

新規ヒ素高耐性細菌の遺伝子構成と耐性機構の解明に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○倉田真志

東北学院大学大学院 非会員 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。その処理対策は主として封じ込め、固化・不溶化、廃棄物としての埋立処分などがなされている。しかし、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。ヒ素の浄化には一般的に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。本研究で水俣湾から単離した *Bacillus* sp. MB23(以下、MB23 株と記述) は、既知の細菌に比べてヒ素に対して非常に高い耐性を示す。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の全容を明らかに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 MB23 株の全ヒ素耐性遺伝子群の解明

以前の研究で、MB23 株のヒ素耐性遺伝子群のうち *arsRBCD* の単離に成功した。しかし、その下流の *arsA* 遺伝子については 3'側が欠けた不完全なものであった。*arsA* の 3'末端を取得するために MB23 の *arsRBCD* と高い相同性を示す *Lysinibacillus sphaericus* C3-41 の *arsA* の 3'末端 (R②)、下流 100 bp(R③)、および下流 1000 bp(R④)のプライマーを設計し(Fig. 2)、既得の *arsA* 内部のプライマー(F)と組み合わせて断片の増

幅を試みた。

2-2 逆転写 PCR を用いた MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の転写解析

MB23 株を 50 μ M のヒ素存在下、非存在下で培養し、RBC Bioscience 社の Total RNA Extraction Kit を用いて total RNA を取得した。取得した total RNA を用い、東洋紡社の ReverTra Ace、9mer の Random Primer を用いて逆転写反応を行った。そこで得られた cDNA を鋳型として *arsA* の部分配列を増幅するプライマーを用い PCR を行った。PCR の標的とした領域を Fig. 1 に示す。

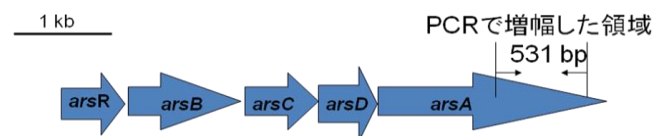


Fig. 1 MB23 株の *ars* オペロンの構造

2-3 定量 PCR を用いた MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の転写解析

抽出 RNA を逆転写した *arsA*-cDNA について Roche 社の LightCycler を用い、定量 PCR を行った。鋳型とプライマーは 2-2 と同じものを使用した。

3. 実験結果と考察

3-1 MB23 株ヒ素耐性遺伝子群全長配列の取得

2-1 に示した方法によって *arsA* 遺伝子の未知領域を PCR 法によって解析した結果、Fig. 3 に示すように、プライマー R③を用いたとき予想される 1000 bp の増幅が確認された。得られた断片の塩基配列を決定したところ、*arsA* の全長

を決定することができた。今回の研究でその全容が明らかになった MB23 の *arsRBCDA* 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。既知の Ars タンパク質との相同性から考察して、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 はヒ素と吸着しそれを ArsB に送り出す機能を担うタンパク質であると推定される。

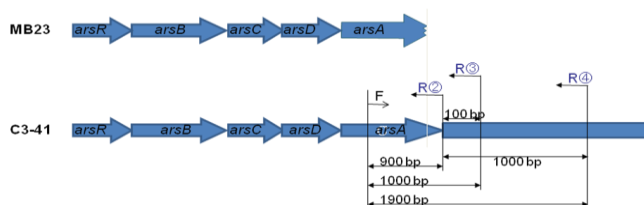


Fig. 2 *arsA* の 3'末端取得に用いたプライマー

3-2 逆転写 PCR を用いた MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の転写解析

ヒ酸存在下で *ars* 遺伝子群が転写されているかを調べるために逆転写 PCR を行った。ヒ酸存在下、非存在下で生育させた MB23 株から取得した RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型として、*arsA* の一部分を増幅するプライマーを用い PCR を行った。その結果、Fig. 3 に示すように予想されたサイズ(約 500 bp)にヒ酸存在下、非存在下ともに PCR 産物が見られた。

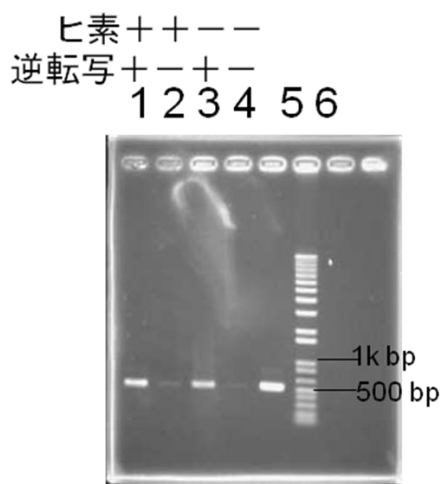


Fig. 3 逆転写 PCR の電気泳動写真

Lanes 1-4; 逆転写 PCR 産物 Lanes 5; MB23 total DNA を鋳型とした PCR 産物(コントロール)
Lane6; 1 kb ladder

3-3 定量 PCR を用いた MB23 のヒ素耐性遺伝子群の転写解析

逆転写 PCR を用いた MB23 のヒ素耐性遺伝子群の転写解析から、ヒ酸非存在下でも PCR 産物が見られたので定量 PCR によって転写量を測定した。結果は Table 1 に示すようにヒ酸存在下で約 16 倍転写されていたため、ヒ素耐性遺伝子群はヒ酸存在下でより多く転写が大きく活性化されることが示された。

Table 1 定量 PCR の結果

	(Copies/ng cDNA)
ヒ素有リ	8.875×10^3
ヒ素無し	5.314×10^2

4. おわりに

本研究によって、MB23 株のヒ素耐性遺伝子群の全塩基配列の解析に成功した。この配列は既知のヒ素耐性遺伝子群と高い相同性を示した。また、このヒ素耐性遺伝子群がヒ酸存在下のときに転写されているかを調べた。その結果、ヒ酸非存在下に比較してヒ酸存在下での転写量が増加した。これらより、MB23 株のヒ素耐性遺伝子群はヒ素耐性に関与していると考えられる。

今後の展望として、ヒ素耐性遺伝子群を破壊して、MB23 株の高い耐ヒ酸性能が今回解明したヒ素耐性遺伝子群にのみ依存するのか、或いはその他の遺伝子群によるものかを調べると共に、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、今後研究を行いたいと考えている。