

平成 30 年度研究拠点形成事業 (A.先端拠点形成型)
最終年度 実施報告書

(本報告書は、前年度までの実施報告書とともに事後評価資料として使用します。)

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. 採択期間

平成 26 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

(5 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 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), 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、マエファラーン大学、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、ソングラ王子大学、ラジャマンガラ工科大学タウンオク、ラジャマンガラ工科大学イサン、ランパイパニ教育大学、ラムカンヘン大学、シーナカリンウィロット大学、スラナリー工科大学、タマサート大学、タクシン大学、ウボンラチャタニ大学、パヤオ大学、ワライラク大学、タイ科学技術研究所、バイオテック、タイ王立科学会

経費負担区分（A型）：パターン２

（２）国名：ドイツ

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

（和文）ベルリンボイト工科大学

コーディネーター（所属部局・職・氏名）：（英文）

Life Sciences and Technology・Professor・Peter GOETZ

協力機関：（英文）なし

（和文）

経費負担区分 (A 型) : パターン 2

(3) 国名 : ベトナム

拠点機関 : (英文) **Can Tho University**

(和文) カントー大学

コーディネーター (所属部局・職・氏名) : (英文)

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

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

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

経費負担区分 (A 型) : パターン 2

(4) 国名 : インドネシア

拠点機関 : (英文) **University of Brawijaya**

(和文) ブラビジャヤ大学

コーディネーター (所属部局・職・氏名) : (英文)

Faculty of Agriculture • Lecturer • Anton MUHIBUDDIN

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

(和文) セプルフノペンベル工科大学、マタラム大学、ハイルン大学、ベテランスラバヤ大学、ガジャマダ大学、技術の評価と応用庁、インドネシア大学

経費負担区分 (A 型) : パターン 2

(5) 国名 : ラオス

拠点機関 : (英文) **National University of Laos**

(和文) ラオス国立大学

コーディネーター (所属部局・職・氏名) : (英文)

Faculty of Science • Associate Professor • Somchanh BOUNPHANMY

協力機関 : (英文) なし

経費負担区分 (A 型) : パターン 2

5. 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分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 30 年度研究交流目標

<研究協力体制の構築>

本事業に関する研究協力体制やその運営や支援をするコーディネーター組織および組織委員会は初年度に構築され、最終年度もそれを踏襲する。各研究グループは担当する研究課題に沿って英語の年度計画書を協力して作成し、必要に応じて研究課題リーダーと相談しながら、本年度の共同研究を実施する。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、イギリスとの交流を強化するとともに、日本との交流に加えて日本以外の国間での交流を加速する。なお、マッチングファンドについて、インドネシアはブラビジャヤ大学に加えて平成 29 年度から政府機関の Ristekdikti からも支援が得られるようになったが、イギリスはこれまでと同様に予算獲得を試みる。

<学術的観点>

平成 30 年度は本事業の最終年度に当たることから、それぞれの小研究課題の目標を達成できるように遂行し、その成果を論文や学会発表として報告する。特に、それぞれの研究課題はいずれも世界をリードする先導的な研究内容を含んでいることから、それらの研究成果を公表し、新規な知見や新たな技術のシーズを提供し社会の発展に寄与する。たとえば、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」に関する「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」などの研究成果を発信する。

平成30年度はメンバー全員が参加する最終ジョイントセミナーを山口大学で開催し、本事業成果の情報交換だけでなく次の拠点事業に向けて研究課題や研究協力体制等について意見交換や研究グループ内での研究テーマ等の相談を行う。また、例年と同様にNRCTの支援を受けてタイ研究博覧会2018で分科会を開催する。さらに、ラオスで第5回サテライトセミナーとe-ASIA共同研究会議(JST, 2017-2019; 本事業経費外)を開催し、本事業の広報や本事業から生まれたシードを発展させ、高温発酵等の革新的技術開発に繋げる。

<若手研究者育成>

第15回若手研究者セミナーを山口市で開催する。本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。JASSO 短期留学生や私費で参加する若手研究者を含め、約半数が留学生や外国人研究者となる見込みであり、英語によるプレゼンテーション能力の向上、若手研究者育成に加えて友好関係の構築や国際ネットワーク形成に繋げる。また、日本側メンバーが、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等を努める。

<その他(社会貢献や独自の目的等)>

本事業では、熱帯性環境微生物の探索、環境適応機構、生態における役割ならびにそれを利用した有用物質生産や新技術開発を目指している。特に、我が国に無い熱帯性環境微生物資源の開発は、生物多様性条約の締結によってアクセスが困難になる中、本事業のような国際共同研究を通じて唯一継続できる。また、開発した微生物の寄託機関へ登録や研究成果の公表によって社会還元を行うとともに、若手研究者の育成に加えて相手国の研究力や技術力向上にも貢献し、友好関係を構築する。

5-3 研究交流成果に対する達成度とその理由

- 研究交流目標は十分に達成された
- 研究交流目標は概ね達成された
- 研究交流目標はある程度達成された
- 研究交流目標はほとんど達成されなかった

【理由】

本事業では、ASEAN 諸国と欧州からの7カ国(6拠点大学と1協力大学)によって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「熱帯性環境微生物」を対象とする国際共同研究を実施した。熱帯性環境に棲息する微生物は環境に

適応して「耐熱性」を有し、様々な特性をもつ「多様性」が見込まれる。本事業によって「耐熱性」についてはその分子機構を明らかにするとともに、更なる耐熱化や耐熱性を生かした高温発酵等の多くの技術開発を行った。これらの「耐熱性」や「耐熱化」に関する研究や応用についての論文数は世界をリードし、中国等の多くの研究者が同様な観点からの研究を急速に増やしている。中でも有用性の高い中温菌の耐熱化実験によって耐熱化の限界が2～3度程度でしかないことが示され、中温菌やそれが形成する環境は地球温暖化の影響を強く受ける可能性を示唆した。また、「多様性」に関する研究やエコシステムの研究は多くのメンバーが新たなアイデアに基づいて実施し、微生物の限りない多様性や環境との相互作用、食生活と腸内細菌叢組成との関連性やウイルスの伝播ルートの解明等について数多くの知見を得た。研究交流は5年間で10,000日人を越え、論文数は227報（共著論文135報）に達した。また、企業との共同技術開発数は把握しているだけで10件あり、企業からの技術相談も多数あった。特に、本事業成果の社会還元活動として、タイおよび日本の企業への技術紹介セミナーを在タイ日本大使館で開催し、また、Thailand Research EXPOでの分科会を毎年開催した。たとえば、耐熱性微生物を利用した高温発酵は冷却コスト削減等複数のメリットが見込まれ、延いてはCO2削減に繋がる革新的技術として期待され、さらに様々な有用物質生産に利用できる技術でもあることから、企業との共同研究も始まっている。

一方、本事業のもう一つの柱となる若手研究者育成として、毎年100名規模の国際的な若手研究者セミナーを日本で開催し、タイにおいてはワークショップを隔年開催した。さらに、相互の学生の研究指導や多くの博士課程学生の副指導を行った。このように本事業の目的である「熱帯性環境微生物」を対象とする先端研究分野を新しく開拓するとともに、若手研究者育成を様々な取り組みを通して実施した。

6. 研究交流成果

6-1 平成30年度の研究交流成果

<研究協力体制の構築>

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、例年と同様に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。個々の共同研究（小課題研究）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、次期拠点事業について意見交換を行った。継続的な国際交流が重要との共通認識のもと、研究テーマや目的について相談した。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。このような研究協力体制は初年度から継続している。

本年度は最終合同セミナーを含め4つのセミナーを、日本、ラオス、タイで開催した。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10名(他経費で14名)、ベトナム1名(4名)、インドネシア(7名)、ラオス6名(1名)をそれぞれ派遣した。一方、タイ、ベトナム、インドネシア、ラオス、ドイツ、イギリスから、それぞれ42名(他経費で53名)、3名(8名)、2名(9名)、1名(3名)、3名(4名)、1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。以上の実績から本年度目的を十分達成することができたと評価している。

<学術的観点>

共同研究を57件計画し、57件実施した。一方、一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、最終合同セミナーを含む4件のセミナーを計画し、全て実施し、成功裡に終えた。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。昨年に引き続き 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。ドイツは、ワークショップ「Advanced Course in Fermentation Technology」(タイ側開催の活動であるため7・2セミナーには入れていない)をタイのチェンマイ大学で共同開催し、タイ、ベトナム、ラオスの多くの若手研究者が参加した。また、日本との間で修士学生の相互派遣を実施するとともに、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継続して実施した。タイ、インドネシア、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実施した。

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た。

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:前年度と同じく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7件および5件の共同研究(小研究課題)を実施した。いずれの小研究課題においても活発な共同研究および研究者交流が行われた。研究の成果は、査読付き国際雑誌に17編(うち15編が国際共著論文)公表され、国際会議において32題が発表された。これらの数値は、いずれも過去5年間で最高となった。

課題2：様々な発酵微生物のゲノムワイド解析を通して、高温域での生育や発酵、ストレス耐性を調査した。耐熱化株で独立に得られた複数の変異を組み合わせることにより、さらなる耐熱化を試みた。タンパク質の耐熱性を生細胞で評価するための変異株をゲノム工学的に作製した。実用性を高めるため、低栄養要求性株を耐熱化育種し、その原因遺伝子の特定を進めた。国内の発酵企業と共同研究を実施し、本事業で育種された菌株の実用性を検討した。

課題3：11件の課題について研究を実施した。タイを中心に様々な亜熱帯の生態系より有用微生物の単離が試みられ、藻類における有用脂質の同定や、放線菌や糸状菌などから新規物質や色素の同定が行われた。また、微生物による環境修復については植物との相互作用の重要性が示され、バイオ（ファイト）レメディエーションへの展開に重要な、植物と微生物の相互作用の分子機構の一端が明らかにされた。疫学面においては、タイ人の腸内細菌叢データに基づいたプロバイオティクス解析が行われ、また、東南アジアにおける狂犬病ウイルスや節足動物媒介感染症ウイルスなどの感染症の分布状況や媒介生物との関係性について、重要なデータと知見が得られた。

課題4：19件の共同研究交流活動を実施した。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た。そのなかで、新たに単離した微生物を用いて農業システム改革への下地を形成し、また、既にある程度成果を得ていた微生物由来生理活性物質に関する研究では新規物質の同定と性状解析を果たした。微生物由来有用酵素もレパートリーをさらに増やすことができ、応用局面で必要な酵素を即座に用意できる体制を確立した。

課題5：12件の共同研究交流活動を実施し、最終目標に向けた研究が実施された。バイオエタノールやバイオガス生産において新しい技術を組み込んだ生産プロセスの有効性、スクリーニングで得た酵素のペプチド・糖生産、毒性物質分解での優位性、遺伝子操作による代謝系の改変による目的生産物の生産量増加などの成果が得られた。得られた成果には共著論文、学会発表等で公表されたものがある。

以上の実績から本年度目的を十分達成することができたと評価している。

<若手研究者育成>

第15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39名、外国人若手研究者39名および講師や関連教員等が参加した。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した。本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、参加した全ての若手研究者が自身の研究成果等を英語で発表した。懇親会も開催し将来的な国際ネットワーク形成に繋がる機会となった。これ以外に以下に列挙したように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。特に、海外メンバーが日本側共同研究室に滞在中、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た。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等を務めた。

- ・ 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生を 16 名、各 3 ヶ月間程度受け入れ、研究指導を行った。
 - ・ 静岡大学では、ベトナム・フエ大学からの留学生である Le Thi Ha Thanh 氏の研究をサポートし、国際学会と論文投稿を行うことができた。
 - ・ RISTEKDIKTI のショートトレーニングプログラムに協力し、若手研究者を 2 ヶ月間受け入れ、発酵微生物の発酵試験等を行った。
 - ・ 本研究で形成されたタイとの共同研究を契機に、Prince of Songkla 大学大学院出身の博士研究員である Dr. Siriporn Chaikaew 氏、および Mr. Aem Nuylert 氏を科学研究費基盤研究 (S) で雇用し、両名は強力な研究要員として活躍している。
 - ・ Dr. Weeranuch Seesom および Dr. Phuengmaung Pornpimol の博士論文の副査を担当。関連研究を実施した山口大学の 4 年生の学生が YSS にて研究発表を行った。
 - ・ カセサート大院生 (P. Fueangbangluang, K. Naloka, P. Taweecheep, P. Konjanda, T. Phathanathavorn) の研究指導。
 - ・ 各国の研究者を招き、研究指導するとともに、現地でも共同して研究を行った。博士課程の学生としても受け入れ、指導している。
 - ・ 本事業に携わった学生のうち 3 名 (広島大学 2 名、チュラロンコン大学 1 名) が博士号を取得した。いずれも大学の教員として活躍している。
 - ・ [受賞] 緋田安希子 : 広島大学学長表彰 (2018)、Mattana Tunchai : Cosmos Editor's Choice in 2017 Asia-Pacific 3 minute-competition semi final (Brisbane, Australia, 2017) 。
 - ・ 本交流事業の研究プロジェクトに参加した Orawan La-ongkham は関連の研究テーマで博士号(Ph.D, カセサート大学)を取得するに至った。
 - ・ コンケン大学にて 3 名の博士を育成した。
 - ・ 本事業の研究に携わった Srinakharinwirot University の大学院博士課程学生が学位を取得し、同大学の助教に採用された。
 - ・ 岐阜大学修士課程学生を Kasetsart University が受け入れ育成した。当該学生は博士課程に進学し、炭素繊維の生体影響評価を行っている。
 - ・ タイおよびインドネシアからの留学生で博士号取得者 1 名、修士号取得者 2 名を輩出した。現在、修士課程を 1 名、博士課程を 1 名受け入れている。
- 以上の多くの実績から本年度目的を十分達成することができたと評価している。

<その他 (社会貢献や独自の目的等) >

- ・ 伝統的アルコール飲料製造におけるスターター内には多様なアルコール生産酵母及び糸状菌が含まれていることが明らかとなった。Thailand Research EXPO において、この成果を発表したところ、ラオスおよびコンケン大学の教授から共同研究の誘いを受けた。
- ・ 「耐熱性微生物の作成方法」(特許第 6474063 号、平成 31 年 2 月 8 日)の特許を取得した。

- ・植物生長促進効果をもつ微生物あるいはその生産物を用いた作物増収技術の開発や、メタノール資化性微生物による低環境負荷型有用物質生産系の開発に資する研究成果であった。
 - ・各国において、研究基盤の整備に貢献できた。節足動物媒介感染症のリスクに関して、新たな発見ができた。
 - ・本研究はタイ国の乳酸発酵企業との共同で行い、得られた知見は同国発酵産業の様々な技術向上につながった。
 - ・炭素繊維の生体影響評価は、とりわけ日本において重要な課題である。GO を研究することで、当該分野への参入が容易であった。
 - ・社団法人 SOFIX 農業推進機構（非営利）を立ち上げた。
 - ・一財）熊本公徳会設立 75 周年記念講演会で講演「美味しくて面白い発酵食品と健康」(2018 年 9 月) を行った。
 - ・JST さくらサイエンスプランを実施した。また、山形大学国際交流事業・チェンマイ大学農産学部ショートステイプログラムを実施した。
 - ・企業を対象としたセミナー（2018 年 12 月 13 日、東京）で「次世代発酵技術によるバイオエタノール生産～中高温性発酵微生物を利用した生ごみや紙ごみ等のエタノール変換～」と題して講演を行った。
- 以上の多くの実績から本年度目的を十分達成することができたと評価している。

6-2 全期間にわたる研究交流成果

(1) 国際研究交流拠点の構築

- ① 日本側拠点機関の実施体制（拠点機関としての役割・国内協力機関との協力体制等）

山口大学は拠点大学として、海外の拠点大学と協力して本事業を円滑に実施するためにコーディネーターと副コーディネーターを配置し、5つの研究課題のそれぞれにリーダーとサブリーダーを配置した。リーダーは研究課題のメンバーと連絡をとりながら、各年度の研究計画書や研究報告書を作成するとともに、各セミナーでの口頭発表候補者をコーディネーターに推薦する役割を担った。コーディネーターは海外の拠点大学のコーディネーターと相談して、最終的な口頭発表者を決定した。コーディネーターは必要に応じて運営会議を開催し、本事業の問題点やセミナー等の開催に関する相談の機会を確保した。運営会議の構成員は旧拠点事業のコーディネーター（アドバイザー）、現コーディネーター、副コーディネーター、リーダー、サブリーダーおよび担当事務員とした。以上の実施体制は初年度から運用されており、目標を十分に達成している。
- ② 相手国拠点機関との協力体制（各国の役割分担・ネットワーク構築状況等）

タイ、ドイツ、ベトナム、インドネシア、ラオスに、それぞれ拠点大学とコーディネーターを配置し、協力大学のイギリス・マンチェスター大学にもコーディネーターを配置して事業全体を掌握するネットワーク体制を構築して本事業を開始した。毎年、各共同研究グループから英文の研究計画書を提出させ、コーディネーターはその計画

書で提案された共同研究交流候補者について相談し、それぞれの年度の候補者リストを作成し予算に応じてプライオリティ順に交流研究者を決定した。一方、各国のコーディネーターは予算獲得のために、それぞれの国の機関等との折衝や補助金申請を行ってきたが、必要に応じて他国のコーディネーターが協力した。また、各セミナーへの発表者の派遣やワークショップの講師など積極的に協力した。さらに、コーディネーターは必要に応じて研究者同士のマッチングも斡旋した。イギリスは拠点国を目指して外部予算獲得を模索してきたがかなわず、共同研究の一部を実施し、その費用を負担した。このように目標を十分に達成している。

③ 日本側拠点機関の事務支援体制（拠点機関全体としての事務運営・支援体制等）

学術研究部研究推進課が事務局として日本学術振興会との窓口となり、実施計画書や実施報告書等の提出に関する支援等統括的な事務を行った。コーディネーターの所属となる農学部各系においては、研究者の受入、海外派遣に係る事務手続きや研究交流経費の管理、執行等の経理事務を行った。また、大学としての広報は事務局総務企画部総務課が行い、ジョイントセミナーやサテライトセミナーの報告を大学ホームページに掲載した。以上のような事務支援体制にて、円滑な研究活動を支援した。

（2）学術的観点

本事業では5つの研究課題を設定し、合計57件の共同研究を実施した。全ての共同研究の研究成果の概要を最終年度にSummary bookとしてまとめ、最終合同セミナーでポスター発表し、それらの情報を共有した。その成果の一部は227報の論文として報告し、そのうち135報は共著論文であった。また、12報は3国以上の共著論文であり、日本国内の共著論文も55件あった。論文数は2014年9報、2015年37報、2016年68報、2017年42報、2018年76報と着実に増加し、*Biotechnol Biofuels* など各専門分野のTop10%補正論文も複数含まれ、本事業が順調に推移したことが伺える。また、多くの技術が開発され、その内10件は企業との共同研究へと発展した。

以下に5つの研究課題毎の学術交流成果について述べる。

課題1：2つのサブ研究課題「有用微生物の検索」（7小研究課題）と「分離微生物および生産物質の研究」（5小研究課題）合わせて12の小研究課題について共同研究を実施した。その結果、「有用微生物の検索」では、バイオ燃料や有用酵素の生産効率を高める優良酵母株、バイオマス資源（ココナッツコプラミールや稲ワラ）の有効利用に資する微生物、耐熱性ポリヒドロキシ酪酸生産菌、熱帯作物病害の微生物農薬候補菌、アルコール飲料スターターの微生物叢情報などを新たに得ることができた。「分離微生物および生産物質の研究」では、*Thermobifida alba* のカルボキシエステラーゼの新規活性、細菌および糸状菌の有用酵素の発現系の構築による生産性向上、耐熱性酵母で生産したβ-グルコシダーゼの特性、耐熱性酵母に独特のストレス応答系、耐熱性放線菌における熱ショック代謝物の生合成、などをはじめ明らかにすることができた。

課題2：高温域での生育や発酵に適した優良株を獲得、育種を行った。それらの耐熱性や耐熱化の仕組みをゲノムワイドに解析した。相手国との進捗状況の確認・共有の方法や

頻度等については、派遣や受入によって直接行うか、電子メールによって頻繁に行った。

課題3：東南アジアにおけるウイルス・微生物等に関する感染症について、特に伴侶動物のウイルス感染状況や、節足動物を介したウイルスの家畜・ヒトへの感染状況に関する貴重なデータを得ることが出来た。また、亜熱帯の生態系の維持や環境保全に関わると考えられる多数の微生物が単離・分析され、それらの一部が有用物質の産生や、有害物質の分解能を有している事が明らかにされた。本課題で扱った課題・微生物種は多岐にわたったが、生態系の保全や環境の維持、人や動物の健康に関する亜熱帯性微生物の特性が明らかにされ、貴重な知見を得ることができた。

課題4：食品、食品保蔵、衛生等への新たな活用方法の開発などを目指して有用微生物の探索を進め、新たなプロバイオティクスを生産する微生物など多くの有用微生物の単離を完了した。この際、タイだけでなくインドネシアやラオス、ベトナムまでスクリーニング範囲を広げたのは極めて有効であった。その成果に加えて、それぞれの微生物を利用する技術開発を進め、新規モナスカス色素、プロバイオティクス、フィコシアニン、多糖分解酵素、新規シクロデキストリン生合成酵素を単離同定することに成功し、それぞれが実際の応用への試行段階に進んでいる。さらに、土壌微生物・葉面微生物の制御による持続的農業システムの提案も達成した。

課題5：計15件の共同研究交流活動を実施した。廃キャッサバパルプからのバイオエタノール生産については、NEDO やタイの公的機関からの支援も受け、日本及び現地企業とも共同して実証試験を実施し、高温発酵の有用性を示すことができた。さらに、バイオエタノール、バイオガス生産における減圧蒸留や微生物電気分解など新しい技術の有効性を示すことができた。酵素を用いた物質生産でも、獲得した酵素に加え、その生産物の有用性が示された。組換え体や新規単離菌を活用したバイオリファイナリー基幹物質の生産にも成功した。これらの成果をベースとした新規産業への展開が期待される。また、各国での耐熱性菌の分離が進み、それぞれの国での産業化に際しての障壁を取り除くこともできた。なお、バイオガス生産に関する研究では非常に多くの論文が発表された。

以上の共同研究の成果等が示すように目標を十分に達成している。

(3) 若手研究者育成

毎年100名規模の若手研究者セミナーを開催した。約半数が外国人研究者や留学生からなることから、企画運営を中心となって担当する大学院生は他国の大学院生と協力して国際会議の運営経験ができ、国際的なネットワーク形成の機会ともなった。さらに、参加者全員が英語で口頭発表することから、発表においても貴重な体験ができるものとなっている。また、タイにおいてワークショップを開催し、タイ、ベトナム、ラオスの若手研究者に対して発酵制御技術等の先進的技術の習得の機会を提供した。さらに、日本人のメンバーは本事業と関連して、留学生の育成や副指導教員として海外の大学の大学院生の研究教育に携わってきた。指導した博士課程学生の数は5年間で20名を越え、そのうち12名が学位を授与された。このように目標を十分に達成している。

(4) 社会貢献や独自の目的等

日本人メンバーの社会貢献数は5年間で39件の報告があった。その中には、新たな技術を開発したものや、その技術を紹介する多くの講演が含まれている。以下にそのいくつかを紹介する。

- ・山口大学ではタイを重点連携国に指定し、その第1回セミナーおよびALCAワークショップ「High-Temperature Fermentation Technology with Thermotolerant Microorganisms in Tropical Aria」をカセサート大学で開催し、タイの研究者や企業関係者を含む多くの参加者に対して、これまでの20年以上の耐熱性微生物に関する実績を紹介した。
- ・平成27年3月の日本農芸化学会大会で『微生物及び植物における「耐熱性」と「耐熱化」』と題してシンポジウムを開催し、一般研究者や企業関係者が多数参加した。
- ・「高温酢酸発酵酢酸菌」(特許第5470807号, 平成26年2月14日)の特許を取得した。
- ・特許「耐熱性微生物の作成方法」が公開された(公開特許2015-057996)。
- ・本事業に関する総説等「省エネ型エタノール発酵新技術とセルロース系バイオマス変換基盤技術」(化学工業 66:1-5, 2015)、「耐熱性発酵微生物の耐熱性を賦与する分子機構」(化学と生物, 53(11): 763-773, 2015)、「High-temperature fermentation technology for low-cost bioethanol」(*J. Jpn. Inst. Energy*, 94:1154-1162, 2015)を発表した。
- ・SOFIX分析は、日本・アメリカ・中国・オーストラリアで国際特許を取得し、詳細な土壌診断や有機農法の施肥指導に役立っている。(社)SOFIX農業推進機構を設立し、SOFIX分析サービスを開始した。
- ・本事業と関連して、神戸大学農学部とチェンマイ大学アグロインダストリー学部、及び山口大学農学部とメイファールアン大学理学部とで学部間協定を締結した。
- ・日本・アメリカ・フィリピン・インドネシアとの共同研究申請した課題3関連のe-ASIA JRP「An integrated research for the development of a scheme to control emerging vector-borne viral diseases in Asia」が採択された。
- ・平成28年3月に山口大学中高温微生物研究センターのセミナー「微生物のロバスト化と発酵未来技術」を企業向け(約80名参加)に開催し、これまで開発したエタノール発酵技術を含めて発表した。
- ・耐熱性微生物が生産するバイオガスから低コストかつ効率的に二酸化炭素を除去する装置の開発に関して、山口県の推進する「二酸化炭素の有効活用」に関する研究開発に参画している。
- ・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。
- ・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。
- ・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。

(5) 予期しなかった成果

- ・耐熱性放線菌の耐熱性因子の一端を見出した。
- ・タイだけではなくラオスにおいて関連研究をセミナーにより解説できた結果、さくらサイエンスの支援によりラオス国立大学との交流ができるようになった。
- ・相手国訪問やジョイントセミナー等で国内外の研究者達と交流した中から、冬虫夏草の育種（カウンターパート:メイファーラン大学の Sunita Chamyuang 講師）やマツタケオール生合成系の解明（カウンターパート:山口大学松井教授）といった全く新しい共同研究が芽生えてきており、今後の進展が期待される。
- ・本プログラムで交流活動のあった研究者の博士学生が学位取得後にタイ国内の大学に採用され、別途国内助成金を利用して共同研究による枠組みを拡大することができた。
- ・阿波番茶の製造工程から多数の乳酸菌を得ることができたこと。

(6) 今後の課題・問題点及び展望

- ・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。
- ・昨今のゲノムワイド解析には近代的な解析装置や細密なバイオインフォマティクス解析が必要となり、国際的に評価される論文に仕上げていくには、日本側の努力が大きなウェイトを占めるのが現状であると考えられる。

7. 平成30年度及び全期間にわたる研究交流実績状況

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 |
|---------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| 共同研究課題名 | (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・職名 | (和文) 伊藤真一・山口大学創成科学研究科・教授・1-5 (英文) Shinichi ITO・Yamaguchi University・Professor・1-5 | | | | |
| 相手国側代表者 氏名・所属・職名 | (英文) Piamsook PONGSAWASDI・Chulalongkorn University・Professor・2-13 Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor・3-1 Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor・4-1 Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Professor・5-1 Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor・6-1 | | | | |
| 30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果 | <p>これまでと同じく、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7件および5件の共同研究（小研究課題）を実施した。本研究課題の今年度の交流は、タイ・ラオス・インドネシア・ベトナムから9名（合計257日）を受け入れたが、日本からの派遣はなかった。なお、研究の進捗状況の共有は、各小課題を実施する共同研究者間において電子メール等により随時行われた。</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</p> <p>黒色酵母 <i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 135684 株からバイオマス分解酵素である β-xylosidase の遺伝子を単離することができた。この遺伝子には2つのイントロンがあった。イントロンを抜きながら、遺伝子を出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の多コピーベクター YEpGAP-cherry にクローニングし、発現させた。発現した活性量は、本来の <i>A. pullulans</i> 由来の活性よりも約2倍の活性を示した。</p> <p><i>A. pullulans</i> は製紙製造工程で廃棄物となるパルプに含まれるキシランを分解する酵素であるキシラナーゼとキシロシダーゼを分泌する。本酵母から耐熱性のキシロシダーゼを精製し、バイオマス分解に使えること、および、その遺伝子から遺伝子工学的に酵素を大量に生産する準備が整った。今後、リグニンやキシランが含まれるヘミセルロース系のバイオマス分解に有用な酵素が利用できるようになる。</p> <p>2) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析</p> <p>これまでの共同研究によってタイで確立された耐熱性酵母の分離方法を用いて、ラオス・ベトナム・インドネシアからそれぞれ100~200株の酵母を分離し、同定をすすめるとともに、耐熱性やエタノール生産性の優れた株を選別してきた。30年度は、選別された株間で高温発酵能力や種々のス</p> | | | | |

トレス耐性を比較し、それらの特性の優れた8株について、熱耐性に加えてストレス耐性を強める育種を行った。また、バイオマスに適した株の選別や育種等を行った。

高温エタノール発酵は、熱帯性環境にあるタイ・ラオス・ベトナム・インドネシアにおいて期待される技術であるが、それに不可欠な耐熱性酵母は生物多様性条約等の制約から、それぞれの国で分離する必要がある。30年度の共同研究によって、ラオス・ベトナム・インドネシアからの選抜株についてストレス耐性を強める育種を行い、耐熱性を含めて強靱性の増強した株の分離に成功した。これによって、それぞれの国で使用できるデンブン系バイオマスをエタノールに変換できる優良株を得ることができた。またタイからの選抜株については、変異源処理によってセルロース系バイオマスをエタノールに変換できる優良株を得た。共同研究成果の一部を2つの論文として報告した。

3) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析

植物油脂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検討した。また、今年度新たにタイで分離されたヤスデ *Orthomorpha communis* の生産する油脂成分を研究対象とし、ヤスデのヘキサン抽出物の GC/MS 分析により、含有する油脂の構造解析を実施した。

本ヤスデの抽出物には 1-methoxy-*n*-hexadecane を始めとする脂肪族メチルエーテル類が著量含有していることを明らかとした。これらの脂肪族メチルエーテル類は、ヤスデの表皮において耐水性を保持する機能を付与するものと考えられる。この結果はヤスデの耐水機構に関する初めての知見であり、今後脂肪族メチルエーテル類の生合成に関与する新規酵素の発見が期待される。

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

- 2018/6/1: Srinakharinwirot Univ マスター生 (Ms. Sankasa Nipaporn) の受入 (2ヶ月)。
- 2018/10/22: 大阪府立大学大学院生 (中裕規君) の Srinakharinwirot Univへの派遣 (1ヶ月)。
- 2019/1/7: Srinakharinwirot Univ ポスドク (Dr. Phuengmaung Pornpimol) とドクター生 (Ms. Kanoknat Woranuch) の受入 (3ヶ月)。

アラビノキシラン分解に有効なフェルラ酸エステラーゼについて、2種の遺伝子の大量発現系を構築し、それらの反応特性解析を行った。

当初、本年度計画では稲ワラ中に含まれるアラビノキシラン分解に有効なアラビノフラノシダーゼとキシロシダーゼの大量発現系の構築を予定していたが、実験が難航したため計画を変更した。稲アラビノキシランにはフェルラ酸が結合しているため、本多糖を効率的に分解するためには、フェルラ酸を遊離させる必要がある。そこで、本年度はその反応を触媒するフェルラ酸エステラーゼ (FAE) に焦点を絞り、本研究室内保有の *Penicillium chrysogenum* 由来の2種の FAE 遺伝子の発現系を構築した。

5) I) 伝統的なタイの発酵食品から単離した乳酸菌の同定

II) 微生物由来の耐熱性セルラーゼの性状解析

・タイ国の発酵食品由来から単離された細菌の性状解析を行った。
・単離した乳酸菌群の酸および胆汁に対する耐性試験を行った結果、Pra-jom 由来の 4 株および発酵タケノコ由来 4 株について耐性を確認した。また、これらの株は食品汚染源となる細菌（大腸菌・セレウス菌・黄色ブドウ球菌・*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium および *Listeria innocua*）に対して抗菌活性を示した。また、発酵タケノコ 4 製品中 3 製品において *Lactobacillus* 属が細菌叢のほぼ 100% を占めることが 16S メタゲノム解析により明らかになった。

6) 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、静岡大学にて H29 年 3 月にタイ側研究者から入手した抽出サンプルの解析を試みたが、ポリヒドロキシ酪酸と思われる成分が認められないことが判明した。HPLC 解析ではポリヒドロキシ酪酸の生成が検出されたことから、再度タイ側でサンプルの調製を試みた。送付されたサンプルの解析結果は前と同様であり、微生物による生産法と抽出法に問題がある可能性が明らかとなった。現在も解決に向けた検討がタイ側で続けられている。また、今年度はベトナム・フエ大学との共同研究で、ベトナムのダイオキシン汚染土壌からのダイオキシン類分解菌の探索とそのゲノム解析に関する共同研究を、タイ側の研究者も交えて行った。その結果、ダイオキシン類の一種であるジベンゾフランを分解する好熱菌の取得とゲノム解析に成功し、今後、高温で培養した時のジベンゾフラン分解と分解系遺伝子群の発現の解析を通して、好熱菌におけるダイオキシン類の分解の全容を解明する予定である。

HPLC 分析では、ポリヒドロキシ酪酸とみられるピークが得られたものの、抽出後のサンプルでは、NMR、FTIR 等を用いた解析が不能であったことから、抽出法に問題点があると考えられ、抽出法を再検討することとした。また、新たに開始した、ダイオキシン類の一種であるジベンゾフランを分解する好熱菌のスクリーニングと解析は、既知の分解菌と比較して、分解性の高い菌の取得に成功し、ゲノム解析も終了したことから、今後さらに詳細を解析する予定である。

7) 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

2018 年 12 月に Dr. Anurag Sunpapao（タイ・ソクラ王子大）が来日し、本事業で分離された「熱帯作物の病原菌に対して拮抗作用を示す微生物」の中で最もバイオコントロールに有望な菌株として選抜された *Streptomyces* 属菌および *Trichoderma* 属菌の微生物学的性状およびレタスの病害防除への応用に関する共同研究を実施した。また、論文作成に関する打合せを行った。

レタスの病害の原因菌（*Curvularia oryzae* および *C. lunata*）に対して強い拮抗作用を示す *Streptomyces* 属菌および *Trichoderma* 属の生物学的性状を初めて明らかにすることができた。また、得られた成果をまとめて共著論文を作成し、国際雑誌に 5 報公表することができた。

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ピレスロイド等農薬分解への応用

Thermobifida alba AHK119 株よりクローン化したカルボキシルエステラーゼ(Ca119)が低分子基質のエステル結合分解能を有していることがこれまでの研究で判明したので、クチナーゼによるポリエステルで生じる低分子基質を Ca119 が分解処理していると結論づけた。また、Ca119 は農薬マラチオンの分解能力を有していることを見出したので、応用化のために、酵素の固定化を試み、最適条件を設定し、遊離酵素と比較して耐久性、繰り返し使用などに耐えることを確認した。また、酵素活性を利用して農産物中の残存マラチオンの簡易測定に利用できないかを検討した。

上記のように Ca119 の固定化が成功したので、本酵素の固定化に関して論文投稿の準備をすすめている。マラチオン検出への応用は既存の方法と比べて感度は劣るが、測定が容易であることから、さらに検討を進めて、有効性を実証したいと考えている。

2) ①レバナーゼに於ける加水分解生成物のサイズに関与するアミノ酸残基の同定、②*Bacillus licheniformis* 様細菌の 23-37DP 長環状 1, 4 グルカン合成新規酵素の精製、③ *Bacillus paralicheniformis* の大環状 CD 産生酵素の解析、④担子菌由来遺伝子組換え N-型糖鎖遊離酵素の応用開発

・ *B. amyloliquefaciens* 由来のエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子をクローニングし、予想される長さの遺伝子を発現用ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換し遺伝子発現系を構築した。

・ *Bacillus licheniformis* の大環状シクロデキストリン (CD) 合成酵素遺伝子データベースをもとに、同酵素遺伝子をクローニングし、これを発現系ベクターへの挿入・大腸菌形質転換を行い、遺伝子発現系を構築した。

・ *Bacillus paralicheniformis* の培養液を、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分画し、デンプン分解活性と大環状 CD 合成活性画分を調べた。また、デンプンを基質として各画分中酵素による反応生成物を HPAEC で分析した。

・ 担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を用いて、ヒト血清糖タンパク質に結合する N-型糖鎖の遊離を行い、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を解析した。また、糖タンパク質糖鎖の転移作用を検証した。

・ *B. amyloliquefaciens* ゲノムからクローニングしたエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子を導入した発現用ベクターで形質転換した大腸菌で、これら酵素の遺伝子組換えを発現することができた。

・ *Bacillus licheniformis* のゲノム DNA からクローニングした大環状 CD 合成酵素の遺伝子を挿入した発現系ベクターで形質転換した大腸菌において、同酵素の遺伝子組換え発現体が発現することができた。

・ *Bacillus paralicheniformis* の培養液の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって、デンプン分解活性画分と大環状 CD の合成活性画分とに分離され、デンプン分解活性画分とは別の画分中の酵素が大環状 CD の合成に関与していることを明らかにすることができた。また、生成した大環状 CD は 50 グルコース単位以上のサイズであった。この画分中の酵素は、デンプンから大環状 CD を合成への利用が期待できる。

・ 担子菌由来エンド β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を、直接ヒト血清中に加えることによって血清糖タンパク質から N-型糖鎖を遊離することができた、また、用いた酵素の特異性に依存して、糖鎖遊離

| | |
|-----------------------|---|
| | <p>タンパク質が異なっていた。また、遊離した糖鎖を検出することで、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を明らかにすることができた。また、糖タンパク質糖鎖の転移反応生成物を検出することができた。</p> <p>3) 耐熱性酵母 <i>Candida easanensis</i> 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</p> <p>タイで単離した耐熱性酵母 <i>Candida easanensis</i> JK-8 株のゲノム解析を行い、β-グルコシダーゼ (BGL) の部分アミノ酸配列と相同のある領域を検索、候補遺伝子を PCR 増幅し、クローニングを試みた。また、本酵素の応用例として、ワインの香り成分であるモノテルペンアルコールを遊離する可能性が示されたことから、遺伝子組み換えを使用しない BGL 高生産変異株の取得も試みた。研究の結果、1278 bp からなる本酵素の ORF を予測するとともに、33 残基の分泌シグナル配列が予測された。成熟酵素の分子量は 45 kDa であり、精製酵素の SDS-PAGE の結果と一致した。続いて、予測した ORF を増幅するプライマーを設計し PCR を行い、電気泳動にて単一のバンドが確認できた。クローニング、異種タンパク質発現に向けて取り組んでいるところである。一方、紫外線変異により、BGL 高生産変異株も取得した。</p> <p>4) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用</p> <p>平成 30 年度は、マンガン (Mn) に対する耐性変異体獲得に向けてさらに強いストレス条件でスクリーニングを行った。その結果、数株の Mn に対する耐性変異株を単離できた。これらの Mn 耐性変異体に関して Mn 吸収調べたが、いずれの変異株も Mn 吸収を示さなかった。この結果から、耐熱性酵母の金属耐性機構は醸造酵母のそれとは異なる可能性が示唆された。</p> <p>醸造酵母では Mn の取り込みに関する遺伝子の情報が集まりつつあり、耐熱性酵母の遺伝子がそれらとは異なるとすれば、このような遺伝子を解析することによって耐熱性酵母特有のストレス応答遺伝子を見つけ出せる可能性を示したと考えている。</p> <p>5) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>耐熱性放線菌 46 株のうち計 19 株を 6 種類の培地を用いて 30°C 及び 45°C で培養し、それらの 1-BuOH 抽出物を、LCMS を用いて解析した。その結果、19 株中 16 株において HSM の生産が見られ、合計 157 個の HSM の検出に成功した。本研究では検出された複数の HSM について、各種クロマトグラフィーを行い精製し、NMR スペクトル解析などにより熱ショック代謝物の構造解析・同定を行った。</p> <p>これまでに耐熱性放線菌 46 株のうち計 19 株を 6 種類の培地を用いて 30°C 及び 45°C で培養し、代謝物を解析した。その結果、19 株中 16 株において合計 157 個の HSM が検出された。続いて、これらの HSM の単離精製・構造解析を行った。その結果、アングサイクリン系既知化合物 9 種を含む計 14 種類の HSM の同定に成功した。</p> |
| <p>全期間にわたる研究交流活動及</p> | <p>本研究課題の 5 年間の交流は、日本から 21 名 (合計 218 人日) を派遣し、タイ・ラオス・インドネシア・ベトナムから 60 名 (合計 1825 日) を受け</p> |

| | |
|-------------------|---|
| <p>び得られた成果の概要</p> | <p>入れ、活発な研究交流を行うことができた。また、以下に示すように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）とも、当初の目標を上回る研究成果をあげることができた。</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</p> <p>タイ・チュラロンコン大学農学部の Dr. Sehanat Prasongsuk の研究室は毎年、CCP 予算及びチュラロンコン大学から支援を受けたポスドク、さらにはドクターコースの学生も山口大学の我々の研究室に1か月から3ヵ月滞在して研究を続けてきた。黒色酵母からの酵素の単離及び、その性質把握はチュラロンコン大学で進められ、我々は、その遺伝子の単離、出芽酵母での遺伝子工学的発現による生産までを目標として進めてきた。5年間で、当初の予定通り、少なくともキシロシダーゼに関しては、酵母宿主での生産が可能となり、本来の酵母よりも2倍以上の生産ができるようになった。この方法を続けることで、様々な酵素の性質決定とその遺伝工学的生産が可能となり、バイオマスの有効利用に貢献できる成果となった。</p> <p>2) 有用なエタノール生産性酵母の探索とその解析</p> <p>高温発酵は、冷却コストの削減・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が、そのためには、高温での発酵能力が高く、熱を含むストレス耐性株の存在が不可欠である。</p> <p>本共同研究では生物多様性条約等の制約から、それぞれの国で耐熱性株の分離を進めてきた。タイで確立された耐熱性酵母の分離方法を用いてラオス・ベトナム・インドネシアから、それぞれ100~200株の酵母を分離し、同定をすすめるとともに、耐熱性やエタノール生産性の優れた株を選別した。さらに、それぞれの選抜株についてストレス耐性を強める育種を行い、耐熱性を含めて強靱性の増強した株を分離し、それぞれの国で使用できるデンプン系およびセルロース系のバイオマスをエタノールに変換できる優良株を得た。これらの共同研究成果を複数の論文として報告した。</p> <p>3) 熱帯地域由来微生物の有用酵素の探索と機能解析</p> <p>1) 東南アジア地域において伝統的なアルコール飲料の製造に利用されているスターターの微生物叢の網羅的な解析、(2) タイで分離されたりパーゼを産生する酵母の遺伝子クローニング、(3) ヤスデの生産する油脂成分解析について共同研究を行った。</p> <p>1) スターターの微生物叢を明らかにするとともに、各種糖源からのエタ</p> |
|-------------------|---|

ノール生産が可能な酵母や糸状菌を取得し、その代謝酵素を解析することで、バイオマスからのバイオエタノール生産のための新たな微生物生産法の開発が見込まれる。富山県立大学において、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 (*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Leuconostocaceae* 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 *Lactobacillus* 属が、5種類では *Lactococcus* 属が、8種類では *Pediococcus* 属が、7種類では *Leuconostoc* 属が優占していた。また真菌に関しては、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、1種に関して高いエタノール生産が確認され、他のものと比べて約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、他のものと比べて2~4倍ほど高い生育数が確認できた。また、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。

2) 平成29年11月2日~11月30日まで、タイ国 Prince of Songkla University の Apichat Upaichit 准教授が滞在し、「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。植物油脂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検討した。

3) タイで分離されたヤスデ *Orthomorpha communis* の生産する油脂成分を研究対象とし、ヤスデのヘキササン抽出物の GC/MS 分析により、含有する油脂の構造解析を実施した。本ヤスデの抽出物には 1-methoxy-*n*-hexadecane を始めとする脂肪族メチルエーテル類が著量含有していることを明らかにした。これらの脂肪族メチルエーテル類はヤスデの表皮において耐水性を保持する機能を付与するものと考えられる。

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

大阪府立大学と Srinakharinwirot Univ.間での5年間の若手研究者交流の詳細。

2014年度

| | |
|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Srinakharinwirot Univ.博士後期課程2名の受入 (9ヶ月、他経費による) <p>2016年度</p> <ul style="list-style-type: none"> • Srinakharinwirot Univ.博士後期課程1名の受入 (15ヶ月、他経費による) <p>2017年度</p> <ul style="list-style-type: none"> • 大阪府立大学大学院生の派遣 (1ヶ月、他経費による) <p>2018年度</p> <ul style="list-style-type: none"> • Srinakharinwirot Univ.博士前期課程1名の受入 (2ヶ月、他経費による) • 大阪府立大学大学院生1名の派遣 (1ヶ月、他経費による) • ポスドク及びSrinakharinwirot Univ.博士後期課程、各1名の受入(3ヶ月、他経費による) <p>5年間の研究成果概要</p> <p>タイで大量に発生するバイオマス資源であるココナッツコプラミールと稲ワラの有効利用を目的に、それらの分解酵素の研究を行った。前者の研究においては、耐熱性マンナーゼを <i>Bacillus</i> 属細菌より単離し、その諸性質を決定した。また、本遺伝子のクローニングと大量発現系を構築した。稲ワラ分解においてはエンド-キシラナーゼを既に保有していたため、完全分解に必要なアラビノフラノシダーゼとフェルラ酸エステラーゼに関して大量生産系を確立した。</p> <p>5) 有用な微生物および酵素のスクリーニングと解析</p> <p>タイ国の伝統的な発酵食品 (Kapi, Pla-som, Pla-jom 及び発酵タケノコ) から DNA を抽出して 16S メタゲノム解析による菌叢解析を行うと共に、乳酸菌を単離して食中毒原因菌に対する抗菌活性を調べた。16S メタゲノム解析の結果、Pla-som 等において、予想通り <i>Lactobacillus</i> 属細菌が優勢であった。Kapi より約 25 株、Pla-som より約 40 株、Pla-jom より約 70 株、発酵タケノコより 15 株の細菌を分離しており、うち約半数について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づき菌種同定を行い、多数の乳酸菌株を得ている。</p> <p>これら乳酸菌群の経口摂取時を想定して人工消化管液耐性を評価したところ、Pla-jom 由来の 4 株および発酵タケノコ由来の 4 株の乳酸菌について、高い酸耐性(pH 2.0)および胆汁耐性を示した。本乳酸菌群は、食品汚染原因と成り得る大腸菌・セレウス菌・黄色ブドウ球菌・<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 及び <i>Listeria innocua</i> に対して抗菌活性を示したほか、これら汚染細菌群に対する共凝集活性についても確認した。Pla-som 由来乳酸菌 21 株についても、大腸菌・セレウス菌・黄色ブドウ球菌及び枯草菌に対する抗菌活性を確認した。</p> <p>また、タイ国において単離されたエンドグルカナーゼ活性を有する細菌</p> |
|--|--|

を 16S rRNA 遺伝子解析により *Bacillus* 属細菌と同定し、当該菌よりエンドグルカナーゼ遺伝子の遺伝子クローニングを行うと共に、塩基配列を決定した。

6) ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)生産菌の単離と解析

ポリヒドロキシ酪酸(PHB, PHBV)は、生分解性プラスチックの原料として重要な物質である。本研究は、タイ土壤から耐熱性と高生産性を指標として、新規の高生産性菌のスクリーニングを目的として行った。

その結果、数種の耐熱性ポリヒドロキシ酪酸生産菌の取得に成功した。そのうちの 1 菌株については、静岡大学にてゲノム解析を行うことができた。

また、ポリヒドロキシ酪酸の生産条件を検討し、得られた産物について、静岡大学にて NMR、FTIR、GPC カラムクロマトグラフィーを用いて、その構造解析を試みた。HPLC 解析でピークが認められるものの、抽出産物の解析ができない結果となり、抽出法の改善が必要であるという結果となった。本研究では構造解析まで進めることができなかったが、今後も共同研究を継続し、本研究で取得した耐熱性細菌が生産するポリヒドロキシ酪酸の構造解析を行うことをタイ側研究者と話し合っている。

7) 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 (タイ・ソクラ王子大) を 3 回 (2015、2017、2018) および Dr. Chatchawan Jantasriyarat (タイ、カセサート大) を 1 回 (2018) 山口大に受け入れ、共同研究を実施した。日本側からは、伊藤がカセサート大を 2 回 (2015、2017)、佐々木が 1 回、それぞれ訪問してセミナーを行った。また、2016 年および 2018 年に、カセサート大修士課程院生を特別研究生としてそれぞれ 3 ヶ月間受け入れた。これらの交流を通じて得られた研究成果を国際誌に 5 報公表することができた。

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ピレスロイド等農薬分解への応用

カウンターパートである Dr. U. Thumarat (ソクラ王子大学) を 3 回受け入れ (2014-2016)、こちらもコンケーンの CCP meeting (2016) 及び 2018 年 9 月 (他経費) の 2 回、タイを訪問した。また、2017 年にはソクラ王子大学から修士課程院生を特別研究生として 3 ヶ月間受け入れた (ソクラ王子大学経費)。これらの交流を通じて国際誌に 2 報掲載し、さらに 1 報を投稿準備中である。カウンターパートを日本生物工学会の DaSilva Award

に推薦し、受賞させるに至ったことも成果として挙げられる (2015)。

2) ①レバナーゼに於ける加水分解生成物のサイズに関与するアミノ酸残基の同定、②*Bacillus licheniformis* 様細菌の 23-37DP 長環状 1, 4 グルカン合成新規酵素の精製、③ *Bacillus paralicheniformis* の大環状 CD 産生酵素の解析、④担子菌由来遺伝子組換え N-型糖鎖遊離酵素の応用開発

2014 年度(平成 26 年度)

Corynebacterium glutamicum 由来のアミロマルターゼ遺伝子への変異導入により、様々な変異酵素遺伝子を取得した。また、発現した変異酵素を精製した。あわせて、プルラナーゼのスクリーニングと同酵素遺伝子のクローニングを実施した。また、*Fusarium* sp. F59 から 2 種のグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングするとともに BCG を脱色するオリゴ糖を産生する土壌細菌が、*Bacillus licheniformis* であると同定し、生成するオリゴ糖は、重合度が 20 以下であることを明らかにした。さらに、*Bacillus amyloliquefacience* のレバンスクララーゼ遺伝子の大腸菌での機能的発現条件を検討し、その発現に成功した。また、組換え発現酵素を利用して、様々な化合物へのフルクトース転移を調べ、生成したフルクトオリゴ糖の構造解析を行った。これまでに得られた微生物の産生する酵素の発現系の構築により、発現酵素の安定供給が可能となる。また、酵素の特異性の改変や転移反応生成物の解析から、様々な機能性のオリゴ糖や配糖体の酵素合成とその生産が可能となる。そして、酵素合成オリゴ糖の食品などの分野などへの利用が期待できる。

2015 年度(平成 27 年度)

明治大学に於いて、チュラロンコン大学学生の短期留学 (3 ヶ月) を受け入れた。

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

2016年度(平成28年度)

反応液中のアントシアニン濃度、CGTase 活性、マルトシルβ-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、α-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。

2017年度(平成29年度)

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。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ーに供し、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°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遊離を遊離し、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。

2018年度(平成30年度)

B.amyloliquefaciens ゲノムからクローニングしたエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子を導入した発現用ベクターで形質転換した大腸菌で、これら酵素の遺伝子組換え体を発現することができた。

また、*Bacillus licheniformis* のゲノム DNA からクローニングした大環状 CD 合成酵素の遺伝子を挿入した発現系ベクターで形質転換した大腸菌において、同酵素の遺伝子組換え発現体を発現することができた。*Bacillus paralicheniformis* の培養液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって、デンプン分解活性画分と大環状 CD の合成活性画分とに分離され、デンプン分解活性画分とは別の画分中の酵素が大環状 CD の合成に関与していることを明らかにすることができた。また、生成した大環状 CD は 50 グルコース単位以上のサイズであった。この画分中の酵素は、デンプンから大環状 CD を合成への利用が期待できる。担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を、直接ヒト血清中に加えことによって血清糖タンパク質から N-型糖鎖を遊離することができた。また、用いた酵素の特異性に依存して、糖鎖遊離タンパク質が異なっていた。さらに、遊離した糖鎖を検出することで、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を明らかにすることができた。また、糖タンパク質糖鎖の転移反応生成物を検出することができた。

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

タイで単離した耐熱性酵母 *Candida easanensis* JK-8 株を用いて β -グルコシダーゼ (BGL) 生産する条件を検討し、セロビオースを炭素源として培養した際に、培養液中の BGL 活性が高いことが明らかとなった。そこで、その培養液からイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーを用いて、SDS-PAGE にて単一バンドになるまで精製し、その酵素特性を評価した。その結果、精製酵素は、セロビオースなどの β -1,4 結合の加水分解を触媒するとともに、 β -1,3 結合を有するラミナリンに対して強い活性を示した。また本酵素は、反応産物であるグルコースによる阻害効果に対する耐性を示した。さらに、本酵素の pH プロフィールや温度プロフィール、アルコール耐性についても明らかにし、査読付き論文として発表した。本酵素の応用例として、ブドウに含まれるモノテルペンアルコール配糖体からモノテルペンアルコールを遊離することが可能であり、ワインの香りを高める可能性を示し、査読付き論文として発表した。さらなる酵素生産に向けた取り組みとして、JK-8 株の紫外線変異により、BGL 高生産変異株の取得も行った。さらに、JK-8 株のゲノム解析と精製酵素のアミノ酸配列

| | |
|--|---|
| | <p>解析結果から、本酵素の ORF を予測した。</p> <p>4) 金属高吸収性を示す耐熱性酵母の解析とその応用</p> <p>2014 年度から 2018 年度の 5 年間で、前半は耐熱性酵母のストレス応答機構を放射線照射法によって解析した。その結果、醸造酵母とは異なるストレス応答系の可能性を示した。また後半では、耐熱性酵母のバイオリメディエーションへの利用を目的として、マンガン吸収変異株のスクリーニングを試みた。残念ながら目的の変異株は得られなかったが、金属に対するストレス応答系も、耐熱性酵母では醸造酵母とは異なることが示唆された。これらの事から耐熱性酵母には独特のストレス応答系が存在することを予測できるようになった。</p> <p>5) 微生物の生産する生理活性物質の探索</p> <p>放線菌ライブラリー3040 株より、30°C 及び 45°C で生育することができる放線菌を探索した結果、全体の 1.6%にあたる 46 株が耐熱性放線菌であることを見出した。これらの放線菌は 45°C 培養選択的に代謝物が複数存在することを見出し、このような代謝産物を熱ショック代謝物(Heat Shock Metabolites(HSM))と命名した。これまでに合計 157 個の HSM が検出された。HSM の一部は耐熱性放線菌の 45°C での生育を濃度依存的に促進した。そのため、熱ショック代謝物は耐熱化に関与していることが示唆された。また、放線菌における熱ショック代謝物の生合成に着目した結果、HSM の多くは解糖系もしくは脂肪酸合成経路の中間体を起点として生合成されていることがわかった。このことから、高温培養によって解糖系・脂肪酸合成経路が活性化したこと、もしくはそれに付随した二次代謝物生合成遺伝子が活性化したことが示唆された。</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 |
|---------------------|--|--------|----------|--------|----------|
| 共同研究課題名 | (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・職名 | (和文) 薬師寿治・山口大学創成科学研究科・教授・1-17 (英文) Toshiharu YAKUSHI・Yamaguchi University・Professor・1-17 | | | | |
| 相手国側代表者 氏名・所属・職名 | (英文) Pornthap THANONKEO・Khon Kaen University・Associate Professor・2-47 Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor・3-1 Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor・4-1 Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Professor・5-1 Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate | | | | |

| | Professor・6-1 |
|--------------------------------------|---|
| <p>30年度の研究 交流活動及び得 られた成果</p> | <p>タイ・ラオス・インドネシア・ベトナムと、ストレス耐性に関して解析を進めた。特に耐熱性酵母を対象にして、1) 高温培養開始直後の代謝切替えについて溶存酸素の測定、ミトコンドリアの形態観察、代謝物解析、RNA-Seq による転写解析などを行った。また、2) 培養後半の酢酸蓄積とその影響について ROS 蓄積およびコロニー形成数等を調べた。さらに、3) グルコース抑制機構について他の酵母菌と分子生物学的に比較した。</p> <p>タイと <i>Zymomonas</i> 属細菌由来の耐熱化した変異株の耐熱化機構を明らかとするため、これまでに得られた様々な発酵性細菌の耐熱化株の変異を比較解析し、耐熱化と変異の関係性を解析した。また、細胞の耐熱性を比較する方法を、コロニー形成数や細胞の状態を可視化できる蛍光試薬による結果と比較した。一方、耐熱化株で得られた変異を組み合わせることにより <i>Zymomonas</i> 属細菌のさらなる耐熱化を試みるとともに、変異株の熱以外のストレスに対する耐性を解析した。</p> <p>タイとタンパク質の耐熱性を支配するしくみを明らかにする目的で、細胞周期を制御する必須遺伝子である CDC28 に変異を導入し、変異を持つ CDC28 タンパク質の耐熱性変化を観察することにした。必須遺伝子などの遺伝子への変異は、遺伝子発現量変化を引き起こさないように、染色体上に導入する必要があるため、染色体上の遺伝子への部位特異的な変異を導入する方法を開発した。この方法で、CDC28 の変異株を各種作製できた。</p> <p>ベトナムおよびラオスと、それぞれの国で分離された酢酸菌の系統解析及び生理学的解析を昨年に続き進め、複数の高温酢酸生成菌とセルロース生産株を取得した。タイと耐熱性酢酸菌の耐熱化株から低栄養育種した株、さらに企業モデル株を耐熱化育種して得られた株の発酵能を実用的ファメンター（アセテーター）によるもろみ培地で調べた。タイと耐熱性酢酸菌の耐熱化株、さらに低栄養育種した菌株の耐熱性もしくは低栄養生育メカニズムの解析を行った。</p> <p>タイと、タイで分離されたコリネ型細菌を用いて様々な温度でのグルタミン酸発酵能を調べた。耐熱性コリネ型細菌 N24 の性質を解析し、新種を提唱した。</p> <p>以下に挙げた国々の研究者と、高温域での生育や発酵、ストレス耐性に関わる因子についてゲノムワイドに解析し、耐熱性や耐熱化の仕組みを理解する試みを行った。国内企業との共同研究も進め、本事業で育種した菌株の実用化に向けた検証を行った。</p> <p>共同研究にかかる国内の協力機関および相手国との進捗状況の確認・共有の方法や頻度等について、以下に示すように派遣や受入によって直接行</p> |

| | |
|---------------------------------|--|
| | <p>うか、電子メールによって頻繁に行った。</p> <p>派遣：タイ（3人・9日人）</p> <p>受入：タイ（2人・65日人）、ベトナム（2人・58日人）、インドネシア（1人・33日人）、ドイツ（1人・28日人）</p> |
| <p>全期間にわたる研究交流活動及び得られた成果の概要</p> | <p>タイ、ラオス、インドネシア、ベトナムで高温発酵に適した優良株を獲得するために、それぞれの国と共同で多くの酵母を分離・解析をすすめた。タイの共同研究者によって分離された耐熱性酵母のゲノム解析および転写結果を報告した。また、タイとストレス耐性に関して解析を行った。インドネシアとグルコース抑制機構について、分子生物学的に解析した。</p> <p>タイと、<i>Zymomonas</i> 属細菌から獲得した耐熱化株の生理学的な解析およびその変異と耐熱化の関係性、そして <i>Zymomonas</i> 属細菌の耐熱性の比較方法の検討などを行った。</p> <p>タイと、タンパク質の耐熱性を支配する機構を調べた。必須遺伝子へ点変異を与える実験系を作製した。</p> <p>タイの研究者を受け入れ、耐熱性に関わる Zn-プロテアーゼについて解析を進めた。また、新たにタイから高い耐熱性を持つ酢酸菌を単離し、耐熱性・生産性・その細胞表面の多糖の構造を調べた。</p> <p>ベトナムおよびラオスと、複数の高温酢酸生成菌とセルロース生産株を取得した。タイと、耐熱性酢酸菌の耐熱化株を基に育種されたエタノール（酢酸）耐性株から育種した株の発酵能を調べ、ゲノム解析に基づく遺伝子機能の解析を行った。Komagataeibacter 属酢酸菌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のゲノム解析を行った。上述した育種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た。</p> <p>タイとの共同研究で、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や高濃度 K⁺の添加の有効性を調べた。新規な耐熱性グルタミン酸生産菌をタイより分離し解析した。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をタイと共同で調べた。</p> <p>以下に挙げた国々の研究者と高温域での生育や発酵に適した優良株を獲得、育種を行った。それらの耐熱性や耐熱化の仕組みをゲノムワイドに解析した。</p> <p>相手国との進捗状況の確認・共有の方法や頻度等については、以下に示すように派遣や受入によって直接行うか、電子メールによって頻繁に行った。</p> <p>派遣：タイ（10人・49日人）、ドイツ（1人・4日人）、イギリス（1人・</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>28 日人)</p> <p>受入：タイ (15 人・482 日人)、ベトナム (10 人・306 日人)、ラオス (3 人・83 日人)、インドネシア (3 人・77 日人)、ドイツ (2 人・36 日人)、イギリス (1 人・17 日人)</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 |
|------------------------------|---|--------|----------|--------|----------|
| 共同研究課題名 | <p>(和文) 熱帯性生態系を維持する環境微生物に関する研究</p> <p>(英文) Research on Environmental Microbes Sustaining Tropical Ecosystem</p> | | | | |
| 日本側代表者 氏名・所属・職名 | <p>(和文) 前田健・山口大学共同獣医学部・教授・1-4</p> <p>(英文) Ken Maeda・Yamaguchi University・Professor・1-4</p> | | | | |
| 相手国側代表者 氏名・所属・職名 | <p>(英文)</p> <p>Sunee NITISINPRASERT・Kasetsart University・Associate Professor・2-20</p> <p>Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor・4-1</p> <p>Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Professor・5-1</p> <p>Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor・6-1</p> | | | | |
| 30 年度の研究 交流活動及び得 られた成果 | <p>最終年度は、熱帯生態系を維持する環境微生物に関する 11 の課題について研究を実施した。本研究課題における今年度の交流は、タイ、ベトナムから 7 名 (合計 57 日) を受け入れ、一方、日本からはタイへ 1 名 (6 日間) 派遣した。別途、研究の進捗状況については、各小課題を実施する共同研究者間において電子メール等により随時行われ、その情報が共有された。</p> <p>1. 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</p> <p>研究室の学部 4 年生 1 名を相手大学 (カセサート大学) へ短期で派遣 (他経費) し、タイ産の培養ケイ藻類から脂質を抽出して脂肪酸組成を分析する実験の習得を行なった。また、藻類の多糖の抽出および構造に関する解析法を学んだ。</p> <p>タイ産の培養ケイ藻類において付加価値の高い脂肪酸類の存在を見出し、大量培養法が確立できれば、藻類を用いた生産技術への可能性が示唆され、価値ある知見を得た。</p> <p>2. アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓</p> <p>バンコク市で採取した好熱性放線菌株から二種類の新規芳香族ポリケチドと一種類の新規ノルジテルペノイドを単離、構造決定した。</p> <p>春成はラヨーン県沿岸海域において採集したサンゴ 20 種を用いて、共生</p> | | | | |

する希少放線菌の分離をバンコク市のラムカムヘン大学にて行った(他経費)。奥は第 5 回サテライトセミナーにて、タイ北部で食されるラン藻 *Nostochopsis lobatus* から得られた新規抗菌性物質の構造について報告し、ラオス側出席者と本藻の利用について情報交換した。

好熱性放線菌による有用物質生産について十分な知見がなかったが、今回の新規化合物発見を通じて、その有用性を明らかにすることができた。

タイ沿岸域のサンゴ共生放線菌に関する知見はこれまで全くないことから、新たな薬物探索資源としての新種放線菌の分離が期待される。また、これまで *N. lobatus* の食利用はタイとインドからの報告に限られていたが、サテライトセミナー出席者より、ラオスにおいても同藻が食されるとの証言があり、ラン藻食の地理的分布を考察する上で重要な新知見を得た。

3. 生態系/環境修復のための有害物質バイオレメディエーションおよび細菌-植物相互作用に関与する微生物機構の研究

植物成長促進細菌である *Pseudomonas protegens* CHA0 のアミノ酸走化性の分子生物学的解析を行い、4 つのセンサーを特定するとともに、それぞれのセンサーのリガンド特異性、転写発現パターンを明らかにすることに成功した。*Pseudomonas* 属細菌の根圏定着にはアミノ酸走化性が関与していることが示唆されているので、*P. fluorescens* MC46 株を用いたファイトレメディエーション執行に貢献する情報が得られたといえる。

4. 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、加藤が私費で 7 月に訪タイしてサンプリングを行った。当初の予定では、タイ東部と北部でのサンプリングを計画していたが、豪雨のため道路が通行止めになり、急遽行き先を変更して、タイ東部タイ湾近辺【トラート県】およびタイ南部タイ湾近辺【ナコーンシータンマラート県、スラートターニー県】の滝付近や熱帯雨林の植物体をサンプリングした。植物体をカセサート大にて後処理し、単離した耐熱性緑藻株を持ち帰り、培養後、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ている。

タイ東部、南部の植物体サンプルより耐熱性緑藻株を約 300 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。今後も目的の耐熱性株を単離すべく検討を重ねる。

5. 植物共生 *Methylobacterium* 属細菌の走化性と運動性

メタノール走化性は植物・微生物の共生成立に関わっていると考えられ、研究を展開したいと考えている。

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。また、それらの細胞内局在や認識するリガンド濃度の違いなどの性質を明らかにした。さらに、ホルムアルデヒド走化性に関わる MCP も 2 つ見いだした。

6. 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

昨年度までの研究で、地方都市ブリラムの小学児童がバンコクに比べて有意に便中の酪酸とプロピオン酸濃度が高いことが示された。そこで続いて、中山は、両都市の子どもの糞便 16S rRNA 遺伝子データを基に仮想メタゲノム解析 (PICRUSt) を行った。Nakphaichit は、自身で発酵魚より分離した *Lactococcus lactis* KA-FF 1-4 株のプロバイオティクス能をインビトロ腸内細菌叢培養モデルにより検証した。

上記仮想メタゲノム解析 (PICRUSt) から、大変興味深いことに、ブリラムの子ともでは、ピルビン酸からの酪酸生合成系に加えて、グルタミン酸から酪酸の生合成酵素遺伝子が多く存在することが示唆された。つまり、ブリラムの子どもの腸内フローラは糖質からの短鎖脂肪酸生合成に加えてアミノ酸から短鎖脂肪酸を合成する系を利用している可能性が示唆された。Nakphaichit は、*L. lactis* KA-FF 1-4 株がマルトデキストリンとの相乗的作用によりバンコマイシン耐性腸球菌の増殖を抑制する効果があることを示した。

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

これまでの研究で単離してきたパラコート分解性糸状菌を用いて、液体培地などの測定系ではなく、現地での環境で使用可能な新しい肥料の開発を目指して、土壌中のパラコートの分解能の測定を行った。ゴム園から単離した土壌をオートクレーブにて滅菌しパラコートを添加後、前培養した菌体を摂取した。しかし、パラコートの多くは土壌に吸着しているとみられ、抽出後の測定では、未植菌のコントロールと菌体処理を行った土壌の間で有為差は見られなかった。また、*Cunninghamella* sp. PFCM-1 株について種の正確な同定を目指して、分子生物学的な観点から、ITS および L

S U 領域の塩基配列解析を行って新種であることを明らかにし、*Cunninghamella thailandensis* と命名した。

ファイナルジョイントセミナーに参加し、これまでの共同研究の成果について総括する口頭発表を行う共に、共同研究のさらなる展開に向けてディスカッションを行った結果、これまでの研究成果を2報の論文にまとめて投稿すること、今後も続けて、パラコート生分解メカニズムの解明と、実用的なバイオレメディエーション基材の開発を共同で進めて行くことを確認した。

8. アジアにおける感染症の疫学的解析

1) タイで狂犬病ウイルス、節足動物媒介感染症ウイルス、E 型肝炎ウイルスに関する疫学調査を実施した。2) インドネシアで、コウモリにおける感染症、霊長類における感染症、イノシシ・ブタ・イヌにおける感染症の調査を実施した。3) フィリピンで、家畜における感染症の調査を実施した。4) 日本で、狂犬病ウイルスを含む各種リッサウイルス、各種フレボウイルス、各種フラビウイルス、各種フィロウイルスの疫学調査のための調査系を確立した。

1) タイ国内におけるイヌの狂犬病ウイルスに対する抗体保有状況を明らかにし、狂犬病対策後の抗体保有状況の解析のための基礎を把握した。2) 各国の豚とイノシシにおける E 型肝炎の感染状況を明らかにし、タイではウイルスの検出に成功した。3) 各国における日本脳炎ウイルスの感染状況を明らかにし、すべての国から日本脳炎ウイルスの分離に成功した。4) 各種人獣共通感染症の疫学調査のための基礎を確立した。

9. 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明

Lumyong 教授が 2018 年 12 月 5 日～11 日まで山口大学に滞在（他経費）し、新規植物内生菌由来赤色素の構造決定に関する研究計画について松井と討議した。その上で 2018 年 11 月 1 日～2019 年 1 月 7 日まで Lumyong 教授の研究費により博士研究員の Suwannarach が山口大学に滞在し、策定した研究計画に則って研究を進めた。

rDNA 配列解析により単離菌を *Nigrospora aurantiaca* と同定し、国立医薬品食品衛生研究所杉本直樹室長、西崎雄三研究員との共同研究による精細 MS 解析、NMR 解析によりその構造後 bostorycin と同定した。これとは別にメラニン色素生成菌を同定し、生成されたメラニンを生成し、FT-IR、ESR により構造を推定した。

10. 亜熱帯の生態系保持に関わる淡水プランクトンの研究

| | |
|---------------------------------|---|
| | <p>ボルボックス類の DNA バーコードを構築するために、日本、タイから採種された複数のボルボックスについて、葉緑体ゲノム上のマーカー遺伝子 <i>rbcL</i> (ルビスコ大サブユニット) について配列決定を行った。そして、その一部について分子系統解析を行った。</p> <p>予備調査でも示唆されていたが、日本とタイからそれぞれ採種されたボルボックスの葉緑体ゲノムにコードされている <i>rbcL</i> 遺伝子の配列より、亜熱帯地域のタイで採取されたボルボックスは、日本のボルボックスと進化的に異なるユニークな種であることが明らかとなった</p> <p>1 1. 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</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。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、日本では葉面微生物によるパントテン酸およびその前駆体化合物の葉面における利用性の解析と、葉面での棲息に重要なストレス応答制御因子の機能解析を行った。タイでは葉面微生物による安価なインドール酢酸 (IAA) 生産のための培養条件を検討した。また、日本ではメタノール資化性酵母におけるメタノール誘導性遺伝子発現に関与する転写制御機構の解析を行った。</p> <p>タイ側で分離した酵母株を <i>Papiliotrema</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 の安価な培養生産法を確立した。一方日本側では、メタノール資化性 <i>Methylobacterium</i> 細菌の生育に必要なパントテン酸およびその合成前駆体化合物が、実際に植物葉面に存在することを明らかにした。また、本属細菌の葉面定着に関わる概日性遺伝子ホモログ <i>KaiC</i> が、リン酸化や発現量が生育温度により調節され、UV に対する環境適応を制御していることを明らかにした。また、酵母メタノール誘導性遺伝子のエタノールによる発現抑制機構を明らかにした。</p> |
| <p>全期間にわたる研究交流活動及び得られた成果の概要</p> | <p>1. 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</p> <p>相手側のタイ (カセサート大学) から講師 1 名および大学院修士学生 1 名を受け入れ (他経費)、タイ産の藻類の多糖の抽出・精製およびその構造解析 (IR, NMR) を行なった。また、藻類の脂質を抽出し、その脂肪酸組成を機器分析 (GC-MS) により同定した。また、相手側へは学部 4 年生 2 名を派遣 (他経費) し、藻類に関する同様な成分分析ならびに構造解析に関する手法を習得した。</p> |

2. アジア熱帯地域からの薬物探索資源微生物の開拓

タイ王国各地で分離された放線菌を対象として、新規生理活性物質の探索研究を行った。カセサート大学との共同研究では、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 からはポリエーテル系の新規化合物を単離、構造決定した。本化合物は黄色ブドウ球菌などの病原細菌に対する極めて強力な抗菌活性、血管新生の抑制、オートファジーの促進など興味深い活性を示した。また、タイの高温環境に着目し、好熱性放線菌の分離と有用物質スクリーニングを行い、40°Cを至適生育温度とするタイ薬草由来 *Microbispora* 属放線菌からは3種類の新規ポリケチド系化合物を発見し、それらが抗糖尿病活性、抗癌活性を示すことを明らかにした。加えて、マヒドン大学との共同研究では、ハーブの根圏土壌から分離した未同定放線菌は 50°Cを至適生育温度とし、その培養液から2種類の新規芳香族ポリケチドと1種類の新規テルペン化合物を見出し、それらが白血病細胞への殺細胞活性を呈することを見出した。

この間、さらに有用物質生産微生物を開拓する目的で、ラムカムヘン大学と共同でラヨーン県沿岸海域においてイシサンゴを採集し、共生希少放線菌の分離を実施した。タイ沿岸域のサンゴ共生放線菌に関する知見はこれまで全くないことから、新たな薬物探索資源としての新種放線菌の分離が期待される。

また、タイ北部で食されるラン藻 *Nostochopsis lobatus* には新規抗菌性物質が含有されることを明らかにすると共に、ラオスにおいても同系統の藻類が食されている情報を得ることができ、今後の研究対象として興味を持たれる。

3. 生態系/環境修復のための有害物質バイオレメディエーションおよび細菌-植物相互作用に関する微生物機構の研究

本共同研究では、①環境浄化細菌を積極的に環境汚染物質に集積させ効率的にバイオレメディエーションを行う（細菌の探索機能を活用する能動的バイオレメディエーション）、②環境浄化細菌を植物の根圏に定着させ、植物が供給する栄養物をエネルギー源として環境浄化をはかる（複合ファイトレメディエーション）、2つのタイプのバイオレメディエーションの実現に資する基盤的な走化性研究を行った。タイ側および日本側の代表者が互いに研究室を訪問して研究討論を重ね、①および②の課題の研究を進めた。

①の成果（タイ側が担当）根圏土壌を分離源として植物成長促進能を有するとともに除草剤の土壌残留物質クロロアニリン分解能も有する *Pseudomonas fluorescens* MC46 株の分離に成功した。MC46 株の走化性測定

を行った結果、この菌はクロロアニリンに正の走化性を示すことが分かった。現在、クロロアニリン走化性センサーの探索を行っているところである。このスクリーニングでは、アルカンを資化・分解する *Pseudomonas* 属細菌も分離した。この菌は種々の鎖長のアルカンに対し走化性応答を示した。遺伝学的解析から2つの走化性センサーがアルカンを感知していることが判明した。面白いことに、一方は短鎖のアルカン、もう一方は相対的に長鎖のアルカンを感知していることが分かった。

②の成果（日本側が担当）植物成長促進細菌 (*Pseudomonas protegens* CHA0) と植物病原菌 (*Ralstonia solanacearum*) を用いて土壌細菌の植物根圏ターゲットングに關与する走化性について研究した。*R. solanacearum* では6つの走化性センサーのリガンドを明らかにした。それら遺伝子の破壊株を用い、植物感染をエンドポイントとして植物根圏ターゲットングへの關与を評価した結果、L-リンゴ酸に対する走化性がそれに関与していることを発見した。*P. protegens* に近縁な *P. fluorescens* Pf0-1 を用いた研究から、*Pseudomonas* 属細菌ではアミノ酸走化性が植物根圏のターゲットングに寄与していることが分かっている。そこで、*P. protegens* CHA0 のアミノ酸走化性を遺伝学的に解析した結果、4つの走化性センサーがアミノ酸を感知していることが分かった。それぞれのリガンドを調べたところ、2つのセンサーは限定された(2~4アミノ酸)アミノ酸を感知し、他の2センサーは広範なアミノ酸(7~20アミノ酸)を感知することが分かった。CHA0株でこれらセンサーを過剰発現させるとアミノ酸走化性が強化されることから、このような操作で根圏定着能の効率化を果たせる可能性が示唆できた。

4. 耐熱性緑藻による機能性脂質生産

1) エイコサペンタエン酸 (EPA) の生産

EPA 蓄積株としてタイ国の海水から単離された耐熱性微細藻類 *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。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。

2) アラキドン酸 (ARA) の生産

ARA 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東部タイ湾近辺【トラート県】およびタイ南部タイ湾近辺【ナコーンシータンマラート県、スラートターニー県】タイ南部アダマン海近

辺【スラータニー県、クラビー県、バンガー県、ラノーン県、チュムポン県】の熱帯雨林の湖沼水、植物体からサンプリングを行い、耐熱性緑藻株を約 500 株単離した。得られた緑藻株を Chonudomkul 講師が来学時に持参、もしくは加藤が持ち帰り、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。今後さらにタイ国の環境中から広くスクリーニングすることで目的株を取得すべく鋭意努力してゆく予定である。

5. 植物共生 *Methylobacterium* 属細菌の走化性と運動性

引き続きカウンターパートを探しており、本プロジェクトに参加できるカウンターパートを見つけたい。走化性の研究では、メタノールとホルムアルデヒドへの走化性に関わる MCP を同定できたことは学術的に評価できる。リガンドの特定などが出来ればインパクトの高い研究に昇華できる。

6. 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

九州大学とカセサート大学間の 5 年間におよぶ有機的な交流により、中山らの専門であるヒト腸内フローラの構造と機能解析の技術を活かして、タイ人の腸内フローラの実態調査を進めることができた。また Nakphaichit らは、これまでの交流事業での経験をさらに生かして、タイのバイオリソースによりタイ人の食と健康を支えるプロバイオティクスとしての利用が期待される乳酸菌の分離に成功した。中山は、タイ人の腸内細菌叢を知るために、伝統食習慣を維持する地方都市ブリラムの子ともバンコクの子どもの糞便細菌叢と代謝物を比較解析した。その結果、細菌叢には大きな差はなかったが、宿主恒常性維持に重要な働きを有するとされている短鎖脂肪酸量に大きな差が見られた。同時に行った食事調査の結果も含めると、タイの大都市では食の現代化が進み、その影響から腸内フローラの機能が偏倚してきていると考えられる。Nakphaichit らは *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 や *L. lactis* KA-FF 1-4 などの病原菌に対して強い効果を示す乳酸菌株やコレステロール資化能を示す *Lactobacillus pentosus* HM04-3 等を取得した。これらはヒトや畜産分野のプロバイオティクスとしての利用が期待される。

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

て

今日タイ北部においては、ゴムの樹は経済的に重要な栽培植物となっており、2005年以降の政府による奨励もあり、その栽培面積は増え続けてきた。しかしながら、気候や地理的環境、栽培技術、病気の管理という点において適している南部若しくは東部タイに比べて、独特の特徴を有している北部地方においては、今後研究し解明していくべき多くの課題が存在している。我々はまた、この地方において収量を上げるためには、除草剤や肥料、植物ホルモンといった化学薬品の使用が不可避であることも明らかにしてきた。この地方では グラモキソン（一般名：パラコート、1,1-dimethyl-4,4-dipyridinium）が広く用いられてきた。パラコートは100日程度にも及ぶ長い半減期を持ち、土壌の微生物相と酵素スペクトラムに悪影響を与える結果、土壌の肥沃度を下げる。本研究では、タイ北部圃場からパラコート分解性微生物の単離を行い、汚染環境の修復に向けた実用的な技術開発に繋げることを目的とした。

タイ北部のパラコートを使用している複数のゴム園から土壌をサンプリングし、微生物の単離を行った。これらの中で、パラコート分解能を持つ菌について1次スクリーニング、2次スクリーニングを行い、最終的に10種の細菌、9種の糸状菌を単離した。これらについて、バクテリアについては16S rDNA、糸状菌についてはITS配列の塩基配列決定を行い、種の同定を行った。また、予備的なパラコート分解能の測定により高い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。*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、*Cunninghamella thailandensis* と命名した。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ことが期待され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。

8. アジアにおける感染症の疫学的解析

1) アジアにおける日本脳炎ウイルスの蔓延状況を明らかにした。2) インドネシアの蚊からの各種ウイルス分離に成功した。3) アジアにおける Getah ウイルスの蔓延状況を明らかにした。4) マダニから Muko ウイルスの分離に成功した。5) 死亡したタヌキの脳から Tarumizu ウイルスの分離

に成功した。6) 渡り鳥に咬着したマダニから **Kemerovo** ウイルスの分離に成功した。7) 渡り鳥を吸血しているマダニから未知のウイルスの分離に成功した。8) 和歌山県の植生マダニからダニ媒介性フレボウイルス、**Yamaguchi** ウイルス、**Nishimuro** ラブドウイルス、**Oz** ウイルス、**Kabuto Mountain** ウイルスが検出された。9) 山口県の植生マダニからダニ媒介性フレボウイルス、**SFTS** ウイルス、**Yamaguchi** ウイルスが検出された。10) 隠岐の島の植生マダニからダニ媒介フレボウイルスが検出された。11) 鳥吸血マダニからダニ媒介フレボウイルスがシェルチェマダニ 2 プールから検出された。12) 各種ダニ媒介フレボウイルスの遺伝子解析を行った結果、北海道の鳥吸血マダニからは **Mukawa** ウイルス、山口県の植生マダニからは **Khasan** ウイルスと **Okutama** ダニウイルス、和歌山の植生マダニからは **Okutama** ウイルスと **Dabieshan** ダニウイルス、隠岐の島の植生マダニからは **Dabieshan** ダニウイルスが検出された。更に、山口と和歌山からは新規のフレボウイルスが検出された。13) 新規ダニ媒介フラビウイルス **Yamaguchi** ウイルスの感染環を解明した。14) 新規ラブドウイルス **Nishimuro** ラブドウイルスの感染環を解明した。15) 新規トーゴトウイルス **OZ** ウイルスの感染環を解明した。16) ユビナガコウモリ由来 **Heramatsu** ウイルスの分離と感染環の解明に向けた研究を実施中である。17) インドネシアとタイでのマダニより **Langat** ウイルスの検出に成功した。18) 新規トーゴトウイルス **Kamigamo** ウイルスの感染環を解明した。19) タイにおけるフラビウイルス感染の疫学調査を実施した。20) インドネシアのヒトにおけるアルボウイルスに対する抗体保有状況を調査した。21) インドネシアのオラウータンにおけるアルボウイルスに対する抗体保有状況を調査した。22) インドネシアの **JEV** ウイルスと **Getah** ウイルスの感染状況を調査した。23) フィリピンの動物におけるフラビウイルスの感染状況を調査した。24) インドネシアの爬虫類を吸血するマダニにおけるダニ媒介細菌を検出した。25) インドネシアのイノシシを吸血するマダニにおけるダニ媒介細菌を検出した。26) タイ・インドネシア・フィリピン・ベトナムにてイエコ属 8 種 14838 匹、ヤブカ属 5 種 3343 匹、ハマダラカ属 4 種 1359 匹、その他 8 種 1559 匹の捕集に成功した。27) 蚊のゲノムに内在する内在性フラビウイルス遺伝子の解析を行った。28) 蚊の細胞の樹立とそれを用いたウイルス増殖性の解析を行った。29) 各種フラビウイルスの血清疫学調査のためのウイルス様粒子の発現を行った。30) 各種ダニ媒介性フレボウイルスの血清疫学調査のためのウイルス蛋白の発現を行った。

9. 熱帯性植物と内生菌との化学的相互作用の解明

本事業でサポート頂いたのは **Lumyong** 教授の比較的短期の山口大学滞

在だけであったが、Lumyong 教授の強力なリーダーシップのもと、Lumyong 教授所属の博士研究員、博士課程学生が複数名毎年山口大学へ派遣され 2～3 ヶ月滞在することで効率的に共同研究が進められた。この間の経費は Lumyong 教授の研究経費と部分的に松井の研究経費を充てた。その間タイ北部で単離された新規植物内生菌を少なくとも 5 株同定し、また、それぞれに特徴的な二次代謝産物の生産を認め、生理活性が期待されるものについては精製し、構造決定を果たした。これまでに *Muscodor* 属菌の生産する揮発性化合物による植物病抑止効果、生卵防腐効果などを発見し、また *Colletotrichum* 属菌の生産する赤色素を精製し、構造決定した。この色素は繊維染料としての応用が期待される。その間 6 編の査読付国際誌に原著論文を発表し、現在 2 編を執筆中である。

10. 亜熱帯の生態系保持に関わる淡水プランクトンの研究

本課題は、プロジェクトの 3 年目からタイのコンケン大学にカウンターパートを見出し、藻類を中心とした淡水性のプランクトンに着目して、亜熱帯環境（タイ）と温帯環境（日本）における環境と種の分布に関する関係について、フィールド調査を基盤に水圏の生態系保持に関する基礎的な研究を行ってきた。その結果、亜熱帯環境のタイにおいて数十年報告されていなかったボルボックスの原種を再捕獲することに成功し、論文として報告した。タイと日本の淡水域より採取されるボルボックス目の藻類には、共通する種も見いだされたが、それぞれの環境に特異的な固有種が分布していることが明らかにされた。現在、緑藻を中心に DNA バーコードの作成を試みており、未知の種の同定のための塩基配列情報を蓄積しているところである。将来的には、採取された藻類株を単離・純化し、バイオリソースとしてカルチャーコレクションに寄託することも検討している。各生態系に生息する多様な藻類種を同定、比較することによって、亜熱帯環境や温帯環境に特異的なマーカー種を決定できる可能性がある。

11. 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

研究計画や進捗状況に関して随時メールで連絡を取りあうとともに、同じ国際会議に参加した際に詳細なディスカッションを行った。タイ側では、様々な植物試料から分離した微生物の系統解析を進め、複数の細菌や酵母菌株の新種提唱を行うとともに、イネ葉面から単離したインドール酢酸生産菌の解析を進め、高生産培養条件を確立した。日本側では、葉面メタノール資化性 *Methylobacterium* 細菌のビタミン要求性の解析やストレス応答制御因子の機能解明を行うとともに、メタノール資化性酵母による有用タ

| | |
|--|--|
| | ンパク質生産およびメタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写制御因子やシグナル伝達因子の分子機能を解明した。 |
|--|--|

| 整理番号 | R-4 | 研究開始年度 | 平成26年度 | 研究終了年度 | 平成30年度 |
|---------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|
| 共同研究課題名 | (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・職名 | (和文) 松井健二・山口大学創成科学研究科・教授・1-3 (英文) Kenji MATSUI・Yamaguchi University・Professor・1-3 | | | | |
| 相手国側代表者 氏名・所属・職名 | (英文) Kosum CHANSIRI・Srinakharinwirot University・Professor・2-81 Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor・4-1 Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Professor・5-1 Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor・6-1 | | | | |
| 30年度の研 究交流活動 及び得られ た成果 | <p>本年度は15件の共同研究交流活動を実施した。これら全て農環境における食糧生産から、新規機能性食品の創成、食品保蔵技術への展開、更には生態系維持・改善、といった実質的な応用を目途した微生物機能の探索とその技術化を目指した。(農業) インドネシアを中心にバイオリメディエーション、バイオフィーターライザーとして有用な微生物を単離し、温室レベルでその有効性を明らかにした。また SOFIX データベースについては引き続き整備拡張し、獲得されたデータに基づいた最適な農地改良方針の基準化を進めるに至った。さらに木質バイオマスをベースとした人工土壌を試作するに至った。さらにイチゴ炭疽病に有効な放線菌を単離同定し、バイオ農薬開発基盤を得た。(有用酵素) 微生物由来多糖分解酵素に関してはラミナリンを良い基質とする酵素を同定し、その構造を明らかにすることで多糖分解酵素反応に関する構造基盤を明らかにした。一方、多糖合成酵素に関しても引き続き検討し、大環状シクロデキストリン生成酵素を同定し、その性状について解析を終えた。また、ポリ乳酸分解菌から分解酵素を単離し、その性質を明らかにした。(生理活性物質) 乳酸菌由来バクテリオシンについては既に応用がなされているが、今回、タイのみならずベトナムの発酵食品などから広く単離同定し、ニワトリ飼料や食品包装フィルムなどへの応用段階に移行させている。インドネシアの紅麹発酵食品からも機能性ペプチドを単離することに成功した。耐熱性シアノバクテリアでフィコシアニンを大量生産するシステムについてはパイロットスケールでの検討段階を負え、工業生産に移行している。また、新規モナスカス色素生産菌を同定し、当該色素を単離して構造に関する知見を得、その抗菌</p> | | | | |

性を評価した。これらの成果に示されるように、新たに単離した微生物を用いて農業システムの改革への下地を形成し、また、既にある程度成果を得ていた微生物由来生理活性物質に関する研究では新規物質の同定と性状解析を果たした。微生物由来有用酵素もレパートリーをさらに増やすことができ、応用局面で必要な酵素を即座に用意できる体制を確立した。

本研究課題での共同研究交流として、日本からタイ・ベトナムへ研究者派遣 2 名/12 人日、およびタイ・ベトナム・インドネシアから日本へ研究者受入 7 名/242 人日を実施した。また、山口大学で開催した **Final Joint Seminar** 参加の際に各小課題でディスカッションを行ったほか、お互いの進捗状況についてはメール等にて頻繁に連絡を取り合い、共同研究の進展を図った。以下に個々の研究交流に関する実績を示す。

1) 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

最終報告会 (2018.12 月) に参加し、成果を発表するとともに共同研究者と今後の進め方などについてディスカッションした。また、ベトナムの **Phuong Nam Biology Company** の **Mr. Hung Le Tan** 及び **Cantho University** の **Prof. N. Dung**、**Nam Cantho University** の **Em. Prof. V. Xung** を訪問し、今後の研究と交流のあり方についてディスカッションした。その結果、研究成果の社会実装について、さらに踏み込んだ活動の必要性が認識され、計画を進めることとなった。ベトナムの研究者とは、企業・カントー大学・バイオテクノロジー研究所を巻き込んだ有機的広域連携の青写真を描くことができた。

2) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用

Xylaria psidii 培養液からの抗菌物質について、シリカゲルクロマトグラフィー・TLC・HPLC での精製を進めたが、純度の高い精製が達成できなかった。不安定な化合物である可能性が考えられ、化合物の安定化を確定する必要がある。一方、ヒトヨタケ培養系を確立し、子実体形成時の揮発性化合物組成変化を解析した。

3) 除草剤や重金属耐性を持つ土壌微生物の探索

インドネシアで問題となっている農地の残留除草剤のバイオリミディエーションのために、生物多様性に富む熱帯地域 (インドネシア・マラン近郊) で菌類の探索 (スクリーニング) を行った。今年度もこれを継続し、農薬で汚染された農地土壌 (インドネシア・マラン近郊における農薬で汚染された農地を複数地点選定してそれらを対象とする) をサンプリングし

て、それらから農薬（対象は除草剤）を分解できる菌類をスクリーニングするとともに、リンを可溶態にするバイオフィーターライザーとして利用可能な細菌類についてもスクリーニングを行った。これらの微生物に対して、その特徴を明らかにした。農地の残留除草剤のバイオリメディエーションに利用できる菌類のスクリーニング、及びリンを可溶態にするバイオフィーターライザーとして利用可能な細菌類についてもスクリーニングを行った。これらの微生物に対して、その特徴を明らかにした。具体的には、農薬で汚染された農地土壌（インドネシア・マラン近郊における農薬で汚染された農地を複数地点選定してそれらを対象とする）をサンプリングして、それらから農薬（対象は除草剤）を分解できる菌類をスクリーニングするとともに、リンを可溶態にする細菌類についてもスクリーニングを行った。これらの微生物に対して、その特徴を明らかにした後に、インドネシア・マランの温室栽培（数種類の豆類の栽培）にそれらを適用した。

4) 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

耐熱性乳酸菌 *L. paracasei* T-25 株を宿主とするバクテリオファージ ϕ T25 のタンパク質を分離し、SDS-PAGE によって単離して、ESI-MS/MS 解析を行ってアミノ酸配列を決定した。そのアミノ酸配列を解読した ϕ T25 ゲノム情報と相同性検索を行った。さらに、T-25 株の全ゲノム配列を次世代シーケンシングによって解析した。精製した ϕ T25 ファージ粒子を SDS-PAGE で分離し ESI-MS/MS 解析を行ったところ、複数のバンドのアミノ酸配列が、ゲノム情報から推定した ϕ T25 の構造タンパク質や溶菌酵素をコードする ORF のアミノ酸配列と一致した。また、*L. paracasei* T-25 株のゲノム配列を決定し、DDBJ などの公的データベースに登録した。

5) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価

酸化グラフェン (GO) そのものでは、*S. cerevisiae* に対して殺菌効果を示さないが、アエロゲルにすることにより、*S. cerevisiae* への殺菌効果が確認された。このことは、GO の状態により抗菌活性が出現する可能性を示している。また、ナノ毒性を議論する際の物質の状態の重要性を示している。ただし、そのメカニズム解析には至っていない。ナノ材料は、その状態により殺菌効果が変わることが確認できた。しかしながら、その抗菌メカニズムを示せたわけではない。単に抗菌性だけでなく、メカニズムにまで踏み込んだ解析の必要性を認識した。

6) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

昨年度に引き続き、タイおよびベトナムの発酵食品などの種々の試料から得られた乳酸菌についてバクテリオシン生産能などの特性を解析した。

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と構造解析を行った。また、一部の分離株について全ゲノム解析を行い、バクテリオシン遺伝子の配列解析によるバクテリオシンの構造決定を試みた。タイより1名の研究者を受け入れ、他の研究者とはメールあるいはジョイントセミナーの際に討議を行い、研究の進展を図った。タイの乳酸菌分離株について、バクテリオシンの精製と質量分析、さらには乳酸菌の全ゲノム解析により、バクテリオシンの構造決定を進め、新奇バクテリオシンと予想されるものが複数得られた。タイで得られたバクテリオシン生産乳酸菌とそのバクテリオシンは、ニワトリ飼料や食品包装フィルムなどへの利用を図っている。ベトナムの乳酸菌分離株にも有望なものが得られつつあり、解析を進めている。

7) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

研究パートナーである Chayakorn Pumas 氏とは、電子メールにての討論を概ね数週間毎に行ってきたり、研究進捗状況の共有化を図り続けている。昨年末には Pumas 氏が渡日し、直接の討論並びに新たな実験手法の伝達などを積極的に行った。加えて、12月に開催されたジョイントセミナーにおいては、日本側の石井ではなく、タイ側の Pumas 氏が発表を行った。頻繁に討論し続けているため研究の遅延は殆ど無く、進捗は良好であった。加えて、上述の通りジョイントセミナーではタイ側研究者 (Chayakorn Pumas 氏) が口頭発表を行っている。研究者のレベルを国際的なところまで引き上げることは、プロジェクトの直接の目的ではないかもしれないが、とても重要なことと理解している。その意味合いで、Pumas 氏が問題無く英語にて発表できるようになったことは大きな成果と言えよう。実際の研究については、遺伝子クローニングを通しての大腸菌でのフィコシアニン異種発現については、アポタンパク質の発現は見られたものの、ホロタンパク質の発現には至らなかった。一方、シアノバクテリアそのものを利用してのフィコシアニンの大量生産については、パイロットスケールでの生産をクリアし工業生産レベルでの生産に向かいつつある。

8) 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

立命館大学において、畑および水田の SOFIX データベースを構築した。並行して、タイ・パヤオ大学、チェンマイ大学およびインドネシア・ブラウウィジャヤ大学を中心として、各国の農地土壌をサンプリングした。両国合わせ合計 30 サンプルの SOFIX 分析、データベース化を行い、日本土壌と比較した。また、SOFIX 最適値を基盤とした有機標準土壌を試作し、それらの性能解析から最適な有機標準土壌を作製した。タイ土壌 (水田) は、

有機物量や微生物数共に少ない傾向が顕著であった。一方、インドネシア土壤（水田）では、有機物量は多かったが微生物数は少なかった。ヒアリング結果と合わせると、タイの農法は多くの化学肥料や農薬を使用しているため、このような結果になったものと考えられた。一方、有機標準土壤は木質バイオマスをベース土壤とすることで、安定した微生物叢等、再現性のある人工土壤の作製が出来た。

9) 微生物の多糖分解酵素の病原性微生物の防除およびオリゴ糖および発酵基質生産への応用

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、ゲノム解析の結果から、数種類の β -1,3-グルカナーゼを生産する可能性が示唆されている。30年度は、ラミナリンを唯一の炭素源として培地で誘導生産される酵素を精製し、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。また、*Paenibacillus glycanilyticus* HF1 由来 α -1,3-グルカナーゼ HF1(AglHF1)の結晶構造解析を行った。*S. thermodiastaticus* 由来 β -1,3-グルカナーゼを単一に精製し、諸性質を明らかにした。至適 pH は 4.5、至適温度は 65°Cで、60°Cで 10 分間の処理では活性の低下が見られず、比較的高い温度安定性を示した。分子質量はゲルろ過と SDS-PAGE により 53 kDa と見積もられた。ラミナリンに高い基質特性を示し、主生成物は二糖であった。一方、AglHF1 の結晶構造解析を行い、2Å 前後の解像度で良好な回折像が得られた。現在精密化を進めており、耐熱性 α -1,3-グルカナーゼの構造基盤の解明に 1 歩近づく成果を得た。

10) ポリ乳酸微生物の応用

①タイの土壤中に 24 か月間放置したポリ乳酸 (PLA) 不織布を回収し、PLA 不織布分解菌の分離を試みた。

②コンポストからの PLA 不織布分解菌の分離は、協力企業が見つからず実施できなかった。

③Thailand Research EXPO 2018 (Bangkok) で口頭発表

24 か月間土壤中に放置した PLA 不織布には植物根等による物理的な破壊は認められたが、不織布自体はしっかりしていた。この不織布から PLA 不織布分解微生物の分離を試みたところ、PLA 乳濁液を含む PLA 寒天プレートではクリアゾーンは認められたが、PLA 不織布を分解 (30°C、5 日間) する株は得られなかった。PLA フィルムを分解する *Actinomadura* sp T16-4 株の PLA 分解酵素が、PLA 不織布を 24 時間、50°Cで分解することを見出した。

11) 植物内生放線菌の農業への応用

①イチゴ炭疽病に有効な放線菌 3 株 (I29 株、B22 株、SS3 株) がイチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulate* 01 株の菌体を含む寒天プレートで、病原菌菌

体を分解することを確認した。さらに、これらの放線菌は病原菌菌体を添加した液体培地でも 30°C、2 日の培養で病原菌菌体を完全に分解した。

イチゴポット栽培で、イチゴ炭疽病抑制効果を示した放線菌がイチゴ炭疽病菌を効率よく溶菌することを見出し、現在、よりイチゴ炭疽病抑制効果の高い菌株の育種を目指し、溶菌活性の高い株の選抜および変異導入による高溶菌活性株の分離を試みている。

②イネから分離した内生細菌が、植物に成長促進やストレス耐性を付与する 2-Aza-8 oxohypoxanthine(AOH) を 2-Azahypoxanthine(AHX) から変換可能なことを示した。

イネにおいて、イネの内生細菌が AHX から AOH を生成する可能性を示した。

12) レバナーゼに於ける加水分解生成物のサイズに関するアミノ酸残基の同定、*Bacillus licheniformis* 様細菌の 23-37DP 長環状 1, 4 グルカン合成新規酵素の精製、*Bacillus paralicheniformis* の大環状 CD 産生酵素の解析、担子菌由来遺伝子組換え N-型糖鎖遊離酵素の応用開発

B.amyloliquefaciens 由来のエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子をクローニングし、予想される長さの遺伝子を発現用ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換し遺伝子発現系を構築した。

Bacillus licheniformis の大環状シクロデキストリン (CD) 合成酵素遺伝子データベースをもとに、同酵素遺伝子をクローニングし、これを発現系ベクターへの挿入・大腸菌形質転換を行い、遺伝子発現系を構築した。

Bacillus paralicheniformis の培養液を、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分画し、デンプン分解活性と大環状 CD 合成活性画分を調べた。また、デンプンを基質として各画分中酵素による反応生成物を HPAEC で分析した。

担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を用いて、ヒト血清糖タンパク質に結合する N-型糖鎖の遊離を行い、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を解析した。また、糖タンパク質糖鎖の転移作用を検証した。

B.amyloliquefaciens 由来のエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子をクローニングし、予想される長さの遺伝子を発現用ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換し遺伝子発現系を構築した。

Bacillus licheniformis の大環状シクロデキストリン (CD) 合成酵素遺伝子データベースをもとに、同酵素遺伝子をクローニングし、これを発現系ベクターへの挿入・大腸菌形質転換を行い、遺伝子発現系を構築した。

Bacillus paralicheniformis の培養液を、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分画し、デンプン分解活性と大環状 CD 合成活性画分を調べた。また、デンプンを基質として各画分中酵素による反応生成物を HPAEC で分析した。

担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を用いて、ヒト血清糖タンパク質に結合する N-型糖鎖の遊離を行い、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を解析した。また、糖タンパク質糖鎖の転移作用を検証した。

B.amyloliquefaciens ゲノムからクローニングしたエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子を導入した発現用ベクターで形質転換した大腸菌で、これら酵素の遺伝子組換え体を発現することができた。

また、*Bacillus licheniformis* のゲノム DNA からクローニングした大環状 CD 合成酵素の遺伝子を挿入した発現系ベクターで形質転換した大腸菌において、同酵素の遺伝子組換え発現体を発現することができた。

Bacillus paralicheniformis の培養液の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって、デンプン分解活性画分と大環状 CD の合成活性画分とに分離され、デンプン分解活性画分とは別の画分中の酵素が大環状 CD の合成に関与していることを明らかにすることができた。また、生成した大環状 CD は 50 グルコース単位以上のサイズであった。この画分中の酵素は、デンプンから大環状 CD を合成への利用が期待できる。

担子菌由来エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を、直接ヒト血清中に加えることによって血清糖タンパク質から N-型糖鎖を遊離することができた、また、用いた酵素の特異性に依存して、糖鎖遊離タンパク質が異なっていた。また、遊離した糖鎖を検出することで、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を明らかにすることができた。また、糖タンパク質糖鎖の転移反応生成物を検出することができた。

13) 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

Dr. Kangsadan を琉球大学で客員研究員として受け入れ、*Monascus* 変異株の Angkak 抽出色素に関する実験を行った。各種溶媒で抽出し、抗酸化活性、抗菌活性および LC/MS 測定を行った。また、当研究室の所有株で調製した紅麴抽出物を用いて抗菌活性スクリーニングを行い、グラム陽性細菌および陰性細菌に対し、それぞれ特徴的に抗菌スペクトルを示す菌株を選抜した。Dr. Kangsadan の Angkak 抽出色素に関しては、色素の精製と構造解析まで行い、論文化を予定している。当研究室で得た成果は、2019 年度の食品科学工学会での成果発表を予定している。

14) 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

CCP プログラムの枠組みを活用し、日本・タイ・ベトナムで感染性下痢症をはじめとした感染症予防に関する発酵食品の予防効果に関する共同研究を開始した。インドネシアのボゴール農業大学との連携を開始し、発酵食品のペプチドの機能性や官能評価に関する共同研究を行った。*Jatropha curcas* の紅麴発酵産物から抗酸化ペプチドを単離し、精製ペプチドの構造解析と機能性評価を行った。紅麴溶媒抽出画分にグラム陰性細菌および陽性細菌に対して特異的な抗菌作用を示す菌株を選抜できた。インドネシア発酵食品テンペから機能性ペプチドの de novo スクリーニングを行い、製造工場の衛生環境によって生成する機能性ペプチドに違いがあることを示した。*Jatropha curcas* の紅麴発酵産物から抗酸化活性の高いペプチドを単離することができた。

| | |
|---------------------------------|---|
| | <p>15) ラオス、ベトナム、タイのスターターの比較研究とその微生物資源の利用</p> <p>これまでに行った黒米、赤米、緑米、ワイルドライスを用いて製造したアルコール飲料の特性については 12 月に山口大学で開催された Core to Core Program, The Final Joint Seminar において発表した。また、ラオス国立大学の S ブンパミ氏およびベトナムカントー大学の NTP ドウン氏と今後の研究についてディスカッションした。ラオスの伝統的アルコール飲料の主たるものは、コメを原料にしている。醸造酒も蒸留酒も、糖化剤は餅麴（もちこうじ）ペンラオ（pen lao）であった。これは、タイの餅麴ルパン（loog pang）、ベトナムの餅麴メン（men）と基本的な製造法が同じであった。いずれの麴も発酵性酵母とアミラーゼ生産性の糸状菌が生育していた。</p> <p>コメを原料としたラオスの伝統的醸造酒ラオラオは固体発酵でつくられ、発酵開始数日後にアルコール濃度を下げるために加水し、さらに飲酒時に好みのアルコール濃度になるよう加水して、吸酒管で飲まれる。タイでは、コメを原料とし吸酒管で飲まれる伝統的醸造酒ウ（ou）は、ラオス国境に近い東北部で飲まれているが、その他の地域では吸酒管を使用しない場合が多い。ベトナムでは、コメを原料とした伝統的な蒸留酒やそれにハーブなど薬用成分を漬け込んだアルコール飲料が多かった。白米や黒米を原料とした醸造酒は見ることはできたが、吸酒管で飲む酒は見ることはできなかった。</p> |
| <p>全期間にわたる研究交流活動及び得られた成果の概要</p> | <p>本プロジェクト開始時に有用微生物は既に多く単離されていたが、この 5 年間も引き続き有用微生物の探索を進め、新たなプロバイオティクスを生産する微生物など多くの有用微生物の単離を完了した。この際、タイだけでなくインドネシアやラオス、ベトナムまでスクリーニング範囲を広げたのは極めて有効であった。その成果に加えて、それぞれの微生物を利用する技術開発を進め、新規モナスカス色素、プロバイオティクス、フィコシアニン、多糖分解酵素、新規シクロデキストリン生合成酵素を単離同定することに成功し、それぞれが実際の応用への試行段階に進んでいる。さらに、土壌微生物葉面微生物の制御による持続的農業システムの提案も達成した。</p> <p>なお、全期間にわたる本研究課題での共同研究交流として、日本からタイ・ベトナム・インドネシア・ラオスへ研究者派遣 23 名/159 人日、およびタイ・ベトナム・インドネシアから日本への研究者受入 58 名/1798 人日を実施し、特に相手国の若手研究者育成に寄与した。</p> |

1) 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

5年間の交流を通じて、タイ国カセサート大学及びコンケン大学と7報の査読付き国際誌共著論文を含む、多くの成果を発表することができた。現在、いくつかの成果について実用化技術としての展開について議論をしている。また、ベトナム・ドイツ・イギリスの研究者とは、今後の交流を深化発展していく道筋を作ることができた。

2) 熱帯性植物からの担子菌類の単離とその応用

当研究室で学位を取得した Pattana Kakumyan は、この5年間で4回(191日間)山口大学に滞在する機会を与えられ、共同研究を進めた。Kakumyan が単離した菌株の rDNA 分析から *Xylaria psidii* と同定し、麦芽エキストラクト培地で効率よく抗菌物質を培地中に分泌することを明らかにした。その後、本抗菌化合物を種々のクロマトグラフィーにより精製を進めたが、その吸収スペクトラムから *methylmellein* の類縁体と推定されるが、現在まで構造確定には至っておらず、本事業終了後も引き続き共同研究を進める必要がある。また、その間、採取した担子菌について揮発性化合物の GC-MS 測定を進め、これまでに *Linderia bicolumnata*、*Coprinopsis atramentaria* について子実体形成に伴う揮発性化合物の組成変化を詳細に解析した。この成果については現在論文投稿中である。

3) 除草剤や重金属耐性を持つ土壌微生物の探索

インドネシア・マランにて農地の残留除草剤のバイオリミディエーションに利用できる菌類のスクリーニング、及びリンを可溶態にするバイオフィーターライザーとして利用可能な細菌類についてもスクリーニングを行った。これらの微生物に対して、その特徴（農薬への耐性や、リンの可溶化特性等）を明らかにした。さらに、インドネシア・マランの農地における温室栽培（数種類の豆類の栽培）に、上記のスクリーニングした菌類および細菌類を適用した。以上より、農薬や重金属などで汚染された土壌のバイオリミディエーションに資するとともに、バイオフィーターライザーとしての細菌類の利用方法を示した。

4) 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 株および本株を宿主とする耐熱性バクテリオファージ ϕ T25 の特性および全ゲノム構造をそれぞれ明らかにした。これらの情報を基に、タイ国の乳酸発酵現場で問題となっているファージ汚染の防止策を提示することができ

た。さらに、これまで情報の少なかった耐熱性乳酸菌と耐熱性バクテリオファージの遺伝情報から、乳酸菌における耐熱性およびファージ耐性の分子メカニズムを推定できた。

5) 酵母DNAマイクロアレイを用いた酸化グラフェンの抗菌影響評価

酸化グラフェン (GO) は、カルボキシル基、フェニールヒドロキシルおよびエポキシド基を有するグラフェンシートである。GO は微生物細胞の増殖を阻害することができると考えられている。本研究では、GO の酵母増殖およびゲノムプロファイルへの影響を DNA マイクロアレイ技術によって分析することを目標とした。当初、殺菌性を示さないため、発現解析などが達成できなかった。30 年度には、酸化グラフェン (GO) をアエロゲルにすることにより *S.cerevisiae* への殺菌効果が確認された。このことは、GO の状態により抗菌活性が出現する可能性を示している。また、ナノ毒性を議論する際の物質の状態の重要性を示している。ただし、そのメカニズム解析には至っていない。

6) 新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索とその利用

タイとベトナムの発酵食品等の分離源から多数のバクテリオシン生産乳酸菌を得ることができた。特に、タイの分離株から、新奇環状バクテリオシンの構造を決定し、その生合成遺伝子群を決定することができた。他にも、新奇の構造を有すると推定される複数のバクテリオシンを見出すことができ、引き続き解析を続けている。また、分離されたバクテリオシン生産乳酸菌、及びそのバクテリオシンを発酵ソーセージのスターターやニワトリの飼料、食品の包装フィルムに利用を図ることができた。ベトナムにもバクテリオシン生産乳酸菌の分離と評価方法が定着しつつあり、今後、新たな特性を持つバクテリオシンおよび乳酸菌の分離が期待できる。

7) 耐熱性ラン藻由来の熱安定性物質の応用

本研究交流活動においては、タイ側研究者 (Chayakorn Pumas 氏) が渡日し、研究を行って貰うことを主とした。その理由は、石井はこれまで何度もタイを訪問し、現地の研究環境を熟知しているため、どのようにすればタイ側で研究がきちんと進捗するかが分かっているからである。実際の研究内容については、上述もしたが、大腸菌さらには別種ラン藻を使つての異種発現はアポタンパク発現には成功したものの、ホロタンパク発現には至らなかった。この研究を通して、遺伝子取り扱いの基本的な技術を伝授できたことは大いに評価できることと考えているが、具体的な実験結果として実を結ぶには至ってはならず、研究戦略に問題があったのか否か、現

在も検証を続けている。一方で、シアノバクテリアそのものを利用しての、フィコシアニンの大量生産については十分な成功を収めつつある。即ち、実験室レベルさらにパイロットスケールでの生産をクリアし、現在は工業生産レベルに向かいつつある。

8) 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

5年間にわたりタイ及びインドネシアとの研究交流活動を実施し、各国の抱える農業問題や、その解決に関わる研究が実を結んだものと考えている。特筆すべきは、3か国の農地比較解析を行ったことで、地質と共に農業形態が大きく環境に影響を与えていることが明らかとなった。特にタイの農業では、化学肥料や農薬の使用が増加傾向にあり、土壌環境にも顕著に影響が出ていた。これらを改善するために有機標準土壌を作製し、この土壌を標準として使うことで、より明確に農地土壌改善を行う基盤が出来たものと考えている。2017年には、インドネシアで開催された国際会議の Keynote Address (International Fisheries Symposium, -IFS 2017-, Batu City, Indonesia, November 7-9, 2017.) に招待され、本研究交流成果等を発表できた。

9) 微生物の多糖分解酵素の病原性微生物の防除およびオリゴ糖および発酵基質生産への応用

タイのカセサート大学から本学博士後期課程に2名の学生、チェンマイ大学から博士前期課程へ2名、博士後期課程に2名の学生を受け入れた。このうち2名の修士学位取得者と1名の博士学位取得者を輩出した。また、コンケン大学ならびにチェンマイ大学の博士後期課程の学生2名を3-10ヶ月受け入れ、共同研究の一貫として研究指導を行った。ソクラ王子大学ならびにブラウイジャヤ大学との共同研究も加えて、本プロジェクトに関連して13報の論文を発表した。

10) ポリ乳酸微生物の応用

- ①日本で家畜等(羊、ヤギ、ウサギ)の糞から、集積培養法を用いPLA不織布分解微生物の分離を試みたが目的の微生物は得られなかった。
- ②PLA不織布をタイ土壌中で24か月間放置後、そのPLA不織布から分解菌の分離を試みたが、30℃、5日間で分解する菌は見いだせなかった。
- ③PLAフィルムを分解する *Actinomadura* sp T16-4 株から、PLA分解酵素遺伝子をクローン化し、放線菌 *Streptomyces lividance* で発現させた。組換え酵素は、PLAフィルムを2時間、不織布を24時間で分解した。

11) 植物内生放線菌の農業への応用

- ①有機栽培した野菜から植物内生および根圏土壌から放線菌を分離した。
- ②野菜内生及び根圏土壌放線菌を用いて、トマト萎凋病を抑制する放線菌

の探索を寒天プレート上ではなくポット栽培で行い、ポット栽培において部分的にトマト萎凋病抑制効果を示す放線菌 **KT5** 株を得た。

③野菜内生及び根圏土壌放線菌のなかから、植物（レタス等）の成長を促進する放線菌を見出した。以上の結果から、作物の病気を抑制し、成長促進効果を有する機能性堆肥の可能性が示された。

12) レバナナーゼに於ける加水分解生成物のサイズに關与するアミノ酸残基の同定、*Bacillus licheniformis* 様細菌の 23-37DP 長環状 1, 4 グルカン合成新規酵素の精製、*Bacillus paralicheniformis* の大環状 CD 産生酵素の解析、担子菌由来遺伝子組換え N-型糖鎖遊離酵素の応用開発

2014 年度(平成 26 年度)

Corynebacterium glutamicum 由来のアミロマルターゼ遺伝子への変異導入により、様々な変異酵素遺伝子を取得した。また、発現した変異酵素を精製した。あわせて、プルラナーゼのスクリーニングと同酵素遺伝子のクローニングを実施した。また、*Fusarium sp. F59* から 2 種のグルコアミラーゼ遺伝子をクローニングするとともに BCG を脱色するオリゴ糖を産生する土壌細菌が *Bacillus licheniformis* であると同定し、生成するオリゴ糖は重合度が 20 以下であることを明らかにした。さらに、*Bacillus amyloliquifaciens* のレバンスクララーゼ遺伝子の大腸菌での機能的発現条件を検討し、その発現に成功した。また、組換え発現酵素を利用して様々な化合物へのフルクトース転移を調べ、生成したフルクトオリゴ糖の構造解析を行った。

これまでに得られた微生物の産生する酵素の発現系の構築により、発現酵素の安定供給が可能となる。また、酵素の特異性の改変や転移反応生成物の解析から、様々な機能性のオリゴ糖や配糖体の酵素合成とその生産が可能となる。そして、酵素合成オリゴ糖の食品などの分野などへの利用が期待できる。

2015 年度(平成 27 年度)

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

2016 年度(平成 28 年度)

反応液中のアントシアニン濃度、CGTase 活性、マルトシル β -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。*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、 α -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。

2017 年度(平成 29 年度)

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 DH5 α を形質転換し、両酵素遺伝子の発現用ベクターを得た。得られた発現用ベクターにより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ーに供し、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 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°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遊離を遊離し、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。

2018 年度(平成 30 年度)

B.amyloliquefaciens ゲノムからクローニングしたエキゾレバナーゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼの遺伝子を導入した発現用ベクターで形質転換した大腸菌で、これら酵素の遺伝子組換え体を発現することができた。また、*Bacillus licheniformis* のゲノム DNA からクローニングした大環状 CD 合成酵素の遺伝子を挿入した発現系ベクターで形質転換した大腸菌において、同酵素の遺伝子組換え発現体を発現することができた。*Bacillus paralicheniformis*.の培養液の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによって、デンプン分解活性画分と大環状 CD の合成活性画分とに分離され、デンプン分解活性画分とは別の画分中の酵素が大環状 CD の合成に関与していることを明らかにすることができた。また、生成した大環状 CD は 50 グルコース単位以上のサイズであった。この画分中の酵素は、デンプンから大環状 CD を合成への利用が期待できる。担子菌由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ FV および AB を、直接ヒト血清中に加えことによって血清糖タンパク質から N-型糖鎖を遊離することができた。さらに、用いた酵素の特異性に依存して糖鎖遊離タンパク質が異なっていた。また、遊離した糖鎖を検出することで、MALDI-TOF MS によって遊離糖鎖構造を明らかにすることができた。また、糖タンパク質糖鎖の転移反応生成物を検出することができた。

| | |
|--|--|
| | <p>13) 突然変異を利用した食品保存と健康増進のための新奇モナスカス色素の開発</p> <p>2018 年度よりカウンターパートと紅麴変異株の作出と紅麴色素に関する研究を開始し、それぞれ有用菌株の作出ならびに選抜までできた。今後、特徴的な色素の機能性に関して、さらに研究を継続・拡大すべく、他の競争的研究資金獲得に向けて申請中である。</p> <p>14) 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</p> <p>研究者交流派遣 4 回 (KMUTT、タイ)、研究者交流受入 2 回 (琉球大学) を通じ、さらに各自、独自の研究助成等を獲得して共同研究ならびに研究者交流活動を継続できたことは非常に意義のあることである。さらに、研究交流機会を経てタイ国内の新たなカウンターパートを見つけ、本プログラムの中で共同研究を拡大できたことに感謝する。また、カウンターパートの博士学生が研究者として新たな研究活動を開始するにあたり、他の助成金ではあるが、新たに共同研究を起ち上げることができた。現在、インドネシアにおいても共同研究の枠組みを構築すべく、別事業費を活用しながら若手研究者の派遣および共同研究を起ち上げているところである。</p> <p>15) ラオス、ベトナム、タイのスターターの比較研究とその微生物資源の利用</p> <p>タイの餅麴ルパン、ベトナムの餅麴メン、ラオスの餅麴ペンラオと醸造酒と蒸留酒を比較研究することができた。</p> <p>ルパン酵母、メン酵母を用いて、黒米、赤米、緑米、ワイルドライスを原料として作った、アルコール飲料の、DPPH ラジカル消去能、脂質過酸化阻止能を測定して抗酸化能評価を行った。黒米を原料としたアルコール飲料は強い抗酸化能を有していた。</p> <p>ルパンより分離した糸状菌 <i>Amylomyces rouxii</i> YTH3 で散麴(ばらこうじ)を作成し、それを糖化剤に用いて、黒米、赤米、緑米、ワイルドライスを原料として作ったアルコール飲料の抗酸化能評価も行った。黒米を用いたものが最も強い抗酸化能を示した。</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 |
| 共同研究課題名 | (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・職名 | (和文) 星田尚司・山口大学創成科学研究科・准教授・1-15 |
| | (英文) Hisashi HOSHIDA・Yamaguchi University・Associate Professor・1-15 |
| 相手国側代表者 氏名・所属・職名 | (英文) Savitree LIMTONG・Kasetsart University・Professor・2-31 Peter GOETZ・Beuth University of Applied Sciences・Professor・3-1 Dung NGO Thi Phuong・Can Tho University・Associate Professor・4-1 Anton MUHIBUDDIN・University of Brawijaya・Professor・5-1 Somchanh BOUNPHANMY・National University of Laos・Associate Professor・6-1 |
| 30年度の研究成果 交流活動及び得られた成果 | <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>昨年度からの課題である、高温発酵プロセスによるエタノール生産をコンピュータによりシミュレーションするため、モデル化とその構築を共同研究者と検討した。一方、高温発酵を可能にする培養条件を検討するため、耐熱性細菌である <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 548 において、培地への金属イオンの添加により耐熱性にどのような影響があるのかを比較検討した。</p> <p>高温発酵プロセスのコンピュータモデル化は検討を共同研究者と行なったが、モデル構築を実施することができなかった。一方、<i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 548 に対して様々なイオンを添加し耐熱性への影響を解析したところ、Mg^{2+} と K^+ の添加により、耐熱性の向上が確認された。これらイオンの添加は高温生育限界域における細胞内 ROS の蓄積や細胞の伸長を抑制していた。また、相加効果が確認されたことから、それぞれのイオンによる高温時の細胞への影響は異なる可能性が示された。この成果は学会発表を行なった。</p> <p>2) 微生物工学的手法を用いた新規の糖の生産技術の開発に関する研究</p> <p>8月にチェンマイを4日間訪問(他経費)、12月に山口を3日間訪問した際、カウンターパートと打ち合わせを行い、来年度以降の研究課題について検討を行った。今後は、乳酸菌を用いた健康機能性を持つ食品、特にタイのミャン、日本の阿波晩茶といった後発酵茶に焦点を絞って研究を進めることで同意した。日本側では、今年度から阿波晩茶の産地である上勝町を拠点に乳酸菌の探索・分離を行い、数種の有用な乳酸菌を見つけることができた。</p> <p>D-グルコシド3-デヒドロゲナーゼを用いた新規の糖生産の研究において成果がまとまりつつあり、本年度は2報の論文(日本側)を発表した。また、マルトースホスホリラーゼを用いた新規の機能性オリゴ糖の生産</p> |

に成功しており、国際学会における発表、および論文にまとめ投稿を準備している段階である。また、阿波番茶から数種の乳酸菌が得ることができた。ホスホリラーゼについては継続して研究を進めている。

3) 耐熱性酵母を用いた安定した高温エタノール発酵系の構築

耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いた高温発酵・減圧蒸留について、燃料米を原料として 40°C から 45°C での SSF と SHF を比較するとともに、減圧蒸留の温度条件も検討した。また、減圧蒸留によって得た 20-30%エタノール溶液を用いて膜分離によるエタノール濃縮を試みた。さらに、耐熱性分離酵母を用いてキャッサバスターチや廃棄パルプを用いた SSF を行った。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収集を実施した。

耐熱性酵母を用いた高温発酵・減圧蒸留について、燃料米を原料として 40°C から 45°C での SSF と SHF を比較したところ、エタノール生産性は SSF と SHF はほとんど差がなく、42°C までは理論収率の 95%であった。この結果から、SSF は SHF の加水分解時間を短縮できることを示した。減圧蒸留ではより高温で行ったところ、45°C ではより速くエタノールを回収できるだけでなく、酵母の死滅もほとんど見られなかった。また、減圧蒸留によって得た 20-30%エタノール溶液を用いて膜分離によるエタノール濃縮を試みたところ、効果的に濃縮できることが示された。さらに、耐熱性分離酵母を用いてキャッサバスターチや廃棄パルプを用いて SSF を実施し、SSF が有効であることを示した。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収集した。さらに、タイだけでなくラオス、インドネシア、ベトナムのそれぞれの国で利用できる耐熱性酵母を分離した。

4) 餅麹ルパン (*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

課題 4 へ移動

5) 耐熱性微生物の生産する菌体外酵素の特性解析および耐熱性微生物を用いた未利用資源の分解と物質生産

平成 30 年度の研究計画の中で「蚕繭・セリシン層を効率的に加水分解する微生物酵素の特性解析とその利活用に関する研究」に注力し、日本側(2名)-タイ側(2名)で協調して同酵素の特性解析とセリシン由来生理活性ペプチドの評価をおこなった。

B. halodurans の生産する耐熱性アルカリセリンプロテアーゼは市販の

類縁酵素よりも蚕繭・セリシン層の加水分解に優れていた。蚕繭を加水分解すると 500 Da から 2 kDa までの可溶性ペプチドやタンパク質を得ることができた。さらに、可溶性ペプチドは種々の条件下で抗酸化活性を示すことがわかった。

- 6) 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
- パームオイルの製造工程から排出される廃水及びその木質および残渣からの第 2 世代バイオ燃料の生産プロセスの開発に関して、オイルパームの樹木部分の木質やその残渣を原料としたバイオ水素生産のための前処理工程を高率化するために、酵素の利用による加水分解工程の加速に着目して、その前処理後の可溶化液を用いたバイオ水素とその廃水を用いたバイオメタン生産の高効率化を行ってきた。今年度は、上記の最終段階として、酵素の最適添加量を決定し、それによる可溶化液を用いたバイオガス生産を行った。キシラナーゼ (5unit/mL) を 50°C で 12 時間インキュベートしたものをを用いて、60°C の高温発酵を 45 日間実施した。パームオイルの製造工程から排出される廃水及びその木質および残渣からの第 2 世代バイオ燃料の生産プロセスの開発に関して、オイルパームの樹木部分の木質やその残渣を原料としたバイオ水素生産のための前処理工程を高率化するために、酵素の利用による加水分解工程の加速に着目して、その前処理後の可溶化液を用いたバイオ水素とその廃水を用いたバイオメタン生産の高効率化を行ってきた。今年度は、上記の最終段階として、酵素の最適添加量を決定し、それによる可溶化液を用いたバイオガス生産を行った。キシラナーゼ (5unit/mL) を 50°C で 12 時間インキュベートしたものをを用いて、60°C の高温発酵を 45 日間実施し、これまでの 2.5 倍から 3 倍高いバイオガス生産量を得ることができた。また、キシラナーゼは 5unit/mL 以上用いた場合でも顕著な効果は得られなかった。また、微生物群集の解析の結果、*Clostridium* sp. と *Methanocaldococcus* sp が優占していることが確認された。

- 7) 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

熱帯性微生物を利用した植物性バイオマスからの有用生産物（主に環境・バイオテクノロジー用途）の開発として、人工染料（アゾ染料）や PAH 等の細胞毒性や発がん性物質を含有する排水の浄化が可能なバイオテクノロジーを用いた産業排水のバイオレメディエーションのための新規手法の開発を *Trametes versicolor* を対象に行ってきた。手法としては、対象微生物の担体固定や各種酵素（キシラナーゼ、セルラーゼ、

リグニナーゼ等)の固定化を用いた。さらに、*Aureobasidium pullulans* や *Trametes versicolor* を用いて、排水中の有毒物質のバイオレメディエーションを細胞や酵素の新規固定手法を用いて試みた。今年度は、新しく単離された白色腐朽菌 (CU-07, MH-2, MH-1, DTM-2 and MH-6.1) から得られたラッカーゼの特性を検討した。

微生物細胞そのものの固定化、あるいは付加価値を高めた各酵素 (キシラナーゼ、セルラーゼ、リグナーゼ等について、酵素生産技術とともに) 新規固定化技術の開発をさらに進め、それらの低コスト化を実現するために、今年度は、タイの各地で新しく単離された白色腐朽菌 (CU-07, MH-2, MH-1, DTM-2 and MH-6.1) から得られたラッカーゼの特性を検討し、それがいくつかの毒性を含むポリマーを分解するために有効であることが確認できた。

- 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
食糧と競合しないネピアグラス及びそのサイレージからのバイオ水素生産に加え、バイオ水素生産の原料となるバイオマスの対象を拡大し、微細藻類 (*Chlorella* sp.) をその対象に加えた。今年度は、上記の最終段階として、水素発酵時 (CSTR 反応器) における水素分圧を下げるために UASB 反応器にて生産されたバイオガスを一部 CSTR 反応器に循環させる方法を検討し、バイオガス生産量を最大化するための検討を行った。

今年度は、上記の最終段階として、水素発酵時における水素分圧を下げるために生産されたバイオガスを一部反応器に循環させる方法を検討した。実験結果から、この方法を適用することによって、バイオガス生産量を最大 35% 向上させることができた。長期連続実験の結果、生産されたバイオガスは 15.1% の水素と 38.3% のメタンを含有していた。

- 9) 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

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高温ハイタン (水素+メタン) 生産に関して、バイオ水素生産のためのリグノセルロースの前処理に関して改良を行い、リグノセルロースを多く含む稲わらを対象に、バイオエネルギーガス (水素及びメタン) 生産に関する研究を実施した。また、原料の対象を水生植物 (ホテイアオイ) に拡大し、嫌気性発酵におけるホテイアオイからのバイオエネルギー生産のための研究を実施した。今年度は、稲わら及びバガスから還元糖を得るための前処理方法の検討を行った。前処理後の可溶化液を用いて高温バ

イオガス生産実験を行った。

リグノセルロースを多く含む稲わら及びバガスを対象に、稲わら及びバガスからの還元糖を得るための前処理法について検討した。前処理から得られた可溶化液からバイオガス（水素＋メタン）生産実験により、その効果を把握するためのデータを得た。なお、植種源としてはコンポスト、嫌気性消化汚泥、塩田土壌、マングローブ林の土壌の4つを用いた。以上より、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）生産プロセスの開発を行った。

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

二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン生産の効率化・促進化に関して、高温安定性のアミラーゼ、高温安定性のセルラーゼをタイ南部の温泉地域からスクリーニングした菌により生産させるための研究を実施し、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・同定を実施し成果を得た。さらに、これまで実施してきた二相式高温嫌気性発酵に微生物電気分解を組み合わせ、パームオイル廃水からの高効率水素生産に関する研究を実施し、その最適運転条件を把握した。

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タン生産の効率化・促進化と、これまで対象としてきた二相式高温嫌気性発酵に新たに「微生物電気分解」を組み合わせたパームオイル廃水からのさらなる高効率水素生産に関して、最適運転条件を把握した。最適 COD 負荷は、8.3g/L/d で、最適初期 pH は 6.5 であった。この条件で、「微生物電気分解」なしの場合に最大の水素収率（104 ml-H₂ g-VS⁻¹）が得られた。

「微生物電気分解」を加えた場合は、0.7V の印加で（144 ml-H₂ g-VS⁻¹）の水素収率が得られた。この結果から「微生物電気分解」の組み込みによって 135%の効率向上となった。

11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

コリネ型細菌を宿主とした代謝工学に関して電子メールで研究進捗を連絡し合うことで、研究の方向性を議論した。研究内容に関しては、コリネ型細菌でのアセチル CoA 誘導体生産を実現するべく、アセチル CoA の供給・代謝に関わる遺伝子発現の改変を基盤に、アセチル CoA の前駆体であるピルビン酸を原栄養的に生産しうる変異株の取得を試みた。また、アセチル CoA 誘導体同様にコリネ型細菌で生産報告の少ない 2-

オキシグルタル酸からグルタミン酸を経ないで生成される化合物の生産に適した原栄養性 2-オキシグルタル酸生産菌の造成を試みた。まず、TCA 回路の正の転写制御因子である RamA の欠損株を作製し、そのグルコース代謝へ及ぼす影響を最小培地で評価した。その結果、欠損株は野生株と比較して発酵的な代謝を行うことが明らかになった。次いで、コリネ型細菌の代表的な副産物である乳酸および酢酸の生成能を不活化した株を作製したのち、その株を親株に RamA の欠損を導入した。構築株を同様の方法で培養したところ、アセチル CoA 前駆体であるピルビン酸を培地中に蓄積した。また、窒素源濃度、ビオチン濃度を最適化することでコリネ型細菌野生株は多量の 2-オキシグルタル酸を培地中に蓄積することを明らかにした。

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

廃棄バイオマスを原料としたバイオエタノール生産において耐熱性酵母の高温でのエタノール生産能を利用して低コスト化を図ることを目指している。耐熱性酵母野生株はこれまでエタノール生産に向けての開発が行われていなかったことから、より効率的な生産系を構築するために、耐熱性酵母のストレス耐性に関わる遺伝子を探索することにした。耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* の株間特性比較の結果をもとに、エタノール耐性に着目した。まず、安定に耐性を評価するための実験系を構築した。続いて、高エタノール耐性株と低エタノール耐性株から、交配・孢子形成可能な株を選び、交配育種を進めた。耐性の低い株を得る育種は目的の株を得にくい状態であったが、多淫性の高い株を得る育種を進めることができた。ウボンラチャタニ大学のカウンターパートとはメールで随時情報を交換した。

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

カウンターの民間への移動により中止

14) 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

今年度は、平成 31 年 2 月 19 日～3 月 18 日の期間、Salakkam 氏が来日し、愛媛大学にて、柑橘果皮から直接アルダル酸を生産する統合プロセスの完成を目指して研究を実施した。まず、柑橘果皮を耐熱性真菌による固体発酵プロセスにより糖化しウロン酸を生成した。続いて、その糖化液を基質として、酢酸菌による酸化発酵プロセスによりアルダル酸へ

| | |
|---------------------------------|--|
| | <p>の酸化変換を試みた。それぞれの反応はこれまでに最適化した条件にて実施した。統合プロセスの評価は、基質であるウロン酸の減少量を追跡することで評価した。</p> <p>耐熱性真菌による固体発酵プロセスにより、柑橘果皮から約 6 g/L のウロン酸溶液を生産することができた。また、それを基質にして、酢酸菌による酸化発酵プロセスによりアルダル酸への酸化変換を実施し、ウロン酸の減少量から約 80% が変換されたと算出された。評価の結果、より実用的なプロセスの実現のためには、柑橘果皮から高濃度の糖化液を得ることが重要であることが示された。これらの結果を踏まえて、共著論文の執筆に努めているところである。</p> <p>今年度 12 件の共同研究交流活動を実施した。これらの共同研究は、タイ・ドイツ・ベトナム・インドネシア・ラオスからの、2 か国から 6 か国による共同研究である。今年度の交流は、日本からタイへの派遣 1 人(23 日間)、タイ・ドイツ・ベトナム・インドネシアからの受入 8 人(259 日)であった。最終のジョイントセミナーにおいて、この 5 年間の成果について共有・議論することができた。</p> |
| <p>全期間にわたる研究交流活動及び得られた成果の概要</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>本課題では、高温発酵プロセスによるエタノール生産をエタノール生産性細菌 <i>Zymomonas mobilis</i> TISTR 548 を用いて行うため、様々な検討と実験を試みた。まず、米を原料とする高温減圧蒸留発酵を試み、10 L リアクター、そして <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 由来の耐熱化株を用いることで 40°C での米からのエタノール生産が実施可能なことを実証した。この高温発酵プロセスをコンピュータによりシミュレーションすることを検討したが、モデルの構築には至らなかった。一方、発酵条件の検討による高温発酵の可能性を探るため、様々な金属イオンの添加による <i>Z. mobilis</i> TISTR 548 の耐熱性への影響を解析したところ、Mg²⁺ と K⁺ の耐熱性への添加効果と相加効果が明らかとなった。これらのイオンの添加による耐熱性の向上は約 1°C であった。</p> <p>2) 微生物工学的手法を用いた新規の糖の生産技術の開発に関する研究</p> <p>アジア発祥の後発酵茶であるミャンの研究を通して、乳酸菌の能力を知ることができ、また、乳酸菌の生産する酵素を用いたオリゴ糖生産に関する研究、そして、日本(四国)にも後発酵茶があることを知り、伝統的後発酵茶である阿波番茶の研究を通して、人の健康機能に役立つ食品の機能を科学的に調べる研究の重要性を知るとともに、その研究に取り組む</p> |

シーズを開発することができた。また、後発酵茶の工程管理(GAP)や大量生産に乳酸菌、あるいは、その酵素を応用可能な研究成果が得られた。

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

次世代発酵技術開発を目指して耐熱性酵母を用いた高温発酵や非温度制御発酵の試験を実施してきた。特に、40°Cでの発酵と減圧蒸留を組み合わせたプロセスを安定に3回以上繰り返すことができることを示した。さらに、ダウンストリームでは従来に無い簡易なエタノール濃縮技術の構築をすすめ、20-30%エタノール溶液に対応できる膜の開発に成功した。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収集した。一方、高温発酵の更なる有利性を示すために、燃料米を原料として40°Cから45°CでのSSFとSHFを比較し、SSFはSHFの加水分解時間を短縮できることや42°Cまでは高いエタノール収率が得られること、酵母の死滅無く45°Cでの減圧蒸留ができることを示した。また、タイではセルロース系バイオマスに適応できる耐熱性酵母を、ラオス、インドネシア、ベトナムではデンプン系バイオマスに適応できる耐熱性酵母を分離・解析し、それぞれの国で利用できる耐熱性酵母を開発した。

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

課題4へ移動

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

研究交流活動を介して、神戸大学農学部・チェンマイ大学農産学部との学部間交流協定締結に至った。山形大学では、山形大学農学部・チェンマイ大学農産学部との共同研究契約締結に至った。また、この期間には、いくつかの支援プログラムのサポートを受けながら若手研究者育成も進め、JSTさくらサイエンスプログラム(科学技術研修コース)で3回、JASSO 海外留学支援制度(協定受入)で2回、チェンマイ大学農産学部ショートステイプログラムで3回の学生の受入・派遣を実施した。さらに、国際学会(FAB2014, 2016, 2018)へ参画することができた。

6) 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
パームオイルの製造工程から排出される廃水及びその木質および残渣からの第2世代バイオ燃料の生産プロセスの開発に関して、オイルパー

木の樹木部分の木質やその残渣を原料としたバイオ水素生産のための前処理工程を高率化するために、酵素の利用による加水分解工程の加速に着目して、その前処理後の可溶化液を用いたバイオ水素とその廃水を用いたバイオメタン生産の高効率化を行った。最終的には、酵素の最適添加量を決定し、それによる可溶化液を用いたバイオガス生産により、これまでの2.5倍から3倍高いバイオガス生産量を得ることができた。

7) 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

白色腐朽菌を代表として、バイオレメディエーションに有効に働く菌類を数多く単離した。それらの微生物細胞そのものの固定化、あるいはそれらが生産する付加価値を高めた各酵素（キシラーゼ、セルラーゼ、リグナーゼ等について、酵素生産技術とともに）の新規固定化技術の開発をさらに進め、それらの低コスト化を実現するために農作物残渣等を原料に用いるための前処理を含めた諸条件を把握した。以上より、本研究の成果を環境浄化へ応用する技術開発につなげることができた。

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

バイオ水素生の原料として、ネピアグラス及びそのサイレージ、微細藻類 (*Chlorella* sp.) をその対象とした。これらの前処理の検討（酸・加熱法、有機溶媒・触媒法、加水分解酵素添加法等）、前処理後の処理後の処理液を用いた2段階発酵（水素発酵（CSTR）＋メタン発酵（UASB））法の最適運転条件の検討を行った。最後に水素発酵時における水素分圧を下げるために生産されたバイオガスを一部反応器に循環させる方法を検討した。以上より、第2世代、第3世代バイオマスを用いたバイオ水素生産プロセスの構築の一助となすことができた。

9) 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

リグノセルロースを多く含む稲わら、ホテイアオイ、バガス等の農業系廃棄物を対象に、これらの廃棄バイオマスから効率よくバイオガス（水素＋メタン）を生産するためには、これら廃棄バイオマスから還元糖を得るための加温＋化学的前処理（酸処理やアルカリ処理を予定）が必要である。したがってそれに関して最適化を行った。得られた可溶化液からバイオガス（水素＋メタン）生産実験によりその効果を把握するためのデータを得た。以上より、リグノセルロース加水分解物からの高温ハイタン（水素＋メタン）生産プロセスの開発を実施した。

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

二相式高温嫌気性発酵によるパームオイル廃水からのハイタン(水素+メタン)生産の効率化・促進化のためにと、この二相式高温嫌気性発酵におけるその最適運転条件を実験的に検討し、それを把握した。これに加えて新たに「微生物電気分解」を組み合わせたパームオイル廃水からのさらなる高効率水素生産に関して検討した。その結果から「微生物電気分解」の組み込みによって 135%の効率向上という結果が得られた。以上より、パームオイル廃水からの高効率水素生産プロセスの実用化に貢献できた。

11) 再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産

再生可能資源を原料とした有用化成品の発酵生産を目的に、本研究交流活動を開始した。開始当初までの共同研究で、独自性の高い 1,3-ブタンジオール合成代謝経路の大腸菌内での構築に成功していたため、これを軸に研究を駆動していった。その結果、培養工学による 1,3-ブタンジオール生産の効率化、1,3-ブタンジオール合成代謝経路の改変による大腸菌での好氣的 1-ブタノールおよび酪酸の生産、さらに、原料とする有機酸依存的に様々な骨格を持つ 1,3-ジオール類の生産、を達成した。また、毒性を持つ 1-ブタノールの効率的生産を指向し、ブタノール耐性を有するコリネ型細菌の利用を考え、コリネ型細菌でのアセチル CoA 供給強化に向けた原栄養性ピルビン酸高生産株の造成に成功した。

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

タイのサケオ地域に建設した 10,000 kL サイズのパイロットプラントにおいて、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* を用いた高温でのエタノール発酵生産試験をするうえで、この生産試験に使用する菌株の安定供給と育種ための基本的な実験をウボンラチャタニ大学のカウンターパートと共同して進めることができた。パイロット試験では菌株の供給が必須であり、実情に合わせた菌株の保存・評価・輸送について議論計画し、発酵試験を遂行するだけの菌株供給を実施することができた。さらに、パイロット試験はコスト的に、これまでの生産方法に十分対抗できる生産方法であることが示された。一方で、実生産に近い環境で菌株の問題点も明らかになった。しかし、この問題点は菌株の改良育種により解決することで、より効率的な生産を実現できることを示している。そこで、菌株の耐性能に着目し、耐性に関わる遺伝子の同定を進める研究に展開させることができた。

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
カウンターパートの民間への移動により中止

14) 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ツロン酸からガラクトアル酸への微生物変換

本研究では、耐熱性微生物が産生する酵素を利用したバイオリファイナリー技術の構築を目指し、日本およびタイ国で大量に廃棄されている果物果皮等の農産廃棄物に着目して、そこから有用ケミカルを生産するプロセスを確立することを目的とした。農産廃棄物に柑橘果皮に着目し、そこに含まれるペクチンを高効率に分解する耐熱性真菌 *Aspergillus* sp. TPG-01 を分離、同定した。本菌は、日本国内で分離された中温性真菌と比較すると、固体発酵系で 40°C でも良好なペクチンの分解ならびにそこに働くポリガラクトツロナーゼ (PGase) を産生した。一方、*Gluconobacter* 属酢酸菌に、ペクチン分解物 D-ガラクトツロン酸 (GalUA) を D-ガラクトアル酸 (GalAA) へと酸化する反応を見出した。ここに働く酵素は PQQ を補欠分子族とする細胞膜酵素であった。耐熱性真菌による固体発酵工程と酢酸菌による酸化発酵工程の最適化を図り、それぞれを組みわせることによって、柑橘果皮から 6 g/L の GalUA を生産し、変換効率から 4.5 g/L 相当の GalAA を生産したと算出できた。GalAA 等のアルダル酸は、米国エネルギー省が定めるバイオリファイナリー技術の重要な基幹物質として知られており、新規なプロセスを提案できると考えている。

本課題では 5 年間で計 15 件の共同研究交流活動を実施した。これらの共同研究は、タイ・ドイツ・ベトナム・インドネシア・ラオスからの、2 か国から 6 か国による共同研究である。5 年間の交流は、日本からタイへの派遣 14 人 (124 日間)、タイ・ドイツ・ベトナム・インドネシアからの受入 41 人 (1202 日) であった。加えて、各小課題においては電子メールを使っての進捗状況の共有を随時行い、交流の活性化を図った。

7-2 セミナー

(1) 平成30年度セミナー実施状況

| | |
|---|--|
| 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」最終合同セミナー (英文) Final 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30年12月2日 ~ 平成30年12月4日 (3日間) |
| 開催地(国名、都市名、会場名) | (和文) 日本、山口市、山口大学会館 (英文) Japan、Yamaguchi City、Yamaguchi University Hall |
| 日本側開催責任者 氏名・所属・職名・研究者番号 | (和文) 山田 守・創成科学研究科・教授・1-1 (英文) Mamoru YAMADA・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation・Professor・1-1 |
| 相手国側開催責任者 氏名・所属・職名・研究者番号 (※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) | | 備考 |
|------------------|----|-----------------|-----|------------------------|
| | | A. | B. | |
| 日本 | A. | 34/ | 129 | |
| | B. | 40 | | |
| タイ | A. | 46/ | 230 | |
| | B. | 35 | | |
| ドイツ | A. | 3/ | 12 | セミナー前後に山大にて共同研究滞在したため |
| | B. | 2 | | |
| ベトナム | A. | 3/ | 12 | セミナー前に山大にて共同研究滞在したため |
| | B. | 5 | | |
| インドネシア | A. | 1/ | 3 | セミナー前後に山大にて共同研究滞在したため |
| | B. | 20 | | |
| ラオス | A. | 1/ | 5 | |
| | B. | 2 | | |
| 英国 (日本側協力研究者) | A. | 1/ | 4 | セミナー後に共同研究打ち合わせで滞在したため |
| | B. | 0 | | |
| 合計 〈人/人日〉 | A. | 89/ | 395 | |
| | B. | 104 | | |

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）

※人/人日は、2/14（＝2人を7日間ずつ計14日間派遣する）のように記載してください。

※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、備考欄にその内訳等を記入してください。

| | | | |
|---------------------|--|---------------------------------|-------------------|
| セミナー開催の目的 | 全員が参加する最終年度の合同セミナーとなることから、ほぼ全部の研究グループが口頭発表できるように計画する。同時に、全ての小研究課題についてポスター発表を行う。これによって本事業活動の成果を共有するとともに今後の展開に向けての新たな課題を見出すことを目的とする。また、共同研究者間での意見交換の機会も設け、本事業での研究成果の論文等への発表や次の共同研究内容について相談する。 | | |
| セミナーの成果 | <ol style="list-style-type: none"> 1. 全ての小研究課題の5年間の成果を Summary book としてまとめ、セミナーで発表した。これによって事業全体の進展を直接把握できるだけでなく、得られた研究成果を共有し、次期の新たな事業に生かすことができた。 2. 共同研究者間での面談によって、これまでの成果や今後の研究について詳細な打ち合わせを行うことができた。 3. 異なる研究グループの交流によって研究成果や研究手法に関する情報交換ができ、ネットワーク形成に繋がった。 4. 本セミナーは最終合同セミナーであることから、構成員全員で今後の展開について意見交換ができた。 | | |
| セミナーの運営組織 | 本事業の組織委員会を運営組織として開催した。 | | |
| 開催経費 分担内容 と金額 | 日本側 | 内容：国内旅費、外国旅費、謝金、 消耗品費、その他の経費 | 金額 9,529,455 円 |
| | タイ側 | 内容：外国旅費 | |
| | ドイツ側 | 内容：外国旅費 | |
| | ベトナム側 | 内容：外国旅費 | |
| | インドネシア側 | 内容：外国旅費 | |
| | ラオス側 | 内容：外国旅費 | |

| | |
|-------|--|
| 整理番号 | S-2 |
| 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」ファイナルサテライトセミナー</p> <p>(英文) Final Satellite Seminar of 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30年10月23日 ～ 平成30年10月24日 (2日間) |

| | |
|---|---|
| 開催地(国名、都市名、会場名) | (和文) ラオス、ルアンパバーン、ルアンパバーン県人民会議場 |
| | (英文) Lao PDR、Luang Phrabang Province、Meeting People's Council of Luang Phrabang Province, Laos |
| 日本側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 | (和文) 山田 守・創成科学研究科・教授・1-1 |
| | (英文) Mamoru YAMADA・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation・Professor・1-1 |
| 相手国側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 (※日本以外での開催の場合) | (英文) Dr. Somchanh Bounphanmy・Department of Biology, Faculty of Natural Science, National University of Laos・Associate Professor・6-1 |

参加者数

| 派遣先 派遣元 | | セミナー開催国 (ラオス) | | 備考 |
|--------------|----|------------------|----|----|
| | | A. | B. | |
| 日本 | A. | 6/24 | | |
| | B. | 2 | | |
| タイ | A. | 6/24 | | |
| | B. | 1 | | |
| ドイツ | A. | 1/4 | | |
| | B. | 0 | | |
| ベトナム | A. | 1/4 | | |
| | B. | 0 | | |
| インドネシア | A. | 1/4 | | |
| | B. | 0 | | |
| ラオス | A. | 4/16 | | |
| | B. | 30 | | |
| 合計 〈人/人日〉 | A. | 19/76 | | |
| | B. | 33 | | |

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)

※人/人日は、2/14(=2人を7日間ずつ計14日間派遣する)のように記載してください。

※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、備考欄にその内訳等を記入してください。

| | | | |
|---------------------|---|-------------------------|-----------------|
| セミナー開催の目的 | <p>サテライトセミナーは毎年実施し、それぞれの開催国の共同研究の進展を紹介するとともに、今後の研究の展開について相談する機会となる。加えて、現地の研究環境を視察するとともに、主催大学の関連分野の研究者や学生に本事業の紹介をするとともに交流も行う。今回のセミナーは e-ASIA 共同研究の会議と合同で実施する予定である。なお、この e-ASIA 共同研究は本事業の研究を基盤とするもので、本事業の研究課題 1 と 5 を実施している。</p> | | |
| セミナーの成果 | <ol style="list-style-type: none"> 1. ラオスとの共同研究を中心とした研究成果発表の機会となり、今後の研究交流に向けた有用な情報交換の場となった。 2. 本事業について、ラオスの大学関係者や関連分野の研究者ならびに学生に対して紹介できた。 3. ラオスの大学関係者や関連分野の研究者および政府関係者と次期拠点事業について相談することができた。 4. ラオスの企業や政府機関との交流の場となった。 | | |
| 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して開催した。</p> | | |
| 開催経費 分担内容 と金額 | 日本側 | 内容：国内旅費、外国旅費、その他の 経費 | 金額 323,530 円 |
| | () 側 | 内容 | |
| | () 側 | 内容 | |

| | |
|-----------------|---|
| 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30年8月13日 (1日間) |
| 開催地(国名、都市名、会場名) | (和文) タイ、バンコク、センターラグランドアンドバンコクコンベンションセンター |

| | |
|---|--|
| | (英文) Thailand、Bangkok、Centara Grand & Bangkok Convention Centre |
| 日本側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 | (和文) 山田 守・創成科学研究科・教授・1-1 (英文) Mamoru Yamada・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation・Professor・1-1 |
| 相手国側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 (※日本以外での開催の場合) | (英文) Gunjana THEERAGOOL・Kasetsart University・Associate Professor・2-41 |

参加者数

| 派遣先 派遣元 | | セミナー開催国 (タイ) | | 備考 |
|--------------|----|-----------------|----|----------------------|
| | | A. | B. | |
| 日本 | A. | 5/9 | | 3名は共同研究滞在中に参加・発表したため |
| | B. | 1 | | |
| タイ | A. | 30/30 | | |
| | B. | 20 | | |
| ラオス | A. | 3/9 | | |
| | B. | 0 | | |
| 合計 〈人/人日〉 | A. | 38/48 | | |
| | B. | 21 | | |

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)

※人/人日は、2/14 (=2人を7日間ずつ計14日間派遣する) のように記載してください。

※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、備考欄にその内訳等を記入してください。

| | | | |
|---------------------|--|-------------------------|-----------------|
| セミナー開催の目的 | 本事業にはタイの多くの大学やその関係者がかかわり、先端的研究や新技術開発を進めている。そこで例年と同様に NRCT の支援を受けて、Thailand Research EXPO 2018 の分科会で本事業の研究成果を発表し、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 | 本事業での共同研究成果や共同で開発した技術を紹介し、本事業をタイの関連分野の企業や研究者にアピールできた。本年度は特に、環境微生物や病原微生物を中心とした研究発表を行い、それらの知見について討論し、広く意見を得ることができた。紹介した技術やそれに対する意見等は、将来的にタイ企業等による活用に繋がると期待される。 | | |
| セミナーの運営組織 | 本事業の組織員会を運営組織として、開催した。 | | |
| 開催経費 分担内容 と金額 | 日本側 | 内容：国内旅費、外国旅費、その他の 経費 | 金額 580,380 円 |
| | () 側 | 内容 | |
| | () 側 | 内容 | |

| | |
|--------------------------------|---|
| 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15回若手研究者セミナー (英文) The 15 th Young Scientist Seminar of JSPS Core-to-Core Program "Establishment of an international research core for new bio-research fields with microbes from tropical areas" |
| 開催期間 | 平成30年11月13日 ~ 平成30年11月14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, Yamaguchi-ken Seminar Park |
| 日本側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 | (和文) 山田 守・創成科学研究科・教授・1-1 (英文) Mamoru Yamada・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation・Professor・1-1 |

| | |
|---|---------|
| 相手国側開催責任者 氏名・所属・職名・ 研究者番号 (※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) | | 備考 |
|--------------|----|-----------------|----|----|
| | | A. | B. | |
| 日本 | A. | 7/13 | | |
| | B. | 42 | | |
| タイ | A. | 5/10 | | |
| | B. | 17 | | |
| ドイツ | A. | 1/2 | | |
| | B. | 0 | | |
| ベトナム | A. | 2/4 | | |
| | B. | 5 | | |
| インドネシア | A. | 3/6 | | |
| | B. | 12 | | |
| ラオス | A. | 0/0 | | |
| | B. | 1 | | |
| 台湾 | A. | 0/0 | | |
| | B. | 1 | | |
| バングラデ シュ | A. | 0/0 | | |
| | B. | 2 | | |
| 合計 〈人/人日〉 | A. | 18/35 | | |
| | B. | 80 | | |

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）

※人/人日は、2/14（＝2人を7日間ずつ計14日間派遣する）のように記載してください。

※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、備考欄にその内訳等を記入してください。

| | | | |
|---------------------|---|-----------|-----------------|
| 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全般を研究対象とする若手研究者のためのグローバル人材育成の一環として実施し、研究成果発表等を通じて若手研究者の国際的なネットワーク形成に繋げる。本セミナーの企画・運営は日本人や外国人の大学院生が中心となって行われ、招聘講師による講演に加えて、参加者全員がそれぞれの研究成果を英語で発表し、質疑応答を行う。 | | |
| セミナーの成果 | <ol style="list-style-type: none"> 1. セミナー企画・運営の経験を積むことができた。 2. 英語による研究成果の口頭発表や質疑応答の機会となった。 3. 若手研究者は自身の研究について様々な角度から意見を得ることができた。 4. 一般的な微生物や生物の研究を深く知る機会となった。 5. 他国の若手研究者との交流ができ、異文化を知る機会となるだけでなく、国際的なネットワーク形成に繋がる機会となった。 | | |
| セミナーの運営組織 | 若手研究者によって運営委員会が組織され、本事業の組織委員会は支援組織としてセミナーを側面支援した。 | | |
| 開催経費 分担内容 と金額 | 日本側 | 内容：その他の経費 | 金額 324,125 円 |
| | () 側 | 内容 | |
| | () 側 | 内容 | |

(2) 全期間において実施したセミナー件数

| | 平成 26 年度 | 平成 27 年度 | 平成 28 年度 | 平成 29 年度 | 平成 30 年度 |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 国内開催 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 海外開催 | 2 | 2 | 4 | 3 | 2 |
| 合計 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 |

7-3 中間評価の指摘事項等を踏まえた対応

- ① 評価コメント (抜粋) : 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

対応:「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、微生物の多様性とその潜在的な高い有用性を生かすための「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なることから、どうしてもコメントにもあるように「総花的」に見えてしまう。とはいえ、「世界水準の先端研究拠点」を目指すために、その生態学から生理学にわたる多様な研究の中から新規性の高い研究を伸ばし、先端研究として発展させる必要がある。そのため、「多様な熱帯性環境微生物の潜在能力の発掘と新規利用法の開発」(課題1、4)、「熱帯性環境微生物の特性である耐熱性原理の解明」(課題2)、「熱帯環境からのウイルス伝播ルート

の解明」(課題3)、「東南アジアの食文化と腸内細菌叢」(課題3)、「耐熱性を利用した高温発酵・次世代型バイオ燃料生産技術の開発」(課題5)など、先端的な研究を目指した研究交流が複数の国のメンバーの協力によって進められてきた。さらに、より特化した小グループによって以下の3つの先端的な研究が行われてきている。研究課題2の中のグループによるJST・ALCA事業(代表:松下一信)「低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲノム工学的「耐熱化」(23年度~31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~29年度)、そして研究課題5の中のグループによるJST・e-ASIA共同研究(代表:山田守)「ASEANバイオマス活用に向けた耐熱性微生物を利用するバイオ燃料等変換プロセスの開発」(29年度~31年度)である。加えて、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進めた。このように、5つの課題が並行して、かつ連携しながら種々の先端的な基礎研究を発展させ、社会実装へ向けた大きな流れを創ろうとするところが本事業の特徴である。一方、「世界の微生物学を主導できる」とのコメントが挙っている。熱帯性環境に棲息する微生物は環境に適応して「耐熱性」を有し、様々な特性をもつ有用な「多

様性」が見込まれる。本事業によって「耐熱性」については3種の微生物種の網羅的解析から共通する分子機構の存在を見出し、有用微生物への耐熱性付与の可能性を示し、また、耐熱化研究から耐熱化の限界が2~3度であることを示唆し、IPCCの指摘する「継続的に発展する社会」シナリオの温度範囲が常温性微生物の生存範囲であることを初めて示した。さらに、耐熱性を生かした高温発酵等の多くの技術開発を行った。これらの「耐熱性」や「耐熱化」に関する研究や応用についての論文数は世界をリードし、中国等の多くの研究者が同様な観点からの研究を急速に増やしていることから、この事業が新しい研究分野の開拓に繋がっていることを如実に示している。また、「多様性」に関する研究やエコシステムの研究は多くのメンバーが新たなアイデアに基づいて実施し、微生物の限りない多様性や環境との相互作用、食生活と腸内細菌叢組成との関連性やウイルスの伝播ルートの解明等について数多くの知見を獲得した。

- ② 評価コメント（抜粋）：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

対応：「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いが、次期の事業に向けて運営委員会が開かれる度に組織のブラッシュアップを検討してきた。また、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、次期の事業を担う高い研究能力を有する人材の育成に努めてきた。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することによって共同研究の機会を提供し、より特化した先端研究への参加を促してきた。さらに、本事業のセミナーやいくつかの国際会議および Thailand Research EXPO において若手研究者の口頭発表の機会を提供した。

- ③ 評価コメント（抜粋）：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

対応：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。一方、各専門分野の Top10%補正論文をいくつか発表した（論文一覧参照）。論文数も着実に増加し、現集計では 227 報（共著論文 135 報）に達し、現在論文を作成中のものも数多くある。

- ④ 評価コメント（抜粋）：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

対応：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。なお、日本人研究者1名が毎年、他経費も活用しながら1ヶ月以上タイに滞在し、フィールドワーク等を実施した。一方、タイ以外の国との交流拡大については、以下のように進めてきた。インドネシアでは当初、支援機関が拠点大学のブラビジャヤ大学であったが、インドネシアおよび日本のコーディネーターの努力によって平成28年度の途中から政府機関の Ristekdikti へと変更された。これに関連して Ristekdikti は平成29年度から新規に若手研究者短期派遣プログラムを開始し、14~20名を2ヶ月間日本に派遣し、共同研究を実施した。インドネシアは日本だけでなく、タイ、ドイツ、ベトナムにも研究者を派遣してきた。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年からベトナムや日本に若手研究者を長期派遣してきた。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進めてきた。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1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進めた。イギリスは独自予算を獲得するために毎年ベトナム等との共同申請を行ってきたが採択に至らなかった。しかし、共同研究に必要な研究費は独自に獲得してきた。さらに、平成29年度から発酵関連技術開発を目指す e-ASIA 共同研究が開始されたことから、日本とタイだけでなく、ラオスやインドネシアとも、より太い交流が形成されつつある。

⑤評価コメント（抜粋）：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

対応：日本に無く多様性のある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きた。5年間を通じて、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た。以上のような直接的に関与する機会を提供することによって後継者育成をすす

めた。また同時に、リーダーやサブリーダーに協力機関参加者の活動を高めるためのパイプ役も担ってもらった。「拠点機関参加者と協力機関参加者の活動の差が大きい」との指摘であるが、5年間の共著論文数 135 報のうち 68 報は協力機関参加者によるものであり、両者の活動に大きな差はなく、協力機関参加者も本事業に十分貢献していると認識している。

8. 研究交流実績総人数・人日数

8-1 平成30年度の相手国との交流実績

| 派遣元 | 派遣先 | 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) | | 合計 | | |
|---------------|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|------|-----|--------|-----|-----|-----|---------------|-----|----|-----|-----|
| | | | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | 人数 | 人日数 | |
| 日本 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 6 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 44 |
| | | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 30 | 0 | 0 | 6 | 30 |
| | | 4 | 4 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 19 |
| | | 計 | 10 | 57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 30 | 0 | 0 | 17 | 93 |
| タイ | | 1 | 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 |
| | | 3 | 37 | 543 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 543 |
| | | 4 | 5 | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 150 |
| | | 計 | 42 | 693 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 693 |
| ドイツ | | 1 | 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 |
| | | 3 | 3 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 43 |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 計 | 3 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 43 |
| ベトナム | | 1 | 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 |
| | | 3 | 3 | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 64 |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 計 | 3 | 64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 64 |
| インドネシア | | 1 | 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 |
| | | 3 | 2 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 37 |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 計 | 2 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 37 |
| ラオス | | 1 | 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 |
| | | 3 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 計 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| イギリス (日本側) | | 1 | 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 |
| | | 3 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| | | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 計 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| 合計 | | 1 | 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 |
| | | 3 | 47 | 699 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 30 | 0 | 0 | 53 | 729 |
| | | 4 | 5 | 150 | 4 | 13 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 169 |
| | | 計 | 52 | 849 | 10 | 57 | 0 | 0 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 30 | 0 | 0 | 69 | 942 |

※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。

※相手国以外の国へ派遣する場合、国名に続けて(第三国)と記入してください。

8-2 平成30年度の国内での交流実績

| 第1四半期 | 第2四半期 | 第3四半期 | 第4四半期 | 合計 |
|-----------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| 0 / 0 (0 / 0) | 0 / 0 (10 / 20) | 34 / 117 (23 / 69) | 0 / 0 (30 / 90) | 34 / 117 (63 / 179) |

8-3 全期間にわたる派遣・受入人数

| | 平成26年度 | 平成27年度 | 平成28年度 | 平成29年度 | 平成30年度 |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 派遣人数 | 61 (18) | 28 (25) | 52 (34) | 43 (65) | 17 (29) |
| 受入人数 | 30 (35) | 50 (48) | 32 (60) | 37 (89) | 52 (80) |

※各年度の実施報告書の「相手国との交流実績」に記載の人数を転記してください。

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

9. 経費使用総額

9-1 平成30年度経費使用額

(単位 円)

| | 経費内訳 | 金額 | 備考 |
|---------|-------------------|------------|--|
| 研究交流経費 | 国内旅費 | 8,062,650 | 国内旅費、外国旅費の合計は、研究交流経費の50%以上であること。 |
| | 外国旅費 | 1,740,040 | |
| | 謝金 | 129,175 | |
| | 備品・消耗品購入費 | 140,310 | |
| | その他の経費 | 3,314,221 | |
| | 不課税取引・非課税取引に係る消費税 | 213,604 | |
| | 計 | 13,600,000 | 研究交流経費配分額以内であること。 |
| 業務委託手数料 | | 1,360,000 | 研究交流経費の10%を上限とし、必要な額であること。また、消費税額は内額とする。 |
| 合計 | | 14,960,000 | |

9-2 全期間にわたる経費使用額

(単位 円)

| | 平成26年度 | 平成27年度 | 平成28年度 | 平成29年度 | 平成30年度 |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 国内旅費 | 7,546,996 | 9,644,144 | 7,291,011 | 7,971,647 | 8,062,650 |
| 外国旅費 | 7,083,318 | 3,187,022 | 6,263,090 | 4,769,644 | 1,740,040 |
| 謝金 | 0 | 73,760 | 0 | 0 | 129,175 |
| 備品・消耗品購入費 | 66,056 | 15,714 | 0 | 9,865 | 140,310 |
| その他の経費 | 761,867 | 1,327,774 | 415,036 | 812,070 | 3,314,221 |
| 不課税取引・非課税取引に係る消費税 | 541,763 | 251,586 | 530,863 | 436,774 | 213,604 |
| 合計 | 16,000,000 | 14,500,000 | 14,500,000 | 14,000,000 | 13,600,000 |

※各年度の実施報告書の「経費使用額」を転記してください。

※「不課税取引・非課税取引に係る消費税」について、平成27年度以前の実施報告書で

は「外国旅費・謝金等に係る消費税」の記載となっています。

10. 相手国マッチングファンド使用額

※全期間にわたる相手国のマッチングファンドの状況概要について、記入してください。

| | | |
|---|----------------|--|
| ① | 相手国名 | タイ |
| | 拠点機関名 | カセサート大学 |
| | 経費負担区分 | パターン2 |
| | マッチングファンドの状況概要 | 学術助成機関：National Research Council of Thailand プログラム名：Core-to-Core Program A. 支給期間：2014-2019 採択期間内の使用金額：約 1,500 万バーツ |
| ② | 相手国名 | ドイツ |
| | 拠点機関名 | ベルリンボイト工科大学 |
| | 経費区分 | パターン2 |
| | マッチングファンドの状況概要 | 学術助成機関：BMBF, Departmental resources プログラム名：Thai-German S&T Cooperation, Researcher Mobility Scheme 支給期間：2014-2019 採択期間内の使用金額：約 7 万ユーロ Khon Kaen 及び Chiang Mai でのワークショップ、各国への若手研究者の長期派遣など |
| ③ | 相手国名 | ベトナム |
| | 拠点機関名 | カントー大学 |
| | 経費区分 | パターン2 |
| | マッチングファンドの状況概要 | 学術助成機関：Ministry of Sciencee and Technology in Vietnam プログラム名：Research program offered collaboratively with Yamaguchi University 支給期間：2014-2019 採択期間内の使用金額：約 14 万ドル |
| ④ | 相手国名 | インドネシア |
| | 拠点機関名 | ブラビジャヤ大学 |
| | 経費区分 | パターン2 |
| | マッチングファンドの状況概要 | 学術助成機関：ブラビジャヤ大学 プログラム名：Core to Core Project 支給期間：5 年間 (2014-2019) 当初、上記のようにブラビジャヤ大学の助成で開始したが、インド |

| | | |
|---|--------------------|---|
| | | <p>ネシア側コーディネーター及び日本側コーディネーターによる交渉の結果、以下のように 2017 年途中から 3 年間 Ristekdikti の支援が受けられるようになった。</p> <p>学術助成機関：ブラビジャヤ大学及び Ristekdikti</p> <p>プログラム名：Core to Core Project and Short-training Program</p> <p>支給期間：3 年間 (2017-2019)</p> <p>採択期間内の使用金額：約 3,000 万円</p> |
| ⑤ | 相手国名 | ラオス |
| | 拠点機関名 | ラオス国立大学 |
| | 経費負担区分 | パターン 2 |
| | マッチングファンドの 状況概要 | <p>学術助成機関：ラオス国立大学</p> <p>プログラム名：Core-to-Core Program</p> <p>支給期間：2014-2019</p> <p>採択期間内の使用金額：約 230 万円</p> |