

環境浄化微生物に見られる遺伝子の水平伝播 —微生物種に共有された水銀耐性遺伝子から 組み換え生物の開放系利用を考える—

Horizontal Gene Transfer in Environmental Purification Microorganisms — Consideration of the Use of Living Modified Organisms in the Uncontained Environments from the Evidence of Mercury Resistance Genes as Microbial Common Properties —

遠藤 銀朗^{1*}, 松井 一彰¹, 成田 勝²
GINRO ENDO, KAZUAKI MATSUI and MASARU NARITA

¹ 東北学院大学工学部 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1

² 東北緑化環境保全(株)経営企画 〒980-0014 宮城県仙台市青葉区本町2-5-1

* TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070

* E-mail: gendo@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

¹ Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1 Chuo, Tagajo, Miyagi 985-8537, Japan

² Tohoku Afforestation and Environmental Protection Co. Ltd., 2-5-1 Honmachi,
Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-0014, Japan

キーワード: 環境浄化微生物, 遺伝子組み換え生物, 開放系利用, 遺伝子水平伝播, 水銀耐性遺伝子

Key words: Environmental Purification Microorganisms, Living Modified Organisms (LMOs), Use in Uncontained Environments, Horizontal Gene Transfer, Mercury Resistance Gene

(原稿受付 2006年3月15日/原稿受理 2006年4月21日)

1. はじめに

カルタヘナ議定書は、市場への供給を目的としたモダン・バイオテクノロジーによって改変された生物 (living modified organisms=LMOs) の国境を越えた移動および野外における利用の監視と管理を目的とする生物多様性条約の条文に基づく国際的合意文書である³⁾。議定書が作成された目的は、その第1条に記されているように、「環境及び開発に関するリオ宣言の原則15に含まれる予防的アプローチに従い、人の健康に対するリスクをも考慮し、特に国境を越える移動に焦点を当て、生物の多様性の保全及び持続可能な利用に悪影響を及ぼす可能性のあるモダン・バイオテクノロジーによって改変された生物 (LMOs) の安全な輸送、取扱及び利用の分野における適切な水準の保護を確保するために貢献すること」である。また、具体的には、国外から移入される遺伝子組み換え生物等による自国の生物生態系の破壊を防止し、人間の健康への影響の有無を考慮すると同時に生物多様性を保全することである。ここで危惧される組み換え生物等による生態系の破壊とは、遺伝子組み換え等により人工的に作り出された新規な生物(遺伝子改変生物)によって、自然環境に生息する野生生物種が駆逐されることを指している。このことは、特定の国の生態系を構成する生物種を変化させ、さらには生物種を構成要素として成

立している自然環境システムを変化させることを意味している。しかし、人工的に作出された生物による生態系破壊の危険性については、意図的に生態系を改変する目的で作出したものやヒトへの病原性を付与したもの(生物兵器等)以外では、具体的にかつ定量的に評価されているものは少ない。また、遺伝子組み換え生物が他の生物を駆逐する能力や生態系において残存する能力とは別に、自然界における組み換え能力や形質転換能力等によって、組み換え生物の遺伝子自体が他の生物に水平伝播することによって残存したり拡散したりする能力については、いまだほとんど解明されていない。

環境バイオテクノロジーの分野では、遺伝子組み換え微生物を野外でまたは開放型の大規模培養装置内で、汚染環境の浄化などの目的に利用する研究が始まっている。それらの研究では、環境に導入された微生物の消長と同時に、導入された遺伝子の消長がどのようなものであるかについて把握することが必要である。これによって、生物多様性を根底で支えている生態系の遺伝子の多様性と、その遺伝子多様性の保全を検討する基礎的なデータを蓄積できると考えられるからである。

われわれは、これまで細菌の重金属耐性遺伝子に注目してその地域的および地球的な規模での遺伝子の伝播を調べる研究を行ってきた。その結果、トランスポゾンによる遺伝子の伝播と染色体への組み込み・安定化が、環

境における生物種間での遺伝子の伝播に重要な役割を果たしているという知見を得てきた。本論文では、水銀耐性遺伝子の地域規模および地球規模での伝播を例として、トランスポゾンを紹介する自然環境中での遺伝子の伝播拡散に関して得られた研究結果を報告したい。また、それらの研究結果から理解できる遺伝子の自然的組み合わせとは何か、そして人為的遺伝子組み合わせとどのような違いを有するかについて考察し、あわせてカルタヘナ法としての組み合わせ微生物の野外利用の規制の法制上のあり方について考察してみたい。

2. これまで知られている細菌の重金属耐性遺伝子群

生物にとって毒性を示す重金属として知られているものに水銀、カドミウム、クロム、亜鉛、鉛、コバルト、ニッケル、スズ、銅、銀などがある。これらはどれも金属元素としては生物に毒性を示すことはほとんどないが、しかしいったん酸化されたりして重金属イオンになると強い毒性を示す。また、有機化合物と結合してメチル水銀やエチル鉛、ブチルスズのようにいわゆる有機化することによって、生物細胞に進入し細胞内に蓄積し、タンパク質に結合することなどによって毒性を示す。

微生物の重金属耐性のメカニズムを解明することによって、微生物が行っている重金属無毒化のための生物反応の全容を理解することができる。また、そのメカニズムを応用して新しい重金属の無毒化処理や除去のためのバイオテクノロジーの開発が可能になる。生物が重金属に対する強い耐性を獲得するためには、重金属耐性遺伝子といわれる特別な遺伝子群を発現可能な状態で保有していることが必要である。重金属の耐性に関する遺伝子は、通常いくつかの関連遺伝子が同時に発現を調節されるオペロンとして存在しており、重金属の種類によって異なる特別な遺伝子および異なるオペロンが発現するようになっている。これまでに遺伝子構成が解明された代表的な細菌の重金属耐性オペロンとしては、水銀耐性オペロン、カドミウム耐性オペロン、亜鉛耐性オペロン、コバルト耐性オペロン、銀耐性オペロンなどがある。

生物の無機化合物耐性は、重金属以外にもヒ素、セレン、テルルといったきわめて毒性の強い化合物についても発見されている。これらの毒性物質に対する微生物の耐性発現は様々な方法によることが明らかになっているが、いくつかの共通な耐性メカニズムもある。たとえばヒ酸に対する耐性は、水銀に対する場合と同様にヒ酸(5価)を亜ヒ酸(3価)還元してから細胞外に排出する能力によることがわかっている。また、セレン酸やテルル酸に対しては水銀と同様に還元して元素セレンや元素テルルに変えて無毒化するが、これらの単体元素は水銀のように気化して放出される訳ではないので微生物細胞内または細胞周囲に蓄積されるといわれている。

3. 細菌の水銀耐性遺伝子と細菌種間における伝播

毒性物質に対する微生物の耐性遺伝子の伝播については抗生物質耐性遺伝子に関する研究が数多くなされてきており、主としてRプラスミドと伝達性プラスミドの

存在とそれらの特性が明らかにされた。一方、重金属耐性や有機塩素化合物分解等に関する遺伝子については、遺伝子の特徴とオペロンの構造および発現のメカニズムが主として研究されてきた¹²⁾。しかし、それらの環境における伝播とゲノムへの組み込みについてはまだ十分な研究がなされていない。しかし最近になって、これらの遺伝子が複数の細菌で共有されていることに関して新しい科学的知見が得られるようになってきている^{17,18)}。環境汚染物質の分解や耐性に関する遺伝子およびオペロンが異なる細菌間で水平伝達されていることが知られるところとなり、その伝達プロセスとしてトランスポゾンによる媒介が注目されるようになってきている。この論文では、水銀耐性オペロンのトランスポゾンを経た比較的広い範囲での伝播と地球規模での拡散について考察する。

水銀耐性細菌とその遺伝子は、当初消毒剤として水銀を用いていた時代の病院サンプルから分離した大腸菌や *Proteus sp.* といったグラム陰性細菌において発見され、その後グラム陽性細菌の *Staphylococcus aureus* などでも発見されるようになった。また伝達可能なR因子/Rプラスミドが抗生物質耐性と一緒の水銀耐性をコードしていることを明らかにする研究がなされ、*mer* オペロンの遺伝子構成の共通性と多様性が知られるところとなった^{11,12)}。

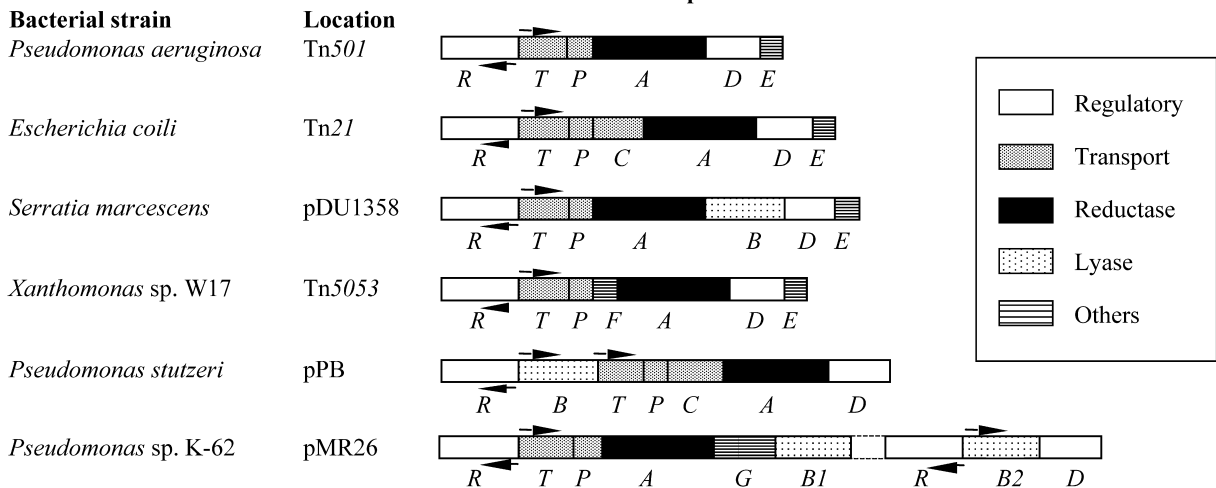
水銀は自然界に広く存在し、生物に対して強い毒性を示す重金属である。無機イオン態の水銀と有機態の水銀は特に毒性が強く、多くの生物はごく低濃度の水銀化合物に曝された場合でも代謝活性を失う。しかし、水銀化合物の分解と水銀イオンの金属水銀への還元と気化によって耐性を得ている細菌が存在し、それらは *mer* オペロンと呼ばれる水銀耐性遺伝子群を持っている。また、このオペロンを持つ細菌はこれまでの研究から地球上に広く分布していることが明らかになっている。細菌の代表的な *mer* オペロンの例を図1に示す。

それらはどれも好気性細菌について調べられた結果であるが、絶対嫌気性のグラム陽性細菌 (*Clostridium butyricum*) においても同様な遺伝子オペロンが存在することが発見され、しかもそれは好気性細菌 *Bacillus cereus* RC607 のオペロンと同一の水銀耐性遺伝子 (*merA*, *merB*) を持つことが明らかとなった⁷⁾。このように、種が異なるだけではなく生息環境の全く異なる好気性細菌と絶対嫌気性細菌が同一の水銀耐性オペロンを共有していることは、細菌間の遺伝子の水平伝達が特殊な伝達媒体によってなされていることを示すものとして注目される。

そのような水銀耐性オペロンの伝達媒体として注目されるものにクラス II トランスポゾンがある。水銀耐性オペロンをコードするトランスポゾンは最初グラム陰性細菌で見つけられ Tn501, Tn5053 や Tn3 family の Tn21 subgroup などが知られるようになった。その後 *Bacillus cereus* RC607 の水銀耐性オペロンの下流にクラス II トランスポゾンの IR 配列が見つかり、グラム陽性細菌の水銀耐性オペロンにもクラス II トランスポゾンが関与していることが示唆されるようになった⁹⁾。

われわれが水俣湾の底泥より分離したグラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 は、クラス II トランスポゾン

Gram-negative



Gram-positive

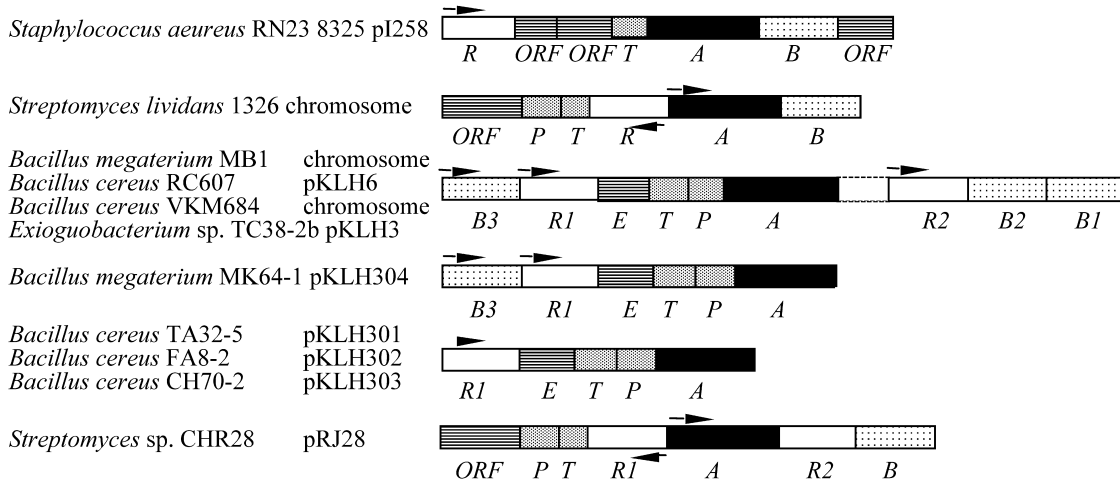


図1. グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の代表的な mer オペロン。

の *tnpA*, *tnpR* と両端に Tn21 サブグループトランスポゾンの IR と相同な IR 配列を持つ完全な形のトランスポゾン (TnMER1) であることが証明された⁴⁾。またこのトランスポゾンは、染色体上にコードされており、そのトランスポゾンの中に水銀耐性オペロンがコードされていることが明らかになった⁴⁾。さらに、このトランスポゾンにはグループ II 型のイントロンが存在し、このイントロンの中にリバーストランスクリプターゼ、マチュラーゼ等の活性ドメインをコードする ORF (*iep*) が確認されている。この水銀耐性トランスポゾン TnMER1 の構造を図 2 (A) に示す。*Bacillus megaterium* MB1 はプラスミドを持っておらず、細菌間でこのトランスポゾンが受け渡された際には接合伝達プラスミドなどの他の媒介ベクターが必要とされたと考えられる。

図 2 (B) には、同一の IR 配列を持つグラム陽性細菌 (*Bacillus cereus* RC607) の水銀耐性クラス II トランスポゾン (Tn5084) を比較のために示したが、これら2つのトランスポゾンはイントロンをコードするかしなやかを除いて基本的には同一のトランスポゾンである。しかも、Tn5084 にもグループ II 型イントロンが挿入するための (あるいは挿入していた) 同じイントロンインターベニ

ング領域が存在するため、このイントロンは Tn5084 ではスプライシングされた可能性がある。この *Bacillus cereus* RC607 はアメリカのボストン港から分離された細菌であり、日本の水俣湾から分離された *Bacillus megaterium* MB1 とは生物種も生息場も異なる。したがって、水銀耐性オペロンを含むこれらのトランスポゾンは地理的隔たりや生物種の壁を超えて世界的に伝播し拡散していると考えられた⁸⁾。

上記の研究を契機として、その後われわれは水銀耐性遺伝子に注目してその地域的および地球的な規模での遺伝子の伝播を調べる研究を行ってきた。その成果として、トランスポゾンによる遺伝子の伝播と染色体への組み込み・安定化が、環境における生物種間での遺伝子の伝播に重要な役割を果たしているという知見を得ることができた⁹⁾。地域的な遺伝子の伝播については、熊本県の水俣湾底泥から単離された水銀耐性の *Bacillus* 属の細菌における水銀耐性遺伝子を調べることによって、いくつかの細菌種で同一の遺伝子オペロンが共有されていることを示すことができた^{8,9)}。

これらのことをさらに確認するために、地球のできるだけ広い地域から海砂や土壌サンプルを採取し、その中

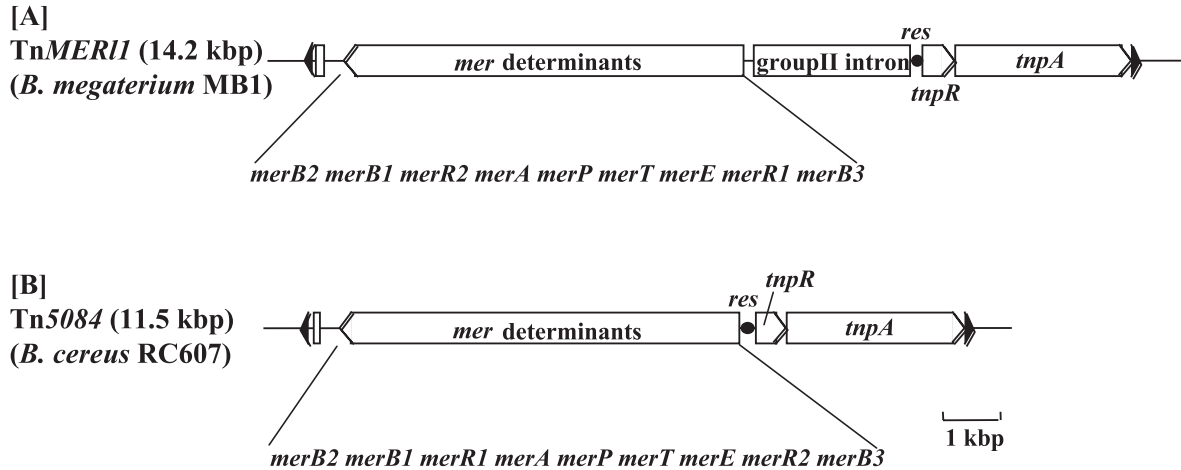


図2. 水銀耐性オペロンをコードするトランスポゾンの例。

(A) *Bacillus megaterium* MB1 由来の TnMER11

(B) *Bacillus cereus* RC607 由来の Tn5084

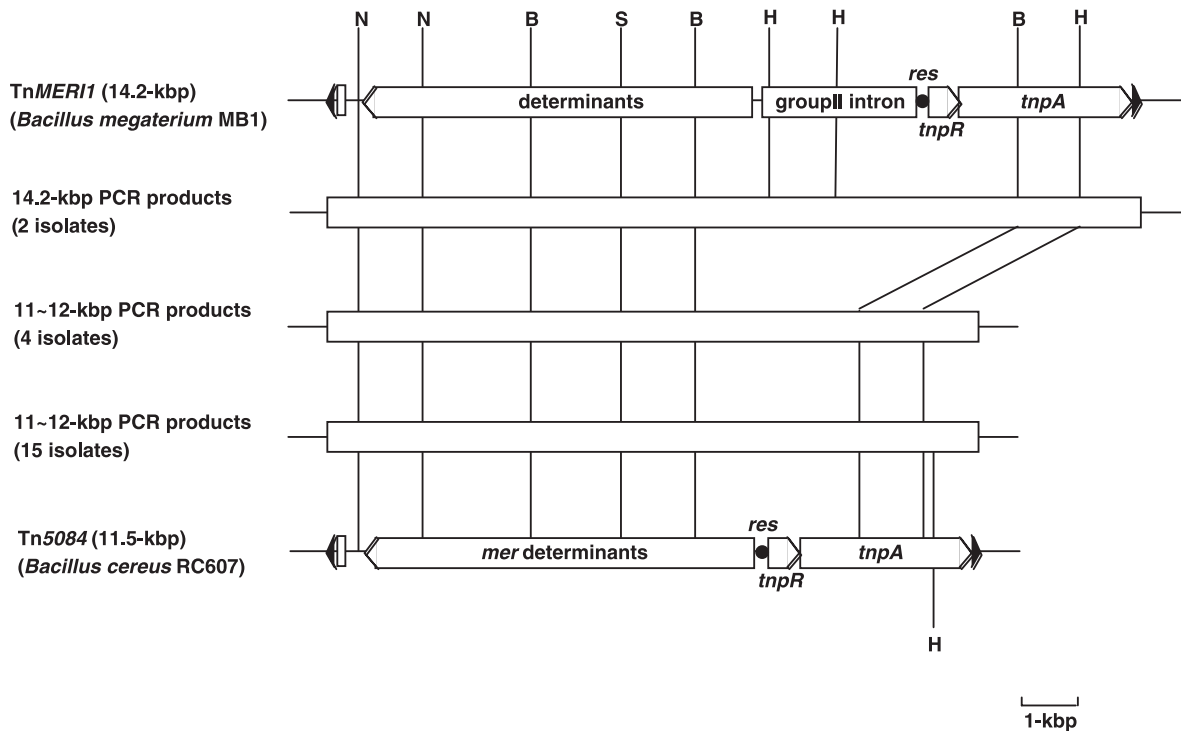


図3. 世界中から分離した *Bacillus* 属細菌が保有する水銀耐性決定領域を含むトランスポゾンの制限酵素地図における TnMER11 と Tn5084 への相同性。

(B; BglII 切断箇所, H; HindIII 切断箇所, N; NcoI 切断箇所, S; SmaI 切断箇所)

の芽胞形成細菌に注目して水銀耐性細菌を分離するとともに、それらの水銀耐性細菌が同一の IR 配列を持つ水銀耐性オペロンを含むトランスポゾンを保有しているかどうかを調べた。この研究では、水俣湾、朝鮮半島海岸、東南アジア海岸（台湾、タイ）、北米大陸の東海岸、同・西海岸、中米メキシコ湾岸、オセアニア大陸の東海岸、同・西海岸、欧州大西洋岸（アイルランド）、欧州河岸（スイス、オランダ）、北欧海岸（スウェーデン）、アフリカ大陸南端海岸（南ア連邦）、他、のようにほぼ全地球をカバーするように土壌や底質を採取した。それらのサンプルから71株の *Bacillus* 属の水銀耐性細菌を

分離することができ、それらのうちの52細菌株が *Bacillus megaterium* MB1 の水銀耐性遺伝子に相同な遺伝子を持っていた。さらに、これら52細菌株のうち23菌株から Tn5084 の IR 配列を単一のプライマーとした PCR によって Tn5084 (11.5 kbp のもの20細菌株) および TnMER11 (14.2 kbp のもの3細菌株) とそれぞれ同じサイズのトランスポゾン領域を増幅し検出することができた⁹⁾。

上記の PCR で増幅した23細菌株のトランスポゾン領域をさらに詳しく調べたところ、図3に示したように16細菌株の PCR 増幅産物は Tn5084 と同一の制限酵素地

図を示し、残り3細菌株は *TnMERII* と同一および4細菌株はイントロン領域を除いた *TnMERII* と同一 (*Tn5085* と同一) の制限酵素地図を示した⁹⁾。また、これら23細菌株からの PCR 産物は *TnMERII* がコードする *merA* 遺伝子プロンプとハイブリダイズし、それらのトランスポゾン上にある水銀耐性オペロンは *TnMERI*, *Tn5084*, *Tn5085* のものと相同であった。したがって、世界中の環境に生息する *Bacillus* 属細菌は、トランスポゾンに多少の違いが見られるものの、基本的には同一系統のトランスポゾンにコードされた同一の水銀耐性オペロンを共有していることになり、トランスポゾンを介する遺伝子の伝播は異なる細菌種間で地球規模でなされていることが理解できた^{2,9)}。

4. 自然的遺伝子組み換えと人為的遺伝子組み換えについて

上記に示したように、自然界における同一の水銀還元遺伝子が多くの細菌種で共有されていることから、環境中の細菌のトランスポゾンなどを介する水平伝播が自然現象として頻繁になされており、遺伝子は微生物種を超えて流動していることを示すものである。それゆえ、環境に導入された組み換え微生物の遺伝子が環境中で伝播し、他の生物種に定着し残存することはあり得る。しかし、このこと自体を生物多様性の破壊につながるリスク要因と考えることはできない。このような生物界における自然的遺伝子組み換えによって、特定の環境において新たに必要とされる遺伝子が生物種の数を減少させることなく複数の生物種に定着し、他生物種に新しい環境での生存の機会をあたえたり生息環境の浄化を行ったりすることによって、より多くの生物種の生息を可能にしているとも考えられるからである。

問題とすべきは、どのような発現形質に関係する遺伝子が伝播するかであると考えられる。自然的遺伝子組み換えと人為的遺伝子組み換えとの間には、識別可能な遺伝的形質の違いを見出すことはできない。したがって、遺伝子組み換えの手段や経路といったプロセスではなく、結果的にできあがった生物の遺伝的あるいは表現的形質について、生物多様性の破壊につながるリスクが付与されたものであるかどうかを評価することがより重要

と考えられる。

人類が経験したあるいは経験しつつある最も顕著な自然的遺伝子組み換えの例として、鳥インフルエンザウイルスからヒトインフルエンザウイルスに変化した例はよく知られるところとなっている^{5,10)}。1968年に発生した香港かぜインフルエンザウイルスは、図4に示したように鳥インフルエンザウイルスと在来の人インフルエンザウイルスとが豚体内において融合することによって遺伝子の交換がなされ、結果的に遺伝子の水平伝播がゲノム再編に至って新型のウイルスを創り出したプロセスの典型的な例であったと考えられている。新型インフルエンザウイルスの出現は、人間の健康な生存にとって大きな脅威となるために大きな問題として取り上げられているが、インフルエンザウイルス以外にも、自然界では数多くの生物が遺伝子の水平伝播によって新たに生まれていると考えざるを得ない。

5. 遺伝子組み換え微生物の野外利用の規制のあり方について

以上のように、本論文で例として取り上げた微生物の遺伝子が自然界において伝播され多くの生物種によって共有されていることは、遺伝子の伝播とそれによる微生物そのものの進化を調べる上で大変興味深いことである。また、そのようにして進化した微生物が水域や土壌といった自然生息環境において環境汚染物質を除去することに大きく関与しているため、微生物に備わったゲノム進化のメカニズムを考えるための基礎情報としてだけでなく、環境汚染を浄化するための環境バイオテクノロジーを考えるためにも、トランスポゾンを介する各種の遺伝子およびオペロン等の伝播に注目することは意味があると思われる。さらには、そのような自然環境における遺伝子の伝播が新しい生物種の出現に結びついているのであるならば、その結果として生物種の多様性を増大させる要因を提供することにもなっていると考えられる。また、このようなオペロン等の伝播の全体像の理解と利用方法の開発は、環境保全のための新しいバイオテクノロジーを開発するためにも大いに参考になると考えられる。

上記のような自然界における遺伝子伝播の状況を念頭

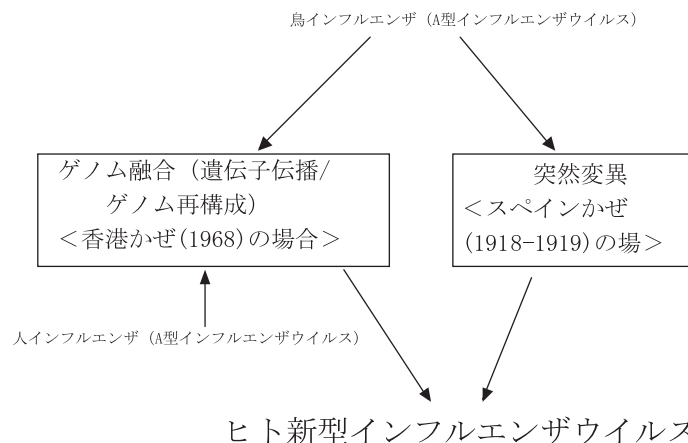


図4. ゲノム融合と突然変異による鳥インフルエンザウイルスからヒトインフルエンザウイルスへの変化。

に置けば、野外で利用しようとする微生物等の生物が遺伝子組み換え生物であろうとなかろうと、導入された自然界において遺伝子の水平伝播を行う可能性を有していることを前提として、開放環境での利用を行うことが必要であると考えられる。したがって、現代バイオテクノロジーによって改変された生物の野外利用（遺伝子組み換え生物等の開放系利用）にあつては、組み換え生物等に人工的に保持させた遺伝子が全く他の生物に伝播しないことを保証しつつ開放系利用を実施する、という現在の規制の原則的な枠組み⁹⁾を順守することは現実には困難であると考えられる。そうである以上、環境に導入しようとする生物が現代バイオテクノロジーによって改変された生物であるかそうでないかに拘わらず、導入された生物によって持ち込まれ遺伝的形質がどのような特徴を持つものであるかによって、特に環境において生物の多様性に影響する遺伝的形質を有するか否かによって、人工的改変生物の環境導入の可否を評価し判定することが必要になると考えられる。

もちろん、生物多様性を保障できるのであれば、あるいは生物多様性を増大できるのであれば、どのような生物であっても本来の生息地とは異なる環境に導入することが認められるということではない。カルタヘナ議定書およびその議定書に基づいて作られた法律の目的とするところは、「個々の環境がもつ固有の生物多様性を消失させる可能性のある生物が導入され、それがその環境に定着し現実に生物の多様性に影響を与えることを監視し防止する」ことであるので、遺伝子組み換え生物の環境への導入の場合であっても、まずその改変生物の生物多様性に及ぼす影響を評価することが必要とされる。すなわち、開放環境に導入しようとする遺伝子改変生物による生態系影響を評価する手法の確立と、明確な評価基準の確立が今後の重要な課題であると考えられる。

本論文で示したように、トランスポゾンの転移を伴う形質転換や接合伝達や形質導入などによる環境中での生物種間遺伝子伝播は、いわば生物に備えられている自然的特性であると考えられるため、それ自体を阻止することが遺伝子組み換え微生物の開放系利用における規制の本来のあり方ではないように思われる。国が定める「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成15年6月18日公布）⁹⁾、およびいくつかの省令で定める「第一種使用等による生物多様性影響評価実施要領」（6省共同、平成15年11月21日公布）に盛り込まれた「第一種使用」としての遺伝子組み換え生物の開放系利用の規制のあり方について、特に「核酸を水平伝達する性質」に関連する生物多様性への影響の評価のあり方について、今後さらに科学的な議論が深まることを期待したい。

謝 辞

本論文に記載した研究データの一部は、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究 B（課題番号16360267）および萌芽研究（課題番号18651039））によってなされた研究の成果であることを付記し、助成いただいたことに感謝いたします。また、研究の実施において、国立中興大学（台湾）生命科学部の黄介辰准教授より多大なご支援をいただきましたことに感謝いたします。

文 献

- 1) Bogdanova, E., L. Minakhin, I. Bass, A. Volodin, J.L. Hobman, and V. Nikiforov. 2001. Class II broad-spectrum mercury resistance transposons in Gram-positive bacteria from natural environments. *Res. Microbiol.* 152: 503–514.
- 2) 遠藤銀朗. 2003. トランスポゾンを介する地球規模での遺伝子の拡散とその環境バイオテクノロジーへの応用. *生物工学会誌*. Vol. 81, No. 10: 428–430.
- 3) 外務省：「生物多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」のホームページ (<http://www.mofa.go.jp/gaiko/kankyo/jyoyaku/cartagena.html>)
- 4) Huang, C.C., M. Narita, T. Yamagata, Y. Itoh, and G. Endo. 1999. Structure analysis of a classII transposon encoding the mercury resistance of the Gram-positive bacterium, *Bacillus megaterium* MB1, a strain isolated from Minamata Bay, Japan. *Gene* 234: 361–369.
- 5) 加地正郎. 2005. インフルエンザの世紀—「スペイン風邪」から「鳥インフルエンザ」まで. 平凡社.
- 6) 文部科学省：「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」のホームページ (http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/kumikae.htm)
- 7) Narita, M., C.C. Huang, and G. Endo. 1993. Molecular analysis of merA gene possessed by anaerobic mercury-resistant bacteria isolated from Minamata Bay. *Microbes and Environments*, Vol. 14, No. 2: 77–84.
- 8) Narita, M., K. Chiba, H. Nishizawa, H. Ishii, C.-C. Huang, Z. Kawabata, S. Silver, and G. Endo. 2003. Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay, FEMS Microbiology Letters, Vol. 223, No. 1: 73–82.
- 9) Narita M. K. Matsui, H. Ishii, C.-C. Huang, Z. Kawabata, and G. Endo. 2004. Dissemination of TnMERII-like mercury resistance transposons among *Bacillus* isolated from worldwide environmental samples. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 48, No. 1: 47–55.
- 10) 岡田晴恵. 2004. 鳥インフルエンザの脅威. 河出書房新社.
- 11) Osborn, A.M., K.D. Bruce, P. Strike, and D.A. Ritchie. 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 239–262.
- 12) Silver, S., and M. Walderhaug. 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 195–228.