

ヒ素高蓄積植物モエジマシダ根圏での亜ヒ酸酸化における微生物の関与に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○平間 知之

東北学院大学 工学部 学生会員 小林 紘太

東北学院大学 非会員 黄 毅、阿部 凌平、堀内 孝人

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. 序論

ヒ素による土壤汚染、地下水汚染は、地球規模で大きな環境問題となっている。ヒ素は5~50 mg を摂取すると中毒症状を起こすだけでなく、数十 ppb の低濃度であっても長時間の摂取によって慢性中毒を引き起こし、発癌等の原因となる為、ヒ素による環境汚染実態の早急な解明及び汚染の除去が必要になっている。ヒ素汚染土壤の浄化には、ヒ素高蓄積植物であるモエジマシダ(*Pteris vittata*)を用いたファイトレメディエーション (Phytoremediation) が効果的だと考えられる。ファイトレメディエーションは、植物がもつ生理的作用や、植物と土壤に生息する微生物などとの共生関係を利用する環境修復技術である。また、水耕栽培を用いることでヒ素汚染水の浄化にも効果があると考えられる。モエジマシダは、土壤中に存在する亜ヒ酸(図-1 As(III))を根圏部でヒ酸(図-1 As(V))に変換し、根部から吸収する。吸収されたヒ酸は植物体内で亜ヒ酸に変換され、地上部の羽片で亜ヒ酸として蓄積される。土壤中のヒ素の形態変化(図-1)には微生物が関与していると考えられているものの、詳細は未だ不明である。本研究では、モエジマシダ根圏の亜ヒ酸酸化への微生物の関与を明らかにするため、モエジマシダを水耕栽培したヒ素汚染水中の微生物がもつ亜ヒ酸酸化酵素遺伝子(*aioA*)の多様性の解析、およびモエジマシダ根圏からの亜ヒ酸酸化細菌の単離を試みた。

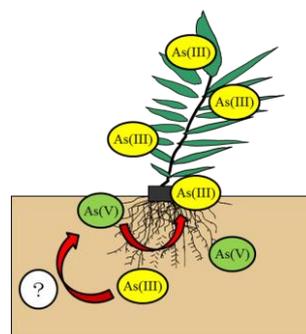


図-1 モエジマシダ根圏部のヒ素の形態変化

2. 実験方法

2-1 シダ栽培水中の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子の解析

亜ヒ酸 500 ppb を含む精製水 5L を入れたタンク中でモエジマシダ 3 株を培養したものと、シダを植えずに放置したものを用意した。2 種の溶液のヒ素濃度を一定時間ごとに測定した結果、シダを植えた溶液でのみ亜ヒ酸がヒ酸に変換されていたため、この溶液を用いて解析を行った。シダ栽培水をフィルターろ過して菌体を回収し、ジルコニアビーズを用いて破碎したものを鋳型として、酵素に TaKaRa Ex Taq を用いて PCR 法により *aioA* を増幅した。PCR 条件は以下のとおりである。94 °C, 5 min、94 °C, 45 sec(変性)、54~50 °C(1 cycle ごとに 0.5 °C ずつ温度を下げる), 45 sec(アニーリング)、72 °C, 90 sec(伸長)を 9 cycle、94 °C, 45 sec(変性)、50 °C, 45 sec(アニーリング)、72 °C, 90 sec(変性)を 25 cycle、72 °C, 7 min。プライマーとして aroA95f (5'-TGYCABTWCTGCAIYG YIGG-3')、

キーワード : arsenite phytoremediation arsenite oxidase *Pteris vittata*

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 FAX: 022-368-7070

aroA599r(5'-TCDGARTTGTASGCIGGICKRTT-3'), (Hamamura ら,2009)を用いた。増幅した約 550 bp の DNA 断片をクローニングし塩基配列を決定した。

2-2 モエジマシダ根圏から単離した菌株の亜ヒ酸酸化能の測定

モエジマシダプラグ苗の根をすり潰し、1/5LB 固体培地(1L 精製水に 2g Bacto trypton, 1g Yeast extract, 5g NaCl)に蒔き生育した菌を単離した。単離菌株を終濃度 10 μ M の亜ヒ酸を含む LB 培地で 30 $^{\circ}$ C、72 時間培養した。0,72h 後に菌液を一部採取し、ヒ酸を除去するためのカートリッジ処理をしたサンプルとしないサンプルに分けた後それぞれヨウ化カリウムを用いて予備還元し、原子吸光分光光度計(島津製 AA-6300)を用いて定量した。また、ネガティブコントロールとして亜ヒ酸酸化活性をもたない大腸菌を使用した。

3. 結果と考察

3-1 シダ栽培水中の亜ヒ酸酸化酵素遺伝子の解析

亜ヒ酸がヒ酸に酸化されたシダ栽培水より菌を回収し、その DNA を鋳型として PCR 法により *aioA* の部分配列を増幅しクローニングした。その内 10 クローンについて DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定、相同性検索を行った。その結果(図-2)、シダ栽培液中に最も多く存在したのは *Variovorax* 属に属する *aioA* と高い相同性を示すものであった。つづいて *Leptothrix*、*Aminobacter*、*Ancylobacter*、*Bosea* 属の *aioA* と相同性を示すものであった。以上のことからシダ栽培水中における亜ヒ酸のヒ酸への変換には *Variovorax* 属の菌が大きく関与していた可能性が高いことが示唆された。

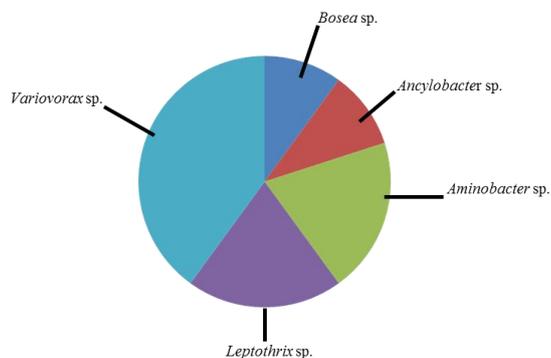


図-2.モエジマシダ水耕栽培液中の *aioA* 遺伝子の分布

3-2 モエジマシダ根圏から単離した菌株の

亜ヒ酸酸化能の測定及び解析

モエジマシダ根圏から単離した菌株を終濃度 10 μ M の亜ヒ酸を含む LB 培地で 72 時間培養し、亜ヒ酸酸化能を測定した。ネガティブコントロールとして大腸菌を用いた。単離した 10 株を調べた結果の内、活性の見たられた 1 株(NE5 株)についての結果を図-3、図-4 に示す。全ヒ素の定量結果(図-3)では 72 h では大きな変化は見られなかった。亜ヒ酸の定量結果(図-4)においては 72 h 後においてネガティブコントロールの大腸菌では変化が見られない。しかし、NE5 株では亜ヒ酸の濃度が低下したことから、亜ヒ酸活性をもつことが強く示唆された。亜ヒ酸酸化活性を示した NE5 株を同定するため、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。相同性検索を行った結果、NE5 株は *Pandora* 属に属する菌であることが明らかとなった。本菌のモエジマシダ根圏における亜ヒ酸酸化への関与については今後明らかにしていく予定である。

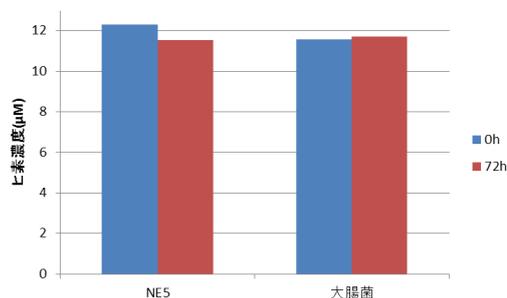


図-3. 菌液中の全ヒ素定量結果

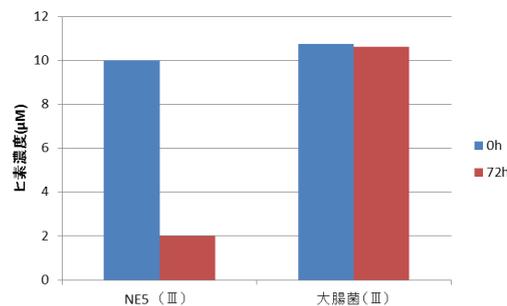


図-4. 菌液中の亜ヒ酸定量結果

4. 参考文献

Hamamura ら.2009. Environmental Microbiology, **11**, 421-431