

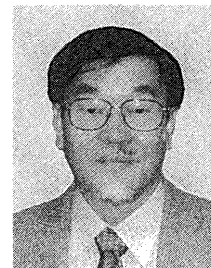
[生物工学会誌 第82巻 第1号 2-13, 2004]

総 合 論 文

遺伝子工学の基盤技術開発

(平成15年度 日本生物工学会生物工学賞受賞)

室岡 義勝



Development of Basic Technologies in Genetic Engineering —Monograph—

YOSHIKATSU MUROOKA (*Department of Bioinformatic Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871*) Seibutsu-kogaku **82**: 2-13, 2004.

In applied microorganisms, improvement of producing strains by sequential mutation and breeding of new strains by introduction of interesting genes have brought technological innovation. It was in 1966 that the author initiated his work on the use of microorganisms to convert chemical compounds to bio-compounds, a field which has recently been called green chemistry, and he has thus worked on *in vivo* and *in vitro* genetic engineering more than 35 years. Here, the author summarizes his group's work on the following six technological developments: (1) quantitative assay method for ribosomal RNA; (2) *in vivo* genetic manipulation with thermo-inducible P1*cl*r100KM and RP4::Mu*cts* to expand host bacteria from *Escherichia coli* to all gram-negative bacteria; (3) expression vectors in *E. coli*, *Bacillus subtilis*, lactic acid bacteria and propionic acid bacteria and production of useful bioactive proteins; (4) wide range promoter-proving vectors in gram-negative bacteria and *B. subtilis*; (5) host-vector systems in *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* species and their applications; (6) symbiotic engineering and its application to phytoremediation and to breeding of industrial plants.

[**Key words**: genetic engineering, rRNA, expression vector, promoter-proving vector, host vector system, symbiotic engineering, phytoremediation]

は じ め に

応用微生物学における特記すべき技術は、変異導入による有用生産株の育種技術と遺伝子導入による育種技術および培養技術である。筆者の最初の論文が醸酵工学会誌(1966)りに掲載された「土壌細菌によるエタノールアミンからグリシンの生産」であり、今でいうグリーンケミストリーの先駆的研究である。以後37年間応用微生物学分野の研究に携わってきた。この度の受賞講演を機に研究を振り返ってみた。それはあまりにも雑多で、一貫した研究哲学がうかがえない。研究に費やされる時間と研究費は限られているから、最も重要な研究課題を

集中して行うべきであった。研究費は足りないことがあっても、研究テーマと優秀な学生には事欠かなかったことから、つい思いつきと興味にまかせて研究を行ってきた。しかしそこには無意識のうちに技術開発の連続性と自分で発見あるいは開発したものを大切に伸ばしてきた形跡がうかがえる。人はそれをオリジナリティーあるいは研究哲学と見るのであろうか。ここでは、その中で受賞対象となった「遺伝子工学の基盤技術開発」について紹介したい。Table 1に開発した技術をまとめた。

著者紹介 大阪大学大学院情報科学研究科(教授) 〒565-0871 吹田市山田丘2-1
TEL. 06-6879-7416 FAX. 06-6879-7418 E-mail: murooka@bio.eng.osaka-u.ac.jp
1966年 大阪大学大学院工学研究科修士課程修了, 工学博士 専門分野: 生物工学

Table 1. 開発した遺伝子操作技術と関連する応用研究

技 術	宿主領域	代表ベクター	起 源	特徴および応用研究
rRNA 定量法	大腸菌			rRNA の定量法の開発, ppGpp による RNA 合成阻害
生体内遺伝子操作法	腸内細菌群および <i>Proteus</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. グラム陰性菌すべておよび一部の枯草菌	P1cI _r 100KM (Km) RP4::Muc _{ts} (Ap, Km, Tc)	大腸菌 P1 ファージ RP4 プラスミド Mu ファージ	P1 ファージが大腸菌以外の細菌の形質導入に利用できることを初めて示した 異種属細菌間での遺伝子交換が広く可能なことを示した <i>in vivo</i> クローニングにも応用されている
異種遺伝子発現系	大腸菌, <i>Klebsiella</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Serratia</i> sp. 枯草菌 乳酸菌 プロピオン酸菌	pYM001 ~ pYM008 (Ap) <i>cl₈₅₇-PRP_L</i> プロモーター pUGP29K 29K プロモーター pRNLDH <i>ldh</i> プロモーター pPKP8 P8 プロモーター	大腸菌 pBR322 ラムダファージ <i>B. subtilis</i> <i>L. plantarum</i> <i>P. freudenreichii</i>	温度制御による異種遺伝子発現用強力ベクター VSV-N, hMT, Apoprotein A など遺伝子産物生産用に広く利用 孢子形成遺伝子産物 ダニアレルゲン生産, コレステロール分解 コレステロール酸化酵素生産, アミノレブリン酸生産
プロモーター検索法	グラム陰性菌すべて 枯草菌	pCVE1 (Ap) <i>choA</i> pCKM1 (Km) <i>choA</i> pUGK-8	<i>Streptomyces</i> sp. pIJ702 <i>B. subtilis</i>	コレステロール酸化酵素をレポーターとし, グラム陰性菌に広く利用 枯草菌用 (ガラクトキナーゼ利用)
宿主ベクター系	<i>Klebsiella</i> 属 <i>Streptomyces</i> 属 <i>Nocardia</i> 属 <i>Clostridium</i> 属 <i>Erwinia</i> 属 <i>Xanthomonas</i> 属 <i>Acetobacter</i> sp. <i>Rhizobium</i> 属 <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Propionibacterium</i> 属	pKI212 (Km) pSY30 (Km Ts) pCK202 (Ts) pCL1, pCS1 (Cm Tc) pBEH3-5 (Ap Cm) pBXC12 (Ap Cm) pFN2A (Ap) pBBR122, pKT230 pRN14 (Ap Em) pPK705 (HygB)	大腸菌 pBR322 <i>S. castaneogibbiporus</i> pYH6202 <i>N. mediterranei</i> pCK101 <i>Clostridium</i> sp. <i>E. carotovora</i> pEC3 <i>X. campestris</i> pXCL6 <i>A. pasteurianus</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>L. plantarum</i> <i>P. acidipropionici</i>	ブルナーゼ, アリールスルファターゼ, モノアミン酸化酵素, 窒素固定 抗生物質生産菌に利用可, コレステロール酸化酵素 リファマイシン生産 好熱菌によるセルロースからのエタノール生産 ペクチナーゼ, 植物病原因子, 氷核形成, 接合伝達機構 多糖生産, 植物病原因子, 氷核形成, ヘム合成 酢酸菌への種々な機能付与 根粒菌への種々な機能付与 乳酸菌への有用機能付与によるプロバイオティクス開発 プロバイオティクス開発, ポルフィリン, ビタミン B12 生産
マメ科植物形質転換法	レンゲソウ	<i>Mesorhizobium huakuii</i> subsp. <i>rengei</i> B3 (pBBR) および <i>Astragalus sinicus</i>		根粒内での物質生産, 新規植物形質転換系, ファイトレメディエーション
共生工学	ミヤコグサ, レンゲソウ, ダイズ	pIG121	<i>A. tumefaciens</i> (pBI121) <i>A. rhizogenes</i> (pBI121)	マメ科植物の高効率形質転換系の開発, ワクチン生産, 共生分子機構の解明

1. リボゾーマル RNA の定量法の開発

分子生物学の成熟期においても, 試験管内での rRNA 合成はままならなかった. そこで試験管内合成系を開発するために rRNA 量を正確に測る必要があった. [³H] ラベルした RNA を大腸菌染色体 DNA 上の rDNA とハイブリダイゼーションさせ, コールドの rRNA と拮抗させる測定法は, ラベルされた mRNA もハイブリダイズするために誤差が大きくなる. そこで大腸菌の mRNA とはハイブリダイズしなく, rDNA とは 99% のホモロジーを持つ *Proteus mirabilis* の DNA を用いて 99% 以上の正確さでもって rRNA を測る方法を開発した.²⁾ このことにより, 大腸菌の精製した RNA ポリメラーゼは試験管内で全 RNA の 2.9% しか rRNA を合成しないことを定量的に確

かめた. 一方, 生体内では rRNA 合成量は全 RNA の 40% から 80% を占める. そこで, *in vitro* rRNA 合成条件を検討し rRNA を 30% 以上合成する試験管内合成系を初めてつくりだした.²⁾ これは試験管内組換え DNA 実験が開発される前の仕事だが, 現在使用されているハイブリダイゼーションのキットも筆者らが 30 年前に行ったのも Gillespie³⁾ が決めた条件とほぼ同じである.

この *in vitro* RNA 合成系を用いた研究から, 転写促進因子を発見し, Y1, Y2 と名づけた.⁴⁾ その頃, Cashel によって⁵⁾ 緊縮制御因子 ppGpp が発見されていたが, この機能を明らかにするのが本来の目的であった. そこで, *in vitro* RNA 合成系と *P. mirabilis* を用いた rRNA 定量法により ppGpp が rRNA を含む全 RNA 合成を阻害することを証明した.²⁾

2. 生体内遺伝子操作法の開発

それまでは大腸菌, サルモネラ菌, 枯草菌など一部の菌においてしか遺伝解析ができなかったため, 種々な細菌に遺伝子を導入できる系の作製に取りかかった. 温度感受性 Km 耐性 P1 ファージ, P1 ϕ 100KM を細菌に感染させ, Km 耐性コロニーを選択し 39°C で溶菌するコロニーを選ぶことにより P1 感受性すなわち P1 ファージがかかり, 遺伝子導入できる株を選択した. この方法により, 今まで P1 ファージにより大腸菌でしか形質導入できなかったものを, ほとんどのグラム陰性菌において遺伝子導入できるようにした.^{6,7)}

次いで, RP4::Mu ϕ s ファスミドを用いた生体内遺伝子操作法を開発した.⁸⁾ 温度感受性 Mu ファージと広宿主薬剤耐性 RP4 プラスミドの特性を利用して, 相同組換えとプラスミド伝達により, 細菌染色体への遺伝子の組み込み, 変異株の取得, 遺伝子の連結,⁹⁾ *in vivo* cloning¹⁰⁾ をほぼすべてのグラム陰性菌において可能にした (Fig. 1). 現在頻繁に行われている遺伝子破壊法や遺伝子連結法は, 原理的に同じものである. こうした研究をしておきながら, 現在コンティグに用いられている Bac ベクターの開発に至らなかったのは筆者の先見の明のなさである.

こうした接合伝達を含めた遺伝子交換法は, 形質転換がうまくいかない菌株で現在でも使われており, 現に筆者の研究室では好塩細菌 *Halomonas elongata*¹¹⁾ の遺伝子導入に接合伝達系を利用している. しかしながら, 試験管内遺伝子操作法に比べれば生体内遺伝子操作系は, 遺伝子産物の生産を考えた場合おのずと限界がある. そこで, 1980年に再び NIH で研究する機会を得たおりに,

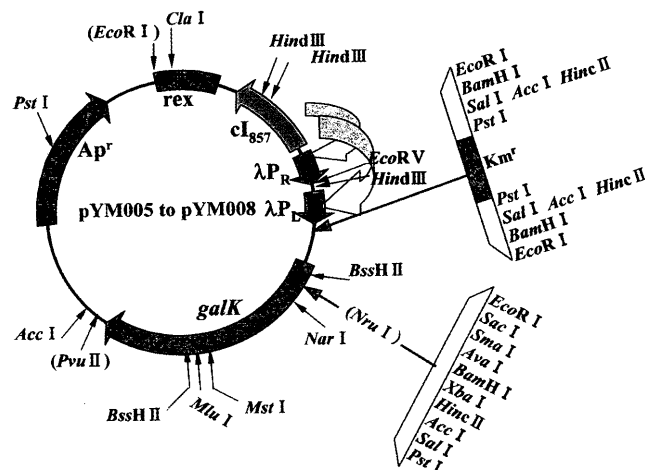


Fig. 2. Development of thermo-inducible expression vectors with λP_{RPL} promoters. These promoters are regulated by the thermo-inducible repressor, *cI857*.

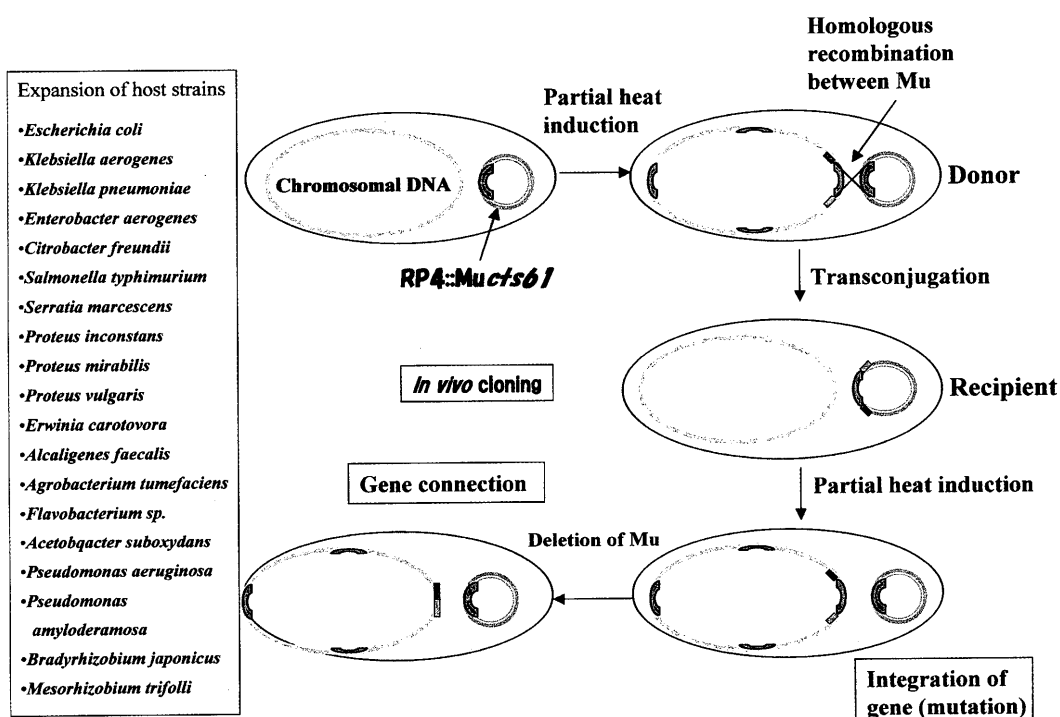


Fig. 1. Development of *in vivo* genetic manipulation with RP4::Mu ϕ s and expansion of the host range.

異種遺伝子発現系の開発を始めた。

3. 異種遺伝子発現系の開発

温度感受性レプレサー *cI857* でコントロールされるラムダファージの P_R および P_L プロモーターを連結した強力な発現ベクター, pYM シリーズを開発した (Fig. 2).¹²⁾ Multi-cloning site およびプロモーター活性測定用に β -galactosidase より小型遺伝子の galactokinase, *galK* をレポーターとして使用した. pYM ベクターに載せた $P_R P_L$ プロモーターの強度を GalK 活性を指標に比較したところ, 強力といわれていた *lac* プロモーターの2倍の活性があった.¹²⁾ この $P_R P_L$ プロモーターは *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* 菌において働くこと, さらにグラム陽性菌の枯草菌においても働くことが分かった (Table 2). これは, 大腸菌由来のプロモーターがグラム陽性菌で働くことを示した初めての報告となった.¹³⁾ この温度制御発現ベクターはいろいろと改変されて, 世界中で使用されている.

この温度発現ベクターにより, 動物タンパク質の大腸菌による発現効率を調べるため, 動物ウイルス Vesicular

Stomatitis Virus (VSV) の Nucleocapsid タンパク質を大腸菌により発現させた.¹⁴⁾ 以後このベクターを利用して, 以下の異種タンパク質を発現させた. 寺西, 水島らと共同で *ompF* シグナルを付けた分泌ベクターを開発し, ヒトの apolipoprotein A1 遺伝子を発現させた. 次いで, pYM 系ベクターにより, サルのメタロチオネイン (MT) 遺伝子を発現させることにした. これは異種タンパク質の生産性を高める一般則の確立を目指して始めたものである. そこで, 低分子量で SH 基に富むタンパク質の発現モデルとしてメタロチオネインを選んだが, 以後そのために大変苦労することになった. 翻訳効率を上げるために 2 cistron 法を取り入れることによりサルの mMT が検出できた. これがメタロチオネインを大腸菌で発現させた最初の報告となった.¹⁵⁾ しかしながら, その生産量は非常に低いものであった. その原因として, MT の 61 アミノ酸残基の内 20 アミノ酸がシステイン残基であり, そのシステインのコドン UGC/UGU 比が 18:2 と偏っているためと考えた. そこで, タンパク質生産性向上の要因を探るため, サルに代えてヒトの MT (hMT) をシステインのコドン比を半半にし, hMT 遺伝子をデザインして全合成した.¹⁶⁾ プロモーターの種類, 誘導条件, 遺伝子連結数など条件を変えて発現量を調べた. その結果, 大腸菌ではコドンの偏りよりもプロモーターの種類や宿主大腸菌株の性質の方が重要であること, Shine-Dalgarno (SD) 配列を 2 つ付けた 2 cistron 系が monocistron より 6 倍発現効率が高いこと, hMT をタンデムに連結すると生産性が向上すること, SH 高含有タンパク質は特に大腸菌の増殖を阻害しないこと, 融合タンパクは高発現することなどが分かった.¹⁷⁾ その後, 今日に至るまで約20年間 hMT 高発現系を開発してきた. 今では, intein-MT 融合によりチオネインを生産させた後で金属と結合させることにより種々な重金属との結合強度を見ることも可能となった.¹⁸⁾

4. 宿主—ベクター系の開発

次に筆者らが開発した宿主—ベクター系を紹介する. 開発した 11 属細菌の内 7 属は世界で初めての宿主—ベクター系の報告となった.

Klebsiella 菌を使用してサルフェート^{19,20)} やモノアミンレギュロン^{21,22)} の研究をしてきた関係から, 最初に *Klebsiella* 菌の宿主—ベクター系を作成した. これらレギュロンの研究は省略して, *Klebsiella* 菌が分泌するデンブリン枝切り酵素プルナーゼについて紹介する. 1985 年に遺伝子をクローニングし,²³⁾ 全塩基配列を発表し

Table 2. Relative strength of promoters from lambda and *E. coli* in various bacteria.

Host strain		Promotor	Relative activity
<i>Escherichia coli</i>	C600	<i>lacUV5</i>	100
		<i>trp</i>	180
		<i>tac</i>	180
		P_R	90
		$P_R P_L$	320
	K12ΔH1Δtrp	<i>lacUV5</i>	140
		<i>trp</i>	210
		<i>tac</i>	240
		P_L	80
		P_R	180
		$P_R P_L$	530
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>lacUV5</i>	260
		<i>trp</i>	280
		$P_R P_L$	240
		$P_R P_L$	5
<i>Citrobacter freundii</i>	IFO12681	$P_R P_L$	5
<i>Serratia marcescens</i>	IFO4046	$P_R P_L$	10
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>lacUV5</i>	>5
		<i>trp</i>	>5
		<i>tac</i>	>10
		$P_R P_L$	>5
		P21K (<i>B. subtilis</i>)	5
		P29K (<i>B. subtilis</i>)	10
		PEm (<i>S. aureus</i>)	>5

た.²⁴⁾ 当時は配列決定に2~3年かかり、パスツール研究所の Pugsley のグループもシーケンス途中であったことが後で分かった。推定アミノ酸配列から細胞膜リポタンパク質の保存配列 Leu-Leu-Ser-Gly-Cys が見つかり、この Cys がリピッドで修飾されたリポタンパク質である可能性が示唆された。そこで Cys を Ser に変換した変異プルナーゼを作製した。²⁵⁾ その結果、元の酵素は palmitate でラベルされ、変異酵素はラベルされないこと、野生型酵素は Cys の前でプロセッシングされるが変換酵素は他の位置でプロセッシングされること、ペリプラスミック区分に変異酵素が蓄積することから、脂肪による修飾は細胞内局在と分泌に関与することを明らかにした。²⁶⁾ なお、これはアミラーゼの一種がリポタンパク質であることを示した最初の報告である。

木材の爆砕と発酵法によって、セルロースからエタノールを生産するために分離された好熱性 *Clostridium* の宿主-ベクター系は黒瀬らと共同開発した。²⁷⁾ 15 年前の研究であるが、バイオマスからのアルコール生産は再び脚光を浴びようとしている。

植物病原細菌の遺伝子導入のため、氷核を作る植物

病原細菌の *Erwinia* の宿主-ベクター系を開発した²⁸⁾ *E. carotovora* が保持していた小型のプラスミドをベクターの基盤にして開発した。一方でこのプラスミドは、非自己伝達性プラスミドの伝達に cAMP が関与するなどプラスミドの伝達メカニズムの研究に発展した。²⁹⁻³¹⁾ 次いで、工業用多糖 Xanthan 生産植物病原菌 *Xanthomonas* 属の宿主-ベクター系を開発した。³²⁾ このベクターは、接合伝達および試験管内形質転換の両方に用いることができる。この菌はアミノレブリン酸 (ALA) 生合成に C5 経路を利用していることが glutamate 1-semialdehyde aminomutase 遺伝子³³⁾ および *hemA* 遺伝子³⁴⁾ のクローニングにより明らかとなり、*hem* 遺伝子の研究に発展した。こうした宿主-ベクター系は病原性因子のテストにとって有益である。

酢酸菌の遺伝子交換は、先の生体内遺伝子操作系で初めて報告したが、その後深谷ら³⁵⁾ によって宿主-ベクター系の開発がなされている。最近筆者らは氏家らと共同で、食酢醸造現場より分離した *Acetobacter pasteurianus*³⁶⁾ の保持しているプラスミドを用いて *Acetobacter* や *Gluconobacter* の多くの種に広く利用されるベクターを開発した

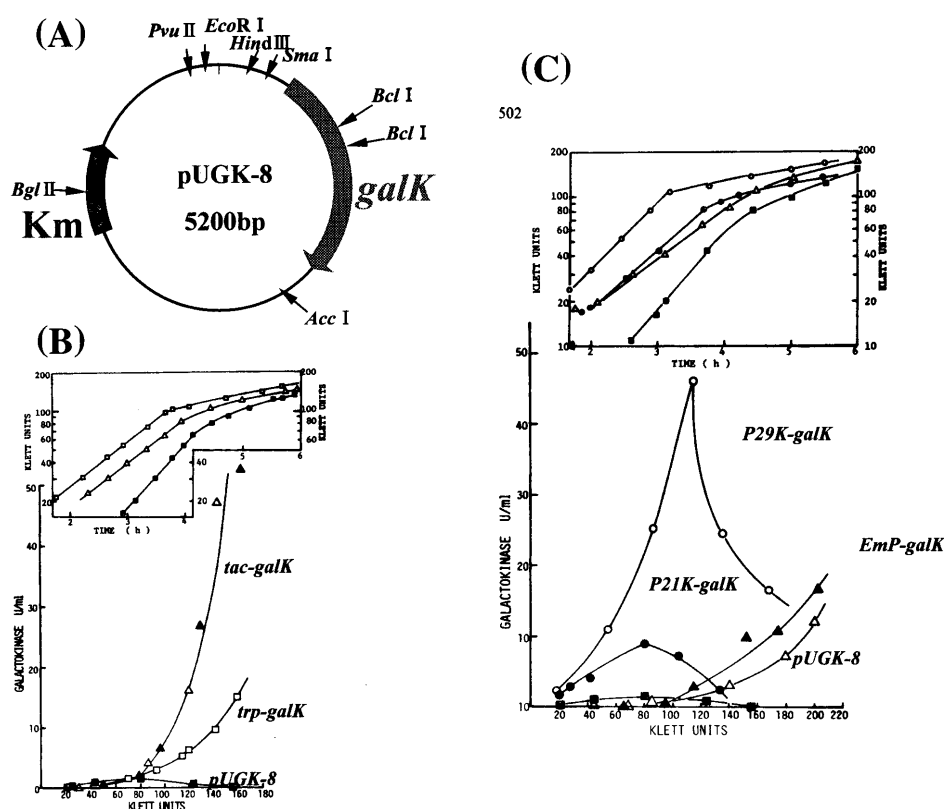


Fig. 3. Promoter proving-vector for *Bacillus subtilis* and strength of various promoters in various growth phases. A, Promoter-proving vector pUGK-8; B, expression of the *galK* gene under the control of *E. coli* promoters; C, expression of *galK* under the control of *B. subtilis* promoters in various growth phases.

(未発表)。

Rifamycin 生産菌, *Nocardia* のベクターは高麗大学との共同研究によって開発した. 抗生物質生産菌 *Streptomyces* 属に広く利用できる宿主-ベクター系も 1984 年に杉山らと開発したが, 便利なベクターに改良しなかったため, 広く使用されるに至っていない.

以上紹介したようなベクターは世界中の研究者に広く使用されてこそ意味あるものだから, 要求に応じて世界中の研究者に分与してきた.

5. プロモーター検索用ベクター

宿主-ベクター系を開発して発現ベクターにするためには強力な自己プロモーターを取得する必要がある. ここではそのうちの, 枯草菌のプロモーター検索用ベクターとグラム陰性菌に利用できる便利なプロモーター検索用ベクターを紹介する. Galactokinase をレポーターとするプロモーター活性測定用ベクターを作製し, 大腸菌由来プロモーターの *tac* や *trp* が *Bacillus subtilis* 内で働くことを初めて示した (Fig. 3).¹³⁾ 枯草菌から分離したプロモーターは, プロモーターの種類により log phase と stationary phase で活性が違ってくことから, 生産用にはそれぞれ適したものを選ぶ必要があることを提案した.³⁷⁾

コレステロール酸化酵素をレポーターとする, 低コピーとハイコピーの広宿主プロモーター検索用ベクターを開発した (Fig. 4).³⁸⁾ 一般に β -galactosidase をレポーターとするベクターが大腸菌で使われているが, 他の有用細菌で使用するにはラクトース欠損変異株を取得しなければならない. それに対してコレステロール酸化酵素は特殊な菌株しか持っていないので, ほとんどの菌でレポーターとしてすぐに使え, 簡単に検出測定できる利点がある.

6. コレステロール酸化酵素の改良

コレステロール酸化酵素は, コレステロールを 5-cholesten-3-one に変換する酸化反応とさらに 4-cholesten-3-one に変換する異性化反応を触媒する酵素である. この酵素は臨床検査用に使用されている. 酸化反応で生じる過酸化水素を利用した呈色反応によって酵素活性の定量が行われている (Fig. 5). この呈色反応を利用して 1986 年に放線菌の分泌型コレステロール酸化酵素遺伝子 (*choA*) をクローニングした.³⁹⁾ 報告すると欧米から遺伝子分与の申し込みが相次いだ. この *choA* 上流隣に *P450* 遺伝子がありオペロンを成していた.^{40,41)} 最初は両者の

関係が分からなかったが, コレステロールの生分解には *P450* による反応の必要性が推察された. 抗生物質合成の一部も *P450* が触媒している. 偶然ではあるが, 放線菌における *P450* 遺伝子の最初の発見となった. *P450-choA* オペロン上流を欠矢させることにより, *Streptomyces lividans* により元の生産菌の 100 倍以上も分泌生産した (Fig. 6).^{42,43)} この酵素は臨床検査試薬として欧米に輸出されていることから, 安定性を高める必要があった. そこで, 西谷, 平山らと共同でタンパク質工学による改良を試みた. ランダム変異によって 4 種類の耐熱化した変異酵素が得られた.⁴⁴⁾ そのうち最も耐熱性が向上していた V145E 変異酵素は pH 安定性も飛躍的に向上していた. 平山により開発されたソフトを用いて, V145 を Glu に変換することにより, Asp134 と水素結合をとり, Arg147 とソルトブリッジを取りやすくなり安定化するというモデルを提唱した.⁴⁵⁾

さらに site-directed mutation により oxidation と isomerization 反応を切り離し, 2つの新規酵素を作製した.⁴⁶⁾ 予測された活性部位のアミノ酸を種々変換したところ, S379 の Thr 置換によって, 基質特異性がコレステロールよりプレグネノロンに対して 7 倍高くなることを発見した.⁴⁷⁾

コレステロール酸化酵素以外に, ketosteroid dehydrogenase^{48,49)} や ketosteroid isomerase^{50,51)} を *Arthrobacter* よりクローニングし, ステロイド医薬の前駆体である AD や ADD を蓄積する目的で, 放線菌で高発現させた. コレステロール酸化酵素が, 殺虫タンパク質として作用するという興味ある機能は Monsanto の研究員により発見された.⁵²⁾ これは, Bt トキシン耐性のワタの害虫に効く生物農薬を探索する過程で発見されたものである. 彼らは放線菌の *choA* 遺伝子をタバコのプロトプラストで発現させた⁵³⁾ が, 筆者らは植物のコレステロールを分解させる目的で, タバコ細胞で発現させた.⁵⁴⁾

7. プロバイオティクス菌の発現ベクター

次に, プロバイオティクスと呼ばれる菌の宿主-ベクター系の開発と応用について紹介する. 先の酢酸菌のように, 微生物工業に使用されている菌の多くは企業において独自の株に対して開発されているため, 独自で開発する必要が生じてくる.

乳酸菌 L137 株は高野らにより, フィリピン伝統発酵食品からアミラーゼ生産乳酸菌として分離され,⁵⁵⁾ *Lactobacillus plantarum* に分類された.⁵⁶⁾ 熱殺菌した L137 株はインターロイキン 12 (IL12) などのサイトカイン

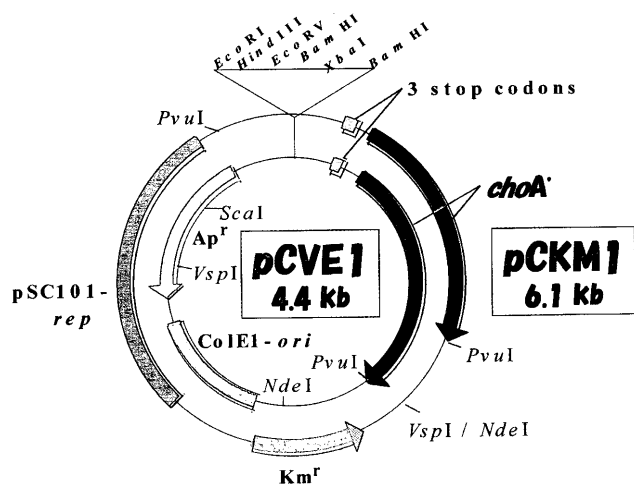


Fig. 4. Development of wide host range promoter-proving vectors. A low copy (pCCKM1) and a high copy (pCCKM2) vectors are widely applicable promoter-proving vectors with *choA* as a reporter gene since most bacterial strains do not have cholesterol oxidase.

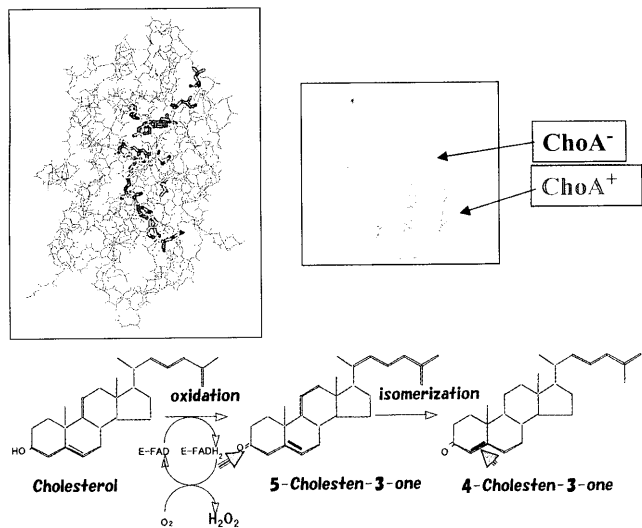


Fig. 5. *Streptomyces* cholesterol oxidase. Cholesterol oxidase catalyzes two reactions, oxidation and isomerization, to form 5-cholesten-3-one and 4-cholesten-3-one, respectively, from cholesterol. Upper left and right panels show three-dimensional structure of *Streptomyces* cholesterol oxidase and color reaction of the enzyme on filter paper, respectively.

の生産を誘導し、IgE 抗体の産生を抑制する⁵⁷⁾ことから、花粉症などの減感作治療に効果があると予測されている。また移植ガンに対する延命効果も報告されている。⁵⁸⁾ この乳酸菌 L137 株への機能付与のため、宿主ベクター系を作成した。L137 株は 15 種類のプラスミドを保持していた。これらプラスミドをキュアリングすることにより、アミラーゼ生産に関与する遺伝子がプラスミド上にコードされていることが分かった。⁵⁶⁾ 小型プラス

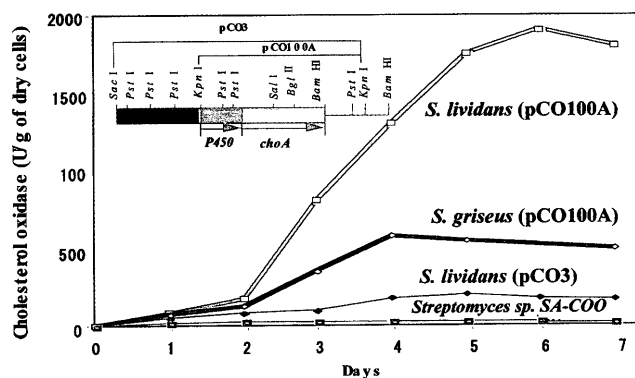
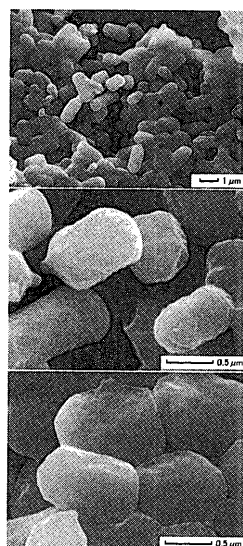
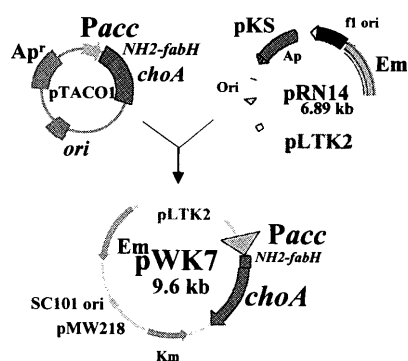


Fig. 6. Secreted production of *Streptomyces* cholesterol oxidase. The deletion of a 1.2-kb fragment upstream of the P450-*choA* operon and subcloning of the operon into pCO100A vector resulted in the secreted overproduction of *Streptomyces* cholesterol oxidase.

ミドの全塩基配列を決定し、⁵⁹⁾ このプラスミドと乳酸菌より分離した acetyl CoA carboxylase の promoter⁶⁰⁾ を利用して発現ベクターを作製した。⁶¹⁾ このベクターに先の *choA* 遺伝子を乗せてコレステロール酸化酵素を乳酸菌 L137 株で発現させた (Fig. 7).⁶¹⁾ もっとも乳酸菌によるコレステロール分解を目的とした研究は、筆者が分与した *choA* 遺伝子を使用して乳酸菌で発現した例がすでに報告されていた。⁶²⁾

乳酸菌 L137 株を経口減感作用宿主菌とするため、以前小笠らと共同でクローニングしたダニアレルゲン遺伝子⁶³⁻⁶⁶⁾ を発現させることにした。ダニの主要アレルゲン Del f1 を L137 株で発現させた。⁶⁷⁾

いま一つのプロバイオティクスのプロピオン酸菌はチーズのスターターやビタミン B₁₂ 生産に利用されている。プロピオン酸菌の宿主ベクター系を開発するため、*P. acidopropionici* プラスミドの全塩基配列 6868bp を決定した。⁶⁸⁾ これが、プロピオン酸菌のプラスミドの全塩基配列を決定した初めての報告となった。このプラスミドに hygromycin B を選択マーカーにしてベクターを構築した (Fig. 8).⁶⁹⁾ 一度 *P. freudenreichii* をくぐらし、制限修飾系を解除することにより高い頻度で種々な *Propionibacterium* 種の形質転換に成功した。⁶⁸⁾ 世界中で 10 年以上もプロピオン酸菌の形質転換系の開発が試みられながら、私たちが最初に成功したのは、今までの宿主ベクター系開発の実績と研究者の粘り強い熱意によるものであろう。pCCKM1 ベクターに *choA* 遺伝子を組み込んでプロモーター検索ベクターとして *Propionibacterium* 由来の強いプロモーターを選択した。⁶¹⁾ プロピオン酸菌のプロモーター配列は大腸菌のそれとはかなり違うことを明ら



Sample: L137HK

装置: JSM-5600

加速電圧 (kV): 10

写真倍率: x10,000

画像: SE1

<二次電子像>

作動距離 (mm): 9

x5 219倍

測定日: 2001-07-03

装置: JSM-5600

加速電圧 (kV): 10

写真倍率: x50,000

画像: SE1

<二次電子像>

作動距離 (mm): 9

x5 219倍

測定日: 2001-07-03

装置: JSM-5600

加速電圧 (kV): 10

写真倍率: x50,000

画像: SE1

<二次電子像>

作動距離 (mm): 9

x5 219倍

測定日: 2001-07-03

Expression of *choA* in *L. plantarum* NCL21 and in *L. casei* K95-5

Strain	Plasmid	Cholesterol oxidase
		U/g protein
<i>L. plantarum</i>	pRN14	0.0
<i>L. plantarum</i>	pWK7	2.8
<i>L. casei</i>	pRN14	0.0
<i>L. casei</i>	pWK7	0.9

Fig. 7. Development of expression vector for *Lactobacillus* species and expression of *choA* in *L. plantarum* and *L. casei*. Strain NCL21 is a derivative from strain L137. Upper right panel shows electron micrograph of heat killed *L. plantarum* L137 cells.

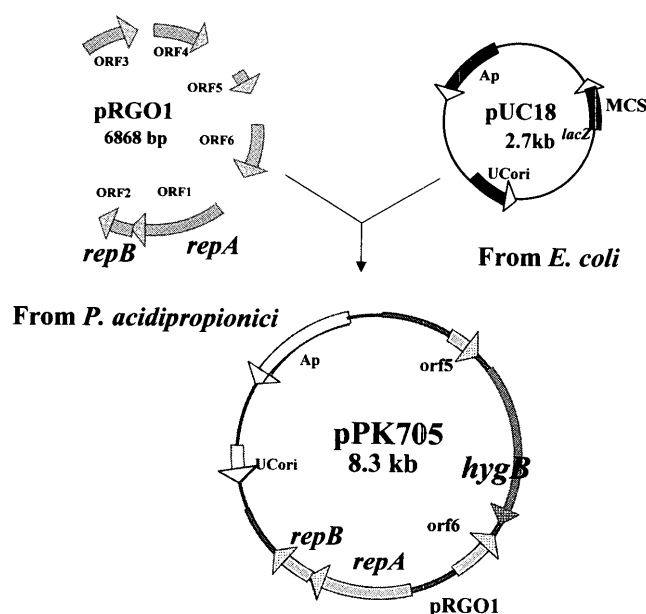


Fig. 8. Construction of a shuttle vector, pPK705, used between propionibacteria and *E. coli* with hygromycin B as a drug marker.

かにした。この発現ベクターによりまずコレステロール酸化酵素を生産させた。⁶¹⁾ コレステロールの分解能を付与した乳酸菌やプロピオン酸菌は、将来食品微生物として高コレステロール食品のプロセッシングに利用できるだろう。次いで *Rhodobacter sphaeroides* の *hemA* 遺伝子を発現させることにより、アミノレブリン酸 (ALA) をプロピオン酸菌で高生産させた。⁶⁹⁾ プロピオン酸菌は ALA 合成系として大腸菌で知られている C4 経路⁷¹⁾ と C5 経路⁷¹⁾ の両者の活性が知られている (Fig. 9)。ALA は Heme やビタミン B₁₂ の前駆体であるとともに植物の成長促進、ストレス耐性の作用が知られ、ガンのレーザー光治療への応用が期待されている。⁷²⁾ 現在、ビタミン B₁₂ 生合成に関与する遺伝子を取得し、⁷³⁻⁷⁵⁾ ポルフィリンや B₁₂ 生産の研究を展開している。

8. 共生工学の開発

最後にマメ科植物の形質転換法の開発と現在進めている共生工学について紹介する。植物と微生物との相互作用に興味を持ち、身近なレンゲソウを材料として研究を

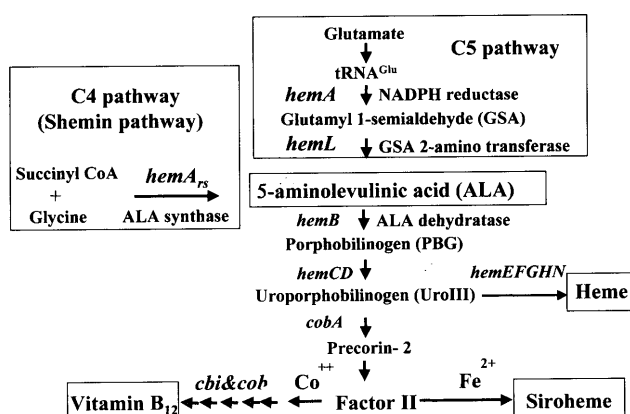


Fig. 9. Metabolic position of 5-aminolevulinic acid (ALA), an intermediate in the heme, siroheme, and vitamin B₁₂ synthetic pathways. The ALA is synthesized by either C4 or C5 pathway.

始めた。1980年当時はまだ大学近辺にもレンゲソウ畑が広がり春には赤い絨毯が敷き詰められた。レンゲソウ根粒菌の分類学報告が見当たらなかったため、根粒内共生菌の分離より行った。新種であった。⁷⁶⁾ 投稿前に中国から新種の論文が載った。⁷⁷⁾ その後詳細に調べたところ日本のレンゲソウ根粒菌と中国のそれとはいくつかの相

違点が見つかったため、日本の菌は *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* とした。⁷⁸⁾ レンゲソウの共生プラスミド,⁷⁹⁾ レンゲソウ根粒形成に関わるノデュリン⁸⁰⁻⁸²⁾ をクローニングした。またレンゲソウの試験管内根粒形成系を開発した。この研究を通して、植物と微生物の両方の性質を同時に利用できる共生系の技術開発の研究を始め、これを「共生工学」と名づけた (Fig. 10)。デザイン (設計), 組み立て, システム, プロセスなどを包括して初めて工学 (Engineering) と呼ぶことができる。共生工学の材料として、植物 (レンゲソウ, ミヤコ草), 微生物 (根粒菌, 菌根菌), 付加遺伝子 (メタロチオネインなど) を使用した。先に大腸菌で発現させたメタロチオネインをさらに安定化させかつ金属結合量を増加させるために4量体をデザインした。⁸³⁾ 4量体 (MTL4) はタンパク分子あたり28分子のCd, Znを結合した。⁸⁴⁾ このMTL4遺伝子をレンゲソウ根粒菌に組換えするため、根粒菌の形質転換系⁸⁵⁾ およびレンゲソウの形質転換系⁸⁶⁾ を開発した。このように、レンゲソウに関するすべての技術開発を独自で行う必要があった。

根粒菌ベクターに *tac-MTL4* 遺伝子を組み込み、形質転換根粒菌をレンゲソウに感染させて根粒形成させた

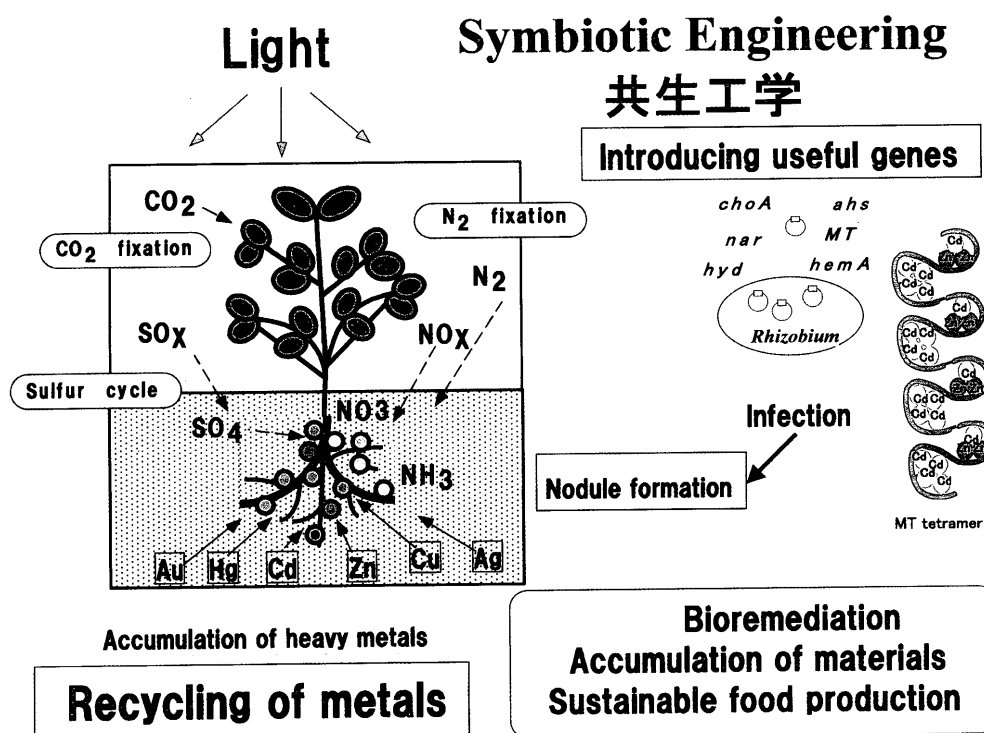


Fig. 10. 'Symbiotic engineering' using symbiosis between leguminous plant and rhizobia, which are transformed by various interest genes. For example, the MT tetramer or other useful genes are transferred into rhizobia, and then the transformants are infected to plant seed and form nodules on the roots. These genes should be expressed under an appropriate promoter in bacteroids in nodules.

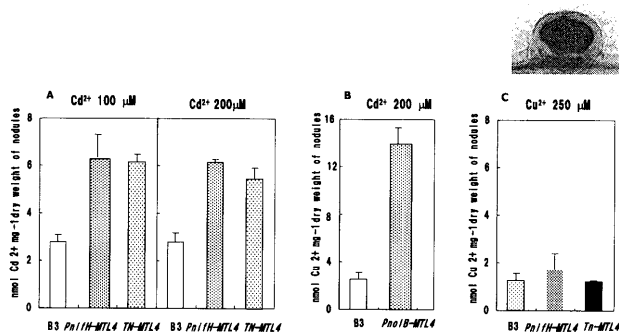


Fig. 11. Expression of *PnifH-MTL4* and *PnolB-MTL4* and accumulation of Cd^{2+} in nodules. The plant infected with B3 with or without vector was grown in soil containing CdCl_2 or CuCl_2 . A, Cd^{2+} accumulation with or without *PnifH-MTL4*; B, Cd^{2+} accumulation with or without *PnolB-MTL4*; C, Cu^{2+} accumulation with or without *PnifH-MTL4*.

が、根粒バクテロイド内で *MTL4* は発現しなかった。そこで、共生プラスミドに乗っている *nifH*⁷⁹⁾ *nolB* プロモーターを分離し、これらプロモーター下に *MTL4* を挿入したところ根粒バクテロイド内で発現した。⁸⁷⁾ これは、植物根粒内においてヒトの遺伝子を発現させた最初の例となった。さらにこの方法は、植物への新規遺伝子導入法ともなった。これら *MTL4* が発現した根粒は野生株の 2-7 倍のカドミウムを取り込んでいた (Fig. 11).⁸⁷⁾ 細菌メタロチオネインがヒ素も結合することを証明した⁸⁸⁾ ので、ヒ素のバイオレメディエーションにも応用できるかもしれない。

次いで、カドミウムを結合することで知られているファイトケラチンを根粒で発現させることにした。アラビドプシスのファイトケラチン合成酵素遺伝子 (*AtPCS*) を *nifH* プロモーター下流に挿入し、レンゲソウ根粒菌でオリゴファイトケラチンを発現させた (Fig. 12)。 *M. huakuii* subsp. *rengei* 内では 10-20 倍のカドミウムを取り込んだ (Fig. 13).⁸⁹⁾ 根粒内へのカドミウムの蓄積は 1.5 倍にとどまった。そこで、先の *MTL4* と *AtPCS* とを根粒内で同時に発現させたところ、カドミウム蓄積の相乗効果が見られた。現在、マメ科牧草へ大腸菌 O157:H7 感染因子を導入して牛に対する経口ワクチンの開発研究および経口減感作療法を目指したマメ科植物におけるダニアルレルゲンの発現研究を行っている。共生工学は今後、植物代謝工学と組み合わせて工業植物の育種にも貢献するであろう。⁹⁰⁾

共生工学の技術開発には共生分子機構の解明が不可欠なことから、モデルマメ科植物のミヤコ草 (*Lotus japonicus*) を用いて共生に関わる遺伝子の解析を行って

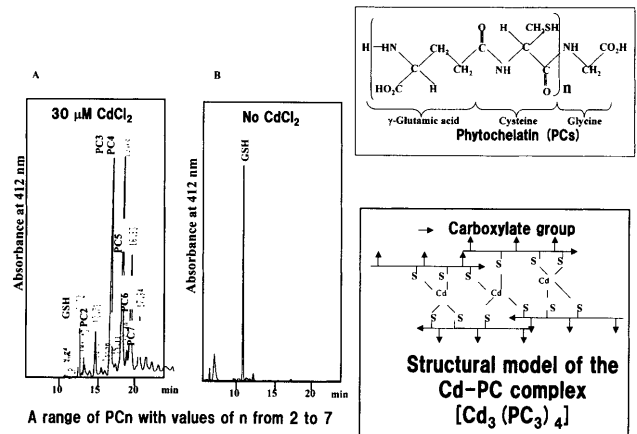


Fig. 12. Accumulation of phytochelatins in *M. huakuii* subsp. *rengei* B3 cells with (A) or without (B) *AtPCS*. Gas chromatography analysis showed that a range of PCn, with values of n from 2 to 7, was synthesized in B3 cells in the presence of Cd^{2+} .

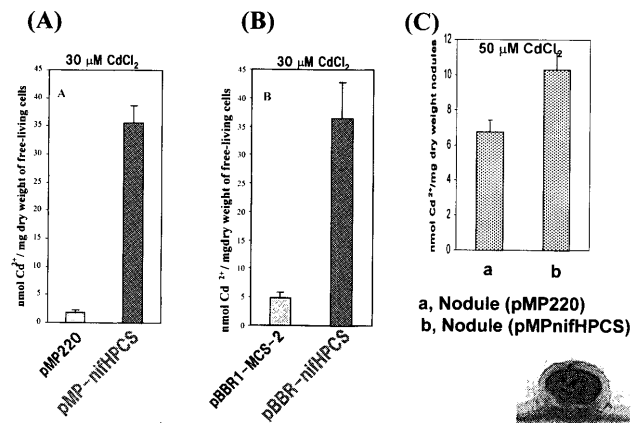


Fig. 13. Accumulation of Cd^{2+} by *M. huakuii* subsp. *rengei* expressing *AtPCS*. A, Cd^{2+} accumulation in strain B3 with or without pMP-*nifHPCS*; B, Cd^{2+} accumulation in strain B3 with or without pBBR-*nifHPCS*; C, Cd^{2+} accumulation in nodules with or without pMP-*nifHPCS*.

いる。⁹¹⁻⁹²⁾ この共生工学をさらに進化させ、地球上の生物が互いに共存しあう共生社会を構築することが筆者の夢である。

以上の研究は、広島大学工学部醸酵工学科および大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻において多くの優秀な学生や森永力、山下光雄、金子嘉信、小野比佐好、林誠先生などの研究室スタッフおよび山田隆、小埜和久、平山令明先生など多くの共同研究者とともに行ったものである。この間、絶えずご指導ご薫陶をいただいた恩師、原田篤也先生、能美良作先生をはじめ両大学の先輩、同僚の先生方にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 原田篤也, 室岡義勝: 醸酵工学, **44**, 192-197 (1966).

- 2) Murooka, Y. and Lazzarini, R. A.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6248–6250 (1973).
- 3) Gillespie, S. and Gillespie, D.: *Biochem. J.*, **125**, 481–487 (1971).
- 4) Murooka, Y. and Lazzarini, R. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2336–2340 (1972).
- 5) Cashel, M. and Gallan, J.: *Nature*, **221**, 838–890 (1969).
- 6) Murooka, Y. and Harada, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 754–757 (1979).
- 7) Takizawa, N. and Murooka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1451–1458 (1984).
- 8) Murooka, Y., Takizawa, N., and Harada, T.: *J. Bacteriol.*, **145**, 358–368 (1981).
- 9) Yamashita, M. and Murooka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1459–1470 (1984).
- 10) Murooka, Y., Oka, M., Yamashita, M., Sugiyama, M., and Harada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1807–1815 (1983).
- 11) Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, T., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **181**, 91–99 (1999).
- 12) Murooka, Y. and Mitani, I.: *J. Biotechnol.*, **2**, 303–316 (1985).
- 13) Murooka, Y., Oda, M., and Kobayashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 499–503 (1986).
- 14) Murooka, Y. and Arnheiter, H.: *J. Biotechnol.*, **2**, 289–301 (1985).
- 15) Murooka, Y. and Nagaoka, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 204–207 (1987).
- 16) Yamashita, M., Kuwata, H., Murakami, H., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 113–118 (1994).
- 17) Murooka, Y.: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications* (Murooka, Y. and Imanaka, T.), p.1–13, Marcel Dekker Inc., New York (1994).
- 18) Hong, S.-H., Toyama, M., Maret, W., and Murooka, Y.: *Protein Expr. Purif.*, **21**, 243–250 (2001).
- 19) Murooka, Y., Ishibashi, K., Yasumoto, M., Sasaki, M., Sugino, H., Azakami, H., and Yamashita, M.: *J. Bacteriol.*, **172**, 2131–2140 (1990).
- 20) Azakami, H., Sugino, H., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **174**, 2344–2351 (1992).
- 21) Sugino, H., Sasaki, M., Azakami, H., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **174**, 2485–2492 (1992).
- 22) Azakami, H., Sugino, H., Yokoro, N., Iwata, N., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **175**, 6287–6292 (1993).
- 23) Takizawa, N. and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 294–298 (1985).
- 24) Katsuragi, N., Takizawa, N., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **169**, 2301–2306 (1987).
- 25) Murooka, Y. and Ikeda, R.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 17524–17531 (1989).
- 26) Yamashita, M., Nakagawa, A., Katsuragi, N., and Murooka, Y.: *Molec. Microbiol.*, **6**, 389–394 (1992).
- 27) Kurose, M., Miyazaki, T., Kakimoto, T., Yagyu, J., Uchida, M., Obayashi, A., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 371–374 (1989).
- 28) Hamamoto, A. and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 242–247 (1987).
- 29) Nomura, N., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Gene*, **170**, 57–62 (1996).
- 30) Nomura, N. and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 250–254 (1994).
- 31) Nomura, N., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 534–538 (1998).
- 32) Murooka, Y., Iwamoto, H., Hamamoto, A., and Yamachi, T.: *J. Bacteriol.*, **169**, 4406–4409 (1987).
- 33) Murakami, K., Korbsrisate, S., Asahara, N., Hashimoto, Y., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 502–506 (1993).
- 34) Asahara, N., Murakami, K., Korbsrisate, S., Hashimoto, Y., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 846–850 (1994).
- 35) Fukaya, M., Okumura, H., Masaki, H., Uozumi, T., and Beppu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2083–2090 (1985).
- 36) Nanda, K., Taniguchi, T., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 986–990 (2001).
- 37) Murooka, Y., Oda, M., Nagaoka, T., and Kobayashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 504–508 (1986).
- 38) Nomura, N., Choi, K.-P., Yamashita, M., Yamamoto, H., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 410–416 (1995).
- 39) Murooka, Y., Ishizaki, T., Nimi, O., and Maekawa, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1382–1385 (1986).
- 40) Ishizaki, T., Hirayama, N., Shinkawa, H., Nimi, O., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **171**, 596–601 (1989).
- 41) Horii, M., Ishizaki, T., Paik, S.-Y., Manome, T., and Murooka, Y.: *J. Bacteriol.*, **172**, 3644–3653 (1990).
- 42) Molnar, I., Choi, K.-P., Hayashi, N., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 368–372 (1991).
- 43) Molnar, I. and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 257–264 (1993).
- 44) Nishiya, Y., Harada, N., Teshima, S., Yamashita, M., Fujii, I., Hirayama, N., and Murooka, Y.: *Protein Eng.*, **10**, 231–235 (1997).
- 45) Murooka, Y. and Yamashita, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 433–441 (2001).
- 46) Yamashita, M., Toyama, M., Ono, H., Fujii, I., Hirayama, N., and Murooka, Y.: *Protein Eng.*, **11**, 1075–1081 (1998).
- 47) Toyama, M., Yamashita, M., Yoneda, M., Zaborowski, A., Nagato, M., Ono, H., Hirayama, N., and Murooka, Y.: *Protein Eng.*, **15**, 477–483 (2002).
- 48) Molnar, I., Hayashi, N., Choi, K.-P., Yamamoto, H., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Molec. Microbiol.*, **7**, 419–428 (1993).
- 49) Choi, K.-P., Molnar, I., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 1044–1049 (1995).
- 50) Choi, K.-P., Molnar, I., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *J. Biochem.*, **117**, 1043–1049 (1995).
- 51) Molnar, I., Choi, K.-P., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Molec. Microbiol.*, **15**, 895–905 (1995).
- 52) Purcell, J. P., Greenplate, J. T., Jennings, M. G., Ryerse, J. S., Pershing, J. C., Sims, S. R., Prinsen, M. J., Corbin, D. R., Tran, M., Sammons, D., and Stonald, R. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1406–1413 (1993).

- 53) Corbin, O. R., Greenplate, J. T., Wong, E. Y., and Purcell, J. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4239–4244 (1994).
- 54) Cho, H.-J., Choi, K.-P., Yamashita, M., Morikawa, H., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 133–138 (1995).
- 55) Olympia, M., Ono, H., Shinmyo, A., and Takano, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 193–197 (1992).
- 56) Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y., and Takano, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 124–130 (1995).
- 57) Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 57–64 (1998).
- 58) Murosaki, S., Muroyama, K., Yamamoto, Y., and Yoshikai, Y.: *Cancer Immunol. Immunother.*, **49**, 157–164 (2000).
- 59) Kaneko, Y., Kobayashi, H., Kiatpapan, P., Nishimoto, T., Napitupul, R., Ono, H., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 62–67 (2000).
- 60) Kiatpapan, P., Kobayashi, H., Sakaguchi, M., Ono, H., Yamashita, M., Kaneko, Y., and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 426–433 (2001).
- 61) Kiatpapan, P., Yamashita, M., Kawaraichi, T., Yasuda, N., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 459–465 (2001).
- 62) Somokuti, G. A., Daniel, K. Y., Solaiman, D. K., and Steinberg, D. H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 330–334 (1992).
- 63) Aki, T., Fujikawa, A., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., Oka, S., and Ono, K.: *J. Biochem.*, **115**, 435–440 (1994).
- 64) Aki, T., Ono, K., Paik, S.-Y., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., and Oka, S.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 349–356 (1994).
- 65) Aki, T., Ono, K., Paik, S.-Y., Wada, T., Jyo, T., Shigeta, S., Murooka, Y., and Oka, S.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 357–364 (1994).
- 66) Aki, T., Kodama, T., Fujikawa, A., Miura, K., Shigeta, S., Wada, T., Jyo, T., Murooka, Y., Oka, S., and Ono, K.: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 74–83 (1995).
- 67) 筒井麻衣子, 金 鐘賢, 山下光雄, 室岡義勝, 河本正次, 秋 庸裕, 重田征子, 小埜和久: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.70 (2002).
- 68) Kiatpapan, P., Hashimoto, Y., Namamura, H., Piao, Y.-Z., Ono, H., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4688–4695 (2000).
- 69) Kiatpapan, P. and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 144–149 (2001).
- 70) Chen, W., Russel, C. S., Murooka, Y., and Cosloy, S. D.: *J. Bacteriol.*, **176**, 2743–2746 (1994).
- 71) Murakami, K., Hashimoto, Y., and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 347–350 (1993).
- 72) Nishikawa, S. and Murooka, Y.: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **18**, 149–170, Intercept Ltd, Andover, UK (2001).
- 73) Sattler, I., Roessner, C. A., Stolorowich, N. J., Hardin, S. H., Harris-Haller, L. W., Yokubaitis, N. T., Murooka, Y., Hashimoto, Y., and Scott, A. I.: *J. Bacteriol.*, **177**, 1564–1569 (1995).
- 74) Hashimoto, H., Yamashita, M., Ono, H., and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 93–100 (1996).
- 75) Hashimoto, Y., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 385–392 (1997).
- 76) Murooka, Y., Xu, T., Sanada, K., Araki, M., Morinaga, T., and Yokota, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 38–44 (1993).
- 77) Chen, W. X., Li, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L., and Li, L.: *J. Syst. Bacteriol.*, **41**, 275–280 (1991).
- 78) Nuswantara, S., Fujie, M., Yamada, T., Malek, W., Inaba, M., Kaneko, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 49–55 (1999).
- 79) Xu, Y. and Murooka, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 276–279 (1995).
- 80) Fujie, M., Nakanishi, Y., Murooka, Y., and Yamada, T.: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 846–852 (1998).
- 81) Kasai, K., Fujie, M., Nakanishi, Y., Murooka, Y., Usami, S., and Yamada, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 559–563 (2000).
- 82) Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y., and Yamada, T.: *Plant Physiol.*, **124**, 1087–1095 (2000).
- 83) Hong, S.-H., Ghoya, M., Ono, H., Murakami, H., Yamashita, M., and Murooka, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 84–89 (2000).
- 84) Murooka, Y., Toyama, M., Hong, S.-H., Ghoya, M., Ono, H., Yamashita, M., and Hirayama, N.: *Biocatalysis and Biotransformation*, **19**, 399–412 (2001).
- 85) Hayashi, M., Maeda, Y., Hashimoto, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 550–553 (2000).
- 86) Cho, H.-J., Widholm, J. M., Tanaka, N., Nakanishi, Y., and Murooka, Y.: *Plant Science*, **138**, 53–65 (1998).
- 87) Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K., and Murooka, Y.: *J. Biotechnol.*, **99**, 279–293 (2002).
- 88) Toyama, M., Yamashita, M., Hirayama, N., and Murooka, Y.: *J. Biochem.*, **132**, 217–221 (2002).
- 89) Sriprang, R., Hayashi, M., Ono, H., Takagi, M., Hirata, K., and Murooka, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1791–1796 (2003).
- 90) Murooka, Y., Mori, Y., and Hayashi, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 225–230 (2002).
- 91) Hayashi, M., Miyahara, A., Sato, S., Kato, T., Yoshikawa, M., Taketa, M., Hayashi, M., Pedrosa, A., Onda, R., Imaizumi-Anraku, H., Bachmair, A., Sandal, N., Stougaard, J., Murooka, Y., Tabata, S., Kawaguchi, S., and Harada K.: *DNA Research*, **8**, 301–310 (2001).
- 92) Tansengco, M., Hayashi, M., Kawaguchi, M., Imaizumi, H., and Murooka, Y.: *Plant Physiol.*, **131**, 1054–1063 (2003).