

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4199919号
(P4199919)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月10日(2008.10.10)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 P 23/00 (2006.01)	C 1 2 P 23/00
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C 1 2 P 23/00
	C 1 2 R 1:01

請求項の数 17 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2000-505326 (P2000-505326)	(73) 特許権者	504000281
(86) (22) 出願日	平成10年7月16日 (1998.7.16)		イッサム・リサーチ・ディベロップメント
(65) 公表番号	特表2001-512030 (P2001-512030A)		・カンパニー・オブ・ザ・ヘブルー・ユニ
(43) 公表日	平成13年8月21日 (2001.8.21)		バーシティ・オブ・エルサレム
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/014905		イスラエル国エルサレム91390・ギバ
(87) 国際公開番号	W01999/006586		ットラム・エドモンドサフラキャンパス・
(87) 国際公開日	平成11年2月11日 (1999.2.11)		ハイテクパーク (番地無し)
審査請求日	平成17年5月20日 (2005.5.20)	(74) 代理人	100085660
(31) 優先権主張番号	08/902,518		弁理士 鈴木 均
(32) 優先日	平成9年7月29日 (1997.7.29)	(72) 発明者	ハースキバグ ヨゼフ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル エルサレム 93714
微生物の受託番号	DSM 11574		バルラ ストリート 26
		(72) 発明者	ハーカー マーク
			イスラエル エルサレム 92144
			ソコロブ ストリート 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規カロテノイド産生細菌種とそれを用いたカロテノイドの生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) Paracoccus 属の細菌種を炭素源、窒素源および無機物質源を含む栄養培地中で培養し、(b) 個々のカロテノイド色素またはカロテノイド色素の混合物を回収する各段階を含む、少なくとも一つのカロテノイド色素の生産方法であって、前記細菌種が、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen に DSM 11574 として寄託されている Paracoccus marcusii MH1 株である、前記生産方法。

【請求項2】

前記少なくとも一つのカロテノイド色素が - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス - アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンからなる群から選択される、請求項1記載の生産方法。

【請求項3】

前記回収が前記培地から行なわれる、請求項1記載の生産方法。

【請求項4】

前記回収が前記細菌種の細胞から行なわれる、請求項1記載の生産方法。

【請求項5】

前記細菌が、小胞に入った前記カロテノイド色素を分泌する、請求項1記載の生産方法。

【請求項 6】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen に DSM 11574 として寄託されている、*Paracoccus marcusii* MH1 株。

【請求項 7】

前記回収が前記小胞から行なわれる、請求項 5 記載の生産方法。

【請求項 8】

少なくとも一つのカロテノイド色素の生産のための、請求項 6 記載の細菌種の使用。

【請求項 9】

カロテノイド含有小胞の生産のための、請求項 6 記載の細菌種の使用。

10

【請求項 10】

少なくとも一つのカロテノイドを含む、請求項 6 記載の細菌種を培養している成長培地。

【請求項 11】

少なくとも一つのカロテノイド色素の生産のための、請求項 10 記載の成長培地の使用。

【請求項 12】

前記少なくとも一つのカロテノイド色素が - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス - アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンからなる群から選択される、請求項 10 記載の成長培地。

20

【請求項 13】

前記少なくとも一つのカロテノイド色素が - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス - アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンからなる群から選択される、請求項 11 記載の使用。

【請求項 14】

段階 (b) が：(b1) 前記細菌種の細胞をペレット化するのに足りる第一の速度で前記液体培地を遠心分離し、(b2) カロテノイド含有小胞を含む上清を収集し、(b3) そのカロテノイド含有小胞をペレット化するのに足りる第二の速度でその上清を遠心分離する各段階を含む、請求項 7 記載の生産方法。

30

【請求項 15】

さらに、(b4) 前記小胞のペレットを収集する段階を含む、請求項 14 記載の生産方法。

【請求項 16】

段階 (b) が、サイズ分離技術を使用して、前記カロテノイド含有小胞を前記細菌種の細胞から分離する段階を含む、請求項 5 記載の生産方法。

【請求項 17】

前記サイズ分離技術が、分画遠心法と濾過とからなる群より選択される、請求項 16 記載の生産方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の技術分野と背景)

本発明は新規細菌種に関する。16S リボソーム RNA 分析で決定したところ、この新種は *Paracoccus* 属に最も類似する。しかし、この新規細菌種はその生活環の少なくともいくつかの段階でカロテノイド含有小胞を産生し、盛んに分泌するという、これまでに見られたことのない現象を示すので、この新規細菌種はおそらく新しい属の最初の分離菌に相当するのだろう。さらに本発明は、 - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン (*adonirubin*)、シス - アドニキサンチン (*cis-adonixanthin*)、アドニキサンチン (*adonixan*

50

thin)、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなど(ただしこれらに限らない)のカロテノイドを、それらを産生し分泌する種を使って生産する方法に関する。

本発明のカロテノイドは飼料添加物、食品添加物、化粧品などとして役立つ天然色素である。以下に詳述するように、とりわけアスタキサンチンは、サケ、マス、マダイなどの養殖魚用の飼料添加物(色調改良剤など)として、また安全な天然食品添加物として、産業上有用である。またアドニキサンチンは、その工業的生産方法が確立されれば、食品添加物としても飼料添加物としてもアスタキサンチンと同様に有望である。

また - カロテンは食品添加物、飼料添加物、医薬物質などとして使用されている。エチネノン(10)は食品添加物、飼料添加物などとして有望である。カンタキサンチンは食品添加物、飼料添加物として、また化粧品などに使用されている。そしてゼアキサンチンは食品添加物、飼料添加物などとして使用されている。

【0002】

カロテノイドは生体に見られる黄色、橙色および赤色の多くを担っている天然色素である。カロテノイドは自然界に広く分布し、様々な生体系で主要な生物学的機能を2つ持っている。これらは光合成において集光性色素として働くとともに、これらは光酸化的損傷から防護する。カロテノイドのこのような生物学的機能、それらが持つ重要な産業上の役割、それらの生合成およびそれらを産生する生物について、以下に述べる。

カロテノイドは、集光アンテナの一部として、光子を吸収し、そのエネルギーをクロロフィルに伝達することにより、450~570nmの範囲の光の収集を助けることができる [Cogdell R JおよびFrank HA(1987)「光合成細菌におけるカロテノイドの機能のしかた」*Biochim Biophys Acta* 895:63-79; Cogdell R(1988)「クロロプラストにおける色素の機能」Goodwin TW編「*Plant Pigments*」(Academic Press・ロンドン)の183-255頁; Frank HA、Violette CA、Trautman JK、Shreve AP、Owens TGおよびAlbrecht AC(1991)「光合成におけるカロテノイド:構造と光化学」*Pure Appl Chem* 63:109-114; Frank HA、Farhoosh R、Decoster BおよびChristensen RL(1992)「光合成におけるカロテノイドからクロロフィルへのエネルギー移動の効率を制御する分子特性」Murata N編「*Research in Photosynthesis*」(Kluwer・ドルドレヒト)第I巻の125-128頁; Cogdell R JおよびGardiner AT(1993)「光合成におけるカロテノイドの機能」*Meth Enzymol* 214:185-193参照]。カロテノイドは光合成生物における集光アンテナのタンパク質-色素複合体の不可欠な成分であるが、これらは光合成反応中心の重要な成分でもある。

【0003】

総カロテノイドの大半は集光性複合体II中に位置する [Bassi R、Pineaw B、Dainese PおよびMarquardt J(1993)「光化学系IIのカロテノイド結合タンパク質」*Eur J Biochem* 212:297-302]。光合成活性カロテナンパク質(carotenoprotein)の正体と集光系におけるそれらの正確な位置はわかっていない。好熱性シアノバクテリア*Synechococcus* sp.の光合成活性クロロフィル-タンパク質複合体中のカロテノイドは、配向した試料の線二色性分光法によって調べられた [Breton JおよびKato S(1987)「光化学系IIにおける色素の配向: *Synechococcus* sp.から単離されたコア粒子とそのクロロフィル-タンパク質サブユニットの低温線二色性研究」*Biochim Biophys Acta* 892:99-107参照]。これらの複合体は、膜面に接近して配向された505および470nm付近を吸収する - カロテンプルを、主として含有していた。光合成不活性クロロフィル-タンパク質複合体では、その - カロテンが495および465nm付近を吸収し、これらの分子は膜面に対して垂直に配向される。

カロテノイドがシアノバクテリアの光化学系(PS)IIに関係するという証拠は記述さ

10

20

30

40

50

れている [Suzuki R および Fujita Y (1977) 「光合成反応中心 I I の作用によって誘発されるカロテノイド光退色: DCMU 感受性」 *Plant Cell Physiol* 18: 625 - 631; Newman PJ および Sherman LA (1978) 「藍藻 *Synechococcus cedrorum* からの光化学系 I および I I 膜粒子の単離と特徴づけ」 *Biochim Biophys Acta* 503: 343 - 361 参照]。PSII の反応中心コアには 2 分子の β -カロテンがあり [Ohno T, Satoh K および Kato S (1986) 「好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. から精製した酸素発生複合体の化学組成」 *Biochim Biophys Acta* 852: 1 - 8; Gounaris K, Chapman DJ および Barber J (1989) 「*Synechocystis* PCC 6803 からの D1/D2/チトクロム b-559 複合体の単離と特徴づけ」 *Biochim Biophys Acta* 973: 296 - 301; Newell RW, van Amerongen H, Barber J および van Grondelle R (1993) 「偏光を用いた光化学系 I I の反応中心の分光学的特徴づけ: PSII 反応中心における β -カロテン励起物質の証拠」 *Biochim Biophys Acta* 1057: 232 - 238 参照]、それらの正確な機能はまだはっきりしていない [Murata N 編 「*Research in Photosynthesis*」 (Kluwer・ドルドレヒト) 第 II 巻 3 - 12 頁に Satoh K による総説 (1992) 「PSII 反応中心の構造と機能」がある]。これら 2 分子の連結した隆 J ロテンは単離された PSII 反応中心においてクロロフィル P680 を光損傷から保護することが証明されており [De Las Rivas J, Telfer A および Barber J (1993) 「2 分子の連結した β -カロテンが単離された PSII 反応中心において P680 を光損傷から保護する」 *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 155 - 164 参照]、これは PSII の D1 サブユニットの分解からの防護に関係するのかもしれない [Sandmann G (1993) 「フィトエンからリコピンへの不飽和化反応に関与する遺伝子と酵素」 (抄録) カロテノイドに関する第 10 回国際シンポジウム、トロンヘイム CL1 - 2 参照]。好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. の高度に精製された酸素発生 PSII 複合体の集光性色素は 50 分子のクロロフィル a と 7 分子の β -カロテンからなるが、キサントフィル分子は含まない [Ohno T, Satoh K および Kato S (1986) 「好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. から精製した酸素発生複合体の化学組成」 *Biochim Biophys Acta* 852: 1 - 8 参照]。 β -カロテンは緑藻類における活性な PSII の集合に役割を果たすことが示されている [Humbeck K, Romer S および Senger H (1989) 「活性な PSII の集合におけるカロテノイドの重要な役割に関する証拠」 *Planta* 179: 242 - 250 参照]。

【0004】

Phormidium luridum から単離された PSI の複合体 (P700 一個につき 40 個のクロロフィルを含有) は平均 1.3 分子の β -カロテンを含有していた [Thornber JP, Alberte RS, Hunter FA, Shiozawa JA および Kan KS (1976) 「植物光合成単位におけるクロロフィルの組織化」 *Brookhaven Symp Biology* 28: 132 - 148 参照]。*Synechococcus* sp. PCC 6301 株から得られた PSI 粒子の調製物 (P700 一個につき 130 ± 5 分子のアンテナクロロフィルを含有) には 16 分子のカロテノイドが検出された [Lundell DJ, Glazer AN, Melis A および Malkin R (1985) 「シアノバクテリア光化学系 I 複合体の特徴づけ」 *J Biol Chem* 260: 646 - 654 参照]。大量の β -カロテンと、キサントフィル・クリプトキサニンおよびイソクリプトキサニンが、好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の PSI 色素-タンパク質複合体に検出された [Coufal J, Hladik J および Sofrova D (1989

) 「シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の光化学系 I 色素 - タンパク質複合体のカロテノイド含量」 *Photosynthetica* 23: 603 - 616 参照]。4つのポリペプチド(分子量62、60、14および10kDa)からなる好熱性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. のPSIのサブユニットタンパク質複合体構造はP700一個につきおよそ10分子のβ-カロテンを含有していた[Takahashi Y、Hirota KおよびKato H S(1985)「*Synechococcus* sp. から得られる複数の型のP700-クロロフィル - タンパク質複合体: 鉄、キノンおよびカロテノイド含量」 *Photosynth Res* 6: 183 - 192 参照]。このカロテノイドは、もっぱら、機能性およびアンテナクロロフィルaを保持する大きなポリペプチドに結合している。これらの複合体の蛍光励起スペクトルから、β-カロテンはPSIにとって効率の良いアンテナとして働くことが示唆された。

10

【0005】

上述のように、カロテノイドのもう一つの基本的機能は、クロロフィルの励起三重項状態によって引き起こされる光合成装置における光酸化過程から防護することである。9個以上の炭素 - 炭素二重結合からなるβ-電子共役を持つカロテノイド分子はクロロフィルから三重項状態エネルギーを吸収することができ、そうすることで、有害な一重項状態酸素ラジカルの形成を防止できる。*Synechococcus* sp. では、カロテノイドの三重項状態が閉じたPSII中心でモニターされたが、約25ナノ秒というその立ち上がり速度はアンテナ中のクロロフィル三重項からのエネルギー移動に帰される[Schlödter EおよびBrettel K(1988)「11ナノ秒の寿命を持つ閉じた光化学系IIにおける初期電荷分離. *Synechococcus* から得られる酸素発生性光化学系II複合体を使ったフラッシュ吸収分光学」 *Biochim Biophys Acta* 933: 22 - 34 参照]。ラジカル対形成の収率と比較して低い収率を持つこの過程は、過度の励起による損傷からクロロフィルを保護する上で役割を果たす。生体内でのカロテノイドの防護的役割は、酸素放出型光合成を行なうすべての生物でカロテノイド生合成を抑制するノルフルラゾンなどの漂白性除草剤の使用によって解明されている[Boger PおよびSandmann G編「Target Site of Herbicide Action」(CRC Press・フロリダ州ボカラトン)の25 - 44頁にSandmann GとBoger Pによる総説(1989)「除草剤によるカロテノイド生合成の抑制」がある]。明所でのノルフルラゾンによる処理はカロテノイドレベルとクロロフィルレベルの両方の低下をまねくが、暗所ではクロロフィルレベルは変化しない。ピリジノン除草剤フルリドン(fluridone)で処理された*Oscillatoria agardhii*の細胞における光合成効率の抑制は、ミクソキサントフィル、ゼアキサントフィルおよびβ-カロテンの相対的存在量の低下(これは結果としてクロロフィル分子の光酸化を引き起こす)が原因であるとされた[Cantode Loura I、Dubacq J PおよびThomas J C(1987)「シアノバクテリアの色素と脂質に対する窒素欠乏の効果」 *Plant Physiol* 83: 838 - 843 参照]。

20

30

【0006】

アンテナクロロフィルの過剰な励起エネルギーを非放射的に放散させるにはゼアキサントニンが必要であることが植物で証明されている[Demmig-Adams B(1990)「植物中のカロテノイドと光防護: キサントフィル・ゼアキサントニンの役割」 *Biochim Biophys Acta* 1020: 1 - 24; Demmig-Adams BおよびAdams WW III(1990)「カロテノイド・ゼアキサントニンとクロロフィル蛍光の高エネルギー状態クエンチング」 *Photosynth Res* 25: 187 - 197 参照]。藻類と植物では、ピオラキサントニンの光誘発性脱エポキシ化によるゼアキサントニンの生成が光防護過程に関係している[Demmig-Adams BとAdams WW IIIによる総説(1992)「強い光ストレスに対する植物の光防護その他の反応」 *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol*

40

50

Biol 43:599-626がある]。ピオラキサンチンの光誘発性脱エポキシ化と、暗所で起こるその逆反応は「キサントフィルサイクル」として知られている [Demmig-Adams BおよびAdams WW III (1992)「強い光ストレスに対する植物の光防護その他の反応」Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 43:599-626参照]。ゼアキサンチンを含むせず、放射エネルギー放散をおそらく行なうことができないシアノバクテリア地衣類は高い光強度に対して感受性であり、ゼアキサンチンを含む藻地衣類は強い光ストレスに対して、より耐性である [Demmig-Adams B、Adams WW III、Green TGA、Czygan FCおよびLange OL (1990)「一方のパートナーがキサントフィルサイクルを持ち一方がキサントフィルサイクルを持たないフィコシンビオデーム (phycosymbiodeme) を形成する2つの地衣類における光ストレスに対する感受性の相違」Oecologia 84:451-456; Demmig-Adams BおよびAdams WW III (1993)「日光順化葉のキサントフィルサイクル、タンパク質ターンオーバーおよび高い耐光性」Plant Physiol 103:1413-1420; Demmig-Adams B (1990)「植物中のカロテノイドと光防護:キサントフィル・ゼアキサンチンの役割」Biochim Biophys Acta 1020:1-24参照]。藻類や植物とは対照的に、シアノバクテリアはキサントフィルサイクルを持たない。しかしこれらは、ゼアキサンチンと、クロロフィルの光防護を支持できる他のキサントフィル類とを大量に含有する。

【0007】

他にもいくつかの機能がカロテノイドに帰されている。カロテノイドが近紫外 (UV) 照射によって生成する有害種から防護する可能性は、シアノバクテリア *Gloeocapsa alpicola* のUV耐性変異株での -カロテンの蓄積を示す結果によって示唆される [Buckley CEおよびHoughton JA (1976)「藍藻 *Gloeocapsa alpicola* の色素沈着に対する近UV照射の効果の研究」Arch Microbiol 107:93-97参照]。このことは、カロテノイドを産生する *Escherichia coli* 細胞によって、より鮮やかに立証された [Tuvesson RWおよびSandmann G (1993)「*Escherichia coli* で発現させたクローン化カロテノイド遺伝子による、近紫外光によって活性化された光毒性分子からの防護」Meth Enzymol 214:323-330参照]。カロテノイドは酸素ラジカル種を消滅させるというその能力ゆえに効率のよい抗酸化物質であり、その結果として、酸化的損傷から細胞を保護する。カロテノイドのこの機能は事実上全ての生物で重要である [Krinsky NI (1989)「カロテノイドの抗酸化機能」Free Radical Biol Med 7:617-635; Palozza PおよびKrinsky NI (1992)「生体内および試験管内でのカロテノイドの抗酸化効果; 概要」Meth Enzymol 213:403-420参照]。その他の細胞機能も、間接的ではあるとしても、カロテノイドによる影響を受けうる。シアノバクテリア中のカロテノイドは光走性の主要な光受容体ではないが、*Anabaena variabilis* で観察された光走性反応に対するカロテノイドの影響は、この系でシグナル中間体として作用しうる一重項酸素ラジカルが除去されるためだとされた [Nultsch WおよびSchuchart H (1985)「シアノバクテリア *Anabaena variabilis* の光走性反応連鎖のモデル」Arch Microbiol 142:180-184参照]。

【0008】

花と果実では、カロテノイドは受粉媒介者の誘引と種子の散布を促進する。この側面は農業と強く関係する。果実と花における色素沈着のタイプと程度は、数多くの農作物の最も重要な特徴の一部である。その理由は主に、それら産物の色がしばしば消費者に対するこれらの訴求性を決定し、したがってそれらの市場価値を高めうることにある。カロテノイドは無毒であるため、これらは食品産業において着色剤としての重要な商業的用途を持っている [Bauernfeind JC (1981)「Carotenoid

10

20

30

40

50

s as colorants and vitamin A precursors (着色料およびビタミンA前駆体としてのカロテノイド)」(Academic Press・ロンドン)参照]。トマトの実の赤色は、果実の成熟中に有色体に蓄積するリコピンによるものである。高含量(乾燥重量で80%以上)のリコピンを含有するトマトエキスは、食品用着色料として工業的に利用するため、世界中で商業生産されている。また、魚や鳥の肉、羽根または卵は、与えられた食餌カロテノイドの色をおびており、家禽用の食餌添加物や水産養殖には、このようにカロテノイドがしばしば使用されている。水産養殖では、動物と人間用の補助食品を生産するために、一定のシアノバクテリア種、例えば *Spirulina sp.* が培養されている [Sommer TR、Potts WTおよびMorrissey NM(1990)「水産養殖における加工微小藻類の最近の進歩」*Hydrobiologia* 204/205:435-443参照]。したがってこれらシアノバクテリア中のカロテノイド(主として β -カロテン)の含量はバイオテクノロジーにおいて商業的に重大な意味を持つ。

【0009】

ほとんどのカロテノイドは8つの C_5 イソプレノイド単位から構成された C_{40} 炭化水素主鎖からなり、一連の共役二重結合を含有する。カロテンは酸素原子を含まず、1個または2個の末端環構造を含有する線状もしくは環化分子である。キサントフィルはカロテンの酸素化誘導体である。様々なグリコシル化カロテノイドとカロテノイドエステルが同定されている。 C_{40} 主鎖はさらに延長されて C_{45} または C_{50} カロテノイドを与えたり、短縮されてアポカロテノイド(apocarotenoid)を与えうる。一部の非光合成細菌は C_{30} カロテノイドも合成する。カロテノイドに関する一般的基礎知識は、Goodwin TW(1980)「The Biochemistry of the Carotenoids(カロテノイドの生化学)」第1巻(第二版/Chapman and Hall・ニューヨーク)と、Goodwin TWおよびBritton G(1988)「カロテノイドの分布と分析」Goodwin TW編「Plant Pigments」(Academic Press・ニューヨーク)の62-132頁に見出すことができる。

自然界に存在するカロテノイドはこれまでに640種類以上が特徴づけられており、それゆえカロテノイドは微生物、菌類、藻類、植物、動物に見出される様々な色調の黄色、橙色および赤色のほとんどを担っている。カロテノイドは全ての光合成生物と、いくつかの非光合成細菌および菌類によって合成されるが、これらはまた、摂食により、動物界のいたるところに広く分布する。

カロテノイドは、光合成生物と一部の微生物でのみ、イソプレノイド前駆体からデノボ合成され、それらは通例、光合成膜、細胞膜および細胞壁中のタンパク質複合体に蓄積する。

【0010】

図1に詳述するように、 β -カロテンの生合成経路では、4つの酵素が中央(central)イソプレノイド経路のゲラニルゲラニルピロリン酸を β -カロテンに変換する。カロテノイドは一般(general)イソプレノイド生合成経路から作られる。この経路は数十年来知られてきたが、最近になってようやく、主に遺伝学と分子生物学を利用して、カロテノイド生合成に關与する分子機序の一部が解明された。これは、フィトエンからカロテンおよびキサントフィルへの変換に關与する酵素の大半が、可溶化すると活性を失う不安定な膜結合型タンパク質であるという事実による [Beyer P、Weiss GおよびKleinig H(1985)「スイセン有色体の膜結合型カロテノイド生成(carotenogenic)酵素の可溶化と再構成」*Eur J Biochem* 153:341-346; Bramley PM(1985)「カロテノイドのインビトロ生合成」*Adv Lipid Res* 21:243-279参照]。

しかし、部分活性を保持した *Synechocystis sp.* PCC 6714 株からのカロテノイド生成酵素の可溶化が報告されている [Bramley PMおよびSandmann G(1987)「*Aphanocapsa*のカロテノイド生成酵素の可溶化

10

20

30

40

50

」 *Phytochem* 26:1935-1939]。

【0011】

酵素活性の直接測定を可能にするカロテノイド生合成用の純粋なインビトロ系はない。無細胞カロテノイド生成系が開発され [Clarke IE, Sandmann G, Bramley PM および Boger P (1982) 「単離された光合成膜によるカロテン生合成」 *FEBS Lett* 140:203-206 参照]、シアノバクテリアへの適合がなされている [Sandmann G および Bramley PM (1985) 「*Phycomyces blakesleeanus* のフィトエン生成系と共役させた *Aphanocapsa* ホモジネートによるカロテノイド生合成」 *Planta* 164:259-263; Bramley PM および Sandmann G (1985) 「シアノバクテリア *Aphanocapsa* によるキサントフィルのインビトロおよびインビボ生合成」 *Phytochem* 24:2919-2922 参照]。

Synechococcus sp. PCC7942 株から得られるフィトエンデサチュラーゼのリボソームでの再構成が、*Escherichia coli* 中で発現されたそのポリペプチドの精製後に達成された [Fraser PD, Linden H および Sandmann G (1993) 「*Escherichia coli* 過剰発現株からの組換え *Synechococcus* フィトエンデサチュラーゼの精製と再活性化」 *Biochem J* 291:687-692 参照]。

【0012】

再び図1について述べると、カロテノイドはイソプレノイド前駆体から合成される。イソプレノイド生合成の中央 (central) 経路はアセチル-CoA のメバロン酸への変換で始まると見ることができる。メバロン酸から一つの C₅ 分子、D³-イソペンテニルピロリン酸 (IPP) が生成するが、これが全ての長鎖イソプレノイドの構成単位である。IPP のジメチルアリルピロリン酸 (DMA PP) への異性化に続いて、さらに三分子の IPP が化合して C₂₀ 分子であるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を与える。これらの 1'-4 縮合反応は、プレニルトランスフェラーゼによって触媒される [Kleinig H (1989) 「イソプレノイド生合成における色素体の役割」 *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:39-59 参照]。植物では、同じ酵素 GGPP シンターゼが DMA PP から GGPP に至る反応の全てを行なうという証拠がある [Dogbo O および Camara B (1987) 「アフィニティークロマトグラフィーによる *Capsicum* 有色体からのイソペンテニルピロリン酸イソメラーゼとゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼの精製」 *Biochim Biophys Acta* 920:140-148; Laferriere A および Beyer P (1991) 「*Sinapis alba* エチオプラストからのゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼの精製」 *Biochim Biophys Acta* 216:156-163 参照]。

【0013】

カロテノイド生合成に特有の最初の段階は2分子の GGPP の頭-頭 (head-to-head) 縮合によるプレフィトエンピロリン酸 (PPPP) の生成である。ピロリン酸エステルの除去に続いて、GGPP は無色の C₄₀ 炭化水素分子である 15-cis-フィトエンに変換される。この二段階反応はシアノバクテリアでも植物でも可溶性酵素フィトエンシンターゼ (単一の遺伝子 (crtB) によってコードされる酵素) によって触媒される [Chamovitz D, Misawa N, Sandmann G および Hirschberg J (1992) 「カロテノイド生合成酵素フィトエンシンターゼをコードするシアノバクテリア遺伝子の分子クローニングと *Escherichia coli* での発現」 *FEBS Lett* 296:305-310; Ray JA, Bird CR, Maunder M, Grierson D および Schuch W (1987) 「トマト由来の成熟関連 cDNA、pTOM5 の配列」 *Nucl Acids Res* 15:10587-10588; Camara B (1993) 「植物フィトエンシンターゼ複合体 - 成分3酵素、免疫学および生合成」 *Meth Enzymol* 214:3

10

20

30

40

50

52 - 365 参照]。この経路のこれ以降の段階はすべて膜内で起こる。4回の不飽和化(脱水素)反応により、フィトエンはフィトフルエン、 β -カロテン、ノイロスポレンを経てリコピンに変換される。各不飽和化反応によって共役二重結合数は2つずつ増加し、共役二重結合数はフィトエンでの3からリコピンでの11まで増加する。

【0014】

フィトエンの酵素的脱水素の分子機序についてわかっていることは比較的少ない [Jones BL および Porter JW (1986) 「高等植物におけるカロテンの生合成」CRC Crit Rev Plant Sci 3:295-324; Beyer P、Mayer M および Kleinig H (1989) 「分子状酸素と中間体の幾何異性状態はスイセン有色体におけるカロテンの不飽和化反応と環化反応に極めて重要である」Eur J Biochem 184:141-150 参照]。シアノバクテリア、藻類および植物では、15-cis-フィトエンから β -カロテンへの最初の2回の不飽和化反応が単一の膜結合型酵素フィトエンデサチウラーゼによって触媒されることが確認されている [Jones BL および Porter JW (1986) 「高等植物におけるカロテンの生合成」CRC Crit Rev Plant Sci 3:295-324; Beyer P、Mayer M および Kleinig H (1989) 「分子状酸素と中間体の幾何異性状態はスイセン有色体におけるカロテンの不飽和化反応と環化反応に極めて重要である」Eur J Biochem 184:141-150 参照]。この β -カロテン産物はほとんどが全トランス配置にあるので、シス-トランス異性化はこの不飽和化段階で起こると考えられる。シアノバクテリアにおけるフィトエンデサチウラーゼポリペプチドの一次構造は、藻類と植物の同ポリペプチドでも保存されている(65%を超える残基が同一) [Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann G および Hirschberg J (1992) 「フィトエンの β -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果実の成熟中に転写調節される」Proc Natl Acad Sci USA 89:4962-4966; Pecker I、Chamovitz D、Mann V、Sandmann G、Boger P および Hirschberg J (1993) 「植物におけるカロテノイド生合成の分子的特徴づけ: トマト中のフィトエンデサチウラーゼ遺伝子」Murata N 編「Research in Photosynthesis」第III巻(Kluwer・ドルドレヒト)11-18頁参照]。さらに、同じ阻害剤がこれら2つの系のフィトエンデサチウラーゼを阻害する [Sandmann G および Boger P (1989) 「除草剤によるカロテノイド生合成の抑制」Boger P および Sandmann G 編「Target Sites of Herbicide Action」(CRC Press・フロリダ州ボカラトン)の25-44頁参照]。したがって、おそらくシアノバクテリアと植物ではフィトエンとフィトフルエンの不飽和化を触媒する酵素の生物学的性質と分子的性質がよく似ていて、他の微生物のフィトエンデサチウラーゼのそれら特性とは異なると思われる。そのような相違の一つはRhodobacter capsulatus、Erwinia sp. または菌類から得られるフィトエンデサチウラーゼが、フィトエンをそれぞれノイロスポレン、リコピンまたは3,4-デヒドロリコピンに変換することである。

【0015】

酸素はこの反応に直接関与するわけではないが、スイセン有色体でのフィトエンの不飽和化 [Beyer P、Mayer M および Kleinig H (1989) 「分子状酸素と中間体の幾何異性状態はスイセン有色体におけるカロテンの不飽和化反応と環化反応に極めて重要である」Eur J Biochem 184:141-150 参照] と、Synechococcus sp. PCC7942株の無細胞系 [Sandmann G および Kowalczyk S (1989) 「試験管内カロテノイド生成とAnacystisにおけるフィトエンデサチウラーゼ反応の特徴づけ」Biochem Biophys Res Com 163:916-921 参照] は、分子状酸素に(おそらくは最終電子受容体として)依存する。シアノバクテリアではデヒドロゲナーゼ-モノオキシ

10

20

30

40

50

ゲナーゼの脱水素機構よりデヒドロゲナーゼ - 電子伝達酵素の機構が支持された [Sandmann G および Kowalczyk S (1989) 「試験管内カロテノイド生成と *Anacystis* におけるフィトエンデサチラーゼ反応の特徴づけ」 *Biochem Biophys Res Com* 163:916-921 参照]。一次構造が分析されている全てのフィトエンデサチラーゼには保存された FAD - 結合モチーフが存在する [Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann G および Hirschberg J (1992) 「フィトエンの β -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果実の成熟中に転写調節される」 *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4962-4966; Pecker I、Chamovitz D、Mann V、Sandmann G、Boger P および Hirschberg J (1993) 「植物におけるカロテノイド生合成の分子的特徴づけ: トマト中のフィトエンデサチラーゼ遺伝子」 Murata N 編「*Research in Photosynthesis*」第 III 巻 (Kluwer・ドルドレイト) の 11-18 頁参照]。コショウのフィトエンデサチラーゼ酵素はタンパク質結合型 FAD を含有することが明らかにされている [Hugueney P、Romer S、Kuntz M および Camara B (1992) 「*Capsicum* 有色体でフィトフルエンと β -カロテンの合成を触媒するフラボタンパク質の特徴づけと分子クローニング」 *Eur J Biochem* 209:399-407 参照]。フィトエンデサチラーゼは膜内に位置するので、別途可溶性の酸化還元成分が予想される。この仮説上の成分は、示唆されているように NAD(P)⁺ を利用するか [Mayer MP、Nieve lstein V および Beyer P (1992) 「*Narcissus pseudonarcissus* の有色体から得られる NADPH 依存性酸化還元酵素 - カロテン不飽和化反応に関与すると思われる酸化還元媒介因子 - の精製と特徴づけ」 *Plant Physiol Biochem* 30:389-398 参照]、例えばキノンなどの他の電子および水素運搬体を利用しうる。 *Synechocystis* sp. PCC6714 株と *Anabaena variabilis* ATCC29413 株におけるフィトエンデサチラーゼの細胞での位置は、特異的抗体を使って、主として (85%)、光合成チラコイド膜中であると決定された [Serrano A、Gimenez P、Schmidt A および Sandmann G (1990) 「光合成無機栄養原核生物におけるフィトエンデサチラーゼの免疫細胞化学的な位置決定と機能決定」 *J Gen Microbiol* 136:2465-2469 参照]。

【0016】

シアノバクテリア藻類と植物では、 β -カロテンがノイロスポレンを経てリコピンに変換される。単一の酵素によって行なわれると予想されるその酵素的機序については、ほとんどわかっていない [Linden H、Vioque A および Sandmann G (1993) 「 β -カロテンデサチラーゼをコードするカロテノイド生合成遺伝子の異種相補性による *Anabaena* PCC7120 からの単離」 *FEMS Microbiol Lett* 106:99-104]。 *Anabaena* sp. PCC7120 株中の β -カロテンデサチラーゼの推定アミノ酸配列はフィトエンデサチラーゼに見出されるものに似たジヌクレオチド結合モチーフを含有する。

リコピンは2回の環化反応によって β -カロテンに変換される。 *Synechococcus* sp. PCC7942 株 [Cunningham FX Jr、Chamovitz D、Misawa N、Gantt E および Hirschberg J (1993) 「 β -カロテンの生合成を触媒する酵素リコピンシクラーゼのシアノバクテリア遺伝子のクローニングと *Escherichia coli* での機能的発現」 *FEBS Lett* 328:130-138 参照] と、植物 [Camara B および Dogbo O (1986) 「*Capsicum* 有色体膜由来のリコピンシクラーゼの証明と可溶化」 *Plant Physiol* 80:172-184 参照] では、これら2つの環化反応が単一の酵素リコピンシクラーゼによって触媒されるという証拠が得られている。この膜結合型酵素はトリエチルアミン化合物 CPTA と MPTA によって阻害される [Sandma

10

20

30

40

50

nn GおよびBoger P(1989)「除草剤によるカロテノイド生合成の抑制」
Boger PおよびSandmann G編「Target Sites of Herbicide Action」(CRC Press・フロリダ州ボカラトン)の25
- 44頁参照]。シアノバクテリアは - 環化のみを行なうので、 - カロテン、 - カ
ロテンおよび - カロテンとそれらの酸素化誘導体を含有しない。牝ツは、線状リコピン
分子の末端にあるC - 1, 2二重結合がC - 5, 6二重結合の位置に折りたたまれた後、
C - 6からプロトンを失うと、「カルボニウムイオン」中間体の生成を経て形成される。
7, 8結合が二重結合でない環状カロテンは報告されていない。したがってこの反応には
、完全な不飽和化(例えばリコピンの場合)か、少なくとも半分子の不飽和化(例えばノ
イロスポレンの場合)が必須である。リコピンの環化は酸素を必要としない脱水素反応を
10 伴う。この反応の補因子はまだわかっていない。Synecococcus sp. P
CC7942株のリコピンシクラーゼポリペプチドにはジヌクレオチド結合ドメインが見
出されていることから、補酵素としてNAD(P)またはFADがリコピンシクラーゼと
結びつけられる。

【0017】

ヒドロキシ、メトキシ、オキシ、エポキシ、アルデヒドまたはカルボン酸部分などの様々
な酸素含有側鎖の付加によって様々なキサントフィル種が生成する。キサントフィルの生
成についてはほとんどわかっていない。 - カロテンのヒドロキシル化には、混合機能酸
素添加酵素反応に分子状酸素が必要である。

全経路の酵素をコードする遺伝子のクラスターが紅色光合成細菌Rhodobacter
capsulatus [Armstrong GA, Alberti M, Leach
FおよびHearst JE(1989)「Rhodobacter capsula
tusのカロテノイド生合成遺伝子クラスターのヌクレオチド配列、編成およびタンパク
質産物の性質」Mol Gen Genet 216: 254 - 268参照]と、非光合
成細菌Erwinia herbicola [Sandmann G, Woods WS
およびTuveson RW(1990)「Erwinia herbicolaと形質
転換Escherichia coli株におけるカロテノイドの同定」FEMS Mi
crobiol Lett 71: 77 - 82; Hundle BS, Beyer P,
Kleinig H, Englert HおよびHearst JE(1991)「Er
winia herbicolaのカロテノイドとErwinia herbicola
30 カロテノイド遺伝子クラスターを保持するEscherichia coli HB10
1株」Photochem Photobiol 54: 89 - 93; Schnurr
G, Schmidt AおよびSandmann G(1991)「Erwinia h
erbicolaのカロテノイド生成遺伝子クラスターのマッピングと6遺伝子の機能的
同定」FEMS Microbiol Lett 78: 157 - 162参照]およびE
rwinia uredovora [Misawa N, Nakagawa M, Kob
ayashi K, Yamano S, Izawa I, Nakamura KおよびH
arashima K(1990)「Escherichia coliにおける遺伝子
産物の機能解析によるErwinia uredovoraカロテノイド生合成経路の解
40 明」J Bacteriol 172: 6704 - 6712参照]からクローニングされ
ている。2つの遺伝子、GGPPシクラーゼのal - 3 [Nelson MA, More
lli G, Carattoli A, Romano NおよびMacino G(19
89)「青色光によって調節されるNeurospora crassaカロテノイド生
合成遺伝子(albino - 3)の分子クローニングとホワイトカラー遺伝子の産物」Mo
l Cell Biol 9: 1271 - 1276; Carattoli A, Roma
no N, Ballario P, Morelli GおよびMacino G(199
1)「Neurospora crassaカロテノイド生合成遺伝子(albino
3)」J Biol Chem 266: 5854 - 5859参照]と、フィトエンデサ
チュラーゼのal - 1 [Schmidhauser TJ, Lauter FR, Rus
so VEAおよびYanofsky C(1990)「Neurospora cra
50

ssaのカロテノイド生合成遺伝子al-1のクローニング、配列決定および光調節」Mol Cell Biol 10:5064-5070参照]が、カビNeurospora crassaからクローニングされている。しかし、シアノバクテリアや植物から対応する遺伝子をクローニングするために、これらの遺伝子を異種分子プローブとして使用する試みは、十分な配列類似性がないために不成功に終わっている。

【0018】

カロテノイド合成酵素の最初の「植物型」遺伝子は分子遺伝学的方法を使ってシアノバクテリアからクローニングされた。フィトエンデサチュラーゼの遺伝子をクローニングするための第一段階として、Synechococcus sp. PCC7942株で、フィトエンデサチュラーゼ特異的阻害剤ノルフルゾンに耐性な突然変異株がいくつか分離された[Linden H、Sandmann G、Chamovitz D、Hirschberg JおよびBoger P(1990)「漂白性除草剤ノルフルゾンに抗して選択されるSynechococcus突然変異株の生化学的特徴づけ」Pestic Biochem Physiol 36:46-51参照]。次にノルフルゾン耐性を付与する遺伝子が、野生型株を除草剤耐性に形質転換することによってクローニングされた[Chamovitz D、Pecker IおよびHirschberg J(1991)「除草剤ノルフルゾンに対する耐性の分子的根拠」Plant Mol Biol 16:967-974; Chamovitz D、Pecker I、Sandmann G、Boger PおよびHirschberg J(1990)「シアノバクテリア中のノルフルゾン耐性遺伝子のクローニング」Z Naturforsch 45c:482-486参照]。クローニングされたその遺伝子(以前はpdsと呼ばれていたが、現在はcrtPと呼ばれている)がフィトエンデサチュラーゼをコードすることは、各種の証拠によって示された。最も決定的な証拠は、形質転換されたEscherichia coliでのフィトエンデサチュラーゼ活性の機能的発現だった[Linden H、Misawa N、Chamovitz D、Pecker I、Hirschberg JおよびSandmann G(1991)「様々なフィトエンデサチュラーゼ遺伝子のEscherichia coliでの機能的相補性と蓄積されたカロテンの分析」Z Naturforsch 46c:1045-1051; Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann GおよびHirschberg J(1992)「フィトエンの -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果実の成熟中に転写調節される」Proc Natl Acad Sci USA 89:4962-4966参照]。crtP遺伝子はSynechocystis sp. PCC6803株からも同様の方法によってクローニングされた[Martinez-Ferez IMおよびVioque A(1992)「Synechocystis sp. PCC6803から得られるフィトエンデサチュラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列と除草剤ノルフルゾンに対する耐性を付与する新しい突然変異の特徴づけ」Plant Mol Biol 18:981-983参照]。

【0019】

次に、シアノバクテリアのcrtP遺伝子は、藻[Pecker I、Chamovitz D、Mann V、Sandmann G、Boger PおよびHirschberg J(1993)「植物におけるカロテノイド生合成の分子的特徴づけ: トマト中のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子」Murata N編「Research in Photosynthesis」第III巻(Kluwer・ドルドレイト)の11-18頁参照]と高等植物[Bartley GE、Viitanen PV、Pecker I、Chamovitz D、Hirschberg JおよびScolnik PA(1991)「カロテノイド生合成経路の一酵素フィトエンデサチュラーゼをコードするダイズcDNAの分子クローニングと光合成細菌における発現」Proc Natl Acad Sci USA 88:6532-6536; Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann GおよびHirschberg J(1992)「フィトエンの -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果

10

20

30

40

50

実の成熟中に転写調節される」Proc Natl Acad Sci USA 89: 4962-4966参照]から相同遺伝子をクローニングするための分子プローブとして使用された。Synechococcus sp. PCC 7942株とSynechocystis sp. PC6803株中のフィトエンデサチウラーゼはそれぞれ474および467アミノ酸残基からなり、それらの配列は高度に保存されている(同一性74%、類似性86%)。計算分子量は51kDaで、わずかに疎水性であるものの(疎水親水指数-0.2)、脂質二重層膜を貫通するのに足りる長さの疎水領域は含まない。シアノバクテリアのフィトエンデサチウラーゼの一次構造は、緑藻Dunaliella bardawilから得られる酵素(61%同一で81%類似; [Pecker I、Chamovitz D、Mann V、Sandmann G、Boger PおよびHirschberg J(1993)「植物におけるカロテノイド生合成の分子的特徴づけ: トマト中のフィトエンデサチウラーゼ遺伝子」Murata N編「Research in Photosynthesis」第III巻(Kluwer・ドルドレイト)の11-18頁参照])と、トマト[Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann GおよびHirschberg J(1992)「フィトエンの -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果実の成熟中に転写調節される」Proc Natl Acad Sci USA 89: 4962-4966参照]、コショウ[Huguenev P、Romer S、Kuntz MおよびCamara B(1992)「Capsicum有色体でフィトフルエンと -カロテンの合成を触媒するフラボタンパク質の特徴づけと分子クローニング」Eur J Biochem 209: 399-407参照]およびダイズ[Bartley GE、Vitonen PV、Pecker I、Chamovitz D、Hirschberg JおよびScolnik PA(1991)「カロテノイド生合成経路の一酵素フィトエンデサチウラーゼをコードするダイズcDNAの分子クローニングと光合成細菌における発現」Proc Natl Acad Sci USA 88: 6532-6536参照]から得られる酵素(62-65%同一で約79%類似; [Chamovitz D(1993)「シアノバクテリアにおけるカロテノイド生合成の初期段階の分子的解析: フィトエンシターゼとフィトエンデサチウラーゼ」エルサレム・ヘブライ大学の博士論文参照])で高度に保存されている。真核生物のフィトエンデサチウラーゼポリペプチドの方が大きい(64kDa)が、それらは色素体への輸入中に、シアノバクテリアの酵素と同等のサイズを持つ成熟型にプロセッシングされる。

【0020】

Rhodobacter capsulatus、Erwinia sp. およびNeurospora crassaのカロテノイド酵素には、crtI遺伝子産物フィトエンデサチウラーゼを含めて、高度の構造的類似性がある[Armstrong GA、Hundle BSおよびHearst JE(1993)「光合成生物と非光合成生物から得られるカロテノイド生合成遺伝子産物の進化的保存と構造上の類似性」Metb Enzymol 214: 297-311に概説されている]。上述したように、フィトエンデサチウラーゼの一次構造の高度な保存は酸素放出型光合成生物間にも存在する。しかし「植物型」crtP遺伝子産物と「細菌型」フィトエンデサチウラーゼ(crtI遺伝子産物)の間には、アミノ末端にあるFAD結合配列を除くと、ほとんど配列類似性がない(同一性19~23%、類似性42~47%)。crtPとcrtIは同じ先祖遺伝子から派生したのではなく、それらは収束進化により独立して発生したのだという仮説が立てられている[Pecker I、Chamovitz D、Linden H、Sandmann GおよびHirschberg J(1992)「フィトエンの -カロテンへの変換を触媒する単一のポリペプチドはトマト果実の成熟中に転写調節される」Proc Natl Acad Sci USA 89: 4962-4966参照]。この仮説は、これら2つのタイプの酵素によって触媒される脱水素反応順序が異なることと、それらの阻害剤に対する感受性が異なることによって裏付けられる。

【0021】

10

20

30

40

50

フィトエンデサチュラーゼの場合のように決定的ではないものの、シアノバクテリアと植物およびシアノバクテリアと他の微生物との間には、フィトエンシターゼの構造にも同様の差異が見られる。フィトエンシターゼをコードする *crtB* 遺伝子（以前は *psy* と呼ばれていた）は、*Synechococcus* sp. PCC 7942 株のゲノム中で、*crtP* に隣接して、同じオペロン内に同定された [Bartley GE、Vitanen PV、Pecker I、Chamovitz D、Hirschberg J および Scolnik PA (1991) 「カロテノイド生合成経路の一酵素フィトエンデサチュラーゼをコードするダイズ cDNA の分子クローニングと光合成細菌における発現」 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6532-6536 参照]。この遺伝子は -0.4 の疎水性指数を持つ 307 アミノ酸の 36 kDa ポリペプチドをコードする。シアノバクテリアのフィトエンシターゼの推定アミノ酸配列はトマトのフィトエンシターゼで高度に保存されている（57% 同一で 70% 類似；Ray JA、Bird CR、Maunder M、Grierson D および Schuch W (1987) 「トマト由来の成熟関連 cDNA、pTOM5 の配列」 *Nucl Acids Res* 15:10587-10588）が、他の細菌由来の *crtB* 配列ではあまり保存されていない（整列中に 10 箇所のギャップを入れて 29~32% 同一、48~50% 類似）。両タイプの酵素は共に、多様な生物のプレニルトランスフェラーゼ中にも見出される 2 つの保存された配列モチーフを含有する [Bartley GE、Vitanen PV、Pecker I、Chamovitz D、Hirschberg J および Scolnik PA (1991) 「カロテノイド生合成経路の一酵素フィトエンデサチュラーゼをコードするダイズ cDNA の分子クローニングと光合成細菌における発現」 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6532-6536；Carattoli A、Romano N、Ballario P、Morelli G および Macino G (1991) 「*Neurospora crassa* カロテノイド生合成遺伝子 (*albino 3*)」 *J Biol Chem* 266:5854-5859；Armstrong GA、Hundle BS および Hearst JE (1993) 「光合成生物と非光合成生物から得られるカロテノイド生合成遺伝子産物の進化的保存と構造上の類似性」 *Meth Enzymol* 214:297-311；Math SK、Hearst JE および Poulter CD (1992) 「*Erwinia herbicola* の *crtE* 遺伝子はゲラニルゲラニルニリン酸シターゼをコードする」 *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6761-6764；Chamovitz D (1993) 「シアノバクテリアにおけるカロテノイド生合成の初期段階の分子的解析：フィトエンシターゼとフィトエンデサチュラーゼ」エルサレム・ヘブライ大学の博士論文参照]。このポリペプチド中のこれらの領域は 2 分子の GGP が縮合する際のピロリン酸エステルの結合および / または除去に関与すると考えられる。

【0022】

- カロテンドサチュラーゼをコードする *crtQ* 遺伝子（以前は *zds* と呼ばれていた）は、*Erwinia* sp. の *crtB* および *crtE* 遺伝子とシアノバクテリアの *crtP* 遺伝子とを保持する *Escherichia coli* の細胞中のシアノバクテリアゲノム DNA の発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、*Anabaena* sp. PCC 7120 株からクローニングされた [Linden H、Vioque A および Sandmann G (1993) 「- カロテンドサチュラーゼをコードするカロテノイド生合成遺伝子の異種相補性による *Anabaena* PCC 7120 からの単離」 *FEMS Microbiol Lett* 106:99-104]。これらの *Escherichia coli* 細胞は - カロテンを産生するので、リコピンを産生する褐赤色に着色したコロニーが、- カロテン産生細胞の帯黄色背景上に同定できた。予想される *Anabaena* sp. PCC 7120 株由来の - カロテンドサチュラーゼは 499 アミノ酸残基からなる 56 kDa ポリペプチドである。意外なことに、その一次構造は「植物型」（*crtP* 遺伝子産物）フィトエンデサチュラーゼで保存されてい

10

20

30

40

50

いが、細菌型酵素 (*crtI* 遺伝子産物) とはかなりの配列類似性を持つ [Sandmann G (1993) 「フィットエンからリコピンへの不飽和化反応に関する遺伝子と酵素」(抄録) カロテノイドに関する第10回国際シンポジウム、トロンヘイムCL1-2 参照]。シアノバクテリアの *crtQ* 遺伝子と他の微生物の *crtI* 遺伝子は共通する祖先から進化して生じたのかもしれない。

【0023】

リコピンシクラーゼの *crtL* 遺伝子(以前は *lcy* と呼ばれていた)は、*crtP* の場合と基本的に同じクローニング法を使って、*Synechococcus* sp. PCC 7942 株からクローニングされた。この遺伝子は、リコピンシクラーゼの阻害剤 2-(4-メチルフェノキシ)トリエチルアミン塩酸塩(MPTA)を使用して、野生型の除草剤耐性への形質転換によって単離された [Cunningham FX Jr, Chamovitz D, Misawa N, Gantt E および Hirschberg J (1993) 「 β -カロテンの生合成を触媒する酵素リコピンシクラーゼのシアノバクテリア遺伝子のクローニングと *Escherichia coli* での機能的発現」*FEBS Lett* 328:130-138 参照]。リコピンシクラーゼは単一の遺伝子産物の産物で、リコピンの β -カロテンへの二重環化反応を触媒する。*Synechococcus* sp. PCC 7942 株中の *crtL* 遺伝子産物は 411 アミノ酸残基の 46 kDa ポリペプチドである。これは *Erwinia uredovora* または *Erwinia herbicola* の *crtY* 遺伝子産物(リコピンシクラーゼ)に対して配列類似性を持たない。

β -カロテンヒドロキシラーゼの遺伝子(*crtZ*)とゼアキササンチングリコシラーゼの遺伝子(*crtX*)は、*Erwinia herbicola* [Hundle B, Alberti M, Nievelstein V, Beyer P, Kleinig H, Armstrong GA, Burke DH および Hearst JE (1994) 「*Escherichia coli* 中で発現された *Erwinia herbicola* *Eho10* カロテノイド遺伝子の機能割り当て」*Mol Gen Genet* 254:406-416; Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, Beyer P および Hearst JE (1992) 「*Erwinia herbicola* 由来のゼアキササンチングリコシルトランスフェラーゼの機能的発現とニリン酸結合部位候補」*Proc Natl Acad Sci USA* 89:9321-9325 参照]と、*Erwinia uredovora* [Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa I, Nakamura K および Harashima K (1990) 「*Escherichia coli* における遺伝子産物の機能解析による *Erwinia uredovora* カロテノイド生合成経路の解明」*J Bacteriol* 172:6704-6712 参照] からクローニングされている。

【0024】

単細胞淡水緑藻 *Haematococcus pluvialis* は不利な生育条件にさらされたときや、リン酸欠乏、窒素欠乏、成長培地中の高濃度の塩または強い光強度などの様々な環境ストレス後に、大量の(3S, 3'S)アスタキササンチンを蓄積する [Yong YR および Lee YK (1991) *Phycologia* 30:257-261; Droop MR (1954) *Arch Microbiol* 20:391-397; Andrewes A.G, Borch G, Liaaen-Jensen S および Snatzke G (1974) *Acta Chem Scand* B28:730-736 参照]。この過程でこの藻の栄養細胞は嚢子を形成し、その色を緑から赤色に変化させる。 β -カロテンをカンタキササンチンに変換する酵素 β -C-4-オキシゲナーゼをコードする *Haematococcus pluvialis* 由来の cDNA (*crtO* と命名された)と、 β -カロテンヒドロキシラーゼ(例えば *Erwinia herbicola crtZ* 遺伝子産物)を発現させる異種系でのその発現による(3S, 3'S)アスタキササンチンの産生とは、Harker M, Hirschberg J (19

10

20

30

40

50

97) 「藻類の β -C-4-オキシゲナーゼ遺伝子 *cr t O* を発現させるトランスジェニックシアノバクテリアでのケトカロテノイドの生合成」 *F E B S L e t t . 4 0 4 : 1 2 9 - 1 3 4* に記述されている。

【0025】

ケトカロテノイドであるアスタキサンチン(3,3'-ジヒドロキシ-, β -カロテン-4,4'-ジオン)は β -カロテンの酸化型として水生甲殻類で初めて記述された。後に、アスタキサンチンは多くの海洋動物と藻類に極めて一般的であることがわかった。しかし、アスタキサンチンを他のカロテノイドからデノボ合成できる動物はわずかであり、これらの大半はそれを食物から摂取する。植物界では主としてシアノバクテリア、藻類および地衣類の一部の種にアスタキサンチンが見出される。しかしこれは高等植物種の花弁にもまれに見出される [Goodwin TW (1980) 「The Biochemistry of the carotenoids (カロテノイドの生化学)」第1巻(第二版・Chapman and Hall・ロンドン/ニューヨーク)参照]。図2はアスタキサンチンの生合成経路を表す。

動物における強力な抗酸化剤としてのアスタキサンチンの機能は証明されている [Miki W (1991) 「動物カロテノイドの生物学的機能と活性」 *Pure Appl Chem* 63:141参照]。アスタキサンチンは脂質過酸化の強力な阻害剤であり、生体膜の酸化的損傷からの保護に積極的な役割を果たすことが示されている [Palozza P および Krinsky NI (1992) 「生体内および試験管内でのカロテノイドの抗酸化効果; 概要」 *Methods Enzymol* 213:403-420; Kurashige M, Okimasu E, Inoue M および Utsumi K (1990) 「アスタキサンチンによる生体膜の酸化的損傷の抑制」 *Physiol Chem Phys Med NMR* 22:27参照]。アスタキサンチンの化学的予防効果も研究されていて、そこではアスタキサンチンがマウスの誘発性膀胱癌の発生率を有意に低下させることが示されている [Tanaka T, Morishita Y, Suzuki M, Kojima T, Okumura A および Mori H (1994) 「天然カロテノイド・アスタキサンチンによるマウス膀胱発癌性の化学的予防」 *Carcinogenesis* 15:15参照]。またアスタキサンチンが抗体産生を増進することによって免疫調節効果を発揮することも証明されている [Jyonouchi H, Zhang L および Tomita Y (1993) 「カロテノイドの免疫調節作用の研究 I . アスタキサンチンはポリクローナルB細胞活性を促進することなくT依存抗原に対するインビトロ抗体産生を増進する」 *Nutr Cancer* 19:269; Jyonouchi H, Hill JR, Yoshifumi T および Good RA (1991) 「カロテノイドの免疫調節作用の研究 I . インビトロ培養系でのネズミリンパ球の機能と細胞表面マーカー発現に対する β -カロテンとアスタキサンチンの効果」 *Nutr Cancer* 16:93参照]。アスタキサンチンの生物医学的性質の完全な解明はこれからであるが、初期の結果は、これが免疫系から正の反応を引き出すと共に、癌と腫瘍の予防に重要な役割を果たし得ることを示唆している。

【0026】

アスタキサンチンはサケ科の魚と小エビの主要カロテノイド色素であり、卵、身および皮に魅力的な着色を施している [Torrissen OJ, Hardy RW, Shearer KD (1989) 「サケ科の色素沈着 - サケ科魚類におけるカロテノイドの沈着と代謝」 *Crit Rev Aquatic Sci* 1:209参照]。1991年の全世界のサケの水揚げは約720,000メートルトンで、そのうちの25~30%は様々な水産養殖施設で生産されたものである [Meyers SP (1994) 「世界の水産養殖の発達、飼料配合物、カロテノイドの役割」 *Pure Appl Chem* 66:1069参照]。これは西暦2000年までに460,000メートルトンまで増加すると設定されている [Bjorndahl T (1990) 「The Economics of Salmon Aquaculture (サケ水産養殖の経済学)」(Blackwell Scientific・オックスフォード)の1頁参照]。サケ科魚類の赤

10

20

30

40

50

色は消費者への訴求効果があり、それゆえに最終製品の価格を左右する。動物はカロテノイドを合成できず、一次生産者（海藻類と植物プランクトン）から食物連鎖によってそれらの色素を獲得する。集約的養殖で成長した動物の色は、通常、最適ではない。したがって水産養殖では生産者がかなりの費用をかけてカロテノイド含有栄養物を人工的に添加する。

【0027】

アスタキサンチンは商業的に使用される最も高価なカロテノイド化合物である（現在 - 1995年の市場価値は2500～3500ドル/kgである）。これは主として、多種多様な水生動物に着色を施す栄養補助剤として使用される。極東では、鶏肉に特有の色素沈着が起こるように家禽への給餌にも使用される。またこれは食品産業にとって望ましく効果的な非毒性着色法であり、化粧品にも有用である。最近、アスタキサンチンが人体で強力な抗酸化剤であり、それゆえに望ましい食品添加物であることが報告された。

天然の(3S, 3'S)アスタキサンチンに供給量に制限がある。これは甲殻類種から工業的に抽出されている[Torrisen OJ, Hardy RW, Shearer KD (1989)「サケ科の色素沈着 - サケ科魚類におけるカロテノイドの沈着と代謝」Crit Rev Aquatic Sci 1:209参照]。アスタキサンチンの(3R, 3'R)立体異性体はPhaffiaから生産される[酵母の一種; Andrews AG, Phaff HJおよびStarr MP (1976)「赤色発酵酵母Phaffia rhodozymaのカロテノイド」Phytochemistry 第15巻1003 - 1007頁参照]。(3S, 3'S) -、(3S, 3'R) -、(3R, 3'R) - 異性体の1:2:1混合物である合成アスタキサンチンは、現在、Hoffmann-La Roche社によって生産され、「CAROPHYLL PINK」という名前で高価格（約2500ドル/kg）で販売されている[Mayer H (1994)「カロテノイド合成について」Pure & Appl Chem第66巻931 - 938頁参照]。最近、ケト化合物生合成に関与するcrtWと名付けられた新しい遺伝子が、アスタキサンチンなどのケトカロテノイドを産生する海洋細菌Agrobacterium auranticacumとAlcaligenes PC-1から単離された。Erwiniaカロテノイド生成遺伝子により - カロテンを蓄積するように操作されたEscherichia coliにcrtW遺伝子を導入したところ、そのEscherichia coli形質転換体はアスタキサンチンの合成経路における前駆体カンタキサンチンを合成した[Misawa N, Kajiwara S, Kondo K, Yokoyama A, Satomi Y, Saito T, Miki WおよびOhtani T (1995)「単一の遺伝子による炭化水素 - カロテン中のメチレン基のケト基への変換によるカンタキサンチン生合成」Biochemical and biophysical research communications第209巻867 - 876頁参照]。したがって、水産養殖で飼料補助剤として、また様々な他の工業的用途に有用な化学物質として使用するには、(3S, 3'S)アスタキサンチンの比較的安価な供給源を見出すことが望ましい。

【0028】

アスタキサンチンがマダイ、サケ、マスなどの魚と、小エビ、カニ、エビ、クリルなどの甲殻類に含まれることは知られている[日本水産学会編「海洋生物のカロテノイド」(1978)]。アスタキサンチンを産生する微生物としては、紅色酵母Phaffia rhodozyma[Phytochemistry, 15, 1009, 1976]、プレバクテリウム[Journal of General and Applied Microbiology, 15, 127, 1969]、緑藻Haematococcus pluvialis[Phytochemistry, 20, 2561, 1981]が知られている。化学合成法としては、-カロテンの変換[Prue Appl. Chem. 57, 741, 1985]とホスホニウム塩からの合成[Helv. Chim. Acta. 64, 2436, 1981]が知られている。

しかしクリルやエビなどの天然産物中のアスタキサンチン含量は極めて低く、その抽出は

10

20

30

40

50

困難であるため、既知のアスタキサンチン生産法は費用が高く、有利でない。また、それら資源の供給安定性にも問題がある。さらに、紅色酵母 *Phaffia rhodomyces* の成長速度が遅くアスタキサンチン生産性が低いことは、このケトカロテノイド供給源を産業上の観点からは実用的でないものにしていく。

緑藻 *Haematococcus pluvialis* の成長速度も低く、その培養は汚染されやすく、アスタキサンチンの抽出はこの藻が厚い細胞壁を持つために極めて困難である。したがって藻類からのアスタキサンチンの工業的生産は困難である。

アドニキサンチンは金魚とコイに含まれることが知られているが [日本水産学会編「海洋生物のカロテノイド」(1978)]、アドニキサンチンの化学合成は困難であると考えられる。アドニキサンチンの工業的生産法は知られていない。

【0029】

- カロテンの生産法としては、- イオノンからの合成 [Pure & Appl. Chem. 63(1), 45, 1991] と、ニンジン、サツマイモ、カボチャなどの緑黄野菜からの抽出が知られているが [天然着色料ハンドブック編集委員会編「天然着色料ハンドブック」(1979)光琳]、これらの方法は生産コストが高い。

微生物による - カロテンの生産方法としては藻類 *Dunaliella* による生産 [J. Appl. Bacteriol., 70, 181, 1991] とカビ *Blakeslea* による生産 [J. Appl. Bacteriol., 70, 181, 1991] が知られている。細菌による - カロテンの生産も、米国特許第 5,607,839 号に記載の特定細菌種について知られている。

エチネノン天然産物、例えばオニヒトデなどのヒトデや、マダイなどの魚の内臓、ウニ、ロブスターなどの甲殻類の内臓などから抽出される [日本水産学会編「海洋生物のカロテノイド」(1987)]。しかし微生物によるエチネノンの生産は米国特許第 5,607,839 号に記載の属不詳の一種についてのみ知られている。

カンタキサンチンは数種のキノコ [Botanical Gazette, 112, 228-232, 1950]、魚類、甲殻類など [日本水産学会編「海洋生物のカロテノイド」(1978)] に含まれることが知られている。

微生物によるエチネノンの生産例としては、プレバクテリウム属に属する微生物による生産 [Applied and Environmental Microbiology, 55(10), 2505, 1989] や、ロドコッカス属に属する微生物による生産 [日本国公開特許公報 2-138996 号] がある。また、化学合成法としては、- カロテンの酸化 [J. Amer. Chem. Soc., 78, 1427, 1956] と、新規化合物 3-オキソ-C₁₅ホスホニウム塩からの合成 [Pure & Appl. Chem. 51, 875, 1979] が知られている。

【0030】

ゼアキサンチンの生産法としては、オキソイソホロンの不斉還元によって得られるヒドロキシケトンから出発する化学合成 [Pure & Appl. Chem., 63(1), 45, 1991]、トウモロコシの種子からの抽出 [「生体色素」(1974)朝倉書店] およびフラボバクテリウムを用いる方法 [「Microbial Technology」第二版(ニューヨーク・Academic Press)第1巻529-544頁の「Carotenoids(カロテノイド)」] が知られている。

このようにアスタキサンチンなどのカロテノイドを産生し分泌する細菌の必要性は広く認識されており、それらの細菌を得ることは著しく有利である。というのは、それらの細菌は容易に入手できるカロテノイド供給源になるからである。

本発明の他の特徴と利点は、特許請求の範囲と以下の説明から明らかになるだろう。

【0031】

(発明の要約)

本発明は、16SリボソームRNA分析で決定したところ *Paracoccus* 属の細菌に最も類似する、新規細菌種を提供する。この新種は、本発明のもう一つの側面を構成するカロテノイド含有小胞を産生し、分泌する。その16SリボソームRNAが *Parac*

10

20

30

40

50

occus 属に類似することから、以下、この新種を *Paracoccus marcusii* MH1 株と呼ぶが、おそらくこの新規細菌は新しい属の最初の分離菌に相当するのだろう。

現在 *Paracoccus* 属には相異なる 8 つの種が関連づけられており、そのうちの一つはある生育条件下に黄色色素を呈するものの、いずれもカロテノイドを産生しない。さらに、原核生物界に属する種で、(分解過程とは対立ものとして)その生活環中にその成長培地に相当量のカロテノイドを分泌するものは、今までのところ知られていない。また、科学上知られている細菌種で成長培地にカロテノイド含有小胞を分泌するものはない。したがって、本発明はさらに、 β -カロテン、エチネノン、 β -クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス-アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなど(ただしこれらに限らない)のカロテノイドを生産する方法であって、炭素源、窒素源および無機物質源を含む栄養培地で細菌種を培養し、その細菌細胞、そこから分泌された小胞および/またはその成長培地から個々のカロテノイド色素もしくはカロテノイド色素の混合物を回収することからなる方法を提供する。

【0032】

(発明を実施するための最良の形態)

以下、例示を目的として、後述する添付の図面を参照して本発明を説明する。

本発明は新規細菌種を提供する。16SリボソームRNAホモロジー分析で決定すると、本発明の新規細菌種は、現在知られているすべての細菌属のうち *Paracoccus* 属に最も類似する。しかし、この新種はカロテノイド小胞を産生し分泌するという未だかつて報告されたことのない現象を示すので、これは新しい属の最初の分離菌であると考えられる。さらに本発明は、成長培地にカロテノイドを分泌する細菌種を使ってカロテノイドを生産する方法と、そのようにして得られる産物および調製物をいくつか提供する。

特許請求の範囲を含む本明細書で使用する「小胞」という用語は、実質上球状の親油性の任意の物体であって、生命の形でないもの、すなわち繁殖できないものを指す。この用語のこのような用法は生物学の分野では受け入れられている。

原核生物分類法はしばしば新しい知見および/または既存の知見の新しい評価によって改変されることに留意すべきである。したがって、本発明の新規細菌種がカロテノイドを産生するのに対して、*Paracoccus* 属に属する他の既知の種はいずれもカロテノイドを産生しないことから、この新規細菌種はまだ知られていない新しい属の一種であると仮定される。またこの新種が小胞の形でカロテノイドを分泌するという事実は、この新種が新しい属の最初の標本であるという概念を補強するものである。

特許請求の範囲を含む本明細書で使用する「最も類似する」という用語は先行技術の細菌属だけに適用され、その類似性は16SリボソームRNA相同性分析に基づく。したがって一態様として本発明は、16SリボソームRNAに関する限り *Paracoccus* 属の種に最も類似する任意のカロテノイド産生細菌種に関する。もう一つの態様として本発明は、任意のカロテノイド産生および分泌細菌種に関する。

Paracoccus 属は代謝的にはかなりの多様性を示すグラム陰性の球菌または短桿菌からなる。代表的な種は広範な有機化合物で好氣的に生育できる。いくつかの種は硝酸塩を電子受容体として使用することにより、無機的にも生育でき、代表的な種の一部は化学合成独立栄養成長の電子受容体として水素を使用できる。この属は、系統発生論的には、プロテオバクテリアの β -3サブクラスに属する。

【0033】

Paracoccus 属では現在次の8つの種が認識されている：*P. denitrificans* (この属の基準種) [A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin および K. - H. Schleifer 編「prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications (原核生物・細菌の生物学に関するハンドブック：生態生理学、分離、同定、応用)」第2版第3巻(Springer-Verlag・ニューヨーク)の23

21 - 2334頁 van Verseveld, H. W. および A. H. Stouthamer (1992) 「Paracoccus 属」; Visuvanathan, S., M. T. Moss, J. L. Stanford, J. Hermon-Taylor および J. J. McFadden (1989) 「多様な細菌から DNA を単離するための簡単な酵素法」 J. Microbiol. Meth. 10: 59 - 64]、P. thiocyanatus [Katayama, Y., A. Hiraishi および H. Kuraishi (1995) 「チオシアネート資化性通性化学合成無機栄養生物の新種 Paracoccus thiocyanatus (新種) と、Thiobacillus versutus の Paracoccus versutus (新組合せ) としての Paracoccus 属への属の改訂を伴う帰属変更」 Microbiology 141: 1469 - 1477]、P. versutus (かつては Thiobacillus versutus として知られていた) [Katayama, Y., A. Hiraishi および H. Kuraishi (1995) 「チオシアネート資化性通性化学合成無機栄養生物の新種 Paracoccus thiocyanatus (新種) と、Thiobacillus versutus の Paracoccus versutus (新組合せ) としての Paracoccus 属へのその属の改訂を伴う帰属変更」 Microbiology 141: 1469 - 1477]、P. kocurii [Ohara, M., Y. Katayama, M. Tsuzaki, S. Nakamoto および H. Kuraishi (1990) 「テトラメチルアンモニウム同化性細菌 Paracoccus kocurii (新種)」 Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 292 - 296]、P. alcaliphilus [Urakami, T., J. Tamaoka, K. Suzuki および K. Komagata (1989) 「好アルカリ性通性メチロトロフ細菌 Paracoccus alcaliphilus (新種)」 Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 116 - 121]、P. aminophilus, P. aminovorans [Urakami, T., H. Araki, H. Oyanagi, K. Suzuki および K. Komagata (1990) 「N, N'-ジメチルホルムアミドを資化する新種 Paracoccus aminophilus と新種 Paracoccus aminovorans」 Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 287 - 291]、および P. solventivorans [Siller, H., F. A. Rainey, E. Stackebrandt および J. Winter (1996) 「土壌由来の新しいグラム陰性アセトン分解性硝酸塩還元性細菌 Paracoccus solventivorans (新種)」 Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 1125 - 1130]。

【0034】

先に P. halodenitrificans として知られていた株は、最近、その系統発生的関係から Halomonas 属に移された [Dobson, S. J. および P. D. Franzmann (1996) 「属 Deleya (Baumann ら, 1983)、Halomonas (Vreeland ら, 1980) および Halovibrio (Fendrich 1988) と種 Paracoccus denitrificans (Robinson および Gibbons 1952) の単一の属 Halomonas への統一と属 Zymobacter の科 Halomonadaceae への配置」 Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 550 - 558]。

Paracoccus 属の既知の 8 種はいずれもカロテノイドを産生しない。栄養寒天平板上で汚染菌として現れたグラム陰性の明橙色球状細菌が、以下に詳述するように分離され、特徴づけられた。

表現型による特徴づけと、16S rDNA 配列比較に基づく系統分析により、この細菌は Paracoccus 属のこれまで知られていなかった種として分類されるべきであることが明らかになった。ここに我々は、この分離菌に Paracoccus marcussii (新種) という名前を提案し、その特徴を記載する。

【0035】

10

20

30

40

50

さらに、既に上述したように、また下記の実施例で詳しく証明するように、この新規細菌種は専用の小胞に入れられたカロテノイドを産生しかつ分泌するという、どの原核生物にも未だかつて報告されたことのない現象を示す。したがって本発明の新規細菌種はおそらく新しい属の最初の分離菌に相当するものと思われる。

この新しい分離菌の重要な特徴は様々なカロテノイドの産生と培地へのそれらの小胞性分泌とであるが、これまでに知られている細菌種で、その生活環中にカロテノイドを産生しかつ分泌するものはない。したがってもう一つの側面からみれば本発明は、(分解に係る分泌に対立するものとして)その生活環中にカロテノイドを分泌する任意の細菌種、具体的にはカロテノイド小胞を分泌する株に関する。

カロテノイド分泌は小胞性であるので、本発明のもう一つの側面は、カロテノイド含有小胞、それを含む調製物および培地に関する。

この新しい分離菌は - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス - アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンを産生し分泌する。したがって本発明のもう一つの側面は、ここに記述するような本発明のカロテノイド生産法のいずれかに従って生産されたカロテノイドに関する。

【0036】

したがって本発明のもう一つの態様は、 - カロテン、エチネノン、 - クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス - アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチン(ただしこれらに限らない)などといった少なくとも一つのカロテノイド色素の生産方法に関する。これらのカロテノイドのいくつかを図3にその化学式で表す。

本方法は次の段階を含む。第一に、Paracoccus属に最も類似する細菌種を、炭素源、窒素源および無機物質源を含む液体または固体栄養培地で培養してその成長、カロテノイド色素の産生、および好ましくはそれらの成長培地への分泌を維持する。第二に、個々のカロテノイド色素またはカロテノイド色素の混合物を培地および/またはその種の細胞から回収する。収量が最大になるように精密な生育および回収法を設計する方法は、当業者にはわかるだろう。

本発明によれば、カロテノイドを分泌する任意の細菌種、またはカロテノイドを産生しParacoccus属に最も類似する(本明細書でいうところの「最も類似する」)任意の種を使用できる。

これらの細菌のうち、具体的な一微生物としてP. marcusii MH1株を挙げることができる。この株は本発明者らによって新たに分離され、ブダペスト条約に基づき、1997年6月4日に、DSM 11574株としてDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)に寄託されている。

P. marcusii MH1株の16SリボソームRNAをコードするDNAのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。

【0037】

本微生物を用いるカロテノイド生産用の培地は、例えば次のとおりである。すなわち、それは、生産微生物の成長に必要な炭素源、窒素源および無機塩と、必要であれば、特別な必須物質(例えばビタミン、アミノ酸、核酸など)とを含有する。

炭素源としては、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトースなどの糖類; 酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、ピルビン酸、マロン酸などの有機酸; エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール、グリセロールなどのアルコール; ダイズ油、米ヌカ油、オリーブ油、トウモロコシ油、ゴマ油、亜麻仁油などの油脂が挙げられる。炭素源の添加量はその炭素源の種類に応じて変動するが、通常は培地1リットルあたり1~100g、好ましくは2~50gである。

窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アン

10

20

30

40

50

モニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素などが単独で、または組み合わせて使用される。窒素源の添加量はその窒素源の種類に応じて変動するが、通常は培地 1 リットルあたり 0.1 ~ 30 g、好ましくは 1 ~ 10 g である。

無機塩類としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸第二鉄、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、塩化第一鉄、硫酸第一マンガン、塩化第一マンガン、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸第二銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムなどを単独でまたは組み合わせて使用できる。無機酸の量はその無機塩の種類に応じて変動するが、通常は培地 1 リットルあたり 0.001 ~ 10 g である。

【0038】

特別な必須物質としては、ビタミン、核酸、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、大豆粉、乾燥酵母などを単独でまたは組み合わせて使用できる。特別な必須物質の使用量はその物質の種類に応じて変動するが、通常は培地 1 リットルにつき 0.2 ~ 200 g、好ましくは 3 ~ 100 g である。

培地の pH 値 5 を pH 2 ~ 12、好ましくは 6 ~ 9 に調節する。培養は 15 ~ 40、好ましくは 20 ~ 35 の温度で 1 ~ 20 日間、好ましくは 1 ~ 4 日間、振盪または曝気 / 攪拌によって提供される好気条件下に行なわれる。

最後にカロテノイドをその培養から分離、精製できる。すなわち、微生物細胞を培養から遠心分離やろ過などの従来の手段で分離し、その細胞または培地を適当な溶媒による抽出処理にかける。抽出前に行なってもよい好ましい段階として、カロテノイドが充填された小胞を、例えば限外ろ過やろ過などによって、培地から回収してもよい。

抽出用の溶媒としては、カロテノイドが溶解する任意の物質を使用できる。例えばアセトン、クロロホルム、ジクロロメタン、ヘキサン、シクロヘキサン、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ベンゼン、二硫化炭素、ジエチルエーテルなどの有機溶媒を使用し、好ましくはクロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、メタノール、エタノールまたはイソプロパノールを使用する。精製は吸着、溶出、溶解などの従来の方法を単独で行なうか、好ましくは組み合わせて行なうことによって実施できる。

【0039】

本発明によれば、多くの場合、 β -カロテン、エチネノン、 β -クリプトキサンチン、カンタキサンチン、アドニルピン、シス-アドニキサンチン、アドニキサンチン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンが同時に生産され、培養細胞および / または培地中に存在する。

したがって本発明の一実施の形態として、上述のカロテノイドまたはその他のいずれか一つを、上述の方法で個別に得ることができる。あるいは、カロテノイドの混合物を得ることもできる。このように本発明のカロテノイド生産方法には、個々のカロテノイドの生産方法と、カロテノイドの混合物の生産方法が含まれる。

アスタキサンチンとアドニキサンチンは、例えば吸着 / 溶出カラムクロマトグラフィー、微分抽出、向流抽出および分画晶出 (differential crystallization) などといった従来のカロテノイド相互分離法に従って互いに分離できる。また、個々のカロテノイドを生産するために、培地組成、培養条件などを制御することによって所望のカロテノイドを優先的に生成させることもできる。

【0040】

例えば生産されるカロテノイドの比は、好気条件を変えることによって変化させることができる。例えば生産されるカロテノイドの比は、フラスコ振盪培養時の培地の量または振盪速度によって、もしくは曝気 / 攪拌培養時の空気供給速度または攪拌速度を変えることによって、変化させることができる。

また特定のカロテノイドを優先的に生産するために、生産微生物を突然変異誘発 (例えばその生産微生物の人工的突然変異誘発など) によって、突然変異型微生物が所望のカロテノイドを特に優先的に産生するように改良することもできる。そのような突然変異誘発処理には、例えば X 線照射、UV 照射などの物理的方法; N-メチル-N'-ニトロ-N-

10

20

30

40

50

ニトロソグアニジン (NTG)、エチルメタンサルホン酸 (EMS) の使用などといった化学的方法；および遺伝子組換え技術などの生物学的方法がある。

そのような改良型突然変異体を用いたカロテノイドの生産方法は本発明のカロテノイド生産方法に包含される。

本方法によって生産されるアスタキサンチンでは、(3S, 3'S) - アスタキサンチンの純度がほとんど100%である。エビ、Haematococcus、サケ、マス、マダイなどの天然産物に含まれるアスタキサンチン中の(3S, 3'S) - アスタキサンチンの比率は高いことが知られている。一方、Phaffia rhodozymaは(3R, 3'R) - アスタキサンチンを高い比率で含有することが知られており、その絶対配置は天然産物の大半に含まれるアスタキサンチンのそれとは反対である。

10

【0041】

本方法によって生産されるアスタキサンチンは、そのほとんど100%が(3S, 3'S) - アスタキサンチンであり、その絶対配置は自然界に存在するアスタキサンチンの大半と同じであるため、本方法によって生産されるアスタキサンチンは産業上価値がある。また(3S, 3'S) - アスタキサンチンの化学合成は知られているが(Helv. Chim. Acta, 61, 2609, 1978)、光学的に純粋な(4R, 6R) - 4 - ヒドロキシ - 2, 2, 6 - トリメチルシクロヘキサノンを出発物質として使用するので、その方法は高コストで、産業上有利でない。

また、本方法によって生産されるアスタキサンチンは実質的に全トランス - アスタキサンチンを含有する。全トランス - アスタキサンチンは天然型であり、本生産微生物はそれらが天然型アスタキサンチンを産生するという点で有利である。シス - アスタキサンチンから全トランス - アスタキサンチンを製造することは困難だが、シス - アスタキサンチンが必要な場合は、既知の方法に従って全トランス - アスタキサンチンからこれを得ることができる。

20

以下、実施例に言及する。下記の実施例は上述の説明と共に本発明を例証するものである。

【0042】

(実施例)

下記実施例では次のプロトコルと実験上の細目を参照する。

《生物源》 これ以降 Paracoccus MH1株または Paracoccus marcusii (新種) と呼ぶ株は栄養寒天平板を汚染する単一の明橙色コロニーとして現れた。

30

《培地および培養条件》 Paracoccus MH1株は通例、1リットルあたり10gのバクトトリプトン、5gのバクト酵母エキスおよび5gのNaClを含む培地(pH7.0)中、25℃で生育させた。液体培養は振とう水槽で生育させた。固体培地には1リットルあたり15gのバクト寒天を加えた。下記実施例に明記するように、この培地の組成は、NaNO₃、デンプン、より高濃度のNaCl、および他の成分の添加によって変更された。

《顕微鏡法》 培養物は位相差光学装置を装着したツァイス・スタンダード顕微鏡を使って調べ、写真撮影した。

40

《生理学および生化学的特徴づけ》 カタラーゼ、チトクロムオキシダーゼ、ウレアーゼ、アルギニンデヒドロラーゼ(arginine dehydrolyase)、アミラーゼの存在、硝酸塩での嫌氣的成長などといった諸性質に関する試験を、Holding, A. J. および J. G. Collee (1971) 「定型的生化学試験」(J. R. Norris および D. W. Ribbons 編「Methods in microbiology」(Academic Press・ロンドン)第6A巻の1~32頁)に記述されているような標準的方法を使って行なった。

【0043】

選択した生理学的特徴を、9種類の代謝能(硝酸塩の還元、トリプトファンからのインドールの生成、グルコースからの酸生成、アルギニンジヒドロラーゼ、ウレアーゼ、ゼラチ

50

ンとエスクリンの加水分解および - ガラクトシダーゼ) と 12 種類の炭素源 (グルコース、アラビノース、マンノース、マンニトール、N - アセチルグルコサミン、マルトース、グルコン酸、カプリン酸、アジピン酸、リンゴ酸、クエン酸およびフェニル酢酸) での好氣的成長について調べる A P I 2 0 N E システム (B i o M e r i e u x 社、フランス・マーシーレトワール) で決定した。すべての A P I テストは製造者の指示に従って行なった。

他の炭素源の資化性を試験するために、95 基質の B i o l o g 社 (カリフォルニア州ハイワード) S F - N M i c r o P l a t e マイクロタイタープレートを使用した。細胞を A P I 2 0 N E システムの A U X 培地 (1 リットルあたり 2 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 . 5 g の寒天、82 . 8 m g の無機塩基、250 m g のアミノ酸類、45 . 9 m g のピタ

10

ミン類 / 栄養物質および 40 m M のリン酸緩衝液 (p H 7 . 0) を含有する) に懸濁した。各 140 μ l を B i o l o g 社 マイクロタイタープレートのウェルに加え、30 で 2 ~ 3 日培養した後、成長に関してウェルを調べた。

選択した基質での成長を、さらに、1 リットルあたり 0 . 5 g のバクトトリプトン、0 . 25 g のバクト酵母エキス、5 g の N a C l および 5 m M の H E P E S (p H 7 . 0) を含む液体培地 30 m l を使って、100 m l エルレンマイヤー・フラスコで試験した。この低栄養培地に 1 リットルあたり被験物質 2 . 5 g を補足し、成長を非補足培地での成長と比較した。

【 0 0 4 4 】

脂肪酸分析は、基本的に S i l l e r H、R a i n e y F A、S t a c k b e r a n d t E および W i n t e r J (1 9 9 6) 「土壌由来の新しいグラム陰性アセトン分解性硝酸塩還元性細菌 *Paracoccus solventivorans* (新種) の分離と特徴づけ」 J . S y s . B a c t e r i o l . 4 6 : 1 1 2 5 - 1 1 3 0 に記述されているように行なった。ポリ - - ヒドロキシアルカノエートの生成は、乾燥細胞ペレットをクロロホルムで抽出し、その抽出物を乾燥し、濃硫酸と共に加熱した後クロナートの生成を分光法で評価することによって試験した。

20

《 DNA 塩基組成 》 DNA は V i s u v a n a t h a n らに従ってヒドロキシアパタイトでのクロマトグラフィーによって分離、精製した [V i s u v a n a t h a n , S . , M . T . M o s s , J . L . S t a n f o r d , J . H e r m o n - T a y l o r および J . J . M c F a d d e n (1 9 8 9) 「多様な細菌から DNA を単離するための簡単な酵素法」 J . M i c r o b i o l . M e t h . 1 0 : 5 9 - 6 4] 。 G + C 含量は、M e s b a h らが記述しているように高性能液体クロマトグラフィー (H P L C) を用いて決定した [M e s b a h , M . , U . P r e m a c h a n d r a n および W . B . W h i t m a n (1 9 8 9) 「高性能液体クロマトグラフィーによるデオキシリボ核酸の G + C 含量の正確な測定」 I n t . J . S y s t . B a c t e r i o l . 3 9 : 1 5 9 - 1 6 7] 。

30

《 16 S r DNA 遺伝子の配列決定 》 ゲノム DNA 抽出、16 S r DNA の P C R による増幅およびその P C R 産物の精製は記述されているように行なった [D e S o e t e , G . (1 9 8 3) 「近接データに追加の木をフィッティングするための最小二乗アルゴリズム」 P s y c h o m e t r i k a 4 8 : 6 2 1 - 6 2 6] 。精製した P C R 産物を、A B I P R I S M TM ダイ・ターミネーター・シーケンシング・レディ・リアクション・キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s ・ドイツ) を製造者のプロトコルに指示されているように使用して配列決定した。配列決定反応を A p p l i e d B i o s y s t e m s 3 7 3 A DNA シーケンサーを用いて電気泳動した。得られた配列データを整列エディタ a e 2 [M a i d a k , B . L . , G . J . O l s e n , N . L a r s e n , M . J . M c C a u g h e y および C . R . W o e s e (1 9 9 6) 「リボソーマルデータ - ベースプロジェクト (R D P) 」 N u c l e i c A c i d s R e s . 2 4 : 8 2 - 8 5] に入力し、手動で整列し、プロテオバクテリアの - 亜門の R h o d o b a c t e r グループに属する代表的 16 S r RNA 遺伝子配列と比較した。比較のために 16 S r RNA 配列をリボソーマル・データベース・プロジェクト (R i b o s o

40

50

mal Database Project)のEMBLデータベースから入手した[Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, M. J. McCaugheyおよびC. R. Woese (1996)「リボソーマルデータベースプロジェクト(RDP)」Nucleic Acids Res. 24: 82-85]。系統樹状図を構築するために、PHYLIIPパッケージ[Felsenstein, J. (1993) PHYLIIP (系統推定パッケージ)バージョン3.5.1、ワシントン大学(シアトル)遺伝学部]の演算を使用した。2つずつの進化の距離をJukesとCantorの補正による類似度%から計算した[H. N. Munro編「Mammalian protein metabolism」(Academic Press・ニューヨーク)の21-132頁、Jukes, T. H.およびC. R. Cantor (1969)「タンパク質分子の進化」]。系統樹は進化の距離に基づく近隣結合法によって構築した[Saitou, N.およびM. Nei (1987)「近隣結合法: 系統樹の新しい再構築法」Mol. Biol. Evol. 4: 406-425]。系統樹状図の構築にはDe Soeteの最小二乗距離法[De Soete, G. (1983)「近接データに追加の木をフィッティングするための最小二乗アルゴリズム」Psychometrika 48: 621-626]を使用した。木(tree)の根(root)はRoseobacter denitrificans ATCC 33942^Tの16S rRNA遺伝子配列をこの分析に含めることによって決定した。

【0045】

《ヌクレオチド配列アクセッション番号》 Paracoccus marcusii DSM 11574の16S rDNA遺伝子配列にはEMBLヌクレオチド配列データベースアクセッション番号Y12703が割り当てられている。

《カロテノイド分析》 P. marcusii細胞の一部を13,000 x gで10分間の遠心分離によって収集し、水で1回洗浄した。P. marcusiiによって分泌される小胞の一部を超遠心機中40,000 rpm (Beckman L8、ローターSW50.1、192,000 g)での超遠心分離によって収集した。細胞、小胞を200 μlのアセトンに再懸濁し、暗所にて65 °Cで10分間インキュベートした。細胞除去培地抽出のために、10 μlの培地を200 μlのアセトンと混合し、暗所にて65 °Cで10分間インキュベートした。試料を再び13,000 x gで10分間遠心分離し、色素を含有するアセトン上清をきれいなチューブに入れた。その色素抽出物をN₂の気流下に送風乾固し、分析に必要なまで-20 °Cで保存した。

逆相HPLCは2 cmの保護カラムをつけたSpherisorb ODS2, 5 μmカラム(25.0 cm x 0.46 cm)を使って行なった。0-60% A (0-10分)、60-76% A (10-15分)、76% A (15-22分)、76-100% A (22.1-28.0分)の溶媒勾配を毎分1 mlの流速で使用した(A = 酢酸エチル、B = アセトニトリル/水(9/1 v/v))。溶媒はCM4000三相ポンプシステムを用いて送出した。試料は20 μlずつオンラインRheodyneインジェクターユニットを通して注入した。HP1040Aダイオードアレイ検出器を使って、スペクトルをオンラインで監視し、クロマトグラムを積分した。

【0046】

TLCはKieselgel 60 F₂₅₄シリカプレートで行なった。R_F値はそれぞれジエチルエーテル(TLC系1)とヘキサン/酢酸エチル(3/2 v/v)(TLC系2)の溶媒系に関するものである。

【0047】

UV/可視電子吸収スペクトルは、再蒸留した、またはHPLC用の、アセトンとジエチルエーテル中で記録した。各スペクトルはCecil CE 5501コンピューティング・ダブルビームUV/可視分光光度計を使って記録した。微細構造の程度は% I I I / I Iのピーク高の比として表され、ここに0値を2つの吸収ピーク間の最小値とし、最長波長吸収波長のピーク高をI I I、中央吸収波長のそれをI Iと名付ける。微細構造を伴わない単一吸収ピークを示すアスタキサンチンなどの共役ケトカロテノイドの場合は、%

III値が0である。

質量分析は、低分解能(約1000)で作動するVG7070H二重収束磁気セクタ質量分析計で陽イオンEIを用いて行なった。データの収集と処理はFinnigan社INCO52300データシステムで行なった。フルスキャンMSを、加速電圧2kV、総サイクルタイム3.5秒で40~700のm/z範囲にわたって記録した。プローブ温度は周囲温度から約300まで約5分間で徐々に昇温した。スペクトルは70eVのイオン化ポテンシャルで記録した。

《電子顕微鏡法》電子顕微鏡用の標本は0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4)中の3%グルタルアルデヒドで終夜固定し、同緩衝液中で洗浄し、0.1Mカコジル酸緩衝液中の1%OsO₄で2時間、後固定した。脱水は一連のエチルアルコールとプロピレンオキサイド濃度中で行ない、Epon-812に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した後、Jeol-1000CX電子顕微鏡で観察した。

《キラリティー立体配置》アスタキサンチンのキラリティー立体配置は、アスタキサンチンから誘導したジアステレオ異性カンファン酸エステルのHPLCによって決定した[Renstrom B, Borch G, Skulberg MおよびLiaaen-Jensen S(1981)「Haematococcus pluvialisから得られる(3S,3S)-アスタキサンチンの光学純度」Phytochem 20:2561-2565]。

【0048】

実施例1

Paracoccus MH1の形態学的特徴

図4に示すように、Paracoccus marcusii MH1株は、サイズが1~2x1~1.5µmの球菌ないし短桿菌を形成した。これは主としてペアおよび4~5細菌までの短い鎖またはクラスターからなつた。細胞は非運動性で、孢子を形成しなかつた。MH1株はグラム陰性に染色された。寒天上のコロニーは平滑、平坦で明るい橙色だった。

実施例2

生理学および生化学的特徴づけ

至適成長温度は25~30だった。35では成長が不十分だった。至適温度における標準的成長培地での倍加時間は2.3時間だった。培地中のNaCl濃度を1リットルあたり6gに増やすと成長が遅く、NaClが1リットルあたり8gを超えると成長が起こらなかつた。

次の炭素およびエネルギー源を成長に使用することができた：D-グルコース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-アラビノース、マルトース、セロビオース、D-ラクトース、メリビオース、スクロース、ツラノース、D-トレハロース、гентビオース(gentobiose)、ラクツロース、D-グルコン酸、D-グルクロン酸、D-ガラクトン酸、グリセロール、エリトリール、D-マンニトール、D-ソルビトール、キシリトール、m-イノシトール、アドニトール、D-アラビトール、プロピオン酸、シス-アコニット酸、クエン酸、DL-乳酸、マロン酸、キナ酸、コハク酸、リンゴ酸、ギ酸、L-アラニンおよびアラニンアミド。エスクリンとp-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシドが加水分解された(-グルコシダーゼ活性と-ガラクトシダーゼ活性)。L-フコース、D-プシコース、L-ラムノース、ラフィノース、デキストリン、グリコーゲン、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、-メチルD-グルコシド、DL-グリセロールリン酸、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸、メタノール、2,3-ブタンジオール、メチルアミン塩酸塩、トリメチルアミン塩酸塩、ジメチルホルムアミド、Na₂S₂O₃、Tween 40、Tween 80、酢酸、-ヒドロキシ酪酸、-ヒドロキシ酪酸、-ヒドロキシ酪酸、-ケト酪酸、-ケト吉草酸、カプリン酸、アジピン酸、フェニル酢酸、メチルピルピン酸、グリシン、D-アラニン、L-アラニルグリシン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、L-オ

10

20

30

40

50

ルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、D-セリン、L-スレオニン、DL-カルニチン、 α -アミノ酪酸、イノシン、ウリジンおよびチミジンでは、成長が起こらなかった。デンプンは加水分解されなかった。ゼラチン加水分解は弱いか、起こらなかった。アルギニンジヒドロラーゼ活性とウレアーゼ活性は検出されなかった。インドールはトリプトファンから生成しなかった。

【0049】

代謝は偏性好気性である。チトクロームオキシダーゼ反応とカタラーゼ反応は陽性だった。硝酸塩は嫌氣的成長を支えず、亜硝酸塩に還元されなかった。グルコースは発酵されなかった。

脂肪酸プロフィール(C18:1が79.4%、C18:0が5.0%、C10:0が6.2%、2つの未知ピークが合わせて9.4%)は、プロテオバクテリアの α -サブグループに特有のものである。ポリ- β -ヒドロキシアルカノエートは検出されなかった。

Paracoccus MH1株の著しく際立った特徴はその強い橙色である。一定の成長培地で赤黄色コロニーを形成すると記載されている*P. thiocyanatus*を除くと[Katayama, Y., A. HiraishiおよびH. Kuraishi (1995)「チオシアネート資化性通性化学合成無機栄養生物の新種*Paracoccus thiocyanatus* (新種)と、*Thiobacillus versutus*の*Paracoccus versutus* (新組合せ)としての*Paracoccus*属への属の改訂を伴う帰属変更」*Microbiology* 141:1469-1477]、*Paracoccus*属の他の種はすべて無色である。

実施例 3

DNAのG+C含量

HPLC分析によって決定されたMH1株のDNAのG+C含量は66モル%だった。

実施例 4

MH1株の系統発生的関係

MH1株の16S rRNA遺伝子配列の約95%を、PCR増幅した16S rDNAの直接配列決定によって決定した。16S rRNA系統学のみに基づいて(下記表1の類似度値と図5の系統樹を参照されたい)、MH1株はプロテオバクテリアの α -亜門の*Rhodobacter*グループ内の*Paracoccus*属に最も類似することを決定できた。最も高い16S rRNA遺伝子類似度値はMH1株と*Paracoccus alcaliphilus* JCM 7364^T(96.3%)または*Paracoccus aminophilus* JCOM 7686^T(96.2%)の間に存在する。MH1株は*Paracoccus*属の他の種とは遠い関係しかなく(配列類似度は96.3~93.6%)、またこれはカロテノイドを産生し分泌するので、MH1株はここに初めて報告される新しい属の一員であるとみなしうる。

【0050】

表1は*Paracoccus marcusii*とそれに関連する*Paracoccus* sp.に関する16S rDNA遺伝子配列の類似度行列である。16S rRNA遺伝子類似度値は整列した配列を一組ずつ比較することによって計算した。

MH1株の表現型特性は改訂された*Paracoccus*属の記載の枠内に当てはまった[Katayama, Y., A. HiraishiおよびH. Kuraishi (1995)「チオシアネート資化性通性化学合成無機栄養生物の新種*Paracoccus thiocyanatus* (新種)と、*Thiobacillus versutus*の*Paracoccus versutus* (新組合せ)としての*Paracoccus*属への属の改訂を伴う帰属変更」*Microbiology* 141:1469-1477]。我々は*Paracoccus* MH1株を、イスラエルの遺伝学研究の先駆者である故Menashe Marcus教授に敬意を表して、*Paracoccus marcusii*と名付けることを提案する。

【表1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 ^T	-												
2. <i>Paracoccus alcaliphilus</i> JCM 7364 ^T	96.3	-											
3. <i>Paracoccus aminophilus</i> JCM 7686 ^T	96.2	96.4	-										
4. <i>Paracoccus aminovorans</i> JCM 7685 ^T	95.5	96.9	96.3	-									
5. <i>Paracoccus thiocyanatus</i> IAM 12816 ^T	95.4	96.8	97.1	96.8	-								
6. <i>Paracoccus solventivorans</i> DSM 6637 ^T	95.1	95.7	95.7	95.4	96.2	-							
7. <i>Paracoccus kocurii</i> JCM 7684 ^T	94.4	95.8	94.9	94.7	96.0	96.7	-						
8. <i>Paracoccus denitrificans</i> LMG 4218 ^T	93.3	95.8	96.3	96.0	96.8	95.8	95.5	-					
9. <i>Paracoccus versutus</i> IAM 12814 ^T	93.6	95.4	96.0	96.6	96.5	95.7	95.4	99.3	-				
10. <i>Rhodobacter sphaecroides</i> ATCC 17023 ^T	92.8	92.5	92.9	92.5	92.8	92.9	93.3	93.0	92.5	-			
11. <i>Rhodobacter capsulatus</i> ATCC 17015 ^T	92.5	91.7	92.8	93.2	92.5	92.0	92.2	93.0	93.4	95.6	-		
12. <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSM 1374 ^T	92.0	92.2	91.4	91.6	90.9	92.2	92.2	91.8	91.3	93.0	93.4	-	
13. <i>Roseobacter denitrificans</i> ATCC 33942 ^T	90.9	91.3	91.9	91.7	91.1	91.1	90.3	91.1	90.8	90.7	90.1	89.9	-

10

20

下記表2に *Paracoccus marcusii* MH1株と、以前に記載された *Paracoccus* 属の代表種との特性の比較を要約する。

【表2】

特徴	1	2	3	4	5	6	7	8	9
運動性	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
6%NaClでの成長	w	-	NR	NR	-	-	-	-	-
グリセロールの資化	+	+/-	-	+	w	w	+	+	-
グルコースの資化	+	+	-	+	-	-	-	-	-
マンニトールの資化	+	+	+	+	-	+	-	+	-
フルクトースの資化	+	+	+	+	-	+	-	+	-
NO ₃ ⁻ のNO ₂ ⁻ への還元	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ ⁻ のN ₂ への還元	-	+	+	+	+	-	-	-	+
キ酸での成長	+	+	w	+	+	-	-	-	-
メタノールでの成長	-	+/-	-	w	-	+	-	-	-
メチルアミンでの成長	-	+/-	NR	NR	+	+/-	+	+	-
トリメチルアミンでの成長	-	-	NR	NR	+	-	+	+	-
黄色色素	+	-	+	-	-	-	-	-	-
加チロイド [*] 産生	+	-	-*	-	-	-	-	-	-
DNAのG+Cモル%	66	68	66.5	67.68	71	64.66	63	67.68	68.670

30

40

1. *P. marcusii*、
2. *P. denitrificans*、
3. *P. thiocyanatus*、
4. *P. versutus*、
5. *P. kocurii*、
6. *P. alcaliphilus*、
7. *P. aminophilus*、

50

8. P. aminovorans、

9. P. solventivorans、w = 弱い反応、± = 不定、NR = 報告なし。P. thiocyanatusは黄色に着色しているの、これを東京大学分子細胞生物学研究所(113東京都文京区弥生)IAMカルチャーコレクション細菌セクションから入手し、カロテノイド産生について調べた。上記方法の項に挙げた方法のいずれを使ってもカロテノイドは検出できなかった。

【0051】

実施例5

Paracoccus marcusiiによるカロテノイド合成

次のカロテノイドを、上記方法の項に記述したように生育したParacoccus marcusii MH1株の細胞、培地および/または小胞から回収した。 10

- カロテン: $R_F = 0.98$ (TLC1)、 $R_F = 0.98$ (TLC2)、TLCとHPLCで - カロテン標品と分離不可能。Vis_{max} nm (426) 453および477 (アセトン); (426) 449および476 (ジエチルエーテル)、% III/II = 22。MS m/z 536 [M]⁺、444 [M-92]⁺、430 [M-106]⁺。

エチネノン: $R_F = 0.92$ (TLC1)、 $R_F = 0.94$ (TLC2)、TLCとHPLCでエチネノン標品と分離不可能。Vis_{max} nm 460 (アセトン); 457 (ジエチルエーテル)、% III/II = 0。MS m/z 550 [M]⁺、458 [M-92]⁺。 20

- クリプトキサンチン: $R_F = 0.84$ (TLC1)、 $R_F = 0.80$ (TLC2)、標品は入手不可能。Vis_{max} nm (426) 454および478 (アセトン); (423) 453および477 (ジエチルエーテル)、% III/II = 27。MSを行なうには量が不十分。

カンタキサンチン: $R_F = 0.71$ (TLC1)、 $R_F = 0.65$ (TLC2)、TLCとHPLCでカンタキサンチン標品と分離不可能。Vis_{max} nm 470 (アセトン)、% III/II = 0。MS m/z 564 [M]⁺、472 [M-92]⁺。

アドニルピン: $R_F = 0.65$ (TLC1)、 $R_F = 0.58$ (TLC2)、TLCとHPLCでアドニルピン標品と分離不可能。Vis_{max} nm 473 (アセトン); 465 (ジエチルエーテル)、% III/II = 0。MS m/z 580 [M]⁺、488 [M-92]⁺。 30

シス-アドニキサンチン: $R_F = 0.57$ (TLC1)、 $R_F = 0.51$ (TLC2)、標品は入手不可能。Vis_{max} nm 465 (アセトン)、% III/II = 0。MS m/z 582 [M]⁺、580 [M-2]⁺、564 [M-18]⁺、490 [M-92]⁺。

アドニキサンチン: $R_F = 0.59$ (TLC1)、 $R_F = 0.51$ (TLC2)、標品は入手不可能。Vis_{max} nm 465 (アセトン); 463 (ジエチルエーテル)、% III/II = 0。MS m/z 582 [M]⁺、580 [M-2]⁺、564 [M-18]⁺、509 [M-73]⁺、490 [M-92]⁺。

アスタキサンチン: $R_F = 0.55$ (TLC1)、 $R_F = 0.48$ (TLC2)、TLCとHPLCでアスタキサンチン標品と分離不可能。Vis_{max} nm 474 (アセトン)、NaBH₄還元後に(428) 451、478; 470 (ジエチルエーテル)、% III/II = 0。MS m/z 596 [M]⁺、578 [M-16]⁺、564 [M-32]⁺、490 [M-106]⁺。 40

ゼアキサンチン: $R_F = 0.43$ (TLC1)、 $R_F = 0.43$ (TLC2)、TLCとHPLCでゼアキサンチン標品と分離不可能。Vis_{max} nm (426) 453および477 (アセトン); (426) 449および476 (ジエチルエーテル)、% III/II = 45。MSを行なうには量が不十分。

【0052】

表3にP. marcusii細胞中の上記カロテノイドの総含有量と分布を示す。 50

【表 3】

カロテノイド	総カロテノイドに対する%
β -カロテン	5.2
β -クリプトキサンチン	0.8
エチネノン	7.0
ゼアキサンチン	1.9
3'-ヒドロキシエチネノン	14.6
ヒドロキシエチネノン	4.6
カンタキサンチン	9.5
アドニルピン	9.4
アドニキサンチン	33.2
シス-アドニキサンチン	2.3
アスタキサンチン	11.5
総カロテノイドmg/l培養	1.5
乾燥重量に対する総カロテノイドの%	0.2

10

実施例 6

Paracoccus marcusiiの透過型電子顕微鏡法

P. marcusii MH1株の細胞による成長培地へのカロテノイド排出という現象を、透過型電子顕微鏡を使って調べた。この機構に特定の細胞構造が関与する可能性と、

20

そのような構造が細胞のどの発育段階で現れるかを決定した。
 図6aは、OD₆₀₀が0.7の細胞密度の懸濁培養中の、対数増殖期中期の典型的細胞を示す。少数の親油性小球（小胞）が分裂細胞内にはっきりと見える。これら小球の数はその切片の位置により細胞ごとにより異なる。培養が加齢するにつれて小球の数は増加するが、細胞内にはより小さい小球も多数みえるようになる。これは、OD₆₀₀が1.3の細胞密度の対数増殖期後期の細胞を示す図6bで観察できる。大きい小球は細胞の周縁部に移動し、細胞周辺腔に入ることが観察される。次にそれらの小球は細胞壁を横切って細胞外に現れる小さい円状の小胞中に移動する。これら小球の細胞壁からの疱状突起は、最初はまだ細胞の表面に結合したままの暗く染まった（従って親油性の）小胞の形成をもたらす。この現象は図6cではっきりと識別できる。これ以降の段階では、図6dにみられるように、細胞の表面がこれらの小胞で覆われるようになり、完全に独立した物体を形成し、ついにはそれが成長培地中に放出される。

30

OD₆₀₀が1.58の細胞密度の増殖定常期の懸濁培養から採取した培地の分析により、これらの小胞が培地中に独立した物体として存在することがわかる（図7）。これら小胞のカロテノイド分析により、それらが主としてアドニキサンチンを含有することが明らかになった（下記表4）。これらの小胞は簡単なサイズ分離技術、例えば分画遠心法や濾過など（ただしこれらに限らない）によって、細菌細胞から容易に分離できる。分画遠心法では、細胞をまず成長培地から第一の速度で除去し、小胞はその後に、より高い速度での遠心分離（例えば超遠心）によって除去される。

【0053】

40

細胞培養の加齢中の細胞内でのカロテノイド蓄積は細菌細胞内に見られる暗く染まった親油性小球の出現と完全に相関する。さらに、液体成長培地中に放出された小胞の出現は、細胞外でのカロテノイドの出現と相関する。最後に、成長培地からの超遠心分離によって単離された精製小胞調製物には、主としてケトカロテノイドが認められる（表4参照）。

【表 4】

*P. marcusii*培養のカロテノイド組成

カロテノイド	総カロテノイドに対する%	
	細胞	培地
β -カロテン	5.2	—
β -クリプトキサンチン	0.8	—
エチネノン	7.0	—
ゼアキサンチン	1.9	—
3'-ヒドロキシエチネノン	14.6	10.9
ヒドロキシエチネノン	4.6	—
カンタキサンチン	9.5	—
アドニルピン	9.4	—
アドニキサンチン	33.2	78.1
シス-アドニキサンチン	2.3	3.9
アスタキサンチン	11.5	7.1
総カロテノイドmg/l培養	2.1	
細胞の総カロテノイドmg/l	1.5	
細胞の乾燥重量に対する総カロテノイドの%	0.2	
培地の総カロテノイドmg/l	0.6	

10

*P. marcusii*培養の培養中に観察される成長培地の変色の原因となるのは、これらカロテノイド含有小胞の排出である。さらに、分泌された(すなわち培地に関する)カロテノイドの実質上全てが小胞画分内にあることが定量的に確認された。

20

実施例7

Paracoccus marcusiiによって産生されるアスタキサンチンのキラリティ立体配置の決定

*Paracoccus marcusii*によって産生されるアスタキサンチンのキラリティ立体配置を、そのアスタキサンチンから誘導したジアステレオ異性カンファン酸エステルのHPLCによって決定した[Renstrom B, Borch G, Skulberg MおよびLiaaen-Jensen S (1981)「Haematococcus pluvialisから得られる(3S, 3'S)-アスタキサンチンの光学純度」Phytochem 20:2561-2565]。この分析により、*Paracoccus marcusii*は純粋な(3S, 3'S)アスタキサンチンを合成することが証明された。

30

このように本発明は、カロテノイド類、とりわけ(3S, 3'S)アスタキサンチンを分泌する新規細菌種(これはカロテノイド精製工程を簡便にする)を提供することにより、現在知られている構成の欠点にうまく対処するものである。

本発明を限られた数の態様について説明したが、数多くの変更、修正および他の応用を施しうることは理解されるだろう。

【配列表】

(2) 配列番号1の情報:

40

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1430塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号1:

CAGAACGAAC GCUGGGCGCA GGCUAACAC AUGCAAGUCG AGCGAGACCU 50
 UCGGGUCUAG CGCGGGACGG GUGAGUAACG CGUGGGAACG UGCCCUUCUC 100
 UACGGAAUAG CCCCGGGAAA CUGGGAGUAA UACCGUAUAC GCCCUUUGGG 150
 GGAAGAUUU AUCCGGAGAAG GAUCGGCCCG CGUUGGALUA GGUAGUUGGU 200
 GGGGUAUUGG CCCACCAAGC CGACGAUCCA UAGCUUGUUU GAGAGGAUGA 250
 UCAGCCACAC UGGGACUGAG ACACGGCCA GACUCCUACG GGAGGCAGCA 300
 GUGGGGAUUC UUAGACAAUG GGGGCAACC UGAUUCUAGCC AUGCCGCGUG 350
 AGUGAUGAAG GCCUJAGGGU UGUAAAGCUC UUUUAGUUGG GAAGAUAAUG 400
 ACGGUACCAG CAGAAGAAGC CCCGGCUAAC UCCGUGCCAG CAGCCGCGGU 450
 AAUACGGAGG GGGCUJAGCGU UGUUCGGAAU UACUGGGCGU AAAGCGCACG 500
 UAGGCGGACU GGAAGUCAG AGGUGAAUC CCAGGGCUCA ACCUUGGAAC 550
 UGCCUUUGAA ACUAUCAGUC UGGAGUUCGA GAGAGGUGAG UGGAAUUCGG 600
 AGUGUAGAGG UGAAAUUCGU AGAUUUCGG AGGAACACCA GUGGCGAAGG 650
 CGGCUACUCG GCUCGAUACU GACGCUAGG UGCGAAACG UGGGGAGCAA 700
 ACAGGALUAG AUACCCUGGU AGUCCACGCC GUAAACGAUG AAUGCCAGAC 750
 GUCGGCAAGC AUGCUUGUCG GUGUCACACC UAACGGALUA AGCAUCCGC 800
 CUGGGGAGUA CGGUCGCAAG AUUAAAACUC AAAGGAUUG ACGGGGGCCC 850
 GCACAAGCGG UGGAGCAUGU GGUUAAUUC GAAGCAACGC GCAGAACCUU 900
 ACCAACCCUU GACAUGGCAG GACCGCUGGA GAGAUUCAGC UUUUCGUAA 950
 GAGACCUGCA CACAGGUGCU GCAUGGCGU CGUCAGCUCG UGUUGGAGA 1000
 UGUUCGGUUA AGUCCGGCAA CGAGCGAAC CCACGUCCU AGUUGCCAGC 1050
 AUUCAGUUGG GCACUCUAGG GAAACUGCCG AUGAUUAGUC GGAGGAAGGU 1100
 GUGGAUGACG UCAAGUCCUC AUGGCCCUUA CGGGUUGGGC UACACACGUG 1150
 CUACAAUGGU GGUGACAGUG GGUUAAUCCC CAAAAGCCAU CUCAGUUCGG 1200
 AUUGUCCUCU GCAACUCGAG GGCAUGAAGU UGGAUUCGU AGUAAUCGGG 1250
 GAACAGCAUG CCGGGGUGAA UAGGUUCCG GGCUCUGUAC ACACCGCCG 1300
 UCACACCAUG GGAGUUGGUU CUACCGGACG ACGCUGCCU AACCUUGGG 1350
 GGGCAGGCGG CCACGGUAGG AUCAGCGACU GGGGUGAAGU CGUAACAAGG 1400
 UAGCCGUAGG GGAACCUGCG GCUGGAUCAC 1430

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 - カロテン生合成の一般 (general) 生化学経路を示す図である。この経路では全ての分子が全トランス配置で描かれている。図中、IPPはイソペンテニルピロリン酸、DMAPPはジメチルアリルピロリン酸、GPPはゲラニルピロリン酸、FPPはファルネシルピロリン酸、GGPPはゲラニルゲラニルピロリン酸、PPPPはプレフィトエンピロリン酸である。

【図2】 アスタキサンチンの生合成経路を示す図である。

【図3】 新種 *Paracoccus marcusii* MH1株によって産生されるいくつかのカロテノイドを示す図である。

【図4】 *Paracoccus marcusii* MH1株の位相差顕微鏡写真である。線分は10 μmに相当する。

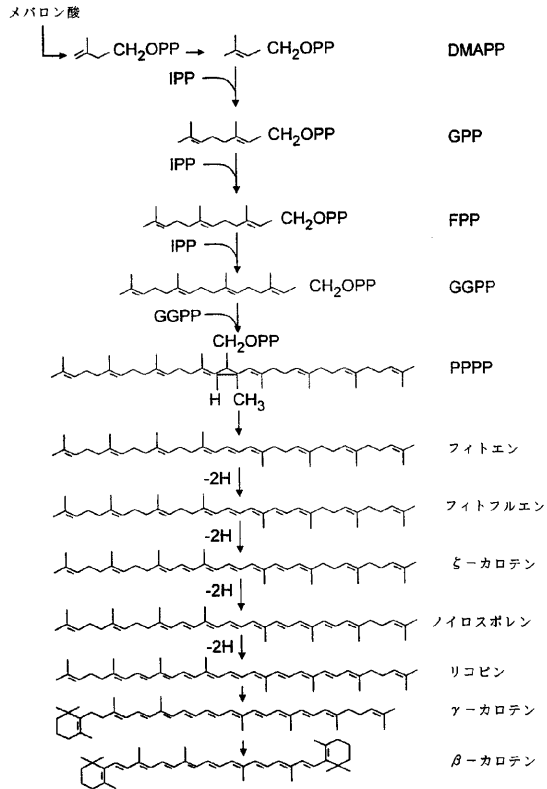
40

【図5】 *Paracoccus* 属の代表種とプロテオバクテリアの - 分岐内の関連種のなかでの *Paracoccus marcusii* MH1株の位置を示す樹状図である。目盛線は100ヌクレオチドあたり10ヌクレオチド置換を示す。

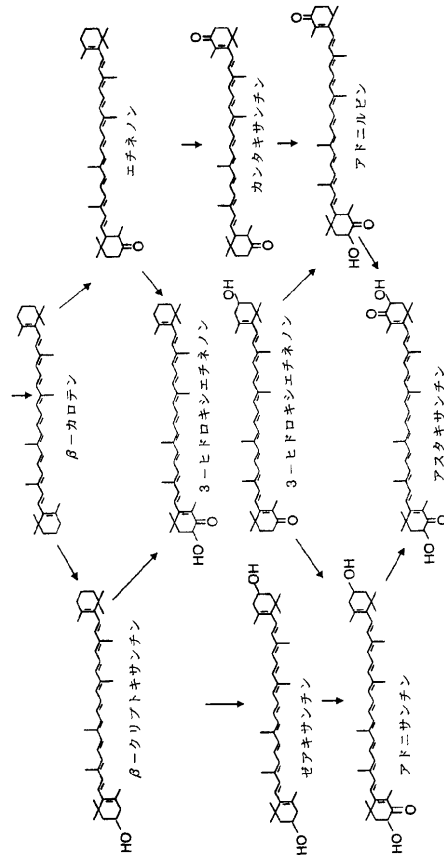
【図6】 a~dはそれぞれ対数増殖期中期、対数増殖期後期、増殖定常期初期、増殖定常期後期における *Paracoccus marcusii* MH1株の電子顕微鏡写真である(倍率×40,000)。

【図7】 *Paracoccus marcusii* MH1株によって分泌される単離された小胞の電子顕微鏡写真である(倍率×200,000)。

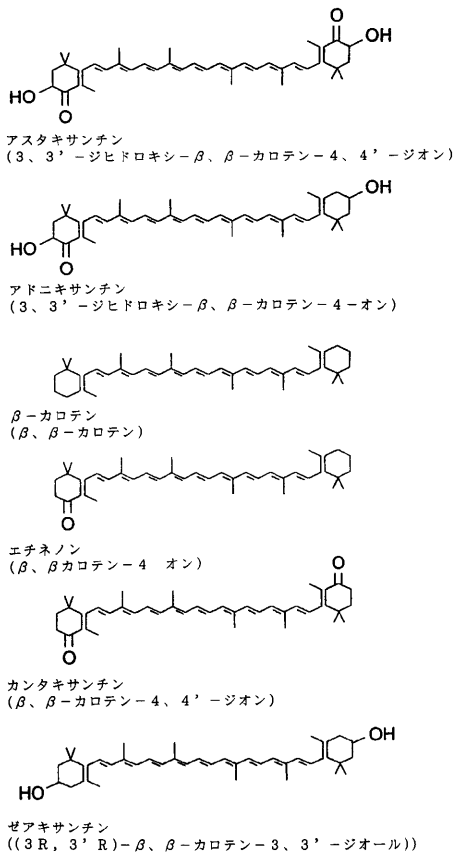
【 図 1 】



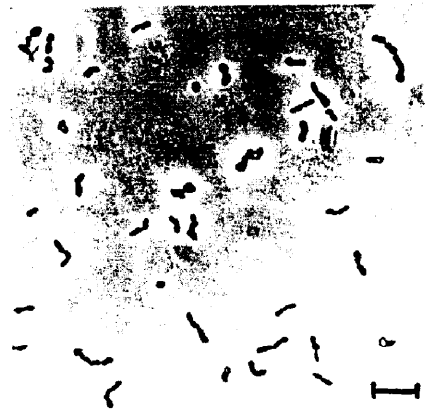
【 図 2 】



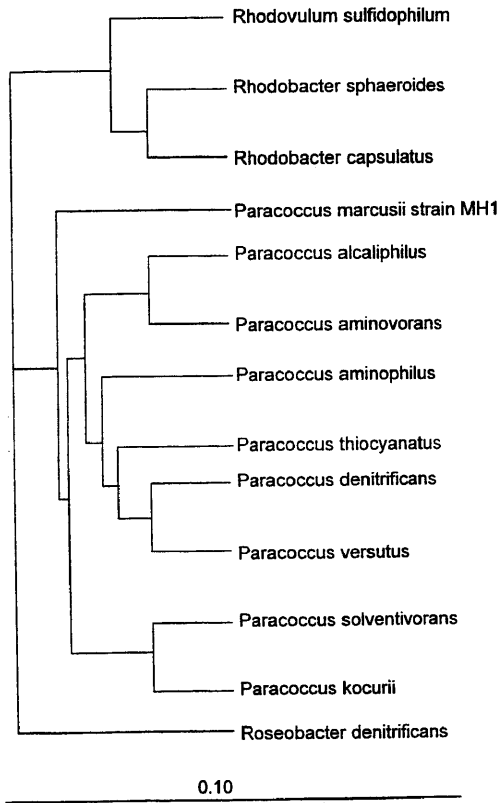
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



FIG. 6A



FIG. 6B

【 図 7 】

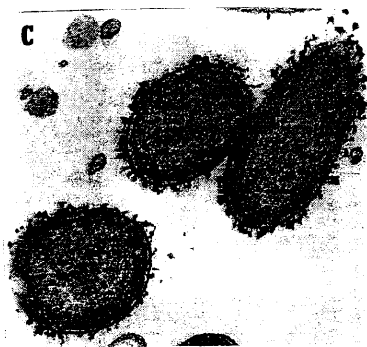


FIG. 6C

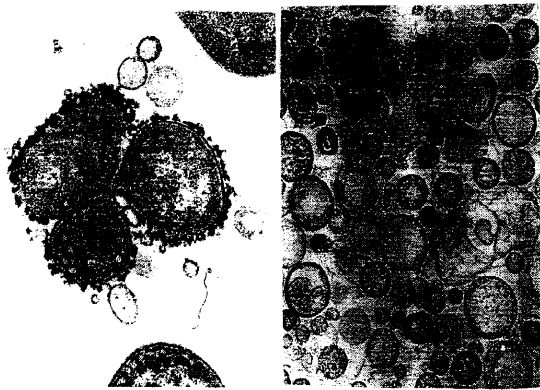


FIG. 6D



FIG. 7

フロントページの続き

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特開平07-079796(JP,A)
特開平07-242621(JP,A)
特開平08-089280(JP,A)
特開平09-023888(JP,A)
国際公開第98/018910(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 23/00
C12N 1/00-1/38
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
Science Direct