

VII-19 *Bacillus* sp.が保有すると考えられる新規ヒ素耐性遺伝子群の 探索に関する研究

東北学院大学工学部	学生員	○小幡紘平
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	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して取り上げられている。そのため、微生物を利用したヒ素の生物学的環境浄化技術の開発を目的として研究が進められてきている。

従来からの研究で、ある種の微生物は、毒性の強い5価のヒ素化合物をより毒性の強い3価のヒ素化合物に還元するヒ素耐性メカニズムを持つ *ars* オペロンを保有していることが知られている。しかしながら、この耐性メカニズムをヒ素汚染の環境浄化技術に利用することは困難である。そこで、3価および5価のヒ素化合物を無害化または弱毒化するヒ素耐性メカニズムを持つ *ars* オペロンが必要と考えられる。そのため、従来から知られているヒ素耐性メカニズムとは異なる新規のヒ素耐性メカニズムを持つ *ars* オペロンを探索し解析することが重要であると考えられる。

よって、本研究においては、新規のヒ素耐性メカニズムを持つ *ars* オペロンを探索し、解析することを目的として研究を行った。

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水銀耐性細菌 *Bacillus* sp. MB24 株を用いた。

2-2 ヒ素耐性組換え大腸菌株の作製

Bacillus sp. MB24 株の保有する *ars* オペロン領域とヒ素耐性に関与すると考えられる遺伝子群を3つの領域に分けて大腸菌 *Escherichia coli* DH5 α 株にクローニングし、ヒ素耐性組換え大腸菌株を作製した。

2-3 ヒ素耐性組換え大腸菌株のヒ素耐性能の評価

2-2 で作製したヒ素耐性組換え大腸菌株を用いて、3価のヒ素化合物（メタ亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO_2)) および5価のヒ素化合物（ヒ酸水素二ナトリウム7水和物 ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)) に対する耐性能の評価を行った。耐性能の評価は、最大耐性濃度 (MTC) と最小阻害濃度 (MIC) を決定することによって行った。

3. 実験結果および考察

3-1 ヒ素耐性組換え大腸菌株の作製結果

Bacillus sp. MB24 株の保有する *ars* オペロン領域とヒ素耐性に関与すると考えられる遺伝子群の領域をそれぞれクローニングし (Fig. 1 に示した①～③領域)、ヒ素耐性組換え大腸菌株の作製を行った (Fig. 1)。クローニングした領域は、*ars* オペロンの領域 (①の領域)、*arsR* 遺伝子とその下流側に存在する3つの ORF の領域 (②の領域)、および①と②領域の両方を含む領域 (③の領域) とした。また、作製した組換え大腸菌株は、①領域を組み込んだ *Escherichia coli* DH5 α / pHYARS1 株、②領域を組み込んだ *Escherichia coli* DH5 α / pHYARS2 株および③領域を組み込んだ *Escherichia coli* DH5 α / pHYARS3 株と命名した。

3-2 組換え大腸菌株のヒ素耐性能の評価結果

Table 1 に 3-1 で作製した各組換え大腸菌株を用いて、3価および5価のヒ素化合物に対する耐性能の評価を行った結果を示す。また、比較対照株として *Escherichia coli* DH5 α / pHY300PLK 株を用いた。3価のヒ素化合物の耐性能評価結果において、各組換え大腸菌株は耐性を示さなかった。また、5価のヒ素化合物の耐性能評価において、*Escherichia coli* DH5 α / pHYARS1 株と *Escherichia coli* DH5 α / pHYARS2 株は耐性を示さなかったものの、*Escherichia coli* DH5 α / pHYARS3 株は *Escherichia coli* DH5 α / pHY300PLK 株の MIC より2倍以上高い耐性を示した。

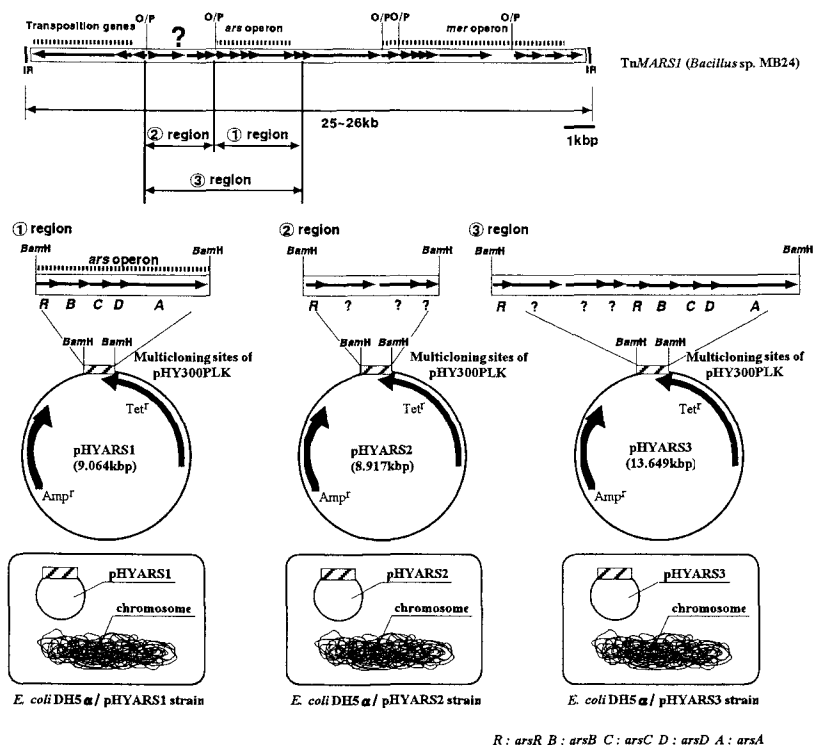


Fig. 1 作製したヒ素耐性組換え大腸菌株

Table 1 ヒ素耐性能の評価結果

	As resistance (mM)			
	As(III)		As(V)	
	MTC	MIC	MTC	MIC
<i>E. coli</i> DH5 α / pHYARS1	2	4	10	20
<i>E. coli</i> DH5 α / pHYARS2	2	4	10	20
<i>E. coli</i> DH5 α / pHYARS3	2	4	40	50
<i>E. coli</i> DH5 α / pHY300PLK	2	4	10	20
<i>Bacillus</i> sp. MB24	12	14	20	30
<i>Bacillus subtilis</i> 168	4	6	30	40

MTC: 最大耐性能濃度 MIC: 最小阻害濃度

4. おわりに

本研究で行った結果から、全ての組換え大腸菌株は3価のヒ素化合物に耐性を示さなかったことから、①、②および③領域の遺伝子群は3価のヒ素化合物の耐性に関与しないことが明らかとなった。また、*Escherichia coli* DH5 α / pHYARS1株と*Escherichia coli* DH5 α / pHYARS2株は5価のヒ素化合物に耐性を示さなかったが、*Escherichia coli* DH5 α / pHYARS3株は耐性を示したことから、②領域の*arsR*遺伝子が①領域の*ars*オペロンの発現に関与したことによって、耐性を示したと考えられた。