

好酸性鉄酸化細菌の有機水銀分解能の検討と水銀汚染土壌修復への応用

金尾 忠芳

岡山大学自然生命科学研究支援センター分析計測部門

はじめに

鉄酸化細菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) は二酸化炭素を同化し、二価鉄や還元型無機硫黄化合物を酸化してエネルギーを獲得する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は、硫化鉱石から銅やウランを溶出させるバクテリアリーチング技術において中心的な存在であり、低品位の鉱石からの金属回収に利用されている。また本菌は、一般の従属栄養細菌と比較して鉄や銅、さらに水銀などの重金属に対して強い抵抗性を示すことが知られている。本研究は、鉄酸化細菌の有機・無機水銀を気化する能力について検討し、この能力に関わる酵素や遺伝子などを分子生物学的、生化学的視点で解明することを目的とした。さらに本菌の持つこの様な能力を利用することにより、最も深刻な重金属環境汚染の一つである「水銀汚染環境の修復」についての可能性を検討することも目的とした。

地球上での水銀汚染は、南米アマゾン川流域での水銀アマルガム法による金の抽出作業後に生ずる汚染や、急激な経済発展を遂げている中国において特に深刻化している。環境中に放出された水銀は、気化して一時的に大気中に存在した後、土壌や河川水に溶解する。この際、多くの無機水銀は周囲の有機物と反応してメチル化（アルキル化）され、猛毒の有機水銀として環境中の生物に蓄積される。生物に蓄積された水銀は、食物連鎖を通して濃縮され、水俣病などの例が示すように人々の健康に甚大な被害をもたらす危険性が極めて高い。

水銀をはじめ多くの重金属は pH の低い酸性領域において溶出しやすく、鉄酸化細菌はこの酸性領域で良好に生育する好酸性細菌である。従って重金属の除去・回収に適していると考えられる。さらに本菌は、水銀還元酵素を有していることから、汚染土壌や汚泥から溶出した水銀 (Hg^{2+}) を還元して (Hg^0) 水銀気化回収を効果的に行うことができるかと期待されている。我々の研究グループでは、高い水銀耐性能を持つ鉄酸化細菌を自然界より選抜して単離を行った。さらに本菌株を高濃度水銀存在下で継代することにより、親株を凌駕する程の高い水銀耐性能を有する菌株を獲得することに成功し、これを *A. ferrooxidans* MON-1 株と名付けた。興味深いことに、本菌株は無機水銀だけでなく、猛毒である有機水銀に対しても抵抗性を持ち、有機水銀から水銀を脱離（無毒化）する organomercury lyase 活性の存在が示唆された¹⁾。この活性は従来、*Bacillus* や *Pseudomonas* など中性域で生育する一部の微生物より報告がなされており^{2),3)}、鉄酸化細菌の様な好酸性細菌からは報告されていない。従って、その様な酵素が鉄酸化細菌に存在すれば学術的観点からも非常に興味深いものである。また環境中に放出された水銀は、酸性条件下で容易にアルキル化され、猛毒となって生物に蓄積するため、鉄酸化細菌に見出された本酵素活性は、これまで限界があった酸性域における生物的な水銀汚染浄化に対して、新たなシステムを構築することが期待できる。

本研究は、鉄酸化細菌より organomercury lyase の活性の有無を検討し、その酵素と遺伝子の存在を追究すること、またこれと並行して鉄酸化細菌を用いた効率的な水銀汚染の浄化システムの可能性を探ることを目的に行われた。

【研究方法】

有機（無機）水銀気化活性の測定：有機水銀の分解活性（organomercury lyase 様活性）は鉄酸化細菌では報告が無く、その活性を測定する必要がある。従来、本酵素活性は ^{203}Hg でラベルした水銀や、有機物部分を HPLC 等で定量して測定を行うが、この様な方法では水銀の放射性廃棄物が出ることや HPLC という高価な装置が必要となる。この様な問題の解決策として、水銀還元酵素とカプリングした測定方法を考案した（後述）。先ずこの測定法に必要な水銀還元酵素遺伝子 *merA*⁴⁾ を鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* 23270 株全ゲノム配列データベース（URL:http://tigrblast.tigr.org/ufmg/index.cgi?database=a_ferrooxidanslseq）より相同性検索を行った。目的遺伝子を表1に示したのプライマーと *A. ferrooxidans* 23270 株から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い水銀還元酵素遺伝子 *merA* を特異的に増幅して単離した。単離した *merA* ORF を含む PCR 産物を鋳型として発現ベクター構築用プライマー（表1）を用いて再度 PCR を行い、得られた *merA* ORF を制限酵素処理し、同酵素で処理したプラスミド pET21a に組み込んで発現ベクター-pETmerA を構築した。シーケンスにより変異がないことを確認後、大腸菌 Tuner(DE3) に導入して MerA タンパク質を 1mM IPTG の存在下で大量発現させることにより獲得した。

表1：使用したプライマーの配列

Af.merA-Nf	5'-GTAGCTGAGCACATAGACACTTTGGAGGATATTATG-3'	
Af.merA-Cr	5'-GCCGCAACGGGACTCCTTTATCAATCCGTCTCAACC-3'	
Af.merAEx-Nf	5'-TTTGGATCCTCATATGACCGAGAACGCGCC-3'	下線部 <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I
Af.merAEx-Cr	5'-GGACTCCTTTATGAATTCGTCTCAACCCGC-3'	下線部 <i>Eco</i> RI

無機水銀の還元活性(MerA 活性)は、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 中に 0.1mM HgCl_2 , 0.2mM NADPH, および酵素溶液（菌体破碎液など）を添加して、水銀の還元に伴う NADPH の酸化による吸光度 340nm の減少を分光学的に測定する（連続的測定法）。またはトラップ剤を添加したリービヒ試験管を 50ml 容三角フラスコ内に設置し、上記と同様の反応液組成で総量を 10ml として反応を行い、管内のトラップ剤に吸着した水銀を定量する測定法（回分的測定法）を用いた。

organomercury lyase 活性測定: 有機水銀（フェニル酢酸水銀:PMA）を基質として 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) 中に 0.8 μ M 添加し、一定時間菌体抽出液と反応させた後、この反応液中に生成した Hg^{2+} を基質として MerA, NADPH を用いた分光学的方法、またはこれらによる還元気化された水銀を定量することで測定した。以下に反応の模式図を示す。

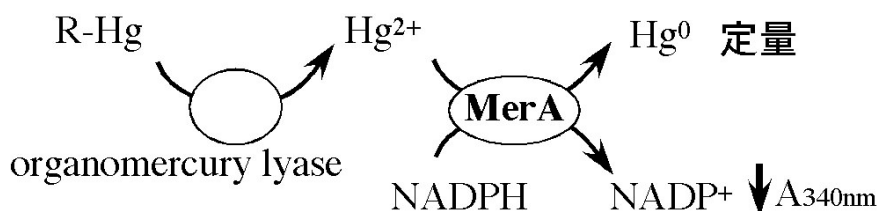


図 1. organomercury lyase の活性測定の模式図

organomercury lyase の生成物である Hg^{2+} を組み換え型 MerA とカプリングさせることで、連続的（NADPH の酸化に伴う $A_{340\text{nm}}$ の減少）および回分的（生成物の水銀を定量）に測定することができる。

【結果】

・鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* 由来水銀還元酵素遺伝子 (*merA*) のクローニング、及び大腸菌内での発現

データベースを利用して *A. ferrooxidans* 23270 株のゲノム解析を行った結果、水銀還元酵素遺伝子 *merA* と高い相同性を有する ORF を検索した。その結果、1641bp (547AA)、分子量 57448 のタンパク質をコードした MerA の一次配列に高い相同性を持つ遺伝子が検索された。この遺伝子を同菌株ゲノム DNA を鋳型として PCR 法を用いて単離し (図 2)、これをシーケンスした結果、目的の ORF の塩基配列に一致した。この DNA 断片を制限酵素で処理し、プラスミド pET21a の同 site に組み込むことで発現ベクター pETmerA を構築した。

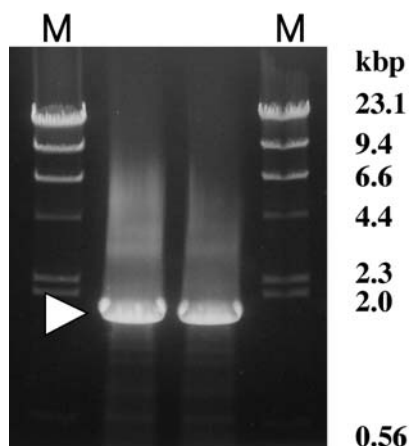


図 2. PCR により増幅した *merA* に高い相同性を持つ遺伝子断片。1.0% Agarose 電気泳動結果。

約 1.6kb の目的 DNA 断片の特異的な増幅さが観察された。増幅断片を図中△で示した。

M: サイズマーカー λ /HindIII, DNA の大きさを右側に kbp として示した。

これを用いてタンパク発現用宿主大腸菌 Tuner(DE3)を形質転換した。1mM IPTG により誘導発現した結果を図 3 および活性を表 2 に示す。

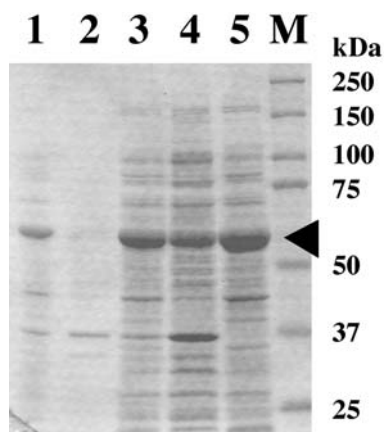


図 3. SDS-PAGE による *merA* 遺伝子の発現解析。

誘導発現した組み換え大腸菌から約 57kDa の目的タンパク質のバンドが確認された。図中▲で示した。

レーン 1, 誘導発現した大腸菌無細胞抽出液。

レーン 2, レーン 1 の不溶性画分。

レーン 3, レーン 1 の可溶性画分。

レーン 4, レーン 1 の超遠心沈殿 (膜) 画分。

レーン 5, レーン 1 の超遠心上清 (細胞質) 画分。

レーン M, タンパク質サイズマーカー。

サイズは右に示した。

10%ポリアクリルアミドゲルにて泳動。目的タンパク質は可溶性タンパク質として発現していた。

表 2. 各菌株の無細胞抽出液の水銀還元活性

	<i>E. coli</i> Tuner (DE3) pET21a	<i>E. coli</i> Tuner (DE3) pETmerA	<i>A. ferrooxidans</i> MON-1
比活性 (U/mg)	0.001	2.58	0.45

※ 1U は 1 分間に $1\mu\text{mol}$ の Hg^{2+} を還元する酵素量と定義した。

・鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* MON-1 株の無細胞抽出液中の有機水銀分解活性の検出

高度水銀耐性菌株である MON-1 株は有機水銀の存在下でも生育が可能であり、これを分解する organomercury lyase の存在が示唆された。鉄酸化細菌で本酵素活性は報告が無く、またゲノム解析を行った結果からは、従来本酵素をコードする遺伝子 (*merB*) に相当する ORF の存在は認められなかった。従って、本菌株は MerB とは異なる新規な organomercury lyase 様活性タンパク質を有するか、何らかの別の有機水銀耐性機構を備えていることが考えられた。

そこで先ず、本菌株の無細胞抽出液より organomercury lyase 様活性を、組み換え型 MerA とカプリングさせた方法にて検出することを試みた。結果を以下に示す。

表 3. 各菌株の無細胞抽出液による有機水銀 (PMA) からの水銀気化活性

	Recombinant MerA のみ	<i>A. ferrooxidans</i> MON-1 のみ	MON-1 抽出液+Rec.MerA
比活性 (U/mg)	0.032	0.052	0.229

※ 1U は 1 分間に 1 μ mol の Hg を気化する酵素量と定義した。

表 3. より *A. ferrooxidans* MON-1 株の無細胞抽出液に、組み換え大腸菌によって過剰発現させた MerA を添加した反応液からは、コントロールと比較して明らかな有機水銀からの水銀気化活性が検出された。表には示さなかったが組み換え型の MerA に 100 $^{\circ}$ C, 10min 煮沸変性させた MON-1 株の無細胞抽出液を添加した場合にも 0.029 (U/mg) の気化活性が検出されており、何らかの非酵素的な PMA の分解があったものと考えられる。MON-1 の無細胞抽出液のみで検出される水銀気化活性は、本来細胞中に存在する MerA によるものと考えられた。

・電気的二価鉄再生法による鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* の高密度培養の試み

organomercury lyase 様活性の本体を明らかにするためには、本酵素活性を追跡することで精製する必要がある。このためには、必要十分量の菌体収量を獲得することが必須となる。しかしながら MON-1 株は通常の鉄酸化細菌と比較しても極端に生育収量が低いために、精製は極めて困難であることが容易に予想された。

A. ferrooxidans は独立栄養性故に概して生育が遅く、また通常の培養法では生育収量も低い。通常の回分培養では、菌体が二価鉄をエネルギー源として代謝した後に蓄積する高濃度の三価鉄によって生育阻害を受けることが知られている。従って、代謝された三価鉄を電氣的に二価鉄に還元して再生する培養方法が検討された。Blake らによって考案された本菌の電気培養法⁵⁾は、大村・松本らによって改良され、高密度培養が可能であることが示された^{6),7)}。電気培養の模式図を図 4 に示した。

これらの報告を受け、MON-1 株の高密度培養と高い菌体収量を得るべく、電気培養装置の開発を行った。現在、以下の写真に示すような装置を作成し、培養を試みている。今後、詳細な条件の検討および培養の最適化を図らなければならない。

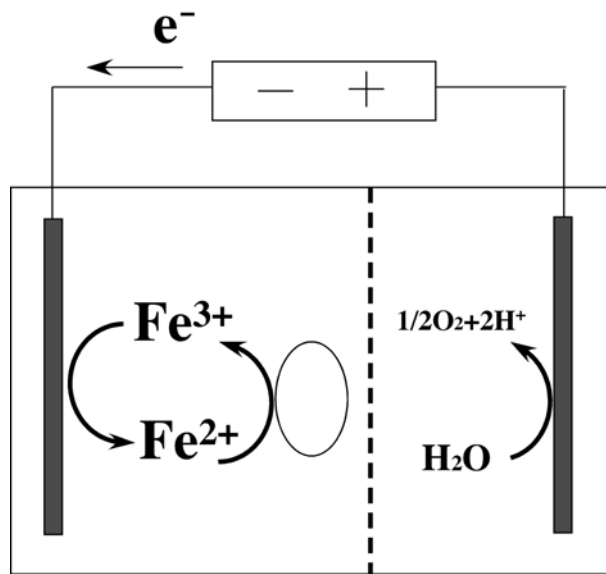


図 4. 電気培養の模式図

培養槽と電解槽をイオン交換膜(図中の点線)で仕切ることにより、電気的に三価鉄を還元して二価鉄を再生する。

再生した二価鉄は菌体(図中の楕円)によって再酸化され、菌体の増殖エネルギーとなる。これにより、菌体の高密度培養が可能となる。

我々は、培養槽内にイオン交換膜で仕切った小型の電解槽を設置する方式で電気培養装置を作成した。電極には炭素板を利用し、それを介する導線には酸性条件下でも安定な白金線を用いた。写真を以下に示す。

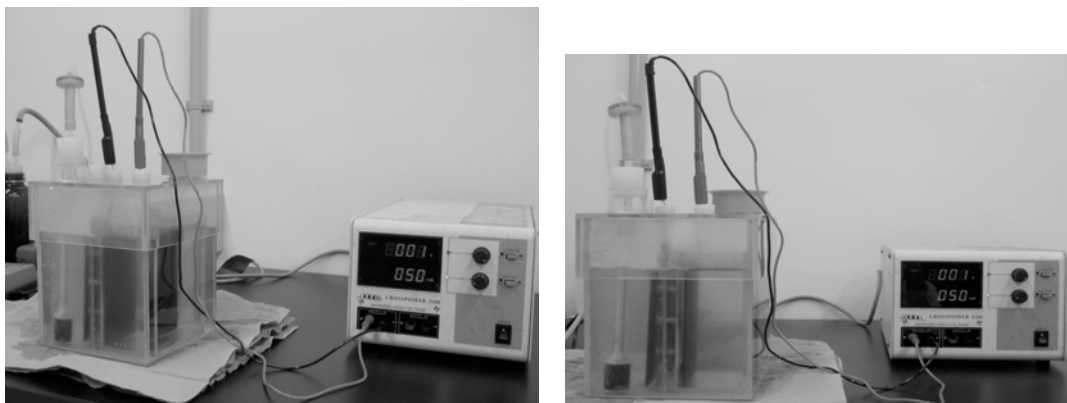


図 5. 電気培養装置と培養の様子(側面から:左図 と 正面から:右図)

【考察および今後の指針】

本研究課題において、鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* に存在する水銀還元酵素(水銀気化酵素) MerA を、組み換え大腸菌により活性型タンパク質として大量に調製出来ることが分かった。また、この組み換え型 MerA を利用したカップリング反応により、従来測定が困難であった organomercury lyase 活性の簡便な測定を可能にし、これまで報告されていない鉄酸化細菌の有機水銀分解能について新たな知見を得ることが出来た。つまり、高度水銀耐性能を獲得した鉄酸化細菌 MON-1 株の無細胞抽出液中には有機水銀から水銀を脱離する活性があり、組み換え型 MerA および NADPH の存在下で水銀を気化回収することが出来た。しかしながら *A. ferrooxidans* 23270 株のゲノム配列中には従来報告のある organomercury lyase をコードした遺伝子 merB の orthologue は検索できなかった。

このことは、*A. ferrooxidans* MON-1 株に見いだされた本活性が新規な機能未知遺伝子にコードされているか、あるいは別の既知遺伝子に似た配列を持っているが実際にはこの様な活性を示すものであるという可能性が考えられる。いずれの場合でも、先ずは MON-1 株より本酵素を精製することで、その本体を突きとめる必要がある。MON-1 株は通常の培養法では、培養液 10 リットルに対し 0.1g の菌体収量しか得られず、極端に生育が悪い。十分な菌体収量を得ることが精製する上での必須条件であり、我々は電気培養による MON-1 株の高密度培養を試みた。現在、培養装置を作成し、電気培養を開始したが、培地成分、植菌量、通気量、通電量、イオン交換膜による完全な隔離など改良すべき点も多く、高密度培養の最適化に向けた更なる試みが必要である。

本研究においては、有機水銀分解活性を簡便に測定する活性測定法の開発と、従来報告の無かった鉄酸化細菌の有機水銀分解能について、この活性測定法を利用して明らかにすることができた点に大きな意義があった。更に高密度電気培養についても取り組むきっかけを得ることが出来た。

MON-1 株の高密度電気培養を可能にすれば organomercury lyase 様活性を持つタンパク質の本体を突きとめることのみならず、酸性領域で生育する本菌の新たな酵素の働きについて情報を提供できるため、学術的にも大きな貢献が期待できる。さらに、鉄酸化細菌の有機水銀分解能について得られる知見は、酸性土壌や汚泥に蓄積する有機水銀の無毒化と、水銀の回収・浄化システムについて新たな展開を与えるものであり、高密度培養した大量の菌体を投与、あるいは固定化菌体を利用するなどして従来よりも高効率なシステムの開発が期待できる。

現在、水銀汚染の除去・回収は、主に燃焼による加熱処理（800~1000℃）や硫化鉄を混合した加熱処理（300~600℃）で実施されている。鉄酸化細菌を利用した生物的水銀汚染の除去・回収は、常温で行うため省エネルギー技術としても有望であり、二酸化炭素排出削減などの環境・エネルギー問題にも大きく貢献できる技術に発展していくものと期待する。

謝辞

本研究を推進するにあたり、資金面でのご支援を頂きました「公益信託エスぺック地球環境研究・技術基金」に深く感謝の意を表します。また鉄酸化細菌の電気培養法についてご助言下さいました財団法人電力中央研究所の大村直也博士、松本伯夫博士に感謝致します。水銀の定量などの分析・測定および水銀廃液処理を行って下さった岡山大学環境管理センター竹内文章助教授ならびに実験協力者の中村壮作氏に感謝致します。

【参考文献】

- 1) Takeuchi F, Negishi A, Nakamura S, Kanao T, Kamimura K, Sugio T.
Existence of an iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* resistant to organomercurial compounds.
J Biosci Bioeng. (2005) 99: 586-591.

- 2) Huang CC, Narita M, Yamagata T, Endo G.
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. (1999) 239: 361-366.

- 3) Kiyono M, Omura T, Fujimori H, Pan-Hou H.
Organomercurial resistance determinants in *Pseudomonas* K-62 are present on two plasmids.
Arch Microbiol. (1995) 163: 242-247.

- 4) Inoue C, Sugawara K, Shiratori T, Kusano T, Kitagawa Y.
Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase.
Gene. (1989) 84: 47-54.

- 5) Blake RC II, Howard GT, McGinness S.
Enhanced yields of iron-oxidizing bacteria by in situ electrochemical reduction of soluble iron in the growth medium. *Appl Environ Microbiol* (1994) 60: 2704-2710

- 6) Matsumoto N, Nakasono S, Ohmura N, Saiki H.
Extension of logarithmic growth of *Thiobacillus ferrooxidans* by potential controlled electrochemical reduction of Fe(III).
Biotechnol Bioeng. (1999) 64: 716-721.

- 7) Matsumoto N, Yoshinaga H, Ohmura N, Ando A, Saiki H.
Numerical simulation for electrochemical cultivation of iron oxidizing bacteria.
Biotechnol Bioeng. (2002) 78: 17-23.