

下水汚泥からの好気性ヒ素耐性細菌の探索と その耐性遺伝子の解析

東北大学大学院工学研究科	学生員	丹野	幸
東北学院大学大学院工学研究科	学生員	小泉	卓哉
科学技術振興事業団		黄	介辰
東北学院大学工学部	F会員	遠藤	銀朗
東北大学大学院工学研究科	F会員	野池	達也

1. はじめに

近年、急激な技術革新によってもたらされた経済活動の増大は私たちの生活を豊かにしてきた。その一方で、局地的な環境汚染が世界各地で発生し、それが地球的規模へと拡大し、生態系や生物環境を破壊し続けてきている。本来自然には自浄作用があるが、私たち人間は生活の豊かさを求めるあまりにそれを上回る量の汚染物質を環境に放出し、その汚染物質が河川・海域・土壌等に堆積されて多くの環境破壊の問題を引き起こしている。環境破壊の問題を解決し、私たちの生活環境をより快適なものとするのに大きな役割を果たしているものに下水道が挙げられるが、下水道には雨水や汚水や地下水が集められ、それに含まれる汚染物質の重要なものの一つとしてヒ素が上げられる。ヒ素は半金属元素で自然界には土壌圈、水圏に幅広く存在している。日本も含めて世界各地で、環境基準値を超えるヒ素に汚染された表流水や地下水を利用した人々の健康が害されているという例が多数報告されており、ヒ素による水の汚染は大きな社会問題となっている。この下・廃水中に含まれるヒ素を処理する場合には様々な方法があるが、実際には処理するための各種条件設定、処理能力、更に吸着剤使用の場合には処理後の問題やコストが高いことなど解決しなければならない問題が多く残されている。

そのため、より経済的利点が多いと考えられる微生物によるヒ素の除去法の開発、あるいは微生物の導入による既知の処理法の改良といった生物学的方法の開発が必要と考えられる。そのための基礎研究として、本研究では下水処理場の初沈汚泥をサンプルを用いてヒ素耐性細菌を分離し、その細菌が持っているヒ素耐性遺伝子の解析を行ったので報告する。

2. 実験方法

本研究では以下の項目について実験と解析を行った。

- (1) 下水処理場初沈汚泥サンプルを用いて段階希釈の後、ヒ酸濃度が4mMになるように調製したLB寒天培地を用いて分離培養を行い、一菌株を純粋分離した。次にPCR法を用いてその分離株の16S rRNA遺伝子部分の増幅を行い、塩基配列を決定し種の同定を試みた。
- (2) 既知の*E. coli*のヒ素耐性遺伝子*arsB*の塩基配列を基にして作成した、プライマー及びプローブを用いたPCR法とサザンハイブリダイゼーション法によって分離株のヒ素耐性遺伝子の探索を行った。
- (3) ヒ素耐性遺伝子が染色体上に存在するのか、もしくはプラスミドを保有しているそのプラスミド上に存在するのかを確認するためにパルスフィールドゲル電気泳動法を行い、染色体部分をゲル回収して、PCR法により*ars operon*のロケーションの確認を行った。
- (4) 最後に分離株と*E. coli*のヒ素耐性遺伝子を制限酵素によるマッピング解析によって比較し、分離株の保有するヒ素耐性オペロンの解析を行った。

3. 実験結果および考察

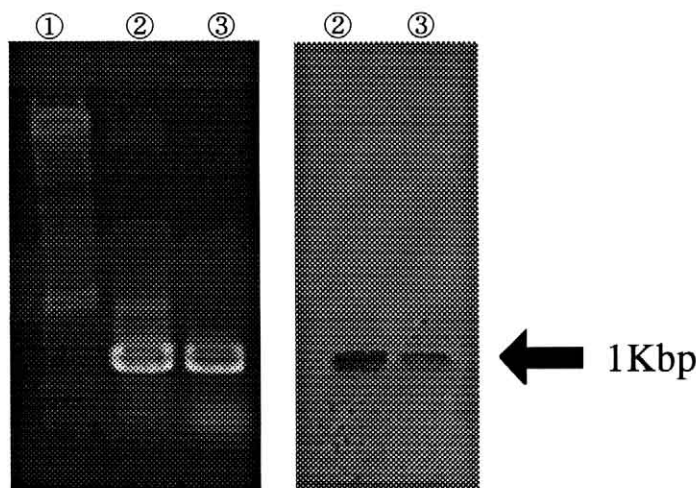
- (1) 下水処理場初沈汚泥からヒ素耐性細菌を純粋分離することが出来た。このうちの一菌株について同定を試み、16S rRNA遺伝子部分の塩基配列を決定したところ、*Acinetobacter*属に分類されたため、この分離株を*Acinetobacter* sp.3Q27と命名した。
- (2) 分離されたヒ素耐性細菌のヒ素耐性遺伝子*arsB*の解析をPCR法およびサザンハイブリダイゼーション法によって試みた結果、分離株*Acinetobacter* sp.3Q27の保有するヒ素耐性遺伝子*arsB*は既知の*E. coli*の*arsB*遺伝子と同じものであることが分かった。(図1)

キーワード：下水汚泥、ヒ素耐性細菌、*arsB*、遺伝子

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1 東北学院大学工学部土木工学科 環境生物工学研究室

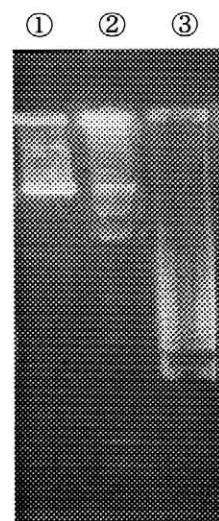
(3) パルスフィールドゲル電気泳動法の結果、分離株*Acinetobacter* sp.3Q27は多数のプラスミドを保有していることが確認された。(図2) そのため、染色体部分のゲルを切り出して回収し、*arsB*遺伝子部分をPCR法により増幅させたところ増幅が確認されたため、染色体上にヒ素耐性遺伝子を保有している事が明らかになった。しかし、この段階では*ars operon*の大きさがおよそ2~3 kbpであることから、それが染色体上のみではなく、ここで保有が明らかとなった多数のプラスミドにも存在する可能性が残された。

(4) 制限酵素地図によるマッピング解析結果の比較から、分離株*Acinetobacter* sp.3Q27の*ars operon*と*E. coli* DH5 α の*ars operon*が同一か、それに近いものであることが確認された。(図3) さらに、制限酵素地図作成の際に行ったゲノミックサザンハイブリダイゼーションによってヒ素耐性遺伝子の検索を行ったところ、検出されたバンドが1本であったため、先のパルスフィールドゲル電気泳動の結果とあわせて分離株*Acinetobacter* sp.3Q27のヒ素耐性遺伝子は染色体上にのみ存在すると考えられた。



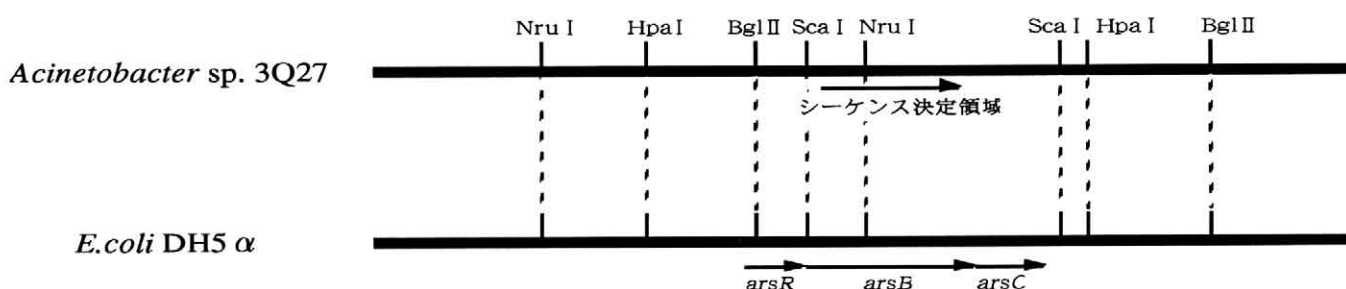
(図1) 分離株のPCR産物の電気泳動とサザンハイブリダイゼーションの結果

左：電気泳動 右：サザンハイブリダイゼーション
 ①： λ -HindIII
 ②：*Acinetobacter* sp.の*arsB*PCR産物
 ③：*E. coli*の*arsB*PCR産物



(図2)パルスフィールドゲル電気泳動結果

①酵母
 ②*Acinetobacter* sp. 3Q27
 ③5k Ladder



(図3)*Acinetobacter* sp.3Q27と*E. coli* DH5 α の*ars operon*周辺領域の制限酵素地図

4. 結論

下水処理場初沈汚泥から分離したヒ素耐性細菌*Acinetobacter* sp.3Q27はヒ素耐性遺伝子を保有しており、そのヒ素耐性遺伝子オペロンである*ars operon*は既知の*E. coli*のものと非常に相同性が高く、*arsB*については全く同じものであるということが分かった。さらに分離株*Acinetobacter* sp.3Q27は、細胞内に多数のプラスミドを保有しているが、*ars operon*は染色体上にのみ存在することも明らかとなった。

本研究は科学事業振興事業団の戦略的基礎研究推進事業の一つとしてなされたことを付記する。