

VII-24 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

東北学院大学	学生員	○丹野	幸
東北学院大学大学院	学生員	小泉	卓哉
東北学院大学		伊東	淑子
科学技術振興事業団		黄	介辰
東北学院大学	正会員	遠藤	銀朗

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。下水道には雨水や污水が集められ、処理場でそれらに含まれる汚染物質が取り除かれる。下・廃水に含まれる汚染物質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、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、1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のかを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をして、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一株のヒ素耐性細菌を分離することが出来た。この細菌の同定を試み、16S rRNA遺伝子の部分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)
- (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*オペロンの大きさがおよそ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* オペロンと*E. coli* DH5 α の*ars* オペロン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サザンハイブリダイゼーション法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可能性が高いと考えられた。

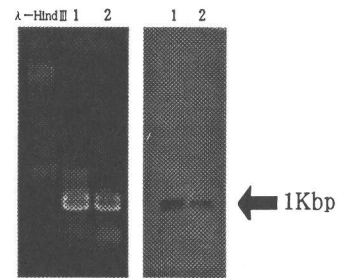


図1 分離株のPCR産物の電気泳動とハイブリダイゼーションの結果
左: 電気泳動
右: サザンハイブリダイゼーション
1: *Acinetobacter* sp. の*arsB*PCR産物
2: *E. coli* の*arsB*PCR産物

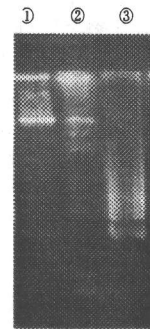


図2 ①酵母
②*Acinetobacter* sp. 3Q27
③5k Ladder

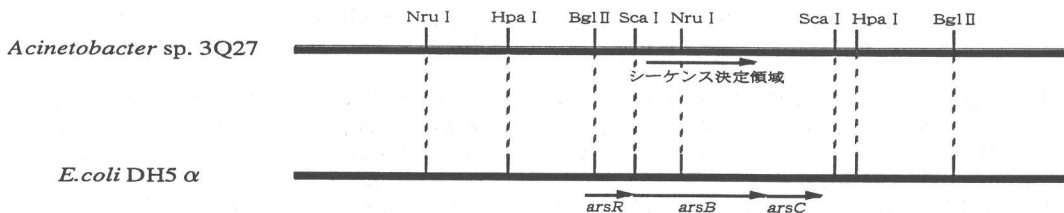


図3 *Acinetobacter* sp. 3Q27と*E. coli* DH5 α の*ars* operon周辺領域の制限酵素地図

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*オペロンは既知の*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はいるが、*ars*オペロンは染色体上に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。