



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201738372 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：106110500

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 29 日

(51)Int. Cl.：

C12N1/21 (2006.01)

C12N15/31 (2006.01)

C12P1/04 (2006.01)

C12P23/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/03/31

日本

2016-071303

(71)申請人：捷客斯能源股份有限公司 (日本) JX NIPPON OIL & ENERGY CORPORATION
(JP)

日本

(72)發明人：永井秀忠 NAGAI, HIDETADA (JP)；佐藤涉 SATO, WATARU (JP)；高橋季之
TAKAHASHI, TOSHIYUKI (JP)；佐藤溫美 SATO, HARUMI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：33 共 128 頁

(54)名稱

類胡蘿蔔素的製造方法

METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS

(57)摘要

含有下述的(a)至(c)的任一項的基因的變異型類胡蘿蔔素產生細菌。

(a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；(b)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；(c)上述(a)及(b)二者的基因。

Provided is a variant carotenoids producing bacterium comprising any one gene of the following (a)~(c).

(a) a gene encoding a protein comprising a variant amino acid sequence in which at least the amino acid residue at No. 225 is substituted by other amino acid residue in the amino acid sequence of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in carotenoids producing bacteria; (b) a gene encoding a protein comprising a variant amino acid sequence in which at least the amino acid residue at No. 305 is substituted by other amino acid residue in the amino acid sequence of decaprenyl 2-phosphate synthase in carotenoids producing bacteria; (c) both genes of the above (a) and (b).

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

類胡蘿蔔素的製造方法

METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS

【技術領域】

【0001】 本發明是關於使用類胡蘿蔔素產生細菌的變異株的類胡蘿蔔素的製造方法。

【先前技術】

【0002】 類胡蘿蔔素是作為飼料添加物、食品添加物、醫藥品等使用的有用的天然色素。類胡蘿蔔素中，包含有蝦紅素、角黃素、玉米黃素(zeaxanthin)、 β -隱黃質(cryptoxanthin)、番茄紅素、 β -胡蘿蔔素、金盞花紅素(adonirubin)、側金盞花黃質(adonixanthin)、海膽烯酮(echinenone)、海星酮(asteroidenone)及3-羥基海膽烯酮(hydroxyechinenone)等。其中，蝦紅素是有用於做為養殖魚的鮭魚、鱒魚、嘉臘魚等的體色改善劑、家禽類的卵黃色改善劑等飼料添加物。又，天然的蝦紅素是作為安全的食品添加物或健康食品素材而在產業上的價值高。側金盞花黃質(adonixanthin)及金盞花紅素(adonirubin)，與蝦紅素同樣作為飼料添加物、食品添加物、醫藥品等的用途而受期待。

【0003】 再者， β -胡蘿蔔素是使用作為飼料添加物、食品添加物、醫藥品等，角黃素是使用作為飼料添加

物、食品添加物、化粧品等，玉米黃素(zeaxanthin)是使用作為食品添加物、飼料添加物等。再者，番茄紅素、海膽烯酮(echinenone)、 β -隱黃質(cryptoxanthin)、3-羥基海膽烯酮(echinenone)、海星酮等也是作為飼料添加物、食品素材等的使用而受期待。這些類胡蘿蔔素的製造方法而言，已知有化學合成法，由天然物的萃取法，由微生物的培養的產生方法等。

【0004】 蝦紅素的化學合成法而言，已知有將 β -胡蘿蔔素的改變的方法(Pure Appl. Chem., 57, 741, 1985(非專利文獻 1))及由 C15 磷鎢鹽合成的方法(Helv. Chim. Acta, 64, 2436, 1981(非專利文獻 2))。由天然物的萃取法而言，蝦紅素是存在於鮭魚、嘉臘魚等魚類及蝦、蟹、磷蝦等甲殼類，所以也可以由這些萃取而採取。

【0005】 由微生物的類胡蘿蔔素的生產方法而言，已報告由綠藻類雨生紅球藻(Haematococcus pluvialis)的培養法(特開 2007-97584 號公報(專利文獻 1))、由紅色酵母紅法酵母(Phaffia rhodozyma)的發酵法(特開平 11-69969 號公報(專利文獻 2))、由屬於副球菌屬(Paracoccus)的細菌(以下，也稱為「副球菌(Paracoccus)屬細菌」)的發酵法、由屬於短波單胞菌(Brevundimonas)屬細菌的發酵法(特開 2006-340676 號公報(專利文獻 3))、由屬於赤桿菌(Erythrobacter)屬細菌的發酵法(特開 2008-259449 號公報(專利文獻 4))的報告。生產類胡蘿蔔素的副球菌(Paracoccus)屬細菌的例而言，可舉 E-396 株及 A-581-1 株(特開平

7-79796 號公報(專利文獻 5))及 *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999), 49, 277-282(非專利文獻 3))。其他的類胡蘿蔔素生產性的屬於副球菌(*Paracoccus*)屬細菌而言，可舉馬氏副球菌(*Paracoccus marcusii*)MH1 株(特表 2001-512030 號公報(專利文獻 6))、海雲台副球菌(*Paracoccus haendaensis*)BC74171 株(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 1699-1702(非專利文獻 4))、副球菌屬(*Paracoccus*)屬細菌 N-81106 株(特開 2007-244205 號公報(專利文獻 7))、玉米素副球菌(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*)(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2003), 53, 231-238(非專利文獻 5))及副球菌(*Paracoccus* sp.)PC-1 株(WO2005/118812 號小冊(專利文獻 8))等。

【0006】 但是，在前述的類胡蘿蔔素的製造方法中有幾個要解決課題，例如，由化學合成法製造的類胡蘿蔔素，即使是安全的也會給予消費者不良的印象。由天然物萃取的類胡蘿蔔素與化學合成法相比，製造成本格外地高。由微生物的製造中，由綠藻類或酵母的培養的產生是生產性低，加上這些微生物是有堅固的細胞壁，因此由培養物的類胡蘿蔔素的萃取有困難。

【0007】 另一方面，由屬於副球菌(*Paracoccus*)屬細菌的類胡蘿蔔素的製造，有該菌體的增殖速度快速、類胡蘿蔔素的生產性高、由培養物的類胡蘿蔔素的萃取容易等優點，已報告有幾個培養方法及製造方法。

【0008】 例如，特開 2007-143492 號公報(專利文獻 9)是說明培養中添加鐵鹽的方法，WO2010/044469 號小冊(專利文獻 10)是說明在培養基添加胺基酸的方法，特開 2011-188795 號公報(專利文獻 11)是說明在培養基添加生物素(biotin)的方法，又，特開 2012-139164 號公報(專利文獻 12)是說明在培養基添加鈣化合物達 3.6mM 以上的方法。

但是，產生類胡蘿蔔素的細菌中，哪一個基因對生產效率的提高有貢獻，則其詳細情況不明。

【0009】

[先前技術文獻]

[專利文獻 1] 日本特開 2007-97584 號公報

[專利文獻 2] 日本特開平 11-69969 號公報

[專利文獻 3] 日本特開 2006-340676 號公報

[專利文獻 4] 日本特開 2008-259449 號公報

[專利文獻 5] 日本特開平 7-79796 號公報

[專利文獻 6] 日本特表 2001-512030 號公報

[專利文獻 7] 日本特開 2007-244205 號公報

[專利文獻 8]WO2005/118812 號小冊

[專利文獻 9] 日本特開 2007-143492 號公報

[專利文獻 10]WO2010/044469 號小冊

[專利文獻 11] 日本特開 2011-188795 號公報

[專利文獻 12] 日本特開 2012-139164 號公報

[非專利文獻]

【0010】

[非專利文獻 1]Pure Appl. Chem., 57, 741, 1985

[非專利文獻 2]Helv. Chim. Acta, 64, 2436, 1981

[非專利文獻 3]International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, 277-282

[非專利文獻 4]International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2004), 54, 1699-1702

[非專利文獻 5]International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2003), 53, 231-238

【發明內容】

[發明要解決的課題]

【0011】 本發明是以提供變異型類胡蘿蔔素產生細菌，及使用該細菌的類胡蘿蔔素的製造方法為目的。

【0012】 本發明者為了解決上述課題而精心進行檢討的結果，由經變異處理的細菌中成功於取得蝦紅素高生產細菌，而達到本發明的完成。

[解決課題的手段]

【0013】

(1)一種變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其係含有下述(a)至(c)的任一項基因。

(a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；

(b)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的十聚異戊二

烯二磷酸合成酶(decaprenyl diphosphate synthase)的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；

(c)上述(a)及(b)二者的基因。

(2)如在(1)項中所述的細菌，其中，1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列是序列編號 2 所示者。

(3)如在(1)項或(2)項中所述的細菌，其中，第 225 個胺基酸殘基是由甘胺酸經取代為天門冬胺酸者。

(4)如在(1)項至(3)項的任一項中所述的細菌，其中，十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列是序列編號 4 所示者。

(5)如在(1)項至(4)項的任一項中所述的細菌，其中，第 305 個胺基酸殘基是由丙胺酸經取代為纈胺酸者。

(6)如在(1)項至(5)項的任一項中所述的細菌，其獲得比沒有編碼包含有變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的胡蘿蔔素產生能力，為更高的產生能力。

(7)如在(6)項所述的細菌，其獲得相較於沒有編碼包含有變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生量，為至少 5 倍以上的產生能力。

(8)如在(1)項至(7)項的任一項中所述的細菌，其中，類胡蘿蔔素產生細菌是屬於副球菌屬(*Paracoccus*)的細菌。

(9)如在(8)項中所述的細菌，其中，屬於副球菌屬(*Paracoccus*)的細菌是 E-396 株。

(10)如在(1)項至(9)項的任一項中所述的細菌，其中，類胡

蘿蔔素是蝦紅素。

(11)類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為培養如在(1)項至(10)項的任一項中所述的細菌，由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。

(12)如在(11)項所述的方法，其中，類胡蘿蔔素的產生量，相較於沒有編碼包含有變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生量，為至少 5 倍以上的產生量。

(13)如在(11)項或(12)項所述的方法，其中，類胡蘿蔔素是蝦紅素。

(14)類胡蘿蔔素產生細菌的篩選方法，其特徵為對於類胡蘿蔔素產生細菌施行變異處理，由經變異處理的細菌中選擇具有下述的(a)至(c)的任一項的特徵的細菌。

(a)1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的活性比變異處理前的細菌中的活性更為提高的特徵；

(b)十聚異戊二烯二磷酸合成酶的活性比變異處理前的細菌中的活性更降低的特徵；

(c)上述(a)及(b)二者的特徵。

(15)類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為培養由(14)項所述的方法選擇的細菌，由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。

(16)編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列。

(17)含有下述的(a)或(b)的 DNA 的基因。

(a)含有序列編號 5 表示的鹼基序列的 DNA；

(b)編碼蛋白質的 DNA，該蛋白質係和包含與上述(a)的 DNA 互補的鹼基序列而成的 DNA 在嚴苛的條件下雜交，並且具有 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶活性。

(18)編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列。

(19)含有下述的(a)或(b)的 DNA 的基因。

(a)含有序列編號 7 表示的鹼基序列的 DNA；

(b)編碼蛋白質的 DNA，該蛋白質係和包含與上述(a)的 DNA 互補的鹼基序列而成的 DNA 在嚴苛的條件下雜交，並且十聚異戊二烯二磷酸合成酶活性降低。

(20)含有下述的(a)至(c)的任一項的基因的重組載體(recombinant vector)。

(a) 如在(16)項或(17)項中所述的基因；

(b) 如在(18)項或(19)項中所述的基因；

(c) 上述(a)及(b)的基因。

(21) 含有如在(20)項中所述的重組載體的形質轉換體。

(22)類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為培養如在(21)項中所述的形質轉換體，由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。

[發明的效果]

【0014】 由本發明，提供類胡蘿蔔素的高生產細菌。由本發明的細菌的使用，可以有效率的製造類胡蘿蔔素。

【圖式簡單說明】**【0015】**

第 1 圖為顯示 E-396 株及 ASB-57 株的總類胡蘿蔔素及蝦紅素的比生產性圖。

第 2 圖為顯示酵素 A 的模板(template)構造圖。

第 3A 圖為顯示酵素 A 及模板構造(201X)的對準(alignment)圖。將推測的活性部位以綠色表示。將紊亂(disordered)區域以藍色棒表示。

第 3B 圖為顯示酵素 A 與模板構造(201X)的對準圖。將推測的活性部位以綠色表示。將紊亂(disordered)區域以藍色棒表示。

第 4 圖為顯示模板構造及酵素 A 及輔酶 TPP 複合體的模型構造圖。模板的源自抗輻射奇異球菌(*D. radiodurans*)的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶(DXS)及 TPP 複合體的構造(201X)(左)及所構築的酵素 A 的模型構造(右)。形成同型二聚體(homodimer)，各次單元(subunit)與 TPP 及 Mg 鍵結。將 TPP 及 Mg 以空間填充(space-filling)表示。

第 5 圖為顯示酵素 A 與 TPP 中間體及基質的複合體的模型構造圖。表示在所構築的酵素 A，有在輔酶 TPP 附加丙酮酸的羥乙基-TPP 中間體及甘油醛 3 磷酸(GAP)鍵結的複合體模型。

第 6 圖為顯示酵素 A 及輔酶 TPP 的相互作用圖。

第 7 圖為顯示推測由酵素 A 與 TPP 的相互作用的胺基酸殘基圖。推測與 TPP 的相互作用的殘基以棒表示。

第 8 圖為顯示推測酵素 A 及與羥乙基-TPP 中間體的羥乙基的相互作用的胺基酸殘基圖。推測與羥乙基的相互作用的殘基以棒表示。

第 9 圖為顯示推測酵素 A 及甘油醛 3 磷酸(GAP)的相互作用的胺基酸殘基圖。

第 10 圖為顯示酵素 A 及基質丙酮酸的相互作用圖。

第 11 圖為顯示酵素 A 及基質甘油醛 3 磷酸的相互作用圖。

第 12 圖為顯示酵素 A 及其他種 DXS 的對準圖。EnzymeA：酵素 A, DXS_ECOLI：DXS (E.coli), DXS_VITVI：DXS 葡萄(Vitis vinifera), DXS_DEIRA：抗輻射奇異球菌(Deinococcus radiodurans)。模板構造(DXS_DEIRA)的紊亂區域以藍色棒表示。活性部位以綠色方塊表示，DXS_ECOLI 及 DXS_VITVI 看到有活性提高的變異以▲表示。

第 13 圖為顯示酵素 A 的紊亂區域的位置圖。紊亂區域(藍色的點線)的 N 末端側的環的 Asn180, Met182 是與 Mg 鍵結，Ile184 是與 TPP 鍵結。

第 14 圖為顯示酵素 A 的紊亂區域的模型構造圖。酵素 A 在紊亂區域(青色)的模型構造(左)及紊亂區域的模型構造的靜電電位圖(右)。

第 15 圖為顯示蝦紅素合成途徑中所推測的酵素 A 變異體的效果圖。

第 16 圖為顯示酵素 C 的模板構造圖。表示源自莢膜紅細菌(Rhodobacter capsulatus)的十聚異戊二烯二磷酸合

成酶(PDB ID : 3MZV)。

第 17 圖為顯示酵素 C 及模板構造(3MZV)的對準圖。推測的活性部位以綠色表示。

第 18 圖為顯示模板構造、以及酶與 IPP 及 FPP 的複合體的模型構造圖。模板的源自莢膜紅細菌(*R. capsulatus*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酵素 C(3MZV)(左)及所構築的酵素 C 的模型構造(右)。FPP 及 IPP 以空間填充表示。

第 19 圖為顯示模板構造、以及酵素 C 與 IPP 及 FPP 的複合體的模型構造圖。FPP 及 IPP 是頭對尾的鍵結，縮合反應是 IPP 的異戊二烯基與 FPP 的磷酸基之間(左圖，箭頭)發生。在長鏈異戊二烯焦磷酸合成酶(prenyl diphosphate synthase)中，反應生成物是再與 IPP 鍵結，向基質鍵結部位的深處(右圖，箭頭)伸長。

第 20 圖顯示模板構造與酵素 C 的模型構造的比較圖。模板源自莢膜紅細菌(*R. capsulatus*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶(左)及酵素 C(右)的基質複合體模型。有一致的胺基酸殘基的構造以綠色表示。基質鍵結區域及其周邊的構造是全部一致。

第 21 圖為顯示酵素 C 與十聚異戊二烯二磷酸合成酶(玉米素副球菌(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*))的對準圖。

第 22 圖為顯示酵素 C 與 FPP 及 IPP 的複合體模型圖。以色帶(ribbon)表示(左)及表面形狀(右)。A 鏈(淡紅)、B 鏈(淡藍)表示。將 FPP 及 IPP 以空間填充表示。

第 23 圖為顯示推測酵素 C 與 FPP(上)、IPP(中)、Mg(下)

的相互作用的胺基酸殘基圖。

第 24 圖為顯示酵素 A 與基質 FPP 及 IPP 的相互作用圖。

第 25 圖為顯示酵素 A 與 Mg 的相互作用圖。

第 26 圖為顯示酵素 C 的野生型及變異體 A305V 的立體構造模型圖。將 Ala305(綠)及 Val305(洋紅)以空間填充表示。

第 27 圖為顯示野生型的 Ala305(左)與變異體的 Val305(右)的周邊的構造圖。Ala305 是與周邊的胺基酸殘基相接。由往 Val305 的變異，引起周邊的構造及立體障礙。將 Ala305 以綠，Val305 以洋紅表示。

第 28 圖為顯示野生型(藍)與變異體 A305V(紅)的分子內能量的比較圖。

第 29 圖為顯示野生型與變異體 A305V 的構造比較圖。由 A305V 的變異、Ala305(綠)與 Val305(洋紅)的周邊的胺基酸殘基的構造起變化(左)。此構造變化也會影響鄰近的 α 螺旋(右)。

第 30 圖為顯示酵素 C 的 A305V 的影響圖。

第 31 圖為顯示酵素 C 的 A305V 的影響圖。

第 32 圖為顯示酵素 C 的 A305V 的影響圖。

第 33 圖為顯示蝦紅素合成途徑中推測的酵素 C 變異體的效果圖。

【實施方式】

【0016】 以下，詳細說明本發明。

1.概要

本發明是關於高生產類胡蘿蔔素的細菌，是含有以下的(a)及(b)的任一項的基因，或含有該兩基因的細菌。

(a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因

(b)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因

【0017】 本發明者為了要開發類胡蘿蔔素的生產能力高的菌，檢討 E-396 株及其變異處理後的菌株的類胡蘿蔔素產生能力，同時解析這些菌株中，編碼參予類胡蘿蔔素合成途徑的酵素的基因的變異。

其結果，取得比使用作為親株的 E-396 株具有更高的類胡蘿蔔素產生能力的菌株(名為「ASB-57 株」)。)。解析 ASB-57 株的基因體的結果，確認在 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶(DXS)的胺基酸序列，及十聚異戊二烯二磷酸合成酶(DPS)的胺基酸序列有發生變異。於是，進行經由胺基酸立體構造解析所預測的功能解析，而推測，至少，在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基及/或 DPS 的第 305 個胺基酸殘基發生變異，此變異對類胡蘿蔔素的高生產有貢獻。

本發明是根據上述知識見解而完成的。

【0018】

2. 變異型類胡蘿蔔素產生細菌

本發明的類胡蘿蔔素產生細菌是將親株變異處理，在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基及/或 DPS 的第 305 個胺基酸殘基產生變異作為指標而得的變異型細菌，是可將類胡蘿蔔素以高效率產生的細菌。將本發明的類胡蘿蔔素產生細菌，在本說明書中稱為「變異型類胡蘿蔔素產生細菌」。

(1)親株

本發明中，使用作為用以獲得變異型類胡蘿蔔素產生細菌的親株的細菌而言，如是會產生類胡蘿蔔素的細菌則無任何限定，例如可舉屬於副球菌(*Paracoccus*)屬、短波單胞菌(*Brevundimonas*)屬、赤桿菌(*Erythrobacter*)屬細菌。

理想是使用屬於副球菌(*Paracoccus*)屬細菌、屬於短波單胞菌(*Brevundimonas*)屬細菌或屬於赤桿菌(*Erythrobacter*)屬細菌，較理想是使用屬於副球菌(*Paracoccus*)屬細菌。副球菌(*Paracoccus*)屬、赤桿菌(*Erythrobacter*)屬及短波單胞菌(*Brevundimonas*)屬，各者均被分類於變形菌(*Proteobacteria*)門、 α -變形菌(*Alphaproteobacteria*)綱，在細菌分類學上有共通性，所以本發明中，可以使用屬於這些屬的細菌。

【0019】 屬於副球菌屬細菌之中，較佳使用類胡蘿蔔素副球菌(*Paracoccus carotinifaciens*)、馬氏副球菌(*Paracoccus marcusii*)、海雲台副球菌(*Paracoccus haeundaensis*)及玉米素副球菌(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*)，尤其較佳使用類胡蘿蔔素副球菌(*Paracoccus carotinifaciens*)。作為屬

於副球菌屬細菌的具體的菌株的例，可舉類胡蘿蔔素副球菌(*Paracoccus carotinifaciens*)E-396株(FERM BP-4283)及副球菌屬細菌 A-581-1株(FERM BP-4671)，這些變異株也較佳使用在本發明。

屬於赤桿菌屬類胡蘿蔔素產生細菌而言、例如可舉赤桿菌 JPCC M 種(特開 2008-259452)、赤桿菌 JPCC O 種(特開 2008-259449)等。

屬於短波單胞屬類胡蘿蔔素產生細菌而言，例如可舉短波單胞菌 SD212株(特開 2009-27995)、短波單胞菌 FERM P-20515、20516株(特開 2006-340676)、泡囊短波單胞菌(*Brevundimonas vesicularis*)(Gene, Vol.379, p.101-108, 1 Sep 2006)等。

【0020】 又，作為類胡蘿蔔素產生細菌，理想是使用與 16S 核糖體 RNA 對應的 DNA 鹼基序列是與序列編號 9 所記載的 E-396 株的鹼基序列有高相同性的細菌。這裡所謂的鹼基序列的相同性，理想是 95% 以上，較理想是 96% 以上，更理想是 97% 以上，特別理想是 98% 以上，最理想是 99% 以上。

與 16S 核糖體 RNA 對應的 DNA 鹼基序列，意指 16S 核糖體 RNA 的鹼基序列中的 U(尿嘧啶)以 T(胸腺嘧啶)取代的鹼基序列。

【0021】 根據此 16S 核糖體 RNA 鹼基序列的相同性的微生物的分類法，近年來成為主流。以往的微生物的分類法是根據以往的運動性、營養需求性、糖的利用性等菌

學的性質，所以由自然突然變異而發生形質的變化等時，有將微生物分類錯誤的情況。與此相比，根據 16S 核糖體 RNA 鹼基序列是遺傳上極為安定之故，根據其相同性的分類法是比较以往的分類法將其分類的信賴度提高很多。

【0022】 類胡蘿蔔素副球菌 E-396 株的 16S 核糖體 RNA 鹼基序列，與其他的類胡蘿蔔素產生細菌馬氏副球菌 DSM 11574 株、副球菌屬細菌 N-81106 株、海雲台副球菌 BC 74171 株、副球菌屬細菌 A-581-1 株、玉米素副球菌 ATCC 21588 株、及副球菌屬 PC-1 株的 16S 核糖體 RNA 鹼基序列的相同性，各分別為 99.7%、99.7%、99.6%、99.4%、95.7%、及 95.4%，可知這些是在分類學上極為近緣的菌株。因此，這些菌株作為產生類胡蘿蔔素的細菌可說是形成一個群組。因此，這些菌株是在本發明優先使用，可有效率的產生類胡蘿蔔素。

【0023】 本發明中，也可使用類胡蘿蔔素的生產性受改良的公知的變異株。該公知的變異株的例而言，可舉蝦紅素生產能力高的菌株(特開 2001-95500)、選擇性的產生多量的角黃素的菌株(特開 2003-304875)、選擇性的產生多量的玉米黃素及 β -隱黃質的菌株(特開 2005-87097)、選擇性的產生番茄紅素的菌株(特開 2005-87100)。

【0024】 在本發明使用作為親株的類胡蘿蔔素產生細菌的例而舉的 E-396 株，在獨立行政法人製品評估技術基盤機構(NITE)專利生物寄託中心(NITE-IPOD)受國際寄託如下述。

國際寄託當局：獨立行政法人製品評估技術基盤機構
(NITE)專利生物寄託中心

郵遞區號 292-0818 日本國千葉縣木更津市上總鎌足
2-5-8

識別表示：E-396

受託編號：FERM BP-4283

原寄託日：平成 5 年(1993 年)4 月 27 日

【0025】 又，在本發明使用作為親株的類胡蘿蔔素產生細菌的其他例而舉的 A-581-1 株，在上述機關受國際寄託如下述。

識別表示：A-581-1

受託編號：FERM BP-4671

原寄託日：平成 6 年(1994 年)5 月 20 日

【0026】

(2)變異處理及篩選

本發明的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，係於前述親株施行變異處理，在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基及/或 DPS 的第 305 個胺基酸殘基產生變異作為指標而得。

變異處理的方法是能誘發變異則沒有特別的限定，例如，可使用由 N-甲基-N'-硝基-N-亞硝基胍(NTG)及甲磺酸乙酯(EMS)等變異劑的化學的方法、紫外線照射及 X 線照射等物理的方法、由基因重組及轉位子(transposon)等生物學的方法等。接受變異處理的細菌是沒有特別的限定，但以類胡蘿蔔素產生細菌為理想。

又，在本發明中，為了要調製上述的有變異的蛋白質，可在編碼該蛋白質的基因(DNA)導入點突然變異。作為其變異導入方法，有利用 Kunkel 法或 Gapped duplex 法等部位特異性的突然變異誘發法的變異導入用套件，例如可使用 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene 公司製)、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen 公司製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：Takara Bio 公司製)等而實施。又，可使用「Molecular Cloning, A Laboratory Manual (4th edition)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012))等所述的部位特異性的變異誘發等方法。

【0027】 變異株的篩選方法是沒有特別的限定，但使用公知的基因體解析工具 PacBio RS II(Pacific Biosciences 公司製)、MiSeq(Illumina 公司製)等而做基因解析，確認在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基及/或 DPS 的第 305 個胺基酸殘基對應的鹼基序列有無變異即可。

再者，與上述基因體解析平行，例如，由在洋菜培養基上的菌落的色調選擇目的之變異株的方法之外，也可選擇以試管、燒瓶、發酵槽等培養變異株，由利用吸光度、高速液體層析法、薄層層析法等之類胡蘿蔔素色素分析，以類胡蘿蔔素的生產量作為指標。

變異及篩選的製程可為 1 次，又，例如也可由突然變異處理及篩選而得變異株，將其再由變異處理及篩選而取得生產性經改良的變異株，如此將變異及篩選製程重複 2

次以上。

【0028】 如此篩選的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，具有編碼在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸，及/或 DPS 的第 305 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸殘基的胺基酸序列的基因。

由 DXS 的第 225 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸，對 DXS 的酶活性的提高有貢獻。由此，促進由丙酮酸至 1-去氧-D 木酮糖-5-磷酸的合成，甚至提高成為蝦紅素合成的基質的異戊二烯二磷酸(IPP)的生產。

由 DPS 的第 305 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸殘基，對 DPS 的酵素活性的降低有貢獻。此變異抑制由法呢基二磷酸(FPP)至十聚異戊二烯二磷酸(DPP)的合成。由 FPP 至 DPP 的合成使用 IPP，所以由上述變異，用於 DPP 合成的 IPP 的量減少，該 IPP 是被利用作為前述的蝦紅素合成的基質。

【0029】 在這裡，在本發明中，只要是具有編碼下述蛋白質的基因：包含在 DXS 的第 225 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸，及/或在 DPS 的第 305 個胺基酸殘基變異為其他的胺基酸殘基的胺基酸序列，且為具有此等之 DXS 活性的胺基酸序列的蛋白質，及/或包含上述胺基酸序列且為 DPS 活性被降低(抑制)的胺基酸序列的蛋白質，則在該 DXS 及/或 DPS 的胺基酸序列的其他的區域的胺基酸序列中，亦可在 1 個以上的胺基酸殘基發生取代、缺失或附加等變異。

因此，本發明的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，可以含有以下的(a)的基因、以下的(b)的基因、或以下的(a)及(b)的基因的兩者。

【0030】 (a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 DXS 的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因

上述變異型 DXS 基因而言，例如可舉下述者。

(i) 編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在 DXS 的胺基酸序列(例如序列編號 2)中第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列，並且具有 DXS 活性的基因

作為如此的變異型胺基酸序列，可舉序列編號 6 所示者，作為上述基因，可舉序列編號 5 所示者。在本發明中，在序列編號 2 所示的胺基酸序列中，第 225 個胺基酸殘基的甘胺酸經天門冬胺酸取代的胺基酸序列為理想。

(ii) 包含有在 DXS 的胺基酸序列(例如序列編號 2)中第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代，並且該第 225 個胺基酸殘基以外的 1 個或複數(例如 1 至數個)個胺基酸殘基經缺失、取代或附加的變異型胺基酸序列，並且具有 DXS 活性的蛋白質

(iii) 包含 DNA 的基因，該 DNA 包含序列編號 5 表示的鹼基序列

(iv) 包含 DNA 的基因，該 DNA 編碼和包含與序列編號 5 表示的鹼基序列的 DNA 為互補的鹼基序列而成的 DNA

在嚴苛的條件下雜交，並且具有 DXS 活性的蛋白質

上述序列編號 5 表示的鹼基序列係編碼蛋白質者，該蛋白質包含有在類胡蘿蔔素產生細菌之編碼 DXS 的胺基酸序列的 DNA(序列編號 1)中，第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的胺基酸序列。

【0031】 (b)編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 DPS 胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列如此的基因而言、例如可舉下述者。

(i) 編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在 DPS 的胺基酸序列(例如序列編號 4)中第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列，並且降低 DPS 活性作為如此的變異型胺基酸序列，可舉序列編號 8 所示者，作為上述基因，可舉序列編號 7 所示者。本發明中，在序列編號 4 所示的胺基酸序列中，第 305 個胺基酸殘基的丙胺酸經纈胺酸取代的胺基酸序列為理想。

(ii) 包含有在 DPS 的胺基酸序列(例如序列編號 4)中第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代，同時該第 305 個胺基酸殘基以外的 1 個或複數個(例如 1 至數個)胺基酸殘基有缺失、取代或附加的變異型胺基酸序列，並且 DPS 活性降低的蛋白質

(iii) 包含 DNA 的基因，該 DNA 包含序列編號 7 表示的鹼基序列

(iv) 包含 DNA 的基因，該 DNA 編碼和包含與序列編

號 7 表示的鹼基序列的 DNA 互補的鹼基序列的 DNA 在嚴苛的條件下雜交，並且降低 DPS 活性的蛋白質

上述序列編號 7 表示的鹼基序列係編碼蛋白質者，該蛋白質包含有在類胡蘿蔔素產生細菌中編碼 DPS 的胺基酸序列的 DNA(序列編號 3)中，第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的胺基酸序列。

【0032】 在這裡，雜交可遵照公知的方法(例如，Sambrook J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (4th edition)(Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012))實施。高嚴苛的條件是指形成所謂特異性的雜交，不會形成非特異性的雜交的條件而言，例如，鈉濃度在 10 mM 至 300 mM，理想是 20 mM 至 100 mM，溫度是 25℃ 至 70℃，理想是 42℃ 至 55℃ 的條件之謂。

【0033】 作為如此的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，例如可舉 ASB-57 株、ASK-8 株、ASH-66 株等。

ASB-57 株具有編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含 DXS 的第 225 個胺基酸殘基的甘胺酸變異為天門冬胺酸，DPS 的第 305 個胺基酸殘基的丙胺酸變異為纈胺酸的胺基酸序列。將 ASB-57 株中的 DXS 的胺基酸序列及基因的鹼基序列各分別表示在序列編號 6、5。又，將 ASB-57 株中 DPS 的胺基酸序列及基因的鹼基序列各分別表示在序列編號 8、7。

【0034】

(4)基因重組物的製作

在本發明中，將編碼上述變異型 DXS 的基因，及/或編碼上述變異型 DPS 的基因導入宿主進行形質轉換，而可得基因重組型的變異型類胡蘿蔔素產生細菌。

將變異型 DXS 基因及/或變異型 DPS 基因導入載體而得重組載體，以及將該重組載體導入宿主所得的形質轉換體，可採用任意的公知方法，例如，可遵照 Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (4th edition) (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012))而實施。

將上述 DXS 基因及 DPS 基因以基因工學的方式合成時，首先，設計合成編碼該酵素的 DNA。DNA 的設計及合成，例如，含有全長的基因的載體等作為鑄模，使用為合成所求的 DNA 區域而設計的引子(primer)，由 PCR 法而可實施。然後，將上述 DNA 與適當的載體連結而得蛋白質表現用重組載體，將此重組載體導入宿主而使目的基因表現而得形質轉換體(Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*(4th edition)(Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)))。

載體係使用在宿主微生物中可自律性的增殖的噬菌體或質體。再者，也可使用動物病毒、昆蟲病毒載體。重組載體的製作是將精製過的 DNA 以適當的限制酶切斷，插入於適當的載體 DNA 的限制酶部位等而與載體連結即可。使用於形質轉換的宿主而言，能表現目的基因者則沒有特定的限定。例如，可舉細菌(枯草菌、副球菌屬(*Paracoccus*)細菌等)、酵母、動物細胞(COS 細胞、CHO 細胞等)、植物

細胞、昆蟲細胞或昆蟲。對宿主的重組載體的導入方法是公知的。

又，對基因的變異的導入方法，與前述相同。

【0035】

(3)類胡蘿蔔素的生產

本發明中，由將上述的類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體以規定的培養基培養，而可使高濃度的類胡蘿蔔素安定的生產。

所產生的類胡蘿蔔素是沒有特別的限定，例如，蝦紅素、角黃素、玉米黃素、 β -隱黃質、番茄紅素、 β -胡蘿蔔素、金盞花紅素、側金盞花黃質、海膽烯酮、海星酮或3-羥基海膽烯酮，理想是蝦紅素、角黃素、玉米黃素或 β -隱黃質，較理想是蝦紅素或玉米黃素。由本發明製造的類胡蘿蔔素可為一種也可以，亦可為複數種組合。

【0036】 以下說明本發明之培養變異型類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體的方法。

【0037】 在本發明的培養所使用的類胡蘿蔔素生產用培養基，可添加類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體能生育、生產類胡蘿蔔素者的任意成分。含有這種添加物的培養基可為任一種，但使用含有碳源、氮源、無機鹽類及必要時的維生素類等的培養基為理想。

【0038】 碳源而言，例如，可舉葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、繭糖、甘露糖、甘露糖醇及麥芽糖等糖類，乙酸、富馬酸、檸檬酸、丙酸、蘋果酸、丙二酸及丙酮酸等

有機酸，乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、己醇、異丁醇及甘油等醇類，大豆油、米糠油、橄欖油、玉米油、胡麻油及亞麻仁油等油脂類等，其中尤其理想是使用葡萄糖或蔗糖。這些的碳源之中，可使用 1 種或 2 種以上。添加於培養前的培養基(起始培養基)的量是隨碳源的種類而有不同但可適宜調整，通常，每 1L 培養基 1 至 100g，理想是 2 至 50g。又，碳源不僅是添加在起始培養基，較佳亦可進行在培養中途逐次的或連續的追加供給。

【0039】 氮源而言，作為無機鹽，在硝酸銨、硫酸銨、氯化銨、磷酸銨等銨鹽類，硝酸鉀等的硝酸鹽類，氨及尿素等之中，使用 1 種或 2 種以上。添加量是隨氮源的種類而有不同但可適宜調整，通常，對培養基 1L 為 0.1g 至 20g，理想是 0.2 至 10g。

又，有機氮源而言，例如，玉米浸液(包含過濾處理物)，PHARMAMEDIA™、大豆粕、大豆粉、花生粕、大豆蛋白腴、可溶酒糟(distiller' s solubles)、乾燥酵母、酵母萃取物、酪蛋白胺基酸(casamino acid)、麩胺酸、天門冬胺酸等之中，使用 1 種或 2 種以上。添加濃度是隨氮源的種類而有不同但可適宜調整，通常，0 至 80g/L，理想是 1 至 30g/L。

【0040】 無機氮源及有機氮源，通常添加於起始培養基，較佳亦可進行逐次或連續的追加供給。

無機鹽類而言，例如，磷酸二氫鉀、磷酸氫二鉀、磷酸氫二鈉等磷酸鹽類，硫酸鎂、氯化鎂等鎂鹽類，硫酸鐵、

氯化鐵等鐵鹽類，氯化鈣、碳酸鈣等鈣鹽類，碳酸鈉、氯化鈉等鈉鹽類，硫酸錳等錳鹽類，硫酸銅等銅鹽類，硫酸鋅等鋅鹽類，鉬酸鈉等鉬鹽類，硫酸鎳等鎳鹽類，硒酸鈉等硒鹽類，鎢酸鈉等鎢鹽類，氯化鋁等鋁鹽類，氯化鉻等鉻鹽類，硼酸及碘化鉀等之中，使用 1 種或 2 種以上。添加量是隨無機鹽的種類而有不同但可適宜調整，通常，對培養基 1L 為 0.0001 至 15g。在磷酸鹽類、鎂鹽類、鈣鹽類、鈉鹽類及鐵鹽類，0.02 至 15g/L 為理想，添加錳鹽類、銅鹽類、鋅鹽類、鉬鹽類、鎳鹽類、硒鹽類、鎢鹽類、鋁鹽類、鉻鹽類、硼酸、碘化鉀等時，0.1 至 15mg/L 為理想濃度。無機鹽類通常添加於起始培養基，亦可逐次或連續的追加供給。

【0041】 維生素類而言，例如，可使用氰鈷胺、核黃素、泛酸、吡哆醇、噻胺、抗壞血酸、葉酸、菸鹼酸、p-胺基安息香酸、生物素、肌醇、膽鹼等。添加比率是隨維生素類的種類而有不同但可適宜調整，通常，對培養基 1L 為 0.001 至 1000mg，理想是 0.01 至 100mg。維生素類通常添加於起始培養基，亦可逐次或連續的追加供給。

【0042】 本發明中，為了抑制培養液的發泡較佳使用消泡劑。消泡劑的種類只要有抑制泡的發生或消除發生的泡的作用，並且對產生細菌的抑制作用的少者則任一種都可以。例如可例示，醇系消泡劑、聚醚系消泡劑、酯系消泡劑、脂肪酸系消泡劑、矽氧烷系消泡劑、磺酸系消泡劑等。添加量是隨消泡劑的種類而有不同但可適宜調整，

通常，對培養基 1L 為 0.01g 至 10g。

【0043】 消泡劑通常添加於殺菌前的起始培養基。再者，亦可在培養中途連續性的或間歇性的追加。在培養中途添加消泡劑的方法而言，可例示以感測器感知泡而自動添加的方法、以程序定時計在一定時間添加的方法、以與生育速度連動之方式與加料用碳源、氮源或 pH 調整劑等混合而添加的方法等。添加於起始培養基的消泡劑與在培養中途添加於培養液的消泡劑可為同種，但配合作用亦可使用不同種類。

【0044】 本發明中，培養基的初期 pH 調整為 2 至 12，理想是 6 至 9，較理想是 6.5 至 8.0。在培養中也維持上述範圍的 pH 為理想。pH 調整劑而言，可例示氫氧化鈉水溶液、氫氧化鉀水溶液、碳酸鈉水溶液、氨水、氨氣、硫酸水溶液或這些的混合物。

本發明中，培養基是經滅菌處理後，用於細菌的培養。滅菌處理，如是本行業者，則可適宜實施，例如，在適當的容器中的培養基以高壓釜加熱滅菌即可。或者，以滅菌過濾器過濾滅菌即可。

【0045】 本發明的變異型類胡蘿蔔素產生細菌或物質轉換體，在如上述的方式調製的培養基植菌，以規定的條件培養。植菌是使用試管、燒瓶或發酵槽等藉由種培養而適宜增加菌株，將所得的培養液添加於類胡蘿蔔素生產用培養基而實施。使用於種培養的培養基，如類胡蘿蔔素產生細菌可良好增殖的培養基則沒有特別的限定。

【0046】 培養是在適當的培養容器中實施。培養容器是依培養容量而可適宜選擇，例如，可舉試管、燒瓶、發酵槽等。

培養溫度是 15 至 40℃，理想是 20 至 35℃，較理想是 25℃ 至 32℃，通常是 1 日至 18 日，理想是 2 至 12 日，較理想是 3 至 8 日，在好氣條件實施培養。好氣條件而言，例如，可舉振盪培養或通氣攪拌培養等，將溶存氧濃度調控在一定的範圍為理想。溶存氧濃度的調控，例如，可藉由改變攪拌迴轉數、通氣量、內壓等而實施。溶存氧濃度理想是調控制在 0.3 至 10ppm，較理想是 0.5 至 7ppm，更理想是 1 至 5ppm。

【0047】 本發明的變異型類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體經培養後的類胡蘿蔔素產生細菌的菌體數或形質轉換體數可藉由 OD 測定。又，由培養類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體所得的培養物中的類胡蘿蔔素、或培養物採取的類胡蘿蔔素的定量，可藉由高速液體層析法實施。如上述的方式培養類胡蘿蔔素產生細菌或形質轉換體之後，可由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。

培養物，例如，可舉培養液、培養上清液、菌體濃縮液、濕菌體、乾燥菌體、菌體溶解物等。培養上清液是將培養液以離心處理或過濾處理，由培養液除去菌體而調製即可。菌體濃縮液可將培養液藉由離心分離或膜過濾濃縮而得。濕菌體可將培養液藉由離心或過濾而得。乾燥菌體可將濕菌體或菌體濃縮液經由一般性的乾燥方法乾燥而

得。如此所得的含有類胡蘿蔔素的乾燥菌體可直接使用作為飼料添加物。

【0048】 發酵培養時的收量，至少是 150mg/L，例如含有 150mg/L、400mg/L、2000mg/L、4000mg/L 的類胡蘿蔔素。隨所使用的菌體而培養液中所含的類胡蘿蔔素的量變動，但例如含有 400mg/L 至 4000mg/L，更理想是含有 500mg/L 至 3500mg/L 的類胡蘿蔔素。

本發明的細菌，比不具有編碼包含 DXS 及/或 DPS 的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生量，至少有 5 倍，理想是 10 倍以上的量的產生能力。

【0049】 本發明中由上述培養物採取類胡蘿蔔素的方法是沒有特別的限定，能將類胡蘿蔔素安定而有效率的回收的任何方法都可以。這些方法，如是本行業者則可由公知的萃取、精製技術適宜選擇而實施。又，在本發明中，也可將上述培養物使用作為含有類胡蘿蔔素的組成物。

實施萃取之前，亦可將培養物以使用鹼試藥或界面活性劑等化學的處理，使用溶菌酶、脂質分解酶及蛋白質分解酶等生化學處理，或使用超音波或粉碎等的物理的處理之中，實施 1 種或 2 種以上的處理。

例如，將類胡蘿蔔素由培養物萃取時，用於萃取及清洗的溶媒是沒有特別的限定，但可舉甲醇、乙醇、異丙醇等低級醇類，丙酮、四氫呋喃、甲基乙基酮、甲基異丁基酮、二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基甲醯胺、二甲基亞碸等。

【0050】 想要極力防止萃取操作中的類胡蘿蔔素的氧化時，在氮氣等惰性氣體環境中處理即可。又，亦可選擇醫藥品或食品所使用的氧化防止劑添加於萃取溶媒。或者，亦可組合這些處理。又，為了極力防止因光的類胡蘿蔔素的分解，亦可在不照光的條件下實施。

如此所得的萃取物可直接使用作為類胡蘿蔔素，亦可再精製而使用。

【0051】 分離殘留在萃取操作後的萃取物的細菌等的方法是沒有特別的限定，但可使用膜濾過、離心分離、傾析等。

由萃取液取得類胡蘿蔔素沉澱物的方法而言，一般的是可舉加熱及/或減壓濃縮或晶析。此外，也可在低溫藉由類胡蘿蔔素色素的析出、由酸·鹼藥劑或各種鹽類的析出，不濃縮類胡蘿蔔素色素而分離。工業上使用時，實施晶析為理想。

【0052】 所得的類胡蘿蔔素沉澱物是，為了清洗必要時亦可使用少量的低級醇類等溶媒使其懸濁攪拌。清洗的手法是沒有特別的限定，但例如，將懸濁攪拌後濾取的方法或由沉澱物之上通液的方法等在實用上可舉為理想的方法。

如上述的方式所得的培養物、萃取物或精製物，可各分別單獨使用作為類胡蘿蔔素，也可將這些以任意的比率混合而使用。

【0053】

2. 參與蝦紅素合成途徑的酵素的立體構造解析

為了顯示前述 DXS 的第 225 個胺基酸殘基，及 DPS 的第 305 個胺基酸殘基的變異對類胡蘿蔔素合成扮演重要的角色，可實施這些的酵素的立體構造解析。

本發明中，鑑定蝦紅素合成途徑上的酵素 2 種(稱為酵素 A、酵素 C)的點變異。蝦紅素的產生的增加，可推想是在這些的酵素發生的變異為原因，將變異經鑑定的酵素 2 種構築立體構造模型，推論由變異的胺基酸取代的影響。

【0054】 酵素 A 推論為 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶(DXS)。經鑑定的胺基酸的變異 G225D，在活性部位的近旁的位置的紊亂區域。由立體構造模型，酵素 A 的變異 G225D，推測與已知使 DXS 活性提高的既知的紊亂區域的變異，在酵素 A 引起同樣的構造變化，預測變異 G225D 酵素的酵素活性提高。考慮 DXS 因 IPP 的回饋抑制而受到調控，則在變異 G225D 酵素中，回饋抑制變成無效，暗示 IPP 的產生量增加。咸信由酵素 A 的變異 G225D，蝦紅素的原料的 IPP 的供給量增加，是蝦紅素產生量的增加的主要原因。

【0055】 酵素 C，推論是十聚異戊二烯二磷酸合成酶。由立體構造模型，推論經受鑑定的變異 A305V，與周邊的胺基酸殘基引起立體障礙，不安定化酵素 C 的立體構造。酵素 C 的基質的十聚異戊二烯二磷酸的原料的 FPP 及 IPP，也是蝦紅素合成的原料。由於不安定化而酵素 C 的活性降低，暗示由酵素 C 所消費的 FPP 及 IPP 的量減少。其

結果，可用於蝦紅素合成的 FPP、IPP 的量增加，咸信蝦紅素的產生量增加。

【0056】 如以上所述，這次經鑑定的變異對蝦紅素合成途徑產生的效果，推論有因酵素 A 的活性提高的 IPP 產生量的增加，及因酵素 C 的活性減少而對蝦紅素合成途徑的 IPP 供給量的增加之 2 者。咸信這些效果是蝦紅素產生量增加的主要原因。

【0057】

(實施例)

以下，由實施例將本發明再具體的說明。但，本發明的範圍不受這些的實施例所限定。

[實施例 1]

【0058】

(1)副球菌屬細菌的變異處理及基因體解析

變異處理方法

對親株(E-396 株)使用 UV 及 NTG(亞硝基胍)等作為變異源，使用種種選汰壓力而實施數次的篩選。篩選是以蝦紅素的收量作為指標而實施。

基因體解析法

基因體解析是使用 PacBio RS II (Pacific Biosciences 公司製)及 MiSeq(Illumina 公司)的序列分析儀，讀出基因體序列後，使用 SMART Cell 8 Pac V3(Pacific Biosciences 公司製)，及 MiSeq Control Software(MCS) v2.4.1.3、Real Time Analysis (RTA) v1.18.54, bcl2fastq v 1.8.4 (Illumina 公司)等

解析軟體進行。

【0059】

基因體解析結果(變異部位的鑑定)

變異部位的鑑定，可想是持有這些基因體解析結果的變異點的蛋白質的區域的胺基酸序列，與在 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)所收錄的酵素基因胺基酸序列之間相同性高者之中，細查出包含在副球菌屬者，再者，由這些的資訊進行酵素的立體構造解析，找出與序列有一致的模板，決定持有變異部位的蛋白質的胺基酸序列的最終的酵素名。

【0060】

(2)蝦紅素的收量

(i) 培養條件

試管衝程 - 330rpm、28℃、pH7.2、培養基量 8ml/支

培養時間 - 72 小時。

培養基 -

將以下的組成的培養基 8mL 裝入於內徑 18mm 的附綿栓的試管，在 121℃ 高壓釜滅菌 15 分鐘，而調製種用試管培養基。種用試管培養基的原料是使用有確認菌體充分生育的批次。

蔗糖	30g/L
玉米浸液	30g/L
磷酸二氫鉀	1.5g/L
磷酸氫二鈉 12 水合物	3.8g/L

氯化鈣 2 水合物	5.0g/L
硫酸鎂 7 水合物	0.7g/L
硫酸鐵 7 水合物	1.0g/L
pH7.2	

【0061】 其次將以下的組成的培養基 7.2mL 裝入於內徑 18mm 的附綿栓試管的生產用試管培養基，準備 5 支。生產用試管培養基的原料是使用確認菌體不充分生育的批次。

葡萄糖	30g/L
玉米浸液過濾處理物	30g/L
硫酸銨	1.5g/L
磷酸二氫鉀	1.5g/L
磷酸氫二鈉 12 水合物	3.8g/L
氯化鈣 2 水合物	5.0g/L
硫酸鎂 7 水合物	0.7g/L
硫酸鐵 7 水合物	1.0g/L
矽氧烷系消泡劑	0.2g/L

【0062】

(ii) 結果

將各株的比生產性示於第 1 圖。

由本實施例，取得與 E-396 株比較有 10 倍以上的類胡蘿蔔素產生能力的 ASB-57 株。

[實施例 2]

參與蝦紅素合成途徑的酵素的立體構造解析

【0063】

1.立體構造數據及手法

酵素 A、酵素 C 的立體構造模型是由同源模擬法(homology modeling)構築。模擬是使用軟體工具 Swiss-Pdb viewer 及 SWISS-MODEL [1, 2]。變異體模型是由 Swiss-Pdb viewer 製作。胺基酸殘基的取代是使用 mutate 指令，分子內能量的算出是使用 compute energy 指令，又，能量最小化計算是使用 energy minimization 指令。與基質等的複合體模型的製作、基質附近殘基的檢出、原子間距離的測定、立體構造的表示，是使用軟體工具 Waals(Altif Labs. Inc.)進行。低分子化合物的立體構造模型是由 MarvinSketch (ChemAxon Ltd.)製作。

【0064】 模板構造的立體構造的座標數據，由蛋白質立體構造數據庫的 Protein Data Base (PDB)([http : //www.rcsb.org/ pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/))取得。模板構造是，在登錄於 PDB 的數據之中，使用與酵素 A、酵素 C 各分別胺基酸一致度最高者。將作為同源模擬法的模板而使用的立體構造數據示於第 1 表。

[第 1 表]

第 1 表 使用於同源模擬法的立體構造數據

酵素	PDB ID	蛋白質	文獻
酵素 A	201X	1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶	[3]
酵素 C	3MZV	十聚異戊二烯二磷酸合成酶	[4]

【0065】

2. 酵素 A 的立體構造模型的構築及變異體的解析

酵素 A 是將成為蝦紅素合成原料的異戊二烯二磷酸 (IPP) 生合成的類異戊二烯 (isoprenoid) 生合成途徑之一的去氧木酮糖途徑中，由丙酮酸及 D-甘油醛三磷酸，合成 1-去氧-D 木酮糖 5 磷酸的，1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶：1-deoxy-D-xylurose-5-phosphate synthase (DXS)。

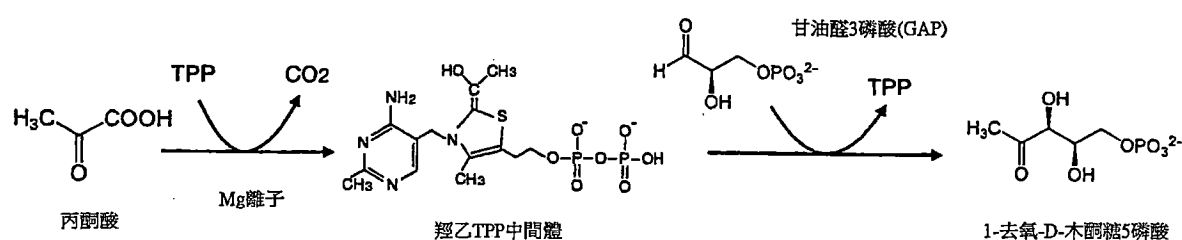
【0066】 由所構築的酵素 A 的立體構造模型，知悉由基因體解析受鑑定的變異 G225D，如有多數報告的產生變異則 DXS 的酵素活性提高的例，在活性部位附近的紊亂區域。由變異體模型的解析結果，推知酵素 A 的變異 G225D，與會提高 DXS 的活性的已知變異，引起同樣的構造變化，預測變異 G225D 酵素也與已知變異同樣，提高 DXS 的酵素活性。由於 DXS 的活性提高，隨著蝦紅素的原料的 IPP 的供給量增加，可信蝦紅素的產生量增加。

【0067】

2.1. 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的酵素反應

酵素 A、1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶：1-deoxy-D-xylurose-5-phosphate synthase (DXS)，由丙酮酸及 D-甘油醛三磷酸，在鎂離子 (Mg) 存在下，合成 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸。觸媒反應，必須有做為輔酶的噻胺焦磷酸 (Thiamine pyrophosphate, TPP)，首先，輔酶 TPP 附加於基質的丙酮酸，產生羥乙基-TPP 中間體。此中間體與甘油醛三磷酸反應而生成 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸。下面表示酵素

A 的酶反應。



【0068】

2.2. 酵素 A 的立體構造模型的構築

(1) 由同源模擬法的酵素 A 的立體構造模型的構築

酵素 A 的立體構造模型，根據有輔酶 TPP 與複合體的立體構造由 X 線結晶構造解析而決定的源自抗輻射奇異球菌 (*Deinococcus radiodurans*) (*D. radiodurans*) 的 1-去氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (DXS、模板) 的立體構造 (PDB ID: 2O1X) [3](第 2 圖)，由同源模擬法構築。

【0069】 同源模擬法是根據酵素 A 及模板構造的立體構造對準而進行(第 3A、3B 圖)。

酵素 A 與源自抗輻射奇異球菌 DXS 的胺基酸一致度是 44.1%。在模板的 DXS 的立體構造，胺基酸編號 199 至 242 殘基的區域(44 殘基)是紊亂，由 X 線結晶構造解析不能特定原子的位置。因此，除去相當於酵素 A 的紊亂區域的 196 至 238 殘基(43 殘基)，而構築胺基酸殘基編號 7 至 630 殘基的立體構造模型。其次，由酵素 A 的立體構造模型與模板構造重疊，將 TPP 及 Mg 嵌入，而製作酵素 A 與 TPP 的複合體模型。在第 4 圖顯示模板構造及所構築的模型構造。

酵素 A，與模板構造同樣，形成同型二聚體，在各分

別的次單元持有 TPP 鍵結部位及基質鍵結部位。酵素 A 的單體，由域 I(1 至 319 殘基)、域 II(320 至 495 殘基)、域 III(496 至 629 殘基)的 3 個域所構成。

【0070】

(2) 酵素 A 的基質複合體模型的製作

為了要推測參與酵素 A 的基質鍵結的胺基酸殘基，而構築基質與酵素 A 鍵結的複合體模型。在模板構造的 201X 中，不能確定基質的丙酮酸及甘油醛 3 磷酸的座標，所以首先，為了檢出丙酮酸鍵結部位，將在輔酶 TPP 經附加丙酮酸的羥乙基-TPP 中間體的複合體模型，根據類似的源自釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)(*S. cerevisiae*)的轉酮醇酶 Transketolase(TK)與羥乙基-TPP 中間體鍵結的立體構造(PDB ID: 1GPU)[6]，藉由重疊，將羥乙基-TPP 中間體嵌入，而製作複合體模型。同樣根據源自釀酒酵母的 TK 與赤藻糖-4-磷酸的立體構造(PDB ID: 1NGS)[7]，將赤藻糖-4-磷酸嵌入，再由赤藻糖-4-磷酸製作甘油醛 3 磷酸模型，而製作酵素 A 與甘油醛三磷酸的複合體模型。

在第 5 圖顯示酵素 A 與基質複合體的模型構造。

【0071】

2.3. 酵素 A 的活性部位的推測

為了要推定與輔酶及基質鍵結的胺基酸殘基，在酵素 A 與輔酶的複合體模型中，調查 TPP 中間體、GAP 及 Mg 的相互作用。

【0072】

(1) 輔酶 TPP 的鍵結部位

在酵素 A 與 TPP 的複合體模型，與模板構造同樣，TPP 是在域 I 及域 II 之間的位置，TPP 的嘧啶環是在域 II 鍵結，磷酸基是在域 I 鍵結。

【0073】 TPP 是由胺基嘧啶(aminopyrimidine)環、噻唑啉(thiazoline)環、焦磷酸所構成(第 6 圖)。胺基嘧啶環是酵素 A 的鍵結口袋的內部剛好收進去的方式鍵結。Phe396 及 Ile369 的側鏈，將胺基嘧啶環由兩側挾住一樣的以疏水性相互作用而鍵結。尤其是可推測 Phe396 側鏈的環狀苯基與胺基嘧啶環是 π 堆疊的強鍵結。Gly120 主鏈的氧與 Glu371 側鏈的氧是與胺基嘧啶環的 1 位的氮原子形成氫鍵結。TPP 的嘧啶環的 1 位的氮原子與 Glu 殘基的氫鍵結，對經由 TPP 的觸媒反應是重要的，已知由將 TPP 作為輔酶而使用的酵素所保存。Arg399 的側鏈，不只是疏水性鍵結，可推測與周邊的胺基酸殘基 Glu371、Ser122 的側鏈的氫鍵結，形成鍵結口袋。與噻唑啉環的相互作用而言，看到與 Ile184、Ile369 的疏水性鍵結。與焦磷酸的相互作用而言、Gly152 主鏈、Lys285 側鏈及 His79 側鏈之間推測有氫鍵結。

【0074】 在輔酶 TPP 的鍵結需要 Mg。Mg 配位在 TPP 的 2 個磷酸基之間，推測 Asp151 與 Asn180 的側鏈及 Met182 的主鏈與 Mg 鍵結。關於 DXS 是已知作為 TPP 鍵結模式，而 GDGX25-30N 的序列受保存 [3]。在酵素 A 推測有 Mg 鍵結的含有 Asp151 及 Asn180 的胺基酸序列 Gly150-Asp151-Gly152-Asn180 的序列，與此模式吻合。

【0075】 如以上所述，TPP 的胺基嘧啶環及噻唑啉環的碳，推測與酵素 A 的疏水性殘基 Ile184、Ile369、Phe396、Arg399 之間有疏水性相互作用。又，胺基嘧啶環的 2 個氮原子推測與 Gly120、Glu371 形成氫鍵結。與焦磷酸之間除 His79、Gly152、Lys285 的氫鍵結之外，推測由 Asp151、Asn180、Met182 有經由 Mg 的氫鍵結。在第 7 圖顯示推測參與 TPP 的鍵結的胺基酸殘基。

【0076】

(2) 與丙酮酸的相互作用

基質的丙酮酸與 TPP 反應，成為羥乙基-TPP 中間體。由酵素 A 與羥乙基-TPP 中間體的複合體模型，作為與源自丙酮酸的羥乙基的相互作用，而推測與 Val77 的疏水性相互作用及與 His432 的氫鍵結。可想這些胺基酸殘基有參與丙酮酸的鍵結。在第 8 圖顯示推測與羥乙基有相互作用的胺基酸殘基。

【0077】

(3) 與甘油醛 3 磷酸的相互作用

作為與基質的甘油醛 3 磷酸(GAP)有相互作用的胺基酸殘基，而推測與 His48、Tyr393、Arg421、Asp428、Arg479 的氫鍵結(第 9 圖)。

His48 及 Asp428 是與 GAP 的醛形成氫鍵結。Tyr393、Arg421、Arg479 是推測與 GAP 的磷酸基形成氫鍵結。

【0078】 以上，將所推測的活性部位示於第 2 表至第 4 表。

[第 2 表]

第 2 表. 推測與在酵素 A 檢出的羥乙基-TTP 中間體有相互作用的胺基酸殘基

羥乙基-TTP	酵素_A		相互作用
胺基-嘓啶	Gly120	主鏈	氫鍵
	Ile369	側鏈	疏水性相互作用
	Glu371	側鏈	氫鍵
	Phe396	側鏈	疏水性相互作用
	Arg399	側鏈	疏水性相互作用
噻唑鎢	Ile184	側鏈	疏水性相互作用
	Ile369	側鏈	疏水性相互作用
PO4	His79	側鏈	氫鍵
	Gly152	主鏈	氫鍵
	Lys285	側鏈	氫鍵
Mg	Asp151	側鏈	氫鍵
	Asn180	側鏈	氫鍵
	Met182	主鏈	氫鍵
羥乙基	Val77	側鏈	疏水性相互作用
	His432	側鏈	氫鍵

[第 3 表]

第 3 表. 推測在酵素 A 檢出的甘油醛 3 磷酸有相互作用的
胺基酸殘基

GAP	酵 素 _A		相 互 作 用
甘 油 醛	His48	側 鏈	氫 鍵
	Asp428	側 鏈	氫 鍵
PO4	Tyr393	側 鏈	氫 鍵
	Arg421	側 鏈	氫 鍵
	Arg479	側 鏈	氫 鍵

[第 4 表]

第 4 表. 推測在酵素 A 的鍵結部位的胺基酸殘基

結合位點	殘基
TTP	His79
	Gly120
	Gly152
	Ile184
	Lys285
	Ile369
	Glu371
	Phe396
	Arg399
Mg	Asp151
	Asn180
	Met182
丙酮酸	Val77
	His432
GAP	His48
	Asp428
	Tyr393
	Arg421
	Arg479

【0079】 又，將酵素 A 與輔酶 TPP 的鍵結樣式、酵
素 A 與丙酮酸的鍵結樣式、酵素 A 與甘油醛 3 磷酸的鍵結
樣式的圖各分別示於第 6 圖、第 10 圖、第 11 圖。

酵素 A 是，由於保持模板的源自抗輻射奇異球菌的
DXS 而已明瞭的輔酶的 TTP、基質的丙酮酸及 GAP 鍵結的

活性部位，因而推測具有 DXS 的酵素活性。這些胺基酸殘基，源自抗輻射奇異球菌的 DXS 之外，在大腸菌等的 DXS 及源自釀酒酵母的 TK 中的保存性也高，是已知的[3]。

【0080】 在大腸菌 DXS，已知如將酵素 A 的相當於 Glu370、Arg399、Arg479 的胺基酸殘基經 Ala 取代，則失去活性[3]。又，在文獻[8]，有說明在由大腸菌 DXS 的相當於酵素 A 的 His48、Glu371、Asp428 的胺基酸殘基使其變異的實驗，各個都使酵素活性大概失去活性。酵素 A 中也可推測這些的胺基酸殘基是對 DXS 的活性是重要的。

【0081】

2.4. 酵素 A 的變異 G225D 的影響

酵素 A 的變異 G225D 是存在於立體構造不能特定的紊亂區域(196 至 238 殘基)。為了推測此變異對酵素 A 的立體構造給予的影響，調查以往的知識見解及立體構造上的紊亂區域的位置與活性部位的關連。

【0082】

(1) 關於既知的紊亂區域的變異

以往，對於圓葉葡萄(muscat)及大腸菌的 DXS，有報告在其紊亂區域發生的變異，各分別在 2 處、計 4 種都使酶活性增加。

有報告指出，在源自圓葉葡萄(*Vitis vinifera*)的 DXS 中，K284N 的變異與野生型比較時， V_{max} 及 K_{cat}/K_m 帶來約 2 倍的活性增大，由於過多呈現，單萜的產生量大幅度增加[9]。

【0083】 又，圓葉葡萄中 K284N 及 R306C 的變異，已知與大腸菌中 K213N 及 K234C 的變異有關的發明(特表 2014-500710、US20130276166)。此發明是關於藉由 DXS 的活性提高而增加萜的產生量的方法，4 例的各者都由各分別的一殘基的變異而增加萜的產生量。

【0084】 在第 12 圖顯示在酵素 A 及大腸菌及圓葉葡萄的 DXS 的酶活性增加的變異的位置。

圓葉葡萄的 K284N 及 R306C、大腸菌的 K213N 及 K234C，各者都存在於紊亂區域(藍)。酵素 A 的變異 G225D 也與這些一樣存在於紊亂區域。由胺基酸序列的對準，推測有保存 DXS 的活性部位(綠)，酵素 A 也與這些的 DXS 持有同樣的反應樣式。又，在紊亂區域的 N 末端側(洋紅)，有活性部位的存在。

【0085】 如以上所述，在 DXS 的紊亂區域有提升 DXS 酵素活性的變異為複數個存在，在本區域導入變異，推測對 DXS 的活性多少有某些影響。

【0086】

(2) 酵素 A 的變異 G225D(紊亂區域)在立體構造中的位置

在第 13 圖以藍色的點線顯示酵素 A 的變異 G225D 存在的紊亂區域(196 至 238 殘基)位置。

本區域位置在於對 DXS 的活性是必須的輔酶 TPP 的鍵結部位附近。在本區域的 N 末端側的環(洋紅)有活性部位的 Asn180、Met182 及 Ile184 存在。Asn180 的側鏈及 Met182 的主鏈鍵結 Mg。Ile184 的側鏈與 TPP 為疏水性鍵結。對

DXS 的活性是必須的 TPP 與 Mg 鍵結，可想此環取適當的構造是重要的。在文獻[9]中，生理的角色是不明，但有考察本區域存在於活性部位的附近，本區域內的變異是否合理的影響酵素的活性。如第 12、13 圖所示，本區域在胺基酸序列上及立體構造上，都存在於 TPP 鍵結部位的附近，所以本區域的變異對這些的活性部位給予影響，可想確實有可能發生的。

【0087】

(3) 酵素 A 的紊亂區域的模式及變異 G225D 酵素的製作

其次，為了要調查酵素 A 的變異 G225D 對紊亂區域的立體構造所給予的影響，而製作酵素 A 的 196 至 238 殘基(43 殘基)的紊亂區域的模型構造。在報告圓葉葡萄的變異 K284N 的文獻[9]中，對於圓葉葡萄 DXS 的紊亂區域，製作模式，查看由變異引起的靜電電位的變化。為了做為參考起見，對於酵素 A 也做同樣的解析。由同源模擬法，基於與酵素 A 的紊亂區域的相同性高的胺基酸序列的片段構造而製作立體構造模型。作為模板構造，使用登錄在 PDB 的立體構造之中有最高的胺基酸一致度(34%)的 1AL7 的片段。紊亂區域是推測有搖動的構造，但可想本區域作為容易形成摺疊(folding)而言是可供參考的。將所製作的模型顯示於第 14 圖(左)。

.....【0088】 再者，將變異處的 Gly225 取代為 Asp 而製作變異 G225D 酵素的立體構造模型。Gly225 位置在表面，因取代為 Asp 而 Asp 的側鏈在表面露出。將在所製作的立

體構造模型的表面形狀測繪靜電電位圖的結果顯示於第 14 圖(右)。藍色表示 positive(正電荷)區域，紅色表示 negative (負電荷)的區域。

【0089】 野生型中，有強的正電荷的區域存在，但可確認在變異 G225D 酵素中正電荷減弱，而負電荷增強。野生型中，持有正電荷的 Arg227、Arg228、Lys230、K234 的側鏈聚集，形成強的正電荷的區域。可想由於在此區域存在的不具電荷的 Gly225 經持有負電荷的 Asp 取代，而 Asp225 附近的正電荷減弱。此結果，與在文獻[9]所示的圓葉葡萄的變異 K284N 的靜電電位的變化，即，與在紊亂區域的表面由正電荷變成負電荷的靜電電位的變化，顯示有相同的傾向。因酵素 A 的 G225D 的紊亂區域的構造變化，可預料在含有 TPP 鍵結部位的活性部位給予與圓葉葡萄的變異同樣的影響，暗示因其影響，酵素 A 的變異體 G225D 也與圓葉葡萄的變異體 K284N 同樣，酵素活性增加。

【0090】

2.5. 蝦紅素合成途徑中酵素 A 的變異 G225D 的影響

如以上所述，可確認酵素 A 的變異 G225D 是在酵素 A 的紊亂區域發生，本區域存在於對活性是必須的 TPP 鍵結部位的附近。又，在本區域至今發現複數的使 DXS 的酶活性提高的變異，G225D 的變異，可預料與使 DXS 的活性提高的既知的變異，發生同樣的構造變化。

【0091】 在立體構造模型確認的紊亂區域的位置，至少如在文獻上所述，可想對紊亂區域的變異在 TPP 鍵結

區域多少給予某種影響，而使酶活性提高。在圓葉葡萄的例，藉由體外的酵素學的實驗顯示變異體的 K_{cat}/K_m 成為野生型的約 2 倍，可預料在紊亂區域的變異由 TPP 的鍵結帶來合適的構造變化。

【0092】 要在細胞內帶來各種的單萆的大幅度的增加，則成為單萆的原料的異戊二烯二磷酸(IPP)的增加是必要的。有報告指出，DXS 受到由去氧木酮糖途徑的產生物的 IPP 的回饋抑制(feedback inhibition)時，IPP 與 TPP 競爭抑制(competitive inhibition)[10]。又，已知 IPP 的量達一定量以上時，去氧木酮糖途徑的最初的酵素的 DXS 受到抑制，而調控 IPP 不再更增加。

【0093】 由此回饋抑制，所供給的 IPP 的量藉由 DXS 調控為一定，所以單只有 DXS 的酵素活性 K_{cat}/K_m 增加的話，IPP 的供給量不增加，萆的量不能大幅度增加。在既知的例中，因紊亂區域的變異之萆的合成量增加，可預測由此變異之 IPP 的供給量增加，即，暗示 DXS 受 IPP 的回饋抑制變成無效。

【0094】 在體外，已明瞭 IPP 與 TPP 互相競爭與 DXS 鍵結，而抑制 DXS [10]。因在紊亂區域的變異，在 TPP 鍵結區域發生構造變化，不只是變成更適於 TPP 鍵結的構造，由於對 IPP 的鍵結給予影響，暗示由 IPP 的回饋抑制變成無效的可能性。

【0095】 酵素 A 的變異 G225D 也是同樣，可推測對 TPP 鍵結區域給予構造變化，因 IPP 的回饋抑制變成無效，

而 IPP 的產生量增加。其結果，咸信成為蝦紅素合成的原料的 IPP 的供給量的增加，因而蝦紅素的合成量增加(第 5 圖)。

【0096】

3. 酵素 C 的立體構造模型的構築及變異體的解析

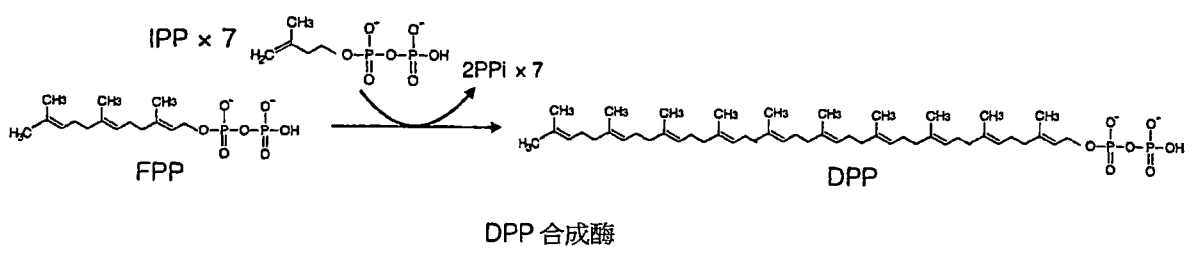
酵素 C，由胺基酸序列的相同性及立體構造比較解析，是聚異戊二烯二磷酸合成酶(polyisoprenyl diphosphate synthase)的一種，是由法呢基二磷酸(farnesyl diphosphate) (FPP)及 7 個異戊二烯二磷酸(IPP)合成十聚異戊二烯二磷酸的十聚異戊二烯二磷酸合成酶：Decaprenyl diphosphate synthase。

【0097】 由所構築的酵素 C 的立體構造模型，經基因體解析受鑑定的變異 A305V，可推測由於與周邊的胺基酸殘基的原子的衝突引起立體障礙，不安定化酵素 C 的立體構造。由立體構造的不安定化而酵素 C 的活性減少，被酵素 C 消費的 FPP 及 IPP 的量減少。其結果，由於可使用於蝦紅素合成的 FPP、IPP 的量增加，可想蝦紅素的產生量增加。

【0098】

3.1. 十聚異戊二烯二磷酸合成酶的酵素反應

十聚異戊二烯二磷酸合成酶，持有縮合 FPP 與 IPP 的活性，重複與 IPP 的縮合，而由 FPP 及 7 個 IPP 合成十聚異戊二烯二磷酸(DPP)的酵素。十聚異戊二烯二磷酸合成酶的酶反應如下。



【0099】

3.2. 酵素 C 的立體構造模型的構築

(1) 由同源模擬法的酵素 C 的立體構造模型的構築

為了要調查酵素 C 的活性部位及變異的影響，作為模板構造，使用在 PDB 的立體構造上胺基酸一致度最高(胺基酸一致度是 76.2%)，立體構造經 X 線結晶構造解析而決定的源自莢膜紅細菌(*Rhodobacter capsulatus*)(*R. capsulatus*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的立體構造(PDB ID: 3MZV)，由同源模擬法構築立體構造模型(第 16 圖)[4]。

同源模擬法，根據酵素 C 及模板構造的立體構造對準而進行(第 17 圖)。

【0100】

(2) 酵素 C 的基質複合體模型的製作

模板構造的 3MZV 是沒有基質的鍵結，所以使用源自大腸菌(*Escherichia coli*)的 octaprenyl pyrophosphate synthase (八異戊二烯二磷酸合成酶)(PDB ID: 3WJN, 3WJO)的立體構造數據[11]，在酵素 C 的立體構造模型重疊 3WJN，將基質的 FPP 嵌入酵素 C 的立體構造模型，而製作酵素 C 及 FPP 的複合體模型。其次，同樣地，將 3WJO 重疊，嵌入 IPP，而製作酵素 C 及 FPP、IPP 複合體模型。

第 18 圖顯示模板構造及所構築的模型構造。酵素 C 是與模板構造同樣形成同型二聚體。

【0101】

3.3. 關於酵素 C

(1) 由立體構造的比較

酵素 C 的十聚異戊二烯二磷酸合成酶，屬於聚異戊二烯二磷酸合成酶的家族(Pfam PF00348 Polyprenyl synthetase)。第 19 圖顯示酵素 C 的基質鍵結的樣子。

聚異戊二烯二磷酸合成酶，由 FPP 將 IPP 以頭對尾(此處是依照文獻[4]，將磷酸基側稱為頭，異戊二烯基側稱為尾。)方向縮合，而合成各種的聚異戊二烯二磷酸。十聚異戊二烯二磷酸合成酶，繼續 FPP 與 IPPG 的縮合反應，往基質鍵結部位的深部(第 19 圖 右以箭印表示)伸長異戊二烯鏈，而合成 C50 的十聚異戊二烯二磷酸。

【0102】 酵素 C 與模板的源自莢膜紅細菌(*R. capsulatus*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸一致度為 76.3%之高，活性部位也有保存(第 17 圖)。立體構造的由 $C\alpha$ 的重疊的 RMSD 是 0.063Å，2 種酵素是非常類似，將胺基酸殘基的一致分顏色表示，則胺基酸殘基的種類不同的區域限於分子表面，在活性部位及鍵結基質的區域，由全部一致的胺基酸殘基所構成(第 20 圖)。

【0103】

(2) 由胺基酸序列的比較

其次，對於酵素 C 的胺基酸序列，實施與源自副球菌

(Paracoccus)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的比較。作為源自副球菌的十聚異戊二烯二磷酸合成酶，作為已經明瞭的胺基酸序列，而在 UniProt(<http://www.uniprot.org>)，有源自玉米素副球菌(Paracoccus zeaxanthinifaciens)(Q8L1I6)及脫氮副球菌(Paracoccus denitrificans)(A1B3M9)的胺基酸序列的登錄。這些與酵素 C 的胺基酸序列比較的結果，胺基酸一致度是 75.1%(類似度 89.2%)，表示高的相同性(第 5 表)。

由胺基酸序列也可推測酵素 C 是十聚異戊二烯二磷酸合成酶。在第 21 圖顯示對準。

[第 5 表]

酵素 C 與十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列的比較

蛋白質	有機體	UniProt	同一性(相似性)
十聚異戊二烯二磷酸合成酶	玉米素副球菌 (Paracoccus zeaxanthinifaciens)	Q8L1I6	86.2%(95.2%)
	脫氮副球菌 (Paracoccus denitrificans)	A1B3M9	75.1%(89.2%)

【0104】

3.4. 酵素 C 的活性部位的推測

在酵素 C 與基質的複合體模型中，推測對基質的 FPP 鍵結部位及 IPP 鍵結部位、觸媒所必要的 Mg 鍵結部位。由這些的結果推測的活性部位及其他的聚異戊二烯二磷酸合成酶的活性中心及基質鍵結部位的保存性高，推測酵素 C 是持有與聚異戊二烯二磷酸合成酶同樣的反應樣式。

【0105】 酵素 C 與基質的複合體模型示於第 22 圖。

酵素 C 是與模板構造的十聚異戊二烯二磷酸合成酶同樣，推測形成同型二聚體。在第 22 圖，顯示 A 鏈(淡紅)的 FPP 與 IPP 的鍵結部位。FPP 是與 A 鏈的隧道狀的區域鍵結，FPP 及 IPP 是向 IPP 的異戊二烯基，將 FPP 的磷酸基以頭對尾的形式鍵結。觸媒反應是在 Mg 存在下，在 FPP 的磷酸基與 IPP 的異戊二烯基之間發生。

【0106】 為了推測酵素 C 的活性部位，在酵素 C 與基質的複合體模型中，檢出存在於 FPP、IPP 附近的胺基酸殘基，推測基質與胺基酸殘基有相互作用。對於 FPP，推測磷酸基與 Arg102、Lys179、Lys244 之間有氫鍵結，聚異戊二烯基與 Ala88、Thr89、His92、Phe125 之間推測有疏水性相互作用(第 23 圖上方圖)。

對於 IPP，推測磷酸基與 Lys54、Arg57、His86、Arg103 之間有氫鍵結，異戊二烯基與 Phe216 之間有疏水性相互作用(第 23 圖中央圖)。

【0107】 在本觸媒反應中，Mg 是必要的。作為 Mg 鍵結部位，在既知的聚異戊二烯二磷酸合成酶中，已知有 2 處的 DDXXD 模體(motief) [11]。在模板構造中沒有決定 Mg 的座標，但在酵素 C 中，DDXXD 模體相當的 Asp93、Asp94、Asp97 及 Asp220、Asp221、Asp224，與既知的 Mg 鍵結部位同樣存在於磷酸基的附近，推測這些胺基酸殘基將 Mg 鍵結(第 23 圖下方圖)。

【0108】 以上，將推測的活性部位示於附加資料的第 6 表至第 8 表中。又，酵素 C 與 FPP 及 IPP 的鍵結樣式，

以及酵素 C 與 Mg 的鍵結樣式的圖則各分別示於第 24 圖、第 25 圖。

[第 6 表]

第 6 表. 在酵素 C 檢出的推測與 FPP 及 IPP 有相互作用的胺基酸殘基

基質		酵素_C		相互作用
FPP	聚異戊二烯	Ala88	側鏈	疏水性相互作用
		Thr89	側鏈	疏水性相互作用
		His92	側鏈	疏水性相互作用
		Phe125	側鏈	疏水性相互作用
	PO4	Arg102	側鏈	氫鍵
		Lys179	側鏈	氫鍵
		Lys244	側鏈	氫鍵
IPP	異戊二烯	Phe216	側鏈	疏水性相互作用
	PO4	Lys54	側鏈	氫鍵
		Arg57	側鏈	氫鍵
		His86	側鏈	氫鍵
		Arg103	側鏈	氫鍵

【0109】 [第 7 表]

第 7 表. 在酵素 C 檢出的推測與 Mg 有相互作用的胺基酸殘基

Mg	酵 素 _C		相 互 作 用
Mg1	Asp93	側 鏈	氫 鍵
	Asp94	側 鏈	氫 鍵
	Asp97	側 鏈	氫 鍵
Mg2	Asp220	側 鏈	氫 鍵
	Asp221	側 鏈	氫 鍵
	Asp224	側 鏈	氫 鍵

【0110】 [第 8 表]

第 8 表. 在酵素 C 推測的活性部位的胺基酸殘基

結合位點	殘基
FPP	Ala88
	Thr89
	His92
	Arg102
	Phe125
	Lys179
	Lys244
IPP	Lys54
	Arg57
	His86
	Arg103
	Phe216
Mg	Asp93
	Asp94
	Asp97
	Asp220
	Asp221
	Asp224

【0111】 推測有鍵結的各胺基酸殘基，與模板構造的源自莢膜紅細菌(*R. capsulatus*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶一致(第 17 圖)。又，酵素 C 的 FPP 鍵結部位、IPP 鍵結部位、Mg 鍵結部位，由於保持用於基質複合體模型的製成所使用的源自大腸菌(*E. coli*)的八異戊二烯二磷酸合成酶的鍵結部位，咸信酵素 C 與八異戊二烯二磷酸合成酶有同樣的反應樣式。

【0112】 尤其是，與 FPP 的磷酸基鍵結的 Arg102、

Lys179、Lys244，與 Mg 鍵結的 Asp93、Asp94、Asp97、Asp220、Asp221、Asp224，可想是直接參與將磷酸基轉移的觸媒活性的重要的殘基。有報告指出，在大鼠及酵母的 FPP 合成酶的變異體製作的實驗中，在相當於酵素 C 的磷酸鍵結部位的 Arg102、Arg103 及 Mg 鍵結部位的 Asp94、Asp97、Asp220、Asp221、及 Asp224 的胺基酸殘基，對酵素活性是重要的，在聚異戊二烯二磷酸合成酶之間這些的胺基酸殘基有高度被保存[14, 15]。

【0113】 又，在 FPP 合成酶中，由在酵素 C 的相當於 Phe216、Gln217 的胺基酸殘基的變異體的製作，闡明了 Phe 及 Gln 的支鏈在基質鍵結為重要的 [16]。在酵素 C 的複合體模型中，也可預料 Phe216、Gln217 是在活性部位的區域，對活性是重要的。

【0114】

3.5. 由酵素 C 的變異 A305V 的影響

為了要推測在酵素 C 受鑑定的由 Ala305 至 Val 的變異對立體構造的影響，而製作酵素 C 的變異 A305V 酵素的立體構造模型。

【0115】

(1) 由 A305V 的一殘基取代的變異模型的製作

為了查看 Ala 經 Val 取代的影響，首先，固定其他的胺基酸殘基的立體構造，(假定為剛性體)，製作 Ala305 經 Val 一殘基取代的模型，與野生型做比較。

【0116】 第 26 圖顯示野生型及變異 A305V 酵素的立

體構造模型。野生型的 Ala305，在 α 螺旋(粉紅)存在，側鏈是與鄰接的 α 螺旋(青藍)的胺基酸殘基經由疏水性相互作用而堆積(packing)。

【0117】 第 27 圖顯示與 Ala305 鄰接的胺基酸殘基的構造。

Ala305 側鏈的甲基的碳原子與周邊的胺基酸殘基，Tyr208、Ala211、His301、Ala302 相接，碳的原子間的距離是各者都未達 4.0Å。由 Ala305 成為 Val 的取代而側鏈的甲基增加 2 個。在 Ala305 經 Val 取代的立體構造模型中，Val 側鏈的甲基的碳與 Tyr208 及 Ala211 的碳的原子間距離是 2.42Å 及 2.47Å。

【0118】 碳間的非共價鍵接觸距離的極限下限值是 2.9Å。在 Val305 測定的碳的原子間的距離是未達此值，所以這些的碳原子會衝突，可想與周邊的胺基酸殘基引起立體障礙。以空間填充的表示中，原子間的距離比凡得瓦氏半徑短，可確認原子間有衝突。由以上所述，A305V 的變異，可預料由於原子的衝突而引起酵素 C 的立體障礙，招致立體構造的不安定化。

【0119】

(2) 由 A305V 的變異的分子內能量的變化

為了評估由 A305V 的構造的不安定化，將酵素 C 的野生型與變異體 A305V 的分子內能量由原子間的鍵結的長度、鍵結角、扭轉、鍵結能量等的合計，以單位千焦耳/mol(KJ/mol)算出。

【0120】 其結果，相對於野生型的-17,912(KJ/mol)，在變異 A305V 酵素是-16,295(KJ/mol)，變異 A305V 的分子內能量增加 9.02%之多，確認構造會不安定化。此分子內能量的增加，尤其是在 Tyr208、Ala211、Val305 的各胺基酸殘基確認，可想這些胺基酸殘基有引起衝突是起因於分子內能量的增加。第 28 圖示酵素 C 的野生型與變異體 A305V 的分子內能量的比較。

【0121】

(3) 由變異 A305V 的構造變化

其次，對變異體模型實施能量最小化計算，由變動周邊的胺基酸殘基的立體構造，調查能否迴避 A305V 的衝突。其結果，獲知為了要迴避 Val305 側鏈的衝突，而容許側鏈的話，需要將與 Val305 存在的 α 螺旋鄰接的 α 螺旋的胺基酸殘基的立體構造變動。即，其構造變化不只是側鏈，也涉及主鏈，在變異 A305V 酵素中，不能做 α 螺旋間的本來的堆積，可預料 2 支的螺旋周邊的構造不安定化。又，在與變異 A305V 鄰接的 α 螺旋，存在基質的 IPP 及鍵結 Mg 的活性部位(Phe216、Gln217、Asp220)。由於活性部位的基礎的 α 螺旋的主鏈構造的構造變化，活性部位的胺基酸殘基無法採取本來的位置，其結果，可想對基質鍵結或活性本身有影響(第 29 圖右圖)。

【0122】 第 29 圖顯示野生型及能量最小化計算後的變異體 A305V 的 Ala305 及 Val305 周邊的構造，第 30、31、32 圖顯示變異體 A305V 的構造變化。

【0123】

(4) 由構造的不安定化的酵素 C 的活性的減少

如以上所述，由 A305V 的立體構造模型，推測有發生與周邊的胺基酸殘基的立體障礙、分子內能量的增加及鄰接的 2 支的 α 螺旋的構造變化，暗示 A305V 的變異使酵素 C 的立體構造不安定化。關於因點變異的立體構造的不安定化，在遺傳病等也有為數不少的報告。例如，持有引起不安定化的變異的蛋白質，不能在溶媒中維持本來的立體構造，而比通常較短的時間失去活性，或，在細胞內，被認為不能做本來的堆積的變異體蛋白質，由細胞本身的功能而被排除。因此之故，不具備本來的活性的，不安定的構造的變異 A305V 酵素，在細菌內有被排除的可能性，結果而言，可推測在細菌內的酵素 C 的活性減少。

【0124】

3.6. 在蝦紅素合成途徑中的酵素 C 的變異 A305V 的效果

十聚異戊二烯二磷酸合成酶是輔酵素 C10(CoQ10)合成途徑的酶之一。這一次，被確認與酵素 C 有高的相同性的源自玉米黃素副球菌(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*)或脫氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)的十聚異戊二烯二磷酸合成酶，已明瞭其為在 CoQ10 的產生上是必要的酶[特開 2005-211020、特表 2006-517794]。十聚異戊二烯二磷酸合成酶的基質的 FPP 及 IPP，也是蝦紅素合成途徑的香葉基香葉基二磷酸(Geranyl-geranyl pyrophosphate; GGPP)合成酶的 CrtE 的基質。因此，可想在通常的副球菌(*Paracoccus*)

的細胞內，十聚異戊二烯二磷酸合成酶及 CrtE，與基質的 FPP 互爭 IPP 的使用。

【0125】 在酵素 C 受鑑定的變異 A305V，由使分子的立體構造不安定化，推測可減少酵素 C 的活性。如酵素 C 的活性減少時，使用的基質的 FPP 及 IPP 的量也減少，其結果，可想蝦紅素合成途徑中可使用的 FPP、IPP 的量增加。

【0126】 CrtE 是由 1 分子的 FPP 及 1 分子的 IPP 合成 1 分子的 GGPP。另一方面，酵素 C 要合成 1 分子的十聚異戊二烯二磷酸時，需要 1 分子的 FPP 及 7 分子的 IPP。由 IPP 視之，則酵素 C 是 1 個反應中消費比 CrtE 的 7 倍多的 IPP。因此、可想酵素 C 的活性減少，對在蝦紅素合成途徑供給的 IPP 的增加是極為有效。

【0127】 其結果，可推測蝦紅素的合成量顯著的增加(第 33 圖)。

【0128】

參考文獻

1. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. Nucleic Acids Res. 2014 ;42 : W252-8.
2. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer : A historical perspective.

Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. Electrophoresis, (2009). 30(S1), S162-S173.

3. Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. Xiang S, Usunow G, Lange G, Busch M, Tong L. J Biol Chem. 2007 26; 282(4) : 2676-82.

4. Prediction of function for the polyprenyl transferase subgroup in the isoprenoid synthase superfamily. Wallrapp FH, Pan JJ, Ramamoorthy G, Almonacid DE, Hillerich BS, Seidel R, Patskovsky Y, Babbitt PC, Almo SC, Jacobson MP, Poulter CD. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 26;110(13) : E1196-202. 14;107(50) : 21337-42.

6. Snapshot of a key intermediate in enzymatic thiamin catalysis : crystal structure of the alpha-carbanion of (alpha,beta-dihydroxyethyl)-thiamin diphosphate in the active site of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. Fiedler E, Thorell S, Sandalova T, Golbik R, König S, Schneider G. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 22;99(2) : 591-5.

7. Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis. Nilsson U1, Meshalkina L, Lindqvist Y, Schneider G. J Biol Chem. 1997 17;272(3) : 1864-9.

8. Catalytically Important Residues in *E. coli*

1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. Jordi Querol-Audí, Albert Boronat, Josep J. Centelles, Santiago Imperial Journal of Biosciences and Medicines, 2014, 2, 30-35

9. Functional effect of grapevine 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase substitution K284N on Muscat flavour formation. Battilana J1, Emanuelli F, Gambino G, Gribaudo I, Gasperi F, Boss PK, Grando MS. J Exp Bot. 2011;62(15) : 5497-508.

10. Feedback Inhibition of Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase Regulates the Methylerythritol4-Phosphate Pathway. Banerjee A1, Wu Y, Banerjee R, Li Y, Yan H, Sharkey TD. J Biol Chem. 2013 7;288(23) : 16926-36.

11. Crystal structures of ligand-bound octaprenyl pyrophosphate synthase from Escherichia coli reveal the catalytic and chain-length determining mechanisms. Han X, Chen CC, Kuo CJ, Huang CH, Zheng Y, Ko TP, Zhu Z, Feng X, Wang K, Oldfield E, Wang AH, Liang PH, Guo RT, Ma Y. Proteins. 2015;83(1) : 37-45.

14. Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. Joly A, Edwards PA. J Biol Chem. 1993 25;268(36) : 26983-9.

15. Yeast farnesyl-diphosphate synthase : site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase

domains I and II. Song L1, Poulter CD. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 12;91(8) : 3044-8.

16. Significance of Phe-220 and Gln-221 in the catalytic mechanism of farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*. Koyama T1, Tajima M, Nishino T, Ogura K. Biochem Biophys Res Commun. 1995 7;212(2) : 681-6.

【符號說明】

無

【序列表】

- <110> 捷客斯能源股份有限公司
- <120> 類胡蘿蔔素的製造方法
- <130> G1152TW
- <150> JP2016-71303
- <151> 2016-03-31
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1926
- <212> DNA
- <213> 類胡蘿蔔素副球菌

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1923)

<400> 1	
atg acc gat cga ccc aag acg ccg att ctg gac cgc gtt agc ctg ccg	48
Met Thr Asp Arg Pro Lys Thr Pro Ile Leu Asp Arg Val Ser Leu Pro	
1 5 10 15	
tcg gat ctg aag acc ctg acc gac gcg caa ctg cgc cag ctt gcc gac	96
Ser Asp Leu Lys Thr Leu Thr Asp Ala Gln Leu Arg Gln Leu Ala Asp	
20 25 30	
gag ttg cgg gcc gag acc atc agc gcc gtc agc gtg acc ggc ggc cat	144
Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His	
35 40 45	
ctg ggc gcg ggc ctg ggc gtg gtc gag ctg acc gta gcc ctg cat gcg	192
Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala	
50 55 60	
gtc ttc gac acg ccg cgc gac aag ctg atc tgg gac gtg ggg cac cag	240
Val Phe Asp Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln	
65 70 75 80	
tgc tat ccg cac aag atc ctg acc ggg cgg cgc gat cgc atc cgc acg	288
Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr	
85 90 95	

ctg cgc atg ggc ggg ggc ctt gcg ggg ttc acc aag cgc gcg gaa agc Leu Arg Met Gly Gly Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ala Glu Ser 100 105 110	336
ccc tat gac ccg ttc ggg gcg ggg cat tcg tcg acc tcg atc agc gcg Pro Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala 115 120 125	384
gcc ctg ggt ttc gcg atg gcg cgg gaa ctg ggc ggc gac ccg ggc gat Ala Leu Gly Phe Ala Met Ala Arg Glu Leu Gly Gly Asp Pro Gly Asp 130 135 140	432
gcg atc gcg gtc atc ggc gac ggc gcc atg agc gcc ggc atg gct tat Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Ser Ala Gly Met Ala Tyr 145 150 155 160	480
gaa gcg ctg aac aat gcg ggc cat gag ggc aag cgc ctg ttc gtg gtc Glu Ala Leu Asn Asn Ala Gly His Glu Gly Lys Arg Leu Phe Val Val 165 170 175	528
ctg aat gac aac gag atg tcc att gcg ccc ccg gtc ggc gcc atg tcc Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Met Ser 180 185 190	576
tcc tat ctg acg cgc ctt tat gca ggc ggg ccg ttc cag gag ctg aag Ser Tyr Leu Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Gly Pro Phe Gln Glu Leu Lys 195 200 205	624
gcg gtg gcc aag ggc gcc gtt ggc atg ctg ccg gac gcc ctg cag gag Ala Val Ala Lys Gly Ala Val Gly Met Leu Pro Asp Ala Leu Gln Glu 210 215 220	672
ggc gcg cgc cgc gcc aag gag atg ctg aag ggc atg gcc gtg ggc ggc Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Gly Met Ala Val Gly Gly 225 230 235 240	720
acc ctg ttc gag gag ctg ggc ttt tcc tat atc ggg ccg gtc gac ggt Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly 245 250 255	768
cac gac atg gaa cag ctg ctg ccc ctg ctg cgc acc gtg cgg gcg cgg His Asp Met Glu Gln Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Arg Ala Arg 260 265 270	816
gcc gac ggt ccg gtc ctg atc cac gtc gtg acc aag aag ggc aag ggt Ala Asp Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys Gly Lys Gly 275 280 285	864
tat gcc ccg gcc gag gcg gcc gcg gac aag ggc cat gcc acc gcc aag Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Ala Asp Lys Gly His Ala Thr Ala Lys	912

290	295	300	
ttc gac gtg atc acc ggc gtg cag gcc aag gcg aaa tcg aac gcg ccc			960
Phe Asp Val Ile Thr Gly Val Gln Ala Lys Ala Lys Ser Asn Ala Pro			
305	310	315	320
agc tat acc gcc gtc ttc gcg cag gcg ctg atc gat cag gcg ggg cgt			1008
Ser Tyr Thr Ala Val Phe Ala Gln Ala Leu Ile Asp Gln Ala Gly Arg			
325	330	335	
gac gac cgc atc ctg ggg gtg acc gcc gcg atg ccg gac ggg acc ggc			1056
Asp Asp Arg Ile Leu Gly Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly			
340	345	350	
ctc aag cag ttc gcg cag cgc ttt ccg cgc cgc tgc ttc gac gtg ggc			1104
Leu Lys Gln Phe Ala Gln Arg Phe Pro Arg Arg Cys Phe Asp Val Gly			
355	360	365	
att gcc gaa cag cat gcc gtg acc ttt gcc gcc ggt ctg gcc gcg gga			1152
Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ala Gly			
370	375	380	
ggc atg aag cct ttc gtc gcg atc tat tcg acc ttt ctg cag cgc ggc			1200
Gly Met Lys Pro Phe Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly			
385	390	395	400
tat gac cag atc gtg cat gac gtc gcg gtc cag aac ctg ccc gtc cgg			1248
Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Val Gln Asn Leu Pro Val Arg			
405	410	415	
ttc gcc gtc gac cgt gcc ggg ctg gtg ggc cag gac ggt ccg acc cat			1296
Phe Ala Val Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Gln Asp Gly Pro Thr His			
420	425	430	
tcc gcc gcc tat gac acc gcc ttc ctg gcc aat ctg ccc ggg ttt gtc			1344
Ser Gly Ala Tyr Asp Thr Ala Phe Leu Ala Asn Leu Pro Gly Phe Val			
435	440	445	
gtc atg gcc gcc gcg gac gag gcc gaa ctg gcc cac atg gtc gcc acg			1392
Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ala His Met Val Ala Thr			
450	455	460	
gcc gcc gca cat gac agc ggc ccc atc gcc ttc cgc ttt ccg cgc gga			1440
Ala Ala Ala His Asp Ser Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe Pro Arg Gly			
465	470	475	480
gag ggc acc ggg gtc gag atg ccc gag cgc ggg cag gtc ctg ccc atc			1488
Glu Gly Thr Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Gln Val Leu Pro Ile			
485	490	495	

ggc aag ggc cgc atg atc gcg gag ggc aag ggc gtc gcc atc ctg tcc 1536
Gly Lys Gly Arg Met Ile Ala Glu Gly Lys Gly Val Ala Ile Leu Ser
500 505 510

ttc ggc acg cgc ctg tcc gag gtg atg acc gcg cgc gag gcg ctg atg 1584
Phe Gly Thr Arg Leu Ser Glu Val Met Thr Ala Arg Glu Ala Leu Met
515 520 525

gcg cgg ggc atc acg ccc acg gtc gcc gac gcg cgc ttt gcc aag ccg 1632
Ala Arg Gly Ile Thr Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro
530 535 540

ctg gat cgt gac ctg atc ctg gca ctg gcc cgc gat cac gag gcg ctg 1680
Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Ala Leu Ala Arg Asp His Glu Ala Leu
545 550 555 560

atc acc atc gag gag ggc gcc gtg ggc ggt ttc ggc agc cat gtc gcc 1728
Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Val Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
565 570 575

cat ctg ctg gcc gag gag ggc gcc ttc gac aag ggg ctg cgc ttc cgg 1776
His Leu Leu Ala Glu Glu Gly Ala Phe Asp Lys Gly Leu Arg Phe Arg
580 585 590

tcg atg gtc ctg ccg gat gcg ttc gtc gac cac gac gcg ccg cgg gcg 1824
Ser Met Val Leu Pro Asp Ala Phe Val Asp His Asp Ala Pro Arg Ala
595 600 605

atg tat gac agc agc tgc ctg aac gcc cag cat atc gag gac aag gtc 1872
Met Tyr Asp Ser Ser Cys Leu Asn Ala Gln His Ile Glu Asp Lys Val
610 615 620

ctc tcc gtg atg ggc gtc cag tcg ctc gcg gcg cgg cgc acc gac cgc 1920
Leu Ser Val Met Gly Val Gln Ser Leu Ala Ala Arg Arg Thr Asp Arg
625 630 635 640

gcc tga 1926
Ala

<210> 2
<211> 641
<212> PRT
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<400> 2

Met Thr Asp Arg Pro Lys Thr Pro Ile Leu Asp Arg Val Ser Leu Pro
1 5 10 15

Ser Asp Leu Lys Thr Leu Thr Asp Ala Gln Leu Arg Gln Leu Ala Asp
20 25 30

Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His
35 40 45

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala
50 55 60

Val Phe Asp Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln
65 70 75 80

Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr
85 90 95

Leu Arg Met Gly Gly Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ala Glu Ser
100 105 110

Pro Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Phe Ala Met Ala Arg Glu Leu Gly Gly Asp Pro Gly Asp
130 135 140

Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Ser Ala Gly Met Ala Tyr
145 150 155 160

Glu Ala Leu Asn Asn Ala Gly His Glu Gly Lys Arg Leu Phe Val Val
165 170 175

Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Met Ser
180 185 190

Ser Tyr Leu Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Gly Pro Phe Gln Glu Leu Lys
195 200 205

Ala Val Ala Lys Gly Ala Val Gly Met Leu Pro Asp Ala Leu Gln Glu
210 215 220

Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Gly Met Ala Val Gly Gly
225 230 235 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255

His Asp Met Glu Gln Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Arg Ala Arg
260 265 270

Ala Asp Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys Gly Lys Gly
275 280 285

Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Ala Asp Lys Gly His Ala Thr Ala Lys
290 295 300

Phe Asp Val Ile Thr Gly Val Gln Ala Lys Ala Lys Ser Asn Ala Pro
305 310 315 320

Ser Tyr Thr Ala Val Phe Ala Gln Ala Leu Ile Asp Gln Ala Gly Arg
325 330 335

Asp Asp Arg Ile Leu Gly Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly
340 345 350

Leu Lys Gln Phe Ala Gln Arg Phe Pro Arg Arg Cys Phe Asp Val Gly
355 360 365

Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ala Gly
370 375 380

Gly Met Lys Pro Phe Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly
385 390 395 400

Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Val Gln Asn Leu Pro Val Arg
405 410 415

Phe Ala Val Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Gln Asp Gly Pro Thr His
420 425 430

Ser Gly Ala Tyr Asp Thr Ala Phe Leu Ala Asn Leu Pro Gly Phe Val
435 440 445

Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ala His Met Val Ala Thr
450 455 460

Ala Ala Ala His Asp Ser Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe Pro Arg Gly
465 470 475 480

Glu Gly Thr Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Gln Val Leu Pro Ile
485 490 495

Gly Lys Gly Arg Met Ile Ala Glu Gly Lys Gly Val Ala Ile Leu Ser
500 505 510

Phe Gly Thr Arg Leu Ser Glu Val Met Thr Ala Arg Glu Ala Leu Met
515 520 525

Ala Arg Gly Ile Thr Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro
530 535 540

Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Ala Leu Ala Arg Asp His Glu Ala Leu
545 550 555 560

Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Val Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
565 570 575

His Leu Leu Ala Glu Glu Gly Ala Phe Asp Lys Gly Leu Arg Phe Arg
580 585 590

Ser Met Val Leu Pro Asp Ala Phe Val Asp His Asp Ala Pro Arg Ala
595 600 605

Met Tyr Asp Ser Ser Cys Leu Asn Ala Gln His Ile Glu Asp Lys Val
610 615 620

Leu Ser Val Met Gly Val Gln Ser Leu Ala Ala Arg Arg Thr Asp Arg
625 630 635 640

Ala

<210> 3
<211> 1002
<212> DNA
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(999)

<400> 3
atg act gtg cag gac aac gtc cgc aaa ccg atg gat cgg ctg agc gag 48
Met Thr Val Gln Asp Asn Val Arg Lys Pro Met Asp Arg Leu Ser Glu
1 5 10 15
gcc ctg acc gcc gag atg gag gcg gtc aac gcg ctg atc cgc gac cgc 96
Ala Leu Thr Ala Glu Met Glu Ala Val Asn Ala Leu Ile Arg Asp Arg
20 25 30
atg gcc agc cgc cat gcc ccc cgc atc ccc gag gtg acg gcg cat ctg 144
Met Ala Ser Arg His Ala Pro Arg Ile Pro Glu Val Thr Ala His Leu
35 40 45
atc gag gcc ggc ggc aag cgc ctg cgc ccg atg ctg acg ctg gcc gcg 192
Ile Glu Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Met Leu Thr Leu Ala Ala
50 55 60
gcc aag ctg ctg ggc tat ccc ggc ccg tgg cat gtc cac ctg gcc gcc 240
Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Gly Pro Trp His Val His Leu Ala Ala
65 70 75 80
acg gtc gaa ttc atc cat acc gcc acg ctg ctg cat gac gac gtg gtc 288
Thr Val Glu Phe Ile His Thr Ala Thr Leu Leu His Asp Asp Val Val
85 90 95
gac gaa agc gcg cag cgg cgc ggg cgc ccg acg gcg aac ctg ctg tgg 336
Asp Glu Ser Ala Gln Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ala Asn Leu Leu Trp
100 105 110

gac aac aag tcc agc gtg ctg gtc gga gat tac ctg ttc gcg cgc agc Asp Asn Lys Ser Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Arg Ser 115 120 125	384
ttt cag ctg atg gtc gaa ccc ggc aac ctg cga acg ctg gag atc ctg Phe Gln Leu Met Val Glu Pro Gly Asn Leu Arg Thr Leu Glu Ile Leu 130 135 140	432
gcc aat gcc agc gcc acc atc gcc gag ggc gag gtg ctg cag ctg acc Ala Asn Ala Ser Ala Thr Ile Ala Glu Gly Glu Val Leu Gln Leu Thr 145 150 155 160	480
gcg gcg cag gac ctg gcg acc gac gaa tcc gtc tat ctg cag gtg gtg Ala Ala Gln Asp Leu Ala Thr Asp Glu Ser Val Tyr Leu Gln Val Val 165 170 175	528
cgc ggc aag acg gcg gcg ctg ttt tcc gcc gcg acc gag gtg ggc ggc Arg Gly Lys Thr Ala Ala Leu Phe Ser Ala Ala Thr Glu Val Gly Gly 180 185 190	576
gtc atc gcc ggt gcg ccc gac gat cag gtg cag gcg ctg ttc gat tac Val Ile Ala Gly Ala Pro Asp Asp Gln Val Gln Ala Leu Phe Asp Tyr 195 200 205	624
ggc gac gcc ctg ggc atc agc ttc cag att gtc gac gac ctg ctg gat Gly Asp Ala Leu Gly Ile Ser Phe Gln Ile Val Asp Asp Leu Leu Asp 210 215 220	672
tac ggc ggc gcg acc gag acg atc ggc aag aac gtg ggc gac gat ttc Tyr Gly Gly Ala Thr Glu Thr Ile Gly Lys Asn Val Gly Asp Asp Phe 225 230 235 240	720
cgc gaa cgc aag ctg acc ctg ccg gtc atc aag gcc atc gcc aag gcc Arg Glu Arg Lys Leu Thr Leu Pro Val Ile Lys Ala Ile Ala Lys Ala 245 250 255	768
gac gcc gag gaa cgc gcc ttc tgg acc cgc acc atc gag gcg ggc gac Asp Ala Glu Glu Arg Ala Phe Trp Thr Arg Thr Ile Glu Ala Gly Asp 260 265 270	816
cag cgc gac ggc gac ctg gag cac gcg ctg tcg ctg ctg gcc cgt cac Gln Arg Asp Gly Asp Leu Glu His Ala Leu Ser Leu Leu Ala Arg His 275 280 285	864
ggt gcg atg gag gcc gcg cgc gcc gat gcg ctg gcc cat gcc gca cgg Gly Ala Met Glu Ala Ala Arg Ala Asp Ala Leu Ala His Ala Ala Arg 290 295 300	912
gcc cgc gcg gcg ctg cag gtg ctg ccc gcg cat ccg att cgc gac atg	960

Ala Arg Ala Ala Leu Gln Val Leu Pro Ala His Pro Ile Arg Asp Met
305 310 315 320

ctg gcc gac ctc gcg gat ttc gtc gtc agc cgc gtg gcc tga 1002
Leu Ala Asp Leu Ala Asp Phe Val Val Ser Arg Val Ala
325 330

<210> 4
<211> 333
<212> PRT
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<400> 4

Met Thr Val Gln Asp Asn Val Arg Lys Pro Met Asp Arg Leu Ser Glu
1 5 10 15

Ala Leu Thr Ala Glu Met Glu Ala Val Asn Ala Leu Ile Arg Asp Arg
20 25 30

Met Ala Ser Arg His Ala Pro Arg Ile Pro Glu Val Thr Ala His Leu
35 40 45

Ile Glu Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Met Leu Thr Leu Ala Ala
50 55 60

Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Gly Pro Trp His Val His Leu Ala Ala
65 70 75 80

Thr Val Glu Phe Ile His Thr Ala Thr Leu Leu His Asp Asp Val Val
85 90 95

Asp Glu Ser Ala Gln Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ala Asn Leu Leu Trp
100 105 110

Asp Asn Lys Ser Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Arg Ser
115 120 125

Phe Gln Leu Met Val Glu Pro Gly Asn Leu Arg Thr Leu Glu Ile Leu
130 135 140

<211> 1926
<212> DNA
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1923)

<400>	5	
atg acc gat cga ccc aag acg ccg att ctg gac cgc gtt agc ctg ccg		48
Met Thr Asp Arg Pro Lys Thr Pro Ile Leu Asp Arg Val Ser Leu Pro		
1 5 10 15		
tcg gat ctg aag acc ctg acc gac gcg caa ctg cgc cag ctt gcc gac		96
Ser Asp Leu Lys Thr Leu Thr Asp Ala Gln Leu Arg Gln Leu Ala Asp		
20 25 30		
gag ttg cgg gcc gag acc atc agc gcc gtc agc gtg acc ggc ggc cat		144
Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His		
35 40 45		
ctg ggc gcg ggc ctg ggc gtg gtc gag ctg acc gta gcc ctg cat gcg		192
Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala		
50 55 60		
gtc ttc gac acg ccg cgc gac aag ctg atc tgg gac gtg ggg cac cag		240
Val Phe Asp Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln		
65 70 75 80		
tgc tat ccg cac aag atc ctg acc ggg cgg cgc gat cgc atc cgc acg		288
Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr		
85 90 95		
ctg cgc atg ggc ggg ggc ctt gcg ggg ttc acc aag cgc gcg gaa agc		336
Leu Arg Met Gly Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ala Glu Ser		
100 105 110		
ccc tat gac ccg ttc ggg gcg ggg cat tcg tcg acc tcg atc agc gcg		384
Pro Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala		
115 120 125		
gcc ctg ggt ttc gcg atg gcg ccg gaa ctg ggc ggc gac ccg ggc gat		432
Ala Leu Gly Phe Ala Met Ala Arg Glu Leu Gly Gly Asp Pro Gly Asp		
130 135 140		
gcg atc gcg gtc atc ggc gac ggc gcc atg agc gcc ggc atg gct tat		480
Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Ser Ala Gly Met Ala Tyr		
145 150 155 160		

gaa gcg ctg aac aat gcg ggc cat gag ggc aag cgc ctg ttc gtg gtc Glu Ala Leu Asn Asn Ala Gly His Glu Gly Lys Arg Leu Phe Val Val 165 170 175	528
ctg aat gac aac gag atg tcc att gcg ccc ccg gtc ggc gcc atg tcc Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Met Ser 180 185 190	576
tcc tat ctg acg cgc ctt tat gca ggc ggg ccg ttc cag gag ctg aag Ser Tyr Leu Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Gly Pro Phe Gln Glu Leu Lys 195 200 205	624
gcg gtg gcc aag ggc gcc gtt ggc atg ctg ccg gac gcc ctg cag gag Ala Val Ala Lys Gly Ala Val Gly Met Leu Pro Asp Ala Leu Gln Glu 210 215 220	672
gac gcg cgc cgc gcc aag gag atg ctg aag ggc atg gcc gtg ggc ggc Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Gly Met Ala Val Gly Gly 225 230 235 240	720
acc ctg ttc gag gag ctg ggc ttt tcc tat atc ggg ccg gtc gac ggt Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly 245 250 255	768
cac gac atg gaa cag ctg ctg ccc ctg ctg cgc acc gtg cgg gcg cgg His Asp Met Glu Gln Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Arg Ala Arg 260 265 270	816
gcc gac ggt ccg gtc ctg atc cac gtc gtg acc aag aag ggc aag ggt Ala Asp Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys Gly Lys Gly 275 280 285	864
tat gcc ccg gcc gag gcg gcc gcg gac aag ggc cat gcc acc gcc aag Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Ala Asp Lys Gly His Ala Thr Ala Lys 290 295 300	912
ttc gac gtg atc acc ggc gtg cag gcc aag gcg aaa tcg aac gcg ccc Phe Asp Val Ile Thr Gly Val Gln Ala Lys Ala Lys Ser Asn Ala Pro 305 310 315 320	960
agc tat acc gcc gtc ttc gcg cag gcg ctg atc gat cag gcg ggg cgt Ser Tyr Thr Ala Val Phe Ala Gln Ala Leu Ile Asp Gln Ala Gly Arg 325 330 335	1008
gac gac cgc atc ctg ggg gtg acc gcc gcg atg ccg gac ggg acc ggc Asp Asp Arg Ile Leu Gly Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly 340 345 350	1056
ctc aag cag ttc gcg cag cgc ttt ccg cgc cgc tgc ttc gac gtg ggc Leu Lys Gln Phe Ala Gln Arg Phe Pro Arg Arg Cys Phe Asp Val Gly	1104

355	360	365	
att gcc gaa cag cat gcc gtg acc ttt gcc gcc ggt ctg gcc gcg gga			1152
Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ala Gly			
370	375	380	
ggc atg aag cct ttc gtc gcg atc tat tcg acc ttt ctg cag cgc ggc			1200
Gly Met Lys Pro Phe Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly			
385	390	395	400
tat gac cag atc gtg cat gac gtc gcg gtc cag aac ctg ccc gtc cgg			1248
Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Val Gln Asn Leu Pro Val Arg			
405	410	415	
ttc gcc gtc gac cgt gcc ggg ctg gtg ggc cag gac ggt ccg acc cat			1296
Phe Ala Val Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Gln Asp Gly Pro Thr His			
420	425	430	
tcc gcc gcc tat gac acc gcc ttc ctg gcc aat ctg ccc ggg ttt gtc			1344
Ser Gly Ala Tyr Asp Thr Ala Phe Leu Ala Asn Leu Pro Gly Phe Val			
435	440	445	
gtc atg gcc gcc gcg gac gag gcc gaa ctg gcc cac atg gtc gcc acg			1392
Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ala His Met Val Ala Thr			
450	455	460	
gcc gcc gca cat gac agc ggc ccc atc gcc ttc cgc ttt ccg cgc gga			1440
Ala Ala Ala His Asp Ser Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe Pro Arg Gly			
465	470	475	480
gag ggc acc ggg gtc gag atg ccc gag cgc ggg cag gtc ctg ccc atc			1488
Glu Gly Thr Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Gln Val Leu Pro Ile			
485	490	495	
ggc aag ggc cgc atg atc gcg gag ggc aag ggc gtc gcc atc ctg tcc			1536
Gly Lys Gly Arg Met Ile Ala Glu Gly Lys Gly Val Ala Ile Leu Ser			
500	505	510	
ttc gcc acg cgc ctg tcc gag gtg atg acc gcg cgc gag gcg ctg atg			1584
Phe Gly Thr Arg Leu Ser Glu Val Met Thr Ala Arg Glu Ala Leu Met			
515	520	525	
gcg cgg ggc atc acg ccc acg gtc gcc gac gcg cgc ttt gcc aag ccg			1632
Ala Arg Gly Ile Thr Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro			
530	535	540	
ctg gat cgt gac ctg atc ctg gca ctg gcc cgc gat cac gag gcg ctg			1680
Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Ala Leu Ala Arg Asp His Glu Ala Leu			
545	550	555	560

atc acc atc gag gag ggc gcc gtg ggc ggt ttc ggc agc cat gtc gcc
Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Val Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
565 570 575

cat ctg ctg gcc gag gag ggc gcc ttc gac aag ggg ctg cgc ttc cgg
His Leu Leu Ala Glu Glu Gly Ala Phe Asp Lys Gly Leu Arg Phe Arg
580 585 590

tcg atg gtc ctg ccg gat gcg ttc gtc gac cac gac gcg ccg cgg gcg
Ser Met Val Leu Pro Asp Ala Phe Val Asp His Asp Ala Pro Arg Ala
595 600 605

atg tat gac agc agc tgc ctg aac gcc cag cat atc gag gac aag gtc
Met Tyr Asp Ser Ser Cys Leu Asn Ala Gln His Ile Glu Asp Lys Val
610 615 620

ctc tcc gtg atg ggc gtc cag tcg ctc gcg gcg cgg cgc acc gac cgc
Leu Ser Val Met Gly Val Gln Ser Leu Ala Ala Arg Arg Thr Asp Arg
625 630 635 640

gcc tga
Ala

1728

1776

1824

1872

1920

1926

<210> 6
<211> 641
<212> PRT
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<400> 6

Met Thr Asp Arg Pro Lys Thr Pro Ile Leu Asp Arg Val Ser Leu Pro
1 5 10 15

Ser Asp Leu Lys Thr Leu Thr Asp Ala Gln Leu Arg Gln Leu Ala Asp
20 25 30

Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His
35 40 45

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala
50 55 60

Val Phe Asp Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln
65 70 75 80

Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr
85 90 95

Leu Arg Met Gly Gly Gly Leu Ala Gly Phe Thr Lys Arg Ala Glu Ser
100 105 110

Pro Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala
115 120 125

Ala Leu Gly Phe Ala Met Ala Arg Glu Leu Gly Gly Asp Pro Gly Asp
130 135 140

Ala Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ala Met Ser Ala Gly Met Ala Tyr
145 150 155 160

Glu Ala Leu Asn Asn Ala Gly His Glu Gly Lys Arg Leu Phe Val Val
165 170 175

Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Met Ser
180 185 190

Ser Tyr Leu Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Gly Pro Phe Gln Glu Leu Lys
195 200 205

Ala Val Ala Lys Gly Ala Val Gly Met Leu Pro Asp Ala Leu Gln Glu
210 215 220

Asp Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Gly Met Ala Val Gly Gly
225 230 235 240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255

His Asp Met Glu Gln Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Arg Ala Arg
260 265 270

Ala Asp Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys Gly Lys Gly
275 280 285

Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Ala Asp Lys Gly His Ala Thr Ala Lys
290 295 300

Phe Asp Val Ile Thr Gly Val Gln Ala Lys Ala Lys Ser Asn Ala Pro
305 310 315 320

Ser Tyr Thr Ala Val Phe Ala Gln Ala Leu Ile Asp Gln Ala Gly Arg
325 330 335

Asp Asp Arg Ile Leu Gly Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly
340 345 350

Leu Lys Gln Phe Ala Gln Arg Phe Pro Arg Arg Cys Phe Asp Val Gly
355 360 365

Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ala Gly
370 375 380

Gly Met Lys Pro Phe Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly
385 390 395 400

Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Val Gln Asn Leu Pro Val Arg
405 410 415

Phe Ala Val Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Gln Asp Gly Pro Thr His
420 425 430

Ser Gly Ala Tyr Asp Thr Ala Phe Leu Ala Asn Leu Pro Gly Phe Val
435 440 445

Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ala His Met Val Ala Thr
450 455 460

Ala Ala Ala His Asp Ser Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe Pro Arg Gly
465 470 475 480

Glu Gly Thr Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Gln Val Leu Pro Ile
485 490 495

Gly Lys Gly Arg Met Ile Ala Glu Gly Lys Gly Val Ala Ile Leu Ser
500 505 510

Phe Gly Thr Arg Leu Ser Glu Val Met Thr Ala Arg Glu Ala Leu Met
515 520 525

Ala Arg Gly Ile Thr Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro
530 535 540

Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Ala Leu Ala Arg Asp His Glu Ala Leu
545 550 555 560

Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Val Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
565 570 575

His Leu Leu Ala Glu Glu Gly Ala Phe Asp Lys Gly Leu Arg Phe Arg
580 585 590

Ser Met Val Leu Pro Asp Ala Phe Val Asp His Asp Ala Pro Arg Ala
595 600 605

Met Tyr Asp Ser Ser Cys Leu Asn Ala Gln His Ile Glu Asp Lys Val
610 615 620

Leu Ser Val Met Gly Val Gln Ser Leu Ala Ala Arg Arg Thr Asp Arg
625 630 635 640

Ala

- <210> 7
- <211> 1002
- <212> DNA
- <213> 類胡蘿蔔素副球菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(999)

<400> 7

```

atg act gtg cag gac aac gtc cgc aaa ccg atg gat cgg ctg agc gag      48
Met Thr Val Gln Asp Asn Val Arg Lys Pro Met Asp Arg Leu Ser Glu
1           5           10           15

```

```

gcc ctg acc gcc gag atg gag gcg gtc aac gcg ctg atc cgc gac cgc      96
Ala Leu Thr Ala Glu Met Glu Ala Val Asn Ala Leu Ile Arg Asp Arg
          20           25           30

```

```

atg gcc agc cgc cat gcc ccc cgc atc ccc gag gtg acg gcg cat ctg      144
Met Ala Ser Arg His Ala Pro Arg Ile Pro Glu Val Thr Ala His Leu
          35           40           45

```

```

atc gag gcc ggc ggc aag cgc ctg cgc ccg atg ctg acg ctg gcc gcg      192
Ile Glu Ala Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Met Leu Thr Leu Ala Ala
          50           55           60

```

```

gcc aag ctg ctg ggc tat ccc ggc ccg tgg cat gtc cac ctg gcc gcc      240
Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Gly Pro Trp His Val His Leu Ala Ala
          65           70           75           80

```

```

acg gtc gaa ttc atc cat acc gcc acg ctg ctg cat gac gac gtg gtc      288
Thr Val Glu Phe Ile His Thr Ala Thr Leu Leu His Asp Asp Val Val
          85           90           95

```

```

gac gaa agc gcg cag cgg cgc ggg cgc ccg acg gcg aac ctg ctg tgg      336
Asp Glu Ser Ala Gln Arg Arg Gly Arg Pro Thr Ala Asn Leu Leu Trp
          100          105          110

```

```

gac aac aag tcc agc gtg ctg gtc gga gat tac ctg ttc gcg cgc agc      384
Asp Asn Lys Ser Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Arg Ser
          115          120          125

```

```

ttt cag ctg atg gtc gaa ccc ggc aac ctg cga acg ctg gag atc ctg      432
Phe Gln Leu Met Val Glu Pro Gly Asn Leu Arg Thr Leu Glu Ile Leu
          130          135          140

```

```

gcc aat gcc agc gcc acc atc gcc gag ggc gag gtg ctg cag ctg acc      480
Ala Asn Ala Ser Ala Thr Ile Ala Glu Gly Glu Val Leu Gln Leu Thr
          145          150          155          160

```

```

gcg gcg cag gac ctg gcg acc gac gaa tcc gtc tat ctg cag gtg gtg      528
Ala Ala Gln Asp Leu Ala Thr Asp Glu Ser Val Tyr Leu Gln Val Val
          165          170          175

```

328265

19

cgc ggc aag acg gcg gcg ctg ttt tcc gcc gcg acc gag gtg ggc ggc 576
Arg Gly Lys Thr Ala Ala Leu Phe Ser Ala Ala Thr Glu Val Gly Gly
180 185 190

gtc atc gcc ggt gcg ccc gac gat cag gtg cag gcg ctg ttc gat tac 624
Val Ile Ala Gly Ala Pro Asp Asp Gln Val Gln Ala Leu Phe Asp Tyr
195 200 205

ggc gac gcc ctg ggc atc agc ttc cag att gtc gac gac ctg ctg gat 672
Gly Asp Ala Leu Gly Ile Ser Phe Gln Ile Val Asp Asp Leu Leu Asp
210 215 220

tac ggc ggc gcg acc gag acg atc ggc aag aac gtg ggc gac gat ttc 720
Tyr Gly Gly Ala Thr Glu Thr Ile Gly Lys Asn Val Gly Asp Asp Phe
225 230 235 240

cgc gaa cgc aag ctg acc ctg ccg gtc atc aag gcc atc gcc aag gcc 768
Arg Glu Arg Lys Leu Thr Leu Pro Val Ile Lys Ala Ile Ala Lys Ala
245 250 255

gac gcc gag gaa cgc gcc ttc tgg acc cgc acc atc gag gcg ggc gac 816
Asp Ala Glu Glu Arg Ala Phe Trp Thr Arg Thr Ile Glu Ala Gly Asp
260 265 270

cag cgc gac ggc gac ctg gag cac gcg ctg tcg ctg ctg gcc cgt cac 864
Gln Arg Asp Gly Asp Leu Glu His Ala Leu Ser Leu Leu Ala Arg His
275 280 285

ggt gcg atg gag gcc gcg cgc gcc gat gcg ctg gcc cat gcc gca cgg 912
Gly Ala Met Glu Ala Ala Arg Ala Asp Ala Leu Ala His Ala Ala Arg
290 295 300

gtc cgc gcg gcg ctg cag gtg ctg ccc gcg cat ccg att cgc gac atg 960
Val Arg Ala Ala Leu Gln Val Leu Pro Ala His Pro Ile Arg Asp Met
305 310 315 320

ctg gcc gac ctc gcg gat ttc gtc gtc agc cgc gtg gcc tga 1002
Leu Ala Asp Leu Ala Asp Phe Val Val Ser Arg Val Ala
325 330

<210> 8
<211> 333
<212> PRT
<213> 類胡蘿蔔素副球菌

<400> 8

Met Thr Val Gln Asp Asn Val Arg Lys Pro Met Asp Arg Leu Ser Glu

1	5	10	15
Ala Leu Thr	Ala Glu Met	Glu Ala Val	Asn Ala Leu
20	25	30	
Met Ala Ser	Arg His Ala	Pro Arg Ile	Pro Glu Val
35	40	45	
Ile Glu Ala	Gly Gly Lys	Arg Leu Arg	Pro Met Leu
50	55	60	
Ala Lys Leu	Leu Gly Tyr	Pro Gly Pro	Trp His Val
65	70	75	80
Thr Val Glu	Phe Ile His	Thr Ala Thr	Leu Leu His
85	90	95	
Asp Glu Ser	Ala Gln Arg	Arg Gly Arg	Pro Thr Ala
100	105	110	
Asp Asn Lys	Ser Ser Val	Leu Val Gly	Asp Tyr Leu
115	120	125	
Phe Gln Leu	Met Val Glu	Pro Gly Asn	Leu Arg Thr
130	135	140	
Ala Asn Ala	Ser Ala Thr	Ile Ala Glu	Gly Glu Val
145	150	155	160
Ala Ala Gln	Asp Leu Ala	Thr Asp Glu	Ser Val Tyr
165	170	175	
Arg Gly Lys	Thr Ala Ala	Leu Phe Ser	Ala Ala Thr
180	185	190	
Val Ile Ala	Gly Ala Pro	Asp Asp Gln	Val Gln Ala
195	200	205	

Gly Asp Ala Leu Gly Ile Ser Phe Gln Ile Val Asp Asp Leu Leu Asp
210 215 220

Tyr Gly Gly Ala Thr Glu Thr Ile Gly Lys Asn Val Gly Asp Asp Phe
225 230 235 240

Arg Glu Arg Lys Leu Thr Leu Pro Val Ile Lys Ala Ile Ala Lys Ala
245 250 255

Asp Ala Glu Glu Arg Ala Phe Trp Thr Arg Thr Ile Glu Ala Gly Asp
260 265 270

Gln Arg Asp Gly Asp Leu Glu His Ala Leu Ser Leu Leu Ala Arg His
275 280 285

Gly Ala Met Glu Ala Ala Arg Ala Asp Ala Leu Ala His Ala Ala Arg
290 295 300

Val Arg Ala Ala Leu Gln Val Leu Pro Ala His Pro Ile Arg Asp Met
305 310 315 320

Leu Ala Asp Leu Ala Asp Phe Val Val Ser Arg Val Ala
325 330

- <210> 9
- <211> 1452
- <212> DNA
- <213> 類胡蘿蔔素副球菌

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1350).. (1350)
- <223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 9
agtttgatcc tggctcagaa ogaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagoga 60
gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120
aatagccccc ggaaactggg agtaataccg tatacgccct ttgggggaaa gatttatcgg 180

agaaggatcg gcccgcggtg gattaggtag ttggtggggt aatggccac caagccgacg	240
atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc	300
ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggggc aaccctgac tagccatgcc	360
gcgtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca gctgggaaga taatgacggt	420
accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggagggggct	480
agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtaggc ggactggaaa gtcagaggtg	540
aaatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaactat cagtctggag ttcgagagag	600
gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc	660
gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg	720
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct	780
tgtcgggtgc acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa	840
aactcaaagg aattgacggg ggccccacac agcggcggag catgtgggtt aattcgaagc	900
aacgcgcaga accttaccaa cccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagctttct	960
cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttc	1020
ggttaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagttg ccagcaattc agttgggaac	1080
tctatggaaa ctgccgatga taagtcggag gaaggtgtgg atgacgtcaa gtcctcatgg	1140
gccttacggg ttgggctaca cacgtgctac aatggtggtg acagtgggtt aatccccaaa	1200
agccatctca gttcggattg tcctctgcaa ctcgagggca tgaagttgga atcgctagta	1260
atcgcggaac agcatccgc ggtgaatacg ttcccgggac ttgtacacac cggccgtcac	1320
accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggcggccac	1380
ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgcggctg	1440
gatcacctcc tt	1452

發明摘要

※ 申請案號：106110500

※ 申請日：106/03/29

※ I P C 分類：
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

類胡蘿蔔素的製造方法

METHOD FOR PRODUCING CAROTENOIDS

【中文】

含有下述的(a)至(c)的任一項的基因的變異型類胡蘿蔔素產生細菌。

(a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；

(b)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；

(c)上述(a)及(b)二者的基因。

【英文】

Provided is a variant carotenoids producing bacterium comprising any one gene of the following (a)~(c).

(a) a gene encoding a protein comprising a variant amino acid sequence in which at least the amino acid residue at No. 225 is substituted by other amino acid residue in the amino acid sequence of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in carotenoids producing bacteria;

(b) a gene encoding a protein comprising a variant amino acid sequence in which at least the amino acid residue at No. 305 is substituted by other amino acid residue in the amino acid sequence of decaprenyl 2-phosphate synthase in carotenoids producing bacteria;

(c) both genes of the above (a) and (b).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

由於本案的圖為實驗結果圖，並非本案的代表圖。

故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

申請專利範圍

1. 一種變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其係含有下述的(a)至(c)的任一項的基因，
 - (a)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基是經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；
 - (b)編碼包含有在類胡蘿蔔素產生細菌的十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基是經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質的基因；
 - (c)上述(a)及(b)的二者的基因。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列是序列編號 2 所示者。
3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，第 225 個胺基酸殘基是由甘胺酸經取代為天門冬胺酸者。
4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列是序列編號 4 所示者。
5. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，第 305 個胺基酸殘基是由丙胺酸經取代為纈胺酸者。

6. 如申請專利範圍第 1 項至第 5 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其獲得相較於沒有編碼包含有變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生能力，為更高的產生能力。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其獲得相較於沒有編碼有包含變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生量，為至少 5 倍以上的量的產生能力。
8. 如申請專利範圍第 1 項至第 7 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，該類胡蘿蔔素產生細菌是屬於副球菌屬(Paracoccus)屬的細菌。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中，該屬於副球菌屬(Paracoccus)的細菌是 E-396 株。
10. 如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，其中該類胡蘿蔔素是蝦紅素。
11. 一種類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為，培養如申請專利範圍第 1 項至第 10 項中任一項所述的變異型類胡蘿蔔素產生細菌，並由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述的類胡蘿蔔素的製造方法，其中，該類胡蘿蔔素的產生量，相較於沒有編碼包含有變異型胺基酸序列的蛋白質的基因的類胡蘿蔔素產生細菌的類胡蘿蔔素產生量，為至少 5 倍以上的產生量。

13. 如申請專利範圍第 11 項或第 12 項所述的類胡蘿蔔素的製造方法，其中，該類胡蘿蔔素是蝦紅素。
14. 一種類胡蘿蔔素產生細菌的篩選方法，其特徵為，對類胡蘿蔔素產生細菌施以變異處理，由經變異處理的細菌選出有下述的(a)至(c)的任一項的特徵的細菌：
 - (a) 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的活性比變異處理前的細菌中之活性更為提高的特徵；
 - (b) 十聚異戊二烯二磷酸合成酶的活性比變異處理前的細菌中之活性更為降低的特徵；
 - (c) 上述(a)及(b)的二者的特徵。
15. 一種類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為，培養由申請專利範圍第 14 項所述的類胡蘿蔔素產生細菌的篩選方法選擇的細菌，由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。
16. 一種基因，其編碼包含有在 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 225 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列的蛋白質。
17. 一種基因，其係含有下述的(a)或(b)的 DNA，
 - (a) 含有序列編號 5 表示的鹼基序列的 DNA；
 - (b) 編碼蛋白質的 DNA，該蛋白質係和包含與上述(a)的 DNA 互補的鹼基序列而成的 DNA 在嚴苛的條件下雜交，並且具有 1-去氧-D-木酮糖 5 磷酸合成酶活性。
18. 一種編碼蛋白質的基因，該蛋白質包含有在十聚異戊二烯二磷酸合成酶的胺基酸序列中，至少第 305 個胺基酸殘基經其他的胺基酸殘基取代的變異型胺基酸序列。

19. 一種基因，其係含有下述的(a)或(b)的 DNA，

(a)含有序列編號 7 表示的鹼基序列的 DNA；

(b)編碼蛋白質的 DNA，該蛋白質係和包含與上述 (a)的 DNA 互補的鹼基序列而成的 DNA 在嚴苛的條件下雜交，並且十聚異戊二烯二磷酸合成酶活性降低。

20. 一種重組載體，其係含有下述的(a)至(c)的任一項的基因，

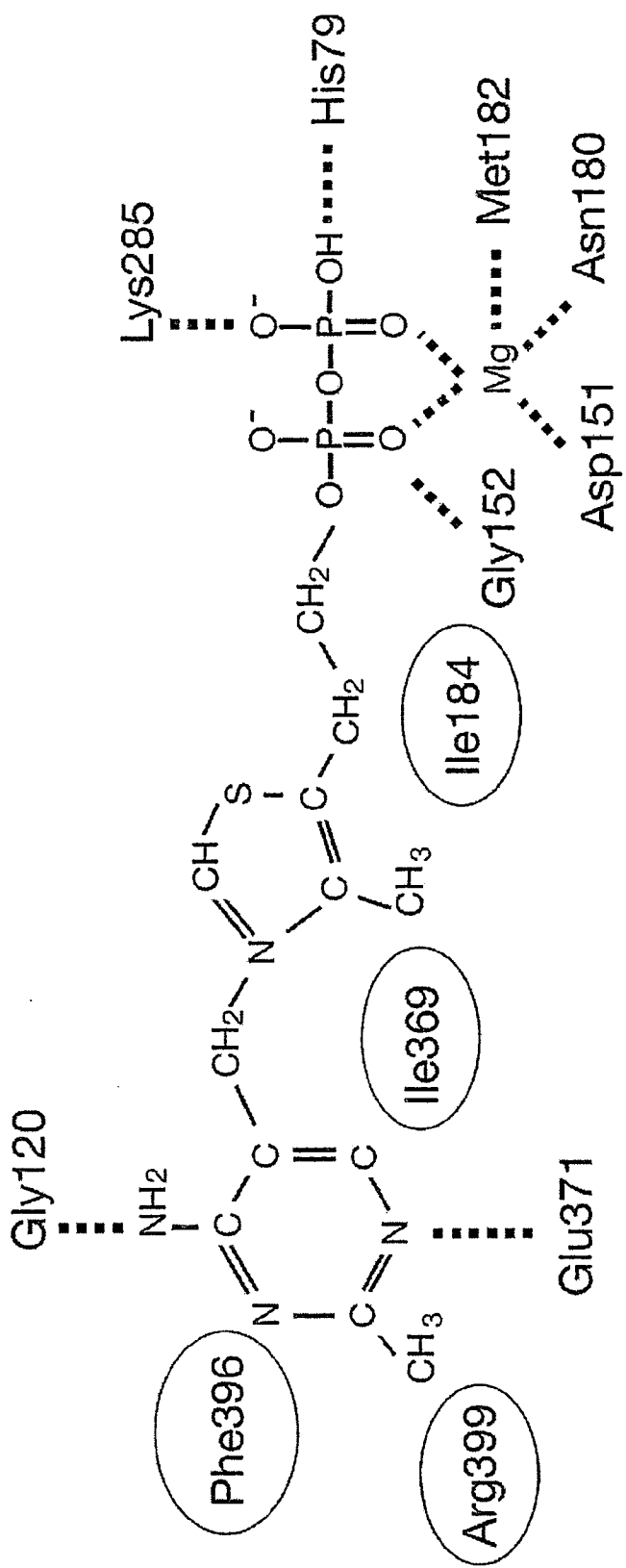
(a)如申請專利範圍第 16 項或第 17 項所述的基因；

(b)如申請專利範圍第 18 項或第 19 項所述的基因；

(c)上述(a)及(b)的基因。

21. 一種形質轉換體，其係含有如申請專利範圍第 20 項所述的重組載體。

22. 一種類胡蘿蔔素的製造方法，其特徵為，培養如申請專利範圍第 21 項所述的形質轉換體，由所得的培養物採取類胡蘿蔔素。

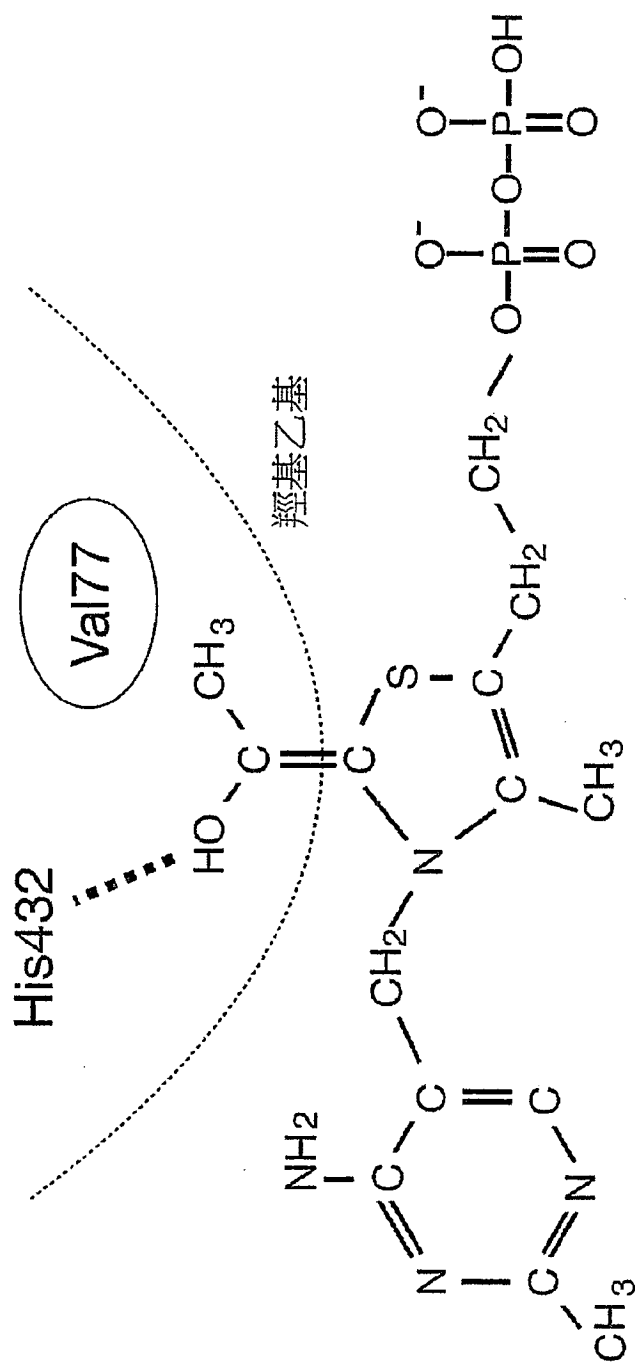


TPP

嘧啶啉環
嘧啶啉環
焦磷酸

氢键
疏水性键

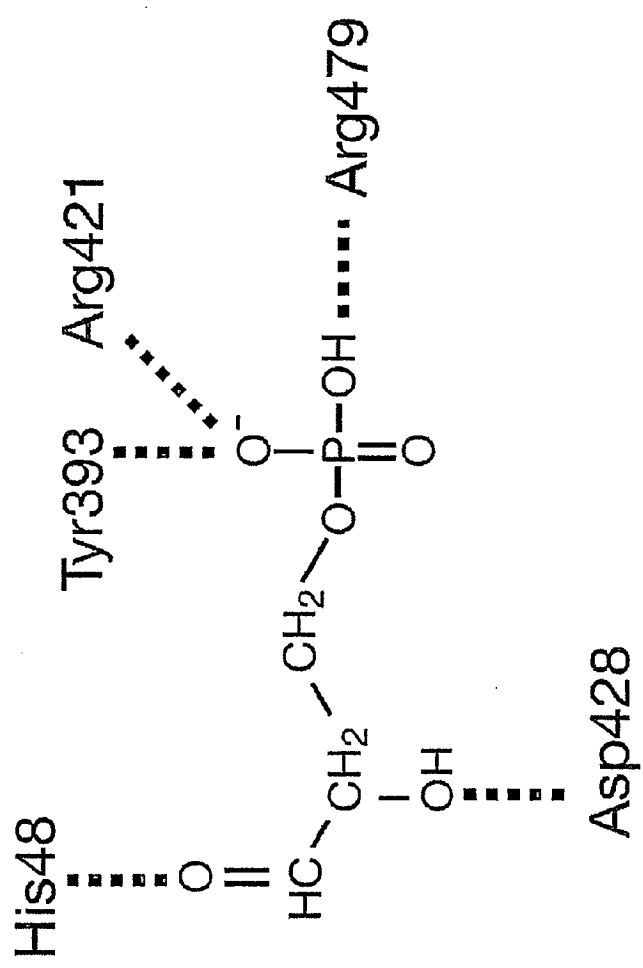
第6圖



羟基乙基-TPP

第10圖

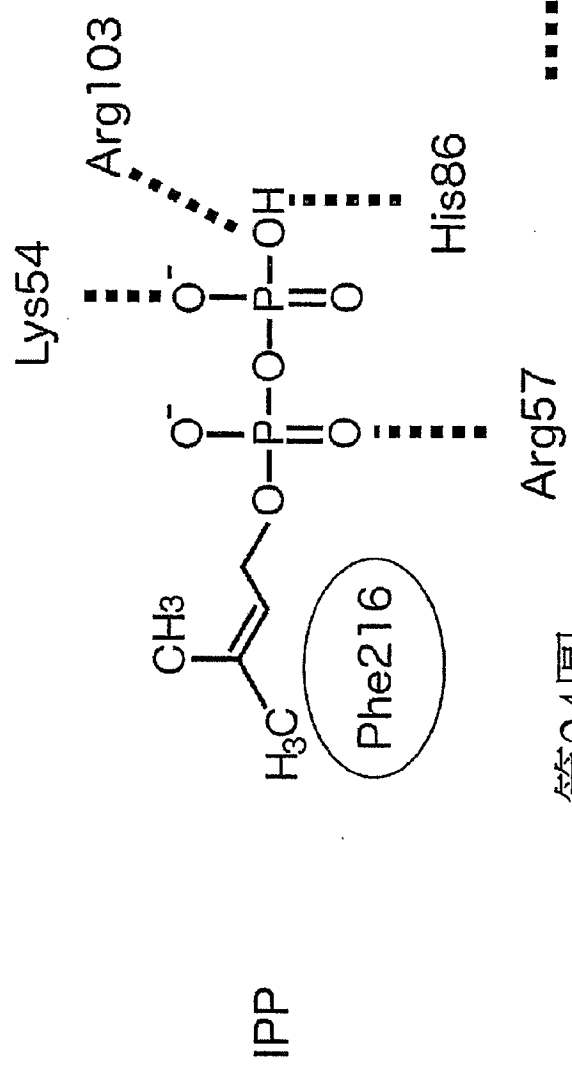
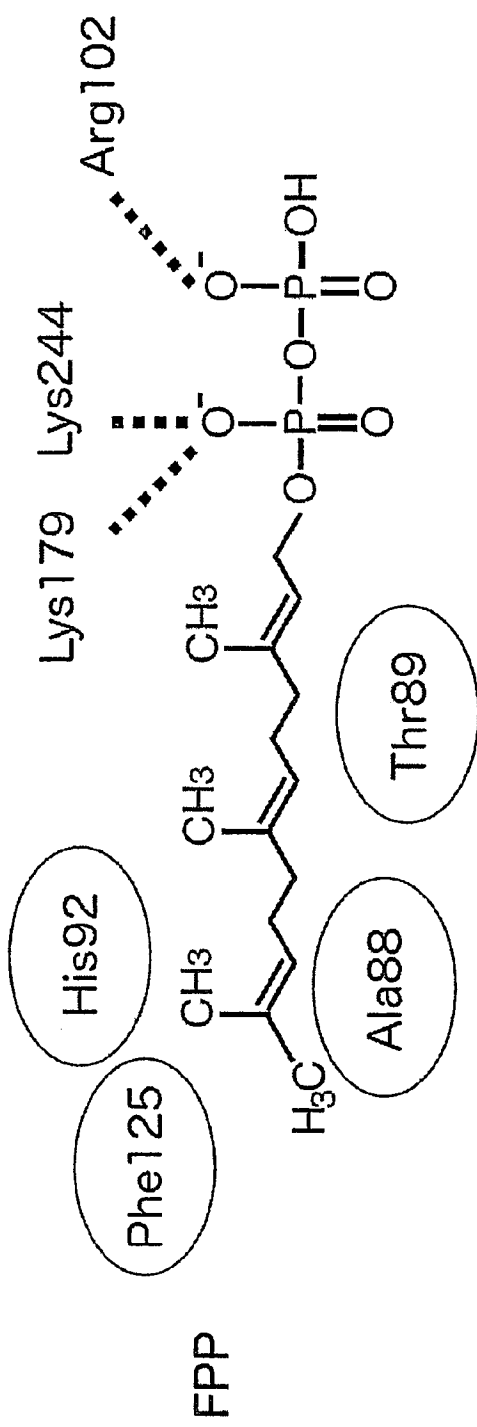




甘油醛3磷酸

第11圖

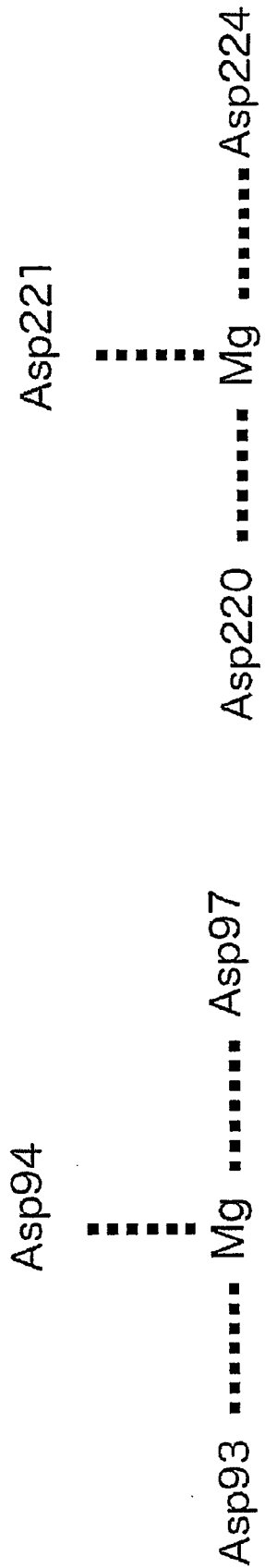
..... 氢键



○ 疏水性鍵

..... 氫鍵

第24圖



第25圖

