

平成26年度
環境研究総合推進費補助金 研究事業
総合研究報告書

ハロモナス菌による木材から
3-ヒドロキシ酪酸等の生産技術
開発に関する研究
(3K123009)

平成27年3月

産業技術総合研究所 河田悦和

補助事業名 環境研究総合推進費補助金研究事業(平成 24 年度～
平成 26 年度)

所 管 環境省

国庫補助金 83,824 千円

研究課題名 ハロモナス菌による木材から 3-ヒドロキシ
酪酸の生産技術開発に関する研究

研究期間 平成 24 年 4 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者名 河田 悦和 (産業技術総合研究所)

研究分担者名 野尻 昌信 (森林総合研究所) 平成 25,26 年度
上垣 浩一 (産業技術総合研究所) 平成 24 年度
川崎 一則 (産業技術総合研究所)

目次

総合研究報告書概要	1
本文	
1. 研究背景と目的	13
2. 研究方法	
2. 1 木材糖化液の調製	14
2. 2 菌体の培養（回分培養、半回分培養）	15
2. 3 ファーメンターによる培養試験	17
2. 4 バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の分析	17
2. 5 培地中の糖、有機酸の分析	18
2. 6 全炭素窒素分析装置による培地上清の分析	18
2. 7 化学固定法による電子顕微鏡観察	18
2. 8 ゲノムDNAの調整	20
2. 9 ゲノム解析	20
2. 10 ハロモナス菌遺伝子の情報解析(原核遺伝子予測)	21
2. 11 全RNAの調整	21
2. 12 mRNA定量による遺伝子発現量の分析（リアルタイムPCR）	21
2. 13 mRNA定量による遺伝子発現量の分析（トランスクリプトーム解析）	22
2. 14 ガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いたメタボローム解析	23
2. 15 キャピラリー電気泳動質量分析装置を用いたメタボローム解析	24
2. 16 ラットによる乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の経口毒性試験	24
3. 研究結果と考察	
3. 1 木材糖化液の性状、組成について	25
3. 2 ハロモナス菌の培養、PHB生産性について	26
3. 3 ハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産	30
3. 4 C6糖、C5糖を用いたハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB の生産	32
3. 5 スギ木材糖化液を用いたハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産	34
3. 6 GC-MS 装置を用いたハロモナス KM-1 株のメタボローム解析	36
3. 7 CE-MS 装置を用いたハロモナス KM-1 株のメタボローム解析	40
3. 8 <i>Halomonas</i> sp. KM-1 株のゲノム解析	40
3. 9 ハロモナス菌によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産性向上について	43
3. 10 スギ木材糖化液を用いたハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産性向上	47
3. 11 PHB 顆粒蓄積と 3-HB 放出の過程における菌体の電子顕微鏡による解析	48
3. 12 ラットによる乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の経口毒性試験	51

4. 結論	
4. 1 ハロモナス菌の培養、PHB 生産性について	54
4. 2 ハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産	55
4. 3 電子顕微鏡による観察	56
4. 4 ハロモナス KM-1 株による木材糖化液の利用、バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産	57
4. 5 ハロモナス KM-1 株による木材糖化液の利用、バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産	58
5. 研究発表	
論文発表	65
学会等発表	66
「国民との科学・技術対話」の実施	66
6. 知的財産権の取得状況	67
7. 研究概要図	68
8. 英文概要	69
9. 参考文献	70
補遺 1 ラットを用いる急性経口毒性試験	72
補遺 2 ラットを用いる亜急性経口毒性試験	76

環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：ハロモナス菌による木材から 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術開発に関する研究
研究番号：3K123009

国庫補助金清算所要額：83,824 千円

研究期間：平成24年4月1日～平成27年3月31日

研究代表者名：河田 悦和（産業技術総合研究所）

研究分担者：野尻 昌信（森林総合研究所）、上垣 浩一（産業技術総合研究所）、
川崎 一則（産業技術総合研究所）

研究目的

国内外で、非可食の木材等を原料として、バイオエタノール生産の研究が進んでいるが、副生する C5 糖の利活用が課題である。一方、日本の石油消費の 21%を占める化成品も、再生可能資源への転換が求められている。我々は、木材利用に好適な独自のハロモナス菌 KM-1 株を発見した。本菌は、高アルカリ高塩濃度環境で生育するため、培養液を殺菌する必要がなく、C6 糖のみならず、利用が難しい C5 糖も利用し、菌体内にバイオプラスチックを蓄積した後、そのモノマーの 3-ヒドロキシ酪酸を分泌する。そこで我々は、C5 糖を含む木材糖化液等を利用して、化成品原料として有望な D 体の 3-ヒドロキシ酪酸等を分泌生産する基礎技術を確立する。具体的には、我々の発見した独自菌株ハロモナス KM-1 株を用い、木材から 3-ヒドロキシ酪酸等を生産する基礎技術を確立するため、商業的な生産の目標値である生産量 100 g/L、生産速度 1.0 g/L・h の達成を目的に研究を実施した。

研究方法

1. 菌体の培養、PHB 生産の比較方法

Halomonas sp. KM-1 株と NBRC または、ATCC より購入したハロモナス菌間の生育を、栄養塩のみの SOT 培地とトリプトンなどを含む培地で比較した。

さらに、KM-1 株による PHB 生産の検討には、栄養塩のみからなる SOT 改培地を用い、適宜炭素源を添加した。また、窒素添加を行う場合には、24 時間目以降 12 時間おきに 2.5 g/L 相当の硝酸ナトリウム、または 0.875 g/L 相当の尿素を適宜追加した。木材糖化液には、SOT 改の組成と同じ塩加え、使用した。試験管通気培養の場合には、20ml 容の試験管に 5mL の培養液を入れ、33°C、135rpm 往復振とう、3 日間培養した。フラスコ・好気培養、微好気培養の場合には、200ml 容のヒダ付きフラスコに 20 mL の培地を入れ、33°C、200 rpm 回転振とうで好気培養を行った。適宜、微好気培養へ移行する場合には、回転数を 50 rpm に減じた。ファーメンターによる培養の場合は、DO20%で 60 時間程度培養し PHB を蓄積した後、DO0.5%以下(空気供給を停止)として培養し、3-ヒドロキシ酪酸を分泌させた。

2. バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の分析

バイオプラスチック PHB は、Ishizaki and Tanaka (1991)及び Monteil-Rivera et al.(2007)の手法に従い、ガスクロマトグラフィーにより分析した。3-ヒドロキシ酪酸は、培養液を遠心分離して上清のみ分離、10 倍に水にて希釈して、これを示唆屈折角の検出器を備えた HPLC にて分析した。使用したカラムは、BIORAD 社アミネックス HPX-87H カラムを用い、溶離液 0.008N 硫酸、流速 0.6mL/min、カラム温度 35°Cにて分析したところ、おおよそ 8.7 分にグルコース、13.3 分に 3-ヒドロキシ酪酸がそれぞれ溶出した。

3. 電子顕微鏡観察

段階的な好気・微好气的条件で培養した場合の KM-1 株の微小形態の変化を、超薄切片電子顕微鏡法と電子線トモグラフィー法によって解析した。

電顕用超薄切片試料の作製と透過電子顕微鏡による観察は、常法に従って行った。

4. 木材糖化液の作成

木材糖化液の原料としてスギおよび広葉樹（ユーカリ・アカシア混合）からの糖化液を作成した。スギ糖化液の原料は、森林総合研究所の北秋田木質バイオエタノール製造実証施設でスギチップをソーダ・アントラキノン蒸解したスギパルプを次亜塩素酸ナトリウム、あるいはオゾンで漂白したものをを用いた。広葉樹糖化液の原料は、製紙会社から提供して頂いた広葉樹クラフトパルプ（漂白済み）を用いた。パルプは、水で懸濁後、クエン酸でpH調整、滅菌し、糖化酵素を添加し、50°Cで133時間回転攪拌して糖化し、濃縮した(Ikeda et al. 2009)。

結果と考察

結果

1. 木材糖化液の性状、組成について

木材糖化液は、褐色の液体で得られた。リグニンは検出できない程度に除去されていた。また、発酵を阻害する糖の変性物（ヒドロキシメチルフルフラール）なども検出できなかった。糖組成については、HPLC（Shodex SP0810 カラム）により分析した平均的な糖組成を表1に示す。

表1 木材糖化液組成

	Glucose	Manose	Xylose	C6糖/C5糖
スギ	89.4%	6.3%	4.2%	95.7/4.2
広葉樹(アカシア、ユーカリ)	84.3%	0.0%	15.7%	84.3/15.7

スギを原料とする場合は、グルコースのほかにマンノースとキシロースを含み、五炭糖は4.2%、広葉樹を原料とする場合は、グルコースとキシロースで構成され、五炭糖は15.7%

であった。糖化時間が短いものでは、セロビオースを数%含むものもあった。

スギを原料とした場合の1試料のマスバランス分析した結果、木材チップ 1000kg から 378kg の糖が生産できる計算となった。ここで糖製造時のロス分としてパルプ 71kg としたのは、糖化後の残渣除去時のロス分を計上してある。黒液は製造時に熱エネルギーと電気を使用するが、黒液の 38%は余剰となるので、マテリアル利用などにも活用できる。

2. ハロモナス菌の培養、PHB 生産性について

KM-1 株と、NBRC13 株、ATCC 2 株のハロモナス菌の生育を比較した。SOT 培地は、栄養塩と炭素源からなり NBRC306 培地、Marine Broth 培地は、栄養塩に加えてトリプトンや酵母エキスなどを含む。SOT 培地では、KM-1 株も含め 5 株のみが成育した。NBRC306 培地、Marine Broth 培地では、高塩濃度を生育に要求する *H. subglaciescola* NBRC 14766^T のぞき 14 種類のハロモナス菌が生育した。

SOT 培地で生育できる 4 種の菌株について、炭素源として 3%グリセロールを加え、試験管培養し、菌体重量、PHB の生産量を測定した。いずれも、22%以上の PHB の蓄積が得られ、特に KM-1 株は、34%以上の PHB を蓄積した。KM-1 株は、試薬のグルコース、グリセロールを用いた場合、PHB を乾燥菌体あたり 80%以上、培養液あたり 40g/L 以上の蓄積し、他のハロモナス菌はもとより、商業培養が検討されている菌株と比べても遜色ない生産性を示した。

3. ハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産

好気条件で 60 時間まで培養した後、微好気条件(50 rpm)へ移行したものについて、菌体重量、PHB 生産量、3-ヒドロキシ酪酸の生産量、残存する炭素源、さらに電子顕微鏡の撮影を実施した。窒素添加の有無、回数により、好気条件で蓄積した PHB を、微好気条件で分解、3-ヒドロキシ酪酸の分泌量が変化するを確認した。特に従来は PHB 合成、分解に窒素が必要なことをはじめて明らかにした。さらに、初発濃度 20%のグルコースを用いた場合、40 g/L 以上の 3-ヒドロキシ酪酸の分泌が行えることを確認した。(図 1)

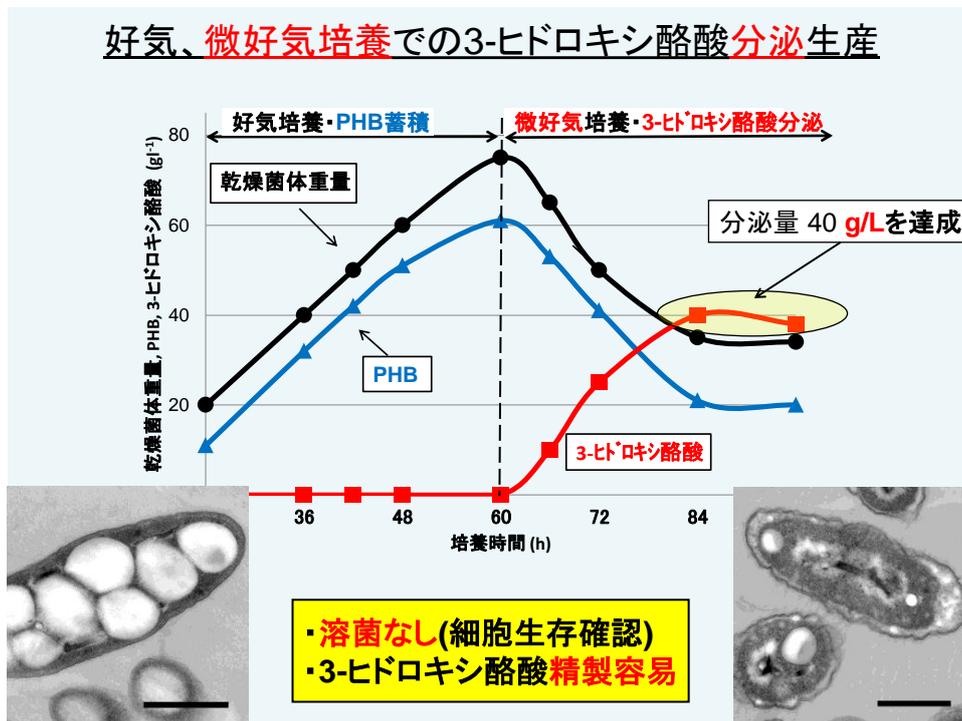


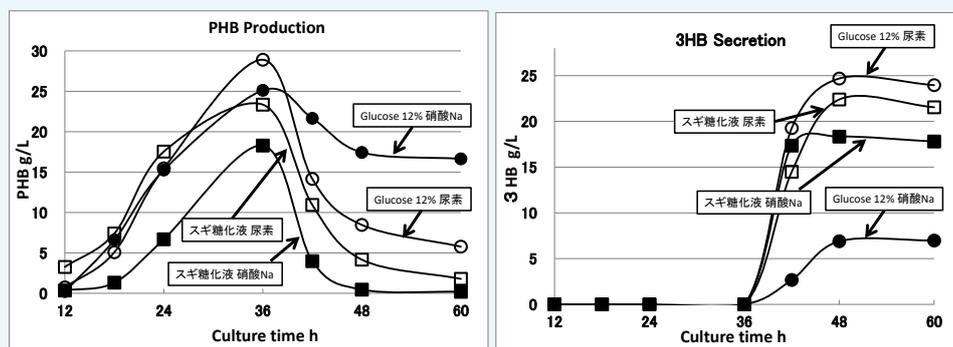
図1 好気、微好気条件での3-ヒドロキシ酪酸分泌生産

4. スギ木材糖化液を用いたハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産

スギ木材糖化液を用い、ハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産を調べた。好気条件の場合、木材糖化液を用い、硝酸ナトリウムを窒素源とした培養では、グルコースを用いた場合と比較し、半分程度の PHB の蓄積量を得た。特徴的なこととしては、グルコースの場合、蓄積した PHB の 35%前後の PHB 顆粒が菌体内に残存するのに対し、木材糖化液の場合は蓄積した PHB のほとんどが分解された。木材糖化液を用いて、窒素源を、硝酸ナトリウム、尿素、塩化アンモニウムで比較したところ、尿素の場合、硝酸ナトリウムの 1.4 倍程度の菌体重量、PHB 蓄積量が得られた。塩化アンモニウムの場合は生育が見られなかった(図2)。この培養時には、木材糖化液中の糖は 36 時間目にすべて消費された。一方、微好気条件として、PHB を分解する過程では、微好気条件移行 12 時間前に窒素添加を行うことが、PHB の分解の促進に重要であることが判明し、その結果、3-ヒドロキシ

酪酸を、糖等量あたりグルコースに匹敵する 20%程度の転換効率、分泌量 21.1 g/L、生産効率 $0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ でスギ糖化液から生産することが可能となった。(図 2) この条件により、木材糖化液に含まれる糖は、すべて消費され、主に PHB に転換された。転換された PHB のほとんどは分解され、3-ヒドロキシ酪酸として分泌された。

スギ糖化液での有効性の確認



・窒素源を硝酸Naから**尿素**に変更

- PHB蓄積量の増加、特にスギ糖化液
- 3HBへの転換が効率化 スギ糖化液で**20g/L**を越える
- ファーマンター試験を予定

図 2 スギ糖化液での尿素の有効性

考察

木材の構成糖の 5-30%を C5 糖が占め、非可食バイオマスからのバイオエタノール生産においても、リグノセルロースに含まれる C5 糖の有効利用が経済性を成立させる上で不可避の課題である。工業的に利用されている微生物の多くは、C5 糖を利用することができず、C6 糖のみが利用される。また、限られた C5 糖を利用できる菌体でも、C6 糖が優先して代謝される特性から、グルコースが優先的に消費され、その後 C5 糖が利用されることが報告されている。本ハロモナス菌は、C6 糖存在下でも C5 糖を C6 糖とほぼ同じスピードで代

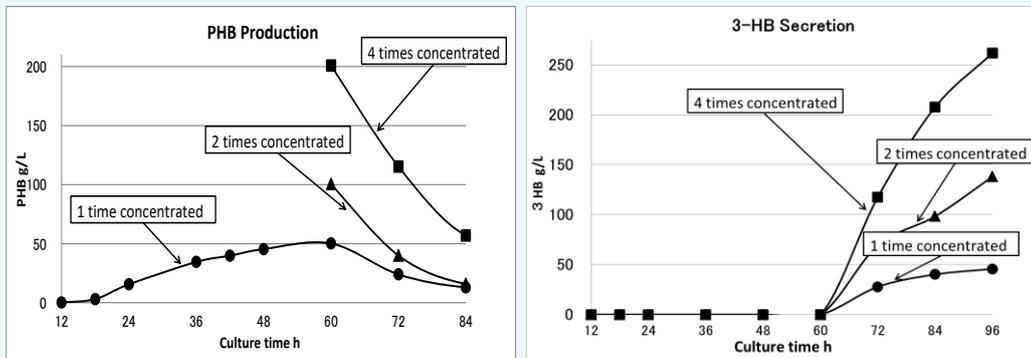
謝し、PHBの生産量も変化がない。このことは、工業的、学術的にも注目される。

本研究では、日本のバイオマス資源として有望なスギを利用し、実際にバイオプラスチック PHB 及び 3-ヒドロキシ酪酸をハロモナス菌で生産した。バイオリファイナリーの構築は世界的な課題であり、実際の木材糖化液そのものを用いて、菌体を培養し、化成品を生産できたことは極めて有意義なことといえる。特に 3-ヒドロキシ酪酸は、総培養時間 60 時間で 21.1 g/L を達成した(表 2)。スギ糖化液中のほとんどの糖は 36 時間目には消費され、PHB へと転換されており、これは全炭素窒素分析装置でも確認された。現状ではこれ以上の生産量、生産性の向上は見込み難しく、商業的な生産の目標値である生産量 100 g/L、生産速度 1.0 g/L・h は困難であった、そこで、PHB 蓄積後の菌体を濃縮し、これから 3-ヒドロキシ酪酸を分泌生産することを試みたところ、濃縮倍率に応じ、最大 250g/L の 3-ヒドロキシ酪酸を分泌生産することに成功し、工業的な生産指標を達成した(図 3)。

表 2 3-ヒドロキシ酪酸の生産量の比較

3-ヒドロキシ酪酸生産量の比較				
Organism	Carbon source	Procedure	(R)-3-HB (g/l)	Reference
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Glycerol	microaerobic condition	15.2	本研究
	Glucose	Wild strain	40.3	
	スギ糖化液		21.1	
<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	lactose	<i>in vivo</i> PHA depolymerization mutant	1.8	Nath et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phbAB, ptb, buk</i>)	12	Gao et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phaCAB, phaZ</i>)	9.9	Lee et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phaCAB, phaZ</i>)	7.3	Shiraki et al. (2006)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phbAB, tesB</i>)	12.2	Liu et al. (2007)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 126	methanol	mutant (3HB dehydrogenase null, lipoic acid synthase null)	2.8	Hölscher et al. (2010)
<i>Ralstonia eutropha</i>	fructose	mutant (3HB dehydrogenase null)	3.1	Shiraki et al. (2006)
<i>Azohydromonas lata</i>	glucose	mutant (UV)	6.5	Ugwu et al. (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wood extract hydrosate	Wild strain	16.8	Wang et al. (2014)

PHB蓄積後の濃縮プロセスの適応 - より高濃度の3HB溶液を得るために -



・PHB蓄積後に遠心濃縮、微好気転換

- PHB蓄積後の菌体は容易に沈殿
- 原料糖の濃縮プロセスを不要に
- 最大 **250 g/L**以上の3HB生産濃度 **達成!**

図3 PHB蓄積後の濃縮、3-ヒドロキシ酪酸の分泌

環境政策への貢献

環境研究総合推進費・第7研究分科会・循環型社会形成・次世代廃棄物処理技術に示す循環型社会形成の推進及び廃棄物に係る問題解決に資する研究を実施するために、当研究では以下の課題の解決を目指す。

1. 森林資源の保護、育成
2. エネルギー以外への余剰バイオマス資源の有効活用、化石燃料資源の使用抑制
3. 循環型社会の促進のためのバイオプロセス・インフラの整備

以下、それぞれの内容を簡潔に述べる。

1. 森林資源の保護、育成

日本では、国土の約26%、1000万haが人工林であり、花粉症に悩まされる人も多いスギが、過半を占める。多く人工林が間伐作業を必要とするが、木材価格の低下ゆえ、間伐作業のコストをまかないきれないのが現状である。2012年末、国の再生可能エネルギー政策の中で、未利用木材燃焼発電が、33.6円/kWに設定された。これは、木材チップ価格37,330円/ton(発電効率0.2の場合)、56,000円/ton(発電効率0.3の場合)に相当する。バイオエタノール生産の場合、現在の目標価格125円/kg(100円/L)、将来は50円/kg(40円/L)を目指しているが、現状では木材チップの原料価格だけで、バイオエタノールを目標価格の相当割合を占める。それゆえ、より高付加価値で、年間数千トン以上の生産スケールが期待される化学品の製造が求められている。そこで我々は、バイオプラスチックのモノマーである3-ヒドロキシ酪酸に注目した。関連する企業の想定により、本品の価格を1kgあたり約1000円、バイオプラスチック・ポリヒドロキシアルカネートの市場規模を30万トン以上と想定した。森林総合研究所プラントによる検討では、スギチップ1トンから368kgの糖を生産可能であった。スギ人工林のバイオマス年間生産量は1.9トン/haであるため、年間699kg/haの糖が生産できる。ハロモナス菌を含め微生物がバイオプラスチックを生産する糖収率が約20%なので、理論上は年間1haあたり140kgのバイオプラスチック、3-ヒドロキシ酪酸が生産でき、日本の人工林の約22%を使用すれば、年間30万トン程度のバイオプラスチックの生産可能であるため、経済性、市場規模ともに有望である。

2. エネルギー以外への余剰バイオマス資源の有効活用、化石燃料資源の使用抑制

現在日本に輸入される石油資源の約20%が、エネルギー以外の用途、主に化成品原料として利用されている。上記の推定では、人工林から年間1900万トンのバイオマスが生産される。現在取り組まれているバイオエタノール製造の場合には、第一段階と

して木材を粉碎し、その後これを酵素や酸で糖化し、微生物発酵によるエタノール生産が行われている。一方で、シェールガスなど非在来型の安価なエネルギー源が市場に供給されつつある現在では、木材からバイオエタノールより高価で、より高付加価値、かつ大量消費される材料、中間原料の生産が求められる。

木材の糖化液には、糖化プロセスに由来するフラン類やフルフラール類、酢酸など多くの微生物の増殖を抑制する物質が含まれており、通常の微生物でこれらの木材糖化液を利用するには、これらの夾雑物の除去が課題である。

我々は、バイオマスの有効利用の観点から、木材糖化液の利用を検討した。通常の木材糖化液に含まれる濃度のフラン類やフルフラール類、酢酸を通常の培地に添加し、ハロモナス菌を培養した結果、ほとんど生育抑制が認められなかった。そこで、実際にいくつかの日本の人工林の代表種であるスギの糖化液に、直接栄養塩を加えて、培養し、バイオプラスチックPHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産を確認した。純粋なグルコースに比べて80%程度の生育、50%程度のPHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産が確認できた。将来、石油由来の脂肪族ポリエステルに替わるべく、生産性の向上をめざし、森林総合研究所と検討を進めた。

3. 循環型社会形成を促進するためのバイオプロセス・インフラの整備

日本に輸入される石油資源の約20%(約4000万KL)が、エネルギー以外の用途、主に化成品原料として利用されている。今後、これらを生成可能資源で生産することを考えた場合、この石油量に匹敵する量の確保が必要である。現在、日本で再生可能・バイオマス資源として検討されているものには、バイオディーゼルの原料である廃食用油、植物本体・リグノセルロースである農業残渣、木材などがあげられる。日本の食用油の総生産量が230万トン、うち廃食用油回収量45万トンと推定され(2006年環境省資料)、前述の、日本の人工林から年間1900万トンのバイオマスが生産されることか

ら、これらのバイオマス資源を用いて、化成品原料の半分程度を賄うことは可能である。しかしながら、これらのバイオマス資源は、そのままでは利用が難しく、リグノセルロースの場合、前段階の糖化プロセスを経て、ようやく化学プロセスやバイオプロセスの原料となるが、微生物の成育を阻害する夾雑物が生じる。

我々のハロモナス菌の場合、これらの糖化リグノセルロース(木材糖化液)、さらにバイオディーゼル廃グリセロールを、これらに含まれる夾雑物の影響を、ほとんど受けず利用可能である。さらに、リグノセルロースの5-30%を占めるキシロース、アラビノースなどのC5糖を直接利用可能である。塩を含み高アルカリ環境で生育するため、他の雑菌の混入も認めないため、現在検討している3-ヒドロキシ酪酸以外の化成品原料を製造するためのバイオプロセス・インフラとしてきわめて有望なものとして期待され、今後、適切な知財の確保に努めながら研究を進展させる。

研究成果の実現可能性

3-ヒドロキシ酪酸の機能については、脳幹、胎盤を通り、ヒトのエネルギー源として利用され、また、がん細胞には利用できないことは従来知られていたが、最近、3-ヒドロキシ酪酸が、炎症を引き起こすタンパク質の一部「NLRP3」の発現を直接抑えることにより炎症性の病気、例えば、2型糖尿病、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化などの発生を抑制する可能性が、マウスを用いた実験で明らかになった(Youm et al., 2015)。それゆえ用途は、バイオプラスチックの合成原料のみならず、安全な生体のエネルギー物質として輸液や目薬の原料、また抗生物質の合成出発物質などとしての利用できる。10年以内の実用化を目指し、当初は販売価格の高い医薬品原料としての利用を目指す。その後、木材糖化プロセスも含め製造プロセスを改良し、微生物では合成が難しい超高分子、異種分子とのコポリマーなど、新たな物性を持ったポリマーを、現在の微生物ポリエステルの価格(1000円/kg)を目標に製造する。将来は、工業製造に適

したハロモナス菌の優位な点を生かして、他の化学基幹品の製造のインフラとして活用することも視野に入れ検討する。

結論

木材から3-ヒドロキシ酪酸(3-HB)の生産技術について、3-HBの生産性、メカニズム等について検討を行った。ハロモナス菌は、木材に含まれるキシロースなどC5糖の利用可能であり、培地の滅菌が不要で、安価な人工培地で生育が早いなど種々の商業的な培養に適した特性を持っている。3-ヒドロキシ酪酸の生産効率についても、十分商業的に成立するレベルに達しており、今後、糖化プロセスのコスト低減、培養プロセスのさらなる改善を経て、企業と共同で、早期の実用化が可能か検討を継続する。

1. 研究背景と目的

国内外で、非可食バイオマスからバイオエタノールの生産が進められている。非可食バイオマスの多くを占めるリグノセルロースは、グルコースなどの C6 糖と、キシロース、アラビノースなどの C5 糖からなり、通常のエタノール発酵酵母は C5 糖を利用できないため、C5 糖の利活用が課題となっている。一方、日本では化成品製造を目的として、約 21%の石油を消費しており、非在来型の石油、天然ガスの商業生産がはじまりつつあるが、早晚、化石資源の石油から再生可能資源への転換が求められている。我々は、環境省・循環型社会形成推進科学研究費補助金「ハロモナス菌を用いた BDF 廃グリセロール利活用によるバイオプラスチック PHA 生産」(平成 20~22 年)において、独自のハロモナス菌を、バイオディーゼル廃グリセロールを炭素源に、好気条件下培養して、バイオプラスチック PHA を生産することを成功した。さらに、プロジェクト終了後、PHA を生産、蓄積する好気条件から、培養条件を微好気培養に変更するだけで、ハロモナス菌が蓄積した PHA を分解し、そのモノマーである 3-ヒドロキシ酪酸を培地に分泌することを見いだした。

本ハロモナス菌は、中程度高塩濃度、pH9-10 の培地で良好に生育するため、雑菌の増殖を認めず、培地の滅菌操作の必要がない。今後、未精製の炭素源を利用できること、省エネルギーなプロセスであること、光学活性化合物が生産できること等の優位性を生かし、スギ間伐材などの非可食の余剰バイオマス資源から 3-ヒドロキシ酪酸などの化成品中間体を生産する基礎技術を確立し、将来は、企業での事業化を通じて、持続可能社会実現に向けた環境政策へ貢献する。具体的には、我々の発見した独自菌株ハロモナス KM-1 株を用い、木材から 3-ヒドロキシ酪酸等を生産する基礎技術を確立するため、商業的な生産の目標値である生産量 100 g/L、生産速度 1.0 g/L・h の達成を目的に研究を実施した。

2. 研究方法

我々の発見した独自菌株ハロモナス KM-1 株を用い、木材から 3-ヒドロキシ酪酸等を生産する基礎技術を確立するため、分泌量の向上、培養阻害物質への一層の耐性の向上をはかる。本年度は、商業的な生産の指標生産量 100 g/L、生産速度 1.0 g/L・h の達成を目的に研究を実施した。本目的を解決するため、以下の実験を実施した。

2. 1 木材糖化液の調製

木材糖化液は、スギおよび広葉樹（ユーカリ・アカシア混合）パルプを原料として作成した。スギ糖化液の原料パルプは、森林総合研究所の北秋田木質バイオエタノール製造実証施設でスギチップをソーダ・アントラキノン蒸解したスギパルプを次亜塩素酸ナトリウム、あるいはオゾンで漂白したものをを用いた。広葉樹糖化液の原料パルプは、製紙会社から提供された広葉樹クラフトパルプ（漂白済み）を用いた。

ソーダ・アントラキノン蒸解は 1,4-dihydro-9,10-dihydroxyanthracene disodium salt を 0.1%含む 3.8%水酸化ナトリウム液に液量の 20%のスギチップ（乾燥物換算）を混合し、パండిア式蒸解釜で 168℃、2 時間行った。黒液をプレス機で除去後、水洗し、スギパルプとした。

次亜塩素酸ナトリウム漂白は、スギパルプ（乾燥物換算）に対して活性塩素が 3%量の次亜塩素酸ソーダを加えて 18 時間漂白し、再度水洗後、脱水して得た。オゾン漂白は、パルプ濃度 10%とし、NaOH を対パルプ 10%添加し、O₂ ガス 6 kg/cm²、90℃、60 分処理を 2 回実施した後、リン酸で pH2.55 にした後、常温でパルプに対し 2%のオゾンで処理して作成した。

酵素糖化は 3L のバッフル付三角フラスコにパルプ固形分濃度 3%から 18%になるように投入し、イオン交換水で懸濁し、全量 1L とした。これをクエン酸で pH 調整(pH5.0)後、滅菌し、糖化酵素として GC220 (Genencoa) 5~8 FPU/g-pulp と Novozyme188 (Novo) 5

～10unit/g-pulp を 0.2 μ m フィルターで無菌ろ過して添加し、50℃で 40～336 時間回転攪拌して作成した。糖化液はオートクレーブで失活後、遠心分離で残渣を除き、必要に応じてロータリーエバポレーターで濃縮した。

パルプ濃度 5%までは糖化率は 95%以上となったが、パルプ濃度 10%では、糖化率 90%となり、パルプ濃度 18%では、糖化率 80%程度に低下した。また、パルプ濃度の増加に伴って糖化時間を長くしなければ糖化率 80%に到達しなかった(Ikeda et al. 2009)。

2. 2 菌体の培養（回分培養、半回分培養）

我々が取得した *Halomonas* sp. KM-1 株は、International Patent Organism Depository, NITE に FERM BP-10995 として寄託した。他の、実験に使用したハロモナス菌は、NBRC (Chiba, Japan) または、ATCC culture collections (Virginia, USA) より購入した。菌株間の生育を、下記の 4 種の培地を用い比較した。

[1] SOT medium (pH 9.0、国立環境研究所 HP 参照)に、1%のグルコースを加えたもの

[2] SOT medium (pH 9.0) に、3%のグリセロールを加えたもの

[3] NBRC 306 medium (pH 7.0) NBRC のハロモナス菌の推奨培地（ポリペプトン、酵母エキス含む）

[4] Marine Broth 培地 (pH 7.6) (Difco, USA) (ポリペプトン、酵母エキス含む)

[5] Marine Broth 培地 (pH 7.6) (Difco, USA)に、3%グリセロールを添加したもの。

さらに、*Halomonas* sp. KM-1 株による PHB 生産の検討の場合には、SOT medium を改変した以下の組成の培地“SOT 改”を用い、これを基準とし、適宜炭素源を添加し、検討した。

また、木材糖化液を利用する際には、SOT 改の組成となる塩を、木材糖化液に溶解して使用した。微好気条件に移行する前に、窒素添加を行う場合は、2.5g/L 相当の硝酸ナトリウムまたは 0.875 g/L 相当の尿素を、微好気条件移行 12 時間前に添加した。

木材糖化液は、森林総合研究所が、森林整備効率化支援機械開発事業（林野庁）で建設した実証プラント(北秋田市)で、スギチップより生産されたものを使用した。

SOT 改

12.6 g/L	NaHCO ₃	2.86 mg/L	H ₃ BO ₃
5.3 g/L	Na ₂ CO ₃	1.81 mg/L	MnSO ₄ ·7H ₂ O
2.0 g/L	K ₂ HPO ₄	0.222 mg/L	ZnSO ₄
12.5 g/L	NaNO ₃	0.079 mg/L	CuSO ₄ ·5H ₂ O
1.0 g/L	K ₂ SO ₄	0.39 mg/L	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
1.0 g/L	NaCl	0.049 mg/L	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O
0.2 g/L	MgSO ₄		
0.04 g/L	CaCl ₂		
0.01 g/L	FeSO ₄ ·7H ₂ O		
0.08 g/L	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	pH 9.4	

試験管・好気培養

20ml 容の試験管に 5mL の培養液を入れ、33°C、135rpm 往復振とう、3 日間培養した。

フラスコ・好気培養、微好気培養

200ml 容のヒダ付きフラスコに 20mL の培地を入れ、33°C、200rpm 回転振とうで好気培養を行った。適宜、微好気培養へ移行する場合には、回転数を 50rpm に減じた。給気条件を検討する場合には、回転数を 100rpm、0rpm(静置)に変え実施した。

各試験は、3 回実施した。

添加する窒素の検討

窒素添加を行う場合には、12 時間ごとに硝酸ナトリウムを、2.5g/L 相当添加した。さ

らに、硝酸ナトリウムに加えて、尿素を用いた検討も実施した。尿素の場合は、2 等量の窒素を含むため 1 / 2 モル相当を添加した。

2. 3 フェルメンターによる培養試験

フェルメンターによる培養試験は、バイオット社微生物培養装置 BMZ-P を用いて行った。通常 1 L 容の培養槽に、400 mL の培地を添加し、滅菌せずに培養した。24 時間までは、DO30%、それ以降は 10%程度に維持し、微好気培養の場合には、空気供給を停止し、攪拌のみを 200rpm で維持した。

2. 4 バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の分析

バイオプラスチック PHB 及び 3-ヒドロキシ酪酸は、Ishizaki and Tanaka (1991)及び Monteil-Rivera et al.(2007)の手法に従い、ガスクロマトグラフィーにより分析した。概略は以下の通りである。培養菌体サンプルは、基本的には 12 時間おきに 0.25 mL を採取し、必要に応じ、6 時間おきに採取し、20,400 g で 3 分遠心分離し、蒸留水を加え、懸濁、遠心、上清の除去を 2 回繰り返した。このサンプルを遠心乾燥機で 3 時間乾燥した。これを秤量後、メチルエステル化反応を行い、ガスクロマトグラフィー分析に供した。

3-ヒドロキシ酪酸の分析は、ガスクロマトグラフィーと液体クロマトグラフィーを用いて分析した。ガスクロマトグラフィーの場合、50 μ L の培養上清液を、遠心乾燥機で 1 時間乾燥し、メチルエステル化反応を行い、同じくガスクロマトグラフィー分析に供し分析した (Ishizaki and Tanaka (1991)及び Monteil-Rivera et al.(2007)) 液体クロマトグラフィーの場合、培養液を遠心分離して上清のみ採取し、40 μ L 程度を 10 倍に水にて希釈し、これを示唆屈折角の検出器を備えた HPLC(島津製作所製 示差屈折計検出器 RID-10A 型、または UV-VIS 検出器 SPD-20A システムコントローラ CBM-20ALite(JP)、送液ポンプ LC-20ADXR、7725I インジェクターASSY、カラムオー

ブン CTO-20A、ワークステーション LABSOL SINGLE LC)にて分析した。分析カラムは、BIORAD 社アミネックス HPX-87H カラムを用い、溶離液 0.008N 硫酸、流速 0.6mL/min、カラム温度 35°Cにて分析したところ、おおよそ 7.9 分にクエン酸、8.7 分にグルコース、9.3 分にピルビン酸、12.1 分に乳酸、13.3 分に 3-ヒドロキシ酪酸、14.9 分に酢酸がそれぞれ溶出した。

2. 5 培地中の糖、有機酸の分析

糖組成は、キャピラリー電気泳動もしくは液体クロマトグラフィーを用いて分析した。キャピラリー電気泳動の場合、従来手法 (Zhang et al., 2003) に従い、1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (Wako, Osaka, Japan)を用いて、糖を修飾し、糖試薬 (D-glucose、D-xylose、L-arabinose (Wako)を標準物質として分析した。液体クロマトグラフィーの場合、上記、3-ヒドロキシ酪酸の場合と同じく分析した。

2. 6 全炭素窒素分析装置による培地上清の分析

培養液を遠心分離して上清のみ採取し、40 μ L 程度を 10 倍～100 倍に水にて希釈し、これを、全窒素分析装置のついた全有機炭素計(島津製作所製 TOC-L CSN)にて分析した。標準液の調整、キャリアガス圧力、電気炉温度等は標準の設定を用いた。

2. 7 化学固定法による電子顕微鏡観察

電顕用超薄切片試料の作製と透過電子顕微鏡による観察は、常法に従って行った。東海電子顕微鏡株式会社の分析サービスを利用した場合のプロトコールは次のとおりである。細胞の化学固定 (前固定) のために、室温において菌体を含む培養液に同体積の固定液 (4%パラホルムアルデヒドと 4%グルタルアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液、pH7.4) を加えた後、4°Cでの遠心によって菌体を沈降させ、別の固定液 (2%グルタルア

ルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液、pH7.4) を加えて懸濁し 4°C にて一夜固定処理を行った。次に、グルタルアルデヒドを除去するため、0.1M リン酸緩衝液による洗浄（遠心操作）を 3 回行い、2% 四酸化オスミウムを含む 0.1M リン酸緩衝液での処理（4°C、3 時間）によって後固定を行った。試料の脱水を、エタノール水溶液の上昇系列（50%、70%、90%、100%）を通すことによって行い、試料をプロピレンオキサイド（PO）、PO と樹脂（クエトール 812、日新 EM）の 70:30 混合液、そして 100% 樹脂の順番に移して樹脂浸透をさせた。樹脂重合は、60°C にて 48 時間の処理で行った。試料が包埋された樹脂ブロックをウルトラミクロトーム上でダイヤモンドナイフによって切り出し、得られた切片に 2% 酢酸ウランによる染色と鉛染色を施した。超薄切片を載せた電顕用グリッドを、透過電子顕微鏡（日本電子 JEM-1200EX、加速電圧 80kV）によって観察した。産業技術総合研究所において実施する場合には、以下の手法に従った。段階的な好気・微好気的条件下で培養した場合の KM-1 株の微小形態の変化を、超薄切片電子顕微鏡法と電子線トモグラフィ法によって解析した。

電顕用超薄切片試料の作製と透過電子顕微鏡による観察は、常法に従って行った。細胞を二重化学固定（グルタルアルデヒドと四酸化オスミウム）で処理した後、エポン樹脂に包埋した。2% 酢酸ウラニルによるブロック染色を施した樹脂ブロックをウルトラミクロトーム上でダイヤモンドナイフによって約 70nm の厚さで切り出し、得られた切片に 5% 鉛染色による染色を施した。超薄切片を載せた電顕用グリッドを、透過電子顕微鏡（日立 H-7600、加速電圧 80kV）によって観察した。

電子線トモグラフィによる菌体の三次元像の再構築のためには、上の方法で作製した樹脂ブロックから約 600~1000nm の厚さの準超薄切片を切り出して観察に用いた。このように厚い試料では菌体が切り取られることなく一つの菌体全体が保存される可能性があるが、その厚さを通常の透過電子顕微鏡で撮像することは困難である。しかし、より透過性に優れた高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡法（HAADF-STEM）では、

数百 nm の試料厚でも観察が可能になる。透過電子顕微鏡 (FEI、TecnaiG2F20、加速電圧 120kV) の HAADF-STEM モードにおいて、KM-1 株の準超薄切片試料を ±60 度程度の試料傾斜角度内で 1 度ずつ回転させながら連続画像を取得した後、ソフトウェア Inspect3D (FEI) および Avizo5 (MCS) を用いて三次元再構築計算と可視化処理を行った。

2. 8 ゲノム DNA の調整

通常のゲノム DNA は、TaKaRa バイオ社の NucleoSpin® Tissue を用いて精製した。次世代シーケンサーに供したゲノム DNA は、TaKaRa バイオ社の NucleoBond AXG 20 を用いて精製した。

2. 9 ゲノム解析

ゲノム DNA の濃度は、リアルタイム PCR 装置を用い測定した。50 μ L の上清サンプルを脱塩のためにエタノール沈殿し、乾燥後、50 μ L 蒸留水に溶解した。ハロモナス菌特異的な 16S rRNA シーケンス (DNA Data Bank of Japan, Japan) から、forward 832f プライマー (5'-TGGGTCCTTCGCGACTTT-3') と、reverse 1016r プライマー (5'-CGTCTCCGAAGGGTTCGCAGG-3') を作成した。それぞれのプライマーは、大腸菌では、それぞれ 832-850、995-1016 (*E.coli* 番号) の位置に相当する。

リアルタイム PCR 反応では、1 μ L の上清サンプル溶液を、10 μ L of 2 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus (Toyobo, Japan) および各 12 pmol の 832f と 1016r のプライマーと混合し、ミリ Q 水を加え 20 μ L とした。ハロモナス菌のゲノム DNA をコントロールに、StepOne real-time PCR 装置 (Applied Biosystems, USA) を用いて通常のプロトコール (15 秒 95°C、1 分 60°C で 40 サイクル) を行い、その後、熱変性ステップで、乖離カーブにより、増幅の特異性を確認した。

ゲノム遺伝子の解析は、各種検討を行った結果、次世代シーケンサーPacBio RS II を用い、物理的に断片化した長鎖 DNA からライブラリーを作製して、1 分子リアルタイム (Single Molecule Real-Time; SMRT) DNA シーケンスにより実施した。

2. 1 0 ハロモナス菌遺伝子の情報解析(原核遺伝子予測)

シーケンスで得られたリードをシーケンサー付属のソフトウェア SMRT Analysis1 (RS_HGAP_Assembly.2) を用いて de novo アセンブルを行った。このゲノムドラフト配列に対して、遺伝子予測解析 (遺伝子領域予測およびアノテーション、コンティグの整列化) を行った。

2. 1 1 全RNAの調整

通常のゲノム DNA は、TaKaRa バイオ社の NucleoSpin® RNA を用いて精製した。トランスクリプトーム分析に供する場合は、Illumina 社の Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)を用いて、リボゾーム RNA を除去し、分析に供した。

2. 1 2 mRNA定量による遺伝子発現量の分析 (リアルタイム PCR)

遺伝子の発現量は、ゲノム DNA から推定した遺伝子配列を元に、PHB 合成遺伝子 (PhaC)、PHB 分解遺伝子(PhaZ)、コントロールとして 16S リボゾーム RNA のそれぞれの RNA の発現量、cDNA をテンプレートにして、リアルタイム PCR 装置を用いて増幅して測定した。それぞれの遺伝子のプライマーは、PHB 合成遺伝子(PhaC) forward (phaC-F: 5' -AACTTCGTCACCACCAACCC-3') および reverse (phaC-R: 5' -GTTCTCGTAAACCACGTAGCC-3'), PHB 分解遺伝子(PhaZ) forward (phaZ-F: 5' -ACAGTGGTCTCAACGAGTGG-3') and reverse (phaZ - R: 5' -TGCTCATCAGTGCCTTGAC-3')および、16S rRNA は、forward 832f プライマー

(5'-TGGGTCCTTCGCGGACTTT-3') と、reverse 1016r プライマー (5'-CGTCTCCGAAGGGTTCGCAGG-3')を用いた。リアルタイム PCR 反応では、1 μ L の全 RNA サンプル溶液を、10 μ L of RNA-direct SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO 社)および各 12 pmol の各プライマーを混合し、ミリ Q 水を加え 20 μ L とした。ハロモナス菌のゲノム DNA をコントロールに、StepOne real-time PCR 装置 (Applied Biosystems, USA) を用いて通常のプロトコール (15 秒 95°C、15 秒 55°C、45 秒 74°C で 45 サイクル)を行い、その後、熱変性ステップで、乖離カーブにより、増幅の特異性を確認した。それぞれの発現量を 16S リボゾーム RNA の発現量で標準化して比較した。

2. 1.3 mRNA定量による遺伝子発現量の分析 (トランスクリプトーム解析)

上記手法で、精製した mRNA の品質検定を実施した後、TruSeq Standard mRNA Sample Preparation Guide Rev. E(イルミナ社)に従い、TruSeq Standard mRNA LT Sample Prep Kit(イルミナ社)を用いて、ライブラリーの作成を行った。すなわち、mRNA 解析検体を断片化し、ランダムプライマーを用いて一本鎖 cDNA を合成し、これを鋳型として dUTP を取り込ませた二本鎖 cDNA を合成し、磁気ビーズ法でサイズ選抜を行った。これに index 付きアダプターを付加し、dUTP を含む鎖を選択的に増幅しない位ポリメラーゼにより PCR 増幅し、得られた PCR 産物を精製して、シーケンスライブラリーとした。これを Agilent 2100Bioanalyzer にて分析し、適切な鎖長分布を示したので、HiSeq2000 を用いてシーケンス解析を行った。これによって得られたリード配列から、ERANGE3.2 を用いて、個々の遺伝子の発現量と新規発現候補領域を決定し、それぞれを比較して、注目している遺伝子の発現量を確認した。

2. 1 4 ガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いたメタボローム解析

ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)を用いたメタボローム解析は、以下の手法で実施した。培養液を 500 μ L 採取し、速やかに氷上にて 30 秒冷却する。その後、4 $^{\circ}$ C、20,400 g で 3 分遠心分離し、上清と菌体を分離する。菌体に、氷冷した蒸留水 1.0 mL を加え、懸濁、遠心、上清の除去を 2 回繰り返した。これに、-30 $^{\circ}$ C のメタノールを 1.0 mL 加え、懸濁、さらに-30 $^{\circ}$ C のクロロホルム 1.0 mL と氷上で冷却した蒸留水 1.0 mL を加え、4 $^{\circ}$ C、20,400 g で 10 分遠心分離した。上層 1.5 mL をバイヤルに移し、濃縮乾燥機でメタノール分を除去し、さらに、凍結乾燥を行った。乾燥したサンプルに、20 mg/mL methoxyamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) のピリジン溶液 50 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C で 90 分間オキシム化反応を行った。さらに、1% trimethylchlorosilane を含む N-methyl-N-trifluoroacetamide (MSTFA) (Thermo, USA) を 100 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分 TMS 化反応を行った。

反応後のサンプルを、GCMS-QP2010 Ultra system (Shimadzu) にて分析した。分析条件は、fused silica capillary column (CP-SIL 8 CB low bleed/MS, 30 m \times 0.25 mm i.d., film thickness, 0.25 μ m; Technologies, USA) を用い、front inlet 温度 230 $^{\circ}$ C、ヘリウムガス流速 1.0 mL/min、injector split ratio 1:25、injection volume 1.0 μ L、solvent delay 4 分で行った。Injector および source 温度は、それぞれ 250 $^{\circ}$ C、200 $^{\circ}$ C に設定した。カラム温度は、80 $^{\circ}$ C で 2 分保持した後、15 $^{\circ}$ C/分で、330 $^{\circ}$ C まで昇温し、その後、6 分間保持 330 $^{\circ}$ C で保持した。質量分析装置は、electron impact ionization mode で 70 eV で測定した。データは、full scan mode で、m/z 85 から 500、scan time 0.05 秒 で測定した(Tsugawa et al., 2011)。

取得したデータは、ピーク分析の前に、MetAlign software にてノイズ除去を行った。カラムや TMS 化試薬に由来するピークはすべて除去した。定量分析のために、21 種類の化合物について標準品を用いて分析した。内部標準 ribitol を用いて、それぞれの化合物を定

量した。

2. 15 キャピラリー電気泳動質量分析装置を用いたメタボローム解析

キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)を用いた代謝物の解析は以下の手法で行った。GC-MSの分析手法と同じく、菌体の回収、洗浄を行った。その後、速やかに、メタノール 1.6 ml、クロロホルム 1.6 ml、さらに蒸留水 0.64ml を加え、20,400 g で 5 分遠心分離を行い、上清を回収、乾固させ、再度蒸留水に溶解して、菌体サンプルとした。培地のサンプルの場合は、培地上清を限外ろ過し、培地サンプルとした。

キャピラリー電気泳動 TOF-MS 分析は、Agilent 社 CE-TOF MS system (Agilent Technologies) の装置で、fused silica capillary column (80 cm x 50 µm i.d.) を用いて、陽イオンモード、陰イオンモードで分析した。

2. 16 ラットによる乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の経口毒性試験

ラットによるハロモナス菌乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の経口毒性試験は、3-ヒドロキシ酪酸の急性毒性試験と、ハロモナス菌乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の亜急性毒性試験をそれぞれ実施した。3-ヒドロキシ酪酸の急性毒性試験の場合には、各群につき雌雄それぞれ 5 匹を用い、投与前に約 18 時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、試験群には 2000 mg/kg の用量の検体を、対照群には注射用水をそれぞれ 20 mL/kg の投与容量で胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。観察期間は 14 日間とし、投与日は頻回、翌日から 1 日 1 回の観察を行った。投与後 7 及び 14 日に体重を測定し、t-検定により有意水準 5 % で群間の比較を行った。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。ハロモナス菌乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の亜急性毒性試験の場合には、ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸を注射用水にそれぞれ懸濁及び溶解し、0 (媒体)、各被験物質それぞれ 1000 及び 2000 mg/kg/日の投与量で計 5 群、6 週齢の Crl:CD(SD) SPF ラット (1 群雌雄各 6 匹) に、投与容量 10 mL/kg 体重とし、4 週間胃ゾンデを用いて強制経口投与し、その毒性を検討した。

3. 研究結果と考察

3. 1 木材糖化液の性状、組成について

木材糖化液は、褐色の液体で得られた。リグニンは検出できない程度に除去されていた。また、発酵を阻害する糖の変性物（ヒドロキシメチルフルフラール）なども検出できなかった。糖組成については、HPLC（Shodex SP0810 カラム）により分析した平均的な糖組成を表 1 に示す。

表 1 木材糖化液組成

	Glucose	Manose	Xylose	C6 糖/C5 糖
スギ	89.4%	6.3%	4.2%	95.7/4.2
広葉樹(アカシア、ユーカリ)	84.3%	0.0%	15.7%	84.3/15.7

スギを原料とする場合は、グルコースのほかにマンノースとキシロースを含み、五炭糖は 4.2%、広葉樹を原料とする場合は、グルコースとキシロースで構成され、五炭糖は 15.7%であった。糖化時間が短いものでは、セロビオースを数%含むものもあった。

スギを原料とした場合の 1 試料のマスバランスを図 1 に示す。木材チップ 1000kg から 378kg の糖が生産できる計算となった。ここで糖製造時のロス分としてパルプ 71kg としたのは、糖化後の残渣除去時のロス分を計上してある。黒液は製造時に熱エネルギーと電気に使用するが、黒液の 38%は余剰となるので、マテリアル利用などにも活用できる。

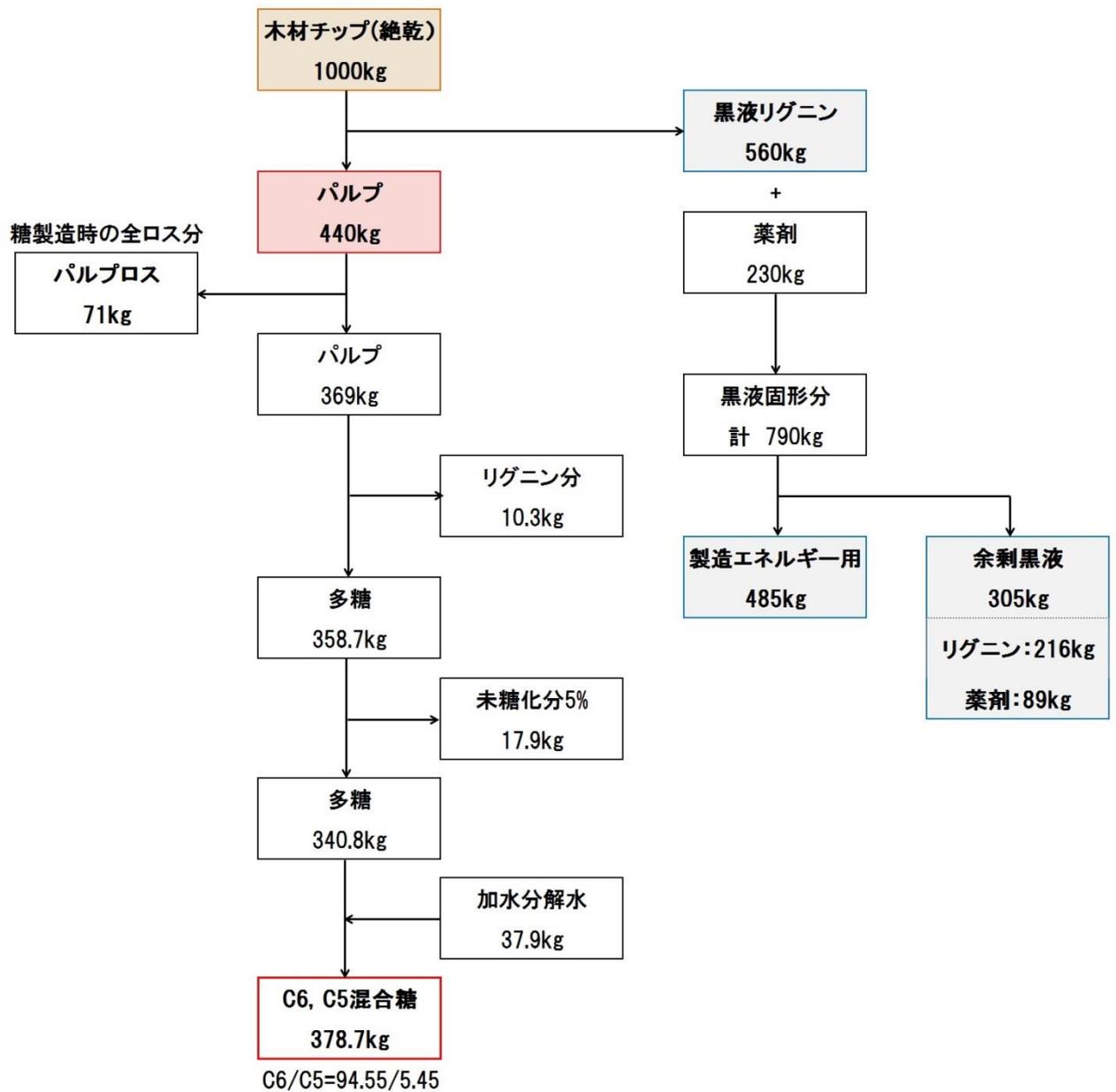


図1 スギを原料とした場合の試料のマスバランス

3. 2 ハロモナス菌の培養、PHB 生産性について

我々が取得した *Halomonas* sp. KM-1 株と、NBRC 13 株、ATCC 2 株のハロモナス菌の生育を比較した(表 2)。SOT 培地は、栄養塩と炭素源からなり、NBRC306 培地、Marine Broth 培地は、栄養塩に加えてトリプトンや酵母エキスなどを含む。SOT 培地

では、KM-1 株も含め 5 株のみが成育した。NBRC306 培地、Marine Broth 培地では、高塩濃度を生育に要求する *H. subglaciescola* NBRC 14766^T のぞき 14 種類のハロモナス菌が生育した。まず、市販されている Marine Broth 培地を用いて、試験管培養にて 33℃、3 日間培養して、それぞれの菌体重量、バイオプラスチック PHB の生産量を測定した(表 3)。菌体重量に差はあるものの、いずれも PHB の生産は認められなかった。そこで、Marine Broth 培地に 3%グリセロールを炭素源として加え、菌体重量、バイオプラスチック PHB の生産量を測定した(表 3)。結果、15 種類のうち 8 種類が 10%以上の PHB の蓄積を認め、KM-1 株を含む 4 株は 20%以上の PHB を蓄積した。さらに、SOT 培地での生育が芳しくない *H. halomophila* NBRC 15537^T をのぞいた 4 種類の SOT 培地で生育できる菌株について、炭素源として 3%グリセロールを加え、試験管培養にて 33℃、3 日間培養して、同じく菌体重量、バイオプラスチック PHB の生産量を測定した(表 4)。いずれも、22%以上の PHB の蓄積が得られ、特に KM-1 株は、34%以上の PHB を蓄積した。さらに、KM-1 株について、SOT 改培地を用い、フラスコ培養にて、菌体重量、バイオプラスチック PHB の生産量を測定し、文献の報告値と比較した(表 5、6)。KM-1 株は、試薬のグルコース、グリセロールを用いた場合、PHB を乾燥菌体あたり 80%以上、培養液あたり 40g/L 以上の蓄積し、他のハロモナス菌はもとより、商業培養が検討されている菌株と比べても遜色ない生産性を示した。さらに、バイオディーゼル廃グリセロールを直接培地に混入した場合でも 15g/L 程度の生産性を示した(表 5)。

表2 各種ハロモナス菌の異なる培地による生育

Observation of the Growth of <i>Halomonas</i> Strains in Different Media				
Culture media	SOT with 1% Glucose	SOT with 3% Glycerol	NBRC306	Marine Broth
<i>Halomonas</i> sp.KM-1	+	+	+	+
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	+	+	+	+
<i>H. meridiana</i> NBRC 15608 ^T	+	+	+	+
<i>H. pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	+	+	+	+
<i>H. halomophilia</i> NBRC 15537 ^T	±	±	+	+
<i>H. aquamarina</i> NBRC 101894 ^T	-	-	+	+
<i>H. cupida</i> NBRC 100987	-	-	+	+
<i>H. cupida</i> NBRC 102219 ^T	-	-	+	+
<i>H. elongata</i> NBRC 15536 ^T	-	-	+	+
<i>H. halodenitrificans</i> NBRC 14912 ^T	-	-	+	+
<i>H. halophila</i> NBRC 102604 ^T	-	-	+	+
<i>H. pacifica</i> NBRC 101900	-	-	+	+
<i>H. pacifica</i> NBRC 102220 ^T	-	-	+	+
<i>H. variabilis</i> NBRC 102410 ^T	-	-	+	+
<i>H. venusta</i> NBRC 102221 ^T	-	-	+	+
<i>H. subglaciescola</i> NBRC 14766 ^T	-	-	-	-

Bacterial growth was indicated by mark as negative (-), positive (+), and weakly positive (+/-). All of the observations were repeated at least twice.

表3 各種ハロモナス菌のマリンブロス培地による生育、PHB生産量

Production of the Bioplastic, poly(3-hydroxybutyrate), by <i>Halomonas</i> Strains 1			
	Culture medium	DCW (mg/ml)	PHB (%) in DCW
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Marine Broth	0.72 ± 0.09	0.0 ± 0.0
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	Marine Broth	0.68 ± 0.12	0.0 ± 0.0
<i>H. meridiana</i> NBRC 15608 ^T	Marine Broth	0.82 ± 0.05	0.0 ± 0.0
<i>H. pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	Marine Broth	0.37 ± 0.01	0.0 ± 0.0
<i>H. halomophilia</i> NBRC 15537 ^T	Marine Broth	0.34 ± 0.08	0.0 ± 0.0
<i>H. aquamarina</i> NBRC 101894 ^T	Marine Broth	0.28 ± 0.07	0.0 ± 0.0
<i>H. cupida</i> NBRC 100987	Marine Broth	1.03 ± 0.06	0.0 ± 0.0
<i>H. cupida</i> NBRC 102219 ^T	Marine Broth	0.79 ± 0.10	0.0 ± 0.0
<i>H. elongata</i> NBRC 15536 ^T	Marine Broth	0.42 ± 0.08	0.0 ± 0.0
<i>H. halodenitrificans</i> NBRC 14912 ^T	Marine Broth	0.25 ± 0.10	0.0 ± 0.0
<i>H. halophila</i> NBRC 102604 ^T	Marine Broth	0.61 ± 0.04	0.0 ± 0.0
<i>H. pacifica</i> NBRC 101900	Marine Broth	0.44 ± 0.16	0.0 ± 0.0
<i>H. pacifica</i> NBRC 102220 ^T	Marine Broth	0.64 ± 0.05	0.0 ± 0.0
<i>H. variabilis</i> NBRC 102410 ^T	Marine Broth	0.77 ± 0.10	0.0 ± 0.0
<i>H. venusta</i> NBRC 102221 ^T	Marine Broth	1.03 ± 0.08	0.0 ± 0.0

All of the observations were repeated thrice. Values indicated are means ± standard deviation.

表4 各種ハロモナス菌の異なる培地による生育、PHB生産量

Production of the Bioplastic, poly(3-hydroxybutyrate), by <i>Halomonas</i> Strains			
	Culture medium	DCW (mg/ml)	PHB (%) in DCW
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Marine Broth with 3% Glycerol	0.67 ± 0.31	24.8 ± 5.0
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ¹	Marine Broth with 3% Glycerol	0.60 ± 0.09	23.5 ± 1.3
<i>H. meridiana</i> NBRC 15608 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.80 ± 0.15	5.0 ± 2.0
<i>H. pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.40 ± 0.21	22.6 ± 6.0
<i>H. halomophilia</i> NBRC 15537 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.41 ± 0.09	0.0 ± 0.0
<i>H. aquamarina</i> NBRC 101894 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.32 ± 0.08	12.3 ± 2.0
<i>H. cupida</i> NBRC 100987	Marine Broth with 3% Glycerol	1.07 ± 0.21	15.4 ± 2.3
<i>H. cupida</i> NBRC 102219 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.86 ± 0.25	2.2 ± 1.0
<i>H. elongata</i> NBRC 15536 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.44 ± 0.20	2.5 ± 1.2
<i>H. halodenitrificans</i> NBRC 14912 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.30 ± 0.12	2.2 ± 1.5
<i>H. halophila</i> NBRC 102604 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.68 ± 0.15	12.8 ± 2.0
<i>H. pacifica</i> NBRC 101900	Marine Broth with 3% Glycerol	0.50 ± 0.25	18.0 ± 3.2
<i>H. pacifica</i> NBRC 102220 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.70 ± 0.32	25.1 ± 6.0
<i>H. variabilis</i> NBRC 102410 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.70 ± 0.18	5.3 ± 2.0
<i>H. venusta</i> NBRC 102221 ^T	Marine Broth with 3% Glycerol	0.98 ± 0.15	10.5 ± 1.8
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	SOT with 3% Glycerol	1.85 ± 0.06	34.2 ± 1.9
<i>H. campisalis</i> ATCC 700597 ^T	SOT with 3% Glycerol	1.58 ± 0.08	24.4 ± 0.4
<i>H. meridiana</i> NBRC 15608 ^T	SOT with 3% Glycerol	1.40 ± 0.08	25.0 ± 1.6
<i>H. pantelleriensis</i> ATCC 700273 ^T	SOT with 3% Glycerol	0.79 ± 0.05	22.5 ± 1.7

All of the observations were repeated thrice. Values indicated are means ± standard deviation.

表5 各種細菌の異なる炭素源によるバッチ培養による PHB 生産

Comparison of PHA yields achieved in batch systems (shake flasks and fermentors)						
Organism	Carbon source	PHA content (wt.%)	CDW (g l ⁻¹)	PHA concentration (g l ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Reference
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Glucose	79.3	51.1	40.5	1.67	This work
	Glycerol	80.2	50.5	40.5	1.04	
	Waste Glycerol	60.0	24.8	14.9	0.58	
<i>Halomonas boliviensis</i>	Sucrose	54.0	14.0	7.7	0.40	Quillaguamán et al. 2007
<i>Alcaligenes latus</i>	Sucrose	83.0	14.0	11.5	0.39	Wang and Lee 1997
<i>Azotobacter vinelandii</i> ^a	Glucose	74.0	10.0	7.5	0.30	Page 1992
<i>Escherichia coli</i> ^a	Glucose	80.8	8.9	7.2	0.15	Lee et al. 1994
<i>Wautersia eutropha</i>	H ₂ /CO ₂	76.0	17.0	13.0	0.18	Heinze and Lafferty 1980
<i>Wautersia eutropha</i> ^a	Glucose	54.0	9.4	5.1	0.11	Doi et al. 1988
<i>Haloferax mediterranei</i>	Starch	67.0	9.7	6.5	-	Lillo and Rodriguez-Valera 1990 ; Rodriguez-Valera and Lillo 1992

表 6 KM-1 株の半回分培養による PHB 生産の向上

バイオプラスチックPHB生産量の比較						
Organism	Carbon source	PHB content (wt.%)	CDW (g l ⁻¹)	PHB concentration (g l ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Reference
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Glucose	79.3	51.1	40.5	0.48	バッチ培養
	Glucose	88.7	96.4	89.3	1.06	半回分
<i>Halomonas boliviensis</i>	Sucrose	54.0	14.0	7.7	0.40	Quillaguamán et al. 2007
<i>Alcaligenes latus</i>	Sucrose	83.0	14.0	11.5	0.39	Wang and Lee 1997
<i>Azotobacter vinelandii</i> ^a	Glucose	74.0	10.0	7.5	0.30	Page 1992
<i>Escherichia coli</i> ^a	Glucose	80.8	8.9	7.2	0.15	Lee et al. 1994
<i>Wautersia eutropha</i>	H ₂ /CO ₂	76.0	17.0	13.0	0.18	Heinzle and Lafferty 1980
<i>Wautersia eutropha</i> ^a	Glucose	54.0	9.4	5.1	0.11	Doi et al. 1988
<i>Haloferax mediterranei</i>	Starch	67.0	9.7	6.5	-	Lillo and Rodriguez-Valera 1990

3. 3 ハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産

好気培養(200rpm)で 36 時間まで培養した後、給気条件を変更(100rpm、50rpm、0rpm)して、菌体濃度(濁度)およびゲノム DNA の溶出量を測定した(図 2)。好気培養では、菌体濃度の上昇が認められるが、50rpm、0rpm では菌体濃度が減少した。そこで、培地に溶出したゲノム DNA の濃度をリアルタイム PCR 法で測定した結果、0rpm ではゲノム DNA の溶出が見られたが、50rpm ではほとんどゲノム DNA の溶出は見られず、溶菌はなかった。さらに、好気条件(コントロール)と、好気条件で 48 時間まで培養した後、微好気条件(50rpm)へ移行したものについて、菌体重量、PHB 生産量、3-ヒドロキシ酪酸生産量、残存する炭素源(グリセロール)、さらに電子顕微鏡の撮影を実施した(図 3, 4)。微好気条件に変更した場合、好気条件で蓄積した PHB を分解し、ほぼ定量的に 3-ヒドロキシ酪酸を分泌すること認められ、電子顕微鏡による観察からも蓄積した PHB が分解し

ている様子が認められた。

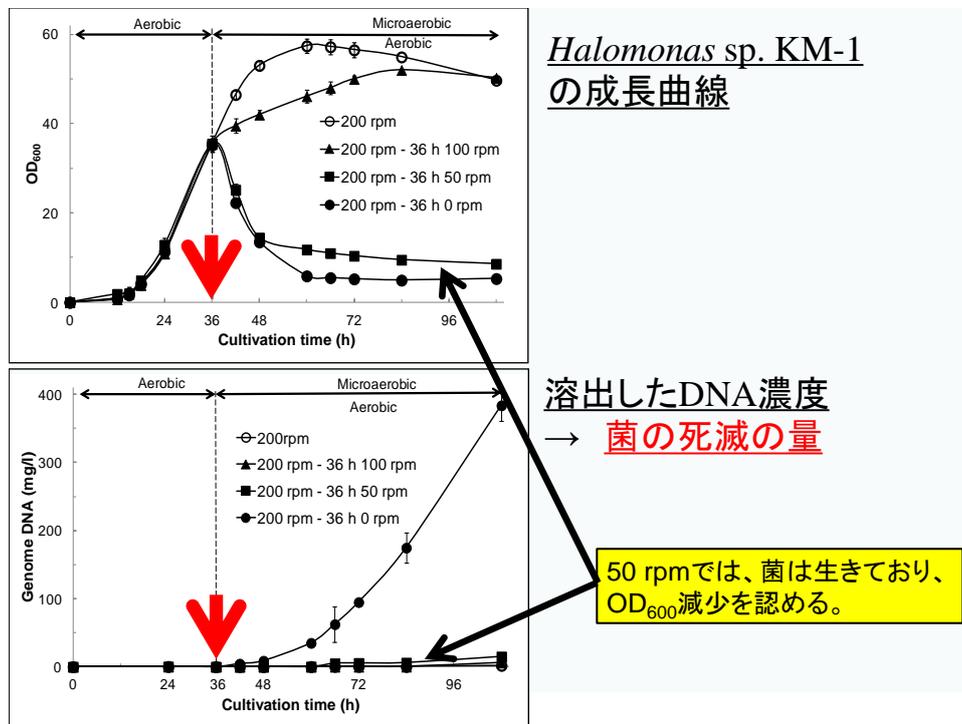


図2 好気条件変更によるハロモナス KM-1 株の OD 変化と DNA 溶出量

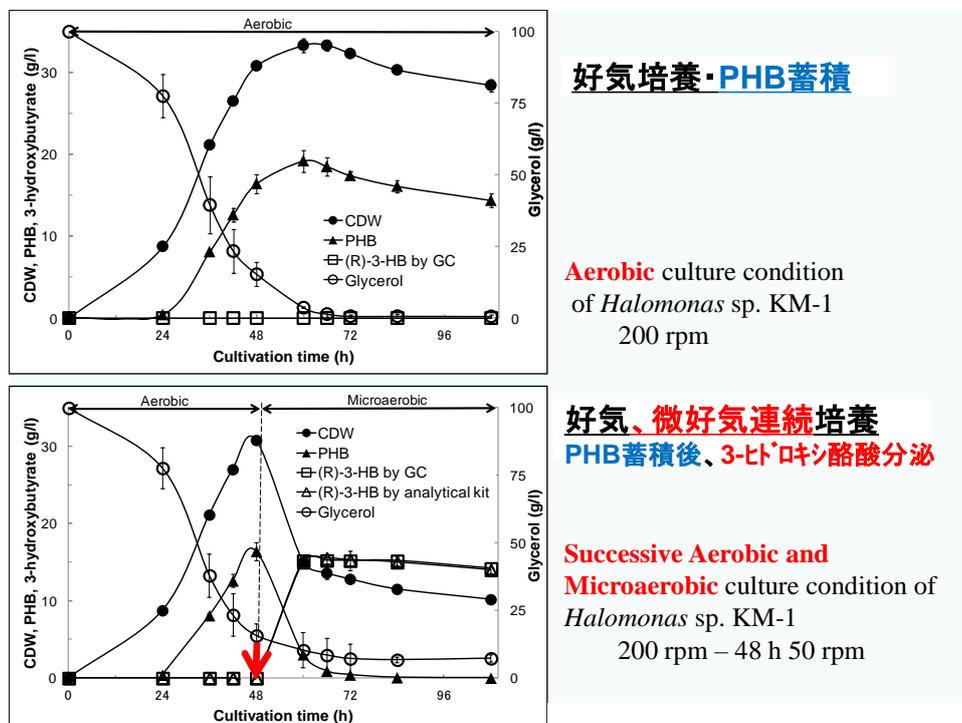


図3 好気、微好気条件による3-ヒドロキシ酪酸の生産

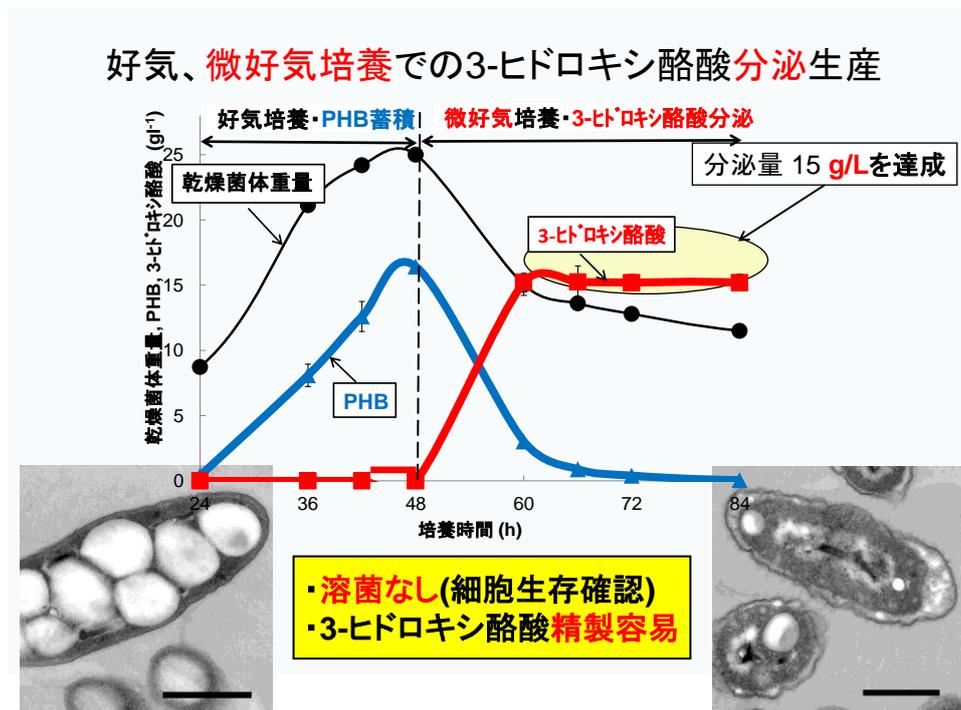
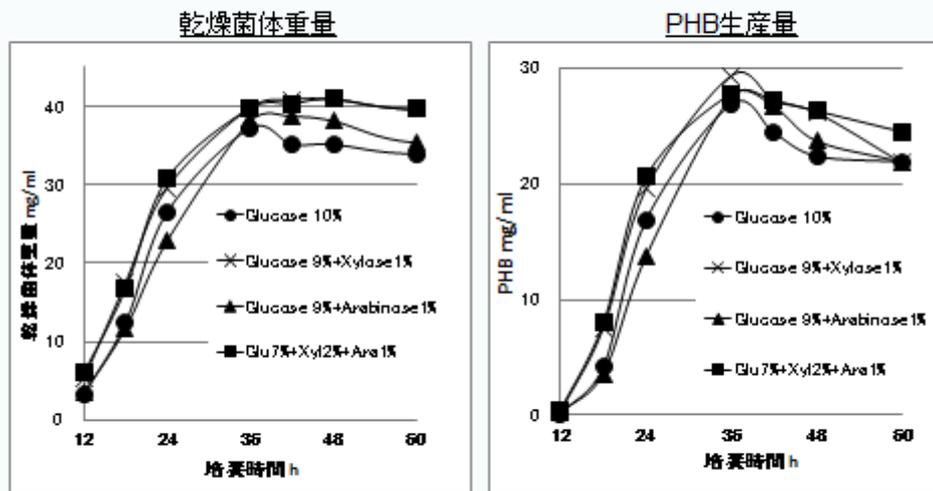


図4 好気微好気条件による3-ヒドロキシ酪酸の生産観察

3. 4 C6糖、C5糖を用いたハロモナス KM-1株によるバイオプラスチック PHB の生産

木材の構成糖の5-30%をC5糖が占めることから、C6糖(グルコース)とC5糖(キシロース、アラビノース)を用いて、バイオプラスチック PHB の生産量を検討した。SOT改培地に、グルコース 10%、グルコース 9%+キシロース 1%、グルコース 9%+アラビノース 1%、グルコース 7%+キシロース 2%+アラビノース 1%を、それぞれ加え、乾燥菌体重量、PHB 生産量、培地中の糖濃度をそれぞれ測定した(図5, 6)。乾燥菌体重量、PHB 生産量ともにグルコースだけものとグルコースとC5糖が混合されたもの間にはほとんど差はなく、36時間の培養で乾燥菌体重量が約40 g/L、PHB 生産量が29-30g/Lであった。培地中のC6糖グルコースとC5糖キシロース、アラビノースの培養液中の残存量を調べたところ、C5糖とC6糖の間に、ハロモナス菌による消費速度の差は認められず、低濃度のC5糖の方が先に消費されていた。

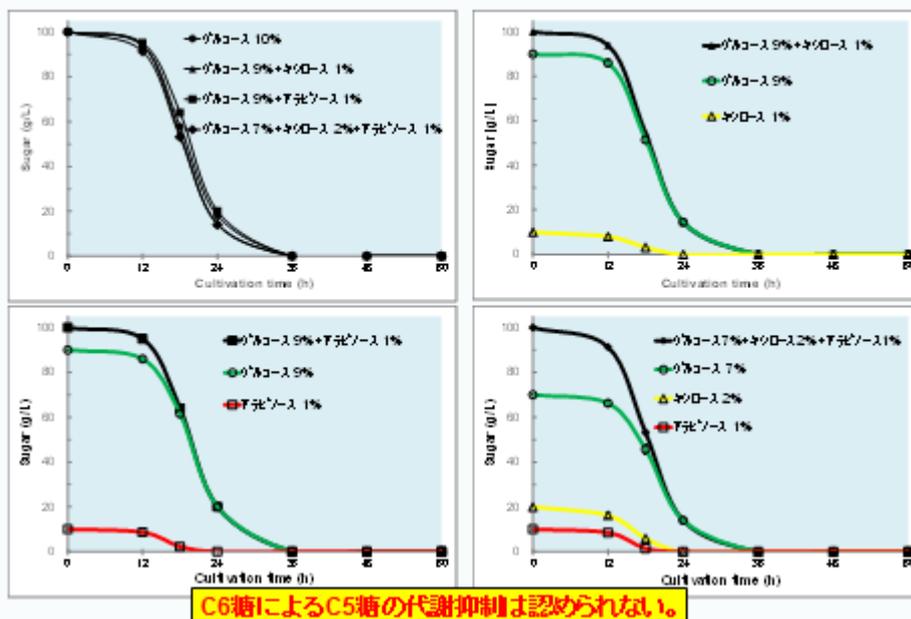
C6糖、C5糖混合好気培養による菌体重量、PHB生産



C6糖、C5糖の利用にほぼ差はない。

図5 C6糖、C5糖混合好気培養による菌体重量、PHB生産

ハロモナス菌のC6糖、C5糖の利用について



C6糖によるC5糖の代謝抑制は認められない。

図6 ハロモナス KM-1 株による C6 糖、C5 糖の利用について

3. 5 スギ木材糖化液を用いたハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産

森林総合研究所にて調整されたスギ木材糖化液を用い、これに SOT 改培地の組成塩を加えて、ハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産を調べた。木材糖化液の糖組成は、95.9 g/L D-glucose, 8.3 g/L D-mannose, 0.3 g/L D-galactose, 5.3 g/L D-xylose, 0.2 g/L L-arabinose であったため、コントロール実験としてグルコース 10% (100 g/L) 含む SOT 改培地を用いた。好気条件の場合、木材糖化液を用いた培養では、24 時間後、36 時間後それぞれ、菌体重量 22.3 g/L, 26.3 g/L、PHB 生産量 8.4 g/L、13.0 g/L が得られた。一方、コントロールの 10%グルコースの場合は、24 時間後、36 時間後それぞれ、菌体重量 28.5 g/L、37.2 g/L、PHB 生産量 17.6 g/L、26.9 g/L が得られた。好気条件の際には、培地中に 3-ヒドロキシ酪酸は検出されなかった。好気培養 24 時間後、微好気培養に移行して 18 時間目には、木材糖化液の場合、菌体重量 15.2 g/L、PHB 生産量 0.6 g/L (菌体内)、3-ヒドロキシ酪酸生産量 8.0 g/L (培養液)が得られた(図 7)。一方、コントロールの 10%グルコースの場合は、菌体重量 16.7 g/L、PHB 生産量 6.1 g/L(菌体内)、3-ヒドロキシ酪酸生産量 12.1 g/L (培養液)が得られた。好気、微好気培養におけるハロモナス菌の状況を、電子顕微鏡で観察した(図 8, 9)

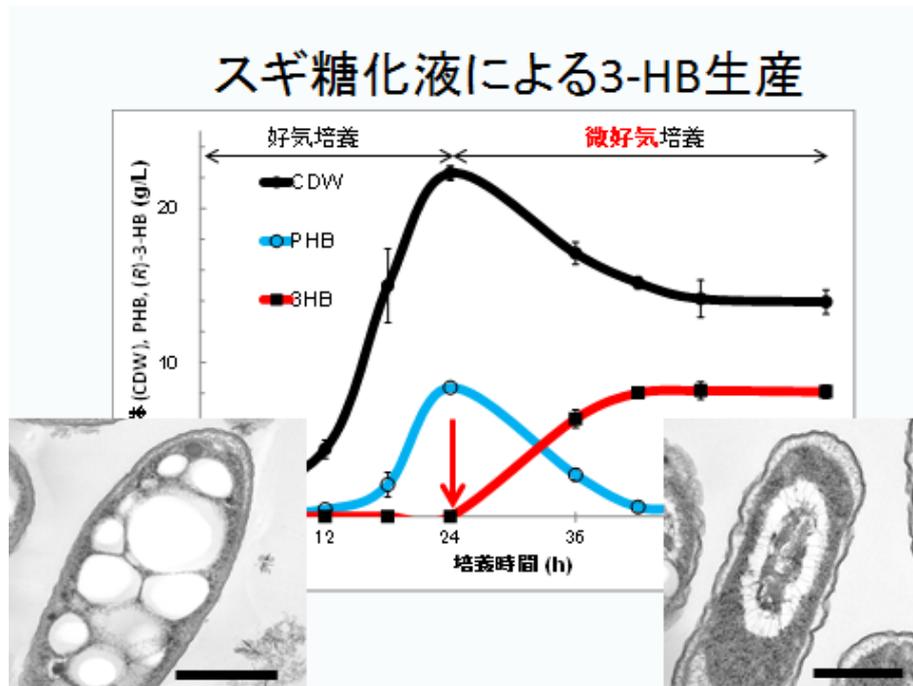


図7 スギ糖化液による3-ヒドロキシ酪酸の生産

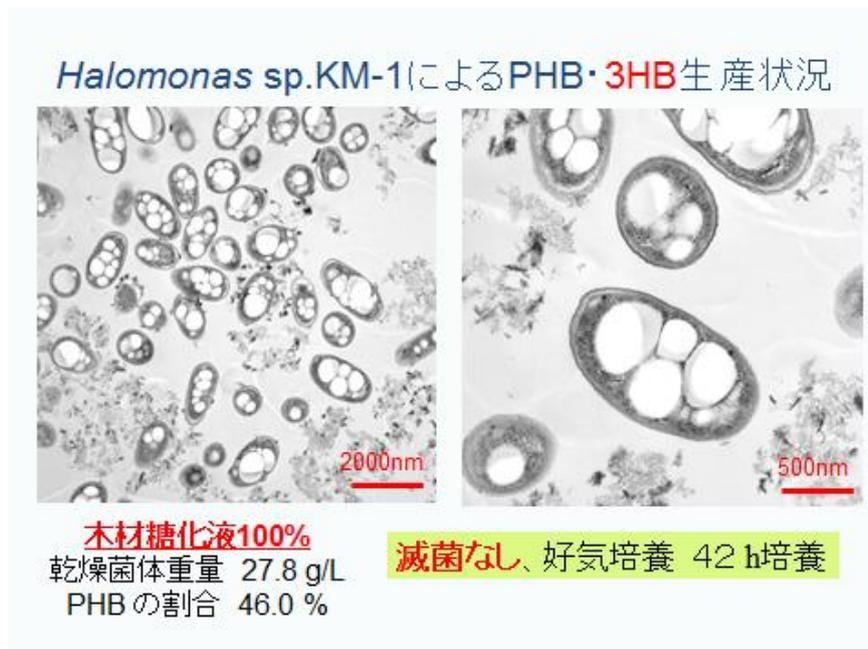


図8 スギ糖化液を用いたPHB、3HB生産の電子顕微鏡観察

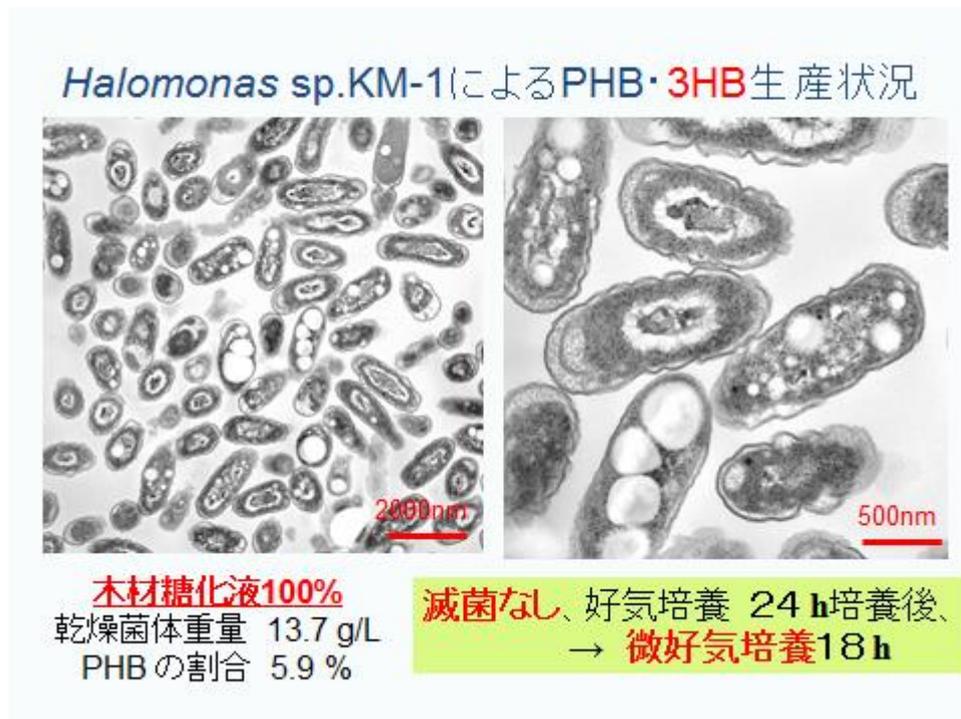


図9 スギ糖化液を用いた PHB、3HB 生産の電子顕微鏡観察

3. 6 GC-MS 装置を用いたハロモナス KM-1 株のメタボローム解析

Halomonas sp. KM-1 株を用い、グルコース 5%、10%を炭素源に SOT 改培地で培養し、経時的にサンプリングして、菌体内、培養液それぞれの代謝物の組成、傾向を GC-MS 装置を用いて分析した(図10)。菌体内は、53種類、培地には35種類化合物が検出された(表7、8)。特徴的なこととしては、菌体内に培養定常期においてのみ、3-ヒドロキシ酪酸が検出された(図11)。さらに、対数増殖期と定常期において検出された化合物を主成分分析した結果、3-ヒドロキシ酪酸が多いグループと、コハク酸が多いグループに分けられた(図12)。また、PHB 産生の多いハロモナス菌と、少ないハロモナス菌について、それぞれ定常期の菌体内の分析を行い、主成分分析を行った結果、PHB の多い菌と、少ない菌がそれぞれ異なる主成分を持つグループとして分けることができた

(図 1 3)。

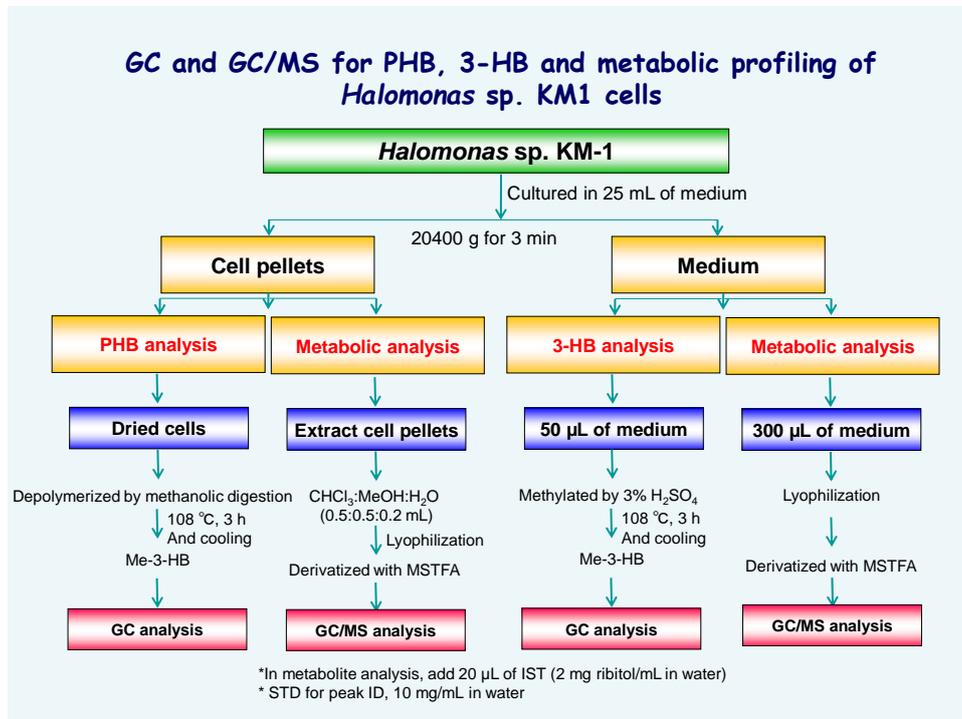


図 1 0 ハロモナス菌のメタボローム解析の概略

表 7 KM-1 株細胞中の代謝物の GC-MS による分析

***Halomonas* sp. KM-1 cell metabolic using GC/MS**

The number of identified fluctuating compounds

ID	Compound Name	ID	Compound Name	ID	Compound Name	ID	Compound Name
1	Pyruvate+Oxalacetic acid	15	N-Acetyl-Valine	28	Lauroic acid	41	Mannose
2	Lactic acid	16	Thymine	29	Ribose	42	Galactose
3	Oxalate	17	Alanine	30	Arabitol	43	Glucono-1,5-lactone
4	Valine	18	Citramalic acid	31	N-Acetyl-Glutamate	44	Adonine
5	3-Hydroxy-Butyrate	19	Malic acid	32	Threonine	45	Glucose
6	N-Caprylic acid	20	Nicotinamide	33	Glutamine	46	Gluconic acid
7	Isoleucine	21	Pyroglutamic acid	34	2-Oxogluconic acid	47	Glucuronate
8	Proline	22	Cytosine	35	2-Aminopimelic acid	48	Coniferyl alcohol
9	Glycine	23	β-Ionone	36	Citric acid+Isocitric acid	49	Cysteic acid
10	Succinic acid	24	Phosphoenolpyruvic acid	37	Tartronic acid	50	Tryptophan
11	Glycolic acid	25	Glutamic acid	38	Dimethylbenzimidazole	51	Malic acid
12	Uracil	26	Phenylalanine	39	Fructose	52	Cysteine+Cystine
13	Fumaric acid	27	Anabiosac	40	Fructose-2	53	Fructose-6-Phosphate
14	Serine						

表 8 KM-1 株培養液中の代謝物の GC-MS による分析

KM-1 culture medium metabolic using GC/MS

The number of identified fluctuating compounds

ID	Compound Name	ID	Compound Name	ID	Compound Name
1	2-Hydroxypyridine	15	Nicotinamide	28	Glucose
2	Pyruvate/Oxalacetic acid	16	3-amino-2-hydroxypyridine	29	Gluconic acid
3	N-Butylamine	17	Ketoglutaric acid	30	Mannitol
4	Oxalic	18	Phosphoenolpyruvic acid	31	Gulonic-1,4-lactone
5	Ketovaline	19	Malic acid	32	Galactosamine
6	3-Hydroxy-Butyrate	20	Glutamic acid	33	Glucuronic
7	Ketoleucine	21	Phenylalanine	34	Coniferyl alcohol
8	3-Hydroxyisovaleric acid	22	Hydroxybenzoic acid	35	Flavanone
9	Valine	23	Mibulose		
10	Succinic acid	24	Glutathione Oxidized		
11	Glycolic acid	25	Fructose		
12	Phenyl pyruvate	26	Mannose		
13	Fumaric acid	27	Galactose		
14	Glutamic anhydride				

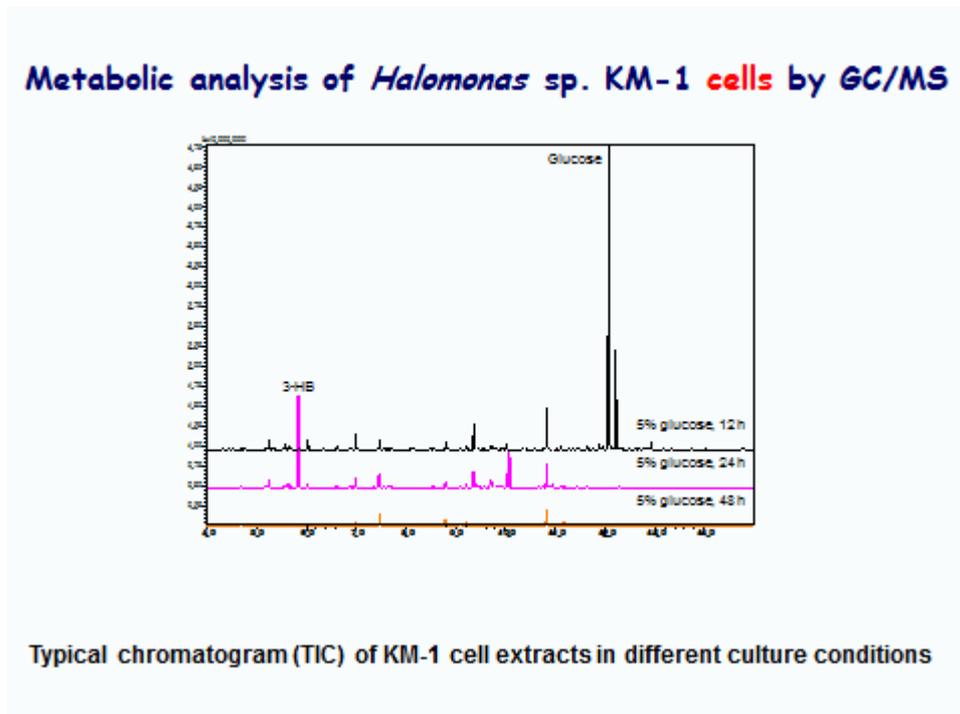
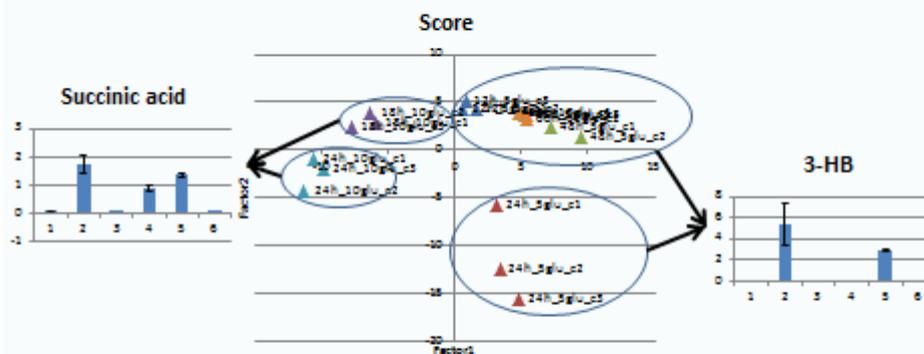


図 1 1 KM-1 株細胞中の代謝物の GC-MS によるクロマトグラフ

Principal component analysis (PCA) of KM-1 cells

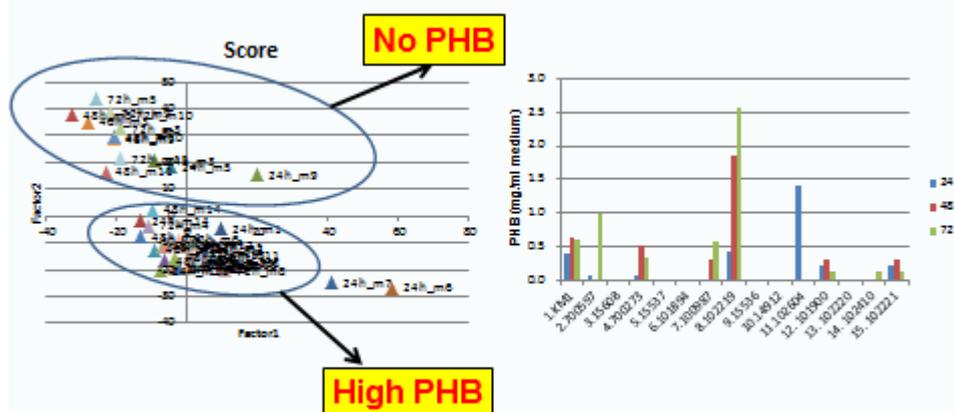


PCA score plot for 18 samples of cell extracts.

- > 1(12h-5% glucose), 2(24h-5% glucose), 3(48h-5% glucose);
- > 4(18h-10% glucose), 5(24h-10% glucose) and 6(60h-10% glucose).

図 1 2 KM-1 株細胞中の代謝物の GC-MS による PCA 分析

Principal component analysis (PCA) of 15 different *Halomonas* strains



- > PCA score plot for 45 samples of 15 different strains cell extracts.
- > The level of PHB in the culture medium.

図 1 3 ハロモナス菌株細胞中の代謝物の GC-MS による PCA 分析

3. 7 CE-MS 装置を用いたハロモナス KM-1 株のメタボローム解析

Halomonas sp. KM-1 株を用い、グルコース 10%を炭素源に SOT 改培地で好気条件から微好気条件へ培養条件を変更し、対数増殖期、定常期、微好気培養に移行して 18 時間目、それぞれの菌体内、培地の組成物、傾向を CE-MS 装置を用いて分析した。サンプリング数が少ないので定性的な分析しかできていないが、ヒートマップによる分析では、明らかにそれぞれの代謝物の組成に違いが見られた(図 1 4)。

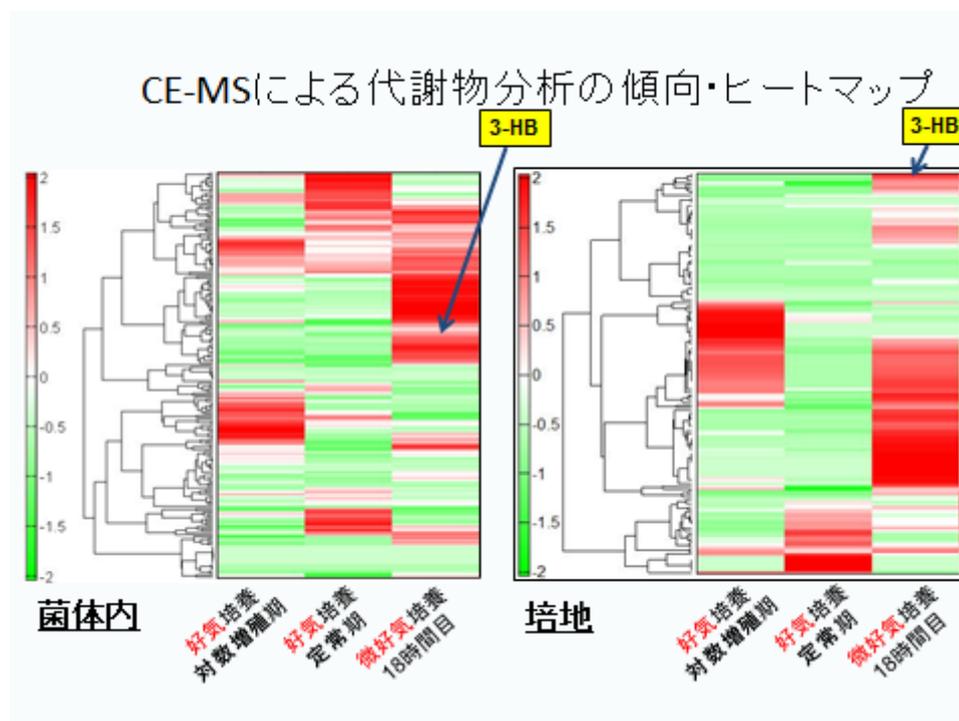


図 1 4 CE-MS 分析による KM-1 株代謝物のヒートマップ

3. 8 *Halomonas* sp. KM-1 株のゲノム解析

従来より *Halomonas* sp. KM-1 株のゲノム解析を行ってきたが、完全シークエンスをめざし、デジタルバイオロジー社 PacBio RS II シークエンサーを用い解析を行った結果、リード数塩基数 Polymerase Reads 87,985 626,210,428 bp, Subreads 114,036 624,957,170 bp のシークエンスを得、アセンブルにより、完全シークエンスを得た。以下の表 9 に結果を示す。本シークエンスを解析ソフト CRITICA、Glimmer2、

tRNAScan-SE、BLASTIN および BLASTP により解析した結果、表 10 に示す結果を得た。CRITICA、Glimmer2 それぞれの解析ソフトにより同定された遺伝子の機能分類を、図 15, 16 に示す。

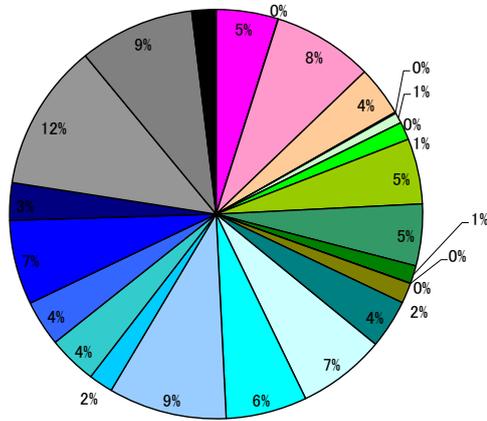
表 9 解析対象ゲノム配列情報項目

総コンティグ数	1
全コンティグの総塩基数	5,091,463bp
GC含量	64.08%
参照ゲノム配列	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 chromosome, complete genome
参照ゲノム配列アクセッション番号	NC_014532
参照ゲノム配列塩基数	4,061,296 bp

表 10 アノテーション解析結果

項目	使用ソフト	解析対象、クエリ	解析結果
遺伝子の領域予測	CRITICA	100bp 以上のコンティグ	予測 CDS 数 : 4,333
	Glimmer2	100bp 以上のコンティグ	予測 CDS 数 : 5,309
遺伝子予測結果のマージ		CRITICA、glimmer2 遺伝子予測結果	CRITICA, glimmer2一致 : 2,633 CRITICAのみ : 1,685, glimmer2のみ : 2,660 マージ後 : 6,978
tRNA 予測	tRNAScan-SE	全コンティグ	tRNA 領域 : 66 カ所 anti codon : 37 種類 アミノ酸種類 : 20 種類
rRNA 予測	BLASTIN	全コンティグ	rRNA 領域 : 1 コンティグ 5S : 1 コンティグ 16S : 1 コンティグ 23S : 1 コンティグ
アノテーション 1	BLASTP	CRITICA 予測 CDS	アノテーションのついた CDS : 4236
	BLASTP	glimmer2 予測 CDS	アノテーションのついた CDS : 4871
アノテーション 2	BLASTP	CRITICA 予測 CDS	アノテーションのついた CDS : 4308
	BLASTP	glimmer2 予測 CDS	アノテーションのついた CDS : 4980

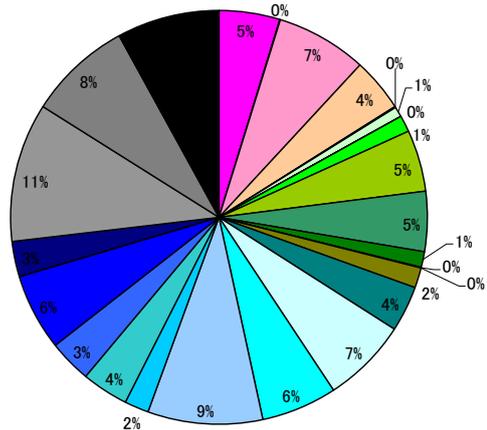
A functional classification of CDS predicted by CRITICA



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- RNA processing and modification
- Transcription
- Replication, recombination and repair
- Chromatin structure and dynamics
- Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- Nuclear structure
- Defense mechanisms
- Signal transduction mechanisms
- Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- Cell motility
- Cytoskeleton
- Extracellular structures
- Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme transport and metabolism
- Lipid transport and metabolism
- Inorganic ion transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- Not Annotated

図 1 5 CRITICA 解析ソフトにより同定された遺伝子の機能分類

A functional classification of CDS predicted by glimmer



- Translation, ribosomal structure and biogenesis
- RNA processing and modification
- Transcription
- Replication, recombination and repair
- Chromatin structure and dynamics
- Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- Nuclear structure
- Defense mechanisms
- Signal transduction mechanisms
- Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- Cell motility
- Cytoskeleton
- Extracellular structures
- Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- Energy production and conversion
- Carbohydrate transport and metabolism
- Amino acid transport and metabolism
- Nucleotide transport and metabolism
- Coenzyme transport and metabolism
- Lipid transport and metabolism
- Inorganic ion transport and metabolism
- Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- General function prediction only
- Function unknown
- Not Annotated

図 1 6 Glimmer2 解析ソフトにより同定された遺伝子の機能分類

3. 9 ハロモナス菌によるバイオプラスチックPHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産性向上について

好気条件で 60 時間まで培養した後、微好気条件(50pm)へ移行したものについて、菌体重量、PHB 生産量、3-ヒドロキシ酪酸生産量、残存する炭素源、さらに電子顕微鏡の撮影を実施した。窒素添加の有無、回数により、好気条件で蓄積した PHB を、微好気条件で分解、3-ヒドロキシ酪酸の分泌量が変化するかを確認した。特に PHB 合成、分解に窒素添加が必要なことをはじめて明らかにした。さらに、初発濃度 20%のグルコースを用いた場合、40g/L 以上の 3-ヒドロキシ酪酸の分泌が行えることを確認した(図 17, 18, 19)。さらに、同時期の PHB 合成酵素 PhaC、PHB 分解酵素 PhaZ それぞれの発現量を、16S リボソーム RNA の発現量と比較して確認したところ、合成酵素では窒素添加を行うことで、合成酵素の発現量が 3 から 4 倍程度多くなった(図 20)。また、好気微好気条件では、微好気条件にすると発現量が少なくなる傾向が見られた。一方、分解酵素の場合は、36 時間目の場合、窒素添加無添加で、ほぼ差はなく、一方、微好気条件に誘導すると、窒素無添加は発現量が少なくなる傾向を示すのに対し、窒素添加あり微好気条件では、倍以上分解酵素の発現が見られた。結果、電子顕微鏡に見られる PHB 顆粒が著しく小さくなる減少は、合成酵素と分解酵素の発現量のバランスが、合成優位から分解優位に変わることで起こったものと推定された(図 20)。同時に、菌体内の代謝物の変化について、GC-MS で分析した結果、Ketovaline, Glucosamine-6-phosphate, Alanine, Ornithine などいくつかの化合物が 3-ヒドロキシ酪酸と同様の増加を示したのに対し、Adenine は逆の傾向を示した。今後これらの代謝物の変化を元に、新たな化合物の生産に向けた検討を実施していく(表 11、図 21)。

窒素添加・無添加、好気・微好気条件によるハロモナス菌の反応

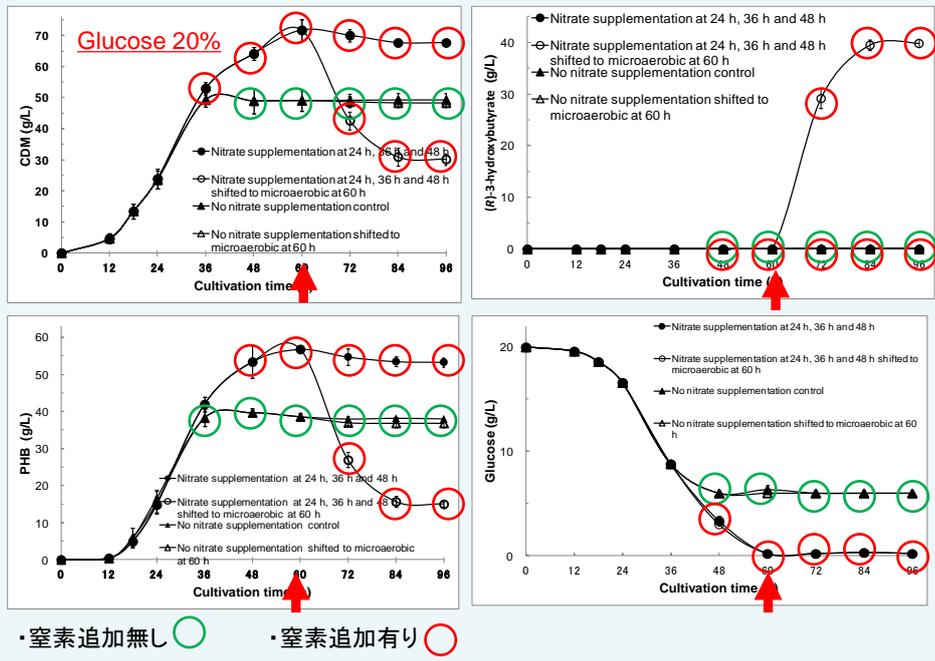


図 1 7 窒素添加・無添加、好気・微好気条件によるハロモナス菌の反応

異なる代謝条件での電子顕微鏡観察

窒素添加なし

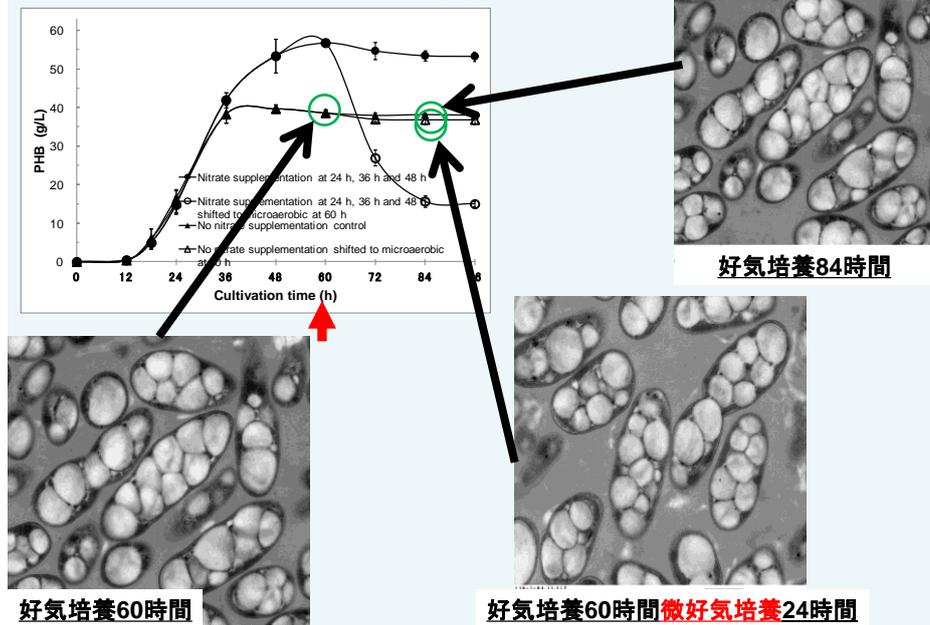


図 1 8 異なる代謝条件での電子顕微鏡観察 (窒素添加なし)

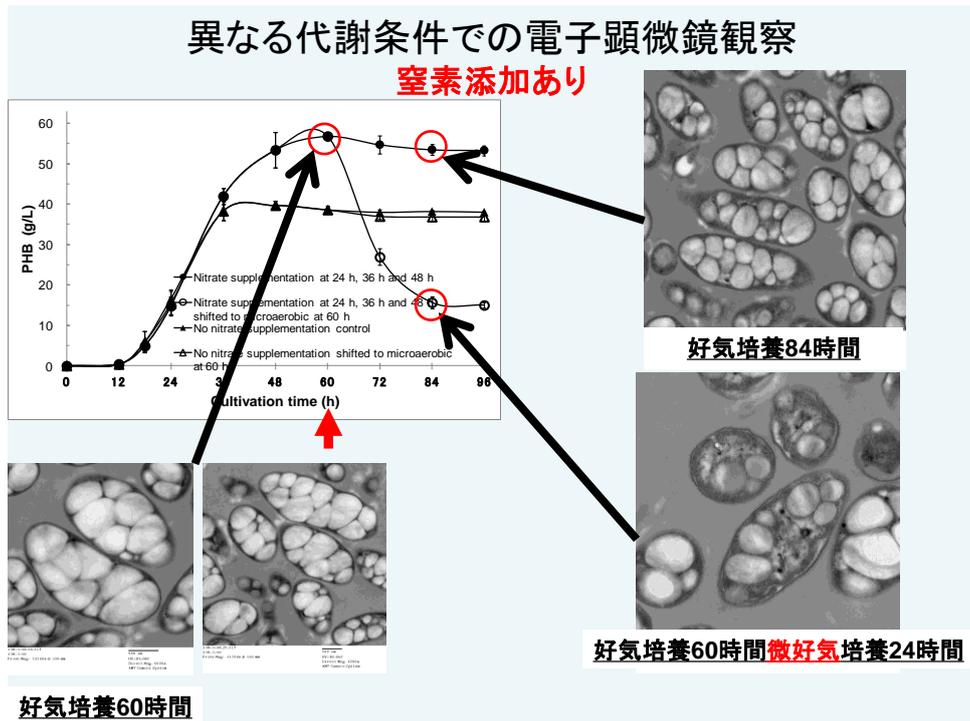


図 1 9 異なる代謝条件での電子顕微鏡観察 (窒素添加あり)

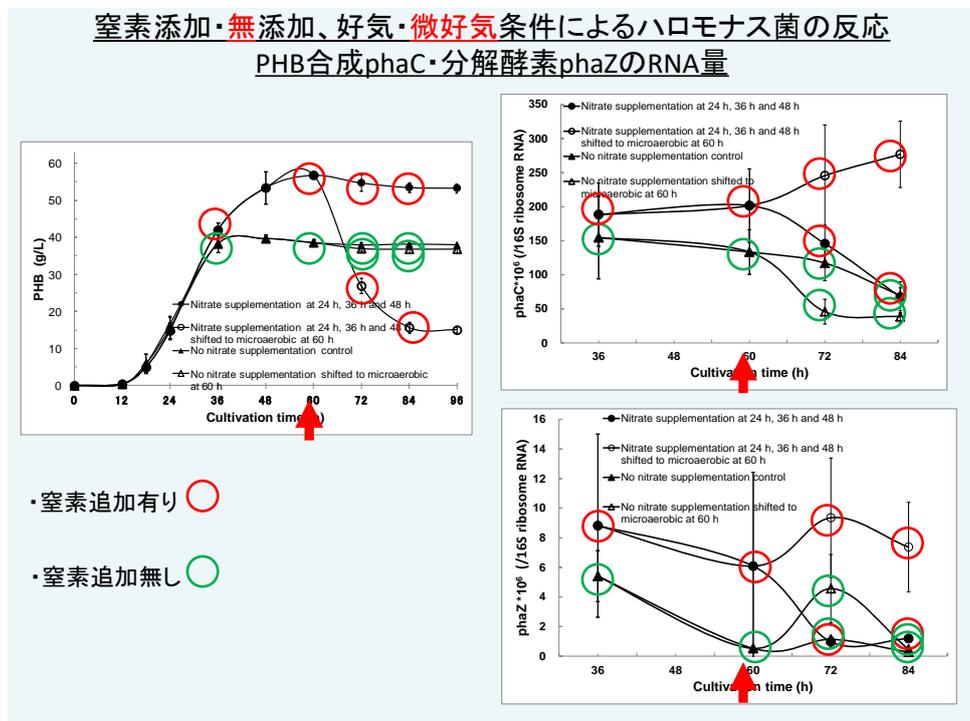


図 2 0 窒素添加・無添加、好気、微好気条件によるハロモナス菌の反応
PHB 合成酵素 phaC、分解酵素 phaZ の RNA 発現量

表 1 1 メタボローム解析による各種代謝物の変化 1

メタボローム解析による各種代謝物の変化 1

Data represent the mean (S.D.) values of 3 separate samples.

Metabolite	RT	Nitrate limitation							
		28 h. Aerobic	60 h. Aerobic	84 h. Aerobic	84 h. Microaerobic	36 h. Aerobic	60 h. Aerobic	84 h. Aerobic	84 h. Microaerobic
2-Hydroxyindole::C03502	350.45	0.0177±0.001239	0.00378±0.00346	0.00793±0.00610	0.00384±0.00171	0.0244±0.01856	0.0488±0.02374	0.0203±0.01680	0.0183±0.01804
Pyruvate::Oxaloacetic acid::C00022+CC	258.15	0.01847±0.00554	0.00583±0.00180	0.02430±0.00847	0.04375±0.02391	0.00352±0.00317	0.00008±0.00007	0.00005±0.00006	0.0083±0.01823
Lactic acid::C00186	262.20	0.01924±0.00524	0.0108±0.00396	0.02353±0.00979	0.02969±0.02081	0.02214±0.00628	0.00623±0.00772	0.01943±0.00160	0.0297±0.01313
Alanine_2TMS_Major::C00041	292.60	0.00996±0.00110	0.00159±0.00137	0.00200±0.00179	0.00676±0.00242	0.0006±0.00100	0.0004±0.00091	0.0006±0.00120	0.0127±0.00981
Ketovaline_1_Major::C00141	293.50	0.00119±0.00103	0.00101±0.00021	0.00043±0.00072	0.00175±0.00027	0.00003±0.00001	0.00010±0.00012	0.00041±0.00062	0.00097±0.00115
n-Butylamine::C11708	296.25	0.0021±0.00065	0.00157±0.00011	0.00143±0.00131	0.00254±0.00024	0.0008±0.00148	0.00011±0.00011	0.00160±0.00125	0.00158±0.00191
Oxalate::C00029	312.10	0.00015±0.00040	0.00346±0.00598	0.00615±0.01083	0.01186±0.01647	0.00004±0.00002	0.00010±0.00012	0.00040±0.00028	0.0091±0.01088
Ketovaline_2_Minor::C00141	314.80	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00002±0.00000	0.00003±0.00002	0.00011±0.00011	0.00003±0.00004	0.0046±0.00553
2-Aminoisobutyrate::C00865	318.55	0.00132±0.00121	0.00170±0.00005	0.00193±0.00012	0.00001±0.00114	0.00218±0.00187	0.00054±0.00074	0.00168±0.00141	0.00160±0.00181
3-Hydroxybutyrate::C01089	330.80	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00037±0.00054	0.00002±0.00000	0.00004±0.00003	0.00787±0.01343	0.1128±0.09281	0.7458±0.68963
3-Hydroxybutyrate::C01089	332.10	0.00252±0.00453	0.00314±0.00543	0.00001±0.00000	0.00001±0.00001	0.00004±0.00003	0.00011±0.00011	0.00048±0.01634	0.00004±0.00003
Valine_2TMS_Major::C00183	366.50	0.00076±0.00073	0.00001±0.00000	0.00001±0.00000	0.00111±0.00051	0.00003±0.00001	0.00010±0.00012	0.00040±0.00060	0.00000±0.00101
2-Aminethanol::C00189	398.15	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00135±0.00121	0.00012±0.00099	0.00004±0.00003	0.00008±0.00006	0.00005±0.00007	0.00031±0.00098
Phosphate::C00009	399.50	0.0688±0.00702	0.0548±0.00701	0.0686±0.00370	0.0988±0.02719	0.0711±0.01002	0.0172±0.01652	0.1588±0.01651	0.1071±0.03013
Phosphate::C00009	401.35	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00001	0.00001±0.00000	0.00483±0.00832	0.00010±0.00012	0.00004±0.00003	0.0075±0.00884
Phosphate::C00009	401.85	0.00458±0.00309	0.00675±0.00155	0.00484±0.00401	0.00214±0.00302	0.00004±0.00002	0.00010±0.00012	0.00004±0.00003	0.0108±0.00423
Glycine_2TMS_Major::C00037	422.15	0.00596±0.00274	0.00222±0.00238	0.0115±0.00124	0.0135±0.00257	0.00116±0.00197	0.0008±0.00532	0.0127±0.00149	0.0101±0.00507
Succinic acid(or aldehyde)::C00042	426.65	0.00522±0.00090	0.0000±0.00000	0.00276±0.00475	0.00422±0.00584	0.00004±0.00003	0.00481±0.00805	0.01401±0.01298	0.00004±0.00003
Uracil::C00106	440.80	0.0038±0.00088	0.00144±0.00062	0.0024±0.00048	0.00324±0.00098	0.00221±0.00029	0.00078±0.00118	0.0024±0.00221	0.0047±0.00137
Fumaric acid::C00122	447.20	0.00031±0.00049	0.0000±0.00000	0.00112±0.00153	0.00108±0.00148	0.00003±0.00001	0.00028±0.00025	0.00004±0.00003	0.0003±0.00045
Nonanoic acid::C01601	454.55	0.00224±0.00174	0.00078±0.00138	0.00448±0.00072	0.00649±0.00112	0.00144±0.00243	0.00069±0.00091	0.00357±0.00315	0.0031±0.00689
Malic acid::C00145	518.80	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00063±0.01043	0.00027±0.03369	0.00000±0.00001	0.00004±0.00002	0.00004±0.00003	0.0000±0.00005
Nicotinamide::C00455	523.45	0.00312±0.00276	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00002±0.00000	0.00004±0.00003	0.00123±0.00193	0.00108±0.00171	0.0008±0.00105
Adipic acid::C00104	532.00	0.00002±0.00000	0.0000±0.00000	0.00038±0.00065	0.00152±0.00015	0.0005±0.00015	0.00010±0.00012	0.00003±0.00003	0.0000±0.00003
trans-4-Hydroxy-L-proline::C01157	540.70	0.00188±0.00024	0.00103±0.00037	0.00114±0.00089	0.00188±0.00048	0.00055±0.00087	0.00054±0.00078	0.00138±0.00109	0.0011±0.00128
Pyruvate::acetyl::C01178	540.75	0.02271±0.00297	0.01874±0.00461	0.02459±0.00928	0.02843±0.00731	0.03207±0.00838	0.02535±0.00489	0.03381±0.00312	0.0302±0.01082
4-Aminobutyric acid::C00334	544.10	0.0056±0.00052	0.00054±0.00098	0.00021±0.00055	0.00078±0.00107	0.00089±0.00148	0.0028±0.00383	0.0008±0.00442	0.002±0.00253
Threonine acid::C01620	552.50	0.00198±0.00341	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00001±0.00000	0.00004±0.00003	0.00008±0.00007	0.00005±0.00006	0.00003±0.00003
Alpha-Ketoglutaric acid::C00026	563.85	0.0291±0.02958	0.00474±0.00447	0.02797±0.03325	0.0319±0.01821	0.00004±0.00002	0.00010±0.00012	0.00004±0.00003	0.0000±0.00003
l-Glutamic acid::055374	581.25	0.00067±0.00647	0.00001±0.00000	0.00001±0.00000	0.00001±0.00001	0.01820±0.02348	0.00078±0.00119	0.00111±0.00181	0.0028±0.00324
Glutamic acid::C00302	584.25	0.02177±0.02700	0.0009±0.00019	0.00398±0.00284	0.00388±0.00101	0.05653±0.08574	0.01877±0.02057	0.04841±0.00319	0.0178±0.01016
Leucic acid::C00219	603.05	0.00067±0.00113	0.00118±0.00103	0.00174±0.00151	0.00087±0.00121	0.00073±0.00121	0.00183±0.00296	0.00118±0.00183	0.0006±0.00109
N-Formyl-L-Methionine_1_Minor_df-C	619.70	0.00480±0.00486	0.00135±0.00150	0.00242±0.00087	0.00157±0.00219	0.00451±0.00187	0.00477±0.00571	0.00218±0.00233	0.00174±0.00200
Ribitol::00474	625.40	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00004±0.01126	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000	0.00000±0.00000	0.0000±0.00003
Ribitol::00474	629.25	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000	1.00000±0.00000
Glutamine_3TMS::C00064	655.65	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00001	0.00001±0.00000	0.0028±0.00250	0.00040±0.00059	0.00298±0.00028	0.0000±0.00003
Citric acid + Isocitric acid::C00158+CC	671.80	0.0018±0.00217	0.0000±0.00000	0.00002±0.00001	0.00001±0.00000	0.00000±0.00001	0.00010±0.00012	0.0002±0.00023	0.0004±0.00084
Ornithine::C00077	673.00	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00002±0.00000	0.00004±0.00003	0.00008±0.00008	0.00005±0.00007	0.00137±0.00161
Taurosine_1_Minor::C00785	683.80	0.00151±0.00258	0.0000±0.00000	0.00002±0.00001	0.00001±0.00000	0.0004±0.00085	0.00005±0.00079	0.00008±0.00006	0.00003±0.00003
Adenine::C00147	700.40	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00001	0.00001±0.00000	0.00038±0.00058	0.00035±0.00040	0.00039±0.00054	0.00003±0.00003
Glucose_2_Minor::C00031	702.80	0.49610±0.21220	0.0889±0.03529	0.1819±0.18885	0.20109±0.24389	0.42818±0.44731	0.00175±0.00284	0.00008±0.00126	0.0672±0.1220
Glucose_2_Minor::C00031	711.50	0.7148±0.02725	0.0048±0.00838	0.0484±0.03184	0.0252±0.04596	0.0720±0.09628	0.00007±0.00006	0.00006±0.00003	0.0000±0.00003
Glucosamine_1_Mid::C00329	712.00	0.00059±0.00010	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00002±0.00000	0.00004±0.00003	0.00121±0.00190	0.00005±0.00006	0.0002±0.00055
Tyramine::C00423	716.35	0.00471±0.00100	0.0023±0.00069	0.00150±0.00163	0.00142±0.00201	0.0000±0.00018	0.00181±0.00262	0.0091±0.00185	0.0044±0.00284
Glucosamine_3_Minor::C00329	724.10	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00002±0.00001	0.00001±0.00000	0.00004±0.00002	0.00093±0.00138	0.00004±0.00003	0.0000±0.00002
a-Diaminopimelate::C00666	742.85	0.00001±0.00001	0.0000±0.00000	0.00079±0.00068	0.00152±0.00011	0.00003±0.00001	0.00010±0.00012	0.00007±0.00004	0.0004±0.00073
Hepidicacate::Pu20chem-4113470	804.80	0.00181±0.00161	0.00212±0.00024	0.00184±0.00144	0.0039±0.0127	0.0001±0.00158	0.0007±0.00096	0.0011±0.00163	0.0006±0.00117
Bladic acid::C01172	833.90	0.03084±0.00950	0.00780±0.00530	0.03933±0.01777	0.03332±0.00308	0.03334±0.01936	0.05188±0.02538	0.03159±0.01444	0.0417±0.01588
Oxidobutyrate::C01530	840.15	0.1482±0.00825	0.10477±0.01018	0.1128±0.01197	0.1701±0.08070	0.1184±0.02885	0.0939±0.02548	0.1208±0.01554	0.1517±0.05253
Glucosamine_6-Phosphate_2::C00352	873.45	0.00002±0.00001	0.00087±0.00115	0.00002±0.00001	0.00001±0.00000	0.00004±0.00002	0.00088±0.00093	0.00004±0.00003	0.00124±0.00192
Glucosamine_6-Phosphate_4::C00352	883.05	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00001±0.00000	0.00001±0.00001	0.00004±0.00003	0.00077±0.00079	0.00005±0.00007	0.0005±0.00102
Uridine_2_Minor::C00239	811.05	0.00002±0.00001	0.0000±0.00000	0.00041±0.00087	0.00001±0.00000	0.00003±0.00001	0.0000±0.00003	0.00041±0.00071	0.0003±0.00027

メタボローム解析による各種代謝物の変化 2

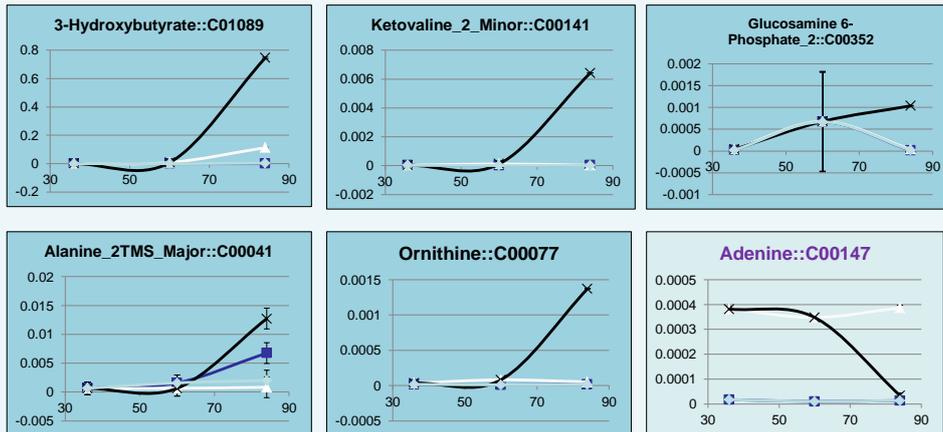


図 2 1 メタボローム解析による各種代謝物の変化 2

3. 10 スギ木材糖化液を用いたハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産性向上

スギ木材糖化液を用い、ハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産を調べた。グルコースもしくはスギ糖化液の糖濃度を 12% に調整した。窒素源として、等量の尿素もしくは硝酸ナトリウムを用いて培養した。尿素の場合は、硝酸ナトリウムの場合と比べ、グルコース、木材糖化液を用いたいずれの場合も、20% 以上 PHB の蓄積量が向上し、全炭素窒素分析装置でも同様の結果を確認した。好気条件の場合、木材糖化液を用いた培養では、グルコースを用いた場合と比較し、半分程度の PHB の蓄積量であったが、グルコースの場合、蓄積した PHB の 35% 前後の PHB 顆粒が菌体内に残存するのに対し、木材糖化液の場合は蓄積した PHB のほとんどが分解され、21 g/L 以上の 3-ヒドロキシ酪酸が分泌されることが判明した。(図 2 2, 表 1 2)

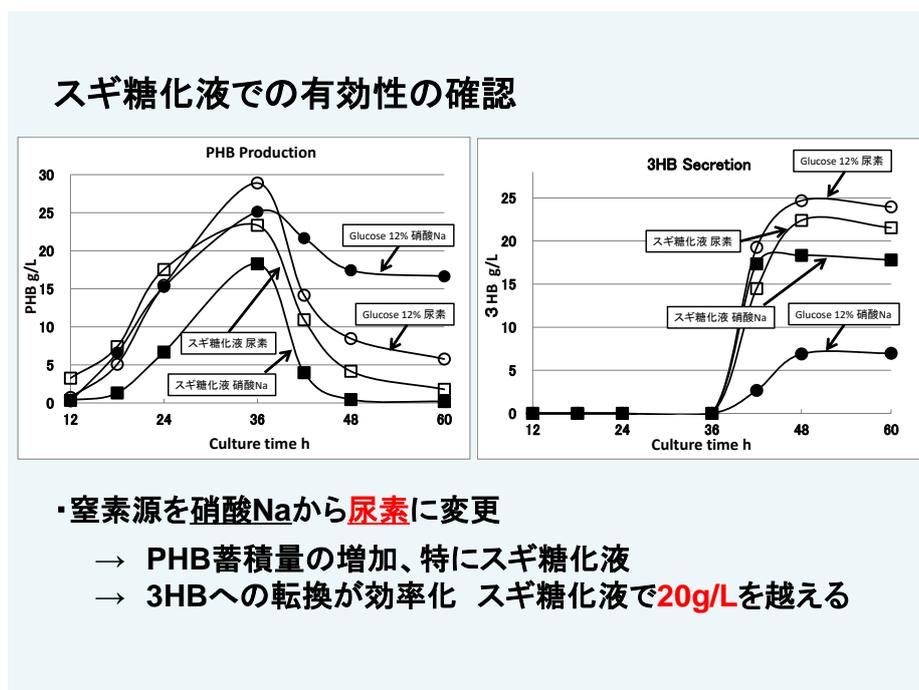


図 2 2 スギ糖化液での各種窒素源の有効性

表 1 2 3-ヒドロキシ酪酸の生産量の比較

3-ヒドロキシ酪酸生産量の比較

Organism	Carbon source	Procedure	(R)-3-HB (g/l)	Reference
Halomonas sp. KM-1	Glycerol	microaerobic condition	15.2	Kawata et al. (2012)
	Glucose スギ糖化液	Wild strain	40.0	Kawata et al. (2014)
				21.1
<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	lactose	<i>in vivo</i> PHA depolymerization mutant	1.8	Nath et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phbAB, ptb, buk</i>)	12	Gao et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phaCAB, phaZ</i>)	9.9	Lee et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phaCAB, phaZ</i>)	7.3	Shiraki et al. (2006)
<i>Escherichia coli</i>	glucose	recombinant (<i>phbAB, tesB</i>)	12.2	Liu et al. (2007)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 126	methanol	mutant (3HB dehydrogenase null, lipoic acid synthase null)	2.8	Hölscher et al. (2010)
<i>Ralstonia eutropha</i>	fructose	mutant (3HB dehydrogenase null)	3.1	Shiraki et al. (2006)
<i>Azohydromonas lata</i>	glucose	mutant (UV)	6.5	Ugwu et al. (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Wood extract hydrosate	Wild strain	16.8	Wang et al. (2014)

3. 1 1 PHB 顆粒蓄積と 3-HB 放出の過程における菌体の電子顕微鏡による解析

好氣的培養（震盪 200rpm 条件詳細）の過程における菌体の形態の時間変化（4 条件：好気 12 時間、18 時間、24 時間、36 時間）と、その好氣的条件から微好氣的条件（震盪 50rpm 条件詳細）に移した場合（好気 24 時間+微好気 24 時間、および好気 36 時間+微好気 24 時間）の形態の様子を、超薄切片電子顕微鏡法によって観察した(図 2 3)。好氣的培養の初期（12 時間）においては、桿菌の形状の菌体内に径が 100nm 以下の小型顆粒が観察された。培養時間の経過とともに 200-500nm 程度に成長した顆粒が観察されるようになり（18 時間、24 時間）、これら顆粒によって内から押し出されるように菌体の外形は膨張した。好氣的培養 36 時間においては細胞内部に大型顆粒（500nm 前後）が密に充填された状態となり、菌体の外形は楕円にまで変形した。好氣的培養 24 時間、あるいは 36 時間の後に微好氣的培養に移して 24 時間を経た菌体では、顆粒のサ

イズが縮小し、微好気条件移行の前には詰まっていた顆粒と顆粒の間隔が広がり、細胞質の空間が回復した。

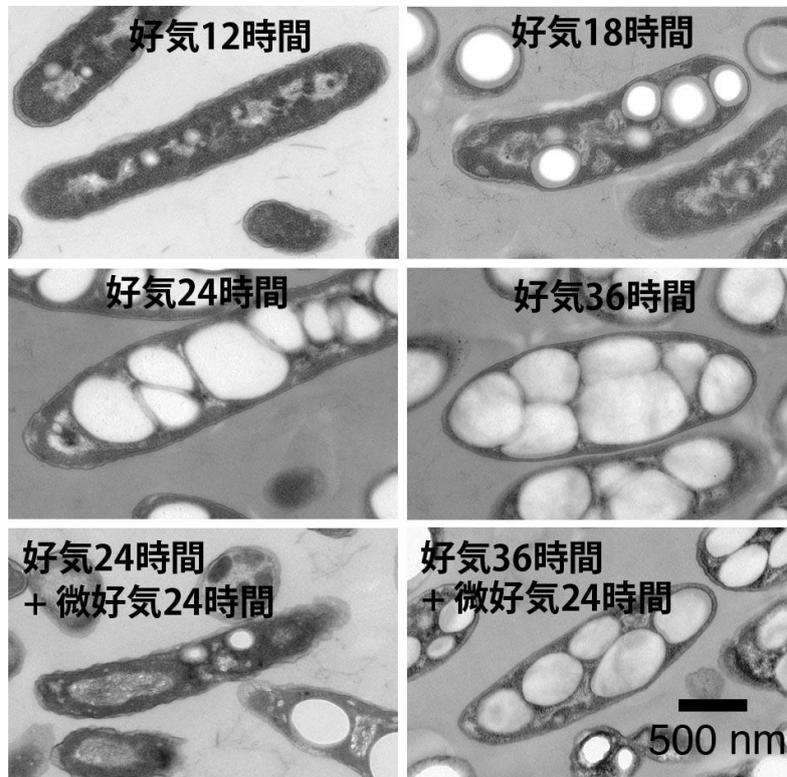


図 2 3 PHB 顆粒蓄積と 3-HB 放出の過程の電子顕微鏡解析

電子線トモグラフィー解析においても、好氣的培養時（3 条件：好気 12 時間、18 時間、36 時間）と、好氣的条件から微好氣的条件に移した場合（好気 24 時間+微好気 24 時間）の観察を行い、菌体の形態を三次元像として把握することに成功した(図 2 4、2 5)。菌体内に顆粒が密に充填された状態において、顆粒同士がどのような空間的配置をとるかを明らかにすることが可能となり、また好氣的培養初期には細長い桿菌であった形状が回転楕円体状に膨張していることを三次元像から明確に評価することが可能となった。

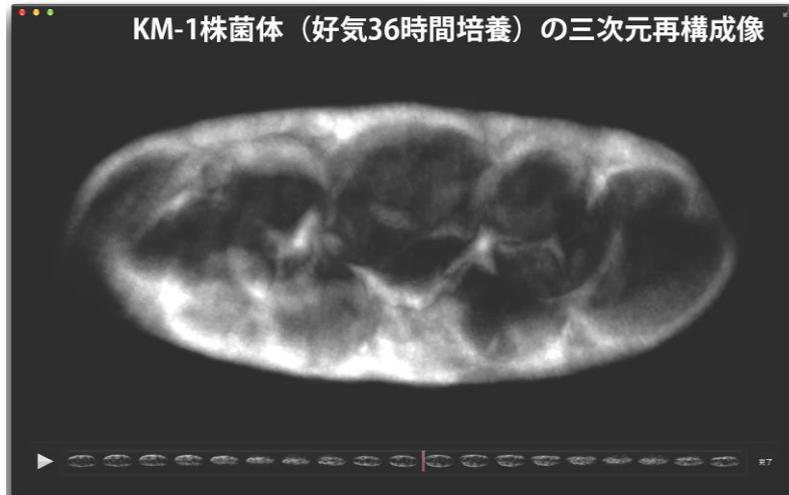
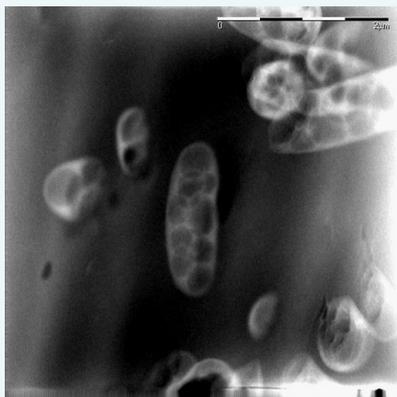


図 2 4 KM-1 株菌体の三次元再構成像

ハロモナス菌の電子顕微鏡立体解析



好気培養

乾燥菌体重量 52.1 g/L
PHB の割合 88.2 %



好気+微好気培養

乾燥菌体重量 10.9 g/L
PHB の割合 22.9 %

図 2 5 ハロモナス KM-1 株の電子顕微鏡立体解析

電子線トモグラフィー解析においても、好氣的培養時（3 条件：好気 12 時間、18 時間、36 時間）と、好氣的条件から微好氣的条件に移した場合（好気 24 時間+微好気 24 時間）の観察を行い、菌体の形態を三次元像として把握することに成功した。菌体内に顆粒が密に充填された状態において、顆粒同士がどのような空間的配置をとるかを明ら

かにすることが可能となり、また好氣的培養初期には細長い桿菌であった形状が回転楕円体状に膨張していることを三次元像から明確に評価することが可能となった。結果、超薄切片電子顕微鏡法と電子線トモグラフィ法による解析から明らかになった段階的な好気・微好氣的条件の培養における菌体内顆粒の成長と縮小は、細胞乾燥重量と PHB 含量の測定によって把握される増大・減少とよく一致しており、PHB 顆粒蓄積と 3-HB 放出の過程を形態的に評価したデータとして活用ができる。この一連の実験においては、「好気 24 時間+微好気 24 時間」の培養と「好気 36 時間+微好気 24 時間」の培養を比較すると、後者の方がピーク時の PHB 蓄積が前者より多いことが測定されているにもかかわらず、続く微好気 24 時間での PHB 量減少の程度は前者の方が大きく、3-HB 放出の効率としては有利である。このような PHB 蓄積・3-HB 放出の効率の様子は、電子顕微鏡観察から明解な形で評価ができる。好気 24 時間よりも好気 36 時間の方が PHB 顆粒が大型に成長していることも画像化されたし、「好気 36 時間+微好気 24 時間」の培養後に大型顆粒の多くがまだ菌体内に残留している様子も画像化された。

3. 1 2 ラットによる乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の経口毒性試験

3-ヒドロキシ酪酸の急性毒性試験の場合には、

- ・観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。
- ・一般状態 雌雄ともにいずれの投与群においても、観察期間中に異常は見られなかった。
- ・体重変化 投与後 7 及び 14 日の体重測定において、雌雄ともに試験群は対照群と比べ体重値に差は見られなかった。
- ・剖検所見 観察期間終了時の剖検では、雌雄ともにすべての試験動物に異常は見られなかった。

以上の結果から、以上のことから、ラットを用いる単回経口投与において、検体の

LD50 値は、雌雄ともに 2000 mg/kg を超えるものと考えられた。結果の詳細を、補遺 1 に示した。

ハロモナス菌乾燥菌体、3-ヒドロキシ酪酸の亜急性毒性試験の場合には、以下の性状が見受けられた。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例と雌 1 例で、それぞれ前胃の白色隆起巣と腺胃の暗赤色巣がみられたが、発現頻度及び病理学的性状から偶発所見と判断した。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、1000 mg/kg/日投与群の雄 1 例で空腸の憩室がみられたが、用量相関性がみられず、病理学的性状から偶発所見と判断した。

2000 mg/kg/日投与群の雄の瀕死動物 1 例（動物番号：5005）で、低栄養状態、皮膚の蒼白化、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄、ガス貯留による胃及び腸の拡張、腺胃の暗赤色巣、胸腺及び脾臓の小型化がみられた。

ハロモナス菌乾燥菌体では、投与期間を通じて死亡動物はみられなかった。

雌雄すべての投与群で一般状態、体重及び摂餌量に異常はみられなかった。

尿検査で 2000 mg/kg/日投与群の雌の尿量で有意な低値がみられたが、血液化学検査で腎臓パラメータ、腎臓の器官重量及び剖検で腎臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。2000 mg/kg/日投与群の雄と雌の血液化学検査で、それぞれ無機リンと総コレステロールの有意な低値が認められたが、軽微な低値であり、腎臓及び肝臓の器官重量並びに剖検で腎臓及び肝臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。2000 mg/kg/日投与群の雄の胸腺で絶対及び相対重量の有意な高値が認められたが、血液学検査でリンパ球及び剖検で胸腺に異常がみられていないことから、偶発的な変動と判断した。

3-ヒドロキシ酪酸では、2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例で試験 20 日に消瘦、自発運動の減少、呼吸数の減少及び皮膚の蒼白化並びに腹部膨満がみられ、瀕死期剖検した。剖検では低栄養状態、皮膚の蒼白化、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄、ガス貯留による胃及び腸の拡張、腺胃の暗赤色巣、胸腺及び脾臓の小型化がみられ、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄より生じた胃及び腸の拡張による横隔膜の圧迫が瀕死の原因と考えられた。なお、同瀕死動物のこれらの所見は、病理学的性状から投薬起因性の毒性変化では無いと判断した。

生存動物の一般状態、体重及び摂餌量に異常はみられなかった。

尿検査で 2000 mg/kg/日投与群の雄の pH で低値傾向、タンパク質陽性例及びケトン体陽性例の増加、1000 mg/kg/日以上投与群の雌で pH の低値傾向、タンパク質陽性例の増加及び尿量の有意な低値がみられたが、腎臓の器官重量及び剖検で腎臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

血液化学検査では、2000 mg/kg/日投与群の雄でグルコース、ナトリウム及び無機リンの有意な低値、2000 mg/kg/日投与群の雌で総タンパク質及びアルブミンの有意な低値がみられたが、軽微な低値であり、腎臓及び肝臓の器官重量並びに剖検で腎臓及び肝臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

以上の結果から、本試験におけるハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸の無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 2000 mg/kg/日を上回る(無毒性と判断)と推定された。結果の詳細を、補遺 2 に示した。

4. 結論

4. 1 ハロモナス菌の培養、PHB 生産性について

我々が取得した *Halomonas* sp. KM-1 株と、NBRC (Chiba, Japan) 13 株、ATCC 2 株のハロモナス菌の生育を比較した結果、*Halomonas* sp. KM-1 株は、カルチャーコレクションの他のハロモナス菌と比較し、バイオプラスチック PHB の生産量が多いことが確認された。特に、限られた 5 種類のハロモナス菌しか生育しない栄養塩と炭素源からなる安価な SOT 培地や SOT 改培地においても、顕著な PHB 蓄積量を示した。これらの高い PHB の蓄積量、安価な、滅菌を必要としない培地組成は、商業培養を行う上で優位点である。さらに、実用化の際には未精製の炭素源が使用されることが予想されるため、今回試みた炭素源としてスギ糖化液やバイオディーゼル廃グリセロールを用いること、特にスギ糖化液の場合は、そのものに直接栄養塩を添加した培地でも生育可能であることは、今後の商業応用の可能性を示している。現状では、スギ糖化液の価格が、対グルコースなどの市販糖と比べて高く、十分な商業化のインセンティブをもたらしているとは言い難いのが状況である(図 2.6)。しかしながら、将来社会状況の変化と共に、循環型社会形成の雰囲気醸成が行われれば、十分商業化できうるレベルに達していると自負している。

同時に KM-1 株の PHB 蓄積時の代謝分析、KM-1 株と他のハロモナス菌との PHB 生産量の違いと代謝物の主成分分析は、今後より PHB の蓄積量、炭素源からの転換効率、次なる生産物のターゲットを検討する上で重要な示唆を与えるものと思われる。

スギ糖化プロセスの特徴

1. ソーダ蒸解法は、**すべての**木質系バイオマスの脱リグニンに利用可能。
2. 黒液は、エネルギー利用の実績があり、糖製造時の**エネルギーは完全自給可**、さらに**余剰エネルギーも得られる**。苛性ソーダは回収し、再利用するため、廃棄物も少ない。
3. スギチップ**1tから378kg**(C6糖:357kg、C5糖:21kg)の糖を回収できる。(実証プラント実績)
4. スギパルプの**酸素漂白処理により**、**糖化酵素**使用量を大幅削減、結果糖価格を**1kg当たり125円と試算**。余剰リグニン成分の有効利用により、**さらなるコスト低減**が期待される。

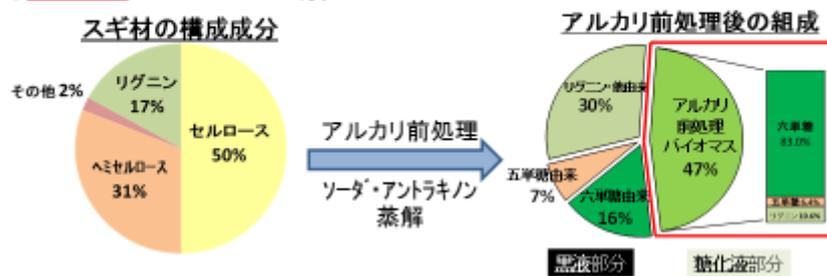


図 2 6 スギ糖化プロセスの特徴

4. 2 ハロモナス KM-1 株によるバイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産

ハロモナス KM-1 株による 3-ヒドロキシ酪酸の生産の生産については、好気培養(200rpm)で蓄積した PHB を、給気条件を変更(50rpm)しただけで、ハロモナス菌が溶菌することなく、著量の 3-ヒドロキシ酪酸が、PHB から分解され、分泌している(図 4、27)。代謝物の変化については、GC-MS や CE-MS で分析しており、ヒートマップの分析からも、好気培養から微好気培養へと培養の様子が変わり、代謝物が変化していることが明らかになった。給気条件を変化し、代謝を変更させ、著量の間体を分泌させる手法は、公益財団法人地球環境産業技術研究機構(RITE)のグループが、コリネバクテリウム属の菌体で検討しているものが著名だが、今後ハロモナス菌が、培養時に雑菌の混入が少なく、安価な培地で生育できる特性を生かし、3-ヒドロキシ酪酸以外の生産にも有益な知見が得られることが期待され、 α -ケトグルタル酸など一部の代謝物については既に特許出願を行っている。

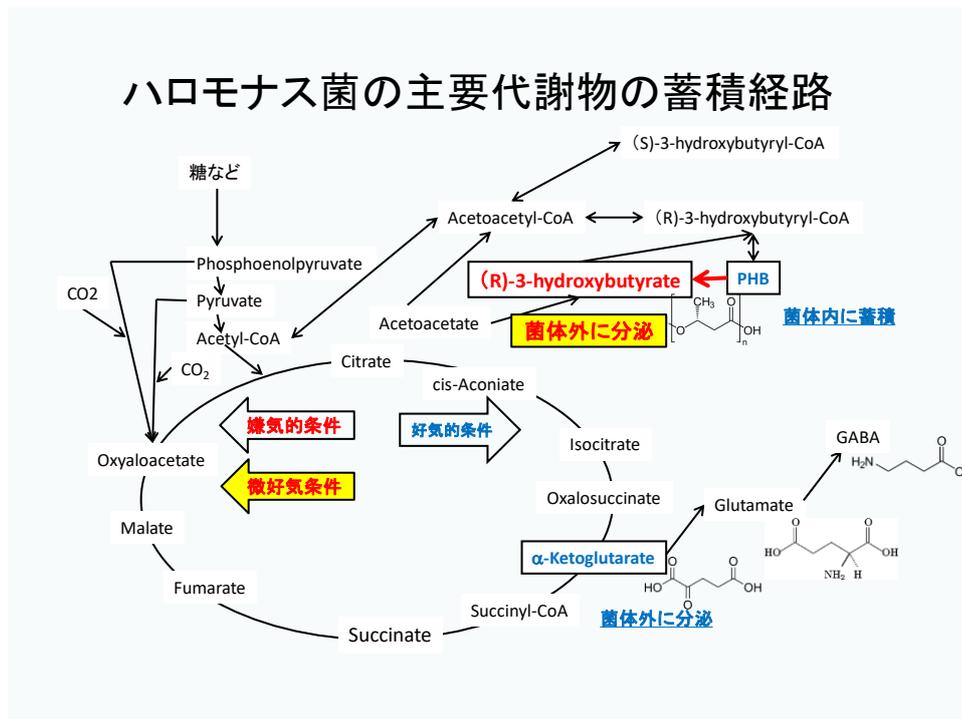


図 2 7 ハロモナス菌の主要代謝物の蓄積経路

4. 3 電子顕微鏡による観察

好気的条件と微好気的条件下において杉の木質糖化液で培養した際の、KM-1 細胞の形態変化を電子顕微鏡によって観察した。最初の好気培養では、PHB の蓄積として直径 0.15~0.45 μm ほどの細胞内顆粒が細胞一個あたり 6~14 個観察された。微好気培養の観察のためには、震盪 200rpm で 24 時間の培養をしてから震盪 50rpm で 5 時間の培養をして、化学固定を行った。好気条件とは対照的に細胞内顆粒の個数は 0~5 個に減少し、顆粒の大きさも直径 0.05~0.5 μm 程に小さくなった。電顕観察に用いた菌体の PHB 含量は、好気条件で 8.4 g/L であり、微好気条件で 0.6 g/L であった。電顕で観察された細胞内顆粒の個数とサイズの減少は、震盪を 200rpm から 50rpm に変えたときの細胞乾燥重量と PHB 含量の減少とよく一致する。

前の報告で、グリセロールによる好気的条件下での培養を行った際には細胞内顆粒の直径は約 0.3~0.7 μm であった。今回、杉の木質糖化液による 24 時間培養で PHB 産生レ

ベルが 8.8 g/L であったのに対して、純粋なグリセロールによる 48 時間培養では PHB 産生レベルは 21.3 g/L であった。この違いは主として細胞内に蓄積された PHB 含量の違いの結果であり、そう考えれば電顕で観察された形態の違いも説明がつく。

電顕観察に用いた試料については、さらに、含まれる細胞数をコロニー形成で確認した。好気条件と微好機条件での生細胞個数は、それぞれ $6.2 \times 10^{10}/\text{mL}$ 、および $6.0 \times 10^{10}/\text{mL}$ であり、微好機条件において KM-1 細胞の生存能力に損傷がないことが確認され、今後商業培養が検討される過程において、十分な優位性をもっていると結論できる。

4. 4 ハロモナス KM-1 株による木材糖化液の利用、バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産

木材の構成糖の 5-30% を C5 糖が占め、現在さかんに検討される非可食バイオマスからのバイオエタノール生産においても、リグノセルロースに含まれる C5 糖の有効利用が経済性を成立させる上で不可避の課題である。工業的に利用されている微生物の多くは、C5 糖を利用することができず、C6 糖のみが利用され C5 糖のキシロース、アラビノースなどは培地中に残っていたのが実際である。また、限られた C5 糖を利用できる菌体でも、C6 糖が優先して代謝される特性(Glucose catabolite repression 異種代謝抑制)から、グルコースが優先的に消費され、その後 C5 糖が利用されることが報告されている(図 2 8)。ハロモナス菌 KM-1 株は、C6 糖存在下でも、C5 糖を C6 糖とほぼ同じスピードで代謝し、PHB の生産量も変化ないことから、工業的な利用において極めて有利である。また、この異種代謝抑制がないことは、学術的な観点から、遺伝子代謝制御の解除のメカニズムについても極めて注目される菌体である。

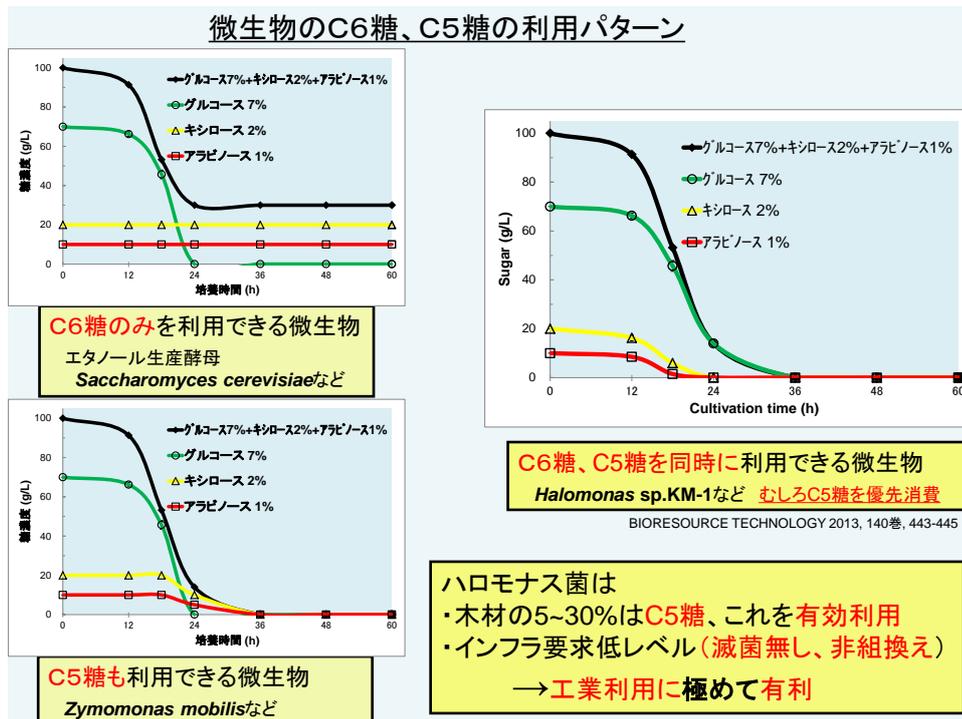


図 2.8 各種微生物の C6 糖、C5 糖の利用パターン

4. 5 ハロモナス KM-1 株による木材糖化液の利用、バイオプラスチック PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産

本研究では、ハロモナス菌で日本のバイオマス資源として有望なスギを利用し、実際にバイオプラスチック PHB 及び 3-ヒドロキシ酪酸を生産した。バイオリファインリーの構築は世界的な課題であり、実際の木材糖化液そのものを用いて、菌体を培養し、化成品を生産できたことは極めて有意義なことといえる。今後、試薬のグルコース、キシロース、アラビノースと比べて劣る PHB、3-ヒドロキシ酪酸の生産性をどのように向上させるかが課題である。この点については、糖濃度 11%のスギ糖化液を持ちいて、培養した結果、スギ糖化液中の糖は 36 時間目にすべて消費され、3-ヒドロキシ酪酸を、糖等量あたりグルコースに匹敵する 20%程度の転換効率、分泌量 21.1 g/L、生産効率 0.35 g · L⁻¹ · h⁻¹ でスギ糖化液から生産することが可能となり、現在のところスギ糖化液は有効に PHB へと転換され、転換された PHB のほとんどは分解され、3-ヒドロキシ酪酸とし

て分泌されるといえる(図4, 表12)。生産濃度、速度のさらなる向上については、糖の濃縮が初期検討したが、濃縮にかかるエネルギー消費が大きく、培養後に菌体濃縮して、3-ヒドロキシ酪酸を分泌生産することを試みた。通常は、濃縮に伴う、分解抑制などが起こることが懸念されたが、培養60時間の時点で、2倍、4倍に濃縮して、微好気条件に移行した場合、それに比例して分泌される3-ヒドロキシ酪酸の生産量、濃度が上昇することが判明し、最大250 g/Lの分泌溶液を回収することができ、十分事業性のあるものと判断した(図29)。

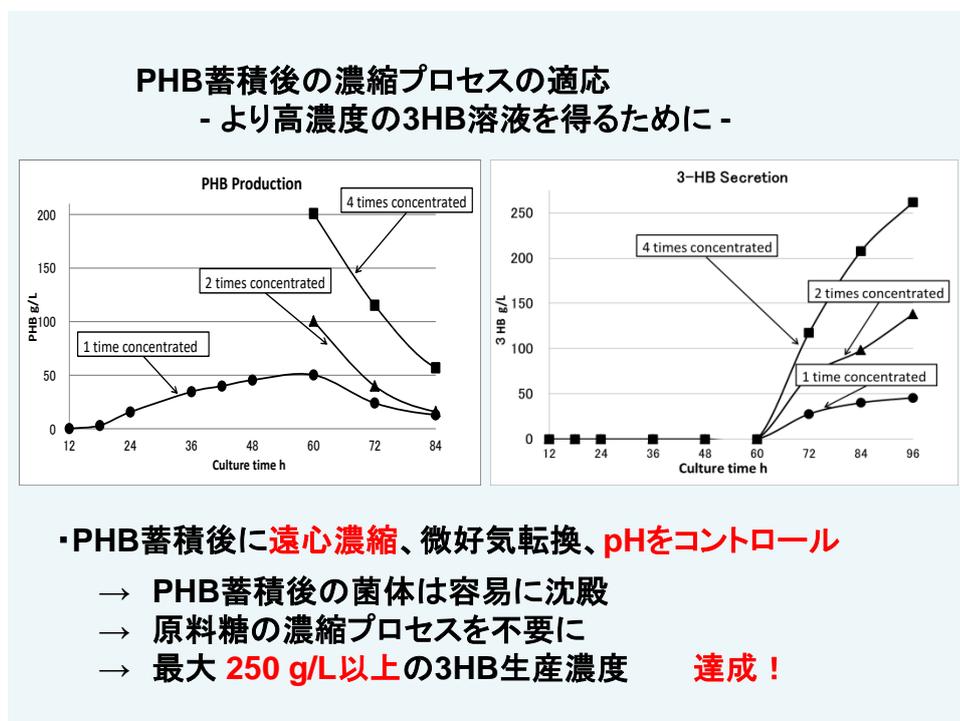


図29 PHB蓄積後の、3HB分泌プロセスの改良

一般に、化学反応プロセスと比較すると、微生物による発酵生産プロセスは、高い原料価格、水の精製のコスト、低い基質濃度、生産物濃度など実用化を妨げる多くの課題を抱えている。特に、他の微生物のコンタミネーションを防ぐために、滅菌プロセスが必要であり、連続的な培養が難しく、これらが一層のコスト上昇に関わっている。近年、これらの課題を解決する可能性のある手段として、ハロモナス菌を含む好塩菌の優位性

が認識されている。好塩菌は、高塩濃度で生育すること、そのため培地を滅菌せずとも、コンタミネーションの懸念なく、連続培養が可能であること、幅広い温度領域で生育できること、高い基質濃度にも耐性であること、また、一部の好塩菌は pH で生育すること等、低コスト化に適した特徴がある (Yin et al. 2014)。特に、我々が使用した *Halomonas* sp. KM-1 は、至適 pH が 9.4 程度と高く、今回のプロジェクトの実験にあたっては、種菌の培養時以外は、滅菌操作を行わずに実験を実施した。基質濃度も、グルコースの場合 30%程度の濃度まで生育可能であり、それに伴って生産物の濃度も向上させることが可能である。

一方、3-ヒドロキシ酪酸の生産の経済性の試算では(図 3 0)、3-ヒドロキシ酪酸 1kg あたり、1,000 円程度での生産の可能性が示された。今後より詳細な試算検討が必要なもの、企業における数十 L スケールの、精製糖を用いた培養により、事業化に向けた課題が判明しつつある。事業化にあたっては、まずは市販価格の高い医療用原料や健康食品などとしての利用を検討していくことが妥当と判断する。

3-ヒドロキシ酪酸の機能については、脳幹、胎盤を通り、ヒトのエネルギー源として利用され、また、がん細胞には利用できないことは従来知られていたが、最近、3-ヒドロキシ酪酸が、炎症を引き起こすタンパク質の一部「NLRP3」の発現を直接抑えることにより炎症性の病気、例えば、2 型糖尿病、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化などの発生を抑制する可能性が、マウスを用いた実験で明らかになった (Youm et al., 2015) (図 3 1、3 2)。

また、今回のプロジェクトの中で、ラットを用いた亜急性毒性試験を実施した。ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸の無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 2000 mg/kg/日を上回る、すなわち無毒性と判断された。このことは、3-ヒドロキシ酪酸が、安全な化合物であることと共に、それを生産するハロモナス菌も生産プロセスとして安全であると判断された。今後、ハロモナス菌を用いて、3-ヒドロキシ酪酸以外の化合物の生産

を検討するホワイトバイオプロセス、バイオマスリファイナリーの確立にあたって、今回のプロジェクト検討の中で判明した種々の結果は、早急な事業化に向けて、有意な可能性を示したものと思われる。プロジェクト発足当時は、バレル 100 ドル程度であった原油の価格が、現在は 50 ドル程度と、バイオマスリファイナリーの事業化、特にエネルギーへの応用へは厳しい状況が生じている。日本国内においては、未だ遺伝子組換え手法を用いた生物の社会寛容度は低く、バイオマスリファイナリーの生産はバイオプラスチックなどごく限られた検討がなされているに過ぎない。それゆえ、今後の事業化検討においては、まずは遺伝子組換え体でないこと、バイオセーフティレベル 1(ヒトあるいは動物に病気を起こす可能性の低い微生物)であることのメリットを生かし、野生株を用いた培養プロセスの調整のみでの事業化に向けた展開について検討する(図 3 3、3 4)。

PHB, 3-HB生産の経済性について

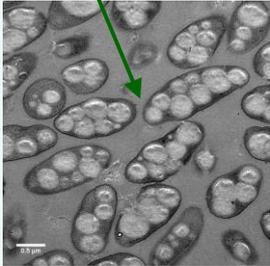
間伐材を利用した場合の経済性・有効性 (年産5000 ^ト 、想定、日本全体 0.23%にあたる人工林2.4万haの年間増加バイオマスに相当)		
原料費	木材糖化液 125円/kg(対糖収率33%なので)	378.8 円
	その他原料	20.8
→ 木材糖化液の製造コストを 目標 30-50%削減 リグニンの有効利用など		
設備費		216.5
製造コスト (人件費・処理費など)		69
→ 雑菌の混入がない利点を生かし、 設備費を 目標 30-50%削減		
精製コスト (乳酸精製コストを代替)		55.6
重合コスト	運転費	100
	設備費	37
3-HB製造コスト	想定額 740.7 円/kg	目標 443-562 円/kg
PHB製造コスト	877.7 円/kg	580-699 円/kg
PHB市場価格(カネカ資料) 現在	1000 円/kg	予想 500-800円/kg ?

試算根拠 バイオマスプラスチックの開発・利用普及に関する調査 日本有機資源協会

図 3 0 PHB、3 HB 生産の経済性について

PHB, 3-ヒドロキシ酪酸とは

微生物中に蓄えられる
PHB (ポリ3-ヒドロキシ酪酸)



Halomonas sp. KM-1

構造・特長

[*]OC(C)CC(=O)O[*]

ポリ3-ヒドロキシ酪酸
・精製に難、異臭あり
・物性の調整難しい

OC(C)CC(=O)O

3-ヒドロキシ酪酸
・精製可能
・化学合成でポリマーに

↔

3-ヒドロキシ酪酸の用途

- ・医療・医薬
輸液(点滴)の材料
- ・ファインケミカル原料
光学活性をもつ合成出発物質
- ・高機能化飼料
ストレス耐性の付与
- ・ポリエステル原料
今は石油から生産 数万トン/年

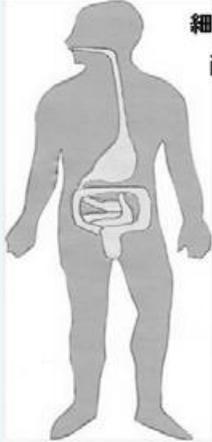
炎症性蛋白質NLRP3
の発現抑制

- ・2型糖尿病
- ・アルツハイマー
- ・アテローム性動脈硬化

Nature Medicine
DOI:10.1038/nm.3804

図 3 1 PHB、3-ヒドロキシ酪酸とは

3-ヒドロキシ酪酸の人に対する効果



細胞膜、ミトコンドリア内膜、血液脳関門、胎盤を通過

酸素消費の最も少ない効率のよいエネルギー源

脳の最も効率の良いエネルギー源

酸欠状態における神経細胞保護

脳の酸化ストレス低下

認知機能の低下を改善

虚血心筋へのエネルギー供給

難産のときの胎児の脳の保護

睡眠時無呼吸症候群の機能低下予防

小児てんかんの予防(Na塩、エステル)

糖質ゼロ食を3~4週間 ⇔ 血中のR-3HB濃度が500~600 mg/L

沖縄県工業技術センター研究報告書 第15号 平成24年度より

図 3 2 3-ヒドロキシ酪酸の人に対する効果

参考 企業との検討

- 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術に関し、企業と共同で、大スケール培養、精製等のプロセスの検討を実施。

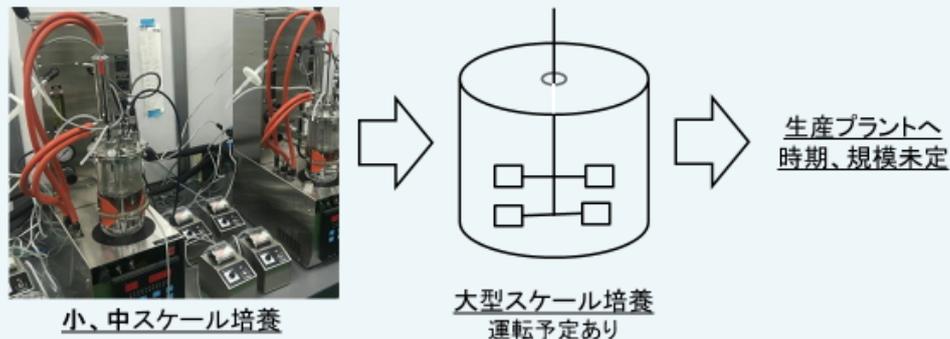


図 3 3 企業との検討

独自菌株ハロモナス菌の利点

- 未精製の余剰バイオマス(木材糖化液、バイオディーゼル廃グリセロール)を利用可能
- 木材糖化液に含まれるC6糖グルコースに加え、C5糖キシロース、アラビノースを同時に利用可能
- 中程度の高塩濃度(海水利用可能)、高アルカリ環境に生育するので、雑菌増殖なく、多量のエネルギーを要する培地の滅菌が不要
- 好氣的条件で乾燥菌体重量の約80%のバイオプラスチックPHBを菌体内に蓄積、微好気条件に変更後、光学活性基幹化学品 (R)-3-ヒドロキシ酪酸を分泌

図 3 4 独自菌体ハロモナス菌の利点

5. 研究発表

論文発表 (査読あり)

1. “Efficient production and secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from living *Halomonas* sp. KM-1 under successive aerobic and microaerobic conditions” Y. Kawata, K. Kawasaki, S. Shigeri APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 96 卷 4 号 913~920 頁 2012/11/01
2. “Taxonomic characterization and metabolic analysis of the *Halomonas* sp. KM-1, a highly bioplastic poly(3-hydroxybutyrate)-producing bacterium” Y. Kawata, L-H Shi, K. Kawasaki, S. Shigeri JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 113 卷 4 号 456~460 頁 2012/04/01
3. “Draft Genome Sequence of the *Halomonas* sp. KM-1, a Moderately Halophilic Bacterium that Produces the Bioplastic, Poly(3-hydroxybutyrate)” Y. Kawata, K. Kawasaki, S. Shigeri, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 194 卷 10 号 2738~2739 頁, 2012/04/01
4. “Metabolomics-based component profiling of *Halomonas* sp. KM-1 during different growth phases in poly(3-hydroxybutyrate) production” You-Xun Jin, Lian-Hua Shi, Yoshikazu Kawata BIORESOURCE TECHNOLOGY 2013, 140 卷, 73~ 79
5. “Efficient secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 cultured with saccharified Japanese cedar under microaerobic conditions” Y. Kawata, Y-X Jin, M. Nojiri, BIORESOURCE TECHNOLOGY 2013, 140 卷 443~ 445
6. “Efficient secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 by nitrate fed-batch cultivation with glucose under microaerobic conditions”, Y. Kawata, H. Ando, I. Matsushita, J. Tsubota, BIORESOURCE TECHNOLOGY, 2014, 156 卷, 443~445
7. “Analysis of optimal conditions for poly-(R)-3-hydroxybutyric acid and (R)-3-hydroxybutyric acid production by *Halomonas* sp. KM-1 cells under nitrate fed-batch cultivation with glucose” Y. Kawata, in submission
8. “Optimal (R)-3-hydroxybutyric acid secretion from *Halomonas* sp. KM-1 cells cultured with saccharified Japanese cedar via urea fed-batch cultivation” Y. Kawata, M. Nojiri, I. Matsushita, J. Tsubota, in submission

論文発表(査読なし)

1. “光学活性基幹化学品を余剰バイオマスから製造する技術” 河田悦和, ケミカルエンジニヤリング, 57 卷 12 号 901~907 頁 2012/12/01 化学工業社
2. “好塩菌ハロモナスの工業利用” 河田悦和, 生物工学会誌, 90 卷 9 号 594 頁 2012/09/01

3. “バイオマスリファイナリープロセスの実現はハツ夢になるか？” 河田悦和, 環境技術, 44 巻 1 号 1-2 項

招待講演

1. “ハロモナス菌による微好気培養による 3-ヒドロキシ酪酸等の生産技術開発に関する研究” 河田悦和, SCE2012 第 32 回キャピラリー電気泳動シンポジウム 主催 (公社)日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会 2012/11/08
2. “余剰バイオマス資源を用いた 光学活性基幹化学品 3-ヒドロキシ酪酸の生産”河田悦和 高機能遺伝子デザイン技術研究組合講演会 主催 高機能遺伝子デザイン技術研究組合 2013/04/12
3. “Efficient secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 cultured with saccharified Japanese cedar under microaerobic conditions, 河田悦和, You-Xun Jin, 川崎一則, 野尻昌信, 10th Biomass-Asia Workshop タイ王国バンコク 主催者 NASTDA, TISTR, AIST, NEF, 2013/08/05
4. “余剰バイオマス資源を用いた光学活性基幹化学品 3-ヒドロキシ酪酸の生産” 河田悦和, 高分子同友会勉強会 2013/08/26 主催者 高分子学会高分子同友会

口頭・ポスター発表

1. “*Halomonas* sp. KM-1 による好気・微好気条件における 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産” “Efficient secreted production of (R)-3-hydroxybutyric acid under successive aerobic and microaerobic conditions by *Halomonas* sp. KM-1” 河田悦和, 川崎一則, 茂里康, 第 64 回日本生物工学会大会 口頭発表 主催 日本生物工学会 2012/10/24
2. “ハロモナス菌による微好気培養による 3-ヒドロキシ酪酸等の生産技術開発に関する研究” 河田悦和, 第 2 回健康工学研究部門研究会, 主催 産総研健康工学研究部門, 2012/09/15
3. “ハロモナス菌によるバイオプラスチック PHB 生産と GC-MS を用いた代謝分析” JIN YOUXUN, 河田悦和, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013/3/26
4. “C5 糖、C6 糖混合物を用いた光学活性基幹化学品 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産” 河田悦和, 第 2 回 JACI/GSC シンポジウム (第 13 回 GSC シンポジウム) 主催 公益社団法人 新化学技術推進協会, 2013/06/06
5. “スギを用いたハロモナス菌による 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産” 河田悦和, 川崎一則, 野尻昌信, 日本生物工学会 2013 年度大会 主催 日本生物工学会, 2013/09/18
6. “ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術開発” 河田悦和, 川崎一則, 野尻昌信 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014/03/28
7. “ソーダ・アントラキノン蒸解スギのオンサイト培養酵素を使った酵素糖化” 野尻昌信 他 セルロース学会第 20 回年次大会

8. “ハロモナス菌 KM-1 株のスギ糖化液を用いた 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産” 河田 悦和, 川崎 一則, 野尻昌信, 日本生物工学会 2014 年度大会 主催 日本生物工学会, 2014/09/09
9. “ハロモナス菌による 3-ヒドロキシ酪酸の生産技術開発” 河田悦和, CphI 国際医薬品 中間体展, 主催者 UBM, 化学工業日報, 2014/04/10
10. “ハロモナス菌 KM-1 株のスギ糖化液を炭素源とした 3-ヒドロキシ酪酸の分泌生産” 河田 悦和, 川崎一則, 野尻昌信 第 66 回日本生物工学会大会 (2014)、2014/09/09
11. “ハロモナス菌を用いた木材糖化液からの 3-ヒドロキシ酪酸の生産の最適化” 河田悦和, 野尻昌信, 松下 功, 坪田 潤 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015/03/28

「国民との科学・技術対話」の実施

1. 産総研関西センター研究講演会

“余剰バイオマス資源を用いた光学活性基幹化学品 3-ヒドロキシ酪酸の生産”

主催 産総研関西センター 2013 年 3 月 7 日 参加者 80 名

2. 産総研関西センター一般公開

“池田でとれた微生物、バイオ技術でひろがる未来”

主催 産業技術総合研究所 2013 年 8 月 3 日 参加者 40 名

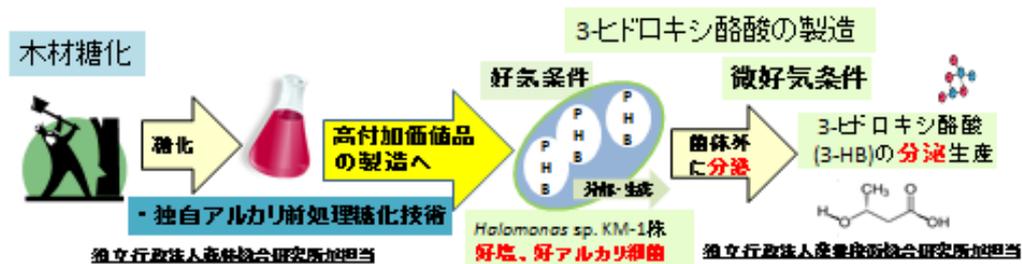
6. 知的財産権の取得状況（関連する主な特許の状況）

1. 好塩菌によるポリヒドロキシアルカノエート（PHAs）産生方法及び好塩菌
登録 5164182（H24/12/28） 日本
登録 特 8372611 2013/02/12 米国
登録 602008027526.4（2013/09/11） ドイツ
2. 3-ヒドロキシ酪酸又はその塩の産生方法
特願 2011-222685（H23/10/07）日本
PCT/JP2012/075352（H24/10/01） 移行中 米国、EPO、マレーシア、タイ
3. 好塩菌による木材糖化液を用いたポリヒドロキシアルカノエート（PHAs）等の産生方法 登録 5299969（H25/06/28）
4. 好塩菌による乳酸及び／又は酢酸の産生方法 登録 5229904（H25/03/29）
5. ハロモナス菌を用いた3-ヒドロキシ酪酸の製造方法 特願 2013-233961、2013/11/12
6. ハロモナス菌を用いた3-ヒドロキシ酪酸の製造方法 特願 2014-030915、2014/02/20
7. ハロモナス菌を用いた3-ヒドロキシ酪酸の製造方法 特願 2014-105522、H26/05/21
8. ハロモナス菌を用いた3-ヒドロキシ酪酸の製造方法特願 2014-187957、H26/09/16
9. ハロモナス菌を用いた3-ヒドロキシ酪酸の製造方法 PCT/JP2014/079855、H26/11/11

7. 研究概要図

(横式ロ)

K123009ハロモナス菌による木材から3-ヒドロキシ酪酸等の生産技術開発に関する研究
独立行政法人産業技術総合研究所



特長

・独自木材糖化技術
発酵阻害物質が激減

・独自開発3-ヒドロキシ酪酸生産ハロモナス菌
C5, C6糖の同時利用
発酵阻害物質に強い
優れた3-ヒドロキシ酪酸の生産性、経済性

本研究の課題

- ・木材糖化
発酵阻害物質の低減
- ・3-ヒドロキシ酪酸の製造
発酵阻害物質への耐性向上
生産性向上

研究期間で

対策

- ・木材糖化
阻害物質の生成抑制
糖化濃度の向上、阻害物質の低減
- ・3-ヒドロキシ酪酸の製造
馴化
培養条件の最適化、大量培養検討

8. 英文概要

Title; Development of 3-hydroxybutyric acid Production Technology from Wood using *Halomonas*

Research Institute; Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

Principal Investigator; Yoshikazu Kawata

Abstract;

Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) is a major species in Japanese artificial forests and its utilization is a major concern of forestry management. *Halomonas* sp. KM-1 was recently isolated and found to grow effectively with saccharified Japanese cedar wood, resulting in intracellular storage of poly-(*R*)-3-hydroxybutyric acid (PHB) under aerobic conditions; under microaerobic conditions, extracellular secretion of (*R*)-3-hydroxybutyric acid ((*R*)-3-HB) led to degradation of intracellular PHB. In this study, we optimized the production of PHB and secretion of (*R*)-3-HB using saccharified Japanese cedar in urea fed-batch culture. Intracellular PHB production after 36 h aerobic cultivation was 23.6 g/L; after a shift to microaerobic conditions for 24 h, the concentration of (*R*)-3-HB in the medium reached 21.1 g/L. This is the highest level of (*R*)-3-HB productivity of a living bacterium reported to date using saccharified wood source. Thus, KM-1 efficiently utilizes saccharified Japanese cedar to produce PHB and secreted (*R*)-3-HB, making it a practical candidate for use in the industrial production of (*R*)-3-HB.

9. 参考文献

- Gao, H.J., Wu, Q. and Chen, G.Q. (2002) Enhanced production of D-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **213**, 59-65.
- Ikeda, T., Sugimoto, T., Nojiri, M., Magara, K., Hosoya, S. and Shimada, K. (2009) Alkali pre-treatment for producing bioethanol fuel from lignocellulosics part2. Bioethanol production from waste and recycled materials. *Japan TAPPI J* **63**, 581–591.
- Ishizaki, A., Tanaka, K., 1991. Production of Poly-beta-Hydroxybuturic Acid from Carbon Dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 71 (4), 254-257
- Lee, S. Y., Lee, Y. and Wang, F. (1999) Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol Bioeng* **65**, 363–368.
- Lee, S.Y. and Lee, Y. (2003) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3421-3426.
- Liu, Q., Ouyang, S.P., Chung, A., Wu, Q. and Chen G.Q. (2007) Microbial production of R-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring genes of phbA, phbB, and tesB. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 811-818.
- Matsumoto, K., Okei, T., Honma, I., Ooi, T., Aoki, H. and Taguchi, S. (2013) Efficient (R)-3-hydroxybutyrate production using acetyl CoA-regenerating pathway catalyzed by coenzyme A transferase. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 205-210.
- Monteil-Rivera, F., Betancourt, A., Van Tra, H., Yezza, A. and Hawari, J. (2007) Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells. *J Chromatogr A* **1154**, 34–41.
- Nath, A., Bhat, S., Devle, J. and Desai, A. (2005) Enhanced production of 3-hydroxybutyric acid (3-HB) by in vivo depolymerization of polyhydroxybutyric acid in 3-HB dehydrogenase mutants of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Ann Microbiol* **55**, 107-111.
- Quillaguaman, J., Doan-Van, T., Guzman, H., Guzman, D., Martin, J., Everest, A. and Hatti-Kaul, R. (2008) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 227–232.
- Quillaguaman, J., Guzman, H., Van-Thuoc, D. and Hatti-Kaul, R. (2010) Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1687–1696.
- Ren, Q., Ruth, K., Thöny-Meyer, L. and Zinn, M. (2010) Enantiomerically pure

- hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 41–52.
- Shiraki, M., Endo, T. and Saito, T. (2006) Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **102**, 529-534.
- Tan, D., Xue, Y.S., Aibaidula and G. Chen, G.Q. (2011) Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol* **102**, 8130–8136.
- Tokiwa, Y. and Ugwu, C.U. (2007) Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. *J Biotechnol* **132**, 264–272.
- Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., Fukusaki, E., 2011. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*. 12, 131.
- Ugwu, C.U., Tokiwa, Y., Aoyagi, H., Uchiyama, H. and Tanaka, H. (2008) UV mutagenesis of *Cupriavidus necator* for extracellular production of (R)-3-hydroxybutyric acid. *J Appl Microbiol* **105**, 236-242.
- Ugwu, C.U., Tokiwa, Y. and Ichiba, T. (2011) Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by fermentation and bioconversion processes with *Azohydromonas lata*. *Bioresour Technol* **102**, 6766-6768.
- Wang, Y. and Liu, S. (2014) Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates. *AMB Express*, **4**, 28.
- Yin, J., Chen, J.C., Qiong, W. and Chen, G.Q. (2014) Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol Adv*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>
- Youm, Y.H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M. Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., Kang, S., Horvath, T L., Fahmy, T. M., Crawford, P.A., Biragyn, A., Alnemri, E. and Dixit, V D. (2015) The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine* **21**,263-269
- Zhang, L., Xu, J., Zhang, L., Zhang, W., Zhang, Y., 2003. Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B*. 793, 159–165.

補遺 1 ラットを用いる急性経口毒性試験

ラットを用いる急性経口毒性試験

要 約

3-ヒドロキシ酪酸を検体として、ラットを用いる急性経口毒性試験(限度試験)を行った。

試験群には2000 mg/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として注射用水を雌雄ラットに単回経口投与し、14日間観察を行った。その結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。以上のことから、ラットを用いる単回経口投与において、検体のLD50値は、雌雄ともに2000 mg/kgを超えるものと考えられた。

依 頼 者

独立行政法人 産業技術総合研究所

検 体

3-ヒドロキシ酪酸

試験期間

2014年08月26日～2014年9月16日

試験実施施設

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所
北海道千歳市文京2丁目3番

試験責任者

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所
安全性試験部
服部 秀樹

1 試験目的

検体について、OECD Guideline for Testing of Chemicals 420(2001)に準拠し、ラットにおける急性経口毒性を調べる。

2 検 体

3-ヒドロキシ酪酸

3 試験液の調製

検体に注射用水を加え、50℃に設定した恒温水槽[アズワン株式会社]で加温及び超音波洗浄機[東京超音波技研株式会社]を用いて処理を行い、100 mg/mL試験液とした。

なお、検体の一部が溶解せず試験液にはわずかに浮遊物が認められたため、浮遊物を避けて分注し、投与に用いた。

4 試験動物

4週齢のSlc:Wistar/ST雌雄ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、約1週間の予備飼育を行って一般状態に異常のないことを確認した後、試験に使用した。試験動物はプラスチック製ケージに2又は3匹ずつ収容し、室温20～26℃、照明時間12時間/日に設定した飼育室において飼育した。飼料[マウス・ラット・ハムスター用ガンマ線照射飼料；CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社]及び飲料水(水道水)は自由に摂取させた。

5 試験方法

検体投与用量として2000 mg/kgを投与する試験群及び溶媒対照として注射用水を投与する対照群を設定し、各群につき雌雄それぞれ5匹を用いた。

投与前に約18時間試験動物を絶食させた。体重を測定した後、試験群には試験液、対照群には注射用水をそれぞれ20 mL/kgの投与容量で胃ゾンデを用いて強制単回経口投与した。

観察期間は14日間とし、投与日は頻回、翌日から1日1回の観察を行った。投与後7及び

14日に体重を測定し、t-検定により有意水準5%で群間の比較を行った。観察期間終了時に動物すべてを剖検した。

6 試験結果

1) 死亡例

雌雄ともにいずれの投与群においても、観察期間中に死亡例は認められなかった。

2) 一般状態

雌雄ともにいずれの投与群においても、観察期間中に異常は見られなかった。

3) 体重変化(表-1及び2)

投与後7及び14日の体重測定において、雌雄ともに試験群は対照群と比べ体重値に差は見られなかった。

4) 剖検所見

観察期間終了時の剖検では、雌雄ともにすべての試験動物に異常は見られなかった。

7 考 察

検体について、ラットを用いる急性経口毒性試験(限度試験)を実施した。

その結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。以上のことから、ラットを用いる単回経口投与において、検体のLD50値は、雌雄ともに2000 mg/kgを超えるものと考えられた。

表-1 体重変化(雄)

投与群	投与前	投与後(日)	
		7	14
試験群	139.1±5.6 (5)	208.4±4.1 (5)	259.5±5.4 (5)
対照群	140.7±4.3 (5)	208.5±9.8 (5)	262.6±11.2 (5)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。

括弧内に動物数を示した。

表-2 体重変化(雌)

投与群	投与前	投与後(日)	
		7	14
試験群	119.1±4.6 (5)	166.2±1.9 (5)	192.0±6.0 (5)
対照群	119.7±3.2 (5)	162.4±9.0 (5)	186.2±11.2 (5)

体重は平均値±標準偏差で表した(単位:g)。

括弧内に動物数を示した。

以 上

補遺2 ラットを用いる亜急性経口毒性試験

最終報告書

ハロモナス菌乾燥菌体及び3-ヒドロキシ酪酸のラットを用いた
4週間反復経口投与毒性試験

試験番号：N-TT140003

報告日：2015年2月6日

試験期間：2014年11月11日~2015年2月28日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所
〒300-2611 茨城県つくば市大久保8番

試験委託者

独立行政法人産業技術総合研究所
〒563-8577 大阪府池田市緑ヶ丘1-8-31

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7

1. 目次

1.	目次	- 77 -
2.	試験実施概要	- 80 -
2.1	試験番号	- 80 -
2.2	試験表題	- 80 -
2.3	試験目的	- 80 -
2.4	動物の福祉	- 80 -
2.5	試験委託者	- 80 -
2.6	試験受託者	- 80 -
2.7	試験実施施設	- 81 -
2.8	試験責任者	- 81 -
2.9	試験担当者	- 81 -
2.10	試験日程	- 81 -
2.11	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと	- 81 -
2.12	資料の保存	- 82 -
2.13	試験責任者の記名・押印	- 82 -
3.	要約	- 82 -
4.	試験材料及び方法	- 82 -
4.1	被験物質及び媒体	- 82 -
4.1.1	被験物質 1	- 82 -
4.1.2	被験物質 2	- 83 -
4.1.3	媒体	- 83 -
4.2	投与液の調製	- 83 -
4.3	試験動物種及び系統の選択理由	- 83 -
4.4	試験動物	- 83 -
4.5	飼育条件	- 84 -
4.6	飼料、床敷及び飲料水中の混入物質の分析	- 84 -

4.7	動物の識別	- 84 -
4.8	群分け	- 84 -
4.9	投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	- 85 -
4.10	投与方法	- 85 -
4.11	投与量及び群構成	- 85 -
4.12	投与量の設定根拠	- 85 -
4.13	観察及び検査の方法	- 86 -
4.13.1	一般状態の観察	- 86 -
4.13.2	体重測定	- 86 -
4.13.3	摂餌量測定	- 86 -
4.13.4	摂水量測定	- 86 -
4.13.5	尿検査	- 87 -
4.13.6	臨床検査用採血	- 87 -
4.13.7	病理学検査	- 90 -
4.13.7.1	剖検	- 90 -
4.13.7.2	器官重量測定	- 90 -
4.13.7.3	固定/保存	- 90 -
4.13.7.4	病理組織学検査	- 90 -
4.13.7.5	瀕死動物の取扱い	- 90 -
4.14	統計解析	- 92 -
5.	試験結果	- 92 -
5.1	死亡動物	- 92 -
5.2	一般状態	- 92 -
5.3	体重	- 93 -
5.4	摂餌量	- 93 -
5.5	尿検査（摂水量を含む）	- 93 -
5.6	血液学検査	- 93 -
5.7	血液化学検査	- 94 -
5.8	器官重量	- 94 -

5.9 剖検 - 94 -

6. 考察 - 95 -

図

Fig. 1~4 体重
Fig. 5~8 摂餌量

表

Table 1-1~1-6 一般状態
Table 2-1~2-4 体重
Table 3-1~3-4 摂餌量
Table 4-1~4-16 尿検査
Table 5-1~5-16 血液学検査
Table 6-1~6-12 血液化学検査
Table 7-1~7-8 器官重量 (絶対重量)
Table 8-1~8-8 器官重量 (相対重量)
Table 9-1 及び 9-2 剖検所見

付表

Appendix 1-1~1-30 個体別一般状態
Appendix 2-1~2-10 個体別体重
Appendix 3-1~3-10 個体別摂餌量
Appendix 4-1~4-10 個体別尿検査
Appendix 5-1~5-33 個体別血液学検査
Appendix 6-1~6-22 個体別血液化学検査
Appendix 7-1~7-20 個体別器官重量 (絶対重量)
Appendix 8-1~8-20 個体別器官重量 (相対重量)
Appendix 9-1 及び 9-2 個体別剖検所見

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

N-TT140003

2.2 試験表題

ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸のラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験

(A 4-week oral gavage repeated dose toxicity study of the dried cells of *Halomonas* sp.KM-1and 3-Hydroxybutyric acid in rats)

2.3 試験目的

ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸をラットに 4 週間反復経口投与し、明らかな毒性変化を惹起する用量とその変化の内容、及び毒性変化の認められない用量を求める。

2.4 動物の福祉

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、最終改正平成 24 年 9 月 5 日法律第 79 号)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」
(日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日)

本試験は試験実施施設の動物実験委員会の承認を受けている(承認番号: APS14001)。

2.5 試験委託者

独立行政法人産業技術総合研究所

〒563-8577 大阪府池田市緑ヶ丘 1-8-31

担当者: 河田 悦和

TEL: 072-751-9684 FAX: 072-751-9628

2.6 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

TEL: 03-5453-8101 FAX: 03-5453-8109

2.7 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所

〒300-2611 茨城県つくば市大久保 8 番

代表 TEL : 029-877-2755 FAX : 029-865-1798

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所 安全性・薬理研究部

金光弘幸

ダイヤル TEL : 029-877-2770 FAX : 029-865-1798

2.9 試験担当者

試験主担当者 : 寺戸康徳

臨床検査責任者 : 中村大地

病理標本作製主担当者

: 野口真紀

病理検査責任者 : 花見正幸

2.10 試験日程

試験開始日 : 2014年11月11日

試験責任者被験物質受領日

: 2014年12月16日

動物入荷日 : 2014年12月12日

投与開始日 : 2014年12月19日

投与終了日 : 2015年1月15日

投与終了剖検日 : 2015年1月16日

試験終了日 : 2015年2月XX日

2.11 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

計画剖検時の血液学検査で、動物番号：3102のクエン酸ナトリウム入り容器への血液量（試料3）が十分に得られなかった。その結果、検査項目のPT及びAPTTが測定できなかった。

同群の6例中5例でPT及びAPTTが測定できており、被験物質投与による影響を評価するのに十分な例数の測定がなされていることから、試験評価への影響は無いと判断した。

2.12 資料の保存

試験計画書原本（試験計画書変更書を含む）、記録文書、生データ、報告書類（最終報告書の原本を含む）及び標本は株式会社ボゾリサーチセンターつくば研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後5年間とする。期限終了後の保存については、独立行政法人産業技術総合研究所と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。ただし、長期保存に耐えられない生体試料（尿及び血漿）については、試験終了時に廃棄する。

2.13 試験責任者の記名・押印

金 光 弘 幸 年 月 日 印

株式会社ボゾリサーチセンター つくば研究所

要約

ハロモナス菌乾燥菌体及び3-ヒドロキシ酪酸を注射用水にそれぞれ懸濁及び溶解し、0 (媒体)、各被験物質それぞれ1000及び2000 mg/kg/日の投与量で6週齢のCrI:CD(SD) SPFラット（1群雌雄各6匹）に4週間強制経口投与し、その毒性を検討した。

ハロモナス菌乾燥菌体及び3-ヒドロキシ酪酸投与群のすべての動物で、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液化学検査及び剖検で投薬起因性の毒性変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験におけるハロモナス菌乾燥菌体及び3-ヒドロキシ酪酸の無毒性量（NOAEL）は、雌雄ともに2000 mg/kg/日を上回ると推定された。

試験材料及び方法

2.14 被験物質及び媒体

2.14.1 被験物質 1

供給者	:	独立行政法人産業技術総合研究所
名称	:	ハロモナス菌乾燥菌体
含量	:	ほぼ100%
性状	:	乾燥菌体
保存方法	:	冷凍（冷凍庫内、許容値：-20℃以下、実測値：-38.6~-24.1℃）
保存場所	:	つくば研究所 被験物質保存室及び被験物質調製室
返却	:	動物試験終了後の残量はすべて試験委託者に返却した。

2.14.2 被験物質 2

供給者	:	企業より分与
名称	:	3-ヒドロキシ酪酸
含量	:	95%以上
性状	:	淡黄色液体
保存方法	:	冷蔵（冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：2.9~5.0°C）
保存場所	:	つくば研究所 被験物質保存室及び被験物質調製室
返却	:	動物試験終了後の残量はすべて試験委託者に返却した。

2.14.3 媒体

名称	:	注射用水
規格	:	日本薬局方
メーカー	:	株式会社大塚製薬工場
ロット番号	:	4E88N 及び 4G73N
保存方法	:	室温
保存場所	:	つくば研究所 媒体調製室

2.15 投与液の調製

調製方法	:	試験 1 から 4 日までハロモナス菌乾燥菌体を必要量秤量し、媒体を加え懸濁し、所定濃度とした。試験 5 日以降は、ハロモナス菌乾燥菌体を必要量秤量し、アルミナ乳鉢を用いて粉碎しつつ媒体を徐々に加えて懸濁させ、所定濃度とした。試験期間を通じて、3-ヒドロキシ酪酸を必要量秤量し、媒体を加え加温後（約 50°C）溶解し、所定濃度とした。なお、各投与液ごとに調製した。
調製頻度	:	用時調製（調製後 3 時間以内に投与に使用した。）

2.16 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされている。ラットは医薬品などの安全性試験に広く用いられており、この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

2.17 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー（株）、厚木飼育センター] 雌雄各 33 匹を 5 週齢で購入し、4 日間の検疫期間を含む 7 日間の検疫・馴化飼育し、体重増加（検疫初回の体重~群分け時の体重）が順調で一般状態に異常の

みられなかった動物を選び、6週齢で試験に供した。使用動物は雌雄各30匹を用いた。検疫・馴化期間中、体重を3回（投与開始の6、4及び2日前）測定し、一般状態の観察を毎日1回行った。その結果、体重推移及び一般状態に異常はみられなかった。投与開始日の体重範囲は雄で191~216g、雌で138~181gであった。群分け後の予備動物は、試験から除外した（試験1日に、教育・研究用として飼育室から搬出した）。

2.18 飼育条件

動物は、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値：21.3~23.1 $^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度 $50\pm 20\%$ （実測値：48~60%）、換気回数1時間当たり10~20回、照明1日12時間±15分（07:00~19:00）の動物飼育室（飼育室番号：D302号室）に、床敷（7070C、販売業者：株式会社日本医科学動物資材研究所、生産所：Harlan、ロット番号：090914P）を入れたポリカーボネート製ケージ（W 280 × D 440 × H 210 mm）で個別飼育し、固形飼料CR-LPF（放射線滅菌：オリエンタル酵母工業（株）、ロット番号：141022）及び飲料水（つくば市水道水：給水瓶使用）を自由に摂取させて飼育した。

2.19 飼料、床敷及び飲料水中の混入物質の分析

飼料、床敷及び飲料水中の混入物質の分析は下記の施設で実施し、その分析報告書入手した。試験成績に影響のないことを確認したのち、分析報告書の写しを生データとして保存した。

供試飼料についての分析報告書（Eurofins Food and Product Testing K.K、供試全ロット）

供試床敷についての分析報告書（harlan、供試全ロット）

水道法に準拠する水質の分析報告書（株式会社 江東微生物研究所、2014年11月）

2.20 動物の識別

動物は、入荷時に小動物用耳標をつけて個体識別を行った。群分け後は、性別及び投与量ごと[対照群、低及び高用量（ハロモナス菌乾燥菌体群）、低及び高用量（3-ヒドロキシ酪酸群）]に4桁の動物番号を付けた。この場合、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌とした）、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには用量（群）ごとに色分けし、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、被験物質名及び剖検予定日を明記したケージラベルを掲示した。

2.21 群分け

「4.4 試験動物」に示した手順で選択した動物を群分け当日（投与開始2日前）の体重に基づいて、各群の平均体重ができるだけ均等となるように各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ（ブロック配

置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) により行った。

2.22 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

毒性試験ガイドラインに準じ、投与経路は使用適用予定経路である経口投与を選択し、投与期間は4週間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(7回/週)とした。

2.23 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。

投与容量は10 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した(08:50~12:55)。

対照群には媒体(注射用水)を同様に投与した。個体ごとの投与液量(表示単位:0.1 mL)は最新の体重を基準に算出した。

2.24 投与量及び群構成

ハロモナス菌乾燥菌体及び3-ヒドロキシ酪酸を、それぞれ投与量1000及び2000 mg/kg/日の2用量とし、対照群を加え5群構成とした。1群当たりの動物を雌雄各6匹とした。群構成表を次に示す。

群構成表

被験物質名	試験群	投与量 (mg/kg/日)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
	対照群	0	0	10	雄	6	1001~1006
					雌	6	1101~1106
ハロモナス菌 乾燥菌体	低用量群	1000	100	10	雄	6	2001~2006
					雌	6	2101~2106
	高用量群	2000	200	10	雄	6	3001~3006
					雌	6	3101~3106
3-ヒドロキシ 酪酸	低用量群	1000	100	10	雄	6	4001~4006
					雌	6	4101~4106
	高用量群	2000	200	10	雄	6	5001~5006
					雌	6	5101~5106

2.25 投与量の設定根拠

本試験は各被験物質の毒性情報が不明であったため、一般毒性試験における最大投与量2000 mg/kg/日を高用量とし、1000 mg/kg/日を低用量とした。

2.26 観察及び検査の方法

投与開始前は入手した全動物について、投与期間中は試験群の動物について次の表に示す観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

試験 1 日 (Study Day 1) : 投与開始日
試験 1 週 (Study Week 1) : 試験 1 から試験 7 日

観察及び検査（生前検査）の項目及び実施時期など

項目	実施時期又は頻度
一般状態観察	投与開始前（検疫・馴化期間中）：1回/日 投与期間中：投与前、投与直後及び1~3時間後の間（土及び休日は投与前と投与直後）
体重測定	投与開始前（検疫・馴化期間中）：3回（投与開始の6、4及び2日前） 投与期間中：試験1、4、7、10、14、17、21、24及び28日（測定当日の投与前） 剖検日：剖検のための動物搬出前
摂餌量測定	投与期間中：試験1、4、7、10、14、17、21、24及び28日（測定当日の投与前）
摂水量測定	試験4週（試験26及び27日）の尿検査時
尿検査	試験4週（試験26及び27日）

2.26.1 一般状態の観察

全個体について、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

2.26.2 体重測定

全個体について 07:18~10:52（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約16時間絶食させた後の体重を測定した。瀕死期剖検動物については、搬出前に測定した（ただし、データは参考値とし帳票には記載していない）。

2.26.3 摂餌量測定

全個体について 07:53~11:10（投与期間中は測定当日の投与前）に測定した。投与開始日の測定は前日からの1日量を、その後は3から4日ごとに3ないし4日間の累積摂取量を測定し、1匹1日量を算出した。

2.26.4 摂水量測定

尿検査時に、尿検査対象動物について前日からの1日当たりの摂水量を給水瓶を用い

て測定した。

2.26.5 尿検査

試験 4 週の検査当日の投与後、全ての生存例を採尿用のバットを取り付けた金網ケージ (W280 × D350 × H175 mm) に入れ尿検査を実施した。絶食・自由摂水下で 4 時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の 20 時間尿を採取した。次の表に記載した項目及び方法により検査した。測定用の試料は、遠心分離 (設定: 室温、約 500×g、約 5 分間) した上で測定に供した。

尿検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	試料	検査方法	単位
pH	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
タンパク質(protein)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
ケトン体(Ketone body)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
グルコース(Glucose)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
潜血(Occult blood)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
ビリルビン(Bilirubin)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	—
ウロビリノーゲン (Urobilinogen)	4 時間尿	試験紙法 (MultiStix ^{a)})	E.U./dL
色調(Color)	4 時間尿	肉眼検査	—
尿量(Uri.Vol.) ^{Note}	4 及び 20 時間尿	目盛り付のスピッツ管又はシリンジ を用いて測定	mL

使用機器

a): 尿自動分析装置 Clinitek AdvantusTM (Siemens Healthcare Diagnostics)

Note: 4 時間値と 20 時間値を合計し、24 時間尿量を算出した。

2.26.6 臨床検査用採血

剖検日に各群の全ての生存例についてイソフルラン麻酔下で動物 (約 16~20 時間絶食) の腹大動脈から採血を行った。採取用器材、採血量及び試料の種類を次の表に示す。血漿を得るために遠心分離 (設定: 室温、約 2,000×g、約 10 分間) を行った。

臨床検査用採血、採取用器材及び採血量など

試料 ^注	採取用器材	採血量	試料の種類
1	EDTA-2K 入り容器 (SB-41:シスメックス株式会社)	約 1 mL	血液
2	ヘパリンナトリウム入り容器 (ベノジェクトIIヘパリンナトリウム(5mL用): テルモ株式会社)	約 4 mL	血漿

3	3.2%クエン酸ナトリウム入り容器 (3.2%クエン酸ナトリウム入りニプロ採血管：ニプロ株式会社) (3.2%クエン酸ナトリウム：血液=1：9)	約 1.8mL	血漿
---	---	---------	----

注：採血は1→2→3の順に実施した。

1) 血液学検査

試料 1 及び 3 について実施した。また、鏡検による確認に備え試料 1 の一部を用いて May-Grünwald-Giemsa 染色血液塗抹標本を作製した。検査項目及び方法等を次の表に記載した。

血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	試料	検査方法	単位
赤血球数(RBC)	血液	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	$\times 10^4/\mu\text{L}$
ヘモグロビン濃度(HGB)	血液	シアンメトヘモグロビン変法 ^{a)}	g/dL
ヘマトクリット値(HCT)	血液	赤血球数と平均赤血球容積から算出	%
平均赤血球容積(MCV)	血液	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	fL
平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	血液	ヘモグロビン濃度と赤血球数から算出	pg
平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	血液	ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値から算出	g/dL
網状赤血球数 (Retic)	血液	RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	$\times 10^9/L$
血小板数(PLT)	血液	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	$\times 10^4/\mu\text{L}$
白血球数(WBC)	血液	2 角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	$\times 10^2/\mu\text{L}$
白血球百分比 ^{Note}	血液	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法と 2 角度レーザーフローサイトメトリー法 ^{a)}	%, $\times 10^2/\mu\text{L}$
プロトロンビン時間(PT)	血漿	クロット法 ^{b)}	S
活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)	血漿	クロット法 ^{b)}	S

使用機器

a): 総合血液学検査装置 ADVIA2120i (Siemens Healthcare Diagnostics)

b): 血液凝固自動分析装置 ACL Elite Pro (Instrumentation Laboratory)

Note: リンパ球 (LYMP)、好中球 (NEUT)、好酸球 (EOS)、好塩基球 (BASO)、単球 (MONO)、大型非染色性細胞 (LUC)。また、上記の細胞数を白血球数と白血球百分比から算出した。

2) 血液化学検査

試料 2 について実施した。検査項目及び方法等を次の表に記載した。

血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

検査項目	試料	検査方法	単位
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	血漿	UV レート法 ^{a)}	IU/L
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	血漿	UV レート法 ^{a)}	IU/L
アルカリフォスファターゼ (ALP)	血漿	Bessey-Lowry 法 ^{a)}	IU/L
γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-GTP)	血漿	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法 ^{a)}	IU/L
総コレステロール (T-CHO)	血漿	CEH-COD-POD 法 ^{a)}	mg/dL
トリグリセライド (TG)	血漿	LPL-GK-GPO-POD 法 ^{a)}	mg/dL
総ビリルビン (T-BIL)	血漿	ビリルビンオキシダーゼ法 ^{a)}	mg/dL
グルコース (GLU)	血漿	グルコースデヒドロゲナーゼ法 ^{a)}	mg/dL
尿素窒素 (BUN)	血漿	ウレアーゼ-LEDH 法 ^{a)}	mg/dL
クレアチニン (CRNN)	血漿	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-PPOD 法 ^{a)}	mg/dL
ナトリウム (Na)	血漿	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
カリウム (K)	血漿	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
クロライド (Cl)	血漿	イオン選択電極法 ^{a)}	mmol/L
カルシウム (Ca)	血漿	OCPC 法 ^{a)}	mg/dL
無機リン (P)	血漿	モリブデン酸法 ^{a)}	mg/dL
総タンパク質 (TP)	血漿	ビュレット法 ^{a)}	g/dL
アルブミン (ALB)	血漿	BCG 法 ^{a)}	g/dL
アルブミン・グロブリン比 (A/G)	血漿	総タンパク質とアルブミンから算出	—

使用機器

a): 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR (Toshiba Medical Systems)

3) 瀕死動物の取り扱い

瀕死動物 (動物番号:5005) については、可能な範囲内で臨床検査を実施したが、クエン酸ナトリウム入り容器への血液量 (試料 3) が十分に得られなかったため、PT 及び APTT については測定できなかった。なお、それらすべての成績は統計解析から除外した。

2.26.7 病理学検査

2.26.7.1 剖検

計画剖検動物全例について血液学及び血液化学検査用試料の採血を終えた後、腹腔血管からの放血により安楽殺し、剖検を行い、以降の検査を実施した。

2.26.7.2 器官重量測定

計画剖検動物全例について、次表に示す器官の絶対重量を測定するとともに、絶食後の体重から相対重量（/100 g 体重）を算出した。両側器官は左右別に測定するが、左右の値を合算して評価した。

2.26.7.3 固定/保存

計画剖検動物全例について、眼球、視神経、精巣、精巣上体を除く次表に示す器官・組織を 10 %リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。眼球及び視神経は 3 %グルタルアルデヒド・2.5 %ホルマリン液にて、精巣及び精巣上体はブアン液にて、それぞれ固定後、10 %リン酸緩衝ホルマリン液に移し、保存した。

2.26.7.4 病理組織学検査

計画剖検で被験物質投与に起因すると考えられる変化のみられた器官・組織がみられなかったため、病理組織学検査は実施しなかった。

2.26.7.5 瀕死動物の取扱い

瀕死に陥った動物（動物番号:5005）はイソフルラン麻酔下で開腹し、可能な範囲内で採血して放血致死させた後、速やかに剖検した。瀕死動物の器官重量は測定していない。瀕死動物については、次表に示す対象の器官/組織を 10 %リン酸緩衝ホルマリン液にて固定し、保存した。瀕死動物の器官・組織については、被験物質投与に起因すると考えられる変化がみられなかったため、病理組織学検査は実施しなかった。

固定/保存対象器官/組織

器官/組織	病理学検査	
	固定/保存	器官重量
大脳	√	√ (脳として測定)
小脳	√	
脊髄 (胸部)	√	
坐骨神経	√*	
眼球	√*	
視神経	√*	

器官/組織	病理学検査	
	固定/保存	器官重量
ハーパー腺	√*	
下垂体	√	√
甲状腺	√*	√
上皮小体	√*	(甲状腺として測定)
副腎	√*	√
胸腺	√	√
脾臓	√	√
顎下リンパ節	√	
腸間膜リンパ節	√	
心臓	√	√
胸大動脈	√	
気管	√	
肺 (気管支を含む)	√	√
舌	√	
食道	√	
胃	√	
十二指腸	√	
空腸	√	
回腸 (パイエル板を含む)	√	
盲腸	√	
結腸	√	
直腸	√	
顎下腺	√*	
舌下腺	√*	
肝臓	√	√
膵臓	√	
腎臓	√*	√
膀胱	√	
精巣/卵巣	√*/√*	√/√
精巣上体/子宮	√*/√*	
前立腺/陰	√/√	
精嚢	√*	
乳腺 (鼠径部)	√*	

器官/組織	病理学検査	
	固定/保存	器官重量
胸骨（骨髄）	√	
大腿骨（骨髄）	√*	
大腿部骨格筋	√*	
皮膚（鼠径部）	√*	
肉眼的異常部位	√	
喉頭	√	
鼻腔**	√	

個体識別部位（耳標装着耳介）も同様に保存した。

√印の部位を採取、器官重量測定、固定/保存した（瀕死動物の器官重量は測定していない）。

*: 両側性臓器は、両方を採取し固定・保存した。

**： 動物番号:5005 の瀕死の原因が鼻腔内にある可能性があったため、鼻腔を脱灰後切り出し、鼻腔内を観察した。

2.27 統計解析

計量データ（体重*、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量）について、次の手順に従って検定した。

まず、Bartlett 法により分散性の検定を行った（有意水準：1%）。分散が等しい場合には Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Steel 法を用いて対照群とハロモナス菌乾燥菌体群、対照群と 3-ヒドロキシ酪酸群の間で検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った。なお、検定には SAS® Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を使用した。

*： 相対器官重量算出のためのみに測定した剖検日の体重は除外した。

3. 試験結果

3.1 死亡動物

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

雌雄ともに投与期間を通じて死亡動物はみられなかった。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例（動物番号:5005）が試験 20 日に瀕死期剖検。対照群及び 1000 mg/kg/日投与群の雄並びに雌の全例で死亡はみられなかった。

3.2 一般状態

成績を Table 1-1~1-6 及び Appendix 1-1~1-30 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

雌雄ともに投与期間を通じて、異常はみられなかった。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雄の瀕死動物で試験 10 日に消瘦、試験 20 日に自発運動の減少、呼吸数の減少及び皮膚の蒼白化並びに腹部膨満が認められた。対照群及び 1000 mg/kg/日投与群の雄並びに雌の全例で異常はみられなかった。

3.3 体重

成績を Fig. 1~4、Table 2-1~2-4 及び Appendix 2-1~2-10 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸投与群：

雌雄ともに投与期間を通じて、対照群とほぼ同様に推移した。

3.4 摂餌量

成績を Fig. 5~8、Table 3-1~3-4 及び Appendix 3-1~3-10 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸投与群：

雌雄ともに投与期間を通じて、対照群とほぼ同様に推移した。なお、ハロモナス菌乾燥菌体の 2000 mg/kg/日投与群の雌で試験 1 日に有意な低値が認められたが、投与前の値であることから偶発的な変動と判断した。

3.5 尿検査（摂水量を含む）

成績を Table 4-1~4-16 及び Appendix 4-1~4-10 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雌で尿量の有意な低値が認められた。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雄で pH の低値傾向、タンパク質陽性例（2+）及びケトン体陽性例（1+）の増加、1000 mg/kg/日以上投与群の雌で pH の低値傾向、タンパク質陽性例（2+）の増加及び尿量の有意な低値が認められた。

3.6 血液学検査

成績を Table 5-1~5-16 及び Appendix 5-1~5-33 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

すべての投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、1000 mg/kg/日投与群の雄で好塩基球数の有意な高値が認められたが、用量相関性が認められず、実数のみの変動であったことから、偶発的な変動と判断した。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

すべての投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、2000 mg/kg/日投与群の雄でヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の有意な低値が認められたが、軽微な低値であり、他の赤血球パラメータにも変動がみら

れていないことから、偶発的な変動と判断した。

3.7 血液化学検査

成績を Table 6-1~6-12 及び Appendix 6-1~6-22 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雄と雌で、それぞれ無機リンと総コレステロールの有意な低値が認められた。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

2000 mg/kg/日投与群の雄でグルコース、ナトリウム及び無機リンの有意な低値が認められた。また、2000 mg/kg/日投与群の雌で総タンパク質及びアルブミンの有意な低値がみられた。

3.8 器官重量

成績を Table 7-1~7-8（絶対重量）及び Table 8-1~8-8（相対重量）、Appendix 7-1~7-20（絶対重量）及び Appendix 8-1~8-20（相対重量）に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

被験物質投与との関連が疑われる変化が雄の胸腺にみられた。

胸腺： 対照群と比較して絶対及び相対重量の有意な高値が、雄の 2000 mg/kg/日投与群でみられた。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

すべての投与群で被験物質投与による影響はみられなかった。

その他の変化は、用量相関性が無い、又は絶対重量あるいは相対重量のいずれか一方の変化であり、偶発的な変動と判断した。

3.9 剖検

成績を Table 9-1 及び 9-2、Appendix 9-1 及び 9-2 に示す。

ハロモナス菌乾燥菌体投与群：

被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例と雌 1 例で、それぞれ前胃の白色隆起巣と腺胃の暗赤色巣がみられたが、発現頻度及び病理学的性状から偶発所見と判断した。

3-ヒドロキシ酪酸投与群：

被験物質投与による影響はみられなかった。

なお、1000 mg/kg/日投与群の雄 1 例で空腸の憩室がみられたが、用量相関性がみられず、病理学的性状から偶発所見と判断した。

2000 mg/kg/日投与群の雄の瀕死動物 1 例（動物番号：5005）で、低栄養状態、皮

膚の蒼白化、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄、ガス貯留による胃及び腸の拡張、腺胃の暗赤色巣、胸腺及び脾臓の小型化がみられた。

4. 考察

ハロモナス菌乾燥菌体及び 3-ヒドロキシ酪酸を注射用水にそれぞれ懸濁及び溶解し、0 (媒体)、各被験物質それぞれ 1000 及び 2000 mg/kg/日の投与量で 6 週齢の CrI:CD(SD) SPF ラット (1 群雌雄各 6 匹) に 4 週間強制経口投与し、その毒性を検討した。

ハロモナス菌乾燥菌体

投与期間を通じて死亡動物はみられなかった。

雌雄すべての投与群で一般状態、体重及び摂餌量に異常はみられなかった。

尿検査で 2000 mg/kg/日投与群の雌の尿量で有意な低値がみられたが、血液化学検査で腎臓パラメータ、腎臓の器官重量及び剖検で腎臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

2000 mg/kg/日投与群の雄と雌の血液化学検査で、それぞれ無機リンと総コレステロールの有意な低値が認められたが、軽微な低値であり、腎臓及び肝臓の器官重量並びに剖検で腎臓及び肝臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

2000 mg/kg/日投与群の雄の胸腺で絶対及び相対重量の有意な高値が認められたが、血液学検査でリンパ球及び剖検で胸腺に異常がみられていないことから、偶発的な変動と判断した。

以上の結果から、本試験におけるハロモナス菌乾燥菌体の無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 2000 mg/kg/日を上回ると推定された。

3-ヒドロキシ酪酸

2000 mg/kg/日投与群の雄 1 例で試験 20 日に削瘦、自発運動の減少、呼吸数の減少及び皮膚の蒼白化並びに腹部膨満がみられ、瀕死期剖検した。剖検では低栄養状態、皮膚の蒼白化、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄、ガス貯留による胃及び腸の拡張、腺胃の暗赤色巣、胸腺及び脾臓の小型化がみられ、鼻腔粘膜の肥厚による内腔の狭窄より生じた胃及び腸の拡張による横隔膜の圧迫が瀕死の原因と考えられた。なお、同瀕死動物のこれらの所見は、病理学的性状から投薬起因性の毒性変化では無いと判断した。

生存動物の一般状態、体重及び摂餌量に異常はみられなかった。

尿検査で 2000 mg/kg/日投与群の雄の pH で低値傾向、タンパク質陽性例及びケトン体陽性例の増加、1000 mg/kg/日以上投与群の雌で pH の低値傾向、タンパク質陽性例の増加及び尿量の有意な低値がみられたが、腎臓の器官重量及び剖検で腎臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

血液化学検査では、2000 mg/kg/日投与群の雄でグルコース、ナトリウム及び無機リ

ンの有意な低値、2000 mg/kg/日投与群の雌で総タンパク質及びアルブミンの有意な低値がみられたが、軽微な低値であり、腎臓及び肝臓の器官重量並びに剖検で腎臓及び肝臓に異常が認められていないことから、偶発的な変動と判断した。

以上の結果から、本試験における 3-ヒドロキシ酪酸の無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに 2000 mg/kg/日を上回ると推定された。