

かび臭物質(2-MIB)の発光遺伝子による定量方法の試み

前澤工業中央研究所 及川栄作、木村憲司

東北学院大学工学部 正会員 ○石橋良信

東北学院大学大学院 山田賢治、山田知広、秋山力三

1. はじめに

上水道におけるかび臭は近畿、関東を中心に毎年1千万人から2千万人を超える人々に不快感を与え、おいしい水供給の観点から解決に急を要する大きな課題になっている。かび臭原因物質は主に カンファーに似た二環性モノテルペンである2-メチルイソボルネオール(2-MIB)と二環性モノテルペンの ジェノスミンが同定されている。かび臭物質の測定方法は最近ではかび臭物質を抽出濃縮した後、ガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)によって測定する物理化学的方法に準拠することが規定されている。この機器分析による測定法は、再現性があり感度が高いが、試料水の純度、濃縮方法、濃縮効率、GC-MS操作の複雑さに問題がある。なお、この方法により 1 ng/l の2-MIB、ジェノスミンの測定が可能である。

環境中に放出された難分解性の物質を含め、各種の有機化合物に対して耐性や分解する遺伝子群(オペロン)が単離され、これらの遺伝子と生物発光遺伝子を連結することによりバイオセンサーが開発されている。この原理はオペロン中のリプレッサーやプロモーター部位を含む領域に発光遺伝子を連結した構造のプラスミドを構築し、大腸菌などに導入して耐性や分解の対象となる物質を遺伝子の誘導物質として添加し、発光遺伝子を誘導させ発光量を測定するものである。ここで転写における mRNAはプロモーター部位と発光遺伝子の融合体として合成され、誘導物質量は発光量に反映される。

本研究室では2-MIBがカンファー分解遺伝子 *camI* オペロンによって分解されることや、2-MIBによって *camI* オペロンの遺伝子発現誘導がなされることなどを明らかにしてきた。¹⁾ これらの事実を応用して遺伝子操作で生物学的に2-MIBを定量分析することができると考えバイオセンサー開発の基礎研究を行った。

2. 実験方法

生物発光遺伝子は *Vibrio fischeri* 由来の *lux* オペロンを用い、この遺伝子が導入されている plasmid pUCD 615 を以下の構築に使用した。pUCD615のマルチクローニングサイトに *camI* オペロン中のリプレッサー部位を連結した plasmid pLC87を作成した。pLC87を大腸菌 DH5 α などに形質転換して下記に示す遺伝子誘導発現および発光量の測定実験に用いた。-85℃ にグリセロールストックした pLC87を保有する大腸菌 DH5 α は終濃度 50 μ g/mlのAmp(7 μ l/20 μ l)入り 1 $\times$ LBプレートに画線し、37℃一晩培養した。単一のコロニーは白金耳でかき取り 3 ml の Amp入り 1 $\times$ LB液体培地に植え継ぎ 37℃、16~20時間、140 rpmで振とう培養した。200 μ l の培養液は 20 ml の Amp 入り M9培地に植え継ぎ OD_{600nm} が 0.2になるまで15, 20, 25, 30, 37℃で培養を続けた。OD_{600nm}が0.2 になったらメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した 2-MIBや カンファーなどの誘導物質を適量添加し、2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24...時間後の培養液 300 μ lをマイクロプレートに分取し発光量をルミメーターで測定した。コントロールとして誘導物質と等量のDMSOを添加した組換え体を用いた。以上を通して本研究では大腸菌発現による pLC87の発光量や発光遺伝子の酵素活性に与える影響因子、また 2-MIBの検出限界など基礎的知見を得る実験を試みた。

3. 実験結果

camI オペロン プロモーターと生物発光遺伝子の転写融合系により 2-MIB量を大腸菌発現の *in vivo*反応発光量に置

き換えることにより定量分析することができる可能性が示唆された。具体的に、大腸菌の増殖度と発光強度の関係は、誘導物質を添加後2～3時間で最大発光強度を示し、その時の増殖度は対数増殖期である。その後発光は徐々に減少し菌数の最も多い定常期にはわずかに検出される程度となった。この減少は *camV* プロモーターの発現が活性化し発光遺伝子の発現を抑制したためと推察される。本センサーは発光酵素の安定性に起因すると考えられるが大腸菌の増殖の至適培養温度 37℃ では活性が低く、それより培養温度が低くなるに従い発光強度や発光時間が増加し、20℃ で培養した際に最大発光量を示した。また、図-1 に示すように培地の栄養条件が富栄養な 2×LB 培地より貧栄養な 1×LB 培地の方が発光強度活性が高く、より貧栄養なグルコースを唯一の炭素源とする M9 培地で培養した時に最も強い活性を示した。基質特異性は 2-MIB と カフーのほかに 2-MIB の生合成経路の3つ前の前駆物質 ケラニールには反応せず、1つ前の前駆物質とされる イソケラニールおよびこの異性体 ネルニールには反応することが明かとなった。この点はいくつかの臭発生を予測する際検討を要する。検出感度は培養温度が 20℃ や 15℃ で、M9 培地で培養したとき図-2 に示すように 2-MIB の終濃度 100 ng/ml まで定量的に検出され、1 ng/ml まではコントロールと比較して定性的には感知できるようであるが、実際の湖沼での分析のためには試水の濃縮の必要性があると考えられる。

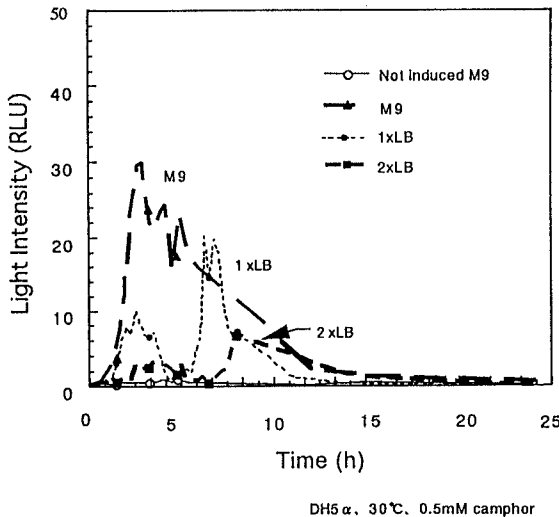


図-1 栄養条件の違いによる発光量への影響

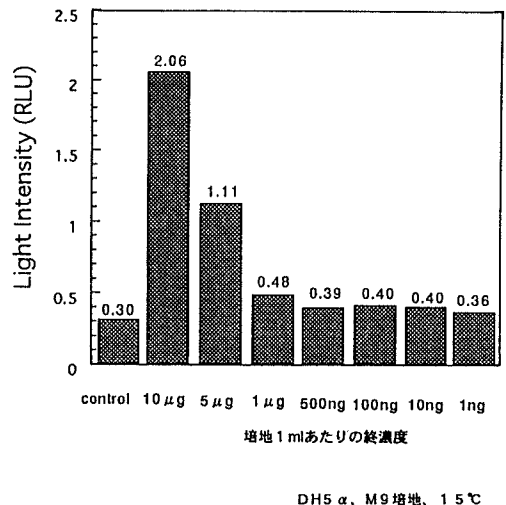


図-2 培地中に添加した2-MIBの検出限界最大発光強度

4. おわりに

本実験はかび臭物質 2-MIBを対象にしたバイオセンサーのための基礎研究であり、上水道、生物工学的に有用であると考えられる。しかし、未だ濃縮および感度、2-MIB のみの特定技術などの面で改良すべき点も多々含んでいるが、将来さらに高感度で簡便に測定でき実用に供することができると期待している。本研究を遂行するにあたり、*camV* プロモーターは九州大学薬学部堀内忠郎教授（現創価大学）、相良康弘教授（現高知医科大学）より譲り受けた。また、pUCD615 は米国 カリフォルニア大学Kado教授の許可のもとに（株）日本農薬の廣岡 卓氏より譲与されたことを記して感謝する。

参考文献 1) 及川栄作：水道におけるかび臭物質生合成および生分解の機構解明に関する分子生物学的研究、学位論文（東北学院大学）平成7年3月。