(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
2019年3月28日(28.03.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/059337 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 7/26 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C07C 49/637 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/034996

(22) 国際出願日： 2018年9月21日(21.09.2018)

(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 2017-182448 2017年9月22日(22.09.2017) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (**AJINOMOTO CO., INC.**) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 田島 義教 (**TAJIMA, Yoshinori**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許事務所 (**SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE**); 〒1000013 東京都千代田区霞が関３丁目８番１号 虎の門三井ビルディング 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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).

(54) **Title:** NOOTKATONE PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称： ヌートカトンの製造方法

(57) **Abstract:** The present invention provides an efficient method for producing nootkatone via a biological method. More specifically, the present invention provides a nootkatone production method including converting nootkatole to nootkatone in the presence of (i) a transformant microorganism having improved alcohol dehydrogenase activity over a wild-type organism, or (ii) alcohol dehydrogenase, the alcohol dehydrogenase being: (A) a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO. 30 or 32; (B) a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO. 30 or 32 with one or more amino acid substitutions, deletions, insertions, or additions, and having alcohol dehydrogenase activity; or (C) a protein having an amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO. 30 or 32, and having alcohol dehydrogenase activity.

(57) 要約：本発明は、生物学的方法によるヌートカトンの効率的な製造方法を提供する。より具体的には、本発明は、（ｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物、または（ｉｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの存在下において、ヌートカトールをヌートカトンに変換することを含み、アルコールデヒドロゲナーゼが、下記：（Ａ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列を含むタンパク質；（Ｂ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または（Ｃ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質である、ヌートカトンの製造方法を提供する。

WO 2019/059337 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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)）

明　細　書

発明の名称 ： ヌートカトンの製造方法

技術分野

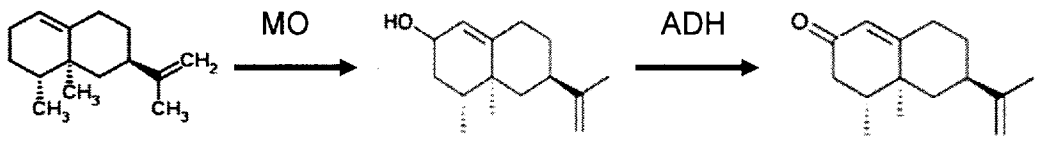
[0001] 本発明は、ヌートカトンの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 多くの生物（例、微生物、植物、動物）は、メチルエリスリトール－４－リン酸（ＭＥＰ）経路、またはメバロン酸（ＭＶＡ）経路のいずれか、もしくはその両方に関与する一連の酵素群を発現している。これらの経路は、イソペンテニル二リン酸（ＩＰＰ）およびジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）の供給の役割を担っている。ＩＰＰおよびＤＭＡＰＰは、テルペノイドの産生に必要な中間体としても知られている。例えば、テルペノイドとしてヌートカトンが生合成される場合、ファルネシル二リン酸シンターゼによりＩＰＰおよびＤＭＡＰＰからファルネシル二リン酸（ＦＰＰ）が生合成され、次いで、バレンセンシンターゼによりＦＰＰからヌートカトンの原料であるバレンセンが生合成される。

[0003] ヌートカトン（４，４ａ，５，６，７，８－ヘキサヒドロ－６－イソプロペニル－４，４ａ－ジメチル－２（３ＩＩ）－ナフタレノン）は、グレープフルーツにおける重要な香り成分であるセスキテルペノイドである。ヌートカトンは、香料として有用であり、飲料や化粧料等の製品に利用されている。ヌートカトンは、シトクロムＰ４５０等のモノオキシゲナーゼ（ＭＯ）によりバレンセンがヌートカトールに変換され、次いで、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）によりヌートカトールがヌートカトンに変換されることにより生合成される。

[化1]



Valencene Nootkatol Nootkatone

[0004] 生物学的方法によるヌートカトンの製造については、幾つかの知見が報告されている。

特許文献１には、ＭＥＰ経路が強化されたＥ．ｃｏｌｉにおいて、Ｓｔｅｖｉａ ｒｅｂａｕｄｉａｎａ由来のシトクロムＰ４５０を利用することにより、ヌートカトンを製造する方法が記載されている。

非特許文献１には、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ）の発現を強化することで、ヌートカトンの生産量が増加することが記載されている。

非特許文献２には、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍの変異体がバレンセンをヌートカトールに変換できることが記載されている。

非特許文献３には、Ｅ．ｃｏｌｉに由来するアルコールデヒドロゲナーゼであるＹａｈＫが、種々のアルデヒド化合物を基質として認識できることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１６／０２９１８７号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｗｒｉｅｓｓｎｅｇｇｅｒ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔａｂ Ｅｎｇ． ２０１４ Ｊｕｌ；２４：１８－２９

非特許文献2：Ｓｏｗｄｅｎ ＲＪ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ Ｂｉｏｍｏｌ

Ｃｈｅｍ． ２００５ Ｊａｎ ７；３（１）：５７－６４

非特許文献3：Ｐｉｃｋ Ａ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ２０１３ Ｊｕｌ；９７（１３）：５８１５－２４

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、生物学的方法によるヌートカトンの効率的な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

[0008] 本発明者らは、鋭意検討した結果、特定のアルコールデヒドロゲナーゼがヌートカトールを基質として利用してヌートカトンに変換できること、および当該特定のアルコールデヒドロゲナーゼがヌートカトールからのヌートカトンの変換において既知の酵素（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ由来ＡＤＨ；非特許文献１を参照）に比し高い活性を示すことができることから、ヌートカトールをヌートカトンに効率的に変換できることなどを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔１〕ヌートカトンの製造方法であって、

（ｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物、または（ｉｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの存在下において、ヌートカトールをヌートカトンに変換することを含み、

アルコールデヒドロゲナーゼが、下記：

（Ａ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または

（Ｃ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有

するタンパク質である、方法。

〔２〕前記形質転換微生物が、前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む微生物である、〔１〕の方法。

〔３〕前記形質転換微生物が、下記（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれかの微生物である、〔２〕の方法：

（ｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む微生物；

（ｉｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を非天然ゲノム領域または非ゲノム領域に含む微生物；あるいは

（ｉｉｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを、複数のコピー数において発現単位に含む微生物。

〔４〕前記形質転換微生物が腸内細菌科に属する細菌である、〔２〕または〔３〕の方法。

〔５〕形質転換微生物が、パントエア属細菌、エシェリヒア属細菌、またはコリネバクテリウム属細菌である、〔２〕～〔４〕のいずれかの方法。

〔６〕形質転換微生物が、パントエア・アナナティス、エシェリヒア・コリ、またはコリネバクテリウム・グルタミカムである、〔５〕の方法。

〔７〕前記形質転換微生物が、バレンセンをヌートカトールに変換する能力を有するモノオキシゲナーゼを産生する、〔２〕～〔６〕のいずれかの方法。

〔８〕前記形質転換微生物が、ファルネシル二リン酸シンターゼおよびバレンセンシンターゼを産生する、〔２〕～〔７〕のいずれかの方法。

〔９〕前記形質転換微生物が、メチルエリスリトール－４－リン酸経路、もしくはメバロン酸経路のいずれか、またはその双方を有する、〔２〕～〔８〕のいずれかの方法。

発明の効果

[0010] 本発明の方法によれば、生物学的方法によりヌートカトンを効率的に製造することができる。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、ヌートカトンの製造方法を提供する。本発明の方法は、（ｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物、または（ｉｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの存在下において、ヌートカトールをヌートカトンに変換することを含む。本発明の方法で用いられるアルコールデヒドロゲナーゼは、以下のタンパク質に対応する：

（Ａ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または

（Ｃ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[0012] タンパク質（Ｂ）では、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる１、２、３または４種の変異により、１個または数個のアミノ酸残基を改変することができる。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の１つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「１または数個」は、タンパク質の活性を大きく損なわない個数を示す。用語「１または数個」が示す数は、例えば１～５０個、好ましくは１～４０個、より好ましくは１～３０個、さらにより好ましくは１～２０個、特に好ましくは１～１０個または１～５個（例、１個、２個、３個、４個、または５個）である。

[0013] タンパク質（Ｃ）では、配列番号２または５のアミノ酸配列との同一性％は、９０％以上である。好ましくは、同一性は、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以

上または９９％以上であってもよい。同一性％は、以下のとおり決定することができる。

ポリペプチド（タンパク質）の同一性％の算出は、アルゴリズムｂｌａｓｔｐにより行うことができる。より具体的には、ポリペプチドの同一性の算定％は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）において提供されているアルゴリズムｂｌａｓｔｐにおいて、デフォルト設定のＳｃｏｒｉｎｇ Ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ（Ｍａｔｒｉｘ：ＢＬＯＳＵＭ６２；Ｇａｐ Ｃｏｓｔｓ：Ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ＝１１ Ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ＝１；Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌ Ａｄｊｕｓｔｍｅｎｔｓ：Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎａｌ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌ ｓｃｏｒｅ ｍａｔｒｉｘ ａｄｊｕｓｔｍｅｎｔ）を用いて行うことができる。

ポリヌクレオチド（遺伝子）の同一性％の算出は、アルゴリズムｂｌａｓｔｎにより行うことができる。より具体的には、ポリヌクレオチドの同一性％の算定は、ＮＣＢＩにおいて提供されているアルゴリズムｂｌａｓｔｎにおいて、デフォルト設定のＳｃｏｒｉｎｇ Ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ（Ｍａｔｃｈ／Ｍｉｓｍａｔｃｈ Ｓｃｏｒｅｓ＝１，－２；Ｇａｐ Ｃｏｓｔｓ＝Ｌｉｎｅａｒ）を用いて行うことができる。

[0014] （Ａ）～（Ｃ）のタンパク質は、ヌートカトールを基質とするアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有することから、ヌートカトールをヌートカトンに変換することができる。（Ｂ－１）配列番号３０のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク、および（Ｃ－１）配列番号３０のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質はそれぞれ、特定の測定条件で活性を測定した場合、（Ａ－１）配列番号３０のアミノ酸配列を含むタンパク質（好ましくは、配列番号３０のアミノ酸配列からなるタンパク質）の活性を基準として、例えば６０

％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらにより好ましくは８５％以上、特に好ましくは９０％以上、９４％以上、９６％以上、９８％以上、または同等（すなわち、１００％）以上の活性を有していてもよい。また、（Ｂ－２）配列番号３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク、および（Ｃ－２）配列番号３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質はそれぞれ、特定の測定条件で活性を測定した場合、（Ａ－２）配列番号３２のアミノ酸配列を含むタンパク質（好ましくは、配列番号３２のアミノ酸配列からなるタンパク質）の活性を基準として、例えば６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらにより好ましくは８５％以上、特に好ましくは９０％以上、９４％以上、９６％以上、９８％以上、または同等（すなわち、１００％）以上の活性を有していてもよい。このような特定の測定条件としては、次の条件を採用することができる。先ず、目的のタンパク質を発現する形質転換微生物をＬＢ培地に播種後、３４℃で一晩培養を行う。次に、得られた菌体を約２０ｍｇ／Ｌのヌートカトール（Ｓｕｎｄｉａ社製）を含むＭＳ－ＰＩＰＥＳ－Ｎｏｏｔｋａｔｏｌ培地に接種し、３７℃にて試験管で約１６時間、振盪培養を行う。培養終了後、遠心分離（４℃、１５，０００ｒｐｍ　１０ｍｉｎ．）にて菌体を除去することにより得られる上清液において、ヌートカトンの量を測定することにより、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を評価することができる。

[0015] タンパク質（Ｂ）および（Ｃ）は、目的特性を保持し得る限り、触媒ドメイン中の部位、および触媒ドメイン以外の部位に、変異が導入されていてもよい。目的特性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかである。具体的には、当業者は、１）同種の特性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列を比較し、２）相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、３）相

対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。したがって、当業者は、本発明で用いられるタンパク質のアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0016] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0017] 本発明で用いられるタンパク質はまた、異種部分とペプチド結合を介して連結された融合タンパク質であってもよい。このような異種部分としては、

例えば、目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分（例、ヒスチジンタグ、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ　ＩＩ等のタグ部分；グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、およびこれらの変異型等の目的タンパク質の精製に利用されるタンパク質）、目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分（例、Ｎｕｓ－ｔａｇ）、シャペロンとして働くペプチド成分（例、トリガーファクター）、他の機能を有するペプチド成分（例、全長タンパク質またはその一部）、ならびにリンカーが挙げられる。

[0018] 本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）に属する細菌（例、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、またはパントエア・アナナティス等のパントエア属細菌）に由来するタンパク質、天然に生じるそのホモログ、または人為的に作出された変異タンパク質が挙げられる。変異タンパク質は、例えば、目的タンパク質をコードするＤＮＡに変異を導入し、得られた変異ＤＮＡを用いて変異タンパク質を産生させることにより、得ることができる。変異導入法としては、例えば、部位特異的変異導入、ならびに無作為変異導入処理（例、変異剤による処理、および紫外線照射）が挙げられる。

[0019] 一実施形態では、本発明の方法は、本発明で用いられる上記タンパク質自体を用いて行うことができる。本発明で用いられるタンパク質として、天然タンパク質または組換えタンパク質を利用することができる。組換えタンパク質は、例えば、無細胞系ベクターを用いて、または本発明で用いられるタンパク質を産生する微生物から得ることができる。本発明で用いられるタンパク質は、未精製、粗精製または精製タンパク質として利用することができる。これらのタンパク質としては、反応において、固相に固定された固相化タンパク質として利用されてもよい。

[0020] 本発明で用いられるタンパク質を公知の方法で単離し、必要に応じて更に精製することにより、目的とするタンパク質が得られる。タンパク質を産生する微生物としては、タンパク質の大量入手等の観点より、形質転換微生物が好ましい。

[0021] 微生物を培養するための培地は公知であり、例えば、ＬＢ培地などの栄養培地や、Ｍ９培地などの最小培地に炭素源、窒素源、ビタミン源等を添加して用いることができる。形質転換微生物は宿主に応じて、通常、１６～４２℃、好ましくは２５～３７℃で５～１６８時間、好ましくは８～７２時間培養される。宿主細胞に依存して、振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて攪拌を行ってもよく、通気を行ってもよい。目的タンパク質の発現のために誘導型プロモーターを用いる場合、培地にプロモーター誘導剤を添加して培養を行うことができる。

[0022] 産生された目的タンパク質は、形質転換微生物の抽出物から公知の塩析、等電点沈殿法もしくは溶媒沈殿法等の沈殿法、透析、限外濾過もしくはゲル濾過等の分子量差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の疎水度の差を利用する方法やその他アフィニティークロマトグラフィー、ＳＤＳポリアクリルアミド電気泳動法、等電点電気泳動法等、またはこれらの組み合わせにより、精製および単離することが可能である。目的タンパク質を分泌発現させた場合には、形質転換微生物を培養して得られた培養液から、菌体を遠心分離等で除くことで目的タンパク質を含む培養上清が得られる。この培養上清からも目的タンパク質を精製および単離することが可能である。

[0023] 別の実施形態では、本発明の方法は、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物の存在下で行うことができる。本発明では、用語「形質転換」は、宿主細胞に対するポリヌクレオチドの導入のみならず、宿主細胞におけるゲノムの改変もまた意図される。

[0024] 好ましくは、本発明で用いられる上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、以下（ａ）～（ｄ）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドであってもよい：

（ａ）配列番号２９または３１の塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｂ）配列番号２９または３１の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリ

ヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（ｃ）配列番号２９または３１の塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；ならびに

（ｄ）（ａ）～（ｃ）からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体。

[0025] 上記ポリヌクレオチドは、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいが、ＤＮＡであることが好ましい。配列番号２９の塩基配列は、配列番号３０のアミノ酸配列をコードする。配列番号３１の塩基配列は、配列番号３２のアミノ酸配列をコードする。

[0026] 上記ポリヌクレオチド（ｂ）において、用語「ストリンジェント条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ストリンジェント条件としては、６×ＳＳＣ（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中、約４５℃でのハイブリダイゼーション、続いて、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中、５０～６５℃での１または２回以上の洗浄が挙げられる。

[0027] 上記ポリヌクレオチド（ｃ）では、配列番号２９または３１の塩基配列に対する塩基配列の同一性％は、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上であってもよい。

[0028] 上記ポリヌクレオチド（ｄ）において、用語「縮重変異体」とは、変異前のポリヌクレオチド中の所定のアミノ酸残基をコードする少なくとも１つのコドンが、同一アミノ酸残基をコードする別のコドンに変更されたポリヌクレオチド変異体をいう。このような縮重変異体はサイレント変異に基づく変異体であることから、縮重変異体によりコードされるタンパク質は、変異前のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質と同一である。

[0029] 好ましくは、縮重変異体は、それが導入されるべき宿主細胞のコドン使用頻度に適合するようにコドンが変更されたポリヌクレオチド変異体である。ある遺伝子を異種宿主細胞（例、微生物）で発現させる場合、コドン使用頻度の相違により、対応するｔＲＮＡ分子種が十分に供給されず、翻訳効率の低下および／または不正確な翻訳（例、翻訳の停止）が生じることがある。例えば、エシェリヒア・コリでは、表Ａに示される低頻度コドンが知られている。

[0030] [表A]

表A. エシェリヒア・コリにおける低頻度コドン

アミノ酸残基	コドン	低頻度コドン
Arg	AGG/AGA/CGG/CGA/CGU/CGC	AGG/AGA/CGG/CGA
Gly	GGG/GGA/GGU/GGC	GGA
Ile	AUA/AUU/AUC	AUA
Leu	UUG/UUA/CUG/CUA/CUU/CUC	CUA
Pro	CCG/CCA/CCU/CCC	CCC

[0031] したがって、本発明では、後述するような宿主細胞のコドン使用頻度に適合する縮重変異体を利用することができる。例えば、縮重変異体は、アルギニン残基、グリシン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、およびプロリン残基からなる群より選ばれる１種以上のアミノ酸残基をコードするコドンが変更されたものであってもよい。より具体的には、縮重変異体は、低頻度コドン（例、ＡＧＧ、ＡＧＡ、ＣＧＧ、ＣＧＡ、ＧＧＡ、ＡＵＡ、ＣＵＡ、およびＣＣＣ）からなる群より選ばれる１種以上のコドンが変更されたものであってもよい。好ましくは、縮重変異体は、以下からなる群より選ばれる１種以上（例、１種、２種、３種、４種、または５種）のコドンの変更を含んでいてもよい：

ｉ）Ａｒｇをコードする４種のコドン（ＡＧＧ、ＡＧＡ、ＣＧＧ、およびＣＧＡ）からなる群より選ばれる少なくとも１種のコドンの、Ａｒｇをコードする別のコドン（ＣＧＵ、またはＣＧＣ）への変更；

ｉｉ）ＧｌｙをコードするＧＧＡ）の、別のコドン（ＧＧＧ

、ＧＧＵ、またはＧＧＣ）への変更；

ｉｉｉ）Ｉｌｅをコードする１種のコドン（ＡＵＡ）の、別のコドン（ＡＵＵ、またはＡＵＣ）への変更；

ｉｖ）Ｌｅｕをコードする１種のコドン（ＣＵＡ）の、別のコドン（ＵＵＧ、ＵＵＡ、ＣＵＧ、ＣＵＵ、またはＣＵＣ）への変更；ならびに

ｖ）Ｐｒｏをコードする１種のコドン（ＣＣＣ）の、別のコドン（ＣＣＧ、ＣＣＡ、またはＣＣＵ）への変更。

縮重変異体がＲＮＡの場合、上記のとおりヌクレオチド残基「Ｕ」が利用されるべきであるが、縮重変異体がＤＮＡの場合、ヌクレオチド残基「Ｕ」の代わりに「Ｔ」が利用されるべきである。宿主細胞のコドン使用頻度に適合させるためのヌクレオチド残基の変異数は、変異前後で同一のタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、１～４００個、１～３００個、１～２００個、または１～１００個である。

[0032] 低頻度コドンの同定は、当該分野で既知の技術を利用することにより、任意の宿主細胞の種類およびゲノム配列情報に基づいて容易に行うことができる。したがって、縮重変異体は、低頻度コドンの非低頻度コドン（例、高頻度コドン）への変更を含むものであってもよい。また、低頻度コドンのみならず、生産菌株のゲノムＧＣ含量への適合性などの要素を考慮して変異体を設計する方法が知られているので（Ａｌａｎ Ｖｉｌｌａｌｏｂｏｓ ｅｔ ａｌ．, Ｇｅｎｅ Ｄｅｓｉｇｎｅｒ： ａ ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｂｉｏｌｏｇｙ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｎｇ ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ ＤＮＡ ｓｅｇｍｅｎｔｓ, ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ． ２００６ Ｊｕｎ ６；７：２８５．）、このような方法を利用してもよい。このように、上述の変異体は、それが導入され得る任意の宿主細胞（例、後述するような微生物）の種類に応じて適宜作製できる。

[0033] 上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、好ましくは、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む微生物である。

[0034] 本発明において、用語「発現単位」とは、タンパク質として発現されるべき所定のポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む、当該ポリヌクレオチドの転写、ひいては当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の産生を可能にする最小単位をいう。発現単位は、ターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでいてもよい。発現単位は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいが、ＤＮＡであることが好ましい。発現単位はまた、宿主細胞に対して同種（ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ）（すなわち、固有（ｉｎｈｅｒｅｎｔ））であっても、異種（ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ）（すなわち、非固有）であってもよい。発現単位はまた、タンパク質として発現されるべき１つのポリヌクレオチド、およびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位（すなわち、モノシストロニックｍＲＮＡの発現を可能にする発現単位）、またはタンパク質として発現されるべき複数のポリヌクレオチド（例えば２以上、好ましくは３以上、より好ましくは４以上、さらにより好ましくは５以上、特に好ましくは１０以上のポリヌクレオチド）、およびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位（すなわち、ポリシストロニックｍＲＮＡの発現を可能にする発現単位）であってもよい。発現単位は、微生物（宿主細胞）においてゲノム領域（例、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドが固有に存在する天然ローカスである天然ゲノム領域、もしくは当該天然ローカスではない非天然ゲノム領域）、または非ゲノム領域（例、細胞質内）に含まれることができる。発現単位は、１または２以上（例、１、２、３、４、または５）の異なる位置においてゲノム領域中に含まれていてもよい。非ゲノム領域に含まれる発現単位の具体的な形態としては、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、および人工染色体が挙げられる。

[0035] 発現単位を構成するプロモーターは、その下流に連結されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を宿主細胞で発現させることができるものであれば特に限定されない。例えば、プロモーターは、宿主細胞に対して

同種であっても異種であってもよいが、好ましくは異種である。例えば、組換えタンパク質の産生に汎用される構成または誘導プロモーターを用いることができる。このようなプロモーターとしては、例えば、ＰｈｏＡプロモーター、ＰｈｏＣプロモーター、Ｔ７プロモーター、Ｔ５プロモーター、Ｔ３プロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｔｒｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ＰＲプロモーター、ＰＬプロモーター、ＳＰ６プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーターが挙げられる。好ましくは、宿主細胞で強力な転写活性を有するプロモーターを用いることができる。宿主細胞で強力な転写活性を有するプロモーターとしては、例えば、宿主細胞で高発現している遺伝子のプロモーター、およびウイルス由来のプロモーターが挙げられる。

[0036] 一実施形態では、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、（ｉ）上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む微生物であってもよい。用語「異種発現単位」とは、発現単位が宿主細胞に対して異種であることを意味する。したがって、本発明では、発現単位を構成する少なくとも１つのエレメントが宿主細胞に対して異種である。宿主細胞に対して異種である、発現単位を構成するエレメントとしては、例えば、上述したエレメントが挙げられる。好ましくは、異種発現単位を構成する、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド、もしくはプロモーターの一方、または双方が、宿主細胞に対して異種である。したがって、本発明では、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド、もしくはプロモーターの一方、または双方が、宿主細胞以外の生物（例、原核生物および真核生物、または微生物、昆虫、植物、および哺乳動物等の動物）もしくはウイルスに由来するか、または人工的に合成されたものである。異種発現単位としては、発現単位を構成する少なくとも１つのエレメントが宿主細胞に対して異種である異種発現単位が好ましい。

[0037] （ｉ）の微生物は、発現単位を構成するタンパク質が宿主細胞に対して異種であってもよい。このような微生物としては、例えば、（ｉ－１）（Ａ’）配列番号３０のアミノ酸配列を含むタンパク質、（Ｂ’）配列番号３０のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または（Ｃ’）配列番号３０のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む微生物（ただしパントエア属微生物、好ましくはパントエア・アナナティスを除く）、ならびに（ｉ－２）（Ａ’’）配列番号３２のアミノ酸配列を含むタンパク質、（Ｂ’’）配列番号３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または（Ｃ’’）配列番号３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む微生物（ただしエシェリヒア属微生物、好ましくはエシェリヒア・コリを除く）が挙げられる。

[0038] 別の実施形態では、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、（ｉｉ）上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を非天然ゲノム領域または非ゲノム領域に含む微生物であってもよい。

[0039] さらに別の実施形態では、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、（ｉｉｉ）上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、複数のコピー数において発現単位に含む微生物であってもよい。複数のコピー数は、例えば２以上、好ましくは３以上、より好ましくは４以上、さらにより好ましくは５以上、特に好ましくは１０以上のコピー数で

あってもよい。

[0040] さらに別の実施形態では、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、（ｉｖ）タンパク質の発現を増強するように、固有の発現単位（例、プロモーター領域）において変異が導入された非天然の発現単位を含む微生物、または（ｖ）上記タンパク質の活性が向上するように上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドに対してゲノム編集等の技術により変異が導入された非天然の発現単位を含む微生物であってもよい。

[0041] 好ましくは、上記タンパク質の活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物は、（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれかの微生物である。

[0042] 本発明において、形質転換微生物として使用される宿主細胞としては、例えば、腸内細菌科（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）に属する細菌等の細菌、および真菌が挙げられる。細菌はまた、グラム陽性菌であってもグラム陰性菌であってもよい。グラム陽性細菌としては、例えば、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌が挙げられる。バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌としては、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）が好ましい。コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ）が好ましい。グラム陰性細菌としては、例えば、エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌が挙げられる。エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌としては、エシェリヒア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）が好ましい。パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）属細菌としては、パントエア・アナナティス（Ｐａｎｔｏｅａ ａｎａｎａｔｉｓ）が好ましい。真菌としては、サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の微生物が好ましい。サッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の微生物としては、サッカロミセス・セレビシエー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）が

好ましい。シゾサッカロミセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属の微生物としては、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）が好ましい。

[0043] 形質転換微生物は、バレンセンをヌートカトールに変換できるモノオキシゲナーゼを産生する微生物であってもよい。したがって、形質転換微生物は、このようなモノオキシゲナーゼの発現単位（好ましくは異種発現単位）を含む宿主細胞であってもよい。バレンセンをヌートカトールに変換する能力を有するモノオキシゲナーゼとしては、例えばシトクロムＰ４５０が挙げられる。シトクロムＰ４５０には、その構造的特徴から真核生物に広く分布されている膜結合型シトクロムＰ４５０と原核生物に広く分布している細胞質可溶性のシトクロムＰ４５０が知られている。例えば、真核生物由来のシトクロムＰ４５０酸化酵素（ＣＹＰ）として、Ｓｔｅｖｉａ　ｒｅｂａｕｄｉａｎａ　Ｋａｕｒｅｎｅオキシダーゼ（ＳｒＫＯ）、Ｃａｌｌｉｔｒｏｐｓｉｓ　ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来ＣＹＰ７０６Ｍ１、Ｈｙｏｓｃｙａｍｕｓ　ｍｕｔｉｃｕｓ由来ＣＹＰ７１Ｄ５５、およびこれらの変異体が挙げられる（国際公開第２０１６／０２９１８７号；Ｋａｔａｒｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，２０１４；５８８：１００１－１００７；Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．，２００７；２８２：３１７４４－３１７５２を参照）。また、これらのシトクロムＰ４５０酸化酵素として、共役して機能するシトクロムＰ４５０還元酵素（ＣＰＲ）としてＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ由来ＣＰＲ（Ｇｅｎｂａｎｋ　ｎｕｍｂｅｒ　ＮＭ＿１１８５８５．３）、Ｓｔｅｖｉａ　ｒｅｂａｕｄｉａｎａ由来ＳｒＣＰＲ、およびこれらの変異体が挙げられる（Ｗｒｉｅｓｓｎｅｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１４；２４：１８－２９；国際公開第２０１６／０２９１８７号）。一方、原核生物由来のシトクロムＰ４５０として、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ由来Ｐ４５０ＢＭ３やＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来Ｐ４５０ｃａｍの変異体等が挙げられる（Ｒ

ｅｂｅｃｃａ ＪＳ ｅｔ ａｌ．， Ｏｒｇ． Ｂｉｏｍｏｌ． Ｃｈｅｍ．， ２００５；３：５７－６４）。他の微生物、植物、動物（例、哺乳動物）等の生物に由来するシトクロムＰ４５０もまた、本発明で利用することができる。

[0044] Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＣ（ＣａｍＣ）のような原核生物由来のシトクロムＰ４５０酸化酵素を発現する場合、用いる形質転換微生物は、当該酵素と共役するタンパク質を産生する微生物であってもよい。このようなタンパク質としては、フェレドキシンレダクターゼ〔例、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来プチダレドキシンレダクターゼ（ＣａｍＡ）、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来フェレドキシンレダクターゼ（ＦＮＲ；ｌｏｃｕｓ ｎｏ．，ＴＴＣ００９６）〕、フェレドキシン〔例、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来プチダレドキシン（ＣａｍＢ）、Ｔｈｅｒｏｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来フェレドキシン（Ｆｄｘ； ｌｏｃｕｓ ｎｏ．， ＴＴＣ１８０９）〕、およびこれらの変異体が挙げられる（国際公開第２０１６／０２９１８７号、Ｒｅｂｅｃｃａ ＪＳ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００５；３：５７－６４、 Ｍａｎｄａｉ ｅｔ ａｌ．， ＦＥＢＳ Ｊ．， ２００９；８：２４１６－２４２９を参照）。他の微生物、植物、動物（例、哺乳動物）等の生物に由来する上記タンパク質もまた、本発明で利用することができる。

[0045] 形質転換微生物はまた、ファルネシル二リン酸シンターゼ（ＥＣ：２．５．１．１０）およびバレンセンシンターゼ（ＥＣ：４．２．３．７３）を産生する微生物であってもよい。したがって、形質転換微生物は、ファルネシル二リン酸シンターゼおよびバレンセンシンターゼの発現単位（好ましくは異種発現単位）を含む宿主細胞であってもよい。ファルネシル二リン酸シンターゼおよびバレンセンシンターゼの発現単位は、モノシストロニックｍＲＮＡを発現する独立した２個の発現単位であっても、ポリシストロニックｍＲＮＡを発現する単一の発現単位であってもよい。

[0046] ファルネシル二リン酸シンターゼとしては、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ファルネシル二リン酸シンターゼｉｓｐＡ（配列番号６８）、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来ファルネシル二リン酸シンターゼＥＲＧ２０（ＮＣＢＩ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｐ０８５２４）、およびこれらの変異体が挙げられる（国際公開第２０１６／０２９１８７号、Ｆｒｏｈｗｉｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．， ２０１４；１９１：２０５－２１３を参照）。他の微生物、植物、動物（例、哺乳動物）等の生物に由来するファルネシル二リン酸シンターゼもまた、本発明で利用することができる。

[0047] バレンセンシンターゼとしては、例えば、Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ（配列番号６４；ＧｅｎｅＢａｎｋ：ＡＦＮ２１４２９．１）、Ｖｉｔｉｓ ｖｉｎｉｆｅｒａ由来バレンセンシンターゼ、Ｃｉｔｒｕｓ ｓｉｎｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ、Ｃａｌｌｉｔｒｏｐｓｉｓ ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ、およびこれらの変異体が挙げられる（国際公開第２０１６／０２９１８７号、Ｆｒｏｈｗｉｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．， Ｊ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．， ２０１４；１９１：２０５－２１３、 Ｂｅｅｋｗｉｌｄｅｒ ｅｔ ａｌ．， Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．，２０１４；１２（２）：１７４－１８２を参照）。他の微生物、植物、動物（例、哺乳動物）等の生物に由来するバレンセンシンターゼもまた、本発明で利用することができる。

[0048] 形質転換微生物はさらに、培地成分として用いられる炭素源からイソペンテニル二リン酸（ＩＰＰ）を供給する能力を有する微生物であってもよい。このような微生物は、ＭＥＰ経路、もしくはＭＶＡ経路のいずれか、またはその双方を有する微生物である。微生物は通常、これらのいずれかの経路を有する。例えば、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌は、ＭＥＰ経路によるジメチルアリル二リン酸の合成能を固有に有し得る。また、サッカロミセス・セレビシエー等のサッカロミセス属酵母は、ＭＶＡ経路によるジ

メチルアリル二リン酸の合成能を固有に有し得る。ＭＥＰ経路については、例えば、Ｋｕｚｕｙａｍａ ＴおよびＳｅｔｏ Ｈ，Ｐｒｏｃ Ｊｐｎ Ａｃａｄ Ｓｅｒ Ｂ Ｐｈｙｓ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ．８８，４１－５２（２０１２）；Ｇｒａｗｅｒｔ Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．６８，３７９７－３８１４（２０１１）を参照のこと。また、ＭＶＡ経路については、例えば、Ｋｕｚｕｙａｍａ ＴおよびＳｅｔｏ Ｈ，Ｐｒｏｃ Ｊｐｎ Ａｃａｄ Ｓｅｒ Ｂ Ｐｈｙｓ Ｂｉｏｌ Ｓｃｉ．８８，４１－５２（２０１２）；Ｍｉｚｉｏｒｋｏ ＨＭ，Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ．５０５，１３１－１４３（２０１１）を参照のこと。このような形質転換微生物は、ＭＥＰ経路、もしくはＭＶＡ経路のいずれか、または双方に関与する１以上（例、１、２、３、４、５または６）の酵素の発現単位（好ましくは異種発現単位）を含む宿主細胞であってもよい。このような形質転換微生物はまた、ＩＰＰをジメチルアリル二リン酸（ＤＭＡＰＰ）に変換する能力を有するイソペンテニル二リン酸デルタイソメラーゼの発現単位（好ましくは異種発現単位）を含む宿主細胞であってもよい。これらの発現単位は、モノシストロニックｍＲＮＡを発現する独立した複数個の発現単位であっても、ポリシストロニックｍＲＮＡを発現する単一の発現単位であってもよい。

[0049] ＭＥＰ経路に関与する酵素としては、例えば、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－リン酸シンターゼ（ＥＣ：２．２．１．７、例１、Ｄｘｓ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿４１４９５４；例２、ＡＴ３Ｇ２１５００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿５６６６８６；例３、ＡＴ４Ｇ１５５６０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿１９３２９１；例４、ＡＴ５Ｇ１１３８０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿００１０７８５７０）、１－デオキシ－Ｄ－キシルロース－５－リン酸リダクトイソメラーゼ（ＥＣ：１．１．１．２６７；例１、Ｄｘｒ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿４１４７１５；例２、ＡＴ５Ｇ６２７９０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＩＤ ＮＰ＿００１１９０６００）、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリ

スリトールシンターゼ（ＥＣ：２．７．７．６０；例１、ＩｓｐＤ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７２２７；例２、ＡＴ２Ｇ０２５００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６５２８６）、４－ジホスホシチジル－２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトールキナーゼ（ＥＣ：２．７．１．１４８；例１、ＩｓｐＥ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１５７２６；例２、ＡＴ２Ｇ２６９３０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１８０２６１）、２－Ｃ－メチル－Ｄ－エリスリトール－２，４－シクロニリン酸シンターゼ（ＥＣ：４．６．１．１２；例１、ＩｓｐＦ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７２２６；例２、ＡＴ１Ｇ６３９７０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６４８１９）、１－ヒドロキシ－２－メチル－２－（Ｅ）－ブテニル－４－ニリン酸シンターゼ（ＥＣ：１．１７．７．１；例１、ＩｓｐＧ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７０１０；例２、ＡＴ５Ｇ６０６００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１１１９４６７）、４－ヒドロキシ－３－メチル－２－ブテニル二リン酸レダクターゼ（ＥＣ：１．１７．１．２；例１、ＩｓｐＨ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１４５７０；例２、ＡＴ４Ｇ３４３５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６７９６５）が挙げられる。

[0050] ＭＶＡ経路に関与する酵素としては、例えば、メバロン酸キナーゼ（ＥＣ：２．７．１．３６；例１、Ｅｒｇ１２ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３９３５；例２、ＡＴ５Ｇ２７４５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１１９０４１１）、ホスホメバロン酸キナーゼ（ＥＣ：２．７．４．２；例１、Ｅｒｇ８ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３９４７；例２、ＡＴ１Ｇ３１９１０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１１８５１２４）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（ＥＣ：４．１．１．３３；例１、Ｍｖｄ１ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１４４４１；例２、ＡＴ２Ｇ３８７００、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１８１４０４；例３、ＡＴ３Ｇ５４２５０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６６９９５）、アセチル－ＣｏＡ－Ｃ－アセチルトランスフェラーゼ（

ＥＣ：２．３．１．９；例1、Ｅｒｇ１０ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１５２９７；例2、ＡＴ５Ｇ４７７２０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿００１０３２０２８；例3、ＡＴ５Ｇ４８２３０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿５６８６９４）、ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡシンターゼ（ＥＣ：２．３．３．１０；例1、Ｅｒｇ１３ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３５８０；例2、ＡＴ４Ｇ１１８２０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１９２９１９；例3、ＭｖａＳ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＡＡＧ０２４３８）、ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡリダクターゼ（ＥＣ：１．１．１．３４；例1、Ｈｍｇ２ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３５５５；例2、Ｈｍｇ１ｐ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１３６３６；例3、ＡＴ１Ｇ７６４９０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１７７７７５；例4、ＡＴ２Ｇ１７３７０、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１７９３２９、ＥＣ：１．１．１．８８、例、ＭｖａＡ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　Ｐ１３７０２）、アセチル－ＣｏＡ－アセチルトランスフェラーゼ／ヒドロキシメチルグルタリル－ＣｏＡリダクターゼ（ＥＣ：２．３．１．９／１．１．１．３４、例、ＭｖａＥ、ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＡＡＧ０２４３９）が挙げられる。

[0051] イソペンテニル二リン酸デルタイソメラーゼ（ＥＣ:５．３．３．２）としては、例えば、Ｉｄｉ１ｐ（ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿０１５２０８）、ＡＴ３Ｇ０２７８０（ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１８６９２７）、ＡＴ５Ｇ１６４４０（ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿１９７１４８）、およびＩｄｉ（ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ　ＩＤ　ＮＰ＿４１７３６５）が挙げられる。

[0052] 本発明で用いられる形質転換微生物は、当該分野において公知の任意の方法により作製することができる。例えば、上述したような形質転換微生物は、発現ベクターを用いる方法（例、コンピテント細胞法、エレクトロポレーション法）、またはゲノム改変技術により作製することができる。発現ベクターが宿主細胞のゲノムＤＮＡと相同組換えを生じる組込み型（ｉｎｔｅｇ

ｒａｔｉｖｅ）ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれることができる。一方、発現ベクターが宿主細胞のゲノムＤＮＡと相同組換えを生じない非組込み型ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込まれず、宿主細胞内において、発現ベクターの状態のまま、ゲノムＤＮＡから独立して存在できる。あるいは、ゲノム編集技術（例、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム、Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ（ＴＡＬＥＮ））によれば、発現単位を宿主細胞のゲノムＤＮＡに組み込むこと、および宿主細胞が固有に備える発現単位を改変することが可能である。

[0053] 発現ベクターは、発現単位として上述した最小単位に加えて、宿主細胞で機能するターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでいてもよい。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する耐性遺伝子が挙げられる。

[0054] 発現ベクターはまた、宿主細胞のゲノムＤＮＡとの相同組換えのために、宿主細胞のゲノムとの相同組換えを可能にする領域をさらに含んでいてもよい。例えば、発現ベクターは、それに含まれる発現単位が一対の相同領域（例、宿主細胞のゲノム中の特定配列に対して相同なホモロジーアーム、ｌｏｘＰ、ＦＲＴ）間に位置するように設計されてもよい。発現単位が導入されるべき宿主細胞のゲノム領域（相同領域の標的）としては、特に限定されないが、宿主細胞において発現量が多い遺伝子のローカスであってもよい。

[0055] 発現ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、または人工染色体であってもよい。発現ベクターはまた、組込み型（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ）ベクターであっても非組込み型ベクターであってもよい。組込み型ベクターは、その全体が宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。あるいは、組込み型ベクターは、その一部（例、発現単位）のみが宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい

。発現ベクターはさらに、ＤＮＡベクター、またはＲＮＡベクター（例、レトロウイルス）であってもよい。発現ベクターはまた、汎用されている発現ベクターであってもよい。このような発現ベクターとしては、例えば、ｐＵＣ（例、ｐＵＣ１９、ｐＵＣ１８）、ｐＳＴＶ、ｐＢＲ（例、ｐＢＲ３２２）、ｐＨＳＧ（例、ｐＨＳＧ２９９、ｐＨＳＧ２９８、ｐＨＳＧ３９９、ｐＨＳＧ３９８）、ＲＳＦ（例、ＲＳＦ１０１０）、ｐＡＣＹＣ（例、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＡＣＹＣ１８４）、ｐＭＷ（例、ｐＭＷ１１９、ｐＭＷ１１８、ｐＭＷ２１９、ｐＭＷ２１８）、ｐＱＥ（例、ｐＱＥ３０）、およびその誘導体が挙げられる。

[0056] 本発明の方法において用いられる基質であるヌートカトールは、上記アルコールデヒドロゲナーゼを含む反応系（例、上記アルコールデヒドロゲナーゼを含む水溶液、上記アルコールデヒドロゲナーゼを産生する形質転換微生物を含む培養液）に添加することができる。あるいは、本発明の方法では、反応系において生成したヌートカトールを基質として利用することもできる。例えば、反応系における基質であるヌートカトールは、上述したようなタンパク質（例、モノオキシゲナーゼおよびその共役タンパク質、ファルネシル二リン酸シンターゼ、バレンセンシンターゼ、ＭＶＡ経路またはＭＥＰ経路に関与する酵素、イソペンテニル二リン酸デルタイソメラーゼ）を利用することにより生成することができる。好ましくは、ヌートカトールは、上述したようなタンパク質を発現する形質転換微生物を培養する培地中の炭素源から生成されてもよい。上述したようなタンパク質に加えて、上記アルコールデヒドロゲナーゼを発現する形質転換微生物を用いる場合、ヌートカトールを介して炭素源からヌートカトンを製造することができる。

[0057] 本発明の方法が上記アルコールデヒドロゲナーゼ自体を用いて行われる場合、反応系としては、上記アルコールデヒドロゲナーゼを含む水溶液を用いることができる。水溶液としては、緩衝液が好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液が挙げられる。ｐＨは、例えば約５～９である。反応系におけるアル

コールデヒドロゲナーゼおよびヌートカトール（基質）の量、ならびに反応時間は、生成されるべきヌートカトンの量に応じて、適宜調節することができる。反応温度は、反応が進行する限り特に限定されないが、２０～４０℃が好ましい。

[0058] 本発明の方法が上記アルコールデヒドロゲナーゼを産生する形質転換微生物の存在下で行われる場合、形質転換微生物を含む培養培地を反応系として利用して、形質転換微生物を培養することにより本発明の方法を行うことができる。培養培地としては、上述したものを用いることができる。培養培地は、炭素源を含むことが好ましい。炭素源としては、例えば、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グリセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素数が１の化合物（以下、Ｃ１化合物という。）；コーン油、パーム油、大豆油等のオイル；アセテート；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；又はこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、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等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンＢ１、Ｌ－ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

[0059] 形質転換微生物の培養条件としては、特に限定されず、標準的な細胞培養条件を用いることができる。

培養温度としては、２０～４０℃が好ましく、３０～３７℃がより好ましい。ガス組成としては、CO_2濃度が約６％～約８４％であることが好ましく、ｐＨが、約５～９であることが好ましい。また、宿主細胞の性質に応じて好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で培養を行うことが好ましい。

[0060] 培養方法としては、任意の適切な方法を用いることができる。このような培養方法としては、例えば、バッチ培養法、流加培養法、連続培養法が挙げられる。形質転換体微生物により産生される特定のタンパク質の発現がｌａｃプロモーター等の誘導的プロモーターの制御下にある場合、培養培地中に、例えばＩＰＴＧ（イソプロピル－β－チオガラクトピラノシド）等の誘導剤を添加して、タンパク質の発現を誘導してもよい。

[0061] ヌートカトンの製造の確認は、適宜行うことができる。例えば、このような確認は、反応系からヌートカトンを有機溶媒で抽出し、抽出液をガスクロマトグラフィーや質量分析に供することにより行うことができる。培養培地からのヌートカトンの回収および精製もまた、適宜行うことができる。例えば、ヌートカトンの回収および精製は、有機溶媒による抽出・分画、および包接化合物を用いる方法（シクロデキストリン等の包接化合物等を接触させることで、ヌートカトンの包接錯体を作成させ、その後当該包接錯体からヌートカトンを脱離する方法）が挙げられる。ヌートカトンの回収および精製はまた、一般的な香料と同じく、精密蒸留により分離する方法により行われてもよい。ヌートカトンの製造の確認、ならびに回収および精製については、例えば、国際公開第２０１６／０２９１８７号、米国出願公開第２０１２／０２４６７６７号、特開２００２－４７２３９号公報、Ｘｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍ．，２００９；１１７：３７５－３８０を参照してもよい。

実施例

[0062] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0063] 実施例１：Ｐａｎｔｏｅａ ａｎａｎａｔｉｓに内在するヌートカトール酸

化酵素の同定

１－１）Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ発現プラスミドの構築

ヌートカトールを酸化する酵素として、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ３Ｐと命名）が報告されている（Ｗｒｉｅｓｓｅｎｇｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔａｂ　Ｅｎｇ．，２０１４，Ｊｕｌ；２４：１８－２９）。本タンパク質をコントロールに、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓに存在するヌートカトール酸化酵素の同定を試みた。ＡＤＨ３Ｐの発現プラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐを以下の手順に従って構築した。ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社の人工遺伝子合成受託サービスを利用しＡＤＨ３Ｐ遺伝子がｐＵＣ５７にクローニングされたｐＵＣ５７－ＡＤＨ３Ｐを取得した。合成したＡＤＨ３Ｐの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号１と配列番号２に示した。

[0064] ｐＵＣ５７－ＡＤＨ３Ｐを鋳型にＡＤＨ３Ｐ－Ｆ（配列番号３）とＡＤＨ３Ｐ－Ｒ（配列番号４）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０　ｓｅｃ．、５４℃・２０　ｓｅｃ．、６８℃・１２０　ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ製、Ａ９２８１）で精製し、ＡＤＨ３Ｐの遺伝子断片を取得した。同様に、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}（国際公開第２０１３／０６９６３４号）を新たな鋳型として、ｐＳＴＶ－Ｆ（配列番号５）とｐＳＴＶ－Ｒ（配列番号６）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・２４０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片を取得した。ＡＤＨ３ＰとｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ

（登録商標） ＨＤ ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ製、６３９６４８）で連結し、ＪＭ１０９株に形質転換した。４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢ培地に播種後、３７℃で一晩培養を行い、形質転換微生物を取得した。出現した形質転換微生物はＡＤＨ３Ｐ－ＦとＡＤＨ３Ｐ－Ｒで示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ｔａｃプロモーターの制御下でＡＤＨ３Ｐが発現するプラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐを取得した。

[0065] １－２）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓに内在するヌートカトール酸化酵素の探索

Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓに内在するヌートカトール酸化酵素の同定を試みた。ヌートカトールを基質と認識するアルコールデヒドロゲナーゼを、データベースから探索した。Ｐ． ａｎａｎａｔｉｓＡＪ１３３５５株のゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＰ０１２０３２．２）は既に公開されている。ＫＥＧＧデータベース（Ｋｙｏｔｏ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅｓ；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ｊｐ／ｋｅｇｇ）を利用し、ａｌｃｏｈｏｌ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅというキワードでヒットした１１個の遺伝子を抽出した。抽出した１１個のアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を表１にまとめた。

[0066] [表1]

表１ Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓにおけるアルコールデヒドロゲナーゼの一覧

遺伝子名	Locus tag 番号	Annotation
yjgB	PAJ_p0120	Alcohol dehydrogenase
adhP	PAJ_0311	Alcohol dehydrogenase
ybdR	PAJ_0426	Alcohol dehydrogenase
adhE	PAJ_1411	Aldehyde-alcohol dehydrogenase
adhC	PAJ_1841	Putative alcohol dehydrogenase class III
-	PAJ_1939	Hypothetical protein
yahK	PAJ_2275	Zinc-type alcohol dehydrogenase like protein
yphC	PAJ_2283	Alcohol dehydrogenase
yahK	PAJ_3430	Zinc-type alcohol dehydrogenase like protein
adhB	PAJ_3463	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit precursor
qor	PAJ_3763	Zinc-type alcohol dehydrogenase like protein

[0067] １－３）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ発現プラスミドの構築

抽出された１１個のＰ．ａｎａｎａｔｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼについて、各遺伝子の発現プラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿ＸＸＸＸ（ＰＡＪ＿ＸＸＸＸはＬｏｃｕｓ　ｔａｇ番号を意味する）を以下の手順に従って構築した。Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＡＪ１３３５５株のゲノムＤＮＡを鋳型に、ＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－ＦとＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－Ｒで示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１８０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。実験に用いたＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－ＦとＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－Ｒのプライマー配列番号を表２にまとめた。得られたＰＣＲ産物は、Ｗｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＰＡＪ＿ＸＸＸＸの遺伝子断片を取得した。同様に、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}を新たな鋳型として、ｐＳＴＶ－Ｆ（配列番号５）とｐＳＴＶ－Ｒ（配列番号６）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・２４０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物を同様にＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片を取得した。ＰＡＪ＿ＸＸＸＸとｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ製、６３９６４８）で連結し、ＪＭ１０９株に形質転換した。出現した形質転換微生物はＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－ＦとＰＡＪ＿ＸＸＸＸ－Ｒで示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ｔａｃプロモーターの制御下でＰＡＪ＿ＸＸＸＸが発現するプラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿ＸＸＸＸを取得した。

[0068]

[表2]

表２　ＡＤＨ遺伝子増幅用プライマー一覧

プライマー名	配列 5’-3’	配列番号
PAJ_0311-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGACGATGAAA ATCAACACGATGATGAAGGC3’	配列番号７
PAJ_0426-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAAAGCGTTA ACCTATCACGGCCCTCATAAAGTCA3’	配列番号８
PAJ_1411-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGGCCGTTACT AATGTCGCTGAACTCAATGCA3’	配列番号９
PAJ_1841-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAACATGATC AAAACCCGTGCCGCCGTAG3’	配列番号１０
PAJ_1939-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAAAGCTGTC GTTCTGAAAGCGTGG3’	配列番号１１
PAJ_2275-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAGAGGCACC ATGAAAATTAATGCACTGATCG3’	配列番号１２
PAJ_2283-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAAAAGTAAT TTCCGAATCGAAAGGT 3’	配列番号１３
PAJ_3430-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAACATTACC CATGCGTATGCTGCTCAGG3’	配列番号１４
PAJ_3463-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGGTGATGAAA AACGGTATTTTAGCCCTG3’	配列番号１５
PAJ_3763-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGTCTGTTCGC GCGATTGCCGTCGATC3’	配列番号１６
PAJ_p0120-F	5’ TAAGAAGGAGATATAATGAGGTACAGA ATGACAATTAAGAGTTACG3’	配列番号１７
PAJ_0311-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTACAACGACAT ATCCACCACAATACGGCCTTCA3’	配列番号１８
PAJ_0426-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTACAGCGTGGC CTGGATTGGCATCATGC3’	配列番号１９
PAJ_1411-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTAGGCTTTTTT AGCTTTCTTCGCCGCTT3’	配列番号２０
PAJ_1841-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTACTTGTTAAA ATGCACGACGGAGCGGATCGA3’	配列番号２１
PAJ_1939-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTCACGCCAGGC GCTGAACGGGCGGTAC3’	配列番号２２
PAJ_2275-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTACGCCCAGCG CGTCGCTTTCATATCCATCACG3’	配列番号２３
PAJ_2283-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTCAGAACGTCGT GACTACCGTGACGCCTGGTGA3’	配列番号２４
PAJ_3430-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTTATGCCGCTGA TTCATCACGCAGCGTA3’	配列番号２５
PAJ_3463-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCCTACTTCCCTTC TAACACCTTGATATCTGCA3’	配列番号２６
PAJ_3763-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTCAGTAAACCAT GACAACCTTGCCGCGCAT3’	配列番号２７
PAJ_p0120-R	5’ ACGGCCAGTGAATTCTCAGAAGTCGG CTTTCAGAACCACACGGTA3’	配列番号２８

[0069] １－４）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）株へのアルコールデヒドロゲナーゼ発現プラスミドの導入

Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）株（Ｋａｔａｓｈｋｉｎａ　Ｊ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．，２００９；１０：３４）のエ

レクトロコンピテントセルを調製し、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿ＸＸＸＸ、あるいはｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}をエレクトロポレーション法にて導入した。その後、４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種した。その後、３４℃で一晩培養を行い、形質転換微生物を取得した。得られた菌株を各々ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿ＸＸＸＸ株、及びＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}株と命名した。

[0070] １－５）各種アルコールデヒドロゲナーゼ発現強化株を用いたヌートカトールからヌートカトンへの変換試験

前記で構築したＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿ＸＸＸＸ株、及びＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}株を、４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢ培地に播種後、３４℃で一晩培養を行った。その後、得られた菌体を約２０ｍｇ／Ｌのヌートカトール（Ｓｕｎｄｉａ社製）を含むＭＳ－ＰＩＰＥＳ－Ｎｏｏｔｋａｔｏｌ培地に接種し、３７℃にて試験管で約１６時間、振盪培養を行った。培養終了後、培養液を純水で５１倍希釈し、OD_{600}値をＵ－２００１　Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒ（日立社製）、グルコース濃度をＢＦ－５（エイブル・バイオット社製）を用いて測定した。以下、ＭＳ－ＰＩＰＥＳ－Ｎｏｏｔｋａｔｏｌ培地の組成を示す。

[0071] [表B]

表Ｂ　MS-PIPES-Nootkatol 培地の組成

MS-PIPES-Nootkatol 培地	成分量
A stock solution	200 mL
B stock solution	200 mL
1M PIPES	100 mL
2g/L Nootkatol	終濃度 20 mg/L

[0072] Ａ　ｓｔｏｃｋ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ；４０ｇのグルコースと１ｇ　$MgSO_4$

・$7H_2O$を純水に溶解し４００ｍＬにメスアップした後、１１５℃、１０ｍｉｎ．の条件にてオートクレーブ殺菌した。

Ｂ ｓｔｏｃｋ ｓｏｌｕｔｉｏｎ；５ｇ $(NH_4)_2SO_4$、１ｇ KH_2PO_4、２ｇ Ｂａｃｔｏ－ｙｅａｓｔ ｅｘｔｒａｃｔ、１０ｍｇ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、１０ｍｇ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$を純水に溶解し、ｐＨをＫＯＨで７．０に調整後、４００ｍＬにメスアップした。その後、１１５℃、１０ｍｉｎ．オートクレーブ殺菌した。

１Ｍ ＰＩＰＥＳ；６０．４８ｇのＰＩＰＥＳを純水に溶解し、ｐＨをＫＯＨで７．０に調整後、２００ｍＬにメスアップした。その後、０．２２μｍのフィルターで滅菌濾過した。

２ｇ／Ｌ Ｎｏｏｔｋａｔｏｌ；ヌートカトール（Ｓｕｎｄｉａ社製）を、終濃度２ｇ／Ｌになるように９９．５％のエタノールに溶解した。

[0073] 培養液に含まれるヌートカトールとヌートカトンは以下の手順で定量分析した。２００μＬの培養液を８００μＬの９９．５％エタノールに良く懸濁し、遠心分離（４℃、１５，０００ｒｐｍ １０ｍｉｎ．）にて菌体を除去した。得られた上清液を分析サンプルとして解析した。分析サンプルは、ＧＣ－２０１０ Ｐｌｕｓ（島津社製）を用いて以下の条件にて測定した。カラムはＤＢ－５；全長３０ｍ、内径０．２５ｍｍ、膜圧０．２５μｍ（アジレント・テクノロジー社製）を使用した。ヌートカトン標準液は市販試薬（シグマ社製）を９９．５％エタノールに溶解させ、１０、１００、１０００ｍｇ／Ｌの標準液を作成した。ヌートカトール標準液は市販試薬（Ｓｕｎｄｉａ社製）を９９．５％エタノールに溶解させ、１０、１００、１０００ｍｇ／Ｌの標準液を作成した。詳細な分析条件を以下に示す（気化室温度；２５０℃、注入量；１．０μＬ、キャリアガス；Ｈｅ、カラムオーブン温度；６５℃～３００℃、カラム昇温条件６５℃～２１０℃；１５℃／ｍｉｎ．、２１０℃～２１５℃；０．５℃／ｍｉｎ．、２１５℃～３００℃；１５℃／ｍｉｎ．、検出器温度；３００℃、検出器；ＦＩＤ、水素流量；４０ｍＬ／ｍｉｎ．、計空；４００ｍＬ／ｍｉｎ）。ヌートカトールからヌートカトン

への変換試験結果を表３に示した。対照であるＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}株が２．８ｍｇ／Ｌのヌートカトンを生産したのに対して、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株では、１１．２ｍｇ／Ｌのヌートカトン蓄積が観察された。一方、抽出された１１個の遺伝子の中で、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿３４３０株で最も高いヌートカトン蓄積が観察された。同株は１２．７ｍｇ／Ｌのヌートカトンを培地中に蓄積し、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株よりも高い値を示した。ＰＡＪ＿３４３０はＺｉｎｃ－ｔｙｐｅ　ａｌｃｏｈｏｌ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ－ｌｉｋｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ＹａｈＫをコードしており、同タンパク質がヌートカトールの酸化反応を触媒することを見出した。

[0074] [表3]

表３　ヌートカトールからヌートカトンへの変換試験結果

菌株/プラスミド	OD_{600}	消費グルコース量(g/L)	ヌートカトン濃度(mg/L)	残存ヌートカトール濃度（mg/L）
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-T_{trp}	30.8±0.1	39.7	2.8±0.1	13.1±0.7
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-ADH3P	31.2±0.7	39.7	11.2±0.2	3.0±0.1
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_0120	27.6±1.1	39.7	1.7±0.4	12.7±0.1
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_0311	29.4±0.8	39.7	3.0±0.6	12.5±0.5
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_0426	25.6±0.6	39.7	6.5±0.2	9.5±0.7
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_1411	30.4±0.1	39.7	3.0±0.6	12.6±0.8
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_1841	30.2±0.3	39.7	3.3±0.8	12.2±0.6
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_1939	28.9±0.6	39.7	3.8±0.1	11.8±0.4
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_2275	29.0±0.3	39.7	4.6±0.3	11.2±0.7
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_2283	27.1±0.7	39.7	2.0±0.1	14.0±0.1
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_3430	26.4±0.1	39.7	12.7±0.5	2.8±0.1
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_3463	29.5±3.9	39.7	3.9±1.1	12.1±2.3
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_3763	30.8±0.1	39.7	2.4±0.1	13.1±0.7

各値は n=3 の平均値を示す。

[0075] 実施例２：Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおけるヌートカトール酸化酵素の同定

２－１）Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉにおけるヌートカトール酸化酵素の探索

ＰＡＪ＿３４３０にコードされたタンパク質と高い同一性を示すタンパク質をＥ．ｃｏｉｌＭＧ１６５５株のゲノム情報（ＮＣ＿０００９１３）から

探索した。ＰＡＪ＿３４３０の塩基配列を配列番号２９、アミノ酸配列を配列番号３０に示した。ＰＡＪ＿３４３０のアミノ酸配列を基に、ｂｌａｓｔｐ（ｈｔｔｐｓ：／／ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）によって相同検索を行った。その結果、Ｌｏｃｕｓ ｔａｇ ｂ０３２５にコードされたＹａｈＫが６６％の同一性を示した。Ｅ．ｃｏｌｉ由来ＹａｈＫの塩基配列を配列番号３１、アミノ酸配列を配列番号３２に示した。

[0076] ２－２）Ｅ．ｃｏｌｉ由来ＹａｈＫの発現プラスミドの構築

前記の方法に準じて、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ＹａｈＫの発現プラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５を以下の手順に従って構築した。Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５株のゲノムＤＮＡを鋳型に、ｂ０３２５－Ｆ（配列番号３３）とｂ０３２５－Ｒ（配列番号３４）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ ｓｔａｒ ＧＸＬ（登録商標） ９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１２０ｓｅｃ．、３５ ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標） ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ＵＰ ｓｙｓｔｅｍで精製し、ｙａｈＫの遺伝子断片を取得した。同様に、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}（国際公開第２０１３／０６９６３４号）を新たな鋳型として、ｐＳＴＶ－Ｆ（配列番号５）とｐＳＴＶ－Ｒ（配列番号６）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ ｓｔａｒ ＧＸＬ（登録商標） ９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・２４０ｓｅｃ．、３５ ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標） ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ＵＰ ｓｙｓｔｅｍで精製し、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片を取得した。ｙａｈＫとｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}の遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔで連結し、ＪＭ１０９株に形質転換した。４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢ培地に播種後、３７℃で一晩培養を行い、形質転換微生物を取得した。出現した形質転換微生物はＭ１３ Ｐｒｉｍｅｒ Ｍ

４（配列番号３５）とＭ１３　Ｐｒｉｍｅｒ　ＲＶ（配列番号３６）で示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ｔａｃプロモーターの制御下でＥ．ｃｏｌｉＭＧ１６５５株由来ｙａｈｋ遺伝子が発現するプラスミド、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５を取得した。

[0077] ２－３）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株の構築

ＳＣ１７（０）株のエレクトロコンピテントセルを調製し、ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５をエレクトロポレーション法にて導入した。その後、４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢ培地に播種後、３４℃で一晩培養を行い、形質転換微生物を取得した。得られた菌株をＰ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株と命名した。

[0078] ２－４）Ｅ．ｃｏｌｉ由来ｙａｈｋ遺伝子発現強化株を用いたヌートカトールからヌートカトンへの変換試験

ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株を用いて、前記と同様にヌートカトールからヌートカトンへの変換試験を実施した。ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿３４３０株、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株、及びＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}株を、４０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢ培地に播種後、３４℃で一晩培養を行った。その後、得られた菌体を約４０ｍｇ／Ｌのヌートカトールを含むＭＳ－ＰＩＰＥＳ－Ｎｏｏｔｋａｔｏｌ培地に接種し、３７℃にて約１６時間、振盪培養を行った。培養終了後、前記の方法に準じてOD_{600}値、グルコース濃度、ヌートカトール濃度、更にはヌートカトン濃度を測定した。培養結果を表４に示した。対照であるＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－T_{trp}株が５．１ｍｇ／Ｌのヌートカトンを生産したのに対して、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＰＡＪ＿３４３０株では、１７．４ｍｇ／Ｌのヌートカトン蓄積が観察された。また、ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株でも、対照よりも高い８．９　ｍｇ／Ｌのヌートカトン蓄積が観察された。以上の結果より、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ｙ

ａｈｋ遺伝子の発現を強化することで、ヌートカトンの蓄積量が増加する結果を見出した。

[0079] [表4]

表４　ＳＣ１７（０）／ｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ｂ０３２５株を用いたヌートカトールからヌートカトンへの変換試験結果

菌株/プラスミド	OD_{600}	消費グルコース量(g/L)	ヌートカトン濃度(mg/L)	ヌートカトール濃度(mg/L)
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-T_{trp}	21.1±1.3	36.9	5.1±0.1	40.0±0.4
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-PAJ_3430	22.9±1.1	39.7	17.4±4.0	21.4±0.2
SC17(0)/pSTV28-P_{tac}-b0325	24.6±0.3	39.7	8.9±2.0	26.0±7.5

各値はn=3の平均値を示す。
形質転換微生物は、P. ananatisである。

[0080] 実施例３：メバロン酸経路が強化されたＰ．ａｎａｎａｔｉｓＩＰ０３株の構築

３－１）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）　ΔＬ－Ｉｄｈ：：ａｔｔＬφ８０－Km^R－ａｔｔＲφ８０株の構築

次にヌートカトール生産能を付与したＰ．ａｎａｎａｔｉｓでＰＡＪ＿３４３０とｂ０３２５の効果を検討した。まず、メバロン酸経路が強化されたＰ．ａｎａｎａｔｉｓＩＰ０３株（メバロン酸経路に関与する酵素であるＥｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃａｌｉｓ由来アセトアセチルＣｏＡチオラーゼ／３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリルＣｏＡ（ＨＭＧ－ＣｏＡ）レダクターゼ（ＭｖａＥ）、Ｅ．　ｆａｅｃａｌｉｓ由来３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリルＣｏＡ（ＨＭＧ－ＣｏＡ）シンターゼ（ＭｖａＳ）、Ｍｅｔｈａｎｏｃｅｌｌａ　ｐａｌｕｄｉｃｏｌａ由来メバロン酸キナーゼ（Ｍｖｋ）、Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来ホスホメバロン酸キナーゼ（ＰＭＫ）、Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（ＭＶＤ）、Ｓ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来イソプレニルピロフォスフェイトイソメラーゼ（ｙＩＤＩ）をコードする遺伝子が導入された株）を以下の手順に従って構築した。Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓの染色体上にあるＬ－Ｉｄｈ遺伝子（ＰＡＪ＿ｐ０２７６）にカナマイシン耐性遺伝子の発現カセットａｔｔＬφ８０－Km^R－ａｔｔＲφ８０を導入した。Ｐ．ａｎａｎ

ａｔｉｓＡＪ１３３５５株のゲノム配列（Ｇｅｎｂａｎｋ：ＡＰ０１２０３２）は既に公開されおり、Ｌ－ｌｄｈ遺伝子の塩基配列（配列番号３７）を基に、5’末端に同遺伝子と相同な配列を有するＬ－ｌｄｈ＿Ｋｍφ８０＿Ｆ（配列番号３８）とＬ－ｌｄｈ＿Ｋｍφ８０＿Ｒ（配列番号３９）のプライマーを設計した。ｐＭＷａｔｔｐｈｉ（Ｍｉｎａｅｖａ Ｎｌ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８；８：６３）を鋳型にＬ－ｌｄｈ＿Ｋｍφ８０＿ＦとＬ－ｌｄｈ＿Ｋｍφ８０＿Ｒのプライマーにて ＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ ｓｔａｒ ＧＸＬ（登録商標） ９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１２０ｓｅｃ．、３５ ｃｙｃｌｅｓ）を実施し、得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標） ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ＵＰ ｓｙｓｔｅｍで精製することで両末端にＬ－ｌｄｈ遺伝子との相同配列を有するａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０遺伝子断片を取得した。その後、既報（Ｋａｔａｓｈｋｉｎａ Ｊｌ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，２００９；１０：３４）に従って得られたａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０遺伝子断片６００ｎｇをＳＣ１７（０）／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株（Ｋａｔａｓｈｋｉｎａ Ｊｌ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，２００９；１０：３４）にエレクトロポレーション法により導入し、カナマイシン ５０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種した。その後、得られた形質転換微生物をＬ－ｌｄｈ－Ｆ（配列番号４０）とＬ－ｌｄｈ－Ｒ（配列番号４１）で示すプライマーにてコロニーＰＣＲを実施し、Ｌ－ｌｄｈ遺伝子がａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０配列に置換されていることを確認した。同形質転換微生物をＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲを除去するために、１０％ Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでＰ．ａｎａｎａ

ｔｉｓ ＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株を取得した。

[0081] ３－２）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０株の構築

次にＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株からカナマイシン耐性遺伝子（ｋａｎ遺伝子）の除去を実施した。既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ ＩＦ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）の手法に従って、ｐＡＨ１２９－ｃａｔを用いて行った。ｋａｎ遺伝子を除去するために、ＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株のコンピテントセルを調製し、ｐＡＨ１２９－ｃａｔをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行い、続けて４２℃に温度を上げ、更に１時間の培養を行った。回復培養後の菌体を、クロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌ含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した後、３０℃で更に一晩培養を行った。得られた形質転換微生物をカナマイシン５０ｍｇ／Ｌを含むプレートで生育が出来ないことを確認するとともに、Ｌ－ｌｄｈ－Ｆ（配列番号４０）とＬ－ｌｄｈ－Ｒ（配列番号４１）で示すプライマーにてコロニーＰＣＲを実施し、Ｌ－ｌｄｈ遺伝子がａｔｔＢφ８０配列に置換されていることを確認した。同株を新たにＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株と命名した。既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ ＩＦ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）の手法に従って、ＳＣ１７（０） ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株からｐＡＨ１２９－ｃａｔの除去を行った。同株をＬＢプレートにて３４℃で一晩培養した。得られた菌体を再び、１ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３４℃にて３時間培養した。その後、温度を４２℃に上げて、更に１時間培養を行った。次に、培養液をシングルコロニーが出現するようにＬＢプレートに播種し、３７℃で１晩培養を行った。出現し

た形質転換微生物を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートで生育出来ないことを確認することで、ｐＡＨ１２９－ｃａｔが脱落したＰ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０株を取得した。

[0082] ３－３）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株の構築

ＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０株に対してｐＡＨ１２３－ｃａｔ（Ａｎｄｒｅｅｖａ　ＩＦ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）をエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬに添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体をクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌ含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をＳＣ１７（０）ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株と命名した。続けて、ＳＣ１７（０）ΔＬ－ｌｄｈ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株のコンピテントセルを作成し、既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ　ＩＦ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）に従ってエレクトロポレーション法でＣＲＩＭプラスミド、ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ（国際公開第２０１５／０８０２７３号）を導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行い、続けて４２℃に温度を上げ、更に１時間の培養を行った。回復培養後の菌体を、２５ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した後、３０℃で更に一晩培養を行った。得られた形質転換微生物をＰ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株と命名した。

[0083] ３－４）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＷＩＴＣＨ－ＰｐｈｏＣΔｇｃｄ　ΔＬ－ｌｄｈ：：P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株の構築

前記の手法に準じて、ＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－

P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株からゲノムＤＮＡを調製した。その後、ＳＷＩＴＣＨ－ＰｐｈｏＣΔｇｃｄ株（国際公開第２０１７／０５１９３０号）からコンピテントセルを調製後、エレクトロポレーション法にてＳＣ１７（０）　ΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株から抽出したゲノムＤＮＡ、６００ｎｇを導入した。形質転換後の菌体をＳＯＣ培地１ｍＬにて、３４℃にて２時間、回復培養を行った。培養液をテトラサイクリン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに塗布し、３４℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をＰ．ａｎａｎａｔｉｓＳＷＩＴＣＨ－ＰｐｈｏＣΔｇｃｄΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株と命名した。

[0084] ３－５）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＩＰ０３株の構築

ＳＷＩＴＣＨ－ＰｐｈｏＣΔｇｃｄΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株からテトラサイクリン耐性遺伝子を除去した。Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＷＩＴＣＨ－ＰｐｈｏＣΔｇｃｄΔＬ－ｌｄｈ：：ｐＡＨ１６２－P_{phoC}－ｍｖａＥＳ株に対してｐＲＳＦＰａｒａＩＸ（Ｔａｊｉｍａ　Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ　Ｅｎｖｉｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１５；８１（３）：９２９－９３７）をエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬに添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールと０．２Ｍのアラビノースを含むＬＢプレートに播種し、シングルコロニーを形成させた。得られたコロニーは２５ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢプレートと６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートにそれぞれ接種し、３４℃にて１６時間培養を行った。テトラサイクリンを含むＬＢプレートでのみ生育が出来ない株を取得することで、テトラサイクリン遺伝子が脱落していることを確認した。この表現型を示す菌株を新たにＩＰ０３／ｐＲＳＦＰａｒａＩＸ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＰａｒａＩＸを除去するために、１０％　Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ　ＩＰＴＧを含むＬＢプレ

ートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでｐＲＳＦＰａｒａＩＸが脱落したＰ．ａｎａｎａｔｉｓＩＰ０３株を取得した。

[0085] 実施例４：バレンセンを基質として認識するように改変されたＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０変異体（ＣａｍＣ＊ＡＢ）の発現プラスミド構築

４－１）Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０$_{camC}$（ＣａｍＣ）発現プラスミドの構築

バレンセンからヌートカトンへの水酸化反応を触媒する為のシトクロムＰ４５０発現プラスミドを構築した。Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株のゲノム配列は既に公開されている（ＮＣ＿００２９４７）。Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＣ（ＣａｍＣ）はシトクロムＰ４５０酸化酵素として機能することが知られている（Ｒｅｂｅｃｃａ　ＪＳ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００５；３：５７－６４）。ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社が提供する人工遺伝子合成受託サービスを利用し、ＣａｍＣの塩基配列の遺伝子合成を実施した。合成したＣａｍＣの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号４２と配列番号４３に示す。ＣａｍＣがクローニングされたｐＵＣ５７－ＣａｍＣを鋳型に、ｐＳｏｌ－Ｐ４５０ＣａｍＣ－ＣＦ（配列番号４４）とｐＳｏｌ－Ｐ４５０ＣａｍＣ－ＣＲ（配列番号４５）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１５０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＣａｍＣの遺伝子断片を取得した。ｐＳｏｌ－Ｈｉｓ（Ｌｕｃｉｇｅｎ社　４９０６０－１）とＣａｍＣの遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔで連結し、ＪＭ１０９株に形質転換した。出現した形質転換

微生物は同キットに付属のｐＲｈａｍ　ＦｏｒｗａｒｄとｐＥＴｉｔｅ　Ｒｅｖｅｒｓｅで示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲ（Ｓａｐｐｈｉｒｅ　Ａｍｐ（登録商標）　Ｆａｓｔ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘ　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、７２℃・２５ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を行い、ラムノースプロモーターの制御下でＣａｍＣが発現するプラスミドｐＳｏｌ－ＣａｍＣを取得した。

[0086] ４－２）Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０$_{cam}$$_{C}$の４重変異体（ＣａｍＣ＊）発現プラスミドの構築

バレンセンを基質と認識するＣａｍＣの変異体（ＣａｍＣ＊）がこれまでに報告されている（Ｒｅｂｅｃｃａ　ＪＳ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００５；３：５７－６４）。ＣａｍＣ＊は、野生型のＣａｍＣに対してＦ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ／Ｌ２４４Ａ／Ｖ２４７Ｌの変異が導入されている。ＣａｍＣ＊の発現プラスミド、ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊は以下の手順に従って構築した。ｐＳｏｌ－ＣａｍＣを鋳型に、ＣａｍＣ－Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ－ＣＦ（配列番号４６）とＣａｍＣ－Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ－ＣＲ（配列番号４７）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・３００ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＣａｍＣ遺伝子に変異が導入されたＣａｍＣ（Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ）遺伝子を含むプラスミドを取得した。同プラスミドをＪＭ１０９株に形質転換し、得られたプラスミドｐＳｏｌ－ＣａｍＣ（Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ）の遺伝子変異箇所をｐＲｈａｍ　ＦｏｒｗａｒｄとｐＥＴｉｔｅ　Ｒｅｖｅｒｓｅで示すプライマーでシーケンス解析し、変異が導入されたことを確認した。次に、ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ（Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ）を鋳型に、ＣａｍＣ－Ｌ２４４Ａ／Ｖ２４７Ｌ－ＣＦ（配列番号４８）とＣａｍＣ－Ｌ２４４Ａ／Ｖ２４７Ｌ－ＣＲ（配列番号４９）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ

（登録商標） ９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・２４０ｓｅｃ．、３５ ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標） ＳＶ Ｇｅｌ ａｎｄ ＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－ＵＰ ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＣａｍＣ（Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ）遺伝子に更に変異が導入されたＣａｍＣ＊（Ｆ８７Ａ／Ｙ９６Ｆ／Ｌ２４４Ａ／Ｖ２４７Ｌ）遺伝子断片を含むプラスミドを取得した。同プラスミドをＪＭ１０９株に形質転換し、得られたプラスミドｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊の遺伝子変異箇所をｐＲｈａｍ ＦｏｒｗａｒｄとｐＥＴｉｔｅ Ｒｅｖｅｒｓｅで示すプライマーの組み合わせでシーケンス解析し、変異が導入されたことを確認した。ラムノースプロモーターの制御下でＣａｍＣ＊が発現するプラスミドをｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊と命名した。

[0087] ４－３）Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０$_{CamC*AB}$（ＣａｍＣ＊ＡＢ）発現プラスミドの構築

ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊ＡＢは以下の手順に従って構築した。Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノム配列は既に公開されている（ＮＣ＿００２９４７）。Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ由来プチダレドキシンレダクターゼ（ＣａｍＡ）とプチダレドキシン（ＣａｍＢ）は、ＣａｍＣタンパク質と共役して機能することが知られている（Ｒｅｂｅｃｃａ ＪＳ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２００５；３：５７－６４）。ＣａｍＡの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号５０と配列番号５１、ＣａｍＢの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号５２と配列番号５３に示す。ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社が提供する人工遺伝子合成受託サービスを利用し、ＣａｍＡ遺伝子とＣａｍＢ遺伝子が連結した人工オペロンの遺伝子合成を実施した。ＣａｍＡ遺伝子とＣａｍＢ遺伝子からなる人工オペロンＣａｍＡ－ＣａｍＢの塩基配列を配列番号５４に示す。ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社で化学合成されたｐＵＣ５７－ＣａｍＡ－ＣａｍＢを鋳型に、ＣａｍＡＢ－Ｆ（配列番号５５）とＣａｍＡＢ－Ｒ（配列番号５６）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ ｓｔａｒ ＧＸＬ（登録商標）

９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１５０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＣａｍＡ－ＣａｍＢの遺伝子断片を取得した。次に、ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊を鋳型に、ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊－Ｆ（配列番号５７）とｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊－Ｒ（配列番号５８）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・３００ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊の遺伝子断片を取得した。ｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊とＣａｍＡＢの遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔで連結し、ＪＭ１０９株に形質転換した。出現した形質転換微生物はｐＲｈａｍ　ＦｏｒｗａｒｄとｐＥＴｉｔｅ　Ｒｅｖｅｒｓｅで示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲ（Ｓａｐｐｈｉｒｅ　Ａｍｐ（登録商標）　Ｆａｓｔ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘ　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、７２℃・４０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を行い、ラムノースプロモーターの制御下でＣａｍＣ＊、ＣａｍＡ、ＣａｍＢが発現するプラスミドｐＳｏｌ－ＣａｍＣ＊ＡＢを取得した。

[0088] 実施例５：バレンセン生産能が付与された　Ｐ．　ａｎａｎａｔｉｓ　ＩＰ０３ＶＩ株の構築

５－１）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株の構築

次にＰ．ａｎａｎａｔｉｓＩＰ０３株にバレンセン生産能が付与したＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＩＰ０３ＶＩ株を以下の手順に従って構築した。ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株は以下の手順で構築した。ｐＭＷａｔｔｐｈｉ（Ｍｉｎａｅｖａ　Ｎｌ　ｅｔ　ａｌ．，ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８；８：６３）を鋳型に、ｐｆ

ｌＡ－ｐｈｉ８０－ａｔｔＲ（配列番号５９）とｐｆｌＡ－ｐｈｉ８０－ａｔｔＬ（配列番号６０）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１８０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ　（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、両端にｐｆｌＡ遺伝子（Ｌｏｃｕｓ　ｔａｇ；ＰＡＪ＿０６６９）との相同領域を保持した遺伝子断片を取得した。同遺伝子断片６００ｎｇをＳＣ１７（０）／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株に形質転換し、カナマイシン耐性を示す株を取得した。ｐｆｌＡ－ｃｈｅｃｋ１（配列番号６１）とｐｆｌＡ－ｃｈｅｃｋ２（配列番号６２）で示すプライマーを用いてコロニーＰＣＲを実施し、ｐｆｌＡ遺伝子がａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０遺伝子に置き換わっていることを確認した。

[0089] ５－２）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０株の構築

Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株からのｋａｎ遺伝子の除去は以下の手順に従って実施した。カナマイシン５０ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに同株を均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。プレートから菌体を掻き取り、コンピテントセルを調製し、ｐＡＨ１２９－ｃａｔをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地１ｍＬを添加し、３４℃で２時間振盪培養した後、４２℃にて更に１時間振盪培養を行った。培養液をクロラムフェニコール　６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに塗布し、３０℃で一晩培養した。出現したクロラムフェニコール耐性株がカナマイシン感受性を示すことを確認し、ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株とした。続けて、ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株からのｐＡＨ１２９－ｃａｔの除去を行った。ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株をＬＢ培地に

接種し、３４℃、３時間培養した。その後、４２℃、１時間培養した。培養液をＬＢプレートに塗布し、シングルコロニーを取得した。各形質転換微生物の中からクロラムフェニコールを含むＬＢプレートで生育できないクローンを取得し、ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０株と命名した。

[0090] ５－３）Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ　ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ（ＶｌｎＳＣＮ）とＥ．ｃｏｌｉ由来ファルネシル二リン酸シンターゼ（ＩｓｐＡ）の発現カセットを含むＣＲＩＭプラスミドｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡの構築

ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡは以下の手順に従って構築した。Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ　ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ（ＶｌｎＳＣＮ）の塩基配列（ＧｅｎｅＢａｎｋ：ＡＦＮ２１４２９．１）は既に公開されている。ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社が提供する人工遺伝子合成受託サービスを利用し、ＶｌｎＳＣＮの塩基配列の遺伝子合成を実施した。合成したＶｌｎＳＣＮの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号６３と配列番号６４に示す。ＶｌｎＳＣＮがクローニングされたｐＵＣ５７－ＶｌｎＳＣＮを鋳型に、P_{tac}－ＶｌｎＳＣＮ－Ｆ（配列場号６５）とＶｌｎＳＣＮ－Ｒ（配列番号６６）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ（登録商標）　ＧＸＬ　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、７２℃・１２０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＶｌｎＳＣＮの遺伝子断片を取得した。次に、Ｅ．ｃｏｌｉＭＧ１６５５株のゲノム配列（ＮＣ＿０００９１３）を基にＩｓｐＡを増幅する為のプライマーを設計した。ＩｓｐＡの塩基配列とアミノ酸配列を配列番号６７と配列番号６８に示す。Ｅ．ｃｏｌｉＭＧ１６５５株のゲノムＤＮＡを鋳型にＩｓｐＡ－Ｆ（配列番号６９）とＩｓｐＡ－Ｒ（配列番号７０）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ（登録商標）　ＧＸＬ　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、７２℃・９０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した

。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＩｓｐＡの遺伝子断片を取得した。その後、ＶＩｎＳＣＮの遺伝子断片とＩｓｐＡの遺伝子断片を鋳型に、$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶＩｎＳＣＮ－Ｆ（配列番号６５）とＩｓｐＡ－Ｒ（配列番号７０）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ（登録商標）　ＧＸＬ　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、７２℃・２４０ｓｅｃ．、３５　ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＶＩｎＳＣＮ遺伝子とＩｓｐＡ遺伝子が連結されたＶＩｎＳＣＮ－ＩｓｐＡの遺伝子断片を取得した。次に制限酵素ＰｓｔＩとＢａｍＨＩで消化処理したｐＡＨ１６２－Ｐｔａｃ（国際公開第２０１７／０２２８５６号）とＶＩｎＳＣＮ－ｉｓｐＡの遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ製、６３９６４８）で連結し、ＰＩＲ２株（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ製、Ｃ１１１１１０）に形質転換した。出現した形質転換微生物はｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｆ２（配列番号７１）とｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｒ（配列番号７２）で示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ｔａｃプロモーター制御下でＶＩｎＳＣＮ－ｉｓｐＡオペロンが発現するｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶＩｎＳＣＮ－ｉｓｐＡを取得した。

[0091] ５－４）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＩＰ０３ＶＩ株の構築

Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０株に対してｐＡＨ１２３－ｃａｔをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体をクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌ含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株と命名した。続けて、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｐｆｌＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株のコンピテントセ

ルを作成し、既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ　ＩＦ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）に従って、ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ　２００ｎｇをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を用いて３４℃、２時間振盪培養した後、４２℃にて１時間培養した。培養液の一部をＴｅｔ　２５ｍｇ／ＬとＣｍ　６０ｍｇ／Ｌ含むＬＢプレートに塗布し、３７℃で１晩培養した。得られた形質転換微生物をＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ株と命名した。前記の手法に準じて、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）ΔｐｆｌＡ：：ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ株からゲノムＤＮＡを調製した。その後、ＩＰ０３株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法にてＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｐｆｌＡ：：ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ株から抽出したゲノムＤＮＡ　６００ｎｇを導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃にて２時間、回復培養を行った。培養液をテトラサイクリン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに塗布し、３４℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をＩＰ０３ΔｐｆｌＡ：：ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ株と命名した。続けて、同株からテトラサイクリン耐性遺伝子を除去した。ＩＰ０３ΔｐｆｌＡ：：ｐＡＨ１６２－$Ｐ_{ｔａｃ}$－ＶｌｎＳＣＮ－ｉｓｐＡ株のコンピテントセルを調製し、ｐＲＳＦＰａｒａＩＸをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地で、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールと０．２Ｍのアラビノースを含むＬＢプレートに播種し、シングルコロニーを形成させた。得られたコロニーは２５ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢプレートと６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートにそれぞれ接種し、３４℃にて１６時間培養を行った。テトラサイクリンを含むＬＢプレートでのみ生育が出来ない株を取得することで、テトラサ

イクリン耐性遺伝子が脱落していることを確認した。この表現型を示す菌株を新たにＩＰ０３ＶＩ／ｐＲＳＦＰａｒａＩＸ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＰａｒａＩＸを除去するために、１０％　Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ　ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでｐＲＳＦＰａｒａＩＸが脱落したＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＩＰ０３ＶＩ株を取得した。

[0092] 実施例６：各種ＡＤＨ遺伝子発現カセットが染色体に導入されたＩＰ０３ＶＩ株の構築

６－１）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株の構築

ＩＰ０３ＶＩ株に対して、各種ＡＤＨ遺伝子の発現カセットを染色体に導入した。まず、染色体に導入する為のａｔｔＢφ８０サイトをｍｇｓＡ遺伝子（Ｌｏｃｕｓ　ｔａｇ；　ＰＡＪ＿０７２２）のローカスに構築した。Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＡＪ１３３５５株のゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＰ０１２０３２．２）は既に公開されおり、ｍｇｓＡ遺伝子の塩基配列（配列番号７３）を基に、５’末端に同遺伝子と相同な配列を有するｍｇｓＡ＿Ｋｍφ８０＿Ｆ（配列番号７４）とｍｇｓＡ＿Ｋｍφ８０＿Ｒ（配列番号７５）のプライマーを設計した。ｐＭＷａｔｔｐｈｉ（Ｍｉｎａｅｖａ　ＮＩ　ｅｔ　ａｌ．，　ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００８；８：６３）を鋳型にｍｇｓＡ＿Ｋｍφ８０＿ＦとｍｇｓＡ＿Ｋｍφ８０＿Ｒのプライマーにて ＰＣＲを実施し、両末端にｍｇｓＡ遺伝子領域との相同配列を有するａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０遺伝子断片を取得した。得られたａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０遺伝子断片６００ｎｇをＳＣ１７（０）／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株にエレクトロポレーション法により導入し、カナマイシン　５０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種した。その後、得られた形質転換微生物をｍｇｓＡ－Ｆ（配列番号７６）とｍｇｓＡ－Ｒ（配列番号７

７）で示すプライマーにてコロニーＰＣＲを実施し、ｍｇｓＡ遺伝子がａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０配列に置換されていることを確認した。同形質転換微生物をＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲを除去するために、１０％　Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ　ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでＰ．ａｎａｎａｔｉｓＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株を取得した。

[0093] ６－２）Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０株の構築

次にＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株からカナマイシン耐性遺伝子（ｋａｎ遺伝子）の除去を実施した。既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ　ＩＦ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）の手法に従って、ｐＡＨ１２９－ｃａｔを用いて行った。ｋａｎ遺伝子を除去するために、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＬφ８０－Ｋｍ^{R}－ａｔｔＲφ８０株に対してｐＡＨ１２９－ｃａｔをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍｌ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行い、続けて４２℃に温度を上げ、更に１時間の培養を行った。回復培養後の菌体を、６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した後、３０℃で更に一晩培養を行った。得られた形質転換微生物をカナマイシン５０ｍｇ／Ｌを含むプレートで生育が出来ないことを確認するとともに、ｍｇｓＡ－Ｆ（配列番号７６）とｍｇｓＡ－Ｒ（配列番号７７）で示すプライマーにてコロニーＰＣＲを実施し、ｍｇｓＡ遺伝子がａｔｔＢφ８０配列に置換されていることを確認した。同株を新たにＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）

ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９－ｃａｔ株と命名した。続けて、ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９株からのｐＡＨ１２９の除去は以下の手順に従って実施した。１ｍＬのＬＢ培地にＳＣ１７（０）　ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２９株を植菌し、３４℃、３時間培養した。その後、４２℃で１時間培養した。培養液をＬＢプレートに塗布し、シングルコロニーを取得した。得られたクローンが６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールで生育不能であることを確認し、ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０株として使用した。

[0094] ６－３）ＣＲＩＭプラスミド、ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐの構築

ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐは以下の手順に従って構築した。前記で構築したｐＳＴＶ２８－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐを鋳型に、ｐＡＨ１６２－ＡＤＨ３Ｐ－Ｆ（配列番号７８）とｐＡＨ１６２－ＡＤＨ３Ｐ－Ｒ（配列番号７９）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１２０ｓｅｃ．、３５ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、ＡＤＨ３Ｐの遺伝子断片を取得した。次に、ｐＡＨ１６２－P_{tac}を制限酵素ＰｓｔＩとＢａｍＨＩで消化処理し、得られたプラスミド断片をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製した。その後、ＡＤＨ３ＰとｐＡＨ１６２の遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔで連結し、ＰＩＲ２株に形質転換した。出現した形質転換微生物を用いて、ｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｆ２（配列番号７１）とｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｒ（配列番号７２）で示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ＡＤＨ３ＰがｐＡＨ１６２－P_{tac}にクローニングされている事を確認した。ｔａｃプロモーターの制御下でＡＤＨ３Ｐが発現するプラスミドをｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐと命名した。

[0095] ６－４）ＣＲＩＭプラスミド、ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５

）の構築

ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｂ０３２５は以下の手順に従って構築した。Ｅ．ｃｏｌｉＭＧ１６５５株のゲノムＤＮＡを鋳型に、ｐＡＨ１６２－ｙａｈＫＥ－Ｆ（配列番号８０）とｐＡＨ１６２－ｙａｈＫＥ－Ｒ（配列番号８１）で示すプライマーの組み合わせでＰＣＲ（Ｐｒｉｍｅ　ｓｔａｒ　ＧＸＬ（登録商標）　９４℃・１０ｓｅｃ．、５４℃・２０ｓｅｃ．、６８℃・１２０ｓｅｃ．、３５ｃｙｃｌｅｓ）を実施した。得られたＰＣＲ産物をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製し、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ｙａｈＫ（ｂ０３２５）の遺伝子断片を取得した。次に、ｐＡＨ１６２を制限酵素ＰｓｔⅠとＢａｍＨⅠで消化処理し、得られたプラスミド断片をＷｉｚａｒｄ（登録商標）　ＳＶ　Ｇｅｌ　ａｎｄ　ＰＣＲ　Ｃｌｅａｎ－ＵＰ　ｓｙｓｔｅｍで精製した。その後、ｙａｈＫ（ｂ０３２５）とｐＡＨ１６２の遺伝子断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）　ＨＤ　ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔで連結し、ＰＩＲ２株に形質転換した。出現した形質転換微生物はｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｆ２（配列番号７１）とｐＡＨ１６２－Ｇｅｎｅ－Ｒ（配列番号７２）で示すプライマーの組み合わせでコロニーＰＣＲを行い、ｔａｃプロモーターの制御下でＥ．ｃｏｌｉ由来ｙａｈＫ（ｂ０３２５）遺伝子が発現するプラスミドｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈｋ（ｂ０３２５）を取得した。

[0096] ６－５）ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株の構築

ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株は、以下の手順で構築した。ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０株のコンピテントセル液を調製し、ｐＡＨ１２３－ｃａｔをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニ

コールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株と命名した。続けて、ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＡＨ１２３－ｃａｔ株のコンピテントセルを作成し、既報（Ａｎｄｒｅｅｖａ ＩＦ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｌｅｔｔ．２０１１；３１８（１）：５５－６０）に従ってエレクトロポレーション法でｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３ＰとｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）をそれぞれ導入した。その後、ＳＯＣ培地を用いて３４℃、２時間振盪培養した後、４２℃にて１時間培養した。培養液の一部をＴｅｔ ２５ｍｇ／ＬとＣｍ ６０ｍｇ／Ｌ含むＬＢプレートに塗布し、３７℃で１晩培養した。得られた各々の形質転換微生物をＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株と命名した。

[0097] ６－６）ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株の構築

ＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株をそれぞれ、２５ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢプレートに均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。得られた菌体から前記の方法に従ってゲノムＤＮＡを抽出した。その後、ＩＰ０３ＶＩ株からコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法にてＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＳＣ１７（０）ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株からそれぞれ抽出したゲノムＤＮＡ６００ｎｇを導入した。回復培養は、ＳＯＣ培地にて３４℃にて２時間、回復培養を行った。培養液をテトラサイクリン２５ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに塗布し、３４℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をそれぞれＩＰ０３ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３Ｖ

ＩΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－Ｐｔａｃ－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株と命名した。

[0098] ６－７）ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３Δｍｇｓ Ａ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株の構築

ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３ΔｍｇｓＡ：：ｐＡＨ１６２－P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株からテトラサイクリン耐性遺伝子を除去した。両該菌株に対してｐＲＳＦＰａｒａＩＸをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬに添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールと０．２Ｍのアラビノースを含むＬＢプレートに播種し、シングルコロニーを形成させた。得られたコロニーは２５ｍｇ／Ｌのテトラサイクリンを含むＬＢプレートと６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートにそれぞれ接種し、３４℃にて１６時間培養を行った。テトラサイクリンを含むＬＢプレートでのみ生育が出来ない株を取得することで、テトラサイクリン耐性遺伝子が脱落していることを確認した。この表現型を示す菌株を新たにＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ／ｐＲＳＦＰａｒａＩＸ株とＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）／ｐＲＳＦＰａｒａＩＸ株とそれぞれ命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＰａｒａＩＸを除去するために、１０％ Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでｐＲＳＦＰａｒａＩＸが脱落したＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３Δｍｇｓ Ａ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株を取得した。

[0099] ６－８）ＳＣ１７（０）λａｔｔＬ－Km^{R}－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株の構築

ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株と同じように、ｔａｃプロモーターの制御下でｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）遺伝子が発現するＩＰ０３ＶＩP_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株の構築を行った。Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＡＪ１３３５５株のゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋ：ＡＰ０１２０３２．２）は既に公開されおり、ｙａｈＫ遺伝子（ＰＡＪ＿３４３０）のプロモーター領域の配列（配列番号８２）を基に、５’末端に同遺伝子のプロモータ領域と相同な配列を有するＰｔａｃ－ｙａｈＫ１－Ｆ（配列番号８３）とＰｔａｃ－ｙａｈＫ１－Ｒ（配列番号８４）のプライマーを設計した。λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－Ｐｔａｃ（国際公開第２００８／０９０７７０号）を鋳型にＰｔａｃ－ｙａｈＫ１－ＦとＰｔａｃ－ｙａｈＫ１－Ｒのプライマーにてｐｃｒを実施し、両末端にｙａｈＫ遺伝子のプロモーター領域と相同配列を有するλａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}遺伝子断片を取得した。得られたλａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}遺伝子断片６００ｎｇをＳＣ１７（０）／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株にエレクトロポレーション法により導入し、カナマイシン　５０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種した。その後、得られた形質転換微生物をｙａｈＫ１－ＣＦ（配列番号８５）とｙａｈＫ１－ＣＲ（配列番号８６）で示すプライマーにてコロニーＰＣＲを実施し、ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）遺伝子のプロモーター領域がλａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}配列に置換されていることを確認した。同形質転換微生物をＰ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＳＣ１７（０）λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ／ｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＲｅｄＴＥＲを除去するために、１０％　Ｓｕｃｒｏｓｅと１ｍＭ　ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシングルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでＳＣ１７（０）λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株を取得した。

[0100] ６－９）ＩＰ０３ＶＩ　P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株の構築

ＳＣ１７（０）λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株をそれぞれ、５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含むＬＢプレートに均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。得られた菌体から前記の方法に従ってゲノムＤＮＡを抽出した。その後、ＩＰ０３ＶＩ株からコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法にてＳＣ１７（０）λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株からそれぞれ抽出したゲノムＤＮＡ　６００ｎｇを導入した。その後、ＳＯＣ培地１ｍＬを添加し、３４℃にて２時間、回復培養を行った。培養液をカナマイシン　５０ｍｇ／Ｌを含むＬＢプレートに塗布し、３４℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をそれぞれＰ０３ＶＩ　λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株と命名した。続けて、ＩＰ０３ＶＩ　λａｔｔＬ－Km^R－λａｔｔＲ－P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株からカナマイシン耐性遺伝子を除去した。該菌株に対してｐＲＳＦＰａｒａＩＸをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物を６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールと０．２Ｍのアラビノースを含むＬＢプレートに播種し、シングルコロニーを形成させた。得られたコロニーは５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含むＬＢプレートと６０ｍｇ／Ｌのクロラムフェニコールを含むＬＢプレートにそれぞれ接種し、３４℃にて１６時間培養を行った。カナマイシンを含むＬＢプレートでのみ生育が出来ない株を取得することで、カナマイシン耐性遺伝子が脱落していることを確認した。この表現型を示す菌株を新たにＩＰ０３ＶＩ　P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）／ｐＲＳＦＰａｒａＩＸ株と命名した。次に同株からクロラムフェニコール耐性のｐＲＳＦＰａｒａＩＸを除去するために、１０％　Ｓｕｃｒｏｓｅ　と１ｍＭ　ＩＰＴＧを含むＬＢプレートに播種し、３４℃にて１６時間培養した。得られたシン

グルコロニーをクロラムフェニコール６０ｍｇ／Ｌを含むＬＢ培地に播種し、生育が出来ないことを確認することでｐＲＳＦＰａｒａＩＸが脱落したＩＰ０３ＶＩ　P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株を取得した。

[0101] 実施例７：各種ＡＤＨ遺伝子発現カセットが導入されたバレンセン変換菌の構築とバレンセンからのヌートカトン変換試験

７－１）各種ＡＤＨ遺伝子発現カセットが導入されたバレンセン変換菌の構築

ＩＰ０３ＶＩ株、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０株、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ株とＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）株、更にはＩＰ０３ＶＩ　P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）株にｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢをエレクトロポレーション法で導入した。その後、ＳＯＣ培地を１ｍＬ添加し、３４℃で２時間、回復培養を行った。回復培養後の菌体を５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含むＬＢプレートに播種し、３７℃にて一晩培養した。得られた形質転換微生物をそれぞれＩＰ０３ＶＩ／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株とＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株、更にはＩＰ０３ＶＩ　P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株と命名した。

[0102] ７－２）バレンセンからのヌートカトン変換試験

各種菌株をＬＢプレートに均一に塗布し、３４℃にて１６時間培養した。その後、生育した菌体をラムノース２．０ｇ／Ｌを含有するＬＢプレートに再び塗布し、３４℃にて１６時間培養した。約１／２プレート分の菌体を５ｍＬのＭＳ／ＶＩｎ培地に植菌し、太試験管を用いて３０℃、１２０ｒｐｍにて４日間振盪培養を実施した。以下にＭＳ／ＶＩｎ培地の成分を示す。

[0103]

[表C]

表C　MS／Vln培地の成分

MS/Vln 培地	成分量
A stock solution	200 mL
B stock solution	200 mL
1M PIPES	100 mL
100 g/L Valencene 溶液	終濃度 1.0 g/L
200 g/L ラムノース溶液	終濃度 2.0 g/L
1M $ZuSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液	終濃度 5 mM

[0104] Ａ　ｓｔｏｃｋ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ；４０ｇのグリセロールと１ｇ　$MgSO_4 \cdot 7H_2O$を純水に溶解し４００ｍＬにメスアップした後、１１５℃、１０ｍｉｎ．オートクレーブ殺菌した。

Ｂ　ｓｔｏｃｋ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ　；５ｇ　$(NH_4)_2SO_4$、１ｇ　KH_2PO_4、２ｇ　Ｂａｃｔｏ－ｙｅａｓｔ　ｅｘｔｒａｃｔ、１０ｍｇ　$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、１０ｍｇ　$MnSO_4 \cdot 5H_2O$を純水に溶解し、ｐＨをＫＯＨで７．０に調整後、４００ｍＬにメスアップした。その後、１１５℃、１０ｍｉｎ．オートクレーブ殺菌した。

１Ｍ　ＰＩＰＥＳ；６０．４８ｇのＰＩＰＥＳを純水に溶解し、ｐＨをＫＯＨで７．０に調整後、２００ｍＬにメスアップした。その後、０．２２μｍのフィルターで滅菌濾過した。

１００ｇ／Ｌ　Ｖａｌｅｎｃｅｎｅ溶液；バレンセンを９９．５％エタノールに溶解させ、１００ｇ／Ｌのバレンセン溶液を調整した。その後、培地に終濃度　１．０ｇ／Ｌになるように添加した。

２００ｇ／Ｌ　ラムノース溶液；ラムノースを純水に溶解させ、２００ｇ／Ｌのラムノース溶液を調整した。その後、０．２２μｍのフィルターで滅菌濾過した。培養時には終濃度２．０ｇ／Ｌになるように培地に添加した。

１Ｍ　$ZuSO_4 \cdot 7H_2O$溶液；$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$を純水に溶解させ、１Ｍ　$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$を調整した。その後、０．２２μｍのフィルターで

滅菌濾過した。培養時には終濃度５ｍＭになるように培地に添加した。

[0105] ７－３）培養終了後、培養終了時のブロスでOD_{600}値を測定した。消費したグリセロール量、生成したヌートカトンとヌートカトールの蓄積量はＧＣ分析にて測定した。培養終了時のブロス２００μＬを８００μＬのエタノールに懸濁し、エッペンシェーカーにて５分間混合した。その後、４℃、１５，０００ｒｐｍで１０分間遠心し、上清液６００μＬをＧＣ用ガラスバイアルに移液し、ＧＣ－２０１０　Ｐｌｕｓ（島津社製）でＧＣ分析に供した。バレンセンからのヌートカトン変換試験の結果を表５に示した。対照であるＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：ａｔｔＢφ８０／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株が１８．９ｍｇ／Ｌのヌートカトンを生産したのに対して、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ＡＤＨ３Ｐ／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株では、２６．０ｍｇ／Ｌの蓄積が観察された。また、Ｅ．ｃｏＩｉＭＧ１６５５由来ｙａｈＫ（ｂ０３２５）遺伝子の発現カセットが導入されたＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ｂ０３２５）／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株では５３．１ｍｇ／Ｌの蓄積が観察された。最大のヌートカトン蓄積量は、ＩＰ０３ＶＩΔｍｇｓＡ：：P_{tac}－ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）／ｐＳｏＩ－ＣａｍＣ＊ＡＢ株で確認され、１４８．７ｍｇ／Ｌに達した。これらの結果から、Ｅ．ｃｏＩｉ由来ｙａｈＫ（ｂ０３２５）遺伝子、及びＰ．ａｎａｎｔｉｓ由来ｙａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）遺伝子の発現を強化することで、ヌートカトン生産量が増加することが確認された。

[0106]

[表5]

表５　バレンセンからのヌートカトン変換試験の結果

菌株/プラスミド	OD_{600}値	消費グリセロール量(g/L)	ヌートカトン濃度(mg/L)	ヌートカトール濃度(mg/L)
IP03VI /pSol-CamC*AB	26.7±2.4	40.9	18.5±0.1	81.6±0.4
IP03VI Δ mgsA::attB φ80 /pSol-CamC*AB	28.8±1.2	40.9	18.9±0.3	85.6±0.4
IP03VI Δ mgsA::P_{tac}-ADH3P /pSol-CamC*AB	30.7±0.3	40.9	26.0±2.8	80.2±1.5
IP03VI Δ mgsA P_{tac}-yahK(PAJ_3430) /pSol-CamC*AB	19.0±1.1	40.9	148.7±14.0	7.4±0.2
IP03VI Δ mgsA::P_{tac}-yahK(b0325) /pSol-CamC*AB	19.8±0.8	40.9	53.1±7.6	125.6±2.1

各値は n=3 の平均値を示す。
形質転換微生物は、P. ananatis である。

産業上の利用可能性

[0107]　本発明は、飲料や化粧料等の製品に利用可能なヌートカトンの製造のために有用である。

配列表フリーテキスト

[0108] 配列番号１は、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ３Ｐ）の塩基配列を示す。

配列番号２は、Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ由来アルコールデヒドロゲナーゼ（ＡＤＨ３Ｐ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号３～２８は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号２９は、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ由来ＹａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）遺伝子の塩基配列を示す。

配列番号３０は、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ由来ＹａｈＫ（ＰＡＪ＿３４３０）タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号３１は、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ｙａｈＫ遺伝子（ｂ０３２５）の塩基配列を示す。

配列番号３２は、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ＹａｈＫ（ｂ０３２５）タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号３３～３６は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号３７は、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓＡＪ１３３５５株由来Ｌ－ｉｄｈ遺伝子（ＰＡＪ＿ｐ０２７６）の塩基配列を示す。

配列番号３８～４１は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号４２は、合成したＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＣ（ＣａｍＣ）の塩基配列を示す。

配列番号４３は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＣ（ＣａｍＣ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号４４～４９は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号５０は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＡ（ＣａｍＡ）の塩基配列を示す。

配列番号５１は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＡ（ＣａｍＡ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号５２は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＢ（ＣａｍＢ）の塩基配列を示す。

配列番号５３は、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ由来シトクロムＰ４５０ｃａｍＢ（ＣａｍＢ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号５４は、ＣａｍＡ遺伝子とＣａｍＢ遺伝子からなる人工オペロンＣａｍＡ－ＣａｍＢの塩基配列を示す。

配列番号５５～６２は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号６３は、Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ　ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ（ＶｌｎＳＣＮ）の塩基配列を示す。

配列番号６４は、Ｃｕｐｒｅｓｓｕｓ　ｎｏｏｔｋａｔｅｎｓｉｓ由来バレンセンシンターゼ（ＶｌｎＳＣＮ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号６５および６６は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号６７は、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ファルネシル二リン酸シンターゼ（ＩｓｐＡ）の塩基配列を示す。

配列番号６８は、Ｅ．ｃｏｌｉ由来ファルネシル二リン酸シンターゼ（ＩｓｐＡ）のアミノ酸配列を示す。

配列番号６９～７２は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号７３は、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ　ＡＪ１３３５５株に由来するｍｇｓＡ遺伝子（ＰＡＪ＿ｐ０２７６）の塩基配列を示す。

配列番号７４～８１は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号８２は、Ｐ．ａｎａｎａｔｉｓ由来ｙａｈＫ遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を示す（３’末端のａｔｇは、ｙａｈＫ遺伝子の開始コドンを示す）。

配列番号８３～８６は、プライマーの塩基配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] ヌートカトンの製造方法であって、

（ｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの活性が野生型微生物に比し向上した形質転換微生物、または（ｉｉ）アルコールデヒドロゲナーゼの存在下において、ヌートカトールをヌートカトンに変換することを含み、

アルコールデヒドロゲナーゼが、下記：

（Ａ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｂ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；または

（Ｃ）配列番号３０または３２のアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質である、方法。

[請求項2] 前記形質転換微生物が、前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む微生物である、請求項１記載の方法。

[請求項3] 前記形質転換微生物が、下記（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれかの微生物である、請求項２記載の方法：

（ｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む微生物；

（ｉｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を非天然ゲノム領域または非ゲノム領域に含む微生物；あるいは

（ｉｉｉ）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを、複数のコピー数において発現単位に含む微生物。

[請求項4] 前記形質転換微生物が腸内細菌科に属する細菌である、請求項２または３記載の方法。

[請求項5] 形質転換微生物が、パントエア属細菌、エシェリヒア属細菌、またはコリネバクテリウム属細菌である、請求項２～４のいずれか一項記載の方法。

[請求項6] 形質転換微生物が、パントエア・アナナティス、エシェリヒア・コリ、またはコリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項５記載の方法。

[請求項7] 前記形質転換微生物が、バレンセンをヌートカトールに変換する能力を有するモノオキシゲナーゼを産生する、請求項２～６のいずれか一項記載の方法。

[請求項8] 前記形質転換微生物が、ファルネシル二リン酸シンターゼおよびバレンセンシンターゼを産生する、請求項２～７のいずれか一項記載の方法。

[請求項9] 前記形質転換微生物が、メチルエリスリトール－４－リン酸経路、もしくはメバロン酸経路のいずれか、またはその双方を有する、請求項２～８のいずれか一項記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/034996

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12P7/26(2006.01)i, C07C49/637(2006.01)n, C12N1/21(2006.01)n, C12N9/04(2006.01)n, C12N15/53(2006.01)n

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)
Int.Cl. C12P7/26, C07C49/637, C12N1/21, C12N9/04, C12N15/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WRIESSNEGGER, T. et al., "Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic endineering of Pichia pastoris", Metabolic Engineering, 2014, 24, 18-29, abstract, page 23, right column to page 24, right column, 3.4	1-9

☒ 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 27 November 2018 (27.11.2018)	Date of mailing of the international search report 04 December 2018 (04.12.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/034996

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accessin No. AOAOH3L9E7 <https://www.uniprot.org/uniprot/AOAOH3L9E7.txt?version=14> 07-JUN-2017 uploaded, [retrieved on 27 November 2018] HARA, Y. et al., Definition: SubName: Full= Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein YahK, columns "DE, OS, SQ"	1-9
A	JP 2017-525395 A (MANUS BIOSYNTHESIS, INC.) 07 September 2017, claims & WO 2016/029153 A1, claims & US 2018/0135081 A1 & CN 107002109 A	1-9
A	WO 2016/029187 A2 (GIVAUDAN SA) 25 February 2016, claims & US 2018/0327789 A1	1-9
A	EP 3196312 A1 (METABOLIC EXPLORER) 26 July 2017, claims 1-4, paragraph [0060], SEQ ID NO: 1 (Family: none)	1-9
A	PICK, A. et al., "Novel CAD-like enzymes from Escherichia coli K-12 as additional tools in chemical production", Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97, 5815-5824, abstract, table 1	1-9
P,A	KR 10-2017-0141384 A (UNIV GYEONGSANG IND ACAD COOP FOUND) 26 December 2017, paragraph [0091], SEQ ID NO: 23 (Family: none)	1-9

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０３４９９６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P7/26(2006.01)i, C07C49/637(2006.01)n, C12N1/21(2006.01)n, C12N9/04(2006.01)n, C12N15/53(2006.01)n

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.　C12P7/26, C07C49/637, C12N1/21, C12N9/04, C12N15/53

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	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

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
A	WRIESSNEGGER, T. et al., Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic endineering of Pichia pastoris, Metabolic Engineering, 2014, 24, 18-29, 要旨、23 頁右欄-24 頁右欄の 3.4	１－９

☑　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	国際調査報告の発送日
２７．１１．２０１８	０４．１２．２０１８

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）　４Ｂ　３３３５
吉田　知美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accessin No. A0A0H3L9E7 <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0H3L9E7.txt?version=14> 07-JUN-2017 uploaded, [retrieved on 2018-11-27] HARA, Y. et al., Definition: SubName: Full= Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein YahK, DE 欄、OS 欄、SQ 欄	１－９
Ａ	JP 2017-525395 A (マナス　バイオシンセシス　インコーポレイテッド) 2017.09.07, 請求の範囲 & WO 2016/029153 A1, 請求の範囲 & US 2018/0135081 A1 & CN 107002109 A	１－９
Ａ	WO 2016/029187 A2 (GIVAUDAN SA) 2016.02.25, 請求の範囲 & US 2018/0327789 A1	１－９
Ａ	EP 3196312 A1 (Metabolic Explorer) 2017.07.26, 請求項１～４、[0060]、配列番号１ (ファミリーなし)	１－９
Ａ	PICK, A. et al., Novel CAD-like enzymes from Escherichia coli K-12 as additional tools in chemical production, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2013, 97, 5815-5824, 要旨、表１	１－９
Ｐ，Ａ	KR 10-2017-0141384 A (UNIV GYEONGSANG IND ACAD COOP FOUND) 2017.12.26, [0091]、配列番号２３ (ファミリーなし)	１－９