

〔生物工学会誌 第76巻 第1号 8-19. 1998〕

## 総合論文

## 生体触媒の開発と利用に関する研究

(平成9年度 日本生物工学会生物工学賞受賞)

田中 渥夫

Studies on the Development and Application of Biocatalyst Systems  
—Monograph—

ATSUO TANAKA (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8317) Seibutsu-kogaku 76: 8-19, 1998.

1. Research on the functions and biogenesis of yeast peroxisomes, which appear in *n*-alkane- and methanol-grown cells, is summarized. 2. The immobilization of biocatalysts, especially by prepolymer methods, is demonstrated, with emphasis on the application of biocatalysts in organic solvents and in the live state. 3. The bioconversion of organosilicon compounds is considered in connection with the specific features of the silicon atom. 4. The development of cell surface engineering is introduced, especially with respect to the construction of yeast cells able to utilize polysaccharides.

[Key words: yeast peroxisome, *Candida tropicalis*, immobilized biocatalysts, prepolymer methods, organosilicon compounds, cell surface engineering]

## はじめに

この度、図らずも生物工学賞をいただくことになり、誠に光栄に感ずるとともに、身のひきしまる思いがいたします。1961年に、京都大学工学部工業化学科4回生として、卒業研究のため工業生化学講座(福井三郎先生ご担当)に配属されて以来、36年余りにわたって、同じ研究室(現在は大学院工学研究科合成・生物化学専攻生物化学講座応用生物化学分野と称していますが)で過ごして参りましたが、この間、福井先生を始め多くの先生方のご指導とご鞭撻、多数の共同研究者のご協力により、生物化学および生物工学の分野に少しでも寄与できたことを感謝している次第です。

ここに、これまで行ってきました研究、現在も発展中の研究についてまとめさせていただきます。

## 1. 酵母ペルオキシソームに関する研究

博士課程へ進学した際、福井先生より論文のテーマとして石油発酵(石油成分や石油化学製品を原料とする微

生物による物質生産)を選んではどうかのご提案があった。当時、石油タンクの生産を始めとする石油発酵が世界中の注目を浴びつつあり、我が国においても産官学いずれもがこの分野での研究を活発に開始していた。少し抵抗してみたものの、これといったテーマも見つからず、先生のご提案通り石油発酵によるビタミンや補酵素の生産についての研究を開始した。

ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、カロチノイド、ポルフィリン、シトクロムcなどさまざまな物質のアルカンや石油化学製品からの生産を試みるとともに、<sup>1,2)</sup>とくにアルカン資化性微生物の呼吸系や脂肪酸代謝、グリオキシル酸回路など、生理的な方面にも少しずつ研究を広げていった。<sup>3,4)</sup>

このような時に、ジェット機の墜落事故の原因の一つに燃料タンクの微生物腐食があることを知り、これに興味をもってジュラルミンの腐食をテーマとして取り上げた。しかしながら、思うような成果は得られず、やがて菌体外酸化還元物質の検索、さらに菌体内酸化還元物質の生産へとテーマが移ることとなった。このような酸化

著者紹介 1967年京都大学大学院工学研究科博士課程修了 京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 教授  
〒606-8317 京都市左京区吉田本町 TEL. 075-753-5524 FAX. 075-753-5534 E-mail: atsuo@sbchem.kyoto-u.ac.jp

還元物質の一つとして、医薬としての応用がうわさされていた Coenzyme Q (CoQ) の生産を試みたところ、<sup>5)</sup> 当時の通産省微生物工業技術研究所からいただいた酵母 *Candida tropicalis* pK233 がすぐれた生産性を示すことを見いだした。<sup>6)</sup> 本酵母は CoQ<sub>9</sub> を生産することがわかったが、我々にとって幸いだったことは、CoQ<sub>9</sub> もヒト型の CoQ<sub>10</sub> とともに医薬として認可されるであろうという希望的観測があったことである (実際は CoQ<sub>10</sub> のみが認可された)。本酵母を用いた一連の研究の中で、アルカン生育菌体の異常な挙動、すなわち遠心分離時に沈降しにくい菌体が存在することを見だし、顕微鏡観察の結果、擬菌糸状に増殖する、いわゆる二形性を示していることを明らかにした。<sup>7)</sup> この二形性については、後に別のグループが詳細な研究を行うこととなったが、我々はこの擬菌糸の微細構造が知りたく、日本女子大学大隅正子先生と共同研究をしていたグループの試料に紛れ込ませて電子顕微鏡写真を撮っていただいたのは、1970年か71年の頃であった (Fig. 1)。マイクロボディ (現在ではペルオキシソームと呼ぶことが多い) が多数出現していますよ、と大隅先生の興奮が伝わるようなコメントをいただいたが、当時このオルガネラについての知識は皆無であり、先生のご説明をうけて、やっと事の重大さに気付いた次第であった。しかしながら、自分なりにも勉強し、この発見は一生仕事になるであろうとの予感に身震いしたことを覚えている。大隅先生が撮影されたのと同様な写真はすでに2例報告されていたが、取り込まれたアルカンの油滴あるいは蓄積された脂質の集合体とみなされ、生化学的に重要なオルガネラとはまったく考えられていなかった。したがって、もし大隅先生との出会いがなかったら、我々もペルオキシソームの存在に気付かないまま、石油発酵の研究を止めていたかも知れない。

この当時、*Saccharomyces cerevisiae* でのペルオキシソームの存在は一応知られていたが、<sup>8)</sup> 形が小さく数もきわめて少ないこと、また、それらの誘導条件が不明であったことから、その生理機能を研究することは不可能であった。*C. tropicalis* を始めとするアルカン資化性酵母におけるアルカンや脂肪酸によるペルオキシソームの誘導合成は、その機能だけでなく発達の機構を研究するうえでも絶好の材料となり、多くの研究者の興味を引くことになった。<sup>9,10)</sup>

ペルオキシソームの基本的な定義は、過酸化水素を生成するオキシダーゼとこれを分解するカタラーゼを含むオルガネラということであるが、酵母によるメタノールの酸化はアルコールオキシダーゼによって触媒されるこ

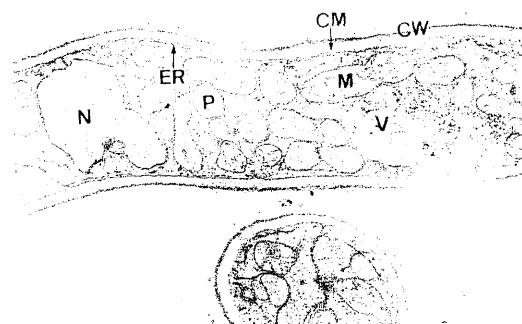


Fig. 1. Ultrastructure of *n*-alkane-grown cell of *Candida tropicalis*. CM, cell membrane; CW, cell wall; ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondrion; N, nucleus; P, peroxisome; V, vacuole. Courtesy of Prof. M. Osumi.

と、メタノール生育酵母菌体は高レベルのカタラーゼを保持していることが報告されていたことから、メタノール生育菌におけるペルオキシソームの出現は容易に推察できた。事実、我々は1974年から1975年にかけて、ドイツ<sup>11)</sup> およびオランダのグループ<sup>12)</sup> と相前後してメタノール生育菌体の微細構造を発表するとともに、<sup>13)</sup> ドイツのグループ<sup>14)</sup> とほぼ同時にペルオキシソームの単離に成功し、<sup>15)</sup> アルコールオキシダーゼおよびカタラーゼの局在性を証明することができた。さらに、合成高分子に包括固定化したペルオキシソームを用いるという特殊な方法で、オルガネラ内ではカタラーゼが、アルコールオキシダーゼによって産生された過酸化水素を酸化剤としてメタノールをホルムアルデヒドに変換する、いわゆるペルオキシダーゼ活性を示すことを明らかにした。<sup>16)</sup> また、このようなカタラーゼのペルオキシダーゼ活性の発現については、人工的な系においても証明することができた。<sup>17)</sup>

一方、アルカン生育酵母、とくに *C. tropicalis* のペルオキシソームについては、その後詳細な研究を続け、グリオキシル酸回路では鍵酵素であるイソクエン酸リアーゼおよびリンゴ酸シンターゼのみがペルオキシソームに局在し、トリカルボン酸回路と共通の他の酵素はミトコンドリアに存在すること、<sup>18)</sup> 過酸化水素を生成するアシル CoA オキシダーゼを初発酵素とする脂肪酸  $\beta$ -酸化系がペルオキシソームに存在すること、<sup>19)</sup> などを明らかにした。当時、酵母における  $\beta$ -酸化系は、動物細胞から類推してミトコンドリアに存在するものと信じられていた。しかしながら、この証明はまったくなされておらず、我々の発見が酵母における  $\beta$ -酸化系の存在の最初の証拠となった。その後、他のアルカン生育酵母やオレイン酸生育 *S. cerevisiae* でも  $\beta$ -酸化系のペルオキシソーム局

在性が示されたが、ミトコンドリアでの局在はいまだに知られていない。

*C. tropicalis* のアシル-CoA オキシダーゼ<sup>20)</sup> および  $\beta$ -酸化の第2, 第3段階を触媒する2頭酵素 (エノイル-CoA ヒドラターゼ活性および3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ活性を併せもつ: 実際はさらに3-ヒドロキシアシル-CoA エピメラーゼ活性をもつ3頭酵素)<sup>21)</sup> は他のグループによって精製されたが、我々はこれら酵素の細胞内局在性を明らかにするとともに、<sup>22)</sup>  $\beta$ -酸化の最終段階を触媒する3-ケトアシル-CoA チオラーゼについて詳細に研究した。すなわち、アルカンで生育した *C. tropicalis* のペルオキシソームには、アセトアセチル-CoA のみを基質とするチオラーゼI (アセトアセチル-CoA チオラーゼ) と幅広い基質特異性をもつチオラーゼIII (3-ケトアシル-CoA チオラーゼ) が局在する。<sup>23)</sup> これらの酵素はいずれも異なった遺伝子にコードされているが、<sup>24,25)</sup> 両酵素ともミトコンドリアには存在せず、本酵母において脂肪酸  $\beta$ -酸化がもっぱらペルオキシソームで行われていることが再度確認された。ペルオキシソームへ移行しないように変異させた酵素および相同組換えによる各酵素の欠損から、チオラーゼIは一部ペルオキシソームに存在してその機能を発揮するとしても、主として細胞質ゾルにおいてステロイドの合成に関与しており、 $\beta$ -酸化にはチオラーゼIIIが強く関わっていることが明らかとなった。<sup>26)</sup>

脂肪酸  $\beta$ -酸化の生成物はアセチル-CoA である (奇数鎖長のアルカンまたは脂肪酸からはプロピオニル-CoA も生成する)。これらの生成物がミトコンドリアに局在するトリカルボン酸回路やメチルクエン酸回路 (プロピオニル-CoA の場合)、あるいはミトコンドリアとペルオキシソームにまたがるグリオキシル酸回路 (アセチル-CoA の場合) で代謝されるためには、いったんミトコンドリアに輸送されねばならない。これらアシル-CoA はそのままではオルガネラ膜を透過できないとされているので、何らかの輸送システムが必要となる。このようなシステムとしてもっとも可能性が高いのが、ペルオキシソームおよびミトコンドリア両者に局在するカルニチンアセチルトランスフェラーゼによって触媒される「アセチルカルニチンシャトル」である。<sup>27)</sup> *C. tropicalis* のペルオキシソーム型酵素およびミトコンドリア型酵素は、一つの遺伝子にコードされており、<sup>28)</sup> 転写開始点ではなく翻訳開始点の違いにより、ミトコンドリアへの輸送シグナルをもつものともたないものが合成され、それぞれ2つのオルガネラへと識別輸送されることが明らかとな

った。<sup>29)</sup> このような翻訳開始の仕組みがどのように調節されているのかは、残された興味ある点である。

我々は細胞内における酵素の局在性から、Fig. 2 のようなアルカン代謝におけるペルオキシソームの役割を提唱しているが、<sup>30,31)</sup> 研究の進展によってさらに、アルカン代謝への直接、間接の関与を問わず新たな機能が付け加えられるものと予想される。実際、動物細胞においては、一見直接的な関連がないようないくつかの代謝系がペルオキシソームに共存し、ペルオキシソームが細胞の正常な機能発現に必須のオルガネラであることが知られている。

このように酵母ペルオキシソームの機能の概略が分かってくると、次の興味はその発達機構に移ってくる。ペルオキシソームは、もともとグルコース生育菌体のような細胞に存在している前駆体オルガネラが、<sup>32)</sup> アルカンや脂肪酸を資化するうちに発達し、体積を増すとともに分裂して、その数を増やすものと考えられている。したがって、ペルオキシソームに局在する酵素やタンパク質がどのような情報の下に誘導合成されてくるのか、遊離リボソーム上で合成されたこれらタンパク質がどのような認識の下でペルオキシソームへと集積されるのか、分裂の引き金とその機構はどのようなものなのか、などが問題となってくる。我々は、第3の点についてはほとんど手を付けていないが、第1および第2の点については、少しずつではあるが成果を挙げつつある。

ペルオキシソーム局在酵素の大部分は成熟型として合成されてくるので、その分子内に輸送に関する何らかのシグナルをもっているはずである。現在までに知られているこのようなシグナル (PTS, peroxisomal targeting sequence) としては、C-末端の3アミノ酸 SKL (セリン/リシン/ロイシン) あるいはそのアナログ (SKL モチーフ) があるが、中性アミノ酸/塩基性アミノ酸/疎水性アミノ酸という配列からなっており、PTS 1 と呼ばれる。今までに一次構造が明らかにされた *C. tropicalis* のペルオキシソーム酵素は、いずれも SKL 配列そのものはないが、SKL モチーフをもっているものがいくつか見つかっている。たとえば、イソクエン酸リアーゼのC-末端は AKV (アラニン/リシン/バリン) であり、<sup>33)</sup> SKL モチーフに含まれるが、この配列を欠失させても酵素タンパク質はペルオキシソームへ輸送されることから、<sup>34)</sup> このタンパク質では分子内部の未知の領域 (PTS 3 と呼ばれる) にシグナルがあるものと思われる。一方、チオラーゼI (アセトアセチル-CoA チオラーゼ) のC-末端は SKL モチーフに属する AKL (アラニン/リ



Table 1. Levels of peroxisome-associated enzymes in *C. tropicalis*.<sup>31)</sup>

	Activity (nmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )		
	Glucose-grown cells (A)	Alkane-grown cells (B)	B/A
Long-chain alcohol dehydrogenase	6	80	13
Long-chain aldehyde dehydrogenase	9	98	11
Acyl-CoA synthetase	37	70	2
Acyl-CoA oxidase	6	2500	417
Enoyl-CoA hydratase	55	5700	104
3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0	240	—
3-Ketoacyl-CoA thiolase	3	540	180
Acetoacetyl-CoA thiolase	41	110	3
Catalase	170 × 10 <sup>3</sup>	4670 × 10 <sup>3</sup>	27
NAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase	11	169	15
Carnitine acetyltransferase	531	9870	19
Isocitrate lyase	171	529	3
Malate synthase	23	65	3
NADP-linked isocitrate dehydrogenase	242	491	2
Uricase	42	182	4
D-Amino acid oxidase	112	73	0.7

オキシソームへの取り込みが完全に抑制される。<sup>37)</sup>このことは、ペルオキシソームとタンパク質との相互の認識とともに、ペルオキシソームマトリックスへのタンパク質の輸送にはその高次構造が重要な情報を与えていることを示唆しており、PTSの同定とともに、輸送機構のダイナミクスについても研究を進める必要がある。

ペルオキシソームが発達する条件下では、ペルオキシソームに集積すべきタンパク質の誘導合成が起こり、細胞内レベルは数倍から数百倍に上昇する (Table 1). *C. tropicalis* においては、アルカンや長鎖脂肪酸のみならず、酪酸のような短鎖の酸でもこの現象がみられる。<sup>38)</sup>このような誘導物質から遺伝子へどのように情報が伝わるのかを解明することは、面白い課題であるといえよう。*C. tropicalis* のイソクエン酸リアーゼ遺伝子の 5'-上流部分 (*UPR-ICL*) は、*S. cerevisiae* や *Escherichia coli* においてもプロモーターとしての機能を示すこと、<sup>39)</sup> アルカンや長鎖脂肪酸のみならず酢酸やエタノールが誘導基質として働くこと<sup>40)</sup> などから、これら微生物における外来タンパク質の生産に利用できるだけでなく、情報伝達の仕組みの一部を解明する手段としても使える。*C. tropicalis* pK233 が diploid であり、単一変異株の取得が困難であったこと、*S. cerevisiae* では情報伝達に関する知見が蓄積されつつあることなどから、*S. cerevisiae* に *UPR-ICL* をそのまま、あるいはその一部を欠失させたものを導入した。その結果、*UPR-ICL* には酢酸による転写促進に関与する互いに独立な二つの領域があることを見いだ

し、<sup>41)</sup> 現在、これらの情報伝達のカスケードを明らかにするための努力が続けている。また、*C. tropicalis* における相同組換えの技術が完成したことから、これらの知見をもとに、本酵母における情報伝達の機構の解明にも取り組みたいと思っている。実際、*C. tropicalis* においては、ペルオキシソームに局在する酵素の遺伝子が、必ずしも同じ染色体に存在しないことから、<sup>42)</sup> これら遺伝子の同調発現の機構には興味もたれる。

また、*UPR-ICL* は *S. cerevisiae* において強力なプロモーターとして働くことから、これを含んだカセットベクターを構築するとともに、動物、細菌、他種酵母由来のさまざまな外来タンパク質の細胞内および細胞外生産に応用している。<sup>43-46)</sup>

## 2. 生体触媒の固定化と応用に関する研究

福井研究室においては、1970年代前半には主としてビタミン B<sub>6</sub> 補酵素をリガンドとする生化学的特異結合による酵素の固定化について、世界の最先端を行く研究が行われていた。<sup>47)</sup> そこで筆者は、このような固定化法とは異なる、汎用性のある方法として包括固定化法に着目し、しかも生化学反応の多様化にも対応できる性質をもった担体が入りしうる合成高分子を用いることを考えた。福井先生のご教示により、1975年頃より関西ペイント(株)で調製された光架橋性(光硬化性)樹脂プレポリマー<sup>48)</sup> および東洋ゴム工業(株)で合成されたウレタン樹脂プレポリマー<sup>49)</sup> を用いる、いわゆるプレポリマー法の

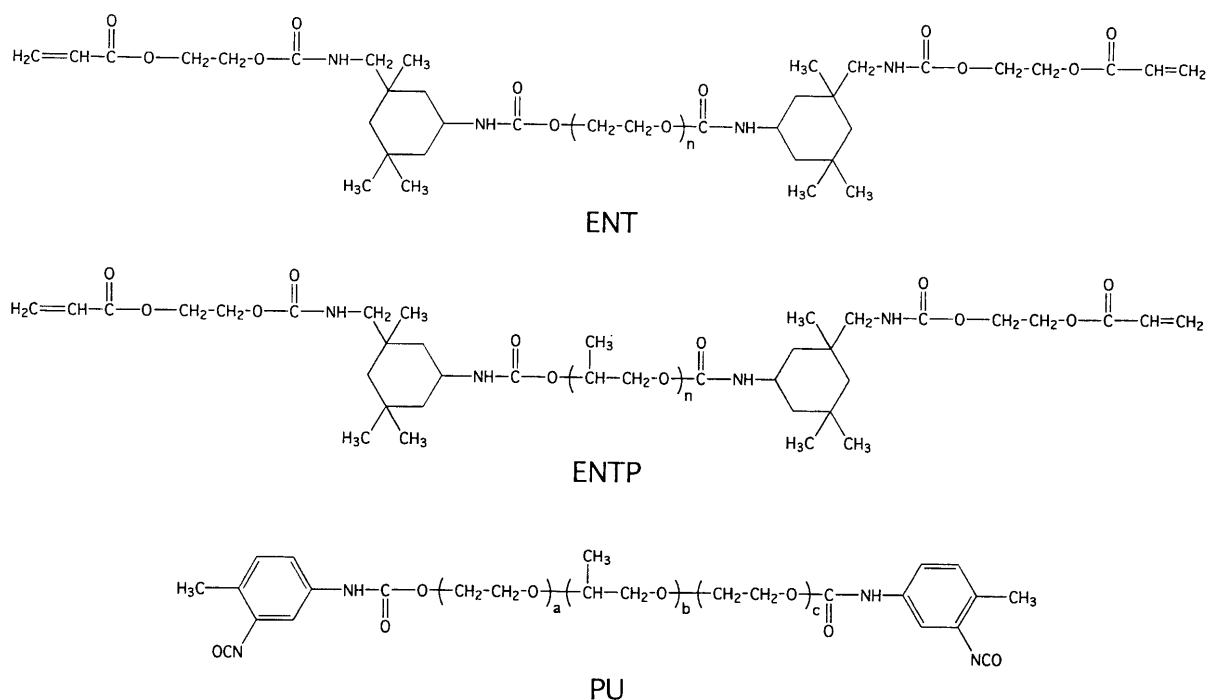


Fig. 3. Structures of typical photo-crosslinkable resin prepolymers (ENT and ENTP) and urethane resin prepolymers (PU). ENT, hydrophilic; ENTP, hydrophobic.

開発に着手した。

代表的なプレポリマーの構造を Fig. 3 に示すが、光架橋性樹脂プレポリマーにあっては、ポリエチレングリコール (PEG) を主鎖とするもの (ENT) は親水性、ポリプロピレングリコール (PPG) を主鎖とするもの (ENTP) は疎水性である。また、異なった分子量の PEG や PPG を用いることにより、プレポリマーの鎖長を調整しうる。さらに、この主鎖の部分アニオン性やカチオン性のオリゴマーで置換することにより、イオン性のプレポリマーを調製することもできる。一方、ウレタン樹脂プレポリマー (PU) では、主鎖のポリエーテルジエーテルの鎖長を変えたり、主鎖中の PEG と PPG の割合を変えることにより、鎖長や親水性-疎水性バランスの異なるプレポリマーが合成できる。本法の特徴は、光架橋性樹脂プレポリマーでは近紫外線の短時間照射、ウレタン樹脂プレポリマーにあっては水との混合という、きわめて穏和かつ簡便な操作により酵素のみならずオルガネラや細胞を同一の手法で固定化できること、あらかじめ物理的・化学的性質の異なるプレポリマーを合成しておくことにより、格子の疎密、親水性-疎水性バランス、イオン性を任意に調節した担体ゲルを調製しうることにあり、<sup>50,51)</sup>このようなプレポリマーを用いて固定化することにより、生体触媒の応用範囲を拡大することに成功した (Table 2)。

このような研究のなかで、特筆すべきものの一つに、有機溶媒中での反応がある。研究室周辺で扱われている有機化合物の大部分は疎水性化合物であり、それらの化学合成や変換は通常、有機溶媒中で行われる。従来、このような化合物の生化学的反応は、懸濁状態あるいは乳化状態で行われてきたが、固定化生体触媒を用いるバイオリアクターの究極の目的は連続操作であることから、均一な基質および生成物溶液を得ることが必要となる。したがって、有機溶媒中での生化学反応は一つの夢であったが、当時、有機溶媒は絶対的な酵素の失活剤であると信じられていたため、研究テーマとして取り上げることが困難であった。1978年頃、山根恒夫先生 (現名古屋大学教授、当時京都大学工学部化学工学科助手) が留学先のイギリスより、水-有機溶媒二層系でステロイドの変換を触媒しうる *Nocardia rhodochrous* の 1 菌株を持ち帰られたことがきっかけで、この菌の固定化を行うとともに、有機溶媒中での種々ステロイドの変換を試みた。<sup>52,53)</sup>その結果、幸いなことに本菌の固定化物は有機溶媒均一系において十分な活性を示すと同時に、固定化担体の親水性-疎水性バランスが、基質の疎水度、溶媒の極性と関連して、反応の成否に重大な影響を及ぼすことを明らかにし、有機溶媒中での生化学反応の可能性とプレポリマー法の利点を大いにアピールすることができた。現在では、有機溶媒中での生化学反応は特殊なもの

Table 2. Application of biocatalysts entrapped by prepolymer methods.

Biocatalyst	Application
<b>Enzyme</b>	
Invertase	Hydrolysis of sucrose
Catalase	Degradation of hydrogen peroxide
Catalase and glucose oxidase	Construction of artificial yeast peroxisome
Lipase	Hydrolysis and reforming <sup>a</sup> of triglyceride; optical resolution of terpene alcohols <sup>a</sup>
Hydrogenase	Reduction of NAD <sup>+</sup>
Glutamate decarboxylase	Assay of L-glutamate
Lysine decarboxylase	Assay of L-lysine
<b>Organelle and related component</b>	
Mitochondrion (acetate-grown yeast)	Activity of adenylate kinase
Peroxisome (methanol-grown yeast)	Analysis of function; activities of alcohol oxidase, catalase and D-amino acid oxidase
Chromatophore (bacterium)	Synthesis of ATP
Purple membrane (halobacterium)	Generation of photoelectric current
<b>Treated cells</b>	
<i>Escherichia coli</i> (acetone-dried)	Assay of L-threonine
Baker's yeast (dried)	Regeneration of ATP
<i>Hansenula jadinii</i> (dried)	Synthesis of cytidine diphosphate choline
<i>Enterobacter aerogenes</i> (thawed)	Synthesis of adenine arabinoside <sup>b</sup>
<i>Citrobacter freundii</i> (acetone-dried)	Assay of cephalosporin C
<i>Alcaligenes eutrophus</i> (thawed)	Reduction of NAD <sup>+</sup>
<i>Arthrobacter simplex</i> (acetone-dried)	$\Delta^1$ -Dehydrogenation of hydrocortisone <sup>b</sup>
<i>Nocardia rhodochrous</i> (thawed)	$\Delta^1$ -, 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -Dehydrogenation of steroids <sup>a</sup>
<i>Rhodotorula minuta</i> (thawed)	Optical resolution of menthol <sup>a</sup>
Several yeasts (thawed)	Asymmetric reduction of 2-methyl-3-oxo acid esters <sup>a</sup>
<b>Living cells</b>	
<i>Streptomyces rimosus</i> (growing)	Continuous production of oxytetracycline
<i>Streptomyces peucetius</i> (growing)	Production of daunorubicin
<i>Propionibacterium</i> sp. (growing)	Production of vitamin B <sub>12</sub>
<i>Curvularia lunata</i> (resting)	11 $\beta$ -Hydroxylation of cortexolone <sup>b</sup>
<i>Rhizopus stolonifer</i> (resting)	11 $\alpha$ -Hydroxylation of progesterone <sup>b</sup>
<i>Sepedonium ampullosporum</i> (resting)	16 $\alpha$ -Hydroxylation of estrone <sup>b</sup>
<i>Corynebacterium</i> sp. (resting)	9 $\alpha$ -Hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione <sup>b</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (growing)	Continuous production of peptide; production of specific peptidase
Baker's yeast (resting)	Asymmetric reduction of 3-oxo acid ester <sup>a</sup>
<i>Lavandula vera</i> (growing)	Production of blue pigments

<sup>a</sup> In organic solvent systems; <sup>b</sup> in water-organic cosolvent systems.

ではなくなったが、研究における非常識の重要性を実感したことを覚えている。

その後、有機溶媒中での生化学反応は、微生物菌体に限らずいくつかの酵素にまで広がり、テルペンアルコール類の光学分割<sup>54)</sup>やトリグリセリドの改質<sup>55)</sup>などへ応用するとともに、固定化法もプレポリマー法だけでなくさまざまな方法を使うようになった。<sup>56)</sup>とくに、セライト吸着リパーゼによるエステル化反応においては、きわめて長時間の連続反応に成功した。<sup>57)</sup>また現在では、有機溶媒耐性のない微生物の生菌体を長期間使用するための固定化法の開発なども試みている。<sup>58)</sup>

固定化に関するもう一つのトピックは固定化生細胞・

増殖細胞の応用である。<sup>59-61)</sup>このような生きている細胞は、目的とは異なったさまざまな代謝系をもち、基質や生成物の消費、副産物の生成などという欠点はあるものの、触媒系の自己再生能・自己増殖能を有し、また種々補酵素の再生も可能なことから、とくに複雑な反応を行わせるのに適した生体触媒である。糸状菌によるステロイドの水酸化反応において、<sup>62,63)</sup>光架橋性樹脂プレポリマーによって固定化した胞子の担体ゲル内での菌糸への発達は、ゲル格子の疎密、すなわち用いたプレポリマーの鎖長に大きく影響され、短鎖プレポリマーを用いた格子の密なゲルでは菌糸の発達は悪く、水酸化活性も低くなる一方、長鎖のプレポリマーから形成される疎なゲル

では、発達した菌糸がゲルより漏出するため安定な触媒とならない。このように、ゲル格子の疎密を目的に応じて容易に調整、最適化できるのもプレポリマー法の特徴の一つである。最適の条件で調製した固定化糸状菌糸は、時々培地中で再活性化することにより、長期間にわたって水酸化活性を示した。

酵母を用いてトリデカペプチドである $\alpha$ -接合因子を分泌生産させる場合,<sup>64)</sup> 接合因子は同時に分泌されるペプチダーゼにより分解され、培地中に安定に存在しない。ところが、中性とアニオン性の光架橋性樹脂プレポリマーを混合して固定化に用いると、ペプチダーゼがアニオン性を帯びた担体ゲルに吸着され、培地中の接合因子の分解が起こらなくなる。このようにして、接合因子の長期連続生産が可能となった。一方、中性の担体ゲルに高濃度で菌体を固定化すると、接合因子分子中のロイシン-リジン結合を選択的に切断するペプチダーゼ (Leu-lysin と命名) が多量分泌されるようになった。<sup>65)</sup> このように、イオン性のプレポリマーを共存させることにより、担体ゲルのイオン性を調整しうるのもプレポリマー法の利点である。

二次代謝産物の発酵生産においては、細胞増殖と物質生産が連動しないことから、連続化は難しいものとされている。しかしながら、細胞を固定化し、リアクター外への流出を避けることにより、ほとんど増殖していない細胞に、連続的に代謝産物を合成させることができるはずである。実際、このような考えの下に、栄養源を制限して増殖を抑えるとともに固定化により wash-out を避けることにより、放線菌によるオキソテトラサイクリンの連続生産<sup>66)</sup> や植物培養細胞による青色色素の連続生産<sup>67)</sup> に成功した。とくに植物培養細胞の場合、このような連続生産は世界で初めての例であったが、同時に固定化による細胞の生存性の向上が顕著に見られた。<sup>68)</sup>

その他、オルガネラの固定化、<sup>69)</sup> 分析への応用<sup>70)</sup> など、さまざまな分野への応用を目指した生体触媒の固定化を

試みてきたが、それらの結果も Table 2 にまとめている。

なお、ここで紹介したプレポリマー法は、国内外で多くの研究者に利用されてきている。

### 3. 有機ケイ素生化学の展開

生体触媒をさまざまな分野で活用するためには、生理的な条件とは大きくかけ離れた環境 (非生理的条件, 異常環境) での応用を図らねばならない。すなわち、化学触媒が過酷な条件下でもその活性を示すことを規範に、ケモミメティックバイオテクノロジー (Chemomimetic Biotechnology) を提唱している。この成功例の一つは、上述の有機溶媒中での反応であるが、我々は他の試みの一つとして、非天然化合物を基質とする反応を取り上げた。

ケイ素は、生物にとって根元的な元素である炭素と同族であり、地球上には炭素よりもはるかに多量存在するにもかかわらず、自然界では有機ケイ素化合物の存在は知られていない。しかしながら、有機ケイ素化合物は、有機合成の分野においては重要な役割を果たしており、その特異な反応性に注目されている。生物がケイ素をその構成元素として避けていることは、とりまおさず、有機ケイ素化合物が生物にとって好ましくない作用 (反生理作用) をもっていることを示唆している。このことは逆に、有機ケイ素化合物が何らかの生理活性を示しうることを意味している。事実、シラ医薬、シラ農薬が注目されつつあり、このような観点から、酵素による有機ケイ素化合物の認識、有機ケイ素化合物特有の生化学反応の開発、酵素法による光学活性有機ケイ素化合物の調製と利用、などについて研究を進めてきた (Table 3)。<sup>71,72)</sup>

ケイ素は炭素に比べて、原子半径が大きい、電気陰性度が低い、疎水性が大きいなどの特徴をもつが、種々加水分解酵素によるエナンチオ選択的エステル化<sup>73,74)</sup> やアルコール脱水素酵素によるエナンチオ選択的な酸化<sup>75,76)</sup> において、含ケイ素アルコールが炭素同族体とはきわめ

Table 3. Enzymatic transformation of organosilicon compounds.

Enantioselective esterification of 2-(4-chlorophenoxy)propanoic acid with trimethylsilyl-alkanols by lipase <sup>73)</sup>
Enantioselective esterification of trimethylsilylpropanol isomers by hydrolases <sup>74)</sup>
Enantioselective esterification of organosilicon compounds having a stereogenic silicon atom by crude papain <sup>77)</sup>
Dehydrogenation of trimethylsilylalkanols by alcohol dehydrogenase
Enantioselective dehydrogenation of trimethylsilylpropanol isomers by alcohol dehydrogenase <sup>75)</sup>
Enantioselective dehydrogenation of $\beta$ -hydroxysilanes with <i>in situ</i> NAD <sup>+</sup> regeneration <sup>76)</sup>
Preparation of optically active 3-trimethylsilylalanine by acylase <sup>78)</sup>
Synthesis of L-3-trimethylsilylalanine by thermolysin <sup>81)</sup>
Preparation of optically active 3-(4-trimethylsilylphenyl)alanine by <i>N</i> -carbamoylamino acid amidohydrolyase <sup>79,80)</sup>



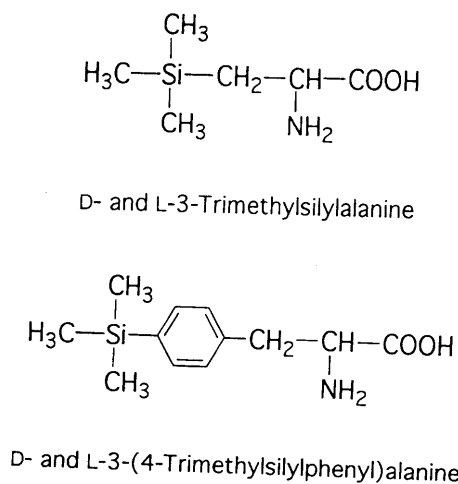


Fig. 4. Structures of optically active silicon-containing amino acids prepared by enzymatic methods.

て異なった挙動を示す場合があること、酵素はケイ素原子上の不斉を認識しうること、<sup>77)</sup>などが明らかとなり、反応に関する官能基とケイ素原子との距離に応じて、特異な性質を発揮することが証明された。たとえば、リパーゼによる2-(4-クロロフェノキシ)プロパン酸のエンナンチオ選択的なエステル化において、炭素化合物では両立することができない高い活性と高いエンナンチオ選択性が、特定の構造をもつ含ケイ素アルコールをアシル受容体として用いることによって達成しうるということが明らかとなったが、<sup>73)</sup>この現象は、ケイ素のもつ原子半径の大きさと低い電気陰性度から説明することが可能であった。

また、医薬や農業の前駆体として有用な光学活性アミノ酸の調製を試み、アミノアシラーゼを利用した*N*-アセチル体からのD-およびL-3-トリメチルシリルアラニン、<sup>78)</sup>*N*-カルバモイルアミノ酸アミドヒドロラーゼを用いた*N*-カルバモイル体からのD-およびL-3-(4-トリメチルシリルフェニル)アラニン<sup>79,80)</sup>の取得に成功している(Fig. 4)。さらに、これら含ケイ素アミノ酸を含むペプチドの合成と、それらの生理活性の検出についても挑戦しているが、<sup>81)</sup>この有機ケイ素生化学(Organosilicon Biochemistry)ともいべき新しい分野をさらに展開したいと考えている。

#### 4. 細胞表層工学の開拓

細胞の表層は、さまざまな物質の認識、情報の伝達、生化学反応、外界との隔離などの場として重要であることは知られているが、この場を積極的に利用しようとする研究はあまり進められていない。我々は、このような

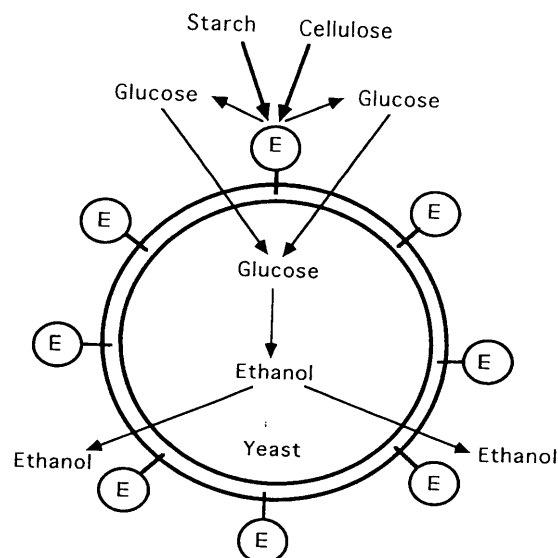


Fig. 5. Schematic illustration of polysaccharide-utilizing yeast cell. E, enzyme.

細胞表層に遺伝子工学の手法を用いて種々のタンパク質やペプチドを提示することにより、新しい機能をもった細胞を構築できるものと考えた。

酵母 *S. cerevisiae* はデンプンやセルロースなど多糖類を直接資化できないことから、これら地球上に多量存在する資源の有効利用を図る目的で、酵母細胞壁に多糖類加水分解酵素を提示、固定化することを試みた。グルコアミラーゼを酵母細胞表層タンパク質の一つであるα-アグルチニンの細胞壁アンカー部分に相当するC-末端側半分と融合するように構築した遺伝子をプラスミドを介して酵母細胞内に導入することにより、デンプンを資化し、エタノールを生成する菌株の取得に成功した<sup>82)</sup>(Fig. 5)。免疫電子顕微鏡や免疫蛍光顕微鏡による観察から、発現したグルコアミラーゼが細胞表層に存在することを確認するとともに、本酵素が細胞壁に共有結合していることを、細胞壁をグルカナーゼ処理することによって証明することができた。このデンプン資化性酵母はC&E Newsに取り上げられ、“Arming Yeast”と命名されている。<sup>83)</sup>さらに、資化能の安定化を図るため融合遺伝子を染色体に組み込み、また、α-アミラーゼと共発現させることにより、安定かつ強力なデンプン資化性酵母の構築に成功している。<sup>84)</sup>この新しい菌株は、給源の異なる種々のデンプンを利用できることから、工業的にも利用可能となろう。また、CM-セルラーゼを提示した細胞の構築にも成功しており、セルロースの部分分解を確認しているが、<sup>85)</sup>さらにセルロースを直接資化しうる菌株を創製するための努力を続けている。

このような方法を細胞表層工学 (Cell Surface Engineering) と呼んでいるが,<sup>80)</sup> この技術を駆使して、資源のリサイクル、環境の浄化など応用面だけでなく、細胞間の認識など生物化学の基礎分野にも貢献するとともに、細胞機能工学 (Cell Function Engineering) と呼ぶべき分野を開拓したいものと思っている。

### おわりに

石油発酵による有用物質の生産に関して、昭和45年に本会から斎藤賞をいただいて以来、この分野をも含め、いくつかの研究を行ってきました。この間、幾度となく挫折の苦しみと成功の喜びを味わって参りましたが、ここに一つの区切りをいただき、有難うございました。永年にわたりご指導、ご鞭撻いただいた恩師京都大学名誉教授福井三郎先生、マイクロボディ (ペルオキシソーム) の発見以来、現在も共同研究をいただいている日本女子大学教授大隅正子先生、遺伝子工学に関して多くのご教示とご便宜をいただいた京都大学教授故沼正作先生、有機溶媒中での生化学反応のきっかけを与えていただいた名古屋大学教授山根恒夫先生、生体触媒の固定化に関して色々とお世話になっている関西ペイント(株)および東洋ゴム工業(株)の研究陣の皆様には、特別の念をもって感謝いたします。また、ここにまとめた研究ならびに残念ながらここでは紹介できなかった研究は、筆者をも含め、園元謙二博士 (現九州大学助教授)、植田充美博士 (当研究室助教授)、川本卓男博士 (当研究室助手)、跡見晴幸博士 (現京都大学助教授) をリーダーとして、多くの学生および研究員諸氏によって行われたものであり、ここに改めて深く感謝いたします。

ここに挙げた研究はすべて未完のものでありますので、多くの夢をもちながら、これからも発展させてゆきたいと思っています。

### 文 献

- 1) 福井三郎, 田中渥夫, 藤井克彦: 工化誌, **72**, 450-455 (1969).
- 2) Fukui, S. and Tanaka, A.: *Adv. Biochem. Eng.*, **17**, 1-35 (1980).
- 3) 福井三郎, 田中渥夫: 酵母の代謝と生理, p. 91-98, 酵母細胞研究会 (1975).
- 4) 田中渥夫, 三品昌美, 福井三郎: 酵母における適応と制御 (長谷川武治編), p. 179-190, 東京大学出版会 (1977).
- 5) Shimizu, S., Tanaka, A., and Fukui, S.: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 542-550 (1969).
- 6) Shimizu, S., Tanaka, A., and Fukui, S.: *J. Ferment. Technol.*, **47**, 551-557 (1969).
- 7) Hirai, M., Shimizu, S., Teranishi, Y., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2335-2343 (1972).
- 8) Hoffmann, H.-P., Szabo, A., and Avers, C. J.: *J. Bacteriol.*, **104**, 581-584 (1970).
- 9) Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, Y., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Arch. Microbiol.*, **99**, 181-202 (1974).
- 10) Osumi, M., Fukuzumi, F., Teranishi, Y., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Arch. Microbiol.*, **103**, 1-11 (1975).
- 11) Sahm, H., Roggenkamp, R., Wagner, F., and Hinkelmann, W.: *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 218-222 (1975).
- 12) Van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Kreger-van Rij, N. J. W. S., and Harder, W.: *Arch. Microbiol.*, **102**, 41-44 (1975).
- 13) Fukui, S., Tanaka, A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y., and Osumi, M.: *J. Bacteriol.*, **123**, 317-328 (1975).
- 14) Roggenkamp, R., Sahm, H., Hinkelmann, W., and Wagner, F.: *Eur. J. Biochem.*, **59**, 231-236 (1975).
- 15) Fukui, S., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Tanaka, A., Osumi, M., and Imaizumi, F.: *Eur. J. Biochem.*, **59**, 561-566 (1975).
- 16) Tanaka, A., Yasuhara, S., Osumi, M., and Fukui, S.: *Eur. J. Biochem.*, **80**, 193-197 (1977).
- 17) Kawaguchi, T., Ueda, M., Tanaka, A., and Teramoto, K.: *Biocatalysis*, **2**, 273-282 (1989).
- 18) Kawamoto, S., Tanaka, A., Yamamura, M., Teranishi, Y., Fukui, S., and Osumi, M.: *Arch. Microbiol.*, **112**, 1-8 (1977).
- 19) Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Eur. J. Biochem.*, **83**, 609-613 (1978).
- 20) Shimizu, S., Yasui, K., Tani, Y., and Yamada, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 108-113 (1979).
- 21) Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Crabb, J. W., and Kunau, W.-H.: *Eur. J. Biochem.*, **148**, 285-291 (1985).
- 22) Ueda, M., Yamanoi, K., Morikawa, T., Okada, H., and Tanaka, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1821-1828 (1985).
- 23) Kurihara, T., Ueda, M., and Tanaka, A.: *FEBS Lett.*, **229**, 215-218 (1988).
- 24) Kurihara, T., Ueda, M., Kanayama, N., Kondo, J., Teranishi, Y., and Tanaka, A.: *Eur. J. Biochem.*, **210**, 999-1005 (1992).
- 25) Kanayama, N., Ueda, M., Atomi, H., Kurihara, T., Kondo, J., Teranishi, Y., and Tanaka, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 273-278 (1994).
- 26) 金山直樹, 跡見晴幸, 植田充美, 田中渥夫: 生化学, **69**, 865 (1997).
- 27) Kawamoto, S., Ueda, M., Nozaki, C., Yamamura, M., Tanaka, A., and Fukui, S.: *FEBS Lett.*, **96**, 37-40 (1978).
- 28) Kawachi, H., Atomi, H., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Eur. J. Biochem.*, **238**, 845-852 (1996).

- 29) 植田充美, 河内浩行, 跡見晴幸, 田中渥夫: 生化学, **69**, 711 (1997).
- 30) Tanaka, A., Osumi, M., and Fukui, S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **386**, 183-199 (1982).
- 31) Tanaka, A. and Ueda, M.: *Mycol. Res.*, **97**, 1025-1044 (1993).
- 32) Ueda, M., Mozaffar, S., Atomi, H., Osumi, M., and Tanaka, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 411-416 (1989).
- 33) Atomi, H., Ueda, M., Hikida, M., Hishida, Y., Teranishi, Y., and Tanaka, A.: *J. Biochem.*, **107**, 262-266 (1990).
- 34) Kamasawa, N., Yoshida, T., Kasahara, M., Kamada, Y., Zou, W., Ueda, M., Tanaka, A., and Osumi, M.: *J. Electron Microsc.*, **45**, 491-497 (1996).
- 35) Kawachi, H., Atomi, H., Ueda, M., Yoshida, T., Kamasawa, N., Osumi, M., and Tanaka, A.: *J. Biochem.*, **120**, 731-735 (1996).
- 36) Okada, H., Ueda, M., Sugaya, T., Atomi, H., Mozaffar, S., Hishida, T., Teranishi, Y., Okazaki, K., Takechi, T., Kamiryo, T., and Tanaka, A.: *Eur. J. Biochem.*, **170**, 105-110 (1987).
- 37) 前田修一, 木下 浩, 跡見晴幸, 植田充美, 田中渥夫: 生化学, **67**, 855 (1995).
- 38) Kurihara, T., Ueda, M., Okada, H., Kamasawa, N., Naito, N., Osumi, M., and Tanaka, A.: *J. Biochem.*, **111**, 783-787 (1992).
- 39) Atomi, H., Umemura, K., Higashijima, T., Kanai, T., Yotsumoto, Y., Teranishi, Y., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Arch. Microbiol.*, **163**, 322-328 (1995).
- 40) Umemura, K., Atomi, H., Kanai, T., Teranishi, Y., Ueda, M., and Tanaka, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 529-533 (1995).
- 41) Umemura, K., Atomi, H., Kanai, T., Takeshita, S., Kanayama, N., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Eur. J. Biochem.*, **243**, 748-752 (1997).
- 42) Fukuda, Y., Atomi, H., Kurihara, T., Hikida, M., Ueda, M., and Tanaka, A.: *FEBS Lett.*, **286**, 61-63 (1991).
- 43) Oda, K., Atomi, H., Ueda, M., Kondo, J., Teranishi, Y., and Tanaka, A.: *Arch. Microbiol.*, **156**, 439-443 (1991).
- 44) Kinoshita, H., Atomi, H., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 682-686 (1994).
- 45) Kanai, T., Atomi, H., Umemura, K., Ueno, H., Teranishi, Y., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 759-765 (1996).
- 46) Kanai, T., Ueki, N., Kawaguchi, T., Teranishi, Y., Atomi, H., Ueda, M., and Tanaka, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- 47) Fukui, S. and Ikeda, S.: *Process Biochem.*, **10**(7), 3-9 (1975).
- 48) Fukui, S., Tanaka, A., Iida, T., and Hasegawa, E.: *FEBS Lett.*, **66**, 179-182 (1976).
- 49) Fukushima, S., Nagai, T., Fujita, K., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1465-1469 (1978).
- 50) Fukui, S. and Tanaka, A.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **29**, 1-33 (1984).
- 51) Fukui, S., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *Methods Enzymol.*, **135**, 230-252 (1987).
- 52) Yamane, T., Nakatani, H., Sada, E., Omata, T., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2133-2145 (1979).
- 53) Omata, T., Iida, T., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 143-155 (1979).
- 54) Fukui, S. and Tanaka, A.: *Methods Enzymol.*, **136**, 293-302 (1987).
- 55) Yokozeki, K., Yamanaka, S., Takinami, K., Hirose, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., and Fukui, S.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 1-5 (1982).
- 56) Tanaka, A. and Sonomoto, K.: *CHEMTECH*, February, 112-117 (1990).
- 57) Fukui, T., Kawamoto, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 330-334 (1990).
- 58) 神田季彦, 川本卓男, 田中渥夫: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 269 (1995).
- 59) Fukui, S. and Tanaka, A.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **36**, 145-172 (1982).
- 60) Fukui, S. and Tanaka, A.: *Experientia*, **45**, 1055-1061 (1989).
- 61) Tanaka, A. and Nakajima, H.: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, **42**, 97-131 (1990).
- 62) Sonomoto, K., Hoq, M. M., Tanaka, A., and Fukui, S.: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 465-469 (1981).
- 63) Sonomoto, K., Hoq, M. M., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 436-443 (1983).
- 64) Okada, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 112-116 (1987).
- 65) Okada, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 316-322 (1987).
- 66) Ogaki, M., Sonomoto, K., Nakajima, H., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 6-11 (1986).
- 67) Nakajima, H., Sonomoto, K., Sato, F., Yamada, Y., and Tanaka, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3077-3078 (1989).
- 68) Nakajima, H., Sonomoto, K., Usui, N., Sato, F., Yamada, Y., Tanaka, A., and Fukui, S.: *J. Biotechnol.*, **2**, 107-117 (1985).
- 69) Ochiai, H., Tanaka, A., and Fukui, S.: *Appl. Biochem. Bioeng.*, **4**, 153-187 (1983).
- 70) 福井三郎, 田中渥夫: ビタミン, **54**, 467-477 (1980).
- 71) Tanaka, A. and Kawamoto, T.: *CHIMICAoggi*, July/August, 63-69 (1994).
- 72) 川本卓男, 田中渥夫: バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 945-949 (1995).
- 73) Kawamoto, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *J. Biotechnol.*, **18**, 85-92 (1991).
- 74) Uejima, A., Fukui, T., Fukusaki, E., Omata, T., Kawamoto, T., Sonomoto, K., and Tanaka, A.: *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 482-486 (1993).
- 75) Fukui, T., Zong, M.-H., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 209-213 (1992).
- 76) Tsuji, Y., Fukui, T., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 219-224 (1994).
- 77) Fukui, T., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **5**, 73-82 (1994).
- 78) Yamanaka, H., Fukui, T., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 51-55 (1996).
- 79) Tsuji, Y., Yamanaka, H., Fukui, T., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 114-119 (1997).
- 80) Yamanaka, H., Kawamoto, T., and Tanaka, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 181-184 (1997).
- 81) 石川豪生, 山中勇人, 川本卓男, 田中渥夫: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 291 (1996).
- 82) Murai, T., Ueda, M., Yamamura, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Amachi, T., and Tanaka, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1362-1366 (1997).
- 83) C&E News, April 14, 32 (1997).
- 84) 村井稔幸, 原野谷郁夫, 植田充美, 柴崎有美, 釜澤尚美, 大隅正子, 田中渥夫: 日本化学会第2回バイオテクノロジー部会シンポジウム要旨集, p. 25 (1997).
- 85) Murai, T., Ueda, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Kawaguchi, T., Arai, M., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 499-503 (1997).
- 86) 植田充美, 田中渥夫: 化学と生物, **35**, 525-532 (1997).