

水銀汚染浄化のための新規バイオテクノロジー

A New Biotechnology for Remediation of Mercurials in Environments

芳生 秀光*, 清野 正子

HIDEMITSU PAN-HOU and MASAKO KIYONO

摂南大学薬学部衛生分析化学研究室 〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町45-1

* TEL: 072-866-3158 FAX: 072-866-3158

* E-mail: houhide@pharm.setsunan.ac.jp

Department of Analytical Chemistry in Hygiene, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University,
45-1, Nagaotogecho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

キーワード：水銀浄化，水銀輸送遺伝子，ポリリン酸キナーゼ遺伝子，pMKB18

Key words: Remediation of mercury, *merT-merP*, *ppk*, pMKB18

1. はじめに

元来、生物の手がとどきにくい場所、すなわち、石油、化石燃料あるいは鉱石などの中に封じ込められているはずの微量金属およびその化合物が、近代化学工業の発展に伴う資源の無制限な採掘と濫用により加速度的に生活環境に放出・蓄積されている。その結果、それらの生体への影響が憂慮されなければならないような状態にたち倒れていることは、すでによく知られている事実である。しかも極微量で強力な生理作用を有するこれら無機金属化合物が生体自身の関与により、さらに毒性の高い有機金属化合物に変換されることがすでに明らかにされている。このことから、微量金属化合物による環境汚染はわれわれにとって極めて重要な問題点となって来た。

この微量金属のうち、単体としては唯一の液状金属である水銀およびその化合物は、極めて有用な化学的、物理的性質をもつため、古くから人類によってさまざまな形で利用されてきた。近代産業の発達に伴ってその用途がますます広範になり、多量の水銀化合物が使われるようになった。水銀化合物の製造、使用過程中、あるいはその利用後の廃棄処置を等閑にすると、当然のことながら環境汚染ひいてはヒトに健康障害を及ぼすという最悪な事態を招くことは容易に予測できる。

無機水銀を化学触媒として使用するアセトアルデヒド、酢酸、塩化ビニール製造工場から水俣湾周辺に流出した水銀総量は1932年から1971年までの間に約80トンに及んだと推定されている^{41,46}。湾内に大量に投棄された水銀化合物はあの悲惨な水俣病を引き起こし、数十年間、周辺地域の住民に多大な苦痛を与えたことは記憶に新しい。現在、水俣湾内で高濃度の水銀により汚染されたヘドロは、埋め立てという非常に多額の費用を要する物理的処理により一応の収束をみているが、埋め立てられた地区からの水銀流出が懸念され、完全に終結したと

は言い難い。その10年後、工場からの水銀廃水による環境汚染は新潟県の阿賀野川流域においても起こった。また、1953年頃からイネのイモチ病やムギのサビ病などの予防を目的としてフェニル酢酸水銀の生産量およびその使用量は飛躍的に増加した(図1)。その結果、これらによる生活環境汚染の事実が多く技術者や研究者によって指摘され、1968年にその使用が中止されるまでの16年間、水銀総量として約2300トンに及ぶフェニル酢酸水銀農薬が狭いわが国土に無制限に散布され続けたことは周知の事実である^{46,47}。このように水銀農薬の濫用あるいは化学工業で使われた水銀の廃棄、漏出により河川、土壌などの生活環境が局地的に汚染され、現在においてもその処理が問題とされている地域が多く残されている。しかも各種水銀化合物が環境中で水俣病の原因物質であるメチル水銀に変換されることはすでに知られており、汚染地域に蓄積している水銀化合物によるヒトを含む生物圏へ及ぼす悪影響が懸念されている。

我が国で起こった水銀化合物による環境汚染の問題が社会的に多大の関心を喚びだしてからすでに相当な年月が経過した。しかしながら現在でも高濃度の水銀化合物による局地的な環境汚染は、依然としてブラジル、タンザニア、中国など世界各地で進行している。とりわけ、経済成長の著しい開発途上国における水銀被害は深刻なものであり、わが国の悲劇が繰り返されようとしている。

水銀化合物は極微量で強い生理作用を示すため、現在、その使用と廃棄に対して厳しく規制がなされている。しかし、近年のIT革命や化石燃料の消費や医療行為などの日常生活に欠かせない人間の社会活動により、微量ながらも水銀化合物が持続的に環境に排出され続けている。水銀化合物の汚染問題は、我が国においても他の先進国と同様、水俣地区等で代表されるような高濃度で局所的な汚染の段階から、微量ではあるが長期間にわたり汚染されることによる人体への影響が問題とされる

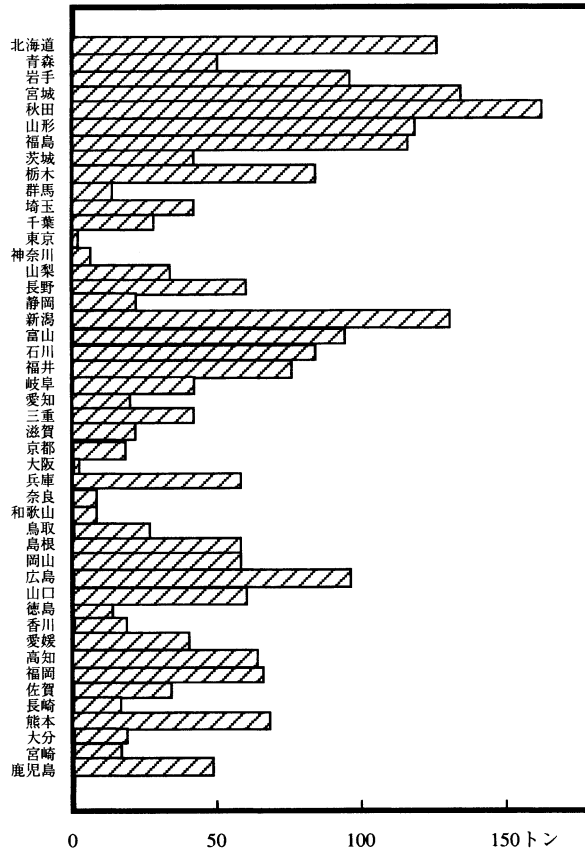


図1. 有機水銀農薬使用量 (昭和28-47年).

段階へと進んできている。微量水銀の有効な除去方法がない現状では、生活環境に蓄積された水銀化合物の量は、低濃度ながらも増加するだけでなく、その汚染が広範囲に及んでいる。この状態のまま放置すると、水銀による環境汚染はさらに拡大し、水俣や新潟で経験した水銀公害で再び苦しむことが危惧される。このような状況下、環境中の水銀化合物の安全かつ有効な浄化法の開発は全世界的な要望であり、焦眉の急務である。本稿では、廃液中または環境に放出される水銀化合物の浄化技術についての最近の研究動向、また、筆者らがこれまで行った研究を中心に紹介する。

2. 水銀の浄化法

2-1. 物理化学的浄化法

現在、無機水銀廃水の処理に、一般に広く利用されている方法は硫化物凝集沈殿法である^{1,4)}。すなわち、廃水に硫化ナトリウムを添加することにより、水銀を極めて難溶性である硫化水銀として凝集沈殿させる方法である。この方法では pH と S^{2-} の濃度が硫化水銀の生成に大きな影響を与える。水銀濃度が低い場合は、硫化水素が過剰に存在し、かつ pH が高くなると多硫化水銀の生成により再溶解が進むという欠点がある。また、この方法を用いて水銀を環境基準値以下にまで処理することはいろいろな問題があり、後処理を必要とする場合が多い。

この硫化物凝集沈殿法の他には活性炭や水銀キレート

樹脂を用いた水銀除去法(活性炭吸着法, イオン交換法)などがある^{6,16,46)}。まず、活性炭による処理法は、水銀濃度が ppm レベル以上の比較的高濃度の場合に対しては有効であるが、ppb レベルでの水銀除去は極めて困難である。活性炭は有機化合物も吸着するので有機物共存系での使用は難しく、また、使用済みの吸着剤の再生も難しいという欠点がある。次に、イオン交換樹脂を用いた場合、水質の環境基準を満足する程度に水銀除去を行うことはほぼ不可能であり、特にコロイド状の金属水銀や不溶性硫化水銀の除去には全く不適である。これらの処理法は各種処理条件の設定の問題や処理能力の問題、また、活性炭の取り替え頻度や大量の処理試薬の投入といったコスト高の問題、特に、環境中に処理試薬を大量投入することにより新たな化学物質による汚染が発生するという問題があり、汚染現場への適用は難しい。経済的かつ効率的な水銀浄化を行うためには、従来の物理化学的処理法よりも生物を利用した生物学的処理法が適していると考えられる。

2-2. 生物学的浄化法

近年、金属などの化学物質による環境汚染の解決策としてバイオレメディエーション技術が有効であることが注目されている。バイオレメディエーション技術とは「生物による環境修復技術」であり、生物機能を活用して汚染された環境を修復する技術である。湾岸戦争時に、クウェートの油井から噴出した原油による生活環境汚染が大変深刻な問題となったことは記憶に新しい。その際に流出した原油を、微生物の石油分解能を利用して浄化するという試みが行われた。この技術は、汚染現場に特別な化学薬品の投入を必要とすることなく、また、特殊な反応条件を要求するものでもないため、手ごろなコストで環境中の汚染物質を環境生物に受容可能なレベルまでに減少させることのできる新しい方法である。本技術は低濃度で広範囲な水銀汚染に対しても有効であると考えられる。

2-2-1. 微生物の水銀耐性機構とその遺伝子

水銀化合物を生物学的に処理するためには、まず処理に用いる微生物が水銀化合物に対してどのように応答するかについて明らかにすることが必要である。水銀化合物は生体成分、特にタンパク質の SH 基に強い親和性をもつために微生物に対して強い殺菌作用を示す。水俣湾やアマゾン流域などの水銀で汚染された環境においては、水銀濃度がしばしば微生物を死に至らしめるレベルまで増加することがある。しかし、その環境には水銀化合物の毒性に耐え抜いた水銀耐性菌が存在している。これらの微生物は水銀化合物に対してどのような機序で水銀耐性を獲得しているのだろうか。この問題についてはこの二十数年の間にほぼ解明された。現在、微生物の水銀耐性獲得機序としては、1) 水銀化合物の菌体内への取り込みの減少による耐性獲得²⁸⁾、2) 水銀化合物と硫化水素との反応、すなわち、不溶性の硫化水銀化合物への変換反応による耐性獲得²⁵⁾、3) 水銀化合物のメチル化反応による耐性獲得^{26,27,40)}、4) 水銀化合物の還元・酸化反応による耐性獲得^{22,33-35,39)} の4つがよく知られている。このうちの1~3)の耐性機構は極めて限られた微生物にのみ見られる現象である。これらの耐性獲得機序

をそのままの形で水銀化合物の生物学的処理に用いることは困難である。一方、これに対して、4) の場合は好気性細菌など、ごく一般的な微生物に見られる水銀耐性獲得機序である。微生物は、菌体内に取り込まれた水銀化合物を代謝してより毒性の低い金属水銀とし、生じた揮発性の Hg^0 を菌体外へ気化・放出することにより耐性を獲得していると考えられている。この還元・気化活性をもつ微生物は、その生物活性が水銀化合物により阻害されることなく、水銀の除去・浄化に利用できると考えられる。

1968年に外村の研究グループは一早く、水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 のもつ水銀還元活性を利用した化学工業廃水中の水銀化合物の除去を試みた³⁶⁾。*Pseudomonas* K-62 株は酢酸フェニル水銀で濃厚に汚染された土壌から単離された水銀耐性菌である。本菌株は無機水銀のみならず、メチル水銀をはじめとする他種類の有機水銀に対しても強い耐性を示し、特に酢酸フェニル水銀に対して通常の細菌の数千倍の耐性を有している。本菌株の水銀耐性は有機水銀を無機水銀に分解する有機水銀分解酵素（リアーゼ）および無機水銀を金属水銀に還元する水銀還元酵素（レダクターゼ）の二つの酵素系の関与により獲得されていることが外村の研究グループにより明らかにされた^{5,37,38)}。本耐性菌を用いて化学工業廃水中の水銀の浄化試験を行ったところ、5～7時間の間に2.5Lの化学工業廃水から菌体湿重量1g当たり約15mgの水銀化合物を除去できると報告された³⁶⁾。

その後、たくさんの研究グループによって水銀耐性菌の水銀耐性機構の遺伝子解析が行われた。その結果、微生物の示す水銀耐性の多くはプラスミドまたはトランス

ポゾン上に存在する機能の異なる複数の水銀耐性遺伝子により構成された、水銀耐性オペロン (*mer operon*) により支配されていることが明らかにされた^{22,33-35)}。*mer operon* の構造は微生物種によって多少の違いが見られている (図2)。無機水銀耐性を支配する *mer operon* は、*mer operon* の発現を制御する調節遺伝子 *merR* およびペリプラズムで水銀との結合に関与する遺伝子 *merP*、水銀の膜透過に関与する輸送遺伝子 *merT* および水銀イオンを金属水銀へ変換する働きをもつ水銀還元酵素遺伝子 *merA* などの構造遺伝子から構成される。無機水銀耐性を示す微生物はこれらの遺伝子をはほぼ共通に保有している。一方、無機水銀のみならず有機水銀に対しても耐性を示す微生物はさらに有機水銀から無機水銀への変換反応に関与する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を保有している^{7,9,13,22,33-35)}。この共通した遺伝子の他に、ペリプラズムで水銀との結合に関与している *merE*、無機水銀の膜輸送に関与している *merC*、*merF*、フェニル水銀の膜輸送に関与している *merG* および *mer operon* の発現を制御している *merD* などの遺伝子は、図2に示すようにそれぞれ異なる *mer operon* 上に存在することが次々に確認された^{7,9,13,22,33-35)}。*mer operon* 上の水銀耐性遺伝子の数またその配列順序は、微生物によって微妙に異なっていること、また、機能が同じである有機水銀分解酵素をコードする *merB* 遺伝子は一つの *mer operon* 上に複数存在することも明らかにされた^{7,9,13)}。この *mer operon* の多様性の理由についてはまだ十分に解明されていないが、恐らく微生物の生存する環境における水銀化合物の曝露の違いによってもたらさ

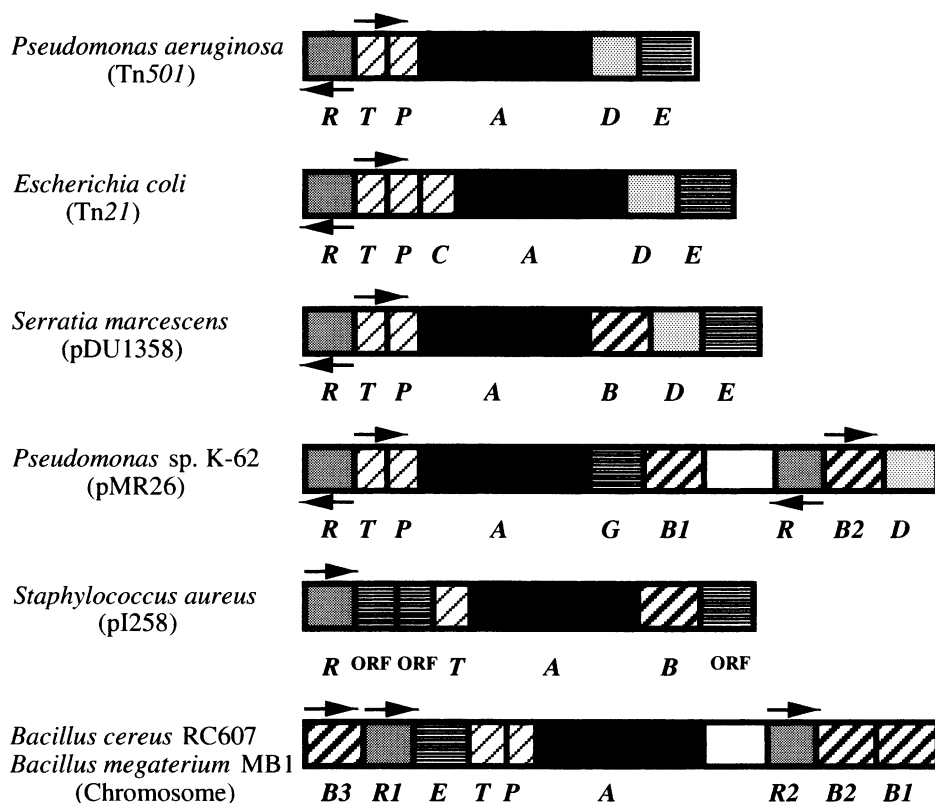


図2. 水銀耐性オペロンの構造.

れた結果ではないかと考えられる。このことから、微生物を用いた水銀の生物学的処理技術の開発を行うには、当然のことながらその環境に最も普遍的に存在すると考えられる *mer operon* を選択して利用することが効果的である。

2-2-2. 微生物を利用した水銀浄化法

廃液中の水銀化合物の浄化に微生物のもつ水銀還元活性を利用した試みは前述のように1968年に外村の研究グループにより初めて行われた³⁰が、その後、暫くの間、これに関連する報告はなかった。しかし、1975年以後の水銀耐性遺伝子の全貌解明が、その後の水銀汚染環境や工場水銀廃水の処理技術の開発に大きく貢献したことは事実である。Brunke らは *merA* 遺伝子をもつ種々の微生物から調製した固定化細胞をカラムにつめ、これに 50 µg/ml Hg²⁺ の廃液を流すと、95%前後の無機水銀イオンが金属水銀の形としてカラム中に捕集されたことを報告した³²。この報告以後、無機水銀化合物の浄化に微生物のもつ水銀還元・気化活性を利用する試みは数多く報告された^{19,21,31,32,43-45}。Wagner-Döblern の研究グループは、馴化した *Pseudomonas* 菌のもつこの水銀還元・気化活性と活性炭との併用により、苛性ソーダ製造工場の廃水中の無機水銀を効率よく浄化できることを報告した^{44,45}。しかし、水銀耐性微生物のもつ *merA* 遺伝子にコードされる水銀還元活性を利用すると、最終的に生じた金属水銀は揮発性が高いため、再び拡散して他の地域を汚染するという問題がある。そのため、開放系での水銀化合物の浄化に *merA* 遺伝子は利用されていない。アマゾン流域での水銀汚染及びその全流域への汚染拡大はまさしくこの金属水銀に起因するものである^{17,18,20,29}。

水銀の還元・気化活性は多くの微生物に水銀耐性を付与することが前述のように遺伝子レベルですでに明らかにされている。一方、酵母や動物においては水銀を無毒化する別の機構が存在している。酵母や動物細胞内では、金属イオンをキレートする働きのある物質が存在し、金属イオンは遊離イオンで存在するよりもキレート体を形成する方がその毒性は低いと考えられる。その一例としてメタロチオネインが挙げられる。ラットなどの動物にカドミウムや水銀などの金属を投与すると、体内にメタロチオネインが誘導合成される。その結果、体内に取り込まれた金属がメタロチオネインによってキレートされることにより解毒される。1997年に Chen と Wilson はメタロチオネイン遺伝子と水銀輸送系遺伝子を大腸菌内に同時に発現させると、菌体内に蓄積する無機水銀量が対照菌の約5倍高いことを見出した³。また、Chen の研究グループはさらにフィトケラチン遺伝子と水銀輸送系遺伝子を大腸菌内に形質転換すると、対照菌に比べて約6倍高い無機水銀を蓄積する組換え体を得たことを報告した²。彼らはこれらの高水銀蓄積遺伝子改変微生物が環境中の水銀浄化に利用できると考えた。しかし、メタロチオネインおよびフィトケラチンの菌体内での発現量は低いため、実用化には問題点が存在する。

そこで筆者らは、まず、従来の *merA* 遺伝子にコードされる水銀還元活性を利用した際に、生じた金属水銀による環境再汚染の問題を解決できる、また、無機水銀のみならず有機水銀をも同時に効率よく浄化・回収できる新規の生物学的な水銀浄化法の開発を試みた。

Pseudomonas K-62 はこれまでに報告された水銀耐性菌の中で最も強い水銀耐性を示すとされた土壌細菌である。その耐性獲得の生化学的機序は、いち早く詳細に解析されたにも拘わらず、その遺伝学的研究は行われていなかった。筆者らは、本菌株のもつ水銀代謝能を利用した水銀汚染地域の浄化を実現化するための第一段階として、まず本菌株の水銀耐性遺伝子の解析を最初に行った。その結果、本菌株の水銀代謝活性に基づく水銀耐性は、本菌株の保有するプラスミド pMR26 および pMR68 に支配されていることが判明した¹²。また、pMR26 上の水銀耐性遺伝子を解析した結果、図3に示すような遺伝子から構成された有機水銀化合物の分解を司る二組の *mer operon* が存在することが明らかとなった^{9,13}。さらにその遺伝子の機能を調べたところ、水銀輸送系遺伝子、*merT-merP* は無機水銀の取り込み・輸送のみならず、フェニル水銀の取り込み・輸送にも関与する、しかし、メチル水銀の取り込み・輸送に関与しないことを初めて明らかにした^{11,42}。さらに、pMR26 上に新規遺伝子が存在し、それは、フェニル水銀の分解と還元反応に寄与しないが、フェニル水銀耐性獲得に寄与することを明らかにした¹⁰。筆者らはこの新規遺伝子を *merG* と名付けた。図4に示すように、*merG* を欠失した変異株の水銀化合物の取り込み活性は、*merG* を保有する野生株に比べて、無機水銀に対してはほとんど差異が見られないが、フェニル水銀に対しては著しく高いことが判明した¹⁰。このことから本遺伝子はフェニル水銀の取り込み抑制に働く遺伝子である可能性が考えられた。

以上の解析結果から、*Pseudomonas K-62* の *mer operon* を利用して水銀浄化を行う際に水銀を気化させることなく、菌体内に回収させる場合には、まず *merA* および *merG* を欠失した *mer operon* の再構築が必要であると考えられる。すなわち、*merT-merP* により取り込まれた水銀化合物を *merA* の働きにより還元気化するのではなく、それをキレートし、かつその毒性を軽減できる生体分子の組換えが必要だと考えた。そこで筆者らはまず、生体内で Mg, Ca, Mn などの生体必須金属をキレートすることが知られているポリリン酸という分子に着目した。

ポリリン酸は微生物や酵母などの生体内に普遍的に存在する生体成分であり、生体内で、図5に示すようにポリリン酸キナーゼの作用により、ATP のエネルギーを消費し、無機リン酸が数百個から千個ほど重合して作られる直鎖状ポリマーである^{14,15,30}。生体内での役割については不明な点が多いが、現在のところポリリン酸は生物のエネルギー源、リン酸の貯蔵、二価必須金属のキレート剤、遺伝子発現や転写の調節因子として機能していると考えられている^{1,4,14}。筆者らはまずポリリン酸が水銀化合物のキレーターになり得るかどうかを *in vitro* で調べた。その結果、一価の有機水銀化合物はポリリン酸によりキレートされないが、二価の無機水銀はキレートされることが明らかとなった²³。

以上の結果から、ポリリン酸は無機水銀のキレーターになり得ることが明らかとなった。そこで筆者らは *Pseudomonas K-62* の水銀代謝活性を利用した水銀汚染地域の浄化を将来的に実現するために、以下の試みを行った。すなわち、本菌株の輸送遺伝子 *merT-merP* の下

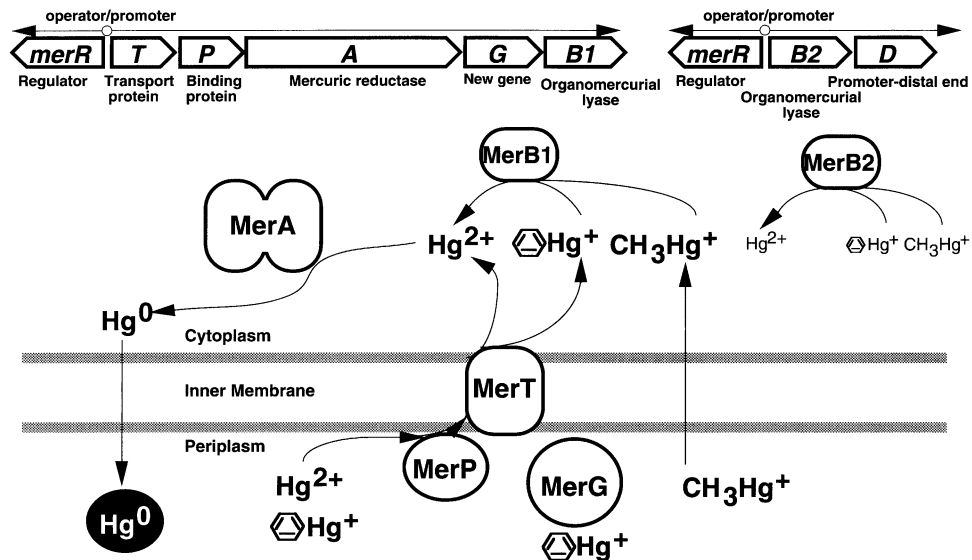


図3. *Pseudomonas* K-62 のプラスミド pMR26 にコードされる水銀解毒システム。

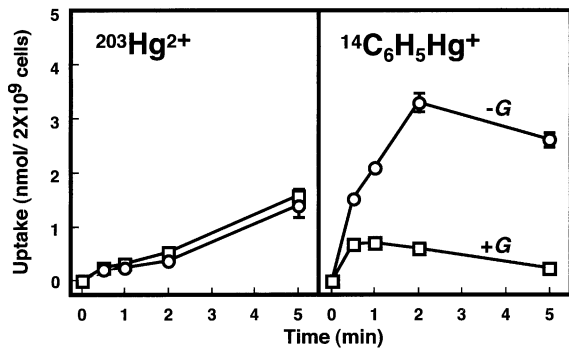


図4. 水銀化合物の取り込みに及ぼす *merG* の影響。
○: pMU29; *merR-T-P-A-B*.
□: pMRA17; *merR-T-P-A-G-B*.

nas K-62 の *merR-o/p-merT-merP* の下流に *Klebsiella aerogenes* 由来の *ppk* を組換えて作成したプラスミド pMK27 (*merR-o/p-merT-merP-ppk*) をもつ大腸菌は、図6に示すように *ppk* をもたない対照菌に比べて無機水銀に対して高い耐性を示した。また、pMK27 をもつ大腸菌の菌体内水銀蓄積量はクロニングベクターをもつ対照菌に比べて有意に高かった²⁴⁾。これらの実験結果から、ポリリン酸は微生物に水銀耐性および水銀蓄積能を付与することを初めて示した。本 pMK27 は環境中の無機水銀の浄化・回収に利用できると筆者らは考えた。

環境に放出された無機水銀の多くは自然環境に存在する微生物により容易にメチル化され、結果として有機水銀の形で存在することが報告されている。この自然環境中で生成された有機水銀化合物、あるいは前述した農業

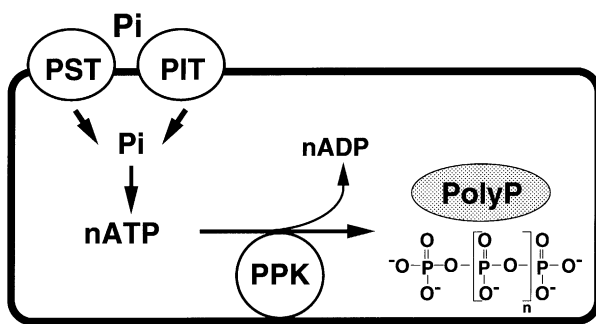


図5. 菌体内でのポリリン酸の生合成。
PST: high-affinity Pi-specific transport system.
PIT: low-affinity Pi inorganic transport system.
PPK: PolyP kinase.

流にポリリン酸の生合成を触媒するポリリン酸キナーゼ遺伝子 (*ppk*) を挿入することにより、水銀化合物を拡散しやすく、他の地域を再汚染する可能性のある金属水銀ではなく、無機水銀の形でポリリン酸にキレートさせて回収する試みについて検討した。その結果、*Pseudo-*

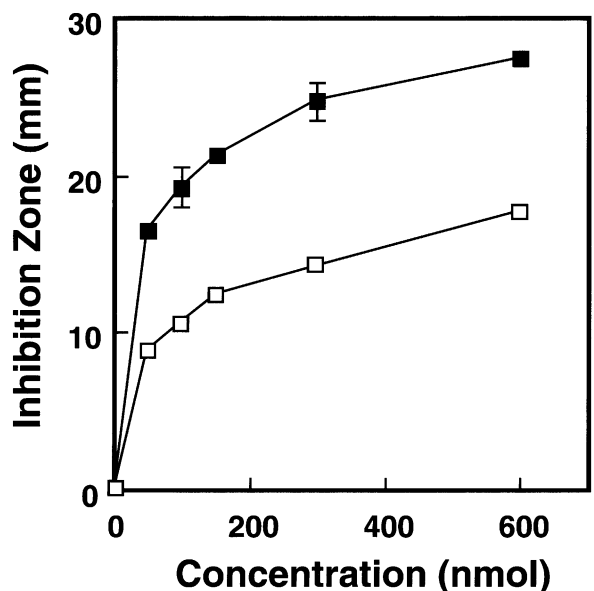


図6. 無機水銀耐性に及ぼす *ppk* の影響。
■: pMRD141; *merR-T-P*.
□: pMK27; *merR-T-P-ppk*.

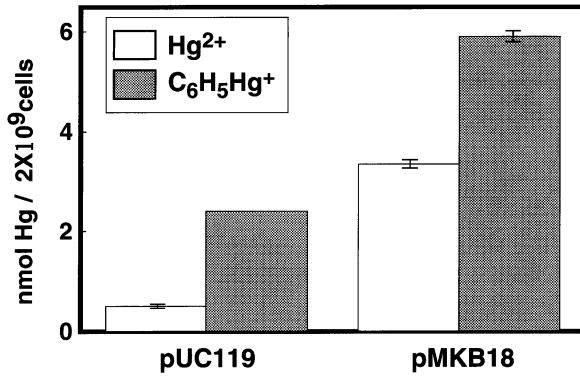


図7. 水銀化合物の菌体内への蓄積.
pUC119: control.
pMKB18: *merR-T-P-B-ppk*.

として使用されているフェニル水銀などの有機水銀による土壌、食品汚染およびそれを摂取することによる健康影響は大きな社会問題となっている。従って水銀化合物を浄化するにあたり、これらの有機水銀化合物にフォーカスを合せなければならない。しかしながら、ポリリン酸は有機水銀をキレートする活性をもたないため、本融合遺伝子 pMK27 は有機水銀の浄化・回収には適用できない欠点があった。そこで筆者らは、無機水銀のみならず有機水銀の浄化・回収をも同時に可能とするために先の pMK27 へ pMR26 上の有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を組換えた。

pMK27 (*merR-o/p-merT-merP-ppk*) の *merP* と *ppk* の間に *merB* を組み込んだ pMKB18 (*merR-o/p-merT-merP-merB-ppk*) をもつ大腸菌のメチル水銀やフェニル水銀に対する耐性は、pMK27 をもつ対照菌に比べて、明らかに上昇した。有機水銀に対する耐性が上昇することから、菌体内に取り込まれた有機水銀は *merB* にコー

ドされる有機水銀分解酵素によって分解され、生じた無機水銀がポリリン酸とキレート結合することにより菌体内で解毒されることが示唆された。また、pMKB18 をもつ大腸菌の菌体内水銀蓄積量は図7に示すように、pUC119 をもつ対照菌に比べて、無機水銀の場合は約10倍、フェニル水銀の場合は約3倍高いことが判明した²³⁾。

以上の結果から、図8に示すように、*merT-merP* により菌体内に取り込まれた無機水銀は、*ppk* にコードされるポリリン酸キナーゼによって生合成されたポリリン酸によりキレートされ、無機水銀の毒性を軽減した形で菌体内に蓄積されると考えられる。一方、*merT-merP* により菌体内に取り込まれた有機水銀は *merB* にコードされる有機水銀分解酵素によって分解され、生じた無機水銀がポリリン酸とキレートを形成し、ポリリン酸のキレート体として菌体内に蓄積していると考えられる。筆者らは、この融合遺伝子 pMKB18 を用いて、3~40 μM の水銀化合物を含む実験廃水中の水銀浄化試験を行ったところ、短時間内に廃液中の水銀量はほぼ完全に除去されること、また、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の存在下でも水銀化合物が選択的に除去されることを見出した。また、この pMKB18 をもつ大腸菌は大量の水銀を細胞内に蓄積しているにも拘らず水銀耐性を示した。以上のことから、微生物に付与したこの水銀バイオアキュムレーション活性を環境中の水銀浄化に利用することができると筆者らは確信している。また、筆者らがこれまでに得た実験結果から、このポリリン酸を生合成する細菌は水銀化合物だけではなく、カドミウムなど数種の重金属に対しても耐性を示し、これらの重金属の生物蓄積除去にも適用可能であると考えられる。

ポリリン酸は微生物に存在する生体成分の一つであり、最適条件下では菌体湿重量の40%までに発現、蓄積することができると報告されている^{1,4)}。また、筆者ら

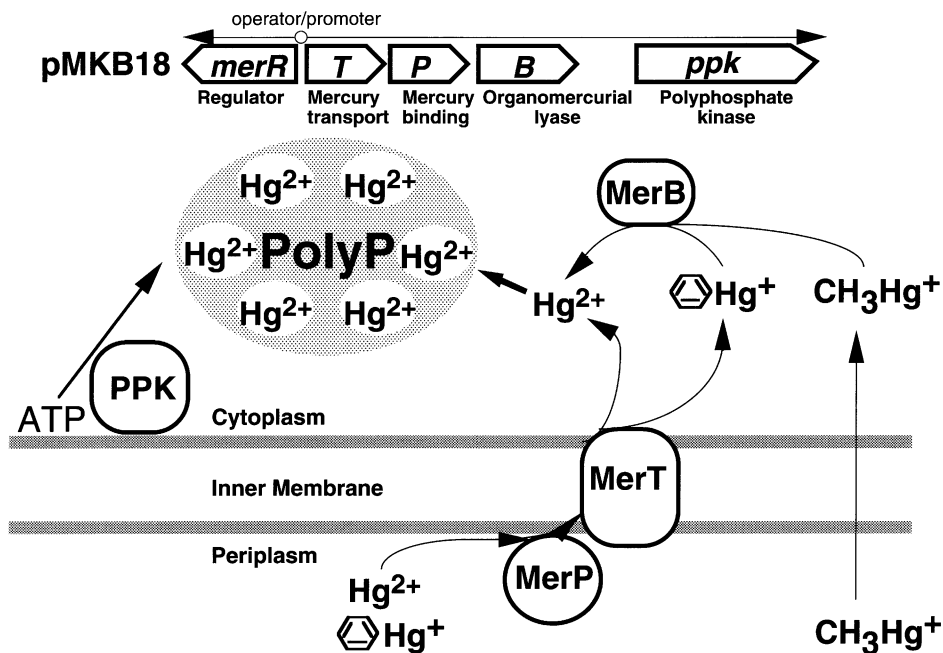


図8. 水銀のバイオレメディエーションのモデル。

の実験結果から算出した菌体内の水銀とポリリン酸のモル比はおよそ35であり、ポリリン酸はメタロチオネインの約5倍高い水銀受容能をもっている。今後、ポリリン酸の発現条件の改善によりさらに高水銀受容能をもつ浄化微生物を創生することができると考えている。

3. おわりに

水銀によって汚染された環境を浄化するためにこれまで用いられてきた方法は主として物理化学的方法である。しかしながら、ここで述べたように、環境に生棲している水銀耐性菌の多くは自分自身の周りにおける水銀化合物を無毒化し、気化・除去する能力をもっている。この水銀気化除去能力、または、遺伝子工学の手法を用いて微生物に付与した水銀バイオアキュムレーション能力を利用して廃水また汚染環境から水銀化合物を浄化する新しい環境技術を開発することができるようになった。

筆者らがここで提案した水銀輸送系、有機水銀分解系およびポリリン酸合成系と共役した新しい生物学的水銀浄化法は、従来の水銀還元気化法とは異なり、少なくとも処理後の水銀が環境を再汚染する懸念が少なく、開放系の浄化にも利用し易いものである。また、*ppk*遺伝子を利用することにより無機リン化合物に起因する富栄養化の解消にも役立つ可能性をもち、環境に優しい生物学的水銀浄化法であるといえるであろう。

文 献

- 1) Archibald, F.S., and I. Fridovich. 1982. Investigations of the state of the manganese in *Lactobacillus plantarum*. Arch. Biochem. Biophys. 215: 589-596.
- 2) Bae, W., R.K. Mehra, A. Mulchandani, and W. Chen. 2001. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5335-5338.
- 3) Chen, S., and D.B. Wilson. 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg²⁺-contaminated environments. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2442-2445.
- 4) Dunn, T., K. Gable, and T. Beeler. 1994. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. J. Biol. Chem. 269: 7273-7278.
- 5) Furukawa, K., and K. Tomomura. 1972. Metallic mercury releasing enzyme in mercury resistant *Pseudomonas*. Agric. Biol. Chem. 36: 217-226.
- 6) Gardea-Torresdey, J.L., M.K. Becker-Hapak, J.M. Hosea, and D.W. Darnall. 1990. Effect of chemical modification of algal carboxyl groups on metal ion binding. Environ. Sci. Technol. 24: 1372-1378.
- 7) Huang, C.C., M. Narita, T. Yamagata, and G. Endo. 1999. Identification of three *merB* genes and characterization of a broad-spectrum mercury resistance module encoded by a class II transposon of *Bacillus megaterium* strain MB1. Gene 361-366.
- 8) Jernelöv, A., and H. Lann. 1973. Studies in Sweden on feasibility of some methods for restoration of mercury-contaminated bodies of water. Environ. Sci. Technol. 7: 712-718.
- 9) Kiyono, M., and H. Pan-Hou. 1999. DNA sequence and expression of a defective *mer* operon from *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Biol. Pharm. Bull. 22: 910-914.
- 10) Kiyono, M., and H. Pan-Hou. 1999. The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. J. Bacteriol. 181: 726-730.
- 11) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Lack of involvement of *merT* and *merP* in methylmercury transport in mercury resistant *Pseudomonas* K-62. FEMS Microbiol. Lett. 128: 301-306.
- 12) Kiyono, M., T. Omura, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1995. Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids. Arch. Microbiol. 163: 242-247.
- 13) Kiyono, M., T. Omura, H. Inuzuka, H. Fujimori, and H. Pan-Hou. 1997. Nucleotide sequence and expression of the organomercurial-resistance determinants from a *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. Gene 189: 151-157.
- 14) Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: Toward making a forgotten polymer unforgettable. J. Bacteriol. 177: 491-496.
- 15) Kulaev, I.S. 1979. The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 16) Kuyucak, N., and B. Volesky. 1988. Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. Biotechnol. Lett. 10: 137-142.
- 17) Lacerda, L.D., and W.C. Pfeiffer. 1992. Mercury from gold mining in Amazon environment—an overview. Quimica Nova 55: 283-294.
- 18) Martinelli, B.L.A., J.R. Ferreira, B.R. Forsberg, and R.L. Victoria. 1988. Mercury contamination in the Amazon: A gold rush consequence. Ambio 17: 252-254.
- 19) Narita, N., T. Yamagata, H. Ishii, C.C. Huang, and G. Endo. 2002. Simultaneous detection and removal of organomercurial compounds by using the genetic expression system of an organomercury lyase from the transposon TnMERII. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 86-90.
- 20) Nriagu, J.O., W.C. Pfeiffer, O. Malm, C.M.M. Souza, and G. Mierle. 1992. Mercury pollution in Brazil. Nature 356: 389.
- 21) Okino, S., K. Iwasaki, O. Yagi, and H. Tanaka. 2001. Removal of mercuric chloride by immobilized cells of genetically modified *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134. J. Environ. Biotechnol. 1: 41-47.
- 22) 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.
- 23) Pan-Hou, H., M. Kiyono, H. Omura, T. Omura, and G. Endo. 2002. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. FEMS Microbiol. Lett. 207: 159-164.
- 24) Pan-Hou, H., M. Kiyono, T. Kawase, T. Omura, and G. Endo. 2001. Evaluation of *ppk*-specified polyphosphate as a mercury remedial tool. Biol. Pharm. Bull. 24: 1423-1426.
- 25) Pan-Hou, H.S., and N. Imura. 1981. Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. Arch. Microbiol. 129: 49-52.
- 26) Pan-Hou, H.S., and N. Imura. 1982. Involvement of mercury-methylation in microbial mercury detoxication. Arch. Microbiol. 131: 176-177.
- 27) Pan-Hou, H.S., and N. Imura. 1982. Physiological role of mercury-methylation in *Clostridium cochlearium* T-2C. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 29: 290-297.
- 28) Pan-Hou, H.S., M. Nishimoto, and N. Imura. 1981. Possible role of membrane proteins in mercury resistance of *Enterobacter aerogenes*. Arch. Microbiol. 130: 93-95.
- 29) Pfeiffer, W.C., and L.D. Lacerda. 1988. Mercury input into the Amazon region, Brazil. Environ. Technol. Lett. 9: 325-330.
- 30) Pisoni, R.L., and E.R. Lindley. 1992. Incorporation of [³²P]orthophosphate into long chains of inorganic polyphosphate within lysosomes of human fibroblasts. J. Biol. Chem. 267: 3626-3631.
- 31) Saouter, E., M. Gillman, and T. Barkay. 1995. An evaluation of *mer*-specified reduction of ionic mercury as a remedial tool

- of a mercury-contaminated freshwater pond. *J. Ind. Microbiol.* 14: 343–348.
- 32) Saouter, E., R. Turner, and T. Barkay. 1994. Microbial reduction of ionic mercury for the removal of mercury from contaminated environments. *Ann. NY Acad. Sci.* 721: 423–427.
 - 33) Silver, S., and L.T. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753–789.
 - 34) Silver, S., and M. Walderhaug. 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 195–228.
 - 35) Summers, A.O. 1886. Organisation, expression and evolution of genes for mercury resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 607–634.
 - 36) Suzuki, T., K. Furukawa, and K. Tonomura. 1968. Studies on removal of inorganic mercurial-Compounds in waste by the cell-reused method of mercury resistant bacterium. *J. Ferment. Technol.* 46: 1048–1055.
 - 37) Tezuka, T., and K. Tonomura. 1976. Purification and properties of a second enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury resistant *Pseudomonas* K-62 strain. *J. Bacteriol.* 135: 138–143.
 - 38) Tezuka, T., and K. Tonomura. 1976. Purification and properties of an enzyme catalyzing the splitting of carbon-mercury linkages from mercury resistant *Pseudomonas* K-62 strain. *J. Biochem.* 80: 79–87.
 - 39) Tonomura, K., K. Maeda, F. Futai, T. Nakagami, and M. Yamada. 1968. Stimulative vaporization of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. *Nature* 217: 644–646.
 - 40) Trevors, J.T. 1986. Mercury methylation in bacteria. *J. Bacteriol.* 26: 499–504.
 - 41) Tsubaki, T., and K. Irukayama. “Minamata Disease”. Elsevier Scientific Publishing Co., 1977.
 - 42) Uno, Y., M. Kiyono, T. Tezuka, and H. Pan-Hou. 1997. Phenylmercury transport mediated by *merT-merP* genes of *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 107–109.
 - 43) von Canstein, H., Y. Li, and I. Wagner-Döbler. 2001. Long-term performance of bioreactors cleaning mercury-contaminated wastewater and their response to temperature and mercury stress and mechanical perturbation. *Biotech. Bioeng.* 74: 21–219.
 - 44) von Canstein, H., Y. Li, K.N. Timmis, W-D. Deckwer, and I. Wagner-Döbler. 1999. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5279–5284.
 - 45) Wagner-Döbler, I., H. von Canstein, Y. Li, K.N. Timmis, and W-D. Deckwer. 2000. Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4628–4634.
 - 46) 喜多村正次, 近藤雅臣, 滝澤行雄, 藤井正美, 藤木素士. “水銀”, 講談社サイエンティフィック. 1976.
 - 47) 富沢長次郎. 1974. 農薬を媒体とする水銀汚染. *食の科学.* 18: 39–45.