

# ロドコッカス属細菌おけるヒ素耐性遺伝子群の単離と解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○藤田真由

長岡技術科学大学 工学部 非会員 福田雅夫

東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介

## 1. 序

ヒ素による環境汚染・地下水汚染は、世界規模での深刻な環境問題となっている。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壌浄化による抽出が比較的有効な浄化手法とされているが、浄化後に土壌機能を損なってしまう恐れがある。そこで本研究室では、土壌機能を損なうことなく、かつ低コストで行うことが可能とされる微生物を利用した生物学的な浄化技術の開発を目的として研究を進めている。

*Rhodococcus jostii* RHA1 は土壌環境中から PCB 分解菌として単離された細菌であり、2006 年には RHA1 株の全 DNA 配列が決定された。この配列を調べたところ、ro03367、ro03368、ro03369 の各オープンリーディングフレームがそれぞれ既知のヒ素耐性遺伝子である *arsR*、*arsB*、*arsC* とそれぞれ相同性を示したため、これらを *arsR*、*arsB*、*arsC* と命名した。

そこで本研究では、これらの遺伝子群が実際に RHA1 のヒ素耐性に関与しているのかを調べるために

- (1) RHA1 のヒ素耐性能の評価
- (2) *arsRBC* 破壊株の解析
- (3) *arsR* プロモーター解析を試みた。

## 2. 実験方法

### 2-1 *Rhodococcus* のヒ素耐性能の評価

- (1) LB 液体培地 10ml に M9+ビフェニルプレート

で生育させた RHA1 を植菌し一晩培養した。

- (2)新しい LB 液体培地に前培養した菌液を入れ、3 価のヒ素として NaAsO<sub>2</sub> を 1mM、3mM、10mM、5 価のヒ素として Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> を 10mM、30mM になるように加えた。

- (3) 0 時間から 15 分毎に 96 時間 OD<sub>660</sub> を測定した。

### 2-2 *arsR* プロモーター解析

- (1)PCR で *arsR* プロモーター領域を増幅した。
- (2)レポータープラスミド pKLA1 のルシフェラーゼ遺伝子上流に増幅した DNA を挿入した。
- (3)作製したプラスミドを RHA1 に Electroporation で導入した。
- (4)LB+Km 液体培地に形質転換体を植菌し、30°C で前培養後、菌液を OD<sub>600</sub>=1.0 に合わせた。
- (5)菌液 5ml を試験管に移し、終濃度 250μM の 5 価のヒ素を加えて培養した。
- (6)0 時間と 24 時間後の OD<sub>600</sub> とルシフェラーゼ活性を測定した。
- (7)ルシフェラーゼ活性を OD<sub>600</sub> の値で割ったものを単位菌体当たりのプロモーター活性とした。

## 3. 実験結果

### 3-1 RHA1 株のヒ素耐性評価

RHA1 のヒ素耐性能を調べるために、LB 液体培地で前培養した RHA1 の菌液を様々な濃度のヒ素を含む培地に 2%植菌し、0 時間から 15 分毎に 96 時間 OD<sub>660</sub> を測定した。

結果を図-1 に示す。1mM、3mM の 3 価のヒ素、10mM の 5 価のヒ素存在下での RHA1 の生育については、いずれもヒ素なしのときとほぼ同じ生育曲線となった。30mM の 5 価のヒ素存在下でも、0mM と比較すると 50 時間ほど生育し始める時間に遅れがあるものの、生育し始めてからは同じような増殖速度を示した。10mM の 3 価のヒ素存在

キーワード 微生物 ヒ素 環境浄化

連絡先 宮内啓介 (宮城県多賀城市中央 1-13-1)

TEL 022-368-7493

下では生育しなかった。独立したほかの回の実験では生育を示す場合も観察されることから、3 価のヒ素については 10mM 付近が生育限界であると考えられる。

以上の結果から、3 価のヒ素については 3mM に耐性を示し 5 価のヒ素については 30mM まで耐性を示すことが分かった。

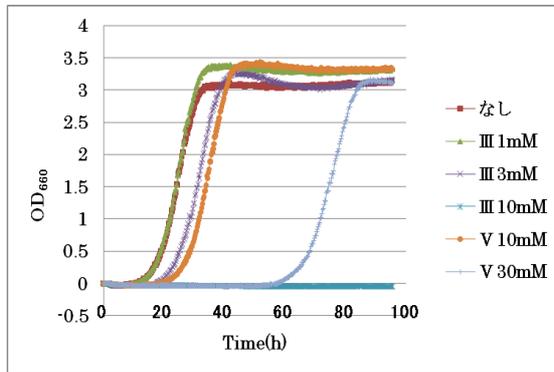


図-1 RHA1 のヒ素耐性能

### 3-2 *arsRBC* 破壊株の解析

*arsRBC* の機能を調べるために RHA1 の *arsRBC* 遺伝子群を破壊し、破壊株を RHA1 $\Delta$ *arsRBC* と命名した。

RHA1 $\Delta$ *arsRBC* のヒ素耐性能を調べるために、LB 液体培地で前培養した RHA1 $\Delta$ *arsRBC* の菌液を様々な濃度のヒ素を含む培地に 2% 植菌し、0 時間から 15 分毎に 96 時間 OD<sub>660</sub> を測定した。

結果を図-2 に示す。0.01mM の 3 価のヒ素、0.1mM の 5 価のヒ素存在下での RHA1 $\Delta$ *arsRBC* の生育については、いずれもヒ素なしとほぼ同じであった。0.1mM、1mM の 3 価のヒ素、1mM の 5 価のヒ素存在下では生育しなかった。RHA1 のヒ素耐性能(図-1)と比較すると、RHA1 は 1mM の 3 価のヒ素、10mM の 5 価のヒ素存在下で生育しているのに対して、RHA1 $\Delta$ *arsRBC* ではそれぞれ 1/10 の濃度である 0.1 mM の 3 価のヒ素、1mM の 5 価のヒ素存在下で生育が見られなかった。

以上より、RHA1 $\Delta$ *arsRBC* 株ではヒ素耐性能が低下していることから、*arsRBC* 遺伝子群は RHA1 においてヒ素耐性に関与していることが強く示唆された。

上記のことを確かめるため、RHA1  $\Delta$  *arsRBC* 株に *arsRBC* 遺伝子群を相補した。*arsRBC* を相補した破壊株の生育を RHA1 $\Delta$ *arsRBC* と同じヒ素濃度下で測定したところ、すべての濃度においてヒ素非存在下とほぼ同じ生育を示した(図は示さない)。

以上の結果から、*arsRBC* 遺伝子群は RHA1 に

おいてヒ素耐性に関与していることが明らかになった。

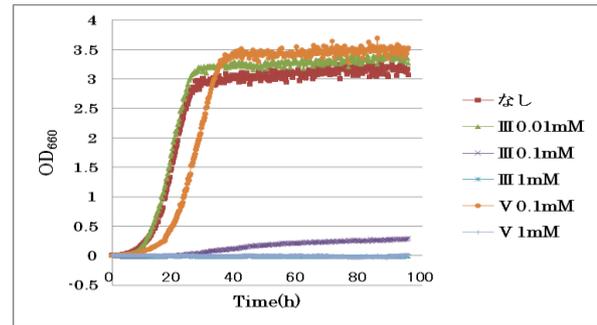


図-2 RHA1 $\Delta$ *arsRBC* のヒ素耐性能

### 3-3 *arsR* プロモーター解析

ArsR タンパク質は、ヒ素非存在下では *arsR* プロモーター領域に結合し、転写を抑制している。3 価のヒ素が存在すると、ArsR はヒ素と結合することでプロモーター領域から離れて転写が始まる。

ArsR が結合する DNA 領域を明らかにするため、レポータープラスミド pKLA1 のルシフェラーゼ遺伝子上流に *arsR* プロモーター領域を挿入したプラスミドを作製し RHA1 に導入した。得られた形質転換体をヒ素の存在/非存在下で培養した後ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、プロモーター領域が存在しない pKLA1 をもつ RHA1 はヒ素に応答しなかった。*arsR* の上流 100 bp、156 bp、308 bp、500 bp、627 bp のプロモーター領域を含んだレポータープラスミドをもつ RHA1 は全てヒ素に応答した。この結果から ArsR タンパク質がプロモーター領域と結合する場所は *arsR* の上流 100bp 以内にあることが明らかとなった。

## 4. 結論

RHA1 の *ars* オペロンの機能を明らかにするために実験を行い、以下の結果を得た。

- 1 RHA1 は 3mM の 3 価のヒ素、30mM の 5 価のヒ素存在下で生育する。
- 2 *arsRBC* を破壊するとヒ素耐性能は低下した。
- 3 ArsR タンパク質が *arsRBC* プロモーター領域と結合する場所は、*arsR* の上流 100 bp 以内に存在する。

これらの結果より、*arsRBC* は RHA1 のヒ素耐性に関与していることが示された。