

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5717271号  
(P5717271)

(45) 発行日 平成27年5月13日(2015.5.13)

(24) 登録日 平成27年3月27日(2015.3.27)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 1 2 Q 1/18 (2006.01)** C 1 2 Q 1/18  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2010-56824 (P2010-56824)  
 (22) 出願日 平成22年3月13日(2010.3.13)  
 (65) 公開番号 特開2011-188783 (P2011-188783A)  
 (43) 公開日 平成23年9月29日(2011.9.29)  
 審査請求日 平成25年2月11日(2013.2.11)

(73) 特許権者 504174135  
 国立大学法人九州工業大学  
 福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号  
 (74) 代理人 100090697  
 弁理士 中前 富士男  
 (74) 代理人 100176142  
 弁理士 清井 洋平  
 (74) 代理人 100159581  
 弁理士 藤本 勝誠  
 (72) 発明者 前田 憲成  
 福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 九州工業大学大学院  
 生命体工学研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被験物のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験物の存在下に高度水素生産菌を培養し、該菌の水素生成量の変化を測定することによって、被験物の生物毒性を判定するスクリーニング方法であって、

前記高度水素生産菌が、BW25113株を遺伝子改変した大腸菌であることを特徴とする被験物のスクリーニング方法。

【請求項2】

培養が、グルコースを含有するLB培地を用いて行われることを特徴とする請求項1記載の被験物のスクリーニング方法。

【請求項3】

水素生成量の変化が、ガスクロマトグラフにより測定されることを特徴とする請求項1記載の被験物のスクリーニング方法。

【請求項4】

水素生成量の変化が、水素センサ膜により測定されることを特徴とする請求項1記載の被験物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、迅速な有害物の検出技術に関し、より具体的には、高度水素生産菌を活用した

有害化学物質（被験物）のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

これまで多くの機能性を持った化学物質が合成され、それらが文明の発展に寄与してきたことは、言うまでもない。その一方、それらの化学物質の有害性・安全性が十分に検証されず、ヒトの生活や環境などに出回っている点は、大きな問題であり、迅速に化学物質の有害性の有無を判定できる試験法の開発が急務である。

【0003】

従来有害物の検出技術には色々な方法が知られている。例えば、Ames試験は、アミノ酸要求性の変化を測定することで化学物質の変異原性を評価する手法であり、正確性に優れているが、測定時間がかかる（約2日）ことや複雑な培地作製など準備が面倒である。Um u試験は、大腸菌等のSOS応答を測定する手法であり、操作は比較的簡単であるが、測定時間が数時間かかる。発光umu試験は、大腸菌等のSOS応答を発光により測定する手法であり、比較的簡易な操作で高い感度を得られるが、測定時間が数時間かかる上、特殊、かつ、高価な測定装置を必要とする。細胞増殖阻害試験は、微生物の増殖度合を測定することで細胞毒性を評価する手法であり、簡単な評価方法で比較的簡易操作で行えるが、測定時間が約1日間かかる。

【0004】

以上のように、従来行われている方法は、それぞれ正確性、比較的簡易操作、高い感度、簡単な評価法といった長所がある一方、特に判定時間がかかるという欠点、測定に高価な装置が必要になる場合があるなど一長一短がある。従って、短時間（迅速）に、かつ、効果的な装置を使うことなく、化学物質の有害性を検出できるツールの開発が強く望まれていた。

【0005】

一方、本発明者は、大腸菌の代謝改変及びタンパク質改変による水素ガスの高度生産化について研究を行ってきており、これまでに、遺伝子改変された大腸菌からなる多数の高度水素生産菌を開発してきた（非特許文献1～3）。本発明者は、かかる高度水素生産菌が生成する水素の量が、有害物の存在下で顕著に減少すること、そして、その程度は有害性の程度と相関していることを知見し、本発明に到達したものである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Appl Microbiol Biotechnol, 77巻, 4号, 879-890頁, 2007年

【非特許文献2】Microbial Biotechnology, 1巻, 1号, 30-39頁, 2008年

【非特許文献3】Journal of Environmental Biotechnology, 9巻, 2号, 69-74頁, 2009年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、化学物質の有害性の有無の評価を、迅速、かつ、高感度に検出できる技術（スクリーニング方法）を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、被験物の存在下に高度水素生産菌を培養し、該菌の水素生成量の変化を測定することによって、被験物の生物毒性を判定することを特徴とする被験物のスクリーニング方法である。

【0009】

高度水素生産菌としては、既に本発明者が提案した、遺伝子改変された大腸菌が用いられる。好ましくは、E.coli BW25113株を遺伝子改変したものである（非特許文献1と2参照）。かかる大腸菌の変異株（TT100株：大腸菌BW25113 hyaB hybC hycA fdoG aceE frdC I

10

20

30

40

50

dhA株)は、グルコースを含有するLB培地を用いて培養するのが好ましい。そして、水素生成量の変化は公知の方法・手段で検出・測定することができるが、特に、ガスクロマトグラフ、水素センサ膜、燃料電池などにより測定するのが簡便である。

【発明の効果】

【0010】

本発明のスクリーニング方法によると、水素高度生産菌の優れた物質生産能を利用しているので、有害物の迅速な測定が可能であり、これに水素センサ膜を組み合わせると、簡易判定の手段ともなる。また、本発明のスクリーニング方法は、新規化学物質の安全性評価にも有効である。本発明は、新規化学物質の有害性の有無の判定や食品の安全性評価に活用でき、最終的には、ヒトの健康QOLの維持・向上に役立つ技術としての効果が期待できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】グルコース添加又は無添加のLB培地に菌株を接種後、嫌氣的又は好氣的な条件で培養して、水素ガスの生産性を検討した結果を示す図。

【図2】菌濁度と水素ガスの生成の関係を示す図。

【図3】トリクロロエチレン暴露量と水素ガスの生産量の低下を示す図。

20

【図4】過酸化水素暴露量と水素ガスの生産量の低下を示す図。

【図5】2,4,6-トリニトロトルエン暴露量と水素ガスの生産量の低下を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、被験物の存在下に高度水素生産菌を培養し、該菌の水素生成量の変化を測定することによって、被験物の生物毒性を判定することからなる被験物のスクリーニング方法である。本発明の方法は、有毒物の存在下で水素高度生産菌株の水素生成能が低下する現象を利用した毒性試験法である。従って、水素高度生産菌株からどのように水素ガスが生成されるのか、及び、水素生産能が低下するということはどのような仕組みによるものなのかを知る必要がある。

30

【0013】

本発明者の研究によると、菌株の染色体上に座位する水素生産遺伝子群(hycA~hycI)が転写され、mRNAが生合成される。次に、そのmRNAはリボソームなどの働きにより、翻訳され、最終的にはタンパク質ができる。そのタンパク質が機能を発現することより、水素ガスが生成されるという仕組みが明らかにされた(非特許文献1、2参照)。

【0014】

例えば、水素高度生産菌株(TT100株)は、水素ガスを高度に生成するように代謝経路を改変し作製された菌株であり、具体的には、水素を消費する機構(hyaB、hyaC)の破壊、水素生成経路(hycA)の活性化、水素生成に関わる遺伝子群(fdoG)の活性化など、菌株に計4つの細工を実施し作製した菌株(ギ酸から親株よりも最大で141倍の水素生成率を示す)に、更にグルコースからの水素生産性を高める3つの遺伝子変異(aceE、frdC、ldhA)を組み入れて作製された菌株である。この菌株は、親株よりも5倍の水素生産性を保持している。その菌株は、200mLのLB培地又は0.1%のグルコースを含有した200mLのLB培地に接種して、37℃で18時間好氣的又は窒素ガスの通気後に嫌氣的に培養された。その菌株は、本発明の高度水素生産菌として、好ましく用いられる。

40

【0015】

スクリーニング方法における迅速化のカギの一つは、高度水素生産菌株から生産される水素ガスの生産効率を高めることであり、このことがスクリーニングの時間短縮に必要不可欠である。また、有害性のある化学物質などの水素高度生産菌株への作用(感受性)を正確に評価するためには、1細胞あたりの水素生産量が最も高い条件を検討する必要がある

50

。水素発酵に適した前培養条件、菌密度条件、グルコース濃度条件などを検討する必要がある。

【0016】

本発明において、高度水素生産菌の前培養条件（被験物を加える前段階の培養条件）は特に限定されるものではないが、前記のごとく、LB培地、特にグルコースを含有したLB培地に接種して培養するのが好ましい。LB培地とは、ルリア-ベルターニ培地（Luria-Bertani medium）とも言われ、細菌用富栄養培地の一種で、特に分子生物学の分野で大腸菌などの培養に多く使用される培地である。LB培地の基本処方、トリプトン1%（w/v）、酵母エキス0.5%（w/v）、塩化ナトリウム0.5%（w/v）であり、これによりアミノ酸、ビタミン、ミネラル、微量元素などに富んだ培地が構成される。寒天培地として用いる際には1.5%（w/v）の寒天を加えるのが一般的である。

10

【0017】

水素生成に關与するタンパク質は、酸素存在下で不活性化するため、一般的に水素高度生産菌株が水素ガスを生成する条件は、貧酸素あるいは嫌気条件である。従って、本来であれば、効率良く水素生産を行うためには貧酸素条件での培養が適していることが考えられる。しかしながら、窒素ガスの通気による貧酸素条件のセットアップには、時間及び手間がかかる作業が必要である。従って、迅速性のためには、好氣的培養が好ましい。

【0018】

図1には、グルコース添加又は無添加のLB培地に菌株を接種後、嫌氣的又は好氣的な条件で培養して、水素ガスの生産性を検討した結果を示した。グルコース無添加のLB培地を好氣的に培養した菌株では、水素ガスの生産量が低下したが、グルコースを添加したLB培地では、好氣的及び嫌氣的な条件で同程度の水素生産性を示した。従って、本発明では、操作が比較的容易である、グルコース添加したLB培地を好氣的に前培養した菌液を使用するのが好ましい。

20

【0019】

菌濁度条件は、水素ガスの生産効率を高めるためには重要である。水素ガスの生成は菌数に依存しているため、菌濁度が低い条件では、水素ガスの生産量は少なくなる。一方、濃い菌濁度では、理論的には水素ガスの生産は増加するが、菌株同士の接触機会が多くなることによる菌株の「ヘタリ」により、水素ガスの生産量が低下する恐れがある。そこで、菌株の水素生産性を適切に評価するためには、1細胞あたりの水素生産量が最も高い菌密度条件を決定する必要がある。図2に示したように、適切な菌濁度条件は、菌濁度が1（OD<sub>600</sub>）の条件であった。

30

【0020】

表1には、3種類の化学物質（クロラムフェニコール、過酸化水素、2,4,6-トリニトロトルエン）を用いて、これらの化学物質に対する感受性に最適な菌濁度条件を検討した結果を示した。菌濁度が0.2及び0.5（OD<sub>600</sub>）の場合、高度水素生産菌株からの水素生産量が3倍程度減少した。一方、これらの化学物質に対する感受性が菌濁度1の時よりも顕著に改善された。

【0021】

【表1】

40

菌濁度 OD <sub>600</sub>	コントロール（未添加）		クロラムフェニコール		過酸化水素		2,4,6-トリニトロトルエン	
	H <sub>2</sub> 量(μmol)	ガス減少率	H <sub>2</sub> 量(μmol)	感受性*	H <sub>2</sub> 量(μmol)	感受性	H <sub>2</sub> 量(μmol)	感受性
1	45±3	1	26±1	1.7	21±1	2.1	23.8±0.5	1.9
0.5	13±1	0.29	4.4±0.5	3.0	1.4±0.4	9.3	5.5±0.5	2.4
0.2	11.6±0.2	0.26	2.6±1	4.5	0.8±0.2	14.5	2.6±0.2	4.5
0.1	2.4±0.1	0.05	1.5±0.1	1.6	0.6±0.1	4	1.3±0.1	1.8

50

## 【0022】

表1の実験において、水素ガスは30分後に測定された。また、使用したクロラムフェニコール、過酸化水素、及び2,4,6-トリニトロトルエンの最終濃度は、それぞれ30 $\mu$ g/mL、74mg/L、50mg/Lとした。なお、感受性とは、コントロールでの水素ガス発生量との比較であり、ここでは試験化学物質の添加により、水素ガスの発生量が何倍低下したのかを表したものである。

## 【0023】

グルコースは、高度水素生産菌株が水素ガスを生成するための原料である。そこで基質濃度(0.8%、0.4%、0.2%、及び0.1%のグルコース濃度)による水素生産性の変化を検討したところ、どのグルコース濃度でも水素生産性に大きな変化はなかった。

## 【0024】

以上のことから、本発明においては、前培養条件として0.1%グルコース添加したLB培地を好氣的に前培養したものが適当で、迅速性に最適な菌濁度として1、感受性が高まる菌濁度として0.2~0.5が適当である。なお、グルコース濃度は特に水素発生量に大きな影響を及ぼさない。

## 【0025】

本発明において、生成した水素ガスの測定方法は、特に限定されるものではない。例えば、ガスクロマトグラフで行うことができるし、水素センサ膜を使用して検出、また燃料電池を用いて電気量で測定することもできる。水素センサ膜としては、例えば、タングステン材料をベースとした触媒膜をガラスの上に貼り付けたものがあり、水素ガス分子がこの触媒膜上で触媒され、水素原子に分解されると膜上の物質と結合して、青色に変化するという仕組みで水素ガスの検出を可能にする方法・手段も知られている。また、センサ膜を実際の水素発酵用ボトルに固定して、過酸化水素添加の有無による水素ガス発生の違いを調べることができる。あるいは、水素センサ膜をシステムの上部に設置して、菌株から生成された水素ガスを青色で判定できるようにすることにより、簡単に色の変化で評価できるシステムも考えられる。

## 【実施例】

## 【0026】

以下、実施例により本発明を詳述する。各種測定法は以下のとおりである。

## 【0027】

水素発酵実験の基本的な操作は、以下のような手法で行った。水素高度生産菌株(TT100株)の培養液及び新しいLB培地を窒素ガスで5分間通気し、培地内を嫌気状態にした。嫌気ボックス内で得られた培養液を遠心管に入れ、遠心分離(7,000rpm、10min、4)を行った後、再び嫌気ボックス内でペレットを新しいLB培地で懸濁し、任意の菌濁度となるように調製した。一方で、同様に水素発酵用ボトルも注射針を利用して、窒素ガスで2分間通気して嫌気条件にした後、嫌気ボックス内でグルコース(100 $\mu$ L)、抗生物質、抗菌物質、有害物、毒物など(任意の濃度で添加:100 $\mu$ L)を調製した前記培養液と混合して、水素発酵を行った。水素ガスの検出は、ガスクロマトグラフにより検出した。また、1細胞あたりの水素生産性を比較するために、水素ガスの生産性の計算には、実験で使用した菌濁度から算出した総タンパク質量(0.22mg-cell<sup>-1</sup>、protein/OD<sub>600</sub>/mL)を考慮した。

## 【0028】

[抗生物質等を用いた水素生産性の影響の検討]

水素ガスが生成される仕組みは、高度水素生産菌株の染色体上に座位する水素生産遺伝子群が転写され、mRNAが生合成される。次に、そのmRNAはリボソームなどの働きにより、翻訳され、タンパク質成熟、成熟したタンパク質の細胞膜付近への局在化、水素生産反応を介して、水素ガスが生産される。そのタンパク質が機能を発現することより、水素ガスが生産されるという機構である。そこで、表2に示したような、作用機序が明らかとなっている数種類の抗生物質などを用いて、高度水素生産菌株からの水素生成が低減す

10

20

30

40

50

る原因の検討を行った。

【 0 0 2 9 】

表 2 の化合物において、ゼオシンは DNA 切断を誘発する性質を有し、ナリジキシン酸は最終的に DNA 複製を阻害する性質を有し、テトラサイクリンとクロラムフェニコールはタンパク質合成を阻害する性質を有し、リファンピシリンは RNA 合成を阻害する性質を有し、アンチマイシンは水素ガスの原料となるプロトンイオンの代謝に関わる電子伝達系を阻害する性質を有し、アンピシリンは水素生成酵素の細胞膜への局在化に影響を及ぼすと考えられる細胞壁合成を阻害する効果を持っている。

【 0 0 3 0 】

結果は、表 3 に示したように、DNA 切断を誘発するゼオシンでは、水素ガスの生産量の低下は見られなかったが、翻訳レベルを阻害するテトラサイクリンとクロラムフェニコール、転写レベルを阻害するリファンピシリン、又は細胞壁合成を阻害するアンピシリンは、顕著な水素生産量の減少効果があった。ナリジキシン酸においても、同様に水素生産量の低下が見られた。表 3 の実験において、水素ガスは 1 時間後に測定された。菌濁度は、\* 印は 1 の場合で、無印は 0.5 の場合である。

【 0 0 3 1 】

【表 2】

抗生・抗菌物質	使用濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	作用	効果
ゼオシン	100	DNA の間に結合	DNA の切断
ナリジキシン酸	100	DNA ジャイレースを阻害	正常な二重らせん構造を取ることが出来ず、DNA の複製と転写が阻害
テトラサイクリン	20	リボソームの 30S サブユニットに結合	翻訳の阻害
クロラムフェニコール	30	リボソームに結合することでペプチジルトランスフェラーゼを阻害	翻訳の阻害
リファンピシリン	100	RNA ポリメラーゼに直接作用	RNA 合成の開始反応を阻害
アンチマイシン	100	シトクロム C オキシドリダクターゼに作用	呼吸鎖(電子伝達系)を特異的に阻害
アンピシリン	50	ペプチド転移酵素を拮抗阻害	細胞壁合成の阻害

【 0 0 3 2 】

10

20

30

【表 3】

抗生・抗菌物質	水素ガス発生量 ( $\mu\text{mol}$ )	Relative
なし	48 $\pm$ 3	1
ゼオシン	41 $\pm$ 1	0.85
ナリジキシン酸	62 $\pm$ 3*	0.72
テトラサイクリン	13 $\pm$ 2	0.27
クロラムフェニコール	8.6 $\pm$ 0.8	0.18
リファンピシリン	44 $\pm$ 2*	0.51
アンチマイシン	26 $\pm$ 2	0.54
アンピシリン	25 $\pm$ 0.5	0.52

10

20

## 【0033】

## 【水素発酵における毒物の影響の検討】

既に有害性・毒性などが報告されている化学物質5種類(2,4,6-トリニトロトルエン、トリクロロエチレン、トリクロロ酢酸、過酸化水素、安息香酸ナトリウム)を、本発明で用いられる水素高度水素生産菌株に暴露して、毒物暴露量と水素生産性の相関性を検討した。次に、ヒトやマウスなどにおける急性毒性・慢性毒性に関する毒性値(文献値)と実験データを比較した。なお、本実験では、迅速化を意識して30分間のインキュベーション後に生成した水素ガスを測定した。

## 【0034】

試験した化学物質の中で、トリクロロエチレン(図3)、トリクロロ酢酸、過酸化水素(図4)、2,4,6-トリニトロトルエン(図5)は、暴露量に相関して水素ガスの生産量の低下が見られた。トリクロロ酢酸及び安息香酸ナトリウムは大きな水素発酵阻害効果を示さなかった。

## 【0035】

次に、得られた結果をMSDSデータ(Material

Safety Data Sheet)と比較して評価したところ、表4に示したように、得られた結果はおおよそ生体毒性(魚毒性)のデータと一致していた。毒性の程度が比較的強いトリクロロエチレン、過酸化水素、2,4,6-トリニトロトルエンを本手法においても評価できている点は、本研究技術が簡易迅速毒性試験法として有用である可能性を秘めている。表4の実験において、水素ガスは、30分後に測定された。また、表中、1は経口ラット、2は腹腔ラット、3は甲殻類(オオミジンコ)の48時間 $EC_{50}$ 、4は藻類(セレンストラム)の96時間 $EC_{50}$ の値を示したものである。

## 【0036】

30

40

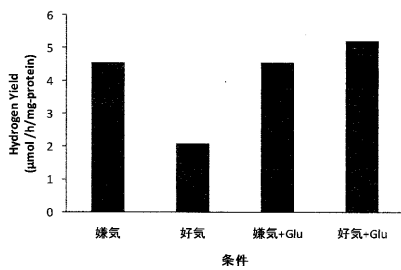
【表 4】

使用した化学物質	使用濃度 (mg/L)	菌濁度 0.2		MSDS データ	
		H <sub>2</sub> 発生量 (μmol)	Relative	急性毒性	生体毒性 (魚毒性)
なし	—	11.6 ± 0.2	1	—	—
トリクロロエチレン	14.6	5 ± 0.2	0.43	LD50 : 4920 mg/kg <sup>1</sup> LD50 : 1282 mg/kg <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> = 7.4 mg/L <sup>3</sup>
トリクロロ酢酸	100	5.6 ± 0.7	0.48	LD50 : 3320 mg/kg <sup>1</sup>	EC <sub>50</sub> = 2000 mg/L <sup>3</sup>
過酸化水素	74	0.8 ± 0.2	0.07	LD50 : 4060 mg/kg <sup>1</sup>	EC <sub>50</sub> = 2.4 mg/L <sup>3</sup>
2,4,6-トリニトロトルエン	50	2.6 ± 0.2	0.22	LD50 : 795-3140 mg/kg <sup>1</sup>	EC <sub>50</sub> = 0.62 mg/L <sup>4</sup>

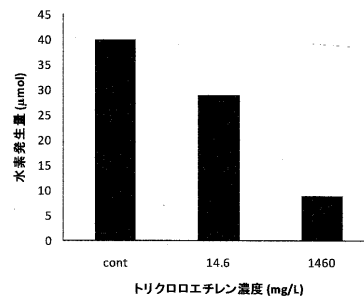
10

20

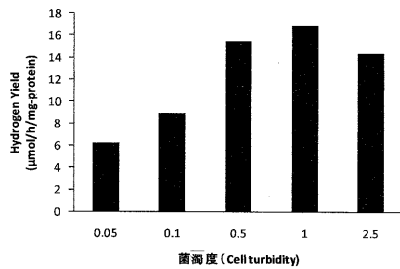
【図 1】



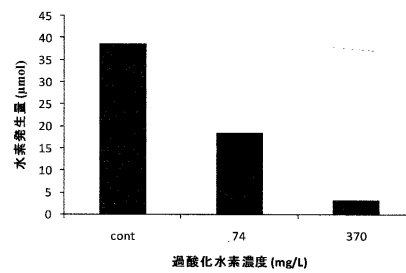
【図 3】



【図 2】

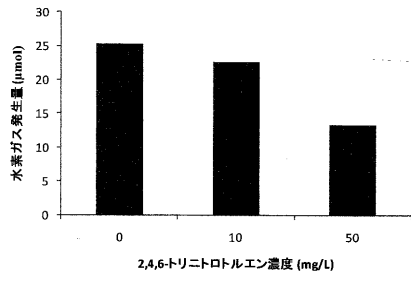


【図 4】





【 図 5 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 尾川 博昭

福岡県北九州市若松区ひびきの2 - 4 九州工業大学大学院  
究科内

生命体工学研

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開2001-212589(JP,A)

特開2003-004723(JP,A)

特開2005-249664(JP,A)

Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol. 77, No. 4, pp. 879-890

J. Environ. Biotechnol., 2009, vol. 9, No. 2, pp. 69-74

光合成研究, 2007, Vol. 17, No. 1, pp. 6-11

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00

G01N 33/18

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

Thomson Innovation