

組換えヒスタミンオキシダーゼを用いた ヒスタミンセンサーの作製

化学技術部 バイオ技術チーム 廣井 哲也
荒木 真由美
電子技術部 電子デバイスチーム 伊藤 健

主に魚介類では腐敗が生じる過程でヒスタミンが生成される。ヒスタミンの摂取により、人はアレルギー様食中毒を引き起こす。そのため、食品中のヒスタミン濃度の測定は品質管理上重要とされている。本研究では取り扱いが簡便で迅速に測定するためのヒスタミン測定用バイオセンサーを開発するため、遺伝子組み換え技術によるヒスタミンオキシダーゼ (HOD) 発現系の構築と電気化学測定法によるセンサーデバイスの作製を試みた。

キーワード：ヒスタミンセンサー、ヒスタミンオキシダーゼ、マイクロリアクター、遺伝子組換え

1 はじめに

魚介類の鮮度低下により発生するヒスタミン中毒はヒスチジンの脱炭酸で生じる有害なヒスタミンにより引き起こされる食中毒である。食中毒事例のほとんどが仕出しや飲食店での集団発生によるものとされるが、実際には食中毒として届け出はなされないものの家庭などでも相当数発生があると推測され、発生件数の多い中毒と思われる。

食中毒を防止するには、安全な食品を提供できる衛生管理システムを取るとともに、平易なモニタリング方法（検査法）を確立することが必要である。従来ヒスタミンは、蛍光定量法や高速液体クロマトグラフィ（HPLC）などを使って測定されてきたが、試料処理や分析に時間を要するなどオンサイトでの測定が困難であった。ヒスタミンに特異的に反応する酵素を用い、反応生成物を測定する方法は従来から特許にもいくつか見受けられるが、酵素の選択的反応性やコストなどの問題のため現在のところ実用化されていない。

本研究では、酵素法によるヒスタミンの簡便な分析のために、ヒスタミンオキシダーゼ (HOD) の反応性が従来よく知られている *Arthrobacter globiformis* IAM12137 由来よりも優れているとされる *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007 由来ヒスタミンオキシダーゼ^{1,2)}を利用することとした。昨年度までに、KAIT-B-007 株より抽出されたヒスタミンオキシダーゼを大腸菌により発現させる系を構築している。

本研究では大腸菌により大量生産が可能となったヒスタミンオキシダーゼを利用して、酵素反応により生成した過酸化水素を検出する小型センサの開発を行った。

2 方法

2. 1 組換えヒスタミンオキシダーゼの調製

組換え HOD の調製には p Cold I 発現ベクター系を用いて *A. crystallopoietes* KAIT-B-007 由来ヒスタミンオキシダーゼ^{1,2)}遺伝子を導入した大腸菌株 BL21star(DE3)を用いた^{3,4)}。組換え HOD の精製は金属アフィニティークロマトグラフィー (TALONspin Column, クロンテック社)により行った。

2. 2 ヒスタミンセンサーの作製

本研究ではオンサイトでの測定の要求にこたえるため、電極表面に電解質膜をコートすることで競合物質の影響を低下させ、センサは微細加工技術を利用することで数 cm 角内に収める設計を行った。そのために、微小流路内に段差構造を形成し、酵素を固定化した担体を微小流路内にトラップすることでマイクロリアクターとして機能する構造を考案した⁴⁾。(図1)

段差上流側の深さは 125 μm 、段差下流側の深さは 50 μm とした結果、リアクターの体積はおよそ 0.5 μL であった。また、その段差構造の直近の下流に電気化学検出用の電極を内蔵させた。電極は上流側から作用極（金または白金）、参照極（銀）、対極（金または白金）の順に配置し、それぞれの流れ方向での長さは 0.5mm, 0.25mm, 2mm とした。作用極上には Nafion®(5wt%)溶液を滴下し、乾燥させることでコーティングした。



図1 マイクロリアクター型センサの写真

3 結果

大腸菌に発現させた組換え HOD は金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製し SDS 電気泳動で単一バンドであることを確認した (図 2)。

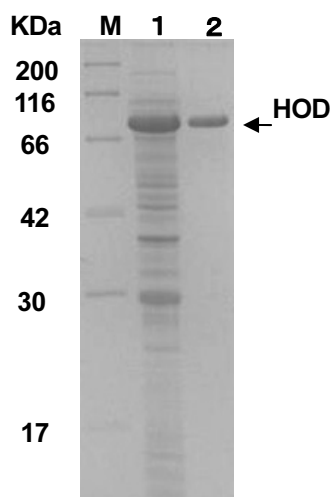


図 2 組換え HOD の SDS-PAGE

M : 分子量マーカー

1 : HOD 発現後の大腸菌の抽出液

2 : 精製 HOD

本研究では電子回路形成用レジストとして利用されてきた感光性シート (ドライフィルムレジスト) を用いてマイクロ流体デバイス及びダム構造を形成し、酵素固定化担体がダム構造によりトラップされることが確認できた。また、微量の多検体を高速に測定するシステムを実現するためにフローインジェクション法を応用してセンサシステムを構築した。

ヒスタミン濃度 $10 \mu\text{mol/L}$ から 5mmol/L のサンプルを測定した結果、 $10 \mu\text{mol/L}$ の低濃度でも電流ピークが観測されることが分かった。ヒスタミン濃度 $10 \mu\text{mol/L}$ から 5mmol/L における電荷量を測定し、検量線を図 2 に示した。重相関係数 $R=0.9999$ と非常に直線性の高い結果を得た。また、 $S/N=3$ の時の測定限界は $9.2 \mu\text{mol/L}$ であった。この結果から、 1ppm から 555ppm までの広範囲で測定が可能であることが分かった。食品衛生や品質管理の手法として世界的に注目されている HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) ではヒスタミンの規制値が 50ppm = 注意喚起レベル、 500ppm = 毒素レベルと定められており、本研究結果は HACCP の基準を十分に測定できることがわかった。

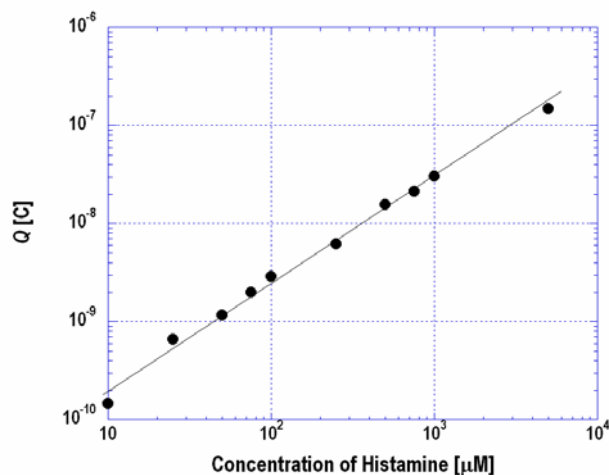


図 3 ヒスタミンの検量線

流速 : $5 \mu\text{L/min}$

なお、本研究は神奈川県産学公地域総合研究の一環として実施した。

文 献

- 1) H. Yanaka and M. Matsumoto, *Journal of Food Hygienics Society of Japan*, **30**, 397(1989).
- 2) Y. Sekiguchi, A. Nishikawa, H. Makita, A. Yamamura, K. Matusmoto and N. Kiba, *Analytical Science*, **17**, 1161(2001).
- 3) 天谷努, 伊藤健, 廣井哲也, 松本邦男, 平成 18 年度産学公地域総合研究成果報告書, 37.
- 4) 廣井哲也, 伊藤健, 荒木真由美, 松本邦男, 山村晃, 平成 19 年度産学公地域総合研究成果報告書, 37.