

〈研究発表〉

線虫臭気物質受容体と生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を
組み合わせた水中の極微量カビ臭物質検知塩 出 貞 光¹⁾, アリーシャ・アンダーソン²⁾, 長谷川 絵 里³⁾, 山 口 太 秀⁴⁾¹⁾メタウォーター(株) R&D センター ソリューション技術開発部
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: shiode-sadamitsu@metawater.co.jp)²⁾the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO)
(Black Mountain Laboratories, Clunies Ross St. ACT, Australia E-mail: Alisha.Anderson@csiro.au)³⁾メタウォーター(株) R&D センター ソリューション技術開発部
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: hasegawa-eri@metawater.co.jp)⁴⁾メタウォーター(株) R&D センター ソリューション技術開発部
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: yamaguchi-dabide@metawater.co.jp)

概 要

水中のカビ臭物質 (ジェオスミン, 2-MIB) をより簡便に, 安価に, 一方で高感度, 高選択性を持たせた分析法の開発を進めている。この方法は CSIRO (the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) が開発した技術を応用しており, 線虫臭気物質受容体と生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を組み合わせたもので, 臭気物質に対して高感度, 高選択性を有する。今回, CSIRO が所有する受容体ライブラリーから, カビ臭物質に対して感度及び選択性を勘案した受容体を探索したところ, 複数の受容体はその可能性を示した。

キーワード: カビ臭物質, 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET), 線虫臭気物質受容体, スクリーニングテスト
原稿受付 2019. 6. 28 EICA: 24(2・3) 84-87

1. は じ め に

昭和 26 年 (1951 年), 日本の水道水源で初めて神戸市千苧貯水池でカビ臭の発生が記録されて以来, 湖沼の富栄養化等の水源水質の悪化により, 昭和 40 年代に入ってから琵琶湖や霞ヶ浦など全国的な広がりを見せて, 水道水へのカビ臭着臭を原因とする異臭味被害が拡大してきた。カビ臭等の異臭味による被害を受けた人口は, 平成 2 年度のピーク時に 2,000 万人まで増加したが, 高度浄水処理の導入等により改善し, 平成 21 年度では 200 万人を下回ったものの, 平成 26 年度では 300 万人近くと増加している。平成 29 年度の異臭味被害人口 (原水, 浄水) は約 198 万人と依然として高い数値を示しており, 浄水における異臭味被害の種類別内訳においてはカビ臭, 土臭は 90% の高い割合を占めている¹⁾。

水道事業者では, 貯水池などの水源で発生したカビ臭に対しては, 水源における硫酸銅散布や浄水場内で粉末活性炭の添加等の対応により異臭味被害の減少に努めているが, 効率的な除去・低減のためには水源におけるカビ臭物質 (ジェオスミン: $C_{12}H_{22}O \cdot MW182.3$, 2-MIB: $C_{11}H_{20}O \cdot MW168.3$) の濃度についての情報をリアルタイムでより多くより正確に収集することが重要となる。しかし, カビ臭物質測定には

高度に熟練された分析技術が必要なこと, 分析機器及びその維持管理費用が高額なこと, 水源が浄水場から遠いこと等から, 現実的には水源におけるカビ臭物質濃度についてのリアルタイムな情報は満足できるものではないことが推察され, カビ臭発生抑制やカビ臭物質濃度低減などのカビ臭対策への対応の遅れや効率的な低減処理に支障をきたす恐れがある。

そこで我々は, 前処理-GC/MS などの高度・高額な分析装置を用いることなく, 水源などの現場でも測定可能で, 簡便な手順により短時間で結果が得られ, しかも水質基準 (0.00001 mg/L 以下) の 10 分の 1 以下の極微量の濃度でカビ臭物質を測定できる測定法の開発を試みた。

CSIRO (the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) は, 揮発性物質に対して高い検知能を有する線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の受容体 (GPCR: G-Protein Coupled Receptor) と生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET: Bioluminescent Resonance Energy Transfer) を組み合わせたことにより, 低い濃度の揮発性物質に対して高い検知能を有する CYBERTONGUE 技術を開発した²⁾。この技術は, **Fig. 1** に示すように, 線虫 GPCR の一部に生物発光体 Renilla Luciferase (Rluc, 青色発光, 410 nm) と蛍光発光体 Green Fluorescent Protein (GFP, 緑色

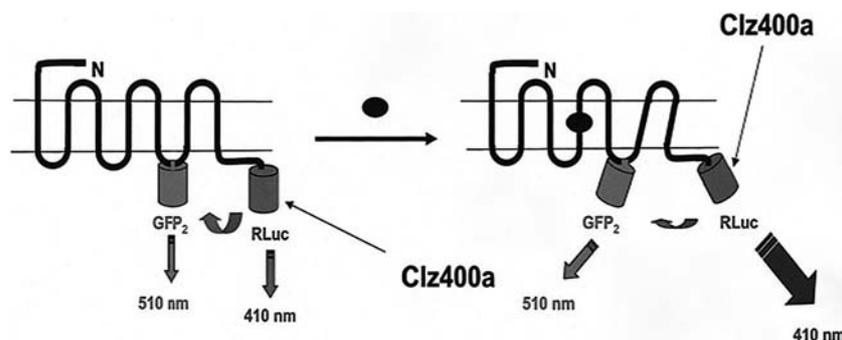


Fig. 1 Transduction technology to detect conformational change in volatile sensing proteins

発光, 510 nm) を遺伝子工学的に組み込んでおり, 基質として添加した Clz400a の酸化作用により生物発光体から 410 nm の蛍光が発現し, BRET の作用を受けて蛍光発光体が 510 nm の蛍光を発現する。この系に揮発性物質が存在すると GPCR が構造的変化を受け, 生物発光体からの 410 nm の蛍光を受けた蛍光発光体の 510 nm の蛍光強度に変化を与える。こうして, 揮発性物質存在下での 410 nm の蛍光強度と 510 nm の蛍光強度の比により, 揮発性物質の濃度を知ることが可能となる。CSIRO は, 臭気物質である Diacetyl ($C_4H_6O_2$, MW86.1) に対する OGOR (Diacetyl に選択的に反応する線虫由来の GPCR) を用いた時の EC_{50} は 0.3 ppq (0.0003 ng/L) であることを示した³⁾。

本報告では, この CSIRO の CYBERTONGUE 技術をカビ臭物質検知に応用する最初の段階として, カビ臭物質 (ジェオスミン, 2-MIB) に応答可能な線虫 GPCR の探索を行ったので, その結果を報告する。

2. 実験

カビ臭物質に応答可能な線虫 GPCR の探索には, CSIRO が独自に開発したスクリーニング方法を用いた^{4,5)}。CSIRO は線虫由来の 297 種類の GPCR ライブラリーを有しており, 今回はこれらすべての GPCR を対象に探索を行った。

スクリーニング方法の概要を Fig. 2 に示す。これは, リガンド (カビ臭物質, Diacetyl) が GPCR と結合するとレポーター遺伝子が発現し, 発現結果であるニトロフェノール (吸収波長: 420 nm) の吸光度に変化が起きることを利用している。

スクリーニングによる GPCR 探索については次の 4 点について段階的に検討した。

- 1) 50 μ M のカビ臭物質を用いて 3 回繰り返し実験 (一次スクリーニング)
- 2) 上記結果で高い吸光度を持つ GPCR に対して吸収スペクトル変化の確認
- 3) カビ臭物質のジェオスミンまたは 2-MIB に応答

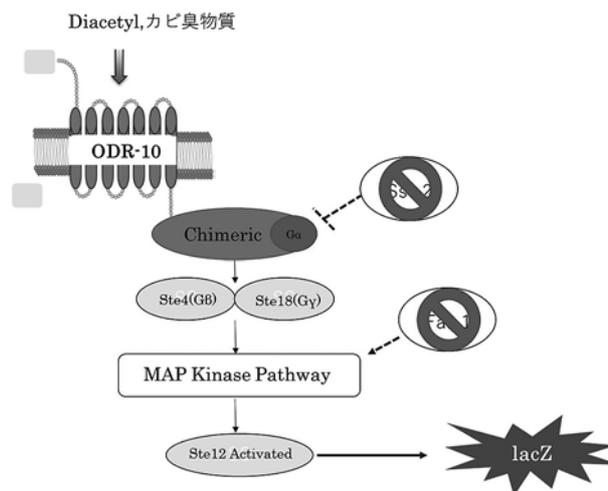


Fig. 2 Schematic illustration of engineered yeast pheromone signalling pathway for screening nematode ORs with volatile biomarkers

した GPCR を用いて, カビ臭物質と類似構造を有し, 河川水中に微量で存在する有機化合物による応答確認

- 4) 同上の GPCR を用いて, カビ臭物質濃度 (無添加, 0.05 μ M から 50 μ M までの 5 種類) を変化させた時の応答確認

3. 結果

3.1 3 回繰り返し実験 (一次スクリーニング)

50 μ M のジェオスミン及び 2-MIB を用いて, 297 種類の線虫 GPCR について 3 回繰り返しスクリーニングを実施した。その結果, 45 種類の GPCR がジェオスミンまたは 2-MIB に応答する可能性を示した。なお, 応答の有無については, 発現結果であるニトロフェノールの最大吸収波長である 420 nm での吸光度が 0.2 より大きい時に応答ありと判断した (Fig. 3)。

3.2 吸収スペクトル変化

3.1 で得られた 45 種類の GPCR について, 380 nm~500 nm の波長スペクトルの変化を求めた。これは既報で示したように⁵⁾, 420 nm にスペクトルの

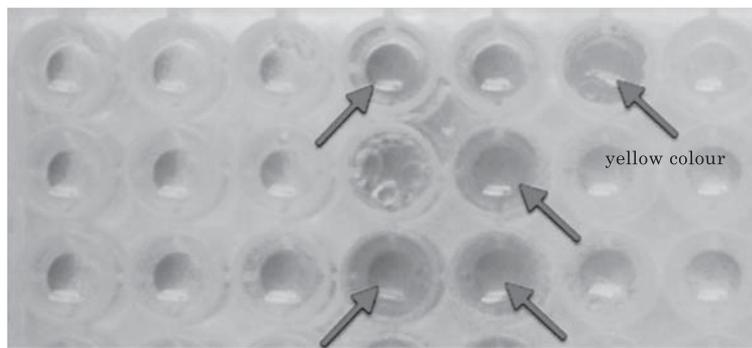


Fig. 3 Example of positive hits recovered using screening assay. Development of yellow colour indicates a positive response.

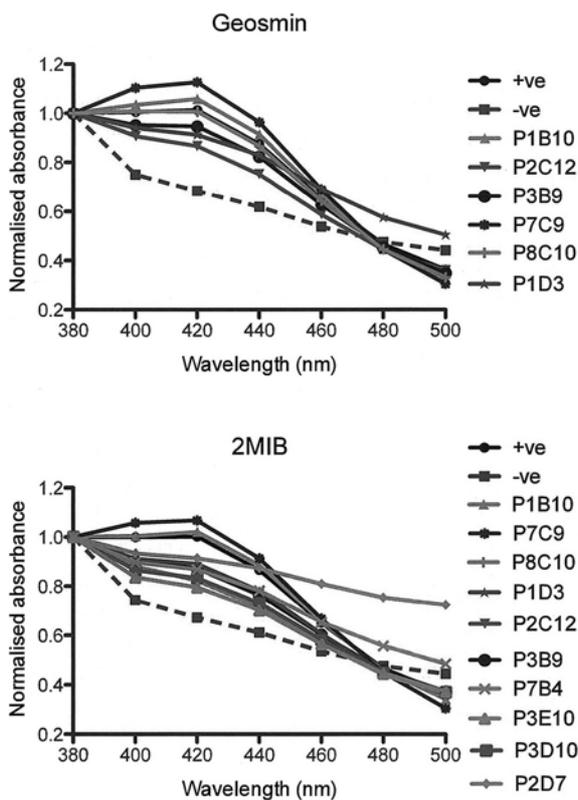


Fig. 4 Confirmation of positive responders. Spectral analysis of receptors challenged by geosmin or 2-MIB. A positive response is indicated by a peak at 420 nm. The positive control is the ODr10 response to its known ligand, diacetyl and the negative control is a mutated ODr10 receptor which we know does not respond to diacetyl. The negative control shows no peak at 420 nm.

ピークが現れるかどうかにより、リガンド (カビ臭物質) に対する GPCR の応答の有無をさらに正確に判断するために行うものである。結果を Fig. 4 に示した。ジェオスミンについては 6 種類の GPCR が応答を示した。一方、2-MIB では同じ 6 種類の GPCR に加えて 4 種類の GPCR が応答する結果となった。なお、この時ポジティブコントロールとして ODr10 (Diacetyl に対して特異的に応答する受容体) を、ネガティブコントロールとして変異 ODr10 (Diacetyl には応答しない受容体) を用いた。

3.3 類似構造を持つ有機化合物の応答確認

我々の開発目標とする新たなカビ臭測定法は湖沼水や河川水などを対象とするため、これらの水に種々の有機化合物が共存した場合、測定に影響を及ぼす恐れがある。そこで、3.2 で得られた 10 種類の GPCR が、カビ臭物質と構造的に類似し、河川水中に微量に存在が認められている有機化合物に対して、カビ臭物質と同様な応答を示すかを確認した。用いた有機化合物は、トリクロロアニソール⁶⁾、2-イソプロピル-3-メトキシピラジン (IPM)⁶⁾、2-イソブチル-3-メトキシピラジン (IBM)⁶⁾、カフェイン⁷⁾、クロタミトン⁷⁾である。その結果、トリクロロアニソールは 1 種類の GPCR に対して弱い応答を示し、IPM は 4 種類の GPCR に対して応答の疑いを示したが、それ以外の有機化合物についてはどの GPCR でもカビ臭物質と同様な応答を示すことはなかった。

3.4 カビ臭物質濃度変化による応答確認

3.3 と同じ 10 種類の GPCR を用いて、カビ臭物質濃度を変化させた時の応答性を確認した。カビ臭物質濃度は無添加、0.05、0.5、5、50 μM である。Fig. 5 に P7C9 という GPCR を用いた時の結果を示す。カビ臭物質濃度が無添加以外ではいずれも 420 nm でピークを有している。これは、0.05 μM のジェオスミン及び 2-MIB でもこの GPCR (P7C9) が応答していることを示している。

4. おわりに

水源などの現場でも測定可能で、簡便な手順により短時間で結果が得られ、しかも水質基準よりも十分に低い濃度のカビ臭物質を測定する方法の開発を進めている。この方法は、CSIRO が有する臭気物質に対して高い検知能を有する CYBERTONGUE 技術を応用している。本報告では、カビ臭物質に対して応答可能な線虫 GPCR の探索を、CSIRO が独自に開発したスクリーニング方法を用いて行ったところ、複数の

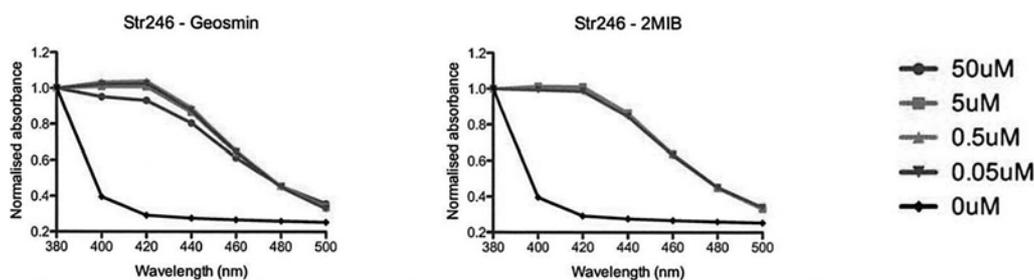


Fig. 5 Chemical sensitivity of responses of geosmin and 2-MIB to P7C9. A positive response is indicated by a peak at 420 nm

Table 1 Summary of selected receptor responses to geosmin and 2-MIB including sensitivity and selectivity. ++ indicates a response as strong as or stronger than the positive control. + indicates a response as indicated by peak at 420 nm however this is not as strong as the positive control. (G=geosmin, M=2-MIB)

Plate # / Well #	Geosmin 420 nm peak	2-MIB 420 nm peak	Selectivity	Sensitivity
1/B10	++	++	Weak response to trichloroanisole	<0.05 uM G <0.05 uM M
7/C9	++	++	Geosmin, 2-MIB	<0.05 uM G <0.05 uM M
8/C10	++	+	Geosmin, 2-MIB	<0.05 uM G <0.05 uM M
3/B9	+	+	Geosmin, 2-MIB	5 uM G 5 uM M
1/D3	+	+	Geosmin, 2-MIB possible IPM response	nd
2/C12	+	+	Geosmin, 2-MIB possible IPM response	nd
3/E10	-	+	2-MIB possible IPM response	nd
3/D10	-	+	2-MIB possible IPM response	nd
2/D7	-	+	2-MIB	50 uM M
7/B4	-	+	2-MIB	0.5 uM M

GPCR がカビ臭物質に対して選択的に、しかも低濃度で応答することを示した (Table 1)。今後はこれらの GPCR を用いたセンサ (遺伝子工学的に線虫 GPCR に生物発光体や蛍光発光体を組み込んだもの) を作成し、そのセンサについて各種の原理検証 (濃度依存性、

夾雑物質の影響確認等) を行う予定である。

参考文献

- 1) 厚生労働省：平成 30 年度全国水道関係担当者会議，全国水道関係担当者会議資料【資料編】，水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について pp.115-120 (2018)
- 2) Nowotny, T., de Bruyne, M., Berna, A. Z., Warr, C. G. and Trowell, S. C.: Drosophila olfactory receptors as classifiers for volatiles from disparate real world applications. *Bioinspir Biomim* **9**, 046007 (2014).
- 3) Dacres, H. et al.: Greatly enhanced detection of a volatile ligand at femtomolar levels using bioluminescence resonance transfer (BRET). *Biosensors& Bioelectronics* Vol. **29**, pp. 119-124 (2011)
- 4) Tehseen, M. et al.: Functional coupling of a nematode chemoreceptor to the yeast pheromone response pathway. *PLoS One* **9**, e111429 (2014)
- 5) International Patent Application PCT/AU2014/000435 'G-Protein coupled receptor library'
- 6) W. Sun, R. Jia and B. Gao *Front : Environ. Sci. Eng.*, Vol. **6**, pp. 66-74 (2012)
- 7) Kuroda K., Murakami M., Oguma K., Muramatsu Y., Takada H. and Takizawa S.: Assessment of ground water pollution in Tokyo using PPCPs as sewage marker. *Environ. Sci. Technol.* Vol. **46**, pp. 1455-1464 (2012).