

リグノセルローズ直接発酵菌の育種

Breeding of Lignocellulose-Direct Fermenting Yeast

岡田 弘 輔*

Hirosuke Okada

1. はじめに

本論説は、文部省の重点領域研究「エネルギー変換と高効率利用」に参加した「生物燃料直接発酵菌の育種」班の研究成果の1部を紹介したものである。昭和62年度から平成元年度までこの研究班に参加していただいた先生方は

名古屋大学農学部 鶴高重三教授、東京大学農学部 別府輝彦教授、大阪府立大学農学部 荒井基夫教授、名古屋大学工学部 小林 猛教授、大阪大学工学部 吉田敏臣教授、大阪府立大学農学部 外村健三教授、広島大学工学部 宮川都吉教授と著者（大阪大学工学部 当時）であった。研究成果の詳細は成果報告書が出版されているのでそちらに譲るとして、本稿では本研究班が何を目標として研究を進めたか、またどの程度目標を達成したかについて、遺伝子工学の専門でない方々に御理解願えるように解説するものである。

2. 再生可能資源からエタノール生産の必要性

石油資源の固渇は一般に言われている程早くはないであろうが、石油埋蔵量に限界がある以上、早晚地球上に訪れるであろう。化学工業の原料としての石油の代替は難しいから、まずエネルギー資源としての石油を他に代替することになるだろう。代替え資源としては、主として核融合反応を含む核エネルギーに仰ぐことになると予測されるが、補助資源として、石炭、地熱や太陽エネルギーとともに再生可能資源の利用が考えられている。再生可能資源とは毎年地球上で再生産されている農林水産資源の総称である。再生産可能資源の年産量は¹⁾、

糖類（主としてしょ糖）	1億トン
でん粉（主として穀物）	10億トン
リグノセルローズ	1000億トン

*熊本工業大学 教授
〒860 熊本市池田4-22-1

と推定されている。糖およびでん粉からのエタノール生産はすでに確立されている。しかし将来の食糧問題に悪影響をおよぼすと思われる糖やでん粉をエネルギー資源に利用することは控えるべきであろう。リグノセルローズの年産額は（またそれがもっているエネルギー総量）は現在の年間石油消費量を充分賄うものである。しかし徹底利用は生態系の破壊、ひいては環境問題を惹起するし、採集コストが高くつくことなどから燃料への転換には量が限られるであろう。

リグノセルローズをエネルギーに転換するには必ずしもエタノールにする必要はなく、そのまま燃料にすることは可能であるが、移動式のエネルギー発生装置（例えば自動車）では液体であることが要求される。

リグノセルローズは主として、セルローズ（約40%）、ヘミセルローズ（約20%）、リグニン（約20%）からなっている。もちろん針葉樹、広葉樹、草など植物種によって含有量は変動する。植物細胞ではセルローズやヘミセルローズ繊維間をリグニンが埋めている構造をとっており、酵素分解に対して抵抗性である。したがってまずこの構造を破壊するような前処理が必要である。前処理については別稿で越島哲夫教授から紹介がある筈である。

3. セルローズからエタノールへの変換

原理的には、セルローズをセルラーゼなどの酵素で加水分解すればグルコースが生じる。このグルコースを酵母でエタノール発酵するとエタノールが生産される。通産省が行った新燃料研究組合が、セルロース性資源からのエタノール生産をパイロットプラントまで開発研究を行い、その成果が刊行されている²⁾。その工程を図-1に示している。バガス（さとうきびの絞り糟）を原料として *Trichoderma* の生産するセルラーゼ系を糖化酵素として使い、発酵には固定化酵母をバックしたカラムを用いて連続発酵を使用するという方法でエタノールを生産している。この方法を使用した

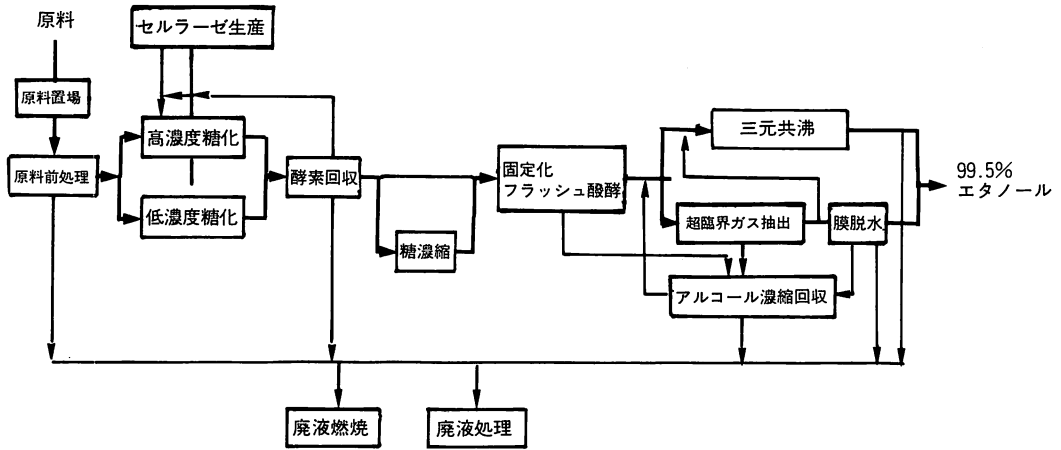


図-1 リグノセルロースからエタノール生産のパイロットプラント、フローダイアグラム

として原価計算すると約200円/kgになった。この原価が半分になるか、石油価格が倍以上の高騰がないと実用化できないことになる。さらに生産原価を下げるために、*Trichoderma*によって作らせていたセルラーゼ系酵素を酵母自身に生産させることを考えた。すなわち直接発酵菌の育種である。

4. キシランからエタノールの生産

ヘミセルロースの主成分であるキシランはキシロースの縮合重合体である。したがってセルロースの場合と同様にキシランを分解する酵素系（キシラナーゼとβ-キシロシダーゼ）によってキシロースまで分解できる。したがってこれらの酵素遺伝子を酵母に導入すると、酵母自身によってキシロース迄分解が可能になる筈である。しかしアルコール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) はキシロースを効果的に発酵することができない。キシラン直接発酵のためには、酵母にキシロース発酵の能力を付与する必要がある。

遺伝子工学が発達した結果、特定の酵素の遺伝子を核外遺伝子（プラスミド）中に挿入して酵母の中に導入すること（クローン化）、その遺伝子を酵母の中で発現させて酵素を生産させること、および遺伝子を改良して酵素生産量を合成全蛋白質の数%ないし数十%に達させることが可能になっている。この技術を使用してセルロースまたはキシランを直接発酵する酵母を育種するのがこの研究班の目的であり、それによってリグノセルロース資源からのエタノール生産原価を下げるのが目標である。

5. 直接発酵菌育種のための要素技術

前に述べた基本方針にしたがって直接発酵菌を育種するために解決しなければならない技術問題点を列挙すると、セルロース直接発酵菌育種の場合には、図-2に示すように、

- 1) 適当な微生物からセルラーゼ系酵素、[C₂セルラーゼ（非結晶構造のセルロース分子に作用して、セル

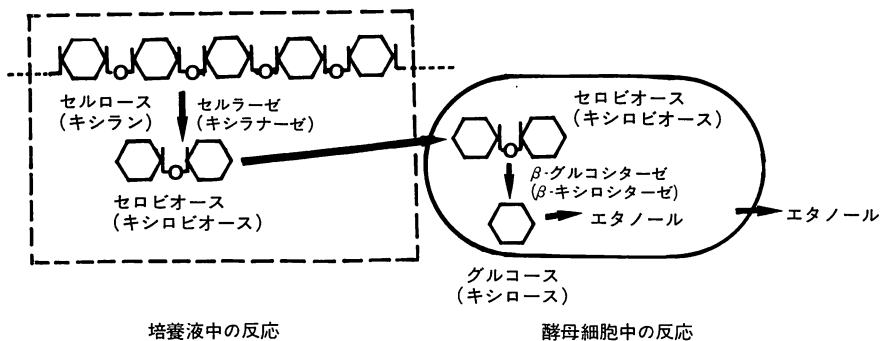


図-2 セルロース（キシラン）を直接アルコール発酵する酵母の代謝経路

ローズの低分子化を行う), エンドグルカナーゼ (セルローズ分子の末端に作用して順次グルコース分子を切り離す), セロビオヒドラーゼ (セルローズの非還元末端からセロビオース単位で切り離す), や β -グルコシダーゼ (セロオリゴ糖からグルコースを生成する)] 遺伝子を大腸菌にクローン化する. 大腸菌を宿主として使用するのは, 大腸菌で遺伝子組み換え技術が一番進んでいるからである.

2) クローン化した遺伝子を酵母に導入する.

3) 導入した酵素遺伝子を酵母内で発現させ, 酵素を生産させる.

4) セルローズなどの高分子化合物は細胞内に取り込まれないので, 分解酵素を細胞外に分泌させ, 低分子化してから細胞内へ取り込ませること.

が必要である. セルラーゼ系酵素のセルローズに対する作用は単独では殆んど作用せず, 種々の酵素の協同作用による相乗効果が大い. したがって酵母によって複数種の酵素を生産させることが望ましく, その組み合わせを適当に選ぶ必要がある³⁾.

キシラン直接発酵菌の育種もセルローズの場合と共通である.

1) キシラン分解系酵素 [キシラナーゼ (キシランを分解してキシロオリゴ糖を生じる), β -キシロシダーゼ (キシロオリゴ糖からキシロースを生じる) 遺伝子を大腸菌にクローン化する.

2) 上記酵素遺伝子を酵母に導入する.

3) 上記酵素遺伝子を酵母の中で発現させて, これらの酵素を生産させる.

4) キシラナーゼを酵母細胞外へ分泌させる.

その他にアルコール酵母をキシロース発酵性にするために,

5) キシロース還元酵素, またはキシロースイソメラーゼ遺伝子をクローン化し, 酵母に導入, 発現させる必要がある.

以上の技術要素の他に, 酵母に生産させる酵素をできるだけ活性が高く, 使い易いように改良しておくことが望ましい. このためにはいわゆる蛋白質工学の技法が応用できるであろう.

6. キシラン直接発酵菌の育種

著者らは研究班の中でキシラン直接発酵菌の育種を担当したので, まずキシラン直接発酵菌の場合をやや

```

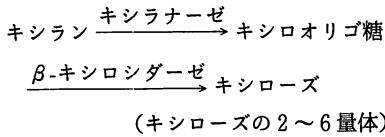
                20          40          60          75          90
GAATTCATT CAICTTAGAG ATGCACAGAAT TAAAAGGATG AAAAAAGGAGA GGAATGACGA ATG AAT TTG AGA AAA TTA AGA CTG TTG TTT GTG ATG
                MET ASH LEU ARG LYS LEU ARG LEU LEU PHE VAL MET
105          120          135          150          165          180
TGT ATT GGA CTG ACG CTT ATA CTG ACG GCT GTA CCA GCC CAT GCG AGA ACC ATT ACG AAT AAT GAA ATG GGT AAC CAT AGC GGG TAL
CYS ILE GLY LEU THR LEU ILE LEU THR ALA VAL PRO ALA HIS ALA Arg Thr Ile Thr Asn Asn Glu Met Gly Asn His Ser Gly Tyr
195          210          225          240          255          270
GAT TAT GAA TTA TGG AAG GAT TAT GGA AAC ACC TCG ATG ACA CTC AAT AAC GGC GGG GCA TTT AGT GCA GGC TGG AAC AAT ATC GGA
Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Glu Asn Thr Ser Met Thr Leu Asn Asn Gly Gly Ala Phe Ser Ala Gly Trp Asn Asn Ile Gly
285          300          315          330          345
AAT GCT TTA TTT AGA AAA GGG AAA AAG TTT GAT TCC ACT AGA ACT CAC CAT CAG CTT GGC AAC ATA TCC ATC AAT TAC AAC GCA AGT
Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asp Ser Thr Arg Thr His His Gln Leu Gly Asn Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ala Ser
360          375          390          405          420          435
TTT AAC CCA AGC GGG AAT TCC TAT CTA TGT GTC TAT GGC TGG ACA CAA TCT CCA TTA GCA GAA TAC TAC ATT GTF GAT TCA TGG GGC
Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Gln Ser Pro Leu Ala Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly
450          465          480          495          510          525
ACA TAT CGT CCA ACA GGA GCG TAT AAA GGA TCA TTT TAT GCT GAT GGA GGC ACA TAT GAC ATT TAT GAA ACA ACC CGT GTC AAT CAG
Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Ala Tyr Lys Gly Ser Phe Tyr Ala Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val Asn Gln
540          555          570          585          600          615
CCT TCC ATT ATC GGG ATC GCA ACC TTC AAC CAA TAT TGG AGT GTA CGT CAA ACG AAA CGT ACA AGC GGA ACG GTC TCC GTC AGC GCG
Pro Ser Ile Ile Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Thr Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Ser Val Ser Ala
630          645          660          675          690          705
CAT TTT AGA AAA TGG GAA AGC TTA GGG ATG CCA ATG GGG AAA ATG TAT GAA ACG GCA TTT ACT GTA GAA GGC TAC CAA AGC AGC GGA
His Phe Arg Lys Trp Glu Ser Leu Gly Met Pro Met Gly Lys Met Tyr Glu Thr Ala Phe Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly
720          735          760          780          800
AGT GCA AAT GTG ATG ACC AAT CAG CTG TTT ATT GGC AAC TAAAAA AGTCAAAGAA AAGAGCCGGG AGCAAACACT CTGGCTTTTT CTATCATAAT T
Ser Ala Asn Val Met Thr Asn Gln Leu Phe Ile Gly Asn
820          840          860          880          900
TTTCAACT CGACTCTGCC GGGAAAGAAC GTTCCGGAAA AGAACGTGCG ACCGCCGCC ATATCTGCCA AGCGATCAGG TGTGAGCCA TTCACCAAAAT GTTTTT
TGCC TTTTTGGTC TGCCATAAT CTTGGCTGAC AACACACCA GATAACACAT TTTGTCCGAC TGACACGATC AGCTGCGAAT CTCCTCGATG ATTCAGCACA
1020          1040          1060
CGAACCATGT CCCCATCTC AATCTGTCTT TCTTTTGCAT CTGTTCAT CATATGAGGC

```

図-3 *B. pumilus* IPOのキシラナーゼ遺伝子の塩基配列と, それから推定されるアミノ酸の一次配列

詳しく説明する。

微生物のキシラナーゼがクローン化されているのは主として*Bacillus*属細菌のものである。我々はキシラナーゼ高生産株*B. pumilus* IPOをタイ国水田土壌から分離し⁴⁾、キシラン分解に関与する酵素、キシラナーゼと β -キシロシダーゼを精製し、その諸性質を検討した^{4, 5)}。その結果キシラン分解経路は次のように決定された。



B. pumilus IPOの染色体DNAからキシラナーゼ遺伝子を、ベクタープラスミド(核外遺伝子プラスミドから改良して、遺伝子クローン化用に便宜に作成したプラスミド)pBR322を使って大腸菌にクローン化し⁶⁾、その塩基配列を決定した⁷⁾。決定した塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸の一次配列を図-3に示している。その結果からキシラナーゼは228個のアミノ酸からなるプレエンザイムとして生産され、アミノ末端の27アミノ酸残基は分泌のためのシグナルである(このシグナルは*Bacillus*属細菌では認識されるが、大腸菌や酵母では認識されない)⁸⁾。分泌シグナル部分はキシラナーゼが細胞外へ分泌されるときに切除されて、残りの201アミノ酸残基が成熟型のキシラナーゼになる。

上に述べたpBR322に*B. pumilus*の染色体DNAの断片を挿入した合成プラスミド、pOXN29はキシラナーゼ遺伝子をも含んでおり、そのDNAの塩基配列を決定した決果から、 β -キシロシダーゼは537アミノ

酸残基からなるペプチド2分子からなるホモダイマー酵素であることが判った。

キシラナーゼの機能を十分理解し、改良するためには、その立体構造を把握し、触媒作用の機構を知っておく必要がある。そのためにキシラナーゼのX線結晶解析を行った。解析用の単結晶はポリエチレングリコール6000溶液からマイクロディフュージョン法により析出させた。重原子置換体はPtイオンまたは UO_2 イオンの溶液に浸し同位置換体を作成した⁹⁾。天然型および重原子置換型のキシラナーゼを4軸回転型のX線回折計を用いて解析した。30,000点以上の反射スポットの密度を測定し、計算を行った。得られた電子密度地図を解釈して立体構造を推定した。図-4Aはアミノ酸の α 位炭素の配置、図-4Bは全立体構造を2次構造で示したものである。キシラナーゼは3つの大きな β -シート構造と、1つの小さな α -ヘリックス構造からなっている。2つの β -シート構造は折れ曲ってV字形を作っており、その中に基質キシランを収容するのに十分なクレフトを形成している¹⁰⁾。

キシラナーゼの触媒作用に直接関与するアミノ酸残基の推定は次のような理由からGlu⁹³とGlu¹⁸²と推定した。

- 1) リゾチームからの類推で酸性アミノ酸が触媒基であろうと考えられること。
- 2) キシラナーゼのクレフト内に突出していること。
- 3) 進化起源を同じくしていると考えられるキシラナーゼ(*B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereulans*, *Trichoderma harzianum*, *Schizophyllum commune*)間で残基が保存されていること。

以上の条件を満足するものはAsp²¹, Glu⁹³とGlu¹⁸²

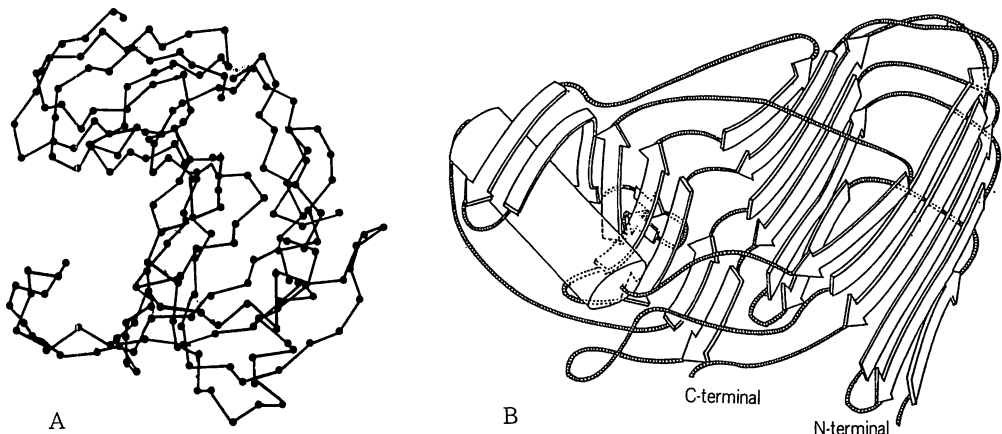


図-4 キシラナーゼの立体構造, 各アミノ酸の α 位炭素(A)または二次構造(B)で示す

のみである。Glu⁹³は重原子置換体を作成するときのUO₂イオンの結合部位であり、UO₂⁻がキシラナーゼ1分子に対して1原子結合すると活性は完全になくなる。また、グリシンアミドでGlu⁹³を修飾しても活性が完全に消失するのでGlu⁹³は触媒活性に関与していると考えられる。他の候補残基、Asp⁹¹、Glu⁹³とGlu¹⁸²を部位特異的変異法（蛋白質のアミノ酸一次配列の中の特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する方法）でセリンまたは他方の酸性アミノ酸に置換して変異キシラナーゼを作った結果から、Glu⁹³とGlu¹⁸²が触媒基と決定された。

キシラナーゼ遺伝子を酵母に導入し、発現させるために2種類の合成プラスミドを作成した。1つはpYXN3と命名したが、酵母の性ホルモン、 α -因子の遺伝子を利用した。 α -因子のプロモーター、 α -因子の分泌シグナルの直後に成熟型キシラナーゼ遺伝子が来るように設計した。 α -因子遺伝子の分泌シグナルをコードしている部分の末端に存在するHind IIIサイトと、キシラナーゼ遺伝子の中に存在するBst E IIサイトを計画に合致するように合成したオリゴヌクレオチドリンカーを用いて連結した。このように作成した合成プラスミドを大腸菌中で増殖させ、回収したのち酵母に導入した。形質転換酵母は少量のキシラナーゼを生産したが、細胞外へは分泌していなかった。

次に合成したpNAX 2では、強力なプロモーターの支配下に成熟型キシラナーゼ遺伝子を置くことを試みた。強力プロモーターとしてGAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のプロモーターを利用した。合成したプラスミドpNAX 2の構造を図-5に示している。GAPプロモーターの下流に

存在するEco RIサイトと、キシラナーゼ遺伝子の中に存在するBst E IIサイトの間を合成リンカーを用いて連結した。リンカーはEco RIサイトの直後に翻約開始コドンATG、次いで成熟型キシラナーゼをコードするように設計してある。したがってこのプラスミドがコードしているキシラナーゼはN末端にメチオンが付加している。

pNAX 2を大腸菌中で増殖し回収して酵母中に導入した。形質転換酵母株は細胞内に大量のキシラナーゼを生産していたが、培地中への分泌は見られなかった。また酵母によって生産されたキシラナーゼはグリコシル化されていなかった。pYXN 3とpNAX 2の酵母中での発現を比較すると

プラスミド	プロモーター	キシラナーゼ活性
pYXN 3	α -因子	8 mU/A ₂₈₀
pNAX 2	GAP	180mU/A ₂₈₀

である。pNAX 2は酵母内で十分量のキシラナーゼを生産していることがわかった。

B. pumilus IPOの β -キシロシダーゼを酵母中で発現させるために合成プラスミドpYXBを構築した。プロモーターとしてはGAPのものを使用し、その下流に β -キシロシダーゼ遺伝子を結合するように設計したが、原遺伝子の翻約開始コドンがTTGであったのを、より効率のよいATGに改訂した。すなわち、GAPプロモーターの下流にあるEco RIサイトと酵素遺伝子の中にあるHgi A Iサイトを、設計に合致するように合成したリンカーで結合した。pYXBはシャトルベクターであり、大腸菌中では、細胞抽出液中の蛋白質1mg当り0.8Uの β -キシロシダーゼを、また酵母中では同じく蛋白質1mg当り0.3Uの酵素を生産していた。この酵母中での生産量は全蛋白質の1%に相当し、キシラン直接発酵菌の育種には十分な発現量であった。

以上キシラン直接発酵菌の育種に必要な要素技術(キシロース発酵性酵母の育種を除いて)は、①キシラナーゼ遺伝子のクローン化、②キシラナーゼ遺伝子の酵母への導入、③キシラナーゼ遺伝子の酵母での発現、④キシラナーゼの分泌、⑤ β -キシロシダーゼ遺伝子のクローン化、⑥ β -キシロシダーゼ遺伝子の酵母への導入、⑦ β -キシロシダーゼ遺伝子の酵母での発現、のうち④の分泌以外はすべて達成されたことになる。

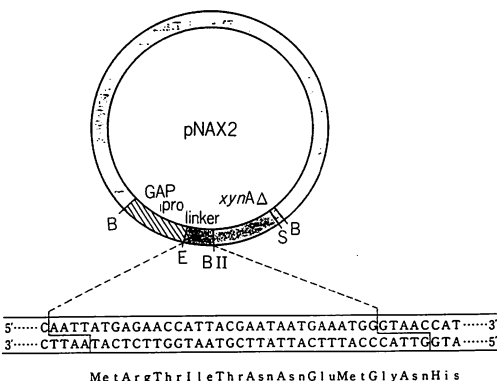


図-5 pNAX 2 の構造

7. キシロース発酵性酵母の育種

(担当, 吉田敏臣教授)

通常のアルコール酵母は、キシロースを発酵できない。キシロース資化性酵母として知られる *Pichia stipitis* はエタノール収率が悪く、嫌気性でアルコール発酵ができないという欠点がある。予測されるキシロースからエタノールに至る代謝経路を図-6に示している。アルコール酵母がキシロースからエタノールを生産できることは、キシロース培地にキシロースイソメラーゼ（キシロースからキシリトールへの反応を触媒する）を添加するとエタノールを生産することからわかる。キシロースからキシリトールに至る経路は2つ考えられる。1つは前述のキシロースイソメラーゼによる方法で、他は *Pichia stipitis* で行なわれている経路¹¹⁾でキシロースからキシリトールまでキシロース還元酵素が触媒し、次いでキシリトールからキシリトールへキシリトール脱水素酵素が触媒している。

P. stipitis のキシロース還元酵素を精製し、その情報を利用して遺伝子をクローン化した。クローン化遺伝子を酵母に導入した。その結果、酵母中でキシロース還元酵素のmRNAの存在が確認でき、また酵素活性も認められるが、キシロースを炭素源として生育することはできなかった。この原因は種々考えられるが、酵素の生産量が少なすぎること、キシロースからキシリトールへの還元反応とキシリトールからキシリトールへの酸化反応の共役がうまく行っていないことなどが考えられるが、将来の検討が必要であろう。

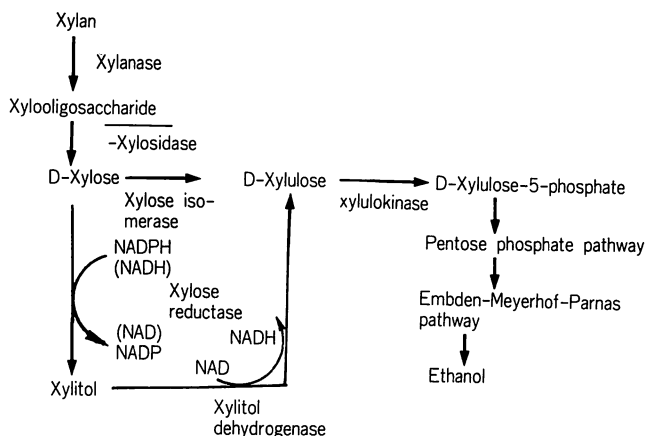


図-6 酵母におけるキシロース代謝経路

8. セルロース直接発酵菌の育種

(担当, 別府輝彦教授, 荒井基夫教授, 小林 猛教授, 宮川都吉教授)

セルロース直接発酵菌の育種についてはキシランの場合と類似に考えられるので現在まで研究班が達成した成果についてのみ紹介する。

1) セルラーゼ系遺伝子のクローン化, *Bacillus subtilis*^{12,13)}, 好アルカリ性 *Bacillus* 属細胞 (理化学研究所 堀越弘毅教授), *Aspergillus acleatus*^{14,15)}, 好熱嫌気性菌 NA10¹⁶⁾, 3B¹⁷⁾, 腸内細菌 *Ruminococcus albus*^{18,19)} のクローン化に成功した。

2) 以上のうち NA10 株のエンドグルカナナーゼとセロビオヒドラーゼ²⁰⁾ と, *A. acleatus* のセルラーゼは酵母に導入されて効果的に発現され酵素生産に成功している。

3) β -グルコシダーゼについては, *R. albus* 由来のもの, *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のものがクローン化された。

4) *S. fibuligera* 由来のものは酵母に導入され, 発現, 酵素生産に成功している。さらにこの場合は酵母細胞外へ分泌させることができた。

しかし現在までセルラーゼを分泌させることには成功しておらず課題として残されている。

9. セロビオース発酵性酵母の育種

(担当, 宮川都吉教授)

上で述べた *S. fibuligera* の β -グルコシダーゼ遺伝子をアルコール酵母に導入した酵母の例では, 生産された β -グルコシダーゼは細胞外に分泌される。この

酵母はセロビオースを炭素源としてエタノールを生産することが確認された。この酵母にさらにセルラーゼを分泌生産させる能力を付与すれば、目的とするセルローズ直接発酵菌の育種が完成する筈である。

10. おわりに

本稿の中では研究班の成果について主として紹介してきた。世界の中では、本研究班のセルラーゼやキシラナーゼ遺伝子のクローン化の研究、蛋白質工学的研究は最先端に位置していると自負しているし、原核生物の遺伝子の真核生物での発現、分泌と云った未知の分野を開拓する必要性にも遭遇している。解決はこの班の研究の中から生まれるかも知れないし、また世界中のバイオテクノロジーの発展の中で生まれ、この研究目的に利用されるかも知れない。

当初計画した成果の殆んどに成功した事を班員の先生方の御努力に感謝します。

引用文献

- 1) Holt et al (岡田弘輔 訳); バイオテクノロジー—OECD リポート, 培風館 (1982).
- 2) 新燃料油開発技術研究組合; 新燃料油研究開発調査 (1990).
- 3) Wood, W. A., and Kellogg (ed); Methods in Enzymol., 160, (1988).
- 4) Panbangred, W. et al; Agric. Biol., Chem., 47, (1982) 957.
- 5) Panbangred, W. et al; Mol. Gen. Genet. Appl. Microbiol. Biotechnol., 192, (1983) 259.
- 6) Panbangred, W. et al; Eur. J. Biochem., 138, (1984) 267.
- 7) Fukusaki; E. et al; FEBS Lett., 171 (1984) 197.
- 8) Panbangred, W. et al; Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, (1985) 259.
- 9) Moriyama, H. et al; J. Mol. Biol., 193, (1987)
- 10) Katsube, Y., et al; Protein Engineering (Ikehara, M. ed) p. 91, Japan Scientific Soc. Press (1990).
- 11) Schellenberg, G. D. et al; J. Bacteriol., 259, (1983) 6826.
- 12) Koide, Y. et al; Agric. Biol. Chem., 50, (1986) 233.
- 13) Nakamura, A. et al; Eur. J. Biochem., 164, (1987) 317.
- 14) Ooi, T. et al; Nucleic Acid Res., 18, (1990) 5884.
- 15) Ooi, T. et al; Curr. Genet., 18, (1990) 217.
- 16) Honda, H. et al; Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, (1987) 480.
- 17) Kawai, S. et al; Agric. Biol. Chem., 51, (1987) 59.
- 18) Honda, H. et al; Enz. Microbial. Technol., 10, (1988) 559.
- 19) Honda, H. et al; Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, (1988) 264.
- 20) Honda, H. et al; Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, (1988) 57.

