

細胞表層工学を適用したヒ素除去法の検討

東北学院大学大学院	学生員	大友 公房
東北学院大学環境防災工学研究所	正会員	及川 栄作
東北学院大学工学部	正会員	石橋 良信

1. 目的

現在、世界各地でヒ素地下水汚染が表面化している。特にインドの東部からバングラディッシュにまたがるガンジス川流域では、大規模なヒ素地下水汚染が発生している。しかし、バングラディッシュでは技術的、経済的な理由からヒ素汚染された地下水を適切な処理をしない生活用水として利用しているケースが多い。その結果、国民の95%もの人々が慢性的なヒ素中毒に脅かされている。そのため、一刻も早く安全な水を供給する必要がある、安価で簡便なヒ素処理技術が求められている。微生物の細胞表層は外界環境から直接刺激を受け、多くの情報と物質の伝達が行われている。このことから、細胞表層は反応性に富み、細胞内と外部を繋ぐインターフェイスと捉えることができる。この細胞表層を利用した細胞表層工学では、遺伝子組換えにより、微生物の細胞表層に新しく有用な機能を付加した新機能細胞 (Arming Cell) を作り出すことが可能である。¹⁾

本実験では、遺伝子組換えにより大腸菌の細胞表層にヒ素耐性オペロンのリプレッサータンパク質を導入した。この組換え大腸菌でヒ素吸着能が向上した結果が得られたので報告する。

2. 実験原理

本実験では、遺伝子組換えにより、ArsR タンパク質を大腸菌の細胞表層に提示し、細胞表層のヒ素吸着能を向上させヒ素除去を試みた。ArsR タンパク質は、大腸菌などヒ素耐性菌のゲノムにコードされているヒ素耐性遺伝子群で遺伝子発現の調節を行うリプレッサーのタンパク質である。ヒ素のない環境下で ArsR タンパク質は、ヒ素耐性遺伝子群のオペレーション(O.P)部位に結合することで遺伝子群の発現を抑制している。しかし、ヒ素のある環境下で ArsR タンパク質は、ヒ素耐性遺伝子群を発現させるためにヒ素と優先的に結合し、O.P部位から離れる働きがある。(Fig.1)この ArsR タンパク質を大腸菌のペリプラズム層の最外層を構築する lamB 遺伝子で、タンパク質の全体構成や3量体に悪影響を与えないアミノ酸153-154をコードする遺伝子間に arsR 遺伝子を導入した。²⁾

この lamB-arsR 合成遺伝子を大腸菌に導入し、細胞表層に ArsR タンパク質を提示した。(Fig.1)

3. 実験方法

ArsR 遺伝子、lamB 遺伝子は共に大腸菌の染色体から PCR クローニングした。ダブル PCR 法により arsR 遺伝子の両末端に BamHI サイトを導入した。同様にダブル PCR 法により lamB のアミノ酸 153-154 の間に BamHI サイトを導入した。この lamB のアミノ酸 153-154 部位をコードする DNA 配列間に arsR を導入し lamB-arsR 合成遺伝子断片を作り出した。lamB-arsR 合成遺伝子断片を遺伝子発現用の pTV118N ベクターに組み込み、大腸菌に導入した。同様に、コントロールとして lamB 遺伝子のみを大腸菌に導入した組換え体を作成した。これら的大腸菌を 1×LB+Amp、30 の温度条件下で一晩ほど培養し、吸光度(OD₆₀₀)を測定した。培養液は 9.5 ml 分注した。この培養液にヒ素を加え終濃度を 0.5 ppm、培養液の終量を 10 ml とした。これらの培養液は軽

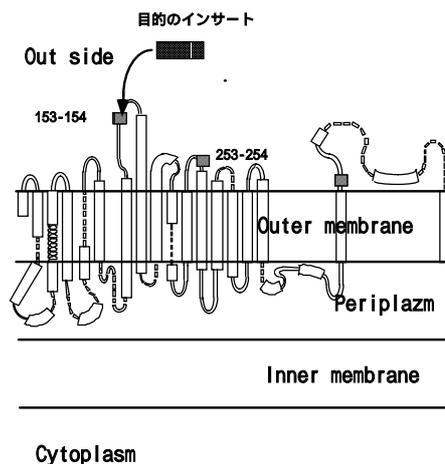


Fig.1 大腸菌の細胞表層

キーワード 細胞表層工学, ヒ素, リプレッサータンパク質

連絡先 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目-13-1 東北学院大学工学部 TEL 022-368-7418

くボルテックスをかけ菌体とヒ素を十分に攪拌し 4 で静置した。各種組換え体によるヒ素除去率の測定方法は菌体をゆっくり自然沈下させた方法と、遠心分離機により菌体を沈下させた方法の 2 種類おこなった。自然沈下ではヒ素を添加した組換え体培養液を一週間ほど静置し、上清の培養液のヒ素濃度を測定した。遠心分離機による沈下ではヒ素を添加した組換え体を 2 日間ヒ素と反応させた後、4 、2500 rpm、5 min の条件で菌体と培養液を遠心分離し、上清の培養液のヒ素濃度を測定した。各種組換え体のヒ素濃度はジエチルジチオカルバミン酸銀による吸光光度法により OD₅₃₅ を測定し、検量線から算出した。

4．実験結果および考察

菌を自然沈下させた場合では、ヒ素を添加した 2 日後に確認したところ pTV+lamb-arsR の組換え体が他の組換え体より速く沈殿した。このことから、沈殿速度の差が確認できた。原因として、大腸菌の細胞表層にヒ素が吸着して菌の比重が重くなることで沈降速度が速くなったことが考えられる。その後、すべての組換え体で自然沈下するまで待ちヒ素除去率を測定した。結果を(Fig.2)に示す。これより、pTV+lamb-arsR が lamb より多く除去できていることが確認できた。遠心によるヒ素除去率の結果は(Fig.3)に示す。遠心による試料でヒ素除去率に差異がほとんど見受けられなかった。原因として、遠心力でヒ素が沈殿すること、遠心力により菌に吸着したヒ素が脱着したと考えられる。

5．おわりに

本実験により、静置 2 日目の pTV+lamb-arsR の組換え体で他の組換え体より速く菌が沈殿した。このことから、ArsR タンパク質を細胞表層に導入した組換え体で沈降速度に明かな差が現れたことが確認された。菌を自然沈下させた場合、pTV+lamb-arsR で、pTV+lamb よりも高いヒ素除去能があることが認められた。

これまで、細胞表層にリプレッサータンパク質を提示して重金属除去が試みられた例はなく、他の重金属除去方法の開発への応用も期待される。

また、大腸菌には元々ヒ素耐性能力があることが知られている。遺伝子を組換えない大腸菌と今回使用した組換え体のヒ素耐性を調べたところ、500 ppm の濃度のヒ素を添加した培養液中で培養速度は遅くなるものの、どの菌も同じように増殖することが確認された。菌とヒ素の接する時間を長くおけば置くほど馴化し、ヒ素除去は菌量に依存してくることも十分考えられる。今後の実験の課題として、pH などの反応条件を変えた場合や、ヒ素と大腸菌を短い時間反応させた場合のヒ素除去率の変化を把握する必要がある。

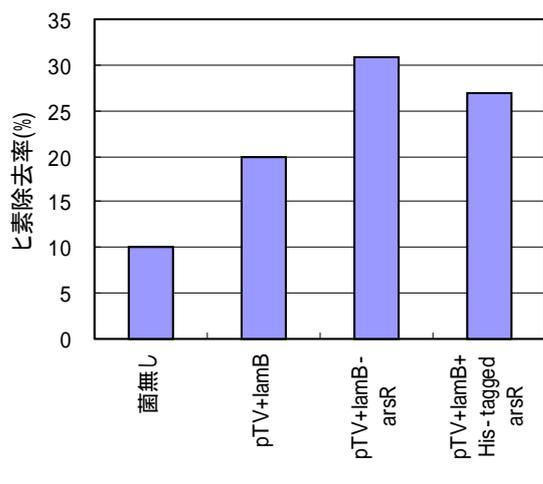


Fig.2 自然沈下によるヒ素除去率

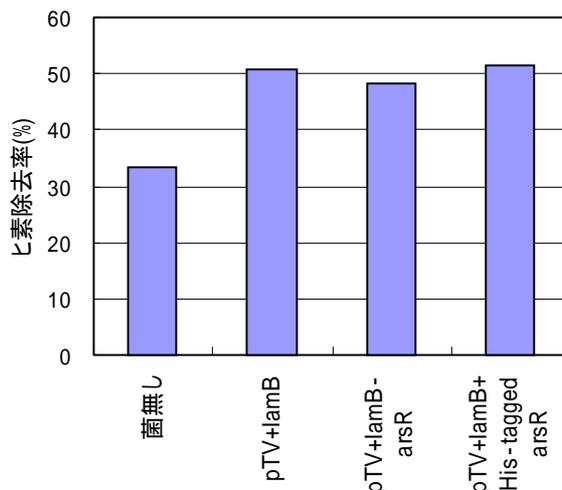


Fig.3 遠心分離をかけた場合のヒ素除去率

参考文献

- 1)日本農芸化学会講演要旨集 1999Mar73 巻 臨時増刊号、植田充美、田中渥夫「細胞表層工学による新育種法の開発」
- 2)Alain Charbit; Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope ; expression at the cell surface, The EMBO Journal Vol.5,no.11,pp.3029-3037,1986