

# 高度水素生産菌株を活用した有害化学物質迅速 検出技術の高感度化

九州工業大学・大学院生命体工学研究科 前田 憲成

## 1. 諸言

筆者はこれまで迅速に食品や化学物質の有害性の有無をアッセイできる試験法の開発を目的に研究を進めてきたが、本研究では、有害物質の存在下で水素高度生産菌株から作られる水素ガスの発生量の変化に着目し、その違いを水素センサ膜による呈色反応、または燃料電池による発電反応などにより検知するというシステムの開発を目指している。しかしながら、これまでの研究の過程で、有害化学物質などに対する感受性が最大で2倍程度と低い検出感度がシステム開発における大きな問題となっていた。

本研究では、生物化学的または遺伝子工学的なアプローチを導入して、本システムにおける化学物質の有害性評価の感度を高めること（高感度化）を目的に研究を進めてきた。具体的には、迅速性と感受性の双方に最適な菌濁度を追究すること、および細胞の酸化損傷または遺伝子変異の修復などの関わる遺伝子を不活性化して、有害化学物質に対する感受性の向上に有用な遺伝子変異の探索を行った。加えて、高度水素生産菌株に対しても、有効な遺伝子変異を導入して、化学物質の有害性を迅速に検出できる試験菌株の「感受性」の改善などについて追究した。

## 2. 実験

高度水素生産菌株を用いた水素発酵は、これまでの筆者の手法と同じように実施した。本実験にはクロラムフェニコール、テトラサイクリン、アンチマイシン、アンピシリン、過酸化水素、2,4,6-トリニトロトルエンを用いた。また、使用した大腸菌は、KE10 変異ライブラリーを用いて、カナマイシン耐性遺伝子を取り除くシステムと P1 トランスダクションを組み合わせて実施することで、多重変異株を作製した。導入した遺伝子変異は、標的遺伝子周辺の塩基配列、およびカナマイシン耐性遺伝子内の塩基配列に基づいた PCR 反応によって生じた PCR 産物のサイズを解析することで確認した。

## 3. 結果と考察

はじめに、幾つかの菌濁度の条件を設定して、クロラムフェニコールの添加または無添加における水素ガスの発生量および感受性を追究した（図1）。 $OD_{600}=0.01$  から 1 の範囲で菌濁度の増加に伴い、水素ガスの発生量の増加が見られ、菌濁度 1 の条件で最も高い水素生成量を示した。その一方で、感受性の観点においては、菌濁度 0.1~0.2 の条件で最も高

い感受性を示したが、それ以上の菌濁度では感受性が低下することが明らかとなった。

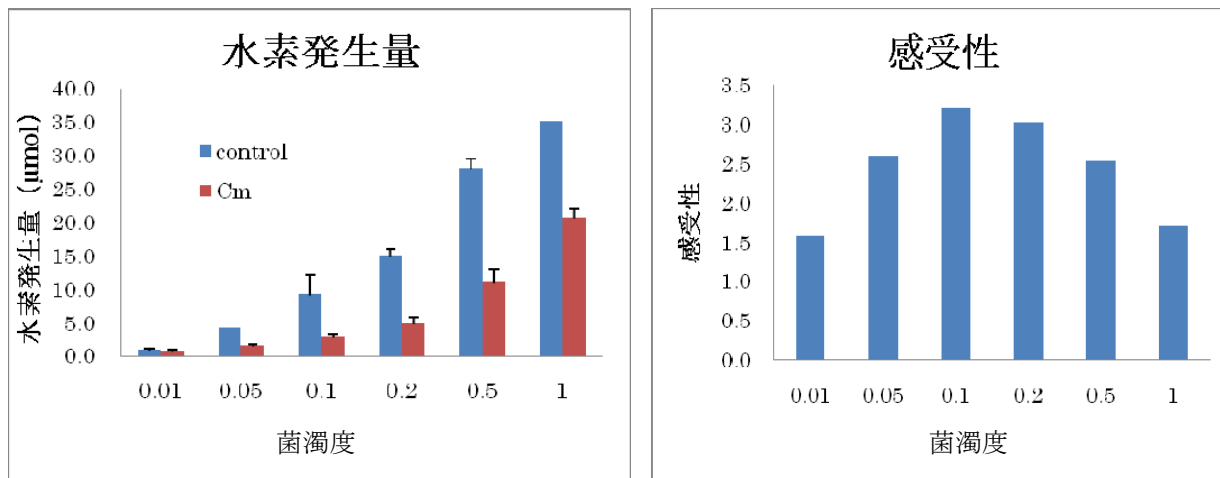


図1. クロラムフェニコールの添加または未添加における各菌濁度条件における水素発生量と感受性の比較（水素ガスは60分後に測定した）

次に、*dam* 遺伝子変異または *sodABC* 遺伝子変異による過酸化水素またはクロラムフェニコールに対する感受性の向上効果を追究した。その結果、過酸化水素に対して、*dam* 遺伝子、*sodA* 遺伝子、および *sodB* 遺伝子変異株において野生株よりも高い感受性を示した。次に、*sodA*、*sodB*、*sodC* のそれぞれの二重変異株を作製して、同様に追究したところ、図2に示すように、最終的に *sodA sodB* の二重変異株が最も高い感受性を示し、過酸化水素に対して12倍の感受性を示した。さらなる研究の進展が必要であるが、本手法で比較的短時間に医薬品を含む化学物質の有害性の有無を高感度に判定できる特徴から、医薬品環境リスク評価への展開が期待できる。

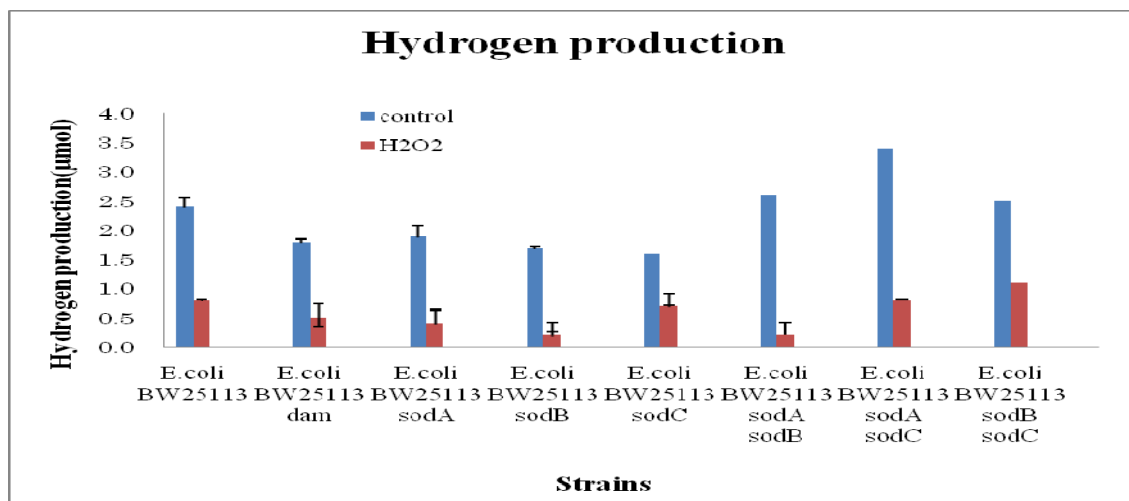


図2. 親株、単一変異株、または二重変異株における過酸化水素に対する水素ガス発生と感受性評価（水素ガスは30分後に測定した）