

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7762951号
(P7762951)

(45)発行日 令和7年10月31日(2025. 10. 31)

(24)登録日 令和7年10月23日(2025. 10. 23)

(51)Int. Cl.	F I	
C 1 2 P 17/04 (2006. 01)	C 1 2 P 17/04	
C 1 2 P 23/00 (2006. 01)	C 1 2 P 23/00	
C 1 2 N 1/16 (2006. 01)	C 1 2 N 1/16	A
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 4 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-164871(P2021-164871)	(73)特許権者	598096991
(22)出願日	令和3年10月6日(2021. 10. 6)		学校法人東京農業大学
(65)公開番号	特開2023-55465(P2023-55465A)		東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号
(43)公開日	令和5年4月18日(2023. 4. 18)	(74)代理人	100122574
審査請求日	令和6年8月29日(2024. 8. 29)		弁理士 吉永 貴大
		(72)発明者	渡辺 智
			東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京農業大学内
		(72)発明者	伊藤 晋作
			東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京農業大学内
		(72)発明者	坂巻 裕
			東京都世田谷区桜丘一丁目1番1号 東京農業大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】シアノバクテリアおよび酵母によるストリゴラクトンの生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

カーラクトン生産能を有するシアノバクテリアを培養することによりシアノバクテリア培養液を調製する工程と、

酵母を培養することにより酵母培養液を調製する工程と、

前記シアノバクテリア培養液と、前記酵母培養液とを混合し、シアノバクテリア - 酵母共培養液を調製する工程と、

前記シアノバクテリア - 酵母共培養液を培養する共培養工程と、

を有する、ストリゴラクトンの生産方法であって、

前記カーラクトン生産能を有するシアノバクテリアが、カロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子としてCCD7遺伝子およびCCD8遺伝子、-カロテン-9-イソメラーゼ遺伝子としてD27遺伝子を有し、

前記酵母がMAX1及びATR1を有する、

ストリゴラクトンの生産方法。

【請求項2】

前記ストリゴラクトンが、4デオキシオロバンコールである、請求項1に記載のストリゴラクトンの生産方法。

【請求項3】

前記共培養工程の後、酢酸エチルを添加し、ストリゴラクトンを抽出する工程を含む、請求項1又は2に記載のストリゴラクトンの生産方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のストリゴラクトンの生産方法により、ストリゴラクトンを含む培養物またはその精製物を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、シアノバクテリアおよび酵母によるストリゴラクトンの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ストリゴラクトン (strigolactones) は、植物から得られる一群のラクトン構造を有するカロテノイド誘導体であり、植物体内において分枝を抑制する機能を有することが知られている。ストリゴラクトンは、宿主植物自身の枝分かれ抑制作用、植物にリンや窒素を供給するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導作用、根寄生植物の種子発芽刺激作用等の農業生産において重要な生理作用をもつ。しかしながら、植物から回収できるストリゴラクトンの量は限られている。

10

【0003】

ここでストリゴラクトンの植物体内における生合成には、カロテノイドを基質とした、2 種のカロテノイド酸化型開裂酵素、 β -カロテン-9-イソメラーゼそして 4 デオキシオロバンコール合成酵素が関与していることが知られている。

【0004】

非特許文献 1 は、カロテノイド酸化型開裂酵素である CCD7、CCD8、および β -カロテン-9-イソメラーゼである D27 の機能解析を行い、カロテノイドを基質に 3 つの酵素が連続的に作用することにより、カーラクトン (carlactone) と名づけられた化合物が生成することを報告している。また、カーラクトンはストリゴラクトンの化学構造に特有のプテノライド環を有しており、ストリゴラクトン同様の生理活性も有することが示され、ストリゴラクトンの生合成中間体であることが示唆されている。

20

【0005】

非特許文献 2 は、カーラクトンが実際に植物の代謝物として存在することに加え、 ^{13}C 標識カーラクトンをイネのストリゴラクトン生合成変異体に投与することにより、植物体内でカーラクトンがストリゴラクトンに変換されることを報告している。

30

【0006】

非特許文献 3 は、カーラクトンにイネの 4 デオキシオロバンコール合成酵素 (CYP711A2) を混合することにより、カーラクトンがストリゴラクトンの一つである 4 デオキシオロバンコールに変換されることを報告している。

【0007】

非特許文献 4 には、カーラクトン生産能を有する大腸菌 (*Escherichia coli*) と AtMAX1 (CYP711A1) と ATR1 を導入した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* ECL-3 株) を用いたストリゴラクトン生産に関する研究が報告されている。

【0008】

上記のようにカーラクトンは植物ホルモンの一つであるストリゴラクトンおよびその前駆物質であり、カーラクトンおよびストリゴラクトンは根寄生植物の駆除に有効である。しかしながら現時点において、シアノバクテリアと酵母を用いてカーラクトンおよびストリゴラクトンを大量生産可能な方法については報告がない。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】 Adrian Alder et al. , “ The Path from β -Carotene to Carlactone , a Strigolactone-Like Plant Hormone ” , Science 16 Mar 2012 : Vol . 335 , Issue 607 4 , pp . 1348-1351 , DOI : 10.1126/science . 1218094

【非特許文献 2】 Yoshiya Seto et al . , “ Carlactone is an endogenous biosynthetic

50

precursor for strigolactones” , PNAS January 28 , 2014 111 (4) 1640-1645 ; <https://doi.org/10.1073/pnas.1314805111>

【非特許文献3】Zhang et al. , “ Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis ” , Nat Chem Biol . 2014 Dec ; 10(12) : 1028-33 . doi : 10.1038/nchembio.1660 .

【非特許文献4】Wu et al. , “ Establishment of Strigolactone-Producing Bacterium-Yeast Consortium ” , Sci Adv 2021 Sep 17 ; 7(38) : eabh4048 . doi : 10.1126/sciadv.abh4048 .

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0010】

ストリゴラクトンを大量生産するアプローチの一つの方法は、工業レベルの物質生産ホストにおいてストリゴラクトンの生合成経路の基質となるカーラクトンを生産し、それを効率よくストリゴラクトンへと変換する系を確立することである。そこで本発明は、シアノバクテリアを用いて生産されたカーラクトンを、酵母と共培養することで効率よくストリゴラクトンへと変換する、生産性の高いストリゴラクトンの生産方法の確立を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記課題を解決するため、本発明者らは、植物細胞内においてストリゴラクトンは葉緑体および小胞体で作られるという点に着目し、葉緑体に似た細胞内環境を持つシアノバクテリアを物質生産のホストとしたカーラクトンの生産系を構築した。さらに本発明者らは、小胞体を持ちストリゴラクトン代謝酵素を活性化できる酵母を組み合わせ、シアノバクテリアと酵母の共培養によるストリゴラクトン生産経路を構築した。イネの4デオキシオロバンコール合成酵素 (CYP711A2) を発現する酵母を用いることでストリゴラクトンの一つである4デオキシオロバンコールの生産に成功した。

20

【0012】

本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、カーラクトン生産能を有するシアノバクテリアを培養することによりシアノバクテリア培養液を調製する工程と、酵母を培養することにより酵母培養液を調製する工程と、前記シアノバクテリア培養液と、前記酵母培養液とを混合し、シアノバクテリア - 酵母共培養液を調製する工程と、前記シアノバクテリア - 酵母共培養液を培養する共培養工程と、を有する、ストリゴラクトンの生産方法を提供するものである。

30

【0013】

また、本発明は、前記ストリゴラクトンの生産方法により得られる、ストリゴラクトンを含む培養物またはその精製物を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係るストリゴラクトンの生産方法によれば、シアノバクテリアと酵母を用いることで培養液1 mLあたり約1200 pgのストリゴラクトン (4デオキシオロバンコール) を生産することができる。これはイネの根から抽出される4デオキシオロバンコールの1万倍量である。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本実施形態のストリゴラクトンの生産方法の概要を説明するための図である。

【図2】本実施形態のストリゴラクトンの生産方法の工程図である。

【図3】シアノバクテリア - 酵母の共培養により生産されたストリゴラクトンの分析結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

50

本発明の実施形態に係るストリゴラクトンの生産方法について説明する。図1は、本実施形態のストリゴラクトンの生産方法の概要を説明するための図である。

【0017】

1. シアノバクテリア培養液を調製する工程

まず、カーラクトン生産能を有するシアノバクテリアを培養することによりシアノバクテリア培養液を調製する工程について説明する。

【0018】

本実施形態に用いることのできるシアノバクテリアの種類には、特に制限はなく、あらゆる種類のもものが挙げられる。好ましくは、以下に限定されないが、シネコシスティス属 (*Synechocystis*)、シネココッカス属 (*Synechococcus*)、サーモシネココッカス属 (*Thermosynechococcus*)、トリコデスミウム属 (*Trichodesmium*)、アカリオクロリス属 (*Acaryochloris*)、クロコスファエラ属 (*Crocospaera*)、及びアナベナ属 (*Anabaena*) に属するシアノバクテリアであり、より好ましくは、シネコシスティス属 (*Synechocystis*)、シネココッカス属 (*Synechococcus*)、サーモシネココッカス属 (*Thermosynechococcus*)、又はアナベナ属 (*Anabaena*) に属するシアノバクテリアを挙げることができる。より好ましくは、シネコシスティス・エスピー-PCC6803、シネコシスティス・エスピー-PCC7509、シネコシスティス・エスピー-PCC6714、シネココッカス・エロンガタスPCC7942、シネココッカス・エロンガタスUTEX 2973、シネココッカス・エスピー-PCC7002、サーモシネココッカス・エロンガタスBP-1、トリコデスミウム・エリスラエウムIMS101、アカリオクロリス・マリアナMBIC11017、クロコスファエラ・ワトソニーWH8501、及びアナベナ・エスピー-PCC7120を挙げることができる。特に好ましくは、シネココッカス・エロンガタスPCC7942、である。

【0019】

-カロテン-9-イソメラーゼとは、全トランス-β-カロテン(All-trans-β-carotene)を9-シス-β-カロテンへ変換を触媒する酵素である。本発明の組換えシアノバクテリアは当該酵素を発現するように、β-カロテン-9-イソメラーゼ遺伝子を有する。β-カロテン-9-イソメラーゼ遺伝子としては、シアノバクテリア内のトランス-β-カロテンを9-シス-β-カロテンへ変換可能な酵素を発現する限りにおいて限定されない。このような遺伝子としては例えば、以下の植物または藻類：イネ (*Oryza sativa*, *Oryza brachyantha*)；ソルガム (*Sorghum bicolor*)；アワ (*Setaria italica*)；ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*)；タルホコムギ (*Aegilops tauschii*)；トウモロコシ (*Zea mays*)；アスパラガス (*Asparagus officinalis*)；マレーヤマバショウ (*Musa acuminata*)；ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)；ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera*)；タバコ (*Nicotiana tabacum*)；シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)；ミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*)；セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)；アマナズナ (*Camelina sativa*)；タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)；ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)；クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)；ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*)；モノラフィディウム (*Monoraphidium neglectum*)；ボルボックス (*Volvox carteri*)；ココミクサ (*Coccomyxa subellipsoidea*) に由来するD27遺伝子を挙げることができる。

【0020】

本実施形態においてカロテノイド酸化型開裂酵素は、(i) β-カロテン-9-イソメラーゼにより生成された9-シス-β-カロテンが9-シス-β-アポ-10'-カロテノール (9-cis-β-Apo-10'-carotenol) へ変換することを触媒する酵素、及び/又は、(ii)9-シス-β-カロテンが9-シス-β-アポ-10'-カロテノールをカーラクトン ((Z)-(R)-Carlactone) へ変換することを触媒する酵素である。本実施形態に用いる組換えシアノバクテリアは当該酵素を発現するように、カロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子を有する。カロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子としては、シアノバクテリア内の9-シス-β-カロテンをカーラクトンへ変換可能な酵素を発現する限りにおいて限定されない。このような遺伝子としては例えば、以下の植物または藻類：イネ (*Oryza sativa*, *Oryza brachyantha*)；ソルガム (*Sorghum bic*

olor) ; アワ (*Setaria italica*) ; ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) ; タルホコムギ (*Aegilops tauschii*) ; トウモロコシ (*Zea mays*) ; アスパラガス (*Asparagus officinalis*) ; マレーヤマバショウ (*Musa acuminata*) ; ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*) ; ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera*) ; タバコ (*Nicotiana tabacum*) ; シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ; ミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*) ; セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) ; アマナズナ (*Camelina sativa*) ; タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) ; ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) ; クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) ; ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*) ; モノラフィディウム (*Monoraphidium neglectum*) ; ボルボックス (*Volvocx carteri*) ; コッコミクサ (*Coccomyxa subellipsoidea*) に由来する CCD7 遺伝子及び CCD8 遺伝子を挙げる事ができる。なお、CCD7 遺伝子は、そのオーソログ遺伝子として MAX3 遺伝子、D17 遺伝子、RMS5 遺伝子、DAD3 遺伝子などが知られており、これらを含むオーソログ遺伝子もカロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子として本発明に用いることができる。また CCD8 遺伝子は、そのオーソログ遺伝子として MAX4 遺伝子、D10 遺伝子、RMS1 遺伝子、DAD1 遺伝子などが知られており、これらを含むオーソログ遺伝子もカロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子として本発明に用いることができる。

10

【 0 0 2 1 】

好ましい一実施の形態において本実施形態に用いる組換えシアノバクテリアは、カロテノイド酸化型開裂酵素として、(i)9-シス-β-カロテンが9-シス-β-アポ-10'-カロテノールへ変換することを触媒する酵素をコードする遺伝子、及び、(ii)9-シス-β-カロテンが9-シス-β-アポ-10'-カロテノールをカールクトン (Z)-(R)-Carlactone) へ変換することを触媒する酵素をコードする遺伝子の両方を有する。

20

【 0 0 2 2 】

なお、β-カロテン-9-イソメラーゼ遺伝子、および、カロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子によりコードされる各酵素は、上記する触媒反応を有する限り、そのアミノ酸配列において1つまたは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されていてもよい。

【 0 0 2 3 】

シアノバクテリアへの遺伝子の導入には、例えば、プラスミドベクターなどのベクターを用いることができる。ベクターは、発現ベクターが好ましい。例えば、異種カロテノイド酸化型開裂酵素遺伝子およびβ-カロテン-9-イソメラーゼ遺伝子の DNA 断片及びそれを発現させるためのプロモーターを含む発現ベクターを構築する。プロモーターとしては、lac、tac 若しくは trc プロモーター、イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加によって誘導可能な誘導体に関するプロモーター、又は Rubisco オペロン (rbc) 、PSI 反応中心タンパク質 (psaAB) 、PSII の D1 タンパク質 (psbA) などのシアノバクテリアから単離されたプロモーター利用できるが、これらに限定されるわけではなく、シアノバクテリアにおいて機能する多様なプロモーターを利用することができる。また上記発現ベクターには、当該ベクターが適切に導入された宿主を選択するためのマーカー遺伝子、(例えば、カナマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、エリスロマイシンなどの薬剤の耐性遺伝子) がさらに組み込まれていてもよい。上記発現ベクターを、公知の手段で親シアノバクテリア又は本発明の改変シアノバクテリアに導入し、形質転換する。シアノバクテリアへのベクターの導入法としては、自然形質転換法、エレクトロポレーション法、接合法などの一般的な方法を用いることができる。形質転換処理後のシアノバクテリアを選択培地、例えば、抗生物質含有培地で培養すれば、所望の形質を有する形質転換体を選択することができる。

30

40

【 0 0 2 4 】

本実施形態に用いる組換えシアノバクテリアは、カールクトン生産能を有する。また本発明の組換えシアノバクテリアはカールクトンを細胞外へ分泌する。したがって、本発明の組換えシアノバクテリアを適切な条件で培養し、次いで分泌されたカールクトンを回収すれば、効率のよいカールクトン生産を実施することができる。

【 0 0 2 5 】

50

シアノバクテリアの培養は、一般に、BG-11培地 (J Gen Microbiol., 1979, 111:1-61) を用いた液体培養又はその変法に基づいて実施することができる。カーラクトン生産には、細胞の代謝が活性化し十分にカロテノイドが細胞に蓄積するまで培養することが好ましく、例えば、1~7日間、通気攪拌培養又は振とう培養することが好適である。またIPTG添加等により導入遺伝子の発現を誘導する場合、誘導時期としては以下に限定されないが、例えば、培養開始より1~3日間後に添加することが好ましい。

【0026】

上記培養により、シアノバクテリアはカーラクトンを生産し、当該カーラクトンを培養物中に分泌する。

【0027】

1. 酵母株を作成する工程

本実施形態に用いることのできる酵母の種類には、特に制限はなく、あらゆる種類のものが挙げられる。好ましくは、以下に限定されないが、例えば、サッカロミセス属、デバリオマイセス属、シゾサッカロマイセス属、キャンディダ属、ヤロウミア属、ロドトルラ属、リポマイセス属、クルイベロマイセス属、ロドスポリジウム属、トリコデルマ属または、トルロプシス属、ピキア属等に属する酵母を親株として用いることが好ましい。例えば、サッカロミセス・セルピシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・パヤヌス (*Saccharomyces bayanus*)、デバリオマイセス・ニルソニ (*Debaryomyces nilssonii*)、デバリオマイセス・ハンセニ (*Debaryomyces hansenii*)、チゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、キャンディダ・グラブラータ (*Candida glabrata*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*)、キャンディダ・ボイディニイ (*Candida boidinii*)、ヤロウミア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、ロドトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*)、リポマイセス・リポフェラス (*Lipomyces lipoferus*)、クルイベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ロドスポリジウム・トルロイデイス (*Rhodospodium toruloides*)、トリコデルマ・リセイ (*Trichoderma reesei*)、トルロプシス・コリキユロサ (*Torulopsis colliculosa*)、ピキア・ファリノサ (*Pichia farinosa*) 等が挙げられる。これらの中で、遺伝子工学的手法が使いやすいことから、サッカロミセス属が最も好ましい。

【0028】

本実施形態において酵母細胞内で発現させる4デオキシオロバンコール合成酵素は、カーラクトン (Z)-(R)-Carlactone) を4デオキシオロバンコール (4-deoxyorobanchol) へと変換することを触媒する酵素である。本実施形態で用いる組換え酵母は当該酵素を発現するように、4デオキシオロバンコール合成酵素遺伝子を有する。4デオキシオロバンコール合成酵素遺伝子としては、カーラクトンを4デオキシオロバンコールへ変換可能な酵素を発現する限りにおいて限定されない。このような遺伝子としては例えば、以下の植物または藻類：イネ (*Oryza sativa*, *Oryza brachyantha*)；ソルガム (*Sorghum bicolor*)；アワ (*Setaria italica*)；ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*)；タルホコムギ (*Aegilops tauschii*)；トウモロコシ (*Zea mays*)；アスパラガス (*Asparagus officinalis*)；マレーヤマバショウ (*Musa acuminata*)；ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)；ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera*)；タバコ (*Nicotiana tabacum*)；シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)；ミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*)；セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)；アマナズナ (*Camelina sativa*)；タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)；ラッカセイ (*Arachis hypogaea*)；ヒマワリ (*Helianthus annuus*)；ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*)；ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)；クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)；ドナリエラ (*Dunaliella Bardawil*)；モノラフィディウム (*Monoraphidium neglectum*)；ボルボックス (*Volvox carteri*)；コッコミクサ (*Coccomyxa subellipsoidea*) に由来するMAX1遺伝子を挙げることができる。

【0029】

本実施形態ではMAX1酵素と共にその活性化に必要なNADPH-P450 reductase (ATR1)を酵

10

20

30

40

50

母において発現させる必要がある。ATR1が発現する酵母WAT11株に対しイネのMAX1酵素の発現ベクターを導入し共発現させる。ベクターは、発現ベクターが好ましい。例えば、4デオキシオロバンコール合成酵素遺伝子のDNA断片及びそれを発現させるためのプロモーターを含む発現ベクターを構築する。プロモーターとしては、ガラクトースの添加によって誘導可能な誘導体に関するプロモーターが利用できるが、これらに限定されるわけではなく、酵母において機能する多様なプロモーターを利用することができる。また上記発現ベクターには、大腸菌でのクローニングする際の選択に必要なマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、エリスロマイシンなどの薬剤の耐性遺伝子）や、当該ベクターが適切に導入された宿主酵母を選択するためのマーカー遺伝子、（例えば、ロイシン、トリプトファン、ヒスチジン、ウラシル、アデニンなどの代謝系遺伝子）がさらに組み込まれていてもよい。上記発現ベクターを、公知の手段で親酵母となるWAT11株に導入し、形質転換する。酵母へのベクターの導入法としては、ポリエチレングリコールを用いた形質転換法、接合法などの一般的な方法を用いることができる。形質転換処理後の酵母を選択培地、例えば、アミノ酸や核酸を欠いた培地で培養すれば、所望の形質を有する形質転換体を選択することができる。

10

【0030】

2．酵母培養液を調製する工程

次に、酵母を培養することにより酵母培養液を調製する工程について説明する。酵母の培養は一般に、SGI培地を用いた液体培養又はその変法に基づいて実施することができる。MAX1およびATR1の発現には、細胞の代謝が十分に活性化するまで培養することが好ましく、例えば、2～4日間、振とう培養することが好適である。

20

【0031】

3．シアノバクテリア - 酵母共培養液を調製する工程

次に、前記シアノバクテリア培養液と、前記酵母培養液とを混合し、シアノバクテリア - 酵母共培養液を調製する工程について説明する。3日間培養した組換えシアノバクテリア培養液と2日間培養した組換え酵母培養液を混ぜた後、さらに酵母のMAX1遺伝子の遺伝子発現誘導剤であるガラクトースを含有するYPGE培地を添加することにより共培養液を調製する。

【0032】

4．共培養工程

次に、前記シアノバクテリア - 酵母共培養液を培養する共培養工程について説明する。ストリゴラクトン生産には、細胞の代謝が活性化し十分にストリゴラクトンが細胞に蓄積するまで培養することが好ましく、例えば、1～3日間、振とう培養することが好適である。

30

【0033】

5．ストリゴラクトン抽出工程

シアノバクテリア - 酵母からのストリゴラクトンの抽出には酢酸エチルを用いる。シアノバクテリア - 酵母の培養液に酢酸エチルを添加した後、よく攪拌する。分離した酢酸エチル層を新しい遠心チューブに移す。これを三回繰り返す。酢酸エチル層に生理食塩水を加え良く攪拌した後、分離した酢酸エチル層を新しいチューブに移す。酢酸エチル層に固形硫酸ナトリウムを加えて脱水し、適当なサンプル量に分取した後、エバポレーターを用いて溶媒を除去する。このサンプルを50%アセトニトリルに再溶解しLC-MS/MSに供した。

40

【0034】

以下、具体的な実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されない。

【実施例】

【0035】

1．カーラクトン生産プラスミド構築および形質転換体の作製

以下3つの遺伝子（DbD27遺伝子、OsCCD7遺伝子、および、AtCCD8遺伝子）をPrimeStar DNA polymerase (TaKaRa)を用いたPCRにより増幅した。PCRの条件は、PrimeStar DNA po

50

lymerase (TaKaRa)の指示書に準じて行った。

【 0 0 3 6 】

DbD27遺伝子断片は、ドナリエラのD27遺伝子(Davidi and Pick, Plant Cell Rep 2017)をシネココッカス・エロンガタスPCC7942用にあわせてコドン最適化したDNAを準備し、これを鋳型として、DbD27-f1およびSD-DbD27-r2のプライマーセットを用いて増幅した。OsCCD7遺伝子断片はイネのCCD7遺伝子 (NCBI-ProteinID: XP_015637185) のcDNAクローンを鋳型としてSD-OsCCD7-f3およびSD-OsCCD7-r4のプライマーセットを用いて増幅した。AtCCD8遺伝子断片はシロイヌナズナのCCD8遺伝子 (NCBI-ProteinID: NP_195007) のcDNAクローンを鋳型としてSD-AtCCD8-f5およびAtCCD8-r6のプライマーセットを用いて増幅した。各プライマー情報を下記表に示す。

10

【 0 0 3 7 】

【表 1】

プライマー	塩基配列
DbD27-f1	ATTTAGGAGGTTATCATGGAATTCACCGGCCAG (配列番号1)
SD-DbD27-r2	CCTCCTTCAAGTTCTAGATTATTAGGTCACCTTCAGGCAGGTG (配列番号2)
SD-OsCCD7-f3	TAGAACTTGAAGGAGGTTTAATAATGACGGACACGCTGTCCGCGGCCTT (配列番号3)
SD-OsCCD7-r4	CCTCCTTACGGGTTTACTTTTATCATTCTCCCCAGAAACCAT (配列番号4)
SD-AtCCD8-f5	GTAAACCCGTAAGGAGGAAGACTATGTTATTTGCTCGGAGGATCTTCGG (配列番号5)
AtCCD8-r6	TTACTAGTAAGCTTATTAATCTTTGGGGATCCAGC (配列番号6)

【 0 0 3 8 】

3つのDNA断片はPrimeStar GXL polymerase (TaKaRa)ならびにDbD27-f1およびAtCCD8-r6のプライマーセットを用いて再結合した。得られたDNA断片はIn-Fusion cloning kit (TaKaRa)を用いてpHRA-lacI-Plac-Ptrcベクター中にクローニングし、pHRA-SL3と名付けた。lacI-trc promoter-DbD27-OsCCD7-AtCCD8を含むDNA断片をp24-B0015ter-f およびB0011-Cm-rのプライマーセットを用いて増幅し、In-Fusion cloning kitを用いてp24EXプラスミドベクター中にクローニングした。得られたプラスミドをp24EX-SL3と名付けた。各プライマー情報を下記表に示す。

30

【 0 0 3 9 】

【表 2】

プライマー	塩基配列
p24-B0015ter-f	TGAGCGACGACGATCCCAGGCATCAAATAAAACGA (配列番号7)
B0011-Cm-r	GGATTTATTTATTCTCACATTTCCCCGAAAAGTG (配列番号8)

【 0 0 4 0 】

p24EX-SL3はシネココッカス・エロンガタスPCC7942の形質転換に用いた。対数増殖期まで培養した培養液20 mLを0.5 mLに濃縮し、1 μ gのp24EX-SL3を加えた。一晩暗所で転倒攪拌した後、明所で1時間転倒攪拌した。形質転換体は、10 μ g/ μ lのクロラムフェニコールを含むBG11寒天培地上に塗布し選択した。得られた形質転換体は以下のシアノバクテリア培養液調製工程に用いた。

40

【 0 0 4 1 】

2. カーラクトン生産シアノバクテリアの培養

図2はストリゴラクトンの生産方法の工程図である。シアノバクテリアCL生産株はOD750 = 0.05となる濃度で、7.5 μ g/mLのクロラムフェニコールを含むBG11 培地40 mLに植菌した。培養48時間後IPTG (終濃度1 mM) を添加した。IPTG添加より24時間後に菌体を回収した。

【 0 0 4 2 】

50

3 . 酵母株を作成する工程

MAX1とATR1には非特許文献3と同様にイネMAX1酵素とシロイヌナズナATR1を発現する出芽酵母株 (*Saccharomyces cerevisiae* WAT11, pYeDP60-0sCYP711A2)を使用した。

【0043】

4 . MAX1酵母培養液調製工程

MAX1酵母はSGI培地(20 g/L D (+)-glucose, 1 g/L bactocasamino acids, 6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acid, 40 mg/L L-tryptophan) 10 mLに植菌した。30で48時間、振盪培養した。

【0044】

5 . シアノバクテリア - 酵母共培養液を調製する工程

カーラクトンを生産させた組換えシアノバクテリア培養液と2日間培養した組換え酵母培養液100 μ Lを混ぜた後、さらに酵母のMAX1遺伝子の遺伝子発現誘導剤であるガラクトース(終濃度20 g/L)を含有するYPGE培地(5 g/L D (+)-glucose, 10 g/L yeast extract, 10 g/L bactopectone, 3 % (vol/vol) ethanol)を500 μ L添加することにより共培養液を調製した。組換えシアノバクテリア培養液を加える量は500 μ L、250 μ L、100 μ Lとし、BG11培地を用いて合計の培養液量を揃えた。

【0045】

6 . 共培養工程

表3に示す配合(合計1100 μ L)の培養液を調製し、試験管において振盪培養した。培養の温度は28で19時間、振盪培養した。

【0046】

【表3】

	Empty Vector株(EV)	CL生産株	CL生産株 1/2量	CL生産株1/5
YPGE培地	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
CL生産株培養液	500 μ L	500 μ L	250 μ L	100 μ L
希釈用BG11培地	—	—	250 μ L	400 μ L
酵母培養液	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
合計 1100 μ L				

【0047】

7 . ストリゴラクトン抽出工程

振盪培養終了後、培養液の入ったチューブに酢酸エチル500 μ Lを添加した。また、内部標準としてd₆-5-デオキシストリゴール(d₆-5DS)を40 μ L (400 pmol)入れた。その後、激しく混和し分離した酢酸エチル層を新しいチューブへ移した。この作業を各サンプルに対し3回実施した。飽和NaClを1 mLを入れ、強く振って静置した。静置後、二層に分離したチューブ中より酢酸エチル層をさらに新しいチューブへ回収した。酢酸エチル層へ無水硫酸ナトリウムを小さじ2杯添加後、綿栓ろ過し、エバポレーターにより溶媒を減圧留去し乾固した。

【0048】

上記より得られた菌体試料および上清試料は、下記のようにして液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS/MS)に供した。乾固させたサンプルを50%アセトニトリル40 μ Lに溶解し、LC/MS/MSに供した。LC/MS/MSは、Acquity UPLC BEH-C18カラム(2.1*50mm, 1.7 μ m (Waters社)およびUPLC装置(Nexera (Shimadzu社))ならびMS装置(TripleTOF(登録商標)5600system (Sciex社))の組み合わせを用い、以下の条件で行った。流速0.3 mL/min、移動相A0.5%ギ酸水、Bアセトニトリル、カラムオープン40度として0分B20%、4分B40%、7分B70%、9分B99%、11分B99%となるようにグラジエントをかけて行った。4デオキシオロバコールはポジティブイオンモードにてm/z=331.1>216.1で検出を行った。また内部標準であるd₆-5-デオキシストリゴールはポジティブイオンモードにてm/z=337.2>222.1で検出した。

10

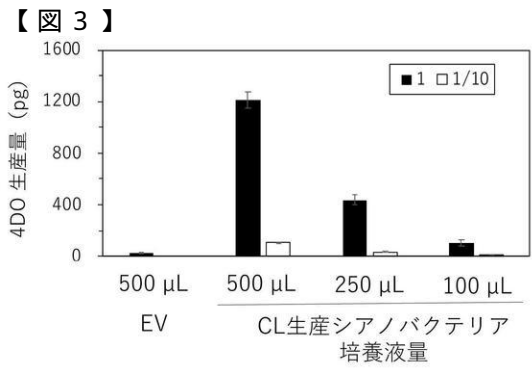
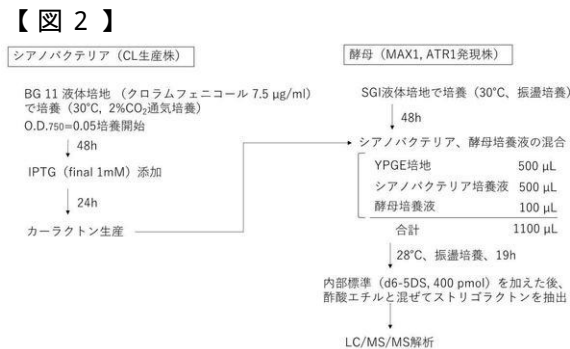
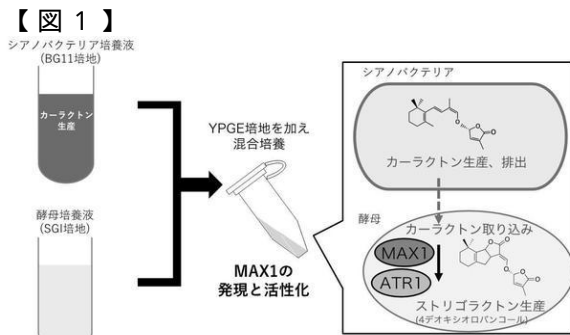
20

40

50

【 0 0 4 9 】

図3は、シアノバクテリア - 酵母の共培養により生産されたストリゴラクトン（4 デオキシオロバンコール：4 DO）の分析結果を示す図である。図3に示すように、シアノバクテリア培養液500 μLと酵母培養液 100 μLを用いた場合、培養液1 mLあたり約1200 pg（1100 μL培養系あたり1320 pg）のストリゴラクトン（4 デオキシオロバンコール）を生産することができた。ストリゴラクトンの生産量は共培養に使用したシアノバクテリア培養液量に比例して増加した。非特許文献2によるとイネの根から抽出されるストリゴラクトン量は1gあたり10 pg程度である。1 mLのシアノバクテリア-酵母培養液からは9 mg程度の菌体を得られることから、本実施形態より得られるストリゴラクトン量はイネの根から抽出される量の1万倍以上である。



試料1 mL (1)、100 μL (1/10) から別々に回収し解析に用いた。

【配列表】

0007762951000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	15/52	(2006.01)	C 1 2 N	15/52 Z
C 1 2 N	15/61	(2006.01)	C 1 2 N	15/61
C 1 2 N	15/53	(2006.01)	C 1 2 N	15/53

審査官 宮内 弘剛

(56)参考文献 特開2021-126075 (JP, A)

Sheng Wu et al., Establishment of strigolactone-producing bacterium-yeast consortium
, Science Advances, 2021年09月17日, Vol 7, Issue 38, eabh4048, 10.1126/sciadv.adh4048

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 1 7 / 0 4
C 1 2 N 1 / 2 0
C 1 2 N 1 / 1 6
C 1 2 N 1 5 / 5 2
C 1 2 N 1 5 / 6 1
C 1 2 N 1 / 2 1