

代謝プロファイリング法の微生物育種技術への応用

Application of Metabolic Profiling to Microorganism Breeding Technology

蓮 沼 誠 久*
TOMOHISA HASUNUMA*

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

* TEL: 078-803-6356 FAX: 078-803-6192

* E-mail: hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada, Kobe 657-8501, Japan

キーワード: 代謝プロファイリング, メタボロミクス, 酵母, 藻類

Key words: Metabolic Profiling, Metabolomics, Yeast, Algae

(原稿受付 2016年8月7日/原稿受理 2016年8月14日)

1. はじめに

植物や藻類等のバイオマス資源を液体燃料や汎用化学品に変換するバイオリファインリーは、地球上の炭素循環の定常化や持続的なエネルギー供給を実現する方策として期待されている。一方で、実用化を実現するには課題が多く、微生物発酵工程の効率化もその課題の一つである。一般に、微生物の細胞内代謝は複雑なネットワークを形成し、遺伝子発現・翻訳レベル、タンパク質活性レベル、代謝物レベルで厳密に制御されている。したがって、微生物の発酵効率を向上させるためには、グローバルな代謝情報を獲得し、得られた情報に基づいて微生物改変戦略を立案することが重要である。筆者らは、トランスクリプトミクスやメタボロミクス、代謝フラックス観測技術等により細胞内代謝物の分布やターンオーバーを詳細に解析し、グローバルな細胞内情報から合理的に微生物を育種する技術を開発し、微生物の発酵能を向上させることを目指してきた。

2. 代謝プロファイリング法に基づく微生物育種

細胞に含まれる低分子化合物(代謝物質)の蓄積量を網羅的に定量する代謝プロファイリング(メタボロミクス)は、ゲノム情報である遺伝子の発現、翻訳産物であるタンパク質の生化学反応を経て形成される細胞の表現型を特徴づけることができる。数十種類以上の代謝物質の蓄積量の増減を計測することにより、細胞の代謝状態を俯瞰することが可能であり、微生物が生産する高機能性化合物の生産性に寄与するバイオマーカーの特定、バイオマーカーに基づく優良変異株の選抜や培養条件の最適化が可能になる¹⁻³⁾。

一般に、代謝プロファイリングでは、培養液から細胞を回収して、細胞内代謝成分を抽出し、分離・分析に供

する。*In vivo*の代謝プロファイルをより正確に観測するためには、培養液のサンプリング後、速やかに代謝反応を停止させること(クエンチング)が求められる。また、細胞と培養液の分離、細胞からの代謝物の抽出効率も重要である。また、サンプル調製中に細胞内成分が細胞外へ漏出することを防がなくてはならない。出芽酵母を例にとって作業手順を述べる⁴⁾。培養液をサンプリングすると同時に -50°C に冷却したメタノールと混合してクエンチングを行った後、直ちに培養液を除く。次に、沸騰したエタノール中で細胞を懸濁することによって細胞内代謝成分を抽出し、これを遠心上清として回収する。抽出した代謝物の分離・分析には、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計(LC-MS/MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)などが用いられる。代謝プロファイリングにおいて最もよく用いられる分析技術は、質量分析である⁵⁾。質量分析の利点は、大量の定性情報が得られる上に、高感度な定量が可能なことである。CE-MSは馴染みの薄い分析システムかもしれないが、CEはイオン性化合物の分離に優れている点が大らかな魅力である。生体内にはATPやNADH、NADPHといったヌクレオチド類、CoAなどの補酵素類をはじめ、細胞内のエネルギー状態を反映し、細胞内代謝と密接な関連があるイオン性化合物が数多くあり、CE-MSによるイオン性成分の網羅的解析手法は代謝プロファイリングの重要な役割を担うと考えられる。

筆者らは、キシロース資化性を付与した遺伝子組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を実験材料とし、発酵阻害物質の一つである酢酸の存在下における代謝プロファイル解析した。酢酸やギ酸といった低分子の弱酸は、非解離状態で細胞膜を通過し、細胞内で解離してプロトンを放出することで細胞内pHを低下させる⁶⁾。細胞内pHの低下は中央代謝系や核酸の生合成を阻害する。ま

た、過剰に蓄積したプロトンを汲出すために ATPase が稼働して細胞内 ATP を枯渇させると考えられている⁶⁾。従来、弱酸の細胞内への流入は代謝系全般に悪影響を与えるため、発酵阻害を回避する酵母の育種は容易ではなかった。弱酸の流入を回避するために、発酵液の pH を上昇させる手段もあり得るが、バクテリア等の雑菌汚染のリスクを考えると得策ではない。そこで本研究では、メタボローム解析によりグローバルな代謝物プロファイルを取得し、酢酸添加により阻害されるエタノール生合成系のボトルネック反応を探索することとした⁴⁾。具体的には、0, 30, 60 mM の酢酸存在下でキシロース発酵を行い、解糖系、ペントースリン酸経路 (PPP), TCA 回路の中間代謝物や補酵素類の細胞内蓄積量の経時変化を調べた。その結果、酢酸濃度依存的に PPP に関与する代謝中間体が蓄積していることが分かった。特に、発酵開始 24 h 後のセドヘプトコース 7 リン酸 (S7P) は、60 mM の酢酸を添加することにより、酢酸非添加時と比べて 22 倍以上増加した (図 1)。この結果は、酢酸添加により PPP の代謝フラックスが減速している可能性を示唆している。そこで、S7P を基質とするトランスアルドラーゼの遺伝子 *TAL1* を *TDH3* プロモーターの下流に連結して、構造的に過剰発現させた。その結果、*TAL1* 高発現型キシロース資化性酵母は酢酸存在下で高いエタノール生産性を示し、30 mM 酢酸存在下では 83% の対糖エタノール収率を達成した (図 1)。

代謝プロファイリングは合理的な代謝改変戦略を可能とし、進化学と合わせて有効な微生物育種技術の一つとなっている (図 2)。つまり、代謝プロファイリング等のシステムバイオロジー解析に基づく代謝改変を施した後に、進化学的アプローチにより微生物代謝をファインチューニングすることでストレスに対する耐性能を向上させることができる。最近では、その順序を逆にし、進化学的手法で改変した微生物のシステムバイオロジー解析を行うことで有用な形質特定し、それを人為的に付与していく **Inverse Metabolic Engineering** (逆代謝工学) の有効性が見出されている¹⁾。しかしながら、変異株の中から優良株を見出すスクリーニングや、ナチュラルオカレンスでの変異出現を促す長期間の馴化培養は作業が煩雑で時間がかかるという問題もある。そこで、筆者らは短期間で逆代謝工学を行う新規の微生物育種アプローチを開発した⁶⁾。

本来、微生物の代謝システムは可塑的であり、生育環境に柔軟に対応することができる。筆者らは、発酵の前培養液に 20 mM ギ酸あるいは 30 mM 酢酸を添加し、ここで増殖した出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いてギ酸あるいは酢酸存在下のキシロース発酵を行った (図 3)。その結果、72 h の前培養時に酸にさらされた株では発酵阻害が見られず、キシロースを効率的にエタノールに変換できることが明らかになった (図 4)。ここで考えられるのは、酵母が前培養の間に代謝状態を変化させて酸

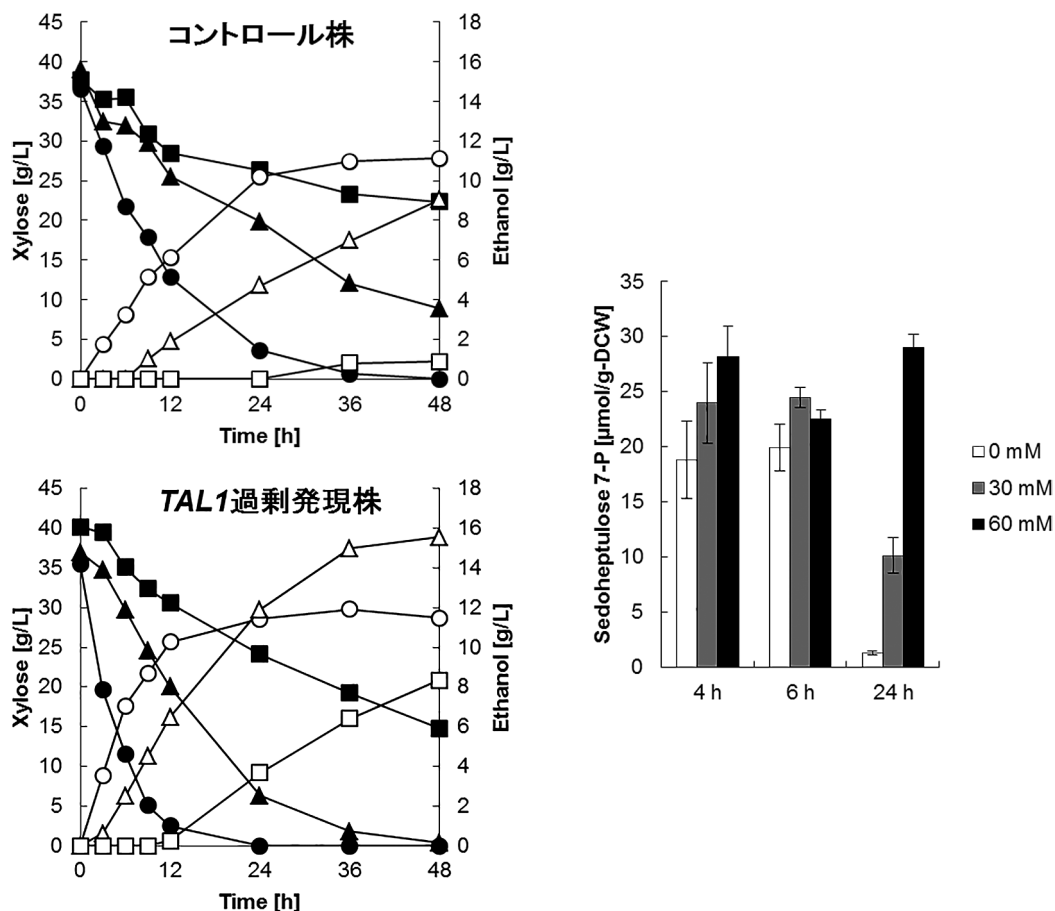


図 1. 0 mM (●), 30 mM (△), 60 mM (□) 酢酸存在下におけるコントロール株と *TAL1* 過剰発現株のキシロースからのエタノール生産と、0–60 mM の酢酸存在下でキシロース発酵を行った時のセドヘプトコース 7 リン酸のブルーサイズの経時変化。

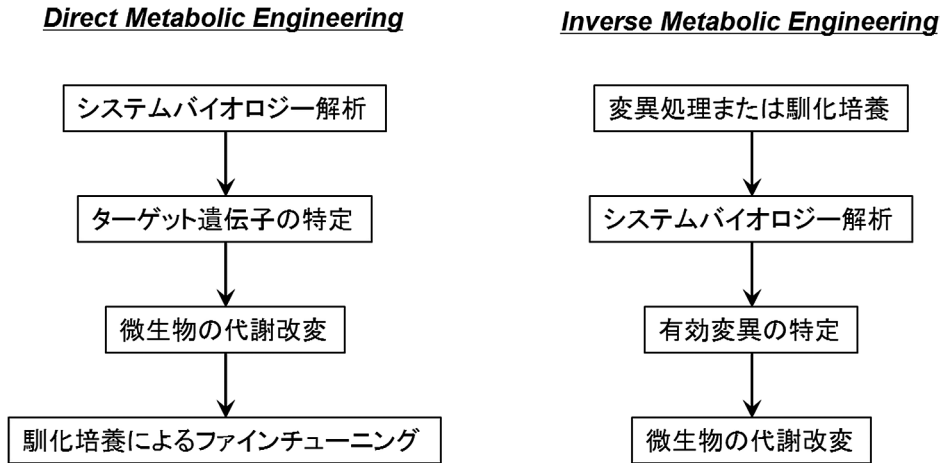


図2. ストレス耐性付与のための微生物改変ストラテジー。

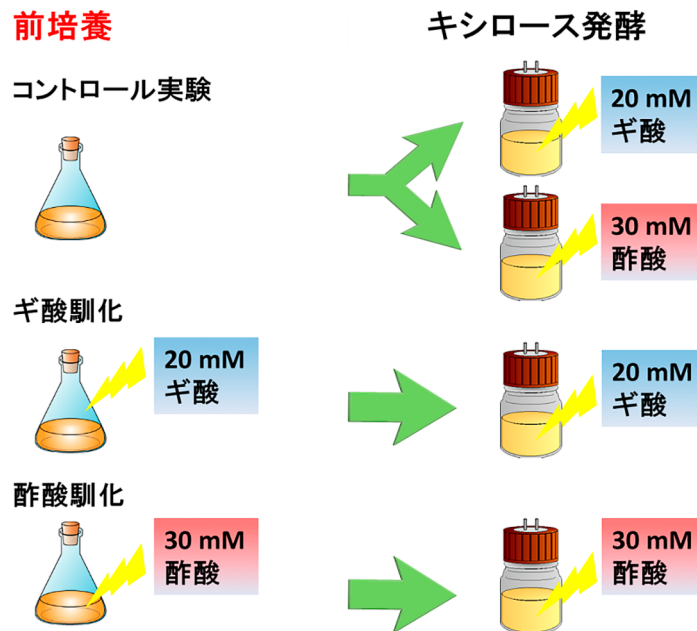


図3. 吉酸、酢酸への短時間（72 h）馴化後のキシロース発酵試験。

ストレスへの対応を行ったために、本発酵での発酵能を向上させたのではないかということである。発酵時の酵母のトランスクリプトーム解析を行ったところ、前培養時の酸添加により、213 遺伝子の発現が増加し、559 遺伝子の発現が低下していた。したがって、酵母は代謝を包括的にリプログラミングさせていたと考えられる。筆者らは、mRNA の転写・翻訳に関与する遺伝子 (*RNC3*, *ANBI* 等) が高発現していたことに着目し、これらを過剰発現するキシロース資化性酵母を作出した。その結果、*RNC3* あるいは *ANBI* 過剰発現酵母は吉酸および酢酸に対する耐性能が高いことが明らかになった。これまでに、酸存在下のキシロース発酵を向上させる遺伝子はいくつか単離されてきたが⁷⁻⁹⁾、転写・翻訳系遺伝子がキシロース発酵を向上させた例は初めてである。短期間のストレス応答を解析するという新規アプローチが新たな鍵遺伝子の同定を可能にしたのかもしれない。

3. 藻類を利用したバイオベース化学品生産

近年、水圏のバイオマスを利用する第三世代バイオ燃料の生産が注目されている¹⁰⁾。その理由として、光、水、CO₂ と微量のミネラルで増殖させることができ、倍加時間が短いため、一定のバイオマスの収穫に必要な生産域が陸生のバイオマスよりも少なく済むということが挙げられる。また、通年の収穫が可能な藻類の利用は、より安定なエネルギー供給を実現し得る。さらに、海洋性藻類を利用すれば、陸生バイオマスの利用で直面する耕作地の限界や水資源の枯渇を回避できるという点も利点である。

藻類は光エネルギーを ATP や NADPH などの化学エネルギーに変換し、これらを使って CO₂ から油脂や炭水化物（デンプンやグリコーゲン等）を生産する。シアノバクテリア（ラン藻）の場合は、独立栄養条件下でグリコーゲンを細胞内に蓄積することが知られている¹¹⁾。

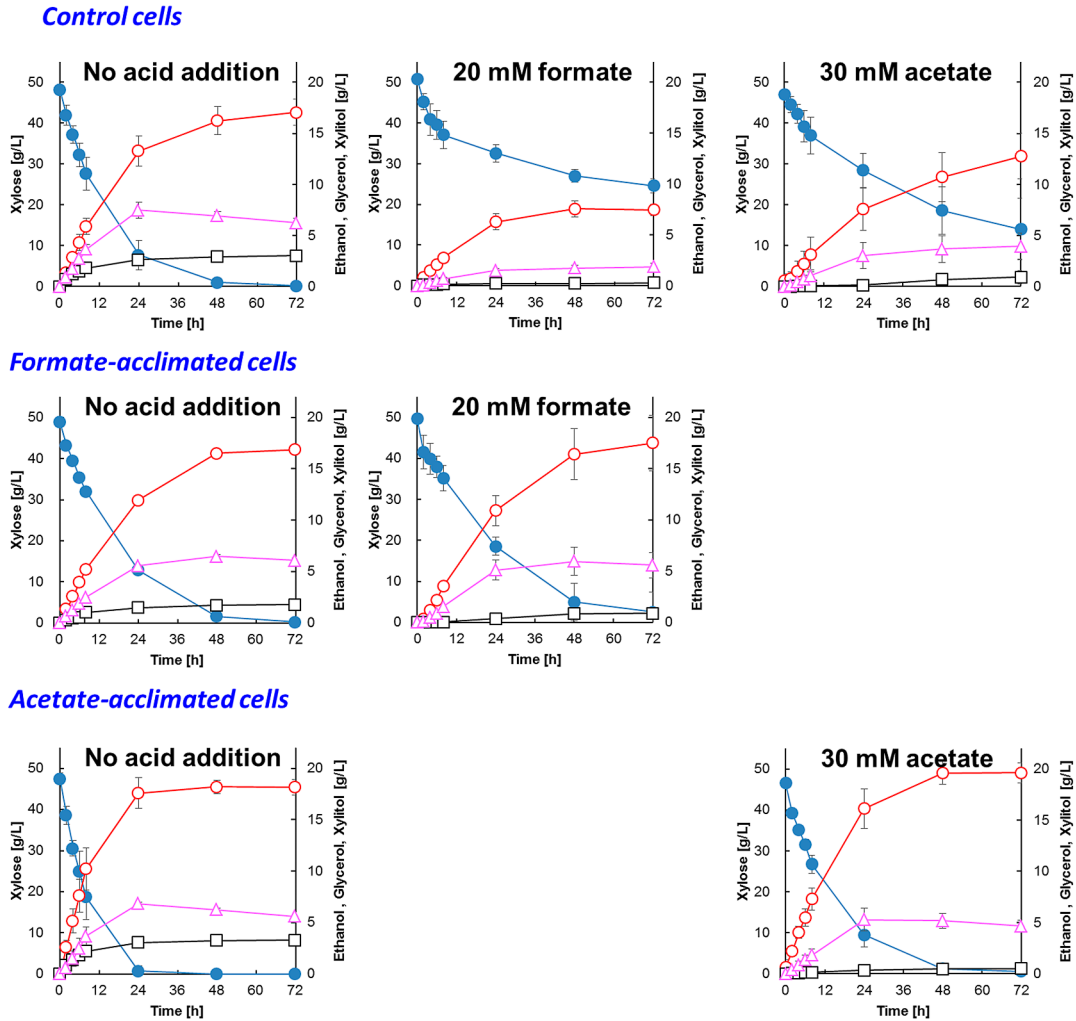


図4. 20 mM ギ酸 (中段) あるいは 30 mM 酢酸 (下段) に馴化した酵母によるキシロース (●) からのエタノール (○), キシリトール (△), グリセロール (□) 生産。キシロース発酵は酸無し, 20 mM ギ酸存在下, あるいは 30 mM 酢酸存在下で行った。

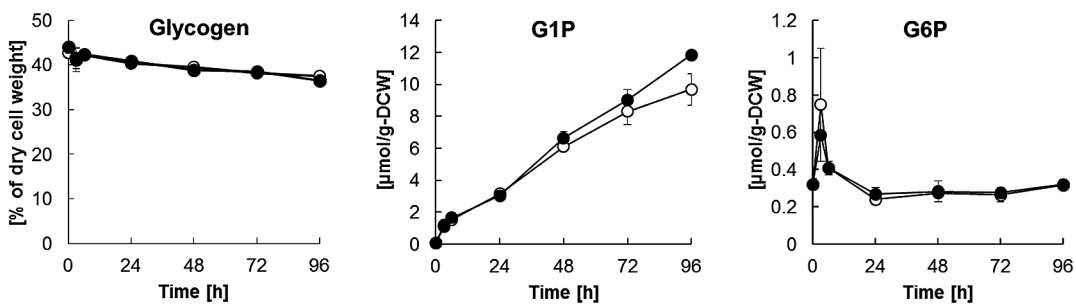


図5. 5 mM NaNO_3 (○) あるいは NH_4Cl (●) で光培養した藻体を用いてオートファーメンテーションを行った時の細胞内グリコーゲン含有率, G1P 蓄積量, G6P 蓄積量の経時変化。

一方で, 暗黒嫌気条件下で培養するとグリコーゲン蓄積量が減少するとともに, 乳酸, コハク酸などの有機酸が細胞外へ放出されることが知られている。これまで, 暗黒嫌気条件下ではグリコーゲンの異化による有機酸生産が行われると考えられ, 自身の炭水化物を発酵の原料とすることから, この現象はオートファーメンテーションと呼ばれてきた。

筆者らはラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のオートファーメンテーションについて解析を進めている¹²⁾。

5 mM NH_4Cl または NaNO_3 を含む BG11 培地中で, $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1% CO_2 (v/v) 条件下で培養した藻体を回収して, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.8) に懸濁後, 暗黒嫌気条件下で発酵を行った。その結果, 細胞内グリコーゲンの減少と同時に, 酢酸, 乳酸, コハク酸, リンゴ酸, 2-ケトグルタル酸の培養液中への放出が確認された。この際の代謝プロファイリングを行ったところ, グルコース 1-リン酸 (G1P) が経時的に蓄積することが明らかになった (図5)。G1P はグリコーゲンの分解産物

で、グルコース 6 リン酸 (G6P) へ異性化されることが知られている。G6P は解糖系の出発化合物であり、代謝プロファイリングの結果は G1P の異性化反応がグリコーゲン資化の律速段階となる可能性を示唆している。

4. 動的代謝プロファイリング技術の開発と応用

代謝プロファイリングにより得られる情報は、細胞から代謝物を抽出した時点での蓄積量のスナップショットであり、代謝物の変換速度に関する動的な情報は得られない。たとえば、代謝産物であると同時に代謝反応の基質となる化合物の場合、蓄積量の増減だけではその代謝物に関わる代謝系が活性化したかどうかを判断することは難しい。なぜなら、代謝系が定常状態にある時、代謝物の合成と分解はつりあっており、総量は変わらないからである。つまり、生合成が活性化しても代謝プロファイリングでその変化を捉えることはできない。しかしながら、代謝データに基づいて目的物質を高生産するためには、代謝物の蓄積量だけではなく、反応速度論的な情報も重要となる。

そこで筆者らは、代謝経路の活性化度を知るために、動的な代謝の流れである代謝ターンオーバーを直接観測する技術を開発することとした。代謝プロファイリング技術と、安定同位体炭素 (^{13}C) による *in vivo* 標識技術を組合せた「動的代謝プロファイリング技術」を確立し、代謝物の蓄積量と動的変動を同時に俯瞰することが可能になった¹¹⁻¹⁵⁾。

同位体を利用して代謝経路の特定の原子を標識し、その変化を追跡するトレーサー実験は、代謝研究に必須の技法の一つである。元素の化学的性質は電子配置、つまり原子番号で決まり、原子量にはよらないため、代謝物

中のある原子のたどる道は、その原子を同位体で標識して代謝経路での行動を調べればよい (同位体の質量差による反応速度の差を同位体効果というが、炭素の場合には無視できる)。同位体には、不安定で放射能を持ち崩壊する放射性同位体と、安定で崩壊しない安定同位体とがある。Calvin らが放射性同位体を用いて還元的ペントースリン酸経路の構成化合物を決定したように¹⁶⁾、代謝経路や生体内物質の分布などの研究に幅広く使用されてきた。ただし、放射性核種を使用する放射性トレーサー実験は放射線防護に注意する必要がある、標識率を定量化できない、分子内の標識部位を識別できないという欠点も有している。

安定同位体は質量分析計 (MS) や核磁気共鳴装置で検出することによりトレーサー実験に適用される。天然存在比が 100% に近い ^1H , ^{31}P , ^{12}C , ^{14}N といった原子に対し、たとえば ^{13}C は 1.1%, ^{15}N は 0.4% しか存在しないため、これらを細胞内に取り込ませることにより、標識された代謝物を選択的に観測することが可能である。MS はイオン化した代謝物を質量電荷比 (m/z) に従って分離して検出するため、安定同位体標識された化合物は m/z が分子内に含まれる安定同位体の数だけ増加した値を示す。したがって、安定同位体が含まれない主分子イオンと安定同位体を含む同位体イオンの強度比を観測することにより安定同位体標識率を算出することができる。

筆者らは、 $^{13}\text{CO}_2$ を炭素源として植物体に与えて細胞内炭素代謝物を *in vivo* 標識し、同位体標識の濃縮度分率を経時観測することで、糖リン酸などの微量一次代謝物のターンオーバーに関する情報を得た (図 6)。 $^{13}\text{CO}_2$ を利用した植物体の標識実験は 30 年以上前から行われているが¹⁷⁾、多くの場合、分析対象となる化合物は糖類

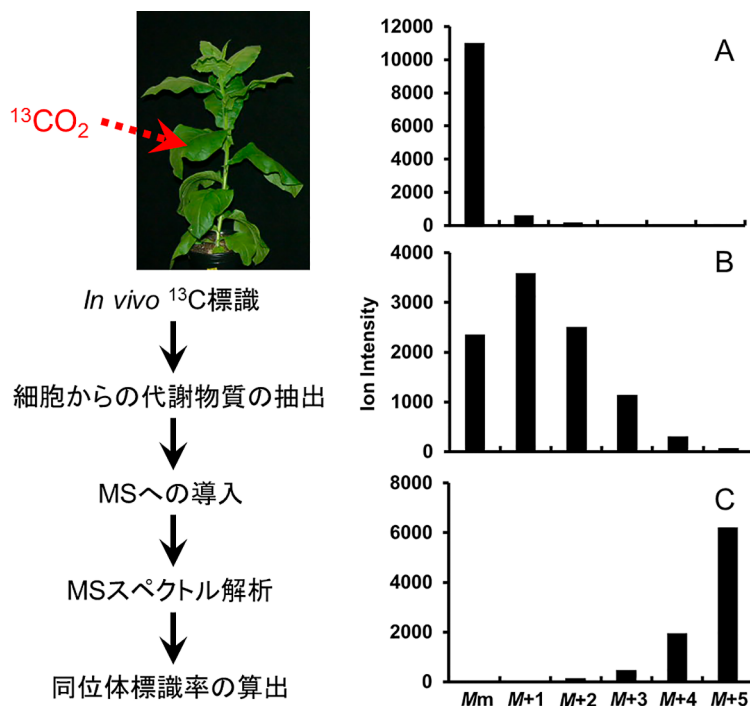


図 6. 高等植物における動的代謝プロファイリングの実験手順 (左) と $^{13}\text{CO}_2$ による標識開始 0 min (A), 1 min (B), 10 min (C) 後の細胞内リブローズビスリン酸のマススペクトル (右)。Mm は主分子イオン, M+n は同位体イオンを表す。

や二次代謝物質といった細胞内蓄積量の多い物質に限られていた。しかしながら、近年の分析装置の検出機能の高感度化、マスペクトル情報の高解像度化、データ取得速度の高速化などにより、代謝ネットワーク上の分岐点に位置する微量な中間代謝物質の分析が可能になった¹¹⁾。一方で、Calvin 回路をはじめとする主要経路のターンオーバーは非常に速く、ターンオーバーを正確に観測するためには、標識化細胞の採集から代謝反応のクエンチングに要する時間をできるだけ短くすることが重要となる。また、短時間で標識を行う場合には CO₂ 固定速度を厳密に管理する必要があり、光合成速度に影響を与えるファクター（光強度、CO₂ 濃度など）の制御も必須である。そこで、光合成速度をリアルタイムで観測しながら通気する炭酸ガスを ¹²CO₂ から ¹³CO₂ へと切り替えるとともに葉片を瞬時に凍結できるチャンバーを開発した¹¹⁾。光強度 1000 μmol photons m⁻² s⁻¹、CO₂ 濃度 0.1% (v/v) で光合成させた時、3-ホスホグリセリン酸をはじめとする Calvin 回路系化合物は標識開始 10 分で ¹³C 標識率が最大となった。この時、糖質合成系の中間代謝物であるグルコース 1 リン酸の標識速度が、前駆体であるグルコース 6 リン酸の標識速度よりも遅い（図 7）ことが分かり、グルコース 6 リン酸をグルコース 1 リン酸に変換する酵素反応がスクロース合成の律速段階

であることが示唆された¹¹⁾。

次に、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の動的代謝プロファイリングに取り組んだ。NADPH を再酸化する NADPH オキシドレダクターゼをコードする遺伝子 *flv3* を過剰発現する組換え株は、酸素発生速度や細胞内 ATP 含有量が増大することが明らかとなっている¹⁴⁾。そこで、NaH¹³CO₃ を用いて細胞の *in vivo* ¹³C 標識を行い、CE-MS を用いて同位体濃度分率を経時的に観測した（図 8）。その結果、*flv3* 過剰発現株では Calvin 回路、糖代謝系の代謝物質の ¹³C 標識率が高かった。¹³C 標識率の経時変化は、代謝物質のターンオーバーを示すと考えられるため、*flv3* 過剰発現株では CO₂ から代謝フローが促進されていることが示唆されている。¹³C を用いた動的代謝プロファイリング技術はシアノバクテリアの炭素同化速度を直接評価できる唯一の手法であり、図 8 に示すように、炭素同化速度の向上を捉えることが可能である。また、炭素源の細胞内への流入速度と代謝中間体のターンオーバー速度には正の相関が見られることが明らかとなり、その相関係数を調べることで代謝経路のボトルネック反応を推定できることも分かってきた（論文執筆中）。

Synechocystis sp. PCC6803 の中にはグルコースを炭素源とできる変異体があり、代謝研究によく使われてい

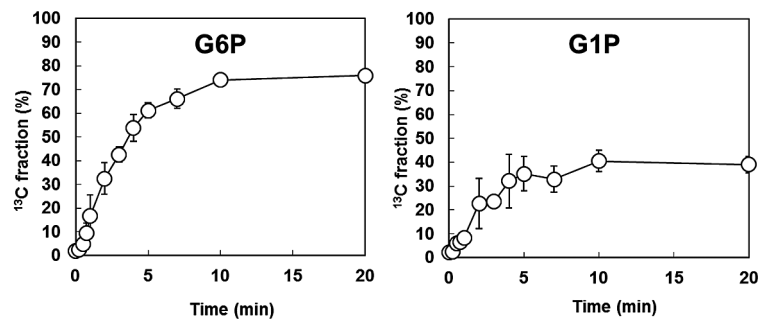


図 7. ¹³CO₂ 標識開始後の G6P および G1P の ¹³C 標識率の経時変化。

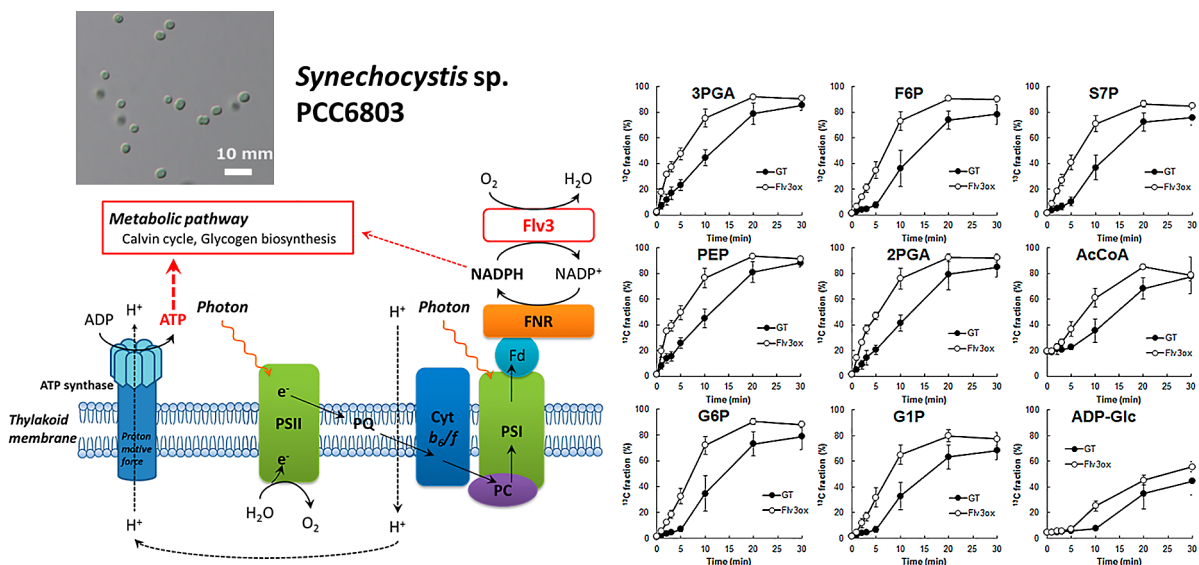
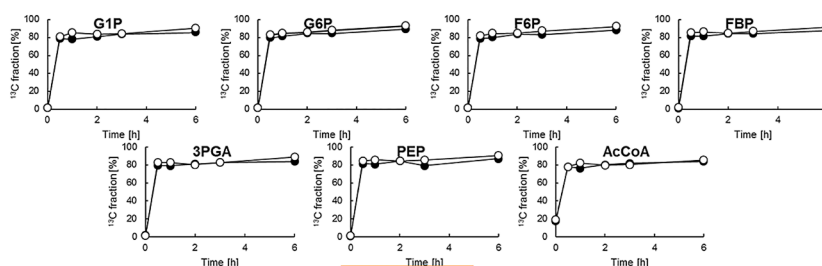
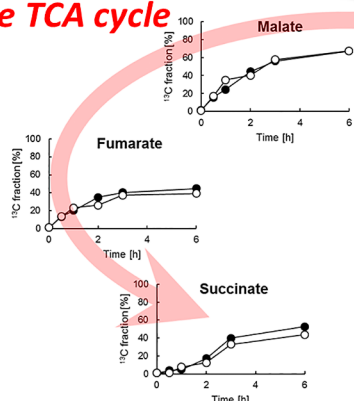


図 8. *Synechocystis* sp. PCC6803 における *flv3* 遺伝子の過剰発現が細胞内代謝物質のターンオーバーに及ぼす影響。

Glycolysis



Reductive TCA cycle



Oxidative TCA cycle

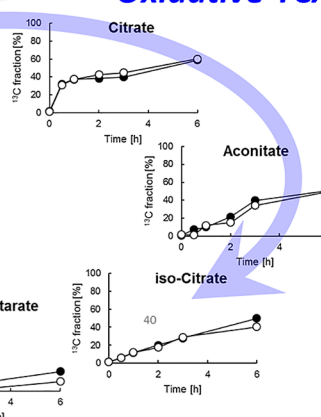


図 9. オートファーメンテーション時の細胞内代謝物の ^{13}C 標識率の経時変化。

る。前述のオートファーメンテーションの際に $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -グルコースを添加し、動的代謝プロファイリングを行ったところ、糖リン酸やアセチル CoA は発酵開始 30 分で標識率が最高値に達した (図 9)。一方で、TCA 回路の有機酸は ^{13}C 標識速度が遅いことが観測された¹²⁾。この結果は、解糖系と TCA 回路の間に代謝フローの律速段階があることを示唆している。ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子 *ppc* を過剰発現させたところ、コハク酸生産量が 1.3 倍増大したことから、律速段階の存在は支持された。また、図 9 において、2-ケトグルタル酸の ^{13}C 標識率が他の有機酸と比べて低いことが確認できる。このことは、コハク酸がフマル酸から生合成されている可能性を示唆しており、ラン藻においても還元的 TCA 回路が駆動していることが明らかとなった。

5. おわりに

産業上有用な微生物には、基質から目的物質への変換効率の高さと、高い生産性を実現する細胞増殖能力が求められる。一方で、微生物の細胞内代謝は、遺伝子発現、酵素反応、分子間相互作用などを介して厳密に制御され、いわばシステムを構成している。したがって、人為的に代謝系を改変し、有用な微生物を育種するためには、細胞システムの中から最大の効果を生む代謝反応を見出すことが重要である。本稿で記載したように、オミクス解析を利用して代謝状態をグローバルに捉えることが、代謝改変の鍵反応の特定に有効であることが示されつつある。今後は、有用遺伝子のさらなる探索が期待される。

文 献

- 1) Hasunuma, T., J. Ishii, and A. Kondo. 2015. Rational design and evolutionary fine tuning of *Saccharomyces cerevisiae* for biomass breakdown. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 29: 1–9.
- 2) Link, H., T. Fuhrer, L. Gerosa, N. Zamboni, and U. Sauer. 2015. Real-time metabolome profiling of the metabolic switch between starvation and growth. *Nat. Methods.* 12(11): 1091–1097.
- 3) Liu, Y., H. Link, L. Liu, G. Du, J. Chen, and U. Sauer, 2016. A dynamic pathway analysis approach reveals a limiting futile cycle in *N*-acetylglucosamine overproducing *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* 7: 11933.
- 4) Hasunuma, T., T. Sanda, R. Yamada, K. Yoshimura, J. Ishii, and A. Kondo. 2011. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 10(1): 2.
- 5) Kato, H., Y. Izumi, T. Hasunuma, F. Matsuda, and A. Kondo. 2012. Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *J. Biosci. Bioeng.* 113(5): 665–673.
- 6) Hasunuma, T. and A. Kondo. 2012. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol. Adv.* 30(6): 1207–1218.
- 7) Hasunuma, T., T. Sakamoto, and A. Kondo. 2016. Inverse metabolic engineering based on transient acclimation of yeast improves acid containing xylose fermentation and tolerance to formic and acetic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(2): 1027–1038.
- 8) Hasunuma, T., K.M. Sung, T. Sanda, K. Yoshimura, F. Matsuda, and A. Kondo. 2011. Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90(3): 997–1004.
- 9) Ismail, K.S., T. Sakamoto, T. Hasunuma, and A. Kondo. 2013. Time-based comparative transcriptomics in engineered xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* identifies temperature-

- responsive genes during ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40(9): 1039–1050.
- 10) Dismukes, G.C., D. Carrieri, N. Bennete, G.M. Ananyev, and M.C. Posewitz. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235–240.
 - 11) Hasunuma, T., F. Kikuyama, M. Matsuda, S. Aikawa, Y. Izumi, and A. Kondo. 2013. Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *J. Exp. Bot.* 64(10): 2943–2954.
 - 12) Hasunuma, T., M. Matsuda, and A. Kondo. 2016. Improved sugar-free succinate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 following identification of the limiting steps in glycogen catabolism. *Metab. Eng. Commun.* in press
 - 13) Hasunuma, T., K. Harada, S. Miyazawa, A. Kondo, E. Fukusaki, and C. Miyake. 2010. Metabolic turnover analysis by a combination of *in vivo* ^{13}C -labelling from $^{13}\text{CO}_2$ and metabolic profiling with CE-MS/MS reveals rate-limiting steps of the C_3 photosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Exp. Bot.* 61(4): 1041–1051.
 - 14) Hasunuma, T., M. Matsuda, Y. Senga, S. Aikawa, M. Toyoshima, G. Shimakawa, C. Miyake, and A. Kondo. 2014. Overexpression of *flv3* improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow. *Biotechnol. Biofuels.* 7: 493.
 - 15) Ho, S.H., A. Nakanishi, X. Ye, J.S. Chang, C.Y. Chen, T. Hasunuma, and A. Kondo. 2015. Dynamic metabolic profiling of the marine microalga *Chlamydomonas* sp. JSC4 and enhancing its oil production by optimizing light intensity. *Biotechnol. Biofuels.* 8: 48.
 - 16) Calvin, M. 1956. The photosynthetic carbon cycle. *J. Chem. Soc. (London)* 1895–1915.
 - 17) Schaefer, J., E.O. Stejskal, and C.F. Beard. 1975. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of metabolism in soybean labeled by $^{13}\text{CO}_2$. *Plant Physiol.* 55: 1048–1053.