

〈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 (その2)

長谷川 絵 里¹⁾, アリーシャ・アンダーソン²⁾

塩 出 貞 光³⁾, 宮 崎 俊⁴⁾, 山 口 太 秀⁵⁾

¹⁾ メタウォーター(株) 事業戦略本部 R&D センター ソリューション技術開発部 上水技術開発グループ
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: hasegawa-eri@metawater.co.jp)

²⁾ the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO)
(Black Mountain Laboratories, Clunies Ross St., Black Mountain, ACT 2601, Australia
E-mail: Alisha.Anderson@csiro.au)

³⁾ メタウォーター(株) 事業戦略本部 R&D センター ソリューション技術開発部 上水技術開発グループ
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: shiode-sadamitsu@metawater.co.jp)

⁴⁾ メタウォーター(株) 事業戦略本部 R&D センター ソリューション技術開発部 上水技術開発グループ
(〒101-0041 東京都千代田区神田須田町1-25 E-mail: miyazaki-shun@metawater.co.jp)

⁵⁾ メタウォーター(株) 事業戦略本部 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

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、カビ臭物質をより簡便に、安価に、高感度で測定できる分析法の開発を進めている。これまでの研究で、カビ臭物質に対して特異的に反応する G 蛋白共役受容体 (GPCR) を4種類選定した。今回、それらの GPCR センサを、酵母を用いて製作し、濃度応答性を評価した結果、ジェオスミンおよび2-MIBが0.18 ng/L以上で検出可能であることが示された。しかし、0.18 ng/L以上での BRET 比の変化が認められなかったため、今後は、低濃度側の検証範囲を広げ、直線性の評価を行う予定である。

キーワード：ジェオスミン, 2-メチルイソボルネオール (2-MIB), 生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET), 線虫臭気物質受容体, G 蛋白共役受容体 (GPCR) センサ

原稿受付 2020.6.26

EICA: 25(2・3) 65-69

1. は じ め に

近年、貯水池において1,000 ng/Lを超えるような突発的なカビ臭の発生や¹⁾、春先から秋だけでなく、冬期を含めた通年の発生²⁾、北海道を含めた全国的な発生³⁾が報告されている。水道事業者では、浄水中にカビ臭物質を残留させないように、貯水池への硫酸銅散布等で取水中濃度を抑え、浄水場内では粉末活性炭の注入量を高める等の対策を行っているが、適正量の制御等で苦慮している事業者も多い。実際に、水道技術研究センターのプロジェクト「A-Batons」で実施された水道事業者へのアンケート結果では、処理水質に関して困っていることの一位がカビ臭であり、回答数1,152浄水場のうち、66浄水場(5.7%)が現在も困っていると回答している⁴⁾。また、厚生労働省の発表しているカビ臭被害事業者数の推移によると、平成22年度までは年間80事業者前後で推移していたのが、その後増加し、平成30年では130事業者となっている⁵⁾。被害人口は大きな増加が見られないことから、

特に、高度浄水処理が導入されていない中小事業者がカビ臭対策に悩まされていることが示唆される。

取水中のカビ臭物質濃度は、一般的に、GC/MSでモニタリングされている。しかし、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が高額なことから、特に中小規模の浄水場ではリアルタイムでモニタリングすることは難しいのが現状である。そのため、適正な粉末活性炭の注入率を決定することが難しく、過少注入による異臭味被害、過剰注入によるコストアップが課題となっている。

そこで我々は、2.に記載するCYBERTONGUE[®]技術を応用し、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、簡便な手順により短時間で結果が得られ、しかも水道水質基準(0.00001 mg/L以下)の10分の1以下の極微量の濃度でもカビ臭物質を測定できる測定法の開発に着手している。本報告では、G蛋白共役受容体(GPCR)センサを製作し、カビ臭物質濃度に対する応答性および夾雑物質の影響評価を行った結果について、報告する。

2. CYBERTONGUE[®]技術

CSIRO (the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) の開発した CYBERTONGUE[®]技術は、線虫の非常に優れた匂い検知能に着目し、線虫の GPCR の形状が、匂い物質を取り込む際に変化する特徴を利用した、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) アッセイ法である。Fig. 1 に乳製品中の臭気物質であるジアセチルを例に CYBERTONGUE[®]技術の測定メカニズムを示す。線虫の GPCR の一部に生物発光体 Renilla Luciferase 2 (RLuc2, 青色発光, 410 nm) と蛍光発光体 Green Fluorescent Protein 2 (GFP2, 緑色発光, 510 nm) を遺伝子工学的に組み込んだ GPCR センサを用意する。それに基質として Clz400a を添加すると (図中①), 酸化作用により生物発光体から 410 nm の蛍光が発現し (図中②), それに共鳴し蛍光発光体が 510 nm の蛍光を発現する (BRET) (図中③)。この系に揮発性物質が存在すると GPCR センサが構造的変化

を受け (図中④), 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 (図中⑤)。すなわち, GPCR センサの形状変化は, BRET 比 (=510 nm の蛍光強度 / 410 nm の蛍光強度) の変化として計測でき (図中⑥), 予め求めた BRET 比とジアセチルの検量線より, ジアセチルの濃度が算出される。サンプルを注入するだけの簡単な操作で, 短時間 (5 分以内) に EC₅₀ (half maximal Effective Concentration : 半数効果濃度) で 0.31 pg/L レベルのジアセチルを高感度に測定できることが報告されている⁶⁾。

そこで, CYBERTONGUE[®]技術を応用したカビ臭物質 (ジェオスミンおよび 2-メチルイソボルネオール (2-MIB)) の新しい測定方法の開発を行うこととした。前報にて, CYBERTONGUE[®]技術をカビ臭物質検知に応用する最初の段階として, CSIRO の所有する 297 種類の線虫の GPCR ライブラリーを対象としてカビ臭物質に応答可能な線虫の GPCR のスクリーニングを行った結果, 4 種類が選定されたことを報告した⁷⁾。

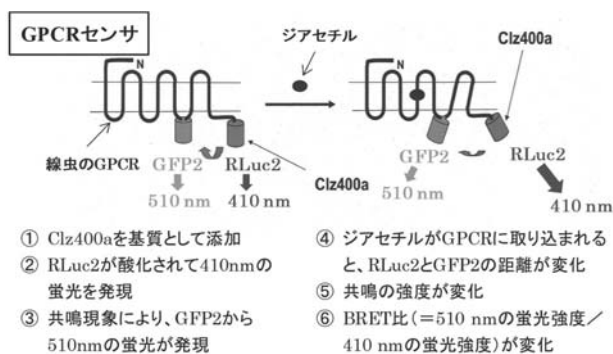


Fig. 1 Measurement mechanism of Diacetyl by CYBERTONGUE[®] technology

3. 実験方法

3.1 GPCR センサの作製

GPCR のアミノ酸 240-241 の間に GFP2 を, レセプターの C 末端に RLuc2 を遺伝子操作により修飾, 酵母を用いて細胞膜に GPCR センサを発現させ, 細胞膜を破碎, 精製することで作製した。操作手順の詳細は Fig. 2 に示す。対象とした GPCR はスクリーニングで選定した 4 種類である。なお, 以降ではそれらの GPCR センサを P8C10, P7C9, P2D7 および P7B4 と

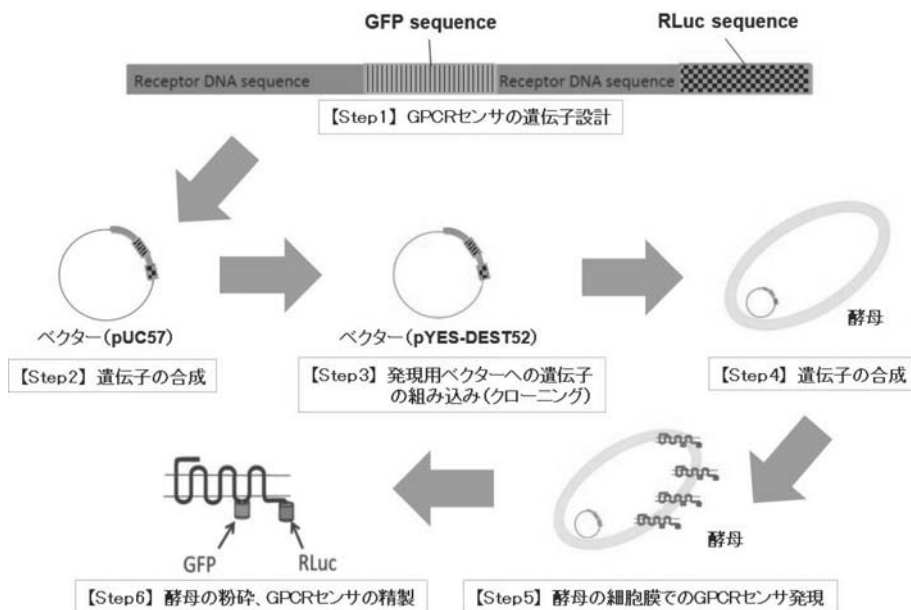


Fig. 2 Producing process of GPCR sensor

記す。

3.2 カビ臭物質濃度に対する応答性評価

マイクロチップにセンサ，基質 (Clz400a) およびカビ臭物質の標準液を添加し，混合させた。次に，410 nm および 510 nm の蛍光強度を，BMT LABTEC 社製の POLARstar OPTIMA にて測定し，BRET 比を算出した。繰り返し回数は 3 回とした。

ジェオスミン標準液の濃度は， 10^{-12} M (0.18 ng/L)， 10^{-10} M (18 ng/L)， 10^{-8} M (1.8 μ g/L) および 10^{-6} M (180 μ g/L) とし，2-MIB 標準液の濃度は， 10^{-12} M (0.17 ng/L)， 10^{-10} M (17 ng/L)， 10^{-8} M (1.7 μ g/L) および 10^{-6} M (170 μ g/L) とした。

3.3 夾雑物質の影響評価

夾雑物質は，カビ臭物質と同様の性質（環状構造，臭気等）を有し，環境水中に存在する可能性のあ

るものという基準で，2-isobutyl-3-methoxypyrazine (IBM)，2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPM)，Caffeine，Crotamiton および Trichloroanisole (TCA) の 5 種類を選定した (Fig. 3)。標準液濃度は，それぞれ 1 pM (10^{-12} M) および 1 nM (10^{-9} M) とした。

4. 実験結果および考察

4.1 カビ臭物質濃度に対する応答

GPCR センサ P8C10 を用い，ジェオスミンを測定した際の，各ジェオスミン濃度における BRET 比を Fig. 4(a) に示す。また，P2D7 を用い，2-MIB を測定した際の，2-MIB 濃度における BRET 比を Fig. 4(b) に示す。なお，グラフ中の 10^{-15} M のプロットは，コントロールの結果を示している。GPCR センサ P8C10 について，ジェオスミン濃度 0.18 ng/L 以上でコントロールの BRET 比との有意差が認められた (t

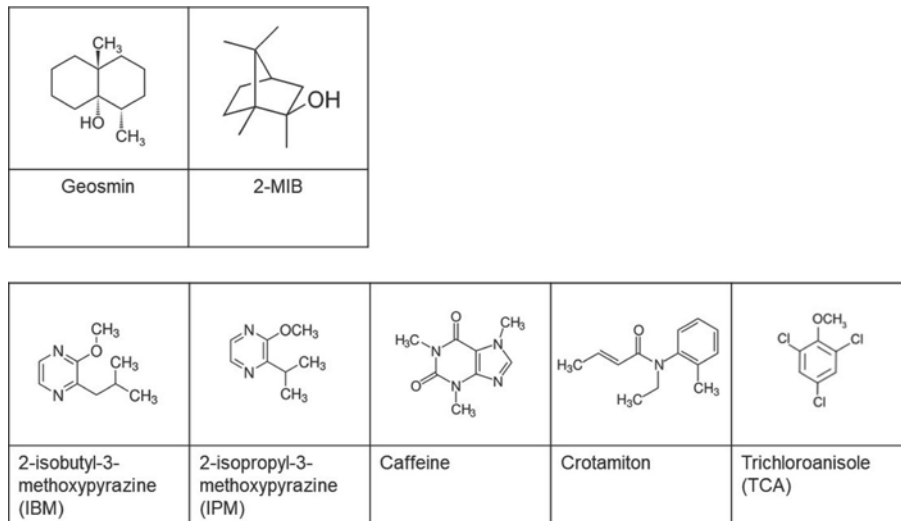
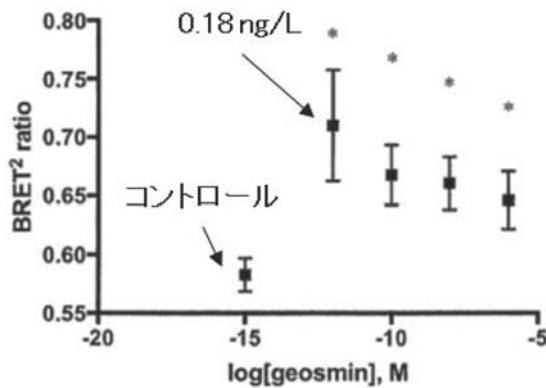
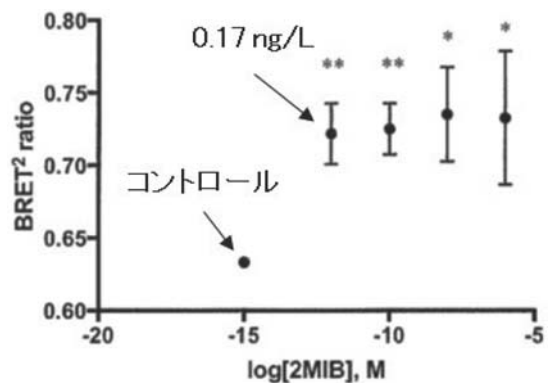


Fig. 3 Structural formulas of Geosmin, 2-MIB and competing compounds



* $p < 0.05$ (students t-test) ** $p < 0.01$ (students t-test)

Fig. 4(a) Relationship between BRET ratio and concentration of Geosmin using GPCR sensor P8C10. Means are based on 3 biological repeats. Error bars represent standard error of the mean. -15 is a control (no odorant present). **/* significantly different from control.



* $p < 0.05$ (students t-test) ** $p < 0.01$ (students t-test)

Fig. 4(b) Relationship between BRET ratio and concentration of 2-MIB using GPCR sensor P2D7. Means are based on 3 biological repeats. Error bars represent standard error of the mean. -15 is a control (no odorant present). **/* significantly different from control.

検定における p 値 $< 5\%$)。また、P2D7 について、2-MIB 濃度 0.17 ng/L 以上でコントロールの BRET 比との差が認められた。これは、ジェオスミンについては P8C10、2-MIB については P2D7 を使うことで、カビ臭濃度が 0.18 ng/L 以上の濃度で存在すれば、検出が可能であることを示唆している。

しかし、 0.18 ng/L 以上のカビ臭濃度に対して BRET 比に変化が認められず、定量性の確認には至らなかった。ただし、先行技術のジアセチルの EC_{50} は 0.31 pg/L と低濃度であるため、さらに低濃度域 ($\sim 0.18 \text{ ng/L}$) にて BRET 比とカビ臭濃度との相関性が認められる可能性がある。今後は、低濃度側の検証範囲を広げ、直線性評価を実施する予定である。

その他の GPCR センサ (P7C9, P7B4) とカビ臭物質の組み合わせについては、コントロールとの差が認

められなかった。

4.2 夾雑物質の影響

4.1 を受けて P8C10 および P2D7 について、夾雑物質の BRET 比を測定した結果を、**Fig. 5** に示す。なお、 y 軸は、コントロールの BRET 比を 1 としたときの比率で表示している。また、P8C10 についてはジェオスミン、P2D7 については 2-MIB の測定結果を併せて示している。P8C10 について、IPM が 1 nM の時、BRET 比率にバラツキが認められたものの、いずれの夾雑物質も BRET 比率は 1 程度で、測定に影響を与える可能性は低いことが確認できた。

今後は、試水として実環境水を用い夾雑物質の影響有無を評価し、影響が認められた場合には前処理方法の検討を行う予定である。

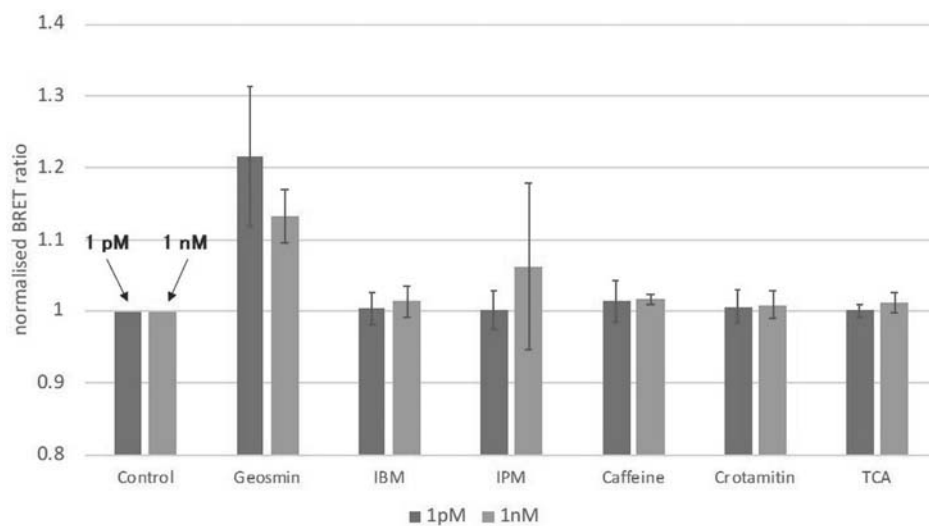


Fig. 5(a) Normalized BRET ratio of competing compounds (IBM, IPM, Caffeine, Crotamiton, and TCA) and Geosmin using GPCR sensor P8C10. Their concentrations are 1 pM and 1 nM . Means are based on 3 biological repeats. Error bars represent standard error of the mean.

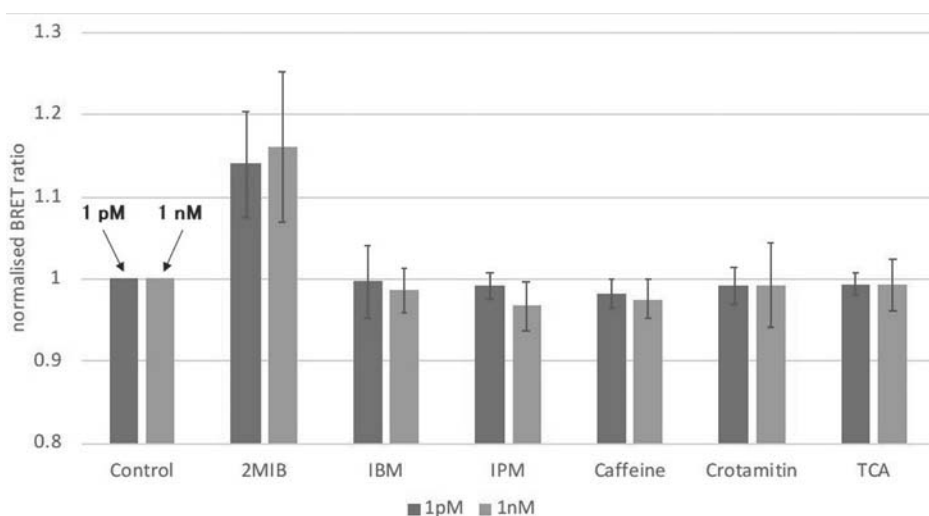


Fig. 5(b) Normalized BRET ratio of competing compounds (IBM, IPM, Caffeine, Crotamiton, and TCA) and 2-MIB using GPCR sensor P2D7. Their concentrations are 1 pM and 1 nM . Means are based on 3 biological repeats. Error bars represent standard error of the mean.

5. お わ り に

CYBERTONGUE[®]技術を応用し、簡便な手順により短時間で結果が得られ、しかも水道水質基準(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、新しいカビ臭物質測定法の開発を進めている。酵母を用いてGPCR センサを製作し、濃度応答性を評価した結果、P8C10を使うとジェオスミンが、P2D7を使うと2-MIBが0.18 ng/L以上で検出可能であった。また、5種類の夾雑物質(IPM, IBM, Caffeine, Crotamiton および TCA)の影響を評価したところ、いずれも測定にはほとんど影響を与えないことが確認できた。しかし、0.18 ng/L以上でのBRET比の変化が認められなかったため、定量性の確認までは至らなかった。今後は、低濃度側の検証範囲を広げ、直線性の評価を行う予定である。また、試水として実環境水を用い、夾雑物質の影響有無の確認と前処理方法の検討についても進める予定である。

参 考 文 献

- 1) 小原昭彦：浅瀬石川ダム貯水池における水質保全対策について、平成29年度国土交通省東北地方整備局管内業務発表会講演集(2018)
- 2) 西井淳雄, 茂野誠一, 島本卓弥：印旛沼におけるかび臭の発生状況、令和元年度全国水道研究発表会講演集, pp.234-235 (2019)
- 3) 本郷将輝, 藤田司, 櫛引英之：滝里ダムにおける水質保全対策について——水質予測によるカビ臭事前回避運用——, 第62回(2018年度)北海道開発技術研究発表会発表論文集, 管25 (2019)
- 4) 水道技術研究センター：変化に対応した浄水技術の構築に関する研究(A-Batons)平成29・30年度成果報告書 添付資料1-1 アンケート結果, pp.16-17 (2018)
- 5) 厚生労働省：令和元年度全国水道関係担当者会議(資料編), p.117(2019)
- 6) H. Dacres, J. Wang, V. Leitch, I. Horne, A. R. Anderson and S. C. Trowell, : Greatly enhanced detection of a volatile ligand at femtomolar levels using bioluminescence resonance transfer (BRET), *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 29, pp.119-124 (2011)
- 7) 塩出貞光, アリーシャ・アンダーソン, 長谷川絵里, 山口太秀：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, *Journal of EICA*, Vol. 24, No. 2/3, pp.84-87 (2019)