

(5) グラム陽性細菌*Bacillus megaterium* MB1株が持つ新規有機水銀耐性
オペロンの同定と有機水銀分解遺伝子の機能解析

Identification and Characterization of a new broad-spectrum mercury resistance *mer* operon
encoded in a Gram-positive bacterium, *Bacillus megaterium* MB1

山肩健史*・黄介辰**・成田勝*・遠藤銀朗***

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

ABSTRACT; The structure of a broad-spectrum mercury resistance module was shown by sequencing the Gram-positive bacterial transposon Tn*MER11* from *Bacillus megaterium* MB1 that was isolated from Minamata Bay sediment. In the upstream region of a previously identified organomercurial lyase *merB* (*merB1*) region of the Tn*MER11*, a second *merR* (*merR2*) and a second *merB* gene (*merB2*) were found. These three genes constitute a second operon (*mer* operon 2) following a promoter/operator (P_{merR2}) region. The result suggest that the constitutinal genes of the broad-spectrum mercury resistance module of Tn*MER11* are organized as $P_{merR1}-merR1-merE-like-merT-merP-merA-P_{merR2}-merR2-merB2-merB1$.

To characterize the functional roles of the two *merB* genes encoded in the broad-spectrum mercury resistance module, subcloning analysis of the *merB* genes using *Escherichia coli* DH5 α as the host strain was performed by showing their specificity for organomercury resistance. It was demonstrated that the *merB* genes conferred the different patterns of organomercury resistance on the host bacterial strain. Besides p-chloromercuribenzoic acid, thimerosal, and fluorescein mercuric acetate, *merB1* conferred phenylmercury acetate resistance, while the *merB2* did not. This is the first report to distinguish the substrates specificity for *merB1* and *merB2* genes and these data offers some important clues for enzymatic and environmental biotechnological interests.

Keywords; Broad-spectrum mercury resistant bacteria, *Bacillus megaterium* MB1, *mer* operon, organomercurial lyase genes, minimum inhibitory concentration (MIC)

1. はじめに

下水道の普及に伴い、下水処理場において発生する汚泥を肥料や他の有用な資源等として利用することが検討されるようになってきている。その際には、汚泥中への重金属の混入と濃縮が重大な問題になる。汚泥

* 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)

中への混入が考えられる重金属の中でも水銀は、かつて熊本県水俣湾周辺で水俣病をもたらしたように人体に対して直接的な影響を与えることが知られており、混入する許容濃度は厳しく制限されている。一方、自然界において広く存在している水銀化合物を分解し、さらには水銀イオンを毒性の低い金属水銀に還元して気化することにより、水銀に対する耐性を獲得している微生物の存在が知られている¹⁾。このような耐性メカニズムを持つ細菌株が水銀に汚染された環境中に存在すれば、環境中の水銀を生物的に還元し気化することから、水銀汚染の除去につながると考えられる。我々はこの様な耐性機構を応用した新たな廃水の生物処理システムを構築することを目的とし、また自然環境中での水銀汚染地域などバイオレメディエーションへの適用も視野に入れ、水銀耐性細菌の生態や耐性機構について基礎研究を行っている。

一般的に、水銀イオンの還元・気化による耐性メカニズムは*mer operon*と呼ばれている遺伝子群の連携作用によることが知られている。*mer operon*の構造は菌株によって多少の違いが見られるが、その基本的な組成は、水銀イオンに応答する転写調節遺伝子 (*merR*)、水銀イオンを細胞内へ輸送する遺伝子 (*merT*、*merP*) と、細胞内に取り込んだ水銀イオンを揮発性の高い金属水銀に還元する遺伝子 (*merA*) などからなることが明らかにされている^{2),3)}。また、水銀イオンよりも毒性の高い有機水銀に対して、分解酵素をコードした*merB*遺伝子が付加されていることもしばしば発見されている²⁾。これまでの*mer operon*に関する知見の多くはグラム陰性菌から得られており、グラム陽性菌に関する研究は遅れている。そこで、本研究は、水銀耐性のグラム陽性菌が多く生存していることが確認されている水俣湾^{4),5)}の底泥サンプルからグラム陽性菌*Bacillus megaterium* MB1株を単離し、遺伝子解析を行った⁶⁾。その結果、MB1株の水銀耐性モジュールがアメリカのボストン港の底泥から単離された*Bacillus cereus* RC607株⁷⁾と同一のものであることが分かり⁶⁾、また、このグラム陽性細菌由来の水銀耐性モジュールはTn*MER11*と命名されたClass II トランスポゾン⁸⁾にコードされていることが明らかになった⁵⁾。しかしながら、この水銀耐性モジュールの*merA*遺伝子と*merB* (*merB1*) 遺伝子間の領域はまだ解析されていないため、本研究では、PCRによりその領域を増幅し、塩基配列の解析とサブクローニングによる解析を行ったので報告をする。

2. 実験方法

2.1 *merR2*—*merB2*領域の増幅と解析

(1) *merR2*—*merB2*領域のPCR増幅

Bacillus cereus RC607タイプの水銀耐性モジュールの*merA*遺伝子と*merB* (*merB1*)の間にまだ十分に検討されていない領域があり、本研究では、それに対応する領域を水俣湾の底泥サンプルから単離されたMB1株のTn*MER11*から増幅した。プライマーDNAは*merA*遺伝子と*merB*(*merB1*)の間の領域が増幅する様に黄らの論文⁶⁾を参考にして、Gap-F (Forward; 5'-ATGTTGCAATAACACCATT-3') とGap-R (Reverse; 5'-AAACAGCCAC TTCATGGATT-3') を使用した。PCRはTP240 Thermal Cycler (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) と*Ex Taq*TM (Takara Shuzo) を使用して行った。PCRの条件は、94℃で最初の熱変性を1分行った後、熱変性は94℃で30sec、アニーリングは55℃で90sec、また伸長反応は72℃で2minを1サイクルとして30サイクル行った。

(2) 塩基配列の解析

(1) で増幅されたPCR産物は、電気泳動後、GeneCleanII Kit (BIO 101, La Jolla, California) により回収し pGEM-T Easyベクター (Promega, Madison, Wisconsin, USA) とライゲーションを行った後、*Eschericia coli* DH5 α に形質転換した。クローニングされたプラスミドDNAは、FlexiPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)により回収し、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) とAuto-Sequencer Li-Cor Model 4200 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA)を用い、サンガー法⁹⁾によってPCR産物の塩基配列を決定した。

塩基配列の解析は、DNASIS(Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan)とNational Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)に提供されているORF Finder及びBLASTプログラムにより行った。

2.2 サブクローニングと水銀耐性能の比較

(1) 水銀耐性能を比較するためのサブクローニング

これまで知られているTnMERIと*B. cereus* RC607株の水銀耐性モジュールの塩基配列 (Fig.1) を基に、本研究で必要とされるDNA領域のPCR増幅用のプライマーDNAをデザインした。Fig.1におけるmerRからmerAまでの領域の増幅のためにはプライマーとしてMerR-F (Forward; 5'-TCTAGAATTCAACAACGCGCAAGGACAAGCT-3') とMerA-R (reverse; 5'-AAAGGATCCTTTTTATTAAGTAAGTTTTATAGAT-3') を、Fig. 1におけるmerRからmerBの直上流の領域の増幅のためにはプライマーとしMerR-FとMerBB-R (Reverse 5'-AAAGGATCC TCCTTTGTTATTTTTTGTTTCCTATTAT-3') を、またmerRからmerBまでの領域の増幅のためプライマーとしてMer operonF (forward; 5'-TTGGATTAAATTCACCTGGGACCAAACTCTGG-3') とMer operonR (reverse; 5'-CTCGTAAACTTATAATTTGTACACAGCTGCCCT-3') を用いた。これらのプライマーは何れも既知のシーケ

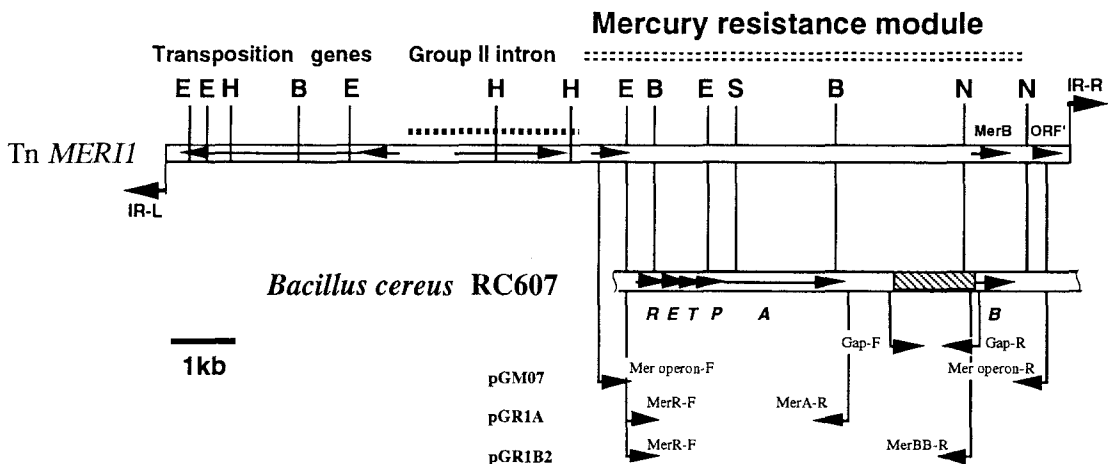


Fig. 1 水銀耐性モジュールの未解析領域及び解析用PCRプライマーの位置

Abbreviations: B; *Bg*III, E; *Eco*RI, H; *Hind*III, N; *Nco*I, P; *Pst*I, S; *Sma*I.

R, T, P, A and B denote the *merR*, *merT*, *merP*, *merA* and *merB*, respectively.

ンスに基づいて設計した。PCR増幅用のDNAポリメラーゼはLA PCR Kit Ver.2 (Takara)を用いた。これらのプライマーのアニーリング温度はプライマーの融解温度を求めることによって、最適な値に決定した。各反応条件は、*merR-merA*の領域と*merR-merB*直上流の両領域では、プレヒートを94℃で1分行った後、熱変性は94℃で30sec、アニーリングは55℃で90sec、伸長は72℃で5minを1サイクルとして30サイクルを行った。*merR-merB*の領域のPCR条件は、プレヒートを94℃で1分行った後、熱変性は98℃を20sec、アニーリング及び伸長反応を68℃で6minを1サイクルとして30サイクル行い、その後72℃で10分間保温させた。各々のPCR増幅産物を2.1と同様pGEM-T Easy ベクターに挿入して*E. coli* DH5 α に形質転換してクローニングした。また、ここで用いた株は*merR*から*merA*までの領域を挿入したプラスミドをpGR1A、*merR*から*merB*直上流までの領域を挿入したプラスミドをpGR1B2、*merR1*から*merB1*までの領域を挿入したプラスミドをpGMO7とそれぞれ命名した。

(2) 水銀耐性能の比較

水銀耐性能は最小阻害濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC) により評価した。塩化第二水銀 (mercury chloride; MC)、塩化メチル水銀 (methylmercury chloride; MMC)、酢酸フェニル水銀 (phenylmercury acetate; PMA)、チメロサル水銀 (thimerosal; TH)、フルオレセイン酢酸水銀 (fluorescein mercuric acetate; FMA)、パラクロロ安息香酸水銀 (p-chloromercuribenzoic acid; PCMB)、塩化エチル水銀 (ethylmercury chloride; EMC) 計7種類を用い試みた。塩化水銀 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) の添加により誘導をかけ、一晚LB液体培地で培養した菌液を各濃度の各々の水銀化合物を添加したLB液体培地に植菌し、37℃、2日間振盪培養させてODが600nmで0.5以上と成るまで増殖できるかどうかによって耐性を評価した。

3. 実験結果および考察

3.1 *merA-merB(merB1)*領域の塩基解析と水銀耐性モジュールの構造解析

塩基配列の解析をFig.2に示す。この塩基配列中のオープンリーディングフレーム (ORF) はNational Center for Biotechnology Information (NCBI)で提供されているプログラムを使い、解析を行った。その結果、2つのORFの存在が明らかとなり、それらを*merR2*遺伝子と*merB2*と命名した。また従来から知られていた*merR*遺伝子を*merR1*、また*merB*を*merB1*と再命名した。さらに、*merR2*の上流に*merR1*のプロモーター領域 (P_{merR1}) と類似している領域 (P_{merR2}) が存在していることと*merB2-merB1*の間にプロモーターモチーフが検出されないことから、Tn*MER11*上で既に同定されている*merB1*と共に、 $P_{\text{merR2}}-merR2-merB2-merB1$ が第二のoperonを形成していることが明らかとなった (Fig.3)。このことから、*Bacillus cereus* RC-607とTn*MER11*タイプの水銀耐性モジュールは2つのoperonから組成され、その構造は $P_{\text{merR1}}-merR1-merE\text{-like}-merT-merP-merA-P_{\text{merR2}}-merR2-merB2-merB1$ であることが分かった (Fig.3)。

*merR2*遺伝子は390bpの読み枠からなり、129アミノ酸残基のポリペプチドMerR2を有する。そのアミノ酸配列の相同性を調べたところ、このMerR2と既に知られている水銀耐性調節遺伝子の相同性が非常に低い (30%以下のidentity) ことが分かった。一方、*mer* operon 1によってコードされているポリペプチドMerR1で

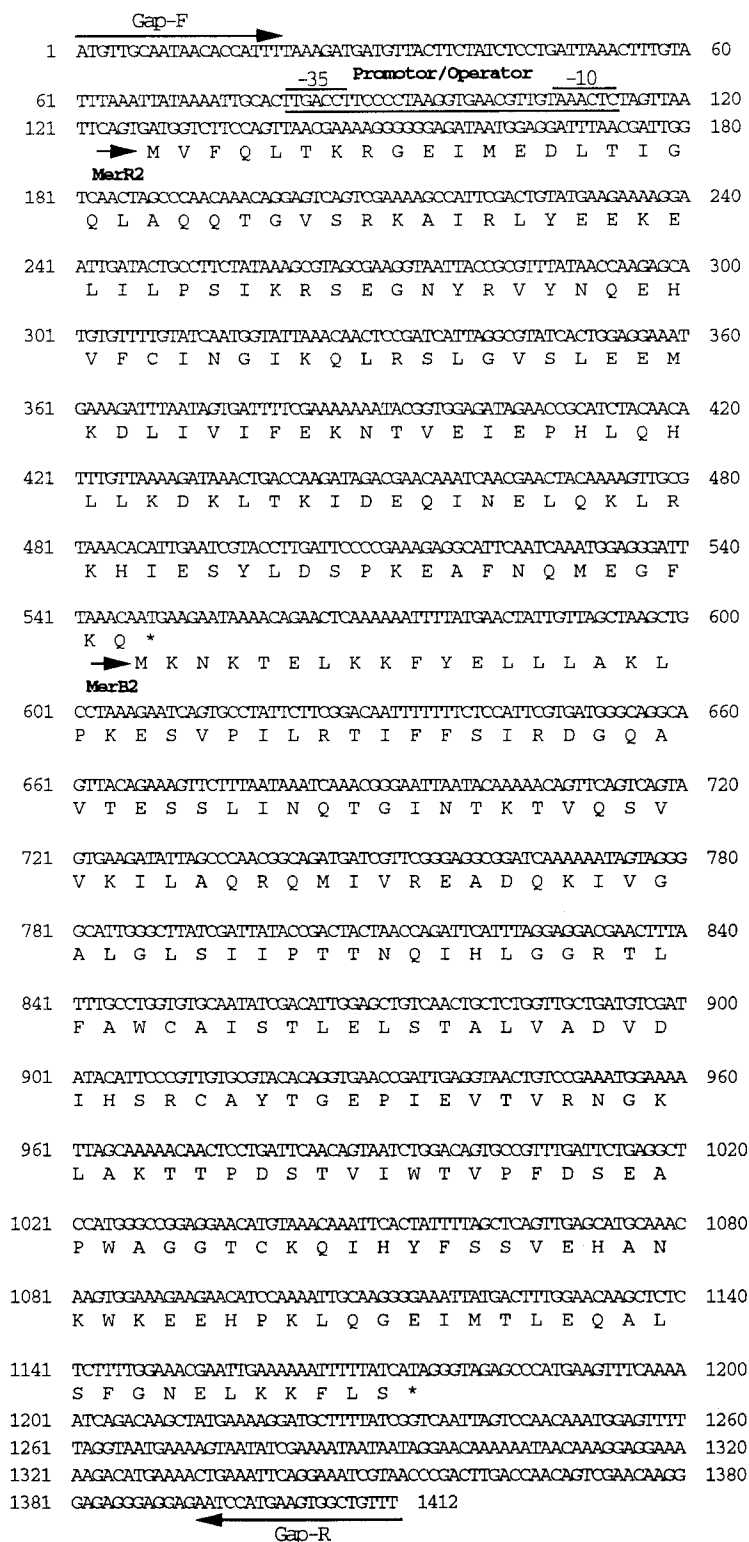


Fig. 2 *merR2*と*merB2*の塩基配列と読み枠

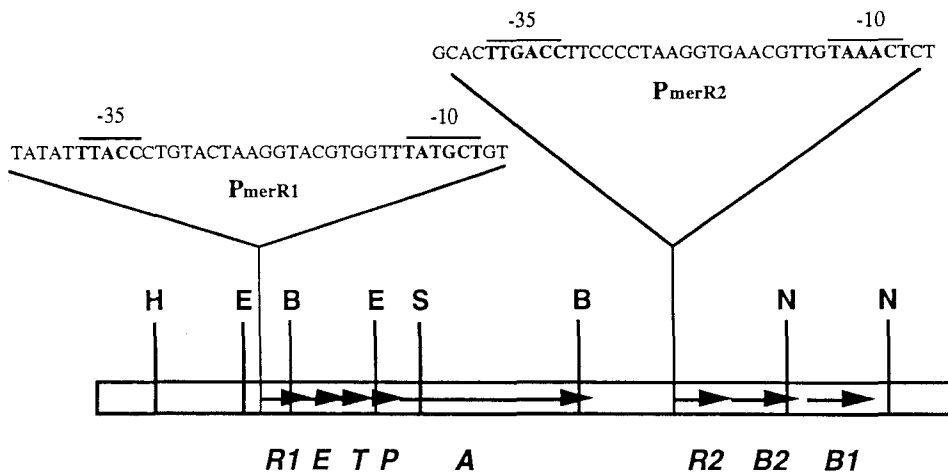


Fig. 3 TnMERII 上の水銀耐性モジュールの構成遺伝子地図

Abbreviations: B; *Bgl*III, E; *Eco*RI, H; *Hind*III, N; *Nco*I, P; *Pst*I, S; *Sma*I.
R, T, P, A and B denote the *merR*, *merT*, *merP*, *merA* and *merB*, respectively.

は、陰性菌由来のMerRにも関わらず、既知のMerRと比較的高い相同性が見られた。更に、既知の全てのMerRに保存され、水銀イオンのバインディングに関係しているシステイン残基が3つである（MerR1の順で、Cys-79, Cys-114, Cys-123）のに対し、MerR2のシステイン残基は一つしか持っていない（Cys-50）ことが知られた。このことから、*merB2*と*merB1*に対する転写の制御は、既知のMerRの制御パターンとは異なるものと考えられた。

merR2 遺伝子の直下流に*merB2*の660bpからなる読み枠が存在し、*merB2*の最初の4塩基は*merR2*と重複している（Fig.2）。そのアミノ酸配列では、グラム陽性菌の*Staphylococcus aureus*(pI258)やグラム陰性菌の*Serratia marcescens* (pDU1358)、*Pseudomonas* spp. (pMR26)、*Pseudomonas stutzeri* (pPB)などプラスミド由来のMerBタンパク質は、相同性が低い、配列の中央部には比較的高い相同性が見られた（Fig.4）。このことから、MerBタンパク質の中央部に高度に保存されているシステイン残基やロイシン残基などは、これらのタンパク質の機能の発揮に重要な意味を持っていると考えられる。しかしながら、同じoperonに位置し、同じ有機水銀分解酵素であるMerB2とMerB1の間の相同性が低いこと（27.4% identity）から、*merB1*と*merB2*の2つの遺伝子に何らかの機能的な相違性を持っていることが示唆された。

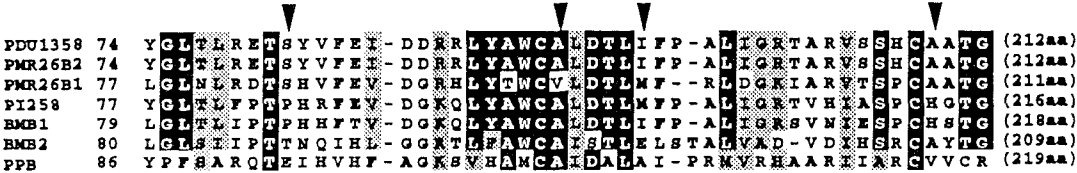


Fig. 4 MerB2のアミノ酸シーケンスと他のMerBタンパクの中央部の比較

2つのシステイン（Cys-116,Cys-136）、トレオニン（Thr-100）とロイシン（Leu 121）はすべてのMerBに存在していた（矢印で示す）。ここで使用したアミノ酸シーケンスの Accession numberは PDU1358 (P08664), PMR26B1 (D83080), PMR26B2 (A13925), PI258 (P08653), BMB1 (AF138877), BMB2 (AB027307), PPB(U90263), BMB3 (AB027306).

3.2 水銀耐性能の比較

まず、*B. megaterium* MB1の水銀耐性スペクトラムを調べた。水銀耐性モジュールを持っていない水銀感受性である*B. subtilis* 168と比べた結果、塩化第二水銀の他に酢酸フェニル水銀、チメロサル、フルオレセイン酢酸水銀、パラクロロ安息香酸水銀の4つの有機水銀に耐性を示した（Table1）。塩化メチル第二水銀、塩化エチル第二水銀の2種類に対して、MB1と168両株ともに耐性が低く、水銀耐性モジュールの有無による耐性の違いは得られなかった。次に、2つの*merB*遺伝子の機能的な相違性を解明するため、大腸菌を用いてサブクローニングを行い、有機水銀に対する基質特異性を調べた。得られた結果もTable1に示す。両*merB*遺伝子を持っていないプラスミドpGR1A保持株である*E.coli* DH5 α（pGR1A）が塩化第二水銀（無機水銀）のみ耐性を示すことに対し、両*merB*遺伝子を持つpGMO7保持株では、元株*B. megaterium* MB1と同様の4つの有機水銀に耐性を示した。一方、*merB2*遺伝子のみを持つプラスミドpGR1B2保持株ではチメロサルとフルオレセイン酢酸水銀の2つの有機水銀にしか耐性を示さなかった。この結果から、両*merB*遺伝子は異なる基質特異性を持つことが示された。

Table1 MICによる水銀耐性能の評価結果

Mercury compounds		MIC				
(μg/ml)	<i>B. megaterium</i> MB1	<i>B. subtilis</i> 168	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α /pGR1A	<i>E. coli</i> DH5 α /pGR1B2	<i>E. coli</i> DH5 α /pGMO7
MC	12.0	1.0	3.0	30.0-32.0	30.0-32.0	30.0-32.0
MMC	0.25-0.5	0.25-0.5	0.5-0.75	0.5-0.75	0.5-0.75	0.5-0.75
EMC	0.25	0.25	0.5-0.75	0.5-0.75	0.5-0.75	0.5-0.75
PMA	1.0	0.5	6.0-8.0	7.0-9.0	9.0-10.0	30.0
TH	0.75	0.25-0.5	1.0	1.0-1.5	1.5	1.5
FMA	16.0	3.0	6.0-7.0	12.0-14.0	30.0	30.0
PCMB	8.0-10.0	2.5-3.0	18.0	20.0-24.0	24.0	50.0-60.0

MC; mercury chloride, MMC; methylmercury chloride, EMC; ethylmercury chloride, PMA; phenylmercuric acetate, TH; thimerosal, FMA; fluorescein mercuric acetate, PCMB; p-chloromercuribenzoate.

4. 結論

本研究では、微生物が持つ水銀耐性メカニズムを利用した新たな下水の生物処理システムの構築やその自然環境中でのバイオレメディエーションへの適用などを目標として、水俣湾の底泥より単離された好気性グラム陽性菌*B. megaterium* MB1の有機水銀耐性モジュールを解析した結果、以下のような知見が得られた。

1) *B. megaterium* MB1のClassIIトランスポゾンにコードされている有機水銀耐性モジュールの*merA*遺伝子と*merB1*遺伝子の間に第二の調節遺伝子*merR2*と第二の有機水銀分解遺伝子(*merB2*)の存在が確認された。このことにより、このモジュールには2つの*mer* operonが存在し、それぞれのプロモーター・オペレーター領域と転写制御遺伝子を持ち、オペロン遺伝子群の配置は $P_{merR1}-merR1-merE-like-merT-merP-merA-P_{merR2}-merR2-merB2-merB1$ であることが分かった。

2) 本研究で発見した第二の調節遺伝子*merR2*と従来知られている他の水銀耐性調節遺伝子との塩基配列との相同性は低く、*merR2*の遺伝子産物による転写の制御は今まで知られている*mer* operonの転写調節の制御パターンとは異なることが示唆された。

3) MICによる7種類の水銀化合物に対する大腸菌各サブクローンのMICの結果から、*merB1*と*merB2*の2つの*merB*遺伝子産物は異なる基質特異性を持つことが知られた。

謝辞

本研究を進めるに当たり、協力を頂きました大学院生博士前期課程の小泉卓哉氏、石神清隆氏、斎藤公利氏、卒業研究生の伊藤有希博氏、石井秀学氏に謝意します。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., Endo, G. and Nakamura, K.: Mercury in the environment and laboratory. J. Jpn. Soc. Water Environ. 17, 235-243, 1994.
- 2) Misra, T. K.: Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmid 25, 4-16, 1992.
- 3) Osborn, A. M., Bruce, K. D., Strike, P., and Ritchie, D. A.: Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. FEMS Microbiol. Rev. 19, 239-262, 1997.
- 4) Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiyama, H., and Yagi, O.: Organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediment of Minamata Bay, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 56, 304-305, 1990.
- 5) 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.
- 6) Huang, C. -C., Narita, M., Yamagata, T., Itoh, Y., and Endo, G.: Structure analysis of a class II transposon encoding the mercury resistance of the Gram-positive bacterium, *Bacillus megaterium* MB1, a strain isolated from Minamata Bay, Japan. Gene, in press, 1999.

- 7) 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.
- 8) Grinsted, J., De la Cruz, F., and Schmidt, R.: The Tn21 subgroup of bacterial transposable element. *Plasmid* 24, 163-189, 1990.
- 9) Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467, 1977.