

**研究拠点形成事業  
平成 29 年度 実施報告書**

**A. (平成 26～29 年度採択課題用) 先端拠点形成型**

**1. 拠点機関**

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

**2. 研究交流課題名**

(和文)：バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成  
(交流分野：応用微生物学)

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

(交流分野：Applied Microbiology)

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

**3. 採用期間**

平成 26 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

( 4 年度目)

**4. 実施体制**

**日本側実施組織**

拠点機関：山口大学

実施組織代表者（所属部局・職・氏名）：山口大学・学長・岡正朗

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：創成科学研究科・教授・山田守

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

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

**相手国側実施組織**（拠点機関名・協力機関名は、和英併記願います。）

(1) 国名：タイ

拠点機関：(英文) Kasetsart University

(和文) カセサート大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：(英文)

Faculty of Science・Associate Professor・Gunjana THEERAGOOL

協力機関：(英文) Burapha University, Chiang Mai University, Chulalongkorn University, Khon Kaen University, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Mae Fah Luang University, Mahasarakham University, Maejo University, Mahidol University, Naresuan University, Phramongkutklao College of Medicine, Prince of Songkla University, Rajamangara University of Technology Tawan-ok, Rajamangara University of Technology Isan, Rambhai Barni Rajabhat University, Ramkhamhaeng University, Srinakharinwirot University, Suranaree University of Technology, Thammasat University, Thaksin University, Ubon Ratchathani University, University of Phayao, Walailak University, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, BIOTEC (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology), Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King

(和文) ブラパ大学、チェンマイ大学、チュラロンコン大学、コンケン大学、モンクット王技術大学ラドクラバング校、モンクット王工科大学トンブリ校、マエファーン大学、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、タイ王立科学会

経費負担区分 (A型)：パターン2

(2) 国名：ドイツ

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

(和文) ベルリンボイト工科大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：(英文)

Life Sciences and Technology・Professor・Peter GOETZ

協力機関：(英文) なし

(和文)

経費負担区分 (A型)：パターン2

(3) 国名：ベトナム

拠点機関：(英文) Can Tho University

(和文) カントー大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：(英文)

Biotechnology R & D Institute・Associate Professor・Dung Thi Phuong NGO

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

(和文) ホーチミン市技術大学、タイドー大学、タンタオ大学、ベトナム国家農業大学、ニュエンタットン大学、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導的研究と位置づけられる。また、開発される技術は、エネルギー、環境、医療・衛生や食料等の問題解決に活用され、新規産業創成にも繋がること期待される。同時に、若手研究者の育成や先導的解析技術の普及を進め、ASEAN諸

国の研究力の底上げと国際ネットワーク構築を推進する。本事業を、将来を見据えて発展させ、熱帯環境微生物資源の潜在能力について基礎・応用研究を世界に先駆けて推進する「熱帯性環境微生物の国際研究拠点」の形成を目指す。

## 5-2. 平成29年度研究交流目標

### <研究協力体制の構築>

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

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

### <学術的観点>

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

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

### <若手研究者育成>

本事業では、多くの若手研究者が参加しており、実践的な若手研究者育成の場となっている。日本側の若手研究者や学生は、滞在する海外研究者との共同研究や Discussion 等によって貴重な体験ができる。また、日本側メンバーも、渡航中に特別セミナーや特別講義を実施するとともに、若手研究者の研究指導や博士課程学生の Co-Advisor 等を努めている。数年前から JASSO 短期留学奨学金や大学の奨学金などを活用して、交流大学への学生の派遣、相手先大学からの学生の受け入れなどを継続しており、本年度も実施する予定である。

また、第13回若手研究者セミナーを山口市で開催する。特に、多くの外国人若手研究者が参加するように JASSO 短期留学奨学金事業等と合同で実施する。若手研究者セミナーは日本人および留学生の大学院学生が中心となって企画・運営し、参加する全ての若手研究者が自身の研究成果等を英語で発表することから、若手研究者育成にとどまらず、将来的な友好関係や国際ネットワーク形成に繋がる重要なものと位置づけている。

### <その他（社会貢献や独自の目的等）>

本事業では、基盤研究に基づいて有用物質生産や新技術開発を目指している。特に、先の拠点事業に引き続き、本事業でも継続して熱帯性環境微生物資源の開発をすすめ、それらの微生物資源を用いた新技術開発によって社会貢献に繋げる。新規微生物については、日本側と相手国側で寄託機関へ登録すると同時に、研究成果は学術論文として報告する。生物多様性条約の枠組の中、微生物資源の重要性の認識とともに当該国間で微生物資源の共同開発を進めるが、そのために協定締結によって友好的な展開を図っている。

## 6. 平成29年度研究交流成果

### 6-1 研究協力体制の構築状況

例年と同様に、各共同研究グループから提出された年度計画に基づいて、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。個々の年度計画書は、共同研究グループ内の意思統一のためにまず英語で作成し、さらに、それに沿って日本語の年度計画書を作成した。コーディネーターはこれに基づいて全体の年度計画書をまとめ、それぞれの国の支援機関に提出した。特に、研究者交流候補者の選抜においては、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、各セミナーの口頭発表者選抜では、リーダーから推薦された候補者の中から決定した。一方、サテライトセミナー時にコーディネーター会議を開催し、残りの1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。全体の年度報告書は、共同研究グループから提出された年度報告書に基づいて、リーダーやコーディネーターが協力して作成した。このように研究協力体制は初年度からしっかりと整っている。

昨年度までと同様に、直接的な研究交流はそれぞれの国の研究者数や予算規模に応じて人数を決定し、セミナーや学会への参加、セミナーや学会への参加と合わせた共同研究、共同研究のみの3つの形式で実施した。日本からタイ、ベトナム、インドネシア、ドイツにそれぞれ93名、1名、5名、7名派遣した。一方、タイ、ベトナム、インドネシア、ラオスからそれぞれ95名、9名、17名、4名を受け入れた。これ以外にも日本以外の国の間で派遣受入を10件程度実施した（その一部の実績は後述する）。派遣受入については当初計画通り実施

したことから、本年度の目標を十分に達成したと評価している。

## 6-2 学術面の成果

共同研究を62件計画し、60件実施した。実施しなかった2件の内1件は、課題2の関連する共同研究と統合して実施した。残りの1件はインドネシア政府の研究機関との共同研究で、研究技術高等教育省（Ristekdikti）の支援（拠点経費）が開始されたが政府研究機関であることから規則上渡航費をその経費から払えないことが分かり、共同研究を断念することとなった。一方、昨年度頃から多くの共同研究成果が学術論文として発表され、本事業活動が順調に推移していることが伺える。また、サテライトセミナーを含む4件のセミナーを計画し、全て実施した。加えて、世界的拠点形成に向けて本事業に加わったインドネシア、ドイツ、イギリスとの交流の強化をすすめた。Ristekdiktiの支援でインドネシアから本事業関係者を含め20名の研究者が2ヶ月間日本を訪問し、それぞれの訪問先で共同研究を実施した。インドネシアとは、タイやラオスとともに、課題5に関連してe-ASIA共同研究（JST事業）としてバイオマスからの有用物質生産開発を開始した。また、ドイツは第4回サテライトセミナーを国際シンポジウムとして開催し、本事業メンバーだけでなくベルリン工科大学等の大学や研究機関からの発表があり、関連分野のドイツ研究者と広く交流できた。ドイツは、ベトナムおよび日本へ若手研究者を派遣するとともに、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行った。さらに、イギリスとは、課題2や5に関するシミュレーション解析等の共同研究を実施した。以上のことから、今年度の目標を概ね達成したと評価する。

本事業では、我が国に無い熱帯性環境微生物（耐熱性微生物）をキーワードとして共同研究を進めると同時に新たな研究領域の開拓を目標として掲げている。研究課題1～3では熱帯性環境に棲息する有用微生物の探索、耐熱性機構や環境への適応機構の解明、熱帯性生態系を維持する環境微生物の研究など先端的な基礎研究を、研究課題4では熱帯性環境微生物の食品、食品保蔵、衛生等への新たな活用方法の開発など応用研究を、研究課題5では、耐熱性微生物を利用して高温発酵等の次世代型発酵技術構築を目指している。

以下に本事業を構成する5つの研究課題について進捗状況を述べる。

課題1では、12の小研究課題について活発な共同研究および研究者交流が実施されてきた。その成果は形となって表れており、本プログラムにおいて微生物の探索からスタートした研究が、分離微生物や生産物質の有用性の検証を経て、国際共著論文の公表に至ったケースも多くみられる。このようなことから、本年度までの研究交流活動の目標はほぼ達成できていると判断される。

課題2においては、エタノール生産性の酵母・バクテリア（*Zymomonas*）、酢酸菌、アミノ酸生産性のコリネ型細菌、エタノール・CoQ10生産性の分裂酵母など、いわゆる有用微生物における、耐熱性や耐熱化に関する研究をゲノムワイドに行った。これまでに多くの知見が蓄積してきているので、それらを有機的に結びつけて解釈しようとしている。

課題3は亜熱帯の環境に生息する微生物を対象としているが、温帯である国内で解析されている微生物とは異なる独自の機能を有している。それら微生物を用いた生態系の維持、環境浄化および環境修復、その微生物が産生する有用物質の様々な分野への応用が期待される。本課題では、幾つかの特徴的微生物、微生物の産生する物質、微生物と環境との相互作用の発見に成功するなど、ほぼ順調に成果が出ている。

課題4では、例えば耐熱性を有するグルカナナーゼ、グルコシダーゼを発見しオリゴ糖生産、

新規生体認識機能を有する配糖体生産への基盤を確立、多機能性微生物を用いた循環型農業生産システムのパイロットテスト、農薬重金属汚染土壌のリメディエーション実証、ウキクサ成長促進細菌による工場排水浄化予備試験など、本格的な実用化直前までの技術確立が達成できている。これら以外にも、生理活性の確定がほぼ終了し、実用化可能性の検証が始まりつつあり、更に複数の有望技術の提案が可能になると期待される。

課題5では新産業創出を目指した次世代発酵技術としてのバイオリファイナリー関連の13の共同研究を実施しており、エネルギー生産ではパイロットスケール高温発酵試験や新しいダウンストリーム技術の開発、廃バイオマス前処理技術の開発が進められてきた。バイオリファイナリーではモデルコリネ菌で新規合成経路の開発に成功し、酵素利用技術では糖修飾酵素やプロテアーゼ、リパーゼの生産菌の獲得に成功し、生産性の向上を図っている。

### 6-3 若手研究者育成

第13回若手研究者セミナーを山口市で開催し、日本人若手研究者42名、外国人若手研究者43名が参加した。例年と同様に、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予定であったが、同奨学金事業の採択がズレたため、同奨学金事業参加学生のために臨時に第14回若手研究者セミナーを山口大学で開催した（臨時開催であったことから7-2には挙げていない）。本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。これ以外にも多くの個々の共同研究と関連して若手研究者育成を実施した。その例を以下に列挙する。特に、海外メンバーが日本側共同研究者の研究室に滞在する間、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をしている。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。

- ・山形大学農学部において、本学教職員・研究員及び学生を対象とした、JSPS-CCP派遣事業セミナーを開催し、Dr. Phisit Seesuriyachan (チェンマイ大学准教授)が講演を行った。
- ・山口大学はJASSOのSSSVプロジェクトにより、本事業のタイ、インドネシアのカウンターパートの指導する大学院生や学部学生を16名各2ヶ月間受け入れ、研究指導を行った。
- ・インドネシアからの留学生2名（修士および博士）を輩出した。また、インドネシア留学生2名、タイ留学生1名を受け入れた。
- ・カウンターパートの研究室から博士課程学生1名をRoyal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D.プログラムにて6か月間、修士課程学生1名を2か月間、受け入れた。
- ・Prince of Songkla大学の博士研究員2名をERATO浅野酵素活性プロジェクトで雇用し、研究を実施した。以前の同大学からの留学生による論文も出版された。
- ・カウンターパートの大学で開催された国際学会に大学院生5名を7日間派遣。また、学部4年生1名を短期派遣(3か月)した。
- ・カウンターパートの所属大学の大学院生をRGJにて半年間受け入れ指導した。
- ・カウンターパートの所属大学の博士課程学生を9か月間受け入れ、研究指導を行った。
- ・カウンターパートの研究担当のD3学生が2017 Asia-Pacific 3 minute-competition semi final (Brisbane, Australia)で発表しCosmos Editor's Choiceに選ばれた。
- ・山形大学さくらサイエンスプランにてチェンマイ大学アグロインダストリー学部の学部生および修士生を受け入れた。
- ・さくらサイエンスプランにて、コンケン大学理学部の学生10名+教員1名を11/12-18の

間、受け入れた。

#### 6-4 その他（社会貢献や独自の目的等）

・「食と微生物の事典」朝倉書店 2017（平成 29 年）ISBN 978-4-254-43121-6 C3561 の「世界の希少酒と伝統酒」の項 pp. 110-113 を執筆担当した。

・本事業関連の発表演題が第 69 回日本生物工学会大会トピックスに選定された。

・小林国際奨学財団の研究助成に採択(平成 29 年度)され、琉球大学農学部および医学部、KMUTT、Mahidol 大学、ベトナムパスツール研究所の連携で ASEAN 発酵食品または発酵微生物から感染症細菌の予防に関する共同研究に発展させることができた。また、沖縄県内の高校への出前授業の中で、本 CCP における琉球大学とタイ、インドネシアの大学との共同研究について紹介し、ASEAN 諸国と沖縄県の発酵食品の比較についてプレゼンした。

・ナノ材料の正しい理解を進めるために、既に出版した ISO/TS19337:2016 の普及に努めている。

・日本農芸化学会・福岡市科学館共催のサイエンスカフェ（テーマ：カスピ海乳酸菌－ヨーグルトの粘りの秘密・健康効果－2018 年 2 月 22 日、福岡市科学館）において一般市民に対し、乳酸発酵およびファージについての情報発信を行った。

#### 6-5 今後の課題・問題点

タイ側から生物資源を持ち出す場合、日本人研究者が NRCT に外国人研究者として登録されて正規の手続きを取る必要がある。今後生物資源の国家間の移動を伴う共同研究を継続して進めて行く為には、今まで以上にきちんと相手国の法令を遵守する必要がある。大学当局に MAT や知財等を一括で扱い、管理する窓口の創設が早急に整備される必要がある。

名古屋議定書の批准により共同研究の実施が難しくなっており、対策が急務と思われる。研究資材（微生物資源）等の分与についての手続きの煩雑さが問題として挙げられ、その簡素化（共通認識化）が課題である。また、研究交流に伴う消耗品購入費等の充実が課題である。

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间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等々の指摘がある。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。

#### 6-6 本研究交流事業により発表された論文等

(1) 平成 29 年度に学術雑誌等に発表した論文・著書	42 本
うち、相手国参加研究者との共著	30 本
(2) 平成 29 年度の国際会議における発表	42 件
うち、相手国参加研究者との共同発表	21 件
(3) 平成 29 年度の国内学会・シンポジウム等における発表	33 件
うち、相手国参加研究者との共同発表	16 件



## 7. 平成29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 氏名・所属・職	(和文) 伊藤真一・山口大学創成科学研究科・教授 (英文) Shinichi ITO・Yamaguchi University・Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Piamsook PONGSAWASDI・Chulalongkorn University・Professor Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
29年度の研究 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、分離微生物および生産物質の研究）に分け、それぞれ8件および5件の共同研究（小研究課題）を実施した。</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                      今年度は、チュラロンコン大学からSehanat Prasongsuk准教授とその研究室のポスドクおよびチュラロンコン大学のドクターコースの学生1人（ともにチュラロンコン大学支援）、計3人が山口大学に滞在して、研究活動を行った。Sehanat先生とポスドクは2017年11月7日～12月7日の間滞在し、精密なPCRにより様々なキシロシダーゼが異なる<i>Aureobasidium</i>菌から取得できることを明らかにした。また、酵母への遺伝子導入方法も成功させ、高発現系を構築している。さらに、学生は2017年11月7日～2018年2月7日の間滞在し、キシリトール生産菌を研究した。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析                      効率的なバイオ燃料生産を目指して、高速高温発酵に適したエタノール生産性微生物である <i>Zymomonas mobilis</i> 菌株をタイとインドネシアにおいて分離培養する予定であったが、分離方法確立に時間を要することが分かり、課題2の関連する共同研究と統合して実施した。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析                      本研究グループでは、タイ、ベトナム、ラオス、インドネシアにおいて、耐熱性でエタノール生産性の優れた株を分離し、デンプン系やセルロース系バイオマスからのエタノール生産に使える株の取得を目指している。これまでそれぞれ100株以上を分離し、その中で特に耐熱性やエタノール生産性に優れた約10株を選び、デンプン系やセルロース系バイオマスを用いたフラスコスケールのエタノール発酵試験を行い、そ</p>				

れぞれ数株のより優れた株を選別した。中には、再熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の中で最も耐熱性に優れている株 (DMKU3-1042) と比べて、高温でのエタノール生産性やキシロースからのエタノール生産性がより高いものが見出されている。

#### 4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

富山県立大学においては、タイ各地で収集したスターターより各種培地を用いて、細菌、酵母、糸状菌を単離し、グルコース、キシロース、アラビノースからのエタノール生産性を検討するとともに、7種類のスターターについて、PCR-DGGE法により微生物叢の解析を行った結果、発酵に関わる数種類の微生物の存在を確認した。さらに、タイより新たに収集したスターターを含めた全27種類について、次世代シーケンサーを用いて微生物叢を解析し、一部のスターターを用いて蒸米の発酵中でのアルコール生産と菌量の変化を解析した。

2017年11月2日～11月30日にApichat Upaichit博士が滞在し、「タイ由来のリパーゼ産生酵母のリパーゼ遺伝子のクローニング研究」を行った。

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

タイにおいて大量に発生する稲ワラや籾殻などの廃棄系バイオマスの有効利用技術の開発を目的に、本年度はヘミセルロースの1種であるキシランに焦点を絞り、その分解酵素について、遺伝子のクローニングおよび大量発現系の構築、組換え酵素の反応特性解析を行った。

#### 6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

2017年8月25日～28日に、小柳博士および栗原博士がパヤオ大学を訪問し、研究打ち合わせおよび情報交換を行った。

2018年3月1日～31日(31日間)、Thida Chaiwangsri 博士および Chayaphon Sriphannam 博士が、石川県立大学にて研究活動に従事した。

#### 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継続して実施した。また、昨年度に実施した構造解析では、ポリヒドロキシ酪酸の含有率が少なく、構造解析が不可能であったことから、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。特に、培地の成分と培養温度を変化させて目的産物の生産を試みた。その結果、HPLCの解析では、ポリヒドロキシ酪酸の生成を検出することができた。日本側研究者は2017年3月にタイ側研究者を訪問し、HPLCデータを確認するとともに、得られた産物の分析を静岡大学で行うこととし、現在NMR、FTIR、蛍光顕微鏡を用いた分析の準備を行っている。

#### 8) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の単離・同定

2017年7月1日～30日、Dr. Sunpapao (ソクラ王子大学、タイ) を山口大学に招聘し、熱帯作物 (アブラヤシ) の病原菌に対して拮抗作用を示す微生物の生化学的性質に関する共同研究を行った。

2018年3月1日～30日、Dr. Jantasuriyarat (カセサート大、タイ) を山口大学に招聘し、インド・中国産イネから分離したいもち病抵抗性遺伝子の日本産イネ品種における分布について共同研究を行った。

## 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等農薬分解への応用

Ca が PET の分解産物を効率的に分解することを確認した (主に日本サイドが HPLC など検討)。Ca の固定化試行と最適固定化方法を確立するために、カウンターパートである Dr. Thumarat の修士学生を3か月間受け入れ、固定化の指導を行い、帰国後も引き続きタイ側で検討した。

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

①分離細菌 *Bacillus* 属菌の β-ガラクトシダーゼおよび α-ガラクトシダーゼ遺伝子を PCR によってクローニングし、得られたそれぞれの遺伝子を発現用ベクターへ導入し、大腸菌の形質転換を行った。

②*Corynebacterium glutamicum* のアミロマルターゼのアミノ酸置換による変異酵素を作成し、変異酵素を用いた糖転移反応によって生成した反応生成物を解析した。

③*Fusarium* sp. F59 の生産するグルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生 α-グルコシダーゼの精製を最終目的としてその極在性を調べた。さらに、担子菌 *F. verutipes* および *A. bisporus* 由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ FV (エンド FV) および AB を (エンド AB) 用いて、生体試料中の糖タンパク質からの糖鎖遊離を電気泳動、TLC および質量分析計によって調べた。

④新規大環状アミロース合成酵素を生産する *Bacillus* 属細菌を生理、生化学的性質から詳細に同定試験を行うとともに、本菌が生産する新規大環状アミロース合成酵素の同定を目指し、カラムクロマトグラフィーにより分析した。

タイから Dr. Kamontip Kuttiyawong が大阪市立大学(2018年2月18日～3月31日)、Dr. Kuakarun Krusong が明治大学(2018年1月6日～2月7日)を訪れ、研究・交流を行った。また、日本から伊藤がチュラロンコン大学を訪問(2018年1月13日～23日)し、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

タイより Dr. Jantaporn Thongekkaew を 11 月 14 日から 12 月 26 日まで受入れ、タイで単離した耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株の生産する  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子の配列解析とワイン香気成分増強を念頭にした応用可能性について検討し、ワインの香り増強を期待させる成果を得た。また、論文 1 通が掲載された。

酵素の大量生産を目指し、 $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子の配列解析を nested PCR 法を用いて行ったが、全配列を決定することはできなかった。次年度は、次世代シーケンサーによる本菌株の全ゲノム配列決定等により遺伝子取得や酵素の大量生産を目指す。また、本菌株の  $\beta$ -グルコシダーゼは pH 酸性条件やエタノール存在下、グルコース存在下でも活性阻害がかかりにくいことから、バイオマス利用のみならずワイン醸造でも利用価値が高いと考えられる。そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼによる香気成分増強効果について検討した。ぶどう抽出物に  $\beta$ -グルコシダーゼを作用させたところ、酵素がモノテルペンアルコール配糖体を分解し、モノテルペンアルコールの遊離と増強を確認した。本酵素のエタノール耐性や耐糖性、耐酸性を考えるとワインの香り増強酵素としての有用性を期待させる結果となった。

### 4) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用

平成 29 年度はテーマを「金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用」に変更し、耐熱性酵母の重金属ストレス応答および金属吸収能を解析するための重金属等の高吸収活性を持つ耐熱性酵母菌株のスクリーニングに着手した。そのために岸田が 11 月 1-6 日にコンケン及びビエンチャンを訪問し、単離源として想定しているタイ伝統酒酏をタイ国東北部コンケン周辺およびラオス国ビエンチャン周辺の醸造ファクトリー数社から恵与いただいた。現在、目的酵母の分離作業中であるが、まだ良好な候補株は得られていない。また、単離原分離のために訪れたコンケン大学とラオス国立大学において「Metal absorption using yeast」のタイトルで講義を行った。各々 20 人程度の学生と若手研究者が参加し、活発な質疑応答が行われた。尚、平成 28 年度までの研究の成果について、国際会議発表と論文投稿（平成 30 年度掲載予定）を行った。

### 5) 微生物の生産する生理活性物質の探索

昨年度までに見出した 124 株の耐熱性放線菌のうち、液体培養で生育可能な 46 株の耐熱性放線菌について、6 種の培地で培養をおこない、培養初期・後期の培養液をサンプリングして熱ショック代謝物 (HSM) の網羅的解析を試みた。さらには、見出した HSM の中から新規化合物の取得を目指し、各 HSM の分子量と UV スペクトルをデータベース化した。

2017 年 8 月 10 日～24 日の間、当研究室の博士課程学生がタイ側のカウンターパートである Dr. Ramida Watanapokasin 研究室を訪問し、

	<p>当研究室で実施している種々の薬理活性評価試験について説明し、さらに今後の共同研究について情報交換を行った。また、Dr. Ramida 研究室の学生らとの交流を深めた。さらに 2018 年 3 月 3 日～31 日の間、Dr. Ramida が当研究室を訪問し、HSM や薬理活性評価について情報交換・技術交換を行った。</p>
<p>29 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 昨年度から様々な PCR による遺伝子取得を試してきたが、良い結果が得られなかった。今年度は、もしかすると <i>Aureobasidium</i> の菌株は、かなりの多様性があるのではと思い、いくつかの PCR を異なる株に対して、それぞれ行って比較すると、合成できるものとできないものがあることがわかり、同じ種であってもかなりの多様性を持つことがわかった。したがって、数多くの株に対して PCR を行うことで、遺伝子が取得できることがわかった。今後、多様な酵素遺伝子群が取得できることが予想された。</p> <p>2) 耐熱性エタノール生産性細菌の探索とその解析 共同研究者による菌株分離が行えなかったため、成果は得られなかった。一方、既存の株を種々のサンプルと混ぜた実験等からエタノール耐性や抗生物質の添加等いくつかの条件検討が必要であることが分かってきた。</p> <p>3) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析 高分子のバイオマスからのエタノール生産は糖化に、また、熱帯地域や日本の夏場の高温は発酵維持に不可欠な冷却にコストがかかる。高温発酵は、冷却コスト削減、冷却装置の簡易化、雑菌混入の抑制などが見込まれ、次世代の省エネ技術として期待されている。しかし、高温発酵には優れた耐熱性発酵微生物が不可欠である。また、生物多様性の条約等から、有用微生物の国境を越えた利用は制約がある。そこで、本小課題研究は、それぞれの国で高温発酵に不可欠な優れた耐熱性酵母を開発し、課題 5 等で使用する。</p> <p>4) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析 タイで収集した 27 種類のスターターから直接 DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる塩基配列決定を行った。その結果、細菌に関しては、18 種のスターター中で乳酸菌 (<i>Lactobacillus</i> 属、<i>Lactococcus</i> 属、<i>Pediococcus</i> 属、<i>Leuconostocaceae</i> 科) が 50%以上を占めることがわかった。スターターによって優占種は異なり、3 種類のスターターでは <i>Lactobacillus</i> 属が、5 種類では <i>Lactococcus</i> 属が、8 種類では <i>Pediococcus</i> 属が、7 種類では <i>Leuconostoc</i> 属が優占していた。また真菌に関しては、</p>

多くのスターターにおいて *Rhizopus* 属や *Mucor* 属を確認した。さらに、3 種類 (No. 24、25、28) のスターターによりエタノールの生成量を測定した結果、No. 24 に関して高いエタノール生産が確認され、他のもの比べて約 4 倍あることがわかった。また、それに伴い真菌の菌数も急激に増加しており、他のもの比べて 2~4 倍ほど高い生育数が確認できた。植物油成分を原料としてバイオディーゼルを製造する方法の開発を行うために、タイで分離された酵母 *Saprochaete clavatum* 17B 由来のリパーゼの精製を開始した。

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

本年度研究において、キシラン分解に関連する 2 種の遺伝子 (アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼと  $\beta$ -1,3-キシロシダーゼ) を獲得し、組換え酵素の大量生産系の確立に成功した。さらに、両酵素の詳細な反応特性について解析した。

アラビノキシランアラビノフラノヒドロラーゼ: アラビノキシラン中で側鎖として存在するアラビノースを特異的に分解する酵素であった。さらに、本酵素の詳細な反応特性を決定し、アラビノキシラン分解において本酵素はエンド-キシラナーゼと強力な相乗作用を示すことを明らかにした。

$\beta$ -1,3-キシロシダーゼ:  $\beta$ -1,3-キシランは緑藻類にのみ存在する多糖であるが、本酵素はそのオリゴ糖を特異的に糖化する酵素であり、海洋バイオマスの資源化に有用な酵素であることを明らかにした。また、本酵素に関する報告例は 1 報しかなく、グラム陽性菌では初めての発見であった。

#### 6) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析

##### ①発酵食品に由来する乳酸菌の同定について

タイの伝統発酵食品 (なれずし・発酵タケノコ) より 40 菌株を分離して 16S rRNA 遺伝子解析による菌種同定を行い、*Lactobacillus plantarum* 等の乳酸菌を単離した。取得した株について大腸菌、黄色ブドウ球菌、およびセレウス菌に対する抗菌活性を調べたところ、一部の菌株において増殖阻害効果が確認された。

##### ②微生物由来の耐熱性セルラーゼの性状解析について

タイ土壌より分離したエンドグルカナーゼ産生菌について 16S rRNA 遺伝子解析を行い、*Bacillus subtilis* と同定した。PCR による増幅を行って遺伝子配列を決定したところ、既知のセルラーゼ遺伝子と高い相同性を示した。現在、インバース PCR 法による全長遺伝子の取得を試みている。

#### 7) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)生産菌の単離と解析

昨年度の産物の分析結果は、含有率が少ないため構造解析には至らなかったが、今年度得られた産物は、HPLC 分液では目的とするポリヒド

ロキシ酪酸のピークが認められている。現在、産物の解析準備中である。クロロホルムに溶解することを確認しているため、今後、DPC カラムによる分子量分布と NMR 測定を予定している。

#### 8) 熱帯作物の病害防除に利用可能な有用微生物の単離・同定

Dr. Sunpapao (ソククラ王子大学、タイ) との共同研究により、熱帯作物 (アブラヤシ) の病原菌に対して拮抗作用を示す微生物の生化学的性質が明らかになった。これまでの共同研究の成果をまとめて国際誌に 2 報投稿した (1 報は受理済み)。また、Dr. Jantasuriyarat (カセサート大、タイ) との共同研究により、インド・中国産イネから分離したいもち病抵抗性遺伝子が日本産イネ品種に保持されていることが明らかになった。さらに、日本産イネ品種のいもち病抵抗性遺伝子がインド・中国産イネにも保持されていることがわかった。

## 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等農薬分解への応用

PET の分解産物はクチナーゼよりも Ca119 で効率的に処理できることを確認した。このことは Ca119 を共存させることで分解産物による反応阻害を防ぎ、ポリエステルの完全分解の促進に有効であることを示唆した。Ca の固定化を幾つか試みた結果、ケイ酸への吸着が最も有効であった。固定化酵素は pH 及び温度安定性が増加し、回収も容易で繰り返し使用が可能であったので、実用化への経済効果を立証できた。

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

①*Bacillus* 属菌の β-ガラクトシダーゼおよび α-ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、塩基鎖長がそれぞれ約 1.9K および約 2.1K であることを明らかにした。さらに、クローニングした遺伝子をそれぞれ発現用ベクターへ導入後大腸菌 DH5α を形質転換し、両酵素遺伝子の発現用ベクターを得た。さらに、得られた発現用ベクターで大腸菌の形質転換体を得た。

②*C. glutamicum* のアミロマルターゼのアミノ酸置換変異酵素による反応生成物を HPAEC で解析したところ、置換したアミノ酸によって生成する配糖体の種類が変化することを見出した。

③*Fusarium* sp. F59 の生産するグルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生 α-グルコシダーゼの極在性を分画遠心分離法で調べたところ、目的酵素活性は主に細胞内小器官を含む画分から見出された。また、この目的酵

素活性は、4℃で7日間の保存で50%以上の活性を失うことが明らかになった。一方、担子菌 *F. verutipes* および *A. bisporus* のエンド FV およびエンド AB は、ヒト血清中の異なる糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離し、エンド AB によって遊離する糖鎖をコンプレックス型と特定することができた。

④新規大環状アミロース合成酵素を生産する *Bacillus* 属細菌を詳細に同定したところ、本菌を *Bacillus licheniformis* と同定した。また、本菌の培養上清を透析後、陰イオン交換クロマトグラフィに供し、分画した各酵素画分による反応生成物を分析したところ、目的酵素活性を含むと思われる複数の画分を同定することができた。

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

β-グルコシダーゼによる酒類の香り増強を念頭にワインの品質向上に利用できるか検討し、ぶどう抽出物からのモノテルペンアルコールの増強効果を確認した。本酵素のエタノール耐性や耐糖性、耐酸性を活かし無臭の配糖体からモノテルペンアルコールを切り出しワインの香りを増強するといった酒類の高品質化への利用可能性が示された。

### 4) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用

現在、醸造酵母においてマンガンを中心に金属高吸収変異酵母の解析が進行中であり、耐熱性酵母において同様の金属吸収酵母が見つければ、双方を比較することにより酵母の金属吸収機構の解明に繋がるとともに、本酵母及び関連因子群を利用することにより、タイ等の亜熱帯域における土壌・水質汚染金属のバイオリメディエーションへの応用が期待できる。

### 5) 微生物の生産する生理活性物質の探索

46株の耐熱性放線菌について6種の培地、および培養初期・後期の培養液をサンプリングしてHSMの網羅的解析を試みた結果、46株中18株で約50個のHSMが生産され、その生産は培地成分および培養日数に強く依存することがわかった。続いて50個のHSMについて新規化合物の発見を目的に、その分子量およびUVスペクトルを解析したところ、放線菌CA40株が400nm付近にUV吸収を持つHSMを多数生産していることが明らかになった。そこで放線菌CA40株が生産するHSMの単離精製・構造解析をおこなったところ、これらHSMの多くは芳香族ポリケタイドの一種であるアングサイクリン系の既知化合物であると同定した。



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・山口大学創成科学研究科・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				
29年度の研究 交流活動	<p>本研究課題において、下記の7件の共同研究交流活動を実施した。</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 本研究グループは、課題1と連動して耐熱性エタノール生産性酵母の分布調査を行っている。それぞれの国において様々の場所から採取したサンプルを高温条件で集積培養を行い、分離株の種や特性を比較している。これまで、それぞれ100以上の分離株を解析した。一方、耐熱性に優れたエタノール生産性酵母株の種々の解析から、高温で代謝を切替えている可能性が推測された。本年度は、この切替えについて培養初期の詳細な解析を行った。加えて、一般に複数の糖を含むバイオマス利用で問題になるグルコース抑制について、耐熱性酵母における制御因子遺伝子破壊の影響を解析した。</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 前年度に引き続き耐熱性エタノール生産性微生物 <i>Zymomonas mobilis</i> の耐熱化株のゲノム内変異の解析を行なった。2つの株 (TISTR548 と CP4) を用いて耐熱化し、その内1つの株は1系統でもう1つの株は4系統で耐熱化し、それぞれの耐熱化株の変異を特定した。今年度は特に、それぞれの変異を親株に戻し、耐熱性の向上が見られるか検討した。一方、分布調査については、課題1の分離と統合して試みた。</p> <p>3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発 ① ベトナムおよびラオスで分離された <i>Acetobacter</i> 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。② より実用的な高酸度・高温酢酸発酵系の開発を目指し、“もろみ”のような低栄養培地に適応した菌株の取得を試みた。耐熱性酢酸菌 <i>A. pasteurianus</i> SKU1108 の耐熱化株 TH-3 からエタノール (酢酸) 耐性株 7E-13 をベースに、“もろみ”培地および YGE 培地に適応した、それぞれ 7E-13LN および G.40-1 株を取得し、それらの発酵能、栄養要求性を調べた。③ <i>Komagataeibacter</i> 属菌 MSKU3 株から耐熱化およびエタノール (酢酸) 耐性育種によって得られた適応変異株 KWT-4 および KWE-3 株のゲノム解析を行い、それぞれ</p>				

11 および7つの変異を見つけた。④上述した 7E-13LN 株および G. 40-1 株を用いた高温酢酸発酵系の開発を企業との共同で進め、実用的フェメンター（アセテーター）によるもろみ培地での発酵に 37°C で成功した。⑤ *Komagataeibacter* 属菌の内在性プラスミドのベクターとしての有用性を明らかにした。また、この pH 感受性 GFP を構築し、本菌の細胞質 pH の変動を調べた。対数期から定常期の初期にかけて細胞内酸性度は低く、本菌が異種タンパク質発現に適した宿主であることを示した。さらに、⑥ 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。

#### 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* PP25 及び PP80 が N24 株に匹敵する高温で生育可能なこと、そのうち PP80 株が高温でグルタミン酸を生産できることが明らかとなった。② *C. glutamicum* の高温生育に、SOD およびカタラーゼ共に、その高温生育に重要であることを明らかにした。③ 耐熱性コリネ型細菌 N24 は新種の *Corynebacterium* であることが明らかとなった。

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

9月15日から10月15日まで、Wichai Soemphol 博士を交流研究者として琉球大学に受け入れた。滞在中に耐熱性酢酸菌の多糖の解析と、耐熱性欠損変異株の解析を行った。

#### 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

耐熱性の異なる 2 つの酵母株の繰り返しの交配で得られた耐熱性株のドラフトゲノム解析で明らかになった耐熱性に関与すると期待される領域に存在する遺伝子の耐熱性への寄与を調べた。この領域に存在する 24 個の遺伝子を耐熱性の高い株の染色体から PCR で増幅し、それぞれ耐熱性の低い株に導入した。得られた遺伝子導入株の耐熱性を、温度を変えて調べたところ、いくつかの遺伝子が耐熱性の低い株を高温で培養した時の生存率を高めている可能性を示す結果を得た。

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

日本国内で *S. japonicus* 酵母を探索し、単離することに成功した *S. japonicus* についても、ほとんどコエンザイム Q を合成せず、良好なエタノール発酵を行う株であった。

29年度の研究  
交流活動から得  
られた成果

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

微生物の分布調査は種の広がりだけでなく、地球温暖化等の影響をみるためにも今後重要性を増すと考えられる。本研究では有用性も考慮して耐熱性酵母に焦点を当てている。これまで、タイ、ベトナム、ラオス、インドネシアからそれぞれ100以上の株を分離し、種や特性を明らかにした。また、耐熱性酵母の解析から高温で代謝切替えが存在していることが示された。さらに、耐熱性酵母のグルコース抑制の分子機構の一部を明らかにした。これらの情報は他の酵母等の耐熱化や高温発酵に利用できる可能性がある。

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

耐熱化株の親株が TISTR548 株である場合では、少なくとも4つの変異が耐熱性向上に寄与することを明らかとした。親株が CP4 である場合は、耐熱化による変異のほとんどが耐熱性向上に寄与することを明らかにするとともに、トランスポーターへの変異は耐熱性向上への寄与が弱いことを示した。これらの結果から、耐熱化株に存在する変異はその全てではないが、多くが耐熱性の向上に寄与するものであり、変異の組み合わせにより微生物のさらなる耐熱化が可能なことを示唆した。

3) 耐熱性酢酸菌による高温酢酸発酵系の開発

次の成果をあげることができる。① 耐熱性酢酸菌株の取得とそれらの耐熱化機構の理解の前進。② 高温酢酸発酵に有用な菌株の育種と高温酢酸発酵系の開発。③ 変異 *Komagataeibacter* 属菌の利用によるハエ除去法の開発。

4) 耐熱性コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵

次の成果をあげることができる。① 新規な耐熱性グルタミン酸生産菌がタイより分離された。② 耐熱性株とその耐熱化株を用いて、グルタミン酸高温発酵の開発が始まった。③ 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  $K^+$  の添加が有効であることが明らかとなった。

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

1) *A. tropicalis* SKU1100 株の耐熱性に関与する遺伝子の特徴づけ

以前の研究で、セリンプロテアーゼ遺伝子にトランスポゾンが挿入され耐熱性の低下した *A. tropicalis* SKU1100 の変異株 (43-38 株) と野生株のペリプラズム画分のタンパク質について SDS-PAGE で比較を行ったが、タンパク質の同定をすることは困難であった。特に変異株の生育が 39°C で極端に低いためであった。今回は、まず温度を 39°C から 37°C にした。変異株では野生型よりは生育が低いままであったが、39°C の時に比べると菌体収量が増加した。ペリプラズム画分を調製し、タンパク質について SDS-PAGE で比較を行った。結果として、野生株で見られる

約 50 kDa のタンパク質バンドが変異株では消失しており、反対に約 40 kDa のタンパク質バンドが野生株では見られないが変異株では検出された。これらのタンパク質と生育の低下に関連があるものと予想されたので、今後これらのタンパク質の同定と耐熱性との関係について調べる予定である。

#### 2) 耐熱性菌から単離された菌膜多糖の解析

以前にコンケンから単離された耐熱性酢酸菌 2-16 株と 2-3 株の菌膜多糖について解析した。構成糖に関しては、いずれの菌株も同じ種のタイから単離された酢酸菌 SKU1108 の菌膜多糖と同じグルコース、ラムノース、ガラクトースであった。しかし、FT-IR 解析では 3 株に違いが見られた。酢酸菌 SKU1108 の菌膜多糖では、側鎖のグルコースの一部がアセチル基されていることが分かっているので、2-16 株と 2-3 株の菌膜多糖ではそのアセチル化の度合いが違うものと推察された。また、走査型電子顕微鏡による菌体の形状の違いについても観察したが、3 株の違いは特に観察されなかった。

#### 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

耐熱性に寄与すると考えられる遺伝子候補が絞られたことで、耐熱性のメカニズムや遺伝子工学的な耐熱化の可能性が見えてきた。また、*Saccharomyces cerevisiae* と相同性のない遺伝子については、未知の分子機能を持つ遺伝子である可能性も示唆される。まずは、これらの遺伝子の寄与の程度を詳細に解析する必要がある。

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

*S. japonicus* の基本的な特性として、コエンザイム Q をほぼ合成せず、解糖系によってエネルギーを獲得している酵母であることがわかった。*S. japonicus* をエタノール発酵に利用できる可能性がある。

整理番号	R-3	研究開始年度	平成26年度	研究終了年度	平成30年度
研究課題名	(和文) 熱帯性生態系を維持する環境微生物の研究				
	(英文) Research on Environmental Microbes sustaining Tropical Ecosystem				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 前田 健・山口大学共同獣医学部・教授				
	(英文) Ken MAEDA・Yamaguchi University・Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Sunee NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
29年度の研究 交流活動	<p>1) アジアにおける感染症の疫学調査 タイ・インドネシア・ベトナムにおいて人獣共通感染症・食品媒介感染症・伴侶動物感染症・節足動物媒介感染症の調査を実施した。さらに、蚊と共生するウイルスの解析を行い、その意義を解析した。 タイより6名の講師並びに学生を受け入れた。インドネシアより1名の講師を受け入れた。タイ・インドネシア・ベトナムに、延べ11名の研究者を派遣した。</p> <p>2) 植物葉圏における植物-微生物間相互作用の解析と葉圏微生物による有用物質生産 前年度に引き続き、タイで分離した微生物の系統分類学的解析を行った。植物生長促進作用および微生物-植物間相互作用に関わる因子に関しては、日本では微生物が利用するビタミン類、タイでは微生物が生産するインドール酢酸 (IAA) に着目し、ビタミン類およびその前駆体化合物の要求性試験や IAA 高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転写制御・シグナル伝達因子の解析や本酵母のストレス応答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 既に <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 で特定したクロロアニリンの走化性センサーの特性化を引き続き行った。クロロアニリンに加え、やはり代表的な環境汚染物質である n-アルカンに対する走化性について解析を行った。環境汚染物質に対する植物の応答を調べた。平成28年度に発見した植物病原菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> のハウ酸走化性センサーの特性化を行った。<i>R. solanacearum</i> の植物感染防除に資する環境応答として様々な化合物に対する負の走化性 (忌避応答) を解析した。 平成29年8月13~16日、加藤はチュラロンコン大学の Alisa Vangnai 研究室を訪問した。平成30年2月14日、山口大学に滞在中の Alisa Vangnai 博士を加藤が訪問した。</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 2017年9月24日~28日にカウンターパートであるタイのカセサート大学にて、以下に示す研究についての研究打ち合わせとディスカッションを行った。 4-1. Gut microbiota analysis of Thai and Indonesian people and investigation on effect of foodson their gut microbiota</p>				

日本の児童とタイおよびインドネシアの児童では、腸内フローラが大きく異なっていることが、これまでの我々の調査で明らかになっている。日本の児童の腸内フローラはビフィズス菌とバクテロイデスを主体とするタイプ（BBタイプ）であり、インドネシアの児童はプレボテラ属細菌を主体とするPタイプである。また、タイはPタイプとBBタイプの児童が混在している。そして本CCPではタイの研究グループとともに、タイ大都市バンコク(n=17)と地方都市ブリラム(n=25)の児童を対象に、糞便のサンプリングと食生活調査を行ない、フローラタイプを左右させる食因子を明らかにすることを目標と研究を行ってきた。本年度は、得られた食生活調査のデータ解析と、得られた糞便サンプルを用いての腸内細菌のメタ16S解析と代謝物解析を行った。その結果、ブリラムの子どもは野菜を多く食するイサン地方（タイ中東部）の食習慣を維持しており、それに相関して腸内細菌の有益代謝物としての短鎖脂肪酸の濃度が上昇していることが示された。

#### 4-2. Genome analysis of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

*Lactobacillus reuteri* KUB-AC5は乳酸菌には珍しく、サルモネラ菌に対する抗菌物質を生産している。しかし長年、その抗菌物質の化学的実態を明らかにすべく研究を行ってきたが、未だにその単離・構造決定には至っていない。そこで本年度は、次世代シーケンサーを用いてKUB-AC5のゲノム配列を解析した。その結果、バクテリオシン様の配列をそのゲノム配列の中に見出すことができた。

#### 5) 耐熱性緑藻による機能性脂質生産

アラキドン酸含有脂質を高蓄積する耐熱性緑藻株の探索を目的として、加藤が訪タイしてタイ南部アダムン海近辺（スラータニー県、クラブイー県、バンガー県、ラノーン県、チュムポーン県）の熱帯雨林の湖沼水、植物体からサンプリングを行い、カセサート大にて耐熱性緑藻株を単離した。得られた緑藻株をカウンターパートが7月の来日時に持参して、一ヶ月の滞在期間中に培養、各種分析法にてアラキドン酸含有脂質蓄積能の評価を行った。

#### 6) アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

バンコク市内で採集したハーブ類から50℃で生育する微生物を分離した。次いでそれらを培養し、二次代謝物生産を分析したところ、一株が他の分離株とは異なる物質生産パターンを示したため、生産物を単離、精製し、構造解析した。その結果、ナフトキノン骨格を有する新規化合物が得られた。本菌株の至適生育温度は、ほぼ50℃であり、放線菌様の性状を呈する。16S rRNA 遺伝子配列の解析と生理活性評価を現在進めている。

平成30年3月11日～14日の日程で、五十嵐教授と春成助教がバンコクの4大学を訪問した。共同研究先であるチュラロンコン大学、カセサート大学のカウンターパートと面談した。春成助教は両大学で研究講演をした。さらに、タイ放線菌からの有用物質探索研究の状況について議論した。また、同じく共同研究先のマヒドン大学を訪問し、開発研究中の抗菌剤について講演した。春成助教も有用微生物探索に関して講演した。さらに、カウンターパートが解析中の抗菌物質の構造決定についての相談を受け、意見交換した。次いで、ラムカムヘン大学を訪問し、サンゴの専門家に面会した。彼らは、私たちが取り組んでいるサンゴ共生微生物の研究に強い関心を示し、今夏からタイでサンゴ採集を行い、そこから放線菌や共生細菌を分離する共同研究を行うこととなった。

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

タイ北部から単離されたパラコート分解菌のうち、自ら土壌中を成長し進展できる糸状菌を中心に分解の最適条件の検討を行った。その結果、15日間の培養により Czapek Dox 培地中のパラコートの最大60～80%を除去できることが明らかになった。また、*Aspergillus tamari* による最適条件は、スクロース10%、ペプトン10%、温度37℃、pH7.0であった。

なお、交流活動としては、Pairote Wongputtisin 博士を10月27日から11月26日(31日間)招聘し、菌による分解産物、中間産物の検出実験を行った。また、日本側研究者は12月25日から1月8日の間、メイジョ大学、チェンマイ大学およびチェンライのメイファールアン大学を訪問し、講演、ディスカッション、論文の作成指導、新たな展開に向けたテーマの探索を行った。

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

*Methylobacterium* 属細菌は主要な植物共生細菌の一つで、植物が放出するメタノールを感知し走化性を示し、また、メタノール特異的に鞭毛が誘導される。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。この研究成果を8月に開催された Thailand Research Expo 分科会で発表した。

9) 微小藻類における脂肪酸分解由来の香り成分に関する研究

山口大学から、大学院修士学生1名がSSSVでカセサート大学へ留学中、ケイ藻から脂質の抽出とその脂肪酸組成の決定方法ならびに多糖の抽出と分析方法を学んだ。

10) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明

Lumyong 教授の博士研究員2名を2017年12月1日より2018年2月3日まで受け入れ(旅費はLumyong 教授の研究費から、滞在費は松井の研究費から支給)、タイ北部で単離された植物内生菌 *Muscodor cinnamomi* 由来の揮発性化合物をGC-MS分析し、主要化合物を同定するとともに、本菌が放散する揮発性化合物のバイオ燻蒸剤としての有効性を評価した。さらにJASSOのSS-SVプロジェクトでLumyong 教授が指導する博士課程学生を2名、2018年1月22日～3月11日まで受け入れ、タイ北部で単離されて新規植物内生菌の有効利用に関する次年度の共同研究に向けた予備的な検討を進めた。また、Lumyong 教授が2月15-18日に滞在し、共同研究方針を討議した。

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

今年度は、日本側研究者がタイのコンケン大学を訪れ、現地で淡水域に生息する植物・動物プランクトンの生態について調査を行った(現地で完結)。当初の予定では、タイ国よりプランクトンや微生物を含んだ水サンプルを持ち帰る予定であったが、名古屋議定書が発効され、正式に山口大学理学部とコンケン大学理学部間でMAT等を取り交わす準備を進めていたが間に合わなかったため、サンプルは持ち帰らなかった。タイ国は名古屋議定書に未だ批准していないが、生物資源の国家間の移動(持ち出し)に関して、独自でかなり厳密なルールを定めており、日本の研究者もその手続きに従う必要がある。現在、コンケン大理学部の助教を窓口にして、タイ国の生物資源を持ち出すためにNRCTに日本側

	研究者の個人登録を進めている。
29年度の研究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  タイ・インドネシアにおいて各国より日本脳炎ウイルスの検出に成功した。驚くべきことに、各国で異なるウイルスが現在も維持されており、アジア各国間でのウイルスの移動がほとんどないことが明らかとなった。さらに、E型肝炎ウイルスをタイの豚から検出することに成功した。また、蚊から各種ウイルスの分離に成功し、現在解析中である。  タイ・カセサート大学の修士課程ならびに博士課程の学生の実質的指導をすることとなった。</p> <p>2) 植物葉圏における植物-微生物間相互作用の解析と葉圏微生物による有用物質生産  タイ側で分離した酵母株を<i>Cyberlindnera</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<i>Enterobacter</i>属細菌によるIAAの高生産法を確立した。一方日本側では、葉面から分離したメタノール資化性<i>Methylobacterium</i>細菌が葉面で利用可能なビタミンB<sub>5</sub>（パントテン酸）合成前駆体化合物を同定した。また、酵母メタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる転写制御因子やメタノールセンシングに関わる因子の機能解析を進めるとともに、ストレス応答因子Hog1のメタノール資化性酵母における新奇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  等温滴定マイクロ熱量計(ITC)を用いてクロロアニリン走化性センサーのリガンド結合ドメイン(LBD)/ペリプラズムリン酸結合蛋白質(PstS)に対するクロロアニリン、リン酸の結合の競合試験を行ったところ、説明が困難な結果が得られた。LBDの不溶化が問題であると推察した。そこで、LBDの結晶構造の解析からクロロアニリンやリン酸の結合様式を解こうと考え、LBDの結晶化を試みた。現在、結晶化試験を継続している。種々の鎖長のn-アルカンに対する<i>P. aeruginosa</i> PA01の走化性を測定し、この菌株がn-アルカンに走化性を示すことを確認した。走化性センサー遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングからそれぞれ短鎖のn-アルカンと長鎖のn-アルカンの感知に関わる2つの走化性センサーの特定に成功した。環境汚染物質が存在する中で植物を栽培するための条件を検討し、決定した。ホウ酸走化性センサーのLBDを精製しITCおよびCDに供した結果、ホウ酸はLBDのダイマーに直接結合することを明らかにした。ホウ酸走化性センサーのホモログは植物病原菌にのみ分布しているため、ホウ酸走化性は植物感染と何らかの関係があると予想される。そこで、現在、ホウ酸走化性と植物感染との関連を追及している。様々な化合物に対する<i>R. solanacearum</i>の走化性応答の測定からエタノールを始めとするアルコール、マレイン酸に負の走化性を示すことを発見した。  8月の訪問では、研究を担当する学生の発表に基づき研究討論を行うことで研究指導を行った。2月のAlisa Vangnai博士との議論では、8月以降の研究の進捗について議論するとともに、将来の研究方向に関して議論を行った。</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>



バンコクとブリラムの子どもの腸内細菌叢と食習慣の調査から、ブリラムの子どもは野菜を多く食するイサン地方（タイ中東部）の食習慣を維持しており、それに相関して腸内細菌の有益代謝物としての短鎖脂肪酸の濃度が上昇していることが示された。短鎖脂肪酸は宿主の免疫系や代謝系の調節に重要な役割を有しており、腸内細菌によりそれらを有効的に発酵生産させることが健康維持に重要であるとされている。高脂質・低食物繊維の近代食の影響で、バンコクの子どもの腸内細菌叢が偏倚し、従来の短鎖脂肪酸の発酵生産能を失したと考えられ、タイの子どもの健康を考える上で重要な知見である。一方、プロバイオティクスの候補株で、サルモネラ菌に対して抗菌活性を示す *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 の長年構造が不明であったバクテリオシン様物質の候補遺伝子を見出すことに成功した。このバクテリオシン様物質の遺伝子そしてペプチドの実態を明らかにできれば、それを利用した抗菌物質の大量生産も可能となり、今後の研究に大いに期待される。

#### 5) 耐熱性緑藻による機能性脂質生産

タイ南部の湖沼水、植物体サンプルより耐熱性緑藻株を約 100 株単離した。これらを富山県立大にて様々な培地にて培養後、脂質を抽出、脂肪酸メチルエステルへと誘導した。簡易 TLC、Ag-イオン TLC、キャピラリー GLC にて順次分析することでアラキドン酸含有脂質の蓄積能を評価した。今のところ耐熱性緑藻中からは、富山県の植物体から単離したアラキドン酸含有脂質高蓄積株に匹敵するほどの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

好熱性微生物をタイの自然環境から分離し、新規物質を生産する菌株を見出すことに成功した。我々はこれまでも 50°C を至適生育温度とするタイ薬草由来 *Microbispora* 属放線菌から新規化合物を得ており、例数は少ないが、好熱性微生物が新規化合物の探索源として有望であることを示唆する結果を得た。引き続き、好熱性微生物の物質生産能の解析を検討した。交流活動を通じて、ラムカムヘン大学と海洋性微生物に関して新規に共同研究を開始する運びとなった。またマヒドン大学で研究中の *Paenibacillus* が生産するペプチド抗生物質の構造解析に協力することとなった。

#### 7) ゴム園における農薬等の汚染が土壤の微生物活性に与える影響について

有効なパラコート分解菌のスクリーニング、分類とパラコート分解挙動の解明という学術的なデータは揃いつつあるので、ここまでの成果を学術誌に投稿すべく論文執筆に入っている。一方、現場での実用化に向けた開発研究はこれからによるところが大きい。タイ国訪問によりメイジョ大学で講演会を行い、より広い立場から共同研究を拓げるべく、新たな交流活動の展開の起点となるイベントを行うことができた。さらに、現在まで交流実績の無かったメイファールアン大学に赴き、真菌類の利用や分類を専門とする研究者や学生達を集めた講演会を開催し、将来の国際共同研究に向けた具体的なテーマの相談に入った。

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

モデルとした *M. aquaticum* 22A 株のゲノムにコードされている 50 を超える MCP タンパク質遺伝子の中から、メタノール走化性に必要な三つの MCP 遺伝子を同定した。

- 9) 微小藻類における脂肪酸分解由来の香気成分に関する研究  
微小藻類から脂質の抽出とその脂肪酸組成の決定方法ならびに多糖の抽出と分析方法を学び、今後の共同研究へ展開を期待する。
- 10) 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明  
Muscodor cinnamomi が放散する主要な揮発性化合物は 2-メチルプロパン酸、3-メチルブタン-1-オールであった。これらの化合物を気体状態で *Bacillus drentensis* など 7 種の細菌に曝すとこれらの生育を抑制した。そこで、新鮮な生卵を Muscodor cinnamomi が生産する揮発性化合物で処理し、その後の生卵表面の微生物叢を解析したところ、揮発性化合物曝露が有意に食中毒菌の生育を抑制していることが明らかとなった。
- 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  
亜熱帯域（タイ）と温暖域（日本）の淡水域に生息するプランクトンの生態調査において、環境条件（水質、温度、pH 等）との相関について分析を行った結果、その指標として緑藻ボルボックス目の藻類が研究対象として適した生物種の 1 つであるという結論に至った。亜熱帯のタイにおいては、報告例の少ない特徴的な種の存在が確認されたので、その成果の一部を学会発表した。今後は、生息条件とボルボックス藻類の進化系統関係について遺伝子レベルでの解析に着手し、生態系の指標としての特性を明らかにしていく予定である。

整理番号	R-4	研究開始年度	平成26年度	研究終了年度	平成30年度
研究課題名	(和文) 食品、食品保蔵、衛生および生態系維持のための有用微生物研究				
	(英文) Research on Microbes Useful for Food, Food Preservation, Health and Ecosystem				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 松井健二・山口大学創成科学研究科・教授				
	(英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor				
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				
29年度の研 究交流活動	<p>本研究課題では以下の19件の共同研究交流活動をしている。これら全て農環境における食糧生産から、新規機能性食品の創成、食品保蔵技術への展開、更には生態系維持・改善、といった実質的な応用を目的とした微生物機能の探索とその技術化を目指している。これまでに新規機能を有する微生物の探索の段階をほぼ終え、新しい微生物株を単離同定するに至っている。その上で、これら新規微生物から新規機能性物質の単離を進めており、既に技術化が達成され評価を得ているバクテリオシンについては、より効果の高い類縁体の単離、また、新規色素などの開発がほぼ完成しつつある。また、他の化合物に関しても単離構造決定が精力的に進められ、複数の新規化合物を同定するに至っている。他にも、葉面微生物、根圏微生物、または内生菌として植物内に存在し、植物とゆるい共生関係を確立し、多くの場合、植物の生育を促している微生物にも多いに着目し、新規微生物を単離するとともに、その機能性の評価を進めている。</p> <p>本研究課題での研究者交流として、日本からの研究者派遣9名および日本への研究者受入10名を実施した。</p> <p>1) タイ北東部における果実から分離した酢酸菌の同定と解析 酢酸菌は、エタノールからの酢酸発酵に代表されるように、「お酢」を作り出す菌として古くから人類に親しまれてきたバクテリアである。人類にとっては食経験を持つまれな菌であり、食品への応用が期待される。酢酸菌は、果実や花など糖類・アルコール類の豊富な環境を天然の生息域とするので、本研究では、タイ北東部（イサン）由来の様々な果実から多くの分離した酢酸菌の、属・種レベルでの同定と酢酸発酵能を解析した。さらに、エタノール酸化に不可欠なアルコール脱水素酵素の機能解析を行った。タイから1名(58日間)受け入れた。</p> <p>2) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用 タイおよびベトナムの発酵食品などの種々の分離源から乳酸菌を分離し、それらについてバクテリオシン生産能などの特性を解析した。分離された乳酸菌株の菌種同定を行い、バクテリオシン様の抗菌活性を示</p>				

した分離株については、生産するバクテリオシンの精製と構造決定を試みた。また、一部のバクテリオシン生産乳酸菌については全ゲノム解析を試みた。さらに、一部の乳酸菌分離株については、乳酸生産能などの評価も行った。

ベトナムから2名、タイから1名の研究者を受け入れ、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するとともに、一部については試料を受け入れて解析を行った。

### 3) 微生物の多糖分解酵素の植物病原性糸状菌の防除および有機酸生産への応用

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、分子量の大きい酵素(AglHF2)を精製し、諸性質を明らかにするとともに、同酵素の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。今年度は、もう一方の酵素である AglHF1 の C-末端アミノ酸残基、すなわち、AglHF2 から AglHF1 が生じる際の切断箇所の特性を MALDI-TOF mass を用いて行い、AglHF1 の遺伝子クローニングと大腸菌での発現系の構築を行った。また、これら組換え酵素(recAglHF1,recAglHF2)を利用した口腔内細菌 *Streptococcus mutans* の付着抑制ならびにバイオフィルム分解効果について検討した。また、タイ側カウンターパートであるソククラ大学講師を日本側研究者が訪問し、AglHF1 とキチナーゼの共発現組換えプラスミドの作製ならびに大腸菌における両組換え酵素の共発現条件の検討、精製、諸性質の検討ならびに担子菌類に対する両酵素の溶解活性について検討した。タイ側カウンターパートは2018年3月1日から30日の約1ヶ月間、立命館大学において、これら一連の実験に関して立命館大学の共同研究者ならびに学生を指導することにより実施した。一方、農畜産廃棄物として位置付けられるホエーの有効利用法として、有機酸やミネラル等を豊富に含む発酵生産物の検討を行った。本年度は、有機酸としてクエン酸に着目した。

### 4) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

29年度は、アミノ酸配列情報を基に、フィコシアニン遺伝子のクローニングを進め、他のラン藻での発現 (*Synechococcus elongates* と *Arthrospira pltenis*)を進めたものの、大量発現には至らなかった。アポタンパク質発現は観察されているので、ビリングがタンパク質に入る部分(ホロ化)の問題があるものと考えられる。今年度はタイ側カウンターパートが3月の1か月間、共同研究のために来日した。

### 5) 多機能性微生物を利用した総合的な農作物生産および廃棄物リサイクル法の確立

(1) 8月25-27日：タイエキスポにおけるセッションに参加し、発表すると共に共同研究者と議論を行った。

(2) 11月21-25日：タイのカセサート大学およびコンケン大学を訪問し、研究の進捗状況、成果の論文化、今後の方向性に関するディスカッションを行った。

(3) 9月4-5日ドイツ Beuth 大学で開催された第4回サテライトセミナーに参加し、発表すると共に共同研究者とディスカッションを行った。

#### 6) 植物内生放線菌の農業への応用

①マンゴーの葉から病原菌分離を行ったが、目的の病原菌は得られなかった。イネの葉、茎、根圏から微生物を分離した。イネ内生微生物の AOH (2-Aza-8 oxohypoxanthine) 変換活性を調べたところ、多くのイネ内生微生物に AOH 変換活性を確認した。

② 7<sup>th</sup> FerVAAP (Khon Kaen・タイ、平成29年7月26-27日) 参加し、口頭発表した。

③ Dr. Wasu Pathom-aree (チェンマイ大学理学部生物学科助手) が、静岡大学農学部で1か月間滞在した。

#### 7) ポリ乳酸微生物の応用

ポリ乳酸フィルムを分解する微生物から得られたポリ乳酸分解酵素がポリ乳酸不織布を分解することを確認したが、ポリ乳酸不織布を分解しなかった。タイの土壤中に2年間放置したポリ乳酸不織布を回収し、ポリ乳酸不織布を分解する微生物を探索したが、現在のところ、目的の微生物は得られていない。

7<sup>th</sup> FerVAAP(Khon Kaen・タイ)参加

日本側研究者が、カウンターパートであるカセサート大学とシリナカリンウイロット大学を訪問 (平成29年12月4-9日) した。

#### 8) 突然変異を利用した食品保存と健康増進のための新奇モナスカス色素の開発

本年度は、7月にカウンターパートの研究室を訪問し、共同研究の概要について議論した。本年度中に双方で作出した紅麹菌変異株から色素の抽出物ライブラリーを作成し、LC/MSなどの機器分析により色素成分に関する情報を収集し、各種生理活性について調べることになった。また、当研究室では、食中毒細菌および感染症細菌に対する抗菌活性の実験系を確立するため、本学医学部で手技および設備について教授してもらい、研究室の整備を行った。色素の抗光退色についての試験も開始した。本プロジェクトを国内の助成金に申請し、1月に採択されたため、タイ側の色素抽出ライブラリーを受け取りにカウンターパートの研究室を5月に訪問する予定である。

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

本年度は、7月にカウンターパートである KMUTT の Dr. Worapot 研究室を訪問した。Worapot 研究室出身の博士が Mahidol 大学の講師に着任

されたことから（これまで本 CCP において当該学生と交流があった）Mahidol 大学でも基調講演を行い、今後の共同研究で連携することを確認した。本年度、小林国際奨学財団の研究助成に採択され、琉球大学農学部および医学部、KMUTT、Mahidol 大学、ベトナムパストゥール研究所の連携で ASEAN 発酵食品または発酵微生物から感染症細菌の予防に関する共同研究に発展させることができた。

*Jatropha curcas* の紅麴菌発酵産物の生理活性ペプチドについても引き続き精製と構造解析を進めている。本年度は、インドネシア・ボゴール農業大学の研究予算で共同研究者である Hanifah 教授が7月～8月、我々の研究室に短期滞在され、発酵食品の嗜好性ペプチドの構造解析を行った。さらに、1月～2月には同大学の博士学生も来学し、生理活性ペプチドの構造解析に関して機器分析を行った。

10) 細菌由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の解析、機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニング

分離細菌 *Bacillus* 属菌の  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を PCR によってクローニングし、得られたそれぞれの遺伝子を発現用ベクターへ導入し、大腸菌の形質転換を行った。*Corynebacterium glutamicum* のアミロマルターゼのアミノ酸置換による変異酵素を作成し、変異酵素を用いた糖転移反応によって生成した反応生成物を解析した。また、新規大環状アミロース合成酵素を生産する *Bacillus* 属細菌を、生理、生化学的な性質から詳細に同定試験を行うとともに、本菌が生産する新規大環状アミロース合成酵素の同定を目指し、カラムクロマトグラフィーにより分析した。それに加え、*Fusarium* sp. F59 の生産するグルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生  $\alpha$ -グルコシダーゼの精製を最終目的としてその極在性を調べた。さらに、担子菌 *F. verutipes* および *A. bisporus* 由来エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV (エンド FV) および AB を (エンド AB) 用いて、生体試料中の糖タンパク質からの糖鎖遊離を電気泳動、TLC および質量分析計によって調べた。

タイから Dr. Kamontip Kuttiyawong が大阪市立大学 (平成 30 年 2 月 18 日～3 月 31 日)、Dr. Kuakarun Krusong が明治大学 (平成 30 年 1 月 6 日～2 月 7 日) を訪れ、それぞれ研究・交流を行った。また、日本から伊藤がチュラロンコン大学 (平成 30 年 1 月 13 日～23 日) を訪問し、研究・交流を行った。

11) 微生物機能を活用した安全で高付加価値を有する食料生産

(1) タイおよびインドネシアの土壌解析

水田土壌サンプルを中心に、タイ：18 サンプル、インドネシア：15 サンプルの SOFIX 解析を実施した。

(2) 日本の土壌解析

水田、畑、および樹園地の約 1,000 サンプルの SOFIX 解析を実施した。

また、有機標準土壌を作製し、連作障害に対する基盤土壌を作った。

(3) 交流活動（インドネシア：来日期間 2 月 4 日～3 月 1 日）

インドネシア土壌サンプルの SOFIX 分析結果に対する議論を行い、データベース作成および論文作成の打ち合わせを実施した。また、セミナーを実施し、学生・院生参加での研究交流を行った。

(4) 交流活動（タイ：来日期間 3 月 2 日～3 月 30 日）

タイ土壌サンプルの SOFIX 分析結果に対する議論を行い、データベース作成および論文作成の打ち合わせを実施した。また、若山研究室との合同セミナーを実施し、学生・院生参加での研究交流を行った。

12) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価

29 年度は、カウンターパートであるカセサート大学を訪問し、現在当該大学で利用しているグラフェンの抗菌性を評価する手法について議論を行うことができた。また、その際にグラフェンを入手することができた。帰国後は当該グラフェンサンプルを用いて、酵母に対する抗菌性を示す条件を検討しているが、未だその条件を提示できていない。来年度に残された課題である。

13) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用

本プロジェクトにより 2017 年 10 月 1 日～11 月 29 日の間、Pattana Kakumyan 博士が山口大学に滞在した。その間、タイ・チェンライ近郊で単離同定された *Xylaria psidii* の培養ろ液の抗菌活性の生成とその構造の解明を進めた。また、滞在中に山口大学キャンパス内で単離した *Linderia bicolumnata* 子実体の成熟に伴う揮発性化合物変化を解析した。さらに SS-SV により Dr. Pattana 研究室の学生を 1 名 2 か月間受け入れ、指導した。

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

タイの餅麴ルパン（もちこうじ *loog pang*）から分離したアミラーゼ生産性糸状菌 *Amylomyces rouxii* YTH3 を用いて日本型の散麴（ばらこうじ）作成を試み、最適な製麴条件の検討を行った。この散麴を用いて各種原料米を原料にアルコール飲料の試醸を行った。試醸した各種アルコール飲料については一般分析を行い、抗酸化能評価を DPPH ラジカル消去能により行った。

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

平成 30 年 3 月 19 日より 6 日間、カウンターパート Dr. Somchanh Bounphanmy が副学長をつとめているラオス国立大学を訪問し、ディスカッションを行った。その後、Dr. Somchanh とともにビエンチャン近郊の醸造元、蒸留所、市場を訪問し、調査とサンプリングを行った。

ビエンチャン北部 Non Sa Art village, Xay Tha Ni district で醸造酒ラオ

ハイ (*lauh hai*) の製造および販売している家庭 2 軒を訪問した。家の主人にラオハイの原料や製法等について説明を受け、討論し、調査を行った。また、ビエンチャン郊外の市場や蒸留酒製造販売元を訪問し、麴や酒類を入手した。市場や蒸留酒製造販売元の主人に米製の蒸留酒ラオラーオ (*lau lao*) の原料や製法等について説明を受け、討論し、調査を行った。

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

農薬耐性や重金属耐性のあるインドネシアに土着の菌を探索する研究を行った。これらの菌はバイオ肥料（リンの可溶化、窒素固定、土壌の団粒化を促進する細胞外多糖類の生産等を行うことができる）の役割が期待される。スクリーニングされた菌類の特性を調べ、それを豆類、緑豆類を生産する農地（ハウス栽培を含む）への適用を図った。

交流活動として、Dr. Novi Arfarita（マランイスラム大学准教授）を 10 月 13 日から 2 ヶ月間、山口大学工学部に受け入れ、菌類によるバイオリメディエーションなどの共同研究を実施した。

#### 17) 発酵乳中からの乳酸菌とそのファージの単離と特性解析

タイ国の発酵乳から単離した耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* T-25 株を宿主とする耐熱性バクテリオファージ  $\phi$ T25 について、形状、宿主域、薬剤耐性などの諸性質を検討し、ゲノム構造を解析した。その結果、 $\phi$ T25 は *Siphoviridae* 科に属する溶菌ファージで T-25 株のみに感染性を示した。本ファージは、0.15%過酢酸、75% エタノール、0.08% 次亜塩素酸、1% Virkon、5% Dettol、2%Decon 90 などの薬剤に対し、1 分以内に感染性を失うことがわかった。 $\phi$ T25 ゲノムは 38,421 bp の二本鎖 DNA からなり、50 個の ORF が推定された。現在、 $\phi$ T25 のタンパク質を分離し、ESI-MS/MS により決定したアミノ酸配列と解読したゲノム情報との相関性を検討している。

#### 18) 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

平成 27 年度に Dengue ウイルスの組換え Capsid protein 発現に成功しており、これを用いて昨年度からマウスを用いた免疫化実験を目指して、Capsid protein の精製および解析を進めてきた。インドネシア側の予算として Ristekdikti の支援（拠点経費）が開始されたことから、本年度から共同研究を本格的に実施する予定であった。しかし、インドネシア政府の研究機関との共同研究に対しては、Ristekdikti 予算が規則上渡航費等に使用できないことが分かり、共同研究を断念することとなった。

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

タイ湾岸から単離したバイオサーファクタント生産能を有する真菌



*Aureobasidium pullulans* YTP6-14 について、各種培養条件を検討した結果、炭素源としてグリセロール及びグルコースそれぞれ 2.5%、C:N 比が 100 の培地条件において 30°C, 1 week 後に最大のバイオサーファクタント生産性（最小表面張力：31.4 mN/m）を示した。次に培養液を遠心分離して菌体を沈殿除去し、培養上清から油層と水層を得た。これまでに同種の真菌において、油層にバイオサーファクタントを生産することが報告されていたが、今回、水層にも高いバイオサーファクタント活性（油膜排除活性：5,300 cm<sup>2</sup>/ml）が検出された。そこで、水層に生産されているバイオサーファクタントを薄層クロマトグラフィ及び高速液体クロマトグラフィにより精製し、精密質量分析および核磁気共鳴スペクトル解析を行い、化学構造を決定した。その結果、当該活性物質は 5-hydroxy-2-decenoic acid delta-lactone であった。驚いたことに同物質は熱帯雨林に自生するクスノキ科樹木 *Cryptocarya massoy* の樹皮から製造されている食品用ココナツフレーバー添加物：マッソイアラクトンと同一であることが分かった。実際に培養液上清より精製したバイオサーファクタントは同じ芳香を有していた。本真菌が河川水の流れ込む湾岸から単離されたことから、河川上流の森林においてマッソイアラクトン合成遺伝子が樹木と真菌の間で太古に水平伝搬した可能性も予想され大変興味深い。これまでに、マッソイアラクトンが界面活性を有していることは知られておらず、世界初の「芳香性バイオサーファクタント」として論文発表した。一方、YTP6-14 のバイオフィーム形成についても検討を行ったが、本真菌は凝集活性が高いものの、ガラスやプラスチック表面におけるバイオフィーム形成量は少なくバイオサーファクタント生産性との相関を見ることなどは難しく、本実験計画は中断した。

また、一昨年、タイのバイオディーゼル油製造工場の廃グリセロールからバイオサーファクタント生産菌 RC44 を取得した。RC44 は細菌の一種であり、その後の 16SrRNA 遺伝子全長配列解析から *Klebsiella* 属細菌であるが、病原種 *pneumoniae* とは種が異なることが分かった。これまでに、同属細菌からバイオサーファクタント生産について報告された例はない。そこで、RC44 が生産するバイオサーファクタントの構造解析を目的として精製を試みた。先ず、生産条件を検討した結果、TSB 培地において 30°C, 24h で最も高いバイオサーファクタント生産性を示した（油膜排除活性：1,600 cm<sup>2</sup>/ml）。菌体を遠心分離によって除去した培養上清から酢酸エチルでバイオサーファクタントを抽出し、薄層クロマトグラフィによって当該活性物質を含む画分を得た。続いて、逆相高速液体クロマトグラフィに供したが、いずれのピーク画分および非吸着画分にも活性成分は含まれなかった。現在、順相液体クロマトグラフィなどによる精製を試みており、当初目標としていた構造解析には至らなかったが、上記の諸特性から RC44 が全く新しい構造をもつバイオサーファクタントを生産している可能性が強く示唆された。

29年度の研究  
交流活動から得  
られた成果

1) タイ北東部における果実から分離した酢酸菌の同定と解析

分離酢酸菌の同定についてはリボゾーム RNA の配列を決定することで進めた。GroEL などのいわゆるハウスキーピング遺伝子の配列決定も行った。結果を現在解析中である。アルコール脱水素酵素については、3つのサブユニットのうちのチトクロムcサブユニットを欠いた変異株において、酸化剤処理によって著しく不活性化されることを偶然見いだした。その不活性化は、メルカプトエタノールなどのチオール剤やアスコルビン酸等の還元剤によって回復した。本酵素が複雑な機能発現機構を持つことが示唆された。

2) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

16S rRNA 遺伝子解析等によって菌種同定を行い、分離株のほぼ全て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され、良好な抗菌活性を示した分離株については、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った。さらに、バクテリオシンの精製と構造解析を進めており、一部についてはこれまでに報告されているバクテリオシンとは異なる分子量を有することが明らかとなった。ベトナムの研究者には、バクテリオシン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。タイの研究者とは、バクテリオシン生産乳酸菌の全ゲノム解析によるバクテリオシンの同定も進めており、成果の論文化を進めている。

3) 微生物の多糖分解酵素の植物病原性糸状菌の防除および有機酸生産への応用

*S. thermodiastaticus* が生産する AglHF1 は AglHF2 から C-末端ペプチドが切断・遊離することにより生成するが、その切断箇所を明らかにすることで、最終的に AglHF1 と AglHF2 の2種類の  $\alpha$ -1,3-グルカナーゼ遺伝子の*E. coli*における高発現系の構築に成功し、その成果を論文にまとめ投稿した（現在、論文審査中）。これら組換え酵素（recAglHF1, recAglHF2）を用いて口腔内細菌 *Streptococcus mutans* の付着抑制ならびにバイオフィーム分解効果について検討した結果、recAglHF1 と recAglHF2 が共に効率良く口腔内細菌のガラス表面への付着を抑制するとともに、*S. mutans* によりガラス表面に生成したバイオフィームを分解することを明らかにした。また、AglHF1 とキチナーゼの共発現組換えプラスミドの作製ならびに*E. coli*における両組換え酵素の共発現条件の検討、精製、諸性質の検討ならびに担子菌類に対する両酵素の溶解活性について検討した結果、AglHF1 と *Bacillus circulans* KA-304 由来キチナーゼの*E. coli* Rosetta GamiB における両酵素の高共発現に成功した。これら両酵素を用いた担子菌 *S. commune* 細胞壁溶解能を検討した結果、弱酸性領域において効率良くプロトプラストを生成することを見出した。今回得られた結果は、酵素生産の省エネ化につながるとともに、共生産した酵素をそのまま細胞壁溶解に利用できることを示しており、担子菌類の細胞融合による品種改良や遺伝子導入による物

質生産系の構築など応用や園芸等における植物病原菌防除への利用の可能性が高まる成果と考えられる。また、農畜産廃棄物として位置付けられるホエーの有効利用法として、有機酸やミネラル等を豊富に含む発酵生産物としてクエン酸生産について検討した。麹菌 *Aspergillus niger* および *A. awamori* をクエン酸発酵菌として用いて、クエン酸で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。ホエーはタンパク質やミネラルを多量に含むことからペプチドやマグネシウムやカルシウム等のミネラルを豊富に含有する有機肥料としての利用も可能であること、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ことから、今後さらなる生産条件の検討を行い、有機農業への利用を検討していく。

#### 4) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

ラン藻での発現性に問題が見られたため、大腸菌を用いての発現性チェックに切り替えていく。コアタンパク質をコードする遺伝子、フィコシアノビルリンやフィコエリスロビルリン（クロモホア）を合成する酵素をコードする遺伝子、さらにはリアーゼ（この場合には、合成酵素となる）を大腸菌で共発現させることで目的達成を図る。フィコウロビルリンやフィコビオビルリンなどのレアビルリン合成遺伝子も入手できているので、それらの機能的発現もあわせて行い、多面的に目的達成を図る。

#### 5) 多機能性微生物を利用した総合的な農作物生産および廃棄物リサイクル法の確立

複数の査読付き共著論文を発表できた。

#### 6) 植物内生放線菌の農業への応用

イネ内生微生物が、成長促進およびストレス耐性を付与する AHX (2-Azahypoxanthine) の AOH への変換活性を示すことから、植物内での変換が内生微生物で行われている可能性が示された。

#### 7) ポリ乳酸微生物の応用

ポリ乳酸分解酵素がポリ乳酸不織布を分解することから、高い結晶性を示すポリ乳酸を分解する微生物の可能性が示唆された。

#### 8) 突然変異を利用した食品保存と健康増進のための新奇モナスカス色素の開発

色素抽出物の一部において感染症細菌に対する抗菌活性が認められた。抗菌活性の詳細なメカニズムの解明のため財団の研究助成に申請し、採択された（小林国際奨学財団研究助成、H29～H31）。紅麹色素に強い抗酸化活性を見出した。現時点で劇的な進展はないものの、次年度以降に助成金を活用しながら研究の進捗を図る予定である。

#### 9) ASEAN 諸国と日本の伝統発酵食品の生理活性ペプチドおよび生理

### 活性物質の活性に関する比較研究

紅麴発酵産物の抽出物に食中毒細菌および感染症細菌に対する抗菌活性を見出すことができた。また、色素画分に強い抗酸化活性を見出すことができた。これまでのペプチド生理活性物質とあわせて、活性物質の単離、構造解析を行っている。インドネシアの伝統発酵食品由来の抽出物に含まれる低分子ペプチドの *de novo* 解析、主成分解析等により、製造工場の衛生環境とペプチド成分の関連性について比較解析を行っている。

#### 10) 細菌由来 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子のクローニングとその発現およびその性質の解析、機能性オリゴ糖合成のための糖修飾酵素の探索とその遺伝子のクローニング

*Bacillus* 属菌の  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をクローニングし、塩基鎖長がそれぞれ約 1.9K および約 2.1K であることを明らかにした。さらに、クローニングした遺伝子をそれぞれ発現用ベクターへ導入後大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、両酵素遺伝子の発現用ベクターを得た。さらに、得られた発現用ベクターで大発現用大腸菌の形質転換体を得た。また、*C. glutamicum* のアミロマルターゼのアミノ酸置換変異酵素による反応生成物を HPAEC で解析したところ、置換したアミノ酸によって生成する配糖体の種類が変化することを見出した。さらに、新規大環状アミロース合成酵素を生産する *Bacillus* 属細菌を詳細に同定したところ、本菌を *Bacillus licheniformis* と同定した。また、本菌の培養上清を透析後、陰イオン交換クロマトグラフィに供し、分画した各酵素画分による反応生成物を分析したところ、目的酵素活性を含むと思われる複数の画分を同定することができた。さらに、*Fusarium* sp. F59 の生産するグルコアミラーゼ非分解性オリゴ糖産生  $\alpha$ -グルコシダーゼの極在性を分画遠心分離法で調べたところ、目的酵素活性は主に細胞内小器官を含む画分から見出された。また、この目的酵素活性は、4°C で 7 日間の保存で 50% 以上の活性を失うことが明らかになった。一方、担子菌 *F. verutipes* および *A. bisporus* のエンド FV およびエンド AB は、ヒト血清中の異なる糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離し、エンド AB によって遊離する糖鎖をコンプレックス型と特定することができた。

#### 11) 微生物機能を活用した安全で高付加価値を有する食料生産

##### (1) タイおよびインドネシアの土壌解析

水田土壌サンプルを中心に、タイ：18 サンプル、インドネシア：15 サンプルの SOFIX 解析を行い、各国での水田環境の特徴を明らかにした。また、日本での水田データベース上に、タイおよびインドネシアの分析結果をプロットし、3 か国での水田データベースを構築した。その結果、タイの水田は総炭素量が低く、インドネシア土壌の総炭素量は高い傾向が認められた。また、日本の水田土壌の総炭素量は全国でほぼ同じであることが明らかとなった。

##### (2) 日本の土壌解析

水田、畑、および樹園地の約 1,000 サンプルの SOFIX 解析を実施した。これらの土壌解析結果のデータベースを構築し、それぞれの農地環境の違いを明らかにした。また、連作障害の出る圃場での微生物叢を解析し、連作障害が出る土壌は菌叢が少なくなることが明らかとなった。

12) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価

カウンターパートと同じ試料を用いて抗菌性の評価をすることが可能となった。未だ確認はできていないものの、抗菌性の検証をお互いに確認することが可能になった。

13) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用

*Xylaria psidii* 培養液を集め、酢酸エチルで抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC で精製を進めた。しかしながら、精製された化合物を LC-MS/MS で分析したところ、*Xylaria psidii* 培養液には認められない化合物であることが判明した。精製された化合物には抗菌活性が認められたこと、また LC-MS/MS のデータから予測すると本活性化合物は生成途上で重合してしまうことが明らかとなった。今後、こうした重合を避けながら精製する手法を確定しなければならない。

一方、*Linderia bicolumnata* は複数の含硫揮発性化合物を生成放散することが確認された。その中にジメチルテトラスルフィドが存在していた。本化合物は市販されていないので、その含有が報告されているニラの香气成分を分析し、その保持時間と MS プロファイルから同定した。

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

タイの麴ルパン (*loog pang*) から分離したアミラーゼ生産性糸状菌 *Amylomyces rouxii* YTH3 を用いて散麴を作成した。本麴を糖化剤に用いて新規アルコール飲料を試醸したところ、糸状菌 *A. rouxii* YTH3 麴はアルコール発酵の糖化剤として利用可能であった。糸状菌 *A. rouxii* YTH3 麴をもちいてつくった新規アルコール飲料を分析した結果、エタノール濃度、pH、酸度は 8.2 ~10.8% (v/v)、3.5 to~4.4、3.0~5.2 ml であった。本麴を用い黒米 (*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Shiun*) を原料としたアルコール飲料は、鮮やかな赤い色を呈しており強い抗酸化能を示した。

黒米を用いたアルコール飲料の DPPH ラジカル消去能は 1800 $\mu$ M Trolox equivalent であった。一方、赤米 (*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Engimai*)、緑米 (*Oryza sativa* var. *Japonica* cv. *Midorinoka*)、白米 (*O. sativa* var. *Japonica* cv. *Hinohikari*)、ネイティブアメリカンが食料としたイネ科マコモ属のワイルドライス (*Zizania aquatica*)を用いたアルコール飲料では 300~600  $\mu$ M Trolox equivalent と低い値であった。

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

ビエンチャン北部の Non Sa Art village, Xay Tha Ni district で醸造酒ラオハイ (*lauh hai*) を製造および販売している家庭を 2 軒訪問した。使用している餅麴ルパン (もちこうじ *look peng*) をサンプリングした。今日、両家庭ともルパンを家庭で自ら製造することはしない。品質の安定したベトナム製の市販ルパン (ベトナム名はメン *men*) を購入して発酵に使用しているとのこと。ベトナム製のルパンは品質が安定しており、自らつくるより便利なため、殆どの家庭では市販品を利用しているとのことであった。さらに、ビエンチャン郊外の市場 Non Khor Market を訪問した。糯米 (もちごめ) を原料とした蒸留酒ラオラーオ (*lau lao*、アルコール 40%、150 円/500ml)、同ラオラーオに薬草など薬用成分を漬け込んだ薬酒ラオボンヤ (*low bong ya*)、餅麴ルパン (長径 5 cm の卵型、15 円/1 個)、粉碎ルパンなどを入手することができた。同じくビエンチャン郊外の別の市場 Phon Tong Chom Ma Ng Market を訪問したが、ラオラーオと麴を販売している店は当日開いていなかった。ビエンチャン郊外の Ban Nong Duang Thong, Sikhot Ta Bong district の蒸留酒ラオラーオ (*lau lao*) 製造販売元を訪問。主人よりラオラーオの原料や製法について説明を受けた。蒸留所は郊外に移転したとのこと、業務が拡大していると思われる。40%、55%、65%の製品を販売していた。アルコールメーターを用いてアルコール濃度を計測していた。上記のフィールドワークで得られたサンプルより、有用菌の分離、同定と特性を調べていく予定である。また、上述した麴、醸造酒、蒸留酒の特性については総説をまとめる予定である。

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

農薬耐性や重金属耐性のあるインドネシアに土着の菌を探索する研究を行った。これらの菌はバイオ肥料 (リンの可溶化、窒素固定、土壌の団粒化を促進する細胞外多糖類の生産等を行うことができる) の役割が期待される。インドネシアのマランの農地でスクリーニングされた菌類の特性を調べ、それを豆類、緑豆類を生産する農地 (露地栽培及びハウス栽培を含む) への適用を図り、その有効性を検証中である。

17) 発酵乳中からの乳酸菌とそのファージの単離と特性解析

タイ国では発酵乳中のファージ汚染被害が甚大かつ深刻で、効果的な対策は未だに確立されていないのが現状である。本邦においても乳酸発酵産業でのファージ汚染被害は毎年生じており、大きな問題の一つである。そのため本研究を通じ、汚染ファージの特性を明らかにでき、食品添加可能な薬剤を用いた防除法が開発できた。さらに、ゲノム構造を明らかにできたので、発酵現場でのファージの迅速検出が可能となり、被害の拡散が抑制できると考えられた。現在、ファージの特性について論文作成中である。

18) 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

	<p>験に関する研究</p> <p>東南アジアを中心に広がっている感染症による被害を減らし、また将来日本にまで北上が予想されるデングウイルス熱に対する予防が可能となるなどを見込んでいたが、Ristekdikti 予算がインドネシア政府機関との共同研究に対しては、規則上使用できないことが分かり、共同研究を断念することとなった。</p> <p>19) 熱帯微生物を活用した有益なバイオフィルムおよびバイオサーファクタントの開発</p> <p>これまでの一連の研究によって、タイ湾岸から単離した真菌 <i>Aureobasidium pullulans</i> YTP6-14 が生産するバイオサーファクタントが、熱帯樹木由来の芳香化合物と同一であることを明らかにした。その生産性は今のところ 8.6 mg/L であり、現状では工業生産は難しいが、熱帯雨林の減少による急速な地球温暖化が危惧される状況において、今回新たに発見した微生物資源によって熱帯樹木の伐採を抑止し、森林生態系の保全に役立つ可能性を示唆できたことの意義は大きいと考えられる。</p>
--	--

整理番号	R-5	研究開始年度	平成 26 年度	研究終了年度	平成 30 年度
研究課題名	(和文) 新規産業のための次世代発酵技術の構築				
	(英文) Development of Next-generation Fermentation Technology for New Wave Industry				
日本側代表者 氏名・所属・職	(和文) 星田尚司・山口大学創成科学研究科・准教授				
	(英文) Hisashi HOSHIDA・Yamaguchi University・Associate Professor				
相手国側代表者 氏名・所属・職	(英文) Savitree LIMTONG・Kasetsart University・Professor Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Lecturer Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor				
29年度の研究 交流活動	<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  <i>Zymomonas</i> を用いた高温発酵プロセスのコンピュータモデル構築を目指し、生育およびエタノール生成速度をえるとともに、モデルの構築を検討した。しかし、<i>Zymomonas</i> を用いた発酵速度パラメータは得られなかったものの、いくつか温度条件を変えて生育速度パラメータを得ることができた。</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  平成 29 年度は、共同研究を進めるために日本側研究者 2 名および香川大学大学院生 3 名が 10 月にチェンマイ大学農産学部を訪問し、研究打合せとタイの伝統的発酵茶葉であるミャンの生産地視察、生産工程の見学、学生間の交流を行った。さらに、学会参加のため 2 月に再度、高田及び香川大学大学院生 3 名が農産学部を訪問し、研究成果発表を行うとともに、研究情報の交換を行った。最近の研究交流により、乳酸菌単離源としてのミャンに関して、その製法とよく似た発酵茶葉が四国(高知、愛媛、徳島)でも生産されていることを知った(碁石茶など)。</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  タイから分離した耐熱性酵母を用いて、コメを原料とした 5L スケールでの発酵試験を実施した。特に、37-45 度の範囲で単行複発酵 (SHF) と平行複発酵 (SSF) を比較し、両者の比較だけでなく高温発酵を評価するためにシミュレーションに必要なデータの一部を取得した。また、タイやラオスから分離した株の中に、セルロース系バイオマス利用で課題となっているキシロース発酵能が高い株があり、キシロースからのエタノール高温発酵およびセルロースからのエタノール高温発酵を検討した。また、発酵後に単蒸留し、分離膜を用いた濃縮を試みた。</p> <p>4) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産</p>				



竹中は 6/25-7/1 の間チェンマイ大学に Dr. Thanongsak Chaichaso を訪問し、蚕繭からセリシンを抽出可能なセリンプロテアーゼにアルカリ耐性を獲得させるための *Pichia* 酵母による異種発現についてディスカッションを行った。また、共同研究の成果報告についてもディスカッションを行った。Dr. Chaichaso は H30/1/29-2/26 に神戸大学に滞在し、16S rRNA 遺伝子解析による分離菌の同定と *P. pastoris*-pPICZalphaA によるキシラナーゼの異種発現系を完成した。

渡辺は 7/25-7/28 に FerVAAP2017&ABBS2017 JSPS-NRCT CCP Joint Session に演者として参加し、また、滞在期間中カウンターパートであるチェンマイ大学の Dr. Phisit Seesuriyachan らと、今後の研究展開、学術論文投稿についてディスカッションを行った。さらに、本事業による交流をベースに締結された大学間交流協定に基づく、山形大学国際交流事業・チェンマイ大学ショートステイプログラム”Short stay program in CMU 2017” (9/1-9/9)において、本学学部生 8 名が教職員とともに参加し、Dr. Phisit との共同研究内容の確認と、同氏が山形大学に滞在期間中に行う予定の実験内容のディスカッションを行った。Dr. Phisit は山形大学滞在中の 10/1-10/30 に、耐熱性のイヌリナーゼとフルクトオリゴサッカライドに関わる精製イヌリナーゼの特徴付け、実験計画法 (Plackett-Burman 法) による耐熱性のイヌリナーゼとフルクトオリゴサッカライド双方の生産条件の最適化を実施した。また、渡辺は 11/25-12/1 にチェンマイ大学に滞在し、共同研究について方向性と進捗状況を報告しあった。さらに、耐熱性フィターゼ生産乳酸菌の新規分離株の詳細について、カウンターパートの Dr. Noppol Leksawasdi より説明を受けた。

5) 加水分解酵素を利用したオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加

平成 29 年度は、これまでに行ってきた 2 相式リアクター (ASBR あるいは CSTR+UASB) によるパームオイル廃水からの水素生産+メタン生産について、ラボスケール (1L-5L) から移動式の実スケール (5L-25L と 50L-250L) へスケールアップを行った。これらのスケールアップした装置を用いて、スタートアップ、パラメータの最適化、回分式及び連続式の運転実験を行った。

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

平成 29 年度は、引き続き白色腐朽菌のバイオレメディエーションへの適用について研究を実施した。*Aureobasidium pullulans* や *Trametes versicolor* を用いて、アゾ染料系の着色排水中の色度の除去・並びにその生物学的分解を含むバイオレメディエーションに関する実験を行った。

7) 第 2 世代、第 3 世代バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの開発

これまでに、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、さらにバイオ水素発酵の

原料となるバイオマスの対象を拡大し、微細藻類 (*Chlorella sp.*) をその対象に、その前処理方法を検討した。平成 29 年度はサトウキビの絞り滓と廃液を用いて、2 相式リアクター (CSTR+UASB: 後段の UASB からの生成ガスを前段の CSTR に直接吹き込む新方式: これにより CSTR での水素分圧を低下させてバイオ水素生産量の向上を図る) により、バイオ水素とバイオメタンを同時生産する実験を行った。日本側研究者は、7/24~8/3、12/19~12/21 の二度コンケン大学を訪問し、共同研究を実施した。

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

これまでバイオ水素発酵のためのリグノセルロースの前処理に関して改良を行ってきた。平成 29 年度は、固定化セルラーゼを用いたリグノセルロースを含む農業残渣 (稲わら等) について前処理に関する検討を行い、嫌気性発酵によるバイオガス生産のため、バイオエネルギー生産のためのセルロース分解微生物の選定に関する研究を実施した。日本側研究者は、4/25~5/7、6/19~6/25、6/29~7/4、8/9~9/5、9/15~9/25、12/22~12/23、12/27~1/8、3/20~3/31 の 8 回にわたってカセサート大学を訪問し、タイ側カウンターパートと共同研究を実施した。

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

平成 29 年度は、これまで実施してきた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トン生産の効率化・促進化に加えて、パームオイル生産工程から排出される固形有機物 (empty fruit bunches 等) 殻の高温発酵による高効率水素生産に関する研究を実施した。Dr. Sompong O-Thong (タクシン大) を 12/5~1/15 の間、山口大学工学部に受け入れ、バイオ水素生産などの共同研究を実施した。

10) 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、これまでに構築に成功している 1,3-ブタンジオール合成代謝経路を基盤に 2 つの改変を施した 1,3-ジオール類を対象とする新規合成代謝経路を設計、大腸菌内で構築することで 1,3-ペンタンジオール、4-メチル-1,3-ペンタンジオール、1,2,4-ブタントリオールの生産を試みた。

11) バイオマス原料を用いたパイロットスケール高温エタノール発酵試験

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 18 株の、耐熱性、エタノール耐性、糖耐性、及び交配能の解析を行った。比較対象としてブラジルでのエタノール生産に使用されたことのある *Saccharomyces cerevisiae* 株 (ブラジル株) を用いた。その結果、耐熱性はどの *K. marxianus* 株もブラジル株より優れていた、エタノール耐性や糖耐性は株によって耐

	<p>熱性は異なったが、ブラジル株より優れている株や同等の株が存在した。<i>K. marxianus</i> DMKU3-1042 株を対象とした交配、組換え能の高い株は少なかった。</p> <p>12) 新規に単離された <i>Aspergillus</i> 属真菌および酢酸菌によるガラクトン酸からガラクトアル酸への微生物変換</p> <p>平成 30 年 1 月 16 日～2 月 16 日に Apilak Salakkm 博士が愛媛大学に滞在し、柑橘果皮からアルダル酸を直接生産できる統合プロセスの検討を行った。固体発酵の最適な条件を決定し、真菌による固体発酵から酢酸菌による酸化発酵プロセスの統合について最適化を図った。</p>
<p>29 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>29 年度の成果としては、我々が実施した条件ではエタノール生産速度が出せず、生育速度のパラメータを得るにとどまった。一方、共同研究者によるモデル構築の実施は実質できなかつたため、モデル構築に関しては結果が得られなかつた。</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>日本側では、特に糸状菌の生産する酸化還元酵素(D-グルコシド-3-デヒドロゲナーゼ、ピラノースオキシダーゼ)、タイ側では乳酸菌の生産する糖転移酵素(アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼ)に関する研究が進んでおり、日本側では今後、タイ側ではすでに 2 報の論文を発表または発表予定である。また、タイからミャンを持ち帰ることができないため、四国各地の発酵茶葉の生産地を訪問し、発酵茶葉から微生物の試料採取を行い、有用乳酸菌の探索をタイ側とともに進めている。</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>2050 年には世界のバイオ燃料需要が 10 倍以上に増加すると予測され、セルロース系バイオマス利用に加えて、コスト削減に繋がる技術開発が不可欠である。本小研究課題では耐熱性酵母を用いた高温発酵系の開発とそのダウンストリームの新技術開発を目指している。今年度は、コメを原料とした 5L スケールでの高温発酵試験を行い、SSF でも SHF と同等なエタノール収量があり、SSF が時間短縮できる点で有利であることが分かった。また、高温発酵を評価するためにシミュレーションに必要なデータの一部を取得した。また、単蒸留によって濃縮したサンプルを用いた分離膜濃縮のデータが得られた。</p> <p>4) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産</p> <p>得られた実験データを基に下記論文の投稿を予定している。つまり、耐熱性 <i>Kluyveromyces marxianus</i> と <i>Rhodotorula glutinis</i> との共培養によりイヌラーゼ生産の最適化条件の確立により論文 1 を、<i>Bacillus halodurans</i> の生産するセリシン分解プロテアーゼの特性解析により論文</p>

2を、電気化学的に処理した脱脂米ぬかからのタンパク質調製法の確立により論文3を予定している。

1. Optimization of inulinase production by thermophilic strain of *Kluyveromyces marxianus* through response surface methodological approaches and co-cultivation with *Rhodotorula glutinis* for single cell protein production.

2. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Bacillus halodurans* SE5 and its application on bio-bleaching of yellow cocoon.

3. Quality evaluation of protein concentrate derived from heat-stabilized defatted rice bran prepared (recover and purified) by using combination of isoelectronic precipitation and electrolyzed water treatment (IP-EWT) process.

5) 加水分解酵素を利用したオイルパーム廃水からのバイオガス生産量の増加

平成 29 年度は、これまでに行ってきた2槽式リアクターによるパームオイル廃水からの水素生産+メタン生産についてラボスケール(1L-5L)から移動式の実スケール(5L-25L と 50L-250L)へのスケールアップを行った。これらのスケールアップした装置を用いて、スタートアップ時の種汚泥の処理方法、運転パラメータの最適化、回分式及び連続式の運転実験の実施により、ガス生成量 3.68LH<sub>2</sub>/L.day、23.46 LCH<sub>4</sub>/L.day、収率でそれぞれ 0.101、0.763L/gVS を得た。

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

平成 29 年度は、引き続き白色腐朽菌のバイオレメディエーションへの適用について研究を実施した。具体的には、上記白色腐朽菌から得られた酵素の新規固定手法(酵素の組み替えキシランによる新規固定化)を用いたバイオレメディエーションの開発を行った。

7) 第 2 世代、第 3 世代バイオマスからのバイオ水素生産プロセスの開発

平成 29 年度はサトウキビの絞り滓と廃液を用いて、2相式リアクターによりバイオ水素とバイオメタンを同時生産する実験を行い、水素生産速度が 35% (17.1L./day から 23.1L./day) 向上した。この結果から、試みた新方式の有用性が示された。

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

平成 29 年度は、固定化セルラーゼを用いたリグノセルロースを含む農業残渣(稲わら等)について前処理に関する検討を行い、嫌気性発酵によるバイオガス(バイオ水素+バイオメタン)生産のためのセルロー

ス分解微生物の選定に関する研究を実施し、最終的にセルロースを分解する微生物叢の集積に成功した。

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

平成 29 年度は、パームオイル生産工程から排出される固形有機物 (empty fruit bunches : パームオイルの絞り滓等) からの高温発酵による高効率嫌気性発酵に関する研究を実施した。高温菌である *Thermoanaerobacterium* sp. と *Clostridium* sp. を用いて、乾式高温嫌気性発酵によって 1 トンの empty fruit bunches から 45m<sup>3</sup> のバイオメタンが得られた。この結果から、パームオイル産業から排出される固形有機物は高いメタン生産ポテンシャルを持つことが示された。

10) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

1,3-ジオール類生産のための新規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構築することで、グルコースと任意の有機酸から 1,3-ジオール骨格を持つ複数の化合物を生産しうる組換え大腸菌を造成した。本菌株はグルコースに加え、プロピオン酸からは 1,3-ペンタンジオールを、イソ酪酸からは 4-メチル-1,3-ペンタンジオール、グリコール酸からは 1,2,4-ブタントリオールを生成した。

11) バイオマス原料を用いたパイロットスケール高温エタノール発酵試験

*K. marxianus* は *S. cerevisiae* に比べエタノール耐性や糖耐性で劣ると考えられていたが、エタノール生産に重要な性質をブラジル株と比較したことで、*K. marxianus* の各株の個々の能力がエタノール生産に適していることが明らかになった。交配能については DMKU3-1042 株との交配可能株は少なかったものの、グルーピングができたことになり、交配できなかった株間の交配の可能性が示唆された。

12) 新規に単離された *Aspergillus* 属真菌および酢酸菌によるガラクトロン酸からガラクトール酸への微生物変換

固体発酵では、原料果皮を 1-2 mm サイズに処理したものが最もペクチナーゼ生産性がよく、それ以上のサイズでは著しく生産性が低下した。このことから、原料果皮は 2 mm 以下に処理することが重要であると結論した。

固体発酵と酸化発酵の統合プロセスでは、原料果皮をこれまでの 5 倍量で準備すると、通気不良の影響から大幅に発酵が遅れることが判明した。また、酸化発酵工程での反応がうまく進行せず、不具合の原因を抽出して対策を講じる必要性が明らかになった。

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

参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 (タイ)	
	A.	B.
日本 〈人/人日〉	9/27	3
	20/40	30
タイ 〈人/人日〉	1/3	2
	1/3	2
ベトナム 〈人/人日〉	3/6	5
	25/52	39
インドネシア 〈人/人日〉	合計	

A. 本事業参加者 (参加研究者リストの研究者等)

B. 一般参加者 (参加研究者リスト以外の研究者等)

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

セミナー開催の目的	コンケン大学で隔年開催される国際発酵会議において、本事業の発酵に関連する先端的な基礎研究および応用研究のセッションを、分科会として開催する。本事業の発酵微生物分野の成果発表を行うと同時に、本事業の新たな知識や技術を紹介することによって、本事業関係者間で情報共有が可能になることに加えて、本事業成果を発酵関係者へ広く広報する。		
セミナーの成果	国際学会での研究成果発表の機会となり、本事業のアピールができた。同時に、本事業の各共同研究グループ内で研究の打ち合わせを実施し、今後の方針等の確認を行うことができた。さらに、異分野の研究者と広く交流の機会となり、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た。		
開催経費 分担内容	日本側	内容	国内旅費 金額 170,000 円 外国旅費 1,043,000 円 不課税・非課税取引に係る消費税 83,440 円
	(タイ)側	内容	セミナー開催経費
	(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

整理番号	S-2
セミナー名	(和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」Thailand Research Expo 分科会
	(英文) Session in TRE, JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“
開催期間	平成29年8月26日～平成29年8月26日(1日間)
開催地(国名、都市名、会場名)	(和文) タイ、バンコク、センターラグラントアンドバンコクコンベンションセンター
	(英文) Thailand、Bangkok、Centara Grand & Bangkok Convention Centre
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科 教授
	(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文) Dr. Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor

参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 (タイ)	
	A.	B.
日本 〈人/人日〉	8/24	
	10	
タイ 〈人/人日〉	30/30	
	40	
インドネシア 〈人/人日〉	1/2	
	4	
ラオス 〈人/人日〉	1/2	
	0	
合計 〈人/人日〉	32/34	
	44	

A. 本事業参加者(参加研究者リストの研究者等)

B. 一般参加者(参加研究者リスト以外の研究者等)

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

セミナー開催の目的	本 Core-to-Core Program 事業にはタイの多くの大学やその関係者がかかわっており、また、先端的研究や新技術開発も含まれている。そこで昨年度に引き続き、Thailand Research EXPO 2016 の分科会で本事業の研究成果を発表すると同時に、タイの一般研究者や企業関係者に本事業成果や研究開発の内容を広く公開する。
-----------	---



セミナーの成果	タイ国内の大きなイベントであることから、本事業での共同研究成果や共同開発した技術等を広く紹介できた。特に本年度は、新規酵素や酵素が関連する糖鎖の生理学的特性など酵素に関する研究を中心とした研究発表を行い、それらの知見や技術について広く意見を得ることができた。これらの知見や技術が今後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した。		
開催経費 分担内容	日本側	内容	国内旅費 金額 100,000 円 外国旅費 540,000 円 不課税・非課税取引に係る消費税 43,200 円
	タイ側	内容	セミナー開催経費
	インドネシア側	内容	外国旅費
	ラオス側	内容	外国旅費

整理番号	S-3
セミナー名	(和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」第4回サテライトセミナー
	(英文) The fourth satellite seminar of JSPS Core-to-Core Program “Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas“
開催期間	平成29年9月4日～平成29年9月5日(2日間)
開催地(国名、都市名、会場名)	(和文) ドイツ、ベルリン、ベルリンボイト工科大学
	(英文) Germany, Berlin, Beuth University of Applied Sciences
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学創成科学研究科 教授
	(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文) Dr. Peter Goetz・Beuth University of Applied Sciences・Professor

#### 参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 (ドイツ)	
	A.	B.
日本 〈人/人日〉	A.	7/28
	B.	0
タイ 〈人/人日〉	A.	5/20
	B.	1
ドイツ 〈人/人日〉	A.	4/8
	B.	10
イギリス(日本側) 〈人/人日〉	A.	1/4
	B.	0
合計 〈人/人日〉	A.	17/60
	B.	11

A. 本事業参加者(参加研究者リストの研究者等)

B. 一般参加者(参加研究者リスト以外の研究者等)

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

セミナー開催の目的	サテライトセミナーは、メンバー全員が参加するジョイントセミナーを補完するために開催する。本年度はドイツの拠点大学であるベルリンボイト工科大学で実施し、ドイツの大学の研究者や若手研究者との交流の場となる。
セミナーの成果	本事業メンバーに加えて、ベルリン工科大学などの研究者も参加し、国際シンポジウムとして参加者に多くの新しい知見を提供した。研究成果を発表し、本事業活動や研究レベルのアピールもできた。加えて、本事業活動や共同研究について意見交換ができ

	た。ドイツの研究者から事業活動に関して積極的な意見があり、若手研究者の派遣や今後の共同研究について相談した。また、ベルリンボイト工科大学の施設見学を行い、機器をはじめとする研究環境を理解することができた。		
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た。		
開催経費 分担内容	日本側	内容	国内旅費                      金額                      60,000 円 外国旅費                      940,000 円 外国旅費に係る消費税                      75,200 円
	タイ側	内容	外国旅費
	ドイツ側	内容	セミナー開催経費
	イギリス(日本側)	内容	外国旅費

整理番号	S-4
セミナー名	(和文) 日本学術振興会研究拠点形成事業「バイオ新領域を拓く熱帯性環境微生物の国際研究拠点形成」第13回若手研究者セミナー
	(英文) The 13 <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18日～平成28年11月19日(2日間)
開催地(国名、都市名、会場名)	(和文) 日本、山口市、山口県セミナーパーク
	(英文) Japan, Yamaguchi, Yamaguchiken Seminar Park
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 山田 守・山口大学・教授
	(英文) Mamoru YAMADA・Yamaguchi University・Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外での開催の場合)	(英文) なし

参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 (日本)	
	A.	B.
日本 〈人/人日〉	A.	9/18
	B.	45
タイ 〈人/人日〉	A.	6/12
	B.	13
ベトナム 〈人/人日〉	A.	5/10
	B.	3
インドネシア 〈人/人日〉	A.	4/8
	B.	12
合計 〈人/人日〉	A.	24/48
	B.	73

A. 本事業参加者(参加研究者リストの研究者等)

B. 一般参加者(参加研究者リスト以外の研究者等)

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

セミナー開催の目的	本セミナーは、熱帯環境微生物だけでなく生物を研究対象とする若手研究者のグローバル人材育成の一環として実施し、本セミナーを通じて若手研究者のネットワーク形成に繋げる。また、日本人大学院生や外国人大学院生が中心となって本セミナーの企画・運営を経験するとともに、参加者全員がそれぞれの研究成果を英語で発表および質疑応答の機会を提供する。
-----------	---

セミナーの成果	<p>1) セミナー企画・運営の経験を積ませることができた。</p> <p>2) 英語による研究成果発表や討議の機会となった。</p> <p>3) 若手研究者自身の研究について、様々な角度から意見を受けることができ、それに対する対応能力育成の機会となった。</p> <p>4) 一般的な微生物研究を深く知る機会を提供できた。</p> <p>5) 他国の若手研究者との交流によって異文化を知る機会となり、ネットワーク形成の場を提供できた。</p>		
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た。		
開催経費 分担内容	日本側	内容	国内旅費 191,000 円 その他（バス借り上げ代） 100,000 円
	(タイ)側	内容	外国旅費（他経費により支出）
	(ベトナム)側	内容	外国旅費（他経費により支出）
	(インドネシア)側	内容	外国旅費（他経費により支出）

### 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。

平成 29 年度は実施していない。

### 7-4 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

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

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

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

「参加者の再考」については、現在、本事業が進行中であることから国内のメンバーの大幅な変更は難しく、次期の事業に向けての課題として、現在検討を進めているところである。相手側の参加者については、100 名以上のメンバーがいるタイ側について、そのメンバーの

組換えではなく、彼らの中から高い研究能力を有する人材の育成を努めている。学術論文やセミナー発表等、業績の顕著な若手研究者を優先して日本へ招聘し、日本での共同研究の機会を提供しており、また他の外部資金による、より特化した先端研究への参加を促している。さらに、平成 29 年度開催した第 7 回国際発酵会議、Thailand Research EXPO 2017、ドイツで開催したサテライトセミナーでは、それぞれの課題のなかで顕著な実績を挙げている研究課題を選択し発表させ、Thailand Research EXPO では本事業で開発した優れたシーズの紹介を、サテライトセミナーではドイツとの新たな先端的共同研究に繋がる課題の紹介を行った。

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

微生物を研究材料としていることや科学研究の発展途上国との共同研究が中心であることなどのためにトップジャーナルへの論文発表は簡単ではないが、トップジャーナルの 1 つである Science (351:1196-1199; 353:759) に、既に退官しメンバーから外れた小田が、以前の拠点事業からの長期にわたる研究を報告している。本事業の性質上、相手国参加者との共著論文を中心とせざるを得ず、また、本事業予算（交流経費）を利用した研究論文に絞って提出していることから、論文数に限りがあるのは否めない。しかしながら、Top10%ジャーナルへの掲載は複数ある。また、学術論文数については、平成 26 年度：9 報（共著 7 報）、平成 27 年度：31 報（共著 21 報）、平成 28 年度：68 報（共著 31 報）、平成 29 年度：42 報（共著 30 報）と初年度に比べて増えており、特に共著論文数が昨年度から比較的高いレベルで維持されていることから、本事業が順調に進んでいることを反映していると考えている。なお、投稿準備中の論文も数多くあり、その中にはインドネシア、イギリス、ドイツ、ラオス、ベトナムの研究者との共著論文や著書も含まれている。

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

共同研究にかかる交流に関する指摘されている懸念については十分認識している。まず、日本からの派遣が少ない点は、本事業の相手国の性質からして理解をお願いしたいところである。つまり、相手国側には熱帯性微生物資源が豊富にあり、これは重要な利点であるが、ドイツもしくはイギリス（後述）以外は研究施設や解析技術等の問題があり、日本に相手国の研究者を招聘して研究する機会がどうしても多くなるからである。一方、タイ以外の国との交流拡大については、以下のように現在進めているところである。インドネシアでは、これまで支援機関が拠点大学のブラビジャヤ大学から Ristekdikti となり、平成 28 年度の途中から協力大学のメンバーに研究費支援が開始され、平成 29 年度から交流が拡大された。特に、平成 29 年度は本事業メンバー以外の研究者も含め 20 名が山口大学をはじめとする日本の関連大学に 2 ヶ月滞在し、トレーニングを含めた共同研究を行った。平成 30 年度も同様な支援計画が示されている。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にも派遣した。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 5 ヶ月派遣し、平成 30 年 3 月から日本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行っている。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すすめている。さらに、平成 29 年度から日本、タイ、ラオス、インドネシアが参加する e-ASIA 共同研究による発酵関連技術開発を開始した。

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

熱帯性環境微生物の開発のためには、本事業のような国際拠点事業を永続的に遂行する必要がある、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、これまで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きた。たとえば、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し、各種セミナーのテーマ決定、口頭発表者の選出等をリーダーとの討議を基に進めてきた。また、リーダーやサブリーダーが、メンバーと連絡を密に取りながら、研究課題毎の計画書や報告書の取り纏めを行い、研究課題の実態を把握すると同時に、メンバーとの意思疎通を図ってきた。そのようにして、本年度の運営委員会で若手の中から次期事業の代表者を決定した。この次期代表者を中心に次期事業の申請準備を開始した。



## 8. 平成29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	四半期	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 側参加研究 者)	合計
日本	1		1/7 (4/28)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	1/7 (4/28)
	2		20/109 (28/422)	5/25 (2/10)	0/0 (1/3)	0/0 (2/12)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	25/134 (33/447)
	3		8/47 (13/93)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/7)	1/2 (0/0)	0/0 (0/0)	9/49 (14/100)
	4		7/44 (12/196)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (2/10)	1/6 (0/0)	0/0 (0/0)	8/50 (14/206)
	計		36/207 (57/739)	5/25 (2/10)	0/0 (1/3)	0/0 (5/29)	2/8 (0/0)	0/0 (0/0)	43/240 (65/781)
タイ	1	1/30 (10/100)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/3)	0/0 (0/0)	1/30 (11/103)
	2	6/172 (11/384)		0/0 (6/30)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/5)	0/0 (0/0)	6/172 (18/419)
	3	9/351 (31/853)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/3)	0/0 (0/0)	9/351 (32/856)
	4	14/439 (13/564)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (2/4)	0/0 (0/0)	14/439 (15/568)
	計	30/992 (65/1901)		0/0 (6/30)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (5/15)	0/0 (0/0)	30/992 (76/1944)
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)
	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)
	3	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)
	4	0/0 (1/26)	0/0 (1/5)		0/0 (1/3)	0/0 (1/5)	0/0 (1/2)	0/0 (0/0)	0/0 (5/41)
	計	0/0 (1/26)	0/0 (1/5)		0/0 (1/3)	0/0 (1/5)	0/0 (1/2)	0/0 (0/0)	0/0 (5/41)
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)
	2	0/0 (0/0)	0/0 (1/28)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/28)
	3	5/143 (2/58)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	5/143 (2/58)
	4	0/0 (2/100)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (2/100)
	計	5/143 (4/158)	0/0 (1/28)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	5/143 (5/186)
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)
	2	0/0 (1/60)	0/0 (4/11)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (5/71)
	3	1/32 (12/709)	0/0 (1/60)	0/0 (0/0)	0/0 (2/120)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	1/32 (15/889)
	4	1/21 (2/65)	0/0 (1/60)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	1/21 (3/125)
	計	2/53 (15/834)	0/0 (6/131)	0/0 (0/0)	0/0 (2/120)		0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	2/53 (23/1085)
ラオス	1	0/0 (1/6)	0/0 (1/6)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (2/12)
	2	0/0 (2/86)	0/0 (3/10)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (5/96)
	3	0/0 (0/0)	0/0 (1/26)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (1/26)
	4	0/0 (1/31)	0/0 (2/30)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (3/61)
	計	0/0 (4/123)	0/0 (7/72)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		0/0 (0/0)	0/0 (11/195)
イギリス (日本側 参加研究 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)
	2	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	1/4 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		1/4 (0/0)
	3	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)
	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)
	計	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	1/4 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)		1/4 (0/0)
合計	1	1/30 (11/106)	1/7 (5/34)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (0/0)	0/0 (1/3)	0/0 (0/0)	2/37 (17/143)
	2	6/172 (14/530)	20/109 (36/471)	6/29 (8/40)	0/0 (1/3)	0/0 (2/12)	0/0 (1/5)	0/0 (0/0)	32/310 (62/1061)
	3	15/526 (45/1620)	8/47 (15/179)	0/0 (0/0)	0/0 (2/120)	0/0 (1/7)	1/2 (1/3)	0/0 (0/0)	24/575 (64/1929)
	4	15/460 (19/786)	7/44 (16/291)	0/0 (0/0)	0/0 (1/3)	0/0 (3/15)	1/6 (3/6)	0/0 (0/0)	23/510 (42/1101)
	計	37/1188 (89/3042)	36/207 (72/875)	6/29 (8/40)	0/0 (4/128)	0/0 (6/34)	2/8 (6/17)	0/0 (0/0)	81/1432 (185/4234)

※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	( 4/8 )	0/0	( 20/40 )	0/0	( 14/45 )	0/0	( 40/80 )	<b>0/0</b>	( <b>78/173</b> )

## 9. 平成29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	7,971,647	
	外国旅費	4,769,644	
	謝金	0	
	備品・消耗品 購入費	9,865	
	その他の経費	812,070	
	不課税取引・ 非課税取引に 係る消費税	436,774	
	計	14,000,000	
業務委託手数料		1,400,000	
合 計		15,400,000	

## 10. 平成29年度相手国マッチングファンド使用額

相手国名	平成29年度使用額	
	現地通貨額[現地通貨単位]	日本円換算額
タイ	3,539,000[バーツ]	12,168,000 円相当
ドイツ	8,000[ユーロ]	1,062,000 円相当
ベトナム	25,100[アメリカドル]	2,705,000 円相当
インドネシア	400 万円	400 万円
ラオス	200 万円	200 万円

※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。