

明 細 書

発明の名称：

形質転換体並びにそれを用いるカロテノイド組成物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、形質転換体並びにそれを用いるカロテノイド組成物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] カロテノイドは、植物、藻類、細菌などが生産する天然色素であり、生物において多様な生理的機能を司る重要な化合物群である。これまでに多くのカロテノイドが単離されており、自然界に微量にしか存在しないカロテノイドについてもその健康機能が注目され始めてきたが、微量であるため商業的な製造は高コストとなり困難であった。

[0003] このため、近年、カロテノイドを微生物で安価に生産するためのバイオテクノロジー研究が盛んにおこなわれてきた。植物におけるカロテノイド生合成経路および生合成遺伝子は、2000年までにほぼ明らかにされている。カロテノイドの生合成に関与する遺伝子を上流から同定し、同定された遺伝子を微生物に導入した形質転換体を作製して、当該形質転換体によってカロテノイドを生産する多くの試みがなされてきた。

[0004] カロテノイド産生の宿主として最も研究されている微生物が、大腸菌である。大腸菌は、カロテノイドを含むイソプレノイドの基本代謝経路として、非メバロン酸経路（MEP経路）により、イソペンテニルニリン酸（IPP）と、その異性体であるジメチルアリルニリン酸（DMAPP）を合成する（非特許文献1）。合成されたIPP及びDMAPPは、プレニル基転移酵素を介した連続縮合反応により、ゲラニルニリン酸（GPP）及びファルネシルニリン酸（FPP）まで代謝される。

[0005] 大腸菌はカロテノイド非生産菌であり、FPP以降のカロテノイド合成に必要な酵素遺伝子を保有していないが、ゲラニルゲラニルピロリン酸（GG

PP) 合成酵素遺伝子 (crtE)、フィトエン合成酵素遺伝子 (crtB)、リコペンを合成するフィトエン不飽和化酵素遺伝子 (crtI)、 β カロテンを合成するリコペン環化酵素遺伝子 (crtY)、 β クリプトキサンチン及びゼアキサンチンを合成する β カロテン水酸化酵素遺伝子 (crtZ) といったカロテノイド生合成遺伝子を、産生目的のカロテノイドに応じて上流から組み込むことで、種々のカロテノイドを合成することが可能となる。

[0006] 一方で、このようにして産生可能であることが判明したカロテノイドであっても、単にカロテノイドの生合成遺伝子群を導入するだけでは、実際の産生量が実用生産レベルからは程遠いことが多い。これは、大腸菌が、カロテノイド合成の前駆体となるFPPを少量しか産生できないことが原因しているとされている。このため、カロテノイドの大量生産を目指し、FPP増産を目的としたパスウェイエンジニアリングが検討されている。

[0007] パスウェイエンジニアリングのアプローチとしては、MEP経路を含む内在代謝経路を改変する方法、及び異種生物由来のメバロン酸(MVA)経路遺伝子群を導入する方法とに大別される。

[0008] 前者のアプローチの代表例として、*S. cerevisiae*又は緑藻(*Haematococcus pluvialis*)由来の1型IPPイソメラーゼ遺伝子(idi)を高発現させた大腸菌で、カロテノイド生産量を顕著に増加させる方法(非特許文献2)が挙げられ、例えば、idiと、*Pantoea ananatis*由来のcrtE、crtB、crtI、crtY、及びcrtZとが導入された大腸菌が、ゼアキサンチンを優勢に産生できること(非特許文献3)が報告されている。

[0009] 後者のアプローチの代表例として、放線菌*Streptomyces* sp. CL190株由来のMVA経路遺伝子群(2型IPPイソメラーゼ遺伝子を含む)を機能発現させた大腸菌を利用し、重水素化D-MVALラクトンを基質として、重水素化ゼアキサンチンが合成されることが見出されている(非特許文献4)。このアプローチは、大腸菌を宿主としたカロテノイド生産のためのパスウェイエンジニアリング研究において、強力かつ効果的な手段であると考えられて

いる（非特許文献5）。

- [0010] 一方、ゼアキサンチンエポキシ化酵素（ZEP）遺伝子がゼアキサンチンからアンテラキサンチンを合成すること、及びカプサンチン→カプソルビン合成酵素（CCS）遺伝子がアンテラキサンチンからカプサンチンをそれぞれ合成すること（非特許文献6）が判明している。しかしながら、これら遺伝子が判明してから久しいにも関わらず、他のカロテノイド生合成遺伝子群と共に宿主に導入してカプサンチンが合成されたという報告はない。

先行技術文献

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Rohmer, M. et al.: Biochem. J., 295, 517 (1993)
非特許文献2：Kajiware, S. et al.: Biochem. J., 324, 421 (1997)
非特許文献3：Takemura, M. et al.: Tetrahedron Letters 56, 6063 (2015)
.
非特許文献4：Kakinuma, K. et al.: J. Am. Chem. Soc., 123, 1238 (2001)
.
非特許文献5：生物工学会誌, 第93巻, 第7号, 397 (2015).
非特許文献6：Bouvier, F. et al. The Plant Journal, 6(1), 45 (1994)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] カプサンチンは、リコペン、カロテン、クリプトキサンチン、ゼアキサンチンとは異なり、これまで知られている組換え微生物を用いた方法では合成することができないものであった。事実、本発明者が、CrtE遺伝子、CrtB遺伝子、CrtI遺伝子、CrtY遺伝子、CrtZ遺伝子、ZEP遺伝子、及びCCS遺伝子をIDI遺伝子とともに腸菌に導入しても、カプサンチンは全く生成しなかった。
- [0013] 本発明は、カプサンチンのように、これまで合成できなかったカロテノイドを含む組成物を遺伝子組換え技術により製造する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

[0014] 本発明者は、カプサンチンの生合成遺伝子群のうち一部の遺伝子の発現量のみが相対的に多くなるように制御するという斬新な発想に思い至った。そこで、カプサンチンの基質を相対的に多く得ることを目的として、カプサンチンの生合成遺伝子群のうち上流の遺伝子の発現量が相対的に多くなるように組換えベクターを構築し、これを形質転換してカプサンチンの合成を試みた。しかしながらこの方法では、*idi*を組み込んでも、カプサンチンは全く生成しなかった。

[0015] そこで、カプサンチンの生合成遺伝子群のうち下流の遺伝子の発現量が相対的に多くなるように組換えベクターを構築するよう発想を転換してみると、意外にも、その形質転換体がカプサンチンを生成できることを見出した。さらに、ZEP遺伝子及びCCS遺伝子を、所定のアフィニティータンパク質の多量体を介してZEP及びCCSが間接的に結合するように発現させるようにベクターに組換えベクターに組み込んだ場合には、カプソルビン、ククルビタキサンチンA等の他の多様なカロテノイドまでも生成できることも予期せず見出した。本発明は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねることにより完成された発明である。

[0016] すなわち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. 第1のプロモータ、及び前記第1のプロモータに作動可能に連結された、 *crt Y*及び *crt Z*を含むカロテノイドの生合成遺伝子上流遺伝子と、

前記第1のプロモータよりプロモータ強度が高い第2のプロモータ、及び前記第2のプロモータに作動可能に連結されたZEP遺伝子及びCCS遺伝子と、

が宿主細胞に導入された、形質転換体。

項2. 前記第1のプロモータと前記第2のプロモータとのプロモータ強度の差が、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータとPBADとのプロ

モータ強度の差以上である、項 1 に記載の形質転換体。

項 3. 前記上流遺伝子が、*crtI* ; *crtI* 及び *crtB* ; 又は *crtI*、*crtB* 及び *crtE* をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の転換体。

項 4. 前記第 1 のプロモータが、*P_{lac}* 又はカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータである、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の形質転換体。

項 5. 前記第 2 のプロモータが、*P_{BAD}* 又は *P_{tac}* である、項 1 ～ 4 のいずれかに記載の形質転換体。

項 6. 更に、S プロテイン遺伝子、S タグ遺伝子及びリンカー遺伝子が前記宿主細胞に導入されており、

前記 ZEP 遺伝子及び前記 CCS 遺伝子それぞれに、前記 S タグ遺伝子が連結され、

前記リンカー遺伝子が、前記 ZEP 遺伝子と前記 S タグ遺伝子との間及び／又は前記 CCS 遺伝子と前記 S タグ遺伝子との間に介在して連結されている、項 1 ～ 5 のいずれかに記載の形質転換体。

項 7. 前記 S タグ遺伝子がコードする S タグが、以下の (1) 及び (2) のいずれかのポリペプチドである、項 6 に記載の形質転換体：

(1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリペプチド

(2) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列に対する 12 番目以外の配列同一性が 90% 以上であり、且つ、S プロテインと特異的に結合するポリペプチド。

項 8. 前記リンカー遺伝子が、少なくとも、前記 ZEP 遺伝子と前記 S タグ遺伝子との間に介在して連結されている、項 1 ～ 7 のいずれかに記載の形質転換体。

項 9. 前記リンカー遺伝子が、前記 ZEP 遺伝子と前記 S タグ遺伝子との間に介在して連結され、前記 CCS 遺伝子と前記 S タグ遺伝子との間に介在しない、項 1 ～ 8 のいずれかに記載の形質転換体。

項 10. 項 1 ～ 9 のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程を含む、カロテノイド組成物の製造方法。

項 1 1. 前記カロテノイド組成物がカプサンチンを含む、項 1 0 に記載の製造方法。

項 1 2. 前記カロテノイド組成物が、カプソルビン、カプサンチン 3' - アセテート、カプソルビン 3 - アセテート、ククルビタキサンチン A、カプソルビンジアセテート、カプサンチン 3, 6 - エポキシド、及び／又はカプサンチン 3, 6 - エポキシド 3' - アセテートを含む、項 1 0 又は 1 1 に記載の製造方法。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、カプサンチンのように、これまで合成できなかったカロテノイドを含む組成物を遺伝子組換え技術により製造することが可能になる。このような効果が得られるメカニズムとしては定かではないが、次のように考察される。CCS については、アンテラキサンチンからカプサンチンを合成する活性だけでなく、カロテノイド生合成経路の上流におけるリコピンから β カロテンを合成する副活性も見出された。このため、上流の基質を多くすると、CCS の機能の多くがリコピンから β カロテンを合成する反応の触媒に利用され、カプサンチンを合成する活性を示す方に機能しなかったと考えられる。ゼアキサンチン及びそれより上流の遺伝子の発現量を相対的に低く、ゼアキサンチンの合成に係る遺伝子よりも下流のZEP 遺伝子及びCCS 遺伝子の発現量を高めることで、ゼアキサンチン及びそれより上流の中間体の過度の蓄積を抑制し、これまでカプサンチンを合成する活性を示すように機能させることができなかったCCS を始めて機能させることができたと考えられる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]カロテノイド生合成経路及びそれを仲介する酵素群を示す。

[図2]比較例 1 で作製した組換えベクターの模式図である。

[図3]比較例 2 (比較例 2 - 1 及び比較例 2 - 2) で作製した組換えベクターの模式図である。

[図4]比較例 2 (比較例 2 - 1 及び比較例 2 - 2) で得られたカロテノイド組

成物のHPLCクロマトグラムである。

[図5]実施例1で作製した組換えベクターの模式図である。

[図6]実施例1で得られたカロテノイド組成物のHPLCクロマトグラムである。

[図7]実施例1で得られたカロテノイド組成物のUPLCクロマトグラム（a）、カプサンチンの吸収スペクトル（b）、及びカプサンチンのマスペクトル（c）を示す。

[図8]実施例2（実施例2-1及び実施例2-2）で作製した組換えベクターの模式図である。

[図9]実施例2（実施例2-1及び実施例2-2）で得られたカロテノイド組成物のHPLCクロマトグラムを示す。

[図10]実施例2（実施例2-1及び実施例2-2）で得られたカロテノイド組成物のカプサンチンの産生量を示す。

[図11]実施例3（実施例3-1～実施例3-3）で作製した組換えベクターの模式図である。

[図12]実施例3（実施例3-1～実施例3-3）による発現系で構築される、Sプロテインを用いたCCS及びZEPの協調システムを模式的に示す。

[図13]実施例3（実施例3-1～実施例3-3）で得られたカロテノイド組成物の分析結果を示す。

[図14]実施例3（実施例3-2）で得られたカロテノイド組成物の分析結果を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 1. 形質転換体

本発明の形質転換体は、第1のプロモータ、及び前記第1のプロモータに作動可能に連結された、crtY及びcrtZを含むカロテノイドの生合成遺伝子上流遺伝子と；前記第1のプロモータよりプロモータ強度が高い第2のプロモータ、及び前記第2のプロモータに作動可能に連結されたZEP遺伝子及びCCS遺伝子と、が宿主細胞に導入されたものであることを特徴

とする。これによって、宿主細胞でカロテノイドの生合成酵素を発現させ、カロテノイド組成物の生成を可能にする。

[0020] 1-1. カロテノイド生合成酵素及びそれをコードする遺伝子（カロテノイド生合成遺伝子）

図1に、カロテノイド生合成経路及びそれを仲介する酵素群を示す。なお、図1では、組換え大腸菌を用いてカロテノイドを生合成する例を挙げている。

[0021] CrtEは、ファルネシルニリン酸（FPP）からゲラニルゲラニルピリン酸（GGPP）を合成するGGPP合成酵素であり、以下において、CrtEをコードする遺伝子を「crtE」と記載する。

[0022] CrtBは、GGPPからフィトエンを合成するフィトエン合成酵素であり、以下において、CrtBをコードする遺伝子を「crtB」と記載する。

[0023] CrtIは、フィトエンからリコペンを合成するフィトエン不飽和化酵素であり、以下において、CrtIをコードする遺伝子を「crtI」と記載する。

[0024] CrtYは、リコペンからβカロテンを合成するリコペン環化酵素であり、以下において、CrtYをコードする遺伝子を「crtY」と記載する。

[0025] CrtZは、βカロテンからβクリプトキサンチン及びゼアキサンチンを合成するβカロテン水酸化酵素であり、以下において、CrtZをコードする遺伝子を「crtZ」と記載する。

[0026] ZEPは、ゼアキサンチンからアンテラキサンチン及びピオラキサンチンを合成するゼアキサンチンエポキシ化酵素である。

[0027] CCSは、アンテラキサンチン及びピオラキサンチンからそれぞれカプサンチン及びカプソルピンを合成することが知られている、カプサンチン／カプソルピン合成酵素である。さらに本発明者により見いだされた知見では、CCSは、アンテラキサンチンから、カプサンチン3'-アセテート、ククルピタキサンチンAを合成し、ピオラキサンチンから、カプソルピン3'-ア

セテート、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3, 6-エポキシド、カプサンチン3, 6-エポキシド3'-アセテートを合成する合成酵素でもある。

[0028] 上記の、カロテノイド生合成酵素をコードする遺伝子は公知の遺伝子であり、その具体的な配列は、公式データベース等から適宜取得することができる。

[0029] これらカロテノイド生合成遺伝子の由来となる生物としては特に限定されず、これらの遺伝子に対応するカロテノイドを産生する生物から特に制限なく選択される。具体的な由来生物としては、植物及び微生物を問わず、具体的には、*Capsicum*属、(例えば*Capsicum annuum*)、*Lilium*属(例えば*Lilium lancifolium*)、*Arabidopsis*属(例えば*Arabidopsis thaliana*)、*Zea*属(例えば*Zea Mays*)、*Prunus*属(例えば*Prunus armeniaca*)、*Ipomoea*属(例えば*Ipomoea nil*)、*Gentiana*属(例えば*Gentiana lutea*)、*Marchantia*属(例えば*Marchantia Polymorpha*)、*Pantoea*属(例えば*Pantoea ananas*)、*Agrobacterium*属(例えば*Agrobacterium aurantiacum*)、*Heamatococcus*属、*Monoraphidium*属、*Phaffia*属(*Xanthophyllomyces*属)、*Paracoccus*属、*Brevundimonas*属、*Gordonia*属(*Rhodococcus*属)、*Nostoc*属、*Brevundimonas*属、および、*Gloeobacter*属、等が挙げられ、好ましくは*Capsicum*属、*Lilium*属、*Pantoea*属が挙げられる。また、それぞれの遺伝子の由来となる生物の異同は問わないが、好ましくは同じ生物が挙げられる。

[0030] 本発明で用いることができるカロテノイドの生合成遺伝子には、公式データベースから取得できる塩基配列及びそのコドン最適化配列からなるもの

けでなく、カロテノイドの生合成酵素活性を有する酵素をコードするものであれば、当該配列と類似（具体的には、下記（I-1）、（II-1）、（III-1）の塩基配列に対する（I-2）、（II-2）、（III-2）及び（I-3）、（II-3）、（III-3）の塩基配列の類似性に相当する程度に類似）の塩基配列からなるものも含まれる。

[0031] 上記のカロテノイドの生合成遺伝子の塩基配列の好ましい例としては、以下が挙げられる。

（I-1）DDBJアクセッション番号D90087で示されるcrtE、crtY、crtI、crtB及びcrtZ遺伝子の塩基配列、

（II-1）DDBJアクセッション番号XM_016705616で示されるZEP遺伝子の塩基配列、

（III-1）DDBJアクセッション番号X76165で示されるCCS遺伝子の塩基配列、

（I-2）ファルネシルニリン酸（FPP）からゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）を合成するGGPP合成酵素活性を有する酵素、GGPPからフィトエンを合成するフィトエン合成酵素活性を有する酵素、フィトエンからリコペンを合成するフィトエン不飽和化酵素活性を有する酵素、リコペンからβカロテンを合成するリコペン環化酵素活性を有する酵素、及びβカロテンからβクリプトキサンチン及びゼアキサンチンを合成するβカロテン水酸化酵素活性を有する酵素をそれぞれコードする遺伝子であって、上記（I-1）に示す塩基配列と相補的な塩基配列それぞれからなる核酸とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸の塩基配列、

（II-2）ゼアキサンチンからアンテラキサンチン及びビオラキサンチンを合成するゼアキサンチンエポキシ化酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子であって、上記（II-1）に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸の塩基配列、

（III-2）アンテラキサンチン及びビオラキサンチンからそれぞれカプサンチン及びカプソルピンを合成し、その他、カプソルピン、カプサンチン3' -

アセテート、カプソルビン3-アセテート、ククルビタキサンチンA、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3, 6-エポキシド、カプサンチン3, 6-エポキシド3'-アセテートを合成する酵素活性をコードする遺伝子であって、上記 (III-1) に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸の塩基配列、

(I-3) ファルネシルニリン酸 (FPP) からゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成するGGPP合成酵素活性を有する酵素、GGPPからフィトエンを合成するフィトエン合成酵素活性を有する酵素、フィトエンからリコペンを合成するフィトエン不飽和化酵素活性を有する酵素、リコペンからβカロテンを合成するリコペン環化酵素活性を有する酵素、及びβカロテンからβクリプトキサンチン及びゼアキサンチンを合成するβカロテン水酸化酵素活性を有する酵素をそれぞれコードする遺伝子であって、上記 (I-1) に示す塩基配列と相補的な塩基配列それぞれと90%以上の相同性を有する塩基配列、

(II-3) ゼアキサンチンからアンテラキサンチン及びビオラキサンチンを合成するゼアキサンチンエポキシ化酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子であって、上記 (II-1) に示す塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列、

(III-3) アンテラキサンチン及びビオラキサンチンからそれぞれカプサンチン及びカプソルビンを合成し、その他、カプソルビン、カプサンチン3'-アセテート、カプソルビン3-アセテート、ククルビタキサンチンA、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3, 6-エポキシド、カプサンチン3, 6-エポキシド3'-アセテートを合成する酵素活性をコードする遺伝子であって、上記 (III-1) に示す塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列。

[0032] 上記 (I-2)、(II-2)、(III-2) において、「ストリンジェントな条件下」とは、0.5% SDS、5×デンハルツ [Denhartz's, 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% ポリビニルピロリドン、0.

1%フィコール400] および100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは、0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0) 中で、50℃～65℃で4時間～一晩保温する条件をいう。ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、具体的には、以下の手法によって行われる。即ち、DNAライブラリー又はcDNAライブラリーを固定化したナイロン膜を作成し、6×SSC、0.5% SDS、5×デンハルト、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液中、65℃でナイロン膜をブロッキングする。その後、³²Pでラベルした各プローブを加えて、65℃で一晩保温する。このナイロン膜を6×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む2×SSC中、室温で10分間、0.1% SDSを含む0.2×SSC中、45℃で30分間洗浄した後、オートラジオグラフィーをとり、プローブと特異的にハイブリダイズしている核酸を検出することができる。

[0033] 上記(I-3)、(II-3)、(III-3)において、上記相同性は90%以上であればよいが、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは98.5%以上、一層好ましくは99%以上、より一層好ましくは99.5%以上、特に好ましくは99.9%以上が挙げられる。「相同性」は、基準配列を照会配列として比較するアルゴリズムをもった公開又は市販されているソフトウェアを用いて計算される。具体的には、BLAST、FASTA、又はGENETYX (株式会社ゼネティックス製) 等を用いることができ、これらはデフォルトパラメーターに設定して使用すればよい。

[0034] さらに、上記のカロテノイドの生合成遺伝子は、全長配列が組換えベクターに組み込まれてもよいし、宿主での目的酵素の発現において不要な配列を除去した状態で組換えベクターに組み込まれてもよい。たとえば、カロテノイドの生合成遺伝子の由来となる生物が植物であり、宿主が非植物細胞である場合、カプサンチンの産生量をより一層向上させる観点から、シグナル配列を除去した状態で組換えベクターに組み込むことが好ましい。それぞれの植物由来遺伝子のシグナル配列も、公式データベース、又は様々な遺伝子解

析ツールを用いることによって容易に取得できる。

[0035] 以下において、カロテノイドの生合成遺伝子群のうち、*crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*及び*crtZ*を「上流遺伝子」に分類し、*ZEP*遺伝子及び*CCS*遺伝子を「下流遺伝子」に分類する。

[0036] カロテノイドの生合成遺伝子の上流遺伝子は、第1のプロモータに作動可能に連結され、カロテノイドの生合成遺伝子の下流遺伝子は、第2のプロモータに作動可能に連結される。つまり、第1のプロモータは、上流遺伝子の転写制御を行う領域であり、第2のプロモータは、下流遺伝子の転写制御を行う領域である。また、作動可能に連結とは、制御因子と上記の遺伝子とが、宿主細胞中で作動し得る状態で連結されていることをいう。

[0037] 1-2. プロモータ

第1のプロモータと第2のプロモータとの関係については、第2のプロモータが、第1のプロモータよりプロモータ強度が高くなるように設計される。例えば、第2のプロモータのプロモータ強度が、第1のプロモータのプロモータ強度の3倍以上であることが好ましい。プロモータ強度とは、転写開始の頻度をいい、例えば、*Pbla*単位 (*Pbla* unit; Deuschle et al., *EMBO J.*, 5:2987-2994 (1986))、ミラー単位 (Miller units; β ガラクトシダーゼ単位ともいう; *Pbla*単位の5000倍 (Lanzer et al., *PNAS USA*, 85, 8973-8977 (1988))、*RPU* (Relative promoter units; Meyer et al., *Nature Chemical Biology* 15, 196-204 (2019)) 等により測定される。

[0038] 本発明では、第1のプロモータ及び第2のプロモータにより、カロテノイドの生合成遺伝子の上流遺伝子の発現量が相対的に低く、下流遺伝子の発現量が相対的に高くなるように制御されることで、カロテノイドの合成を可能にする。

[0039] カロテノイドの合成量をより一層向上させる観点から、第1のプロモータと第2のプロモータとのプロモータ強度との差が、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ（好ましくは*Pantoea ananatis*に生来的に備わっているプロモータ、より好ましくは*DDBJ*アクセッション番

号D90087に含まれるプロモータ)とPBADプロモータとのプロモータ強度の差以上であることが好ましく、カロテノイドの生合成遺伝子固有(好ましくは*Pantoea ananatis*に生来的に備わっているプロモータ、より好ましくはDDBJアクセッション番号D90087に含まれるプロモータ)のプロモータとtacプロモータとのプロモータ強度の差以上であることがより好ましい。

[0040] 第1のプロモータ及び第2のプロモータとしては、第2のプロモータの方で相対的にプロモータ強度が高くなるように設計されることを限度として特に限定されず、これらのプロモータが組み込まれた組換えベクターが導入される宿主の種類に応じて適宜選択される。第1のプロモータ及び第2のプロモータは、天然プロモータであってもよいし人工プロモータであってもよい。

[0041] 第1のプロモータ及び第2のプロモータとして用いられるプロモータの具体例として、大腸菌等の原核生物においては、lacプロモータ(Plac)、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ、BADプロモータ(PBAD)、tacプロモータ(Ptac)、trcプロモータ、T7プロモータ、T7lacプロモータ、T5プロモータ、UV5lacプロモータ、L8-UV5lacプロモータ、cspAプロモータ、CAGプロモータ、CMVプロモータ、RSVプロモータ等、酵母においては、GAL1プロモータ、NMT1プロモータ、TEF1プロモータ、ADH1プロモータ、TP11プロモータ、HXT7プロモータ、TDH3プロモータ、PGK1プロモータ、PYK1プロモータ、CAGプロモータ、CMVプロモータ、RSVプロモータ等が挙げられる。

[0042] なお、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータは、カロテノイドの生合成において生来的に備わっているプロモータである。カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータとしては、特に制限なく用いることができ、上述のカロテノイド生合成遺伝子の由来となる生物において、当該カロテノイド生合成遺伝子のプロモータとして生来的に備わっているプロモータを用い

ることができる。一例として、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータの制御下に配置される遺伝子が *Pantoea ananatis* 由来である場合、当該カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータとしても、好ましくは *Pantoea ananatis* に生来的に備わっているプロモータ、より好ましくは DDBJ アクセッション番号 D90087 に含まれるプロモータを用いることができる。

[0043] これら例示を含む様々なプロモータの中から、プロモータ強度の異なる2種を選択し、プロモータ強度の低い方を第1のプロモータとして、プロモータ強度の低い方を第2のプロモータとして選択することができる。さらに、カロテノイドの合成量をより一層向上させるためには、上記例示を含む様々なプロモータの中から、プロモータ強度が上述のプロモータ強度の差となるような2種のプロモータの組み合わせを選択し、プロモータ強度の低い方を第1のプロモータとして、プロモータ強度の低い方を第2のプロモータとして選択することができる。

[0044] 更に好ましくは、第1のプロモータとして、*Plac* 及びカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータが挙げられ、第2のプロモータとして、*PBAD* 及び *Ptac*、一層好ましくは *Ptac* が挙げられる。

[0045] また、上記のようなプロモータ強度の異なる第1のプロモータ及び第2のプロモータを用いることによる発現量の制御は、CCSによるリコピンからβカロテンを合成する反応を抑制するようになされる。従って、第1のプロモータによって発現される上流遺伝子には、少なくとも *crtY* 及び *crtZ* が含まれていればよい。

[0046] 他の上流遺伝子については、*crtY* 及び *crtZ* と同様に第1のプロモータの制御下に配置されていてもよいし、他のプロモータの制御下に配置されていてもよい。好ましくは、他の上流遺伝子は、第1のプロモータの制御下に配置されることが好ましい。他の上流遺伝子が第1のプロモータの制御下に配置される場合の具体例としては、当該上流遺伝子として、更に (i) *crtI* を含む場合； (ii) *crtI* 及び *crtB* を含む場合；及び (iii) *c*

r t l、c r t B及びc r t Eを含む場合が挙げられる。また、他の上流遺伝子とともに、I P Pイソメラーゼ遺伝子 (i d i) を含んでもよく、つまり、第1のプロモータの制御下、更に (iv) c r t l、c r t B、c r t E 及び i d i が配置されてもよい。

[0047] 第1のプロモータ及びその制御下に配置された遺伝子と、第2のプロモータ及びその制御下に配置された遺伝子とは、いずれも、1個の発現ベクターに組み込まれることによって1個の組換えベクターを構成してもよいし、別個の発現ベクターに組み込まれることによってそれぞれ第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターを構成してもよい。

[0048] 1-3. Sプロテインを介したCCS及びZEPの協調システム発現のための遺伝子

CCSは、カプサンチン／カプソルビン合成活性の他に、C r t Yの持つリコピンβ-シクラーゼ活性も有する。このようなCCSの二重活性により、大腸菌体内でCCS遺伝子が効率よく発現したとしても、ZEPではなく、フィトエンデサチュラーゼC r t lと共同して作用することで、C r t lからリコペンを基質として受け取りβ-カロテンを合成する反応が優先する場合がある。そこで、CCSを選択的にZEPと協調反応させることでCCSによる反応生成物の生成量をより一層高めるため、CCS遺伝子及びZEP遺伝子は、以下のように、Sプロテインを介したCCS及びZEPの協調システムを発現させる態様で宿主細胞に導入されることが好ましい。当該協調システムを模式的に説明する図を図12に示す。

[0049] 本発明の、Sプロテインを介したCCS及びZEPの協調システムを発現させる態様では、更に、Sプロテイン遺伝子、Sタグ遺伝子及びリンカー遺伝子が宿主細胞に導入されており、当該ZEP遺伝子及び当該CCS遺伝子それぞれに、当該Sタグ遺伝子が連結され、当該リンカー遺伝子が、当該ZEP遺伝子と当該Sタグ遺伝子との間及び／又は当該CCS遺伝子と当該Sタグ遺伝子との間に介在して連結されている。

[0050] SタグとSプロテインとは、互いに特異的なアフィニティータグとアフィ

ニティータンパク質の関係にあり、一つのRNase A分子を構成するポリペプチドである。RNase Aをサティライシンで切断して得られるN末端20アミノ酸断片がSタグであり、残りの約100アミノ酸からなる断片がSプロテインである。SタグとSプロテインとは非共有的に結合して元の高次構造を再現することができ、その結果RNase活性を呈する (Lopez-Alonso, J. P., Bruix, M., Font, J., Ribo, M., Vilanova, M., Rico, M., Gotte, G., Libonati, M., Gonzalez, C. and Laurents, D. V. (2006) J. Biol. Chem. 281, 9400-9406)。

[0051] Sプロテイン及びRNase Aは、これらの分子の一部がC末端 β -ストランドを分子間でスワッピングし、図12に示すような、ホモ「2量体」、ホモ「3量体」、3量体以上のホモ「多量体」のような、多量体を形成する性質を持つ。

[0052] 一方で、Sタグ遺伝子が連結されたZEP遺伝子及びCCS遺伝子は、それぞれ、宿主細胞内でSタグ融合ZEP及びSタグ融合CCSとして発現する。さらに、リンカー遺伝子が、ZEP遺伝子とSタグ遺伝子との間及び／又はCCS遺伝子とSタグ遺伝子との間に介在して連結されているため、宿主細胞内で発現するSタグ融合ZEP及びSタグ融合CCSは、いずれか又は両方が、Sタグと酵素の間にリンカーを介した融合タンパク質の形態をとる。図1の模式図においては、Sタグ融合ZEP及びSタグ融合CCSの両方が、Sタグと酵素の間にリンカーを介した融合タンパク質の形態で発現している（図中「S tag + linker + CCS」及び「S tag + linker + ZEP」）例を挙げて示している。

[0053] このようなSタグ融合ZEP及びSタグ融合CCSがSプロテインと共発現するため、図12に示すようにSプロテイン多量体に、Sタグを介して融合ZEP及び融合CCSが間接的に結合した複合体を形成する。このような複合体を形成することで、宿主細胞内でZEPとCCSとが物理的に接近するため、CCSが選択的にZEPと協調反応することができる。つまり、CCSは、ZEPによる代謝物を円滑に受け取ることができる。これによって

、CCS代謝により生成するカロテノイドをより多く得ることが可能になる。より具体的には、カプサンチンの生成量を向上させる、並びに／若しくは、カプソルビン、カプサンチン3'-アセテート、カプソルビン3'-アセテート、ククルビタキサンチンA、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3,6-エポキシド、及び／又はカプサンチン3,6-エポキシド3'-アセテートの生成量を向上させることができる。

[0054] Sプロテインは、上述の通りRNase Aのサティライシンによる約100アミノ酸からなる切断生成物として知られているため、そのアミノ酸配列は公知であり（具体的には、配列番号2が挙げられる。）、Sプロテイン遺伝子の塩基配列も公知である（具体的には、配列番号1が挙げられる。）。本発明で用いることができるSプロテイン遺伝子の塩基配列としては、以下が挙げられる。

[0055] (IV-1) 配列番号1で示される塩基配列、

(IV-2) 多量体を形成し且つSタグと特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子であって、上記(IV-1)に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸の塩基配列、及び

(IV-3) 多量体を形成し且つSタグと特異的に結合するタンパク質をコードする遺伝子であって、上記(IV-1)に示す塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列。

[0056] 上記(IV-2)における「ストリンジентな条件下」については、上記(I-2)、(II-2)、(III-2)に関して述べたものと同じである。また、上記(IV-3)における「相同性」及びその好ましい例については、上記(I-3)、(II-3)、(III-3)に関して述べたものと同じである。

[0057] Sタグは、上述の通りRNase AのサティライシンによるN末端の20アミノ酸切断生成物として知られているため、そのアミノ酸配列は公知であり（具体的には、配列番号4の12番目がフェニルアラニンの代わりにヒスチジンであるアミノ酸配列が挙げられる。）、Sプロテイン遺伝子の塩基

配列も公知である（具体的には、配列番号3の34～36番目がフェニルアラニンをコードする配列の代わりにヒスチジンをコードする配列である塩基配列が挙げられる。）。

[0058] 本発明で用いることができるSタグとしては、以下のいずれかが挙げられる。

（1）配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリペプチド

（2）配列番号4に示すアミノ酸配列に対する12番目以外の配列同一性が90%以上、好ましくは95%以上であり、且つ、Sプロテインと特異的に結合するポリペプチド

[0059] なお、配列番号4に示すアミノ酸配列は、Sタグが宿主細胞内でSプロテインと結合することに起因するRNase活性への影響を抑制することを目的として、12番目が、野生型Sタグでのヒスチジンからフェニルアラニンに置換されている。

[0060] 上記（2）のポリペプチドにおいて、配列番号4に示すアミノ酸配列に対する配列同一性とは、配列番号4に示すアミノ酸配列と比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、BLAST PACKAGE [sg i 32 b i t e d i t i o n , V e r s i o n 2 . 0 . 1 2 ; a v a i l a b l e f r o m N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I)] の b l 2 s e q p r o g r a m (T a t i a n a A . T a t s u s o v a , T h o m a s L . M a d d e n , F E M S M i c r o b i o l . L e t t . , V o l . 1 7 4 , p 2 4 7 - 2 5 0 , 1 9 9 9) により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Gap insertion Cost value : 11、Gap extension Cost value : 1に設定すればよい。

[0061] 本発明で用いることができるSタグ遺伝子の塩基配列としては、上記Sタグをコードする塩基配列であれば特に限定されないが、好ましくは以下が挙

げられる。

[0062] (V-1) 配列番号3で示される塩基配列（つまり、配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列）、

(V-2) Sプロテインと特異的に結合するペプチドをコードする遺伝子であって、上記(V-1)に示す塩基配列（但し、配列番号3の34～36番目以外の塩基配列）と90%以上、好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列

。

[0063] 上記(V-2)における「相同性」については、上記(I-3)、(II-3)、(III-3)に関して述べたものと同じである。

[0064] なお、Sタグ遺伝子の上記(V-1)～(V-2)における配列番号3の34番目～36番目は、発現したSタグが宿主細胞内でSプロテインと結合すること起因するRNase活性への影響を抑制することを目的として、野生型Sタグに存在するヒスチジンをコードする配列からフェニルアラニンをコードする配列に置換されている。

[0065] また、Sタグ遺伝子の結合位置としては特に限定されないが、Sタグと融合させる酵素の活性への影響を少なくする観点から、酵素（ZEP及び／又はCCS）のN末端にSタグが結合するように設計することができる。

[0066] リンカー遺伝子としては、融合タンパク質においてSタグと酵素との間でリンカー（ペプチド）が適度な距離を持たせることで、複合体においてCCSとZEPと間に自由度を担保できるものであれば特に限定されない。融合タンパク質におけるリンカー（ペプチド）の好ましい配列としては、リンカー（ペプチド）自体の極性の偏りを排除し不所望の吸着等を抑制する観点から、非極性アミノ酸と極性アミノ酸とが交互に連結した配列であることが好ましく、当該非極性アミノ酸と極性アミノ酸との組み合わせとしては、好ましくはグリシン及びセリンの組み合わせが挙げられる。リンカー（ペプチド）の長さとしては、例えば15～25アミノ酸、好ましくは18～22アミノ酸が挙げられる。

[0067] リンカー遺伝子の介在位置は、上述のとおり、ZEP遺伝子とSタグ遺伝

子との間及びC C S 遺伝子とS タグ遺伝子との間の少なくともいずれかであればよいが、好ましくは、少なくともZ E P 遺伝子とS タグ遺伝子との間であり、特に好ましくは、Z E P 遺伝子とS タグ遺伝子との間のみ（C C S 遺伝子とS タグ遺伝子との間には介在しない）である。

[0068] 1-4. 他の遺伝子

組換えベクターには、上記の配列に加えて、第1のプロモータ及び第2のプロモータ以外の調節配列を含んでもよい。このような調節配列は、カロテノイドの生合成遺伝子上流遺伝子の配列及び／又はカロテノイドの生合成遺伝子下流遺伝子の配列の上流（5'側）、当該配列内、又は下流（3'側）に位置して、転写、RNAプロセッシング又は安定性等に影響を及ぼす。調節配列としては、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、ステムループ構造等が挙げられる。

[0069] 1-5. 発現ベクター

発現ベクターとしては、宿主内で自律的に増殖し得るプラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、ISエレメント、ファスミド、コスミド等から遺伝子組換え用として構築されたものを用いることができる。このような発現ベクターとしては、例えば、pET、pLG、pACYC、pBR、pUC、pKC、pRep、pHS、pKK、pDHE、pPLc、pMBL、pUR、pIN、λgt、pBdCl、pUB、pC、pBD；pSA、pAJ、YEp、YRp、Ylp、pYAC、pCDM、pMT2PC、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等が挙げられる。また、第1の組換えベクターと第2の組換えベクターとで、基礎となる発現ベクターは同じであってもよいし、異なってもよい。また、発現ベクターは、宿主細胞との適切な組み合わせを選んで使用すればよく、例えば大腸菌を宿主細胞とする場合の好ましい例として、pACYCベクター及びpUCベクターとJM101（DE3）大腸菌株との組み合わせ等が挙げられる。

[0070] 1－6. 宿主細胞

宿主としては、組換えベクターが安定であり、且つ自律増殖可能で外来遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されず、また、カロテノイド産生細胞及びカロテノイド非産生細胞を問わない。宿主の好ましい例としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属等に属する細菌；酵母（例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*S. pombe*)、トルラ酵母 (*Candida utilis*)、メタノール資化性酵母 (*Pichia pastoris*)、赤色酵母 (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) 等）等が挙げられるが、その他、動物細胞、昆虫細胞、植物等であってもよい。これらの中でも特に好ましい宿主としては大腸菌が挙げられる。

[0071] 1－7. 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、宿主に組換えベクターを導入することによって得ることができ、宿主に組換えベクターを導入する条件は、宿主の種類等に応じて適宜設定すればよい。宿主が細菌の場合であれば、例えば、ヒートショック法、カルシウムイオン処理によるコンピテントセルを用いる方法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が酵母の場合であれば、例えば、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、スフェロプラスト法及び酢酸リチウム法等が挙げられる。宿主が動物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法及びリポフェクション法等が挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合であれば、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法及びエレクトロポレーション法等が挙げられる。宿主が植物細胞の場合であれば、例えば、エレクトロポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、及びPEG法等が挙げられる。

[0072] 組換えベクターが宿主に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザン

ハイブリダイゼーション法、及びノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。

[0073] PCR法によって組換えベクターが宿主に組み込まれたか否かを確認する場合、例えば、形質転換体から組換えベクターを分離・精製すればよい。

[0074] 組換えベクターの分離・精製は、例えば、宿主が細菌の場合、細菌を溶菌して得られる溶菌物に基づいて行うことができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチームなどの溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼ、及び他の酵素並びにラウリル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤が併用される。

[0075] 更に、凍結融解、超音波照射およびフレンチプレス処理のような物理的破砕方法を組み合わせてもよい。溶菌物からのDNAの分離・精製は、例えば、フェノール処理およびプロテアーゼ処理による除蛋白処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理並びに市販のキットを適宜組み合わせることにより行うことができる。

[0076] DNAの切断は、常法に従い、例えば制限酵素処理を用いて行うことができる。制限酵素としては、例えば特定のヌクレオチド配列に作用するI型制限酵素を用いることができる。DNAと発現ベクターとの結合は、例えばDNAリガーゼを用いて行うことができる。

[0077] その後、分離・精製したDNAを特定の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム及びSYBR Green液等により染色し、検出されたバンド長パターンから、形質転換されたことを確認することができる。

[0078] また、分離・精製したDNAを鋳型として、プライマーを設計してPCRを行うことによっても、形質転換されたことを確認することができる。PCRにより得られた増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウムおよびSYBR Green液等により染色し、そして増幅産物をバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認することができる。

[0079] また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光および酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用してもよい。

[0080] 2. カロテノイド組成物の製造方法

本発明のカロテノイド組成物の製造方法は、本発明の形質転換体を培養する工程を含む製造方法によって得ることができる。

[0081] 形質転換体の培養条件は、宿主の栄養生理的性質を考慮して適宜設定すればよいが、好ましくは液体培養が挙げられる。また、工業的製造を行う場合であれば、通気攪拌培養が好ましい。

[0082] 培地の栄養源としては、形質転換体の生育に必要とされるものが使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、糖蜜、グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、ラクトース、ショ糖、デンプン、乳糖、グリセロール、ピルビン酸等が挙げられる。

[0083] 窒素源としては、資化可能な窒素化合物であればよく、例えば、コーンステープリカー、ペプトン（獣肉ペプトン、カゼインペプトン、大豆ペプトン等）、エキス（肉エキス、酵母エキス）等の天然成分；酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩；グルタミン酸、アスバラギン酸、グリシン等のアミノ酸等が挙げられる。

[0084] 炭素源及び窒素源の他に、例えば、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン及び亜鉛等の塩類、並びに特定のビタミンなどを必要に応じて使用してもよい。

[0085] 培養温度は、本発明の形質転換体が生育可能であり、且つ本発明の形質転換体が本発明のポリペプチドを産生する範囲で適宜設定し得るが、好ましくは20～40℃程度、好ましくは30～37℃程度が挙げられる。培養は、本発明のポリペプチドが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に完了すればよく、培養時間の例としては、24～200時間、好ましくは60～90時間程度が挙げられる。

- [0086] 培養終了後の菌体の回収方法としては、培養液のろ過、デカンテーション、遠心分離等が挙げられる。回収した菌体は、必要に応じ、水、塩化ナトリウム溶液、ジメチルホルムアミド等で処理することができる。
- [0087] 本発明の製造方法において得られるカロテノイド組成物には、典型的にはカプサンチンが含まれ、好ましくは、さらに、カプソルビン、カプサンチン3'-アセテート、カプソルビン3'-アセテート、ククルビタキサンチンA、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3, 6-エポキシド、及び／又はカプサンチン3, 6-エポキシド3'-アセテートが含まれる。
- [0088] 菌体からのカロテノイド組成物の抽出には、適当な有機溶媒を用いることができる。有機溶媒の例としては、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、ジクロロメタン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、酢酸メチル、酢酸エチル等が挙げられ、これらの溶媒から1種又は複数種を選択することができる。これらの有機溶媒の中でも、好ましくはアセトン、メタノール及びジエチルエーテルが挙げられる。
- [0089] 上記のようにして得られたカロテノイド組成物画分は、組成物としてそのまま濃縮及び乾燥させてもよいし、各カロテノイドを精製し濃縮及び乾燥することができる。
- [0090] 精製方法としては、例えば、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の方法を適宜組み合わせることによって行うことができる。乾燥方法としては、凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライ等が挙げられる。

実施例

- [0091] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例及び比較例において用いられるプロモータは、Plac、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ (Pantoea ananatis に生来的に備わっているプロモータ

タであり、具体的にはDDBJアクセッション番号D90087に含まれるプロモータ)、PBAD、又はPtacであり、プロモータ強度の関係は、 $Plac < \text{当該カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ} < PBAD < Ptac$ であり、PBADのプロモータ強度は、当該カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータのプロモータ強度の3倍以上である。

[0092] [比較例1]

本比較例では、組み込む第1の組換えベクターとして図2に示すpACHP-Zeaを構築し、第2の組換えベクターとして図2に示すpUC-Plac-CaCCS-CaZEPを構築した。これら組換えベクターは、上流遺伝子の発現量がカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ(Pantoea ananatis由来)により相対的に高く、下流遺伝子の発現量がPlacにより相対的に低くなるように設計した。本比較例の第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターの概要を表1に示す。

[0093] [表1]

	組換え ベクター	プロモータ	プロモータ 相対強度	ベクター構成(略号)
比較例1	第1	Pantoea ananatis 由来	高	pACHP-Zea
	第2	Plac	低	pUC-Plac- CaCCS-CaZEP

[0094] 第1の組換えベクターとしてのpACHP-Zeaは、非特許文献3の報告で用いられたゼアキサンチン合成用のベクターである。pACHP-Zeaは、pACYCベクターに、Haematococcus pluvialis由来idi遺伝子(DDBJアクセッション番号AB019034)とともに、ゼアキサンチン生合成に必要な遺伝子群(Pantoea ananatis由来crtE、crtY、crtI、crtB及びcrtZ各遺伝子(DDBJアクセッション番号D90087))が挿入されて構成されている。

[0095] 第2の組換えベクターとしてのpUC-Plac-CaCCS-CaZEPは、Capsicum annuum由来ZEP遺伝子(以下において「C

a Z E P」に記載する；D D B J アクセション番号 X M _ 0 1 6 7 0 5 6 1 6) と *C a p s i c u m a n n u u m* 由来 C C S 遺伝子（以下において「C a C C S」と記載する；D D B J アクセション番号 X 7 6 1 6 5) とを p U C ベクターの P l a c プロモータ下流に配置することによって作製した。

[0096] これら第1の組換えベクターと第2の組換えベクターとを、共に、ヒートショック法により大腸菌 J M 1 0 9 株に導入した。

[0097] 組換えベクター導入後、L B 培地上のシングルコロニーを 5 m L の L B 液体培地に移植し、2 0 0 r p m、3 7 ° C で 1 6 時間振盪培養した。1 0 0 μ L の培養液を 1 0 m L の T B 液体培地に移植し、2 0 0 r p m、3 0 ° C で 2 4 時間振盪培養後に 1 0 μ L のイソプロピルーβ-D-ガラクトピラノシド (I P T G) を加えて遺伝子発現を誘導し、さらに培養を 4 8 時間続けた。また、抗生物質として、クロラムフェニコール (3 0 m g / L) 及びカナマイシン (4 0 m g / L) を培地に加えた。

[0098] 得られた培養液の 1 m L を 8, 0 0 0 g で 1 分間遠心分離し、上清を除いて細胞画分を回収した。細胞画分を 1 % 塩化ナトリウム溶液に懸濁し、8, 0 0 0 g で 1 分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。回収した細胞に、0. 5 m L のアセトン、1 m L のジエチルエーテル／ヘキサン (1 : 1 (体積基準)) を添加し、ボルテックスで強く攪拌した。水 1 m L を添加し攪拌した後 5 分間静置し、上層を 1. 5 m L 遠心チューブに回収し、真空遠心濃縮器で乾固させた。

[0099] 得られた乾固物を、A q u i t y H - c l a s s U P L C (W a t e r s) を用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとして A q u i t y U P L C B E H C 1 8 c o l u m n (2. 1 x 1 0 0 m m, 1. 7 μ m, W a t e r s) 、移動相 A としてアセトニトリル：超純水 (8 5 : 1 5 (体積基準)) 、移動相 B としてアセトニトリル：メタノール (6 5 : 3 5 (体積基準)) を用い、移動相 A : 移動相 B が 1 0 0 : 0 から 0 : 1 0 0 とする 8 分間のグラジエントで送液した。その後、0 : 1 0 0 を 5 分間保持す

ることにより、カロテノイドを分離した。

[0100] その結果、カプサンチン標品と溶出時間を同じくするピークは確認できなかった。

[0101] [比較例 2（比較例 2－1 及び比較例 2－2）]

本比較例では、組み込む第 1 の組換えベクターとして図 3 に示す pAC-HiEBIY-Z-CaZEP を構築し、第 2 の組換えベクターとして図 3 に示す pUC-CaCCS（この第 2 の組換えベクターを用いた場合を比較例 2－1 とする。）又は pUC-LICCS（この第 2 の組換えベクターを用いた場合を比較例 2－2 とする。）を構築した。これら組換えベクターは、上流遺伝子及び下流遺伝子のうちの ZEP 遺伝子の発現量が Ptac により相対的に高く、下流遺伝子のうち CCS 遺伝子の発現量が PBAD により相対的に低くなるように設計した。本比較例の第 1 の組換えベクター及び第 2 の組換えベクターの概要を表 2 に示す。

[0102] [表 2]

	組換え ベクター	プロモータ	プロモータ 相対強度	ベクター構成（略号）
比較例 2-1	第 1	Ptac	高	pAC-HiEBIY-Z- CaZEP ^(※1) (※1:CaZEP ₆₄₋₆₆₈)
	第 2	PBAD	低	pUC- CaCCS ^(※2) (※2:CaCCS ₄₁₋₄₉₈)
比較例 2-2	第 1	Ptac	高	pAC-HiEBIY-Z- CaZEP ^(※1) (※1:CaZEP ₆₄₋₆₆₈)
	第 2	PBAD	低	pUC- LICCS ^(※2) (※2:LICCS ₄₁₋₄₉₈)

[0103] 比較例 2－1 及び比較例 2－2 において、非特許文献 3 の報告をもとに、pACYC プラスミドベクターに、Haematococcus pluvialis 由来 idi 遺伝子、と共に、ビオラキサンチン生合成に必要な Pantoea ananatis 由来 crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ 各遺伝子および CaZEP のアミノ酸残基 64 番目から 668 番目まで（植物由来遺伝子は大腸菌内では不要なシグナル配列をタンパク質の N 末端に持つことが多いため。CaZEP₆₄₋₆₆₈ と略し、図 3 中では ZEP*

と示す。)をP t a cプロモータの下流に配置したp A C-H i E B I Y-Z-C a Z E Pを第1の組換えベクターとして作製した。

[0104] 作製した第1の組換えベクターp A C-H i E B I Y-Z-C a Z E Pを、比較例1と同様にして、大腸菌J M 1 0 1 (D E 3)に導入及び培養し、上清を得た。

[0105] 得られた上清を、日立製H P L C Chromaster systemを用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとしてI n e r t s i l O D S-3 (4. 6 x 1 5 0 mm, 5 μm, G Lサイエンス)、移動相Aとしてアセトニトリル、移動相Bとしてイソプロパノールを用い、移動相A : 移動相Bを1 0 0 : 0で5分間送液した後、移動相A : 移動相Bが1 0 0 : 0から5 0 : 5 0 (体積基準)になるよう5分間のグラジェントで送液し、5 0 : 5 0をさらに5分間保持し、カロテノイドを分離した。

[0106] 図4に、得られたH P L Cクロマトグラムを示す。図4に示すように、ピオラキサンチンとアンテラキサンチンの他にゼアキサンチンとβ-カロテンや他の多くのカロテノイド中間体を生成したことを確認した。

[0107] 次に、比較例2-1及び比較例2-2のうち比較例2-1では、このカロテノイド生産大腸菌株にC a C C Sを共発現させることでカプサンチン及びカプソルビンが生産できるかを調べた。C a C C SのN末端葉緑体シグナル配列を予測し、N末端アミノ酸を削ったC a C C S₄₁₋₄₉₈をデザインした。C a C C S₄₁₋₄₉₈をp U CベクターのP B A Dプロモータ下流に配置したプラスミドp U C-C a C C Sを第2の組換えベクターとして作製し、上記のカロテノイド生産大腸菌株に導入した。

[0108] また、比較例2-1及び比較例2-2のうち比較例2-2では、L i l i u m l a n c i f o l i u m由来C C S (以下において「L I C C S」と記載する ; D D B Jアクセッション番号G U 4 4 3 9 5 5)をC a C C Sのかわりに導入したことを除いて比較例2-1と同様にしてp U C-L I C C Sを第2の組換えベクターとして作製し、上記のカロテノイド生産大腸菌株に導入した。

[0109] 比較例 2-1 及び比較例 2-2 において、上記それぞれの第 2 の組換えベクター導入後、LB 培地上のシングルコロニーから 3 mL の LB 液体培地に移植し、200 rpm、37℃で 16 時間振盪培養した 100 µL の培養液を 10 mL の TB 液体培地に移植し、200 rpm、30℃で 24 時間振盪培養後に 10 µL のイソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を加えて遺伝子発現を誘導し、さらに培養を 48 時間続けた。また、抗生物質として、クロラムフェニコール (30 mg/L)、カナマイシン (40 mg/L) を培地に加えた。

[0110] 得られた培養液の 1 mL を 8,000 g で 1 分間遠心分離し、上清を除いて細胞画分を回収した。細胞画分を 1% 塩化ナトリウム溶液に懸濁し、8,000 g で 1 分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。回収した細胞に、アセトン/メタノール (7:3 (体積基準)) を添加してカロテノイドを抽出し、12,000 g で 2 分間遠心分離し、上清をカロテノイド分析に用いた。

[0111] 得られた上清を、日立製 HPLC Chromaster system を用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとして Inertsil ODS-3 (4.6 × 150 mm, 5 µm, GLサイエンス)、移動相 A としてアセトニトリル、移動相 B としてイソプロパノールを用い、移動相 A : 移動相 B を 100 : 0 で 5 分間送液した後、移動相 A : 移動相 B が 100 : 0 から 50 : 50 (体積基準) になるよう 5 分間のグラジェントで送液し、50 : 50 をさらに 5 分間保持した。

[0112] その結果、図 4 の比較例 2-1 及び比較例 2-2 の結果に示すように、CaCCS 及び LICCS どちらを共発現させた場合も、生産されるカロテノイドに変化はなく、カプサンチンの生成は確認できなかった。

[0113] [実施例 1]

本実施例では、組み込む第 1 の組換えベクターとして図 5 に示す pACH P-Zea を構築し、第 2 の組換えベクターとして図 5 に示す pUC-CaCCS-CaZEP を構築した。これら組換えベクターは、上流遺伝子の発

現量がカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ（*Pantoea ananatis* 由来）により相対的に低く、下流遺伝子の発現量がPBADにより相対的に高くなるように設計した。本実施例の第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターの概要を表3に示す。

[0114] [表3]

	組換えベクター	プロモータ	プロモータ相対強度	ベクター構成（略号）
実施例1	第1	<i>Pantoea ananatis</i> 由来	低	pAHP-Zea
	第2	PBAD	高	pUC-CaCCS ^(※2) -CaZEP ^(※1) (※2:CaCCS ₄₁₋₄₉₈)(※1:CaZEP ₆₄₋₆₆₈)

[0115] 第1の組換えベクターとしてのpAHP-Zeaは、比較例1と同様に作製した。このpAHP-Zeaは、非特許文献3の報告により、その形質転換体によるカロテノイド組成物ではβ-カロテンが検出されずにゼアキサンチンが総カロテノイドを占めることが分かっている。

[0116] 第2の組換えベクターとしてのpUC-CaCCS-CaZEPは、CaZEP₆₄₋₆₆₈とCaCCS₄₁₋₄₉₈をpUCベクターのPBADプロモータ下流に配置して作製した。

[0117] これら第1の組換えベクターと第2の組換えベクターとを、共に、比較例1と同様にして大腸菌JM101（DE3）に導入した。

[0118] 組換えベクター導入後、LB培地上のシングルコロニーを3mLのLB液体培地に移植し、200rpm、37℃で16時間振盪培養した。100μLの培養液を10mLのTB液体培地に移植し、200rpm、30℃で24時間振盪培養後に10μLのイソプロピルーβ-D-ガラクトピラノシド（IPTG）を加えて遺伝子発現を誘導し、さらに培養を48時間続けた。また、抗生物質として、クロラムフェニコール（30mg/L）及びカナマイシン（40mg/L）を培地に加えた。

[0119] 得られた培養液の1mLを8,000gで1分間遠心分離し、上清を除いて細胞画分を回収した。細胞画分を1%塩化ナトリウム溶液に懸濁し、8,000gで1分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。アセトン/メ

タノール（7：3（体積基準））を添加してカロテノイドを抽出し、12,000gで2分間遠心分離し、上清をカロテノイド分析に用いた。

[0120] 得られた上清を、日立製HPLC Chromaster systemを用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとしてInertsil ODS-3（4.6×150mm, 5 μ m, GLサイエンス）、移動相Aとしてアセトニトリル、移動相Bとしてイソプロパノールを用い、移動相A：移動相Bを100：0で5分間送液した後、移動相A：移動相Bが100：0から50：50（体積基準）になるよう5分間のグラジェントで送液し、50：50をさらに5分間保持し、カロテノイドを分離した。

[0121] また、得られた上清（カロテノイド）を、Aquity H-class UPLC（Waters）にも供した。カラムとしてAquity UPLC BEH C18 column（2.1×100mm, 1.7 μ m, Waters）、移動相Aとしてアセトニトリル：超純水（85：15（体積比））、移動相Bとしてアセトニトリル：メタノール（65：35（体積比））を用い、A：Bが100：0から0：100となる8分間のグラジェントで送液した後、0：100を5分間保持するプログラムで、カロテノイドを分離した。

[0122] 分析結果を図6に示す。図6では、第1の発現ベクターを単独で発現させた場合のHPLCクロマトグラム（上）と、第1の発現ベクター及び第2の発現ベクターを共発現させた場合（実施例1）のHPLCクロマトグラム（下）との結果、並びに後者（実施例1）で検出されたピーク1、2、3、5の吸収スペクトルを示している。図6に示すように、第1の発現ベクターと第2の発現ベクターとの共発現によって新たなピーク5が確認できた。

[0123] 同じ上清（カロテノイド）（sample）をUPLCで分析し標品（standards）と比較した結果を図7aに示す。図7aに示される通り、第1の発現ベクターと第2の発現ベクターとの共発現（実施例1）によって新たなピーク5が確認できた。また、ピーク5の吸収スペクトルを図7bに示す。図7aのUPLCクロマトグラムで確認されたピーク5は、カプサ

ンチンと同様の保持時間及び吸収スペクトルを示した。ピーク強度からモル吸光係数をもとに計算した結果、培養液あたりのカプサンチン生産量は $292 \mu\text{g/L}$ であった。

[0124] ピーク5のLC/MS分析は、Acquity UPLCシステムを搭載したWaters Xevo G2S Q TOF質量分析計(Waters)を使用して行った。飛行時間型質量分析装置(ESI-TOF-MS)による分析条件は、キャピラリー電圧3.2 kV、コーン電圧20 eV、120°C、30 L/hの窒素ガスを使用し、 m/z 100~1,500をスキャンした。MS/MSスペクトルは、20 Vのコリジョンエネルギーでアルゴンを使用した四重極TOF MS/MS装置で測定した。UV-VIS吸収スペクトルは、フォトダイオードアレイを使用して200 nm~600 nmで記録した。HPLC分離はAcquity 1.7 μm BEH UPLC C18カラム(Waters)を使用し、アセトニトリル：超純水(85：15 (体積基準))からアセトニトリル：メタノール(65：35 (体積基準))のグラジエントプログラム(流速0.4 mL/分、15分)を用いた。結果を図7cに示す。図7cに示される分子イオンピークはカプサンチンの分子量の計算値と一致した。

[0125] また、ピーク5の¹H NMR (500 MHz) スペクトルは、TMSを内部標準とし、重クロロホルムを用いてVarian UNITY INOVA 500 spectrometer (Varian Corporation) を使用して測定した。その結果、ピーク5はカプサンチンと同定された。

[0126] [実施例2 (実施例2-1 及び実施例2-2)]

本実施例では、組み込む第1の組換えベクターとして図8に示すpACH P-Zeaを構築し、第2の組換えベクターとして図8に示すpUC-Ca CCS-Ca ZEP (2種類) を構築した。これら組換えベクターは、上流遺伝子の発現量がカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータ (Pantoea ananatis由来) により相対的に低く、下流遺伝子の発現量

が P_{tac} により相対的に高くなるように設計した。本実施例の第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターの概要を表4に示す。

[0127] [表4]

	組換えベクター	プロモータ	プロモータ相対強度	ベクター構成 (略号)
実施例2-1	第1	Pantoea ananatis 由来	低	pAHP-Zea
	第2	Ptac	高	pUC- CaCCS^(※2)-CaZEP (※2:CaCCS ₄₁₋₄₉₈)
実施例2-2	第1	Pantoea ananatis 由来	低	pAHP-Zea
	第2	Ptac	高	pUC- CaCCS-CaZEP

[0128] 第1の組換えベクターとしてのpAHP-Zeaは、比較例1と同様に作製した。このpAHP-Zeaは、非特許文献3の報告により、その形質転換体によるカロテノイド組成物では β -カロテンが検出されずにゼアキサントシンが総カロテノイドを占めることが分かっている。

[0129] 第2の組換えベクターとしてのpUC-CaCCS-CaZEPは、CaZEP (シグナル配列を除去していないもの) と、CaCCS (シグナル配列を除去していないもの) 又はCaCCS₄₁₋₄₉₈とを、pUCベクターの P_{tac} プロモータ下流に配置して作製した。

[0130] これら第1の組換えベクターと第2の組換えベクターとを、共に、比較例1と同様にして大腸菌JM101 (DE3) に導入した。

[0131] 組換えベクター導入後、LB培地上のシングルコロニーを0.5mLのLB液体培地に移植し、1000rpm、37℃で16時間振盪培養した。20 μ Lの培養液を2mLのTB液体培地に移植し、1000rpm、30℃で24時間振盪培養後に2 μ Lの1Mイソプロピルー β -D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加し遺伝子発現を誘導した。さらに48時間培養した。抗生物質としては、クロラムフェニコール (30mg/L)、カナマイシン (40mg/L) を培地に加えた。

[0132] 得られた培養液の1mLを8,000gで1分間遠心分離し、上清を除い

て細胞画分を回収した。細胞画分を1%塩化ナトリウム溶液に懸濁し、8,000gで1分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。アセトン／メタノール（7：3（体積基準））を添加してカロテノイドを抽出し、12,000gで2分間遠心分離し、上清をカロテノイド分析に用いた。

[0133] 得られた上清を、日立製HPLC Chromaster systemを用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとしてInertsil ODS-3（4.6×150mm, 5μm, GLサイエンス）、移動相Aとしてアセトニトリル、移動相Bとしてイソプロパノールを用い、移動相A：移動相Bを100：0で5分間送液した後、移動相A：移動相Bが100：0から50：50（体積基準）になるよう5分間のグラジェントで送液し、50：50をさらに5分間保持し、カロテノイドを分離した。

[0134] なお、比較用に、上記の第2の発現ベクターでCaCCSもCaCCS₄₁₋₄₉₈も組み込まなかったことを除いて同様に作製した比較用の第2の発現ベクターを用い、同様の操作を行った。

[0135] 分析結果を図9に示す。図9では、第1の発現ベクターと比較用の第2の発現ベクターとを共発現させた場合のHPLCクロマトグラム（上）と、第1の発現ベクター及び第2の発現ベクター（全長CaCCSを組み込んだもの：実施例2-2）を共発現させた場合のHPLCクロマトグラム（中）と、第1の発現ベクター及び第2の発現ベクター（シグナル配列を除去したCaCCS₄₁₋₄₉₈を組み込んだもの：実施例2-1）を共発現させた場合のHPLCクロマトグラム（下）との結果、並びに第1の発現ベクター及び第2の発現ベクター（シグナル配列を除去したCaCCS₄₁₋₄₉₈を組み込んだもの：実施例2-1）を共発現させた場合に検出されたピーク1、2、3、5の吸収スペクトルを示している。図9に示すように、第1の発現ベクターと第2の発現ベクターとの共発現によって新たなピーク5、つまりカプサンチンが確認できた。

[0136] また、図9におけるカプサンチンのピーク5の強度を対比したグラフを図10に示す。図10に示すように、全長CCSを組み込んだ第2の発現ベク

ターを用いた場合（実施例2-2）よりも、シグナル配列を除去したCCS₄₁₋₄₉₈を組み込んだ第2の発現ベクターを用いた場合（実施例2-1）の方が、多くカプサンチンを産生した。

[0137] さらに、ピーク5のカプサンチンの産生量を、ピーク強度からモル吸光係数に基づいて計算した結果、全長CCSを組み込んだ第2の発現ベクターを用いた場合（実施例2-2）の培養液あたりのカプサンチン生産量は326 $\mu\text{g/L}$ 、シグナル配列を除去したCCS₄₁₋₄₉₈を組み込んだ第2の発現ベクターを用いた場合（実施例2-1）の培養液あたりのカプサンチン生産量は452 $\mu\text{g/L}$ だった。

[0138] [実施例3（実施例3-1、実施例3-2、実施例3-3）]

本実施例では、第1の組換えベクターとして、比較例1と同じpACHP-Zeaを用いた。このpACHP-Zeaは、非特許文献3の報告により、その形質転換体によるカロテノイド組成物では β -カロテンが検出されずにゼアキサンチンが総カロテノイドを占めることが分かっている。

[0139] 第2の組換えベクターとして、図11に示すpUC-S/sIC/sZ、pUC-S/sC/sIZ、又は、pUC-S/sIC/sIZ（「S」はS Proteinを表し、「s」はS-Tagを表し、「I」はリンカーを表す。）を作製した。本実施例の第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターの概要を表5に示す。

[0140]

[表5]

	組換え ベクター	プロモータ	プロモータ 相対 強度	ベクター構成 (第2の組換えベクターについては、上段が略号、下段が詳細な構造を示す。)
実施例 3-1	第1	<i>Pantoea ananatis</i> 由来	低	pAHP-Zea
	第2	Ptac	高	pUC-S/sI C /s Z ----- S protein / s tag + <u>linker</u> + CaCCS ₄₁₋₄₉₈ / s tag + CaZEP
実施例 3-2	第1	<i>Pantoea ananatis</i> 由来	低	pAHP-Zea
	第2	Ptac	高	S/s C /sI Z ----- S protein / s tag + CaCCS ₄₁₋₄₉₈ / s tag + <u>linker</u> + CaZEP
実施例 3-3	第1	<i>Pantoea ananatis</i> 由来	低	pAHP-Zea
	第2	Ptac	高	S/sI C /sI Z ----- S protein / s tag + <u>linker</u> + CaCCS ₄₁₋₄₉₈ / s tag + <u>linker</u> + CaZEP

[0141] この第2の組換えベクターは、図12に模式的に示すように、CCSとZEPとがそれぞれS-T a gと融合したタンパク質（それぞれ、図12中で、「S tag + linker + CCS」及び「S tag + linker + ZEP」として示される。）として発現した後、多量体化したS Protein（図12中で、「多量体」として示される。）を介して間接的に結合し複合体（図12中で、「複合体」として示される。）を形成するように設計した。このように設計された第2の組換えベクターの態様を、「S-T a gが組み込まれた」とも表現する。

[0142] 図11に示したpUC-S/sI**C**/s**Z**、pUC-S/s**C**/sI**Z**、及び、pUC-S/sI**C**/sI**Z**の3種の第2の組換えベクターは、S-T a gとCCSとの間、及び／又はS-T a gとZEPとの間のリンカーの有無の組み合わせが異なる構成を有するように設計した。S-T a gが組み込まれた第2の組換えベクター内でリンカーの導入位置をこのように異ならしめることにより、発現後にCCSとZEPと間の自由度が異なる3条件を構築した。

[0143] また、S-T a g が組み込まれた第2の組換えベクター構築に関する配列情報を下記表6に示す。

[0144] [表6]

	塩基配列	アミノ酸配列
S protein	配列番号 1	配列番号 2
S-Tag	配列番号 3	配列番号 4
S-Tag/CaCCS	配列番号 5	配列番号 6
S-Tag/linker/CaCCS	配列番号 7	配列番号 8
S-Tag/CaZEP	配列番号 9	配列番号 10
S-Tag/linker/CaZEP	配列番号 11	配列番号 12

[0145] 配列番号 8, 12 に示す通り、リンカーとしては、非極性アミノ酸のグリシン (G) と極性アミノ酸のセリン (S) とからなる単位 (GS) が 10 単位連続した、20 個アミノ酸残基からなるリンカー ({GS}₁₀ リンカー) を用いた。また、S-T a g の融合位置は、C a C C S および C a Z E P 各々の N 末端とした。S p r o t e i n、S-T a g 等を導入するコンストラクトとしては、p U C l a c - p t a c - C a C C S M 4 0 - C a Z E P (p M F 5 4 1) (Furubayashi, M., Kubo, A., Takemura, M., Otani, Y., Maoka, T., Terada, Y., Yaoi, K., Ohdan, K., Misawa, N. and Mitani, Y., (2021) J. Agric. Food Chem., 69, 5076-5085) を用いた。

[0146] 上記の第1の組換えベクター及び第2の組換えベクターを、実施例1と同様にして導入した後、LB培地上のシングルコロニーを3 mLの2YT液体培地に移植し、ヤマト科学株式会社製 S h a k i n g B a t h B W 2 0 1 を用いて 105 rpm、28℃で16時間振盪培養した。20 µL の培養液を 2.1 mL の T B 液体培地に移植し、K u h n e r 社製 L a b - T h e r m L T - X を用いて 180 rpm、30℃で4時間振盪培養後に 0.1 mM の イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を加えて遺伝子発現を誘導し、さらに培養を48時間続けた。また、抗生物質として、クロラムフェニコール (30 mg/L) 及びアンピシリン (100 mg/L) を培地に加えた。

得られた培養液の1 mLを8,000 gで1分間遠心分離し、上清を除いて細胞画分を回収した。細胞画分を1%塩化ナトリウム溶液に懸濁し、8,000 gで1分間遠心分離し、上清を除き、細胞を回収した。メタノールおよびクロロホルムを添加してカロテノイドを抽出し、12,000 gで2分間遠心分離し、上清をカロテノイド分析に用いた。

- [0147] 得られた上清を、日立製HPLC Chromaster systemを用いたカロテノイドの分離に供した。カラムとしてInertsil ODS-3 (4.6 × 150 mm, 5 μm, GLサイエンス)、移動相Aとしてアセトニトリル、移動相Bとしてイソプロパノールを用い、移動相A : 移動相Bを100 : 0で5分間送液した後、移動相A : 移動相Bが100 : 0から50 : 50 (体積基準) になるよう5分間のグラジエントで送液し、50 : 50をさらに5分間保持し、カロテノイドを分離した。
- [0148] HPLC分析における各カロテノイドのピーク強度を対比したグラフを図13に示す。x図13においては、S-T a gが組み込まれていない実施例2-1で用いた第2の組換えベクターpUC-C a C C S₄₁₋₄₉₈-C a Z E P (図中、「C/Z」と示す。)を用いた場合の結果を併せて示している。図13に示されるとおり、S-T a gが組み込まれていない場合 (実施例2-1) よりも、S-T a gが組み込まれた第2の組換えベクターを用いた場合 (実施例3-1 ~ 実施例3-3) のほうが、多くカプサンチンを蓄積した。また、S-T a gが組み込まれた3種の第2の組換えベクターの中でも、S-T a gとZ E Pとの間にリンカーを組み込んだpUC-S / s C / s I Zを用いた場合 (実施例3-2) に顕著にカプサンチン蓄積量が多かった。
- [0149] さらに、ピーク強度からモル吸光係数に基づいて計算した結果を表7に示す。S-T a gが組み込まれていない第2の組換えベクターを用いた場合 (実施例2-1) の培養液あたりのカプサンチン生産量に比べ、S-t a gが組み込まれた第2の組換えベクターを用いた場合 (実施例3-1 ~ 3-3) の培養液あたりのカプサンチン生産量が向上していた。特に、S-T a gとZ E Pとの間にリンカーを組み込んだpUC-S / s C / s I Zを第2の組

換えベクターとして用いた場合（実施例 3-2）は、培養液あたりのカプサンチン生産量が顕著に向上しているだけでなく、表 7 に示すカロテノイドの全量に対するカプサンチンの比率も顕著に向上していた。

[0150] [表 7]

	実施例 2-2		実施例 3-1		実施例 3-2		実施例 3-3	
	C/Z		S/slC/sZ		S/sC/slZ		S/slC/slZ	
	ug/gFW	ug/L	ug/gFW	ug/L	ug/gFW	ug/L	ug/gFW	ug/L
Zeaxanthin	3.88	1151.7	1.58	334.44	3.57	817.68	2.53	522.86
Antheraxanthin	1.48	440.41	2.72	574.75	3.91	894.03	3.35	692.94
Violaxanthin	0.98	289.22	5.28	1113.7	4.27	977.97	5.93	1225.5
Capsanthin	1.16	343.41	2.04	431.13	3.94	901.4	2.19	452.13
Total	7.5	2224.7	11.62	2454.1	15.7	3591.1	14	2893.4
Capsanthin/Total (%)	15.5		17.6		25.1		15.6	

[0151] また、 $pUC-S/sC/slZ$ を第 2 のベクターとして用いた場合（実施例 3-2）に得られたカロテノイドを実施例 1 と同様の方法で UPLC 分析した結果を図 14 に示す。図 14 から明らかな通り、カプサンチン 3'-アセテート、カプサンチン 3, 6-エポキシド、カプサンチン 3, 6-エポキシド 3'-アセテート、カプソルビン 3-アセテート、カプソルビンジアセテート、ククルビタキサンチン A の各ピークが検出された。これらのカロテノイドを実施例 1 と同様の方法で LC/MS 分析した結果、分子イオンピークが各カロテノイドの分子量の計算値と一致した。さらに、UPLC 分析のピーク強度から各カロテノイドの比率を算出した結果を表 8 に示す。

[0152]

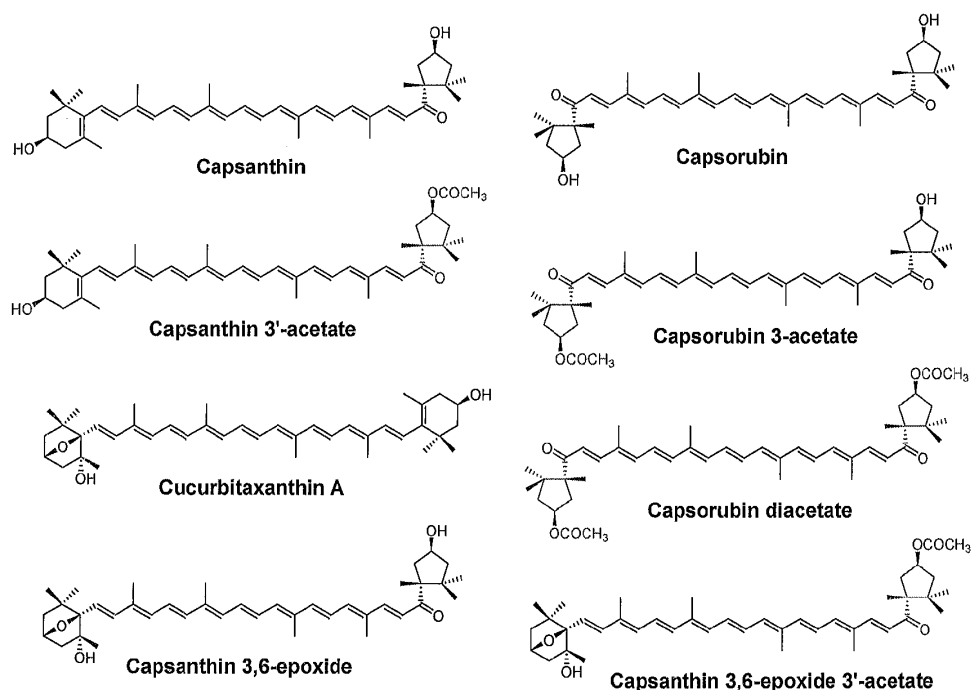
[表8]

Carotenoids	%
β -Carotene	3.3
β -Cryptoxanthin	3.7
Capsorubin diacetate	4.1
Capsanthin 3,6-epoxide-3'-acetate	5.5
Cucurbitaxanthin A	2.8
Capsanthin 3'-acetate	3.5
Capsorubin monoacetate	12.1
Zeaxanthin	19.4
Zeaxanthin epoxide	9.4
Capsanthin	18.5
Capsanthin 3,6-epoxide	3.2
Capsorubin	3.7
Auroxanthin	3.8
Others	7.0
	100.0

[0153] NMR測定のため、カロテノイドはシリカゲルクロマトグラフィーを用い、ヘキサンからエーテル；ヘキサン（1：1）、エーテル：アセトン（1：1）へと順に極性を上げ、各画分を分取し濃縮した後、さらに、silica gel（Cosmosil 5 SL-11）カラム10×250 mmを用い、アセトン：ヘキサン（3：7）を移動相とし、流速2 ml/minで分離して得られた各カロテノイドピークを分取したサンプルを実施例1と同様の方法で¹H NMR測定に用いた。¹H NMR分析の結果、同定されたカロテノイド（カプサンチン、カプソルビン、ククルビタキサンチンAその他誘導体等）の構造式を下記式に示す。

[0154]

[化1]



配列表フリーテキスト

[0155] 配列番号 3 は、S-Tagをコードする塩基配列の 34 番目～36 番目がフェニルアラニンにコードする配列に置換されたものである。

配列番号 4 は、S-Tagのアミノ酸配列において 12 番目がフェニルアラニンに置換されたものである。

配列番号 5 及び 6 は、それぞれ、S-Tagが導入されたCaCCSの塩基配列及びアミノ酸配列である。

配列番号 7 及び 8 は、それぞれ、リンカーを介してS-Tagが導入されたCaCCSの塩基配列及びアミノ酸配列である。

配列番号 9 及び 10 は、それぞれ、S-Tagが導入されたCaZEPの塩基配列及びアミノ酸配列である。

配列番号 11 及び 12 は、それぞれ、リンカーを介してS-Tagが導入されたCaZEPの塩基配列及びアミノ酸配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 第1のプロモータ、及び前記第1のプロモータに作動可能に連結された、*crtY*及び*crtZ*を含むカロテノイドの生合成遺伝子上流遺伝子と、
- 前記第1のプロモータよりプロモータ強度が高い第2のプロモータ、及び前記第2のプロモータに作動可能に連結された*ZEP*遺伝子及び*CCS*遺伝子と、
- が宿主細胞に導入された、形質転換体。
- [請求項2] 前記第1のプロモータと前記第2のプロモータとのプロモータ強度の差が、カロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータと*PBAD*とのプロモータ強度の差以上である、請求項1に記載の形質転換体。
- [請求項3] 前記上流遺伝子が、*crtI*；*crtI*及び*crtB*；又は*crtI*、*crtB*及び*crtE*をさらに含む、請求項1又は2に記載の形質転換体。
- [請求項4] 前記第1のプロモータが、*Plac*又はカロテノイドの生合成遺伝子固有のプロモータである、請求項1～3のいずれかに記載の形質転換体。
- [請求項5] 前記第2のプロモータが、*PBAD*又は*Ptac*である、請求項1～4のいずれかに記載の形質転換体。
- [請求項6] 更に、*S*プロテイン遺伝子、*S*タグ遺伝子及びリンカー遺伝子が前記宿主細胞に導入されており、
- 前記*ZEP*遺伝子及び前記*CCS*遺伝子それぞれに、前記*S*タグ遺伝子が連結され、
- 前記リンカー遺伝子が、前記*ZEP*遺伝子と前記*S*タグ遺伝子との間及び／又は前記*CCS*遺伝子と前記*S*タグ遺伝子との間に介在して連結されている、請求項1～5のいずれかに記載の形質転換体。
- [請求項7] 前記*S*タグ遺伝子がコードする*S*タグが、以下の(1)及び(2)のいずれかのポリペプチドである、請求項6に記載の形質転換体：

(1) 配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリペプチド

(2) 配列番号4に示すアミノ酸配列に対する12番目以外の配列同一性が90%以上であり、且つ、Sプロテインと特異的に結合するポリペプチド。

[請求項8] 前記リンカー遺伝子が、少なくとも、前記ZEP遺伝子と前記Sタグ遺伝子との間に介在して連結されている、請求項1～7のいずれかに記載の形質転換体。

[請求項9] 前記リンカー遺伝子が、前記ZEP遺伝子と前記Sタグ遺伝子との間に介在して連結され、前記CCS遺伝子と前記Sタグ遺伝子との間に介在しない、請求項1～8のいずれかに記載の形質転換体。

[請求項10] 請求項1～9のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程を含む、カロテノイド組成物の製造方法。

[請求項11] 前記カロテノイド組成物がカプサンチンを含む、請求項10に記載の製造方法。

[請求項12] 前記カロテノイド組成物が、カプソルビン、カプサンチン3'-アセテート、カプソルビン3-アセテート、ククルビタキサンチンA、カプソルビンジアセテート、カプサンチン3,6-エポキシド、及び／又はカプサンチン3,6-エポキシド3'-アセテートを含む、請求項10又は11に記載の製造方法。