

2016年度 生物工学賞 受賞



アプローチをデザインするスマート 発酵工学の基盤研究

園元 謙二



Basic Study on Smart Fermentation Technology by Designed Approaches

Kenji Sonomoto (*Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581*)
Seibutsu-kogaku **95**: 000-000, 2017.

1. はじめに

この度、栄えある生物工学賞を賜り、本誌に受賞内容を紹介する機会を得た。ここでは、私の研究履歴と今回の受賞研究に至った経緯を、その年代と研究テーマの変遷を縦糸に、知的好奇心やセレンディピティ (serendipity) などを横糸に、発想に至る経緯、エピソードなども交えて俯瞰してみたい。甚だ異色とも思えるこの内容が特に、若い世代へのメッセージともなれば、生物工学研究の“夢”をつなぐと期待している。

2. 酵素工学の時代

私の最初の研究分野は酵素工学である。京都大学工学部工業化学科工業生化学講座で、大学院生から助手の間、恩師の福井三郎先生（故人）、田中渥夫先生（現京都大学名誉教授）の指導を受けた。主に、バイオリアクターの反応素子としての生体触媒の開発とバイオシステムの構築を行っていた。生体触媒として次第に複雑なもの、酵素、オルガネラ、微生物、動植物細胞を扱うようになったが、あくまでも“反応触媒”としての意識が強かった。この間、助手になって2年目の1983年に本会の生物工学奨励賞（斎藤賞）「プレポリマー法による生体触媒の固定化とその応用」を受賞する幸運を得た¹⁾。この酵素工学の時代で特に思い出すエピソードとしては、①生化学と合成化学の反応場の違いの認識、そして有機溶媒中での酵素反応の実現、②生体触媒の固定化担体のデザイ

ンによる触媒活性の制御効果、③発酵のすばらしさを学び、“自己再生能・自己増殖能をもった触媒”の創造、④植物培養細胞を利用した際の思わぬ発見、などがある。酵素工学という研究分野の勃興期から成熟期に遭遇する機会に恵まれたことに感謝している。また、現在の生物工学を構成するさまざまな研究分野を代表する優れた先生方に巡り会うことができた。特に、所属が異なる先輩、同期、後輩との交流による触発は、私のその後の研究展開に大きな影響を与えた。若い時のこのような経験は何物にも代えがたい重要なものであると改めて感じている。下記はその時代に得た大学の三つの階層（年代別）における教訓などである。この大学院生から助手の時代に、研究者としての基本的な素養が培われたと思われる。

<修士課程学生>

- ・初心者は早く行動する
- ・当たり前のことができる人間となる
- ・目標とする人を持つ
- ・深く考える（脳に植え付ける）
- ・きちんと学ぶ姿勢が大事。これがないとどんなサポートをしてもダメ
- ・この時期は研究に没頭する時期
- ・エリート意識を持つ
- ・実験事実は経験を凌ぐ！
- ・常に問題意識を持つ（なぜ？など）。ここから inspiration, serendipityが始まる。これがないと単なる技術

習得になる

- 真面目は最大の長所であり、欠点でもあることを認識する
- 先生や年長者を恐れるな！同じ研究者として対話する。ただし、敬意ははらう
- 先生をうまく活用せよ？常にinputしておく
- 隠れ実験をする。先生は神ではない

<博士課程学生>

- こだわりは持つ。しかし諦める決断も大事（頑固と柔軟性）（独りよがり、唯我独尊に陥らない）
- 取捨選択、視点を変える
- アイデアはすぐに浮かぶものではない。常に意識する。皆と同じ考え・行動をしない。聞き上手になる
- 自分と同じ人間はいない！グループリーダーとして先で待つ余裕、意外な（想定外の）展開と喜び
- 異分野の人と付き合う。特に世代を超えて（企業の人と話す、付き合う→社会を知る）
- 世界にはすごい研究者が居ることを知る

<助手>

- 研究のバックグラウンドは大切に、しかし他分野へのチャレンジ
- 個の力と集団・組織の力（1+1は？）。個性か組織か？→グループの旗印（共通の目的意識）の重要性
- “意気に感じる”集団の形成には？リーダーとしての自覚。放任とケアの狭間を意識する
- 道場破りをする（新たな刺激と展開のために）
- 集中と開放：研究を離れる時を持つ。研究は人生の一部
- エリートを育てる、すべての学生？
- 世界のトップに立つことをいつも意識する。困難を伴うがチャレンジする気持ちがないとダメ

次に、九州工業大学の新設直後の情報工学部生物化学システム工学科に助教授として赴任した。そこでは、異常環境下（低温、高温など）での生化学反応と生体触媒の新機能開発に関する研究に従事した。この学科は全国から理系をほぼ網羅するさまざまな経歴を持った教員が30名ほど新任として集まってきたが、このことが私にとって彼らの研究の流儀やアプローチに触れる機会ともなった。また、この中の一人の研究者との出会いがその後の私の研究の大きなエポックメイキングとなることはこの時思いもしなかった（後述）。

3. 微生物工学へ

私の次の研究履歴は微生物工学である。1993年に九州大学農学部の微生物工学研究室（石崎文彬教授）に助教授として転任した。生命体としての発酵微生物を扱い、その利用を工学的に行う“発酵工学研究”がこの転任によって始まったといえる。

しかし、転任直後に与えられた研究テーマは「バクテリオシンの遺伝生化学研究」であった。その後、新奇バクテリオシン生産菌の迅速スクリーニング法の開発、バクテリオシンの構造決定、バクテリオシンの生合成機構・作用機作などの解明、チオエーテル環のランチオニンなど異常アミノ酸を有するランチビオティックの研究なども始まった。研究には紆余曲折がつきものであるが、この分野の先進国である欧州とは異なる視点で研究展開を行い、現在では世界有数のフロンランナーとして情報発信していると自負している。その結果、幸運にも、「新奇バクテリオシンの探索・発見とその利用」で2008年に生物学功績賞を受賞した。ここでは、その研究の最近の総説^{2,3)}をあげるだけで先を急ぎたい。

この間、私は本格的に発酵工学研究に携わっていない。当時、研究室では、石崎先生の指導の下、回分培養、流加培養、連続培養における速度解析、数々の新奇な発酵システムによる高速高効率発酵生産などが行われていた⁴⁾。これらの研究成果は、その後、本会から下記の顕彰を受けている。

- 1996年度生物学奨励賞（照井賞）、田中賢二「炭酸ガスから化学合成独立栄養的にPHBを生産する安全な培養プロセスの開発」
- 1999年度生物学賞、石崎文彬「嫌気性微生物による有用物質生産に関する生物工学的研究」
- 2008年度生物学奨励賞（照井賞）、柘植丈治「バイオプラスチックの環境低負荷型発酵生産法に関する研究」

私はまさに、発酵学とバイオエンジニアリングの融合を図った発酵工学研究を目の当たりにしていた。しかし、当たり前の話であるが、酵素という触媒物質にはない生命体としての微生物の次の特徴が行く手を阻んでいた。①培養による触媒量、すなわち菌体量の増加、②培養特性に基づく代謝活性の変化がもたらす発酵生産性の変動、③微生物自体の合目的代謝制御、などなど。発酵工学研究では、これらの特徴を踏まえて、目的に合わせた人為的発酵制御技術を開発する必要がある。私はこれまでの酵素工学研究アプローチと比較しながら、これらの研究アプローチについて学んでいたが、この発酵工学研究をどのように継承・発展したらよいのか模索していた。

そして、石崎先生のご退職後、幸運にも研究室を受け継いだ。食品・医薬・環境保全のための微生物利用技術の開発を目的として、以下の4つの主課題を継続した。

1. 微生物の培養工学と代謝工学に関する研究
2. 地球環境保全のための微生物利用技術の開発
3. 有用微生物の分離・同定・分子生物学的手法による機能の改善
4. 酵素や新規生理活性物質の構造と機能・遺伝生化学的研究

そして、この中の発酵工学研究では、私自身の職歴【工学部（工業化学）から農学部（応用微生物学）】と研究歴【酵素工学から微生物工学】の過程において学んできたいくつかの研究分野の研究“アプローチ”を活かす道を選んだ。しかし、最初から世界に通用する斬新なアイデアは思い浮かばなかった。

4. 乳酸発酵を活用した 植物バイオマスのカスケード利用

当時の研究室では、次世代バイオ燃料であるブタノールを生産する acetone-butanol-ethanol (ABE) 発酵を現実的な産業として蘇らせるため、優れた ABE 生産 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 を用いて盛んに研究が行われていた。具体的には、①安価な発酵原料の探索、②ブタノールによる強い生産物阻害の解除、③ブタノールの低コストな回収、などであった。特に、安価な発酵原料の探索では、さまざまな廃棄物を対象とし、かつ廃棄物に関する環境問題対策としても有用であることを明らかにしている⁵⁻⁸⁾。

私は ABE 生産 *Clostridium* 属細菌の独特な代謝に注目した(図1)。すなわち、ABE 発酵は、乳酸、酢酸、酪酸を生産する酸生成期（対数増殖期）から、それら有機酸を再利用しながらエタノール、アセトン、ブタノールを生産するソルベント生成期（定常期）へ代謝転換する。また、ピルビン酸からアセチル CoA へ変換される際に二酸化炭素が放出され、炭素損失が起こる⁹⁻¹¹⁾。

4-1. 新たな切り口の始まり：酪酸からのブタノールのサルベージ合成 発酵産業では、プレカーサーを利用して目的産物を効率的に得ることがしばしば行われている。ABE 発酵では酪酸からのソルベント生産が報告されていたが、効率的な生産システムの構築例はなかった。酵素工学でも、菌体のサルベージ合成能を利用したプレカーサーからの目的産物生産を行った経験があったので、まずは酪酸からのブタノール生産を試みた。その理由は、①酪酸からブタノールへの変換に係わる代謝反応数が少ないこと、②炭素を損失しないこと、など単純なものであった。

酪酸添加による N1-4 株の増殖阻害は想定内であったが、実験データを詳しく解析した結果、以下の想定外の知見を見逃さなかった。すなわち、酪酸添加によって、酸生成期でも比ブタノール生産速度が増加し、酪酸による代謝転換の迅速化とブタノール生産促進が起こった。次に、ブタノール生産に適した菌体をどのように維持しながら酪酸から効率的にブタノールを生産できるかが課題点となった。ソルベント生成期への代謝転換が pH 5.5 付近で起こることはわかっていたので、研究室ですでに開発されていたアプローチ、pH-stat 流加発酵法¹²⁾をデザインすることにした。また、代謝図から、酪酸からブタノールへの変換には、NADH などの補因子が必要であることから、共役基質としてグルコースを選び、pH 5.5 を指標に酪酸とグルコースを供給基質とした pH-stat 流加発酵法を ABE 発酵に適用した。同時に、供給液中の酪酸とグルコースの比 (g/g) (B/G 比) の最適化により、培養液中に残存する酪酸濃度とグルコース濃度をほぼ 0 に制御できた。その結果、グルコースのみに比べて効率的ブタノール生産プロセスの開発に成功した¹³⁾。

この酪酸利用の研究は、その後、living cell による人工電子供与体を伴った生産システムを構築して、高いブタノール対炭素源収率 (0.671 C-mol/C-mol) を得た (2008 年度生物工学論文賞)¹⁴⁾。この収率は糖類からの最大理論ブタノール対炭素源収率 0.667 C-mol/C-mol を上回っていた。さらに、cell recycling 法による高密度 living cell を用いた連続ブタノール生産プロセスへと発展し、高いブタノール対炭素源収率を維持しながら高いブタノール生産性 (7.99 g/L/h) も実現した¹⁵⁾。

4-2. Serendipity：乳酸、酢酸からブタノールができるか？ 当時の研究室では、光学活性乳酸を生産する乳酸菌の探索、キシロースからのホモ乳酸発酵の速度論解析などの研究も盛んに行われていた。光学活性乳酸を生産する乳酸菌を探索している際、多くの分離菌がラセミ体の DL-乳酸や酢酸を生産した。しかもそれら分離菌は、種々のバイオマスを迅速に資化して有機酸を多量に生産した。この時、ABE 生産におけるカスケード利用(図2)がひらめいた。バイオマスを乳酸発酵によって有機酸に変換し、それらを ABE 発酵のフィードストックとして利用するのである¹⁶⁾。これらの有機酸は安定性、貯蔵性、輸送性に優れており、腐敗微生物によるバイオマス分解に伴う炭素損失を防ぐことができる。

酪酸同様に、乳酸のみではブタノール生産は認められず、共役基質としてグルコースが必要であった。最終的に、乳酸とグルコースを供給基質とした pH-stat 流加発酵法により効率的なブタノール生産に世界で初めて成功した。さらに、同位体ラベルした乳酸を用いてブタノール

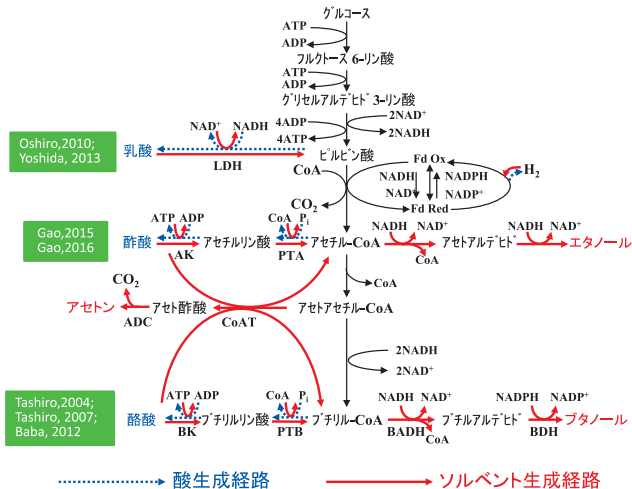


図1. *Clostridium* 属細菌による ABE 発酵の代謝経路とサルベージ合成能力を活用したブタノール生産. LDH, lactate dehydrogenase; AK, acetate kinase; PTB, phosphate acetyltransferase; ADC, acetoacetate decarboxylase; CoAT, CoA transferase; BK, butyrate kinase; PTB, phosphate butyryltransferase; BADH, butyraldehyde dehydrogenase; BDH, butanol dehydrogenase.

ルへの乳酸炭素の取込みを証明した (変換率, 52.6%)¹⁷⁾. それまで, 乳酸からのブタノール生産に関する報告はなく, この研究成果を論文として投稿した際に, 査読者からのコメント「著者らはこの研究成果のすばらしさを本当に認識しているのか?」に感激したことを覚えている.

次に, これまで共役基質としてグルコースを使用してきたが, 完全非食料資源からのブタノール生産をめざした. 結果として, グルコースの代わりにペントースのアラビノースやキシロースを用いることに成功した. その際, 予想外の結果として, pH 非制御の回分培養でも糖と乳酸の消費が同時に始まり, かつ同じ速度で消費され, グルコース利用時よりも高いブタノール生産濃度を得た. 乳酸からピルビン酸への反応には, NAD^+ 依存的乳酸脱水素酵素 (nLDH) に加えて NAD^+ 非依存的乳酸脱水素酵素 (iLDH) の関与が考えられる. グルコースによる iLDH 活性の低下が明らかとなっているが, アラビノース利用時における iLDH による乳酸消費の促進が示唆された (2013 年度生物工学論文賞)¹⁸⁾.

酢酸をグルコースとともに培地に添加した場合, 添加しない場合に比べてブタノール生産量が 48.3%, アセトン生産量が 90.5% 増加し, 酢酸の添加が代謝流を変化させたと考えられた. $^{13}\text{C}_2$ -酢酸を用いた ABE 発酵からほぼすべての $^{13}\text{C}_2$ -酢酸が溶媒へ変換されていた. さらに, 酢酸添加が酸生成期でも, グルコースからの溶媒への変換効率を増加させる興味深い結果を得た. 一方, 酵素活性レベルでの酢酸添加効果も検証した. 酸生成期および溶媒生成期において, 酢酸

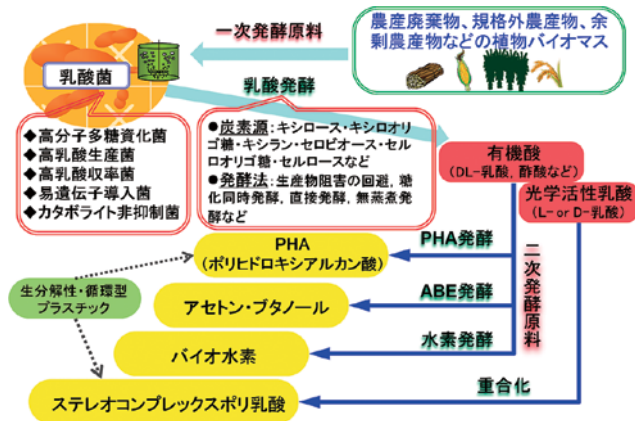


図2. 乳酸菌を用いた乳酸発酵によるバイオマスのカスケード利用

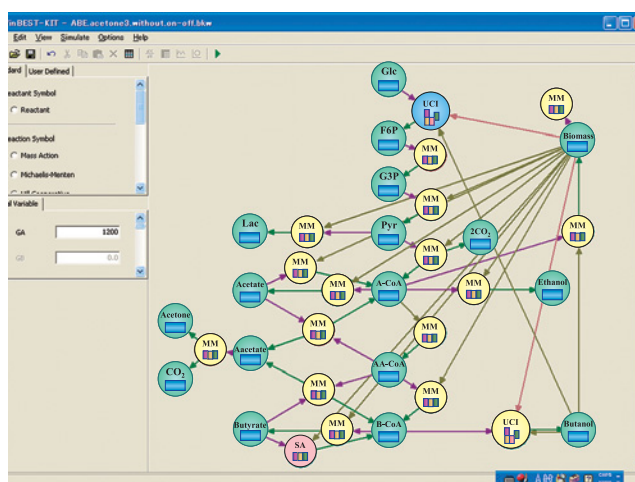


図3. WinBEST-KITを用いて構築途中の ABE 発酵の動的代謝モデル

の添加が酢酸の取込みに関わる酵素 (酢酸キナーゼ, リン酸アセチルトランスフェラーゼ, CoA トランスフェラーゼ) および溶媒生成経路に関わる酵素 (アセト酢酸デカルボキシラーゼ, ブタノールデヒドロゲナーゼ) の活性を高めていた. このように, 酢酸添加が増殖初期においても溶媒生産を誘導し, 酢酸およびグルコースからブタノールおよびアセトンへの代謝流を増加させることを初めて定量的に明らかにした^{19,20)}.

現在, 乳酸と酢酸の混合有機酸を ABE 生産に利用するための基質供給法について検討している. また, 実際のバイオマスの乳酸発酵液はこれらの有機酸だけでなく残存糖も含まれる^{21,22)}. この発酵液を使用してどのような“アプローチ”をどのように“デザイン”して ABE 生産へのカスケード利用に結びつけるか, 興味は尽きない.

5. IT 駆動型微生物工学の取組み

発酵による目的代謝産物の生産では, いわゆる “wet

な研究者”はこれまで、発酵に関わる諸条件をできるだけ論理的に組み合わせながら、生産性の向上を図ってきた。この過程では、常に、膨大な実験と多くの辛酸・研究費の賜物としての結果が集積され、当初の目標ゴールにたどり着いている。発酵工学研究でも、さまざまな外因的パラメータを用いて発酵制御が行われる。それらパラメータは微生物の増殖・生命維持・代謝全般などに影響を及ぼし、例外を除いて特異的なものではない。パラメータによって酵素反応が直接影響を受ける酵素工学とこの点が異なる。

私が発酵工学研究を本格的に始めて2、3年が経っていた頃のことである。発酵という複雑迷路において、経験や勘ではなく、代謝物の動的な変化を的確に捉えて、物質生産におけるボトルネック経路を明らかにしたり、どのような制御をしたらいかがをある程度、容易に予測することはできないであろうかという“未常識”で切ない思いがあった。もちろん、メタボローム、プロテオーム、トランスクリプトームなどにおける精密解析手法は魅力的であったが、別の解決方法を模索していた。当時、代謝工学では、さまざまな測定データを利用して物質生産時の代謝流束解析が行われていた。しかし、その解析法では、擬定常状態を仮定しており、時間的な変化を考慮した動的な解析を行うことができない。たとえば、回分培養など細胞内外の条件が連続的に変化する場合は（基質や生産物の濃度変化などなど）、それに応じて遺伝子発現量も連続的に変化する。すなわち、明らかにした遺伝子発現制御機構を組み込んだ代謝のモデル化のためには、従来の代謝流束解析のような静的モデルではなく、連続的な変化に対応する動的なモデルが必要であった。

この時、前述した九州工業大学で知り合ったバイオインフォマティクスを専門とする岡本正宏先生（九州大学教授）が同じ大講座にいる幸運に恵まれた。九州工業大学時代から“wetな研究者とdryな研究者”が互いの専門性を乗り越え激論を交わしながら共同研究をしたいと酒席で語り合っていた仲であった。また、岡本先生は代謝制御経路の解析用シミュレータWinBEST-KIT (Biochemical Engineering System analyzing Tool-KIT)を開発したばかりでもあった²³⁾。岡本研究室に准教授として赴任してきた、生物化学工学が専門の花井泰三先生も合流し、まずABE発酵の動的代謝モデルの構築に乗り出した。その際、互いの専門領域の架け橋となる学生を育成するために、発酵工学が専門の学生を岡本研究室で1年間“修行”させたことが大きな原動力になった。学生の立場からは大変な経験であったと思うが、以下に述べる成果を導き出し、見事に重責を果たしてくれた。後に博士号を取得する進藤秀彰氏（現栗田工業（株））

である。

ABE発酵におけるブタノールによる阻害効果および酪酸による活性効果をモデルに導入し、さらにグルコース枯渇後にエネルギー依存的な代謝反応が停止するモデルを構築したところ、モデルによる計算値は初発グルコース濃度36.1-295 mMにおける実験値と定性的に一致した ($r^2 = 0.901$)。このような広範囲の初発グルコース濃度におけるABE発酵の動的モデル化は世界で初めてであった（図3、p.5掲載）。さらに、ブタノール生産の律速経路を調べるために、構築したモデルのそれぞれの反応速度式の数値パラメータ ($V_{\max}$, K_m , K_i など) を5%ずつ変化させる感度解析を行い、ブタノール生産への影響を検討した。その結果、酪酸生産の逆経路はブタノール生産を正に制御し、CoAトランスフェラーゼを介した酪酸再同化経路はブタノール生産を負に制御していることが明らかとなった²⁴⁾。また、キシロース代謝におけるABE発酵の動的代謝モデル化にも成功した²⁵⁾。なお、詳細については、最新の総説²⁶⁾を参照してほしい。

一方、乳酸発酵についても代謝経路が複雑なものがあり、その動的代謝モデルの構築に乗り出した。*Lactococcus lactis* IO-1によるキシロースからの乳酸発酵では、ホモ発酵 (pentose phosphate (PP) 経路) およびヘテロ発酵 (phosphoketolase (PK) 経路) の二つの代謝経路がキシロース濃度により代謝流束が変化する複雑な代謝機構を有している（図4）²⁷⁾。我々はすでに化学量論式より構成される静的代謝モデルを構築し、代謝流束解析に使用していた²⁸⁾。WinBEST-KITを用いて、この発酵の動的代謝モデル化を行い、生産される乳酸の最終濃度について感度解析を行った結果、ピルビン酸代謝のpyruvate dehydrogenase, pyruvate-formate lyase, lactate dehydrogenaseがキー代謝経路と予測でき、酵素活性測定によって実験的にも証明した²⁹⁾。なお、IO-1株の全ゲノム解析から、PP経路のキー酵素であるtransaldolase遺伝子が欠損しているが、バイパス経路が働いてホモ発酵を行っていることが示唆されている^{30,31)}。

これらの成果は、実験非依存的にターゲット遺伝子を予測できるだけでなく、発酵制御の手がかりとなり、さらに、代謝工学分野などに大きな影響を与えたエポックメイキング研究と思われる。

6. デザインドバイオマス研究

6-1. 起 さて、バイオリファイナリー研究では、“バイオマス”は発酵研究者にとって一般に発酵原料と認識されている。私が発酵工学研究を始めた頃、バイオエタノール生産は非可食バイオマス（廃棄物・残渣、未利用資源などを含む）を発酵原料とする研究が盛んに行われ

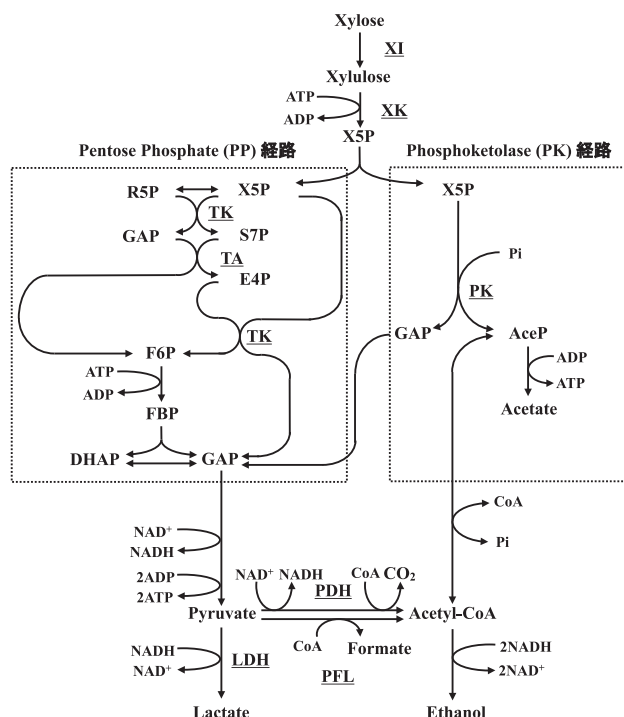


図4. 乳酸菌におけるキシロース代謝経路。代謝物：AceP, acetyl phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate; FBP, fructose 1,6-diphosphate; F6P, fructose 6-phosphate; GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; X5P, xylulose 5-phosphate。代謝酵素：XI, xylose isomerase; XK, xylulokinase; TK, transketolase; TA, transaldolase; PK, phosphoketolase; PDH, pyruvate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate-formate lyase。

ていた。他のバイオ燃料やバイオマテリアルの生産でも同様な研究戦略であった。当時、私もこのような時代背景を意識して、前述してきたように、ABE発酵や乳酸発酵について、非可食バイオマスに含まれるキシロース、バイオマスのカスケード利用による有機酸、などから効率的な生産システムの構築を行っていた。一方では、地域の農産物や農産廃棄物を発酵によって賦活化する産学官連携プロジェクト（地域の一次産業の活性化事業などニーズオリエンテッドなプロジェクト）にかり出されることが多く、常にそれら“バイオマス”を直接あるいは前処理して発酵原料とし、機能性物質（特に食品機能性物質）を生産する微生物の探索・分離を担当していた。これらのプロジェクトでは、優れた微生物単離が律速となりやすく、分離が成功しなければ、次の担当者が研究できない、次のステップに進めないというプレッシャーがいつも付きまとっていた。

6-2. 承 これまでバイオリファイナリー研究は、非可食バイオマスの発酵原料への効率的かつ経済的な変換（非可食バイオマスの前処理・酵素糖化技術）、および発酵微生物の代謝強化などによる改変・創製（発酵微

生物の分子育種技術）が主なものである。我が国でも各省庁が連携して活発に研究を行っているが、実用化・商業化レベルでは米国などに遅れを取っている。

私は約10年前、本会のバイオリファイナリー研究関連のシンポジウム世話人を務めた際、次のようなことを述べている。『バイオマスの戦略的活用では、バイオマスの多様性に基づく創造的な「デザイン」が求められている。我々は、応用微生物学におけるスクリーニングからエンジニアリング関連技術をこの「デザイン」にいかに関活用すべきかという観点から、乳酸発酵によるポリ乳酸素材の光学活性乳酸を効率的に生産する研究を進めている。』そして、具体的な成功事例として、以下の二つを紹介している。

- ①キシラン・キシロオリゴ糖からD-乳酸の生産³²⁾
- ②デンプンからの直接L-乳酸生産³³⁾

そして、最後に、『さまざまな高分子多糖を資化する乳酸菌のスクリーニングや発酵プロセスのエンジニアリングはさらに発展させる必要がある。一方、発酵基質そのものの改変・デザイン化を目指した「デザインドバイオマス」は微生物によるバイオマスの利活用にとって必要な要素技術となるであろう。』と締めくくっている³⁴⁾。

すなわち、私は上記の成功事例から、今後の研究にとって重要な知見を得ていた。以下に簡潔に示す。

- ①発酵原料のキシロオリゴ糖（キシロピオースからキシロヘキサオース）の細胞内への輸送が各オリゴ糖からの乳酸生産性を支配していた。取り込まれたオリゴ糖は細胞質画分に局在しているβ-キシロシダーゼによって迅速にキシロースに変換されていた。
- ②デンプン資化性乳酸菌のうち、分泌されたアミラーゼの活性が一番低い*Enterococcus faecium* No. 78株が乳酸生産性に優れていた。また、デンプンが分解されてできる還元糖の蓄積が一番少なかった（図5）。さらに、各乳酸菌が分泌するアミラーゼ特性を調べた結果、No. 78株ではデンプンがほとんどマルトースに分解され、他の2株ではグルコース、マルトース、マルトオリゴ糖が混在していた。

上記①、②の知見などから、オリゴ糖や多糖からの乳酸発酵は、発酵菌が取り込む（輸送する）糖について特異性があり、その取込みが発酵を支配する可能性があることをつかんだ。また、取り込む糖は単糖が優れているとは限らないかもしれない。すなわち、非可食バイオマスの酵素などによる完全糖化は発酵菌によっては不要あるいはマイナスかもしれない。この他にも、このinspirationを補強する示唆に富む事例があるが、ここでは割愛する。

最後のinspirationの機会は、偶然訪れた。私は教授就

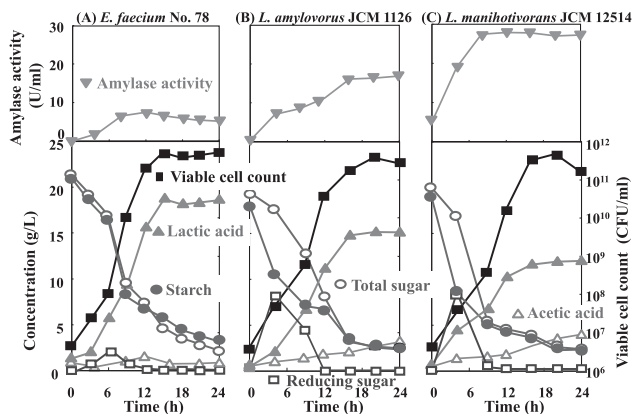


図5. デンプン資化性乳酸菌によるサゴデンプンからの直接L-乳酸生産とアミラーゼ活性

任後、「微生物工学」の講義を担当することとなり、石崎先生が翻訳された「発酵工学の基礎」(学会出版センター)を引き続き教科書として使用した。この本は、他の応用微生物学関連の成書と比べて優れた点が多々あるが、端的に言えば、発酵微生物を実際に工業化した企業関係者が実験室から工場に至る過程を想定して執筆したことがあげられる。「第3章 工業微生物の分離、保存および育種」で、目的の“工業用”微生物の分離法が詳細に紹介されている。その中で、何気ない表現『カタボライトリプレッションを起こさないよう炭素源や窒素源は容易に資化される型(グルコースやアンモニア)で与えない』が表の一文にあった。微生物学を専門とする方にとって当たり前のことであるが、私は当初、乳酸発酵などの微生物のスクリーニングで、最初の集積培養の段階では、ほとんど単糖(ヘキソースやペントース)を炭素源として使用していた。将来、問題点となるカタボライトリプレッションのことまで想定して研究していなかった。

6-3. 転 私は約20年前に“デザインドバイオマス”という言葉は植物育種学分野の講演を聴いて知っていた。植物学者が従来の品種改良技術だけでなくさまざまな植物分子育種技術を開発・駆使して新たな植物のデザイン化をめざすものであった。主な目的は、最終産物である植物機能の高度化と植物由来物質の最適化などである。最近では、ゲノム編集技術の導入も行われ始めていることは周知の通りである。

私はバイオマスを発酵原料として使用する発酵工学研究者の立場から、新たな概念として『デザインドバイオマス』(発酵微生物の能力が最大限利用できるようにデザインされた適合物質)を提唱してきた^{16,35,36)}。上記の植物学者のキャッチコピーと同じ文言となるが、植物バイオマスの創出デザイン、そしてそのバイオマスの発酵

原料としての改変デザイン、前述したカスケード利用による適合物質の探索アプローチなどすべてを含む“ネオデザインドバイオマス”ともいえる新たな概念である。

バイオマスから有価物を得るためのバイオプロセスにおいて、従来研究では最初に発酵原料に用いるバイオマスを決定した(提示された)後、優秀微生物の分離・育種や優秀微生物による効率的発酵プロセスの構築を行うことが多い。新たなアプローチであるデザインドバイオマス研究では、まず、これまで得られてきたさまざまな知的財産物・技術(優秀微生物や効率的発酵プロセス)に適するように基質の改変、あるいは入手が容易な有機酸類やグリセロールなど基質の探索を行う。次に、得られたデザインドバイオマスをを用いて『適応型発酵プロセス』の構築を目指す(図6)。

周知のように、リグノセルロース系バイオマスはもともと賦存量が大きく安定供給が可能であり、それを発酵原料とするバイオリファイナリー研究が活発に行われている。しかし、下記のようにいくつかの課題を克服しなければならない。

課題① 原料となるバイオマスの選択と前処理：主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンの組成が植物種、ロット、部位、採取時期で大きく異なる³⁵⁾。バイオマスの選択と省エネルギー型前処理が、その後の発酵工程で用いる糖組成を決め、発酵挙動に大きな影響を与える。

課題② 糖化阻害：セルロースの糖化では、生成した糖類(特にグルコース)による糖化酵素フィードバック阻害が起こり、その結果、糖化効率が低下するためにさらなる糖化酵素(特に β -glucosidases (β -G))の投与が必要となる。

課題③ 発酵阻害：前処理・糖化処理されたものは分

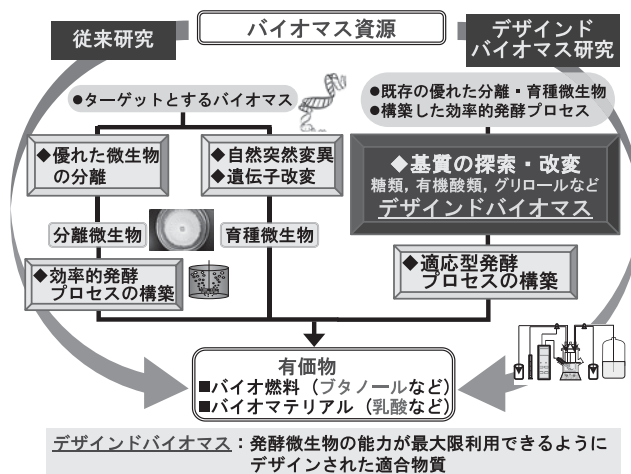


図6. デザインドバイオマス研究の概念図

別しない限りヘキソースとペントースの混合糖となる。混合糖の発酵ではカーボカタボライト抑制 (CCR) が起こりやすい。たとえば、グルコース存在下で他の糖 (キシロースなど) の消費が阻害される。

課題④ 発酵生産性: 発酵原料としての混合糖を用い、『適応型発酵プロセス』を構築して、目的に適う高い発酵生産性を達成する。

私は、上記の課題に対処できる“パラダイムシフト”を起こしたいという思いがあった。

6-4. 結 光学活性乳酸を生産するための乳酸発酵では、リグノセルロース系バイオマスに由来するヘキソースとペントースから成る混合糖を発酵原料とする場合、さらに課題が増す²²⁾。

課題⑤ ペントース資化: ペントースを資化する乳酸菌が必要である。

課題⑥ ホモ発酵: 糖源にかかわらず副産物を生じない。一般に、乳酸菌はペントース資化ではPK経路によってヘテロ発酵を示す。

課題⑦ 乳酸の光学純度: 可能な限り高い純度 (>99%) が望ましい。

課題⑧ 省エネ・省工程・低コストの発酵: 一般に、乳酸菌の最適発酵温度は30°C位である。故に、耐熱性あるいは高温菌であることが望ましい。また、貧栄養培地でも高い発酵能を示すことも重要である。

私は、上述の課題①~⑧すべてに応える優秀微生物や効率的発酵プロセスなどを持ち合わせていなかった (図7)。故に、課題①を踏まえ、組成の異なる広範なりグノセルロース系バイオマスに対応できる適合乳酸菌 (ス

マート microbe) の必要性を感じ、約10年前にその分離に乗り出した。その時の主要な戦略は、ヘキソースの単糖 (たとえばグルコース) を使用しないことであった。これは、「6-2. 承」で述べた inspiration が土台となっている。特に、課題③のCCRを回避するためには必須であると考えた。グルコースとキシロースから成る混合糖 (GX混合糖) の場合、グラム陽性細菌のCCRでは、phosphotransferase system (PTS) がグルコース輸送時にグルコースをリン酸化し、histidine-containing protein kinase (HPrK) によるHPrのリン酸化を誘起し、リン酸化HPrがcatabolite control protein A (CcpA) と複合体を形成して、キシロース代謝に関わる酵素遺伝子の転写調節を行うことが報告されている。また、リン酸化HPrがキシロースの輸送を阻害することもある。

最初のスクリーニングは、40°Cで、セロビオースとキシロースをそれぞれ資化する乳酸菌を求めた。その後のスクリーニングの結果、光学純度99.9%でL-乳酸をホモ発酵生産する *Enterococcus mundtii* QU 25の分離に成功した。QU 25株の主な特性は以下の通りで、上記の課題をすべて克服できると思われる³⁷⁾。

- A) 43°Cが最適発酵温度で、50°Cでも生育できる高温発酵菌であった³⁸⁾。
- B) セロビオースはじめセロオリゴ糖を資化できた³⁸⁾。
- C) キシロースやキシロオリゴ糖を資化できた³⁹⁾。
- D) 高濃度キシロースでホモ乳酸発酵を示した³⁹⁾。
- E) GX混合糖を基質とする場合、単糖の濃度を制御することによって、CCRを回避しながら流加培養に成功した (2016年度生物工学論文賞)⁴⁰⁾。

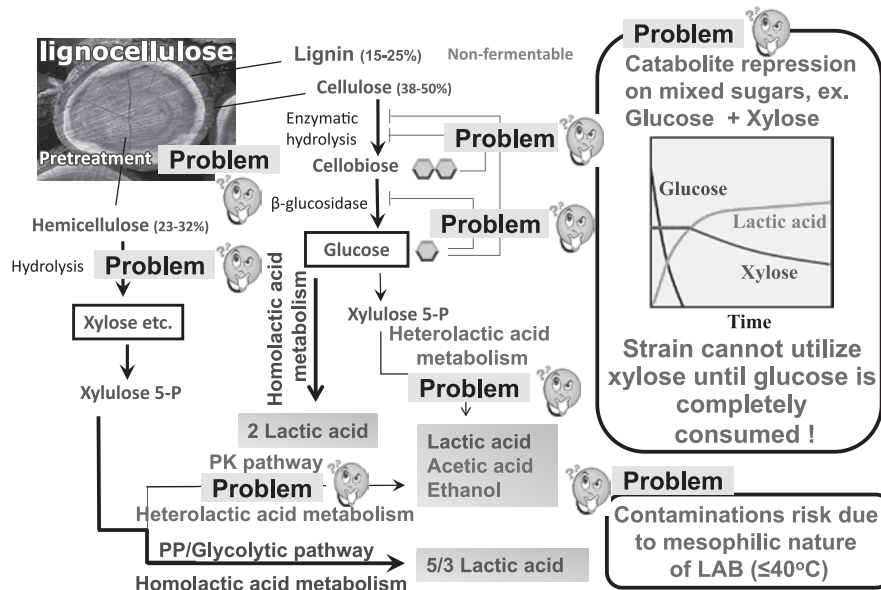


図7. リグノセルロース系バイオマスから高効率・高収率で光学活性乳酸を生産する問題点

F) セロビオースとキシロースから成る混合糖 (CX 混合糖) を使用すると, GX 混合糖に比べて容易に CCR の完全回避ができた。また, 資源作物であるエナジーケーンの加水分解物を想定した混合糖 (グルコース 10 g/L / セロビオース 80 g/L / キシロース 40 g/L) を用いた流加培養で高乳酸生産を達成した (図 8)⁴¹⁾。

G) 150 時間以上の長時間安定した非殺菌・開放・繰り返し発酵 (10 回以上) で高乳酸生産 (各 100 g/L 以上) に成功した。また, 貧栄養培地 (低コスト培地) も使用できた⁴²⁾。

この中で, D) のキシロース濃度によるヘテロ発酵とホモ発酵の代謝転換について, 高濃度キシロースでは, PK 経路が停止し, PP 経路の代謝流束が増大することにより, QU 25 株によるホモ発酵が可能となることが明らかとなった。QU 25 株の全ゲノム解析⁴³⁾の結果, 二つのクラスター (キシロースに関する輸送 (キシローストランスポーター)・上流の代謝酵素 (xylose isomerase [XI], xylulokinase [XK])・抑制因子などから成るクラスターと PP 経路の代謝酵素から成るクラスター) が染色体上で隣接して存在する一方, PK 経路の代謝酵素はクラスターを形成せずに分散していることが明らかとなった。また, 比較ゲノム解析では, QU 25 株は ABC transporter, PTS の遺伝子数が近縁種よりも多く, 高い糖輸送能を持つことが示唆された。さらに, 最近では, キシロースを基質として用いてホモ発酵を維持しながら, 高密度菌体による連続高効率乳酸発酵にも成功している⁴⁴⁾。この際, 残存する (発酵槽から出てくる) キシロース濃度を低く抑えることも重要な要求項目であった。

E) の GX 混合糖を基質とする場合, 選択すべきリグノセルロース系バイオマスは, 葉類やギョウギシバ類などセルロースよりもヘミセルロース含有比が大きいものが適している (課題①)。高濃度グルコースがキシ

ロース代謝の上流酵素 (XI, XK) の活性を抑制して CCR を生じていた。また, ゲノム情報を活用した RNA sequencing などによる転写解析によってもこれらの遺伝子の転写制御を明らかにした⁴⁵⁾。

F) の CX 混合糖でのセロビオースが CCR によるキシロース消費阻害を回避できるメカニズムは, セロビオースが 100 g/L と高濃度であっても, グルコース 100 g/L と比べてキシロース代謝の上流酵素 (XI, XK) 活性が 3 倍程度大きく CCR が回避され, かつ細胞膜に局在する β -G の発現誘導により, セロビオースとキシロースが同時に消費されることが示唆された。セロビオースなどオリゴ糖の利用はセルロース糖化工程のコスト削減につながる (課題②)。

このような特徴を有するスーパー乳酸菌 QU 25 株により期待できる効果は下記の通りである。

- ・非食用バイオマスの前処理工程の簡略化・コストダウン
- ・セルロースの酵素糖化プロセスの簡便化・コストダウン
- ・非食用バイオマスからの L-乳酸収率の実質的な向上
- ・非殺菌・開放・非冷却・繰り返し・貧栄養培地使用発酵によって, ①発酵槽の付帯設備の必要性およびエネルギー消費の低下, ②発酵工程の単純化と労力の削減, ③原料費の削減, などが可能

さらに, 上述したスクリーニング手法により次々と優秀な産業用の微生物が分離されており, たとえば, QU 25 株よりも高い最適発酵温度 (50°C) で高い L-乳酸生産性を示し, かつ低濃度のキシロースでもホモ発酵特性を示すハイパー乳酸菌 *Enterococcus faecium* QU 50 の分離にも成功している⁴⁶⁾。QU 50 株は CX 混合糖のみならず GX 混合糖でも CCR を回避することができた。さらに, 混合糖を用いた 50°C・非殺菌・開放条件下での繰り返し発酵で非常に高い操作安定性と高速発酵を達成できた⁴⁷⁾。

一方, ABE 発酵を行う *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 はキシロースやアラビノース, セロビオースなどリグノセルロース系バイオマスを構成する糖を利用できることが明らかとなっている¹⁸⁾。そこで, この特徴を活かして N1-4 株を適合微生物とし, CX 混合糖を用いて CCR を回避したブタノール生産系をめざした発酵工学的アプローチ研究を行った (2014 年度生物工学論文賞)⁴⁸⁾。その結果, 回分・流加培養でセロビオースおよびキシロースの同時消費, すなわち, 野生株による CCR を回避した効率的なブタノール生産に世界で初めて成功した (図 9)。その際, セロビオース/キシロース比は 1:1 が最適であった。また, CCR 条件 (GX 混合糖)

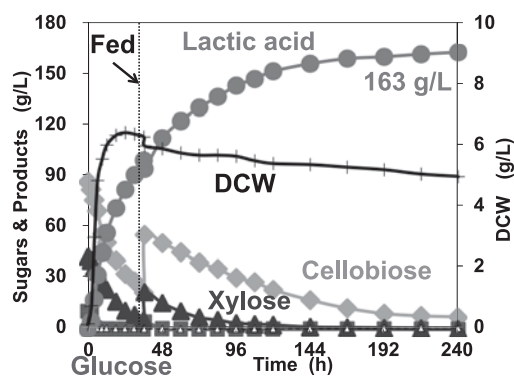


図 8. エナジーケーンの加水分解物を想定した混合糖を用いた流加培養

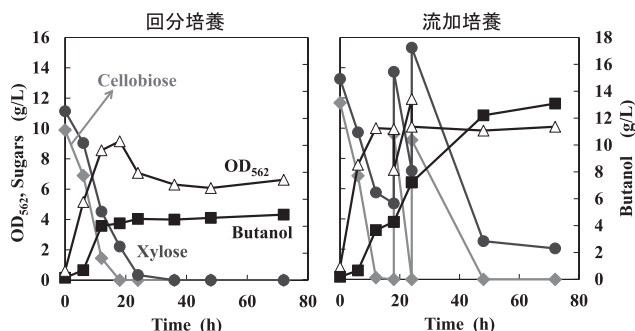


図9. セロビオース/キシロース混合糖を用いた回分・流加培養でのブタノール生産

と非CCR条件（CX混合糖）のキシロース代謝関連酵素XIの活性は、後者が約3倍高いことを見いだした。さらに、転写解析で、CX混合糖を用いた場合に観察されるCCR回避機構では、セロビオースの非PTS系輸送体であるパーミアーゼと菌体内 β -グルコシダーゼを介したバイパス経路の利用、そしてCCRのキー酵素遺伝子*hprK*（前出）の発現抑制が重要な要因であることを示唆している。

これまで、我々は、グルコースあるいはキシロースを単一の炭素源としたcell recycling法による高密度連続発酵によるブタノールの高効率生産を報告した^{49,50}。特に、キシロースを発酵原料としたABE連続発酵は初めての報告であった。しかし、混合糖を用いた連続ブタノール生産に関する報告はあるが、いずれもCCRによる糖消費率の低下が認められ、効率的な発酵プロセスの実現には至っていない。すなわち、CCRによってグルコース以外の糖が未利用のまま廃棄されることが報告されている。混合糖を用いた連続培養で高い物質生産性を実現するには、培地中の糖濃度が一定となる定常状態でのCCR回避、すなわち混合糖中のすべての糖の同時消費が不可欠である。そこで、次に、混合糖を用いながらCCRを回避した高効率連続ブタノール生産系の構築を試みた⁵¹。CX混合糖（組成比1:1）とcell recyclingによる高密度菌体を用いた連続発酵系で検討した結果、約 0.7 h^{-1} の高希釈率でも混合糖の同時消費と高い糖消費率を維持しながら、通常の連続培養と比較して7倍以上のブタノール生産性を達成した（ 5.50 g/L/h ）。一方、GX混合糖を用いるとCCRが起り、ブタノール生産性が低下するだけでなく、消費されない糖の廃棄率が高くなった。

このように、ABE発酵でもCX混合糖を用いることにより、回分培養、流加培養、そして連続培養でCCRを回避した効率的なブタノール生産のための適応型発酵プロセスを構築することができた。これらの結果は、リ

グノセルロース系バイオマスターゲットとする新規糖化プロセスや植物育種、すなわちデザインバイオマスの創生に有用な知見となり得る。この他、適応型発酵プロセスの構築例として、乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換にも成功した（2009年度生物学論文賞，2009年度生物工学技術賞）⁵²。

7. そしてスマート発酵工学への展開

私は酵素工学でも発酵工学でも、研究を進める際に、常にそれらの領域における新しい原理・原則・理念の発見、発明、構築などを目指す姿勢を取ってきた。既成概念の“未常識”部分を入念な準備と“ひらめき”そして“切り口”によって開拓するという産みの苦しみを楽しんできたような気がする。これらの研究成果が実学研究そして産業化に貢献すれば良いと考えてきた。もちろん、たとえばバイオリファイナリー研究では即産業化を考えるなら、最初から実際のバイオマスを使用して研究を行う方が貢献できるかもしれない。しかし、大学における研究は前者がより重要・インパクトがあり、結局は大きな貢献をできると学生時代からたたき込まれてきた“三つ子の魂百まで”に由来すると思われる。過去に、ユーカリのような実バイオマス⁵³や食品廃棄物⁵⁴⁻⁵⁷などからのバイオ燃料・バイオマテリアル生産を行ってきたが、まだ前述したようなアプローチを導入していなかった。しかし、最近、稲わらを酵素糖化不完全処理によって得たデザインバイオマスを利用した結果、N1-4株のABE発酵能を高め、投与酵素当たりのブタノール収率が向上することが分かった⁵⁸。

さて、今回の受賞研究は、生物工学会に所属していなければなし得なかったと思われる。すなわち、生物工学会の多様な研究分野のアプローチに学び、それらを自分なりにデザインして発酵工学研究に活用することができたからである。受賞研究に取り組んで10年余り、長年どっしりと一つの研究に専念してきた先生方から見ればまだまだ不十分な成果と痛感している。

我々が提唱するデザインバイオマス構想は微生物の発酵特性を最大限活用できるような基質の選択、創出を目標としている。本成果を実バイオマスへ応用するためには、従来のバイオマス処理とは異なるアプローチ、すなわちグルコースをターゲットとする前処理、糖化処理を改変する必要がある。具体的には、セロビオースやセロオリゴ糖の選択的な獲得を実現する前処理、糖化処理法の条件や糖化酵素の探索が求められる。セロオリゴ糖を多く含むような少々「粗い」加水分解は、糖化酵素投入コストを減らし、同時糖化発酵の温度を発酵微生物の生育至適温度に設定できるだけでなく、バイオマス構成

スマート発酵工学

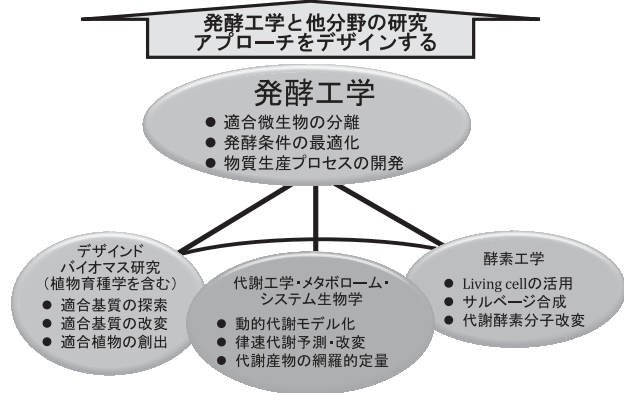


図10. スマート発酵工学の概念図

糖に対して幅広い資化能を有する微生物や育種菌株ライブラリーを最大限活かすことにつながると考えている。

さらに我々は、デザインドバイオマス研究を積極的に推進し、かつ諸問題を有機的に解決するために、発酵工学、分子微生物学、代謝工学・メタボローム・システム生物学、酵素工学および植物育種学の研究者らによる学際的連携からなる“スマート発酵工学”を展開している(図10)⁵⁹⁾。たとえば、発酵工学分野で得られた知見を植物育種学分野と分子生物学分野に提供(フィードバック)し、発酵に適応するように育種(デザイン)したバイオマスおよび微生物を創生(フィードフォワード)する。その結果、発酵生産プロセスの効率化まで視野に入れた適合植物バイオマスの創出戦略(e.g. 少糖化を目的とした糖化酵素の植物体での発現やセルロース、ヘミセルロース含量の制御)や糖化戦略(e.g. β -G糖化工程を省略した新規糖化プロセスの検討)、微生物育種戦略(e.g. 少糖取り込み能力や代謝の強化)といった展開が期待できる。このように、発酵工学と他分野の研究アプローチを階層的にデザインすることによって、スマート発酵工学の基盤研究を精力的に行いつつある。

謝 辞

私の研究履歴と今回の受賞研究に至った経緯と内容を述べてきましたが、多くの方々に支えられ研究生活を送ってきた、と感懷を抱いています。その研究履歴の変遷において幾人かのすばらしいキーパーソンに恵まれました。そして、この度の受賞研究は、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門システム生物学講座微生物工学研究室で行ってきたものです。まず、私に発酵工学研究の考え方などをご教授いただいた石崎文彬先生(九州大学名誉教授)に心より感謝申し上げます。また、本研究は同研究室の中山二郎准教授、善藤威史助教のご協力がなければならなかったものであり、深甚なる謝意を表します。紙面の関係上、すべての研究を紹介できませんでしたが、実に多くの卒業生および在校生の努力の賜

物と思います。各位に厚く感謝します。また、同じ講座で土壌環境微生物学研究室の酒井謙二教授、田代幸寛准教授には発酵工学研究などで、吉川博文教授(東京農業大学)、門多真理子教授(武蔵野大学)には乳酸菌のゲノム解析や転写解析でご協力いただきました。ここに御礼申し上げます。すでにお名前をあげた先生方以外に、メタボローム、代謝工学、酵素工学、システム生物学など多くの分野の共同研究者、そして研究アプローチをご教授いただいた方々に感謝申し上げます。本研究成果は、文部科学省、経済産業省、農林水産省などによる多くの研究支援によるものです。関係の皆様、共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

最後になりますが、ヘテロな方々と杯を交わし合い、気宇壮大な夢を描くことができる生物工学会の発展のために今後も微力を尽くす所存です。

文 献

- 1) 園元謙二, 田中渥夫: 醗酵工学, **61**, 153–172 (1983).
- 2) 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二: 日本乳酸菌学会誌, **25**, 24–33 (2014).
- 3) Islam, M. R., Nagao, J., Zendo, T., and Sonomoto, K.: *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, 1528–1533 (2012).
- 4) 石崎文彬: 生物工学, **78**, 2–12 (2000).
- 5) 大城麦人, 田代幸寛, 園元謙二: 廃棄物学会誌, **19**, 271–277 (2008).
- 6) 田代幸寛, 園元謙二: 生物工学, **87**, 484–486 (2009).
- 7) 進藤秀彰, 園元謙二: バイオ液体燃料, p. 411–422, エヌ・ティー・エス (2007).
- 8) 青木義則, 沖田雅一, 星野貴由, 川口浩美, 党 正治, 石崎文彬, 園元謙二: エコバイオエネルギーの最前線—ゼロエミッション型社会を目指して—, p. 259–265, シーエムシー出版 (2005).
- 9) Tashiro, Y. and Sonomoto, K.: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Microbiology Book Series, Volume 2)*, 1383–1394 (2010).
- 10) Tashiro, Y., Yoshida, T., Noguchi, T., and Sonomoto, K.: *Eng. Life Sci.*, **13**, 432–445 (2013).
- 11) Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 1–9 (2015).
- 12) Tsuge, T., Tanaka, K., Shimoda, M., and Ishizaki, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 404–409 (1999).
- 13) Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 263–268 (2004).
- 14) Tashiro, Y., Shinto, H., Hayashi, M., Baba, S., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 238–240 (2007).
- 15) Baba, S., Tashiro, Y., Shinto, H., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **157**, 605–612 (2012).
- 16) 田代幸寛, 吉田剛士, 園元謙二: 化学と工業, **63**, 894–896 (2010).
- 17) Oshiro, M., Hanada, K., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1177–1185 (2010).
- 18) Yoshida, T., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 526–530 (2012).
- 19) Gao, M., Tashiro, Y., Yoshida, T., Zheng, J., Wang, Q., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *RSC Adv.*, **5**, 8486–8495

- (2015).
- 20) Gao, M., Tashiro, Y., Wang, Q., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 176–182 (2016).
 - 21) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *Biotechnol. Adv.*, **31**, 877–902 (2013).
 - 22) Abdel-Rahman, M. A. and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **236**, 176–192 (2016).
 - 23) Yoshimura, J., Shimonobou, T., Sekiguchi, T., and Okamoto, M.: *Chem-Bio. Inform. J.*, **3**, 114–129 (2003).
 - 24) Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **131**, 45–56 (2007).
 - 25) Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., and Sonomoto, K.: *Process Biochem.*, **43**, 1452–1461 (2008).
 - 26) 田代幸寛：生物工学, **93**, 130–138 (2015).
 - 27) Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Hall, S. J., and Stanbury, P. F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 160–167 (2002).
 - 28) Ohara, H., Owaki, M., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 92–94 (2007).
 - 29) Oshiro, M., Shinto, H., Tashiro, Y., Miwa, N., Sekiguchi, T., Okamoto, M., Ishizaki, A., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 376–384 (2009).
 - 30) Kato, H., Shiwa, Y., Oshima, K., Machii, M., Araya-Kojima, T., Zendo, T., Shimizu-Kadota, M., Hattori, M., Sonomoto, K., and Yoshikawa, H.: *J. Bacteriol.*, **194**, 2102–2103 (2012).
 - 31) Shimizu-Kadota, M., Kato, H., Shiwa, Y., Oshima, K., Machii, M., Araya-Kojima, T., Zendo, T., Hattori, M., Sonomoto, K., and Yoshikawa, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1804–1808 (2013).
 - 32) Ohara, h., Owaki, M., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 415–420 (2006).
 - 33) Shibata, K., Flores, D. M., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 149–155 (2007).
 - 34) 柴田圭右, Amira Mohsen El-Sayed Hamdan, 小原仁実, 善藤威史, 園元謙二：生物工学, **86**, 222–225 (2008).
 - 35) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **156**, 286–301 (2011).
 - 36) Wang, Y., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 10–18 (2015).
 - 37) 田代幸寛, 園元謙二：日本乳酸菌学会誌, **25**, 155–165 (2014).
 - 38) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Shibata, K., and Sonomoto, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1039–1049 (2011).
 - 39) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Hanada, K., Shibata, K., and Sonomoto, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1892–1895 (2011).
 - 40) Abdel-Rahman, M. A., Xiao, Y., Tashiro, Y., Wang, Y., Zendo, T., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 153–158 (2015).
 - 41) Wang, Y., Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Xiao, Y., Zendo, T., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *RSC Adv.*, **4**, 22013–22021 (2014).
 - 42) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., and Sonomoto, K.: *RSC Adv.*, **3**, 8437–8445 (2013).
 - 43) Shiwa, Y., Yanase, H., Hirose, Y., Satomi, S., Araya-Kojima, T., Watanabe, S., Zendo, T., Chibazakura, T., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., and Sonomoto, K.: *DNA Res.*, **21**, 369–377 (2014).
 - 44) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *RSC Adv.*, **6**, 17659–17668 (2016).
 - 45) Yanase, H., Araya-Kojima, T., Shiwa, Y., Watanabe, S., Zendo, T., Chibazakura, T., Shimizu-Kadota, M., Sonomoto, K., and Yoshikawa, H.: *RSC Adv.*, **5**, 93283–93292 (2015).
 - 46) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, 1–7 (2015).
 - 47) 沼口真緒, Tan Jiaming, Mohamed Ali Abdel-Rahman, 田代幸寛, 善藤威史, 酒井謙二, 園元謙二：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 322 (2016).
 - 48) Noguchi, T., Tashiro, Y., Yoshida, T., Zheng, J., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 716–721 (2013).
 - 49) Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **120**, 197–206 (2005).
 - 50) Zheng, J., Tashiro, Y., Yoshida, T., Gao, M., Wang, Q., and Sonomoto, K.: *Bioresour. Technol.*, **129**, 360–365 (2013).
 - 51) 木原隆寛, 野口拓也, 田代幸寛, 酒井謙二, 園元謙二：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 322 (2015).
 - 52) Furuta, Y., Maruoka, N., Nakamura, A., Omori, T., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 393–397 (2008).
 - 53) Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *Appl. Energy*, **140**, 113–119 (2015).
 - 54) Liu, J., Wang, Q., Wang, S., Zou, D., and Sonomoto, K.: *Biosyst. Eng.*, **112**, 6–13 (2012).
 - 55) Wu, C., Wang, Q., Yu, M., Zhang, X., Song, N., Chang, Q., Gao, M., and Sonomoto, K.: *Appl. Energy*, **155**, 846–853 (2015).
 - 56) Ma, H., Yang, J., Jia, Y., Wang, Q., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *Bioresour. Technol.*, **209**, 254–258 (2016).
 - 57) Ma, H., Yang, J., Jia, Y., Ma, X., Wang, Q., and Sonomoto, K.: *Bioresour. Technol.*, **218**, 463–468 (2016).
 - 58) Zhao, T., Tashiro, Y., Noguchi, T., Zheng, J., Sakai, K., and Sonomoto, K.: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 298 (2016).
 - 59) 野口拓也, 田代幸寛, 園元謙二：バイオサイエンスとインダストリー, **71**, 530–532 (2013).