

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-198313

(P2019-198313A)

(43) 公開日 令和1年11月21日 (2019. 11. 21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N	1/19 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 P 17/06 (2006.01)		C 1 2 P	17/06	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/09 Z	

審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2018-206212 (P2018-206212)	(71) 出願人	513306431
(22) 出願日	平成30年11月1日 (2018. 11. 1)		インテリジェント シンセティック バイ オロジー センター
(31) 優先権主張番号	10-2018-0056159		I N T E L L I G E N T S Y N T H E T I C B I O L O G Y C E N T E R
(32) 優先日	平成30年5月16日 (2018. 5. 16)		大韓民国 305-701 テジョン ユ ソング 291 テハーンノ (373 -1 クソンドン) エー-401 ケ ーアイ ビルディング
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		A-401 K1 Bldg., 291 Daehak-ro (373-1 G useong-dong), Yuseo ng-gu, Daejeon 305- 701, Republic of Ko rea
			最終頁に続く

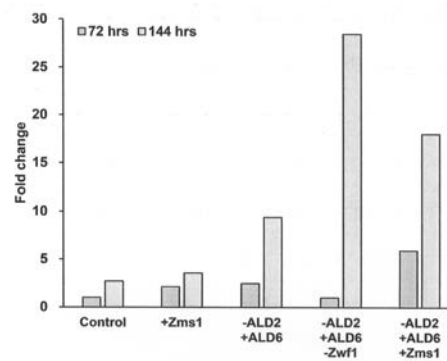
(54) 【発明の名称】 酵母のNADPH関連生合成経路の改良を通じたジンセノサイドの生産増大

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ジンセノサイドを高収率で生産するための酵母、及びそのような酵母の製造方法の提供。

【解決手段】 ジンセノサイド生産能を有する酵母においてAld2、Ald6、Zwf1及びZms1を変化させ、ジンセノサイド生産能を向上させる。前記酵母を用いてジンセノサイドを生産する。

【選択図】 図8



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N A D P H 生合成関与遺伝子の発現レベルが内在的発現レベルに比べて変化した、ジンセノサイド生産用酵母。

【請求項 2】

前記 N A D P H 生合成関与遺伝子は、A l d 2、A l d 6、Z w f 1 及び Z m s 1 からなる群から選択された 1 以上である、請求項 1 に記載の酵母。

【請求項 3】

前記 A l d 2 の発現レベルは内在的発現レベルに比べて減少し、A l d 6 発現レベルは内在的発現レベルに比べて増加した、請求項 2 に記載の酵母。

10

【請求項 4】

前記酵母は、Z w f 1 の発現レベルが内在的発現レベルに比べてさらに減少した、請求項 3 に記載の酵母。

【請求項 5】

前記酵母は、Z m s 1 の発現レベルが内在的発現レベルに比べてさらに増加した、請求項 3 に記載の酵母。

【請求項 6】

前記酵母は、N A D P H の生産能が内在的レベルに比べて増加した、請求項 1 に記載の酵母。

【請求項 7】

前記酵母は、さらにジンセノサイド合成に関与する遺伝子の発現が内在的発現レベルに比べて増加した、請求項 1 に記載の酵母。

20

【請求項 8】

前記遺伝子は、P g D D S (P a n a x g i n s e n g , d a m m a r e n e d i o l - I I s y n t h a s e) , P g P P D S (P a n a x g i n s e n g c y t o c h r o m e P 4 5 0 C Y P 7 1 6 A 4 7) , P g C P R (P a n a x g i n s e n g , N A D P H - c y t o c h r o m e P 4 5 0 r e d u c t a s e) , t H M G 1 (S . c e r e v i s i a e H M G - C o A r e d u c t a s e) 及び P g S E (P a n a x g i n s e n g , s q u a l e n e e p o x i d a s e) で構成された群から選択された 1 以上の遺伝子である、請求項 7 に記載の酵母。

30

【請求項 9】

ジンセノサイド生産酵母菌株に N A D P H 生合成関与遺伝子の発現レベルを、内在的発現レベルに比べて変化させる段階を含む、ジンセノサイド生産能が向上した酵母の製造方法。

【請求項 10】

前記 N A D P H 生合成関与遺伝子は、A l d 2、A l d 6、Z w f 1 及び Z m s 1 からなる群から選択された 1 以上である、請求項 9 に記載の酵母の製造方法。

【請求項 11】

前記 A l d 2 の発現レベルは内在的発現レベルに比べて減少し、A l d 6 発現レベルは内在的発現レベルに比べて増加した、請求項 9 に記載の酵母の製造方法。

40

【請求項 12】

前記酵母は、Z w f 1 の発現レベルが内在的発現レベルに比べてさらに減少した、請求項 11 に記載の酵母の製造方法。

【請求項 13】

前記酵母は、Z m s 1 の発現レベルが内在的発現レベルに比べてさらに増加した、請求項 11 に記載の酵母の製造方法。

【請求項 14】

前記ジンセノサイド生産酵母菌株は、P g D D S (P a n a x g i n s e n g , d a m m a r e n e d i o l - I I s y n t h a s e) , P g P P D S (P a n a x g i n s e n g c y t o c h r o m e P 4 5 0 C Y P 7 1 6 A 4 7) , P g C P R (P

50

anax ginseng, NADPH-cytochrome P450 reductase), tHMG1 (S. cerevisiae HMG-CoA reductase) 及び PgSE (Panax ginseng, squalene epoxidase) で構成された群から選択された 1 以上の遺伝子の発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加した、請求項 8 に記載の酵母の製造方法。

【請求項 15】

(a) 請求項 1～8 のいずれか一項に記載の酵母を培地で培養する段階；及び

(b) 前記酵母または培地からジンセノサイドを得る段階を含む、ジンセノサイド生産方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、ジンセノサイドの生産を増大するための酵母及びそれを用いてジンセノサイドを生産する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サポニンとは、植物界に広く存在する配糖体において糖でない部分が様々な環式化合物からなる物質を意味する。高麗人参又は紅参に主要生理活性成分として含まれるサポニン成分であるトリテルペンサポニン (triterpene saponin) は、他の植物において見られるサポニンとは化学構造が異なるので、この高麗人参サポニンを他の植物系サポニンと区別するために、高麗人参 (Ginseng) 配糖体 (Glycoside) という意味でジンセノサイド (Ginsenoside) と呼ぶ。ジンセノサイドは、アグリコン (aglycone) の構造によってプロトパナキサジオール系 (Protopanaxadiol-type, PPDタイプ) ジンセノサイド、プロトパナキサトリオール系 (Protopanaxatriol-type, PPTタイプ) ジンセノサイド、及びオレアノール酸系 (Oleanolic acidタイプ) ジンセノサイドの 3 種類に分類される。

20

【0003】

高麗人参の薬理学的な研究結果は、人参サポニン成分であるジンセノサイドに対する関心を増大させ、それらの大量生産の必要性が台頭しているが、一般的な耕作方法によって人参の有用物質を大量生産することは 4～6 年の長い栽培期間、遮光栽培による病虫害防除の困難さ、輪作栽培などのような問題点を含むので、新たな代替生産方法に関する開発が切実に求められている。

30

【0004】

最近バイオテクノロジーに基づいた人参サポニン関連遺伝子が多く発掘され、これらの遺伝子を用いてジンセノサイドを酵母から大量生産するための技術開発も最近になって注目を集め始めた。ジンセノサイドは植物体からメバロン酸合成経路を含むイソプレノイド合成経路を通じて生合成されるため、酵母のエルゴステロール合成経路を再設計してジンセノサイド生産菌株を開発しようとする合成生物学の研究が試みられている。最近、中国の Huang と Zhang の共同研究チームで高麗人参のプロトパナキサジオールダマレンジオール-II 合成酵素 (protopanaxadiol dammarenediol-II synthase) プロトパナキサジオール合成酵素 (protopanaxadiol synthase genes) 遺伝子をシロイヌナズナから確保した NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (NADPH-cytochrome P450 reductase) 遺伝子とともに酵母サッカロマイセス・セレビシエに発現させてプロトパナキサジオールを生産することに成功したことを報告した (Dai, Z. et al., (2013) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. Metab. Eng. 20:146-156. (非特許文献 1))。今後、より最適化作業を通じてジンセノサイド生産合成酵母は、植物体から

40

50

抽出する複雑な工程過程を代替することができる経済的な生産工程を提供すると期待されている。

【0005】

このような背景の下で、本発明者らは、酵母を用いたジンセノサイド生産量を増大させるために鋭意研究努力した結果、ジンセノサイド生産酵母のNADPH生合成関与遺伝子の発現が変化した酵母、及び前記酵母の製造方法を開発し、前記酵母は、既存のジンセノサイド生産能を有する酵母よりジンセノサイド生合成の中間産物であるプロトパナキサジオールの生産量が増加することを確認し、本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0006】

【非特許文献1】Dai, Z. et al., (2013) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab. Eng.* 20: 146-156.

【非特許文献2】J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

【非特許文献3】F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York

【非特許文献4】Ju Young Lee et al., (2015) *Biotechnol. Bioeng.*, 112, 751-758.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

本発明の目的は、ジンセノサイド生産用酵母を提供することにある。

本発明の他の目的は、前記酵母を製造する方法を提供することにある。

本発明のもう一つの目的は、前記酵母を用いてジンセノサイドを高収率で生産する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

これを具体的に説明すると次の通りである。一方、本出願で開示されたそれぞれの説明及び実施形態は、それぞれの他の説明及び実施形態にも適用することができる。すなわち、本出願で開示された多様な要素の全ての組み合わせが本出願のカテゴリに属する。また、下記記述された具体的な叙述によって、本出願のカテゴリが制限されるとは見られない。

30

【0009】

本発明の目的を達成するための一つの様態として、NADPH生合成関与遺伝子の発現レベルが内在的発現レベルに比べて変化した、ジンセノサイド生産用酵母を提供することである。

【0010】

本発明の目的を達成するためのもう一つの様態として、NADPH生合成関与遺伝子の発現レベルが内在的発現レベルに比べて変化した、ジンセノサイド生産用酵母を含むジンセノサイド生産用組成物を提供することである。

40

【0011】

本発明における用語、「NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)」とは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド構造を共有するNADHと共に多くの酸化還元酵素 (oxidoreductase と dehydrogenase) の反応に電子供与体として参与し、還元力を提供する補酵素の一種である。これら補酵素の酸化物 (NAD^+ と NADP^+) は、生体異化反応で生成されるエネルギーを電子とプロトンの形態で受容する重要な機能を担当し、酸化還元酵素反応に電子受容体として参与していることが知られている。

【0012】

本発明は、NADPH生合成関与遺伝子の発現レベルを変化 (増加または減少) させる

50

ことによってジンセノサイドの生産を増大させる特徴がある。本発明の目的上、前記NADPH生合成関与遺伝子中、ジンセノサイド、具体的には、プロトパナキサジオール（PPD）の大量生産に関与する遺伝子であれば制限なく利用可能である。

【0013】

本発明の実施例では、NADPH生合成経路に関連する遺伝子変異菌株を製作し、野生型酵母細胞及び形質転換された酵母細胞のNADPH生産量を確認した（実施例1～実施例3）。具体的には、Ald2またはGdh1遺伝子が不活性された菌株、Gnd1、Gdh2、Ald6、Zwf1またはStb5遺伝子が過発現された菌株、Ald2不活性及びAld6過発現菌株、またはGdh1不活性及びGdh2過発現菌株など、NADPH生合成に関連する多様な遺伝子を不活性させたり、または過発現させた多様な菌株を製作し、NADPHの生産量が増加するかを確認した。

10

【0014】

NADPH生合成関与遺伝子は、Ald2、Gdh1、Gnd1、Gdh2、Ald6、Stb5、Zwf1またはZms1からなる群から選択された1以上のものであってもよく、より具体的には、Ald2、Ald6、Zwf1及びZms1からなる群から選択された1以上のものであってもよいが、これに限定されない。前記NADPH生合成関与遺伝子は、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個または1個であってもよい。

【0015】

前記遺伝子又は前記遺伝子などによりコードされる酵素の配列は公知となったデータベースから得ることができ、その例としてNCBIのGenBankなどがあり得るが、これに限定されない。

20

【0016】

前記Ald2遺伝子によりコードされる酵素であるALD2はアセトアルデヒドを酢酸に転換させる酵素であり、その過程でNADHを生成することが知られている。また、ALD6はALD2と同一の反応をする酵素（isozyme）であり、同様に、その過程でNADPHを生成することが知られている。また、前記Zms1遺伝子によってコードされる酵素であるZMS1は転写調節因子であり、Ald6の過発現を誘導することが知られている。

【0017】

具体的には、前記Ald2は、配列番号1の遺伝子配列を有することができ、Ald6は配列番号2の遺伝子配列を有することができるが、それぞれALD2、ALD6酵素またはALD2、ALD6酵素をコードする配列は、制限なく含まれる。

30

【0018】

前記Zwf1遺伝子によってコードされる酵素であるZWF1はペントースリン酸経路（PP pathway）の必須の酵素であり、PP pathwayの最初の段階を触媒する。酸化ストレスに関与し、細胞内で五炭糖（pentose）とNADPHの生産を担当することが知られている。

【0019】

具体的には、前記Zwf1は配列番号3の遺伝子配列を有することができ、Zms1は配列番号4の遺伝子配列を有することができるが、それぞれZWF1、ZMS1酵素またはZWF1、ZMS1酵素をコードする配列は、制限なく含まれる。それ以外にもGdh1、Gnd1、Gdh2、及びStb5は、それぞれ配列番号31、配列番号32、配列番号33及び配列番号34の遺伝子配列を有することができるが、それぞれGDH1、GND1、GDH2、及びSTB5酵素をコードする配列は、制限なく含まれる。

40

【0020】

本発明の目的上、NADPH生合成を増加させるのに関与し、ジンセノサイドまたはプロトパナキサジオール（PPD）系ジンセノサイドを増加させる遺伝子であれば制限なく適用可能である。

【0021】

50

また、本発明において、前記遺伝子は、記載された配列番号だけではなく、前記配列と80%以上、具体的には90%以上、さらに具体的には95%以上、より一層具体的には、99%以上の相同性を示す遺伝子を含むことができる。また、前記配列と相同性を示す塩基配列であり、実質的に前記酵素と同一または相応する効能を示す酵素をコードする遺伝子配列であれば制限なく含まれる。また、このような相同性を有する塩基配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換、または付加された塩基配列も、本発明の範囲内に含まれることは自明である。

【0022】

前記における用語「相同性」とは、与えられた塩基配列と一致する程度を意味し、パーセンテージで表示することができる。本明細書において、与えられた塩基配列と同一または類似の活性を有するその相同性配列が「%相同性」と表示される。例えば、スコア (score)、同一性 (identity) 及び類似度 (similarity) などの媒介パラメータ (parameter) を計算する標準ソフトウェア、具体的には、BLAST 2.0 を利用したり、定義された厳格な条件の下でサザン混成化実験によって配列を比較することにより確認することができ、定義される適切な混成化条件は、当該技術の範囲内であり、当業者によく知られている方法 (例えば、J.Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (非特許文献2) ; F.M.Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (非特許文献3)) で決定されてもよい。

10

20

【0023】

本発明の酵母は、NADPH 生合成関連タンパク質の発現レベルが内在的発現レベルに比べて変化したことを特徴とする。

【0024】

本発明における「内在性発現レベル」とは、微生物が天然の状態又は当該タンパク質の発現レベルを改変する前の親菌株において発現する mRNA 又はタンパク質の発現レベルを意味する。これは、本質的に菌株などの細胞及び組織などにおいて正常な状況又は特定タンパク質の発現を調節する前の状況で与えられた mRNA 又はタンパク質を生産する程度である。内在的発現レベルは、菌株の種類、細胞のタイプ及び組織間で比較されてもよく、または一部の刺激により誘発された発現レベルと比較されてもよい。具体的には、NADPH 生合成関連タンパク質の発現を調節していない微生物において発現する mRNA 又はタンパク質の発現レベルであってもよい。

30

【0025】

前記における用語における「変化」とは、減少または増加の両方を含む意味で使うことができ、本発明の目的上、特定の遺伝子を不活性させて発現を減少させるか、特定の遺伝子を過発現させて発現を増加させることをいずれも含む。すなわち、「減少」は「発現レベルが内在的発現レベルに比べて減少」という意味で使うことができ、「増加」は「発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加」という意味で使うことができる。

【0026】

具体的には、「発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加」とは、当該ポリペプチドを暗号化する遺伝子が自然の状態または変形前の状態より多く発現され機能性のある該当ポリペプチドを多く生産することを意味する。具体的には、

40

- 1) 前記タンパク質を暗号化するポリヌクレオチドのコピー数の増加、
- 2) 前記ポリヌクレオチドの発現が増加するように発現調節配列の変形、
- 3) 前記タンパク質の活性が強化するように、染色体上のポリヌクレオチド配列の変形、または
- 4) その組み合わせにより強化されるように変形する方法などにより行うことができるが、これらに限定されない。

【0027】

前記1) ポリヌクレオチドのコピー数の増加は、特にこれに限定されないが、ベクター

50

に作動可能に連結された形態で実行されてもよく、宿主細胞内の染色体内に挿入されることによって実行されてもよい。具体的には、本発明の酵素を暗号化するポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主と無関係に複製されて機能することができるベクターが宿主細胞内に導入されることによって実行されてもよく、前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主細胞内の染色体内に前記ポリヌクレオチドを挿入することができるベクターが宿主細胞内に導入されることにより、前記宿主細胞の染色体内の前記ポリヌクレオチドのコピー数を増加させる方法で行ってもよい。前記導入は、公知となった形質転換方法を当業者が適宜選択して行うことができ、宿主細胞内で前記導入されたポリヌクレオチドが発現されることにより、酵素が生成され、その活性が増加されてもよい。

【0028】

次に、2) ポリヌクレオチドが発現が増加するように発現調節配列の変形は、特にこれに限定されないが、前記発現調節配列の活性をさらに強化するように核酸配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換またはこれらの組み合わせで配列上の変異を誘導して行ってもよく、さらに強い活性を有する核酸配列で交換することによって行われてもよい。前記発現調節配列は、特にこれに限定されないが、プロモーター、オペレーター配列、リボソーム結合部位をコードする配列、転写及び解読の終結を調節する配列などを含むことができる。

【0029】

併せて、3) 染色体上のポリヌクレオチド配列の変形は、特にこれに限定されないが、前記ポリヌクレオチド配列の活性をさらに強化するように核酸配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換、またはこれらの組み合わせで発現調節配列上の変異を誘導して行ってもよく、さらに強い活性を有するように改良されたポリヌクレオチド配列で交換することによって行われてもよい。

【0030】

最後に、4) 前記1)～3)の組み合わせによって強化されるように変形する方法は、前記酵素を暗号化するポリヌクレオチドのコピー数の増加、その発現が増加するように発現調節配列の変形、染色体上の前記ポリヌクレオチド配列の変形及び前記酵素の活性を示す外来ポリヌクレオチドまたはそのコドン最適化された変異型ポリヌクレオチドの変形中、1以上の方法を共に適用して実行することができる。

【0031】

本発明で使用された用語「ベクター」とは、適切な宿主内で目的タンパク質を発現させることができるように、適切な調節配列に作動可能に連結された前記目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA製造物を意味する。前記調節配列は、転写を開始することができるプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び解読の終結を調節する配列を含むことができる。ベクターは、適切な宿主細胞内に形質転換された後、宿主ゲノムとは無関係に複製または機能することができ、ゲノムそのものに統合することができる。

【0032】

本発明で使用されるベクターは、宿主細胞内で複製可能なものであれば特に限定されず、当業界において公知となった任意のベクターを利用することができる。通常使用されるベクターの例としては、天然の状態または組換えされた状態のプラスミドとして前記複製開始点は、酵母自己複製配列 (autonomous replication sequence、ARS) を含んでもよい。前記酵母自己複製配列は、酵母動原体配列 (centrometric sequence、CEN) によって安定化される。前記プロモーターは、CYCプロモーター、TEFプロモーター、GPDプロモーター、PGKプロモーター、及びADHプロモーターなどからなる群から選択されたものであってもよい。前記ターミネーターはPGK1、CYC1、及びGAL1などからなる群から選択されてもよい。前記ベクターは、選別マーカーをさらに含むことができる。

【0033】

本出願で使用可能なベクターは、特に制限されるものではなく、公知となった発現ベクターを使用することができる。また、細胞内の染色体挿入用ベクターを通じて染色体内に目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することができる。前記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当業界において公知となった任意の方法、例えば、相同組換えによって行うことができるが、これに限定されない。前記染色体挿入有無を確認するための選別マーカー (selection marker) をさらに含むことができる。選別マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選別、すなわち、目的核酸分子の挿入有無を確認するためのものであり、薬剤耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を与えるマーカーが使用されてもよい。選択剤 (selective agent) が処理された環境では、選別マーカーを発現する細胞のみが生存したり、または他の表現形質を示すので、形質転換された細胞を選別することができる。

10

【0034】

本発明における「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に導入して宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現させることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内で発現さえできれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、染色体外に位置するかに関係なく、それら全てを含むことができる。また、前記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNAやRNAを含む。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現することができるものであれば、どのような形態で導入されても構わない。例えば、前記ポリヌクレオチドは、自体で発現されるのに必要なすべての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入することができる。前記発現カセットは、通常、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター (promoter)、転写終結シグナル、リボソーム結合部位及び翻訳終結シグナルを含むことができる。前記発現カセットは、自己複製可能な発現ベクター形態であってもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞において発現に必要な配列と作動可能に連結されたものであってもよいが、これに限定されるものではない。前記形質転換する方法は、核酸を細胞内に導入する如何なる方法も含まれ、宿主細胞に応じて当分野において公知となったように、適切な標準的な技術を選択して実行することができる。例えば、電気穿孔法 (electroporation)、リン酸カルシウム (CaPO_4) 沈殿、塩化カルシウム (CaCl_2) 沈殿、微細注入法 (microinjection)、ポリエチレングリコール (PEG) 法、DEAE-デキストラン法、カチオンリボソーム法、及び酢酸リチウム-DMSO法などがあるが、これらに限定されない。

20

30

【0035】

また、前記における用語「作動可能に連結された」とは、本出願の目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介するようにするプロモーター配列と、前記ポリヌクレオチド配列が機能的に連結されていることを意味する。動作可能な連結は、当業界において公知となった遺伝子組換え技術を用いて製造することができ、部位特異的DNA切断及び連結は、当業界の切断及び連結酵素などを使用して製作することができるが、これに限定されない。

40

【0036】

本出願における用語「発現レベルが内在的発現レベルに比べて減少」とは、特定の遺伝子を不活性させることであり、具体的には、「不活性化」とは、本来微生物が有する酵素タンパク質の内在的活性または変換前の活性に比べて、その活性が弱化する場合、全く発現されていない場合、または発現されても、その活性がない場合を意味する。また、本発明において、前記不活性化は、減少、欠失、または弱化を全て含む意味で使用することができる。

【0037】

具体的には、前記不活性化は、酵素をコードするポリヌクレオチドの変異などにより酵

50

素自体の活性が本来の微生物が有している酵素の活性に比べて弱化したり、除去された場合と、それをコードする遺伝子の発現阻害または翻訳 (translation) 阻害などにより細胞内で全体的な酵素活性の程度が、天然型微生物に比べて低いか、または除去された場合、前記遺伝子の一部または全体が欠失された場合、及びこれらの組み合わせも含む概念であり、これに限定されない。

【0038】

このような酵素活性の不活性化は、当該分野においてよく知られている多様な方法の適用により達成することができる。前記方法の例として、1) 前記酵素の活性が除去された場合を含め、前記酵素の活性が弱化するように突然変異された遺伝子であり、染色体上の前記酵素をコードする遺伝子を代替する方法；2) 前記酵素をコードする染色体上の遺伝子の発現調節配列を変形する方法；3) 前記酵素をコードする遺伝子の発現調節配列を活性が弱いか、存在しない配列に交換する方法；4) 前記酵素をコードする染色体上の遺伝子の全体または一部を欠失させる方法；5) 前記染色体上の遺伝子の転写体に相補的に結合して前記mRNAから酵素への翻訳を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスRNA）を導入する方法；6) 前記酵素をコードする遺伝子のSD配列の前段にSD配列と相補的な配列を人為的に付加して2次構造物を形成させてリボソーム (ribosome) の付着が不可能にする作り方または7) 該当配列のORF (open reading frame) の3'末端に逆転写されるようにプロモーターを付加するRTE (Reverse transcription engineering) 方法などがあり、これらの組み合わせでも達成することができるが、これに、特に制限されるものではない。

10

20

【0039】

前記染色体上の遺伝子配列を変形する方法は、前記酵素の活性をさらに弱化するように遺伝子配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換、またはこれらの組み合わせで配列上の変異を誘導して行ってもよく、さらに弱い活性を有するように改良された遺伝子配列または活性がないように改良された遺伝子配列で交換することにより行ってもよいが、これに限定されるものではない。

【0040】

前記発現調節配列を変形する方法は、前記発現調節配列の活性をさらに弱化するように核酸配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換、またはこれらの組み合わせにより発現調節配列上の変異を誘導して行ってもよく、さらに弱い活性を有する核酸配列で交換することにより行ってもよい。前記発現調節配列には、プロモーター、オペレーター配列、リボソーム結合部位をコードする配列、及び転写と解読の終結を調節する配列を含むが、これに限定されるものではない。

30

【0041】

また、酵素をコードするポリヌクレオチドの一部または全体を欠失する方法は、細胞内の染色体挿入用ベクターを通じて染色体内の内在的目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、一部の核酸配列が欠失したポリヌクレオチドまたはマーカー遺伝子で交換することにより行うことができる。このようなポリヌクレオチドの一部または全体を欠失させる方法の一例として、相同組換えによりポリヌクレオチドを欠失させる方法を使用することができるが、これに限定されない。

40

【0042】

前記ポリヌクレオチドは、機能をすることができるポリヌクレオチド集合体である場合、遺伝子として記載されてもよい。本出願においてポリヌクレオチドと遺伝子は混用されてもよい。

【0043】

前記における「一部」とは、ポリヌクレオチドの種類によって異なるが、具体的には1～300個、より具体的には1～100個、より一層具体的には1～50個であってもよいが、特にこれらに限定されるものではない。

【0044】

50

本発明の一実施例では、NADPH濃度が対照群に比べて増加された菌株を選別し、前記菌株からNADPH生合成経路に影響を与える遺伝子がPPD酵母細胞の成長及びPPDの生産にも影響を与えるかを確認するために、PPD酵母細胞にAld2不活性及びAld6過発現された菌株（PPD、△ald2::ald6）を作製した（実施例4）。また、前記菌株に、さらにZwf1が不活性化された菌株（PPD、△ald2::ald6、△zwf1）及びZms1が過発現された菌株（PPD△ald2::ald6、p416_GPD_Zms1）を作製した。

【0045】

その結果、製作された形質転換酵母は、対照群（control）に比べて優れたプロトパナキサジオール（PPD）を生産することを確認した。具体的には、Ald2不活性及びAld6過発現菌株は、対照群に比べて約4倍程度のプロトパナキサジオールを生産し、Ald2不活性及びAld6過発現菌株にNADPH生合成経路で影響を与える遺伝子であるZwf1をさらに不活性させるか、Zms1をさらに過発現させた場合にプロトパナキサジオールの生産量が著しく増加することを確認した（表5、図7及び図8）。

【0046】

これは、NADPH生合成関与遺伝子（Ald2、Ald6、Zwf1及びZms1）の発現レベルが内在的発現レベルによって変化した場合、ジンセノサイド生合成中間体産物であるプロトパナキサジオールの生産量が増加するところ、これは最終的にジンセノサイド生産能が向上することを示唆することである。

【0047】

本発明における用語、「ジンセノサイド生産用酵母」とは、自然にジンセノサイド生産能を有している酵母またはジンセノサイドの生産能のない親菌株にジンセノサイドの生産能が付与された酵母を意味する。

【0048】

具体的には、本発明においてジンセノサイドを生産する微生物は、天然型微生物自体または外部ジンセノサイド生合成に関連する遺伝子を導入してジンセノサイド生産能を有するようになった微生物または外部NADPH生産メカニズムと関連する遺伝子が挿入されるか、内在的遺伝子の活性を強化したり、不活性させてジンセノサイド生産能が増加した微生物を意味することができる。

【0049】

より具体的には、本願の前記酵母はサッカロミセス（*Saccharomyces*）、ジゴサッカロマイセス（*Zygosaccharomyces*）、ピキア（*Pichia*）、クルイベロミセス（*Kluyveromyces*）、カンジタ（*Candida*）、シゾサッカロミセス（*Shizosaccharomyces*）、イサケンキア（*Issachenkia*）、ヤロウイア（*Yarrowia*）またはハンゼヌラ（*Hansenula*）に属する菌株であってもよい。

【0050】

サッカロミセスに属する菌株は、例えば、サッカロミセス・セレビスエ（*S. cerevisiae*）、サッカロミセス・バヤヌス（*S. bayanus*）、サッカロミセス・ブラウディ（*S. boulardii*）、サッカロミセス・ブルデリ（*S. bulderi*）、サッカロミセス・カリオカヌス（*S. cariocanus*）、サッカロミセス・カリオカス（*S. cariocus*）、サッカロミセス・シュバリエ（*S. chevalieri*）、サッカロミセス・ダイレネンシス（*S. dairenensis*）、サッカロミセス・エリプソイデウス（*S. ellipsoideus*）、サッカロミセス・ユーバヤヌス（*S. eubayanus*）、サッカロミセス・エクシグウス（*S. exiguus*）、サッカロミセス・フロレンティヌス（*S. florentinus*）、サッカロミセス・クルイベリ（*S. kluyveri*）、サッカロミセス・マティニアエ（*S. martiniae*）、サッカロミセス・モナセンシス（*S. monacensis*）、サッカロミセス・ノルベンシス（*S. norbensis*）、サッカロミセス・パラドキサス（*S. paradoxus*）、サッカロミセス・パストリアヌス（*S. pastori*

10

20

30

40

50

anus)、サッカロミセス・スペンセロルム (*S. spencerorum*)、サッカロミセス・トゥリセンシス (*S. turicensis*)、サッカロミセス・ユニスポラス (*S. unisporus*)、サッカロミセス・ウバルム (*S. uvarum*)、またはサッカロミセス・ゾナトゥス (*S. zonatus*) であってもよい。より具体的には、前記酵母はサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*; *S. cerevisiae*) であってもよいが、これに限定されない。

【0051】

前記ジンセノサイドを生産する微生物は、特にこれに限定されないが、Ald2の発現レベルは、内在的発現レベルに比べて減少し、Ald6発現レベルは、内在的発現レベルに比べて増加したものであってもよく、さらにZwf1の発現レベルが内在的発現レベルに比べて減少したものであってもよい。また、さらにZms1の発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加したものであってもよいが、これらに限定されない。

【0052】

また、前記ジンセノサイドを生産する酵母は、特にこれに限定されないが、ジンセノサイド生合成に不可欠な前駆体であるスクアレンの生合成の増大のためのメバロン酸代謝経路を強化するためにHMG-CoAをメバロン酸に転換するHMG-CoA還元酵素 (HMG-CoA reductase; tHMG1) 及びスクアレンを2, 3-オキシドスクアレンに転換する人参由来スクアレンエポキシダーゼ (*Panax ginseng*, squalene epoxidase; PgSE) の活性を内在的活性に比べて増加させるように変形し、ジンセノサイド生合成代謝経路を導入するために2, 3-オキシドスクアレンをダンマレンジオール-IIに転換する人参由来ダンマレンジオール-II合成酵素 (*Panax ginseng*, dammarenediol-II synthase; PgDDS)、ダンマレンジオール-IIをプロトパナキサジオールに転換する人参由来シトクロムP450 CYP716A47 (*Panax ginseng* cytochrome P450 CYP716A47; PgPPDS) 及び人参由来NADPH-シトクロムP450還元酵素 (*Panax ginseng* NADPH-cytochrome P450 reductase; PgCPR) の活性を導入するように変形されたものであってもよい。

【0053】

本発明における用語「ジンセノサイド (ginsenoside)」とは、高麗人参由来のダンマラン (dammaranane) 系サポニンまたはその誘導体を意味するが、他の植物で発見されるサポニンとは異なる特異な化学構造を有している。具体的には、ジンセノサイドは、アグリコン (aglycone) の構造に応じてプロトパナキサジオール系 (Protopanaxadiol-type、PPDタイプ) ジンセノサイド、プロトパナキサトリオール系 (Protopanaxatriol-type、PPTタイプ) ジンセノサイド及びオレアノール酸系 (Oleanolic acidタイプ) ジンセノサイドの3種類に分類される。これら3つのグループは、さらに化合物構造中の環の3位の炭素、6位の炭素及び20位の炭素位置にグリコシド結合 (glycosidic bond) により付着する糖部分 (アグリコン) (sugar moieties (aglycones)) の位置及び数によって分類される。オレアノール酸系ジンセノサイドの基本骨格は、5環状であり、これには唯一ジンセノサイドRoがあり、そのアグリコンはオレアノール酸 (oleanolic acid) である。現在、40種類以上のジンセノサイドが分離され、これらのほとんどはPPDタイプのジンセノサイドである。PPDタイプのジンセノサイドはRb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、ギペノシドXVII (Gypenoside XVII)、化合物O (Compound O)、化合物Mc1 (Compound Mc1)、F2、化合物Y (Compound Y)、化合物Mc (Compound Mc)、Rg3、Rh2、CKが含まれる。PPTタイプのジンセノサイドにはRe、Rg1、Rf、Rg2、Rh1などが含まれる。

【0054】

前記ジンセノサイドは、特にこれに限定されないが、一例としてPPD (protop

anaxadiol)系のジンセノサイド、PPT (protopanaxatriol)系のジンセノサイドなどであってよく、他の例としてPPD、PPT、Ra3、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Re、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2、Rs1、C-O、C-Y、C-Mc1、C-Mc、F1、F2、コンパウンドK (compound K)、ギペノシドXVII (Gypenoside XVII)、ギペノシドLXXV (Gypenoside LXXV)、Rs2、PPD、Re、Rg1、Rf、F1、Rg2、PPT及びRh1などを単独でまたは混合物として使用することができ、他の例としては、PPD、PPT、コンパウンドK (compound K)、Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Re、F1、F2、Rg1、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2などを単独でまたは混合物として使用することができる。具体的には、プロトパナキサジオール系ジンセノサイドであってもよい。

10

【0055】

また、本発明の酵母は、NADPHの生産能が内在的レベルに比べて増加したものであってもよい。

【0056】

本発明のもう一つの具体例は、前記酵母は、さらにジンセノサイド合成に関与する遺伝子の発現が内在的発現レベルに比べて増加したものである、組換え酵母を提供する。

【0057】

本発明のもう一つの具体例は、前記遺伝子は、PgDDS (Panax ginseng, dammarenediol-II synthase), PgPPDS (Panax ginseng cytochrome P450 CYP716A47), PgCPR (Panax ginseng, NADPH-cytochrome P450 reductase)、tHMG1 (S. cerevisiae HMG-CoA reductase) 及びPgSE (Panax ginseng, squalene epoxidase) で構成された群から選択された一つ以上の遺伝子である、酵母を提供する。

20

【0058】

前記ジンセノサイド生合成代謝経路に関する酵素には、それぞれ配列番号5～9のアミノ酸配列、又はそれと70%以上、より具体的には80%以上、さらに具体的には90%以上の相同性を有するアミノ酸配列が含まれてもよい。

30

【0059】

本発明の他の態様は、ジンセノサイド生産酵母菌株にNADPH生合成関与遺伝子の発現レベルを、内在的発現レベルに比べて変化させる段階を含む、ジンセノサイド生産能が向上した酵母の製造方法を提供する。

【0060】

本発明の一つの具体例は、前記NADPH生合成関与遺伝子としてAld2、Ald6、Zwf1及びZms1からなる群から選択された1以上の発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加させる、酵母の製造方法を提供する。

【0061】

前記ジンセノサイド生産酵母菌株、NADPH生合成関与遺伝子、Ald2、Ald6、Zwf1、Zms1及び内在的発現レベルなどについては前述した通りである。

40

【0062】

本発明のもう一つの具体例は、前記ジンセノサイド生産酵母菌株は、PgDDS (Panax ginseng, dammarenediol-II synthase)、PgPPDS (Panax ginseng cytochrome P450 CYP716A47)、PgCPR (Panax ginseng, NADPH-cytochrome P450 reductase)、tHMG1 (S. cerevisiae HMG-CoA reductase) 及びPgSE (Panax ginseng, squalene epoxidase) で構成された群から選択された1以上の遺伝子の発現レベルが内在的発現レベルに比べて増加したものであってもよい。

50

【0063】

本発明のもう一つの態様は、前記酵母を培地で培養する段階；及び前記酵母または培地からジンセノサイドを得る段階を含む、ジンセノサイド生産方法を提供することである。

【0064】

前記方法において、前記酵母を培養する段階は、特にこれに限定されないが、公知となった回分式培養方法、連続式培養方法、流加式培養方法などにより行われる。このとき、培養条件は、特にこれに限定されないが、塩基性化合物（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたはアンモニア）または酸性化合物（例えば、リン酸または硫酸）を使用して適正pH（例えば、pH 5～9、具体的にはpH 6～8、最も具体的には、pH 6.8）を調節することができ、酸素または酸素含有ガス混合物を培養物に導入させて好気性条件を維持することができる。培養温度は20～45℃、具体的には25～40℃を維持することができ、約10～160時間培養することができる。前記培養によって生産されたジンセノサイドは培地中に分泌されたり、細胞内に残留してもよい。

10

【0065】

併せて、使用される培養用培地は、炭素供給源としては、糖及び炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、モラセス、澱粉及びセルロース）、油脂及び脂肪（例えば、大豆油、ヒマワリの種油、ピーナッツ油及びココナッツ油）、脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸）、アルコール（例えば、グリセロール及びエタノール）及び有機酸（例えば、酢酸）などを個別に使用したり、または混合して使用することができるが、これに限定されない。窒素供給源としては、窒素含有有機化合物（例えば、ペプトン、酵母抽出液、肉汁、麦芽抽出液、トウモロコシ浸漬液、大豆粕分及び尿素）、または無機化合物（例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム）などを個別に使用したり、または混合して使用することができるが、これに限定されない。リン供給源としてリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、これに相応するナトリウム含有塩などを個別に使用したり、または混合して使用することができるが、これに限定されず、その他の金属塩（例えば、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄）、アミノ酸及びビタミンのような必須の成長促進物質を含むことができる。

20

【0066】

前記方法は、生産されたジンセノサイドを回収する段階をさらに含むことができる。この回収段階は、培養された細胞またはその上澄液から回収する段階であってもよく、回収に適切なプロセスを当業者が選択することができる。

30

【0067】

本発明の前記培養段階で生産されたジンセノサイドを回収する方法は、培養方法、例えば、回分式、連続式または流加式培養方法などによって、当該分野において公知となった適切な方法を用いて培養液から目的とする生産物を収集することができる。例えば、遠心分離、ろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化及びHPLCなどが使用されてもよく、当該分野において公知となった適切な方法を用いて培地または微生物から、目的とするジンセノサイドを回収することができる。前記ジンセノサイドを回収する方法は、精製段階をさらに含むことができる。

40

【発明の効果】

【0068】

本発明のジンセノサイド生産酵母のNADPH生合成関与遺伝子の発現が変化した酵母は、既存のジンセノサイド生産能を有する酵母よりジンセノサイド生合成の中間産物であるプロトパナキサジオールの生産量を増加させる効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】NADPH生合成経路の改良を通じたジンセノサイド生産増大について簡単に説明した図である。

【図2】ジンセノサイド生合成代謝経路に関する図である。

50

【図 3】Ald2 または Gdh1 遺伝子を不活性させるために製作されたベクターである pUC57-URA3Myc のベクターマップを示す図である。

【図 4】Gnd1、Gdh2、Ald6、Zwf1 または Stb5 遺伝子を過発現するために製作されたベクターである p416_GPD のベクターマップを示す図である。

【図 5】Ald2 不活性及び Ald6 過発現させ、Gdh1 不活性及び Gdh2 過発現させるために製作されたベクターである pUC57GPD-URA3Myc のベクターマップを示す図である。

【図 6】野生型酵母細胞及び形質転換された酵母細胞の NADPH を示す図である。具体的には、C は対照群菌株として野生型 *S. cerevisiae* CEN. PK2-1D を表し；-Ald2 は CEN. PK2-1D, ΔAld2；-Gdh1 は CEN. PK2-1D, ΔGdh1；+GND1 は CEN. PK2-1D, p416_GPD_GND1；+Gdh2 は CEN. PK2-1D, p416_GPD_Gdh2；+Ald6 は CEN. PK2-1D, p416_GPD_Ald6；+Zwf1 は CEN. PK2-1D, p416_GPD_Zwf1；+STB5 は CEN. PK2-1D, p416_GPD_STB5；-Ald2/+Ald6 は CEN. PK2-1D, Δald2::ald6 及び -Gdh1/+Gdh2 は CEN. PK2-1D, ΔGdh1::Gdh2 をそれぞれ示す。

【図 7】形質転換された酵母細胞内の PPD の生産量を示すグラフである。具体的には、Control は、PPD 菌株 (*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D Δtrp1::PGPD1 tHMG1+PGPD1 PgSE Δleu2::PGPD1 PgDDS +PGPD1 PgPPDS+PGPD1 PgCPR) を示し；+Zwf1 は PPD, p416_GPD_Zwf1；+STB5 は PPD, p416_GPD_Stb5；-Ald2/+Ald6 は PPD, Δald2::ald6 そして、-Gdh1/+Gdh2 は PPD, ΔGdh1::Gdh2 を示す。

【図 8】形質転換された酵母細胞内の PPD の生産量を相対値で表したグラフである。具体的には、Control (対照群) は PPD 菌株 (*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D Δtrp1::PGPD1 tHMG1+PGPD1 PgSE Δleu2::PGPD1 PgDDS +PGPD1 PgPPDS+PGPD1 PgCPR) を示し；+Zms1 は PPD, p416_GPD_Zms1；-Ald2/+Ald6 は PPD, Δald2::ald6；-Ald2/+Ald6/-Zwf1 は PPD, Δald2::ald6, ΔZwf1 そして、-Ald2/+Ald6/+Zms1 は PPD, Δald2::ald6, p416_GPD_Zms1 を示す。値は、対照群菌株の 72 時間におけるプロトパナキサジオール生産濃度を 1 と置いたとき、製作された菌株で生産されたプロトパナキサジオールの fold 変化値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0070】

以下、本発明を実施例及び実験例を通じてより詳しく説明する。しかし、これらの実施例及び実験例は本発明を例示的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例及び実験例に限定されるものではない。

【0071】

実施例 1：PPD 酵母変異株の作製

本特許の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*; *S. cerevisiae*) CEN. PK2-1D 野生型菌株 [(MATα ura3-52; trp1-289; leu2-3, 112; his3Δ1; MAL2-8; SUC2)、EUROSCARF accession number: 30000B] にジンセノサイド生合成代謝経路の導入及びジンセノサイド生合成に不可欠な前駆体であるスクアレネ (squalene) の生合成を増大させるためのメバロン酸代謝経路の強化によるプロトパナキサジオール (protopanaxadiol; PPD) を生産する酵母菌株を製作し、前記酵母菌株を PPD 酵母変異株と命名した。

。

【0072】

PPD菌株の遺伝子型は、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D Δ trp1::P_{GPD1} tHMG1+P_{GPD1} PgSE+ Δ leu2::P_{GPD1} PgDDS+P_{GPD1} PgPPDS+P_{GPD1} PgCPRである。ジンセノサイド生合成酵素である PgDDS (*Panax ginseng*, dammarenediol-11 synthase, 配列番号5)、PgPPDS (*Panax ginseng* cytochrome P450 CYP716A47, 配列番号6)及び PgCPR (*Panax ginseng*, NADPH-cytochrome P450 reductase, 配列番号7)とメバロン酸代謝経路を強化させるために代謝経路の酵素である tHMG1 (*S. cerevisiae* HMG-CoA reductase, 配列番号8)及び PgSE (*Panax ginseng*, squalene epoxidase, 配列番号9)をコードする遺伝子を、それぞれ高発現の常時性プロモーターであるGPD1 (TDH3) プロモーターから転写されて発現されるようにした。

10

【0073】

実施例2：NADPH生合成経路に関連する変異菌株の製作

2-1：Ald2またはGdh1不活性菌株の製作

PPD酵母変異株において、NADPH生合成または消費経路に関連する遺伝子Ald2またはGdh1の不活性が、前記酵母変異株の成長及びPPDの生産能に関与するかどうかを確認するために、前記Ald2またはGdh1遺伝子が不活性された酵母変異株を作製した。

20

【0074】

ゲノム上のAld2遺伝子を不活性させるために、既存に製作されたpUC57-URA3Mycベクター (Ju Young Lee et al, (2015) Biotechnol. Bioeng., 112, 751-758. (非特許文献4))を鋳型とし (図3及び配列番号18)、Del__Ald2__F及びDel__Ald2__Rのゲノム上のAld2部位の相同組換え配列をプライマーとして使用したPCRによってAld2を不活性するカセットを得た。製作された不活性カセットを前記野生型酵母細胞 (*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D)に形質導入した。形質導入は、一般的な熱衝撃 (heat shock transformation)によって実行され、形質導入後、uracil dropout培地で細胞を培養してゲノム上のAld2がURA3を含む前記カセットで置換されるようにした。

30

【0075】

その結果、得られた菌株に対してAld2不活性を確認するために、前記細胞のゲノムを鋳型とし、Ald2__conf__FとAld2__conf__Rプライマーセットを使用したPCRによってAld2不活性を確認し、CEN. PK2-1D、 Δ Ald2菌株と命名した。これと同様の方法でDel__Gdh1__FとDel__Gdh1__Rプライマーセットを使用してGdh1不活性カセットを製作し、Gdh1__conf__FとGdh1__conf__Rプライマーセットを使用してGdh1不活性を確認し、CEN. PK2-1D、 Δ Gdh1菌株と命名した。前記で使用したプライマーは、下記表1に示した。

40

【0076】

【表 1】

名称	プライマー配列(5' →3')	配列番号
Del_Ald2_F	TTACATTGCATGTCCATCAAAAACAATCGTGAAAATAAGCCAAAAGAAAAC CAGTCACGACGTTGTAAAA	10
Del_Ald2_R	CTGCAACATCCCACTCCTTCTTTGCAGTTTCTTTAAACTTTTCAACAAACA GGTTTCCCGACTGGAAAGC	11
Ald2_conf_F	TTACATTGCATGTCCATCAAAAACA	12
Ald2_conf_R	CTGCAACATCCCACTCCTTC	13
Del_Gdh1_F	ACTATCGCATTATTCTAATATAACAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAGAAC CAGTCACGACGTTGTAAAA	14
Del_Gdh1_R	GACGGCAATAGCTTCTGGAGTGAACCCATGTTGGAACCTTCGGCAATAAA GGTTTCCCGACTGGAAAGC	15
Gdh1_conf_F	CAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAGAA	16
Gdh1_conf_R	GACGGCAATAGCTTCTGGAG	17

10

20

【0077】

2-2: Gnd1, Gdh2, Ald6, ZwflまたはStb5の過発現菌株の作製
Gnd1の過発現のために、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D genomic DNAからGnd1をプライマーセットGnd1_FとGnd1_Rを使用してPCRによって増幅し、増幅産物をEcoRIとXhoIで消化させた後、EcoRIとXhoIで消化されたp416_GPDベクター（図4及び配列番号29）に連結してp416_GPD_Gnd1ベクターを製造した。

30

【0078】

Gdh2の過発現のために、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D genomic DNAからGdh2をプライマーセットGdh2_FとGdh2_Rを使用してPCRによって増幅し、増幅産物をXbaIとSmaIで消化させた後、XbaIとSmaIで消化されたp416_GPDベクターに連結してp416_GPD_Gdh2ベクターを製造した。

【0079】

Ald6の過発現のために、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D genomic DNAからAld6をプライマーセットAld6_FとAld6_Rを使用してPCRによって増幅し、増幅産物をBamHIとXhoIで消化させた後、BamHIとXhoIで消化されたp416_GPDベクターに連結してp416_GPD_Ald6ベクターを製造した。

40

【0080】

Zwflの過発現のために、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D genomic DNAからZwflをプライマーセットZwfl_FとZwfl_Rを使用してPCRによって増幅し、増幅産物をEcoRIとXhoIで消化させた後、EcoRIとXhoIで消化されたp416_GPDベクターに連結してp416_GPD_Zwflベクターを製造した。

【0081】

Stb5の過発現のために、*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D genomic DNAからStb5をプライマーセットStb5_FとStb5_Rを使用

50

してPCRによって増幅し、増幅産物をEcoRIとSalIで消化させた後、EcoRIとSalIで消化されたp416_GPDベクターに連結してp416_GPD_Stb5ベクターを製造した。

【0082】

前記で使用したプライマーは下記表2に示した。

【0083】

【表2】

名称	プライマー配列(5'→3')	配列番号
Gnd1_F	GGAATTCATGTCTGCTGATTTTCGGTTT	19
Gnd1_R	CCGCTCGAGTTAAGCTTGGTATGTAGAGGAAGAA	20
Gdh2_F	GCTCTAGAATGCTTTTTGATAACAAAAATCGCGG	21
Gdh2_R	TCCCCCGGGTCAAGCACTTGCCTCCGCTT	22
Alc6_F	CGGGATCCATGACTAAGCTACACTTTGACACTGC	23
Alc6_R	CCGCTCGAGTTACAACCTAATTCTGACAGCTTTTACTTCAG	24
Zwf1_F	GGAATTCATGAGTGAAGGCCCCGTCAA	25
Zwf1_R	CCGCTCGAGCTAATTATCCTTCGTATCTTCTGGC	26
Stb5_F	GGAATTCATGGATGGTCCCAATTTTGCAC	27
Stb5_R	ACGCGTCGACTCATACAAGTTTATCAACCCAAGAGACG	28

【0084】

Gnd1、Gdh2、Alc6、Zwf1またはStb5遺伝子を過発現するために、前記で製作したp416_GPD_Gnd1、p416_GPD_Gdh2、p416_GPD_Alc6、p416_GPD_Zwf1またはp416_GPD_Stb5ベクターを前記野生型*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D酵母菌株にそれぞれ導入した。導入は、一般的な熱衝撃形質転換(heat shock transformation)によって実行され、uracil drop-out培地で細胞を培養して過発現の対象となる特定の遺伝子とURA3を含むベクターが導入された菌株のみが成長できるようにした。

【0085】

その結果、製造された菌株をそれぞれCEN. PK2-1D+ Gnd1、CEN. PK2-1D+ Gdh2、CEN. PK2-1D+ Alc6、CEN. PK2-1D+ Zwf1、CEN. PK2-1D+ Stb5と命名した。

【0086】

2-3: Alc2 不活性及びAlc6 過発現菌株、Gdh1 不活性及びGdh2 過発現菌株の製作

Alc2 不活性及びAlc6 過発現のために*S. cerevisiae* CEN. PK2-1DゲノムDNAからAlc6をプライマーセットAlc6_FとAlc6_Rを使用(表2)し、PCRによって増幅し、増幅産物をBamHIとXhoIで消化させた後、BamHIとXhoIで消化されたpUC57GPD-URA3Mycベクター(Ju Young Lee et al., (2015) Biotechnol. Bioeng., 112, 751-758. (非特許文献4))に連結して(図5及び配列番号30) pUC57GPD-URA3Myc_Alc6ベクターを製造した。Alc2 不活

性及びAld6過発現のために、前記で作製したpUC57GPD-URA3Myc-Ald6ベクターを鋳型とし、Del-Ald2-F及びDel-Ald2-RのAld2部位の相同組換え配列をプライマーとして使用したPCRによってAld2をAld6で置換するカセットを得た。

【0087】

Gdh1不活性及びGdh2過発現のためにプライマーセットGdh2-FとGdh2-Rを使用（表2）し、実施例2-2と同様の方法でXbaIとSmaIで消化させて連結してpUC57GPD-URA3Myc-Gdh2ベクターを製造した。Gdh1不活性及びGdh2過発現のためにpUC57GPD-URA3Myc-Gdh2ベクターを鋳型とし、Del-Gdh1-F及びDel-Gdh1-RのGdh1部位の相同組換え配列をプライマーとして使用したPCRによってGdh1をGdh2で置換するカセットを得た。

10

【0088】

製作されたカセットを、前記野生型*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D酵母菌株にそれぞれ導入した。導入は、一般的な熱衝撃形質転換（heat shock transformation）によって実行され、形質導入後、uracil dropout培地で細胞を培養してゲノム上のAld2またはGdh1がURA3を含む前記カセットで置換されるようにした。その結果、得られた菌株についてAld6またはGdh2で置換されたことを確認するために、前記細胞のゲノムを鋳型とし、Ald2-conf-FとAld2-conf-RプライマーセットまたはGdh1-conf-FとGdh1-conf-Rプライマーセットを使用したPCRによってAld2がAld6またはGdh1がGdh2で置換されたことを確認した。その結果、製造された菌株をそれぞれCEN. PK2-1D、 Δ ald2::ald6とCEN. PK2-1D、 Δ Gdh1::Gdh2と命名した。

20

【0089】

実施例3：野生型酵母及び形質転換された酵母のNADPH生産量の確認

野生型*S. cerevisiae* CEN. PK2-1D酵母及び前記で作製された形質転換酵母を2%のグルコースを含有する最小培地（minimal uracil dropout media）50mlにOD₆₀₀値が0.5になるように接種し、30℃で250rpmで攪拌しながら24時間好気条件で培養した。

30

【0090】

培養終了時点で、細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート（NADPH）はEnzyChromTM NADP⁺/NADPH assay kit（ECNP-100）を用いて分析した。分析方法は、同封された手続きを実験条件に合わせて変形して行い、これは次の通りである。具体的には、分光計を用いたOD₆₀₀測定値に基づいて、10 OD（ $\sim 8 \times 10^9$ cells）を含む細胞培養液を遠心機で分離した後、上澄み液は捨て、ペレット（pellet）形態の細胞のみを集めた後、集められた細胞を冷PBSバッファーで洗浄した後、NADPH抽出バッファーと混ぜる。60℃で5分間熱を加えた後、20μLのアッセイバッファーと100μLのNADP抽出バッファーを入れる。よく混ざった溶液は遠心機を用いて14000rpmで5分間分離した後、上清液のみを用いて565nmで合わせた分光計で標本値を測定する。Calibration curveに測定値を代入した後、正確なNADPHの濃度値を求める。24時間の培養の結果、細胞内のNADPH濃度は、図8に示した通りである。

40

【0091】

具体的には、図8に示したように、NADPH濃度はZwf1の過発現菌株（CEN. PK2-1D+Zwf1）、STB5の過発現菌株（CEN. PK2-1D+STB5）、Ald2不活性及びAld6過発現菌株（CEN. PK2-1D、 Δ ald2::ald6）、Gdh1不活性及びGdh2過発現菌株（CEN. PK2-1D、 Δ Gdh1::Gdh2）で、細胞内のNADPH濃度が対照群に比べて高くなることを確認した。

【0092】

50

実施例 4：形質転換された変異株の成長及び PPD の生産量の確認

実施例 3 を通じて細胞内の NADPH 濃度が対照群に比べて増加した菌株を選別し、前記菌株から NADPH 合成経路に影響を与える遺伝子が PPD 酵母細胞の成長及び PPD の生産にも影響を与えるかを確認しようとした。

【0093】

4-1：PPD 酵母細胞において Zw f 1 または St b 5 過発現菌株の製作

まず、PPD 酵母細胞において Zw f 1 と St b 5 遺伝子を導入して過発現させ、その過発現が PPD 酵母細胞の成長及び PPD の生産に与える影響を確認しようとした。

【0094】

具体的には、PPD 酵母細胞において Zw f 1 または St b 5 遺伝子過発現のために、前記実施例 1 で製作された p 4 1 6 __GPD__Zw f 1 と p 4 1 6 __GPD__St b 5 ベクターを前記 PPD 酵母菌株にそれぞれ導入した。導入は、一般的な熱衝撃形質転換 (heat shock transformation) によって実行され、uracil dropout 培地で細胞を培養して URA3 を含む p 4 1 6 __GPD__Zw f 1 または p 4 1 6 __GPD__St b 5 ベクターが導入された菌株のみが成長できるようにした。

その結果、製作された菌株は、それぞれ PPD、p 4 1 6 __GPD__Zw f 1 及び PPD、p 4 1 6 __GPD__St b 5 と命名した。

【0095】

4-2：PPD 酵母細胞において Ald 2 不活性及び Ald 6 過発現、Gdh 1 不活性及び Gdh 2 過発現菌株の作製

PPD 酵母細胞において Ald 2 遺伝子を Ald 6 遺伝子で置換し、Ald 2 発現を抑制すると共に、strong GPD promoter の下で Ald 6 を過発現させ、その過発現が PPD 酵母細胞の成長及び PPD の生産に与える影響を確認しようとした。同様な方式で Gdh 1 遺伝子を Gdh 2 遺伝子で置換及び Gdh 2 遺伝子を過発現して PPD 酵母細胞の成長及び PPD の生産に与える影響を確認しようとした。

【0096】

具体的には、PPD 酵母細胞において Ald 2 不活性及び Ald 6 過発現または Gdh 1 不活性及び Gdh 2 過発現のために、前記実施例 1 で作製した pUC57GPD-URA3Myc__Ald 6 と pUC57GPD-URA3Myc__Gdh 2 ベクターを用いて前記と同様の方法で相同組換え用 DNA カセットを得た。製作されたカセットを、前記 PPD 酵母菌株にそれぞれ導入した。導入は、一般的な熱衝撃形質転換 (heat shock transformation) によって実行され、形質導入後、uracil dropout 培地で細胞を培養してゲノム上の Ald 2 または Gdh 1 が URA3 を含む前記カセットで置換されるようにした。その結果、得られた菌株に対して Ald 6 または Gdh 2 で置換されたことを確認するために、前記細胞のゲノムを鋳型とし、Ald 2 __conf__F と Ald 2 __conf__R プライマーセットまたは Gdh 1 __conf__F と Gdh 1 __conf__R プライマーセットを使用した PCR によって Ald 2 が Ald 6 または Gdh 1 が Gdh 2 で置換されたことを確認した。

【0097】

その結果、製造された菌株は、それぞれ PPD、 Δ ald 2::ald 6 及び PPD、 Δ Gdh 1::Gdh 2 と命名した。

【0098】

4-3：PPD 酵母細胞において Zw f 1 不活性菌株の製作

前記実施例 4-2 で製造した菌株に、さらに Zw f 1 遺伝子を不活性して PP pathway を統制し、それに伴う Detoured carbon-flux が PPD 酵母細胞の成長及び PPD の生産に与える影響を確認しようとした。

【0099】

具体的には、Zw f 1 遺伝子を不活性するために、既存に製作された pUC57-URA3Myc ベクター (Ju Young Lee et al., (2015) Bio

10

20

30

40

50

technol. Bioeng., 112, 751-758. (非特許文献4))を鋳型とし、Del_Zwf1_F及びDel_Zwf1_Rのゲノム上のZwf1部位の相同組換え配列をプライマーとして使用したPCRによってZwf1を不活性するカセットを得た。製作された不活性カセットを前記PPD、 $\Delta ald2::ald6$ 酵母菌株に導入した。導入は、一般的な熱衝撃形質転換(heat shock transformation)によって実行され、形質導入後、uracil drop-out培地で細胞を培養してゲノム上のZwf1がURA3を含む前記カセットで置換されるようにした。

【0100】

また、得られた菌株に対してZwf1不活性を確認するために、前記細胞のゲノムを鋳型とし、Zwf1_conf_FとZwf1_conf_Rプライマーセットを使用したPCRによってZwf1不活性を確認した。

【0101】

その結果、製造された菌株は、PPD、 $\Delta ald2::ald6$ 、 $\Delta Zwf1$ と命名した。前記で使用したプライマーは下記表3に示す。

【0102】

【表3】

名称	プライマー配列(5'→3')	配列番号
Del_Zwf1_F	TATAGACAGAAAGAGTAAATCCAATAGAATAGAAAACACATAAGGCAAGC CAGTCACGACGTTGTAAAA	34
Del_Zwf1_R	CCTCCCAACGCTCGTTTTCGATGTTGAAAGTCATTGCTGCAAAAGTGACAA GGTTTCCCGACTGGAAAGC	35
Zwf1_conf_F	AGAATAGAAAACACATAAGGCAAG	36
Zwf1_conf_R	CCTCCCAACGCTCGTTTTCG	37

【0103】

4-4: PPD酵母細胞においてZms1の過発現のためのベクターの製作

また、前記実施例4-2で製造した菌株にZms1遺伝子を過発現させ、その過発現がPPD酵母細胞の成長及びPPDの生産に与える影響を確認しようとした。

【0104】

具体的には、Zms1の過発現のためにS. cerevisiae CEN. PK2-1D genomic DNAからZms1をプライマーセットZms1_FとZms1_Rを使用してPCRによって増幅し、増幅産物をXmaIとXhoIで消化させた後、XmaIとXhoIで消化されたp416_GPDベクターに連結してp416_GPD_Zms1ベクターを製造した。前記で使用したプライマーは下記表4に示した。

【0105】

【表4】

名称	プライマー配列(5'→3')	配列番号
Zms1_F	TAGTGGATCCCCGGGATGTTTGTGAACGGTAATCAATCTAATTTC	38
Zms1_R	AATTACATGACTCGAGTTATATTCTAGTGTTCCTTTTTTCGTAAC	39

【0106】

Zms1 遺伝子を過発現するために、前記で作製したp416_GPD_Zms1ベクターを前記PPD酵母菌株とPPD、 $\Delta ald2::ald6$ にそれぞれ導入した。

【0107】

導入は、一般的な熱衝撃形質転換 (heat shock transformation) によって実行され、uracil drop-out 培地で細胞を培養してURA 3を含むp416_GPD_Zms1ベクターが導入された菌株のみが成長できるようにした。

【0108】

その結果、製造された菌株は、PPD、p416_GPD_Zms1及びPPD、Δald2::ald6、p416_GPD_Zms1と命名した。

【0109】

実施例5：形質転換された酵母変異株の成長及びPPDの生産量の確認

前記で作製された形質転換酵母変異株を2%のグルコースを含有した最小培地 (minimal URA drop-out media) 50mlにOD₆₀₀値が0.5になるように接種し、30℃で250rpmで攪拌しながら144時間好気条件で培養した。培養中の細胞の成長は、分光計 (spectrophotometer) を用いてOD₆₀₀値を測定した。培養中の細胞内代謝産物 (squalene、2,3-oxidosqualene、Protopanaxadiol) はHPLC (High performance liquid chromatography) を用いて分析した。

【0110】

その結果、細胞の成長、すなわち、培養物のOD₆₀₀値及び細胞内の各代謝産物の濃度は、下記表5、図7及び図8に示した通りである。

【0111】

【表5】

前記製作された形質転換酵母変異株の培養による代謝産物の濃度

	OD ₆₀₀		Protopanaxadiol (mg/L)	
	72h	144h	72 h	144 h
Control	26.75	24.62	0	1.52
+Zwf1	26.03	22.91	0.03	0.51
+STB5	19.70	20.80	1.09	0.64
-Ald2+Ald6	13.19	11.88	1.58	6.01
-Gdh1+Gdh2	24.82	24.08	0	0.40

【0112】

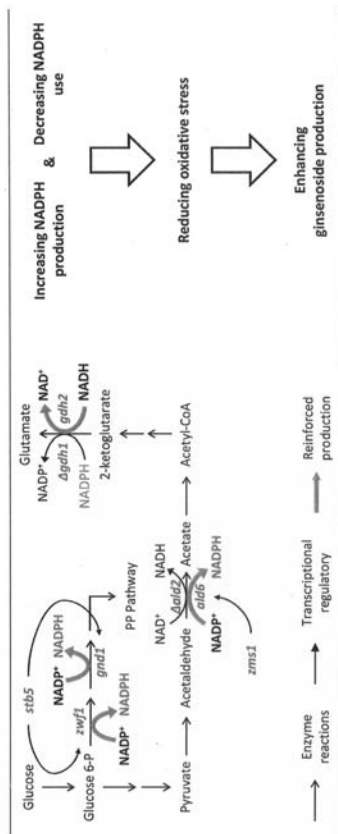
具体的には、図7の結果を見ると、Ald2不活性及びAld6過発現菌株でPPDの生産量が対照群 (control) に比べて144h培養後の約4倍程度のプロトパナキサジオールを生産することを確認した。また、前記Ald2不活性及びAld6過発現菌株にNADPH生合成経路で影響を与える遺伝子であるZwf1をさらに不活性させたり、Zms1をさらに過発現させた場合にプロトパナキサジオールの生産量が著しく増加することを確認し、特にAld2不活性及びAld6過発現菌株にZwf1遺伝子をさらに不活性させた場合に、対照群に比べて約20倍以上のプロトパナキサジオールを生産することを確認した (図8)。

【0113】

前記結果から、NADPH生合成関与タンパク質 (Ald2、Ald6、Zwf1及びZms1) の発現レベルが内在的発現レベルによって変化した場合、プロトパナキサジオールの生産量が著しく増加することが分かった。

【0114】

【図 1】



The diagram illustrates the metabolic pathway of sterol biosynthesis, starting from Pyruvate and leading to Ergosterol. The pathway is divided into several stages, with enzymes and cofactors indicated for each step.

Pyruvate dehydrogenase complex converts **Pyruvate** to **Acetyl-CoA**.

Acetyl-CoA is converted to **2 acetyl-CoA** (Enzyme: **Acetyl-CoA acetyltransferase**, EDC 10, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

2 acetyl-CoA is converted to **Acetoacetyl-CoA** (Enzyme: **Acetoacetyl-CoA synthetase**, EDC 11, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Acetoacetyl-CoA is converted to **HMG-CoA** (Enzyme: **HMG-CoA synthase**, EDC 12, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

HMG-CoA is converted to **Mevalonate (R) Mevalonate** (Enzyme: **Mevalonate kinase**, EDC 13, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Mevalonate (R) Mevalonate is converted to **Mevalonate-S Phosphate** (Enzyme: **Mevalonate-S Phosphate kinase**, EDC 14, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Mevalonate-S Phosphate is converted to **IPP (R) Mevalonate-S Phosphate** (Enzyme: **IPP (R) Mevalonate-S Phosphate kinase**, EDC 15, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

IPP (R) Mevalonate-S Phosphate is converted to **DMAPP** (Enzyme: **DMAPP synthase**, EDC 16, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

DMAPP is converted to **Squalene** (Enzyme: **Squalene synthase**, EDC 17, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Squalene is converted to **2,3-Oxido squalene** (Enzyme: **2,3-Oxido squalene synthase**, EDC 18, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

2,3-Oxido squalene is converted to **Ginsenoside Ro** (Enzyme: **Ginsenoside Ro synthase**, EDC 19, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

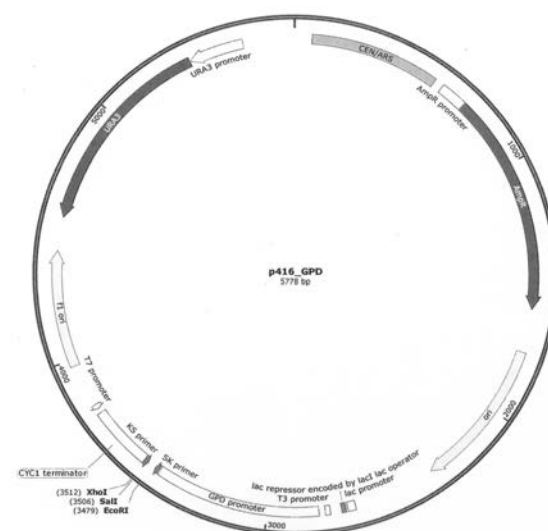
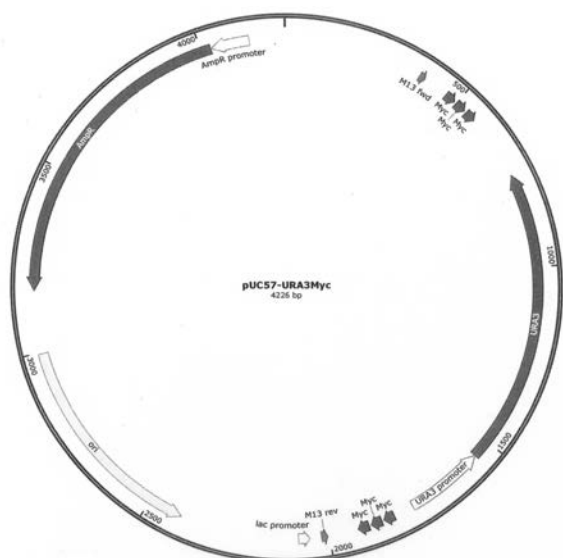
Ginsenoside Ro is converted to **Ginsenoside Rg1** (Enzyme: **Ginsenoside Rg1 synthase**, EDC 20, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Ginsenoside Rg1 is converted to **Protoginsenoside Rg1** (Enzyme: **Protoginsenoside Rg1 synthase**, EDC 21, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

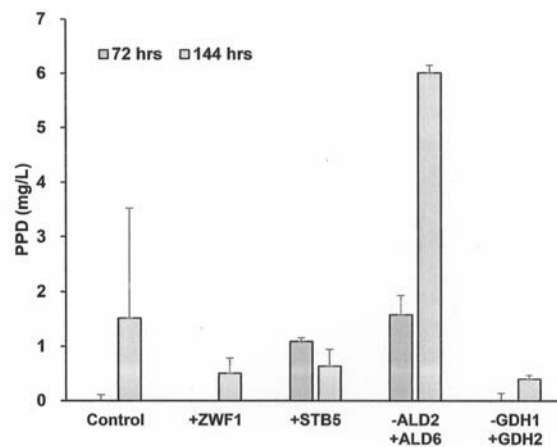
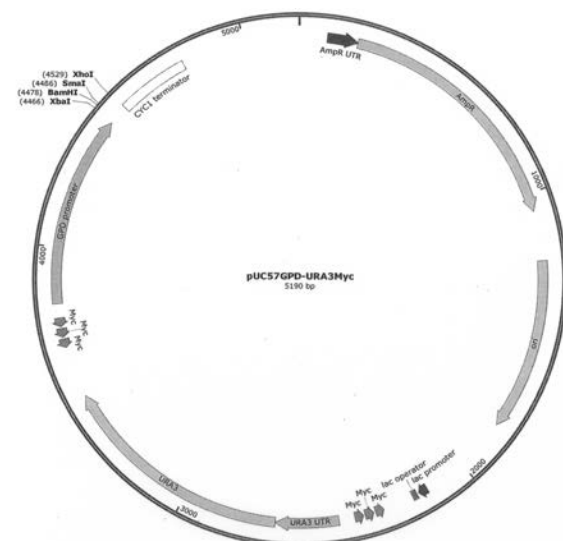
Protoginsenoside Rg1 is converted to **Ginsenoside Rg1** (Enzyme: **Ginsenoside Rg1 synthase**, EDC 22, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

Ginsenoside Rg1 is converted to **Ergosterol** (Enzyme: **Ergosterol synthase**, EDC 23, Cofactors: NAD^+ , $NADH$, H_2O).

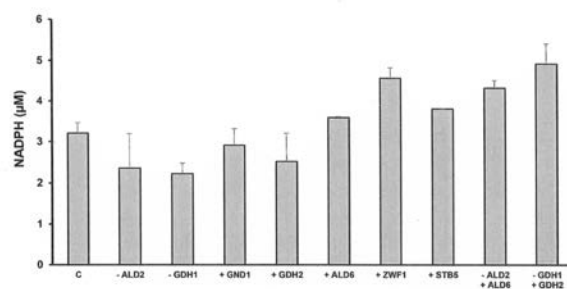
【図 4】



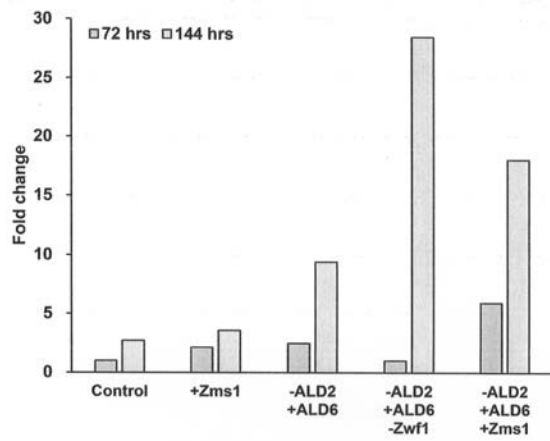
【图 7】



【图 6】



【図 8】



【配列表】

2019198313000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 110000796

特許業務法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 キム スンチャン

大韓民国 34141 テジョン ユソング テハクロー 291 401ホ インテリジェン
ト シンセティック バイオロジー センター

(72)発明者 イ ジュヨン

大韓民国 18454 キョンギード ファソナーシ トンタンバンソクロー 156

(72)発明者 キム ジェウン

大韓民国 37584 キョンサンブクード ポハンナーシ プクーク セチョンニョンデロ 1
235 104-2801

(72)発明者 チャン インソン

大韓民国 48046 プサン ヘウンデーク サムオーロ 61 108-2003

(72)発明者 チェガル ジョンゴン

大韓民国 44459 ウルサン チュング ユゴクロー 80 502-401

Fターム(参考) 4B064 AC14 CA06 CA19 DA01

4B065 AA72X AA80X AA80Y AB01 BA02 CA05 CA44