

丝状真菌次级代谢产物生物合成的表观遗传调控

周锐, 廖国建, 胡昌华

西南大学药学院现代生物医药研究所, 重庆 400716

摘要: 丝状真菌产生的次级代谢产物是新药的重要来源之一, 其生物合成过程受到众多因素的调控。最近的研究表明, 表观遗传对多种丝状真菌次级代谢产物的生物合成具有调控作用。DNA 和组蛋白的甲基化与乙酰化修饰是目前所知的丝状真菌主要的表观遗传调控形式。通过过表达或缺失相关表观修饰基因和利用小分子表观遗传试剂改变丝状真菌染色体的修饰形式, 不仅可以提高多种已知次级代谢产物产量, 而且可以通过激活沉默的生物合成基因簇诱导丝状真菌产生新的未知代谢产物。丝状真菌表观遗传学正逐渐成为真菌菌株改良的新策略以及挖掘真菌次级代谢产物合成潜力的强有力手段。

关键词: 丝状真菌, 表观遗传, DNA 甲基化, 组蛋白修饰, 次级代谢产物, 生物合成, 菌株改良

Epigenetic regulation of secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi: a review

Rui Zhou, Guojian Liao, and Changhua Hu

Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Secondary metabolites of filamentous fungi are important sources of new drugs, and their biosynthetic processes are regulated by numerous factors. Recent studies indicate that many filamentous fungal secondary metabolites are regulated by epigenetic modifications, which not only affect the titers of secondary metabolites, but also activate the cryptic gene clusters. This review summarizes recent advances of epigenetic application in filamentous fungal secondary metabolite biosynthesis, especially the types of fungal epigenetic modification and epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolism. The application of epigenetic theory in filamentous fungi is becoming a new strategy for fungal strain improvement and a powerful method to obtain novel natural products.

Keywords: filamentous fungi, epigenetic, DNA methylation, histone modification, secondary metabolite, biosynthesis, strain improvement

Received: February 16, 2011; **Accepted:** May 13, 2011

Supported by: Chongqing Key Program of Science and Technology Development (No. CSTC 2009AB1029), Chongqing Science and Technology Innovation Ability Construction Program (Nos. CSTC2009, CB1010).

Corresponding author: Changhua Hu. Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhu@swu.edu.cn

重庆市科技攻关重点项目 (No. CSTC 2009AB1029), 重庆市创新能力建设项目 (Nos. CSTC2009, CB1010) 资助。

丝状真菌具有十分丰富的次级代谢产物合成能力, 很多在医药上有重要应用价值的抗生素 (如青霉素和头孢菌素)、降血脂药物 (如洛伐他汀)、免疫抑制剂 (如环孢菌素) 等都是由真菌产生的。随着真菌基因组的挖掘和次级代谢产物的生物合成研究越来越深入^[1], 人们发现目前已知的丝状真菌次级代谢产物只是真菌能够合成的产物的冰山一角, 比如分析构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 基因组, 发现该菌具有产生 27 个聚酮类化合物, 14 个非核糖体多肽, 1 个萜类化合物以及两个吡啶生物碱的潜力, 然而目前的培养条件下, 仅发现数个次级代谢产物^[2]。这些在实验室培养条件下未表达的生物合成基因簇被称为沉默 (Cryptic) 基因簇, 激活这些沉默的基因簇将极大地丰富丝状真菌次级代谢产物的种类和数量, 为新药开发提供重要的先导化合物。

沉默的次级代谢生物合成基因簇的激活以及新次级代谢产物发现是目前真菌次级代谢产物研究的热点与难点之一^[3-4], 也是微生物菌种改良的一种新方法新策略^[5]。无论是真菌还是原核生物链霉菌都可以通过改变发酵培养条件^[6-7]、过表达次级代谢产物生物合成途径特异性转录调控基因^[8-9], 异源表达整个生物合成基因簇^[10-11]得到新的化合物。近年来在链霉菌中发现, 通过核糖体工程激活沉默基因簇的表达^[12], 成为链霉菌次级代谢产物改构获取新化合物的有效途径, 但在真菌中未见相关报道。最近的研究表明, 丝状真菌的次级代谢生物合成与其基因簇所处的表观遗传状态有着密切的关系, 通过表观遗传操作能大范围改变微生物的次级代谢产物谱, 激活大量次级代谢产物的生物合成, 这将极大丰富丝状真菌次级代谢产物的研究。本文综述了丝状真菌表观遗传研究的新进展, 特别是其在真菌次级代谢生物合成和代谢产物开发中的应用。

1 丝状真菌中的表观遗传

表观遗传是指在染色体中 DNA 序列不发生变化的情况下, 基因表达却发生了可遗传的改变, 这

种改变在发育和细胞增殖过程中能稳定地遗传下去。表观遗传分子机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑以及 RNA 干扰等, 这些变化在基因转录调控过程中扮演重要角色。表观遗传修饰在肿瘤细胞与组织中已得到普遍研究, 但在真菌的形态与次级代谢的研究中刚起步。这些相关修饰中 DNA 甲基化和组蛋白修饰一直是表观遗传学领域的研究热点, 研究表明这两类修饰与丝状真菌的多种生理状态密切相关。

1.1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是指由 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 在 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 作用下, 基因组内 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的 5 位碳原子被甲基化形成 5-甲基胞嘧啶。它是一种真核生物中常见的 DNA 转录后碱基共价修饰过程。由于胞嘧啶 5 位碳原子引入了甲基, 使得 DNA 分子构象发生了变化, 影响了 DNA 与蛋白质分子的结合。在肿瘤细胞中, CpG 岛的高甲基化通常导致抑癌基因的失活, 而去甲基化可激活抑癌基因的表达。在黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 中典型的 DNA 甲基化水平在 0.25%~1.5% 之间^[13-14]。在同种真菌中不同的生长时期, 甲基化水平也不尽相同。比如在毛霉 *Phycomyces blakesleeanus* 的菌丝体阶段, 其基因组甲基化水平约 0.48%, 而在其孢子阶段, 其甲基化水平为 2.9%^[15]。虽然 DNA 甲基化是一种遗传性状, 然而这种遗传性状却不甚稳定^[16-17]。

1.2 组蛋白修饰

组蛋白是含量丰富的染色体相关蛋白, 具有两个重要的作用: 作为核小体的组成部件, 为 DNA 提供结合位点; 另一个功能是它可以调控转录的起始。组蛋白的 N-末端通过共价修饰作用发生甲基化、乙酰化、泛素化、SUMO 化和磷酸化等翻译后修饰, 进而形成丰富的组蛋白密码。

组蛋白乙酰化是最早被发现的, 也是目前研究得最深入的与转录有关的组蛋白修饰方式。组蛋白乙酰化主要发生在组蛋白 H3 和 H4 的 N-端尾部比较

保守的赖氨酸残基上, 依靠组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 维持乙酰化的平衡。在正常情况下, 组蛋白赖氨酸的氨基基团存在质子化现象, 这促使带正电荷的赖氨酸与带负电荷的 DNA 因静电效应而紧密结合; 相反, 组蛋白尾部赖氨酸残基被乙酰化能够使组蛋白携带的正电荷量减少, 降低其与带负电荷 DNA 链的亲合性, 促使参与转录调控的各种蛋白因子与 DNA 结合^[18]。根据赖氨酸与 DNA 链的亲合力不同, 而调控转录的“开”“关”, 最终控制基因的表达或沉默。

组蛋白甲基化是通过组蛋白甲基转移酶 (Histone methyltransferase, HMTs) 和去甲基化酶 (Demethylase) 的相互作用, 动态地调节组蛋白的甲基化状态, 并且与其他功能蛋白的相互作用, 来调控基因转录激活或抑制生物学过程。与组蛋白赖氨酸乙酰化促进基因表达不同, 组蛋白赖氨酸甲基化对基因表达的影响比较复杂, 它们中有些可以促进基因表达, 有些可以抑制基因表达, 取决于它所位于的残基情况。如在很多真核生物中, H3K9 的甲基化通常是异染色质形成的标志, 并且导致基因沉默^[19], 但是在一些真菌中组蛋白甲基化是菌种正常生长的必要条件, 如在烟曲霉中, 敲除编码 H3K9 甲基化酶的基因 (*clrD*) 会降低菌落的生长半径, 推迟 *brlA* 的表达从而影响分生孢子的产生^[20]; 在粗糙脉孢霉中, H3K36 甲基化是其正常发育所必需的^[21]。

2 表观遗传修饰与次级代谢产物生物合成

研究发现真菌次级代谢生物合成基因簇常处于异染色质状态, 并且位于端粒附近, 其结构基因可能受表观遗传调控。丝状真菌基因组的 DNA 甲基化、组蛋白的乙酰化和甲基化都与次级代谢产物的生物合成密切相关, 不仅影响次级代谢产物的产量, 还能激活大量沉默的次级代谢产物生物合成基因簇的表达。

2.1 组蛋白去乙酰化与次级代谢产物生物合成

表观遗传修饰对真菌次级代谢产物影响的直接

证据来自通过分子遗传学手段阻断构巢曲霉的 3 种类型的 HDACs (*HdaA*, *HosB*, *HstA*)。构巢曲霉能产生多种次级代谢产物, 包括青霉素、norsolorinic acid 和 terrequinone A。阻断 *hosB* (真菌特异的 HOS3-like HDAC) 和 *hstA* (*sirtuin* 的同源体) 对真菌次级代谢没有显著的影响, 而阻断 *hdaA* (保守的 class II HDAC) 后显著地提高 norsolorinic acid 和青霉素的产量。同时失去这 3 种 HDACs 的突变株的 norsolorinic acid 产量进一步提高, 令人惊讶的是青霉素的产量却没有显著地改变^[22]。在上述的所有突变株中, terrequinone A 的产量都没有明显的变化。HDACs 对构巢曲霉不同次级代谢产物产量的影响可能是与这 3 种次级代谢产物生物合成簇在基因组上的位置有关。青霉素和 norsolorinic acid 的合成基因簇位于染色体 VI 和 IV 靠近端粒的 100 kb 以内, 并且其周围含有保守的 DNA 重复序列, 这些特征是亚端粒区域的典型特征。而 terraquinone A 的合成簇位于染色体 V 的远端, 离端粒的距离约 700 kb。与构巢曲霉类似, 在烟曲霉 *A. fumigatus* 中敲除 *hdaA* 也可提高多种次级代谢产物的产量, 对烟曲霉 14 个非核糖体肽合成酶 (NRPS) 进行 RT-PCR 分析发现, *HdaA* 对 9 个 NRPS 有调控作用, 对包括制霉菌素在内的 4 个 NRPS 存在正调控作用, 对另外 5 个 NRPS 为负调控, 但是通过分析 14 个 NRPS 基因与端粒位置的关系发现, NRPS 在染色质上的定位与其是否受 *hdaA* 调控没有相关性^[23]。因此, 次级代谢生物合成基因簇在基因组位置是否具有表观遗传修饰的偏好, 需要在更多的真菌系统中进行深入研究。

2.2 组蛋白甲基化与次级代谢产物生物合成

组蛋白的甲基化是一种重要的表观遗传修饰, 有广泛的生物学功能。*Bre2* 是酿酒酵母中催化组蛋白 H3K4 甲基化的含 *Set1* 的 COMPASS 复合物的一个组分。*bre2* 在构巢曲霉中的同源体是 *cclA*。*cclA* 阻断突变株 H3K4 的二甲基化和三甲基化显著降低, 并伴随着 H3K9 的二甲基化和三甲基化降低。*cclA*

阻断突变株至少激活了 2 条沉默基因簇的表达, 产生 8 种新化合物, 包括 mondeictyphenone、几种大黄素同系物、芳香聚酮 F9775A 和 F9775B 等^[24]。

除了 *cclA* 外, 在曲霉中还发现了一个可能的组蛋白甲基转移酶 *LaeA*。*LaeA* 是首先在曲霉中发现的细胞核蛋白, 含有一个保守的 S 腺苷甲硫氨酸的作用位点^[25]。*LaeA* 仅存在于丝状真菌中, 如曲霉 (*A. terreus*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. flavus*) 和青霉 *Penicillium chrysogenum*, 在酿酒酵母中则没有发现 *laeA* 的存在。*LaeA* 是一个重要全局调控因子, 不仅控制了菌体形态而且决定了多种次级代谢产物的表达量。在土曲霉中, *LaeA* 正调控洛伐他汀 (Lovastatin) 的生物合成, 当敲除 *laeA* 时, 洛伐他汀的产量显著降低; 在构巢曲霉中, *LaeA* 不仅可以正调控 sterigmatocystin 和青霉素的生物合成, 还可以调控异源表达的洛伐他汀生物合成基因簇的表达^[2]。在构巢曲霉中过表达 *laeA* 可导致 *ipnA* (编码异青霉素 N 合成酶)、*lovE* (编码洛伐他汀特异的 Zn2 Cys6 转录因子) 和 *lovC* (编码洛伐他汀聚酮合酶) 也随之高表达, 但是 *stcU* (编码 sterigmatocystin 生物合成所必需的酶) 的表达量却没有变化; 在土曲霉中过表达 *laeA* 导致洛伐他汀的量提高了 400% 到 700%^[2,25]。通过比较构巢曲霉 *laeA* 过表达菌株和缺失菌株的代谢谱图, 成功地发现了编码 terrequinone A 的生物合成基因簇^[2], 而通过基因芯片分析烟曲霉的野生型和 *laeA* 阻断突变株的转录谱发现, 烟曲霉基因组中的 22 个次级代谢生物合成基因簇中的 13 个受 *LaeA* 的调控, 包括正调控烟曲霉主要毒素-胶黏毒素 (Gliotoxin) 的生物合成^[26]。*laeA* 的阻断突变株不仅次级代谢产物合成受到影响, 还对真菌的形态分化产生影响。在液体培养基条件下, 突变株的分生孢子的生长受到影响, 分生孢子表面突起明显减少^[27]。在产黄青霉中, *laeA* 正调控青霉素和色素的生物合成并影响孢子的形成, 过表达 *laeA* 能显著地提高青霉素的产量^[28]。鉴于

LaeA 在真菌次级代谢产物生物合成过程的重要作用, 本实验室从产美伐他汀的橘青霉 *Penicillium citrinum* 中克隆了 *laeA* 基因, 序列分析显示与产黄青霉的 *laeA* 有 95% 的同源性, 并发现 *laeA* 的表达与美伐他汀的生物合成正相关^[29]。尽管 *LaeA* 对真菌的次级代谢有重要的影响, 但是 *LaeA* 的具体作用机制还不甚清楚。由于 *LaeA* 的蛋白序列与组蛋白甲基转移酶有同源性, 提示 *LaeA* 可能参与了组蛋白修饰; 而且 *LaeA* 作用靶点大都位于基因组上的亚端粒区, 因此可能通过染色体的重排来发挥作用。

2.3 组蛋白 SUMO 化与次级代谢产物生物合成

SUMO 化是真核细胞中一种重要的翻译后修饰, 影响很多重要的细胞过程, 如调节基因的转录和染色体的结构。SUMO 是类似泛素的小蛋白, 能共价结合到很多蛋白质上, 包括组蛋白等。敲除构巢曲霉基因 *sumO*, 可显著影响该菌的次级代谢, 其中 asperthecin 的表达量提高近 200 倍, 而 austinol, dehydroaustinol 和 sterigmatocystin 的表达量分别降低 21 倍、10 倍和 54 倍。然而 emericellamides 的表达量没有改变^[30]。由于 SUMO 化的作用靶点的多样性, 还需要进一步研究来确定 SUMO 化是直接作用次级代谢产物生物合成簇, 还是通过未知的靶点从而间接影响次级代谢产物的生物合成。

3 化学表观修饰剂在丝状真菌次级代谢产物研究中的应用

通过分子遗传学手段直接阻断和高表达表观遗传学靶点能够有效地确定目的靶点与次级代谢生物合成之间的关系, 提高抗生素的产量和发现新的次级代谢产物。然而, 除了少数模式真菌 (如曲霉和青霉) 外, 很多的丝状真菌都缺乏高效的遗传操作系统, 因此在目前的技术条件下, 很难使用分子遗传学手段研究非模式真菌的表观遗传。随着研究的深入, 一系列的小分子物质被筛选出来特异性地或者半特异性地抑制表观遗传修饰酶类, 从而形

成了一门新的学科——化学表观遗传学 (Chemical epigenetics)。虽然这些小分子物质都是用来针对人类疾病的重要靶点,但是它们在很多真菌的对应靶点上也有较好的效果。控制表观遗传靶点的小分子能够影响多种生理过程,其中包括对次级代谢产物生物合成的调控。

3.1 DNA 甲基转移酶抑制剂对次级代谢生物合成的影响

在真菌细胞中, DNA 甲基化与去甲基化是受 DNA 甲基转移酶和 DNA 去甲基化酶调控的一个动态平衡过程。利用 DNA 甲基转移酶抑制剂可激活真菌的沉默基因的表达,如利用 5 杂氮胞苷、5 杂氮脱氧胞苷两种 DNA 甲基转移酶抑制剂激活了裂褶菌 *Schizophyllum commune*^[31]和粗糙脉胞菌中的潮霉素抗性基因^[32],黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 中的腐草霉素抗性基因^[33]。Mooibroek 等^[31]先后使用了 5 种 DNA 甲基转移酶抑制剂,5 杂氮胞苷、5 杂氮脱氧胞苷、甲硫腺苷、西奈芬净、S-腺苷高半胱氨酸,分别对 12 种真菌,包括 2 种曲霉 (*A. flavus*, *A. westerdijkiae*), 1 种枝孢霉 *Cladosporium cladosporioides*, 1 种粘帚霉 *Clonostachys* sp., 1 种胶孢壳 *Diatrype* sp., 2 种青霉 (产黄青霉和桔青霉), 一种根霉 *Rhizopus* sp., 1 种轮枝菌 *Verticillium psalliotae* 和 3 株未鉴定的真菌进行表观遗传修饰。结果显示 12 种真菌中的 11 种对表观遗传修饰有反应,提高了部分次级代谢产物的产量,并可能激活了新的化合物合成。选择其中的两株真菌 (*C. cladosporioides* 和 *Diatrype* sp.) 进行大规模发酵,结果表明使用 5 杂氮胞苷诱导 *C. cladosporioides* 得到了未诱导菌株本身不产生的氧脂素 (Oxylipin),诱导 *Diatrype* sp.得到了两种新型糖基化聚酮化合物。上述研究表明 5 杂氮胞苷作为 DNA 甲基转移酶抑制剂可提高多种真菌中的次级代谢产物产量和获取新型化合物,也证明了利用小分子的 DNA 甲基转移酶抑制剂作为真菌新型化合物开发的工具具有很大的可行性。

3.2 组蛋白去乙酰化酶抑制剂对次级代谢生物合成的影响

组蛋白的乙酰化可激活沉默基因,促进基因的转录与表达,因此通过小分子化学试剂抑制组蛋白的去乙酰化,提高组蛋白乙酰化水平,有可能促进基因的表达。使用不同的组蛋白去乙酰化酶抑制剂分别作用上述的 12 种真菌,结果表明曲古柳菌素 A (Trichostatin A) 和伏立诺他 (Suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 有较好的提高已有次级代谢产物表达和激活新的次级代谢产物合成的能力。Williams 等使用 SAHA 诱导 *C. cladosporioides* 得到了 7 种首次在该菌中发现的 perylenequinone 化合物^[34]。Henrikson 等新近使用 SAHA 诱导黑曲霉也获得了全新的天然产物 Nygerone A^[35]。进一步的转录谱研究表明,黑曲霉培养基中添加 SAHA 大幅上调了 14 个生物合成基因簇的表达,其中 13 个基因簇位于端粒附近 1.5 Mb 内^[36],这与 HADCs 突变所获得的结论一致,说明组蛋白乙酰化对黑曲霉次级代谢生物合成基因簇的调节具有较强的能力并且可能有位置上的偏好。

4 展望

使用重要表观遗传修饰酶类的小分子抑制剂和通过分子遗传学手段直接控制表观遗传修饰酶类的表达水平是目前采用的两种主要方法。这两种方法各有利弊,都成功地获得了新的次级代谢产物。使用小分子抑制剂的方法操作简单,投入成本低,适用于模式真菌以及遗传背景模糊的真菌,能够进行高通量的筛选。然而其缺点也很明显,很多真菌对小分子抑制剂有抗性作用,并且通过这种方法实现的表观遗传修饰,在传代中很不稳定。相比之下,通过分子水平的操作来进行表观遗传修饰,遗传稳定性大大提高,但是这种方法十分繁琐,并且要求对菌株的遗传背景有充分的了解,具有相应的技术平台,因此该方法不容易实现和普及。可将二者结合起来,先使用小分子抑制剂来测试表观遗传修

饰是否可以影响次级代谢产物的生物合成, 然后通过分子水平操作来靶向改变表观遗传酶类的表达, 以达到提高目的代谢产物的表达水平和获取新化合物的目的。

表观遗传研究是近年来生命科学领域研究热点, 在植物、动物、人类疾病几个方面已取得较大进展, 我国已于 2009 年启动了重大研究计划《细胞编程和重编程的表观遗传机制》, 新近 2011 年植物表观遗传机制也纳入了重大研究计划中。真菌作为真核生物的大类群和新药开发重要资源, 其表观遗传研究刚刚起步, 我们有理由相信, 对真菌表观遗传学的深入研究不仅会丰富和推动真核生物表观遗传学的内容和发展, 也会极大地促进真菌系统进化的研究和基因沉默问题的解决, 更会为新药开发提供更多的先导化合物, 以增加我国创制原创新药的竞争力。

REFERENCES

- [1] Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*, 2009, 10(4): 625–633.
- [2] Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, et al. Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem Biol*, 2006, 13(1): 31–37.
- [3] Chiang YM, Chang SL, Oakley BR, et al. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(1): 137–143.
- [4] Brakhage AA, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol*, 2011, 48(1): 15–22.
- [5] Zhao WT, Zou Y, Hu CH. Novel methods and strategies for strain improvement. *Chin J Biotech*, 2009, 25(6): 801–805.
赵文婷, 邹懿, 胡昌华. 微生物菌种改良的新方法新策略. *生物工程学报*, 2009, 25(6): 801–805.
- [6] Bode HB, Bethe B, Höfs R, et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, 2002, 3(7): 619–627.
- [7] Doull JL, Ayer SW, Singh AK, et al. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot (Tokyo)*, 1993, 46(5): 869–871.
- [8] Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(4): 213–217.
- [9] Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, et al. A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(8): 2965–2970.
- [10] Sakai K, Kinoshita H, Shimizu T, et al. Construction of a citrinin gene cluster expression system in heterologous *Aspergillus oryzae*. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(5): 466–472.
- [11] Lin X, Hopson R, Cane DE. Genome mining in *Streptomyces coelicolor*: molecular cloning and characterization of a new sesquiterpene synthase. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(18): 6022–6023.
- [12] Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, et al. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotech*, 2009, 27(5): 462–464.
- [13] Gowher H, Ehrlich KC, Jeltsch A. DNA from *Aspergillus flavus* contains 5-methylcytosine. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 205(1): 151–155.
- [14] Foss HM, Roberts CJ, Claeys KM, et al. Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science*, 1993, 262(5140): 1737–1741.
- [15] Antequera F, Tamame M, Vilanueva JR, et al. Developmental modulation of DNA methylation in the fungus *Phycomyces blakesleeianus*. *Nucl Acids Res*, 1985, 13(18): 6545–6558.
- [16] Zolan ME, Pukkila PJ. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(1): 195–200.
- [17] Irelan JT, Selker EU. Cytosine methylation associated with repeat-induced point mutation causes epigenetic gene silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 1997, 146(2): 509–523.
- [18] Nakayama T, Takami Y. Participation of histones and histone-modifying enzymes in cell functions through alterations in chromatin structure. *J Biochem*, 2001, 129(4): 491–499.

- [19] Stewart MD, Li JW, Wong JM. Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(7): 2525–2538.
- [20] Palmer JM, Perrin RM, Dagenais TRT, et al. H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(12): 2052–2060.
- [21] Adhvaryu KK, Morris SA, Strahl BD, et al. Methylation of histone H3 lysine 36 is required for normal development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(8): 1455–1464.
- [22] Shwab EK, Bok JW, Tribus M, et al. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(9): 1656–1664.
- [23] Lee I, Oh JH, Shwab EK, et al. HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46(10): 782–790.
- [24] Bok JW, Chiang YM, Szweczyk E, et al. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(7): 462–464.
- [25] Bok JW, Keller NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp.. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(2): 527–535.
- [26] Perrin RM, Fedorova ND, Bok JW, et al. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog*, 2007, 3(4): 508–517.
- [27] Bok JW, Balajee SA, Marr KA, et al. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(9): 1574–1582.
- [28] Kosalková K, García-Estrada C, Ullán RV, et al. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 2009, 91(2): 214–225.
- [29] Xing W, Deng C, Hu CH. Molecular cloning and characterization of the global regulator LaeA in *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(11): 1733–1737.
- [30] Szweczyk E, Chiang YM, Oakley CE, et al. Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(24): 7607–7612.
- [31] Mooibroek H, Kuipers AG, Sietsma JH, et al. Introduction of hygromycin B resistance into *Schizophyllum commune*: preferential methylation of donor DNA. *Mol Gen Genet*, 1990, 222(1): 41–48.
- [32] Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(5): 399–409.
- [33] Birch PRJ, Sims PFG, Broda P. A reporter system for analysis of regulatable promoter functions in the basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Appl Microbiol*, 1998, 85(3): 417–424.
- [34] Williams RB, Henrikson JC, Hoover AR, et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 2008, 6(11): 1895–1897.
- [35] Henrikson JC, Hoover AR, Joyner PM, et al. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(3): 435–438.
- [36] Fisch KM, Gillaspay AF, Gipson M, et al. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36(9): 1199–1213.