

(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
2017年3月30日(30.03.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/051928 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/078322
- (22) 国際出願日: 2016年9月26日(26.09.2016)
- (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 2015-188597 2015年9月25日(25.09.2015) JP
特願 2016-110490 2016年6月1日(01.06.2016) JP
特願 2016-110491 2016年6月1日(01.06.2016) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)
[JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 星野 康(HOSHINO, Yasushi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 松平 晶子(MAT-SUDAIRA, Akiko); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 守屋 美加(MORIYA, Mika); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 新田 暢久(NITTA, Nobuhisa); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 西尾 陽介(NISHIO, Yosuke); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許事務所 (SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が関3丁目8番1号 虎の門三井ビルディング Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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))

(54) Title: LINALOOL PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: リナロールの製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an efficient production method for linalool. The present invention provides a linalool production method that includes generating linalool by culturing, in a culture medium, a microorganism that expresses linalool synthase.

(57) 要約: 本発明は、効率的なリナロールの製造方法を提供することを目的とする。本発明は、リナロールシンターゼを発現する微生物を培養培地中で培養してリナロールを生成することを含む、リナロールの製造方法を提供する。



WO 2017/051928 A1

明 細 書

発明の名称： リナロールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、リナロールの製造方法などに関する。

背景技術

[0002] 芳香物質として知られるリナロールは、ラベンダーやオレンジをはじめ、様々な植物の精油中に含まれるモノテルペンアルコールの一種である。リナロールは、香水、化粧品、シャンプーや石鹸といった香粧品に使われる他に、食品や飲料へのフレーバー付加のための添加物としても利用されている。また、リナロールは、他のモノテルペン系香料の原料になるほか、ビタミンAやEの中間体としても重要な化合物である。リナロールにはエナンチオマーが存在し、 $(3R) - (-) - \text{linalool}$ ($(3R) - 3, 7$ -ジメチルオクター-1, 6-ジエン-3-オール、R-リナロール)、及び $(3S) - (+) - \text{linalool}$ ($(3S) - 3, 7$ -ジメチルオクター-1, 6-ジエン-3-オール、S-リナロール) はそれぞれリカレオール、コリアンドロールと呼ばれている。リカレオールとコリアンドロールは異なる香りを呈することが知られており、リカレオールはウッディーなラベンダー様香気を、コリアンドロールはプチグレンに近い甘い柑橘系の香気を呈するとされている。2つのエナンチオマーは香気の性質に加えて匂いの閾値も異なり、リカレオールはコリアンドロールの9倍程度低い閾値を示すとされる（例えば、非特許文献1を参照）。リナロールは最もその機能の研究が進んでいる香気成分の一つであり、鎮静作用、抗炎症作用、抗酸化作用など、比較的多くの生物活性を有することが明らかとなってきた。近年、健康志向の高まりから機能性の植物由来素材が添加された食品及び飲料のニーズが高まってきており、リナロールを添加することでリナロールが有する機能を訴求した商品の開発も行われている。今後もこのような食品や飲料のニーズが高まると予想され、それに伴いリナロールの需要も高まることが考えられ

ることから、効率的にリナロールを生産できる製法の確立が望まれている。

[0003] リナロールはリナロールシンターゼによって、モノテルペンの共通前駆体であるゲラニルニリン酸（GPP）より合成される。GPPはイソペンテニルニリン酸（IPP）、及びその異性体であるジメチルアリルニリン酸（DMAPP）の縮合によって生成する。IPPやDMAPPの生合成経路として、メバロン酸経路、及び非メバロン酸経路（MEP経路）の存在が知られている。メバロン酸経路は植物、動物、酵母などの真核生物や一部の放線菌や古細菌に存在している。一方、MEP経路はバクテリアや植物のプラスチドに存在している。従来、リナロールをはじめとした植物の精油成分は様々な抽出法によって植物から抽出することで製造されている。抽出法として例えば特許文献1には水蒸気蒸留法が、特許文献2には減圧蒸留法が、それぞれ記載されている。また、特許文献3には植物材料と溶媒の混合物を超高温処理することで植物成分を抽出する方法の記載がある。一方で、化学合成による製法も確立されており、例えば、非特許文献2には α -ピネンを原料に触媒を利用した化学合成によるリナロールの製造法が記載されている。さらに近年では遺伝子組換え技術を用いて酵母又は大腸菌でのリナロール生産が報告されている（例えば、特許文献4、及び非特許文献3～6を参照）。しかしながら、遺伝子組換え酵母によるリナロール生産量は非常に微量なレベルに止まっており、必ずしも効率的な生産方法とはいえない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2005-298580号公報

特許文献2：特開2006-291007号公報

特許文献3：特表2011-506713号公報

特許文献4：中国特許出願公開第102071155号明細書

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ana Clara Aprotosoaie, Monica Hancianu, Irina-Iuliana Costache

Anca Miron, Flavour and Fragrance Journal, 2014, 29, 193–219.

非特許文献2: V. A. Semikolenov, I. I. Ilyna, and I. L. Simakova, Applied Catalysis A, General, 2001, 211: 91–107.

非特許文献3: Sun MX, Liu JD, Du GC, Zhou J, and Chen J., Chin J Biotech, 2013, 29 (6): 751–759.

非特許文献4: Herrero O, Ramon D, and Orejas M, , Metab Eng, 2008, 10, 78–86.

非特許文献5: Rico J, Pardo E, and Orejas M, Appl Environ Microbiol, 2010, 76, 6449–6454.

非特許文献6: Ratana Thanasomboon, Dujduan Waraho, Supapon Cheevadhanarak, and Asawin Meechaia, Procedia Computer Science 11 (2012) 88–95.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、効率的なリナロールの製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、植物由来の、又は放線菌由来のリナロールシンターゼを発現する細菌を培養培地で培養することにより、リナロールを効率的に生産することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1] 以下の式で表されるモチーフ：



(式中、Dはアスパラギン酸を示し、Fはフェニルアラニンを示し、Yはチロシンを示し、Gはグリシンを示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸を示し、[F Y]はF又はYを示し、[D Y]はD又はYを示す。)

を少なくとも1つ有すること、及び
植物又は微生物由来であること
の少なくともいずれかを満たすリナロールシンターゼを発現する細菌を培養培地中で培養してリナロールを生成することを含む、リナロールの製造方法。

〔2〕式中、

X_1 は、イソロイシン(I)、バリン(V)、メチオニン(M)又はフェニルアラニン(F)を表すこと

X_2 は、バリン(V)、イソロイシン(I)、アラニン(A)又はトレオニン(T)を表すこと、及び

X_3 は、チロシン(Y)、システイン(C)、ヒスチジン(H)、グルタミン酸(E)又はフェニルアラニン(F)を表すこと

のうちいずれかを満たす、〔1〕記載の方法。

〔3〕前記リナロールシンターゼが、アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、シロイヌナズナ属、ミカン属、リンゴ属、シソ属、ブドウ属、ラベンデュラ属、メンタ属、メボウキ属、又はサンジソウ属に属する植物、若しくは放線菌由来である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔4〕放線菌は、ストレプトマイセス属に属する細菌である、〔3〕記載の方法。

〔5〕前記リナロールシンターゼは、アクチニジア・アルグータ、コリアンドラム・サティバム、アルテミシア・アナア、バクハウシア・シトリオドラ、アラビドプシス・タリアナ、シトラス・ウンシュウ、マルス・ドメスティカ、ペリラ・フルテセンス・バー・クリスパ、ビティス・ビニフェラ、ラベンデュラ・アングスティフォリア、メンタ・シトラータ、オシマム・バシリ

カム、クラルキア・ブリュワリ、又はストレプトマイセス・クラブリゲルスに由来する、〔1〕～〔4〕のいずれか1項記載の方法。

〔6〕前記細菌は、前記リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、〔1〕～〔5〕のいずれか1項記載の方法。

〔7〕前記ポリヌクレオチドは、以下の（a 1）～（c 2 3）からなる群より選ばれる1又は2以上のポリヌクレオチドである、〔6〕記載の方法：

（a 1）（i 1）配列番号2で表される塩基配列、（i i 1）配列番号2で表される塩基配列中の7 9～1 7 2 5番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは（i i i 1）配列番号3で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（b 1）前記（i 1）、（i i 1）もしくは（i i i 1）の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（c 1）前記（i 1）、（i i 1）もしくは（i i i 1）の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（a 2）（i 2）配列番号5で表される塩基配列、（i i 2）配列番号5で表される塩基配列中の1 1 5～1 7 7 3番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは（i i i 2）配列番号6で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（b 2）前記（i 2）、（i i 2）もしくは（i i i 2）の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（c 2）前記（i 2）、（i i 2）もしくは（i i i 2）の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコード

するポリヌクレオチド；

(a 3) (i 3) 配列番号 62 で表される塩基配列、もしくは (i i 3) 配列番号 63 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 4) (i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列、(i i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列中の 85～1704 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 4) 配列番号 71 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 5) (i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列、(i i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列中の 169～1785 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 5) 配列番号 74 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 6) (i 6) 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列、もしくは (i i 6) 配列番号 102 (M14) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 7) (i 7) 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列、もしくは (i i 7) 配列番号 104 (M16) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 8) (i 8) 配列番号 91 (M3) で表される塩基配列、もしくは (i i 8) 配列番号 106 (M18) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と 90%以上の同一性

を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 9) (i 9) 配列番号 92 (M4) で表される塩基配列、もしくは (i i 9) 配列番号 108 (M20) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 10) (i 10) 配列番号 93 (M5) で表される塩基配列もしくは (i i 10) 配列番号 110 (M22) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 10) 前記 (i 10) もしくは (i i 10) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 10) 前記 (i 10) もしくは (i i 10) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 11) (i 11) 配列番号 94 (M6) で表される塩基配列、もしくは (i i 11) 配列番号 112 (M24) で表される塩基配列を含むポリヌ

レオチド；

(b 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 2) (i 1 2) 配列番号 95 (M7) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 2) 配列番号 114 (M26) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 3) (i 1 3) 配列番号 96 (M8) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 3) 配列番号 116 (M28) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 4) (i 1 4) 配列番号 9 7 (M 9) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 4) 配列番号 1 1 8 (M 3 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 5) (i 1 5) 配列番号 9 8 (M 1 0) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 5) 配列番号 1 2 0 (M 3 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 6) (i 1 6) 配列番号 9 9 (M 1 1) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 6) 配列番号 1 2 2 (M 3 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 7) (i 1 7) 配列番号 1 0 0 (M 1 2) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 7) 配列番号 1 2 4 (M 3 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 8) (i 1 8) 配列番号 1 0 1 (M 1 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 8) 配列番号 1 2 6 (M 3 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 9) (i 1 9) 配列番号 1 7 0 で表される塩基配列もしくは (i i 1 9) 配列番号 1 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と相補的な塩基

配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 0) (i 2 0) 配列番号 1 7 3 で表される塩基配列もしくは (i i 2 0) 配列番号 1 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 1) (i 2 1) 配列番号 1 7 6 で表される塩基配列もしくは (i i 2 1) 配列番号 1 7 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 2) (i 2 2) 配列番号 1 7 9 で表される塩基配列もしくは (i i 2 2) 配列番号 1 8 0 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 3) (i 2 3) 配列番号 1 8 2 で表される塩基配列もしくは (i i 2 3) 配列番号 1 8 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

(c 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔8〕前記リナロールシンターゼは、以下の (A 1) ～ (C 3 1) からなる群より選ばれる 1 又は 2 以上のタンパク質である、〔1〕～〔7〕のいずれか 1 項記載の方法：

(A 1) (i 1') 配列番号 1 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 1') 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 2 7 ～ 5 7 4 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1) 前記 (i 1') もしくは (i i 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1) 前記 (i 1') もしくは (i i 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2) (i 2') 配列番号 4 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 2') 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列中の 3 9 ～ 5 9 0 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有

するタンパク質；

(C 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3) (i 3') 配列番号 61 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 4) (i 4') 配列番号 69 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 4') 配列番号 69 で表されるアミノ酸配列中の 29 ~ 567 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 5) (i 5') 配列番号 72 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 5') 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列中の 57 ~ 594 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ

酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 6) (i 6') 配列番号 1 0 3 (M 1 5) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 7) (i 7') 配列番号 1 0 5 (M 1 7) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 8) (i 8') 配列番号 1 0 7 (M 1 9) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 9) (i 9') 配列番号 1 0 9 (M 2 1) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリ

ナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 0) (i 1 0') 配列番号 1 1 1 (M 2 3) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 0) 前記 (i 1 0') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 0) 前記 (i 1 0') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 1) (i 1 1') 配列番号 1 1 3 (M 2 5) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 2) (i 1 2') 配列番号 1 1 5 (M 2 7) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 3) (i 1 3') 配列番号 1 1 7 (M 2 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、か

つリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 4) (i 1 4') 配列番号 1 1 9 (M 3 1) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 5) (i 1 5') 配列番号 1 2 1 (M 3 3) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 6) (i 1 6') 配列番号 1 2 3 (M 3 5) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 7) (i 1 7') 配列番号 1 2 5 (M 3 7) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、か

つリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 8) (i 1 8') 配列番号 1 2 7 (M 3 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 9) (i 1 9') 配列番号 1 6 1 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 9) 前記 (i 1 9') ものアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 9) 前記 (i 1 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 0) (i 2 0') 配列番号 1 6 2 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 1) (i 2 1') 配列番号 1 6 3 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 2) (i 2 2') 配列番号 1 6 4 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 3) (i 2 3') 配列番号 1 6 5 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 4) (i 2 4') 配列番号 1 6 6 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 5) (i 2 5') 配列番号 1 6 7 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 6) (i 2 6') 配列番号 1 6 8 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 7) (i 2 7') 配列番号 1 6 9 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 8) (i 2 8') 配列番号 1 7 2 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 9) (i 2 9') 配列番号 1 7 5 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A30) (i30') 配列番号178で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B30) 前記(i30')のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C30) 前記(i30')のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A31) (i31') 配列番号181で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B31) 前記(i31')のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；
及び

(C31) 前記(i31')のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質。

〔9〕前記細菌は、さらにゲラニルニリン酸シンターゼを発現する細菌である〔1〕～〔8〕のいずれか1項記載の方法。

〔10〕前記細菌が、メチルエリスリトールリン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、〔1〕～〔9〕のいずれか1項記載の方法。

〔11〕前記細菌が、メバロン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、〔1〕～〔10〕のいずれか1項記載の方法。

〔12〕前記細菌は、腸内細菌科細菌、コリネ型細菌又はラン藻に属する細菌である、〔1〕～〔11〕のいずれか1項記載の方法。

〔13〕前記細菌は、エシェリヒア属、パントエア属、又はシネコシスティス属に属する細菌、若しくはコリネバクテリウム属に属する細菌である、〔12〕記載の方法。

〔１４〕前記細菌は、エシェリヒア・コリ、パントエア・アナナティス、シネコシスティス s p. 又はコリネバクテリウム・グルタミカムである、〔１３〕記載の方法。

〔１５〕前記細菌は、２－ケトグルコン酸生成経路が遮断されている細菌である、〔１〕～〔１４〕のいずれか１項記載の方法。

〔１６〕２－ケトグルコン酸生成経路が、グルコース脱水素酵素活性の低減により遮断されている、〔１５〕記載の方法。

〔１７〕前記細菌において、グルコース脱水素酵素遺伝子であるポリヌクレオチドが破壊されている、〔１６〕記載の方法。

〔１８〕前記ポリヌクレオチドは、以下の（ｘ）～（ｚ）からなる群より選ばれる１又は２以上のポリヌクレオチドである、〔１７〕記載の方法。

（ｘ）〔ｉ〕配列番号５９で表される塩基配列、もしくは〔ｉｉ〕配列番号５９で表される塩基配列中３０１～２６９１番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（ｙ）前記〔ｉ〕もしくは〔ｉｉ〕の塩基配列と９０％以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又は

（ｚ）前記〔ｉ〕もしくは〔ｉｉ〕の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔１９〕前記グルコース脱水素酵素は、以下の（Ｘ）～（Ｚ）からなる群より選ばれる１又は２以上のタンパク質である、〔１６〕記載の方法。

（Ｘ）配列番号６０で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

（Ｙ）配列番号６０で表されるアミノ酸配列と９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質；及び

（Ｚ）配列番号６０で表されるアミノ酸配列において１個もしくは数個のア

ミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

〔20〕前記培養培地中のリナロールが200mg/L以上である、〔1〕～〔19〕のいずれか1項記載の方法。

〔21〕前記培養培地中のリナロールが500mg/L以上である、〔1〕～〔19〕のいずれか1項記載の方法。

〔22〕アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、もしくはバクホウシア属に属する植物由来の、又は放線菌由来のリナロールシンターゼを発現する細菌。

〔23〕リナロールシンターゼは、アクチニジア・アルグータ、コリアンドラム・サティバム、アルテミシア・アヌア、バクホウシア・シトリオドラ、アラビドプシス・タリアナ、シトラス・ウンシュウ、マルス・ドメスティカ、ペリラ・フルテセンス・バー・クリスパ、ビティス・ビニフェラ、ラベンデュラ・アングスティフォリア、メンタ・シトラータ、オシマム・バシリカム、クラルキア・ブリュワリ、又はストレプトマイセス・クラブリゲルスに由来する、〔22〕記載の細菌。

〔24〕前記微生物は、前記リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、〔22〕又は〔23〕記載の細菌。

〔25〕前記ポリヌクレオチドは、以下の（a1）～（c23）からなる群より選ばれる1又は2以上のポリヌクレオチドである、〔24〕記載の細菌。

（a1）（i1）配列番号2で表される塩基配列、（ii1）配列番号2で表される塩基配列中の79～1725番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは（iii1）配列番号3で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（b1）前記（i1）、（ii1）もしくは（iii1）の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を

有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1) 前記 (i 1)、(i i 1) もしくは (i i i 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2) (i 2) 配列番号 5 で表される塩基配列、(i i 2) 配列番号 5 で表される塩基配列中の 1 1 5 ~ 1 7 7 3 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 2) 配列番号 6 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 3) (i 3) 配列番号 6 2 で表される塩基配列、もしくは (i i 3) 配列番号 6 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 4) (i 4) 配列番号 7 0 で表される塩基配列、(i i 4) 配列番号 7 0 で表される塩基配列中の 8 5 ~ 1 7 0 4 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 4) 配列番号 7 1 で表される塩基配列を含むポ

リヌクレオチド；

(b 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 5) (i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列、(i i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列中の 169～1785 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 5) 配列番号 74 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 6) (i 6) 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列、もしくは (i i 6) 配列番号 102 (M14) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌク

レオチド；

(a 7) (i 7) 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列、もしくは (i i 7) 配列番号 104 (M16) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 8) (i 8) 配列番号 91 (M3) で表される塩基配列、もしくは (i i 8) 配列番号 106 (M18) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 9) (i 9) 配列番号 92 (M4) で表される塩基配列、もしくは (i i 9) 配列番号 108 (M20) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と相補的な塩基配列か

らなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 0) (i 1 0) 配列番号 9 3 (M 5) で表される塩基配列もしくは (i i 1 0) 配列番号 1 1 0 (M 2 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 1) (i 1 1) 配列番号 9 4 (M 6) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 1) 配列番号 1 1 2 (M 2 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 2) (i 1 2) 配列番号 9 5 (M 7) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 2) 配列番号 1 1 4 (M 2 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタ

ンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 3) (i 1 3) 配列番号 9 6 (M 8) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 3) 配列番号 1 1 6 (M 2 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 4) (i 1 4) 配列番号 9 7 (M 9) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 4) 配列番号 1 1 8 (M 3 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 5) (i 1 5) 配列番号 9 8 (M 1 0) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 5) 配列番号 1 2 0 (M 3 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 6) (i 1 6) 配列番号 99 (M 1 1) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 6) 配列番号 122 (M 3 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 7) (i 1 7) 配列番号 100 (M 1 2) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 7) 配列番号 124 (M 3 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 8) (i 1 8) 配列番号 101 (M 1 3) で表される塩基配列、もし

くは (i i 1 8) 配列番号 1 2 6 (M 3 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 9) (i 1 9) 配列番号 1 7 0 で表される塩基配列もしくは (i i 1 9) 配列番号 1 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 0) (i 2 0) 配列番号 1 7 3 で表される塩基配列もしくは (i i 2 0) 配列番号 1 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 1) (i 2 1) 配列番号 1 7 6 で表される塩基配列もしくは (i i 2

1) 配列番号 177 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 2) (i 2 2) 配列番号 179 で表される塩基配列もしくは (i i 2 2) 配列番号 180 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 3) (i 2 3) 配列番号 182 で表される塩基配列もしくは (i i 2 3) 配列番号 183 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

(c 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔2 6〕前記細菌は、エシェリヒア属、パントエア属、シネコシスティス属、又はコリネバクテリウム属に属する細菌である、〔2 2〕～〔2 5〕のい

ずれか1項記載の細菌。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、リナロールを効率よく製造することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、*E. coli* Paraプロモーター及びリプレッサー遺伝子 *araC*の制御下にある *E. faecalis* 由来 *mvaES* オペロンを保有する *pAH162-Para-mvaES* プラスミドを示す図である。

[図2]図2は、*pAH162-mvaES* のマップを示す図である。

[図3]図3は、*pAH162-MCS-mvaES* 染色体固定用プラスミドを示す図である。

[図4]図4は、(A) P_{lldD} 、(B) P_{phoC} 、又は(C) P_{pstS} の転写制御下にある *mvaES* 遺伝子を保持する染色体固定用プラスミドのセットを示す図である。

[図5]図5は、*pAH162- λ attL-Km^R- λ attR* ベクターの構築の概要を示す図である。

[図6]図6は、*pAH162-Ptac* 染色体固定用発現ベクターを示す図である。

[図7]図7は、化学合成により得られた *KDyI* オペロン中のコドン最適化を示す図である。

[図8]図8は、コドン最適化した *KDyI* オペロンを保持する、(A) *pAH162-Tc-Ptac-KDyI*、及び (B) *pAH162-Km-Ptac-KDyI* の染色体固定プラスミドを示す図である。

[図9]図9は、*M. paludicola* 由来のメバロン酸キナーゼ遺伝子を保持する染色体固定プラスミドを示す図である。

[図10]図10は、(A) $\Delta ampC::attB_{phi80}$ 、(B) $\Delta ampH::attB_{phi80}$ 、及び (C) $\Delta crt::attB_{phi80}$ のゲノム改変体のマップを示す図である。

[図11]図11は、(A) $\Delta crt::pAH162-Ptac-mvk$ (X

）、及び（B） $\Delta crt::Ptac-mvk$ （X）のゲノム改変物のマップを示す図である。

[図12]図12は、（A） $\Delta amp^H::pAH162-Km-Ptac-KDyl$ 、（B） $\Delta amp^C::pAH162-Km-Ptac-KDyl$ 、及び（C） $\Delta amp^C::Ptac-KDyl$ の染色体改変物のマップを示す図である。

[図13]図13は、（A） $\Delta amp^H::pAH162-Px-mvaES$ 、及び（B） $\Delta amp^C::pAH162-Px-mvaES$ の染色体改変物のマップを示す図である。

[図14]図14は、リナロール添加試験の結果を示す図である。

[図15]図15は、リナロール蓄積の経時変化の結果を示す図である。

[図16]図16は、O. D. 620nmの経時変化の結果を示す図である。

[図17]図17は、モチーフ1のシーケンスロゴを示す図である。

[図18]図18は、モチーフ2のシーケンスロゴを示す図である。

[図19]図19は、モチーフ3のシーケンスロゴを示す図である。

[図20]図20は、モチーフ4のシーケンスロゴを示す図である。

[図21]図21は、モチーフ5のシーケンスロゴを示す図である。

[図22]図22は、モチーフ1のアラインメントを示す図である。

[図23]図23は、モチーフ2のアラインメントを示す図である。

[図24]図24は、モチーフ3のアラインメントを示す図である。

[図25]図25は、モチーフ4のアラインメントを示す図である。

[図26]図26は、モチーフ5のアラインメントを示す図である。

[図27]図27は、モチーフ1～5の入力配列における分布を示す図である。

[図28]図28は、リナロールシンターゼ（配列番号103：M15）におけるモチーフ1の分布を示す図である。

[図29]図29は、リナロールシンターゼ（配列番号105：M17）におけるモチーフ1の分布を示す図である。

[図30]図30は、リナロールシンターゼ（配列番号107：M19）におけ

るモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図31]図 3 1 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 0 9 : M 2 1）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図32]図 3 2 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 1 1 : M 2 3）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図33]図 3 3 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 1 3 : M 2 5）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図34]図 3 4 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 1 5 : M 2 7）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図35]図 3 5 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 1 7 : M 2 9）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図36]図 3 6 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 1 9 : M 3 1）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図37]図 3 7 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 2 1 : M 3 3）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図38]図 3 8 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 2 3 : M 3 5）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図39]図 3 9 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 2 5 : M 3 7）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図40]図 4 0 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 2 7 : M 3 9）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図41]図 4 1 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 1）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図42]図 4 2 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 2）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図43]図 4 3 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 3）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図44]図 4 4 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 4）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

フ 1 の分布を示す図である。

[図45]図 4 5 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 5）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図46]図 4 6 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 6）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図47]図 4 7 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 7）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

[図48]図 4 8 は、リナロールシンターゼ（配列番号 1 6 8）におけるモチーフ 1 の分布を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、リナロールの製造方法を提供する。

[0012] 本発明の方法はリナロールシンターゼを発現する微生物を培養培地中で培養してリナロールを生成することを含む。リナロールシンターゼは、後述のモチーフを少なくとも 1 つ有すること、及び植物又は微生物由来であることの少なくとも 1 つ以上を満たすリナロールシンターゼである。

[0013] リナロールは、 $C_{10}H_{18}O$ で表されるイソプレノイド化合物の 1 種である。CAS 番号 7 8 - 7 0 - 6 で表され、R 体は 1 2 6 - 9 1 - 0、S 体は 1 2 6 - 9 0 - 9 で表記される。

[0014] リナロールシンターゼとは、ゲラニルニリン酸（GPP）からのリナロールの合成に関与する 1 以上の酵素をいう。

[0015] リナロールシンターゼは例えば、以下の式で表されるモチーフ：



を少なくとも 1 つ有するリナロールシンターゼであってもよい。

[0016] 式中、D はアスパラギン酸を示す。[FY] はフェニルアラニン（F）又はチロシン（Y）を示す。[DY] は D 又は Y を示す。X₁、X₂、X 及び X₃ はそれぞれ独立して任意のアミノ酸を示す。X₁としては例えば、イソロイシン（I）、バリン（V）、メチオニン（M）、F が挙げられ、I 又は V が好ましい。X₂としては例えば、V、I、アラニン（A）、トレオニン（T）が挙

げられ、Vが好ましい。X₃としては例えば、Y、システイン（C）、ヒスチジン（H）、グルタミン酸（E）、Fが挙げられ、Yが好ましい。

リナロールシンターゼは、前記モチーフを1つ、または複数有するリナロールシンターゼでもよいが、1つ有するリナロールシンターゼが好ましい。

[0017] 前記モチーフとしては例えば、以下のものが挙げられる：

- ・ X₁がI、[F Y]がF、[D Y]がD、X₂がV、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がF、[D Y]がD、X₂がV、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がF、[D Y]がD、X₂がV、X₃がHの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がF、[D Y]がD、X₂がT、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がF、[D Y]がY、X₂がV、X₃がCの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がI、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がA、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がI、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がV、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がV、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がI、X₃がYの組み合わせ；
- ・ X₁がV、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がV、X₃がFの組み合わせ；
- ・ X₁がM、[F Y]がY、[D Y]がD、X₂がI、X₃がYの組み合わせ；

及び

- ・ X₁がF、[F Y]がF、[D Y]がD、X₂がV、X₃がEの組み合わせ。

[0018] リナロールシンターゼを有する生物としては、例えば、アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、フラガリア属、サンジソウ属、シロイヌナズナ属、ミカン属、シソ属、メンタ属、ラベンデュラ属、トウヒ属、ナス属、ブドウ属、メボウキ属、リンゴ属に属する植物、放線菌が挙げられ、好ましくは、アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、ミカン属、リンゴ属、シソ属、ブドウ属、ラベンデュラ属、メンタ属、又はメボウキ属に属する植物、又は放線菌である。

[0019] アクチニジア属に属する植物としては例えば、サルナシ（アクチニジア・アルグータ；*Actinidia arguta*）、マタビ（*Actinidia polygama*）が挙げられ、サルナシが好ましい。コリアン

ドラム属に属する植物としては例えば、コリアンダー（コリアンドラム・サティバム；*Coriandrum sativum*）が挙げられる。ヨモギ属に属する植物としては例えば、クソニンジン（*Artemisia annua*）が挙げられる。バクホウシア属に属する植物としては例えば、レモンマートル（*Backhousia citriodora*）が挙げられる。フラガリア属に属する植物としては例えば、イチゴ（*Fragaria x ananassa*）が挙げられる。サンジソウ属に属する植物としては例えば、サンジソウ（*Clarkia breweri*）が挙げられる。シロイヌナズナ属に属する植物としては例えば、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）が挙げられる。ミカン属に属する植物としては例えば、ウンシュウミカン（*Citrus unshiu*）が挙げられる。シソ属に属する植物としては例えば、シソ（*Perilla hirtella*、*Perilla setoensis*；*Perilla frutescens* var. *crispa*；*Perilla frutescens* var. *hirtella*）が挙げられ、*Perilla frutescens* var. *crispa*が好ましい。メンタ属に属する植物としては例えば、ベルガモットミント（*Mentha citrata*）、ウォーターミント（*Mentha aquatica*）が挙げられ、ベルガモットミントが好ましい。ラベンデュラ属に属する植物としては例えば、ラベンダー（*Lavandula angustifolia*）が挙げられる。トウヒ属に属する植物としては例えば、ベイトウヒ（*Picea sitchensis*）、ドイツトウヒ（*Picea abies*）が挙げられる。ナス属に属する植物としては例えばトマト（*Solanum lycopersicum*）が挙げられる。リンゴ属に属する植物としては例えば、リンゴ（*Malus domestica*）が挙げられる。ブドウ属に属する植物としては例えばヨーロッパブドウ（*Vitis vinifera*）が挙げられる。メボウキ属に属する植物としては例えばバジリコ（*Ocimum basilicum*）が挙げられる。

[0020] 放線菌としては例えば、*Streptomyces* 属、*Kitasato* *spora* 属、*Streptacidiphilus* 属、*Pseudonocardia* 属、*Actinoalloteichus* 属、*Actinokineospora* 属、*Actinomycetospora* 属、*Actinophytocola* 属、*Actinosynnema* 属、*Alloactinosynnema* 属、*Allokutzneria* 属、*Amycolatopsis* 属、*Crossiella* 属、*Goodfellowiella* 属、*Haloechinothrix* 属、*Kibdelosporangium* 属、*Kutzneria* 属、*Labedaea* 属、*Lechevalieria* 属、*Lentzea* 属、*Longimycelium* 属、*Prauserella* 属、*Saccharomonospora* 属、*Saccharopolyspora* 属、*Saccharothrix* 属、*Sciscioneella* 属、*Streptoalloteichus* 属、*Tamaricihabitans* 属、*Thermobispora* 属、*Thermocrispum* 属、*Thermotunica* 属、*Umezawaea* 属、*Yuhushieiella* 属等の微生物が挙げられ、好ましくは *Streptomyces* 属微生物（例：*Streptomyces clavuligerus*、*Streptomyces griseus*、*Streptomyces antibioticus*、*Streptomyces avermitilis*、*Streptomyces verticillus*、*Streptomyces peuceticus*、*Streptomyces tsukubaensis*、*Stereptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*）である。

[0021] リナロールシンターゼは、アクチニジア属、又はコリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、ミカン属、リンゴ属、シソ属、ブドウ属、ラベンデュラ属、メンタ属、又はメボウキ属に属する植物に由来するか、又は放線菌に由来することが好ましい。

[0022] 前記生物に由来するリナロールシンターゼは、前記モチーフを有していて

もよく、植物由来のリナロールシンターゼは、前記モチーフを有することが好ましい。なお、リナロールシンターゼは、前記モチーフを少なくとも1つ有していればよく、前記生物に由来するリナロールシンターゼに限定されない。

[0023] リナロールシンターゼを発現する微生物は、例えば、上記生物由来のリナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む発現ベクターで微生物を形質転換することにより得ることができる。

[0024] 遺伝子、プロモーター等の核酸配列、又はタンパク質等のアミノ酸配列について本明細書中で用いられる語句「由来」は、微生物により天然又はネイティブに合成される、あるいは天然又は野生型の微生物から単離され得るヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を意味し得る。

[0025] リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチドは、例えば以下の（a 1）～（c 2 3）からなる群より選ばれる1以上のポリヌクレオチドであることが好ましい：

（a 1）（i 1）配列番号2で表される塩基配列、（i i 1）配列番号2で表される塩基配列中の79～1725番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは（i i i 1）配列番号3で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（b 1）前記（i 1）、（i i 1）もしくは（i i i 1）の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（c 1）前記（i 1）、（i i 1）もしくは（i i i 1）の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（a 2）（i 2）配列番号5で表される塩基配列、（i i 2）配列番号5で表される塩基配列中の115～1773番目のヌクレオチド残基からなる塩

塩基配列、もしくは (i i i 2) 配列番号 6 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 3) (i 3) 配列番号 62 で表される塩基配列、もしくは (i i 3) 配列番号 63 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 4) (i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列、(i i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列中の 85～1704 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 4) 配列番号 71 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコード

するポリヌクレオチド；

(a 5) (i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列、(i i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列中の 169～1785 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 5) 配列番号 74 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 6) (i 6) 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列、もしくは (i i 6) 配列番号 102 (M14) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 7) (i 7) 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列、もしくは (i i 7) 配列番号 104 (M16) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 8) (i 8) 配列番号 9 1 (M 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 8) 配列番号 1 0 6 (M 1 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 9) (i 9) 配列番号 9 2 (M 4) で表される塩基配列、もしくは (i i 9) 配列番号 1 0 8 (M 2 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 0) (i 1 0) 配列番号 9 3 (M 5) で表される塩基配列もしくは (i i 1 0) 配列番号 1 1 0 (M 2 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の

同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 1) (i 1 1) 配列番号 9 4 (M 6) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 1) 配列番号 1 1 2 (M 2 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 2) (i 1 2) 配列番号 9 5 (M 7) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 2) 配列番号 1 1 4 (M 2 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 3) (i 1 3) 配列番号 9 6 (M 8) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 3) 配列番号 1 1 6 (M 2 8) で表される塩基配列を含むポリヌ

レオチド；

(b 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 4) (i 1 4) 配列番号 97 (M9) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 4) 配列番号 118 (M30) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 5) (i 1 5) 配列番号 98 (M10) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 5) 配列番号 120 (M32) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 6) (i 1 6) 配列番号 9 9 (M 1 1) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 6) 配列番号 1 2 2 (M 3 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 7) (i 1 7) 配列番号 1 0 0 (M 1 2) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 7) 配列番号 1 2 4 (M 3 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 8) (i 1 8) 配列番号 1 0 1 (M 1 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 8) 配列番号 1 2 6 (M 3 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 9) (i 1 9) 配列番号 1 7 0 で表される塩基配列もしくは (i i 1 9) 配列番号 1 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 0) (i 2 0) 配列番号 1 7 3 で表される塩基配列もしくは (i i 2 0) 配列番号 1 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 1) (i 2 1) 配列番号 1 7 6 で表される塩基配列もしくは (i i 2 1) 配列番号 1 7 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリ

ヌクレオチド；

(a 2 2) (i 2 2) 配列番号 1 7 9 で表される塩基配列もしくは (i i 2 2) 配列番号 1 8 0 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 3) (i 2 3) 配列番号 1 8 2 で表される塩基配列もしくは (i i 2 3) 配列番号 1 8 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

(c 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0026] 配列番号 2 で表される塩基配列は、サルナシ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長の塩基配列である。配列番号 2 で表される塩基配列は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列をコードし、1～78 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、79～1725 (1 7 2 2) 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 3 で表される塩基配列は、配列番号 2 で表される塩基配列における 79～1725 (1 7 2 2) 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列にあるコドンが改変されており、さらに 5' 末端にメチオニンコドンが付加されているヌクレオチド配列か

らなる。

[0027] 配列番号5で表される塩基配列は、コリアンダー由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号5で表される塩基配列は、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードし、1～114番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、115～1773（1770）番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号6で表される塩基配列は、配列番号5で表される塩基配列における115～1773（1770）番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列にあるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0028] 配列番号62で表される塩基配列は、ストレプトマイセス・クラブリゲルス由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号62で表される塩基配列は、配列番号61で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号63で表される塩基配列は、配列番号62で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、ストレプトマイセス・クラブリゲルスのリナロールシンターゼには、推定上の葉緑体移行シグナルは存在しない。

[0029] 配列番号70で表される塩基配列は、クソニンジン由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号70で表される塩基配列は、配列番号69で表されるアミノ酸配列をコードし、1～84番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、85～1704（1701）番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号71で表される塩基配列は、配列番号70で表される塩基配列における85～1704番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列にあるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0030] 配列番号73で表される塩基配列は、レモンマートル由来リナロールシン

ターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 73 で表される塩基配列は、配列番号 72 で表されるアミノ酸配列をコードし、1～168 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、169～1785 (1782) 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 74 で表される塩基配列は、配列番号 73 で表される塩基配列における 169～1785 (1782) 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列にあるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0031] 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列は、シロイヌナズナ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 89 (M1) で表される塩基配列は、配列番号 103 (M15) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 102 (M14) で表される塩基配列は、配列番号 89 (M1) で表される塩基配列における 70～1644 (1641) 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列にあるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0032] 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列は、シロイヌナズナ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 90 (M2) で表される塩基配列は、配列番号 105 (M17) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 104 (M16) で表される塩基配列は、配列番号 90 (M2) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0033] 配列番号 91 (M3) で表される塩基配列は、ウンシュウミカン由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 91 (M3) で表される塩基配列は、配列番号 107 (M19) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 106 (M18) で表される塩基配列は、配列番号 91 (M3) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0034] 配列番号 92 (M4) で表される塩基配列は、ウンシュウミカン由来リナ

ロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 92 (M4) で表される塩基配列は、配列番号 109 (M21) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 108 (M20) で表される塩基配列は、配列番号 92 (M4) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0035] 配列番号 93 (M5) で表される塩基配列は、ウンシュウミカン由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 93 (M5) で表される塩基配列は、配列番号 111 (M23) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 110 (M22) で表される塩基配列は、配列番号 93 (M5) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0036] 配列番号 94 (M6) で表される塩基配列は、リング由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 94 (M6) で表される塩基配列は、配列番号 113 (M25) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 112 (M24) で表される塩基配列は、配列番号 94 (M6) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0037] 配列番号 95 (M7) で表される塩基配列は、シソ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 95 (M7) で表される塩基配列は、配列番号 115 (M27) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 114 (M26) で表される塩基配列は、配列番号 95 (M7) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0038] 配列番号 96 (M8) で表される塩基配列は、ヨーロッパブドウ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 96 (M8) で表される塩基配列は、配列番号 117 (M29) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 116 (M28) で表される塩基配列は、配列番号 96 (M8) で表される塩基配列におけるコドンが改変

されたヌクレオチド配列からなる。

[0039] 配列番号 97 (M9) で表される塩基配列は、ヨーロッパブドウ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 97 (M9) で表される塩基配列は、配列番号 119 (M31) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 118 (M30) で表される塩基配列は、配列番号 97 (M9) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0040] 配列番号 98 (M10) で表される塩基配列は、ラベンダー由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 98 (M10) で表される塩基配列は、配列番号 121 (M33) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 120 (M32) で表される塩基配列は、配列番号 98 (M10) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0041] 配列番号 99 (M11) で表される塩基配列は、ベルガモットミント由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 99 (M11) で表される塩基配列は、配列番号 M35 で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 M34 で表される塩基配列は、配列番号 99 (M11) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0042] 配列番号 100 (M12) で表される塩基配列は、バジリコ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 100 (M12) で表される塩基配列は、配列番号 125 (M37) で表される成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 124 (M36) で表される塩基配列は、配列番号 100 (M12) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0043] 配列番号 101 (M13) で表される塩基配列は、サンジソウ由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 101 (M13) で表される塩基配列は、配列番号 127 (M39) で表される成熟リナロールシンタ

ーゼのアミノ酸配列をコードし得る。配列番号 126 (M38) で表される塩基配列は、配列番号 101 (M13) で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。

[0044] 配列番号 170 で表される塩基配列は、アラビドプシス・タリアナ (シロイヌナズナ) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 170 で表される塩基配列は、配列番号 169 で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号 171 で表される塩基配列は、配列番号 170 で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、配列番号 169 ~ 171 で表される各配列には、推定上の葉緑体移行シグナルに対応する配列部分は含まれていない。

[0045] 配列番号 173 で表される塩基配列は、ペリラ・フルテセンス・バー・クリSPA (シソ) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 173 で表される塩基配列は、配列番号 172 で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号 174 で表される塩基配列は、配列番号 173 で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、配列番号 172 ~ 174 で表される配列には、推定上の葉緑体移行シグナルに対応する配列部分は含まれていない。

[0046] 配列番号 176 で表される塩基配列は、ビティス・ビニフェラ (ヨーロッパパブドウ) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 176 で表される塩基配列は、配列番号 175 で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号 177 で表される塩基配列は、配列番号 176 で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、配列番号 175 ~ 177 で表される配列には、推定上の葉緑体移行シグナルに対応する配列部分は含まれていない。

[0047] 配列番号 179 で表される塩基配列は、メンタ・シトラータ (ベルガモッ

トミント) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 179 で表される塩基配列は、配列番号 178 で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号 180 で表される塩基配列は、配列番号 179 で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、配列番号 178 ~ 180 で表される配列には、推定上の葉緑体移行シグナルに対応する配列部分は含まれていない。

[0048] 配列番号 182 で表される塩基配列は、オシマム・バシリウム (バジリコ) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の完全長である。配列番号 182 で表される塩基配列は、配列番号 181 で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟リナロールシンターゼのアミノ酸配列のコーディング領域を含み得る。配列番号 183 で表される塩基配列は、配列番号 182 で表される塩基配列におけるコドンが改変されたヌクレオチド配列からなる。なお、配列番号 181 ~ 183 で表される配列には、推定上の葉緑体移行シグナルに対応する配列部分は含まれていない。

[0049] 塩基配列との同一性%は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%以上であってもよい。リナロールシンターゼ活性とは、ゲラニルニリン酸 (GPP) からリナロールを生成する活性をいう (以下同様)。

[0050] 塩基配列の同一性%及び後述するようなアミノ酸配列の同一性%は、例えば Karlin 及び Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993))、Pearson による FASTA (Methods Enzymol., 183, 63 (1990)) を用いて決定することができる。このアルゴリズム BLAST に基づいて、BLASTP、BLASTN とよばれるプログラムが開発されているので (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 参照)、これらのプログラムをデフォルト設定で用いて、塩基配列及びアミノ酸配列の同一性%を計算してもよい。また、アミノ酸配列の相

同姓としては、例えば、Lipman-Pearson法を採用している株式会社ゼネティックスのソフトウェアGENETYX Ver 7.0.9を使用し、ORFにコードされるポリペプチド部分全長を用いて、Unit Size to Compare=2の設定でSimilarityをpercentage計算させた際の数値を用いてもよい。塩基配列及びアミノ酸配列の同一性%として、これらの計算で導き出される値のうち、最も低い値を採用してもよい。

[0051] 「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このような条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、高い同一性を有する実質的に同一のポリヌクレオチド同士、例えば上述した同一性%を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより低い相同性を示すポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件である。具体的には、このような条件としては、 $6\times\text{SSC}$ （塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中、約 45°C でのハイブリダイゼーション、続いて、 $0.2\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS中、 $50\sim 65^{\circ}\text{C}$ での1又は2回以上の洗浄が挙げられる。ハイブリッドが形成されるDNAの同一性は、 90% 、 91% 、 92% 、 93% 、 94% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 又は 99% 以上であってもよい。

[0052] 上記(a1)～(c23)のポリヌクレオチドは、DNAであっても、チミン塩基をウラシル塩基に置換することにより対応するDNAから得られるRNAであってもよいが、DNAであることが好ましい。

[0053] リナロールシンターゼは、以下の(A1)～(C31)からなる群より選ばれる1以上のタンパク質であることが好ましい：

(A1) (i1') 配列番号1で表される全長アミノ酸配列、もしくは(i i1') 配列番号1で表されるアミノ酸配列中の27～574番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B1) 前記(i1') もしくは(i i1') のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有

するタンパク質；

(C 1) 前記 (i 1') もしくは (i i 1') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2) (i 2') 配列番号4で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 2') 配列番号4で表されるアミノ酸配列中の39～590番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3) (i 3') 配列番号61で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 4) (i 4') 配列番号69で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 4') 配列番号69で表されるアミノ酸配列中の29～567番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ

酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 5) (i 5') 配列番号 72 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 5') 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列中の 57～594 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 6) (i 6') 配列番号 103 (M15) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 7) (i 7') 配列番号 105 (M17) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 8) (i 8') 配列番号 107 (M19) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 9) (i 9') 配列番号 1 0 9 (M 2 1) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 0) (i 1 0') 配列番号 1 1 1 (M 2 3) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 0) 前記 (i 1 0') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 0) 前記 (i 1 0') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 1) (i 1 1') 配列番号 1 1 3 (M 2 5) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 2) (i 1 2') 配列番号 1 1 5 (M 2 7) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 3) (i 1 3') 配列番号 1 1 7 (M 2 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 4) (i 1 4') 配列番号 1 1 9 (M 3 1) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 5) (i 1 5') 配列番号 1 2 1 (M 3 3) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 6) (i 1 6') 配列番号 1 2 3 (M 3 5) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 7) (i 1 7') 配列番号 1 2 5 (M 3 7) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 8) (i 1 8') 配列番号 1 2 7 (M 3 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 9) (i 1 9') 配列番号 1 6 1 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 9) 前記 (i 1 9') ものアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 9) 前記 (i 1 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 0) (i 2 0') 配列番号 1 6 2 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有する

アミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 1) (i 2 1') 配列番号 1 6 3 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 2) (i 2 2') 配列番号 1 6 4 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 3) (i 2 3') 配列番号 1 6 5 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 4) (i 2 4') 配列番号 1 6 6 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する

アミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 5) (i 2 5') 配列番号167で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 6) (i 2 6') 配列番号168で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

及び

(C 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 7) (i 2 7') 配列番号169で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 8) (i 2 8') 配列番号172で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 9) (i 2 9') 配列番号 1 7 5 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3 0) (i 3 0') 配列番号 1 7 8 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3 0) 前記 (i 3 0') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 3 0) 前記 (i 3 0') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3 1) (i 3 1') 配列番号 1 8 1 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3 1) 前記 (i 3 1') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；
及び

(C 3 1) 前記 (i 3 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質。

[0054] 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 1～26 番目のアミノ酸残基から

なるアミノ酸配列は、推定上の葉緑体移行シグナルを含み得る。27～574番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、成熟リナロールシンターゼを含み得る。微生物で成熟リナロールシンターゼの発現を実施する際には、通常、N末端にメチオニン残基を付与した配列を用いる。

[0055] 配列番号4で表されるアミノ酸配列中の1～38番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、推定上の葉緑体移行シグナルを含み、39～590番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、成熟リナロールシンターゼを含み得る。

[0056] 配列番号61で表される全長アミノ酸配列は、成熟リナロールシンターゼを含み得る。

[0057] 配列番号69で表されるアミノ酸配列中の1～28番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、推定上の葉緑体移行シグナルを含み、29～567番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、成熟リナロールシンターゼを含み得る。

[0058] 配列番号72で表されるアミノ酸配列中の1～56番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、推定上の葉緑体移行シグナルを含み、57～594番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、成熟リナロールシンターゼを含み得る。

[0059] 配列番号103及び105（M15、M17）で表される全長アミノ酸配列はそれぞれ、アラビドプシス・タリアナ（シロイヌナズナ）由来の成熟リナロールシンターゼ（配列番号103（M15）はテルペンシンターゼ10、配列番号105（M17）はテルペンシンターゼ14）を含み得る。配列番号107、109、111（M19、M21、M23）で表されるアミノ酸配列はそれぞれ、シトラス・ウンシュウ（ウンシュウミカン）由来の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号113（M25）で表されるアミノ酸配列は、マルス・ドメスティカ（リンゴ）由来の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号115（M27）で表されるアミノ酸配列は、ペリラ・フルテセンス・バー・クリSPA（シソ）由来の成熟リナロールシン

ターゼを含み得る。配列番号 1 1 7 及び 1 1 9 (M 2 9 及び M 3 1) で表されるアミノ酸配列はそれぞれ、ピティス・ビニフェラ (ヨーロッパブドウ) 由来の成熟リナロールシンターゼ (それぞれ (3 S) - リナロール / (E) - ネロリドールシンターゼ、(3 R) - リナロールシンターゼ) の成熟アミノ酸配列を含み得る。配列番号 1 2 1 (M 3 3) で表されるアミノ酸配列は、ラベンデュラ・アングスティフォリア (ラベンダー) の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号 1 2 3 (M 3 5) で表されるアミノ酸配列は、メンタ・シトラータ (ベルガモットミント) の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号 1 2 5 (M 3 7) で表されるアミノ酸配列は、オシマム・バシリカム (バジリコ) の成熟リナロールシンターゼ (R - リナロールシンターゼ) を含み得る。配列番号 1 2 7 (M 3 9) で表されるアミノ酸配列は、クラルキア・ブリュワリ (サンジソウ) の成熟リナロールシンターゼ (S - リナロールシンターゼ) を含む。配列番号 1 6 1 のアミノ酸配列は、ソラナム・リコペルシクム (トマト) の成熟リナロールシンターゼ (R - リナロールシンターゼ) を含み得る。配列番号 1 6 2 のアミノ酸配列は、バクハウシア・シトリオドーラ (レモンマートル) の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号 1 6 3 及び 1 6 4 のアミノ酸配列は、アルテミシア・アヌア (クソニンジン) の成熟リナロールシンターゼを含み得る。配列番号 1 6 5 のアミノ酸配列は、アクチニジア・アルグータ (サルナシ) の成熟リナロールシンターゼ (S - リナロールシンターゼ) を含み得る。配列番号 1 6 6 のアミノ酸配列は、アクチニジア・ポリガマ (マタタビ) の成熟リナロールシンターゼ (S - リナロールシンターゼ) を含む。配列番号 1 6 7 のアミノ酸配列は、ペリラ・フルテセンス・バー・ヒルテラ (シソ) の成熟アミノ酸シンターゼ (S - リナロールシンターゼ) を含み得る。配列番号 1 6 8 のアミノ酸配列は、ペリラ・セトエンシス (シソ) の成熟アミノ酸シンターゼ (S - リナロールシンターゼ) を含み得る。

[0060] 配列番号 1 6 9、1 7 2、1 7 5、1 7 8 及び 1 8 1 で表される全長アミノ酸配列は、それぞれ、アラビドプシス・タリアナ (シロイヌナズナ)、ペ

リラ・フルテセンス・バー・クリスパ（シソ）、ビティス・ビニフェラ（ヨーロッパパブドウ）、メンタ・シトラータ（ベルガモットミント）及びオシマム・バシリクム（バジリコ）由来の成熟リナロールシンターゼ（R-リナロールシンターゼ）を含み得る。

[0061] 配列番号103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127（M15、M17、M19、M21、M23、M25、M27、M29、M31、M33、M35、M37、M39）、161～168、169、172、175、178及び181のアミノ酸配列は、それぞれ式 $DDX_1[FY][DY]X_2X_3G$ で表されるモチーフを有する。

[0062] アミノ酸配列との同一性％は、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％又は99％以上であってもよい。

[0063] アミノ酸残基の変異としては、例えば、アミノ酸残基の欠失、置換、付加及び挿入が挙げられる。1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1個もしくは数個」は、タンパク質の立体構造や活性を大きく損なわない範囲を示すものである。タンパク質の場合における用語「1もしくは数個」が示す数は、例えば、1～100個、好ましくは1～80個、より好ましくは1～50個、1～30個、1～20個、1～10個又は1～5個である。上記（A1）～（C26）のタンパク質は、N末端に開始メチオニン残基を有していてもよい。上記（A1）～（C26）のタンパク質は、C末端にヒスチジントグ等の精製用タグを有していてもよい。

[0064] （B1）及び（C1）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i1'）もしくは（i i 1'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50％以上、60％以上、70％以上、80％以上、90％以上又は95％以上の活性を有することが好ましい。

[0065] （B2）及び（C2）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i2'）もしくは（i i 2'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタン

パク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

[0066] (B3) 及び (C3) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i3') のアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

[0067] (B4) 及び (C4) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i4') もしくは (ii4') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

[0068] (B5) 及び (C5) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i5') もしくは (ii5') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

[0069] (B6) 及び (C6) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i6') もしくは (ii6') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

(B6) 及び (C6) のタンパク質は、(A6) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0070] (B7) 及び (C7) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i7') もしくは (ii7') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。

(B7) 及び (C7) のタンパク質は、(A7) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0071] (B8) 及び (C8) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i8') のアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の

50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B8)及び(C8)のタンパク質は、(A8)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0072] (B9)及び(C9)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i9')もしくは(ii9')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B9)及び(C9)のタンパク質は、(A9)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0073] (B10)及び(C10)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i10')もしくは(ii10')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B10)及び(C10)のタンパク質は、(A10)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0074] (B11)及び(C11)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i11')もしくは(ii11')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B11)及び(C11)のタンパク質は、(A11)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0075] (B12)及び(C12)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i12')もしくは(ii12')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B12)及び(C12)のタンパク質は、(A12)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0076] (B13)及び(C13)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、

上記（i 1 3'）のアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 1 3）及び（C 1 3）のタンパク質は、（A 1 3）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0077] （B 1 4）及び（C 1 4）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 1 4'）もしくは（i i 1 4'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 1 4）及び（C 1 4）のタンパク質は、（A 1 4）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0078] （B 1 5）及び（C 1 5）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 1 5'）もしくは（i i 1 5'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 1 5）及び（C 1 5）のタンパク質は、（A 1 5）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0079] （B 1 6）及び（C 1 6）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 1 6'）もしくは（i i 1 6'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 1 6）及び（C 1 6）のタンパク質は、（A 1 6）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0080] （B 1 7）及び（C 1 7）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 1 7'）もしくは（i i 1 7'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 1 7）及び（C 1 7）のタンパク質は、（A 1 7）のタンパク

質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0081] (B 1 8) 及び (C 1 8) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i 1 8') のアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は 9 5 % 以上の活性を有することが好ましい。(B 1 8) 及び (C 1 8) のタンパク質は、(A 1 8) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0082] (B 1 9) 及び (C 1 9) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i 1 9') もしくは (i i 1 9') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は 9 5 % 以上の活性を有することが好ましい。(B 1 9) 及び (C 1 9) のタンパク質は、(A 1 9) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0083] (B 2 0) 及び (C 2 0) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i 2 0') もしくは (i i 2 0') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は 9 5 % 以上の活性を有することが好ましい。(B 2 0) 及び (C 2 0) のタンパク質は、(A 2 0) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0084] (B 2 1) 及び (C 2 1) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i 2 1') もしくは (i i 2 1') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は 9 5 % 以上の活性を有することが好ましい。(B 2 1) 及び (C 2 1) のタンパク質は、(A 2 1) のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0085] (B 2 2) 及び (C 2 2) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記 (i 2 2') もしくは (i i 2 2') のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7

0%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B22)及び(C22)のタンパク質は、(A22)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0086] (B23)及び(C23)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i23')のアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B23)及び(C23)のタンパク質は、(A23)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0087] (B24)及び(C24)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i24')もしくは(ii24')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B24)及び(C24)のタンパク質は、(A24)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0088] (B25)及び(C25)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i25')もしくは(ii25')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B25)及び(C25)のタンパク質は、(A25)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0089] (B26)及び(C26)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記(i26')もしくは(ii26')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。(B26)及び(C26)のタンパク質は、(A26)のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0090] (B27)及び(C27)のタンパク質は、同一条件で測定された場合、

上記（i 2 7'）もしくは（i i 2 7'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 2 7）及び（C 2 7）のタンパク質は、（A 2 7）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0091] （B 2 8）及び（C 2 8）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 2 8'）もしくは（i i 2 8'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 2 8）及び（C 2 8）のタンパク質は、（A 2 8）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0092] （B 2 9）及び（C 2 9）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 2 9'）もしくは（i i 2 9'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 2 9）及び（C 2 9）のタンパク質は、（A 2 9）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0093] （B 3 0）及び（C 3 0）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 3 0'）もしくは（i i 3 0'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 3 0）及び（C 3 0）のタンパク質は、（A 3 0）のタンパク質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0094] （B 3 1）及び（C 3 1）のタンパク質は、同一条件で測定された場合、上記（i 3 1'）もしくは（i i 3 1'）のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のリナロールシンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。（B 3 1）及び（C 3 1）のタンパク質は、（A 3 1）のタンパク

質に含まれるモチーフを維持することが好ましい。

[0095] 上記タンパク質は、目的活性を保持し得る限り、触媒ドメイン中の部位、及び触媒ドメイン以外の部位に変異が導入されていてもよい。目的活性を保持し得る、タンパク質中の変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に自明である。具体的には、当業者は、1) 同種の活性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列（例、配列番号1又は4により表されるアミノ酸配列、及び他のリナロールシンターゼのアミノ酸配列）を比較し、2) 相対的に保存されている領域、及び相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3) 相対的に保存されている領域及び相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域及び機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。したがって、当業者は、リナロールシンターゼのアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0096] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基含有側鎖（例、アルコール、フェノキシ基含有側鎖）を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、及び硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システ

イン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、及びグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0097] リナロールシンターゼを発現する微生物は、ゲラニルニリン酸シンターゼも発現してもよく、導入されるリナロールシンターゼによっては発現することが好ましい。ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP、dimethylallyl diphosphate) は、ペプチドグリカンや電子受容体 (メナキノン等) の前駆体であり、微生物の増殖に必須であることが知られている (Fujisaki et al., J. Biochem., 1986; 99: 1137-1146)。ゲラニルニリン酸シンターゼ活性とは、IPP 及び DMAPP からゲラニルニリン酸を生成する活性をいう。ゲラニルニリン酸シンターゼとしては、例えば、エシェリヒア・コリ由来のゲラニルニリン酸シンターゼが挙げられる。もしくは、パントエア・アナナティス (Pantoea ananatis) (例えば、国際公開第 2007/029577A1 号) 由来、バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) (例えば、特開 2000-245482 号公報)、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (Geobacillus stearothermophilus) 等の微生物由来のゲラニルニリン酸シンターゼが挙げられる。また、アメリカオオモミ (Abies grandis)、ペパーミント (Mentha x piperita)、オウシュウトウヒ (Picea abies)、ニチニチソウ (Catharanthus roseus)、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、キンギョソウ (Antirrhinum majus)、ホップ (Humulus lupulus) 等の植物由来のゲラニルニリン酸シンターゼが挙げられる。

[0098] ゲラニルニリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチドは、以下の〔p〕、〔q〕及び〔r〕からなる群より選ばれる1以上のポリヌクレオチドであることが好ましい。

〔p〕〔x i〕配列番号7で表される塩基配列、もしくは〔x i i〕配列番号8で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

〔q〕前記〔x i〕、もしくは〔x i i〕の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつゲラニルニリン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又は

〔r〕前記〔x i〕、もしくは〔x i i〕の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつゲラニルニリン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0099] 配列番号7で表される塩基配列は、エシェリヒア・コリ由来ファルネシルニリン酸／ゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子の塩基配列である。配列番号8で表される塩基配列は、配列番号87で表されるアミノ酸配列をコードし、成熟ファルネシルニリン酸／ゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子のコーディング領域を含み得る。配列番号8で表される塩基配列は、配列番号7で表される塩基配列にあるコドンが改変されており、配列番号87で表されるタンパク質の80番目のセリンをコードするコドンがフェニルアラニンをコードするコドンに変異している（S80F変異）。すなわち、配列番号8で表される塩基配列は、配列番号88で表されるアミノ酸配列をコードし、配列番号88で示されるタンパク質は、配列番号87で表されるタンパク質の80番目のセリン残基がフェニルアラニン残基に置換されている（S80F）変異タンパク質である。このS80F変異を有するファルネシルニリン酸シンターゼは、ゲラニルニリン酸シンターゼとしての機能が向上していることが知られている（Reiling KK et al. (2004) Biotechnol Bioeng. 87 (2) 200-212）。ゲラニルニリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチドは上記〔q〕又は〔r〕

〕でもよいことから、上記のS80F変異に限らず、同様の効果が得られる変異を有していてもよく、変異はS80F変異に限定されるものではない。また、ファルネシルニリン酸シンターゼ遺伝子の由来はエシェリヒア・コリに限定されるものではなく、例えばバチルス・ステアロサーモフィルス由来のファルネシルニリン酸シンターゼにおいて、菌体内のゲラニルニリン酸の濃度を高める変異が明らかにされている(Narita K., et al., (1999) J Biochem 126 (3) 566-571.)。また、ファルネシルニリン酸シンターゼ遺伝子への変異導入によって得られるゲラニルニリン酸シンターゼに限らず、本来ゲラニルニリン酸シンターゼとして機能する遺伝子を用いてもよい。例えば、ニチニチソウ由来ゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子(Rai A., et al., (2013) Mol Plant. 6 (5) 1531-49)、シロイヌナズナ由来ゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子(Camara B., (2000) Plant J. 24 (2), 241-252)、放線菌由来ゲラニルニリン酸シンターゼ遺伝子(国際公開2007/029577A1号)等を用いてもよい。ファルネシルニリン酸シンターゼ活性とは、ゲラニルニリン酸(GPP)からファルネシルニリン酸を生成する活性をいう。塩基配列の同一性、ストリンジェントな条件、ポリヌクレオチドの定義は、上記(a1)～(c23)のポリヌクレオチドにて説明したのと同様である。

[0100] ゲラニルニリン酸シンターゼは、以下の〔P〕～〔R〕からなる群より選ばれる1以上のタンパク質であることが好ましい。

〔P〕 配列番号87又は88で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

〔Q〕 前記アミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつゲラニルニリン酸シンターゼ活性を有するタンパク質；及び

〔R〕 前記アミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつゲラニルニリン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

[0101] 配列番号 87 で表されるアミノ酸配列は、成熟ファルネシルニリン酸／ゲラニルニリン酸シンターゼを含み得る。配列番号 88 で表されるアミノ酸配列は、変異型成熟ファルネシルニリン酸／ゲラニルニリン酸シンターゼを含み得る。〔Q〕及び〔R〕のタンパク質は、同一条件で測定された場合、配列番号 87 又は 88 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質のゲラニルニリン酸シンターゼ活性の、好ましくはゲラニルニリン酸シンターゼ活性及びファルネシルニリン酸シンターゼ活性の、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%以上の活性を有することが好ましい。欠失、置換、付加もしくは挿入の定義、アミノ酸の同一性等については、(A1)～(C31)のタンパク質にて説明したのと同様である。

[0102] 本発明で用いられる微生物が含み得る発現単位では、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びプロモーターの一方は、宿主細胞に固有のものではない。したがって、発現単位は、異種発現単位であり得る。好ましくは、リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド、及びプロモーターの双方が、宿主細胞に固有のものではない。プロモーターは、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに対して同種であっても異種であってもよい。発現単位はさらに、ターミネーター、リボソーム結合部位、及び薬物耐性遺伝子等のさらなるエレメントを含んでもよい。発現単位はDNAであってもRNAであってもよいが、好ましくはDNAである。異種発現単位は、リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド以外のタンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。斯かるタンパク質としては、例えば、リナロールシンターゼ、メバロン酸経路に關与する1以上の酵素、及びメチルエリスリトールリン酸経路に關与する1以上の酵素が挙げられるが、これらに限定されない。

[0103] 本発明で用いられる微生物は、例えば、以下の発現ベクターで形質転換することにより得ることができる：リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む発現ベクター；リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド、

ゲラニルニリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む発現ベクター；リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む第1の発現単位と、ゲラニルニリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む第2の発現単位とを含む発現ベクター；及び、リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む第1の発現ベクターと、ゲラニルニリン酸シンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む第2の発現ベクターの組み合わせ。発現ベクターは、組込み型（*i n t e g r a t i v e*）ベクターであっても、非組込み型ベクターであってもよい。発現ベクターにおいて、前記リナロールシンターゼをコードする遺伝子は、構成型プロモーター、又は誘導型プロモーターの制御下に配置され得る。構成型プロモーターとしては、例えば、*t a c*プロモーター、*l a c*プロモーター、*t r p*プロモーター、*t r c*プロモーター、T7プロモーター、T5プロモーター、T3プロモーター、及びSP6プロモーターが挙げられる。誘導型プロモーターとしては、例えば、後述の増殖促進剤逆依存プロモーターが挙げられる。用語「作動可能に連結された」とは、調節領域のヌクレオチド配列が核酸分子又は遺伝子（すなわち、ポリヌクレオチド）のヌクレオチド配列にポリヌクレオチドの発現（例、増強された、向上された、構成的な、基礎的な、抗転写終結の、弱毒化された、調節解除された、減少した、又は抑制された、発現）が可能な形式で連結しており、これによりヌクレオチド配列によりコードされるポリヌクレオチドの発現産物が生産されることを意味する。

[0104] リナロールシンターゼを発現する微生物は、効率的なリナロールの製造のためのIPP及びDMAPPの供給の観点からジメチルアリルニリン酸供給経路によるジメチルニリン酸の合成能を有することが好ましい。ジメチルアリルニリン酸供給経路としては、例えば、メチルエリスリトールリン酸（M

E P) 経路及びメバロン酸 (MVA) 経路が挙げられる。

[0105] メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路とは、非メバロン酸経路とも呼ばれ、リナロールの前駆体であるイソペンテニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) の生合成経路である。メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路に関与する酵素としては、例えば、1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸シンターゼ (EC: 2. 2. 1. 7、例1、Dxs、ACCESSION ID NP_414954; 例2、AT3G21500、ACCESSION ID NP_566686; 例3、AT4G15560、ACCESSION ID NP_193291; 例4、AT5G11380、ACCESSION ID NP_001078570)、1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸リダクトイソメラーゼ (EC: 1. 1. 1. 267; 例1、Dxr、ACCESSION ID NP_414715; 例2、AT5G62790、ACCESSION ID NP_001190600)、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリスリトールシンターゼ (EC: 2. 7. 7. 60; 例1、IspD、ACCESSION ID NP_417227; 例2、AT2G02500、ACCESSION ID NP_565286)、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリスリトールキナーゼ (EC: 2. 7. 1. 148; 例1、IspE、ACCESSION ID NP_415726; 例2、AT2G26930、ACCESSION ID NP_180261)、2-C-メチル-D-エリスリトール-2, 4-シクロニリン酸シンターゼ (EC: 4. 6. 1. 12; 例1、IspF、ACCESSION ID NP_417226; 例2、AT1G63970、ACCESSION ID NP_564819)、1-ヒドロキシ-2-メチル-2-(E)-ブテニル-4-ニリン酸シンターゼ (EC: 1. 17. 7. 1; 例1、IspG、ACCESSION ID NP_417010; 例2、AT5G60600、ACCESSION ID NP_001119467)、4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸レダクター

ゼ (EC : 1. 17. 1. 2 ; 例1、I s p H、ACCESSION ID NP__414570 ; 例2、AT4G34350、ACCESSION ID NP__567965) が挙げられる。発現ベクターにおいて、メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路に関与する1以上の酵素をコードする遺伝子は、増殖促進剤逆依存プロモーターの制御下に配置されてもよい。

[0106] メバロン酸 (MVA) 経路に関与する酵素としては、例えば、メバロン酸キナーゼ (EC : 2. 7. 1. 36 ; 例1、Erg12p、ACCESSION ID NP__013935 ; 例2、AT5G27450、ACCESSION ID NP__001190411)、ホスホメバロン酸キナーゼ (EC : 2. 7. 4. 2 ; 例1、Erg8p、ACCESSION ID NP__013947 ; 例2、AT1G31910、ACCESSION ID NP__001185124)、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (EC : 4. 1. 1. 33 ; 例1、Mvd1p、ACCESSION ID NP__014441 ; 例2、AT2G38700、ACCESSION ID NP__181404 ; 例3、AT3G54250、ACCESSION ID NP__566995)、アセチル-CoA-C-アセチルトランスフェラーゼ (EC : 2. 3. 1. 9 ; 例1、Erg10p、ACCESSION ID NP__015297 ; 例2、AT5G47720、ACCESSION ID NP__001032028 ; 例3、AT5G48230、ACCESSION ID NP__568694)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoAシンターゼ (EC : 2. 3. 3. 10 ; 例1、Erg13p、ACCESSION ID NP__013580 ; 例2、AT4G11820、ACCESSION ID NP__192919 ; 例3、MvaS、ACCESSION ID AAG02438)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoAリダクターゼ (EC : 1. 1. 1. 34 ; 例1、Hmg2p、ACCESSION ID NP__013555 ; 例2、Hmg1p、ACCESSION ID NP__013636 ; 例3、AT1G76490、ACCESSION ID NP__177775 ; 例4、AT2G173

70、ACCESSION ID NP_179329、EC:1.1.1.88、例、MvaA、ACCESSION ID P13702)、アセチル-CoA-C-アセチルトランスフェラーゼ/ヒドロキシメチルグルタリル-CoAリダクターゼ (EC:2.3.1.9/1.1.1.34、例、MvaE、ACCESSION ID AAG02439) が挙げられる。

[0107] リナロールの材料であるIPP及びDMAPPは、上記のとおり通常、微生物が固有又はネイティブに有するメチルエリスリトールリン酸経路又はメバロン酸経路のいずれかにより生合成される。したがって、効率的なリナロールの製造のためのIPP及びDMAPPの供給の観点から、本発明で用いられる微生物は、メチルエリスリトールリン酸経路及び/又はメバロン酸経路が強化されていてもよい。

[0108] このような強化のため、本発明で用いられる微生物は、リナロールシンターゼに加えて、メバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路の酵素、例えばメバロン酸キナーゼをさらに発現していてもよい。したがって、リナロールシンターゼを発現する微生物は、メバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する1以上の酵素が導入されていてもよい。言い換えれば、メバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する1以上の酵素をコードする遺伝子及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含んでいてもよい。メバロン酸キナーゼ遺伝子としては、例えば、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) 等のメタノサルシナ (*Methanosarcina*) 属、メタノセラ・パルディコラ (*Methanocella paludicola*) 等のメタノセラ (*Methanocella*) 属、コリネバクテリウム・ヴァリアビル (*Corynebacterium variabile*) 等のコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、メタノセタ・コンキリ (*Methanosaeta concilii*) 等のメタノセタ (*Methanosaeta*) 属、及びニトロソプミラス・マリチマス (

Nitrosopumilus maritimus) 等のニトロソプミラス (*Nitrosopumilus*) 属に属する微生物の遺伝子が挙げられる。

[0109] リナロールシンターゼを発現する微生物は、メバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する1以上の酵素発現ベクターにより形質転換されていてもよい。発現ベクターは、組込み型 (*integrative*) ベクターであっても、非組込み型ベクターであってもよい。発現ベクターにおいて、メバロン酸キナーゼをコードする遺伝子は、構成型プロモーター、又は誘導型プロモーター (例、増殖促進剤逆依存プロモーター) の制御下に配置され得る。具体的には、メバロン酸キナーゼをコードする遺伝子は、構成型プロモーターの制御下に配置され得る。構成型プロモーターとしては、例えば、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター、*trp* プロモーター、*trc* プロモーター、T7 プロモーター、T5 プロモーター、T3 プロモーター、及びSP6 プロモーターが挙げられる。誘導型プロモーターとしては、例えば、後述の増殖促進剤逆依存プロモーターが挙げられる。

[0110] 発現ベクターはさらに、メバロン酸経路及び／又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する複数の酵素 (例、1種、2種、3種又は4種以上) を一緒又は個別に発現するものであってもよく、例えば、ポリシストロニック mRNA の発現ベクターであってもよい。

[0111] メバロン酸経路及び／又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する1以上の酵素の由来は、宿主に対して同種であってもよいし、異種であってもよい。メバロン酸経路及び／又はメチルエリスリトールリン酸経路に関与する酵素の由来が宿主に対して異種である場合、例えば、宿主が上述したような細菌 (例、大腸菌) であり、かつ、メバロン酸経路に関与する酵素が真菌 (例、サッカロミセス・セレビシエ) に由来するものであってもよい。また、宿主が、メチルエリスリトールリン酸経路に関与する酵素を固有に産生するものである場合、宿主に導入される発現ベクターは、メバロン酸経路に関与する酵素を発現するものであってもよい。

- [0112] 発現ベクターにおいて、メバロン酸（MVA）経路及び／又はメチルエリスリトールリン酸（MEP）経路に関与する1以上の酵素をコードする遺伝子は、増殖促進剤逆依存プロモーターの制御下に配置されてもよい。
- [0113] また、メチルエリスリトールリン酸経路及び／又はメバロン酸経路強化のため、イソペンテニルニリン酸（IPP）からジメチルアリルニリン酸（DMAPP）への変換能を有するイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼが、微生物に導入されてもよい。
- [0114] イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼ（EC:5.3.3.2）としては、例えば、`Idi1p`（ACCESSION ID NP_015208）、`AT3G02780`（ACCESSION ID NP_186927）、`AT5G16440`（ACCESSION ID NP_197148）、及び`Idi`（ACCESSION ID NP_417365）が挙げられる。発現ベクターにおいて、イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼをコードする遺伝子は、増殖促進剤逆依存プロモーターの制御下に配置されてもよい。
- [0115] 発現ベクターによる宿主の形質転換は、1以上の公知の方法を用いて行うことができる。このような方法としては、例えば、カルシウム処理された菌体を用いるコンピテント細胞法や、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、プラスミドベクター以外にもファージベクターを用いて、菌体内に感染させ導入する方法によってもよい。
- [0116] リナロールシンターゼを発現する微生物は、ジメチルアリルニリン酸供給経路を有し、かつ2-ケトグルコン酸生成経路が遮断されていることが好ましい。
- [0117] 本発明で用いる微生物は、2-ケトグルコン酸生成経路が遮断されている微生物であることが好ましい。2-ケトグルコン酸生成経路においては、グルコースがグルコース脱水素酵素により酸化されてグルコン酸が生成され、次いでグルコン酸がグルコン酸2-ケト脱水素酵素により酸化されてNADPHと2-ケトグルコン酸が生成される。よって、2-ケトグルコン酸生成

経路が遮断されている微生物は、グルコース脱水素酵素（GCD）及びグルコン酸２－ケト脱水素酵素からなる群より選ばれる１以上の酵素の活性を低減させることにより得ることができる。好ましくは、２－ケトグルコン酸生成経路は、酵素活性の低減により遮断される。すなわち、本発明で用いる微生物は、グルコースデヒドロゲナーゼ及びグルコン酸２－ケトーデヒドロゲナーゼからなる群より選ばれる１以上の酵素の酵素活性が低減しており、これにより微生物内で２－ケトグルコン酸生成経路が遮断されている。

[0118] 微生物における酵素活性の低減は、例えば、酵素活性の低下及び完全消失を含む。また、微生物における酵素活性の低減は、例えば、微生物における酵素の発現の低下及び完全消失を含む。微生物における酵素の発現の低下又は完全消失は、微生物が保有する活性の低下又は完全消失につながるためである。微生物における酵素活性の低減は、例えば、酵素をコードする遺伝子、酵素の発現又は活性を調節し得る因子をコードする遺伝子、又はこれらの遺伝子上流に位置する転写調節領域、翻訳調節領域等の発現調節領域（例、プロモーター、シャインダルガルノ（SD）配列）、非翻訳領域を破壊することにより達成することができる。上記の遺伝子又は領域の破壊は、酵素の発現又は活性を低下又は完全消失させるように、上記の遺伝子又は領域に対応するゲノム領域を改変することにより行うことができる。このような改変としては、例えば、上記ゲノム領域の一部又は全ての欠失、上記ゲノム領域へのポリヌクレオチドの挿入、及び上記ゲノム領域の別のポリヌクレオチドへの交換が挙げられるが、これらに限定されない。

[0119] リナロールシンターゼを発現する微生物は、ピロロキノリンキノン（PQQ）を合成する能力のある、あるいは、培養環境中に含まれるPQQを利用する能力のある微生物であることが好ましい。

[0120] リナロールシンターゼを発現する微生物は、グルコース脱水素酵素の活性が低減していることが好ましく、PQQを補酵素として利用するグルコース脱水素酵素の活性が低減していることがより好ましい。

[0121] リナロールシンターゼを発現する微生物が、リナロールシンターゼの発現

ベクターで、本来的に２－ケトグルコン酸経路を有している腸内細菌科に属する微生物等の宿主を形質転換して得られる微生物である場合には、該微生物は２－ケトグルコン酸経路を遮断するための改変がなされることが好ましい。

[0122] 例えば、エシェリヒア・コリ等の腸内細菌科に属する微生物はグルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を持ち、GCDアポ酵素を産生するが、PQQ産生能を有していないため、PQQ非添加ではGCD活性を有しない。しかしながらある外来遺伝子を菌体内で発現させるとPQQを代替する物質が生成し、GCD活性を発現することが知られている（国際公開第2006/133898号）。GCD活性を後天的に獲得した上述の腸内細菌科に属する微生物等の微生物は、本発明における「本来的に２－ケトグルコン酸経路を有する微生物」に含まれる。

[0123] ２－ケトグルコン酸生成経路を遮断するための改変は、グルコース脱水素酵素活性を低減するための改変であることが好ましく、PQQを補酵素として利用するグルコース脱水素酵素活性を低減するための改変であることが好ましい。改変は、微生物の細胞あたりのGCD活性が、非改変株、例えば野生型の腸内細菌科に属する菌株よりも低くなるように行い得る。例えば、改変株の細胞あたりのGCDの分子数、又は分子あたりのGCD活性が、野生株のそれよりも低下すればよい。細胞あたりのGCD活性の比較は、例えば、同じ条件で培養した改変株と野生株の細胞抽出液に含まれるGCD活性を比較することによって、行うことができる。比較の対照となり得る野生型のパントエア属細菌としては、例えば、パントエア・アナナティスAJ13355株（FERM BP-6614）、パントエア・アナナティスSC17株（FERM BP-11091）、パントエア・アナナティス SC17 (O) 株（Katashkina J l et al., BMC Mol Biol., 2009; 10:34 VKPM B-9246）が挙げられる。

[0124] PQQを補酵素とするGCDの活性は、下記反応を触媒する活性をいう。

[0125] β -D-グルコース+酸化型PQQ $\rightarrow$ D- δ -グルコノラクトン+還元型PQQ

[0126] GCD活性は、例えば、以下の反応を介した還元型DCPIPの生成を600nmの吸光度を測定による検出に基づき、測定することができる（特開2007-129965号公報）。

D-グルコース+酸化型PMS $\rightarrow$ D-グルコノ-1, 5-ラクトン+還元型PMS

還元型PMS+酸化型DCPIP $\rightarrow$ 酸化型PMS+還元型DCPIP

PMS：フェナジンメトサルフェート

DCPIP：2, 6-ジクロロフェノール-インドフェノール

[0127] GCDの活性は、GCDをコードする遺伝子（gcd遺伝子）、GCDの発現又は活性を調節し得る因子をコードする遺伝子、又はこれらの遺伝子上流に位置する転写調節領域を破壊することにより低減させることができる。

[0128] gcd遺伝子としては、以下の（x）～（z）からなる群より選ばれる1以上のポリヌクレオチドであることが好ましい。

（x）〔i〕配列番号59で表される塩基配列、もしくは〔ii〕配列番号59で表される塩基配列中301～2691番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド；

（y）前記〔i〕もしくは〔ii〕の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつGCD活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又は

（z）前記〔i〕もしくは〔ii〕の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつGCD活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0129] 配列番号59に示す塩基配列は、パントエア・アナナティスのgcd遺伝子の完全長の塩基配列である。配列番号59で表される塩基配列は、配列番号60で表されるアミノ酸配列をコードし、301～2691（2688）

番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟 G C D のアミノ酸配列をコードし得る。塩基配列の同一性、ストリンジェントな条件、ポリヌクレオチドの定義は、上記 (a 1) ~ (c 2 3) のポリヌクレオチドにて説明したのと同様である。

[0130] G C D は、以下の (X) ~ (Z) からなる群より選ばれる 1 以上のタンパク質であることが好ましい。

(X) 配列番号 6 0 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(Y) 配列番号 6 0 で表されるアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ G C D 活性を有するタンパク質；及び

(Z) 配列番号 6 0 で表されるアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつ G C D 活性を有するタンパク質。

[0131] 配列番号 6 0 で表されるアミノ酸配列は、成熟 G C D を含み得る。(Y) 及び (Z) のタンパク質は、同一条件で測定された場合、配列番号 6 0 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質の G C D 活性の 5 0 % 以上、6 0 % 以上、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上又は 9 5 % 以上の活性を有することが好ましい。欠失、置換、付加もしくは挿入の定義、アミノ酸の同一性等については、(A 1) ~ (C 3 1) のタンパク質にて説明したのと同様である。

[0132] g c d 遺伝子は、これらの配列に基づき、オリゴヌクレオチドを合成し、パントエア・アナナティスの染色体を鋳型として P C R 反応を行うことによってクローニングすることができる。g c d 遺伝子の破壊は、相同組換えにより行ってもよい。この場合、染色体上の g c d 遺伝子と一定以上の相同性、例えば、8 0 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上の相同性を有する遺伝子を用いてもよい。また、染色体上の g c d 遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子を用いてもよい。ストリンジェントな条件としては、例えば、6 0 °C、1 × S S C、0. 1 % S D S、好ましくは、0. 1 × S S C、0. 1 % S D S に相当する塩濃度で、

1 回より好ましくは 2 ～ 3 回洗浄する条件が挙げられる。

[0133] g c d 遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の標的遺伝子の上下流の配列を含めた標的遺伝子全体の欠失、g c d 遺伝子の不活化は、染色体上の g c d 遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）の導入、終始コドンの導入（ナンセンス変異）、あるいは一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異の導入によっても達成出来る（Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617 (1997), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515 (1998), Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991)）。

[0134] 各遺伝子の破壊は、遺伝子組換えにより行われることが好ましい。遺伝子組換えによる方法としては例えば、相同組換えを利用して、染色体上の標的遺伝子の発現調節配列（例、プロモーター領域、又はコード領域、もしくは非コード領域）の一部又は全部を欠失させること、又はこれらの領域にポリヌクレオチドを挿入することが挙げられる。

[0135] 発現調節配列の破壊は、好ましくは 1 塩基以上、より好ましくは 2 塩基以上、更に好ましくは 3 塩基以上につき行われる。また、コード領域を欠失させる場合は、各遺伝子が産生するタンパク質の機能が低減するのであれば、欠失させる領域は、N 末端領域、内部領域、C 末端領域のいずれの領域であってもよく、コード領域全体であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に標的遺伝子を破壊することができる。欠失させる領域の上流と下流のリーディングフレームは一致しないことが好ましい。

[0136] コード領域にポリヌクレオチドを挿入する場合、挿入位置は、標的遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が、確実に標的遺伝子を破壊することができる。挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。ポリヌクレオチドとしては、標的遺伝子によりコードされるタンパク質の機能を低減させるものであれば特に制限さ

れないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子を又はL-アミノ酸生産に有用な遺伝子を搭載したトランスポゾン等が挙げられる。

[0137] 染色体上の標的遺伝子を上記のように改変する方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、標的遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能するタンパク質を産生できない変異遺伝子を作製する。次に、該遺伝子を含むDNAで細菌を形質転換して、変異遺伝子と染色体上の標的遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の標的遺伝子を変異遺伝子に置換する。得られる欠失型標的遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても、野生型タンパク質とは異なる立体構造を有し、その活性が低減する。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立している。例えば、「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645 (2000))、又は、Redドリブンインテグレーション法とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002))とを組み合わせた方法(国際公開第2005/010175号)等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミド、接合伝達能力を有するプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスイサイドベクターを利用する方法などが挙げられる(米国特許第6303383号明細書、又は特開平05-007491号公報)。

[0138] 標的遺伝子の転写が低下するか否かの確認は、標的遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株、あるいは非改変株と比較することによって行うことが出来る。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる(Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001))

）。転写量は、野生株あるいは非改変株のいずれかと比較して低下していればよいが、例えば野生株、非改変株と比べて少なくとも75%以下、50%以下、25%以下、又は10%以下に低下していることが好ましく、全く発現していないことが特に好ましい。

[0139] 標的遺伝子がコードするタンパク質の量が低下したことの確認は、同タンパク質に結合する抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことが出来る (Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質量の低下は、野生株あるいは非改変株と比較して、低下していればいずれでもよいが、例えば、野生株あるいは非改変株と比べて少なくとも75%以下、50%以下、25%以下、又は10%以下に減少していることが好ましく、全くタンパク質を産生していない（完全に活性が消失している）ことがより好ましい。

[0140] GCDの活性を低下させるには、上述の遺伝子操作法以外に、例えば、パントエア属に属する細菌等の腸内細菌科に属する微生物を紫外線照射又は、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、GCDの活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。

[0141] GCDの活性は、PQQの合成能の低減によっても低減させることができる。PQQの合成能は、例えば、PQQ生合成に必要なオペロンであるpqqABCDEFの一部又は全部を欠失させることによって、低下させることができる (J. S. Velterop, P. W. Postma, J. Bacteriology 177 (17) : 5088-5098 (1995))。

[0142] 本発明で宿主として用いられる微生物は、通常は細菌であり得る。細菌は、グラム陽性菌であってもグラム陰性菌であってもよい。微生物としては例えば、腸内細菌科に属する微生物及びラン藻を含む後述する微生物が挙げられ、腸内細菌科又はラン藻がより好ましい。

- [0143] グラム陽性細菌としては、例えば、バシラス (*Bacillus*) 属細菌、リステリア (*Listeria*) 属細菌、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属細菌、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属細菌、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属細菌等が挙げられ、バシラス (*Bacillus*) 属細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌が好ましい。
- [0144] バシラス (*Bacillus*) 属細菌としては、例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 等が挙げられ、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) がより好ましい。
- [0145] コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*) 等が挙げられ、コリネバクテリウム・グルタミカムがより好ましい。
- [0146] グラム陰性細菌としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌、サルモネラ (*Salmonella*) 属細菌、ビブリオ (*Vibrio*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラン藻 (*Cyanobacteria*) 等が挙げられ、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、ラン藻 (*Cyanobacteria*) が好ましい。
- [0147] エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌としては、エシェリヒア

・コリ (*Escherichia coli*) が好ましい。例えば、エシェリヒア・コリ MG1655、エシェリヒア・コリ W3110 等が挙げられる。

[0148] パントエア (*Pantoea*) 属細菌としては、例えば、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュアルティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 等が挙げられ、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が好ましい。また、パントエア属細菌としては、欧州特許出願公開第 0952221 号明細書に例示された株を使用してもよい。パントエア属細菌の代表的な株としては、例えば、欧州特許出願公開第 0952221 号明細書に開示されるパントエア・アナナティス AJ13355 株 (FERM BP-6614) 及びパントエア・アナナティス AJ13356 株 (FERM BP-6615)、パントエア・アナナティス SC17 株 (FERM BP-11091)、パントエア・アナナティス SC17 (0) 株 (Katashkina JI et al., BMC Mol Biol., 2009; 10:34 VKPM B-9246) が挙げられる。

[0149] エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられ、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) が好ましい。また、エンテロバクター属細菌としては、欧州特許出願公開第 0952221 号明細書に例示された菌株を使用してもよい。エンテロバクター属細菌の代表的な株としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランス ATCC 12287 株、エンテロバクター・アエロゲネス ATCC 13048 株、エン

テロバクター・アエロゲネスNBRC12010株 (Biotechnol Bioeng. 2007 Mar 27; 98 (2) : 340-348)、エンテロバクター・アエロゲネスAJ110637 (FERM BP-10955) 株等が挙げられる。エンテロバクター・アエロゲネスAJ110637株は、2007年8月22日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6; 現在は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 特許生物寄託センター (NITE-IPOD) (〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)) に受託番号FERM P-21348として寄託され、2008年3月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-10955の受領番号が付与されている。

[0150] ラン藻 (Cyanobacteria) としては、例えば、アナベナ (Anabaena) 属ラン藻、アルスロスピラ (Arthrospira) 属ラン藻、シアノテーセ (Cyanothecae) 属ラン藻、ノストック (Nostoc) 属ラン藻、プロクロコッカス (Prochlorococcus) 属ラン藻、シネココッカス (Synechococcus) 属ラン藻、サーモシネココッカス (Thermosynechococcus) 属ラン藻等が挙げられ、シネコシスティス (Synechocystis) 属ラン藻が好ましい。

[0151] シネコシスティス (Synechocystis) 属細菌としては、例えば、Synechocystis sp. (例、Synechocystis sp. PCC6803、PCC6701、PCC6714、PCC6902、PCC7008) 等が挙げられ、Synechocystis sp. PCC6803が好ましい。シネコシスティス (Synechocystis) 属細菌の代表的な株としては、Synechocystis sp. PCC6803 GT株 (国際公開第2014/142051A1号) が挙げられる。

[0152] *Synechocystis* sp. PCC6803はフランスのパストール研究所、あるいはATCC27184はAmerican Type Culture Collectionから入手でき、*Synechocystis* sp. PCC6803 GT株等の株は、Qinglong D., et al. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 24081-24093に記載の方法に基づき前記PCC6803株から派生させ得る。

[0153] さらに本発明の方法は、培養培地中にリナロールが蓄積していてもよい。リナロールの蓄積量は、200mg/L以上でもよく、500mg/L以上でもよく、500mg/L以上が好ましい。リナロールはリナロールを生産する微生物に対して通常毒性を示し、多量にリナロールが蓄積した条件ではほとんど生育ができない。一方、本発明では、培地中にリナロールが蓄積していてもよく、蓄積量が200mg/L以上、又は500mg/L以上であっても、細菌は生育することができる。本発明の方法においては、培養培地中にリナロールが200mg/L以上又は500mg/L以上、好ましくは600mg/L以上、さらに好ましくは625mg/L、700mg/L以上蓄積していてもよく、むしろ高い濃度で蓄積していることが好ましい。培養培地に含まれてもよい成分の例等、培養条件については後段にて説明する。

[0154] 培養培地中のリナロールの蓄積量とは、培養培地1Lあたりのリナロール含量(mg)を意味する。リナロール及び他の揮発性成分の合計含量中のリナロール含量とは、リナロール及び他の揮発性成分の合計1Lあたりのリナロールの含量(mg)を意味する。

[0155] リナロール以外の揮発性成分としては、例えば、3-メチル-1-ブタノール、1-ペンタノール、3-メチル-2-ブテン-1-オール、 β -シトロネロール、(R)-(+)- β -シトロネロール、ゲラニオール、ネロール、トランス-ネオリドール、ネロリジル酢酸、酢酸リナリル、リモネン、カリオフィリン等の揮発性香気成分(香気揮発性成分)が挙げられるが、培

養培地中にこれらが含まれない場合もある。リナロール及び他の揮発性成分の合計含量に対してリナロール及び他の揮発性成分の合計含量とは、組成物に含まれる揮発性有機化合物の総重量を意味する。

[0156] リナロール組成物に含まれる揮発性有機化合物及びリナロールの同定、定量方法としては、例えば、ガスクロマトグラフィー、ヘッドスペース法が挙げられる。

[0157] ヘッドスペース法は、一般的に揮発性成分を分析するのに広く使用されている方法である（長井 裕美、酒類の香気成分分析におけるヘッドスペースGC法の改良、日本食品工業学会誌、39（3）、264-270、1992）。ヘッドスペース法によりリナロール組成物中の揮発性成分の合計含量を測定する場合、例えば以下の手順で行えばよい。リナロール組成物を含む溶液をヘッドスペースバイアルに封入し、一定条件の下で加温の後、ガスクロマトグラフにより分離、質量分析によりその種類を同定する。同定された化合物について検量線を作成することにより、溶液中に含まれる濃度に換算することができ、そこから、揮発性成分の合計含量と、各成分の構成比を求めることができる。このようにして、組成物中の揮発性成分の合計含量を測定することができる。

[0158] ガスクロマトグラフィーによりリナロール及び他の揮発性成分の合計含量を測定する場合、例えば以下の手順で行えばよい。揮発性成分を、例えば、Tenax TA（登録商標）吸着剤（ジーエルサイエンス株式会社）を用いてサンプリングし、水素炎イオン化検出器又は質量分析計を用いて無極性のキャピラリーカラムでn-ヘキサンとn-ヘキサデカンの範囲で溶出及び検出される、クロマトグラムピーク面積の合計をトルエン相当量に換算する方法（日本工業規格JIS A 1965）等が知られている。

[0159] 本発明の方法は、以下の工程1)～3)を含むことが好ましい。

1) 十分な濃度の増殖促進剤の存在下でリナロールシンターゼを発現する微生物を培養して、リナロール生成微生物を増殖させること；

2) 増殖促進剤の濃度を減少させて、前記微生物によるリナロールの生成を

誘導すること；及び

3) 前記微生物を培養してリナロールを生成すること。

[0160] 効率的なリナロールの製造の観点から、微生物の増殖期に対応する上記工程 1)、及びリナロールの生成期に対応する上記工程 3) が分離される。また、上記工程 2) は、微生物の増殖期からリナロールの生成期に移行させるため、リナロール生成の誘導期に対応する。

[0161] 増殖促進剤とは、微生物により消費され得る、微生物の増殖に必須の因子又は微生物の増殖の促進作用を有する因子であって、微生物により消費され培地中の量が減少すると微生物の増殖が喪失又は低減するものをいう。例えば、ある量の増殖促進剤を用いた場合、その量の増殖促進剤が消費されるまで微生物は増殖し続けるが、一旦増殖促進剤が全て消費されると、微生物は増殖し得ず、又は増殖速度が低下し得る。したがって、増殖促進剤により、微生物の増殖の程度を調節することができる。このような増殖促進剤としては、例えば、酸素（ガス）等の物質；鉄、マグネシウム、カリウム、カルシウムのイオン等のミネラル；リン酸（例、モノリン酸、二リン酸、ポリリン酸）又はその塩等のリン化合物；アンモニア、硝酸、亜硝酸、尿素等の窒素化合物（ガス）；硫酸アンモニウム、チオ硫酸等の硫黄化合物；ビタミン（例、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E、ビタミン K、ビタミン B 1、ビタミン B 2、ビタミン B 6、ビタミン B 12、ナイアシン、パントテン酸、ビオチン、アスコルビン酸）、及びアミノ酸（例、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、セレノシステイン）等の栄養素が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法では、1 種の増殖促進剤を用いてもよいし、2 種以上の増殖促進剤を組み合わせ用いてもよい。

[0162] 本発明の方法が上記工程 1) ～ 3) を含む場合、リナロールシンターゼを発現する微生物は、増殖促進剤に依存して増殖する能力、及び増殖促進剤逆

依存プロモーターに依存してリナロールを生成する能力を有する、酵素反応によるリナロール合成能を付与された微生物であることが好ましい。斯かる微生物は、微生物の増殖に十分な濃度の増殖促進剤の存在下で、増殖できる。ここで、「十分な濃度」とは、微生物の増殖に有効な濃度で増殖促進剤が用いられることをいい得る。表現「増殖促進剤逆依存プロモーターに依存してリナロールを生成する能力」とは、相対的に高い濃度の増殖促進剤の存在下では、リナロールを少しも生成できず、又はリナロールの生成効率が低い、相対的に低い濃度の増殖促進剤の存在下又は増殖促進剤の不在下では、リナロールを生成できること、又はリナロールの生成効率が低いことを意味し得る。したがって、本発明で好ましく用いられる微生物は、十分な濃度の増殖促進剤の存在下では、良好に増殖し得るが、リナロールを生成できず、又はリナロールの生成効率が低い。本発明で用いられる微生物はまた、不十分な濃度の増殖促進剤の存在下又は増殖促進剤の不在下では、良好に増殖し得ないが、リナロールを生成でき、又はリナロールの生成効率が低いことが好ましい。

[0163] 本発明の方法が上記工程 1) ～ 3) を含む場合、リナロールシンターゼを発現する微生物のリナロールシンターゼ遺伝子は、増殖促進剤逆依存プロモーターの制御下にあり得る。表現「増殖促進剤逆依存プロモーター」とは、相対的に高い濃度の増殖促進剤の存在下では、転写活性を有しない、又は低い転写活性を有するが、相対的に低い濃度の増殖促進剤の存在下又は増殖促進剤の不在下では、転写活性を有する、又は高い転写活性を有するプロモーターを意味し得る。したがって、増殖促進剤逆依存プロモーターは、微生物の増殖に十分な濃度の増殖促進剤の存在下では、リナロールシンターゼ遺伝子の発現を抑制でき、一方、微生物の増殖に不十分な濃度の増殖促進剤の存在下では、前記リナロールシンターゼ遺伝子の発現を促進できる。具体的には、微生物は、増殖促進剤逆依存プロモーターの制御下にある。

[0164] 例えば、増殖促進剤がリン化合物である場合、リン欠乏誘導型プロモーターを利用することができる。表現「リン欠乏誘導型プロモーター」とは、低

濃度のリン化合物で下流遺伝子の発現を促進できるプロモーターをいい得る。低濃度のリン化合物とは、（遊離）リン濃度 100 mg/L 以下の条件をいい得る。表現「リン」は、表現「リン化合物」と同義であり、それらは交換可能な様式で使用され得る。総リン濃度は、溶液中の全種のリン化合物を、強酸あるいは酸化剤によってオルトリン酸態リンに分解して定量可能である。リン欠乏条件下の総リン濃度は、 100 mg/L 以下、 50 mg/L 以下、 10 mg/L 以下、 5 mg/L 以下、 1 mg/L 以下、 0.1 mg/L 以下、又は 0.01 mg/L 以下であってもよい。リン欠乏誘導型プロモーターとしては、例えば、アルカリフォスファターゼをコードする遺伝子（例、*phoA*）のプロモーター、酸性フォスファターゼをコードする遺伝子（例、*phoC*）のプロモーター、センサーヒスチジinkinナーゼをコードする遺伝子（例、*phoR*）のプロモーター、レスポンスレギュレーターをコードする遺伝子（例、*phoB*）のプロモーター、及びリン取り込み担体をコードする遺伝子（例、*pstS*）のプロモーターが挙げられる。

[0165] 上記工程 1) では、リナロールシンターゼを発現する微生物が、十分な濃度の増殖促進剤の存在下で増殖される。より具体的には、リナロールシンターゼを発現する微生物の増殖は、十分な濃度の増殖促進剤の存在下で、培地中でリナロールシンターゼを発現する微生物を培養することにより行うことができる。

[0166] 例えば、リン化合物が増殖促進剤として用いられる場合、リナロールシンターゼを発現する微生物は、十分な濃度のリン化合物の存在下で良好に増殖することができるので、リン化合物は、増殖促進剤として作用することができる。増殖促進剤がリン化合物である場合、1) において、増殖に十分なリン化合物の濃度は、特に限定されないが、例えば 200 mg/L 以上、 300 mg/L 以上、 500 mg/L 以上、 1000 mg/L 以上、又は 2000 mg/L 以上であってもよい。増殖のためのリン化合物の濃度はまた、例えば 20 g/L 以下、 10 g/L 以下、又は 5 g/L 以下であってもよい。

[0167] 上記工程 2) では、微生物によるリナロールの生成の誘導が、増殖促進剤

の濃度を減少させることにより行われる。より具体的には、増殖促進剤の濃度の減少は、培地中への増殖促進剤の供給量を低下させることにより、行うことができる。増殖促進剤の濃度の減少はまた、培地中への増殖促進剤の供給量を工程 1) 及び 2) を通じて一定にした場合であっても、微生物の増殖を利用して行うことができる。工程 1) における微生物の増殖の初期では、微生物が十分に増殖しておらず、培地中の微生物数が少ないため、微生物による増殖促進剤の消費も相対的に少ない。したがって、増殖の初期では、培地中の増殖促進剤の濃度は、相対的に高い。一方、工程 1) における微生物の増殖の後期では、微生物が十分に増殖しており、培地中の微生物数が多いため、微生物による増殖促進剤の消費も相対的に多い。したがって、増殖の後期では、培地中の増殖促進剤の濃度は、相対的に低くなる。このように、一定量の増殖促進剤を、工程 1) 及び 2) を通じて培地中に供給し続けた場合、微生物の増殖と反比例して、培地中の増殖促進剤の濃度は減少する。この減少した濃度をトリガーとして、微生物によるリナロールの生成を誘導することができる。

[0168] 例えば、リン化合物又はアミノ酸が増殖促進剤として用いられる場合、微生物によるリナロールの生成を誘導できる培地中のリン化合物又はアミノ酸の培地中の濃度は、例えば 100 mg/L 以下、50 mg/L 以下、又は 10 mg/L 以下であり得る。

[0169] 上記工程 3) では、リナロールの生成が、微生物を培養することにより行われる。より具体的には、リナロールの生成は、増殖促進剤の濃度が減少した工程 2) の条件下において培地中で微生物を培養することにより行うことができる。培地中の増殖促進剤の濃度は、微生物によるリナロールの生成を可能にするため、工程 2) で上述したような濃度に維持され得る。

[0170] 本発明の方法では、工程 3) における微生物の培養期間を、工程 1) のその期間よりも長く設定することも可能である。誘導剤を利用する従来の方法では、より多量のリナロールを得るためには、リナロールの生成期において誘導剤を用いて微生物を長期培養する必要があった。しかし、長期培養する

と誘導剤が分解することから、微生物がリナロールの生産能を維持できなくなる。そのため、誘導剤を継続的に培養培地に添加する必要があるが、誘導剤は高価であり得、リナロール製造費が上昇し得る。したがって、リナロールの生成期において誘導剤を用いる微生物の長期培養は、その培養期間の長さに応じて、リナロールの製造費が上昇し得るという問題があった。一方、工程3)において誘導剤等の特定物質を用いない本発明の方法では、当該特定物質の分解を考慮する必要がなく、リナロールの生成期における長期培養がリナロール製造費の上昇を引き起こすという従来の問題も生じない。したがって、本発明の方法は、誘導剤を用いる従来の方法とは異なり、工程3)の期間を長く設定し易い。本発明の方法では、工程3)の期間を長く設定すればするほど、より多量のリナロールを製造することができる。

[0171] 本発明の方法は、リナロールの生成量をさらに向上させる観点等から、他の方法と併用されてもよい。このような方法としては、例えば、光 (Pia Lindberg, Sungsoon Park, Anastasios Melis, *Metabolic Engineering* 12 (2010) : 70-79) 又は温度 (Norma A Valdez-Cruz, Luis Caspeta, Nestor O Perez, Octavio T Ramirez, Mauricio A Trujillo-Roldan, *Microbial Cell Factories* 2010, 9 : 1) 等の環境因子を利用する方法、pHの変化 (欧州特許公開第1233068A2号明細書)、界面活性剤の添加 (特開平11-009296A号公報)、自己誘導法 (国際公開第2013/151174号) が挙げられる。

[0172] 本発明の方法で用いられる培地は、リナロール生成のための炭素源を含んでいてもよい。炭素源としては、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グリセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素数が1の化合物（以下、C1化合物という。）；コーン油、パーム油、大豆油等のオイル；ア

セテート；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；又はこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンB 1、L-ホモセリンなどの要求物質又は酵母エキス等を適量含有させることが好ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

[0173] 単糖類としては、ケトトリオース（ジヒドロキシアセトン）、アルドトリオース（グリセルアルデヒド）等のトリオース；ケトテトロース（エリトルロース）、アルドテトロース（エリトロース、トレオース）等のテトロース；ケトペントース（リブロース、キシロロース）、アルドペントース（リボース、アラビノース、キシロース、リキソース）、デオキシ糖（デオキシリボース）等のペントース；ケトヘキソース（プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース）、アルドヘキソース（アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース）、デオキシ糖（フコース、フクロース、ラムノース）等のヘキソース；セドヘプツロース等のヘプトースが挙げられ、フルクトース、マンノース、ガラクトース、グルコース等のC 6 糖；キシロース、アラビノース等のC 5 糖の炭水化物が好ましい。

[0174] 二糖類としては、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ツラノース、セロビオース等が挙げられ、スクロース、ラクトースが好ましい。

- [0175] オリゴ糖類としては、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖類；アカルボース、スタキオース等の四糖類；フラクトオリゴ糖（FOS）、ガラクトオリゴ糖（GOS）、マンナンオリゴ糖（MOS）等のその他のオリゴ糖類が挙げられる。
- [0176] 多糖類としては、グリコーゲン、デンプン（アミロース、アミロペクチン）、セルロース、デキストリン、グルカン（ β -1, 3-グルカン）が挙げられ、デンプン、セルロースが好ましい。
- [0177] 微生物性タンパク質としては、酵母又は細菌由来のポリペプチドが挙げられる。
- [0178] 植物性タンパク質としては、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁由来のポリペプチドが挙げられる。
- [0179] 脂質としては、C 4 以上の飽和、不飽和脂肪酸を 1 以上含む物質が挙げられる。
- [0180] オイルとしては、C 4 以上の飽和、不飽和脂肪酸を 1 以上含み、室温で液体の脂質であり得、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁、油性微生物細胞、ナンキンハゼ、又はこれらの 2 以上の組み合わせからなるものが挙げられる。
- [0181] 脂肪酸としては、式 RCOOH （「R」は 2 以上の炭素原子を有する炭化水素基を表す。）で表される化合物が挙げられる。
- [0182] 不飽和脂肪酸は、上記の基「R」における 2 つの炭素原子間に少なくとも 1 つの炭素-炭素二重結合を有する化合物であり、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、パルミテライジン酸、アラキドン酸等が挙げられる。
- [0183] 飽和脂肪酸は、「R」が飽和脂肪族基である化合物であり、ドコサン酸、イコサン酸、オクタデカン酸、ヘキサデカン酸、テトラデカン酸、ドデカン酸等が挙げられる。
- [0184] 中でも、脂肪酸としては、1 以上の C 2 から C 22 の脂肪酸が含まれるも

のが好ましく、C 1 2 脂肪酸、C 1 4 脂肪酸、C 1 6 脂肪酸、C 1 8 脂肪酸、C 2 0 脂肪酸、C 2 2 脂肪酸が含まれるものがより好ましい。

[0185] また、炭素源としては、これら脂肪酸の塩、誘導体、誘導体の塩も挙げられる。塩としては、リチウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩等が挙げられる。

[0186] また、炭素源としては、脂質、オイル、油脂、脂肪酸、グリセロール脂肪酸エステルとグルコース等の炭水化物との組み合わせが挙げられる。

[0187] 再生可能な炭素源としては、加水分解されたバイオマス炭素源が挙げられる。

[0188] バイオマス炭素源としては、木、紙、及びパルプの廃材、葉状植物、果肉等のセルロース系基質；柄、穀粒、根、塊茎等の植物の一部が挙げられる。

[0189] バイオマス炭素源として用いられる植物としては、コーン、小麦、ライ麦、ソルガム、トリティケイト、コメ、アワ、大麦、キャッサバ、エンドウマメ等のマメ科植物、ジャガイモ、サツマイモ、バナナ、サトウキビ、タピオカ等が挙げられる。

[0190] バイオマス等の再生可能な炭素源を細胞培地に添加する際には、炭素源は、前処理され得る。前処理としては、酵素的な前処理、化学的な前処理、酵素的な前処理と化学的な前処理の組み合わせが挙げられる。

[0191] 再生可能な炭素源を細胞培地に添加する前に、その全部又は一部を加水分解することが好ましい。

[0192] また、炭素源としては、酵母エキス、又は酵母エキスと、グルコース等の他の炭素源との組み合わせが挙げられ、酵母エキスと、二酸化炭素やメタノール等のC 1 化合物との組み合わせが好ましい。

[0193] 本発明の方法では、リナロールシンターゼを発現する微生物を生理食塩水と栄養源を含む標準的培地で培養することが好ましい。

[0194] 培養培地としては、特に限定されず、Luria Bertani (LB) ブロス、Sabouraud Dextrose (SD) ブロス、Yea

s t m e d i u m (Y M) ブロス等の一般的に市販されている既成の培地が挙げられる。特定の宿主細胞の培養に適した培地を適宜選択して用いることができる。

[0195] 培地には適切な炭素源の他に、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、及び培養に適していること、又はリナロールの産出を促進することが当業者にとって公知の成分が含まれていることが好ましい。

[0196] 微生物の培養条件としては、標準的な培養条件を用いることができる。

[0197] 培養温度としては、20℃～40℃であり得、pHが、約4.5～約9.5であり得る。

[0198] また、リナロール微生物の宿主の性質に応じて好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で培養を行うことが好ましい。培養方法としては、バッチ培養法、流加培養法、連続培養法等の公知の発酵方法を適宜用いることができる。

[0199] なお、リナロールは水に対する溶解度が低く、培地中に有機層を形成させ、二相で培養することにより、有機層に溶解させて回収することができる。有機層を形成させるために添加する物質としては例えば、ドデカン、オレイン酸メチル、オレイルアルコール、フタル酸ジブチル、又はイソプロピルミリスレート等を使用することができる。

実施例

[0200] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

参考例1：リナロール添加試験

後述する実施例4で構築したSWITCH-PphoC Δgcd株を市販のプラスミドベクターpSTV28（タカラバイオ株式会社製）にて形質転換したSWITCH-PphoC Δgcd/pSTV28株のグリセロールストックを融解し、菌体懸濁液50μLを60mg/Lのクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて18時間静置培養した。得られたプレート上の菌体を回収し、60mg/Lのクロラムフェニコールを含む以下に記載の培地4mLを注入した小型L型培養管（型式：T

V100030、アドバンテック東洋株式会社製）に開始O.D.が0.01から0.02の範囲になるように植菌し、キャップ式のシリコ栓を培養栓として用いた。生育培地は最少培地とし、表1記載の10×M9 salts 50mLに対して、別殺菌（AC 120℃、20分、1M CaCl₂はフィルトレーション）した20%（w/v）グルコース10mL、1M CaCl₂ 0.05mL、1M MgSO₄ 1.0mLを冷却後（50℃以下）添加し、滅菌水で500mLになるよう混合調製した。培養温度を34℃、振盪速度を70rpmとし、小型振盪培養装置TVS062CA（アドバンテック東洋株式会社製）を用いて23時間培養し、15分毎に5.0sec振盪を停止し、O.D.値を自動計測した。

[0201] [表1]

表1. 10×M9 salts		
Na ₂ HPO ₄ ・7H ₂ O	128	g/L
KH ₂ PO ₄	30	g/L
NaCl	5.0	g/L
NH ₄ Cl	10	g/L
pH無調整 AC 120℃、15分		

[0202] 培養開始後、O.D.値が0.6－0.7に達した時点で、それぞれ培地中の試薬リナロール濃度が1251、837、626、417mg/Lとなるようリナロール溶液を各小型L型培養管に添加した。リナロール溶液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を15%、10%、7.5%、5.0%、0.0%（v/v）となるようエタノール（和光純薬工業株式会社製）で希釈し、各小型L型培養管に40μL添加した。培地中のリナロール濃度は試薬リナロールの比重0.86（20/4℃）（引用文献：和光純薬工業株式会社実績値）から算出した。

[0203] TVS062CA通信ソフト（TV100070、アドバンテック東洋株式会社製）を用いて測定した培養経時のO.D.値の経時変化のグラフを図14に示す。

[0204] 一般的に、リナロールをはじめとした複数種のモノテルペノイドは抗菌性を示すことが知られている（Park S N et al., Anaero

be, 18 (3), 369-372, 2012)。SWITCH-PphoC Δgcd/pSTV28株において、培地へ626mg/L以上のリナロールを添加することによってO.D. 値の減少が認められた(図14)。これらの結果は、菌体生育の阻害を抑制するためには培地中のリナロール濃度が626mg/L未満であることが好ましいことを示している。

[0205] 実施例1：リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

1-1) *Actinidia arguta* (サルナシ) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の取得

*Actinidia arguta*由来リナロールシンターゼ(AaLINS)遺伝子の塩基配列(GenBank accession number: GQ338153)、及びアミノ酸配列(GenPept accession number: ADD81294)は既に知られている(Chen, X. et al., (2010) Functional Plant Biology, 37, 232-243)。*Actinidia arguta*由来リナロールシンターゼタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号1、及び配列番号2に示す。AaLINS遺伝子を効率的に発現させる為、コドン最適化し、さらに葉緑体移行シグナルが切断されたAaLINS遺伝子を設計し、これをopt__AaLINSと名付けた。opt__AaLINSの塩基配列を配列番号3に示す。opt__AaLINS遺伝子にtacプロモーター領域(deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25)を付加したDNAは化学合成された後、pMW119(株式会社ニッポンジーン製)にクローニングされ、得られたプラスミドをpMW119-Ptac-opt__AaLINSと名付けた。

[0206] 1-2) *Coriandrum sativum* (コリアンダー) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の取得

*Coriandrum sativum*由来リナロールシンターゼ(CsLINS)遺伝子の塩基配列(GenBank accession nu

mber:KF700700)、及びアミノ酸配列 (GenPept accession number: AHC54051) は既に知られている (Galata Met al., (2014) *Phytochemistry*, 102, 64-73)。Coriandrum sativum由来リナロールシンターゼタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子配列を配列番号4、及び配列番号5に示す。CsLINS遺伝子を効率的に発現させる為、コドン最適化し、さらに葉緑体移行シグナルが切断されたCsLINS遺伝子を設計し、これをopt_CsLINSと名付けた。opt_CsLINSの塩基配列を配列番号6に示す。opt_CsLINS遺伝子にtacプロモーター領域 (deBoer, et al., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80, 21-25) を付加したDNAは化学合成された後、pMW119 (株式会社ニッポンジーン製) にクローニングされ、得られたプラスミドをpMW119-Ptac-opt_CsLINSと名付けた。

[0207] 1-3) *Escherichia coli* 由来変異型ファルネシルニリン酸シンターゼ遺伝子の取得

Escherichia coli のファルネシルニリン酸シンターゼは、ispA遺伝子 (配列番号7) によりコードされている (Fujisaki S., et al. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* 108:995-1000.)。Bacillus stearothermophilus由来のファルネシルニリン酸シンターゼにおいて、菌体内のゲラニルニリン酸の濃度を高める変異が明らかにされている (Narita K., et al. (1999) *J Biochem* 126 (3):566-571.)。本知見を基に*Escherichia coli* のファルネシルニリン酸シンターゼにおいても、同様の変異体が作出されている (Reiling KK et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 87 (2) 200-212.)。ゲラニルニリン酸生成活性の高いispA変異体 (S80F) 遺伝子を効率的に発現さ

せるため、コドン最適化した配列を設計し、これを *ispA** と名付けた。

*ispA** の塩基配列を配列番号 8 に示す。*ispA** 遺伝子は化学合成された後、pMW119（株式会社ニッポンジーン製）にクローニングされ、得られたプラスミドを pMW119-*ispA** と名付けた。

[0208] 1-4) *opt__AaLINS*、及び *ispA** 遺伝子の同時発現プラスミドの構築

配列番号 9 に示したプライマーと配列番号 11 に示したプライマーを用いて pMW119-*Ptac-opt__AaLINS* を鋳型に PCR を行い、*Ptac-opt__AaLINS* 断片を得た。さらに、配列番号 12 に示したプライマーと配列番号 13 に示したプライマーを用いて pMW119-*ispA** を鋳型に PCR を行い、*ispA** 断片を得た。精製した *Ptac-opt__AaLINS* 断片、及び *ispA** 断片を制限酵素 *Pst*I と *Sca*I で消化した pACYC177（株式会社ニッポンジーン製）に *In-Fusion HD cloning kit*（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-*Ptac-opt__AaLINS-ispA** を構築した。

[0209] 1-5) *opt__CsLINS*、及び *ispA** 遺伝子の同時発現用プラスミドの構築

配列番号 9 に示したプライマーと配列番号 14 に示したプライマーを用いて pMW119-*Ptac-opt__CsLINS* を鋳型に PCR を行い、*Ptac-opt__CsLINS* 断片を得た。さらに、配列番号 15 に示したプライマーと配列番号 13 に示したプライマーを用いて pMW119-*ispA** を鋳型に PCR を行い、*ispA** 断片を得た。精製した *Ptac-opt__CsLINS* 断片、及び *ispA** 断片を制限酵素 *Pst*I と *Sca*I で消化した pACYC177（株式会社ニッポンジーン製）に *In-Fusion HD cloning kit*（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-*Ptac-opt__CsLINS-ispA** を構築した。

[0210] 1-6) opt__AaLINS遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号9に示したプライマーと配列番号10に示したプライマーを用いてpMW119-Ptac-opt__AaLINSを鋳型にPCRを行い、Ptac-opt__AaLINS断片を得た。精製したPtac-opt__AaLINS断片、及び制限酵素Pst IとSca Iで消化したpACYC177（株式会社ニッポンジーン製）にIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-Ptac-opt__AaLINSを構築した。

[0211] 実施例2：E. coli 野生株におけるリナロール発酵

2-1) E. coli MG1655株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

E. coli MG1655のコンピテントセルを調製し、pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*、pACYC177-Ptac-opt__AaLINS、あるいはpACYC177をエレクトロポレーション法にて導入した。得られた株をE. coli MG1655/AaLINS-ispA*株、E. coli MG1655/AaLINS株、及びE. coli MG1655/pACYC177株と命名した。

[0212] 上記で得られた株を50mg/Lのカナマイシンを含むLB液体培地にて終O.D. 600≒0.3となるように37℃で培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注し-80℃に保存した。

[0213] 2-2) E. coli MG1655株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

E. coli MG1655/AaLINS-ispA*株、E. coli MG1655/AaLINS株、及びE. coli MG1655/pACYC177株のグリセロールストックを融解し、50μLを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティンググループ10μ

L (Thermo Fisher Scientific社製) のループ部分 1 / 4 程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管 (直径 × 長さ × 肉厚 (mm) = 25 × 200 × 1.2) 中の、50 mg / L のカナマイシンを含む発酵培地 (表2) 5 mL に接種し、往復振とう培養装置で 30 °C、120 rpm の条件にて 24 時間培養した。

[0214] [表2]

表2 [リナロール発現宿主E. coli MG1655向け発酵用培地]

A 区

D-グルコース	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
pH無調整 AC 115°C、10分	

B 区

(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g/L
KOHでpH 7.0に調整後、AC 115°C、10分	

C 区

CaCO ₃	20 g/L
乾熱滅菌 180°C、2時間	

[0215] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5 mL の発酵培地に対して、1 mL のミリスチン酸イソプロピル (東京化成工業株式会社製) を添加した。

[0216] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF (株式会社島津製作所製) を用いて以下の条件にて測定した。カラムはDB-5 (アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μm) を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール (和光純薬工業株式会社製) を用いて調製した。O. D. 値は分光光度計 (HITACHI U-2900) によって620 nmで測定した。以下、特に断りがない限り、O. D. 値は本機器で測定した。

[0217] 気化室温度 360.0 °C
 注入量 1.0 μL

3-1) *P. ananatis* SC17株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

P. ananatis SC17株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*、pACYC177-Ptac-opt__AaLINSあるいはpACYC177を導入した。得られた株をそれぞれ、*P. ananatis* SC17/AaLINS-ispA*株、*P. ananatis* SC17/AaLINS株、及び*P. ananatis*/pACYC177と命名した。

[0221] 3-2) *P. ananatis* SC17株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

P. ananatis SC17/AaLINS-ispA*株、*P. ananatis* SC17/AaLINS株、及び*P. ananatis* SC17/pACYC177株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34 $^{\circ}$ Cにて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、インキュレーティンググループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径 $\times$ 長さ $\times$ 肉厚(mm))=25 $\times$ 200 $\times$ 1.2)中の、50mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地(表4)5mLに接種し、往復振とう培養装置で30 $^{\circ}$ C、120rpmの条件にて24時間培養した。

[0222]

[表4]

表 4. リナロール生産宿主 *P. ananatis* SC17 株向け発酵用培地

A 区	
D-グルコース	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
pH 無調整 AC 115℃、10分	
B 区	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g/L
KOH で pH 7.0 に調整後、AC 115℃、10分	
C 区	
CaCO ₃	20 g/L
乾熱滅菌 180℃、2時間	

[0223] 滅菌完了後に上記 A 区、B 区、C 区を混合した。試験管に分注した 5 mL の発酵培地に対して、1 mL のミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業株式会社製）を添加した。

[0224] 培養開始から 24 時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフ GC-2025 AF（株式会社島津製作所製）を用いて以下の条件にて測定した。カラムは DB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。

[0225] 気化室温度	360.0℃
注入量	1.0 μL
注入モード	スプリット 1:10
キャリアガス	He
制御モード	線速度
圧力	125.5 kPa
全流量	20.5 mL/min
カラム流量	1.59 mL/min
線速度	36.3 cm/sec
ページ流量	3.0 mL/min

[0226] カラムオープン温度プログラム 合計時間 21.5 min

レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)
	65.0	5.0
5.0	105.0	0.5
35.0	297.5	2.5
検出器温度	375.0°C	
検出器	FID	
メイクアップガス	He (30.0 mL/min)	
水素流量	40.0 mL/min	
空気	400.0 mL/min	

[0227] リナロール濃度は培地量に換算した値として示す。試験管2本の結果の平均値を表5に示す。対照ベクターpACYC177を導入した対照株ではリナロール生産は認められなかったが、*P. ananatis* SC17/AaLINS株、及び*P. ananatis* SC17/AaLINS-ispA*株においてリナロール生産が確認された。

[0228] [表5]

表5 *P. ananatis* SC17における*A. arguta*由来リナロールシンターゼ及び変異型*ispA*導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
<i>P. ananatis</i> SC17 / pACYC177	31.8	0.0
<i>P. ananatis</i> SC17 / AaLINS	20.9	1.8
<i>P. ananatis</i> SC17 / AaLINS-ispA*	30.2	5.8

[0229] 参考実施例1：微好気誘導型イソプレノイド化合物生成微生物 (SWITCH-H-Pild/ispSM) 及びリン酸欠乏誘導型イソプレノイド化合物生成微生物 (SWITCH-PphoC/ispSM, SWITCH-PpstS/ispSM)、アラビノース誘導型イソプレノイド化合物生成微生物 (SWITCH-Para/ispSM) の構築

1-1) pMW-Para-mvaES-Ttrpの構築

1-1-1) *Enterococcus faecalis* 由来mvaE遺伝子の化学合成

acetyl-CoA acetyltransferaseとhydroxymethylglutaryl-CoA reductaseをコードする*Enterococcus faecalis*由来mvaEの塩基配列、及びアミノ酸配列はすでに知られている（塩基配列のACCESSION番号：AF290092.1、(1479..3890)、アミノ酸配列のACCESSION番号：AAG02439）（J. Bacteriol. 182(15), 4319-4327 (2000)）。*Enterococcus faecalis*由来mvaEタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号20、及び配列番号21にそれぞれ示す。mvaE遺伝子を*E. coli*で効率的に発現させるために*E. coli*のコドン使用頻度に最適化したmvaE遺伝子を設計し、これをEFmvaEと名付けた。この塩基配列を配列番号22に示す。mvaE遺伝子は化学合成された後、pUC57（GenScript社製）にクローニングされ、得られたプラスミドをpUC57-EFmvaEと名付けた。

[0230] 1-1-2) *Enterococcus faecalis*由来mvaS遺伝子の化学合成

hydroxymethylglutaryl-CoA synthaseをコードする*Enterococcus faecalis*由来mvaSの塩基配列、及びアミノ酸配列はすでに知られている（塩基配列のACCESSION番号：AF290092.1、complement(142..1293)、アミノ酸配列のACCESSION番号：AAG02438）（J. Bacteriol. 182(15), 4319-4327 (2000)）。*Enterococcus faecalis*由来mvaSタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号23、及び配列番号24にそれぞれ示す。mvaS遺伝子を*E. coli*で効率的に発現させるために*E. coli*のコドン使用頻度に最適化したmvaS遺伝子を設計し、これをEFmvaSと名付けた。この塩基配列を配列番号25に示す。mvaS遺伝子は化学合成された後、pUC57（GenScript社製）

）にクローニングされ、得られたプラスミドを pUC57-EFmv a S と名付けた。

[0231] 1-1-3) アラビノース誘導型 m v a E S 発現ベクターの構築

アラビノース誘導型メバロン酸経路上流遺伝子発現ベクターは次の手順で構築した。プラスミド pKD46 を鋳型として配列番号 26 と配列番号 27 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR により *E. coli* 由来 *araC* と *araBAD* プロモーター配列からなる *Para* を含む PCR 断片を得た。プラスミド pUC57-EFmv a E を鋳型として配列番号 28 と配列番号 29 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR により EFmv a E 遺伝子を含む PCR 断片を得た。プラスミド pUC57-EFmv a S を鋳型として配列番号 30 と配列番号 31 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR により EFmv a S 遺伝子を含む PCR 断片を得た。プラスミド pSTV-Ptac-Ttrp (国際公開第 2013/069634 A1 号) を鋳型として配列番号 32 と配列番号 33 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR により Ttrp 配列を含む PCR 断片を取得した。これら 4 つの PCR 断片を得るための PCR には Prime Star ポリメラーゼ (タカラバイオ株式会社製) を用いた。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、98℃にて 10 秒、55℃にて 5 秒、72℃にて 1 分/kb の反応を 30 サイクル行った。精製した *Para* を含む PCR 産物と EFmv a E 遺伝子を含む PCR 産物を鋳型として配列番号 26 と配列番号 29 に示す合成オリゴヌクレオチドを、精製した EFmv a S 遺伝子を含む PCR 産物と Ttrp を含む PCR 産物を鋳型として配列番号 30 と配列番号 33 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行った。その結果、*Para* と EFmv a E 遺伝子、EFmv a S と Ttrp 含む PCR 産物を取得した。プラスミド pMW219 (株式会社ニッポンジーン製) は常法に従って *Sma*I 消化した。*Sma*I 消化後 pMW219 と精製した *Para* と EFmv a E 遺伝子を含む PCR 産物、EFmv a S 遺伝子と Ttrp を含む PCR 産物は *In-*

Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて連結した。得られたプラスミドは、pMW-Para-mvaES-Ttrpと命名した。

[0232] 1-2) メバロン酸経路の上流及び下流遺伝子を保有する組込み型コンディショナル複製プラスミドの構築

1-2-1) 異なるプロモーターの制御下にあるmvaES遺伝子を含むプラスミドの構築

メバロン酸経路の上流及び下流遺伝子を保有する組込み型プラスミドを構築するため、pAH162- λ attL-TcR- λ attR vector (Minaeva *et al.*, BMC Biotechnol. 2008; 8:63)を用いた。

[0233] pMW-Para-mvaES-TtrpのKpnI-SaIIフラグメントを、pAH162- λ attL-TcR- λ attRのSphI-SaII認識部位中にクローニングした。その結果、E. coli Paraプロモーター及びリプレッサー遺伝子araCの制御下にあるE. faecalis由来mvaESオペロンを保有するpAH162-Para-mvaESプラスミドを構築した(図1)。

[0234] オペロンのプロモーター欠損バリエーションを得るために、pMW219-Para-mvaES-TtrpのEcl136II-SaIIフラグメントを、同じ組込み型ベクター中にサブクローニングした。得られたプラスミドのマッピングを、図2に示す。

[0235] 異なるプロモーターの制御下にあるmvaES遺伝子を保持する染色体固定用プラスミドのセットを構築した。この目的のために、I-SceI、XhoI、PstI及びSphI認識部位を含むポリリンカーを、mvaES遺伝子の上流に位置する唯一のHindIII認識部位中に挿入した。この目的を達成するために、プライマー1及び2(表6)とポリヌクレオチドキナーゼを用いてアニーリングを行った。得られた二本鎖DNAフラグメントを、ポリヌクレオチドキナーゼで5'リン酸化し、得られたリン酸化フラグ

メントをHindIIIにて切断したpAH162-mvaESプラスミドにライゲーション反応により挿入した。得られたpAH162-MCS-mvaESプラスミド（図3）は、mvaES遺伝子の前で所望の配向性を保ちながらプロモーターをクローニングするのに都合が良いものである。lldD、phoC及びpstS遺伝子の調節領域を保持するDNAフラグメントを、P. ananatis SC17(0)株(Katashkina JI et al., BMC Mol Biol., 2009; 10: 34)のゲノムDNAを鋳型として、ならびにプライマー3及び4、プライマー5及び6、ならびにプライマー7及び8（表6）をそれぞれ用いて、PCRにより生成し、pAH162-MCS-mvaESの適切な制限酵素認識部位中にクローニングした。得られたプラスミドを、図4に示す。クローニングされたプロモーターフラグメントの配列決定を行い、予想されるヌクレオチド配列に正確に対応することを確認した。

[0236] 1-2-2) pAH162-Km-Ptac-KDyl染色体固定用プラスミドの構築

tetAR遺伝子を含むpAH162- λ attL-Tc^R- λ attR(Minaeva NI et al., BMC Biotechnol., 2008; 8: 63)のAatII-ApaIフラグメントを、プライマー9及び10（表6）、ならびにpUC4Kプラスミド(Taylor LA 及びRose RE., Nucleic Acids Res., 16, 358, 1988)を鋳型として用いたPCRで得られたDNAフラグメントと置換した。その結果、pAH162- λ attL-Km^R- λ attRが得られた（図5）。

[0237] Ptacプロモーターを、pAH162- λ attL-Tc^R- λ attRベクター(Minaeva NI et al., BMC Biotechnol., 2008; 8: 63)のHindIII-SphI認識部位に挿入した。その結果、染色体固定用発現ベクターpAH162-Ptacが構築された。クローニングしたプロモーターフラグメントの配列を決定し、設

計通りの配列であることを確認した。pAH162-Ptacのマップを、図6に示す。

[0238] ATG Service Gene (ロシア) により化学合成された、レアコドンと同義コドンに置換した*S. cerevisiae*由来PMK、MVD及びyld遺伝子を保持するDNAフラグメント (図7) を、染色体固定用ベクターpAH162-PtacのSphI-KpnI制限酵素認識部位中にサブクローニングした。化学合成されたKDyIオペロンを含むDNA配列を配列番号58に示す。Ptac-KDyI発現カセットを保持する得られたプラスミドpAH162-Tc-Ptac-KDyIを、図8 (A) に示す。その後、薬剤耐性マーカー遺伝子を置換する目的でtetAR遺伝子を保持するpAH162-Tc-Ptac-KDyIのNotI-KpnIフラグメントを、pAH162- λ attL-Km^R- λ attRにて対応するフラグメントにより置換した。その結果、カナマイシン耐性遺伝子kanをマーカーとするpAH162-Km-Ptac-KDyIプラスミドを得た (図8 (B))。

[0239] 古典的SD配列に連結された、メタノセラ・パルディコラ (*Methanocella paludicola*) 株であるSANA E [完全ゲノム配列については、GenBankアクセッション番号AP011532を参照] 由来の推定mvk遺伝子のコーディング部分を含む化学合成DNAフラグメントを、上記組込み型発現ベクターpAH162-PtacのPstI-KpnI認識部位中にクローニングした。mvk遺伝子を保持する染色体固定プラスミドのマップを、図9に示す。

[0240] 1-3) レシピエント株SC17 (0) Δ ampC::attB_{phi80} Δ ampH::attB_{phi80} Δ crt::Ptac-mvk (*M. paludicola*) の構築

attL_{phi80}及びattR_{phi80}に隣接したkan遺伝子、ならびに標的染色体部位に相同な40bp配列を含むPCR増幅DNAフラグメントの λ Red依存的な組込み (Katashkina JI et al., BM

C Mol Biol., 2009; 10: 34)、続いて、カナマイシン耐性マーカーのファージ ϕ 80 Int/Xis 依存的な除去 (Andreeva IG et al., FEMS Microbiol Lett., 2011; 318 (1): 55–60) を含む2段階の手法を用いて、 Δ ampH::attB _{ϕ 80}及び Δ ampC::attB _{ϕ 80}染色体改変を、P. ananatis SC17 (0) 株に段階的に導入した。SC17 (0) は、P. ananatis AJ13355の λ Red耐性誘導体である (Katashkina JI et al., BMC Mol Biol., 2009; 10: 34); P. ananatis AJ13355の注釈付完全ゲノム配列は、PRJDA162073又はGenBankアクセッション番号AP012032.1及びAP012033.1として利用可能である。pMWatt ϕ プラスミド [Minaeva NI et al., BMC Biotechnol., 2008; 8: 63] を鋳型として用いて、プライマー11及び12、ならびにプライマー13及び14 (表6) をプライマーとして用いて、それぞれampH及びampC遺伝子領域への組込みに使用されるDNAフラグメントを生成した。プライマー15及び16、ならびにプライマー17及び18 (表6) を、得られた染色体改変物のPCR検証に用いた。

- [0241] 並行して、P. ananatis AJ13355ゲノムの一部である、pEA320 320 kbメガプラスミド上に位置するcrtオペロンの代わりに ϕ 80ファージのattB部位を保持するP. ananatis SC17 (0) の誘導体を構築した。この株を得るために、ゲノム中の標的部位に相同な40 bp領域に隣接したattL _{ϕ 80}–kan–attR _{ϕ 80}を保持するPCR増幅DNAフラグメントの λ Red依存的な組込みを、以前に記載された手法 (Katashkina JI et al., BMC Mol Biol., 2009; 10: 34) にしたがって行った。attL _{ϕ 80}–kan–attR _{ϕ 80}によるcrtオペロンの置換に用いられるDNAフラグメントを、プライマー19及び20 (表6) を用いる反

応で増幅した。pMWattphiプラスミド (Minaeva *et al.*, BMC Biotechnol., 2008; 8:63) を、この反応で鋳型として用いた。得られた組込み体を、SC17 (0) $\Delta crt::attL_{phi80}-kan-attR_{phi80}$ と名付けた。プライマー21及び22 (表6) を、SC17 (0) $\Delta crt::attL_{phi80}-kan-attR_{phi80}$ の染色体構造のPCR検証に用いた。構築株からのカナマイシン耐性マーカーの除去を、既報の手法に従い pAH129-catヘルパープラスミドを用いて行った (Andreeva *et al.*, FEMS Microbiol Lett., 2011; 318 (1): 55-60)。オリゴヌクレオチド21及び22を、得られたSC17 (0) $\Delta crt::attB_{phi80}$ 株のPCR検証に用いた。得られた $\Delta ampC::attB_{phi80}$ 、 $\Delta ampH::attB_{phi80}$ 及び $\Delta crt::attB_{phi80}$ ゲノム改変物のマップをそれぞれ、図10 (A)、(B) 及び (C) に示す。

[0242] 上記 pAH162-Ptac-mvk (M. paludicola) プラスミドを、既報のプロトコル (Andreeva *et al.*, FEMS Microbiol Lett., 2011; 318 (1): 55-60) にしたがってSC17 (0) $\Delta crt::attB_{phi80}$ の $attB_{phi80}$ 部位に組み込んだ。プラスミドの組込みを、プライマー21及び23、ならびにプライマー22及び24 (表6) を用いたポリメラーゼ連鎖反応で確認した。その結果、SC17 (0) $\Delta crt::pAH162-Ptac-mvk$ (M. paludicola) 株を得た。 $\Delta crt::pAH162-Ptac-mvk$ (M. paludicola) 改変物のマップを、図11 (A) に示す。

その後、ゲノムDNAエレクトロポレーション手法 (Katashkina *et al.*, BMC Mol Biol., 2009; 10: 34) を介してSC17 (0) $\Delta crt::pAH162-Ptac-mvk$ (M. paludicola) の遺伝形質をSC17 (0) $\Delta ampC$

: : attB_{phi80} Δamp^H: : attB_{phi80}へ移行させた。得られた株はテトラサイクリン耐性遺伝子 *tetRA* をマーカーとして利用している。*tetRA* マーカー遺伝子を含む pAH162-Ptac-mvk (*M. paludicola*) 組込み型プラスミドのベクター部分を、既報の pMW-intxis-cat ヘルパープラスミド [Katashkina Jilet al., BMC Mol Biol., 2009; 10: 34] を用いて除去した。その結果、マーカー遺伝子欠損株 SC17 (0) Δamp^H: : attB_{phi80} Δamp^C: : attB_{phi80} Δcrt: : Ptac-mvk (*M. paludicola*) を得た。Δcrt: : Ptac-mvk (*M. paludicola*) ゲノム改変物のマップを、図11 (B) に示す。

[0243] 1-4) SWITCH株のセットの構築

pAH162-Km-Ptac-KDyl プラスミドを、既報のプロトコル (Andreeva IG et al. FEMS Microbiol Lett. 2011; 318 (1): 55-60) にしたがって、SC17 (0) Δamp^H: : attB_{phi80} Δamp^C: : attB_{phi80} Δcrt: : Ptac-mvk (*M. paludicola*) / pAH123-cat 株の染色体に組み込んだ。50 mg/L カナマイシンを含む LB アガー上に細胞を撒いた。増殖した Km^R クローンを、プライマー 11 及び 15、ならびにプライマー 11 及び 17 (表6) を用いた PCR 反応で試験した。Δamp^H: : attB_{phi80} 又は Δamp^C: : attB_{phi80} に組み込まれた pAH162-Km-Ptac-KDyl プラスミドを保持する株を選択した。Δamp^H: : pAH162-Km-Ptac-KDyl、Δamp^C: : pAH162-Km-Ptac-KDyl、Δamp^C: : Ptac-KDyl 染色体改変物のマップを、図12 (A)、(B) 及び (C) に示す。

[0244] pAH162-Px-mvaES (ここで、Px は、以下の調節領域のうちの一つである: araC-P_{ara} (*E. coli*)、P_{lldB}、P_{phoC}、P

p_{stS}) を、既報のプロトコル [Andreeva I G et al., FEMS Microbiol Lett., 2011; 318 (1) : 55-60] にしたがって pAH123-cat ヘルパープラスミドを用いて SC17 (0) $\Delta ampC::pAH162-Km-Ptac-KDyl$ $\Delta ampH::attB_{phi80}$ $\Delta crt::Ptac-mvk$ (M. paludicola) 及び SC17 (0) $\Delta ampC::attB_{phi80}$ $\Delta ampH::pAH162-Km-Ptac-KDyl$ $\Delta crt::Ptac-mvk$ (M. paludicola) レシピエント株の $attB_{phi80}$ 部位に挿入した。その結果、SWITCH-Px-1 及び SWITCH-Px-2 とそれぞれ名付けられた 2 セットの株を得た。 $\Delta ampH::pAH162-Px-mvaES$ 及び $\Delta ampC::pAH162-Px-mvaES$ 染色体改変物のマップを図 13 に示す。

[0245]

[表6]

表6. 参考実施例1にて利用したプライマー配列

No.	Name	Sequence 5' -> 3'
1	Linker-F	AGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGCTGCAGGCATGCA (配列番号34)
2	Linker-R	AGCTTGCATGCCTGCAGCTCGAGATTACCCTGTTATCCCTAA (配列番号35)
3	11dD5' CAS	TTTTTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGATTTAAAGCGGCTGCTTTAC (配列番号36)
4	11dD3' CAS	TTTTTAAGCTTGCATGCCTGCAGTATTTAATAGAATCAGGTAG (配列番号37)
5	phoC5' CAS	TTTTTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGTGGATAACCTCATGTAAAC (配列番号38)
6	phoC3' CAS	TTTTTAAGCTTGCATGCCTGCAGTTGATGTCTGATTATCTCTGA (配列番号39)
7	pstS5' CAS	TTTTTAAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATCTCGAGAGCCTCTCACGCGTGAATC (配列番号40)
8	pstS3' CAS	TTTTTAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGGGAGAAAAGTCAGGCTAA (配列番号41)
9	n67	TGCGAAGACGTCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTG (配列番号42)
10	n68	TGCGAAGGGCCCGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATG (配列番号43)
11	ampH-attL-phi80	ATGCGCACTCCTTACGTACTGGCTCTACTGTTTCTTTGCGAAAGGTCATTTTCCTG AATATGCTCA (配列番号44)
12	ampH-attR-phi80	TTAAGGAATCGCTGGACCATCATCGGCGAGCCGTTCTGACGTTTGTTGACAGCTGGT CCAATG (配列番号45)
13	DampC-phL	CTGATGAAGTGCACCTGAATGAGTGCTGATGAAAATATAGAAAGGTCATTTTCCTG AATATGCTCA (配列番号46)
14	DampC-phR	ATTCGCCAGCATAACGATGCCGCTGTTGAGCTGAGGAACACGTTTGTTGACAGCTGGT CCAATG (配列番号47)
15	ampH-t1	GCGAAGCCCTCTCCGTTG (配列番号48)
16	ampH-t2	AGCCAGTCAGCCTCATCAGCG (配列番号49)
17	ampC-t1	GATTCCCACTTCACCGAGCCG (配列番号50)
18	ampC-t2	GGCAGGTATGGTGCTCTGACG (配列番号51)
19	crtE-attRphi80	ATGACGGTCTGCGCAAAAAACACGTTTCATCTCACTCGCGGTTTGTTGACAGCTGGT CCAATG (配列番号52)
20	crtZ-attLphi80	ATGTTGTGGATTTGGAATGCCCTGATCGTTTCGTTACCGGAAAGGTCATTTTCCTG AATATGCTCA (配列番号53)
21	crtZ-test	CCGTGTGGTTCTGAAAGCCGA (配列番号54)
22	crtE-test	CGTTGCCGTAAATGTATCCGT (配列番号55)
23	phL-test	GGATGTAAACCATAACACTCTGCGAAC (配列番号56)
24	phR-test	GATTGGTGGTTGAATTGTCCGTAAC (配列番号57)

[0246] 実施例4 : SC17 (0) Δgcd と SWITCH-PphoC Δgcd の構築

P. アナナティスのgcd遺伝子は、グルコースデヒドロゲナーゼをコードしており、P. アナナティスは好気性増殖中にグルコン酸を蓄積することが知られている (Andreeva IGら, FEMS Microbiol Lett. 2011 May; 318 (1) : 55-60)。

[0247] プライマーgcd-attL及びgcd-attR (表7) 及び鋳型としてpMW118-attL-kan-attRプラスミドを用いるPCRで

得られたDNAフラグメントの λ Red依存的な組込み (Minaeva NIら, BMC Biotechnol. 2008; 8:63) を用いて、gcd遺伝子が破壊されたSC17 (0) Δ gcd株を構築する。組込み体を確認するため、プライマーgcd-t1及びgcd-t2 (表7) を用いる。

- [0248] SC17 (0) Δ gcd株のゲノムDNAを、Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ) を用いて単離し、既報の方法 [Katashkina JIら, BMC Mol Biol. 2009; 10:34] にしたがってSWITCH-PphoC株のマーカールを含まない誘導体中に電気形質転換する。その結果、SWITCH-PphoC- Δ gcd (Km^R) 株を得る。プライマーgcd-t1及びgcd-t2 (表7) を、得られた組込み体のPCR解析に用いる。カナマイシン耐性マーカール遺伝子を、標準的な λ Int/Xis媒介手法 [Katashkina JIら, BMC Mol Biol. 2009; 10:34] にしたがって得る。得られた株を、SWITCH-PphoC Δ gcd株と命名する。

- [0249] [表7]

表7. プライマーのリスト

Primer	ヌクレオチド配列 (配列番号)
gcd-attL	GGTCAACATTATGGGGAAAACTCCTCATCCTTTAGCGTGTGAAGCCTGCTTTTTTATAC TAAGTTGG (配列番号16)
gcd-attR	TTACTTCTGGTCGGGCAGCGCATAGGCAATCACGTAATCGCGCTCAAGTTAGTATAAAAA AGCTGAAC (配列番号17)
gcd-t1	TGACAACAATCTATCTGATT (配列番号18)
gcd-t2	TGCGCCTGGTTAAGCTGGCG (配列番号19)

- [0250] SWITCH-PphoCのコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーションによりpACYC177、pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*あるいはpACYC177-Ptac-opt__CsLINS-ispA*を導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC/pACYC177、SWITCH-PphoC/AaLINS-ispA*、SWITCH-PphoC/CsLINS-ispA*と命名

した。

[0251] 実施例5：SWITCH-PphoC株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

実施例4で得られたSWITCH-PphoC/AaLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC/CsLINS-ispA*株、及びSWITCH-PphoC/pACYC177株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34 $^{\circ}$ Cにて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティングループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径 $\times$ 長さ $\times$ 肉厚(mm)=25 $\times$ 200 $\times$ 1.2)中の、50mg/Lのカナマイシンを含む表8に記載の発酵培地5mLに接種し、往復振とう培養装置で30 $^{\circ}$ C、120rpmの条件にて24時間培養した。

[0252] [表8]

表8. リナロール生産宿主SWITCH-PphoC株向け発酵用培地

A区	
D-グルコース	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
pH無調整 AC 115 $^{\circ}$ C、10分	
B区	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g/L
KOHでpH 7.0に調整後、AC 115 $^{\circ}$ C、10分	
C区	
CaCO ₃	20 g/L
乾熱滅菌 180 $^{\circ}$ C、2時間	

[0253] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5mLの発酵培地に対して、1mLのミリスチン酸イソプロピル(東京化成工業株式会社製)を添加した。

[0254] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF(株式会社島津

製作所製）を用いて以下の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。

[0255] 気化室温度 360.0℃
 注入量 1.0μL
 注入モード スプリット 1:10
 キャリアガス He
 制御モード 線速度
 圧力 125.5kPa
 全流量 20.5mL/min
 カラム流量 1.59mL/min
 線速度 36.3cm/sec
 パージ流量 3.0mL/min

[0256] カラムオープン温度プログラム 合計時間 21.5分
 レート (°C/min) 温度 (°C) ホールド時間 (min)
 65.0 5.0
 5.0 105.0 0.5
 35.0 297.5 2.5
 検出器温度 375.0℃
 検出器 FID
 メイクアップガス He (30.0mL/min)
 水素流量 40.0mL/min
 空気 400.0mL/min

[0257] リナロール濃度は培地量に換算した値として示す。試験管2本の結果の平均値を表9に示す。リナロールシンターゼ発現株においてリナロールを生産していることが示された。

[0258]

[表9]

表9. *Actinidia arguta* 由来リナロールシンターゼ及び *Coriandrum sativum* 由来リナロールシンターゼ導入時のリナロール蓄積

Strain	O. D. (620nm)	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC / pACYC177	17.5	0.0
SWITCH-PphoC / CsLINS-ispA*	25.8	0.7
SWITCH-PphoC / AaLINS-ispA*	26.4	805.3

[0259] 実施例6 : SWITCH-PphoC Δ gcd 株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

実施例4で得られたSWITCH-PphoC Δ gcd株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーションによりpACYC177、pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*あるいはpACYC177-Ptac-opt__CsLINS-ispA*を導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC Δ gcd/pACYC177、SWITCH-PphoC Δ gcd/AaLINS-ispA*、SWITCH-PphoC Δ gcd/CsLINS-ispA*と命名した。

[0260] 得られたSWITCH-PphoC Δ gcd/AaLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δ gcd/CsLINS-ispA*株、及びSWITCH-PphoC Δ gcd/pACYC177株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50 mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティングループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径×長さ×肉厚(mm)=25×200×1.2)中の、50 mg/Lのカナマイシンを含む表10に記載の発酵培地5 mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120 rpmの条件にて24時間培養した。

[0261]

[表10]

表 10. リナロール生産宿主SWITCH-PphoC Δ gcd株向け発酵用培地

A 区	
D-グルコース	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
pH無調整 AC 115℃、10分	
B 区	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g/L
KOHでpH 7.0に調整後、AC 115℃、10分	
C 区	
CaCO ₃	20 g/L
乾熱滅菌 180℃、2時間	

[0262] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5 mLの発酵培地に対して、1 mLのミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業株式会社製）を添加した。

[0263] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて以下の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。

[0264] 気化室温度	360.0℃
注入量	1.0 μL
注入モード	スプリット 1:10
キャリアガス	He
制御モード	線速度
圧力	125.5 kPa
全流量	20.5 mL/min
カラム流量	1.59 mL/min
線速度	36.3 cm/sec
パージ流量	3.0 mL/min

[0265]	カラムオープン温度プログラム	合計時間	21.5分
	レート (°C/min)	温度 (°C)	ホールド時間 (min)
		65.0	5.0
	5.0	105.0	0.5
	35.0	297.5	2.5
検出器温度	375.0°C		
検出器	FID		
メイクアップガス	He (30.0 mL/min)		
水素流量	40.0 mL/min		
空気	400.0 mL/min		

[0266] リナロール濃度は培地量に換算した値として示す。試験管2本の結果の平均値を表11に示す。対照ベクターpACYC177を導入した対照株ではリナロール生産は認められなかったが、SWITCH-PphoC Δgcd/AaLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd/CsLINS-ispA*株においてリナロール生産が確認された。

[0267] [表11]

表11. *Actinidia arguta* 由来リナロールシンターゼ及び *Coriandrum sativum* 由来リナロールシンターゼ導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. (620nm)	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δgcd / pACYC177	15.9	0.0
SWITCH-PphoC Δgcd / CsLINS-ispA*	20.2	2.6
SWITCH-PphoC Δgcd / AaLINS-ispA*	12.0	1328.2

[0268] 実施例7：リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

7-1) *Streptomyces clavuligerus* 由来リナロールシンターゼ遺伝子の取得

Streptomyces clavuligerus 由来リナロールシンターゼ (ScLINS) 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession number: DS570692)、及びアミノ酸配列 (GenPept accession number: EDY52263) は既に

知られている (Nakano C et al. (2011) ChemBioChem. Volume 12, Issue 16, pages 2403-2407)。Streptomyces clavuligerus由来リナロールシンターゼタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号61、及び配列番号62に示す。ScLINS遺伝子を効率的に発現させる為、コドン最適化し、これをopt__ScLINSと名付けた。opt__ScLINSの塩基配列を配列番号63に示す。opt__ScLINS遺伝子にtacプロモーター領域 (deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) を付加したDNAは化学合成された後、pMW119 (株式会社ニッポンジーン製) にクローニングされ、得られたプラスミドをpMW119-Ptac-opt__ScLINSと名付けた。

[0269] 7-2) opt__ScLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

配列番号9に示したプライマーと配列番号64に示したプライマーを用いてpMW119-Ptac-opt__ScLINSを鋳型にPCRを行い、Ptac-opt__ScLINS断片を得た。さらに、配列番号65に示したプライマーと配列番号13に示したプライマーを用いてpMW119-ispA*を鋳型にPCRを行い、ispA*断片を得た。精製したPtac-opt__ScLINS断片、及びispA*断片を制限酵素PstIとScaIで消化したpACYC177 (株式会社ニッポンジーン製) にIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-Ptac-opt__ScLINS-ispA*を構築した。

[0270] 7-3) opt__ScLINS遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号9に示したプライマーと配列番号66に示したプライマーを用いてpUC57-Ptac-opt__ScLINSを鋳型にPCRを行い、Ptac-opt__ScLINS断片を得た。精製したPtac-opt__S

c L I N S断片を制限酵素P s t IとS c a Iで消化したp A C Y C 1 7 7（株式会社ニッポンジーン製）にI n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t（クロンテック社製）を用いて連結し、p A C Y C 1 7 7 - P t a c - o p t _ _ S c L I N Sを構築した。

[0271] 7-4) 発現量を至適化したo p t _ _ C s L I N S、及びi s p A*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

配列番号67に示したプライマーと配列番号13に示したプライマーを用いて実施例1で構築したp A C Y C 1 7 7 - P t a c - o p t _ _ C s L I N S - i s p A*を鋳型にP C Rを行い、C s L I N S上流の配列が一部変更されたo p t _ _ C s L I N S - i s p A*断片を得た。精製したC s L I N S上流の配列が一部変更されたo p t _ _ C s L I N S - i s p A*断片を制限酵素P s t IとS c a Iで消化したp A C Y C 1 7 7（株式会社ニッポンジーン製）にI n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t（クロンテック社製）を用いて連結し、構築されたo p t _ _ C s L I N S - i s p A*発現プラスミドをp A C Y C 1 7 7 - P t a c 2 - o p t _ _ C s L I N S - i s p A*と名付けた。

[0272] 7-5) 発現量を至適化したo p t _ _ C s L I N S遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号67に示したプライマーと配列番号68に示したプライマーを用いて実施例1で取得したp M W 1 1 9 - P t a c - o p t _ _ C s L I N Sを鋳型にP C Rを行い、C s L I N Sの上流の配列が一部変更されたo p t _ _ C s L I N S断片を得た。精製したC s L I N S上流の配列が一部変更されたo p t _ _ C s L I N S断片を制限酵素P s t IとS c a Iで消化したp A C Y C 1 7 7（株式会社ニッポンジーン製）にI n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t（クロンテック社製）を用いて連結し、構築されたプロモーター改変o p t _ _ C s L I N S発現プラスミドをp A C Y C 1 7 7 - P t a c 2 - o p t _ _ C s L I N Sと名付けた。

[0273] 7-6) A r t e m i s i a a n n u a（クソニンジン）由来リナロール

シンターゼ遺伝子の取得

*Artemisia annua*由来リナロールシンターゼ (AnLINS) 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession number: AF154125)、及びアミノ酸配列 (GenPept accession number: AAF13357) は既に知られている (Jia JW et al., (1999) Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 372, 143-149)。さらに、他にも*Artemisia annua*由来リナロールシンターゼ遺伝子の塩基配列 (GenBank accession number: AF154124)、及びアミノ酸配列 (GenPept accession number: AAF13356) が既に知られている。前者の*Artemisia annua*由来リナロールシンターゼタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号69、及び配列番号70に示す。AnLINS遺伝子を効率的に発現させる為、コドン最適化し、さらに葉緑体移行シグナルが切断されたAnLINS遺伝子を実験的に設計し、これをopt__AnLINSと名付けた。opt__AnLINSの塩基配列を配列番号71に示す。opt__AnLINS遺伝子にtacプロモーター領域 (deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) を付加したDNAは化学合成された後、pMW119 (株式会社ニッポンジーン製) にクローニングされ、得られたプラスミドをpMW119-Ptac-opt__AnLINSと名付けた。

[0274] 7-7) *Backhousia citriodora* (レモンマートル) 由来リナロールシンターゼ遺伝子の取得

*Backhousia citriodora*由来リナロールシンターゼ (BcLINS) 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession number: AB438045)、及びアミノ酸配列 (GenPept accession number: BAG82825) は既に知られて

いる (Sugiura M et al., (2011) Biosci Biotechnol Biochem., 75, 1245-8)。Backhousia citriodora由来リナロールシンターゼタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号72、及び配列番号73に示す。BcLINS遺伝子を効率的に発現させる為、コドン最適化し、さらに葉緑体移行シグナルが切断されたBcLINS遺伝子を設計し、これをopt__BcLINSと名付けた。opt__BcLINSの塩基配列を配列番号74に示す。opt__BcLINS遺伝子にtacプロモーター領域 (deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) を付加したDNAは化学合成された後、pMW119 (株式会社ニッポンジーン製) にクローニングされ、得られたプラスミドをpMW119-Ptac-opt__BcLINSと名付けた。

[0275] 7-8) opt__AnLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

配列番号9に示したプライマーと配列番号75に示したプライマーを用いてpMW119-Ptac-opt__AnLINSを鋳型にPCRを行い、Ptac-opt__AnLINS断片を得た。さらに、配列番号76に示したプライマーと配列番号13に示したプライマーを用いてpMW119-ispA*を鋳型にPCRを行い、ispA*断片を得た。精製したPtac-opt__AnLINS断片、及びispA*断片を制限酵素PstIとScaIで消化したpACYC177 (株式会社ニッポンジーン製) にIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-Ptac-opt__AnLINS-ispA*を構築した。

[0276] 7-9) opt__BcLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

配列番号9に示したプライマーと配列番号77に示したプライマーを用い

て pMW119-Ptac-opt__BcLINS を鋳型に PCR を行い、Ptac-opt__BcLINS 断片を得た。さらに、配列番号 78 に示したプライマーと配列番号 13 に示したプライマーを用いて pMW119-ispA* を鋳型に PCR を行い、ispA* 断片を得た。精製した Ptac-opt__BcLINS 断片、及び ispA* 断片を制限酵素 PstI と ScaI で消化した pACYC177 (株式会社ニッポンジーン製) に In-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-Ptac-opt__BcLINS-ispA* を構築した。

[0277] 実施例 8 : *P. ananatis* SC17 におけるリナロール発酵

8-1) *P. ananatis* SC17 株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

P. ananatis SC17 株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により実施例 7 で構築した pACYC177-Ptac-opt__ScLINS-ispA*、pACYC177-Ptac-opt__ScLINS、pACYC177-Ptac2-opt__CsLINS-ispA* あるいは pACYC177-Ptac2-opt__CsLINS を導入した。得られた株をそれぞれ、*P. ananatis* SC17/ScLINS-ispA* 株、*P. ananatis* SC17/ScLINS 株、*P. ananatis* SC17/Ptac2-CsLINS-ispA* 株、及び *P. ananatis* SC17/Ptac2-CsLINS 株と命名した。

[0278] 上記で得られた株を 50 mg/L のカナマイシンを含む LB プレートにて 34℃、16 時間培養した後、プレート上の菌体をイノキュレーティングループ 10 μL (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて適当量掻き取り、20%グリセロール溶液に懸濁し、適当量ずつ分注した上で -80℃ に保存した。

[0279] 8-2) *P. ananatis* SC17 株由来リナロールシンターゼ発現

株のリナロール生産能の評価

P. ananatis SC17/ScLINS-ispA*株、*P. ananatis* SC17/ScLINS株、*P. ananatis* SC17/Ptac2-CsLINS-ispA*株、*P. ananatis* SC17/Ptac2-CsLINS株、並びに、実施例3で構築した*P. ananatis* SC17/pACYC177株、及び*P. ananatis* SC17/AaLINS-ispA*株、*P. ananatis* SC17/AaLINS株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50 mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティンググループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径×長さ×肉厚(mm)=25×200×1.2)中の、50 mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地(表12)5 mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120 rpmの条件にて24時間培養した。

[0280] [表12]

表12. リナロール発酵用培地

<u>A区</u>	
D-グルコース	40 g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1 g/L
pH無調整 AC	115℃、10分
<u>B区</u>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Yeast Extract	2 g/L
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.01 g/L
KOHでpH 7.0に調整後、AC	115℃、10分
<u>C区</u>	
CaCO ₃	20 g/L
乾熱滅菌 180℃、2時間	

[0281] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5 mLの発酵培地に対して、植菌後に1 mLのミリスチン酸イソプロピル(東京化成工業株式会社製)を添加した。

[0282] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて以下の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール（和光純薬工業株式会社製）で希釈した。

[0283] 気化室温度	360.0℃
注入量	1.0 μ L
注入モード	スプリット 1:10
キャリアガス	He
制御モード	線速度
圧力	125.5kPa
全流量	20.5mL/min
カラム流量	1.59mL/min
線速度	36.3cm/sec
パージ流量	3.0mL/min

[0284] カラムオープン温度プログラム	合計時間	21.5min
レート (℃/min)	温度 (℃)	ホールド時間 (min)
	65.0	5.0
5.0	105.0	0.5
35.0	297.5	2.5
検出器温度	375.0℃	
検出器	FID	
メイクアップガス	He (30.0mL/min)	
水素流量	40.0mL/min	
空気	400.0mL/min	

[0285] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。試験管2本の

結果の平均値を表13に示す。対照ベクターpACYC177を導入した対照株以外の全ての株においてリナロール生産が確認された。

[0286] [表13]

表13. *P. ananatis* SC17における*S. clavuligerus*、*C. sativum*、*A. arguta*由来リナロールシンターゼ及び変異型*ispA*導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
<i>P. ananatis</i> SC17 / pACYC177	36.4	0.0
<i>P. ananatis</i> SC17 / ScLINS	35.4	0.1
<i>P. ananatis</i> SC17 / ScLINS- <i>ispA</i> *	37.8	0.3
<i>P. ananatis</i> SC17 / Ptac2-CsLINS	31.7	0.4
<i>P. ananatis</i> SC17 / Ptac2-CsLINS- <i>ispA</i> *	27.2	1.4
<i>P. ananatis</i> SC17 / AaLINS	25.1	1.9
<i>P. ananatis</i> SC17 / AaLINS- <i>ispA</i> *	32.0	6.8

[0287] 実施例9：SWITCH-PphoC株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

9-1) SWITCH-PphoC株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

参考実施例1で得られたSWITCH-PphoC株より常法に従いマーカーを除去後、コンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により実施例7で構築したpACYC177-Ptac-opt__ScLINS-*ispA**, pACYC177-Ptac-opt__ScLINS、pACYC177-Ptac2-opt__CsLINS-*ispA**, pACYC177-Ptac2-opt__CsLINSあるいは実施例1で構築したpACYC177-Ptac-opt__AaLINSを導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC/ScLINS-*ispA**株、SWITCH-PphoC/ScLINS株、SWITCH-PphoC/Ptac2-CsLINS-*ispA**株、SWITCH-PphoC/Ptac2-CsLINS株、及びSWITCH-PphoC/AaLINS株と命名した。

[0288] 上記で得られた株を50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートにて34℃、16時間培養した後、プレート上の菌体をイノキュレーティンググループ10μL (Thermo Fisher Scientific社製)

を用いて適当量掻き取り、20%グリセロール溶液に懸濁し、適当量ずつ分注した上で-80℃に保存した。

[0289] 9-2) SWITCH-PphoC株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

SWITCH-PphoC/ScLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC/ScLINS株、SWITCH-PphoC/Ptac2-CsLINS-ispA*株、及びSWITCH-PphoC/Ptac2-CsLINS株、SWITCH-PphoC/AaLINS株、実施例4で構築したSWITCH-PphoC/pACYC177株、SWITCH-PphoC/AaLINS-ispA*株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50μLを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティングループ10μL (Thermo Fisher Scientific社製) のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管 (直径×長さ×肉厚 (mm) = 25×200×1.2) 中の、50mg/Lのカナマイシンを含む実施例8に記載の発酵培地 (表12) 5mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120rpmの条件にて24時間培養した。

[0290] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5mLの発酵培地に対して、植菌後に1mLのミリスチン酸イソプロピル (東京化成工業株式会社製) を添加した。

[0291] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF (株式会社島津製作所製) を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5 (アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm) を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール (和光純薬工業株式会社製) を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール (和光純薬工業株式会社製) で希釈した。

[0292] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。試験管 2 本の結果の平均値を表 14 に示す。

[0293] [表14]

表 14. SWITCH-PphoC における *S. clavuligerus*、*C. sativum*、*A. arguta* 由来リナロールシンターゼ及び、変異型 *ispA* 導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC / pACYC177	13.2	0.0
SWITCH-PphoC / ScLINS	9.2	56.1
SWITCH-PphoC / ScLINS- <i>ispA</i> *	36.7	891.4
SWITCH-PphoC / Ptac2-CsLINS	11.7	80.7
SWITCH-PphoC / Ptac2-CsLINS- <i>ispA</i> *	21.6	820.8
SWITCH-PphoC / AaLINS	12.3	37.2
SWITCH-PphoC / AaLINS- <i>ispA</i> *	21.1	1053.1

[0294] 実施例 10 : SWITCH-PphoC Δgcd 株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

10-1) SWITCH-PphoC Δgcd 株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

実施例 4 で得られた SWITCH-PphoC Δgcd 株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により実施例 7 で構築した pACYC177-Ptac-opt__ScLINS-*ispA**, pACYC177-Ptac-opt__ScLINS、pACYC177-Ptac2-opt__CsLINS-*ispA**, pACYC177-Ptac2-opt__CsLINS、あるいは実施例 1 で構築した pACYC177-Ptac-opt__AaLINS を導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC Δgcd /ScLINS-*ispA**株、SWITCH-PphoC Δgcd /ScLINS株、SWITCH-PphoC Δgcd /Ptac2-CsLINS-*ispA**株、SWITCH-PphoC Δgcd /Ptac2-CsLINS株、及び SWITCH-PphoC Δgcd /AaLINS株と命名した。

[0295] 上記で得られた株を 50 mg/L のカナマイシンを含む LB プレートにて 34℃、16 時間培養した後、プレート上の菌体をイノキュレーティングループ 10 μ L (Thermo Fisher Scientific 社製)

を用いて適当量掻き取り、20%グリセロール溶液に懸濁し、適当量ずつ分注した上で-80℃に保存した。

[0296] 10-2) SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ 株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /ScLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /ScLINS株、SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /Ptac2-CsLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /Ptac2-CsLINS株、SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /AaLINS株、実施例6で構築したSWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /pACYC177株、SWITCH-PphoC $\Delta g c d$ /AaLINS-ispA*株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50 mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティンググループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径×長さ×肉厚(mm)=25×200×1.2)中の、50 mg/Lのカナマイシンを含む実施例8に記載の発酵培地(表12)5 mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120 rpmの条件にて24時間培養した。

[0297] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5 mLの発酵培地に対して、植菌後に1 mLのミリスチン酸イソプロピル(東京化成工業株式会社製)を添加した。

[0298] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF(株式会社島津製作所製)を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5(アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μ m)を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール(和光純薬工業株式会社製)を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール

(和光純薬工業株式会社製) で希釈した。

[0299] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。試験管 2 本の結果の平均値を表 15 に示す。

[0300] [表15]

表 15. SWITCH-PphoC Δ gcd における *S. clavuligerus*、*C. sativum*、*A. arguta* 由来リナロールシンターゼ、及び変異型 *ispA* 導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δ gcd / pACYC177	8.9	0.0
SWITCH-PphoC Δ gcd / ScLINS	7.5	84.6
SWITCH-PphoC Δ gcd / ScLINS- <i>ispA</i> *	14.9	1179.0
SWITCH-PphoC Δ gcd / Ptac2-CsLINS	12.3	92.3
SWITCH-PphoC Δ gcd / Ptac2-CsLINS- <i>ispA</i> *	21.5	1108.1
SWITCH-PphoC Δ gcd / AaLINS	13.7	50.0
SWITCH-PphoC Δ gcd / AaLINS- <i>ispA</i> *	17.4	1575.7

[0301] 実施例 11：リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

11-1) *Synechocystis* sp. PCC6803 GT株
へ形質転換可能なプラスミド

Synechocystis sp. PCC6803 は自然形質転換が可能であることは既に知られている。プラスミド pTCP2031V には、*slr2030*、*slr2031* のコーディング領域の一部の配列、クロラムフェニコール耐性遺伝子の配列、*psbA2* (*slr1311*) プロモーター配列等が含まれており、*slr2030*、*slr2031* のコーディング領域を相同配列とすることで *Synechocystis* sp. PCC6803 株のゲノム組換えが可能である (Horiuchi M., et al. (2010) J Biochem 431:135-140)。プラスミド pTKHT0846-*slr0846* には、*slr0822*、*slr0846*、*slr0821* のコーディング領域の一部の配列、カナマイシン耐性遺伝子の配列等が含まれており、*slr0846*、*slr0821* のコーディング領域を相同配列とすることで *Synechocystis* sp. PCC6803 株のゲノム組換えが可能である (Midorikawa T., et al. (2012) Plant Cell Physiol. 53 (1):164-172)。これらのプラスミドを東京大学大学院

総合文化研究科の池内昌彦教授から分譲いただいた。

[0302] 11-2) opt__AaLINS遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号79に示したプライマーと配列番号80に示したプライマーを用いて、実施例1で取得されたpMW119-Ptac-opt__AaLINSを鋳型にPCRを行い、opt__AaLINS断片を得た。精製したopt__AaLINS断片及び制限酵素NdeIで消化したpTCP2031VにIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製)を用いて連結し、pTCP2031V-PpsbA2-opt__AaLINSを構築した。

[0303] 11-3) ispA*遺伝子発現用プラスミドの構築

配列番号81に示したプライマーと配列番号82に示したプライマーを用いて、実施例1で取得されたpMW119-ispA*を鋳型にPCRを行い、Ptac-ispA*断片を得た。精製したispA*断片及び制限酵素AatIIとHpaIで消化したpTKHT0846-slr0846にIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製)を用いて連結し、pTKHT0846-Ptac-ispA*を構築した。

[0304] 実施例12: Synechocystis sp. PCC6803 GT株におけるリナロール生産

12-1) Synechocystis sp. PCC6803 GT株へのopt__AaLINS遺伝子発現プラスミドの導入

Synechocystis sp. PCC6803 GT株を既報に従い形質転換を行った(国際公開2015/115520A1号)。Synechocystis sp. PCC6803 GT株のO.D₇₃₀=0.5~1.0の培養液1mLに対し、構築したプラスミドpTCP2031V-PpsbA2-opt__AaLINSを1~2 μg混合し、これを細胞-DNA混合液とした。O.D.値は96穴プレートリーダー(Molecular Devices Spectra Max M2e)によって720nmで測定した。以下、Synechocystis sp. PC

C6803 GT株を用いた培養のO.D.値は本機器で測定した。薬剤無添加のBG-11寒天培地（表16）にニトロセルロース膜（ミリポア、界面活性剤フリー、孔径0.2 μm 、型番：HATF08250）をのせ、細胞-DNA混合液を塗布した。18～24時間、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件で培養した後、クロラムフェニコールが20 mg/L添加されたBG-11寒天培地（表16）にニトロセルロース膜を移した。その後2～4週間、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件で培養し、出現したコロニーを新しいクロラムフェニコールが20 mg/L添加されたBG-11寒天培地（表16）へ植え継いだ。この植え継ぎ操作を3～4回繰り返し、得られたコロニーについて、配列番号83に示したプライマーと配列番号84に示したプライマーを用いてコロニーPCRを行った。ゲノム中の目的の場所に目的の大きさのDNA断片が挿入されていることを確認し、得られた株をGT2031C-AaLINS株と命名した。

[0305] 上記で得られた株を、クロラムフェニコールが20 mg/L添加されたBG-11寒天培地（表16）で生育させた。菌体をイノキュレーティングループ1 μL （Thermo Fisher Scientific社製）を用いて適当量掻き取り、6穴プレート（コーニング社製、型番：351146）中のクロラムフェニコールが20 mg/L添加されたBG-11液体培地（表16）5 mLへ接種した。LED光照射ユニット（LC-LED 450W（白色））を設置した巡回振とう培養装置（タイテック株式会社 NR-20あるいはNR-30）で60 rpm、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件で約3日間培養した。その培養液約1 mLを7000 rpm、5 min、室温で遠心して集菌し、上清を除去しBG-11液体培地（表16）にジメチルスルホキシドを終濃度5%になるように加えて調製したストック溶液を添加し懸濁した後、適当量ずつ分注し、フリーズストックとして-80℃に保存した。

[0306] 12-2) GT2031C-AaLINS株へのispA*遺伝子発現用プラ

スミドの導入

12-1と同様の方法で形質転換を行った。GT2031C-AaLINS株のOD730=0.5~1.0の培養液1mLに対し、構築したプラスミドpTKHT0846-Ptac-ispA*を1~2 μ g混合し、これを細胞-DNA混合液とした。薬剤無添加のBG-11寒天培地(表16)にニトロセルロース膜(ミリポア、界面活性剤フリー、孔径0.2 μ m、型番:HATF08250)をのせ、細胞-DNA混合液を塗布した。18~24時間、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 μ E/m²/sの条件で培養した後、クロラムフェニコール、及びカナマイシンがそれぞれ20mg/Lずつ添加されたBG-11寒天培地(表16)にニトロセルロース膜を移した。その後2~4週間、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 μ E/m²/sの条件で培養し、出現したコロニーを新しいクロラムフェニコール、及びカナマイシンがそれぞれ20mg/Lずつ添加されたBG-11寒天培地(表16)へ植え継いだ。この植え継ぎ操作を3~4回繰り返し、得られたコロニーについて、配列番号85に示したプライマーと配列番号86に示したプライマーを用いてコロニーPCRを行った。ゲノム中の目的の場所に目的の大きさのDNA断片が挿入されていることを確認し、得られた株をGT2031C-AaLINS_0846K-ispA*株と命名した。

- [0307] 上記で得られた株を、クロラムフェニコール及びカナマイシンが20mg/L添加されたBG-11寒天培地(表16)で生育させ、そこから菌体をイノキュレーティンググループ1 μ L(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて適量掻き取り、6穴プレート(コーニング社製、型番:351146)中のクロラムフェニコール、及びカナマイシンがそれぞれ20mg/Lずつ添加されたBG-11液体培地(表16)5mLへ接種した。LED光照射ユニット(LC-LED 450W(白色))を設置した巡回振とう培養装置(タイテック株式会社 NR-20あるいはNR-30)で60rpm、34℃、CO₂濃度1%、光強度50 μ E/m²/sの条件で約3日間培養した。その培養液約1mLを7000rpm、5

min、室温で遠心して集菌して上清を除去し、BG-11液体培地（表16）にジメチルスルホキシドを終濃度5%になるように添加して調製したストック溶液を加え懸濁した後、適量ずつ分注し、フリーズストックとして-80℃に保存した。

[0308] 12-3) *Synechocystis* sp. PCC6803 GT株
由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

Synechocystis sp. PCC6803 GT株、GT2031C-AaLINS株、GT2031C-AaLINS_0846K-ispA*株のフリーズストックを融解し、50μLを必要な薬剤を含むBG-11寒天培地（表16）に均一に塗布し、34℃、CO₂濃度1%、光強度50μE/m²/sの条件で約7日間培養した。*Synechocystis* sp. PCC6803 GT株は薬剤無添加で培養し、GT2031C-AaLINS株はクロラムフェニコールを20mg/L添加して培養し、GT2031C-AaLINS_0846K-ispA*株はクロラムフェニコール、及びカナマイシンをそれぞれ20mg/Lずつ添加した上で培養を実施した。得られた寒天培地上の菌体を、イノキュレーティングループ1μL（Thermo Fisher Scientific社製）のループを用いて適量掻き取り、6穴プレート（コーニング社製、型番：351146）中の必要な薬剤を含むBG-11液体培地（表16）5mLへ接種した。培養条件は、LED光照射ユニット（LC-LED 450W（白色））を設置した巡回振とう培養装置（タイテック株式会社 NR-20あるいはNR-30）で60rpm、30℃、CO₂濃度1%、光強度50μE/m²/sとし、約3日間培養した。この培養液を用いてOD₇₃₀=0.05になるように50mL容三角フラスコ（HARIO）中の必要な薬剤を含む培養用BG-11液体培地（表16）10mLへ接種し、LED光照射ユニット（LC-LED 450W（白色））を設置した巡回振とう培養装置（タイテック株式会社 NR-20あるいはNR-30）で60rpm、30℃、CO₂濃度1%、光強度100μE/m²/sの条件で約6日間培養した。

。

[0309] [表16]

表16. 培養用BG-11培地

ストック液

I液

Citric acid (無水)	0.3 g/100 mL
Ferric Ammonium citrate	0.3 g/100 mL
Na ₂ EDTA	0.05 g/100 mL
pH無調整、逆浸透膜で処理した水（RO水）で100 mLに調製	

II液

NaNO ₃	30 g/L
K ₂ HPO ₄	0.78 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g/L
pH無調整、RO水で1 Lに調製	

III液

CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.9 g/100 mL
pH無調整、RO水で100 mLに調製	

IV液

Na ₂ CO ₃	2 g/100 mL
pH無調整、RO水で100 mLに調製後、フィルター滅菌	

A6液

H ₃ BO ₃	2.86 g/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g/L
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g/L
Na ₂ MoO ₄	0.021 g/L
濃硫酸	一滴/L
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0494 g/L
pH無調整、RO水で1 Lに調製	

[0310] 液体培地は、II液を50 mL、III液を2 mL、IV液を1 mL、A6液を1 mL、1M TES-KOH (pH 8.2) を20 mL、RO水を926 mL混合し、AC121℃、20分し、同じくAC121℃、20分したI液を2 mL混合した。

[0311] 寒天培地は、I液を1 mL、II液を25 mL、III液を1 mL、IV液を0.5 mL、A6液を0.5 mL、チオ硫酸ナトリウム（無水）を1.5 g、1M TES-KOH (pH 7.8) を10 mL、RO水を261 mL混合し、AC121℃、20分した溶液と、同じくAC121℃、20分したBacto Agar（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）7.5 gとRO水200 mLの混合液を全量混合した。

[0312] 三角フラスコに分注した10mLの培養用BG-11液体培地（表16）に対して2mLのミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業株式会社製）を添加した。

[0313] 培養開始から約6日後に、ミリスチン酸イソプロピルのリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製、長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。

[0314] リナロールは培養液中の蓄積濃度に換算した値として示す。三角フラスコ2本の結果の平均値を表17に示す。対照株の*Synechocystis* sp. PCC6803 GT株ではリナロール生産は認められなかったが、GT2031C-AaLINS株は、GT2031C-AaLINS_0846K-ispA*株においてリナロール生産が確認された。

[0315] [表17]

表17. *A. arguta*由来リナロールシンターゼ及び変異型ispA導入時のリナロール蓄積

strain	0. D730nm	Linalool (mg/L)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 GT株	9.69	0.0
GT2031C-AaLINS株	9.60	0.7
GT2031C-AaLINS_0846K-ispA*株	9.82	1.3

[0316] 実施例13: SWITCH-PphoC Δgcd株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

13-1) SWITCH-PphoC Δgcd株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

実施例4で得られたSWITCH-PphoC Δgcd株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により実施例7で構築したpACYC177-Ptac-opt__AnLINS-ispA*、pACYC177-Ptac-opt__BcLINS-ispA*を導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC Δgcd/AnLINS-ispA*、SWITCH-PphoC Δgcd/BcLINS-ispA*と命名した。

A*株、SWITCH-PphoC Δgcd/BcLINS-ispA*株と命名した。

[0317] 上記で得られた株を50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートにて34℃、16時間培養した後、プレート上の菌体をイノキュレーティンググループ10μL (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて適量掻き取り、20%グリセロール溶液に懸濁し、適量ずつ分注した上で-80℃に保存した。

[0318] 13-2) SWITCH-PphoC Δgcd株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

SWITCH-PphoC Δgcd/AnLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd/BcLINS-ispA*株、及び実施例6で構築したSWITCH-PphoC Δgcd/pACYC177株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50μLを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティンググループ10μL (Thermo Fisher Scientific社製) のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径×長さ×肉厚(mm)=25×200×1.2)中の、50mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地(表18)5mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120rpmの条件にて48時間培養した。

[0319]

[表18]

表18. *Artemisia annua*、*B. citriodora* 由来リナロールシンターゼ発現株向けリナロール発酵用培地A区

D-グルコース 60 g/L
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L
 pH無調整 AC 115℃、10分

B区

$(NH_4)_2SO_4$ 20 g/L
 KH_2PO_4 0.5 g/L
 Yeast Extract 2 g/L
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L
 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01 g/L
 KOHでpH 7.0に調整後、AC 115℃、10分

C区

$CaCO_3$ 20 g/L
 乾熱滅菌 180℃、2時間

[0320] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5 mLの発酵培地に対して、植菌後に1 mLのミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業株式会社製）を添加した。

[0321] 培養開始から48時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μm ）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール（和光純薬工業株式会社製）で希釈した。

[0322] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。試験管2本の結果の平均値を表19に示す。

[0323] [表19]

表19. SWITCH-PphoC Δgcd における*Artemisia annua*、*B. citriodora*由来リナロールシンターゼ、及び変異型*ispA*導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δgcd / pACYC177	45.9	0.0
SWITCH-PphoC Δgcd / AnLINS- <i>ispA</i> *	19.0	0.1
SWITCH-PphoC Δgcd / BeLINS- <i>ispA</i> *	19.3	0.5

[0324] 実施例14：ジャーファーマンターを用いたミリスチン酸イソプロピル無添

加条件（単相条件）でのリナロール発酵

実施例6で構築したSWITCH-PphoC Δ gcd/pACYC177株、SWITCH-PphoC Δ gcd/AaLINS-ispA*株、及び実施例10で構築したSWITCH-PphoC Δ gcd/ScLINS-ispA*株を試験に用いた。グリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50 mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて18時間培養した。得られた菌体をプレートより回収した。続いて、50 mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地（表20）300 mLを1 L容積のジャーファーマンターに注入した。そして、開始O.D.が0.1になるように植菌した。発酵培地は滅菌完了後に表20に記載のA区、B区を混合した。培養温度を30℃、通気量を1 vvmとし、攪拌により溶存酸素濃度を6%以上に、アンモニアガスを用いて培養pHを6.5に制御しながら30時間培養した。

[0325] [表20]

表20. ジャーファーマンター培養向けリナロール発酵用培地

A区

D-グルコース 100 g/L

MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L

pH無調整 AC 120℃、20分

B区

クエン酸3Na · 2H₂O 1 g/L

(NH₄)₂SO₄ 1 g/L

KH₂PO₄ 1.25 g/L

無水ベタイン 2 g/L

FeSO₄ · 7H₂O 30 mg/L

MnSO₄ · 5H₂O 30 mg/L

Yeast Extract 2 g/L

ディスホームGD-113K 0.01 mL/L

pH無調整 AC 120℃、20分

[0326] 培養開始後、適宜サンプリングし、O.D.値とリナロールの分析を実施した。リナロール濃度はガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μ m）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール

ール（和光純薬工業株式会社製）で希釈した。

[0327] 培養終了時のリナロール濃度とO. D. 値を表21に示し、経時変化のグラフをそれぞれ図15、図16に示す。

[0328] [表21]

表21. SWITCH-PphoC Δ gcd株由来*S. clavuligerus*、*A. arguta*由来リナロールシンターゼ、及び変異型*ispA*導入株のジャーフェーメンターを用いた単相条件での発酵結果

Strain	Symbol	O.D. 620nm ($\times 101$)	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δ gcd / pACYC177	●	0.19	0.0
SWITCH-PphoC Δ gcd / ScLINS <i>ispA</i> *	▲	0.31	507.3
SWITCH-PphoC Δ gcd / AaLINS- <i>ispA</i> *	■	0.27	801.0

[0329] 表21、図15及び16（ジャー培養の結果）からSWITCH-PphoC Δ gcd株に対して生育阻害を起こす626mg/Lのリナロール濃度に達してもリナロール発酵は可能であることが示された。参考例1において培地中のリナロールを625mg/L以下に抑えて培養することが好ましいことが示唆されていたが、SWITCH-PphoC Δ gcd/AaLINS-*ispA**株は宿主に毒性を与える濃度以上のリナロールを蓄積し、十分な生育を伴いながら培養が可能であった。実施例14の結果は、培養条件に拘らず生育阻害が起きにくく、効率的なリナロール発酵が可能であることを示している。

[0330]

[表22]

表 2 2 . 実施例 1 0 から 1 4 で用いる配列情報

No.	配列番号	配列
H 1	6 1	<i>S. clavuligerus</i> 由来リナロールシンターゼアミノ酸配列
H 2	6 2	<i>S. clavuligerus</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 3	6 3	コドン改変 <i>S. clavuligerus</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 4 (446)	6 4	GTGTGAAATTAGCCAGAGCTGCGGGCCACC
H 5 (447)	6 5	TGGCTAATTTACACAGGAGACTGCCatggattttccccagcag
H 6 (509)	6 6	ATGACTTGGTTGAGTTAGCCAGAGCTGCGGGC
H 7 (510)	6 7	ACGTTGTTGCCATTGCCCTGTTTGCAATTAATCATCG
H 8 (431)	6 8	ATGACTTGGTTGAGTTTATAAGGGAATGGGTTCAAC
6 5 4	7 9	AAGGAATTATAACCAAAATGCCACGCGTGCCCTCTATGCCCACTACCAAAAAT
6 5 5	8 0	GGCATGGAGGACATATTAGCTACTGGAATCATACAACATGGTTTCATGTGTCT
6 7 1	8 1	TCTAGAGTCGACGTCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGA
6 7 8	8 2	ATCCAATGTGAGGTTCTATTGTTGCGCTGGATGATGTAATCGGCCAGGGCTTCC
6 1 4	8 3	TTGGAACATTGTGTTGAGCCCATGGCTGTCTCCCGCCATTGCTAA
6 1 5	8 4	TTGTTCCCGGTACAACCTTAGCCACCAACTCCTTGAGAATGACCAC
6 8 3	8 5	GGAGGATTGGGTTACCTCAGTGTG
6 8 4	8 6	CGCCATATCAATCCCAACGCTCTGG
H 9	6 9	<i>Artemisia annua</i> 由来リナロールシンターゼアミノ酸配列
H 1 0	7 0	<i>Artemisia annua</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 1 1	7 1	コドン改変 <i>Artemisia annua</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 1 2	7 2	<i>B. citriodora</i> 由来リナロールシンターゼアミノ酸配列
H 1 3	7 3	<i>B. citriodora</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 1 4	7 4	コドン改変 <i>B. citriodora</i> 由来リナロールシンターゼ塩基配列
H 1 5 (425)	7 5	TGTGAAATTAATAACCTTGAATGGGGG
H 1 6 (433)	7 6	GTATTTAATTTACACAGGAGACTGCCATGGATTTTCCCCAGCAG
H 1 7 (408)	7 7	TGTGAAATTAATCTAAAGACACGCTTTC
H 1 8 (435)	7 8	TAGATTAATTTACACAGGAGACTGCCATGGATTTTCCCCAGCAG

[0331] 実施例 1 5 : リナロールシンターゼデータベース検索

サルナシ由来リナロールシンターゼ (GenPept accession number ADD81294.1) のアミノ酸配列を問い合わせ配列とし、BLASTPプログラム (Altschul, S. F. et al., "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215, 403-410, 1990) により non redundant データベースに対して相同性検索を行った。また、Essential oil データベース (Kumari S. et al., "EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom" Database, 2014, 1-12 doi:10.1093/database/bau120) よりリナロールを産生する事

が報告されている植物名を検索した。二つの結果を照らし合わせる事で、リナロール生産能が知られた植物種よりリナロールシンターゼの候補を抽出した。更に、候補となる配列の参照文献を確認し、リナロールシンターゼとしての機能が期待された13種の酵素を抽出した(表23)。これら13種の酵素のアミノ酸配列について、葉緑体移行シグナル配列をSignalPあるいは表24に記載のある文献情報に従い調査した。シグナル配列の存在が示唆されるものについては、予想されるシグナル配列を除き、成熟体のアミノ酸配列を得た。これらのアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を配列番号89~101に示す(表23:M1~M13)。これらについて、コドン利用を*Pantoea ananatis*に最適化した配列に基づき遺伝子合成を行った。コドン利用最適化後のDNA配列を配列番号102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126に示す(表24:M14, M16, M18, M20, M22, M24, M26, M28, M30, M32, M34, M36, M38)。これらのDNA配列に対し、表25に示す遺伝子名を付与した。これらのDNA配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127に示す(表24:M15, M17, M19, M21, M23, M25, M27, M29, M31, M33, M35, M37, M39)。コドン利用最適化後の各遺伝子のDNAを化学合成により得た後、pUC57にクローニングした。得られたプラスミドの名称を表25に記す。

[0332]

[表23]

表 2 3 抽出されたリナロールシンターゼ候補

#	Origin	GenPept accession number	DDBJ/EMBL/Genbank accession number	番号	配列番号
1	Arabidopsis thaliana	NP_001185286	NM_001198357	M1	89
2	Arabidopsis thaliana	ACF41947	BT033153	M2	90
3	Citrus unshiu	BAP75561	AB857232	M3	91
4	Citrus unshiu	BAP75560	AB857231	M4	92
5	Citrus unshiu	BAP75559	AB857230	M5	93
6	Malus domestica	AGB14629	JX848734	M6	94
7	Perilla frutescens var. crispa	AAL38029	AF444798	M7	95
8	Vitis vinifera	AEY82696	JQ062931	M8	96
9	Vitis vinifera	ADR74209	HM807390	M9	97
10	Lavandula angustifolia	ABB73045	DQ263741	M10	98
11	Mentha citrata	AAL99381	AY083653	M11	99
12	Ocimum basilicum	AAV63789	AY693647	M12	100
13	Clarkia breweri	AAC49395	U58314	M13	101

[0333] [表24]

表 2 4 表 2 3 に記載されたリナロールシンターゼ候補の文献とアノテーション情報

#	Definition	literature	DNA配列番号 ⁽¹⁾	アミノ酸配列番号 ⁽²⁾
1	terpene synthase 14	Nature 408, 816-820 (2000)	102 (M14)	103 (M15)
2	At2g24210, terpene synthase 10, TPS10	Plant Cell. 25, 4640-4657 (2013), Arch Biochem Biophys. 375, 261-269 (2000)	104 (M16)	105 (M17)
3	linalool synthase	Plant Sci. 229, 154-166 (2014)	106 (M18)	107 (M19)
4	linalool synthase	Plant Sci. 229, 154-166 (2014)	108 (M20)	109 (M21)
5	linalool synthase	Plant Sci. 229, 154-166 (2014)	110 (M22)	111 (M23)
6	linalool synthase	Plant Physiol. 161, 787-804 (2013)	112 (M24)	113 (M25)
7	linalool synthase	Phytochemistry 71, 1068-1075 (2010)	114 (M26)	115 (M27)
8	(3S)-linalool/(E)-nerolidol synthase	Int J Mol Sci 15, 21992-22010 (2014)	116 (M28)	117 (M29)
9	(3R)-linalool synthase	BMC Plant Biol. 10, 226 (2010)	118 (M30)	119 (M31)
10	linalool synthase	Arch. Biochem. Biophys. 465, 417-429 (2007)	120 (M32)	121 (M33)
11	linalool synthase	Arch. Biochem. Biophys. 405, 112-121 (2002)	122 (M34)	123 (M35)
12	R-linalool synthase	Plant Physiol. 136, 3724-3736 (2004)	124 (M36)	125 (M37)
13	S-linalool synthase	Plant Cell 8, 1137-1148 (1996)	126 (M38)	127 (M39)

[0334] [表24の脚注]

(1) はコドン最適化後のDNA配列に相当する配列表の配列番号 [記号]

(2) は試験に用いたリナロールシンターゼのアミノ酸配列に該当する配列表の配列番号

[0335] [表25]

表25 表24のコドン最適化後の配列をpUC57にクローニングして得られたベクター

#	インサートDNA の配列番号	コドン最適化後の 遺伝子名称	ベクター名称
1	102 (M14)	A t 1 L I N S	p U C 5 7 - A t 1 L I N S
2	104 (M16)	A t 2 L I N S	p U C 5 7 - A t 2 L I N S
3	106 (M18)	C u 1 L I N S	p U C 5 7 - C u 1 L I N S
4	108 (M20)	C u 2 L I N S	p U C 5 7 - C u 2 L I N S
5	110 (M22)	C u 3 L I N S	p U C 5 7 - C u 3 L I N S
6	112 (M24)	M d L I N S	p U C 5 7 - M d L I N S
7	114 (M26)	P f L I N S	p U C 5 7 - P f L I N S
8	116 (M28)	V v 1 L I N S	p U C 5 7 - V v 1 L I N S
9	118 (M30)	V v 2 L I N S	p U C 5 7 - V v 2 L I N S
10	120 (M32)	L a L I N S	p U C 5 7 - L a L I N S
11	122 (M34)	M c L I N S	p U C 5 7 - M c L I N S
12	124 (M36)	O b L I N S	p U C 5 7 - O b L I N S
13	126 (M38)	C b L I N S	p U C 5 7 - C b L I N S

[0336] 実施例16：各種リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

16-1) A t 1 L I N S、及び i s p A*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ28（配列番号128）とプライマーQ29（配列番号129）を用いて、表25に記載のpUC57-A t 1 L I N Sを鋳型にPCRを行い、A t 1 L I N S断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-P t a c - o p t _ A a L I N S - i s p A*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とt a cプロモーター領域（d e B o e r, e t a l., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）およびi s p A*を含むDNA断片を得た。これら2種のDNA断片をIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-A t 1 L I N S - i s p A*を構築した。

[0337] 16-2) At2LINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ30（配列番号130）とプライマーQ31（配列番号131）を用いて、表25に記載のpUC57-AT2LINSを鋳型にPCRを行い、At2LINS断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域（deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）およびispA*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片をIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-At2LINS-ispA*を構築した。

[0338] 16-3) MdLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ32（配列番号132）とプライマーQ33（配列番号133）を用いて、表25に記載のpUC57-MdLINSを鋳型にPCRを行い、MdLINS断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域（deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）およびispA*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片をIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-MdLINS-ispA*を構築した。

[0339] 16-4) PfLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ34（配列番号134）に示した配列とプライマーQ35（配列番号135）を用いて、表25に記載のpUC57-PfLINSを鋳

型にPCRを行い、P f L I N S断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-P t a c - o p t _ A a L I N S - i s p A*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とt a cプロモーター領域（deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）およびi s p A*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片をIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-P f L I N S - i s p A*を構築した。

[0340] 16-5) V v 1 L I N S、及びi s p A*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ36（配列番号136）とプライマーQ37（配列番号137）を用いて、表25に記載のpUC57-V v 1 L I N Sを鋳型にPCRを行い、V v 1 L I N S断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-P t a c - o p t _ A a L I N S - i s p A*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とt a cプロモーター領域（deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）およびi s p A*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片をIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社製）を用いて連結し、pACYC177-V v 1 L I N S - i s p A*を構築した。

[0341] 16-6) V v 2 L I N S、及びi s p A*遺伝子の同時発現プラスミドの構築

プライマーQ38（配列番号138）とプライマーQ39（配列番号139）を用いて、表25に記載のpUC57-V v 2 L I N Sを鋳型にPCRを行い、V v 2 L I N S断片を得た。さらにプライマーQ46（配列番号146）とプライマーQ47（配列番号147）を用いて、実施例1で構築し

たプラスミド pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域 (de Boer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) および ispA*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片を In-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-Vv2LINS-ispA*を構築した。

[0342] 16-7) McLINS、及び ispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築
プライマーQ40 (配列番号140) とプライマーQ41 (配列番号141) を用いて、表25に記載のpUC57-McLINSを鋳型にPCRを行い、McLINS断片を得た。さらにプライマーQ46 (配列番号146) とプライマーQ47 (配列番号147) を用いて、実施例1で構築したプラスミド pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域 (de Boer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) および ispA*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片を In-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-McLINS-ispA*を構築した。

[0343] 16-8) ObLINS、及び ispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築
プライマーQ42 (配列番号142) とプライマーQ43 (配列番号143) を用いて、表25に記載のpUC57-ObLINSを鋳型にPCRを行い、ObLINS断片を得た。さらにプライマーQ46 (配列番号146) とプライマーQ47 (配列番号147) を用いて、実施例1で構築したプラスミド pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域 (de Boer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) および ispA*を含む断片を得た。

これら2種のDNA断片を In-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-ObLINS-ispA*を構築した。

- [0344] 16-9) CbLINS、及びispA*遺伝子の同時発現プラスミドの構築
 プライマーQ44 (配列番号144) とプライマーQ45 (配列番号145) を用いて、表25に記載のpUC57-CbLINSを鋳型にPCRを行い、CbLINS断片を得た。さらにプライマーQ46 (配列番号146) とプライマーQ47 (配列番号147) を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-Ptac-opt_AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、pACYC177とtacプロモーター領域 (de Boer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25) およびispA*を含む断片を得た。これら2種のDNA断片を In-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製) を用いて連結し、pACYC177-CbLINS-ispA*を構築した。

- [0345] 実施例17: SWITCH-PphoC Δgcd株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価
 17-1) SWITCH-PphoC Δgcd株へのリナロールシンターゼ発現プラスミドの導入

実施例4で得られたSWITCH-PphoC Δgcd株のコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーション法により実施例16で構築したpACYC177-At1LINS-ispA*、pACYC177-At2LINS-ispA*、pACYC177-MdLINS-ispA*、pACYC177-PfLINS-ispA*、pACYC177-Vv1LINS-ispA*、pACYC177-Vv2LINS-ispA*、pACYC177-McLINS-ispA*、pACYC177-ObLINS-ispA*、pACYC177-CbLINS-ispA*あるいはpACYC177を導入した。得られた株をそれぞれ、SWITCH-PphoC Δgcd/

At1LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /At2LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /MdLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /PfLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /Vv1LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /Vv2LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /McLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /ObLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /CbLINS-ispA*株、及びSWITCH-PphoC Δgcd /pACYC177株と命名した。

[0346] 上記で得られた株を50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートにて34℃、16時間培養した後、プレート上の菌体をイノキュレーティングループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific社製)を用いて適当量掻き取り、20%グリセロール溶液に懸濁し、適当量ずつ分注した上で-80℃に保存した。

[0347] 17-2) SWITCH-PphoC Δgcd 株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

SWITCH-PphoC Δgcd /At1LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /At2LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /MdLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /PfLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /Vv1LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /Vv2LINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /McLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /ObLINS-ispA*株、SWITCH-PphoC Δgcd /CbLINS-ispA*株、及びSWITCH-PphoC Δgcd /pACYC177株のグリセロールストックを融解し、各株の菌体懸濁液50 μ Lを50mg/Lのカナマイシンを含むLBプレートに均一に塗布し、34℃にて16時間培養した。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティ

ングループ10 μ L (Thermo Fisher Scientific 社製) のループ部分1/4程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管(直径 $\times$ 長さ $\times$ 肉厚(mm)=25 $\times$ 200 $\times$ 1.2)中の、50mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地5mLに接種し、往復振とう培養装置で30 $^{\circ}$ C、120rpmの条件にて24時間培養した。発酵培地を表26に示す。

[0348] [表26]

表26. リナロール生産宿主SWITCH-PphoC Δ gcd株向け発酵用培地(ミリスチン酸イソプロピル添加条件)

A区

D-グルコース 40 g/L

MgSO₄·7H₂O 1 g/L

pH無調整 AC 115 $^{\circ}$ C、10分

B区

(NH₄)₂SO₄ 20 g/L

KH₂PO₄ 0.5 g/L

Yeast Extract 2 g/L

FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L

MnSO₄·5H₂O 0.01 g/L

KOHでpH 7.0に調整後、AC 115 $^{\circ}$ C、10分

C区

CaCO₃ 20 g/L

乾熱滅菌 180 $^{\circ}$ C、2時間

[0349] 滅菌完了後に上記A区、B区、C区を混合した。試験管に分注した5mLの発酵培地に対して、植菌後に1mLのミリスチン酸イソプロピル(東京化成工業株式会社製)を添加した。

[0350] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF(株式会社島津製作所製)を用いて以下に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5(アジレント・テクノロジー株式会社製 長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25 μ m)を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール(和光純薬工業株式会社製)を用いて調製した。測定用のサンプルは適宜エタノール(和光純薬工業株式会社製)で希釈した。

[0351] 気化室温度 360.0 $^{\circ}$ C

注入量 1.0 μ L

注入モード スプリット 1 : 1 0
 キャリアガス H e
 制御モード 線速度
 圧力 1 2 5 . 5 k P a
 全流量 2 0 . 5 m L / m i n
 カラム流量 1 . 5 9 m L / m i n
 線速度 3 6 . 3 c m / s e c
 パージ流量 3 . 0 m L / m i n

[0352] カラムオープン温度プログラム 合計時間 2 1 . 5 m i n

レート (°C / m i n)	温度 (°C)	ホールド時間 (m i n)
	6 5 . 0	5 . 0
5 . 0	1 0 5 . 0	0 . 5
3 5 . 0	2 9 7 . 5	2 . 5

検出器温度 3 7 5 . 0 °C
 検出器 F I D
 メイクアップガス H e (3 0 . 0 m L / m i n)
 水素流量 4 0 . 0 m L / m i n
 空気 4 0 0 . 0 m L / m i n

[0353] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。ミリスチン酸イソプロピル添加条件の試験管2本の結果の平均値を表27に示す。

[0354] [表27]

表27. SWITCH-PphoC Δgcdにおける各種リナロールシンターゼ、及び変異型 i s p Δ導入時のリナロール蓄積（ミリスチン酸イソプロピル添加条件）

菌株	O. D. 620nm	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δgcd / pACYC177	13.6	0.0
SWITCH-PphoC Δgcd / At1LINS-ispA*	20.2	13.3
SWITCH-PphoC Δgcd / At2LINS-ispA*	18.9	30.8
SWITCH-PphoC Δgcd / MdLINS-ispA*	11.5	116.7
SWITCH-PphoC Δgcd / PflINS-ispA*	14.6	29.2
SWITCH-PphoC Δgcd / Vv1LINS-ispA*	16.5	37.3
SWITCH-PphoC Δgcd / Vv2LINS-ispA*	16.6	2.6
SWITCH-PphoC Δgcd / McLINS-ispA*	16.4	19.0
SWITCH-PphoC Δgcd / ObLINS-ispA*	21.7	519.8
SWITCH-PphoC Δgcd / CbLINS-ispA*	19.7	44.3

[0355] 実施例 18 : リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

コリネ型細菌として *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) 2256 株 (ATCC13869) を利用した (Okumura et al., 1962, Santamaria et al., 1984, Tsuchida et al., 1986)。 *C. glutamicum* で opt__AaLINS 遺伝子と ispA 遺伝子を発現させる為のプラスミドは次の手順で構築した。配列番号 148 及び 149 に示したプライマー 814 及び 815 を用いて、実施例 1 で取得した pACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA* を鋳型に PCR を行い、opt__AaLINS-ispA* 断片を取得した。次に Elongation Factor Tu のプロモーター配列 (以下、P0480) (国際公開 2013/179722A1 号) を取得する目的で *C. glutamicum* 2256 株の染色体 DNA を鋳型として、配列番号 150 及び 151 に示したプライマー 812 及び 813 を用いて PCR を行い、P0480 断片を取得した。続いて *C. glutamicum* と *E. coli* のシャトルベクター・pVK9 (国際公開 2013/179722A1 号) を制限酵素 XbaI (タカラバイオ社製) にて消化した (Miwa et al., 1985)。精製した opt__AaLINS-ispA* 断片と、P0480 の PCR 産物、XbaI にて消化後精製した pVK9 を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech 社製) を用いて連結した。得られた opt__AaLINS-ispA* 遺伝子発現用プラスミドを pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA* と命名し、このプラスミドの配列情報を配列番号 152 に示した。

[0356] 実施例 19 : *C. glutamicum* 2256 株におけるリナロール生産

19-1) *C. glutamicum* 2256 株への opt__AaLINS-ispA* 遺伝子発現プラスミドの導入

C. glutamicum 2256 株を既報に従い形質転換を行った (

国際公開2013/179722A1号)。pVK9、pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA*の各プラスミドDNAを導入し、カナマイシン25 μ g/mlを含むCM-Dexプレート培地（国際公開2013/179722A1号）に塗布し、30℃にて48時間培養した。培養後のプレートから、カナマイシン耐性を示す形質転換体を取得し、C. glutamicum 2256株にpVK9が導入された株を2256/pVK9株、pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA*が導入された株を2256/pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA*と命名した。

[0357] 19-2) C. glutamicum 2256株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

2256/pVK9株、2256/pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA*株を、25 (mg/L) のカナマイシンを含むCM-Dexプレートに均一に塗布し、30℃にて約18時間培養した。培養後のプレートから、1/6プレート分の菌体を25 (mg/L) のカナマイシンを含むコリネ__リナロール生産用培地（表28）5mlを張り込んだ太試験管に接種し、30℃にて24時間培養した。

[0358] [表28]

表28. コリネ__リナロール生産用培地

Glucose	80	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	g/L
KH ₂ PO ₄	1	g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4	g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01	g/L
MnSO ₄ · 4-5H ₂ O	0.01	g/L
VB1 · HCl	200	μ g/L
Biotin	60	μ g/L
豆 濃	0.48	g/L

pH8.0 (KOH)

Autoclave 115℃ 10min

CaCO ₃	50	g/L
-------------------	----	-----

180℃、90 min

[0359] 太試験管に分注した5 mLのコリネ__リナロール生産用培地（表28）に対して1 mLのミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業社製）を添加した。

[0360] 培養開始から24時間後に、ミリスチン酸イソプロピル、及び培養上清中のリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（島津製作所社製）を用いて実施例8と同じ条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント社製、長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬社製）を用いて調整した。

[0361] リナロール濃度は培地量に換算した値として示す。太試験管3本の結果の平均値を表30に示す。対照株の2256/pVK9株ではリナロール生産は認められなかったが、2256/pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA*株においてリナロール生産が確認された（表29）。

[0362] [表29]

表29. *A. arguta*由来リナロールシンターゼ及び変異型ispA導入時のリナロール蓄積

Strain	O.D. 620nm	Linalool (mg/L)
2256/pVK9	73.4	0.00
2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -sLINS2-ispA*	86.3	4.32

[0363] 実施例20：リナロールシンターゼ発現プラスミドの構築

20-1) *Synechocystis* sp. PCC6803 GT株
へ形質転換可能なプラスミド

Synechocystis sp. PCC6803は自然形質転換が可能であることは既に知られている。プラスミドpTKHT0846-slr0846、pUC57-slr0846には、slr0822、slr0846、slr0821のコーディング領域の一部の配列、カナマイシン耐性遺伝子の配列等が含まれており、slr0846、slr0821のコーディング領域を相同配列とすることで*Synechocystis* sp.

PCC6803株のゲノム組換えが可能である（Midorikawa T., et al. (2012) *Plant Cell Physiol.* 53 (1) : 164-172)。pTKHT0846-slr0846のプ

ラスミドは東京大学大学院総合文化研究科の池内昌彦教授から分譲いただき、pUC57-slr0846はGenScript社製に全合成を依頼した。

[0364] 20-2) opt__AaLINS遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号153に示したプライマー671と配列番号154に示したプライマー691を用いて、実施例1で取得されたpMW119-Ptac-opt__AaLINSを鋳型にPCRを行い、Ptac-opt__AaLINS断片を得た。精製したPtac-opt__AaLINS断片及び制限酵素AatIIとHpaIで消化したpTKHT0846-slr0846にIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製)を用いて連結し、pTKHT0846-Ptac-opt__AaLINSを構築した。

[0365] 20-3) opt__AaLINS-ispA*遺伝子発現用プラスミドの構築

配列番号155に示したプライマー719と配列番号156に示したプライマー721を用いて、実施例1で取得されたpACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、opt__AaLINS-ispA*断片を得た。精製したopt__AaLINS-ispA*断片及び制限酵素NheIで消化したpUC57-slr0846-PpsbA2にIn-Fusion HD cloning kit (クロンテック社製)を用いて連結し、pUC57-slr0846-PpsbA2-opt__AaLINS-ispA*を構築した。

[0366] 実施例21: Synechocystis sp. PCC6803 GT株におけるリナロール生産

21-1) Synechocystis sp. PCC6803 GT株へのopt__AaLINS遺伝子発現プラスミドの導入

Synechocystis sp. PCC6803 GT株を実施例11に記載した方法で形質転換を行った。pTKHT0846-Ptac-opt__AaLINSが導入された形質転換体の選抜のための薬剤としてカ

ナマイシン 20 mg/L が添加された培地（表 16）を使用した。得られたコロニーについて、配列番号 157 及び 158 に示したプライマー 683 及び 684 を用いてコロニー PCR を行った。ゲノム中の目的の場所に目的の大きさの DNA 断片が挿入されていることを確認し、得られた株を GT0846K-Ptac-AaLINS 株と命名した。

[0367] 上記で得られた株を、カナマイシンが 20 mg/L 添加された BG-11 寒天培地（表 16）で生育させた。実施例 12 に記載した方法でフリーズストックを作製し、-80℃ に保存した。

[0368] 21-2) *Synechocystis* sp. PCC6803 GT 株への opt__AaLINS-ispA* 遺伝子発現プラスミドの導入

実施例 11 と同様の方法で形質転換を行った。pUC57-slr0846-PpsbA2-opt__AaLINS-ispA* が導入された形質転換体の選抜のための薬剤としてカナマイシン 20 mg/L が添加された培地（表 16）を使用した。得られたコロニーについて、配列番号 157 及び 158 に示したプライマー 683 及び 684 に示したプライマーを用いてコロニー PCR を行った。ゲノム中の目的の場所に目的の大きさの DNA 断片が挿入されていることを確認し、得られた株を GT0846K-PpsbA2-AaLINS-ispA* 株と命名した。

[0369] 上記で得られた株を、カナマイシンが 20 mg/L 添加された BG-11 寒天培地（表 16）で生育させた。実施例 12 に記載した方法でフリーズストックを作製し、-80℃ に保存した。

[0370] 21-3) *Synechocystis* sp. PCC6803 GT 株由来リナロールシンターゼ発現株のリナロール生産能の評価

Synechocystis sp. PCC6803 GT 株、GT0846K-Ptac-AaLINS 株、GT0846K-PpsbA2-AaLINS-ispA* 株について実施例 12 と同様の方法でリナロール生産能の評価を行った。*Synechocystis* sp. PCC6803

GT 株は薬剤無添加で培養し、GT0846K-Ptac-AaLINS

株、GT0846K-PpsbA2-AaLINS-ispA*株はカナマイシンを20mg/L添加した上で培養を実施した。

[0371] 培養開始から約6日後に、ミリスチン酸イソプロピルのリナロール濃度をガスクロマトグラフGC-2025AF（株式会社島津製作所製）を用いて実施例8に記載の条件にて測定した。カラムはDB-5（アジレント・テクノロジー株式会社製、長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm）を使用し、リナロール標準液は試薬リナロール（和光純薬工業株式会社製）を用いて調製した。

[0372] リナロールは培養液中の蓄積濃度に換算した値として示す。三角フラスコ3本の結果の平均値を表30に示す。対照株の*Synechocystis* sp. PCC6803 GT株ではリナロール生産は認められなかったが、GT0846K-Ptac-AaLINS株、GT0846K-PpsbA2-AaLINS-ispA*株においてリナロール生産が確認された。

[0373] [表30]

表30. *A. arguta*由来リナロールシンターゼ及び変異型ispA導入時のリナロール蓄積

Strain	0. D730nm	Linalool (mg/L)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 GT株	8.2	0.0
GT0846K-Ptac-AaLINS株	8.7	11.4
GT0846K-PpsbA2-AaLINS-ispA*株	3.4	11.6

[0374] 実施例22：酵母からの*Actinidia arguta*（サルナシ）由来リナロールシンターゼ発現プラスミド導入株の構築

22-1) 酵母で*Actinidia arguta*由来リナロールシンターゼを発現するプラスミドの構築

プライマーQ48（配列番号159）とプライマーQ49（配列番号160）を用いて、実施例1で構築したプラスミドpACYC177-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を鋳型にPCRを行い、AaLINS-ispA*断片を得た。精製したAaLINS-ispA*断片を制限酵素KpnIとBamHIで消化したベクターpYES2（Invitrogen製）にIn-Fusion HD cloning kit（クロンテック社

製)を用いて連結し、pYES2-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を構築した。

[0375] 22-2) 酵母への*Actinidia arguta*由来リナロール発現プラスミド導入

特許第5857973号公報に記載がある*Saccharomyces cerevisiae* S288C ura3Δ0株にpYES2-Ptac-opt__AaLINS-ispA*を導入した。

[0376] S288C ura3Δ0株は、YPD液体培地に植菌して30℃で16時間培養した後に、その培養液0.6mlを10mlに植え継いでさらに30℃で2時間培養した後に全量を集菌してFrozen-EZ Yeast Transformation II™キット(ZYMO RESEARCH CORP. 製)を用いてコンピテントセルを調製した。作製したコンピテントセルをpYES2-Ptac-opt__AaLINS-ispA*で形質転換し、SD-Uraプレートに塗布した後に30℃で3日間培養して形質転換体を得た。得られた株はS288C ura3Δ0/pYES2-Ptac-opt__AaLINS-ispA*と命名した。YPD培地の組成を表31に、SD-Ura培地の組成を表32に示す。

[0377] [表31]

表31. YPD培地

A区

Polypeptone 10g/L
Yeast Extract 10g/L
pH無調整、AC120℃、15分

B区

Glucose 20g/L
pH無調整、AC120℃、20分
殺菌後にA区とB区を混合
プレートの場合にはAgarを20g/Lの濃度になるように添加した。

[0378]

[表32]

表32. SD-Ura培地

A区

Difco Yeast Nitrogen Base W/O AA (Becton Dickinson Cat. No. 291940) 6.7 g/L

Ura DO supplement (Clontech Cat. No. 630416) 0.77 g/L

pHをKOHで5.7に調整後、AC120℃、15分

B区

Glucose 20 g/L

pH無調整 AC120℃、20分

殺菌後にA区とB区を混合

プレートの場合にはAgarを20 g/Lの濃度になるように添加した。

[0379] 実施例23：酵母におけるリナロール生産

実施例22で得られたS288C ura3Δ0/pYES2-Ptac-opt__AaLINS-ispA*株を、表33に組成を示したSD-Uraプレートに均一に塗布し、30℃にて約24時間培養する。得られたプレート上の菌体を、イノキュレーティングループ10 μL (Thermo Fisher Scientific社製) のループ部分1/2程度の量を掻き取り、AGCテクノグラス株式会社製試験管（直径×長さ×肉厚（mm）＝25×200×1.2）中のSD-Ura-Gal培地5 mLに接種し、往復振とう培養装置で30℃、120 rpmの条件にて48時間培養することでリナロールを得ることができる。SD-Ura-Gal培地の組成を表33に示す。

[0380] [表33]

表33. SD-Ura-Gal培地

A区

Difco Yeast Nitrogen Base W/O AA (Becton Dickinson Cat. No. 291940) 6.7 g/L

Ura DO supplement (Clontech Cat. No. 630416) 0.77 g/L

pHをKOHで5.8に調整後、フィルター滅菌

B区

Galactose 20 g/L

pH無調整、フィルター滅菌

殺菌後にA区とB区を混合

[0381] 試験管に分注した5 mLのSD-Ura-Gal培地に対して、植菌後に1 mLのミリスチン酸イソプロピル（東京化成工業株式会社製）を添加する

。

[0382] 実施例 24：リナロールシンターゼに局所的に保存されたアミノ酸配列モチーフの探索

遺伝子合成をおこなった 13 種のリナロールシンターゼを入力配列とし、局所的に保存されている配列を見出すことができる MEME (Timothy L. Bailey and Charles Elkan, "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994、<http://meme-suite.org>.) を用い、モチーフ探索を行った。MEME の検索オプションとして、部位の分布 (site distribution) 条件は各配列に類似のモチーフが一つ存在する (One occurrence (of a contributing motif site) per sequence)、という条件を採用し、これ以外はデフォルト条件を利用して検索を行った。その結果、5 つのモチーフを出力として得た (図 17~21)。各モチーフ配列を構成するアラインメントを図 22~26 に示す。13 種のリナロールシンターゼにおいて、各モチーフの分布位置を図 27 に示す。

[0383] 続いて、見いだされたモチーフを文字列として規定する為に、モチーフを構成するアミノ酸残基が一意に決まる残基、或いは二種類のアミノ酸のみで規定される残基とそれ以外の残基に分類した。その後、モチーフ長が 8 から 20 アミノ酸となるように規定し、表 34 に示す 6 種のアミノ酸配列モチーフを得た。

[0384] これら 6 種類のアミノ酸配列モチーフについて検出感度を調べた。偽陰性

の調査として、GenPeptデータベースより”linalool synthase”のキーワード検索で抽出された168種のアミノ酸配列に対して6種のアミノ酸モチーフ配列の保存性をfuzzproにより調べた。偽陽性の調査として、GenPeptデータベースより”limonene synthase”のキーワード検索で抽出された151種のアミノ酸配列に対して6種のアミノ酸モチーフ様配列が保存されているかをfuzzproにより調べた（表34）。

[0385] [表34]

表34 アミノ酸配列モチーフによるリナロールシンターゼとリモネンシンターゼの検出

アミノ酸配列モチーフ	対リナロールシンターゼ	対リモネンシンターゼ
DDx[FY][DY]xxG	140/168, 83%	86/151, 57%
Lxx[FL][TA]x(4)[RN]W[DE]	117/168, 70%	75/151, 50%
[DE]Lx(4)LxF[RW]L[LF]R	65/168, 39%	55/151, 36%
Axx[DN]x(4)[QK]xxx[QR]xEx(6)W[WS]	72/168, 43%	50/151, 33%
[EV]Yxxx[AG]xx[ST]	121/168, 72%	60/151, 40%
R[LI]x[DN]D[LI]x[ST]xxxExxxG	103/168, 61%	70/151, 46%

[0386] リナロールシンターゼのキーワード検索により抽出された配列のうちのいくつかは、極端に配列が短い、あるいは、実際にはリナロールシンターゼとは異なる酵素がおよそ10から20含まれる。一方表24に示す各リナロールシンターゼは、DDx[FY][DY]xxGモチーフを含むことが明らかとなった（図28～40）。表24には示していない他のリナロールシンターゼ（表35）においても、DDx[FY][DY]xxGモチーフが観察された（図41～48）。これらのことから、今回得られたDDx[FY][DY]xxGはリナロールシンターゼを検出可能なアミノ酸配列モチーフであることがわかった。一方、偽陽性が86/151（57%）と高いことから、DDx[FY][DY]xxGモチーフを有することだけではリナロールシンターゼのみを的確に予測することはできない。Lxx[FL][TA]x(4)[RN]W[DE]、[EV]Yxxx[AG]xx[ST]、R[LI]x[DN]D[LI]x[ST]xxxExxxGについても、偽陽性が多い点ではDDx[FY][DY]xxGと同様の特征があると言える。

[0387] テルペンシンターゼに分布しているモチーフとして、DDxxDモチーフ、NSEモチーフ、DxDDモチーフが知られている (Chen et al., The Plant Journal (2011) 66, 212-229)。今回見出されたDDx[FY][DY]xxGモチーフは、DDxxDモチーフを含むが、それに限定されず、より細かく配列を規定することのできるモチーフである。

[0388] [表35]

表 3 5 DDx[FY][DY]xxGモチーフを有するリナロールシンターゼ

配列番号	微生物名及び登録番号
1 6 1	Q1XBU5 R-linalool synthase EC 4.2.3.26 Solanum lycopersicum TrEMBL
1 6 2	gi 211970992 dbj BAG82825.1 linalool synthase [Backhousia citriodora]
1 6 3	gi 6469618 gb AAF13357.1 AF154125_1 (3R)-linalool synthase, partial [Artemisia annua]
1 6 4	gi 6469616 gb AAF13356.1 AF154124_1 (3R)-linalool synthase [Artemisia annua]
1 6 5	D4N3A0 S-linalool synthase EC 4.2.3.25 Actinidia arguta TrEMBL
1 6 6	D4N3A1 S-linalool synthase EC 4.2.3.25 Actinidia polygama TrEMBL
1 6 7	C0KVV5 S-linalool synthase EC 4.2.3.25 Perilla frutescens var. hirtella TrEMBL
1 6 8	C0KVV3 S-linalool synthase EC 4.2.3.25 Perilla setoyensis TrEMBL

[0389]

[表36]

表 3 6 実施例 1 6 以降で用いたプライマー等の配列 (その 1)

配列番号	記号	配列等
1 2 8	Q 2 8	CACAAGGAGACTGCCATGGCGAACACGGCGAAGCGTAGTATCC
1 2 9	Q 2 9	GTCTCCTGTGTGAAATTACATCAGGCTTTTCAGATACTCATCGG
1 3 0	Q 3 0	CACAAGGAGACTGCCATGCGTCGTAGTCCGAATTACCAGCCGAG
1 3 1	Q 3 1	GTCTCCTGTGTGAAATTAGTCCAGCGGGATAGGGTTAAACAGC
1 3 2	Q 3 2	CACAAGGAGACTGCCATGGAGTTTAGCATTAGCCAGAGTAGTTTTGCG
1 3 3	Q 3 3	GTCTCCTGTGTGAAATTAGGCGTGCAGCATACTCTTCATGTACTC
1 3 4	Q 3 4	CACAAGGAGACTGCCATGTATAGCCTGCGTATTTATGTGGCG
1 3 5	Q 3 5	GTCTCCTGTGTGAAATTAGGCATAGGGTTCAAACAGCAGGCAGGCG
1 3 6	Q 3 6	CACAAGGAGACTGCCATGGGTTTTAGTCTGCCTTTTATGCGTG
1 3 7	Q 3 7	GTCTCCTGTGTGAAATTACAGGGGAAACGCTTCAAACAGCAGACTC
1 3 8	Q 3 8	CACAAGGAGACTGCCATGGAACTGACCCTGACGAGTCTGAGCCCG
1 3 9	Q 3 9	GTCTCCTGTGTGAAATTAGCGGCGGTTACTCATCTTCATGCCATCC
1 4 0	Q 4 0	CACAAGGAGACTGCCATGTGTACCATCATTAGCGTCAATCATC
1 4 1	Q 4 1	GTCTCCTGTGTGAAATTAGACGTAGGGCTTAAACAGCAGATTGGC
1 4 2	Q 4 2	CACAAGGAGACTGCCATGGCGAGTGCGGTCCCCCTGAGTAGTACG
1 4 3	Q 4 3	GTCTCCTGTGTGAAATTAATACTACTCAGCAGGGGCGTAAAAACAGGG
1 4 4	Q 4 4	CACAAGGAGACTGCCATGCGTGAGAGCCTGAGCAGTAGCAGTAGC
1 4 5	Q 4 5	GTCTCCTGTGTGAAATTAATAAAAGCACAGTTTGATATTCCGAC
1 4 6	Q 4 6	GGCAGTCTCCTTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
1 4 7	Q 4 7	TTTCACACAGGAGACTGCCATGGATTTTCCCCAGC
1 4 8	8 1 4	ATGTCCACCGCCGTGCCCTCTATGCCACTACCCAAAAATG
1 4 9	8 1 5	gcagggtcgactctagCTATTTGTTGCGCTGGATGATGTAATC
1 5 0	8 1 2	ggtacccggggatcctctagAGATCGTTTAGATCCGAAGG
1 5 1	8 1 3	CACGGCGGTGGACATTGTATGTCCTCCTGGACTTCGTGGT
1 5 2	xx	pVK9-P0480-opt__AaLINS-ispA* 4363-4724 : P0480;4725-6374 : opt__AaLINS;6375-6393 : spacer; 6394-7293 : ispA*

[0390]

[表37]

表 3 7 実施例 1 6 以降で用いたプライマー等の配列 (その 2)

配列番号	記号	配列
1 5 3	6 7 1	tctagagtcgacgtcCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG TGTGGA
1 5 4	6 9 1	tccaatgtgaggttTTAGCTACTGGAATCATACAACATGGTTTTCATGT GTTCT
1 5 5	7 1 9	aaggaaatlalaaccaaATGTCCACCGCCGTGCCCTCTATGCCCCACTACC CAAAAATG
1 5 6	7 2 1	gatggggaagtttaggctagcCTATTTGTTGCGCTGGATGATGTAATCG GCCAGG
1 5 7	6 8 3	ggaggattgggttaccctcagtgtg
1 5 8	6 8 4	cgccatalcaatcccaacgctctgg
1 5 9	Q 4 8	GGAATATTAAGCTTGGTACCATGTCCACCGCCGTGCCCTCTATG
1 6 0	Q 4 9	GTGGATCCGAGCTCGGTACCCTATTTGTTGCGCTGGATGATG

[0391] 実施例 2 5 : S c L I N S、C s L I N S、及び A a L I N S をそれぞれ発現する S W I T C H - P p h o C Δ g c d 株のグルコース 6 0 g / L 条件での培養評価

実施例 6 で得られた S W I T C H - P p h o C Δ g c d / A a L I N S - i s p A * 株、実施例 1 0 で得られた S W I T C H - P p h o C Δ g c d / S c L I N S - i s p A * 株、及び S W I T C H - P p h o C Δ g c d / P t a c 2 - C s L I N S - i s p A * 株を実施例 1 3 に記載の条件で培養した。また、リナロールの定量は実施例 3 に記載の条件で実施した。

[0392] リナロールは発酵液中の蓄積濃度に換算した値として示す。試験管 3 本の結果の平均値を表 3 8 に示す。対照ベクター p A C Y C 1 7 7 を導入した対照株ではリナロール生産は認められなかったが、S W I T C H - P p h o C Δ g c d / A a L I N S - i s p A * 株、S W I T C H - P p h o C Δ g c d / S c L I N S - i s p A * 株、及び S W I T C H - P p h o C Δ g c d / P t a c 2 - C s L I N S - i s p A * 株において前例のない著量のリナロール生産が確認された。

[0393]

[表38]

表38. SWITCH-PphoC Δ gcd株におけるScLINS、CsLINS、AaLINS、及び変異型ispA導入時のリナロール蓄積（グルコース60g/L条件下での培養結果）

Strain	Linalool (mg/L)
SWITCH-PphoC Δ gcd / pACYC177	0.0
SWITCH-PphoC Δ gcd / ScLINS-ispA*	3714.8
SWITCH-PphoC Δ gcd / Ptac2-CsLINS-ispA*	4341.5
SWITCH-PphoC Δ gcd / AaLINS-ispA*	5603.9

[0394] その好ましい実施形態を参照して本発明を詳細に記述したが、本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更が為され得ること、及び均等物が採用され得ることは、当業者に明らかである。本明細書中の全ての引用文献は、本願の一部として参照により援用される。

産業上の利用可能性

[0395] 本発明の方法は、リナロールの製造に有用である。

請求の範囲

[請求項1]

以下の式で表されるモチーフ：



(式中、Dはアスパラギン酸を示し、Fはフェニルアラニンを示し、Yはチロシンを示し、Gはグリシンを示し、 X_1 、 X_2 及び X_3 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸を示し、 $[F Y]$ はF又はYを示し、 $[D Y]$ はD又はYを示す。)

を少なくとも1つ有すること、及び

植物又は微生物由来であること

の少なくともいずれかを満たすリナロールシンターゼを発現する細菌を培養培地中で培養してリナロールを生成することを含む、リナロールの製造方法。

[請求項2]

式中、

X_1 は、イソロイシン (I)、バリン (V)、メチオニン (M) 又はフェニルアラニン (F) を表すこと

X_2 は、バリン (V)、イソロイシン (I)、アラニン (A) 又はトレオニン (T) を表すこと、及び

X_3 は、チロシン (Y)、システイン (C)、ヒスチジン (H)、グルタミン酸 (E) 又はフェニルアラニン (F) を表すこと

のうちのいずれかを満たす、請求項1記載の方法。

[請求項3]

前記リナロールシンターゼが、アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、シロイヌナズナ属、ミカン属、リンゴ属、シソ属、ブドウ属、ラベンデュラ属、メンタ属、メボウキ属、又はサンジソウ属に属する植物、若しくは放線菌由来である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項4]

放線菌は、ストレプトマイセス属に属する細菌である、請求項3記載の方法。

[請求項5]

前記リナロールシンターゼは、アクチニジア・アルゲータ、コリア

ンドラム・サティバム、アルテミシア・アヌア、バクハウシア・シトリオドラ、アラビドプシス・タリアナ、シトラス・ウンシュウ、マルス・ドメスティカ、ペリラ・フルテセンス・バー・クリスパ、ビティス・ビニフェラ、ラベンデュラ・アングスティフォリア、メンタ・シトラータ、オシマム・バシリカム、クラルキア・ブリュワリ、又はストレプトマイセス・クラブリゲルスに由来する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

[請求項6] 前記細菌は、前記リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

[請求項7] 前記ポリヌクレオチドは、以下の(a1)～(c23)からなる群より選ばれる1又は2以上のポリヌクレオチドである、請求項6記載の方法：

(a1) (i1) 配列番号2で表される塩基配列、(ii1) 配列番号2で表される塩基配列中の79～1725番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは(iii1) 配列番号3で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b1) 前記(i1)、(ii1)もしくは(iii1)の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c1) 前記(i1)、(ii1)もしくは(iii1)の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a2) (i2) 配列番号5で表される塩基配列、(ii2) 配列番号5で表される塩基配列中の115～1773番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは(iii2) 配列番号6で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 3) (i 3) 配列番号 62 で表される塩基配列、もしくは (i i 3) 配列番号 63 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 4) (i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列、(i i 4) 配列番号 70 で表される塩基配列中の 85～1704 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 4) 配列番号 71 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 5) (i 5) 配列番号 73 で表される塩基配列、(i i 5) 配列

番号 73 で表される塩基配列中の 169 ～ 1785 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 5) 配列番号 74 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 6) (i 6) 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列、もしくは (i i 6) 配列番号 102 (M14) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 7) (i 7) 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列、もしくは (i i 7) 配列番号 104 (M16) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブ

リダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 8) (i 8) 配列番号 9 1 (M 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 8) 配列番号 1 0 6 (M 1 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 9) (i 9) 配列番号 9 2 (M 4) で表される塩基配列、もしくは (i i 9) 配列番号 1 0 8 (M 2 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 0) (i 1 0) 配列番号 9 3 (M 5) で表される塩基配列もしくは (i i 1 0) 配列番号 1 1 0 (M 2 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 1) (i 1 1) 配列番号 9 4 (M 6) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 1) 配列番号 1 1 2 (M 2 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 2) (i 1 2) 配列番号 9 5 (M 7) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 2) 配列番号 1 1 4 (M 2 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 3) (i 1 3) 配列番号 9 6 (M 8) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 3) 配列番号 1 1 6 (M 2 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と 9 0 %

以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 4) (i 1 4) 配列番号 9 7 (M 9) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 4) 配列番号 1 1 8 (M 3 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 5) (i 1 5) 配列番号 9 8 (M 1 0) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 5) 配列番号 1 2 0 (M 3 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 6) (i 1 6) 配列番号 9 9 (M 1 1) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 6) 配列番号 1 2 2 (M 3 4) で表される塩基配列

を含むポリヌクレオチド；

(b 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 7) (i 1 7) 配列番号 1 0 0 (M 1 2) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 7) 配列番号 1 2 4 (M 3 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 8) (i 1 8) 配列番号 1 0 1 (M 1 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 8) 配列番号 1 2 6 (M 3 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 9) (i 1 9) 配列番号 1 7 0 で表される塩基配列もしくは (i i 1 9) 配列番号 1 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 0) (i 2 0) 配列番号 1 7 3 で表される塩基配列もしくは (i i 2 0) 配列番号 1 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 1) (i 2 1) 配列番号 1 7 6 で表される塩基配列もしくは (i i 2 1) 配列番号 1 7 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下で

ハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 2) (i 2 2) 配列番号 1 7 9 で表される塩基配列もしくは (i i 2 2) 配列番号 1 8 0 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 3) (i 2 3) 配列番号 1 8 2 で表される塩基配列もしくは (i i 2 3) 配列番号 1 8 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

(c 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項8]

前記リナロールシンターゼは、以下の (A 1) ~ (C 3 1) からなる群より選ばれる 1 又は 2 以上のタンパク質である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法：

(A 1) (i 1') 配列番号 1 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 1') 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列中の 2 7 ~ 5 7 4 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1) 前記 (i 1') もしくは (i i 1') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1) 前記 (i 1') もしくは (i i 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2) (i 2') 配列番号 4 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 2') 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列中の 39～590 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2) 前記 (i 2') もしくは (i i 2') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3) (i 3') 配列番号 61 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 3) 前記 (i 3') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 4) (i 4') 配列番号 69 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 4') 配列番号 69 で表されるアミノ酸配列中の 29～567 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 4) 前記 (i 4') もしくは (i i 4') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 5) (i 5') 配列番号 72 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i 5') 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列中の 57～594 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 5) 前記 (i 5') もしくは (i i 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 6) (i 6') 配列番号 103 (M15) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 6) 前記 (i 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 7) (i 7') 配列番号 105 (M17) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有す

るアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 7) 前記 (i 7') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 8) (i 8') 配列番号107 (M 19) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 8) 前記 (i 8') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 9) (i 9') 配列番号109 (M 21) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 9) 前記 (i 9') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 10) (i 10') 配列番号111 (M 23) で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 10) 前記 (i 10') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 10) 前記 (i 10') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配

列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 1) (i 1 1') 配列番号 1 1 3 (M 2 5) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 1) 前記 (i 1 1') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 2) (i 1 2') 配列番号 1 1 5 (M 2 7) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 2) 前記 (i 1 2') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 3) (i 1 3') 配列番号 1 1 7 (M 2 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 3) 前記 (i 1 3') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 4) (i 1 4') 配列番号 1 1 9 (M 3 1) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を

有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 4) 前記 (i 1 4') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 5) (i 1 5') 配列番号121 (M33) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 5) 前記 (i 1 5') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 6) (i 1 6') 配列番号123 (M35) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 6) 前記 (i 1 6') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 7) (i 1 7') 配列番号125 (M37) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 7) 前記 (i 1 7') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配

列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 8) (i 1 8') 配列番号 1 2 7 (M 3 9) で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 8) 前記 (i 1 8') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 1 9) (i 1 9') 配列番号 1 6 1 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 1 9) 前記 (i 1 9') ものアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 1 9) 前記 (i 1 9') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 0) (i 2 0') 配列番号 1 6 2 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 0) 前記 (i 2 0') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 1) (i 2 1') 配列番号 1 6 3 で表される全長アミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を

有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 1) 前記 (i 2 1') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 2) (i 2 2') 配列番号164で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 2) 前記 (i 2 2') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 3) (i 2 3') 配列番号165で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 3) 前記 (i 2 3') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 4) (i 2 4') 配列番号166で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 4) 前記 (i 2 4') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配

列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 5) (i 2 5') 配列番号 1 6 7 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 5) 前記 (i 2 5') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 6) (i 2 6') 配列番号 1 6 8 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 6) 前記 (i 2 6') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 7) (i 2 7') 配列番号 1 6 9 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 7) 前記 (i 2 7') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 8) (i 2 8') 配列番号 1 7 2 で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を

有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 8) 前記 (i 2 8') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 2 9) (i 2 9') 配列番号175で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 2 9) 前記 (i 2 9') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3 0) (i 3 0') 配列番号178で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3 0) 前記 (i 3 0') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(C 3 0) 前記 (i 3 0') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；

(A 3 1) (i 3 1') 配列番号181で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(B 3 1) 前記 (i 3 1') のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質；及び

(C 3 1) 前記 (i 3 1') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配

列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質。

- [請求項9] 前記細菌は、さらにゲラニルニリン酸シンターゼを発現する細菌である請求項1～8のいずれか1項記載の方法。
- [請求項10] 前記細菌が、メチルエリスリトールリン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。
- [請求項11] 前記細菌が、メバロン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。
- [請求項12] 前記細菌は、腸内細菌科細菌、コリネ型細菌又はラン藻に属する細菌である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。
- [請求項13] 前記細菌は、エシェリヒア属、パントエア属、シネコシスティス属、又はコリネバクテリウム属に属する細菌である、請求項12記載の方法。
- [請求項14] 前記細菌は、エシェリヒア・コリ、パントエア・アナナティス、シネコシスティス s p.、又はコリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項13記載の方法。
- [請求項15] 前記細菌は、2-ケトグルコン酸生成経路が遮断されている細菌である、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。
- [請求項16] 2-ケトグルコン酸生成経路が、グルコース脱水素酵素活性の低減により遮断されている、請求項15記載の方法。
- [請求項17] 前記細菌において、グルコース脱水素酵素遺伝子であるポリヌクレオチドが破壊されている、請求項16記載の方法。
- [請求項18] 前記ポリヌクレオチドは、以下の(x)～(z)からなる群より選ばれる1又は2以上のポリヌクレオチドである、請求項17記載の方法。

(x) [i] 配列番号59で表される塩基配列、もしくは[i i]配列番号59で表される塩基配列中301～2691番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(y) 前記〔i〕もしくは〔i i〕の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；又は

(z) 前記〔i〕もしくは〔i i〕の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項19] 前記グルコース脱水素酵素は、以下の(X)～(Z)からなる群より選ばれる1又は2以上のタンパク質である、請求項16記載の方法。

(X) 配列番号60で表される全長アミノ酸配列を含むタンパク質；

(Y) 配列番号60で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質；及び

(Z) 配列番号60で表されるアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつグルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

[請求項20] 前記培養培地中に蓄積されるリナロールが200mg/L以上である、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

[請求項21] 前記培養培地中に蓄積されるリナロールが500mg/L以上である、請求項1～19のいずれか1項記載の方法。

[請求項22] アクチニジア属、コリアンドラム属、ヨモギ属、バクハウシア属、シロイヌナズナ属、ミカン属、リンゴ属、シソ属、ブドウ属、ラベンデュラ属、メンタ属、又はメボウキ属、又はサンジソウ属に属する植物由来の、又は放線菌由来のリナロールシンターゼを発現する細菌。

[請求項23] リナロールシンターゼは、アクチニジア・アルゲータ、コリアンドラム・サティバム、アルテミシア・アヌア、バクハウシア・シトリオドラ、アラビドプシス・タリアナ、シトラス・ウンシュウ、マルス・

ドメスティカ、ペリラ・フルテセンス・バー・クリSPA、ビティス・ビニフェラ、ラベンデュラ・アングスティフォリア、メンタ・シトラータ、オシマム・バシリカム、クラルキア・ブリュワリ、又はストレプトマイセス・クラブリゲルスに由来する、請求項22記載の細菌。

[請求項24] 前記微生物は、前記リナロールシンターゼをコードするポリヌクレオチド及びそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む異種発現単位を含む、請求項22又は23記載の細菌。

[請求項25] 前記ポリヌクレオチドは、以下の(a1)～(c23)からなる群より選ばれる1又は2以上のポリヌクレオチドである、請求項24記載の細菌。

(a1) (i1) 配列番号2で表される塩基配列、(ii1) 配列番号2で表される塩基配列中の79～1725番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは(iii1) 配列番号3で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b1) 前記(i1)、(ii1)もしくは(iii1)の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c1) 前記(i1)、(ii1)もしくは(iii1)の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a2) (i2) 配列番号5で表される塩基配列、(ii2) 配列番号5で表される塩基配列中の115～1773番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは(iii2) 配列番号6で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b2) 前記(i2)、(ii2)もしくは(iii2)の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2) 前記 (i 2)、(i i 2) もしくは (i i i 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 3) (i 3) 配列番号 6 2 で表される塩基配列、もしくは (i i 3) 配列番号 6 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 3) 前記 (i 3) もしくは (i i 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 4) (i 4) 配列番号 7 0 で表される塩基配列、(i i 4) 配列番号 7 0 で表される塩基配列中の 8 5 ~ 1 7 0 4 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 4) 配列番号 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 4) 前記 (i 4)、(i i 4) もしくは (i i i 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 5) (i 5) 配列番号 7 3 で表される塩基配列、(i i 5) 配列番号 7 3 で表される塩基配列中の 1 6 9 ~ 1 7 8 5 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列、もしくは (i i i 5) 配列番号 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 5) 前記 (i 5)、(i i 5) もしくは (i i i 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 6) (i 6) 配列番号 89 (M1) で表される塩基配列、もしくは (i i 6) 配列番号 102 (M14) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 6) 前記 (i 6)、もしくは (i i 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 7) (i 7) 配列番号 90 (M2) で表される塩基配列、もしくは (i i 7) 配列番号 104 (M16) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と 90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 7) 前記 (i 7) もしくは (i i 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 8) (i 8) 配列番号 91 (M3) で表される塩基配列、もしくは

は (i i 8) 配列番号 1 0 6 (M 1 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド ;

(b 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(c 8) 前記 (i 8) もしくは (i i 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(a 9) (i 9) 配列番号 9 2 (M 4) で表される塩基配列、もしくは (i i 9) 配列番号 1 0 8 (M 2 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド ;

(b 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(c 9) 前記 (i 9) もしくは (i i 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(a 1 0) (i 1 0) 配列番号 9 3 (M 5) で表される塩基配列もしくは (i i 1 0) 配列番号 1 1 0 (M 2 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド ;

(b 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド ;

(c 1 0) 前記 (i 1 0) もしくは (i i 1 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク

質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 1) (i 1 1) 配列番号 9 4 (M 6) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 1) 配列番号 1 1 2 (M 2 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 1) 前記 (i 1 1) もしくは (i i 1 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 2) (i 1 2) 配列番号 9 5 (M 7) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 2) 配列番号 1 1 4 (M 2 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 2) 前記 (i 1 2) もしくは (i i 1 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 3) (i 1 3) 配列番号 9 6 (M 8) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 3) 配列番号 1 1 6 (M 2 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 3) 前記 (i 1 3) もしくは (i i 1 3) の塩基配列と相補的

な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 4) (i 1 4) 配列番号 9 7 (M 9) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 4) 配列番号 1 1 8 (M 3 0) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 4) 前記 (i 1 4) もしくは (i i 1 4) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 5) (i 1 5) 配列番号 9 8 (M 1 0) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 5) 配列番号 1 2 0 (M 3 2) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 5) 前記 (i 1 5) もしくは (i i 1 5) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 6) (i 1 6) 配列番号 9 9 (M 1 1) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 6) 配列番号 1 2 2 (M 3 4) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活

性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 6) 前記 (i 1 6) もしくは (i i 1 6) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 7) (i 1 7) 配列番号 1 0 0 (M 1 2) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 7) 配列番号 1 2 4 (M 3 6) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 7) 前記 (i 1 7) もしくは (i i 1 7) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 8) (i 1 8) 配列番号 1 0 1 (M 1 3) で表される塩基配列、もしくは (i i 1 8) 配列番号 1 2 6 (M 3 8) で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 8) 前記 (i 1 8) もしくは (i i 1 8) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 1 9) (i 1 9) 配列番号 1 7 0 で表される塩基配列もしくは (i i 1 9) 配列番号 1 7 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 1 9) 前記 (i 1 9) もしくは (i i 1 9) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 0) (i 2 0) 配列番号 1 7 3 で表される塩基配列もしくは (i i 2 0) 配列番号 1 7 4 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 0) 前記 (i 2 0) もしくは (i i 2 0) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 1) (i 2 1) 配列番号 1 7 6 で表される塩基配列もしくは (i i 2 1) 配列番号 1 7 7 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 1) 前記 (i 2 1) もしくは (i i 2 1) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(a 2 2) (i 2 2) 配列番号 1 7 9 で表される塩基配列もしくは (

i i 2 2) 配列番号 1 8 0 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c 2 2) 前記 (i 2 2) もしくは (i i 2 2) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

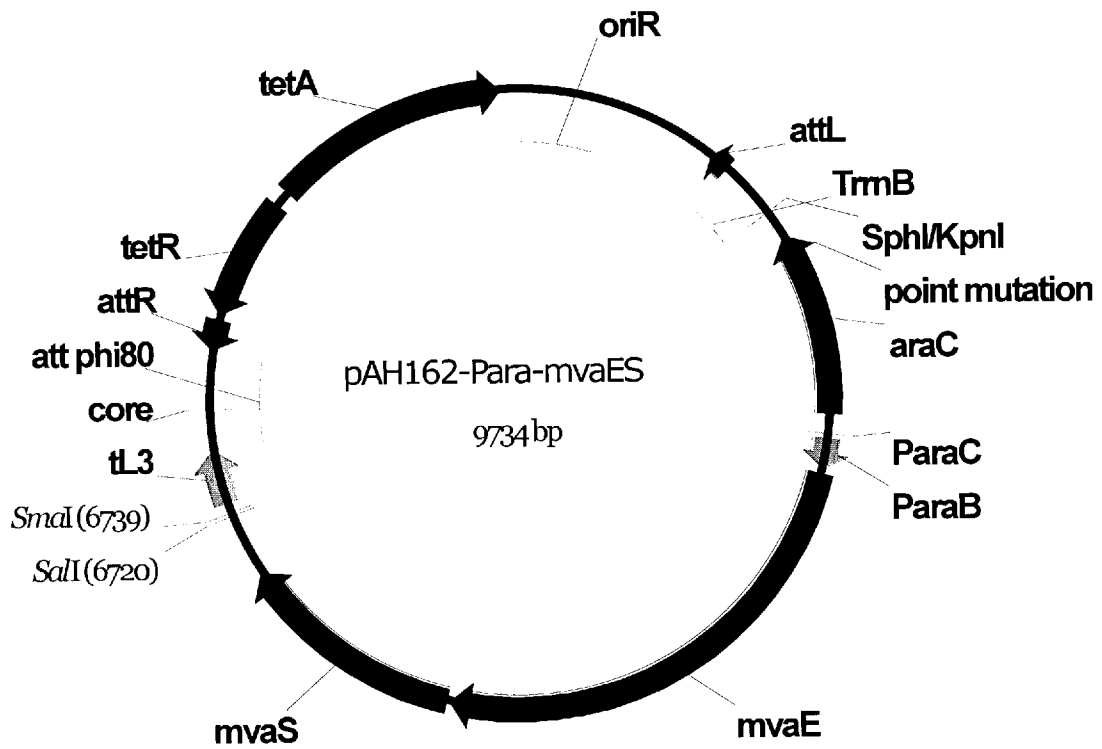
(a 2 3) (i 2 3) 配列番号 1 8 2 で表される塩基配列もしくは (i i 2 3) 配列番号 1 8 3 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；及び

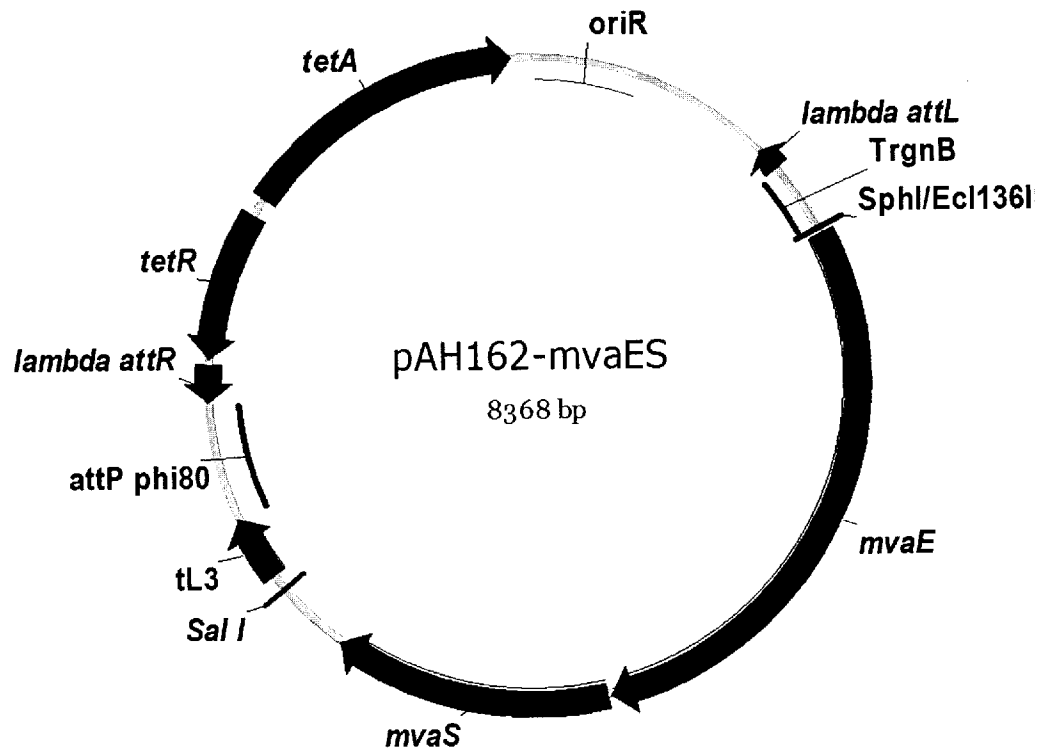
(c 2 3) 前記 (i 2 3) もしくは (i i 2 3) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリナロールシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項26] 前記細菌は、エシェリヒア属、パントエア属、シネコシスティス属、又はコリネバクテリウム属に属する細菌である、請求項 2 2 ～ 2 5 のいずれか 1 項記載の細菌。

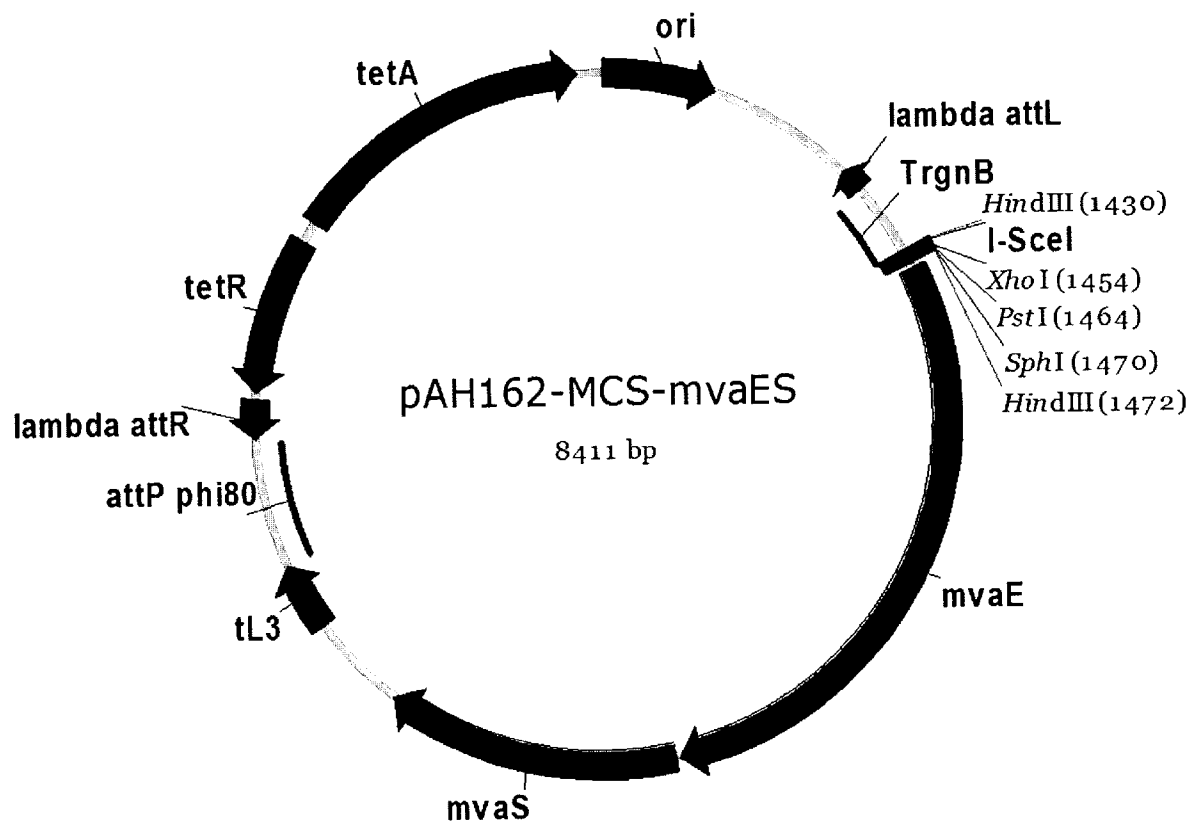
[図1]



[図2]

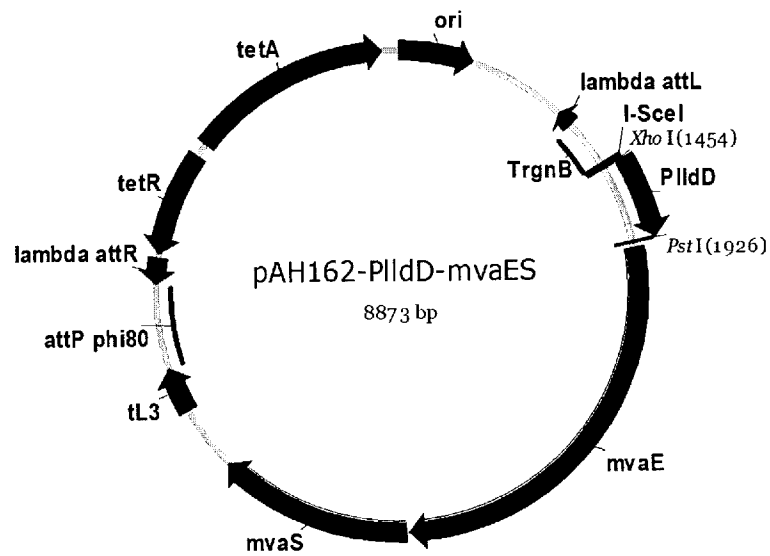


[図3]

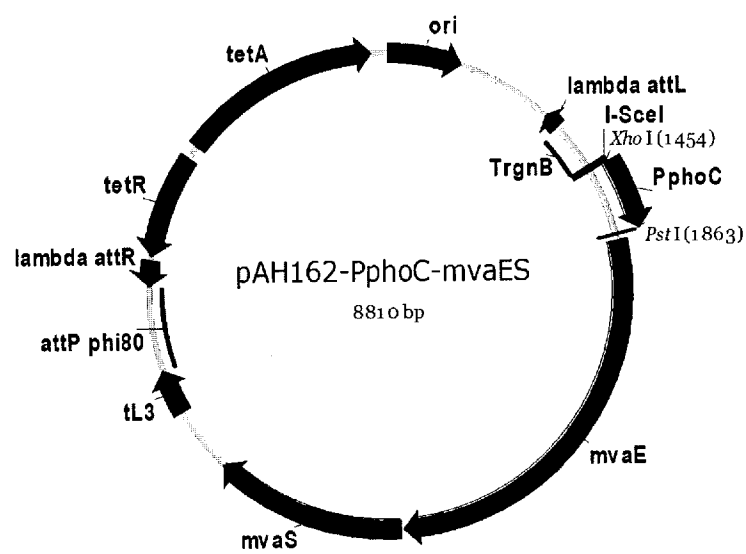


[図4]

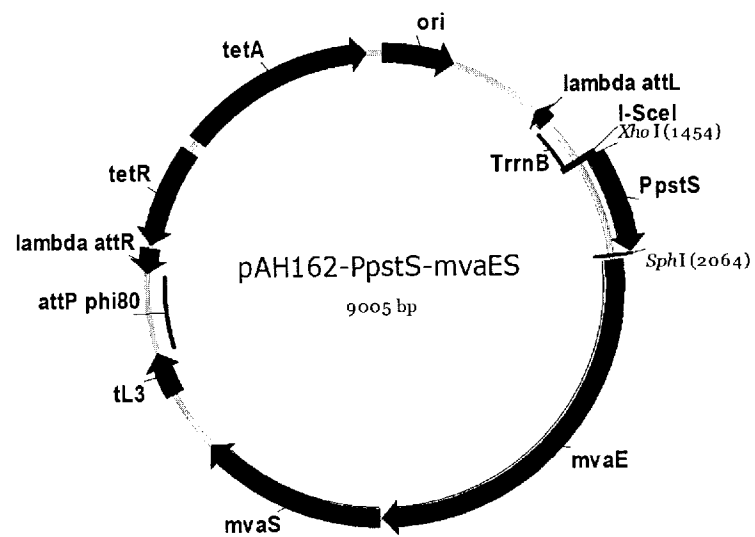
(A)



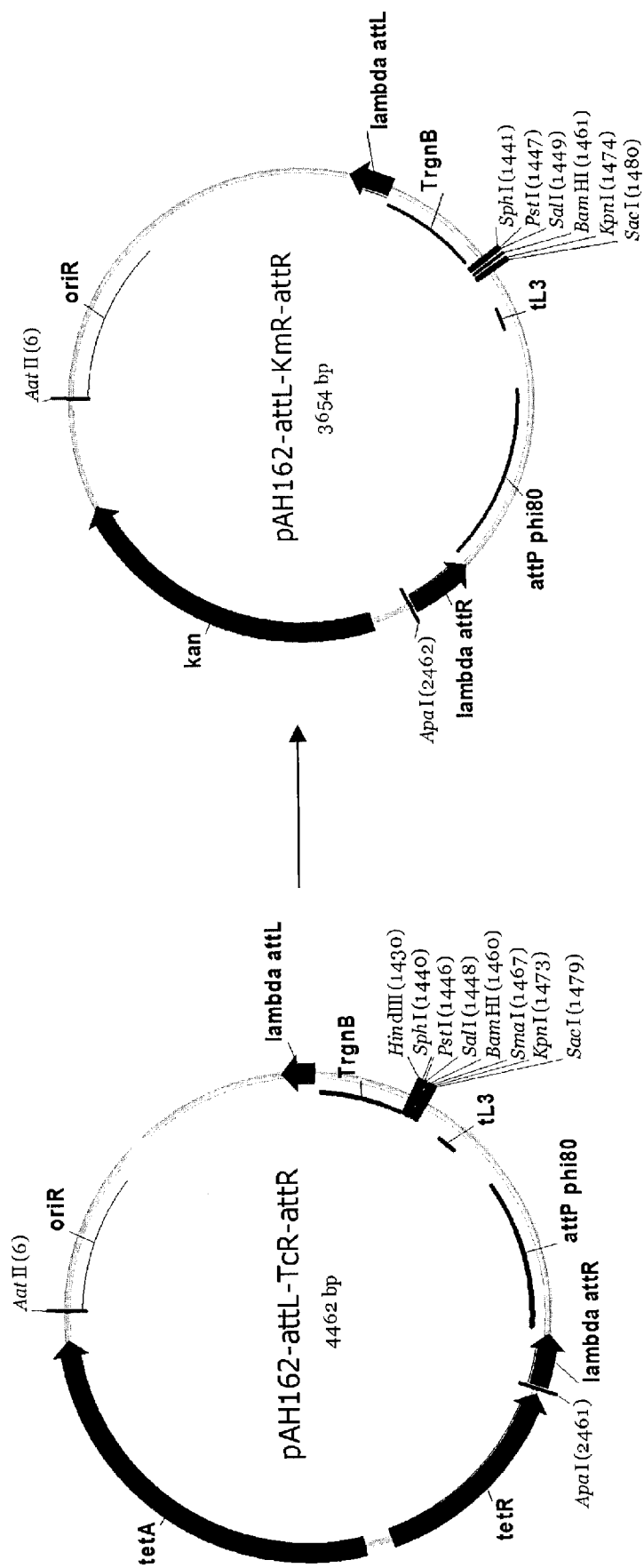
(B)



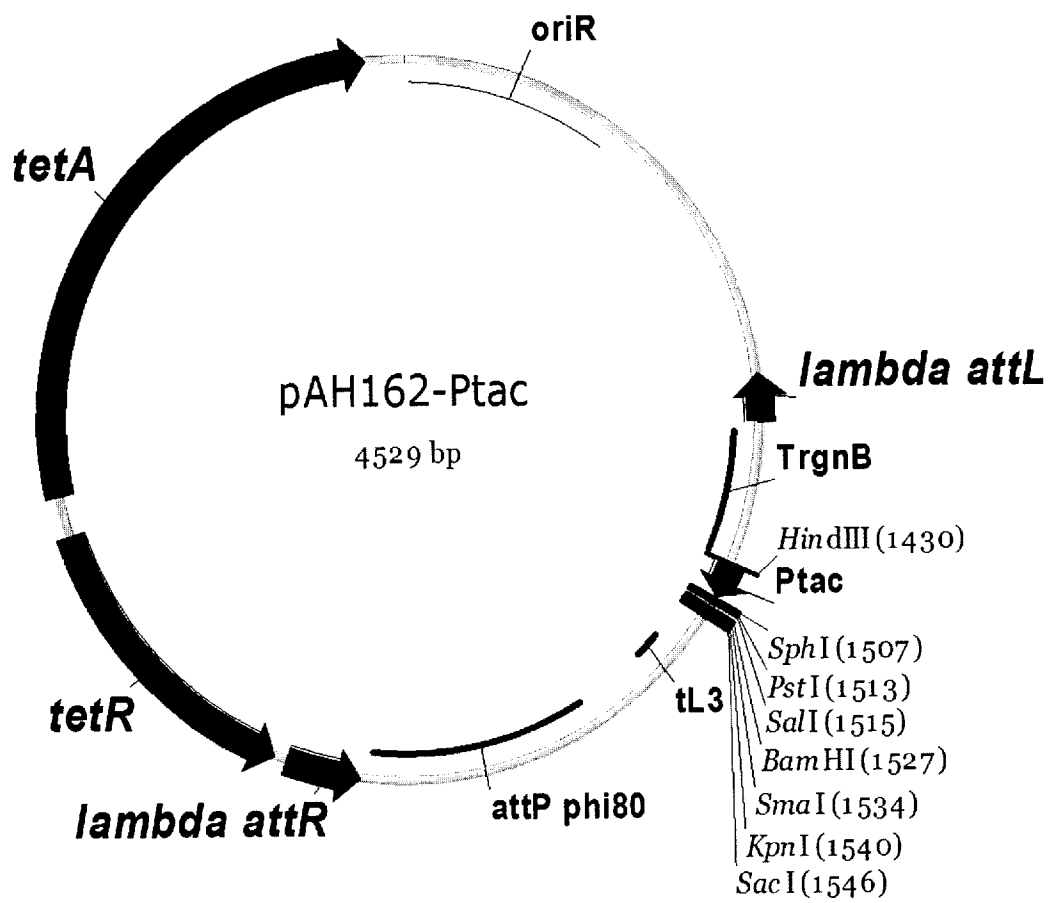
(C)



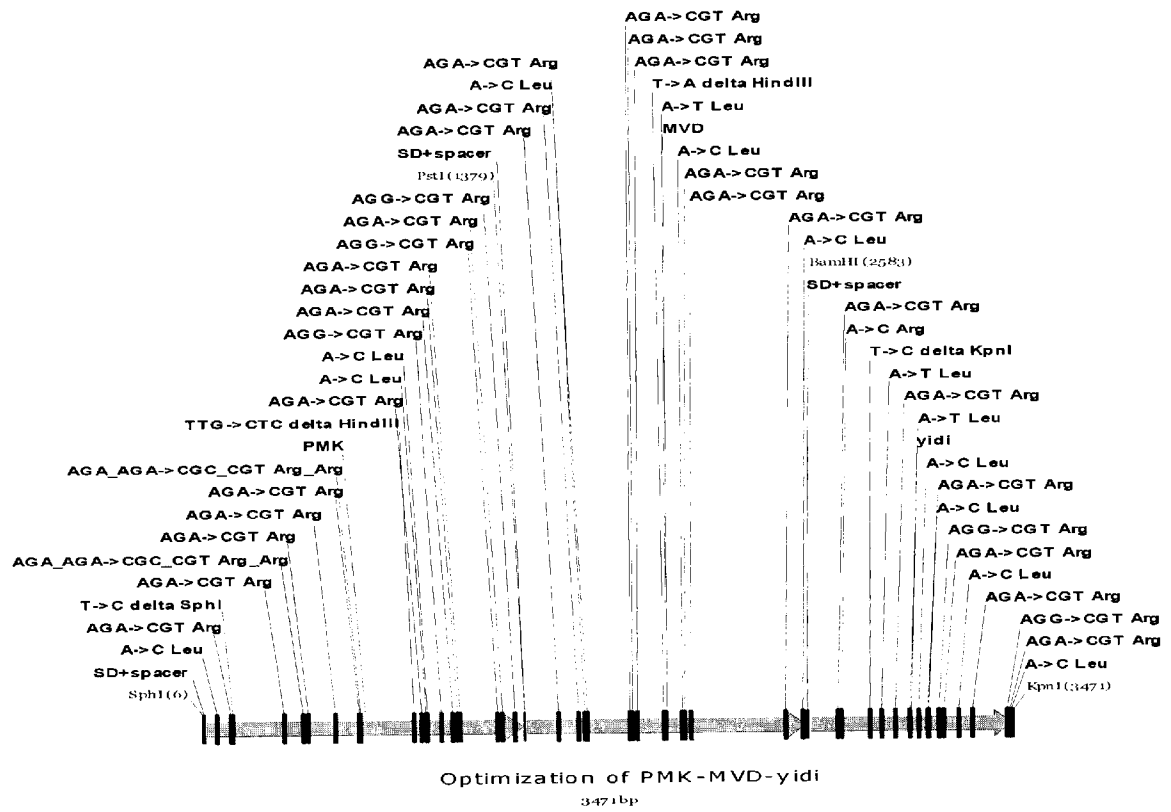
[図5]



[図6]

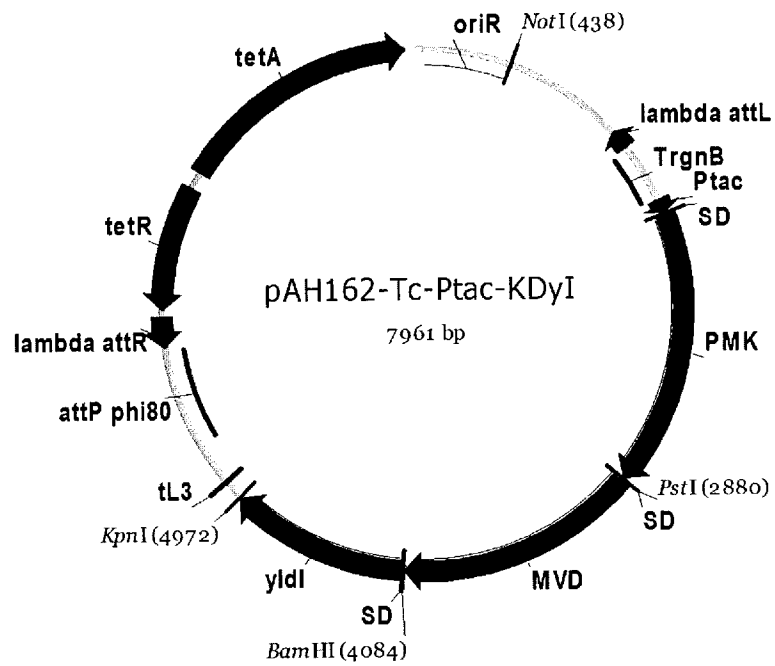


[図7]

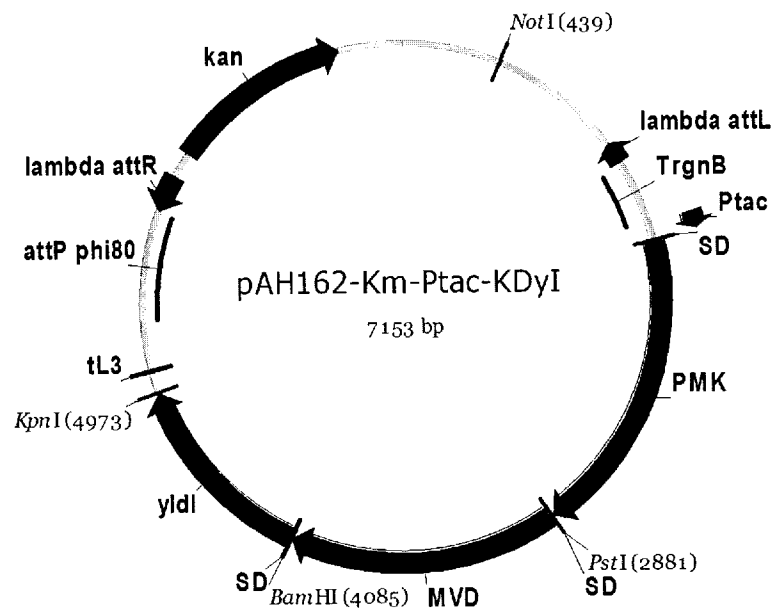


[図8]

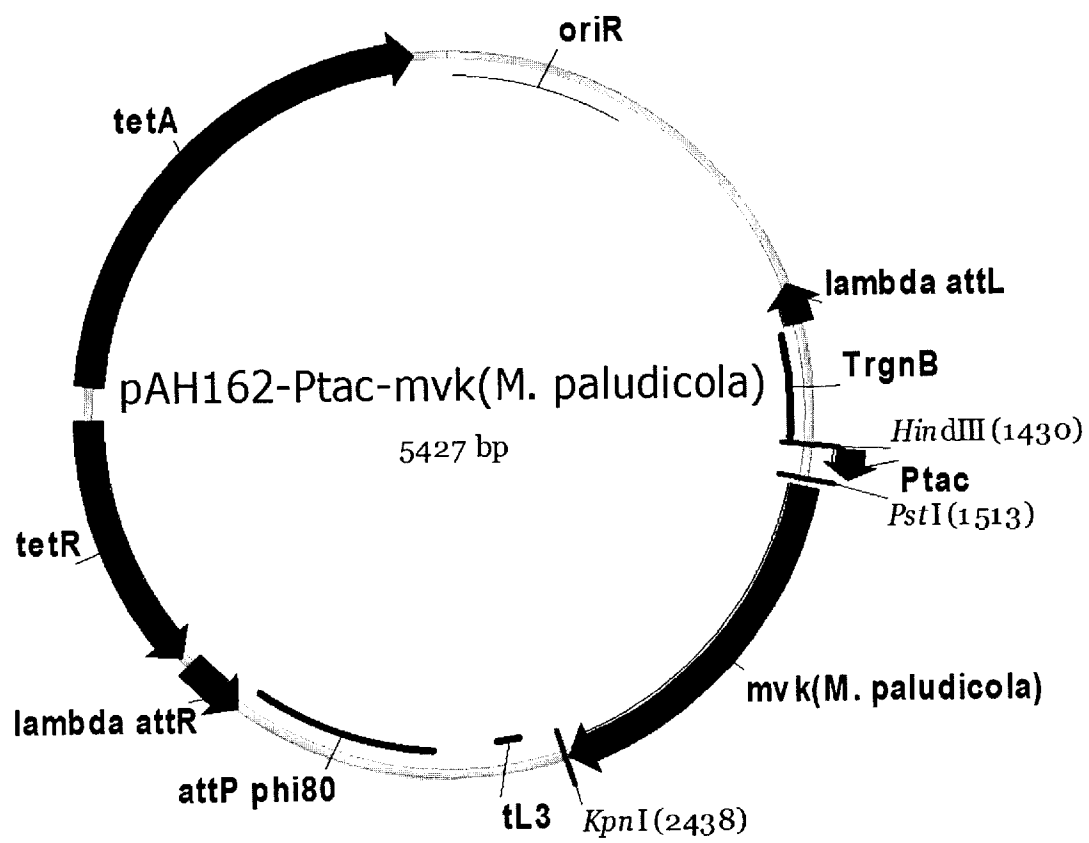
(A)



(B)

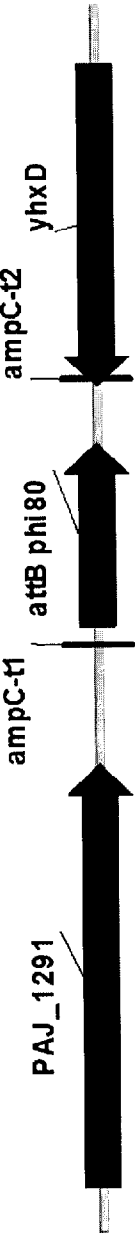


[図9]

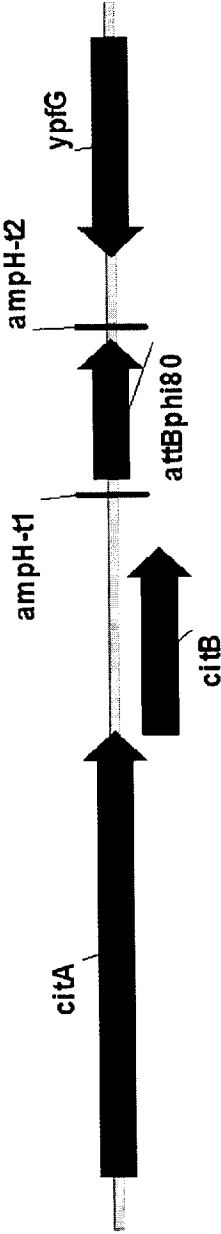


[図10]

(A)



(B)

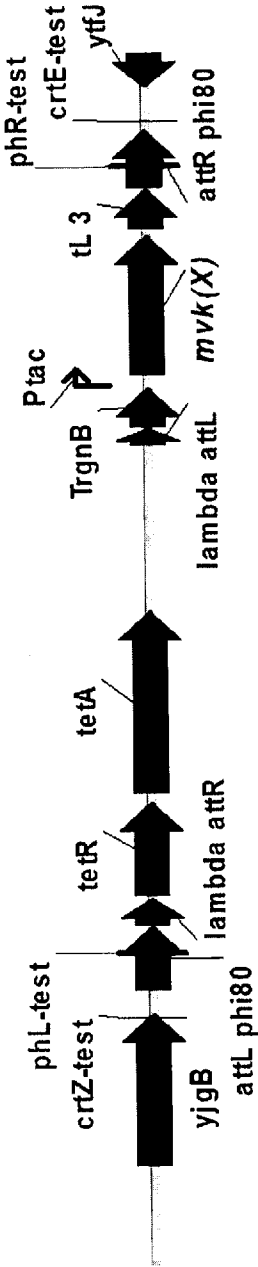


(C)

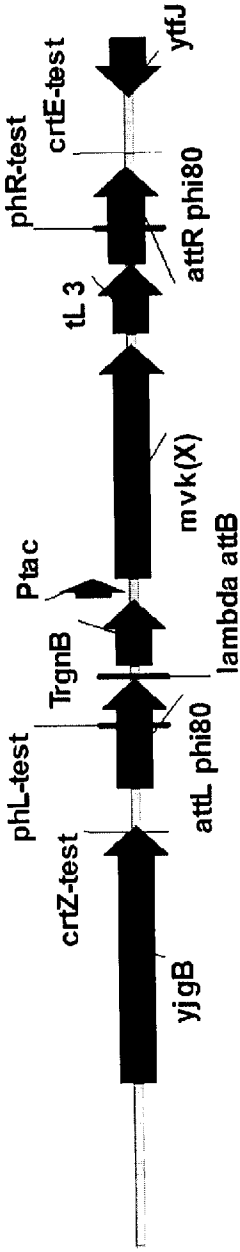


[図11]

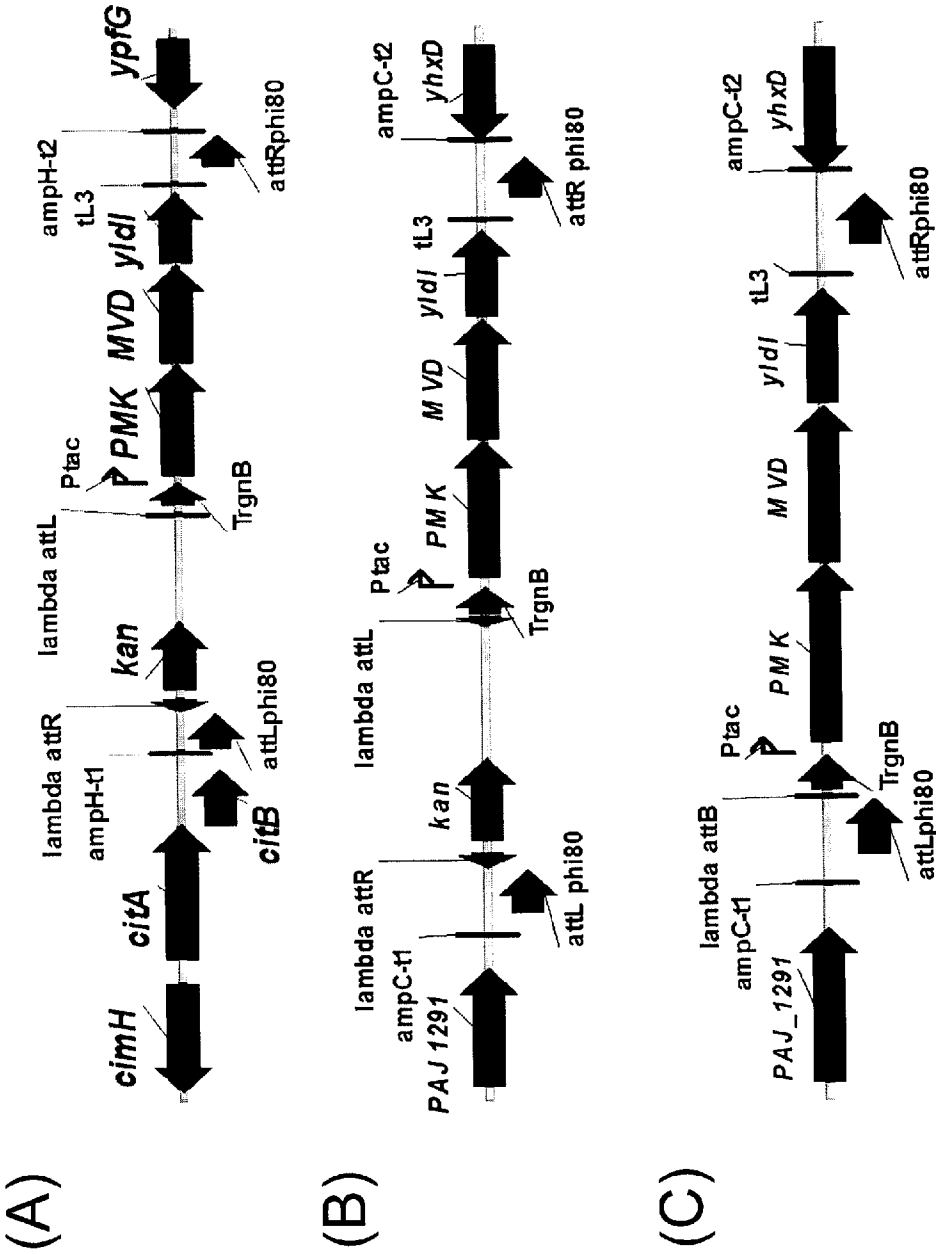
(A)



(B)

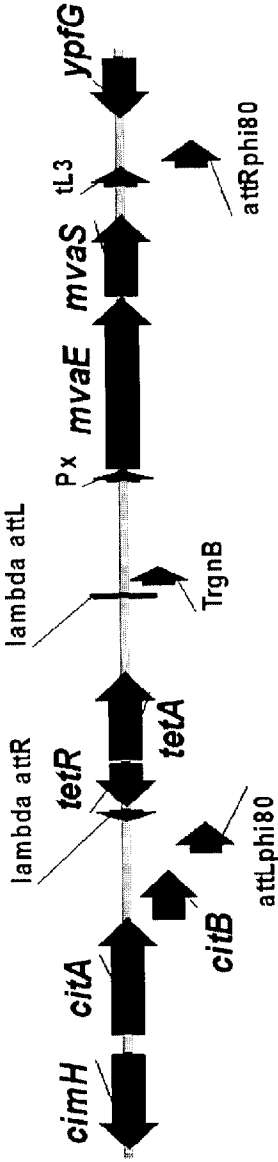


[図12]

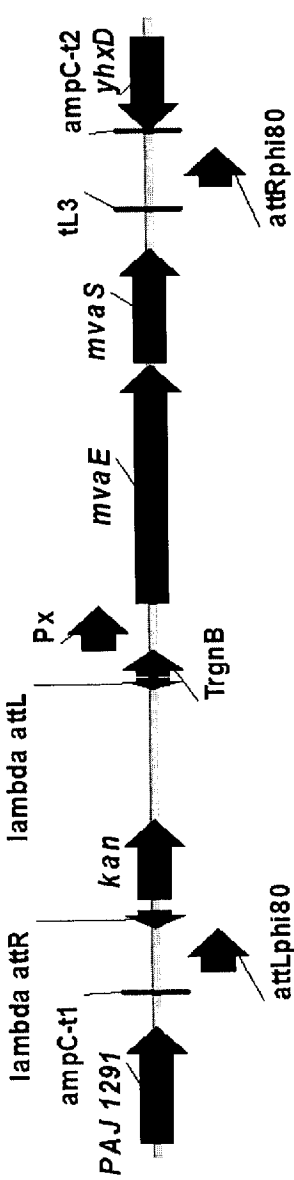


[図13]

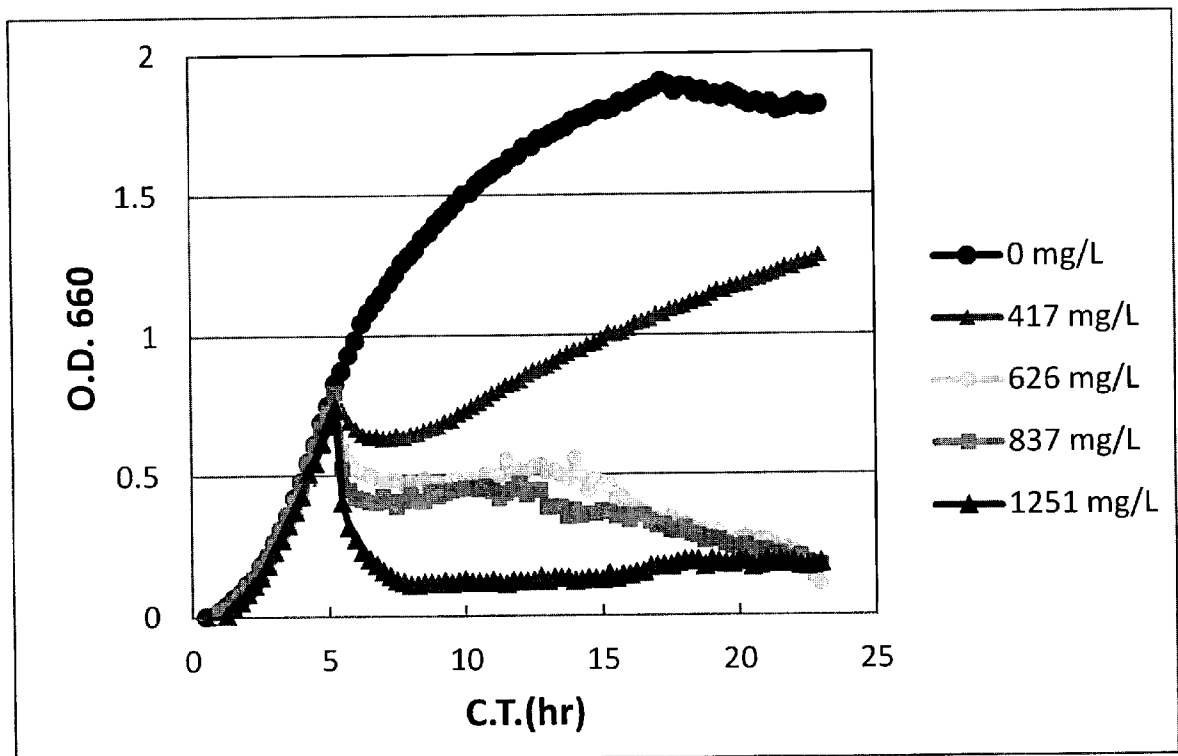
(A)



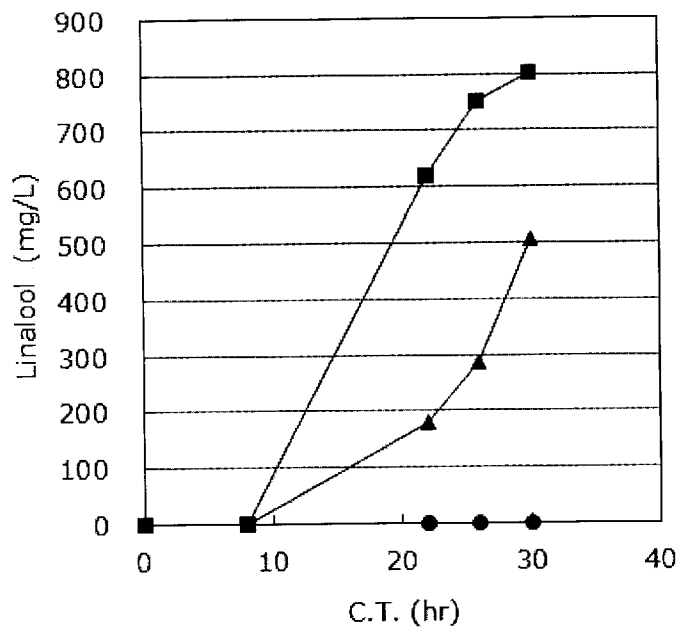
(B)



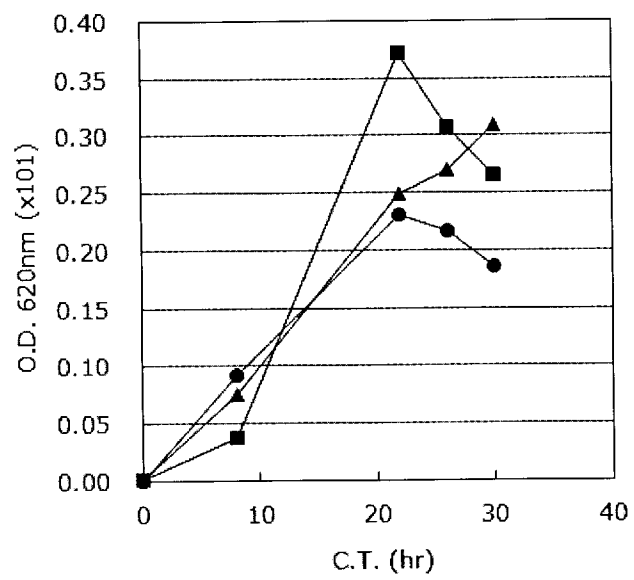
[図14]



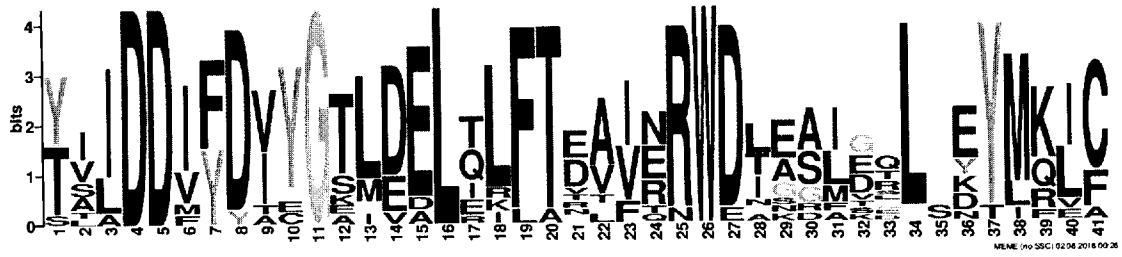
[図15]



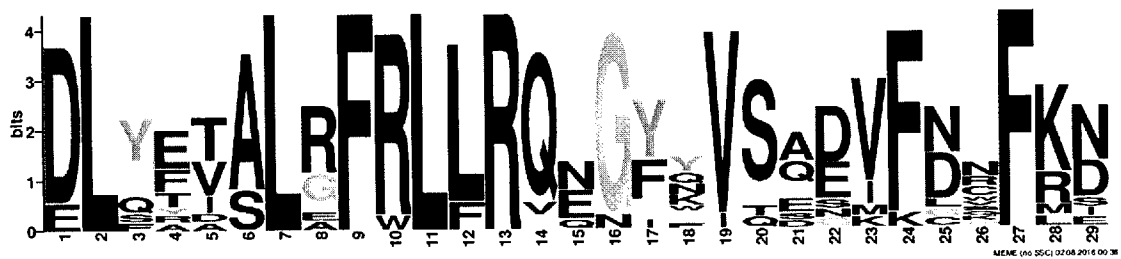
[図16]



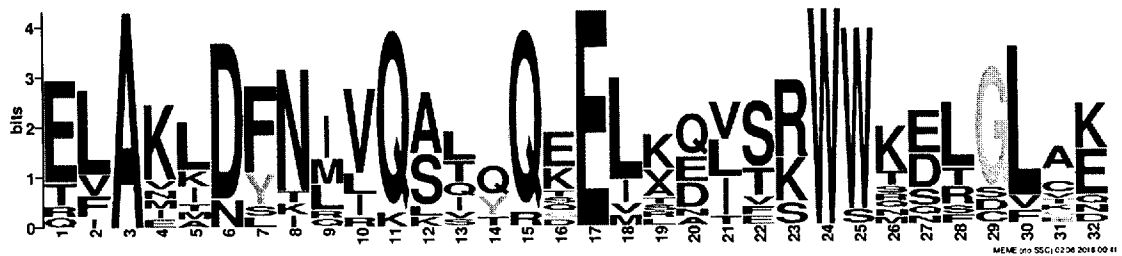
[図17]



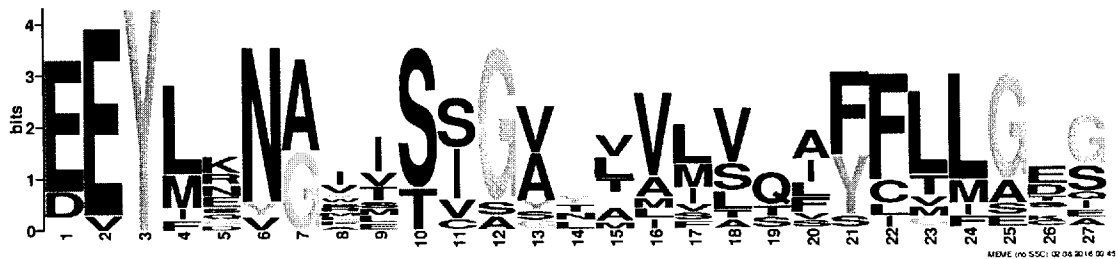
[図18]



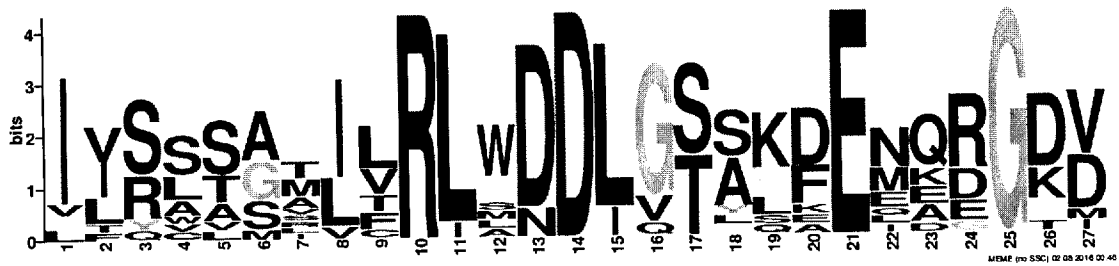
[図19]



[図20]



[図21]



[図22]

M23	YIIDDIFDVYGTLDLDELILFTETITRWDLAAMGQLPEYMKIC
M29	YIIDDIFDVHGTLDLDELTLFTEAVNRWDIAAFETLPNYMKIC
M37	YVIDDIFDTYGKMDLILFTDAIRRWDLAAMEGLPEYMKIC
M25	YLIDDIFDVYGTLDLDELTLFTEVVRWEIGSIEHLPDYMKIC
M27	TSLDDVYDIYGTLDLDELQLFTDAIQRWDTESISRLPYMQLF
M31	TAIDDMYDIYGSPDELRRFTDAVNRWDTEALVDPDYMKIC
M21	YIIDDIFYVCGALDALTLFTEPINRWDLGDIDQLPEYMKIC
M17	TTIDDIYDIYGTLEELQLFTVAFENWDINRLDELPEYMRIC
M15	YVIDDIFDVYGELEELTIFTRVVERWDHKGKLTLPKYMVRC
M35	TALDDVYDIYGTLDLDELQLFTHVIRRWDTESATQLPYQLF
M19	SIIDDIYDAYGTIEELELFATAIERWDLSAIDLLPEYMKIC
M33	TSLDDVYDIYGTLDLDELQLFTNLFERWDNASIGRLPEYLQLF
M39	TVADDFFDVEGSMVDLEKLTDAVRRWDAEGLGSHSKTIFEA

[図23]

M25	DLHEVALRFRLLRQHGYFVSDDVFNNFKN
M27	DIYFTALGFRLLRQHGFQVSQEVDFCFKN
M29	DLYEVALRFRLLRQEGYHVPADVFNFKN
M21	DLQEVALRFRLLRQQGYVSADVFNFRN
M33	DIYFTALGFRLFRQHGFQVSQEVDFRKN
M35	DLHFTSLGFRLLRQHGFNVSQGVDFCFKN
M23	DLQEVALRFRLLRQEGYVVPADMFNFRN
M31	DLSTALRFRLLRQHGYVPSSEVDFQFRS
M17	DLHATALEFRLFRQHGFNVSEVDFVFME
M19	ELYIISLHFRLLRQNGYKISADVFNFKD
M15	DLHEIALRFRLLRQEGHYVQENKKGFKD
M37	DLFTAALRFRLLRHNGIQVTPEIFLKFKN
M39	ELYRDSLAFWLLRVNNHWWSPSTFCWFLD

[図24]

M23	ETAKKDFNMVQALHQKEIVQVTKWWKDLGLTK
M29	ELAKADFNMQSIHQELLQISKWWQDRGLAE
M17	EFAKIDFNIVQAIHQEELKNVSSWWMETGLGK
M27	ELAKLDFNIIQATQQEELKDLRWWKSTCLAE
M33	ELAKLNFNIVQATQQEELKALSRWWSSSLGLAE
M25	TVAKTDLNMVQSLHQEVAQVSKWWKELGLCK
M37	ELAILDYNQVQAQHQSELTEITRWWKQLGLVE
M35	ELAKLDFNIIQATQQEELKDLRWWNDSSLPQ
M21	ELANMDFKLQSLHQKEIVQISSWWRELGLAK
M31	ELAKLDYNLVQSSYQTELKELTRWTDLGFKK
M19	TFAMLDNFILQKQHQEELRDIVRWWKNFDVPN
M15	RVAEIDSIRLKSQTQGEMSQTFKWWTELGLEK
M39	QLAVKNYTLRQLVYRDELAEVERWSKERGLCD

[図25]

M21	EEYLENGIVSSGVHLVLVHIFFLGHG
M25	EEYLKNGIISGVNVVMVHIFFILGEG
M29	HEYLKNGVISSGVHVVLVHLFFLLGHG
M23	EEYLRNGIESSGVHVALAHFFFLGHG
M15	EEYMKNQVSSGVHVLMLHAYILLGEE
M37	EEYIENGASTVGAYMVLVHLFFLIGEG
M31	DEYLSNAWTSVGGPAAMVHAYFLMGCA
M33	EEYFDNAFMTIGAPPVLSQAYFTLGSS
M27	EEYLNNAYISIGATPVISQVFFTLATS
M35	EEYLNYSITIGAPAVISQIYFMLAKS
M17	EEYMQNARISISSPTIFVHFYCVFSDQ
M39	DVYLGNAMTSIAAHTMVLTAASCLLGP
M19	EEYMRVALLSCGYLLSTSSFLGMEDI

[図26]

M25	IISSTAAILRLWDDLGSAKDENQDGDD
M29	IISSTAAILRLWDDLGSAKDENQDGH
M23	IISSTATILRLWDDLGSAKDENQEGKD
M15	IVSSAATILRLWDDLGSAKDENQDGT
M27	ILRLSGMLVRLPDDLGTSPFEMKRGDV
M35	IIRLSGMLVRLPDDLGTLPFEMKRGDV
M21	IVSSVATILRIWDDLGSAKDENQGGKD
M33	ILRVSGMLVRLPDDLGTSSFEMERGDV
M19	IVQASSIICRLMDDIVSHKFEQQRGHV
M37	PFSAAGRIFRLWDDLGTSEEEERGDM
M17	VVRCSSSVFRLANDLVTSPDELARGDV
M31	LLYWSSLITRLSDDLGTSLAEIARGDV
M39	ITSLLMVLTRLLNDIQSYLKEEDEGKI

[図27]

MOTIF LOCATIONS

◎ Only Motif Sites? ○ Motif Sites+Scanned Sites? ○ All Sequences?			
Name?	p-value?	Motif Location?	
1. M15	1.51e-101		
2. M17	2.20e-104		
3. M19	8.15e-92		
4. M21	9.27e-122		
5. M23	8.78e-129		
6. M25	1.58e-133		
7. M27	3.69e-121		
8. M29	3.03e-134		
9. M31	1.98e-106		
10. M33	1.75e-114		
11. M35	8.45e-112		
12. M37	3.08e-109		
13. M39	3.98e-62		

[図28]

>At1LINS_M15

MANTAKRSILRNHASVSNPSKQFHINKTSLEYLHELNIKKIKNLSANVDVPSNLEMIDVIQSLGIDLHFRQEIEQTLH
 MIYKEGLQFNGLHEIALRFRLLRQEGHYVQENKKGGFKDVVKNDVKGLTELFASELRVEGEETLDGAREFTYSRLNEL
 CSGRESHQKQEIMKSIAQPRHKTVRGLTSKRFTSMIKIAGQEDPEWLQSLLRVAEIDSIRLKS LTQGEMSQTFKWWTELG
 LEKDVEKARSQPLKWHTWSMKILQDPTLTEQRDLTKPISLVYVI **DDIFDVYGE**LEELTIFTRVVERWDHKGLKTLPKY
 MRVCFEALDMITTEISMKIYKSHGWNPTYALRQSWASLCKAFLVEAKWFNSGYLPTTEEYMKNGVSSGVHLVMLHAYIL
 LGEELTKEKVELIESNP GIVSSAATILRLWDDLGS AKDENQDGTGDSYVECYLNEYKGSTVDEARTHVAQKISRRAWKRLN
 RECLNPCF SRSFSKACLNIARTVPLMYSYDDDQRLPDEYLKSLM

[図29]

>At2LINS_M17

MRRSANYQPSRWDHHLLSVENKFAKDKVRERD LLKEKVRKMLNDEQKTYLDQLEFIDDLQKLGVS YHFEAEIDNILTS
 SYKKDRTNIQESDLHATALEFRLFRQHGFNVSEDFDVFME NCGKFD RDDIYGLISLYEAS YLSTKLDKNLQIFIRPFAT
 QQLRDFVDTHSNEDFGSCDMVEIVVQALDMPYYWQMRRLSTRWYIDVY GKRQNYKNLVVVEFAKIDFNIVQAIHQEELKN
 VSSWWMETGLGKQLYFARDRIVENYFWTIGQIQEPQYGYVRQTMTKINALLTTI **DDIYDIYGT**LEELQLFTVAFENWDI
 NRLDELPEYMRLCFLVIYNEVNSIACEILRTKNINVIPFLKKS WTDVSKAYLVEAKWYKSGHKPNLEEYMQNARISISSP
 TIFVHFYCVFSDQLSIQVLETLSQHQQNVVRCSSSVFR LANDLVTSPDELARGDVCKSIQCYMSETGASEDKARSHVRQM
 INDLWDEMNYEKMAHSSSILHHD FMETVINLARMSQCMYQYGDGHGSPEKAKIVDRVMSLLFNPIPLD

[図30]

>Cu1LINS_M19

MLFQVSASPKNK VIRTNAEKESTRRSANFDPTIWGDYFLSYTGDFKESGDASVKHQELKKEIRTMLRADINKPTQTKLDLI
 DDIIQLRGVSYHFESEIDEILRKMHEANQDCDLGDDENVQELYYISLHFRLLRQNGYKISADVFN SFKDSNGNFKSFLKRD
 IRGMLSLYEA AHLRVHGENILNEALTFTVTHLESFTSQSNTQLAAQVNRALNRPIRKS LPRLEAKHYMPIYQKDP SHNKD
 LLTFAMLD FNILQKQHQEELRDIVRWWKNFDVPNKLPFIRDRVVEGYFWILGVYFEPKFLLARKILT KVISMASIT **DDI**
YDAYGTIEEELFATAIERWDL SAIDLLPEYMKLCYCALLDAYSEFEKDLASKGILYGLPFAKESMKILVRSYIIEARW
 CDQQYVPTMEEYMRVALLSCGYLLSTSSFLGMEDIVTKEAF EWVSGNPKIVQASSIICRLMDDIVSHKFEQQRGHVASA
 VECYMKQHGVSEEEAVKVFREKVGNAWKDINEELMRPPVVPMLLERVLNARLMDVLYQNDSYTNPHLMKDHI VAALLK
 DPVVFED*

[図31]

>Cu2LINS_M21

MAFSSKDISSDSSHIHFIPKHISKVGNRNLNNINSLLPNNKKGSTNDNIGVSARLKRFTYPSEHSSNFNDDIHIKHAKKL
 EVIKHILIKLGDDDSFEGLAMIDVVQRLGIDYYFQDEIELILRRQYSIFFTDGDRYNDLQEVALRFRLLRQQGYVVSADV
 FNRFRNKEGEFKQNIISEDINGLMSLYEASQLSIGGEDGLDEAGHFSATHLANYDLAGVVEHLLLYPYRKSLSPAKNFFHG
 NFQGSSEYIWILDQLANMDFKLQSLHQKEIVQISSWWRELGLAKKLEFAREQPVKWWVWSMACFTDPNLSWQRIELTK
 PISFVYIIDDIFYVCGALDALTLFTEPINRWDLGDIDQLPEYMKICFKALNDITNEISKQGVQRSMGITLCTPLRKGVG
 EVLCNAFLIEAKWFASGHLPKAEYLENGIVSSGVHLVLVHIFLLGHGITNETVQLIDSNPPIVSSVATILRIWDDLGS
 AKDENQGGKDGSIYYMMEHRLTAEDAHHKHAMDKISDAWKRLNKECLSPNPFSSASFTRASFNCARMVPLMYSYDDSQR
 LPSLEEYIKSSLFNLTPTQGVY

[図32]

>Cu3LINS_M23

MAFSSSSRAKLSATSHISKAPDKISKTSRPSLIEFTPSPTIYQKGCITSNDTVASPLKHFTHTTRHPSFFDHDJQVEHS
 RKLKEFKHIFSLVGGNSFEGLVMIDAVQRLRIEYLFKDEIEEILQRQYIISSTCGGHLHDLQEVALRFRLLRQEGYYVPA
 DMFNNFRIKEGRFSRINVSEDIGTLMEVYEASQLSIAGEEGLDEAGHFSAKMLNECMTHLDHYHALAIGNTLRHPYHKSL
 PRFMAKDVFLSNFQGERRLIIVLKEIAKKDFNMVQALHQKEIVQVTKWWKDLGLTKKLPFARDQPLKWIWSMACLTDPSL
 SEQRVELTKPISLIYIIDDFDVYGTLDLILFTETITRWDLAAMGQLPEYMKICFKALDDITNEISCKVYKKHGYNPV
 QSLRNAWTSLCKAFLVEAKWFASGHMPEAEYLRNGIESSGVHVALAHFFLLGHGITKETVELIDGNPAIISSTATILR
 LWDDLGS AKDENQEGKDGSIHYMMKEHRYSAEEAQSAINKISDAWKRLNKECLCPNPFSSASFTRASLNARMVPLMY
 SYDDNQRLPSLEHYIKSLLFESVPTGVY

[図33]

>MdLINS_M25

MEFSISQSSFATSSSTPAAPEHLSSQKWSIPEDHSLSTPLKPLNSKTKYTSSKDGIICFQNEQKLDDLRLHALIKVGGEA
 VESLDMIDAVQRLGLDYHFEEIDQILQKQHIISSTTAHGAHHPTDLHEVALRFRLLRQHGYFVSDDVFNNFKNREGNFN
 QMLREDIKGLMSLYEASQLSIEGEVLEEAGKFSGHFLNSSLSHLDDHQAQVVGNTLRNPHHKS LAPFMAKNFFVSSFPQG
 TNNRWLNILQTVAKTDLNMVQSLHQKEVAQVSKWWKELGLCKELKFARDQPIKWIWSMACLTNPNSDERIELTKPISF
 IYLIIDDFDVYGTLDLILFTTEVVNRWEIGSIEHLPDYMKICFKALYDMTNEISCKVYQKHGWNPLHSLKKTWASLCNA
 FLVEAKWFKSGHLPMAEEYLKNGTISSGVNVVMVHIFLLGEGITNQSVFLNGTPAIISSTAAILRLWDDLGS AKDENQ
 DGDDGSYVKLYLNEHQGKTMEEAQEHVTNMISEEWKLNKELVSPNPLPAAFTKASLNARMVPLMYSYDDNQCLPSLDE
 YMKSMIIIA

[図34]

>PflINS_M27

MYSLRIYVAIMKKPSAKHVDNVDKKASKPSWRVSLSSSAGLRASSSLQLDVKKPADDEILTARRSGNYQPSI.WDFNYLQS
 LNTTQYKEVRHILKREAELIEQVKMLLEEEMEAVQQLELVDDLKLNGLSYFFEDQIKQILTFIYNEHKCFHSNSII EAEEI
 RDLYFTALGFRI.LRQHGFQVSQEVFDCFKNEEGSDFKARLGDDTKGLLQLYEASFLLREGEDTLELARQYATKFLQKKVD
 HELIDDNLLSWILHSLEIPLHWRIQRLEARWFLDRYATRRDMNQIILELAKLDFNIIQATQQEELKDLSRWWKSTCLAE
 KLPFVRDRLVESYFWAIALFEPHQYGYHRKVAAKIITLITSLDDVYDIYGTLDLQLFTDAIQRWDTESISRLPYMQ
 FYMVLYNFVSELAYDGLKEKGFITIPYLQRSWADLVEAYLKEAKWFYNGYVPSMEEYLNAYISIGATPVISQVFFTLAT
 SIDKPVIDSLYEYHRILRLSGMLVRLPDDLGTSPFEMKRGDVPKAIQLYMKERNATEIEAQEHVRFLIREAWKEMNTVTT
 AACPFPTDDLVAATRNLGRAAQFMYLDGDNHSQLHQRIACLLFEPYA

[図35]

>Vv1LINS_M29

MGFSPAFYACSI PPVGPKNKFTELGQSKFN NVVLVPTAQKWSIAHDHTLVYKPLRKIHNSQHLSTDEFYIKHAQRLDEI
 RNVFSEVGEDTLEGLMMIDAIQRLGIDYHFKEEIEAVLQRQYMKASTHGESIQDLYEVALRFRLLRQEGYHVPADVFN NF
 KNKEGKFKQNL SKDIKGLLALYEASQLSIEGEDILEEAQRFSS TLLNAGLEHLNHHEATVVGHTLEHPHHKSLPRFMAKS
 FLKDFQGPGNGLTVLQELAKADFNMVQSIHQQELLQISKWWQDRGLAEELKFARDQPLKWHMWPMVLPDPSLSEQRVEL
 TKPISMIYIIDDIFDVHGTLDLTLFTEAVNRWDIAAFETLPNYMKICFKTLDEITNEISNKVYKEHGWNPVDSL RKTW
 VSLCNAFLVEAKWFASGHVPAHEYLKNGV I SSGVHVVLVHLFFLLGHGITRGNVDLVDDFPSIISSTAAILRLWDDLGS
 AKDENQDGHGDSYIECYIKEHQGSSMENARQNVTYMISDLWKRLNKECLSQHPFSTSFTKGS LN IARMVPLMYSYDDNQS
 LPHLEEHMKSLLFEAFPL

[図36]

>Vv2LINS_M31

MELTSLTSLPLAYGALNCRKNFAMASPRMRIKQGRSELNLTITSKIDELQVTERRSANYHPSIWDPKFIESLSTPYTNE
 GYSNQLEDLKEEAKRVIKDARDTSSRLEFIDSMQRLGVAYHLEEEIKEAIDLVLDDTTTDDLSTTALRFRLLRQHGYPV
 SSEVFDQFRSKDGRFMDGISQDIAGPLSLYEASHLGVEGEDDLEEARRFSTIHLKSLVGNLES DLADQVQQSLEVPLHWR
 MPRLEARNFIDYQRRNTKNSALLELAKLDYNLVQSSYQTELKELTRWTDLGFKEKLSFSRDRMLENYLWSMGIAPEPH
 FSKSRIGLTKFICILTAIDDMYDIYGSPDELRRFTDAVNRWDTEALVDLPDYMKICYLAMFNANEMAYDALRDHDLYI
 LPYLKSQWLNLC TSY SMEAQWFYNGYKPSIDEYLSNAWTSVGGPAAMVHAYFLMGCATKGNLNNCLDNASNLLYWSSLIT
 RLSDDLGTSLAEIARGDVAKSIQCYMIEKCISEEQARDQVEKLIRYSWKKLNEASTDSSLPKSLINSSLNMARSAQCIFQ
 FGDGIGTSVGVTKDRLTSFIIKPILIEPSIKPYLDGMKMSNRR

[図37]

>LaLINS_M33

MSININMPAAVLRPFRCSQLHVDETRRSGNYRPSAWDSNYIQSLNSQYKEKKCLTRLEGLIEQVKELKGTKMEAVQQLE
 LIDDSQNLGLSYFFQDKIKHILNLIYNDHKYFYDSEAEGMDLYFTALGFRLFRQHGFKVSQEVFDRFKNENGTYFKHDDT
 KGLLQLYEASFLVREGREETLEQAREFATKSLQRKLDDEGDGIDANIESWIRHSLEIPLHWRAQRLEARWFLDAYARRPDM
 NPVIFELAKLNFNIVQATQQEELKALSRWWSSGLAEKLPFVRDRLVESYFWAIPLEPHQYGYQRKVATKIITLITSL
 DDVYDIYGTLDELQLFTNLFERWDNASIGRLPEYLQLFYFAIHNFVSEVAYDILKEKGFTSIVYLQRSWVDLLKGYLKE
 AKWYNSGYTPSLEEYFDNAFMTIGAPPVLSQAYFTLGSSMEKPIIESMYEYDNILRVSGMLVRLPDDLGTSSFEMERGDV
 PKSVQLYMKETNATEEEAVEHVRFLNREAWKKMNTAEAAGDSPLVSDVVAVAANLGRAAQFMYFDGNGNSSLQQWIVSM
 LFEPYA

[図38]

>McLINS_M35

MCTIISVNIHHVAILSKPKVKLFHTKNKRSASINLPWSLSPSSSAASRPISCSISSKLYTISSAQEETRSGNYHPSVWD
 FDFIQSLDTHYKEEKQLEREHEELIMEVKKILGAKMEATKQLELIDDLQNLGLSYFFRDEIKNILNSIYKIFQNNNSTKV
 GDLHFTSLGFRLLRQHGFNVSQGVFDCFKNEHGSDFEKTLIGEDTKGVLQLYEASFLLREGEDTLEVARKFSTEFLEEKL
 KAGIDGDNLSSSIGHSLIPLHWRIQRLEERWFLDAYSRRKDMNPIIFELAKLDFNIIQATQQEELKDLSRWWNDSSLPQ
 KLPFVRDRLVESYYWALGLFEAHKFGYERKTAAKIITLITALDDVYDIYGTLDELQLFTHVIRRWDTESATQLPYYLQL
 FYFVLYNFVSEVAYHILKEEGFISIPFLHRAWVDLVEGYLQEAkWYYTKYTPTMEEYLNYSITIGAPAVISQIYFMLAK
 SKEKPVIESFYEYDEIRLSGMLVRLPDDLGTLPFEMKRGDVAKSIQIYMKEQNATREEAEHVRFMIREAWKEMNTTMA
 ANSDLRGDVVMMAANLGRDAQFMYLDGDGNHSQLQHRIANLLFKPYV

[図39]

>ObLINS_M37

MASAVPLSSTPLINGDNSPLKNTHQHVEERSSKRREYLLEETARKLQRNDTESVEKLKLIDNIQRLGIGYYFEDAIDAVL
RSPFSAEEEEEDLFTAALRFRLLRINGIQVTPEIFLKFKDERGEFDESCTLGLLSLYEASNLGVTGEEILEEAMEFAEPRL
RRSLSELAAPLRSEVAQALDVPRHLRMRLEARRFIEQYQKQSDHDGDLLELAILDYNQVQAQHQSELTEJTRWWKQLGL
VEKLGFGDRDALECFMWTMGILPHPKYSSSRIESAKAAAALLYVI**DDIFDTYG**KMDELILFTDAIRRDLEAMEGLPEYM
KICYMALYNTTNEICYRVLKDTGRIALPYLKSVWIETIEAYMVEVKWFSGGSAPKLEEYIENGASTVGAYMVLVHLFFLI
GEGLT HQNVLFFKQKPYHKPFAAGRIFRLWDDLGTSGEEEEERGMASSIRLFMKEYKLSTVEEARSCVLEEISRLWKDL
NEGLISIKDALPLTIVKVALNIARTSQVVYKHEQHTYMLSVDNYVEALFFTPLLSS

[図40]

>CbLINS_M39

MRESLSSSSSNTQNLFLSTSPYDTAWLALIPHPHHHHHGRPMFEKCLQWILHNQTPQGFWAAAGDNISDTDDDDVTLDCL
 LSTLACLVALKRWQLAPDMIHKGLEFVNRNTERLVMKQKPSDVPRWFTIMFPAMLELAGASSLRVDFSENLRILVELSQ
 NRDDILTREEVDEKKQYSPLLLFLEALPAQSYDNDVLKQIIDKNLSNDGSLLQSPSATARAYMITGNTRCLSYLHSLTNS
 CSNGGVPSFYFPVDDDLHDLVMVNQLTRSGLTEHLIPEIDHLLLVQKNYKYYKKASPKSLYSIAAELYRDSLAFWLLRVNN
 HWVSPSIFCWFLDDDEIRDHIETNYEEFAAVLLNVYRATDLMFSGEVQLVEARSFATKNLEKILATGNIHKTNADISSSL
 HKMIEHELVRPWTARMDHVENRIWIEETASSALWFGKSSYLRLSCFHKMSLQQLAVKNYTLRQLVYRDELAEVERWSKER
 GLCDMGFCREKTGYCYAFAASTCLPWSSDVRLVLTAAVVITVADDFDVEGSMVDLEKLTDAVRRWDAEGLGSHSKT
 IFEALDDLNEVRLKCFQNGQDIKNNLQQLWYETFHSWLMEAKWGKGLTSKPSVDVYLGNAmtsIAAHTMVLtASCLLG
 PGFPVHQLWSQRRHQDITSLLMVLTRLLNDIQSYLKEEDEGKINYVWMYMIENNQASIDDSVRHVQTIINVKKQEFIQRV
 LSDQHCHNLPKSFKQIHFSCLVFNMFNSSNIFDtdtDlLLDIHEAFVSPpQVPKFKPHIKPPHQLPATLQPPHQPQQIM
 VNKKKVEMVYKSYIHFPKVFTLQKKQSSGHGTmNPRASILAGPNIKLCFS

[図41]

>Q1XBU5|R-linalool synthase|EC 4.2.3.26|Solanum lycopersicum|TrEMBL

MVSILSNIGMMVVTfKRPSLFTSLRRRSANNIIITKHSHPISTTRRSGNYKPTMWDFQFIQSLHNPYEGDKYMKRLNKLK
 KEVKKMMMTVEGSHDEELEKLELIDNLERLGVSYHFkDEIMQIMRSINININIAPPDSLYTTALKFRLLRQHGFHISQDI
 LNDFKDENGNLKQSICKDtkDILNssKDEHDNLKQSTCnntKGLLkLYEASFLSIENESFLRntTKSTLAHLMRYVDQNR
 CGEEDNMIVELVVHALELPRHWMVPRLETRWYISiYERMSNANPLlLELAKLDFNIVQATHQQDLRILSRWWKNTGLAEK
 LPFSRDILVENMFWAVGALFEPQHsYFRRLITKVIvFISIIDDIYDVYGTlDELELFTLAIQRWDTKAMEQLPDYMKVC
 YLALINIINEVAYEVLKNHDINVLpyLTkSWADLCKSYLQeAKWYHNGYKPNLEeYMDNARISIGVPMVLVHSLFLVTNQ
 ITKEALDSLtNYPDIIRWSATIFRLNDdLGTSSDELKRGDVSKSIQCYMNEKGASEEEAIEHIEFLIqETWEAMNTAQSK
 NSPLSEtFIEVAKNITKASHfMYLHSDVKSSISKIILFEPIIISNvAFALK

[図42]

>gi|211970992|dbj|BAG82825.1| linalool synthase [Backhousia citriodora]
MALPALFGSSLPSSIRHNQPSLFSFRHPRFCSSSSSASFSSQFILCASKTGDQEIVRRSANWQPSVWDYDYVQSLTVDYT
EDKYTKQVQRLKEEVKGLFDREMKQVAKLEFIDVVQRLGLGYHFKTEIKIALSSIHNNTEDAQLSNDLYAASLRFRLLRQ
YGCNVQQDVFQRFMNKTGTFKESLNKDVKGILGLYEASFHGMGETVLDEAWNFASKHLKDLNLDEVPTNLASNVSHALD
MPIHWRPNRLEARWFMDMYEKQQLIPSLRLAKLDFNIVQSIHRKEVSNLARWWELGANKMTFFRDLVESYFWSCIL
VFEPQYTDFRELNTRIACMATLI **DDVYDIYG** TPEELELLTDFILRWDITDIDKLPPTIRNGFMALYNTTNKVGYRTMTK
RGINPIPYLRKLWGDECKADMKEVHWFNNGIKPTLKEYMDVAVDSIGGLILLNSYFLTDDYLTEEGLNYVSKIPSVMH
SAQIFRFNDDISTSSHELARGDNSKALECYMNETGASEEIAREHIRHLVRETWKKMNKEVFEDYPFSGFGPFLSACLNL
RASHCFYEYGDGYGIPDHQTRDHLASTIFESVSLD

[図43]

>gi|6469618|gb|AAF13357.1|AF154125_1 (3R)-linalool synthase, partial [Artemisia
annua]
GNAYMRIYSTKTTRITANATVNAADTHVRRSANYKPSSWSFDHIQSLSSKYTGDDYVARANTLKDAVKTMIRKSGNSLRT
LELVDELQRLGISYLFEEEISNLLETIYYNYKFPENWNKINLNLKALGFRLLRQHGYHVPQEIFLNFKDKNQNLNSYLL
NDVVEMLNLYEASYHSFEDESILDDARDITTKYLKESLEKIDGSIFSSVTHALEQPLHWRVPRVEAKWFIELYEKKNGMS
PTLVELAKLDFDMVQAIHLEDLKHASRWWRDTSWDTKLTFARDLIVENFLWTIGFSYLPNFSRGRRTITKVAVMITTL **D**
DVYDVFG TLGELEQFTDVINRWDIKAIEQLPDYMKICFLGLYKSINDITHETLANKGFLILPYLKKAWADLCKAYLVEA
QWYHRGHIPTLNEYLDNACVSISGPVALMHVHFLTSVSSIEEIHQCIQRTENIVHYVSLIFRLADDLGTSLGEMERGD
KSIQLHMHETGATEPEARSYIKLLINKTWKKLNKERATVNSESSQEFIDYATNLVRMAQFMYGEGDEDFGLDVIKSHVLS
LLFTPIQGI

[図44]

>gi|6469616|gb|AAF13356.1|AF154124_1 (3R)-linalool synthase [Artemisia annua]
 MASISLFPYSILKQTSPLARGTAYNRIYSTKTTGITVDVAESHVRRSANYEPSSWSFDHIQSLSSKYTGDDCVARANTLK
 ESVKTMIRKEGNLLRTLELVDELQRLGISYLFEGEISNLETIYYNHYKFPEKWNKFIDLNLKALGFRLLRQHGYIIVPQEI
 FLNFKDKNQNLNSYLLLEDVVGMLNLYEASYHSFEDESILTEARDIATKYLKASLEKIDGSILSLVSHALDNRLHWRVPRV
 ESKWFIIEVYEKRVGASPTLIELAKLDFDMVQAIHLEDLKHASRWWRNTSWDTKLTFARDMLVENFLWTVGFSLPNFSGH
 RRTITKVAAMITLDDVYDVFGTLGELEQFTDVINRWDIKAEQLPDYMKICFFGLYNSINDITYETLATKGFLILPYI
 KKAWADLCKSYLVEAQWYHRGHIPTLNEYLDNACVSISGPVALMHVHFLTsvsstKEIHHCiERTQNIVRYVSLIFRLTD
 DLGTSLGEMERGDTLKSIIQLYMHETGATEPEARSYIKSLIDKTWKKLNKERAIVSSESSREFIDYATNLARMAHFMYGEG
 DEDFRLDVIKSHVSSLLFTPIQGI

[図45]

>D4N3A0|S-linalool synthase|EC 4.2.3.25|Actinidia arguta|TrEMBL
 MASFNRFVCVSSLLAPNNSPQISNAPRSTAVPSMPTTQKWSITEDLAFISNPSKQHNHQTGYRIFSDEFYLKHENKLKDVR
 RALREVEETPLEGLVMIDTLQRLGIDYHFQGEIGALLQKQQRISTCDYPEHDLFEVSTRFLLRQEGHNVPADVFNFRD
 KEGRFKSELSRDIRGLMSLYEASQLSIQGEDILDQAADFSSQLLSGWATNLDHHQARLVRNALTHPYHKSLATFMARNFN
 YDCKGQNGWVNNLQELAKMDLTMVQSMHQEVLQVSQWWKGRGLANELKLVRNQPLKWMWPMAALTDPRFSEERVELTK
 PISFIYIIDDIFDVYGTLEELTLFTDAVNRWELTAVEQLPDYMKICFKALYDITNEIAYKIYKKHGRNPIDSLRRTWAS
 LCNAFLEEAKWFASGNLPKAEYLYKNGIISGGMHVTVHMFLLGGCFTEESVNLVDEHAGITSSIATILRLSDDLGSAK
 DEDQDGYDGSYLECYLKDHKGSSVENAREEVIRMISDAWKRLNEECLFPNPFSATFRKGSLNIARMVPLMYSYDDNHNLP
 ILEEHMKTMLYDSSS

[図46]

>D4N3A1|S-linalool synthase|EC 4.2.3.25|Actinidia polygama|TrEMBL
 MASFHRCVSSLLVPNNSPQISNAYRAPAVPSMPTTQKWSITEDLAFISNPSKQHNNHQTGYRTFSDEFYVKREKKLDVR
 RALREVEETPLEGLVMIDTLQRLGIDYHFQGEIGALLQKQQRKSKCDYPEHDLFEVSTRFLLRQEGHNVPADVFNHFRD
 KKGRFKSELSRDIRGLMSLYEASQLSIQGEDILDQAADFSSQLLSGWATNPDHHQARLVARNALHPYHKSLATFTARNFII
 YDCKGQNGWVNNLQELAKMDLTVVQSMHQEVLQVSQWWKDRGLANELKLVRNQPLKWMWMAALTDPRFSEERVELT
 K PISFIYII **DDIFDVYG** TLEELTLFTDAVNRWELTAVEQLPDYMKVCFKALYDITNEIAYKIYKKHGWNPIDSLRRMWAS
 LCNAFLVEAKWFFASGHLPKAEYLKNGIISGSMHVTVHMFLLGGCFTDESVDNLVDEHAGITSSIATILRLSDDLGS
 AK DEDQDGYDGSYVEYYLKDHLKSSVENAREEVIRMISSDAWKRLNEECLSPNPFSAFRKGCLNIARMVPLMYSYDDNHNLP
 LLEEHMKAMLYDSSS

[図47]

>COKWV5|S-linalool synthase|EC 4.2.3.25|Perilla frutescens var. hirtella|TrEMBL
 MSSMRIYVAIMKKPSVKHVDYVDKKASKPSWRVSSSATAGLRASSSLQDVKKPADEILTARRSGNYQPSLWDFNYLQSL
 NTTHYKEERHLKREAELIEQVKMLLDEEMGAVQKLDLVDDLKNLGLSYFFEDQIKQILTFIYNEHECFRSNVEAKERDLY
 FTALGFRLLRQHGFQVSQEVDFCFKNEEGSDFKASLGDDTKGLVQLYEASFLLREGEDTLELARQYATKFLQKKVDHEL
 I DDDSNLLSWIRHSLEIPLHWRIQRLEARWFLDAYATRHVNP I ILELAKLDFNIIQATQQEELKDLSRWWNSTCLVEKLP
 FVRDRLVESYFWAIALFEPHQYGYHRKIAAKIITLITSL **DDVYDIYG** TLDELQLFTDAIQRWDTESISRLAYYMQLFYM
 VLYNFVSELAYDGLKEKGFITIPYLQRSWADLVEAYLKEAKWFYNGYTPSMEEYLNNAYISIGATPVISQVFFTLATSID
 KPVIESLYEYHRILRLSGMLVRLPDDLGTSPFEMKRGDVPKTIELYMKERNATEIEAQEHVRFLIREAWREMNTATAAAD
 CPFTDDLVAANLGRAAQFMYLDGDNHSQLHQRIASLLFEPYA

[図48]

>C0KWV3|S-linalool synthase|EC 4.2.3.25|Perilla setoyensis|TrEMBL
MSSMRTYVAIMKKPSVEHVDNVDDKKASKPSWRVSLSAGLRSSCSLQLEVKPADQILTARRSGNYQPSLWDFNYLQSLNTT
HYKEVRHLKREAELIEQVKMLLEEEMEAVQQLELVDDLKLNGLSYFFEDQIKQILTFIYNEHKCFHSNSIIEAEEIRDLY
FTALGFRLLRQHGFQISQEVFDCFKNEEGSDFKARLGDDTKGLLQLYEASFLLREGEDTLELARQYATKFLQKKVDHELI
DDNNLLSWILHSLEIPLHWRIQRLEARWFLDAYASRRDMNQIIILELAKLDFNIIQATQQEELKDLSRWWKSSCLAELPF
VRDLVESYFWAIALFEPHQYGYHRKIAAKIITLITSLDDVYDIYGTLDLQLFTDAIQRWDTESISRLPYMQLFYMV
LYNFVPRLAYDGLKEKGFITIPYLQRSWADLVEAYLKEAKWYNGYTSPMEEYLNAYISIGATPVISQVFFTLATSIDK
PVIDSLYEYHRILRLSGILVRLPDDLGTSPFEMKRGDVPKATQLYMKERNATEIEAQEHVRFLIREAWKEMNTATAAVDC
PFTDDLVTAAANLGRAAQFMYLDGDGNHSQLHQRIACLLFEPYA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/00(2006.01)i, C12P7/04(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, C12N1/21, C12N9/00, C12P7/04

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2013-143944 A (Amyris, Inc.), 25 July 2013 (25.07.2013), paragraphs [0093], [0114] to [0116], [0121]; example 23 & US 2008/0274523 A1 & WO 2007/139924 A2 paragraphs [0093], [0114] to [0116], [0121]; example 23 & EP 2021486 A & KR 10-2009-0013814 A & CN 101484584 A	1-14, 22-26 1-14, 20-26
X Y	JP 2013-63063 A (Ishikawa Prefectural Public University Corp.), 11 April 2013 (11.04.2013), paragraphs [0003] to [0006], [0012]; examples 16 to 18 (Family: none)	1-2, 6, 10-14 1-14, 20-26

☒ 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
14 November 2016 (14.11.16)

Date of mailing of the international search report
29 November 2016 (29.11.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2011-147432 A (Kirin Holdings Co., Ltd.), 04 August 2011 (04.08.2011), claims; paragraph [0040]; examples & WO 2011/078338 A1	1-2, 6, 10-14 1-14, 20-26
X Y	NAKANO, C., et al., Identification and characterization of the linalool/nerolidol synthase from <i>Streptomyces clavuligerus</i> ., ChemBioChem, 2011, Vol. 12, pp. 2403-2407, particularly, page 2404, right column, 5th line from the bottom to the last line, fig. 3	1-6, 10, 12-14, 22-24, 26 1-14, 20-26
X Y	DICKSCHAT, J. S., et al., Volatiles released by a <i>Streptomyces</i> species isolated from the North Sea., Chem. Biodivers., 2005, Vol. 2, No. 7, pp. 837-865, particularly, table 1	1-4, 22 1-14, 20-26
X Y	THANASOMBOON, R., et al., Construction of Synthetic <i>Escherichia Coli</i> Producing s-linalool, Procedia Comput. Sci., 2012, Vol. 11, pp. 88-95, particularly, fig. 6	1-2, 6, 9-10, 12-14 1-14, 20-26
Y	JP 2013-13406 A (Suntory Holdings Ltd.), 24 January 2013 (24.01.2013), examples 2, 3 (Family: none)	1-14, 20-26
Y	IIJIMA, Y., et al., The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil., Plant Physiol. 2004, Vol. 136, No. 3, pp. 3724-3736, particularly, fig. 3, 5	1-14, 20-26
Y	JIA, J.-W., et al., (3R)-Linalool synthase from <i>Artemisia annua</i> L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction., Arch. Biochem. Biophys., 1999, Vol. 372, No. 1, pp. 143-149, particularly, summary	1-14, 20-26
Y	SUGIURA, M., et al., Molecular cloning and characterization of a linalool synthase from lemon myrtle., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, Vol. 75, No. 7, pp. 1245-1248, particularly, summary	1-14, 20-26
Y	SHIMADA, T., et al., Characterization of three linalool synthase genes from <i>Citrus unshiu</i> Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> and <i>Penicillium italicum</i> in citrus leaves and fruits., Plant Sci., 2014, Vol. 229, pp. 154-166, particularly, summary	1-14, 20-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LANDMANN, C., Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (<i>Lavandula angustifolia</i>)., Arch. Biochem. Biophys., 2007, Vol. 465, pp. 417-429, particularly, page 419, 'Heterologous expression and partial purification'	1-14, 20-26
Y	CROWELL, A. L., et al., Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase., Arch. Biochem. Biophys., 2002, Vol. 405, pp. 112-121, particularly, summary	1-14, 20-26
A	HARADA, H., et al., Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered <i>Escherichia coli</i> ., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, Vol. 81, pp. 915-925	1-26
A	Hisashi HARADA, "Development of efficient functional analysis of plant terpene biosynthetic genes: mainly of saquiterpene biosynthetic genes", BSJ-Review, 2011, vol, 2, pages 10 to 17	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/00(2006.01)i, C12P7/04(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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12N9/00, C12P7/04

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2013-143944 A (アムイリス, インコーポレイテッド) 2013.07.25, [0093], [0114] - [0116], [0121], 実施例 23 & US 2008/0274523 A1 & WO 2007/139924 A2, [0093], [0114]-[0116], [0121] and Example 23 & EP 2021486 A & KR 10-2009-0013814 A & CN 101484584 A	1-14, 22-26 1-14, 20-26
X Y	JP 2013-63063 A (石川県公立大学法人) 2013.04.11, [0003] - [0006], [0012], 実施例 16 - 18 (ファミリーなし)	1-2, 6, 10-14 1-14, 20-26

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

1 4 . 1 1 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 9 . 1 1 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

川合 理恵

4 N

4 0 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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
X Y	JP 2011-147432 A (キリンホールディングス株式会社) 2011.08.04, 特許請求の範囲、[0040]、実施例 & WO 2011/078338 A1	1-2, 6, 10-14 1-14, 20-26
X Y	NAKANO, C., et al., Identification and characterization of the linalool/nerolidol synthase from <i>Streptomyces clavuligerus</i> ., ChemBioChem, 2011, Vol. 12, pp. 2403-2407, 特に、第2404頁右 欄下から5行ー最終行、図3	1-6, 10, 12-14, 22-24, 26 1-14, 20-26
X Y	DICKSCHAT, J. S., et al., Volatiles released by a <i>Streptomyces</i> species isolated from the North Sea., Chem. Biodivers., 2005, Vol. 2, No. 7, pp. 837-865, 特に表1	1-4, 22 1-14, 20-26
X Y	THANASOMBOON, R., et al., Construction of Synthetic <i>Escherichia</i> <i>Coli</i> Producing s-linalool, Procedia Comput. Sci., 2012, Vol. 11, pp. 88-95, 特に、図6	1-2, 6, 9-10, 12-14 1-14, 20-26
Y	JP 2013-13406 A (サントリーホールディングス株式会社) 2013.01.24, 実施例2, 3 (ファミリーなし)	1-14, 20-26
Y	IIJIMA, Y., et al., The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil., Plant Physiol. 2004, Vol. 136, No. 3, pp. 3724-3736, 特に、図3及び図5	1-14, 20-26
Y	JIA, J.-W., et al., (3R)-Linalool synthase from <i>Artemisia annua</i> L.: cDNA isolation, characterization, and wound induction., Arch. Biochem. Biophys., 1999, Vol. 372, No. 1, pp. 143-149, 特に、要旨	1-14, 20-26
Y	SUGIURA, M., et al., Molecular cloning and characterization of a linalool synthase from lemon myrtle., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, Vol. 75, No. 7, pp. 1245-1248, 特に、要旨	1-14, 20-26
Y	SHIMADA, T., et al., Characterization of three linalool synthase genes from <i>Citrus unshiu</i> Marc. and analysis of linalool-mediated resistance against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> and <i>Penicilium</i> <i>italicum</i> in citrus leaves and fruits., Plant Sci., 2014, Vol. 229, pp. 154-166, 特に、要旨	1-14, 20-26

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
Y	LANDMANN, C., Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (<i>Lavandula angustifolia</i>)., Arch. Biochem. Biophys., 2007, Vol. 465, pp. 417-429, 特に、第 419 頁の「Heterologous expression and partial purification」	1-14, 20-26
Y	CROWELL, A. L., et al., Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase., Arch. Biochem. Biophys., 2002, Vol. 405, pp. 112-121, 特に、要旨	1-14, 20-26
A	HARADA, H., et al., Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered <i>Escherichia coli</i> ., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, Vol. 81, pp. 915-925	1-26
A	原田尚志, 植物由来テルペン生合成酵素遺伝子の効率的機能解析法の開発ーセスキテルペンを中心にー, BSJ-Review, 2011, Vol. 2, pp. 10-17	1-26