

ヒ素耐性菌ロドコッカス属細菌のヒ素耐性遺伝子群の解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○平田一真
東北学院大学 工学部 非会員 中野渡優
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、地球規模で大きな環境問題になっている。ヒ素の処理方法としては主に封じ込め、固化、不溶化、廃棄物としての埋め立て処分等が挙げられる。しかしこれらの処理方法は一時的なものであり、必ずしも根本的な浄化方法ではない。また熱処理や電気化学的処理は高コストの為、あまり利用されていない。一般的には硫酸やシュウ酸などを用いた抽出による土壌浄化が比較的有効な浄化方法とされているが、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 erythropolis IAM1399 は、当研究室で *Rhodococcus* 属細菌の宿主として用いている細菌であり、同じ *Rhodococcus* 属である *Rhodococcus jostii* RHA1 等と比べて非常に高いヒ素耐性能があることが明らかになっている。また、IAM1399 は既知のヒ素耐性遺伝子群と相同性をもつ領域を2種類 (ars1、ars2 領域) もつことがこれまでの研究で明らかになっている。

本研究では IAM1399 のヒ素耐性機構を解明するために、(1) IAM1399 の ars1 領域破壊株の作製、及び (2) ars1 領域破壊株 (Δ ars1 株) のヒ素耐性能の評価を行った。また (3) Δ ars1 株に ars1 領域を相補しヒ素耐性能の評価を行った。

2. 実験方法

2-1 IAM1399 の ars1 領域破壊株の作製

(1) pK18 mob sacB に ars1 領域の上流 1 kb、下流 1 kb を導入し ars1 破壊用プラスミドを作製した。

(2) ars1 破壊用プラスミドを IAM1399 に導入し、上流と下流で相同組換えを起こさせ ars1 領域を破壊する。

(3) 破壊株の確認のためにサザン解析を行った。プローブとしては、ars1 領域の下流 1 kb を用いた。

2-2 IAM1399 株、 Δ ars1 株のヒ素耐性能の評価

(1) LB 液体培地 10 ml に IAM1399 株、 Δ ars1 株を植菌し、30 °Cで一晩培養した。

(2) 新しい LB 液体培地に前培養した菌液を2%植菌し、As(III)としてメタ亜ヒ素ナトリウム (NaAsO_2) を 10 mM、15 mM、20 mM、As (V) としてヒ素水素ナトリウム (Na_2HAsO_4) を 0 mM、50 mM、300 mM になるように加えた。

(3) 0 時間から 15 分毎に 72 時間 OD₆₆₀ を測定した。

2-3 Δ ars1 株に ars1 領域を導入した株のヒ素耐性能の評価

(1) 大腸菌-ロドコッカスシャトルベクターである pK4XSpe に ars1 領域を増幅した PCR 産物を導入し、ars1 相補用プラスミド (pK4ars1) を作製した。

(2) pK4ars1 をエレクトロポレーションを用いて Δ ars1 株に導入した。

(3) 2-2 と同様に Δ ars1 株 (pK4ars1) のヒ素耐性能の評価を行った。

3. 実験結果

3-1 IAM1399 の ars1 領域破壊株の作製

2-1 の方法で IAM1399 の ars1 領域を欠失させた。複数の候補株を得、それらの ars1 領域が欠失されたこと

キーワード: 微生物 ヒ素 遺伝子構造

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 宮内啓介研究室

TEL: 022-368-7445

を確認するために、*ars1* 領域の下流 1 kb をプローブとして使用しサザン解析を行った。*ars1* 領域が欠失されていれば *PvuII* と *EcoRI* 消化で 1952 bp に、*SphI* 消化で 529 bp にバンドが現れるはずである (図-1)。サザン解析の結果を図-2 に示す。候補株 7 番で目的のバンドが検出されたため、候補株 7 番を $\Delta ars1$ 株とした。

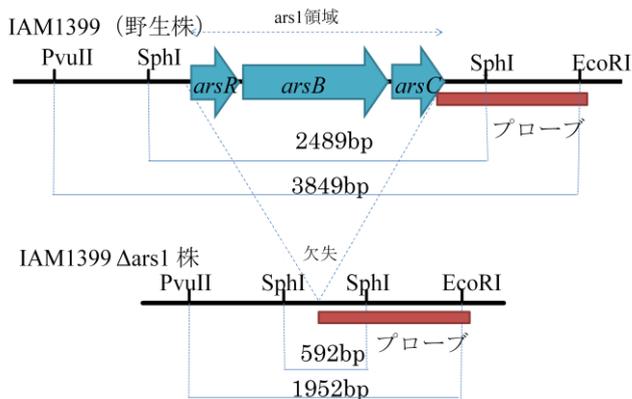


図-1 IAM1399 と $\Delta ars1$ 株の *ars1* 及びその周辺領域の遺伝子地図

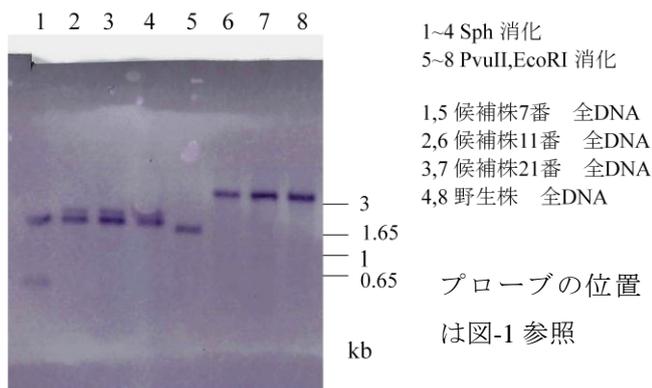


図-2 サザン解析の結果

3-2 IAM1399 株、 $\Delta ars1$ 株のヒ素耐性能の評価

IAM1399 株及び、 $\Delta ars1$ 株のヒ素存在下での生育を調べた。結果を図-3、図-4 に示す。 $\Delta ars1$ 株のヒ酸存在下での生育は、IAM1399 株と同程度であった。亜ヒ酸存在下においても $\Delta ars1$ 株の生育の立ち上がりが早くなったものの大きな変化はなかった。以上より *ars1* 領域がヒ素耐性に関与していない可能性、及び *ars1* 領域と *ars2* 領域が共にヒ素耐性に関与しており、どちらか一方が存在していれば十分である可能性が考えられた。

3-3 $\Delta ars1$ 株に *ars1* 領域を導入した株のヒ素耐性能の評価

$\Delta ars1$ 株に *ars1* 領域を導入し、ヒ素耐性を調べた。結果を図-5 に示す。*ars1* 領域を導入すると、ヒ素に対する耐性が IAM1399 より高くなった。これは *ars1* 領域

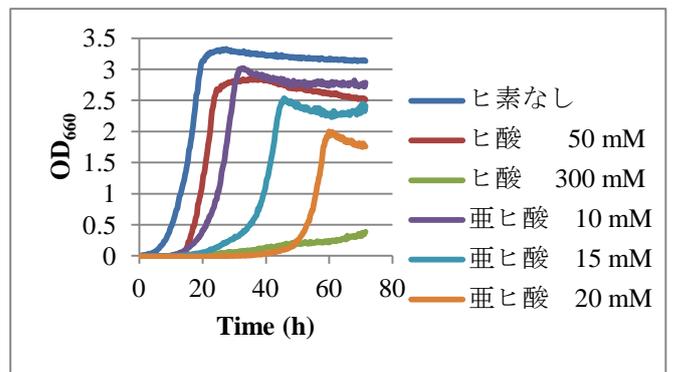


図-3 ヒ素存在下における IAM1399 の生育

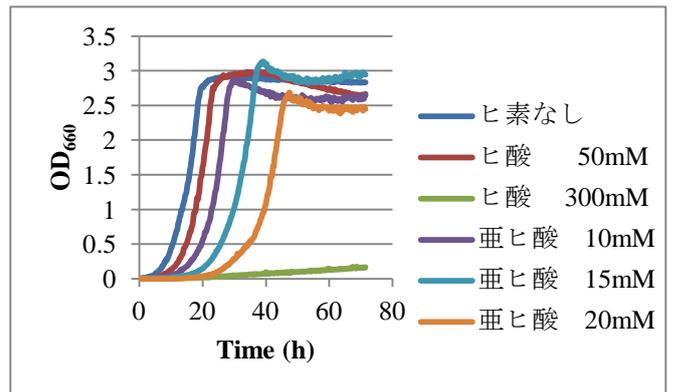
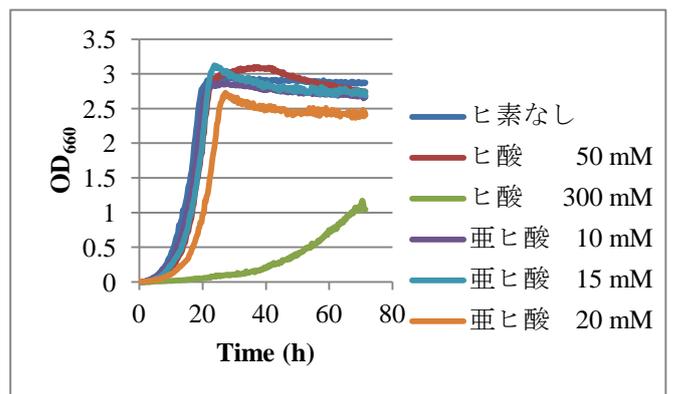


図-4 ヒ素存在下における *ars1* 破壊株の生育

をプラスミドとして導入したことにより *ars1* のコピー数が増加したためと考えられる。また *ars1* 領域が IAM1399 中でヒ素耐性に関与している事が強く示唆された。

図-5 ヒ素存在下における $\Delta ars1$ 株(pK4*ars1*)の生育



4. 結論

ars1 領域を高発現させるとヒ素耐性が上がったことから、IAM1399 中で *ars1* はヒ素耐性に関与している事が強く示唆された。 $\Delta ars1$ 株が野生株と同様のヒ素耐性を示したことから *ars2* 領域のみでもヒ素耐性を与えることが明らかになった。