

## *Bacillus* 属水銀耐性細菌と組み換え大腸菌による 有機水銀化合物の除去特性

### Characterization of Organomercury Compounds Removal by Hg-resistant *Bacillus* Strains and *mer* Gene-Cloned *Escherichia coli*

成田 勝<sup>1</sup>, 西澤 博<sup>2</sup>, 石井 秀学<sup>2</sup>

MASARU NARITA, HIROSHI NISHIZAWA, HIDENORI ISHII

黄 介辰<sup>3</sup>, 遠藤 銀朗<sup>1\*</sup>

CHIEH-CHEN HUANG, GINRO ENDO

<sup>1</sup> 東北学院大学工学部環境土木工学科 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1

<sup>2</sup> 東北大学大学院生命科学研究科 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

<sup>3</sup> 国立中興大学生命科学部生命科学学科 〒40227 台中市南区国光路250号, 台湾

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

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

<sup>1</sup> Laboratory of Environmental Biotechnology, Tohoku Gakuin University, Tagajo, Miyagi 985-8537, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Life Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

<sup>3</sup> Department of Life Science, National Chung-Hsing University, Taichung 40227, Taiwan

(原稿受付 2003年5月6日/原稿受理 2003年7月9日)

Resistance spectrum and removal characteristics of organomercurial compounds were compared by using three mercury-resistant *Bacillus* strains (*Bacillus megaterium* MB1, *Bacillus cereus* RC607, and *Bacillus cereus* VKM684) which possess identical *mer* operons. Although the three *Bacillus* strains could remove all of the tested organomercurials, *B. cereus* RC607 and *B. cereus* VKM684 showed higher organomercury resistance profiles than that of *B. megaterium* MB1. To understand the functional roles of three *merB* genes (*merB1*, *merB2*, and *merB3*) possessed by the three *Bacillus* strains, organomercurial removal of recombinant *Escherichia coli* clones carrying each *merB* gene was characterized. The recombinant *E. coli* carrying the *merB3* could remove all of the tested organomercurials, while the recombinant *E. coli* carrying the *merB2* and the recombinant *E. coli* carrying the *merB1* could not remove methylmercury. However, the recombinant *E. coli* carrying the *merB3* gene conferred relatively low removal rate of organomercurials than those of wild type strains, *B. cereus* RC607 and *B. cereus* VKM684. From these results, it is concluded that wild type strain *B. cereus* RC607 or *B. cereus* VKM684 is effective for biological remediation or biological treatment of toxic organomercurials contamination.

**Key words:** mercury-resistant bacteria, *Bacillus*, recombinant *E. coli*, organomercury resistance, removal of organomercurials

キーワード: 水銀耐性細菌, *Bacillus*, 組み換え大腸菌, 有機水銀耐性, 有機水銀除去

## 1. 緒 言

水銀による環境汚染は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もたらしている<sup>23)</sup>. 特に, メチル水銀やフェニル水銀化合物等の有機水銀化合物は, 人体に対して極めて有害な物質であり, 環境基準としては検出されてはならない物質とされている<sup>26)</sup>. この高い毒性を持つメチル水銀による水銀中毒事件は, 1950年代に熊本県の水俣湾周辺で<sup>23)</sup>, 1965年に新潟県の阿賀野川流域で<sup>23)</sup>, 1971~1972年にはイラクで<sup>1)</sup>, 近年ではブラジルで<sup>13,17)</sup> それぞれ発生してきている. 現在, 有機水銀などの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処理方法がとられている. また, 生物による有機水銀除去を目的として, 水銀除去能のある細菌 (水銀耐性細菌) の生態や耐性機構についての研究が進められている. 水銀耐性細菌の耐性機構には有機水銀化合物を分解して細菌の生理活性を保つための機構を備えているものが知られている<sup>19)</sup>. このような耐性機構を持つ細菌は, 有機水銀化合物を分解するだけでなく, 有機水銀化合物の分解によって生じた水銀イオン ( $\text{Hg}^{2+}$ ) を還元し金属水銀 ( $\text{Hg}^0$ ) を生成する<sup>19)</sup>. また, 生成された  $\text{Hg}^0$  は細菌細胞外へと気化放出される. この一連の化学反応に参与する機能は, *mer* オペロンと呼ばれる遺伝子群の連携した発

現によって獲得されていることが知られている<sup>10,19</sup>。mer オペロンの構成は、水銀イオンに応答する転写調節遺伝子 (*merR* 等)、水銀イオンを細胞内へ輸送する水銀輸送遺伝子 (*merT*, *merP* 等)、細胞内に輸送された水銀イオンを金属水銀に還元する水銀還元酵素遺伝子 (*merA*) および有機水銀化合物を水銀イオンと有機物へ分解する有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB*) などの遺伝子群からなっている<sup>10,19</sup>。かつて高濃度の水銀に汚染された熊本県の水俣湾底泥から、*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属などの水銀耐性細菌が多数分離され、様々な有機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<sup>14-16</sup>。

これまでの我々の研究において、有機水銀化合物を分解し水銀を無毒化できる水銀耐性細菌を得ることを目的として、メチル水銀に汚染された当時の熊本県の水俣湾底泥サンプルからグラム陽性の水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 を分離した<sup>9</sup>。この *B. megaterium* MB1 の *mer* オペロンの解析を行った結果、アメリカのポストン港底泥から分離された *Bacillus cereus* RC607 や *B. cereus* VKM684 が保有する *mer* オペロンと全く同一であることが明らかになった<sup>4,8,9,24</sup>。さらに、*B. megaterium* MB1 の *mer* オペロンは TnMER11 と命名した染色体のクラス II トランスポゾン上にシングルコピーとしてコードされていることが明らかになった<sup>9</sup>。また、この *mer* オペロンには3つの有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1*, *merB2*, *merB3*) がコードされており、これらの *merB* 遺伝子間の相同性は極めて低いことが知られている<sup>8</sup>。MerB タンパク質 (*merB* 遺伝子産物) は、有機水銀の炭素-水銀 (C-Hg) 結合を切断し分解するために必須の酵素であり<sup>23</sup>、生物学的有機水銀除去技術を開発するためにはこれらの遺伝子を保有する細菌やその *merB* 遺伝子産物の有機水銀化合物種に対する分解能の特性を知ることが重要となる。

本研究においては、同一の *mer* オペロンを保有する *Bacillus* 属細菌野生株と各 *merB* 遺伝子を保有する水銀耐性組み換え大腸菌株を用いて、各種有機水銀化合物に対する耐性と除去の特性を調べることによって、これらの細菌株を用いた有機水銀除去技術への適用の可能性を検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 供試菌株およびプラスミド

同一の *mer* オペロンを保有する野生株として *B.*

*megaterium* MB1<sup>9</sup>、*B. cereus* RC607<sup>24</sup> および *B. cereus* VKM684<sup>4</sup> を用いて各種水銀化合物に対する耐性と除去の特性を調べた。これらの3細菌株の保有する *mer* オペロン構造を図1に示す。また、*mer* オペロンを保有していない水銀感受性細菌 *Bacillus subtilis* 168 をコントロールとして用いた。さらに、水銀耐性プラスミドを持つ組み換え大腸菌株 *Escherichia coli* DH5a/pGB3A 株、*E. coli* DH5a/pGR1B2 株および *E. coli* DH5a/pGMO7 株<sup>9</sup> も使用して各種水銀化合物に対する除去特性を調べた。この際に用いた各水銀耐性プラスミド pGB3A, pGR1B2 および pGMO7 は、Tベクター pGEM-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin) に、上記の *Bacillus* 属細菌野生株が保有する *mer* オペロンの断片を挿入し作製したプラスミドである。pGB3A プラスミドは、水銀応答調節遺伝子 (*merR1*)、水銀輸送遺伝子群 (*merE*, *merT*, *merP*)、水銀還元酵素遺伝子 (*merA*) の各遺伝子に加えて、*merR1* 遺伝子の上流側に有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB3*) を含む遺伝子群をコードしたプラスミドである。pGR1B2 プラスミドは、pGB3A プラスミドの保有する水銀耐性遺伝子群のうち、*merB3* 遺伝子を含まず、*merA* 遺伝子の下流側に水銀応答調節遺伝子 (*merR2*) と有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB2*) を含む遺伝子群をコードしたプラスミドである。pGMO7 プラスミドは、pGR1B2 プラスミドの保有する水銀耐性遺伝子群に加え、*merB2* 遺伝子の下流側にもう一つの有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1*) を含む遺伝子群をコードしたプラスミドである。各プラスミドが保有する水銀耐性遺伝子群のクローニング領域を図2に示す。

本研究で用いた全ての細菌株は Luria-Bertani (LB) 液体培地<sup>21</sup>で培養を行い、水銀耐性組み換え大腸菌株については、アンピシリンの最終濃度が 100 µg/ml になるように調製した LB 液体培地で培養を行った。また、本研究で用いた水銀耐性遺伝子群は、*E. coli* 細胞内で発現することが明らかになっており、発現の誘導は前培養液に塩化第二水銀を添加することによって行った。

### 2.2. 水銀化合物

無機水銀化合物1種と有機水銀化合物3種の合計4種の水銀化合物を使用した。塩化水銀 (無機水銀) (MC)、塩化メチル水銀 (MMC)、酢酸フェニル水銀 (PMA) は和光純薬 (Osaka, Japan)、パラクロロ安息香酸水銀 (PCMB) は SIGMA (St. Louis, MO.) からそれぞれ購入した。各水銀ストック溶液 (1 mg/ml or 10 mg/ml) は、滅菌精製水もしくはジメチルスルホキシド (和光純薬) で作製した。

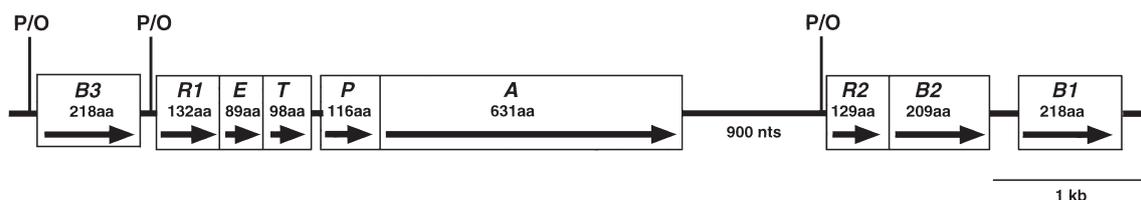


図1. Schematic representation of the mercury-resistant determinant (*mer* operon) from the three *Bacillus* strains. Transcriptional directions of the *mer* operon genes are indicated by arrows. Three promoter/operator (P/O) regions are shown in the mercury resistance module. The letters B3, R1, E, T, P, A, R2, B2, and B1, denote *merB3*, *merR1*, *merE*, *merT*, *merP*, *merA*, *merR2*, *merB2*, and *merB1*, respectively.

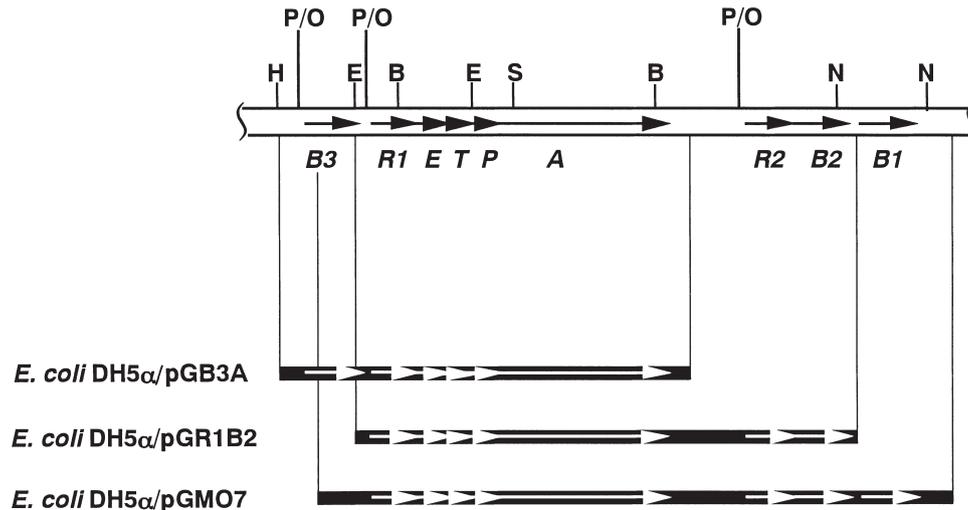


図2. Construction of recombinant mercury resistance plasmids. Three promotor/operator (P/O) regions are shown in the mercury resistance module. Restriction enzyme recognition sites are shown with abbreviations: B; *Bgl*II, E; *Eco*RI, H; *Hind*III, N; *Nco*I, and S; *Sma*I. The cloned fragment are inserted in the same site and cloned in the same configuration on the vector pGEM-T Easy.

### 2.3. *Bacillus* 属細菌野生株の有機水銀耐性

塩化水銀濃度 0.25  $\mu\text{g/ml}$  を含む 10 ml の LB 液体培地によって 37°C で一晩培養された各細菌株の培養液は、吸光度 ( $\text{OD}_{600}$ ) で0.060~0.065になるように LB 液体培地で希釈した。100  $\mu\text{l}$  の各希釈培養液は、様々な水銀濃度に設定した 10 ml の LB 液体培地に植菌し 37°C で48時間培養した。有機水銀耐性は、各細菌株の各有機水銀化合物に対する最小阻害濃度 (minimum inhibitory concentration; 以下 MIC と述べる) を決定することによって行った。MIC は48時間培養後の細菌の増殖による培地の濁度を評価し、細菌の増殖が阻害された最小の水銀濃度の数値として求めた。細菌の増殖がなされたことを判定するための基準は、培地の濁度が  $\text{OD}_{600}$  で約0.2以上の場合とした。各水銀化合物の設定濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) は0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 80および120とし、MIC の試験は4回繰り返して行った。

### 2.4. *Bacillus* 属細菌野生株と組み換え大腸菌株の有機水銀の除去

塩化水銀濃度 0.25  $\mu\text{g/ml}$  を含む 10 ml の LB 液体培地によって 37°C で一晩培養された各細菌株の培養液は、 $\text{OD}_{600}$  で0.060~0.065になるように LB 液体培地で希釈した。100  $\mu\text{l}$  の各希釈培養液は、様々な水銀濃度に設定した 10 ml の LB 液体培地に植菌し 37°C で48時間培養した。有機水銀除去は、還元・気化法によるフレームレス原子吸光計 (SP-3D, Nippon Instruments Co., Tokyo, Japan) を使用して培養液中の水銀残存量を測定することによって行った。各水銀化合物の設定濃度 (単位はいずれも  $\mu\text{g/ml}$ ) は、塩化水銀10.0 (対象とした *B. subtilis* 168 は3.0), 塩化メチル水銀0.1, パラクロロ安息香酸水銀5.0および酢酸フェニル水銀1.0とした。

## 3. 結 果

### 3.1. *Bacillus* 属細菌野生株の有機水銀耐性

表1に各 *Bacillus* 属細菌野生株の有機水銀耐性の比較結果を示す。また、無機水銀化合物である MC に対する耐性の比較結果も同時に示す。*B. megaterium* MB1 の PCMB と PMA に対する MIC は、*B. subtilis* 168 より2倍高い値を示した。しかしながら、MMC に対する MIC は、*B. subtilis* 168 より低い値を示した。一方、*B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 の各種水銀化合物に対する MIC は、MMC を除き *B. subtilis* 168 株や *B. megaterium* MB1 に比べ高い値を示した。特に、*B. cereus* RC607 の PCMB に対する MIC は、*B. subtilis* 168 よりも16倍高く、*B. megaterium* MB1 よりも8倍高い値を示した。さらに、*B. cereus* VKM684 の PCMB に対する MIC もまた、*B. subtilis* 168 よりも10倍高く、*B. megaterium* MB1 よりも5倍高い値を示した。

以上の結果から、各細菌株は全く同一の *mer* オペロンを持つにも拘わらず<sup>4,9,24</sup>、それぞれ異なった MIC を示した。特に *B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 は *B.*

表1. MICs of mercury compounds of three *Bacillus* strains tested.

Mercury compounds	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	MC	MMC	PCMB	PMA
<i>B. subtilis</i> 168	5.0	0.5	5.0	1.0
<i>B. megaterium</i> MB1	20.0	0.25	10.0	2.0
<i>B. cereus</i> RC607	50.0	1.0	80.0	10.0
<i>B. cereus</i> VKM684	50.0	0.5	50.0	3.0

Abbreviations: MC, mercury chloride; MMC, methylmercury chloride; PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; PMA, phenylmercury acetate. The MICs that increased more than three times are highlighted in boxes.

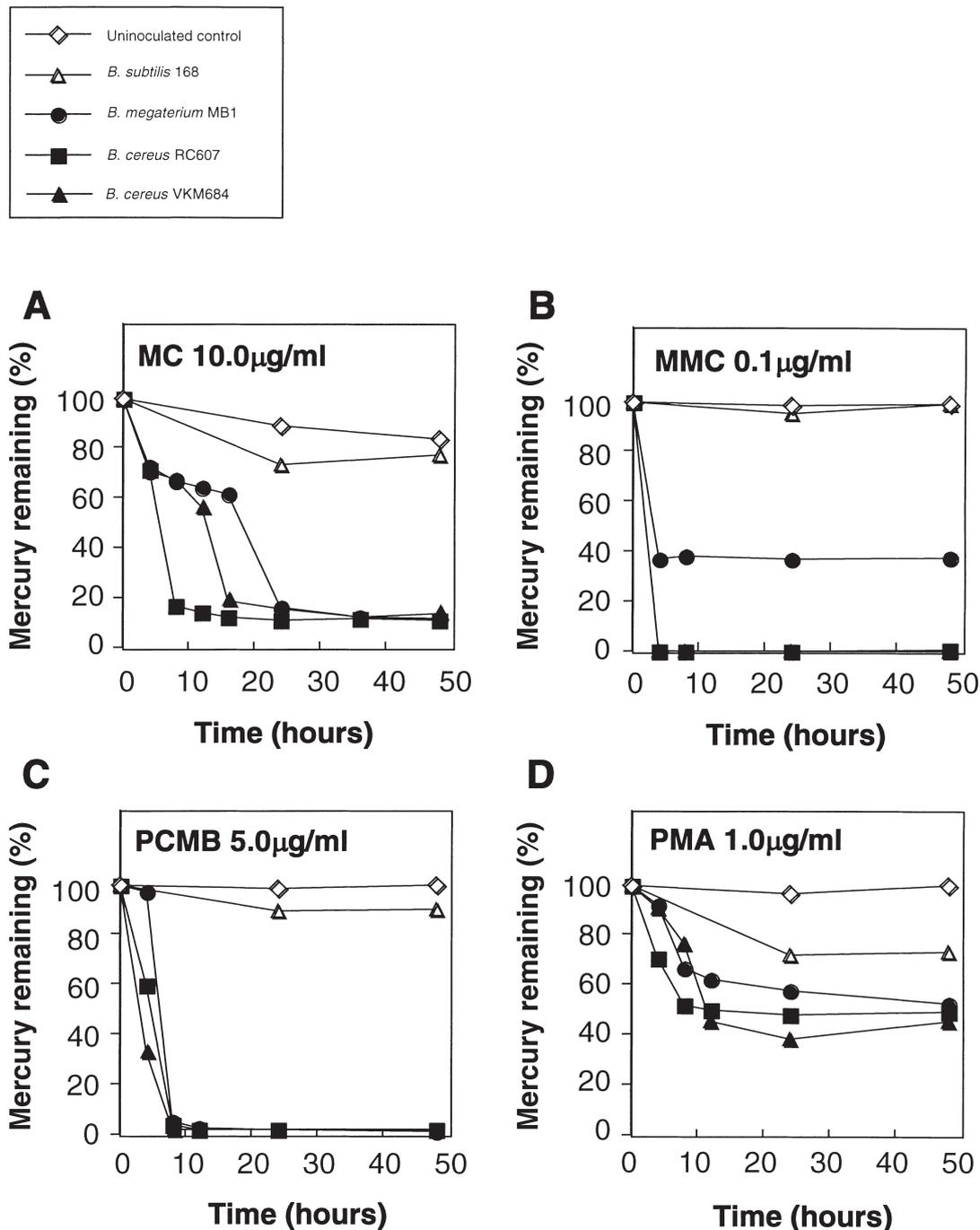


図3. Comparison of organomercury removal among the three *Bacillus* strains. Incubated with 10.0 μg/ml of mercury chloride (MC) (A), 0.1 μg/ml of methylmercury chloride (MMC) (B), 5.0 μg/ml of *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) (C), and 1.0 μg/ml of phenylmercury acetate (PMA) (D). Symbols: Uninoculated control (◇); *B. subtilis* 168 (△); *B. megaterium* MB1 (●); *B. cereus* RC607 (■); *B. cereus* VKM684 (▲).

*megaterium* MB1 よりも高い MIC を示すことが明らかになった。

### 3.2. *Bacillus* 属細菌野生株の有機水銀の除去

図3A~Dに各 *Bacillus* 属細菌野生株の有機水銀除去率の比較結果を示す。また、無機水銀化合物である MC の除去率の比較結果も同時に示す。各細菌株は本研究で用いた全ての有機水銀化合物を除去することができたものの、水銀化合物種によっては除去率に違いが観察され

た。また、各細菌株は対数増殖期で除去活性が最大となり、48時間培養後は定常期に達した (data not shown)。

MC の除去率において、培養後24時間で *B. megaterium* MB1 と *B. cereus* VKM684 は約85%を示し、*B. cereus* RC607 は約89%を示した。よって、無機水銀イオンの還元能力はほぼ同じであることが明らかになった (図3A)。

*B. megaterium* MB1 は MMC に耐性を示さないが (表1)、培養後4時間で約60%の MMC の除去率を示

したのに対して (図 3B), *B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 は, 培養後 4 時間でほぼ完全に MMC を除去した。よって, これらの 3 細菌株で MMC の除去率には差が見られた (図 3B)。

PCMB の除去率については, 3 細菌株ともに培養後 24 時間で約 98% とほぼ完全に除去できることが明らかになった (図 3C)。また, 3 細菌株とも培養後 48 時間で約 50% の PMA の除去率しか示さず, PMA の分解は不十分であった (図 3D)。

以上の結果から, 各細菌株は様々な水銀化合物種を除去できることが明らかになったものの, 同一の *mer* オ

ペロンを保有しているにも拘わらず, 水銀化合物種によっては除去率や除去速度に違いがあることが明らかになった。特に *B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 は PMA を除く水銀化合物を効果的に除去できることが明らかになった。また, 各細菌株の水銀除去は水銀耐性プロフィールの結果 (表 1) と相関を示さなかった。

### 3.3. 組み換え大腸菌株の有機水銀の除去

図 4A~D に各組み換え大腸菌株の有機水銀除去率の比較結果を示す。また, 無機水銀化合物である MC の除去率の比較結果も同時に示す。各細菌株は各水銀化

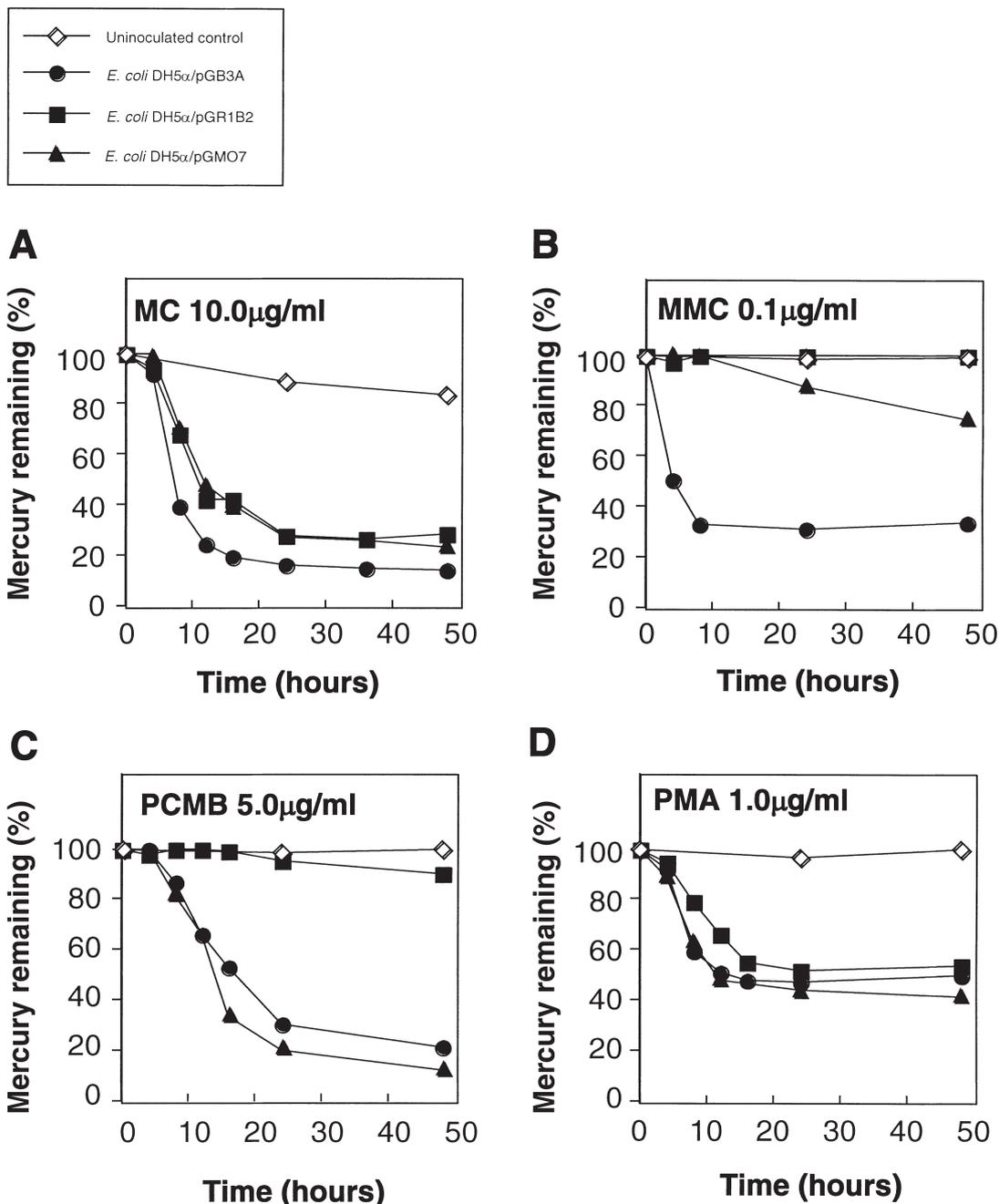


図 4. Comparison of organomercury removal among three *E. coli* DH5α cells harboring recombinant plasmids pGB3A, pGMO7, and pGR1B2. Incubated with 10.0 μg/ml of mercury chloride (MC) (A), 0.1 μg/ml of methylmercury chloride (MMC) (B), 5.0 μg/ml of *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) (C), and 1.0 μg/ml of phenylmercury acetate (PMA) (D). Symbols: Uninoculated control (◇); *E. coli* DH5α/pGB3A (●); *E. coli* DH5α/pGR1B2 (■); *E. coli* DH5α/pGMO7 (▲)

合物についてそれぞれ異なる除去能を示した。また、各細菌株は対数増殖期で除去活性が最大となり、48時間培養後は定常期に達した (data not shown)。*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGB3A 株は、本研究で用いた全ての有機水銀化合物を除去できた (図 4A~D)。しかしながら、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGR1B2 株は MC と PMA を除去したものの (図 4A および D)、MMC と PCMB を全く除去できなかった (図 4B および C)。また、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGMO7 株は MMC を除去できず、それ以外の水銀化合物を除去できた (図 4A~D)。

MMC の除去率において、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGR1B2株は全く除去できず、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGMO7 株は培養後48時間で約25%だけの除去が観察された (図 4B)。それに対し *E. coli* DH5 $\alpha$ /pGB3A 株は培養後 8 時間で約70%の除去率を示した (図 4B)。しかしながら、培養後 8 時間以降の除去活性を示さず、培養直後から 8 時間の培養までの間に除去を行うことが判明した。以上の結果から、MMC の分解に大きく貢献しているのは MerB3 タンパク質 (*merB3* 遺伝子産物) であると考えられ、MerB1 タンパク質 (*merB1* 遺伝子産物) は MMC の分解にわずかに関与しないことが示唆された。

PCMB の除去率において、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGB3A 株と *E. coli* DH5 $\alpha$ /pGMO7 株は48時間で約80%以上の除去率を示した (図 4C)。一方、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGR1B2 株は、MMC の除去能と同様に除去活性が全く観察されなかった。また、以前報告した PCMB に対する MIC の結果において、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGR1B2 株は PCMB に耐性を示さないことが知られている<sup>9)</sup>。よって、各細菌株の PCMB に対する耐性と除去の間には相関があるといえる。以上の結果から、MerB2 タンパク質は PCMB の分解とそれへの耐性には関与せず、MerB1 タンパク質と MerB3 タンパク質の両方が PCMB の分解に関与していると結論づけられた。

各細菌株の培養後48時間の PMA の除去率は約50%前後であった (図 4D)。また、*E. coli* DH5 $\alpha$ /pGR1B2 株は PMA に対して耐性を示さないことが知られているにも拘わらず<sup>9)</sup>、PMA を除去できた (図 4D)。

以上の結果から、有機水銀分解酵素である各 MerB タンパク質は、有機水銀化合物種に対して異なる分解特性を示し、それらの中の MerB3 タンパク質は最も多くの

種類の有機水銀化合物を分解できることが明らかになった。

#### 4. 考 察

本研究で用いた各 *Bacillus* 属細菌野生株は、同一の *mer* オペロンを保有しているのに拘わらず<sup>4,9,24)</sup>、異なった MIC プロファイルを示した (表 1)。特に、*B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 は、*B. megaterium* MB1 よりも高い耐性能を示した。MIC プロファイルはこれらの細菌株を実際の水銀除去技術に使用する際には重要なパラメーターとなる。MIC プロファイルの結果において、各細菌株の MMC に対する MIC は、PCMB や PMA などの他の有機水銀化合物に比べ低かった (表 1)。しかしながら、各細菌株は MMC を培養後 4 時間程度で除去できた (図 3B)。*Bacillus* 属細菌株と同様のグラム陽性の水銀耐性細菌 *Staphylococcus aureus* は、PMA およびパラヒドロキシ安息香酸水銀 (pHMB) に対して耐性を示すものの、塩化エチル水銀 (EMC) やチメロサル (TH) などのアルキル水銀化合物に対しては感受性を示すことが報告されている<sup>25)</sup>。しかしながら、EMC や TH を分解し気化できることが明らかにされている<sup>25)</sup>。この水銀耐性 *S. aureus* の *mer* オペロンはプラスミド pI258 にコードされ、有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を一つ保有している<sup>12)</sup>。この結果は有機水銀化合物に対する耐性と除去の間には相関がないことを示している。また、この結果と共通の結果がグラム陰性の水銀耐性 *Pseudomonas* 属細菌にも見られている<sup>9)</sup>。各細菌株の水銀耐性能の違いは、各細菌株における遺伝子発現レベルが異なるためであると考えられる。さらには、細菌細胞膜への水銀化合物の透過性の違いや細胞内のタンパク質や酵素の SH 基化合物への水銀イオンの結合の度合いに違いがあることが考えられる。

3つの *merB* 遺伝子産物の各種有機水銀化合物に対する分解能の特性を調べるために、*E. coli* を宿主とした水銀耐性組み換え大腸菌株を用いて除去の評価を行った。本実験の結果より、MerB3 タンパク質は MMC の分解に大きく関与していると考えられ、MerB1 タンパク質と MerB2 タンパク質は MMC の分解に関与しない可能性が示唆された。しかしながら、PMA の除去結果では、

表 2. Homology among three MerB enzymes and other typical organomercurial lyases.

Sources	Identity of amino acid sequence (%)				
	MerB1	MerB2	MerB3	MerB <sub>pI258</sub>	MerB <sub>pDU1358</sub>
MerB1	—				
MerB2	27.4%	—			
MerB3	25.1%	21.0%	—		
MerB <sub>pI258</sub>	72.5%	23.9%	23.5%	—	
MerB <sub>pDU1358</sub>	39.4%	23.9%	18.5%	40.8%	—

MerB1, MerB2, and M3erB3 (MerB1, MerB2, and MerB3 of *B. megaterium* MB1 chromosome of *B. cereus* RC607 plasmid pKLH6, accession numbers AF138877, AB027307, AB027306<sup>8,9,24)</sup>); MerB<sub>pI258</sub> (MerB of *Staphylococcus aureus* RN23 8325 plasmid pI258, accession number L29436<sup>12)</sup>); MerB<sub>pDU1358</sub> (MerB of *Serratia marcescens* plasmid pDU1358, accession number P08664<sup>7)</sup>).

MerB1 タンパク質と MerB2 タンパク質は PMA を分解でき、有機水銀化合物種によって分解能に違いがあることを示した。この分解能の違いは、各々の MerB タンパク質の各種有機水銀イオンに対する認識と切断効率の度合いの違いが考えられる。

3つの有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を持った水銀耐性細菌は、本研究で用いた *B. megaterium* MB1, *B. cereus* RC607 および *B. cereus* VKM684 の他に、ウクライナのカルパチアの土壌から分離された *Exiguobacterium* sp. TC38-2b<sup>4)</sup> に見られている。一方、ロシアの土壌から分離された *B. megaterium* MK64-1<sup>4)</sup> は、*merB3* 遺伝子のみを持ち、*merB1* および *merB2* 遺伝子を保有していない *mer* オペロンをコードしていることが知られている。現在まで本研究で用いた *Bacillus* 属細菌株由来の3つの *merB* 遺伝子を含め、少なくとも9種類の *merB* 遺伝子がグラム陰性とグラム陽性の両方の水銀耐性細菌から発見されている。上記の3つ以外の *merB* 遺伝子は、グラム陰性細菌では *Serratia marcescens* (pDU1358)<sup>7)</sup> の *merB* 遺伝子、*Pseudomonas stutzeri* (pPB)<sup>20)</sup> の *merB* 遺伝子、*Pseudomonas* sp. K-62 (pMR26) の2つの異なる *merB* 遺伝子 (*merB1* および *merB2*)<sup>11)</sup>、グラム陽性細菌では *S. aureus* (pI258)<sup>12)</sup> の *merB* 遺伝子、*Streptomyces lividans* 1326 (染色体上)<sup>22)</sup> の *merB* 遺伝子である。これらの遺伝子産物である MerB タンパク質のアミノ酸配列の比較から、*B. megaterium* MB1 株の保有する MerB3 タンパク質は、他の MerB タンパク質と比べ、アミノ酸配列レベルでほとんど相同性を示さないことが明らかになっている(表2)<sup>8)</sup>。しかしながら、唯一 *P. stutzeri* (pPB) に保有されている MerB タンパク質とアミノ酸配列レベルで25.5%と低いながら相同性を持つことが明らかにされている<sup>8)</sup>。

現在、水銀を含んだ廃水の処理は主として物理化学的処理方法がとられているものの、これらの処理方法には活性炭やイオン交換樹脂の取り替えや莫大な化学薬品の添加によるコスト高などの問題がある<sup>5,18)</sup>。低濃度の水銀汚染の経済的かつ効率的な除去を行うためには、物理化学的処理方法よりも微生物を利用した生物学的処理方法が適していると考えられる。本研究においては、水銀耐性 *Bacillus* 属野生細菌株と水銀耐性組み換え大腸菌株の各種有機水銀化合物に対する耐性と除去の特性を調べた。それらの細菌株の中で、野生株である *B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 は、*B. megaterium* MB1 に比べ、MMC を除く3種の水銀化合物に対し高い耐性を示し、MMC を含めた4種の水銀化合物を効果的に除去できた。したがって、同一の *mer* オペロンを持つ野生株であっても、それを保有する形態および保有する細菌細胞の特徴によって各水銀化合物の除去特性は異なることが明らかになった。また、組み換え大腸菌株である *E. coli* DH5 $\alpha$ /pGB3A 株は、本研究で用いた全ての水銀化合物を除去できたものの、各水銀化合物の除去率は野生株の *B. cereus* RC607 と *B. cereus* VKM684 のそれらよりも低かった。よって、分子育種微生物による水銀化合物の除去を十分に達成するためには、宿主として用いる細菌と遺伝子とを適切に組み合わせて用いること(例えば、グラム陰性細菌由来の水銀耐性遺伝子を用いて宿主大腸菌か *Pseudomonas* 属細菌を育種する等)が重要と

考えられる。環境浄化に用いる微生物の生存性や活性の保存とともに、これらの検討が今後の研究課題といえる。

## 謝 辞

本研究を進めるに当たり、*B. cereus* RC607 株を譲渡下さいましたイリノイ大学シカゴ校医学部微生物学免疫学科の Simon Silver 教授および *B. cereus* VKM684 株を譲渡下さいましたロシア科学アカデミーの Elena S. Bogdanova 博士に深く感謝申し上げます。また、本研究は日本学術振興会 (JSPS) の平成13年度および平成14年度の科学研究費による助成を受けてなされたことを付記します。

## 文 献

- 1) Bakir, F., S.F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha, A. Khalidi, N.Y. Al-Rawi, S. Tikriti, H.I. Dhahir, T.W. Clarkson, J.C. Smith, and R.A. Doherty. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230-241.
- 2) Begley, T.P., A.E. Walts, and C.T. Walsh. 1986a. Bacterial organomercurial lyase: overproduction, isolation, and characterization. 25: 7186-7192.
- 3) Begley, T.P., A.E. Walts, and C.T. Walsh. 1986b. Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme: bacterial organomercurial lyase. 25: 7192-7200.
- 4) Bogdanova, E.S., I.A. Bass, L.S. Minhakhin, M.A. Petrova, S.Z. Mindlin, A. Volodin, E.S. Kalyaeva, G.M. Tiedge, J.L. Hobman, N.L. Brown, and V. Nikifirov. 1998. Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144: 609-620.
- 5) Chang, J.-S., and W.-S. Law. 1998. Development of microbial mercury detoxification processes using mercury-hyperresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* cPU21. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 462-470.
- 6) Clark, D.L., A.A. Weiss, and S. Silver. 1977. Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 132: 186-196.
- 7) Griffin, H.G., T.J. Foster, S. Silver, and T.K. Misra. 1987. Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 3112-3116.
- 8) Huang, C.-C., M. Narita, T. Yamagata, and G. Endo. 1999a. Identification of three *merB* genes and characterization of a broad-spectrum mercury resistance module encoded by a class-II transposon of *Bacillus megaterium* MB1. *Gene.* 239: 361-366.
- 9) Huang, C.-C., M. Narita, T. Yamagata, Y. Itoh, and G. Endo. 1999b. 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.
- 10) Hobman, J.L., and N.L. Brown. 1997. Bacterial mercury-resistance genes, pp. 527-568. In H. Sigel and A. Sigel (ed.), *Metal ions in biological system.* vol. 34. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- 11) Kiyono, M., T. Omura, M. 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.
- 12) Laddaga, R.A., L. Chu, T.K. Misra, and S. Silver. 1987. Nucleotide sequence and expression of the mercurial-resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5106-5110.
- 13) Malm, O., W.C. Pfeiffer, C.M.M. de Souza, and R. Reuther. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River Basin, Brazil. *Ambio.* 19: 11-15.
- 14) Nakamura, K., T. Sakata, and H. Nakahara. 1988. Volatilization of mercury compounds by methylmercury-volatilizing

- bacteria in Minamata Bay sediment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41: 651–656.
- 15) Nakamura, K., and S. Silver. 1994. Molecular analysis of mercury-resistant *Bacillus* isolates from sediment of Minamata Bay, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4596–4599.
  - 16) Narita, M., 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 TnMER11. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 86–90.
  - 17) Nriagu, J.O., W.C. Pfeiffer, O. Malm, C.M.M. de Souza, and G. Mierle. 1992. Mercury pollution in Brazil. Nature 356: 389.
  - 18) Okino, S., K. Iwasaki, O. Yagi, and H. Tanaka, 2000. Development of a biological mercury removal-recovery system. Biotechnol. Lett. 22: 783–788.
  - 19) 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. Reviews. 19: 239–262.
  - 20) Reniero, D., E. Galli, and P. Barbieri. 1995. Cloning and comparison of mercury- and organomercurial-resistance determinants from a *Pseudomonas stutzeri* plasmid. Gene. 166: 77–82.
  - 21) Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  - 22) Sedlmeier, R., and J. Altenbuchner. 1992. Cloning and DNA sequence analysis of the mercury resistance genes of *Streptomyces lividans*. Mol. Gen. Genet. 236: 76–85.
  - 23) Silver, S., G. Endo, and K. Nakamura. 1994. Mercury in the environment and the laboratory. J. Jpn. Soc. Water Environ. 17: 235–243.
  - 24) Wang, Y., M. Moore, H.S. Levinson, S. Silver, C. Walsh, and I. Mahler. 1989. Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from a *Bacillus* sp. with broad spectrum mercury resistance. J. Bacteriol. 171: 83–92.
  - 25) Weiss, A.A., S.D. Murphy, and S. Silver. 1977. Mercury and organomercury resistances determined by plasmids in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 132: 197–208.
  - 26) 山肩健史, 石井秀学, 成田 勝, 熊谷康, 黄 介辰, 遠藤銀朗. 2001. 新たに発見された有機水銀分解遺伝子 *merB3* とその発現調節系を利用した有機水銀の検出方法に関する研究. 水環境学会誌. 24: 219–224.