

環境浄化に寄与する微生物の単離と遺伝子の解析

東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室

1. 環境汚染を浄化するために役立つ微生物の探索

よく知られている環境汚染を引き起こす物質として、ハロゲン化有機化合物があります。これらのうち、ポリ塩化ビフェニル (PCB)・トリクロルエチレン (TCE)・テトラクロルエチレン (PCE) やダイオキシンなどの有機塩素化合物による環境汚染は重大な社会問題を引き起こしてきました。これらの有機塩素化合物は、環境中では分解されずに長期間残留すると考えられており、実際、PCB やダイオキシンはほとんど分解されることなく海洋生物などの食物連鎖を通して大型魚類や海洋哺乳動物に濃縮され、発ガン等の人間の健康にも影響を及ぼし重大な環境汚染問題の原因をつくっています。特に分解が困難で安定な化合物としての特徴をもつために大量に生産され産業上大量に利用された PCB と TCE による汚染は深刻なものがあります。

一方、重大な環境汚染問題を引き起こす無機物としては重金属類やヒ素・セレン・テルルといった半金属が挙げられます。特に有害な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・鉛・銀などがあります。これらは何れも元素金属としては生物に毒性を示すことはほとんどないものの、いったん酸化されたりして重金属イオンとなると強い毒性を示します。また、有機物と結合してメチル水銀やエチル鉛のようないわゆる有機化すると、生物細胞に進入し細胞質などに蓄積して毒性を発揮するのです。当研究室では、特にこれらのうち国内や世界において重大な公害問題を起こしてきた水銀とカドミウムによる汚染を微生物によって浄化する技術の基礎理論を確立するための研究を行っています。

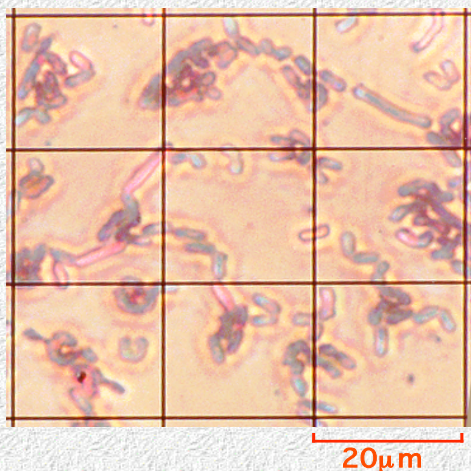
自然界には通常の生物にとってきわめて毒性の高い重金属に対してもそれを細胞から放出したり無毒な金属に変換したりして生きている微生物が存在しています。この微生物の重金属化合物の変換能力や除去能力を活用することによって、工場廃水などに含まれる重金属の除去を行ったり重金属によって汚染された環境を清浄な状態に修復することができると思われます。このような微生物が持つ特質は「重金属耐性」と呼ばれています。微生物の重金属耐性のメカニズムを解明することによって、微生物が行っている重金属無毒化のための生物反応の全容を理解することができると思われます。また、そのメカニズムを応用して新しい重金属の無毒化処理や除去のためのバイオテクノロジーの開発が可能になると考えられます。

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す。そこで当研究室では重金属によって汚染された環境サンプルから水銀等に耐性な微生物を探索する研究を行うとともに、その耐性遺伝子や遺伝子オペロンを単離して耐性のメカニズムを解明する研究を行っています。

2. 水銀汚染水域底泥からの水銀耐性微生物の単離と耐性遺伝子群の解析

当研究室では、かつて水銀によって汚染されていた時期に採取されその後乾燥状態で保存されていた水俣湾底泥から幾つかの水銀耐性細菌を単離することに成功しました。それらはいずれも芽胞形成性の *Bacillus* 属の細菌でした。この細菌の一つは、同定後に *Bacillus megaterium* MB1 株と命名されました。その顕微写真を図-1 に示します。また、この細菌の染色体には、水銀耐性オペロンが存在していました。またそのオペロンの水銀耐性遺伝子の配置構成を図-2 に示します。さらに、この水銀耐性遺伝子オペロンは、クラス II トランスポゾンと呼ばれる転移因子上に存在することがわかりました。したがって、この細菌がもつ水銀耐性は生物種が確立されたあとに水銀耐性を獲得したと考えられました。その後の私たちの解析で、アメリカの研究者がボストン湾から単離した水銀耐性の細菌 (*Bacillus cereus* RC607 と名付けられた細菌) もやはりトランスポゾン上に水銀耐性オペロンを持っていることを明らかにすることができました。これら 2 つの細菌が持つトランスポゾン類似性を図-3 に示します。

A Gram-positive mercury-resistant bacterium isolated from mercury polluted sediment of Minamata Bay.

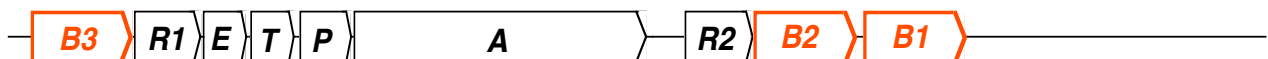


Growth	strictly aerobic
Morphology	rod
Diameter of the rod	more than 1.0 μm
Spores	endospore-forming
Gram staining	positive
Growth at 50 °C	no
Growth in 7% NaCl	yes
16SrRNA gene sequence	100%

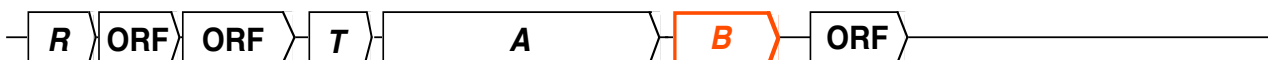
***Bacillus megaterium* MB1**

図-1 水俣湾底泥から単離して *Bacillus megaterium* と同定した水銀耐性細菌

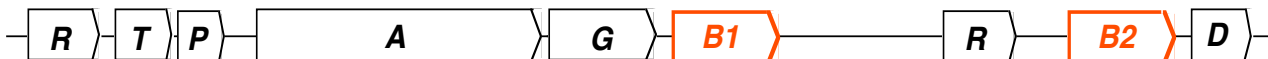
Bacillus megaterium MB1 & *Bacillus cereus* RC607



Staphylococcus aureus RN23 8325



Pseudomonas sp. K-62



Bacillus megaterium MK64-1

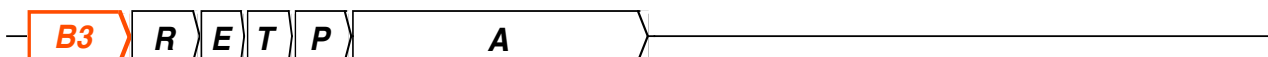
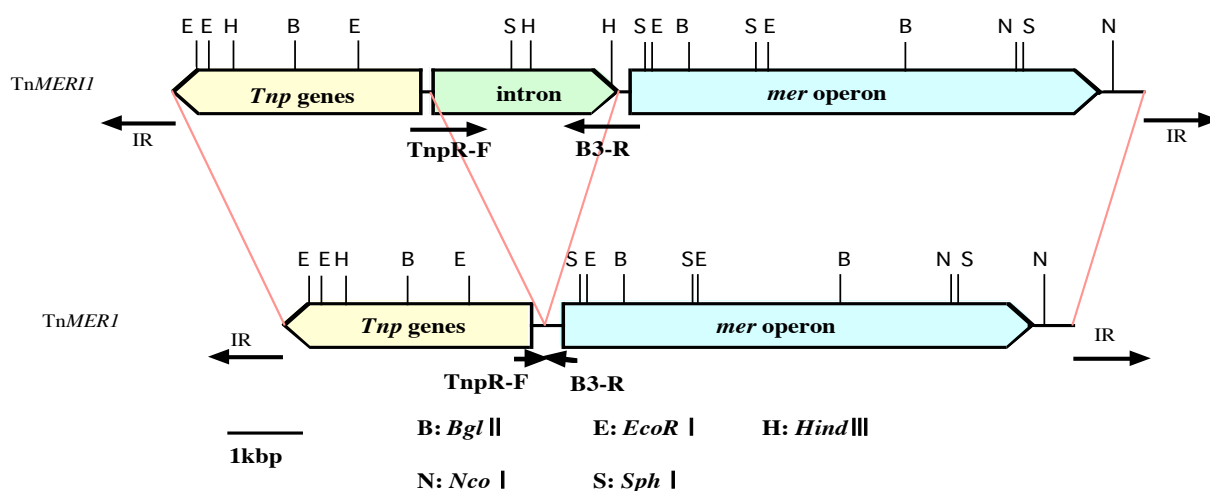


図2 水銀耐性細菌が持っていた水銀耐性遺伝子群の配置構成 (各文字は水銀耐性酵素 MerA, MerT などに対応)



Restriction endonuclease maps of PCR-amplified transposon fragments of corresponding regions of *B. megaterium* MB1 (TnMER11) and of *B. cereus* RC607 (TnMER1).

図3 水俣湾からの *B. megaterium* MB1 株とボストン湾からの *B. cereus* RC6 株のトランスポゾンの比較

3. 水俣湾底泥から単離した水銀耐性細菌およびその水銀耐性遺伝子をクローニングした大腸菌による水銀除去に関する研究

上記の水俣湾底泥から単離した水銀耐性細菌とそれが持つ幾つかの水銀耐性遺伝子を組み合わせて組み換えた大腸菌クローンを用いて、水銀を含む水から水銀を除去できるかどうかを確認する研究を行いました。その結果は、図-4 に示したように、高い水銀還元（2 価の水銀イオンや有機水銀を 0 価の金属水銀イオンに変換）能力を持つことと、還元された金属水銀が気化蒸発して水中から除去されることが明らかになりました。

このような高い微生物の水銀除去能力を利用して水銀化合物によって汚染された水や土壌浄化することができると考えられます。そこで、このような細菌をゲルビーズに包括固定化して、固定化微生物を用いたバイオリアクターによって水銀を還元気化させ、それから発生する水銀蒸気を活性炭等の水銀吸着塔によって吸着回収し除去する水銀除去プロセスを開発しました。

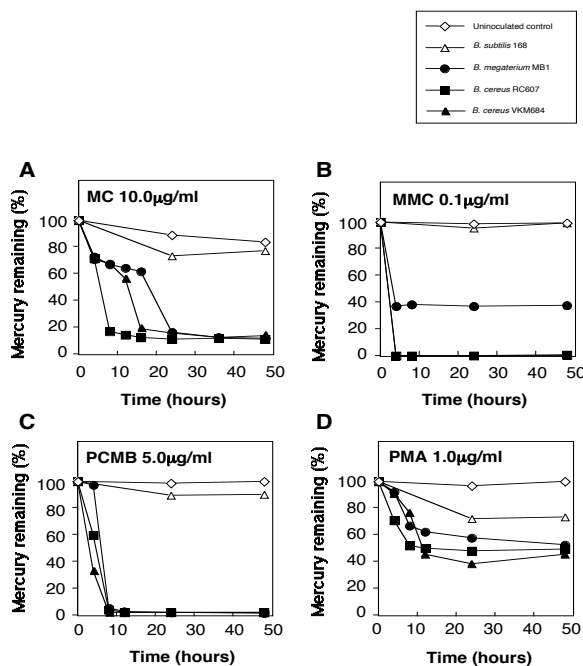


Fig. 3

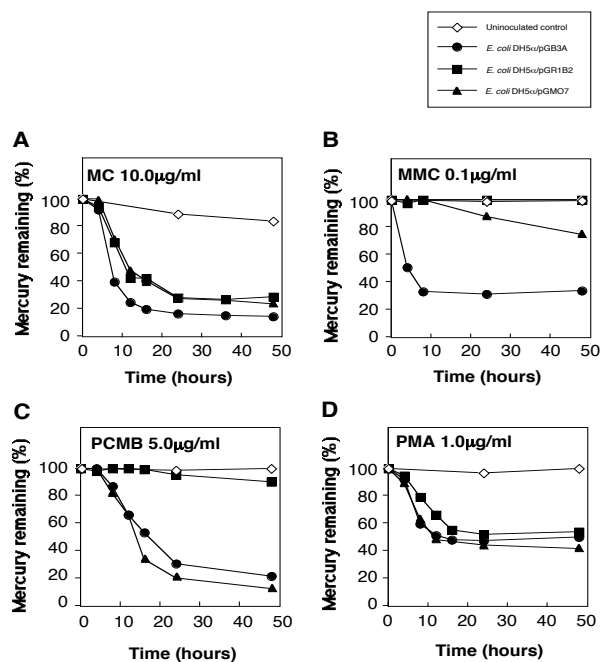


Fig. 4

図4 水俣湾から分離した水銀耐性細菌およびその遺伝子をクローニングした大腸菌による水銀化合物の除去能力 (*B. subtilis* 168 は水銀感受性株、MC;塩化第2水銀、MMC;塩化メチル水銀、PCMB; ラクロロ安息香酸水銀、PMA; 酢酸フェニル水銀、Fig.3 は野生株、Fig.4 は *B. megaterium* MB1 株の各水銀耐性遺伝子をクローニングした大腸菌組み換え株)

4. 明らかにできた水銀耐性トランスポゾンを活用する新しい環境バイオテクノロジーの提案

特定の微生物に備わっている重金属耐性遺伝子群を利用して、重金属によって汚染された環境を浄化できるように微生物や植物を改良する研究が、これからの環境バイオテクノロジーの開発にとって重要になると考えられます。また、上述したように、自然界では重金属耐性遺伝子およびオペロンがトランスポゾンを通じて細菌の種を超えて広範囲に遺伝形質が水平伝播していることが明らかになってきています。このような遺伝子の水平伝播現象を、重金属によって汚染された実際の汚染環境中で本来その環境に生息する土着の細菌に重金属除去遺伝子群を伝播させて浄化機能を発現させることに応用して、図-5 に示すような環境浄化微生物の「*in situ* 分子育種法」という新しい技術概念を提案することができました。

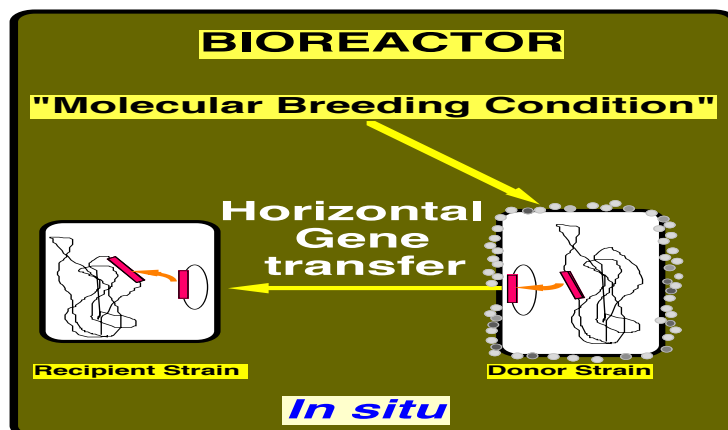


図5 本研究で提案する環境浄化微生物の「*in situ* 分子育種法」の概念

このような技術は、これまでの分子育種方法である遺伝子工学による組み換え生物の創出とは異なり、遺伝子の細胞間水平伝播という自然現象を促進させることによって微生物の環境浄化機能を強化しようとするものです。これによって微生物の開放系での利用を効果的にするだけでなく、生態系への影響の少ない新しいバイオテクノロジーを開発できる可能性があります。遺伝子組み換え技術を適用するかしないかに拘わらず、微生物の重金属耐性遺伝子を利用して環境を汚染している重金属を除去する技術を開発することは、環境分野における重要な意義があると考えられます。これを実現するために、これまで知られている重金属耐性遺伝子の機能を十分に理解した上で、どのような新しい方法が可能であるかをさまざまな角度から検討することが今後の課題であると考えています。

5. ナイジェリアの水銀汚染ラグーン底泥から単離された水銀耐性酵母の研究

ナイジェリアではアフリカ諸国の中では比較的早い段階から鉱工業が発展してきましたが、水銀、カドミウム、鉛、石油、PCB などによる環境汚染も深刻な問題となっています。ナイジェリアの最大都市ラゴスは、ラゴスラグーンという大きな汽水湖の周辺に発達した都市ですが、この汽水湖はさまざまな有害物質によって汚染が進んでいます。当研究室ではこの湖の底泥からも水銀を除去したり石油成分を分解したりする微生物を単離し、その利用方法について研究を行っています。

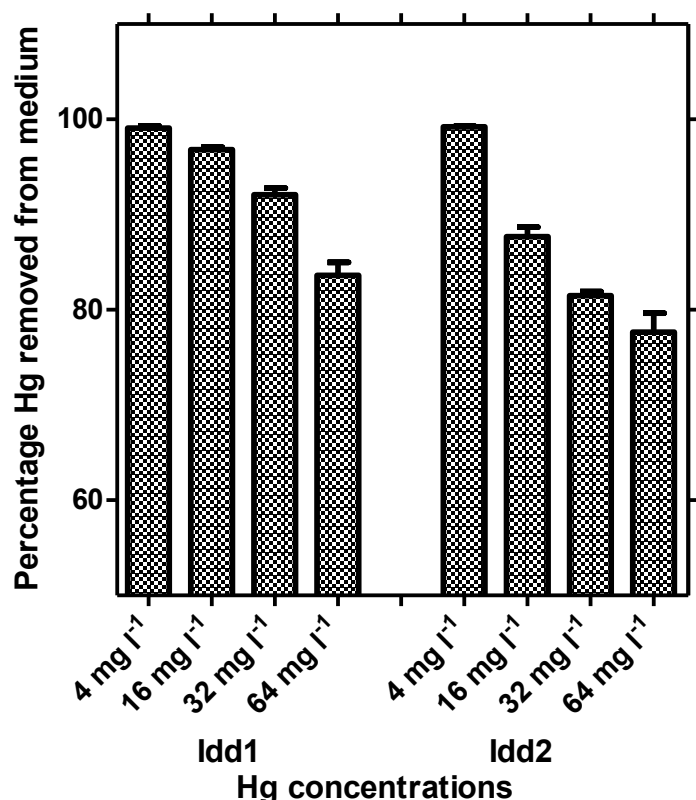


図6 ラゴスラグーンから単離した水銀耐性酵母 *Yarrowia* sp. Idd1 株および *Yarrowia* sp. Idd2 株による塩化第2水銀の吸着除去結果（横軸の濃度は、初期水銀濃度 (mg/L)）

これまでの研究で、ラゴスラグーン底泥から分離した水銀耐性の酵母に注目した研究では、この酵母が細胞外に多量の多糖を生産し、その多糖が図-6 に示したように水銀イオンを高濃度に吸着できることを明らかにしました。

今後はこの酵母を用いた吸着塔型水銀除去装置の開発を行うことにしています。

本研究による発表論文の一覧

S. Silver, G. Endo and K. Nakamura: Mercury in the environment and the laboratory. 水環境学会誌, Vol. 17, No. 4, pp. 235-243 (1994)

G. Endo, G. Ji and S. Silver: Heavy metal resistance plasmids and use in bioremediation. Proceedings of Second International Symposium on Environmental Biotechnology, pp. 47-62 (1994)

G. Endo and S. Silver: CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. Journal of Bacteriology, Vol. 177, pp. 4437-4441 (1995)

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, Vol. 35, pp. 457-466 (1998)

M. Narita, C. C. Huang and G. Endo: Molecular analysis of *merA* gene possessed by anaerobic mercury-resistant bacteria isolated from Minamata Bay. Microbes and Environments, Vol. 14, No. 2, pp. 77-84 (1999)

C. C. Huang, M. Narita, T. Yamagata, Y. Itoh, M. 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, No. 234, pp. 361-369 (1999)

C. C. Huang, M. Narita, T. Yamagata and G. Endo: 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, No. 239, pp. 361-366 (1999)

M. Narita, C. C. Huang, T. Koizumi, T. Yamagata and G. Endo: Characteristics of anaerobic mercury-resistant bacteria isolated from mercury-polluted sediment. Proceedings of 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference, Vol. 1, pp. 310-315 (1999)

C. C. Huang, M. Narita, T. Yamagata and G. Endo: In situ molecular breeding for bioremediation of mercury-polluted water environment. Proceedings of 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference, Vol. 1, pp. 322-327 (1999)

成田勝、黄介辰、小泉卓哉、山肩健史、遠藤銀朗： 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、環境工学研究論文集, Vol. 36, pp. 29-37 (1999)

山肩健史、黄介辰、成田勝、遠藤銀朗： グラム陽性細菌 *Bacillus megaterium* MB-1 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、環境工学研究論文集, Vol. 36, pp. 39-47 (1999)

G. Endo, F. Ohtsuki and C.C. Huang: Development of bio-luminescence sensor to monitor the environmental mercury contamination. Proceedings of the 3rd IAWQ Specialized Conference on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants, pp. 258-265 (1999)

山肩健史、黄介辰、成田勝、遠藤銀朗: *Bacillus megaterium* MB1 の Tn*MER11* から発見された新規有機水銀分解遺伝子 *merB3* の発現調節に関する研究、日本農芸化学会誌, Vol. 74, No. 8, pp. 897-901 (2000)

M. Narita, C.C. Huang, T. Koizumi, T. Yamagata and G. Endo: Identification and Characterization of anaerobic mercury-resistant bacteria isolated from mercury-polluted sediment. Water Science and Technology, Vol. 42, No. 3-4, pp. 109-114 (2000)

山肩健史、石井秀学、成田勝、熊谷康、黄介辰、遠藤銀朗: 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, Vol. 24, No. 4, pp. 219-224 (2001)

M. Narita, C.C. Huang and G. Endo: Substrate specificity of the three organomercury lyase genes of a mercury resistance module of *Bacillus megaterium* MB1. Proceedings of Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology, pp. 368-371 (2001)

55) C.C. Huang, M. Narita and G. Endo: Development of bio-monitoring and bio-purification system for the prevention of organomercury contamination. Proceedings of Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology, pp. 372-375 (2001)

T. Yamagata, M. Ishii, M. Narita, C.C. Huang and G. Endo: Bio-affecting mercury detection using mercury resistance gene module fused with bioluminescence reporter genes. Proceedings of Asian Waterqual 2001-First IWA Asia-Pacific Regional Conference, Vol. 1, pp. 329-334 (2001)

H. Pan-Hou, M. Kiyono, T. Kawase, T. Omura and G. Endo: Evaluation of *ppk*-specified polyphosphate as a mercury removal tool. Biol. Pharm. Bull., Vol. 24, No. 12, pp. 1423-1426 (2001)

H. Pan-Hou, M. Kiyono, H. Omura, T. Omura and G. Endo: Polyphosphate production in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. FEMS Microbiology Letters, No. 10325, pp. 159-164 (2002)

M. Narita, T. Yamagata, H. Ishii, C.-C. Huang and G. Endo: Simultaneous detection and removal of organomercurial compounds by using the genetic expression system of an organomercury lyase from the transposon Tn*MER11*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 59, No. 1, pp. 86-90 (2002)

C.C. Huang, M. Narita, T. Yamagata, G. Endo and S. Silver: Characterization of two regulatory genes of the mercury resistance determinants from Tn*MER11* by luciferase-based examination. Gene, No. 301, pp. 13-20 (2002)

T. Yamagata, M. Ishii, M. Narita, C.C. Huang and G. Endo: Bio-affecting mercury detection using mercury resistance gene module fused with bioluminescence reporter genes. Water Science and Technology, Vol. 46, No. 11-12, pp. 253-256 (2002)

G. Endo, M. Narita, C-C. Huang and S. Silver: Heavy metal resistance transposons and plasmids: Potential use for Environmental Biotechnology. J. Environmental Biotechnology, Vol. 2, No. 2, pp. 71-82 (2002)

M. Narita, K. Chiba, H. Nishizawa, H. Ishii, C.-C. Huang, Z. Kawabata, S. Silver and G. Endo: Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay, FEMS Microbiology Letters, Vol. 223, No. 1, pp. 73-82 (2003)

G. Endo, T. Yamagata, M. Narita and C-C. Huang: Bioluminescence biosensor for the detection of organomercury contamination. Acta Biotheologica, Vol. 23, No. 2/3, pp. 123-129 (2003)

成田勝、西澤博、石井秀学、黄介辰、遠藤銀朗: *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、環境バイオテクノロジー学会誌、Vol. 3, No. 1, pp. 43 -50 (2003)

遠藤銀朗: トランスポゾンを紹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, pp. 428-430 (2003)

K. Matsui, M. Narita, H. Ishii and G. Endo: Participation of the *recA* determinant in the transposition of class II transposon mini-Tn*MER11*. FEMS Microbiology Letters, No. 253, pp. 309-314 (2005)

遠藤銀朗、松井一彰、成田勝: 環境微生物に見られる遺伝子の水平伝播-微生物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-
環境バイオテクノロジー学会誌, Vol. 6, No. 1 pp. 27-32 (2006)

松井一彰、遊佐清孝、菅原宏幸、成田勝、遠藤銀朗: 有機水銀分解遺伝子と生物発光システムを用いた有機水銀化合物検出用微生物バイオセンサーの開発に関する研究、水環境学会誌、Vol. 30, No. 2, pp. 77-81 (2007)

J-L. Hsieh, C-Y. Chen, J-S. Chang, C-C. Huang and G. Endo: Over expression of a Single Membrane Component from the *Bacillus mer* Operon Enhanced Mercury Resistance in an *Escherichia coli* Host, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Vol. 71, No. 6, pp. 1494-1499 (2007)

松井一彰、成田勝、遠藤銀朗: 大陸と海洋を渡り歩く細菌と遺伝子: 水銀耐性細菌と耐性遺伝子のグローバルな分散、日本生態学会誌、Vol. 57, No. 3, PP. 390-397 (2007)

Mei-Fang Chien, Chei-Chen Huang, Tomonobu Kusano and Ginro Endo: Facilities for transcription and mobility of an exon-less bacterial group II intron nested in transposon Tn*MER11*, Gene, No. 408, pp. 167-171 (2008)

Chen-Yi Chen, Ju-Ling Hsieh, Simon Silver, Ginro Endo, Chei-Chen Huang: Interaction between two MerR regulator/promoter region in the mercury resistance module of *Bacillus megaterium*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Vol. 72, pp. 2403-2410 (2008)

Mei-Fang Chien, Saeko Tosa, Cieh-chen Huang and Ginro Endo: Splicing of a bacterial group II intron from *Bacillus megaterium* is independent of intron-encoded protein, Microbes and Environments, Vol 24, No. 1, pp. 28- 32 (2009)

Ju-Liang Hsieh, Ching-Yi Chen, Meng-Hsuen Chiu, Mei-Fang Chien, Jo-Shu Chang, Ginro Endo and Chieh-Chen Huang: Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals, J. Hazardous Materials, Vol.161, No. 2/3, pp.920–925 (2009)

(doi:10.1016/j.jhazmat.2008.04.079)

Mei-Fang Chien, Masaru Narita, Kuo-Hsing Lin, Kazuaki Matsui, Chieh-Chen Huang and Ginro Endo: Organomercurials removal by heterogeneous *merB* genes harboring bacterial strains, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.110, No. 1, pp.94–98 (2010)

(doi:10.1016/j.jbiosc.2010.01.010)

Mei-Fang Chien, Kao-Hung Lin, Juu-En Chang, Chieh-Chen Huang, Ginro Endo, and Satoru Suzuki: Distribution of mercury resistance determinants in highly mercury polluted area of Taiwan, Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry, Vol.3, pp. 31–36 (2010)

Mei-Fang Chien, Ryo Nakahata, Tetsuya Ono, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo: Mercury removal and recovery by immobilized mercury reducing bacterium *Bacillus megaterium* MB1, Frontiers of Chemical Science and Engineering, in press (2012)

Ganiyu Oladunjoye Oyetibo, Shakirat Titilayo Ishola, Wakako Ikeda-Ohtsubo, Keisuke Miyauchi, Matthew Olusoji Ilori, Ginro Endo: Mercury-bioremoval by *Yarrowia* strains isolated from sediments of mercury polluted estuarine water, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 99, No. 8, 3615–3657 (doi: 10.1007/s00253-014-6279-1) (2014)

Kazuaki Matsui, Satoshi Yoshinami, Masaru Narita, Mei-Fang Chien, Le T. Phung, Simon Silver, Ginro Endo: Mercury resistance transposons in Bacilli strains from different geographical regions, FEMS Microbiology Letters, Vol.363, No.5, (2016)

(doi:10.1093/fems/lnw013)

Ganiyu Oladunjoye Oyetibo, Keisuke Miyauchi, Hitoshi Suzuki, Satoru Ishikawa, Ginro Endo: Extracellular Mercury Sequestration by Exopolymeric Substances produced by *Yarrowia* spp.: Thermodynamics, Equilibria, and Kinetics Studies, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.122, No.6, 701–707 (2016)

(doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.05.009)

Ganiyu Oladunjoye Oyetibo, Keisuke Miyauchi, Hitoshi Suzuki, Ginro Endo: Mercury Removal during Growth of Mercury Tolerant and Self-Aggregating *Yarrowia* spp., Applied Microbiology and Biotechnology Express, Vol.6, No.1, 1–12 (2016)

(doi: 10.1186/s13568-016-0271-3)

Ganiyu Oladunjoye Oyetibo, Keisuke Miyauchi, Yi Huang, Mei-Fang Chien, Matthew Olusoji Ilori, Olukayode Oladipo Amund, Ginro Endo: Biotechnological Remedies for the Estuarine Environment Polluted with Heavy Metals and Persistent Organic Pollutants, International Biodeterioration & Biodegradation, No. 119, 614–625 (2016) (doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.005)

Ganiyu Oladunjoye Oyetibo, Mei-Fang Chien, Wakako Ikeda-Ohtsubo, Hitoshi Suzuki, Oluwafemi Sunday Obayori, Sunday Adekunle Adebuseye, Matthew Olusoji Ilori, Olukayode Oladipo Amund, Ginro Endo: Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek, International Biodeterioration & Biodegradation No. 120, 143-151 (2017) (doi.10.1016/j.ibiod.2017.02.021)