

組換え微生物によるカロテノイド生産

原田 尚志^{1*}・小島 基²・鈴木 宗典²・金本 浩介²

カロテノイドは植物、藻類、細菌などが生産する天然色素であり、生物において多様な生理的機能を司る重要な化合物群である。天然からは現在までに750種類以上のカロテノイドが単離されているが、一部を除きその存在量に限りがあるものが大半を占める。これらの中にはヒトに対して優れた生理活性を示すにもかかわらず有効利用されていないものや、微量であるが故にその生理活性さえ確認されていないカロテノイドも含まれる。組換え微生物を利用したカロテノイド生産系は、未利用カロテノイドの有用性や効果の検証、あるいは有用カロテノイドの利用促進への貢献が期待されている技術である。本稿では、組換え微生物を宿主としたカロテノイド生産研究の成り立ちから実用生産を見据えた最新の研究状況まで、特に重要と思われるトピックを取り上げながら概説する。

カロテノイド生合成遺伝子と微生物生産系

生合成酵素遺伝子の機能同定法の確立 今日組換え微生物を利用したカロテノイド生産研究の発展は、生合成遺伝子の機能同定法の確立を抜きに語ることはできない。現在までに多くのカロテノイド生合成遺伝子が単離・機能同定されているが、今から25年ほど前には機能同定された遺伝子の数はほんの一握りにすぎなかった。これは、生合成酵素の存在量が少ないことや、その不安定性ゆえに酵素精製による機能同定が困難であったことが原因であると考えられる。一方、1990年にMisawaらは土壌細菌 *Pantoea ananatis* (旧名: *Erwinia uredovora*) より、前駆体ゲラニルゲラニルニリン酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) の合成から最終産物であるゼアキサントシン β -D-グルコシド (zeaxanthin β -D-diglycoside) までの反応を担う6個の酵素遺伝子 (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* および *crtX*) の単離と機能同定に成功した¹⁾。この際、*P. ananatis* のカロテノイド生合成遺伝子群断片を含むプラスミドベクターを宿主大腸菌 (*Escherichia coli*) に導入し、生成した最終カロテノイド産物を分析することで生合成酵素遺伝子の機能同定を行うという、当時としては画期的な方法が用いられた。これにより、それまで機能同定を困難にしていた酵素化学的手法を経ることなく生合成遺伝子の機能同定が可能になっただけでなく、単離されたさまざまな

遺伝子を利用した組換え微生物によるカロテノイド生産研究発展への道を拓いた。

新規カロテノイド生合成遺伝子の単離 機能同定法の確立に伴い、カロテノイドを合成する細菌、菌類、藻類、高等植物などから新しい生合成遺伝子が次々に単離された。特に細菌においては、カロテノイド生合成遺伝子がゲノム上でクラスターを形成している場合が多く、生合成経路中の一連の酵素遺伝子が包括的に単離されている。これらの中には通常の炭素鎖40 (C40) のカロテノイドとは異なり、C30やC50など一部の細菌のみが生産できるユニークな構造を持つカロテノイドの生合成遺伝子も含まれている。一方、真核生物においては一般的にクラスター構造を形成していないことから、一部の遺伝子機能のみに留まっているものが多く、生合成経路の全容が解明されていないものがほとんどである。なお、現在までに単離・機能同定されたカロテノイド生合成遺伝子の詳細については総説²⁾や良書³⁾にまとめられており、カロテノイドの異種生産研究にも用いられている。

組換え大腸菌によるカロテノイド生産系

組換え微生物による物質生産研究において専ら用いられている宿主は、大腸菌や出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) などのいわゆるモデル微生物であろう。これら微生物は、遺伝子機能に関する知見やゲノム情報などが充実していること、プラスミドベクターや遺伝子ライブラリなどの遺伝子工学ツールが豊富であること、遺伝子導入やノックアウトなどが容易に行えることなど、他の宿主微生物よりも多くのメリットがあることが理由である。カロテノイドの生産研究においては、前述の様に生合成遺伝子の機能同定法が大腸菌をプラットフォームとしたシステムにより構築されたこともあり、大腸菌を生産宿主とした研究が数多く行われている。本項では大腸菌を宿主としたカロテノイド生産系について解説するとともに、大量生産を目的とした研究の現状についても紹介したい。

大腸菌を宿主としたカロテノイド生産 大腸菌はカロテノイドを含むイソプレノイド (isoprenoid) の基本代謝経路として、非メバロン酸経路 (メチルエリスリトールリン酸経路, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP経路) によりC5のイソプレン (isoprene)

* 著者紹介 ¹鳥取大学大学院工学研究科化学・生物応用工学専攻 (准教授) E-mail: harada@bio.tottori-u.ac.jp

²神戸天然物化学株式会社バイオ事業部バイオ開発室第3チーム

単位となるイソペンテニル二リン酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) と、その異性体であるジメチルアリル二リン酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) を合成する⁴⁾。合成されたIPPとDMAPPは、プレニル基転移酵素 (prenyltransferase) を介した連続縮合反応により、C10のゲラニル二リン酸 (geranyl diphosphate, GPP), C15のファルネシル二リン酸 (farnesyl diphosphate, FPP) まで代謝される。図1に大腸菌を生産宿主とした主要カロテノイド生合成の概要を示した。大腸菌はカロテノイド非生産菌であり、FPP以降のカロテノイド合成に必要な酵素遺伝子を保有していないが、GGPP合成酵素 (CrtE) およびフィトエン (phytoene) 合成酵素 (CrtB) をコードする遺伝子の機能発現により、GGPPを基質として最初のC40カロテノイドであるフィトエンを合成することができる。また、フィトエン以降のカロテノイド合成に必要な生合成酵素遺伝子を機能発現することで、リコペン (lycopene) やβ-カロテン (β-carotene), さらにゼアキサントフィルやアスタキサントフィル (astaxanthin) などのキサントフィルを含む、さまざまなC40カロテノイドの大腸菌生産が可能になる。一方、C40カロテノイド以外にもC30やC50カロテノイドを生産することも可能である。たとえばC30カロテノイドについては、GGPP合成酵素遺伝子の代わりにジアポフィトエン (diapophytoene) 合成酵素 (CrtM) をコードする遺伝子を機能発現することにより、FPPを基質としてC30カロテノイドであるジアポフィトエンを、さらにジアポフィトエン不飽和化酵素 (CrtN) によりジアポニューロスポレン (diaponeurosporene) を生産す

ることができる。C50カロテノイドについても、CrtE およびCrtBに加えてフィトエン不飽和化酵素 (CrtI) によりリコペンまでを合成した後、リコペン伸長酵素 (CrtEb) によりC50カロテノイドであるフラブキサントフィル (flavuxanthin) が、さらに環化酵素 (CrtY_eおよびCrtY_p) によりデカプレノキサントフィル (decaprenoxanthin) が合成される。このように大腸菌においては、生合成遺伝子が機能発現さえすれば、比較的容易に多種多様なカロテノイドの生産システム構築が可能である。

大腸菌における大量生産研究 前述のように大腸菌で種々のカロテノイド生産が可能であることは事実であるが、単純にFPP以降の生合成酵素遺伝子の機能発現により得られる量は、実用生産レベルからは程遠いのが現状である。たとえば、*P. ananatis* の *crtE*, *crtB* および *crtI* を大腸菌で機能発現することにより生産されるリコペンの量は通常、1 g乾燥菌体重量 (dry cell weight, DCW) あたり0.5~2 mg程度である。これは、大腸菌が元来少量のイソプレノイド化合物しか生産しないため、前駆体であるFPPの存在量が少ないことが原因であると考えられる。つまり、大腸菌でカロテノイドを大量生産するためには、大腸菌が生産するFPP量を大幅に増やす必要がある。

パスウェイエンジニアリング (pathway engineering) は宿主生合成経路の大規模改変により目的化合物を生産する技術であり、代謝工学 (metabolic engineering) や合成生物学 (synthetic biology) 分野において近年大きな注目を集めている⁵⁾。FPP増産を目的として、これまでにさまざまなパスウェイエンジニアリング研究が行われている。これらの研究は、代謝関連遺伝子の過剰発現やノックアウトによりMEP経路を含む内在代謝経路を改変する方法と、もう一つのイソプレノイド基本代謝経路である異種生物由来のメバロン酸 (mevalonate, MVA) 経路遺伝子群を導入する方法とに大別することができる。

内在経路の改変による大量生産 IPPイソメラーゼ (IPP isomerase, Idi) は、イソプレノイドのビルディングブロックであるIPPとDMAPPの異性化反応を可逆的に触媒する酵素であり、一次配列の違いにより真核から原核生物までさまざまな生物種が保有する1型と、一部の細菌やアーキアのみが持つ2型に分類される⁶⁾。Kajiwarらは、*S. cerevisiae* や緑藻 (*Haematococcus pluvialis*) 由来の1型IPPイソメラーゼ遺伝子 (*idi*) を高発現させた大腸菌で、カロテノイド生産量が顕著に増加することを初めて見いだした⁷⁾。その後これと同様に、MEP経路中の1-デオキシ-D-キシロース5-リン酸 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP) 合成

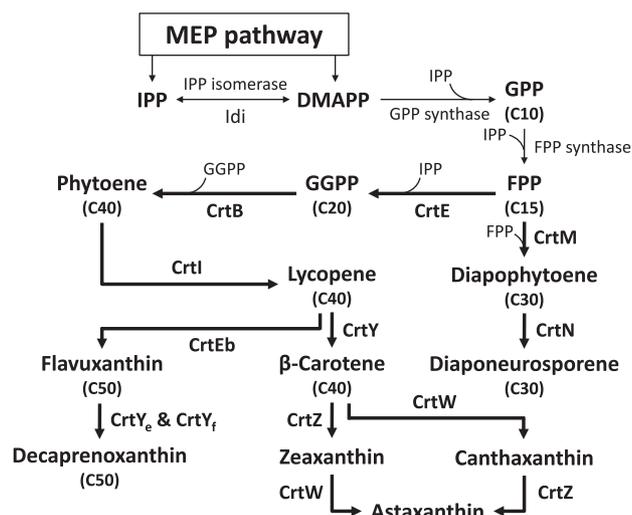


図1. 大腸菌を宿主とした主要カロテノイド生合成の概要。細矢印は大腸菌の内在経路、太矢印は異種カロテノイド生合成経路と酵素名を示す。

酵素 (Dxs) またはDXPレダクトイソメラーゼ (DXP reductoisomerase, Dxr) をコードする遺伝子を大腸菌で高発現させてもカロテノイド増産効果が見られたことから、これらがカロテノイド生合成の鍵酵素であることが示されている⁸⁾。この他にも、シグマ因子 (RpoS) や転写アクチベーター (AppY) などのいわゆるグローバル制御因子を高発現化する方法や、解糖経路、TCA回路あるいはペントースリン酸経路中の補酵素生産や菌体内の酸化還元バランス維持に関与する酵素遺伝子の高発現化またはノックアウトを組み合わせた方法により、最大で16 mg/g DCWのリコペン生産が行われている^{9,10)}。さらに、カロテノイド増産に向けた新たなアプローチとして最近、大腸菌のグルコースリン酸転移システム (phosphotransferase system, PTS) オペロン (*ptsHICrr*) のノックアウト株を利用して最適培養条件検討が行われた結果、最大で20 mg/g DCWのリコペン生産例も報告されている¹¹⁾。

異種MVA経路遺伝子群導入による大量生産 一方、大腸菌が本来持たない異種MVA経路遺伝子群を利用したパスウェイエンジニアリング研究も多数報告されている。Kakinumaらは、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株由来のMVA経路遺伝子群 (2型 *idi* を含む) を機能発現させた大腸菌を利用し、重水素化D-MVAラクトン (D-mevalonolactone, MVL) を基質として、重水素化されたゼアキサントンの合成に成功した¹²⁾。その後さまざまな研究グループによって、*S. cerevisiae*、連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae* や *Streptococcus pyogenes*)、

腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) またはブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などの異種MVA経路遺伝子群を利用したカロテノイド増産研究が行われている。これまでにMVLを基質として、フラスコレベルで20 mg/g DCW程度、ファーメンターレベルで30 mg/g DCW程度のリコペンやβ-カロテンが生産されている^{10,13)}。一方、筆者らは前述の *Streptomyces* sp. CL190 のMVA経路遺伝子群を用い、MVLよりも構造が単純かつ安価なアセト酢酸リチウム塩 (Li acetoacetate, LAA) を基質として利用できる生産系を開発した¹⁴⁾。この生産系では、放線菌由来のMVA経路遺伝子群に加え、*S. cerevisiae* 由来の1型 *Idi* と、アセト酢酸塩を基質としてアセトアセチル-CoA (acetoacetyl-CoA) を合成できるラット (*Rattus norvegicus*) 由来アセト酢酸-CoAリガーゼ (acetoacetate-CoA ligase, Aacl) をコードする遺伝子を高発現するプラスミド (pAC-Mev/Scidi/Aacl) を構築して生産に利用している (図2)。本生産系を用いてリコペン生産を行った結果、LAAを基質としてフラスコレベルで13 mg/g DCWのリコペンを生産できた。これについて筆者らはごく最近、既存の放線菌由来MVA経路遺伝子群を複数の異種細菌由来の遺伝子群に置換することにより、さらに2~3倍程度生産量を増やすことに成功している¹⁵⁾。このように異種メバロン酸経路遺伝子群を導入する方法は、大腸菌を宿主としたカロテノイド生産のためのパスウェイエンジニアリング研究において、現在のところ最も強力かつ効果的な手段であると考えられる。

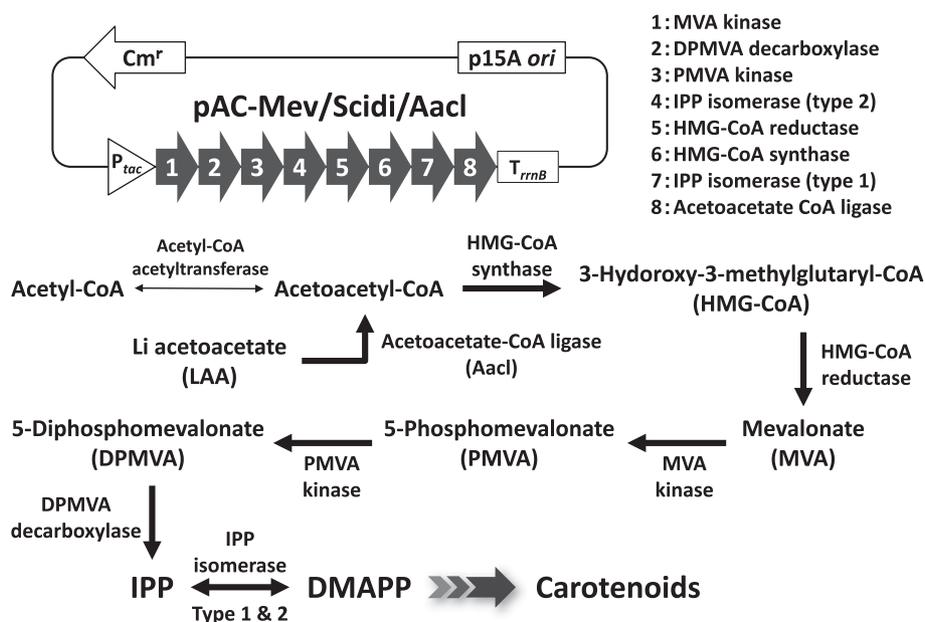


図2. 異種MVA経路遺伝子群を利用した大腸菌のパスウェイエンジニアリング。新たに導入した生合成経路酵素を太矢印で示した。

組換え酵母によるカロテノイド生産系

酵母を宿主としたカロテノイド生産研究 酵母を宿主としたカロテノイド生産研究も、これまでに多数報告されている。一口に酵母と言っても出芽酵母だけに限らず、トルラ酵母 *Candida utilis*、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*、あるいは赤色酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (旧名: *Phaffia rhodozyma*) などを対象とした研究により発展してきた経緯がある。 *S. cerevisiae*、*C. utilis* および *P. pastoris* はカロテノイド非生産宿主であるが、これら酵母では内在 MVA 経路により FPP を合成した後、これを基質として細胞膜成分の一つであるエルゴステロール (ergosterol) を合成する¹⁶⁾。そこで大腸菌と同様にカロテノイド生合成に必要な酵素遺伝子を酵母細胞に導入、機能発現することにより、リコペン、 β -カロテン、あるいはアスタキサンチンなどのカロテノイド生産が可能になる。一方、赤色酵母 *X. dendrorhous* はその名の通り菌体内に赤色素を生産するが、この主成分はアスタキサンチンである。ただし *X. dendrorhous* のアスタキサンチンは、*H. pluvialis* など他の生物種が生産する 3*S*,3'*S*-アスタキサンチンのエナンチオマーである 3*R*,3'*R*-アスタキサンチンであり、カロテノイド生合成経路およびその関連遺伝子についても機能同定されている。

酵母による大量生産研究 酵母を宿主とした大量生産研究についても、これまで幾つかの研究が報告されている。Shimadaらは *C. utilis* を宿主として、内在の HMG-CoA レダクターゼ (HMG-CoA reductase) 触媒ドメインの高発現化と、スクアレン合成酵素 (squalene synthase) 遺伝子 (*ERG9*) のノックアウトを組み合わせることで、リコペン生産量を約7倍 (1.1 mg/g DCW \rightarrow 7.8 mg/g DCW) 向上させることに成功した¹⁷⁾。また *S. cerevisiae* を宿主とした研究においては、内在の GGPP 合成酵素遺伝子 (*BTS1*) と、*X. dendrorhous* 由来のカロテノイド生合成遺伝子である *crtE*、*crtYB* (フィトエン合成酵素とリコペン β 環化酵素の融合型酵素遺伝子)、ならびに *crtI* 遺伝子の高発現化により、約22倍 (0.5 mg/g DCW \rightarrow 11 mg/g DCW) の総カロテノイド量増産効果が報告されている¹⁸⁾。さらに最近、*S. cerevisiae* のノックアウトライブラリを利用した網羅的解析が行われ、エルゴステロール、アミノ酸および脂肪酸合成関連遺伝子などを含む、カロテノイド増産効果を示す24遺伝子が同定された¹⁹⁾。一方、カロテノイド生産酵母である *X. dendrorhous* においては、通常0.2 mg/g DCW程度程度のカロテノイドが生産され、このうち約70%をアスタキサンチンが占めることが分かっているが、*crtYB* の高発現化

と化学的変異導入を組み合わせることにより、最大で約30倍 (6 mg/g DCW) の増産効果を示すとともに、アスタキサンチンが全カロテノイドの約90%を占めた²⁰⁾。

組換え微生物生産系による応用研究

組換え微生物によるカロテノイド生産システムは、有用な生理活性を示すものの天然の存在量が希少なカロテノイドの生産や、自然界から未だ単離されていない、あるいはそもそも自然界に存在しない新規カロテノイドの生産にも応用できる。ここでは、異種生産系を利用した新規・希少カロテノイド生産を目的とした応用研究と、新規宿主生産系の探索の話題について紹介する。

新規・希少カロテノイド生産への応用 エラープローンPCR (error-prone PCR, epPCR) やDNAシャuffling (DNA shuffling) などに代表される進化分子工学的手法を利用した遺伝子改変技術は、目的とする機能を持つ遺伝子の分子育種に非常に有用な方法である。Umenoらは、FPPとGGPPが縮合重合したC35 (C15 + C20) 骨格を持つカロテノイドの大腸菌生産系を構築するとともに、epPCRにより作出した変異型 *crtN* および *crtI* などを用いて10種の新規非天然型C35カロテノイドの生産に成功した²¹⁾。同様に彼らは、C25イソプレノイド骨格であるファルネシルゲラニル二リン酸 (farnesylgeranyl diphosphate, FGPP) の合成を可能にする *Geobacillus stearothermophilus* (旧名: *Bacillus stearothermophilus*) 由来の変異型FPP合成酵素遺伝子 (*BsFDS_{Y81A}*) と、epPCRにより作出した変異型 *crtM* 遺伝子を用いて、FGPPとGGPPが重合したC45 (C25 + C20) 骨格を持つ新規カロテノイド生産系も構築している²²⁾。一方筆者らは、*P. ananatis* のゼアキサンチン配糖体合成遺伝子群、および海洋細菌 *Brevundimonas* sp. SD212 由来の2,2'- β -ヒドロキシラーゼ (2,2'- β -hydroxylase) 遺伝子 (*crtG*) を共発現した大腸菌により、新規カロテノイドであるカロキサンチン3'- β -D-グルコシド (caloxanthin 3'- β -D-glucoside)、天然にはほとんど存在しない希少カロテノイドであるカロキサンチンやノストキサンチン (nostoxanthin) を生産することができた (図3)²³⁾。今後はこれら新規・希少カロテノイド生産システムと大量生産システムとの融合により、天然からの抽出や有機合成による生産が困難な有用カロテノイドの利用促進が期待される。

新しい生産宿主の探索とその利用可能性 これまで紹介してきた大腸菌や酵母を宿主とした組換えカロテノイド生産システムは、使いやすい既存のプラットフォームを利用しているだけに過ぎず、カロテノイドの生産宿主としてこれら微生物が本当に適しているのかは判然と

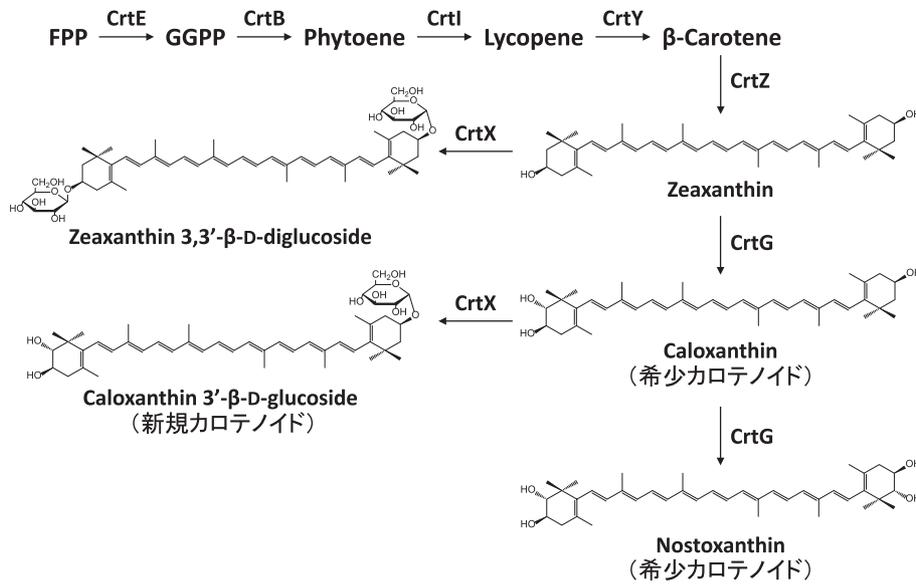


図3. 大腸菌による新規・希少カロテノイドの生産例。

していない。そこで近年、新たなカロテノイド生産宿主の探索が行われている。*Methylomonas* sp. strain 16aは、メタンまたはメタノールを唯一の炭素源として生育可能な偏性メタン酸化性菌であり、カロテノイド非生産菌である。この菌を宿主に *Paracoccus* sp. N81106株 (旧名: *Agrobacterium aurantiacum*) 由来のアスタキサンチン生合成遺伝子群を導入、機能発現すると、メタンを炭素源として最大2.4 mg/g DCWのカロテノイドが生産され、このうち約90%がアスタキサンチンであった²⁴⁾。アルカン酸化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は、菌体内に大量の脂肪酸を脂肪滴 (lipid body) として蓄積することから別名油性酵母 (oleaginous yeast) とも呼ばれており、バイオ燃料や有用物質の生産宿主として近年注目を集めている。カロテノイド非生産菌である *Y. lipolytica* においてはごく最近、*P. ananatis* 由来 *crtB* と *crtI* の導入、ならびに複数のβ酸化経路関連遺伝子のノックアウトを組み合わせて作出した菌株を利用し、グルコースを炭素源とした流加培養により最大16 mg/g DCWのリコペンが生産されており、このうちの約70%はlipid bodyに局在していた²⁵⁾。大腸菌を始めとする組換え微生物によるカロテノイド生産においては、生産されたカロテノイドのほとんどが細胞膜など脂溶性組織に蓄積することから、生育阻害効果が観察されるとともにその蓄積量にも当然ながら限界がある。これに関して大腸菌では最近、細胞壁外膜成分であるリピッドA (lipid A) の菌体外輸送に関与するABC (ATP-binding cassette) 輸送体について、これをコードする *msbA* 遺伝子とカロテノイド生合成遺伝子群との共発現により、デカン (decane) を重層した二相培養系を用いたカロテノイドの分泌生産システム

も考案されている²⁶⁾。一方、油性酵母では1 g DCW当たり40%から70%もの脂質を蓄積できることが報告されており²⁷⁾、カロテノイドの生産宿主としても有望である。筆者らの研究グループでもこの油性酵母のポテンシャルに強い関心を寄せており、産業利用を視野に入れた有用物質生産技術の開発を行なっている。特にカロテノイドを含む有用イソプレノイド生産システム構築を目指し、7属15種の油性酵母について至適培養条件の検討や二次代謝産物プロファイル解析を行った。脂肪酸およびイソプレノイド化合物を対象に定性・定量解析を行った結果、脂肪酸、ステロイドおよびカロテノイドなどを含む計83化合物が検出された。一方、モノテルペン類やセスキテルペン類、あるいはジテルペン類は検出されなかった。また、検出された化合物の成分構成比に基づいてクラスター解析を行ったところ、それぞれの油性酵母株がステロイド類比率が高いクラスター (cluster 1) と脂肪酸比率が高いクラスター (cluster 2) に分類され、同属の菌種間においても成分構成に多様性が認められた (図4)²⁸⁾。これらの結果を基に、カロテノイドなどイソプレノイド類の実用生産に有望な酵母株を選抜している。さらに現在、選抜した実用酵母株については、高発現化やノックアウトなどの遺伝子操作技術の開発によるパスウェイエンジニアリング研究を進めている。

今後の研究展望

これまで紹介してきたように、組換え微生物を利用した異種宿主によるカロテノイド生産研究は、天然物からの大量抽出や複雑な有機合成過程を経ずに「量的」な解決手段を提供するだけでなく、新規構造を持つカロテ

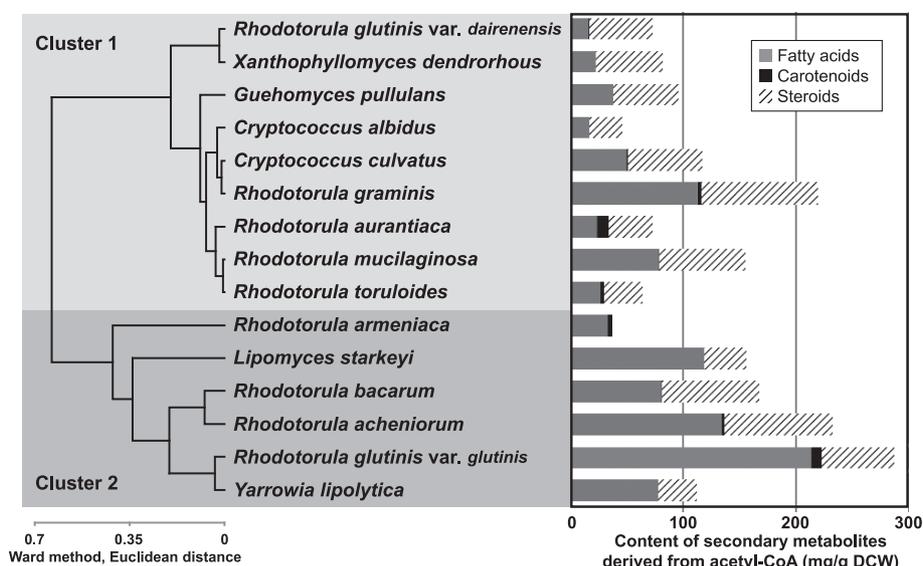


図4. 各種油性酵母株の二次代謝産物プロファイル分析による分類。

ノイドの生産といった「質的」な価値の創造にも貢献できる技術である。実用生産を視野に入れると、現在までに確立されている大腸菌や酵母による生産システムの利用に加え、今後は油性酵母などそれ以外の微生物、さらに言えば高等植物や藻類などを含めた新規宿主生産系の開発、すなわち「適材適種」の生産系開発が必要であろう。このような新しい物質生産系の活用は何もカロテノイド分野に限定する必要はなく、来るべき化石エネルギー資源の枯渇や環境・食糧問題など地球規模の課題に対する備えとして、多種多様なバイオプロセス研究の一翼を担うものと期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究成果の一部は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』により実施したものである。また、本研究を進めるにあたりお世話になりました、石川県立大学生物資源工学研究所の三沢典彦先生、日本女子大学家政学部の新藤一敏先生、大澤絢子先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Misawa, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **172**, 6704 (1990).
- 2) Harada, H. and Misawa, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1021 (2009).
- 3) 三室 守ら：カロテノイド—その多様性と生理活性—, 裳華房 (2006).
- 4) Rohmer, M. *et al.*: *Biochem. J.*, **295**, 517 (1993).
- 5) Misawa, N.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 627 (2011).
- 6) Kaneda, K. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **98**, 932 (2001).
- 7) Kajiwara, S. *et al.*: *Biochem. J.*, **324**, 421 (1997).
- 8) Albrecht, M. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **21**, 791 (1999).
- 9) Das, A. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 505 (2007).
- 10) Li, Y. and Pfeifer, B.: *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **19**, 8 (2014).
- 11) Zhang, C. *et al.*: *PLoS One*, **8**, e75164 (2013).
- 12) Kakinuma, K. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1238 (2001).
- 13) Jiang, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 2497 (2012).
- 14) Harada, H. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 915 (2009).
- 15) 千田大樹ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 59 (2014).
- 16) Miura, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1226 (1998).
- 17) Shimada, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2676 (1998).
- 18) Verwaal, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4342 (2007).
- 19) Özaydın, B. *et al.*: *Metab. Eng.*, **15**, 174 (2013).
- 20) Gassel, S. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **35**, 565 (2013).
- 21) Umeno, D. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 6690 (2002).
- 22) Umeno, D. and Arnold, F.: *J. Bacteriol.*, **186**, 1531 (2004).
- 23) Osawa, A. *et al.*: *Phytochemistry*, **72**, 711 (2011).
- 24) Ye, R. *et al.*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 289 (2007).
- 25) Matthäus, F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 1660 (2014).
- 26) Doshi, R. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **110**, 7642 (2013).
- 27) Ratledge, C.: *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 1047 (2002).
- 28) 小島 基ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 161 (2014).