

深海由来酵母が生産する糖脂質の分子デザイン

Molecular Design of Glycolipids Produced by Deep-Sea Yeast

小 西 正 朗 *
MASAAKI KONISHI*

北見工業大学工学部バイオ環境化学科 〒090-8507 北海道北見市公園町 165 番地

* TEL: 0157-26-9402 FAX: 0157-24-7719

* E-mail: konishim@mail.kitami-it.ac.jp

Department of Biotechnology and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology,
165, Koen-cho, Kitami, Hokkaido 090-5807, Japan

キーワード: 深海, 酵母, 糖脂質, 代謝工学

Key words: deep sea, yeast, glycolipid, metabolic engineering

(原稿受付 2014年6月26日 / 原稿受理 2014年7月2日)

1. はじめに

海洋は地球表面の約7割を占め, その平均深度は3,700 m程度といわれている。深海は一般的には水深200 m以上, 近年では太陽光が到達する有光層1,000 m以深とされる。体積比では約70%に達する広大な生物圏と言える。太陽光が到達しない暗黒の環境では, 太陽光による一次生産の恩恵を直接受けることがないため, 海洋表面や陸域由来の有機物の沈降(マリンスノー)や地殻内からの化学エネルギーに支えられている。地殻内からのエネルギーフラックスの総エネルギー量は 9×10^{12} W程度と見積もられており, 太陽光由来のエネルギーフラックス(1.2×10^{14} W)と比べて2オーダー以上少ない¹⁾。エネルギーフラックスからの推定では, エネルギーで支えられるバイオマス量は地球全体の0.001%程度にすぎない。また, 化学エネルギーを利用できる微生物の多くは難培養であり, 既存のバイオプロダクト生産には適用が困難であるものがほとんどである。一方, 深海の大部分の生命圏を支える光合成エネルギーを基盤とする従属栄養微生物に関する研究は意外と少ない。上記のごとく, 深海生命圏の大部分がマリンスノーのように表層からの有機物流入に支えられていると仮定すると, 沈降する有機物はその最中に易分解性のものから順に分解され, 深海環境へ到達する際は難分解性の物質が増加していることが推定される。難分解性多糖の分解菌については研究が進められており, 駿河湾の深海底(深度2,406 m)から分離された*Microbulbifer* sp. A94株が生産する耐熱性 β -アガラーゼはネオアガロ4糖(ガラクトースとアンヒドロガラクトースが交互に結合した構造)を特異的に分解するため, アガロースゲルからのDNA抽出用試薬として, 実用化されている²⁻⁴⁾。その他にも, 耐熱性菌が生産する多糖分解酵素が報告されており, 配糖体の合成に利用できる可能性がある⁵⁻⁶⁾。

著者らは, これまで探索例が非常に少ない二次代謝物の生産菌の分離, 利用の可能性を調査するために, 深海で特に難分解性の基質を分解利用し, 二次代謝産物として, 界面活性物質を生産する微生物について探索してきた。本稿では, 得られた分離株の特性を紹介するとともに更なる高度利用を目指し, ドラフトゲノム解析を積極的に取り入れた解析, 育種手法を検討している。これらの取り組みについて, 概説したい。

2. 深海由来微生物株による糖脂質生産

2.1 マンノシルエリスリトールリピッド

相模湾の海底環境サンプルから分離されたSY62株は, 植物油を炭素源とする培地で, よく増殖し, 糖脂質を生産することがわかっている⁷⁾。リボゾーマルRNAの部分配列(D1/D2領域)のDNAシーケンスに基づく分子系統解析から, SY62株は*Pseudozyma hubeiensis*に属する菌株であることが明らかとなっている。*P. hubeiensis*は陸域でも分離されている株であるが分離例が非常に少ない⁸⁾。また, 運動性を持たず, 耐冷性を示すため, 近縁種は南極等からも分離されている。従って, 本菌株は陸域からの流入種であることが推測される。しかしながら, 糖脂質の生産性が非常に高く, 陸域分離株の数倍の糖脂質生産能力を示し, 1週間の培養で129 g/Lの糖脂質を生産することがわかっている⁹⁾。この株の生産性は報告のあるMEL生産の論文の中でも, 最大であった(表1)。生産された糖脂質の構造解析を行った結果, 主要な生産物はマンノシルエリスリトールリピッド(MEL)と呼ばれる糖脂質であることがわかっており, マンノースの6位のアセチル基がないMEL-Cに分類されることがわかった。脂肪酸組成が陸域のものと同様のものであるものの, 陸域由来の*P. hubeiensis* KM-59株と同様の代謝産物を生産する(図1)。*Pseudozyma*属,

表 1. 報告されている MEL 生産菌の生産性

Strains	MEL 濃度 (g/l)	培養時間 (days)	生産性 (g/l/day)	参考文献
<i>P. hubeiensis</i> SY62	129	7	18.4	9)
<i>P. hubeiensis</i> KM-59	76.3	16	4.8	10)
<i>P. aphidis</i> DSM 14930	165	11.8	13.9	11)
<i>Candida</i> sp. SY16	95	8.3	11.4	12)
<i>P. tsukubaensis</i> 1E5	73.1	7	10.4	13)
<i>P. antarctica</i> T-34	140	30	4.6	14)
<i>U. maydis</i> DSM 4500	30	7	4.3	15)

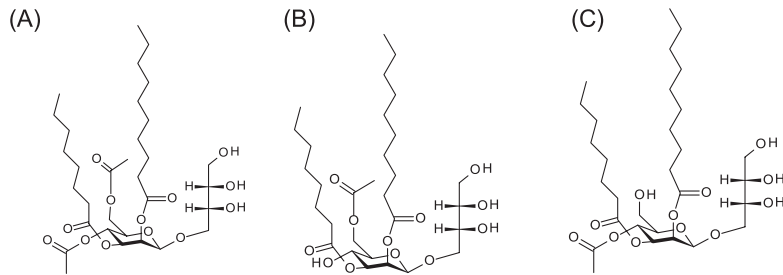


図 1. MEL の分子構造 (A) MEL-A, (B) MEL-B, (C) MEL-C

Ustilago 属に含まれる多くの種で MEL を合成できることがわかっているが、その分子種は種ごとに異なることがわかっており、多様な生産株を収集することで、多様な MEL を選択的に生産することも試みられている⁸⁾。MEL は自己集合特性に優れており、化粧品材料やヘアケア素材として利用できる^{16,17)}。生産性を向上し、価格を抑えることができれば、より幅広い分野で利用できる。また、界面活性物質の界面活性と分子構造の相関関係があることはよく知られており、代謝制御により様々な代謝中間体を効率のかつ選択的に生産できれば、有用性を高めることが可能である。

2.2 グルコトリオースリピッド

沖縄トラフの伊平屋北フィールドの熱水噴出域で採取された環境サンプルから分離された放線菌 *Rhodococcus* sp. BS15 株はアルカンや植物油から糖脂質を生産できることを指標に分離された糖脂質生産菌である¹⁸⁾。rRNA の DNA 配列に基づく系統解析を行った結果、面白いことに、植物病原菌の *Rhodococcus facians* に近縁であった。最も近縁の株は北極圏で分離されたアルカン分解菌 *Rhodococcus* sp. 5/1 株 (Accession no. AF181689) であり、本菌株も SY62 株同様、耐冷性を持つことが示唆された。海洋性の *Rhodococcus* 種 NPO-JL-61 株や南極での分離株 *Rhodococcus* sp. R37551 株も近縁であった。最適増殖温度は、一般的な *Rhodococcus* 属細菌の 30°C より若干低く 20°C 付近で最も増殖することがわかった。核磁気共鳴スペクトル (¹H-, ¹³C-NMR)、マトリックス支援レーザーイオン化質量分析法 (MALDI-TOF-MS)、ガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) を用いて、主要生産物を解析した結果、2 分子の α -glucoside、1 分子の β -glucoside、1 分子のコハク酸、3 分子のカプロン酸もしくはカプリル酸、2 分子の 3 ヒドロキシカプロン酸もしくはカプリル酸が 1 つの分子内に存在することがわかり、図 2 に示すようなグルコトリオースリピッド

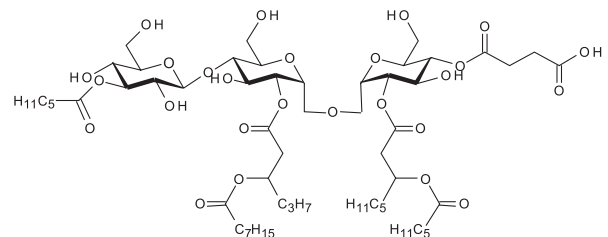
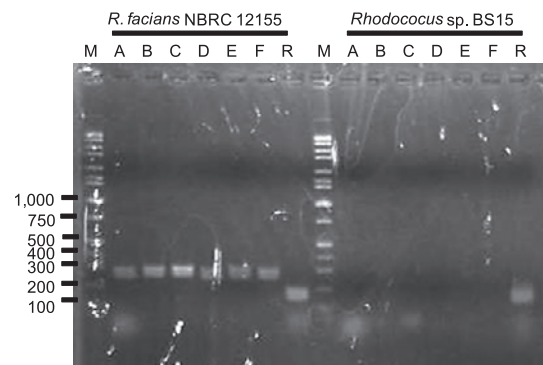


図 2. グルコトリオースリピッド (GTL) の分子構造

図 3. *fas* 遺伝子群の PCR 増幅試験結果。M: Wide range ladder (TakaraBio), A: *fasA*, B: *fasB*, C: *fasC*, D: *fasD*, E: *fasE*, F: *fasF*, R: 16S rRNA V4 region.

(GTL) 構造であることが推定された。3 分子の糖を親水基として保持する 3 糖型の分泌型の糖脂質の報告例は我々の知る限り初めてであった。表面張力を測定した結果、臨界ミセル濃度は 2.3×10^{-6} M であり、表面張力は 29.5 mN/m まで低下し、高い界面活性を保持していることがわかっている。

植物病原菌 (輸入防疫規制株) との近縁があり、植物病原性の保持が疑われた、しかしながら、深海由来株が

高等植物への寄生性や病原性を保持している必要性は感じられない。そこで、よく調べられている *R. facians* NBRC 12155 株の *fas* 遺伝子に対する PCR プライマーを設計し、PCR 増幅をおこなった結果を図 3 に示す。*R. facians* NBRC 12155 株のゲノム DNA を鋳型にした場合、200 bp 程度の PCR 産物が検出された。一方、BS-15 株から分離したゲノム DNA を鋳型にした場合は、PCR 産物が検出されなかった。このことから、*Rhodococcus* sp. BS-15 株は *R. facians* NBRC 12155 株と同様の植物病原性遺伝子を保有していないことが示唆された。NBRC 12155 株で *fas* 遺伝子はプラスミド上に保持されていることがわかっている。陸生の非植物病原性宿主にプラスミド伝播により、病原性が付与された。もしくは、深海環境の高等植物が存在しない環境に適応するため、植物病原性遺伝子が欠落したことが示唆された。いずれにせよ、陸生の植物病原性株と深海由来株は別の進化系統をたどってきたことが推定された。

3. ドラフトゲノム解析の活用

3.1 *Pseudozyma hubeiensis* SY62

SY62 株の近縁種である *Ustilago maydis*¹⁹⁾ と *Pseudozyma antarctica*²⁰⁾ のドラフトゲノム解析はすでに実施されており、MEL 合成に関わる遺伝子も同定されている。しかしながら、いずれの宿主も MEL-A を主に合成する株であり、MEL-C を主に生産する *P. hubeiensis* のゲノム情報は存在しなかった。筆者らは、ハイスループットで MEL 関連遺伝子を推定し、MEL 合成の選択性を遺伝レベルで議論するために、SY62 株のドラフトゲノム解析を行った²¹⁾。Illumina HiSeq を用い、400 bp のペアエンドライブラリーを解析し、62,228,512 read のシーケンスを得た。Augustus v1.2.08 を用いて、アセンブルした結果、160 contig, 74 scaffolds にアセンブルできた。ゲノムサイズは 18,442,938 bp、G+C 含量は 56.5% であった。SY62 株のゲノムサイズと G+C 含量は *U. maydis* 521 株¹⁹⁾ や *P. antarctica* T-34 株²⁰⁾ のものとほぼ同等であった。

Open reading frames (ORFs) のアノテーションには、MetaGenomeAnnotator 1.0 ならびに NCBI BLAST 2.2.18 を用いた。rRNA と tRNA 領域の推定には、RNAmmer, tRNAscan を用いた。7,523 個の ORF, 26 個の rRNA, 121 個の tRNA が推定された。MEL 合成に関わる遺伝子クラスター (*emt1*, *mac1*, *mac2*, *mmf1*, *mat1*) に相当する ORF が推定でき、近縁種のそれらとの相同性は表 1 に示す通りであった。MEL の合成経路は図 4 に示すようにエリスリトールを出発物質とし、glycosyltransferase (Emt1) によりマルトースが結合し、2 種の acyltransferases (Mac1, Mac2) によるアシル化、acetyltransferase (Mat1) によるアセチル化により、合成されると推定されている¹⁷⁾。アセチル化に関与する Mat1 の相同性が特に低いことから、選択的に生産される MEL 分子種の違いは Mat1 の多様性に起因することが推定された。

3.2 *Rhodococcus* sp. BS-15

Rhodococcus sp. NS-15 株についても、植物病原性に関与する *fas* 遺伝子群の同質遺伝子 (isogene) の存在を確認するため、ドラフトゲノムシーケンスを行っている¹⁸⁾。Ion Torrent システムならびに Ion 316 chip kit を用いてショットガン解析した結果、平均 173.78 bp のリードを 1,975,325 read シーケンスできた。全長 5.5 Mb, 652 contig にアセンブルできた。コンティグ中には、6,235 個の ORF, 40 個の tRNA, 2 個の rRNA が検出された。近縁種の *R. fascians* DSM 20669 と *R. fascians* D188 のゲノムサイズはそれぞれ 5.6 Mb, 5.8 Mb であることから、94.8% 程度のカバー率で解析できていると考えられた。BLAST による *fas* 同質遺伝子の検索の結果、RC006g027 番遺伝子が *fasB* との相同性が 53% であり、同質遺伝子と考えるほど相同性が高くなく、同質遺伝子ではないと考えられた。7 個の *fas* 遺伝子とも相同性の高い配列は検出されなかったため、同質遺伝子による植物病原性をもつ可能性も極めて低いことが示唆された。一方、TGL は新規性が高く、遺伝子情報が全くないため、現在のところ関連遺伝子の推定には至っていない。

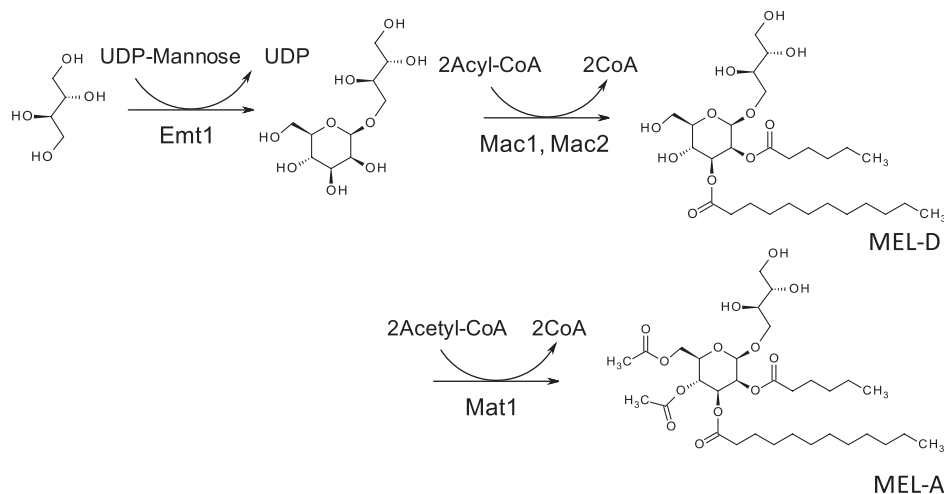


図 4. MEL 合成代謝経路 Emt1: glycosyltransferase, Mac1, Mac2: acyltransferase, Mat1: acetyltransferase

4. 分子デザインのための代謝工学

4.1 分子デザインコンセプト

界面活性物質のような分子構造—物理化学機能の相関が高い物質については、野生株が生産する天然型の代謝物のみならず、代謝工学を利用し、特定の代謝中間体を選択的かつ効率的に生産できれば、特定の分子構造をもつ代謝産物を容易に入手することが可能となる。しかしながら、これまで遺伝情報が十分でない種の微生物に対して代謝工学を適用するためには、代謝関連遺伝子の特定やクローニングに大変な時間と労力を要し、網羅的に人工的な代謝産物を得ることは大変困難であった。昨今のシーケンス技術の向上と次世代シーケンサーの一般化により、遺伝情報の網羅的取得が可能となり、非常用の微生物の遺伝情報不足が解消できるようになりつつある。ドラフトシーケンス技術により、ゲノム情報を活用することで、任意の代謝産物（デザインされた代謝産物）を取得し、機能解析することで、新たな代謝物の機能を探索できるだけでなく、比較可能な類似の分子構造

を持つ代謝物の機能を比較することにより、構造—機能相関についても深い検証が可能となる。このように代謝産物側からみた代謝工学は分子デザイン技術とも捉えることができる。非常用酵母（non-conventional yeast）の生産する二次代謝産物のデザイン技術のケーススタディとして、上記の *P. hubeiensis* SY62 株の MEL について分子デザインを進め、知見が不足している MEL の詳細な構造—機能相関について、研究を進めている。分子デザインを行う上で、ゲノムデータの他、遺伝子導入技術、網羅的な遺伝子破壊法などが必要になる。

4.2 遺伝子導入法の検討

Ustilago 属、*Pseudozyma* 属真菌に導入可能なプラスミドはいくつか開発されている^{23,24}。中でも、pUXV プラスミド²⁴は ATCC から入手可能であり、*Ustilago maydis* 由来の複製領域 ARS 領域を持つため、*Ustilago* 属、*Pseudozyma* 属の細胞内で自己複製可能である²⁵。このプラスミドを利用することで、*Pseudozyma* 属酵母の一種である *P. hubeiensis* への遺伝子導入法の検討が可能である。pUVX1 はハイグロマイシン耐性遺伝子を真菌用選択マーカーとしてもち、*Ustilago* 由来の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase プロモーターでドライブされるシングルクローニングサイト（*Bam*HI サイト）を含んでいる。*Bam*HI サイトに pPRSET-emGFP (Invitrogen) から PCR で取得した emGFP 遺伝子を導入したベクター pUXV1-emGFP を作成し、遺伝子導入すると、GFP 由来の蛍光を発する細胞が得られる（図 5）。pUXV1-emGFP を用いて、SY62 への遺伝子導入の検討を行ったところ、前培養の条件次第で、薬剤耐性を持つ擬陽性株が出現しやすいことや、エレクトロポレーションの条件により導入効率が大きく変化することを確認している。GFP を導入することで、陽性クローンと擬陽性クローンを容易に区別できる。詳細については、今後報告したい。

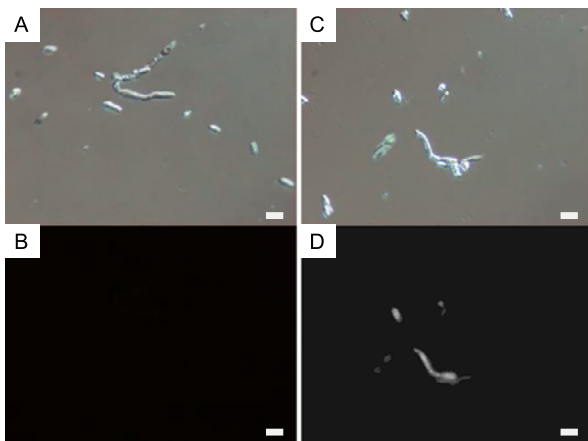


図 5. 蛍光顕微鏡観察写真（400 倍） A：野生株（微分干渉像）， B：野生株（蛍光観察）， C：GFP 導入株（微分干渉像）， D：GFP 導入株（蛍光観察）

4.3 遺伝子破壊コンジュゲートの作成

Ustilago maydis の遺伝子組換えには、目的遺伝子の

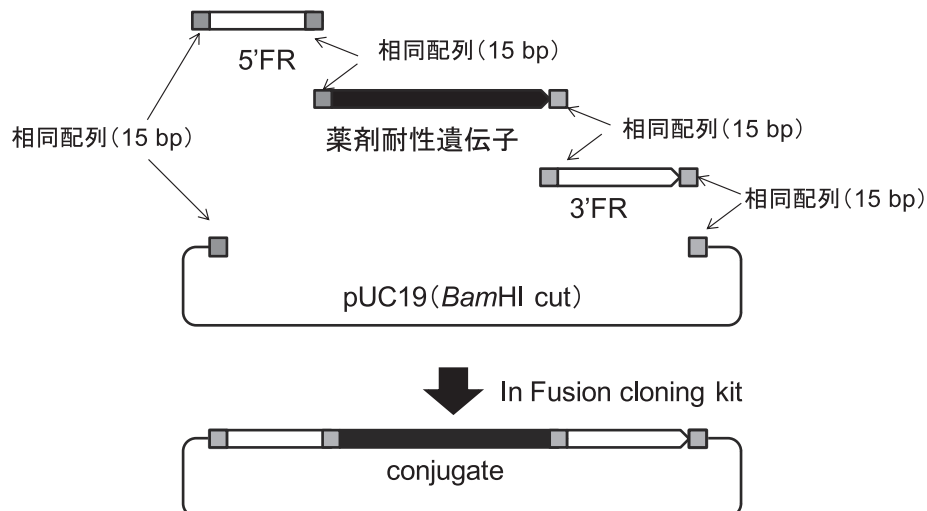


図 6. In Fusion 反応を利用した遺伝子破壊用 conjugate の作成方法

上流と下流の1 kb程度の配列(5' and 3' flanking regions, 5' FR, 3' FR)の間に抗生物質耐性遺伝子カセットが挿入されたDNAを合成する必要がある。Fusion PCR²⁶⁾や各フラグメントをLigation後、目的配列をPCRで増幅する方法などが報告されている²⁷⁾。筆者らは、In-fusion反応を用いたconjugateの作成を行っている。使用しているkitはIn-fusion kit(Clontec)であるが、Life Technologies社のGneArtやNew England BioLabsのGibson Assembly kitも同等である。末端に15 bpの相同配列を付加したflanking regionと耐性遺伝子カセットならびにBamHIで直線化したpUC19を試薬と混合し、50°Cで15~60 min反応させることで、遺伝子破壊カセットを合成することができる。得られたベクターは大腸菌に形質転換し、目的の配列が挿入されたクローンを得る。挿入配列は制限酵素処理する必要がないため、破壊したい遺伝子のflanking regionをPCR増幅できれば、ほぼ同じシステムで遺伝子破壊カセットを合成できるメリットがあり、網羅的な遺伝子破壊実験のスループット向上に寄与する。筆者らもこの方法で、遺伝子破壊カセットを合成し、遺伝子破壊を検討している。

5. 終わりに

地球生命圏で最も広大であると考えられる熱水、メタン冷湧水域以外の深海環境から得られた微生物の利活用、特に二次代謝産物の生産菌としての界面活性物質生産菌の分離と機能評価、さらにゲノム情報を利用した代謝物デザイン技術への展開について、筆者の取り組みを中心に紹介した。系統的には必ずしも新規性が高くない分離株についても、詳細に性能を評価することで、SY62株のように陸域分離株では得られない高生産性が見出されたり、BS-15株のように新規の界面活性物質を生産する菌が見出されたりすることがわかった。深海環境における微生物について、熱水噴出孔付近の超高温環境やメタン冷湧水域の化学物質に依存した微生物、好圧微生物など比較的環境と微生物機能の関係がわかりやすい微生物の機能もしくは進化系統などに注目が集まることが多いが、深海には環境との関連がわかりにくいもしくはは一見系統的に特徴がない微生物も多く生息している。基礎研究の観点からは、微生物探索の意義付けや機能解析の動機付けが難しいが、調べてみたら興味深い微生物や新しい機能が発見されるかもしれません。

謝 辞

生物工学会大会にて開催された環境バイオテクノロジー極限環境生物学会共催シンポジウム「極限生物たちが切り拓く未来の環境バイオテクノロジー」を企画するにあたって、中心的な役割をされた大阪大学の本田孝祐先生をはじめ、ご協力いただいた環境バイオテクノロジー学会会員・極限環境生物学会会員のみなさまに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Elderfield, H. and A. Schultz. 1996. Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 24: 191–224.
- 2) Miyazaki, M., Y. Nogi, Y. Ohta, Y. Hatada, Y. Fujiwara, S. Ito, and K. Horikoshi. 2008. *Microbulbifer agarilyticus* sp. nov. *Microbulbifer thermotolerans* sp. nov., agar-degrading bacteria isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1128–1133.
- 3) Ohta, Y., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 1073–1081.
- 4) Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, M. Akita, Y. Hatada, S. Goda, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 505–514.
- 5) Hang, V., Y. Hatada, S. Goda, Y. Hidaka, Z. Li, M. Akita, Y. Ohta, K. Watanabe, H. Matsui, S. Ito, and K. Horikoshi. 2005. α -glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 757–765.
- 6) Konishi, M., T. Fukuoka, Y. Shimane, K. Mori, Y. Nagano, Y. Ohta, D. Kitamoto, and Y. Hatada. 2011. Biochemical synthesis of novel, self-assembling glycolipids, form ricinoleic acid by a recombinant α -glucosidase from *Geobacillus* sp. *Biochem. Lett.* 33: 139–145.
- 7) Konishi, M., T. Fukuoka, T. Nagahama, T. Morita, T. Imura, D. Kitamoto, and Y. Hatada. 2010. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoe* (Deep-Sea Cold-Seep Clam) in the deep sea. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 169–175.
- 8) Konishi, M., T. Morita, T. Fukuoka, T. Imura, K. Kakugawa, and D. Kitamoto. 2007. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 37–46.
- 9) Konishi, M., T. Nagahama, T. Fukuoka, T. Morita, T. Imura, D. Kitamoto, and Y. Hatada. 2011. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma hubeiensis* SY62. *J. Biosci. Bioeng.* 111: 702–705.
- 10) Konishi, M., T. Morita, T. Fukuoka, T. Imura, K. Kakugawa, and D. Kitamoto. 2008. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 37–46.
- 11) Rau, U., L.A. Nguyen, H. Roeper, H. Koch, and S. Lang. 2005. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 607–613.
- 12) Kim, H.S., J.W. Jeon, B.H. Kim, C.Y. Ahn, H.M. Oh, and B.D. Yoon. 2006. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 391–396.
- 13) Morita T., M. Takashima, T. Fukuoka, M. Konishi, T. Imura, and D. Kitamoto. 2010. Isolation of basidiomycetous yeast *Pseudozyma tsukubaensis* and production of glycolipid biosurfactant, a diastereomer type of mannosylerythritol lipid-B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88: 679–688.
- 14) Kitamoto, D., T. Ikegami, G.T. Suzuki, A. Sasaki, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura, and H. Yanagishita. 2001. Microbial conversion of *n*-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1709–1714.
- 15) Spoehckner, S., V. Wray, M. Nimtz, and S. Lang. 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 33–

- 39.
- 16) Morita, T., M. Kitagawa, S. Yamamoto, A. Sogabe, T. Imura, T. Fukuoka, and D. Kitamoto. 2010. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair. *J. Oleo Sci.*, 59: 267–272.
 - 17) Takahashi, M., T. Morita, T. Fukuoka, T. Imura, and D. Kitamoto. 2012. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. *J. Oleo Sci.* 61: 457–464.
 - 18) Konishi, M., S. Nishi, T. Fukuoka, D. Kitamoto, T. Watsuji, Y. Nagano, A. Yabuki, S. Nakagawa, Y. Hatada, and J. Horiuchi. 2014. Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15 lacking the phytopathogenic fas genes, produces a novel glucotriose lipid biosurfactant. *Mar. Biotech.* 16: 484–493.
 - 19) Kämper, J., R. Kahmann, M. Bölker, et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97–101.
 - 20) Morita, T., H. Koike, H. Hagiwara, M. Machida, S. Sato, H. Habe, and D. Kitamoto. 2014. Genome and transcriptome analysis of the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* producing extracellular glycolipids, Mannosylerythritol lipids. *PLOS one.* 9: e86490.
 - 21) Konishi, M., Y. Hatada, and J. Horiuchi. 2013. Draft genome sequence of basidiomycetes yeast-like fungus, *Pseudozyma hubeiensis* SY62, which produces an abundant amount of biosurfactant, mannosylerythritol lipids. *Genome Announc.* 1: e00409–13.
 - 22) Hewald, S., U. Linne, M. Scherer, M.A. Marahiel, J. Kämper, and M. Bölker. 2006. Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5469–5477.
 - 23) Wang, J., D.W. Holden, and S.A. Leong. 1988. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 865–869.
 - 24) Kinal, H., J. Tao, and J.A. Bruenn. 1991. An expression vector for the phytopathogenic fungus, *Ustilago maydis*. *Gene* 98: 129–134.
 - 25) Tsukuda T., S. Carleton S. Fotheringham, and W.K. Holloman. 1988. Isolation and characterization of autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3703–3709.
 - 26) Shevchuk, N.A., A.V. Bryksin, Y.A. Nusinovich, F.C. Cabello, M. Sutherland, and S. Ladisch. 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32: e19.
 - 27) Kämper, J. 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. 2004. *Mol Genet Genomics.* 271: 103–110.