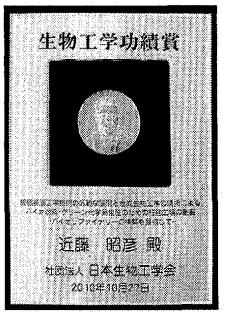
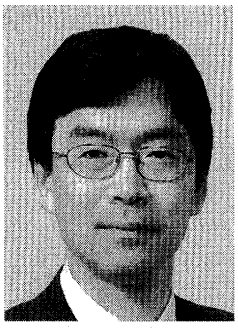
The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔生物工学会誌　第89巻　第4号　154–160. 2011〕

2010年度　生物工学功績賞　受賞



細胞表層工学技術の広範な展開と合成生物工学の開拓によるバイオ燃料・グリーン化学品生産のための細胞工場の創製
—バイオリファイナリーの構築を目指して—



近藤　昭彦

Development of various cell surface display systems and synthetic bioengineering for construction of cell factories to produce biofuels and green chemicals: Creation of integrated biorefinery

Akihiko Kondo (*Department of Chemical Science and Engineering, School of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodaicho, Nada, Kobe 657-8501*) Seibutsu-kogaku **89**: 154–160, 2011.

はじめに

化石資源への依存から脱却する方策として，再生可能な資源であるバイオマスからのエネルギーや化学品の供給に期待が高まっている．バイオマスは光合成によってCO_2を固定して生産され，賦存量が多いことから，その有効利用は資源の持続可能かつ安定な供給に寄与すると考えられる．バイオマス利用の中核として，バイオマスから燃料や化学製品を作るという製造概念，すなわちバイオリファイナリーに注目が集まっている（図1）．

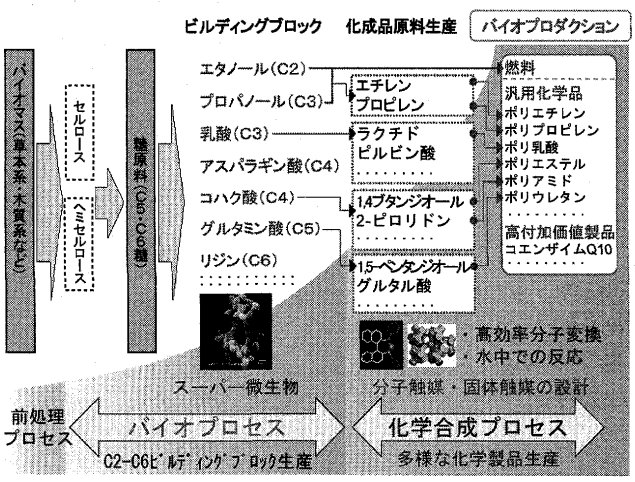


図1．バイオリファイナリー

バイオマスはセルロース，ヘミセルロース，リグニン，デンプンなどで構成される．バイオマスをバイオ燃料や化学品に変換するバイオリファイナリー技術においては，物理化学的な前処理を施した後に，「酵素による糖化プロセス」と「微生物による発酵プロセス」を組み合わせた生物変換プロセスによって目的物質の生産を行う．生物変換プロセスは，投入エネルギーや環境への負荷を軽減できる酵素反応や微生物代謝反応を利用するため高純度の目的物質を生産できる，といった点で有用である．しかしながら，従来の化学プロセスを凌駕する先端的なバイオプロセスを開発するためには，プロセスの簡略化，低コスト化，そして省エネルギー化が必要である．そのためには製造技術における要である，糖化プロセスと発酵プロセスを同時に行える（すなわちセルロースやヘミセルロースの直接発酵が行える）一貫バイオプロセス（consolidated bioprocessing，CBP）の開発が必須である（図2）．

これまでに筆者らが京都大学の植田充美教授のグルー

著者紹介　神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻（教授）E-mail: akondo@kobe-u.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

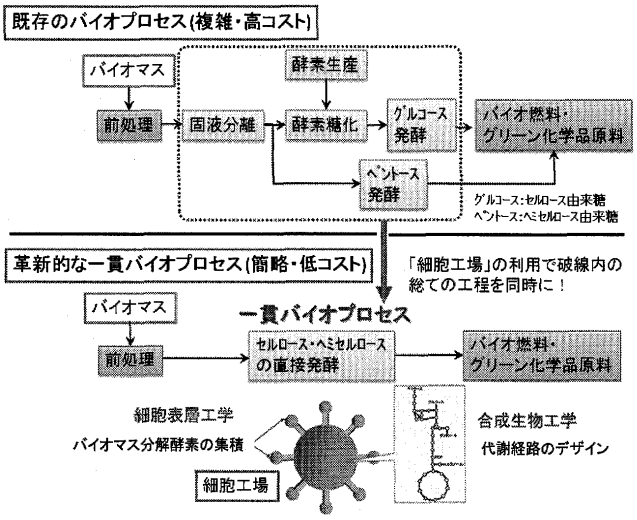


図2. 一貫バイオプロセス

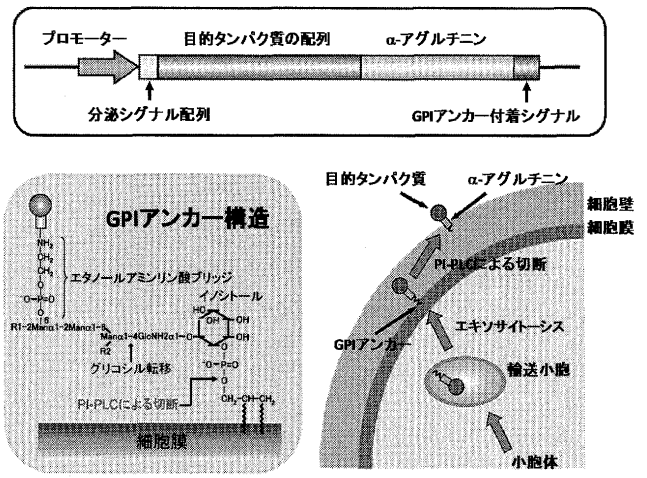


図3. 酵母細胞表層ディスプレイシステムの概念

プとともに確立してきた細胞表層工学技術は，一貫バイオプロセスを実現する上で有望な技術である．本技術は，発酵生産性に優れた微生物自らが，バイオマス分解酵素を生産して細胞表層に集積することにより，細胞表層でバイオマス資源を分解し，分解産物である多様な糖を細胞内に取り込んで，有用なプロダクトを発酵により一気に生産することを可能とする．また，微生物を回収すると同時に酵素も回収されるため，糖化・発酵工程での繰り返し利用が可能となる．さらに，細胞表層におけるバイオマス分解酵素の局在化（集積化）は，分解物（グルコース）の効率的な取り込みを可能にし，反応系内のグルコース濃度を常に低濃度に維持することにより，酵素反応の生成物阻害を回避するだけでなく，雑菌によるコンタミネーションの問題も解決できると期待される．

筆者らは，日本が伝統的に強い基盤を持つ産業微生物である酵母，大腸菌，乳酸菌，コリネ型細菌，麹菌，放線菌などでの細胞表層工学を広範に展開してきた．また，近年飛躍的に発達した代謝工学やシステムバイオロジーを活用して，細胞の“ものづくり”代謝を画期的に強化できる合成生物工学を展開している．最終的には細胞表層工学と合成生物工学を組み合わせることにより(図2)，バイオマスからの目的物質の高収率・低コスト生産を可能とする革新的な細胞工場（スーパー微生物）をコア技術とする，先端的なバイオプロセスの完成を目指している．

細胞表層工学の広範な展開

細胞表層（細胞壁，細胞膜）は細胞の構造や形態を維持するだけでなく，物質の認識やシグナルの伝達，酵素反応などの場として重要な役割を果たしている．この細胞表層に種々の機能性タンパク質やペプチドをディスプレイして，新しい機能を持った細胞を創製することが活発に行われ，細胞表層工学として展開してきている．

まず，酵母の細胞表層ディスプレイ技術を紹介する[1]．酵母*Saccharomyces cerevisiae*の細胞表層は，グルカン層と，それに結合して細胞表層に局在する糖タンパク質とからなる頑丈な細胞壁で覆われている．酵母から動植物の広い範囲にわたって真核生物の細胞表層に局在する糖タンパク質は，N末端に分泌シグナルとC末端にGPI（グリコシルフォスファチヂルイノシトール）アンカー付着シグナルという二つの疎水性シグナルを持ち，GPIアンカーを介してグルカン層に共有結合する．酵母では，Cwp1p，Tip1p，Tir1pなど(*O*-型糖鎖付加タンパク質)およびα-アグルチニン，フロッキュリンFlo1，Sed1pなど(*N*，*O*-型糖鎖付加タンパク質）が代表的なGPIアンカー付着シグナルを持つタンパク質である．したがって，目的タンパク質を，こうしたGPIアンカー付着シグナルを持つアンカータンパク質との融合タンパク質として発現させることで，細胞表層ディスプレイできる(図3)[1-4]．筆者らは，性凝集素タンパク質であるα-アグルチニンや凝集性酵母におけるレクチン様凝集タンパク質であるフロッキュリンFlo1を利用して，各種タンパク質の細胞表層ディスプレイに成功してきている[1]．現在までに，酵母では，ペプチドから分子量のかなり大きなタンパク質（たとえば分子量136 kDaの*Aspergillus aculeatus* β-グルコシダーゼ）まで多種多様な分子のディスプレイに成功している．また，Flo1を用いて目的タンパク質のN末およびC末のどちらを利用しても細胞表層ディスプレイできるようにアンカータンパク質の開発を行っている．いずれの場合も酵母では，細胞一つあたり10^5–10^6個とかなり多くの分子がディスプレイできる．

筆者らは，乳酸菌[5,6]やコリネ型細菌[7]などのグラム陽性菌や，グラム陰性菌である大腸菌[8]における細胞表

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

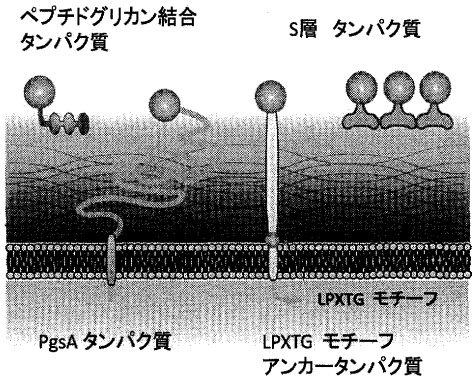


図4. グラム陽性菌の細胞ディスプレイシステム

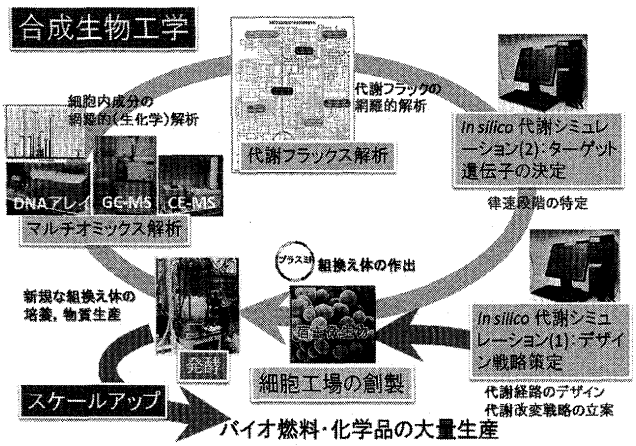


図5. 合成生物工学

層ディスプレイ系の開発も行ってきている（図4）．ここでは，代表的な例として乳酸菌における細胞表層ディスプレイ系について述べる．乳酸菌などの細胞表層には，多様な細胞表層タンパク質が存在している．そこで，筆者らはペプチドグリカン結合タンパク質AcmAのCAドメインをアンカータンパク質として用いた細胞表層ディスプレイ系の開発を行った[6]．CAドメインをタンデムに3つ連結させてアンカータンパク質として用いることで，目的タンパク質のN末およびC末のどちらを利用しても，効率よく細胞表層ディスプレイできることを明らかにした．また，麹菌などにおける細胞表層ディスプレイ系の開発にも成功している[9,10]．

合成生物工学の開拓

バイオ燃料・化成品の大量生産のための細胞工場の能力を飛躍的かつ迅速に向上させるために，近年飛躍的に発達した代謝工学やシステムバイオロジーを活用して，微生物の代謝解析，遺伝子の強化や破壊，新たな代謝経路導入を大規模に行う試みが活発に行われている[11,12]．微生物の細胞内代謝は遺伝子レベル，タンパク質レベル，代謝物質レベルで厳密に制御されているため，細胞の“ものづくり”代謝を画期的に強化して目的物質を大量に生産するためには，これらの生体内分子の挙動をシステムとして理解し，工学的に最適化する必要がある．筆者らは，これを合成生物工学として展開してきている（図5）．具体的には，①*in silico*代謝シミュレーションによる代謝デザイン戦略の策定，②遺伝子工学を駆使しての微生物細胞工場の創製，③微生物による目的生産物の発酵生産性評価，④マルチオミクス解析や代謝フラックス解析による微生物代謝の評価，⑤微生物代謝データを用いての*in silico*代謝シミュレーションなどによる律速段階の同定と改変ターゲット遺伝子の決定，となる．このサイクルを回すことにより，微生物をより優れた細胞工場に進化させていくことが可能である．ここで，マルチオミクス解析はDNA塩基配列の網羅的解析（ゲノミクス），転写産物の網羅的解析（トランスクリプトミクス），タンパク質の網羅的解析（プロテオミクス），代謝物の網羅的解析（メタボロミクス）を統合する解析手法である．バイオリファイナリーにおける微生物細胞工場の創製においては，標的代謝物の生産能力を飛躍的に向上させることが目的となるため，代謝系生合成遺伝子の発現解析やタンパク質（酵素），代謝物の網羅的解析は重要な意味を持つ．なかでもメタボロミクスの大きな特徴は，その一般性である．代謝経路は，多くの場合，種間で互換性を有するため，ゲノム情報が利用できない微生物にも適用可能な点で有用である[13]．目的物質を高生産するためには，代謝物の蓄積量だけではなく，反応速度論的な情報も重要となる．たとえば，アミノ酸や核酸のように，それ自体が重要な代謝産物であると同時に他の代謝物の基質となるような分子の場合，蓄積量の増減だけではその代謝物が関わる経路が活性化したかどうかを判断することは難しい．つまり，代謝経路の活性化度を直接的に知るためには動的な代謝の流れ，すなわち代謝フラックスを観測する必要がある．代謝フラックス解析は，生体試料に安定同位体基質（^{13}Cなどで標識されたもの）を取り込ませ，質量分析計などを用いてその標識率を観測していくことで，代謝の流れを定量化する手法である[14,15]．メタボロミクスと代謝フラックス解析を統合することで，細胞内代謝反応を網羅的かつ定量的に把握することが可能となり，律速段階となる代謝反応の推定が可能となる．

合成生物工学的な代謝改変研究では，目的化合物の生合成経路を宿主微生物へ導入した後，高収率を達成するため代謝経路中の他の遺伝子発現の増強，抑制を行う．しかしながら，微生物の代謝システムの挙動は非常に複雑であり，ある遺伝子の発現強化や欠損が予期したとおりの結果をもたらすとは限らない．そこで，計算機上で

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

微生物の代謝経路を再現し，遺伝子欠損や過剰発現などの代謝改変の影響をあらかじめ推定する，代謝シミュレーション技術の必要性が認識されている．そして，微生物のゲノム情報や文献情報から再構築されたゲノムスケールの代謝モデルを用い，*in silico*シミュレーションを実行するための環境が整備されてきた[16,17]．これにより，計算機中のバーチャル大腸菌や酵母を用いて，複数の遺伝子を除いた多重欠損株の性能をあらかじめ，おおよそ評価することが可能となった．その結果は実際の代謝改変研究でターゲットとする遺伝子の絞り込みに利用できる．より詳細な代謝経路の挙動を再現するには，代謝中間体含量や酵素反応の速度論式を加味した動的な代謝モデルを用いたシミュレーションが必要になる．それには，全代謝反応の生体中でのK_m値などのパラメーターを網羅する必要があり，モデルの構築に向けたさまざまな試みが行われている[18]．さらに，エレメンタリーモード解析などの代謝経路の挙動を解析するさまざまな手法が開発されており，それぞれが異なった視点から代謝システムに対する知見を提供している[19]．これらを組み合わせ，あるいは状況に応じて使い分けることで合成生物工学に必要な情報を得るための模索が，今後きわめて重要な課題である．

また，目的化合物の生産能を飛躍的に向上させるために，新規な生合成経路のデザインの重要性も増してきている．筆者らも，代謝パスウェイデータベースの情報を集約し，特定の中間体（ピルビン酸，オキサロ酢酸など）から，目的化合物へと変換する経路を探索するパスウェイマイニングツールの構築および利用も積極的に進めている．

細胞工場のデザイン策定戦略としては*in silico*のアプローチだけでなく，微生物の馴化といった進化工学的な手法を合わせて活用していくことも有効である．たとえば，微生物にキシロース代謝系を導入した後，さらにその代謝効率を上げていく上で，キシロース培地での馴化培養を繰り返すことは有効である[20]．より増殖速度の高い株を選択することで，よりキシロース発酵速度の優れた株を得ることができる．また，ランダムなアプローチとして，トランスポゾン変異の利用や[21]，化学物質や常温プラズマ[22]を用いた変異処理などの従来からのアプローチを組み合わせることも有効である．ランダムな変異と馴化培養などの選択を組み合わせて，効率の良い進化工学的アプローチとすることで，より性能の高い株を取得することができる．いずれの場合でも，得られた高性能株についてマルチオミクスや代謝フラックス解析を行って，性能が向上した原因を明らかにできれば，さらなる微生物デザイン戦略の策定につなげることができる．

以上，代謝経路の作りこみについて述べてきたが，セルロース系バイオマスの前処理プロセスで生じる過分解物質は，微生物の生理活性や生産性を低下させる阻害物であることが明らかとなってきており，それらに対する耐性を微生物に付与することも大きな課題である．また，目的とする生産物自体も微生物に毒性を示す場合が多い．そこで，阻害物質や目的生産物の存在によりダメージを受ける代謝経路の探索を，上述したようにシステムバイオロジー的に行い，当該経路を強化した耐性微生物を創製することによって，発酵阻害を防ぐことも重要な課題となる．

バイオマスからのエタノール生産

筆者らは上述の細胞表層ディスプレイ技術を利用して細胞表層に各種アミラーゼを提示した酵母*S. cerevisiae*を創製し，無処理の生デンプンや玄米のような原料からの直接エタノール発酵について検討してきた．具体的には，酵母表層に*Rhizopus oryzae*由来グルコアミラーゼをα-アグルチニンのC末端部と遺伝子工学的に融合して表層ディスプレイし，さらに*Streptococcus bovis*由来のα-アミラーゼを分泌生産あるいはFlo1と遺伝子工学的に融合して表層ディスプレイする酵母を創製した．これらの酵母を利用することで，無蒸煮デンプンを唯一の炭素源とする培地で，効率よくエタノール発酵を行うことに成功した[23,24]．さらにアミラーゼ遺伝子の染色体組み込みを行った後に，酵母の多倍体化などを行って遺伝子コピー数を増やせば，アミラーゼ発現量が増加して，エタノール生産性が向上することを明らかにした[25–27]．このようなアミラーゼ発現酵母を用いることで，デンプンからのエタノール発酵において問題となっている酵素添加やデンプンの前処理を省略することできる．

リグノセルロース系バイオマスは木材，草本などの農林廃棄物や古紙などにも含まれ，地球上でデンプンよりもはるかに豊富に存在するバイオマスである．デンプンは食糧として需要が大きいが，セルロース系バイオマスは食糧問題とも競合することがない非食用資源である．また，比較的安価に入手することが可能であるため，将来の石油代替資源として期待されている．セルロースはグルコースがβ-1,4-グルコシド結合して連結した直鎖上の高分子多糖であり，この直鎖状高分子の側鎖同士が水素結合を介して強固に相互作用して結晶領域と非結晶領域を有する構造を形成している．筆者らは細胞表層に各種セルラーゼをディスプレイした酵母*S. cerevisiae*を創製し，セルロース原料からの直接エタノール発酵について検討してきた[28–31]．セルロースの酵素分解には3種のセルラーゼ類，すなわちエンドグルカナーゼ（EG），セロビオヒドラーゼ（CBH）そしてβ-グルコシダーゼ（BGL）が必要である．そこで，*Trichoderma reesei*由来

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

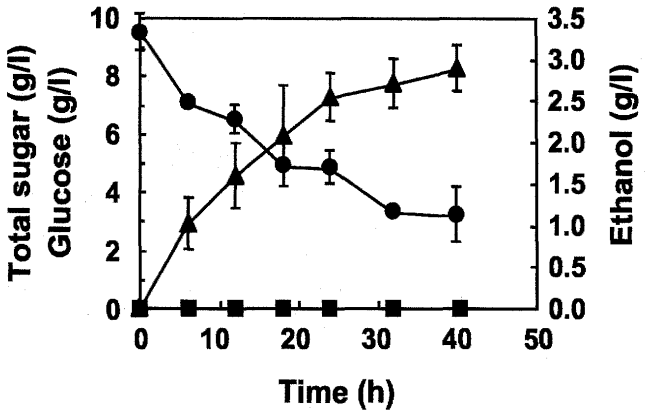


図6. 3種のセルラーゼを表層共提示した酵母によるセルロースからのエタノール発酵. ●, total sugar ; ▲, ethanol ; ■, glucose.

EGとCBHおよび，*Aspegillus aculeatus*由来BGLの3種のセルラーゼ遺伝子をそれぞれα-アグルチニンと遺伝子工学的に融合したプラスミドを構築し，そのすべてを同一の酵母に形質転換した遺伝子組換え体の創製を行った．その結果，3種類のセルラーゼ酵素はすべて細胞表層にディスプレイされていることが確認できた．さらに，セルラーゼ表層ディスプレイ酵母は，リン酸膨潤セルロースから直接エタノール発酵を高収率で行えることが確認できた(図6)．

上述のように，セルロース分解には3種のセルラーゼ酵素が関与する必要があるが，その存在比（混合比）もセルロースの糖化率を左右する大きな要因であると言われている．そこで，効率的なセルロース分解システムを構築するために，表層ディスプレイする3種のセルラーゼ酵素の存在比率を最適化できるシステムの確立を行った．ここでは，δ-インテグレーションシステムを活用し，3種類の酵素を同時に染色体組み込みすることで，ランダムなライブラリーを構築し，その中からセルロース分解活性の高いものを選んでいくことで，各酵素の組み込みコピー数を最適化できる手法を開発した[32]．

リグノセルロース系バイオマスにはセルロース以外にも多様な成分が含まれており，中でもキシランを主成分とするヘミセルロースはセルロースに次いで多量に存在する．そこで，キシランをターゲットとしたエタノール生産を試みた[33,34]．元来，キシランをキシロースに分解する能力は酵母*S. cerevisiae*には存在せず，これらの分解酵素群を表層ディスプレイする必要がある．さらに，酵母にはグルコース代謝経路は存在するが，キシロース代謝経路は存在しない．そこで，キシランをキシロースに分解するのに必要な*T. reesei*由来キシラナーゼ遺伝子，*Aspergillus oryzae*由来βキシロシダーゼ遺伝子をそれぞれα-アグルチニン遺伝子と遺伝子工学的に融合し，共に酵母に形質転換することで，両者の機能を賦与した遺伝子組換え酵母の創製を行った．さらに，キシロースを代謝するために必要な*Pichia stipitis*由来キシロースレダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼを菌体内発現させるとともに，*S. cerevisiae*由来キシルロキナーゼを過剰発現させることで，ヘミセルロースを代謝可能な酵母が創製できることを明らかにしている．

こうしたキシランやキシロース発酵性を持たせた酵母を用いてリグノセルロースを分解して得られる混合糖を発酵させる場合，前処理中に生成する酢酸やギ酸が，特にキシロースの発酵阻害を引き起こす．その原因，対処法についてトランスクリプトミクスやメタボロミクスなどのシステムバイオロジー解析を行うことで，明らかにすることを試みた[35,36]．メタボロミクスから，酢酸やギ酸については，特にペントースリン酸回路（PPP）の代謝物の著しい蓄積が見られることからPPP中の酵素群が阻害を受けることが示された．そこで，酢酸による阻害効果を低減するために，PPP中のトランスアルドラーゼ（TAL）遺伝子を過剰発現させたところ，酢酸耐性の著しい向上が見られた．またトランスクリプトミクスからは，ギ酸存在下ではギ酸デヒドロゲナーゼ（FDH）遺伝子の発現量が著しく増加することが明らかとなった．FDHはギ酸を分解する酵素であり，この結果は細胞の防御機構として納得できるものである．そこで，FDHを過剰発現させたところ，予想通り，ギ酸耐性が著しく向上した．

以上述べてきた，細胞表層工学によるセルラーゼやヘミセルラーゼの表層ディスプレイ，キシロース代謝経路の導入，そして発酵阻害物に耐性を与える遺伝子群の発現などにより，リグノセルロース前処理物の効率的な発酵を行うスーパー酵母の創製を行うことができた．

バイオマスからの乳酸生産

ポリ乳酸はバイオマス資源から生産が可能な低環境負荷性の環境調和型プラスチックとして注目を集めている．このポリ乳酸は引っ張り強度，曲げ強度，弾性率に優れ，生分解性プラスチックの中では，唯一無色透明な材料である．このポリ乳酸は魅力的な素材であるにもかかわらず，年間の生産量は45万tと，汎用プラスチックの生産量の1億tをはるかに下回る．この現状を打破するため，ポリ乳酸の「低価格化」と「多機能化」が危急の課題となっている．本研究ではバイオマスから高効率かつ安価にポリ乳酸原料であるL-乳酸および，近年ポリ乳酸高機能化に向けて需要が高まっているD-乳酸を生産するための乳酸生産技術の開発を行った[37–42]．

まず，L-乳酸を高収率，高光学純度で生産する乳酸菌*Lactococcus lactis* IL 1403に，生デンプンを高効率に分

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

解する*S. bovis* 148由来のα-アミラーゼを遺伝子工学的に発現させることで，デンプンからの高効率L-乳酸生産技術の開発を試みた．この結果，光学純度99.2%のL-乳酸を，対糖収率89%と世界トップレベルの高収率で生産することに成功した[37]．

さらに，D, L-両乳酸を生産する遺伝子操作が容易な乳酸菌である*Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826のL-乳酸デヒドロゲナーゼ*ldhL1*遺伝子を欠損させることで，遺伝子操作が容易なD-乳酸生産菌を新たに創製した．この乳酸菌にα-アミラーゼを発現させることで，デンプンからD-乳酸を直接生産することを試みた．その結果，デンプンから99.6%と非常に光学純度の高いD-乳酸を，85%と高い対糖収率で生産することに成功した[38]．さらに，エンドグルカナーゼを発現させることで，セロオリゴ糖から光学純度の高いD-乳酸を発酵生産することにも成功している[39]．

リグノセルロースを分解して得られるペントース類からの乳酸生産についても検討を行った．ペントース資化性の乳酸菌は，例外なく乳酸以外に多量の酢酸，ギ酸，エタノールといった副産物を生産することが知られている（図7：ヘテロ乳酸発酵）．そこで，代謝工学的に，ペントースの発酵経路を，乳酸のみを生産する（ホモ乳酸発酵）経路に組み換え，ペントースからの効率的な乳酸発酵技術の開発を試みた．*L. plantarum* NCIMB 8826 Δ*ldhL1*株はアラビノースの資化が可能であり，D-乳酸を生産する．この株において，ヘテロ乳酸経路の入り口となる反応を触媒するホスホケトラーゼ遺伝子（*pkt*）を欠損し，ホモ乳酸経路の入り口となる反応を触媒するトランスケトラーゼ遺伝子（*tkt*）を導入した．この結果，アラビノースからのホモD-乳酸発酵に成功し，99.9%と非常に光学純度の高いD-乳酸を，82%と高い対糖収率で生産することに成功した[41]．このアラビノースからのホモD-乳酸発酵技術を，キシロースの利用にも拡張するために，

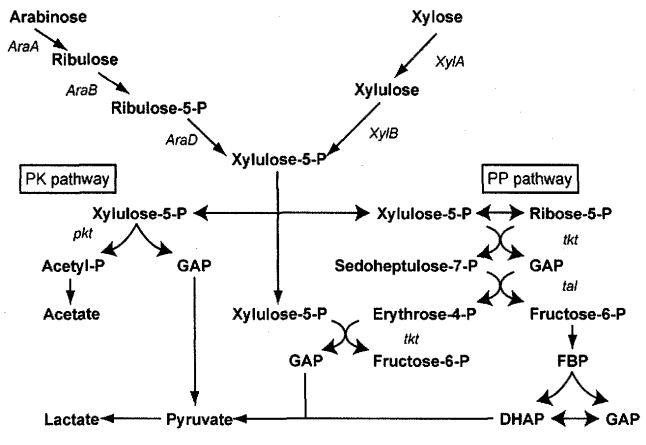


図7．乳酸菌におけるペントース代謝[40]

キシロース資化経路の導入を行った[42]．この結果，キシロースから99.9%と非常に光学純度の高いD-乳酸を，90%と高い対糖収率で生産することに成功した．

バイオマスからの多様な化学品生産に向けた取り組み

図1に示したように，バイオリファイナリーは，バイオポリプロピレン，バイオポリエチレン，バイオポリアミド，バイオポリエステルをはじめとして，化学産業が必要とするほとんどの製品をバイオマスから作り出そうとする試みである．筆者らも，バイオマスからの多様な化学品原料の生産についても検討を進めてきている．例えば，カダベリン[43]，リシン[44]などのバルク化学品原料の生産やグルタチオン[45]などのファイン化学品の生産を行ってきている．多様な製品の生産を実現することで，“石油からのものづくり”から，“再生可能資源バイオマスからのものづくり”への転換を起こしていけると期待される．

おわりに

以上述べてきたように，筆者らは細胞表層技術の広範な展開に加え，細胞内の代謝経路強化を合理的に行うために合成生物工学に関しても研究を推進してきている．すなわち「細胞表層技術」×「合成生物工学」による革新的なスーパー微生物の創製，そして「バイオプロセス」開発を統合することで，多様な燃料や化学品原料の先端バイオプロセスによる製造開発を加速させることを試みている．バイオ燃料やグリーン化学品の実用化を通して，バイオマス利用による“グリーン・イノベーション”を起こし，低炭素社会構築に貢献していきたいと考えている．

本研究は，神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻，ならびに自然科学系先端融合研究環において，学生をはじめとした多くの協力者とともに行ってきたものである．福田秀樹神戸大学長には，あらゆる意味でご指導を頂いた．また，細胞表層工学の研究においては，京都大学大学院農学研究科の植田充美教授との共同研究として推進してきたものであり，当研究室の荻野千秋准教授や田中勉助教の協力の基に展開してきた．合成生物工学については，大阪大学の福崎英一郎教授や清水浩教授との共同研究として推進してきたものであり，当研究室の蓮沼誠久講師および松田史生准教授の協力の基に展開してきた．そして，この間，多くの企業との共同研究を行う中で，援助を頂いた．ご指導・ご協力を頂きました全ての方々に心より感謝申し上げます．

文　献

1) Kondo, A. and Ueda, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 28–40 (2004).
2) Nakamura, Y., Shibasaki, S., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

57, 500–505 (2001).
3) Matsumoto, T., Fukuda, H., Ueda, M., Tanaka, A., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4517–4522 (2002).
4) Sato, N., Matsumoto, T., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 469–474 (2002).
5) Narita, J., Okano, K., Kitao, T., Ishida, S., Sewaki, T., Sung, M. H., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbial.*, **72**, 269–275 (2006).
6) Okano, K., Qiao, Z., Kimura, S., Narita, J., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1117–1123 (2008).
7) Narita, J., Okano, K., Tateno, T., Tanino, T., Sewaki, T., Sung, M. H., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Microbial.*, **70**, 564–572 (2006).
8) Tateno, T., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1213–1220 (2007).
9) Adachi, T., Ito, J., Kawata, K., Ishida, H., Sahara, H., Hata, Y., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 711–719 (2008).
10) Tabuchi, S., Ito, J., Adachi, T., Ishida, H., Hata, Y., Okazaki, F., Tanaka, T., Ogino, C., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1783–1789 (2010).
11) Mapelli, V., Olsson, L., and Nielsen, J.: *Trends Biotechnol.*, **26**, 490–497 (2008).
12) Bara, R., Reindl, W., and Northern, T. R.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**, 547–552 (2009).
13) Garcia, D. E., Baidoo, E. E., Benke, P. I., Pingitore, F., Tang, Y. J., Villa, S., and Keasling, J. D.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 233–239 (2008).
14) Zamboni, N. and Sauer, U.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**, 553–558 (2009).
15) Oldiges, M., Lütz, S., Pflung, S., Schroer, K., Stein, N., and Wiendahl, C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 495–511 (2007).
16) Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., Broadbelt, L. J., Hatzimanikatis, V., and Palsson, B. O.: *Molecular Systems Biology*, **3**, 121 (2007).
17) Reed, J. L. and Palsson, B. O.: *J. Bacteriol.*, **185**, 2692–2699 (2003).
18) Steuer, R., Gross, T., Selbig, J., and Blasius, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11868–11873 (2006).
19) Trinh, C. T., Wlaschin, A., and Srienc, F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 813–826 (2009).
20) Kuyper, M., Toirkens, M. J., Diderich, J. A., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: *FEMS Yeast Research*, **5**, 925–934 (2005).
21) Naiying, N., Laplaza, J. M., and Jeffries, W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2061–2066 (2007).
22) Wang, L.-Y., Huang, Z.-L., Li, G., Zhao. H.-X., Xing, X.-H., Sun, W.-T., Li, H.-P., and Bao, C.-Y.: *J. Appl. Microbiol.*, **108**, 851–858 (2010).
23) Kondo, A., Shigachi, H., Abe, M., Uyama, K., Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kishimoto, M., and Fukuda, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 291–296 (2002).
24) Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5407–5414 (2004).
25) Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 1491–1498 (2010).
26) Yamakawa, S., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 109–115 (2010).
27) Yamada, R., Yamakawa, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Enzyme Microbial Technol.* (in press)
28) Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5136–5141 (2002).
29) Fujita, Y., Itoh, J., Ueda, M., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1207–1212 (2004).
30) Yanase, S., Yamada, R., Kaneko, S., Noda, H., Hasunuma, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Biotechnol. J.*, **5**, 449–455 (2010).
31) Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 381–388 (2010).
32) Yamada, R., Taniguchi, N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Microbial Cell Factories*, **9**, 32 (2010).
33) Katahira, S., Fujita, Y., Mizuike, A., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5037–5040 (2004).
34) Katahira, S., Mizuike, A., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 1136–1143 (2006).
35) Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., and Kondo, A.: *Microbial Cell Factories*, **10**, 2 (2011).
36) Hasunuma, T., Sung, K. M., Sanda, T., Yoshimura, K., Matsuda, F., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
37) Okano, K., Kimura, S., Narita, J., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1007–1013 (2007).
38) Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 462–467 (2009).
39) Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 643–650 (2010).
40) Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 413–423 (2010).
41) Okano, K., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 5175–5178 (2009).
42) Okano, K., Yoshida, S., Yamda R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7858–7861 (2009).
43) Tateno, T., Okada, Y., Tsuchidate, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 115–121 (2009).
44) Tateno, T., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1213–1220 (2007).
45) Yoshida, H., Arai, S., Yamada, R., Hara, K., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)

NII-Electronic Library Service