

germacrene D 遺伝子を用いた geosmin 産生放線菌の特定手法の試み

東北学院大学 学生員 ○三浦雄哉
東北学院大学大学院 村上将也, 太田康裕
東北学院大学 正会員 韓連熙, フェロー 石橋良信

1. はじめに

かび臭の発生は、藍藻類や放線菌類が産生する代謝産物である 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) や geosmin が原因であり、これらの微生物が増殖しやすい湖沼水や河川水を水源とする水道水で問題が多い。

仙台市の主要な水源である釜房湖でも、藍藻類 *Phormidium tenue* (*P. tenue*) が産生する 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) に長年苦慮している。反面、*P. tenue* が産生しないはずの geosmin も検出されており、その原因として放線菌が疑われている。ここでは、釜房湖底泥から採取した放線菌の同定およびかび臭産生の有無を示すとともに、図-1 の geosmin 産生経路中の germacrene D 遺伝子が geosmin の生合成に関与し、かつ本遺伝子は、geosmin 産生機能遺伝子になりえるか否かの判断に適用可能であるかについて報告する。

2. 非メバロン酸経路および geosmin 生合成

2-MIB と geosmin はピルビン酸 (Pyruvate) と GA3P (glyceraldehyde-3-phosphate) の縮合で始まる非メバロン酸経路で産生することが知られている¹⁾。geosmin は図-1 に示すようにファルネシルピロリン酸 (Farnesyl pyrophosphate : FPP) を起点に、前駆物質である germacradienol を経て geosmin が生合成される。germacrene D は FPP を起点に生合成されているため、germacrene D 遺伝子も geosmin 産生に係わると推測されるが、位置付けおよび機能については未知の部分が多い²⁾。

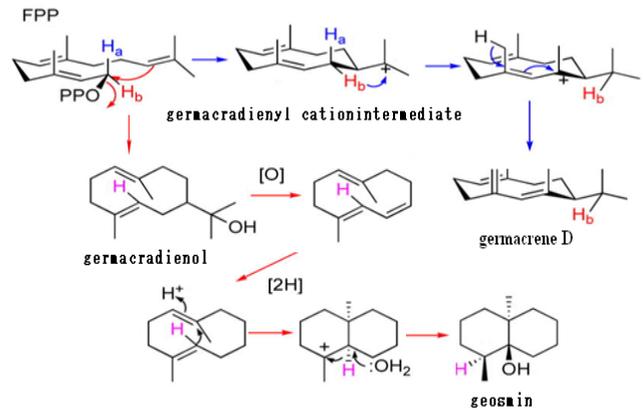


図-1 geosmin 産生経路²⁾

3. 実験および解析方法

釜房湖底泥から試料を採取し、かび臭を産生する放線菌を単離し、TA クローニング法で属種を同定するとともに geosmin 産生の有無を GC-MS 検出によって判定した。一方、germacrene D 遺伝子に係わる実験については、「NCBI」(遺伝情報サイト) から得られたデータベースを基に解析およびプライマー設計を行った。なお、プライマー設計にはインターネット上の primer3 を利用した。

4. 実験結果および考察

GC-MS 検出による geosmin 産生の有無を表-1 に示す。実験に供した放線菌はすべて *Streptomyces* 属であり、No.2, 3, 4, 6, 9 株が geosmin を産生していた。

geosmin 産生と germacrene D 遺伝子との関連では、germacrene D 遺伝子を効果的に増幅するプライマーを以下に示し、以後の実験に使用した。

キーワード：放線菌，異臭味水，geosmin 産生経路，germacrene D 遺伝子，

住所：〒985-8537 多賀城市中央一丁目 13 番 1 号，電話番号：022-368-7418，FAX：022-368-7070

Ger F CGGCGCATCTCGATGTACT

Ger R GACTGGTACGTGTGGGTGTTTC

このプライマーを適用して PCR により DNA を増幅させた結果を図-2 に示す。

表-1 と図-2 の結果から、レーン 4, 5, 6, 8, 9 にバンドを確認することができ、geosmin を産生する株と合致した。目的の大きさである 350 bp 付近にバンドが確認でき、シーケンサーで読み取った波形データ結果により germacrene D 遺伝子の断片を増幅したことが判明した。

したがって、No.2 No.3 No.4 No.6 No.9 は、geosmin を産生する株であり、germacrene D 遺伝子を有していることが明らかになったことから、germacrene D 遺伝子をもっていると geosmin を産生する可能性があることが示唆された。さらに、germacrene D 遺伝子が geosmin 産生機能遺伝子になりえることが同じく示唆された。

また、釜房湖から採取した底泥サンプルを、設計したプライマーを用いて PCR をかけたところ、バンドが確認された。このことから釜房湖底泥に存在するメタゲノム中から *Streptomyces* 属の germacrene D 遺伝子を増幅できたと判明した。これにより単離できない *Streptomyces* 属の検出にも応用できる可能性がある。また、実証株としてリアルタイム PCR に適用すれば geosmin 産生の挙動を知る手掛かりになり得ると思われる。

表-1 泳動レーン説明と geosmin 産生の有無

レーン	説明	geosmin
1	λ Hind III	
2	スペース	
3	No.1 <i>Streptomyces aureofaciens</i>	×
4	No.2 <i>Streptomyces virvexofuscus</i>	○
5	No.3 <i>Streptomyces triostivus</i>	○
6	No.4 <i>Streptomyces bobli</i>	○
7	No.5 <i>Streptomyces</i> sp.	×
8	No.6 <i>Streptomyces achromocenes</i>	○
9	No.9 <i>Streptomyces regensis</i>	○
10	No.K <i>Streptomyces mirabilis</i>	×

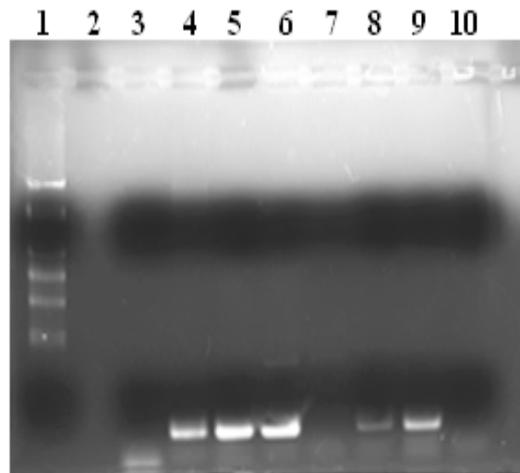


図-2 泳動写真

5. おわりに

germacrene D 遺伝子は geosmin を産生する放線菌の検出に有用であると示唆された。また、将来の展望として germacrene D 遺伝子が geosmin 産生に関与していることを実証株および geosmin 濃度推移データによる実証をする必要がある。

最後に、実験・調査にご協力くださった仙台市水道局、および本学大学院生村上将也氏、太田康裕氏の労に感謝する。

参考文献・引用文献

- 1) Y. Ishibashi and E. Oikawa : Inhibitory action of musty odor substance by fosmidomycin, Seventh IWA Symposium on off-flavours in the Aquatic Environment, pp24-28, 2005.
- 2) Jiaoyang Jiang and David E. Cane : Geosmin Biosynthesis. Mechanism of the Fragmentation-Rearrangement in the Conversion of Germacradienol to Geosmin, J. Am Chem. Soc., vol.16, No.130, pp.428-429, 2008