

研究拠点形成事業 平成29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

(4 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）：創成科学研究科・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、岐阜大学、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、農学部事務部、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 Songkla 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, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, BIOTEC (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology), Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King

(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、タイ科学技術研究所、バイオテック、タイ王立科学会

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 GOETZ

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 ・ Associate Professor ・ Dung Thi Phuong NGO

協力機関：(英文) Ho Chi Minh City University of Technology, Tay Do University, Tan Tao University, Vietnam National University of Agriculture, Nguyen Tat Thanh University, Institute of Biotechnology of Vietnam Academy of Science and Technology

(和文) ホーチミン市技術大学、タイドー大学、タンタオ大学、ベトナム国家農業大学、ニェンタツタン大学、科学技術ベトナムアカデミーバイオテクノロジー研究所

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) セプルフノペンベル工科大学、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端的な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端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

本事業は、以下の5つの研究課題に分けて実施する。各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。

研究課題1：Explorational Research of Useful Microbes

(有用微生物の探索研究)

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)

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)

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)

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)

昨年は中間年にあたり全体会議としてジョイントセミナーを開催し、個々の共同研究の達成状況や今後の課題等について報告した。これによって、本事業の重要な柱「我が国に無い熱帯性環境微生物の開発・利活用」について着実に進展していることが確認できた。昨年度は、特に、「多様な熱帯性環境微生物の潜在能力の発掘と新規利用法の開発」、「熱帯性環境微生物の特性の1つである耐熱性原理の解明」、「食文化と腸内細菌叢」、「ウイルス伝播ルートの解明」、「耐熱性を利用した高温発酵等の次世代型バイオ燃料生産技術開発」、「発酵後のダウンストリームにおける膜分離等の技術開発」、「高温発酵のシミュレーションによる評価」など、先端的な研究が複数の国のメンバーの協力によって進められている。また、基礎研究から応用研究への連携、つまり研究課題1の成果を研究課題2や4や5に利用する横の連携も始まっている。

研究課題1では、メンバーの移動などで実質的な交流が困難となった2件を除く13件の共同研究を実施し、関連して日本からの派遣8名、日本への受け入れ32名の研究者交流を行った。主な成果として、1) タイおよびブラオスで分離したエタノール生産性酵母が耐熱性、グルコース耐性、フルフラール耐性等において既存の菌株よりも優れた性質を有すること、2) タイで単離した耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株のβ-グルコシダーゼがバイオマス利用などの産業利用に適していること、3) ストレス(高温および放射線)に暴露した耐熱性酵母の抗酸化物質の挙動と関連遺伝子の発現に関連性があること、4) 熱ショック(45°C)を与えた放線菌において、二次代謝産物合成経路の覚醒および撓乱が誘発され、特異な二次代謝産物(これらの熱ショック二次代謝産物を Heat Shock Metabolites (HSM) と名付けた)

が生成されること、などの発見があった。これらのうち、タイおよびラオスで分離したエタノール生産性酵母については、今後、研究課題2および5の研究に利用された。また、本事業での研究成果を共著論文にまとめる段階に達した共同研究もある。このように、本研究課題は想定した目標をほぼ達成している。

研究課題2では、7件の共同研究を実施してきた。総計、日本からの派遣5名、日本への受け入れ14名があり、十分に研究交流活動が達成できた。特に、昨年度は日本側協力研究者のいるマンチェスター大学(イギリス)に1名、1ヶ月間派遣し、高温発酵評価に関する共同研究を行った。本課題では、1) 種々の微生物を対象とした耐熱性・耐熱化あるいはストレス耐性機構の解析が行われた。それらの耐性関連遺伝子がゲノムワイドに解析され、変異遺伝子リストや転写量変動遺伝子リストを作るだけでなく、個々の遺伝子やタンパク質の分子生物学研究へと発展している。加えて、ある種の低分子化合物やイオンの添加が耐性に関与することも明らかになってきている。特に、エタノール生産性酵母の研究においては、高温での代謝の切り替えが示唆されており、その切り替えの制御機構の解析が始められている。2) いくつかのバクテリアにおいては、耐熱化株で生じていた変異遺伝子群の個別の検証が進められ、耐熱化メカニズムの分子生物学的研究が進んでいる。3) 酢酸菌では、トランスクリプトーム解析などを用いた耐熱化機構の解析が進められている一方で、酢酸菌およびその生成物による衛生害虫誘引という新しい利用の試みがなされており、今後、ゲノムワイドのかつ分子生物学的な展開が行われる。4) これらの研究に加えて、亜熱帯地方の天然から有用微生物を探索する努力も引き続き続けられている。このように、難しい研究課題でありながらも、総じて達成目標を満たしている。

研究課題3では、微生物とヒト、動物、植物、昆虫、環境の相互作用を解析することにより、感染症対策、環境改善、有用物質の発見を目指している。特に、亜熱帯地域である東南アジアと温帯地域である日本の微生物を比較することにより、新たな知見が得られている。平成28年度は12件の共同研究を実施し、以下の成果を上げた。1) 各種動物由来・昆虫由来感染症の疫学調査を、タイ・ベトナム・インドネシアで実施し、数種類の蚊特異的フラビウイルスが蚊と共存していることを見出した。2) 農地土壌の除草剤残留成分(クロロアニリン)分解能を有する植物成長促進根圏細菌 *Pseudomonas fluorescens* MC46を単離した。この細菌は農薬残留物で汚染した土壌の *phytostimulated bioremediation* (植物促進・支援型環境修復)に有望である。3) タイ人が日本食を食べることによって、その腸内細菌叢が日本人型のものに推移することを見出した。4) タイの土壌において見つけれられた *Actinomadura* が産生する *Nonthmicins* が、グラム陽性細菌の抑制や癌の浸潤の抑制、オートファジーの活性化に関与することを見出した。5) パラキート分解能がある細菌、特に *Cunninghamella* sp.の単離、6) アラキドン酸を含む脂質を産生する緑藻株の単離、7) *Ralstonia solanacearum* による青枯れ病がリンゴ酸により誘引されること、8) タイで分離したメタノール資化性微生物が植物の成長を促進すること等の発見があった。9) タイ北部で単離された植物内生菌 *Muscodora suthepensis* がオレンジの収穫後の *Penicillium digitatum* によるさび病を軽減させることを実証し、病原菌生育抑制効果のある化合物の同定に成功した。このように、上記研究成果は、本年度までの目標を概ね達成できたと考えている。

研究課題4においては食品、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関連の19件の共同研究を実施しており、これまでに派遣9名、受入15名の交流を行った。その成果として、1) BCG脱色オリゴ糖産生土壌細菌(*Bacillus licheniformis*)、ベトナム餅麴メン由来 *Saccharomyces cerevisiae* Y3酵母、タイ壺酒「ウ」由来 *S. cerevisiae* NP01、新規ベニコウジカビ(*Monascus* sp.)、タイ自生新種キノコ *Clitopilus* sp.、新規バイオサーファクタント高生産菌(*Aureobasidium* 属酵母)、

アミド・ニトリル化合物分解菌(*Bacillus* 属細菌)、タイ発酵乳由来耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* および本菌株を宿主とする耐熱性バクテリオファージ φT25 など、独自の視点からの単離により、これまでに顧みられなかった菌株の取得に成功している。こうした菌株の一部では更に研究を進め、2) 新規機能としてタイ伝統発酵食品 Kapi Ta Dam に抗酸化活性と ACE 阻害活性を見出し、野生イネを原料に今回単離した K7 酵母とスミチームを用いたアルコール飲料試醸にも成功した。特筆すべきことにこの飲料には高い脂質過酸化阻止能が見いだされた。他に、3) 新規ベニコウジカビ(*Monascus* sp.) のフェニルエチルアルコール等の香気成分生成能、タイ北部キノコ新種 *Clitopilus* sp. 菌糸に高い抗菌活性、イチゴ内生菌のシデロフォアによらない植物成長促進効果原因物質などの発見もなされている。これら生理活性化化合物群については、現在、単離構造決定を進めており、29 年度中の構造確定を目指している。4) こうした新規機能性成分の生成に関連した遺伝子として *Fusarium* sp. F59 から 2 種のグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングし、*Corynebacterium glutamicum* 由来のアミロマルターゼ遺伝子への変異導入により、機能性の異なる変異酵素遺伝子を取得した。本研究課題では、このように微生物資源の獲得、生理活性の発見、さらに応用を目的とした遺伝子単離とその発現制御機構の解明を進めており、食品開発やその保蔵、農環境などの改善への応用に向けて着実に成果が蓄積しつつある。こうした研究結果の蓄積により、5) 乳酸菌ファージ φT25 耐性乳酸菌の単離に成功し、その耐性機構を解明することで乳酸発酵中での乳酸菌死滅事故を抑制できる新技術、6) デング熱ワクチン用ハプテン合成にはほぼ成功し、実質的なワクチン生産、7) 新たに単離した乳酸菌から新奇バクテリオシンの発見、といった成果も挙がっている。その一方で、8) 根圏微生物叢解析による土壌最適環境条件測定技術を畑、水田、果樹園などの実際の農業現場で試行し、実証データを得、この成果をもとに汎用的な土壌環境評価体系を確立した。また、9) 実際の農業現場で単離微生物を利用するための開発研究も進め、タイ北部森林担子菌から新規抗菌物質の生成分泌を確認し、AM 菌根菌と細菌の同時接種による作物生産促進効果を確認した。このように、葉面、根圏、更には組織内で植物とゆるく共生する微生物叢の単離同定の成果が実質的な農環境の改善技術に適應されてきており、本研究グループの新しい主要プロジェクトとして精力的に進めることとなっている。

研究課題 5 では、新産業創出を目指した次世代発酵技術としてのバイオリファイナリー関連の 12 件の共同研究を実施し、派遣 7 名、受入 18 名の交流を行った。ほとんどの共同研究が目標達成に向けて着実に進展しており、3 年の共同研究を経て次のステップへ進む課題もある。1) バイオガス生産では、例えば 2 層式培養系の有用性が明らかになり、生産改善を目指した微生物群の解析や適用バイオマスを拡大させる取り組みが進んでいる。エタノール生産では、2) 耐熱性酵母を用いた廃キャッサバパルプを原料とするパイロットスケール試験の結果を踏まえ、菌株育種へ展開した。エネルギー作物としてのコメの利用を目的とした発酵や、熱帯地域で生産されるキクイモ塊茎やスイートソルガム汁を原料とした発酵の最適条件も決定された。さらに、3) 耐熱性酵母の利点を生かした新しいエタノール生産プロセスの開発が進展している。エネルギー以外では、4) 組換え体を用いた 1-ブタノールの生産の生産性の向上に成功し、種々の用途を持つ酪酸の生産を目指した代謝工学的解析が新たに開始された。5) バイオマスの有効利用、機能性糖の生産では、糖質関連酵素、リパーゼ、プロテアーゼの生産菌の単離、酵素の特性評価に続いて、組換え系での大量生産の研究が進んでいる。6) 耐熱性ペクチナーゼ生産菌も獲得され、高生産に向けて最適化や個体培養での解析が進行している。

ジョイントセミナーに加えて、サテライトセミナーを開催し、ベトナムの研究者との共同研究を中心に発表・意見交換を行うとともに、ベトナムでの本事業の広報を行った。また、在タイ日本大使館にお

いて、タイ企業やタイの日本企業関係者を対象にして、本事業から得られた発酵有用物質生産技術等のシーズを紹介した。これによって5つのシーズについて7企業との共同研究が検討されることとなった。さらに、タイ研究博覧会 2016 において、環境微生物や病原性微生物関連を中心とした Core-to-Core Program セッションを開催した。

7. 平成29年度研究交流目標

<研究協力体制の構築>

本事業は日本を含む7カ国によって実施していることから、コーディネーター間でメール等によって連絡を密にとるとともに、セミナーの機会にコーディネーター会議や組織委員会を開催し、事業全体の効率的な運営を図る。また、メンバー数の多い日本やタイでは国内の運営委員会を開催する。各共同研究グループは、グループ内の意思統一のために英語による年度計画書や年度報告書を提出する。リーダーや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。

平成29年度は本事業の4年目となることから、各共同研究が目標を達成できるように協力関係をより密にする。特に、世界的拠点形成に向けて本事業に加わったインドネシア、ドイツ、さらに日本側研究協力者として加わったイギリスとの交流を重点的に強化する。インドネシアとは、タイやラオスとともに、課題5に関連して e-ASIA 共同研究を開始する。また、ドイツは第4回サテライトセミナーを主催し、本事業メンバーだけでなく、関連分野のドイツ研究者との交流を目指す。ドイツは、ベトナムへの研究者派遣やインドネシアとのエタノール発酵生産工場への技術協力を開始し、今後、その協力体制を強化しようとしている。さらに、イギリスとは、課題2や5に関するシミュレーション解析等の共同研究をはじめとして交流を拡大する。

<学術的観点>

本事業では、学術的交流の場を確保し新しい分析技術や生産技術等の情報共有や協力体制の強化のために、いくつかのセミナーを毎年実施している。平成29年度は次のように計画している。第7回国際発酵会議において本事業に関する Core-to-Core Program セッションを分科会として開催し、発酵に関連する基礎研究および応用研究を発表する。また、タイ研究博覧会 2017 では、環境微生物を中心とした1つの分科会を開催する。同時に、e-ASIA 共同研究 (JST, 2017-2019) のキックオフ会議を開催する。この e-ASIA 共同研究は、研究課題5と直接関連し、タイ、インドネシア、ラオスの実情に合わせてバイオマスからのバイオ燃料等の高温発酵系の構築を目指すとともに、膜分離技術を取り入れた新たな技術開発を目指す。さらに、第4回サテライトセミナーをベルリンボイト工科大学で開催し、ドイツの研究者との交流を行うとともに、本事業の広報の場とする。

個々の共同研究は、我が国に無い熱帯性環境微生物（耐熱性微生物）をキーワードとして新たな研究領域の開拓を目指し、互いの強みを生かして実施する。研究課題1～3では熱帯性環境に棲息する有用微生物の探索、耐熱性機構や環境への適応機構の解明、熱帯性生態系を維持する環境微生物の研究など先端的な基礎研究を、研究課題4では熱帯性環境微生物の食品、食品保蔵、衛生等への新たな活用方法の開発など応用研究を進める。その基盤的な研究はタイを含む ASEAN 諸国で実施し、先端的な研究は日本の大学を中心として実施する。研究課題5では、耐熱性微生物を利用して高温発酵等の次世代型発酵技術構築を目指す。高温発酵のメリットの検証や発酵後のプロセスの技術開発等を、日本、ドイツ、

イギリスを中心に実施する。

<若手研究者育成>

本事業では、多くの若手研究者が参加しており、実践的な若手研究者育成の場となっている。日本側の若手研究者や学生は、滞在する海外研究者との共同研究やDiscussion 等によって貴重な体験ができる。また、日本側メンバーも、渡航中に特別セミナーや特別講義を実施するとともに、若手研究者の研究指導や博士課程学生のCo-Advisor等を努めている。数年前から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継続しており、本年度も実施する予定である。

また、第13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JASSO 短期留学奨学金事業等と合同で実施する。若手研究者セミナーは日本人および留学生の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、将来的な友好関係や国際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。

<その他（社会貢献や独自の目的等）>

本事業では、基盤研究に基づいて有用物質生産や新技術開発を目指している。特に、先の拠点事業に引き続き、本事業でも継続して熱帯性環境微生物資源の開発をすすめ、それらの微生物資源を用いた新技術開発によって社会貢献に繋げる。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っている。

8. 平成29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			
		(英文) Explorational Research of Useful Microbes			
日本側代表者 氏名・所属・職		(和文) 伊藤真一・山口大学創成科学研究科・教授			
		(英文) Shinichi ITO・Yamaguchi University・Professor			
相手国側代表者 氏名・所属・職		(英文) Piamsook PONGSAWASDI・Chulalongkorn University・Professor Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor			

<p>29年度の 研究交流活動 計画</p>	<p>本研究課題では、2つのサブ研究課題（有用微生物の探索、分離微生物および生産物質の研究）に分け、それぞれ8件および4件の共同研究（小研究課題）を実施する。また、本研究課題での研究者交流として、最終確定ではないが日本からの研究者派遣7名および日本への研究者受入13名を予定し、それぞれの派遣期間と受入期間は来年3月までに、およそ7日間および1ヶ月間となる予定である。なお、個々の共同研究については、共同研究者間で相談し英語の計画書を作成し、それに基づいて研究を実施する。研究における個々の問題や研究成果の検討は、メールやスカイプ等を用いて行う。また、セミナーの際には進捗状況を直接確認する機会を設ける。</p> <p>『有用微生物の探索』では、これまでの研究交流によって、バイオエタノールやバイオディーゼルの生産、バイオマスの分解、植物病害のバイオコントロール、あるいは生分解性プラスチック生産などに資する微生物（細菌、放線菌、および酵母）が多数分離されている。これらの中には、従来にない優れた特性をもつ微生物が含まれていることが明らかになりつつある。29年度は、これまでに分離された微生物の性状解析を進めるとともに、酵素の精製、生産物の構造解析、および関連する遺伝子の解析など、一步踏み込んだ研究に発展させる。また、今年度から新たにイネバイオマスのキシランの完全糖化を目指した共同研究を開始する。</p> <p>『分離微生物および生産物質の研究』では、昨年度に引き続き、細菌、酵母、糸状菌由来の有用酵素の遺伝子クローニングを推進するとともに、金属高吸収性能（耐熱性酵母）や熱ショック二次代謝産物（耐熱性放線菌）の薬理活性など、耐熱性微生物のもつユニークな特性に焦点を当てた研究を実施する。</p> <p>1. Screening useful microorganisms (有用微生物の探索)</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>熱帯地域に生息する白色腐朽菌および褐色腐朽菌を採取している。これらのカビから、様々な酵素を生産する目的で、リグニンパーオキシダーゼ、ラッカーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ等を調べている。29年度は、その中で、キシロシダーゼ遺伝子を<i>Aureobasidium</i>菌から取得し、酵母菌に遺伝子組換えを行い、酵母での生産を試みる。現在、<i>Aureobasidium</i>菌のゲノムDNAを取得し、遺伝子配列からエキソンのPCR合成を行う予定である。エキソン部分を酵母内で、相同組換えにより結合させ、カビ遺伝子からの発現系を構築する。高発現系を作製することができれば、様々な酵素遺伝子へと展開する予定である。</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>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。前年度に引き続き、高温高速発酵によるバイ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に、エタノール生産性微生物である <i>Zymomonas mobilis</i> 菌株を ASEAN の諸国において分離培養することを試みる。分離した株は簡易的な発酵能の比較を実施し、有用な菌株の際には、詳細な解析（既存の同</p>
--------------------------------	---

種株との耐熱性、糖資化性、エタノール生産性等の比較、さらには、ゲノム解析) を行う。今年度は、*Zymomonas* 属細菌の分離培養方の考案とその応用を ASEAN 諸国において、特にタイとインドネシアで実施する予定である。

3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析

以前の研究で、タイで分離された耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の中で最も耐熱性に優れている株の1つ DMKU3-1042 について、高温でのエタノール生産性や完全ゲノム解析を行ってきた。初年度からのスクリーニングによってタイやラオスから、DMKU3-1042 に勝る耐熱性、グルコース耐性、フルフラール耐性等を示す株が見出されてきた。今年度は、耐熱株分離の継続とともに、個々の分離株について、グルコースやキシロース等からのエタノール生産性を詳細に検討すると同時に、異なる地域から分離された優良株の特性や発酵能を比較する。

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次世代シーケンサーによる網羅的な解析により明らかにする。また、スターターから単離し、各種糖源からのエタノール生産性が認められた酵母や糸状菌のペントース代謝経路を明らかにする。特に、酵母からの単離や諸性質の解明が十分に行われていないアラビノース代謝酵素について、その構造と機能を明らかにする。また、タイで新たに分離されたリパーゼを産生する酵母の遺伝子クローニングについて共同研究を行う。

5) 稲アラビノキシランを分解する微生物由来 β -キシロシダーゼと α -L-アラビノフラノシダーゼの同定

タイは世界でも有数の米生産国であり、その生産量は年間 1,875 万トンに達するが、一次加工において稲ワラや籾殻などの廃棄系バイオマスが大量に発生する。アラビノキシランは稲ワラなどに含まれる主要な糖質成分の1つであり、その有効利用技術の開発は重要な課題である。我々はこれまでの研究交流において、耐熱性菌 *Streptomyces* sp. SWU10 株を単離し、本菌由来の3種のエンドキシラナーゼ遺伝子のクローン化と大量発現系の構築、および組換え酵素の反応特性解析を行ってきた。本年度はアラビノキシランの完全糖化を目的に、キシロオリゴ糖糖化活性を有する β -キシロシダーゼおよびアラビノキシラン側鎖遊離活性を有する α -L-アラビノフラノシダーゼの遺伝子を上記菌株よりクローン化し、それらの異種発現系の構築を行う。さらに得られる組換え酵素の性質を解析する。

6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

・発酵食品に由来する乳酸菌の同定

タイ国の伝統的な発酵食品より乳酸菌を単離し、16S rRNA 遺伝子解析によって種を同定する。また、食品汚染原因菌に対する生育阻害作用を調べる。

・微生物由来の耐熱性セルラーゼの性状解析
タイ国で単離された微生物から耐熱性の高いセルラーゼを単離して性状解析を行う。また、バイオマス分解への利用を試みる。

7) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)生産菌の単離と解析

28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(PHB, PHBV)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でポリヒドロキシ酪酸を生産し、得られた産物について、静岡大学にてNMR、FTIR、GPC カラムクロマトグラフィーを用いてその構造を解析する。また、生産菌のゲノム解析を静岡大学にて行う。

8) 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

28年度までの共同研究で分離した「熱帯作物（アブラヤシおよびパラゴムノキ）の病原菌に対して拮抗作用を示す微生物」のうち、最もバイオコントロールに有望な菌株として選抜された *Streptomyces* 属菌の種を同定するとともに、生化学的および遺伝系統解析を行う（Dr. Sunpapao との共同研究）。また、タイ産イネにおける抵抗誘導機構を解析するとともに、タイ産イネに対していもち病抵抗性を誘導する微生物の探索を行う（Dr. Jantasuriyarat との共同研究）。

2. Study on isolated microorganisms and their products

（分離微生物及び生産物質の研究）

1) ①細菌由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の解析。②機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニングならびに機能開発。③*Fusarium* sp. F59および土壌分離細菌によって合成されるオリゴ糖の構造解析。④*Bacillus* sp.が生産する包接作用を有する新規多糖生成酵素の精製と特性解析、および遺伝子のクローニング。

分離細菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、発現系を構築する。遺伝子組換え酵素の糖転移作用を解析し、生成したガラクトオリゴ糖の機能を検証する。*Corynebacterium glutamicum*のアミロマルターゼの変異酵素を作成し、大環状サイクロデキストリン産生変異酵素を創生する。*Bacillus licheniformis*様細菌から新規大環状アミロース合成酵素を精製し、性質を調べる。同酵素遺伝子のクローニングと発現系構築を行い、発現酵素の性質を調べる。さらに、発現酵素を用いて大環状アミロースを合成し、その機能開発を行う。グルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生*Fusarium* sp. F59 からクローニングしたα-ガラクトシダーゼとグルコアミラーゼ遺伝子の発現系を構築する。また、BCG脱色オリゴ糖産生土壌細菌*Bacillus* sp. 43-1からオリゴ糖合成酵素を精製し、その特性解析と遺伝子のクローニングを行う。担子菌由来エンド-遺伝N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた糖タンパク質糖鎖分析と新規配糖体合成を検討する。

2) 耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株のβ-グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと

配列解析

タイで単離した耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株の生産する β -グルコシダーゼを精製し特性評価を行ったところ、この酵素の活性は pH5.0、60°C が至適と酸性や高温環境に向いていることがわかった。また、この酵素は反応生成物のグルコースがあっても活性の阻害がかかりにくく、メタノールやエタノール存在下でも活性が下がりにくかった。これらの性質はバイオマス利用等の産業利用に向いているが大量に取得することは難しい。そこで、この酵素をコードする遺伝子を *Pichia pastoris* のタンパク高発現系で発現することで酵素を大量に取得できるか試みる。また、組換え酵素の特性評価を行うとともに産業利用の可能性を探る。

3) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用

28年度は、高温や放射線曝露時の耐熱性酵母の抗酸化物質（酵素を含む）の挙動および関連遺伝子の発現を検証した、また醸造酵母において重金属に対する応答を解析した。そこで29年度は、耐熱性酵母においても重金属ストレス応答および金属吸収能を解析することを計画し、その計画に必要な金属(重金属等)高吸収活性を持つ耐熱性酵母のスクリーニングと性質解析を行う。それにあたり、テーマ名称を「金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用」に変更する。

4) 微生物の生産する生理活性物質の探索

新たな放線菌二次代謝産物を得ることを目的に耐熱放線菌に着目した。30°C培養で増殖する3040種類の放線菌のうち、124種類の放線菌が45°Cでも増殖することを見出し、さらにそれらのうちランダムに選んだ3株を45°Cと通常の30°Cで培養し、それぞれの培養生成物をLC-MSで比較したところ、高温(45°C)培養選択的に生産が検出される化合物群があることを見出した。このことから高温(45°C)で培養することで放線菌に熱ショックを与え、二次代謝産物生合成経路の覚醒および攪乱が誘発されることが示された。我々はこの高温(45°C)培養によって生産される熱ショック二次代謝産物のことを Heat Shock Metabolite (HSM) と名付け、耐熱性放線菌の生産する HSM の in vitro および in vivo での薬理活性を評価する。

5) *Thermobifida alba* AHK119 由来のクチナーゼ及びカルボキシリエステラーゼのポリエステル及ピレスロイド等農薬分解への応用

AHK119株よりクローン化したカルボキシリエステラーゼ(Ca119)が低分子気質のエステル結合分解能を有していることがこれまでの研究で判明した。クチナーゼがポリエステルを分解して生じる低分子基質をCa119が分解処理していると考えられる。また、Ca119は農薬マラチオンの分解能力を有していることを基本的に確認した。本年度はさらに詳細な検討や他の農薬への検討を加えるとともに、酵素の固定化を試み、環境中の農薬分解への応用を試みる。固定化酵素は酵素の産業利用にも有用な技術と考えられる。

<p>29年度の 研究交流活動 から得られる ことが期待さ れる成果</p>	<p>1. Screening useful microorganisms (有用微生物の探索)</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 熱帯地域に生息する耐熱性のカビから有用酵素が取得できることが期待される。カビの培養は簡単ではないので、遺伝子工学的に宿主を酵母とした生産系を目指すことで、様々な酵素での安定な高発現が可能となることを期待している。酵素によりその性質や発現量が異なり、発現困難な酵素の存在が予想されるが、それが本研究での解決すべき課題でもある。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析 新しい耐熱性株のスクリーニング法を開発することや、既存株より優秀な耐熱性エタノール生産性を見出す可能性がある。そのような株は、将来的に高温高速エタノール発酵に利用できると期待される。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析 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2や課題5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 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酵母や糸状菌を取得し、その代謝酵素を解析し、組換え酵母の作製に利用することで、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。また、植物油脂成分を原料とし、リパーゼを用いてバイオディーゼルを製造する方法の開発が期待できる。</p> <p>5) 稲アラビノキシランを分解する微生物由来 β-キシロシダーゼと α-L-アラビノフラノシダーゼの同定 エンド-キシランナーゼの反応特性解析の結果、キシランを基質とした場合には本酵素は主要産物としてキシロオリゴ糖を蓄積させる。また、稲ワラ中に含まれるキシランは部分的に α-L-アラビノース側鎖により修飾を受けているため、これが障害となり本酵素で稲キシランを処理すると、アラビノキシロオリゴ糖も生成する。29年度計画で強力な β-キシロシダーゼおよび α-L-アラビノフラノシダーゼを得ることができれば、稲キシランの完全糖化が可能となる。</p>
--	---

6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

- ・発酵食品に由来する乳酸菌の同定

より安全な食品製造法や保存法の開発が期待される。

- ・微生物由来の耐熱性セルラーゼの性状解析

高耐熱性酵素の取得と効率的なバイオマス利用法の開発が期待される。

7) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)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(PHB, PHBV)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、ゲノム解析により、単離した菌株の機能の詳細が解析可能となる。

8) 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

29年度は、熱帯作物（アブラヤシおよびパラゴムノキ）の病害の原因菌に対して強い拮抗作用を示した *Streptomyces* 属菌の種が同定され、生化学的性質および遺伝系統が明らかになることが期待できる。また、タイ産イネにおけるいもち病抵抗性誘導に関する知見を得ることが期待できる。さらに、イネにいもち病抵抗性を誘導する微生物の単離が期待できる。

2. Study on isolated microorganisms and their products

(分離微生物及び生産物質の研究)

1) ①細菌由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の解析。②機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニングならびに機能開発。③*Fusarium* sp. F59および土壌分離細菌によって合成されるオリゴ糖の構造解析。④*Bacillus* sp.が生産する包接作用を有する新規多糖生成酵素の精製と特性解析、および遺伝子のクローニング。

新規β-ガラクトシダーゼによってプレバイオティック機能などの生理機能を持つ新規ガラクトオリゴ糖の合成が期待できる。また、変異導入 *C.glutamicum* 由来アミロマルターゼによって新規な超大環状アミロース合成が期待できる。さらに、遺伝子組換え *B.licheniformis* 様細菌由来新規大環状アミロース合成酵素を用いて、大環状アミロースの大量生産が期待できる。難消化性オリゴ糖産生グルコシダーゼの解析によりその生合成機構の解明が期待できる。また、脱色作用を持つオリゴ糖生成酵素の性質と生成糖の構造が明らかとなる。さらに、糖鎖遊離酵素用いた糖タンパク質糖鎖分析とアスパラギン結合型糖鎖配糖体の合成が期待出来る。

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

β-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。耐糖性が高く、エタノール耐性も高い酵素の大量生産技術が確立できれば、セルラーゼと

	<p>の相乗効果や高温発酵技術への応用につながることを期待される。また、β-グルコシダーゼは酒類の香り生成にも重要な働きをしている。至適 pH が低く、エタノール存在下でも活性が落ちにくい性質は、酒類の高品質化にも利用できる可能性がある。</p> <p>3) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用 タイ等の亜熱帯域における土壌・水質汚染金属のバイオリメディエーションへの応用や酵母の金属吸収機構の解明が期待される。</p> <p>4) 微生物の生産する生理活性物質の探索 Heat Shock Metabolite (HSM) の取得により、これまでにないユニークな構造や活性を有する 2 次代謝産物が得られると期待でき、したがって、新しい疾患治療シーズの開発が期待される。</p> <p>5) マラチオンはタイではなお、大量に使用されている農薬の一種であり、環境残存性が高く、公衆衛生上からも問題視される。Ca119 はマラチオンに対する高い分解能を示したので、本酵素による残存農薬の処理が期待される。そのためには酵素の固定化が実用化に近づける一つの方法である。固定化には酵素の安定化という側面も期待される。Ca119 のクローニングと基本的な諸性質については論文の data を揃えて、できるだけ速やかに公表すべく用意する。</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	<p>(和文) ゲノム情報に基づく耐熱性微生物研究</p> <p>(英文) Genome-based Research on Thermotolerant Microbes</p>				
日本側代表者 氏名・所属・職	<p>(和文) 薬師寿治・山口大学創成科学研究科・准教授</p> <p>(英文) Toshiharu YAKUSHI・Yamaguchi University・Associate Professor</p>				
相手国側代表者 氏名・所属・職	<p>(英文) Pornthap THANONKEO・Khon Kaen University・Associate Professor</p> <p>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor</p> <p>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer</p> <p>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor</p>				
29年度の 研究交流活動 計画	<p>本研究課題において、下記の 7 件の共同研究交流活動 (小研究課題) を計画している。また、本研究課題での研究者交流として、最終確定ではないが日本からの研究者派遣 2 名および日本への研究者受入 7 名を予定している。なお、個々の共同研究については、共同研究者間で相談し英語の計画書を作成し、それに基づいて研究を実施する。研究における個々の問題や研究成果の検討は、メールやスカイプ等を用いて行う。また、セミナーの際には進捗状況を直接確認する機会を設ける。</p> <p>エタノール生産性の酵母・バクテリア (<i>Zymomonas</i>)、酢酸菌、アミノ酸生産性のコリネ型細菌、エタノール・CoQ10 生産性の分裂酵母など、いわゆる有用微生物における耐熱性や耐熱化に関する研究をゲノムワイドに行う。生物学の研究がポストゲノム時代を迎えて 20 年経過する。加えて、プロテオームやトランスクリプトームなどのゲ</p>				

ノムワイドな研究も確立された。ここで、肝心な生物学の理解がどれだけ進んだのかを考えてみると、いわゆるゲノムワイド解析によって爆発的に進んだとは言いがたい。巨大な情報量に対して解釈する生物学的背景が足りていないと考えている。本研究課題では、耐熱性・耐熱化やストレス耐性を中心とする表現型を観察し、そこに関わる遺伝学的背景をゲノム解析、ゲノム改変、変異導入、交配育種などの手法によって解析する。これまでに明らかにしてきた、関与する遺伝子をリスト化する。このリストから、これまでに知られている知見を加えて耐熱性やストレス耐性獲得に至るストーリーを導き出す。ここには低分子化合物や金属イオンも登場し、初期の培地成分や培養に伴う培地組成の変化、あるいは細胞内化合物、イオンなどの解析も重要となる。このような解析についても積極的に開始する。ゲノムワイドな変動から個々の遺伝子やタンパク質の役割、低分子化合物の動きに至るまでを解析することによって耐熱性微生物研究を進める。

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

本研究グループは、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ているが、本課題では耐熱性機構やストレス耐性機構を明らかにし、それを課題5に生かすことを目指している。初年度からの耐熱性に優れたエタノール生産性酵母株の解析、特に、転写解析や増殖特性、代謝産物などから、高温で代謝を切替えている可能性が推測された。この切替えと耐熱性との関連あるいはより生産性の高い発酵を目指して、この代謝切替えについて詳細な解析を行う。

2) 耐熱性エタノール生産性細菌の分布調査と高温適応の分子機構

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旨とし、耐熱性エタノール生産性微生物 *Zymomonas mobilis* 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。加えて、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。加えて、*Z. mobilis* がASEAN 諸国でどのように分布しているかについて考慮する予定である。

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、その耐熱性機構の理解及び食酢の有効利用を促進するために、以下の6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、その分類学および生理学的特性を明らかにする。(2) *Acetobacter* および *Komagataeibacter* 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 *Komagataeibacter* sp.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。

(5) 酢酸菌の耐熱化育種を促進するために、酢酸菌を宿主とする異種発現系の開発を進める。(6) 食酢及び調合酢によるハエ誘因効果についての検証を行う。

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) 遺伝子工学的アプローチによって、コリネ型細菌の高濃度のグルタミン酸生産菌やその他の有用代謝産物生産菌の開発を行う。

5) 耐熱性 *Gluconobacter* と *Acetobacter* の耐熱性機構の解析とその応用

これまでにノンカイの発酵飲料から *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 よりも高い温度で高濃度の酢酸を生産できる耐熱性酢酸菌を単離し、*Acetobacter pasteurianus* と同定された 2-3R 株は、最も高い酢酸生産能力を示した。コロニーの形状が他の菌株とは異なることから、多糖の構造が異なることが推測されたので、糖組成分析を行ったところ、SKU1108 と同様であった。IR スペクトルからアセチル基の違いが示唆された。*Acetobacter tropicalis* SKU1100 の Zn-プロテアーゼがグルコース培地 (YPGD 培地) での高温での生育を改善するが、その作用機序について明らかにすることを目指したが、解析中である。*Gluconobacter frateurii* CHM43 の化学変異株やトランスポゾン変異株の中から高温での生育が改善された株を取得し、それらの株の変異箇所を決定して、高温での生育を改善するのに関わる遺伝子を同定している。組み換え酵素を利用した酒石酸生産系の開発を試みる。

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耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* から得た栄養要求性株を用いて交配を行い、実用的なエタノール生産に適した株を育種するとともに、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明らかにする。これまでに、耐熱性の異なる2つの株の繰り返し交配で得た株のドラフトゲノムシーケンスから耐熱性に関与すると推定される遺伝子領域を明らかにした。今年度は、これらの領域に存在するどの遺伝子が耐熱性に寄与しているかを明らかにする。同時に、明らかになった遺伝子の新たな解析系として、エタノール生産性に優れた常温性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた変異導入手法の開発を行う。

7) 耐熱性分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の有効利用

Schizosaccharomyces 属の分裂酵母は現在4種類知られているが、世界的によく研究

	<p>に使用されている <i>S. pombe</i> とは別に、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なうこと、ほとんどコエンザイム Q (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出している。昨年度日本国内で <i>S. japonicus</i> 酵母を探索し、単離することに成功したので、エタノール生産性と CoQ の生産能を調べていきたい。</p>
<p>29年度の 研究交流活動 から得られる ことが期待さ 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 省エネ型のエタノール高温発酵技術構築のために、耐熱性に優れたエタノール生産性酵母の開発が必要である。本課題では、これまで分離された酵母について、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する。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を理解する。これらの情報は他の酵母等の耐熱化や高温発酵に利用できる可能性がある。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の分布調査と高温適応の分子機構 これまでに分離された <i>Zymomonas mobilis</i> 株より耐熱化株を育種する。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 高温・非温度制御・酢酸発酵系の開発に有用な知見を得るとともに、具体的な高温酢酸発酵系の開発や生成される食酢の有効利用ができる。</p> <p>4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵 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とともに、本菌アミノ酸生産性向上に寄与する代謝・生理学的特徴を明らかにできる。</p> <p>5) 耐熱性 <i>Gluconobacter</i> と <i>Acetobacter</i> の耐熱性機構の解析とその応用 微生物の高温での適応に必要な性質 (遺伝子) の同定を行うことで、他の微生物の耐熱性化の設計に寄与することができる。高温発酵系の開発に寄与できる。</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 耐熱性遺伝子が明らかになれば、耐熱性メカニズムの解明につながると同時に、耐熱性で劣るものの別の優れた特性を持つ株へ遺伝子導入することにより、エタノール生産により有利な株の育種につながる。また、変異遺伝子解析系を構築することで、わずかな遺伝子変異の影響を調べることが可能になる。</p> <p>7) 耐熱性分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> の有効利用 分裂酵母の <i>S. japonicus</i> の有効利用を検討していくことは、高温でのエタノール発酵を行なうことや、CoQ10 の生産性につながる。これまで、あまり知られていない <i>S. japonicus</i> の特性を知り、有効利用に繋げていく。</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 氏名・所属・職	(和文) 前田 健・山口大学共同獣医学部・教授 (英文) Ken MAEDA・Yamaguchi University・Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Suneo NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
29年度の 研究交流 活動計画	<p>亜熱帯の環境に生息する微生物は、温帯である国内で解析されている微生物とは異なる独自の機能を有している。それら微生物を用いた生態系の維持、環境浄化および環境修復、その微生物が産生する有用物質の様々な分野への応用が期待される。本研究課題グループは、それらの基礎となる微生物と環境・宿主との相互作用について基礎的な検討を行うことにより、他の応用系研究課題グループへの展開を目指している。本年度は、ヒト・動物・節足動物に感染する病原微生物、昆虫と共生する微生物の解析、環境汚染物質の分解能を有する微生物の解析、腸内細菌叢や植物内生微生物が有する病原菌抑制物質の解析、植物共生微生物と植物との相互作用の解析、熱帯性藻類と環境との相互作用の解析と藻類が有用物資の探索を中心に研究を進める。本研究課題グループは、微生物としてヒト感染微生物・動物感染微生物・植物感染微生物・昆虫感染微生物・環境微生物のみならず、藻類に着目している点も他の研究課題グループにはよい特徴である。</p> <p>本研究課題での研究者交流として、最終確定ではないが日本からの研究者派遣7名および日本への研究者受入2名を予定し、それぞれの派遣期間と受入期間は来年3月までに、およそ7日間および1ヶ月間となる予定である。なお、個々の共同研究については、共同研究者間で相談し英語の計画書を作成し、それに基づいて研究を実施する。研究における個々の問題や研究成果の検討は、メールやスカイプ等を用いて行う。また、セミナーの際には進捗状況を直接確認する機会を設ける。</p> <p>平成29年度は、以下の11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 タイ・インドネシア・フィリピン・ベトナムにおいて人獣共通感染症・食品媒介感染症・伴侶動物感染症・節足動物媒介感染症の調査を継続する。さらに、蚊と共生するウイルスの解析を行い、その意義を解析する。</p> <p>2) 植物葉圏における植物-微生物間相互作用の解析と葉圏微生物による有用物質生産 これまでに植物試料から取得したメタノール資化性微生物（細菌および酵母）を含む葉面微生物について、植物生長促進作用および微生物-植物間相互作用に関わる因子（微生物が生産する植物生長促進因子、微生物が植物表層で利用する栄養源など）を同定する。また、葉面微生物が生産する有用物質生産について、インドール酢酸（IAA）を対象にタイ側で進める。一方、メタノール資化性酵母による有用タンパク質生産お</p>				

よびメタノール誘導性遺伝子発現制御機構解明については日本側で進める。

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

農地土壌の除草剤残留成分（クロロアニリン）分解能を有する植物成長促進根圏細菌 *Pseudomonas fluorescens* MC46 を単離した。この細菌は農薬残留物で汚染した土壌の *phytostimulated bioremediation*（植物促進・支援型環境修復）に有望である。この生物修復システムでは植物が重要な役割をはたしており、植物根圏内に定着している汚染物質分解細菌に光合成で生成した栄養物を提供する。したがって、「栄養提供者」であるところの植物の生理に及ぼす汚染物質の影響に関する知見が *phytostimulated bioremediation* の成功の鍵となる。そこで2017年は、引き続きこの環境修復システム並びに汚染物質に対する走化性の分子生物学的解析を続行する。また、環境汚染物質が存在する時の植物の生理学的変化（特に植物根からの栄養物質の分泌）について研究を行う。

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

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。本CCPでは、タイのDr. Sunee Nitisinprasertらのグループとともに、タイ大都市バンコクと地方都市ブリラムの児童を対象に、糞便のサンプリングと食生活調査を行ない、フローラタイプを左右させる食因子を明らかにすることを目標としている。これまでに、バンコク（n=17）とブリラム(n=25)に住む小学児童を対象に糞便のサンプリングと食習慣アンケートを実施した。そして現在、得られた糞便サンプルを用いて腸内細菌のメタ16S解析と代謝物解析を行っている。本年度は、解析を完了させ、食データとの相関解析を行い、フローラタイプに影響を与える食事因子あるいは環境因子を探索する。加えて、*Lactobacillus reuteri* KUB-AC5は乳酸菌には珍しく、サルモネラ菌に対する抗菌物質を生産している。しかし、長年、その抗菌物質の化学的実態を明らかにすべく研究を行ってきたが、未だにその単離・構造決定には至っていない。そこで、全ゲノム配列を解析し、遺伝子からその実態把握に努める。

5) 耐熱性緑藻による機能性脂質生産

アラキドン酸含有脂質を蓄積する耐熱性緑藻株の探索することを目的として、1. タイ各地の水環境、土壌、植物体等からのサンプリングと耐熱性緑藻株の単離、2. 得られた耐熱性緑藻群からのアラキドン酸含有脂質蓄積株の選抜、3. 選抜株のアラキドン酸含有脂質蓄積能の評価を実施する。

6) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

タイ土壌から 50°C 付近を至適生育温度とする熱帯性細菌類を分離・収集し、その培養生産物中に新規な低分子有機化合物が見られたことから、それらの単離、構造決定を行う。

7) 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

タイ北部のゴム園において農薬グラモキシソン (パラコート

1,1-dimethyl-4,4-dipyridium) が広く用いられており、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ことが予想されている。そこでこの農薬により汚染された土壌から、生物的環境修復に向けた農薬分解性微生物の単離を段階的に進めてきた。これまでに土壌から単離された各種微生物のゲノム DNA より増幅した ITS 領域について塩基配列の決定を行って、10 種のバクテリアと 9 株の真菌類を同定し、パラコート分解性を持つもののスクリーニングを行った。平成 29 年は、これらの中で最も分解能が高かった *Aspergillus tamari* (fungal isolate No.7) および *Cunninghamella* sp. (fungal isolate No.9) 菌の分解能について詳細な解析を行う。

8) 植物共生 *Methylobacterium* 属細菌の走化性と運動性

Methylobacterium 属細菌は主要な植物共生細菌の一つで、植物が放出するメタノールを感知し走化性を示す。さらにメタノール特異的に鞭毛が誘導される。この分子メカニズムと共生における重要性を明らかにする

9) 微小藻類における脂肪酸分解由来の香気成分に関する研究

培養したタイ産の微小藻類のケイ藻 (*Skeletonema spp*) から脂質を抽出して、その脂肪酸組成を決定する。また、ケイ藻から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 (化学防御などのアレロケミカル) ならびにその生合成機構を解明する。

10) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明

これまでの研究で、タイ北部で単離された植物内生菌 *Muscodor suthepensis* がオレンジの収穫後の *Penicillium digitatum* によるさび病を軽減させることを実証し、病原菌生育抑制効果のある化合物の同定を果たした。29 年度はその応用の一環で生卵保存の際のサルモネラ菌などの食中毒菌生育抑制への効果を評価する。また、新たな化合物として新規植物内生菌の生成する赤色素の単離、構造決定を行い、その用途を開発する。

11) 亜熱帯の生態系保持に関わる淡水プランクトンの研究

昨年度に引き続き亜熱帯域 (タイ) と温暖域 (日本) の淡水域に生息する植物・動物プランクトンの生態について調査を行い、環境条件 (水質、温度、pH 等) との相関について分析を行う。両地域で近縁種が認められた場合には遺伝子の塩基配列レベルでの分

	<p>析を行い、生態系維持の指標や環境適応に対する考察を行う。併せて、採取プランクトンの中からバイオマス創成に資する事が可能な有用藻類の探索も行う。また、微細藻類やプランクトンの培養や物質生産に適用可能な環境保全に配慮した素材の合成とその評価に関して、淡水微生物に対するナノパーティクルの生理作用に関する予備的実験にも着手する。</p>
<p>29年度の 研究交流活動 から得られる ことが期待さ れる成果</p>	<p>上記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疫学的解析 各種感染症のリスクを各国に情報提供するとともに、その対策について提言できる。また、蚊と共生するウイルスを解析することにより、蚊媒介感染症の予防法へと結びつくことが期待される。</p> <p>2) 植物葉圏における植物-微生物間相互作用の解析と葉圏微生物による有用物質生産作物増収、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、微生物-植物間相互作用に関わる因子の同定や、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できる。</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-植物相互作用に関与する微生物機構の研究 持続可能な社会構築のための基盤技術（環境修復技術）が得られる。また、微生物（特に植物成長促進根圏細菌）-植物相互作用に関する基礎的知見は、持続可能な農業の確立に大きく寄与すると考えられる。</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 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と期待される。また、ACP あるいは CCP にてこれまでに見出されたプロバイオティクス候補株である、<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 および <i>Lactococcus lactis</i> KAFFL1-4 のプロバイオティクスとしての効果の検証をさまざまな実験手法で行うことで、これらのプロバイオティクスとしての具体的な利用の可能性を探ることができると期待される。</p> <p>5) 耐熱性緑藻による機能性脂質生産 アラキドン酸含有脂質を蓄積する緑藻株の種類および蓄積能を日本で単離された常温性株とタイから単離された耐熱性株間で比較することで、アラキドン酸含有脂質の生理学的存在意義解明の糸口とする。また、常温性株を凌駕するアラキドン酸含有脂質蓄積能をもつ耐熱性株が得られれば、この化合物の工業生産に向けた大きな一歩となる。</p>

	<p>6) 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、未だ十分な研究がなされていない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応用可能な化合物が発見されれば、実用化の可能性も期待できる。</p> <p>7) 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</p> <p>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・同定により、パラコート汚染土壌の生物的環境修復方法の開発が期待される。</p> <p>8) 植物共生 <i>Methylobacterium</i> 属細菌の走化性と運動性</p> <p>植物と共生細菌が共生を始める段階では微生物の走化性が重要となる。また炭素源・栄養源に依存した鞭毛構成成分の変更という現象は新奇であり、その分子メカニズムと意義を解明して本属細菌の植物生長促進能力への裏付けとする。</p> <p>9) 微小藻類における脂肪酸分解由来の香り成分に関する研究</p> <p>ケイ藻における脂肪酸組成および脂肪酸由来の香り成分の生成機構とその生理的役割を明らかにすることにより、有用な脂肪酸の生産方法の確立や化学生態学に関する重要な知見が得られる。</p> <p>10) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明</p> <p>合成物質を用いない安心安全なポストハーベスト技術の確立につながる。</p> <p>11) 亜熱帯の生態系保持に関わる淡水プランクトンの研究</p> <p>亜熱帯域、温帯域で動物・植物プランクトンを生態調査することによって、各種の環境条件に適応した近縁種のエコタイプを取得できる。そして、温帯と亜熱帯の株間の差異が明らかにされ、特に亜熱帯環境条件への適応機構や生態系の維持に関する細胞生態学的情報が整備される。ナノパーティクルの代謝系調節因子としての効果が確認できれば、微生物を用いた物質生産の新規な外的調節システムが構築できる可能性がある。</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				
	(英文) Research on Microbes Useful for Food, Food Preservation, Health and Ecosystem				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 松井健二・山口大学創成科学研究科・教授				
	(英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor				

<p>相手国側代表者 氏名・所属・職</p>	<p>(英文) Kosum CHANSIRI ・ Srinakharinwirot University ・ Associate Professor Dung NGO Thi Phuong ・ Can Tho University ・ Associate Professor Anton MUHIBUDDIN ・ University of Brawijaya ・ Lecturer</p>
<p>29年度の 研究交流活動 計画</p>	<p>本研究課題では以下の19件の共同研究交流活動を計画している。これら全て農環境における食糧生産から、新規機能性食品の創成、食品保蔵技術への展開、更には生態系維持・改善、といった実質的な応用を目途した微生物機能の探索とその技術化を目指している。そのためには、新規機能を有する微生物の探索から始まる。アプローチとして、これまで伝統的に利活用されてきた微生物の再発見、これまで余り探索対象とされなかった植物葉面菌、植物内生菌、さらには生育の遅さと生育条件最適化の困難さからこれまで対象とされにくかった担子菌を中心に探索を進めており、これまでの共同研究で新しい微生物株を単離同定するに至っている。こうした成果を受け、今年度も更にユニークな視点での微生物単離を正直に進めていく。さらに、これら新規微生物から新規機能性物質の単離を進めており、既に技術化が達成され評価を得ているバクテリオシンについては、より効果の高い類縁体の単離、また、新規色素などの開発がほぼ完成しつつある。この方向においても継続し、まだ単離構造決定をみない化合物については早急に構造決定を進め、その応用可能性を評価する。また、これまでに得られた微生物達は葉面、根圏、また内生菌として植物内に存在し、植物とゆるい共生関係を確立し、多くの場合、植物の生育を促している。こうした微生物叢をSOFIXなどのパラメーターで評価し、農環境における土壌診断に応用する技術は完成に近く、より多くのデータを得ることで、その有効性を確実にするとともに、次世代型農業のひとつとしてSOFIXを操作する技術の開発を進める。一方、汚泥処理などにおいて微生物の機能は活用されているが、汚泥に限らず、様々な環境浄化技術のひとつとして微生物の利用を進めてきている。今年度から今井らのグループを研究課題4に移動させ、他の研究者と連携しながら、問題となっている環境の列挙と、その環境を改善する技術の開発を念頭に微生物機能を探索する。このように研究課題4では、発酵とは異なった側面からの微生物機能の利用に特化し、微生物機能の適用範囲を拡大するための基盤醸成を今年度も鋭意進める。</p> <p>本研究課題での研究者交流として、最終確定ではないが日本からの研究者派遣8名および日本への研究者受入16名を予定し、それぞれの派遣期間と受入期間は来年3月までに、およそ7日間および1ヶ月間となる予定である。なお、個々の共同研究については、共同研究者間で相談し英語の計画書を作成し、それに基づいて研究を実施する。研究における個々の問題や研究成果の検討は、メールやスカイプ等を用いて行う。また、セミナーの際には進捗状況を直接確認する機会を設ける。</p> <p>1) タイ北東部における果実から分離した酢酸菌の同定と解析</p> <p>酢酸菌はアルファプロテオバクテリア門 <i>Acetobacteraceae</i> 科に属する絶対好気性菌で、「お酢」を作り出す菌として古くから人類に親しまれてきたバクテリアである。酢酸菌は、エタノールからの酢酸発酵に代表されるように、様々な糖類・アルコール類を酸化して対応する酸化産物を高濃度に蓄積するという「不完全酸化代謝」を営むと</p>

いう特徴を持つ。加えて、人類にとっては食経験を持つまれな菌であり、食品への応用が期待される。酢酸菌は、果実や花など糖類・アルコール類の豊富な環境を天然の生息域とする。本研究は、タイ北東部（イサン）由来の様々な果実から多くの酢酸菌を分離しているため、それを属・種レベルで同定し、酢酸発酵能を解析することを目的とした。特に、耐熱性やエタノール耐性、酢酸耐性などについて詳細に解析を進める。

2) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

発酵食品をはじめとする、各国特有の様々な分離原より得られた未開拓な乳酸菌資源からの新奇のバクテリオシンの探索を継続する。分離乳酸菌の特性、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、それらの応用利用の可能性を評価する。具体的には、乳酸菌の菌種を 16S rRNA 遺伝子配列解析等によって同定し、抗菌スペクトルの解析によってバクテリオシンの新奇性や応用の可能性を評価する。新奇性が高いと判断されたバクテリオシンについては、精製・構造解析を行うとともに、安定性や作用機構等の特性の解析を進める。さらに、発酵食品をはじめとする種々の食品の保存や加工への利用や、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検討を進める。また、タイ・ベトナム等への技術移転を推進し、有用な新奇乳酸菌および新奇バクテリオシンの探索をさらに進め、探索の効率化とともに乳酸菌とバクテリオシンの応用利用への展開を図る。

3) 微生物の多糖分解酵素の植物病原性糸状菌の防除および有機酸生産への応用

28年度は、植物病原菌に対する抗菌作用を有する耐熱性多糖分解酵素の生産候補菌株として、取得した耐熱性放線菌 2 株 *Streptomyces* 属と *Mucilaginibacter* 属のうち、*Streptomyces* 属細菌が生産する 2 種類の α -1,3-グルカナーゼを均一に精製し、諸性質の検討を行うとともに、両酵素遺伝子のうち α -1,3-グルカナーゼ 2 の遺伝子のクローニングに成功した。さらに、 α -1,3-グルカナーゼ 2 の大腸菌での酵素の高発現系を構築し、組換え酵素の諸性質を検討した。29年度は、もう 1 種類の酵素 α -1,3-グルカナーゼ 1 の遺伝子のクローニングを行い、大腸菌での酵素の高発現系を構築し、組換え酵素の諸性質を検討する。また、 α -1,3-グルカナーゼに加え、*Streptomyces* 属由来キチナーゼを精製し、その諸性質を明らかにすることにより、植物病原性糸状菌の防除への応用について検討する。さらに、多糖分解酵素等を利用した熱帯性農畜産廃棄物からの有機酸の高効率簡易発酵生産系の構築を目指す。

4) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

28年度には、耐熱性ラン藻の分子遺伝学的特徴づけ（16S rDNA の配列解析）、並びに、フィコシアニンの精製並びに特徴づけを行った。熱安定性を中心としたタンパク質化学的解析実験を行い、さらには、フィコシアニンのアミノ末端のアミノ酸配列情報を得た。

29年度は、アミノ酸配列情報を基に、フィコシアニン遺伝子のクローニングを進め、

他のラン藻での発現 (*Synechococcus elongates* あるいは *Arthrospira plitensis*)を進めていく。異種発現成功の暁には、遅滞なく、タンパク質の精製に進める。

5) 多機能性微生物を利用した総合的な農作物生産および廃棄物リサイクル法の確立
本年は、(1)タイおよびベトナム土壌より分離された放線菌の性質解明と植物病原菌抑制活性の検討、および(2)POME スラッジ-EFB 共コンポストから分離された多機能性植物成長促進細菌の性質解明を行う。

6) 植物内生放線菌の農業への応用
作物生産における農薬使用量削減を目的として、農業に有用な微生物の開発を行う。イネおよび各種野菜から分離した内生および根圏放線菌を用いて、マンゴーの病原菌に対する有効性を検討する。

7) ポリ乳酸微生物の応用
最近、ポリ乳酸は繊維としても利用されているが、結晶性が高いポリ乳酸は分解されにくいいため、ポリ乳酸不織布の自然界での分解には長い時間が必要になる。ポリ乳酸不織布を効率的に分解する微生物を森林土壌等から分離し、ポリ乳酸不織布を分解する酵素の性質を明らかにし、ポリ乳酸不織布の分解条件等を検討する。引き続きポリ乳酸不織布分解微生物を探索する。

8) 突然変異を利用した食品保存と健康増進のための新奇モナスカス色素の開発
紅麹菌 (*Monascus* 属菌) は、東アジア諸国において伝統的に天然着色料の原料として利用され、発酵食品や発酵飲料の製造にも利用されている。それ故、紅麹菌は ASEAN 諸国や日本において重要な食品微生物とされている。これまでに、両研究室において色素生産性を向上させる目的で多くの紅麹菌変異株が作出されている。本研究プログラムの目的は、抗菌活性、抗酸化活性、保存料あるいは抗光退色性などの機能性を高めた新しい紅麹色素を開発することである。

9) 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
研究の最終目的は、ASEAN と沖縄県の伝統的な発酵食品を健康管理と生活の質向上に役立てるために機能性食品に利用することである。そのために、とうふようや泡盛蒸留粕などの沖縄県の伝統的発酵食品から生理活性ペプチドを探索する研究を継続している。加えて、我々は東南アジアで広く栽培されている *Jatropha curcas* の搾油後の種子残渣を用いて紅麹菌発酵した産物からの生理活性ペプチドの単離・同定を継続し、*in vitro* の培養細胞においていくつかの生理学的活性について調べる。今年度からは、紅麹菌で発酵した米糠や熱帯・亜熱帯産マメ類からも生理活性物質の探索を開始する。

10) 細菌由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の

解析、機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニングならびに機能開発、*Fusarium* sp. F59 および土壌分離細菌によって合成されるオリゴ糖の構造解析、*Bacillus* sp. が生産する包接作用を有する新規多糖生成酵素の精製と特性解析および遺伝子のクローニング分離細菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、発現系を構築する。遺伝子組換え酵素の糖転移作用を解析し、生成したガラクトオリゴ糖の機能を検証する。*Corynebacterium glutamicum* のアミロマルターゼの変異酵素を作成し、大環状サイクロデキストリン産生変異酵素を創生する。*Bacillus licheniformis* 様細菌から新規大環状アミロース合成酵素を精製し、性質を調べる。同酵素遺伝子のクローニングと発現系構築を行い、発現酵素の性質を調べる。さらに、発現酵素を用いて大環状アミロースを合成し、その機能開発を行う。グルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生 *Fusarium* sp. F59 からクローニングした α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼ遺伝子の発現系を構築する。また、BCG 脱色オリゴ糖産生土壌細菌 *Bacillus* sp. 43-1 からオリゴ糖合成酵素を精製し、その特性解析と遺伝子のクローニングを行う。担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた糖タンパク質糖鎖分析と新規配糖体合成を検討する。

11) 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

タイならびにインドネシアの農地土壌分析（特に水田圃場）を行い、環境成分分析データを集積するとともに SOFIX（Soil Fertile Index、土壌肥沃度指標）のデータベースを充実・完成させる。このデータベースから、タイとインドネシアの土壌の特徴を示し、最終的に3か国の農地環境（特に水田環境）の違いを明らかにする。

一方、日本に於いては、SOFIX に基づく有機農法で栽培した作物の栄養成分含量（硝酸イオン、各種ミネラル、抗酸化物質）を評価する。さらに連作障害の改善・処方を意識して、生育が良好な土壌と連作障害の土壌中の微生物叢とバイオマス量を解析し、それらの特徴を明らかにする。

12) 酵母DNAマイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価

酸化グラフェン (GO) は、カルボキシル基、フェニールヒドロキシルおよびエポキシド基を有するグラフェンシートである。GO は、微生物細胞の増殖を阻害することができると考えられている。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は毒性学におけるモデル真核生物であり、機能的ゲノミクス解析が可能である。これは、酵母 DNA マイクロアレイは、各遺伝子の相対的な遺伝子発現を決定するための優れたスクリーニングツールだからである。2016年に我々は *S.cerevisiae* への GO の効果を研究し、GO は酵母の生存能力に影響を及ぼさないことを発見した。これは、必ずしも *S.* が *S.cerevisiae* の増殖に影響を及ぼさないことを示すとは限らない。この研究では、GO の酵母増殖およびゲノムプロファイルへの影響を DNA マイクロアレイ技術によって分析する。

13) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用

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 *Clitopilus* に属する種を数株単離しており、極めて高い抗菌活性を確認した。28年度までの共同研究で本化合物が新規化合物であることが確実となったが未だに完全精製できていない。そこで、29年度は高速液体クロマトグラフィーを駆使してより完全に精製し、GC-MS, LC-MS, NMR により構造決定する。

14) タイ国とベトナムの麴から分離した酵母を用いたアルコール飲料の特性の比較検討

これまでにタイ国の麴ルパン (*loog pang*) とベトナムの麴メン (*men*) より、それぞれ発酵性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* NP01 と *S. cerevisiae* Y3 を分離同定している。さらに、ルパンより糖化酵素を産生する *Amylomyces rouxii* YTH3 を分離している。今年度は、分離酵母 NP01 と Y3 および分離糸状菌 YTH3 と清酒醸造用麴菌をもちいてアルコール飲料を試醸する。酵母と糸状菌の組み合わせにより試醸したアルコール飲料の一般分析、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能など機能性の評価を行う。発酵原料には、黒米、ワイルドライス、アマランサス、ミレット類を用いて機能性の高いアルコール飲料の開発を試みる。

ラオスのアルコール飲料ラオラオやラオスの麴ルパンより発酵性酵母の分離同定後は、あわせて比較研究を行う。

15) 伝統的なラオスの麴ルパン (*look peng*) と発酵酒ラオラオ (*lauh lao*) の特性とそれらの発酵微生物の分離、同定と利用

28年度より、タイ国でのジョイントセミナー時のディスカッションと複数回のメールでのやり取りを行っている。29年度は以下の研究を予定している。

ラオスでは、ルパン (*look peng*) とよばれる麴を用いて、ラオラオ (*lauh lao*) と呼ばれる醸造酒が伝統的につくられている。ラオスのルパンはタイ国のルパン (*loog pang*) と近縁の麴であり、ラオラオは自家製または小規模でつくられている。

本研究では、微生物学的、醸造学的な研究の少ないラオスのラオラオやルパンの特性を調べ、その微生物資源や醸造法を新規アルコール飲料に応用することを目的としている。今年度は、ビエンチャン近郊で実際にラオラオとルパンをサンプリングして、分析及び発酵性微生物の分離、同定、応用を試みる。これまでに分離しているタイ国とベトナムの発酵性酵母とラオラオおよびルパンより分離した酵母の特性の比較検討を行ってゆく予定である。

16) 熱帯性菌類を用いた農薬や重金属などで汚染された農地土壌のバイオレメディエーション

インドネシアでは除草剤が多く使われており、その除草剤が農地土壌に残留していることが報告されている。そこで、生物多様性に富む熱帯地域でスクリーニングした菌類を用いて、農薬や重金属などで汚染された土壌のバイオリメディエーションを行

	<p>う。今年度は、農薬で汚染された農地土壌（インドネシアのマランにおける農薬で汚染された農地を複数地点選定してそれらを対象とする）をサンプリングして、それから農薬（対象は除草剤）を分解できる菌類をスクリーニングし、その農薬分解特性を明らかにする。</p> <p>17) 発酵乳中からの乳酸菌とそのファージの単離と特性解析 タイ国の発酵乳から単離した耐熱性乳酸菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> T-25 株および本株を宿主とする耐熱性バクテリオファージφT25 の特性およびゲノム構造を明らかにする。特に 29 年度は、φT25 のタンパク質を分離し、ESI-MS/MS 似よりアミノ酸配列を決定し、解読したゲノム情報との相関性を検討する。また、<i>L. paracasei</i> T-25 株の全ゲノム配列を決定し、φT25 をはじめとするプロファージの存在を検索する。</p> <p>18) 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 平成 27 年度にデングウイルスの組換え Capsid protein 発現に成功しており、これを用いて昨年度からマウスを用いた免疫化実験を目指して、Capsid protein の精製および解析を進めている。インドネシア側の予算等の都合で、本年度から共同研究を本格的に実施する。具体的には、構築した組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫またはさなぎに注射することで、組換え prM-E および C-prM-E タンパク質をカイコで発現させる。カイコ体液またはさなぎ抽出液からこれらタンパク質を精製し、このタンパク質の特徴を調べる。また、prM-E および C-prM-E タンパク質は、発現させるだけでエンベロップを持つウイルス様粒子を形成することが知られており、透過型電子顕微鏡でウイルス様粒子の形状を確認するとともに、マウスへの免疫化実験を進める。特に、動物を用いた免疫化実験はインドネシア側で行う。</p> <p>19) 熱帯微生物を活用した有益なバイオフィームおよびバイオサーファクタントの開発 昨年度に引き続きタイ側で既に取得しているバイオサーファクタント生産真菌 <i>Aureobasidium pullulans</i> YTP6-14 などの亜熱帯微生物コレクションについて、バイオフィーム形成とバイオサーファクタントや細胞外分泌酵素など工業的に有用な産物の生産能力との相関性について調べる。培地へのバイオサーファクタントの添加によるバイオフィーム形成への影響についても検討する。 一方、昨年度新たにタイにおいて、廃グリセロールからバイオサーファクタント生産菌 RC44 を取得することに成功した。RC44 株は細菌の一種であり、16SrRNA 遺伝子配列から <i>Klebsiella pneumoniae</i> に分類されることが分かった。これまでに、同種細菌からバイオサーファクタントの生産について報告された例はない。そこで、RC44 株が生産するバイオサーファクタントについて精製ならびに構造解析を日本側で行う。</p>
<p>29年度の 研究交流活動 から得られる</p>	<p>1) タイ北東部における果実から分離した酢酸菌の同定と解析 人類に有用と期待される新しい酢酸菌を手に入れ、それらの能力・特徴を知ることができる。他の化合物を用いた不完全酸化についても、新しい展開が期待される。</p>

<p>ことが期待される成果</p>	<p>2) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用</p> <p>現地の微生物資源の有効利用と、食品の品質と安全性の向上に寄与できる。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と、新奇のバクテリオシンの発見が期待される。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。</p> <p>3) 微生物の多糖分解酵素の植物病原性糸状菌の防除および有機酸生産への応用</p> <p>(1) 微生物機能を利用した減化学農薬および on site 生産型有機肥料を志向した有機農法の開発</p> <p>これまでに取得した多糖分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。また、熱帯性農畜産廃棄物からの on site での有機酸の高効率な簡易発酵生産系を構築することにより、有機酸やミネラル等を豊富に含む生産物を肥料として再利用する経済効果の高いリサイクル農業が可能となる。</p> <p>(2) 有用担子菌類等の育種への応用</p> <p>多糖分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> <p>4) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用</p> <p>フィコシアニンについては、食用等の色素利用、毛染め剤への利用、が考えられる。(関連する特許を申請中である)</p> <p>5) 多機能性微生物を利用した総合的な農作物生産および廃棄物リサイクル法の確立</p> <p>前者の一部は既に性質が明らかになりつつあり、新規且つ作物栽培におけるバイオコントロール材としての利用が期待される。後者のいくつかも微生物学的新規性を有している。また、作物栽培に対する有効性を発揮することが期待される。</p> <p>6) 植物内生放線菌の農業への応用</p> <p>農業に有効な微生物を利用することにより、農薬の使用量を削減し、より安全安心な食品の生産を可能にする。</p> <p>7) ポリ乳酸微生物の応用</p> <p>ポリ乳酸不織布を用いた製品の効率的な分解が可能となる。</p> <p>8) 突然変異を利用した食品保存と健康増進のための新奇モナスカス色素の開発</p>
-------------------	--

本研究成果は ASEAN 諸国や日本において、食品、化粧品、機能性食品および水産加工分野において様々な貢献が期待される。

9) 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

ASEAN 諸国の発酵食品に関する生理活性について情報を引き続き調査・収集し、機能性を有する新しいペプチドや化合物がこれらの発酵食品から発見されることが期待される。また、これらの発酵産物の抽出液は、薬用化粧品、医療および補助食品産業において潜在的な可能性を秘めていると考えられる。

10) 細菌由来β-ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の解析、機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニングならびに機能開発、*Fusarium* sp. F59 および土壌分離細菌によって合成されるオリゴ糖の構造解析、*Bacillus* sp.が生産する包接作用を有する新規多糖生成酵素の精製と特性解析および遺伝子のクローニング

新規β-ガラクトシダーゼによってプレバイオティック機能などの生理機能を持つ新規ガラクトオリゴ糖の合成が期待できる。また、変異導入 *C.glutamicum* 由来アミロマルターゼによって新規な超大環状アミロース合成が期待できる。さらに、遺伝子組換え *B.licheniformis* 様細菌由来新規大環状アミロース合成酵素を用いて、大環状アミロースの大量生産が期待できる。難消化性オリゴ糖産生グルコシダーゼの解析によりその生合成機構の解明が期待できる。また、脱色作用を持つオリゴ糖生成酵素の性質と生成糖の構造が明らかとなる。さらに、糖鎖遊離酵素用いた糖タンパク質糖鎖分析とアスパラギン結合型糖鎖配糖体の合成が期待できる。

11) 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

(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

微生物機能を評価・利用する新しい SOFIX (Soil Fertile Index) を開発してきた。地域バイオマス資源と本法を利用し、各農産物に適した農地の肥沃化手法の適応は徐々に広まっており、本法に基づく農地管理技術の開発も進んできた。また、海外での技術移転希望も多くなってきており、海外の土壌 SOFIX データを集積することで、より精度が高く汎用性の高い評価法に進化していくことが期待される。

(2) 微生物機能を利用した減化学肥料ならびに減農薬を目指した有機農法の開発

SOFIX に基づく管理農法は、物質循環型農法を基本とし、化学肥料ならびに農薬を用いないことを基本としている。化学肥料や化学農薬を使用しなくても、病原菌に強くかつ高栄養を有する農作物を作ることにも期待できる。さらに、良好な土壌環境で生育した農産物は、品質や栄養成分含量が高く、また病原菌に対する抵抗性を有することが明らかになれば、本来の植物が持つ性能・含有成分等を的確に把握することが可能となる。

	<p>12) 酵母DNAマイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価 酸化グラフェン (GO) に代表されるような、新材料が本当に殺菌性や毒性を有するのかを検証することにつながる。</p> <p>13) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用 新規抗菌活性物質の発見とその構造決定等が期待される。</p> <p>14) タイ国とベトナムの麴から分離した酵母を用いたアルコール飲料の特性の比較検討 タイ国とベトナムで分離した酵母と糸状菌を用い、発酵原料に、黒米、ワイルドライス、アマランサス、ミッレット類を用いて試醸を行う。抗酸化能等の機能性もつ新規アルコール飲料の開発が期待できる。 タイ国、ベトナム、ラオスの伝統的アルコール飲料の特性の比較検討を行うことができる。</p> <p>15) 伝統的なラオスの麴ルパン (<i>look peng</i>) と発酵酒ラオラオ (<i>lauh lao</i>) の特性とそれらの発酵微生物の分離、同定と利用 ラオラオ醸造に使用されている、発酵性酵母の分離とその特性を調べ、タイ国とベトナムで分離した酵母との比較検討を行う。分離酵母を用いて、黒米や赤米など各種有色米を原料として抗酸化能等の機能性を新規アルコール飲料の開発を試みる。</p> <p>16) 熱帯性菌類を用いた農薬や重金属などで汚染された農地土壌のバイオレメディエーション 農薬で汚染された農地土壌（インドネシアのマランにおける農薬で汚染された農地を複数地点選定してそれらを対象とする）から農薬（対象は除草剤）を分解できる菌類をスクリーニングする。生物多様性に富む熱帯地域のため、また、長年農薬にさらされてきた経緯から、農薬分解能に優れた菌類をスクリーニングできると期待される。スクリーニングされた菌類の特性を調べ、農薬や重金属などで汚染された土壌のバイオリメディエーションに資する。</p> <p>17) 発酵乳中からの乳酸菌とそのファージの単離と特性解析 発酵乳中のファージ汚染の被害は甚大かつ深刻であるが、効果的な対策は未だに確立されていない。本研究を行うことで、これら汚染ファージの特性が明らかとなり、特に、プロファージ状態のファージの検出につながるため、ファージ汚染予測につながる。また、全ゲノム解読により CRISPR/Cas 配列も明らかになることで、本株のファージ感染履歴が明らかになり、今後の予防対策も講じることができる。</p> <p>18) 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。</p>
--	---

	<p>19) 環境中で多くの微生物はなんらかの固体表面に付着し、高次構造体すなわちバイオフィルムを形成している。バイオフィルムは環境ストレスに対する抵抗性を付与することや特定の物質を生産することなどが知られている。しかしながら工業的に有用な真菌類を対象としたバイオフィルム形成に関する知見は限られている。</p> <p><i>Aureobasidium pullulans</i> YTP6-14 は新規バイオサーファクタント（論文投稿中）と共にプルランやいくつかの菌体外酵素を生産する。本研究を推進することによって、有用工業真菌 YTP6-14 のバイオフィルム状態での生理学的特性が明らかになる。そこから得られる知見は、微生物発酵生産プロセス開発の基盤構築に貢献することが期待される。また、<i>Klebsiella pneumonia</i> RC44 が生産するバイオサーファクタントの構造解明は新しい有用微生物資源の拡充に貢献する。</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	(和文) 新規産業のための次世代発酵技術の構築 (英文) Development of Next-generation Fermentation Technology for New Wave Industry				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 星田尚司・山口大学創成科学研究科・准教授 (英文) Hisashi HOSHIDA・Yamaguchi University・Associate Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Savitree LIMTONG・Kasetsart University・Professor Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
29年度の 研究交流活動 計画	<p>本研究課題では以下の12件の共同研究交流活動を計画している。これらの交流活動ではバイオリファイナリー技術、つまりバイオマス資源を材料とした生物変換による有用物質生産を目指した共同研究が進行している。現代は石油を起源とするエネルギーや化学材料に支えられているが、石油が有限であること、さらには、その使用により放出された二酸化炭素が人類の生存を脅かす大きな地球環境の変化をもたらしていることから、材料を石油からバイオマスへ移行した循環型社会の構築が望まれている。バイオリファイナリーで生産されるものとして第一に挙げられるのはエネルギーとして利用される物質である。バイオエタノールはすでに大量に生産され利用されているが、安定かつ低コストでの生産、あるいは使用バイオマスを拡大することが重要であり、本課題でも3つの共同研究で耐熱性菌を利用した解決法が研究されている。さらに、メタンや水素のガスも重要なエネルギーで、これらを生産するための材料、前処理から発酵方法までを含む様々な共同研究が4つあり、計7つのエネルギー生産関連研究が進められている。これらに加え、組換え体を用いたバイオリファイナリーによる化学品生産の共同研究が進められている。バイオマス資源からの高付加価値物質の生産あるいはバイオマス資源を利用するための効率的な分解を目的として、3つの共同研究で、有用糖の生産及びバイオマス分解のための酵素生産菌のスクリーニング、</p>				

酵素特性評価、酵素の大量生産に関する研究が行われている。このほか、バイオマスを活用したバイオレメディエーションの共同研究が行われている。

本研究課題での研究者交流として、最終確定ではないが日本からの研究者派遣3名および日本への研究者受入6名を予定し、**それぞれの派遣期間と受入期間は来年3月までに、およそ7日間および1ヶ月間となる予定である。**なお、個々の共同研究については、共同研究者間で相談し英語の計画書を作成し、それに基づいて研究を実施する。研究における個々の問題や研究成果の検討は、メールやスカイプ等を用いて行う。また、セミナーの際には進捗状況を直接確認する機会を設ける。

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

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。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、分離もしくは開発し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29年度は、*Zymomonas* を用いた高温発酵がどれほど効果的なのか、モデルを用いた検討を行う。また、開発した耐熱化 *Zymomonas* を用いた高温発酵の実施も検討する。

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

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、新規の二糖および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。特に糸状菌の生産する酸化還元酵素、乳酸菌の生産する糖転移酵素、加リン酸分解酵素に焦点を当て新規の生産基盤技術の確立を目指す。29年度は日本側研究者を1名、カウンターパートの大学に派遣して連携を密にし、有用微生物のスクリーニングおよび生産する酵素の有用性の評価を続ける。

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

課題1で分離した耐熱性酵母の中に、分離された国や地域が異なる株が複数あり、それらの発酵特性を5Lスケールで比較する。また、これらの中に、セルロース系バイオマス利用で課題となっているキシロース発酵能が高い株があり、キシロースからのエタノール高温発酵およびセルロースからのエタノール高温発酵を検討する。一方で、高温発酵を評価するためにシミュレーションに必要なデータを種々の条件でとる計画である。

4) 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

平成28年度の共同研究にて、蚕繭からセリシンを抽出可能なセリンプロテアーゼ、トウモロコシ廃棄物からのオリゴキシロ糖が生産可能なキシラナーゼ、糖エステルが

合成可能なリパーゼについて研究を進めた。平成29年度は、それぞれの分解酵素について、「酵素の精製と特性解析」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と大量発現系の構築」を進める。つまり、①セリンプロテアーゼについては、大量発現系の構築と組換え酵素を用いた蚕繭または抽出セリシンの限定加水分解とペプチドの生成に取り組む。②キシラナーゼおよびリパーゼについては、*Bacillus* 属細菌または *Pichia* 酵母の発現系にて組換え酵素の調製に取り組む。また、分離菌・組み換え酵素発現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、培養条件の最適化を行う。

5) 加水分解酵素を利用したオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加

これまでに、オイルパーム（パーム椰子）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に関して、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生産の高効率化を行った。H29年度は、それをさらに進め、加水分解酵素を利用してオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加を試みる。

6) バイオテクノロジーを用いた産業排水のバイオレメディエーションのための新規手法の開発

熱帯性微生物を利用した植物性バイオマスからの有用生産物（主に環境・バイオテクノロジー用途）の開発において、昨年度は、細胞毒性や発がん性物質（人工染料：アゾ染料やPAH等）を含有する排水の浄化が可能なバイオテクノロジーを用いた産業排水のバイオレメディエーションのための新規手法の開発を *Trametes versicolor* を対象に対象微生物の担体固定や各種酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ等）の固定化により行った。H29年度は、*Aureobasidium pullulans* や *Trametes versicolor* を用いて、排水中の有毒物質のバイオレメディエーションを行う。具体的には細胞や酵素の新規固定手法の開発を行い、それらの低コスト化を指向するために農作物残渣などを原料にその生産を試みる。

7) 第2世代、第3世代バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの開発

ネピアグラス及びその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に関して、これまでに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の成果を得た。そこで、昨年度はバイオ水素発酵の原料となるバイオマスの対象を拡大し、微細藻類 (*Chlorella* sp.) をその対象にその前処理方法を検討した。H29年度は微細藻類の前処理方法を酸・加熱法、有機溶媒・触媒法、加水分解酵素添加法の検討を引き続き行う。

8) 嫌気性発酵におけるホテイアオイからのバイオエネルギー生産のためのセルロース

	<p>分解微生物の選定</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）生産に関して、これまで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ってきた。昨年度はリグノセルロースを多く含む稲わらを対象に、一相式あるいは二相式高温嫌気性発酵によるバイオエネルギー（水素及びメタン）生産を行った。H29年度は、原料の対象を拡大（ホテイアオイを予定）し、嫌気性発酵におけるホテイアオイからのバイオエネルギー生産のためのセルロース分解微生物の選定を実施する。</p> <p>9) 二相式高温嫌気性発酵と微生物電気分解を用いたパームオイル廃水からの高効率水素生産</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・促進化に関して、これまで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し、成果が得られた。昨年度は、高濃度の固形物を含有するパームオイル排水からのバイオガス生産プロセスの改善のために嫌氣的セルロース分解微生物群の探索・同定を行った。H29年度は、これまで実施してきた二相式高温嫌気性発酵に微生物電気分解を組み合わせ、パームオイル廃水からの高効率水素生産に関する研究を実施する。</p> <p>10) 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ン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、再生可能資源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、昨年度までに構築に成功している 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に拡張することで、1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール等の C4 以上の炭素骨格を持つ有価物の生産を試みる。</p> <p>11) 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進めてきた。これまで、タピオカデンプン抽出後の廃バイオマスであるキャッサバパルプを用いたパイロットスケールの発酵試験を行い、耐熱性酵母に対する課題や改良点が明らかになった。そこで 29 年度は、菌株改良の基礎段階として約 20 の耐熱性酵母株の高温エタノール生産に関する個々の能力評価を行う。</p> <p>12) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化</p> <p>本研究では、耐熱性微生物が産生する酵素を利用したバイオリファインリー技術の</p>
--	--

	<p>構築を目指している。日本およびタイ国で大量に廃棄されている果物果皮等の農産廃棄物に着目して、そこから有用ケミカルを生産するプロセスを確立することを最終目標とした。これまでに、果皮の糖化プロセスとその後の酸化変換プロセスに適した株を単離に成功し、各プロセスの最適化に注力した。</p> <p>H29年度は、柑橘果皮から直接アルダル酸を生産する統合プロセスの構築に注力する。Salakkam氏の日本滞在期間中(33日間を予定)に、統合プロセスにおける固体発酵の最適な基質濃度を検討し、さらに真菌による固体発酵から酢酸菌による酸化発酵プロセスの統合についての条件を検討し最適化を図る。</p>
<p>29年度の 研究交流活動 から得られる ことが期待さ 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</p> <p>構築した高温発酵プロセスモデルの検証を行うことで、菌株の耐熱性とエタノールの生産性の比較がモデルによって推察できるかを明らかにする。また、これまでに開発した菌株が実用的な利用が可能であるかを、発酵試験を行うことで検証する。</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>28年度は共同研究論文を2報出すなど、研究成果が生まれつつある状況にある。しかし、その成果は主にカウンターパート側が担当している、スクリーニングで得た糖質加水分解酵素に関する研究であり、日本側の研究成果はまだ十分ではないのが現状である。本年度、新たにスクリーニングで得た根粒菌および糸状菌の酸化還元酵素を用いたオリゴ糖生産を試みる予定にしており、十分な研究成果が生まれるものと考えられる。また、短期留学制度を利用して、本学学生を6か月間カウンターパートの大学に研究派遣する予定にしており、引き続き活発な共同研究の遂行が期待できる。</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>世界のバイオ燃料需要は今後10倍以上に増加すると予測されている。この需要を満たすためには、コストが倍増するセルロース系バイオマスを利用しなければならないことから、コスト削減に繋がる技術開発が不可欠である。本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、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。これらによって、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) 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>対象とする微生物酵素の特性解析および組み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、プロテアーゼは機能性(生理活性を示す)ポリペプチド・タンパク質の取得が期待される。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を検討することで、原料の効率的分解と生成物の収率</p>

の向上が期待される。

5) 加水分解酵素を利用したオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加

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。今年度は加水分解酵素を利用してオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加を試みる。加水分解酵素の利用が水素及びメタン生産に及ぼす影響を把握する。これらのデータの蓄積により、パイロットスケールの連続運転のためのデータ蓄積を行う。

6) バイオテクノロジーを用いた産業排水のバイオレメディエーションのための新規手法の開発

微生物細胞そのものの固定化、あるいは付加価値を高めた各酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ、リグナーゼ等について、酵素生産技術とともに）新規固定化技術の開発を行い、それらの低コスト化を指向するために農作物残渣などを原料にその生産を実施する。以上より、本研究の成果を環境浄化へ応用する技術開発につなげる。

7) 第2世代、第3世代バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの開発

昨年度よりバイオ水素発酵の原料となるバイオマスの対象を拡大し、微細藻類（*Chlorella* sp.）をその対象に加えた。昨年度に引き続き、微細藻類の前処理方法（酸・加熱法、有機溶媒・触媒法、加水分解酵素添加法等）の検討を行うことで、糖への転換率の最大化を図り、水素とメタンの生産効率の向上を可能とする。

8) 嫌気性発酵におけるホテイアオイからのバイオエネルギー生産のためのセルロース分解微生物の選定

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）生産に関して一定の成果が得られたことから、H29年度は原料の対象を拡大（ホテイアオイ）し、嫌気性発酵におけるホテイアオイからのバイオエネルギー生産のためのセルロース分解微生物の選定を行う。水生植物をターゲットとしたバイオエネルギー（水素及びメタン）生産に関する知見を得る。

9) 二相式高温嫌気性発酵と微生物電気分解を用いたパームオイル廃水からの高効率水素生産

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・促進化に関して、これまでに一定の成果が得られた。H29年度は、これまで対象としてきた二相式高温嫌気性発酵に新たに「微生物電気分解」を組み合わせ、パームオイル廃水からのさらなる高効率水素生産に関する実験的検討を行い、その改善に資する。

10) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

	<p>前述の 1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオールは、β-ラクタム系抗生物質の前駆体や合成ゴム原料としての用途を持つ有用物質であるが、非天然型化合物であるがゆえにバイオでの生産が困難であるのが現状である。本研究により、再生可能資源より前述の化合物を生産する技術を確立できれば、これまでの化石資源依存型の生産プロセスからの脱却に貢献できるとともに、非天然型化合物の微生物生産の分野を開拓する先駆的な研究になると期待される。</p> <p>11) 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 これまでのパイロットスケール発酵試験から、高温エタノール発酵あるいは廃バイオマス材料に対する耐熱性酵母の課題が明らかになった。今年度、耐熱性酵母株の、糖耐性、増殖速度、エタノール耐性、エタノール資化能など、高温発酵の効率を高めるために重要な性質の比較を行い、優良株を選択することで、翌年度の菌株育種へ展開することができる。</p> <p>12) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化 本研究課題では、果物残渣等の未利用資源を利活用できる次世代発酵技術の構築を目指す。果物残渣等の農産廃棄物に多量に含まれるペクチンは、セルロースやヘミセルロースに次ぐ再生可能資源として利活用技術の開発が期待されている。上記研究活動により、環境負荷が低減された農産廃棄物のバイオリファイナリー技術が提案できると期待している。</p>
--	--

8-2 セミナー

整理番号	S-1
セミナー名	<p>(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</p> <p>(英文) Session in Fer.VAAP, JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“</p>
開催期間	平成29年7月26日 ~ 平成29年7月27日 (2日間)
開催地 (国名、都市名、会場名)	<p>(和文) タイ国、コンケン、プルマンコンケンラジャオーキッドホテル</p> <p>(英文) Thailand, Khon Kaen, Pullman Khon Kaen Raja Orchid Hotel</p>
日本側開催責任者 氏名・所属・職	<p>(和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科・教授</p> <p>(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor</p>
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	<p>(英文) Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor</p> <p>Vichai Leelavatcharamas・Khon Kaen University・Assistant Professor</p>

参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 (タイ)	
	A.	B.
日本 〈人／人日〉	A.	9/ 36
	B.	4
タイ 〈人／人日〉	A.	20/ 40
	B.	20
ドイツ 〈人／人日〉	A.	1/ 4
	B.	0
ベトナム 〈人／人日〉	A.	4/ 12
	B.	2
インドネシア 〈人／人日〉	A.	3/ 9
	B.	2
ラオス 〈人／人日〉	A.	3/ 6
	B.	2
イギリス(日本 側) 〈人／人日〉	A.	1/ 4
	B.	2
合計 〈人／人日〉	A.	41/ 111
	B.	32

- 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、本事業の発酵に関連する先端的な基礎研究および応用研究のセッションを、分科会として開催する。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、本事業の各共同研究グループ内で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 分担内容	日本側	内容	金額
		国内旅費	95,000 円
		外国旅費	1,200,000 円
		外国旅費に係る消費税	96,000 円

	(タイ)側	内容	セミナー開催経費	金額	1,000,000 円
	(ドイツ)側	内容	外国旅費	金額	160,000 円
	(ベトナム)側	内容	外国旅費	金額	160,000 円
	(インドネシア)側	内容	外国旅費	金額	150,000 円
	(ラオス)側	内容	外国旅費	金額	30,000 円

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29年8月26日～平成29年8月26日 (1日間)
開催地 (国名、都市名、会場名)	(和文) タイ、バンコク、センターラグラウンドアンドバンコクコンベンションセンター
	(英文) Thailand, Bangkok, Centara Grand & Bangkok Convention Centre
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科 教授
	(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文) Dr. Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor

参加者数

派遣先 派遣元		セミナー開催国 (タイ)	
日本 〈人／人日〉	A.	3/ 9	
	B.	4	
タイ 〈人／人日〉	A.	20/ 20	
	B.	20	
ベトナム 〈人／人日〉	A.	2/ 4	
	B.	0	
インドネシア 〈人／人日〉	A.	1/ 2	
	B.	2	
合計 〈人／人日〉	A.	26/ 35	
	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	本Core-to-Core Program 事業にはタイの多くの大学やその関係者がかかわっており、また、先端的研究や新技術開発も含まれている。そこで昨年度に引き続き、Thailand Research EXPO 2016 の分科会で本事業の研究発表を同時に行い、タイの一般研究者や企業関係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、環境微生物関連を中心とした研究発表を行い、それらの知見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 分担内容	日本側	内容	国内旅費	金額 30,000 円
			外国旅費	300,000 円
			外国旅費に係る消費税	24,000 円
	(タイ)側	内容	セミナー開催経費	金額 1,000,000 円
	(ベトナム)側	内容	外国旅費	金額 80,000 円
	(インドネシア)側	内容	外国旅費	金額 50,000 円

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4回サテライトセミナー
	(英文) The fourth 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29年9月4日～平成29年9月5日 (2日間)
開催地 (国名、都市名、会場名)	(和文) ドイツ、ベルリン、ベルリンボイト工科大学
	(英文) Germany、Berlin、Beuth University of Applied Sciences
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科 教授
	(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文) Dr. Peter Goetz・Beuth University of Applied Sciences・Professor

参加者数

派遣先 派遣元		セミナー開催国 (ドイツ)	
		A.	B.
日本 〈人／人日〉	A.	5/20	
	B.	1	
タイ 〈人／人日〉	A.	5/20	
	B.	1	
ドイツ 〈人／人日〉	A.	4/8	
	B.	10	
インドネシア 〈人／人日〉	A.	5/20	
	B.	0	
イギリス(日本側) 〈人／人日〉	A.	1/4	
	B.	0	
合計 〈人／人日〉	A.	20/72	
	B.	12	

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。本年度はドイツの拠点大学であるベルリンボイト工科大学で実施し、ドイツの大学の研究者や若手研究者との交流の場となる。				
期待される成果	研究成果発表に加えて、発表に関連する共同研究グループ内で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、ベルリンボイト工科大学の施設見学等によって今後の共同研究計画の参考になる。加えて、ドイツの研究者や若手研究者に対して本事業の広報ができる。				
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 分担内容	日本側	内容	国内旅費	金額	52,000 円
			外国旅費		900,000 円
			外国旅費に係る消費税		72,000 円
	(タイ)側	内容	外国旅費	金額	800,000 円
	(ドイツ)側	内容	セミナー開催経費	金額	800,000 円
	(インドネシア)側	内容	外国旅費	金額	800,000 円

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13回若手研究者セミナー (英文) The 13 th 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28年11月18日～平成28年11月19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 (英文) Japan, Yamaguchi, Yamaguchiken Seminar Park
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学・教授 (英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文)

参加者数

派遣先 派遣元		セミナー開催国 (日本)	
日本 〈人／人日〉	A.	8/16	
	B.	50	
タイ 〈人／人日〉	A.	5/10	
	B.	20	
ベトナム 〈人／人日〉	A.	2/4	
	B.	10	
インドネシア 〈人／人日〉	A.	1/2	
	B.	10	
ラオス 〈人／人日〉	A.	1/2	
	B.	1	
合計 〈人／人日〉	A.	17/34	
	B.	91	

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、熱帯環境微生物だけでなく生物を研究対象とする若手研究者のグローバル人材育成の一環として実施し、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。また、日本人大学院生や外国人大学院生が中心となって本セミナーの企画・運営を経験するとともに、参加者全員がそれぞれの研究成果を英語で発表および質疑応答の機会を提供する。		
期待される成果	1) セミナー企画・運営の経験を積ませることができる。 2) 英語による研究成果発表や討議の機会となる。 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。 4) 一般的な微生物研究を深く知る機会を提供できる。 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 分担内容	日本側	内容	その他(会場借上代) 金額 59,000 円 その他(印刷製本費) 100,000 円 その他(バス借り上げ代) 160,000 円
	(タイ)側	内容	外国旅費 (他経費により支出)

	(ベトナム)側	内容 外国旅費 (他経費により支出)
	(インドネシア)側	内容 外国旅費 (他経費により支出)
	(ラオス)側	内容 外国旅費 (他経費により支出)

8-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

共同研究、セミナー以外の交流（日本国内の交流を含む）計画を記入してください。

所属・職名 派遣者名	派遣時期	訪問先・内容
山口大学・教授・ 松井 健二	平成30年1月	ドイツ及びイギリス・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

1) 総合的評価、1. これまでの交流を通じて得られた成果の学術的側面および3. 今後の研究交流活動計画において指摘された「総花的であり、もっと絞り込んで先端的研究をめざすべき」について

「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」を目指す本事業課題は、「熱帯性環境微生物の探索とその利活用」をその重要な柱としている。そのためには、総合評価のコメントの冒頭に記されているように、熱帯環境を有する国々の研究者との共同研究の推進と、その活動の中での信頼関係や友好関係の構築が不可欠である。一方で、「熱帯性環境微生物の探索とその利活用」を推進するためには多様な研究が基盤として必要であり、コメントにもあるように「総花的」になるキライがある。とはいえ、「世界水準の先端研究拠点」を目指すために、その生態学から生理学にわたる多様な研究の中から新規性の高い研究を伸ばし、先端研究として発展させる必要がある。そのため、「多様な熱帯性環境微生物の潜在能力の発掘と新規利用法の開発」（課題1、4）、「熱帯性環境微生物の特性である耐熱性原理の解明」（課題2）、「熱帯環境からのウイルス伝播ルートの解明」（課題3）、「東南アジアの食文化と腸内細菌叢」（課題3）、「耐熱性を利用した高温発酵・次世代型バイオ燃料生産技術の開発」（課題5）など、先端的な研究を目指した研究交流が複数の国のメンバーの協力によって進められている。さらに、より特化した小グループによって以下の3つの先端的な研究が行われている。研究課題2の中のグループによるJST・ALCA事業（代表：松下一信）「低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲノム工学的「耐熱化」（23年度）」、研究課題3のグループによるJST・e-ASIA共同研究（代表：前田健）「アジアにおける節足動物媒介新興感染症制御手法構築のための総合研究」（27年度）」、そして研究課題5の中のグループによるJST・e-ASIA共同研究（代表：山田守）「ASEANバイオマス活用に向けた耐熱性微生物を利用するバイオ燃料等変換プロセスの開発」（29年度から開始）である。一方で、研究課題間の多様な連携も進行し、基礎研究から応用研究への連携、つまり研究課題1の成果を研究課題2や4や5に利用する横の連携も始まっている。このように、5つの課題が並行して、かつ連携しながら種々の先端的な基礎研究発展させ、社会実装へ向けた大きな流れを創ろうとするところが本事業の特徴である。しかしながら、指摘されているように「世界の微生物学を主導できる」ような展開を目指すには、将来的に、現在行われている課題の中から真に先端的な課題を抽出し、発展させて行く必要があると考えている。その意味で、本事業の強みを生かすために「耐熱性微生物」、「耐熱性遺伝子」、「高温限界温度の代謝」、「耐熱化と高温適応」、「高温発酵」などの研究を推進するとともに、ドイツやイギリスとの共同研究を

増やしながらか先端研究に挑戦して行く予定である。

2) 総合評価において指摘された「参加研究者の再考が必要で、同一分野の研究者が多数重なっていることの改善等により組織のブラッシュアップが求められる」について

「参加者の再考」については、現在、本事業が進行中であることから国内のメンバーの大幅な変更は難しく、次期の事業に向けての課題として、現在鋭意検討・議論を進めているところである。相手側の参加者については、100名以上のメンバーがいるタイ側について、そのメンバーの組換えではなく、彼らの中から高い研究能力を有する人材の育成に鋭意努めているところである。学術論文やセミナー発表等、業績の顕著な若手研究者を優先して日本へ招聘し、日本での共同研究の機会を提供しており、また他の外部資金による、より特化した先端研究への参加を促している。さらに、平成29年度開催する第7回国際発酵会議、Thailand Research EXPO 2017、ドイツで開催するサテライトセミナーでは、それぞれの課題のなかで顕著な実績を挙げている研究課題を選択し、発表させ、Thailand Research EXPO では本事業で開発した優れたシーズの紹介を、サテライトセミナーではドイツとの新たな先端的共同研究に繋がる課題の紹介を予定している。

3) 1. これまでの交流を通じて得られた成果の研究業績に関する指摘「トップジャーナルに掲載されているわけでもなく、研究者数を考えると決して業績が多いとは言えない」について

微生物を研究材料としていることや科学研究の発展途上国との共同研究が中心であることなどのためにトップジャーナルへの論文発表は簡単ではないが、トップジャーナルの1つである Science (351:1196-1199; 353:759)に、既に退官しメンバーから外れた小田が、以前の拠点事業からの長期にわたる研究を報告している。本事業の性質上、相手国参加者との共著論文を中心とせざるを得ず、また、本事業予算（交流経費）を利用した研究論文に絞って提出していることから、論文数に限りがあるのは否めない。しかしながら、学術論文数については、平成26年度：9報（共著7報）、平成27年度：31報（共著21報）、平成28年度：68報（共著31報）と増加傾向にあり、本事業が順調に進んでいることを反映していると考えている。

4) 2. 事業の実施状況における研究交流に関する指摘「日本人研究者の外国における滞在日数が少ないこと」、「タイとの交流が大部分であり、その他の国との交流が少ない」、「マッチングファンドが少ない国がある」について

共同研究にかかる交流に関する指摘されている懸念については十分認識している。まず、日本からの派遣が少ない点は、本事業の相手国の性質からして理解をお願いしたいところである。つまり、相手国側には熱帯性微生物資源が豊富にあり、これは重要な利点であるが、ドイツもしくはイギリス（後述）以外は研究施設や解析技術等の問題があり、日本に相手国の研究者を招聘して研究する機会がどうしても多くなるからである。一方、タイ以外の国との交流拡大については、以下のように現在進めているところである。インドネシアでは、これまで支援機関が拠点大学のブラビジャヤ大学であったことから、他の協力大学との交流が限られてきた。インドネシア側コーディネーターおよび日本側コーディネーターが Ristekdikti と交渉し、平成28年度の途中から幾つかの協力大学のメンバーに Ristekdikti からの研究費支援が開始され、平成29年度から交流が拡大する見込みである。また、平成29年度12月頃から CCP 支援を開始すると Ristekdikti から内諾を得ていることから、平成30年度はさらに交流が盛んにな

ると予想している。インドネシアは、日本だけでなくタイにも研究者を派遣してきており、平成29年度はさらにベトナムやドイツにも派遣する予定である。一方で、ドイツでは、ドイツ政府機関や拠点大学からの支援を受けて、平成28年1月にタイ、インドネシア、ベトナムでセミナーを開催し、平成29年2月からベトナムに若手研究者を長期派遣している。さらに、インドネシア側と協力してインドネシア企業の発酵生産に関する技術支援を始めている。また、イギリスに関しては、日本およびタイから、平成28年度に若手研究者をイギリスにそれぞれ一ヶ月派遣し、高温発酵のシミュレーション評価のための基礎研究や複数の微生物による複合発酵のシミュレーション化など、先端的な共同研究を開始した。さらに、平成29年度から発酵関連技術開発を目指すe-ASIA共同研究が開始されることから、日本とタイだけでなく、ラオスやインドネシアとも、より太い交流が形成されると考えている。

5) 3. 今後の研究交流活動計画において指摘された「拠点事業の継続・発展のための後継者育成が必要」および2. 事業の実施状況において指摘された「拠点機関参加者と協力機関参加者の活動の差が大きい」について

熱帯性環境微生物の開発のためには、本事業のような国際拠点事業を永続的に遂行する必要があり、そのためには日本側の後継者育成が極めて重要となる。本事業では、後継候補者に共同研究やセミナーに参加するだけでなく、理解を深めるために事業運営に直接参加してもらっている。5つの研究課題に、それぞれリーダーとサブリーダーを配し、運営委員会を開催して本事業のセミナー等の年度計画とその諸課題についての討議を行っている。平成29年度についても、各種セミナーのテーマ決定、口頭発表者の選出等をリーダーとの討議を基に進めている。また、リーダーやサブリーダーが、メンバーと連絡を密に取りながら、研究課題毎の計画書や報告書の取り纏めを行い、研究課題の実態を把握すると同時に、メンバーとの意思疎通を図っている。

9. 平成29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

派遣先 派遣元	日本 〈人/人日〉	タイ 〈人/人日〉	ドイツ 〈人/人日〉	ベトナム 〈人/人日〉	インドネシア 〈人/人日〉	ラオス 〈人/人日〉	イギリス(日本側) 〈人/人日〉	合計 〈人/人日〉
日本 〈人/人日〉		20/160 (30/200)	6/30 (1/5)	0/0 (2/12)	0/0 (3/20)	1/5 (0/0)	1/6 (0/0)	28/201 (36/237)
タイ 〈人/人日〉	31/940 (10/800)		0/0 (5/20)	0/0 (2/10)	0/0 (2/10)	0/0 (2/10)	0/0 (2/20)	31/940 (23/870)
ドイツ 〈人/人日〉	0/0 (1/7)	0/0 (1/10)		0/0 (1/10)	0/0 (1/10)	0/0 (1/10)	0/0 (0/0)	0/0 (5/47)
ベトナム 〈人/人日〉	7/170 (3/260)	0/0 (5/100)	0/0 (0/0)		0/0 (1/20)	0/0 (1/20)	0/0 (0/0)	7/170 (10/400)
インドネシア 〈人/人日〉	2/40 (2/160)	0/0 (5/25)	0/0 (5/20)	0/0 (2/20)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	2/40 (14/225)
ラオス 〈人/人日〉	1/30 (0/0)	0/0 (5/20)	0/0 (0/0)	0/0 (1/5)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	1/30 (6/25)
イギリス(日本側) 〈人/人日〉	0/0 (0/0)	1/4 (1/4)	1/4 (1/4)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		2/8 (2/8)
合計 〈人/人日〉	41/1180 (16/1227)	21/164 (47/359)	7/34 (12/49)	0/0 (8/57)	0/0 (7/60)	1/5 (4/40)	1/6 (2/20)	71/1389 (96/1812)

※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 (20/40) 〈人/人日〉

10. 平成29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	7,528,000	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	5,078,000	
	謝金	0	
	備品・消耗品購入費	0	
	その他の経費	977,000	
	不課税取引・非課税取引に係る消費税	417,000	非課税等対象額 5,212,500円 内 外国旅費 5,078,000円 内 海外旅行保険 134,500円
	計	14,000,000	研究交流経費配分額以内であること。
業務委託手数料		1,400,000	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		15,400,000	