



細菌ポリエステルおよび関連代謝の 新規利活用システムに関する研究

前田 勇



Studies on Novel Applied Systems Using Bacterial Polyesters and Their Related Metabolisms

Isamu Maeda (Department of Bioproduative Science, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University,
350 Minemachi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505) Seibutsu-kogaku 85: 69-74, 2007.

はじめに

細菌が生合成するポリ (3-ヒドロキシアルカン酸) (PHA) は生分解性プラスチックとしての利用が期待されるポリエステルの一種である (図1)。これまでにPHAの合成系¹⁾や分解系²⁾, それらの調節系³⁾, 微生物や植物を宿主とした生産プロセス^{4,5)}に関する多くの知見や成果が得られている。いくつかの細菌でPHA合成の研究に

携わった経緯から⁶⁻⁸⁾ PHAの有する貯蔵物質としての特性や生分解性, 生体適合性に特化した応用的研究の必要性を感じたため, PHAやその代謝をバイオプラスチック以外の用途に活用する系を新たに開発するという課題を設定した。研究開始時の知見から一定の成果を期待できた3つの課題, すなわち①水溶性薬物の経皮ドラッグデリバリーシステムの基剤としてのPHAの利活用, ②光合成細菌による水素生産を廃水処理と共役させる, 橋渡し代謝としてのPHA代謝の利活用, ③真核細胞の脂肪酸代謝の解析ツールとしてのPHA合成酵素遺伝子の利活用についての研究成果を報告する。

PHAを基剤とした経皮ドラッグデリバリーシステム

経皮ドラッグデリバリーシステム (TDDS)⁹⁾ は経口投与による胃腸障害を回避できる, 投薬管理が容易であるなどの利点を有するすぐれた薬物投与方法である。しかしながら, 水溶性薬物をTDDSにより投与する場合には疎水性の皮膚角質層がバリアとなるため, 効率的な角質層透過が前提条件となる。本研究においては, 塩酸タムスロシン (前立腺肥大症治療薬)¹⁰⁾, ケトプロフェン (非ステロイド性抗炎症薬)¹¹⁾, そして塩酸クロニジン (高血圧治療薬)¹²⁾ をモデル薬物としてPHAを基剤としたパッチを作製した。本研究では *Pseudomonas putida* のオクタン酸流加培養により得られたPHAを用いた。モノマー組成を分析したところ, 0.08と0.92の比率で (R)-3-ヒ

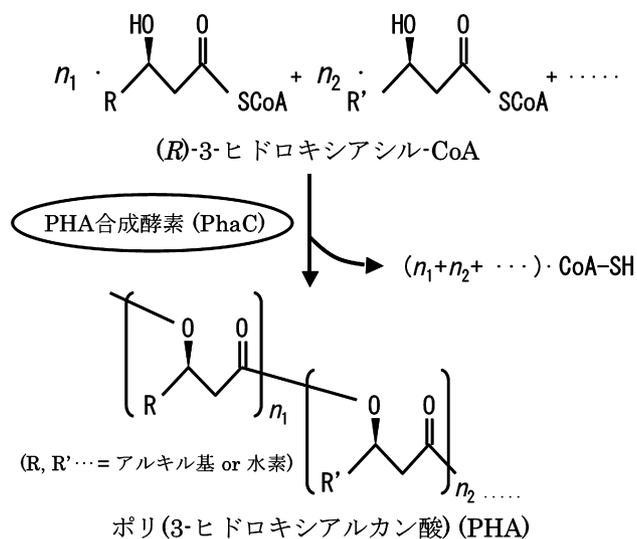


図1. 細菌が蓄積するポリエステルの一種, ポリ (3-ヒドロキシアルカン酸) (PHA) の構造とPHA合成酵素 (PhaC) により触媒される重合反応

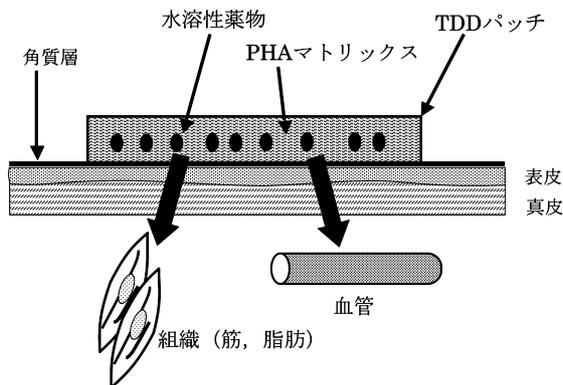


図2. 経皮ドラッグデリバリーシステムにおけるポリ(3-ヒドロキシアルカン酸)(PHA)のパッチ基剤としての利活用

ドロキシヘキサン酸と (R)-3-ヒドロキシアクタン酸から構成されていた^{13,14)}. 上記の薬物は疎水性のPHA分子中においても良好に分散することが確認された¹⁴⁾. ヒト皮膚角質層のモデルとしてはアミニシキヘビ *Python reticulatus* の脱皮殻を用いた¹⁵⁾. PHAパッチは脱皮殻と良好な親和性を示したのに対し、ポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)は脱皮殻と馴染みにくく基剤としては向かないことが示唆された¹⁴⁾. PHAパッチと飽和水溶液からの薬物透過をそれぞれ調べた結果、水溶液からの薬物透過速度はクロニジンで $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ 、タムスロシンとケトプロフェンではほとんど透過が認められなかったのに対し、PHA基剤からはそれぞれ $285, 15, 205 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{d}$ となり、いずれの薬物においても透過が大幅に向上することが明らかとなった¹⁴⁾. 本研究は、実験動物を用いて実証するまでには至っていないが、PHAのTDDS基剤としての利用を初めて提唱したものであり(図2)、これによりPHAの医薬への応用範囲が広がることを期待する。

光合成細菌のPHA代謝を介した水素生産

水素は次世代クリーンエネルギーとして注目されている。紅色非硫黄細菌はニトログナーゼの触媒下、光依存の水素発生を行うことが知られている¹⁶⁾。 *Rhodovulum sulfidophilum* を用いた水素生産の研究に携わった経緯から¹⁷⁻¹⁹⁾、紅色非硫黄細菌が菌体内に蓄積するポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)代謝²⁰⁾と水素発生との関係について研究を行った。 *Rhodobacter sphaeroides* と *Rhodospirillum rubrum* を用いた研究から、基質である酢酸からの還元当量消費において水素発生とPHB合成が競合関係にあることが示された²¹⁾。このことから、紅色非硫黄細菌ではPHB分子内にいったん貯蔵された還元当量を消費することで水素生産が行われるのではないかという発想に至った。 *R. sulfidophilum* を光照射下、酢酸ナトリウムを添加して培養すると菌体乾燥重量の50%のPHBが菌体

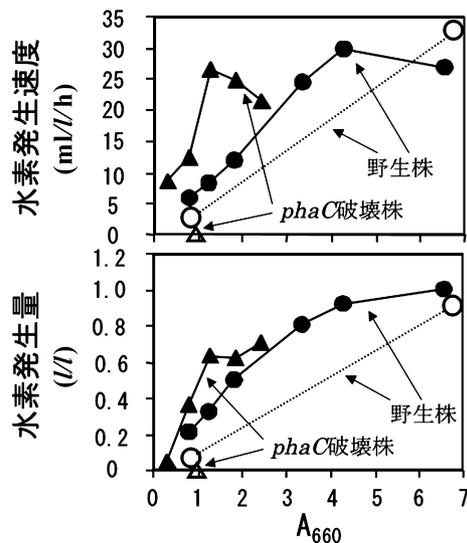


図3. 光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* の野生株と *phaC* 破壊株における水素の発生速度と発生量の菌体濃度に対する変化。野生株ではポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(PHB)を蓄積した菌体を、*phaC* 破壊株ではPHBを蓄積しない菌体をそれぞれ水素発生条件に移行させた。外部基質として50 mMコハク酸ナトリウムを添加した条件(●, ▲)と外部基質を添加しない条件(○, △)を検討した。

内に蓄積した。その菌体を基質非添加培地に再懸濁し水素発生条件に移行させると、菌体内PHB含量の低下に伴い水素が発生した²²⁾。一方、コハク酸ナトリウムを添加して培養した場合、PHBの蓄積は1%しか認められず、この時には外部基質の非存在下において水素発生は認められなかった。

菌体内PHBからの水素発生を詳細に解析するために、*R. sulfidophilum* のPHA合成酵素遺伝子 (*phaC*) の破壊株を育種した²³⁾。野生株と *phaC* 破壊株を光照射下において酢酸ナトリウムを添加して培養したところ、*phaC* 破壊株は野生株と同等の基質取り込み速度を示したが、PHB蓄積は認められなかった。一方、野生株は細胞増殖と連動しPHBを合成したが酢酸の枯渇後には増殖と連動したPHB含量の低下が認められた。酢酸で培養後の野生株と *phaC* 破壊株の菌体を用いて水素発生試験を行った(図3)。*phaC* 破壊株を、外部基質を添加せずに水素発生条件に移行させた場合、水素発生は認められなかったことから外部基質非添加時に発生する水素の還元当量はPHBから供給されることが証明された。基質としてコハク酸ナトリウムを添加して菌体濃度に対して水素発生速度と発生量を調べた結果、一定の菌体濃度でプラトーに達したため、この値をそれぞれ最大生産速度そして最大生産量とした。最大生産速度そして最大生産量共に野生株の値が *phaC* 破壊株の値を上回った。この結果から、外部基質の存在下においても菌体内PHBは水素発生速度あるいは発生量を向上させる働きがあることが明らか

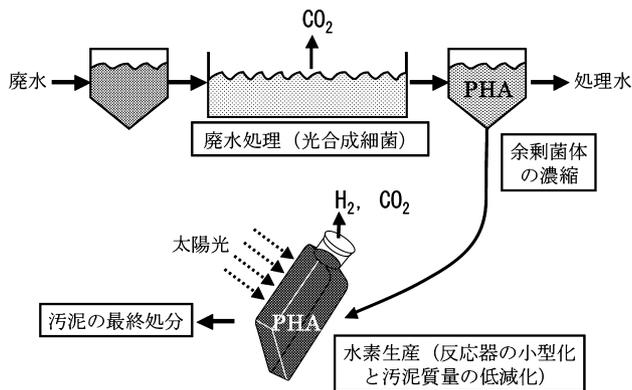


図4. 光合成細菌を用いた廃水処理と水素生産. 好気的な廃水処理の後, ポリ(3-ヒドロキシアリカン酸) (PHA) を蓄積した菌体を濃縮し光生物反応器において水素生産を行う. 光合成細菌は低BOD条件下でPHAを分解しつつ水素を生産する.

となった. さらに, 野生株の外部基質非添加時の最大水素発生速度は 33.0 ml/l/h となり野生株と *phaC* 破壊株のコハク酸添加時の最大速度 29.9 と 26.6 ml/l/h を上回った. コハク酸を外部基質に用いた場合に他の有機酸やアルコールの場合と比較し, *R. sulfidophilum* はより高い水素発生速度を示すが, 菌体内 PHB を基質とした場合には更に高い速度で水素発生が行われることが示された.

光合成細菌は食品工場などから排出される有機廃水の分解処理にも活用可能であり^{24,25)}, 本研究成果は有機廃水の処理過程で生じた余剰菌体質量の低減と水素の副次的生産に結びつくものとして, 次に示すようなことが期待される (図4). 提案する系において, 有機廃水処理は開放型処理槽における好気培養により行われる. この過程で廃水中の BOD が低減する. 水素発生を触媒するニトロゲナーゼは嫌気条件で活性化されるため¹⁶⁾, 廃水処理時に水素発生は行われず廃水中に存在した有機物の還元当量の一部が菌体内 PHA として貯蔵される. 廃水処理で生じた余剰の菌体を濃縮後に密閉型の光生物反応器へと導き水素生産を行う. 水素生産開始時にすでに廃水の BOD は低下しているため菌体内 PHA を基質とした効率的な水素生産が期待される. また, 密閉型の反応器は開放型のものと比較して製造コストがかかるが, 本系を用いることで水素生産用の光生物反応器の小型化が可能となるため, 水素生産コストの低減にも結びつくと考えられる.

phaC 導入酵母における脂肪酸代謝の解析

PHA 合成酵素は DNA 塩基配列から推定されるアミノ酸配列と酵素の基質特異性, サブユニットの構成から 4 つのクラス (タイプ) に分類される²⁶⁾. クラス I とクラス II の PHA 合成酵素は 1 種類のサブユニット, すなわち PhaC のみから構成され, それぞれ炭素数 3 から 5 と 6 から 14 の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸の補酵素 A (CoA) チ

オエステルに対して活性を示す.

モデル真核生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を研究試料として用いることにより, これまでにさまざまな真核生物の生命活動の仕組みや代謝が解明されてきた. *S. cerevisiae* において脂肪酸の分解はオルガネラの一つ, ペルオキシソームにおける β -酸化回路を介して行われる. Poirier らは, クラス II の PHA 合成酵素をコードする緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の遺伝子 *phaC*²⁶⁾ の 3' 末端にペルオキシソームターゲティングシグナル (PTS) の配列を付加することで, PhaC 活性を *S. cerevisiae* のペルオキシソームに局在化させた²⁷⁾. 形質転換株をオレイン酸 (シス-9-オクタデセン酸) の存在下で培養した結果, 6 以上 14 以下の偶数の炭素数を有する (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸モノマーから構成される PHA が合成された.

したがって, 合成された PHA のモノマー組成はペルオキシソームに局在化させた PhaC の基質特異性により決定づけられたと考えられる. また, *S. cerevisiae* に偶数鎖長の脂肪酸を供給した場合は偶数鎖長の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸, 奇数鎖長の脂肪酸を供給した場合は奇数鎖長の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸をモノマーとする PHA がそれぞれ合成されたことから, PhaC の基質である (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA は脂肪酸 β -酸化回路の中間代謝産物から供給されることが明らかとなった. β -酸化回路は 4 つの酵素活性, すなわちアシル-CoA オキシダーゼ, トランス-2-エノイル-CoA ヒドラターゼ, (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ, 3-ケトアシル-CoA チオラーゼから構成される (図5). アシル-CoA オキシダーゼは *fox1* に, トランス-2-エノイル-CoA ヒドラターゼと (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼは *fox2* に, 3-ケトアシル-CoA チオラーゼは *fox3* にそれぞれコードされる. したがって, *fox1* と *fox2* の遺伝子破壊株は β 酸化活性を有しておらず, *phaC* を導入したこれらの破壊株をオレイン酸と共に培養した場合に菌体内 PHA は検出されなかったことから²⁸⁾, 蓄積した PHA 含量と β -酸化活性との間に一定の相関があることが明らかとなった. これらの実験結果より, *phaC* を異種発現させた *S. cerevisiae* が合成した PHA のモノマー量と組成を解析することで, 脂肪酸の β -酸化スパイラル上の代謝産物を解析する手法が考案された (図5). クラス I あるいはクラス II に属する PhaC, またはその両方をペルオキシソームに局在化させることにより, β -酸化回路を介して生成した炭素数 4 から 14 の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸の CoA チオエステルについて, 設定した条件間における相対量の変化を調べることが可能となった.

本手法はオルガネラに局在する PhaC が脂肪酸の代謝

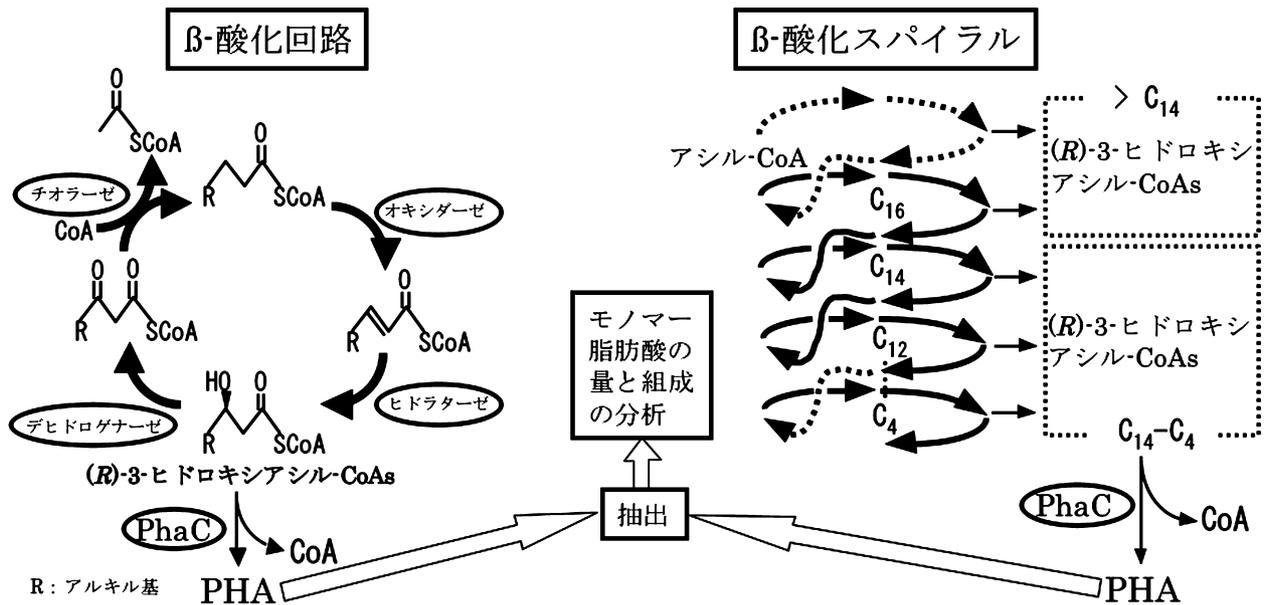


図5. ペルオキシソーム配向型の PHA 合成酵素 (PhaC) 活性を利用した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂肪酸 β -酸化回路における代謝産物の解析

産物を PHA 分子中へと取り込むことにより代謝産物がポリエステル分子中に固定化され、以後の代謝や輸送を受けないという原理に基づく。したがって、培養期間を通じて PHA 分子内に継続的に捕捉された、鎖長の異なる (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA の定性ならびに定量が可能である。このため、サンプリング時の一時的な細胞内濃度が強く反映される直接定量法と比較し、定量感度にすぐれた代謝過程の全体像をより反映した結果を得ることができる点ですぐれている。本手法で得られた、*S. cerevisiae* の脂肪酸 β -酸化に関するいくつかの知見を以下に示す。

前述のように *fox2* はトランス-2-エノイル-CoA ヒドラーターゼと (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼ活性を有する multifunctional enzyme type 2 (MFE-2) をコードする²⁹⁾。MFE-2 の A ドメインと B ドメインは (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼとして機能する。組換えタンパク質を用いた酵素反応のカイネティクス解析の結果、B ドメインの機能を欠損させた B Δ 酵素は長鎖 (C16) と中鎖 (C10) に活性を示し短鎖 (C4) とはまったく反応しないのに対し、A ドメインの機能を欠損させた A Δ 酵素は長中鎖より短鎖の基質に対し高い反応速度を示すことが明らかとなった。この研究で示された A Δ そして B Δ 酵素のカイネティクスが *S. cerevisiae* 細胞内においても反映されることが示された^{30,31)}。クラス I の *Wautersia eutropha* (*Ralstonia eutropha*) PhaC²⁶⁾ とクラス I に対するホモロジーが高く 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸の共重合体を合成する *Aeromonas caviae* PhaC³²⁾、クラス II の *P. aeruginosa* PhaC の各遺伝

子に PTS の塩基配列を付加し *S. cerevisiae* 株に導入した。*phaC* を導入した株はゲノム DNA 上の *fox2* Δ をプラスミド DNA 上の *fox2*, *fox2-a* Δ , *fox2-b* Δ でそれぞれ相補した株である。オレイン酸を添加し各形質転換株を培養したところ、*P. aeruginosa phaC* を導入した株では炭素数 14 から 6 の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸からなる PHA が合成された。そのモノマーの組成は *fox2* Δ (*fox2*) と *fox2* Δ (*fox2-a* Δ) がほぼ同じであるのに対し、*fox2* Δ (*fox2-b* Δ) では C6 モノマーのモル比が増加し C8-14 モノマーのモル比が減少するという傾向が認められた。*W. eutropha phaC* と *A. caviae phaC* を導入した株では炭素数 6 から 4 の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸からなる PHA が合成された (図 6)。この試験で用いられた PhaC は短鎖の基質に対して活性を示すため、B ドメイン欠損株にのみ PHA 含量の著しい増加が認められた。(R)-3-ヒドロキシアシル-CoA デヒドロゲナーゼと PhaC はそれぞれの基質である (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA を消費する上で競合し合う酵素である。したがって、B ドメイン欠損により C6 モノマーのモル比や短鎖モノマーからなる PHA の含量が増加するという実験結果は、生体内においても B ドメインが短鎖の (R)-3-ヒドロキシアシル-CoA の脱水素反応を担うということを示している。

また、*S. cerevisiae* のペルオキシソームに局在するアシル-CoA チオエステラーゼ (Pte1) の遺伝子破壊株に *P. aeruginosa phaC* を導入し、合成された PHA を解析することにより短鎖脂肪酸と分枝脂肪酸の β -酸化における Pte1 の生理学的役割を明らかにした³³⁾。Pte1 はアシル-CoA のチオエステル結合を加水分解し脂肪酸と CoA を生成さ

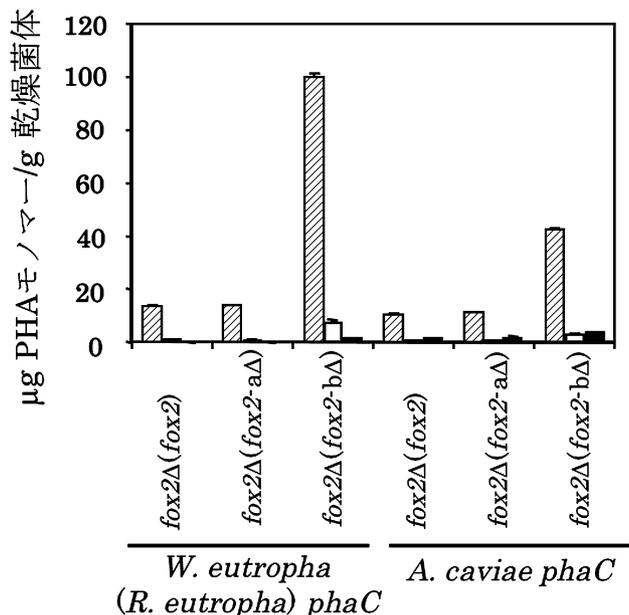


図6. (R)-3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼのAドメイン欠損 (*fox2-aΔ*) とBドメイン欠損 (*fox2-bΔ*) が *phaC* を導入した *S. cerevisiae* のPHA合成に及ぼす影響. バーはC4 (▨), C5 (□), C6 (■) の (R)-3-ヒドロキシ脂肪酸を示す.

せる酵素である. 長鎖 (C17) や中鎖 (C13, C11, C9) の直鎖型脂肪酸を添加して培養を行った場合に, 親株と *pte1* 破壊株の PHA 含量に有為な差は認められなかった. 一方, 短鎖脂肪酸 (C7), あるいは8-メチル-ノナン酸 (C9) や9-メチル-アンデカン酸 (C11), 10-メチル-アンデカン酸といった分枝脂肪酸を添加して培養を行った場合には, 親株と比較し *pte1* 破壊株の PHA 含量が著しく低下した. 実験結果より, *Pte1* は短鎖脂肪酸や分岐脂肪酸のβ-酸化過程において重要な役割を担うことが示された. *Pte1* はアシル-CoAを加水分解しCoAを生成することでペルオキシソーム内のCoAプールとβ-酸化を維持すると考えられている (図7). β-酸化によりアセチル-CoAが生成するとアセチルユニットのペルオキシソーム外への輸送システムにより *Pte1* 非依存的に CoA が再生される³⁴⁾. この点を考慮すると, 短鎖脂肪酸や分岐脂肪酸のβ-酸化過程におけるアセチル-CoAの生成効率が高くないため, CoA再生における *Pte1* 活性への依存度が高くなるというメカニズムが推察される.

おわりに

PHA や関連する代謝の利活用を考える上で理想となるのはコモディティケミカルとして素材化あるいは製造法の構築であろう. その一方で, PHAより価格競争力のあるバイオプラスチックが開発されている現状がある. したがって, PHAの利活用を押し進めるといった観点から, 汎用から脱却し機能性や生体適合性, 生分解性と

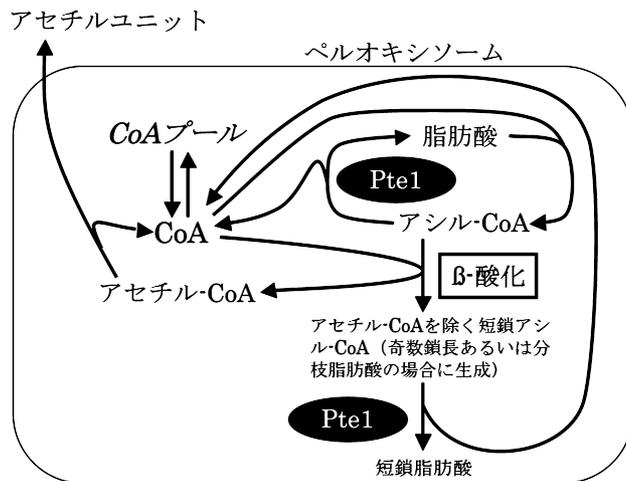


図7. *S. cerevisiae* ペルオキシソームでのβ-酸化におけるアシル-CoAチオエステラーゼ (*Pte1*) の生理学的役割. 奇数鎖長短鎖脂肪酸や分枝脂肪酸のβ-酸化では, 初発のアシル-CoAに対して生成するアセチルCoAのモル比が低くなり, CoA再生における *Pte1* 活性への依存度が高まる.

いった要素が強調される利用法を開発することも肝心であると考えられる. たとえば, 医薬分野における利用では本研究で示したTDDS基剤としての利用以外にも, 抗生物質投与のためのDDS担体^{35,36)}や心臓弁の再生医療用の足場³⁷⁾としての利用などが挙げられる. 水処理工業分野においては, バイオ脱窒処理の際の還元当量の供給源と微生物フィルム床としての利用が提案された^{38,39)}. また, *phaC*を *S. cerevisiae* やモデル植物の *Arabidopsis thaliana* に導入することで, 脂肪酸代謝に関するいくつかの知見が得られた^{40,41)}. さまざまな生物種に *phaC* を導入し合成されるPHAを解析することで, 新たな生化学的知見や油脂を原料とした有用物質生産のための代謝工学, 脂肪酸代謝異常に起因する疾患の原因究明などに役立つ可能性が考えられる.

現在, 得られている生化学的あるいは物性学的知見を基に, 今後もPHAの用途や応用分野が拡大し, さらに汎用プラスチックとしての生産を可能にする技術が進展することが期待される.

本研究を遂行するにあたり大阪大学大学院薬学研究科の八木清仁教授, 川瀬雅也 助教授 (現大阪大谷大学薬学部教授), 三浦喜温 名誉教授, 溝口 正 教授 (現大手前大学社会文化学部教授), 宇都宮大学農学部の上田俊策 教授, ローザンヌ大学生物学舎のYves Poirier教授から指導と助言をいただきました. 本研究は研究室に在籍した大学院生と学部生の多大なる協力により行われました. また, 関西電力株式会社と同社の宮坂均 チーフリサーチャーに研究の一部をサポートいただきました. 日本学術振興会の二国間交流事業のサポートによりPoirier研究室に留学させていただきました. ここであらためて深謝いたします.

文 献

- 1) Aldor, I. S. and Keasling, J. D.: *Curr Opin Biotechnol.*, **14**, 475–483 (2003).
- 2) Gao, D., Maehara, A., Yamane, T., and Ueda, S.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **196**, 159–164 (2001).
- 3) Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., and Doi, Y.: *J. Bacteriol.*, **184**, 3992–4002 (2002).
- 4) Lee, S. Y., Choi, J., and Wong, H. H.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 31–36 (1999).
- 5) Snell, K. D. and Peoples, O. P.: *Metab. Eng.*, **4**, 29–40 (2002).
- 6) Chowdhury, W. Q., Idehara, K., Maeda, I., Umeda, F., Yagi, K., Miura, Y., and Mizoguchi, T.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 361–366 (1996).
- 7) Nishikawa, T., Ogawa, K., Kohda, R., Zhixiong, W., Miyasaka, H., Umeda, F., Maeda, I., Kawase, M., and Yagi, K.: *Curr. Microbiol.*, **44**, 132–135 (2002).
- 8) Yagi, K., Miyawaki, I., Kayashita, A., Kondo, M., Kitano, Y., Murakami, Y., Maeda, I., Umeda, F., Miura, Y., Kawase, M., and Mizoguchi, T.: *Appl. Environ Microbiol.*, **62**, 1004–1007 (1996).
- 9) Hadgraft, J.: *Int. J. Pharm.*, **224**, 1–18 (2001).
- 10) Wilde, M. I. and McTavish, D.: *Drugs*, **52**, 883–898 (1996).
- 11) Mazieres, B.: *Drugs R D*, **6**, 337–344 (2005).
- 12) Sica, D. A. and Grubbs, R.: *J. Clin. Hypertens*, **7**, 558–562 (2005).
- 13) Wang, Z., Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., Umeda, F., Yamakawa, J., Kawase, M., and Yagi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 541–543 (2003).
- 14) Wang, Z., Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., Umeda, F., Yamakawa, J., Nishimine, M., Suenobu, T., Fukuzumi, S., Kawase, M., and Yagi, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 537–540 (2003).
- 15) Ogiso, T. and Shintani, M.: *J. Pharm. Sci.*, **79**, 1065–1071 (1990).
- 16) Hillmer, P. and Gest, H.: *J. Bacteriol.*, **129**, 724–731 (1977).
- 17) Maeda, I., Chowdhury, W. Q., Idehara, K., Yagi, K., Mizoguchi, T., Akano, T., Miyasaka, H., Furutani, T., Ikuta, Y., Shioji, N., and Miura, Y.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70–72**, 301–310 (1998).
- 18) Maeda, I., Daba, M., Hirose, N., Nagao, H., Idehara, K., Miura, Y., Yagi, K., and Mizoguchi, T.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **171**, 121–126 (1999).
- 19) Maeda, I., Mizoguchi, T., Miura, Y., Yagi, K., Shioji, N., and Miyasaka, H.: *Curr. Microbiol.*, **40**, 210–213 (2000).
- 20) Madigan, M. T. and Gest, H.: *Arch. Microbiol.*, **117**, 119–122 (1978).
- 21) Hustede, E., Steinbuchel, A., and Schlegel, H. G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 87–93 (1993).
- 22) Maeda, I., Idehara, K., Okayama, N., Miura, Y., Yagi, K., and Mizoguchi, T.: *Biotechnol. Lett.*, **19**, 1209–1212 (1997).
- 23) Maeda, I., Miyasaka, H., Umeda, F., Kawase, M., and Yagi, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 474–481 (2003).
- 24) Mitsui, A., Matsunaga, T., Ikemoto, H., and Renuka, B. R.: *Developments in Industrial Microbiology*, **26**, 209–222, Society for Industrial Microbiology (1985).
- 25) Tanaka, T., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., and Nishio, N.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 677–680 (1994).
- 26) Rehm, B. H.: *Biochem. J.*, **376**, 15–33 (2003).
- 27) Poirier, Y., Erard, N., and Petetot, J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5254–5260 (2001).
- 28) Marchesini, S. and Poirier, Y.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 32596–32601 (2003).
- 29) Qin, Y. M., Marttila, M. S., Haapalainen, A. M., Siivari, K. M., Glumoff, T., and Hiltunen, J. K.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 28619–28625 (1999).
- 30) De Oliveira, V. C., Maeda, I., Delessert, S., and Poirier, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5685–5687 (2004).
- 31) Marchesini, S., Erard, N., Glumoff, T., Hiltunen, J. K., and Poirier, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6495–6499 (2003).
- 32) Fukui, T. and Doi, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, 4821–4830 (1997).
- 33) Maeda, I., Delessert, S., Hasegawa, S., Seto, Y., Zuber, S., and Poirier, Y.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 11729–11735 (2006).
- 34) van Roermund, C. W., Hettema, E. H., van den Berg, M., Tabak, H. F., and Wanders, R. J.: *EMBO J.*, **18**, 5843–5852 (1999).
- 35) Rossi, S., Azghani, A. O., and Omri, A.: *J. Antimicrob. Chemother.*, **54**, 1013–1018 (2004).
- 36) Turesin, F., Gursel, I., and Hasirci, V.: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **12**, 195–207 (2001).
- 37) Sodian, R., Hoerstrup, S. P., Sperling, J. S., Daebritz, S., Martin, D. P., Moran, A. M., Kim, B. S., Schoen, F. J., Vacanti, J. P., and Mayer, J. E., Jr.: *Circulation*, **102**, III22–29 (2000).
- 38) Hiraishi, A. and Khan, S. T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 103–109 (2003).
- 39) Third, K. A., Burnett, N., and Cord-Ruwisch, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **83**, 706–720 (2003).
- 40) Arai, Y., Nakashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Shimizu, T., Yasuda, M., Doi, Y., and Yamaguchi, I.: *Plant Cell Physiol.*, **43**, 555–562 (2002).
- 41) Zhang, B., Carlson, R., and Srien, F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 536–543 (2006).