

2018年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



好熱性酵素を用いた 細胞外人工代謝経路の構築と 利用に関する先駆的研究

本田 孝祐



In vitro reconstitution of synthetic metabolic pathways using thermophilic enzymes

Kohsuke Honda (*Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*) *Seibutsu-kogaku* **97**: 115–121, 2019.

はじめに

1897年、Buchnerは、酵母の無細胞抽出液によってもエタノール発酵が生じることを見だし、微生物発酵に生きた細胞は必ずしも必要とされないことを示した。この発見は、生気論 (vitalism, 生命には非生物にはない特別な機能が備わるとする学説) をめぐる論争に終止符を打ち、酵素学、代謝学という新たな学問分野の扉を開いた。1907年、この業績により、ノーベル化学賞を受賞したBuchnerは、授賞講演でこう述べた。

“We are seeing the cells of plants and animals more and more clearly as chemical factories.”

数多くの化学反応が同調的に進行し、多種多様な物質が生み出される生物の代謝のありさまは、確かに化学工場における化成品生産を見るようでもある。しかし、生物と化学工場の間には、そのサイズの違いに加え、もう一つ決定的な物理的差異がある。それは多数の化学反応を履行するために必要とされるコンパートメント (反応容器などの仕切られた反応場) の数である。有機化学的な合成反応では多くの場合、1ステップの反応に一つの反応容器が要され、ステップごとに生産物の分離・精製が必要となる。これに対し、生物の細胞は、オルガネラという限られた数のコンパートメント内で数千に及ぶ反応を平行に履行可能であり、原核生物に至ってはもはや細胞という単一のコンパートメントしか存在しない。常温・常圧に近い温和な条件下での高い反応速度や

優れた位置・立体選択性など、生体触媒を用いた化学品製造プロセス (バイオプロセス) には、化学プロセスにはないアドバンテージがあるとされる。これらに勝るとも劣らぬバイオプロセス特有のアドバンテージとして筆者は、多ステップからなる逐次反応をワンポットで実施可能な点をあげたい¹⁾。

好熱性酵素を用いた *in vitro* 代謝工学

たとえば、デンプン分解酵素 (α -amylase, glucoamylase) と glucose isomerase を組み合わせた異性化糖の製造は、現在までに産業利用されている生体触媒利用技術のうち、もっとも大規模なものであると同時に、ワンポットでの多段階反応の実施という上述のアドバンテージを活用した好例でもある。このように、2~4ステップ程度の酵素反応を組み合わせた有用化学品生産にはすでに多くの実用例が存在し、デンプン加工だけでも異性化糖のほか、シクロデキストリン製造やトレハロース製造などがあげられる。

同様のコンセプトに則り、さらに多数の酵素を組み合わせた逐次反応を設計・実施すれば、より多彩な化学品が製造可能となることは想像に難くない。しかし、これを実現するためには、数多くの酵素を単離・精製する必要がある。この操作の煩雑さをいかにして軽減するかという課題に直面する。この課題を解決するための方策として筆者らは、好熱菌に由来する酵素の優れた熱安定性に注目した。好熱性酵素が示す耐熱性はこれらの酵素

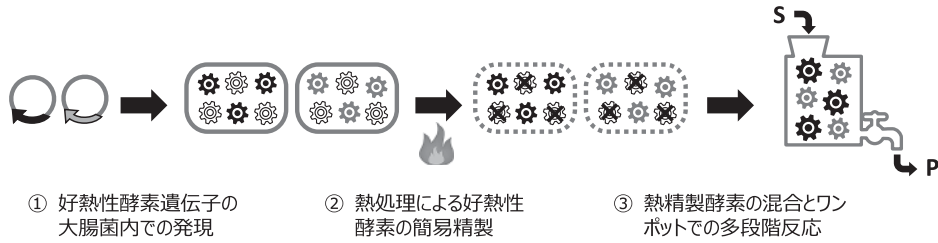


図1. 好熱性酵素を用いた *in vitro* 人工代謝経路構築のスキーム

分子の堅牢な構造，すなわちアミノ酸配列に起因する。したがって，遺伝子組換え技術を用いて，これらの酵素を中温菌（あるいは好冷菌）内で産生させたとしても，得られる組換え酵素は，好熱菌から取得されたそれと同等の耐熱性を示す。好熱性酵素を中温性宿主（大腸菌など）内で発現させた後，これらの無細胞抽出液を70～90°C程度の熱処理に供することで，宿主由来の夾雑酵素を変性させ，所望の好熱性酵素を高い純度で得ることができる。熱処理による組換え好熱性酵素の簡易精製は，これらの酵素を扱う研究者らの間で古くから利用されてきた手法である。同様に筆者らは，(i) 目的とする好熱性酵素を大腸菌内で発現させ，(ii) これらを熱精製に供した後に，(iii) 同一の反応容器内で混合することで，多数の酵素を簡便に精製，これらを用いた多段階反応をワンポットで実施することに取り組んだ(図1)。さまざまな酵素を人為的に組み合わせ，天然にはないカスケード反応を構築する本法は，生きた微生物の代謝経路を改変する代謝工学のアナロジーとしても理解できる。そこで本稿では，上記スキームによる多段階酵素反応のデザイン・構築と，それを用いた化学品製造技術を「*in vitro* 代謝工学」と称することとする。

ATPを作らない解糖系

生きた微生物の代謝経路を改変する既存の代謝工学では，微生物が自身の生育・生存のために生産したい代謝物と，我々が商業目的で生産したい代謝物との間に齟齬が生じるケースが少なくない。これに対し，生きた細胞を反応場としない *in vitro* 代謝工学では，宿主の生理活性に左右されることなく，物質生産のみに特化した人工経路を構築することが可能となる。一方，*in vitro* 代謝工学を含め，細胞から取り出した酵素を物質生産に利用する際にしばしば問題となるのは，補欠因子類の供給である。多くの酵素はその触媒活性を発揮するにあたり，補酵素などの補欠因子を要求する。代謝反応データベースであるKEGGに登録された約1万種の反応のうち，700種類を超える反応が，ATP，ADP，AMPの少なくともいずれか一つを要求する。また，酸化還元補酵素で

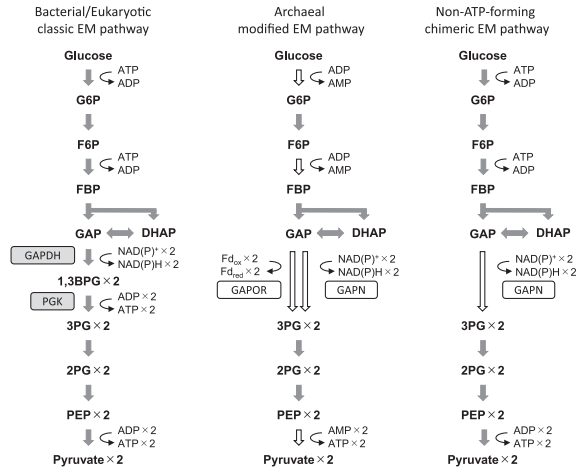


図2. 細菌・真核生物における一般的なEM経路(左)，一部のアーキアに見られる変形EM経路(中)，および本研究で構築したATP非生産性キメラ型EM経路(右)。変形EM経路に特徴的な酵素反応を白抜き矢印で示す。変形EM経路には，GAPNのほかフェレドキシン依存的にGAPの酸化を触媒するGAP ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) が存在する。

あるNAD(P)⁺，NAD(P)Hを必要とする酵素は2000種類以上にも及ぶ。これら補酵素類はいずれも高価な物質であることから，有用化学品の商業生産を目的に *in vitro* 人工代謝経路を構築する場合には，補酵素要求性の酵素反応を含まない経路を設計する，あるいは経路内での補酵素の消費と再生をバランスさせ，少量の補酵素をリサイクルしながら継続的に利用可能な経路をデザインすることが重要である。

たとえば，解糖系(Embden-Meyerhof経路，EM経路)の場合，グルコース1分子がピルビン酸2分子にまで酸化を受ける過程で，2分子のADPから2分子のATPが生産される(図2左)。すなわち，天然の解糖系を *in vitro* で再構築し，これを用いてグルコースからのピルビン酸製造を行おうとすれば，ピルビン酸1 mol(約1万5千円)あたり1 molのADP(約500万円)を損失することとなり，本製造法が経済的に成立しないものであることは自明である(価格はいずれもSigma Aldrich Japan オンラインカタログ2018より概算)。解糖系が担う重要な生理的役割の一つは，グルコースの自由生成エネルギーを生体

内のエネルギー通貨であるATPの形で抽出することである。したがって、天然に存在する解糖系酵素群を用いて、ATPを作らない(ADPを消費しない)解糖系を設計することは困難に思われるかもしれない。しかし、微生物の多様性はわれわれが思う以上に豊かである。たとえば、*Sulfolobus*属、*Thermoproteus*属などの超好熱性アーキアが有する変形Entner-Doudoroff経路では、ATPの生成を伴うことなくグルコースからピルビン酸への酸化が生じる²⁾。同じく超好熱性アーキアである*Thermococcus*属、*Pyrococcus*属に見られる変形EM経路(図2中)は、通常のEM経路と同様、2分子のADPを消費し2分子のATPを生産する一方、ADPをリン酸基ドナーとするkinaseや、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への変換に伴いAMPからATPへの2リン酸化を触媒するpyruvate synthaseなどユニークな補酵素特異性を有した酵素から構成される²⁾。このうち筆者らは、変形EM経路においてグリセルアルデヒド-3-リン酸(GAP)から3-ホスホグリセリン酸(3PG)への変換を触媒するnon-phosphorylated GAP dehydrogenase(GAPN)に注目した。通常のEM経路においてGAPは、リン酸依存型のGAP dehydrogenase(GAPDH)とphosphoglycerate kinase(PGK)の2段階の酵素反応により3PGへと変換され、この過程でGAP1分子あたり1分子のATPが生産される(図2左)。これに対し、GAPNはリン酸非依存的な酸化反応によりATPの生産を伴うことなくGAPを3PGへと変換する。したがって、通常型EM経路のGAPDH、PGKを変形EM経路由来のGAPNで置換することにより、ATP/ADPの消費と再生が釣り合った、すなわちATPを生産しないキメラ型解糖系が構築される(図2右)。筆者らは、本キメラ型解糖系に、NADH依存的にピルビン酸をL-乳酸へと還元する酵素(malate/lactate dehydrogenase)を組み合わせ、ATP/ADP間のバランスに加え、NAD⁺/NADH間の収支が釣り合った*in vitro*人工代謝経路を構築した³⁾。本経路を用いたL-乳酸生産試験では、各0.2 mMのATP、ADPを含む反応液中で、6 mMのグルコースが12 mMのL-乳酸へと変換され、この際のATPの回転数(リサイクルされた回数)は31と求められた。さらに筆者らは、本キメラ型解糖系を拡張、あるいはその一部を他の酵素に置き換えた*in vitro*経路を構築・駆動させることで、グルコースのほか、グリセロール、コロイド状キチンといった基質から、L-リンゴ酸、L-ブタノールなどの物質を生産することにも成功している^{4,7)}。

好熱性酵素遺伝子の人工オペロン化と共発現

ここまでで紹介した研究事例ではいずれも、経路を構

成する好熱性酵素を個別に調製、これらを任意の割合で混合することで*in vitro*代謝経路を構築してきた。個別に調製した酵素を混合して用いる場合、各酵素の添加量を実験的にチューニングし、目的物質の生産速度(=*in vitro*代謝経路の流束)を最大化することが可能となる。その反面、多数の酵素を個別に調製するためには、相応の手間と時間が要される。たとえば、10ステップの反応からなる人工経路を構築したければ、10種類の組換え大腸菌を別々に培養、それぞれの菌体より酵素精製を行わなければならない。こうなると、ワンポットでの多段階反応が実施可能という冒頭に述べたバイオプロセスの利点はなかば放棄されるに等しい。この問題を解決するには、経路を構成する一連の好熱性酵素を単一の大腸菌株内で共発現させ、一度の熱精製ですべての酵素をまとめて調製すれば良いことは容易に着想できる。しかしこの場合、大腸菌内(*in vivo*)での各酵素遺伝子の発現量と、*in vitro*で代謝流束を最大化させるための各酵素の最適量をいかにして合致させるかという別の課題が生じる。筆者らはこの課題に対し、好熱性酵素遺伝子群を単一プロモーター下に集積した人工オペロンを作製し、各遺伝子の*in vivo*での発現量を調整しつつ共発現させることで、その解決をはかった。一般に、単一プロモーター制御下でポリシストロニックに転写される遺伝子は、プロモーターからの距離が遠ざかるにつれ(オペロン中の配置順が後方に下がるにつれ)、その発現量が低下する。筆者らは、ATP非生産性キメラ型解糖系を構成する9つの好熱性酵素遺伝子を対象に、これらをmRNAの必要量に順じて集積した人工オペロンを作製した。このためにまず、(i)組換え大腸菌内で1ユニット当量の酵素を生産するために必要なmRNA量(copies mRNA/U enzyme)を各酵素について定量した。次に、(ii)*in vitro*代謝経路の流束を最大化させるための酵素濃度(U enzyme/mL reaction mixture)を別の実験で求め、(iii)この値と(i)で求めたmRNA量を乗じることで、*in vitro*経路構築に最適な各酵素の濃度をmRNA濃度(copies mRNA/mL reaction mixture)へと換算した。こうして求められた必要mRNA量に基づき、各酵素遺伝子のオペロン中での配置順を決定、これらを熱誘導型プロモーターの下流に集積した。なお、遺伝子の集積作業には、柘植らによって開発されたOGAB(ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*)法⁸⁾を用いた。構築した人工オペロンを導入した大腸菌内で各遺伝子の発現比率はおおむね予想どおりに調節されており、粗酵素抽出液を熱精製の後、SDS-PAGE解析に供したところ、目的の好熱性酵素群の発現を確認することができた(図3)。この熱精製粗酵素液を用いたグルコースからのL-

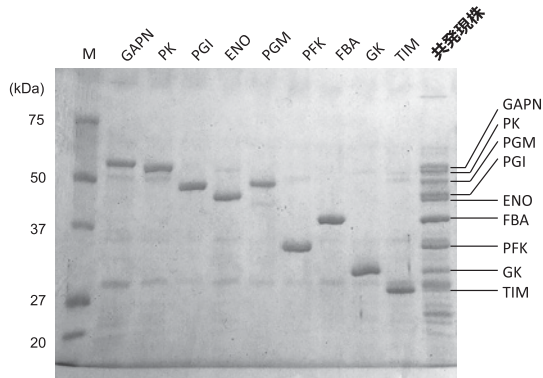


図3. キメラ型EM経路を構成する好熱性酵素を発現させた組換え大腸菌粗酵素液のSDS-PAGE解析. 図に示した各酵素, およびこれらの遺伝子を人工オペロンに集積共発現させた大腸菌 (それぞれ約1 mg wet weight) の粗酵素液を70°C, 30分間の熱処理に供したのち, 解析に供した. 各酵素の略称は以下のとおりとする: GAPN, non-phosphorylating GAP dehydrogenase; PK, pyruvate kinase; PGI, glucose-6-phosphate isomerase; ENO, enolase; PGM, phosphoglycerate mutase; PFK, 6-phosphofructokinase; FBA, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; GK, glucokinase; TIM, triosephosphate isomerase.

乳酸生産試験では, 個別に調製した酵素の混合液を用いた場合と同等以上の生産速度を得ることができている⁹⁾.

NAD⁺の*in vitro*サルベージ合成

好熱菌由来酵素を用いて人工代謝経路を構築する*in vitro*代謝工学では, 好熱性酵素の最適反応温度に近い高温条件 (50~70°C程度) で変換反応を行うことが望ましい. 多くの好熱性酵素はこのような高温条件下においても優れた安定性を示すことが知られているが, 実際にこれらを組み合わせて変換反応を行ったところ, 反応開始から数時間以内に目的生産物の蓄積が停止するケースがほとんどであった. 生きた細胞の代謝反応とは異なり, *in vitro*代謝経路は限定された数のコンポーネントのみから構成される. そこで筆者らは, 反応停止後の溶液に各コンポーネントを追添加し, 生産反応の回復をモニターすることで, 反応停止の原因となった因子の究明を行った. この結果, 酸化還元補酵素であるNAD⁺, NADHの追添加を行った場合のみ, 反応速度の回復が見られ, *in vitro*代謝反応の停止はこれらの物質の熱分解に起因することが明らかとなった. しかし, 先にも述べたとおり, これらの補酵素は高額な物質であり, 分解するからといって容易く追添加できるものでもない. 調べてみると, NAD⁺, NADHをはじめとするニコチンアミド補酵素が高温で不安定であることはよく知られた事実であり, ならばこれらの安定性を高めるため, すでに何らかの方策が講じられているのではないかと文献調査を続けたところ, 化学合成した安定なアナログ物質により天然のニコチンアミド補酵素を代替するという報告

を見いだすにいたった¹⁰⁾. しかし残念ながら, これらのアナログ物質を用いて得られる酵素反応速度 (k_{cat}/K_m) は, 天然の補酵素を用いた場合の1/10~1/1000程度と十分な値とは言いがたいものであった.

では, どうしたものかと思案するうちに, 筆者は次のような着想に至った.

「任意の好熱性酵素反応を自在に組み合わせられる*in vitro*代謝工学では, 原理上, 好熱菌が産生するあらゆる代謝物を生産することが可能である. そしてニコチンアミド補酵素もまた, 好熱菌が産生する代謝物の一つである. であれば, ニコチンアミド補酵素をその熱分解物より再合成 (サルベージ合成) 可能な*in vitro*代謝経路を構築すれば, これらの濃度を高温でも一定に保てるのではないか?」

この着想に基づき, 筆者らはNAD⁺を対象にその熱分解物を同定, 得られる熱分解物からのNAD⁺サルベージ合成に関わる酵素を調査した. 同定試験の結果, NAD⁺は加熱により, ニコチンアミドとADPリボースの間のC-N結合の切断を受け, これら2つの物質へと分解されることを確認した. 次に, ニコチンアミドとADPリボースからのNAD⁺サルベージ合成経路に関わる酵素を文献, データベースより探索したところ, 同経路は好熱菌のみならず多くの生物に保存されているものであることが判明した. 筆者らは, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoplasma acidophilum*といった好熱菌より各酵素遺伝子を取得, これら6つの好熱性酵素からなる*in vitro*代謝経路を構築した (図4). なお本経路では1分子のNAD⁺を再合成するため, 3分子のATPが消費され, 3分子のAMPが生じる. そのため経路には, 上記の6酵素に加え, *Thermus thermophilus*由来adenylate kinase, およびpolyphosphate kinase¹¹⁾を組み合わせた, ポリリン酸をリン酸基供与体とするAMPからATPへの再生反応を組み込んだ. これらの好熱性酵素群の存在/非存在下で60°CにおけるNAD⁺の残存濃度を経時的に定量したところ, 酵素群の非存在下ではおよそ6時間でNAD⁺濃度が半減したのに対し, 酵素が存在する場合, 約15時間にわたってNAD⁺の濃度を一定に保つことが可能であった¹²⁾. さらに筆者らは, これらのサルベージ酵素遺伝子群を前項に述べたスキームに則って人工オペロンに集積, 共発現させた大腸菌株の構築にも成功している¹³⁾.

NAD⁺サルベージ合成と好熱菌の生育温度域

*T. thermophilus*は1968年9月, 大島らによって伊豆の峰温泉より採取された高度好熱性細菌であり¹⁴⁾. 本稿執筆中の2018年はその発見から50年を数える記念の年

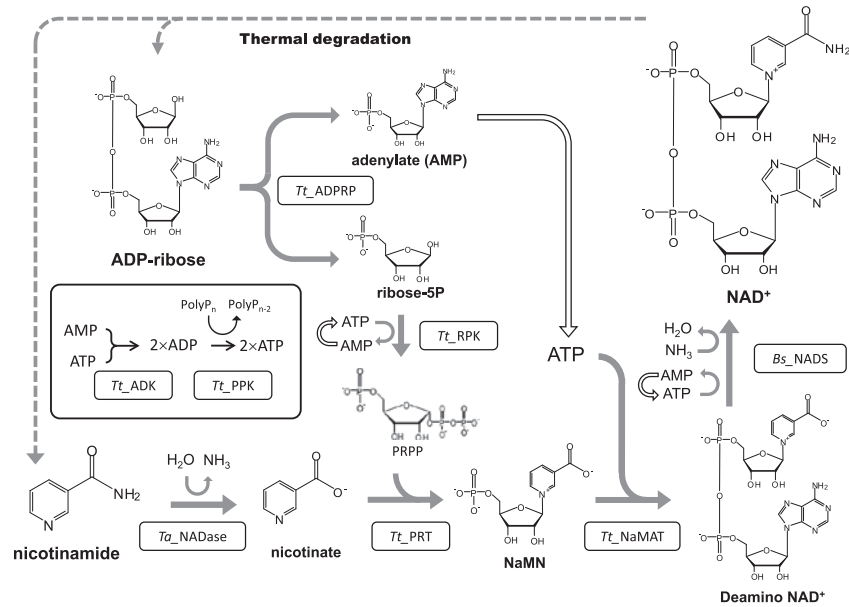


図4. NAD⁺サルベージ合成のために構築した *in vitro* 人工代謝経路。白抜き矢印は、枠内に示された酵素反応によるAMPからATPへの再生反応を示す。各酵素の略称に付した接頭語は、それぞれの酵素の由来となった好熱菌を表す：*Ta*, *T. acidophilum*；*Tt*, *T. thermophilus*；*Bs*, *B. stearothermophilus*。各酵素の略称は以下のとおりとする：NAMase, nicotinamidase；PRT, nicotinate phosphoribosyltransferase；NaMAT, nicotinate mononucleotide (NaMN) adenylyltransferase；NADS, NAD synthase；ADPRP, ADP-ribose pyrophosphatase；RPK, ribose-phosphate pyrophosphokinase；ADK, adenylate kinase；PPK, polyphosphate kinase。

でもある。この間、*T. thermophilus* は好熱性細菌のモデル生物としてさまざまな研究に用いられ、標準株である *T. thermophilus* HB8 では、そのゲノム（および3つのプラスミド）にコードされた約2200の遺伝子のうち、75%以上の遺伝子を網羅した1遺伝子発現ライブラリ（大腸菌内での発現プラスミドセット）が完備されている¹⁵⁾。本ライブラリは筆者らの研究にとっても欠かすことのできないリソースとなっており、多くの場合、目的の好熱性酵素遺伝子を探索する際のファーストチョイスとしてこれを利用している。

さてここで、図4のNAD⁺サルベージ合成経路を今一度よくご覧いただきたい。サルベージ合成に関わる6種の酵素（ATP再生に関わる酵素2種を除く）のうち、4種類は *T. thermophilus* 由来であり、これらはいずれも上述の1遺伝子発現ライブラリより取得されたものである。残る2つの酵素、すなわちニコチンアミドからのNAD⁺サルベージ合成の初発反応を触媒する nicotinamidase (NAMase) および最終ステップを担う NAD synthase (NADS) が他の好熱菌由来となっている。このうちNADSに関しては、ライブラリ内にも該当する酵素が含まれていたものの、その活性が十分ではなかったことから、探索試験により *B. stearothermophilus* 由来のものを獲得するに至った。一方、NAMaseについては、ライブラリはもとより、*T. thermophilus* HB8 のゲノムアノテーション情報にも当該酵素遺伝子の情報

が見いだされなかったため、大腸菌内での発現実績が報告されていた *T. acidophilum* 由来酵素を採用した。しかしながら、*T. thermophilus* HB8 のゲノム上、NAD⁺サルベージ合成に関わる一連の酵素遺伝子がほぼすべて完備されている中で、NAMaseだけが欠落しているというのも合点がいかない。また仮に *T. thermophilus* HB8 がNAMaseを有さず、そのサルベージ経路が不完全なものであるとすれば、本菌はいかにして高温環境下におけるNAD⁺のホメオスタシスを維持しているのだろうか？このような疑問から、再度 *T. thermophilus* HB8 ゲノムを精査したところ、他の微生物由来のNAMaseと高い相同性を示す遺伝子（TTHA0328）を見いだすに至った。TTHA0328の産物はデータベース上、isochorismataseと呼ばれる別の加水分解酵素とアノテーションされていたが、本遺伝子を大腸菌で発現させ得られた組換え酵素は、ニコチンアミドに対する高い活性 ($k_{cat}/K_m = 2900 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) を示した。またTTHA0328破壊株を作製し、細胞内のNAD⁺およびNADHの総量を定量したところ、その値は野生株に比べ有意に低く、またこの差異はNAMaseの反応産物であるニコチン酸を培地に添加することで相補されたことから、TTHA0328は、*T. thermophilus* HB8内でNAMase遺伝子として機能するものと結論づけられた。次に筆者らは、NAD⁺サルベージ合成能が *T. thermophilus* HB8の生育温度に及ぼす影響を調査した。野生株とTTHA0328破壊株のそ

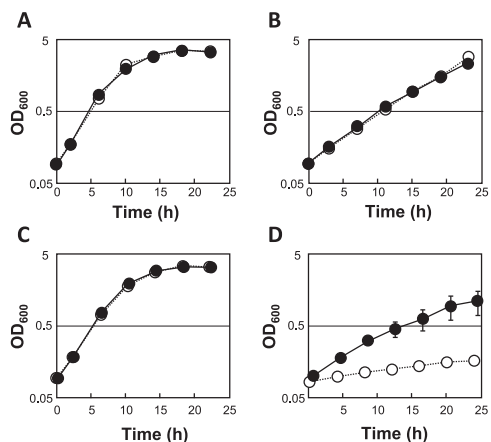


図5. *T. thermophilus* HB8野生株 (A, B) およびTTHA0328破壊株 (C, D) の70°C (A, C) および80°C (B, D) における生育プロファイル。最少培地に100 μMのニコチン酸を添加した場合 (●), および非添加の場合 (○) のそれぞれで培養を行った。データは独立した3回の試験結果の平均と標準誤差 (エラーバー) で示す。

それぞれを *T. thermophilus* 野生株の最適生育温度付近である70°Cにて培養したところ、意外にも両者の生育プロファイルにほとんど違いは見られなかった。一方、培養温度を80°Cにまで高めた場合、TTHA0328破壊株では顕著な生育阻害が認められ、またこの生育阻害は培地にニコチン酸を添加することにより緩和された(図5)¹⁶⁾。以上のことから、*T. thermophilus* HB8は、最適生育温度付近では生育に必要なニコチンアミド補酵素を *de novo* 合成のみで調達可能である一方、これを上回る高温条件下では、サルベージ合成経路の駆動が重要となる事が示された。少々大げさな表現をお許しいただくなれば、本発見は高度好熱菌の生育温度の上限を決定する因子の一つを分子レベルで明らかにした成果ということもできよう。

おわりに

以上のとおり筆者は、新規生体触媒利用技術としての *in vitro* 代謝工学の確立と、本法を用いた有用物質生産研究に取り組んできた。また、好熱性酵素遺伝子群の人工オペロン集積と共発現や、*in vitro* 人工経路によるNAD⁺のサルベージ合成など、本法のフィージビリティ向上に向けた要素技術開発にも努めてきた。幸いなことに本法に興味を持っていただける民間企業にも恵まれはじめ、有用物質の商業生産に向けた共同研究にも取り組みだしている。近い将来、*in vitro* 代謝経路を用いた有用物質生産プロセスを商業スケールで稼働させることが現在の筆者の目標の一つである。

一方、最後に紹介したNAMaseの例に見られるように、人工代謝経路デザインのため種々の微生物由来の代謝酵

素群を精査していると、既知の代謝経路にはまだまだ数多くのミッシングリンクが残されていることに気づかされる。これらのミッシングリンクの穴埋め作業は、新規の酵素反応や代謝経路の発見に直結するものである。とりわけ好熱菌は、そのユニークな生態を支えるための独自の分子メカニズムを発達させており、新規酵素反応の宝庫となっている¹⁷⁾。これらの酵素の探索と特性評価に関する研究は、基礎的知見の拡充に貢献するものであると同時に、人工代謝経路デザインの可塑性を高め、その利用可能性を押し広げるなど、応用的側面からも重要な役割を果たす。基礎研究と応用研究は、われわれの社会を豊かで実り多いものにするための両輪である。この事実を忘れずに、両者のバランスを心掛けながら、今後の研究に取り組んでいきたい。

“There is no such thing as a special category of science called applied science; there is science and its applications, which are related to one another as the fruit is related to the tree that has borne it.”

- Louis Pasteur

謝 辞

本研究は、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻合成生物学領域(旧称、生物化学工学領域)にて実施されたものです。本研究の実施にあたり、多大なご指導・ご鞭撻を賜りました大竹久夫先生(大阪大学名誉教授、早稲田大学客員教授)、ならびに多くのご助言・ご協力をいただきました大政健史先生(大阪大学教授)、岡野憲司先生(大阪大学助教)に心より御礼申し上げます。また、ともに研究に取り組んだ研究員、学生諸氏のハードワークに敬意を表するとともに深く感謝いたします。また、学生時代の恩師であり、筆者に酵素化学の基礎とこれらを用いた物質生産の面白さをご教授いただきました清水昌先生(京都大学名誉教授、バイオインダストリー協会会長)、片岡道彦先生(大阪府立大学教授)に感謝申し上げます。このほかにも本研究の遂行にあたっては、数多くの皆様からさまざまなサポートをいただきました。ご協力をいただいたすべての皆様に感謝申し上げますとともに、本研究のさらなる発展により、御恩に報いて参りたいと存じます。本研究の一部は、科学技術振興機構、日本学術振興会からの支援を得て行われたものです。

文 献

- 1) Honda, K.: *Biotechnology of Microbial Enzymes* (Brahmachari, G. Ed.), p. 433–450, Elsevier (2016).
- 2) Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., de Vos, W. M., and van der Oost, J.: *Biochem. J.*, **375**, 231–246 (2003).
- 3) Ye, X., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., Omasa, T., Hirota, R., Kuroda, A., and Ohtake, H.: *Microb. Cell Fact.*, **11**, 120 (2012).
- 4) Jaturapaktrarak, C., Napathorn, S. C., Cheng, M., Okano, K., Ohtake, H., and Honda, K.: *Bioresour.*

- Bioprocess.*, **1**, 18 (2014).
- 5) Honda, K., Kimura, K., Ninh, P. H., Taniguchi, H., Okano, K., and Ohtake, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 296–301 (2017).
 - 6) Ye, X., Honda, K., Morimoto, Y., Okano, K., and Ohtake, H.: *J. Biotechnol.*, **164**, 34–40 (2013).
 - 7) Krutsakorn, B., Honda, K., Ye, X., Imagawa, T., Bei, X., Okano, K., and Ohtake, H.: *Metab. Eng.*, **20**, 84–91 (2013).
 - 8) Tsuge, K., Matsui, K., and Itaya, M.: *Nucleic Acids Res.*, **31**, E113 (2003).
 - 9) Ninh, P. H., Honda, K., Sakai, T., Okano, K., and Ohtake, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **112**, 189–196 (2015).
 - 10) Ansell, R. J. and Lowe, C. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 703–710 (1999).
 - 11) Iwamoto, S., Motomura, K., Shinoda, Y., Urata, M., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H., Hirota, R., and Kuroda, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5676–5678 (2007).
 - 12) Honda, K., Hara, N., Cheng, M., Nakamura, A., Mandai, K., Okano, K., and Ohtake, H.: *Metab. Eng.*, **35**, 114–120 (2016).
 - 13) 谷口博範, 岡野憲司, 本田孝祐: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 196 (2018).
 - 14) Oshima, T. and Imahori, K.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **24**, 102–112 (1974).
 - 15) 高度好熱菌まるごと一匹プロジェクト: http://www.thermus.org/j_index.htm (2018/10/29).
 - 16) Taniguchi, H., Sungwallek, S., Chotchuang, P., Okano, K., and Honda, K.: *J. Bacteriol.*, **199**, e00359-17 (2017).
 - 17) Sato, T. and Atomi, H.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 307–311 (2011).