

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-76042

(P2014-76042A)

(43) 公開日 平成26年5月1日 (2014. 5. 1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15 Z N A	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-119612 (P2013-119612)	(71) 出願人	000002174
(22) 出願日	平成25年6月6日 (2013. 6. 6)		積水化学工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2012-208292 (P2012-208292)		大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(32) 優先日	平成24年9月21日 (2012. 9. 21)	(71) 出願人	504157024
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		国立大学法人東北大学
			宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
		(74) 代理人	100100480
			弁理士 藤田 隆
		(72) 発明者	古谷 昌弘
			茨城県つくば市和台32 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	岩佐 航一郎
			東京都港区虎ノ門2-3-17 積水化学工業株式会社内
		最終頁に続く	

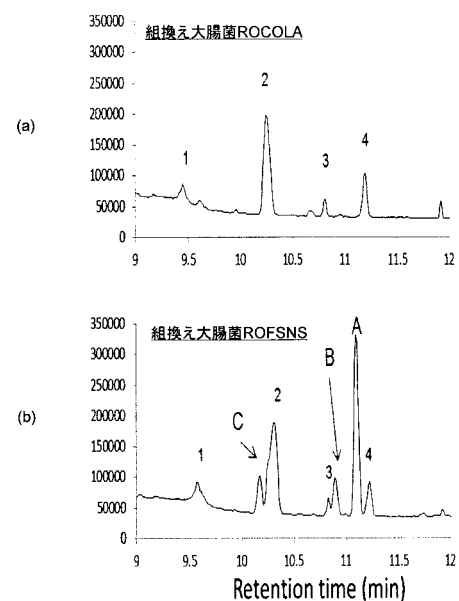
(54) 【発明の名称】 組換え細胞、並びに、 $\beta$ -フェランドレンの生産方法

## (57) 【要約】

【課題】 - フェランドレンを高純度かつ大量に取得するための一連の技術を提供する。

【解決手段】 ゲラニルニリン酸 (GPP) 合成酵素をコードする核酸及びネリルニリン酸 (NPP) 合成酵素をコードする核酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの核酸と、 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸とが宿主細胞に導入されてなり、かつこれらの核酸が宿主細胞内で発現する、 - フェランドレン生産能を有する組換え細胞が提供される。当該組換え細胞を培養することにより、当該組換え細胞に - フェランドレンを生産させる - フェランドレンの生産方法も提供される。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ゲラニルニリン酸合成酵素をコードする核酸及びネリルニリン酸合成酵素をコードする核酸からなる群より選ばれた少なくとも 1 つの核酸と、  
- フェランドレン合成酵素をコードする核酸とが宿主細胞に導入されてなり、かつこれらの核酸が宿主細胞内で発現する、  
- フェランドレン生産能を有する組換え細胞。

**【請求項 2】**

宿主細胞は、メタンモノオキシゲナーゼを有さないものである請求項 1 に記載の組換え細胞。

**【請求項 3】**

宿主細胞は、大腸菌又は酵母である請求項 2 に記載の組換え細胞。

**【請求項 4】**

組換え細胞の湿潤菌体 1 g あたり 10 mg 以上の - フェランドレンを生産可能である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組換え細胞。

**【請求項 5】**

ゲラニルニリン酸合成酵素をコードする核酸は、下記 (a)、(b) 又は (c) のタンパク質をコードするものである請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組換え細胞。

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 20 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

(c) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

**【請求項 6】**

ネリルニリン酸合成酵素をコードする核酸は、下記 (d)、(e) 又は (f) のタンパク質をコードするものである請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組換え細胞。

(d) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(e) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 20 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

(f) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

**【請求項 7】**

- フェランドレン合成酵素をコードする核酸は、下記 (g)、(h) 又は (i) のタンパク質をコードするものである請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組換え細胞。

(g) 配列番号 6 又は 8 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(h) 配列番号 6 又は 8 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 20 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ - フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質、

(i) 配列番号 6 又は 8 で表されるアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつ - フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質。

**【請求項 8】**

イソペンテニルニリン酸の合成経路で作用する少なくとも 1 つの酵素をコードする核酸がさらに導入され、当該核酸が宿主細胞内で発現する請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の組換え細胞。

**【請求項 9】**

イソペンテニルニリン酸の合成経路は、メバロン酸経路である請求項 8 に記載の組換え細胞。

**【請求項 10】**

前記メバロン酸経路は、酵母又は放線菌のメバロン酸経路である請求項 9 に記載の組換

10

20

30

40

50

え細胞。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の組換え細胞を培養することにより、当該組換え細胞に - フェランドレンを生産させる - フェランドレンの生産方法。

【請求項 1 2】

組換え細胞の湿潤菌体 1 g あたり 1 0 m g 以上の - フェランドレンを生産させる請求項 1 1 に記載の - フェランドレンの生産方法。

【請求項 1 3】

組換え細胞の細胞外に放出された - フェランドレンを回収する請求項 1 1 又は 1 2 に記載の - フェランドレンの生産方法。

10

【請求項 1 4】

組換え細胞の培養系の気相から - フェランドレンを回収する請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の - フェランドレンの生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は - フェランドレン生産能を有する組換え細胞、及び当該組換え細胞を用いる - フェランドレンの生産方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

20

モノテルペンは、ジメチルアリルニリン酸 ( D M A P P ) とイソペンテニルニリン酸 ( I P P ) とが縮合したゲラニルニリン酸 ( G P P ) を生合成前駆体とする、炭素 1 0 個を持つイソプレイン則に従う化合物の総称である。モノテルペンは、現在 9 0 0 種類以上のものが知られている。

【0 0 0 3】

モノテルペンはバラや柑橘類のような芳香を持ち、香水などにも多用されている。例えば、リモネンはレモンなど柑橘類に含まれる香気成分であり、溶剤や接着剤原料などとしても利用されている。また、メントールは爽やかな芳香を持ち、菓子や医薬品に清涼剤として用いられている。一方、樹脂産業では、 - ピネン、 - ピネン、リモネン、 - フェランドレン等が、接着剤や透明樹脂等のモノマー原料として検討されている ( 非特許文献 1 )

30

【0 0 0 4】

モノテルペンの一種である - フェランドレン ( - phellandrene ) は、新たなポリマー材料としての用途が期待されている。 - フェランドレンは、 - フェランドレンに比べてより高分子量のポリマーを得る可能性がある。しかし、合成化学的手法によって - フェランドレンを得る場合には、その異性体である - フェランドレンの生成が避けられず、またこれらの異性体の分離は極めて困難である ( 非特許文献 2 )。そのため、高純度の - フェランドレンを得ることは難しく、このことが - フェランドレンのポリマー物性等を調べることを困難にしている。

【0 0 0 5】

40

一方、 - フェランドレンの生合成経路としては、ゲラニルニリン酸 ( G P P ) 合成酵素又はネリルニリン酸 ( N P P ) 合成酵素の作用によって、イソペンテニルニリン酸 ( I P P ) からゲラニルニリン酸 ( G P P ) 又はネリルニリン酸 ( N P P ) が生合成される。続いて、 - フェランドレン合成酵素の作用により、G P P 又は N P P から - フェランドレンが生合成される。そして、トマトとラベンダーにおいて、 - フェランドレン合成酵素が見出されている ( 非特許文献 3 , 4 )。

【0 0 0 6】

特許文献 1 には、環状テルペンシンターゼ ( 環状テルペン合成酵素 ) をコードする核酸が導入された C 1 代謝宿主細胞の形質転換体を用いて、モノテルペンを製造する方法について記載されている。その実施例として、メチロモナス属細菌の形質転換体を用いてリモ

50

ネンを製造した実験例が記載されている。しかし、 $\alpha$ -フェランドレンについては、言及はあるものの、実施例は示されていない。 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素に関する言及もあるが、 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素とその遺伝子の具体例や取得方法、さらに $\alpha$ -フェランドレンを生産できる形質転換体の具体的構成や構築方法については示されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特表2005-500805号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Satou K., et al., Green Chemistry 2006, 8, 878-882

【非特許文献2】Mori K., Tetrahedron: Asymmetry 2006, 17, 2133-2142

【非特許文献3】Demissie, Z. A., et al., Planta. 2011, 233, 685-96.

【非特許文献4】Schillmiller, A. L., et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 2009, 106, 10865-70.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記現状に鑑み、本発明は、 $\alpha$ -フェランドレンを高純度かつ大量に取得するための一連の技術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】

【0010】

上記した課題を解決するための本発明の1つの様相は、ゲラニルニリン酸合成酵素をコードする核酸及びネリルニリン酸合成酵素をコードする核酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの核酸と、 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸とが宿主細胞に導入されてなり、かつこれらの核酸が宿主細胞内で発現する、 $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え細胞である。

【0011】

本発明は $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え細胞に係るものである。本発明の組換え細胞は、「ゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素をコードする核酸及びネリルニリン酸(NPP)合成酵素をコードする核酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの核酸」と、「 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸」とが宿主細胞に導入されてなるもので、かつこれらの核酸が宿主細胞内で発現する。すなわち、本発明の組換え細胞では、GPP合成酵素及び/又はNPP合成酵素の発現能と $\alpha$ -フェランドレン合成酵素の発現能とが、宿主細胞に対して新たに付加又は増強されている。

本発明の組換え細胞では、細胞内で発現されたGPP合成酵素の作用によってイソペンテニルニリン酸(IPP)からGPPが合成され、及び/又は、細胞内で発現されたNPP合成酵素の作用によってIPPからNPPが合成される。さらに、細胞内で発現された $\alpha$ -フェランドレン合成酵素の作用によって、GPP及び/又はNPPから $\alpha$ -フェランドレンが合成される。その結果、本発明の組換え細胞を培養することにより、 $\alpha$ -フェランドレンを高純度かつ大量に生産することができる。

【0012】

好ましくは、宿主細胞は、メタンモノオキシゲナーゼを有さないものである。

【0013】

好ましくは、宿主細胞は、大腸菌又は酵母である。

【0014】

かかる構成により、組換え細胞を容易に大量培養することができる。

【0015】

好ましくは、組換え細胞の湿潤菌体1gあたり10mg以上の $\alpha$ -フェランドレンを生産可能である。

10

20

30

40

50

## 【0016】

好ましくは、ゲラニルニリン酸合成酵素をコードする核酸は、下記（a）、（b）又は（c）のタンパク質をコードするものである。

（a）配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（b）配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

（c）配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

## 【0017】

10

好ましくは、ネリルニリン酸合成酵素をコードする核酸は、下記（d）、（e）又は（f）のタンパク質をコードするものである。

（d）配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（e）配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

（f）配列番号4で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

## 【0018】

20

好ましくは、 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸は、下記（g）、（h）又は（i）のタンパク質をコードするものである。

（g）配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

（h）配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha$ -フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質、

（i）配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつ $\alpha$ -フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質。

## 【0019】

好ましくは、イソペンテニルニリン酸の合成経路で作用する少なくとも1つの酵素をコードする核酸がさらに導入され、当該核酸が宿主細胞内で発現する。

30

## 【0020】

かかる構成により、GPP合成酵素やNPP合成酵素の基質となるIPPが効率的に供給される。

## 【0021】

好ましくは、イソペンテニルニリン酸の合成経路は、メバロン酸経路である。

## 【0022】

好ましくは、前記メバロン酸経路は、酵母又は放線菌のメバロン酸経路である。

## 【0023】

本発明の他の様相は、上記した組換え細胞を培養することにより、当該組換え細胞に $\alpha$ -フェランドレンを生産させる $\alpha$ -フェランドレンの生産方法である。

40

## 【0024】

本発明は、 $\alpha$ -フェランドレンの生産方法に係るものである。本発明では、上記した組換え細胞を培養することにより、当該組換え細胞に $\alpha$ -フェランドレンを生産させる。本発明によれば、 $\alpha$ -フェランドレンを高純度かつ大量に生産することができる。

## 【0025】

好ましくは、組換え細胞の湿潤菌体1gあたり10mg以上の $\alpha$ -フェランドレンを生産させる。

## 【0026】

好ましくは、組換え細胞の細胞外に放出された $\alpha$ -フェランドレンを回収する。

## 【0027】

50

好ましくは、組換え細胞の培養系の気相から - フェランドレンを回収する。

【発明の効果】

【0028】

本発明によれば、 - フェランドレンを高純度かつ大量に生産することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】実施例5で行った培養の気相画分をGC-MSで分析した結果を表すトータルイオンクロマトグラムであり、(a)はコントロールの組換え体、(b)は - フェランドレン生産能を有する組換え体の場合である。

【図2】図1(b)の各ピークをGC-MSで同定した結果を表すマススペクトルであり、(a)はピークA( - フェランドレン)、(b)はピークB(リモネン)、(c)はピークC(ミルセン)の場合である。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明の組換え細胞は、ゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素をコードする核酸及びネリルニリン酸(NPP)合成酵素をコードする核酸からなる群より選ばれた少なくとも1つの核酸と、 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸とが宿主細胞に導入されてなり、かつこれらの核酸が宿主細胞内で発現する組換え細胞であり、 - フェランドレン合成能を有するものである。

【0031】

20

GPP合成酵素としては、組換え細胞内でその酵素活性を発揮できるものであれば特に限定はない。GPP合成酵素をコードする核酸(遺伝子)についても同様であり、組換え細胞内で正常に転写・翻訳されるものであれば特に限定はない。

NPP合成酵素、 - フェランドレン合成酵素、及びこれらをコードする核酸についても同様である。

【0032】

GPP合成酵素の具体例としては、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来のもの(GenBank Accession No.: Y17376/At2g34630; Bouvier, F., et al., Plant J., 2000, 24, 241-52.)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)由来のもの; (GenBank Accession No.: NP\_215504; Mann, F. M., et al., FEBS Lett., 2011, 585, 549-54.)、等が

30

挙げられる。  
配列番号1に上記シロイヌナズナ由来GPP合成酵素をコードする核酸(DNA)の塩基配列と対応のアミノ酸配列、配列番号2にアミノ酸配列のみを示す。配列番号1で表される塩基配列を有するDNAは、GPP合成酵素をコードする核酸の一例となる。

【0033】

さらに、GPP合成酵素をコードする核酸には、少なくとも、下記(a)、(b)又は(c)のタンパク質をコードする核酸が含まれる。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

40

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつゲラニルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

なお(c)におけるアミノ酸配列の相同性については、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上である。

【0034】

NPP合成酵素の具体例としては、トマト(*Solanum lycopersicum*)由来のもの(GenBank Accession No.: FJ797956)、等が挙げられる。

配列番号3に上記トマト由来NPP合成酵素をコードする核酸(DNA)の塩基配列と対応のアミノ酸配列、配列番号4にアミノ酸配列のみを示す。配列番号3で表される塩基

50

配列を有するDNAは、NPP合成酵素をコードする核酸の一例となる。

【0035】

さらに、NPP合成酵素をコードする核酸には、少なくとも、下記(d)、(e)又は(f)のタンパク質をコードする核酸が含まれる。

(d) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(e) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質、

(f) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつネリルニリン酸合成酵素の活性を有するタンパク質。

10

なお(f)におけるアミノ酸配列の相同性については、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上である。

【0036】

本発明の組換え細胞において、「ゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素をコードする核酸」と「ネリルニリン酸(NPP)合成酵素をコードする核酸」については、いずれか一方の核酸のみが導入されたものでもよいし、両方の核酸が導入されたものでもよい。

【0037】

- フェランドレン合成酵素及びそれをコードする核酸の具体例としては、トマト(*Solanum lycopersicum*)由来のもの(GenBank Accession No.: FJ797957; Schilmiller, A. L., et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 2009, 106, 10865-70.)、ラベンダー(*Lavandula angustifolia*)由来のもの(GenBank Accession No.: HQ404305; Demissie, Z. A., et al., Planta, 2011, . 233, 685-96)、等が挙げられる。

20

配列番号5に上記トマト由来 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸(DNA)の塩基配列と対応のアミノ酸配列、配列番号6にアミノ酸配列のみを示す。

配列番号7に上記ラベンダー由来の - フェランドレン合成酵素をコードする核酸(DNA)の塩基配列と対応のアミノ酸配列、配列番号8にアミノ酸配列のみを示す。

配列番号5又は配列番号7で表される塩基配列を有するDNAは、 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸の一例となる。

【0038】

さらに、 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸には、少なくとも、下記(g)、(h)又は(i)のタンパク質をコードする核酸が含まれる。

30

(g) 配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(h) 配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ - フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質、

(i) 配列番号6又は8で表されるアミノ酸配列と60%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、かつ - フェランドレン合成酵素の活性を有するタンパク質。

なお(i)におけるアミノ酸配列の相同性については、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上である。

【0039】

40

本発明の組換え細胞における宿主細胞としては特に限定はなく、原核細胞、真核細胞のいずれでもよい。原核細胞の例としては、細菌、放線菌、が挙げられる。細菌の例としては、大腸菌等のエシェリヒア(*Escherichia*)属細菌、枯草菌等のバチルス(*Bacillus*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属細菌、シアノバクテリア(ラン藻)、クロストリディウム(*Clostridium*)属細菌、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属細菌、ラルストニア(*Ralstonia*)属細菌、等が挙げられる。この中でも、大量培養が容易な大腸菌が特に好ましい。

真核細胞の例としては、酵母、糸状菌、真核微細藻類、植物細胞、動物細胞が挙げられる。

【0040】

50

酵母の例としては、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾ  
 サッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、サッカロミセス・ウバルム (*S*  
*accharomyces uvarum*)、サッカロミセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces carls*  
*bergensis*)、サッカロミセス・ジアスタチクス (*Saccharomyces diastaticus*)、カンジ  
 ダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・マルトサ (*Candida maltosa*)、  
 カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pas*  
*toris*)、ピキア・ファリノサ (*Pichia farinosa*)、ピキア・ピヌス (*Pichia pinus*)、  
 ピキア・パンリジイ (*Pichia variijii*)、ピキア・ファーマンタンス (*Pichia fermentan*  
*s*)、ピキア・ギリエルモンディイ (*Pichia guilliermondii*)、ピキア・スチピチス (*Pi*  
*chia stipitis*)、サッカロミセス・テルリス (*Saccharomyces elluris*)、カンジダ・ユ  
 ーティリス (*Candida utilis*)、カンジダ・ギリエルモンディイ (*Candida guilliermond*  
*ii*)、ハンセヌラ・ヘンリチイ (*Hansenula henricii*)、ハンセヌラ・カプスラタ (*Hans*  
*enula capsulata*)、ハンセヌラ・ポリモーファ (*Hansenula polymorpha*)、ハンセヌラ  
 ・サツルヌス (*Hansenula saturnus*)、リボミセス・コノネンコエ (*Lypomyces kononenk*  
*oe*)、クルイベロミセス・マルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、カンジダ・リ  
 ポリティカ (*Candida lipolytica*)、サッカロミコブシス・フィブリゲラ (*Saccaromycop*  
*sis fibuligera*)、サッカロミコデス・ルドウィギイ (*Saccharomycodes ludwigii*)、サ  
 ッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*)、トレメラ・メセンテリカ (*Trem*  
*ella mesenterica*)、チゴサッカロミセス・アシドファシエンス (*Zygosaccharomyces ac*  
*idofaciens*)、チゴサッカロミセス・ファーマンタチ (*Zygosaccharomyces fermentati*)  
 、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、およびチゴサッカロミセス・ソ  
 ヤ (*Zygosaccharomyces soja*)、等が挙げられる。この中でも、大量培養が容易な酵母を  
 選択することが特に好ましい。

10

20

30

40

50

#### 【0041】

また宿主細胞は、メタンモノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.25) を有さないものであることが好ましい。

#### 【0042】

GPP合成酵素、NPP合成酵素、 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする各核酸を  
 宿主細胞に導入する方法としては特に限定はなく、宿主細胞の種類等によって適宜選択す  
 ればよい。例えば、宿主細胞に導入可能でかつ組み込まれた核酸を発現可能なベクターを  
 用いることができる。

例えば、宿主細胞が細菌等の原核生物の場合には、当該ベクターとして、宿主細胞にお  
 いて自立複製できないしは染色体中への組み込みが可能で、挿入された上記核酸 (DNA  
 ) を転写できる位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。例えば、  
 当該ベクターを用いて、プロモーター、リボソーム結合配列、上記核酸 (DNA)、およ  
 び転写終結配列からなる一連の構成を宿主細胞内で構築することが好ましい。

#### 【0043】

宿主細胞が大腸菌の場合に使用可能なベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のもの  
 が好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラス  
 ミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。より具体的には  
 、例えば、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pUC18、pBR322、pHelix1 (ロシュ・ダイア  
 グノスティクス社製)、pKK233-2 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE2  
 80 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8 (キアゲン社製)、pET  
 -3 (ノバジェン社製) pBluescript II SK(+), pBluescript II KS (+) (ストラタジーン社  
 製)、pSTV28 (タカラバイオ社製)、pUC118 (タカラバイオ社製) 等を用いることができ  
 る。ベクター上のプロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で作動できるものであれ  
 ばいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)  
 )、PLプロモーター、PRプロモーター等の、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等  
 に由来するプロモーター、及びtacプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的  
 に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。



## 【 0 0 4 4 】

宿主細胞が酵母の場合も基本的に同様であり、当該ベクターの構成として、宿主酵母内で安定に維持するための複製系、挿入された上記核酸（DNA）を転写可能なプロモーター、およびターミネーター配列を有することが好ましい。例えば、当該ベクターは、宿主酵母で複製し得るまたは宿主染色体内に組み込まれ得るプラスミドであってもよい。また当該ベクターは、各々が選択的な切断部位により分離される、所望DNA配列の反復コピーの発現をコードし得るものでもよい。

酵母で作動可能なプロモーターの種類は特に限定されないが、例えば、イソクエン酸リアーゼ遺伝子のプロモーター、AOX1プロモーター、GAPDHプロモーター、PHO5プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（TDH3）プロモーター、ADHIプロモーター、MF1プロモーター、およびGAL10プロモーターなどを用いることができる。

10

## 【 0 0 4 5 】

ベクターを用いて各核酸を宿主細胞に導入する場合、各核酸を1つのベクターに組み込んでもよいし、別々のベクターに組み込んでもよい。さらに1つのベクターに複数の核酸を組み込む場合には、各核酸を共通のプロモーターの下で発現させてもよいし、別々のプロモーターの下で発現させてもよい。

## 【 0 0 4 6 】

宿主細胞が $\alpha$ -フェランドレン合成酵素を有するものである場合には、宿主細胞の $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をノックアウトしておくことが好ましい。ただし、一般に $\alpha$ -フェランドレン合成酵素を有する生物は植物のみであるので、少なくとも、細菌や酵母を宿主細胞とする場合においては当該操作は通常必要ない。

20

## 【 0 0 4 7 】

本発明の組換え細胞においては、GPP合成酵素、NPP合成酵素、 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする各核酸に加えて、他の核酸が導入されていてもよい。1つの実施形態では、イソペンテニルニリン酸（IPP）の合成経路で作用する少なくとも1つの酵素をコードする核酸がさらに導入され、当該核酸が宿主細胞内で発現する。導入される当該核酸は1種のみでもよいし、2種以上でもよい。

## 【 0 0 4 8 】

一般に、IPPの合成経路はメバロン酸経路（MVA経路）と非メバロン酸経路（MEP経路）の2つに大別される。

30

メバロン酸経路は真核生物が備えているものであり、アセチルCoAを出発物質としている。メバロン酸経路で作用する酵素としては、上流から順に、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ、HMG-CoAシンターゼ、HMG-CoAレダクターゼ、メバロン酸キナーゼ、5-ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、が挙げられる。

## 【 0 0 4 9 】

一方、非メバロン酸経路は原核生物や葉緑体・色素体が備えているものであり、グリセルアルデヒド3-リン酸（GAP）とピルビン酸を出発物質としている。非メバロン酸経路で作用する酵素としては、上流から順に、DOXPシンターゼ、DOXPレダクトイソメラーゼ、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリトリトールシンターゼ、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリトリトールキナーゼ、2-C-メチル-D-エリトリトール-2,4-シクロニリン酸シンターゼ、HMB-PPシンターゼ、HMB-PPレダクターゼ、が挙げられる。

40

## 【 0 0 5 0 】

本実施形態でさらに導入される核酸がコードする「IPP合成経路で作用する酵素」は、メバロン酸経路で作用する酵素が好ましい。

メバロン酸経路で作用する酵素群としては、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ、HMG-CoAシンターゼ、HMG-CoAレダクターゼ、メバロン酸キナーゼ、5-ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニル

50

ニリン酸イソメラーゼが挙げられる。このうち、例えば、HMG-CoAシンターゼ、HMG-CoAレダクターゼ、メバロン酸キナーゼ、5-ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、及びイソペンテニルニリン酸イソメラーゼからなる酵素群が宿主細胞内で発現するように、導入する核酸を選択すればよい。

#### 【0051】

メバロン酸経路は全ての真核生物が保有しているが、真核生物以外でも見出されている。真核生物以外でメバロン酸経路を有するものとしては、放線菌では、*Streptomyces* sp. Strain CL190 (Takagi M. et al., J. Bacteriol. 2000, 182 (15), 4153-7)、*Streptomyces griseolosporeus* MF730-N6 (Hamano Y. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001, 65(7), 1627-35) が挙げられる。

10

細菌では、*Lactobacillus helveticus* (Smeds A et al., DNA seq. 2001, 12(3), 187-190)、*Corynebacterium amycolatum*、*Mycobacterium marinum*、*Bacillus coagulans*、*Enterococcus faecalis*、*Streptococcus agalactiae*、*Myxococcus xanthus*等が挙げられる (Lombard J. et al., Mol. Biol. Evol. 2010, 28(1), 87-99)。

アーキアでは、*Aeropyrum*属、*Sulfolobus*属、*Desulfurococcus*属、*Thermoproteus*属、*Halobacterium*属、*Methanococcus*属、*Thermococcus*属、*Pyrococcus*属、*Methanopyrus*属、*Thermoplasma*属等が挙げられる (Lombard J. et al., Mol. Biol. Evol. 2010, 28(1), 87-99)。

上記メバロン酸経路で作用する酵素群の由来としては特に限定はないが、酵母又は放線菌のメバロン酸経路で作用する酵素群が特に好ましく採用される。

20

#### 【0052】

これらの酵素については、天然に存在するものの他、各酵素の改変体でもよい。例えば、各酵素のアミノ酸置換変異体や、各酵素の部分断片であって同様の酵素活性を有するポリペプチドでもよい。

#### 【0053】

本発明の組換え細胞を培養する方法としては特に限定はなく、宿主細胞の種類等に応じて適宜行うことができる。

組換え細胞が好気性や偏性嫌気性の場合には、例えば、液体培地を用いた通気・攪拌培養を行うことができる。

組換え細胞が絶対嫌気性の場合には、例えば、気相を高純度もしくは脱酸素処理された窒素等のガスで置換し、さらに培養液も硫化ナトリウム、システイン等の還元剤を適量添加することにより、培養を行うことができる。

30

培地についても、組換え細胞が成育する培地であれば特に限定はない。培地の主たる炭素源としては、糖類やタンパク質分解物のような有機炭素源を用いることが好ましい。糖類としては、単糖（グルコース等）、二糖（マルトース等）、オリゴ糖、多糖（デンプン等）、糖アルコールなどが挙げられる。タンパク質分解物としては、ペプトン、トリプトン、カザミノ酸などが挙げられる。

#### 【0054】

本発明の組換え細胞を培養することにより、 $\gamma$ -フェランドレンを大量に生産することができる。 $\gamma$ -フェランドレンの生産能力としては、湿潤菌体 1 g あたり  $\gamma$ -フェランドレン 10 mg 以上の生産量が実現可能である。

40

#### 【0055】

本発明の組換え細胞を培養して  $\gamma$ -フェランドレンを生産する場合には、合成化学的手法で生産する場合と異なり、 $\gamma$ -フェランドレンの混入は実質的に起こらない。

#### 【0056】

生産された  $\gamma$ -フェランドレンは、組換え細胞の細胞外に放出されるか、細胞内に蓄積される。本発明においては、いずれの  $\gamma$ -フェランドレンを回収してもよく、具体的には、菌体破砕物、培養液（培養上清）、培養系の気相などから回収することができる。好ましくは、細胞外に放出された  $\gamma$ -フェランドレンを回収し、具体的には、培養液（培養上清）や培養系の気相から回収する。

50

## 【 0 0 5 7 】

組換え細胞の培養物から - フェランドレンを単離・精製する方法としては、例えば、培養液（培養上清）をペンタン等の適切な溶媒で抽出し、さらに逆相クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって高純度に精製することできる。細胞外に放出された - フェランドレンは気相にも蒸発するため、コールドトラップ等でこれらを液化し、回収することも可能である。

## 【 0 0 5 8 】

以下、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

## 【 実施例 1 】

10

## 【 0 0 5 9 】

本実施例では、トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子とトマト由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該組換え大腸菌を培養して - フェランドレンを生産した。

## 【 0 0 6 0 】

## ( 1 ) トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子の単離

トマト (*Solanum lycopersicum*) 由来の全 R N A を鋳型とし、配列番号 9 と配列番号 10 で表されるプライマーを使用した R T - P C R によって、トマト由来 N P P 合成酵素をコードする核酸（トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子、配列番号 3、GenBank Accession No.: FJ797956）を増幅した。得られた核酸を N d e I 及び E c o R I で切断した後、p E T 2 3 a ベクター（Novagen社）に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、トマト由来 N P P 合成酵素発現ベクター p T 2 1 T N P P を作製した。

20

## 【 0 0 6 1 】

## ( 2 ) トマト由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子の単離

トマト由来の全 R N A を鋳型とし、配列番号 11 と配列番号 12 で表されるプライマーを使用した R T - P C R によって、トマト由来 - フェランドレン合成酵素をコードする核酸（トマト由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子、配列番号 5、GenBank Accession No.: FJ797957）を増幅した。得られた核酸を N c o I 及び B a m H I で切断した後、p A C Y C D u e t - 1 ベクター（Novagen社）に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、トマト由来 - フェランドレン合成酵素発現ベクター p A C T P D を作製した。

30

## 【 0 0 6 2 】

## ( 3 ) - フェランドレン生産能を有する組換え大腸菌の作製

上記 ( 1 )、( 2 ) で得られた発現ベクター p T 2 3 T N P P 及び p A C T P D を大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 株に導入し、 - フェランドレン生産能を有する組換え大腸菌 B L 2 1 B P D 1 を作製した。

コントロールとして、核酸が挿入されていない p E T 2 3 a ベクターのみを導入した組換え大腸菌、並びに、核酸が挿入されていない p A C Y C D u e t - 1 ベクターのみを導入した組換え大腸菌を別途作製した。

40

## 【 0 0 6 3 】

## ( 4 ) - フェランドレン生産

組換え大腸菌 B L 2 1 B P D 1 をアンピシリン 100  $\mu$  g / m L およびクロラムフェニコール 34  $\mu$  g / m L を含む 2  $\times$  Y T 培地 ( 1.6% (w/v) Bacto Tripton, 1% (w/v) Yeast Extract, 0.5% (w/v) NaCl ) にて、30、110 r p m ( 旋回 ) の条件で 30 時間培養した。この際、培養開始から 16 時間後に密閉系にした。培養終了後、遠心分離により菌体と培養上清を得た。

菌体を破碎し、破碎液の上清をペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、 - フェランドレンが検出された。また、気相画分を分析したところ、気相にも - フェランドレンが検出された。

50

培養上清についてもペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、 $\alpha$ -フェランドレンが検出された。

一方、pET23aベクターあるいはpACYCDuet-1ベクターのみを導入したコントロールの組換え大腸菌では、菌体、培養上清、及び気相のいずれからとも $\alpha$ -フェランドレンは検出されなかった。

以上のことから、トマト由来NPP合成酵素遺伝子とトマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を培養することにより、 $\alpha$ -フェランドレンを生産できることが示された。また生産された $\alpha$ -フェランドレンは、菌体、培養上清、及び気相から回収可能であった。

#### 【実施例2】

10

#### 【0064】

本実施例では、シロイヌナズナ由来GPP合成酵素遺伝子とラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該組換え大腸菌を培養して $\alpha$ -フェランドレンを生産した。

#### 【0065】

##### (1) シロイヌナズナ由来GPP合成酵素遺伝子の単離

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の全RNAを鋳型とし、配列番号13と配列番号14で表されるプライマーを使用したRT-PCRによって、シロイヌナズナ由来GPP合成酵素をコードする核酸(シロイヌナズナ由来GPP合成酵素遺伝子、配列番号1、GenBank Accession No: Y17376)を増幅した。得られた核酸をNdeI及びEcoRIで切断した後、pET23aベクター(Novagen社)に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、シロイヌナズナ由来GPP合成酵素発現ベクターpT23AGPPを作製した。

20

#### 【0066】

##### (2) ラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子の単離

ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) 由来の全RNAを鋳型とし、配列番号15と配列番号16で表されるプライマーを使用したRT-PCRによって、ラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸(ラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子、配列番号7、GenBank Accession No.: HQ404305)を増幅した。得られた核酸をNcoI及びEcoRIで切断した後、pACYCDuet-1ベクター(Novagen社)に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、ラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素発現ベクターpACLPDを作製した。

30

#### 【0067】

##### (3) $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え大腸菌の作製

上記(1)、(2)で得られた発現ベクターpT23AGPP及びpACLPDを大腸菌BL21(DE3)株に導入し、 $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え大腸菌BL21BPD2を作製した。

コントロールとして、核酸が挿入されていないpET23aベクターのみを導入した組換え大腸菌、並びに、核酸が挿入されていないpACYCDuet-1ベクターのみを導入した組換え大腸菌を別途作製した。

40

#### 【0068】

##### (4) $\alpha$ -フェランドレン生産

組換え大腸菌BL21BPD2をアンピシリン100 $\mu$ g/mLおよびクロラムフェニコール34 $\mu$ g/mLを含む2 $\times$ YT培地にて、30 $^{\circ}$ C、110rpm(旋回)の条件で30時間培養した。この際、培養開始から16時間後に密閉系にした。培養終了後、遠心分離により菌体と培養上清を得た。

菌体を破碎し、破碎液の上清をペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、 $\alpha$ -フェランドレンが検出された。

培養上清についてもペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて

50

分析したところ、 $\alpha$ -フェランドレンが検出された。また、気相画分を分析したところ、気相にも $\alpha$ -フェランドレンが検出された。

一方、pET23aベクターあるいはpACYCDuet-1ベクターのみを導入したコントロールの組換え大腸菌では、菌体、培養上清、及び気相のいずれからとも $\alpha$ -フェランドレンは検出されなかった。

以上のことから、シロイヌナズナ由来GPP合成酵素遺伝子とラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を培養することにより、 $\alpha$ -フェランドレンを生産できることが示された。また生産された $\alpha$ -フェランドレンは、菌体、培養上清、及び気相から回収可能であった。

#### 【実施例3】

10

#### 【0069】

本実施例では、トマト由来NPP合成酵素遺伝子とトマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母を作製し、当該組換え酵母を培養して $\alpha$ -フェランドレンを生産した。

#### 【0070】

##### (1) トマト由来NPP合成酵素遺伝子の単離

トマト由来の全RNAを鋳型とし、配列番号13と配列番号14で表されるプライマーを使用したRT-PCRによって、トマト由来NPP合成酵素をコードする核酸(トマト由来NPP合成酵素遺伝子、配列番号3、GenBank Accession No:FJ797956)を増幅した。得られた核酸をBamHIで切断した後、pPIC3.5Kベクター(Invitrogen社)に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、トマト由来NPP合成酵素発現ベクターpP3.5TNPPを作製した。

20

#### 【0071】

##### (2) トマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子の単離

トマト由来の全RNAを鋳型とし、配列番号19と配列番号20で表されるプライマーを使用したRT-PCRによって、トマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸(トマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子、配列番号5、GenBank Accession No:FJ797957)を増幅した。得られた核酸をBamHIで切断した後、pPIC3.5Kベクター(Invitrogen社)に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、トマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素発現ベクターpP3.5TPDを作製した。

30

#### 【0072】

##### (3) $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え酵母の作製

メタノール資化性酵母Pichia pastoris GS115株(Invitrogen社)を、上記(1)、(2)で得られた発現ベクターpP3.5TNPP及びpP3.5TPDの等量混合物で形質転換した。形質転換の方法は、Invitrogen社のマニュアル(No.25-0156、No. 25-0043)に従って行った。マルチコピーの遺伝子導入体を得るために、1.5mg/mL濃度のGeneticin(Invitrogen社)耐性株を取得した。これにより、トマト由来NPP合成酵素遺伝子及びトマト由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子をそれぞれ複数コピー保持する組換え酵母GSNP-1を取得した。

40

コントロールとして、核酸が挿入されていないpPIC3.5Kベクターのみを導入した、1.5mg/mL濃度のGeneticin(Invitrogen社)耐性株を取得した(組換え酵母GS115)。

#### 【0073】

##### (4) $\alpha$ -フェランドレン生産

GSNP-1をMGY培地(1.34%(w/v) YNB, 1%(w/v) glycerol,  $4 \times 10^{-5}$  %(w/v) biotin; YMB:13.4%(w/v) yeast nitrogen base, 10%(w/v) ammonium sulfate)(Invitrogen社マニュアルNo. 25-0043)にて前培養した後、菌体を回収し、回収菌体をFermentation basal salts培地(85% Phosphoric acid 26.7 ml, Calcium sulfate 0.093%(w/v), Potassium sulfate 1.82%(w/v), Magnesium sulfate-7H<sub>2</sub>O 1.49%(w/v), Potassium hydroxide

50

0.413%(w/v), Glycerol 4.0%(w/v)) (Invitrogen社マニュアルVer.B 053002) にて 6 4 時間本培養した。この際、培養開始から 2 4 時間後に密閉系にした。導入した酵素遺伝子の発現誘導のために、培養開始から 2 4 時間経過時と 4 8 時間経過時に、1 / 2 0 0 容の 1 0 0 %メタノールを培養液に添加した。培養終了後、遠心分離により菌体及び培養上清を回収した。

菌体をガラスビーズ法 (Invitrogen社マニュアルNo. 25-0043) によって破碎し、上清を得た。この上清のペンタン抽出物をガスクロマトグラフィーで分析したところ、 $\alpha$ -フェランドレンが検出された。

培養上清についてもペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、 $\alpha$ -フェランドレンが検出された。また、気相画分を分析したところ、気相にも  $\alpha$ -フェランドレンが検出された。

一方、p P I C 3 . 5 K ベクターのみを導入したコントロールの組換え酵母 G S 1 1 5 では、菌体、培養上清、及び気相のいずれから  $\alpha$ -フェランドレンは検出されなかった。

以上のことから、トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子とトマト由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母を培養することにより、 $\alpha$ -フェランドレンを生産できることが示された。また生産された  $\alpha$ -フェランドレンは、菌体、培養上清、及び気相から回収可能であった。

#### 【実施例 4】

##### 【0074】

本実施例では、シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素遺伝子とラベンダー由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母を作製し、当該組換え酵母を培養して  $\alpha$ -フェランドレンを生産した。

##### 【0075】

###### (1) シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素遺伝子の単離

シロイヌナズナ由来の全 R N A を鋳型とし、配列番号 2 1 と配列番号 2 2 で表されるプライマーを使用した R T - P C R によって、シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素をコードする核酸 (シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素遺伝子、配列番号 1、GenBank Accession No.: Y17376) を増幅した。得られた核酸を B a m H I で切断した後、p P I C 3 . 5 K ベクター (Invitrogen社) に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素発現ベクター p P 3 . 5 A G P P を作製した。

##### 【0076】

###### (2) ラベンダー由来 $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子の単離

ラベンダー由来の全 R N A を鋳型とし、配列番号 2 3 と配列番号 2 4 で表されるプライマーを使用した R T - P C R によって、ラベンダー由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素をコードする核酸 (ラベンダー由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子、配列番号 7、GenBank Accession No.: HQ404305) を増幅した。得られた核酸を E c o R I で切断した後、p P I C 3 . 5 K ベクター (Invitrogen社) に導入した。ベクターに導入された核酸の塩基配列を確認し、相違ないことを確認した。これにより、ラベンダー由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素発現ベクター p P 3 . 5 L P D を作製した。

##### 【0077】

###### (3) $\alpha$ -フェランドレン生産能を有する組換え酵母の作製

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* GS115 株 (Invitrogen社) を、上記 (1)、(2) で得られた発現ベクター p P 3 . 5 A G P P 及び p P 3 . 5 L P D の等量混合物で形質転換した。形質転換の方法は、Invitrogen社のマニュアル (No.25-0156、No. 25-0043) に従って行った。マルチコピーの遺伝子導入体を得るために、1 . 5 m g / m L 濃度の Geneticin (Invitrogen社) 耐性株を取得した。これにより、シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素遺伝子及びラベンダー由来  $\alpha$ -フェランドレン合成酵素遺伝子をそれぞれ複数コピー保持する組換え酵母 G S N P - 2 を取得した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 8 】

## ( 4 ) - フェランドレン生産

G S N P - 2 を M G Y 培地 ( Invitrogen社マニュアルNo. 25-0043 ) にて前培養した後、菌体を回収し、回収菌体を Fermentation basal salts 培地 ( Invitrogen社マニュアル Ver.B 053002 ) にて 6 4 時間本培養した。導入した酵素遺伝子の発現誘導のために、培養開始から 2 4 時間経過時と 4 8 時間経過時に、1 / 2 0 0 容の 1 0 0 % メタノールを培養液に添加した。この際、培養開始から 2 4 時間後に密閉系にした。培養終了後、遠心分離により菌体及び培養上清を回収した。

菌体をガラスビーズ法 ( Invitrogen社マニュアルNo. 25-0043 ) によって破碎し、上清を得た。この上清のペンタン抽出物をガスクロマトグラフィーで分析したところ、 - フェランドレンが検出された。

培養上清についてもペンタンで抽出した。この抽出画分をガスクロマトグラフィーにて分析したところ、 - フェランドレンが検出された。また、気相画分を分析したところ、気相にも - フェランドレンが検出された。

一方、p P I C 3 . 5 K ベクターのみを導入したコントロールの組換え酵母 G S 1 1 5 ( 実施例 3 で作製 ) では、菌体、培養上清、及び気相のいずれから - フェランドレンは検出されなかった。

以上のことから、シロイヌナズナ由来 G P P 合成酵素遺伝子とラベンダー由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母を培養することにより、 - フェランドレンを生産できることが示された。また生産された - フェランドレンは、菌体、培養上清、及び気相から回収可能であった。

## 【 実施例 5 】

## 【 0 0 7 9 】

本実施例では、トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子とラベンダー由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該組換え大腸菌を培養して、フェランドレンの生成確認と副生成物の同定を行った。

## 【 0 0 8 0 】

実施例 2 で作製した p A C L P D より、N C O I 及び E c o R I で切断して、ラベンダー由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子を切り出し、p C O L A D u e t - 1 ( Novagen 社 ) の N c o I 及び E c o R I 切断部位へ導入し、p C O D L F S を構築した。一方、実施例 1 で作製した p T 2 1 T N P P を鋳型として配列番号 2 5 および 2 6 のプライマーを用いて P C R を行い、トマト由来 N P P 合成酵素遺伝子を増幅した。増幅した断片を N d e I および K p n I で切断し、上記 p C O D L F S の N d e I および K p n I 切断部位へ導入し、共発現ベクター p C O L D F S N S を構築した。上記 p C O L D F S N S を R o s e t t a 2 ( D E 3 ) へ導入し、ラベンダー由来 - フェランドレン合成酵素およびトマト由来 N P P 合成酵素を共発現する組換え大腸菌 R O F S N S を得た。コントロール大腸菌として p C O L A D u e t - 1 のみを有する組換え大腸菌 R O C O L A も作製した。

## 【 0 0 8 1 】

組換え大腸菌 R O F S N S および R O C O L A をクロラムフェニコール 3 4  $\mu$  g / m L 、およびカナマイシン 1 5  $\mu$  g / m L を含む 2  $\times$  Y T 培地 ( 1.6% ( w / v ) Bacto Trypton, 1 % ( w / v ) Yeast Extract, 0.5% ( w / v ) NaCl ) にて、1 8 、 1 1 0 r p m ( 旋回 ) の条件下で、密閉系で 2 4 時間培養した。培養終了後、気相画分を G C - M S によって分析した。図 1 に示すように R O F S N S では - フェランドレンが検出され ( ピーク A ) 、副生成物と思われるピーク B および C も検出された。一方、R O C O L A ではこれらのピークは検出されなかった。また各ピークの同定を行ったところ、図 2 に示すように R O F S N S の培養気相では、主要生成物である - フェランドレン以外にも、リモネン ( ピーク B ) およびミルセン ( ピーク C ) が副生成物として少量生成していた。

R O F S N S による - フェランドレンの気相での生成量は 7 5 0  $\mu$  g / L 培養液であった。

## 【 実施例 6 】

## 【 0 0 8 2 】

本実施例では、放線菌由来メバロン酸経路遺伝子、トマト由来NPP合成酵素遺伝子、およびラベンダー由来 - フェランドレン合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を作製し、当該組換え大腸菌を培養して - フェランドレンを生産した。

## 【 0 0 8 3 】

*Streptomyces griseolosporeus* (*Kitasatospora griseola*)のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号27と配列番号28で表されるプライマーを使用したPCRによって、*S. griseolosporeus*のメバロン酸経路酵素をコードする核酸(配列番号29)を増幅した。この核酸には、Mevalonate kinase、Mevalonate diphosphate decarboxylase、Phosphomevalonate kinase、IPP isomerase、HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) reductase (HMGR)、及びHMG-CoA synthaseをコードする遺伝子クラスターが含まれている。得られた増幅DNA断片をpT7-Blue Tベクターへクローニングし、pT7SMVを構築した。

10

## 【 0 0 8 4 】

上記ベクターpT7SMVより、NcoI及びEcoRIによる切断によって回収した遺伝子断片をpCOLADuet-1 (Novagen社)のNcoI及びEcoRI切断サイトへ導入し、pCSMVを構築した。

pCSMVのNdeI-KpnI切断部位へ、配列番号30で示されるトマトNPP合成酵素遺伝子、ラベンダー - フェランドレン合成酵素遺伝子オペロンの合成核酸を導入し、放線菌メバロン酸経路遺伝子、トマトNPP合成酵素遺伝子、及びラベンダー - フェランドレン合成酵素遺伝子を含むpCSMVNSFSを構築した。発現ベクターpCSMVNSFSを大腸菌Rosetta2(DE3)へ導入し、組換え大腸菌ROSMVNSFSを得た。

20

## 【 0 0 8 5 】

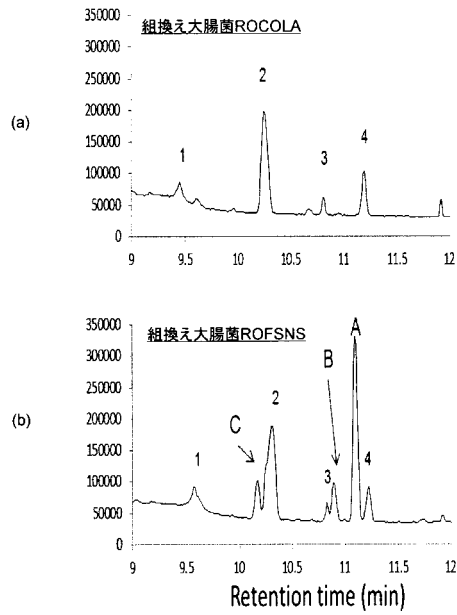
組換え大腸菌ROSMVNSFSをクロラムフェニコール34 µg/mL、およびカナマイシン15 µg/mLを含む2×YT培地(1.6%(w/v)Bacto Trypton, 1%(w/v)Yeast Extract, 0.5%(w/v)NaCl)にて、18、110rpm(旋回)の条件下で、密閉系で24時間培養した。培養終了後、気相画分をガスクロマトグラフィーによって分析したところ、 - フェランドレンが検出された。 - フェランドレンの気相での生成量は8.5 mg/L培養液であった。

30

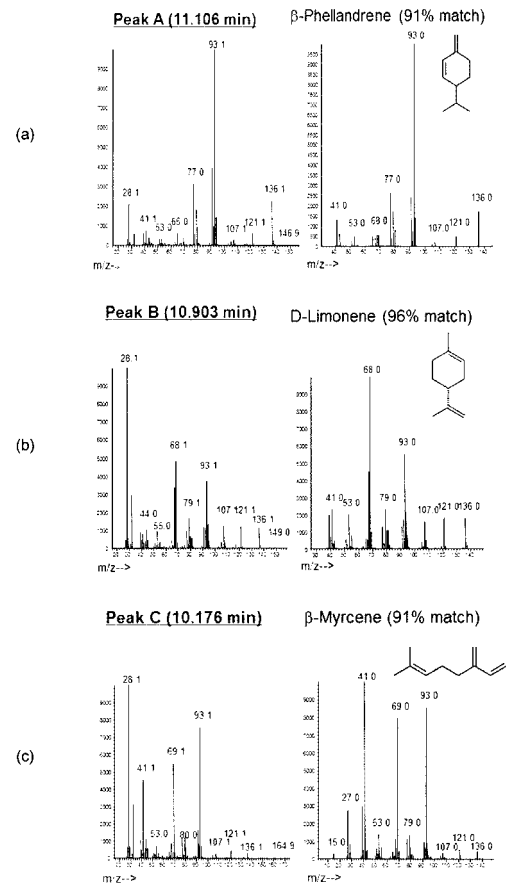
以上の結果と実施例5での - フェランドレン生成量とから、放線菌MVA経路遺伝子をさらに導入することで、 - フェランドレンの産生量を増大させることが可能であった。



【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2014076042000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 P 5/00 (2006.01) C 1 2 P 5/00

(72)発明者 郡 悌之  
茨城県つくば市和台 3 2 積水化学工業株式会社内

(72)発明者 上西 章太  
神奈川県川崎市幸区大宮町 1 3 1 0 番地 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構内

(72)発明者 高橋 征司  
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6 - 6 - 1 1 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 下山 武文  
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6 - 6 - 1 1 国立大学法人東北大学内

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA04 DA06 DA12 EA04 GA11  
4B064 AB05 CA19 CC24 CE02 CE08 DA16  
4B065 AA26X AA50Y AA77X AA88Y AB01 AC14 BA01 BC01 BD01 BD15  
BD16 CA03 CA60