

シアノバクテリアのカビ臭生成における
遺伝子発現及び代謝経路の解析

2014 年 3 月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）
理工学専攻（主指導教員 川合真紀）

柿 本 真 之

目次

第 1 章	1
1.1. はじめに	2
1.1.1. カビ臭による被害	2
1.1.2. 湖沼・貯水池での異臭発生とその防止法	2
1.1.3. シアノバクテリアの増殖因子	3
1.1.4. カビ臭原因物質	4
1.1.5. ジェオスミン及び 2-MIB 産生種	5
1.1.6. ジェオスミン合成経路と関連遺伝子の単離	6
1.1.7. シアノバクテリアのジェオスミン合成遺伝子	8
1.1.8. ジェオスミン遺伝子のモニタリング手法の開発	8
1.1.9. 放線菌より単離された 2-MIB 合成関連遺伝子	9
1.1.10. GPPMT 及び MIBS の機能解析	10
1.1.11. シアノバクテリアにおける GPPMT 及び MIBS 遺伝子の単離	11
1.1.12. 遺伝子の発現解析	13
1.1.13. MIB タンパク質の構造解析	13
1.2. 本論文の概要	14
1.2.1. 本論文の目的と意義	14
1.2.2. 本論文の構成	15
第 2 章	17
2.1. はじめに	18
2.2. 実験方法	19
2.2.1. 使用株と培養条件	19
2.2.2. DNA 抽出	21
2.2.3. 遺伝子の単離	21
2.2.4. クローニング	22
2.2.5. シーケンス	22
2.2.6. オペロンの解析	23
2.3. 結果	23
2.3.1. <i>pgmtf</i> 配列の決定	23
2.3.2. <i>pgmtc</i> 配列の決定	24
2.3.3. オペロンにおける <i>pgmtf</i> と <i>pgmtc</i> の配置	24
2.4. 考察	25

第 3 章	36
3.1. はじめに	37
3.2. 実験方法	38
3.2.1. 培養条件の検討.....	38
3.2.2. 2-MIB 濃度の測定	38
3.2.3. 温度処理実験における培養条件	39
3.2.4. RNA 抽出.....	39
3.2.5. cDNA 合成.....	40
3.2.6. Real-time RT-PCR による発現解析.....	40
3.3. 結果.....	41
3.3.1. <i>P.galeata</i> の増殖に対する温度の影響	41
3.3.2. 低温における発現解析	41
3.3.3. 高温における発現解析	41
3.4. 考察.....	42
第 4 章	48
4.1. はじめに	49
4.2. 実験方法	50
4.2.1. 培養条件.....	50
4.2.2. キャピラリー電気泳動による代謝解析	50
4.2.3. データ解析	50
4.3. 実験結果	52
4.3.1. 化合物の測定	52
4.3.2. 主成分分析	52
4.3.3. クラスタ解析及びヒートマップ.....	52
4.3.4. 培養温度による代謝変動	52
4.3.5. 相関解析.....	52
4.4. 考察.....	53
第 5 章	60
5.1. 本研究のまとめ	61
5.2. 今後の展望.....	62
参考文献.....	63
活動実績.....	70
謝辞	72

第 1 章

序論

1.1. はじめに

1.1.1 カビ臭による被害

水道水の異臭は夏場を中心に起こり、日本に限らず世界で多くの水道利用者が被害を受けている。水道水源は、約 7 割が河川や湖沼などの地表水からなる。異臭味被害は湖沼や貯水池など停滞水域の富栄養化による、シアノバクテリアや放線菌の異常発生・増殖が起きることによって生じるものである。

日本では、カビ臭の異臭味被害人口は、平成元年付近をピークに年々減少している(図 1-1)。しかしながら、被害事業者数はそれほど減少しておらず、いまだに多くの水道利用者が異臭味の被害を受けている状況にある。

これはカビ臭が低濃度でも感知されやすく、不快感を与えるためである。水道事業者はカビ臭低減のための対策に大きな負荷がかかっている。

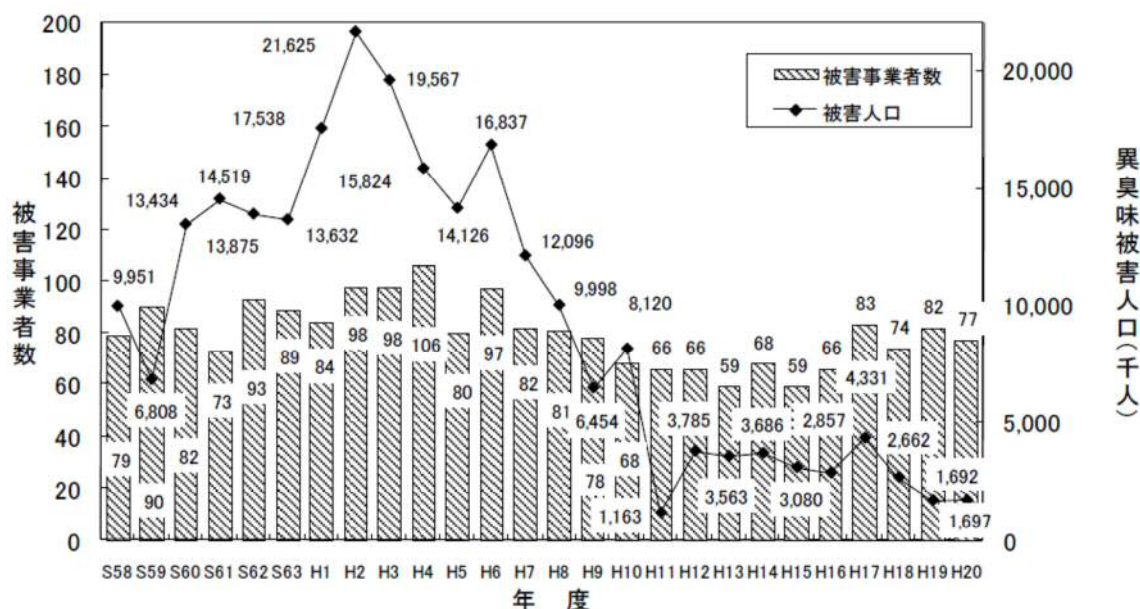


図 1-1 カビ臭の被害状況(厚生労働省調査より)

1.1.2 湖沼・貯水池での異臭発生とその防止法

湖沼や貯水池は、河川の水源となっており、水の流れがあまりないことから、多くの生物が滞留することで異臭の原因となる。その中には、アオコの発生によってカビ臭や腐敗臭が発生するもの、淡水赤潮の発生によって魚臭や生臭さが発生するもの、土中に生息する放線菌によってカビ臭や土臭が発生するものがある。

放線菌によるカビ臭については海外でさまざまな研究がおこなわれ、Gerber らの研

究を中心に、*Streptomyces*、*Nocardia*、*Micromonospora* 属などがカビ臭生成生物として分離されている (Gerber et al., 1965; 1968; 1969)。

アオコについてのこれまでの報告では、アオコは富栄養化が進行した多くの湖沼などで見られる現象で、細胞内にガス胞を持つ一部のシアノバクテリア (*Anabaena* 等) が大量発生することにより生じるものである。富栄養化とは、生活排水や事業場排水に含まれる窒素・リンなどの栄養塩が水域に大量に流入することである。これらを摂取するシアノバクテリアを含む微細藻類が短期間に異常発生し、生態系に影響を与える場合もある。

これらアオコの大量発生は中国での報告 (Xu et al., 2010) をはじめ世界中で見られる。日本では 1960 年代よりおこっており、霞ヶ浦では 1973 年に *Microcystis* の大量発生で、社会的な大問題へと発展した。アオコが形成されるプロセスは、シアノバクテリアが水面近くで活発に光合成を行い、細胞内の浸透圧が上昇し、ガス胞が破壊されて下層部へ沈降し、下層部で窒素・リン等の栄養塩を吸収し、再びガス胞を形成し浮上して光合成を行う、というサイクルを繰り返すことで起こると考えられている。とくに有毒シアノバクテリアが発生した時の影響は大きい。

これらの発生をコントロールすることはカビ臭低減に非常に有力であり、物理的防止法や化学的防止法が考案されている。物理的には、湖内の負荷量を低減するために、底質泥を除いたりすることで栄養物質を削減することや、下水道や浄化槽を整備することで栄養物質の流入を防ぐなどの方法がとられている。

化学的防止法としては、活性炭を利用する方法、オゾンを利用する方法、銅イオンを使って緑藻類の生育を阻害するなどの方法がある。活性炭は十分な効果を示すものの、残留塩素も取り除いてしまうことや、費用がかかるため投入タイミングが難しい (Lalezary-Craig et al., 1998; Cook et al., 2001)。オゾンによる除去の研究では、80%-90%のジェオスミンと MIB が除去されている (Glaze et al., 1990)。銅による方法は他の生物にも毒性を示すなどの問題に加え、毒性に耐性がある藻類も登場してきている (Garcia-Villada et al., 2004)。

1.1.3. シアノバクテリア増殖因子

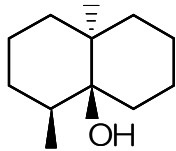
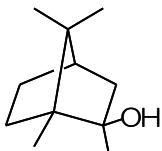
アオコの増殖防止のため、優占化と水環境因子についての研究が行われている (藤本ら 1995)。松本ら (1981) の産生条件についての研究では、リン濃度が重要な影響

を与えると述べている。温度の影響については、*Microcystis* を用いた研究 (Davis et al., 2009) が行われており、また藤本ら (1995) は同じく *Microcystis* を用い、優占化に重要な環境因子として窒素、リン、N/P 比 (窒素とリンの比率)、水温、深度、混合度をあげている。これらを全国の湖沼で調査した結果、N/P 比 30 未満の湖沼において優占率が 40% と高く、30 以上で著しく低下し、10% 以下になると報告されている。この中で、リンの欠乏が大きく影響していると考えられている。また、混合度が増加することでシアノバクテリアの優占率は高まる傾向にある。このことは比較的水深が浅く、混合しやすい湖沼ほど富栄養化しやすいことと関係していると考えられる。また、*Phormidium* 属や *Oscillatoria* 属は混合度が高い湖沼で優占化する傾向にある。

1.1.4. カビ臭原因物質

カビ臭の原因としては、これまで様々な物質が報告されており、大部分がテルペン化合物である (Krishnani et al., 2008)。主なものとしては 2-methoxy-3-idoptopylpyrazine, di-, tri-, tetra-, pentachloro anisoles、Octa-1,3-diene (Kilkast et al., 1993)、2-methylenebornane (2-MB) (Fravel et al., 2002)、2-methyl-1-propanol、3-methyl-1-butanol、1-octen-2-ol、3-octanone、3-methylfuran、ethyl-acetate (Schnurer et al., 1999)、そしてジェオスミン (trans-1,10-Dimethyl-trans-9-dicalol)、2-メチルイソボルネオール (1,2,7,7-Tetramethyl-exo-bicyclo-heptan-2-ol; 2-MIB) が報告されている。

表 1-1 ジェオスミンと 2-MIB の特徴

	ジェオスミン	2-MIB
化学名	trans-1,10-Dimethyl-trans-9-dicalol	1,2,7,7-Tetramethyl-exo-bicyclo-heptan-2-ol
分子式	C ₁₂ H ₂₂ O	C ₁₁ H ₂₀ O
構造式		
分子量	182.31	168.28
臭気	土臭	カビ臭

また、これらのテルペン化合物を放出する生物は、放線菌やシアノバクテリア以外でも *Aspergillus* や *Fusarium*、*Penicillium* 等が報告されている(Kaminski et al., 1974)。日本で主に原因となっているのは 2-MIB とジェオスミンであり、表 1-1 のような特徴を持つ。

1.1.5. ジェオスミン及び 2-MIB 産生種

ジェオスミンは土臭物質として 1964 年に初めて単離された(Gerber and Lechevalier, 1965)。2-MIB はカビ臭物質として 1969 年以降報告がされている(Medsker et al., 1969、Gerber et al., 1969、Rosen et al., 1970)。それぞれの両物質とも、最初は放線菌より発見された(Gerber et al., 1968; 1969、Blevins et al., 1980、Yagi et al. 1983)。その後、シアノバクテリアでも報告されている(Izaguirre et al., 1982; 2004、Wu and Juttner, 1988、Bowmer et al., 1992、Schrader and Blevins 1993)。特に、*Osillatoria* 属は非常にたくさんの種類がカリフォルニア州で採取されており(Izaguirre et al., 1982)、*Lyngbya* 属は他の属よりも強いカビ臭を発するものが存在した(Martin et al., 1991)。水源以外でも、放線菌についてはリンゴジュース内(Siegmund et al., 2006)で、シアノバクテリア(*Anabaena*, *Ocillatoria*, *Lyngbya*)についてはナマズの中で繁殖し、カビ臭を発生した(Tucker et al., 2000)。表 1-2 では 2-MIB 産生種の一覧を示している。一部例外はあるが、これらは主に糸状性のシアノバクテリアである。その中で、*Pseudanabaena* 属は比較的新しい種としてカリフォルニア州で採取され、窒素固定専用のヘテロシスト細胞を形成しないといった特徴がある(Izaguirre et al., 1998、Acinas et al., 2009)。日本で 2-MIB 被害の原因となっていた *Phormidium tenue* はこの種と形態的に類似していると考えられていたが、近年の系統分類の結果、*Pseudanabaena* 属に再分類された。

表 1-2 2-MIB 産生種 (Krishnani et al., 2008 より改定)

Species	Origin	Habitat
<i>Oscillatoria</i>		
<i>O.perornata</i>	USA	Planktonic
<i>O.limosa</i>	USA	Benthic
<i>Oscillatoria</i> sp.	USA	Planktonic
<i>O.tenuis</i>	Japan	Planktonic
<i>O.geminata</i>	Japan	
<i>O.limnetica</i>	Japan	
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>curviceps</i>	USA	Benthic
<i>O.variabilis</i>	Japan	Benthic
<i>O.chalybea</i>	Jisrael	Benthic
<i>Phormidium</i>		
<i>Phormidium</i> LP684	USA	Benthic
<i>P.favosum</i>	Australia	Benthic
<i>P.tenue</i>	Japan	Planktonic/Benthic
<i>Pseudanabaena</i>		
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	USA	Planktonic
<i>Pseudanabaena galeata</i>	Japan	Planktonic
<i>Pseudanabaena</i> sp. NIVA-111	Japan	Planktonic
<i>other species</i>		
<i>Synechococcus</i> sp.	USA	Planktonic
<i>Planktothrix cryptovaginata</i>	Finland	Planktonic
<i>Leptolyngbya</i> LO198	USA	Benthic
<i>Jaaginema geminatum</i>	Japan	Benthic

1.1.6. ジェオスミンの合成経路と関連遺伝子の単離

ジェオスミンの合成経路は、放線菌とシアノバクテリアの双方で研究が進んでいる。この物質は、セスキテルペンであるファルネシルジフosphate (FPP) がセスキテルペンシクラゼの働きにより、環状化されて合成される(図 1-2; Jiang et al., 2006; 2008)。

ジェオスミンの合成に関与する遺伝子はテルペンシンターゼ (ジェオスミン合成酵素) として、放線菌 *S.coelicolor* A3 より初めて単離された (Cane et al., 2003; Gust et al., 2003)。この株は全ゲノム配列の解析が行われており、著者らはコスミドクローンを

作成してこの遺伝子を単離した。この塩基配列は 2178bp からなり、726 個のアミノ酸をコードする酵素で、SCO6073(*cyc2*)と名付けられた。これは Mg^{2+} 依存性の酵素で C15 のセスキテルペン非環状化前駆体であるファルネシル 2 リン酸 (FPP) をジェオスミンへと変化させる反応を触媒する(bi-function)。図 1-2 のように、FPP からゲルマクラディエノールへの環状化を進め、更にもう一段階 8,10-ジメチル 1-オクタリンへの環状化と、2 段階の反応を触媒する。この遺伝子は、研究されているペンタレネンシンターゼ(336 アミノ酸をもつセスキテルペン合成遺伝子)と N 末端及び C 末端で高いレベルの相同性を有する(Jiang et al., 2007)。この遺伝子から組み換えタンパク質を作成し、機能解析を行ったところ、N 末端が FPP をゲルマクラディエノールとゲルマクレネ D へ触媒する反応に重要で(反応比率は 85:15)、C 末端側がゲルマクラディエノールをジェオスミンへ変化させる反応に重要であることが示された(Jiang et al., 2007)。N 末端と C 末端を欠損させた実験により、それぞれが独立して機能することも示された。

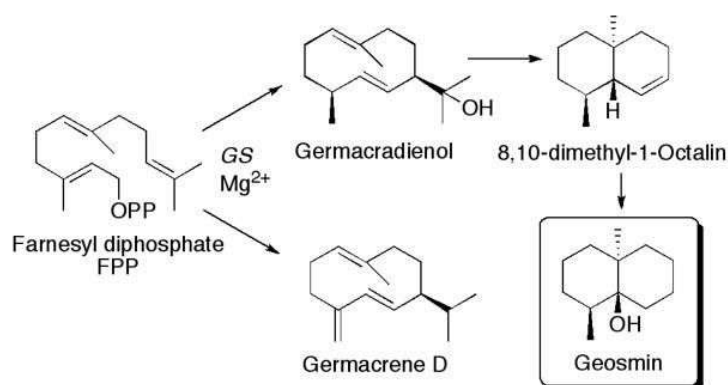


図 1-2 ジェオスミン合成推定経路(Gust et al., 2003 より)

また、*S. avermitilis* を用いた実験では、*cyc2* と類似した SAV2163 (*geoA*) という遺伝子が単離された(Cane et al., 2006)。*cyc2* 同様、組み換えタンパク質の実験より Mg^{2+} 存在下で、ジェオスミンを合成した。また、おそらくジェオスミン合成酵素をコードであると推測される遺伝子が、*Streptomyces* や *Frankia*、*Saccharopolyspora* 属で見いだされ、アミノ酸にして 730-740aa で高度に保存されていることが示された。これらのタンパクでは N 末端に DDHFLE 配列、その 140aa 下流に ND(L/I)FSY(Q/E)RE が存在する。これはすべてのセスキテルペン合成遺伝子に見られる特徴である(Agger et al., 2008、Ghimire et al., 2008)。C 末端にも同様の 2 つの保存領域があるが、上流

のアスパラギンリッチ領域に多少の変化があり DDYYP となっていた。

1.1.7. シアノバクテリアのジェオスミン合成遺伝子

放線菌より単離された *cyc2* 遺伝子の配列を利用して、ジェオスミンを生産するシアノバクテリアである *Phormidium* 属より相同性を持つ2つの遺伝子が単離された (Ludwig et al., 2007)。この遺伝子はタンデムに並んでおり、*geoA1*、*geoA2*と名付けられ、*cyc2* との相同性も高かった。著者らはオペロンの可能性を示唆しているが、その直接的な因果関係は不明であった。

また、全ゲノム配列決定が行われているカビ臭合成糸状性シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* PCC73102 株の遺伝子検索より、放線菌のジェオスミン合成遺伝子と相同性の高い *npun02003620* 遺伝子がみつかった (Giglio et al., 2008)。この遺伝子は、SCO6073 がもつ N 末端の 2 つの高度保存領域は有していたものの、この配列を翻訳すると 630aa しかなく、SCO6073 よりも約 100aa 短かった。また、C 末端の 2 つの保存領域のうち、NES の領域が存在しなかった。*npun02003620* の組み換えタンパク質を大腸菌の中で発現させ、FPP を添加して培養したが、ジェオスミンは合成されなかった。また C 末端を NES へ変更した組み換えタンパク質 NJ2 (100 のアミノ酸欠損はそのまま) についても、ゲルマクラディエノールまでは合成できたものの、ジェオスミンを合成することはできなかった。この結果より、NSE 配列以外の要素もジェオスミン合成に必要であること、及び登録されている *npun02003620* の配列が不完全であると判断された。そこで、正確な ORF として NPUNMOD (ほぼ SCO6073 と同様の長さ) の組み換えタンパク質を大腸菌内で発現させ、培養したところ、ジェオスミンを合成することが報告されている。

1.1.8. ジェオスミン遺伝子のモニタリング手法の開発

Giglio (2008) らは、先に述べたジェオスミン合成酵素の配列を利用して、リアルタイム PCR のためのプライマーを作成した。これを用いて株の分別を行ったところ、ジェオスミンを合成する *Phormidium*、*Aanbaena*、*Geitlerinema* 属を検出し、ジェオスミン合成しない *Oscillatoria*、*Pseudanabaena* 属は検出しなかった。また、別のプライマーを用いて融解温度の違いによる分類方法も開発した。

1.1.9. 放線菌より単離された 2-MIB 合成関連遺伝子

2-MIB の合成経路については放線菌の放射線ラベリングの手法を用いて、ジェオスミンと一緒に研究がなされている (Bentley and Maganathan, 1981)。放射線標識した ^{14}C の酢酸塩とメチオニンを経験液に加えたところ、生成された 2-MIB にも ^{14}C が含まれていた。このことより、2-MIB がモノテルペン由来であり、かつ S-アデノシルメチオニンによるメチル化がなされていることが示された。このメチル化反応を起こしているのが GPP メチルトランスフェラーゼである (GPPMT)。また、この結果より、セスキテルペンが分解したものではないということも示された。そして図 1-3 に示したように、メチル化された GPP が 2-MIB 合成の基質となっていることも示された (Dickschat et al., 2007)。

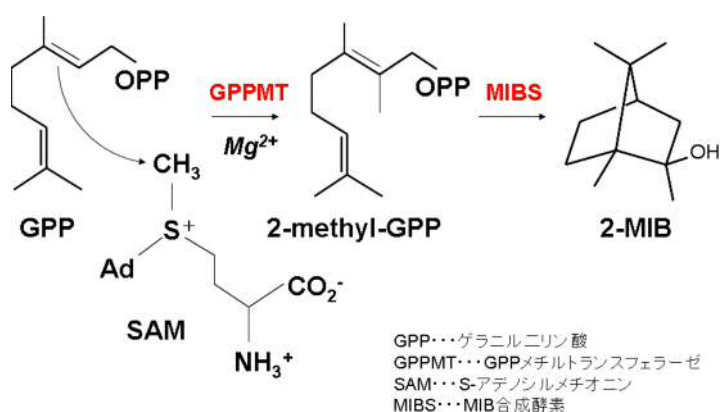


図 1-3 2-MIB 合成経路と関連酵素 (Komatsu et al., 2008 を改定)

全生物を通じて 2-MIB 合成遺伝子は、Komatsu(2008)らが放線菌よりデータベースの検索から発見した。テルペンシクラーゼをコードすると考えられる遺伝子の配列の特徴として、微生物のそれは、植物とのそれほど保存性が高いわけではないが、酸性アミノ酸が多く、高度に保存された 2 つのマグネシウム結合領域を持つ。このマグネシウムイオンは触媒として必須であると考えられている (図 1-4)。テルペンシクラーゼの機能を持つと考えられているアミノ酸配列をデータベースより集めて、hidden Markov モデルを用いて系統樹を作成したところ、3 つのグループに分類されることが示された (図 1-3)。その Group II にはセスキテルペンシクラーゼ、ゲルマクラディエノール/ジェオスミン合成酵素、エピイソジザエネス合成酵素が分類され、Group III にはジテルペンシクラーゼが分類された。Group I に分類されるタンパク質は特に機能がこれまで報告されていない遺伝子であり、ほかの Group II や Group III のタンパク群とはそれほど高い相同性を示

さなかったが、マグネシウム結合領域は高度に保存されていた。図 1-4 に見られるように、Group I のこれら二つのマグネシウム結合領域は、Group II や Group III のそれに比べ C 末端側に位置していた。結合領域間の距離も他のグループが 104aa と 106aa であるのに対し、112aa とわずかに長かった。この遺伝子が 2-MIB 合成酵素 (MIBS) である可能性が高いと考えられた。MIBS の最初のマグネシウム結合領域の配列は -xVDDxxx[D/E]- で、酸性アミノ酸リッチな領域である。また、2 つめの配列も -xxxNxxxS-xxxE- となり、ジェオスミン合成酵素と同様に、これまで報告されているマグネシウム結合領域に見られる特徴を有していた (Seemann et al., 2002, Starks et al., 1997, Rynkiewicz et al., 2001)。

この Group I に属するモノテルペンシクラーゼは、GPPMT をコードする遺伝子より、わずかに上流に存在していることから、オペロンを形成していると推測された (Wang and Cane, 2008)。この GPPMT は SAM 依存性のものである。また、ヌクレオチド結合タンパクもゲノム上の近辺に存在することが示されている。3 つの遺伝子が近隣にあるのは、2-MIB を合成する複数の放線菌にも見られる傾向であった。

[Group I]									
SAV	100	VAGKLLLAENIVDDCYCED---RGGS	128.....240	AELLV* 244					
SCAB82161	93	AAGKLLLAHLVDNLYCEVDEGKGGSP	124.....236	YARPEVQ	RIT	ALAGNAATLVNDLYSFAREMAN	DPH	LNL	275
SAML0357	185	LATRLMVAENAVDDCYCED---HGGSP	213.....325	HARPD	MQR	VIALAGNATTIVNDLYSYTKE	LDSP	GRHL	364
SCO7700	185	LATRLMVAENAVDDCYCED---HGGSP	213.....325	HARPD	MQR	VIALAGNATTIVNDLYSYTKE	LDSP	GRHL	364
SCAB5041	185	LATRLMVAENAVDDCYCED---HGGSP	213.....325	HARPD	MQR	VIALAGNATTIVNDLYSYTKE	LDSP	GRHL	364
SLA	226	LATRLMVAENAVDDCYCED---HGGSP	254.....366	HARPD	MQR	VIALAGNATTIVNDLYSYTKE	LDSP	GRHL	405
SGR1269	182	LATRLMVAENAVDDCYCED---HGGSP	210.....322	HAQAAM	QKV	VIALASNATTIVNDLYSYTKE	LAAP	GRHL	361
SACE3722	101	AAGKMIVAEAVDDYFCETNSRRDAND	132.....244	YAHPLV	QDCT	TARATLIATLYNDLASCERE	IREH	GLPF	283
MOL	146	AAAKCVVAEWATDDYVVEEVS-LGAD	176.....288	FFDPRV	RRAY	TTAALANVLLNDIHS	GTCE	SDT---	324
Pf1_1841	83	LVAQCFAALFAVDDHYCDDQS-LGGR	113.....225	YSRPDI	HVHT	ALASLATLVNDLYSAYKE	HLNET	GDF	264
[sesquiterpene cyclase in Group II]									
SCO5222	86	QAIADYSAWFFVDDRHDR---DIVHGR	114.....220	RKHPAY	RRRA	ALLSQEFAAWYNDLCSLPKE	IAGDE	VHNL	259
SAV3032	88	QAIADYSAWFFVDDRHDR---DVIHRR	116.....222	REHPGY	RRRA	ALLSQEFAAWYNDLCSLPKE	IAGDE	VHNL	261
Q55012	67	DLGVDLMSWFFLFDDLFDCGPRGEN	93.....199	FDSAVM	SAM	LQIAVDVNLLNDIASLEKEEAR	-GEQN	NMV	237
SAV2998	67	DLGVDLMSWFFLFDDLFDCGPRGED	93.....199	FDSAVL	FAM	LQIATDTNLLNDIASLEKEEAR	-GELN	NMV	237
Franci13	75	DLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	106.....211	AATRPL	QVLR	DTFADAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	250
FRAAL6507	75	DLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	106.....211	AATRPL	QVLR	DTFADAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	250
Franean1	75	DLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	106.....211	AATRPA	QVLR	DTFSDAHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	250
MXAN_6247	83	DLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	114.....220	AASRPM	RVLK	DTFSDAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	259
SCO6073	73	SLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	104.....209	AGTRPL	RVL	METFSDAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	248
SCAB20121	72	SLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	103.....208	ADTRPL	RVL	METFSDAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	247
SAV2163	72	SLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	103.....208	AGSRPL	RVL	METFSDGVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	247
SGR6839	72	SLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRS	103.....209	ADARPL	RVL	RDADFSDAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	248
SACE_4907	77	GLVTDWYVWVFYFDDHFLLEYKRT	108.....214	ARTRPM	SVLK	DTFADAVHLRNDLFSYQREVEE	EGEL	SNGV	253
[diterpene cyclase in Group III]									
BAB39207	64	LAASLWTAELIVNDDRWYDVQEDG	95.....199	RDDPV	RRAI	DDVVVRFGCLSN	DYYS	WGRE	238

図 1-4 放線菌におけるアミノ酸配列のアラインメント (Komatsu et al., 2008)

1.1.10. GPPMT 及び MIBS の機能解析

モノテルペンシクラーゼが実際に 2-MIB 合成に関与しているかを調べるために、*S. lasaliensis* の GPPMT と MIBS を大腸菌に組み込み、組み換えタンパク質を発現させた (Komatsu et al., 2008)。これを単離し、酵素活性を測定した結果、GPP と

SAM の存在条件下で、2-MIB が合成された。逆に SAM と組み換えタンパク質を除いた場合には合成されなかった。組み換えタンパク質のうち、GPPMT のみを GPP と SAM と共にインキュベートし、アルカリフォスファターゼ処理をしたときに、2-メチルゲラニオール の生成のみが確認された。これらの結果より、GPPMT が GPP を 2-メチル GPP に変換する能力があることが示された。また、2-メチル GPP が MIBS の基質であることも明らかとなった。

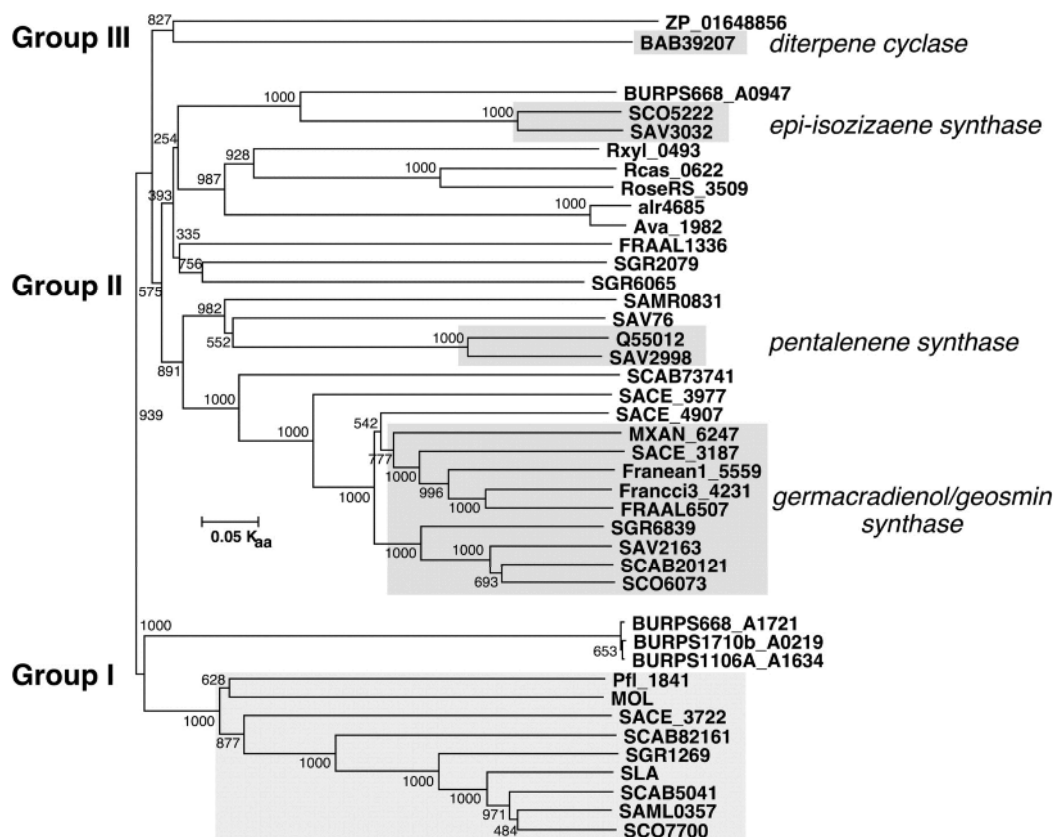


図 1-5 放線菌におけるテルペンシクラーゼの系統樹解析

(Komatsu et al., 2008 より)

1.1.11. シアノバクテリアにおける GPPMT 及び MIBS 遺伝子の単離

2-MIB を放出する生物として知られるシアノバクテリアで、初めて GPPMT と MIBS をコードする遺伝子を単離したのは、Giglio (2011) らである。彼らは 2 種類の *Pseudanabaena limnetica* 株 (Castic lake と NIVA-111) より、次世代シーケンサーを用いて両遺伝子の配列を決定した。放線菌との相同性は 60% 前後であったが、2 つのマグネシウム結合領域のうち、前半の -DDxxx[D/E] については、放線菌では DDCYCE であ

ったのに対し(Komatsu et al., 2008、Wang and Cane., 2008)、シアノバクテリアではDDYYADであるといった違いが見られた。後半の領域についても、放線菌グループで-xxNxxxSxxxE-であった配列が、最後のグルタミン酸(E)がアスパラギン酸(D)に変化しているという違いが見られた。Wang(2011)らは*Pseudanabaena* sp. dqh15株と*Planktothricoids raciborskii*の株から配列を決定し、同様の結果を得ている。また、オペロンの位置関係も図1-6に示すように放線菌とシアノバクテリアでは順序が異なっており、上流よりヌクレオチド結合タンパク質、GPPMT、MIBSであった(放線菌の一部で例外あり)。同オペロンを形成するヌクレオチド結合タンパク質の2-MIB合成における役割については、今のところ明らかになっていない。また、Wang(2011)らは、この3種のタンパク質に加えて、さらにMIBSの下流に、もうひとつヌクレオチド結合タンパクが存在し、4つでオペロンを形成している可能性があることを示している。かつ、このタンパクがCrp-Fnr調節ファミリーの一種であると推測している。

Giglio(2010)らは、Komatsu(2008)らの実験同様、大腸菌内で組み換えタンパク質を合成して解析を行っている。その結果、放線菌と同様に、GPPMTがGPPをメチル化し、MIBSによって環状化され、2-MIBが合成されることが示された。

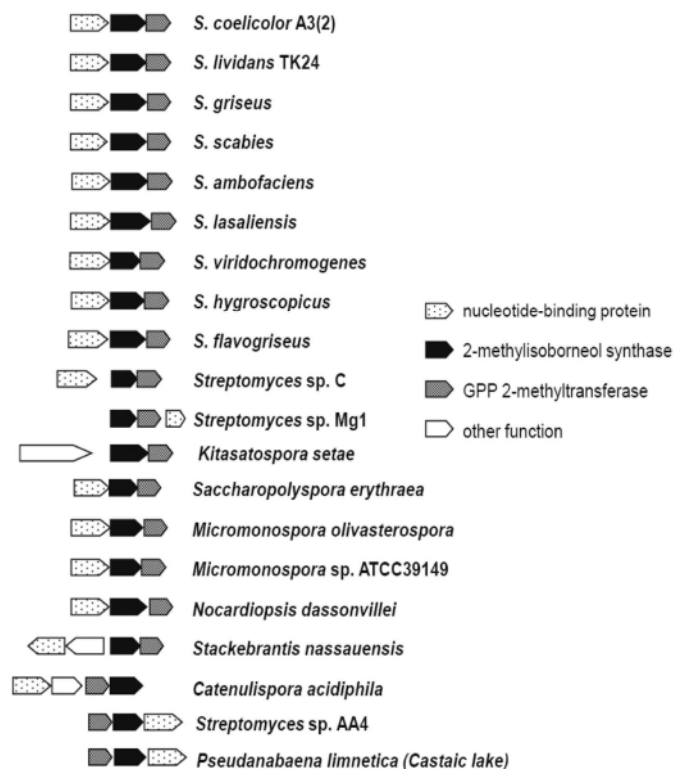


図1-6 2-MIB合成関連遺伝子の遺伝子順序(Giglio et al., 2010より)

1.1.12. 遺伝子の発現解析

カビ臭合成に関連する遺伝子の発現については、これまであまり報告されていない。ジェオスミンについては Ludwig et al. (2007) が *Phormidium* 種より単離した *geoA1*、*geoA2* の二つの遺伝子の発現を、光条件と関連して報告している。実験では 12 時間ごとの明暗条件で培養した場合、明条件では二つの遺伝子の発現が見られたが、暗条件時には発現が見られなかった。2-MIB 合成関連遺伝子の発現については Wang (2011) らが光条件について調べた例が報告されている。この実験では、シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. dqh15 と *Planktothricoidis raciborskii* を用いてメチルトランスフェラーゼ (*mtf*) とモノテルペンシクラーゼ (*mic*) 遺伝子について光の条件を強光 ($60 \mu\text{M photon/m}^2/\text{s}$)・弱光 ($10 \mu\text{M photon/m}^2/\text{s}$) にして行われた。その結果、通常の光条件 ($30 \mu\text{M photon/m}^2/\text{s}$) と比較して、弱光条件では発現量が増加し、強光条件では発現量が減少した (図 1-7)。しかしながら、全くの暗条件では双方の遺伝子とも非常に弱い発現しか見られなかった。この実験では 2-MIB 量との相関性は示されていないかった。

1.1.13. MIBS タンパク質の構造解析

MIBS については放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3 を用いて、構造解析がなされている (Koksal et al., 2012)。MIBS はゲラニル-S-thiolodiphosphate と 2-fluorogeranyl diphosphate の 2 つのサブユニットからなる。2 次構造は α ヘリックスを中心とした構造である (図 1-7)。三次構造はこれまで報告されているテルペンシクラーゼにみられるような構造であったが、4 次構造はこれまで植物や微生物で報告されているシクラーゼの特徴とは異なっていた。部分的には FPP 合成酵素 (シクラーゼでない) と類似しているところがあった。複合体の構造は MIBS とほかのテルペンシクラーゼとの触媒メカニズムの違いを解明する手がかりとなりえる。

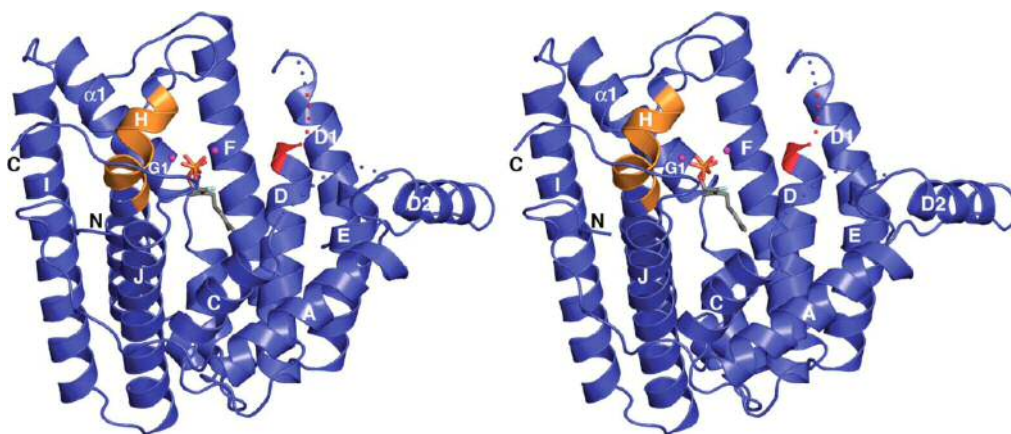


図 1-7 MIBS の 2 次構造 (Köksal et al., 2012)

MIBS の C 末端触媒領域は α ヘリックス構造をしている 35kDa サブユニット、N 末端はプロリンリッチな 13kDa のサブユニット。オレンジの部分金属結合領域。

1.2. 本論文の概要

1.2.1. 本研究の目的と意義

水道水の異臭の原因は常日頃から、日本に限らず世界で問題となっており、さまざまな報告がされている。夏場を中心に、多くの水道利用者がカビ臭等の異臭被害を受けている。これは水道原水となる湖沼の富栄養化がカビ臭を生成する放線菌や糸状性藍藻を大量発生させることが原因であると考えられている。

日本ではジェオスミンと 2-MIB が厚生労働省令で指定されている水道水質基準項目で、その基準値は共に 0.00001mg/L である。この値は平成 15 年度までの 0.00002mg/L から更に低減されており、基準値超過の可能性は高まっている。さいたま市での平成 17 年度から 22 年度までのカビ臭の発生状況を表 1-3 に示す。これらの結果より、2-MIB については基準値の 9 割に達することもあり、早急な対策が望まれる。また人間が感知するための閾値は非常に低く、ジェオスミンで 10 ng/L、2-MIB で 5 ng/L といわれている。さらにこれらの物質は非常に分解されにくい(Westerhoff et al., 2005)。分解除去するために、現在の日本では活性炭等を利用することが多いが、費用がかさむため、投入時期を見極める必要がある。

カビ臭の発生は富栄養化が主原因と考えられているが、水温条件等が同じでも、年により発生状況が異なり、そのメカニズムの詳細はいまだに不明である。

表 1-3 さいたま市におけるカビ臭の検出状況(平成 17 年度～22 年度)
(さいたま市水質検査結果より)

荒川系統(13ヶ所)		(単位:ng / L)		
	基準値	最大値	最小値	平均値
ジェオスミン	10	6	1	2～4
2-MIB	10	9	1	2～4

利根川系統(3ヶ所)		(単位:ng / L)		
	基準値	最大値	最小値	平均値
ジェオスミン	10	5	1	2～4
2-MIB	10	3	<1	1～3

カビ臭発生のメカニズム研究は主に放線菌を使って行われてきた。しかしながら、シアノバクテリアにおける遺伝子レベルや代謝レベルでの報告はほとんどないため、このレベルでのカビ臭の生成機構の詳細を知ることは、シアノバクテリアが原因のカビ臭の増殖を抑える上で極めて重要である。本研究ではカビ臭 2-MIB を生成するシアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* を用いて、2-MIB 発生のメカニズムの詳細を解明し、低減に向けた情報を提供することで、水の衛生的利用に貢献することを目的とした。

1.2.2. 本論文の構成

本論文は以下の 3 つの章より構成される。

第 1 章「序論」は本研究の背景、研究目的と意義を述べ、全体構成を示した。

第 2 章「シアノバクテリアの 2-MIB 合成関連遺伝子の単離と塩基配列の決定」では、本研究で用いたシアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* の GPPMT 及び MIBS 塩基配列を決定し、遺伝子情報から得られた結果を示した。これまでも、放線菌や一部のカビ臭生成シアノバクテリアで GPPMT 及び MIBS の塩基配列は決定されているが、それらと本株の配列を比較することにより、今回単離された遺伝子がカビ臭合成遺伝子として機能するかについて考察した。

第 3 章「カビ臭関連遺伝子の発現解析」では、今回単離し、配列を決定した遺伝子

が、温度条件を変化させることでどのように発現パターンが変わるかについて解析を行った。これまで、カビ臭と温度との関連性については多くの報告があるが、遺伝子レベルの解析は行われていなかったことから、温度と遺伝子発現の関連について研究を行った。

第4章「シアノバクテリアと代謝解析」では *P. galeata* を用いて、異なる温度処理後、24時間における代謝解析を行い、異なる培養温度下における2-MIBと一次代謝物の関連性について解析を行ったので報告する。これまでカビ臭の合成には窒素が重要な因子であることが報告されているが、それが代謝レベルでどのように関連しているかについて明らかにした。

第 2 章

2-MIB 関連遺伝子の塩基配列の決定と

オペロンの解析

2.1. はじめに

カビ臭合成遺伝子に関しては、ジェオスミンと 2-MIB に関する研究がこれまで進められている。ジェオスミンについては、2003 年に放線菌より *cyc2* 遺伝子が単離されたことで、詳細なメカニズムが明らかになりつつある (Gust et al., 2003、Giglio et al., 2008)。2-MIB についてはそれより遅く、2008 年に *S.ambofaciens* をはじめとしたいくつかの放線菌より 2 つの遺伝子 (SAM 依存性メチルトランスフェラーゼとモノテルペンシクラーゼ) が最初に単離された (Komatsu et al., 2008、Cane et al., 2008)。この二つの遺伝子のうち、どちらが欠けても 2-MIB は合成されない。また、これらはもう一つのヌクレオチド結合タンパク質を加えた 3 遺伝子でオペロンを形成している。

このように、放線菌では、カビ臭を合成する種の全ゲノム配列が決定されているために解析が進んできたが、シアノバクテリアでは、ジェオスミンを合成する *Nostoc punctuform* PCC73102 種のみで全ゲノム配列の解明が行われていたため、研究が遅れていた。ジェオスミン合成酵素については、この種を用いて遺伝子の同定が行われた (Giglio et al., 2008)。これに対し、2-MIB を産生するシアノバクテリアでゲノム解析が完了した種はなかった。しかしながら、近年、次世代シーケンサーの技術を利用して、*P.limnetica* より放線菌 *S.coelicolor* に相同性の高い配列が単離され、組み換えタンパク質の実験により、これらが 2-MIB 合成に関与していることが示された (Giglio et al., 2011)。また、オペロンを構成する遺伝子の位置関係については放線菌群とシアノバクテリア群で順序の違いがあることが示された。

本章では、*P.galeata* より 2-MIB 合成に関与すると考えられる 2 つの遺伝子 (GPP メチルトランスフェラーゼ: *pgmtf*、モノテルペンシクラーゼ: *pgmtc*) を単離し、その塩基配列の決定を行った。また、2-MIB 生産生物の遺伝子との相同性を調べて系統樹を作成し、近縁関係について考察を行った。さらに、これらの遺伝子もオペロンを形成していると考えられることから、その位置関係についても解析を行った。

2.2. 実験方法

2.2.1. 使用株と培養方法

実験材料のシアノバクテリアは、国立環境研究所より購入した *Pseudanabaena galeata* (NIES-512: 図 2-1) を用いた。

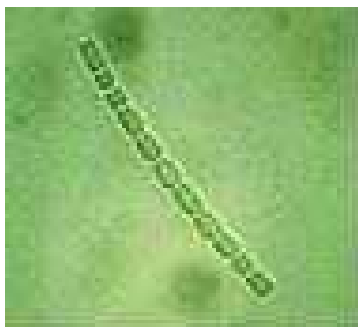


図 2-1 *P.galeata* (NIES-512)

生育培地として、BG-11 培地 (Rippka et al., 1979) を用いた。緩衝剤としては HEPES-KOH (pH8.0) を用いた。組成は以下のとおりである。

Stock solution

Trace Metal Mix		濃度 (g/L)
H ₃ BO ₃		2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O		1.80
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.22
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0.39
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		0.0494
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0.079
0.25 M Na ₂ EDTA		濃度 (g/L)
Na ₂ EDTA		93
NaOH		till pH8.0

100×BG-11	濃度 (g/L)
NaNO ₃	149.58
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.49
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.60
Citric acid	0.60
0.25 M Na ₂ EDTA	1.12 ml
Trace Metal Mix	100 ml

HEPES-KOH (pH8.0)	濃度 (g/L)
HEPES	23.831
10M KOH	till pH8.0

以上のストックおよび他の試薬を 1L 中に以下のように混合し、121℃、15 分オートクレーブして作成した。

表 2-1 最終培地添加量

	ml
100×BG-11	10.0
Na ₂ CO ₃	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
HEPES-KOH	10.0
Ferric Ammonium Citrate (6 mg/ml)	1.0

培養条件は 20℃、20 μ mol/m²/s で白色 24 時間連続照射下で行った。また攪拌すると生育せず、寒天培地でも生育することができないため、液体の静置状態で培養を行った。100 ml 容量に 30 ml の BG-11 培地を入れ、7 日ごとに 2 ml の培養液を新しい培地に継代した。

2.2.2. DNA 抽出

培養した *P.galeata* より、ガラスビーズ法を用いてゲノムを抽出した。1 週間生育させた菌体を 15000rpm, 4°C, 2 分で遠心して集菌し、これにガラスビーズ(ポリサイエンス社製)を添加してボルテックスを約 3 分間行い、菌を破砕した。これ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Japan)を利用して菌を溶解し、上澄を除去したのち、エタノール沈殿を行い、30 μ l の超純水に溶解し、-30°C で保存した。

2.2.3. *pgmtf*, *pgmtc* 遺伝子の単離

P.galeata より二つの遺伝子 *pgmtf*, *pgmtc* を単離するため、Wang(2011)らが報告した *Pseudanabaena* sp. dqh15 株の配列を参考にし、表 2-2 のプライマーを作成した。

表 2-2 プライマー配列

プライマー名	配列
GPPMT1	5'-CACCTATTCACCAGTAACACATTCT-3'
GPPR2	5'-TGGTGCGGGTTAT GTTTTGGATAATC-3'
MIBF2	5'-CTGCCCTA ATAAAGGGATAAGAGC-3'
MIBR2	5'-GGTTGA ACTATGTGCGCTCCTATAA-3'

PCR 反応は Appleid Biosystem 社のサーマルサイクラー (PCRsystem9700) を用いて行った。反応液は、抽出したゲノム DNA に、10×buffer 2 μ L、2.5 mM dNTP 2 μ L、25 mM MgCl₂ 1.6 μ L、フォワードプライマー 1 μ l、リバープライマー 1 μ l、0.5 U Takara Ex *Taq* polymerase (Takara, Japan) 0.2 μ l を加え、容量 20 μ l とした。PCR 反応サイクルははじめに 94°C で 2 分反応させ変性させた後、

96°C 30 秒

60°C 30 秒 × 40 サイクル

72°C 1 分

で行った。

2.2.4. クローニング

ベクターとして pGEM-easy (Promega, USA) を用い、PCR で増幅させた DNA を組み込んだ。

プラスミド DNA の抽出には GenElute Plasmid Miniprep Kit (SIGMA 社) を用いたアルカリ SDS 法に準じた。組み換えプラスミドを、抗生物質アンピシリンを添加した 2 ml の LB 培地で 37℃、8 時間培養した後、培養液を Resuspension solution 200 μ l に十分ボルテックスすることで完全に溶解したのち、Lysis solution 200 μ l に溶解し、転倒混和し、5 分間静置した。その後、Neutralization solution を 350 μ l 加えて再び転倒混和したのち、14,000 rpm で 10 分間遠心した。その上澄を GeneElute Miniprep column (Column preparation solution で平衡化したもの) に移し、14,000 rpm で 1 分間遠心した後、diluted wash solution を 750 μ l 加え、遠心して残渣を除いた。最後にカラムに Elution solution 100 μ l を加えて 14,000 rpm で 1 分間遠心して、プラスミド液を抽出した。

2.2.5. シークエンス

上記のように抽出したプラスミド DNA をテンプレートとしてシーケンス反応に用いた。使用キットは Beckman coulter 社製の DTCS Quick Start Master Mix Kit を用いた。DNA テンプレート 50 fm、M13 フォワードプライマーとリバースプライマーを 1.6 pmol、Master Mix 4.0 μ l、純水 (トータル 10 μ l になるように) を用意し、このうち DNA テンプレートと純水を混合し、96℃ で 1 分処理したのち、急冷することでテンプレートにニックを入れた。その後、プライマーと Master Mix を加え、以下のようにシーケンス反応を行った。

96℃ 20 秒

50℃ 20 秒 × 40 サイクル

60℃ 4 分

これで得られた反応産物にストップソリューション (3 M 酢酸ナトリウム 1 μ l、0.5 M Na₂EDTA 0.2 μ l、20 mg/ml グリコーゲン 0.5 μ l、純水 0.8 μ l) を添加し、99.5%

エタノール 30 μ l を加えて攪拌し、14,000 rpm, 15 分、4℃で遠心を行った。上澄を除き、70%エタノールで 2 回リンスした。これをデシケーターで乾燥させ、ローディングソリューション 40 μ l に溶解し、シーケンスサンプルとした。シーケンサーは BECKMAN COULTER 社製の CEQ8000 を用いた。

2.2.6. オペロンの解析

オペロンにおける遺伝子配置の関係は、Giglio(2011)らの方向を参考にし、表 2-3 のプライマーを作成して行った。これらのプライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動を行った。

表 2-3 オペロン解析用プライマー

プライマー名	配列
GPPF2	5'-TTGCGCAGTGAATATCAGAAGTCAG-3'
ROSF1	5'-ATGGCGGTTCTGGTCGCGGC-3'
DDR	5'-CTGTCGTCAGCATAGTAGTCATCAG-3'
NESR	5'-CTTTGGCAACCGAAAGGAGAAG-3'

2.3. 結果

2.3.1. *pgmtf* の単離と配列の決定

表 2-2 に示すプライマーを使用し、PCR の増幅により遺伝子の単離を試みたところ、目的のサイズ(約 900bp)のバンドの増幅を確認できた。この DNA 断片をベクターに組み込み、その塩基配列を決定した結果を図 2-2(A)に示す。また、翻訳したアミノ酸配列は図 2-2(B)であった。*P.galeata* の *pgmtf* の配列は 870 bp からなり、アミノ酸配列は 289 aa で、GPP メチルトランスフェラーゼに特徴的なメチオニン結合領域を持っていた。分子量は 32720.5 Da で水溶性タンパク質であると SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui>) から推定された。得られた塩基配列情報は DDJB に AB826229 として登録した。

図 2-3 に示す通り、他の株との相同性は非常に高く、アミノ酸レベルでは *Pseudanabaena* sp. dqh15 とは 100% の相同性を持ち、他の株とはそれぞれ *P. limnetica* str. Castaic Lake (96%), *Pseudanabaena* sp. NIVA-CYA 111 (95%)、

Planktothricoides racibors (94%)、*Oscillatoria limosa* (94%)、*Streptomyces* sp. AA4 (66%)の相同性が見られた。

分子系統樹解析を行った結果(図 2-4)、シアノバクテリアと *Streptomyces* 属放線菌、その他の放線菌属の 3 つのグループに分類された。

2.3.2. *pgmtc* の単離と配列の決定

表 2-2 に示すプライマーを使用し、PCR の増幅により遺伝子の単離を試みたところ、目的のサイズ(約 1200bp)のバンドの増幅を確認できた。決定した塩基配列は図 2-5 (A)に示し、それを翻訳したアミノ酸配列は図 2-5 (B)である。*pgmtc* の配列は 1194 bp からなり、アミノ酸配列は 397aa で、MIBS に特徴的な2つのマグネシウム結合領域を持っていた。分子量は 44065.5Da で、水溶性タンパク質であると SOSUI から推定された。得られた塩基配列情報は DDJB に AB826230 として登録した。

図 2-6 に示す通り、他の株との相同性は *pgmtf* と同様に高く、アミノ酸レベルでは *Pseudanabaena* sp. dqh15 (98%)、*P. limnetica* str. Castaic Lake (97%)、*Pseudanabaena* sp. NIVA-CYA 111 (96%)、*Streptomyces* sp. AA4 (62%)の相同性が示された。マグネシウム結合保存領域については、-DDYYAD-と-xxNxxxSxxxD-であり、これまで報告されているシアノバクテリアの配列と同様であった。

分子系統樹解析を行った結果(図 2-7)、シアノバクテリアと *Streptomyces* 属放線菌の2つのグループは *pgmtf* と同様に分かれたが、その他の放線菌属はシアノバクテリアに近縁の種(CP000094.2)と *Streptomyces* 属に近縁の種に分かれた。

2.3.3. オペロンにおける *pgmtf* と *pgmtc* の配置

これまでの報告では、メチルトランスフェラーゼ遺伝子とモノテルペンシクラーゼ遺伝子はオペロンを形成し、放線菌とシアノバクテリアでその配置に特徴があった。そこで、本株における *pgmtf* と *pgmtc* の関係を調べた(図 2-8)。

プライマーのペアが①～④ (*pcmtf* が上流であることを想定して作成したペア)のときは、予想されるサイズの特異的なバンドが見られたのに対し、⑤のペア(*pgmtc* が上流であることを想定して作成したペア)では複数の非特異的なバンドが見られた。この結果より、*pgmtf* が *pgmtc* の上流に存在することが分かった。また、バンドサイズより、こ

の二つの間に 30~100 bp のギャップが存在することも推定された。この順序はこれまで報告されている 3 種類の糸状性シアノバクテリアの順序と一致し、放線菌の順序とは異なっていた。

2.4. 考察

本章では、使用した *P.galeata* 株の *pgmtf* 及び *pgmtc* の単離と塩基配列及びアミノ酸配列の決定、そして相同性比較、分子系統樹の解析を行った。

本研究で用いた *P.galeata* は *Pseudanabaena* 属の糸状性シアノバクテリアで、これまで日本では *Phormidium tenue* として呼ばれており、はやくからカビ臭生成生物として知られていた。また *Pseudanabaena* 属は、海外でもカリフォルニア州の Castic lake をはじめいくつかの場所で単離され、夏場にカビ臭を多く放出することが報告されている (Izaguirre and Taylor, 1998, Yagi et al., 1983)。

2-MIB 合成関連遺伝子は、放線菌で初めて単離され (Komatsu et al., 2008) しており、GPPMT と MIBS をコードしている。MIBS をコードしている遺伝子は **-DDYYAD-** と **-xxNxxxSxxx[D/E]-** の二つの高度に保存されたマグネシウム結合領域を有している。

シアノバクテリアの 2-MIB 関連遺伝子は、*P.galeata* と同属の糸状性シアノバクテリア *P.limnetica* や *Pseudanabaena* sp. dqh15 株、*Ocillatoria limosa*、*Pseudanabaena* sp. NIVA-111 等で報告されている (Giglio et al, 2010, Wang et al., 2011)。本研究で単離した *pgmtf* と *pgmtc* 両遺伝子は、塩基配列、アミノ酸配列ともこれまで報告されている 2-MIB 関連遺伝子と非常に相同性が高く、重要な 2 つの保存領域 (Mg^{2+} 結合領域) が存在していること、及びオペロンの配列順序が一致していることから GPPMT 及び MIBS の機能を持つものであると推測された。この保存領域については、これまで **-DDYYA[D/E]-** と **-xxNxxxSxxx[D/E]-** の二つの領域において、最後の D/E が放線菌で E (ただし *Streptomyces* AA4 など一部例外あり) であるのに対し、シアノバクテリアでは D となっており、明確に違いがあることが示されていた。本研究で明らかとなった *pgmtf* 及び *pgmtc* においてもシアノバクテリアのパターンを持つことが分かった。また、*pgmtc* の分子系統解析 (Fig.2-7) において、シアノバクテリアと *Streptomyces* 属放線菌の間に分類された CP00094.2 と AM420293.1 について、CP00094.2 はシアノバクテリアに近く、AM420293.1 は *Streptomyces* 属放線菌に

近い。CP000094.2 は二つの保存領域配列が-DDxxxD-と-NxxxSxxxE-であったのに対し、AM420293.1 は-DDxxxE-と-NxxxSxxxE-であった。このため、保存領域の D/E の組み換えは進化の過程で、早期に起きたと考えられる。

本研究では、*pgmtf*と*pgmtc*が 2-MIB 合成に実際に関与しているかについて、組み換えタンパク質を用いた実験は行わなかった。これまでの報告では *Pseudomonas* Pf0-1 など、2-MIB でなく、類似した物質である 2-MB (2-methylenebornane) を合成する種もいることが知られている (Komatsu et al., 2008, Chou et al., 2011)。これは、MIBS に相当する酵素の性質が異なっているためにおこる。このため *pgmtc* が他の類似物の合成に関与している可能性も否定できないが、実際に本株では高濃度の 2-MIB 生成が見られることにより、2-MIB 合成を触媒している酵素である可能性が高い。しかしながら今後、実際に 2-MIB 合成に関与しているかを証明するための組み換えタンパク質実験は行う必要がある。

また、これらの遺伝子はオペロンを形成すると考えられており、これまでの研究 (Komatsu et al., 2008; Wang et al., 2008; Gilgio et al., 2010) では、ヌクレオチド結合タンパクを含めた、3 つの遺伝子でオペロンを形成している株が多い。このヌクレオチド結合タンパクは 2-MIB 合成の調節に関与していると考えられるが、まだ機能については説明されていない。しかしながら、*S. scabies* 87.22 や *Pseudomonas fluorescens* では GPPMT に相当する遺伝子が欠損しており、また、*S. avermitilis* のゲノムには MIBS に相当する遺伝子をコードしている配列が GPPMT の下流に存在するものの、-NES-の保存領域が存在せず、GPP を 2-MIB に変換することができない。このことより、これらの株の MIBS は、以前は 2-MIB 合成に関与していたものの、現在は違う働きを担っている可能性がある。また、この並び順序は種によって異なっており、放線菌では主にヌクレオチド結合タンパク質、MIBS、GPPMT の順序で並ぶが、シアノバクテリアではヌクレオチド結合タンパク、GPPMT、MIBS の順序である。このように、順序の変化が生じる理由についての原因についてはまだはっきりしていない。さらに、Wang et al. (2011) では 2 つのヌクレオチド結合タンパクが 2 つの 2-MIB 関連遺伝子をはさんで、オペロン上の最上流と最下流に存在することを示しており、4 遺伝子でオペロンを形成していると推測している。本株におけるこのヌクレオチド結合タンパク質の存在及び機能についても、今後解明していく必要がある。

A

```

1  ATGTCAACGCCCCAACTATCACTGCCGACAATGTTTTGCGTAGCGAGTATCAGAAGTCA   60
61  GTTGCCAACACTATTGGAACCAAGAAAAAATCCCGTTAATCTTCTACTCGGTCACGTTGAT  120
121  GGCTATTACCACCACCACTACGGGATCGGCGATGTTCGATTGGTCGGTATTAGAGGCTCCC  180
181  GAAGGTGAGCGCGACGATCAGATTATTCGTGAACTACACCGACTCGAACACGCTCAGGCG  240
241  GTTTTCTCTGCTCGACCATCTGGGCAACGTCAAGCCTGATGACCGCGTGATGGATGGCGGT  300
301  TCTGGTCGCGGCGGTACCAGCTTTGTGGTCAATGAACGCTTCGGCTGTCAGGTCGATGGA  360
361  GTGTCAATCTCAGAATCTCAGGTCAAGTTTGCCAATGACCAGTCTGTGCAGCGCGGCATA  420
421  GCTGACAAGGTAAAGTTCCACTTTCGCAATATGCTGGATACTGGCTTCGAGACGGGAGCC  480
481  ATGCGTAGCATTTGGACGAATGAGACCACAATGTATGTGGATCTGTTTCAGGCTGTTTCGCC  540
541  GAGTTTTCTCGTCTTTTGCAGGATGGTGGTCGCTACGCCTGCATAACGGGTTGCTACAAC  600
601  GATGTTACGGGAGGGCGATCGCGGGCTGTCAGCCAGATCGATGCACATTACATCTGTAAC  660
661  ATCCATCCGCGCAGTCAATATTTCAAGGCACTAGCGGCGAACAACCTCGTCCCGATTACT  720
721  GTAACCGATCTGACTCCCCTAACAATTCCCTACTGGGAACTACGGGCCAAGTCTTCGCTC  780
781  ATCACTGGGGTTGAGGATTACTTCCTTACTGCATATAAAGAGGGCAGTTTCCACTATCTG  840
841  CTCATCGTTGCTGACCGCATCATTCGGTAA 870

```

図2-2 (A) *pgmt* の塩基配列

*P. galeata*より得られた*pgctf* のORFの塩基配列を示した。

B

```

1  MSTPQTITADNVLRSEYQKSVANYWNQEKNPVNLLLGHVDGYYHHHYGIG  50
51 DVDWSVLEAPEGERDDQIIRELHRLEHAQAVFLLDHLGNVKPDDRVM DGG  100
101 SGRGGTSFVVNERFGCQVDGVSISESQVKFANDQSVQ RGIADKVKFHFRN  150
151 MLDTGFETGAMRSIW TNETTMYVDL FRLFAEFSRLLQDGGRYACITGCYN  200
201 DVTGGRSRAVSQIDAHYICNIHPRSQYFKALAANNLVPITVTDLTPLTIP  250
251 YWELRAKSSLITGVEDYFLTAYKEGSFHYLLIVADRIIR  289

```

図2-2(B) *pgmtf* の推定アミノ酸配列
S-アデノシルメチオニン結合領域を下線で示す。

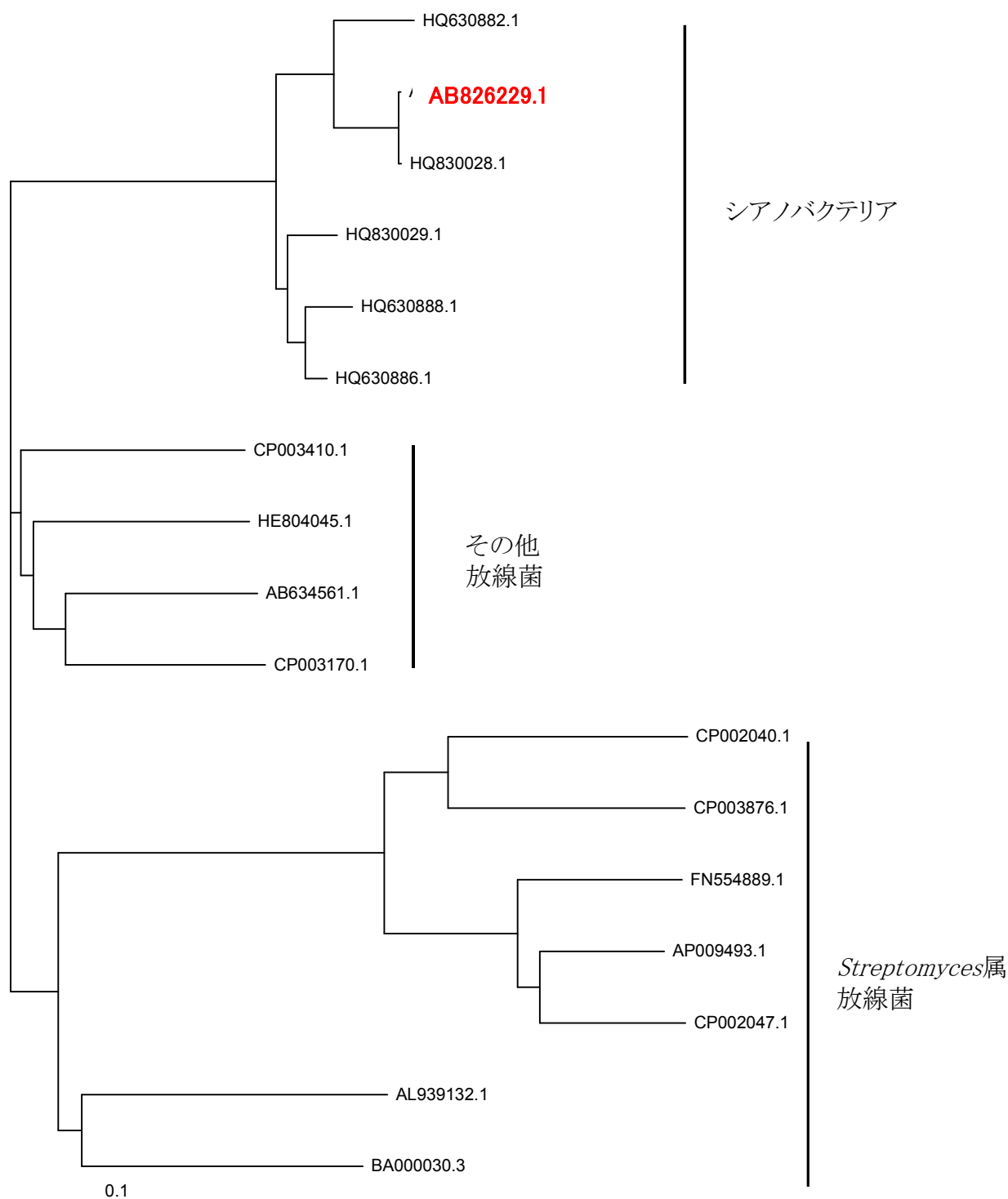


図2-4 メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の分子系統樹

AB826229.1 (本研究で単離した *pgmtA*)、HQ830028.1 (*Pseudanabaena* sp. dqh15)、HQ630882.1 (*Pseudanabaena limnetica* str. Castaic Lake)、HQ630888.1 (*Pseudanabaena* sp. NIVA-CYA 111)、HQ630886.1 (*Oscillatoria limosa* LBD 305b)、HQ830029.1 (*Planktothricoides raciborskii* CHAB3331)、CP003410.1 (*Amycolatopsis orientalis* HCCB10007)、FN554889.1 (*Streptomyces scabiei* 87.22)、HE804045.1 (*Saccharothrix espanaensis* DSM 44229)、CP003170 (*Actinoplanes* sp. SE50/110)、CP003729.1 (*Amycolatopsis mediterranei* S699)、CP003876.1 (*Nocardia brasiliensis*)、CP002047 (*Streptomyces bingchengensis*)、AM420293.1 (*Saccharopolyspora erythraea*)、AP009493 (*Streptomyces griseus*)、AM238663.1 (*Streptomyces ambofaciens*)、AL939132.1 (*Streptomyces coelicolor* A3)、BA000030.3 (*Streptomyces avermitilis* MA-4680)、AB634561.1 (*Micromonospora olivasterospora*)。

A

```

1  ATGAAAGATACCAACTTGGATAATACGAGTACCACATTTTTATTTGGCCCGACTGGTCTT   60
61  GGTACATCCGCCGCTCGCTTTGTGAGTGAGATAGCCAAGGCTGCTCGTACCGATAACCTA  120
121  GATTTCAGGACTACTCCAGACAGATCTCGCCTCGGTGGGGGATTGTGATCCTGCCTATGCA  180
181  GAGAGAGATTGGGGCGATGGAAGTGCCTCACCCTCTACTGCCCCATTACCGAGCGATTTC  240
241  AACGAGCCACTAGCGGACGAGGTCGATGATCGGCTGGCGGACTGGGCATTGGAATGCGGG  300
301  TTTGATGAGGACGAGGCGCAGAAAATTCGCAAGGCGCGGTTTGGACGGCTGGTGATGCTA  360
361  GCTCACCAGACTGCGATGACCCATCTCGGCTGTTGATTGGGGCCAAGTTGAACATGGCT   420
421  TGGTGGGCTGCTGATGACTACTATGCTGACGACACCGAGCTTGGGGCAGATCCAAAGTTG  480
481  CTCCCCCGCGTCTCTTGTGGCGATGACTTCCCTGGACCCGCCCCCGCCAGAGGGGAA   540
541  TTTACGCCCCCGATGGAGGCCGCGATCGCCGAAAAGCGGGTGTTAGTAGCCCTCGGTAAG  600
601  GGCATTGACTATTTGAGCCAGTATGCCACACCAGAGCAAGTTCAGCGTACCTGTTACGCC  660
661  ACCTTCTCTATGTTTCGTCTCTTGGAGTGCCTACGCAGCGTGGCGTTACACTGGCGAGTAT  720
721  CCGCCAGCGTGGAATATCTGGCTGCGCGACAGCACGACAGCTTCTACACCTCCATGACA  780
781  CTAATCGACCCCATCGGAGGCTACGTCCTCCCACCAGATCTTTTCTTCGATCCGCGCGTC  840
841  CGTCACACAGCCTTCCTAGCTGGGACGGCGGTCGTTCTGGTCAACGATCTCCTTTTCGGTT  900
901  GCCAAAGATCTGGCAGACGAGCAGCCACCTGTCAACATGGTGCTACAGATTGCGGCGGAT  960
961  CGGGGCTGCTCTATCGAAGAGGCAACGGAGATCACTGTCAAGTTTCATAACGACTTGGTT 1020
1021 CATGACTTTCGGGAACGACACCAGAAGCTCCAAGCTGTACCCAACGTTGAGCTTCAGAGG 1080
1081 TTCCTGCGCGGATTGCGCGGCTGGATGGGCGGCGCATTTGAATGGCATAACAGCAACCCG 1140
1141 CGCTATAAAAACAGCAACGGTGCTTCACAGCCAGATTACAAATCACTAGCCTAA 1194

```

図2-5(A) *pgmtc*の塩基配列

*P. galeata*より得られた*pgmtc*のORFの塩基配列を示した。

B

1	MKDTNLDNTSTTFLFGPTGLGTSAARFVSEIAKAARTDNLDSGLLQTDLA	50
51	SVGDCDPAYAERDWGDGTASPLYCPITERFNEPLADEVDDRLADWALECG	100
101	FDEDEAQKIRKARFGRLVMLAHPDCDDPSRLLIGAKLNMAWWA <u>DDYYAD</u>	150
151	DTELGADPKLLPPRLLLAMTSLDPPPPAGEFTPPMEAAIAEKRVLVALGK	200
201	GIDYLSQYATPEQVQRTCYATFSMFVSW SAYAAWRYTGEYPPAWKYLAAR	250
251	QHDSFYTSMTLIDPIGGYVLPPDLFFDPRVRHTAFLAGTAVVLV <u>NDLLSV</u>	300
301	<u>AKD</u> LADEQPPVNMVLQIAADRGCSIEEATEITVKFHNDLVHDFRERHQKL	350
351	QAVPNVELQRFLRGLRGWMGGAFEWHSNPNRYKNSNGASQPDSQSLA	397

図2-5(B) *pgmtc*の推定アミノ酸配列

マグネシウムイオン結合領域を下線で示し、赤文字は保存されたアミノ酸配列。

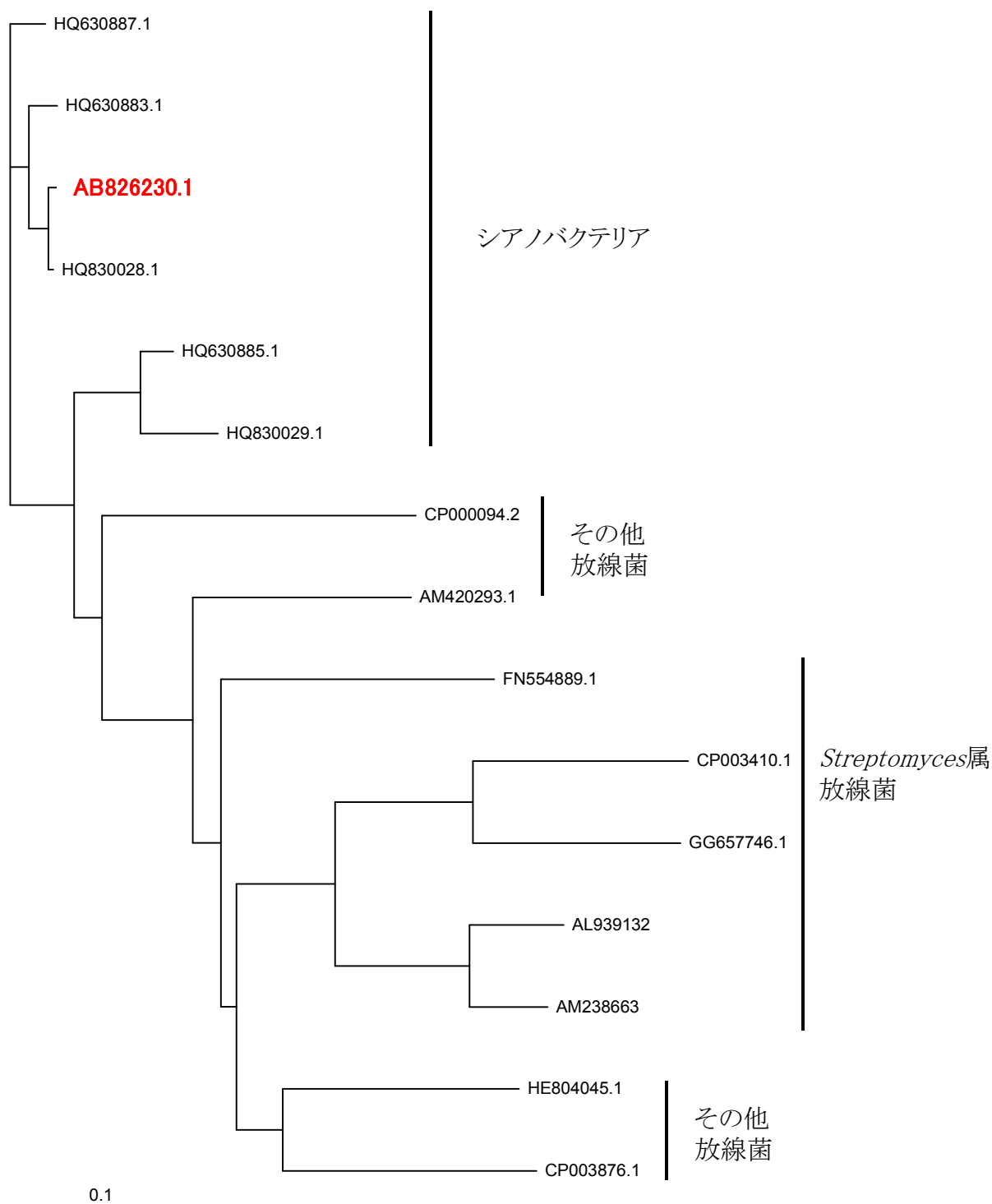


図2-7 モノテルペンシクラーゼをコードする遺伝子の分子系統樹

AB826230.1 (本研究で単離した *pgmtc*)、HQ830028.1 (*Pseudanabaena* sp. dqh15)、HQ630883.1 (*Pseudanabaena limnetica* str. Castaic Lake)、HQ630887.1 (*Pseudanabaena* sp. NIVA-CYA 111)、HQ630885.1 (*Oscillatoria limosa* LBD 305b)、HQ830029.1 (*Planktothricoides raciborskii* CHAB3331)、CP003410.1 (*Amycolatopsis orientalis* HCCB10007)、FN554889.1 (*Streptomyces scabiei* 87.22)、HE804045.1 (*Saccharothrix espanaensis* DSM 44229)、CP003729.1 (*Amycolatopsis mediterranei* S699)、CP003876.1 (*Nocardia brasiliensis*)、CP000094.2 (*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1)、AM420293.1 (*Saccharopolyspora erythraea*)、AM238663.1 (*Streptomyces ambofaciens*)、AL939132 (*Streptomyces coelicolor* A3)、GG657746 (*Streptomyces* sp. AA4)。

第 3 章

2-MIB 関連遺伝子の発現解析

3.1. はじめに

水道の異臭味被害は夏場に多く報告される。これは、夏場の水温が高く、人間が感じやすいということ、及びアオコ等が多く発生し、カビ臭濃度が高度になりやすいということが主たる要因と考えられている。しかしながら、松本ら（1981）が報告しているように、冬場に東京都でジェオスミン濃度が増加したり、昨年度（2012年）、荒川を水源とする水道事業体で、冬場にカビ臭苦情が増加したとの事例もある。したがって、カビ臭の合成には温度だけでなく栄養塩、光など複数の環境要因との関係が報告されているものの（Li et al., 2012、Tung et al., 2008、Watson et al., 2004）、これらの項目は単独でなく、複雑に関与しあっている可能性が考えられる。

カビ臭合成に関連する遺伝子の発現については、これまであまり報告されていない。ジェオスミン合成遺伝子は、放線菌とシアノバクテリアを中心としてその機能解析が行われている（Gust et al., 2003、Giglio et al., 2010）が、発現解析はほとんど行われていない。環境的要因に関しては、Ludwig et al.（2007）が *Phormidium* 種より単離した *geoA1*、*geoA2* の二つの遺伝子の発現を、光条件と関連して報告している。これによると、12 時間ごとの明暗条件で培養した場合、明条件では二つの遺伝子の発現が見られたが、暗条件時には発現が見られなかった。

また、Yague et al（2013）らは *S.coelicolor* の生育段階における発現量の変化について、マイクロアレイを用いて解析を行っている。生育段階の初期の核が一つの細胞に一つずつある段階（M I）と、多核化細胞（M II）になった段階で比較しており、*geoA* の発現は M II では M I の 4.6 倍になることが示されている。

2-MIB 合成関連遺伝子の発現については、Wang（2011）らが光条件を変えた際の研究例が報告されている。この実験では、シアノバクテリア *Pseudanabaena* sp. dqh15 と *Planktothricoids raciborskii* の生育条件を強光・弱光として調べている。メチルトランスフェラーゼ（*mtf*）とモノテルペンシクラーゼ（*mic*）遺伝子の発現を調べた結果、通常の光条件と比較して、弱光条件では発現量が増加し、強光条件では発現量が減少した。しかしながら、暗条件では、双方の遺伝子とも非常に弱い発現しか示さなかった。

以上のようにジェオスミン、2-MIB 共に環境要因としては光条件に対する遺伝子発現解析のみが行われており、その他の条件での発現解析の報告はない。本章では、まず、*P.galeata* 株が培養温度により、増殖と 2-MIB 量の生成にどのような関係を示すかについて解析した。更に 2-MIB 合成関連遺伝子 *pgmtf* と *pgmtc* の発現が、温度条件によりどのように変化したかについて報告する。これにより遺伝子の発現と 2-MIB 生成量の関連性について考察した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 培養条件の検討

異なる培養温度下での *P.galeata* の増殖を調べるため、BG-11 培地で $20 \mu\text{M photon/s/m}^2$ の光条件下で、 OD_{730} (増殖量) = 0.05~0.1 まで培養した株を 15℃、20℃、25℃に移し、それぞれ 10 日間培養し、3 日目、6 日目、10 日目の増殖量と、菌体あたりの 2-MIB 濃度の関係を調べた。また、更に温度に対する詳細を調べるため、4℃、20℃、30℃の条件下で 24 時間培養後の菌体量と、菌体あたりの 2-MIB 量を調べた。

3.2.2. 2-MIB 濃度の測定

2-MIB 濃度はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS QP2010 島津製作所製) を用いて行った。一様に攪拌した菌体を含む溶液を 1 ml 採取し、これにメタノール 1 ml を加えボルテックスした。この溶液にさらに 1 ml ヘキサンを加えボルテックスしたのち、2,000 rpm で遠心したものの溶媒層をとり、サンプル液とした。GC-MS の条件はオーブン温度 60℃、気化室温度 250℃、イオン源温度 250℃、インターフェース温度 260℃、昇温条件は 60℃→5℃/min→260℃で、カラムには Rtx-1 を用い、スプリットレスモードで行った。この条件で 2-MIB のピークは 7.8 分付近に見られた (図 3-1)。

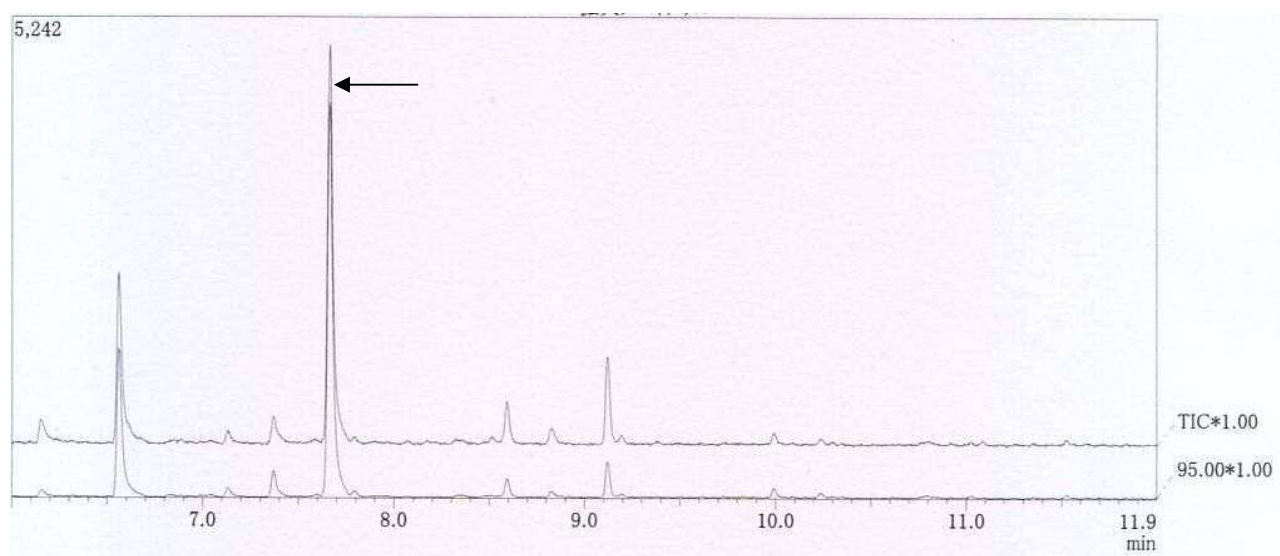


図 3-1 GC-MS による 2-MIB の分析
($m/z = 95.0$)

3.2.3. 温度処理実験における培養条件

P.galeata を 20°C 、 $20 \mu\text{mol photon/s/m}^2$ の条件下で $\text{OD}_{730}=0.05\text{-}0.1$ まで培養したものを 4°C 、 20°C 、 30°C の培養器に移し、1、3、6、12、24 時間培養したものを用いた。

3.2.4. RNA 抽出

異なる温度で 24 時間培養した株をチューブに移し、5%フェノールで反応を停止させたのち、 4°C 、8,000 rpm で 3 分間遠心し、上澄を捨て集菌をしたものを即座に液体窒素で凍結させた。この菌体を乳鉢で磨り潰し、細胞壁を破壊した。このサンプルを Invitrogen 社の Trizol 液を用いてプロトコルに従い、処理した。Trizol 液 1 ml を加え、 50°C で 10 分間インキュベートしたものにクロロホルム $200 \mu\text{l}$ を添加してボルテックスしたのち、15,000 rpm、 4°C 、15 分間遠心し、上澄約 $500 \mu\text{l}$ にイソプロパノール $250 \mu\text{l}$ 、High Salt 液 $250 \mu\text{l}$ を加え、ボルテックスしたのち 15,000 rpm、 4°C 、15 分間遠心し、エタノール沈殿を行った。最後にコンタミしていると考えられる DNA を分解するため、DNase により 37°C 、30 分間処理し、 $25 \mu\text{l}$ の RNase-free 水に溶解した。RNA 濃度は NanoVue Plus (GE ヘルスケアジャパン社製) により測定し、RNA

の純度が A_{260}/A_{280} が 1.8 以上であることを確認した。

3.2.5. cDNA 合成

cDNA は Invitrogen 社の SuperscriptIII を用いて合成した。Total RNA 1 μ g、50 ng Random hexamer primers 1 μ l、10 mM dNTP 1 μ l を混合した。

プライマーをアニーリングさせるため、65℃で 5 分間処理した後、10×buffer 2 μ l、0.1 mM DTT 2 μ l を添加した。この混合液を室温で 10 分間、続いて 50℃で 50 分間インキュベートし、cDNA 合成を行った。残った RNA を分解するために RNase を加え、37℃で 20 分間インキュベートした。

3.2.6. Real-time RT-PCR による発現解析

pgmtf と *pgmtc* の発現解析は、Applied Biosystem 社の Real time PCR system7300 を用いて行った。合成した cDNA を 1 μ l 用い、プライマーのペアは Wang et al. (2011)らのものを参考にし、以下の配列を用いた。

反応液は Applied Biosystem 社の Power SYBR Master mix を用いて行った。

また、内部標準には 16S rRNA の配列を用いた。

表 3-1 real-time RT-PCR 用プライマー

プライマー名	配列
GPP-RTF	5'-CGATTGGTCGGTATTAGAGGCT-3'
GPP-RTR	5'-ATCACGCGGTCA TCAGGCTT-3'
MIBS-RTF	5'-CGCTCGCTTTGTG AGTGAGATAG-3'
MIBS-RTR	5'-GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT-3'
16S-RTF	5'-ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC-3'
16S-RTR	5'-CGAAAGCCTGACGGAGCAATA-3'

16S rRNA の分析時には、cDNA は 1000 倍希釈したものを用いた。

反応は 94℃で 3 分間のプレヒートを行った後、94℃で 15 秒、60℃で 15 秒の 40 サイクルで行った。この後、95℃まで一度温度を上昇させ、そこから 40℃にまで徐々に温度を下げていき、融解温度を測定した。

それぞれの発現量を定量化するために、既知濃度の *pgmtf* 及び *pgmtc* を用い

て検量線を作成し、この検量線より作成した濃度を内部標準で除した値を用いて、それぞれの相対発現量を求めた。

3.3. 結果

3.3.1. *P.galeata* の増殖に対する温度の影響

各温度で培養した株の増殖（図 3-2A）と菌体あたりの 2-MIB 量（B）を調べた。増殖曲線については、15℃、20℃、25℃でほとんど差が見られなかった。しかし、25℃で培養した場合は、10 日目で菌体量が減少する結果となった。これに対し、菌体あたりの 2-MIB 量は時間が経過するにつれ増加した。また、温度が上昇するほど高濃度になることも示された。

更に、温度に対する菌の応答を詳細に解析するために、4℃、20℃、30℃の条件下で 24 時間培養後の菌体量と、菌体あたりの 2-MIB 量を調べた（図 3-3）。4℃で培養した時、菌体量（A）は他の温度条件より少ない結果となったが、20℃と 30℃では有意な差は見られなかった。これに対し、菌体あたりの 2-MIB 量（B）は温度の上昇と共に増加がみられた。温度を変化させる前と比較して、4℃ではほぼ同量の 2-MIB 量が増加しており、20℃と 30℃ではそれ以上の 2-MIB の増加が見られた。

3.3.2. 低温における発現解析

低温条件（4℃）で培養開始 24 時間後の *pgmtf* と *pgmtc* の発現量を調べた（図 3-4 A、B）。20℃での発現と比較し、*pgmtf*（A）は 1 時間後には発現量が少し増加し、3 時間後はほぼ同値となり、6 時間以降は低い状態となった。これに対し、*pgmtc*（B）は 1 時間後に急激に増加し、3 時間後も高い状態が維持されたが、6 時間以降は低い状態となった。

3.3.3. 高温における発現解析

高温条件（30℃）で培養開始 24 時間後の *pgmtf* と *pgmtc* の発現量を調べた（図 3-5 A、B）。その結果、双方の遺伝子の相対発現パターンは類似しており、20℃での発現と比較し、1 時間後には発現量が急激に増加し、24 時間後も高い状態が維持されていた。

3.4. 考察

シアノバクテリア *Microcystis* 属などの増殖と温度の関係についてはこれまでも研究が行われており、夏場の高温条件で増殖が良くなることが示されている (Westerhoff et al., 2005、Izaguirre et al., 1982; 1998)。

本研究において、10 日間の培養実験では、6 日目までは各温度における生育の差はほとんどなかったが、10 日目では 25℃で菌の死滅が見られた。今回使用した *P.galeata* は、通常条件でも他のシアノバクテリアと比較して生存期間が短い。2-MIB は高い溶菌作用があることが報告されている (Ozaki et al., 2008)。このことが、高濃度の 2-MIB を放出する *P.galeata* の生存期間が短い原因の一つになっていると考えられる。今回、25℃で早い段階での死滅が起こったのは、25℃における 2-MIB 量が 15℃、20℃と比較して高いため、2-MIB が *P.galeata* 自身に対し、溶解作用を及ぼしていたと考えられる。

また、菌体あたりの 2-MIB 量については、温度の上昇とともに増加した。

24 時間後の増殖と 2-MIB 生成量の解析により、4℃でも菌体の増殖が見られたが、これは 4℃に移動させた直後には、通常通りの増殖が起こっていたが、24 時間後には増殖はほとんどなかったものと考えられる。菌体あたりの 2-MIB 量についても、0 時間の状態から変化はなく、24 時間後では 2-MIB の合成はほとんど行われていなかったと考えられる。この結果より、2-MIB 生成量は温度依存的であるが、細胞増加と 2-MIB 量が単調に増加しているわけではないことが示唆された。

これまでの報告で、2-MIB 遺伝子の発現が光強度の違いにより転写レベルで制御されていることが示唆されている (Wang et al., 2011)。そこで、別の環境因子として温度に注目し、2-MIB 生成活性の違いに転写レベルでの制御が関与するかを調べた。

培養開始 24 時間の遺伝子発現解析では、温度が増加するほど遺伝子発現量は増加していた。1 時間後や 3 時間後に、低温と高温双方で発現が増加したのは、急激な温度変化によるストレスの影響と考えられる。また、2-MIB やジェオスミンがストレスや外部敵に対する成長抑制物質として働くという報告がある (Paerl and Millie, 1996)。このため温度ストレスから身を守るために遺伝子の発現量が増加した可能性が考えられる。

これまでの研究により *pgmtf* と *pgmtc* は同一のオペロンを形成していることから、二つの遺伝子の発現パターンはほぼ同じと考えられるが、4℃ではやや異なった結果が得られた。これは二つの遺伝子間の mRNA の安定性に違いがある可能性が考えられる。今後これらのメカニズムについて調べる必要があると考えられる。

以上、増殖曲線と遺伝子発現の解析より、2-MIB 合成には *pgmtf* と *pgmtc* の 2 遺伝子の発現レベルの調節も関与しているものと考えられた。今回は短期間培養後の発現解析を行ったため、長期にわたる発現を調べることや、これらの遺伝子の発現が他の環境条件でどのように変化するかについても、今後研究をしていく必要性があると考えられる。また、これらの遺伝子の発現を制御する転写因子の存在についても研究を行うことで、2-MIB 合成の詳細を解明できると考えられる。

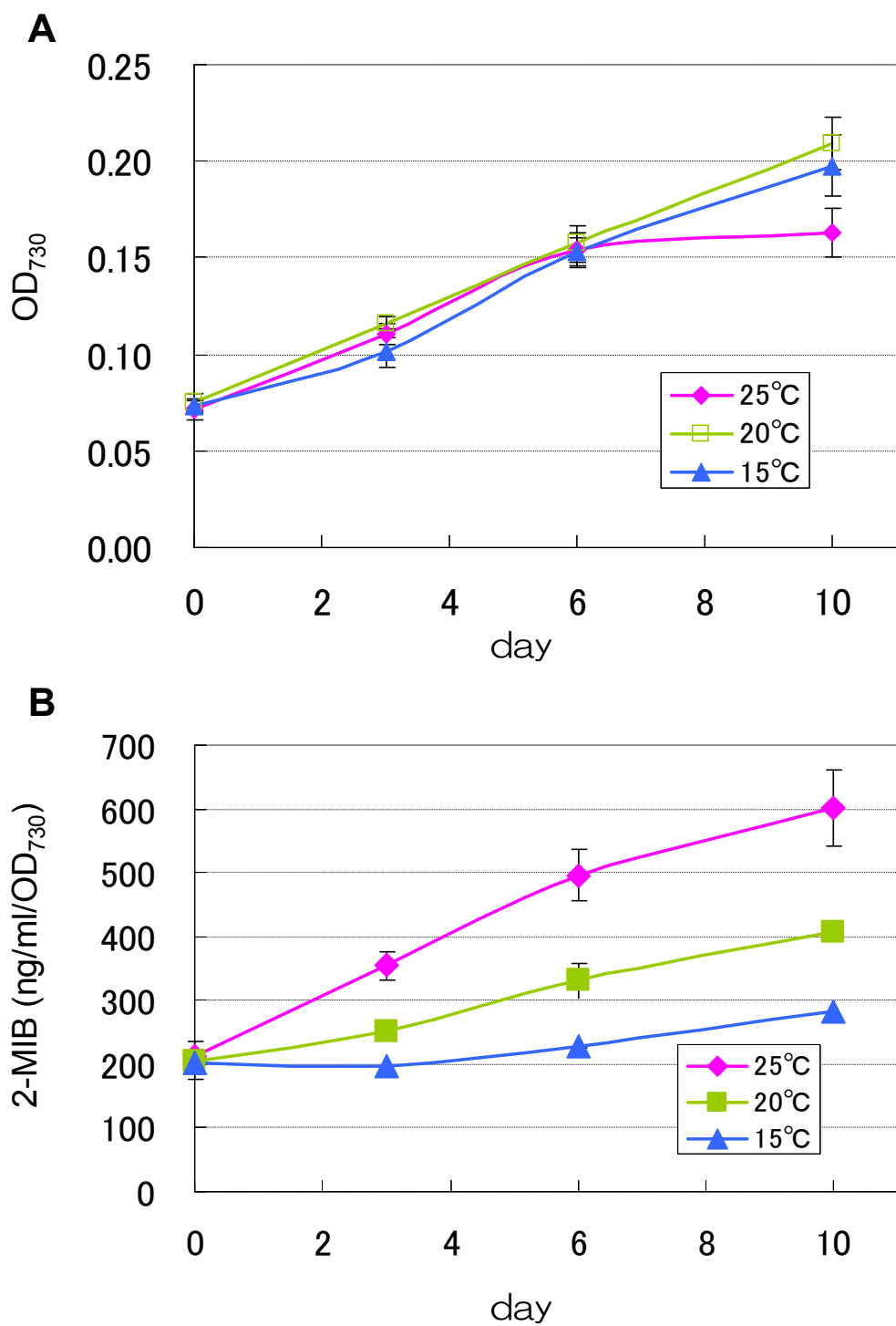


図3-2 各温度における生育曲線(A)と菌体あたりの2-MIB量(B)
BG-11培地で20 μ mol photon/s/m²の光条件下で、15°C、20°C、25°Cでそれぞれ10日間培養した。n=3 (mean \pm SD)。

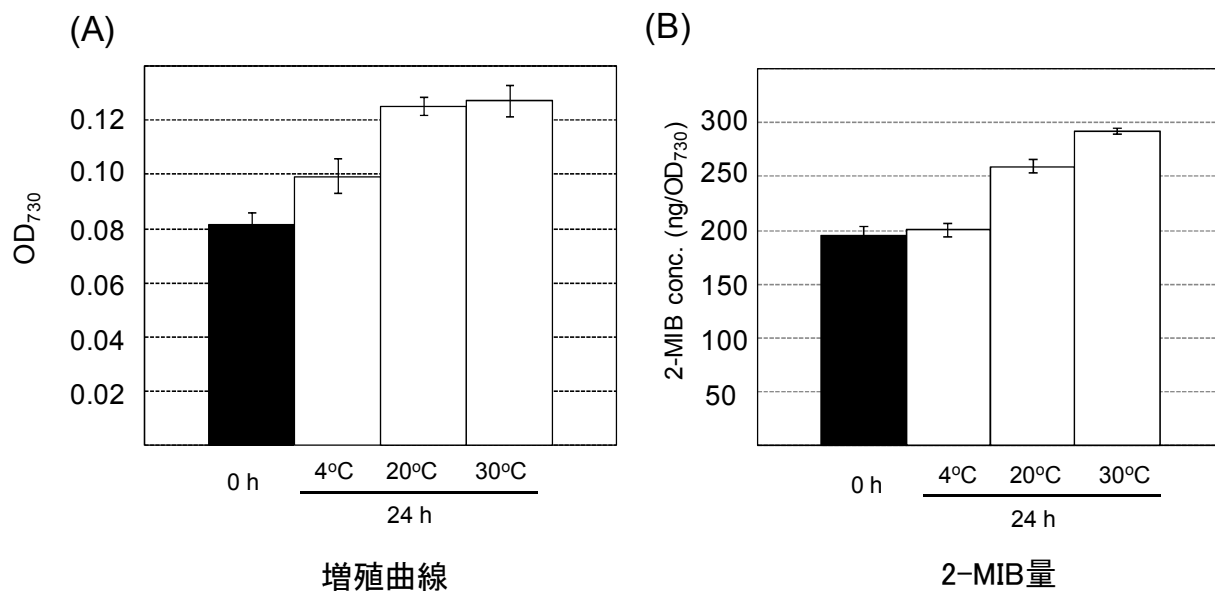


図3-3 各温度(4°C、20°C、30°C)で24時間培養した際の*P. galeata*の増殖曲線(A)と菌体あたりの2-MIB量(B)

BG-11培地で連続照射のもと、20°Cで培養していた株を4°C、20°C、30°Cに移し、24時間培養した。n=3 (mean±SD)。

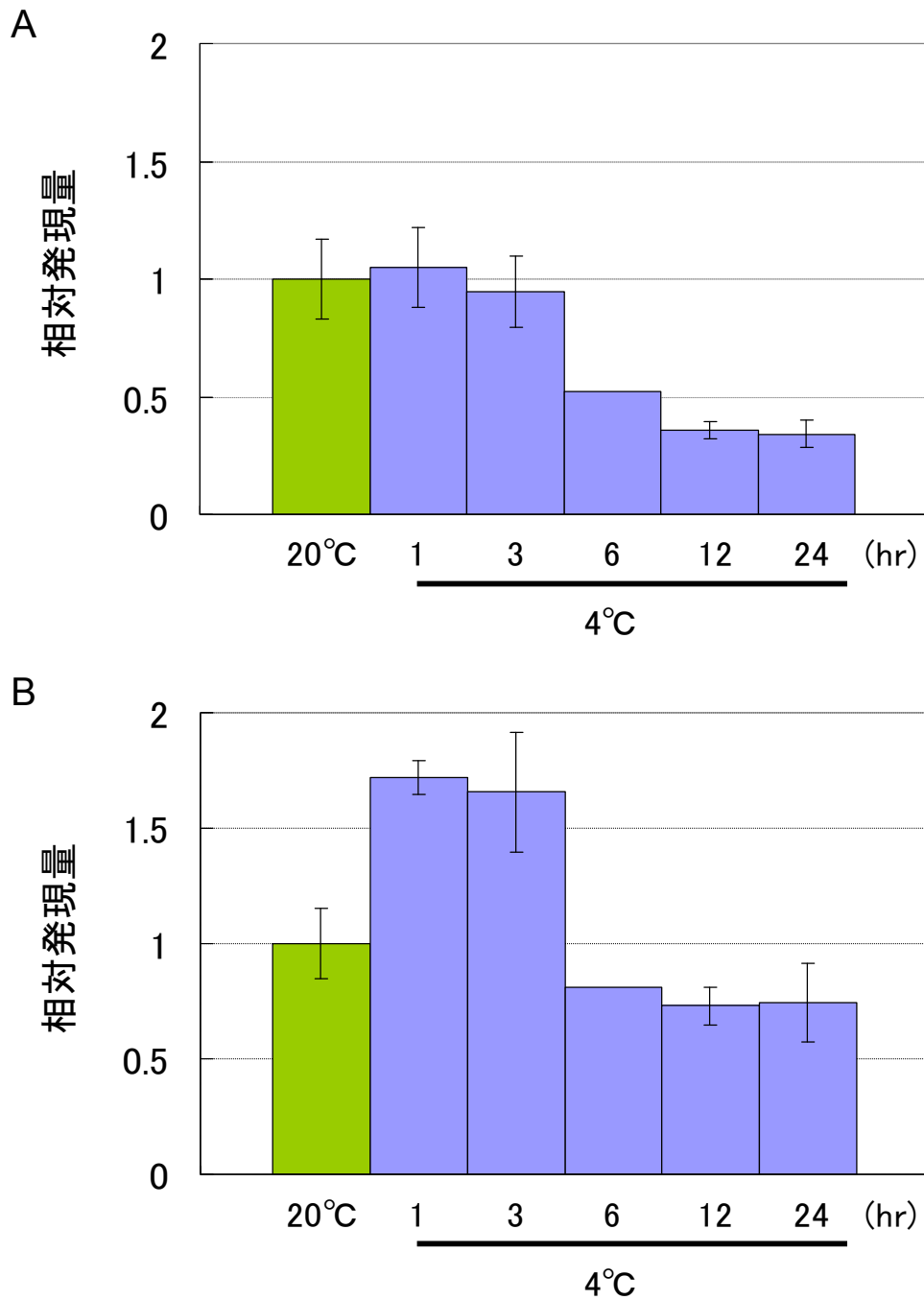


図3-4 低温培養時(4°C)における $pgmtf$ (A)と $pgmtc$ (B)の相対発現量
 定量はリアルタイムPCRによって行い、相対発現量は20°Cで培養した時との相対値である。株の培養はBG-11で連続光の条件で行った。
 $n=3$ (mean \pm SD)。

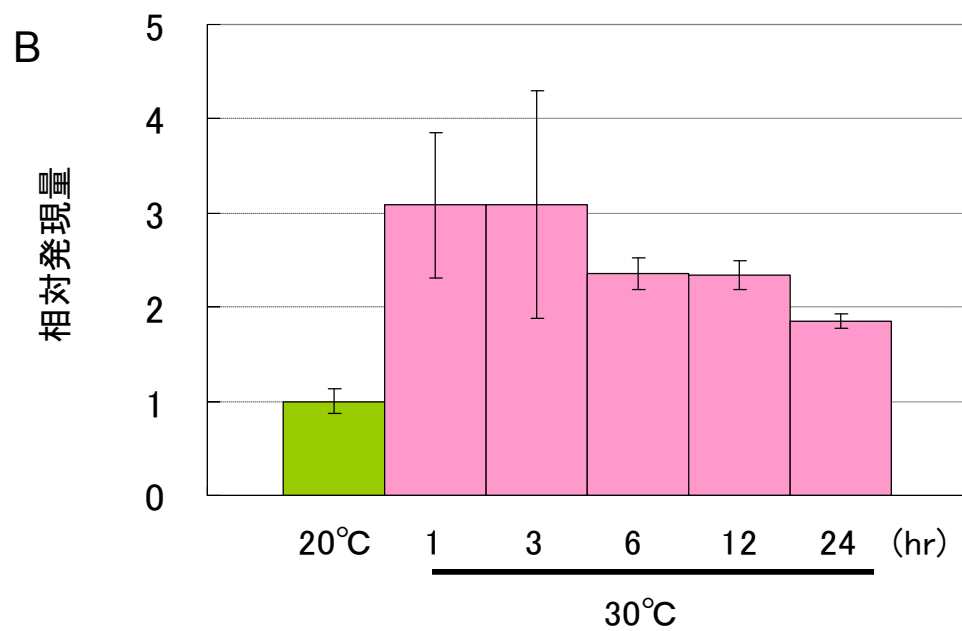
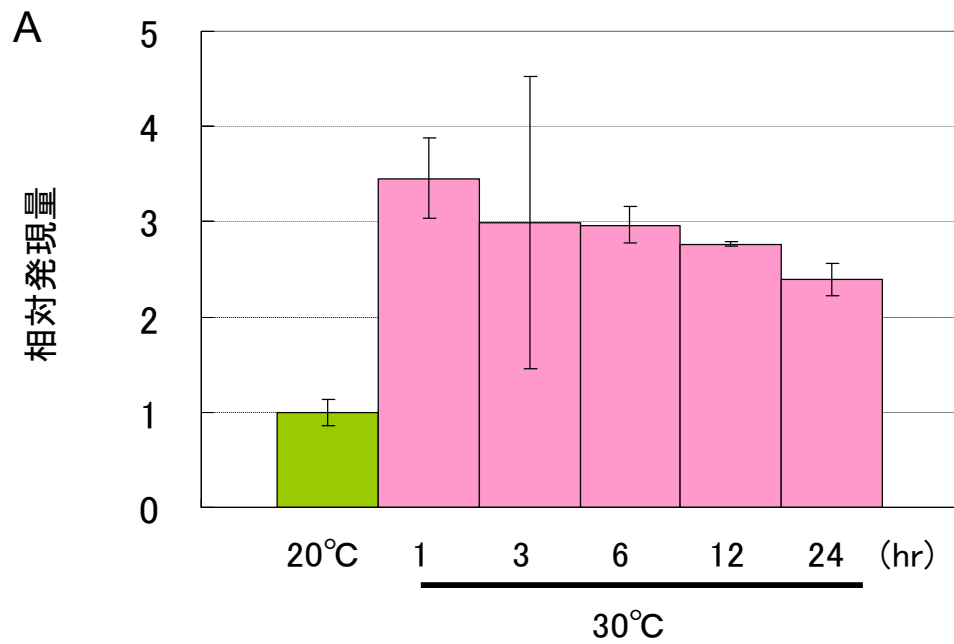


図3-5 高温培養時(4°C)における*pgmtf* (A)と*pgmtc* (B)の相対発現量
 定量はリアルタイムPCRによって行い、相対発現量は20°Cで培養した時との相
 対値である。株の培養はBG-11で連続光の条件で行った。n=3 (mean±SD)。

第 4 章

2-MIB 合成における代謝経路の解析

4.1. はじめに

ジェオスミンや 2-MIB は 2 次代謝物であり、生命に必須の因子ではないと考えられるため、なぜ生産されるかについてはまだ解明がされていない。これまで推測されていることは、これらの 2 次代謝物が、他の生物に対して不利な働きをすることが提唱されている (Vining et al., 1992)。また、外部に放出することで、シアノバクテリアが生育条件が適さない環境になった時 (温度が低い時など) に、それが競合者への化学的抑止物質になるということも報告されている (Paerl and Millie., 1996)。実際に、2-MIB には他の菌に対する溶菌作用がある (Ozaki et al., 2008)。

2-MIB の生産機構についての解明には、代謝全体の解析が必要であると考えられる。シアノバクテリアの代謝プロファイリングの研究はあまり行われていなかったが、近年になりバイオマスとしての重要性が取り上げられ、いくつかの報告もされるようになってきた。Eisenhut et al. (2008) は *Synechosystis* sp. PCC6803 を用いて CO₂ 量を変化させたときの代謝物の変化を見ている。高 CO₂ 条件から低 CO₂ 条件に移した時に、代謝プロファイルの変化を見ることで、CO₂ の馴化に必要な要素について解析している。また、Takahashi et al. (2006) はキャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) を用いて、光独立栄養条件と混合条件での代謝比較を行っている。そのほかグリコーゲン合成に関連するプロファイリングも CE-MS を用いて研究されている (Hasunuma et al., 2013)。

CE-MS はイオン性化合物に対する高い分離能を持ち、物質を誘導体化することなく精度良く定量することが可能で、有機酸やヌクレオチド、アミノ酸を分析するのに適している。これまでも枯草菌やシロイヌナズナ、イネ、ギシギシ等で CE-MS を用いたメタボローム解析の報告がある (Soga et al., 2002, Sato et al., 2004, Takahashi et al., 2008, Miyagi et al., 2013a,b)。

2-MIB の合成経路についてはこれまでもラベリング実験や関連遺伝子の発見により研究が進められている。また、2-MIB 合成に影響を与える環境因子として光強度、水温、栄養条件 (主に窒素・リン)、水深等が示されている。しかしながら、これらの条件を変化させたときの 2-MIB 合成に関連する代謝変動の報告は、これまでなされていない。そこで、本研究では CE-MS を用いて、解糖系物質や、TCA 回路中間体などの一次代謝物が、温度によりどのような変化を生じるかについて調べ、2-MIB 合成に必要な条件についての考察を行った。

4.2. 実験方法

4.2.1. 培養条件

培養条件は 3.2.3 同様に、*P.galeata* を 20℃、20 μ molphoton/s/m² の条件下で OD₇₃₀=0.05-0.1 まで培養したものを 4℃、20℃、30℃ の培養器に移した。サンプルは 24 時間後に採取した。

4.2.2. キャピラリー電気泳動 (Capillary electrophoresis-mass spectrometry : CE-MS) による代謝解析

代謝物は CE-MS 装置を使った分析を、Miyagi et al. (2013a,b) が報告している手法に従って行った。細胞は 9,000 rpm で 10 分間遠心して集菌した。液体窒素で細胞を凍結し、乳鉢に入れて破碎した。この細胞に 4℃で冷やした 50%メタノールを 0.1 ml 添加し酵素を不活性化させた。このメタノール液に内部標準物質である 50 μ M 1,4-piperazine diethane sulfonic acid (PIPES) と 50 μ M methionine sulfone (MeS) を含む純水を 0.1 mL 加えた。15,000 rpm で 5 分間遠心したのち、分画分子量 3 kDa のフィルター (Millipore 社) を用いて、除タンパク処理を行った。このフィルターをチューブに乗せ、15,000 rpm で 30 分間遠心し、フィルターろ過した液をサンプル溶液とした。

陰イオン (有機酸、リン酸化化合物) の分析にはポリエチレングリコールコーティングキャピラリー DB-WAX (100 cm \times 50 μ m、アジレント社) を用い、溶離液は 20 mM の酢酸アンモニウムを用いた。陽イオン (アミノ酸) 分析にはシリカキャピラリーを用い、溶離液は 1 M ギ酸 (pH1.9) を用いた。

分析は装置に 25 V の電圧をかけ、それぞれ陽イオン、陰イオンモードにして行った。安定した結果を得るために、シース液としてアニオン化合物用に 5 mM の酢酸アンモニウムを使用し、8 μ L/min の速さで送液した。キャピラリー電圧は \pm 3,500 V で窒素ガスを毎分 8 L/min で 20 \sim 30 分流した。解析にはアジレント社の ChemStation software (Rev.A10.01) を用いて、化合物の定量を行った。測定化合物の構成は表 4-1(A)、(B) のとおりである。

4.2.3. データ解析

CE-MS で得られた定量データの結果を用いて、主成分分析及び階層クラスター解

析を行った。これらの解析は統計ソフト SPSS (Statistical Package for the Social Sciences ver.20.0) を用いて行った。また、ヒートマップの作製は Microsoft Excel 2010 を用いて行ったが、この時、定量した値は Z スコアへ変換した。相関解析はピアソンの相関係数を用いて SPSS で行った。

表 4-1 分析化合物 (分子量、名称)

(A) 陰イオン性化合物

分子量	名称	分子量	名称	分子量	名称
87	Pyruvate	147	Cinnamate	89	Lactate
167	PEP	163	Formate	115	Fumarate
169	DHAP	173	Shikimate	117	Succinate
185	3PGA	229	Ru5P	133	Malate
259	G1P	229	R5P	145	2OG
259	G6P	275	6PG	173	Asconitate
339	FBP	309	RuBP	175	Ascorbate
				191	Isocitrate
				191	Citrate

(B) 陽イオン性化合物

分子量	名称	分子量	名称	分子量	名称
89	Alanine	76	Glycine	104	GABA
133	Ornithine	116	Proline	106	Serine
133	Aspartate	122	Cysteine	118	Valine
134	Aspartic acid	132	Isoleucine	120	Threonine
147	Lysine	132	Leucine	176	Citrulline
147	Glutamate	150	Methionine	182	Tyrosine
148	Glutamine acid	156	Histidine	205	Tryptophane
175	Arginine	166	Phenylalanine		

略号: PEP: Phosphoenolpyruvate、DHAP: Dihydroxyacetone phosphate、3PGA: 3-Phosphoglyceric acid、G1P: Glucose-1-phosphate、G6P: Glucose-6-phosphate、Ru5P: Ribulose-5-phosphate、R5P: Ribose 5-phosphate、6PG: 6-Phosphogluconate、RuBP: ribulose-1,5-diphosphate、2OG: 2-oxoglutarate、GABA: γ (gamma)-aminobutyric acid

4.3. 実験結果

4.3.1. 化合物の測定

CE-MS で 44 物質の測定を行ったが、検出されたのは 36 物質であった(表 4-2)。

4.3.2. 主成分分析

各サンプルで主成分分析をした結果、それぞれの温度でグループが形成された(図 4-1)。第 1 主成分では低温処理したサンプルが正の方向、常温が 0 付近、高温処理したサンプルが負の方向にグループを形成した。

第 2 主成分では、温度を変化させたときのサンプルが正の方向、温度を変化させなかった 20℃ のサンプルが負の方向にグループを形成した。

4.3.3. クラスタ解析及びヒートマップ

各温度群の違いを視覚化するために、クラスタリング解析を行った。その結果、図 4-2 に示すように 2 つのクラスター(Group I、Group II)に分類された。Group I は主に解糖系の中間産物より成り、Group II が 2-MIB を含み、アミノ酸と TCA サイクルの中間代謝物から構成された。

4.3.4. 培養温度による代謝変動

上記の結果を代謝マップに表現した。4℃で処理した時に増加した物質は G1P、G6P、6PG、RuBP、PEP、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Succinate で、主に解糖系物質と TCA サイクルに入る前のアミノ酸であった。低下した物質は 2-MIB、Citrate、Glu、Asn と、TCA サイクル関連物質であった(図 4-3)。30℃で処理した時に増加した物質は 2-MIB、Citrate、Malate、Asn、Asp、Arg、Ornithine、Glu、Gln で TCA サイクルや窒素同化関連物質、低下したのは G1P、G6P、6PG、RuBP、3PG、Fumarate、Succinate、Met と解糖系関連物質が中心であった(図 4-4)。

4.3.5. 相関解析

相関解析は CE-MS で得られた代謝物を 2-MIB 量と比較することにより行った(図 4-5)。この中で、いくつかのアミノ酸(Lys、Arg、Asp、Glu、Citrulline)は 2-MIB と高い相関性が見られた。これに対し、2-MIB と有機酸の間には大きな相関性は見られな

かった。逆に負の相関性はアミノ酸 (Met)、解糖系中間代謝物では (PEP、G1P、G6P) などで見られた。

4.4. 考察

CE-MS による一次代謝物の一斉測定の結果、測定した主要代謝物の含有量は、温度条件を変更することで大きく変化した。2OG、R5P をはじめとする 8 物質については検出されなかった。この中には 2OG のように、培地中の窒素分が多いときに検出されにくいものなどもあるため、代謝に関与していないとまでは言えないが、2-MIB 合成への影響はそれほど大きくないと考えられる。主成分分析の結果、それぞれの温度でグループが形成されたが、第 1 主成分は、低温処理したサンプルが正方向、常温が 0 付近、高温処理が負の方向であったことから、温度による影響を示していると考えられる。第 2 主成分は、低温及び高温へ温度変化させた時のサンプルが正の方向、常温のままのサンプルが負の方向に位置したことから、温度ストレスの影響を示していると考えられる。増加したのは G6P、G1P、6PG、RuBP、FBP 等で、解糖系及び OPP 経路関連代謝物であった。これらの結果より、4℃における炭素の流れは非常に遅くなっていることが推測される。その結果、2-MIB の合成に必要な炭素が十分供給されていないと考えられた。対照的に、高温では増加するアミノ酸が多くみられた。これらのアミノ酸は、TCA 回路由来のものが多く、また窒素同化の中間代謝物であるものが多かった。これらの結果より、2-MIB 合成には窒素が要求されることが考えられる。

また、今回の結果では、メチオニンが 2-MIB と負の相関を示した ($r = -0.811$)。この結果はメチオニンが 2-MIB の合成に必要な SAM の基質として消費されていたと推測される。

今後はそれぞれの物質が 2-MIB とどのように関連しているかについての詳細を、2-MIB 合成に必要な要素を特定するために調べる必要がある。また、2-MIB を合成する他の種との比較、ジェオスミンを産生する種と比較して、2-MIB との合成メカニズムの相違について検討していくことも必要である。このことで、現在のところ、発生条件の推定が困難なカビ臭の産生メカニズムの詳細をつかみ、水道のカビ臭問題への効果的な対策へつながると考えられる。

表4-2 各温度における代謝物の含有量

(A) 陰イオン性化合物 (ng/gFW⁻¹)

	PEP	3PGA	FBP	DHAP	G1P	G6P	RuBP	6PG	Cinnamate	Citrate	Fumarate	Malate	Succinate	Lactate
30°C	16.56	61.04	2.70	39.26	13.96	77.14	14.10	17.10	59.54	518.00	4.14	9.94	13.34	163.24
30°C	14.87	83.97	2.18	51.67	17.11	68.03	9.46	14.60	58.64	523.78	4.12	7.99	12.19	250.65
30°C	15.13	62.72	2.01	48.78	11.60	74.35	12.30	14.88	57.00	395.17	5.42	7.13	15.45	176.08
20°C	23.20	111.15	0.86	63.47	24.91	101.41	50.47	17.03	37.57	574.43	8.63	6.26	18.10	96.18
20°C	7.87	104.95	0.65	59.26	30.07	120.02	77.94	19.04	30.98	416.37	5.03	7.53	16.81	136.57
20°C	26.18	90.67	8.54	51.94	23.23	102.00	61.52	18.60	36.91	373.12	6.70	5.88	17.73	170.02
4°C	26.37	63.67	4.97	54.27	192.45	468.15	279.33	25.55	47.19	389.84	7.40	7.11	33.54	191.41
4°C	23.68	101.08	5.02	61.86	139.27	398.16	459.80	28.71	44.34	307.09	6.48	6.68	28.48	173.51
4°C	23.78	63.58	3.38	53.11	156.60	429.67	303.07	22.70	40.63	335.40	4.70	7.14	29.43	137.41

(B) 陽イオン性化合物 (ng/gFW⁻¹)

	Ornithine	LYS	ARG	ALA	ASN	GLN	GLU	ASP	HIS	GLY	ILE	LEU	MET	PRO
30°C	9.66	97.37	65.83	182.43	5.65	90.30	972.07	256.90	7.82	57.11	52.70	58.18	1.20	109.93
30°C	10.09	101.32	55.39	185.53	4.43	82.44	946.53	232.93	7.96	55.45	54.47	60.65	1.55	85.44
30°C	9.41	100.61	70.35	190.07	6.13	88.21	1035.25	251.77	7.09	57.63	53.85	59.47	1.38	95.15
20°C	7.99	71.75	50.07	183.77	4.09	85.26	578.28	207.78	6.05	38.46	54.55	61.42	1.94	129.53
20°C	9.39	62.29	52.20	154.48	3.65	78.30	500.65	178.84	5.94	39.79	53.28	61.18	1.88	139.21
20°C	6.16	61.22	39.87	148.55	3.12	67.73	437.15	159.34	5.54	41.33	53.48	63.53	2.55	135.25
4°C	8.28	59.95	46.31	450.42	2.61	78.21	502.99	184.02	4.88	59.30	80.40	201.42	3.32	377.05
4°C	10.43	55.81	51.77	406.04	2.50	77.02	466.98	169.85	5.83	57.84	71.26	186.47	3.01	391.61
4°C	7.04	56.44	40.69	401.76	2.20	68.56	419.56	155.71	4.52	50.65	74.54	184.19	2.58	346.26

	PHE	GABA	SER	VAL	THR	TRP	CTL	TYR
30°C	6.66	0.94	120.67	81.15	32.87	2.52	61.40	14.01
30°C	7.15	1.22	116.35	79.61	31.90	2.72	46.21	13.53
30°C	7.48	1.26	114.00	73.16	31.80	2.57	57.85	11.76
20°C	6.93	0.75	85.75	73.54	26.19	2.68	43.50	10.39
20°C	6.98	0.92	81.51	69.83	26.30	2.64	49.70	9.94
20°C	6.79	1.68	88.76	69.94	26.66	2.43	46.63	10.47
4°C	5.83	1.90	218.30	167.58	77.40	2.58	20.04	17.19
4°C	6.25	1.37	210.00	154.69	73.40	2.81	21.74	17.04
4°C	5.28	1.03	192.60	151.59	67.23	2.47	12.69	14.85

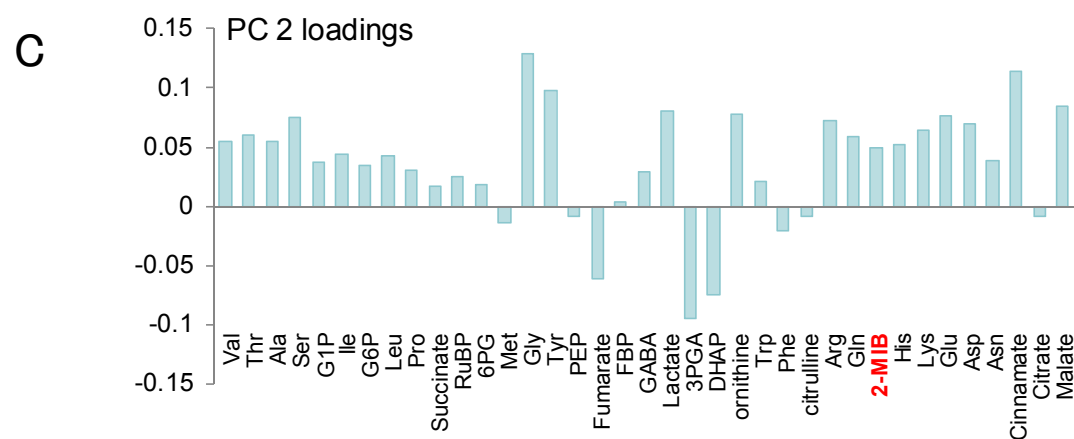
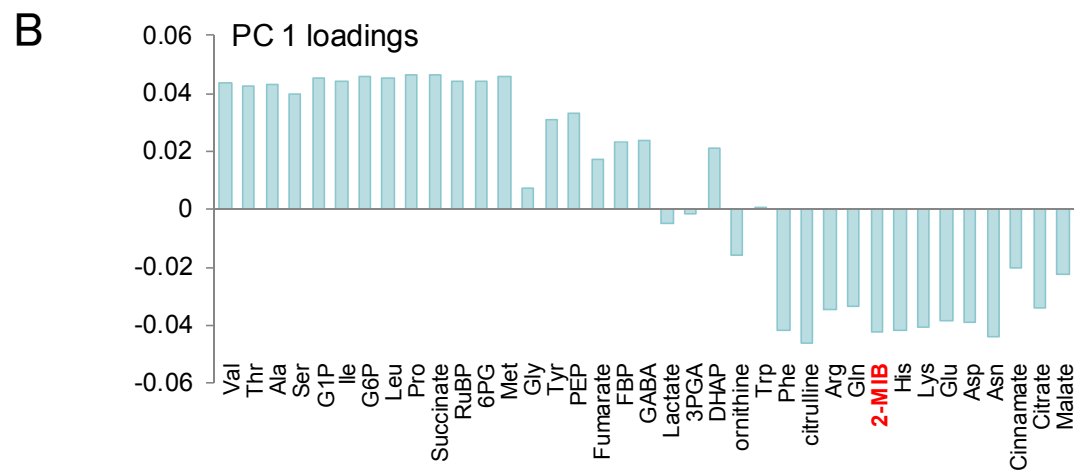
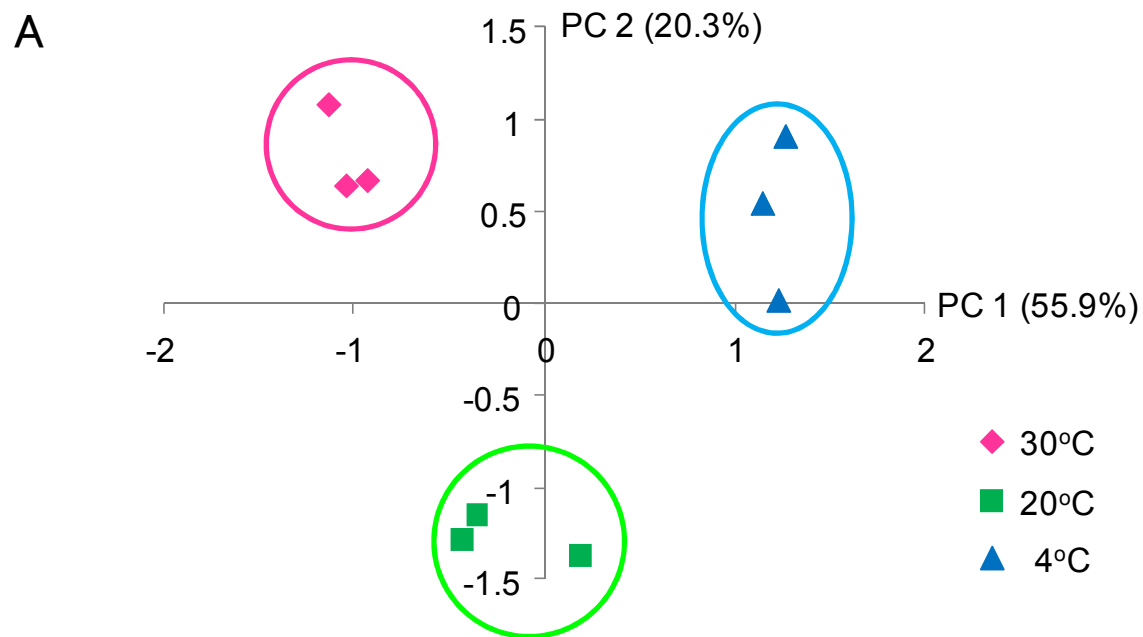


図4-1 主成分分析解析

それぞれの温度で24時間培養した*P.galeata*の代謝物の主成分分析(A)。これは2つの主成分よりなり、第1主成分構成(B) 第2主成分構成 (C)をそれぞれ示した。物質の順序はSPSSによるクラスター解析の結果に基づいている。

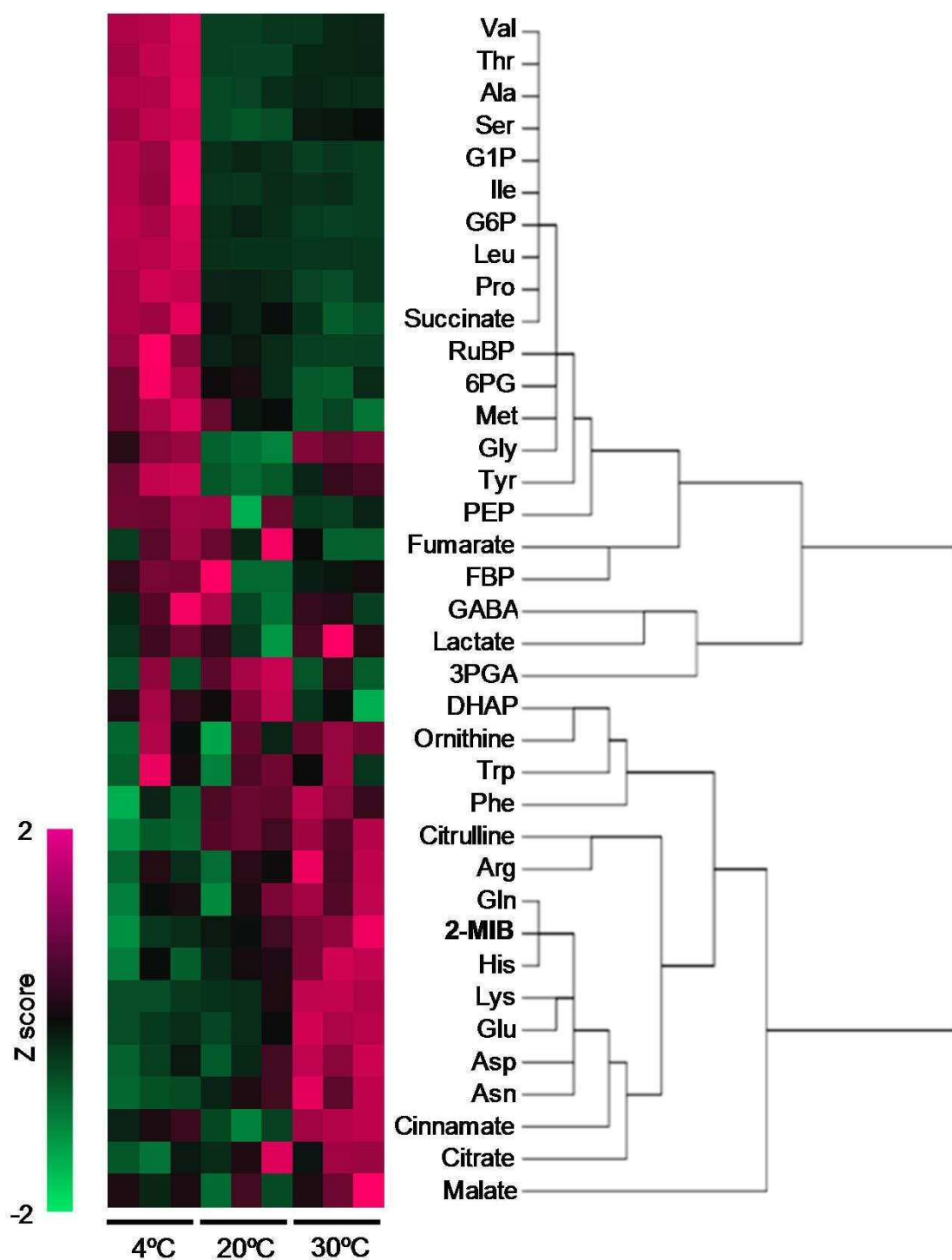


図4-2 クラスター解析と系統樹
データの順序は図4-1に従っている。赤が増加した物質、緑が減少した物質を示す。

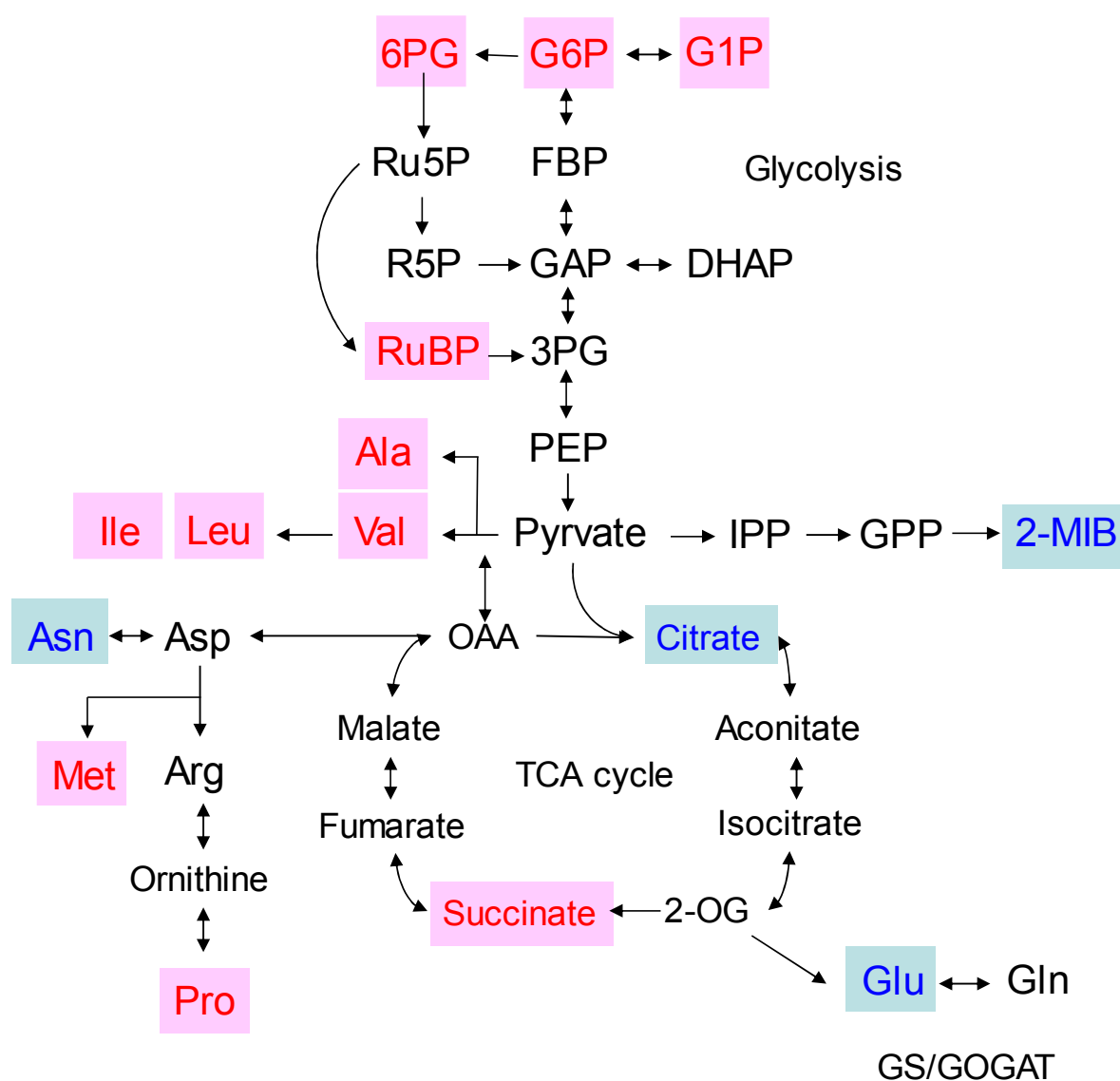


図4-3 4℃と20℃における代謝比較

赤字は4℃で増加した物質、青字は4℃で減少した物質を示す。

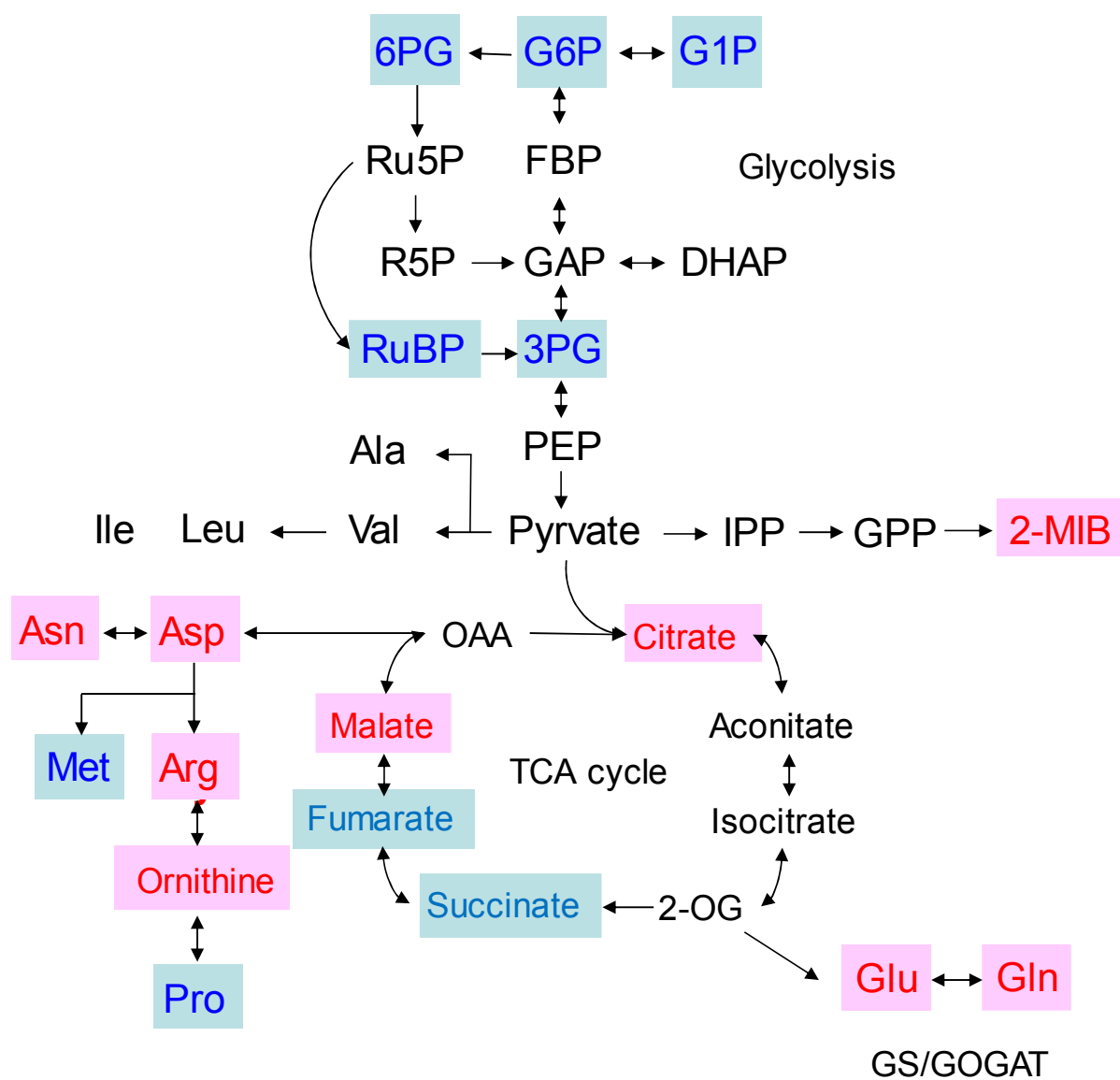


図4-4 30℃と20℃における代謝比較

赤字は30℃で増加した物質、青字は30℃で減少した物質を示す。

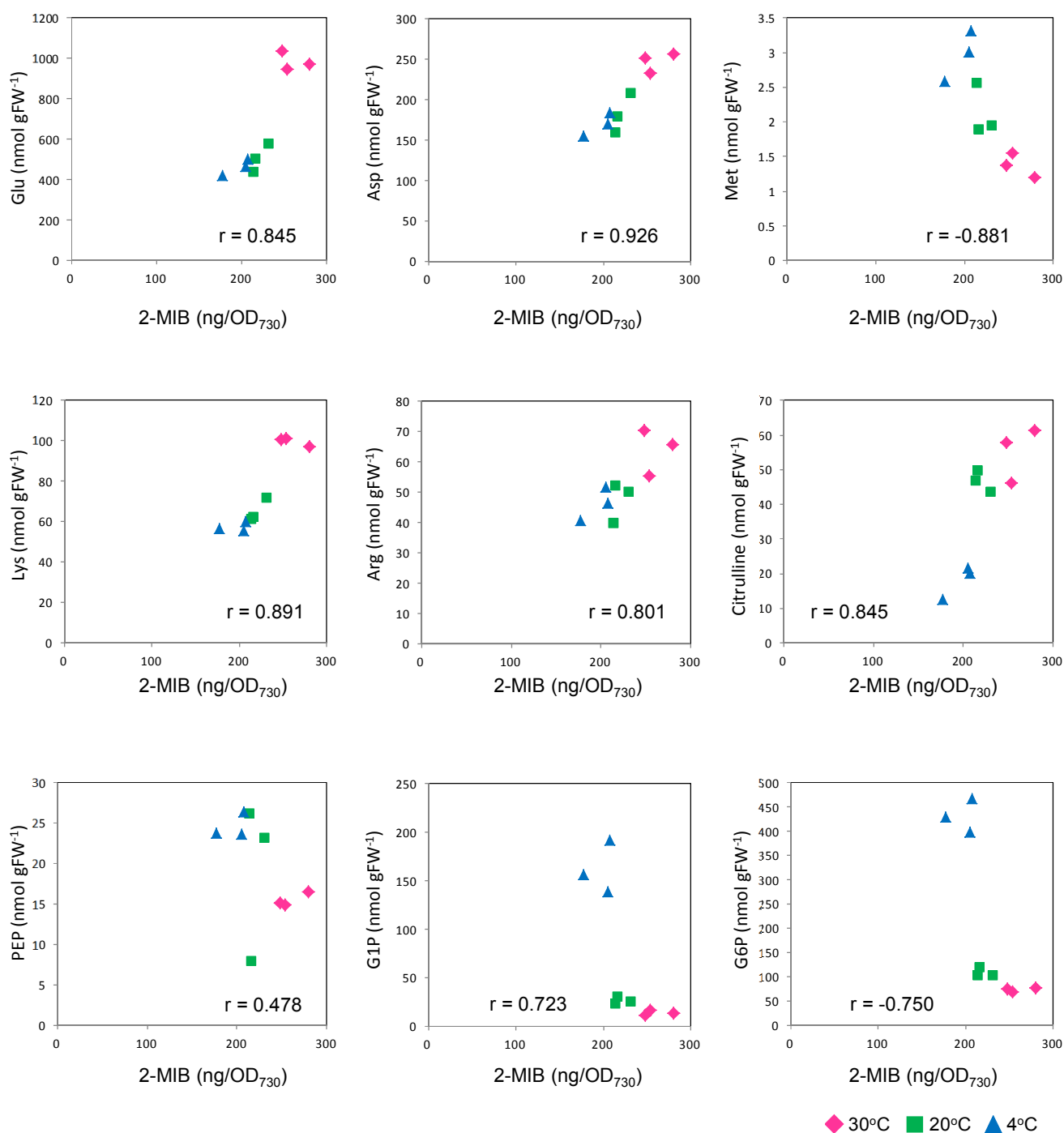


図4-5 各物質と2-MIBの相関性

各サンプルにおける、2-MIBと代謝物 (Glu、Asp、Met、Lys、Arg、Citrulline、PEP、G1P、G6P) をプロットした相関図を示した。

第 5 章

総括

5.1. 本研究のまとめ

水環境中では、カビ臭 2-MIB による被害が夏場を中心に多く報告されている。2-MIB の合成経路の解明は近年進んでいるものの、遺伝子や代謝レベルでの解析はまだ十分でない。そこで本研究では、2-MIB 合成と温度の関係に注目し、遺伝子発現と代謝経路のメタボローム解析を行い、2-MIB の分子レベルでの合成メカニズムを解明することを目的とした。

本研究ではまず、2-MIB を産生する糸状性シアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* より 2-MIB 合成に関与すると考えられる 2 つの遺伝子 (*pgmtf* :GPPMT をコード、*pgmtc* :MIBS をコード)を単離し、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定した。その結果、遺伝子の長さはそれぞれ 870bp と 1194bp で、重要な SAM 結合領域、マグネシウム結合領域を持っており、これまでシアノバクテリアで報告されている遺伝子と相同性が非常に高かった。この結果より、*pgmtf*と*pgmtc*は 2-MIB の合成に関与する可能性が高いことがわかった。また、放線菌やシアノバクテリアにおいて、この二つの遺伝子はゲノム上に隣接しており、ヌクレオチド結合タンパク質をコードする遺伝子と共にオペロンを形成していると報告されている。本研究においても隣接遺伝子であると考えられ、かつこれまでの報告されているシアノバクテリアの配列同様、*pgmtf*が*pgmtc*の上流に存在することがわかった。

そこで、この両遺伝子が異なる温度条件下でどのように発現が変化するか、それが増殖条件と相関があるかについて調べた。15℃～25℃で 10 日間培養した結果、増殖曲線については温度が上昇してもそれほど大きな差は見られなかったが、菌体あたりの 2-MIB 量については温度が高いほど多かった。4℃～30℃で処理し、24 時間後の状態を見た実験でも、4℃で生育の遅れが見られたものの、細胞の増加と 2-MIB の合成量の間に単純な相関関係があるわけでないことが分かった。この条件で、両遺伝子の発現解析を行った結果、低温条件下では両遺伝子とも一時的な発現の増加が見られたものの、24 時間後には通常条件下よりも発現が低くなるという結果が得られた。これに対し、高温条件では、低温同様、温度変化後に急激な発現上昇が一時的に見られたものの、24 時間後でも、通常条件と比較して高い発現状態が維持されていた。これらの結果より、*pgmtf*と*pgmtc*の発現が温度依存的であり、2-MIB の合成が細胞の増殖だけでなく、遺伝子発現によっても調節されていると推察された。

次に温度を同様に 4℃から 30℃に変化させたときの代謝レベルの解析をおこない、

CE-MS による代謝物の変化を確認し、2-MIB 合成に必要な条件について考察した。主成分分析の結果、培養温度ごとにクラスターを形成し、温度とストレスが重要な要因であることが推定された。また、分析した 44 物質のうち、検出されたのは 36 物質であったが、低温条件下では、解糖系物質や OPP 経路の物質の蓄積量が多く、炭素の流れが十分起きてきていなかった。これに対し、高温条件下では TCA サイクルやその周辺の有機酸やアミノ酸の蓄積が多くみられることが分かった。また、代謝物のクラスタリング解析でも、低温と高温で二つのグループ化がされた。このことより、2-MIB 合成には炭素の流れが十分に生じていることが必要とされること、及び TCA サイクルや窒素同化と挙動を共にし、窒素が必要であると推測された。相関関係の調査では、Lys、Arg、Asp、Glu、Citrulline が 2-MIB と高い正の相関性を持つことが確認され、逆に Met は負の相関を示した。これは、Met が 2-MIB の合成に必要な SAM の基質として消費されていることを裏付けていると考えられる。

以上の結果より、2-MIB 濃度が温度により変動することについて、細胞増殖の他の原因として、遺伝子発現や代謝レベルでも様々な調節が行われていることが示唆された。

5.2. 今後の展望

カビ臭の発生はこれまで推測が難しく、その指標となる情報が必要であった。本研究で決定した塩基配列の情報を用いて、2-MIB を放出する株のみを特異的に検出するプライマーを作成することで、2-MIB の原因生物の早期発見を可能にし、効率的な 2-MIB の低減に貢献できると考えられる。また、遺伝子発現や代謝メカニズムの一過的な情報を用いることで、2-MIB が発生する条件についての知見を与え、2-MIB 合成のメカニズムの更なる解明及び発生予測に役立つものと考えられる。

参考文献

- Acinas SG, Haverkamp TH, Huisman J, Stal LJ. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). *ISME J* 2009; 3: 31-46.
- Agger SA, Lopez-Gallego F, Høye TR, Schmidt-Dannert C. Identification of Sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC73102 and *Nostoc* sp. strain PCC7120. *J Bacteriol* 2008; 190: 6084-6096.
- Bentley R, Meganathan R. Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in streptomycetes. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS Lett* 1981; 125: 220-222.
- Blevins WT, Schrader KK, Saadoun I. Comparative physiology of geosmin production by *Streptomyces halstedii* and *anabaena* sp. *Water Sci Technol* 1980; 31: 127-133
- Bowmer HK, Padovan A, Oliver RL, Korth W, Garf GG. Physiology of geosmin production by *Anabaena circinalis* isolated from the Murrumbidgee River Australia. *Water Sci Technol* 1992; 25: 259-267
- Cane DE, Watt RM. Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1547-1551.
- Cane DE, He X, Kobayashi S, Omura S, Ikeda H. Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. *J Antibiot (Tokyo)*. 2006; 59: 471-479.
- Chou WK, Ikeda H, Cane DE. Cloning and characterization of Pfl_1841, a 2-methylenebornane synthase in *Pseudomonas fluorescens* PfO-1. *Tetrahedron* 2011; 67: 6627-6632.
- Cook D, Newcombe G, Sztajn P. The application of powdered activated carbon for MIB and geosmin removal: predicting PAC doses in four raw waters. *Water Res* 2001; 35: 1325-1329.
- Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 2009; 8: 715-725.

- Dickschat JS, Nawrath T, Thiel V, Kunze B, Müller R, Schulz S. Biosynthesis of the off-flavor 2-methylisoborneol by the Myxobacterium *Nannocystis exedens*. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46: 8287-8290.
- Eisenhut M, Huege J, Schwarz D, Bauwe H, Kopka J, Hagemann M. Metabolome phenotyping of inorganic carbon limitation in cells of the wild type and photorespiratory mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Plant Physiol* 2008; 148: 2109-2120.
- García-Villada L, Rico M, Altamirano MM, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*; characterization and future implication in the use of copper sulfate as algicide. *Water Res* 2004; 38: 2207-13.
- Gerber NN. Geosmin, an earthy smelling substance isolated from Actinomycetes. *Applied Microbiol* 1965; 13: 935-938.
- Gerber NN. Geosmin, from microorganisms, is trans-1,10-dimethyl-trans- 9-decalol. *Tetrahedron lett* 1968; 25: 2971-2974.
- Gerber NN. A volatile metabolite of Actinomycetes, 2-methylisoborneol. *J Antibiotics (Japan)* 1969; 22: 508-509.
- Ghimire GP, Oh TJ, Lee HC, Kim BG, Sohng JK. Cloning and functional characterization of the germacradienol synthase (*spterp13*) from *Streptomyces peucetius* ATCC27952. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1216-1220.
- Giglio S, Jiang J, Saint CP, Cane DE, Monis PT. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 8027-8032.
- Giglio S, Chou WKW, Ikeda H, Cane DE, Monis PT. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 992-998
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1541-1546.
- Glaze WH, Schep R, Chauncey W, Ruth EC, Zarnoch JJ, Aieta EM, Tate CH, McGuire MJ. Evaluating oxidants for the removal of model taste and odor compounds from a

- municipal water supply. *J Am Water Works Assoc* 1990; 82: 79–84.
- Hasunuma T, Kikuyama F, Matsuda M, Aikawa S, Izumi Y, Kondo A. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *J Exp Botany* 2013; 64:2943-2954.
- Hu Y, Chou WK, Hopson R, Cane DE. Genome mining in *Streptomyces clavuligerus*. expression and biochemical characterization of two new cryptic sesquiterpene cyclases. *Chem Biol* 2011; 18: 32-37.
- Iwata M, Sasner JJ, Haney JF. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia* 2001; 443: 19-22.
- Izaguirre G, Hwang CJ, Krasner SW, McGiore MJ. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply system. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43: 708-714.
- Izaguirre G, Taylor WD. A *Pseudanabaena* species from Castaic Lake, California that produces 2-methylisoborneol. *Water Res* 1998; 32: 1673-1677.
- Izaguirre G, Taylor WD. A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. *Water Sci Technol* 2004; 49: 19-24.
- Jiang J, He X, Cane DE. Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 8128–8129.
- Jiang J, He X, Cane DE. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 711-715.
- Jiang J, Cane DE. Geosmin biosynthesis. Mechanism of the fragmentation-rearrangement in the conversion of germacradienol to geosmin. *J Am Chem Soc* 2008;130:428–429.
- Jüttner F. Elimination of terpenoid odorous compounds by slow sand and river bank filtration of the Ruhr River, Germany. *Water Sci Technol* 1995; 31: 211–217.
- Jüttner F, Watson SB. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in the source of water. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 4395-4406.

- Kaminski E, Stawicki S, Wasowicz E. Volatile Flavor Compounds Produced by Molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. *Appl Microbiol* 1974; 27: 1001-1004.
- Komatsu M., Tsuda M, Omura S., Oikawa H, Ikeda H. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7422-7427.
- Köksal M, Chou WK, Cane DE, Christianson DW. Structure of 2-Methylisoborneol synthase from *Streptomyces coelicolor* and implications for the cyclization of a Noncanonical C-methylated monoterpene substrate. *Biochemistry* 2012; 5: 3011-3020.
- Krishnani KK, Ravichandran P, Ayyappan S. Microbially derived off-flavor from geosmin and 2-methylisoborneol: sources and remediation. *Rev Environ contam Toxicol* 2008; 194: 1-27.
- Lalezary-Craig S, Pirbazari M, Dale MS, Tanaka TS, McGuire MJ. Optimizing the removal of geosmin and 2-methylisoborneol by powdered activated carbon. *J Am Water Works Association* 1988; 80: 73-80.
- Li Z, Hobson P, An W, Burch MD, House J, Yang M. Earthy odor compounds production and loss in three cyanobacterial cultures. *Water Res* 2012; 46: 5165-5173.
- Ludwig F, Medger A, Börnick H, Opitz M, Lang K, Göttfert M, Röske I. Identification and expression analysis of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of *geoA*-like genes in a drinking water reservoir. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:6988-6993.
- Martin JF, Izaguirre G, Waterstrat P. A planktonic *Oscillatoria* species from Mississippi catfish ponds that produces the off-flavor compound 2-methylisoborneol. *Water Res* 1991;24: 1447-1451.
- Medsker LL, Jenkins D, Thomas JF, Koch C. Odorous compounds in natural waters: 2-exo-hydroxy-2-nethylbornane, the major odorous compound produced by several actinomycetes. *Environ Sci Technol* 1969; 3: 476-477.
- Miyagi A, Uchimiya M, Kawai-Yamada M, Uchimiya H. Impact of aluminium stress on oxalate and other metabolites in *Rumex obtusifolius*. *Weed Res* 2013a; 53: 30-41.
- Miyagi A, Uchimiya M, Kawai-Yamada M, Uchimiya H. An antagonist treatment in

- combination with tracer experiments revealed isocitrate pathway dominant to oxalate biosynthesis in *Rumex obtusifolius* L. *Metabolomics* 2013b; 9: 590-598.
- Nawrath T, Dickschat JS, Muller R, Jiang J, Cane DE, Schulz S. Identification of (8S,9S,10S)-8, 10-Dimethyl-1-octalin, a key intermediate in the biosynthesis of geosmin in bacteria. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 430–431.
- Ozaki K, Ohta A, Iwata C, Horikawa A, Ysuiji K, Ito E, Ikai Y, Harada K. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. *Chemosphere* 2008; 71: 1531-1538.
- Paerl HW, Millie DF. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 1996; 35: 160-167.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979 ; 111 : 1-61.
- Roen AA, Mashni CI, Safferman RS. Recent developments in the chemistry of odour in water: the cause of earthy-musty odour. *Water Treat Exam* 1970; 19: 106.
- Rynkiewicz MJ, Cane DE, Christianson DW. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13543-13548.
- Sato S, Soga T, Nishioka T, Tomita M. Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *The plant J* 2004; 40: 151-163.
- Schrader K, Blevin W. Geosmin producing species of *Streptomyces* and *Lyngbya* from aquaculture ponds. *Can J Microbiol* 1993; 39: 834-840.
- Seemann M, Zhai G, de Kraker JW, Paschall CM, Christianson DW, Cane DE. Pentalenene synthase. Analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Am Chem Soc* 2002; 124 :7681-7689.
- Siegmund B, Plooiner-Zierler B. Odor threshold of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 5984-5989.
- Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Ohashi Y, Tomita M, Nishioka T. Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*

- 2002; 74: 2233-2239.
- Starks CM, Back K, Chappell J, Noel JP. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science* 1997; 277: 1815-1820.
- Takahashi H, Watanabe A, Tanaka A, Hashida S-Nm Kawai-Yamada M, Sonoike K, Uchimiya H. Chloroplast NAD kinase is essential for energy transduction through the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Plant and cell physiol* 2006; 47: 1678-1682.
- Takahashi H, Uchimiya H, Hihara Y. Difference in metabolite levels between photoautotrophic and photomixotrophic cultures of *Synechocystis* sp. PCC6803 examined by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *J Exp Bot* 2008 ; 59 : 3009-3018.
- Tucker CS. Off-flavor problems in aquaculture. *Rev Fish Sci* 2000; 8: 45-88.
- Tung SC, Lin TF, Yang GC, Liu CL. Seasonal change and correlation with environmental parameters for 2-MIB in Feng-Shen Reservoir, Taiwan. *Environ Monit Assess* 2008; 145: 407-416.
- Vining LC. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity-a review. *Gene* 1992; 115:135-140.
- Wang CM, Cane DE. Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 8908-8909.
- Wang Z, Xu Y, Shao J, Wang J, Li R. Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: isolation characterization and expression in response to light. *PLoS One* 2011: e18665.
- Watson SB, Ridal J. Periphyton: a primary source of widespread and severe taste and odour. *Water Sci Technol* 2004; 49: 33-39.
- Westerhoff P, Rodriguez-Hernandez M, Baker L, Sommerfeld M. Seasonal occurrence and degradation of 2-methylisoborneol in water supply reservoirs. *Water Res* 2005; 39: 4899-4912.
- Wu J, Juttner F. Differential partitioning of geosmin and 2-methylisoborneol between cellular constituents in *Oscillatoria tenuis*. *Arch Microbiol* 1988; 150: 580-583.
- Xu Y, Wang G, Yang W, Li R Dynamics of the water bloom-forming *Microcystis* and its

- relationship with physicochemical factors in Lake Xuanwu (China). *Environ Sci Res* 2010 ;17: 1581-1590.
- Yagi M, Kajino M, Matsuo U, Ashitani K, Kita T, Nakamura T. Odor problems in Lake Biwa. *Water Sci Technol* 1983; 15: 311-321.
- Yague P, Rodriguez-Garcia R, Lopez-Garcia M, Martin JF, Rioseras B, Sanchez J, Manteca A. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE* 2013; 8: e60665.
- Zahang T, Li L, Song L, Chen W. Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta). *J Appl Phycol* 2009; 21: 279-285.
- Zimba PV, Dionigi CP, Millie DF. Evaluating the relationship between photopigment synthesis and 2-methylisoborneol accumulation in cyanobacteria. *J Phycol* 1999; 35: 1422-142.
- 及川栄作、石橋良信、阿部隆弘、梅津洋 かび臭および毒素産生藍藻類の系統発生的分類 環境工学研究論文集 2000 ; 37 : 183-191.
- 土屋悦輝、松本淳彦、岡本敏彦 藍藻 *Oscillatoria splendid*、*O.amoena*、*O.geminata* および *Aphanizomenon* sp.の産生する代謝物の確認
- 藤本尚志、福島武彦、稲森悠平、須藤隆一 全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子との関係 水環境学会誌 1995; 18: 901- 908.
- 松本淳彦、土屋悦輝 藍藻類とカビ臭に関する研究 東京都衛生研究所年報 1981; 274-284

活動実績

学術雑誌

(査読あり)

1. Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Pseudanabaena galeata*.
Kakimoto M, Ishikawa T, Miyagi A, Saito K, Miyazaki M, Asaeda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Kawai-Yamada M.
Journal of Plant Physiology 2013; doi:pii: S0176-1617(13) 00360-X.10.1016
2. Plastidic protein Cdf1 is essential in Arabidopsis embryogenesis.
Kawai-Yamada M, Nagano M, Kakimoto M, Uchimiya H.
Planta 2013 Oct 6; PMID: 24097264
3. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L.
Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.
Plant Journal 2007 ;50 :54-69.
4. Genome-wide screening of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Kakimoto M, Kobayashi A, Fukuda R, Ono Y, Ohta A, Yoshimura E.
Biometals 2005; 18(5): 467-474.

学会発表

1. シアノバクテリアのカビ臭関連遺伝子の探索とその環境応答性
柿本真之，石川寿樹，齊藤和晃，渡部茂和，川合真紀
第46回日本水環境学会 東京
2. シアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* のカビ臭関連遺伝子の探索と発現解析

柿本真之，石川寿樹，齊藤和晃，渡部茂和，川合真紀

第 53 回日本植物生理学会、京都

3. カビ臭生成シアノバクテリアの遺伝子発現及び代謝解析

柿本真之，石川寿樹，宮城敦子、齊藤和晃，井上豊，川合真紀

第 54 回日本植物生理学会、岡山

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くのご指導、ご助言を賜りました指導教官の川合真紀准教授には深く感謝いたします。また、環境科学研究センターの山口雅利准教授、内宮博文客員教授、同コースの浅枝隆教授、藤野准教授のご指導並びにご閲覧いただきました。

同研究室の石川寿樹研究員、宮城敦子研究員には実験の技術、方向性、計画についてご指導いただき、深く感謝いたします。また、研究室の皆様及び職場の皆様には、研究遂行のために様々なご配慮を頂きありがとうございました。

平成 26 年 2 月 柿本 真之