(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 15 日(15.10.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/156369 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/061168

(22) 国際出願日: 2015 年 4 月 9 日(09.04.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-080242 2014 年 4 月 9 日(09.04.2014) JP

(71) 出願人: 株式会社ＡＤＥＫＡ (**ADEKA CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1168554 東京都荒川区東尾久７丁目２番３５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 竹花　稔彦 (**TAKEHANA Toshihiko**); 〒1168554 東京都荒川区東尾久７丁目２番３５号 株式会社ＡＤＥＫＡ内 Tokyo (JP). 小池　誠治 (**KOIKE Seiji**); 〒1168554 東京都荒川区東尾久７丁目２番３５号　株式会社ＡＤＥＫＡ内 Tokyo (JP). 葛山　智久 (**KUZUYAMA Tomohisa**); 〒1550032 東京都世田谷区代沢２の１１の５ Tokyo (JP).

(74) 代理人: 森田　憲一，外 (**MORITA Kenichi** et al.); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目６７番８号 板橋中央ビル５階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: MUTANT ENZYME AND PRODUCTION METHOD FOR TERPENOID USING SAID MUTANT ENZYME

(54) 発明の名称 : 変異酵素及び前記変異酵素を用いたテルペノイドの製造方法

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to efficiently produce a useful terpenoid compound and, in particular, to provide a production method for squalene being an important intermediate of terpenoid. Said issue can be solved by a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) including: (a) an amino acid other than an analine (A) at position 10 in an Sα2 amino acid sequence; (b) an amino acid other than a proline (P) at position 1 from the C end of a DKK area in an HMG-CoA bond site; (c) an amino acid other than an analine (A) at position 1 in an Lα2 amino acid sequence; and (d) an amino acid other than a glutamic acid (E) at position 6 in an Lα2 amino acid sequence.

(57) 要約:　本発明の目的は、有用なテルペノイド化合物を効率よく生産することであり、特にはテルペノイドの重要な中間体であるスクアレンの製造方法を提供することである。　前記課題は、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）の（ａ）Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、及び（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸、を含むヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼによって解決することができる。

WO 2015/156369 A1

明　細　書

発明の名称 ：

変異酵素及び前記変異酵素を用いたテルペノイドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、変異酵素及び前記変異酵素を用いたテルペノイドの製造方法に関する。本発明によれば、メバロン酸経路を経て産生されるスクアレンを大量に生産することができる。

背景技術

[0002] テルペノイドは、５万種を超える天然化合物群の総称であり、炭素数５のイソプレン単位を基本骨格に有する。テルペノイドは炭素数によりヘミテルペン（Ｃ５）、モノテルペン（Ｃ１０）、セスキテルペン（Ｃ１５）、ジテルペン（Ｃ２０）、セスタテルペン（Ｃ２５）、トリテルペン（Ｃ３０）、テトラテルペン（Ｃ４０）及びその他のポリテルペンに分類することができ、生合成においてはまず、イソペンテニルピロリン酸（ＩＰＰ）、及びイソペンテニルニリン酸が異性化で生成したジメチルアリルニリン酸（ＤＭＡＰＰ）の縮重合によって数の異なる各種プレニルニリン酸が作られる。炭素数１０のゲラニルニリン酸からはモノテルペン（Ｃ１０）が、炭素数１５のファルネシルニリン酸からはセスキテルペン（Ｃ１５）、炭素数２０のゲラニルゲラニルニリン酸からはジテルペン等が生合成されていく。

[0003] テルペノイドの生合成に不可欠なＩＰＰとＤＭＡＰＰは、長い間メバロン酸を経由するいわゆる「メバロン酸経路」のみから生合成されると信じられてきたが、瀬戸、及び葛山らにより、「メバロン酸経路」以外に、多くの真正細菌や植物の色素体に存在するメチルエリスリトールリン酸（ＭＥＰ）経路を経由して生合成されることが明らかとなっている（非特許文献１）。

[0004] テルペノイドの中には、（Ｃ５Ｈ８）ｎの不飽和炭化水素以外に、それらの酸化還元生成物（アルコール、ケトン、酸等）、又は炭素の脱離した化合物などが多くの植物及び動物体内に見いだされており、これらの中には生理

活性を有するものが数多く含まれる。例えば、アブシジン酸、ジベレリン、ブラシノステロイド等の植物ホルモン、幼若ホルモンといった生体内で極めて重要な働きを担う化合物や、構造の一部にイソプレン構造を有する複合テルペンとしてクロロフィル、ビタミンＫ、ユビキノン、ｔＲＮＡ等の有用な生理活性を示す化合物が含まれる。このうち、ビタミンＫは血液凝固系に関与する重要なビタミンであり、止血剤として利用されているほか、最近では骨代謝への関与が示唆され、骨粗鬆症治療への応用が期待されており、フィロキノンとメナキノンは医薬品として許可されている。また、ユビキノンやビタミンＫ類には船体や橋脚等の建造物への貝類の付着阻害作用が在り、貝類付着防止塗料への応用が期待される。更に、カロチノイドには抗酸化作用があり、β－カロチン、アスタキサンチン、及びクリプトキサンチン等は、がん予防、又は免疫賦活活性を有するものとして期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２０１１－５２０４７１号公報

特許文献2：特表２００９－５３８６０１号公報

特許文献3：特表２０１０－５３９９０２号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー（Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry）」（日本）２００２年、第６６巻、ｐ１６９１－１６２７

非特許文献2：「化学と生物」（日本）２０１２年、第５０巻、ｐ１６３－１７４

非特許文献3：「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー（Journal of Bacteriology）」（米国）１９９９、第１８１巻、ｐ．１２５６－１２６３

非特許文献4：「ザ・エンボ・ジャーナル（The EMBO Journal）」（英国）２０００年、第１９巻、ｐ８１９－８３０

非特許文献5：「アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノ

ロジー（Applied Microbiology and Biotechnology）」（１９９８）４９：ｐ６６－７１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] テルペノイド合成に関わる経路が明らかになるにつれ、これらを改良し、テルペノイドの生産量を向上させるための検討が行われてきた（非特許文献２）。これらのテルペノイド中でもスクアレンはファルネシル二リン酸から直接生合成され多様なトリテルペンへと続く主要な中間体に位置づけられることから、スクアレンの生産量向上を目的とした検討が、各種行われている。例えば、特許文献１では、増加した濃度のイソプレノイドを生成するように修飾された遺伝的に改変された酵母を含む組成物について開示されており、その中でヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）の膜結合領域を削除することでスクアレンの生産量が増加することが述べられている。また、特許文献２及び特許文献３では、スクアレンを含むイソプレノイド化合物を生産する方法が開示されている。

しかし、特許文献１に記載のスクアレンの生産量は多くても菌体乾重量の５％程度であり、十分とはいえないものであった。また特許文献２及び３に開示されている技術は、製造条件を調整するためのものであり、従来技術を大きく超えるものではなかった。

[0008] 本発明の目的は、有用なテルペノイド化合物を効率よく生産することであり、特にはテルペノイドの重要な中間体であるスクアレンの製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、テルペノイド化合物の生産方法について、鋭意研究した結果、驚くべきことに、メバロン酸経路の酵素の１つであるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼとして、特定のアミノ酸配列を有するヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼを用いることによって、メバロン酸経路の下流の化合物、特にはスクアレンの生産量が飛躍的に増加することを

見出した。

本発明は、こうした知見に基づくものである。

従って、本発明は、

［１］ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）の（ａ）Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、及び（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸、を含むヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

［２］前記Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がアスパラギン（Ｎ）である、［１］に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

［３］前記ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）が、更に（ｅ）Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、及び（ｇ）Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、からなる群から選択される１つ又は２つ以上のアミノ酸を、含む［１］又は［２］に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

［４］前記Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のアミノ酸がロイシンであり、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸がトレオニンであり、Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸がロイシンである、［３］に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

［５］下記（１）～（３）のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで

あって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドである、［１］～［４］のいずれかに記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ：（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列、（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列、又は（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列、

［６］下記（１）～（３）のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドである、［１］～［５］のいずれかに記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ：（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列、（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列、又は（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列、

［７］膜結合領域を含まない、［１］～［６］のいずれかに記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

［８］［１］～［７］のいずれかに記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードするポリヌクレオチド、

［９］［８］に記載のポリヌクレオチドを有する微生物、

［１０］［８］に記載のポリヌクレオチドを持つＤＮＡを含むベクター、

［１１］［１０］に記載のベクターを有する形質転換体、又は

［１２］［１１］に記載の形質転換体を培養することを特徴とするテルペノイドの製造方法、

に関する。

前記［１］に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、

［１３］ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）のＳ

α２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸であり、Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸であり、そしてＬα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼであって、且つＳα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）であり、そして他のアミノ酸配列が同一であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼと比較して活性が向上しているヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、又は

［１４］前記Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸がトレオニン（Ｔ）であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がアスパラギン（Ｎ）である、［１］に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ、

に置き換えることができる。

発明の効果

[0010] 本発明の変異酵素及び前記変異酵素を用いたテルペノイドの製造方法によれば、有用なテルペノイド化合物を効率よく生産することが可能である。例えば、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼを用いるこ

とによって、メバロン酸経路において、メバロン酸の産生量を増加させることができる。また、テルペノイドの重要な中間体であるスクアレンを大量に効率よく産生することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]メバロン酸経路、及びその下流のテルペノイド化合物の産生経路を示した概略図である。

[図2]本発明のＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲ及び現在報告されているＨＭＧＲのＳα２近傍のアミノ酸配列をアラインした図である。凡例記号は以下の通り。ADK_HMGR：本発明の酵素のアミノ酸配列／HMG1：Saccharomyces cerevisiae（DDBJのアクセッション番号M22002）／HMG2：Saccharomyces cerevisiae（DDBJアクセッション番号M22255）由来酵素のアミノ酸配列／AF273765：Homo sapiens（ヒト）由来酵素のアミノ酸配列を示す。（DDBJ：DNA Data Bank of Japan＜www.ddbj.nig.ac.jp/＞） また、以下の凡例記号はUniProt（Universal Protein Resource＜www.uniprot.org/＞）のアクセッション番号を示す。Q6BSE8：Debaryomyces hansenii（ATCC 36239）／G3AY61：Candida tenuis（ATCC 10573）／J8PYR1：Saccharomyces arboricola（strain H-6）／G8B666：Candida parapsilosis（ATCC MYA-4646）／A3LX63：Scheffersomyces stipitis（ATCC 58785）／H2AW26：Kazachstania africana（ATCC 22294）／G8Y9W2：Pichia sorbitophila（ATCC MYA-4447）／F2QRB0：Komagataella pastoris（ATCC 76273）由来酵素のアミノ酸配列を示す。

[図3]本発明のＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲ及び現在報告されているＨＭＧＲのＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域及びＬα２近傍のアミノ酸配列をアラインした図である。凡例記号は上記図２の説明と同じ。

[図4]全長ＡＤＫ４６５３遺伝子を含む清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）によるメバロン酸の産生の増加を示したグラフである。

[図5]全長ＡＤＫ４６５３遺伝子を含む清酒酵母によるスクアレン産生を示したグラフである。（SQ：スクアレン、ERG：エルゴステロールを表す。）

[図6]短縮型ＡＤＫ４６５３遺伝子、及び清酒酵母の短縮型ＨＭＧＲ遺伝子を

含む清酒酵母によるスクアレン産生を示したグラフである。（SQ：スクアレン、ERG：エルゴステロールを表す。）

[図7-1]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのアミノ酸配列及び清酒酵母ＨＭＧＲのアミノ酸配列、ヒト由来の酵素タンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。凡例記号は以下の通り。ADK_HMGR：本発明の酵素のアミノ酸配列／K7 HMG1：Saccharomyces cerevisiae　協会７号由来の酵素のアミノ酸配列（DDBJのアクセッション番号 DG000049、CDS 114719..117883）／AF273765：Homo sapiens（ヒト）由来の酵素タンパク質のアミノ酸配列（DDBJのアクセッション番号AF273765)

[図7-2]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのアミノ酸配列及び清酒酵母ＨＭＧＲのアミノ酸配列、ヒト由来の酵素タンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。凡例記号は上記図７－１の説明と同じ。

[図8]全長ＡＤＫ４６５３遺伝子又は短縮型ＡＤＫ４６５３遺伝子を含む清酒酵母によるスクアレン産生の経時的変化を示したグラフである。

[図9]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのＬα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸（ｃ）をセリンからアラニンに置換するか、第５番目のアミノ酸（ｆ）をトレオニンからイソロイシンに置換するか、又はその組み合わせの置換を行って、スクアレン生産量を検討したグラフである。

[図10]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのＳα２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸（ａ）をセリンからアラニンに置換してスクアレン生産量を検討したグラフである。

[図11]ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）（Ｌα２領域のＮ末端側からＮ末端側へ２番目の位置に存在するアミノ酸）をアラニンからプロリンに置換してスクアレン生産量を検討したグラフである。

[図12]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのＬα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸（ｄ）をアスパラギンからグルタミン酸に置換してスクアレン生産量を検討したグラフである。

[図13]清酒酵母（Ｋ７０１株）の短縮型ＨＭＧＲのアミノ酸配列においてＳα２を構成するアミノ酸３残基、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトとＬα２の間に位置するアミノ酸１残基及びＬα２を構成するアミノ酸３残基に変異を導入した変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ）を発現させた酵母のスクアレン生産量を検討したグラフである。具体的には、清酒酵母（Ｋ７０１株）の短縮型ＨＭＧＲのアミノ酸配列におけるＳα２領域の第７番目のアミノ酸（ｅ）をイソロイシンからロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目のアミノ酸（ａ）をアラニンからセリンに、Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸（ｇ）をアラニンからロイシンに、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）（Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するアミノ酸）をプロリンからアラニンに、Ｌα２領域の第１番目のアミノ酸（ｃ）をアラニンからセリンに、Ｌα２領域の第５番目のアミノ酸（ｆ）をイソロイシンからトレオニンに、Ｌα２領域の第６番目のアミノ酸（ｄ）をグルタミン酸からアスパラギンに、置換してスクアレン生産量を検討した。

[図14]ＡＤＫ４６５３ＨＭＧＲのＳα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸（ｇ）をロイシンからアラニン（実施例７）に、Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のアミノ酸（ｅ）をロイシンからイソロイシン（実施例８）に置換してスクアレン生産量を検討したグラフである。

[図15]清酒酵母（Ｋ７０１株）の短縮型ＨＭＧＲのアミノ酸配列におけるＳα２領域の第７番目のアミノ酸（ｅ）をイソロイシンからロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目のアミノ酸（ａ）をアラニンからセリンに、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）（Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するアミノ酸）をプロリンからアラニンに、Ｌα２領域の第１番目のアミノ酸（ｃ）をアラニンからセリンに、Ｌα２領域の第５番目のアミノ酸（ｆ）をイソロイシンからトレオニンに、Ｌα２領域の第６番目のアミノ酸（ｄ）をグルタミン酸からアスパラギンに置換してスクアレン生産量を検討したグラフ

である（実施例９）。

[図16]清酒酵母（Ｋ７０１株）の短縮型ＨＭＧＲのアミノ酸配列におけるＳα２領域の第７番目のアミノ酸（ｅ）をイソロイシンからロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目のアミノ酸（ａ）をアラニンからセリンに、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）（Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するアミノ酸）をプロリンからアラニンに、Ｌα２領域の第１番目のアミノ酸（ｃ）をアラニンからセリンに、Ｌα２領域の第６番目のアミノ酸（ｄ）をグルタミン酸からアスパラギンに置換してスクアレン生産量を検討したグラフである（実施例１０）。また、清酒酵母（Ｋ７０１株）の短縮型ＨＭＧＲのアミノ酸配列におけるＳα２領域の第７番目のアミノ酸（ｅ）をイソロイシンからロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目のアミノ酸（ａ）をアラニンからセリンに、Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸（ｇ）をアラニンからロイシンに、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）（Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するアミノ酸）をプロリンからアラニンに、Ｌα２領域の第１番目のアミノ酸（ｃ）をアラニンからセリンに、Ｌα２領域の第６番目のアミノ酸（ｄ）をグルタミン酸からアスパラギンに置換してスクアレン生産量を検討したグラフである（実施例１１）。

発明を実施するための形態

[0012] ［１］ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、（ａ）Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、及び（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸、を含む。また、前記Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸（ａ）は好ましくはセリン（Ｓ）であり、Ｈ

ＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）は好ましくはアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸（ｃ）は好ましくはセリン（Ｓ）であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸（ｄ）が好ましくはアスパラギン（Ｎ）である。

ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）は、更に（ｅ）Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、及び（ｇ）Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、からなる群から選択される１つ又は２つ以上のアミノ酸を、含んでもよい。前記Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のアミノ酸は好ましくはロイシンであり、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸は好ましくはトレオニンであり、Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸は好ましくはロイシンである。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸（ａ）がアラニン（Ａ）であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）がプロリン（Ｐ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸（ｃ）がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸（ｄ）がグルタミン酸（Ｅ）であり、Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のアミノ酸（ｅ）がイソロイシンであり、Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸（ｆ）がイソロイシンであり、Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸（ｇ）がアラニンであるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼと比較して活性が向上している。

なお、前記「ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（ｂ）」は、「Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するアミノ酸」と同じに位置に存在するアミノ酸である。

[0013] 《ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ》

ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（以下、ＨＭＧＲと称することがある）は、膜結合タンパク質であり、膜結合部位と活性部位からなる。ＨＭＧＲは、メバロン酸経路において、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタルＣｏＡ（以下、ＨＭＧＣｏＡと称することがある）を還元して、メバロン酸（ＭＶＡ）に変換する酵素である。活性部位には、モチーフＡ～Ｇと呼ばれる領域が真核生物から真正細菌、古細菌にわたって高度に保存されている（非特許文献３）。また、ヒトのＨＭＧＲの結晶解析により、Ｌα１～９、Ｌβ１～６、Ｓα１～３、及びＳβ１～４の領域が同定されている（非特許文献４）。

本発明においては、使用するＨＭＧＲとして真核生物又は古細菌由来であることが好ましく、真核生物由来であることがより好ましい。上述のように、ＨＭＧＲは活性領域が高度に保存されているものであるが、真核生物又は古細菌由来のＨＭＧＲであることにより、より大きな効果が期待できる。

[0014] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、特徴的なアミノ酸の１つは、図２に示す（ａ）Ｓα２の領域の第１０番目に存在し、アラニン（Ａ）以外のアミノ酸である。限定されるものではないが、好ましくはαヘリックスの構造を壊すアミノ酸、例えばセリン、チロシン、グリシン、又はプロリン、又はαヘリックスの構造に影響しないアミノ酸、例えばイソロイシン、バリン、システイン、トレオニン、又はアスパラギンであり最も好ましくはセリン（Ｓ）である。また、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、特徴的なアミノ酸の１つは、図３に示す（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸であって、Ｌα２領域のＮ末端からＨＭＧＲのＮ末端側へ２番目の位置に存在するアミノ酸がプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸である。プロリン（Ｐ）以外のアミノ酸としては特に限定されるものではないが、好ましくはαヘリックス構造を強固に形成するアミノ酸、例えばグルタミン酸、アラニン、メチオニン、ロイシン、リシン、ヒスチジン、グルタミン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、又はαヘリックス構造を形成しやすい傾向を示

すアミノ酸、例えばトリプトファン、アルギニンであり、最も好ましくはアラニンである。

また、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、特徴的なアミノ酸の１つは、図３に示す（ｃ）Ｌα２の領域の第１番目に存在し、アラニン（Ａ）以外のアミノ酸である。限定されるものではないが、好ましくはαヘリックスの構造を壊すアミノ酸、例えばセリン、チロシン、グリシン、又はプロリン、又はαヘリックスの構造に影響しないアミノ酸、例えばイソロイシン、バリン、システイン、トレオニン、又はアスパラギンであり、最も好ましくはセリン（Ｓ）である。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、特徴的なアミノ酸の１つは、図３に示す（ｄ）Ｌα２の領域の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸である。グルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸としては特に限定されるものではないが、好ましくはαヘリックスの構造を壊すアミノ酸、例えばセリン、チロシン、グリシン、又はプロリン、又はαヘリックスの構造に影響しないアミノ酸、例えばイソロイシン、バリン、システイン、トレオニン、又はアスパラギンであり、最も好ましくはアスパラギン（Ｎ）である。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、好ましいアミノ酸の１つは、（ｅ）前記Ｓα２領域の第７番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸である。イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸としては特に限定されるものではないが、セリン、チロシン、グリシン、プロリン、イソロイシン、バリン、システイン、トレオニン、アスパラギン、又はロイシンを挙げることができ、特にはαヘリックス構造を形成する性質があるアミノ酸が好ましく、最も好ましくはロイシン（Ｌ）である。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、好ましいアミノ酸の１つは、図３に示す（ｆ）Ｌα２の領域の第５番目に存在し、イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸である。限定されるものではないが、好ましくはαヘリックスの構造を壊すアミノ酸、例えばセリン、チロシン、

グリシン、又はプロリン、又はαヘリックスの構造に影響しないアミノ酸、例えばバリン、システイン、トレオニン、又はアスパラギンであり、最も好ましくはトレオニン（Ｔ）である。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける、好ましいアミノ酸の１つは、図２に示す（ｇ）Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸である。アラニン（Ａ）以外のアミノ酸としては、特に限定されるものではないが、好ましくはセリン、チロシン、グリシン、プロリン、イソロイシン、バリン、システイン、トレオニン、アスパラギン、又はロイシンであり、最も好ましくはロイシン（Ｌ）である

[0015] 表１に示すように、前記（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つのアミノ酸のうち、特に（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）の４つの位置のアミノ酸が、それぞれアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、プロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、アラニン（Ａ）以外のアミノ酸、及びグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸であることが重要である。具体的には、比較例３～比較例６の結果からわかるように、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の位置のアミノ酸のいずれか１つをＫ７０１＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸に置換するとスクアレンの生産量の相対値は、０～１３．９と急激に低下した。従って、これらの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の位置のアミノ酸が、特にヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼのスクアレンの産生において重要である。

更に、実施例６～１１の結果からわかるように、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の３つのアミノ酸のいずれかが、イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、又はアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であることにより、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲよりも優れたスクアレンの生産量を示す。

[0016] 比較例２及び実施例３から明らかなように、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ（ａ＝Ａ、ｂ＝Ｐ、ｃ＝Ａ、ｄ＝Ｅ、ｅ＝Ｉ、ｆ＝Ｉ、ｇ＝Ａ）と比較して、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つの

アミノ酸が異なるＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ（ａ＝Ｓ、ｂ＝Ａ、ｃ＝Ｓ、ｄ＝Ｎ、ｅ＝Ｌ、ｆ＝Ｔ、ｇ＝Ｌ）は、スクアレンの生産量が顕著に優れていた。更に、実施例５からわかるように、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つのアミノ酸をＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの７つのアミノ酸に置換することによって、スクアレンの生産量の相対値は９２．１と、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲとほぼ同等になった。ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲとＫ７０１＿ｔＨＭＧＲとは、アミノ酸配列の長さも異なり、短縮型ＨＭＧＲ（ｔＨＭＧＲ）のアミノ酸配列の同一性も７８％である。Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸のうち、わずか７アミノ酸をＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸に置換することによって、スクアレンの生産量がＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲと同等となることは、驚くべきことである。

[0017] 前記Ｓα２の領域は、１２アミノ酸の長さを有している。現在までに報告されているＳα２のアミノ酸配列は、順番に（Ｅ／Ｉ／Ｓ）、Ｅ、Ｇ、（Ｑ／Ｓ／Ｆ）、（Ｎ／Ｋ／Ｓ／Ａ）、（Ｌ／Ａ／Ｓ／Ｔ／Ｖ）、（Ｉ／Ｖ／Ｍ）、Ｋ、（Ｋ／Ｎ／Ｅ）、Ａ、Ｆ、（Ｎ／Ｄ）である。本発明者らの知る限りにおいて、Ｓα２の第１０番目のアミノ酸として現在まで報告されているアミノ酸は、アラニン（Ａ）のみであり、アラニン以外のアミノ酸を有するヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは報告されていない。

また、前記Ｌα２の領域は、６アミノ酸の長さを有している。現在までに報告されているＬα２のアミノ酸配列は、順番にＡ、Ｉ、Ｎ、Ｗ、（Ｉ／Ｌ）、（Ｅ／Ｎ）である。Ｌα２の第１番目のアミノ酸として現在まで報告されているアミノ酸は、アラニン（Ａ）のみであり、アラニン以外のアミノ酸を有するヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは報告されていない。また、Ｌα２の第５番目のアミノ酸として報告されているアミノ酸は、ロイシン（Ｌ）及びイソロイシン（Ｉ）のみであり、ロイシン及びイソロイシン以外のアミノ酸を有するヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは報告されていない。更に、Ｌα２の第６番目のアミノ酸として報告され

ているアミノ酸は、ほとんどがグルタミン酸（Ｅ）であるが、アスパラギン（Ｎ）を有するヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、本発明者らの知る限りにおいて、１種のみである。更に、Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸として報告されているアミノ酸は、ほとんどがプロリン（Ｐ）であり、バリン（Ｖ）、アラニン（Ａ）、又はセリン（Ｓ）を有する１つずつのヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼが報告されているのみである。

[0018] 前記ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトは、ＨＭＧＲの活性において重要な役割を果たしている領域である。ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトの一部は上記Ｌα２領域からＮ末端側へ数アミノ酸のところに位置し、アスパラギン酸（Ｄ）、リシン（Ｋ）、リシン（Ｋ）の配列が高度に保存されている（非特許文献４）。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおいては、前記の（ａ）～（ｇ）の７つのアミノ酸が、それぞれ（ａ）アラニン（Ａ）以外のアミノ酸、（ｂ）プロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、（ｃ）アラニン（Ａ）以外のアミノ酸、（ｄ）グルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸、（ｅ）イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、（ｆ）イソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、及び（ｇ）アラニン（Ａ）以外のアミノ酸、であることが最も好ましい。しかしながら、（ａ）～（ｄ）の４つのアミノ酸が、それぞれの前記アミノ酸以外のアミノ酸であってもよい。更に、（ａ）～（ｄ）の４つのアミノ酸に加え、（ｅ）～（ｇ）のいずれか１つのアミノ酸（すなわち５つのアミノ酸）が前記のアミノ酸以外のアミノ酸であってもよい。更に、（ａ）～（ｄ）の４つのアミノ酸に加え、（ｅ）～（ｇ）の２つのアミノ酸（すなわち６つのアミノ酸）が前記のアミノ酸以外のアミノ酸であってもよい。

更に、（ａ）～（ｇ）のアミノ酸から選択される、６つ以上のアミノ酸がそれぞれのアミノ酸以外であってもよい。例えば、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｆ）、及び（ｇ）の６つのアミノ酸が、それぞれのアミノ酸以外であってもよく、（ａ）～（ｆ）の６つのアミノ酸が、それぞれのアミノ

酸以外であってもよい。

[0019] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）であり、そして他のアミノ酸配列が同一であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼと比較して活性が向上している。すなわち、Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）以外であり、Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸であることによって、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性が向上する。

また、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）であり、そして他のアミノ酸配列が同一であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼと比較して活性が向上している。すなわち、Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸がプロリン（Ｐ）以外であり、Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（

Ｅ）以外のアミノ酸であることによって、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性が向上する。

[0020] 本明細書において、「ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性」とは、基本的にはＨＭＧＣｏＡを還元してメバロン酸（ＭＶＡ）に変換することを意味する。しかしながら、活性の測定方法としてはメバロン酸の産生を測定することに限定されず、メバロン酸経路の下流の各種テルペノイドの産生を測定することが含まれる。例えば、実施例に記載のように、スクアレンの蓄積を測定することによって、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性を測定することが可能である。

[0021] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、公知の遺伝子組換え技術などを用いて取得することができる。例えば、酵母のｍＲＮＡを取得し、適当なプライマーを用いて、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの遺伝子を、ＰＣＲなどによって増幅する。得られた遺伝子を、適当なベクターに組み込み、遺伝子配列を決定する。（ａ）Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がアラニン、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がプロリン、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がアラニン、（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がグルタミン酸である場合は、それ以外のアミノ酸への変異を導入することによって、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードする遺伝子を取得することができる。更に、（ｅ）Ｓα２領域の第７番目のアミノ酸がイソロイシン、（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸がイソロイシン、（ｇ）Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸がアラニンである場合には、それ以外のアミノ酸への変異を導入してもよい。その遺伝子を、酵母等の宿主に組み込み、発現させることによって、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼを得ることが可能である。

また、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードする遺伝子は、公知の合成遺伝子の合成方法、例えば、Ｋｈｏｒａｎａらの

方法（Ｇｕｐｔａ　ｅｔ　ａｌ．，１９６８）、Ｎａｒａｎｇらの方法（Ｓｃａｒｐｕｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，１９８２）、又はＲｏｓｓｉらの方法（Ｒｏｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９８２）によって合成することも可能である。そして、合成された遺伝子を発現させることにより、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼを得ることができる。

[0022] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列を含むポリペプチドからなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、実施例に記載のように、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの優れた活性を示す。従って、配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列を含むポリペプチドも、同様にヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの優れた活性を示すものである。例えば、配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列を含むポリペプチドとしては、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの発現を上昇させるために、前記ポリペプチドのＮ末側又はＣ末側にグルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）又はＨｉｓタグなどを融合させた融合タンパク質を挙げることができる。このような融合タンパク質は、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの機能を損なうことなく、精製などを容易にすることができる。

[0023] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドからなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。

本明細書において、「アミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸

が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸」とは、アミノ酸の置換等により改変がなされたことを意味する。アミノ酸の改変の個数は、好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１０個、更に好ましくは１～５個、最も好ましくは１～２個である。本発明に用いることのできる変異ペプチドの改変アミノ酸配列の例は、好ましくは、そのアミノ酸が、１又は数個（好ましくは、１、２、３又は４個）の保存的置換を有するアミノ酸配列であることができる。

[0024] ここで、「保存的置換」とは、１若しくは数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことでできる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。非極性（疎水性）アミノ酸としては、例えば、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、例えば、グリシン、セリン、トレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。正電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおける（ａ）Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸への置換（変異）、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸）のプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸への置換（変異）、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸への置換（変異）、（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列の第５番目のアミノ酸のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸への置換（変

異）、（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸のグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸への置換（変異）、（ｇ）Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸への置換（変異）、及び（ｅ）Ｓα２領域の第７番目のアミノ酸のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸への変異（置換）からなる群から選択される４つ以上の変異（置換）、好ましくは５つ以上の変異（置換）、より好ましくは６つ以上の変異（置換）、最も好ましくは７つの変異（置換）は、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性を向上させるための、積極的な置換（変異）であるが、前記保存的置換はヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性を維持するための置換であり、当業者であれば容易に実施することのできるものである。

[0025] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列、を含むポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドからなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。

[0026] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、実施例に記載のように、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの優れた活性を示す。

[0027] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドからなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。ここで、「アミノ酸配列において、１若しくは複数のア

ミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸」とは、前記と同じようにアミノ酸の置換等により改変がなされたことを意味する。例えば、配列番号１で表されるアミノ酸からなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼにおいて、第１番～５１３番のアミノ酸が欠失しても、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼを示すことができる。従って、特に第１番～５１３番においては、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの活性を阻害しない限りにおいて欠失、置換、又は挿入が入っていてもよい。

[0028] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、好ましくは（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列、より好ましくは該相同性が９０％以上であるアミノ酸配列、最も好ましくは該相同性が９５％以上であるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドからなるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼである。なお、ここでいう相同性とはアミノ酸配列の同一性を意味する。

[0029] 本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼの好ましい態様においては、膜結合領域を含まない。ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼは、膜結合（貫通）ドメイン、リンカー部位、及び活性ドメインからなるタンパク質であることが知られ、例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの膜結合領域については（非特許文献５）等に記載されている。

なお、本発明において「膜結合領域を含まない」とは、膜結合領域のみを含まない場合のほか、一部のリンカー領域を合わせて含まない場合も意味するものとする。配列番号１に記載のアミノ酸配列においては、上記膜結合領域は、第１～第５１３番のアミノ酸配列としている。

[0030] ［２］ポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードするポリヌクレオチドである限りにおいて、特に限定されるものではない。すなわち、（ａ）Ｓα２アミノ酸配列における第１

０番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸（Ｌα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸）がプロリン以外のアミノ酸であり、（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸であり、そして（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のポリヌクレオチドとして、更に好ましくは、前記のアミノ酸に加えて、（ｅ）Ｓα２領域の第７番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸がイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、及び（ｇ）Ｓα２領域の第６番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）以外のアミノ酸からなる群から選択される１つまたは２つ以上のアミノ酸であるヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼをコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。

具体的には、配列番号２で表される塩基配列からなる配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号２で表される塩基配列における１５４０番～３０６６番の塩基からなる配列を含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

更には、配列番号２で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号２で表される塩基配列における１５４０番～３０６６番の塩基からなる配列を含むポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、しかも、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、ＤＮＡ及びＲＮＡの両方が含まれる。

本明細書において「ストリンジェントな条件」とは、９０％以上の相同性、好ましくは９５％以上の相同性、より好ましくは９７％以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。具体的には、ストリンジェントな条件としてハイブリダイゼーションを６５

℃で一晩実施し、非特異反応を除去するための洗浄を２×ＳＳＣを用いて室温で５分間行った後、０．１％ＳＤＳを含む０．２×ＳＳＣを用いて６５℃で３０分間の洗浄を２回繰り返すことなどが挙げられる。２ＸＳＳＣの組成は、０．３ｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ及び３０ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）である。

[0031] ［３］微生物

本発明の微生物は、本発明のポリヌクレオチドを有する微生物である。すなわち、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に含む限りにおいて特に限定されるものではないが、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌、パン酵母、又はアカパンカビを挙げることができる。

[0032] ［４］ベクター

本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを持つＤＮＡを含むベクターである。すなわち、本発明のベクターは、本発明による前記ポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明による前記ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるベクターを挙げることができる。

[0033] 発現ベクターとしては、宿主である大腸菌、パン酵母等において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、外来タンパク質の発現効率の高いものが好ましい。前記ポリヌクレオチドを発現させるための発現ベクターは、微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、前記ＤＮＡ及び転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

より具体的には、発現ベクターとして、例えば、ｐＢＴｒｐ２、ｐＢＴａｃ１、ｐＢＴａｃ２（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、ｐＫＫ２３３－２（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐＳＥ２８０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、ｐＧＥＭＥＸ－１（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）、ｐＱＥ－８（ＱＩＡＧＥＮ社製）、ｐＱＥ－３０（ＱＩＡＧＥＮ社製）、ｐＫＹＰ１０（特

開昭５８－１１０６００）、ｐＫＹＰ２００〔Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４８，６６９（１９８４）〕、ｐＬＳＡ１〔Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，５３，２７７（１９８９）〕、ｐＧＥＬ１〔Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２，４３０６（１９８５）〕、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ ＳＫ＋、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、ｐＴｒＳ３０（ＦＥＲＭＢＰ－５４０７）、ｐＴｒＳ３２（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０８）、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）、ｐＥＴ－３（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）、ｐＴｅｒｍ２（ＵＳ４６８６１９１、ＵＳ４９３９０９４、ＵＳ５１６０７３５）、ｐＳｕｐｅｘ、ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９４、ｐＵＣ１８〔ｇｅｎｅ，３３，１０３（１９８５）〕、ｐＵＣ１９〔Ｇｅｎｅ，３３，１０３（１９８５）〕、ｐＳＴＶ２８（宝酒造社製）、ｐＳＴＶ２９（宝酒造社製）、ｐＵＣ１１８（宝酒造社製）、ｐＰＡ１（特開昭６３－２３３７９８号公報）、ｐＥＧ４００〔Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７２，２３９２（１９９０）〕等を例示することができる。

[0034] プロモーターとしては、宿主である大腸菌、パン酵母等の細胞中で発現することができるものであればいかなるものでもよい。例えば、ｔｒｐプロモーター（Ｐｔｒｐ）、ｌａｃプロモーター（Ｐｌａｃ）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、ＳＰＯ１プロモーター、ＳＰＯ２プロモーター、ｐｅｎＰプロモーター等を挙げることができる。またＰｔｒｐを２つ直列させたプロモーター（Ｐｔｒｐｘ２）、ｔａｃプロモーター、ｌｅｔＩプロモーター、ｌａｃＴ７プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。本発明においては、上記プロモーターの中でも組織を問わず常時目的遺伝子を発現させるプロモーター、すなわち構成的プロモーターであることがより好ましい。構成的プロモーターとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ１遺伝子（ＡＤＨ１）、翻訳伸長因子ＴＦ－１α遺伝子（ＴＥＦ１）、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子（ＰＧＫ１）、トリオースリン

酸イソメラーゼ遺伝子（ＴＰＩ１）、トリオースリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ＴＤＨ３）、ピルビン酸キナーゼ遺伝子（ＰＹＫ１）のプロモーターが挙げられる。

[0035] ［５］形質転換体

本発明の形質転換体も、本発明による前記ポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明による前記ポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、本発明による前記ポリヌクレオチドを含むベクターの形で含有する形質転換体であることもできる。また、本発明によるポリペプチドを発現している形質転換体であることもできるし、あるいは、本発明によるポリペプチドを発現していない形質転換体であることもできる。本発明の形質転換体は、例えば、本発明による前記ベクターにより、あるいは、本発明による前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

[0036] 宿主細胞は、特に限定されないが、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母、アカパンカビ等取り扱いが容易な菌株が好ましいが、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞などを用いることも可能である。しかしながら、最も好ましくは酵母である。最も好ましい酵母株としては、清酒酵母が挙げられる。特に好ましくは、清酒酵母協会７号又は７０１号が挙げられる。協会７０１号酵母は、協会７号から育種された泡なし酵母で高泡を形成しない特長があるが、他の性質は同じである。

[0037] ［６］テルペノイドの製造方法及びスクアレンの製造方法

発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによって、テルペノイド又はスクアレンを製造することができる。例えば、酵母について記載すると、酵母は通常用いられるＹＰＤ培地などで培養すればよい。相同組換えにより遺伝子導入された酵母、又は発現ベクターを有する酵母を前培養し、更にＹＰＤ培地などに植菌し、そして２４～２４０時間、好ましくは７２～１２０時間程度培養する。培地中に分泌されたテルペノイド又はスクアレ

ンは、そのまま、又は公知の方法により精製して用いることができる。細胞中に蓄積されたテルペノイド又はスクアレンは、以下のように取得することができる。すなわち、慣用の技術、例えば、細胞の酵素処理、超音波による細胞破砕後に適当な有機溶媒で抽出することができ、更に遠心分離、各種クロマトグラフィーなどを用いて精製することができる。

本発明によれば、テルペノイド生合成経路において上流に位置するＨＭＧＲの活性を高めることで各種テルペノイド化合物を効率よく生産できるが、中でもスクアレン、更にスクアレンを経由して生合成されるエルゴステロール、コレステロールといった各種ステロール化合物等を特に効率よく生産することが可能である。

実施例

[0038] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

[0039] 《実施例１：ＨＭＧＲ遺伝子のクローニング》

本実施例では、ＨＭＧＲ遺伝子のクローニングを行った。

酵母（Saccharomycopsis fibuligera）を、ＭＬ－２３６Ｂを含む培地を用いて培養して得られた、ＭＬ－２３６Ｂ耐性株からＨＭＧＲ遺伝子を取得した（以下、該ＭＬ－２３６Ｂ耐性株から得られたＨＭＧＲ遺伝子を「ＡＤＫ４６５３」又は「ＡＤＫ４６５３遺伝子」と呼ぶこともある）。

[0040] （１）ＭＬ－２３６Ｂ耐性株からの全長ＨＭＧＲの取得

ＭＬ－２３６Ｂ耐性株のゲノムＤＮＡを鋳型として、ＰＣＲ法によりＨＭＧＲ遺伝子を増幅した。ゲノムＤＮＡの調製は、Ｚｙｍｏｌｙａｓｅ ２０Ｔ（キリン協和フーズ社）による細胞壁消化後に定法で行い、ＮｕｃｌｅｏＢｏｎｄ ＡＸＧ ２０カラム（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用して精製した。ＰＣＲは、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ Ｍａｘ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社）、下記のプライマー（配列番号３及び４）、サーマルサイクラー（ＴＰ２４０、タカラバイオ社）を使用して行った。

５´－ＡＡＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＣＣＧＧＧＡＴＧＴＴＴＡＧＣＣＴＴＡ

ＧＴＡＡＴＴＡＴＧＴ－３´

（配列番号３）

５´－ＴＴＡＧＴＴＡＡＣＣＴＣＴＡＧＡＧＣＴＣＴＴＡＡＧＡＴＴＴＧＡＴＡＣＡＧＡＴＣＴＴＴＧＡ－３´

（配列番号４）

ＰＣＲは、３ステップでの反応（９８℃：１０秒間、５５℃：５秒間、７２℃：１５秒間）を３５サイクル行った。プライマーの５’末端には、クローニングに使用するベクターのクローニングサイトの相同配列が付加されている。ＰＣＲ産物は、アガロースゲル電気泳動により目的サイズのＤＮＡ、及びエキストラバンドの有無を確認後に、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐカラム（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用して精製を行った。

[0041] （２）発現ベクターの構築

クローニングには、発現用ベクターｐＡＵＲ１２３（タカラバイオ社）を使用した。ベクターは、制限酵素（ＳａｃＩ、タカラバイオ社）及び制限酵素（ＳｍａＩ、タカラバイオ社）処理後に、アガロースゲル電気泳動により目的のＤＮＡ断片を切り出し、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐカラム（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用して精製した。ＨＭＧＲ遺伝子のベクターへのクローニングは、ＧｅｍｅＡｒｔ　Ｓｅａｍｌｅｓｓ　Ｃｌｏｎｉｇ　ａｎｄ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｍｉｘ（Ｉｎｂｉｔｒｏｇｅｎ社）を使用し、取り扱い説明書に従って、反応を行った。反応液は、そのまま大腸菌コンピテントセル（ＨＳＴ０８、タカラバイオ社）による形質転換に使用した。陽性クローンは、コロニーＰＣＲにより目的遺伝子が導入されていることを確認後に、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｐｌａｓｍｉｄ（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用しプラスミドを調製した。コロニーＰＣＲは、ＴａＫａＲａ　Ｅｘ　Ｔａｑ（タカラバイオ社）、プライマー（配列番号５及び６）を使用した。形質転換により得られた大腸菌コロニーを、チップ又は楊枝で極微量ピックアップ

し、ＰＣＲ反応液に懸濁させた。ＰＣＲ反応は、９４℃で１分間の変性処理後に、９８℃：１０秒間、６１℃：３０秒間、７２℃：３分間からなる反応工程を３０サイクル行った後、７２℃で３分間の伸張反応を付加した。ＰＣＲ後に、アガロースゲル電気泳動によりインサートの有無を確認し、ＭＬ－２３６Ｂ耐性株の全長ＨＭＧＲ（以下、「ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲ」ということもある）発現ベクターを取得した。

５´－ＴＣＴＧＣＡＣＡＡＴＡＴＴＴＣＡＡＧＣ－３´

（配列番号５）

５´－ＴＴＣＧＴＴＴＴＡＡＡＡＣＣＴＡＡＧＡＧＴＣＡＣ－３´

（配列番号６）

[0042] （３）短縮型ＨＭＧＲ（ｔＨＭＧＲ）遺伝子のクローニング

上記ＭＬ－２３６Ｂ耐性株のゲノムＤＮＡを鋳型として、ＰＣＲ法により短縮型ＨＭＧＲ遺伝子を増幅した。ゲノムＤＮＡの調製は定法によるＤＮＡ抽出後に、ＮｕｃｌｅｏＢｏｎｄ　ＡＸＧ２０カラム（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用して精製した。ＰＣＲは、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社）を使用し、３ステップでの反応（９８℃：１０秒間、５５℃：５秒間、７２℃：１０秒間）を３５サイクル行った。ＰＣＲプライマーは、配列番号７及び８を使用した。

５´－ＡＡＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＣＣＧＧＧＡＴＧＴＣＴＣＡＡＣＧＴＣＴＴＡＧＣＡＡＧＧＣＴＡＴＴ－３´

（配列番号７）

５´－ＴＴＡＧＴＴＡＡＣＣＴＣＴＡＧＡＧＣＴＣＴＴＡＡＧＡＴＴＴＧＡＴＡＣＡＧＡＴＣＴＴＴＧＡ－３´

（配列番号８）

プライマーの５’末端には、クローニングに使用するベクターのクローニングサイトの相同配列を付加している。

[0043] ＰＣＲ産物は、アガロースゲル電気泳動による確認後に、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐカラム（ＭＡＣＨＥＲ

ＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用して精製を行った。クローニングには、発現用ベクターｐＡＵＲ１２３（タカラバイオ社）を使用し、ＧｅｍｅＡｒｔ Ｓｅａｍｌｅｓｓ Ｃｌｏｎｉｇ ａｎｄ Ａｓｓｅｍｂｌｙ Ｅｎｚｙｍｅ Ｍｉｘ（Ｉｎｂｉｔｒｏｇｅｎ社）による反応を行った。反応液は、そのまま大腸菌コンピテントセル（ＨＳＴ０８、タカラバイオ社）による形質転換に使用した。陽性クローンは、コロニーＰＣＲにより目的遺伝子が導入されていることを確認後に、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｐｌａｓｍｉｄ（ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ社）を使用しプラスミドを調製した。クローニングされた短縮型ＨＭＧＲ遺伝子に、ＰＣＲ反応によるエラーが含まれていないことをシーケンス解析により確認した。シーケンス解析は、精製されたプラスミドを鋳型とし、配列番号５及び６に示したプライマーを用いてＤＮＡシーケンサー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社、３７３０ｘｌ）により解析し、ＭＬ－２３６Ｂ耐性株の短縮型ＨＭＧＲ（以下、「ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ」ということもある）の発現ベクターを取得した。

[0044] 《比較例１》

本比較例では、清酒酵母から短縮型ＨＭＧＲ（ｔＨＭＧＲ）遺伝子のクローニングを行った。

ＭＬ－２３６Ｂ耐性株に代えて、清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）を用いたこと、及びプライマーとして配列番号９及び１０のプライマーを用いたことを除いては、実施例１（３）の操作を繰り返して、清酒酵母の短縮型ＨＭＧＲ（以下、「Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ」ということもある）の発現ベクターを構築した。

５´－ＡＡＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＣＣＧＧＧＡＴＧＧＡＣＣＡＡＴＴＧＧＴＧＡＡＡＡＣＴ－３´

（配列番号９）

５´－ＴＴＡＧＴＴＡＡＣＣＴＣＴＡＧＡＧＣＴＣＴＴＡＧＧＡＴＴＴＡＡＴＧＣＡ－３´

（配列番号１０）

[0045] 《実施例２》

本実施例では、実施例１（２）で得られたベクターを用いて、酵母の形質転換体を取得した。その形質転換体を用いて、メバロン酸の産生、及びスクアレン又はエルゴステロールの産生を行った。

[0046] （１）酵母の形質転換

実施例１（２）で得られた全長ＨＭＧＲ発現ベクターを用いて清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）を形質転換した。ベクターは、あらかじめ制限酵素（ＥｃｏＯ６５Ｉ（BstEII、BstPＩ）、タカラバイオ社）により耐性マーカー遺伝子内の一箇所で切断し、直鎖状にして使用することで相同組換えによる遺伝子導入を行った。つまりベクターの耐性マーカーであるオーレオバシジン耐性遺伝子（ＡＵＲ－Ｃ）と相同性を示す宿主酵母の感受性遺伝子部位で相同組換えが起こり、宿主酵母の感受性遺伝子部位にベクター遺伝子が挿入された。酵母の形質転換は、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ Ｙｅａｓｔ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＩＩ（ＺＹＭＯ ＲＥＳＡＲＣＨ社）を使用し、定法である酢酸リチウム法に準じた方法で行った。形質転換体は、抗生物質（オーレオバシジンＡ、タカラバイオ社）を０．５μｇ／ｍＬ含有するＹＰＤ培地で選抜した。得られたクローンは、コロニーＰＣＲにより目的遺伝子が導入されていることを確認した。コロニーＰＣＲには、Ｔｋｓ Ｇｆｌｅｘ ＤＮＡ Ｐｐｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社）、プライマー（配列番号５及び６）を使用した。酵母コロニーを極微量ピックアップし、細胞壁消化酵素液（Ｚｙｍｏｌｙａｓｅ ２０Ｔ、キリン協和フーズ社、３ｍｇ／ｍＬ、ｐＨ７．４）に懸濁し、３７℃１５分間反応させ、細胞壁を消化した。酵素処理反応液を鋳型ＤＮＡとしてＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲ反応は、９４℃で１分間の変性処理後に、９８℃：１０秒間、６０℃：１５秒間、６８℃：９０秒間からなる反応工程を３０サイクル行った後、６８℃で２分間の伸張反応を付加した。ＰＣＲ後に、アガロースゲル電気泳動によりインサートを確認した。

[0047] （２）メバロン酸、スクアレン又はエルゴステロールの産生の確認

ＡＤＫ４６５３遺伝子は、発現用ベクターｐＡＵＲ１２３（タカラバイオ社）の構成発現プロモーター（ＡＤＨ１遺伝子のプロモーター）により構成的に発現された。清酒酵母が本来有しているＨＭＧＲ遺伝子に加え、形質転換により導入されたＡＤＫ４６５３遺伝子の過剰発現によりメバロン酸経路が増強されることを、当該経路の代謝産物であるメバロン酸、スクアレン又はエルゴステロールを測定することで確認した。対照試験区は、インサートが挿入されていないベクターによる形質転換により得られた形質転換体をコントロールとした。

培養は、容量５００ｍＬのバッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）５０ｍＬに２４時間前培養した菌体を培地の１％量添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。所定の時間にサンプリングを行った。メバロン酸、スクアレン、及びエルゴステロールの定量は以下のように行った。

[0048]（メバロン酸の定量）

メバロン酸は、培地中に分泌生産されたメバロン酸濃度を測定した。培養液の遠心上清を、直接ＨＰＬＣにより分析した。ＨＰＬＣは、ＨＩＴＡＣＨＩ社 ＬａＣｈｒｏｍ（Ｃｏｌｕｍｎ Ｏｖｅｎ Ｌ－２３００、Ｐｕｍｐ Ｌ－２１３０、Ａｕｔｏｓａｍｐｌｅｒ Ｌ－２２００、ＵＶ Ｄｅｔｅｃｔｏｒ Ｌ－２４００）により、カラム（Ｔｈｅｒｍｏ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ社、ＡＱＵＡＳＩＬ Ｃ１８）を使用した。溶離液は、水：トリエチルアミン：酢酸＝１０００：１：１のアイソクラティック、カラム温度４０℃、流量１．０ｍＬ／ｍｉｎに設定し、検出はＵＶ（２１０ｎｍ）で分析した。

[0049]（スクアレン及びエルゴステロールの定量）

スクアレン、エルゴステロールは、菌体を破砕後にクロロホルム・メタノール抽出して測定した。培養液２ｍＬを遠心して上清を除いた後、菌体に破砕用のジルコニアビーズ（ニッカトー社、ＹＴＺボール、φ０．５ｍｍ）を容積で０．６ｍＬ、メタノールを０．４ｍＬ添加し、ビーズクラッシャー（

タイテック社、ｕＴ－１２）で５分間粉砕（３２００ｒ／ｍｉｎ）した。破砕液にクロロホルム０．８ｍＬを加え、均一になるまで転倒攪拌した。５分間超音波処理により懸濁した後に、遠心分離（１６０００ｒｐｍ、５ｍｉｎ）し、有機層を回収した。サンプルは、フィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ社、ＤＩＳＭＩＣ－１３ＨＰ）処理後にＨＰＬＣ分析に供した。ＨＰＬＣは、日本分光工業社のシステム（ＪＡＳＣＯ Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｔ ＨＰＬＣ Ｐｕｍｐ ８８０－ＰＵ、Ｔｅｒｎａｒｙ Ｇｒａｄｉｅｎｔ Ｕｍｉｔ ８８０－０２、Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｔ ＵＶ／ＶＩＳ Ｄｅｔｅｃｔｏｒ ８７０－ＵＶ、Ｓｅｎｓｈｕ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社ＳＳＣ－２１００、ＧＬ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｄｅｇａｓｓｉｎｇ Ｕｎｉｔ ＤＧ６６０Ｂ）により、カラム（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社、ＳＵＰＥＬＣＯＳＩＬ ＬＣ－１８）を使用した。溶離液はアセトニトリル：ＴＨＦ＝８：２のアイソクラティック、カラム温度３０℃、流量１．０ｍＬ／ｍｉｎに設定し、検出はＵＶ（２２０ｎｍ）で分析した。

[0050] メバロン酸の産生の結果を図４に示す。ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲを発現させた宿主では、コントロールの２－２．８倍（１８５－３５５ｍｇ／Ｌ）のメバロン酸を蓄積した。

また、スクアレン及びエルゴステロールの産生の結果を図５に示す。ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲを発現させた清酒酵母のエルゴステロール量には顕著な変化は認められなかった。一方で、スクアレンの生産量は、顕著な増加を示し、メバロン酸経路の増強効果が確認できた。

なお、図４、５の「no insert」は、外部遺伝子を含まないｐＡＵＲ１２３ベクターを導入し、外部遺伝子が発現しない条件であることを示す。また、ＡＤＫはＡＤＫ４６５３を示すものとする。（以下の図表で同じ。）

[0051] 《実施例３》

本実施例では、実施例１（３）で得られたベクターを用いて、酵母の形質転換体を取得した。その形質転換体を用いて、スクアレン又はエルゴステロールの産生を行った。

ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲ発現ベクターに代えて、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いたことを除いては、実施例２（１）及び（２）の操作を繰り返した。結果を図６に示す。

[0052] 《比較例２》

本比較例では、比較例１で得られたＫ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、スクアレンの生産性を検討した。ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターに代えて、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いたことを除いては、実施例３の操作を繰り返して、スクアレンの産生を確認した（培養時間は５日間）。結果を図６に示す。

[0053] 図６に示すように、ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲに代えてＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲを発現させると、ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲと比較して、１２倍のスクアレン生産性を示した。培地中のスクアレン生産量は、１．６６ｇ／Ｌに達し、乾燥菌体あたりの生産量は、１０２ｍｇ／ｇ（１０．２％）を示した。一方、比較例２のＫ７０１＿ｔＨＭＧＲでは、スクアレンの増産効果は認められなかった。

[0054] 前記ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲ及び清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７号）のＨＭＧＲ、ヒト（Homo sapiens、AF273765）ＨＭＧＲのアミノ酸配列の比較を図７－１及び図７－２に示す。図７－１及び図７－２に示すように、清酒酵母から得られたＨＭＧＲでは、Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸がアラニンであるのに対して、ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲはセリンであった。また、清酒酵母から得られたＨＭＧＲではＬα２アミノ酸配列のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって第２番目のアミノ酸がプロリンであるのに対して、ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲはアラニンであった。また、清酒酵母から得られたＨＭＧＲではＬα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸がアラニンであり、第５番目のアミノ酸がイソロイシンであり、第６番目のアミノ酸がグルタミン酸であるのに対して、ＡＤＫ４６５３＿ＨＭＧＲでは、それぞれセリン及びトレオニン及びアスパラギンであった。

なお、上記清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７号）と清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）の短縮型ＨＭＧＲ部分におけるアミノ酸配列は同一である。

[0055]《実施例４》

本実施例では、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲによるスクアレン生産量の経時変化を検討した。

培養時間を、３日、４日、５日、６日、７日、若しくは１０日、又は３日、５日、７日、若しくは１０日としたことを除いては、実施例３の操作を繰り返して、スクアレンの生産量を測定した。また、同時に細胞の重量の変化を測定した。結果を図８に示す。

ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲを発現させた酵母では、コントロール（No insert）と比較して著しいスクアレン生産量を示した。また細胞が定常期に達した３日以降のスクアレン量の変化は少なく、３日間以内の培養で十分な収量が得られた。一方で、エルゴステロールの含量は、コントロール（No insert）と短縮型の遺伝子（ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ）を発現させた酵母での差異は認められなかった。

[0056]《比較例３》

本比較例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸のセリンからアラニンへの置換、又はＬα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸のセリンからアラニンへの置換と第５番目のアミノ酸のトレオニンからイソロイシンへの置換の組み合わせを行って、スクアレン生産量を検討した。また、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲを比較対象とした（以下、比較例４～６でも同じ）。

スクアレン生産量の測定は、実施例２（２）に準じた方法で行った。培養は、バッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）に前培養した菌体を添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。２日間の培養後に、培養菌体を回収し、スクアレン生産量を測定した。

前記ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを鋳型として、アミノ酸置換変異を導入した。具体的には、Ｌα２領域の第１番目のアミノ酸をセリンからアラニンに置換したＳ８２０Ａベクター、及び第１番目のアミノ酸をセリンからアラニンに置換し、そして第５番目のアミノ酸をトレオニンからイソロイシンに置換したＳ８２０Ａ／Ｔ８２４Ｉベクターを作製した。得られたＳ８２０Ａベクター、又はＳ８２０Ａ／Ｔ８２４Ｉベクターを、清酒酵母を宿主として導入し、過剰発現させたＳ８２０Ａ株、又はＳ８２０Ａ／Ｔ８２４Ｉ株を取得した。それぞれの株のスクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。結果を図９に示す。スクアレンの生産量は、培養液あたりの生産量をもとに、変異を導入していないＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの生産量を１００％として相対値で示した（図１０～図１６も同じ）。

なお、変異を導入した発現ベクターの調製は、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社）を使用し、ＰＣＲ法により取扱説明書（ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｂａｓａｌ　Ｋｉｔ　製品コードＲ０４６Ａ）に従って行った。変異を導入するプラスミドを滅菌蒸留水で希釈し反応液中２ｐｇ／μＬになるよう添加した。プライマーは、最終濃度０．２μＭとなるように添加し、ＰＣＲは３ステップ（９８℃：１０秒間、５５℃：１５秒間、７２℃：４５秒間）を４０サイクル行い、アガロースゲル電気泳動により目的サイズの増幅産物を確認した。ＰＣＲ反応液０．４μＬをコンピテントセル２０μＬ（ＪＭ１０９、タカラバイオ社）に添加し形質転換を行った。形質転換により得られた大腸菌から変異が導入されたプラスミドを精製し、ＨＭＧＲをコードする構造遺伝子の塩基配列を解析した。塩基配列の解析により、変異導入の正確性（目的とする変異が導入されていること、意図しないＰＣＲエラーが存在しないこと）を検証した。変異を導入した発現ベクターにより、清酒酵母を宿主とした形質転換を実施し、スクアレンの生産性を解析した。変異導入用プライマーは、下記のプライマーを合成して使用した（配列番号１１、１２、１５、及び１６）

。

Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアミノ酸のセリンからアラニンへ置換した場合スクアレン生産量は低下し、同時に２アミノ酸を置換した変異体では、ほとんど高生産性を示さなくなった。

以上の結果から、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合部位に隣接するモチーフ（Ｌα２）に存在するセリン及びトレオニンは、スクアレンの高生産性に関与する重要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。

変異酵素（Ｓ８２０Ａ）

５´－ＧＣＣＡＴＴＡＡＣＴＧＧＡＣＣＡＡＴＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴ－３´

（配列番号１１）

５´－ＧＧＴＣＣＡＧＴＴＡＡＴＧＧＣＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＴＡＴＣＡＧＴ－３´

（配列番号１２）

変異酵素（Ｓ８２０Ａ／Ｔ８２４Ｉ）

５´－ＧＣＣＡＴＴＡＡＣＴＧＧＡＴＣＡＡＴＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴ－３´

（配列番号１５）

５´－ＧＡＴＣＣＡＧＴＴＡＡＴＧＧＣＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＴＡＴＣＡＧＴ－３´

（配列番号１６）

[0057] 《比較例４》

本比較例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアミノ酸をセリンからアラニンに置換して、スクアレン生産量を検討した。培養は、比較例３の操作を繰り返して、その後スクアレンの生産量を測定した。結果を図１０に示す。その結果、第１０番目のアミノ酸をセリンからアラニンに置換した変異体では、ほとんど高生産性を示さなくなった。

変異酵素（Ｓ７４４Ａ）

５´－ＴＧＡＡＡＡＡＧＣＴＴＴＣＡＡＴＴＣＴＡＣＴＴＣＴＡ－３´

（配列番号１７）

５´－ＡＴＴＧＡＡＡＧＣＴＴＴＴＴＴＣＡＡＣＡＡＧＴＴＴＴＧ－３´

（配列番号１８）

[0058] 《比較例５》

本比較例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトとＬα２の間に位置する第８１８位のアミノ酸をアラニンからプロリンに置換して、スクアレン生産量を検討した。培養は、培養時間を３日間とした以外は比較例３の操作を繰り返して、その後スクアレンの生産量を測定した。結果を図１１に示す。その結果、第８１８位のアミノ酸をアラニンからプロリンに置換した変異体では、ほとんど高生産性を示さなくなった。

変異酵素（Ａ８１８Ｐ）

５´－ＴＧＡＴＡＡＧＡＡＡＣＣＡＧＣＴＴＣＴＡＴＴＡＡＣＴＧ－３´

（配列番号１９）

５´－ＧＣＴＧＧＴＴＴＣＴＴＡＴＣＡＧＴＡＣＡＧＴＡＧＴＴＡ－３´

（配列番号２０）

[0059] 《比較例６》

本比較例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、第８２５位のアミノ酸をアスパラギンからグルタミン酸に置換して、スクアレン生産量を検討した。培養は、培養時間を３日間とした以外は比較例３の操作を繰り返して、その後スクアレンの生産量を測定した。結果を図１２に示す。その結果、第８２５位のアミノ酸をアスパラギンからグルタミン酸に置換した変異体では、ほとんど高生産性を示さなくなった。

変異酵素（Ｎ８２５Ｅ）

５´－ＴＧＧＡＣＣＧＡＡＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴＡＴＴＧ－３´

（配列番号２１）

５´－ＡＣＧＡＣＣＴＴＣＧＧＴＣＣＡＧＴＴＡＡＴＡＧＡＡＧＣＧ－３´

（配列番号２２）

[0060] 《実施例５》

本実施例では、比較例１で得られたＫ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｓα２領域を構成するアミノ酸３残基、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトとＬα２領域の間に位置するアミノ酸１残基及びＬα２領域を構成するアミノ酸３残基に変異を導入した変異酵素を作製し、スクアレン生産量を検討した。

以下、変異導入について具体的に説明する。なお、本実施例において変異箇所を特定する番号は、図７－１及び図７－２に示した清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７号）の配列番号で代用した。上述のように、本願で使用しているのは清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）であるが、活性部位（短縮型ＨＭＧＲ部分）におけるアミノ酸配列は清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７号）と同一であることから、本願では位置特定のために利用しているものである。

図７－１及び図７－２に示すように、清酒酵母（Saccharomyces cerevisiae 協会７０１号）のＳα２領域のアミノ酸配列は、ＥＥＧＱＮＡＩＫＫＡＦＮであり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイト～Ｌα２領域のアミノ酸配列は、ＤＫＫＰＡＡＩＮＷＩＥである。

Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターにおいて、Ｓα２領域のアミノ酸配列がＥＥＧＱＮＬＬＫＫＳＦＮ、またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイト～Ｌα２領域のアミノ酸配列がＤＫＫＡＡＳＩＮＷＴＮとなるようにアミノ酸置換変異を導入した。すなわち、Ｓα２領域の第６番目に存在するアラニン（第７７２位）をロイシンに、Ｓα２領域の第７番目に存在するイソロイシン（第７７３位）をロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目に存在するアラニン（第７７６位）をセリンに置換した。またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトの直後であって、Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存

在するプロリン（第８５０位）をアラニンに置換し、更にＬα２領域の第１番目に存在するアラニン（第８５２位）をセリンに、Ｌα２領域の第５番目に存在するイソロイシン（第８５６位）をトレオニンに、Ｌα２領域の第６番目に存在するグルタミン酸（第８５７位）をアスパラギンに置換した。

[0061] アミノ酸置換変異の導入は、前記Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを鋳型として、比較例３と同様な方法で、プライマーを変えた操作を繰り返しながら、順次変異を導入することで７アミノ酸残基を置換したベクターを構築した。変異導入用プライマーは、下記のプライマーを合成して使用した（配列番号２３～３２）。

構築したベクターを、清酒酵母を宿主として導入し、Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ株を取得した。それぞれの株のスクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。スクアレン生産量の測定は、実施例２（２）に準じた方法で行った。培養は、バッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）に前培養した菌体を添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。２日間の培養後に、培養菌体を回収し、スクアレン生産量を測定した。また、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ及びＫ７０１＿ｔＨＭＧＲを比較対象とした。結果を図１３に示す。７残基のアミノ酸を置換した変異酵素を発現した酵母のスクアレン生産量は、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲに比べ著しく増加し、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲと同等の生産量を示した。

以上の結果から、ＮＡＤＰ（Ｈ）結合部位に隣接するモチーフ（Ｓα２）及びＨＭＧ－ＣｏＡ結合部位に隣接するモチーフ（Ｌα２）近辺に存在する７残基のアミノ酸は、スクアレンの高生産性に関与する重要なアミノ酸であり、当該変異を導入した変異酵素の発現により、メバロン酸経路の増強が可能になることが明らかとなった。

[0062] 変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ａ８５２Ｓ／Ｉ８５６Ｔ）

５´－ＴＣＴＡＴＣＡＡＣＴＧＧＡＣＣＧＡＡＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴ－３´

（配列番号２３）

５´－ＧＧＴＣＣＡＧＴＴＧＡＴＡＧＡＡＧＣＴＧＧＴＴＴＴＴＴＧＴＣＧＧＴ－３´

（配列番号２４）

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ａ７７６Ｓ）

５´－ＡＡＡＡＡＡＴＣＡＴＴＴＡＡＣＴＣＴＡＣＡＴＣＡＡＧＡ－３´

（配列番号２５）

５´－ＧＴＴＡＡＡＴＧＡＴＴＴＴＴＴＡＡＴＴＴＧＣＧＴＴＴＴＧ－３´

（配列番号２６）

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ｅ８５７Ｎ）

５´－ＴＧＧＡＣＣＡＡＴＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴＧＴＣ－３´

（配列番号２７）

５´－ＡＣＧＡＣＣＡＴＴＧＧＴＣＣＡＧＴＴＧＡＴＡＧＡＡＧＣ－３´

（配列番号２８）

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ｐ８５０Ａ）

５´－ＣＧＡＣＡＡＡＡＡＡＧＣＣＧＣＴＴＣＴＡＴＣＡＡＣＴＧ－３´

（配列番号２９）

５´－ＧＣＧＧＣＴＴＴＴＴＴＧＴＣＧＧＴＡＣＡＧＴＡＧＴＴＡ－３´

（配列番号３０）

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ａ７７２Ｌ／Ｉ７７３Ｌ）

５´－ＡＡＡＡＣＴＴＧＴＴＧＡＡＡＡＡＡＴＣＡＴＴＴＡＡＣＴＣ－３´

（配列番号３１）

５´－ＴＴＴＴＣＡＡＣＡＡＧＴＴＴＴＧＴＣＣＣＴＣＴＴＣＴＧ－３´

（配列番号３２）

[0063] 《実施例６》

本実施例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸のトレオニンからイソロイシンへの置換を行って、スクアレン生産量を検討した

。

変異導入用プライマーとして、下記の配列番号１３及び１４のプライマーを用いた以外は、比較例３の操作を繰り返して、Ｔ８２４Ｉベクターを得た。Ｔ８２４Ｉベクターを、清酒酵母に導入し、Ｔ８２４Ｉ株を取得した。スクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。結果を図９に示す。

Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸のトレオニンからイソロイシンへの置換した場合、スクアレン生産量はＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの５０．３％であったが、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲと比較して顕著に高いものであった。

変異酵素（Ｔ８２４Ｉ）

５´－ＴＣＴＡＴＴＡＡＣＴＧＧＡＴＣＡＡＴＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴ－３´

（配列番号１３）

５´－ＧＡＴＣＣＡＧＴＴＡＡＴＡＧＡＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＴＴＡＴＣＡＧＴ－３´

（配列番号１４）

[0064]《実施例７及び８》

本実施例では、実施例１（３）で得られたＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、第７４０位のアミノ酸をロイシンからアラニンに置換、または第７４１位のアミノ酸をロイシンからイソロイシンに置換してスクアレン生産量を測定した。変異の導入は、比較例３と同様な方法により、下記のプライマーを用いて行った。

培養は、比較例３の操作を繰り返して、スクアレンの生産量を測定した。結果を図１４に示す。その結果、第７４０位のアミノ酸をロイシンからアラニンに置換した場合、スクアレン生産量はＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの５４．２％であったが、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲと比較して顕著に高いものであった。また、第７４１位のアミノ酸をロイシンからイソロイシンに置換した

場合、スクアレン生産量はＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの１８．８％であったが、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲと比較して顕著に高いものであった。

変異酵素（Ｌ７４０Ａ）

５´－ＡＡＡＡＣＧＣＡＴＴＧＡＡＡＡＡＡＴＣＡＴＴＣＡＡＴＴＣ－３´

（配列番号３３）

５´－ＴＴＴＴＣＡＡＴＧＣＧＴＴＴＴＧＡＣＣＴＴＣＴＴＣＡＧＴＡ－３´

（配列番号３４）

変異酵素（Ｌ７４１Ｉ）

５´－ＡＣＴＴＧＡＴＴＡＡＡＡＡＡＴＣＡＴＴＣＡＡＴＴＣＴＡ－３´

（配列番号３５）

５´－ＡＴＴＴＴＴＴＡＡＴＣＡＡＧＴＴＴＴＧＡＣＣＴＴＣＴＴＣＡ－３´

（配列番号３６）

[0065] 《実施例９》

本実施例では、比較例１で得られたＫ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｓα２領域を構成するアミノ酸に導入する変異を３残基から２残基とした以外、実施例５と同様にして変異酵素を作製し、スクアレン生産量を検討した。（変異箇所を特定する番号の定義は実施例５と同様である。）

すなわち、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターにおいて、Ｓα２領域のアミノ酸配列がＥＥＧＱＮＡＬＫＫＳＦＮ、またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイト～Ｌα２領域のアミノ酸配列がＤＫＫＡＡＳＩＮＷＴＮとなるようにアミノ酸置換変異を導入した。すなわち、Ｓα２領域の第７番目に存在するイソロイシン（第７７３位）をロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目に存在するアラニン（第７７６位）をセリンに置換した。またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトの直後であって、Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するプロリン（第８５０位）をアラニンに置換し、更にＬα２領域の第１番目に存在するアラニン（第８５２位）をセリンに、Ｌα２領

域の第５番目に存在するイソロイシン（第８５６位）をトレオニンに、Ｌα２領域の第６番目に存在するグルタミン酸（第８５７位）をアスパラギンに置換した。

アミノ酸置換変異の導入は、前記Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを鋳型として、比較例３と同様な方法で、プライマーを変えた操作を繰り返しながら、順次変異を導入することで６残基のアミノ酸を置換したベクターを構築した。変異導入用プライマーは、実施例５で使用したプライマー（配列番号２３～３０）、および下記のプライマーを合成して使用した（配列番号３７～３８）。

構築したベクターを、清酒酵母を宿主として導入し、Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ２株を取得した。それぞれの株のスクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。スクアレン生産量の測定は、実施例２（２）に準じた方法で行った。培養は、バッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）に前培養した菌体を添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。２日間の培養後に、培養菌体を回収し、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲを比較対象としてスクアレン生産量を測定した。結果を図１５に示す。６残基のアミノ酸を置換した変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ２）を発現した酵母のスクアレン生産量は、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲに比べ著しく増加した。

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ｉ７７３Ｌ）

５´－ＡＣＧＣＡＴＴＧＡＡＡＡＡＡＴＣＡＴＴＴＡＡＣＴＣＴＡ－３´

（配列番号３７）

５´－ＡＴＴＴＴＴＴＣＡＡＴＧＣＧＴＴＴＴＧＴＣＣＣＴＣＴＴＣ－３´

（配列番号３８）

[0066] 《実施例１０》

本実施例では、比較例１で得られたＫ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｓα２領域を構成するアミノ酸に導入する変異を３残基から２残基へ、またＬα２領域を構成するアミノ酸に導入する変異を３残基から２残基

へとした以外、実施例５と同様にして変異酵素を作製し、スクアレン生産量を検討した。（変異箇所を特定する番号の定義は実施例５と同様である。）

すなわち、Ｋ７０１_ｔＨＭＧＲ発現ベクターにおいて、Ｓα２領域のアミノ酸配列がＥＥＧＱＮＡＬＫＫＳＦＮ、またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイト～Ｌα２領域のアミノ酸配列がＤＫＫＡＡＳＩＮＷＩＮとなるようにアミノ酸置換変異を導入した。すなわち、Ｓα２領域の第７番目に存在するイソロイシン（第７４１位）をロイシンに置換し、Ｓα２領域の第１０番目に存在するアラニン（第７７６位）をセリンに置換した。またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトの直後であって、Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するプロリン（第８５０位）をアラニンに置換し、更にＬα２領域の第１番目に存在するアラニン（第８５２位）をセリンに、Ｌα２領域の第６番目に存在するグルタミン酸（第８５７位）をアスパラギンに置換した。

変異導入は、前記プライマー（配列番号２３～２９および３７～３８）により変異を導入し、さらに下記のプライマー（配列番号３９～４０）により復帰変異を導入した。

アミノ酸置換変異の導入は、前記Ｋ７０１_ｔＨＭＧＲ発現ベクターを鋳型として、比較例３と同様な方法で、プライマーを変えた操作を繰り返しながら、順次変異を導入することで５残基のアミノ酸を置換したベクターを構築した。

構築したベクターを、清酒酵母を宿主として導入し、Ｋ７０１_Ｍｕｔａｎｔ３株を取得した。それぞれの株のスクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。スクアレン生産量の測定は、実施例２（２）に準じた方法で行った。培養は、バッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）に前培養した菌体を添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。２日間の培養後に、培養菌体を回収し、ＡＤＫ４６５３_ｔＨＭＧＲ、Ｋ７０１_ｔＨＭＧＲを比較対象としてスクアレン生産量を測定した。結果を図１６に示す。５残基のアミノ酸を置換

した変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ３）を発現した酵母のスクアレン生産量は、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲに比べ著しく増加した。

変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ：Ｔ８５６Ｉ）

５´－ＡＡＣＴＧＧＡＴＣＡＡＴＧＧＴＣＧＴＧＧＴＡＡＧＡＧＴ－３´（配列番号３９）

５´－ＡＣＣＡＴＴＧＡＴＣＣＡＧＴＴＧＡＴＡＧＡＡＧＣＧＧＣ－３´（配列番号４０）

[0067]《実施例１１》

本実施例では、比較例１で得られたＫ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを用いて、Ｌα２領域を構成するアミノ酸に導入する変異を３残基から２残基へとした以外、実施例５と同様にして変異酵素を作製し、スクアレン生産量を検討した。（変異箇所を特定する番号の定義は実施例５と同様である。）すなわち、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターにおいて、Ｓα２領域のアミノ酸配列がＥＥＧＱＮＬＬＫＫＳＦＮ、またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイト～Ｌα２領域のアミノ酸配列がＤＫＫＡＡＳＩＮＷＩＮとなるようにアミノ酸置換変異を導入した。すなわち、Ｓα２領域の第６番目に存在するアラニン（第７７２位）をロイシンに、Ｓα２領域の第７番目に存在するイソロイシン（第７７３位）をロイシンに、Ｓα２領域の第１０番目に存在するアラニン（第７７６位）をセリンに置換した。またＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトの直後であって、Ｌα２領域のアミノ末端からＨＭＧＲのアミノ末端へ向かって２番目に存在するプロリン（第８５０位）をアラニンに置換し、更にＬα２領域の第１番目に存在するアラニン（第８５２位）をセリンに、Ｌα２領域の第６番目に存在するグルタミン酸（第８５７位）をアスパラギンに置換した。

アミノ酸置換変異の導入は、前記Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ発現ベクターを鋳型として、比較例３と同様な方法で、プライマーを変えた操作を繰り返しながら、順次変異を導入することで６残基のアミノ酸を置換したベクターを構築した。

変異導入は、前記プライマー（配列番号２３～３２）により変異を導入し、さらに上記のプライマー（配列番号３９～４０）により復帰変異を導入した。

構築したベクターを、清酒酵母を宿主として導入し、Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ４株を取得した。それぞれの株のスクアレン生産量を指標として、メバロン酸経路の増強効果を比較した。スクアレン生産量の測定は、実施例２（２）に準じた方法で行った。培養は、バッフル付き三角フラスコを使用し、ＹＰＤ培地（グルコース５％）に前培養した菌体を添加し、２８℃、２５０ｒｐｍで旋回攪拌しながら培養した。２日間の培養後に、培養菌体を回収し、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲを比較対象としてスクアレン生産量を測定した。結果を図１６に示す。６残基のアミノ酸を置換した変異酵素（Ｋ７０１＿Ｍｕｔａｎｔ４）を発現した酵母のスクアレン生産量は、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲに比べ著しく増加した。

[0068] 実施例３及び５～１１、並びに比較例２～６の（ａ）～（ｇ）の位置のアミノ酸（ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ、又はＫ７０１＿ｔＨＭＧＲからのアミノ酸の置換）及びＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲを１００とした各実施例及び比較例のスクアレンの生産量の相対値を表１にまとめる。なお、アミノ酸は一文字表記で示している。

[0069]

[表1]

	変異を導入したtHMGR	(a) Sα2領域の第10番目	(b) DKK領域のC末端から第1番目	(c) Lα2領域の第1番目	(d) Lα2領域の第6番目	(e) Sα2領域の第7番目	(f) Lα2領域の第5番目	(g) Sα2領域の第6番目	スクアレン生産量 (ΔDK_tHMGRを100とした場合の相対値)
比較例2	K701_tHMGR	A	P	A	E	I	I	A	0.2
実施例3	ADK_tHMGR	S	A	S	N	L	T	L	100.0
実施例5	K701_tHMGR	A→S	P→A	A→S	E→N	I→L	I→T	A→L	92.1
実施例6	ADK_tHMGR	S	A	S	N	L	T→I	L	50.3
実施例7	ADK_tHMGR	S	A	S	N	L	T	I→A	54.2
実施例8	ADK_tHMGR	S	A	S	N	L→I	T	L	18.8
実施例9	K701 tHMGR	A→S	P→A	A→S	E→N	I→L	I→T	A	44.6
実施例10	K701_tHMGR	A→S	P→A	A→S	E→N	I→L	I	A	18.2
実施例11	K701_tHMGR	A→S	P→A	A→S	E→N	I→L	I	A→L	22.8
比較例3	ADK_tHMGR	S	A	S→A	N	L	T	L	13.9
比較例3	ADK_tHMGR	S	A	S→A	N	L	T→I	L	0.4
比較例4	ADK_tHMGR	S→A	A	S	N	L	T	L	0
比較例5	ADK_tHMGR	S	A→P	S	N	L	T	L	4.7
比較例6	ADK_tHMGR	S	A	S	N→E	L	T	L	0.3

表中の網掛けのアミノ酸は、K701_tHMGRのアミノ酸を示す。
(a) Sα2領域の第10番目：ADK4653_tHMGRの第744位のアミノ酸、K701_tHMGRの第776位のアミノ酸
(b) DKK領域のC末端から第1番目：ADK4653_tHMGRの第818位のアミノ酸、K701_tHMGRの第850位のアミノ酸
(c) Lα2領域の第1番目：ADK4653_tHMGRの第820位のアミノ酸、K701_tHMGRの第852位のアミノ酸
(d) Lα2領域の第6番目：ADK4653_tHMGRの第825位のアミノ酸、K701_tHMGRの第857位のアミノ酸
(e) Sα2領域の第7番目：ADK4653_tHMGRの第741位のアミノ酸、K701_tHMGRの第773位のアミノ酸
(f) Lα2領域の第5番目：ADK4653_tHMGRの第824位のアミノ酸、K701_tHMGRの第856位のアミノ酸
(g) Sα2領域の第6番目：ADK4653_tHMGRの第740位のアミノ酸、K701_tHMGRの第772位のアミノ酸

[0070] 比較例２及び実施例３から明らかなように、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲ（ａ＝Ａ、ｂ＝Ｐ、ｃ＝Ａ、ｄ＝Ｅ、ｅ＝Ｉ、ｆ＝Ｉ、ｇ＝Ａ）と比較して、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つのアミノ酸が異なるＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲ（ａ＝Ｓ、ｂ＝Ａ、ｃ＝Ｓ、ｄ＝Ｎ、ｅ＝Ｌ、ｆ＝Ｔ、ｇ＝Ｌ）は、スクアレンの生産量が顕著に優れていた。更に、実施例５からわかるように、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つのアミノ酸をＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの７つのアミノ酸に置換することによって、スクアレンの生産量の相対値は９２．１と、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲとほぼ同等になった。ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲとＫ７０１＿ｔＨＭＧＲとは、アミノ酸配列の長さも異なり、短縮型ＨＭＧＲ（ｔＨＭＧＲ）のアミノ酸配列の同一性も７８％である。Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸のうち、わずか７塩基のアミノ酸をＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸に置換することによって、スクアレンの生産量がＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲと同等となることは、驚くべきことである。すなわち、ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼのスクアレンの産生において、これらの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の７つのアミノ酸が重要な役割を果たしていると考えられる。

更に、比較例３～比較例６の結果からわかるように、ＡＤＫ４６５３＿ｔＨＭＧＲの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の位置のアミノ酸のいずれか１つをＫ７０１＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸に置換するとスクアレンの生産量の相対値は、０～１３．９と急激に低下した。すなわち、これらの（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の位置のアミノ酸が、特にヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼのスクアレンの産生において重要であると考えられる。

また、実施例６～１１の結果からわかるように、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置の３つのアミノ酸のいずれかが、Ｋ７０１＿ｔＨＭＧＲのアミノ酸の場合は、スクアレンの生産量の相対値は１８．２～５４．２である。す

なわち、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、及び（ｄ）の位置のアミノ酸と比較すると、（ｅ）、（ｆ）、及び（ｇ）の位置のアミノ酸がＫ７０１＿ｔＨＭＧＲのものであっても、高いスクアレンの生産性を示す。

産業上の利用可能性

[0071] 本発明によれば、テルペノイド化合物の生産において、メバロン酸の産生、及びスクアレンの産生を向上させることができる。従って、本発明によって得られる、メバロン酸、及びスクアレンは、例えば医薬品の生産の原料として用いることができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請求の範囲

[請求項1] ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）の

（ａ）Ｓα２アミノ酸配列における第１０番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、

（ｂ）ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のプロリン（Ｐ）以外のアミノ酸、

（ｃ）Ｌα２アミノ酸配列における第１番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、及び

（ｄ）Ｌα２アミノ酸配列における第６番目のグルタミン酸（Ｅ）以外のアミノ酸、を含むヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ。

[請求項2] 前記Ｓα２アミノ酸配列の第１０番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、ＨＭＧ－ＣｏＡ結合サイトのＤＫＫ領域のＣ末端から第１番目のアミノ酸がアラニン（Ａ）であり、Ｌα２アミノ酸配列の第１番目のアミノ酸がセリン（Ｓ）であり、そしてＬα２アミノ酸配列の第６番目のアミノ酸がアスパラギン（Ｎ）である、請求項１に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ。

[請求項3] 前記ヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ（ＨＭＧＲ）が、更に

（ｅ）Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、

（ｆ）Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のイソロイシン（Ｉ）以外のアミノ酸、及び

（ｇ）Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアラニン（Ａ）以外のアミノ酸、からなる群から選択される１つ又は２つ以上のアミノ酸を、含む請求項１又は２に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ。

[請求項4] 前記Ｓα２アミノ酸配列における第７番目のアミノ酸がロイシンで

あり、Ｌα２アミノ酸配列における第５番目のアミノ酸がトレオニンであり、Ｓα２アミノ酸配列における第６番目のアミノ酸がロイシンである、請求項３に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ。

[請求項5] 下記（１）～（３）のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドである、請求項１～４のいずれか一項に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ：

（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番のアミノ酸配列、

（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列の５１４番～１０２２番からなるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列。

[請求項6] 下記（１）～（３）のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、且つヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドである、請求項１～３のいずれか一項に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ：

（１）配列番号１で表されるアミノ酸配列、

（２）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、１若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

（３）配列番号１で表されるアミノ酸配列との相同性が８０％以上であるアミノ酸配列。

[請求項7] 膜結合領域を含まない、請求項１～６のいずれか一項に記載のヒドロキシメチルグルタリルＣｏＡレダクターゼ。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか一項に記載のヒドロキシメチルグルタリル

ＣｏＡレダクターゼをコードするポリヌクレオチド。

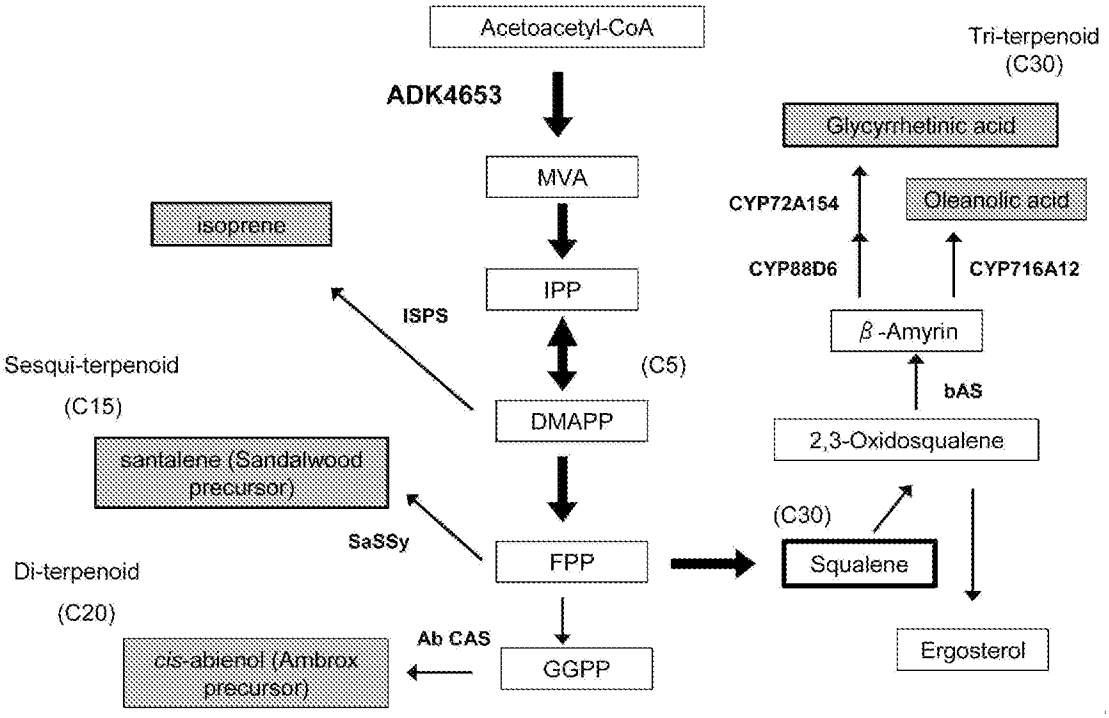
[請求項9] 請求項８に記載のポリヌクレオチドを有する微生物。

[請求項10] 請求項８に記載のポリヌクレオチドを持つＤＮＡを含むベクター。

[請求項11] 請求項１０に記載のベクターを有する形質転換体。

[請求項12] 請求項１１に記載の形質転換体を培養することを特徴とするテルペノイドの製造方法。

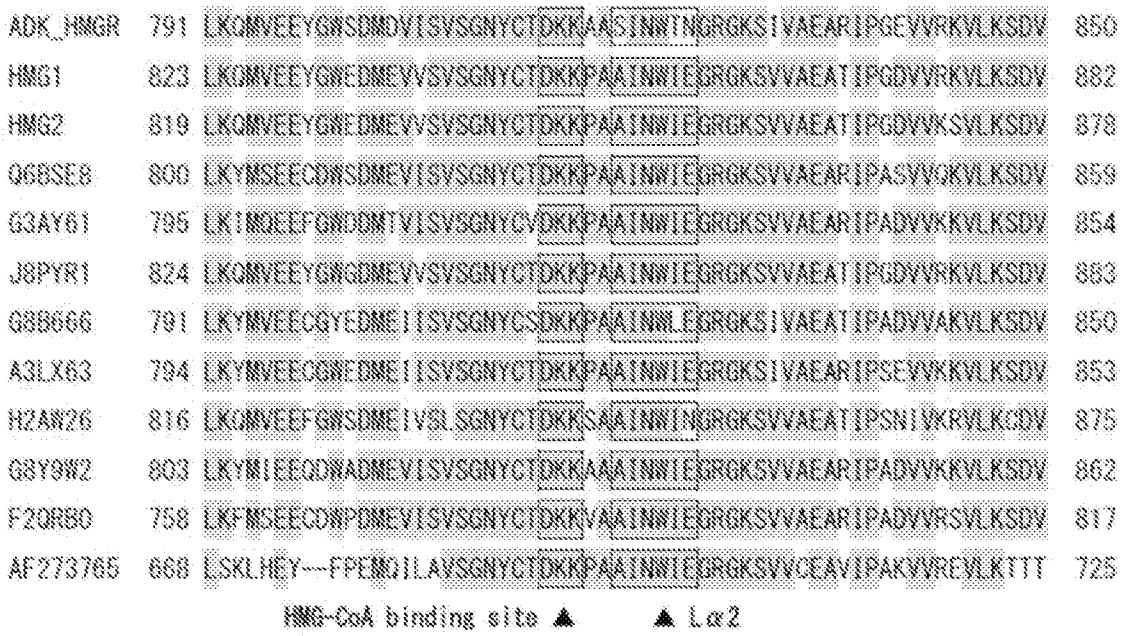
[図1]


Acetoacetyl-CoA
ADK4653
MVA
IPP
DMAPP
FPP
GGPP
ISPS
isoprene
Sesqui-terpenoid
(C15)
santalene (Sandalwood precursor)
SaSSy
Di-terpenoid
(C20)
cis-abienol (Ambrox precursor)
Ab CAS
(C5)
Tri-terpenoid
(C30)
Glycyrrhetinic acid
Oleanolic acid
CYP72A154
CYP88D6
CYP716A12
β-Amyrin
bAS
2,3-Oxidosqualene
(C30)
Squalene
Ergosterol

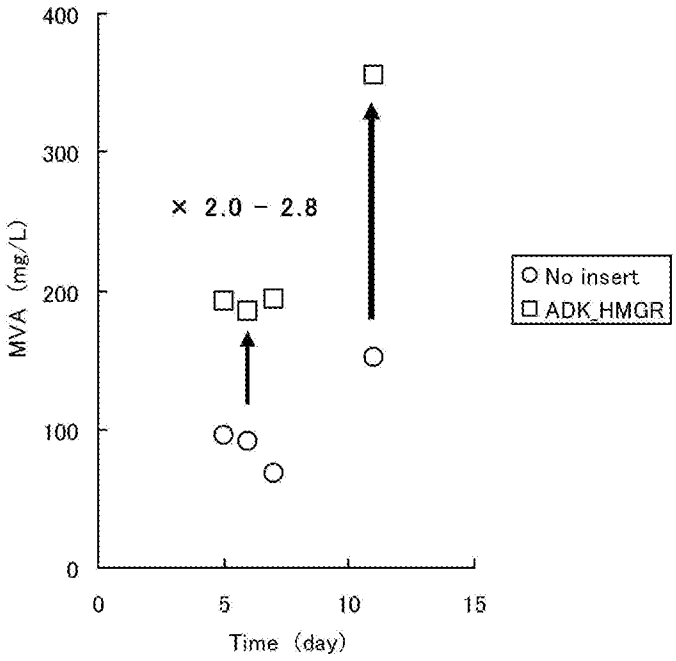
[図2]


ADK_HMGR 731 WLDSEEGQNLLKKSFNSTSRFARLQHVQTAIAGQLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEFT 790
HMG1 763 WLDSEEGQNAIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGQLLFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 822
HMG2 759 WLDSEEGQNSIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGQLLFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 818
Q6BSE8 740 WLDSEEGQKTIKKAFNSTSRFARLQHIQTALAGTLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 799
G3AY61 735 WLDSEEGQKAVKKAFNSTSRFARLQHIKTAIAGRLLYIRFKTTTGDAMGMNMISKGVEHS 794
J8PYR1 764 WIDSEEGQNSIKKAFNSTSRFARLQHVQTCLAGQLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 823
G8B666 731 WIDSEEGQKTIKKAFNSTSRFARLQHIQTSLAGQLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 790
A3LX63 734 WLDSEEGQSTIKKAFNSTSRFARLQHIQTAMAGQLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 793
H2AW26 756 WLDSIEGSNLMKNAFNSTSRFAKLQHIQTTMAGQLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYS 815
G8Y9W2 743 WLDSEEGQNVIKKAFNSTSRFARLQNIQTALAGRLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEHC 802
F2QRB0 698 WLDSEEGQKTIKGAFNSTSRFARLQHVKTTLAGTLLFIRFKTTTGDAMGMNMISKGVEYS 757
AF273765 608 WLETSEGFAVIKEAFDSTSRFARLQKLHTSIAGRNLYIRFQSRSGDAMGMNMISKGTEKA 667
Sα2 ▲ ▲ NADP(H) binding site

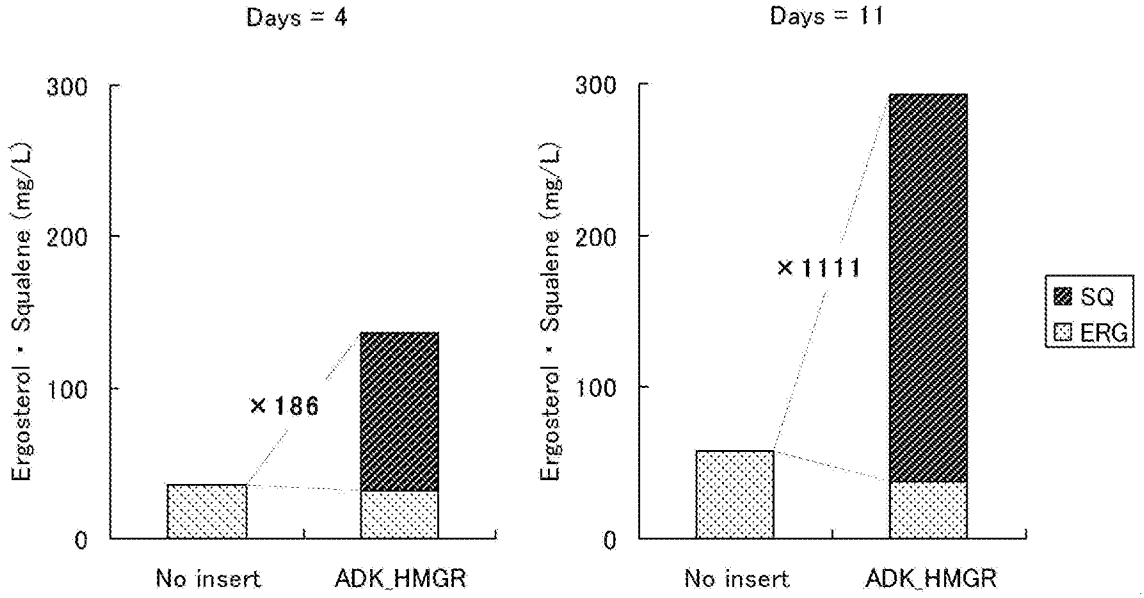
[図3]


ADK_HMGR 791 LKQMVEEYGNSDMDVTSVSGNYCTDKKAASINWTNGRGKSTVAEARTPGEVVRKVLKSDV 850
HMG1 823 LKQMVEEYGNEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEATIPGDVVRKVLKSDV 882
HMG2 819 LKQMVEEYGNEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEATIPGDVVKSVLKSDV 878
Q6BSE8 800 LKYMSEECDNSDMEVTSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEARIPASVVQKVLKSDV 859
G3AY61 795 LKTMQEEFGNDDMTVTSVSGNYCVDKKPAAINWIEGRGKSVVAEARTPADVVKKVLKSDV 854
J8PYR1 824 LKQMVEEYGNGDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEATIPGDVVRKVLKSDV 883
G8B666 791 LKYMVEECGYEDMETTSVSGNYCSDKKPAATNWLEGRGKSIVAEATIPADVVAKVLKSDV 850
A3LX63 794 LKYMVEECGNEDMETTSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSIVAEARIPSEVVKKVLKSDV 853
H2AW26 816 LKQMVEEFGNSDMEIVSLSGNYCTDKKSAAINWINGRGKSVVAEATIPSNIVKRVLKCDV 875
G8Y9W2 803 LKYMIEEQDNADMEVISVSGNYCTDKKAAAINWIEGRGKSVVAEARIPADVVKKVLKSDV 862
F2QR80 758 LKFMSEECDNPDMEVISVSGNYCTDKKVAAINWIEGRGKSVVAEARIPADVVRSVLKSDV 817
AF273765 668 LSKLHEY--FPEMDILAVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVCEAVIPAKVVREVLKTTT 725
HMG-CoA binding site ▲ ▲ Lα2

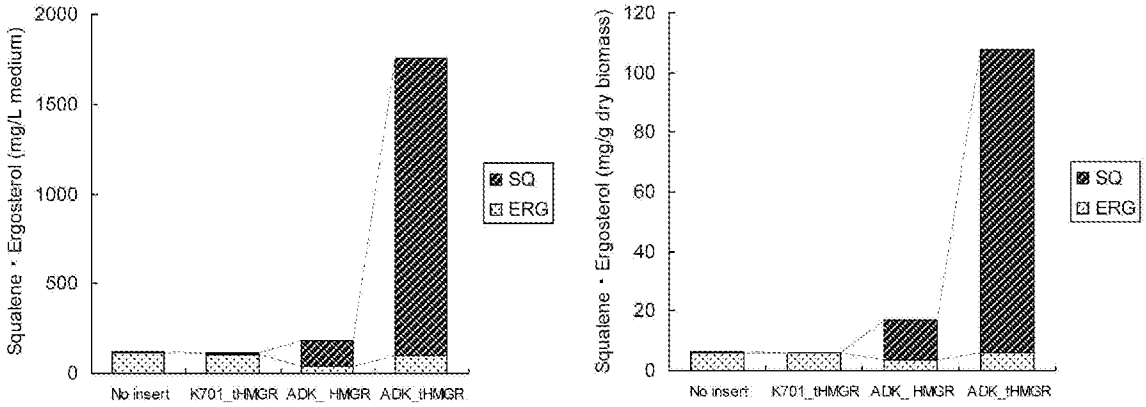
[図4]


400
300
200
100
0
MVA (mg/L)
× 2.0 – 2.8
No insert
ADK_HMGR
0
5
10
15
Time (day)

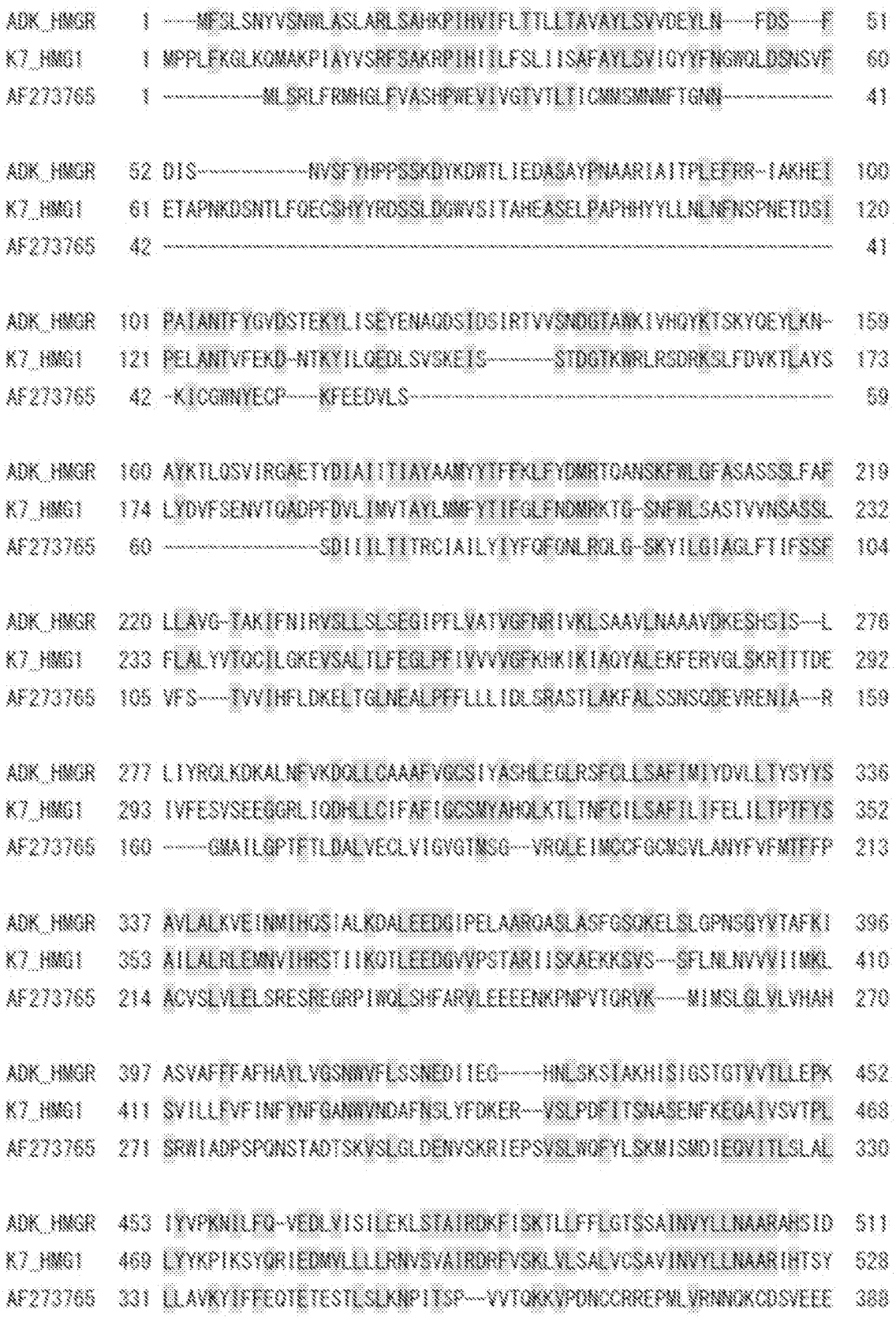
[図5]


Days = 4
Days = 11
Ergosterol・Squalene (mg/L)
300
200
100
0
×186
×1111
SQ
ERG
No insert
ADK_HMGR

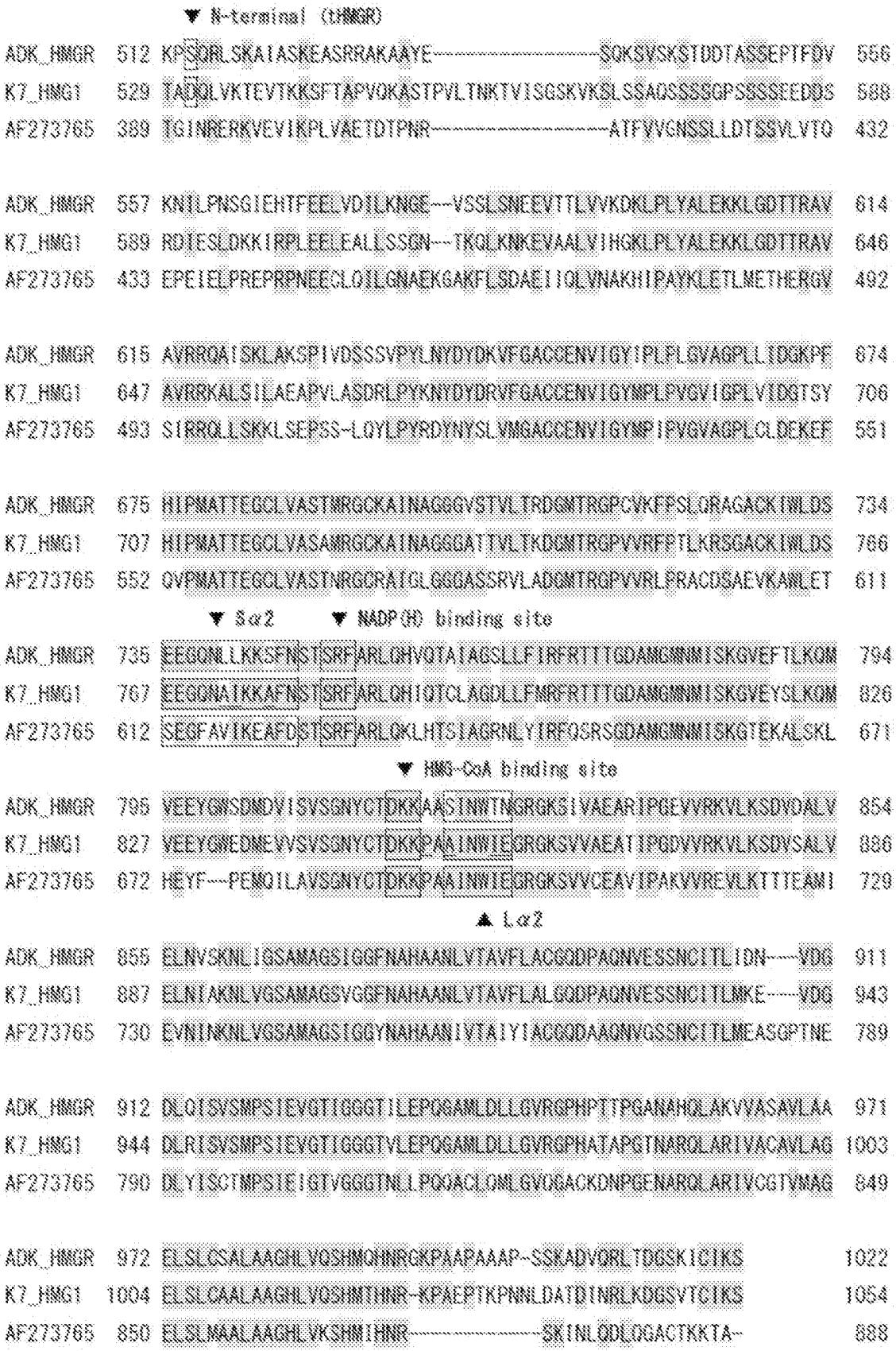
[図6]


Squalene・Ergosterol (mg/L medium)
2000
1500
1000
500
0
Squalene・Ergosterol (mg/g dry biomass)
120
100
80
60
40
20
0
SQ
ERG
No insert
K701_tHMGR
ADK_HMGR
ADK_tHMGR

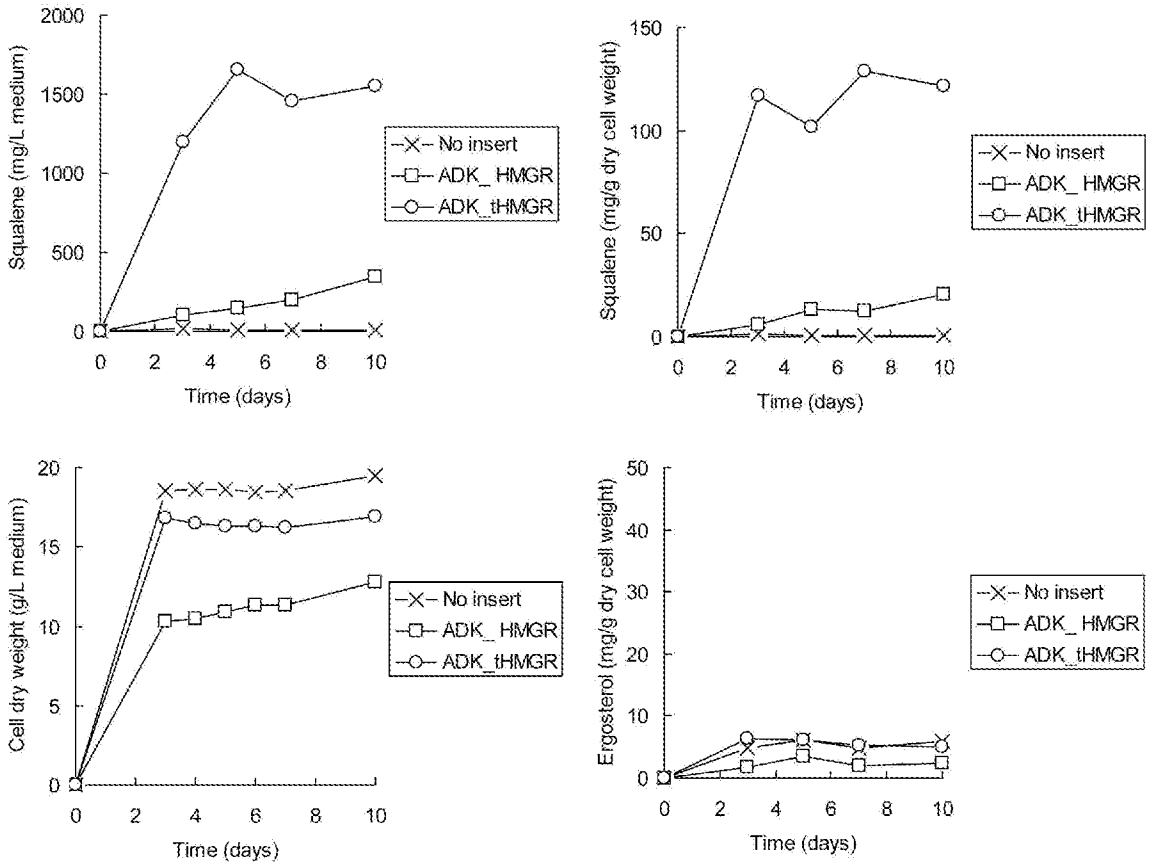
[図7-1]



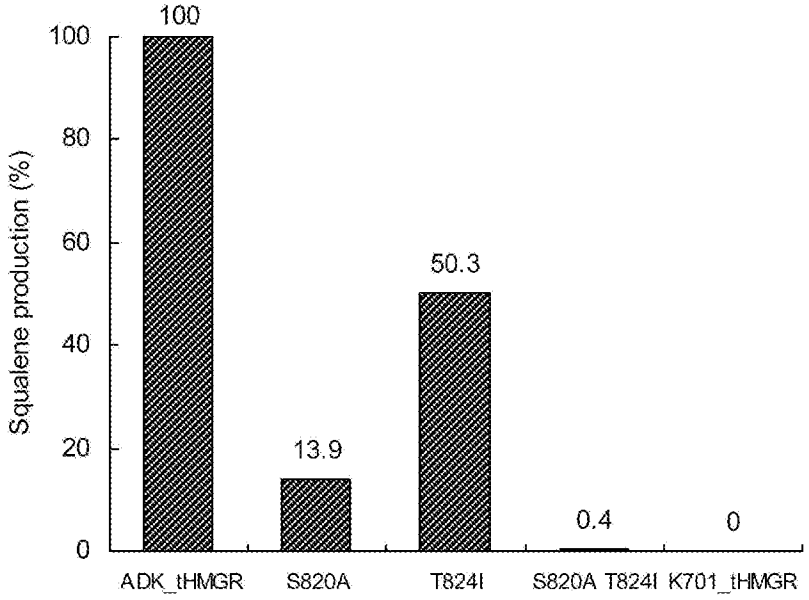
[図7-2]


▼ N-terminal (tHMGR)
ADK_HMGR 512 KPSQRLSKAIASKEASRRAKAAYE---------SQKSVSKSTDDTASSEPTFDV 556
K7_HMG1 529 TADQLVKTEVTKKSFTAPVQKASTPVLTNKTVISGSKVKSLSSAQSSSSQPSSSSEEDDS 588
AF273765 389 TGINRERKVEVIKPLVAETDTPNR---------ATFVVGNSSLLDTSSVLVTQ 432
ADK_HMGR 557 KNILPNSGIEHTFEELVDILKNGE--VSSLSNEEVTTLVVKDKLPLYALEKKLGDTTRAV 614
K7_HMG1 589 RDIESLDKKIRPLEELEALLSSQN--TKQLKNKEVAALVIHGKLPLYALEKKLGDTTRAV 646
AF273765 433 EPEIELPREPRPNEECLQILGNAEKGAKFLSDAEIIQLVNAKHIPAYKLETLMETHERGV 492
ADK_HMGR 615 AVRRQAISKLAKSPIVDSSSVPYLNYDYDKVFGACCENVIGYIPLPLGVAGPLLIDGKPF 674
K7_HMG1 647 AVRRKALSILAEAPVLASDRLPYKNYDYDRVFGACCENVIGYMPLPVGVIGPLVIDGTSY 706
AF273765 493 SIRRQLLSKKLSEPSS-LQYLPYRDYNYSLVMGACCENVIGYMPIPVGVAGPLCLDEKEF 551
ADK_HMGR 675 HIPMATTEGCLVASTMRGCKAINAGGGVSTVLTRDGMTRGPCVKFPSLQRAGACKIWLDS 734
K7_HMG1 707 HIPMATTEGCLVASAMRGCKAINAGGGATTVLTKDGMTRGPVVRFPTLKRSGACKIWLDS 766
AF273765 552 QVPMATTEGCLVASTNRGCRAIGLGGGASSRVLADGMTRGPVVRLPRACDSAEVKAWLET 611
▼ Sα2 ▼ NADP(H) binding site
ADK_HMGR 735 EEGQNLLKKSFNSTSRFARLQHVQTAIAGSLLFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEFTLKQM 794
K7_HMG1 767 EEGQNAIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGDLLFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYSLKQM 826
AF273765 612 SEGFAVIKEAFDSTSRFARLQKLHTSIAGRNLYIRFQSRSGDAMGMNMISKGTEKALSKL 671
▼ HMG-CoA binding site
ADK_HMGR 795 VEEYGNSDMDVISVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSIVAEAIIPGEVVRKVLKSDVDALV 854
K7_HMG1 827 VEEYGNEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVAEATIPGDVVRKVLKSDVSALV 886
AF273765 672 HEYF---PEMQILAVSGNYCTDKKPAAINWIEGRGKSVVCEAVIPAKVVREVLKTTTEAMI 729
▲ Lα2
ADK_HMGR 855 ELNVSKNLIGSAMAGSIGGFNAHAANLVTAVFLACGQDPAQNVESSNCITLIDN----VDG 911
K7_HMG1 887 ELNIAKNLVGSAMAGSVGGFNAHAANLVTAVFLALGQDPAQNVESSNCITLMKE----VDG 943
AF273765 730 EVNINKNLVGSAMAGSIGGYNAHAANIVTAIYIACGQDAAQNVGSSNCITLMEASGPTNE 789
ADK_HMGR 912 DLQISVSMPSIEVGTIGGGTILEPQGAMLDLLGVRGPHPTTPGANAHQLAKVVASAVLAA 971
K7_HMG1 944 DLRISVSMPSIEVGTIGGGTVLEPQGAMLDLLGVRGPHATAPGTNAROLARIVACAVLAG 1003
AF273765 790 DLYISCTMPSTEIGTVGGGTNLLPQQACLQMLGVQGACKDNPGENARQLARIVCGTVMAG 849
ADK_HMGR 972 ELSLCSALAAGHLVQSHMQHNRCKPAAPAAAP-SSKADVQRLTDGSKICIKS 1022
K7_HMG1 1004 ELSLCAALAAGHLVQSHMTHNR-KPAEPTKPNNLDATDINRLKDGSVTCIKS 1054
AF273765 850 ELSLMAALAAGHLVKSHMIHNR---------SKINLQDLQGACTKKTA- 888

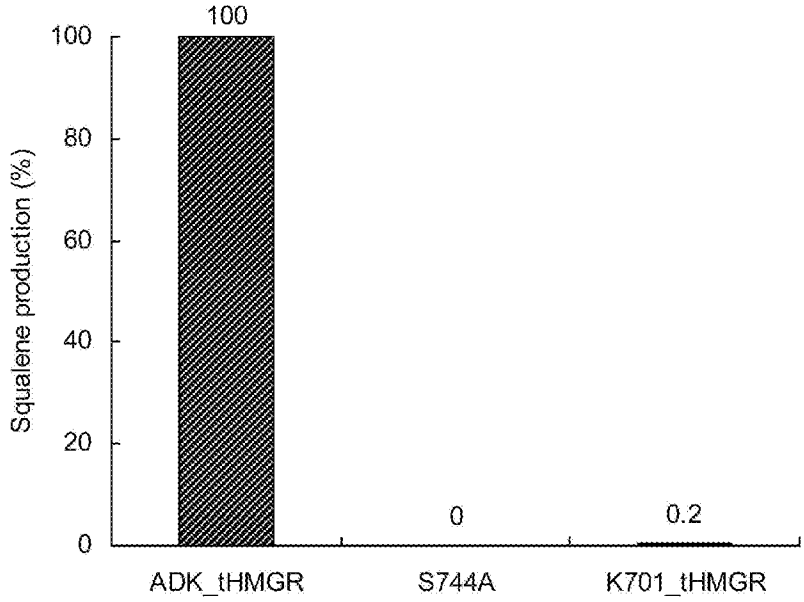
[図8]


Squalene (mg/L medium)
2000
1500
1000
500
0
0 2 4 6 8 10
Time (days)
No insert
ADK_ HMGR
ADK_tHMGR
Squalene (mg/g dry cell weight)
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10
Time (days)
No insert
ADK_ HMGR
ADK_tHMGR
Cell dry weight (g/L medium)
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10
Time (days)
No insert
ADK_ HMGR
ADK_tHMGR
Ergosterol (mg/g dry cell weight)
50
40
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10
Time (days)
No insert
ADK_ HMGR
ADK_tHMGR

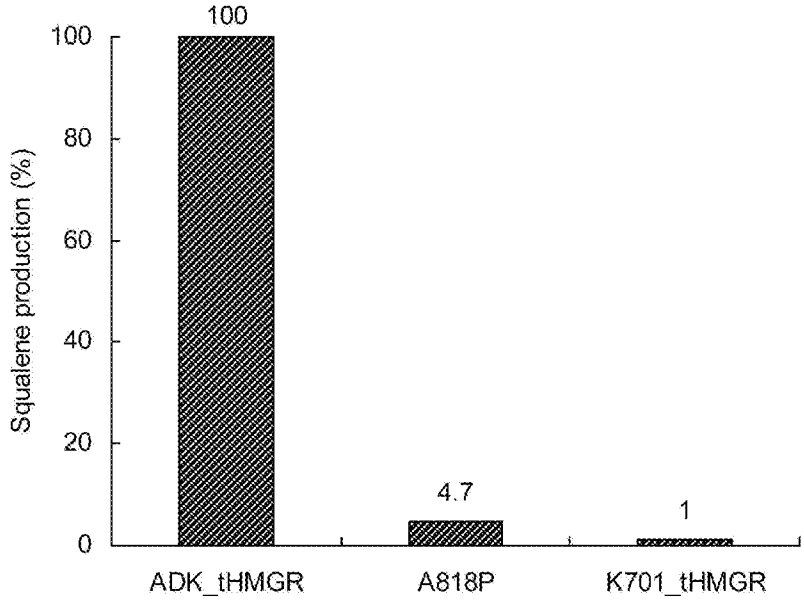
[図9]


Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
100
13.9
50.3
0.4
0
ADK_tHMGR
S820A
T824I
S820A T824I
K701_tHMGR

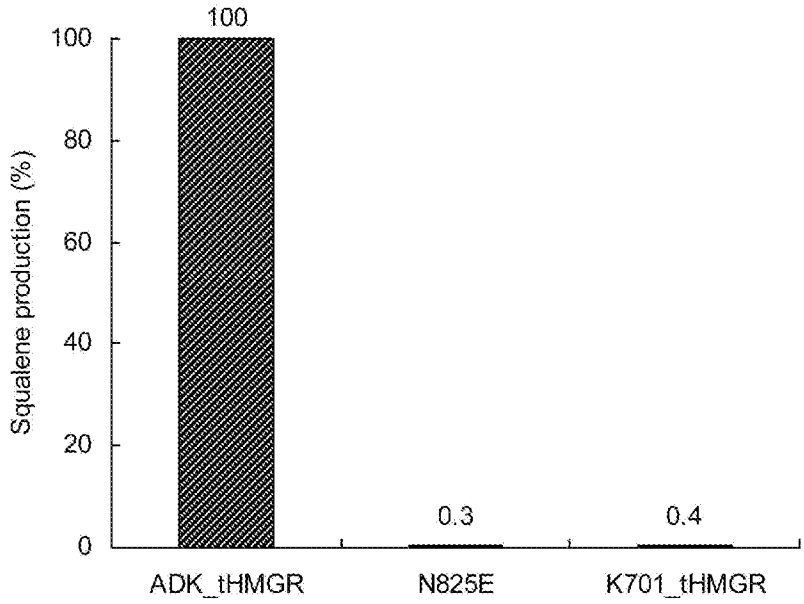
[図10]


100
0
0.2
Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
ADK_tHMGR
S744A
K701_tHMGR

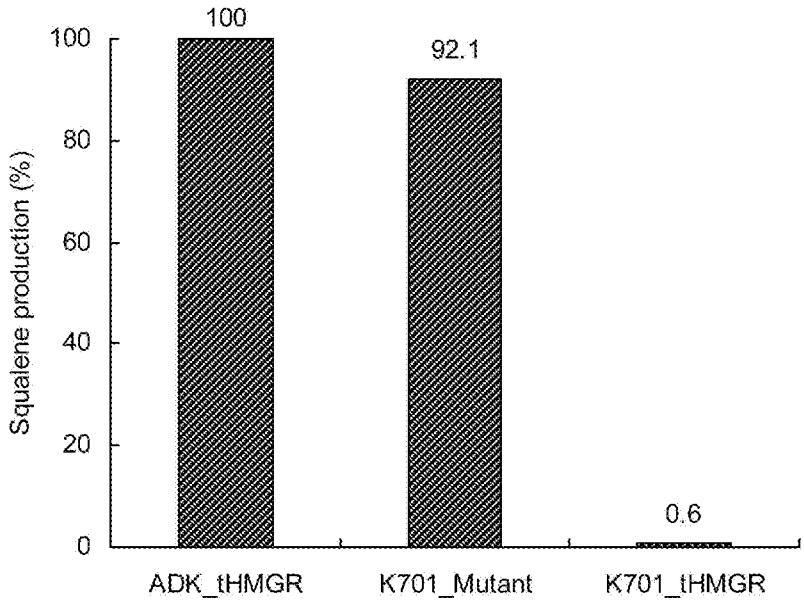
[図11]


100
4.7
1
Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
ADK_tHMGR
A818P
K701_tHMGR

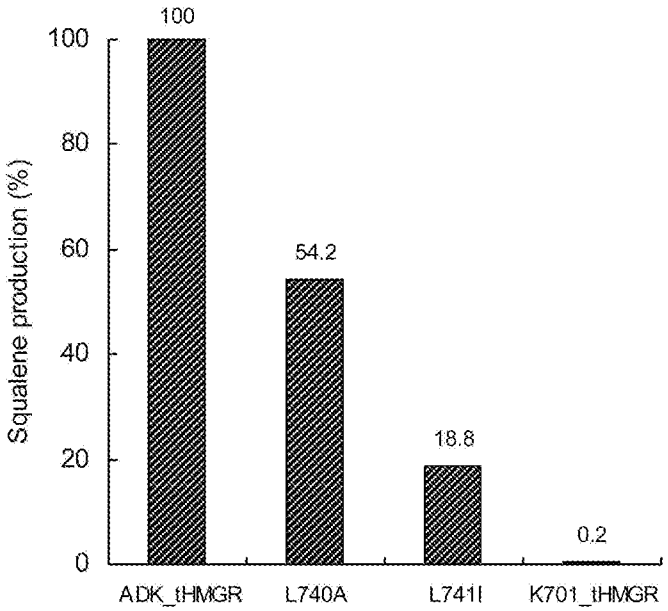
[図12]


100
0.3
0.4
Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
ADK_tHMGR
N825E
K701_tHMGR

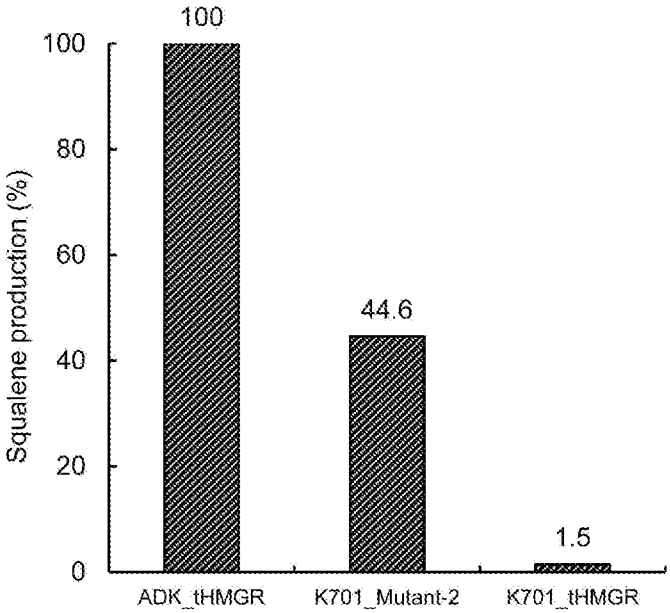
[図13]


Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
100
92.1
0.6
ADK_tHMGR
K701_Mutant
K701_tHMGR

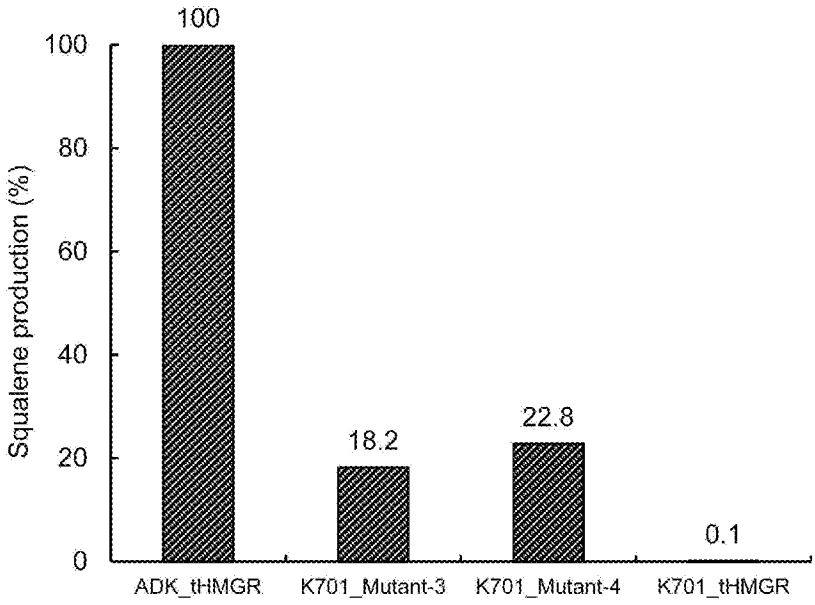
[図14]


Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
100
54.2
18.8
0.2
ADK_tHMGR
L740A
L741I
K701_tHMGR

[図15]


Squalene production (%)
100
80
60
40
20
0
100
44.6
1.5
ADK_tHMGR
K701_Mutant-2
K701_tHMGR

[図16]


100
100
80
60
40
20
0
Squalene production (%)
18.2
22.8
0.1
ADK_tHMGR
K701_Mutant-3
K701_Mutant-4
K701_tHMGR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/061168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/16*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N9/04*(2006.01)i, *C12P5/02*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/16, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12P5/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 3-210174 A (Asahi Denka Co., Ltd.), 13 September 1991 (13.09.1991), & US 5116757 A & EP 392346 A2	9 1-8,10-12
A	JP 2000-050884 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 22 February 2000 (22.02.2000), SEQ ID NO:6 & US 6284506 B1 & EP 955363 A2	1-12
A	LUKACS G et al., Cloning of the Rhizomucor miehei 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in Mucor circinelloides, Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, Vol.95, No.1, pp.55-64	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 June 2015 (29.06.15)	07 July 2015 (07.07.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/061168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG Y et al., Isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutary coenzyme A reductase from an endophytic taxol-producing fungus BT2, Ann. Microbiol., 2012, Vol.62, pp.587-595	1-12
A	WO 2009/133089 A1 (DSM IP Assets B.V.), 05 November 2009 (05.11.2009), Seq ID No.4 & US 2011/0054193 A1 & EP 2271335 A1	1-12
A	ABE Y et al., Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in Penicillium citrinum, Mol. Genet. Genomics, 2002, Vol.268, No.1, pp.130-137	1-12
A	US 5349126 A (Amoco Corp.), 20 September 1994 (20.09.1994), abstract (Family: none)	1-12
A	JP 2013-511282 A (Nucelis Inc.), 04 April 2013 (04.04.2013), claims & US 2011/0124072 A1 & WO 2011/063350 A2 & EP 2504421 A1	1-12
A	JP 2013-502903 A (Organobalance GmbH), 31 January 2013 (31.01.2013), claims & US 2012/0156249 A1 & WO 2011/023298 A1 & EP 2292741 A1	1-12
A	JP 2012-500648 A (Novartis AG.), 12 January 2012 (12.01.2012), claims & US 2011/0243969 A1 & WO 2010/023551 A2 & EP 2268823 A1	1-12
A	JP 5-192184 A (Amoco Corp.), 03 August 1993 (03.08.1993), claims & US 5460949 A & EP 486290 A2	1-12
A	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA) [Scheffersomyces stipitis CBS 6054], NCBI Accession No.XP_001385774, 2010.07.06, [retrieved on 29 June 2015] Retrieved from Internet <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001385774.2>	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０６１１６８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/16(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/16, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/04, C12P5/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	JP 3-210174 A (旭電化工業株式会社) 1991.09.13, & US 5116757 A & EP 392346 A2	9 1-8, 10-12
A	JP 2000-050884 A (エフ・ホフマンーラ　ロシユ　アーゲー) 2000.02.22, 配列番号６ & US 6284506 B1 & EP 955363 A2	1-12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ２９．０６．２０１５	国際調査報告の発送日 ０７．０７．２０１５
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３４３５ 西村　亜希子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	LUKACS G et al., Cloning of the Rhizomucor miehei 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in Mucor circinelloides, Antonie Van Leeuwenhoek, 2009, Vol.95, No.1, pp.55-64	1-12
A	WANG Y et al., Isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutary coenzyme A reductase from an endophytic taxol-producing fungus BT2, Ann. Microbiol., 2012, Vol.62, pp.587-595	1-12
A	WO 2009/133089 A1 (DSM IP Assets B.V.) 2009.11.05, Seq ID No.4 & US 2011/0054193 A1 & EP 2271335 A1	1-12
A	ABE Y et al., Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in Penicillium citrinum, Mol. Genet. Genomics, 2002, Vol.268, No.1, pp.130-137	1-12
A	US 5349126 A (Amoco Corporation) 1994.09.20, Abstract (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2013-511282 A (ニューセリス　インコーポレイテッド) 2013.04.04, 特許請求の範囲 & US 2011/0124072 A1 & WO 2011/063350 A2 & EP 2504421 A1	1-12
A	JP 2013-502903 A (オーガノバランス　ゲーエムベーハー) 2013.01.31, 特許請求の範囲 & US 2012/0156249 A1 & WO 2011/023298 A1 & EP 2292741 A1	1-12
A	JP 2012-500648 A (ノバルティス　アーゲー) 2012.01.12, 特許請求の範囲 & US 2011/0243969 A1 & WO 2010/023551 A2 & EP 2268823 A1	1-12
A	JP 5-192184 A (アモコ・コーポレイシヨン) 1993.08.03, 特許請求の範囲 & US 5460949 A & EP 486290 A2	1-12
A	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA) [Scheffersomyces stipitis CBS 6054], NCBI Accession No.XP_001385774, 2010.07.06, [retrieved on 29 June 2015]Retrieved from Internet <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001385774.2>	1-12