(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
2012 年 12 月 13 日(13.12.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/169623 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 5/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 5/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/064817

(22) 国際出願日: 2012 年 6 月 8 日(08.06.2012)

(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 2011-130326 2011 年 6 月 10 日(10.06.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人　千葉大学 **(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号 Chiba (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅野　太輔 **(UMENO, Daisuke)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号　国立大学法人千葉大学大学院　工学研究科内 Chiba (JP). 古林　真衣子 **(FURUBAYASHI, Maiko)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号　国立大学法人千葉大学大学院　工学研究科内 Chiba (JP). 三沢　典彦 **(MISAWA, Norihiko)** [JP/JP]; 〒9218836 石川県石川郡野々市町末松１丁目３０８番地　石川県公立大学法人石川県立大学内 Ishikawa (JP). 高市　真一 **(TAKAICHI, Shinichi)** [JP/JP]; 〒2110063 神奈川県川崎市中原区小杉町２丁目　２９７－２　学校法人日本医科大学　日本医科大学内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 庄司　隆, 外 **(SHOJI, Takashi** et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目６番１３号　御幸ビル３０７号 Osaka (JP).

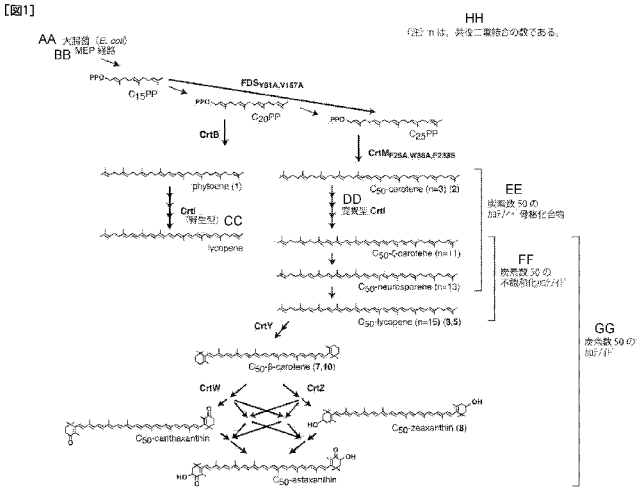
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,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

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS EACH HAVING 50 CARBON ATOMS

(54) 発明の名称 : 炭素数 50 のカロテノイドの製造方法

[図1]



AA Escherichia coli (E. coli)
BB MEP pathway
CC (Wild type)
DD Variant CrtI
EE Carotenoid-skeleton compounds each having 50 carbon atoms
FF Desaturated Carotenoids each having 50 carbon atoms
GG Carotenoids each having 50 carbon atoms
HH (Note) n represents the number of conjugated double bonds

(57) **Abstract**: The present invention provides a method for producing various types of carotenoids each having 50 carbon atoms by desaturating carotenoids each having 50 carbon atoms with high efficiency, said method being comprising culturing a cell that is transformed with a mutant phytoene desaturase gene in a culture medium and obtaining carotenoids each having 50 carbon atoms from the culture. The mutant phytoene desaturase gene is produced by introducing a mutation so as to encode a mutant phytoene desaturase of which the activity of desaturating a carotenoid-skeleton compound having 50 carbon atoms is enhanced.

(57) 要約: 本発明は、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞を培地で培養し、培養物から炭素数 50 のカロテノイドを得ることを手段とする、効率よく炭素数 50 のカロテノイドを不飽和化して種々の炭素数 50 のカロテノイドを製造する方法を提供する。前記変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子は、炭素数 50 のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするよう変異が導入されたものである。

WO 2012/169623 A1

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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 炭素数50のカロテノイドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞を培地で培養する工程を含む、炭素数50のカロテノイドの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 自然界には様々なカロテノイド（carotenoid）が存在する。現在までにおよそ750種類のカロテノイドが同定されており、その多くに、有用な生理機能や産業応用の可能性、例えば、抗酸化活性や抗腫瘍活性や、機能性色素分子としての用途が示されている。カロテノイドは、通常、炭素数が30または40のイソプレン骨格からなるテトラテルペンに分類される化合物である。自然界では基本となる炭素数30または40の直鎖状骨格の形成後に、環化などの種々の修飾が付与される。カロテノイドの構造多様性はかかる修飾の多様性に起因するものである。またカロテノイドは、修飾の多様性に基づく構造的差異により、生理活性が大きく変わることが知られている。

[0003] 数多くのカロテノイドが、植物等の自然界からの単離・抽出や化学合成により得られているが、最近では、微生物発酵を利用した生産も行われている。自然界にごく微量にしか存在しない希少なカロテノイドや、自然界には存在が認められない非天然のカロテノイドの生合成経路を確立するため、多くの研究者によって研究がなされてきた（非特許文献１～８、特許文献１）。非特許文献１～６では、いわゆるコンビナトリアル生合成という手法に基づき合成することにより、種々の構造のカロテノイドが得られている。コンビナトリアル生合成とは、遺伝子工学的手法を用いて微生物の生合成経路を改変し、目的の化合物を微生物に生産させる技術である。種々の構造をカロテノイドに与える修飾酵素は、基質の一部のみを認識して作用するという「局所特異的（locally specific）な」特質を持つものであり、修飾基質のかか

る特質に基づき、カロテノイドのコンビナトリアル生合成が行われている（非特許文献９）。一方、非特許文献７、８、１１および特許文献１では、タンパク質工学を用いて創られた自然界には見いだされない酵素活性を使った代謝経路を構築するという方法で、種々の非天然カロテノイドの生合成を実現している。

[0004] 前述のとおり、自然界に存在するカロテノイドは、炭素数30および炭素数40の骨格を持つ。前者は、ファルネシル二リン酸（C_{15}PP）二分子を頭－頭縮合させて合成される4,4'-ジアポフィトエンから派生するものである。後者は、ゲラニルゲラニル二リン酸（C_{20}PP）二分子を頭－頭縮合させて合成されるフィトエン（炭素数40のカロテノイド骨格化合物）から派生するものである。前者は、自然界に存在すると知られている10数種類のカロテノイドの生合成経路の要であり、後者は約700種類以上のカロテノイドの生合成経路の要となっている。

[0005] また、自然界には炭素数40よりも大きな炭素数50の骨格を持つカロテノイドが存在することも報告されている（特許文献２）。炭素数50の骨格を持つカロテノイドは、炭素数40のカロテノイドにイソプレンユニットを「あとづけ」で結合させて、総炭素数を45、50と増加させることにより合成される（非特許文献１０）。炭素数40以上の骨格、例えば炭素数50や炭素数60の骨格の合成経路は、ゲラニルファルネシル二リン酸（C_{25}PP）やヘキサプレニル二リン酸（C_{30}PP）などを原料として合成される。炭素数40以上の骨格を持つカロテノイドは、従来とは異なる生理機能、色素機能などの多くの可能性が期待されるにも関わらず、自然界における合成経路についての詳細な報告はなく、人工的な生合成経路の報告もほとんどない。

[0006] 本件の発明者の梅野は、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus：黄色ブドウ球菌）由来の炭素数30のカロテノイドの合成酵素（CrtM）を改変し、ゲラニルファルネシル二リン酸（C_{25}PP）を二分子縮合して炭素数50のカロテノイド骨格化合物を合成する機能をもつ酵素を開発した。さらに梅野は、大腸菌（Escherichia coli）において当該酵素を適当な前駆体合

成酵素とともに共発現させ、炭素数50のカロテノイド骨格化合物である16,16'-ジイソペンテニルフィトエンを生産させることに、世界で初めて成功した（非特許文献７）。しかし非特許文献７における合成経路では、炭素数50以外の炭素数30、炭素数40、炭素数45などの骨格を持つカロテノイドも共に合成されていた。この経路に野生型のフィトエン不飽和化酵素（フィトエンデサチュラーゼ）を追加しても、炭素数50のカロテノイド骨格化合物の約75%が不飽和化されずに残っており、合成効率の悪いものであった（非特許文献８）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：米国特許出願公開第2002/0051998号明細書

特許文献2：特開平7-132096号公開公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Takaichi S. et al., Eur J Biochem 241, 291-6(1996)

非特許文献2：Yokoyama A. et al., Tetrahedron Lett. 39, 3709-12 (1998)

非特許文献3：Albrecht M. et al., Nat. Biotechnol. 18,843-6 (2000)

非特許文献4：Lee P. C. et al., Chem. Biol. 10, 453-462 (2003)

非特許文献5：Mijts B. N. et al., Chem. Biol. 12, 453-460 (2005)

非特許文献6：Umeno D. et al., Appl Environ Microbiol 69, 3573-3579 (2003)

非特許文献7：Umeno D. et al., J Bacteriol, 186, 1531-1536 (2004)

非特許文献8：Tobias A. V. et al., Biochim Biophys Acta, 1761, 235-246 (2006)

非特許文献9：Umeno D. et al., Microbiol Mol Biol Rev 69, 51-78 (2005)

非特許文献10：Krubasik P. et al., Eur J Biochem 268, 3702-3708 (2001)

非特許文献11：Schmidt-Dannert C. et al., Nature Biotech. 18, 750-753(2000)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 炭素数50のカロテノイドは炭素数40のカロテノイドに比べて、より大きな骨格を持つため、収容できる共役二重結合サイズが大きいという物質としての優位性を持つ。自然界における炭素数40カロテノイドの合成経路のように、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を合成して不飽和化したものを得ることができれば、様々な修飾酵素と組み合わせることにより、多様な構造および生理活性を持つ炭素数50のカロテノイドを製造することができると考えられる。本発明の課題は、効率よく炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して、種々の炭素数50のカロテノイドを製造する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、フィトエン不飽和化酵素（フィトエンデサチュラーゼ：CrtI）に変異を導入した変異型フィトエン不飽和化酵素により、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を効率よく不飽和化し得ることを見出し、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子を導入した細胞を培養することにより、炭素数50のカロテノイドを効率よく簡便に合成し得ることに着目し、本発明を完成した。

[0011] 即ち、本発明は以下に関する。

１．炭素数50のカロテノイドの製造方法であって、

変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするよう変異が導入されたものであり、

変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞を培地で培養し、培養後の培養物から炭素数50のカロテノイドを得ることを手段とする炭素数50のカロテノイドの製造方法。

２．変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコー

ドするような変異が導入されたものであり、該変異は、配列番号１に記載のアミノ酸配列において304番目のアスパラギン、339番目のフェニルアラニン、338番目のイソロイシン、395番目のアスパラギン酸、228番目のイソロイシンから選択されるいずれか１以上のアミノ酸に相当するアミノ酸の置換をもたらすものであることを特徴とする、前項１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

３．変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたものであり、該変異は、少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するアミノ酸のプロリンまたはセリンへの置換をもたらすものであることを特徴とする、前項１または２に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

４．変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたものであり、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、パントエア・アナナチス（Pantoea ananatis）由来のフィトエン不飽和化酵素遺伝子に変異を導入したことを特徴とする、前項１～３のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

５．前記細胞が、大腸菌または酵母である、前項１～４のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

６．変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞がさらに、ゲラニルファルネシル二リン酸を二分子縮合することにより炭素数50のカロテノイド骨格化合物を合成する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、前項１～５のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

７．前項１～６のいずれか１に記載の細胞がさらに、ファルネシル二リン酸および／またはゲラニルゲラニル二リン酸からゲラニルファルネシル二リン酸を合成する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴

とする、前項１～６のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

８．前項１～７のいずれか１に記載の細胞がさらに、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して得られた炭素数50の不飽和化カロテノイドの末端を環化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、前項１～７のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

９．前項８に記載の環化がβ環化であり、前項８に記載の細胞がさらに、末端にβ環を有する炭素数50のカロテノイドにおいて、β環をヒドロキシル化する酵素および／またはβ環をケト化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、前項８に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

１０．前項１～７のいずれか１に記載の細胞がさらに、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して得られた炭素数50の不飽和化カロテノイドを酸化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、前項１～７のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

１１．炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたことを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

１２．炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が、配列番号１に記載のアミノ酸配列において304番目のアスパラギン、339番目のフェニルアラニン、338番目のイソロイシン、395番目のアスパラギン酸、228番目のイソロイシンから選択されるいずれか１以上のアミノ酸に相当するアミノ酸の置換をもたらすものであることを特徴とする、前項１１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

１３．前項１１または１２に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子の変異が少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するア

ミノ酸のプロリンまたはセリンへの置換をもたらすものであることを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

１４．前項１１～１３のいずれか１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子によりコードされていることを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素。

１５．前項１１～１３のいずれか１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して炭素数50のカロテノイドを製造し得る細胞。

発明の効果

[0012] 本発明の製造方法によれば、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を効率よく不飽和化することができ、多様な構造を持つ炭素数50のカロテノイドを製造することができる。野生型フィトエン不飽和化酵素を含むいくつかの酵素では、炭素数50のカロテノイド骨格化合物に対して最大で数%程度の不飽和化効率しか示さなかったが、本発明の製造方法によれば飛躍的に不飽和化効率が上昇した。このため炭素数50の不飽和化カロテノイドを下流の修飾酵素に受け渡すことが可能となり、多様な炭素数50のカロテノイドが製造可能となった。

[0013] カロテノイドは、酸素等を含まない炭素数40（ある種の細菌では炭素数30）のカロテノイド骨格化合物が酸素添加等の種々の修飾を受けることにより多様な構造を獲得している。自然界の最も主要なカロテンはβ環をもつβ-カロテンであり、自然界にはβ環を修飾する種々の酵素が存在している。本発明の製造方法によれば、β環をもつ炭素数50カロテノイドを合成することが可能である。さらに種々のβ環を修飾する酵素を用いることにより、多様なカロテノイドの生産が可能になる。

[0014] 本発明の製造方法により製造された炭素数50のカロテノイドは、従来カロテノイドに比べて抗酸化機能が向上している可能性や、色素としての色域が従来報告されていない範囲まで拡張したものである可能性、分解代謝されにくい性質を有する可能性などが期待される。

[0015] また本発明の製造方法によれば、培地や培養条件は一般的なものを用いることができるため、炭素数50のカロテノイドを簡便に合成することが可能である。

[0016] さらに本発明の製造方法を利用することにより、不飽和化C_{55}カロテノイドや不飽和化C_{60}カロテノイドなどの高効率な合成を実施することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]カロテノイド生合成に関連する酵素の機能と生合成経路を表す図である。各矢印の横に該当する反応を触媒する酵素の略称を示す。また、化合物名の後ろに括弧書きで示す数字は、図６のHPLC解析のピークの番号と対応している。

[図2]実施例１～６および参考例１および２において使用したプラスミドのマップを示す図である。（ａ）は、pAC-$fds_{Y81A,V157A}$-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$である。pACmodベクターにlacプロモータ／オペレータ(lacPO)-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$とlacプロモータ／オペレータ(lacPO)-$fds_{Y81A,V157A}$を挿入することによって作製した。（ｂ）は、pUC-pBAD-crtI*である。pUC18Nmベクターのlacプロモータ／オペレータを取り除き、araC遺伝子／araBADプロモータ配列（pBADHisAベクター由来）を挿入し、プロモータ下流に変異型crtI（crtI*）を挿入することによって作製した。（ｃ）は、pUC-pBAD-crtI*-crtYである。pUC-pBAD-crtI*の変異型crtIの下流にcrtYを挿入することによって作製した。（ｄ）は、pUC-pBAD-crtI*-crtWZYである。pUC-pBAD-crtI*の変異型crtIの下流にcrtW、crtZ、crtYを挿入することによって作製した。（ｅ）は、pUC-pBAD-crtI*-crtAである。pUC-pBAD-crtI*の変異型crtIの下流にcrtAを挿入することによって作製した。（ｆ）は、pUC-$fds_{Y81A,V157A}$である。pUC18NmベクターのlacPO下流に$fds_{Y81A,V157A}$遺伝子を挿入することによって作製した。（ｇ）は、pAC-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$である。pACmodベクターのBamHIサイトにlacPO-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$を挿入することによって作製した。（ｈ）は、pAC-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$-idiである。pAC-$crt_{MF26A,W38A,F233S}$のClaIサイト上流にlacPO-idiを挿入することによって作製した。

[図3]$FDS_{Y81A,V157A}$と$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$により構築された代謝経路においてIdiを

共発現させた場合の、C_{50}カロテノイド骨格化合物の合成量を示す（実施例１）。「idiなし」および「idiあり」は、各種遺伝子により形質転換した大腸菌について、アセトン抽出液のHPLC分析から得たC_{35}カロテノイド骨格を有する化合物（35）、C_{40}カロテノイド骨格を有する化合物（40）、C_{45}カロテノイド骨格を有する化合物（45）、C_{50}カロテノイド骨格を有する化合物（50）の合成量を表す。具体的には図３中、「35」は4-アポフィトエン、「40」はフィトエン、「45」は16-イソペンテニルフィトエン、「50」はC_{50}-カロテン(n=3)である。

[図4]炭素数50のカロテノイド骨格化合物を効率的に不飽和化し得る変異型フィトエン不飽和化酵素のスクリーニングについて示した図である（実施例２）。（ａ）はスクリーニング実験系の操作概略であり、（ｂ）はスクリーニングの原理を示す。

[図5]スクリーニングにより得られた8個のコロニーのうち6個について、（ａ）アセトン抽出液の実際の色と、（ｂ）アセトン抽出液の吸収スペクトルを表す図である（実施例３）。CrtEBIとはコントロールであり、パントエア・アナナチス（Pantoea ananatis）由来のcrtE、crtB、crtIを含むプラスミドpAC-EBIにより形質転換した大腸菌である。WT（またはCrtIwt）は、野生型crtIにより形質転換したもの、mut1、mut2、mut8、mut4、mut6は、各々CrtI-m1、CrtI-m2、CrtI-m8、CrtI-m4、CrtI-m6のコロニーの結果を示す。なお、これらの形質転換した大腸菌はリコペンを合成している。

[図6]pAC-$fds_{Y81A,V157A}$-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$と各種プラスミドにより大腸菌を共形質転換して培養した場合に製造されたカロテノイドについて、HPLC解析を行った結果を示す図である（実施例３～６）。（ａ）～（ｈ）は各種プラスミドを導入した場合のHPLC解析から得られたクロマトグラムを示す図である。（ｉ）は各ピークを形成する化合物の吸収スペクトルを示す図である。（ｉ）において右端の数値はクロマトグラムのピークの番号に該当し、3桁の数値は最大吸収波長の値である。

[図7]CrtIとCrtYの協働によるβ環化カロテノイド合成結果を示す図であり、

各種遺伝子が導入された細胞を0～48時間培養したときのコロニー色を示す写真である（実施例４）。CrtIは、野生型crtIを大腸菌に導入した場合であり、CrtIYは野生型crtIとcrtYの両方を大腸菌に導入した場合であり、$CrtI_2$は、CrtI-m2に由来する変異型crtIを大腸菌に導入した場合であり、$CrtI_2Y$は、CrtI-m2に由来する変異型crtIとcrtYの両方を大腸菌に導入した場合である。なお各大腸菌にはpAC-$fds_{Y81A,V157A}$-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$が導入されている。

[図8]（ａ）CrtIとCrtW、CrtZ、CrtYの協働、および（ｂ）CrtIとCrtAの協働によるカロテノイド合成結果を示す図である（実施例５）。（ａ）および（ｂ）は、各種遺伝子により形質転換した大腸菌について、アセトン抽出液の吸収スペクトルを表す図であり、（ｃ）は同様の場合について細胞ペレット（上段）とアセトン抽出液（下段）の実際の色を示す写真である。CrtI*はCrtI-m2に由来する変異型crtIを大腸菌に導入したことを表す。

[図9]（ａ）C_{50}-カロテン(n=3)、（ｂ）C_{50}-リコペン(n=15)、（ｃ）C_{50}-β-カロテンの吸収スペクトルを示す図である（実施例３および４）。

[図10]CrtI-m2および$CrtI_{N304P}$によるC_{50}-カロテン(n=3)、C_{50}-リコペン、およびC_{50}-β-カロテンの合成量をHPLCによって解析した結果を示す図である（実施例７）。（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、および（ｅ）はそれぞれ、pUC-pBAD-CrtIで形質転換した大腸菌、pUC-pBAD-CrtI-m2で形質転換した大腸菌、pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$で形質転換した大腸菌、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtYで形質転換した大腸菌、およびpUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtYで形質転換した大腸菌についての結果である。（ａ）ではC_{50}-カロテン(n=3)のみが合成され、（ｂ）および（ｃ）ではC_{50}-カロテン(n=3)とC_{50}-リコペンが合成され、（ｄ）および（ｅ）ではC_{50}-カロテン(n=3)とC_{50}-β-カロテンが合成されている。

[図11]実施例８および９において使用したプラスミドのマップを示す図である。当該プラスミドは、ブレバンディモナス（Brevundimonas）属SD-212株由来のCrtWおよび／またはCrtZを含むものである。（ｉ）は、pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-$CrtW_{BD}$-$CrtZ_{BD}$である。（ｊ）は、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-$CrtW_{BD}$である。（ｋ）は、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-$CrtZ_{BD}$である。（ｌ）は、pAC-$crtM_{F26A,W38}$

$_{A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$-idiである。

[図12]ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtWおよび／またはCrtZを含む各種プラスミドとpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$とを大腸菌に形質転換して培養した場合に製造された、C50-ゼアキサンチン、C50-カンタキサンチン、およびC50-アスタキサンチンについて、HPLC解析を行った結果を示す図である（実施例８）。（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）はそれぞれ、pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$と、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtZ$_{BD}$、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtW$_{BD}$、およびpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とを形質転換した結果を示す。図中の数字１、２、および３はそれぞれC50-ゼアキサンチン、C50-カンタキサンチン、およびC50-アスタキサンチンのピークを示し、ダッシュ（プライム）のついた数字はそれらのシスピークを示す。

[図13]pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$とを形質転換した大腸菌におけるC50-アスタキサンチンの合成量が、idiを共発現させることにより著しく増加したことを示す図である（実施例９）。（ａ）はidiを共発現させなかった時の結果、すなわちpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$とpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とを形質転換した大腸菌におけるC50-カロテン(n=3)およびC50-アスタキサンチンの合成量を示す。（ｂ）はidiを共発現させた時の結果、すなわちpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$-idiとpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とを形質転換した大腸菌におけるC50-カロテン(n=3)およびC50-アスタキサンチンの合成量を示す。

[図14]pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$とを形質転換した大腸菌において合成された化合物がC50-アスタキサンチンであることをNMR解析により同定した結果を示す図である（実施例１０）。

[図15]実施例１１において使用したプラスミドのマップを示す図である。当該プラスミドは、ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtWおよび／またはCrtZに加え、ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtGまたはパントエア・アナナチス由来のCrtXを含むものである。（ｍ）は、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtZ$_{BD}$である。（ｎ）は、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$であ

る。（ｏ）は、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$である。（ｐ）は、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$である。

[図16]カロテノイド生合成経路において、CrtGをさらに発現させることより、さらに多様なカロテノイドを生産できることを説明する図である（実施例１１）。CrtGのさらなる発現により、C_{50}-アスタキサンチンからC_{50}-2-ヒドロキシアスタキサンチン（Hydroxyastaxanthin）およびC_{50}-2,3,2’,3’-テトラヒドロキシ-β,β-カロテン-4,4’-ジオンが生産される。C_{50}-ゼアキサンチンからはC_{50}-カロキサンチン（Caloxanthin）およびC_{50}-ノストキサンチン（Nostoxanthin）が生産される。また、C_{50}-カンタキサンチンからC_{50}-2-ヒドロキシカンタキサンチン（Hydroxycanthaxanthin）およびC_{50}-2,2’-ジヒドロキシカンタキサンチン（Dihidroxycanthaxanthin）が生産される。

[図17]カロテノイド生合成経路において、CrtXをさらに発現させることより、さらに多様なカロテノイドを生産できることを説明する図である（実施例１１）。CrtXのさらなる発現により、C_{50}-アスタキサンチンからC_{50}-アスタキサンチン-β-D-グルコシドおよびC_{50}-アスタキサンチン-β-D-ジグルコシドが生産される。C_{50}-ゼアキサンチンからはC_{50}-ゼアキサンチン-β-D-グルコシドおよびC_{50}-ゼアキサンチン-β-D-ジグルコシドが生産される。

[図18]C50-ゼアキサンチンおよびC50-アスタキサンチンを特異的に合成する大腸菌株へのCrtGまたはCrtXの追加発現により多様なカロテノイドを生産できたことを、コロニーの色、細胞ペレットの色、およびカロテノイド抽出液の色により確認した結果を示す図である（実施例１１）。

[図19]C50-ゼアキサンチンおよびC50-アスタキサンチンを特異的に合成する大腸菌株へのCrtGまたはCrtXの追加発現により得たカロテノイド抽出液の吸収スペクトルを測定した結果を示す図である（実施例１１）。

[図20]C50-ゼアキサンチンを特異的に合成する大腸菌株へのCrtGまたはCrtXの追加発現により生産されたカロテノイドをHPLCによって解析した結果を示す図である（実施例１１）。図中、（ｂ）はCrtGの追加発現により、C50-カロキサンチン（C50-Caloxanthin、ピーク３）およびC50-ノストキサンチン（

C50-Nostoxanthin、ピーク２）が生産されたことを示す。（ｃ）はCrtXの追加発現により、C50-ゼアキサンチン-β-D-ジグルコシド（C50-Zeaxanthin-β-D-diglucoside、ピーク５）が生産されたことを示す

[図21]実施例１２において使用したプラスミドのマップを示す図である。（ｑ）は、pAC-hexPSである。（ｒ）は、pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiである。（ｓ）は、pUC-$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$である。

[図22]C_{55}カロテノイドおよびC_{60}カロテノイドを生合成した結果を示す図である（実施例１２）。$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$とpAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiとを共発現した場合は、C_{45}およびC_{50}カロテノイドに加えてC_{55}カロテノイドを生産した。また、$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$とhexPSとを共発現した場合はC_{60}カロテノイドを特異的に合成した。一方で、$CrtM_{F26A,W38A}$を用いた場合は、C_{55}カロテノイドおよびC_{60}カロテノイドの生産がいずれも確認できなかった。

[図23]AC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiまたはpAC-hexPSを、８種類のCrtM変異体（CrtM variants；pUC-CrtM変異体）と共発現させて、そのカロテノイド合成量を測定した結果を示す図である（実施例１２）。$FDS_{I78G,Y81A}$-idiおよび$CrtM_{F26A,F233S}$または$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$を共発現させた細胞で、C_{55}カロテノイドがより多く合成された。また、HexPSおよび$CrtM_{W38A,F233S}$または$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$を共発現させた細胞で、C_{60}カロテノイドがより多く合成された。

発明を実施するための形態

[0018] まずカロテノイドの生合成経路について説明する（図１参照）。カロテノイドは、自然界ではメバロン酸またはピルビン酸から生合成される。まず、メバロン酸経路または非メバロン酸経路（図１、MEP経路）によりイソペンテニル二リン酸（以下「IPP」とも称する）およびIPPが異性化した化合物であるジメチルアリル二リン酸（以下「DMAPP」とも称する）が合成される。次に、IPPと、DMAPPが縮合してゲラニル二リン酸（以下「C_{10}PP」とも称する）が合成され、さらに２つのIPPが順次付加されることで、ファルネシル二リン酸（以下「C_{15}PP」とも称する）やゲラニルゲラニル二リン酸（以下「C_{20}PP」とも称する）が合成される。C_{15}PPは、ファルネシル二リン酸合成酵素（ファル

ネシル二リン酸シンターゼ）により合成され、C_{20}PPは、ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素により合成される。

[0019] 炭素数40のカロテノイドを合成する経路では、フィトエン合成酵素（CrtB）により、二分子のC_{20}PPが縮合されてフィトエンが合成され、これがカロテノイドの前駆物質（カロテノイド骨格化合物）となる。

[0020] フィトエンが、順次不飽和されることにより、フィトフルエン、ζ－カロテン、ニューロスポレン、リコペン、テトラデヒドロリコペン等が合成される。リコペンの末端が環化や酸化されて修飾を受けることにより、α－カロテン、β－カロテン、γ－カロテン、δ－カロテン、ε－カロテン 、ルテイン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、フコキサンチン、アスタキサンチン、アンテラキサンチン、ビオラキサンチン等の種々のカロテノイドが合成される。なお、炭素と水素のみで構成されているカロテノイドはカロテン類、炭素と水素以外に酸素元素も含むものはキサントフィル類に分類される。

[0021] 本発明は、自然界に存在するカロテノイドの生合成経路を改変して炭素数50のカロテノイドを製造することを可能としたものであり、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞を培地で培養し、培養後の培養物から炭素数50のカロテノイドを得ることを手段とする、炭素数50のカロテノイドの製造方法を対象とするものである。なお、本明細書においては「炭素数50」を単に「C_{50}」と表す場合もあり、炭素数35、40、45、55、60等においても同様とする。

[0022] 本明細書において「炭素数50のカロテノイド」は、変異型フィトエン不飽和化酵素により不飽和化される「炭素数50のカロテノイド骨格化合物」とは区別され、炭素数50のカロテノイド骨格化合物が不飽和化されて二重結合が１以上増加した化合物を指す。炭素数50のカロテノイドは、いかなる修飾を受けていてもよく、例えば末端にβ環やε環を有しているもの、ヒドロキシル基やケト基などの炭素と水素以外の元素を含む官能基を有するものも含まれる。また炭素数50のカロテノイドは骨格化合物に由来する炭素原子の数が50であればよく、例えば修飾によりメチル基やアセチル基などの炭素を含む官

能基を付加された結果、総炭素数が50以上となったものも含まれる。

[0023] 「炭素数50のカロテノイド骨格化合物」は、炭素数50のカロテノイドの前駆物質であり変異型フィトエン不飽和化酵素によって不飽和化され得るものである。炭素数50のカロテノイド骨格化合物は具体的には、C_{50}-カロテン(n=3)(16,16'ージイソペンテニルフィトエン)、および、C_{50}-カロテン(n=3)において共役二重結合が１～５個増加した化合物である。C_{50}-カロテン(n=3)において二重結合が１～５個増加した化合物とは具体的には、二重結合が１個増加したC_{50}-カロテン(n=5)、２個増加したC_{50}-カロテン(n=7)、図１中のC_{50}-ζ-カロテン(n=11)、C_{50}-ニューロスポレン(n=13)等である。なお本明細書において化合物の慣用名の後ろなどに記載しているnは、共役二重結合の数を表す。

[0024] 本明細書においては、変異型フィトエン不飽和化酵素により不飽和化されているが、その後の修飾を受けていないものを、「炭素数50の不飽和化カロテノイド」と称する。炭素数50の不飽和化カロテノイドは直鎖状の化合物であり、骨格化合物に由来するもの以外の官能基を有さないものである。炭素数50の不飽和化カロテノイドは、炭素数50のカロテノイドに包含される。炭素数50の不飽和化カロテノイドは具体的には、C_{50}-カロテン(n=3)において二重結合が１～６個増加した化合物であり、C_{50}-カロテン(n=3)自体は含まない。なお、C_{50}-カロテン(n=3)において二重結合が６個増加したものは、C_{50}-リコペン(n=15)である。

[0025] また本明細書において、炭素数50のカロテノイド、炭素数50のカロテノイド骨格化合物、炭素数50の不飽和化カロテノイドなどを全て含む概念として、「炭素数50のカロテノイド骨格を有する化合物」という用語を使用する場合もある。

[0026] 炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する反応を触媒する変異型フィトエン不飽和化酵素は、野生型フィトエン不飽和化酵素（CrtI）に変異が導入されたものである。フィトエン不飽和化酵素（CrtI）は、炭素数40のフィトエンを不飽和化する酵素であり、自然界においては、３個の共役二重結合を包含するフィトエンを不飽和化して順次二重結合を導入し、１１個の

共役二重結合を包含したリコペンを合成する反応を触媒する。本発明における変異型フィトエン不飽和化酵素は、変異が導入されたことによって、C_{50}のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性が野生型フィトエン不飽和化酵素に比べて増強したものである。

[0027] 本発明における変異型フィトエン不飽和化酵素は、変異によりC_{50}のカロテノイド骨格化合物を不飽和する活性が増強されているものであれば、植物、細菌等を含むいかなる生物由来のものであってもよい。変異型フィトエン不飽和化酵素は、好ましくは微生物由来であり、さらに好ましくはパントエア（Pantoea）属（旧名エルビニア（Erwinia）属）に属する細菌由来であり、より好ましくはパントエア・アナナチス（Pantoea ananatis；旧名エルビニア・ウレドボラ（Erwinia uredovora）、イネ内穎褐変病菌）由来である。パントエア・アナナチス由来の野生型フィトエン不飽和化酵素（CrtI）のアミノ酸配列を、配列表の配列番号１に示す。

[0028] 本発明において、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子（crtI*）は変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするものである。変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子における変異は、本発明の目的を達成するものであればいかなるものであってもよい。好ましくは当該変異は、配列番号１に記載のアミノ酸配列において304番目のアスパラギン、339番目のフェニルアラニン、338番目のイソロイシン、395番目のアスパラギン酸、228番目のイソロイシンから選択されるいずれか１以上のアミノ酸に相当するアミノ酸の置換をもたらすものであり、より好ましくは、少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するアミノ酸のプロリンまたはセリンへの置換をもたらすものである。さらに好ましくは、少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するアミノ酸のプロリンへの置換をもたらすものである。ここで「配列番号１におけるＸ番目のアミノ酸に相当するアミノ酸」とは、変異の対象となるアミノ酸が配列番号１においてＮ末端から数えてＸ番目であることを特定したものであるが、配列番号１に示すアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するフィトエン不飽和化酵素においては、Ｘ番目とは

ならず、異なる数値として表現されることを包含するものである。

[0029] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子としては、具体的には、パントエア・アナナチス由来のフィトエン不飽和化酵素遺伝子（配列表の配列番号２に示す塩基配列）に、所望のアミノ酸置換をもたらす変異を導入した塩基配列が例示される。例えば変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子としては、配列番号２の塩基配列において911番目のアデニン（A）がグアニン（G）に置換している配列番号３の塩基配列を持つ遺伝子が例示される。当該911番目の塩基の置換により、配列番号１のアミノ酸配列の304番目のアスパラギンのセリンへの置換がもたらされる。なお配列番号２には、G1131A、A1476Tのノンシノニマス変異が入っている。また、例えば変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子としては、配列番号２の塩基配列において910～912番目の塩基配列AACがCCT、CCC、CCA、CCG、より好ましくはCCTに置換している塩基配列を持つ遺伝子（配列表の配列番号２８に示す塩基配列）が例示される。かかる塩基の置換により、配列番号１のアミノ酸配列の304番目のアスパラギンのプロリンへの置換がもたらされる（配列表の配列番号２７に示すアミノ酸配列）。なお配列番号２８には、G1131A、A1476Tのノンシノニマス変異が入っている。

[0030] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子は、変異型遺伝子のライブラリを作製し、ライブラリから、目的の機能を持つ酵素をコードする遺伝子をスクリーニングし、塩基配列を決定することができる。スクリーニングは例えば実施例に記載の方法により行うことができる。塩基配列が一旦決定されれば、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子は、化学合成、クローニングされたプローブを鋳型としたPCR、部位特異的突然変異誘発法等によって得ることができる。

[0031] 本発明は、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換される細胞を培地で培養する工程を含むが、当該細胞はもともと他のカロテノイド生合成遺伝子を有するものであってもよいし、他のカロテノイド生合成遺伝子を形質転換されたものであってもよい。他のカロテノイド生合成遺伝子は、C_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化する反応の上流または下流の反応に関連

するものである。上流の反応は、C_{50}カロテノイド骨格化合物を供給する経路に該当し、下流の反応は、C_{50}不飽和化カロテノイドをさらに修飾する経路に該当する。

[0032] C_{50}のカロテノイド骨格化合物を供給する経路について説明する。IPP、DMAPP、C_{10}PP、C_{15}PP、C_{20}PPは、多くの細胞、特に全ての微生物において、もともと合成が可能である。本発明における細胞は、C_{15}PPおよび／またはC_{20}PPからのゲラニルファルネシル二リン酸（以下「C_{25}PP」とも称する）の合成、さらにC_{25}PP二分子を縮合させることによるC_{50}カロテノイド骨格化合物の合成を行うことができることが好ましい。さらに好ましくは本発明における細胞は、C_{15}PPおよび／またはC_{20}PPからC_{25}PPを合成する酵素をコードする遺伝子、C_{25}PPを二分子縮合させることによりC_{50}のカロテノイド骨格化合物を合成する酵素をコードする遺伝子の少なくとも１以上により、形質転換されたものである。

[0033] C_{15}PPおよび／またはC_{20}PPからC_{25}PPを合成する酵素をコードする遺伝子は、目的とする機能を有する遺伝子であればいかなるものであってもよい。かかる遺伝子として例えば、ゲオバチルス（Geobacillus）属の中度好熱性細菌であるゲオバチラス・ステアロサーモフィルス（Geobacillus stearothermophillus）由来のファルネシル二リン酸合成酵素（FDS）の変異型遺伝子が例示される（Ohnuma, S. et al., J Biol Chem 271,30748-30754 (1996)、特願2010-258989）。当該変異型遺伝子として、81番目のチロシンがアラニンに置換（Y81A）し、かつ157番目のバリンがアラニンに置換（V157A）しているFDSの二重変異体（$FDS_{Y81A, V157A}$）をコードする遺伝子が挙げられる（$fds_{Y81A, V157A}$：配列表の配列番号４）。

[0034] C_{25}PPを二分子縮合させることによりC_{50}のカロテノイド骨格化合物を合成する酵素をコードする遺伝子は、目的とする機能を有する遺伝子であればいかなるものであってもよい。かかる遺伝子として例えば、C_{15}PPを二分子縮合させてC_{30}カロテノイド骨格化合物を合成する、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）由来のジアポフィトエン合成酵素（CrtM）の変異型遺伝子が例示される。当該変異型遺伝子として26番目のフェニルアラニ

ンと38番目のトリプトファンがアラニンに置換（F26A、W38A）し、かつ233番目のフェニルアラニンがセリンに置換（F233S）しているCrtMの三重変異体（$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$）をコードする遺伝子が挙げられる（$crtM_{F26A,W38A,F233S}$：配列表の配列番号５）。$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$は、きわめて効率的にC_{50}カロテノイド骨格化合物を合成することがわかってきている。

[0035] 本発明の細胞に、C_{15}PPおよび／またはC_{20}PPからC_{25}PPを合成する酵素をコードする遺伝子と、C_{25}PP二分子からC_{50}のカロテノイド骨格化合物を合成する酵素をコードする遺伝子の両方を形質転換させた場合は、C_{50}カロテノイド骨格化合物を高効率で生産することができ、好ましい。さらに、これらの遺伝子に加えて、IPPをDMAPPに異性化する酵素（例えば、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（Idi））をコードする遺伝子（idi）により、本発明の細胞を形質転換してもよい。IPPをDMAPPに異性化する酵素をコードする遺伝子を細胞に形質転換することにより、C_{50}カロテノイド骨格化合物の生産量と特異性をさらに向上させることができる。

[0036] C_{50}不飽和化カロテノイドをさらに修飾する経路について説明する。C_{50}不飽和化カロテノイドは、自然界におけるリコペンやテトラデヒドロリコペンに相当すると考えられ、リコペンの修飾に関連する種々の酵素によりC_{50}不飽和化カロテノイドを修飾し得ると予測される。本発明における細胞は、C_{50}の不飽和化カロテノイドの末端を環化する酵素をコードする遺伝子、および／またはC_{50}の不飽和化カロテノイドを酸素添加して酸化する酵素をコードする遺伝子を含んでいてもよい。さらに本発明における細胞が、C_{50}の不飽和化カロテノイドの末端を環化（特にβ環化）する酵素をコードする遺伝子を有する場合、当該細胞は、環状部分（特にβ環）をヒドロキシル化する酵素をコードする遺伝子、および／または環状部分（特にβ環）をケト化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていてもよい。なお、β環はβ-イオノン環と同義である。

[0037] C_{50}の不飽和化カロテノイドの末端を環化する酵素をコードする遺伝子は、目的とする機能を有する遺伝子であればいかなるものであってもよい。かか

る遺伝子として例えば、パントエア・アナナチス由来のリコペンからβ－カロテンを合成するリコペン環化酵素（CrtY）をコードする遺伝子（crtY）が例示される（Misawa N. et al., J Bacteriol 172, 6704-6712 (1990)）。

[0038] 末端がβ環化されたカロテノイドにおいて、β環をヒドロキシル化する酵素をコードする遺伝子、および／またはβ環をケト化する酵素をコードする遺伝子は、目的とする機能を有する遺伝子であればいかなるものであってもよい。かかる遺伝子として例えば、海洋細菌パラコッカス（Paracoccus）属N81106株（旧名アグロバクテリウム・アウランティアクム（Agrobacterium aurantiacum））由来、または、海洋細菌ブレバンディモナス（Brevundimonas）属SD-212株由来の、β-イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ（CrtZ）遺伝子（crtZ）、β-イオノン環-4-ケトラーゼ（β-イオノン環-4-オキシゲナーゼ）（CrtW）遺伝子（crtW）（Misawa N. et al., J Bacteriol 177, 6575-6584 (1995); Nishida, Y. et al., Appl Environ Microbiol 71, 4286-4296 (2005)）が例示される。パラコッカス属N81106株由来のcrtZ、crtW、前述のcrtYの結合した塩基配列を、配列番号６に示す。β-イオノン環-3-ヒドロキシラーゼは、β環の3位炭素をヒドロキシル化する反応を触媒するものであり、β-イオノン環-4-ケトラーゼは、β環の4位炭素に酸素添加してカルボニル基（ケト基）を形成する反応を触媒するものである。

[0039] C_{50}の不飽和化カロテノイドを酸化する酵素をコードする遺伝子は、目的とする機能を有する遺伝子であればいかなるものであってもよい。かかる遺伝子として例えば、ロドバクター・スフェロイデス（Rhodobacter sphearoides）由来のスフェロイデンモノオキシゲナーゼ（CrtA）遺伝子（crtA）が例示される（配列番号７）。スフェロイデンモノオキシゲナーゼは、スフェロイデンに酸素原子を挿入してスフェロイデノンへと変換させる酸化反応を触媒する酵素である。

[0040] 本発明の細胞は、製造するカロテノイドの種類に応じて、上記以外のC_{50}不飽和化カロテノイド修飾経路に関連する種々の酵素をコードする遺伝子により形質転換されてもよい。例えば、ブレバンディモナス属SD-212株由来のβ

ーイオノン環-2-ヒドロキシラーゼ（CrtG）遺伝子（国際公開WO2005/049643号公報においては「CrtV」と表記されている）（Nishida, Y. et al, Appl Environ Microbiol 71, 4286-4296, 2005）により、当該細胞を形質転換することにより、有機合成が困難とされるβ環の2位および2'位をヒドロキシル化したC_{50}カロテノイドの生産なども可能になる。また、パントエア・アナナチス由来のゼアキサンチングルコシルトランスフェラーゼ（crtX）遺伝子（Misawa N, J Bacteriol 172, 6704-6712, 1990）により、当該細胞を形質転換することにより、β環の3位および3'位の水酸基がグリコシド化されたしたC_{50}カロテノイドの生産なども可能になる。

[0041] 本発明における、C_{50}カロテノイドを製造し得る細胞は、適当な発現ベクターを選択し、公知の外来遺伝子の導入・発現法により製造することができる（例えば、Sambrook, J., Russel,D. W., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition, CSHL Press, 2001）。形質転換により細胞に導入する遺伝子を、PCR法など常法により調製し、その遺伝子を宿主に適する発現ベクターに常法により組み込み、目的のベクターを選択し、そのベクターにより宿主細胞を常法により形質転換することにより得られる。二種類以上の遺伝子により細胞を形質転換する場合には、それら複数の遺伝子を同一の発現ベクターに組み込んで形質転換してもよいし、異なる発現ベクターに組み込んで共形質転換してもよい。

[0042] 宿主となる細胞は、制限されないが、培養時間の短縮やクローニングの容易さを考え、大腸菌、枯草菌、酵母などの微生物が好ましい。特に大腸菌、酵母が好ましく、好適な大腸菌としては、Escherichia coli XL1-Blue（以下単に「大腸菌XL1-Blue」と表す。）のようなクローニング株、HB101やBL21などの発現株に加え、テルペン前駆体の合成量が豊富な遺伝子ノックアウト株、たとえばJW1750 ΔgdhA (glutamate dehydrogenase欠損)、JW0110 ΔaceE(pyruvate dehydrogenase欠損)（Baba,T. et al.; Mol Syst Biol 2, 2006 0008 (2006)）等が挙げられ、好適な酵母としては、標準的な発芽酵母、INVSc1(invitrogen)、YPH499(stratagene)等が挙げられる。

[0043] 遺伝子を組み込む発現ベクターは、特に制限はなく、一般に用いられているベクターでよい。例えば、宿主が大腸菌であるときは、pUC18、pACYC184などに由来するものが挙げられ、宿主が枯草菌であるときはpUB110、pE194、pC194、pHY300PLK DNAなどが、宿主が酵母であるときは、pRS303、YEp213、TOp2609等が挙げられる。

[0044] 目的の遺伝子が宿主の細胞に導入されたか否かの確認は常法により行うことができ、例えば、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。

[0045] 本発明のC_{50}カロテノイドの製造方法は、上述のようにして得られた形質転換体である細胞を、培地で培養する工程を含む。培地は、C_{50}カロテノイド骨格化合物の供給源となり得る物質を含むものであればよく、細胞の培養に一般的に用いられるような成分が含まれる培地でよい。C_{50}カロテノイド骨格化合物が、IPPおよびDMAPPの代謝により合成される細胞においては、IPPおよびDMAPPの供給源となり得る炭素源が、培地に含まれていればよい。かかる炭素源としては、グルコース等の種々の糖類が例示される。

[0046] 培養時の温度は特に限定されないが、18～30℃とするのが好ましく、20～30℃とするのがさらに好ましい。

[0047] 培養時間も特に限定されないが、形質転換により導入した遺伝子の発現から12～72時間培養することが好ましく、24～48時間培養することがさらに好ましい。

[0048] 培養後の培養物からのC_{50}カロテノイドの回収は、微生物等の細胞から、カロテノイド等の生産物を得るのに常用される方法に従って行うことができる。培養物から細胞のみを分離して、細胞からカロテノイドを得てもよい。

[0049] なお本発明は、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子、当該変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子によりコードされる変異型フィトエン不飽和化酵素、および変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換されている、C_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化してC_{50}のカロテノイドを製造し得る細胞も対象とするものである。

[0050] また、本発明は、不飽和化C_{55}カロテノイドや不飽和化C_{60}カロテノイドなどの高効率な合成にも利用することができる。例えば、ファルネシル二リン酸合成酵素（FDS）の78番目のイソロイシンがグリシンに置換（I78G）し、かつ81番目のチロシンがアラニンに置換（Y81A）しているFDSの二重変異体（$FDS_{I78G,Y81A}$）（Ohnuma S et al., JBiol Chem 273, 26705-26713,1998）を用いて、本発明を利用することにより、C50カロテノイドに加えて不飽和化C_{55}カロテノイドを高効率に製造することができる。また、ミクロコッカス・ルテウス（Micrococcus luteus）由来のC_{30}PP合成酵素（HexPS）（Shimizu N et al, J Bacteriol 180,1578-1581, 1998）を用いて、本発明を利用することにより、。これら$FDS_{I78G,Y81A}$またはHexPSをCrtM変異体と共発現させることにより、不飽和化C_{60}カロテノイドを高効率に製造することができる。

実施例

[0051] 以下、本発明を実施例に示して具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0052]（参考例１）C_{50}カロテノイド骨格化合物の合成

（１）C_{50}カロテノイド原料であるC_{25}PPの供給

大腸菌（E. coli）内で効率よくC_{25}PPを合成するために、変異型遺伝子の$fds_{Y81A,_V157A}$を用いた。$fds_{Y81A,_V157A}$は、ゲオバチラス・ステアロサーモフィルス由来のファルネシル二リン酸合成酵素（FDS）の変異体である。変異Y81AはOhnuma, S. et al., J Biol Chem 271,30748-30754 (1996)に由来している。また本発明者らは、特願2010-258989に記載のテルペン合成酵素遺伝子のスクリーニング方法を用いて、変異型遺伝子fds_{Y81A}にさらに変異を導入することにより、基質に対するサイズ特異性をさらにシフトさせた変異型酵素をコードする$fds_{Y81A,V157A}$を作製した。

[0053]（２）C_{50}カロテノイド骨格化合物の合成

C_{25}PPの二分子縮合によるC_{50}カロテノイド骨格化合物（16,16'－ジイソペンテニルフィトエン）の合成には、変異型遺伝子の$crtM_{F26A,W38A,233S}$を用いた。スタフィロコッカス・アウレウス由来のジアポフィトエン合成酵素（CrtM）は

本来、C_{15}PPを二分子縮合させC_{30}骨格のカロテノイドを合成する酵素である。本発明者らは、基質に対するサイズ選択性の向上した酵素を作製するために、crtM遺伝子に変異を導入した（Umeno et al.,J Bacteriol 184, 6690-6699 (2002)、Umeno et al.,Nucleic Acids Res 31, e91 (2003)）。F26A、W38Aの変異をもつCrtMの二重変異体にC_{25}PPを与えると、わずかにC_{50}カロテノイド骨格化合物を合成することがわかった（非特許文献７）。

[0054] さらに、F26A、W38Aに加えてF233S変異を導入したCrtMの三重変異体が、二分子のC_{25}PPからC_{50}カロテノイド骨格化合物を極めて効率的に合成すること、C_{30}PPを与えるとわずかながらC_{60}カロテノイド骨格化合物を合成することを見出した（古林真衣子，生悦住茉友，斎藤恭一，梅野太輔．非天然カロテノイト合成経路の活性進化，日本農芸化学会関東支部2010年度大会，2010年10月9日：梅野太輔，古林真衣子，生悦住茉友，方波見彰仁，李伶，梶原順．非天然生合成経路を創り，そして育てる，「細胞を創る」研究会3.0，東京大学生産技術研究所，2010年11月12日：Furubayashi M, Saito K, Umeno D, In-laboratory genetic drift of carotenoid synthase and its evolution of size specificity. The international chemical congress of Pacific basin societies, Hawaii, USA, 2010年12月17日：古林真衣子，生悦住茉友，斎藤恭一，梅野太輔．酵素変異体のコンビナトリアル発現による非天然カロテノイドの選択的合成，2011年度農芸化学会大会，2011年3月）。C_{25}PPを供給する$fds_{Y81A,_V157A}$と、$crtM_{F26A,W38A,F233S}$を大腸菌XL1-Blueに共発現させることにより、C_{50}カロテノイド骨格化合物であるC_{50}-カロテン(n=3)を効率よく（約61％）で生産することがわかった。

[0055] （３）なお、$fds_{Y81A,_V157A}$と$crtM_{F26A,W38A,F233S}$による大腸菌XL1-Blueの形質転換は、常法によりプラスミドpAC-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$（図２（ｇ）：配列番号８）およびpUC-$fds_{Y81A,V157A}$（図２（ｆ）：配列番号９）を作製して行った。

[0056] pAC-$crt_{MF26A,W38A,F233S}$はpACmodベクター（Claudia Schmidt-Dannert et al., Nat. Biotechnol., 18: 750-753(2000)）のBamHIサイトにlacプロモータ／オペレータ(lacPO)-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$を挿入することによって作製した。

[0057] pUC-$fds_{Y81A,V157A}$はpUC18Nmベクター（Umeno D. et al, J Bacteriol 184, 6690-6699（2002））の$lacPO$下流に$fds_{Y81A,V157A}$遺伝子を挿入することによって作製した。

[0058] 形質転換した大腸菌は、非特許文献７に記載の手法により、培養を行った。

[0059] 製造されたカロテノイドについての解析も、非特許文献７に記載の方法によりHPLCを用いて行った。

[0060] （実施例１）C_{50}カロテノイド骨格化合物の合成の改良

$fds_{Y81A,_V157A}$と、$crtM_{F26A,W38A,F233S}$に加えて、イソペンテニル二リン酸イソメラーゼ（Idi）をコードする遺伝子（大腸菌ゲノム由来）を大腸菌XL1-Blueにて発現させ、大腸菌を培養した。$fds_{Y81A,_V157A}$と$crtM_{F26A,W38A,F233S}$による大腸菌XL1-Blueの形質転換は、常法によりプラスミドpAC-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$-idi（図２（ｈ）：配列番号１０）およびpUC-$fds_{Y81A,V157A}$（図２（ｆ）：配列番号９）を作製して行った。pAC-$crt_{MF26A,W38A,F233S}$-idiはpAC-$crt_{MF26A,W38A,F233S}$のClaIサイト上流に$lacPO$-idiを挿入することによって作製した。pUC-$fds_{Y81A,V157A}$は参考例１と同様にして作製した。形質転換した大腸菌の培養、製造されたカロテノイドについての解析は参考例１と同様にして行った。

[0061] 結果を図３に示す。Idiを導入した場合は、Idiを導入していない場合に比べて、C_{50}カロテノイド骨格化合物であるC_{50}-カロテン(n=3)の生産量が増加した。またIdiを導入していない場合は、C_{40}カロテノイド骨格化合物であるフィトエンが多量に合成されていたが、Idiを導入した場合は、フィトエンの生産量が減少し、C_{50}-カロテン(n=3)の生産の特異性が向上した。Idiを導入した場合は、C_{50}-カロテン(n=3)の合成効率が向上することがわかった（約90%）

[0062] （参考例２）野生型CrtIによるC_{50}カロテノイド骨格化合物の不飽和化

本発明者らは、CrtI（配列番号２（G1131A、A1476Tのノンシノニマス変異の入ったもの）の塩基配列を有する遺伝子がコードするフィトエン不飽和化酵素）によってC_{50}カロテノイド骨格化合物をもつカロテノイドが不飽和化することを見出した（非特許文献９）。しかしその生産量は極めて少なく、C_{50}

カロテノイド骨格化合物のうち25%が不飽和化されるに留まっていることがわかった（非特許文献８）。

一方、本発明者らは、lacプロモータ（lacP）などを用いた野生型CrtIの定常発現が細胞増殖を著しく阻害すること、また細胞の色素形成を著しく不安定化することを見出した。しかしながらC_{50}カロテノイド骨格化合物の合成／蓄積までの経路を持つ細胞（例えば、参考例１や実施例１にて得られた細胞）では、明らかな細胞毒性は認められなかった。

[0063] 本発明者らは、leakyな発現（誘導しなくても起こる低レベル発現）を低く抑えることのできるaraBADプロモータの下流に、crtIを連結して、大腸菌XL1-Blueにおいて発現させることを試みた。crtIの上流のカロテノイド生合成遺伝子群はlacPで定常的に発現させ、菌密度／菌数が十分量に達した後に、crtIの発現を誘導して、C_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化して色素形成させることを試みた。

[0064] 用いたプラスミドは、pUC-pBAD-crtI（図２（ｂ）のcrtI variant部分にcrtIが導入されたもの）である。pUC18Nmベクター（Umeno D. et al, J Bacteriol 184, 6690-6699 (2002)）のlacプロモータ／オペレータ（lacPO）を取り除き、pBADHisAベクター（invitrogen）由来のaraC遺伝子／araBADプロモータ配列を挿入した。プロモータ下流のXhoI-ApaIサイトにcrtIを挿入した。crtIは、パントエア・アナナチス由来の野生型フィトエン不飽和化酵素をコードする遺伝子である（Misawa N. et al., J Bacteriol 172, 6704-6712 (1990)）。

[0065] pUC-pBAD-crtIにより形質転換した大腸菌では、細胞毒性の問題は解消された。しかしながら、C_{50}カロテノイド骨格化合物の不飽和化は、ほとんど確認できないほど極めて効率の低いものであった。

[0066] （実施例２）C_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化する変異型crtIの取得

フィトエン不飽和化酵素（CrtI）の進化工学に基づき、より効率よくC_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化する変異型crtIの取得を目指した。図４（ａ）に本実施例の操作の概略を示し、図４（ｂ）にスクリーニングの原理を

示す。

[0067] まず、野生型crtIを含むプラスミドpUC-pBAD-crtI（図４（ｂ）中「pUC-I」と示す）をテンプレートとして、$MnCl_2$を用いたエラープローンPCR法（Cadwellら：PCR Methods Appl 2, 28-33 (1992)）によりcrtIにランダム変異を導入した。得られたPCR産物を制限酵素のXhoI、ApaIで消化し、pUC-pBADベクターのaraBADプロモータ下流のXhoI、ApaIの制限酵素部位にライゲーションした。ライゲーション産物を大腸菌XL10-Gold（Stragatene）に形質転換し、その一部をLB（Luria Bertani）固体培地に散布した。残りの形質転換体である大腸菌を、10 mL LB液体培地に加え、37℃で一晩培養後、2 mLからプラスミドを抽出し、これを「変異型crtIプラスミドライブラリ」とした。また、固体培地に形成したコロニー数から、形質転換された細胞数（ライブラリサイズ）を算出したところ、10^5 cfu/transformationであった。

[0068] こうして得たプラスミドライブラリによりプラスミドpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$（図４（ｂ）中「pAC-C_{50}」と示す：配列番号１１）を持つ大腸菌XL1-Blueを形質転換し、ニトロセルロースフィルタを載せたLB固体培地（50μg/mL carbenicillin, 30μg/mL chloramphenicolを含む）に散布した。37℃で24時間、コロニーが形成するまで培養した後、室温でさらに48時間静置した。

[0069] コントロールとして、野生型crtIを含むpUC-pBAD-crtIにより大腸菌XL1-Blueを形質転換した。この場合、コロニーは肌色を示した。変異型crtIプラスミドライブラリを形質転換して得た約2000のコロニー群の中に、ひときわ強い赤紫色を呈する8個のコロニーを目視により検出した。それぞれのコロニーをCrtI-m1, m2, …, m8と名付けた。図４（ｂ）に示すように、C_{50}不飽和化カロテノイドであるC_{50}-リコペン(n=15)は赤紫色を呈する色素であり、かかる化合物が効率よく合成された結果、コロニーが赤紫色を呈したものと考えられた。

[0070] 各コロニーの菌株を、LB液体培地で37℃、12時間培養してプラスミドを抽出し、プラスミドに含まれる変異型crtIの塩基配列をダイデオキシ法によって解析した。解析した結果を以下の表１に示す。

[0071] [表1]

表1 変異型CrtIの遺伝子変異の解析結果

サンプル名	遺伝子変異(括弧内はアミノ酸変異を示す)
CrtI-m1	A195G, A594G, T1016C(F339S)
CrtI-m2	A911G(N304S)
CrtI-m3	なし
CrtI-m4	T1015C(F339L), G1183A(D395N)
CrtI-m5	なし
CrtI-m6	A682G(I228V), A1012G(I338V)
CrtI-m7	T144C, A1012G(I338V)
CrtI-m8	A911G(N304S), T1017C

[0072] CrtI-m2とCrtI-m8は同じ、304番目のアスパラギン（N）がセリン（S）に置換している変異（N304S）を有していることがわかった。また、CrtI-m1とCrtI-m4は、339番目のフェニルアラニン（F）がセリン（S）またはロイシン（L）へ置換している変異（F339S、F339L）を有しており、CrtI-m6とCrtI-m7は338番目のイソロイシン（I）がバリン（V）に置換している変異（I338V）を有していた。これらの変異により、変異型CrtIのC_{50}カロテノイド骨格化合物の不飽和化能が高められたものと考えられた。

[0073] （実施例３）変異型CrtIによる不飽和化C_{50}カロテノイドの合成

実施例２にて得られたコロニーのうち、野生型CrtIに比べて色素形成が増強されていたCrtI-m1, m2, m4, m6, m8について、C_{50}カロテノイド骨格化合物の不飽和化能を確認した。

[0074] プラスミドpUC-pBAD-CrtI-m1, m2, m4, m6, m8のそれぞれにより、pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$を持つ大腸菌XL1-Blueを形質転換し、ニトロセルロース（NC）膜をのせたLB寒天培地に散布して37℃で24時間培養した。プラスミドpUC-pBAD-CrtI-m1, m2, m4, m6, m8は、図２（ｃ）pUC-pBAD-crtI*-crtYのcrtI*の部分に各種変異型遺伝子mut1、mut2、mut4、mut6、mut8が挿入されたものであり、mut2の挿入されたプラスミドの塩基配列を配列番号１２に示す。

[0075] コロニーが形成した後、コロニーの乗った状態でNC膜を、0.2 % アラビノース（arabinose）を含むLB寒天培地上に乗せ換えて、室温で培養した。コロニーを2 mL LB培地（50μg/mL carbenicillin, 30μg/mL chloramphenicolを

含む）に植菌して、37℃で一晩培養した。培養液300μLを30 mL TB培地（50 μg/mL carbenicillin, 30μg/mL chloramphenicolを含む）に植菌し、30℃、200 rpmで震盪培養を行った。24時間、震盪培養した後、培養液に20 % アラビノースを最終濃度 0.2 %となるように添加し、さらに48時間、震盪培養（30℃）を行った。

[0076] 培養液のOD_{600}を測定して、細胞を遠心して集菌した。集菌して得たペレットを生理食塩水で洗浄し、10 mL アセトンで脂溶性画分を抽出した。抽出液から300μLを分取し、Spectra Max 384 (Molecular Device社）を用いて吸光スペクトルを測定した。

[0077] 結果を図５に示す。図５（ａ）は各アセトン抽出液の実際の色を示す写真である。mut2、mut8、mut1、mut4、mut6を発現する大腸菌では、野生型crtI（WT）を発現する大腸菌に比べて、アセトン抽出液の500～600 nm付近の吸光度が増加していた（図５（ｂ））。特にN304Sのある変異型CrtIを有するCrtI-m2およびCrtI-m8では、強い色・吸光度を示していた。これらの変異型CrtIを発現させた場合では、最も右側のピーク（肩）が約540 nmにあるが、これは６ステップ不飽和化された産物（１５個の共役二重結合）が多量に含まれていることを示す。最もC_{50}不飽和化カロテノイドの合成量の多かったのは、CrtI-m2またはCrtI-m8を導入した場合であった。

[0078] 次にCrtI-m2の場合に合成されたカロテノイドについてHPLC解析を行った。アセトン抽出液に1 mLヘキサンおよび35 mL 10 % NaClを加えてヘキサン相にカロテノイド画分を抽出した。ヘキサン抽出液の75%を回収し、これに$MgSO_4$を少量加えて水分を除いた。ヘキサン溶媒を窒素により除去し、最終的に100μLヘキサン中にカロテノイド画分を濃縮してカロテノイド抽出液を得た。得られたカロテノイド抽出液のうち、25μL（全量の75% x 25% = 19%、7.3mL培地相当）を、HPLC-photodiodearrayシステムにインジェクションした。HPLCではTakaichi, S. Photosynth Res, 65,93-99 (2000)の条件に従って分析した（カラム：Waters Spherisorb(R) 5.0μm ODS2 4.6 mm x 250 mm Column、溶出液：Acetonitrile/Tetrahydrofuran/Metanol (58:7:35)　2 mL/min、検出器

：Photodiode array（190～800 nm））。またHPLCによって分取したものについての質量分析は、M-2500型日立二重収束質量分析計（日立製作所）を用いて、フィールド・デソープション・モードで行った(Takaichi(1993) Org. Mass Spectrom. 28:785-788))。

[0079] その結果、CrtI-m2ではC_{50}カロテノイド骨格化合物を６ステップ不飽和化した化合物（C_{50}-リコペン：C_{50}-lycopene）を多く合成していることがわかった（図６（ｂ）ピーク3）。一方野生型CrtIにより形質転換した場合では、ほとんど不飽和化した化合物を合成してないことがわかった（図６（ａ））。

[0080] 図６（ｂ）のピーク2とピーク3についての解析結果を以下に示す。C_{50}-カロテン(n=3)：図６（ｂ）のピーク2に該当する試料をHPLCにより分取し、質量分析を行った。HPLC溶出時間は、不飽和化された同サイズのカロテノイドより非常に遅かったため、C_{50}カロテノイド骨格を有する化合物であると考えられた。吸収スペクトルは、n=3のフィトエンと同様であった。質量分析により得られた質量数は680であり、推定構造（図１の化合物番号２）と合致した。

[0081] C_{50}-リコペン(n=15)：図６（ｂ）のピーク3に該当する試料をHPLCにより分取し、質量分析を行った。HPLC溶出時間は比較的早いものであった。吸収スペクトルはn=15の3,4,3',4'-テトラデヒドロリコペンの文献値（Karrer and Rutschmann（1945）Helv. Chim. Acta 28:793-795）に近く、吸収スペクトルは非環型カロテノイドの特徴を持つものであった。質量分析により得られた質量数は668であり、推定構造（図１の化合物番号３）と合致した。

[0082]（実施例４）不飽和化C_{50}カロテノイドの環化

リコペンからβ－カロテノイドを合成するリコペンシクラーゼをコードするcrtY遺伝子を用いて、不飽和化C_{50}カロテノイドであるC_{50}-リコペン(n=15)の環化を行った。

crtY遺伝子の形質転換には、プラスミドpUC-pBAD-crtI/CrtI-m2-crtYを用いた。当該プラスミドは、pUC-pBAD-crtI/CrtI-m2のApaIサイトの後ろにSpeIサイトを挿入し、ApaI/SpeIサイトにcrtY遺伝子を挿入することにより作製した。crtY遺伝子は、パントエア・アナナチス由来のリコペン環化酵素をコー

ドする遺伝子である（Misawa N. et al., J Bacteriol 172, 6704-6712 (1990)）。なおプラスミド中のCrtI-m2の表記は、CrtI-m2に由来する変異型遺伝子$crtI_{N304S}$を挿入していることを意味する。pUC-pBAD-CrtI-m2-crtYの塩基配列を配列番号１３に示す。

[0083] pUC-CrtI-m2-CrtYにより、pAC-$crtM_{F26A,W38A,F233S}$-$fds_{Y81A,V157A}$を持つ大腸菌XL1-Blueに形質転換した。コントロールとして、crtI-m2の代わりに野生型crtIと共に、crtYを形質転換した。大腸菌をニトロセルロース（NC）膜をのせたLB寒天培地に散布して37℃で24時間培養した。コロニーが形成した後、コロニーの乗った状態でNC膜を0.2 %アラビノースを含むLB寒天培地に乗せ換え、室温で培養してコロニー色を観察した。

[0084] 形質転換した大腸菌を0～48時間培養した写真を図７に示す。CrtI-m2由来の変異型crtIの下流にcrtYがあるプラスミドを形質転換した大腸菌（図７中の「$CrtI_2Y$」）では、非常に濃い赤色を示した。

[0085] また実施例３と同様の手法によりアセトン抽出液についてHPLC解析と質量分析を行った。

[0086] HPLC解析によって、502nmに吸収極大ピークを持つカロテノイドが検出された（図６（ｄ）ピーク7）。CrtIが野生型の場合では、このピークは痕跡量確認されるに留まった（図６（ｃ）ピーク5）。こうして得られたC_{50}カロテノイドの推定構造と合成経路を図１に示す。なお、図１の各化合物の番号は、図６のクロマトグラムにおける番号と対応している。

[0087] C_{50}-β-カロテン：図６のピーク7に該当する試料をHPLCにより分取し、質量分析を行った。HPLC溶出時間はC_{50}-リコペンより遅かった。C_{40}のカロテノイドにおいても同様の挙動を示すことが知られている。吸収スペクトルは化学合成したもの（Khachik and Beecher (1985) J. Chromatogr. 346:237-246）とほぼ一致した（図９（ｃ））。吸収スペクトルは二環型カロテノイドの特徴を持つものと同様であった。質量分析により得られた質量数は668であり、推定構造（図１の化合物番号７）と一致した。

[0088] （実施例５）環状C_{50}カロテノイド経路のさらなる修飾による拡張

実施例４にて確認した環状C_{50}カロテノイドを合成する経路をさらに拡張することにより、オキソカロテノイドを合成した。

[0089] crtW、crtZ、crtYを含むプラスミドpUC-pBAD-crtI-crtWZY（図２（ｄ）：配列番号１４）を用いた。当該プラスミドは、パラコッカス属N81106株のcrtW、crtZ、crtY（配列番号６）をプラスミドpAK32（Misawa N. et al.,J Bacteriol 177, 6575-6584 (1995)）からPCRにより増幅した。得られたcrtW、crtZ、crtYを用いて、pUC-pBAD-crtI-crtWZYとpUC-pBAD-CrtI-m2-crtWZYを作製した。実施例４の手法と同様にして、作製したプラスミドを$pAC\text{-}crtM_{F26A,W38A,F233S}\text{-}fds_{Y81A,V157A}$とともに大腸菌（XL1-Blue）に導入し、大腸菌を培養して、コロニー色を観察した。

[0090] その結果、pUC-pBAD-CrtI-m2-crtWZYを導入した系では、コロニーは鮮やかな赤色を呈した（図８（ｃ）右から２列目：CrtI*のCrtWZY）。

[0091] 実施例４と同様にアセトン抽出液のスペクトルを測定したところ、pUC-pBAD-CrtI-m2-crtWZYにより形質転換した場合は、508nmに強いピークを示した（図８（ａ）CrtI*-CrtWZY）。一方、野生型CrtIを用いた場合では、わずかな色素しか蓄積しなかった（図７（ａ）CrtI-CrtWZY）。実施例４と同様にHPLC解析したところ、502nmに吸収極大ピークをもつ新規な極性の高いカロテノイドがメジャーピークとして得られた（図６（ｆ）ピーク9）。こうして得られたカロテノイドの推定構造と経路を図１に示す。なお、図１の各化合物の番号は、図５のクロマトグラムにおける番号と対応している。

[0092]（実施例６）不飽和化C_{50}カロテノイドの酸化

ロドバクター・スフェロイデス由来のCrtAのアミノ酸配列をもとに、大腸菌用にコドンを最適化してcrtAを全合成した（配列番号７、DNA2.0社に委託）。合成した遺伝子を用いて、プラスミドpUC-pBAD-crtI-crtAおよびpUC-pBAD-CrtI-m2-crtAを作製した（図２（ｅ）：配列番号１５）。

実施例５と同様の手法により、作製したプラスミドを大腸菌に形質転換し、大腸菌を培養し、コロニーの色を観察し、アセトン抽出液のスペクトルを解析した。

[0093] その結果、pUC-pBAD-CrtI-m2-crtAを形質転換した場合は、コロニーは鮮やかな色を呈しており（図８（ｃ）右から１列目：CrtI*のCrtA）、またアセトン抽出液も、オキソカロテノイド特有に見られる、ブロードな吸収スペクトルを与えた（図８（ｂ）CrtI*-CrtA）。野生型のCrtIと共にCrtAを発現させた場合は、ごくわずかな色しか示さなかった。実施例５と同様にHPLC解析したところ、極性の高い新規なカロテノイドがメジャーピークとして現れた（図６（ｈ）ピーク11）。

[0094] （実施例７）C_{50}カロテノイド骨格化合物を不飽和化する能力の高い変異型crtIの取得

実施例３および４において実現したC50-リコペンやC50-β-カロテンの生合成経路は、未だC50骨格（C50-カロテン(n=3)）が残存しているという点で効率に改良の余地を認めた。そこで、よりC50骨格を不飽和化するようなCrtIの変異体の取得を目指した。実施例２で得られたCrtI変異体のうち、CrtI-m2がもっともC50骨格の不飽和化効率が高かった。そこで、CrtI-m2のもつアミノ酸置換N304Sに着目し、304番目のアミノ酸の部位特異的総置換を行い、より不飽和化効率の高い変異体を探索した。

[0095] まず、野生型CrtIを含むプラスミドpUC-pBAD-crtIをテンプレートとして、304番目のアミノ酸をランダム化（NNKコドン）したプライマーを用いてPCRおよびそれにつづくクローニングによりライブラリを作成した。得られたプラスミドライブラリを実施例２に記載した方法と同じ方法によりスクリーニングを行った。CrtI野生型よりも赤い色を示すコロニーを探索し、CrtI変異体のプラスミドを単離した。これらのCrtI変異体を再度スクリーニングし直したところ、グリシン（G）、セリン（S）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、アラニン（A）に置換されたものが特に赤いコロニーを与え、とりわけP置換体（コドン：CCT）が最も赤いコロニーを与えた。P置換体を有するCrtIのアミノ酸配列を配列表の配列番号２７に示し、また、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号２８に示す。

[0096] 次いで、CrtI-m2および$CrtI_{N304P}$によるC50-リコペンの合成量をHPLCによって

解析した。pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$と共に、pUC-pBAD-crtI-m2またはpUC-pBAD-crtI$_{N304P}$を大腸菌XL1-Blueに形質転換し、コロニーが形成した後、コロニーの乗った状態でNC膜を、0.2 % アラビノース（arabinose）を含むLB寒天培地上に乗せ換えて、室温で培養した。コロニーを2 mL LB培地（50μg/mL carbenicillin, 30μg/mL chrolamphenicolを含む）に植菌して、37℃で一晩培養した。培養液300μLを30 mL TB培地（50μg/mL carbenicillin, 30μg/mL chrolamphenicolを含む）に植菌し、30℃、200 rpmで震盪培養を行った。36時間、震盪培養した後、培養液に20 % アラビノースを最終濃度 0.2 %となるように添加し、さらに36時間、震盪培養（30℃）を行った。実施例３に示す方法でHPLC解析を行った。

[0097] その結果を図１０に示す。CrtI$_{N304P}$を用いた場合、細胞に蓄積するC50-リコペン合成量は殆ど増加しなかったが、C50-カロテン(n=3)の生産量が、CrtIm2に比べて明快に減少している。これはC50-リコペンの生合成量（C50カロテンの不飽和化効率）は高いが、C50-リコペンの細胞内での安定性が低く、その多くが分解されているのだと考えられる。

[0098] 次に、CrtI$_{N304P}$を用いてよりC50-βカロテンが増加するかどうかを調べた。まずpUC-pBAD-crtI$_{N304P}$-crtYプラスミドを作成した。このプラスミドおよびpUC-pBAD-crtI-m2-crtYを、pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$と共に大腸菌XL1-Blueに形質転換し、上記項目と同様に培養・抽出・HPLC分析をおこなった。

[0099] その結果、CrtI$_{N304P}$を用いた場合は、CrtI-m2を用いた場合に比べ、C50-カロテン(n=3)が減少してC50-リコペンが増加した（図１０）。

[0100] （実施例８）ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtW, CrtZの使用の検討

実施例５においては、C50-β-カロテンに加えてパラコッカス属N81106株由来のCrtWおよびCrtZを用いてC50-アスタキサンチンの生産を目指した。極性のピークはみられたが、C50-β-カロテンの多くはCrtWまたはCrtZによって修飾されずに残存した。そこでより効率の良いCrtWおよびCrtZを用いてC50-アスタキサンチン、およびその中間体のC50-ゼアキサンチンおよびC50-カンタキサンチンを合成することを目指した。

[0101] 既報 (Choi S.et al., Mar Biotechnol 7, 515-522 (2005), Choi S. et al., Appl Microbiol Biotechnol 72, 1238-1246 (2006)) より、ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtWおよびCrtZはそれぞれ効率の良いβカロテンケトラーゼおよびβカロテンヒドロキシラーゼであることがわかっている。天然型（C40型）のアスタキサンチンを合成するに際して、この酵素が現在入手可能な最良の選択である。そこで、これらの遺伝子をDNA2.0社に委託して大腸菌にコドン最適化したものを全合成した。これらの遺伝子を用いて、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$を作成した。また、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtW$_{BD}$およびpUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtZ$_{BD}$も作成した。pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtW$_{BD}$、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtZ$_{BD}$、およびpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$のプラスミドマップをそれぞれ図１１の（ｉ）、（ｊ）、および（ｋ）に示し、塩基配列をそれぞれ配列番号１６、１７、および１８に示す。

[0102] これらのプラスミドをpAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$とともに大腸菌（XL1-Blue）に導入し、実施例３に示すような方法で培養および抽出を行った。得られたカロテノイド抽出液をHPLC-photodiodearrayシステムにインジェクションした。カラムはμBondapak column (100 × 8 mm, RCM-type, Waters)を用い、メタノールを溶出液として1 mL/minの流速で分析した。

[0103] その結果、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtZ$_{BD}$では特異的にC50-ゼアキサンチンを合成し（図１２中、パネルａ）、pUC-pBAD-CrtI-m2-CrtY-CrtW$_{BD}$を用いた場合は特異的にC50-カンタキサンチンを合成した（図１２中、パネルｂ）。また、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$を用いた場合は特異的にC50-アスタキサンチンを合成した（図１２中、パネルｃ）。

[0104] （実施例９）idiの共発現によるC50-アスタキサンチンの増量

pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$およびpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$を用いて実施例８に記載の方法で大腸菌にC50-アスタキサンチンを合成させ、そのHPLCピーク面積から合成量を求めた。

[0105] その結果、288μg/gDCWのC50-アスタキサンチンを合成した（図１３）。

[0106] ここにidiを共発現させるため、pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$-idiを作成し、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$と共に大腸菌（XL1-Blue）に形質転換させ、同様の方法でカロテノイド合成量を求めた。pAC-crtM$_{F26A,W38A,F233S}$-fds$_{Y81A,V157A}$-idiのプラスミドマップは図１１の（Ｉ）に示し、塩基配列を配列番号１９に示す。

[0107] その結果、884μg/gDCWのC50-アスタキサンチンを合成した（図１３）。

[0108] （実施例１０）実施例４で得られたC50-β-カロテンのピーク（図６中のピーク７）中の化合物、および実施例８で同定されたC50-ゼアキサンチン、C50-カンタキサンチン、C50-アスタキサンチンのピーク（図１２のピーク１、２、および３）中の化合物の同定を行った。

[0109] C50-β-カロテンのピーク（図６中のピーク７）中の化合物の極大吸収波長は、メタノール中で467(肩)、501、 534nmであり、C50-リコペンよりも低波長側にピークシフトしていたことから、環構造をもつカロテノイドである（Takaichi, S. & Shimada, K. Methods Enzymol. 213, 374-385 (1992)）。また、逆相HPLCにおける溶出時間が延びたことからも、環化は明らかである。モレキュラーマスは668であり、C50-β-カロテンに計算される値と同一であった。

[0110] 50-アスタキサンチンのピーク（図１２のピーク３）中の化合物では、メタノール中で512nmに極大吸収波長をもつ広い吸収スペクトルが得られた。728のモレキュラーマスはC50-アスタキサンチンの構造式から予想される値と一致した。さらに、既報（S. Takaichiら、Org. Mass Spdectroscopy, 28, 785-788 (1993)）に従い、化学誘導化による部分構造の決定を試みた。この化合物は、$NaBH_4$による還元により、吸収スペクトルはC50-β-カロテンと等しくなり、モレキュラーマスは732へと増加した。このことから、4, 4'位に２つのカルボニル基が存在することが明らかとなった。$NABH_4$処理前の化合物を、ジアセチルおよびジトリメチルシリル誘導体を作成したところ、そのモレキュラーマスはそれぞれ812および872となった。これはそれぞれ、アセチル基２つおよびトリメチルシリル基２つ分の分子量増加に相当する。こうして、

２つの水酸基を持つことが明らかになった。一方、$NABH_4$処理後の化合物を同じくジアセチルおよびジトリメチルシリル誘導体を作成したところ、そのモレキュラーマスはそれぞれ900および1020となった。つまり、４つのヒドロキシル基があることが確認できた。さらに、この化合物を精製してNMR解析を行ったところ、明快にC50-アスタキサンチンであると同定された（図１４）。

[0111] C50-ゼアキサンチンのピーク（図１２のピーク１）中の化合物は、モレキュラーマスが700であり、そのHPLC溶出プロファイルおよび吸収スペクトルは図１２のパネル（ａ）に示す通りであり、その溶出ピークの極性側へのシフトなどを勘案して、C50-ゼアキサンチンであると断定した。

[0112] C50-カンタキサンチンのピーク（図１２のピーク２）中の化合物は、モレキュラーマスが696であり、そのHPLC溶出プロファイルおよび吸収スペクトルは図１２のパネル（ｂ）に示す通りであり、その溶出ピークの極性側へのシフトなどを勘案して、C50-カンタキサンチンであると断定した。

[0113] （実施例１１）CrtGおよびCrtXの追加発現による多様な構造のカロテノイドの製造

ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtG遺伝子（Nishida,Y. et al, Appl Environ Microbiol 71, 4286-4296, 2005）およびパントエア・アナナチス由来のcrtX遺伝子をさらに発現させることにより、合成されるカロテノイド構造のさらなる多様化を検討した。crtX遺伝子はゼアキサンチングルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

[0114] まず、ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtG遺伝子を用いて、pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-CrtG-$CrtZ_{BD}$および pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-CrtG-$CrtW_{BD}$-$CrtZ_{BD}$を作成した。pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-CrtG-$CrtZ_{BD}$および pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-CrtG-$CrtW_{BD}$-$CrtZ_{BD}$のプラスミドマップをそれぞれ図１５の（ｍ）および（ｎ）に示し、塩基配列をそれぞれ配列番号２０および２１に示す。

[0115] pUC-pBAD-$CrtI_{N304P}$-CrtY-CrtG-$CrtZ_{BD}$とpAC-$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$-$FDS_{Y81A,V157A}$とを大腸菌に共発現させて培養すると、ゼアキサンチンの2位および2'位が水酸化された、C_{50}-カロキサンチン（Caloxanthin）およびC_{50}-ノストキサンチン（Nost

oxanthin）が合成できる（図１６）。

[0116] pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とpAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$とを大腸菌に共発現させて培養すると、アスタキサンチンの2位および2'位が水酸化されたC$_{50}$-2-ヒドロキシアスタキサンチン（Hydroxyastaxanthin）およびC$_{50}$-2,3,2',3'-テトラヒドロキシ-β,β-カロテン-4,4'-ジオンが合成できる（図１６）。

[0117] また、カンタキサンチンの2位および2'位が水酸化されたC$_{50}$-2-ヒドロキシカンタキサンチン（Hydroxycanthaxanthin）およびC$_{50}$-2,2'-ジヒドロキシカンタキサンチン（Dihidroxycanthaxanthin）の合成もできる（図１６）。

[0118] 次に、パントエア・アナナチス由来のcrtX遺伝子を用いて、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$およびpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$を作成した。pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$およびpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$のプラスミドマップをそれぞれ図１５の（ｏ）および（ｐ）に示し、塩基配列をそれぞれ配列番号２２および２３に示す。

[0119] pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$とpAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$とを大腸菌に共発現させて培養すると、ゼアキサンチンの3位および3'位の水酸基がグリコシド化されたC$_{50}$-ゼアキサンチン-β-D-グルコシドおよびC$_{50}$-ゼアキサンチン-β-D-ジグルコシドが合成できる（図１７）。

[0120] pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$とpAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$とを大腸菌に共発現させて培養すると、アスタキサンチンの3位および3'位の水酸基がグリコシド化されたC$_{50}$-アスタキサンチン-β-D-グルコシドおよびC$_{50}$-アスタキサンチン-β-D-ジグルコシドが合成できる（図１７）。

[0121] 実際に、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtZ$_{BD}$、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$、またはpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$のいずれかを、pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$と共に大腸菌（XL1-Blue）に共発現させ、LB固体培地に散布してコロニーを形成させたところ、赤紫色のコロニーを形成した（図１８）。

[0122] コロニーを2 mL LB液体培地に植菌して16時間培養したのち、これを30mL T

B液体培地に1/100量植菌した。30℃にて200rpmで回転させながら36時間培養後、最終濃度0.2% (v/v)となるようにL-アラビノースを加え、さらに36時間培養した。培養液から2mLを集菌回収し、生理食塩水で洗浄後、1 mLアセトンを加えてカロテノイド画分を抽出した。細胞ペレットおよびアセトン抽出液を図１８に示す。また、それぞれの抽出液の吸収スペクトルを図１９に示す。

[0123] 次に、pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$またはpUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtZ$_{BD}$およびpAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$を大腸菌（XL1-Blue）に形質転換した。この細胞コロニーを2 mL LB液体培地に植菌して16時間培養したのち、これを30 mL TB液体培地に1/100量植菌した。30℃にて200 rpmで回転しながら36時間培養後、最終濃度0.2% (v/v)となるようにL-アラビノースを加え、さらに36時間培養した。培養液を遠心集菌し、生理食塩水で洗浄した。細胞ペレットにアセトン10 mLを加えカロテノイド画分を抽出した。アセトン抽出液に1 mLクロロホルムおよび35 mL 10 % NaClを加えてクロロホルム相にカロテノイド画分を抽出した。クロロホルム抽出液をすべて回収し、これにMgSO$_4$を加えて水分を除いた。クロロホルム溶媒を窒素により除去し、最終的にメタノール/THF(1:1, v/v)100 μLにカロテノイド画分を濃縮してカロテノイド抽出液を得た。得られたカロテノイド抽出液のうち、10 μL（全量の10%、3 mL培地相当）を、HPLC-photodiodearrayシステムにインジェクションした。HPLCではNishida, Y. et al, Appl Environ Microbiol, 71, 4286-4296 (2005)の条件に従って分析した（カラム：TSK gel ODS-80Ts column (4.6-mm inner diameter by 150 mm; Tosoh Co.)、溶出液：溶出液A (Methanol/Water, 95:5) を5分，溶出液Aから溶出液B (Methanol/Tetrahydrofuran,7:3) を5分，溶出液Bを15分，1 mL/min、検出器：Photodiode array (190～800 nm)）。

[0124] その結果、C50-ゼアキサンチンにCrtXを共発現させたものでは、より溶出時間の短いところに新規なピークが１つ現れた（図２０のピーク５）。これはC50-ゼアキサンチンと同一の吸収スペクトルをもつこと、極性がC50-ゼアキサンチンより高いことから、C50-ゼアキサンチン-β-D-ジグルコシドであ

ると考えられる。

[0125] また、C50-ゼアキサンチンにCrtGを共発現させたものでは、新規ピークが２つ現れた（図２０のピーク２および３）。C50-ゼアキサンチンと同じ吸収スペクトルをもつこと、極性の高いものであること、などから、それらは、C50-カロキサンチン（図２０のピーク３）およびC50-ノストキサンチン（図２０のピーク２）だと考えられる。

[0126] （実施例１２）C_{55}およびC_{60}カロテノイドの生合成

FDSにI78GおよびY81Aの変異が入った変異体（$FDS_{I78G,Y81A}$）は、C_{25}PPおよびC_{25}PPに更にC_5ユニットが足されたプレニル二リン酸（C_{30}PPやC_{35}PPなど）を合成する（Ohnuma S et al., JBiol Chem 273, 26705-26713,1998）。また、ミクロコッカス・ルテウス（Micrococcus luteus）由来のC_{30}PP合成酵素（HexPS）はC_{30}PPを合成する（Shimizu N et al, J Bacteriol 180,1578-1581, 1998）。これら$FDS_{I78G,Y81A}$またはHexPSをCrtM変異体と共発現させることにより、C_{50}骨格よりも大きいカロテノイド骨格の生合成を目指した。

[0127] まず、pAC-hexPS、pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idi、およびpUC-$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$を作成した。pAC-hexPS、pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idi、およびpUC-$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$のプラスミドマップをそれぞれ図２０の（ｑ）、（ｒ）、および（ｓ）に示し、塩基配列をそれぞれ配列番号２４、２５、および２６に示す。

[0128] pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiまたはpAC-hexPSを、それぞれpUC-$CrtM_{F26A,W38A}$またはpUC-$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$と共に大腸菌（XL1-Blue）に形質転換した。細胞の培養および生産されたカロテノイドの解析は参考例１と同様にして行った。

[0129] 結果を図２１に示す。CrtMF26A,W38A,F233Sを用いた場合は、pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiとを共発現させるとC_{45}およびC_{50}カロテノイドに加えてC_{55}カロテノイドを生産した。また、hexPSを共発現させるとC_{60}カロテノイドを特異的に合成した。一方で、$CrtM_{F26A,W38A}$を用いた場合は、C_{55}カロテノイドおよびC_{60}カロテノイドの生産がいずれも確認できなかった。よって、C_{55}カロテノイドおよびC_{60}カロテノイドの生産には、CrtMのF233S変異が必須である。

[0130] つぎに、pAC-$FDS_{I78G,Y81A}$-idiまたはpAC-hexPSを、８種類のCrtM変異体（pUC-

CrtM変異体）と共発現させて、そのカロテノイド合成量を同様の方法で調べた。その結果を図２２に示す。C_{55}骨格をより多く合成したのは、$FDS_{I78G,Y81A}$-idiと$CrtM_{F26A,F233S}$または$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$とを共発現させた細胞であった。C_{60}骨格を効率的に合成したのはHexPSと$CrtM_{W38A,F233S}$または$CrtM_{F26A,W38A,F233S}$とを共発現させた細胞であった。

産業上の利用可能性

[0131] 以上説明したとおり、本発明の製造方法は、高効率で不飽和化C_{50}カロテノイドを合成することができ、種々のC_{50}カロテノイドを合成可能とする。C_{50}カロテノイドは、自然界においてほとんど確認されておらず、合成された例も皆無といってよい。カロテノイドは、抗酸化作用等の生理活性を有することが知られているが、C_{50}カロテノイドはこれまでにない新たな作用を発揮することや、従来のカロテノイドに比較して顕著に活性が増強していることが期待される。例えばC_{50}カロテノイドは、高い抗酸化活性を持つ可能性、抗腫瘍活性等の生理活性物質の新規シーズとしての用途、機能性色素分子としての利用などが期待される。また、本発明の製造方法は、不飽和化C_{55}カロテノイドや不飽和化C_{60}カロテノイドなどの高効率な合成にも利用することができる。さらに本発明の製造方法は、イソプレノイド合成経路を強化した細胞（Klein-Marcuschamer Dら：Trends Biotechnol 25,417-424 (2007), Kirby Jら：Nat Prod Rep 25, 656-661 (2008)）等の従来技術と組み合わせることにより、合成可能なカロテノイドの種類を飛躍的に増大させるものと考えられる。

請求の範囲

[請求項1] 炭素数50のカロテノイドの製造方法であって、

変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするよう変異が導入されたものであり、

変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞を培地で培養し、培養後の培養物から炭素数50のカロテノイドを得ることを手段とする炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項2] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたものであり、該変異は、配列番号１に記載のアミノ酸配列において304番目のアスパラギン、339番目のフェニルアラニン、338番目のイソロイシン、395番目のアスパラギン酸、228番目のイソロイシンから選択されるいずれか１以上のアミノ酸に相当するアミノ酸の置換をもたらすものであることを特徴とする、請求項１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項3] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたものであり、該変異は、少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するアミノ酸のプロリンまたはセリンへの置換をもたらすものであることを特徴とする、請求項１または２に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項4] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたものであり、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子が、パントエア・アナナチス（Pantoea ananatis）由来のフィトエン不飽和化酵素遺伝子に変異を導入したことを特

徴とする、請求項１～３のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項5] 前記細胞が、大腸菌または酵母である、請求項１～４のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項6] 変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換された細胞がさらに、ゲラニルファルネシル二リン酸を二分子縮合することにより炭素数50のカロテノイド骨格化合物を合成する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、請求項１～５のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１に記載の細胞がさらに、ファルネシル二リン酸および／またはゲラニルゲラニル二リン酸からゲラニルファルネシル二リン酸を合成する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、請求項１～６のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項8] 請求項１～７のいずれか１に記載の細胞がさらに、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して得られた炭素数50の不飽和化カロテノイドの末端を環化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、請求項１～７のいずれか１に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項9] 請求項８に記載の環化がβ環化であり、請求項８に記載の細胞がさらに、末端にβ環を有する炭素数50のカロテノイドにおいて、β環をヒドロキシル化する酵素および／またはβ環をケト化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、請求項８に記載の炭素数50のカロテノイドの製造方法。

[請求項10] 請求項１～７のいずれか１に記載の細胞がさらに、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して得られた炭素数50の不飽和化カロテノイドを酸化する酵素をコードする遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、請求項１～７のいずれか１に記載の炭素数50のカ

ロテノイドの製造方法。

[請求項11] 炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が導入されたことを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

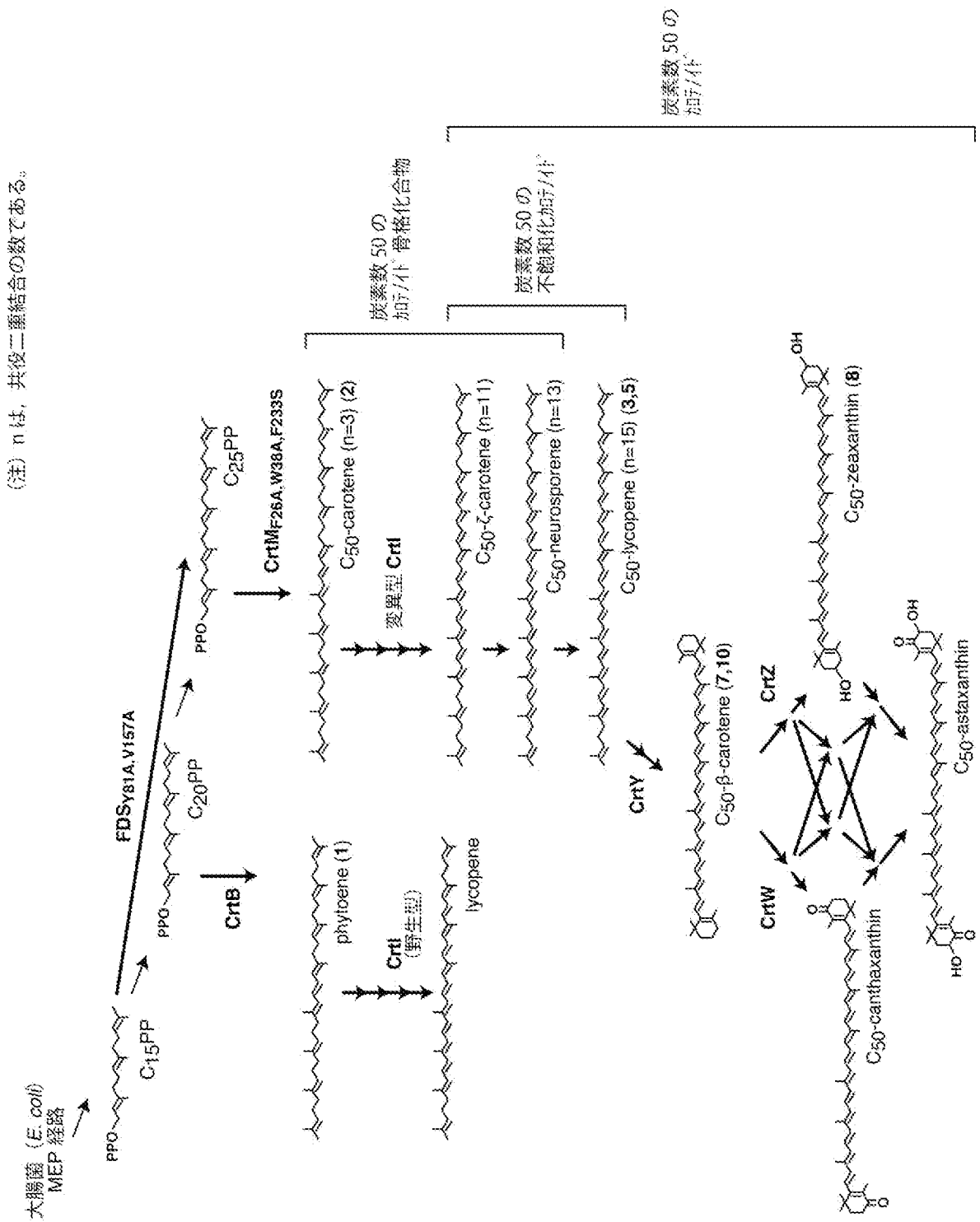
[請求項12] 炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化する活性の増強した変異型フィトエン不飽和化酵素をコードするような変異が、配列番号１に記載のアミノ酸配列において304番目のアスパラギン、339番目のフェニルアラニン、338番目のイソロイシン、395番目のアスパラギン酸、228番目のイソロイシンから選択されるいずれか１以上のアミノ酸に相当するアミノ酸の置換をもたらすものであることを特徴とする、請求項１１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

[請求項13] 請求項１１または１２に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子の変異が少なくとも、配列番号１における304番目のアスパラギンに相当するアミノ酸のプロリンまたはセリンへの置換をもたらすものであることを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子。

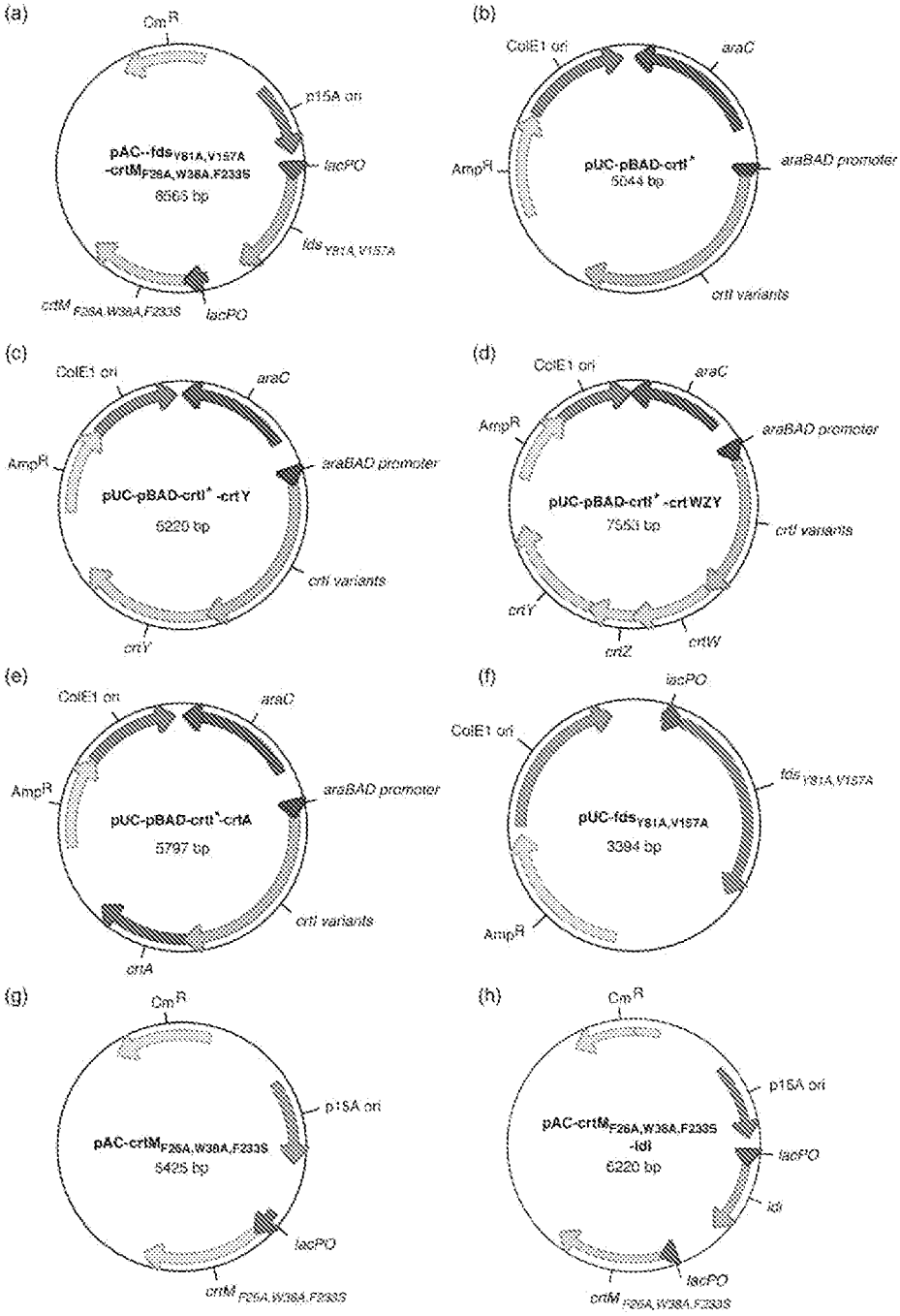
[請求項14] 請求項１１～１３のいずれか１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子によりコードされていることを特徴とする、変異型フィトエン不飽和化酵素。

[請求項15] 請求項１１～１３のいずれか１に記載の変異型フィトエン不飽和化酵素遺伝子により形質転換されていることを特徴とする、炭素数50のカロテノイド骨格化合物を不飽和化して炭素数50のカロテノイドを製造し得る細胞。

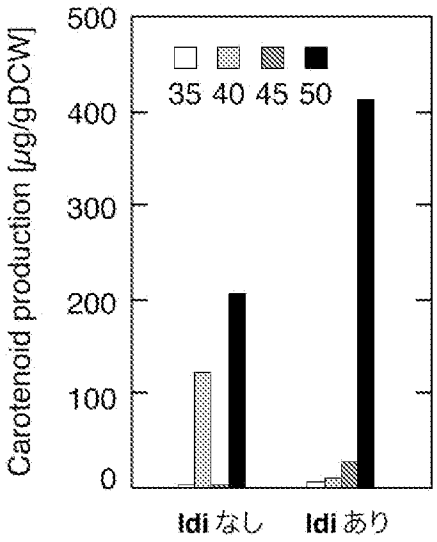
[図1]


(注) n は，共役二重結合の数である。
大腸菌 (E. coli)
MEP 経路
C15PP
FDSY81A,V157A
C20PP
CrtB
C25PP
CrtMF26A,W38A,F233S
phytoene (1)
C50-carotene (n=3) (2)
変異型 CrtI
CrtI
(野生型)
lycopene
C50-ζ-carotene (n=11)
C50-neurosporene (n=13)
C50-lycopene (n=15) (3,5)
CrtY
C50-β-carotene (7,10)
CrtW
CrtZ
C50-zeaxanthin (8)
C50-canthaxanthin
C50-astaxanthin
炭素数 50 の
加成体 骨格化合物
炭素数 50 の
不飽和化加成体
炭素数 50 の
加成体

[図2]


(a)
Cm^R
p15A ori
pAC-fds Y81A,V157A -crtM F26A,W38A,F233S
8565 bp
lacPO
fds Y81A,V157A
crtM F26A,W38A,F233S
lacPO
(b)
ColE1 ori
araC
Amp^R
pUC-pBAD-crtI+
5044 bp
araBAD promoter
crtI variants
(c)
ColE1 ori
araC
Amp^R
pUC-pBAD-crtI+ -crtY
araBAD promoter
crtI variants
crtY
(d)
ColE1 ori
araC
Amp^R
araBAD promoter
pUC-pBAD-crtI+ -crtWZY
crtI variants
crtY
crtZ
crtW
(e)
ColE1 ori
araC
Amp^R
pUC-pBAD-crtI+-crtA
5797 bp
araBAD promoter
crtI variants
crtA
(f)
lacPO
ColE1 ori
fds Y81A,V157A
pUC-fds Y81A,V157A
3394 bp
Amp^R
(g)
Cm^R
p15A ori
pAC-crtM F26A,W38A,F233S
5425 bp
lacPO
crtM F26A,W38A,F233S
(h)
Cm^R
p15A ori
pAC-crtM F26A,W38A,F233S -idi
6220 bp
lacPO
idi
lacPO
crtM F26A,W38A,F233S

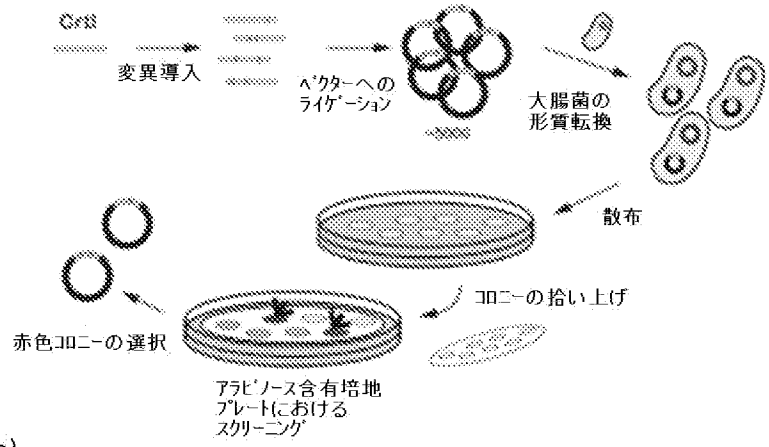
[図3]



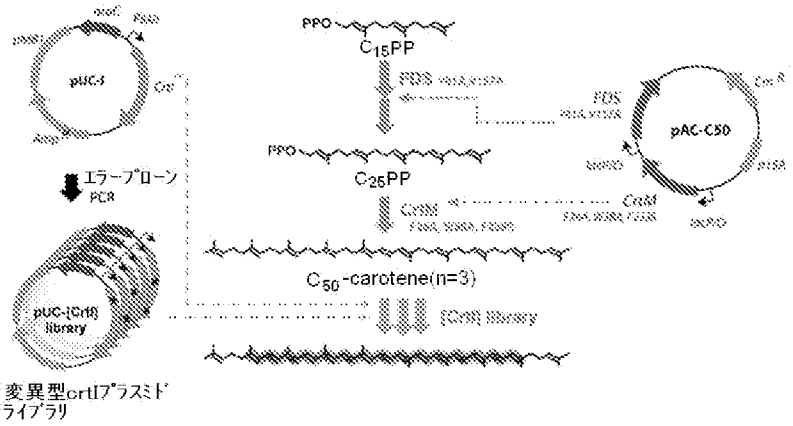
※ $fds_{Y81A,V157A,}$ $crtM_{F26A,W38A,F233S}$ 発現下

[図4]

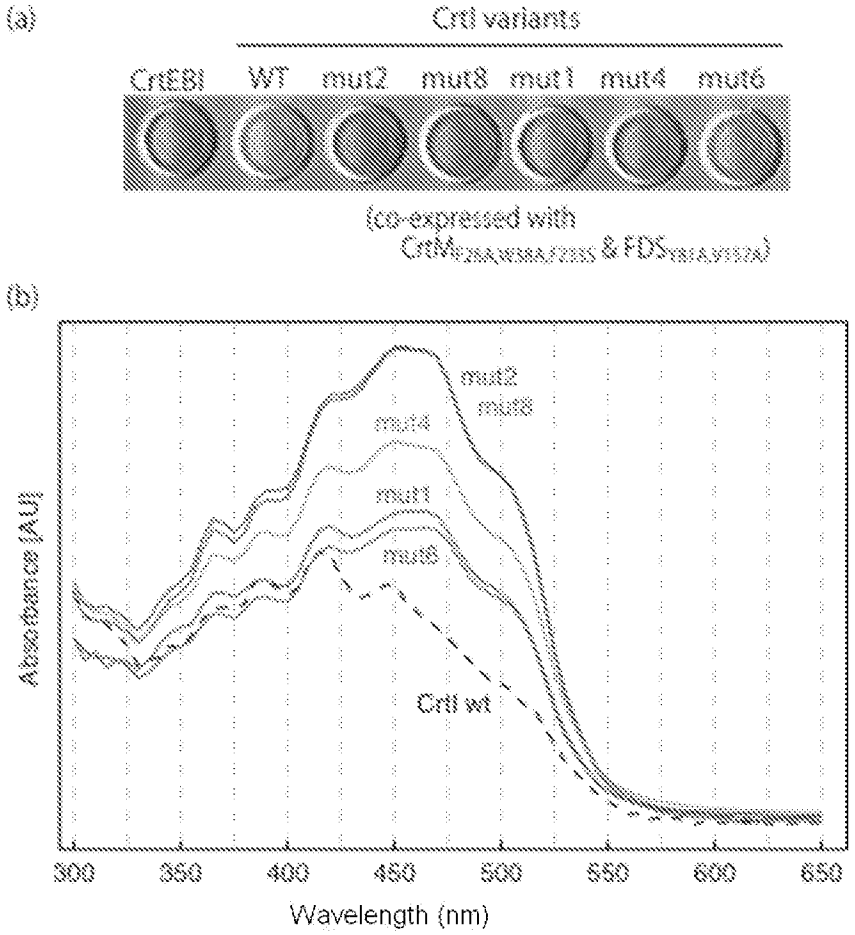
(a)



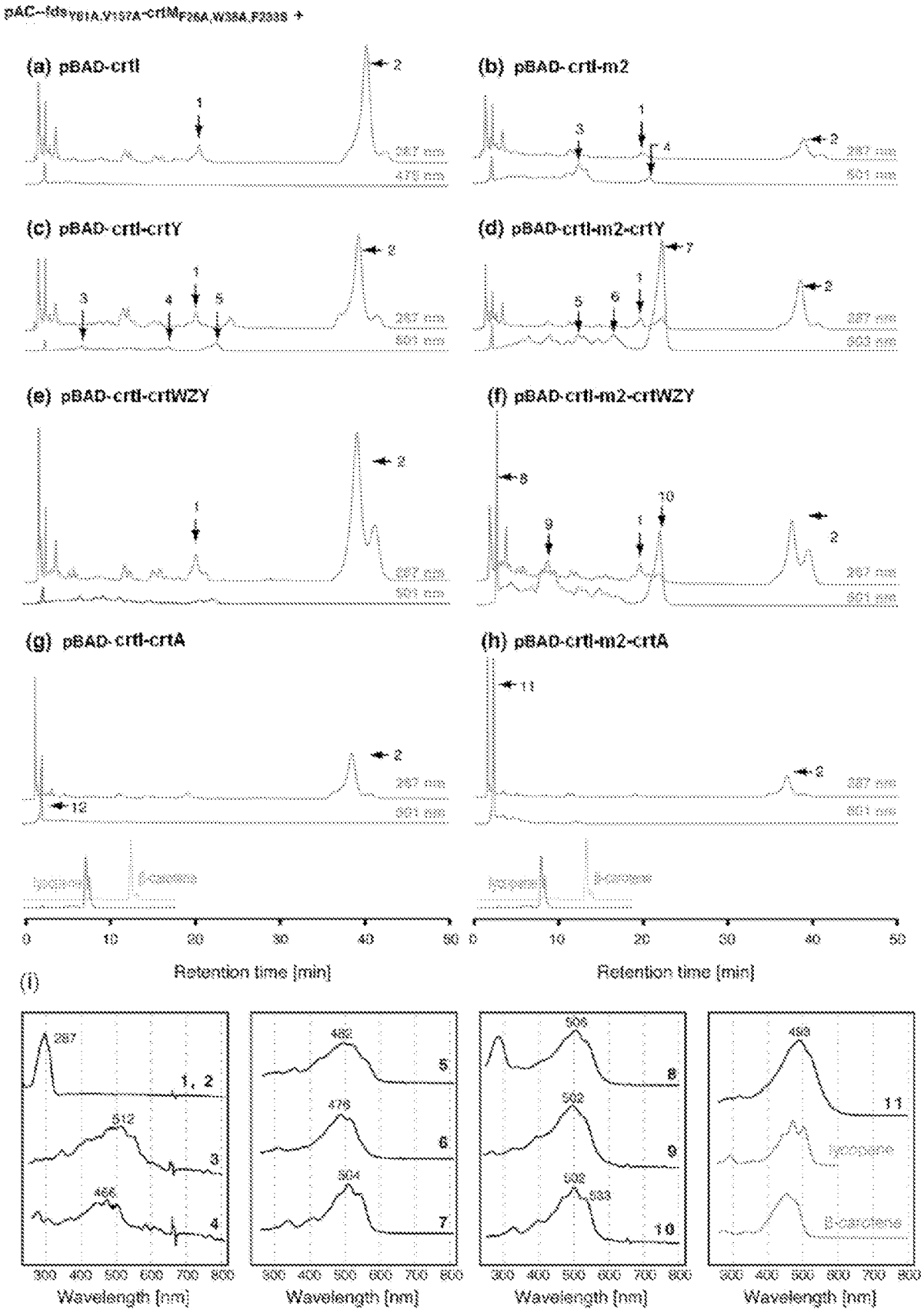
(b)



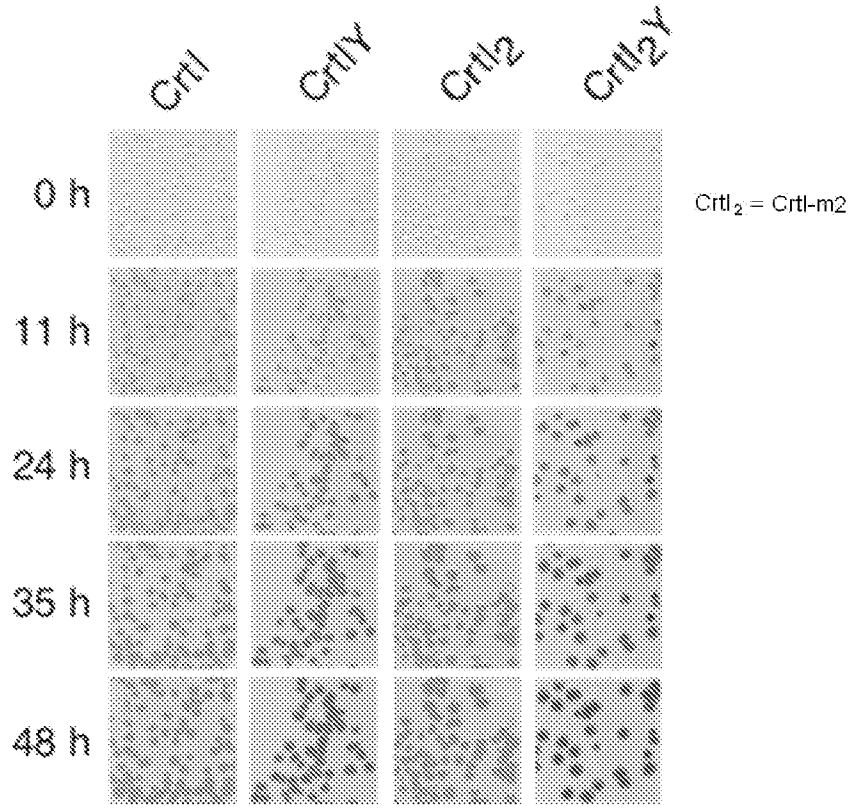
[図5]


(a)
Crtl variants
CrtEBI
WT
mut2
mut8
mut1
mut4
mut6
(co-expressed with
CrtM & FDS)
(b)
mut2
mut8
mut4
mut1
mut6
Crtl wt
Absorbance (AU)
300
350
400
450
500
550
600
650
Wavelength (nm)

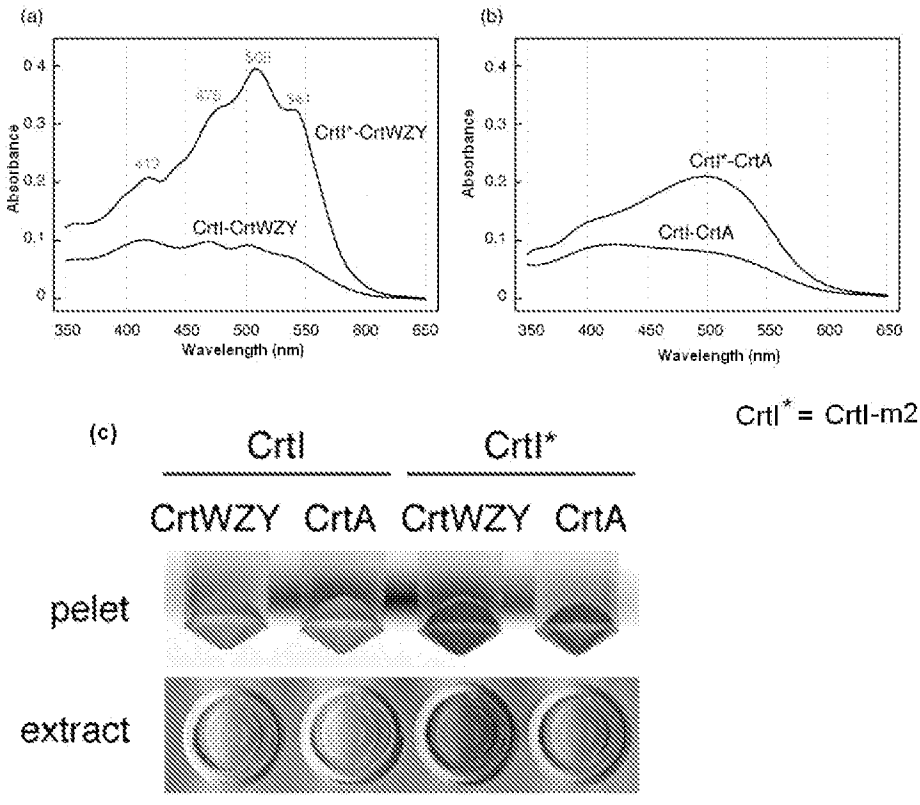
[図6]


pAC-fdsYB1A,V157A-crtMF28A,W38A,F233S +
(a) pBAD-crtI
(b) pBAD-crtI-m2
(c) pBAD-crtI-crtY
(d) pBAD-crtI-m2-crtY
(e) pBAD-crtI-crtWZY
(f) pBAD-crtI-m2-crtWZY
(g) pBAD-crtI-crtA
(h) pBAD-crtI-m2-crtA
Retention time [min]
(i)
Wavelength [nm]

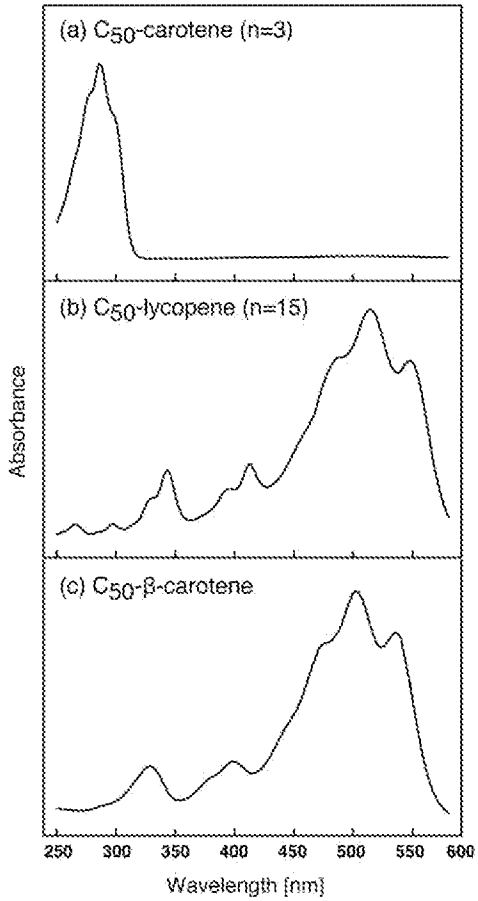
[図7]


CrtI
CrtIY
CrtI2
CrtI2Y
0 h
11 h
24 h
35 h
48 h
CrtI2 = CrtI-m2

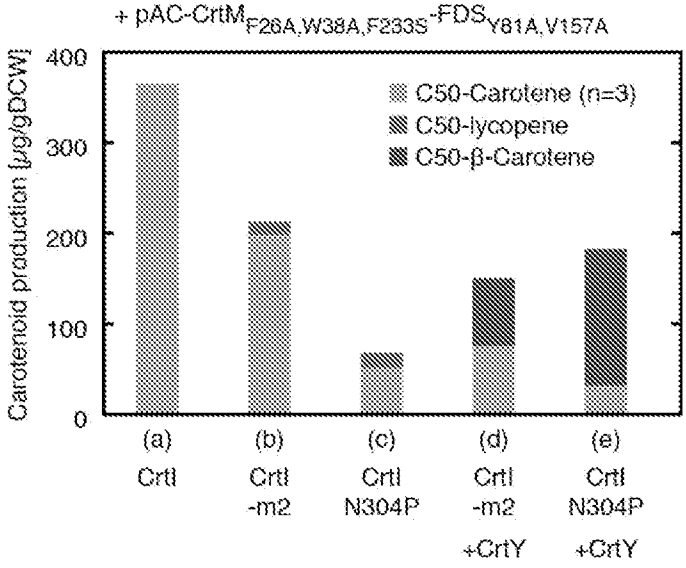
[図8]


(a)
(b)
Absorbance
Wavelength (nm)
CrtI*-CrtWZY
CrtI-CrtWZY
CrtI*-CrtA
CrtI-CrtA
CrtI* = CrtI-m2
(c)
CrtI
CrtI*
CrtWZY
CrtA
CrtWZY
CrtA
pelet
extract

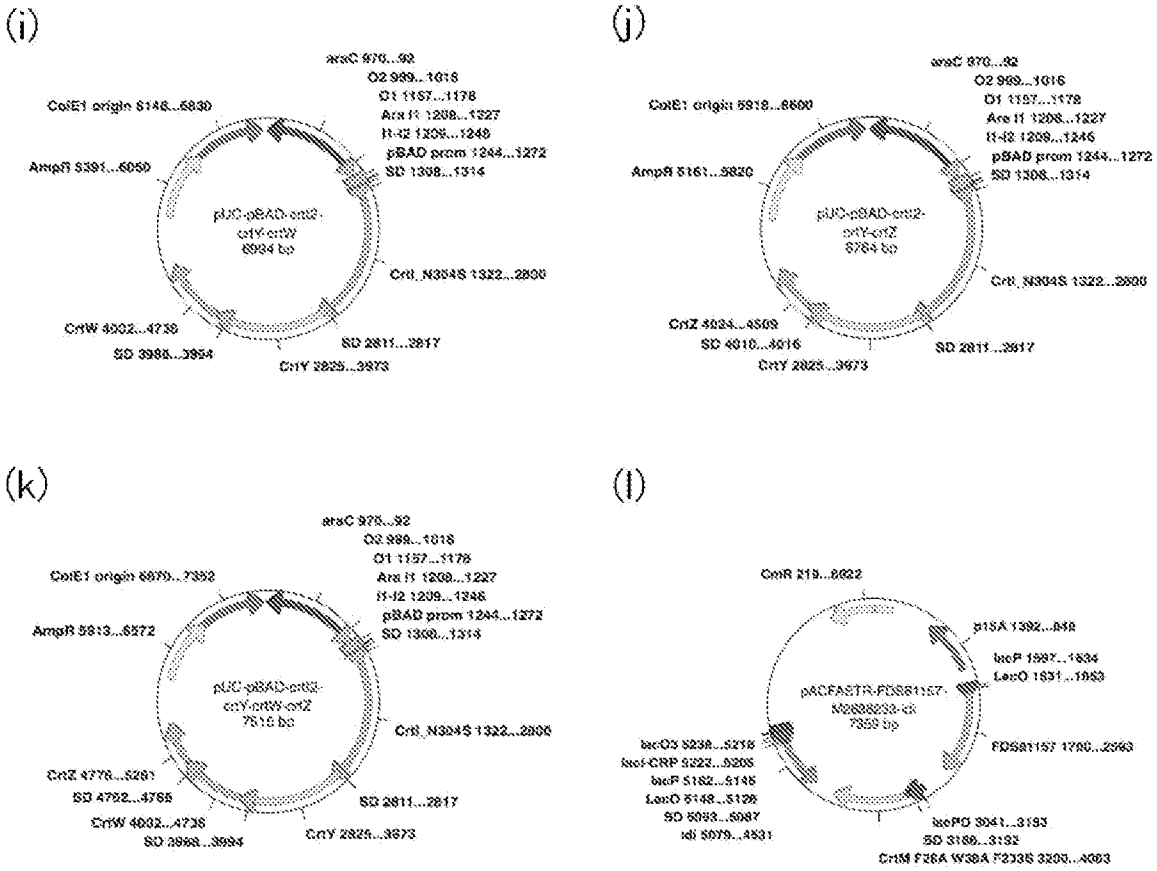
[図9]


(a) C50-carotene (n=3)
(b) C50-lycopene (n=15)
(c) C50-β-carotene
Absorbance
250 300 350 400 450 500 550 600
Wavelength [nm]

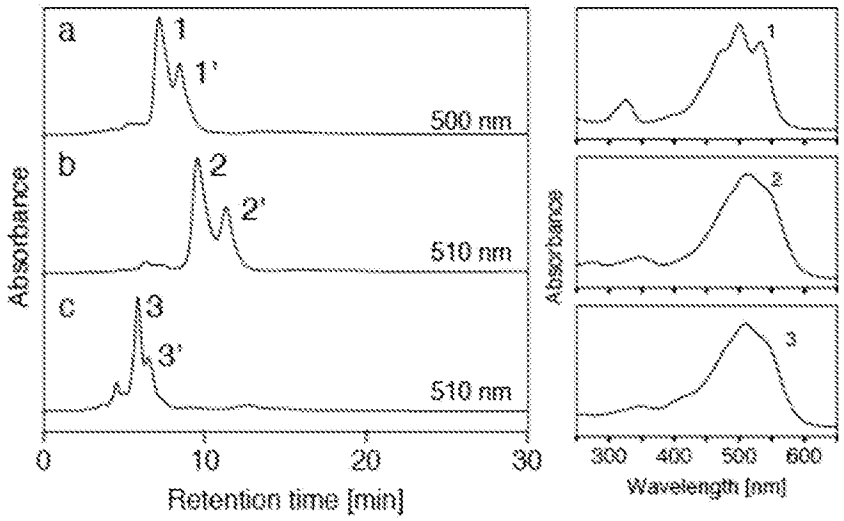
[図10]


+ pAC-CrtM F26A,W38A,F233S-FDS Y81A,V157A
Carotenoid production [μg/gDCW]
400
300
200
100
0
C50-Carotene (n=3)
C50-lycopene
C50-β-Carotene
(a) CrtI
(b) CrtI -m2
(c) CrtI N304P
(d) CrtI -m2 +CrtY
(e) CrtI N304P +CrtY

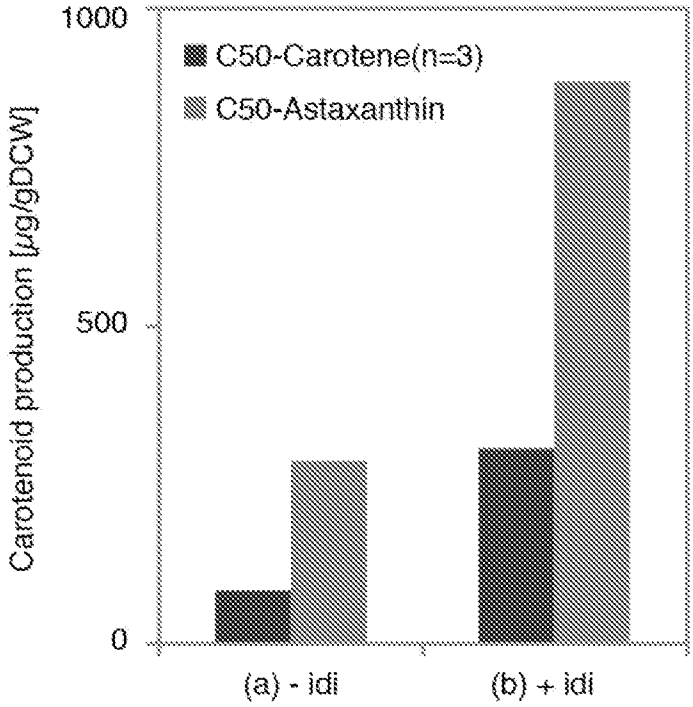
[図11]


(i)
araC 970...92
O2 989...1016
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 5148...5830
AmpR 5391...6050
pUC-pBAD-crtI2-crtY-crtW
6934 bp
CrtI_N304S 1322...2800
CrtW 4002...4738
SD 3988...3994
SD 2811...2817
CrtY 2825...3673
(j)
araC 970...92
O2 989...1016
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 5918...6600
AmpR 5161...5820
pUC-pBAD-crtI2-crtY-crtZ
6784 bp
CrtI_N304S 1322...2800
CrtZ 5034...4509
SD 4016...4016
SD 2811...2817
CrtY 2825...3673
(k)
araC 970...92
O2 989...1016
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 6870...7552
AmpR 5813...6472
pUC-pBAD-crtI2-crtY-crtW-crtZ
7616 bp
CrtI_N304S 1322...2800
CrtZ 4776...5291
SD 4782...4788
SD 2811...2817
CrtW 4002...4738
SD 3988...3994
CrtY 2825...3673
(l)
CmR 219...8822
p15A 1392...848
lacP 1587...1634
LacO 1631...1653
pACFASTR-FDS81157-M2828230-ck
7859 bp
FDS81157 1780...2563
lacO3 5238...5218
lacI-CRP 5222...5205
lacP 5182...5145
LacO 5148...5126
SD 5093...5087
idi 5079...4531
lacPO 3041...3193
SD 3186...3132
CrtM F26A W38A F233S 3200...4083

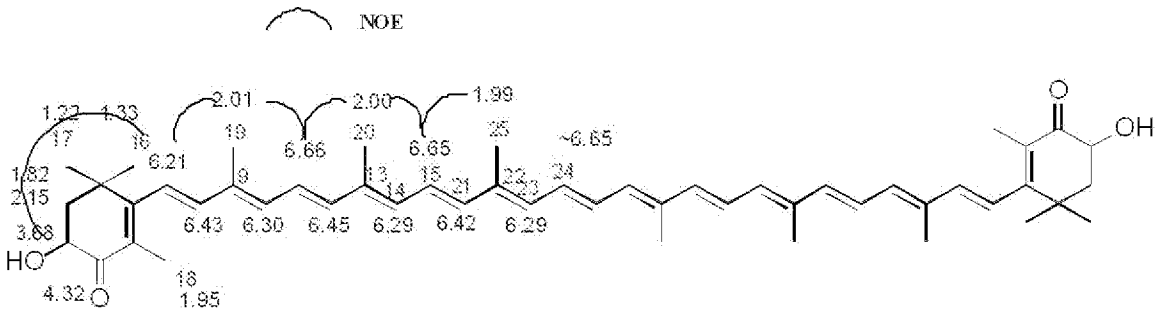
[図12]


a
1
1'
500 nm
b
2
2'
510 nm
c
3
3'
510 nm
Absorbance
0
10
20
30
Retention time [min]
1
2
3
300
400
500
600
Wavelength [nm]

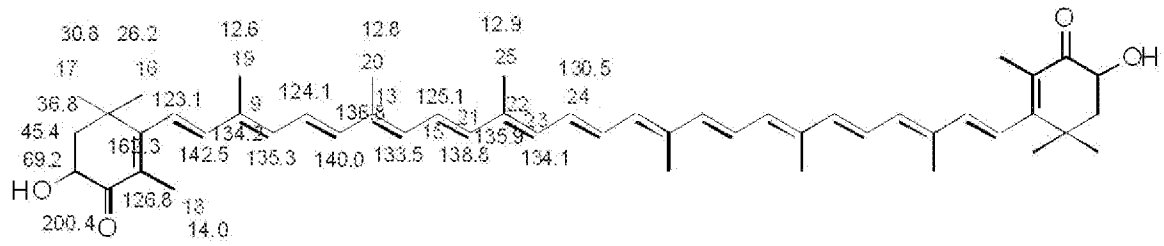
[図13]



[図14]



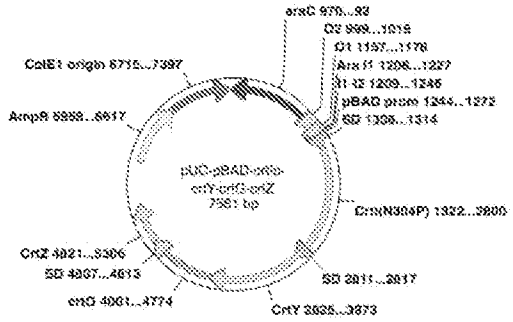
^{1}H-NMR $CDCl_3$



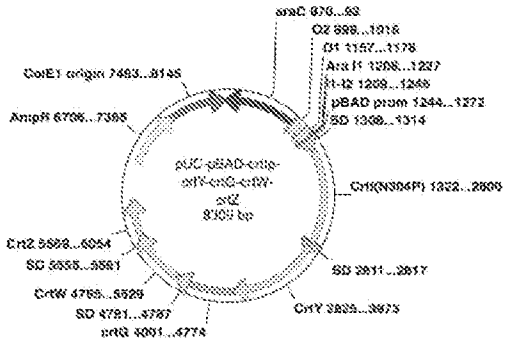
^{13}C-NMR $CDCl_3$

[図15]

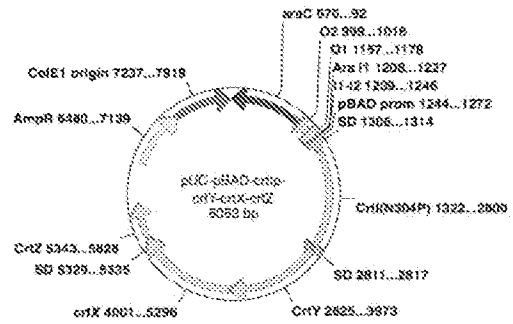
(m)


araC 970...93
O2 998...1018
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 6715...7397
AmpR 5858...6617
pUC-pBAD-crtIp-crtY-crtG-crtZ
7581 bp
CrtI(N304P) 1322...2800
CrtZ 3821...5306
SD 4807...4813
crtG 4061...4774
SD 2811...2817
CrtY 2825...3973

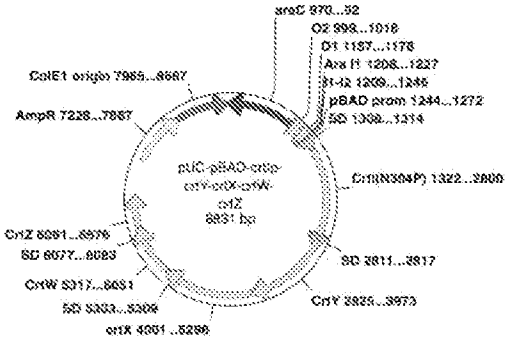
(n)


araC 970...93
O2 998...1018
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 7483...8145
AmpR 6706...7365
pUC-pBAD-crtIp-crtY-crtG-crtW-crtZ
8301 bp
CrtI(N304P) 1322...2800
CrtZ 5928...6054
SD 5555...5561
CrtW 4785...5529
SD 4781...4787
crtG 4061...4774
SD 2811...2817
CrtY 2825...3973

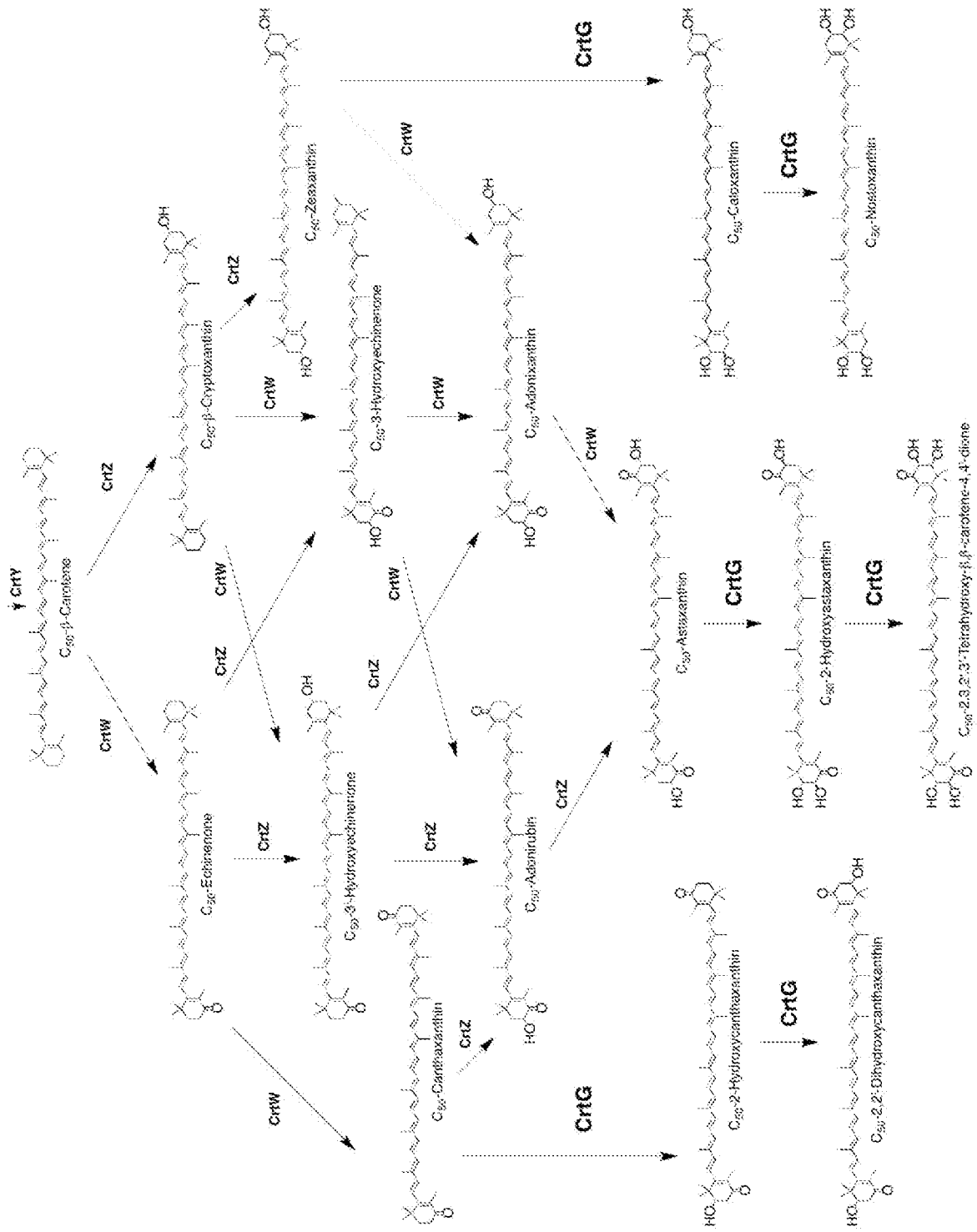
(o)


araC 970...92
O2 998...1018
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 7237...7919
AmpR 6480...7139
pUC-pBAD-crtIp-crtY-crtX-crtZ
6052 bp
CrtI(N304P) 1322...2800
CrtZ 5343...5828
SD 5329...5335
SD 2811...2817
crtX 4061...5296
CrtY 2825...3973

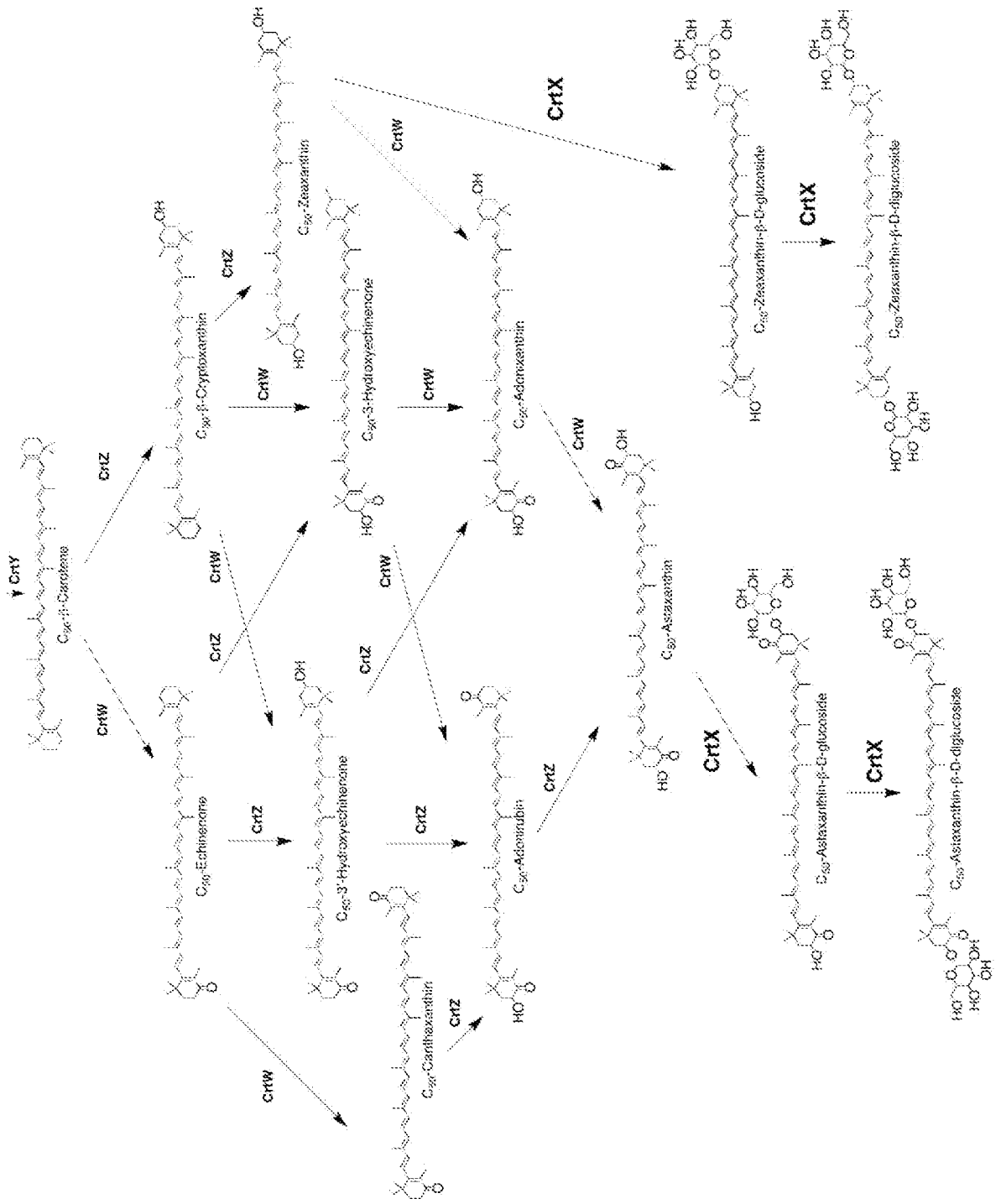
(p)


araC 970...92
O2 998...1018
O1 1157...1178
Ara I1 1208...1227
I1-I2 1209...1246
pBAD prom 1244...1272
SD 1308...1314
ColE1 origin 7965...8687
AmpR 7228...7887
pUC-pBAD-crtIp-crtY-crtX-crtW-crtZ
8831 bp
CrtI(N304P) 1322...2800
CrtZ 6091...6576
SD 6077...6083
CrtW 5317...6051
SD 5303...5309
crtX 4061...5296
SD 2811...2817
CrtY 2825...3973

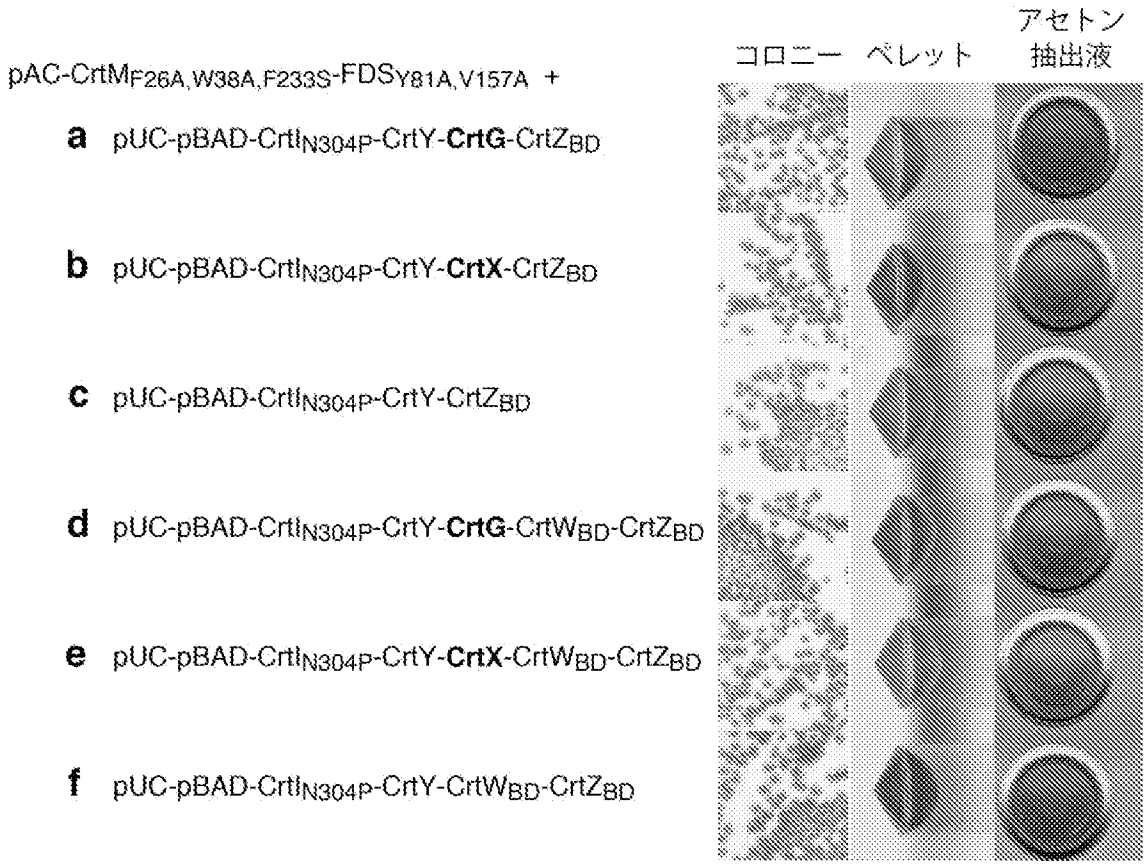
[図16]


CrtY
CrtZ
CrtW
CrtG
C40-β-Carotene
C40-β-Cryptoxanthin
C40-Zeaxanthin
C40-3-Hydroxyechinenone
C40-Adonixanthin
C40-Canthaxanthin
C40-Adonirubin
C40-Astaxanthin
C40-Catoxanthin
C40-Nostoxanthin
C40-2-Hydroxycanthaxanthin
C40-2,2'-Dihydroxycanthaxanthin
C40-2-Hydroxyastaxanthin
C40-2,3,2',3'-Tetrahydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione

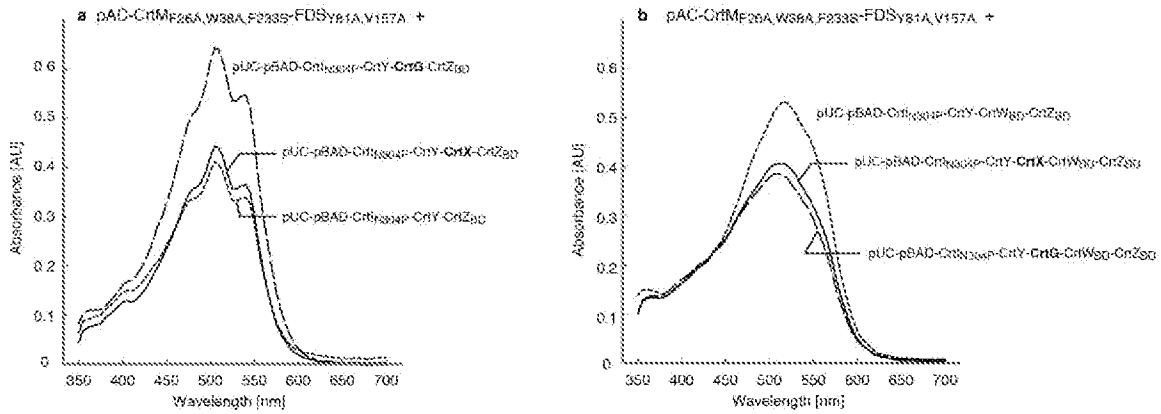
[図17]


CrtY
CrtW
CrtZ
CrtX
β-Carotene
β-Cryptoxanthin
Zeaxanthin
3-Hydroxyechinenone
Adonixanthin
Echinenone
3'-Hydroxyechinenone
Adonirubin
Canthaxanthin
Astaxanthin
Zeaxanthin-β-D-glucoside
Zeaxanthin-β-D-diglucoside
Astaxanthin-β-D-glucoside
Astaxanthin-β-D-diglucoside

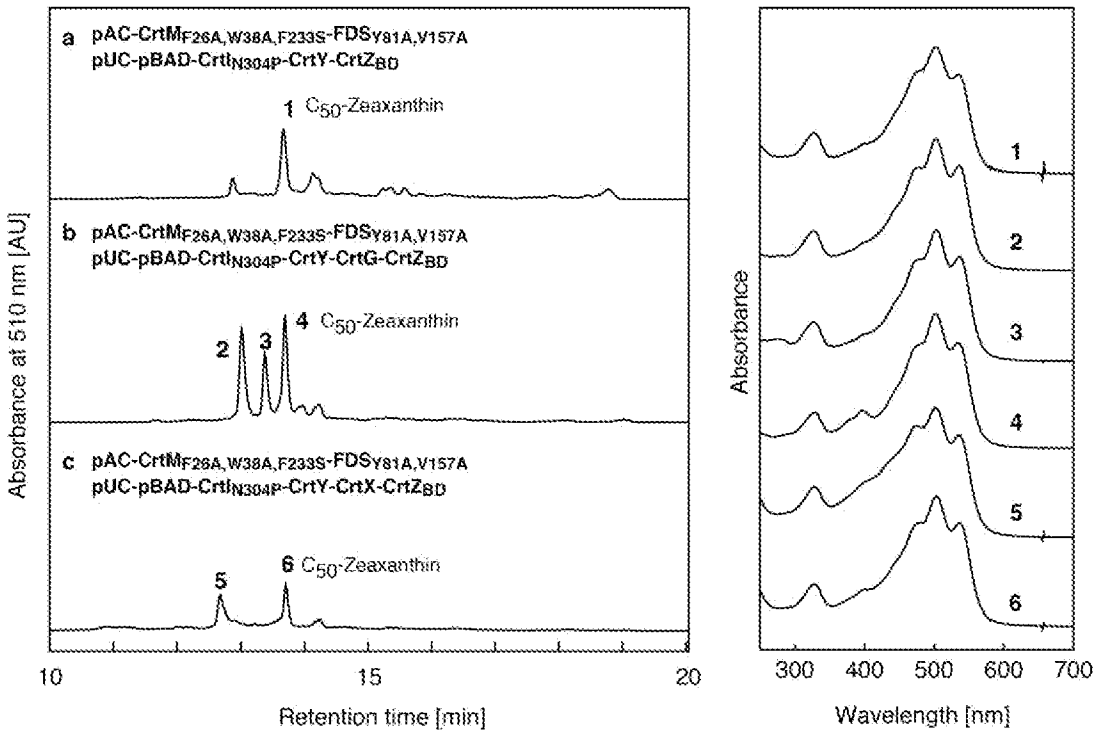
[図18]


pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$ +
a pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-**CrtG**-CrtZ$_{BD}$
b pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-**CrtX**-CrtZ$_{BD}$
c pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtZ$_{BD}$
d pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-**CrtG**-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$
e pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-**CrtX**-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$
f pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtW$_{BD}$-CrtZ$_{BD}$
コロニー
ペレット
アセトン
抽出液

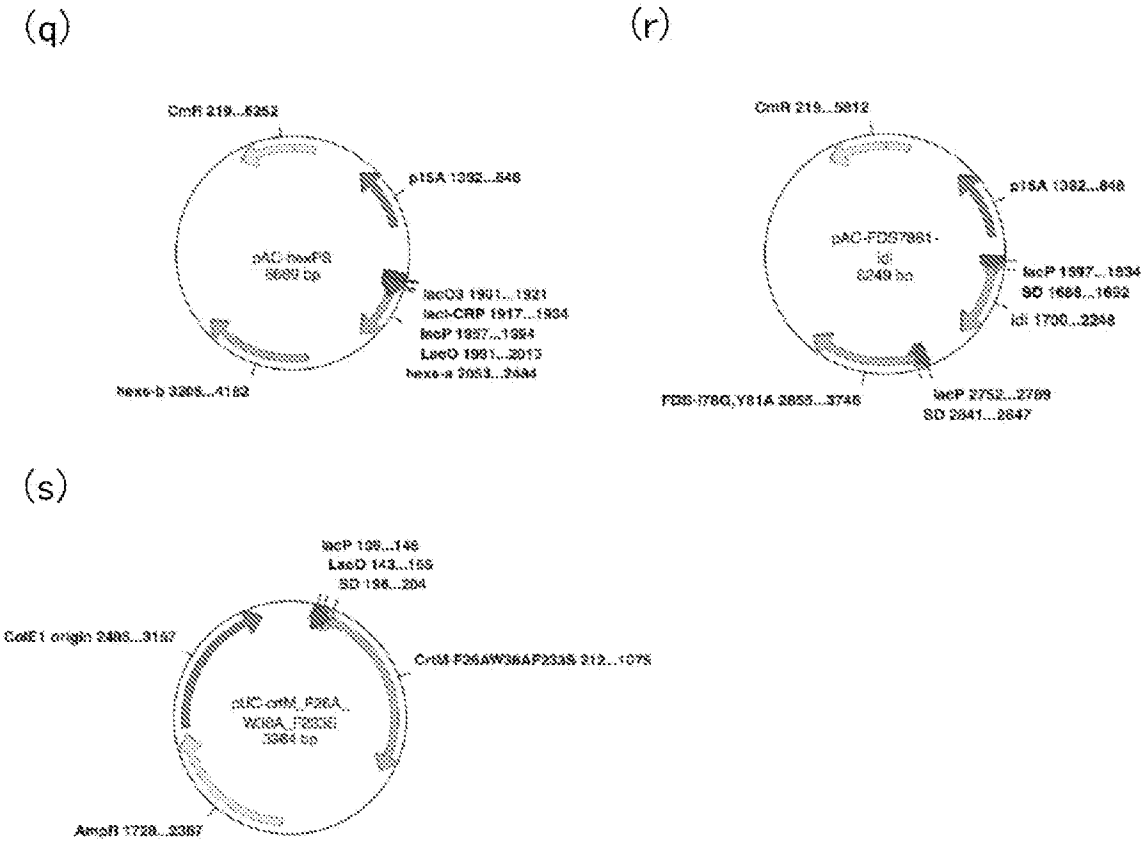
[図19]


a pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$ +
b pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$ +
Absorbance [AU]
Wavelength [nm]
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
350
400
450
500
550
600
650
700

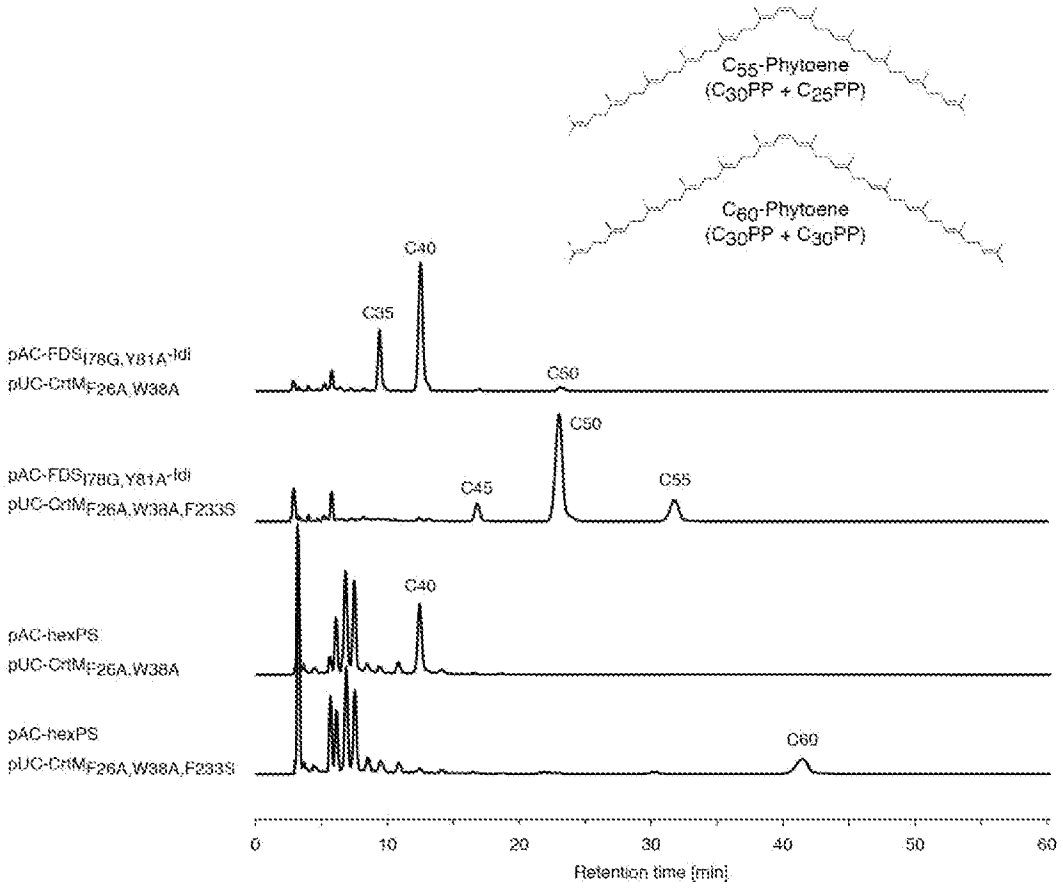
[図20]


a pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$
pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtZ$_{BD}$
1 C_{50}-Zeaxanthin
b pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$
pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtG-CrtZ$_{BD}$
2 3 4 C_{50}-Zeaxanthin
c pAC-CrtM$_{F26A,W38A,F233S}$-FDS$_{Y81A,V157A}$
pUC-pBAD-CrtI$_{N304P}$-CrtY-CrtX-CrtZ$_{BD}$
5 6 C_{50}-Zeaxanthin
Absorbance at 510 nm [AU]
10
15
20
Retention time [min]
Absorbance
1
2
3
4
5
6
300
400
500
600
700
Wavelength [nm]

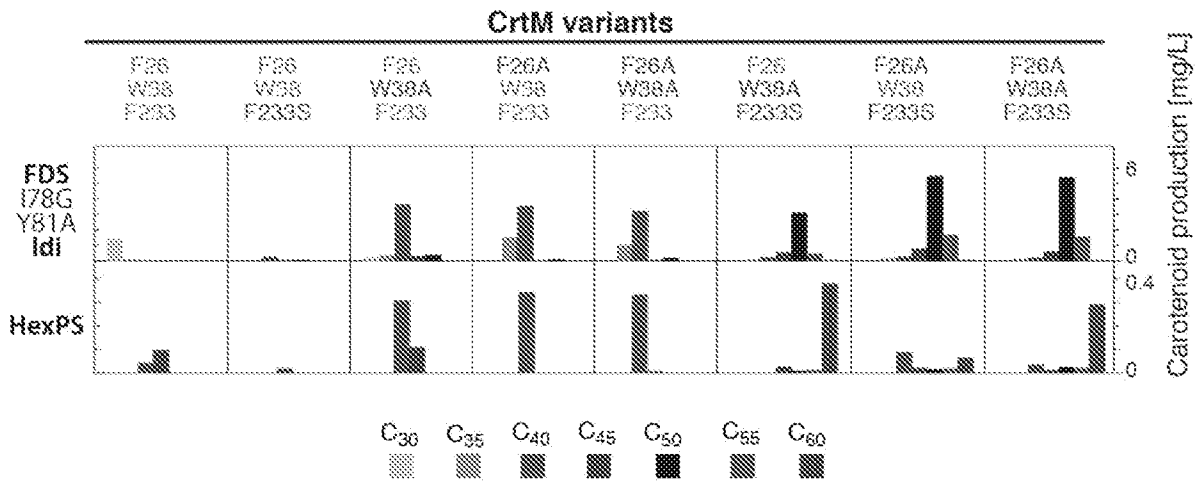
[図21]


(q)
(r)
(s)

[図22]


C55-Phytoene
(C30PP + C25PP)
C60-Phytoene
(C30PP + C30PP)
pAC-FDS(I78G,Y81A)-Idi
pUC-CrtMF26A,W38A
C40
C35
C50
pAC-FDS(I78G,Y81A)-Idi
pUC-CrtMF26A,W38A,F233S
C50
C45
C55
pAC-hexPS
pUC-CrtMF26A,W38A
C40
pAC-hexPS
pUC-CrtMF26A,W38A,F233S
C60
0
10
20
30
40
50
60
Retention time [min]

[図23]


CrtM variants
F26 W38 F233
F26 W38 F233S
F26 W38A F233
F26A W38 F233
F26A W38A F233
F26 W38A F233S
F26A W38 F233S
F26A W38A F233S
FDS I78G Y81A Idi
HexPS
8
0
0.4
0
Carotenoid production [mg/L]
C30 C35 C40 C45 C50 C55 C60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/064817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N9/02*(2006.01)i, *C12P5/00*(2006.01)i, *C12P5/02*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P5/00, C12P5/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 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	TOBIAS A.V. et al., Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: a model for diversification of natural product pathways. Biochim.Biophys. Acta., 2006 Feb, 1761(2), p.235-46	1-15
A	UMENO D.et al., Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. Microbiol.Mol.Biol.Rev., 2005 Mar, 69(1), p.51-78	1-15
A	ALBERMANN C., High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from Pantoea ananatis in Escherichia coli. Biotechnol.Lett., 2011 Feb, 33(2), p.313-9	1-15

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 July, 2012 (06.07.12)	17 July, 2012 (17.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/064817

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norihiko MISAWA, "Carotenoid biosynthesis genes and biotechnology", FFI Journal, 2007, 212(7), pages 532 to 538	1-15
A	JP 10-248575 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 22 September 1998 (22.09.1998), claims 1 to 9 (Family: none)	1-15
A	JP 10-327865 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 15 December 1998 (15.12.1998), claims 1 to 9 (Family: none)	1-15
A	STICKFORTH P.et al., Structural and kinetics properties of a mutated phytoene desaturase from Rubrivivax gelatinosus with modified product specificity. Arch.Biochem.Biophys., 2011 Jan 1, 505(1), p.118-22	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０６４８１７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P5/00(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/02, C12P5/00, C12P5/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２年

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

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 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	TOBIAS A.V. et al.,Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: a model for diversification of natural product pathways. Biochim.Biophys.Acta.,2006 Feb,1761(2),p.235-46	1-15
A	UMENO D.et al.,Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. Microbiol.Mol.Biol.Rev.,2005 Mar,69(1),p.51-78	1-15

☑　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 ０６．０７．２０１２	国際調査報告の発送日 １７．０７．２０１２
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　３１３１ 渡邉　潤也 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	ALBERMANN C.,High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from Pantoea ananatis in Escherichia coli. Biotechnol.Lett.,2011 Feb,33(2),p.313-9	1-15
A	三沢 典彦,カロテノイド生合成遺伝子とバイオテクノロジー, FFI ジャーナル,2007,212(7),p.532-8	1-15
A	JP 10-248575 A (麒麟麦酒株式会社) 1998.09.22, 請求項 1-9 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 10-327865 A (麒麟麦酒株式会社) 1998.12.15 請求項 1-9 (ファミリーなし)	1-15
A	STICKFORTH P.et al.,Structural and kinetics properties of a mutated phytoene desaturase from Rubrivivax gelatinosus with modified product specificity. Arch.Biochem.Biophys.,2011 Jan 1,505(1),p.118-22	1-15