

Rhodococcus erythropolis IAM1399 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 ○本間岬
東北学院大学 工学部 非会員 藤本和希
東北学院大学大学院 工学研究科 会員 平田一真
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 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 (図-1)。

本研究では IAM1399 のヒ素耐性機構を解明するために、IAM1399ars 領域のヒ素感受性 *Rhodococcus* 属細菌への導入、及び ars 領域導入株のヒ素耐性能の評価を行った。また、ars2 の中に存在する機能未知の ORF11 のヒ素耐性への関与を調べた。

2. 実験方法

2-1 使用菌株およびプラスミド

(1) ars 領域導入のために、大腸菌-ロドコッカスシャトルベクターである pK4XS を用いた。pK4XS に ars1 領域、ars2 領域、および ars2 領域から ORF11 を欠失させたものを導入し、pK4ars1、pK4ars2、pK4ars2ΔORF11 を作製した。

(2) ヒ素感受性 *Rhodococcus* 属細菌として、IAM1399 と同じ *Rhodococcus* 属でありヒ素耐性能をもたない *R. jostii* RHA1ΔarsRBC を用いた。

2-2 ars 領域導入株のヒ素耐性能の評価

(1) LB 液体培地 10 ml に、プラスミドを導入した RHA1ΔarsRBC を植菌し、30℃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)としてメタ亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO₂) を 10 mM、15 mM、20 mM、As(V)としてヒ酸水素二ナトリウム (Na₂HAsO₄) を 0 mM、100mM、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。

3. 実験結果

3-1 IAM1399ars 領域のヒ素感受性 *Rhodococcus* 属細菌への導入

IAM1399 の ars1 および ars2 領域をもつ pK4ars1、pK4ars2 をそれぞれエレクトロポレーションを用いてヒ素感受性 *Rhodococcus* 属細菌である *R. jostii* RHA1ΔarsRBC に導入した。ars1,ars2 領域の遺伝子地図を図-1 に示す。

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

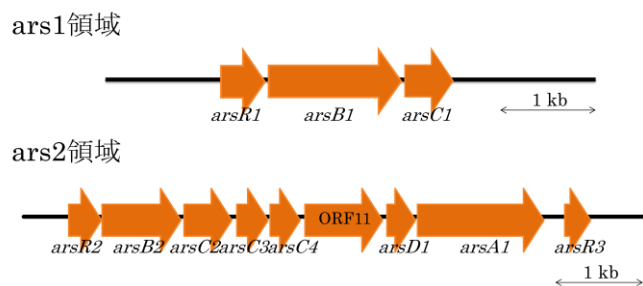


図-1 ars1、ars2 領域の遺伝子地図

3-2 ars 領域導入株のヒ素耐性能の評価

RHA1ΔarsRBC (pK4XS)、RHA1ΔarsRBC (pK4ars1)、RHA1ΔarsRBC (pK4ars2)のヒ素存在下での生育を調べた。結果は図-2、図-3、図-4 に示す。

ars 領域を含まない pK4XS を持つ RHA1 Δ arsRBC ではヒ素存在下で菌の増殖が観察できなかった (図-2)。一方、pK4ars1 と pK4ars2 を導入した場合は、ヒ素存在下で菌の増殖が観察できた。このことから、ars1 領域、ars2 領域は共に IAM1399 中でヒ素耐性に関与していると考えられる。

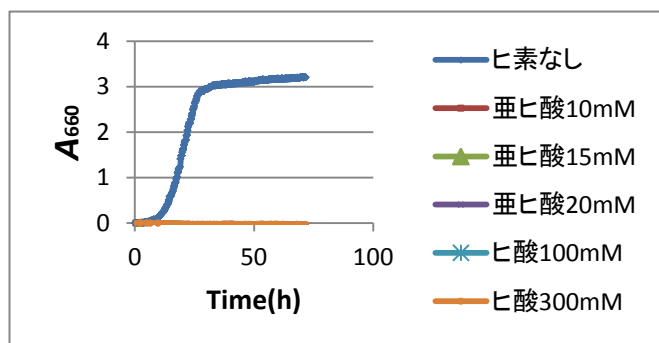


図-2 ヒ素存在下での RHA1ΔarsRBC (pK4XS)の生育

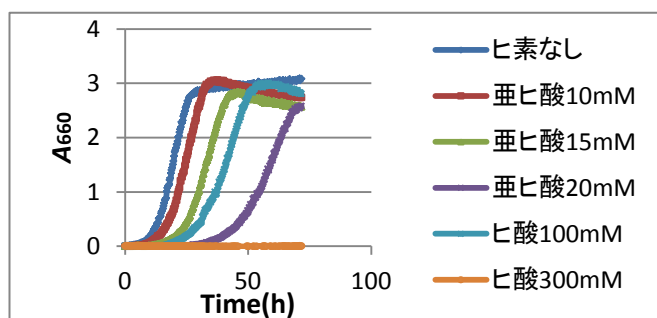


図-3 ヒ素存在下での RHA1ΔarsRBC (pK4ars1)の生育

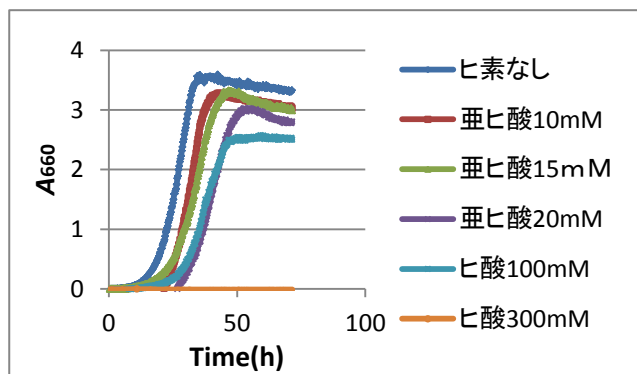


図-4 ヒ素存在下での RHA1ΔarsRBC (pK4ars2) の生育

3-3 ars2 領域中の ORF11 を欠失させたプラスミドを導入した株のヒ素耐性能の評価

ars2 領域の中には機能未知の ORF11 が存在するので、これがヒ素耐性に関与しているのか調べることにした。

ars2 の ORF11 を欠失させた pK4ars2ΔORF11 を RHA1 Δ arsRBC に導入した株のヒ素存在下での生育を調べた。結果は図-5 に示す。

図-4 と図-5 の生育曲線を比べると、ほとんど同じである。このことから、今回調べたヒ素の濃度においては、ORF11 はヒ素耐性に関与していないと考えられる。

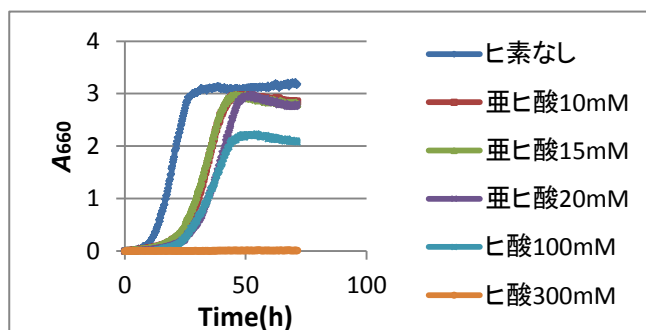


図-5 ヒ素存在下での RHA1ΔarsRBC (pK4ars2ΔORF11) の生育

4. 結論

IAM1399 の ars 領域を持つ pK4ars1 と pK4ars2 は、ヒ素感受性 *Rhodococcus* 属細菌にヒ素耐性を与えるため、ars1 領域、ars2 領域が IAM1399 のヒ素耐性に共に関与していることが強く示唆された。また、ORF11 を欠失してもヒ素耐性に大きな変化がないことから、ORF11 は IAM1399 のヒ素耐性に関与していないことが示唆された。