

新規ヒ素耐性オペロンの単離と解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ◦相馬和侑

東北学院大学大学院(工) 佐藤元氣

東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介

東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

1. はじめに

ヒ素による土壤汚染・地下水汚染は、世界規模での深刻な環境問題になっている。日本の土壤汚染では、ヒ素は鉛に次いで環境基準超過の報告件数が多い。その処理対策は主に封じ込め、固化・不溶化、廃棄物としての埋立処分などがある。これらの処理対策は一時的なものであり、必ずしも根本的な浄化方法とは言えない。また、熱処理や電気化学的処理は高コストの為、あまり用いられていない。一般的には硫酸やシュウ酸などを用いた土壤洗浄による抽出が比較的有効な浄化手法とされているが、浄化後に土壤機能を損なってしまう恐れがある。そこで本研究では安全かつ低コストな浄化技術として、微生物を利用した生物学的浄化技術に注目した。本研究室で水俣湾から単離し *Bacillus* sp. MB23(以下、MB23 株と記述)は、5 価のヒ素に対し既知の細菌に比べて非常に高い耐性能を示す。我々は、この MB23 株のヒ素耐性機構を明らかにし、ヒ素汚染浄化技術に役立てることを目指している。本研究では、MB23 株のヒ素耐性遺伝子を同定することを目的として研究を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1 ヒ素耐性細菌 *Bacillus* sp. MB23 株の DNA ライブラリーの構築

MB23 株のヒ素耐性遺伝子を単離するため、MB23 株の DNA ライブラリーの構築を行った。DNA ライブラリーの作製には、MB23 株の全 DNA を制限酵素 *Sau3AI* で部分消化し、電気泳動で 10 kbp 以上の断片を生じたサンプルを用いた。またベクターとして、Charomid 9-28 を用い

キーワード 微生物 ヒ素 環境浄化 遺伝子

連絡先 遠藤銀朗(宮城県多賀城市中央 1-13-1)

た。その他の実験操作は、Wako 社の Charomid Cloning Kit のプロトコールに従った。宿主には *E. coli* DH5 を用いた。

2-2 DNA ライブラリーからのヒ素耐性クローンの取得

構築した DNA ライブラリー大腸菌を、20mM の 5 価のヒ素を含む LB 液体培地に植菌した後 72hr 培養し、各サンプルの OD₆₀₀ の値(濁度)を測定した。菌の増殖が観察されたサンプルを同培地で継代培養し、ヒ素耐性を示すクローンを選択的に増殖させた。

3. 実験結果と考察

3-1 ヒ素耐性細菌 *Bacillus* sp. MB23 株の DNA ライブラリーの構築

2-1 の方法に従ったライブラリー作製の結果、約 30000 種類のクローンが得られた。得られた DNA ライブラリー中から無作為に 12 クローンを選んでプラスミドを取り、制限酵素 *HindIII* と *EcoRI* で同時に切断し電気泳動を行った。電気泳動の結果から、平均インサート長を計算し(約 8000bp)、ライブラリーの品質の評価を行った。 $W = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$ (P はカバー率、F は挿入長

/ゲノム長、W は必要コロニー数の式) にカバー率 0.99、挿入長 8000、ゲノム長 5×10^6 を代入しカバー率を計算した結果、必要コロニー数は 2875 個であった。取得コロニー数が約 30000 個だったので全ゲノム長の 99% 以上をカバーしたといえる。

3-2 DNA ライブラリーからのヒ素耐性クローンの取得

構築した DNA ライブラリーを、20mM の 5 価

TEL 022-368-7493

のヒ素を含む LB 液体培地に 5 回継代培養した結果、ヒ素耐性能の上昇したクローンを取得する事が出来た。この中から無作為にいくつかのプラスミドを取り、*EcoRI* + *HindIII* で切って電気泳動した。その結果、同一のバンドパターンがみられたクローンが保持するプラスミドを pCAsV20-2 と命名した。

3-3 MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の塩基配列

pCAsV20-2 中にコードされたヒ素耐性遺伝子の塩基配列を決定するため、pCAsV20-2 に含まれる DNA 断片の塩基配列を部分的に決定した。その結果、既知のヒ素耐性遺伝子と相同性を示す領域が存在していたため、これを含む約 5.5kb の DNA 断片を取得することにし、このプラスミドを pUAV20-11 とした。

pCAsV20-2 を制限酵素 *HindIII* で切り、約 5.5kb 断片をベクターである pUC19 に挿入し、得られたプラスミドを pUAV20-11 と命名した。そして、pUAV20-11 の挿入断片の塩基配列の決定を試みた。その結果、本プラスミドにはヒ素耐性に関与すると考えられる、連続する 5 つの遺伝子がコードされていることが明らかとなった。このうち、3'末端にコードされた遺伝子は、完全長の配列が含まれていなかった。得られた DNA 配列を基に作製した遺伝子マップを Fig.1 に示す。これらは *Lysinibacillus sphaericus* C3-41 の推定 *ars* 遺伝子群と DNA 塩基配列及びタンパク質アミノ酸レベルで高い相同性を示した。よって、本遺伝子群を *arsRBCDA* と命名した。既知の *Ars* タンパク質との相同性から考えると、*ArsR* は *ars* 遺伝子の発現を調整する機能、*ArsB* は 3 価のヒ素を細胞外に排出する機能、*ArsC* は 5 価のヒ素を 3 価に還元する機能、*ArsD* は 3 価のヒ素を *ArsB* まで運搬する機能、*ArsA* は *ArsB* に排出するためのエネルギーを供給する機能を担っていると考えられた。また、MB23 株の *ars* 遺伝子群を、以前本研究室で解析された *Bacillus* sp. MB24 の *ars* 遺伝子群と比較したその結果を Table 1 に示す。以上の結果から、本遺伝子群が

MB23 株のヒ素耐性に関与していることが強く示唆された。

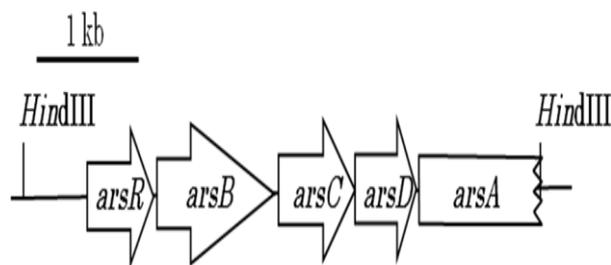


Fig.1 pUAV20-11 にコードされた MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の配置

Table 1 MB23 と MB24 の *ars* 遺伝子群の相同性

	MB23	MB24	相同性 (DNA)	相同性 (protein)
<i>arsR</i>	327 bp (108 aa)	348 bp (113 aa)	-	61%
<i>arsB</i>	987 bp (326 aa)	1056 bp (349 aa)	76%	83%
<i>arsC</i>	420 bp (326 aa)	405 bp (132 aa)	72%	76%
<i>arsD</i>	330 bp (107 aa)	360 bp (117 aa)	-	71%
<i>arsA</i>	1393 bp (464 aa)	1761 bp (584 aa)	74%	74%

4. おわりに

本研究によって、MB23 株のヒ素耐性遺伝子群を明らかにすることが出来た。遺伝子の相同性解析の結果より、3 価のヒ素イオンに特異的に高い耐性を示す MB24 株のヒ素耐性遺伝子と類似することが知られたが、遺伝子およびタンパク質としての相違点も示された。MB23 株が 5 価のヒ素に特に高い耐性を示すことから、このような特徴が耐性遺伝子のどのような違いによってもたらされるかについて明らかにすると共に、そのような特徴をヒ素汚染の浄化にどのように活用出来るかについて、今後研究を行う必要があると考えられる。