

かび臭物質の生物学的検出法の開発とその基礎的研究

東北学院大学大学院 学生員 ○及川 栄作
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

上水におけるかび臭問題は毎年数千万人を越える人々に被害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問題になっている。かび臭原因物質は主にカンファー（樟腦）似た二環性モテルペンである2-メチルイソボルネオール(2-MIB)とギリシャ語に由来する二環性セテルペンのジェオミンが同定されている。かび臭物質の測定方法は大きく2つに分類され、一つは人間の臭覚によって測定する官能法であり、もう一方は発臭原因物質を含む試料からかび臭物質を抽出濃縮した後、ガスクロマト分析(GC)やガス質量分析機器(GC-MS)によって機器分析測定する、物理化学的な分析方法である。官能法は人間の臭覚によるため個人差や被験者の健康状態によって測定結果が大きくばらつくなどの欠点がある。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、濃縮効率、GC-MS操作の複雑さに問題がある。現在は抽出濃縮とGC-MSを組み合わせた機器分析法が主流であり、この方法により1ng/lの2-MIB、ジェオミンの測定が可能であるとされている。

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レポント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オペレーターと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plasmidを構築し、大腸菌などに導入し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 *cam* オペロンによって分解されることや、2-MIBによって *cam* 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。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のではないかと考え研究を行った。

2. 研究方法

生物発光遺伝子として *Vibrio fischeri* 由来の *lux* オペトを用い、この遺伝子が導入されている plasmid pUCD615 を以下の構築に使用した。pUCD615 のマルチクロニング サイトに *cam* オペロン中のリプレッサーである *camR* およびオペレーター、プロモーター部位を連結した plasmid pLC87 を構築した。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 g/ml) 入り 1 xLB プレートに画線し 37℃ 一晚培養した。単一のコロニーは白金線でかき取り 3 ml の Amp 入り 1 xLB 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 2-メチルイソボルネオール(DMSO)に溶解した 2-MIB やカンファーなどの(誘導物質)を適当量添加し 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。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性質を分析する実験を行い、バイオレポントセンサーとしての実用性について検討した。

3. 研究結果

cam 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* 反応で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、バイオレポントセンサーとして活用できる可能性が示された。

1) 図-1 は大腸菌の増殖度と発光強度の関係を示したものである。誘導物質を添加後 2~3 時

間で最大発光強度が示され、その時の菌の増殖度は対数増殖期であり、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。最大発光強度を示した後に減少するのは *camR* リプレッサーの発現が活発化し発光遺伝子の発現を抑制したためであると考えられる。

2) 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増殖の至適培養温度である 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℃で培養した時に最大発光強度を示した。

3) 本センサーは大腸菌の増殖にとって培地の栄養条件が富栄養な 2XLB 培地より貧栄養な 1XLB の方が発光強度活性が高く、さらに貧栄養な グルコースを唯一の炭素源とする M9 培地で培養した時最大の活性を示した。

4) 本センサーの基質特異性は 2-MIB とカンファーのほか 2-MIB の生合成経路の3つ前の前駆物質である ゲラニオールには反応せず、1つ前の前駆物質とされる イソボルネオール およびこの異性体 ボルネオールにも反応することが明らかとなった。

5) 本センサーは大腸菌の培養温度が 20℃や15℃で M9 培地で培養したとき培地中の 2-MIB の終濃度 100ng / ml まで定量検出され1ng/mlまで検出された。このデータを用いて図-2のように検量線を描き未知量の2-MIBの測定に利用することができる。しかし、実際の現場の湖沼の分析に使用するためには試料水の濃縮が必要である。

6) 本研究は特定の臭気物質をはじめて定量化したバクテリアセンサーであり生物工学的にも重要である。今後かび臭物質をさらに高感度で簡便に測定できる実用性の高いバクテリアセンサーの開発に期待がよせられる。

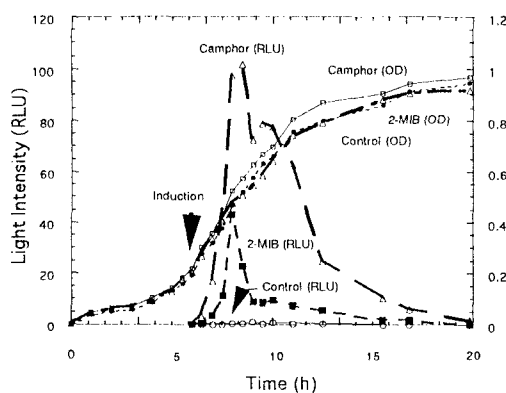


図-1 発光強度と増殖度の関係

DH5 α , 30℃, M9 培地
1mM camphor, 1mM 2-MIB

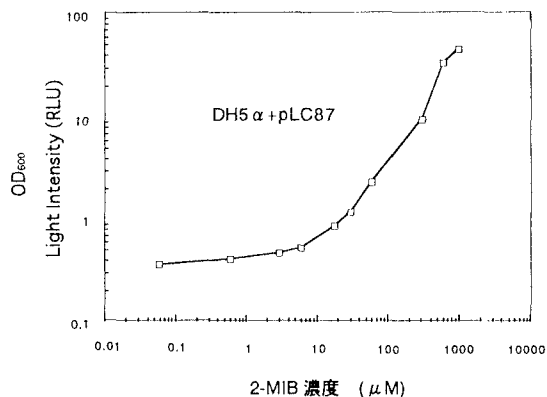


図-2 2-MIB量に応じた発光強度

DH5 α , 20℃, 15℃, M9 培地

4. おわりに

本研究を遂行するにあたり、*cam* オペロンは九州大学薬学部、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は作製者の米国カリフォルニア大学KADO研究室の許可のもとに（株）日本農薬の広岡卓氏より譲りいただき使用させていただいたことを記して感謝申し上げる。