

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06586

研究課題名(和文)キトサン系バイオ凝集剤生産機構の解明と代謝工学的手法を用いたその高生産化

研究課題名(英文)Elucidation of the biosynthetic mechanisms of chitosan-like bioflocculant and its high production by metabolic engineering

研究代表者

武尾 正弘 (Masahiro, Takeo)

兵庫県立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40236443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Citrobacter属細菌の生産するキトサン系バイオ凝集剤の生産機構の解明とその高生産化を目的に、*C. freundii* IFO 13545株において、アミノ糖合成関連遺伝子、グルコース代謝関連遺伝子、凝集剤の多糖化と膜分泌に関わる遺伝子群(bfpABCD)の追加導入や破壊を実施した。いずれの試みも凝集活性の改善に繋がり、最大で野生株の7倍の活性に達した。また、bfpABCDの機能を理解するために、デアセチラーゼをコードすると推定したBfpBを大腸菌で大量発現させ、精製したが、酵素活性の検出には至らなかった。また、凝集剤の培養液からの回収のために、中空糸膜を用いた凝集剤の濃縮を検討した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the biosynthetic mechanisms of chitosan-like bioflocculant produced by *Citrobacter* strains and to improve the production, gene addition/disruption studies were performed on genes involved in amino sugar biosynthesis, glucose metabolisms, and polymerization and secretion of the bioflocculant (bfpABCD) in *C. freundii* IFO 13545. By these trials, the gene modified strains increased the activities, which achieved to 7-times higher activity than that of the wild type strain. To understand the functions of bfpABCD, BfpB, a putative deacetylase, was over-expressed in *E. coli* and purified. However, the protein showed no deacetylating activity against the bioflocculant. For the recovery of the bioflocculant from the culture supernatants, membrane concentration was also conducted using hollow fiber membrane modules.

研究分野：生物工学

キーワード：bioflocculant Citrobacter Metabolic engineering secretion membrane concentration chitosan

## 1. 研究開始当初の背景

凝集剤は、水処理や有機物回収等の分野で幅広く用いられている薬剤であり、国内市場規模は年間 300 億円以上と見積もられている。現在多用されている硫酸バンドやポリ塩化アルミ等の無機系凝集剤は、鉄やアルミが残留する金属含有汚泥を大量発生し、一方、ポリアクリルアミドのような合成高分子凝集剤は、生分解性が悪い汚泥を発生するため、環境に大きな負荷をかけている。カニ殻由来キチン・キトサンや納豆菌由来ポリグルタミン酸等のバイオ凝集剤も知られているが、資源量に限りがあり、生産コストが高く、ほとんど使用されていないのが現状である。生分解性のあるバイオ凝集剤を安価に大量生産できれば、既存の化学系凝集剤の代替となり、環境負荷の低減に大きく貢献できる。

大阪大学・藤田正憲名誉教授らが見いだした *Citrobacter* sp. TKF04 株は、低級脂肪酸（酢酸、プロピオン酸）を基質として、バイオ凝集剤（BF04）を生産する（J. Biosci. Bioeng., 89,40,2000）。平成 10 年度 NEDO 即効型提案公募事業において、大阪大学、姫路工大（現・兵庫県立大学）等の共同研究により、BF04 に関わる、基礎から工業生産に至る幅広い研究を展開した。その結果、本凝集剤はキトサンと類似の構造を有する多糖であり、PAC や PAA に比べ、広範囲の pH で優れた凝集能を示すことがわかった。しかしながら、凝集剤生産の不安定性（培養中に凝集活性低下、生産の再現性がない等）や市販凝集剤とのコスト比較から事業化が中止となった。我々は、この研究の中で、凝集剤生産能が *Citrobacter* 属の近縁種に広く分布していることに気づいた。その後、新たに登場したゲノム解析・メタボローム解析や代謝工学的的手法により上記の問題点を克服できると判断し、平成 22 年度より研究開発を再開した。この研究では、凝集剤を安定かつ高生産する菌株を探索するために、新たに *Citrobacter* 属細菌を幅広く収集し、それらの凝集活性を評価したところ、収集株の 50% 以上に凝集活性を認め、さらに凝集活性の高い 5 株の菌株を得た。また、副添加基質について検討したところ、グルコースを筆頭に、ごく一般的なアミノ酸や有機酸も微量で凝集剤の生産を抑制することがわかり、複雑な代謝制御の存在が浮き彫りとなったが、これを回避する基質も見つけた。

一方、バイオ凝集剤の回収方法としてエタノール沈殿を採用してきたが、一旦凝集剤を固形物にすると高濃度で水に再溶解させることが難しく、その際、凝集活性が著しく損なわれる欠点を有していた。それ故、エタノール沈殿法では、高活性の濃縮品を生産することが困難であり、コストも高いため、これに代わる濃縮・回収法の開発の必要性を感じた。

そこで、平成 24 年より、代謝工学的的手法による安定かつ高活性な凝集剤生産菌株の育種を目指し、*Citrobacter* 属細菌の凝集剤合成経路の推定とドラフトゲノム解析による関連遺伝子の探索を実施した。既知の炭素代謝の情報から、Fig.1 に示す通り、酢酸はアセチル CoA に変換後、TCA 回路あるいはグリオキシル酸 (GO) 回路で炭素源・エネルギー源として利用されるとともに、糖新生を經由してフルクトース 6-リン酸 (Fru-6P) からアミノ糖の合成経路に入り、最終的に凝集剤の前駆体である UDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) を生成すると推定した (Fig.1 のピンク矢印)。凝集剤合成の最終段階では、UDP-GlcNAc を用いて糖鎖を伸長し (多糖化)、菌体外へ分泌すると推定しているが、この機構はこれまでに全く知られていない。3 株の *Citrobacter* 属細菌のドラフトゲノム解析により、この経路の酵素反応に対応する 40 以上の候補遺伝子を見出した。そのうちの一株 *C. freundii* IFO13545 株について、相同組換えによる遺伝子破壊を実施し、破壊した遺伝子と表現型との関係から推定合成経路がほぼ正しいことがわかった。一方、バイオ凝集剤の回収方法として、中空糸膜を用いた膜濃縮を検討したところ、UF 膜で活性のロスなく濃縮できることがわかった。この際、急速な膜の目詰まりは認められず、膜濃縮が凝集剤回収に有効な手段である予備的知見を得た。

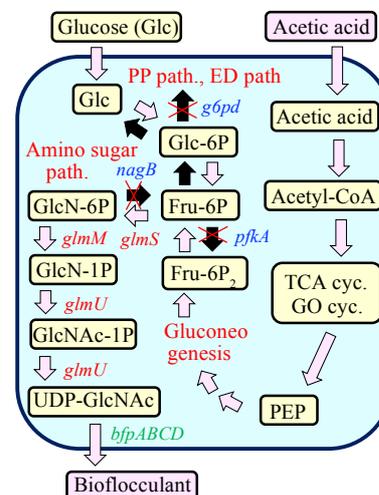


Fig. 1 Biosynthetic pathway of chitosan-like bioflocculant in *Citrobacter* strains

## 2. 研究の目的

本研究では、キトサン系バイオ凝集剤を生産する *Citrobacter* 属細菌の凝集剤生産機構、特にこれまで全く知見のなかった凝集剤生産の最終段階である、UDP 化アミノ糖を用いた糖鎖伸長と膜分泌の機構を解明するとともに、その情報を基に代謝工学的的手法と膜濃縮技術を併用することにより、バイオ凝集剤を高生

産することを目的とし、以下を検討する。

### (1) 代謝工学的手法を用いたバイオ凝集剤高生産株の育種

凝集剤生合成の最終段階に近いアミノ糖合成経路（関連遺伝子はFig.1の*glmUSM*）を強化し、凝集剤高生産株の育種を実施する。また、凝集剤の糖鎖伸長と分泌に関わると推定される遺伝子群 *bfpABCD* (Fig.1) の導入で高生産菌株の育種を行う。さらに、酢酸から凝集剤生産に至る長い生合成経路では、複雑な炭素代謝の制御を受けるため、これを避けて、短絡的にグルコースから凝集剤を生産できる菌株を育種する (Fig.1の *pfkA*, *g6pd* 破壊)。

### (2) キトサン系バイオ凝集剤の糖鎖伸長と膜分泌の機構の解明

凝集剤の糖鎖伸長と分泌に関連すると推定される遺伝子群 *bfpABCD* を見出している。糖鎖伸長に関わるグリコシルトランスフェラーゼ (*bfpC* 産物) やアセチル基を除くデアセチラーゼ (*bfpB* 産物) の遺伝子クローニング、酵素精製と酵素の特徴付けを実施する。さらに、困難な課題ではあるが、膜貫通タンパク (*bfpA* 産物) の結晶化と構造解析を試みる。

### (3) 中空糸膜を用いたバイオ凝集剤の濃縮・回収プロセスの開発

バイオ凝集剤の濃縮・回収の手段として、中空糸膜を用いた膜濃縮が有効であることを述べたが、本研究では、UF膜モジュールの分画分子量や膜材質の適合性を、SPECTRUM製タンジェンシアルフロー濾過システムを用いて検討し、各種パラメーターに基づき、膜濃縮の最適化を行う。また、20Lレベルの大量濃縮も検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 代謝工学的手法を用いたバイオ凝集剤高生産菌株の育種

アミノ糖合成経路では、Fig.1に示す通り、解糖系の中間体であるFru-6PがGlcN-6Pへ変換される。この反応はGlcN-6Pシンターゼ (*glmS*産物) が触媒する。次いで、ホスホグルコサミンターゼ (*glmM*産物) がGlcN-6Pのリン酸基を1位に転移させ、GlcN-1Pを合成する。さらにN-アセチルグルコサミン1-リン酸 (GlcNAc-1P) ウリジルトランスフェラーゼ / GlcN-6Pアセチルトランスフェラーゼ (*glmU*産物・二機能酵素) がGlcN-1Pをアセチル化及びUDP化してUDP-GlcNAcを合成する。*C.freundii* IFO13545株のゲノム配列の情報を基に、*glmUS*及び*glmM*を別々の遺伝子座からPCRで増幅し、これを連結して*glmUSM*とし、大腸菌用T-Vector pMD20 (Takara)に導入する。また、文献情報に基づき*glmUSM*に変異を導入して生産物阻害を受けない高活性型GlmSを

生産する*glmUS\*M*も構築し、これもpMD20へ導入する。これらの遺伝子群をIFO13545株に導入し、凝集活性の改善を試みる。さらに、導入遺伝子の安定化をはかるため、染色体埋め込みベクターpTJ1を用いて*glmUSM*及び*glmUS\*M*をIFO13545株のゲノムに導入し、組換え体の凝集能力を評価する。

IFO13545株はグルコースからバイオ凝集剤を生産しないが、グルコースからの凝集剤生産は糖廃液等の安価な炭素源の利用を可能にすることから極めて重要である。本菌株にグルコースからバイオ凝集剤を生産させるために、グルコースからFru-6Pを蓄積させ、アミノ糖合成経路へ流す炭素フローを増加させる目的で、Fig.1に示す解糖系 (EMP経路) のホスホフルクトキナーゼの遺伝子 *pfkA* とエントナー・ドウドルフ (ED) 経路へバイパスするグルコース6-リン酸 (Glc-6P) デヒドロゲナーゼの遺伝子 *g6pd* を破壊する。また、アミノ糖合成経路からの炭素フローの戻りを防止するためにGlcN-6Pデアミナーゼの遺伝子 *nagB* を破壊する。

### (2) バイオ凝集剤の糖鎖伸長と膜分泌の機構の解明

IFO13545株のゲノム配列情報を基に、多糖の生合成・分泌に関連する遺伝子を次々に破壊したところ、大腸菌のポリグルコサミン (PGA) 合成・分泌に関わる遺伝子群 *pgaABCD* と同源性の高い遺伝子群 (*bfpABCD* と命名、Fig.2) を破壊した場合に、IFO13545株は完全に凝集活性を失った。*pgaABCD* の遺伝子産物の機能から、BfpA: 外膜貫通タンパク、BfpB: デアセチラーゼ (多糖の脱アセチル化)、BfpC: グリコシルトランスフェラーゼ (糖鎖の伸長)、BfpD: 糖鎖伸長の制御、とそれらの機能を推定した (Fig. 3)。

そこで、これらの機能を確かめるために、酵素活性の期待できるBfpBやBfpCについて、大腸菌の遺伝子発現系を用いてタンパク質を発現させ、それらを精製してその性質を調べる。また、BfpAのような構造タンパクについては、大量発現に成功した場合にその結晶化並びにX線構造解析を実施し、構造に関する情報の取得を試みる。

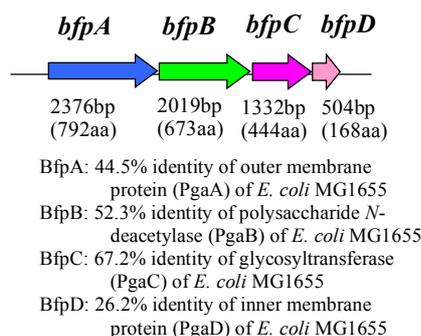


Fig. 2 *bfp* operon on the IFO13545 genome

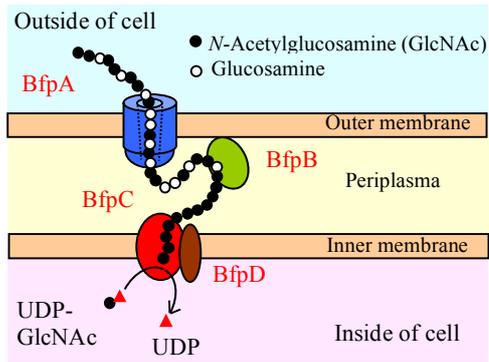


Fig. 3 Putative functions of *bfpABCD* gene products

### (3) 中空糸膜を用いたバイオ凝集剤の濃縮・回収プロセスの開発

バイオ凝集剤の濃縮・回収の手段として、本研究では、SPECTRUM社製KrosFlo Research II TFF systemを用いて中空糸膜を用いた膜濃縮を検討する。小スケール（例えば200ml）の培養から、mPES製モジュールで活性ロスなく凝集剤を50倍以上に濃縮できたので、各種パラメータに基づき、分画分子量や膜材質の適合性等を評価し、膜濃縮条件の最適化を実施する。また、大規模培養・大量濃縮を想定して、20Lレベルの濃縮を実施し、同様に評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 代謝工学的手法を用いたバイオ凝集剤高生産菌株の育種

アミノ糖の生合成に関わる経路の遺伝子強化を狙い、*glmUS*（あるいは *glmUS\**）及び *glmM* を IFO13545 株の別の遺伝子座から個別にクローン化し、*glmUSM*（あるいは *glmUS\*M*）として再構築して IFO13545 株の *glmS* 欠失株（*ΔglmS*）へ戻したところ、Fig.4 に示す通り、ベクターコントロールの菌株は *glmS* 欠失とベクター-pMD20 の保持の負荷で凝集活性を全く示さなかったが、これに *glmUS\*M* を相補

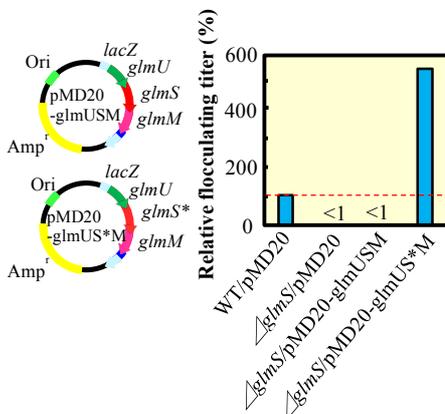


Fig. 4 Recombinant plasmids including *glmUSM* and *glmUS\*M* and flocculation activities of *C. freundii* IFO13545 (wild type: WT), and its *glmS* disruptants (*ΔglmS*) harboring these plasmids

した菌株は、*glmS* を有する野生株 (WT) に比べても約 5.6 倍の凝集活性を示し、これらの遺伝子の導入効果が確認できた。何らかの理由で発現が不十分であったのか、*glmUSM* を補った菌株は全く活性を示さなかった。

次に、グルコースからバイオ凝集剤を生産させるために、グルコースからアミノ糖合成経路へ流す炭素フローを増加させる目的で、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子 *pfkA* と ED 経路へバイパスする Glc-6P デヒドロゲナーゼ遺伝子 *g6pd*、さらにはアミノ糖合成経路からの炭素フローの戻りを防止するために GlcN-6P デアミナーゼ遺伝子 *nagB* を相同組換えにより破壊した。これにより、一重破壊株 *ΔpfkA*, *Δg6pd*, *ΔnagB*、二重破壊株 *ΔpfkAΔnagB*, *ΔpfkAΔg6pd*, *Δg6pdΔnagB*、三重破壊株 *ΔpfkAΔnagBΔg6pd* がそれぞれ得られた。グルコースを基質としてこれらの菌株を培養したところ、Fig.5 に示す通り、野生株は全く凝集活性を示さなかったが、*pfkA* の破壊を有する菌株は全て凝集活性を示した。このことから、*pfkA* の破壊は非常に有効であることがわかった。これらの菌株の中で、二重破壊株 *ΔpfkAΔnagB* が最大の凝集活性を示し、この活性は野生株を酢酸培地で培養した際の凝集活性の 50%程度であった。一方、これらの菌株を酢酸培地で培養し、凝集活性を評価したところ、Fig.6 に示す通り、二重破壊株 *ΔpfkAΔnagB*, *ΔpfkAΔg6pd*、三重破壊株 *ΔpfkAΔnagBΔg6pd* で野生株の 3 倍程度の高い凝集活性を示した。これらの結果から、この 3 つの遺伝子の破壊は酢酸を基質とした場合でも凝集活性の改善に大きく寄与することがわかった。

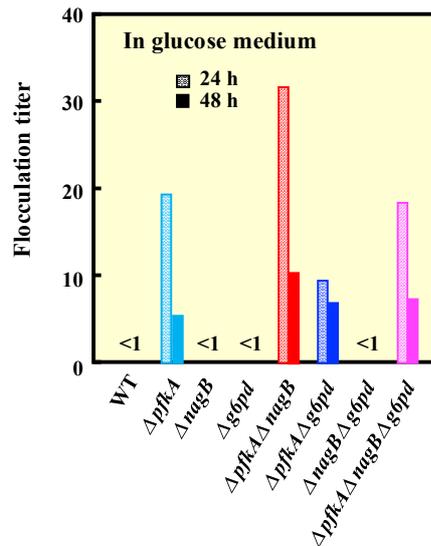


Fig. 5 Flocculation activities of *C. freundii* IFO13545 (Wild type: WT) and its gene disrupted mutants grown in glucose medium.

### (2) バイオ凝集剤の糖鎖伸長と膜分泌の機構の解明

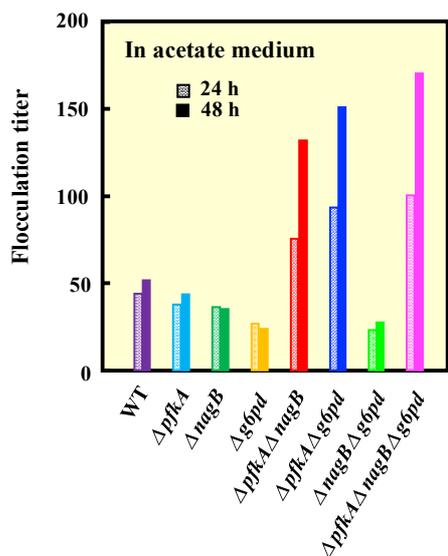


Fig. 6 Flocculation activities of *C. freundii* IFO13545 (wild type: WT) and its gene disrupted mutants grown in acetate medium

*C. freundii* IFO13545 株から *bfpABCD* を大腸菌発現ベクター pHSG298 へクローニングを試みたところ、*bfpABCD* がベクターのプロモーターの転写方向と逆に挿入された組換えプラスミドを持つ形質転換株ばかりが得られた。最終的に、プロモーターの転写方向に一致する組換えプラスミドとそれを保有する形質転換体を得られたが、それらはプラスミドが不安定であった。これらの結果は、この遺伝子群を高発現させると致死に至ることを示唆している。さらに、多糖化に関わると推定される *bfpC* を His-tag ベクター pET26b にクローニングすることに成功したが、SDS-PAGE による分析では顕著な目的タンパクの生産は認められなかった。そのため、*bfpC* に関する研究の進展が困難となった。

また、pET26b を用いて *bfpB* をクローニングしたところ、SDS-PAGE 分析により C 末端に His-tag を付与したタンパクとして大量に生産

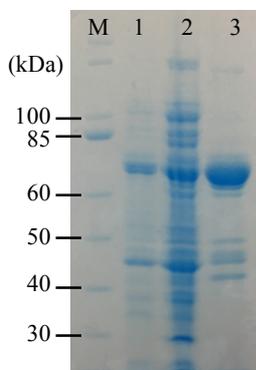


Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the cell extract (Lane 1) and whole cells (Lane 2) of recombinant *E. coli* harboring pET26b+*bfpB*, and purified protein (His-tag BfpB) by affinity chromatography. A molecular marker is shown in Lane M.

されることがわかった (Fig.7)。これをアフィニティークロマトグラフィーで精製し、バイオ凝集剤、キチン・キトサン標準品、GlcNAc ペンタマー標準品を基質に脱アセチル化反応を実施し、HPLC による遊離酢酸の検出や TNBS 法による遊離アミノ基の定量で脱アセチル活性を評価した。しかしながら、コントロールと比較して有意な活性は検出できなかった。BfpB タンパクの N 末端に His-tag を付与して大量発現させても結果は同じであった。現在、酵素活性の検出を継続して検討している。

*bfpABCD* のクローニングにおいて、ベクター pHSG298 のプロモーターと転写方向が一致する組換えプラスミドを、先に得られた遺伝子破壊株 *ΔpfkA* 及び *ΔpfkAΔnagB* に導入してその効果を調べた。その結果、Fig.8 に示す通り、いずれの遺伝子破壊株でも凝集活性の改善が見られ、特に *ΔpfkAΔnagB* (+*bfpABCD*) は、野生株の凝集活性の 7 倍の活性に達した。この結果から *bfpABCD* も凝集活性の改善に大きく寄与する遺伝子群であることが証明された。

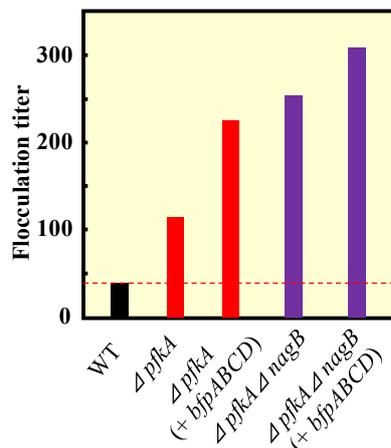


Fig. 8 Flocculation activities of *C. freundii* IFO13545 (wild type: WT) and its gene disrupted mutants harboring *bfpABCD* (in pHSG298)

### (3)中空糸膜を用いたバイオ凝集剤の濃縮・回収プロセスの開発

凝集剤の生産・濃縮・回収プロセスの取り組みとして、IFO13545 株の培養上清を用い、小スケールで各種材質・分画分子量の UF 膜の中空糸モジュールで凝集剤の濃縮を試み、凝集活性のロスがほとんどなく凝集剤を濃縮できる中空糸膜 (100kDa カット、mPES) を決定できた。次に、30L 培養槽を用いた 15L レベルの培養にスケールアップしたところ、フラスコレベルの 80%以上の凝集力価の培養液が得られ、また、同規模の膜濃縮でも大きな問題を生じず、活性ロスなく濃縮に成功した。

この濃縮物については、pH を 4 以下に保つことにより室温あるいは冷蔵庫で 1 ヶ月以上活性が保持されることがわかった。さらに、

膜濃縮サンプルを一定条件で保存すると結晶性のマイクロファイバーが析出することを新たに見出した (Fig.9)。この結晶性ファイバーを集め、酸で溶解した後、凝集活性を測定したところ、高い活性を持つことがわかった。この結果からこの多糖の新素材としての活用や晶析による低コスト回収法等、新たな研究の展開が期待できる。

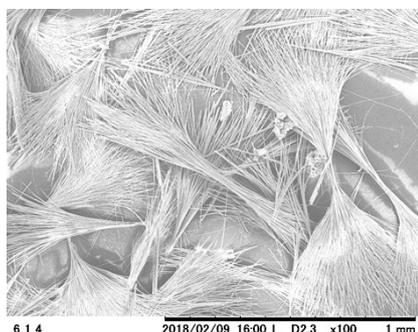


Fig. 9 SEM image of crystalline microfibrils appeared in the concentrated sample of the biofloculant

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① M.Takeo, S.Taguchi, S.Odagaki, P.Baranwal, K.Kimura, S.Negoro "Simple ELISA using polyclonal antibody and lectin for determination of soluble chitosan-like polysaccharide in bacterial culture", Int. J. Bioanal. Methods Bioequival. Stud., 4, 76-81 (2017)
- ② M.Takeo, K.Kimura, S.Mayilraj, T.Inoue, S.Tada, K.Miyamoto, M.Kashiwa, P.Baranwal, D.Kato, S.Negoro. "Biosynthetic pathway and genes of chitin/chitosan-like biofloculant in the genus *Citrobacter*", Polymers, 10, 237 (2018).

[学会発表] (計 10 件)

- ① 武尾正弘、田口冨恵、柏 雅美、木村和幸、根来誠司：「培養液中のキトサン様多糖の ELISA による定量」、第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集、p. 151 (平成 27 年 10 月 26 日、鹿児島城山ホテル) (ポスター発表)。
- ② 柏 雅美、宮本弘毅、木村和幸、多田昇平、根来誠司、武尾正弘：「*Citrobacter freundii* IF013545 遺伝子破壊株によるグルコースからのバイオ凝集剤生産の改善」、第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集、p. 202 (平成 27 年 10 月 26 日、鹿児島城山ホテル) (ポスター発表)。
- ③ 池本啓史、柏 雅美、宮本弘毅、木村和幸、多田昇平、根来誠司、武尾正弘：「バイオ凝集剤生産菌 *Citrobacter freundii* IF013545 株の定量 RT-PCR による遺伝子発現解析」、第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集、p. 292 (平成 27 年 10 月 28 日、鹿児島城山ホテル) (ポスター発表)。
- ④ 柏 雅美、武尾正弘、西岡 洋、姫路佳孝：「トバモライト系吸着剤とバイオ凝集剤の

併用による汚染土壌等からの放射性セシウムの除去」、第 15 回環境技術学会年次大会プログラム p. 106-107 (大阪産業大学・大東市、平成 27 年 9 月 11 日) (ポスター発表)。

- ⑤ 柏 雅美、宮本弘毅、木村和幸、池本啓史、根来誠司、武尾正弘：「糖代謝系遺伝子の破壊による *Citrobacter freundii* IF013545 のバイオ凝集剤生産の改善」、第 68 回日本生物工学会大会 2P-1p063 (平成 28 年 9 月 29 日富山国際会議場(富山)) (ポスター発表)。
- ⑥ 武尾正弘、池本啓史、宮本弘毅、木村和幸、柏 雅美、加藤 太一郎、根来誠司：「*Citrobacter* 属細菌におけるキトサン様バイオ凝集剤の多糖化・分泌関連遺伝子の探索」、第 68 回日本生物工学会大会 3P-2a132 (平成 28 年 9 月 30 日富山国際会議場(富山)) (ポスター発表)。
- ⑦ 武尾正弘、木村和幸、柏 雅美、多田昇平、井上卓弥、宮本弘毅、池本啓史、根来誠司：「*Citrobacter* 属細菌におけるキトサン様バイオ凝集剤の多糖化・分泌関連遺伝子の探索」、第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 1P-43 (平成 29 年 3 月 2 日慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス(藤沢)) (ポスター発表)。
- ⑧ 武尾正弘、柏 雅美、西岡 洋：「放射性物質やその吸着剤残渣を除去するバイオ凝集剤の生産」、国際フロンティア産業メッセ 2016 (ポスター出展) (平成 28 年 9 月 7 日~9 日神戸国際会議場)
- ⑨ 武尾正弘、長山尚輝、木村和幸、バランワル プリヤンカ、柏 雅美、加藤 太一郎、根来誠司「*Citrobacter* 属細菌の生産するキトサン様バイオ凝集剤の中空糸膜による濃縮」、第 69 回日本生物工学会大会(平成 29 年 9 月 11~14 日) 2P-J199 早稲田大学・西早稲田キャンパス(東京)
- ⑩ 武尾正弘、小田垣慎、バランワル プリヤンカ、根来誠司「微生物凝集剤の生産と応用」、兵庫県立大学・知と交流のシンポジウム No. 50 (ポスター発表) (平成 29 年 9 月 19 日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武尾 正弘 (TAKEO, Masahiro)  
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：4 0 2 3 6 4 4 3

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

根来 誠司 (NEGORO, Seiji)  
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：0 0 3 0 1 4 3 2

### (4) 研究協力者

なし