

## 研究拠点形成事業 平成27年度 実施計画書

### A. 先端拠点形成型

#### 1. 拠点機関

|              |             |
|--------------|-------------|
| 日本側拠点機関：     | 国立大学法人山口大学  |
| タイ側拠点機関：     | カセサート大学     |
| ドイツ側拠点機関：    | ベルリンボイト工科大学 |
| ベトナム側拠点機関：   | カントー大学      |
| インドネシア側拠点機関： | ブラビジャヤ大学    |
| ラオス側拠点機関：    | ラオス国立大学     |

#### 2. 研究交流課題名

(和文)：バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成

(交流分野：応用微生物学)

(英文)：Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas (World-class research hub of tropical microbial resources and their utilization)

(交流分野：Applied Microbiology)

研究交流課題に係るホームページ：<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~jsps/index>

#### 3. 採用期間

平成26年4月1日 ～ 平成31年3月31日

( 2 年度目)

#### 4. 実施体制

##### 日本側実施組織

拠点機関：山口大学

実施組織代表者（所属部局・職・氏名）：山口大学・学長・岡正朗

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：医学系研究科・教授・山田守

協力機関：北海道大学、山形大学、東京大学、静岡大学、名古屋大学、京都大学、京都工芸繊維大学、神戸大学、岡山大学、広島大学、島根大学、香川大学、愛媛大学、九州大学、鹿児島大学、琉球大学、大阪府立大学、富山県立大学、石川県立大学、大阪市立大学、明治大学、慶応義塾大学、近畿大学、関西学院大学、立命館大学、

崇城大学

事務組織：学術研究部研究推進課、学術研究部産学連携課、財務部財務課、財務部経理課、  
財務部契約課、農学部事務局、大学研究推進機構研究推進戦略部 URA 室

**相手国側実施組織**（拠点機関名・協力機関名は、和英併記願います。）

（1）国名：タイ

拠点機関：（英文）Kasetsart University

（和文）カセサート大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Faculty of Science・Associate Professor・Gunjana THEERAGOOL

協力機関：（英文）Burapha University, Chiang Mai University, Chulalongkorn University, Khon Kaen University, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Mae Fah Luang University, Mahasarakham University, Maejo University, Mahidol University, Naresuan University, Phramongkutklao College of Medicine, Prince of Songlka University, Rajamangara University of Technology Tawan-ok, Rajamangara University of Technology Isan, Rambhai Barni Rajabhat University, Ramkhamhaeng University, Srinakharinwirot University, Suranaree University of Technology, Thammasat University, Thaksin University, Ubon Ratchathani University, University of Phayao, Walailak University, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, BIOTEC (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) Culture Collection, Bio-Economy of Biodiversity-based Economy Development Office (BEDO)

（和文）ブラパ大学、チェンマイ大学、チュラロンコン大学、コンケン大学、モンクット王技術大学ラドクラバング校、モンクット王工科大学トンブリ校、マエファーラン大学、マハサラカン大学、メイジョ大学、マヒドン大学、ナレスアン大学、フラモンクットクラオ医科大学、ソングラ王子大学、ラジャマンガラ工科大学タウンオク、ラジャマンガラ工科大学イサン、ランパイパニ教育大学、ラムカンヘン大学、シーナカリンウィロット大学、スラナリー工科大学、タマサート大学、タクシン大学、ウボンラチャタニ大学、パヤオ大学、ワライラク大学、遺伝子工学・バイオテック国立研究所、タイ科学技術研究所、バイオテックカルチャーコレクション、生物多様性経済開発庁

経費負担区分（A型）：パターン2

（2）国名：ドイツ

拠点機関：（英文）Beuth University of Applied Sciences

（和文）ベルリンボイト工科大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Life Sciences and Technology・Professor・Peter GOETS

協力機関：（英文）なし

（和文）

経費負担区分（A型）：パターン2

（3）国名：ベトナム

拠点機関：（英文）Can Tho University

（和文）カントー大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Biotechnology R & D Institute・Deputy Director・Dung Thi Phuong NGO

協力機関：（英文）National University of Hanoi, Ho Chi Minh City University of Technology, Tay Do University, Tan Tao University, Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology, IMBT

（和文）ハノイ国家大学、ホーチミン市技術大学、タイドー大学、タンタオ大学、熱帯生物研究所、科学技術ベトナムアカデミー、経営や事業技術研究所

経費負担区分（A型）：パターン2

（4）国名：インドネシア

拠点機関：（英文）University of Brawijaya

（和文）ブラビジャヤ大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Faculty of Agriculture・Lecturer・Anton MUHIBUDDIN

協力機関：（英文）Institut teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Mataram University, University of Khaerum, University of Veteran Surabaya, University of Gadjah Mada, BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi: Agency for the assessment and Application of Technology), University of Indonesia

（和文）11月10日技術大学、マタラム大学、ハイルン大学、ベテランスラバヤ大学、ガジャマダ大学、技術の評価と応用庁、インドネシア大学

経費負担区分（A型）：パターン2

（5）国名：ラオス

拠点機関：（英文）National University of Laos

（和文）ラオス国立大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Faculty of Science・Associate Professor・Somchanh BOUNPHANMY

協力機関：（英文）なし

経費負担区分（A型）：パターン2

## 5. 全期間を通じた研究交流目標

山口大学は、拠点大学交流事業（平成 10-19 年度）やアジア研究教育拠点事業（平成 20-24 年度）において熱帯性環境微生物資源（遺伝資源）に関する国際共同研究を実施し、「耐熱性微生物」の潜在能力開発や次世代型省エネ「高温発酵技術」の基盤技術構築など多くの先導的研究成果を挙げてきた。本事業では、従来の日・タイの拠点大学に、欧州や ASEAN 諸国の 4 拠点大学と 1 協力大学を加え、ゲノム解析を主体とした基礎微生物学及び生態学研究から技術開発研究までに亘る、さらに若手研究者の実践的教育をも含めた、「熱帯性環境微生物」を対象とする世界水準の先端研究拠点を目指す。

「微生物資源の探索や利用」等の継続課題に加えて、「複合微生物」や「微生物-植物または微生物-動物」相互作用を利用する農業生産系や物質生産系への展開、さらにはエネルギー生産や環境保全に係る「バイオマス-微生物」相互作用などを、高速ゲノム解析技術等を駆使して展開する。このような熱帯性環境微生物の基礎から応用に亘る研究は、その「耐熱性微生物」の学術的位置付けや耐熱機構の解析、「高温発酵技術」の基礎研究や実証試験などを通じて、新たなバイオ研究開発領域を拓く先導的研究と位置づけられる。また、開発される技術は、エネルギー、環境、医療・衛生や食料等の問題解決に活用され、新規産業創成にも繋がると期待される。同時に、若手研究者の育成や先導的解析技術の普及を進め、ASEAN 諸国の研究力の底上げと国際ネットワーク構築を推進する。本事業を、将来を見据えて発展させ、熱帯環境微生物資源の潜在能力について基礎・応用研究を世界に先駆けて推進する「熱帯性環境微生物の国際研究拠点」の形成を目指す。

## 6. 前年度までの研究交流活動による目標達成状況

本事業の共同研究は、以下の 5 つの研究課題に分けて実施する。それぞれの課題は後述の各研究課題に記載されているように、複数の共同研究グループによる小研究課題によって構成される。

課題 1 : Explorational Research of Useful Microbes  
(有用微生物の探索研究)

課題 2 : Genome-based Research on Thermotolerant Microbes  
(ゲノム情報に基づく耐熱性微生物研究)

課題 3 : Research on Environmental Microbes Sustaining Tropical Ecosystem  
(熱帯性生態系を維持する環境微生物の研究)

課題 4 : Research on Microbes Useful for Food, Food Preservation, Health and Ecosystem  
(食品、食品保蔵、衛生および生態系維持のための有用微生物研究)

課題 5 : Development of Next-generation Fermentation Technology for New Wave Industry (新規産業のための次世代発酵技術の構築)

課題 1 では 15 件の小研究課題を実施したが、初年度ということもあり、一部の小研究課題において研究交流活動の目標が十分に達成できていない。しかしながら、カウンターパートとの研究交流が円滑に開始された小研究課題（有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析、

熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析、耐熱性微生物が生産するマンナン分解系酵素によるココナツコプラの分解、有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析、*Thermobifida alba* AHK119 由来のクチナーゼ及びカルボキシエステラーゼのポリエステル及びピレスロイド系農薬分解への応用、耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株の生産するセルロース分解酵素の精製と特性評価、微生物の生産する生理活性物質の探索) では、当初の目標どおり、あるいは目標以上の成果をあげている。

課題2では8件の小研究課題を進めている。そのうち2小研究課題は、現在までに海外の適切な共同研究者を選定できていない。その他の6小研究課題については、電子メールによる交流はもちろん、日本からの派遣(4名)、日本への受け入れ(4名)があり、十分に研究交流活動が達成できたと考えている。特に、山口大学工学部が中心となって、タイ・カセサート大学で若手研究者ワークショップを開催した。講演会にとどまらず、コンピュータを使ったトレーニングをタイの学生に対して実施した。これにより、従前の交流が強くなっただけでなく、新たな交流も始めることができた。残された課題もあるが、総合的に見ると、想定以上に達成できたと考えている。

課題3では14件の共同研究を実施している。本研究課題の参加者の多くは、共同研究者を見つけること、または研究計画の立案をする段階であったが、無事に研究を開始するための準備が整いつつある。一方、これまで共同研究の実績がある参加者は、更なる強固な連携へ向かうべく努力し、かつ研究を継続し、新規知見を得ることができた。具体的な成果としては、1) タイの伴侶動物であるイヌとネコの血清を回収してE型肝炎ウイルスの感染を確認できた。日本脳炎ウイルス、猫コロナウイルス、重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染状況も調査を実施した。2) クロロアニリン分解細菌 *Pseudomonas fluorescens* がクロロアニリン走化性を示すことを見出した。3) クロロアニリン感知の分子機構に関する知見を得ることに成功した。4) 内生放線菌分離株の一つから新規化合物を発見し、その生理活性として癌細胞の浸潤阻害活性、前駆脂肪細胞の分化誘導活性をもつことを明らかにした。5) 根圏放線菌分離株の一つが二種類の新規化合物を生産し、それらが血管新生を阻害することを明らかにした。6) タイおよびインドネシアに暮らす人々約150名の腸内フローラ(糞便細菌叢)を次世代シーケンサー等の技術を用いてプロファイル化することができた。以上のように、当初の想定通り進められていると考える。

課題4では17件の小課題研究を実施している。それらを機動的に展開するため、平成26年度はジョイントセミナーの前後に5名の日本側研究者がカウンターパートの研究室を訪問して研究活動の進捗状況の総括および今後の方針について議論し、共同研究の方向を決定した。また、タイ側から10名のカウンターパートを受け入れ共同研究を実施した。さらに、日々の連携についてメールでのやり取りを行い、進捗状況を確認した。具体的な目標の達成状況は平成26年度報告書に記載しているが、ほぼ予定通り進んでいる。

課題5では14の共同研究を実施した。耐熱微生物を用いたバイオエタノールやバイオ水素等、バイオ燃料の高温発酵系での生産については、非食性あるいは未利用バイオマスを用いたラボスケール及びパイロットスケールの発酵試験がスタートし、糖化条件や発酵条件に関して、今後最適化等を進めるための基礎的なデータが得られた。例えば、耐熱性酵母を用いたパイロットスケール発酵試験では生産性を上げるための課題が明確になり、バイオハイタン生産では

生産効率改善が進んだ。バイオポリマー材料の発酵生産についても、発酵条件設定や、副産物抑制試験が実施された。また、1,3-ブタンジオールから1-ブタノールへの合成経路の拡張に成功した。発酵食品や機能性糖の生産に有効な微生物、あるいは酵素のスクリーニングにおいては、耐塩性プロテアーゼ生産菌の獲得、リパーゼおよびキシラナーゼの精製に成功した。ほとんどの小課題で、当初予定していた方向で研究が進展した。ただし、小課題「デザインドバイオマスを用いた発酵工学の構築に関する研究」については、研究者の健康面での問題により中止することとなった。

## 7. 平成27年度研究交流目標

### <研究協力体制の構築>

本事業は拠点大学をもつ6カ国と協力大学のみをもつ1カ国によって実施することから、昨年と同様に、それぞれのコーディネーター間で連絡を密にとるとともにコーディネーター会議を開いて事業全体の効率的な運営を図る。また、それぞれの拠点大学等の代表的なメンバーが加わった組織委員会によって意思疎通を図ると同時に、公正な事業運営とセミナー開催支援等を行う。共同研究の実施については、5つの研究課題のリーダーおよびサブリーダーがそれぞれの小研究課題について研究の進展や問題点を掌握しながらサポートする。

本事業の2年目となる平成27年度は、着実に共同研究を実施してもらうため初年度以上の研究者交流を実施する。そのために、コーディネーター間でメール等により早めに本年度事業計画並びに研究者交流計画を立て、7月末の国際発酵会議（FerVAAP）時に開催する組織委員会で決定し、本年度事業を開始する。但し、早期の研究者交流の要望があれば前倒しも検討する。また、11月に開催する第2回サテライトセミナー開催時にはコーディネーター会議や組織委員会を開催し、本年度の計画実施内容を確認すると同時に次年度からの事業計画等について検討する。

### <学術的観点>

本事業では、全体的交流の場を確保するために、全員が参加するジョイントセミナーをタイおよび日本で隔年開催するとともに、参加国の研究者との共同研究の活性化あるいは本事業の広報のために、サテライトセミナーを毎年開催する。さらに、若手研究者の育成も兼ねて、若手研究者セミナーを毎年開催する。加えて、本事業成果の外部発信の場として国際発酵会議やタイ研究博覧会（Thailand Research EXPO）等でのシンポジウムを企画・開催する。

平成27年度は以下のように目標を設定し、実施する。

第5回国際発酵会議において、本事業の課題1、2、4、5関連で、特に発酵微生物関連を中心とした1つのセッションを開催する。また、タイ研究博覧会2015では、本事業の課題1、3、4関連で、特に環境微生物や病原性微生物関連を中心とした1つのセッションを開催する。このようにして、事業成果の一部を他の研究者や企業関係者へ紹介する。一方、第2回サテライトセミナーを日本で開催することから、本事業に関する先端的研究を紹介する国際セミナー（シンポジウム）として実施し、日本国内の大学や企業関係者に対して情報提供を行う。

昨年に続いて、課題1～4までは熱帯性環境からの微生物の探索や解析等が主な研究となることから、タイを含むASEAN諸国での活動が中心となる。成果が出ている小研究課題につい

ては日本の大学で共同研究を実施する。課題5については、昨年と同様に、先の拠点事業で開発された株などを用いて共同研究を実施する。

各共同研究グループは、英語による年度計画書や年度報告書をコーディネーターに提出する。これによって各研究チーム内の意思疎通を促すとともに、リーダーが研究課題毎にそれらをまとめる。コーディネーターはこれに基づいて、それぞれの国の支援機関に年度計画書及び成果報告書を提出する。

#### <若手研究者育成>

本事業は、関係大学において実践的な若手研究者育成として役立っている。日本側メンバーの多くの研究室において海外メンバー研究者を受け入れているが、日本側の若手研究者や学生は海外メンバー研究者との共同研究や Discussion 等によって貴重な経験ができる。また、日本側メンバーも、海外の若手研究者の研究指導や博士課程学生の Co-Advisor 等による支援を行っている。具体的には、個々の共同研究に加えて、海外メンバーの滞在中に英語による特別セミナーや特別講義を開催する。JASSO 短期留学奨学金や大学の奨学金などを活用して、交流大学への学生の派遣、相手先大学からの学生の受け入れなどを推進する。

また、第11回若手研究者セミナーを山口市で開催する。特に、多くの外国人若手研究者が参加するように計画する。若手研究者セミナーは大学院学生が中心となって企画・運営し、参加する全ての若手研究者が自身の研究成果等を英語で発表することから、若手研究者育成にとどまらず、将来的な研究ネットワーク形成に繋がる重要なものと位置づけている。

そのほか、海外メンバーが学位取得を希望する場合、多様なファンドを活用して支援することなどを目指している。

#### <その他（社会貢献や独自の目的等）>

これまでの拠点事業によって数多くの耐熱性微生物が分離され、新技術に繋がる有用性が示されてきた。本事業においても、熱帯性環境微生物資源の継続的開発をすすめる、それらの微生物資源を用いた新技術開発によって社会に貢献する。新規微生物については、日本側と相手国側で寄託機関へ登録すると同時に、研究成果は学術論文として報告する。生物多様性条約の枠組の中、微生物資源の重要性の認識とともに当該国間で微生物資源の共同開発を進めるが、そのために協定締結によって友好的な展開を図る。さらに、以下のように、個々の研究者による社会貢献も積極的に行う。

・農業生産と微生物応用に関して、SOFIX 分析への要望が非常に高まっている。また、SOFIX 分析と地域バイオマス資源分析による高品質農産物の高生産技術の普及が進んでおり、環境に配慮した農産物生産において社会貢献が出来つつあると考えている。

・本事業に加えて、交流を促進するために、日本学術振興会が支援する「二国間交流事業・共同研究」や、神戸大学農学部とチェンマイ大学アグロインダストリー学部との学部間協定を結ぶための準備をタイ国側カウンターパートと進めている。

・山口大学では、タイ側との共同研究の一部が日本・アメリカ・フィリピン・インドネシアとの共同研究申請の一部となったことから、当該申請が受理されるように、さらに本事業における研究を深めていく。

## 8. 平成27年度研究交流計画状況

### 8-1 共同研究

| 整理番号                  | R-1  | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
|-----------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| 研究課題名                 | (和文) 有用微生物の探索研究<br>(英文) Explorational Research of Useful Microbes  |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職     | (和文) 伊藤真一・山口大学農学部・教授<br>(英文) Shinichi ITO・Yamaguchi University・Professor   |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職    | (英文) Piamsook PONGSAWASDI・Chulalongkorn University・Professor<br>Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Lecturer<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor  |        |        |        |        |
| 参加者数                  | 日本側参加者数  | 34名    |        |        |        |
|                       | (タイ)側参加者数  | 30名    |        |        |        |
|                       | (ドイツ)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
|                       | (ベトナム)側参加者数  | 6名     |        |        |        |
|                       | (インドネシア)側参加者数  | 1名     |        |        |        |
|                       | (ラオス)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
| 27年度の<br>研究交流活動<br>計画 | <p>本研究課題では、2つのサブ研究課題（有用微生物の検索、分離微生物及び生産物質の研究）に分け、それぞれ9件および6件の共同研究（小研究課題）を実施する。</p> <p>1. Screening useful microorganisms<br/>           （有用微生物の検索）</p> <p>1) バイオ燃料および高付加価値物質を生産する熱帯性真菌の探索<br/>           タイから熱帯性真菌を単離し、バイオマス分解酵素を生産する真菌や、抗生物質やバイオポリマーなどの高付加価値物質を生産する真菌をスクリーニングする。これら真菌の同定を試みるとともに、生産物の性質を調べ、その生産量を最適化する培養法を調べることを目的とする。26年度のスクリーニングでは不十分であったので、27年度も酵素生産する熱帯性真菌のスクリーニングを実施する。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析<br/>           効率的なバイオ燃料生産を目指して、高速高温発酵に適した耐熱性細菌を取得することを目的とする。それぞれの国からエタノール生産性の耐熱性細菌を分離し、耐熱性やエタノール生産性等を比較する。優れた株についてはラボスケールで詳細な解析をすると同時に種の同定を行う。さらに、必要に応じてゲノム解析を実施する。前年度に引き続き、高温高速発酵によるバイ</p> |        |        |        |        |



オエタノール生産を安定して実施可能な菌株を得ることを目的として、エタノール生産性微生物である *Zymomonas mobilis* 菌株を ASEAN の諸国において分離培養することを試みる。まずは、*Zymomonas mobilis* の分離を実施し、有用な菌株が得られた際には、詳細な解析（既存の同種株と耐熱性、糖資化性、エタノール生産性等の比較、ゲノム解析）を行う。

### 3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析

ASEAN 諸国のバイオマスからのバイオ燃料生産を目指して、種々のバイオマスに適した有用な酵母を取得することを目的とする。特に、耐熱性酵母を用いた高温発酵は、次世代の省エネ技術として期待されている。なお、昨年の研究において多くの耐熱性酵母を取得しており、引き続いて、それぞれの国から種々の酵母を分離し、糖資化性、耐熱性、エタノール生産性等を検討する。また、必要に応じて異なるバイオマスに適した酵母の分離を目指す。優れた株についてはラボスケールで詳細な解析をするとともに、26S rDNA の塩基配列を決定し種の同定を行う。

### 4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

東南アジア地域において、伝統的なアルコール飲料の製造に利用されているスターターの微生物叢を明らかにした報告は極めて少ない。そこで、タイやラオスにおいてアルコール飲料の製造に利用されているスターターを収集し、PCR-mediated DGGE法によりそれらの中に含まれる微生物叢を明らかにする。このとき、スターターから直接抽出したDNAをPCRの鋳型として用いる。また、各種培地を用いてスターター中に含まれる微生物（細菌、酵母、糸状菌）を単離し、そのアミラーゼ活性や各種糖源からのエタノール生産性を調べる。

### 5) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

アジア熱帯地域は地球上で最も生物多様性の高い地域の一つであることから、その微生物相においても同様に高い多様性が期待できる。そこで本地域にて多様な自然環境から微生物を分離し、その培養産物を調査することにより、新たな薬物資源となり得る微生物分類群の開拓を目指し、感染症や癌に有効な活性物質を探索する。

### 6) 耐熱性微生物が生産するマンナン分解系酵素によるココナッツコプラの分解

ココナッツコプラミールはマンナン含量の高い食品加工副産物であり、タイでは多量に発生する貴重なバイオマス資源である。26年度は耐熱性を有するコプラ高分解菌を単離し (*Bacillus* sp.)、本菌が生産する耐熱性エンド-マンナーゼ (ManS2) の精製および本遺伝子のクローニングと異種発現系の構築を行った。その結果、本菌はさらに2種のマンナン分解酵素を分泌生産することが示唆された。27年度はこれらの酵素の単離と遺伝子クローニングを行うとともに、ManS2を含む3種の酵素の詳細な反応特性を解析する予定である。またマンナンの完全糖化を目的に、上記耐熱性菌より  $\beta$ -マンノシダー

ゼを精製し、マンナナーゼとの相乗作用について検討する。交流については、阪本龍司のタイ派遣（研究指導および打合せ）および Wasana Sukhumsirichart 氏の大府立大学受入（酵素の反応特性解析）を計画している。

7) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

- ・タイ北部の発酵食品に由来する乳酸菌の食品汚染菌に対する生育阻害作用  
平成 26 年度において発酵食品より単離した 20 菌株について、16S rRNA 遺伝子解析により種を同定するとともに、サルモネラ菌やウェルシュ菌など種々の食品汚染原因菌に対する生育阻害作用を調べる。

- ・植物由来のバイオポリマーに作用する耐熱性酵素

平成 26 年度においてはカビ由来の  $\beta$ -グルコシダーゼの耐熱性を 10 度上昇させることに成功した。27 年度においては本耐熱化酵素の X 線結晶構造解析を行い、耐熱性上昇の機構を探るとともに、バイオマス分解への利用を試みる。

8) ポリヒドロキシ酪酸生産菌の単離と解析

26 年度に引き続きタイの各地から、耐熱性と高生産性を指標として、ポリヒドロキシ酪酸生産菌のスクリーニングを実施する。また、これまでのスクリーニングで得られている生産菌を用いて、培養条件を変化させてポリヒドロキシ酪酸の効率的生産法と抽出法の検討を行う。得られた産物について、静岡大学にて NMR、FTIR、蛍光顕微鏡を用いてその構造を解析する。また、培養後の菌の顕微鏡観察を行い、ポリヒドロキシ酪酸の蓄積様態を確認する。

9) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の単離・同定

熱帯作物（アブラヤシ、ゴムノキ、シャロットなど）の難防除病害の原因菌を単離し、rDNA および ITS 領域の塩基配列に基づいて同定するとともに、これらの病原菌の増殖・感染を抑制する有用微生物のスクリーニング（単離および同定）を行う。また、得られた有用微生物候補の応用に関する研究を開始する。

2. Study on isolated microorganisms and their products

（分離微生物及び生産物質の研究）

1) *Thermobifida alba* AHK119 由来のクチナーゼ及びカルボキシルエステラーゼのポリエステル及びピレスロイド系農薬分解への応用

*Thermobifida alba* AHK119 由来の組換えカルボキシルエステラーゼ (Ca119) の発現酵素による特性解析を進める。また、既知のクチナーゼ (Est1&Est119) と合わせてポリエステル分解能およびピレスロイド分解能を調べ、最適酵素を選択する。Cat119 が有効な場合は必要に応じて Ca119 の変異を試みる。

2) *Bacillus liquefaciens* 由来レバナーゼ遺伝子のクローニングとその発現。  
4 $\alpha$ -glucanotransferase を用いたリグナンパイノレシノール配糖体の生合成とその抗酸化および抗炎症作用。

土壌より分離した *B. liquefaciens* のレバナーゼ遺伝子をクローニングし、その大量発現系を構築する。発現した組換えレバナーゼを精製し、その性質を解析し、フルクトオリゴ糖の生産に利用する。また、*Paenibacillus* sp. A11 由来のサイクロデキストリン合成酵素と *Thermus* sp. 由来アミロマルターゼの組換え発現酵素を用いて、デンプンやサイクロデキストリンからマルトオリゴ糖をリグナンピノレシノールに導入し、配糖体を合成する。合成効率条件を検討するとともに合成した配糖体の構造を解析するとともに抗酸化活性と抗炎症作用を調べる。さらに、グルコアミラーゼ非分解性のオリゴ糖を産生する *Fusarium* sp. F59 から $\alpha$ -グルコシダーゼとグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングし、その発現系を構築する。あわせて、BCG を脱色するオリゴ糖を産生する土壌細菌の同定とオリゴ糖の解析を実施する。

3) 耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株の  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと配列解析

26年度は、タイで単離された耐熱性酵母 *Candida easanensis* strain JK-8 の生産する  $\beta$ -グルコシダーゼを単離することに成功した。この酵素の特性を調べたところ、至適 pH5.0、至適温度 60°C であった。27年度は、この新規酵素の配列解析を行うとともに、クローニングや大量生産のための異種発現を実施する。

4) 各種ストレス曝露条件における耐熱性酵母の性質に関する研究

耐熱性酵母のストレス応答反応に関する知見は、醸造酵母に比べて少ない。そこで本課題では各種ストレスが耐熱性酵母の発酵生産に与える影響の解明を研究目的とする。26年度の研究の結果、耐熱性酵母と醸造酵母ではストレス応答性が異なることが示唆されたので、27年度は引き続き、耐熱性酵母の高温、放射線、重金属等のストレス曝露時の生育と生残に関連する因子について、耐熱性酵母細胞内に生じる物質レベルの生理学・生化学的変化の解析により明らかにする。また耐熱性酵母の遺伝解析のための宿主ベクター系の構築も進める。

5) 高付加価値物質を生産する酵母の遺伝子工学的開発

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は実用的なエタノール発酵や有用タンパク質生産が期待できる有用な酵母である。これまでに、*S. cerevisiae* の新しい遺伝子組換え技術を開発してきた。26年度は有用酵素やヒト遺伝子を酵母に導入し、バイオ医薬品や酵素を高生産する株の遺伝子工学的な育種開発を行った。27年度には酵母で機能できる酵素とヒト遺伝子を同定し、どのようなタンパク質が生産可能であるかを調べる。

6) タイ国で分離したマリン酵母をもちいた抗酸化能をもったライスワインの試醸

タイ国の黒米玄米(*Oryza sativa* var. *Indica* cv. *Rice berry*)、日本産の黒米(*Oryza sativa* var. *Japocica* cv. *Shiun*)、赤米(*O. sativa* var. *Japnoca* cv. *Engimai*)、緑米(*O. sativa* var. *Japnoca* cv. *Midorinoka*)、白米精米(*O. sativa* var. *Japonica* cv.

|  |  |
|--|--|
|  | <p><i>Hinohikari</i>)をもちいてアルコール飲料を試醸する。糖化剤は、生デンプン分解能をもつグルコアミラーゼ製剤 <b>Sumizyme</b> を使用し、酵母には、タイ国で分離したマリン酵母を使用する。発酵法は通常の蒸煮法と省エネルギー的な無蒸煮発酵法をもちいる。原料、酵母、発酵法の異なる各種アルコール飲料の比較検討を行ない、さらに品質の改良を行ない、抗酸化能など機能性をもつ新規アルコール飲料の開発を行う。</p> <p>7) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>昨年度、がんの転移阻害や薬剤耐性克服、またパーキンソン病治療薬シーズの開発を目的とした細胞モデル系を幾つか構築した。27年度は昨年度に引き続き、がんや神経変性疾患の細胞モデル系を用いたスクリーニング系を拡充すると共に、昨年度構築した細胞モデル系を用いて疾患治療薬シードを耐熱性微生物より探索する。ヒット株が出た場合、直ぐに活性物質の単離精製および構造解析を行い、活性物質を同定する。また活性物質の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での薬理活性を評価する。</p>  |
| <p>27年度の<br/>研究交流活動<br/>から得られる<br/>ことが期待さ<br/>れる成果</p> | <p>1. Screening useful microorganisms<br/>(有用微生物の検索)</p> <p>1) バイオ燃料および高付加価値物質を生産する熱帯性真菌の探索</p> <p>有用酵素や物質を生産する熱帯性真菌を得ることができれば、有用酵素や物質の応用ができる。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析</p> <p>タイ国において、<i>Zymomonas mobilis</i> 菌株が分離されることが期待される。得られた<i>Zymomonas mobilis</i> 菌株の特徴が明らかとなる。さらには、ゲノム配列解析により菌株の有する遺伝子も明らかになる。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析</p> <p>耐熱性酵母を用いた高温発酵は、冷却コスト削減、冷却装置の簡易化、雑菌混入の抑制などが見込まれ、次世代の省エネ技術として期待されている。一方、生物多様性の条約等から、有用微生物の国境を越えた利用は制約がある。そこで、本小課題研究は、それぞれの国で高温発酵に不可欠な優れた耐熱性酵母を開発する。開発した耐熱性酵母は課題5等で使用する。また、現在切望されているセルロース系バイオマス利用に適した酵母を見出せる可能性もある。</p> <p>4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析</p> <p>東南アジア地域においてアルコール飲料の製造に利用されているスターターの微生物叢を明らかにするとともに、各種糖源からのエタノール生産が可能な微生物を取得することで、バイオマスからのバイオエタノール生産のための新たな微生物生産法の開発が期待される。</p> <p>5) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓</p> <p>微生物からはこれまでに100種を超える医農薬が実用化されてきたが、従来の微生物探索は日本や欧米を中心になされてきたため、熱帯の微生物は十</p> |

分に評価されていない。熱帯は温帯と異なる生物相をもつことから、未知微生物が存在し、そこから新規生理活性物質が発見される可能性が強く期待される。本研究では、タイの土壌、植物、海洋など様々な環境から熱帯性微生物を分離・収集し、抗菌性、抗癌性、農薬活性など医農薬として有用な生理活性を示す低分子有機化合物を探索し、その構造と活性について解析する。27年度は相互に一名ずつお互いを訪問し、議論を交わすことで、研究活動の促進と活性化を図る。

#### 6) 耐熱性微生物が生産するマンナン分解系酵素によるココナッツコプラの分解

マンナンは主鎖構造と側鎖構造の違いにより、グルコマンナン、ガラクトマンナン、ガラクトグルコマンナンなどの存在が知られている。上記で得られる酵素を用いて、これら種々の基質に対する特異性および反応産物の解析を行うことで、マンナン分解における基礎的な知見を得ることができる。これらの結果より、コプラミール分解に最適な酵素の選択が可能となり、また反応産物（未分解産物）解析よりコプラミールの完全分解に不足している酵素活性を明らかにすることができる。

#### 7) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

##### ・タイ北部の発酵食品に由来する乳酸菌の食品汚染菌に対する生育阻害作用について

より安全な発酵食品生産法の開発および食品保存法の開発が期待される。

##### ・植物由来のバイオポリマーに作用する耐熱性酵素について

より効率的なバイオマス分解系の開発が期待される。

#### 8) ポリヒドロキシ酪酸生産菌の単離と解析

耐熱性を指標とした新規のポリヒドロキシ酪酸を取得するという成果が期待できる。これまで得られている生産菌の生産能は、以前に報告されている菌と比較して同等のものが多く、更なるスクリーニングにより、高生産性菌の取得が期待できる。また、産物の構造を解析することで、物性に関する情報を得ることが可能となり、ポリマー原料としての有用性を見極めることができる。

#### 9) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の単離・同定

熱帯作物（アブラヤシ、ゴムノキ、シャロットなど）の難防除病害の中から、防除のターゲットとなる病害が特定され、それらの病原菌の増殖・感染を抑制する有用微生物候補が単離されることが期待できる。

## 2. Study on isolated microorganisms and their products

（分離微生物及び生産物質の研究）

### 1) *Thermobifida alba* AHK119 由来のクチナーゼ及びカルボキシルエステラーゼのポリエステル及びピレスロイド系農薬分解への応用

|  |   |
|--|---|
|  | <p>クチナーゼについてはタンパク構造解析を含めて十分な知見をえているので、Ca119についても機能解析結果から、構造と機能の相関性を明らかにすることができる。これらの酵素はポリエステル類の分解除去に有効である。また、残留農薬の除染に有効な酵素をえることが期待される。</p> <p>2) <i>Bacillus liquefaciens</i> 由来レバナーゼ遺伝子のクローニングとその発現。<br/>4<math>\alpha</math>-glucanotransferase を用いたリグナンパイノレシノール配糖体の生合成とその抗酸化および抗炎症作用。</p> <p>27年度は、高発現系で大量生産されるレバナーゼを利用して、様々なフルクトオリゴ糖が可能となり、その機能性オリゴ糖として利用が可能となる。また、配糖体化することによってリグナンパイノレシノールの抗炎症作用や抗酸化作用が向上し、化粧品や医薬品としての実用化が期待される。また、難消化性オリゴ糖を産生する微生物のグルコシダーゼの解析によりその生合成機構を明らかにすることが期待できる。また、脱色作用を持つオリゴ糖の構造と産生菌の性質が明らかとなる。</p> <p>3) 耐熱性酵母<i>Candida easanensis</i> JK-8株の<math>\beta</math>-グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと配列解析</p> <p><math>\beta</math>-グルコシダーゼは、植物性バイオマスを利用する上で重要なキー酵素である。耐熱性酵母からの<math>\beta</math>-グルコシダーゼの報告例はなく、配列解析から、耐熱性酵母<i>Candida easanensis</i> strain JK-8の学術的位置づけや<math>\beta</math>-グルコシダーゼの分布について重要な情報が得られると期待できる。さらに、大量生産技術の確立は高温発酵技術への応用検討へもつながることが期待される。</p> <p>4) 各種ストレス曝露条件における耐熱性酵母の性質に関する研究</p> <p>耐熱性酵母の持つ耐熱化因子を同定することができれば、本因子の改良による高温発酵性を向上した耐熱性酵母の育種につながると期待される。</p> <p>5) 高付加価値物質を生産する酵母の遺伝子工学的開発</p> <p>酵母宿主に様々な有用遺伝子を導入し、高生産させることが求められている。多くのバイオ医薬品は酵母で生産させているものも多い。医薬に利用できるタンパク質の生産が期待される。</p> <p>6) タイ国で分離したマリン酵母をもちいた抗酸化能をもったライスワインの試醸</p> <p>マリン酵母を使用し、タイ国の黒米ライスベリや各種有色米を原料にしたアルコール飲料の、抗酸化能と特性をしらべて、さらに改良を加えて新規アルコール飲料の開発を行う。</p> <p>7) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>耐熱性微生物からがんやパーキンソン病治療薬シードを探索するため、これまでにないユニークな構造や活性を持った化合物を得ることが期待出来る。</p> |
|--|---|

|                        |   |        |        |        |        |
|------------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| 整理番号                   | R-2   | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
| 研究課題名                  | (和文) ゲノム情報に基づく耐熱性微生物研究<br>(英文) Genome-based Research on Thermotolerant Microbes   |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・<br>職  | (和文) 薬師寿治・山口大学農学部・准教授<br>(英文) Toshiharu YAKUSHI・Yamaguchi University・Associate Professor  |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・<br>職 | (英文) Pornthap THANONKEO・Khon Kaen University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Lecturer<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor   |        |        |        |        |
| 参加者数                   | 日本側参加者数   | 14名    |        |        |        |
|                        | (タイ)側参加者数   | 17名    |        |        |        |
|                        | (ベトナム)側参加者数   | 3名     |        |        |        |
|                        | (インドネシア)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
|                        | (ラオス)側参加者数  | 2名     |        |        |        |
| 27年度の<br>研究交流活動<br>計画  | 本研究課題において、以下の8件の共同研究(小研究課題)を実施する。<br>1) 耐熱性エタノール生産性酵母の分布調査とストレス耐性分子機構<br>本研究グループは、小課題1で、高温発酵に不可欠な耐熱性に優れたエタノール生産性酵母の取得を進める。本小課題ではそれぞれの国において分離された株について、耐熱性、糖資化性、エタノール生産性等の能力を比較するとともに、その地理的分布を把握することを目的とする。特に、同種の株で特異性が異なる有用な株についてはゲノム解析等も含めた高度な解析を行い、その違いに迫る。また、試験管内実験により耐熱性等のストレス耐性化等を行い、耐熱性やストレス耐性化の分子機構を、次世代シーケンシング等を駆使して解明する。さらに、完全ゲノム解析や転写解析が終了した耐熱性酵母について、代謝のバイオインフォマティクス解析を開始する。<br>2) 耐熱性エタノール生産性細菌 <i>Zymomonas</i> 属菌の分布調査と高温適応の分子機構<br>前年に引き続き、高温高速発酵によるエタノール生産を可能にすることを目指し、耐熱性エタノール生産性微生物 <i>Zymomonas mobilis</i> のASEAN諸国での分布を確認するとともに、単離された菌株の耐熱化実験による耐熱化株の取得を目指す。さらには耐熱化を達成した菌株のゲノム配列を解析することにより、これら菌株がどのような機構で耐熱性を獲得したかを明らかにしていく。平成27年度は、耐熱化株のゲノム解析により得られた変異遺伝子を親株において変異させることにより、どのような遺伝的変異が耐熱かの達成に寄与するかを明らかにして行く。 |        |        |        |        |

3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発

耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発を進めるとともに、その耐熱性機構を理解するために、以下の4点に絞って研究を進める。① タイ・ベトナム・ラオス等の花・果実から新規な耐熱性酢酸菌をスクリーニングし、その分類学的および生理学的特性を明らかにする。② *Gluconacetobacter* 属酢酸菌の耐熱化育種を行い、高酸度・高温酢酸発酵系の開発を進める。③ *Acetobacter pasterurianus* および *Gluconacetobacter xylinus* から得られた耐熱化株のゲノム解析に基づく耐熱化機構の解析を進める。④ *A. pasterurianus* の耐熱化株を用いる高温発酵および非温度制御発酵での米酢発酵系の開発を国内とタイで進める。

4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵

高温グルタミン酸発酵系の開発を行うため、以下の3点について研究をすすめる。① 新規な耐熱性コリネ型細菌を分離するとともに、これまでに得られている耐熱性株やそれらの耐熱化株のゲノム解析と生理学的解析を行う。② 耐熱性コリネ型細菌の活性酸素種生成能とその除去酵素系の解析を進めるとともに、その耐熱性機構における役割を明らかにする。加えて、それらの除去系の強化による耐熱化の検証を行う。③ コリネ型細菌のグルタミン酸排出系の解析とその改変による温度非依存的排出系の確立を目指す。

5) 耐熱性 *Gluconobacter* の耐熱性機構の解析とその応用

*Acetobacter tropicalis* SKU1100 の耐熱性に関わる多くの遺伝子を同定することができた。それらのうちのいくつかについては、高い温度での生育におけるこれら遺伝子の生理学的な役割について特徴付けがなされてきている。少なくとも10個の遺伝子が、それらが欠損すると高い温度での生育が顕著に低くなることから、より重要であることが示されている。これらの遺伝子については欠損と相補により、その生理学的な役割を明らかにしようとしてきている。しかしながら、耐熱性におけるこれらの遺伝子の関連性を総括するためには、多くの実験データがまだ必要である。2015年度はこれらの遺伝子の解析を進めるとともに、これら遺伝子の発言量を調べることで、それぞれの遺伝子の生理学的な機能について同定していく予定である。さらに *Gluconobacter frateurii* CHM43 の耐熱性機構についての解析も始める予定である。

6) エタノール発酵生産のための耐熱性酵母の交配育種とゲノム解析

由来の異なる種々の酵母の育種を行い、実用的なエタノール生産に適した株を選択している。耐熱性、エタノール耐性、糖耐性などの高温でのエタノール生産に重要な性質をもたらす遺伝子の同定を、ゲノムシーケンスと遺伝子操作により探している。平成27年度はタンパク質の熱感受性に着目し、タンパク質の温度感受性を制御する変異を探索する。

7) 原始紅藻類の環境適応機構の解析と物質生産に向けた基礎研究

本年度は、LEDを用いた光条件変化によるバイオマス合成誘導の遺伝子レ



|  |  |
|--|--|
|  | <p>ベルでの制御の仕組みを明らかにするために、原始紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> を用いて研究を進める。具体的には、<i>C. merolae</i> でバイオマス合成が誘導される単色赤色光を照射した時のトランスクリプトーム解析を行い、光条件の変化によって発現誘導・抑制が生じる遺伝子に着目して解析を進める。その中でも特に、脂質合成系と糖新生の代謝系に関わる遺伝子群についてはプロファイルを明らかにし、さらにその上流の調節遺伝子群についても探索を進める。</p> <p>8) 耐熱性分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> の有効利用</p> <p>これまでに、耐熱性のある分裂酵母の <i>S. japonicus</i> のエタノール生産性と CoQ について調べてきた。そして、この酵母が 42℃ で良好なエタノール生産を行うこと、ほとんどユビキノンを合成しないが、微量の CoQ10 を合成することを見いだした。本年度では、この CoQ10 の合成能力が低下する原因を調べ、CoQ10 の合成を復活させる方法について検討していく。加えて、その際のエタノールの生産性の変化を調べていきたい。</p>   |
| <p>27年度の<br/>研究交流活動<br/>から得られる<br/>ことが期待さ<br/>れる成果</p> | <p>1) 耐熱性エタノール生産性酵母の分布調査とストレス耐性分子機構</p> <p>省エネ型のエタノール生産技術構築のために、耐熱性に優れたエタノール生産性酵母の取得が必要であるが、ASEAN 諸国のバイオマスからのバイオ燃料生産を目指して、それぞれの国において耐熱性酵母を取得する。また、分離された酵母の耐熱性、糖資化性、エタノール生産性等の違いや同種の地理的分布を把握できる。加えて、試験管内実験を通じた耐熱性等のストレス耐性化株の解析から、耐熱性やストレス耐性化の分子機構の理解が可能になり、その情報を他の酵母に利用できる可能性がある。さらに、代謝のバイオインフォーマティクス解析等から、生産性を改善できると考えている。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌 <i>Zymomonas</i> 属菌の分布調査と高温適応の分子機構</p> <p>これまでに分離された <i>Zymomonas mobilis</i> 株より耐熱化株を育種できる。さらには、ゲノム解析などの結果を利用し耐熱化に関わる遺伝的変化を明らかにできる。</p> <p>3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発</p> <p>高温・非温度制御・酢酸発酵系の開発に有用な知見を得ることが期待される。</p> <p>4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵</p> <p>高温条件下でのアミノ酸発酵系の開発に有用な知見を得ることが期待される。</p> <p>5) 耐熱性 <i>Gluconobacter</i> の耐熱性機構の解析とその応用</p> <p>耐熱化の機構を明らかにすることで、ほかの有用発酵微生物に耐熱性を負荷することが可能となり、冷却コストが削減できる省エネルギーの高温発酵系の開発が可能になると考えられる。</p> <p>6) エタノール発酵生産のための耐熱性酵母の交配育種とゲノム解析</p> |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>タンパク質の温度感受性が、その生物自体の能力を規定していると予想している。そこで、タンパク質の熱安定性を規定する構造を調べるため温度感受性となるタンパク質を探ることにより、タンパク質の耐熱性のメカニズムを明らかにできる。</p> <p>なお、課題7)と8)はカウンターパートが決まっていないため、現在のところ期待される成果は未定である。</p> |
|--|---|

|                            |  |        |        |        |        |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| 整理番号                       | R-3  | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
| 研究課題名                      | (和文) 熱帯性生態系を維持する環境微生物の研究   |        |        |        |        |
|                            | (英文) Research on Environmental Microbes sustaining Tropical Ecosystem  |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・<br>職      | (和文) 前田 健・山口大学共同獣医学部・教授  |        |        |        |        |
|                            | (英文) Ken MAEDA・Joint Faculty of Veterinary Medicine・Professor  |        |        |        |        |
| 相手国側代表<br>者<br>氏名・所属・<br>職 | (英文) Sunee NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate<br>Professor  |        |        |        |        |
| 参加者数                       | 日本側参加者数  | 24名    |        |        |        |
|                            | (タイ)側参加者数  | 14名    |        |        |        |
|                            | (ベトナム)側参加者数  | 1名     |        |        |        |
|                            | (ラオス)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
| 27年度の<br>研究交流活動<br>計画      | <p>平成27年度は14の研究課題を実施する。</p> <p>1) アジアにおける感染症の疫学的解析<br/>タイを中心としたアジアにおける感染症に関する以下の疫学的解析を平成26年度に引き続き実施する。1) 節足動物媒介性の感染症の調査、2) コウモリの行動学と保有する感染症の調査、3) 魚における粘液胞子虫の調査を継続する。</p> <p>2) メタノール資化性微生物による有用物質生産と植物生長促進<br/>平成26年度に続き、タイの植物試料から分離したメタノール資化性微生物について、イネやトウモロコシなどの作物を対象とした植物生長促進効果の評価を幼苗での評価だけでなく圃場栽培試験での評価も行うとともに、植物ホルモンなど植物生長促進に関わる物質の生産性評価を実施する。また、酵母を用いた有用酵素タンパク質生産について、メタノール資化性酵母のメタノール誘導性遺伝子発現制御機構解明を日本側で進めるとともに、ゲノムシャッフリング技術の活用についても検討する。</p> <p>3) 生態系/環境修復のための有害物質バイオレメディエーションおよび細菌-植物相互作用に関する微生物機構の研究</p> |        |        |        |        |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>平成26年度は農薬（主に除草剤）を分解する複数の<i>Pseudomonas</i>属細菌をタイ土壤から分離し、それらが分解対象の農薬に走化性を示すことを見出した。平成27年度は走化性研究が進んでいる<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01株を走化性モデル株として用いるなどして走化性センサーの特定を行う。また植物成長促進細菌(<i>Pseudomonas fluorescens</i>)と植物病原菌(<i>Ralstonia solanacearum</i>)では植物根浸出液に含まれる無機及び有機の酸に走化性応答を示すことが分かった。平成27年度にはそれらの走化性センサーを特定する。</p> <p>4) タイおよびインドネシア人の腸内細菌叢データに基づいたプロバイオティクスの開発に関する研究</p> <p>日本の児童とタイおよびインドネシアの児童では、腸内フローラが大きく異なっていることが、これまでの我々の調査で明らかになっている。日本の児童の腸内フローラはビフィズス菌とバクテロイデスを主体とするタイプ（BB タイプ）であり、インドネシアの児童はプレボテラ属細菌を主体とするPタイプである。またタイはPタイプとBBタイプの児童が混在している。2015年度は、タイのDr. Sunee Nitisinprasertらのグループとともに、タイの児童の食生活を綿密に調査し、フローラタイプに影響を与える食事因子を探索する。プロバイオティクス候補株の<i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 2075の抗サルモネラ菌活性をin vitro gut modelで検証する。このin vitro gut modelではヒトフローラを模倣した細菌コミュニティをフラスコチャンバー内に形成させる。そしてTISTR 2075の投与により、サルモネラ菌だけでなく、他の細菌の変化や化学的環境がどのように変化するかを詳細にモニタリングする。細菌叢の変化は九大にて次世代シーケンサーを用いた網羅的細菌叢解析法によりモニタリングする。</p> <p>5) 納豆菌ガンマポリグルタミン酸(PGA)によるカドミウム障害イネの生育回復と納豆菌(PGA生産菌)とイネとの相互作用におけるPGAの役割に関する研究</p> <p>納豆菌の生産するガンマポリグルタミン酸(PGA)はカドミウム(Cd)で汚染されたイネの生育障害を回復させる機能のあることを見出した。平成27年度は、PGAあるいは納豆菌(PGA生産菌)によるCd障害イネの生育回復実験を圃場のグリーンハウスで行なう。一方では、Cdで汚染された下記の水田土壤から、PGA生産菌、PGA分解酵素生産菌を分離し、これらの分離菌を用いてPGAによるCd障害イネの生育回復のメカニズム、PGA生産菌とイネとの相互作用におけるPGAの役割を明らかにする。</p> <p>6) 植物-微生物間相互作用に関与する新規二次代謝産物と耐熱性緑藻による機能性脂質生産の解析</p> <p>エイコサペンタエン酸(EPA)蓄積株としてタイ国の海水から単離された熱帯性微細藻類<i>Isochysis</i> sp.を理化学研究所の重イオンビーム施設にお</p> |
|--|---|

|  |   |
|--|---|
|  | <p>いて変異処理を行い、処理サンプルを適切な条件下で培養し、生育してきた生存株のうち運動性が欠損した変異株をマイクロピペット法にて単菌化する。単離株を各々培養後、藻体内に蓄積する脂質を抽出、メチルエステル化後、銀コートTLCを用いたハイスループットスクリーニングによりEPAの蓄積量が向上した変異株を選抜する。</p> <p>7) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓<br/>微生物からはこれまでに100種を超える医農薬が実用化されてきたが、従来の微生物探索は日本や欧米を中心になされてきたため、熱帯の微生物は十分に評価されていない。熱帯は温帯と異なる生物相をもつことから、未知微生物が存在し、そこから新規生理活性物質が発見される可能性が強く期待される。本研究では、タイの土壌、植物、海洋など様々な環境から熱帯性微生物を分離・収集し、抗菌性、抗癌性、農薬活性など医農薬として有用な生理活性を示す低分子有機化合物を探索し、その構造と活性について解析する。平成27年度は相互に一名ずつお互いを訪問し、議論を交わすことで、研究活動の促進と活性化を図る。</p> <p>8) 大量並列DNAシーケンス<br/>タイ国由来の微生物におけるゲノム塩基配列情報を富山県立大学工学部生物工学科応用生物情報学講座に設置している大量並列型DNAシーケンサー (MiSeq, Illumina社) を用いて解析する。</p> <p>9) ゴム園における農薬等の汚染が土壌の微生物活性に与える影響について<br/>タイ北部ではグラモキソン(パラコート)がゴム農園で広く用いられてきた。この農薬は 100 日程度にも及ぶ長い半減期を持ち、土壌の微生物相と酵素スペクトラムに悪影響を与える結果、土壌の肥沃度を下げる。従って、この薬品を生物学的に処理することは非常に興味深い。平成 27 年度は農薬汚染された土壌と対照区の土壌の微生物相と酵素活性の状況を評価した平成 26 年度に続いて、環境修復に向けた農薬分解性微生物の単離と同定を段階的に進める。</p> <p>10) 植物共生細菌の多様性解析とその応用<br/>植物表面上に共生する細菌の中で、微生物同士の競合により病原性細菌の増加を抑制する例が知られている。これらのメカニズムと応用は、そのまま農業展開が可能である。いくつかのメカニズムが考えられるが、細菌細胞同士が毒素を注入するタイプ6分泌機構に注目し、病原性細菌を殺傷する能力のある微生物をスクリーニングする。</p> <p>11) 熱帯地域の主要植物細菌性病害の宿主病原体相互作用の解析と生物防除<br/>平成27年度は前年までに得られている生物防除資材候補菌株である <i>Pseudomonas fluorescens</i> C3F1株とSP007s株について、前者では軟腐病菌に対する拮抗性とリン酸溶解能および抗菌活性との関係を、後者では生存能力におけるアラルモンppGppの影響を調査する。</p> <p>12) 熱帯アジアにおけるシロアリ類の分類および多様性に関する研究</p> |
|--|---|

|  |  |
|--|--|
|  | <p>シロアリ分類群の多くは、森林生態系の維持や物質循環に深く関わっており、その中でも、キノコシロアリ亜科は、セルロースとともにリグニンの分解にも寄与することから重要なグループである。平成27年度は、キノコシロアリ亜科の分類体系を整理することを目的に、東南アジアに分布するキノコシロアリ亜科の比較形態を行う。また、これらの種の遺伝的識別法の確立のため、入手容易な日本産シロアリでのDNA分析を行い、形態と比較する。</p> <p>13) 微小および大型藻類における脂肪酸分解由来の香気成分に関する研究<br/>タイ産の微小藻類、特にケイ藻類 (Skeletonema, Thalassiosira) を採取して大量純粋培養の条件を確立する。次に、培養藻類から脂質を抽出して、その脂肪酸組成を精査し、特徴化を行う。また、これらケイ藻類の香気成分を分析して、脂肪酸由来の成分を特定する。さらに、これら脂肪酸由来の香気成分の生理活性 (化学防御、アレロケミカル等) ならびにその生合成機構を解明する。</p> <p>14) 原始紅藻類の環境適応機構の解析と物質生産に向けた基礎研究<br/>LED を用いた光条件変化によるバイオマス合成誘導の遺伝子レベルでの制御の仕組みを明らかにするために、原始紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> を用いて研究を進める。具体的には、<i>C. merolae</i> でバイオマス合成が誘導される単色赤色光を照射した時のトランスクリプトーム解析を行い、光条件の変化によって発現誘導・抑制が生じる遺伝子に着目して解析を進める。</p> |
| <p>27年度の<br/>研究交流活動<br/>から得られる<br/>ことが期待さ<br/>れる成果</p> | <p>上記14の研究課題から得られることが期待される研究成果を以下に挙げる。</p> <p>1) アジアにおける感染症の感染状況が把握でき、感染症のリスク管理に対して貢献できることが期待される。</p> <p>2) 有用メタノール資化性微生物の取得や微生物の新種提唱に加え、作物増収、温暖化ガス排出削減など低環境負荷技術開発につながる成果として、今年度は、メタノール資化性微生物が生産する植物生長促進因子の同定や、メタノール資化性酵母による有用タンパク質生産に関わる重要因子の機能解明という成果が期待される。</p> <p>3) 細菌の走化性の制御を通じて細菌 - 環境汚染物質、細菌 - 植物の相互作用を制御し、バイオレメディエーションの効率化や低農薬 - 低肥料の環境適合型農業の確立を目指している。平成27年度の研究では、その目標達成のための重要な基礎的知見 (特に、研究対象物質に対する走化性センサーの特定) を得られると期待される。</p> <p>4) 日本、タイ、インドネシアの異なる食習慣がどのように腸内細菌叢に影響を与えるか情報が得られれば、それぞれの国民を対象としたプロバイオティクスの開発についての新たな展開戦略が生まれることが期待される。プロバイオティクス候補株の <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 2075 を用いてそのプロバイオティクスの能の検証を進めることにより、プロバイオティク</p>   |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>スのシーズとして期待される。</p> <p>5) タイ中西部のタク市郊外の水田の一部は、スズ鉱山から排出されるカドミウム(Cd)によって汚染されている。本研究は、Cd 汚染水田を端緒として、ガンマポリグルタミン酸(PGA)の重金属吸着能に着目して開始された。得られる成果は、Cd 生育障害イネに対する PGA あるいは PGA 生産菌を用いたバイオレメデーションの基礎情報を提供するものと期待される。</p> <p>6) <i>Isochysis</i> sp. による EPA 生産の実用化において問題となっている、培養効率を著しく低下させる運動性を欠損させることと EPA の生産性の向上を目指し変異処理を行う。変異導入方法として、我が国でその技術が進展している重イオンビームを用いることが極めて有効である。変異株の選抜には我々が最適化した銀コート TLC を用いたハイスループットスクリーニング法を用いることで、効率的かつ簡便に目的とする変異株を選抜できることが期待される。</p> <p>7) 微生物の性質（物質生産能力も含む）は、微生物種や生息環境の影響を受けるため、未研究資源である熱帯性微生物からは、これまでに発見されていない新規な生理活性物質が発見されることが期待される。またそれらの活性評価を通じて医薬品として有用な化合物が発見されれば、実用化の可能性も期待される。</p> <p>8) タイ国あるいは熱帯地方に特徴的な微生物由来の情報を得ることが期待される。</p> <p>9) 農薬に汚染されたゴム園土壌からの農薬分解性微生物の選抜・単離・同定が期待される。</p> <p>10) タイプ 6 分泌機構は発見されてから日が浅く、微生物ゲノムに広く存在することが知られているものの、どの細菌同士が殺傷し合っているのかは分かっていない。植物上の共生細菌のその能力を探索することにより、農業展開が期待される。</p> <p>11) 生態系に対してより安全で影響の少ない生物防除資材として期待される <i>Pseudomonas fluorescens</i> 菌株の、より安定した拮抗能力および環境中の生存能力を向上させるキーポイントを解明することが期待される。</p> <p>12) 1965 年以降ほとんど研究がなされていなかったキノコシロアリ亜科の分類体系が明らかになることは、害虫防除の側面のみならず、シロアリ-キノコ-共生原生動物の系を研究する上での基礎的な情報を与えることが期待される。</p> <p>13) ケイ藻類における脂肪酸由来の香気成分の生成メカニズムの解明ならびにその生理的役割を明らかにすることにより、化学生態学に関する重要な知見が得られることが期待される。</p> <p>14) 光条件変化によるバイオマス合成誘導に関して、遺伝子発現変化を解析することでその調節制御機構を予測することが可能となる。</p> |
|--|--|

|                       |   |        |        |        |        |
|-----------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| 整理番号                  | R-4   | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
| 研究課題名                 | (和文) 食品、食品保蔵、衛生および生態系維持のための有用微生物研究<br>(英文) Research on Microbes Useful for Food, Food Preservation, Health and Ecosystem  |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職     | (和文) 松井健二・山口大学医学系研究科・教授<br>(英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor   |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職    | (英文) Kosum CHANSIRI・Srinakharinwirot University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Lecturer<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer   |        |        |        |        |
| 参加者数                  | 日本側参加者数   | 29名    |        |        |        |
|                       | (タイ) 側参加者数  | 29名    |        |        |        |
|                       | (ベトナム) 側参加者数  | 7名     |        |        |        |
|                       | (インドネシア) 側参加者数  | 6名     |        |        |        |
| 27年度の<br>研究交流活動<br>計画 | <p>本研究課題において、以下の17件の共同研究(小研究課題)を実施する。</p> <p>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用<br/>タイの熱帯環境に生息する担子菌類を単離し、その菌糸培養、子実体形成条件の最適化を進めるとともに当該担子菌、およびその関連担子菌類から抗菌性化合物を単離、同定する。これまでに <i>Clitopilus</i> に属する種を数株単離しており、これを用いた検討を進める。</p> <p>2) アーバスキュラー菌根菌とリン可溶化細菌の同時接種によるアーティチョーク成長ホルモン組成への影響<br/>これまでの検討で、アーティチョークにアーバスキュラー菌根菌とリン可溶化能を有する細菌を同時接種するとその生育が促進されることを見いだした。こうした生育の促進は少なくとも一部は植物の生長を調節する植物ホルモンに依存すると考えられる。そこで、同時接種による植物ホルモンの消長について LC-MS、GC-MS を用いて検討する。</p> <p>3) 微生物機能を活用した安全で高付加価値を有する食料生産<br/>26年度は日本国内ならびにタイ北部の農地土壌分析を重点的に行い、それらの分析データの集積を行った。27年度はインドネシアジャワ島南東部を中心として農地土壌分析を重点的に行い、それらの分析データを集積し、SOFIX のデータベースの3か国の比較検討を開始する。SOFIX に基づく有機農法で栽培した作物の栄養成分含量の評価、病原菌に対する抵抗性評価も引き続き実施する。また、26年度は、植物病原菌に対する抗菌作用を有する耐熱性酵素生産菌を探索し、候補菌株として耐熱</p> |        |        |        |        |

性菌 2 株を取得した。27 年度は、抗菌作用を有する耐熱性酵素の特性解析と引き続き植物病原菌に対する抗菌作用を有する微生物の探索を実施する。

#### 4) 植物内生放線菌の農業への応用

ネコブセンチュウは広範囲の作物に寄生して作物の生育を阻害する。生物的防除法として出芽細菌や糸状菌を用いた生物農薬が知られているが、放線菌を利用した生物防除については研究があまり進んでいない。当研究室では、トマトを用いた栽培により、農業資材への応用が期待できる有機野菜の内生および根圏放線菌の中からネコブセンチュウの生育を阻害する株を探索して、ネコブセンチュウ生育抑制を示す選抜株について、その生育抑制機構を解明する。

放線菌は、有機野菜の葉、茎および根から分離した内生および根圏放線菌を用いた。放線菌のネコブセンチュウ生育抑制は、放線菌 4 株の培養菌体とネコブセンチュウの卵嚢が付着した根を土壤に混合して、播種から 2 週間経過したトマト苗を移植後、4 週間栽培し、トマトの根の状態や重量等を観測して、4 株ずつ行なう。さらにネコブセンチュウ生育抑制効果を示した放線菌グループに関しては、1 株ずつネコブセンチュウ生育抑制を検討する。また、生育抑制効果を示した放線菌の培養液上清等を用いて、試験管内や寒天培地上でのネコブセンチュウへの影響についても検討する。

#### 5) ポリ乳酸分解微生物の探索と応用

昨年度は結晶性ポリ乳酸を分解する微生物分離を目的として、探索を行った。その結果、酸性で加熱処理を行わないポリ乳酸を分解する微生物は得られたが、酸性で加熱処理を行ったポリ乳酸を分解する微生物は得られなかった。そこで 27 年度は、不織布ポリ乳酸および布状のポリ乳酸製品を用いて、結晶性ポリ乳酸を分解する微生物の探索を行う。具体的には、不織布および布状ポリ乳酸を種々の環境下の土壤に埋め込み継続的にサンプリングを行い、これらの結晶性ポリ乳酸の分解状況を観察し、分解したサンプルから微生物の分離を試みる。

#### 6) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

2014 年度には、耐熱性ラン藻（温泉由来ラン藻）によるフィコエリスリン生産を目的として、培地組成と培養条件の検討を行った。また、熱安定性フィコエリスリンの精製スキームについても検討を加えた。さらに、約 40 株の耐熱性ラン藻を用い、熱安定性物質生産（ポリ-β-ヒドロキシ酪酸 (PHB)）の生産について、検討を加えた。通常の培養方法で窒素飢餓等の培養上の操作を行ってはいない段階ではあるものの、*Leptolyngbya* 株が乾燥重量あたり約 12% の PHB を蓄積することが分かった。

#### 7) *Staphylococcus* 属細菌によるベンゾニトリルの生分解に関わるタンパ



|  |  |
|--|--|
|  | <p>ク質の同定</p> <p>2016年3月に Jittima 氏を招へいし、上記の研究を遂行する予定である。</p> <p>8) カイコ発現系を用いた Dengue 熱ワクチンの開発及び有効性試験に関する研究</p> <p>Dengue 出血熱は、年間億人規模で感染が広がり、22000 人以上死者が出ている。蚊による感染地域は、温暖化の影響もあり、日本、南ヨーロッパと米国を含め、100 カ国以上広がっている。しかし、現在 Dengue 熱の感染防止や予防に必要なワクチンの開発は進められているものの、限られており完全に予防できるワクチンはなく、先進諸国においていくつかの臨床試験段階である。そこで、我々が開発したカイコの幼虫と蛹での効率的な遺伝子発現方法を用いて、非常に効果的な成分ワクチンの開発を目標としている。特に多価ワクチンの設計や発現を行い、得られた抗原類をワクチン候補としての有効性試験に供し、ワクチンとして評価を行う。</p> <p>平成27年度には、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ Dengue 熱の成分ワクチンの候補となるなり得る Dengue ウイルスの抗原のスクリーニング</li> <li>・ カイコ発現系を用いた Dengue ウイルス抗原の発現及び免役原性の評価</li> </ul> <p>を計画している。</p> <p>9) 微生物を用いたバイオマス資源の環境保全型利用・重金属処理に関する研究</p> <p>今年度は、昨期分離した強いデンプン利用能を持つ耐熱性微生物を用いて、安価な窒素源を使った直接高温 L-乳酸発酵の最適化と、殺菌や糖化などをしない無処理生ゴミを用いた L-乳酸発酵のプロセス設計を行う。また、Illumina Miesq を用いたブリッジ PCR シーケンシングによる土壤、有機排水中微生物群集構造解析法について種・OTU レベルでの解析法をさらに深化させ、複合微生物系発酵や有機肥料投入土壤や金属処理土壤中の解析に適用する。</p> <p>10) 生理活性天然有機化合物の生物変換</p> <p>これまで用いてきた熱帯産植物はマンゴスチンの果皮であったが、それに加えてさらに様々な熱帯産植物由来の抽出物を調製し、それらを基質として、微生物変換反応を実施し、新規化合物の調製を目指す。その際には、これまで熱帯産植物等から単離してきたエンドファイトはもちろん、それ以外の単離源から新たに単離した微生物を用いて反応を行うことで、よりユニークな反応を行なわせる。</p> <p>11) 熱帯微生物を活用した有益なバイオフィルムおよびバイオサーファクタントの開発</p> <p>昨年度より開始した Assoc. Prof. Jiraporn Thaniyavarn (Chulalongkorn</p> |
|--|--|

University, Thailand) との共同研究を継続する。具体的には、7月下旬に J. Thaniyavarn を北海道大学にて2週間程度受け入れ、研究セミナーを開催すると共に先方で独自に取得している新規バイオフィューエル候補サンプルについて北海道大学にて精密化学構造解析を行う。その後、そこで得られた結果に基づき双方で追加実験を行い、11月中旬に森川が Chulalongkorn University を訪問および3日間程度滞在し、講演を行うと共に成果をまとめるための相談を行う。さらに、次年度からの共同研究開始にむけた準備のために、Dr. Le Thi Nhi Cong (Vietnamese Academy of Science and Technology, Vietnam) および Prof. Irfan D. Prihambada (Universitas Gadjah Mada, Indonesia) らと電子メールおよび電話による研究計画案を策定する。

#### 12) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

昨年度より引き続き、発酵食品をはじめとするさまざまな分離源より得られる未開拓な乳酸菌資源から、新奇のバクテリオシンを探索する。分離された乳酸菌の特性、および乳酸菌が生産するバクテリオシンの構造や特性を解析し、それら応用利用の可能性を検討する。とくに、種々の発酵食品をはじめとする食品の保存や加工への利用、ヒトや環境におけるバイオコントロールへの利用について引き続き検討を進める。またこれらの研究を推進するために、タイ・ベトナム等への技術移転を積極的に進め、有用な新奇乳酸菌および新奇バクテリオシンの探索の効率化を図る。

#### 13) ASEAN 諸国と日本の伝統発酵食品の生理活性ペプチドおよび生理活性物質の活性に関する比較研究

本研究は、近年注目を集めている伝統発酵食品について機能性を科学的に解明し、人類の健康増進と豊かな生活の質の維持・向上に役立てることを目的とする。我々は、これまで沖縄県の伝統発酵食品であるとうふようや泡盛蒸留粕の機能性成分に関する知識と経験を蓄積してきた。発酵食品または二次発酵産物の抽出物を用いて各種生物活性および機能性について明らかにする。特に、細胞培養を用いた脂肪生成阻害、骨石灰化促進、破骨細胞分化抑制作用、神経細胞保護作用および免疫賦活化について調査する。

また、昨年度より発酵食品製造に用いられる微生物を用いて、各種生物資源の微生物発酵二次代謝産物の機能性探索を開始した。これまでに、油用植物搾油粕の糸状菌発酵で得られた抽出物に抗酸化活性の上昇が認められるなど、成果が出つつある。本年度は、さらに発展させて生理活性成分の単離・同定を目指す。

#### 14) ベトナムの餅麴メンから分離した発酵性酵母をもちいたアルコール飲料の特性

黒米 (*Oryza sativa* var. *Japocica* cv. *Shiun*)、赤米(*O. sativa* var. *Japnoca* cv.

*Engimai*)、緑米(*O. sativa* var. *Japnoica* cv. *Midorinoka*)、白米精米(*O. sativa* var. *Japonica* cv. *Hinohikari*)、コメではないが、ワイルドライス(*Zyzania aquatica*)と呼ばれている穀物種子をもちいてアルコール飲料を試醸する。糖化剤は、生デンプン分解能をもつグルコアミラーゼ製剤 **Sumizyme** を使用し、酵母には、ベトナムの麴 *men* から分離同定した *Saccharomyces cerevisiae* Y3、タイ国の麴 *loog pang* から分離同定した *S. cerevisiae* NP01、日本醸造協会 K7 酵母を使用する。発酵法は通常の蒸煮法と省エネルギー的な無蒸煮発酵法をもちいる。原料、酵母、発酵法の異なる各種アルコール飲料の比較検討を行い、さらに品質の改良を行い、抗酸化能など機能性をもつ新規アルコール飲料の開発を行う。

#### 15) *Gluconobacter* を用いた有用糖類の酸化発酵と酢酸菌・乳酸菌における多糖の役割

本研究課題は次のような2つの研究を展開する。

A. 酢酸菌 *Gluconobacter* が持っている、ガラクトールを酸化し、タクトースならびにガラクトースを生産する能力を解析する。特に、酸化に関わる酵素やその遺伝子の解析を進める。

B. 酢酸菌と乳酸菌が生産する多糖のストレス耐性能、特に、耐熱性、耐酸性、有機溶媒耐性における役割を解析する。

#### 16) 出芽酵母と分裂酵母における、タンパク質発現量の限界測定とその異種タンパク質産生への応用

我々の研究室では、酵母を研究対象としてタンパク質の発現量の限界を測定できる「遺伝子つなひき法」を開発してきた。最近、この技術を利用して酵母内での異種タンパク質の発現を向上させる技術の開発に取り組んでいる。平成 26 年度も平成 27 年度に引き続き、我々の研究室のタンパク質生産技術に興味を持つカウンターパートを探すとともに、酵母の分子遺伝学技術に興味を持つ研究者・学生を受け入れ、技術を習得してもらおう。

また、7月もしくは8月にタイで開催される学会等において、研究内容を発表する。

#### 17) 微生物の細胞壁溶解酵素の植物病原性糸状菌の防除への応用

26 年度は、植物病原菌に対する抗菌作用を有する耐熱性細胞壁溶解酵素の生産菌を探索し、候補菌株として耐熱性菌 2 株を取得した。さらに、これら 2 株の同定、酵素生産条件および酵素精製条件の検討を行った。

27 年度は、26 年度に実施した探索条件とは異なる条件下で抗菌作用を有する新規酵素生産菌の探索を行い、様々な特性を有する酵素を幅広く収集した植物病原性糸状菌の防除用酵素ライブラリーの構築を目指す。また、26 年度に取得した 2 株からの細胞壁溶解酵素の精製と諸性質の解明を目指す。

|  |   |
|--|---|
| <p>27年度の<br/>研究交流活動<br/>から得られる<br/>ことが期待さ<br/>れる成果</p> | <p>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用<br/>タイ北部で、<b>Clitopilus</b> 種の担子菌は伝統的に食用に供されているが、現状では野外採取したものだけが入手可能で、人工栽培には成功していない。そこで、当該菌の培養系を確立し、子実体形成の効率化を試みる。また、当該担子菌類には多くの生理活性物質が知られており本菌株でも有効な成分の発見が期待できる。</p> <p>2) アーバスキュラー菌根菌とリン可溶化細菌の同時接種によるアーティチョーク成長ホルモン組成への影響<br/>植物内生菌を用いた植物の生長調節は化学物質を用いない環境に優しい農業システムの開発に貢献すると期待できる。</p> <p>3) 微生物機能を活用した安全で高付加価値を有する食料生産<br/>(1) 微生物機能を利用した土壌の肥沃化と管理技術の開発<br/>立命館大学生命科学部では、微生物機能を評価、利用する新しい土壌肥沃度評価法 (<b>SOFIX</b>, <b>Soil Fertile Index</b>) を開発しており、地域バイオマス資源と本法を利用した標的作物に適した農地の肥沃化は徐々に広まっている。また、本法に基づく農地管理技術の開発も進んでいる。本法は土壌成分の解析データを基盤としているため、より多くのデータを集積することで、より精度の高い、かつ汎用性の高い評価法に進化させることが期待される。27年度は、日本はもとよりタイ北部地域において、<b>SOFIX</b> に基づく地域バイオマスを利用した農地の肥沃化とインドネシアを中心に新たな土壌 20 サンプルの解析を目標とする。<br/>(2) 微生物機能を利用した減化学肥料ならびに減化学農薬を目指した有機農法の開発<br/><b>SOFIX</b> に基づく管理農法は有機農法を基本とし、化学肥料ならびに化学農薬を用いないことを基本としている。それゆえ、化学肥料や化学農薬を使用しないでも病原菌に強く、かつ高栄養を有する農作物を作る方法とも言える。27年度は、26年度に行ったタイ北部での農地土壌分析データをもとに、実際に <b>SOFIX</b> に基づく有機農法で作物を栽培し、栄養成分含量の評価、病原菌に対する抵抗性の評価を検証する。抗菌作用を有する耐熱性酵素生産菌のタイならびにインドネシアの植物病原菌に対する評価を行う。<b>SOFIX</b> に基づく管理農法と化学農薬の代わりに病原菌に対する抗菌作用を有する微生物ならびに酵素等を用いる生物農薬を併用することによる減化学農薬有機農法の開発を目指す。</p> <p>4) 植物内生放線菌の農業への応用<br/>各種野菜から分離した植物病害を抑制する微生物を各種育種法を適用し、有用微生物を改良し、農薬等の使用量をできるだけ抑えることが可能な農業微生物を開発する。</p> <p>5) ポリ乳酸分解微生物の探索と応用<br/>結晶性のポリ乳酸を分解し、それを資化可能な微生物は、不織布を用い</p> |
|--|---|

て製造された製品を効率的に分解可能なため、ポリ乳酸の積極的な分解が可能になる。

6) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

フィコエリスリンに対しては、化粧品への添加等の応用が考えられ、PHBについては、二酸化炭素からの有用物質生産という応用が考えられる。

7) *Staphylococcus* 属細菌によるベンズニトリルの生分解に関わるタンパク質の同定

ベンズニトリル誘導体は農薬として使われており、その残留と人における健康被害が懸念されている。その分解除去と分解機構の解明は重要な課題である。

8) カイコ発現系を用いたデング熱ワクチンの開発及び有効性試験に関する研究

現在、東南アジアを中心に広がっている感染症による被害を減らし、また将来日本にまで北上が予想されるデングウイルス熱に対する予防が可能となる。

9) 微生物を用いたバイオマス資源の環境保全型利用・重金属処理に関する研究

上記研究により、従来には無かったバイオマスの環境保全型利用の提案や重金属処理の現場において今まで明らかにされていなかった微生物情報が得られることが期待される。

10) 生理活性天然有機化合物の生物変換

これまでのマンゴスチン果皮由来化合物の変換反応により、複数のエンドファイトが異なる変換生成物を生じる事が明らかとなり、さらにそれらの中には、出発基質より抗菌活性や抗腫瘍活性などが増加している例が見られたことから、さらに別の植物抽出物を微生物変換することで、多様な構造を有する化合物が創成可能と思われ、その中にユニークな生理活性を有する化合物が存在する事が期待される。また、これまでの実験で、水酸化、環化、スルホン化という構造変化が起こった微生物代謝産物が単離できており、これらの化合物はヒトの代謝研究のための評品として有用であり、今後単離する化合物もヒト代謝研究の材料として有望である。

11) 熱帯微生物を活用した有益なバイオフィルムおよびバイオサーファクタントの開発

タイの新しい微生物資源として、バイオサーファクタント生産能の高い酵母を追加することができる。それぞれの大学で研究を分担および協力するによって、その微生物の諸特性ならびに生産物に関する詳細情報を効率よく得ることができる。拠点交流の範囲を拡大できる可能性がある。

12) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

現地の微生物資源を活用し、食品の品質と安全性の向上に寄与できる。

とくに様々な発酵食品の製造に関わっている未開拓な新奇の乳酸菌の発見が期待できる。さらに、それらからは新奇のバクテリオシンの発見が期待され、発見されたバクテリオシンおよびバクテリオシン生産乳酸菌は食品保存・食品加工等への活用が期待される。

### 13) ASEAN 諸国と日本の伝統発酵食品の生理活性ペプチドおよび生理活性物質の活性に関する比較研究

アジア諸国の伝統発酵食品は、個々の国において利用される微生物に特徴がある。それ故、発酵によって産生される生理活性物質も異なることが予測される。新規な生理活性物質の発見と国情にあった機能性と発酵食品の関連について解明が期待できる。得られた生理活性物質の機能性を明らかにすることで、食品添加物として食品工業へ応用が期待される。さらに、これらの情報を基に国情に則した個々の疾病予防に資する新規発酵食品の開発が期待できる。

また、発酵食品製造微生物を用いた生物資源の発酵産物の新規機能性探索に関する研究では、非食用植物などの有効利用と高付加価値化が期待できる。本研究では、基本的に食品工業への応用展開を想定しているが、得られる機能性の効果によっては医薬への応用も期待できる。

### 14) ベトナムの餅麴メンから分離した発酵性酵母をもちいたアルコール飲料の特性

発酵原料と酵母と発酵法を組み合わせ、比較検討し、さらに品質の改良を行ない、新しいタイプのアルコール飲料を開発する。有色米を原料にすることによる、着色してアメンティがあり、抗酸化能など機能性を併せもつアルコール飲料の開発が期待される。

### 15) *Gluconobacter* を用いた有用糖類の酸化発酵と酢酸菌・乳酸菌における多糖の役割

Aでは、低カロリー甘味料や新規生理活性物質としての利用が期待されるタガトースの生産系を確立する一助となる。また、ガラクトースに関しては、L体が生産できれば魅力的である。Bについては、微生物による発酵におけるストレス回避方法を提案できる。

### 16) 出芽酵母と分裂酵母における、タンパク質発現量の限界測定とその異種タンパク質産生への応用

我々の酵母を用いた基礎生物学の技術を、カウターパートの興味に合わせ食料や食料の保存、健康といった応用に展開できることが期待できる。さらに、酵母を用いた高度な分子遺伝学の技術を広く普及できると期待される。

### 17) 微生物の細胞壁溶解酵素の植物病原性糸状菌の防除への応用

#### (1) 微生物機能を利用した減化学農薬を目指した有機農法の開発

これまでに取得した細胞壁溶解酵素生産菌およびその酵素の特性を考慮したうえで、これらが有する植物病原菌に対する抗菌作用の評価、さ

|  |   |
|--|---|
|  | <p>らに、より効率的な防除条件の検討を日本およびタイで行う。これにより、化学農薬の代わりに病原菌に対する抗菌作用を有する微生物ならびに酵素等を用いる生物農薬を併用することによる減化学農薬有機農法の開発が期待できる。</p> <p>(2) 有用担子菌類等の育種への応用</p> <p>細胞壁溶解酵素は植物病原菌の防除に有用であるのみならず、その作用の特性上担子菌類のプロトプラストの調製に必須の酵素であることから、担子菌類の細胞融合による品種改良や遺伝子導入による物質生産系の構築など応用が期待される。</p> |
|--|---|

|                       |  |        |        |        |        |
|-----------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| 整理番号                  | R-5  | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
| 研究課題名                 | <p>(和文) 新規産業のための次世代発酵技術の構築</p> <p>(英文) Development of Next-generation Fermentation Technology for New Wave Industry</p>  |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職     | <p>(和文) 星田尚司・山口大学医学系研究科・准教授</p> <p>(英文) Hisashi HOSHIDA・Yamaguchi University・Associate Professor</p>   |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職    | <p>(英文) Savitree LIMTONG・Kasetsart University・Professor</p> <p>Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor</p> <p>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Lecturer</p> <p>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer</p> <p>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor</p> |        |        |        |        |
| 参加者数                  | 日本側参加者数  | 20名    |        |        |        |
|                       | (タイ)側参加者数  | 25名    |        |        |        |
|                       | (ドイツ)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
|                       | (ベトナム)側参加者数  | 5名     |        |        |        |
|                       | (インドネシア)側参加者数  | 1名     |        |        |        |
|                       | (ラオス)側参加者数   | 1名     |        |        |        |
| 27年度の<br>研究交流活動<br>計画 | <p>1) 耐熱性細菌を用いた高温高速エタノール発酵系の構築</p> <p>本共同研究では耐熱性あるいは耐熱化細菌を用いた高温高速エタノール発酵系の構築を目的とする。分離された耐熱性株もしくは耐熱化した株を用いたエタノール発酵生産系の確立を目指す。高温高速発酵は将来の利用が期待される発酵技術で、冷却コストの削減、雑菌混入の抑制、そして生産性の向上が期待できる。本研究では、分離もしくは開発された菌株を用いてラボスケールでの発酵生産実験を実施する。特</p>  |        |        |        |        |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>に、どのようなバイオマスをエタノール生産に用いることが可能か、また、糖化およびエタノール発酵による生産性評価などを実施し比較する。平成27年度は、異なるバイオマスを原料にエタノール発酵が可能な菌株を用いた発酵試験を実施し比較する。</p> <p>2) 微生物工学的手法を用いた新規の糖の生産技術の開発に関する研究</p> <p>本研究は、微生物工学の手法を用い、微生物発酵や微生物酵素を用いて、新規の機能性オリゴ糖の生産技術を確立することを最終目標にしている。27年度は4月からタイ側研究者 (Chartchai Khanongnuch 氏) の指導学生を、JASSO 外国人奨学生として6か月間受け入れ、土壌中から分離した乳酸菌の生産する糖質関連酵素(加水分解、加リン酸分解酵素など)を網羅的に検索し、オリゴ糖生産への応用を検討する。また、遺伝子工学的手法を用いた変異導入により、既知酵素(加リン酸分解酵素)の基質特異性の改良についても検討課題とする。</p> <p>3) 耐熱性酵母を用いた安定した高温エタノール発酵系の構築</p> <p>耐熱性あるいは耐熱化酵母を用いた安定した高温エタノール発酵系の構築を目的とする。平成27年度は小課題1で分離した耐熱性酵母あるいは小課題2で獲得した改良酵母を用いて、安定した高温エタノール発酵系の構築を目指す。高温発酵は冷却エネルギーの削減や糖化酵素の削減あるいは中温菌の混入抑制等が可能となり、次世代の発酵技術になると期待されている。種々のバイオマスからのエタノール生産、糖化や発酵等の条件やエタノール生産性の検討などを行う。また、高温発酵に加えてダウンストリームの研究によって、より安価なバイオエタノール生産のための技術開発も進める。</p> <p>4) 餅麴ルパン(<i>Amylomyces rouxii</i> YTH3)と酵母の混合培養により醸造した有色米酒の抗酸化能について</p> <p>タイ国の餅麴ルパンより分離した糸状菌 <i>Amylomyces rouxii</i> YTH3 をもちいて、有色米酒の品質の改良を行う。平成27年度は下記、1~3のアルコール飲料の分析、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能を調べる。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 糸状菌 <i>Amylomyces rouxii</i> YTH3 を蒸米に接種して、麴米をつくる。この麴米を、原料・糖化剤にもちいて、全麴、麴米と日本の黒米玄米 (<i>O. sativa</i> var. <i>Japonica</i> cv. <i>Shiun</i>)、麴米と日本の白米精米 (<i>O. sativa</i> var. <i>Japonica</i> cv. <i>Hinohikari</i>) で3種のもろみをつくり、日本醸造協会7号酵母をもちいてアルコール飲料を試醸する。</li> <li>2. タイ国の黒米玄米 (<i>Oryza sativa</i> var. <i>Indica</i> cv. <i>Rice berry</i>)、日本の黒米玄米、日本の白米精米を原料に、生デンプン分解能をもつグルコアミラーゼ製剤スミチームを糖化剤にして、7号酵母をもちいて、省エネルギー的な無蒸煮アルコール発酵法で、アルコール</li> </ol> |
|--|--|



|  |   |
|--|---|
|  | <p>飲料を試醸する。</p> <p>3. タイ国の黒米、タイ国の黒米発芽米、日本の黒米、日本の白米精米をもちいて、協会7号酵母でアルコール飲料を試醸する。</p> <p>5) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産</p> <p>耐熱性微生物酵素による効率的な物質変換を目的とした平成26年度の共同研究にて、耐熱性微生物酵素として放線菌由来リパーゼ (<i>Streptomyces</i> sp. strain TCW) とキシラナーゼ (<i>Streptomyces</i> sp. strain 1948) および <i>Bacillus</i> 属細菌由来耐塩性プロテアーゼ (<i>Bacillus</i> sp. strain No. 16) を得ることができた。平成27年度は、それぞれの分解酵素について、培養上清中からの酵素精製法を検討しながら、「酵素の特性解析」と「組換え酵素取得を目的とした同遺伝子のクローニング」を進める。具体的には、リパーゼについては、エステル交換反応における基質特異性および酵素反応生成物の構造解析を中心に研究を進める。キシラナーゼについては、キシランから生じるキシロオリゴ糖の解析とN末端および内部アミノ酸配列の解析を中心に進める。プロテアーゼについては、遺伝子をクローニングし、推定一次配列を解析することで耐塩性に関わるアミノ酸残基を考察する。また、分離菌・研究室保有株について農産物由来未利用資源の効率的分解を目指し、培養条件の検討を行う。</p> <p>6) オイルパームの木質および残渣からの第2世代バイオ燃料の生産プロセスの開発</p> <p>本研究ではオイルパーム（パーム椰子）の樹木部分の木質、残渣を原料として、第2世代となるバイオ燃料の生産プロセスの開発を行っている。平成27年度は、オイルパームの樹木部分の木質、残渣を原料とした前処理の高率化（加水分解工程の加速）、前処理後の可溶化液を用いたバイオ水素、その廃水を用いたバイオメタンの生産の高効率化を引き続き行い、その結果を踏まえて、連続運転に移行する計画である。</p> <p>7) 植物性バイオマスの熱帯性微生物による環境・バイオテクノロジーのための有用生産物の開発</p> <p>植物性バイオマスの熱帯性微生物による環境・バイオテクノロジーのための有用生産物の開発において、<i>Aureobasidium pullulans</i> や <i>Phanerochaete sordida</i> を用いて、次世代発酵技術の開発を行う。特に付加価値を高めた生産物（バイオポリマー、酵素等）に焦点を当てる。平成27年度は <i>A. pullulans</i> 及び <i>P. sordida</i> を対象に各種酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ等）の生産を行い、その固定化による効率化を行う。</p> <p>8) ネピアグラスサイレージからのバイオ水素およびバイオプラスチックの生産</p> |
|--|---|

|  |   |
|--|---|
|  | <p>プロセス開発</p> <p>ネピアグラスサイレージからのバイオ水素およびバイオプラスチックの生産プロセスの開発を行っており、平成 27 年度はバイオ水素の生産における環境因子、さらには F/M 比等の最適化を昨年度から引き続き実施し、ネピアグラスとそのサイレージを混合し、さらに牛糞を混合した場合の自己発酵ならびに共発酵について実験を行う。</p> <p>9) 高温嫌気性発酵下における固定化セルラーゼを用いたリグノセルロース加水分解物からのハイタン(水素+メタン)生産</p> <p>高温嫌気性発酵下における固定化セルラーゼを用いたリグノセルロース加水分解物からのハイタン(水素+メタン)生産を行っている。平成 27 年度はバイオ水素発酵のためのリグノセルロースの前処理に関して改良を行う。前処理後の液相中に高濃度のナトリウムイオンが存在しているため、水素発酵菌が還元糖を消費しきれていない。そこで、ナトリウム耐性のある菌のスクリーニングについても実施する。</p> <p>10) 二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン(水素+メタン)生産の促進</p> <p>二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン生産の効率化・促進を進めており、平成 27 年度は、高温安定性のアミラーゼ、高温安定性のセルラーゼをタイ南部の温泉地域からスクリーニングした菌により生産させるための研究を実施する。</p> <p>11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産</p> <p>低炭素化社会実現のため、再生可能資源から化成品を生産するバイオリファイナリー研究が世界で行われている。こういった背景のもと我々のグループでは、人工的に代謝経路を合成し産業微生物に付与することで、グルコースから有用物質を発酵生産する研究を行っている。今年度は、昨年度に構築に成功した 1-ブタノールを好氣的に生産する組換え大腸菌の代謝経路の最適化、具体的には、副生産物生合成遺伝子の欠損等を検討する。</p> <p>12) バイオマス原料を用いたパイロットスケール高温エタノール発酵試験</p> <p>バイオマス原料、特に廃棄バイオマスを原料とした高温でのエタノール発酵技術は、省エネ型再生エネルギー生産技術として大きな期待が寄せられている。本グループでは、タイでスクリーニングされた耐熱性酵母を用い、パイロットスケールでの高温でのエタノール生産技術の確立を目指す。平成 27 年度は、パイロットスケールでの高温発酵試験の最適化を進める。また、ベトナムにおける利用可能なバイオマス資源および高温発酵の可能性について検討する。</p> <p>13) ベトナムでスクリーニングした高温水素発酵菌による熱帯性バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの構築</p> <p>ベトナムでスクリーニングした 4 種類の高温水素発酵菌 (<i>Clostridium</i> 属</p> |
|--|---|

|  |  |
|--|--|
|  | <p>の菌や <i>Thermoanaerobacterium aciditolerans</i>)による熱帯性バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの構築を行っているところであるが、現在, Dr. Huyen Thi Thu NGUYEN がドイツに派遣中であるため共同研究は 2016 年度から再開する予定である。</p>  |
| <p>27年度の<br/>研究交流活動<br/>から得られる<br/>ことが期待さ<br/>れる成果</p> | <p>1) 耐熱性細菌を用いた高温高速エタノール発酵系の構築<br/>     これまでの研究で単離もしくは開発されたエタノール発酵性菌株のなかで、どの菌株が高温高速発酵に適しているかを明らかにできる。さらに、それぞれの菌株に最適なバイオマスの種類を検討できる。</p> <p>2) 微生物工学的手法を用いた新規の糖の生産技術の開発に関する研究<br/>     牛乳を乳酸発酵して得られるヨーグルトにはガラクトオリゴ糖などの機能性オリゴ糖が含まれており、乳酸菌の生産する酵素によって生じていると考えられる。従来の好気性乳酸菌だけでなく嫌気性乳酸菌にターゲットを広げることで、新規の加リン酸分解酵素を得る。加リン酸酵素を用いることで、単糖と糖 1-リン酸から様々なオリゴ糖の生産が可能となる。</p> <p>3) 耐熱性酵母を用いた安定した高温エタノール発酵系の構築<br/>     世界のバイオ燃料の需要は今後 10 倍以上増加することが見込まれているが、そのための原料の確保や安価な生産に必要な技術開発が不可欠である。その中で、本小課題では耐熱性酵母を用いた高温発酵系の開発とそのダウンストリームの新技術開発を目指しているが、高温発酵は、冷却コスト削減、冷却装置の簡易化、雑菌混入の抑制などが見込まれ、次世代の省エネ技術として期待されている。一方、ダウンストリームでは従来に無い簡易なエタノール濃縮技術の開発を目指す。これによって、設備費やランニングコストを大幅に削減できる可能性がある。</p> <p>4) 餅麴ルパン(<i>Amylomyces rouxii</i> YTH3)と酵母の混合培養により醸造した有色米酒の抗酸化能について<br/>     1. タイ国の麴カビをもちいて、機能性をもつアルコール飲料の開発。<br/>     2. タイ国と日本の黒米をもちいたアルコール飲料の特性の比較検討。<br/>     3. 黒米発芽米をもちいたアルコール飲料の特性を調べ新規アルコール飲料の開発。</p> <p>5) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産<br/>     対象とする微生物酵素の特性解析および組換え酵素として大量調製法を確立することにより、産業用酵素としての利用が期待できる。つまり、リパーゼは、生分解性の界面活性剤（エステル化された糖類）の合成用酵素として、キシラナーゼはバイオマスの分解とキシロオリゴ糖の合成酵素として、プロテアーゼは耐塩性酵素として利用が期待される。また、農産物由来未利用資源の分解に与える環境因子の影響</p> |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>を検討することで、原料の効率的分解と生成物の収率の向上が期待される。</p> <p>6) オイルパームの木質および残渣からの第2世代バイオ燃料の生産プロセスの開発</p> <p>    オイルパームの樹木部分の木質、残渣を原料とした前処理の高率化（加水分解工程の加速）、前処理後の可溶化液を用いたバイオ水素、その廃水を用いたバイオメタンの生産の高効率化の条件を得ることができる。それを踏まえて、連続運転を行いパイロットスケール運転のためのデータ蓄積を行う。</p> <p>7) 植物性バイオマスの熱帯性微生物による環境・バイオテクノロジーのための有用生産物の開発</p> <p>    酵素生産技術とともに付加価値を高めた酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ等）固定化技術の開発につなげることができる。</p> <p>8) ネピアグラスサイレージからのバイオ水素およびバイオプラスチックの生産プロセス開発</p> <p>    ネピアグラス及びそのサイレージからのバイオ水素を原料とした場合のバイオ水素生産に影響を及ぼす環境因子を明らかにするとともに、牛糞の混合による自己発酵、共発酵の可能性を明らかにする。</p> <p>9) 高温嫌気性発酵下における固定化セルラーゼを用いたリグノセルロース加水分解物からのハイタン(水素+メタン)生産</p> <p>    バイオ水素発酵のための、リグノセルロースの前処理後の液相中に高濃度のナトリウムイオンが存在しているため、水素発酵菌の生育が阻害され還元糖を消費しきれていない。そこで、ナトリウム耐性のある菌をスクリーニングし、プロセスに適用することで、その問題を解決する。</p> <p>10) 二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン(水素+メタン)生産の促進</p> <p>    二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン生産の効率化・促進化のために、高温安定性のアミラーゼ、高温安定性のセルラーゼが安定的に供給可能となれば、高温で排出されるパームオイル排水中に多く存在する木質系 SS の可溶化に極めて有効である。したがって、それをタイ南部の温泉地域からスクリーニングした菌により生産させる。</p> <p>11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産</p> <p>    副産物の生合成に関わる遺伝子の破壊により、副産物の生成が抑制されることで目的物質の生産向上が期待できる。加えて、目的物質生産に重要となる代謝に関する知見が得られると期待される。</p> <p>12) バイオマス原料を用いたパイロットスケール高温エタノール発酵試験</p> <p>    廃バイオマス中に含まれるエタノールへ変換可能な糖を効率的に利用す</p> |
|--|--|

|  |  |
|--|--|
|  | <p>る条件を明らかにできる。また、温度、時間、酵素量、前処理等を最適化することで更なるコスト削減の可能性を探ることができる。</p> <p>13) ベトナムでスクリーニングした高温水素発酵菌による熱帯性バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの構築</p> <p>活動計画に記載したように、このテーマは次年度から再開する予定である。</p> |
|--|--|

8-2 セミナー

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 整理番号                                  | S-1  |
| セミナー名                                 | (和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」国際発酵会議 (FerVAAP) 分科会<br>(英文) Session in FerVAAP, JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“ |
| 開催期間                                  | 平成27年7月29日 ~ 平成27年7月30日 (2日間)  |
| 開催地 (国名、都市名、会場名)                      | (和文) タイ、コンケン<br>(英文) Thailand, Khon Kaen   |
| 日本側開催責任者<br>氏名・所属・職                   | (和文) 山田 守・山口大学農学部・教授<br>(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor  |
| 相手国側開催責任者<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外で開催の場合) | (英文) Gunjana THEERAGOOL, Kasetsart University<br>Associate Professor<br>Vichai Leelavatcharamas, Khon Kaen University<br>Assistant Professor   |

参加者数

| 派遣先<br>派遣      |    | セミナー開催国<br>(タイ) |
|----------------|----|-----------------|
| 日本<br><人/人日>   | A. | 10/ 40          |
|                | B. | 2               |
| タイ<br><人/人日>   | A. | 20/ 40          |
|                | B. | 20              |
| ドイツ<br><人/人日>  | A. | 2/ 8            |
|                | B. |                 |
| ベトナム<br><人/人日> | A. | 2/ 4            |
|                | B. |                 |
| ラオス<br><人/人日>  | A. | 4/ 8            |
|                | B. | 4               |
| 合計<br><人/人日>   | A. | 38/ 100         |
|                | B. | 26              |

- A. 本事業参加者 (参加研究者リストの研究者等)  
B. 一般参加者 (参加研究者リスト以外の研究者等)

※日数は、出張期間（渡航日、帰国日を含めた期間）としてください。これによりがたい場合は、備考欄を設け、注意書きを付してください。

|              |  |                                 |
|--------------|--|---------------------------------|
| セミナー開催の目的    | コンケン大学で隔年開催される国際発酵会議において、本事業の発酵微生物関連の1つのセッションを開催する。これによって、本事業の発酵微生物分野の成果発表を行うと同時に、本事業の新たな知識や技術を紹介することによって、本事業関係者間で情報共有が可能になることに加えて、本事業成果を発酵関係者へ広く広報する。 |                                 |
| 期待される成果      | 研究成果発表に加えて、本事業内の各研究単位グループ内で共同研究の打ち合わせを実施し、今後の方針等の確認ができる。また、国際学会であることから、異分野の研究者と広く交流ができ、新しい情報の獲得や新たなネットワーク構築に繋がる。                                       |                                 |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。   |                                 |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容：国内旅費、外国旅費、旅費等にかかる消費税         |
|              | タイ側  | 内容：印刷製本費、国内旅費、滞在費、謝金、その他経費、消耗品費 |
|              | ドイツ側   | 内容：外国旅費                         |
|              | ベトナム側  | 内容：外国旅費                         |
|              | ラオス側   | 内容：外国旅費                         |

|                     |  |  |
|---------------------|--|--|
| 整理番号                | S-2  |  |
| セミナー名               | (和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」Thailand Research Expo 分科会   |  |
|                     | (英文) Session in TRE, JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“ |  |
| 開催期間                | 平成27年8月18日 ～ 平成27年8月19日 (2日間)  |  |
| 開催地(国名、都市名、<br>会場名) | (和文) タイ、バンコク   |  |
|                     | (英文) Thailand, Bangkok   |  |
| 日本側開催責任者<br>氏名・所属・職 | (和文) 山田 守・山口大学農学部・教授   |  |
|                     | (英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor  |  |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 相手国側開催責任者<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外で開催の場合) | (英文) Gunjana THEERAGOOL, Kasetsart University<br>Associate Professor |
|---------------------------------------|--|

参加者数

| 派遣先<br>派遣        |    | セミナー開催国<br>(タイ) |
|------------------|----|-----------------|
| 日本<br>〈人／人日〉     | A. | 10/ 40          |
|                  | B. | 2               |
| タイ<br>〈人／人日〉     | A. | 60/ 120         |
|                  | B. | 20              |
| ベトナム<br>〈人／人日〉   | A. | 1/ 4            |
|                  | B. |                 |
| インドネシア<br>〈人／人日〉 | A. | 2/ 8            |
|                  | B. | 2               |
| 合計<br>〈人／人日〉     | A. | 73/ 172         |
|                  | B. | 24              |

- A. 本事業参加者（参加研究者リストの研究者等）  
B. 一般参加者（参加研究者リスト以外の研究者等）

※日数は、出張期間（渡航日、帰国日を含めた期間）としてください。これによりがたい場合は、備考欄を設け、注意書きを付してください。

|              |  |                           |
|--------------|--|---------------------------|
| セミナー開催の目的    | 本 CCP 事業にはタイの多くの大学やその関係者が係っており、また、新技術開発も含まれている。そこで、Thailand Research EXPO 2015 で本事業の研究成果を発表すると同時に、タイの一般研究者に本事業成果や研究開発の内容を広く公開する。 |                           |
| 期待される成果      | 本事業での共同研究成果や共同開発した技術を紹介できる。特に、環境微生物や病原性微生物関連を中心とした研究発表を行い、それらについて広く意見を得るとともに、将来的にタイ企業等による利用に繋がると期待される。                           |                           |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。   |                           |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容：国内旅費、外国旅費、旅費等にかかる消費税   |
|              | タイ側  | 内容：国内旅費、滞在費、謝金、消耗品費、その他経費 |



|  |         |         |
|--|---------|---------|
|  | ベトナム側   | 内容：外国旅費 |
|  | インドネシア側 | 内容：外国旅費 |

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 整理番号                                  | S-3   |
| セミナー名                                 | (和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」第2回サテライトセミナー<br>(英文) The 2 <sup>nd</sup> Satellite Seminar of JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“ |
| 開催期間                                  | 平成27年11月12日～平成27年11月13日(2日間)  |
| 開催地(国名、都市名、会場名)                       | (和文) 日本、福岡、JR博多シティ<br>(英文) Japan, Fukuoka, JR HAKATA CITY   |
| 日本側開催責任者<br>氏名・所属・職                   | (和文) 山田 守・山口大学農学部・教授<br>(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor   |
| 相手国側開催責任者<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外で開催の場合) | (英文)  |

#### 参加者数

| 派遣先<br>派遣        | セミナー開催国<br>(日本) |    |
|------------------|-----------------|----|
|                  | A.              | B. |
| 日本<br>〈人／人日〉     | 30/ 60          | 20 |
| タイ<br>〈人／人日〉     | 10/ 20          | 4  |
| ドイツ<br>〈人／人日〉    | 1/ 4            |    |
| ベトナム<br>〈人／人日〉   | 4/ 12           |    |
| インドネシア<br>〈人／人日〉 | 4/ 14           |    |
| 合計<br>〈人／人日〉     | 49/ 110         | 24 |

- A. 本事業参加者（参加研究者リストの研究者等）  
 B. 一般参加者（参加研究者リスト以外の研究者等）

※日数は、出張期間（渡航日、帰国日を含めた期間）としてください。これによりがたい場合は、備考欄を設け、注意書きを付してください。

|              |  |                    |
|--------------|--|--------------------|
| セミナー開催の目的    | サテライトセミナーは、メンバー全員が参加するジョイントセミナーを補完するために開催する。本年度は日本での開催のため、本CCP 事業に関する先端的研究を中心とした国際セミナー（シンポジウム）を計画する。 |                    |
| 期待される成果      | 本セミナーによって、本事業の先端拠点形成の方向性を明確にするとともに、その一部を国内の他大学や企業の研究者に紹介できる。   |                    |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。   |                    |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容：国内旅費、その他経費、消耗品費 |
|              | タイ側  | 内容：外国旅費            |
|              | ドイツ側   | 内容：外国旅費            |
|              | ベトナム側  | 内容：外国旅費            |
|              | インドネシア側  | 内容：外国旅費            |

|                     |   |
|---------------------|---|
| 整理番号                | S-4   |
| セミナー名               | （和文）日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」第11回若手研究者セミナー<br>（英文）The 11th Young Scientist Seminar of JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“ |
| 開催期間                | 平成27年11月16日～平成27年11月17日（2日間）  |
| 開催地（国名、都市名、会場名）     | （和文）日本、山口市、山口県セミナーパーク<br>（英文）Japan, Yamaguchi Pre., Yamaguchi-ken Seminarpark   |
| 日本側開催責任者<br>氏名・所属・職 | （和文）山田 守・山口大学農学部・教授<br>（英文）Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor   |

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| 相手国側開催責任者<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外で開催の場合) | (英文) |
|---------------------------------------|------|

参加者数

| 派遣先<br>派遣        |    | セミナー開催国<br>(日本) |
|------------------|----|-----------------|
| 日本<br>〈人／人日〉     | A. | 10/ 16          |
|                  | B. | 60              |
| タイ<br>〈人／人日〉     | A. | 3/ 6            |
|                  | B. | 10              |
| ベトナム<br>〈人／人日〉   | A. | 1/ 3            |
|                  | B. | 2               |
| インドネシア<br>〈人／人日〉 | A. | 1/ 3            |
|                  | B. | 2               |
| 合計<br>〈人／人日〉     | A. | 15/ 28          |
|                  | B. | 74              |

- A. 本事業参加者（参加研究者リストの研究者等）  
B. 一般参加者（参加研究者リスト以外の研究者等）

※日数は、出張期間（渡航日、帰国日を含めた期間）としてください。これによりがたい場合は、備考欄を設け、注意書きを付してください。

|           |  |
|-----------|--|
| セミナー開催の目的 | 本セミナーは、有用微生物を含めた生物学研究に携わる若手研究者の育成の一環として実施する。また、本セミナーを通じて若手研究者のネットワーク形成に繋げる。海外の大学院生や日本人大学院生が中心となってセミナーの企画・運営を担当し、セミナー開催のノウハウを習得するとともに、参加者全員による研究成果を英語で発表する機会を提供する。  |
| 期待される成果   | 1) セミナーの企画・運営の経験を積ませることができる。<br>2) 英語による研究成果発表や討議の機会となる。<br>3) 若手研究者自身の研究について、様々な角度から意見を受けることができ、それに対する対応能力育成に役立つ。<br>4) 一般的な微生物研究を深く知る機会を提供できる。<br>5) 他国の若手研究者との交流ができることから、異文化を知る機会となるだけでなく、ネットワーク形成が期待される。 |

|              |  |                                |
|--------------|--|--------------------------------|
| セミナーの運営組織    | 若手研究者によって運営委員会が組織され、本事業の組織委員会は支援組織となる。 |                                |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側                                    | 内容：消耗品費、その他経費                  |
|              | タイ側                                    | S-3で海外旅費を計上しているため、S-4としての負担は無し |
|              | ベトナム側                                  | S-3で海外旅費を計上しているため、S-4としての負担は無し |
|              | インドネシア側                                | S-3で海外旅費を計上しているため、S-4としての負担は無し |

### 8-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

| 所属・職名<br>派遣者名 | 派遣・受入先<br>(国・都市・機関) | 派遣時期        | 用務・目的等             |
|---------------|---------------------|-------------|--------------------|
| 山口大学・教授・山田守   | タイ・バンコク・カセサート大学     | 平成 28 年 1 月 | コーディネーター会議、評議員会議参加 |
| 山口大学・教授・松井健二  | ドイツ・ベルリンボイト工科大学     | 平成 28 年 3 月 | コーディネーター会議         |
|               |                     |             |                    |
|               |                     |             |                    |

### 8-4 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

該当なし

## 9. 平成27年度研究交流計画総人数・人日数

### 9-1 相手国との交流計画

| 派遣<br>派遣               | 日本<br>〈人/人日〉      | タイ<br>〈人/人日〉    | ドイツ<br>〈人/人日〉 | ベトナム<br>〈人/人日〉 | インドネシア<br>〈人/人日〉 | ラオス<br>〈人/人日〉 | 合計<br>〈人/人日〉      |
|------------------------|-------------------|-----------------|---------------|----------------|------------------|---------------|-------------------|
| 日本<br>〈人/人日〉           |                   | 20/80 ( 14/56 ) | 1/7 ( 0/0 )   | 0/0 ( 1/6 )    | 0/0 ( 1/6 )      | 0/0 ( 1/5 )   | 21/87 ( 17/73 )   |
| タイ<br>〈人/人日〉           | 18/400 ( 10/150 ) |                 | 0/0 ( 0/0 )   | 0/0 ( 1/6 )    | 0/0 ( 1/6 )      | 0/0 ( 3/10 )  | 18/400 ( 15/172 ) |
| ドイツ<br>〈人/人日〉          | 1/4 ( 0/0 )       | 0/0 ( 2/8 )     |               | 0/0 ( 0/0 )    | 0/0 ( 0/0 )      | 0/0 0/0       | 1/4 ( 2/8 )       |
| ベトナム<br>〈人/人日〉         | 4/80 ( 2/20 )     | 0/0 ( 3/8 )     | 0/0 ( 0/0 )   |                | 0/0 ( 0/0 )      | 0/0 ( 0/0 )   | 4/80 ( 5/28 )     |
| インドネシア<br>〈人/人日〉       | 2/20 ( 2/20 )     | 0/0 ( 2/8 )     | 0/0 ( 0/0 )   | 0/0 ( 0/0 )    |                  | 0/0 0/0       | 2/20 ( 4/28 )     |
| ラオス<br>〈人/人日〉          | 0/0 ( 0/0 )       | 0/0 ( 4/8 )     | 0/0 ( 0/0 )   | 0/0 ( 0/0 )    | 0/0 ( 0/0 )      |               | 0/0 ( 4/8 )       |
| イギリス(日本側研究者)<br>〈人/人日〉 | 1/4 ( 0/0 )       | 0/0 ( 0/0 )     | 0/0 ( 0/0 )   | 0/0 ( 0/0 )    | 0/0 ( 0/0 )      | 0/0 0/0       | 1/4 ( 0/0 )       |
| 合計<br>〈人/人日〉           | 26/508 ( 14/190 ) | 20/80 ( 25/88 ) | 1/7 ( 0/0 )   | 0/0 ( 2/12 )   | 0/0 ( 2/12 )     | 0/0 ( 4/15 )  | 47/595 ( 47/317 ) |

※各国別に、研究者交流・共同研究・セミナーにて交流する人数・人日数を記載してください。  
(なお、記入の仕方の詳細については「記入上の注意」を参考にしてください。)

※相手国側マッチングファンドなど、本事業経費によらない交流についても、カッコ書きで記入してください。

### 9-2 国内での交流計画

|            |
|------------|
| 0/0 <人/人日> |
|------------|

10. 平成27年度経費使用見込み額

(単位 円)

|         | 経費内訳           | 金額         | 備考                                       |
|---------|----------------|------------|--|
| 研究交流経費  | 国内旅費           | 8,450,300  | 国内旅費、外国旅費の合計は、研究交流経費の50%以上であること。         |
|         | 外国旅費           | 4,874,000  |  |
|         | 謝金             | 0          |  |
|         | 備品・消耗品購入費      | 106,260    |  |
|         | その他の経費         | 644,000    |  |
|         | 外国旅費・謝金等に係る消費税 | 425,440    |  |
|         | 計              | 14,500,000 | 研究交流経費配分額以内であること。                        |
| 業務委託手数料 |                | 1,450,000  | 研究交流経費の10%を上限とし、必要な額であること。また、消費税額は内額とする。 |
| 合 計     |                | 15,950,000 |  |