

糸状菌ゲノムに眠る生理活性物質生合成遺伝子の有効利用

木下 浩・仁平 卓也*

1929年のペニシリン発見以来、抗生物質、抗がん剤などのさまざまな生理活性物質が開発されてきたが、現代においてもNDM-1 (New Delhi Metallo-1) に由来する多剤耐性菌や新型インフルエンザウイルスなど有効な治療法がない疾病が発見され続けられていることから、新たな作用機序、化学構造を持った生理活性物質の発見が切実に求められている。これまでの化合物探索において、土壌を含むさまざまな環境から多様な微生物を単離し、それらの菌群が二次代謝によって生産する数多くの生理活性物質が同定されてきた。70年以上に及ぶこのような探索で発見された化合物の実に70~90%もの物質が、放線菌と糸状菌から単離されていることから、これらの菌群は生理活性物質の最も重要な探索源と認識されている。ただ、これらの菌群は条件によっては生育が遅いため、企業などにおいてハイスループットなスクリーニングを行う場合には、生育のよい限定した条件でのみ培養が行われ、その条件下で生産される化合物だけが探索対象とされてきた。このように探索対象を絞ってしまった結果、微生物からの有用化合物単離は減少の一途をたどり、生理活性物質の探索源としては枯渇したと考えられ、多くの企業が微生物スクリーニングから撤退している¹⁾。しかし、近年のゲノム解析の結果、放線菌・糸状菌のゲノム上には、これまでに同定されてきた化合物数をはるかに凌駕する生理活性物質生合成遺伝子群が存在することが明らかとなってきた²⁾ (表1)。このような齟齬が生じた原因として、これらの菌群はいずれも培養条件に強く依存して化合物の生産プロファイルを変化させるため、限定した培養条件ではほんの一部の化合物

しか生産しておらず、これまでのスクリーニングは大部分を逃してきたためと考えられる³⁻⁷⁾。

現在、ゲノム解析の結果を踏まえ、これらの菌群を新規な生理活性物質の有望な探索源として再評価し、活用するべく新たな研究がなされている。培地成分の検討^{8,9)}、他の菌との共培養¹⁰⁾、遺伝子工学的手法による生合成遺伝子の強制発現などにより、通常では検出できない化合物を生産させる試みや¹¹⁻¹³⁾、菌群が保有する生産物未知の生合成遺伝子を大腸菌、酵母などの汎用な宿主に導入し、異種生産させることにより産物を同定し、新たな化合物の発見につなげるという試みが行われている^{11,14-19)}。しかし異種生産に際してはいずれの宿主も放線菌・糸状菌とは転写制御システムが異なることから、十分な発現量を得るためには生合成に必要な全遺伝子のプロモーターを置換する必要がある。また大腸菌、酵母ともに二次代謝物質をほとんど作らないことから、化合物生産の材料となる構成分子の生合成の強化も求められる²⁰⁾。それに加えて放線菌は遺伝子のGC含量が高いこと、糸状菌はORF内にイントロンを含むことから、コドン置換やcDNA作製というステップも要求される。このような問題を乗り越えるために、放線菌においては宿主-ベクター系が整備され、遺伝学的解析が進んでいる他の放線菌へ、元の菌株から生合成に必要な全遺伝子をクローニングして導入し、化合物を異種生産させる試みがなされている^{13,21-24)}。

糸状菌については、化合物の骨格形成を行うポリケタイド生合成酵素 (polyketide synthase, PKS) などの鍵酵素遺伝子の単独発現、もしくは1, 2個の関連遺伝子との共発現が、さまざまな宿主において試みられてきたが²⁵⁻²⁸⁾、これまで生合成遺伝子群すべてを用いた異種生産系は構築できていなかった。その大きな原因として糸状菌が生産する化合物は複雑な構造を持つものが多く、生合成には多数の酵素、タンパク質が必要であることが挙げられる。たとえばきわめて強い発がん性を持つアフラトキシンの生合成には鍵酵素、修飾酵素、制御因子、トランスポーターなど25個以上のタンパク質が必要と考えられている²⁹⁾。生理活性を持つ最終産物の効率的な生産には、生合成に必要な多数の遺伝子群を同調して発現させることが求められるが、汎用的な大腸菌、パン酵母をホストとして採用すると、上述したような遺伝子ごとのプロモーター置換、イントロン除去という煩雑かつ膨大な工程が必要となる。化合物生合成に必要な構成分子の供給

表1. *Aspergillus* 属のゲノム上にある二次代謝物質生合成遺伝子

Protein	<i>A. oryzae</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. nidulans</i>
PKS	30	14	27
NRPS	18	14	14
FAS	5	1	6
Sesquiterpene cyclase	1	Not detected	1
DMATS	2	7	2
Total	55	36	49
Identified compound	5	18	5

PKS, polyketide synthase; NRPS, nonribosomal peptide synthase; FAS, fatty acid synthase; DMATS, dimethylallyl tryptophan synthase.

* 著者紹介 大阪大学生物工学国際交流センター (教授) E-mail: nihira@icb.osaka-u.ac.jp

能も考慮に入れ、筆者らは糸状菌遺伝子に由来する化合物の生産系には糸状菌を宿主として用いることが望ましいと考えに至った。

麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌などの発酵食品生産に長く利用されてきたことから“国菌”と称されており、これまでに国内の研究グループによりゲノム解析が終了している⁷⁾。さらに、形質転換系をはじめとして多くの遺伝子工学的ツールが整備されていること、また、これまでに他の菌由来のさまざまな酵素を高発現できていることから、糸状菌由来遺伝子の発現宿主として必要な要件を満たしていると考えられる。加えて、通常の培養条件下では *A. oryzae* が二次代謝によって生産する化合物は少数に止まることから、産物の生産能力としては不明な点もあるが、外来遺伝子に由来する産物の同定が容易であると考えられる。そこで本研究では *A. oryzae* を宿主とする異種遺伝子発現系を構築することを目指した。

シトリン生合成

上述のように糸状菌染色体上には多くの二次代謝物質生合成遺伝子が存在しているものの、生合成の最終産物が同定できている例は限られている。そこで筆者らは手始めとして、筆者らの研究室で単離、同定したシトリンの生合成遺伝子群をモデルとして発現系を構築することにした。シトリンは多数の糸状菌によって生産されるカビ毒の一種であり、腎毒性を示す。毒性自体はアフラトキシンと比べてさほど強いものではないが、自然界でブドウ、穀物に対する汚染が起りやすく、1951年のタイ王国黄変米事件をはじめとして多くの事例が報告されている³⁰⁻³²⁾。

図1Aに示すように、シトリンの基本骨格はPKSにより形成されると推定されていた³³⁾。そこで筆者らが紅麹菌 *Monascus purpureus* ゲノム上に存在するPKS遺

子を探査・解析した結果、世界で初めてシトリン生合成に必須なPKS遺伝子 (*pksCT*) の同定に成功した³⁴⁾。その後 *pksCT* 遺伝子の周辺を解析したところ、*pksCT* の近傍には生理活性物質生合成への関与が推定される複数の遺伝子が存在していることが明らかとなった(図1B)。糸状菌において一つの化合物の生産に関与する遺伝子群は染色体上に隣接して存在することが多いこと、また、それら遺伝子産物の機能が推定シトリン生合成経路上の反応に合致することから、*pksCT* 周辺に存在する遺伝子はシトリン生合成に関与していると考えられた。そこで *pksCT* を含む約20 kbの領域を硫酸資化遺伝子 *sC* をマーカーとするコスミドにクローニングし、*A. oryzae* に導入した。硫酸資化能を示した形質転換体を単離し解析した結果、遺伝子型の違いはあるものの、いずれの株にもシトリン生合成遺伝子クラスターがゲノム上に組み込まれていることが明らかとなった。続いて得られた形質転換体を液体振とう培養し、その培養上清抽出物を逆相HPLCおよび市販のシトリン検出キットを用いて解析を行ったところ、遺伝子導入株においてシトリンの生成は確認できたものの、その生産量は非常に少ないものであった³⁵⁾ (図2B, 表2)。

糸状菌における二次代謝物質の生合成は、経路特異的制御因子により生産が調節されている場合が多く見受けられる。該当する制御因子遺伝子は通常、化合物生合成遺伝子クラスター内に存在しており、周辺の生合成関連遺伝子群の発現を一斉に活性化することにより最終化合物の生産誘導を引き起こす。シトリン生合成遺伝子クラスターにおいては $Zn(II)2Cys_6$ 型のDNA結合ドメインを有する転写制御因子をコードする *ctnA* 遺伝子が *pksCT* 遺伝子上流に存在しており、解析の結果、この遺伝子産物がシトリン生合成誘導に必須であることが証明された³⁶⁾。以上の知見から、シトリン生合成遺伝

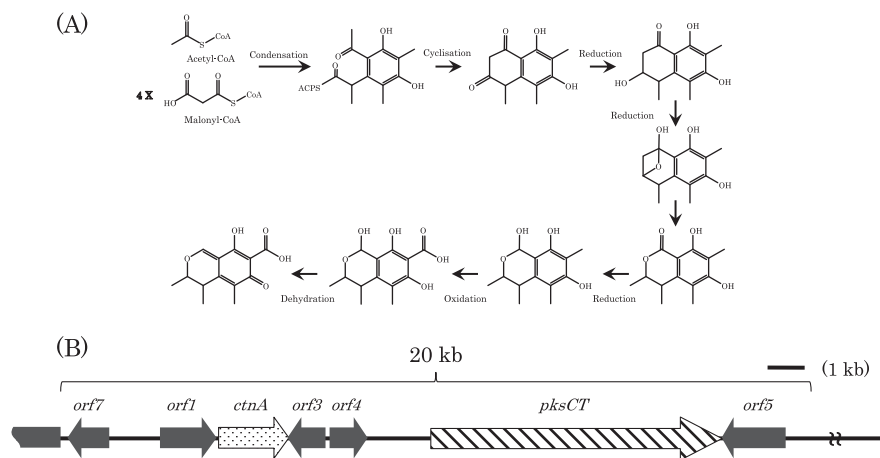


図1. シトリン生合成. (A) シトリン推定生合成経路³³⁾. (B) *M. purpureus* 染色体上のシトリン生合成遺伝子クラスター. 各遺伝子がコードする推定タンパク質: *orf7*, 3-ketoacyl-ACP-reductase; *orf1*, dehydrogenase; *ctnA*, positive regulator; *orf3*, oxygenase; *orf4*, oxidoreductase; *pksCT*, CT polyketide synthase; *orf5*, transporter.

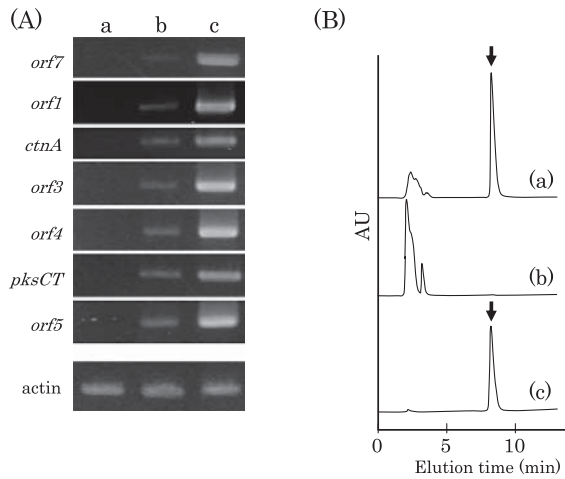


図2. *A. oryzae* 形質転換体の表現型解析. (A) RT-PCRによるシトリニン生合成遺伝子の転写解析. アクチン遺伝子: コントロール, GMP培地7日間培養菌体からのRNA. (a) CossC導入株, (b) シトリニクラスタ導入株, (c) シトリニクラスタ+*ctmA*導入株. (B) シトリニン生産解析. GMP培地7日間培養菌体の培養上清を逆相C₁₈HPLCにより解析 (500 nm 蛍光により検出). 矢印がシトリニンの溶出時間. (a) シトリニン標品, (b) シトリニクラスタ導入株培養上清, (c) シトリニクラスタ+*ctmA*導入株培養上清.

子が導入された*A. oryzae*のシトリニン生産が微量であったのは, *A. oryzae*内で*ctmA*遺伝子の発現が不十分なためであったことが示唆された(図2A). そこで構成的に発現するTrpCプロモーターを用いて*ctmA*遺伝子を過剰発現させたところ, *ctmA*過剰発現株ではシトリニン生産量は400倍にも増加した³⁵⁾(図2B, 表2). 近年, シトリニンのポリケチド骨格合成は一般的なアセチルCoAではなく, 他の未同定PKS由来の化合物から始まる可能性が提案されていた. しかしながら*A. oryzae*内でも十分量のシトリニンが生産できたことから, 導入した約20kbの遺伝子上にシトリニン生合成を行うに十分な生合成遺伝子群(すなわち全生合成クラスター)が含まれており, シトリニンはアセチルCoAを出発物質として生合成されると考えられる. このように今回構築した系は応用的な物質生産だけでなく, 生合成機構の基礎的な解明にも有効なツールであるといえる.

表2. 形質転換体におけるシトリニン生産

菌株	シトリニン (μg/flask)
Control	*N. D.
CT1	0.3
CT3	0.4
CT1+CtnA1	36.9
CT1+CtnA2	0.5
CT1+CtnA3	12.9
CT3+CtnA1	25.4
CT3+CtnA2	0.7
CT3+CtnA3	0.2
CT3+CtnA4	148.1
CT3+CtnA5	145.8
CT3+CtnA6	32.2
CT3+CtnA7	9.2
CT3+CtnA8	8.4

シトリニン検出キットにより定量 (n≥2).
N. D., Not detected.

スタチン生合成

これまでの研究により, 化合物によっては必要な生合成遺伝子が70 kbを超える領域に広がっていることが明らかとなっているが, コスミドは理論上, 最大でも40 kb程度の断片しか保持できない. そこで複数のベクターを用いて, 一つのコスミドには収まらない広い領域にまたがる生合成遺伝子を*A. oryzae*に導入し, 生合成系の再構築を試みることにした. 生産化合物には高脂血症治療薬として用いられているモナコリンK(ロバスタチン)を採用した. モナコリンKは1979年紅麹菌で発見され, 2008年Chenらによりその生合成遺伝子9個が42 kbからなる領域にコードされていることが提唱されている³⁷⁾(図3). そこでデータベースに登録されている情報を基にしてモナコリンK生合成遺伝子クラスターと考えられる領域のクローニングを試みた. その結果, クラスタ末端に存在する*mokB*遺伝子のみが欠損しているクローンが得られたことから, 欠損していた*mokB*遺伝子を別のベクターにクローニングし, 構築した二つのベクターを用いて*A. oryzae*を形質転換することにした. しかしながらモナコリンK生合成遺伝子導入株において, 最終

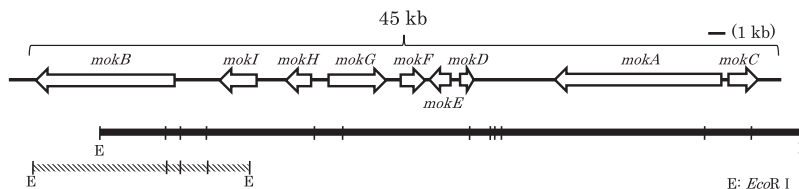


図3. *M. pilosus* 染色体上のモナコリン生合成遺伝子クラスター. 各遺伝子がコードする推定タンパク質 *mokA*, ノナケチド生合成 polyketide synthase; *mokB*, ジケチド生合成 polyketide synthase; *mokC*, P450 monooxygenase; *mokD*, oxidoreductase; *mokE*, dehydrogenase; *mokF*, transesterase; *mokG*, HMG-CoA reductase; *mokH*, transcription factor; *mokI*, efflux pump. 太線, cosmid clone 12-33にクローニングされた領域; 斜線, sCnDmokBが含む *mokB*断片.

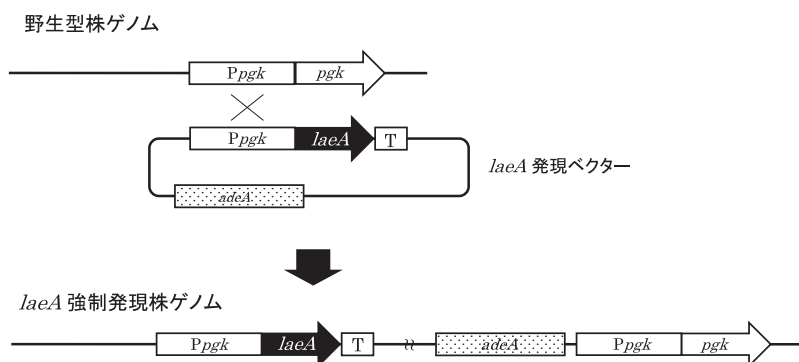


図4. *laeA* 強制発現株の構築. *A. oryzae* NSAR1株のphosphoglycerate kinase遺伝子 (*pgk*) の所に相同組換えにより *laeA* 挿入. *laeA*, *A. nidulans* 由来 *laeA*; Ppgk, *A. oryzae* 由来 *pgk* プロモーター. T, *A. oryzae* 由来 glucoamylase ターミネーター.

産物であるモノコリンKおよびその誘導体の顕著な生産は認められなかった. 転写解析の結果, 導入した生合成遺伝子群の転写が弱いことが原因と考えられたため, モノコリンK生合成遺伝子クラスター内に存在していた経路特異的転写制御因子遺伝子と考えられる *mokH* の高発現株の構築も行ったが, *mokH* を増強した株においても生合成遺伝子の転写, モノコリンKの生産は改善されなかった. これらの結果から, モノコリンK異種生産においては経路特異的転写制御因子を利用した手法は有効ではないと考えられた.

糸状菌においては, 上述の *ctnA* のような経路特異的転写制御因子遺伝子とそのクラスター内に存在している場合がある一方, *Gibberella fujikuroi* におけるジベレリン生合成遺伝子のように特異的な制御因子が該当クラスター内に存在しない場合もある³⁸⁾. 異種発現系の汎用性を高めるために, 特異的制御因子の増強とは異なるアプローチによる遺伝子クラスターの効率的発現誘導方法を開発することにした. 本研究では, 幅広い二次代謝化合物の生産を制御することが報告されている *A. nidulans* 由来の *laeA* (*AnlaeA*) に着目した. *laeA* はヒストンメチルトランスフェラーゼをコードしていると推定されており, クロマチン構造の変化を通じて広範囲にわたる転写活性化を引き起こすと考えられている³⁹⁻⁴²⁾. そこで *AnlaeA* のプロモーターを恒常的に発現している解糖系酵素 phosphoglycerol kinase (PGK) のプロモーターに置換した後, *A. oryzae* に導入した (図4). *AnlaeA* 導入株は親株の *A. oryzae* と比較しても生育, 固体培地上での菌体の様子には変化は見られず, また, 二次代謝プロファイルにも大きな変化は見受けられなかった. この *AnlaeA* 導入株に上述した二つのベクターを用いてモノコリンK生合成遺伝子クラスターを導入したところ, 多量のモノコリンJと顕著なモノコリンKを生産する形質転換体が取得できた (図5). モノコリンJはモノコリンKの前駆体であり, *mokB* 遺伝子が欠損していると中間代謝物として蓄積されることが分かっている. 本研究に

ついて *mokB* はモノコリンK生合成遺伝子クラスターの他の遺伝子とは異なり, 別のベクターにより導入していることから, 発現が協調していないため, もしくは相対的に発現量が少ないためにモノコリンJが蓄積したと考えられる. 今後, *mokB* 遺伝子の発現を増強することによりさらなるモノコリンKの高生産が見込まれる.

アステリキノン生合成

これまで取り上げたシトリニン, モノコリンKの基本骨格はPKSによりマロニルCoAを伸長単位とする縮合反応により生合成される. 上述の2例により *A. oryzae* 内で異種生合成遺伝子クラスターの協調的な発現が可能であること, 伸長基質であるマロニルCoAの十分な供給能を有すること, 最終的なポリケタイド化合物の生合成が行われることが明らかとなった. そこで続いて糸状菌が生産する二次代謝物質のうち, 異なる基質および生合成鍵酵素を必要とする化合物群の生産について検討した. 糸状菌由来の二次代謝物質としてはポリケタイド以外ではイソペンテニルニリン酸 (IPP) を伸長単位とするイソプレノイド化合物, およびアミノ酸からなる非リボソームペプチドが大きな割合を占めている. そこで筆者らはIPPおよびアミノ酸を構成成分とする化合物の異種生産を試みることにした.

インドール環二つを有するアステリキノン類はインスリン受容体結合活性, 抗腫瘍活性, 抗HIV活性など, さまざまな生理活性を示すことから注目されている. これまでの研究で *A. nidulans* から, アステリキノン類の一つテレキノンAの生合成遺伝子群と考えられる5遺伝子が12 kbpの領域に見いだされた⁴³⁻⁴⁵⁾ (図6A). この12 kbpの領域にはテレキノンAの生合成に必要な非リボソームペプチド合成酵素, イソペンテニル基転移酵素をコードする遺伝子が存在することから (図6B), 本研究ではこの5 ORFを含む領域を, 上述の *AnlaeA* 導入済みの *A. oryzae* に導入し, テレキノンAの異種生産を試みた. その結果, 遺伝子クラスター導入株では元の宿主では存

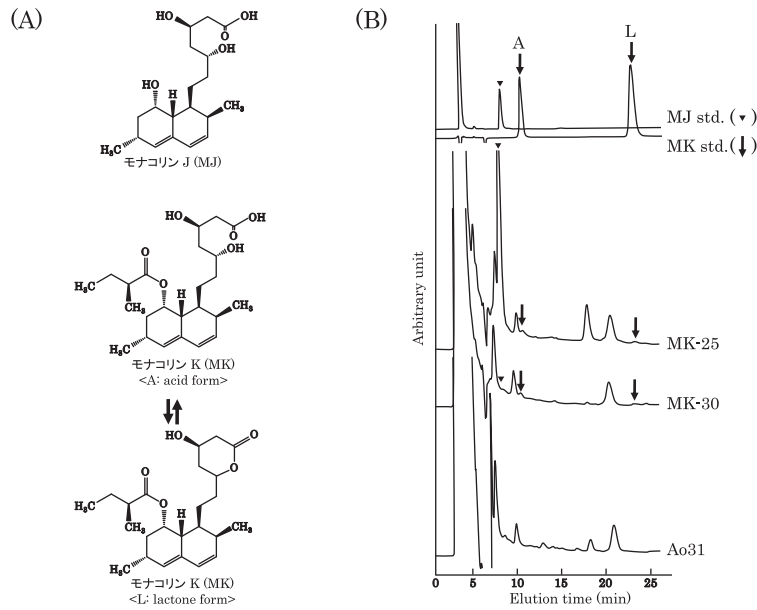


図5. (A) モナコリンJ (MJ) およびモナコリンK (MK) の構造. (B) MK 生合成クラスター導入株におけるモナコリン生産. CDA 培地での7日間培養後の培養上清抽出物を逆相C₁₈HPLCにより解析. 矢印はMK (acid form, 11 min; lactone form, 23 min); 三角はMJの lactone form.

在しない273.5 nmに極大吸収波長を持つピークが観察された(図7B, C). このピークを精製し, NMR, MSを用いて物理化学的性質を解析したところ, テレキノンAであることが確認された. この結果は今回構築した系が, さまざまな生理活性を有するエルゴタミン, エルゴメトリンなどの各種のインドールアルカロイドの生産系としての可能性を示すものである. 糸状菌のゲノム内には通常数種類のジメチルアリルトリプトファンシターゼ(DMATS)が存在しており, 未知のインドールアルカロイドを作る能力を秘めていると考えられる. 本研究で構築された生産系を利用することにより, 糸状菌ゲノム上で眠っている生合成遺伝子を発現させ, 新規インドールアルカロイドを発見できると期待される. また, IPPも十分供給できていることからイソプレノイド化合物の生産系としても有効だと思われる.

おわりに

近年シーケンス技術が飛躍的に発達した結果, 多くの糸状菌のゲノムが次々と解読され, これまで困難であった二次代謝物質とその生合成遺伝子の関連づけも容易になりつつある. さらに, 得られた遺伝情報を基に, 化合物生産の生体内での制御様式についても知見が集まってきており, 今後, 遺伝学的に裏付けされた人為的な生産制御が可能になると考えられる. しかしながら, 糸状菌のゲノム上には生産化合物が未だ同定されていない二次代謝物質生合成遺伝子が多数存在していることから, 新たな化合物資源としての開拓の余地が多く残され

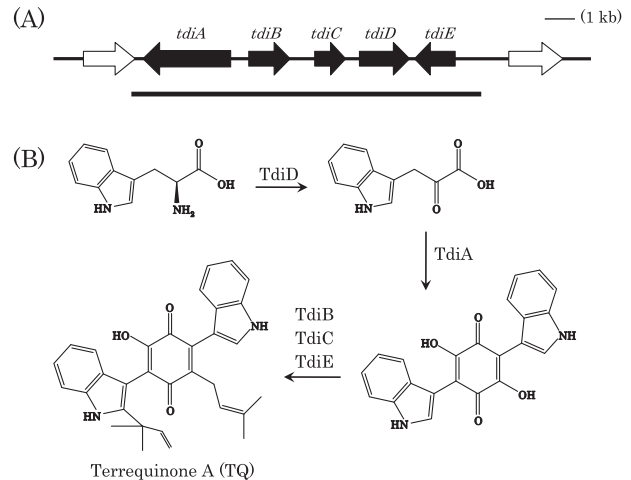


図6. (A) Terrequinone A 生合成遺伝子クラスター. 各遺伝子がコードする推定タンパク質 *tdiA*, nonribosomal peptide synthetase (NRPS); *tdiB*, indole prenyltransferase; *tdiC*, oxidoreductase; *tdiD*, pyridoxal-5'-phosphate-dependent aminotransferase; *tdiE*, S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. 黒い太線, sCossCの挿入領域. (B) Terrequinone A 生合成経路⁴³⁾.

ていると考えられる. 本研究で構築した系を用いれば, 糸状菌が有する二次代謝物質生合成遺伝子のほぼすべてのタイプの化合物を生産できることが示されたことから, 今後ますます蓄積されていく糸状菌由来の二次代謝物質生合成遺伝子を有効利用し, 新規化合物同定につなげることが期待される.

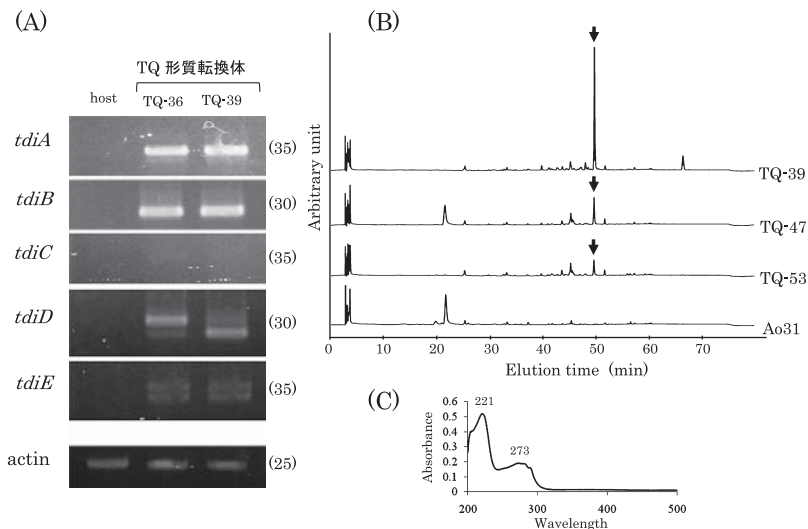


図7. (A) RT-PCRによるterrequinone A生合成遺伝子クラスターの転写解析sCA培地培養7日目の菌体からのRNA. Host: An17. transformants. アクチン遺伝子, コントロール. (B) Terrequinone A生合成クラスター導入株におけるterrequinone A生産. sCA培地での7日間培養後の培養上清抽出物を逆相C₁₈HPLCにより解析. 矢印のピークを精製し, 構造決定を行った. (C) 矢印のピークのUVスペクトル.

文 献

- 1) Li, J. W. and Vederas, J. C.: *Science*, **325**, 161 (2009).
- 2) Keller, N. P. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 937 (2005).
- 3) Bentley, S. D. *et al.*: *Nature*, **417**, 141 (2002).
- 4) Collemare, J. *et al.*: *Mycol. Res.*, **112**, 207 (2008).
- 5) Gao, Q. *et al.*: *PLoS Genet.*, **7**, e1001264 (2011).
- 6) Ikeda, H. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 526 (2003).
- 7) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 8) Henrikson, J. C. *et al.*: *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 435 (2009).
- 9) Williams, R. B. *et al.*: *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 1895 (2008).
- 10) Schroeckh, V. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14558 (2009).
- 11) Brakhage, A. A. and Schroeckh, V.: *Fungal Genet. Biol.*, **48**, 15 (2011).
- 12) Chiang, Y. M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2965 (2009).
- 13) Gross, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 267 (2007).
- 14) Gao, X. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 1233 (2010).
- 15) Kealey, J. T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 505 (1998).
- 16) Kremer, A. *et al.*: *Microbiology*, **153**, 3409 (2007).
- 17) Pfeifer, B. A. and Khosla, C.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 106 (2001).
- 18) Rodriguez, E. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **459**, 339 (2009).
- 19) Wattanachaisareekul, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 893 (2007).
- 20) Wattanachaisareekul, S. *et al.*: *Metab. Eng.*, **10**, 246 (2008).
- 21) Baltz, R. H.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 759 (2010).
- 22) Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J.: *Microb. Biotechnol.*, **4**, 207 (2011).
- 23) Komatsu, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2646 (2010).
- 24) Malpartida, F. and Hopwood, D. A.: *Nature*, **309**, 462 (1984).
- 25) Halo, L. M. *et al.*: *Chembiochem.*, **9**, 585 (2008).
- 26) Kennedy, J. *et al.*: *Science*, **284**, 1368 (1999).
- 27) Seshime, Y. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 3288 (2009).
- 28) Watanabe, A. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **192**, 39 (2000).
- 29) Yu, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1253 (2004).
- 30) Flajs, D. and Peraica, M.: *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **60**, 457 (2009).
- 31) Liu, B. H. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 170 (2005).
- 32) Saito, M. *et al.*: *Microbial Toxins*, (Ciegler, A. *et al.*), Vol. 6, p. 299, Academic Press, New York (1971).
- 33) Hajjaj, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 311 (1999).
- 34) Shimizu, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3453 (2005).
- 35) Sakai, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 466 (2008).
- 36) Shimizu, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5097 (2007).
- 37) Chen, Y. P. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5639 (2008).
- 38) Tudzynski, B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 597 (2005).
- 39) Bayram, O. *et al.*: *Science*, **320**, 1504 (2008).
- 40) Bok, J. W. and Keller, N. P.: *Eukaryot. Cell*, **3**, 527 (2004).
- 41) Reyes-Dominguez, Y. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **76**, 1376 (2010).
- 42) Wiemann, P. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **77**, 972 (2010).
- 43) Balibar, C. J. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 584 (2007).
- 44) Bok, J. W. *et al.*: *Chem. Biol.*, **13**, 31 (2006).
- 45) Bouhired, S. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **44**, 1134 (2007).