

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：31302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651038

研究課題名（和文） 世界において二度と水俣病を起こさないための水銀汚染の原位置生物
浄化技術の開発研究課題名（英文） Development of in situ bioremediation technology to prevent
repetition of Minamata disease in the world

研究代表者

遠藤 銀朗 (ENDO GINROU)

東北学院大学 工学部 教授

研究者番号：80194033

研究成果の概要（和文）：

本研究では、水銀で汚染された土壌試料を用いて、水銀耐性細菌が保有すると考えられる水銀耐性遺伝子のうち、水銀イオン還元酵素遺伝子である *merA* 遺伝子群の解析を行った。次に、遺伝子水平伝播による微生物間の水銀除去能の拡散をメーティング実験によって直接検証し、水銀耐性を示したコロニーを得た。しかし、水銀入りの液体培地に植え継いでも増殖は見られなかった。したがって、水銀除去遺伝子の水平伝播においては、何らかの水平伝達媒体が必要とされることが知られた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed *merA* genes from the soil sample of a mercury contaminated site. The result showed that there is big diversity between *merA* genes. Second study was conducted to wide range of *merA* gene analysis. The results showed that there are many new *merA* genes in the mercury contaminated soil sample. In the final stage of this research, direct interspecies gene transfer was investigated by using filter-mating method and sandwich-mating method. The mercury resistant and tetracycline resistant bacterial colonies were observed on the culture plates. However, those resistant bacteria were not stable in the liquid culture. From these results, it was concluded that interspecies gene transfer of mercury resistance gene needs special vectors for the horizontal gene transfer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	210,000	3,010,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術

1. 研究開始当初の背景

水銀による広範囲な環境汚染とそれによ

る健康被害は、わが国においては「水俣病」として出現しきわめて甚大な公害問題を引

き起こした。この水銀中毒による環境問題はわが国では解決に近づき、少なくとも大規模な水銀環境汚染は埋め立て処分等により一応の安定した状態となり拡大が避けられる状況に至っている。しかしながら、世界的に見れば水俣病と同じ広範囲な環境汚染と健康被害が出現する可能性はむしろ高まってきている。特に、産業の工業化が近年著しく進行している発展途上国において、その出現リスクの高まりが明確に見られるようになり、将来重大な環境問題として出現することが高い確度で予測されている。このような状況の下で、世界において二度と水俣病を引き起こさないようにするためには、環境の水銀汚染を適切にかつ経済的に浄化する技術の開発と活用が必要とされている。

2. 研究の目的

環境中には、水俣病の原因物資である有機水銀等の水銀化合物を分解し金属水銀に変換する微生物が存在することが知られている。このような微生物を高度に活用して環境の水銀汚染を浄化するために、本科学研究費の交付を希望する期間において以下の研究に挑戦することを目的とした。

(1) これまで生物環境浄化技術として提案されることがなかった微生物遺伝子の自然伝播機能を、水銀による水域・土壌汚染の浄化に活用するための新規な環境保全と修復のための技術を確立すること。

(2) 自然界においてなされている環境浄化遺伝子の自然伝播の媒体および伝達のメカニズムについて科学的な解明を行うとともに、環境浄化遺伝子の自然伝播を利用した微生物の現場環境における育種（以下、これを「原位置分子育種」と呼ぶことにする）のための遺伝形質自然伝播の人為的促進法を提案すること。

(3) 水銀耐性遺伝子の環境中での伝達媒体および伝達メカニズムがどのようなものであるかを明らかにし、次に水銀によって汚染された環境の浄化に有用な遺伝子機能を原位置分子育種によって強化する技術を提案すること。

3. 研究の方法

以前の研究において、水銀により汚染された海底の深瀬と埋め立て処分工事をする前

の水俣湾から採取した底質サンプルから、有機水銀変換機能を有する水銀耐性細菌を分離し、その遺伝的形質を徹底的に解明した結果、染色体上に存在する水銀浄化遺伝子群を明らかにすることができた。さらに、このような水銀浄化遺伝子群は環境における遺伝子の水平伝達の媒体となるトランスポゾンや細菌性イントロンと併存していることを発見することができた。

本研究計画では、最近明らかにされた台湾台南市安順地区にある化学工場跡地の高濃度水銀汚染土壌および貯水池から水銀浄化細菌を分離することを試みた。さらに、その水銀浄化遺伝子群を解析し、水俣湾分離細菌の水銀浄化遺伝子群との比較を行い、水平伝播の可能性について調べた。次に、安順工場跡地における水銀汚染浄化遺伝子及び伝達性媒体の分布を明らかにし、水銀浄化遺伝子の水平伝播による土着微生物群集の水銀浄化機能の強化を目的とする新規な環境浄化技術の開発に挑戦した。

4. 研究成果

世界的に見れば広範囲な水銀の環境汚染による水俣病と同じような健康被害が出現する可能性は高まってきている。このような状況の下で、世界において二度と水俣病を引き起こさないようにするためには、環境の水銀汚染を適切にかつ経済的に浄化する技術の開発と活用が必要とされている。

平成 21 年度の研究においては、水銀で汚染された台湾台南市安順地区工場跡地から採集した土壌試料を用いて、水銀耐性細菌が保有すると考えられる水銀耐性遺伝子のうち、水銀イオン還元酵素遺伝子である *merA* 遺伝子群の解析を行った。その結果、*merA* 遺伝子には多様性があることが明らかになるとともに、その多様性は水銀汚染濃度が高いほど大きいことが明らかになった。また、水銀汚染経歴のある水俣湾海底砂サンプルから分離した細菌がトランスポゾン上に持つ有機水銀分解遺伝子の *merB* 遺伝子と、他の地域で分離された細菌がトランスポゾンおよびプラスミド上に持つ *merB* 遺伝子の各種有機水銀に対する分解活性の付与の違いを調べた。その結果、各細菌が持っている *merB* 遺伝子は有機水銀分子種ごとに異なる分解活性を示すなどの多様性があることが

知られた。

遺伝子転移媒体としてのトランスポゾン等については、保存水俣湾底泥試料について調べたが、水銀耐性オペロンを持つ複数のタイプのトランスポゾンの存在が確認され、それらトランスポゾンを介しての自然環境における遺伝子伝播の可能性が示唆された。

平成 22 年度の研究においては、汚染土壌中の水銀還元酵素遺伝子 *merA* に焦点を当て、この遺伝子の分布および多様性の状態を調べた。まず、土壌サンプルから DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型として、Firmicutes, β/γ -Proteobacteria, Actinobacteria, α -Proteobacteria の 4 つの微生物門または亜門が保有するそれぞれの *merA* に特異的なプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。次に、各プライマーセットで増幅された PCR 産物を配列決定し、決定した塩基配列を MerA 酵素のアミノ酸配列に置き換えてアライメント解析によって調べ、系統樹を作成した。その結果、既知の MerA 酵素と相同性が高いものが存在するとともに、新規の MerA 酵素も多く含まれており、MerA 酵素は多様であることが明らかになった。さらに、土壌サンプル中に存在する水銀耐性細菌の単離培養を、塩化水銀濃度が $0\ \mu\text{M}$, $25\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$ の条件下で行った。単離した水銀耐性細菌のゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の増幅及び塩基配列決定により、単離細菌の同定を行った。

平成 23 年度における研究においては、遺伝子水平伝播による微生物間の水銀除去能の拡散を、フィルターおよびサンドウィッチメーティング実験によって直接的に検証した。その結果、フィルターおよびサンドウィッチメーティング実験とも水銀耐性および Tc 耐性を示したコロニーが得られた。また、それらのコロニー出現頻度は、遺伝子供与細菌あたりそれぞれ 2.2×10^{-6} と 6.7×10^{-10} であった。しかし、これらの出現コロニーを Hg 及び Tc 入りの液体 LB 培地において植え継いでも増殖は見られなかった。したがって、最終的な水銀耐性形質の水平伝播を確認することはできなかった。一方、*Bacillus subtilis* RM125 株間で既知の接合伝達性プラスミド pLS20cat を用いた伝達実験を行ったところ、Cm 耐性および Tc 耐性を示すコロニーが得られ、その接合伝達頻度は 8.0×10^{-4} であっ

た。また転移した pLS20cat は受容菌株において遺伝形質を発現していることが確認できた。

これらの結果より、水銀化合物除去遺伝子の水平伝播においても、接合伝達性プラスミドやバクテリオファージ等の何らかの水平伝達媒体が必要とされることが知られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 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*, No.612, pp. 192-197 (2012)
(doi: 10.1007/s11705.012.1284.3)
- ② 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)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 簡梅芳、今野純平、宮内啓介、遠藤銀朗：芽胞形成水銀還元細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株を用いた固定化微生物による無機水銀溶液水銀除去と回収、2012 年度日本農芸化学会大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学、京都府京都市
- ② 大友俊介、簡梅芳、宮内啓介、遠藤銀朗：水銀耐性細菌が保有する水銀耐性遺伝子の水平伝播の直接的検証に関する研究、平成 23 年度土木学会東北支部技術研究発表会、2012 年 3 月 3 日、秋田大学手形キャンパス、秋田県秋田市
- ③ 今野純平、簡梅芳、宮内啓介、遠藤銀朗：生物学的水銀除去のための固定化微生物技術の階は津に関する研究、平成 23 年度土木学会東北支部技術研究発表会、2012

年3月3日、秋田大学手形キャンパス、
秋田県秋田市

- ④ 簡梅芳、今野大、今野純平、中畑涼、
宮内啓介、遠藤銀朗：芽胞形成水銀還
元細菌 *Bacillus megaterium* MB1 を用い
た水銀除去用固定化微生物の開発に関す
る研究、日本生物工学会 2011 年度大会、
2011 年 9 月 27 日、東京農工大学、小
金井キャンパス
- ⑤ G. Endo, M-F. Chien, K. Miyauchi, C-C.
Huang, M. Narita: Environmental
propagation of the bacterial mercury
resistance genes and its application to
mitigate environmental mercury
contamination, 10th International Conference
on Mercury as a Global Pollutant
(ICMGP-2011), 2011.07.29, Halifax World
Trade and Convention Centre, Halifax, Nova
Scotia, Canada
- ⑥ 簡梅芳、中畑涼、小野哲矢、宮内啓介、
遠藤銀朗：固定化した *Bacillus*
megaterium MB1 による水銀除去特性、
環境バイオテクノロジー学会 2011 年度
大会、2011 年 6 月 20 日、東京大学・弥
生講堂、東京
- ⑦ M-F. Chien, R. Nakahata, T. Ono, G. Endo:
Mercury Removal and Recovery by Gel
Immobilized Mercury Resistant Bacterium,
Bacillus megaterium MB1 and by Using
Fixed Bed Bioreactor, Asian Congress on
Biotechnology (ACB-2011), 2011.05.13,
Shanghai Everbright Convention &
Exhibition Center, Shanghai, China
- ⑧ 小山雅之、簡梅芳、宮内啓介、遠藤銀朗：
遺伝子解析法と培養法による水銀汚染土
壌環境中の水銀還元酵素遺伝子保有微生
物に関する研究、平成 22 年度土木学会東
北支部技術研究発表会、2011 年 3 月 5 日、
東北工業大学工学部、宮城県仙台市
- ⑨ 中畑涼、小野哲矢、簡梅芳、宮内啓介、
遠藤銀朗：生物学的水銀を除去・回収す
るバイオリアクターの開発に関する研究、
平成 22 年度土木学会東北支部技術研究
発表会、2011 年 3 月 5 日、東北工業大学
工学部、宮城県仙台市
- ⑩ 簡梅芳、石堂理英、棚木優子、小山雅之、
宮内啓介、張祖恩、遠藤銀朗：台湾の水
銀汚染間今日における水銀還元酵素遺伝
子 *merA* の分布と多様性に関する研究、
第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10

月 27-29 日、ワールドコンベンションサ
ミット、宮崎県宮崎市

- ⑪ Mei-Fang Chien, Hui-Tzu Lin,
Kuo-Hsing Lin, Ginro Endo,
Chieh-Chen Huang: Purification and
Function Analysis of a Broad-Spectrum
Organomercurial Lyase (MerB3) from
Mercury Resistance Transposon,
TnMERII, 14th International
Biotechnology Symposium,
2010.9.14-18, Palacongressi, Rimini,
Italy
- ⑫ 簡梅芳、石堂理英、棚木優子、宮内啓介、
遠藤銀朗：*merA* 遺伝子を標的とした水
銀汚染土壌における水銀耐性細菌の多様
性の解析、環境バイオテクノロジー学会
2010 年度大会、2010 年 6 月 21-22 日、
東北大学片平さくらホール、仙台市
- ⑬ G. Endo, M-F. Chien, M. Narita, C-C.
Huang: Characterization of *merB* Genes
Identified from Several Organomercury
Resistant Bacteria, 110th General Meeting of
American Society for Microbiology,
2010.5.23-27, San Diego Convention Center,
San Diego, USA
- ⑭ 石堂理英、棚木優子、大坪和香子、宮内
啓介、遠藤銀朗：*merA* 遺伝子を標的と
した水銀汚染土壌中に存在する水銀耐性
細菌の解析、平成 21 年度土木学会東北支
部技術研究発表会、2010 年 3 月 6 日、日
本大学工学部、福島県郡山市
- ⑮ 簡梅芳、宮内啓介、林高弘、鈴木聡、張
祖恩、遠藤銀朗：水銀汚染環境における
水銀分解遺伝子の分布、環境バイオテク
ノロジー学会 2009 年度大会、2009 年 6
月 23-24 日、東京大学弥生会館、東京都
- ⑯ M-F. Chien, M. Narita, F-F. Chen, K. Matsui,
C-C. Huang, G. Endo: A Novel
TnMERII-like transposon identified by
molecular characterization of mercury
resistance determinants and arsenic
resistance determinants, 109th General
Meeting of American Society for
Microbiology, 2009.5.18-22, Pennsylvania
Convention Center, Philadelphia, USA

【図書】(計 2 件)

- ① 遠藤銀朗 (共著)：メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収 (植田充美、池 道彦、監修)、シー・エム・シー

出版、2009, ISBN978-4-7813-0117-4

② 遠藤銀朗(共著):微生物学概論、培風館、
2010, ISBN978-4-563-07811-9

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 銀朗 (ENDO GINROU)
東北学院大学 工学部 教授
研究者番号: 80194033

(2) 研究分担者

宮内 啓介 (MIYAUCHI KEISUKE)
東北学院大学 工学部 准教授
研究者番号: 20324014

(3) 連携研究者

簡 梅芳 (KAN BAIHOU)
東北学院大学 工学総合研究所
客員研究員
研究者番号: 20533186