

# 大腸菌および巨大菌を用いた *Bacillus* sp. MB24 株が 保有するヒ素耐性遺伝子群の発現に関する研究

東北学院大学大学院 学生員 ○小幡紘平  
総合地球環境学研究所 松井一彰  
東北学院大学工学部 フェロー 遠藤銀朗

## 1. はじめに

ヒ素による土壤汚染は世界各地において深刻な問題となっている。ヒ素に汚染された土壤は、一般には硫酸やリン酸、シュウ酸などを用いた土壤洗浄によって浄化されることが多いが、これらの方法は浄化後に土壤機能を損なってしまう恐れがある。そこで、そのような危惧のない微生物を利用したヒ素汚染浄化方法を開発することが必要と考えられる。これまでに発見されたヒ素耐性細菌は、ヒ素を亜ヒ酸に還元するシステムを有している。ヒ素の毒性は還元によって高くなってしまいが、亜ヒ酸は水溶性が高く、土壤洗浄の際に土壤機能を損なわずに浄化できるヒ素溶出方法として有効であると考えられる。

以前、本研究室では、水俣湾底泥より *Bacillus* sp. MB24 株を分離した。*Bacillus* sp. MB24 株はトランスポゾン *TnARS1* を保有し、*TnARS1* の遺伝子構造解析を行った結果、*Sinorhizobium* sp. As4 株が保有する *ars* オペロン(ヒ素耐性遺伝子群)と相同性の高い *ars* オペロンを保有していることが明らかになった。*TnARS1* 上の各遺伝子の相同性を Table.1 に示す。

このように、*Bacillus* sp. MB24 株が保有する *ars* オペロンおよび個々のヒ素耐性遺伝子は、将来的に微生物を用いたヒ素汚染に有効であると考えられる。

しかしながら、*Bacillus* sp. MB24 株が保有する *ars* オペロンおよび個々のヒ素耐性遺伝子が、実際に細菌内で発現し、機能するかはまだ確認されていない。

よって、本研究では、*Bacillus* sp. MB24 株が保有する *ars* オペロンおよび個々のヒ素耐性遺伝子が、真のヒ素耐性決定因子であるかどうかを明らかにすることを目的に、大腸菌および巨大菌を宿主としてヒ素耐性能の有無を評価した。また、*ars* オペロンのプロモータ領域が転写開始のために機能しているかどうかについても同時に検証した。

Table.1 *TnARS1*上の遺伝子の相同性

遺伝子名	遺伝子サイズ(bp)	アミノ酸サイズ(aa)	遺伝子の同一性(%)(アミノ酸配列レベル)
recombinase	633	210	<i>Bacillus thuringiensis</i> 株のrecombinaseと94%
<i>arsR'</i>	306	101	<i>Bacillus subtilis</i> 株の <i>arsR</i> と80%
ORF3	1308	435	<i>Bacillus halodurans</i> 株のBH2995 proteinと62%
ORF4	1059	352	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4株のPutative FAD-dependent oxidoreductaseと58%
ORF5	495	164	<i>Bacillus licheniformis</i> 株のHypothetical proteinと66%
<i>arsR</i>	348	115	<i>Sinorhizobium</i> sp. As4株の <i>arsR</i> と99%
<i>arsB</i>	1056	351	<i>Sinorhizobium</i> sp. As4株の <i>arsB</i> と96%
<i>arsC</i>	405	134	<i>Sinorhizobium</i> sp. As4株の <i>arsC</i> と87%
<i>arsD</i>	360	119	<i>Sinorhizobium</i> sp. As4株の <i>arsD</i> と94%
<i>arsA</i>	1761	586	<i>Sinorhizobium</i> sp. As4株の <i>arsA</i> と93%
ORF11	282	93	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987株のplasmid pBc10987の <i>HesB</i> -like domain proteinと97%
ORF12	426	141	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987株のplasmid pBc10987のHypothetical proteinと95%
<i>tnpA</i>	2961	986	<i>Bacillus cereus</i> ZK株のplasmid pE33L466の <i>tnpA</i> と85%

## 2. 実験材料および実験方法

### 2-1 各種組換え菌株の作製

*ars* オペロンがヒ素耐性能の付与に関係するかどうかを検証するために、Fig.1 に示したプロモータ領域を含む①領域を pHY300PLK ベクター(宝酒造)に組み込み、大腸菌 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  株および巨大菌 *Bacillus megaterium* 株に導

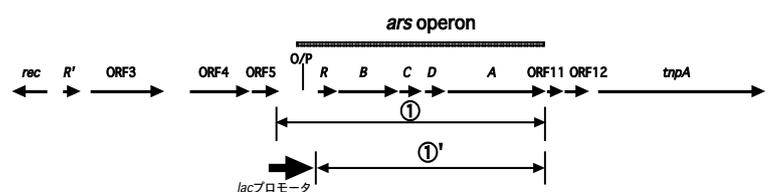


Fig.1 *TnARS1*上よりクローニングを行った領域

キーワード： *Bacillus* sp. MB24 株 ヒ素耐性遺伝子群 ヒ素耐性決定因子

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 TEL022-368-7493 FAX022-368-7070

入ることによって、組換え菌株を作製した。また、*Bacillus* sp. MB24 株が保有するヒ素耐性遺伝子群を強制的に発現させて、ヒ素耐性に関与する因子であるかどうかについても検証するために、pUC19 ベクター(宝酒造)を用いて、大腸菌内で高発現する *lac* プロモータを Fig.1 の①'領域の上流に導入した組換え大腸菌株を作製した。

## 2-2 供試細菌株

- ・組換え大腸菌株 *E.coli* DH5  $\alpha$  (pHY①)株および *E.coli* DH5  $\alpha$  (pHY300)株
- ・組換え巨大菌株 *B. megaterium*(pHY①)株および *B. megaterium*(pHY300)株
- ・*lac* プロモータを用いた組換え大腸菌株 *E.coli* DH5  $\alpha$  (pUC①')株および *E.coli* DH5  $\alpha$  (pUC19)株

## 2-3 各種組換え菌株のヒ素耐性能評価

2-2 で挙げた各種組換え菌株を用いて、ヒ酸(ヒ酸水素二ナトリウム 7 水和物 ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ))に対する耐性能評価を行った。耐性能評価は、ヒ酸を含む LB 培地中で振とう培養を行い(37°C)、24 時間後の菌数を 600nm の吸光度(OD600)で測定し、得られた OD600 値をヒ酸を添加していない時の OD600 値で除算しパーセンテージで表す生存率(cell survival)で表した。

## 3. 実験結果および考察

### 3-1 プロモータ領域の機能検証

Fig. 2 に結果を示す。*ars* オペロンを組み込んだ巨大菌 *B. megaterium*(pHY①)株はヒ酸(arsenate)に対して高い耐性を示した。しかしながら、*ars* オペロンを組み込んだ大腸菌 *E.coli* DH5  $\alpha$  (pHY①)株は耐性を示さなかった。このことから、*arsR* の上流域に存在するプロモータ領域は、大腸菌を宿主とした場合には機能しないが、巨大菌を宿主とした場合は機能することが明らかになった。

### 3-2 *Bacillus* sp. MB24 株が保有する個々のヒ素耐性遺伝子がヒ素耐性決定因子であることについての検証

Fig.3 に結果を示す。個々のヒ素耐性遺伝子を組み込んだ *E.coli* DH5  $\alpha$  (pUC①')株が、ヒ酸に対して高い耐性を示した。したがって、*Bacillus* sp. MB24 株に含まれるヒ素耐性決定因子は、大腸菌用プロモータ領域を用いることによって大腸菌においても発現でき、機能することが明らかになった。

## 4. おわりに

本研究において、得られた知見を以下にまとめる。

*Bacillus* sp. MB24 株が保有する *ars* オペロンは、それ自体は大腸菌を宿主としては機能せず、巨大菌を宿主とした場合にのみ機能することが明らかになった。また、*Bacillus* sp. MB24 株が保有する *ars* オペロンにコードされたヒ素耐性決定因子は、プロモータ領域を変えることにより大腸菌内で発現し、機能できることも明らかになった。

このように、*Bacillus* sp. MB24 株が保有するヒ素耐性決定因子は、プロモータ領域が適切であれば、ヒ素汚染環境中に生息する様々な宿主細菌内で機能することが示唆された。

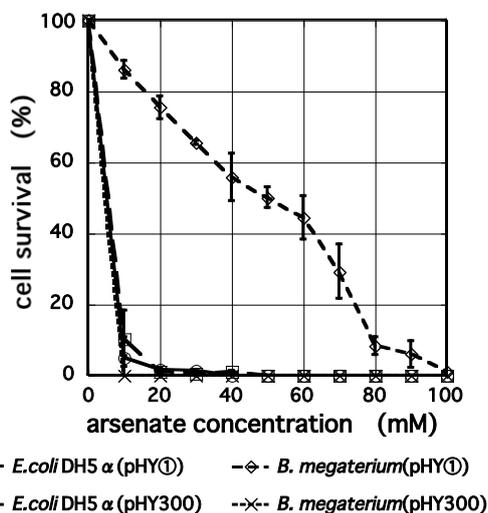


Fig.2 組換え大腸菌株および組換え巨大菌株のヒ素耐性能評価結果

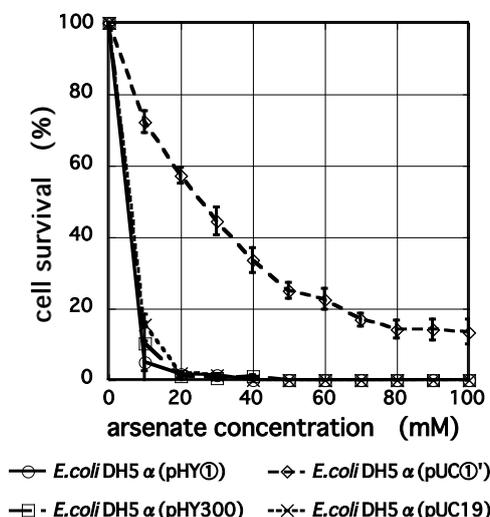


Fig.3 組換え大腸菌株および*lac*プロモータを用いた組換え大腸菌株のヒ素耐性能評価結果