

2011年度 生物工学奨励賞（斎藤賞）受賞



# 酵母のメタノール代謝制御の 分子メカニズムの解明とその応用

中川 智行



## Regulation mechanism of methanol metabolism in the methylotrophic yeast

Tomoyuki Nakagawa (*Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193*) *Seibutsu-kogaku* **90**: 72-77, 2012.

現在、さまざまな地球規模での環境問題が取り上げられ、その問題解決に向けた多くの方策が提案されてきた。特に、地球温暖化対策は国家レベルでの対応が迫られており、CO<sub>2</sub>やCH<sub>4</sub>をはじめとする温室効果ガスの排出削減を目指した新たな社会構造への移行が求められているのが現状である。これらのことから、現在、持続可能でかつ再生可能なバイオマス資源を効率よく活用する「カーボンニュートラルな物質循環系」の構築に向けた多様なプロジェクトが進行中である。

一方、メタノールは植物バイオマスや温暖化ガスであるCH<sub>4</sub>またはCO<sub>2</sub>を原料に直接合成できるC<sub>1</sub>化合物である。また、メタノールは燃焼の際、水とCO<sub>2</sub>にまで完全酸化される特徴を持ち合わせることから、現在、もっとも環境負荷の少ない次世代型エネルギー源・炭素源のひとつに数えられている。これらの性質からメタノールは、図1に示すように「カーボンニュートラルな物質循環系」の中間体としてもっとも優れたクリーンな化合物であると言える。さらにメタノールは安価でかつ水に可溶性炭素源でもあることから、さまざまな発酵生産系の出発原料としてメタノールを利用することは可能であり、メタノールを用いた高効率・高収率な発酵生産系は「環境に配慮した次世代型発酵生産系」としての役割が大いに期待できる。よって、発酵生産系の出発原料となるメタノールを唯一の炭素源・エネルギー源として利用できるメチロトロフは、低環境負荷型発酵生産系の構築に向けた極めて重要な鍵微生物であり、メチロトロフの持つメタノール代謝能力を最大限に引出し、活用す

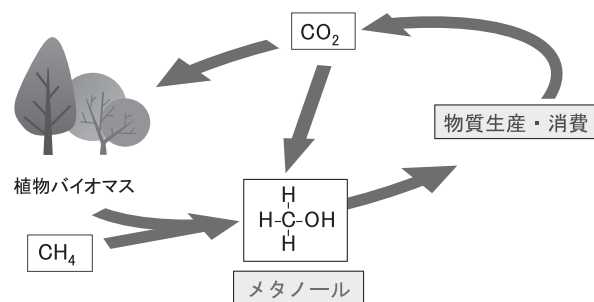


図1. カーボンニュートラルな物質循環系の中間体としてのメタノールの位置付け

る技術の開発が、今後、生物工学分野における大きな柱のひとつになるものと考えられる。

このような背景から、筆者らはメチロトロフの中でも特に「メチロトロフ酵母」の持つメタノール代謝能力を「環境に配慮した次世代型発酵生産系」に活用するための分子基盤の構築を目指して、本酵母のメタノール代謝の制御メカニズムを詳細に解析してきた。本稿では、これまで筆者らが証明してきたメチロトロフ酵母の「細胞内ホルムアルデヒド (FA) 毒性管理」と「細胞の酸素認識と酸素代謝バランス」に立脚したメタノール代謝制御の分子メカニズムについて解説したい。

### メチロトロフ酵母の細胞内ホルムアルデヒド (FA) 毒性管理に立脚したメタノール代謝の制御機構

メチロトロフ酵母のメタノール代謝は、アルコール

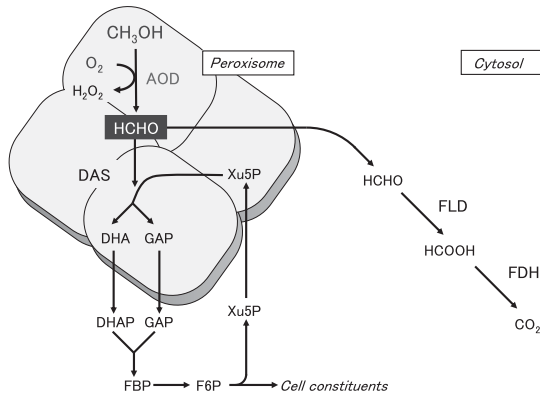


図2. メチロトロフ酵母のメタノール代謝経路. AOD, アルコール酸化酵素; DAS, ジヒドロキシアセトン合成酵素; FLD, FA脱水素酵素; FDH, 脂肪酸脱水素酵素.

酸化酵素 (AOD) によるメタノールの酸化により開始される (図2)<sup>1)</sup>. この反応により生じるホルムアルデヒド (FA) はジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) によりキシルロース5-リン酸に固定され、解糖系を經由して細胞構成成分に導かれる資化経路と、細胞質にてグルタチオン依存型FA脱水素酵素 (FLD) と脂肪酸脱水素酵素 (FDH) によりCO<sub>2</sub>にまで酸化される酸化経路により代謝される<sup>2)</sup>.

筆者らは、メチロトロフ酵母の持つ特異な細胞機能の有効活用に向けて、本酵母の持つ巧妙なメタノール代謝制御機構に着目し、その解明と応用を目指すことにした.

#### メタノール代謝における細胞内FA管理の重要性

メタノールは「目散るアルコール」とも呼ばれ、ヒトの場合、視神経炎、視神経萎縮による失明を起こし、子供ならわずか30 g、大人なら50 gから200 gで死に至る化合物である. メチロトロフ酵母は3%のメタノール濃度までは良好に生育できるが、それを越えると生育障害を示し始める. これらのことから、メチロトロフ酵母のメタノール生育におけるもっとも大きな障害はメタノールの持つ細胞毒性であると思われるが、しかし、出芽酵母を用いてメタノールの毒性試験を行ったところ、10 Mを越えるメタノール濃度においても酵母はまったく生育障害を示さなかった. 一方、メタノール代謝の中間体であるFAを用いて出芽酵母の毒性試験を行ったところ、酵母は4 mMのFAですでに強い生育障害を示した<sup>3)</sup>.

また、メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* のメタノール生育中の培地のFAの挙動を観察したところ、1%から3%のメタノール生育では培地中に0.3 mM程度のFAを蓄積の後、酵母は良好なメタノール生育を開始し

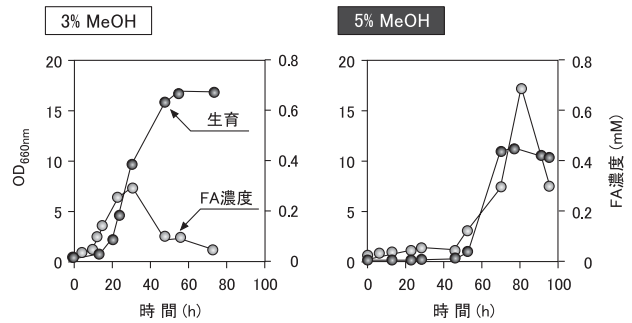


図3. メタノール生育環境下の培地へのFA蓄積. メチロトロフ酵母は培地中にFAを蓄積し、その後、生育を開始する. しかし、5%メタノール環境下では、細胞はメタノールレベルをコントロールできず、培地中にFAを蓄積してしまい、生育障害を示していた.

ていた. 一方、5%メタノール培地でも酵母はFAの蓄積と共に細胞増殖を開始するものの、細胞はFAレベルを完全に制御できず、過剰のFA蓄積に伴う生育障害が観察された (図3).

さらには、メチロトロフ酵母ではメタノール資化には直接関与しないFA脱水素酵素であるFLDを欠損させるとメタノール生育能を完全に失うことが報告されている<sup>4)</sup>.

これらの事実、メチロトロフ酵母のメタノール代謝における最重要課題はメタノールの毒性ではなく、より強い毒性を持つ代謝中間体であるFAの細胞内レベルの管理にあるものと結論づけた.

**AODアイソザイムによるメタノール酸化調節とそれによる細胞内FAレベルの制御** 筆者らは、いくつかのメチロトロフ酵母種がAODをnative PAGEで分離可能な9種のアイソザイムとして持つことを見いだしてきた (図4左)<sup>5)</sup>. 筆者らは本アイソザイムに興味を持ち、

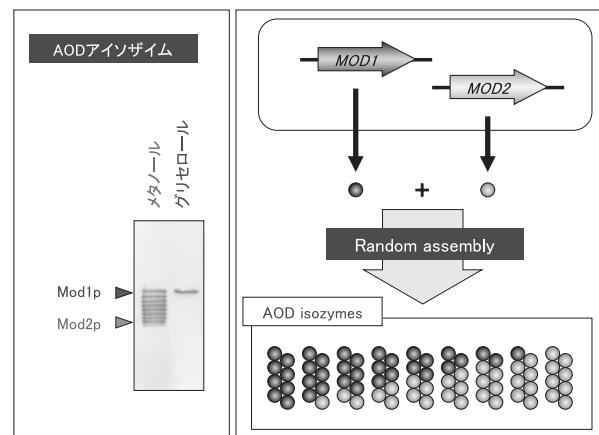


図4. AODアイソザイムの形成機構

その生理的役割を理解するため、まずメチロトロフ酵母 *P. methanolica* の AOD アイソザイムの形成における分子機構を証明することにした。

筆者らは、遺伝子欠損株を用いた *in vivo* 解析、さらには *in vitro* での再構成実験を通して、9種の AOD アイソザイムが異なる遺伝子にコードされる2種類のサブユニット Mod1p と Mod2p のみで構成され<sup>6,7)</sup>、これら9種のアイソザイムは Mod1p と Mod2p のホモ8量体と両サブユニットがランダムに8量体に会合することで生じるハイブリット型8量体で構成されていることを突き止めた(図4右)<sup>7,8)</sup>。

また、*P. methanolica* の AOD アイソザイムのザイモグラムパターンは生育環境のメタノール濃度に応じて変化する。細胞は、低メタノール濃度下では Mod1p を主に誘導し、メタノール濃度が上昇するに応じて Mod2p の誘導が徐々に増加しはじめ、高メタノール濃度では Mod2p を支配的なサブユニットとして誘導していた(図5)<sup>9)</sup>。また、AOD アイソザイムのメタノール濃度に対するザイモグラム変化は、両サブユニットをコードする遺伝子 *MOD1* と *MOD2* の遺伝子発現と完全に連動しており、低メタノール濃度下では *MOD1* が主に発現し、高濃度下では *MOD2* の発現が支配的であった<sup>9)</sup>。つまり、*P. methanolica* は生育環境下のメタノール濃度を的確に認識する能力を持っており、それぞれの環境に応じて *MOD1* と *MOD2* の発現を調節することで、AOD アイソザイムの構成を *MOD* 遺伝子の転写レベルで制御していることが示された。

では、*P. methanolica* はどうして外環境のメタノール濃度に応じて AOD アイソザイムの構成パターンを変化させる必要があるのだろうか？ その答えは、Mod1p と Mod2p の性質にあった。両サブユニットのメタノールに対する  $V_{max}$  と親和性はまったく異なり、Mod1p のメ

タノールに対する  $V_{max}$  は Mod2p の約10倍で、 $K_m$  は約1/10であった<sup>6)</sup>。つまり、*P. methanolica* は、低メタノール濃度下では高  $V_{max}$  低  $K_m$  型サブユニットである Mod1p をメインに誘導し、貴重なメタノールを効率よく利用することでメタノール生育をより有利に進めようとしている。一方、高メタノール環境下では低  $V_{max}$  高  $K_m$  型サブユニットである Mod2p を支配的に発現させることで AOD 活性を意図的に抑え、メタノールの過剰酸化による FA の余剰な蓄積を抑制する戦略をとっていると解釈できる。

さらには、AOD アイソザイムのうちハイブリット型分子は両サブユニットの構成比率に応じて、酵素分子あたりの  $K_m \cdot V_{max}$  を変化させることができる。低メタノール条件下で構築される Mod1p の比率が高いハイブリット型分子は高  $V_{max}$  低  $K_m$  であるが、Mod2p の割合が多くなるにつれて  $V_{max}$  が徐々に低下し、 $K_m$  が増加していく<sup>9,10)</sup>。つまり、*P. methanolica* は2種類のサブユニットの組み合わせで、より多様な基質親和性を持つ AOD 分子種を作り出すことが可能であり、両サブユニットの存在比を厳密に調節するとことでどのようなメタノール条件にも対応できる AOD アイソザイムを作り出しているものと推測できる。

言い換えれば、AOD アイソザイムは FA の生成量を外環境のメタノール濃度に合わせて調節し、どのような生育環境でもメタノール酸化を一定にできる非常に優れた「細胞内 FA レベル調節システム」の一つであると言える。

**AOD アイソザイムの細胞内局在による活性発現制御による細胞内 FA 管理** AOD は DAS やカタラーゼ (CTA) と共にメタノール誘導性のオルガネラであるペルオキシソーム (Ps) に局在するマトリックス酵素であり<sup>11)</sup>、その Ps 局在は Ps 輸送シグナル (PTS) レセプター 1 である Pex5p に依存することが知られている<sup>12)</sup>。また、DAS や CTA は細胞質で2量体や4量体を形成した後に Ps 輸送されるが<sup>13,14)</sup>、AOD はサブユニットのまま Ps に運ばれ、その後、折りたたまれてオクタマーを形成する<sup>1)</sup>。*P. methanolica* の AOD アイソザイムも例外ではなく DAS、CTA と共に Ps に局在し<sup>15-17)</sup>、Pex5p や Ps 膜における Pex5p との結合因子である Pex14p の遺伝子欠損株では、AOD アイソザイムは Ps に輸送されないどころか、まったく活性型にも移行できない<sup>15,18)</sup>。これらの事実は、メチロトロフ酵母は AOD を決して細胞質では活性型にせず、AOD の活性発現を単膜のオルガネラである Ps 内のみに限定し、FA・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生産系を DAS や CTA などの FA・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 代謝系と共に Ps 内に封じ込めていることを意味する。これによりメチロトロフ酵母は FA の

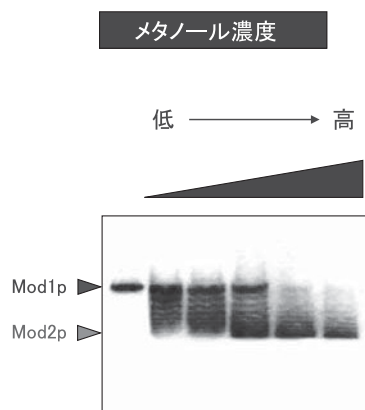


図5. メタノール濃度に対する AOD アイソザイムの誘導パターン



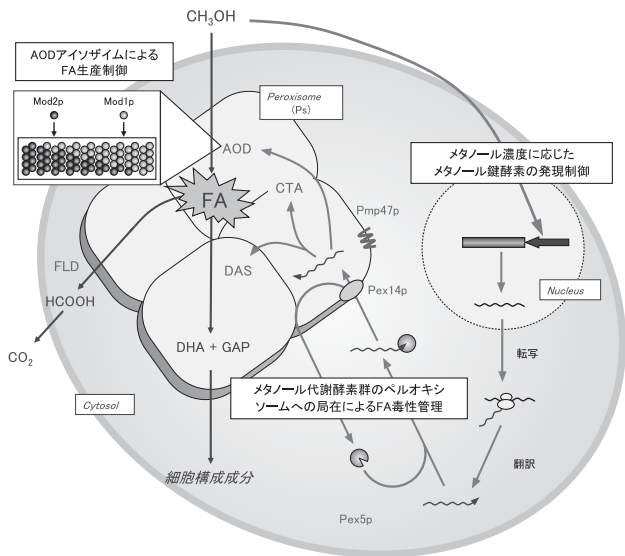


図6. *P. methanolica*のメタノール代謝におけるFA毒性回避の概念図

細胞に対する毒性を最小限に抑えているものと推察できる。つまり、AODアイソザイムのPsへの輸送過程はFAに対する毒性対策において非常に重要なステップの一つであり、Ps局在による活性発現の制御はメタノール代謝における「細胞内FA管理システム」としても大きな意味を持つことが容易に想像することができる(図6)。しかし、現在のところAODアイソザイムのPs輸送と活性型への移行システムの詳細はほとんど証明できていないのが現状であり、今後、AODアイソザイムによるメタノール代謝制御のメカニズムを明らかにする上で解明しなければいけない最重要課題の一つであると言える。

**メタノール代謝酵素群の統括的な活性発現制御による細胞内FA管理** ここまでAODアイソザイムの機能と活性発現制御が優れた細胞内FAレベル調節システムであることを示してきた。しかし、自然界にはAODアイソザイムを持たないメチロトロフ酵母株も多数存在することから、これら酵母群はAODアイソザイム以外にもあの手この手でFAの細胞毒性に対する対策を取っていることが容易に想像できる。筆者らは、その一つにAODを含めたメタノール代謝酵素群の統括的な活性発現制御の存在を見いだしてきた。

これまでメタノール代謝酵素群の発現誘導に関する研究は、ただ単にメタノール誘導性遺伝子群のメタノールによる発現のONとグルコースによるOFFの分子機構を中心に進められてきたが、メチロトロフ酵母では、これら遺伝子群の発現はもっと繊細かつ協調的に制御されていた。たとえば、FLDはAODアイソザイム同様、

外環境のメタノール濃度の上昇に応じて発現を増加させ、AODにより生産されるFAの毒性対策に対応している<sup>19)</sup>。さらには、メタノール代謝酵素群を発現させる順序にも秘密があった。メチロトロフ酵母はメタノール生育時にはFAを生産するAODの発現誘導よりも、FA代謝酵素やPs形成因子を優先的に発現させ、細胞のFA対策を完成させた後に、満を持してAODを発現させることで細胞内のFAの蓄積を防いでいた<sup>20,21)</sup>。

このように、メチロトロフ酵母は外環境のメタノール状況を確認しながら、メタノール代謝に関与するさまざまな因子をそれぞれの機能に応じて個々に活性発現の時期、場所および順序を統括的に制御するシステムを持ち合わせていると考えられる(図6)。これら協調的な活性発現制御システムによって細胞内FAレベルを巧妙に管理することで、メチロトロフ酵母は円滑なメタノール代謝を行っているものと結論づけた。

### メチロトロフ酵母の酸素認識に立脚したメタノール代謝の制御機構

**AODアイソザイムと呼吸鎖の酸素消費バランスの制御による円滑なメタノール代謝** ここまで、メチロトロフ酵母のメタノール代謝では細胞内のFAの毒性対策が肝心であると説明をしてきたが、本代謝を制御する上でもう一つの重要な問題が存在する。それは、AODをはじめとしたメタノール代謝酵素群の発現制御がメタノールのみならず、酸素によっても厳密に制御されていることである<sup>22)</sup>。*P. methanolica*を例に挙げると、すべてのメタノール代謝酵素群は酸素依存的に発現し、嫌気条件下ではこれら酵素の発現は完全に抑制されている<sup>22)</sup>。また、AODアイソザイムの発現は生育環境下の酸素濃度に依存し、低酸素下ではMod1pを、高酸素下ではMod2pを支配的に誘導する(図7左)<sup>23)</sup>。AODアイソザイムの酸素に対する $K_m$ 値は、Mod1pは低 $K_m$ を、

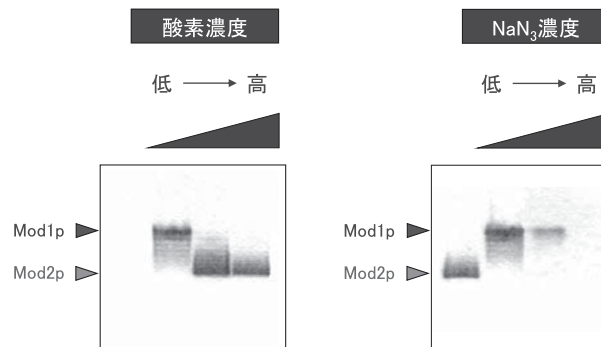


図7. 酸素濃度と呼吸鎖阻害剤( $\text{NaN}_3$ )に対するAODアイソザイムの誘導パターン

Mod2pは高 $K_m$ を示す<sup>22)</sup>。つまり、*P. methanolica*はメタノールと同様に生育環境下の酸素濃度を的確に認識し、生育環境に合わせたAODアイソザイムを構築していることが伺える。

実は、このAODアイソザイムの酸素に対する発現制御がメタノール代謝において非常に重要な意味を持つ。メチロトロフ酵母のメタノール代謝では、少なくとも2つの重要な酸素依存的段階を経なければならない。一方はAODによるメタノール酸化であり、他方はメタノール代謝の最終段階である呼吸鎖である。つまり、メタノール代謝ではAODと呼吸鎖の間で酸素の消費が競合し、もし酸素消費が一方に偏ってしまうと代謝が滞ってしまう。よって、メタノール代謝を円滑に保つためにはAODと呼吸鎖の酸素消費バランスの制御が必要不可欠である。実際、ミトコンドリア遺伝子欠損株 $p^0$ 株では、AODの発現は見られなくなる。さらには、呼吸鎖阻害剤アジ化ナトリウムで呼吸鎖を阻害すると、高阻害条件下ではMod1pが支配的に誘導され、その阻害率を下げるにつれてMod2pの発現比率が高くなっていく(図7右)<sup>22)</sup>。このAODアイソザイムの発現パターンは酸素濃度に対する挙動と非常に類似していることから、細胞は呼吸鎖で酸素濃度を感知し、自身の活性に合わせてAODアイソザイムの発現を制御することで両者の酸素消費バランスを調節し、メタノール代謝を巧妙に制御しているものと思われる。また、呼吸鎖因子シトクロム $c$ の発現もAOD活性に応じて制御されていることが分かっている(未発表)。つまり、AODと呼吸鎖がそれぞれ局在するオルガネラであるPsとミトコンドリアは互いに酸素代謝状態を確認しあい、両者の間でメタノール代謝の酸素消費バランスを巧妙に制御するための、いわゆる「オルガネラクロストーク」が行なわれていることが推測される(図8)。今後、この「オルガネラクロストーク」の分子メカニズムを解明し、その知見を酵母の分子育種に応用することで、酸素環境に依存しない酵母の発酵生産系の構築を目指したいと考えている。

### おわりに

本研究では、メチロトロフ酵母のメタノール代謝制御に焦点を絞り、AODアイソザイムの役割を中心に「細胞内FA毒性管理」と「細胞の酸素認識と酸素代謝バランス」に立脚したメタノール代謝制御の分子メカニズムを解析してきた。本稿で示したように、メチロトロフ酵母のメタノール代謝の制御は巧妙かつ複雑ではあるが、その詳細をひとつひとつ縋き、得られた知見をメチロトロフ酵母自身に反映させていくことで、今後、本酵母特有の細胞機能をより強化した「次世代型メチロ

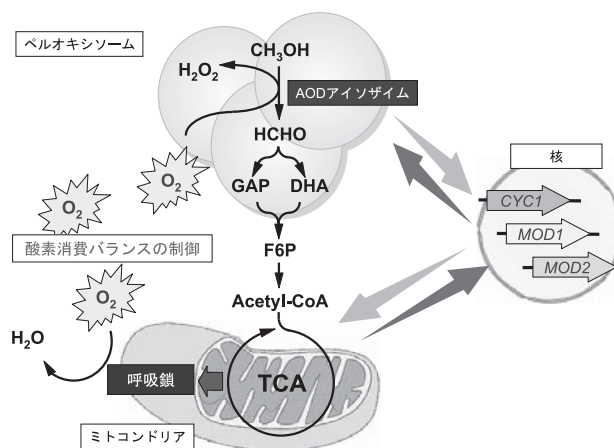


図8. メタノール代謝における「オルガネラクロストーク」

ローフ酵母」の分子育種が可能であると考えている。

現在、メチロトロフ酵母はAODをはじめとした強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*, *P. methanolica*などにおいて開発され、たくさんの研究者に利用されている<sup>24,25)</sup>。また、メチロトロフ酵母は脂肪酸生成やAODを活用したバイオセンサーの開発などに用いられているのみならず<sup>26,27)</sup>、Psをはじめとしたオルガネラダイナミクスの解析やプリオンの研究など、分子生物学の基礎的研究におけるモデル生物としても広く用いられている。今後もメチロトロフ酵母の利用は広がりを見せるものと考えており、その細胞機能を強化することは本酵母の産業利用をより推進していく上で、非常に大きな意味合いを持つものと考えている。

序論でも述べたが、メタノールが最も環境負荷の少ないエネルギー源・炭素源のひとつに数えられていることから、メチロトロフ酵母の有効活用は「環境に配慮した次世代型発酵生産系」への寄与が期待できる。近い将来、次世代型メチロトロフ酵母がその能力を十二分に発揮できるよう、今後、その分子基盤の構築と産業への応用を見据えた技術の開発を目指して研究を行っていき

本研究は、東京農業大学応用生物科学部(旧農学部)応用微生物学研究室で開始し、京都大学大学院農学研究科 制御発酵学研究室、東京農業大学生物産業学部 食品微生物学研究室および現在の岐阜大学応用生物科学部 食品栄養学研究室で行われたものであり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました駒形和男先生、加藤暢夫先生、阪井康能先生、由里本博也先生、冨塚登先生、早川享志先生に心からお礼申し上げます。また、

さまざまな場面でご指導いただいた先生方、共に研究を行った向山博幸博士、伊藤尚志博士、藤村朱喜博士、松藤淑美博士をはじめとした、数多くの学生の皆様に感謝申し上げます。

本研究の一部は、科学研究費補助金、公益財団法人 発酵研究所、秋山記念生命科学振興財団、野田産業科学研究所などからの助成を受けて実施されました。

## 文 献

- 1) Ozimek, P., Veenhuis, M., and van der Klei, I. J.: *FEMS Yeast Res.*, **5**, 975–83 (2005).
- 2) van der Klei, I. J., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Veenhuis, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1453–1462 (2006).
- 3) 佐藤正憲, 松藤淑美, 藤村朱喜, 中川純一, 谷 明生, 早川享志, 中川智行: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.19 (2009).
- 4) Lee, B., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N.: *Microbiology*, **148**, 2697–2704 (2002).
- 5) Ito, T., Fujimura, S., Uchino, M., Tanaka, N., Matsufuji, Y., Miyaji, T., Takano, K., Nakagawa, T., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **24**, 523–532 (2007).
- 6) Nakagawa, T., Uchimura, T., and Komagata K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 498–503 (1996).
- 7) Nakagawa, T., Mukaiyama, H., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N.: *Yeast*, **15**, 1223–1230 (1999).
- 8) Nakagawa, T., Sakai, Y., Mukaiyama, H., Mizumura, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Kato, N., and Tomizuka N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 225–227 (2001).
- 9) Nakagawa, T., Mizumura, T., Mukaiyama, H., Miyaji, T., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **19**, 1067–1073 (2002).
- 10) Gruzman, M. B., Titorenko, V. I., Ashin, V. V., Lusta, K. A., and Trotsenko, Y. A.: *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 1537–1544 (1996).
- 11) Roggenkamp, R., Sahm, H., Hinkelmann, W., and Wagner, F.: *Eur. J. Biochem.*, **59**, 231–236 (1975).
- 12) van der Klei, I. J. and Veenhuis, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1794–1800 (2006).
- 13) Stewart, M. Q., Esposito, R. D., Gowani, J., and Goodman, J. M.: *J. Cell Sci.*, **114**, 2863–2868 (2001).
- 14) Horiguchi, H., Yurimoto, H., Goh, T., Nakagawa, T., Kato, N., and Sakai, Y.: *J. Bacteriol.*, **183**, 6372–6383 (2001).
- 15) Ito, T., Fujimura, S., Matsufuji, Y., Miyaji, T., Nakagawa, T., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **24**, 589–597 (2007).
- 16) Nakagawa, T., Fujimura, S., Ito, T., Matsufuji, Y., Ozawa, S., Miyaji, T., Nakagawa, J., Tomizuka, N., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Hayakawa, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1491–1493 (2010).
- 17) Nakagawa, T., Yoshida, K., Takeuchi, A., Ito, T., Fujimura, S., Matsufuji, Y., Tomizuka, N., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Hayakawa, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1733–1735 (2010).
- 18) Ito, T., Ito, D., Ozawa, S., Fujimura, S., Matsufuji, Y., Nakagawa, J., Tomizuka, N., Hayakawa, T., and Nakagawa, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 624–627 (2011).
- 19) Nakagawa, T., Ito, T., Fujimura, S., Chikui, M., Mizumura, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **21**, 445–453 (2004).
- 20) Yurimoto, H., Komeda, T., Lim, C. R., Nakagawa, T., Kondo, K., Kato, N., and Sakai, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1493**, 56–63 (2000).
- 21) Sakai, Y., Saiganji, A., Yurimoto, H., Takabe, K., Saiki, H., and Kato, N.: *J. Cell Biol.*, **134**, 37–51 (1996).
- 22) Fujimura, S., Nakagawa, T., Ito, T., Matsufuji, Y., Miyaji, T., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **24**, 491–498 (2007).
- 23) Nakagawa, T., Inagaki, A., Ito, T., Fujimura, S., Miyaji, T., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y., and Tomizuka, N.: *Yeast*, **23**, 15–22 (2006).
- 24) Yurimoto, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 793–800 (2009).
- 25) Gellissen, G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 741–50 (2000).
- 26) Aoki, H., Miyamoto, N., Furuya, Y., Mankura, M., Endo, Y., and Fujimoto, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2632–2638 (2002).
- 27) Reshetilov, A. N., Trotsenko J. A., Morozova, N. O., Iliasov, P. V., and Ashin, V. V.: *Process Biochem.*: **36**, 1015–1020 (2001).