

氏名	柿本 真之
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)
学位記号番号	博理工甲第 951 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	委員長 准教授 川合 真紀 委員 教授 浅枝 隆 委員 准教授 藤野 毅 委員 准教授 山口 雅利

## 論文の内容の要旨

水環境中では、カビ臭の 2-メチルイソボルネオール (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、糸状性シアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* より 2-MIB 合成に関与する 2 つの遺伝子 (*pgmtf*:GPPMT をコード、*pgmtc*:MIBS をコード) を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、遺伝子の長さはそれぞれ 870bp と 1194bp で、基質である S-アデノシルメチオニン (SAM) 結合の領域、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関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。本研究においてもこれらが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のか、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 日間培養した場合、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場合、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は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。しかしながら、まったく発現が見られなくなるわけではなかった。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

的であること、及び 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。

次に温度が細胞内の基礎代謝系に与える影響を明らかにするため、4℃から 30℃に変化させたときの代謝解析を行った。キャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) による代謝物の定量を行い、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が形成され、温度が代謝変動の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いないことが考えられた。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みられた。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であり、更に TCA サイクルや窒素同化と挙動を共にすることから、窒素が必要であると考えられた。相関関係の解析では、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、シトルリン等のアミノ酸が 2-MIB と正の高い相関性を持つ一方、メチオニンは負の相関を示した。これは、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ることを裏付けていると推測される。

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。

カビ臭の発生はこれまで予測が難しく、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 を放出する種のみを特異的に検出する PCR 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 合成メカニズムの更なる解明と発生予測手法の開発に役立つものと考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

当論文学位審査委員会は、平成 26 年 2 月 3 日に論文発表会を公開で開催し、発表に続いて質疑と論文内容の審査を行った。以下に審査結果を要約する。

本研究では、各水道事業者で長い間、苦情件数の多くを占める水道の異臭問題に着目している。水道の異臭原因であるカビ臭は、ダム湖の富栄養化を始めとした現象により、放線菌やシアノバクテリアが発生することが原因と考えられ、高温時ほど多く発生する現象が見られる。しかしながら、河川の水温条件等が同じであっても年により発生状況が異なり、そのメカニズムについては不明な点が多い。このカビ臭の生成機構の詳細を知ることは、カビ臭の増殖を抑える上で極めて重要である。本論文では、カビ臭 2-メチルイソボルネオール (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分子レベルでの詳細を解明し、濃度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ものである。

本論文は 5 章より構成される。第 1 章ではカビ臭の原因・被害についての背景に触れ、カビ臭合成についての概要を含むこれまでの既往の研究を紹介し、第 2 章から 4 章で実験の結果を示し、第 5 章で全体を総括している。

第 2 章では、本研究で用いたシアノバクテリア *Pseudanabaena galeata* の 2-MIB 合成に関与する酵素メルトランスフェラーゼ及びモノテルペンシクラゼをコードする遺伝子 (*pgmtf*, *pgmtc*) の塩基配列を決定し、その配列がこれまで報告されている糸状性シアノバクテリアの遺伝子と高い相同性を持つことを示した。また、これらの遺伝子はオペロンを形成していると考えられており、本株もシアノバクテリアに特徴的な配列順序を持つことを明らかにした。最後に、分子系統解析を行い、放線菌とシアノバクテリアの本遺伝子の分化が、進化過程の早期に起こっていることも明らかにした。

第 3 章では、*pgmtf* と *pgmtc* が、異なる培養温度下でどのように発現が変化するかを調べ、2-MIB 濃度と発現量の相関性について解析を行った。*P.galeata* の増殖曲線と生成 2-MIB 濃度の実験では、増殖曲線が温度による差が見えにくかったのに対し、生成した 2-MIB 濃度は温度により増加していた。*pgmtf* と *pgmtc* の遺伝子発現について、双方とも温度を変化させたときに一時的な発現上昇は見られるものの、高温であるほど発現量が増加する結果が示された。これらの結果より、2-MIB の合成は温度依存的であり、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ことが明らかとなった。

第 4 章では、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。主成分分析の結果、培養温度ごとにクラスターを形成し、温度と温度変化のストレスが重要な要因であることが明らかとなった。また、分析した物質のうち、低温条件下では解糖系や酸化的ペントースリン酸経路などの代謝初期経路物質の蓄積量が多く、炭素の流れが十分起きてきていないことが示された。これに対し、高温条件では、2-MIB と共に、クエン酸経路や窒素同化経路に関連する有機酸やアミノ酸の蓄積が多くみられることが明らかとなった。また、代謝物のクラスタリング解析でも、二つのグループの形成が見られ、クエン酸経路や窒素同化経路関連物質は 2-MIB と同じグループに属した。このことより、2-MIB 合成は、炭素の流れが十分に生じていること及びクエン酸経路や窒素同化経路と挙動を共にすることから、窒素が必要であることが明らかとなった。

以上の実験及び検証の結果、シアノバクテリアの 2-MIB の生産量について、これまで主な原因として考えられていた細胞増殖のみでなく、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明らかとなった。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 の原因生物モニタリングを行うことを可能にし、効率的な 2-MIB の低減

政策に大きな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情報を用いることで、2-MIB が発生する条件についての新たな知見を与え、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ことが期待される。

以上のことから当学位論文審査委員会は、本論文が博士（学術）の学位に相応しい内容であると判断した。