merB* 遺伝子) の分子生物学的探索を行った。

(1) 供試菌株

供試菌株は、絶対嫌気性水銀耐性分離株 MN13 の他に、発酵研究所 (IFO) に登録保存されている *Clostridium butyricum* IFO3315、*Clostridium butyricum* IFO3858、*Clostridium butyricum* IFO13949、*Clostridium acetobutylicum* IFO13948 の 4 菌株を用いた。

(2) PCR-Southern hybridization による水銀耐性遺伝子 (*merA* および *merB* 遺伝子) の分子生物学的探索

各菌株において、好気性水銀耐性細菌や分離株 MN13 の持つ *merA* および *merB* 遺伝子と相同する遺伝子を保有しているかどうかを PCR-Southern hybridization によって探索・解析をした。

各細菌株は、PY 液体培地により 30℃ で 1 晩培養後、各菌株から染色体 DNA を抽出した。染色体 DNA は PCR 増幅に用いた。PCR 増幅のための *merA* および *merB* 遺伝子標的用のプライマー DNA は、好気性水銀耐性細菌 *B. cereus* RC607¹⁵⁾ の保有する塩基配列から設計した。*merA* 遺伝子標的用のプライマー DNA の塩基配列は、forward; 5'-TAC GATCCTGAAATTTTCAGA-3' と reverse; 5'-GCACAGCAAGATAATTTCTGA-3' である。また、*merB* 遺伝子標的用のプライマー DNA は 2.1 に記載したものと同様である。PCR 増幅は 2.1 に記載した条件と同様に行った。PCR による DNA 増幅後の PCR 産物は、0.8% アガロースゲル電気泳動後にジギキシゲニン (DIG) 標識された *B. cereus* RC607 の *merA* および *merB* 遺伝子プローブ DNA と 65℃ で一晩ハイブリダイズさせた。*merA* 遺伝子プローブは、RC607 の *merA* 遺伝子の部分シーケンス (770bp) であり、*merB* 遺伝子プローブは、RC607 の *merB* 遺伝子の部分シーケンス (580bp) である。プロット DNA の検出は DIG Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用い、得られた検出結果を評価した。

2.3 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における水銀耐性能の評価と水銀以外の重金属耐性能の評価

絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における重金属耐性のスペクトラムを知るために、各水銀化合物に対する耐性能の評価と水銀以外の重金属化合物に対する耐性能の評価を試みた。

(1) 供試菌株

供試菌株は、絶対嫌気性水銀耐性分離株 MN13 と 2.2 で使用した *Clostridium* 属 4 菌株および好気性水銀耐性グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 と好気性水銀感受性グラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* 168 の合計 7 菌株を用いた。

(2) 各水銀化合物に対する最小阻害濃度 (MIC) の決定

各細菌株の水銀耐性能を評価するために、無機水銀化合物と有機水銀化合物による最小阻害濃度 (minimum inhibitory concentrations; 以下 MIC と記す。) を決定した。MIC の決定に使用した培地は、システイン塩酸塩を除いた PY 液体培地で行った。培地中へのシステイン塩酸塩の添加は、システインと重金属の結合による無毒化を見かけ上かなり高い MIC を与えることが報告されている¹⁶⁾。システイン無添加で絶対嫌気培地を調製するために、無酸素ガスによる PY 培地の脱酸素を行った。PY 液体培地によって 30℃ で 1 晩培養された各細菌株の培養液は、各水銀濃度 0.25 μg/ml を含む PY 液体培地に植菌し、30℃ で 1 晩培養を行った。培養後の培養液は、様々な水銀濃度に設定した PY 液体培地に植菌し、30℃ で 3 日間培養した。各水銀化合物の MIC は、3 日間培養後の培地の濁りを評価し、細菌の増殖が阻害された最小の水銀濃度の数値をとった。また、細菌の十分な増殖がなされたことを判定するための培地の濁りの基準として、水銀化合物を添加していない時の菌の増殖による培地の濁り (OD₆₆₀ で約 0.5)

以上となることを採用した。各水銀化合物の設定濃度 ($\mu\text{g/ml}$) は次のとおりである。

塩化水銀 (HgCl_2): 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0, 24.0, 27.0。

塩化メチル水銀 (CH_3HgCl): 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 10.0, 16.0, 20.0, 24.0。

酢酸フェニル水銀 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOCOCH}_3$): 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0。

(3) 各重金属化合物に対する MIC の決定

細菌株の各種重金属に対する多重耐性能 (広域重金属耐性能) を評価するために、これまでに細菌の耐性機構がよく知られている水銀以外の各重金属化合物を用いてそれらの MIC を決定した。各細菌株の培養条件と MIC の判断基準は 2.3 の(2)に記載した方法と同様である。使用した重金属化合物と設定濃度 ($\mu\text{g/ml}$) は次のとおりである。

メタ亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO_2): 2, 5, 20, 40, 80, 100, 200, 500, 700, 900, 1200, 1600, 1800。

塩化カドミウム (CdCl_2): 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 70, 90, 120, 200, 400, 500。

塩化コバルト ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2200, 2500。

硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 900, 1000。

3. 実験結果および考察

3.1 嫌気性水銀耐性分離株の表現型および遺伝子型による同定

嫌気性水銀耐性分離株 MN13 は、絶対嫌気性条件のみで増殖し、増殖至適温度は 37°C であった。また、この分離株は硫酸塩を還元しないことが確認された。位相差光学顕微鏡による観察から、形状は桿菌でその直径が $1\mu\text{m}$ 以下であること、成熟期には内生孢子を形成することが確認された。グラム染色ではグラム陽性を示した。

分離株 MN13 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST¹⁷⁾ によって相同性解析を行ったところ、*C. butyricum* DSM2478 のそれと 99.7%、*C. butyricum* ATCC43755 のそれと 99.5% の相同性を示した。これらの結果より、分離株 MN13 を *Clostridium butyricum* と同定した。また、この分離株 MN13 を *Clostridium butyricum* Mersaru と命名した。

3.2 *C. butyricum* Mersaru の水銀耐性遺伝子 (*merB* 遺伝子) の PCR 増幅と塩基配列の決定

merB 遺伝子を標的とした PCR 増幅において、*C. butyricum* Mersaru の染色体 DNA から増幅された PCR 産物は、*B. cereus* RC607 の *merB* 遺伝子 PCR 産物と同サイズ (580bp) であった。この PCR 産物の塩基配列を決定し、それをアミノ酸配列に読み直したものと、すでに知られている 3 種の好気性グラム陽性水銀耐性細菌 *B. cereus* RC607¹⁵⁾、*Staphylococcus aureus* R23 8325¹⁸⁾、*Streptomyces lividans* 1326¹⁹⁾ の保有する *merB* 遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸配列とを比較した (Fig. 1)。この結果、*C. butyricum* Mersaru のアミノ酸配列は、*Bacillus* の Mer B アミノ酸配列と完全に一致 (100%) した。また、*Staphylococcus* のそれと 73.1%、*Streptomyces* のそれとは 57.0% の相同性を示した。このことより、*C. butyricum* Mersaru は、*Bacillus* の保有する *merB* 遺伝子と全く同一の遺伝子を保有していることが明らかとなった。嫌気性細菌 *C. butyricum* が有機水銀分解遺伝子である *merB* 遺伝子を持っていることを明らかにしたのは本研究が初めてである。好気性細菌の水銀耐性機構において、*merB* 遺伝子を保有しておらず無機水銀だけに耐性を示すタイプは narrow-spectrum の水銀耐性と呼ばれ、*merB* 遺伝子を保有し無機と有機水銀の両方に耐性を示すタイプは broad-spectrum の水銀耐性と呼ばれている⁴⁾⁵⁾。従って、*C. butyricum* Mersaru の水銀耐性タイプは *merA* と *merB* 遺伝子を保有する broad-spectrum 水銀耐性タイプであることが考えられる。また、従来、嫌気性細菌は無機水銀をメチル化させたり、もしくは不溶性の硫化水銀 (HgS) を生成すると考えられてきた¹⁹⁾。しかしながら、*C. butyricum* Mersaru は、培養液の観察から硫化水銀を生成していないことが確認されているから、無機や有機の水銀を分解しさらに金属水銀 (Hg^0) に還元し気化することによって耐性を獲得している可能性が高いと考えられた。

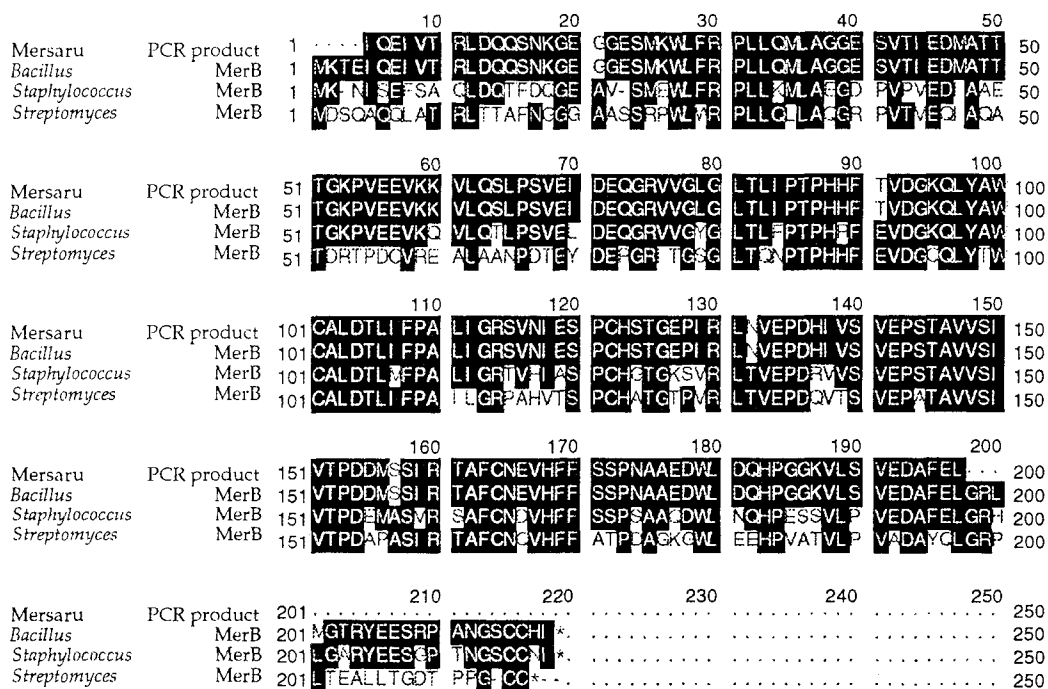


Fig. 1 Alignment of amino acid sequences from PCR product of *C. butyricum* Mersaru with MerB sequences from *Bacillus cereus* RC607, *Staphylococcus aureus* R23 8325, and *Streptomyces lividans* 1326. DNASIS program (Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan) for the amino acid sequence analysis was used.

3.3 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における水銀耐性遺伝子 (*merA* および *merB* 遺伝子) の分子生物学的探索

Fig. 2 と Fig. 3 に *merA* および *merB* 遺伝子を標的とした PCR 増幅とその Southern hybridization の結果を示す。各菌株とも増幅された DNA 断片の濃度は異なるものの、*B. cereus* RC607 の PCR 産物とそれぞれ同サイズ (773bp と 580bp) であった。Southern hybridization の結果は、*B. cereus* RC607 の *merA* および *merB* 遺伝子プローブと各々ハイブリダイズし、相同性を示した。PCR-Southern hybridization の結果から、絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属は *B. cereus* RC607 の *merA* および *merB* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を保有していると考えられた。よって、これらの細菌の水銀耐性メカニズムもまた好気性水銀耐性細菌と同様であると考えられた。また、これら絶対嫌気性細菌の *merA* および *merB* 遺伝子が環境中で発現し、どのような酵素活性を示すかを評価することが今後の重要な課題と考えられる。各細菌株において、*C. butyricum* IFO13949 は豚の腸から²¹⁾、*C. acetobutylicum* IFO13948 は corn meal から²¹⁾ それぞれ分離されている。分離源の環境は全く異なり、またこれらは水銀ストレスを受けた環境ではない。それゆえに、水銀ストレスを受けていない環境からでも水銀耐性遺伝子を保有する絶対嫌気性細菌の存在が明らかとなった。一般に、土壌中の水銀は平均して 20~150ppb 程度存在するといわれている⁴⁾。土壌や底泥はしばしば嫌気的な環境であることから、水銀耐性遺伝子はもともと嫌気性細菌にとって水銀ストレスに対処するための必須遺伝子なのではないかとも考えられる。また、水銀に汚染された嫌気的な環境において、水銀耐性遺伝子を保有する嫌気性の微生物は、自然界における水銀変換に重要な役割を果たしており、*in situ* での水銀分解を行っていると考えられる。

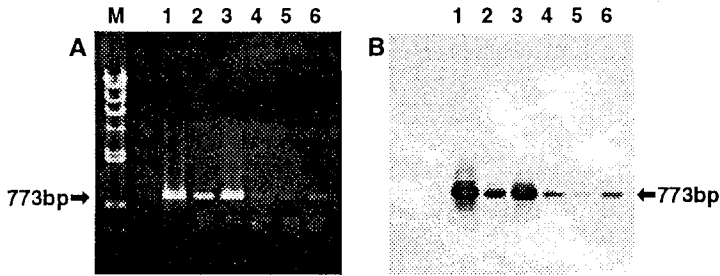


Fig. 2 The result of targeted *merA* gene of strictly anaerobic Clostridia by PCR-Southern hybridization. (A) Result of PCR amplification with *merA* primers. Lane M; λ phage DNA/*Hind*III size marker, Lane 1; PCR product of *merA* gene of *B. cereus* RC607, Lane 2; PCR product of *merA* gene of *C. butyricum* Mersaru, Lane 3 through 6; PCR products of targeted *merA* gene of strictly anaerobic clostridial strains, IFO13949, IFO3315, IFO3858, and IFO13948, respectively. (B) Corresponding Southern hybridization signals on the blotted membrane filter with the *merA* probe.

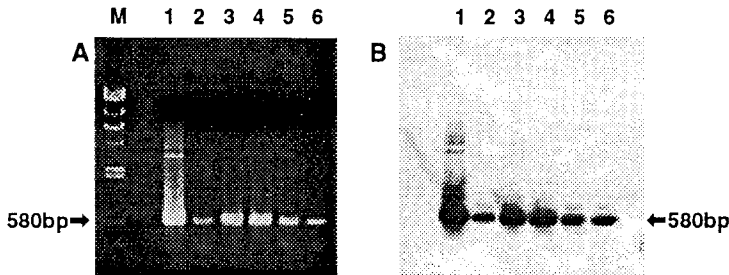


Fig. 3 The result of targeted *merB* gene of strictly anaerobic Clostridia by PCR-Southern hybridization. (A) Result of PCR amplification with *merB* primers. Lane M; λ phage DNA/*Hind*III size marker, Lane 1; PCR product of *merB* gene of *B. cereus* RC607, Lane 2; PCR product of *merB* gene of *C. butyricum* Mersaru, Lane 3 through 6; PCR products of targeted *merB* gene of strictly anaerobic clostridial strains, IFO13949, IFO3315, IFO3858, and IFO13948, respectively. (B) Corresponding Southern hybridization signals on the blotted membrane filter with the *merB* probe.

3.4 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における各水銀化合物に対する MIC の決定

Table 1 に各細菌株の各水銀化合物による MIC を示す。*Bacillus subtilis* 168 を水銀耐性遺伝子を保有していない水銀感受性細菌の対照株として、*Bacillus megaterium* MB1²¹⁾ を好気性的水銀耐性細菌の対照株として用いて、各細菌株の MIC を比較した。*Clostridium* 属それぞれの細菌株において、MIC に大きな差は見られず、ほぼ同様の耐性濃度を示すことが知られた。しかしながら、*B. megaterium* MB1 の MIC と比較した場合、無機水銀と有機水銀の両方に対して *Clostridium* 属が比較的高い耐性能を示した。無機水銀である MC (塩化水銀) については、*Clostridium* 属は耐性細菌 MB1 より 1.1~1.4 倍、感受性細菌 168 より 9.6~16 倍の高い耐性濃度を示した。アルキル水銀である MMC (塩化メチル水銀) に対しては、耐性細菌 MB1 と感受性細菌 168 より 13 倍の高い耐性能を示した。アリル水銀である PMA (酢酸フェニル水銀) については、耐性細菌 MB1 より 6.4~9.6 倍、感受性細菌 168 より 10.7~16 倍高い濃度まで耐えうることが知られた。特に PMA の MIC は、今まで報告されている水銀耐性細菌の MIC よりもかなり高かった。broad-spectrum な水銀耐性の 5 種の好気性水銀耐性細菌において、PMA の MIC は 0.25~5 μ g/ml 以下と報告されており⁶⁾、病院下水分離株の水銀耐性を示す絶対嫌気性細菌 *Clostridium perfringens* において、PMA の MIC は 1.0 μ g/ml 以下と報告されている¹⁹⁾。本研究で示された MIC の結果から、*C. butyricum* Mersaru や他の絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属の水銀耐性タイプは broad-spectrum の水銀耐性であり、従来知られている耐性細菌よりも特に有機水銀に対してより高い耐性能を示すことが知られた。

Table 1 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of mercury compounds of bacterial strains.

Mercury compounds ($\mu\text{g/ml}$)	MICs						
	<i>C. butyricum</i> Mersaru	<i>C. butyricum</i> IFO13949	<i>C. butyricum</i> IFO3315	<i>C. butyricum</i> IFO3858	<i>C. acetobutylicum</i> IFO13948	<i>B. megaterium</i> MB1	<i>B. subtilis</i> 168
MC	16.0	20.0	20.0	16.0	12.0	14.0	1.25
MMC	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	0.75	0.75
PMA	12.0	8.0	8.0	12.0	8.0	1.25	0.75

MC; mercury chloride, MMC; methylmercury chloride, PMA; phenylmercuric acetate.

Dimethyl sulfoxide was used to dissolve MMC and PMA and to make the stock solutions.

3.5 絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属における各重金属化合物に対する MIC の決定

Table 2 に各細菌株の水銀以外の重金属化合物に対する MIC を示す。*B. subtilis* 168 はヒ素耐性細菌 (その他の重金属には感受性) として比較に用いた。*Clostridium* 属それぞれの細菌株において、各重金属化合物に対する MIC に大きな差は見られず、ほぼ同様の耐性濃度を示すことが知られた。カドミウムに対する MIC は、すでに知られているカドミウム耐性細菌の MIC²²⁾ より 1.9 倍高い値を示した。コバルトに対する MIC については、Riley ら²³⁾ や Nieto ら²⁴⁾ は 240 $\mu\text{g/ml}$ 以上が耐性細菌と定義している。本研究で調べた各細菌株のコバルトに対する MIC は 1000 ~ 1500 $\mu\text{g/ml}$ であり、従来知られている耐性濃度よりも 4.2 ~ 6.3 倍高い耐性能を示した。また、亜鉛に対する MIC については、290 $\mu\text{g/ml}$ 以上が耐性細菌²⁴⁾ と定義されているが、IFO13948 株以外の 4 株は 2.1 ~ 2.6 倍の高い濃度まで耐えうることが知られた。また、IFO13948 株に亜鉛耐性はないと判断された。よって、この 1 株を除く本研究で調べた全ての細菌株は、カドミウムやコバルト、さらに亜鉛に耐性であると考えられた。

ヒ素に対する MIC において、各細菌株はヒ素耐性細菌である *B. subtilis* 168 に比べ 0.04 ~ 0.1 倍低い耐性しか示さず感受性であった。Poston ら²⁵⁾ は 250 ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ 程度がヒ素耐性と定義していることから、各細菌株 (MIC は 40 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) にヒ素の耐性はないと考えられた。以上の結果から、絶対嫌気性細菌 *Clostridium* 属において、カドミウム、コバルトおよび亜鉛といった水銀以外の重金属に対する耐性も同時に認められ、これらの絶対嫌気性細菌は、比較的広い重金属耐性スペクトラムを有していると考えられた。

Table 2 MICs of heavy metal compounds of bacterial strains.

Heavy metal compounds ($\mu\text{g/ml}$)	MICs					
	<i>C. butyricum</i> Mersaru	<i>C. butyricum</i> IFO13949	<i>C. butyricum</i> IFO3315	<i>C. butyricum</i> IFO3858	<i>C. acetobutylicum</i> IFO13948	<i>B. subtilis</i> 168
NaAsO ₂	80	80	40	100	40	900
CdCl ₂	70	70	70	70	70	50
CoCl ₂	1000	1500	1500	1500	1000	200
ZnSO ₄	600	600	750	600	250	300

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) 水俣湾底泥より分離した嫌気性水銀耐性分離株は、表現型および遺伝子型による同定から *Clostridium butyricum* と同定された。また、この分離株を *Clostridium butyricum* Mersaru と命名した。
- 2) *C. butyricum* Mersaru は、*B. cereus* RC607 の保有する *mer B* 遺伝子と塩基配列レベルで 100% 同一する遺伝子を保有していることが明らかとなった。

- 3) PCR-Southern hybridization の結果から、*Clostridium* 属の各菌株は *B. cereus* RC607 の *merA* および *merB* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を保有していると考えられた。よって、これらの絶対嫌気性細菌は、好気性水銀耐性細菌と同様の水銀耐性メカニズムを共有していると考えられた。
- 4) *Clostridium* 属それぞれの細菌株において、各水銀化合物の MIC に大きな差は見られなかった。しかしながら、好気性水銀耐性細菌の MIC よりも無機水銀と有機水銀の両方に対して比較的高い耐性を示した。MC(塩化水銀)に対しては 1.1~1.4 倍、MMC(塩化メチル水銀)においては 13 倍、PMA(酢酸フェニル水銀)においては 6.4~9.6 倍の高い濃度まで耐えうることが知られた。
- 5) *Clostridium* 属それぞれの細菌株において、カドミウム、コバルトおよび亜鉛といった水銀以外の重金属化合物の耐性が認められた。しかしながら、各重金属化合物の MIC に大きな差は見られなかった。よって、いくつかの絶対嫌気性細菌は比較的広い重金属耐性スペクトラムを有していると考えられた。

謝辞

本研究を進めるに当たり、*Bacillus cereus* RC607 の *mer* オペロンを分与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の石神清隆氏、斎藤公利氏、卒業研究生(当時)の伊藤有希博氏、岸田啓氏、佐々木こずえ氏、永沼孝之氏に謝意を表します。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. Silver, S., G. Endo, and K. Nakamura: Mercury in the environment and the laboratory., J. Jpn. Soc. Water Environ. 17, 235-243, 1994
2. 井出哲夫編: 水処理工学 第二版, 技報堂出版, 1990
3. 成田勝, 黄介辰, 遠藤銀朗: 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, 環境工学研究論文集, 35, 457-466, 1998
4. Osborn, A. M., K. D. Bruce, P. Strike, and D. A. Ritchie: Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon., FEMS Microbiol. Reviews. 19, 239-262, 1997
5. Silver, S., T. K. Misra, and A. Laddaga: DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances., Biological Trace Element Research. 21, 145-163, 1989
6. Bogdanova, E. S., I. A. Bass, L. S. Minhakhin, M. A. Petrova, S. Z. Mindin, A. A. Volodin, E. S. Kalyaeva, G. M. Tiedge, J. L. Hobman, N. L. Brown, and V. G. Nikifirov: Horizontal spread of *mer* operons among gram-positive bacteria in natural environments., Microbiology. 144, 609-620, 1998
7. Nakamura, K., T. Sakata and H. Nakahara: Volatilization of mercury compounds by methylmercury-volatilizing bacteria in Minamata Bay sediment., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41, 651-656, 1988
8. Nakamura, K., T. Fujisaki and Y. Shibata: Mercury-resistant bacteria in the sediment of Minamata Bay., Nippon Suisan Gakkaishi. 54, 1359-1363, 1988
9. 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
10. 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, 5, 13-20, 1983
11. Pan-Hou, H. S. K., and N. Imura: Role of hydrogen sulphide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium*

cochlearium T-2., Arch. Microbiol. 129, 49-52, 1981

12. Baldi, F., M. Papi, and M. Filippelli: Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation., Appl. Environ. Microbiol. 59, 2479-2485, 1993
13. Narita, M., C.-C. Huang, T. Koizumi, and G. Endo: Molecular analysis of *merA* gene possessed by anaerobic mercury resistant bacteria isolated from sediment of Minamata Bay., Microbes and Environments. 14, 77-84, 1999
14. 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
15. Wang, Y., M. Moore, H. S. Levinson, S. Silver, C. Walsh and I. Mahler: Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus* sp. with broad-spectrum mercury resistance., J. Bacteriol. 171, 83-92, 1989
16. Rudrik, J. T., R. E. Bawdon, and S. P. Guss: Determination of mercury and organomercurial resistance in obligate anaerobic bacteria., Can. J. Microbiol. 31, 276-281, 1985
17. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402, 1997
18. Laddaga, R. A., L. Chu, T. K. Misra and S. Silver: Nucleotide sequence and expression of the mercurial-resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5106-5110, 1987
19. Sedlmeier, R. and J. Altenbuchner: Cloning and DNA sequence analysis of the mercury resistance genes of *Streptomyces lividans*., Mol. Gen. Genet. 236, 76-85, 1992
20. Institute for Fermentation, OSAKA (IFO): List of Cultures, 9th Ed, 1992
21. Huang, C.-C., T. Yamagata, Y. Itoh, M. Narita and G. Endo: Structure analysis of a class II transposon encoding mercury resistance of Gram-positive bacterium, *Bacillus megaterium* MB1, a strain isolated from Minamata Bay, Japan., Gene, 234, 361-369, 1999
22. Trajanovska, S., M. L. Britz, M. Bhawe: Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site., Kluwer Academic Publishers. 8, 113-124, 1997
23. Riley, T. V. and B. J. Mee: Susceptibility of *Bacteroides* spp. to heavy metals., Antimicrob. Agents Chemother. 22, 889-892, 1985
24. Nieto J. J., R. Fernandez-Castillo, M. C. Marquez, A. Ventosa, E. Quesada and F. Ruiz-Berraquero: Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria., Appl. Environ. Microbiol. 55, 2385-2390, 1989
25. Poston, S. M. and S. H. Li F-L: Genetic characterization of resistance to metal ions in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: elimination of resistance to cadmium, mercury and tetracycline with loss of methicillin resistance., J. Med. Microbiol. 34, 193-201, 1991