

バイオリファイナリーに向けた酵母物質生産系の開発

玉川 英幸・生嶋 茂仁・吉田 聡*

一般に基礎研究で用いられる実験室酵母は、ヘテロタリクなパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* であり、安定に一倍体の状態で増殖することができ、遺伝子操作法も確立されている。しかし、これらの酵母がそのまま実用化されることはほとんどなく、実生産に使われている酵母は、たとえばホモタリクなビール酵母やワイン酵母、清酒酵母などである。また、有用物質を生産するために開発された実用酵母としては、メタノール資化性の *Pichia* 酵母や *Candida* 酵母などが知られている。しかしながら、これらの実用酵母は倍数性が高く、さらに遺伝子操作も実験室酵母ほど容易ではないことが多い。

パン酵母 *S. cerevisiae* S288C 株は1996年に全ゲノムが解読され、分裂酵母も2002年に解読された。そして、それらの遺伝子情報を基に、全ゲノムを対象とした研究が始まり、マイクロアレイが作製され網羅的な遺伝子発現解析や染色体構造解析が可能となってきた。また、全遺伝子破壊株や全タンパク質発現株の構築なども行われ、表現型解析も含んだオミックス解析が始まった。一方、実験室酵母の後を追うように実用酵母のゲノム解析も盛んに進められてきている。たとえば、ゲノム情報が公開されたものとして、2007年の *Pichia stipitis*¹⁾、2009年のビール酵母 *Saccharomyces pastorianus*²⁾、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*³⁾ などがあり、これらの酵母でマイクロアレイ解析も行われるようになってきた。

酵母によるバイオエネルギー生産

酵母を用いて作られるエネルギーとしては、バイオエタノール、バイオブタノール、バイオディーゼルなどが挙げられる。バイオエタノールの生産には、*S. cerevisiae* を筆頭にさまざまな酵母が用いられており、また、同じ *S. cerevisiae* でも多様な菌株が用いられている。エタノール発酵については、酒類製造という観点から日本には技術的な蓄積もある一方で、燃料用エタノール発酵では飲料に求められるような優れた香味ではなく、低コスト・低エネルギー消費につながる高効率のバイオマスの糖化法や生産物の精製法、さらには大量生産法がきわめて重要である。つまり、これらバイオリファイナリーは、醸造とは異なる技術体系をなしていると言える。

たとえば、高温で発酵することができれば、冷却コストを削減でき、酵素反応も効率よく行うことができる。さらに、酵母での生産を考えると発酵槽に溜まったエタノールによる酵母の増殖阻害が問題となることから、エタノール耐性も重要となる。以上のような課題を克服するには、*S. cerevisiae* 以外の酵母を用いることも有効である。近年、*Kluyveromyces marxianus* と呼ばれる酵母の中に、45°Cという高温条件で *S. cerevisiae* 並みのエタノール生産性を示す株が見いだされた⁴⁾。その他、エタノール耐性に関与する遺伝子や、その耐性メカニズムについての研究も近年盛んに行われており、さまざまなエタノール耐性酵母が育種されている。

エタノールより炭素鎖が長いブタノールもオクタン価が高く、燃料として優れている。ブタノール発酵菌として、嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌による ABE 発酵が挙げられるが、培養の煩雑さや副産物の多さという問題点がある。それらの問題を回避するために大腸菌などの微生物に *Clostridium* 属細菌由来の遺伝子を導入してブタノールを作らせる取組みも報告されている⁵⁾。一方、オクタン価、ガソリンへの親和性などの特徴からイソブタノールがエタノールに替わるバイオ燃料として注目されている。近年、新規な代謝経路を利用した効率的な微生物を用いたイソブタノール生産法が確立され、大腸菌、コリネ菌、酵母、藻類などでの成果が報告されている⁶⁾。また、DuPont社はBP社とButamax社というベンチャー会社を設立し、酵母によるイソブタノール発酵の実用化の試験段階に入っており、さらに別の米国ベンチャー会社のGevo社はガソリンへの添加適応性の試験も行っている。

一方、バイオディーゼルに関しては、近年、藻類を用いた生産の報告が多数なされているが、酵母においてはその主成分である脂肪酸の生産に関して、油性酵母 *Yarrowia lipolytica* による油脂生産の報告がある⁷⁾。また、*S. cerevisiae* を用いた生産という点では、トヨタ社のプレニルアルコール(ゲラニルゲラニオール、フェルネソールなど)の生産が報告されている⁸⁾。このようにエタノールの次の世代のバイオ燃料として、脂質や高級アルコールなどの提案が多数なされており、競争は激化の一途を辿っている。

*著者紹介 キリンホールディングス・フロンティア技術研究所 (主任研究員) (現: キリンビール株) (主査)
E-mail: satoshiy@kirin.co.jp

筆者らはこのような状況の中で、non-conventionalな酵母を用いたバイオエタノール生産に注目して、いくつかの取組みを行ってきた。その中の1つとして、ビール製造過程の副産物であるビール仕込み粕の有効利用を目的とした、*P. stipitis*によるキシロースからのバイオエタノール生産がある⁹⁾。なお、このビール仕込み粕糖化液中の主な単糖はグルコース、キシロース、アラビノースである^{9, 10)}。*P. stipitis*は、キシロースを糖源としてエタノールを生産できる酵母の1つであり、実際に野生型*P. stipitis*株によるビール仕込み粕糖化液を用いたエタノール発酵を行ったところ、1.26%のエタノールを作ることになった。さらに、キシロース資化に関与する3つの遺伝子を過剰発現させたところ、コントロールの親株に比べてエタノールの生産効率が20%上昇した⁹⁾。一方、これらの取組みの過程で*P. stipitis*は酸などのストレスに対して、他の酵母と比べるとその耐性が弱いという欠点も明らかになった。バイオマスのセルロース成分からはフランやフルフラール類、ヘミセルロース成分からは酢酸、そしてリグニン成分からはフェノール類が発酵阻害物質として生成されるので、これらの物質に対する酵母の耐性の強化が重要な課題となっている。そこで、筆者らはバイオマス利用を視野に入れ、生産宿主としてストレス耐性の高い*Candida utilis*を用いたキシロースからのエタノール生産を試みた。

*Candida utilis*によるキシロースからのエタノール生産

*C. utilis*は最新の酵母分類学の教科書(The Yeast 5th edition, 2011年刊)によると、*Lindnera jadinii*に分類される。*C. utilis*は、他の酵母と比べて増殖が旺盛であり、強い発酵力を有している。また、十分な酸素を与えた条件ではエタノールを生成しないクラブツリー効果陰性である。さらに、アメリカ食品医薬局(FDA)が食品添加物として安全性を認めている酵母でもあり、リボ核酸やグルタチオンの生産に用いられている。そして、遺伝子組換え系も整備されており、これまでも異種タンパク質や乳酸の大量発現に使用された実績がある。その他に、キシロースを唯一の炭素源として増殖することができる特徴を持つ。以上のことから、*C. utilis*はモノづくりに非常に有用な特徴を有していると言える。一方、燃料生産において食糧と競合しないバイオマスを用いることが求められているが、野生型の*C. utilis*はキシロースからエタノールを生産することができず、このことは解決すべき課題である。そこで、筆者らは遺伝子組換え技術を用いた代謝改変を行うことにより、*C. utilis*へのキシロース発酵能の付与を試みた。本章では、キシロース

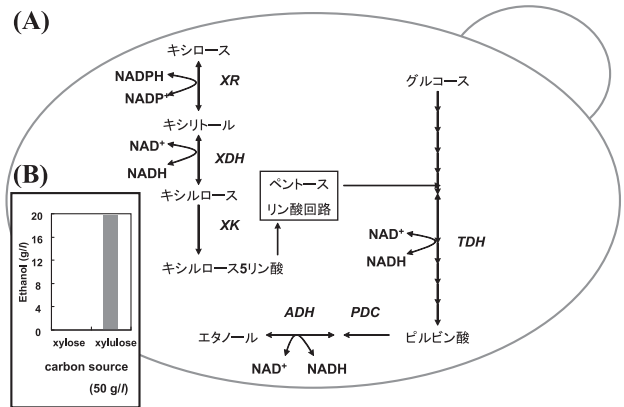


図1. キシロースからのエタノール生産. (A) キシロース, およびグルコースからのエタノール生産経路, (B) キシロース, およびキシリトールからのエタノール生産.

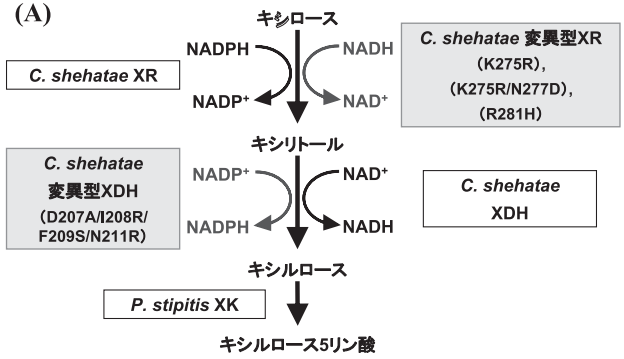
からエタノールを高効率で生産させるための取組みを紹介する。

まず初めに、*C. utilis*がキシロースを資化できるが、エタノールなどを発酵生産できない原因を探るために、キシロース、およびキシルロースを唯一の炭素源とした発酵生産を試みた。文献情報どおり、キシロースからエタノールはまったくできなかったが、50 g/lのキシルロースからは20 g/lのエタノールが生産された。この結果から、*C. utilis*がキシロースからエタノールを生産することができないのは、キシロースを効率よくキシルロースへ変換できていないことが原因であることが示唆された(図1)。そこで、筆者らはキシロースからキシルロースの変換に注目することにした。

キシロースは、キシロース還元酵素(xylose reductase, XR)、キシリトール脱水素酵素(xylitol dehydrogenase, XDH)、キシルロースリン酸化酵素(xylulose kinase, XK)によりキシルロース5リン酸に変換され、これがペントースリン酸経路を介して解糖系に入り、代謝されていく。そこで、筆者らはまず初めに、前述の*P. stipitis*の場合と同様に、これらの3種の遺伝子を*C. utilis*で過剰発現した。その際、XR、XDHは*Candida shehatae*由来の遺伝子を用い、XKは*P. stipitis*由来の遺伝子を用いた。発酵試験を行った結果、*P. stipitis*とは異なりキシロースからのエタノール生産は改善されなかった。そこで、筆者らはキシロース代謝経路上のこれらの酵素の補酵素要求性に注目し(図2A)、*C. shehatae*のXRはNADPHに親和性が高く、またXDHはNAD⁺に親和性が高いため、NADH/NADPHの酸化還元状態のインバランスが生じ、その結果としてキシロースからキシルロースまでの代謝が進まないという仮説を立てた。そしてまず、

XRについてNADHに親和性が高くなると考えられる変異体を3種類 (XR K275R, XR K275R/N277D, XR R281H), XDHについてNADP⁺に親和性が高くなると考えられる変異体を1種類 (ARSdR; D207A/I208R/F209S/N211R) 作製し, それらの酵素活性を調査した. その結果, XRについてはnativeな酵素と比較して, NADH存在下での酵素活性が1.3倍から5.4倍高い株を作製することができた. また, XDHについてはNADP⁺存在下で約730倍酵素活性が高い株を作製することができた (図2B). そして, 元々のnativeな酵素も含めて, さまざまな補酵素親和性をもった組合せのXR, XDHを発現する *C. utilis* 形質転換体を作製した.

そして, これらの変異酵素を持った *C. utilis* 形質転換体を用いて発酵試験を行った. その結果, XDHをNADP⁺親和型に変えて, XRとXDHとの間でのNADPHのリサイクリングにより理論上の酸化還元バランスの収支が合うようにした形質転換体ではエタノール生産量に微増の影響しか与えなかった. 一方, XRをNADH親和型に変えた形質転換体では, エタノール生産性が大きく改善された (図3)¹¹⁾. このことから, NADPHよりNADHが細胞質でのリサイクリングに優位であることが示唆された. 酵母で外来遺伝子を発現させ, 有用物質を生産させる際は, NADH親和性のタイプが成功する可能性が高いかもしれない.



(B)

| Strain | Description | XR (U mg ⁻¹) | | XDH (U mg ⁻¹) | | XK (U mg ⁻¹) |
|--------|-----------------------------|--------------------------|-----------|---------------------------|-------------------|--------------------------|
| | | NADH | NADPH | NAD ⁺ | NADP ⁺ | |
| TMS170 | XR/XDH/XK | 0.41±0.03 | 0.73±0.03 | 2.26±0.15 | 0.04±0.00 | 0.32±0.02 |
| TMS172 | XR K275R/XDH/XK | 0.50±0.07 | 0.53±0.16 | 2.74±0.36 | 0.04±0.01 | 0.36±0.04 |
| TMS174 | XR K275R N277D/XDH/XK | 0.75±0.11 | 0.25±0.10 | 2.31±0.23 | 0.04±0.00 | 0.32±0.00 |
| TMS176 | XR R281H/XDH/XK | 1.07±0.05 | 0.76±0.16 | 2.62±0.59 | 0.05±0.01 | 0.31±0.02 |
| TMS182 | XR/XDH ARSdR/XK | 0.43±0.02 | 0.76±0.02 | 0.20±0.25 | 2.43±0.04 | 0.27±0.03 |
| TMS184 | XR K275R/XDH ARSdR/XK | 0.54±0.06 | 0.73±0.09 | 0.18±0.00 | 2.47±0.05 | 0.28±0.01 |
| TMS186 | XR K275R N277D/XDH ARSdR/XK | 0.67±0.04 | 0.26±0.02 | 0.16±0.01 | 2.32±0.02 | 0.27±0.01 |
| TMS188 | XR R281H/XDH ARSdR/XK | 0.95±0.06 | 0.80±0.02 | 0.19±0.04 | 2.12±0.03 | 0.25±0.02 |
| TMS33 | vector | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.18±0.02 |
| TMS33 | vector (xylose-grown cells) | 0.00±0.00 | 0.03±0.00 | 0.09±0.01 | 0.00±0.00 | 0.20±0.03 |

図2. キシロース代謝経路の遺伝子の改変. (A) キシロース代謝に関与する3つの遺伝子の変異体の作製, (B) キシロース代謝酵素変異体を持った株での各種酵素の *in vitro* 酵素活性と補酵素親和性. 破線の囲みは, XRは本来NADPH親和型であるが, そこに変異を入れるとNADH親和型に変わったことを示す. 実線の囲み左側は, 変異の入っていないXDHではNAD⁺に親和性が高く, 実線の囲み右下側はXDHにARSdRの変異を入れるとNADP⁺に親和性が高くなることを示す.

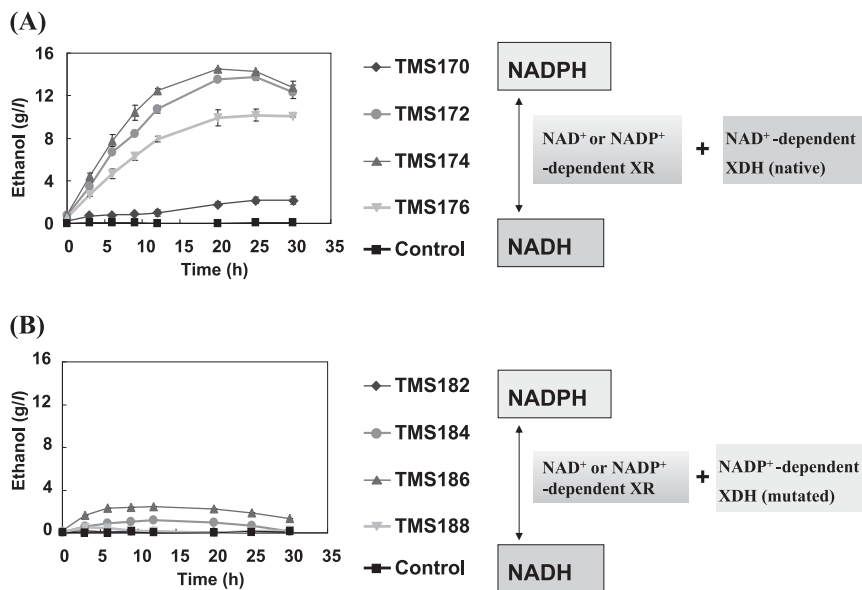


図3. 補酵素親和性を改変したキシロース代謝酵素を発現している組換え *C. utilis* 株のエタノール生産性. (A) NAD⁺親和型XDHを用いたときのエタノール生産, (B) NADP⁺親和型XDHを用いたときのエタノール生産.

微生物による乳酸生産

プラスチックは世界で年間約1億5千万トン生産されており、その原料のほとんどは化石資源に依存している。近年、低炭素社会の実現、カーボンニュートラルな技術開発という環境に配慮した取組みが求められている中で、新たなプラスチックの素材として、ポリ乳酸が注目され、有望素材としてすでに用いられている。ポリ乳酸は乳酸を重合させることにより作られるが、原料となる乳酸の製造については、化学合成と発酵生産の2通りの手法があり、化学合成では一般的にL体とD体の両方が作られる。一方、発酵生産ではL体のみ、もしくはD体のみを作ることが可能である。ところで、単一のL体のみ、もしくはD体のみ光学異性体だけからなるポリ乳酸の融点は180°C近くであるが、L体、D体の両方からなるステレオコンプレックス構造を持ったポリ乳酸の融点は230°C近くになるため、耐久性にも優れたプラスチックとなりうる。そのため、L体のみ、もしくはD体のみを高効率で発酵生産させることが重要となってきている。

乳酸の発酵生産に関しては、乳酸菌や *Rizopus oryzae* のような好気性糸状菌が用いられている。これらの微生物を用いた発酵法では組換え体を用いていないという利点があるが、D体とL体の両方を作ってしまう場合が多い。さらには、エタノールなどの副産物を生産してしまうために乳酸の収率が低いという欠点がある。また、乳酸菌については培養時に、嫌気条件が必要であったり、生育にホエーやコーンステーパーリカーなどの天然栄養源を必要としたりする場合がある。一方、*Rizopus* については、溶存酸素濃度を高く維持するために必要な高通気条件が培養のハンドリングの煩雑さにつながっている。これらのことは、発酵による乳酸生産の実用化への大きな障壁となっている。

微生物を用いた乳酸生産の宿主としては、上記の乳酸菌、糸状菌以外に大腸菌、コリネ菌、酵母が挙げられる。大腸菌は嫌気条件下でD-乳酸を生産するが、遺伝子組換えにより対糖収率95%以上でL-乳酸を生産させることができた。しかし、その生成量、生産性は乳酸菌に比べて低かった。また、コリネ菌は酸素抑制条件下でRITEプロセスにより、高い生産性でL-乳酸を生産させることに成功している。

一方、酵母はそのままでは乳酸を生産することはほとんどないが、発酵反応液から菌体を分離することが容易であり、酸に対するストレスが高く、増殖速度が速く、しかも培地も一般的に安価であるなどの利点がある。さ

らに、遺伝子組換えツールが開発されていることから、遺伝子組換え体の作製が容易であるという点も魅力の1つといえる。そのため、現在までに15年以上さまざまな酵母を用いた乳酸生産が試みられてきた。

たとえば、過去の知見では、*S. cerevisiae* を用いたL-乳酸生産において、48時間で99.9%以上の光学純度のL-乳酸を122 g/l生産させることができていた¹²⁾。しかし、このとき同時に40 g/lのエタノールも副産物として生産されてしまっていた。この原因としては、ピルビン酸からアセトアルデヒドを作るピルビン酸脱炭酸酵素PDCの影響が考えられる。PDCをコードしている遺伝子は *PDC1*、5、6であり、このときはその中の *PDC1* 遺伝子のみを破壊してその株にウシ由来L-LDHを導入しており、残りの2つの *PDC* 遺伝子は破壊されていないためにエタノールが副産物として合成されたと考えられる。さらに、ここで *PDC5* 遺伝子も破壊して *PDC1* と *PDC5* の2つの遺伝子を破壊したところ、100 g/lのグルコースから82.3 g/lのL-乳酸を生産することができ、しかも副産物のエタノール生産量は2.8 g/lと低下させることができた。しかし、増殖速度、糖消費速度が共に大きく低下し、乳酸生産が一定になるまでに192時間を要するという結果であった¹³⁾。このように、*S. cerevisiae* の場合は、*PDC* 遺伝子をすべて破壊すると致死となるために、副産物のエタノール生産、増殖欠損を抑えることが技術的に大きな壁になっている。

また、*Kluyveromyces lactis* においては、副産物であるエタノールを生産しないように、*PDC* をコードしている *PDC1* 遺伝子を破壊したところ、*PDC* 活性をほとんど失ったが、目立った増殖遅延は起こらなかった。そして、この株にL-LDH遺伝子を導入したところ、予想通りエタノールの生産は見られなかったが、その乳酸生産効率は60%程度にとどまっていた¹⁴⁾。さらに、この株で同時にピルビン酸脱水素酵素のサブユニットをコードしている *PDA1* 遺伝子も破壊すると、乳酸生産効率が85%に上昇した。しかし、*PDA1* の破壊により増殖速度が低下し、*S. cerevisiae* の場合と同様、L-乳酸60 g/lの生産のために500時間という長い時間がかかってしまい、生産収率、副産物抑制はクリアしたが増殖遅延はクリアできなかった¹⁵⁾。

さらに、*P. stipitis* について、この酵母はスクロースを炭素源とした発酵はできないが、前述のようにキシロースを用いた発酵を行うことができる。そこで、この酵母に乳酸菌のL-LDHを導入し、糖源としてグルコースとキシロースを用いて発酵させたところ、94 g/lのグルコースから41 g/l、101 g/lのキシロースから58 g/lのL-乳酸

を生産することに成功した¹⁶⁾。このとき用いた株では、PDC遺伝子は破壊されておらず、今後、バイオマス利用を視野に入れた研究として、この酵母を用いた乳酸生産も期待されるところである。

なお、*Candida boidinii*を用いたL-乳酸生産については別の総説に記したので、そちらを参照していただきたい⁹⁾。

Candida酵母によるキシロースからの乳酸生産

最後に筆者らが取り組んできた*C. utilis*での乳酸生産について紹介する。*C. utilis*において、Cre-loxPシステムを利用してPDCをコードするすべての遺伝子を欠損させた株を作製したところ、*K. lactis*と同じく致死にはならず、増殖することができた。そして、この株にウシL-LDHを導入することにより、*C. utilis*においてL-乳酸を生産することに成功した。その生産性は、108.7 g/lのグルコースから103.3 g/lのL-乳酸を光学純度99.9%以上で生産できるというものであった(収率95.1%)¹⁷⁾。さらに、このPDC欠損株にL-LDHの代わりに、乳酸菌*Lactobacillus helveticus*のD-LDHを導入することにより、185 g/lの糖を含むモラセス(スクロースが主な糖源)から163 g/lのD-乳酸を生産させることにも成功した¹⁸⁾。

次に筆者らは、キシロースから乳酸を生産することに取り組んだ。具体的には、先に構築した乳酸高生産株に、キシロースを代謝するために必要な遺伝子改変を行うことによる、キシロースからの乳酸高生産を試みた(図4A)。なお、先に構築した乳酸生産株でキシロースからの乳酸生産能を評価したところ、ほとんど乳酸は生産されなかった(図4B)。一方、エタノール生産で作製した時と同様に、キシロース代謝の酸化還元バランスが最適化された変異遺伝子を導入したところ、キシロースからL-乳酸を高効率で生産させることができた(図4C)¹⁹⁾。

さらに、引き続き、バイオマスの有効利用の具体的な取組みとして、ビール仕込み粕糖化液を用いたL-乳酸発酵を試みた。その結果、25 g/lグルコース、20 g/lキシロース、10 g/lアラビノースを含むビール仕込み粕糖化液から36 g/lのL-乳酸を生産することに成功した(図5)。このように*C. utilis*はバイオマス糖化液からもL-乳酸を生産することができ、ある程度の夾雑物の入った培地においても、発酵能を低下させることなく、有用物質を生産することができる可能性が示された。

今後の酵母による乳酸生産の課題としては、酸性度の高い条件下での発酵を可能にすることで、中和剤コストを削減し、微生物の汚染リスクを低減させることが挙げられる。今まで紹介してきた酵母での乳酸生産はほとんどすべて炭酸カルシウム等の中和剤を添加して行っている。乳酸菌を用いて生産させた場合もやはり中和剤が用いられている。これらの中和剤は添加コストとして費用がかかるが、中和によって生じる廃棄物の処理についても費用がかかる。一方、乳酸はpH3.0以下ではほとんど電離せず、酸度の高い培地で生産された乳酸は、培地のpHに与える影響は小さいと考えられるため、低pHで

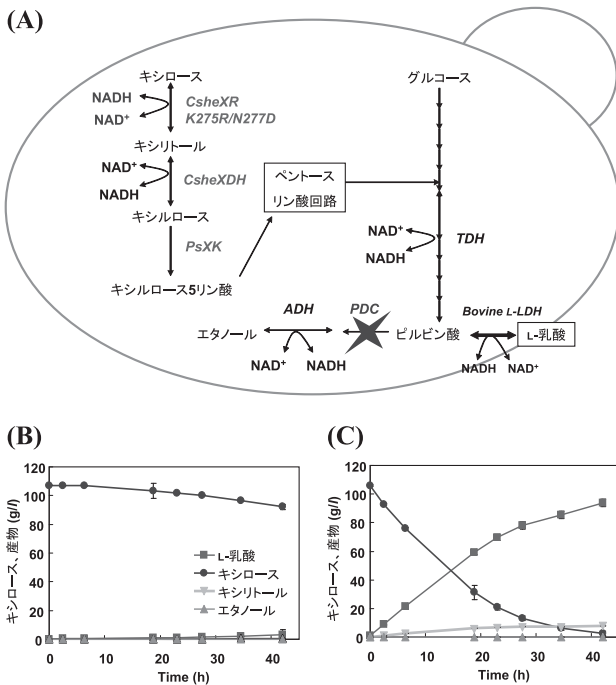


図4. *C. utilis*を用いたキシロースからのL-乳酸生産。(A) キシロースからのL-乳酸生産のための育種戦略。(B) キシロース代謝に関与する3つのXYL遺伝子を過剰発現させた株でのL-乳酸生産。(C) 変異を入れて最適化したキシロース代謝に関与する3つのXYL遺伝子を過剰発現させた株でのL-乳酸生産。

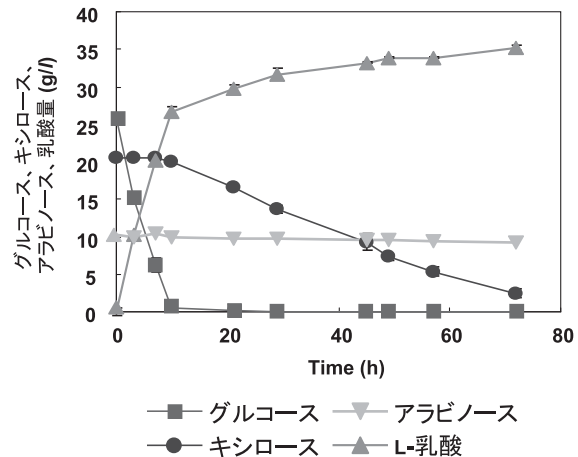


図5. ビール仕込み粕糖化液を用いたL-乳酸生産

の生産ができればコストの削減は可能である。このように、中和剤不添加による生産は大きな課題となっている。また、今後、バイオマスの利用が求められてくる中で、グルコースなどの六単糖とキシロースなどの五単糖の両方とも原料として用いてL-乳酸を生産させることが必要である。先の章で紹介した*P. stipitis*はその能力を持っている酵母である。しかし、ストレスに弱いという欠点もあり、それらを克服する必要がある。今後は、乳酸ストレスに強く、六単糖と五単糖を同時に発酵させることができ、しかも発酵能が強い、これらすべての長所を兼ね備えた酵母の育種が求められている。

実用酵母による物質生産の今後の課題と展望

文頭にも述べたが実用酵母は、実験室酵母に比べて増殖性等、工業生産に優れた特徴を持っているが、倍数性が高いなどの欠点がある。しかし、全ゲノムが解読され、さまざまな酵母の知見を集結することで、遺伝子改変も以前と比べて容易になってきたのも事実である。また、今回見られたようにPDCを完全破壊しても増殖できる酵母、できない酵母も存在しており、個々の酵母種の違いが生まれる原因については不明な点も多い。これらの原因を解明し、遺伝子組換えの容易な実験室酵母に実用酵母の利点をすべて集結させて、さまざまな有用物質を高生産する株を作製する夢もある。また、実用酵母の倍数性を低くして、実験室酵母並みに改変が容易にできるようにになれば、同様にさまざまな有用物質を高生産する株を短時間で作製することができる。さらに、世の

中にはまだ知られていない酵母も多数あると考えられ、そのような生物多様性からの新たな実用酵母の発見も期待される。酵母は古いが、新しさも秘めた微生物と言える。

文 献

- 1) Jeffries, T. W. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 319 (2007).
- 2) Nakao, Y. *et al.*: *DNA Res.*, **16**, 115 (2009).
- 3) De Schutter, K. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 561(2009).
- 4) Nonklang, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7514 (2008).
- 5) Atsumi, S. *et al.*: *Metab. Eng.*, **10**, 305 (2008).
- 6) Atsumi, S. *et al.*: *Nature*, **451**, 86 (2008).
- 7) Sabirova, J. S. *et al.*: *Microb. Biotechnol.*, **4**, 47 (2011).
- 8) Ohto, C. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1327 (2010).
- 9) 吉田 聡ら: *生物工程*, **90**, 179 (2012).
- 10) White, J. S. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1175 (2008).
- 11) Tamakawa, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1994 (2011).
- 12) Ishida, N. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **131**, 795 (2006).
- 13) Ishida, N. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1148 (2006).
- 14) Porro, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4211 (1999).
- 15) Bianchi, M. M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5621 (2001).
- 16) Ilmen, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 117 (2007).
- 17) Ikushima, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1818 (2009).
- 18) 堀江 暁, 生嶋茂仁: *バイオインダストリー*, **6**, 11 (2011).
- 19) Tamakawa, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 73 (2012).