

**研究拠点形成事業**  
**平成 28 年度 実施報告書**  
**(平成 25～27 年度採択課題用)**

**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：    | ベルリンポイト工科大学 |
| 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

( 3 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、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、岡山県

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、ソククラ王子大学、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) ベルリンボイト工科大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：(英文)

Life Sciences and Technology・Professor・Peter GOETS

協力機関：(英文) なし

(和文)

経費負担区分 (A型) : パターン2

(3) 国名 : ベトナム

拠点機関 : (英文) Can Tho University

(和文) カントー大学

コーディネーター (所属部局・職・氏名) : (英文)

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

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

(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、ベトナム国家農業大学、ニュエンタッタン大学、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. 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28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カ国の計7カ国によって実施していることから、昨年までと同様に、それぞれの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、直接相談する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つの研究課題について、それぞれのリーダーおよびサブリーダーが個々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必要に応じてサポートする。

本事業の中間点（3年目）となる平成28年度は、メンバー間の情報交換に加えて、個々の共同研究の進展を確認するために11月に第2回ジョイントセミナー（メンバー全体の会議）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ジョイントセミナーの実施計画並びに研究者交流計画を立て、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コーディネーター間で前倒しを検討する。また、11月に開催する第2回ジョイン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、全メンバーの交流の場を確保するために、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している。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している。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・開催している。

平成28年度は以下のように目標を設定し、実施する。

タイ日本大使館において、本事業の課題4、5関連で、タイ企業やタイの日本企業関係者を対象にして、特に発酵微生物関連を中心としたセミナーを開催する。また、タイ研究博覧会2016では、本事業の課題3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、事業成果の一部を企業関係者や他の研究者へ紹介する。一方、第3回サテライトセミナーをカントー（ベトナム）で開催し、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、ベトナムでの本活動の広報の場とする。また、第2回ジョイントセミナーをチェンマイ（タイ）で開催し、本事業全体の中間成果報告会と位置づけて積極的な意見交換の場とする。

昨年までと同様に、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が、その基盤的な研究は共同研究者間で情報交換をしながらタイを含むASEAN諸国で実施し、より先端的で詳細な解析が必要なものについては日本の大学で実施する。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や本事業で開発された株などを用いて日本やタイで実施する。

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それぞれの国のコーディネーターに提出し、その後コーディネーター間で必要に応じて摺り合わせ、リーダーやサブリーダーを含めて共有する。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>

本事業では拠点大学交流事業やアジア研究教育拠点事業に引き続き、多くの若手研究者が参加しており、参加大学において実践的な若手研究者育成の場として役立っている。海外メンバーは研究者交流として日本側共同研究者の研究室に滞在するが、その間、日本側の若手研究者や学生は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、海外の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。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。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12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。

その他、これまでと同様に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短期受け入れなどの支援および指導を行う。

#### ＜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、課題4や5では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を示してきた。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。

- ・山口大学農学部は、平成28年1月9日、タイの Mae Fah Luang 大学理学部と学部間協定を締結した。

- ・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」などに積極的に申請している。

- ・平成26年度から協議していた神戸大学・農学部とアグロインダストリー学部間の学部間協定を締結することができた（平成28年2月9日）。それにともない、CCPでの交流以外にお互いが行き来することと学部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（平成28年3月22日）。

- ・山口大学では、タイ側との共同研究の一部が e-ASIA 事業に採択され、日本・アメリカ・フィリピン・インドネシアとの共同研究事業となったことから、本事業と平行して実施する。

## 6. 平成28年度研究交流成果

### 6-1 研究協力体制の構築状況

本事業の研究協力体制は既に整っている。昨年までと同様に、各共同研究グループから提出された年度計画書に基づいて、6月末までに、研究者交流の候補者や各セミナー参加候補者を7カ国のコーディネーター間でメールによって相談し、決定した。特に、研究者交流において、派遣希望者数の多いタイ側では業績や将来性を加味して候補者を絞り込んだ。また、各セミナーについてはリーダーから推薦された候補者の中から口頭発表者を決定した。ジョイントセミナー開催時にコーディネーター会議および組織委員会を開催し、残りの2年半の事業計画について意見交換を行うと同時に各国の問題点等を共有し、対策を協議した。特に、継続的な国際交流が重要との共通認識のもと、次の拠点事業申請に向けて研究テーマや目的について意見交換を行った。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頻繁に開催し、スムーズな事業運営に務めた。一方、本事業では、各共同研究グループ内の意思統一のために英語による共同研究の年度計画書を作成し、さらに、それに沿って日本語の年度計画書を作成する。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全体の年度計画書を提出し、本年度の活動を開始した。

世界的拠点形成に向けて、本事業から新たに加わったインドネシア、ドイツ、イギリスとの交流の強化を目指している。インドネシアはコーディネーターの働きかけによって Ristekdikti から研究グループに研究費が支援されるようになり、交流が加速すると期待される。ドイツは第4回サテライトセミナーの平成29年度開催に向けて、積極的な交流を開始し、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た。さらに、イギリスは日本およびタイの若手研究者2名をそれぞれ約1月受け入れ、先端的な共同研究を実施した。

## 6-2 学術面の成果

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。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た。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。

課題1では、1) タイで分離した熱帯性真菌が生産するキシロシダーゼの特徴づけと遺伝子クローニング、2) ラオスで分離したエタノール生産性酵母に関する共著論文の発表、3) タイのアルコール発酵スターターから単離した酵母 *Meyerozyma caribbica* のキシリトール脱水素酵素に関する共著論文の発表、4) タイで分離した耐熱性 *Bacillus* の endo-1,4- $\beta$ -mannanase に関する共著論文の発表、5) タイの土壌から分離したセルラーゼ活性を有する菌株の種の同定、6) タイで問題となっているアブラヤシ・パラゴムノキの病害に対して抑制効果を示す放線菌の特定、7) *Thermobifida alba* AHK119 由来の遺伝子組換えカルボキシエステラーゼ(Ca119)によるマラチオン分解産物の構造確認、8) *Paenibacillus* 由来の遺伝子組換えサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いてアントシアニンの配糖体化に成功、9) タイで単離された耐熱性酵母 *Candida easanensis* strain JK-8 の生産する耐熱性・耐酸性  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと配列解析および共著論文の発表、10) 耐熱性放線菌が生産する熱ショック代謝物(Heat Shock Metabolites: HSM)の発見など、相互の貢献が十分に反映された学術成果を得ることができた。

課題2では、耐熱性や耐熱化の研究、キシロースやアラビノースなどの非可食性の糖類を用いた発酵研究、これらをゲノムワイドに理解・発展させようとしている。耐熱性や耐熱化に関しては、実験室進化や天然分離株のゲノム解析及び比較ゲノム解析から作成された耐熱性・耐熱化遺伝子リストのレベルから、耐熱性・耐熱化における具体的な機能・役割に関する研究レベルへ移行してきている。活性酸素種除去系、タンパク質分解酵素、RNA合成酵素など、生理学的に重要なタンパク質が関わっていることが分かってきた。非可食性の糖類を用いた発酵研究においては、耐熱性酵母 *Kluyveromyces* において、これまで知られていた出芽酵母の仕組みとは異なる仕組みが備わっていることが明らかとなり、新しいメカニズム解明に向けた取り組みに期待したい。他

方、五炭糖を利用するアミノ酸生産菌のゲノムを解読し、その能力のゲノムレベルの洞察を行った。

課題3では、微生物-ヒト、動物、植物、節足動物、微生物、環境の相互作用を解析することにより、生態系の維持、環境の維持、人や動物の健康を目指して研究を行っているが、本年度は以下のような成果を得た。1) アジアにおける感染症の疫学的解析において、様々な節足動物媒介感染症が動物に感染していること、原因となる蚊が大陸間を移動していること、蚊の遺伝子内にウイルス遺伝子が様々な形で挿入されていることが明らかとなった。2) プロバイオティクス開発に関する研究では、タイおよびインドネシア人の腸内細菌叢研究から、タイの子どもが高脂肪食を摂取していること、タイから分離した乳酸菌プロバイオティクスにバンコマイシン腸球菌やサルモネラ菌などの増殖抑制効果があることが明らかになった。3) 植物-微生物相互作用の研究では、葉面微生物がホルモン・ビタミン生成能を有すること、熱帯性植物の内生菌が揮発性化合物を生成することで有害微生物の生育抑制能を有すること、耐熱性緑藻類や珪藻類が機能性脂質生成能を有すること、アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物のゲノム解析から有用ポチケチド生合成遺伝子クラスターが確認され、その情報に基づいて新規類縁体薬剤を作成できることが明らかとなった。4) 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研究では、走化性センサーの特定を通じた有害物質の分解・植物感染のルート解析が進んだこと、高いパラコート分解能を持つ糸状菌を特定したこと、亜熱帯の生態系保持に関わる淡水プランクトンが山口県の淡水湖沼域にも存在することが明らかとなり、今後の熱帯性プランクトン解析の足がかりが得られたことなどの成果があった。

課題4では、抗菌性、神経保護作用、バイオサーファクタントなど生理活性物質を生産する微生物をタイの各地から単離し、リボソームRNA遺伝子解読により種同定した。その結果、新種あるいは既存種であっても新しいゲノタイプを有する亜種を発見した。これら微生物の生産する生理活性物質についてはほぼ精製が完了している。その中で、*Monascus* 菌により穀類発酵で得られるタイの伝統的アルコール飲料の抗酸化活性、バクテリオシンへのアミノ酸点変異導入によるその生合成機構の解明、*Bacillus* と *Aspergillus* の混合発酵によるバナナ皮からの乳酸発酵条件の最適化、ならびに平行発酵による乳酸発酵系の確立、*Streptomyces* 菌由来熱耐性グルカナーゼの発見、バイオサーファクタントとして有用なプロピルグルコシドの酵素による生産手法の開発、土壌肥沃度評価としての SOFIX の更なる最適化と農業現場への適用度評価、農業廃棄物からのメタン発酵システムの確立、が今年度の成果として論文発表された。

課題5では、新規産業創出を目的とする次世代発酵技術の確立を目指して平成28年度は12件の共同研究を実施した。個々の共同研究においては、新たな酵素生産微生物の獲得、生産条件の最適化などが着実に進展している。平成28年度に、特に顕著な進展や新しい展開があった成果として下記を挙げることができる。バイオ燃料生産では同プロセスから出る排水を利用した生産系のメリットが示された。セリシン分解では実バイオマスである蚕の繭を用いた検討が進められた。オリゴ糖生産に関しては普遍的に存在するオリゴ糖の異性化による高機能化の可能性が見いだされた。新しい方向へ研究を展開させた共同研究としては、高温バイオエタノール生産プロセスのモデル化・シミュレーションでの評価や実生産プロセスに利用する耐熱性酵母の菌株育種がスタートしたことを挙げることができる。また、大腸菌での合成生物学的な酪酸生産も、これまでの研究過程における偶然の発見を進展させたものである。基礎科学的な成果としては、耐塩性

プロテアーゼの耐塩性に関わると推定されるアミノ酸残基の特定やハイタン生産のための活性汚泥中のセルロース分解微生物群の同定が進んだ。

### 6-3 若手研究者育成

以下のように積極的な若手研究者育成に努めた。

1. 若手研究者の受入：山口大：Wichanee Bankeeree 博士（チュラロンコン大）、Wichai Soemphol 博士（コンケン大）、Nawarat Nantapong 博士（スラナリー工科大）、Phong Xuan Huynn（カントー大）、Kamonchai Cha-aim 博士（シーナカリンウイロート大）、Prapaipid Chairattanamanokorn 博士（カセサート大）、Sompong 博士（タクシン大）、大学院生2名と学部生4名（カセサート大）；北海道大（森川）：2名の大学院生（タイ）、九大（園元）：Long Hoang Dang Bui 博士（ベトナム）、Amonlaya Tosukhowong 博士（タイ）、静岡大（徳山）大学院生（タイ）
2. 若手研究者の派遣：山口大：高坂（マンチェスター大）、Noppon Lertwattanasakul 博士（マンチェスター大）佐々木（国際セミナーでの発表）、琉球大（橘）大学院生2名（ジョイントセミナー参加）、岐阜大学（岩橋）大学院生1名（ジョイントセミナー参加）
3. 博士課程学生受け入れ：阪本（大阪府大）1名（シーナカリンウイロート大）、前田（山口大）2名（ボゴール農業大、アンザン大）、久保（立命館大）2名（タイとインドネシア）、薬師（山口大）1名（インドネシア）、山田（山口大）1名（インドネシア）
4. 現地での博士課程学生指導：浅野（富山県立大）1名（ソクラ王子大）、若山（立命館大）2名（タイ）、酒井（九大）1名（コンケン大）、
5. 学位付与：山田（山口大）Sukanya Nitiyon（タイ）、若山（立命館大）Elya Mufidah（インドネシア）、久保（立命館大）1名（インドネシア）
6. その他：JST さくらサイエンスプラン（山口大、神戸大、山形大、香川大）多数の大学院生の受入；JASSO 海外留学支援制度（山口大、富山県立大）多数の大学院生および学部生の受入；河合（京都工芸繊維大）Uschara Thumarat 博士が日本生物工学会の DaSilva Award を受賞；徳山（静岡大）シーナカリンウイロット大学と静岡大学との大学間協定を平成29年2月に締結した。

### 6-4 その他（社会貢献や独自の目的等）

- ・2016年10月13日、「バイオエネルギーフォーラム in やまぐち」にて、基調講演「山口大学中高温微生物センターのバイオエネルギーへの取り組み」を行った（山田）。
- ・2016年12月19日、環境エネルギー技術事業化交流会（岡山）「地球温暖化問題と低炭素社会への動向／バイオマス利活用」にて、招待講演「次世代型発酵技術によるバイオエタノールの生産」を行った（山田）。
- ・2017年3月10日、シンポジウム「環境浄化とリンクするバイオ燃料生産高温微生物発酵系の開発」（東京）にて、招待講演を行った（星田）。
- ・2016年11月12日、日本生物工学会九州支部市民フォーラム（沖縄）「沖縄発バイオテクノロジー～微生物をコントロールし活かす～」にて、講演を行った（橘）。
- ・2017年1月28日、日本農芸化学会第98回農芸化学会サイエンスカフェin那覇にて、講演「沖縄の伝統発酵食品「とうふよう」をつくる紅麹菌の話」を行った（橘）。
- ・COC+プログラム「地域企業及び教育機関と連携した米焼酎関連技術検討会」にて、講演「世界

の珍しい酒と発酵食品」を行った（寺本）。

- ・（社）SOFIX 農業推進機構でSOFIX 分析のサービスを開始した（久保）。
- ・山口県の「次世代エネルギー研究会植物工場部会及び微細藻類部会」に属し、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継続して参画している（今井）。

### 6-5 今後の課題・問題点

個々の共同研究においては、それぞれ新たな挑戦をしていることから多くの問題点があり、それらを克服しながら研究を推進している。中には、研究続行が難しいものもあり、そのような場合は共同研究課題を一部変更している。また、一部の共同研究課題において、カウンターパートの移動等によって研究継続を断念したものもある。事業全体の問題として、日本側の研究者から、カウンターパートの来日期間が短く十分な共同研究ができないとの指摘が多数ある。また、自国に最先端機器が無いあるいは研究先進国で学位をとっていない研究者にとっては、短期間の来日では解析が中途半端になるあるいは基本的な技術指導が十分に受けられないとの指摘がある。本事業では一ヶ月の滞在費の支援をしており、受入研究者によっては他の予算によって滞在期間を延ばしているが、予算的に余裕がない場合は対応ができていない。この点の対応として、複数のメンバーによって他の競争資金を獲得している場合もあるが、競争資金の研究課題の枠組みに入れない多くの共同研究に対して JSPS の支援の増額が望まれる。一方、5年間の事業は短すぎるとの意見もある。研究先進国間のみの事業の場合は、事業開始直後に共同研究が軌道に乗るが、本事業のように研究後進国との事業の場合は、研究技術レベルの引き上げなど共同研究が順調に進みだすまでに時間がかかる場合が多く、研究業績をより多く残すためにも2-3年長い方がコストパフォーマンス的にも良いと考えられる。また、本事業と結び付けた博士課程への進学を後押しできるような奨学金制度の要望もでてきている。なお、中間評価で指摘された点に関することについては7-4 でまとめて記述する。

### 6-6 本研究交流事業により発表された論文等

- (1) 平成28年度に学術雑誌等に発表した論文・著書 68本  
うち、相手国参加研究者との共著 31本
- (2) 平成28年度の国際会議における発表 107件  
うち、相手国参加研究者との共同発表 71件
- (3) 平成28年度の国内学会・シンポジウム等における発表 55件  
うち、相手国参加研究者との共同発表 14件

## 7. 平成28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<br>氏名・所属・職  | (和文) 伊藤真一・山口大学創成科学研究科・教授<br>(英文) Shinichi ITO・Yamaguchi University・Professor   |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職 | (英文) Piamsook PONGSAWASDI・Chulalongkorn University・Professor<br>Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor   |
| 28年度の研究<br>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、分離微生物および生産物質の研究）に分け、それぞれ9件および5件の共同研究（小研究課題）を実施した。</p> <p>1. 有用微生物の検索</p> <p>1) バイオ燃料および高付加価値物質を生産する熱帯性真菌の探索<br/>熱帯性真菌を単離し、生産するキシロシダーゼの酵素の性質を調べた結果、有用酵素であることがわかったので、その遺伝子をクローニングした。配列情報から、エキソンをPCRにて取得し、酵母発現系に導入する計画が進めたが、PCR合成ができず、配列情報、または、利用するゲノムに問題がある状況となった。PCR合成を確実に言い、発現系確立に向けて研究を進めている。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析<br/>前年度に引き続き、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。また、<i>Zymomonas mobilis</i> の分離培養法も検討した。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析<br/>ASEAN 諸国にはアメリカや中国に匹敵するバイオマスが存在し、その効率的な利用が求められている。その中で、本共同研究では、バイオエタノール生産等を目指して、種々のバイオマスに適した有用な酵母の開発を進めている。特に、耐熱性酵母を活用した高温発酵は、次世代型の省エネ技術として期待されている。昨年に引き続いて、それぞれの国で酵母の分離をすすめるとともに、これまで分離された酵母について、糖資化性、耐熱性、エタノール生産性等を検討した。また、モラセスなどのバイオマスを炭素源としてスモールスケールで発酵試験を行った。さらに、優れた株については種の同定を行った。</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<br/>タイの各地で収集したアルコール発酵スターターに含まれる細菌や真菌</p> |

の微生物叢を次世代シーケンサーを用いて解析した。また、蒸米にスターターと水を加えてアルコール発酵を行い、発酵中の微生物叢の変遷を解析した。また、スターターから単離した真菌よりアラビノース代謝活性を有する酵母を選択し、その培養菌体よりペントース代謝酵素を精製し、その諸性質を明らかにした。

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

研究者交流では、Phuengmaung Pornpimol 氏 (Srinakharinwirot 大学博士課程学生) を半年間 (2016 年 10 月より) 大阪府立大学に受入れた。

研究ではマンナンの完全糖化を目的に、強力な  $\beta$ -マンノシダーゼおよび  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ生産菌のスクリーニングを行った。

#### 6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

①タイ国土壌よりセルラーゼ活性を有する菌株を分離し、16S rRNA 遺伝子解析による同定を行った。

②*Bacillus* 属細菌よりセルラーゼ遺伝子のクローニングを試みた。

③タイ国発酵食品(pla-som)より乳酸菌を分離し、16S rRNA 遺伝子解析による同定を行うと共に、病原性細菌に対する生育阻害活性を調べた。

④タイ国発酵食品(kapi-ung)について16S rDNA-MiSeq解析による菌叢解析を行った。

#### 7) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)生産菌の単離と解析

抽出産物について、静岡大学にて NMR、FTIR、蛍光顕微鏡を用いてその構造を解析した。その結果、目視で固形物は確認できるものの、NMR、FTIR ともに目標とする物質の確認ができず、検討した培養条件ではポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)の生産が生産できていない、もしくは非常に少ないことが考えられた。タイ側にて生産条件の検討を再度行ったが改善が認められず、NMR、FTIR 解析で目的産物の解析はできなかった。ゲノム解析では、タイ側から送られた 3 サンプルのうち、1 サンプルに関してゲノム解析に成功したが、コンティグ数が多い結果となった。

#### 8) クロム還元菌の探索

主にタイ側で、タイの海水からクロム除去能のある微生物を探索した。

#### 9) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の分離・同定

Dr. Sunpapao (Prince of Songkla University) との共同研究 (アブラヤシおよびパラゴムノキの難防除病害の原因菌の単離・同定) を引き続き実施した。

研究者交流では、International Joint Seminar of New Core to Core Program A.

Advanced Research Networks on “Plant-Microbe Interaction: Friendship and worship”において、熱帯で問題になっている土壌伝染病害に関する研究発表および意見交換を行った。また、新たにカセサート大の Dr. Chatchawan Jantasuriyarat との共同研究 (Genetic diversity of rice blast resistance genes in Japanese rice varieties) を開始した。これに関連して、Dr. Jantasuriyarat の研究室の院生 (1名、84日間) を受け入れ、実験を指導した。

## 2. 分離微生物および生産物質の研究

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

Dr. Uschara Thumarat の京都工繊大滞在(2016年9月26日~10月25日) 期間中、研究の打ち合わせを行い、Ca119 を用いた実験を実施した。

2) ①組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼおよびアミロマルターゼを用いたリグニンおよびサリシン配糖体の合成

②*Paenibacillus* 由来組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いたアントシアニン配糖体の合成

ローゼル (*Hibiscus sabdariffa*) から抽出したアントシアニンに、*Paenibacillus* A11 sp 由来の遺伝子組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ (CGTase)を用いて、マルトシル $\alpha$ -サイクロデキストリンからマルトオリゴ糖を転移導入することによって配糖体化するための最適反応条件を検討した。また、配糖体化したアントシアニンの抗酸化作用を調べるとともに、配糖体化アントシアニンの分離を行った。

*Fusarium* sp. F59 をマルトース培地で培養した時に発現している  $\alpha$ -グルコシダーゼをコードする *mal2* の mRNA をクローニングし、大腸菌での発現系を構築し、その酵素活性を評価した。

*Bacillus licheniformis* 43-1 の生産する DCG 包接能を有する糖質を生成する酵素 (推定ブランチング酵素: BE) の精製を行った。

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

タイ国より Jantaporn Thongekkaew 氏を11月17日~12月27日まで受入れ、タイで単離された耐熱性酵母 *Candida easanensis* strain JK-8 の生産する耐熱性・耐酸性  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと配列解析を試みた。前年度取得した  $\beta$ -グルコシダーゼの部分アミノ酸配列や1,3-グルカナーゼの保存配列の情報を利用し *C. easanensis* strain JK-8 のゲノム DNA から PCR 産物を取得、 $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子の配列を解析するとともに *Hanseniaspora osmophila*、*Candida albicans* and *Candida maltosa* の1,3- $\beta$ -グルコシダーゼのアミノ酸配列と比較した。また、論文1報が掲載され、The 2<sup>nd</sup> Joint Seminar of Core to Core Program A.にてポスター発表した。

|  |  |
|--|--|
|  | <p>4) 各種ストレス曝露条件における耐熱性酵母の性質に関する研究<br/>         今年度は、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、その結果、抗酸化関連遺伝子の発現量に変化があることが示唆された。また醸造酵母において重金属に対する応答を解析し、特にマンガンに対する影響が顕著であった。</p> <p>5) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>①薬剤耐性前立腺癌に有効な微生物二次代謝産物の探索および薬理活性評価を行った。</p> <p>②大腸癌細胞を用いて微生物二次代謝産物キサントフモールの抗がん作用解析を行った。</p> <p>③大腸癌細胞を用いて微生物二次代謝産物ノナクチンの抗がん作用解析を行った。</p> <p>④大腸癌や肝臓癌でよく見られるβ-カテニン変異癌細胞に選択的細胞死を誘導する化合物の探索を行った。</p> <p>⑤耐熱性放線菌を高温(45°C)で培養することで、通常温度(30°C)培養では検出されない二次代謝産物が複数生成されることを見出した。そこで耐熱性放線菌が高温培養選択的に生産する代謝産物を熱ショック代謝物(Heat Shock Metabolites(HSM))と名付け、それらの網羅的な検出および同定・データベース化を試みた。</p> |
| <p>28年度の研究<br/>         交流活動から得られた成果</p> | <p>1. 有用微生物の検索</p> <p>1) バイオ燃料および高付加価値物質を生産する熱帯性真菌の探索<br/>         新たに見出したキシロシダーゼは、キシランからの有用物質生産に利用できる酵素反応を有することが明らかになった。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析<br/>         現地研究者の都合により、今年度の成果として新規な <i>Zymomonas</i> 菌を分離することはできなかった。また、効率の良い分離培養方法の検討も行うことができなかった。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析<br/>         高温発酵は、次世代型の省エネ技術として冷却コスト削減、冷却装置の簡易化、雑菌混入の抑制などが見込まれている。一方、高温発酵に不可欠な熱帯性環境から分離される耐熱性微生物は、生物多様性の条約等から国境を越えた利用に制約があるが、本事業のような国際共同研究によって利用が可能となる。そこで、本共同研究は、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。これまでの研究によって、セルロース系バイオマス利用に適した酵母もいくつか見出した。開発した耐熱性酵母は研究課題2や5で使用する。</p>                              |

## 4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

27 種類のタイ由来スターターに含まれる細菌や真菌の微生物叢を次世代シーケンサーで網羅的に解析した結果、ほとんどのスターターにおいて各種乳酸菌および *Rhizopus* や *Mucor* などの真菌が含まれており、発酵液の酸性化や糖化・発酵に関わっていることが明らかとなった。また、蒸米にスターターと水を加えてアルコール発酵を行い、発酵中の微生物叢の変遷を次世代シーケンサーにより解析し、主に酵母がアルコール発酵に関わっていることを明らかにした。さらに、スターターから単離した真菌よりアラビノース代謝活性を有する酵母 *Meyerozyma caribbica* 株を選択し、その培養菌体よりペントース代謝酵素であるキシリトール脱水素酵素を精製し、その諸性質を検討した。その結果、本酵素はアラビトール脱水素酵素活性を併せ持つ新奇な酵素であることを明らかにした。また、遺伝子クローニングを行い、本酵素の大腸菌および酵母における発現系の構築に成功した。

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

これまでの研究で獲得している研究室保有の耐熱性菌を対象として、マンノオリゴ糖を分解できる  $\beta$ -マンノシダーゼおよびガラクトマンナンを分解できる  $\alpha$ -ガラクトシダーゼを高生産する微生物を探索したが、目的とする高生産株を得ることはできなかった。

## 6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

- ① CMC の分解によるハロー形成を指標にスクリーニングを行い、セルラーゼ活性を有する菌株を単離した。16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Bacillus subtilis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus mojavensis* と 100% の一致を示した。
- ② データベースに登録されている *Bacillus* 属細菌のセルラーゼ遺伝子を参考にして PCR クローニングを試みたが、該当する遺伝子を単離することは出来なかった。
- ③ 16S rRNA 遺伝子解析の結果、*Lactobacillus plantarum*、*Lb. pentosus* および *Weissella confuse* と同定した。単離した菌株は *Staphylococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* に対する生育阻害活性を示した。
- ④ *Tetragenococcus* 属 (最大占有率 43%)、*Staphylococcus* 属 (36%)、*Halanaerobium* 属 (45%) などの耐塩性菌群が顕著に検出された。また *Bacillus* 属、*Virgibacillus* 属および *Natronobacillus* 属といった芽胞形成菌 (10~20%) も検出された。

## 7) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)生産菌の単離と解析

タイ側研究者は、タイの各地から、耐熱性と高生産性を指標として、ポリ

ヒドロキシ酪酸生産菌のスクリーニングを実施した。また、これまでの研究で得られている生産菌を用いて、培養条件を変化させて、ポリヒドロキシ酪酸の効率的生産法と抽出法の検討を行った。タイ側研究者は、学生1名と28年3月に1か月間日本に滞在して培養法を検討し、得られた産物について、28年4月から静岡大学にてNMR、FTIR、蛍光顕微鏡を用いてその構造を解析した。また、使用している生産菌のゲノム解析を静岡大学で実施した。

#### 8) クロム還元菌の探索

*Bacillus megaterium* がクロム (VI) の除去能があることが分かった。除去能の最適条件は pH 7.0, 37°C であった。人工海水による培養では24時間で25 mg/L のクロム (VI) を還元できた。

#### 9) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の分離・同定

アブラヤシおよびパラゴムノキの病害に対して抑制効果を示す放線菌を特定することができた。今後は、種の同定を行うとともに、本菌の生化学的性状を明らかにする予定である。

### 2. 分離微生物および生産物質の研究

#### 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等農薬分解への応用

Ca119 を精製し、精製酵素を用いてマラチオンの分解を試み、TLC 及び Maldi-Tof-Ms により、分解産物の有無と推定代謝産物の構造を確認した。他方、Ca119 はポリエステルの分解能を有していなかったため、Strain119 における Ca119 の役割はポリエステル分解で生じる低分子化合物の分解処理と推定した。

#### 2) ①組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼおよびアミロマルターゼを用いたリグニンおよびサリシン配糖体の合成

#### ②*Paenibacillus* 由来組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いたアントシアニン配糖体の合成

- ・反応液中のアントシアニン濃度、CGTase 活性、マルトシル $\alpha$ -サイクロデキストリン濃度、pH、温度および反応時間に関してアントシアニンの配糖体化最適反応条件を構築した。配糖体化後のアントシアニンは、鉄抗酸化および ABTS 抗酸化作用がいずれも約 15 倍上昇した。このため、マルトオリゴ糖による配糖体化によってアントシアニンの抗酸化機能の上昇に成功した。また、配糖体化アントシアニンは TLC および HPLC によって3つの画分に分れ、構造の異なる3つの配糖体化アントシアニンが生成することを明らかにした。

- ・*Fusarium* sp. F59 由来の *mal2* 遺伝子を大腸菌で発現させ、粗酵素液を調製し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を測定したところ、わずかではあるが本酵素活性を見出すことができた。またこの粗酵素液を SDS-PAGE で分析したところ、微量ではあるが目的酵素と思われるタンパク質を見出すことができ

た。

- ・ *B. licheniformis* 43-1 の生産する BE を陰イオン交換カラムで精製を進めたところ、少なくとも BE 活性を示す 3 つの画分を得ることができた。

### 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

nested PCR と inverse PCR を組み合わせ、*C. easanensis* strain JK-8 $\beta$ -グルコシダーゼの 240 アミノ酸に相当する塩基配列を決定した。*Hanseniaspora osmophila*, *Candida albicans* and *Candida maltosa* の 1,3- $\beta$ -グルコシダーゼのアミノ酸配列と比較・解析し、一致しているアミノ酸配列を明らかになった。3'側 5'側に今回読めていない塩基配列が残っているため、まずはこれらの塩基配列を読む予定である。

### 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

耐熱性酵母では放射線照射に対して醸造酵母とは異なる応答をしていることが判明した。また醸造酵母においてマンガンが吸収されることが判明した。東南アジアではマンガンによる土壤汚染が問題になっており、本活動成果はマンガン除去に耐熱性酵母が利用できる可能性もあることを提示できたことである。

### 5) 微生物の生産する生理活性物質の探索

① *in vitro* におけるアンドロゲンと AR の結合阻害活性を指標としたスクリーニングを実施し、放線菌 BB47 株の培養液中に目的の活性を見出した。そして、活性物質の単離精製・構造解析を試みた結果、20 員環マクロライド構造を有する Antarlide G、H を発見した。さらに、既存の AR アンタゴニストに対して耐性を示す変異体 AR に対してもアンタゴニスト活性を示し、耐性を克服した。

② VCP 阻害剤キサントフモールに対して高い感受性を示すがん細胞ではキサントフモール処理によって抗アポトーシスタンパク質 survivin の発現減少が誘導されることを見出した。また、adenylate cyclase/PKA シグナル伝達経路が survivin の発現制御を介してキサントフモールの抗がん活性を抑制的に制御していることを見出した。

③ 変異型 $\beta$ -カテニン発現細胞では変異型 $\beta$ -カテニンが解糖系を阻害することでミトコンドリア依存的に生存すること、さらに、その結果ノナクチンなどのミトコンドリア脱共役剤によるミトコンドリアダメージ誘導が変異型 $\beta$ -カテニンに対して合成致死を誘導することを明らかにした。

④  $\beta$ -カテニン変異型 HCT116 細胞に対しては選択的細胞死を誘導する化合物を探索し、放線菌 K622 株培養液から metacycloprodigiosin (mcPG) を活性本体として同定した。さらに、野生型 HEK-293T 細胞に変異 $\beta$ -カテニンを過剰発現させると mcPG によって細胞死が誘導されたことから、mcPG は変

|  |  |
|--|--|
|  | <p>異β-カテニンに依存して細胞死を誘導することが示唆された。</p> <p>⑤ 研究室が保有する 3040 株の放線菌を寒天培地上において 45°C で培養した。その結果、110 株が高温(45°C)で生育することを確認した。次に、これらの耐熱性放線菌のうち 10 株を 45°C および 30°C で培養し、それぞれの培養生産物を LC-MS を用い比較した。その結果、45°C 培養選択的に生産が検出される熱ショック代謝物(HSM)があることを見出した。また、培養日数や生産培地の検討結果を解析すると、これらの条件に依存して生産される HSM が存在することが示唆された。さらに、30°C 培養では放線菌の増殖は培養 5 日目まで対数関数的であるのに対し、45°C 培養においては放線菌の増殖が培養後 2、3 日目をピークとしてその後減少する傾向があることを見出した。</p> |
|--|--|

| 整理番号               | R-2   | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| 研究課題名              | (和文) ゲノム情報に基づく耐熱性微生物研究<br>(英文) Genome-based Research on Thermotolerant Microbes   |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職  | (和文) 薬師寿治・山口大学創成科学研究科・准教授<br>(英文) Toshiharu YAKUSHI・Yamaguchi University・Associate Professor  |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職 | (英文) Pornthap THANONKEO・Khon Kaen University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor  |        |        |        |        |
| 28年度の研究<br>交流活動    | <p>本研究課題において、以下の7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</p> <p>これまで各国から分離した株について、whole-cell MALDI-TOF/MS 解析等によって分類した。また、高温発酵やセルロース系バイオマスに適した、キシロースを含む広い糖資化能力をもつ <i>Kluyveromyces marxianus</i> を、タイおよびラオスで見出し、それらの発酵能力やストレス耐性の比較を行った。一方で、同様な分離方法を試したが、ベトナムやインドネシアでは今までのところ同種の酵母を見出せていない。また、高濃度の糖や耐熱性等のストレス耐性化等を行い、優れた耐熱性株についてゲノム解析を行った。今後、ストレス耐性の原因変異の特定を進めていく。さらに、本事業で完全ゲノム解析や転写解析が完了した <i>K. marxianus</i> 株について、高温で代謝が大きく変わることを見出し、その代謝変動の生理的役割について検討した。加えて、同株を親株として、<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のグルコース抑制因子のオルソログを破壊して、<i>S. cerevisiae</i> の対応する変異株と比較したところ、相違点や新規な制御が見出された。</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

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。耐熱化実験により得られた *Zymomonas mobilis* TISTR 548 及び CP4 を親株とする耐熱化株の変異遺伝子を、親株において変異させることでどのような遺伝的変異が耐熱化に寄与するかを明らかにした。

## 3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発

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昨年に続き進めた。タイで分離された 19 株の *Komagataeibacter* 属菌株の中から耐熱性に優れた 5 株を特定し、中でも酢酸発酵能に優れた MSKU3 株と菌膜生成能に優れた MSKU12 株を特定し、それらの特性を明らかにした。② *Komagataeibacter* 属菌 MSKU3 株の耐熱化およびエタノール（酢酸）耐性育種を進め、それぞれ適応変異株 KWT-4 および KWE-3 株を取得するとともに、それらの機能解析を行った。また、耐熱性酢酸菌 *A. pasteurianus* SKU1108 の耐熱化株 TH-3 からエタノール（酢酸）耐性株 7E-13 を取得した。③耐熱化株 TH-3 の変異遺伝子解析および発現解析に加え、メタボローム解析も行い、耐熱化機構解明に向けた研究をさらに進めている。④耐熱化株 TH-3 株と高温耐性・エタノール耐性 7E-13 株による Jasmine Rice Wine ともろみを用いた高温酢酸発酵系の開発を企業との共同で進めた。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、さまざまな食酢からショウジョウバエの誘因効果の検証を行い、玄米酢がリンゴ酢に比べて誘引性が高く、その誘引性がポリアミンに起因することを明らかにした。Gunjana Theeragool 博士（タイ、カセサート大学）を受け入れ、研究打ち合わせを行った。Phong Xuan Huynn 氏（ベトナム、カントー大学）を 1 ヶ月間受け入れ、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のうち、*C. glutamicum* CS176 株にアラビノース資化能があること、ビオチン濃度非依存的にグルタミン酸を生産できることが明らかとなった。また、タイ分離株 *C. glutamicum* N24 とその耐熱化育種株 FT-1 が、37°C でも、Penicillin 添加依存的に高濃度グルタミン酸生産が可能であることも明らかとなった。2) 熱感受性 *C. glutamicum* KY9714 株に加えて、野生株 KY9002 株においても、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) 呼吸鎖遺伝子の破壊株を作製しグルタミン酸生産能を調べ、エネルギー生成能の高い  $bc_1c-aa_3$  末端キノール酸化系の稼働が重要であることが明らかとなった。加えて、 $bc_1c-aa_3$  末端キノール酸化系を破壊したとしても、ビオチン濃度をさらに低下させることでグルタミン酸生産が復帰することを見出した。Nawarat Nantapong 博士を1ヶ月半受け入れ、主に上記2)に関連する共同研究を実施した。

#### 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た。その中の一つである *A. pasteurianus* 2-3R 株は、最も高い酢酸生産能力を示した。多糖の構造が異なることが推測されたので、この多糖の化学構造を解析した。Wichai Soemphol が1ヶ月間琉球大学を訪問し、*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ことに関連して、その作用機序について解析した。外山と Wichai Soemphol が 2nd Joint Seminar に参加し、研究成果の発表を行った。その後、外山が Khon Kaen Univ. Nong Khai Campus を訪問、研究打ち合わせを行った。

#### 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

由来・性質の異なる種々の酵母の育種を行い、実用的なエタノール生産に適した株を選択している。耐熱性、エタノール耐性、糖耐性などの高温でのエタノール生産に重要な性質をもたらす遺伝子の同定をゲノムシーケンズと遺伝子操作により探している。これまでにタンパク質の熱感受性に着目し、タンパク質の温度感受性を制御する変異を探索してきたので、タンパク質中のこれらの変異が温度感受性を変化させるメカニズムを解析した。酵母の分裂に必須の遺伝子である Cdc28 細胞周期プロテインキナーゼの温度感受性変異を取得するためにミスマッチ修復遺伝子破壊株を利用して作成し、様々なアミノ酸を変化させることで温度感受性変異株が取得できることがわかった。また、Kamonchai Cha-aim 研究室から学生1人が約1か月、3人が2週間程度赤田研究室に滞在し、研究を行った。

#### 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、世界的によく研究に使用されている *S. pombe* とは別に、耐熱性のある分裂酵母の *S. japonicus* のエタノール生産性と CoQ について調べ、*S. japonicus* が  $42^{\circ}\text{C}$  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) を合成しないことを見いだしてきた。昨年度に蒐集した日本国内で単離されている由来の異なった *S. japonicus* の性質をさらに調べた。*S.*

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
|                                      | <p><i>japonicus</i> が日本国内に生息し、その特性が、異なった由来の株でも広く保存されていることがわかった。</p>  |
| <p>28年度の研究<br/>交流活動から得<br/>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<br/> whole-cell MALDI-TOF/MS 解析が可能となり、迅速に生理学的な解析にすすめるようになった。セルロース系バイオマスに適し、ストレスに強い <i>K. marxianus</i> が見出された。この株は今後、研究課題5でさらに性能を検討する予定である。また、種々のストレス耐性化株を獲得した。今後、これらの株のそれぞれの原因変異の特定を進める。さらに、新しい知見として、<i>K. marxianus</i> が高温で代謝を切り替えることやグルコース抑制機構が <i>S. cerevisiae</i> と異なる点があることなどを見出した。耐熱化の原因遺伝子の特定や高温での代謝切り替えなどは耐熱性の原理解明につながると考えている。</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<br/> 耐熱化株の変異解析を進め、耐熱化株ゲノムにある6つの変異 (<i>rpoB</i> 等) は耐熱化に寄与することを明らかとした。また、親株に対して変異を移した一次組換え株は、ほぼ全ての変異に対して取得を完了した。これらの成果から、これまでに分離された <i>Zymomonas mobilis</i> 株よりさらに耐熱化した株を育種することが期待できる。また、耐熱化株のいかなる変異が耐熱化に寄与しているかが明らかになる。</p> <p>3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発<br/> 耐熱性酢酸菌株の耐熱化機構の理解を前進させた。一方、高温酢酸発酵系の開発については、有用な菌株を育種するだけでなく、耐熱化機能の解明から考えられる、有効な培養条件の設定への展開が期待できる。<i>Komagataeibacter</i> 属菌を遺伝子工学的に代謝改変し、衛生害虫であるハエの除去トラップへの利用に関する開発を行った。代謝改変を通して、より効率的なトラップ開発が期待できる。</p> <p>4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵<br/> 今年度もタイより分離された新規な耐熱性グルタミン酸生産菌の解析を行った。耐熱性株とその耐熱化株用いて、グルタミン酸高温発酵の開発が始まった。コリネ型細菌の耐熱性に、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。この知見は、グルタミン酸高温発酵の開発に大きく貢献できる。ビオチン制限条件におけるグルタミン酸生産では、<i>bc<sub>1</sub>c-aa<sub>3</sub></i>末端キノール酸化系が主に機能していることが明らかになり、グルタミン酸生産におけるビオチン濃度とエネルギー生成効率の関連が示唆された。グルタミン酸生産における酸素要求性の</p> |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>問題に解決の糸口をもたらす。</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<br/>         ノンカイの発酵飲料から単離した <i>A. pasteurianus</i> 2-3R 株の菌膜多糖を解析したところ、多糖を構成している糖組成は <i>A. pasteurianus</i> SKU1108 株と同じであったが、アセチル化の度合いが異なることが示された。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<br/>         タンパク質の温度感受性が、その生物自体の能力を規定していると予想しており、タンパク質の熱安定性を規定する構造を調べるため温度感受性となるタンパク質を探索している。今年度、アミノ酸残基の種類によりタンパク質の熱安定性が変化することが理解できた。これらの変異タンパク質と温度感受性の程度などを詳細に解析することで、タンパク質の熱感受性を決めるメカニズムを明らかにでき、生物自体の耐熱性の理解につながる。</p> <p>7) 耐熱性分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> の有効利用<br/>         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> が日本国内に生息し、その特性が、異なった由来の株でも広く保存されていることがわかった。</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<br>(英文) Research on Environmental Microbes sustaining Tropical Ecosystem   |        |          |        |          |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職  | (和文) 前田 健・山口大学共同獣医学部・教授<br>(英文) Ken MAEDA・Yamaguchi University・Professor  |        |          |        |          |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職 | (英文) Sunee NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor |        |          |        |          |

|                 |  |
|-----------------|--|
| 28年度の研究<br>交流活動 | <p>本研究課題において、以下の11件の共同研究（小研究課題）を実施した。各研究者の個別交流の詳細については添付資料の四半期交流状況報告に記載のとおりであるが、課題3においては3名77日間の受入、3名13日間の派遣を実施した。なお、他経費による交流で報告があったものは、受入3名9日間、派遣4名22日間である。</p> <p>1) アジアにおける感染症の疫学的解析</p> <p>1) タイの犬336頭中6頭(1.8%)がE型肝炎ウイルスに対して抗体を保有しているのに対して、猫は47頭中8頭(17%)が抗体を保有していた。2) タイの犬228頭中10頭(4.9%)がデングウイルス2型に対してELISA吸光度0.5以上を示した。3) タイの犬231頭中109頭(47.2%)がウイルス中和試験で日本脳炎ウイルスに陽性となった。4) タイの猫160頭中18頭(11.2%)が日本脳炎ウイルス、160頭中8頭(5.0%)がランガットウイルス、160頭中0頭(0%)が重症熱性血小板症候群ウイルスにELISAにより陽性となった。5) タイの牛250頭中170頭(68.0%)が日本脳炎ウイルス、250頭中38頭(15.2%)がランガットウイルスにELISAにより陽性となった。6) タイの猫157頭中6頭(3.8%)が狂犬病ウイルスに対してELISA陽性となった。7) フィリピンのコウモリ415頭全てが狂犬病にELISA陰性となった。8) フィリピンのコウモリ251頭全てがELISA陰性であった。9) インドネシアのコウモリの55頭中2頭にJEV抗体が観察された。ジカウイルスやデングウイルスにも抗体が存在している可能性が示唆された。10) タイの蚊4640匹135プールから17プールよりウイルスが分離された。分離ウイルスの多くは蚊特異的フラビウイルスであった。11) インドネシアの蚊543匹48プールから2プールよりウイルスが分離された。1種類はBannaウイルスであった。12) アジア大陸からコガタアカイエカが国内に侵入していることが証明された。13) コガタアカイエカ特異的ラブドウイルスがネッタイエカ・アカイエカ・チカイエカのゲノム内に挿入されていること、挿入された遺伝子が個体ごとに異なっていることが判明した。14) ベトナムの犬の下痢症を引き起こす主要なウイルス（パルボウイルス・ジステンパーウイルス・コロナウイルス）が明らかとなった。</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>前年度に引き続き、タイの植物試料から分離した微生物の系統分類学的解析を行った。葉面微生物が生産する植物生長促進因子として、植物ホルモンの一つであるインドール酢酸（IAA）に着目し、葉面微生物におけるIAA合成経路の解析を行うとともに、葉面微生物によるIAA生産条件の最適化を行った。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与するメタノールセンシング機構の解析を行った。</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-植物相互作用に関与する微生物機構の研究</p> <p>クロロアニリン走化性センサーの分子レベルでの特性化を行うとともに、植物病原菌及び植物成長促進細菌の植物根分泌物に対する走化性センサーの特定を行った。</p> <p>4) タイおよびインドネシア人の腸内細菌叢データに基づいたプロバイオティクスの開発に関する研究</p> <p>1) タイ大都市バンコクに住む19名の小学児童と地方都市ブリラムに住む29名の小学児童において糞便のサンプリングと食生活調査を行った。糞便</p> |
|-----------------|--|

のサンプルは2回行った。得られた糞便サンプルから細菌 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を全細菌を対象としたプライマーを用いた PCR によって増幅させ、そのアンプリコンを次世代シーケンサ (Illumina MiSeq) を用いて大量に配列解析した。結果、サンプル当たり  $11.3 \pm 3.5$  K 本の配列情報を得た。この配列を基に、97% 相同性グループの OUT (operational taxonomic unit) を作成させた。その結果、719 個の OTU が得られた。計 80 サンプルの菌叢データからサンプル間の類似度を計算し、主成分分析を行ったところ、P タイプと BB タイプの相当する 2 つのクラスターが見られた。しかし、バンコクとブリラムの両方とも P タイプと BB タイプが半数ずつ存在し、両都市間で、エンテロタイプの偏りは観察されなかった。ただし、一部のバンコクの被験者で脂質の摂取量の高い被験者おり、それらは BB タイプを示す傾向にあった。現在、胆汁酸とエンテロタイプと食習慣の関連性を解析している。

2) プロバイオティクス候補株の *Lactococcus lactis* KAFF1-4 をヒト腸管モデルに投与し、フローラの変化をモニタリングした。リアルタイム PCR の結果、KAFF1-4 株の投与で、VRE カウントが約 1 桁低下した。一方腸内細菌科、乳酸菌グループ、*Clostridium leptum* グループ、*Bacteroides fragilis* グループ、*Bifidobacterium*、*Clostridium coccooides* -*Eubacterium rectale* グループ、*Faecalibacterium*、*Prevotella* グループの菌数には有意な変化は見られなかった。今後、腸内細菌の一次代謝産物である短鎖脂肪酸の定量を行う予定である。3) *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 の全ゲノム配列を次世代シーケンサー Illumina MiSeq で解析した。Sequencer の不調で得られたシーケンスのクオリティーが低く、信頼度の高い配列データが得られなかったため、再度シーケンスする予定である。4) KUB-AC5 をそれぞれ  $10^5$  cfu/bird および  $10^7$  cfu/bird を生後 3 日間投与した。4 日後に *Salmonella Enteritidis* S003 を投与した。定量 PCR の結果、非投与群では 10~1000 CFU/g ileum の S003 が検出されたのに対し、KUB-AC5 投与群では <10 CFU/g ileum であった。107 投与群では、*Lactobacillus* の菌数が増加しており、また有害菌を含むプロテオバクテリア門が有意に減少していることが観察された。

5) 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

エイコサペンタエン酸 (EPA) 蓄積株としてタイ国の海水から単離された熱帯性微細藻類 *Isochysis* sp. による EPA の工業生産を目的とし、運動性の欠如した EPA 高生産株を得るべく NTG 変異処理を行った。

6) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

タイ王国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 から二種類の新規ポリエーテル系抗生物質を前年度の研究で発見した。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、癌浸潤の抑制、神経細胞保護作用など興味深い薬理活性を示したことから、創薬リード化合物として期待できる。さらに、一つの化合物がテトロン酸に塩素原子が置換した、前例のない珍しい分子構造を有していた。そこで、遺伝子操作による新規な化合物の生産を目的として、本化合物の生合成遺伝子の同定を試みた。

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昨年度までに単離されていた 10 種の細菌、9 種の糸状菌について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が終わっていた。本年度は塩基配列決定を行い、これらの種の同定を終了した。また、パラコート分解能に関する予備的な実験を行った結果、高い

|                         |  |
|-------------------------|--|
|                         | <p>パラコート分解能を持つ菌については、培養条件（特に炭素源や窒素源、pHなど）を変化させた際の分解能について評価を行った。</p> <p>8) 植物共生細菌の多様性解析とその応用<br/>       タイプ6分泌機構は細菌同士の殺傷に関わっていると考えられる。植物表層のメタノール資化性細菌においてゲノムワイドな発現解析を行ったところ、ランタノイド元素の存在下でタイプ6分泌機構に関わると考えられる遺伝子の発現が見られた。</p> <p>9) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明<br/>       タイ北部で単離された <i>Muscodor cinnamomi</i> の揮発性化合物を GC-MS 分析により同定した。また、タイで生産された生卵表在菌を 18 種単離した。そこで、<i>M. cinnamomi</i> 由来揮発成分のこれら生卵表在菌への効果を検証した。また、生卵を <i>M. cinnamomi</i> とともに保蔵し、生卵の日持ちについて調査した。</p> <p>10) 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<br/>       培養したタイ産の微小藻類のケイ藻 (<i>Skeletonema spp</i>) から脂質を抽出して、その脂肪酸組成を解析した。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した。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の解明を目指した。</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<br/>       今年度は 2016 年 10 月に 30 日間、Sujeephon Athibai 博士（コンケン大・理・生物）が山口市に滞在して、山口県の淡水域に生息する動物・植物プランクトンの採種・調査を行った。タイ側での同様の生態調査が進んでいることから、本調査で温帯域側での予備的な基礎データが得られ、今後の比較解析のための研究基盤が構築された。</p> |
| 28年度の研究<br>交流活動から得られた成果 | <p>1) アジアにおける感染症の疫学的解析<br/>       E型肝炎ウイルスの猫での高い感染が確認された。様々な節足動物媒介感染症が動物に感染していることが確認されたが、より特異的な診断系の確立が次年度以降の課題となっている。蚊が大陸間を移動していることが証明された。更なる国際間の移動ルートの解明を目指していきたい。蚊の遺伝子内にウイルス遺伝子が様々な形で挿入されていることが明らかとなった。この意義については今後の課題である。</p> <p>2) メタノール資化性微生物による有用物質生産と植物生長促進<br/>       タイ側で植物試料から分離した菌株を <i>Nonomuraea</i> 属の新種として論文発表した。また、イネ葉面から単離した担子菌酵母における IAA 生合成経路を明らかにするとともに、別の葉面微生物をもちいて IAA の高生産培養条件を最適化した。一方日本側では、メタノール資化性微生物が様上で利用するビタミンおよびその前駆体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制御に関わる新規因子として PpWsc1/PpWsc3 を同定し、その生理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-植物相互作用に関与する微生物機構の研究<br/> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> から特定されたクロロアニリン走化性センサーは</p>   |

以前、リン酸走化性センサーとして特定された CtpL である。クロロアニリン、リン酸と構造が大きく異なる化合物を CtpL がどのように認識するかを分子レベルで明らかにするために、CtpL のリガンド結合ドメインを高発現し、精製した。等温滴定型熱量分析により、リン酸の認識はリン酸結合蛋白質を介して間接的な認識、クロロアニリンは直接リガンド結合ドメインに結合する直接的な認識が行われていることを指示するデータを得ることに成功した。

*R. solanacearum* では新たにホウ酸、L-酒石酸、マレイン酸、クエン酸の走化性センサーの特定に成功した。遺伝子破壊株を用いた解析から、これら走化性センサーは植物感染には寄与していないことが分かった。植物成長促進細菌 *P. protegens* の3つのアミノ酸走化性センサーの特性化を行い、それぞれが認識するアミノ酸の種類を明らかにした。

#### 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

ヒトの腸内細菌叢研究では、バンコクの子どもがブリラムの子どもに対して高脂肪食を摂取していることが判明し、一部の被験者でその影響からか、プレボテラ型ではなくバクテロイデス/ビフィズス菌型の腸内フローラを宿していた。しかし、全体の統計解析では、高脂肪食の摂取とエンテロタイプには相関は見られなかった。今後、糞便のメタボライト解析を行うなどして、食が腸内の環境をどのように変化させ、細菌叢に影響を与えているか解析できるよう情報を集める予定である。

プロバイオティクスの研究では、タイの資源から分離した乳酸菌プロバイオティクスにバンコマイシン腸球菌やサルモネラ菌などの増殖抑制効果があることが腸管モデルや動物実験で示され、これらのプロバイオティクスの有効利用にさらなる期待が高まった。

#### 5) 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

変異処理による運動性の欠如した同株の出現率は、0.1、0.5、1.0 M の NTG 濃度処理で各々32.9、68.5、86.2%であった。変異株を取得後培養し EPA の生産性を確認したところ、運動性の欠損のみならず EPA の生産性も大きく低下しており、未だもって目的とする運動性の欠如した EPA 高生産株は得られていない。

#### 6) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

次世代シーケンサーにより K4S16 株のドラフトゲノム解析を行い、ゲノム中に4個のI型ポチケチド生合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにした。さらに、それらのモジュール並びにPKSドメインの配列解析を行い、そのうちの1つが、今回発見したポリエーテル化合物の生合成遺伝子であることを確認した。その生合成遺伝子クラスターには、ハロゲン化酵素がコードされていた。そこで、生産培地に臭化ナトリウムを添加して培養したところ、塩素に代わり、臭素原子が置換した新規類縁体を得ることに成功した。

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 *Aspergillus tamari* (fungal isolate No. 7) と *Cunninghamella* sp. (fungal isolate No. 9) が最も高いパラコート分解能を持つことが判明した。特に、*Cunninghamella* sp. についてはこれまで報告例がない新種である可能性が判明した。

#### 8) 植物共生細菌の多様性解析とその応用

|  |   |
|--|---|
|  | <p>植物表層のメタノール資化性細菌においてゲノムワイドな発現解析を行ったところ、ランタノイド元素の存在下でタイプ6分泌機構に関わると考えられる遺伝子の発現が見られた。土壌中などランタノイド元素が存在する環境で分泌機構が活性化すると仮定すると、土壌中での細菌間の競争に関わっていることが考えられる。タイプ6分泌機構の遺伝子誘導が起こる因子は様々であるが、このような元素が関わっている可能性から切り込んでいく。</p> <p>9) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明<br/>GC-MS 分析の結果、<i>M. cinnamomi</i> は 2-methylpropanoic acid, 3-methylbutan-1-ol を大量に生成、放散していることが明らかになった。これら揮発性化合物は調査した18種の微生物のうち、16種の微生物の生育を阻害することを明らかにした。そこで100gのライ麦に本菌を摂取し、これと生卵を共存させて常温で保存した。その結果、<i>M. cinnamomi</i> 培養物と共存させることで生卵表在菌が有意に減少し、日持ちが延長することを明らかにした。</p> <p>10) 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<br/>タイ側では、採取および培養したケイ藻類の脂肪酸組成の比較し、日本側では、海藻の香気成分の分析ならびに特徴的成分の同定を行なった。</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<br/>山口県の淡水湖沼域にも、亜熱帯のタイに生息するのと同様の動物・植物プランクトンが存在することが明らかとなった。今後これらのマーカー種を細胞学的、分子生物学的に精査することで、亜熱帯域・温帯域間での物理的環境への適応や、生態系の維持との関連について検証可能となる。</p> |
|--|---|

|                    |   |        |        |        |        |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| 整理番号               | R-4   | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
| 研究課題名              | (和文) 食品、食品保蔵、衛生および生態系維持のための有用微生物研究<br>(英文) Research on Microbes Useful for Food, Food Preservation, Health and Ecosystem  |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>氏名・所属・職  | (和文) 松井健二・山口大学医学系研究科・教授<br>(英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor   |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職 | (英文) Kosum CHANSIRI・Srinakharinwirot University・Associate Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer  |        |        |        |        |
| 28年度の研究<br>交流活動    | 今年度は下記の14小研究課題に関して具体的な研究交流を実施した。<br>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用<br>タイで単離された新種 <i>Xyralia</i> 属担子菌について、培養液粗抽出液中の抗菌物質について分析を進めた。平成29年3月1日より3月31日までKakumyan氏が山口大学に滞在し、 <i>Xyralia</i> 属担子菌由来抗菌物質を完全精製した。また、課題4の交流研究課題であるチェンマイ大学 Saisamorn 教授の研究室とKakumyan 博士、それに山口大学松井が共同研究を押し進めることとし、その実質的研究内容について討議した。 |        |        |        |        |

2) 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 (橘)

研究活動に関して、油用植物 (Jatropha) 種子の搾油残渣を培養基質に用い、昨年度スクリーニングで選抜した紅麹菌株 (Monascus ruber) による固体発酵産物を得た。発酵産物より水溶性画分を調製し、未植菌のコントロールと比べて DPPH および ORAC 測定法において約 3 倍抗酸化能が向上することを確認した。各種カラムクロマトグラフィーにより、紅麹菌発酵によって生成した特徴的なクロマトピークを同定することができた。得られた活性画分はペプチド様の性質を有していることが示唆された。現在、各種機器分析により精密質量およびアミノ酸配列の解析を行っている。

さらに、紅麹菌の発酵産物の有用生理活性として、水溶性の神経保護作用を産生する菌株のスクリーニングを行い、これまで紅麹菌発酵産物では報告されていない新規な神経保護作用を産生する菌株を選抜した。

研究以外の活動として、本年度は本研究室の大学院生 2 名をジョイントセミナーに参加させ、その後のカウンターパート研究室訪問やタイの伝統発酵調味料 Kapi の工場見学などを行った。Worapot 教授の研究室に所属する大学院生やポスドクとの交流、さらに Worapot 教授の研究室の卒業生との交流を通じて両国の文化的交流や研究に関するディスカッションを行った。

3) 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

大腸菌発現系で発現したデングウイルス 2 型の C タンパク質の精製を行った。また、デングウイルス 2 型の prM-E および C-prM-E を発現する BmNPV バクミドを作製し、カイコ幼虫またはさなぎで発現を行った。さらに、カイコ発現系で発現したタンパク質からウイルス様粒子の形成を行った。日本側の研究者 (朴 龍洙, 加藤竜也) は、平成 28 年 9 月 12 日～15 日 (4 日間) インドネシア BPPT の Dr. S. Pambudi とインドネシア大学の Dr. Fithriyah Sjatha を訪問し、現地で、研究計画の検討を行った。また次年度の研究者派遣・受入について打ち合わせを行った。

4) 熱帯で分離された酵母および糸状菌を用いて、各種穀類からつくったアルコール飲料の特性と抗酸化能

ベトナムのメンより分離した発酵性酵母 Y3 を用いて、精白米 (*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Hinohikari*)、黒米玄米 (*O. S. J.* cv. *Shiun*)、赤米玄米 (*O. S. J.* cv. *Engimai*)、緑米玄米 (*O. S. J.* cv. *Midorinoka*)、ワイルドライス (*Zizania aquatica*) を原料に発酵試験を行った。平成 28 年 11 月 13 日～15 日まで、タイ国チョンブリで開催された The 2<sup>nd</sup> Joint Seminar に参加しポスター発表を行った。その際、Dung 氏と研究打ち合わせ

を行った。その他の研究打ち合わせ等はメールで行った。

5) 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

いくつかの培養条件を検討したが、タイの海岸から発見した *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 および *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 は静置培養における生育が悪く、フラスコ内壁への付着や凝集体形成などのバイオフィーム形成量が従来の細菌群に比べて少ないことが分かった。そのために、バイオサーファクタントおよびタンパク質生産性について検討するまでには至っていない。現在、固形培地を用いた培養法により得られるコロニー細胞外面分を調製しており、十分な量が準備でき次第解析を進める予定である。一方、2016年7～8月の2ヶ月間にわたり、タイ王国プリンスオブソンクラ大学から大学院生1名を受け入れ先方の指導教員 Dr. Benjamas Cheirsilp との共同研究を開始した。その結果、タイにおいてバイオディーゼル油製造工程で廃棄される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 *Klebsiella pneumoniae* 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く、新規構造物である可能性が高いと考えている。

6) 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等の性質を示す乳酸菌の分離とその特性の解析を行った。分離株の菌種同定を行うとともに、良好な抗菌活性を示した分離株については、生産するバクテリオシンの精製を試みた。また、乳酸菌の耐熱性などの生理特性の評価を行った。とくに、ベトナムとタイの研究者1名ずつをそれぞれ1か月受け入れ、研究を進展させた。他の研究者とはメールで研究の進捗について討議した。

7) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌活性メカニズムに関する研究

今年度は、Patcharaporn Siwayaprahm 講師が30日間（1月6日から2月4日）来日したので、まず、グラフェンに本当に抗菌活性があるのか否かの検討を行った。このため、指標微生物としては先ず大腸菌を選択した。また、抗菌性を評価するために、陽性対照として銀イオンをグラフェンに添加した。さらに、抗菌性の評価に際しては、生菌数を測定する方法ではなく、阻止円の形成能を評価した。これは、グラフェンが大腸菌を吸着し見かけ上コロニー形成数が減少するため、正当な評価ができないと考えたからである。

結果的には、グラフェン単独では阻止円の形成が認められなかった。おそらく、グラフェンそのものには抗菌性がないものと考えられることができる。今後は、本当に抗菌性がないのか

#### 8) 微生物酵素および発酵の農水産生産への応用

$\alpha$ -1,3-グルカナーゼは、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) などの細胞壁の溶解作用を有する。耐熱性細胞壁溶解酵素の生産菌として単離された放線菌株 *Streptomyces thermodiastaticus* HF-3 株は、分子量の異なる2種類の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを生産する。昨年度、分子量の小さい  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ (Ag1HF1) を均一に精製し、諸性質の検討を行った。28年度は、もう1種類の分子量の大きい酵素 (Ag1HF2) を精製し、諸性質を明らかにした。N-末端アミノ酸配列を決定したところ、両  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼのN-末端アミノ酸配列は完全に一致した。また、*S. thermodiastaticus* HF-3 株の全ゲノム配列を決定し、これらの酵素の遺伝子を検索した。その結果、両酵素は1つの同一遺伝子にコードされており、翻訳後にC-末端より約130アミノ酸残基がプロセッシングにより遊離して分子量の小さい酵素が生成することが明らかとなった。Ag1HF2 遺伝子のクローニングおよび大腸菌での発現確認を行った。現在、組換え Ag1HF2 の発現条件の検討を行うとともに、Ag1HF1 のC-末端アミノ酸残基、すなわち、Ag1HF2 から Ag1HF1 が生じる際の切断箇所の特特定を行っている。切断箇所の特特定が終わり次第、Ag1HF1 のクローニングと大腸菌での発現系の構築を行う。また、インドネシアの農産廃棄物として、トウモロコシ芯およびバナナ皮を原料として利用した乳酸発酵を行い、高純度のD-乳酸およびL-乳酸の高効率生産系の構築を行なった。本年度末に、ソクラ大学農産業学部の講師 Dr. Wasana Suyotha 女史が立命館大学びわこくさつキャンパスに1ヶ月弱滞在し、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、29年度に向けての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、29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。

#### 9) *Paenibacillus* 由来組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いたアントシアニン配糖体の合成。

ローゼル (*Hibiscus sabdariffa*) から抽出したアントシアニンに、*Paenibacillus* A11 sp 由来の遺伝子組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ (CGTase) を用いて、マルトシル・-サイクロデキストリンからマルトオリゴ糖を転移導入することによって配糖体化するための最適反応条件を検討した。また、配糖体化したアントシアニンの抗酸化作用を調べるとともに、配糖体化アントシアニンの分離を行った。

#### 10) 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、インドネシア、および日本の水田土壌を解析し、それぞれの特徴を明らかにした。具体的には、タイ：8サンプル、インドネシア：6サンプル、日本：101サンプルのSOFIX解析（19項目）を実施し、これらのデータから水田のデータベース構築を行った。また、日本においては、畑土壌および樹園地土壌のSOFIX解析を実施し、同様にデータベース構築し、連作と土壌環境の関係について考察した。

#### 11) 多機能性微生物を用いたバイオマス資源の環境保全型利用に関する研究

今年度は、申請した相手国研究者の来日希望が叶わなかったため、メールでのやり取りおよび11月に行われたタイでのジョイントセミナーにおけるカセサートおよびマンチェスターの研究者とのディスカッションにて計画を進行した。またコンケン大学からは相手側独自の予算を手当てして博士課程学生（Ms. Kulwadee Khotchanalekha）を2ヶ月間受け入れ、機能性微生物の植物組織への侵入、定着、共生に関する実証を行うためのFISHについて検討した。

#### 12) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

*Thermosynnechococcus elongatus* 由来フィコシアニンの熱安定性解析を中心としたタンパク質化学的実験を行い、単離株由来のフィコシアニンが高度の耐熱性を有していることを示した *Thermosynnechococcus elongatus* と同定された菌株からアポフィコシアニン遺伝子（*cpcA* と *cpcB*）を得ることができた。さらに、同遺伝子上流に *Spirulina* フィコシアニンプロモーターを付け、下流に抗生物質遺伝子を付けたフラグメントを得た。このフラグメントを用いて、*Spirulina* でのフィコシアニン発現を進める。

一方、ラン藻（*Leptolyngbya* sp. KC45）を用いたPHB生産については、残念ながら進捗が見られていない。

#### 13) 植物内生放線菌の農業への応用

トマトネコブセンチュウ防除に有効な放線菌として見出したX4株と、ネコブセンチュウ防除に有効な糸状菌 *Monacrosporium phytogagum*（MP菌）をコンポストに添加した農業資材およびタケニグサ抽出物のトマトネコブセンチュウ防除における相乗効果を検討した。放線菌X4株とMP菌を添加した農業資材の同時添加において相乗効果が認められた。

11月20日-30日（11日間）：徳山研から、大学院生（Ms Nopnakorn Pichamon）が、Wasu研究室（チェンマイ大学）で共同研究（野菜内生放線菌の分離）を実施した。2月22日-3月24日（30日間）：Wasu先生が徳山研究室で、微生物防除に関する共同研究を実施した。

|                     |  |
|---------------------|--|
|                     | <p>14) ポリ乳酸微生物の応用</p> <p>ポリ乳酸不織布（ユニチカ製）を分解する微生物の探索を、動物（ヤギ、ヒツジ、ウサギなど）の糞を分離源として実施したが、目的とする微生物は得られなかった。また、カセサート大学カンペンセンキャンパスにおいて、ポリ乳酸不織布を農場の土壌中に12月間放置したが、不織布の分解は認められず、分解菌も分離できなかった。</p> <p>平成28年7月3日-8日（5日間）：徳山が、Dr Vichien(KU)の研究室を訪問し、セミナー及び共同研究を実施した。平成28年11月16-18日（3日間）：徳山が、Dr Vichien(KU)と Dr. Sukhumaporn (SWU) の研究室を訪問し、セミナー及び共同研究打合せを実施した。</p>   |
| 28年度の研究交流活動から得られた成果 | <p>1) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用</p> <p>タイで単離された新種 <i>Xyralia</i> 属担子菌培養液粗抽出液をシリカゲルクロマトにかけ、TLC 上で単一のスポットを与える画分を得た。これを分取HPLC に供し、HPLC 上で単一のピークにまで精製した。LC-MS 分析により本化合物は分子量600程度の比較的大きな化合物と考えられた。これまでに完全精製後の化合物を約0.2 mg 得ている。現在、種々のNMR 溶媒での安定性を確認し、京都大学化学研究所渡辺博士の協力を得てNMR による構造決定を進めている。</p> <p>2) 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（橘）</p> <p>研究に関して、<i>Jatropha</i> 搾油残渣の抽出物には、抗菌活性や有害成分が含まれていることが報告されている。本研究において、紅麹菌発酵産物の抽出物中には有害成分がほとんど検出されなかった。加えて、抗菌活性も消失していた。本研究成果により、東南アジアやアフリカ諸国でバイオディーゼル原料として利用されている <i>Jatropha</i> 種子の搾油残渣の抗酸化ペプチド供給源としての有効利用が期待できる。</p> <p>若手の育成に関して、今年度タイ訪問に参加した大学院生は帰国後もモチベーションが高く、メール等で相互の研究ノウハウについて情報交換を行うなど積極的に若手交流を行った。現在、タイのコンケン大学在籍の博士が本国のファンドを活用して当研究室で研究員をしている。本学学生も積極的に英語によるコミュニケーションと実験スキルの伝授、ディスカッションにかかわるなど、交流の成果が出ている。</p> <p>3) カイコ発現系を用いた Dengue 熱ワクチンの開発及び有効性試験に関する研究</p> <p>大腸菌発現系で発現した Dengue ウイルス 2 型の Cタンパク質の精製を行った。得られたタンパク質は Cタンパク質の検出用として研究を展開している。</p> |

カイコ発現系での発現：デングウイルス2型のprM-EおよびC-prM-Eを発現するBmNPVバクミドを作製し、カイコ幼虫またはさなぎで発現を行った。カイコ体液またはさなぎ抽出液からこれらEタンパク質の発現を確認し、精製を行っている。

prM-EおよびC-prM-Eタンパク質からのウイルス様粒子の作製：上記のカイコ発現系で発現したタンパク質からウイルス様粒子の形成を行った。精製後、透過型電子顕微鏡でウイルス様粒子の形状を確認する予定である。

上記の研究の結果得られる精製タンパク質をインドネシアのカウントパートナーに送り、動物を用いた免疫化実験はインドネシア側で行う予定である。

#### 4) 熱帯で分離された酵母および糸状菌を用いて、各種穀類からつくったアルコール飲料の特性と抗酸化能

精白米、黒米玄米、赤米玄米、緑米玄米、ワイルドライスを原料として、分離した発酵性酵母 Y3 を用いて発酵試験を行った。糖化剤にはスミチーム（新日本科学工業、*Rhizopus* sp. 起源）それぞれの発酵原料は省エネルギー的な無蒸煮法および通常の蒸煮法を用いてアルコール発酵を行った。蒸煮発酵もろみでは、約4日間で12.2～13.3%のアルコールが生成した。無蒸煮発酵では、6日間で10.6～11.5%であった。黒米およびワイルドライスを原料に無蒸煮法および蒸煮発酵法でつくったアルコール飲料は1500～2000 μM トロロックス等量のDPPHラジカル消去能を示し、他の米を用いたものより高い値を示した。脂質過酸化阻止能はワイルドライスを原料につくったアルコール飲料が無蒸煮法、蒸煮法ともに高い値を示した。Y3酵母を用いて黒米、ワイルドライスを原料としてつくったアルコール飲料は、ともにルパンより分離したNP01酵母を用いてつくったアルコール飲料より高いDPPHラジカル消去能を示した。以上、Y3酵母を用い黒米及びワイルドを原料に抗酸化能をもつアルコール飲料をつくることのできた。

紅麹 *Monascus purpureus* NBRC 5965 を用いた製麹法と発酵法については、現在、最適条件の検討を終えている（*Journal of the Institute of Brewing* 122(2), 350-354, 2016）。本麹とY3およびNP01酵母を用いた比較実験を現在行っている。

#### 5) 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

新たな熱帯生物資源のひとつとして、新規バイオサーファクタント生産菌 *Klebsiella pneumonia* R44 を取得した。

#### 6) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

多数の分離株が得られ、16S rRNA 遺伝子解析等によって菌種同定を行い、

大半が乳酸菌であることを確認した。そのうちの数株から、バクテリオシン様の抗菌活性を検出した。良好な抗菌活性を示した分離株や乳酸生産能の良好な分離株については、バクテリオシンや乳酸生産の培養条件の最適化と評価を行うことができた。さらに、バクテリオシンについては精製と構造解析を進めている。ベトナムの研究者には、乳酸生産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。また、タイの研究者とは、これまでの成果の論文化を進めている。

#### 7) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌活性メカニズムに関する研究

グラフェンの抗菌性については、簡単に結論を出すべきでないことが明らかとなった。現時点では、酵母 DNA マイクロアレイの利用には慎重を期すべきと考えられる。今後はより詳細な条件検討や、本当に抗菌性がないのなら、どのように証明すべきかを検討する必要があることが確認できた。

#### 8) 微生物酵素および発酵の農水産生産への応用

(1) *S. thermodiastaticus* から2種類の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼを精製、諸性質を明らかにした。さらに、本菌のゲノム解析を実施し、全ゲノム構造を決定した。この結果に基づき、 $\alpha$ -1,3-グルカナーゼの遺伝子をクローニングするとともに、細胞壁溶解酵素として重要なキチナーゼについても数種類の遺伝子が存在することを突き止め、現在、これらキチナーゼ遺伝子のクローニングを実施している。これらの成果を総合的に組み合わせることにより、植物病原菌に対する抗菌作用、より効率的な防除条件の検討を行う段階まであと一步のところまできた。

(2) 農産廃棄物としてトウモロコシ芯およびバナナ皮を原料として利用した乳酸生産を行った。麹菌 *Aspergillus awamori* を糖化酵素源として、また、*Leuconostoc mesenteroides* と *Bacillus licheniformis* を乳酸発酵菌として用いた並行複醗酵を行うことで、D-乳酸ならびに L-乳酸という付加価値の高い有機酸の生産が高効率に行えることを示した。これらの成果は、生分解性プラスチックの生産に利用可能なだけでなく、有機肥料としての利用も可能であることから、環境にやさしい有機農法の開発へ繋がることが期待される。今後、乳酸も含め、未利用資源から有機酸の生産を行い、有機農業への利用を検討していく。

#### 9) *Paenibacillus* 由来組換えサイクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いたアントシアニン配糖体の合成。

反応液中のアントシアニン濃度、CGTase 活性、マルトシル・ $\alpha$ -サイクロデキストリン濃度、pH、温度および反応時間に関してアントシアニンの配糖体化最適反応条件を構築した。配糖体化後のアントシアニンは、鉄抗酸化お

よび ABTS 抗酸化作用がいずれも約 15 倍上昇した。このため、マルトオリゴ糖による配糖体化によってアントシアニンの抗酸化機能の上昇に成功した。また、配糖体化アントシアニンは TLC および HPLC によって 3 つの画分に分離、構造の異なる 3 つの配糖体化アントシアニンが生成することを明らかにした。

#### 10) 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

水田土壌に於いて、総炭素量 (TC) と微生物数のデータベース構築を行ったところ、日本の土壌においては、TC が 10,000 mg/kg～20,000 mg/kg の範囲に集中していることが明らかとなった。また微生物数は、畑土壌と比べると約 50% 多い傾向であった。

本データベース上にタイとインドネシアのサンプルデータを入れた結果、タイ水田土壌の TC は低く、微生物数は少なかった。一方、インドネシア水田土壌の TC および微生物数は共に高い傾向があることが明らかとなった。

本年度は、上記の情報と収穫量を基盤とし、日本の水田における最適有機環境土壌条件を設定した。

#### 11) 多機能性微生物を用いたバイオマス資源の環境保全型利用に関する研究

今年度の検討で、メタ発酵系に特化した温度制御および発酵 pH 制御法を示すことができた。また、環境影響評価、開放系発酵などをモニター・制御するための細菌群集構造解析法をほぼ確立できた。

#### 12) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

アポフィコシアニン遺伝子フラグメントを得、*Spirulina* におけるフィコシアニンタンパク質発現に関して目途がついた。また、*Thermosynechococcus elongatus* フィコシアニンが耐熱性に優れたタンパク質であることを示した。

#### 13) 植物内生放線菌の農業への応用

トマトネコブセンチュウに有効な農業資材の開発が期待される。

#### 14) ポリ乳酸微生物の応用

ポリ乳酸不織布を分解する微生物が開発できれば、人工的な乳酸ポリマーの分解機構の解明に繋がるだけでなく、不要になったポリ乳酸不織布の分解促進に利用できる可能性がある。

| 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<br>(英文) Development of Next-generation Fermentation Technology for New Wave Industry   |        |        |        |        |
| 日本側代表者<br>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<br>(英文) Hisashi HOSHIDA・Yamaguchi University・Associate Professor   |        |        |        |        |
| 相手国側代表者<br>氏名・所属・職 | (英文) Savitree LIMTONG・Kasetsart University・Professor<br>Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor<br>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor<br>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer<br>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor   |        |        |        |        |
| 28年度の研究<br>交流活動    | <p>本研究課題では以下の12件の共同研究交流活動を実施した。これらの交流活動では、主に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。本研究課題では、エネルギーとしてのバイオエタノール、メタン、水素に加え、化成品としての1-ブタノールや酪酸を対象として、耐熱性微生物による低コスト化、種々のバイオマスの利用促進、組換え体での生産の技術開発が進行している。また、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、有用糖の生産及びバイオマス分解酵素の探索・評価、酵素の大量生産に関する研究がおこなわれている。</p> <p>1) 耐熱性細菌を用いた高温高速エタノール発酵系の構築<br/>           異なるバイオマスを原料にエタノール発酵が可能な菌株を用いた発酵試験を実施し比較する予定であったが、発酵試験を今年度は行うことができなかった。一方、高温エタノール発酵プロセスをコンピュータによりモデル化が可能であるかの検討を、専門家であるマンチェスター大学 Theodoropoulos 教授と開始した。</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<br/>           チェンマイ大学サイサモン氏との共同研究により、<math>\alpha</math>-1,3結合と<math>\alpha</math>-1,4結合を交互に持つ多糖であるニゲランを著量生産する微生物を発見し、最適培養条件の最適化を行った。さらに、ニゲランを分解してオリゴ糖を生産する微生物を発見した。<br/>           チェンマイ大学チャチャイ氏との共同研究では、マンナンを加水分解する微生物を発見し、さらにX線で変異を与えることで効率よくマンノオリゴ糖を生産することができた。さらに、発酵茶葉から分離した乳酸菌から新規のアミラーゼを発見し、酵素生産条件の最適化と酵素の諸</p> |        |        |        |        |

性質の検討を行った。

これらに加え乳酸菌の生産するセロビオース 2-エピメラーゼを発見し、遺伝子組換えおよび酵素の諸性質の検討を行った。根粒菌の生産するグルコシド 3-デヒドロゲナーゼを発見し、遺伝子組換えおよび本酵素を用いた新規オリゴ糖の生産について検討を行った。

### 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

本共同研究は、研究課題 1 や 2 で獲得した耐熱性やストレス耐性酵母を用いて、安定したエタノール高温発酵系の構築を目指している。高温発酵は冷却エネルギーの削減あるいは中温菌の混入抑制等が可能となり、また、酵素量を削減できることからセルロース系バイオマス利用には有利であると期待されている。昨年が続いて、種々のバイオマスからのエタノール発酵について、糖化や発酵等の条件やエタノール生産性などを検討した。また、5 L レベルの発酵およびその後の減圧蒸留によって得られた低濃度エタノールを用いて、低濃度エタノールを処理できる分離膜の開発をすすめた。さらに、高温発酵のシミュレーションによる評価を行うために種々の実験を開始した。

### 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

本共同研究は、研究内容に鑑みて課題 4 へ移動した。

### 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

2nd Joint Seminar (Chonburi, Thailand) に参加した後、平成 28 年度の共同研究について進捗状況を報告し、それ以降の方向性を議論した。日本側からは H26 年度から継続している加水分解酵素の特性解析について報告し、タイ側からは同酵素の応用研究について報告を受けた。また、Dr. Chaiyaso 氏が H29 年 1 月より山形大で共同研究を行うことから、滞在期間中に行う培養条件の検討について確認した。

### 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：パームオイル排水からの二相式高温発酵による水素及びメタンの生産に及ぼす pH 及びアルカリ度の影響

オイルパーム（パーム椰子）の樹木部分の木質および残渣を原料とした第 2 世代バイオ燃料の生産プロセスの開発において、平成 28 年度は、メタン発酵後の pH が中性付近に回復した廃液の循環によるアルカリ度の有効利用とパームの焼却灰を活用下アルカリ度の調整が水素及びメタン生産にそれぞれどのような影響を及ぼすか把握するための実験を行い、

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：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

植物性バイオマスの熱帯性微生物による環境・バイオテクノロジーのための有用生産物の開発において、今年度はバイオレメディエーションに関連して、染料廃水（Reactive Black 5）の脱色に関して新規ラッカーゼを固定化するためにキシランーポリビニールアルコールのゲルビーズを用い得る新規手法の適用による染料廃水の浄化を試みた。また、新規にタイで単離した白色腐朽菌（*Phanerochate sordida*）を用いた同染料廃水の浄化を試みた。

- 8) 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、昨年度までに一定の成果を得た。そこで、今年度よりバイオ水素発酵+バイオメタン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.）をその対象に行った。微細藻類はオイルなどの有用な物質を生産できることが知られており注目が集まっているが、その前処理方法の確立が必要とされている。したがって、今年度は糖への転換率が最大となる処理方法を確立し、水素発酵、次にメタン発酵を行うこととした。前処理方法としては、酸添加加熱法、有機溶媒法（触媒（有/無））、加水分解酵素添加法を用いた。コンケン大学の Alissara 教授を11月に招聘し、YSS(S-4 Young Scientist Seminar)に参加するとともに、上記の一部を実施した。

- 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：一相式あるいは二相式高温嫌気性発酵による稲わらからのバイオエネルギー生産

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、今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。前処理方法として酸添加加熱法を用い、処理後に中和処理を行った。次いで酵素を添加し糖化を行った。処理後の糖化液を対象に単槽（メタン生成）、あるいは二槽（水素生成+メタン生成）の嫌気性処理により高温発酵（55℃）を行った。実験結果を別途行ったキャッサバパルプを原料とした場合のバイオガス生成と比較した。

- 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：高濃度の固形物含有排水からのバイオガス生産プロセスの改善のための嫌氣的セルロース分解微生物群の探索・同定
- 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、今年度は、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。取得したサンプル（パームオイル廃水処理施設からの汚泥）をセルロース主体の培地で長期間培養して選択圧をかけ、嫌氣的セルロース分解微生物群を優占させた。その後、その汚泥を用いて固形物分解試験を実施した。固形物の分解が確認できれば、分子生物学的手法（PCR-DGGE 法）により嫌氣的セルロース分解微生物の同定を進めている。
- 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物質生産に関して電子メールで研究進捗を連絡しあうことで、研究の方向性を議論した。研究内容に関しては、活動計画で述べたように、これまでに構築に成功している 1-ブタノール合成代謝経路を改変することで、新規酪酸生産合成代謝経路を設計するとともに、その経路を大腸菌内で機能的に発現させることで酪酸生産組換え大腸菌の構築を試みた。加えて、培養条件を最適化することで、酪酸生産性の向上を図るとともに、合成生物学的に還元物を生産する際に重要となる因子について考察した。
- 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
- キャッサバパルプを用いた高温エタノール発酵のパイロット試験結果の解析により、現在使用している耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 株に求められる性質が、既存のエタノール生産酵母 *Saccharomyces cerevisiae* との性質の差として明確になった。企業との共同研究の関係で詳細は記載しないが、複数の改善すべき性質の候補が見つかった。今後、他の *K. marxianus* 株の性質評価とそれに続く交配育種、あるいは適応育種の手法を用いて新しい株を改良に取り組むこととした。
- 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：嫌気性処理による熱帯性バイオマス及び有機性産業廃棄物からのバイオ水素の生産
- Dr. Huyen Thi Thu NGUYEN が民間会社に移動したため、平成 28 年度から本共同研究を中止した。なお、平成 29 年度より本テーマを削除する。
- 14) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化

|                            |   |
|----------------------------|---|
|                            | <p>平成29年1月9日～2月9日まで、Apilak Salakkam 博士が愛媛大学に滞在し、タイ国より単離された <i>Aspergillus</i> sp. TPG-01 による柑橘果皮残渣を用いた固体発酵法によるペクチナーゼ産生のための温度、水分含量および最適 pH を調査した。</p>  |
| <p>28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>高温エタノール発酵プロセスのモデル化について検討した結果、発酵試験などで得られた異なる温度での生育速度を基にすれば <i>Zymomonas mobilis</i> による高温エタノール発酵プロセスはモデル化が可能であり、それを基にエタノール生産をシミュレーションできる可能性が示唆された。</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>いくつかのオリゴ糖生産に有用な微生物の発見に成功した。さらに微生物から酵素を抽出しオリゴ糖生産の最適化を行った。特に、食品用途として比較的安全と考えられる乳酸菌に着目し、発酵食品などからいくつかの乳酸菌を分離することに成功した。一方、加水分解とは異なる経路でのオリゴ糖の生産を目指した研究も実施しており、学術的価値の高い酵素の発見に成功した。これらの酵素を用いることで、普遍的に存在するオリゴ糖を異性化することが可能となり、新規の機能性を見出すことが期待できる。なお、当初計画にあった、ホスホリラーゼの探索については、研究途上であり、来年度引き続き研究を進める予定である。</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>世界的にはバイオ燃料需要は今後10倍以上増加することが予測され、米国などではセルロース系バイオマスの利用拡大が図られている。一方で、同バイオマスは前処理や糖化にコストがかかるため、より安価な生産に繋がる技術の開発が急務である。本共同研究では、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。本年度は、まだ幾つかの問題はあるものの開発した分離膜によって低濃度エタノールを高度に濃縮できることを示した。また、高温発酵のシミュレーションによる評価のための種々の実験を行い、今後データ取りを進める予定である。</p> <p>4) 餅麹ルパン (<i>Amylomyces rouxii</i> YTH3) と酵母の混合培養により醸造した有色米酒の抗酸化能について</p> <p>本共同研究は、研究内容に鑑みて課題4へ移動した。</p> <p>5) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産</p> <p>セリシンを分解する分解菌およびその酵素について調べた結果、<i>B. halodurans</i> 株が生産するアルカリ性セリンプロテアーゼであることがわかった。</p> |

日本側で同酵素・遺伝子について、基本的な特性解析を行い、その結果を基にタイ側で蚕の繭中のセリシン層の効率的分解を検討できた。リパーゼ生産菌について同酵素の生産に与える因子(炭素源、脂肪酸、pH 等)の影響を調べた(成果は、2<sup>nd</sup> Joint Seminar にて報告済み)。耐塩性プロテアーゼは、その一次配列と推定高次構造モデルから、耐塩性に関わると推定されるアミノ酸残基の特定まで終了した。キシラナーゼについては、キシロオリゴ糖生産の最適化を検討した。

- 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: パームオイル排水からの二相式高温発酵による水素及びメタンの生産に及ぼす pH 及びアルカリ度の影響

オイルパーム(パーム椰子)の樹木部分の木質および残渣を原料とした第2世代バイオ燃料の生産プロセスの開発(第1段に水素発酵槽、第2段にメタン発酵槽を設けて連続的に処理を行った)において、今年度は、pH の調整(第2段のメタン発酵後の pH が中性付近に回復した廃液の循環)によるアルカリ度の有効利用(添加量を4段階に変化させた)とパームの焼却灰を活用したアルカリ度の調整(同様に添加量を3段階に変化させた)が水素及びメタン生産にそれぞれどのような影響を及ぼすか把握するための実験を行った。これにより、得られたデータから緩衝剤として用いている  $\text{NaHCO}_3$  の添加量を確実に減らすことができ、コスト的に有利であることが確認できた。

- 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: 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

植物性バイオマスの熱帯性微生物による環境・バイオテクノロジーのための有用生産物の開発において、新規ラッカーゼを固定化するためにキシランーポリビニールアルコールのゲルビーズを用いる新規手法による染料廃水(Reactive Black 5)の浄化実験と、新規にタイで単離した白色腐朽菌(*Phanerochate sordida*)を用いた同染料廃水の浄化を行った。両実験の結果から、染料廃水(Reactive Black 5)の効率的な脱色が可能であることが明らかとなった。さらに、新規に2種類の白色腐朽菌がタイにおいて単離された。これらの結果から今年度に3本の論文が国際学術誌へ掲載された。

- 8) 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

今年度よりバイオ水素+バイオメタン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.)をその対象にした。微細藻類は前処理が必要であるため、今年度は糖への転換率が最大となる処理方法の選定を行うための実験を行った。前処理方法としては、酸添加加熱法、有機溶媒法(触媒(有/無))、加水分解酵素添加法を用いた。実験結果から、コスト的には酸添加

加熱法が有利であるものの、糖への転換率は加水分解酵素添加法が高かった。したがって、酸添加加熱法と酵素量を減らした加水分解酵素添加法との組合せによる前処理の有効性が見出された。

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:一相式あるいは二相式高温嫌気性発酵による稲わらからのバイオエネルギー生産

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、今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(メタン生成のみ)あるいは二相式(水素生成+メタン生成)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)生産実験を行った。稲わらは前処理が必要で、その前処理方法として酸添加加熱法(硫酸+加熱)を用い、処理後に水酸化ナトリウムで中和処理を行った。次いで酵素(セルラーゼ)を添加し糖化を行った。処理後の糖化液を対象に単槽(メタン発酵のみ:55℃)、あるいは二槽(水素発酵+メタン発酵:55℃)の嫌気性処理によりバイオガスを生産した。実験結果を、別途行ったキャッサバパルプを原料とした場合のバイオガス生成と比較した。キャッサバパルプの方がガス生成量が多かったが、それは含有される炭水化物の分解の容易さの差に起因するものと考えられた。

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:高濃度の固形物含有排水からのバイオガス生産プロセスの改善のための嫌氣的セルロース分解微生物群の探索・同定

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、今年度は、高濃度の固形物を含有するパームオイル廃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。パームオイル廃水処理施設からの汚泥(サンプル)をセルロース主体の培地で長期間培養して選択圧をかけ、嫌氣的セルロース分解微生物群を優占させた。その後、その培養汚泥によるパームオイル廃水中の固形物分解試験を実施した。実際に固形物の分解が確認されたため、分子生物学的手法(PCR-DGGE 法)により嫌氣的セルロース分解微生物の同定を現在実施中である。

11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

成果としては、4-1) で述べたように、新規酪酸生産合成代謝経路を設計するとともに、その経路を大腸菌内で機能的に発現させることで、酪酸生産大腸菌を造成した。酪酸の生産は一般的に嫌気、微好気といった酸素供給が制限された条件で行われるが、構築した菌株を用いて培養条件を最適化したところ、溶存酸素が十分(培養を通して3 ppm以上)に存在するときに最も酪酸生

|  |  |
|--|--|
|  | <p>産が活性化した。本研究で用いた経路と元来の酪酸生産細菌が保有する代謝経路を比較したところ、NADH, NADPH への依存度が異なっており、この点は、酸素が十分あるときに還元物（酪酸, 1-ブタノール等）を合成生物学的に生産する際の重要な因子の一つであると予想された。</p> <p>12) バイオマス原料を用いたパイロットスケール高温エタノール発酵試験<br/>既存のエタノール生産酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> と耐熱性酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> との性質の差が明確になったことで、高温発酵に用いる <i>K. marxianus</i> の育種の方向性を定めることができた。また、求められる性質と優位性である耐熱性とがトレードオフの関係にある可能性もあることから、操作方法の観点からの改善も必要となる可能性が示唆された。</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: 嫌気性処理による熱帯性バイオマス及び有機性産業廃棄物からのバイオ水素の生産<br/>Dr. Huyen Thi Thu NGUYEN が民間会社に移動したため、平成 28 年度から本共同研究を中止した。なお、平成 29 年度より本テーマを削除する。</p> <p>14) 耐熱性真菌によるペクチナーゼ生産の最適化<br/>検討の結果、水分含量 40%程度の果皮を用いて 42°Cでの発酵が最もペクチナーゼが産生した。一方、ペクチナーゼ生産には、pH4とpH8の2つの至適があることが分かった。</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」第3回サテライトセミナー  |
|  | (英文) The third 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28年11月11日～平成28年11月12日(2日間)  |
| 開催地(国名、都市名、会場名)                        | (和文) ベトナム、カントー、カントー大学   |
|  | (英文) Vietnam、Can-Tho、Can-Tho University   |
| 日本側開催責任者<br>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<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外での開催の場合) | (英文) Dr. Dung NGO Thi Phuong・Can-Tho University・Associate Professor   |

## 参加者数

| 派遣先<br>派遣元       |    | セミナー開催国<br>(ベトナム) |    |
|------------------|----|-------------------|----|
|                  |    | A.                | B. |
| 日本<br>〈人/人日〉     | A. | 5/15              |    |
|                  | B. | 1                 |    |
| タイ<br>〈人/人日〉     | A. | 3/9               |    |
|                  | B. | 0                 |    |
| ドイツ<br>〈人/人日〉    | A. | 0/0               |    |
|                  | B. | 0                 |    |
| ベトナム<br>〈人/人日〉   | A. | 15/30             |    |
|                  | B. | 50                |    |
| インドネシア<br>〈人/人日〉 | A. | 3/9               |    |
|                  | B. | 2                 |    |
| ラオス<br>〈人/人日〉    | A. | 1/3               |    |
|                  | B. | 0                 |    |
| イギリス<br>〈人/人日〉   | A. | 1/3               |    |
|                  | B. | 0                 |    |
| 合計<br>〈人/人日〉     | A. | 28/69             |    |
|                  | B. | 53                |    |

- 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。本年度はベトナムの拠点大学であるカントー大学で実施し、カントー大学を初めとするベトナムの大学の研究者や若手研究者との交流の場となる。   |    |                        |
| セミナーの成果      | 本事業の共同研究の中でより先端的なものやベトナムの研究者が関与するものを中心に成果発表（11件）を行い、ベトナムの本事業関係者だけでなくそれ以外の参加者に対しても興味をもってもらった。また、ベトナムの研究者による発表（口頭発表2件；ポスター発表8件）によって、共同研究の伸展について把握することができた。研究成果発表に加えて、ベトナムの研究者が関与する共同研究の打ち合わせを実施し、今後の研究について相談した。また、カントー大学の施設見学等によって今後の共同研究を進める上での参考になった。加えて、学生を含めて多くの若手研究者が参加し、将来の共同研究や国際交流等に繋がる活動となった。 |    |                        |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。   |    |                        |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容 | 国内旅費 金額 0円             |
|              |  |    | 外国旅費 100,000円          |
|              |  |    | 外国旅費に係る消費税 8,000円      |
|              | (タイ)側  | 内容 | 外国旅費 金額 150,000円       |
|              | (ドイツ)側   | 内容 | 外国旅費 金額 0円             |
|              | (ベトナム)側  | 内容 | セミナー開催経費 金額 2,000,000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 50,000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」第2回ジョイントセミナー<br>(英文) The second joint 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14日～平成28年11月15日（2日間）   |
| 開催地（国名、都市名、会場名） | (和文) タイ、チョンブリ、バンセンヘリテージホテル<br>(英文) Thailand, Chonburi, Bangsaen Helitage Hotel   |
| 日本側開催責任者        | (和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科 教授   |

|  |  |
|--|--|
| 氏名・所属・職                                | (英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor                    |
| 相手国側開催責任者<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外での開催の場合) | (英文) Dr. Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor |

参加者数

| 派遣先<br>派遣元       | 派遣先 | セミナー開催国<br>(タイ) |   |
|------------------|-----|-----------------|---|
|                  |     | A               | B |
| 日本<br>〈人／人日〉     | A.  | 39/ 139         |   |
|                  | B.  | 12              |   |
| タイ<br>〈人／人日〉     | A.  | 82/ 164         |   |
|                  | B.  | 45              |   |
| ドイツ<br>〈人／人日〉    | A.  | 1/ 4            |   |
|                  | B.  | 0               |   |
| ベトナム<br>〈人／人日〉   | A.  | 4/ 16           |   |
|                  | B.  | 0               |   |
| インドネシア<br>〈人／人日〉 | A.  | 3/ 12           |   |
|                  | B.  | 4               |   |
| ラオス<br>〈人／人日〉    | A.  | 4/ 16           |   |
|                  | B.  | 0               |   |
| イギリス<br>〈人／人日〉   | A.  | 2/ 6            |   |
|                  | B.  | 0               |   |
| 合計<br>〈人／人日〉     | A.  | 135/ 357        |   |
|                  | B.  | 61              |   |

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 | 本事業の全体会議であることや3年目となることから、中間成果報告会と位置づけて実施する。また、開催期間中に個々の共同研究グループの構成員間での意見交換の機会を設け、今後の研究の展開について意見交換を行う。  |
| セミナーの成果   | 5つの研究課題から、それぞれリーダーが推薦した新規性の高いあるいは先端的な研究成果を口頭発表（27件）し、それ以外はほぼ全ての共同研究についてポスター発表（80件）を行った。また、特に注目される先端研究2題を Keynote として実施した。これらによって、個々の共同研究の進展や達成状況を把握するとともに、事業全体の活 |

|              |  |    |   |
|--------------|--|----|---|
|              | <p>動や成果を構成員全員で共有することができた。また、Keynote や他の研究グループの成果から多くの知見を収集ことができ、これらを個々の共同研究に生かすことができると期待される。一方、共同研究グループ内で直接相談し、今後の研究の詳細を話し合う良い機会となった。また、全体会議であり、多くの構成員が集まることから、新しい情報交換や新たなネットワーク構築に繋がった。</p> |    |   |
| セミナーの運営組織    | <p>本事業の組織委員会を運営組織とする。</p>  |    |   |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容 | 国内旅費 金額 674,000 円<br>外国旅費 4,990,000 円<br>外国旅費に係る消費税 399,000 円 |
|              | (タイ)側  | 内容 | セミナー開催経費 金額 6,000,000 円                                       |
|              | (ドイツ)側   | 内容 | 外国旅費 金額 200,000 円   |
|              | (ベトナム)側  | 内容 | 外国旅費 金額 200,000 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 60,000 円  |

|  |   |
|--|---|
| 整理番号                                   | S-3   |
| 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」Thailand Research Expo 分科会</p> <p>(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“</p> |
| 開催期間                                   | 平成28年8月18日～平成28年8月18日 (1日間)   |
| 開催地 (国名、都市名、会場名)                       | <p>(和文) タイ、バンコク、グランドコンベンションセンター</p> <p>(英文) Thailand, Bangkok Grand Convention Centre</p>   |
| 日本側開催責任者<br>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<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外での開催の場合) | <p>(英文) Dr. Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor</p>   |

参加者数

| 派遣先<br>派遣元   |    | セミナー開催国<br>(タイ) |    |
|--------------|----|-----------------|----|
| 日本<br>〈人/人日〉 | A. | 10/             | 20 |
|              | B. | 10              |    |
| タイ<br>〈人/人日〉 | A. | 50/             | 50 |
|              | B. | 50              |    |
| 合計<br>〈人/人日〉 | A. | 60/             | 70 |
|              | B. | 60              |    |

A. 本事業参加者（参加研究者リストの研究者等）

B. 一般参加者（参加研究者リスト以外の研究者等）

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

|              |   |    |  |
|--------------|---|----|--|
| セミナー開催の目的    | 本 CCP 事業にはタイの多くの大学やその関係者がかかわっており、また、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 で本事業の研究成果を発表すると同時に、タイの一般研究者に本事業成果や研究開発の内容を広く公開する。                              |    |  |
| セミナーの成果      | 例年と同様に NRCT の要請に応じて本セミナーを開催した。本セミナーでは、本事業の共同研究成果や共同開発技術を紹介することを目的にしており、今回は、環境微生物や病原性微生物関連分野を中心とした研究成果を発表（8 件）した。これらの分野は本事業の新しい取り組みであり、発表した新技術やシーズ等がタイ企業等に利用されることが期待される。 |    |  |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。  |    |  |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側   | 内容 | 国内旅費 金額 125,000 円<br>外国旅費 447,000 円<br>外国旅費に係る消費税 36,000 円 |
|              | (タイ)側   | 内容 | セミナー開催経費 金額 300,000 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12回若手研究者セミナー<br>(英文) The 12 <sup>th</sup> 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22日～平成28年11月23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<br>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<br>氏名・所属・職<br>(※日本以外での開催の場合) | （英文）   |

参加者数

| 派遣先<br>派遣元        | セミナー開催国<br>(日本) |    |
|-------------------|-----------------|----|
|                   | A.              | B. |
| 日本<br>〈人／人日〉      | 14 / 20         |    |
|                   | 52              |    |
| タイ<br>〈人／人日〉      | 2 / 4           |    |
|                   | 32              |    |
| ベトナム<br>〈人／人日〉    | 3 / 6           |    |
|                   | 7               |    |
| インドネシア<br>〈人／人日〉  | 1 / 2           |    |
|                   | 14              |    |
| バングラデシュ<br>〈人／人日〉 |                 |    |
|                   | 3               |    |
| 合計<br>〈人／人日〉      | 20 / 32         |    |
|                   | 108             |    |

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。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。 |
|-----------|---|

|              |  |    |  |
|--------------|--|----|--|
| セミナーの成果      | 実施計画に沿って、1) セミナー企画・運営、2) 英語による研究成果の口頭発表や討議、3) 英語による講演の聴講、4) 色々な生物学研究発表の聴講を行い、他では経験できない積極的なセミナー参加の機会となった。特に、セミナーの企画力や英語によるプレゼンテーション力を養う良い機会となり、加えてネットワーク形成に繋がる他国の若手研究者との交流が達成できた。 |    |  |
| 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なる。   |    |  |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容 | その他(会場借上代) 金額 89,000 円<br>その他(印刷製本費) 50,000 円<br>その他経費 0 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)  |

|  |  |
|--|--|
| 整理番号                                   | S-5  |
| 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」技術紹介セミナー   |
|  | (英文) New Technology 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9月20日～平成28年9月20日 (1日間)  |
| 開催地 (国名、都市名、会場名)                       | (和文) タイ、バンコク、駐タイ日本国大使館   |
|  | (英文) Thailand, Bangkok, Japan Embassy of Thailand  |
| 日本側開催責任者<br>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<br>氏名・所属・職<br>(※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<br>派遣元   |    | セミナー開催国<br>(タイ) |
|--------------|----|-----------------|
| 日本<br>〈人／人日〉 | A. | 4/ 12           |
|              | B. | 20              |
| タイ<br>〈人／人日〉 | A. | 8/ 8            |
|              | B. | 30              |
| 合計<br>〈人／人日〉 | A. | 12/ 20          |
|              | B. | 50              |

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    | 先の国際拠点事業も含めて、これまで開発した熱帯性環境微生物を用いた有用物質生産や新技術を、タイの企業やタイに進出している日本企業に紹介する。   |    |  |
| セミナーの成果      | 佐渡島大使のリーダーシップのもと、本事業やこれまでの拠点事業で開発した技術やシーズ（12件）を、タイ企業や在タイ日本企業に紹介した。25社から30名の参加があり、企業関係者と貴重な情報交換ができた。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り、その中の1件は平成29年3月に共同研究契約が結ばれた。 |    |  |
| セミナーの運営組織    | 本事業の組織委員会を運営組織とする。   |    |  |
| 開催経費<br>分担内容 | 日本側  | 内容 | 国内旅費 金額 51,000円<br>外国旅費 447,000円<br>外国旅費に係る消費税 36,000円 |
|              | (タイ)側  | 内容 | セミナー開催経費 金額 300,000円                                   |

## 7-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

共同研究、セミナー以外でどのような交流（日本国内の交流を含む）を行ったか記入してください。

| 日数   | 派遣研究者    |         | 訪問先・内容              |                              |  | 派遣先    |
|------|----------|---------|---------------------|------------------------------|--|--------|
|      | 氏名・所属・職名 |         | 氏名・所属・職名            |                              | 内容   |        |
| 5 日間 | 山田 守     | 山口大学・教授 | Anton<br>Muhibuddin | ・Brawijaya<br>Univ.・Lecturer | 本CCPインドネシア側大学<br>全体へサポートをお願い<br>するため、インドネシア<br>側コーディネーターであ<br>るDr. Antonと<br>Ristekdiktiへ陳情すると<br>ともに、今後のインドネ<br>シアとの共同研究の進め<br>方について協議した。 | インドネシア |
|      | 日間       |         |                     |                              |  |        |

## 7-4 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

## 1) 先端研究拠点形成のための先端研究の重点化

「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」をめざす本事業課題は、「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」、「熱帯性環境微生物の特性である耐熱性原理の解明」、「東南アジアの食文化と腸内細菌叢」、「熱帯環境からのウイルス伝播ルート解明」、「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」、「発酵バイオ燃料等の膜分離濃縮技術の開発」、「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てきた。さらに、より特化した小グループによって、以下の2つの先端的な課題が行われつつある。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~)と研究課題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~)である。なお、次年度から開始する先端的な課題として、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」が予定されている。ALCA事業は日本の研究者が中心であるが、タイ、インドネシア、ベトナムの若手研究者も共同研究者として加わっている。e-ASIA共同研究の前者は、インドネシア、タイ、フィリピン、アメリカの共同研究として実施され、また後者は、日本、タイ、インドネシア、ラオスの共同研究となる。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、種々の先端的な基礎研究を連携させて、社会実装へ向けた大きな流れを創ろうとするところに本研究課題の特徴がある。

## 2) 組織のブラッシュアップ

100名以上のメンバーがいるタイ側について、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いる。また、上記のように、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28年度開催したジョイントセミナーや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、発表させた。加えて、Thailand Research EXPOおよび在タイ日本大使館でのセミナーや技術セミナーにおいて、これまで開発した優れたシーズの紹介を行った。このようにして実績や貢献度の高い研究者集団への移行を進めている。

## 3) 拠点事業の継続・発展のための後継者育成

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28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た。また、リーダーやサブリーダーが、メンバーと連絡を取りながら、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た。

## 4) トップジャーナルへの論文発表を目指した共同研究や社会貢献のためのシーズ開発

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はしたが、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。また、Impact factorとCitation数をもとに算定されたトムソンロイターの指標AIS (Article Influence Score)で分野別S評価 (Top10%) にランクされるBiotechnol biofuelsに報告している。一方、本事業では、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先端研究に挑戦している。

平成28年度は、タイ研究博覧会でのセミナーに加えて、在タイ日本大使館において技術セミナーを開催し、タイ企業やタイの日本企業関係者を対象に、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り、その中の1件は、既に共同研究契約が結ばれた。

## 5) タイ以外の国との交流拡大

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。このように、タイ以外の国との交流拡大を進めている。

8. 平成28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<br>派遣元                 | 回<br>半期                     | 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                          |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 日本                         | 1                           |                             | 0/0 (1/6)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           |                             | 5/29 (12/81)                | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (2/12)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           |                             | 40/216 (9/44)               | 0/0 (0/0)                   | 5/15 (1/3)                  | 0/0 (2/10)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           |                             | 0/0 (6/43)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 1/5 (1/6)                   | 0/0 (0/0)                   | 1/28 (0/0)                  | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          |                             | 45/245 (28/174)             | 0/0 (0/0)                   | 5/15 (1/3)                  | 1/5 (5/28)                  | 0/0 (0/0)                   | 1/28 (0/0)                  | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| タイ                         | 1                           | 0/0 (1/30)                  |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           | 3/83 (12/29)                |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/3)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 6/163 (20/1094)             |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (3/9)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/4)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | 18/588 (11/354)             |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/7)                   | 1/30 (1/5)                  | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 27/834 (44/1507)            |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (3/9)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (3/14)                  | 1/30 (1/5)                  | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| 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)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 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)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/5)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/4)                   |                             | 0/0 (1/5)                   | 0/0 (1/5)                   | 0/0 (1/3)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (2/9)                   |                             | 0/0 (1/5)                   | 0/0 (1/5)                   | 0/0 (1/3)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| 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)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (3/100)                 | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 3/103 (2/170)               | 0/0 (4/16)                  | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | 0/0 (1/25)                  | 0/0 (1/59)                  | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 3/103 (3/195)               | 0/0 (8/175)                 | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| インドネシア                     | 1                           | 0/0 (1/23)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           | 0/0 (2/10)                  | 0/0 (3/20)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 0/0 (8/404)                 | 0/0 (3/12)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (3/9)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | 1/14 (2/52)                 | 0/0 (1/30)                  | 0/0 (2/14)                  | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 1/14 (13/489)               | 0/0 (7/62)                  | 0/0 (2/14)                  | 0/0 (3/9)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| 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)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           | 1/30 (0/0)                  | 0/0 (2/6)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (4/16)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/3)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/30)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 1/30 (0/0)                  | 0/0 (7/52)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (1/3)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | 0/0 (0/0)                   | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| イギリス<br>(日本側<br>協力研究<br>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)                   |                             | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 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)                   |                             | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | 0/0 (0/0)                   | 2/10 (0/0)                  | 0/0 (0/0)                   | 1/10 (0/0)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 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)                   |                             | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | 0/0 (0/0)                   | 2/10 (0/0)                  | 0/0 (0/0)                   | 1/10 (0/0)                  | 0/0 (0/0)                   | 0/0 (0/0)                   |                             | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |
| 合計                         | 1                           | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 2                           | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 3                           | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
|                            | 4                           | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |
| 計                          | #REF! #REF! ( #REF! #REF! ) |                             |

※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) | 0/0 (5/15) | 0/0 (6/12) | 0/0 (40/80) | 0/0 (51/107) |

## 9. 平成28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                      | 7,291,011  |                 |
|         | 外国旅費                      | 6,263,090  |                 |
|         | 謝金                        | 0          |                 |
|         | 備品・消耗品<br>購入費             | 0          |                 |
|         | その他の経費                    | 415,036    |                 |
|         | 不課税取引・<br>非課税取引に<br>係る消費税 | 530,863    | 消費税額は<br>内額とする。 |
|         | 計                         | 14,500,000 |                 |
| 業務委託手数料 |                           | 1,450,000  |                 |
| 合 計     |                           | 15,950,000 |                 |

## 10. 平成28年度相手国マッチングファンド使用額

| 相手国名   | 平成28年度使用額        |              |
|--------|------------------|--------------|
|        | 現地通貨額[現地通貨単位]    | 日本円換算額       |
| タイ     | 2,500,000 [Baht] | 8,040,000円相当 |
| ドイツ    | 8,000 [ユーロ]      | 1,000,000円相当 |
| ベトナム   | 30,800 [USD]     | 3,400,000円相当 |
| インドネシア | 4,000,000 [円]    | 4,000,000円相当 |
| ラオス    | 300,000 [円]      | 300,000円相当   |

※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。