

水銀耐性遺伝子の水銀浄化への利用

芳生 秀光

Application of Mercury-resistant Genes in Bioremediation of Mercurials in Environments

Hidemitsu PAN-HOU

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1 Nagaotogecho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

(Received May 1, 2010)

Mercury and its organic compounds, especially methylmercury are extremely hazardous pollutants that have been released into the environment in substantial quantities by natural events and anthropogenic activities. Due to the acute toxicity of these contaminants, there is an urgent need to develop an effective and affordable technology to remove them from the environments. Recently, attempts have been made to utilize bacterial *mer* operon-mediated reduction and volatilization of mercurials for environmental remediation of mercury pollution. However, application of this technology to the treatment of mercury-contaminated environments has been limited by social concerns about the release of volatile mercury that will become part of the local mercury cycle and repollute the environment again, into the ambient air. To improve this environmental problem, a new mercury scavenging mechanism that could be expressed in living cells and accumulates mercury from contaminated site without releasing mercury vapor is necessitated. To construct a new biocatalyst that is capable of specifically accumulating mercury from contaminated sites without releasing mercury vapor, we have genetically engineered bacteria and tobacco plant for removal of mercury from wastewater and soils, respectively, to express a mercury transport system and organomercurial lyase enzyme simultaneously, and overexpress polyphosphate, a chelator of divalent metals. The applicability of these new engineered biocatalysts in the environmental remediation of mercurials is evaluated and discussed in this review.

Key words—mercury pollution; polyphosphate kinase gene (*ppk*); *merT*; *merB*; transgenic tobacco; bioremediation

1. はじめに

水銀及びその化合物は、極めて有用な化学的、物理的性質を持つため、古くから人類によって様々な形（化学触媒、防腐剤、抗スピロヘータ剤や農薬など）で利用されてきた。社会の近代化に伴い水銀の産業用途は拡大し、多量の水銀化合物が使用されるようになったが、現在では当然のことである環境汚染や健康障害に及ぼす影響には長い間注意が払われず、今なお解決すべき大きな社会的課題として残されている。

1932年から1971年までの間にアセトアルデヒド製造工場から水俣湾周辺に投棄した水銀量はおよそ

80トンに及んだと推定されている。¹⁻³⁾ その結果、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。また、戦後間もない1953年頃に、食糧増産の至上命題のもとで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酢酸フェニル水銀農薬の使用が認められてから、水銀農薬の使用量は飛躍的に増加した。1968年にその使用が中止されるまでの16年間、約2300トンの酢酸フェニル水銀農薬が狭い国土に無制限に散布された。⁴⁾ このような水銀化合物による環境汚染は国内のみならず国外でも大きな社会問題となっている。中国貴州省貴陽市で1971年から2000年までの約30年間に約130トンに及ぶ水銀化合物が投棄された。⁵⁾ 中国以外にもブラジル、ロシア、タンザニアや東南アジア地区などでは金の採掘・工場排水等による高濃度の水銀化合物による環境汚染が依然として進行しており、わが国の

摂南大学薬学部（〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1）

現住所：〒299-0261 千葉県袖ヶ浦市福王台 1-2-4

e-mail: hm-md-hou@tj8.so-net.ne.jp

本総説は、平成21年度退職にあたり、在職中の業績を中心に記述されたものである。

悲劇が繰り返されようとしている。

以上のように国内外を問わず、水銀農薬の濫用あるいは化学工業で使われた水銀化合物の廃棄、漏出により土壌、河川などの生活環境が汚染された地区は多数存在する。水俣湾内で高濃度の水銀により汚染されたヘドロは、その後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。

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は厳しく規制されている。そのため、特定の場所で大量に水銀が使用・廃棄されるということはほとんどない。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、個々の製品や機器において使用されている水銀化合物は微量ではあるが、総量としては無視できない水銀化合物が持続的に環境に排出され続けている。現在、わが国や先進国における水銀化合物の汚染問題は、既に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段階へと進んできている。微量水銀の除去方法にはいろいろな試みがなされているが、目下のところ有効な方法は開発されていない。現状では、生活環境に蓄積された水銀化合物の量は少しずつ増加し、低濃度ながらもその汚染が広範囲に及んでいる。このような状態をそのまま放置すると、水銀化合物による環境汚染はさらに拡大することは容易に予測される。その結果、水俣や新潟において日本人のみが経験した、長く辛い苦しみを世界各地で再び経験するのではないかと危惧される。環境に放出される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る。筆者は、微量の水銀化合物による汚染環境の修復ができ、かつ環境に優しく、安全・安価な水銀浄化・回収法の開発を目指して研究を続けてきた。

本稿では、まず、*Pseudomonas* K-62 の水銀耐性遺伝子の解析結果について簡単に紹介する。次に、本菌株の持つ水銀耐性遺伝子を利用した水銀化合物の浄化技術の開発について筆者がこれまで行った研究及びその成果を中心に紹介する。

2. *Pseudomonas* K-62 の水銀耐性遺伝子の解析

水銀化合物は生体成分、特にタンパク質のSH基に強い親和性を持つために微生物に対して強い殺菌作用を示す。水俣湾などのある特定の環境においては、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微生物が存在している。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三十数年の間にほぼ解明されてきた。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、⁶⁾ 2) 微生物から産生した硫化水素と水銀化合物との反応、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、⁷⁾ 3) 菌体内での水銀化合物のメチル化反応による耐性獲得、⁸⁻¹⁰⁾ 4) 菌体内での水銀化合物の還元・気化反応による耐性獲得¹¹⁻¹⁵⁾ 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みられる現象である。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みられる水銀耐性獲得機序である。

Pseudomonas K-62 は、外村らにより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。^{15,16)} 本菌株は無機水銀のみならず、メチル水銀を始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も通常の細菌の数千倍の耐性を有している (Table 1)。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) 及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2つの酵素系の関与により獲得されていることが

Table 1. MIC of Mercurials for Bacteria

Bacterial strain	Mercurials ($\mu\text{g/ml}$)	
	MC	PMA
<i>Pseudomonas</i> K-62	450	120
<i>Serratia mercerscens</i> (pDU1358)	12	6
<i>Escherichia coli</i> (Tn21)	35	0.2
<i>Escherichia coli</i>	0.1	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.1	0.1
<i>Bacillus subtilis</i>	0.1	0.05

MIC; Minimum inhibitory concentration, MC; Mercuric chloride, PMA; Phenylmercuric acetate.

外村の研究グループにより明らかにされた。¹⁷⁻²²⁾

その後 30 数年の間に多種類の水銀耐性菌が次々に単離され、これらの微生物の水銀耐性機構に係わる遺伝子の解析が活発に行われるようになった。その結果、微生物の示す水銀耐性の多くはプラスミド又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。¹¹⁻¹⁵⁾ *mer operon* の構造は微生物種や水銀化合物種に対する耐性の相違によって多少の違いがある。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* 及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*、水銀イオンを金属水銀へ変換する働きを持つ水銀還元酵素遺伝子 *merA* 及び *mer operon* の発現を制御すると考えられている *merD* などの遺伝子から構成される。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上記の遺伝子構造に加えて、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。^{11-14,23-26)} この共通した遺伝子のほかに、メチル水銀及び無機水銀の膜輸送に関与すると考えられている *merE*、²⁷⁻²⁹⁾ 無機水銀の膜輸送に関与すると考えられている *merC*、³⁰⁻³²⁾ *merF*^{33,34)} 及びペリプラズムでフェニル水銀の取り込み制御に関与すると考えられている *merG*³⁵⁾ などの遺伝子は、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 (Fig. 1)。

Pseudomonas K-62 の水銀耐性獲得の生化学的機序は、いち早く詳細に研究解明されているにもかかわらず、その遺伝学的研究は 1990 年までに全く行われていなかった。筆者らの研究により本菌株は 6 本のプラスミド (82, 68, 56, 31, 26 及び 8.5-kb) を保有しており、そのうちの 26-kb (pMR26) 及び 68-kb (pMR68) のプラスミドが本菌株の水銀耐性に関与していることが判明した (Fig. 2)。²⁷⁾ また、pMR26 上に *merR*-o/p-*merT*-*merP*-*merA*-*merG*-*merB1*-*merR*-o/p-*merB2*-*merD* から構成された有機水銀化合物の分解を司る 2 組の *mer operon* が存在することを明らかにした。^{24,25)} さらに、それらの遺伝子の機能について調べ、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・輸送にも関与しているが、メチル水銀の取り込み・輸送には関与しないことを初めて明らかにした。³⁶⁻³⁸⁾

さらに、pMR26 上にフェニル水銀の分解と還元反応に関与しないが、フェニル水銀耐性獲得に関与する新規遺伝子の存在が確認され、筆者らはこの新規遺伝子を *merG* と名付けた。³⁵⁾ *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みられないが、フェニル水銀に対しては著しく高いことが判明した。³⁵⁾ 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。その他の遺伝子は既報の遺伝



Fig. 1. Schematic Representation of Bacterial *mer* Operons

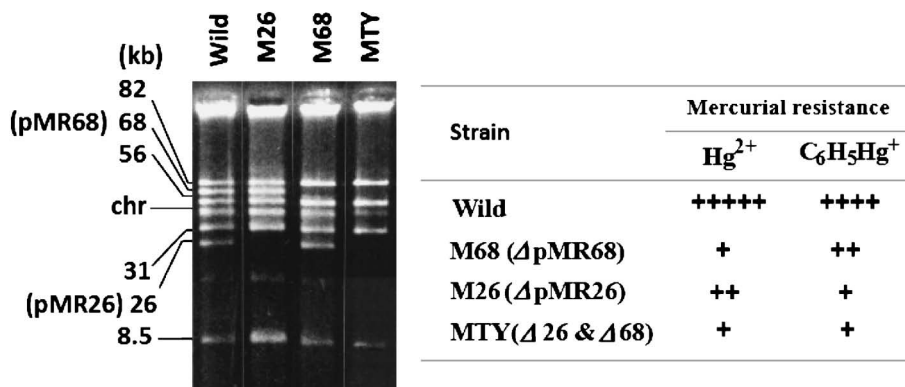


Fig. 2. Mercury Resistance of Plasmid-defective Strain Isolated from *Pseudomonas* K-62

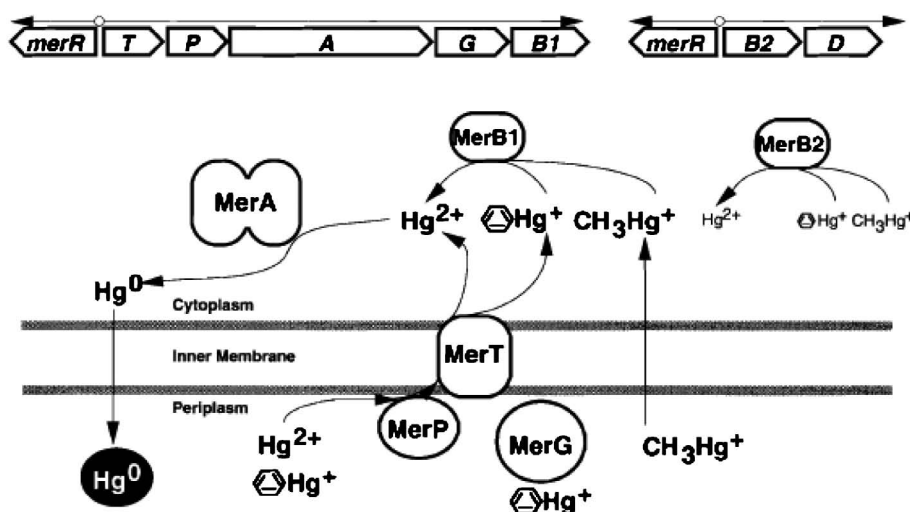


Fig. 3. Mercury Resistance Systems Encoded by *Pseudomonas* K-62's pMR26

子とほぼ同じ機能を示していることが確認された。

以上のように pMR26 の *mer* operon 上の水銀耐性遺伝子の数またその配列順序は、ほかの水銀耐性菌の持つ *mer* operon の構造と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* 遺伝子は複数存在することも明らかにされた。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れた結果ではないかと考えられる。*Pseudomonas* K-62 の有機水銀耐性は、未解析の pMR68 上の水銀耐性遺伝子に加えて pMR26 上の 2 つの有機水銀分解酵素遺伝子 (*merB1*, *merB2*) と 1 つのフェニル水銀の取り込み抑制遺伝子 (*merG*) などを有し、多数の遺伝子の制御によって獲得していると推測される (Fig. 3)。

3. 水銀汚染浄化法

3-1. 物理化学的浄化法 現在、一般に広く利用されている無機水銀廃水の浄化処理方法は硫化物凝集沈殿法である。すなわち、水銀化合物を含む排水に硫化ナトリウムを添加することにより水銀化合物を極めて難溶性である硫化水銀として凝集沈殿させ回収する方法である。この方法では pH と S²⁻ 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 の上昇に伴って多硫化水銀が生成し、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化合物を環境基準値以下にまで浄化処理することは極めて難しい。その上、後処理を必要とする場合が多い。

硫化物凝集沈殿法のほかには、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。^{1,39,40)} 活性炭は一般に界面活性のある疎水性の大きい物質をよく吸着する性質を持ち、疎水性の金属水銀を吸着する。そのため、蒸気や微粒状の水銀は活性炭に吸着する。また、塩化第二水銀や酢酸フェニル水銀もよく吸着できることが知られている。活性炭による水銀化合物の除去は、ppm レベル以上の比較的高濃度の水銀化合物に対して有効であるが、ppb レベルの低濃度水銀化合物に対する除去効率は極めて悪い。さらに、活性炭は水銀化合物以外の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。

現在最も一般的に用いられている排水に含まれる水銀化合物の除去法は、強塩基性陰イオン交換樹脂を用いるイオン交換法である。この場合、水銀は陰イオン錯体として樹脂に吸着除去されるので、まず水銀錯アニオンを形成させることが必要となる。この錯アニオンを形成し易いのが無機水銀イオンであり、イオン交換法は無機水銀イオンの除去に強い効果を発揮する。しかし、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。

以上述べた物理化学的処理法を用いて水銀化合物を環境基準値以下にまで処理することは困難であり、加えて各種処理条件の設定や処理能力の問題、また、吸着体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環境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。これらの問題点を回避し、かつ経済的・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活性を利用した生物学的処理法が適していると考えられる。

3-2. 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、一般に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

実際に行われた。この技術は、汚染現場への特別な化学薬品の投入や特殊な反応条件の設定などの必要がなく、また、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にまで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。

このように、生物学的浄化法は安全性あるいは経済的な観点からも極めて魅力的な方法である。水銀のバイオレメディエーション技術は大きく分けて2つに分類される。1つは水銀のバイオボラタイゼーション、もう1つは水銀のバイオアキュミュレーションに基づく方法である。

3-2-1. 水銀のバイオボラタイゼーション 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。水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 は、菌体内に取り込まれた水銀化合物を毒性の低い金属水銀 (Hg^0) に代謝し、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。この水銀還元・気化活性を持つ微生物は、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ほかに先駆けて、*Pseudomonas* K-62 の持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。⁴¹⁾ 本水銀耐性菌を用いて化学工業廃水中の水銀化合物の浄化試験を行ったところ、5-7時間の間に2.5 lの化学工業廃水から菌体湿重量1 gあたりに約15 mgの水銀化合物を除去できると報告している。この報告は、微生物の水銀耐性機序(水銀のバイオボラタイゼーション活性)をそのままの形で水銀浄化に利用した最初の実験であった。その後しばらくの間、これに関連する報告はなかった。しかし、1975年以後の微生物の水銀耐性遺伝子の解明が、その後の工場水銀廃水や水銀汚染環境の処理・浄化技術の開発に大きく貢献したことは事実である。例えば、Brunkeらは *merA* 遺伝子を持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 $\mu g/ml$ Hg^{2+} の廃液を流したところ、95%前後の無機水銀イオンが金属水銀の形でカラム中に捕集されたことを報告した。⁴²⁾ これ以後、無機水銀化合物の浄化に微生物の持つ水銀還元・気化活性を利用する試みは数多く報告された。⁴³⁻⁴⁸⁾ Wagner-Döblerの研

究グループは、馴化した *Pseudomonas* 菌の持つ水銀還元・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。^{45,47)}

しかし、水銀耐性微生物の持つ *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、再び拡散してほかの地域を汚染するという問題がある。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。⁴⁹⁻⁵²⁾ そのため、水銀還元活性に基づく水銀浄化法が開放系で使用された例は報告されていない。

3-2-2. 水銀のバイオアキュミュレーション法

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既に明らかにされている。一方、酵母や動物においては水銀化合物を無毒化するための別の機構が存在している。それらの細胞内では、金属イオンをキレートする働きのある生体物質が存在する。一般に金属化合物は遊離イオンの形として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。動物にカドミウムや水銀などの金属化合物を投与すると、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、Chen と Wilson はメタロチオネイン生合成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倍高くなることを見出した。⁵³⁾ また、2001年、Bae らはファイトケラチン生合成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ことを報告した。⁵⁴⁾ これらの水銀蓄積能を付与した遺伝子組換え微生物は、環境中の水銀浄化に利用できると考えられた。しかし、メタロチオネイン及びファイ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あると思われる。

4. ポリリン酸を利用した新規水銀浄化法の開発

4-1. 廃水中の水銀浄化に用いる微生物の分子育種

筆者らは前項の問題点を克服し、実用化可能な方法を目指して *merA* 遺伝子にコードされる水銀還元活性を利用しない、新規水銀バイオアキュミュレーションに基づく水銀浄化法の開発を試みた。

Pseudomonas K-62 の *mer operon* を利用して水銀浄化を行う際に水銀化合物を気化させることなく、菌体内に水銀を回収させる場合には、まず *merA* 及び *merG* を欠失した *mer operon* の再構築が必要であり、*merT-merP* により菌体内に取り込まれた水銀化合物をキレートし、その毒性を軽減できる生体分子の生合成能を遺伝子組換えにより付与する必要があると考えた。そこで、筆者らは生体内で Mg, Ca, Mn などの生体必須二価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、生体内でポリリン酸キナーゼの作用により、ATP のエネルギーを利用し、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。⁵⁵⁻⁵⁷⁾ ポリリン酸の生体内での役割についてはまだ不明な点が多いが、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ことが報告されている。⁴⁷⁻⁴⁹⁾ 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、二価の無機水銀はそれによって効率よくキレートされることが判明した。^{58,59)}

そこで *Pseudomonas* K-62 の *merR-o/p-merT-merP* の下流に *Klebsiella aerogenes* 由来のポリリン酸生合成を触媒するポリリン酸キナーゼ遺伝子 *ppk* を組換えたプラスミド pMK27 (*merR-o/p-merT-merP-ppk*) を作製し、大腸菌に形質転換した。その結果、pMK27 を持つ大腸菌は、*ppk* を持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。これに加えて菌体内の水銀蓄積量は対照菌に比べて約5倍増加した (Fig. 4)。⁵⁸⁾ これらの実験結果から、ポリリン酸が微生物に水銀耐性及び水銀蓄積能を付与することを初めて明らかにし、pMK27 は環境中の無機水銀の浄化・回収に利用できる考えた。

一方、水銀化合物に関しては、環境に放出された無機水銀の一部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、結果としてメチル水銀の形で環境に存在することが報告されている。⁶⁰⁻⁶²⁾ 自然環境中で生成されたメチル水銀、あるいは農薬として

使用されていたフェニル水銀などの有機水銀化合物による土壌、食品汚染及びそれによる人の健康影響は大きな社会問題となっている。これらの有機水銀化合物の浄化にもフォーカスを合わせなければならない。しかし、ポリリン酸は有機水銀をキレートする活性を持たないため、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。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、筆者らは pMR26 上に存在する有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を先に構築した pMK27 に組換えたプラスミド pMKB18 (*merR-o/p-merT-merP-merB-ppk*) を作製した。pMKB18 を持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 を持つ対照菌に比べて明らかに上昇した。また、pMKB18 を持つ大腸菌の菌体内水銀蓄積量は、ベクタープラスミドである pUC119 を持つ対照菌に比べ、無機水銀の場合では約 10 倍、フェニル水銀の場合では約 3 倍上昇した。⁵⁹⁾

以上の結果から、*merT-merP* にコードされる 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、菌体膜を通して取り込まれたメチル水銀及び MerT-MerP により菌体内に取り込まれたフェニル水銀は *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 (Fig. 5)。このように遺伝子工学の手法を用いて微生物に付与した水銀のバイオアキュミュレーション能力は廃水における水銀の浄化回収に利用可能であることが示唆された。しかし、実用化に向けては浄化後の

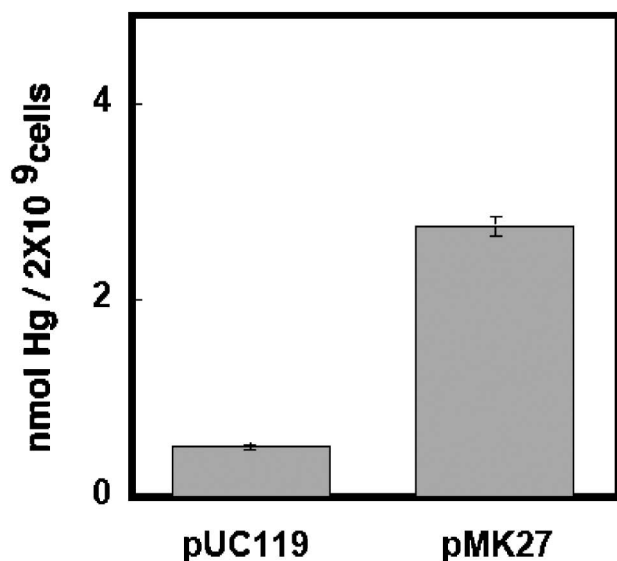


Fig. 4. Mercury Accumulation in *E. coli* with pMK27
The mercury accumulated in bacterial cells was determined after 24 h with 16 μM Hg²⁺. The values are the means of triplicate experiments.

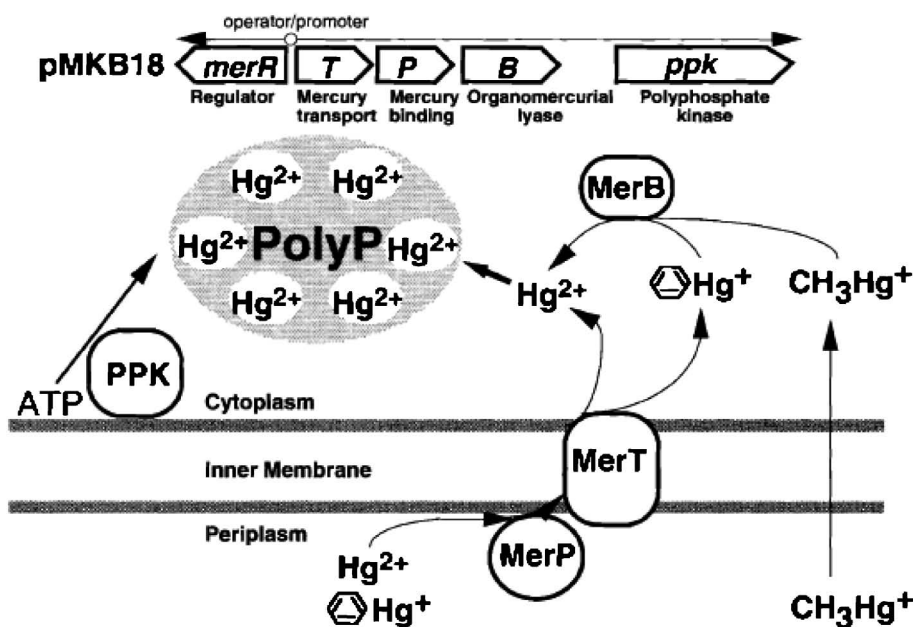


Fig. 5. A Schematic Model of the Mercury-removing System in *E. coli* with pMKB18

微生物の回収法、また本浄化微生物の実環境への適応性などの問題が残された。

そこで、浄化後の微生物の回収を容易にする目的で、浄化微生物をアルギン酸ナトリウムを用いて直径約 3–5 mm のビーズ状となるように固定化処理を施した。本固定化細胞を用いて Hg^{2+} 及び $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ の浄化活性を調べた結果、 $40\ \mu\text{M}$ までの Hg^{2+} 及び $20\ \mu\text{M}$ までの $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ を含む廃水に対して、いずれも短時間内にほぼ完全に浄化された。⁶³⁾ また、これより高濃度の水銀廃水に対しても浄化可能であり、その適用濃度範囲が広いことが判明した。本固定化細胞により回収・蓄積された Hg^{2+} 及び $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ (Hg^{2+} の形として蓄積) は、細胞乾燥重量 1 g 当たりそれぞれ約 890 及び 780 μmol であった。⁶³⁾ こ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 倍高い水銀キレート能を持っている。また、本固定化細胞は少なくとも 3 回、同じ濃度の水銀を含む廃水の浄化に再利用しても、その浄化活性がほぼ一定に保持されていた (Fig. 6)。さらに、低栄養条件下やほかの重金属存在下においても本固定化細胞の水銀浄化活性はほとんど影響を受けず一定であることが判明し、実験室排水や工業廃水中の水銀浄化に栄養を付与することなく利用できると確信している。このポリリン酸を生合成する水銀浄化微生物は、水銀化合物のみならず、環境を汚染して問題となっている Cd^{2+} などに対しても耐性を示すことからこれらの重金属の浄

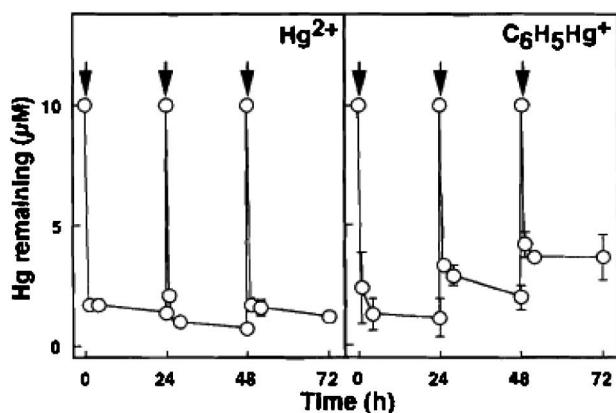


Fig. 6. Removal of Mercurials by Immobilized *E. coli* with pMKB18

After incubation with $10\ \mu\text{M}$ mercurial for indicated time, mercury remaining in the bead-free medium was determined. The values are means of triplicate experiments.

化・回収に利用可能であることが示唆された。⁶³⁾

以上の結果から、筆者らが構築した新しい生物学的水銀浄化法は、従来の *merA* を用いたバイオポラタイゼーション法と異なり、少なくとも浄化後の水銀が再び環境に拡散して環境を再汚染する懸念が少なく、また、固定化細胞を利用するため用いる微生物による生態系の汚染という懸念も少なく、開放系中の水銀浄化に利用し易いと考えられる。ポリリン酸は微生物に存在する生体成分の1つであり、最適条件下では菌体湿重量の 40% まで発現、蓄積することができる⁶⁴⁻⁶⁶⁾ この性質により、本浄化微生物がポリリン酸の基質である無機リンに起因する水の富栄養化の解消にも大きく寄与する可能性を秘めており、極めて斬新な生物学的水銀浄化法であると言える。しかし、本浄化系は廃水中の水銀化合物の浄化を目指して構築したものであり、土壌水銀のバイオレメディエーションを行う場合、浄化微生物の生育制御やバイオマスの回収が極めて困難であるなど、汚染土壌中の水銀浄化には利用し難い技術的な限界があった。

4-2. 土壌中の水銀浄化に用いる植物の分子育種

水銀による汚染土壌の浄化には多くの問題点があり、それを回避する最も有効な手段は水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物の創生だと思われる。

これまで水銀汚染土壌の浄化修復には浚渫、埋め立て、高温加熱処理及び土壌洗浄などの物理化学的処置方法が汎用されている。しかし、これらの施策には莫大な費用を必要とし、また、熱処理や化学薬品処理により土壌の本来の性質を損なうことに加え、ダイオキシンのような非意図的に有害な化学物質が産生される可能性があるため広範囲に及ぶ敷地や農業利用地への適用が困難である。そこで近年、水銀などの化学汚染物質の汚染浄化に植物を利用するファイトレメディエーション技術が注目されている。現在、水銀化合物のファイトレメディエーションに適するトランスジェニック植物の創生が次々試みられている。⁶⁷⁻⁷³⁾ その多くは土壌中の水銀化合物を根から吸収し植物体を経て、金属水銀として葉から大気中へ拡散させるものが主軸となっている。しかし、大気中に放出される金属水銀は再びほかの地域を汚染する懸念があるため実用化には至っていない。この問題点を解決するために水銀高蓄積植物の

分子育種が必要であると考えた。そこで筆者らは、水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物を創出すれば、ファイトレメディエーションの技術を用いて水銀汚染土壌の浄化及び本トランスジェニック植物体内からの水銀回収・リサイクルの両目的が同時に達成できると考えた。また、水銀汚染土壌の浄化は、将来的に実用化されてこそその研究に価値があると信じている。世界各地の汚染地域を想定した場合、栄養や水が不足した土壌でも容易に育ち、また、バイオマスが大きく高い浄化効率が期待できることが要求される。さらに考慮しなくてはならないこととして、遺伝子組換え植物を使用することの環境への影響がある。そのため、ニコチンを多く含有し、鳥などによる葉の捕食が少ないために食物連鎖の影響をほとんど受けることがないと考えられるタバコを植物体として選定した。

最初に、遺伝子工学技術を用いて多量かつ多数の二価金属をキレートする活性を持つポリリン酸の生合成酵素遺伝子 (*ppk*) を組換えた水銀高蓄積タバコの作出を試みた。細菌由来の *ppk* 遺伝子が菌体内及び植物細胞内に翻訳され易いように *ppk* 遺伝子の 5'末端に SD 配列 (AGAAGG) 及び PT 配列 (AACCACA) を付加した *ppk* 遺伝子断片を分子設計した。これらの配列を有する *ppk* 遺伝子断片を PCR 法により増幅した後、バイナリーベクター (pHM6) に組換えたプラスミド (pPKT116) を構築した。次に、植物に対して感染能を有する *Agrobacterium tumefaciens* を介して *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN (タバコ) のゲノムに *ppk* 遺伝子断片を導入した。得られた遺伝子組換えタバコの葉中に *ppk* 遺伝子の存在及び本遺伝子が植物体内で転写・翻訳されてポリリン酸キナーゼ (PPK) タンパク質として発現していることが PCR 法及び抗 PPK 抗体を用いた Western-Blotting 法により確認された。⁷³⁾ さらに、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色法を用いてポリリン酸を検出した結果、*ppk* 遺伝子組換えタバコの葉及び根でポリリン酸顆粒が多数検出された。これらのことから、組換えた *ppk* 遺伝子はタバコ細胞中でポリリン酸を生合成し得る活性型の PPK として翻訳されているものと考えられる。^{73,74)}

水銀の浄化に用いる植物は環境中の水銀化合物に対して耐性を示し、本来の植物と同様、成長するこ

とが必須条件である。そこで、*ppk* 遺伝子組換えタバコの水銀化合物に対する応答を調べた結果、本遺伝子組換えタバコは、野生株のタバコに比べて無機水銀に対して強い耐性を示した。^{73,74)} このことから、*ppk* 遺伝子組換えタバコに取り込まれた無機水銀は PPK により生合成されたポリリン酸によって、毒性の低いポリリン酸キレート体となっていると考えられる。次に、本遺伝子組換えタバコの水銀浄化・回収活性を調べた結果、水銀汚染モデル土壌中で野生株に比べて高い水銀浄化・回収蓄積能を示すことが判明した (Fig. 7)。

これは、植物内に取り込まれた無機水銀が毒性の低い水銀-ポリリン酸キレート体として植物細胞内に蓄積しているためと考えられる。以上の結果から、*ppk* 遺伝子がタバコに高い水銀耐性及び水銀蓄積性を付与したことが本研究により初めて明らかとなり、本遺伝子組換えタバコは水銀汚染土壌の浄化に利用し得ると考えた。

植物を利用した環境浄化のメリットとして、太陽エネルギーを利用するので従来の物理化学的処置方法に比べて低コストで浄化できる、また、原位置処理のため二次的な汚染リスクが少ないこと、さらに生態系に大きな負荷を与えることなく環境修復できることなどが挙げられる。一方、デメリットとして土壌燃焼法や溶媒抽出法など、従来のニーズ即応型の環境浄化法に比べると、浄化完了までに長い時間

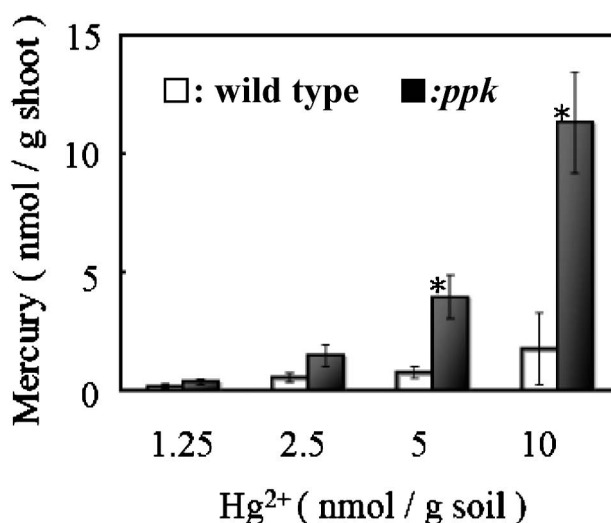


Fig. 7. Accumulation of Mercury in Transgenic Tobacco from Soil

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three determinations from three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. wild type.

を要することや汚染物質を完全に取り除くことができないことなどが挙げられる。なぜなら、植物は生育には不要な元素や有害な物質の吸収を抑制する防御機構を有しているからである。⁷⁵⁾ この防御機構を打破するため浄化対象物質の取り込み系の付与は1つの解決方法であると考えた。

そこで筆者らは、水銀高蓄積タバコ (*ppk* 遺伝子組換えタバコ) への水銀取り込み量を向上させる目的で水銀耐性菌 *Pseudomonas* K-62 由来の水銀輸送遺伝子 *merT*²⁴⁾ を *ppk* 遺伝子組換えタバコへの遺伝子導入を試みた。まず、タバコ体内で *merT* 遺伝子から転写・翻訳された MerT タンパク質の検出を容易にするために、*merT* 遺伝子の下流に、*myc-tag* 遺伝子を付加し、さらに *merT* 遺伝子が菌体内及び植物細胞内において転写・翻訳され易いように、*merT* 遺伝子の上流に SD 配列及び PT 配列を付加した *merT* 遺伝子断片を分子設計した。これらの配列を有する *merT* 遺伝子断片を先の場合と同様、バイナリーベクターに組換えた後 *A. tumefaciens* を介して *ppk* 遺伝子組換えたタバコのゲノムに導入した。得られた *ppk/merT*-遺伝子組換えタバコの葉において *merT* 遺伝子の存在またその遺伝子が MerT タンパク質に転写・翻訳されたことが PCR 法及び抗 c-Myc 抗体を用いた Western-Blotting 法により確認された。⁷⁶⁾ 以上の実験事実から、*Pseudomonas* K-62 由来の水銀輸送遺伝子 *merT* を付加した遺伝子組換えタバコの分子育種に成功したものと考えられる。次に、得られた *ppk/merT* 遺伝子組換えタバコより収穫した種から栽培した若苗を用いて水銀の取り込み活性及び蓄積性を調べた。その結果、水銀輸送体を持たない *ppk* 遺伝子のみを組換えたタバコに比べて、*ppk/merT* 遺伝子組換えタバコは水銀曝露開始直後から積極的に水銀を取り込み、24 時間後には *ppk* 遺伝子のみを組換えたタバコのおよそ 2 倍高い水銀取り込み量を示した (Fig. 8)。⁷⁶⁾

ここで創生した *ppk/merT* 遺伝子組換えタバコは MerT の水銀取り込み活性により水銀浄化能が促進していることから、本組換え株を用いることにより浄化完了時間が大きく短縮可能であることが示唆された。

さらに、*ppk/merT* 遺伝子組換えタバコは *ppk* 遺伝子組換えタバコに比べ、比較的低濃度の水銀を含

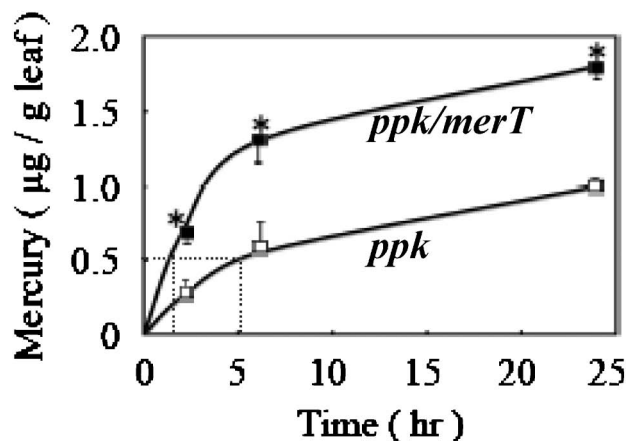


Fig. 8. Mercury Uptake in *ppk/merT*-transgenic Tobacco
Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three determinations from three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. *ppk*.

むモデル土壌から多量の水銀を回収・蓄積していることが判明した (Fig. 9)。⁷⁶⁾ これらの結果より、微量水銀の浄化に不適であるというファイトレメディエーションの欠点の1つが大きく改善し得ることが初めて明らかとなり、植物を用いた重金属の浄化技術の革新に大きく貢献したものと考えられる。

しかし、本 *ppk/merT* 遺伝子組換えタバコは無機水銀の回収・蓄積には有効であるが、メチル水銀等の有機水銀化合物の浄化に利用できないという欠点がある。その理由はポリリン酸が一価の有機水銀化合物をキレートできないためである。^{58,59)} 環境中に排出された無機水銀が微生物等によりメチル化され、神経毒性の強いメチル水銀に変換される機構が存在することが知られている。⁸⁻¹⁰⁾ 環境中で生成されたメチル水銀や人為的に排出されたメチル水銀を始めとする有機水銀による人への健康影響が懸念されており、無機水銀の浄化だけではなくメチル水銀を始めとする有機水銀の浄化も必要とされている。そこで筆者らは、*ppk/merT* 遺伝子組換えタバコに有機水銀分解酵素遺伝子 *merB* を導入し、土壌中の無機水銀のみならずメチル水銀の浄化にも利用できる水銀浄化トランスジェニック植物の創生を試みた。

水銀輸送体を持つ水銀高蓄積タバコ (*ppk/merT* 遺伝子組換えタバコ) への *merB* 遺伝子の導入として、まずタバコ体内で *merB* 遺伝子から転写・翻訳された MerB タンパク質の検出を容易にするため、*merB* 遺伝子の下流に *flag-tag* 遺伝子を付加し、さらに *merB* 遺伝子が菌体内及び植物細胞において転

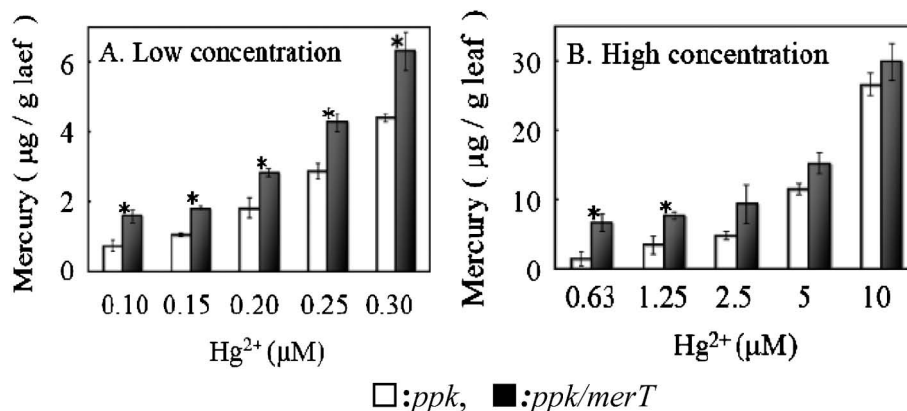


Fig. 9. Mercury Accumulation in Transgenic Tobacco

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of three determinations from three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. *ppk*.

写・翻訳され易いように、*merB* 遺伝子の upstream に SD 配列及び PT 配列を付加した *merB* 遺伝子断片を分子設計した。これらの配列を有する *merB* 遺伝子断片を PCR 法で増幅した後、バイナリーベクターに組換えた。次に、*A. tumefaciens* の感染力を介して *merB* 遺伝子断片を *ppk/merT* 遺伝子組換えタバコのゲノムに導入した。得られた *ppk/merT/merB* 遺伝子組換えタバコの葉において *merB* 遺伝子が MerB タンパク質に転写・翻訳されたことが抗 Flag 抗体を用いた Western-Blotting 法により確認された。さらに、抗 PPK 抗体及び抗 Myc 抗体を用いた Western-Blotting により PPK 及び MerT タンパク質がいずれもタバコの葉の抽出液中に検出されたことから、*ppk* 遺伝子及び *merT* 遺伝子はともにそれぞれ転写・翻訳されていることが確認された。⁷⁷⁾ 水銀のない状態では *ppk/merT/merB* 遺伝子組換えタバコの成長は野生株及び *ppk/merT* 遺伝子組換えタバコとの差は認められず、*merB* 遺伝子の導入はタバコの成長の妨げにならないことが明らかとなった。メチル水銀濃度の増加に伴い、3 者の成長率がともに減少しているが *ppk/merT/merB* 遺伝子組換えタバコの成長率はほかの 2 者に比べ明らかに大きく、*merB* 遺伝子の導入によりメチル水銀に対する耐性能が大きく増強されていることが明らかとなった。⁷⁷⁾ これは野生株及び *ppk/merT* 遺伝子組換え株においては、吸収されたメチル水銀が細胞内で毒性を発現したためと考えられる。一方、細胞内でメチル水銀分解酵素 MerB を発現し得る *ppk/merT/merB* 遺伝子組換え株では、野生株及び *ppk/merT* 遺伝子組換え株に比べて耐性を示したことが

ら、MerB が細胞内で活性を示し、メチル水銀を無機水銀に分解し、その後生じた無機水銀がポリリン酸によりキレートされ、毒性の低い無機水銀-ポリリン酸キレート体になったものと考えられる。

次に、*ppk/merT/merB* 遺伝子組換え株のメチル水銀浄化活性を調べた結果、本遺伝子組換え株には野生株及び *ppk/merT* 遺伝子組換え株に比べ、有意に高い水銀蓄積量を示した。この結果は、本遺伝子組換え株は取込まれたメチル水銀が有機水銀分解酵素 (MerB) により無機水銀に分解された後、無機水銀-ポリリン酸キレート体となってタバコ細胞内に蓄積していることを示唆している。なお、培地中に残存するメチル水銀量を測定したところ、野生株及び *ppk/merT* 遺伝子組換え株ではいずれも培地中に多量のメチル水銀が残存していたのに対し、*ppk/merT/merB* 遺伝子組換え株のメチル水銀残存量は大きく減少していた。このことから、*ppk* 遺伝子及び *merB* 遺伝子が遺伝子組換えタバコ中に効果的に働いていることが確認できた (Fig. 10)。⁷⁷⁾

以上の結果から、*ppk*、*merT* 及び *merB* の 3 遺伝子を同時に発現し、土壌中の無機水銀のみならず、メチル水銀を始めとする有機水銀の浄化・回収に利用できる新規水銀高蓄積 *ppk/merT/merB* 遺伝子組換えタバコの分子育種に成功したと確信している。

現在、ファイトレメディエーションを用いた水銀汚染土壌の浄化・修復法の開発研究を系統的かつ持続的に行っているのは主として、米国ジョージア大学とわれわれの 2 研究グループと思われる。ジョージア大学グループは *merA* 及び *merB* 遺伝子を植物に導入しており、取り込まれた水銀は植物体内に蓄

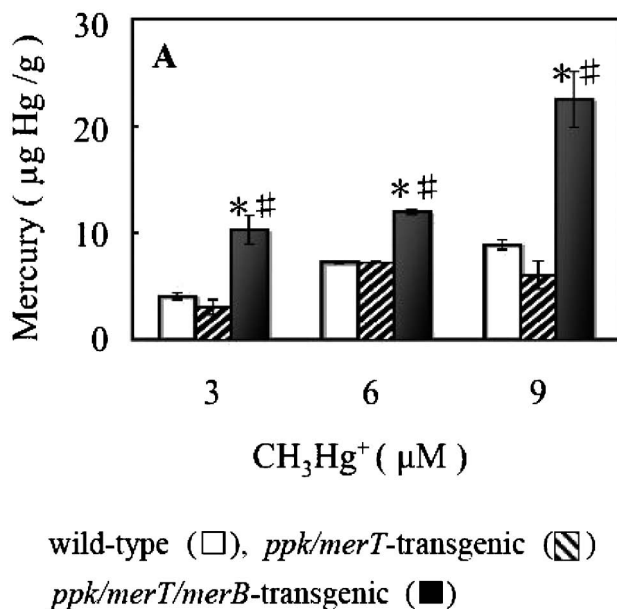


Fig. 10. Mercury Accumulation from CH₃Hg⁺-containing Medium

Data are expressed as the mean ± S.E.M. of three determinations from three independent experiments. **p* < 0.05 vs. wild type. #*p* < 0.05 vs. *ppk/merT*.

積することなく、大気中に放出される。一方、われわれの方法ではタバコ中に蓄積されるため、回収することが可能であり、浄化後の水銀による二次汚染の心配がなく、加えて、回収により資源のリサイクルが可能で、より優れた方法だと考える。なお、植物体中に蓄積している水銀-ポリリン酸キレート体はポリリン酸抽出法により回収が可能であることを確認しており、今後はさらにその回収法の効率化を図る予定である。

微生物由来の遺伝子を植物に導入し、発現させることは技術的に困難な面もあるが、目的遺伝子の分子設計を始めとする遺伝子組換えの各ステップを着実にいった結果、少なくとも本研究の目標である「実施可能な無機・有機水銀土壌の浄化に適用できる新規水銀浄化トランスジェニック植物の創出」をほぼ完成することができたと考える。本研究の成果は実用化の一手手前にきており、小規模であってもフィールドワークを行うことが重要である。

5. おわりに

水銀化合物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ある水銀化合物を無毒化し、気化・除去

する能力を持っている。この水銀気化除去能力、又は、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土壌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、有機水銀分解系及びポリリン酸生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持ち、環境に優しい生物学的水銀浄化法であると言えるであろう。

日本国内においては水銀などの重金属汚染に起因する健康被害とその罹患率は時を経て減少しているが、目を世界に向けるとこれからの健康リスクが問題となる土壌汚染は多く存在する。その多くは開発途上国であり、かつての日本の状況が再現される可能性も高く、わが国の失敗を繰り返さないようにすることが大切である。本研究は、実用化することで、世界の環境、特に経済的に恵まれていない発展途上国の人々の生活と福祉に大きく貢献できる内容であり、過去に水俣や新潟での苦い経験を持ち、また経済的にはまだゆとりのある日本がリーダーシップを取り、実現化の推進をしていくに値すると思う。

謝辞 筆を置くにあたり、本研究の開始から完了に至るまで御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました恩師 井村伸正教授（元北里大学薬学部）に深甚なる感謝の意を表します。本研究テーマに真摯に協力、かつ貢献して頂いた教室員 清野正子准教授（現北里大学薬学部）、長田 武講師（現摂南大学理工学部）、研究員 大村朋子博士並びに研究室に在籍された大学院生、卒業研究生の方々に心からお礼を申し上げます。本研究を進めるにあたり plasmid pKP02.1 を形質転換した大腸菌 JM109 を御恵贈頂きました東北学院大学工学部環境工学研究分野 遠藤銀朗教授に、また、バイナリーベクター pHM-6 及び *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を御恵贈頂きました京都大学生存圏研究所森林圏遺伝子統御分野 矢崎一史教授に、また、タンパク質

に関する専門的な御助言と Western-Blotting に用いる抗 PPK 抗体の抗原となる PPK ペプチドを合成頂きました摂南大学薬学部臨床分析化学研究室 秋澤俊史教授に深謝致します。最後に、研究室の運営に御尽力を賜りました藤森廣幸教授に衷心より感謝し、お礼を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kitamura S., Kondou M., Takizawa Y., Fujii M., Fujiki S., "Mercury," Kodansha, Tokyo, 1976.
- 2) Tsubaki T., Irukayama K., "Minamata Disease-Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, Japan," Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1977.
- 3) Nishimura H., Okamoto T., "Minamatabyou no Kagaku," Nippon Hyoronsha Co., Ltd., Tokyo, 2001.
- 4) Tomizawa T., *Shoku no Kagaku*, **18**, 39-45, (1974).
- 5) Matsuyama A., Liya Q., Yasutake A., Yamaguchi M., Aramaki R., Xiaojie L., Pin J., Mei L., Yumin A., Yasuda Y., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **73**, 846-852 (2004).
- 6) Pan-Hou H. S., Nishimoto M., Imura N., *Arch. Microbiol.*, **130**, 93-95 (1981).
- 7) Pan-Hou H. S., Imura N., *Arch. Microbiol.*, **129**, 49-52 (1981).
- 8) Pan-Hou H. S., Imura N., *Arch. Microbiol.*, **131**, 176-177 (1982).
- 9) Pan-Hou H. S., Imura N., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 290-297 (1982).
- 10) Trevors J. T., *J. Bacteriol.*, **26**, 499-504 (1986).
- 11) Osborn A. M., Bruce K. D., Strike P., Ritchie D. A., *FEMS Microbiol. Rev.*, **19**, 239-262 (1997).
- 12) Silver S., Walderhaug M., *Microbiol. Rev.*, **56**, 195-228 (1992).
- 13) Silver S., Phung L. T., *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 753-789 (1996).
- 14) Summers A. O., *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 607-634 (1986).
- 15) Tonomura K., Maeda K., Futai F., Nakagami T., Yamada M., *Nature*, **217**, 644-646 (1968).
- 16) Tonomura K., Nakagami T., Futai F., Maeda K., *J. Ferment. Technol.*, **46**, 506-512 (1968).
- 17) Furukawa K., Suzuki T., Tonomura K., *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 128-130 (1969).
- 18) Tonomura K., Kanzaki F., *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 227-229 (1969).
- 19) Furukawa K., Tonomura K., *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 604-610 (1971).
- 20) Furukawa K., Tonomura K., *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 217-226 (1972).
- 21) Tezuka T., Tonomura K., *J. Biochem.*, **80**, 79-87 (1976).
- 22) Tezuka T., Tonomura K., *J. Biochem.*, **135**, 138-143 (1978).
- 23) Griffin H. G., Foster T. J., Silver S., Misra T. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3112-3116 (1987).
- 24) Kiyono M., Omura T., Inuzuka H., Fujimori H., Pan-Hou H., *Gene*, **189**, 151-157 (1997).
- 25) Kiyono M., Pan-Hou H., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 910-914 (1999).
- 26) Huang C. C., Narita M., Yamagata T., Endo G., *Gene*, **239**, 361-366 (1999).
- 27) Liebert C. A., Hall R. M., Summers A. O., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 507-522 (1999).
- 28) Barkay T., Miller S. M., Summers A. O., *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 355-384 (2003).
- 29) Kiyono M., Sone Y., Nakamura R., Pan-Hou H., Sakabe K., *FEBS Lett.*, **583**, 1127-1131 (2009).
- 30) Kusano T., Ji G., Inoue C., Silver S., *J. Bacteriol.*, **172**, 2688-2692 (1990).
- 31) Hamlett N. V., Landale E. C., Davis B. H., Summers A. O., *J. Bacteriol.*, **174**, 6377-6385 (1992).
- 32) Inoue C., Kusano T., Silver S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1289-1292 (1996).
- 33) Reniero D., Mozzon E., Galli E., Barbieri P., *Gene*, **208**, 37-42 (1998).
- 34) Wilson J. R., Leang C., Morby A. P., Hobman J. L., Brown N. L., *FEBS Lett.*, **472**, 78-82 (2000).
- 35) Kiyono M., Pan-Hou H., *J. Bacteriol.*, **181**, 726-730 (1999).
- 36) Kiyono M., Omura T., Fujimori H., Pan-Hou H., *Arch. Microbiol.*, **163**, 242-247 (1995).
- 37) Kiyono M., Omura T., Fujimori H., Pan-Hou H., *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 301-306 (1995).
- 38) Uno Y., Kiyono M., Tezuka T., Pan-Hou H., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 107-109 (1997).

- 39) Kuyucak N., Volesky B., *Biotechnol. Lett.*, **10**, 137–142 (1988).
- 40) Gardea-Torresdey J. L., Becker-Hapak M. K., Hosea J. M., Darnall D. W., *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1372–1378 (1990).
- 41) Suzuki T., Furukawa K., Tonomura K., *J. Ferment. Technol.*, **46**, 1048–1055 (1968).
- 42) Brunke M., Deckwer W. P., Frischmuth A., Horn J. M., Lunsdorf M., Rhode M., Rohricht M., Timmis K. N., Weppen P., *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**, 145–152 (1993).
- 43) Saouter E., Turner R., Barkay T., *Ann. NY Acad. Sci.*, **721**, 423–427 (1994).
- 44) von Canstein H., Li Y., Timmis K. N., Deckwer W. D., Wagner-Döbler I., *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5279–5284 (1999).
- 45) Wagner-Döbler I., von Canstein H., Li Y., Timmis K. N., Deckwer W. D., *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 4628–4634 (2000).
- 46) Okino S., Iwasaki K., Yagi O., Tanaka H., *J. Environ. Biotechnol.*, **1**, 41–47 (2001).
- 47) von Canstein H., Li Y., Wagner-Döbler I., *Biotechnol. Bioeng.*, **74**, 212–219 (2001).
- 48) Narita N., Yamagata T., Ishii H., Huang C. C., Endo G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 86–90 (2002).
- 49) Martinelli B. L. A., Ferreira J. R., Forsberg B. R., Victoria R. L., *Ambio*, **17**, 252–254 (1988).
- 50) Pfeiffer W. C., Lacerda L. D., *Environ. Technol. Lett.*, **9**, 325–330 (1988).
- 51) Lacerda L. D., Pfeiffer W. C., *Quim. Nova*, **55**, 283–294 (1992).
- 52) Nriagu J. O., Pfeiffer W. C., Malm O., Souza C. M. M., Mierle G., *Nature*, **356**, 389 (1992).
- 53) Chen S., Wilson D. B., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2442–2445 (1997).
- 54) Bae W., Mehra R. K., Mulchandani A., Chen W., *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5335–5338 (2001).
- 55) Kulaev I. S., “The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates,” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1979.
- 56) Pisoni R. L., Lindley E. R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 3626–3631 (1992).
- 57) Kornberg A., *J. Bacteriol.*, **177**, 491–496 (1995).
- 58) Pan-Hou H., Kiyono M., Kawase T., Omura T., Endo G., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1423–1426 (2001).
- 59) Pan-Hou H., Kiyono M., Omura H., Omura T., Endo G., *FEMS Microbiol. Lett.*, **207**, 159–164 (2002).
- 60) Jensen S., Jernelöv A., *Nature*, **223**, 753–754 (1969).
- 61) Spangler W. J., Spigarelli J. L., Rose J. M., Miller H. M., *Science*, **180**, 192–193 (1973).
- 62) Yamada M., Tonomura K., *J. Ferment. Technol.*, **50**, 159–166 (1972).
- 63) Kiyono M., Omura H., Omura T., Murata S., Pan-Hou H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 274–278 (2003).
- 64) Archibald F. S., Fridovich I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 589–596 (1982).
- 65) Pisoni R. L., Lindley E. R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 3626–3631 (1992).
- 66) Dunn T., Gable K., Beeler T., *J. Biol. Chem.*, **269**, 7273–7278 (1994).
- 67) Rugh C. L., Wilde H. D., Stack N. M., Thompson D. M., Summers A. O., Meagher R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3182–3187 (1996).
- 68) Rugh C. L., Senecoff J. F., Meagher R. B., Merkle S., *Nat. Biotechnol.*, **16**, 925–928 (1998).
- 69) Bizily S. P., Pugh C. L., Summers A. O., Meagher R. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6808–6813 (1999).
- 70) Bizily S. P., Pugh C. L., Meagher R. B., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 213–217 (2000).
- 71) Bizily S. P., Kim T., Kandasamy M. K., Meagher R. B., *Plant Physiol.*, **131**, 463–471 (2003).
- 72) Ruiz O. N., Hussein H. S., Terry N., Daniell H., *Plant Physiol.*, **132**, 1344–1352 (2003).
- 73) Nagata T., Kiyono M., Pan-Hou H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 777–782 (2006).
- 74) Nagata T., Ishikawa C., Kiyono M., Pan-Hou H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2350–2353 (2006).
- 75) Taiz L., Zeiger E., “Plant Physiology,” 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 2002.
- 76) Nagata T., Nakamura A., Akizawa T., Pan-Hou H., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1491–1495 (2009).
- 77) Nagata T., Morita H., Akizawa T., Pan-Hou H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 781–786 (2010).