

**研究拠点形成事業**  
**平成 27 年度 実施報告書**  
 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 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, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, BIOTEC (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology), 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、タイ科学技術研究所、バイオテック、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) ベルリンポイト工科大学  
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 ・ Associate Professor ・ 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  
(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  
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. 研究交流目標

### 5-1. 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。

### 5-2. 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把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。

昨年が続いて、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、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門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。

## 6. 平成27年度研究交流成果

(交流を通じての相手国からの貢献及び相手国への貢献を含めてください。)

### 6-1 研究協力体制の構築状況

コーディネーターは、各研究グループから平成26年12月に研究者交流を含む英文の研究計画書の提出を求め、それに基づいて平成27年度研究計画書を作成し、関連助成機関に提出した。予算確定後、コーディネーター間で調整して研究者交流等の詳細な計画案を策定した。7月29～30日にコンケン(タイ)で開催された第5回国際発酵会議において、本事業に関する分科会を主催し、発酵関連の15題の研究発表を行った。この機会に、組織委員会で平成27年度事業計画を確認するとともに、詳細な計画案を協議し、決定した。8月18日にタイ研究博覧会(バンコク)において、本事業と課題3関連のe-ASIA JRPの合同で分科会を開催した。本事業関連で11題、e-ASIA JRP 関連で4題の発表を行った。同時に、タイ・日本のコーディネーター間で研究交流等について相談した。また、11月12～13日に第2

回サテライトセミナーを開催した。申請計画ではラオスでの開催であったが、ラオスの都合により日本で開催となり、先端的研究を中心とした国際シンポジウムとして実施し、18題の口頭発表と19題のポスター発表を行った。この機会に組織委員会を開催し、平成28年度計画について討議した。また、JSPSから2名の参加をいただき、併せて本事業に関して意見交換を行った。11月に開催した第11回若手研究者セミナー時に、タイ・ベトナムのコーディネーターと本事業について相談した。さらに、タイ側コーディネーターが日本の研究者とともに平成28年3月5～14日にドイツ・イギリスの関連大学を訪問し、組織委員会の協議内容等の説明や本事業に関する意見交換を行うとともに、共同研究の打ち合わせや施設見学等を行った。

## 6-2 学術面の成果

上述のように、本年度計画通りに第2回サテライトセミナー（国際シンポジウム）を開催し、加えて、国際発酵会議とタイ研究博覧会において分科会を開催し、研究成果発表、情報交換及び本事業のアピール（広報）を行った。共同研究については、課題1～5における各小課題の研究成果を以下にまとめて紹介する。

課題1では、1) バイオ燃料を生産する熱帯性真菌の同定、2) ベトナム、ラオス、およびインドネシアから分離したエタノール生産性酵母に関する論文発表、3) アルコール飲料スターターに含まれる微生物叢の解明、4) タイ由来の希少放線菌が生産する新規化合物の構造決定、5) 遺伝子組換えエンドマンナーゼの諸性質の解明、6) タイの発酵食品から乳酸菌群を分離同定、7) パラゴムノキ病原菌に対する拮抗放線菌の分離、8) ポリヒドロキシ酪酸生産菌によるコポリマー生成培養条件の確立、9) *Thermobifida alba* 由来のクチナーゼの特徴解明、10) *Bacillus amyloliquefaciens* の組換えレバナーゼタンパク質の発現に成功、11) *Thermus* sp. 由来アミロマルターゼ遺伝子の組換え発現系の構築、12) *Fusarium* sp. F59 で発現する $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の解明、13) BCG脱色性オリゴ糖を産生する *B. licheniformis* の特徴の解明、14) 耐熱性酵母 *Candida easanensis* の  $\beta$ -グルコシダーゼに関する論文の投稿、15) 醸造酵母における高温および放射線ストレス応答機構の解明と論文発表、16) タイで分離したマリン酵母の培養菌体成分の解明、17) 高温培養下における耐熱性放線菌二次代謝産物パターン変化の発見、などがあげられる。

課題2では、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の完全ゲノム解析とトランスクリプトーム解析の発表が大きな学術的成果といえる。加えて、*K. marxianus* にグルコースと同時に五炭糖を消費させようとする試み（グルコース抑制の解除）の方もゲノムワイドに進められ、順調に成果が上がってきている。今後の応用展開のみならず、グルコース抑制の分子レベルの解明が期待できる。耐熱化育種の方では、エタノール生産性 *Zymomonas* と酢酸菌を用いて関連遺伝子の特定とその機能解析が行われた。単なる関連遺伝子のリスト化に止まらず、表現型の解析や具体的な耐熱化機構の解明への試みが進められた。耐熱性酵母の耐熱性因子を交配育種によって29遺伝子まで絞り込むことができた。酢酸菌においても耐熱性を支配する遺伝子をゲノムワイドに調査した。遺伝子のリスト化から具体的な機能解析へのシフトが期待される。

課題3では、1)日本・フィリピン・タイ・インドネシア・アメリカにおける感染症のネットワークの形成に成功した。2)タイで分離したメタノール資化性微生物の新種を発表した。3)メタノール資化性微生物が利用する栄養源と酵母メタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写制御因子の分子機能を解明した。4) *P. aeruginosa*のクロロアニリンの走化性センサー、*P. fluorescens*のアミノ酸走化性センサーと有機酸走化性センサー、*R. solanacearum*のアミノ酸走化性センサーと有機酸走化性センサーを特定した。このうち有機酸走化性センサーは植物感染に関与していた。5)タイおよびインドネシア人の腸内細菌叢データを得るために、次世代シーケンサーによる大量配列解析を行っている。6)PGA添加によるCd障害イネの生育回復が観察された。7)Cd汚染水田の土壌からPGA分解酵素を生産する優良菌を取得した。8) *Isochysis* sp. 変異株を効率的に選抜することが可能となった。9)バイオインフォマティクスの方法を確立した。10)糸状菌によるパラコートノコギリの最大60%の除去が観察された。植物共生細菌の多様性解析のために、ラベルした株を作製した。11)生物防除資材候補菌株および拮抗される植物病原細菌の分類学的位置付けを明確にした。12)タイにおけるキノコシロアリの論文を作成中である。13)海藻からの多糖の構造に関する有用な知見を得、また脂肪酸組成に関して、新規な結果を得た。14)タイで単離された *Muscodora* がタンジェリンオレンジ貯蔵中の *Penicillium* による劣化を抑制した。

課題4では、18の共同研究により24編の原著論文、19件の国際会議での発表を果たしている。具体的には1)乳酸菌ファージを単離し、これらファージに耐性の乳酸菌の単離に成功した。2)デング熱ワクチン用ハプテン合成にほぼ成功した。3)新奇バクテリオシン生産菌を単離し、乳酸菌の1種であることを明らかにした。4)これまでに開発した土壌最適環境条件を現場で活用する段階に移行させ、畑、水田、果樹園での実地試験を実施した。5)ラウリル硫酸ナトリウム耐性グルカナーゼを単離し、応用への目処をつけた。6)タイ発酵食品製造副産物の新規機能性開発研究を開始した。7, 10, 13)ベンゾニトリル分解菌、トマト根こぶ線虫防除能を有する放線菌、バイオサーファクタント高生産菌を単離した。8)ベトナム伝統発酵食品中の菌のアルコール発酵能を実証した。9)フィルム状ポリ乳酸分解ポリ乳酸分解微生物を確認した。11)マンゴスチンエンドファイトの生理活性代謝産物を精製した。12)デンプン乳酸発酵に群集構造解析手法を応用した。14) *Gluconobacter* による希少糖生産系を開発した。15)耐熱性ランソウから耐熱性フィコシアニン始めて精製した。16)タイ北部森林担子菌から新規抗菌物質の生成分泌を実証した。17)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。18) *Monascus* によるエタノール発酵の最適化が完了した。

課題5では、エタノール発酵に関して、高温発酵と減圧蒸留を組み合わせた新しい技術や、タイの未利用バイオマス資源を活用できる菌株の獲得、さらにはパイロットスケールでの高温発酵の実証の成果が得られた。バイオメタンやバイオ水素の生産においても、前処理や発酵効率の最適化が進んだ。未利用バイオマスからのハイタン生産では、高温安定酵素の生産条件の把握や、前処理により生じる高塩分に耐性をもつ菌を獲得した。糖質関連酵素、リパーゼ、ペクチナーゼなどの有用酵素に関しては、遺伝子のクローニングや特性の解析が進み、高温での高い生産性が明らかになったものもあった。餅麴ルパンと酵母

の混合培養により醸造された複数種類の有色米酒では抗酸化能評価が進んだ。組換え大腸菌を用いた 1-ブタノール生産において、抑制性転写因子を破壊することで大幅に生産性が向上することが明らかになった。これらの成果から計 10 件が論文発表された。なお、1 つの小課題はカウンターパートが留学中のため一時中断している。

### 6-3 若手研究者育成

11 月 18~19 日に第 11 回若手研究者セミナーを山口市で開催した。海外から 6 か国 40 名以上が参加し、日本人学生を含め全体で 100 名を超える若手研究者が参加した。本セミナーは大学院学生が中心となって企画・運営・開催し、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スタイルであり、学会開催のノウハウの取得や海外とのネットワーク形成に繋がるものと期待される。また、山口大学は例年と同様に本事業参加大学と学生の相互派遣を実施し、その機会に学生は派遣先で学科あるいは研究室のセミナーに参加し、英語による研究発表を行った。さらに、本事業関係者による海外若手研究者や留学生の受け入れを、参加大学の奨学金、タイの RGJ、インドネシアの DIKTI 等を利用して積極的に進めた。

その他、特にタイやインドネシアの大学の依頼を受けて、カウンターパートの指導する修士や博士課程学生を Co-Advisor として指導し、あるいは論文の審査委員として博士号を授与した。また、神戸大学および山口大学は、学生の実験技術の向上を目的とし、JST が支援する「日本アジア青少年サイエンス交流事業平成 28 年度さくらサイエンスプラン B コース」に事業計画を申請した。

### 6-4 その他（社会貢献や独自の目的等）

- ・ 特許「耐熱性微生物の作成方法」が公開された（公開特許 2015-057996）。
- ・ 本事業に関する総説等「省エネ型エタノール発酵新技術とセルロース系バイオマス変換基盤技術」（化学工業 66:1-5, 2015）、「耐熱性発酵微生物の耐熱性を賦与する分子機構」（化学と生物, 53 (11): 763-773, 2015）、「High-temperature fermentation technology for low-cost bioethanol」（*J. Jpn. Inst. Energy*, 94:1154-1162, 2015）を発表した。
- ・ SOFIX 分析は、日本、アメリカ、中国、オーストラリアで国際特許を取得し、詳細な土壌診断や有機農法の施肥指導に役立っている。
- ・ 本事業と関連して、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、及び山口大学農学部とメイファールアン大学理学部とで学部間協定を締結した。
- ・ 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した課題 3 関連の e-ASIA JRP 「An integrated research for the development of a scheme to control emerging vector-borne viral diseases in Asia」が採択された。
- ・ 平成 28 年 3 月に山口大学中高温微生物研究センターのセミナー「微生物のロバスト化と発酵未来技術」を企業向け（約 80 名参加）に開催し、これまで開発したエタノール発酵技術を含めて発表した。
- ・ 耐熱性微生物が生産するバイオガスから低コストかつ効率的に二酸化炭素を除去する装

置の開発に関して、山口県の推進する「二酸化炭素の有効活用」に関する研究開発に参画している。

### 6-5 今後の課題・問題点

体制として研究グループの細分化を希望しているところや、交流相手の学科の改築により、研究テーマの一部を変更する必要が出たところがあった。また、来日期間が日本の年度末になると年度で区切りをつけるような研究実施が難しいとの意見や、持ち出しが難しいサンプルがあり日本側での研究の障害になっているとの意見があった。相手国側からの派遣研究員の滞在をもう少し長くすべきとの意見もあった。

その他、個々の小課題で次のような研究上の問題がある。探索が難しい微生物の存在が明らかになり、新たな分離方法の確立が必要になっている。耐熱化株の変異解析とその変異の耐熱化への寄与を明確にするために分子生物学的な手法による研究が必要であるが、想定よりも時間を要すことがわかった。藻類のバイオマス合成の効率的誘導に関して細胞内代謝系の調節を明らかにすることが重要であるが、光条件以外の誘導条件についても多次元で解析が必要である。*S. japonicus* の CoQ10 生合成能力が低下する原因は、試験した範囲では見い出せず、さらなる解析が必要である。PGA によるカドミウム障害イネの生育回復実験をグリーンハウスレベルで成功したが、最終レベルの野外実験は PGA の費用が掛かるため不可能であり、他の方法を考えている。一部の活性細菌が緑膿菌と近似しているため、実用化に向けて別の菌株に集中すべきことが明らかになった。

### 6-6 本研究交流事業により発表された論文等

- (1) 平成27年度に学術雑誌等に発表した論文・著書 31本  
うち、相手国参加研究者との共著 21本
  - (2) 平成27年度の国際会議における発表 61件  
うち、相手国参加研究者との共同発表 24件
  - (3) 平成27年度の国内学会・シポジウム等における発表 48件  
うち、相手国参加研究者との共同発表 13件
- (※ 「本事業名が明記されているもの」を計上・記入してください。)  
(※ 詳細は別紙「論文リスト」に記入してください。)

## 7. 平成27年度研究交流実績状況

### 7-1 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	(和文) 伊藤真一・山口大学農学部・教授				
氏名・所属・職	(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	
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 度の研究 交流活動	<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 7 件の共同研究（小研究課題）を実施した。</p> <p>1. Screening of useful microorganisms          (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>27 年度は、Dr. Sehanat Prasongsuk が日本に滞在し、さらに、Chulalongkorn 大学の費用で、Sehanat 研究室のポスドクも我々の研究室に滞在し、共同研究を進めた。まず、Dr. Sehanat 側から、タイから熱帯性真菌が単離されていたので、そのゲノムからの部分配列を増幅し、遺伝子解析を行い、有用真菌の同定を進めた。さらに、バイオマス分解による増殖が可能な真菌をタイ側で得ており、その有用酵素遺伝子のクローニングできていたので、酵素遺伝子を酵母にクローニングすることを試みた。現在は、その技術をタイで再現しており、順調に成果が出ている。</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>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として、ASEAN の諸国においてエタノール生産性微生物である <i>Zymomonas mobilis</i> 菌株の分離培養を試みた。今年度は、<i>Zymomonas mobilis</i> 菌株を土壌のサンプルより分離培養する際に酵母が優位に生育することから、この酵母との生育の違いを培養方法及び分離方法により実施する方法の検討を試みた。この研究を実施するために、タイ国より Kaewta Sootsuwan 博士を 28 日間受け入れた。</p>	

### 3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析

本共同研究では、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耐熱性酵母を取得することを目的としている。研究活動計画に従って、耐熱性酵母の分離経験が豊富なタイの研究者と協力しながら、ベトナム、ラオスおよびインドネシアのそれぞれ数カ所からサンプリングし、耐熱性酵母の分離を実施した。また、分離株の同定やバイオマスに対する適正等の基礎研究を行った。関係国の研究者や大学院学生の交流も積極的に行った。関係国の研究者とはメールで頻繁に打ち合わせ等を行うと同時に、ベトナム・インドネシアからは研究者が訪れ、共同研究を実施した。また、山口大学の支援を受けたベトナムやインドネシアからの短期留学生と日本の関係研究室の学生との交流も実験等を通じて積極的に行った。

### 4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

タイの各地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 23 種を収集し、そこから直接抽出した DNA を用いて DGGE を行い、各スターターの中に含まれる微生物叢を明らかにした。また、一部のスターターを蒸米に加えてアルコール発酵を行い、その発酵過程における微生物叢の変遷を、次世代シーケンサーを用いて明らかにした。さらに、各種培地を用いてスターター中に含まれる酵母や糸状菌を単離し、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、高いエタノール生産性を示す菌株の同定を行った。また、スターターから単離した酵母よりペントース代謝酵素を精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。マヒドン大学の Pimchai 教授を別経費で受け入れ、共同研究を実施した。また、カウンターパートであるプリンスオブソククラ大学の博士課程学生 4 名を JASSO 奨学金により受け入れ、そのうち 1 名が本実験を担当した。その成果を 11 月に福岡で開催した国際シンポジウムにおいてポスター発表し、また、別の国内学会では口頭発表を行った。日本側の学生 2 名が卒業論文のテーマとして研究を行い、関連する国内学会で口頭発表を行った。

### 5) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

タイの各地で分離された放線菌を対象として、新規生理活性物質の探索研究を行った。カセサート大学 Thamchaipenet 准教授の研究室にて、土壌や植物から分離された一群の放線菌を富山県立大学で確立された培養条件で液体培養を行い、その培養液中に生産される二次代謝物を分析した。HPLC により培養物を分析し、生産物の UV スペクトルを研究室で独自に構築したデータベースを用いて解析した。その結果、*Actinomadura* sp. K4S16 がデータベース中には存在しない未知化合物を生産することが判明したため、

その化合物の同定と生理機能評価を行った。これらの研究経過については随時メールで情報交換し、研究方針を相談しながら進めている。

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ブラの分解

昨年度までに獲得に成功していた遺伝子組換えエンド-マンナーゼ (rManS2) を用いて、詳細な反応特性解析を行った。研究者の交流も積極的に行い、Wasana Sukhumsirichart 氏 (Srinakharinwirot 大学) を 30 日間 (2016 年 3 月 2 日～3 月 31 日) 大阪府立大学に受入れた。また、阪本龍司が Srinakharinwirot 大学にて研究指導を行った (2015 年 8 月 19 日-8 月 22 日)。

7) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

タイ由来発酵食品のうち発酵米麺(Khanom Jeen)および小エビ発酵ペースト(Kapi)より新たに数十株の微生物を分離し、16S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)塩基配列解析により菌種を同定した。その結果、*Lactobacillus* 属および *Weissella* 属をはじめとする乳酸菌群が数多く同定された他、*Bacillus* 属等の好気性芽胞形成菌も単離された。また、昨年度、タイ国由来の淡水魚のなれずし(Pla-som)より分離した菌株を用いて、大腸菌、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、セレウス菌などの食中毒原因菌に対する抗菌活性を調べたところ、一部の菌株について生育阻止円が形成されることを確認した。これらの研究は、タイ側カウンターパート 2 名をそれぞれ 1 か月受け入れた間に行った。今後、抗菌成分について検証する予定である。また、タイ国パヤオ県より得た 7 種の Pla-som について次世代シーケンサー Illumina Miseq を用いた菌叢解析を行ったところ、日本のなれずしと同様、*Lactobacillus* 属をはじめとする乳酸菌群が菌叢の大部分を占めることが明らかとなった。菌叢解析は日本側研究者が行い、電子メールにてタイ側と情報共有している。

8) ポリヒドロキシ酪酸生産菌の単離と解析

8 月 17 日から 22 日までタイに滞在し、タイ側研究者である Pichapak Sriyapai 博士と共同研究を行った。培養法の検討を行い、糖を炭素源として有機酸を添加することで、ポリヒドロキシ酪酸の構造が変化し、3-ヒドロキシペンタン酸とのコポリマーとなることを見出した。また、2016 年 3 月 1 日から 3 月 30 日までタイ側研究者である Pichapak Sriyapai 博士と修士課程の学生 Thitima Chuarung 氏が来日し、8 月以降に新たに単離したポリヒドロキシ酪酸生産菌の培養と、ポリヒドロキシ酪酸の抽出と解析を行った。はじめに、グルコースを炭素源として培養した結果、ポリヒドロキシ酪酸の生産性が非常に悪く、ポリマーの抽出が出来なかったため、これまでの検

討で、ポリヒドロキシ酪酸の生産が認められた廃糖蜜を用いて培養を行った。培養液からポリマーをクロロホルム抽出し、蒸発乾固することで、フィルム上の抽出物を得ることが出来た。今後、静岡大学にて NMR による構造解析と GPC カラムによる分子量の分析を行う予定である。

#### 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

タイ側研究者である Dr. Sunpapao (Prince of Songkla University) が 7 月に来日し、山口大の日本側研究者および修士課程学生と 30 日間の共同研究を実施した。今回の研究では、Dr. Sunpapao がタイにおいて分離したアブラヤシ、パラゴムノキ、および野菜類の病原菌候補 8 菌株の分子遺伝学的同定を行うとともに、同じくタイで分離された未同定の放線菌 10 菌株の抗菌活性を調べた。

## 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ピレスロイド系農薬分解への応用

クチナーゼ Est1 の詳しい解析結果を進め、ポリエステルのモデル化合物を用いて分解産物の解析を行った。その結果、本酵素が PET 構造を認識していることを確認したので、例えばポリエステル繊維の表面加工やポリエステルフィルムの凹凸化には有用であると思われる。この結果は、河合が 2015FerVAAP(July 29-31, Kohn Kaen, Thailand に invited speaker として派遣された時に発表した。他方、Dr. U. Thumarat を京都工芸繊維大学に受け入れ(2月26日-3月27日)、滞在中に遺伝子組換え Ca119 の発現を確認し、その精製酵素を用いて基本的な酵素特性を解析した。また、精製酵素の凍結乾燥物を作成し、タイに持ち帰ってさらに必要な解析を進めることとした。連絡は主にメールを通じて行ったが、格段の支障はなかった。

### 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. amyloliquefaciens* におけるレバナーゼの発現を解析するとともに同菌のレバナーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列の解析を行うとともに、本遺伝子の発現系の構築を行った。また、*Thermus* sp. 由来アミロマルターゼ遺伝子のシャトルベクターを用いた組換え発現系の構築を行った。さらに、*Fusarium* sp. F59 から 3 種の  $\alpha$ -グルコシダーゼおよび 2 種のグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定した。またこれらの遺伝子の発現を RT-PCR で調べた。また、BCG を脱色

するオリゴ糖を産生する 5 株の土壌細菌を同定し、目的オリゴ糖を生成できる粗酵素液をカラムクロマトグラフィーに供し、分画したフラクションの活性を調べることによって目的酵素の種類を解析した。タイ国研究者と電子メールで情報交換を行うとともに、Dr. Kamontip Kuttiyawong と Dr. Kuakarun Krusong の 2 名を受け入れ、研究交流を行った。

### 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

タイで単離された耐熱性酵母 *C. easanensis* strain JK-8 が生産する  $\beta$ -グルコシダーゼの諸性質は既に明らかとしたが、他の酵素と比べ優れた性質を有するかを調べるために、Dr. Jantaporn Thongekkaew を 11 月 11 日—12 月 18 日受け入れ、各種基質を用いた活性測定および、 $\beta$ -グルコシダーゼ利用で問題となる活性発現に対するグルコース耐性を調べた。さらに、遺伝子クローニングのために必要な情報を取得するため、精製酵素の N 末端配列を調べ、既知の酵素と比較した。その他、*C. easanensis* strain JK-8 の新たな産業利用についての検討を行った。また、Dr Jantaporn は、滞在中に山口市で開催された YSS において Invited Speaker として口頭発表するとともに多くの若手研究者とも交流した。

### 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

耐熱性酵母について高温条件下と放射線曝露条件下での細胞内抗酸化物質と抗酸化酵素について解析した。また醸造酵母のそれらと同条件で比較し、細胞内酸化度の違いについて明らかにした。しかし、重金属ストレスについては醸造酵母において先行的に解析できたものの、耐熱性酵母については解析できなかった。岸田が 7 月にコンケン(タイ)で開催された Fer.VAAP に参加し、カウンターパートである Dr.Vichai と研究討議するとともに、Dr. Vichai の学生を研究指導した。

### 5) 高付加価値物質を生産する酵母の遺伝子工学的開発

*Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子組換え技術の習得を進めた。有用遺伝子などの酵母への導入、および発現を試している。技術的な研修は、26 年度に Chulee 研究室のドクターコース学生が日本に滞在し、様々な酵母における遺伝子操作技術を習得した。この技術を元に、タイと日本における有用遺伝子を準備し、酵母による生産を試みる予定である。そのため頻繁にメールをやり取りしている。

### 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

	<p>海洋の動物性プランクトンや甲殻類幼生の安価な栄養源としてマリン酵母を有効利用することを目的とし、2種のマリン酵母 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ASI-8 と <i>Pichia jadinii</i> BS6-2 を4種の培地に生育させ、酵母の成分分析を行なった。乾燥酵母菌体についてタンパク質、脂質、灰分の分析を行なった。本年度は、それぞれの大学への訪問および招聘はなかった。交流としては、主にメールのやり取りによるディスカッションを行った。そのため、マリン酵母を用いた発酵試験は行っていない。</p> <p>7) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>新しい疾患治療シーズを見出すためには、如何にユニークな化学構造や活性を豊富に含む探索源を準備できるかが重要となる。これまでも放線菌の二次代謝産物は薬の探索源として重宝されてきたが、近年では新規化合物の発見が難しくなりその限界が囁かれている。我々は、放線菌を高温で培養すれば放線菌内の一次代謝が変動し、その結果として二次代謝産物も大きく変動する、すなわちこれまでになかったユニークな化学構造や活性を有する二次代謝産物が得られることが期待できると考えた。今年度は、当研究室が保有する、放線菌より高温（45℃）でも成育が可能な耐熱性放線菌を、Dr. Ramida が2016年2月19日-3月20日に来日してスクリーニングした。</p>
<p>27年度の研究交流活動から得られた成果</p>	<p>1. Screening useful microorganisms (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>熱帯性真菌の同定のためのPCR合成に成功し、シークエンスを進め、菌株同定ができた。また、酵母への遺伝子クローニング法を試し、いくつかのクローンを日本で得た。同じ方法でのクローニングをタイでもできるように方法の確立を進めている。この酵素が酵母菌で発現できるようになればバイオマス分解酵素を生産できる酵母菌株の育種ができるので、重要な成果となる。また、現在一連の成果を論文にするべく準備を進めているところである。</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>今年度を実施した菌株単離試験において、土壌サンプルからの有用な <i>Zymomonas</i> 菌株は得られていない。また、抗生物質の添加や培養時の酸素濃度の違いによる酵母と <i>Zymomonas</i> 菌の分離試験を試みたが、これらの方法の <i>Zymomonas</i> 菌分離における有効性は明確には示されなかった。ただ、<i>Zymomonas</i> 菌の分離方法の開発は欠かせない技術であることから、来年度も継続して検討を実施していきたい。</p>

### 3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析

ベトナム、ラオスおよびインドネシアにおいて、それぞれ数カ所の地域からサンプルを採取し、それぞれのサンプルから多くの耐熱性酵母を分離した。分離酵母について MALDI-TOF/MS によって主にリボゾームタンパク質の質量の比較から種の同定を迅速に行うと同時に、必要に応じて 26S rDNA の塩基配列を決定した。さらに、ラオスからの分離株についてはモラセスやサトウキビ搾り汁などを原料として高温での生育及びエタノール生産性の比較を行い、論文発表を行った。また、その中の1つが高温等のストレスに強く、キシロースからのエタノール生産性が高いことが分かり、論文として発表した。

### 4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

アルコール飲料の生産に用いられているスターターに含まれる細菌、酵母、糸状菌の微生物叢を培養に依存しない方法で明らかにすることができた。また、各種糖源からのエタノール生産が可能な糸状菌を単離し、そのアルコール生産性を明らかにした。

### 5) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

タイのノンタブリー地方の水田の泥から分離された希少放線菌 *Actinomadura* sp. K4S16 から二種類の新規化合物を単離、構造決定した。得られた化合物は、3個のエーテル環を含むポリエーテル系抗生物質に属し、分子末端にはテトロン酸構造を有していた。2種類の化合物の一方が結晶として得られたため、X線結晶解析により全立体配置を決定することができた。いずれの化合物も黄色ブドウ球菌などの病原細菌に極めて強力な抗菌活性を示した。加えて、血管新生の抑制、オートファジーの促進など興味深い活性が見られた。

### 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ブラの分解

遺伝子組換えエンド-マンナーゼ (rManS2) は、直鎖マンナンから反応最終産物としてマンノース (Man)、マンノビオース (Man2)、マンノトリオースを生成した。本酵素はコンニャクグルコマンナンを最適の基質とするが、その主要反応産物を単離して構造解析を行った結果、グルコシル Man2 およびセロビオシル Man2 であることが判明した。すなわち、本酵素は Man-Man 間だけでなく、Man-グルコース間のグリコシド結合を加水分解できることが明らかとなった。また、本酵素はガラクトマンナンにも活性を示し、主要産物としてガラクトマンノオリゴ糖を蓄積した。また、酵素

活性はガラクトース側鎖により著しく妨害されることを明らかにした。

#### 7) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

タイ由来の発酵食品から乳酸菌群を単離同定し、一部については、食中毒菌に対する生育阻害活性を検出した。今後、これらの菌株について分子レベルでの解析を行うことにより、発酵スターターとしての利用や抗菌性物質の分離同定、有用酵素遺伝子の単離などに繋がると考えられる。

#### 8) ポリヒドロキシ酪酸生産菌の単離と解析

種々の培養条件検討し、ポリヒドロキシ酪酸の生産と、コポリマーの生産に関して解析を行った。その結果、廃糖蜜を炭素源として有機酸を添加することで、ポリヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシペンタン酸とのコポリマーが生成することを見出した。構造に関しては、今後静岡大学にて解析を行う予定である。

#### 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

病原菌候補 8 菌株について、ITS 領域の塩基配列に基づいて分子遺伝学的同定を行った結果、パラゴムノキ落葉病罹病個体から分離された菌がこれまで病原菌として未記載の *Phyllum* 属もしくは *Phytophythium* 属の菌であることがわかった。ITS 領域の塩基配列に基づいて分子系統を作成したところ、本菌は *Phytophythium* 属と同じクレードに属したことから、*Phytophythium* 属菌であることが強く示唆された。また、放線菌 10 菌株の抗菌スペクトルを調べた結果、アブラヤシおよびパラゴムノキの重要病害の原因菌に対して強い抗菌活性を示す株（2 菌株）が見いだされたことから、これら 2 菌株を有用微生物候補とした。本年度の活動により、研究のターゲットとなる病害（アブラヤシ斑葉病、パラゴムノキ落葉病および腐敗病）がほぼ特定され、これを抑制する有用微生物候補を選抜することができた。

## 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ピレスロイド系農薬分解への応用

クチナーゼ Est1 はタンデムな酵素 Est119 よりも高い活性を有していることを確認することができ、ポリエステル分解に関する生化学的な知見を得ることができた。また、PET 等に対する幅広い分解可能性を確認したので、耐熱性酵素としての利用可能性を示唆することができた。成果は *J. Biosci. Biotechnool.*にて公表した。他方、Est1 と Ca119 の推定構造比較を行ったので、生化学的な基礎知見と合わせて今後の研究に生かしたい。

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。

*B. amyloliquefaciens* がレバン存在下でレバン分解活性を示すことを明らかにした。そして、同菌のレバナーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにした。また、本レバナーゼ遺伝子の発現系を構築し、組換えレバナーゼタンパク質の発現に成功した。さらに、*Thermus* sp. 由来アミロマルターゼ遺伝子のシャトルベクターを用いた組換え発現系を構築した。また、*Fusarium* sp. F59 において見出した $\alpha$ -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼ遺伝子の中で、少なくとも 2 種の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子が発現していることを明らかにした。また BCG を脱色するオリゴ糖を産生する 5 種類の微生物が、いずれも *B. licheniformis* であると同定し、目的オリゴ糖を生成する酵素が blanching enzyme 様活性を有する酵素であることを明らかにした。さらに BCG を脱色する目的オリゴ糖は、23~37 の重合度をもつ多糖であることを見出した。

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

*C. easanensis* strain JK-8 $\beta$ -グルコシダーゼは、グルコース耐性を示すこと、ラミナリンに対する活性が高いことを示した。これら本酵素の特徴をまとめ、現在、報文を投稿中である。また、精製酵素の N 末端配列から、BLAST 解析により、*Candida Albicans*、*Candida maltosa*、*Meyerozyma guilliermondii*、*Wickerhamomyces ciferrii* 由来の各種酵素とホモロジーがあることを示した。今後、これらのコンセンサス配列を利用して、目的酵素の遺伝子の取得を行う予定である。

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

醸造酵母においては高温および放射線ストレス時に活性酸素種の発生と抗酸化系の活性化によるそれらの除去機構が存在することが解明でき、論文発表を行った。一方、耐熱性酵母についても高温および放射線ストレスによる細胞内の酸化が醸造酵母ほどではないことを示し、学会発表した。また醸造酵母の重金属に対する応答の一端を国際会議で発表できた。これらのことから耐熱性酵母のストレス応答における細胞内酸化についての一端が明らかにできた。

5) 高付加価値物質を生産する酵母の遺伝子工学的開発

酵母への有用遺伝子の導入方法や遺伝子発現技術を習得できた。次に、

	<p>生産や利用する対象となる酵素の探索、または、その決定が進んでいない。タイ側で対象としたい酵素が遺伝子操作的な開発において、かなり難しい状況になり、開発対象とする遺伝子を取得できないので、その後の研究が進展していない。開発対象とする遺伝子やタンパク質を変えるか、広げる必要があるが、タイ側との共同研究の方向性の議論が必要である。</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>Potato dextrose broth、Czapek-Dox、Corn meal、Lentil meal 培地に、マリン酵母 AS1-8、BS6-2 を生育させ、培養した菌体を回収し成分分析を行なった。乾燥菌体中のタンパク質はマリン酵母 AS1-8、BS6-2 いずれにおいても Lentil meal 培地を用いたものが高かった。それぞれ、タンパク質含量は約 50%と約 42%であった。脂質含量は、AS1-8 では Corn meal 培地、BS6-2 では Lentil meal 培地を用いたものが高かった。これまで付加価値のある DHA や EPA の蓄積は観察されなかったが、DHA や EPA を多く含む酵母の培養が可能になれば、プランクトンや甲殻類幼生のエサとして有用性が増すと思われる。</p> <p>7) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>現在までに約 100 株の放線菌についてスクリーニングが終了した。その結果、耐熱性放線菌 2 株を見出した。そしてこの 2 株について常温培養時と高温培養時での二次代謝産物を LC-MS で比較解析したところ、1 株で明らかに二次代謝産物に変化していた。現在は、高温で培養した時の二次代謝産物についてその構造等を詳細に解析しているところである。今後は、テストしていない放線菌がまだ数千株残っているので、耐熱性放線菌のスクリーニングを継続し、やはり二次代謝産物の比較解析をおこなう。そしてそれを探索源に、これまでに構築してきた疾患モデル評価系で治療薬シーズをスクリーニングする計画である。</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				
	(英文) Genome-based Research on Thermotolerant Microbes				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 薬師寿治・山口大学・准教授				
	(英文) Toshiharu YAKUSHI・Yamaguchi University・Associate Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Pornthap THANONKEO・Khon Kaen University・Associate Professor				
	Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer				

	Somchanh BOUNPHANMY ・National University of Laos ・Associate Professor	
参加者数	日本側参加者数	16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
	( ドイツ ) 側参加者数	1名
27度の研究交流活動	<p>本研究課題において、以下の8件の共同研究（小研究課題）を実施した。</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  本共同研究では、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し、耐熱性やエタノール生産性等の生理的特性、地理的分布の把握や耐熱性を含むストレス耐性やその分子機構等の解析を行う。研究活動計画に従って、それぞれの国から耐熱性酵母の分離を行った。また、これまで分離した耐熱性酵母についてストレス耐性化を行った。カセサート大学の講師 Noppon Lertwattanasakul 博士が1ヶ月滞在し、耐熱性酵母の代謝に関する解析を行った。ラオス国立大学の講師 Chansom Keo-oudone 氏が来学し、本学主催の若手セミナーに参加した。カントー大学の准教授 Ngo Thi Phuong Dung 博士が1ヶ月滞在し、若手セミナーに参加したほか、高温エタノール発酵を目指した優れた耐熱性酵母（酢酸菌も同時に）の分離と解析を行った。ブラビジャヤ大学・講師 Suprayogi 氏が来学し、別予算で5ヶ月滞在し、セルロース系バイオマス利用を目指した耐熱性酵母変異株の分離と解析を行った。</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  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。今年度は、これまでに得られた耐熱性菌株を用いて、適応育種を用いることにより耐熱株の取得を試みた。そして、得られた菌株のゲノムを解析し、さらには変異箇所の耐熱化への関与を試みた。タイ TRJ 奨学金によりコンケン大学の博士学生を研究室に半年間受け入れ、共同研究を実施した。タイ国で開催された FerVAAP (2015/7/29-31) にて高坂が研究発表を行った。</p> <p>3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発</p>	

① ベトナムで分離された *Acetobacter* 属菌株の系統解析及び生理学的解析を引き続き進めた。② タイで分離された *Gluconacetobacter* および *Komagataeibacter* 属菌株の酢酸発酵特性及び菌膜生成能の解析を行うとともに、それらの株の代表株についてゲノム解析を行った。③ *Komagataeibacter* 属菌株の耐熱化育種を進め、高温適応変異株を取得するとともに、そのゲノム解析を行った。④ 耐熱性酢酸菌 *A. pasteurianus* から得られた耐熱化株 TH-3 の変異遺伝子解析および発現解析を進め、耐熱化機構解明に向けた研究を進めている。⑤ *Komagataeibacter* 属菌のプラスミッドの分離および酢酸発酵時の安定性を検討するとともに、そのベクターとしての有用性を明らかにした。さらに、本菌のアセトイン生成能増大変異株を作製し、その発酵液がショウジョウバエの誘因効果が大きいことを明らかにした。Phong Xuan Huynn 氏 (ベトナム) を受け入れ、共同研究を実施した。

#### 4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵

1) タイで分離されたコリネ型細菌 PP25、PP80、CS176、I2L 及び N24 株の系統解析につづいて、これらのゲノム解析を行った。また、新たに N24 株とともに PP80 株が 41°C 以上での高温生育能を有することが明らかとなった。N24 株については、その耐熱化育種を行い、42°C で生育可能な FT-1 株を取得し、そのゲノム解析も行った。加えて、これらの株はペニシリン添加によって従来のグルタミン酸生産株と同等のグルタミン生産が可能であることも明らかとなった。2) コリネ型細菌 KY9714 株において、SOD およびカタラーゼの破壊及び高発現株を作製し、両酵素ともその高温生育に重要であることを明らかにした。3) コリネ型細菌すべての菌株において、高濃度の K<sup>+</sup>イオンを培地中に添加することによって高温での生育が著しく促進されることが明らかとなった。スラナリー工科大学の Nawarat Nantapong 博士を受け入れ、共同研究を実施した。

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

*Gluconobacter frateurii* CHM43 株について、これまでに取得していた変異剤誘発やトランスポゾン挿入による耐熱化変異株の変異箇所を次世代シーケンサーでゲノムワイドに解析した。また、ノンカイ (タイ) の発酵飲料から高温で高濃度の酢酸を生産できる耐熱性酢酸菌の単離を試みた。コロニー形状の違いから、細胞に結合して菌膜形成に関与する多糖 (CPS) が異なっていることが予想された。タイ・コンケン大学の Wichai Soemphol 博士を 8 月 15 日から 9 月 15 日の間、CCP 派遣研究者と

して受け入れ、*Acetobacter tropicalis* SKU1100 の耐熱性に関わる遺伝子の同定を試みた。滞在中に 2-3R 株を含めた単離株複数株の同定と分類を行った。外山が別経費でタイ・コンケンで開催された FerVAAP2015 に参加、発表した。

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

タンパク質の熱安定性がどのように決まるのかを調べる目的で、機能不全により増殖ができなくなる必須遺伝子に注目し、それを温度感受性に変換する変異を作製する技術の開発を目指した。耐熱性酵母 *K. marxianus* の耐熱性に寄与する遺伝子の同定を交配とゲノム解析から進めており、*K. marxianus* の耐熱性の異なる 2 株の交配を 7 回行った株のドラフトゲノム解析を行った。今年度は派遣・受入がなかったため、Kamonchai Cha-aim 博士（タイ）とメールで実験結果のやり取りを行った。

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

*Cyanidioschyzon merolae* でバイオマス（脂質）合成が誘導される単色赤色光を照射し、経時的にサンプリングしてトランスクリプトーム解析を行ったところ、転写産物量が増減する遺伝子のプロファイルを得ることが出来た。共同研究カウンターパートの選定を電子メールで行った。

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

これまでに耐熱性のある分裂酵母の *S. japonicus* のエタノール生産性と CoQ10 について調べてきた。本年度は、分裂酵母の *S. japonicus* より CoQ10 合成に関わる遺伝子の機能を解析した。また、*S. japonicus* によるエタノール生産性の各種温度による違いを調べた。共同研究カウンターパートの選定を電子メールで行った。

<p>27年度の研究 交流活動から得 られた成果</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  バイオマスからのバイオ燃料生産を目指して、関係国において耐熱性酵母を取得し、耐熱性やエタノール生産性等、耐熱性を含むストレス耐性等やそれらの分子機構の研究を進めた。特に、耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> の完全ゲノム解析と4条件でのトランスクリプトーム解析を終了し、論文発表を行った。また、2-デオキシグルコースを用いて、同酵母を親株としてグルコース存在下でキシロース資化性が向上した株を取得し、その解析結果を発表した。さらに、kanMX4 導入によって2-デオキシグルコース変異株を分離し、その解析からグルコース取り込み異化に係る可能性のある遺伝子を複数見出した。これらの遺伝子については、今後、詳細な機能解析を進める。</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  高温適応育種によりタイ国で得られた CP4 株由来の対熱化株 2 株について、シーケンサーによるゲノム解析及びダイレクトシーケンスによる変異の特定を行ったところ、4箇所の特異的な変異を確認した。また、昨年度取得した対熱化株において特定されていた、DNA ポリメラーゼをコードする <i>rpoB</i> の変異を親株に移し、その耐熱性を解析したところ、この変異による対熱化が確認された。これらの成果の一部は、学会にて発表を行うとともに論文として報告した。</p> <p>3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発  耐熱性酢酸菌株を取得することができ、それらの耐熱化機構の理解を前進させることができた。一方、高温酢酸発酵に有用な菌株を育種することができ、それを用いた高温酢酸発酵系の開発への足がかりを築いた。<i>Komagataeibacter</i> 属菌を遺伝子工学的に代謝改変し、ハエ除去トラップへの利用に関する開発を行った。</p> <p>4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵  新規な5株の耐熱性グルタミン酸生産菌を分離するとともに、通常株と耐熱化株それぞれ1株から耐熱化株を取得した。これら全菌株のゲノム解析を行った。また、コリネ型細菌による高温発酵において、SOD およびカタラーゼによる活性酸素種除去と高濃度 K<sup>+</sup>イオンの添加が有効であることが明らかとなった。</p> <p>5) 耐熱性 <i>Gluconobacter</i> の耐熱性機構の解析とその応用  <i>G. frateurii</i> CHM43 株の耐熱化変異株の変異解析の結果、特定の遺伝子に</p>
--------------------------------------	---

変異を見いだした。また、*A. tropicalis* SKU1100 株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。他方、これまでに報告されているものの中で、最も高温で安定に酢酸発酵を行う *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新しく見いだした。その中の一つである 2-3R 株は最も高い酢酸生産能力を示した。2-3R 株を含めた単離株複数株について、*A. pasteurianus* であることを 16S rDNA の塩基配列により確認、2-3R 株の酢酸耐性の確認と多糖成分の抽出・精製、等を行った。

また、*Acetobacter tropicalis* SKU1100 の耐熱性に関わる遺伝子として同定された Zn 依存性プロテアーゼの遺伝子について、その過剰発現株が、グルコースを含む培地では高温での生育がよくなるが、グルコースを含まない培地では効果がほとんど見られないことが確認された。

#### 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

必須遺伝子の変異を得る方法は、今まで複雑な方法しかなかった。今回、遺伝子置換によりダイレクトに一度の操作で必須遺伝子の温度感受性変異を取得する方法を開発した。これにより、熱感受性となるタンパク質を作成でき、これにより、今後、タンパク質の熱安定性を決めるしくみを解析できる。交配株のドラフトゲノム解析からは、耐熱性遺伝子が存在していると強く考えられる 4 つの領域が明らかになった。これらの領域には 29 の遺伝子が存在しており、これらの内 1 つまたは複数が耐熱性に重要な働きをしていると期待される。

#### 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

想定していた結果と異なり、脂質合成系の代謝遺伝子の転写産物の有意な増加は認められなかった。従って、脂質合成系の活性化は、転写レベルではない次元で調節されている可能性が示唆された。脂質合成系以外の代謝系遺伝子の転写産物量の変化が認められたことから、代謝ネットワークの総体としてバイオマス合成の仕組みを検討する必要性が明らかとなった。

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

本年度は、これまで問題となってきた 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すると同時に、その際のエタノールの生産性の変化を調べた。その結果、CoQ10 合成に関わる側鎖合成酵素の遺伝子と側鎖転移酵素の遺伝子は機能していることを認めた。また、高温でのエタノール生産性を示し、高温でのエタノール生産の可能性を示した。

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・Joint Faculty of Veterinary Medicine・Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Sunee NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
参加者数	日本側参加者数	25 名			
	(タイ) 側参加者数	22 名			
	(ベトナム) 側参加者数	1 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 度の研究交流活動	<p>平成 27 年度は以下の 13 の小研究課題を実施した。なお、計画書にあった「アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓」は課題 1 にも登録されており、重複を避けるため、報告書では課題 1 にのみ記載した。</p> <p>1) アジアにおける感染症の疫学的解析 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した。1)E-Asia プロジェクトと共催で TRE にてシンポジウムを開催した。2)E-Asia プロジェクトでタイ、インドネシア、フィリピン、アメリカから参加してキックオフミーティングを実施した。3) 中高温微生物センターの支援で、タイから研究員を招聘し、感染症に関する共同研究を行った。4)ベトナムにおけるイヌの下痢症の原因を究明した。5)フィリピン、タイ、インドネシアに赴き節足動物媒介感染症の調査を開始した。6)インドネシア・タイ・フィリピンにおけるコウモリの感染症の調査を継続している。</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 タイの植物試料から分離した微生物について、系統分類学的解析を行った。メタノール資化性微生物の葉上生育に関する因子を解析するとともに、いくつかの植物を対象として生長促進効果を評価した。またメタノール資化性酵母による有用タンパク質生産に関して、メタノール誘導性遺伝子発現に関する転写制御因子の機能解析を行った。研究交流に関しては、論文投稿や研究内容に関してメールによる討論</p>				

を行った。また、関連する国際会議（イタリア、タイ）に双方から参加した際に、研究の進捗状況や今後の進め方について議論した。

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

研究に関しては、*P. aeruginosa*のクロロアニリン走化性センサーの特定を行った。また*P. fluorescens*および*R. solanacearum*の植物関連物質（アミノ酸、有機酸）の感知に関わる走化性センサーの特定を行った。研究交流に関しては、Alisa Vangnai研究室の博士課程の学生、Ms. Dojduan Sompornpalinを2015年10～12月の2か月間受入れ、クロロアニリン走化性センサーに関する研究を指導した。2015年8月17日に開催されたThailand Research EXPOのシンポジウムに参加し、研究成果を発表した。また、EXPOの前日、ついで2015年11月にもAlisa Vangnai研究室を訪問し、研究討論を行うとともに、学生の研究指導を行った。

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

1)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。特に、バンコクやその近隣の都市部に住む児童はBBタイプが多く、コンケンなどの地方都市の児童はPタイプを主体としている。このように同一国家において、相異なる腸内フローラタイプが共存するタイは、PタイプとBBタイプを誘導する因子についての研究を行うのに適したコホートである。そこで2015年度は、タイの児童の腸内細菌叢をさらに詳細に調査する同時に、食生活についての詳細な調査を行うことにした。具体的には、Dr. Sunee Nitisinpraser および Dr. Massalin Nakphaichit らのグループの協力の下に、バンコクとベルラム（コンケンと同じような食習慣を有する地方都市）に住む児童それぞれ20名を対象に、糞便のサンプリングと食餌調査を行った。2)当初の計画を変更して、*Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 に変えて、同じくプロバイオティクス候補株 *Lactococcus lactis* KAFFL1-4の *in vitro* gut modelを用いたプロバイオティク効果の検証を行った。具体的には、ヒト腸管細菌コミュニティをフラスコチャンバー内に再現させた *in vitro* gut modelにて、KAFFL1-4株の腸内細菌叢全体へ与える影響と、抗バンコマイシン耐性腸球菌活性を検証した。

3) *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 はすでに鶏飼育用プロバイオティクスとして実績のある株である。ここでは、KUB-AC5 を実際に鶏に投与試験し、腸内フローラの変化をモニターするとともに、宿主の変化も詳細に観察した。

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

本年度の研究概要と活動計画に基づいて、① 今年度の上半期は、納豆菌(PGA生産菌)によるカドミウム(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った。② ガンマポリグルタミン酸(PGA)によるCd障害イネの生育回復は、イネの根に生息する根粒菌(リゾビウム菌)の関与が考えられた。Cd汚染水田から根粒菌を分離し、PGA分解酵素を生産する根粒菌を単離する。単離した根粒菌のPGA分解酵素を分離、精製してその特性を明らかにする。タイ側カウンターパートの Orawan Chunchachart (カセサート大学講師)は、2015年9月から10月の1ヶ月間、静岡大学農学部滞在中、上記の研究活動を行うと共に、投稿論文について検討を重ねた。

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

藻類によるEPA生産実用化を目指した熱帯性緑藻株 *Isochysis* sp. への変異導入方法として重イオンビーム処理を考えていたが、諸事情により断念せざるを得なくなった。そこで基本に立ち返って、古典的な変異処理による緑藻株への変異導入を検討することにした。変異株の選抜において、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変異株の選抜効率の大幅な向上が期待できるため、カセサート大Chonudomkul講師に来日、本学滞在中、我々の指導の下、当該アッセイ法の習熟をしてもらった。

7) 大量並列DNAシーケンス

Dr. Suwatが平成28年度に来研することになったため、目的サンプルのDNAシーケンス解析は今年度には行っていない。その準備として、研究室におけるDNAシーケンサーMiSeqを用いて、環境由来のDNAシーケンス、リボソームRNA遺伝子を指標とした真核生物および原核生物の微生物群相解析、および微生物由来のRNAシーケンス解析を行った。

8) 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

タイ北部のグラモキソン（パラコート）を使用している複数のゴム園から土壌をサンプリングし、微生物の単離を行った。これらの中で、パラコート分解能を持つ菌について1次スクリーニング、2次スクリーニングを行い、最終的にバクテリア7種、糸状菌12種を単離した。平成28年3月には、Dr. Pairote Wongputtisin 氏が京都大学を訪問し、バクテリアについては16S rDNA、糸状菌についてはITS配列のPCR増幅とクローニングを行った。さらに、これらの微生物によるパラコートの分解能についてHPLCを用いた予備的な評価を行った。

9)植物共生細菌の多様性解析とその応用

タイプ6分泌機構により細菌細胞同士の殺傷は、それぞれの菌を特異的にラベルする必要があるため、*Methylobacterium*属細菌のいくつかの基準株について、リファンピシン耐性とカナマイシン耐性株を作製した。今年度はカウンターパートがないため、興味を共有できるカウンターパートを探しながら共同研究の準備を行っている。

10)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

平成27年11月～12月にSupot Kasem博士が来日して静岡市に滞在し、静岡大学で生物防除資材候補菌株および拮抗される植物病原細菌の分類学的位置付けや細菌学的性状の調査等の共同研究を行った。

11)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

タイにおけるキノコシロアリの概説の論文を作成中である。そのために、タイなど熱帯地域の森林局等に対し、メールで関連情報について問い合わせた。また、シロアリの分類が可能な研究者を育成するために、マレーシア・サラワク州森林局において森林局研究者およびスタッフに対して調査手法およびシロアリ同定のレクチャーおよびトレーニングを行った。

12)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

平成27年8月に1ヶ月間、修士学生Anucha Intana（タイ、カセサート大学）を受け入れ、海藻の多糖の構造解析を行った。また、平成28年2月に1ヶ月間、講師Jantana Praiboon（タイ、カセサート大学）を受け入れ、微生物からの色素の分析ならびに海藻の脂肪酸組成の分析を行った。

	<p>13)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</p> <p>タイで単離された<i>Muscodor suthepensis</i> strain CMU-Cib462のタンジェリンオレンジ貯蔵中の<i>Penicillium digitatum</i>による劣化を抑制する能力について検討した。この間、11月に松井がメーファンラン大学(タイ)に招待され滞在した際、Saisamorn教授が同大学を訪問し、研究計画を詳細に議論した。その結果、2016年度にSaisamorn教授の研究室から2名の博士研究員を山口大学に派遣し、研究を強力に推進することが決定された。</p>
<p>27年度の研究 交流活動から得 られた成果</p>	<p>1) アジアにおける感染症の疫学的解析</p> <p>1)タイのイヌで29.7%のJEV、0.5%のランガットウイルス、2.2%のE型肝炎ウイルス、3.1%のSFTSV、0.4%のH1インフルエンザウイルスの感染を証明した。2)タイの牛に咬着していたマダニよりLangatウイルスの検出に成功した。3)タイ・インドネシア・フィリピンで蚊とマダニの捕集方法を一致され、今後の捕集計画を作った。4)ベトナムのII型犬コロナウイルスの遺伝子解析において、一部の遺伝子がin vitroで必要ないことが明らかとなった。また、弱毒化についても証明できた。5)フィリピンのコウモリには狂犬病ウイルスに対する抗体はほとんど存在しないことが確認された。6)日本、フィリピン、タイ、インドネシア、アメリカにおける節足動物媒介感染症のネットワークの形成に成功した。</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</p> <p>タイ側で分離した菌株を<i>Roseomonas</i>属の新種として論文発表した。日本側では、メタノール資化性微生物が様上で利用する栄養源(窒素源やビタミン)を明らかにするとともに、酵母メタノール誘導性遺伝子発現を制御する転写制御因子CbHap3pの分子機能を明らかにした。</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><i>P. aeruginosa</i>のリン酸走化性センサーCtpLがクロロアニリンの走化性センサーであることを特定した。またCtpLのリン酸感知にはペリプラズムリン酸結合蛋白質が必要であるが、クロロアニリンの感知には必要ないことを見出した。<i>P. fluorescens</i>の3つのアミノ酸走化性センサー、2つの有機酸走化性センサーを特定した。また<i>R. solanacearum</i>ではアミノ酸走化性センサーと有機酸走化性センサーをそれぞれ1つずつ特定した。このうち有機酸走化性センサーは<i>R. solanacearum</i>の植物感</p>

染に関与していることを見出した。

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

1) 予定通り行うことができた。現在、各サンプルの菌叢データを得るために、糞便より細菌遺伝子を抽出し、それを鋳型に16S rRNA遺伝子を増幅させたものを用いて、次世代シーケンサーによる大量配列解析を行っている。2016年度の早い時期に、バンコクとベルラムの児童計40名の細菌叢データを得ることができ、食習慣データとの相関解析を行っていくことで、アジア人に見られる2つの腸内細菌叢タイプの決定因子を見出すことができると期待される。2) および3) についても、サンプリングはすでに終了しており、現在菌叢の解析を行っている。3. の *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 は、先行の ACP にて見出した株で、本株が実際の養鶏に、どの程度有効に利用できるか判断するための貴重なデータが得られるものと期待される。こちらも2016年度の早い時期に結果が得られる予定である。

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

1) タク市郊外のCd汚染水田土壌を採取し、土壌のCd汚染を測定した。採取場所によってばらつきがあったが、最もCd汚染の高い土壌のCd含有量は182mg/Kgであった。この汚染を目安にして、PGA添加ポット、PGA無添加ポットを作成し、イネ苗を移植、野外圃場のグリーンハウスで生育を観察した。その結果、昨年度に行なった口紙に培地を浸漬させた水耕培養法で、PGA添加、無添加の培地でイネ苗を生育させた実験結果と遜色のない結果を得た。つまり、口紙を用いた水耕栽培法(実験室レベル)とポット栽培法(グリーンハウスレベル)では、ともにPGA添加によってCd障害イネの生育回復が観察された。2) Cd汚染水田の土壌から根粒菌の選択培地を用いて、根粒菌を分離し、PGA分解酵素を生産する優良菌を3菌株取得した。現在、これらPGA分解酵素生産菌から酵素を分離、精製しようとしている。

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

Chonudomkul 講師の努力により、熱帯性緑藻株 *Isochysis* sp. 変異株の効率的な選抜に使えるレベルにまで技術習得をすることができた。今後、この方法を用いて EPA 生産性の高い変異株分離が開始できると考えて

	<p>いる。</p> <p>7) 大量並列DNAシーケンス DNAシーケンスおよびシーケンス配列のバイオインフォマティクスの方法を確立し、Dr. Suwatのサンプルについて問題なく解析できるようになった。</p> <p>8) 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 吸光度による評価を用いた予備的な実験では、バクテリアでは高いパラコート分解能が見られなかった。一方で、糸状菌のうち3株では培地中のパラコートの最大60%の除去が観察された。</p> <p>9)植物共生細菌の多様性解析とその応用 細菌細胞同士の殺傷作用を検討するために、<i>Methylobacterium</i>属細菌のいくつかの基準株について、リファンピシン耐性とカナマイシン耐性株を作製することができた。今後、これらを用いて殺傷試験が可能となる。</p> <p>10)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 1)使用している生物防除資材候補菌株および拮抗される植物病原細菌の分類学的位置付けについて16SrDNAシーケンス解析および細菌学的性状の調査から明確にした。2)抗菌活性の測定について複数の手法で確認すべきことが明らかになった。</p> <p>11)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 シロアリの分類が可能な研究者を育成するために、調査手法および同定のトレーニングを行った。シロアリ分類の知見を持った研究者をおおく排出することにより、各国で独自の調査研究が可能になる。</p> <p>12)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 海藻からの多糖の構造に関する有用な知見を得、また脂肪酸組成に関して、これまで報告例のない新規な結果を得た。</p> <p>13)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 <i>Muscodor suthepensis</i> strain CMU-Cib462のタンジェリンオレンジ貯蔵中の<i>Penicillium digitatum</i>による劣化を抑制する能力について検討し、</p>
--	---

	明らかな抑制効果が認められ、論文発表した。
--	-----------------------

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・山口大学医学系研究科・教授 (英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Kosum CHANSIRI・Srinakharinwirot University・Associate Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor 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度の研究 交流活動	<p>今年度は下記の18課題に関して積極的な研究交流を実施できた。なお、小研究課題16は、適当なカウンターパートが見つからなかったため中止することとした。多くの研究交流は着実に進展し、全体で24編の原著論文、19件の国際会議での発表を得、準備中も含め堅実な成果を得ている。成果が顕著でない課題に関しても、基盤的な検討はほぼ終えているため28年度以降の発展が期待できる。</p> <p>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用 平成28年1月14日より2月29日まで Kakumyan 氏が山口大学に滞在し、<i>Clitopikus</i> 属担子菌の培養条件確定と、培養液からの抗菌物質の単離精製を進めた。培養液をジクロロメタンで抽出し、TLC プレートで展開して供試菌を塗布したプレートに置くと、大きな阻止円が観察され、極めて強力な抗菌物質を分泌していることが明らかとなった。そこで、ジクロロメタン抽出液をシリカゲルカラムで分画し、TLC によるアッセイと LC-MS/MS を組み合わせて精製を進めた。残念ながら完全精製には至らなかったため、再度カラム精製を進めることとしている。</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 タイ国コンケン県周辺のアーティチョーク畑にこれまでに単離したアーバスキュラー菌根菌と土壌細菌を同時接種し、生育促進効果について再検</p>				

討した。その結果、顕著な生育促進効果が見られた。一方、生育促進に寄与すると考えられる植物ホルモン（オーキシシン、サイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸類など）を LC-MS/MS で網羅的に定量する系を確立しつつある。これまでにオーキシシン、アブシジン酸、ジャスモン酸類の定量系は確立した。そこで、菌を接種したアーティチョーク根、地上部、およびそれぞれの土壤微生物培養液を LC-MS/MS で網羅的に定量すべく準備中である。解析に係る研究方針打ち合わせは、Sophon Boonlue がサテライトシンポジウム（福岡）に参加した際に松井と十分に討議した。

### 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

土壤肥沃度指標（SOFIX）に基づいた、データベースの構築を進めた。内容は、タイ（北部：20 サンプル）、インドネシア（ジャワ島南東部：20 サンプル）、および日本（全国：約 1,000 サンプル）から土壤を採取・SOFIX 分析し、畑、水田、樹園地に分類してデータを解析した後、データベース化をおこなった。日本、タイ、インドネシアでの各土壤は、大きな違いは認められなかった。

土壤肥沃化に関しては、特にインドネシアにおいて需要が高いということもあり、SOFIX データに基づく診断そして処方を 1 か所で実施した。日本国内は、10 か所において実施した。

交流としては、上述の SOFIX データに基づく診断と処方について、適宜メールでの打ち合わせを実施した。また、2016 年 2 月 29 日～2016 年 3 月 13 日まで Dr. Andi Kurniawan を立命館大学に受け入れた。

### 4) 植物内生放線菌の農業への応用

ネコブを添加（放線菌無添加）したトマトポット栽培では、移植後 4 週間の栽培でトマトの根にネコブが形成され、ネコブ無添加のポットに比べ地上部分の生育が遅れた。有機野菜およびその根圏土壤から分離した放線菌約 230 株を 4 株毎にポット栽培試験を行ったところ、5 グループがネコブ線虫抑制効果を示した。3 グループはネコブ形成が抑制され、2 グループは地上部の生育が改善した。ネコブ線虫を添加したトマトの鮮重量は、放線菌およびネコブ線虫無添加のトマトに比べ低下した。放線菌を添加したポットでは、トマトの鮮重量がネコブ線虫を添加したトマトに比べ改善した。次に、効果が認められた放線菌 20 株について個別にトマトポット栽培試験を行った。その結果、A1 株が防除効果を示した。ネコブ線虫添加したトマトの鮮重量は、ネコブ線虫無添加したトマトの 66%に低下した。A1 株を添加したポットでは、トマトの鮮重量が 102%に改善した。次に、防除効果を示した放線菌 20 株の培養液上清が線虫に与える影響を調べた。その結果、

トマトポット栽培試験で防除効果を示した A1 株は線虫の運動に影響を与えなかった。徳山が 11 月にチェンマイ大学 Wasu 研究室を訪問 (11/18-20) し、共同研究打合せや試料採取を実施した。Wasu 研究室の修士学生が静岡大学・徳山研究室に 6 か月間 (H27.10.1 - H28.3.23) 滞在し、イネ内生および根圏微生物を分離し、系統解析を実施した。Wasu 先生が 3 月 1 日から 31 日 (31 日間) まで徳山研究室に滞在し、短期留学中の学生を指導し、イネ内生菌の解析を実施した。

#### 5) ポリ乳酸分解微生物の探索と応用

加熱処理 (120°C、15 分間) したポリ乳酸 (PLA) 懸濁液を用いて PLA 分解微生物を分離したが、液体培地中で PLA 不織布は分解できなかった。次に PLA の不織布を炭素源として、集積培養を行ったが、30 日間の集積培養では森林土壌から、不織布 PLA を分解する微生物は得られなかった。さらに、土中に PLA 不織布を 6 か月間放置し、その試料から PLA 不織布分解微生物の分離を行ったが、目的の微生物は得られなかった。

また、2 月に Sukhumaporn 先生のグループと合同で土壌試料採取を行った。

#### 6) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

100L の培養装置を用いて耐熱性フィコエリスリンを得、飲料等への添加を試みた。また、温泉由来のラン藻から熱安定性フィコシアニンをスクリーニングし、各種カラムクロマトグラフィーを用いて、タンパク質の精製を行った。同フィコシアニンは 70°C30 分の熱処理にも安定であった。さらに、同フィコシアニンの 2 つのサブユニットについて、N 末端アミノ酸配列を解析し、次年度における遺伝子クローニングへと繋げた。*Leptolyngbya* 株の PHB 生成についても検討を重ね、従属栄養条件下酢酸添加条件において、14%まで収量を増加させることに成功した。平成 28 年 3 月 1 日から 31 日まで、Pumas 氏が東京大学において実験を行いながら討論を重ねた。

#### 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ク質の同定

ベンゾニトリルは環境有害性として水生環境有害性(急性)をもつ化合物として分類される。本研究では、ベンゾニトリルを分解する海洋微生物を探索するために、ベンゾニトリル濃度を含めた条件検討を行った。今年度はカウンターパートのライフイベントにより派遣、受け入れは出来なかったが、適宜、メール・スカイプによる進捗状況報告と打ち合わせを行った。

#### 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

デングウイルスの Capsid protein (C)、precursor membrane/membrane protein (PrM/M、PrME)、Envelope protein (E)、及び non-structural protein 1 (NS1)を抗原のターゲットとするため、人工遺伝子合成を行った。Capsid protein 遺伝子は大腸菌発現用ベクターpColdIに挿入して、Capsid protein 発現用ベクターを構築した。構築したベクターを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換後、組換え Capsid protein を発現させた。組換え Capsid protein 発現を抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロットで確認した。

日本側の研究者（朴 龍洙）が平成 27 年 8 月 17 日～22 日（7 日間）インドネシア BPPT の Dr. S. Pambudi を訪問し、BPPT 現地の研究環境、研究計画及び研究者派遣・受入について打ち合わせを行った。Dr. Sabar Pambudi の受け入れ：平成 27 年 11 月 7 日～12 月 6 日（30 日間）日本側の研究者の研究室にて研究を開始した。

#### 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

カセサート大学ピチェン博士、本年度より共同研究者としてリストアップするマンチェスター大学コンスタンチノス博士とはジョイントセミナー中に集中的ディスカッションを行った。一方、カセサート大学 Pinsuang 博士との共同研究は進展がなかった。

これとは別に、酒井および田代を幹事として、第 2 回サテライトセミナーを福岡市にて開催した。基調講演 2 題、招待講演 1 題と、拠点事業参加研究者による個別の研究発表（口頭発表 15 題、ポスター発表 19 題）があり、それぞれの研究内容に対する熱心な議論が展開された。全参加者 75 名（日本国内 43 名、海外 7 カ国 32 名）であった。

#### 10) 生理活性天然有機化合物の生物変換

Dr. Panarat Arunrattiyakorn が 7 月 20 日から 8 月 21 日まで岡山大学神崎研究室に滞在し、研究活動及び研究打ち合わせを行った。

神崎がタイ・バンコクを訪問し、Dr.Panarat と研究打合せをするとともに、新たな共同研究先(King Mongkut's University of Technology North Bangkok)で講演と打ち合わせも行なった。

#### 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

昨年度より開始した Assoc. Prof. Jiraporn Thaniyavarn (Chulalongkorn University, Thailand) との共同研究を継続している。具体的な交流実績としては、2015 年 7 月 12 日から 23 日までの約 10 日間 AP. J. Thaniyavarn および同研究室学生 1 名を北海道大学森川研究室にて受け入れ、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サーファクタントの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った。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った。さらに、森川が同年11月17日から19日にバンコクで開催されたタイ王国バイオテクノロジー学会年次大会 TSB2015 にて招待講演を行うと共に、AP. J. Thaniyavarn 研究室を訪問し、成果を投稿論文としてまとめるための打ち合わせを行った。

#### 12) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

タイおよびベトナムの発酵食品や動物の腸管などの種々の分離源から、引き続きバクテリオシン生産乳酸菌の分離を試みた。バクテリオシン様の抗菌活性を示した分離株の菌種同定を行い、有望な分離株については、生産するバクテリオシンについて詳細な特性を解析した。とくに、ベトナムとタイの研究者を受け入れ、研究を進展させた。また、バンコクで開催されたアジア乳酸菌学会に参加した際に、タイの研究者と情報交換を行った。ベトナムの研究者とはメールで研究の進捗について討議した。

#### 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

研究活動として、沖縄県の伝統大豆発酵食品「とうふよう」製造に用いられる麴で調製した漬け汁の抗酸化性について明らかにし、その有効利用について論文にまとめた。また、紅麴抽出物の生理活性として、脂肪生成阻害効果、骨石灰化促進効果および神経細胞保護効果を調べて学会発表している。さらに、有用植物資源の紅麴菌発酵により抗酸化性の向上も明らかにし、学会で成果を発表している。さらに、泡盛醸造副産物の紅麴菌発酵では、蒸留粕の麴菌成長に及ぼす効果について調べ、予想外の菌体生育促進効果を見出した。

研究者交流として、9月にタイ国 King Mongkut's University of Technology Thonburi に5日間滞在し、同国の発酵食品工場、エビ養殖池、植物園、温泉源等で微生物分離のためのサンプリングを行った。また、3月にはタイ国側研究者として Worapot 教授が本学に5日間滞在し、機能性食品製造工場や製塩工場を視察し、沖縄県の機能性食品や植物について紹介するとともに、食品衛生や製造ラインの近代化について意見交換した。それぞれ、学内研究者とも交流し、今後大学間研究協力協定の締結に向けた共同研究推進を確認した。

#### 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

本年度は、それぞれの大学への訪問および招聘はなかった。交流としては、主にメールのやり取りによるディスカッションを行った。

ベトナムの麴メン (*men*) より分離した酵母と、タイ国の麴 (*loog pang*) より分離した酵母と、日本醸造協会 7 号酵母で発酵試験を行ない、得られたアルコール飲料の特性と抗酸化能を比較検討した。今年度の成果とこれまでの成果をまとめて *International Journal of Biomass and Renewables* に投稿し掲載された。

#### 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、独立した 2 つの課題を行った。電子メールによる研究打ち合わせを行い、一方は目標を概ね達成ができたと考えている。休止菌株 (生細胞) や細胞膜画分を用いた取り組みを中心に行った。他方の課題では、お互いにほとんど取り組めなかった。研究交流も十分ではなかった。総合的には半分の達成と自己評価した。

#### 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

アセアン諸国の関係大学に適当なカウンターパートが見つからなかったので、本小研究課題は中止することとした。

#### 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

耐熱性細胞壁溶解酵素生産菌として選抜、同定された *Streptococcus thermophilus* HF-3 株が生産する 2 種類の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼのうち分子量の小さい方の酵素を均一に精製し、諸性質の検討を行った。細胞壁の溶解に関わり、抗菌活性を発揮するために  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼと同様に重要な役割を担っているキチナーゼについても、*Streptococcus thermophilus* HF-3 株を用いて検討した。また、新規糸状菌細胞壁溶解酵素生産菌のスクリーニングを実施した。

また、本年度末にソクラ大学農産学部で講師 Dr. Wasana Suyotha を訪問し、本年度の共同研究に関するお互いの進捗状況を報告し合うとともに、28 年度に向けてスムーズに共同研究が進むよう、研究計画の修正、確認を綿密に行った。かつ、28 年度の学術的成果の発表計画についても打ち合わせを行った。

#### 18) 発酵乳中からの乳酸菌および乳酸菌ファージの単離と特性解析

2015 年 7 月 29~31 日にタイ国コンケンで開催された The 7<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products

	<p>に土居が参加した際に Srinakharinwirot 大学を訪問し、分離したファージ ΦT25 を <i>L. paracasei</i> を宿主として大量調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心分離によりファージ粒子を精製した。得られたファージ粒子より DNA を抽出し、DNA を制限酵素処理して、本ファージ DNA のサイズを見積もった。さらに、Onanong Pringsulaka 講師が第 2 回サテライトセミナーに参加するため福岡市を訪れた際に ΦT25 ゲノム DNA を持参し、九州大学で土居と共に全塩基配列を次世代シーケンサー(NGS)によって解析した。また、その際に今後の研究方針等の打ち合わせも行った。NGS で得られた配列は Blast を用いて相同性を検索して、コードされている遺伝子を推定した。遺伝子の推定では、メール等による意見交換を行った。また、<i>L. paracasei</i> を紫外線照射および NTG 処理等を行い、ΦT25 耐性乳酸菌変異株を試みた。</p>
<p>27 年度の研究交流活動から得られた成果</p>	<p>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用  タイ北部で単離された担子菌(<i>Clitopilus</i> sp.)についてその菌糸体の培養系を確立した。菌糸体は確立した条件で、液体培地でも旺盛に増殖したが、現在までのところ子実体形成条件の確立には至っておらず、今後検討すべき課題である。菌糸培養液中には高い抗菌活性が確認されたので、Kakumyan 講師が山口大学に来て、精製と MS 解析を進めた。その結果、<i>Citopilus</i> sp. から良く単離されている抗生物質とはまるでフラグメント様式の違う化合物の存在が示唆された。今後、更に精製し、NMR などにより構造決定する必要がある。</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  アーティチョーク栽培現場で、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作物生育が促進されることを見いだしている。今年度はこうした同時接種効果のタイ東部農地での実証に成功し、単位面積当たりの収率増加を認めた。更に、そのメカニズムの解明を進めた。特に接種した菌体が生成放散し、植物の生育を促している可能性について検討した。LC-MS、GC-MS を用いた植物ホルモン分析系を日本側共同研究者が確立したが、一方、タイ側からの作物土壌サンプルの郵送が困難であり、実際的な解析を進めることができなかった。</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  (1) 畑  SOFIX 畑データベースより、植物成長に適した畑の最適環境条件を明らかにした。具体的な条件は、全炭素 (TC) <math>\geq 18,000</math> mg/kg、全窒素 (TN) <math>\geq 1,000</math> mg/kg、C/N 比 : 10~25 等であった。この条件下で、各作物の要求</p>

する肥料成分量を考慮して有機資材を施肥することにより、再現性のある物質循環型農業を遂行することができるようになった。

#### (2) 水田

同様に SOFIX 水田データベースより、水稻に適した水田最適条件を明らかにした。具体的な条件は、TC $\geq$ 13,000 mg/kg、TN $\geq$ 800 mg/kg、C/N 比：18~25 等であった。圃場実践では、この条件下で、約 15%の収穫量が向上した。

#### (3) 樹園地

樹園地に関しては、サンプル数が少なく、また作物により大きな違いがあるため、お茶に絞ってデータベースを構築し、最適条件を推定した。その結果、通常の圃場と違い、土壌 pH が低いこと、また TC 値が高い傾向があることが明かとなった。さらに、生育が良好な圃場は、TC $\geq$ 30,000 mg/kg、TN $\geq$ 2,000 mg/kg であり、今後最適条件を決定していく予定である。

上記の条件下で栽培した農産物は、病虫害の被害が著しく低くなり、減化学農薬可能性があることが示唆された。

#### 4) 植物内生放線菌の農業への応用

ネコブセンチュウの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。そこで、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。その中で、本年度は、トマトポット栽培におけるネコブ線虫防除の評価系を確立し、野菜由来内生放線菌がトマトのネコブ形成を抑制するという現象を見出した。

#### 5) ポリ乳酸分解微生物の探索と応用

本来、ポリ乳酸 (PLA) は生分解性であるが、結晶性が高い PLA (PLA 不織布) は微生物に分解されにくいので、これを効率的に分解する微生物が求められている。結晶性の低い PLA フィイルムを分解する微生物は比較的容易に見出せるが、結晶性が高い不織布 PLA を分解する微生物は、現在のところ集積培養法を用いても分離できていない。

#### 6) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

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性工場のためラン藻培地組成と培養条件を検討し、培養後の熱安定性フィコエリスリンの精製スキームを改良した。さらに、約 40 株の耐熱性ラン藻を用い、ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (PHB) 生産性を評価、比較した。中でも、あるラン

藻に乾燥重量あたり約 12%の PHB 能を見いだしている。更に、これら条件の検討により耐熱性フィコシアニンの精製、ならびに、PHB 収量の増加しつつある。

#### 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ク質の同定

ベンゾ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。そこで、各地からその分解菌単離を試み、分離菌として *Staphylococcus sciuri* が得られた。現在、その性状を明らかにするとともに、合成海水培地での分解試験のため準備を進めている。

#### 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

デングウイルスの Capsid protein (C)を人工遺伝子合成し、それを大腸菌 BL21(DE3)で発現し、抗ヒスチジンタグ抗体を用いたウェスタンブロットによって目的の蛋白を確認した。誘導後、目的の約 11 kDa のところにバンドが確認されたが、20kDa の付近にも太いバンドが見られた。このバンドは二量体と推測されるが、今後の解析が必要である。

#### 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

デンプンからの直接乳酸発酵については、新規分離株について、従来にない光学純度と収率で発酵生産が可能ながわかった。研究成果の一部を *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(1), 143-149 10.1007/s10295-014-1534-0 として報告した。また、群集構造解析手法を独自に改良し、その利用例を *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 200, 57-65 doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.022 として報告した。

#### 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のエンドファイトが異なる変換生成物を生じる事を解明し、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。こうした活性の増強を伴う代謝変換の事例を更に蓄積するため、さらに別の植物抽出物をもとに、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した。これら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。中でも今年度はマンゴスチンのエンドファイトにより変換生成する化合物のうち、精製が

かなり困難であった化合物について、精製に成功した。

11) 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

新規に取得したバイオサーファクタント高生産株 *Aureobasidium pullulans* および *Pichia anomala* をタイ王国カルチャーコレクション Thailand Bioresource Research Center (TBRC)に寄託した。寄託番号は、それぞれ、TBRC5448、TBRC5449。さらに、前者について多様な構造のバイオサーファクタントを生産していることを発見した。

12) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

多数の乳酸菌様分離株が得られ、大半は 16S rRNA 遺伝子解析等によって乳酸菌と同定された。そのうちの数株はバクテリオシン様の抗菌物質を生産することを見出し、さらに解析を進めている。ベトナムの研究者には、乳酸菌の分離やバクテリオシン活性の評価に関する実験手法を新たに供与でき、ベトナムでの研究の進展が大いに期待できる。

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

伝統発酵食品「とうふよう」の製造工程で生まれる副産物（廃棄予定）の有効利用につなげられる成果が得られた。この成果は本発酵食品に限らず、多くの国で作られる多様な発酵食品の副産物の有効利用につなげられる成果であり、今後、タイ国での調査を経て発酵食品製造副産物の機能性効果と有効利用について協議することが予定されている。発酵食品製造に利用される微生物の新規機能性について、タイ国でも深刻化している高齢者の疾病予防に役立つ可能性が確認されたので、同様の試験をタイ国の発酵食品の抽出物でも確認していくことが確認された。

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

日本の麴は麴カビのみが生育しているが、東南アジアの麴には、糖化力をもつカビ、発酵性酵母、乳酸菌など各種微生物が生育している。成果としては、1) ベトナムの麴メンより分離した酵母とタイ国の麴より分離した酵母は、ともに日本醸造協会 7 号酵母と同等の発酵能を示し、アルコール発酵に有用であることを認めた。2) 白米および黒米など各種有色米やワイルドライスを原料にアルコール飲料を試醸した。発酵法は、従来法の蒸煮アルコール発酵法と省エネルギー的な無蒸煮アルコール発酵法により行った。3) 各種アルコール飲料の DPPH ラジカル消去能と脂質過酸化阻

止能を調べた。その結果、黒米やワイルドライスを原料としたアルコール飲料は、白米を原料としたものより強い抗酸化能を示した。また、無蒸着アルコール発酵により黒米を原料に試醸したアルコール飲料は、糠画分に含まれるアントシアニンが熱によるダメージを受けないので、鮮やかな赤い色を呈していた。

#### 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

今年度は、ガラクトールの酸化によって生じる化合物に注目した。複数の生産物が検出できたため、ガラクトールの酸化産物として考えられる、D-ならびに L-タガトース、D-ならびに L-ガラクトースを出発原料として酸化反応を行ったところ、L-タガトースと D-ガラクトースで強い反応が見られた。酢酸菌による D-ガラクトースの酸化反応はすでに報告があるが、L-タガトースの方は報告がないので、新しい反応の発見となった。

#### 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

アセアン諸国の関係大学に適切なカウンターパートが見つからなかったため、本小研究課題は中止することとした。

#### 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) 耐熱性細胞壁溶解酵素 ( $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ)

*S. thermodiastaticus* HF-3 株の培養上清から、陰イオン交換、疎水性相互作用、ゲルろ過の各種クロマトグラフィーを経て均一に精製した酵素を StAgl-1 と命名した。精製酵素は、比活性 1.68 U/mg を示し、 $\alpha$ -1,3-グルカンに高い特異性を示し、セルロース、キシラン、デキストラン等に多糖には活性を示さなかった。本酵素の N-末端およびリジルエンドペプチダーゼ処理により得られた内部のアミノ酸配列を決定したところ、AATAGADL と IGPDYTQG が得られた。本配列をもとに作成したプライマーを用いた PCR により、酵素遺伝子の部分断片を取得した。また、本酵素は、65°C、10 分の処理では 100%近い活性を維持し、60°Cでは 120 分処理後でも 95%の活性を保持する高い耐熱性を有することが明らかとなった。また、ラウリル硫酸ナトリウム(1%)、フッ化ナトリウム(1%)、塩化ベンゼトニウム(1%)および塩化ナトリウム(20%)の存在下においても 100%の活性を保持したことから、本酵素は抗う蝕剤として歯磨き粉の添加剤への利用も可能であることが示唆された。

##### (2) 耐熱性細胞壁溶解酵素 (キチナーゼ)

*S. thermodiastaticus* HF-3 株のキチナーゼ生産性を検討するため、炭素源、

	<p>窒素源等のキチナーゼ活性へ及ぼす影響を調べた。その結果、本菌を1%キチン、0.1%硫酸、イースト抽出物 0.05%を含む培地で最も高いキチナーゼ活性を検出した。陰イオン交換クロマトグラフィーによる予備的精製ならびに SDS-PAGE の結果から少なくとも4種類のキチナーゼが、この条件下において生産されていることが示唆された。今後、<math>\alpha</math>-1,3-グルカナーゼと同様に精製を行い、両酵素を組み合わせた物病原菌に対する細胞壁溶解およびそれに伴う抗菌作用の評価を行なう予定である。</p> <p>(3) 耐熱性細胞壁溶解酵素 (新規酵素生産菌の探索)</p> <p>新規な耐熱性細胞壁溶解酵素の生産菌を得るため、灰色かびの細胞壁を唯一の炭素源とする培地を用いてスクリーニングを行った。100種類の土壌サンプルから50°Cで生育可能な細胞壁溶解酵素生産菌を探索したところ、カビと見られる1菌株を取得した。本単離菌は比較的優れた灰色かび細胞壁溶解能を示したが、18SrDNA解析の結果、<i>Aspergillus fumigatus</i>と同定された。</p> <p>18)発酵乳中からの乳酸菌および乳酸菌ファージの単離と特性解析</p> <p>分離したファージ<math>\Phi</math>T25を<i>L. paracasei</i>を宿主として大量調製したところ、<math>10^{10}</math> pfu/mlの高力価のファージ液を得ることができた。本ファージ液を用いて宿主域を検討したところ、<i>L. paracasei</i>以外には感染性を示さなかった。塩化セシウム密度勾配超遠心分離により精製したファージ粒子より得たDNAをNGSによって解析したところ、110個のcontigが得られたものの、完全長の解読には至らなかった。これらの断片中にはファージのcapsidタンパク質をコードする遺伝子やintegraseと推定される遺伝子が検出された。</p> <p>また、紫外線照射およびNTG処理等により、<i>L. paracasei</i>の<math>\Phi</math>T25耐性乳酸菌変異株が5株得られた。現在、これらの株の性状を検討している。</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・山口大学医学系研究科・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	
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年度の研究 交流活動	<p>本年度の計画では13小課題であったが、1小課題「耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化」を追加した。なお、都合により、「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」は平成16年度から実施することになった。</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  高温高速発酵によるエタノール生産を目指し、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。今年度は、米を原料として酵素により糖化した糖化液からのエタノール生産を、高温(40°C)で生育が可能ないように開発した <i>Zymomonas</i> 菌株を用いて高温発酵試験を実施した。高坂がドイツの共同研究者の研究室を8日間訪問し、お互いの研究に関する情報を交換するとともに、今後の共同研究の方針について議論した。マンチェスター(イギリス)の共同研究者 Colin Webb 博士及び Konstantinos Theodoropoulos 博士の研究室へも3日間訪問し、お互いの研究内容の情報交換と今後の共同研究方針を確認した。コンケン大学(タイ)から博士課程学生(タイ政府奨学金)を受け入れ、<i>Z. mobilis</i> の耐熱化株の解析を行った。</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  27年度は、人材交流として、カウンターパートの研究室から1名の短期留学生在が JASSO 奨学生に採用され11月までの8か月間受け入れを行った。また、カウンターパートの Chartchai 氏を4月と8月の2回受け入れ、共同研究の実施を行った。なお、日本側からの派遣実績はなかった。また、CCP のシンポジウムが福岡で開催され、1件の口頭報告および3件の学生によるポスター発表を行った。研究交流として、乳酸菌の生産する酵素に着目し、タイの伝統的茶葉ミャンから分離した乳酸菌の生産する糖質関連酵素の探索および <math>\beta</math>-ガラクトシダーゼ精</p>	

製を行った。また、新たに  $\beta$ -マンノシダーゼの生産が示唆されたため、28年度は本酵素に関する研究を進めていく予定である。

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

本共同研究では、耐熱性酵母を用いて次世代型の省エネ高温エタノール発酵系の構築を目的としており、課題1や課題2の小課題と連携しながら、優れた耐熱性株をそれぞれ関係国から分離し、それらを高温エタノール発酵に使用している。本年度は、新たに獲得した耐熱性酵母を用いて、タイのバイオマスを原料として高温発酵試験を実施した。また、耐熱性酵母を用いた非温度制御発酵や高温発酵と減圧蒸留を組み合わせた試験を実施した。また、関係国の研究者との交流を積極的に行い、タイのチェンマイ大学及びカセサート大学から講師各1名がそれぞれ1か月滞在し（1名は別経費）、新規に取得した耐熱性酵母の解析や耐熱性酵母の代謝に関する解析を行った。ラオス国立大学の講師は若手研究者セミナー（YSS）に参加し、その際に耐熱性酵母の分離と種々のバイオマスを用いた高温エタノール発酵能比較について議論した。ベトナム・カントー大学の准教授はYSSに参加するとともに1ヶ月滞在し、高温エタノール発酵を目指した優れた耐熱性酵母の分離と解析を行った。インドネシアからはブラビジャヤ大学の講師を別経費も利用して5ヶ月受け入れ、その間セルロース系バイオマス利用を目指した耐熱性酵母変異株の分離と解析を行い、論文発表した。また、学生同士の交流として、関係国からの短期留学生（別経費）と協同して実験等を実施した。

4) 餅麴ルパン(*Amylomyces rouxii* 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

本年度は、それぞれの大学への訪問および招聘はなかった。交流としては、主にメールのやり取りによるディスカッションを行った。タイ国の餅麴メン（もちこうじ men）は、粉碎した生の糯米（もちごめ）に適量の水を加えて直径3 cm～20 cmの団子状にまとめ、それにカビ、酵母、乳酸菌などを生育させてアルコール飲料のスターターとする。今年度は、メンから分離した *Amylomyces rouxii* YTH3 を蒸煮した白米（粳米、うるちごめ）に生育させて、日本式の散麴（ばらこうじ）を作成しアルコール発酵の糖化剤としての有用性を検討した。

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

平成27年7月26日から30日（Fermentation Technology for Value

Added Agricultural Products (Khon Kean) 期間中を含む) タイに滞在し、耐塩性微生物の酵素について報告した。分離済みの耐熱性微生物またはその酵素の特性解析と遺伝子クローニング・発現について協議し、「互いの研究室保有株 (耐熱性菌)」を用いて研究の継続を確認した。また、カウンターパートナー (チェンマイ大・Dr. Thanongsak Chaiyaso・10月から11月30日間) 滞在中は、チェンマイ大研究室保有株 (耐熱性菌) 由来加水分解酵素の特性解析と遺伝子クローニングを行うことにした。同パートナーが帰国後は、日本側でサンプル分析や酵素遺伝子の発現の検討を継続して行った。タイ側は、バイオマスから生じたキシロオリゴ糖の分析を行った。

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

パームオイルを生産する工程から排出される残渣は現在焼却により処理されているのが主であり、その処理の過程で出る廃熱を利用してスチームや発電を実施している。しかしながら、その焼却過程で排出される排ガスは未処理のままであることがほとんどで、その対策が急務である。そこで、オイルパームの樹木部分の木質、残渣からバイオガスの生産を行うことに着目した。固形物残渣からバイオガスを生産する場合には必ず、前処理 (可溶化処理) が必要である。したがって、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の生産の高効率化を昨年度から引き続き行った。研究交流については、タイのゴールドデンジュブリープログラム奨学金によりワライラック大学博士後期課程学生: タクシン大の Sompong 講師の指導学生が、11月から1年間の予定で滞在し上記の一部と以下の10)の一部を実施した。

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

木質系バイオマスの資源化 (特に木質系廃棄物の再資源化) においては、その可溶化工程がボトルネックとなることがよく知られている。したがって、その可溶化工程のキーとなるキシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ等の各種酵素の生産とその固定化による効率的利用が重要なポイントとなる。そこで、これまでに研究室で単離した *Aureobasidium pullulans* 及び *Phanerochaete sordida* を対象として、キシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ等の各種酵素の生産を行い、その固定化による効率化を行った。研究交流については、チュラロン

	<p>コン大学の Hunsra 准教授を本 CCP 予算にて 11 月に 9 日間招聘し、またチュラロンコン大学の予算で Sehanat Prasongsuk 講師を 11 月に 9 日間招聘し、上記の一部を実施した。</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>新規の熱帯性バイオマスとして近年ネピアグラスが注目されている。しかしながら、ネピアグラス単体からのバイオ水素およびバイオプラスチックの生産では、その前処理（可溶化処理）にコストがかかるため、その対策として、ネピアグラスサイレージに着目した。さらに、種菌の供給源として牛糞を混合することによる効果を検討した。ネピアグラス及びそのサイレージからのバイオ水素生産プロセスの開発に関して、バイオ水素の生産における環境因子（pH、温度、滞留時間等）、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った。研究交流については、コンケン大学の Alissara 准教授（12 月に教授に昇進）を本 CCP 予算にて 11 月に 10 日間招聘し、また山口大学予算でコンケン大学の博士後期課程学生：Alissara 准教授の指導学生を 11 月から 3 ヶ月間招聘し、上記の一部を実施した。</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>草本系バイオマスの資源化におけるリグノセルロースの前処理工程について昨年度から引き続き検討した。酸、アルカリ及び加熱工程の有無によるその影響について検討した。その結果を踏まえて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、アルカリ＋加熱処理による改良を行った。一方、前述の前処理（アルカリ＋加熱）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ないという結果が得られた。そこで、ナトリウム耐性のある菌（高塩分濃度耐性菌）のスクリーニングについても実施した。研究交流については、山口大学予算でカセサート大学の Prapaipid Chairattanamanokorn 准教授を 12 月から 2 ヶ月招聘し、上記の一部を実施した。</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・促進化のためには、その第一段階である加水分解工程を高</p>
--	---

速化（しかしながらコストをできるだけかけずに）する必要がある。そこで、従来にはない、高温域で安定的に作用するアミラーゼやセルラーゼ等の加水分解に寄与する酵素をスクリーニングできれば、加水分解工程の低コストでの加速化につながる。そこで、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た。研究交流については、本 CCP の予算によりタクシン大学の Sompong 講師を 11 月の 1 ヶ月間招聘し、上記の一部と上述の 6)の一部を実施した。

11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

合成代謝経路の構築による有用物質生産に関して、これまでに構築に成功している 1-ブタノール生産大腸菌での発酵時の副産物として観察された副産物である乳酸，酢酸生合成経路の欠損が、1-ブタノール生産性に与える影響を評価した。次いで、中枢代謝の強化が、1-ブタノール生産の強化に有効であると考え、特に、ピルビン酸からのアセチル CoA 供給を活性化させる改変が 1-ブタノール生産に与える影響を検証した。電子メールで研究の進捗を連絡することで、研究の指針を議論した。

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

本年度は、タイでスクリーニングされた耐熱性酵母によるパイロットスケールでの廃カッサバパルプからの高温エタノール発酵を行った。エタノール発酵原料には収穫・デンプン抽出直後のウェットパルプ、それを乾燥させたドライパルプの 2 種類を用い、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いて、エタノール発酵温度は 40℃とした。原料の粉砕方法、ウェットおよびドライ原料の混合比、粉砕原料の蒸煮温度、酵素製剤使用量、蒸留投入濃度などの操作条件の最適化を行った。星田の Ubon Ratchathani 大学への派遣及び同大学からの Dr. Sanom Ruamsuk の受入れを行い、発酵試験結果や菌株に関する情報交換と菌株改良に関する研究を行った。

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

Dr. Huyen Thi Thu NGUYEN が現在ドイツに派遣中であるため、2016 年度より実施予定。

14) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化

	<p>平成 27 年 7 月 1 日～8 月 20 日まで、Apilak Salakkam 博士が日本側研究室に滞在し、タイ国より持参した分離菌株および柑橘果皮残渣を用いて実験を行った。まず、ペクチナーゼ生産条件の最適化実験を実施し、続いて、ペクチナーゼ生産性と発酵温度の関係について、日本国内で単離された中温株との比較実験を行った。さらに、日本側において、18S rDNA 解析によりタイ国からの分離菌株を同定した。滞在中は精力的に実験およびディスカッションを実施し、帰国後も電子メール等での意見交換を行いながら研究を展開した。</p>
<p>27 年度の研究交流活動から得られた成果</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><i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 548 株由来の開発した耐熱化 <i>Zymomonas</i> 菌株を用いて、高温発酵 (40°C) と減圧蒸留を組み合わせた試験を実施した。試験では、米を原料とし、高温でのエタノール生産工程と減圧蒸留を 2 回繰り返すことによるエタノール回収工程を組み合わせ実施したところ、エタノールの生産が確認された。さらに、全工程を三度繰り返してもエタノールの生産が確認された。この方法により回収したエタノールは最大 60%に達した。そしてこの成果を、論文として発表した。</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>ミャンから <math>\beta</math>-ガラクトシダーゼを生産する微生物を 1 菌株分離した。同定を行ったところ、<i>Lactobacillus fermentum</i> であった。大腸菌にクローニングを行い組換え酵素の大量生産を試みた。組換え酵素を用いて TLC で生産物を調べたところ、糖転位能を持つことが示唆された。次に、ココナツ残渣由来のマンナンを効率よく分解できる微生物を 1 菌株分離した。同定を行ったところ <i>Bacillus sp.</i> であった。酵素を精製し諸性質の検討を行ったところ、マンノビオース生産性の高い酵素であることが分かった。大腸菌にクローニングを行い組換え酵素の大量生産を試みた。組換え酵素も同様に主生産物はマンノビオースであり、本酵素はエキソ型のマンナーゼであることが示唆された。以上の結果からいくつかの有用な酵素を生産する微生物を見つけることができたので、28 年度はこれらの酵素を用いたオリゴ糖生産の検討を目指す。</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>本共同研究では耐熱性酵母を用いて、高温エタノール発酵系の構築を目的としている。高温発酵は冷却エネルギー削減や中温菌の混入抑制等のメリットに加えて、高い生産性が期待される先端技術として期待される。本年度は、新たに分離したイヌリンを資化できる耐熱性の</p>

*Kluyveromyces marxianus* を用いて、タイのキクイモ塊茎を原料として、また、新たに分離した耐熱性 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、タイのスイートソイガム汁を原料として、高温エタノール生産を種々の条件で実施し、最適条件を決定した。それぞれの成果を論文として報告した。また、耐熱性酵母を用いた非温度制御発酵や高温発酵と減圧蒸留を組み合わせた試験を実施し、その成果を論文発表した。

4) 餅麴ルパン(*Amylomyces rouxii* 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

*Amylomyces rouxii* YTH3 を蒸煮白米に生育させて麴をつくった。最適条件を検討した結果、30°C、2日間で、約 250 U/g 麴のグルコアミラーゼ活性を示した。上記麴と蒸煮および無蒸煮白米を混合したものを原料として 30°C アルコール発酵を行った。麴と蒸煮および無蒸煮白米の総量を 30 g とし、麴含量を 20~100%まで変化させて仕込んだ。酵母は日本醸造協会 K7 酵母を用いた。

蒸煮白米を用いた場合、いずれの仕込みでも 10%以上のアルコールを生成し、*Amylomyces rouxii* YTH3 はアルコール発酵の糖化剤に適していた。無蒸煮白米を原料とした場合、糖化が上手くすすまず、麴含量 20%の場合、アルコールは 3.4%、麴含量 80%の場合もアルコール濃度は 9.1%であった。

アルコール飲料の抗酸化能を調べた結果、原料が蒸煮白米および無蒸煮白米であるにかかわらず、低い値を示し、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能はそれぞれ、約 500 $\mu$ M Trolox 当量、約 5000 $\mu$ M BHT 当量であった。

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

平成 26 年より共同で研究を進めている *Bacillus* sp. No. 16 株の生産する耐塩性プロテアーゼと耐熱性 *Streptomyces* 属放線菌の生産するキシラナーゼとリパーゼについて特性解析を進めた。特に、キシラナーゼ遺伝子の解析を進め、酵素の特性を含めて計画通り原著論文として報告できた。リパーゼについては、同酵素が糖とビニルエステルから糖エステルを生合成できることを確認後、酵素の特性解析を進め、研究の進捗を日本農芸化学会本大会にて報告した。

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

オイルパームの樹木部分の木質、残渣等の固形物からバイオガスの

生産を行うことに着目した。固形物残渣からバイオガスを生産する場合には必ず、前処理（可溶化処理、特に加水分解工程）が必要であるため、それに関する実験的検討を行った。オイルパームの樹木部分の木質及び残渣を原料とした場合の前処理である加水分解工程の加速による高率化、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に関する運転条件（温度、pH、滞留時間等）が得られた。これらのデータを用いた連続運転を行った。

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

木質系バイオマスの資源化（特に木質系廃棄物の再資源化）において重要なポイントである可溶化工程に焦点を当て、その可溶化工程のキーとなるキシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ等の各種酵素の生産をこれまでに研究室で単離した *Aureobasidium pullulans* 及び *Phanerochaete sordida* を対象として行った。各種酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ、リグニナーゼ）の生産工程について最適化を行うとともに、その固定化（重荷はアルギン酸による固定）による効率化を行った。酵素生産に必要な運転条件を把握するとともに、付加価値を高めたキシラナーゼ、セルラーゼ等の酵素固定に関する条件が得られた。

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

新規の熱帯性バイオマスとして近年注目されているネピアグラスの前処理（可溶化処理）を検討した結果、発酵の進んだネピアグラスサイレージと種菌の供給源として牛糞を混合する共発酵に着目した。ネピアグラス及びそのサイレージからのバイオ水素生産プロセスの開発に関して、バイオ水素の生産における環境因子（pH、温度、滞留時間等）、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、ネピアグラス及びそのサイレージ、さらには牛糞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した。ネピアグラス+ネピアグラスサイレージ+牛糞の混合による自己発酵、共発酵の可能性が得られた。

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

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、酸、アルカリ及び加熱工程の有無によるその影響について検討し、アルカリ+加熱処理が適する結果が得られた。一方、この前処理（アルカリ

(NaOH) + 加熱) 後の液相中に高濃度のナトリウムイオンが存在し、水素発酵菌の生育が阻害される。そのため、水素発酵菌が還元糖を消費しきれず、水素発酵が進行しないという結果となった。そこで、ナトリウム耐性のある菌（高塩分濃度耐性菌）のスクリーニングについても実施した。ナトリウム耐性の持つと期待される高塩分濃度耐性菌のスクリーニングができ、現在スクリーニングした菌を継続的に培養中である。

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

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・促進化のためには、その第一段階である加水分解工程をコストをできるだけ押さえながら高速化する必要がある。そこで、従来にはない、高温域で安定的に作用するアミラーゼやセルラーゼ等の加水分解に寄与する酵素を生産できる菌のスクリーニングを実施した。これら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実験条件を把握した。現在もこの実験を継続中である。

11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

副産物合成経路欠損の 1-ブタノール生産への効果については、乳酸経路の欠損は大きな変化を与えることはなかった。一方、酢酸経路 (アセチル CoA → アセチルリン酸 → 酢酸) の欠損は、大腸菌の生育を激しく害し、結果として大幅な生産の低下が起こった。次いで、中枢代謝の活性化が 1-ブタノール生産に与える影響については、中枢代謝の活性化のためにピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHc) 転写因子 (PdhR) に着目し、検討を行った。PdhR は、PDHc の負の制御因子であることから、 $\Delta pdhR$  株では、1-ブタノールの重要中間体であるアセチル CoA 供給が強化されることが考えられた。 $\Delta pdhR$  株に 1-ブタノール生成能を賦与し、生産を評価したところ、期待通り大幅な生産性の向上が観察された。

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

発酵温度を 40°C に設定したが、冷凍機を用いない冷却設備でも、10 kL スケールの発酵タンクの温度を 40°C に維持することができ、耐熱性酵母を用いたことで 40°C でも安定にエタノール発酵できた。また、プロセス中の各条件の最適値を決定できた。一方で、廃棄バイオマスには大量の繊維成分が含まれているために原料の粘度が高いことが最大

	<p>の問題であることが明らかになった。糖化、発酵後には、投入した酵素剤、および <i>Kluyveromyces marxianus</i> が発現するペクチナーゼの作用により粘度は大きく低下した。</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  <b>Dr. Huyen Thi Thu NGUYEN</b> が現在ドイツに派遣中であるため、2016年度より実施予定。</p> <p>14) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化  タイ国由来自自然界サンプルから 40°Cでも良好な生育を示すペクチナーゼ高生産菌の分離、同定に成功した。18S rDNA 解析の結果、<i>Aspergillus</i> 属真菌と同定され、本菌を <i>Aspergillus</i> sp. TPG-01 と名付けた。  柑橘果皮残渣を用いた固体発酵法を検討し、生育およびペクチナーゼ生産には1-2 mmのサイズまで粉碎した果皮残渣が最適であると結論した。また、中温株との比較実験の結果、TPG-01 株は 30°Cの発酵において中温株の 2.7 倍ものペクチナーゼ生産性を示すことが明らかとなった。さらに、TPG-01 株は中温株には難しい 40°C発酵でも、30°C発酵を超える 3.41 U/g-h の優れた酵素生産性を示すことが明らかとなった。</p>
--	--

7-2 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
	(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、Centara Hotel & Convention Centre
	(英文) Thailand, Khon Kaen, Centara Hotel & Convention Centre
日本側開催責任者 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 氏名・所属・職 (※日本以外で開催の場合)	(英文) Gunjana THEERAGOOL, Kasetsart University Associate Professor Vichai Leelavatcharamas, Khon Kaen University Assistant Professor

参加者数

派遣先 派遣	セミナー開催国 (タイ)	
	A.	B.
日本 〈人/人日〉	A.	10/ 40
	B.	3
タイ 〈人/人日〉	A.	20/ 40
	B.	32
ドイツ 〈人/人日〉	A.	0/ 0
	B.	
ベトナム 〈人/人日〉	A.	3/ 6
	B.	
ラオス 〈人/人日〉	A.	2/ 4
	B.	4
合計 〈人/人日〉	A.	35/ 90
	B.	39

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	本事業の発酵微生物分野の研究成果発表と本事業で得られた知識や技術の紹介のために、コンケン大学で隔年開催される国際発酵会議において1つのセッションを開催した。同時に、本事業関係者間での情報共有や発酵関係者への広報を目的した。	
セミナーの成果	この活動によって、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た。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った。	
セミナーの運営組織	本事業の組織委員会を運営組織として開催した。	
開催経費 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  1,300,000 バーツ
	ベトナム側	内容：外国旅費  1,200US ドル
	ラオス側	内容：外国旅費  10,000 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27年8月18日（1日間）
開催地（国名、都市名、会場名）	（和文）タイ、バンコク、セントラルワールド
	（英文）Thailand, Bangkok, Central World
日本側開催責任者 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 氏名・所属・職 (※日本以外で開催の場合)	(英文) Gunjana THEERAGOOL, Kasetsart University Associate Professor
---------------------------------------	--

参加者数

派遣先 派遣		セミナー開催国 (タイ)
日本 〈人／人日〉	A.	6/ 18
	B.	3
タイ 〈人／人日〉	A.	30/ 30
	B.	20
ベトナム 〈人／人日〉	A.	0/ 0
	B.	0
インドネシア 〈人／人日〉	A.	0/ 0
	B.	0
合計 〈人／人日〉	A.	36/ 48
	B.	23

- 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	本事業の研究成果を発表するとともに、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ことを目的として、Thailand Research EXPO 2015 にて1つのセッションを実施した。	
セミナーの成果	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、タイの一般研究者等に本事業の共同研究成果や共同開発した技術を紹介できた。同時に、それらに対する意見を今後の活動に活かせるとともに、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して開催した。	
開催経費 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  200,000 バーツ
--	-----	--

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 (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 (英文) Japan, Fukuoka, JR HAKATA CITY
日本側開催責任者 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 氏名・所属・職 (※日本以外で開催の場合)	(英文)

参加者数

派遣先 派遣		セミナー開催国 (日本)
日本 〈人／人日〉	A.	25/ 63
	B.	68
タイ 〈人／人日〉	A.	10/ 36
	B.	8
ドイツ 〈人／人日〉	A.	1/ 4
	B.	
ベトナム 〈人／人日〉	A.	3/ 9
	B.	
インドネシア 〈人／人日〉	A.	3/ 12
	B.	
ラオス 〈人／人日〉	A.	2/ 7
	B.	
イギリス(日本側 協力研究者) 〈人／人日〉	A.	1/ 4
	B.	
合計 〈人／人日〉	A.	45/ 135
	B.	76

- 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	本事業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サテライトセミナーを毎年開催するが、本年度は日本での開催となり、本事業に関連する先端的研究を中心とした国際シンポジウムとして開催した。	
セミナーの成果	本セミナーによって、本事業で展開している先端的研究を把握すると同時に、ドイツやイギリスのメンバーが得意とする分野を取り入れるなど、先端拠点形成の方向性を示すことができた。	
セミナーの運営組織	本事業の組織委員会を運営組織として開催した。	
開催経費 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  360,000 バーツ

	ドイツ側	内容：外国旅費 600 ユーロ
	ベトナム側	内容：外国旅費 0
	インドネシア側	内容：外国旅費 240,000 円
	ラオス側	内容：外国旅費 80,000 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11回若手研究者セミナー (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 (英文) Japan, Yamaguchi Pre., Yamaguchi-ken Seminarpark
日本側開催責任者 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 氏名・所属・職 (※日本以外で開催の場合)	(英文)

参加者数

派遣先 派遣		セミナー開催国 (日本)
日本 〈人/人日〉	A.	10/ 16
	B.	53
タイ 〈人/人日〉	A.	4/ 8
	B.	14
ドイツ 〈人/人日〉	A.	1/ 2
	B.	
ベトナム 〈人/人日〉	A.	2/ 4
	B.	4
インドネシア 〈人/人日〉	A.	1/ 2
	B.	12
ラオス 〈人/人日〉	A.	2/ 4
	B.	2
イギリス(日本側 協力研究者) 〈人/人日〉	A.	1/ 2
	B.	
合計 〈人/人日〉	A.	21/ 38
	B.	85

- 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	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および留学生との交流によって若手研究者の国際ネットワーク形成を目的に実施した。本セミナー開催によって、日本人大学院生は海外の大学院生と協力して企画・運営を体験するとともに、参加者全員が各自の研究成果を英語で発表する機会となった。また、外国人講師による講演を聴く機会となった。
セミナーの成果	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) セミナーの企画・運営を経験できた。</li> <li>2) 外国人講師による講演を聴く機会となった。</li> <li>2) 英語による研究成果発表や討議の機会となった。</li> <li>3) 若手研究者自身の研究に対する貴重な意見を得るとともに、質疑応答の機会を得た。</li> <li>4) 微生物研究を広く知る機会を得た。</li> </ol>

	5) 他国の若手研究者との交流ができた。	
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して開催した。	
開催経費 分担内容	日本側	内容：消耗品費、その他経費
	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
	ラオス側	内容：外国旅費

### 7-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

所属・職名 派遣者名	派遣・受入先 (国・都市・機関)	派遣期間	用務・目的等
山口大学・教授 松下一信	ドイツ・ベルリン・ベルリンボイト工科大学	平成 28 年 3 月 5 日～平成 28 年 3 月 11 日	次年度計画策定方針の説明、コーディネーター会議
山口大学・助教 高坂智之	ドイツ・ベルリン・ベルリンボイト工科大学	平成 28 年 3 月 5 日～平成 28 年 3 月 10 日	共同研究打ち合わせ
山口大学・助教 高坂智之	イギリス・マンチェスター・マンチェスター大学	平成 28 年 3 月 11 日～平成 28 年 3 月 14 日	次年度計画策定方針の説明、コーディネーター会議（代理）、共同研究打ち合わせ

### 7-4 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

## 8. 平成27年度研究交流実績総人数・人日数

### 8-1 相手国との交流実績

派遣先 派遣元	日#	日本		タイ		ドイツ		ベトナム		インドネシア		ラオス		イギリス(日本側協力研究者)		合計	
		人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数	人数	人日数
日本	1	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/8 )
	2	21/111	( 5/25 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/4 )	1/6	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 8/37 )
	3	1/8	( 3/15 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	1/3	( 0/0 )	0/0	( 5/24 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	2/11	( 8/39 )
	4	1/7	( 4/31 )	2/11	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 3/21 )	0/0	( 0/0 )	1/5	( 0/0 )	4/23	( 7/52 )
計	23/126	( 14/79 )	2/11	( 0/0 )	1/3	( 1/4 )	1/6	( 10/53 )	0/0	( 0/0 )	1/5	( 0/0 )	2/10	( 1/5 )	28/151	( 28/188 )	
タイ	1	0/0	( 2/95 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/95 )
	2	10/268	( 2/58 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/3 )	0/0	( 0/0 )	10/268	( 3/61 )
	3	11/177	( 10/458 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	11/177	( 10/458 )
	4	17/500	( 21/661 )	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/3 )	1/5	( 1/5 )	18/505	( 25/677 )
計	38/945	( 35/1272 )	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/6 )	1/5	( 1/5 )	39/950	( 40/1281 )	0/0	( 0/0 )	
ドイツ	1	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	2	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/8 )
	3	1/8	( 1/5 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/6 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	1/8	( 2/11 )
	4	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
計	1/8	( 1/5 )	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/6 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	1/8	( 4/19 )	
ベトナム	1	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	2	0/0	( 1/6 )	0/0	( 3/20 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 4/26 )
	3	3/87	( 2/146 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	3/87	( 2/146 )
	4	0/0	( 1/91 )	0/0	( 1/10 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 2/101 )
計	3/87	( 4/243 )	0/0	( 4/30 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	3/87	( 8/278 )	
インドネシア	1	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	2	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	3	3/35	( 4/179 )	0/0	( 3/12 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	3/35	( 7/191 )
	4	2/54	( 4/77 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	2/54	( 4/77 )
計	5/89	( 8/256 )	0/0	( 3/12 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	5/89	( 11/288 )	
ラオス	1	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	2	0/0	( 0/0 )	0/0	( 4/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 4/8 )
	3	2/27	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	2/27	( 0/0 )
	4	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/20 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/20 )
計	2/27	( 0/0 )	0/0	( 5/28 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	2/27	( 5/28 )	
イギリス (日本側 協力研究 者)	1	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	2	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
	3	1/9	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	1/9	( 0/0 )
	4	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )
計	1/9	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	1/9	( 0/0 )	
合計	1	0/0	( 2/95 )	0/0	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 4/103 )
	2	10/268	( 3/64 )	21/111	( 14/61 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 1/4 )	1/6	( 2/8 )	0/0	( 1/3 )	0/0	( 0/0 )	32/385	( 21/140 )
	3	21/343	( 17/788 )	1/8	( 6/27 )	0/0	( 0/0 )	1/3	( 0/0 )	0/0	( 6/30 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 0/0 )	23/354	( 29/945 )
	4	19/554	( 26/829 )	1/7	( 6/61 )	2/11	( 2/8 )	0/0	( 0/0 )	0/0	( 3/21 )	0/0	( 1/3 )	2/10	( 1/5 )	24/582	( 39/927 )
計	50/1165	( 48/1778 )	23/128	( 28/157 )	2/11	( 2/8 )	1/3	( 1/4 )	1/6	( 11/59 )	0/0	( 2/6 )	2/10	( 1/5 )	79/1321	( 88/2518 )	

※各国別に、研究者交流・共同研究・セミナーにて交流した人数・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。

### 8-2 国内での交流実績

1	2	3	4	合計
0/0	( 0/0 )	27/37	( 1/3 )	0/0
			( 20/20 )	27/37
				( 21/23 )

## 9. 平成27年度経費使用総額

(単位 円)

	経費内訳	金額	備考
研究交流経費	国内旅費	9,644,144	
	外国旅費	3,187,022	
	謝金	73,760	
	備品・消耗品 購入費	15,714	
	その他の経費	1,327,774	
	外国旅費・謝 金等に係る消 費税	251,586	
	計	14,500,000	
業務委託手数料		1,450,000	
合 計		15,950,000	

## 10. 平成27年度相手国マッチングファンド使用額

相手国名	平成27年度使用額	
	現地通貨額[現地通貨単位]	日本円換算額
タイ	[3,000,000Bt]	9,120,000 円相当
ドイツ	[1,000 ユーロ]	121,000 円相当
ベトナム	[5,000 ドル]	540,000 円相当
インドネシア	[500,000 円]	500,000 円
ラオス	[100,000 円]	100,000 円

※交流実施期間中に、相手国が本事業のために使用したマッチングファンドの金額について、現地通貨での金額、及び日本円換算額を記入してください。