

## 平成20年度 生物工学賞 受賞



### 微生物集団の構造と機能および その利用に関する研究

五十嵐 泰夫



#### Researches on Structure, Function and Utilization of Microbial Communities

Yasuo Igarashi (*Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657*) *Seibutsu-kogaku* **87**: 2-7, 2009.

#### はじめに

平成8年(1996年)7月, 私は東京大学の応用微生物学研究室の教授に就任した。就任当時の私は2つの大きな問題を抱えていた。ひとつは, 新任の教授なら皆当然の如く抱える問題であるが, 研究費の調達の問題である。私の場合, 前任の児玉徹教授から受け継いだ研究スペースや器具・試薬などがあり, またいくばくかの研究費も引き継いでいたので, まったく新しい場所で研究室を開く場合よりもはるかに恵まれた状況にあったとは思いますが, それでも当時20名以上の研究室員を抱えて就任初年度の台所事情は大変であった。その年の科学研究費の申請が採択されたとの通知を受けた時は, 本当に嬉しかった。当時の一般Bという区分で, 2年間で1千万円以下の交付金だったと思うが, 教授室で一人, うっすらと涙したのを記憶している。

第2の問題は研究テーマであった。当時の私の主要テーマは微生物炭酸固定であった。科学研究費などの研究費もほとんどそのテーマで受けていた。しかし, 微生物炭酸固定のテーマでは, すでに先々代の故蓑田泰治教授が農学賞を, 先代の児玉教授が生物工学賞を受賞していた。私としては, 学生時代から中心となってこのテーマを引っ張ってきたという自負はあるが, やはり教授となったからには, 何か新しい, それも研究室の名前にふさわしい「応用の匂い」のする新規テーマを開拓したいと思っていた。それまでの私の研究はかなり基礎的な指向が強く, 周囲からお前のやっているのは一般微生物学

だ, とよく言われていたことも影響したかもしれない。

私が教授になって半年も経たないうちに, この2つの問題を同時に解決するような話が持ち上がった。それは, 当時, 日本学術振興会未来開拓学術推進事業の「環境負荷の影響評価と軽減」分野の研究推進委員会で, 委員長の当時国連大学副学長の鈴木基之先生や委員であった児玉先生らの話し合いで「都市環境負荷の低減」が取り上げられ, その中で「都市廃棄物の新規微生物処理技術の開発」を私に担当させては, ということになったからである。私にとってこの分野は経験のある分野ではあったが, その時点でなにか明確な研究開発方針を持っていたわけではなかった。しかし, とにもかくにも充分な研究費のついた話であり, もともと興味もあり, 「応用の臭い?」も強くする研究であったので, ありがたく飛びつくことにした。この事業は平成9年度から13年度まで5年間継続したり。

前置きが長くなったが, これが今回の生物工学賞の受賞対象となった研究を, 私が本格的に始めるきっかけとなったいきさつである。なお, 先生方が未来開拓学術推進事業として「都市環境負荷の低減・都市廃棄物の新規微生物処理技術」を選択したことは, その後の社会情勢, バイオマスタウン事業などへのこの研究分野の発展などをみても正しい選択であったと信じている。

#### 有機性廃棄物分解過程に働く微生物叢の解析

都市廃棄物として生ゴミを対象とすることは, この研究テーマが私のところにおいてきた段階でほぼ決まっ

いた。この選択も、昨今の地方自治体の状況などを鑑みるに正しい選択であったと思う。しかし具体的な戦略となると、私自身、当時決して確固たる方針を持っていたわけではなかった。研究室の助手から助教授に昇任した石井正治博士らと関係箇所の見学に行ったりもした。

まず最初にぶち当たったのは基質である生ゴミをどう用意するか、という問題である。実際に家庭から出る生ゴミなら現実的ではあるが、一定ではないし、安定に供給もできない。当時排水処理などの研究でよく使われていたドッグフードは、タンパク、脂質、デンプンなどの組成は生ゴミに似ているが、物性などは大きく異なる。検討の結果、新参者の勢いもあって、東京都が報告している生ゴミ組成に近くなるような「合成生ゴミ」（標準生ゴミ）を近くのコンビニから毎日買い求めた材料から調製することにした。ご飯、トリのから揚げの残渣、野菜・果物くずなど、季節に関わりなく入手できるものを選択し、毎日同じものを家庭用コンポスターに投入した。結局、この材料の選択がその後の研究成果に大きな影響を与えることになったのだが、それを知るのは数年先のことである<sup>2-4)</sup>。その後の経験も含めて、生ゴミに限らず、排水、汚染土壌、未利用バイオマスなど、資源・環境に関わるバイオテクノロジー研究においては、研究材料を何にするかという問題はきわめて重要であり、その選択が研究全体の成否を決めることが多いと実感している。

解析手法については、当時分子生態学的手法が発展しつつあった。ちょうど、千葉大学大学院薬学研究科の博士課程を修了した春田伸博士（現在、首都大学東京准教授）が、分子生態学的解析に興味を持って、未来開拓プロジェクトに参画してくれた。菌叢解析については、春田博士の奮闘によるところが大きい<sup>5-9)</sup>。この分野に強いドイツの研究者と私との間に炭酸固定を通じて友好関係があったこともプラスに働いたと思う。ともかくにも、生ゴミを分解する微生物集団の菌叢解析について図1に

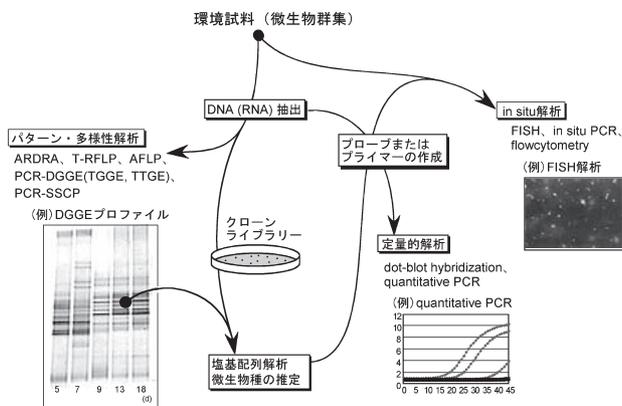


図1. 分子生態学的な解析の戦略。これらの多面的な非培養法に加え、分離培養法を併用し、解析を進めてきた。

示すような戦略を立てた。この戦略は、微生物集団の中がどうなっているのかを覗き込むだけで、積極的に集団機能の利用を図ろうというものではないが、その状況は現在に至るまで、わが国・諸外国の微生物集団機能に関わる研究全体においてあまり変わっていないと思う。

毎日、同じ「合成生ゴミ」を投入し続けたコンポスター中のDGGEによる菌叢解析の結果が図2である。この中に一本、気になるバンドがあった。安定的に生ゴミが分解される時期に、再現的にかつ優占的（全菌数の30-50%）に出現するバンドで、16S rRNA 遺伝子の配列解析から、*Bacillus licheniformis* に近縁の配列であることが判明した。この配列は、活性汚泥など他の有機廃棄物分解系からも検出されていたが、微生物を単離した例は知られていなかった。この菌こそ有機性廃棄物分解の鍵を握っている菌ではないか、と単離に向かった。この菌はかなりの難培養微生物（コロニーとして単離することが困難な微生物）であったが、幸いDGGEやFISHの解析結果から、存在時期や存在箇所にならぬ情報があつた。東北大学の修士を終えて博士課程で研究に加わってくれた中村浩平博士（現岐阜大学助教）が何とか単離してくれた<sup>10-11)</sup>。単離してみると、新属新種ではあつたが(*Cerasibacillus quisquiliarum*)、有機化合物の資化性も狭いし、どうといった特長のない菌であつた。ただ、適度な耐塩性と好アルカリ性(pH8-9)を持ち、これらはコンポスト中では生き延びやすい性質と考えられた。さらにこの菌の持つゼラチン分解活性は、集団中の他の微生物には見られない活性と考えられた。すなわち生ゴミ中に

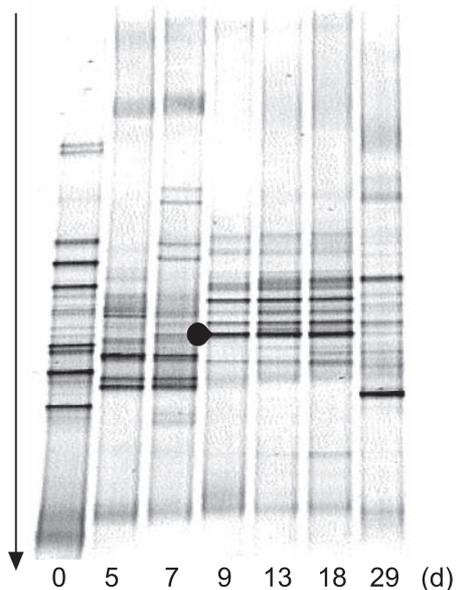


図2. 生ゴミ分解過程のPCR-DGGEプロファイル。約1ヶ月の処理過程を解析した。黒丸で示したバンドが安定分解過程で再現的に検出される。矢印は泳動方向を示す。

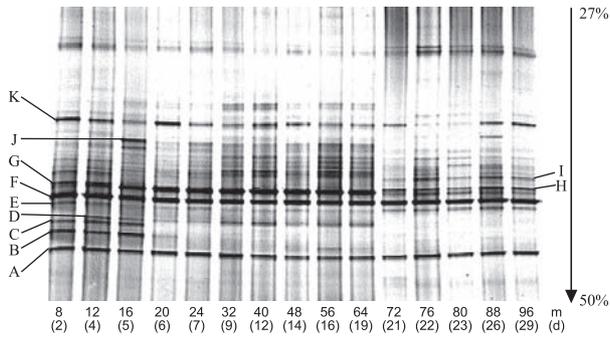


図3. ハザカシステムのPCR-DGGEプロファイル。一回に投入された有機物の処理過程を発酵終了まで解析。各レーンには試料を採取した地点を廃棄物投入部からの距離 (m) で示すとともに、対応する処理日数 (day) を付記した。各バンドの遺伝子塩基配列に対応する近縁種は以下の通り。Bands A, *Propionibacterium acnes*; B, *Clostridium sticklandii*; C, *Clostridium ultunense*; D, *Bacillus infernus*; E, *Bradyrhizobium elkanii*; F, *Methylobacterium radiotolerans*; G, *Bacillus thermocloacae*; H, *Caulobacter bacteroides*; I, J, *B. licheniformis*; K, *Pseudomonas stutzeri*。矢印は泳動方向および変性剤濃度勾配の方向 (数字は変性剤濃度) を示す。

供給され続けていたトリのから揚げ (の皮) をたべるといふニッチでこの微生物の優占性が保たれていたのではないかと想像された。「世の中にはまだまだ知らない菌が変なところでのさばっているんだなあ。」と感じた。

次に、もう少し大規模で安定的にコンポスト化を行っている施設・装置での製造過程における菌叢の変遷を解析しようということになった。この研究は、宮城県のアザカプラントの協力を得て、当時大阪大学国際交流センターの事業でUNESCO 研究生として来日した Mannix Pedro 博士 (現在フィリピン大学ロスバニオス校) が担当した<sup>12,13)</sup>。アザカプラントでは新たに加えた有機性のゴミをスクラパーで1日4mずつ前進させることにより、約1ヶ月の好気性微生物処理で優良なコンポストを生産させることができる。したがって、約4mごとにサンプリングしていけば、一時に1ヶ月の製造過程全体のサンプルが取得できる。このようにして解析したDGGEの結果が図3である。この実験は大変な実験で、Pedro 博士は毎日ほぼ終電車まで実験をしてこの結果を出した。主に彼のこのような努力に対して、日本生物工学会から2度も (2000年、2002年) 論文賞をいただいたのは本当に励みになった。

さらに Pedro 博士は、製造過程全体を通じて優占種となっている2種類の微生物を単離し、それら2種類の微生物の有機物資化性が相補的になっている (栄養的に棲み分けている) という興味ある結果を得ている。

### 微生物集団のいじめ現象

安定的に存在・機能している微生物集団に、何か安定化に関わる構造やシステムがあるのではないかとこの

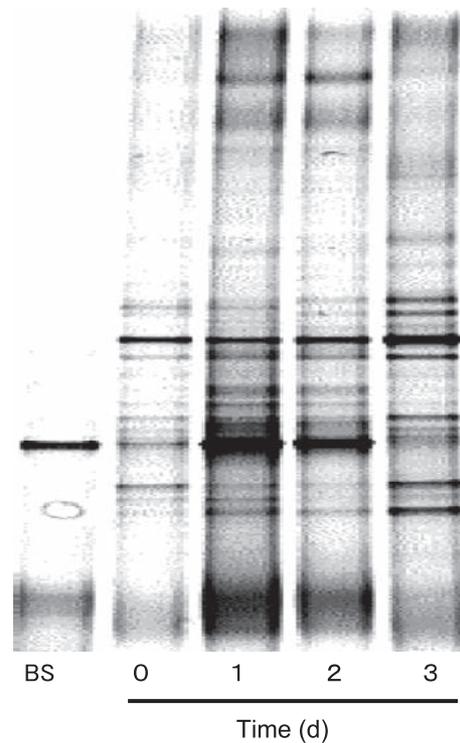


図4. 外来微生物を添加した生ゴミ処理過程のPCR-DGGEプロファイル外来微生物として *Bacillus subtilis* を全菌数の約1%添加し、菌叢の変化をPCR-DGGE法で解析した。BSは添加微生物のDNAのみ、0日は添加前のサンプル。

とを示唆する実験結果は、上記の「栄養的棲み分け」以外にもいくつか見つかっている。

前述の家庭用コンポスターにおける最大の問題のひとつは、家庭からてんぶらの残りカスなどの油分の多いものが排出された時に、コンポスターの内容物が「だま」になり、嫌気微生物が繁殖して臭気が漂うことである。マンションなどでは、その結果、周囲からの苦情などでコンポスターの使用が続けられなくなる。それなら、油脂分の多い生ゴミを出した時には、一緒に油脂分の分解能の高い微生物を添加してやったらどうなるだろうと考えた。油脂分解活性が高く、中華レストランの水周りなどの脱臭効果があるとされた *Bacillus subtilis* をコンポスターに全菌数の1%程度になるように加えたあとの経過をDGGEで追跡したのが図4である。添加した *B. subtilis* は3日以内にDGGEでは検出できなくなっている。しかも添加前と添加3日後の菌叢にはほとんど変化がない。すなわち油脂分解に有効と思われる添加 *B. subtilis* は、既存の菌群によって完全に追い出されたことになる。この現象は、当時学校で問題化していた「いじめ」になぞらえて、「微生物のいじめ現象」、「微生物の社会にもいじめがある」として新聞で紹介されたことがある。

これと同様な現象が、家畜排泄物の液肥化処理過程で見つかっている。それは畜産草地研究所の花島大博士の

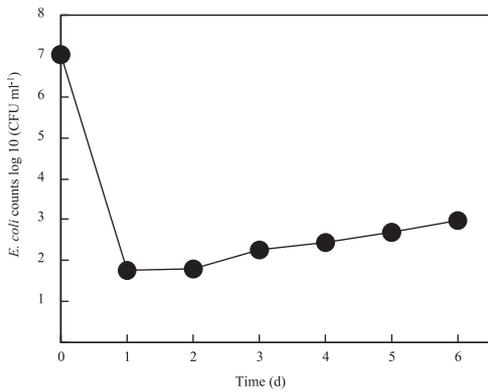


図5. 豚糞尿の液肥化過程での大腸菌数の減少. 豚糞中に含まれる大腸菌群が液肥化が始まってすぐに減少し, 液肥化が終了する処理6日目まで低い値を維持している.

研究によるもので<sup>14)</sup>, 豚の排泄物の液肥化処理過程で大腸菌数が減少するという現象である(図5). この際, 大腸菌の好むグルコースなどを添加すると大腸菌数は急激に上昇するので, この現象は化学物質による大腸菌の生育阻害によるものではなく, 集団中の栄養分の競合, 協調またはネットワークの存在が影響しているのではと想像される. 現時点では, このような現象を利用して大腸菌を死滅させることはできないが, 将来, 化学品に頼らない微生物制御システム, または省エネルギー的滅菌・静菌システム開発に重要なヒントになるのではと期待している.

#### 機能性微生物集団の容器内維持と主要微生物の単離

環境浄化などのために人為的に造られた微生物集団において, それを構成する微生物間に何か特別な関係が成り立っている. 言い換えれば何らかの社会構造とも言うべきものがあるらしいことは判ってきた. しかし社会の構成メンバーも特定できない集団相手では, 主な微生物とその性質を覗き見るのが精一杯で, それ以上の解析は困難のように思われた. そのような時に, かつて未来開拓学術推進事業の際にポスドクとして参加してくれ, 一時中国に帰国後, 2002年11月に発足した寄付研究ユニット「荏原バイオマスリファイナー」の客員准教授で戻ってきてくれた崔宗均博士(現在中国農業大学教授)が, ちょっと思いも着かないような方法で, イネわら分解活性を保持した微生物集団を安定的にガラス容器内の静置培養で植え継ぐことに成功した<sup>15)</sup>. DGGE解析によると, この集団を構成する主要な微生物(優占菌)は10種程度であり, 無菌操作をしなくとも優占菌に変化はないなど, きわめて安定な集団であった. 早速, DGGEの結果を参考に優占菌の単離にかかった. その結果, ほとんどの優占菌は単離できたが, 食物連鎖の第一段階であ

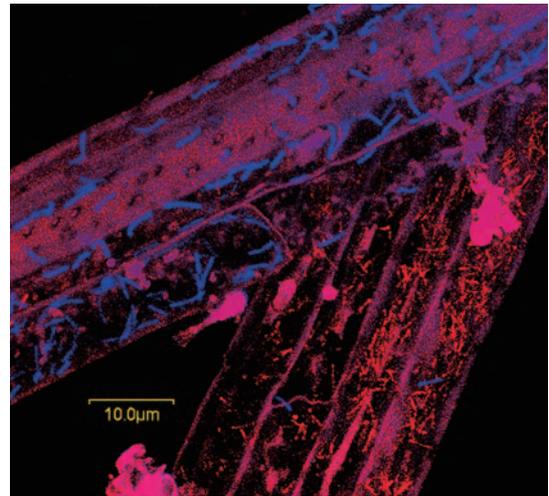


図6. イネわら分解過程のイネ繊維に対するFISH解析. 青は*Clostridium* CSK1株, 赤は*Clostridium* FG4株を示す. なお紫はイネわらの自家蛍光である.

るはずのイネわら分解に関与するセルロース分解菌がなかなか取得できなかった. しかし, 当時大学院生であった加藤創一郎博士(現東京大学先端科学技術研究センターJST/ERATO 研究員)が, セルロース吸着能を利用してこのセルロース分解菌の単離に成功した<sup>16)</sup>. このセルロース分解性の*Clostridium* CSK1およびセルロース非分解性の*Clostridium* FG4がイネわら上に吸着して存在しており(図6), CSK1がセルロースを分解してできたオリゴ糖などをFG4株が処理しているという関係が成り立っていると考えられた.

#### 機能性微生物集団の再構成

CSK1株の単離によって集団の役者がほぼ出揃ったと思われたので, いよいよイネわら分解集団の再構成に取りかかった. その結果, CSK1株およびFG4株を含む5~7種の微生物を混合することによって, 比較的容易にイネわら分解集団を再構成することができた<sup>17-21)</sup>. 最終的にはわずか4種類の微生物による高効率なセルロース分解能を有する安定な再構成系の構築にも成功している.

集団構成微生物の単離および再構成が可能になったことから, (1)単離微生物の生育に及ぼす他微生物培養液の影響, (2)再構成微生物集団から特定の微生物を除いて培養すること(ノックアウト実験)により, 集団内の相互関係などの集団の構造を覗き見るのが可能となった. 詳細は報文に委ねるが, 概ね図7のような微生物間関係が考えられた.

#### 集団機能の利用への道

以上のような努力の結果, 複雑怪奇と思われた自然界の微生物集団と比べて, 比較的単純化された人為操作の

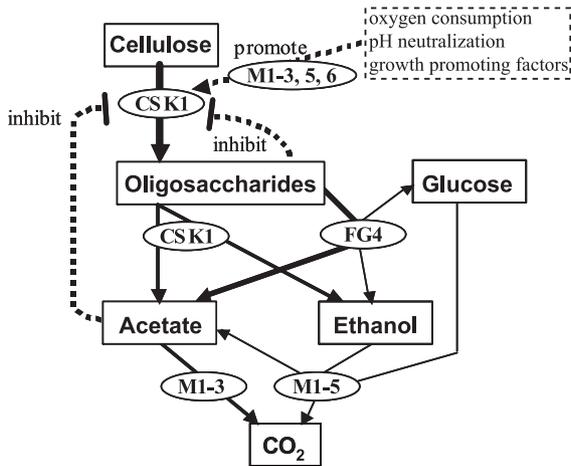


図7. 稲わら分解群集におけるセルロース分解の代謝フローと各菌株の役割のネットワークモデル

入った微生物集団では、その社会構造をある程度覗き見ることができるようになってきた。しかしそれはあくまでも覗き込んでいるだけであって、仕組みを解釈して、それで何かの生産や分解に役立てることができるわけではない。

覗き見の例をもうひとつ挙げよう。鹿児島県福山地区では200年ほど前より、「壺造りの黒酢」と呼ばれる長期熟成された色の濃い食酢が生産されている。これは素焼きの壺の中に、蒸し米と麴と水を加えて壺畑と呼ばれる地面の上に置いておくだけという単純な製法で造られる。よくこれで何万という壺の中が腐らないで酢になっていくものだと不思議に思って、製造工程中の菌叢の変遷を解析することにした<sup>22)</sup>。その結果、当然ことながら、麴菌とアルコール発酵酵母、そして初期の段階で腐敗を防ぐ乳酸菌は麴に由来することが判明した。驚くことに、その後徐々に増加する酢酸菌と熟成期に出現して、恐らく風味や機能性に関与すると思われる酢酸耐性の乳酸菌は壺の内壁に残存していたものが再活性化されたと考えられた。ちなみに新しい壺の場合、最初に黒酢を入れておく、という操作をしないと使用できない。

これでなぜ腐らないか、酢酸菌がどこから来たか、といった疑問はほぼ解けたが、それだけでは黒酢の上手な造り方にも、安定な造り方にも何にも寄与しない。今後、さらに詳細な解析を加えて、何とか品質の向上か製造の効率化・安定化に寄与したいと考えている。

廃棄物分解関係では、堀知行博士<sup>23,24)</sup>（現在産業総合技術研究所特別研究員）や佐々木建吾博士<sup>25-27)</sup>（現在電力中央研究所特別契約研究員）、佐々木大介博士（現在東京大学農学部特任研究員）らにより、メタン発酵の破壊および回復過程の解析なども行われた。上野嘉之博士（鹿島建設技術研究所）は、メタン発酵技術者として研究

グループのメタン発酵研究を当初から支えてくれたが、同時に博士の嫌気微生物集団を用いた水素発酵の研究は先鋭的かつ実用的なもの<sup>28-31)</sup>であった。また基盤的な研究としては、成澤直規博士（現国立感染症研究所研究員）による、抗生物質生産菌、耐性菌および感受性菌によるバイオフィーム形成過程の解析等の研究<sup>32)</sup>、吉田浩爾博士（現地域資源循環技術センター研究員）のメタン発酵における酸化過程とメタン生成過程の間の種間電子伝達に関する研究などがある。

しかしこれらの研究は、自然界または人為的環境における微生物間の相互関係を垣間見た、または集団の形成や変遷の経過を観察したという段階にほぼ留まっている。集団を思い通りに造り変えたり、機能を効率化したわけではない。

### おわりに

20世紀の応用微生物学は、まず一匹の微生物を自然界から単離、培養することから始まった。そして、その微生物を詳細に調べ、さらに必要があれば変異を加え、その上で周囲の微生物を全部殺しつくした上で、その微生物が働くのに最も適した条件を与えて、「さあ世界は君のものだ。思い切って働いてくれ！」とあって、最終的には1リットル当たり何十グラム、百何十グラムという生産物を作り出すということをやってきた。

しかし自然界にはさまざまな微生物がさまざまな状況で活躍している。その中には孤独に生きているものもいるだろうが、多くは周囲の微生物達と何らかの関係を保ちながら生存しているであろう。また固体表面で体を寄せながら生きている微生物もいるだろう。さらには閉鎖された酸素も供給されないような環境でひしめき合っている微生物も多いだろう。このような微生物の集団の構造を解析し、必要であればその構造に手を加えて、集団機能を効率的に発揮させることが21世紀の応用微生物学が向かうべき一つの方向と信じている。そしてこの技術が、物質生産のみならず、環境の維持・修復、感染症予防などの衛生管理や健康維持・回復にまで及ぶ日の来ることを期待している。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室で行われた研究をまとめたものです。第60回生物工学賞受賞に当たり、恩師故山田浩一先生、故菟田泰治先生、児玉徹先生、さらに石井正治准教授、荒井博之助教、春田伸博士をはじめとする研究室の皆様にご心より感謝いたします。本論文の中では、主に関連の研究で博士号を取られた方々を中心とした一部の方しかお名前を挙げさせていただくことができず、さらに研究についてははさらにその一部しか紹介できず、本当に申し訳ありません。誌面数と研究展開の都合上このようになってしまいました。

今回の私の受賞は、すべて周囲の皆様、特に実際に大変な実験を行ってくださった研究室の皆様のお陰です。関連のテーマで博士論文を書かれた方の数だけでも相当数に上ります。受賞講演でも申し上げましたが、現在、若い博士研究者の置かれている状況は危機的なものがあります。私だけがこのような晴れがましい賞を頂き、東大教授などというポストにのぼほと座っているのは、私を信じ一緒にやってきていただいた方々に申し訳が立たないという気持ちで一杯です。還暦を迎え、すでに枯れかかっている私の研究者生活ですが、何らかの形で今後少しでもご恩返しをしたいと思っております。

最後に、今は亡き両親、そして妻奏子、娘春子を始め、今まで私の人生に関わっていただいたすべての方々に改めて感謝いたします。

## 文 献

- 1) 五十嵐泰夫：平成9年度～平成13年度日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業研究成果報告書 (2002).
- 2) Aoshima, M., Pedro, M. S., Haruta, S., Ding, L., Fukada, T., Kigawa, A., Kodama, T., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 456–461 (2001).
- 3) Haruta, S., Kondo, M., Nakamura, K., Aiba, H., Ueno, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 224–231 (2002).
- 4) Haruta, S., Kondo, M., Nakamura, K., Chanchitpricha, C., Aiba, C., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 20–27 (2004).
- 5) 春田 伸：生物工学, **78**, 198 (2000).
- 6) 春田 伸：化学と生物, **39**, 11–12 (2001).
- 7) 五十嵐泰夫, 春田 伸, 中村浩平：環境技術, **31**, 2–6 (2002).
- 8) 春田 伸：環境技術, **31**, 26–28 (2002).
- 9) 春田 伸：腸内細菌学雑誌, **18**, 39–43 (2004).
- 10) Nakamura, K., Haruta, S., Ueno, S., Ishii, M., Yokota, A., and Igarashi, Y.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1063–1069 (2004).
- 11) Nakamura, K., Haruta, S., Nguyen, H. L., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3329–3337 (2004).
- 12) Pedro, M. S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 159–165 (2001).
- 13) Pedro, M. S., Haruta, S., Nakamura, K., Hazaka, M., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 368–373 (2003).
- 14) Hanajima, D., Haruta, S., Ishii, M., Hori, T., Haga, K., and Igarashi, Y.: *J. Appl. Microbiol.*, in press.
- 15) Haruta, S., Cui, Z. J., Huang, Z., Li, M., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 529–534 (2002).
- 16) Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., Yokota, A., and Igarashi, Y.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2043–2047 (2004).
- 17) Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **51**, 133–142 (2004).
- 18) Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7099–7106 (2005).
- 19) Haruta, S., Kato, S., Cui, Z. J., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Environ. Biotechnol.*, **5**, 91–95 (2005).
- 20) Kato, S., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Microb. Ecol.*, in press.
- 21) Narisawa, N., Haruta, S., Cui, Z. J., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 432–434 (2007).
- 22) Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 79–87 (2006).
- 23) Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1623–1630 (2006).
- 24) Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Microbiol. Methods*, **66**, 165–169 (2006).
- 25) Sasaki, K., Haruta, S., Tatara, M., Yamazawa, A., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 271–273 (2006).
- 26) Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 244–246 (2006).
- 27) Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 941–952 (2007).
- 28) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 397–400 (2001).
- 29) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 555–562 (2001).
- 30) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 65–73 (2001).
- 31) Ueno, Y., Sasaki, C., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 331–343 (2006).
- 32) Narisawa, N., Haruta, S., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3887–3894 (2008).