

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6586456号
(P6586456)

(45) 発行日 令和1年10月2日 (2019. 10. 2)

(24) 登録日 令和1年9月13日 (2019. 9. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/52 (2006. 01)

C 1 2 N 15/52 Z N A Z

C 1 2 N 15/53 (2006. 01)

C 1 2 N 15/53

C 1 2 N 15/63 (2006. 01)

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 P 7/24 (2006. 01)

C 1 2 P 7/24

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 10 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-514689 (P2017-514689)
 (86) (22) 出願日 平成28年5月13日 (2016. 5. 13)
 (65) 公表番号 特表2017-528146 (P2017-528146A)
 (43) 公表日 平成29年9月28日 (2017. 9. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2016/005085
 (87) 国際公開番号 W02016/182386
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)
 審査請求日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0067557
 (32) 優先日 平成27年5月14日 (2015. 5. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

前置審査

(73) 特許権者 515262971
 インテリジェント シンセティック バイ
 オロジー センター
 大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン
 ーグ テハクロー 2 9 1 4 0 1 ホ
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳
 (74) 代理人 100152489
 弁理士 中村 美樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シンナムアルデヒドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレプトマイセス・マリチムス (Streptomyces maritimus) 由来の p a l (phenylalanine ammonia lyase) 遺伝子、ストレプトマイセス・セリカラー (Streptomyces coelicolor) 由来の 4 c l (4-coumarate:CoA ligase) 遺伝子、及びシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) 由来の c c r (cinnamoyl Co-A reductase) 遺伝子を含む、シンナムアルデヒド生産用発現カセットであって、

前記 p a l 遺伝子は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし、

前記 4 c l 遺伝子は、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし、

前記 c c r 遺伝子は、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、発現カセット。

【請求項 2】

前記 p a l 遺伝子は、配列番号 1 で表される塩基配列を有する、請求項 1 に記載の発現カセット。

【請求項 3】

前記 4 c l 遺伝子は、配列番号 3 で表される塩基配列を有する、請求項 1 に記載の発現カセット。

【請求項 4】

前記 c c r 遺伝子は、配列番号 5 で表される塩基配列を有する、請求項 1 に記載の発現カセット。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の発現カセットを含む、シンナムアルデヒドの生産用ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベクターを含むシンナムアルデヒド生産用形質転換体。

【請求項 7】

前記形質転換体は、エシェリキア (Escherichia) 属微生物である、請求項 6 に記載のシンナムアルデヒド生産用形質転換体。

10

【請求項 8】

請求項 6 に記載の形質転換体を培養する段階を含む、シンナムアルデヒドの製造方法。

【請求項 9】

前記形質転換体は、フェニルアラニンを含む培地で培養される、請求項 8 に記載のシンナムアルデヒドの製造方法。

【請求項 10】

前記形質転換体は、カサミノ酸 (casamino acid) を含む培地で培養される、請求項 8 に記載のシンナムアルデヒドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、組換え微生物を用いたシンナムアルデヒドの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

シンナムアルデヒドは、桂皮の香りと味を表す主要な成分であり、桂皮精油の 90% を占めている。主に桂皮油またはカシア油に濃い亜硫酸水素ナトリウム溶液を添加した後、生成された添加物を分離し、エタノールで洗浄して、淡硫酸または炭酸ナトリウム水溶液で分解して水蒸気蒸留した後、真空蒸留して製造する。またはベンズアルデヒド、水、水酸化ナトリウムの混合物を攪拌しながらアセトアルデヒドを一滴ずつ添加して反応させてベンゼンで抽出し、減圧下で分別蒸留して製造する。

30

【0003】

シンナムアルデヒドは、多様な用途に使用される。例えば、特許文献 1 はシンナムアルデヒドの抗酸化活性について記載しており、特許文献 2 はシンナムアルデヒドの肥満治療効果について記載している。特許文献 3 は桂皮から分離したトランス - シンナムアルデヒドの B 型肝炎の治療効果について記載している。

【0004】

このように、多様な有用な効果が知られているシンナムアルデヒドを効果的に生産するための方法が研究される必要がある。特許文献 4 はベンズアルデヒド誘導体とビニルアセテートとを炭酸カリウムと水の存在下で、アセトニトリル溶媒中で加熱、還流させてシンナムアルデヒド誘導体を製造する方法について記載している。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】韓国公開特許第 2003 - 0033282 号公報

【特許文献 2】韓国登録特許第 10 - 0683113 号公報

【特許文献 3】韓国公開特許第 2013 - 0038000 号公報

【特許文献 4】韓国登録特許第 10 - 0624236 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Engels and Uhlmann、Angew Chem IntEd Engl., 37:73-127、1988

50

【非特許文献2】Sambrook et al., 1989、Infra

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

このような背景の下、本発明者らはシナムアルデヒドを効率的に生産する方法を開発すべく鋭意研究努力した結果、ストレプトマイセス・マリチムス由来の *p a l* 遺伝子、ストレプトマイセス・セリカラー由来の *4 c l* 遺伝子、及びシロイヌナズナ由来の *c c r* 遺伝子を含む組換え菌株を利用して、シナムアルデヒドを高収率で生産することができることを確認し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

10

【0008】

本発明の主な目的は、ストレプトマイセス・マリチムス (*Streptomyces maritimus*) 由来の *p a l* (*phenylalanine ammonia lyase*) 遺伝子、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来の *4 c l* (*4-coumarate:CoA ligase*) 遺伝子、及びシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *c c r* (*cinnamoyl Co-A reductase*) 遺伝子を含む、シナムアルデヒド生産用発現カセットを提供することにある。

【0009】

本発明の他の目的は、前記発現カセットを含む、シナムアルデヒド生産用ベクターを提供することにある。

本発明の他の目的は、前記ベクターを含むシナムアルデヒド生産用形質転換体を提供することにある。

20

【0010】

本発明の他の目的は、前記菌株を培養する段階を含む、シナムアルデヒドの製造方法を提供することにある。

【発明の効果】

【0011】

本発明によるシナムアルデヒド生産用発現カセット、それを含むベクター、それを含む形質転換体、及びそれを用いたシナムアルデヒドの製造方法を用いる場合、優れた効率でシナムアルデヒドを生成することができる。

【図面の簡単な説明】

30

【0012】

【図1】本発明の一実施例によるシナムアルデヒド生産システムに対する模式図を示したものである。

【図2】本発明の一実施例で使用された *P A L*、*4 C L*、*C C R* の発現のために構築したプラスミドを示したものである。

【図3】精製された *P A L*、*4 C L*、*C C R* タンパク質を *S D S - P A G E* で定量して表したものである。

【図4】最終的に生成されたケイ皮酸 (*cinnamate*, *CA*) の濃度を定量して示したものである。

【図5】シナムアルデヒド (*cinnamaldehyde*, *CAD*) の濃度を定量して示したものである。

40

【図6】複合培地1で形質転換体を培養した後、時間帯別に測定した光学密度 (*OD600*; *open circle*) とそれに伴うシナムアルデヒドの濃度 (*CAD con*; *closed circle*) を示したものである。

【図7】複合培地2で形質転換体を培養した後、時間帯別に測定した光学密度 (*OD600*; *open circle*) とそれに伴うシナムアルデヒドの濃度 (*CAD con*; *closed circle*) を示したものである。

【図8】制限培地1で形質転換体を培養した後、時間帯別に測定した光学密度 (*OD600*; *open circle*) とそれに伴うシナムアルデヒドの濃度 (*CAD con*; *closed circle*) を示したものである。

50

【図 9】制限培地 2 で形質転換体を培養した後、時間帯別に測定した光学密度 (OD600; open circle) とそれに伴うシンナムアルデヒドの濃度 (CAD con; closed circle) を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

前記目的を達成するための一つの様態として、本発明は、シンナムアルデヒド生合成遺伝子を含む、シンナムアルデヒド生産用発現カセット、それを含むベクター、それを含む形質転換体、またはそれを用いたシンナムアルデヒドの製造方法を提供する。

【0014】

本発明者らは、シンナムアルデヒド生合成遺伝子である *p a l* (phenylalanine ammonia lyase) 遺伝子、*4 c l* (4-coumarate:CoA ligase) 遺伝子、及び *c c r* (cinnamoyl Co-A reductase) 遺伝子を導入した微生物を製造した結果、前記の微生物から 1.98 mg/L の収率でシンナムアルデヒドを生成することを確認した (図 6 ~ 図 9)。

【0015】

また、ストレプトマイセス・マリチムス由来の *P A L*、ストレプトマイセス・セリカラー由来の *4 C L*、シロイヌナズナ由来の *C C R* の組み合わせが、他の微生物由来の遺伝子に比べて優れた活性を示すことを確認した (図 4 及び図 5)。

【0016】

以下、本発明におけるシンナムアルデヒド生産用発現カセットを具体的に説明する。

本明細書において、「シンナムアルデヒド生合成遺伝子」とは、*p a l* (phenylalanine ammonia lyase) 遺伝子、*4 c l* (4-coumarate:CoA ligase) 遺伝子、及び *c c r* (cinnamoyl Co-A reductase) 遺伝子を意味する。

【0017】

前記 *p a l* 遺伝子は、ストレプトマイセス・マリチムス (*Streptomyces maritimus*) 由来であり得る。本発明の一実施例では、ストレプトマイセス・マリチムス由来の *P A L* 酵素は、シロイヌナズナ *P A L* 酵素に比べて酵素活性が優れることを確認した (図 4)。

【0018】

非限定的な一例として、前記 *p a l* 遺伝子は、配列番号 1 または配列番号 19 で表される塩基配列を含むものであり得る。前記 *p a l* 遺伝子は、配列番号 1 または配列番号 19 で表される塩基配列と少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の配列相同性を有する配列で表されるものであり得る。前記配列の中、1 つ以上の塩基が置換、欠失、挿入またはこれらの組み合わせにより変異された配列も、それに含まれ得ることは自明である。

【0019】

非限定的な一例として、前記 *p a l* 遺伝子は、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を有する *P A L* タンパク質をコードするものであり得る。前記 *P A L* タンパク質は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (phenylalanine ammonia lyase) の活性を有する限り、配列番号 2 のアミノ酸配列の N - 末端または C - 末端に多様なアミノ酸配列が付加されたすべてのペプチドを含むことができる。それだけでなく、前記 *P A L* タンパク質は、標的化配列、タグ (tag)、標識された残基、半減期またはペプチドの安定性を増加させるための特定の目的で考案されたアミノ酸配列を配列番号 2 で表されるペプチドの N - 末端または C - 末端にさらに含まれるペプチドを意味することができる。また、前記 *P A L* タンパク質は、前記配列番号 2 のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が付加、置換、欠失などの方法で変異された変異体タンパク質を意味することができる。

【0020】

前記 *4 c l* 遺伝子は、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来であり得る。

非限定的な一例として、前記 *4 c l* 遺伝子は、配列番号 3 で表される塩基配列を含むものであり得る。前記 *4 c l* 遺伝子は、配列番号 3 で表される塩基配列と少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上

10

20

30

40

50

の配列相同性を有する配列で表されるものであり得る。前記配列の1つ以上の塩基が置換、欠失、挿入またはこれらの組み合わせにより変異された配列も、それに含まれ得ることは自明である。

【0021】

非限定的な一例として、前記4cl遺伝子は、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有する4CLタンパク質をコードするものであり得る。前記4CLタンパク質は、4-coumarate:CoA ligaseの活性を有する限り、配列番号4のアミノ酸配列のN-末端またはC-末端に多様なアミノ酸配列が付加されたすべてのペプチドを含むことができる。それだけでなく、前記4CLタンパク質は標的化配列、タグ(tag)、標識された残基、半減期またはペプチドの安定性を増加させるための特定の目的で考案されたアミノ酸配列を配列番号4で表されるペプチドのN-末端またはC-末端にさらに含まれるペプチドを意味することができる。また、前記4CLタンパク質は、前記配列番号4のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が付加、置換、欠失などの方法で変異された変異体タンパク質を意味することができる。

10

【0022】

前記ccr遺伝子は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来であり得る。

非限定的な一例として、前記ccr遺伝子は、配列番号5で表される塩基配列を含むものであり得る。前記ccr遺伝子は、配列番号5で表される塩基配列と少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列相同性を有する配列で表されるものであり得る。前記配列の1つ以上の塩基が置換、欠失、挿入またはこれらの組み合わせにより変異された配列も、それに含まれ得ることは自明である。

20

【0023】

非限定的な一例として、前記ccr遺伝子は、配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するCCRタンパク質をコードするものであり得る。前記CCRタンパク質はcinnamoyl Co-A reductaseの活性を有する限り、配列番号6のアミノ酸配列のN-末端またはC-末端に多様なアミノ酸配列が付加されたすべてのペプチドを含むことができる。それだけでなく、前記CCRタンパク質は標的化配列、タグ(tag)、標識された残基、半減期またはペプチドの安定性を増加させるための特定の目的で考案されたアミノ酸配列を配列番号6で表されるペプチドのN-末端またはC-末端にさらに含まれるペプチドを意味することができる。また、前記CCRタンパク質は、前記配列番号6のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が付加、置換、欠失などの方法で変異された変異体タンパク質を意味することができる。

30

【0024】

前記ポリヌクレオチドは、一つ以上の塩基が置換、欠失、挿入またはそれらの組み合わせにより変異することができる。ヌクレオチド配列を化学的に合成して製造する場合、当業界において広く公知となった合成法、例えば、非特許文献1に記述された方法を用いることができ、トリエステル、ホスファイト、ホスホラミダイト及びH-ホスフェート方法、PCR、及びその他のオートプライマー方法、固体支持体上のオリゴヌクレオチド合成法などにより製造することもできる。

40

【0025】

本発明の一実施例において、ストレプトマイセス・セリカラー由来の4CLとシロイヌナズナ由来のCCRの組み合わせを使用する場合は、シロイヌナズナ由来の4CLとシロイヌナズナ由来のCCRの組み合わせに比べて酵素活性が優れることを確認した(図5)。

【0026】

本明細書において配列に関連して使用された用語、「相同性」とは、与えられたアミノ酸配列または塩基配列と一致する程度を意味し、パーセンテージで表示することができる。本明細書において、与えられたアミノ酸配列または塩基配列と同一または類似の活性を有するその相同性配列が「%相同性」と示される。例えば、スコア(score)、同一性(i

50

identity) 及び類似度 (similarity) などのパラメータ (parameter) を計算する標準ソフトウェア、具体的には B L A S T 2 . 0 を用いたり、定義された厳格な条件の下でサザン混成化実験により配列を比較することにより確認することができ、定義される適切な混成化条件は、当該技術の範囲内であり (非特許文献 2) 、当業者によく知られている方法で決定することができる。

【 0 0 2 7 】

前記遺伝子は、形質転換体にコドン最適化されたものであり得る。前記コドンの最適化は、宿主での前記遺伝子の発現をより効率的にするために遺伝子のコドンを、前記宿主遺伝子で高い頻度で使用されるコドンで置換することを意味する。最適化のための方法は、当業界において形質転換体でのタンパク質発現を増加するために使用される方法であれば、限定なく使用することができる。

10

【 0 0 2 8 】

本明細書において、「発現カセット」とは、シンナムアルデヒド生合成遺伝子を含め、シンナムアルデヒドを発現させる単位カセットを意味する。また、本発明において発現カセットは、発現構造体と混用することができる。本発明による発現カセットは、本発明の目的上、菌株に導入され、シンナムアルデヒドを生成することができる。

【 0 0 2 9 】

他の態様として、本発明は、前記発現カセットを含む、シンナムアルデヒド生産用ベクターを提供する。

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

20

【 0 0 3 0 】

前記ベクターは、前記シンナムアルデヒド生合成遺伝子が作動可能に連結されて含まれたものであり得る。本発明において、「作動可能に連結された (operably linked) 」とは、一般的な機能を行うように核酸発現調節配列と、目的とするタンパク質または R N A をコードする核酸配列が機能的に連結 (functional linkage) されているものをいう。例えば、プロモーターとタンパク質または R N A をコードする核酸配列が作動可能に連結され、コーディング配列の発現に影響を与えることができる。組換えベクターとの作動的な連結は、当該技術分野においてよく知られている遺伝子組換え技術を利用して製造することができ、部位 - 特異的 D N A 切断及び連結は、当該技術分野において一般的に知られている酵素などを使用することができる。

30

【 0 0 3 1 】

本発明で使用される発現ベクターは、宿主細胞内で複製可能なものであれば特に限定されず、当業界において知られている任意のベクターを用いることができる。通常使用されるベクターの例としては、天然の状態であるか、組換え状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージを挙げることができる。例えば、ファージベクター、またはコスミドベクターとして p W E 1 5 、 M 1 3 、 M B L 3 、 M B L 4 、 I X I I 、 A S H I I 、 A P I I 、 t 1 0 、 t 1 1 、 C h a r o n 4 A 、及び C h a r o n 2 1 A などを使用することができ、プラスミドベクターとして p E T 系、p T r c 系、p B R 系、p U C 系、p B l u e s c r i p t I I 系、p G E M 系、p T Z 系、p C L 系、p M A L 系または p H T 系などを用いることができる。本発明で使用可能なベクターは、特に制限されるものではなく、公知となった発現ベクターを使用することができる。具体的には、p E T 2 2 b 、 p T r c 9 9 a 、 p D Z 、 p A C Y C 1 7 7 、 p A C Y C 1 8 4 、 p C L 、 p E C C G 1 1 7 、 p U C 1 9 、 p B R 3 2 2 、 p M W 1 1 8 、 p C C 1 B A

40

50

C、pMAL-p2xまたはpHT43ベクターなどを使用することができる。

【0032】

本発明のベクターは、相同組換えを起こして染色体に挿入されることができ、前記染色体に挿入するかどうかを確認するための選別マーカー(selection marker)をさらに含むことができる。

【0033】

適切な発現ベクターは、プロモーター、オペレーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、エンハンサーなどのような発現調節要素以外にも、膜標的化または分泌のための信号配列またはリーダー配列を含み、目的に応じて多様に製造することができる。開始コドン及び終止コドンは、一般に標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部とみなされ、遺伝子作製物が投与されたとき、個体で必ず作用を示さなければならず、コーディング配列とイン・フレーム(in frame)に含まれることができる。ベクターのプロモーターは、構成的または誘導性であり得る。また、発現ベクターは、ベクターを含有する宿主細胞を選択するための選択性マーカーを含み、複製可能な発現ベクターの場合、複製起源を含むことができる。ベクターは、自己複製したり、宿主DNAに組み込むことができる。

10

【0034】

また、前記発現ベクターは、シンナムアルデヒドの検出を容易にするために、任意にエンドペプチダーゼを使用して除去することができるタンパク質タグをさらに含むことができる。前記タグ(tag)とは、定量可能な活性または特性を示す分子を意味し、フルオレセインのような化学的蛍光物質(fluoracer)、蛍光タンパク質(GFP)または関連するタンパク質のようなポリペプチド蛍光物質を含む蛍光分子であることもでき、Mycタグ、フラグ(Flag)タグ、ヒスチジンタグ、ロイシンタグ、IgGタグ、ストレプトアビジンタグなどのエピトープタグであることもできる。特に、エピトープタグを使用する場合、好ましくは、6個以上のアミノ酸残基で構成され、より好ましくは8個~50個のアミノ酸残基で構成されたペプチドタグを使用することができる。

20

【0035】

ベクターを製造する方法は、特に制限されず、当該技術分野において通常使用される方法であれば、いずれのものでも使用することができる。

他の態様として、本発明は、前記ベクターを含むシンナムアルデヒド生産用形質転換体を提供する。

30

【0036】

本発明において、「生産」とは、シンナムアルデヒドを菌株内で作り出すだけでなく、シンナムアルデヒドを細胞外、例えば、培養液に排出することも含む概念である。

本明細書において、「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に導入して宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現させるようにすることを意味することができる。

【0037】

前記形質転換の方法は、当業界において知られている方法であれば、限定されずに使用することができるが、シンナムアルデヒドを生成することができる限り、特にそれに限定されないが、CaCl₂沈殿法、CaCl₂沈殿法にDMSO(dimethyl sulfoxide)という還元物質を使用することにより効率を高めたHannah方法、電気穿孔法(electroporation)、リン酸カルシウム沈殿法、原形質融合法、シリコンカーバイド繊維を用いた攪拌法、アグロバクテリア媒介された形質転換法、PEGを用いた形質転換法、デキストラン硫酸、リポフェクタミン及び乾燥/抑制媒介された形質転換方法などを用いることができる。

40

【0038】

形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内に発現しさえすれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、染色体以外に位置するかに関係なく、それらをいずれも含む。また、前記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNA及びRNAを含

50

む。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現されるものであれば、いかなる形態で導入されても関係ない。例えば、前記ポリヌクレオチドは、それ自体で発現されるが、必要なすべての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入することができる。

【0039】

前記形質転換体として使用することができる微生物は、エシェリキア属 (*Escherichia* sp.)、シゲラ属 (*Shigella* sp.)、シトロバクター属 (*Citrobacter* sp.)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp.)、エンテロバクター属 (*Enterobacter* sp.) エルシニア属 (*Yersinia* sp.)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp.)、エルウイニア属 (*Erwinia* sp.)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium* sp.)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus* sp.)、セレノモナス属 (*Selenomonas* sp.)、ビブリオ属 (*Vibrio* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、ストレプトマイシス属 (*Streptomyces* sp.)、アルカノバクテリウム属 (*Arcanobacterium* sp.)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes* sp.) などに属する微生物であり得るが、それに限定されない。具体的には、エシェリキア属微生物であることができる。

【0040】

他の態様として、本発明は、前記形質転換体を培養する段階を含む、シンナムアルデヒド製造方法を提供する。

本発明の具体的な一実施形態では、前記シンナムアルデヒド生産能を有する形質転換体を培養した後、その培養物に含まれたシンナムアルデヒド生産量を測定した結果、前記微生物から 1.98 mg/L の収率でシンナムアルデヒドを生成することができることを確認した (図6 ~ 図8)。

【0041】

本発明の用語「培養」とは、微生物を適当に人工的に調節した環境条件で生育させる方法を意味する。本発明において、前記形質転換体を培養する方法は、当業界において広く知られている方法を用いて行うことができる。具体的には、前記培養は、本発明のシンナムアルデヒドを発現させて生産することができる限り、特にそれに限定されないが、公知となった回分式培養方法、連続式培養方法、流加式培養方法などにより行うことができる。

【0042】

培養条件は、特にこれに限定されないが、塩基性化合物 (例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたはアンモニア) または酸性化合物 (例えば、リン酸または硫酸) を使用し、適正の pH (例えば、pH 5 ~ 9、好ましくは pH 6 ~ 8、最も好ましくは pH 6.8) を調節することができ、酸素または酸素 - 含有ガス混合物を培養物に導入させて好気性条件を維持することができ、培養温度は 20 ~ 45、好ましくは 25 ~ 40 を維持することができ、約 10 ~ 160 時間培養することが好ましい。

【0043】

前記培養のために使用される培地は、適切な炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを含有した通常の培地内で温度、pHなどを調節しながら、適切な方式で特定の菌株の要件を満たすことができる。

【0044】

使用される炭素供給源としては、糖及び炭水化物 (例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、モラセス、デンプン及びセルロース)、油脂及び脂肪 (例えば、大豆油、ひまわり油、ピーナッツ油及びココナッツ油)、脂肪酸 (例えば、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸)、アルコール (例えば、グリセロール及びエタノール) 及び有機酸 (例えば、酢酸) などを個別に使用したり、または混合して使用することができる。

【0045】

窒素供給源としては、窒素 - 含有有機化合物 (例えば、ペプトン、酵母抽出液、肉汁、麦芽抽出液、コーン浸漬液、大豆粕粉及びウレア)、または無機化合物 (例えば、硫酸ア

10

20

30

40

50

ンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム)などを個別に使用したり、または混合して使用することができる。

【0046】

リン供給源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、これに相応するナトリウム含有塩などを個別に使用したり、または混合して使用することができ；その他の金属塩（例えば、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄）、アミノ酸及びビタミンのような必須成長 - 促進物質を含むことができる。

【0047】

また、培養培地に適切な前駆体が使用されることができる。前記原料は、培養過程で培養物に適切な方式により回分式、流加式または連続式で添加されることができるが、特にそれに限定されない。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアのような基礎化合物またはリン酸または硫酸のような酸化合物を適切な方式で使用して培養物のpHを調節することができる。

【0048】

本明細書において、前記培地は培養液と同じ意味で使用することができる。

一例として、前記製造方法は、培養された形質転換体またはその培養物からシンナムアルデヒドを回収する段階をさらに含むことができる。

【0049】

本明細書において、「培養物」とは、微生物の培養結果として得られる物質であり、前記培地、培養された微生物、及び培養された微生物から分泌される物質を全て含むものであり得る。例えば、菌体を培養するために必要な栄養供給源、例えば、炭素源、窒素源など以外に、無機塩成分、アミノ酸、ビタミン、核酸及び/またはその他、一般に培養培地（または培養液）に含有される成分が含まれていることができる。また、例えば、菌体が生産・分泌した酵素などが含まれていることができる。

【0050】

培養により生産されたシンナムアルデヒドは、培地中に分泌されたり、細胞内に残留することができるため、前記培養物は、微生物の培養により生産されたシンナムアルデヒドを含むことができる。

【0051】

本発明の前記培養段階で生産されたシンナムアルデヒドを回収する方法は、培養方法、例えば、回分式、連続式または流加式培養方法などにより当該分野において公知となった適切な方法を用いて培養液からシンナムアルデヒドを収集することができる。具体的には、前記回収方法は、例えば、遠心分離、ろ過、抽出、噴霧、乾燥、蒸発、沈殿、結晶化、電気泳動、分別溶解（例えば、硫酸アンモニウム沈殿）、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、疎水性及びサイズ排除）などの方法を使用することができる。

【0052】

一例として、前記製造方法は、前記回収されたシンナムアルデヒドを精製する段階をさらに含むことができる。前記精製段階は、免疫親和性クロマトグラフィー、受容体親和性クロマトグラフィー、疎水性作用クロマトグラフィー、レクチン親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、逆相HPLCなどを含む従来のクロマトグラフィー方法により行うことができる。また、所望のタンパク質が特異的タグ、ラベルまたはキレート一部分を有する融合タンパク質であるため、特異的結合パートナーまたは製剤により認識して精製する方法がある。精製されたタンパク質は、所望のタンパク質部分に切断されたり、それ自体で残ることができる。融合タンパク質の切断により切断過程で付加的なアミノ酸を有する所望のタンパク質の形態が作られる。

【0053】

一例として、前記形質転換体は、フェニルアラニンを含む培地で培養されるものであり得る。前記形質転換体に含まれたp_{al}遺伝子は、フェニルアラニンを基質として使用するため、フェニルアラニンを含む培地で培養した場合、優れた効率でシンナムアルデヒド

10

20

30

40

50

を生成することができる。

【 0 0 5 4 】

一例として、前記形質転換体は、カサミノ酸 (casamino acid) を含む培地で培養されるものであり得る。本発明の一実施例において、シンナムアルデヒド生合成遺伝子を含む形質転換体をカサミノ酸を含む培地で培養した結果、最大生産収率が 1 . 9 8 m g / L と高く示されたのに対し、カサミノ酸を含まない培地で培養した結果、最大生産収率は 1 . 2 3 m g / L で示された。

【 0 0 5 5 】

以下、本発明を下記例により詳しく説明する。ただし、下記例は本発明を例示するためのものに過ぎず、下記例により本発明の範囲が制限されるものではない。

実施例 1 . 組換え遺伝子発現のための菌株及びプラスミド制作

まず、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) c D N A から下記表 1 に記載された配列の B H B 2 2 - F 及び B H B 2 2 - R、B H B 2 0 - F 及び B H B 2 0 - R、B H B 1 9 - F 及び B H B 1 9 - R を利用して重合酵素連鎖反応を通じて p a l (phenylalanine ammonia-lyase、配列番号 1 7)、4 c l (4-coumarate:CoA ligase、配列番号 1 8)、c c r (cinnamoyl-CoA reductase、配列番号 5) 遺伝子を得た。

【 0 0 5 6 】

また、コドン最適化されて合成したストレプトマイセス・マリチムス (*Streptomyces maritimus*) p a l 遺伝子から下記表 1 に記載された配列の B H B 3 1 - F 及び B H B 3 1 - R を使用し、重合酵素連鎖反応を通じて p a l 遺伝子 (配列番号 1 9) を得た。また、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 遺伝体 D N A (genomic DNA) から下記表 1 に記載された配列の B H B 2 1 - F 及び B H B 2 1 - R を用いて重合酵素連鎖反応を通じて 4 c l 遺伝子 (配列番号 3) を得た。

【 0 0 5 7 】

【表 1】

BHB 19-F	GCATCTAGAAACACAAACAAGGAAGGAAGATAAATGCACCACCACCA CCACCACCACCACATGCCAGTCGACGTAGCC	配列番号7
BHB 19-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAAGACCCGATCTTAATGCCATTTTC	配列番号8
BHB 20-F	GCATCTAGACCGAAATCAAAAGGAACACCAACGTATGCACCACCACC ACCACCACCACCACATGGCGCCACAAGAACAAG	配列番号9
BHB 20-R	ATGCGCGGCCGCTTATCACAATCCATTTGCTAGTTTTGCC	配列番号10
BHB 21-F	GCATCTAGACGAATACCTGGAGGACCTAAACAGTATGCACCACCACC ACCACCACCACCACATGTTCCGCAGCGAGTAC	配列番号11
BHB 21-R	ATGCGCGGCCGCTTATCATCGCGGCTCCCTGAGCT	配列番号12
BHB 22-F	GCATCTAGACACCTTAAGGAGGTCTATCTTTTCATATGCACCACCACC ACCACCACCACCACATGGAGATTAACGGGGCAC	配列番号13
BHB 22-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAACATATTGGAATGGGAGCTCC	配列番号14
BHB 31-F	GCATTCTAGACCCAACGAAGGGGGAACCACACAATATGCACCACCAC CACCACCACCACCACACCTTCGTTATTGAACTGGATATGAATGTTAC CC	配列番号15
BHB 31-R	ATGCGCGGCCGCTTATCAGTGTGCTGCCACGGCTG	配列番号16

【 0 0 5 8 】

それぞれの重合酵素連鎖反応産物を制限酵素 X b a I と H i n d I I I で切断し、下記表 2 及び図 2 に記載された各ベクターにライゲーション (ligation) した。

【 0 0 5 9 】

【表 2】

菌株	関連特性
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ λ ⁻ ilvG ⁻ rfb ⁻ 50rph ⁻ 1
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> W3110	F ⁻ λ ⁻ rph ⁻ 1 INV(rrnD, rrnE)
<i>E. coli</i> NST74	<i>E. coli</i> W3110 derivative (<i>aroF aroG tyrR pheA pheAo</i>)
プラスミド	関連特性
pET22b	Amp ^R , T7 promoter
pTrc99a	Amp ^R , <i>trc</i> promoter
pHB-I01	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> PAL
pHB-I02	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> 4CL
pHB-I03	pET22b derivative, His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> CCR
pHB-I04	pET22b derivative, His ₈ -tagS. <i>maritimus</i> PAL
pHB-I05	pET22b derivative, His ₈ -tagS. <i>coelicolor</i> 4CL
pHB-P01	pTrc99a derivative, FLAG-tag <i>S. maritimus</i> PAL, His ₈ -tagS. <i>coelicolor</i> 4CL, and His ₈ -tagA. <i>thaliana</i> CCR

10

【0060】

20

ライゲーションが完了した pHB-I01、pHB-I02、pHB-I03、pHB-I04、または pHB-I05 ベクターは、大腸菌菌株 MG1655 を経て最終的に BL21 (DE3) に形質転換させた。pHB-P01 ベクターは、大腸菌菌株 NST74 に形質転換させた。

【0061】

実施例 2 . PAL、4CL、CCR タンパク質の分離精製

大腸菌菌株 BL21 (DE3) 及び NST74 菌株を 2 % のグルコースと 100 μg / mL のアンピシリン (ampicillin) を含む LB (Luria-Bertani) 培地に接種した。これを 37 °C、200 rpm の条件で 12 時間培養した後、新しい LB 培地に 1 / 100 体積だけ移した。その後、同様な条件で OD₆₀₀ が 0.6 に到達するまで培養した。

30

【0062】

その後、BL21 (DE3) 菌株は、タンパク質の生産のために、25 °C、200 rpm の条件で 30 分間適応させた後、1 mM の IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、6 時間さらに培養した。一方、NST74 菌株は 37 °C、200 rpm の条件で 1 mM IPTG を添加した後、培養した。

【0063】

その後、前記培養液を 4 °C、6000 rpm の条件で 10 分間遠心分離して上澄液を除去した。これをバッファー (50 mM リン酸カリウム、300 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0) で再懸濁 (resuspension) し、超音波細胞破碎機を利用し、破碎して細胞懸濁液を得た。その後、前記細胞懸濁液を 4 °C、10000 rpm の条件で 10 分間遠心分離し、水溶性の上層液の部分を得た。

40

【0064】

その後、前記細胞懸濁液から IMAC (immobilized metal affinity chromatography) を利用して 8X ヒスチジンタグ (Histidine tag) を有する PAL、4CL、CCR タンパク質を精製した。

【0065】

また、前記水溶性の上層液の部分を 0.45 μm でフィルタした後、結合バッファー (binding buffer: 50 mM リン酸カリウム、300 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0) で前処理された Talon (R) 金属親和樹脂に加えた。その後、前記樹脂を、10 mL の洗浄バッファー (washing buffer: 50 mM リン酸カリウム、300 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0) で洗浄し、水溶性の上層液の部分を得た。

50

ウム、15 mM イミダゾール、pH 7.0) で洗浄した後、1 mM の溶出バッファ (elution buffer: 50 mM リン酸カリウム、300 mM 塩化ナトリウム、150 mM イミダゾール、pH 7.0) を用いて最終的にタンパク質を精製した。

【0066】

実験例1. PAL、4CL、CCR タンパク質の定量

前記精製されたタンパク質を12% (w/v) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を用いたデンシトメトリー (densitometry) 方法とBSA (bovine serum albumin) を用いた総タンパク質定量法を通じて定量し、図3に示した。

【0067】

図3において、レーンMはタンパク質のサイズを示し、レーン1~3はシロイヌナズナPAL酵素の全体(total)部分、水溶性(soluble)部分、精製後の溶出(elution)部分であり、レーン4~6はシロイヌナズナ4CL酵素の全体部分、水溶性部分、精製した後の溶出部分、レーン7~9はシロイヌナズナCCR酵素の全体部分、水溶性部分、精製した後の溶出部分、レーン10~12はストレプトマイセス・マリチムSPAL酵素の全体部分、水溶性部分、精製した後の溶出部分、そしてレーン13~15はストレプトマイセス・セリカラー4CL酵素の全体部分、水溶性部分、精製した後の溶出部分を示したものである。

【0068】

各タンパク質のサイズは、シロイヌナズナPALは78 kDa (solid arrow)、シロイヌナズナ4CLは61 kDa (dashed arrow)、シロイヌナズナCCRは37 kDa (closed triangle)、ストレプトマイセス・マリチムSPALは56 kDa (open triangle)、ストレプトマイセス・セリカラー4CLは55 kDa (open triangle) で示され、PAL、4CL、CCRタンパク質がそれぞれよく生成されたことを確認した。

【0069】

実験例2. 酵素の活性分析

前記実施例2で精製したPAL、4CL、CCRタンパク質の活性は、細胞外の反応を通じて分析した。

【0070】

まず、PALの活性分析のために100 mM Tris-HCl、0.2 mM フェニルアラニン、精製したPAL酵素200 µg/mLを反応させた。また、4CL及びCCRの活性分析のために、400 mM Tris-HCl、5 mM ATP、5 mM の塩化マグネシウム (magnesium chloride)、0.3 mM のコエンザイムA (Coenzyme A)、0.5 mM のトランス-ケイ皮酸 (trans-cinnamate) 及び精製した4CL及びCCR酵素をそれぞれ50 µg/mLずつ反応させた。

【0071】

前記反応を、30℃で1時間行った後、PAL酵素により生成されたケイ皮酸、そして4CLとCCR酵素により生成されたシンナムアルデヒド (cinnamaldehyde) を逆相高性能液体クロマトグラフィー (reverse-phase high-performance liquid chromatography、reverse-phase HPLC) を通じて分析した。具体的には、ZORBAX Eclipse AAA カラム (150 X 4.6 mm; 3.5 µm; Agilent, CA, USA) で、移動相A (mobile phase A) は0.1% トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)、移動相B (mobile phase B) はアセトニトリル (acetonitrile) を使用した。アセトニトリル (acetonitrile) の割合は、最初の1分間は10%、それ以降の0.9分間は70%に段階的に変更した。カラムの温度は40℃、流速は1 mL/minと固定した。

【0072】

標準溶液 (standard solution; 1, 10, 50, 100, 200 mg/L ケイ皮酸及び0.41, 4.1, 41, 82, 136.7 mg/L シンナムアルデヒド) を使用して標準曲線 (standard curve) を作成し、これを利用して最終的に生成されたケイ皮酸 (cinnamate、図4にCAで表記) 及びシンナムアルデヒド (cinnamaldehyde、図5にCA

10

20

30

40

50

Dと表記)を定量した。

【0073】

その結果、図4で示されるように、シロイヌナズナ由来のPALに比べてストレプトマイセス・マリチムス(*Streptomyces maritimus*)由来のPALの活性が優れることが示された。また、図5で示されるように、ストレプトマイセス・マリチムス由来の4CLとシロイヌナズナ由来のCCRとの組み合わせを使用する場合は、シロイヌナズナ由来の4CLとシロイヌナズナ由来のCCRとの組み合わせに比べて酵素活性が優れることが示された。

【0074】

実験例3.細胞高濃度培養(High-cell density cultivation)

10

まず、R/2 semi-defined培地(6.75 g/Lリン酸二水素カリウム、2 g/Lリン酸二アンモニウム、0.85 g/Lクエン酸、0.7 g/L硫酸マグネシウム七水和物、5 mL/L微量金属溶液(TMS;10 g/L硫酸鉄七水和物、2.2 g/L硫酸亜鉛七水和物、2 g/L塩化カルシウム二水和物、1 g/L硫酸銅五水和物、0.58 g/L硫酸マンガン五水和物、0.1 g/Lセモリブデン酸アンモニウム四水和物、0.02 g/L四ホウ酸ナトリウム十水和物、pH 6.8)に適應された、PHB-P01を含む大腸菌菌株NST74を200 mLの量で37℃、200 rpmで12時間培養した。

【0075】

その後、同一な培地1.8 Lに接種し、合計2 Lの量で5 Lサイズのバイオリアクターで高濃度培養した。pHが6.77より低くなる場合には50%(v/v)のアンモニア(ammonia)を、6.86より高くなる場合には、餌培地(feeding solution)を供給した。餌培地には、複合培地1(complex feeding solution 1;500 g/Lグルコース、75 g/L酵母エキス、20 g/L硫酸マグネシウム七水和物)、複合培地2(complex feeding solution 2;500 g/Lグルコース、100 g/Lカサミノ酸(casamino acid)、20 g/L硫酸マグネシウム七水和物)、制限培地1(defined feeding solution;700 g/Lグルコース、20 g/L硫酸マグネシウム七水和物)、または制限培地2(defined feeding solution;500 g/Lグルコース、20 g/L硫酸マグネシウム七水和物、0.81 g/Lフェニルアラニン)を使用した。

20

【0076】

温度は37℃に維持させ、溶存酸素(DO)は、攪拌速度(agitation rate)を1000 rpmまで上昇させた後、酸素を供給して40%に維持させた。光学密度(optical density、OD₆₀₀)が6.0に達すると、タンパク質(酵素)を生成させるためにIPTG 1 mMを供給した。泡抑制剤は、滅菌後に手動で供給した。

30

【0077】

培養した大腸菌菌株は、時間帯別に光学密度(OD₆₀₀)が4になるように別々に集めてタンパク質分析に用いた。培養液の上澄液は0.22 µmでフィルター(filter)して逆相高性能液体クロマトグラフィー(reverse-phase HPLC)分析を通じてシンナムアルデヒドの定量に用いた。

【0078】

図6は、前記餌培地として複合培地1を使用した後、時間帯別に測定した光学密度(OD₆₀₀;open circle)とそれに伴うシンナムアルデヒドの濃度(CAD con;closed circle)を示す。最大生産収率は1.23 mg/Lであった。

40

【0079】

図7は、前記餌培地として複合培地2を使用した後、時間帯別に測定した光学密度(OD₆₀₀;open circle)とそれに伴うシンナムアルデヒドの濃度(CAD con;closed circle)を示す。最大生産収率は1.98 mg/Lであった。

【0080】

図8は、前記餌培地として制限培地1を使用した後、時間帯別に測定した光学密度(OD₆₀₀;open circle)とそれに伴うシンナムアルデヒドの濃度(CAD con;closed circle)を

50

示す。最大生産収率は 0.71 mg/L であった。

【0081】

図9は、前記餌培地として制限培地2を使用した後、時間帯別に測定した光学密度(OD 600; open circle)とそれに伴うシンナムアルデヒドの濃度(CAD con; closed circle)を示す。最大生産収率は 1.05 mg/L であった。

【0082】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更せずに、他の具体的な形態で実施されることがあることを理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

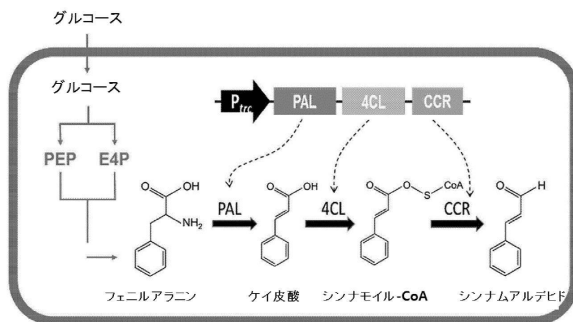
10

【産業上の利用可能性】

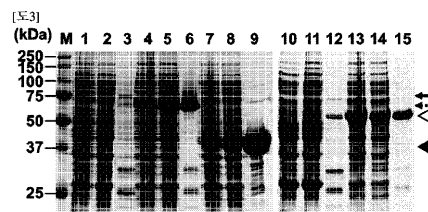
【0083】

したがって、本発明は、シンナムアルデヒド生産用発現カセット、それを含むシンナムアルデヒド生産用ベクター、それを含むシンナムアルデヒド生産用形質転換体、及びそれを用いたシンナムアルデヒドの製造方法を提供することができる。

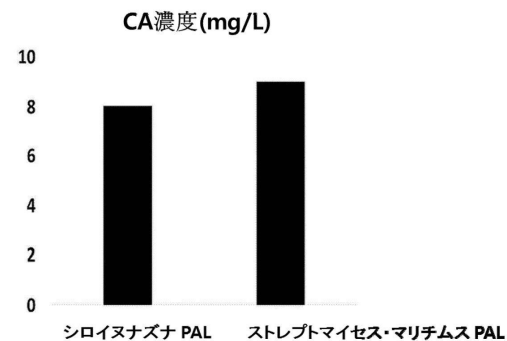
【図1】



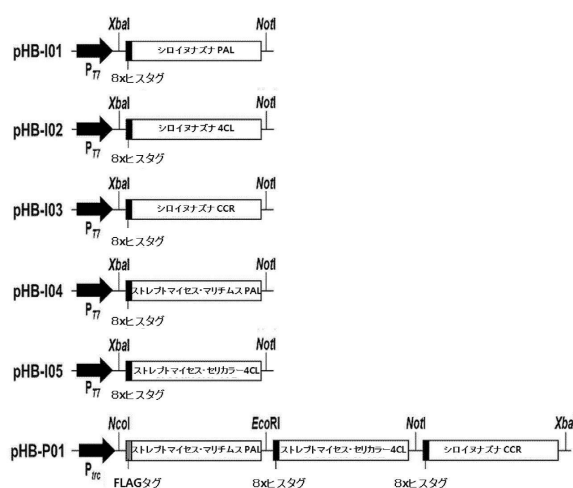
【図3】



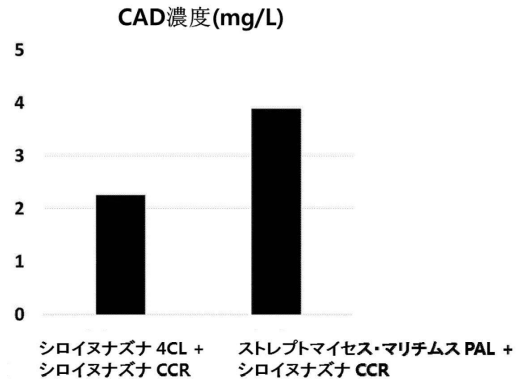
【図4】



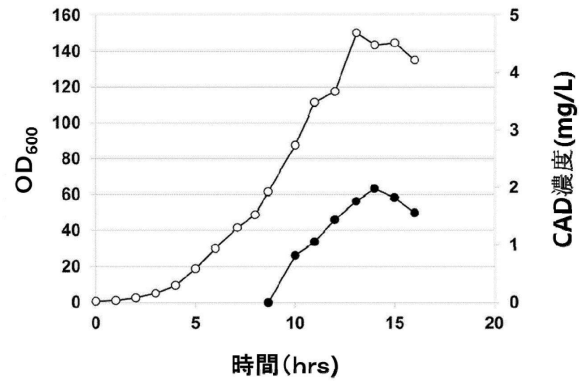
【図2】



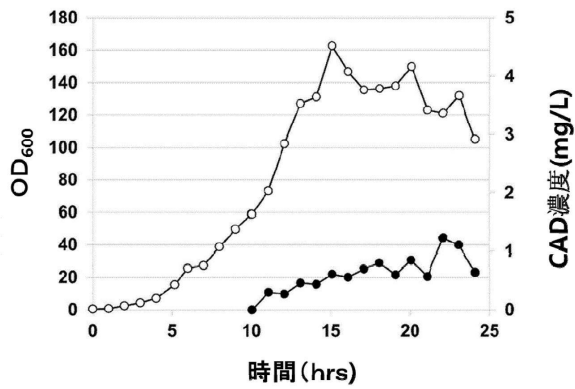
【図 5】



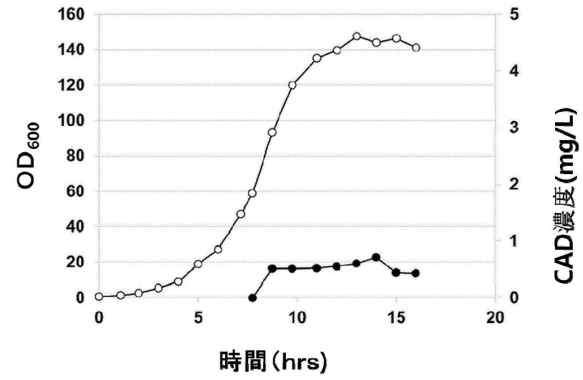
【図 7】



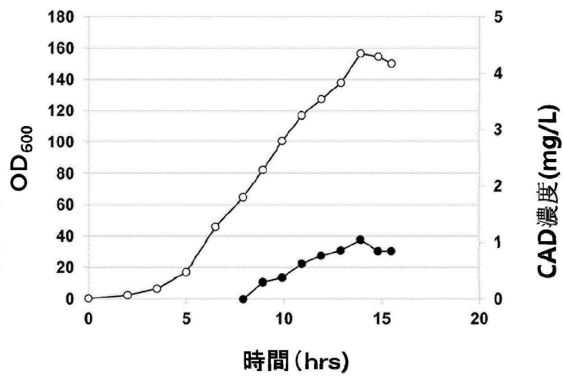
【図 6】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0006586456000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	14/36 (2006.01)	C 0 7 K 14/36
C 0 7 K	14/415 (2006.01)	C 0 7 K 14/415

(72)発明者 チョン、ギ ジュン
大韓民国 3 4 1 2 1 テジョン ユソン - グ ムンジ - ロ 1 4 1 - 3 0 4

(72)発明者 キム、ソン チャン
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - ロ 2 9 1

(72)発明者 パン、ヒョン ベ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - ロ 2 9 1

(72)発明者 イ、ユン ヒョク
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - ロ 2 9 1

(72)発明者 チョン、ソク チェ
大韓民国 3 4 1 4 1 テジョン ユソン - グ テハク - ロ 2 9 1

審査官 上村 直子

(56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 1 2 9 5 (J P , A)
特開 2 0 1 1 - 2 2 3 9 8 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 1 0 2 3 6 8 (W O , A 1)
特開平 0 4 - 2 1 1 3 6 9 (J P , A)
Microbial Cell Factories , 2 0 1 2 年 , 11:49 , p.1-10
Journal of Bacteriology , 2 0 0 3 年 , Vol.185, No.1 , p.20-27
Phytochemistry , 2 0 0 1 年 , Vol.57 , p.1187-1195

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 P 7 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
W P I D S / W P I X (S T N)