

VII-47 水俣湾底泥から分離したヒ素耐性細菌のヒ素耐性能と耐性遺伝子に関する研究

東北学院大学大学院	学生員	○佐藤充則
東北学院大学工学部		洞口厚
日本学術振興会	正員	成田勝
東北学院大学工学部	フェロー	遠藤銀朗

1. はじめに

ヒ素による環境汚染は、我々の生活環境を快適に維持する上で極めて重大な問題となっている。本研究室ではこのような問題解決のために、微生物による生物学的環境浄化技術の開発を目的として研究を進めている。以前、本研究室では熊本県の水俣湾底泥から水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. MB24 株を分離し遺伝子解析を行った。その結果、*Bacillus* sp. MB24 株はクラス II トランスポゾンを持有し、そのトランスポゾン上に水銀耐性遺伝子群 (*mer* オペロン) とヒ素耐性遺伝子群 (*ars* オペロン) をコードしていることを明らかにした。しかしながら、水俣湾底泥から分離された他の数多くの水銀耐性細菌は *Bacillus* sp. MB24 株と同一の *mer* オペロンを持有するものの、*ars* オペロンの持有の有無についてはまだ明らかにされていない。

よって、本研究では水俣湾底泥から分離された同一の *mer* オペロンを持有する水銀耐性細菌 11 株を用いて、ヒ素耐性能の評価と *ars* オペロンの持有の有無について探索を行った。

2. 実験材料および実験方法

2-1 供試細菌株

水俣湾底泥から分離した全く同一の *mer* オペロンを持有する水銀耐性細菌 *Bacillus megaterium* MB1 株、*Bacillus* sp. MB5 株、*Bacillus* sp. MB8 株、*Bacillus* sp. MB9 株、*Bacillus* sp. MB22 株、*Bacillus* sp. MB23 株、*Bacillus* sp. MB25 株、*Bacillus* sp. MB26 株、*Bacillus* sp. MB27 株、*Bacillus* sp. MB28 株および *Bacillus* sp. MB29 株の 11 細菌株を用いた。また、ヒ素耐性細菌 *Bacillus subtilis* 168 株、*Bacillus* sp. MB24 株、*Staphylococcus aureus* RN23 8325 株、*Escherichia coli* K12 株およびヒ素感受性細菌 *Bacillus subtilis* 168S 株の 5 細菌株を比較対照細菌株として用いた。

2-2 ヒ素化合物に対する耐性能の評価

上記の水銀耐性細菌 11 株を用いて、3 価のヒ素化合物(ヒ酸水素二ナトリウム 7 水和物($\text{Na}_2\text{HAsO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)) および 5 価のヒ素化合物(メタ亜ヒ酸ナトリウム(NaAsO_2)) に対する耐性能の評価を行った。耐性能の評価は、様々なヒ素化合物濃度を含んだ LB 液体培地で 16 時間培養を行い、最小阻害濃度(MIC)および最大耐性濃度(MTC)を決定することにより行った。また、比較対照としてヒ素耐性細菌 *B. subtilis* 168 株とヒ素感受性細菌 *B. subtilis* 168S 株を用いた。

2-3 ヒ素耐性遺伝子の探索

水銀耐性細菌 11 株から抽出したトータル DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーション法、PCR 法および PCR-RFLP 法により、*B. subtilis* 168 株、*Bacillus* sp. MB24 株、*S. aureus* RN23 8325 株および *E. coli* K12 株由来の *ars* オペロンを持有するかどうかの探索を行った。また、これらの細菌株が保有する *ars* オペロン構造を Fig.1 に示す。

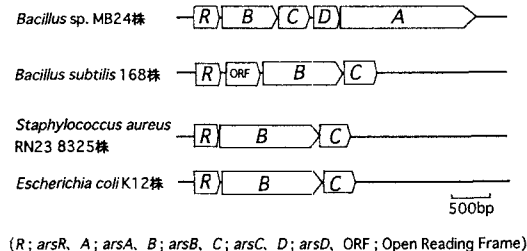


Fig.1 各細菌株の*ars*オペロン領域の構成

3. 実験結果および考察

3-1 ヒ素化合物に対する耐性能の評価結果

Table 1 に各細菌株のヒ素化合物に対する耐性能の評価結果を示す。水銀耐性細菌 11 株は、3 価のヒ素化合物(As(III))に対して、ヒ素耐性細菌 *B. subtilis* 168 株と同一か、またはそれ以上の高い耐性を示した。また、ヒ素感受性細菌 *B. subtilis* 168S 株と *B. subtilis* 168 株の耐性は同様なため、*B. subtilis* 168 株由来の *ars* オペロンは、3 価のヒ素化合物に対して耐性を持たないと考えられた。よって、*B. subtilis* 168 株と同様の耐性を示した 4 細菌株は、3 価のヒ素に対して耐性を持たないと考えられた。

一方、5 価のヒ素化合物(As(V))に対して、水銀耐性細菌 11 株は *B. subtilis* 168 株に比べ高い耐性を示すことが明らかになった。特に、*Bacillus* sp. MB23 株は 10 倍以上の極めて高い耐性を示した。このことより、11 細菌株は何らかのヒ素耐性決定遺伝子を保有すると考えられる。

3-2 ヒ素耐性遺伝子の探索結果

Table 2 に 11 細菌株を用いてハイブリダイゼーションを行った結果を示す。その結果、*Bacillus* sp. MB24 株由来の *ars* オペロンプローブとハイブリダイズしたのは、*Bacillus* sp. MB22 株と *Bacillus* sp. MB25 株であった。しかし、11 細菌株は *B. subtilis* 168 株、*S. aureus* RN23 8325 株および *E. coli* K12 株由来の *ars* オペロンプローブとはハイブリダイズされなかった。続いて、11 細菌株を用いて *B. subtilis* 168 株、*Bacillus* sp. MB24 株、*S. aureus* RN23 8325 株および K12 株由来の *ars* オペロン領域を標的として PCR 増幅を行った。その結果、*Bacillus* sp. MB22 株と *Bacillus* sp. MB25 株の PCR 産物は、*Bacillus* sp. MB24 株の保有する *ars* オペロンと同じ DNA サイズの 4.4kbp で増幅された。そして、得られた PCR 産物を用いて RFLP 解析を行った結果、*Bacillus* sp. MB24 株の PCR 産物と同一の RFLP パターンを示した。また、*S. aureus* RN23 8325 株および *E. coli* K12 株由来の *ars* オペロンを標的として PCR を行った結果、PCR 産物は得られなかった。

以上の結果より、*Bacillus* sp. MB22 株と *Bacillus* sp. MB25 株は *Bacillus* sp. MB24 株と同一の *ars* オペロンを保有すると考えられた。また、他の細菌株は今まで知られている *ars* オペロンと異なる *ars* オペロンを保有している可能性があると考えられた。

Table 1 ヒ素耐性能の評価結果

	As resistance (mM)			
	As(III)		As(V)	
	MTC	MIC	MTC	MIC
<i>Bacillus megaterium</i> MB1	4	6	38	40
<i>Bacillus</i> sp. MB4	4	6	40	50
MB5	4	6	50	60
MB6	4	6	50	60
MB22	10	12	35	38
MB23	10	12	250	300
MB24	12	14	28	30
MB25	10	12	40	50
MB26	10	12	60	80
MB27	10	12	60	80
MB28	10	12	60	80
MB29	10	12	40	50
<i>Bacillus subtilis</i> 168	4	6	38	40

MTC: 最大耐性能濃度 MIC: 最小阻害濃度

Table 2 各細菌株の *ars* オペロンの探索結果

	Hybridization			
	<i>ars</i> オペロンプローブ (MB24株由来)	<i>ars</i> オペロンプローブ (168株由来)	<i>ars</i> オペロンプローブ (P1250株由来)	<i>ars</i> オペロンプローブ (<i>E. coli</i> K12株由来)
	(4.4kbp)	(4.4kbp)	(4.4kbp)	(4.4kbp)
<i>Bacillus megaterium</i> MB1	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. MB4	-	-	-	-
MB5	-	-	-	-
MB6	-	-	-	-
MB22	+	-	-	-
MB23	-	-	-	-
MB24	+	-	-	-
MB25	+	-	-	-
MB26	-	-	-	-
MB27	-	-	-	-
MB28	-	-	-	-
MB29	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 168	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> K12	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> RN23 8325	-	-	+	-

+ : Hybridized - : No Hybridized

4. おわりに

本研究においては、水俣湾底泥から分離された同一の *mer* オペロンを保有する水銀耐性細菌 11 株を用いて、*ars* オペロンの探索を行った。その結果、*Bacillus* sp. MB22 株および *Bacillus* sp. MB25 株は *Bacillus* sp. MB24 株の保有する *ars* オペロンと同一のオペロンを保有することが明らかになった。また、他の細菌株は今まで知られている *ars* オペロンと異なる *ars* オペロンを保有している可能性があると考えられた。