

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7378621号
(P7378621)

(45)発行日 令和5年11月13日(2023.11.13)

(24)登録日 令和5年11月2日(2023.11.2)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
C 0 7 K	14/34 (2006.01)	C 0 7 K	14/34
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
		Z N A	
		Z	
		請求項の数 9 (全20頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2022-529090(P2022-529090)	(73)特許権者	513178894
(86)(22)出願日	令和2年11月24日(2020.11.24)		シージェイ チェイルジェダン コーポレーション
(65)公表番号	特表2023-503077(P2023-503077 A)		大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュン
(43)公表日	令和5年1月26日(2023.1.26)		ーグ、トンホー口、3 3 0 (サンニムー
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/016675	(74)代理人	100080791
(87)国際公開番号	WO2021/112469		弁理士 高島 一
(87)国際公開日	令和3年6月10日(2021.6.10)	(74)代理人	100136629
審査請求日	令和4年5月18日(2022.5.18)		弁理士 鎌田 光宜
(31)優先権主張番号	10-2019-0161716	(74)代理人	100125070
(32)優先日	令和1年12月6日(2019.12.6)		弁理士 土井 京子
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(74)代理人	100121212
微生物の受託番号	KCCM KCCM12630P		弁理士 田村 弥栄子
		(74)代理人	100174296
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規な分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体及びそれを用いたロイシン生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列の N 末端から 1 5 6 番目のバリン (V: valine) アミノ酸がアラニン (Alanine) に置換されており、配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有する、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched-chain amino acid aminotransferase) 変異体。

【請求項 2】

前記変異体は、配列番号 3 のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の変異体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の変異体、前記変異体をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含むベクターの少なくとも 1 つを含む、コリネバクテリウム (Corynebacterium sp.) 属微生物。

【請求項 6】

前記コリネバクテリウム属微生物は、ロイシン (leucine) を生産する、請求項 5 に記載のコリネバクテリウム (Corynebacterium sp.) 属微生物。

【請求項 7】

前記コリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) である、請求項 5 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の微生物を培地で培養するステップを含む、ロイシン生産方法。

【請求項 9】

前記培養した微生物又は培地からロイシンを分離又は回収するステップをさらに含む、請求項 8 に記載のロイシン生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、新規な分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体及びそれを用いたロイシン生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

分枝鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid) とは、バリン、ロイシン、イソロイシンの 3 種を意味し、主に筋肉で代謝され、活動時にエネルギー源として用いられることが知られている。分枝鎖アミノ酸が活動時の筋肉維持及び増量に重要な役割を果たすことが知られるにつれ、その使用量が増加してきている。特に、ロイシンは、必須アミノ酸の一種であり、医薬、食品、飼料添加物、工業薬品など、広範囲に用いられている。

20

【0003】

一方、微生物を用いたロイシンの生産は、主にエシェリキア属微生物又はコリネバクテリウム属微生物により行われ (特許文献 1)、ピルビン酸から様々な段階を経てケトイソカプロン酸 (2-ketoisocaproate) が前駆体として生合成されることが知られている。しかし、ロイシン合成に用いられる酵素は、分枝鎖アミノ酸の生合成過程に同様に用いられるので、1つの分枝鎖アミノ酸を発酵により工業的に大量生産することは困難である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】米国特許出願公開第 2020 / 0032305 号明細書

30

【文献】米国特許第 7662943 号明細書

【文献】米国特許第 10584338 号明細書

【文献】米国特許第 10273491 号明細書

【文献】米国特許第 10351859 号明細書

【非特許文献】

【0005】

【文献】Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444

【文献】Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277

【文献】Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453

【文献】Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)

40

【文献】Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990)

【文献】Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994

【文献】[CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073

【文献】Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482

【文献】Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)

【文献】Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745

【文献】J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

50

【文献】Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、従来のものに比べて収率に優れたロイシン生産方法を開発すべく鋭意努力した結果、ロイシン生産能を向上させる分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体 (branched-chain amino acid aminotransferase; bcaT) を見出し、本出願を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本出願は、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から156番目のバリン (V: valine) アミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched amino acid aminotransferase) 変異体、それをコードするポリヌクレオチド、それを含むベクター、それを含む微生物を提供することを目的とする。

【0008】

また、本出願は、前記微生物を培地で培養するステップを含むロイシン生産方法を提供することを目的とする。

【発明の効果】

【0009】

本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体は、野生型に比べてロイシン生産能を向上させるので、より効率的なロイシン大量生産に広く活用することができる。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、これらを具体的に説明する。なお、本出願で開示される各説明及び実施形態はそれぞれ他の説明及び実施形態にも適用される。すなわち、本出願で開示される様々な要素のあらゆる組み合わせが本出願に含まれる。また、以下の具体的な記述に本出願が限定されるものではない。

【0011】

また、当該技術分野における通常の知識を有する者であれば、通常の実験のみを用いて本出願に記載された本出願の特定の態様の多くの等価物を認識し、確認することができるであろう。さらに、その均等物も本出願に含まれることが意図されている。

【0012】

本出願の一態様は、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から156番目のバリン (V: valine) アミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched amino acid aminotransferase) 変異体を提供する。

【0013】

具体的には、本出願は、配列番号1のアミノ酸配列中に少なくとも1つの置換を有する分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体を提供し、前記アミノ酸の置換には、N末端から156番目のアミノ酸がバリン以外の他のアミノ酸に置換されることが含まれる。前記「他のアミノ酸」は、配列番号1の156番目のアミノ酸であるバリン (Valine) を除く他のアミノ酸であればいかなるものでもよい。具体的には、前記変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において156番目のアミノ酸が非極性 (Nonpolar) アミノ酸に置換されたタンパク質であり、より具体的には、前記変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において前記156番目のバリンがアラニンに置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体であるが、これらに限定されるものではない。

【0014】

本出願における「分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched-chain amino acid aminotransferase; bcaT)」とは、分枝鎖アミノ酸の生合成に関与する酵素である。本出願における分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、「bcaT」、「トランスアミナーゼB (transaminase B)」又は「ilvE」と混用される。また、前記分枝

10

20

30

40

50

鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、i l v E 遺伝子によりコードされるものであるが、これに限定されるものではない。

【0015】

微生物において、ロイシンは、ピルビン酸からアセト乳酸 (acetolactic acid)、ジヒドロキシイソ吉草酸 (dihydroxy isovaleric acid)、ケトイソ吉草酸 (ketoisovaleric acid)、2-イソプロピルリンゴ酸 (isopropylmalic acid)、3-イソプロピルリンゴ酸 (isopropylmalic acid)、ケトイソカプロン酸 (isocaproic acid) を経由して生合成されることが知られている。また、このような生合成過程は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (acetohydroxy acid synthase)、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (acetohydroxyacid isomeroreductase)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (dihydroxy acid dehydratase)、イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (isopropylmalic acid synthase)、イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ (isopropylmalic acid dehydratase)、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (isopropylmalic acid dehydrogenase)、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched amino acid aminotransferase) などの酵素により触媒されて生合成される。

【0016】

しかし、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、ロイシンだけでなく、バリン、イソロイシンの生合成にも関与するので、前記酵素を操作して1種類の分枝鎖アミノ酸を発酵により工業的に製造するには問題があった。

【0017】

本出願における前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、公知のデータベースであるNCBIのGenBankからその配列が得られるが、これに限定されるものではなく、当該分野で周知の様々な方法に基づいて分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼを確保することができる。その方法の例としては、酵素発現に通常広く用いられるコリネバクテリウム属微生物から酵素を高効率で確保できるように、コドン最適化が含まれる遺伝子合成技術や、微生物の大量ゲノム情報に基づいた生物情報学的方法による有用酵素資源のスクリーニング方法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0018】

本出願における変異対象となる前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) 由来の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼであり、具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド／タンパク質であるが、同じ活性を有するポリペプチド／タンパク質であればいかなるものでもよい。例えば、配列番号1のアミノ酸配列、又はそれと80%以上の相同性 (homology) もしくは同一性 (identity) を有するアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。具体的には、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼには、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%以上の相同性又は同一性を有するアミノ酸配列が含まれる。また、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド／タンパク質であっても、このような相同性又は同一性を有し、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を示すポリペプチド／タンパク質であれば、本出願の変異対象となるポリペプチド／タンパク質の範囲に含まれることは言うまでもない。

【0019】

すなわち、本出願に「特定配列番号で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質又はポリペプチド」、「特定配列番号で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質又はポリペプチド」と記載されていても、当該配列番号のアミノ酸配列からなるタンパク質又はポリペプチドと同一又は相当する活性を有するものであれば、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質又はポリペプチドであっても本出願に用いられることは言うまでもない。例えば、「配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチド」の一部の配列が欠失、改変又は置換されるか、又はそのポリペプチドが付加されたアミノ酸配列を含むものであっても、「配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチド」

10

20

30

40

50

と同一又は相当する活性を有するものであれば、「配列番号 1 のアミノ酸配列からなるポリペプチド」に属することは言うまでもない。

【0020】

本出願における「変異体 (variant)」とは、少なくとも 1 つのアミノ酸の保存的置換 (conservative substitution) 及び／又は改変 (modification) により前記列挙した配列 (the recited sequence) とは異なるが、前記タンパク質の機能 (functions) 又は特性 (properties) が維持されるポリペプチドを意味する。変異体は、数個のアミノ酸置換、欠失又は付加により識別される配列 (identified sequence) とは異なる。このような変異体は、一般に前記ポリペプチド配列の 1 つを改変し、その改変したポリペプチドの特性を評価することにより識別することができる。すなわち、変異体の能力は、本来のタンパク質 (native protein) より向上するか、変わらないか又は低下する。また、一部の

変異体には、N 末端リーダー配列や膜貫通ドメイン (transmembrane domain) などの少なくとも 1 つの部分が除去された変異体も含まれる。他の変異体には、成熟タンパク質 (mature protein) の N 及び／又は C 末端から一部分が除去された変異体も含まれる。本出願における「保存的置換 (conservative substitution)」とは、あるアミノ酸が類似した構造的及び／又は化学的性質を有する他のアミノ酸に置換されることを意味する。前記変異体は、少なくとも 1 つの生物学的活性を依然として有する状態で、例えば少なくとも 1 つの保存的置換を有する。このようなアミノ酸置換は、一般に残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性及び／又は両親媒性 (amphipathic nature) における類似性に基づいて発生し得る。通常、保存的置換は、ポリペプチドの活性にほとんど又は全く影響を及ぼさない。

10

20

【0021】

また、変異体は、ポリペプチドの特性と二次構造に最小限の影響を及ぼすアミノ酸の欠失又は付加を含んでもよい。例えば、変異体又は変異型ポリペプチドは、翻訳と同時に (co-translationally) 又は翻訳後に (post-translationally) タンパク質の移転 (transfer) に関与するタンパク質の N 末端のシグナル (又はリーダー) 配列に結合されてもよい。また、前記変異体は、ポリペプチドを確認、精製又は合成できるように、他の配列又はリンカーに結合されてもよい。

【0022】

前記「変異体」には、変異型、改変、変異したタンパク質、変異型ポリペプチド、変異、変異型タンパク質などの用語 (英語表現では、modification、modified protein、modified polypeptide、mutant、mutin、divergent、variant など) が用いられるが、変異を意味する用語であればいかなるものでもよい。本出願の目的上、前記変異体は、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性が変化し、ロイシン生産能が強化されたものである。

30

【0023】

すなわち、本出願における「分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体」は、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸の置換を有するものであり、前記「分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体」は、「分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド」と互換的に用いられる。また、前記「分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体」は、変異型分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼタンパク質、変異型 b c a T、変異型 b c a T タンパク質、b c a T 変異体、変異型トランスアミナーゼ B (transaminase B) タンパク質、変異型トランスアミナーゼ B、トランスアミナーゼ B 変異体、変異型 i l v E タンパク質、変異型 i l v E、i l v E 変異体などと混用されるが、前述したように、変異を意味する用語であればこれらに限定されるものではない。

40

【0024】

配列番号 1 のアミノ酸配列の N 末端から 156 番目のバリン (V: valine) アミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched amino acid aminotransferase) 変異体には、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性

50

を有するポリペプチドのアミノ酸配列において、配列番号1のN末端から156番目の位置に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体が含まれることは言うまでもない。例えば、前記変異体には、配列番号1の配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%又は99%以上の相同性又は同一性を有する配列において、配列番号1のN末端から156番目の位置に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換された配列が含まれる。

【0025】

前記「他のアミノ酸」とは、配列番号1の156番目のアミノ酸に相当するアミノ酸を除く他のアミノ酸である。具体的には、前記変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において156番目のアミノ酸に相当するアミノ酸がアラニンに類似した構造的及び／又は化学的性質を有する非極性アミノ酸に置換されたものである。より具体的には、前記変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において156番目のアミノ酸に相当するアミノ酸がアラニンに置換されたものであるが、これに限定されるものではない。

10

【0026】

本出願における「相当する位置 (corresponding position)」とは、タンパク質もしくはポリペプチドにおいて列挙される位置のアミノ酸残基であるか、又はタンパク質もしくはポリペプチドにおいて列挙される残基に類似、同一もしくは相当するアミノ酸残基を意味する。本出願における「相当領域」とは、一般に関連タンパク質又は比較タンパク質における類似又は対応する位置を意味する。

【0027】

本出願において、本出願に用いられるタンパク質中のアミノ酸残基位置に特定ナンバリングが用いられる。例えば、比較する対象のタンパク質と本出願のタンパク質のポリペプチド配列をアラインメントすることにより、本出願のタンパク質のアミノ酸残基位置に相当する位置を再ナンバリングすることができる。

20

【0028】

本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体は、野生型又は非変異分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼタンパク質に比べて微生物におけるロイシン生産能を向上させる活性を有するものであってもよい。

【0029】

前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から156番目のバリン (V: valine) アミノ酸残基が他のアミノ酸、より具体的にはアラニンに置換されたものであって、配列番号1のアミノ酸配列と70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%又は99%以上の相同性又は同一性を有するものであってもよく、より具体的には、配列番号1と90%以上の相同性又は同一性を有するものであってもよい。

30

【0030】

一実施例において、前記変異体は、配列番号3からなるものであるが、これに限定されるものではない。また、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体は、配列番号3においてN末端から156番目の位置に相当するアミノ酸が固定され (すなわち、配列番号3の156番目のアミノ酸に相当する位置のアミノ酸が、配列番号3の156番目のアミノ酸と同様にアラニンであり)、配列番号3と70%以上、具体的には80%、85%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%以上の相同性又は同一性を有するアミノ酸配列を含むものであるが、これらに限定されるものではない。さらに、そのような相同性又は同一性を有し、前記タンパク質に相当する効能を示すアミノ酸配列であれば、156番目の位置のアミノ酸配列以外に、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本出願に含まれることは言うまでもない。

40

【0031】

本出願における「相同性 (homology)」又は「同一性 (identity)」とは、2つの与えられたアミノ酸配列又は塩基配列が互いに関連する程度を意味し、百分率で表される。

50

【0032】

相同性及び同一性は、しばしば互換的に用いられる。

【0033】

保存されている (conserved) ポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列相同性又は同一性は標準的な配列アルゴリズムにより決定され、用いられるプログラムにより確立されたデフォルトギャップペナルティが共に用いられてもよい。実質的には、相同性を有するか (homologous) 又は同じ (identical) 配列は、中程度又は高いストリンジェントな条件 (stringent conditions) 下において、一般に配列全体又は全長の少なくとも約 50 %、60 %、70 %、80 % 又は 90 % 以上ハイブリダイズする。そのハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドがコドンの代わりに縮退コドンを含むようにするものである。

10

【0034】

任意の 2 つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列が相同性、類似性又は同一性を有するか否かは、例えば非特許文献 1 のようなデフォルトパラメーターと「FASTA」プログラムなどの公知のコンピュータアルゴリズムを用いて決定することができる。あるいは、EMBOSS パッケージのニードルマンプログラム (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, 非特許文献 2) (バージョン 5.0.0 又はそれ以降のバージョン) で行われるように、ニードルマン=ウンス (Needleman-Wunsch) アルゴリズム (非特許文献 3) を用いて決定することができる (GCG プログラムパッケージ (非特許文献 4)、BLASTP、BLASTN、FASTA (非特許文献 5、6 及び 7) を含む)。例えば、国立生物工学情報センターの BLAST 又は Clustal W を用いて相同性、類似性又は同一性を決定することができる。

20

【0035】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドの相同性、類似性又は同一性は、例えば非特許文献 8 に開示されているように、非特許文献 3 などの GAP コンピュータプログラムを用いて、配列情報を比較することにより決定することができる。要約すると、GAP プログラムは、2 つの配列のうち短いものにおける記号の総数で、類似する配列記号 (すなわち、ヌクレオチド又はアミノ酸) の数を割った値と定義している。GAP プログラムのためのデフォルトパラメーターは、(1) 二進法比較マトリックス (同一性は 1、非同一性は 0 の値をとる) 及び非特許文献 9 に開示されているように、非特許文献 10 の加重比較マトリックス (又は EDNAFULL (NCBI NUC 4.4 の EMBOSS バージョン) 置換マトリックス) と、(2) 各ギャップに 3.0 のペナルティ、及び各ギャップの各記号に追加の 0.10 ペナルティ (又はギャップオープンペナルティ 10、ギャップ延長ペナルティ 0.5) と、(3) 末端ギャップに無ペナルティを含む。よって、本出願における「相同性」又は「同一性」は、配列間の関連性 (relevance) を示すものである。

30

【0036】

本出願の他の態様は、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0037】

また、本出願のさらに他の態様は、前記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

40

【0038】

本出願における「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単量体 (monomer) が共有結合により長く鎖状につながったヌクレオチドの重合体 (polymer) であって、所定の長さより長い DNA 又は RNA 鎖を意味し、より具体的には前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド断片を意味する。

【0039】

本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドは、本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチド配列であればいかなるものでもよい。前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列において 156 番

50

目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異体をコードする配列であればいかなるものでもよい。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において156番目のアミノ酸がアラニンに置換された変異体をコードするポリヌクレオチド配列である。例えば、本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号3のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列であるが、これに限定されるものではない。より具体的には、配列番号4のポリヌクレオチド配列からなるものであるが、これに限定されるものではない。

【0040】

前記ポリヌクレオチドは、コドンの縮退 (degeneracy) により、又は前記タンパク質を発現させようとする生物において好まれるコドン considering、タンパク質のアミノ酸配列が変化しない範囲でコード領域に様々な改変を行うことができる。よって、コドンの縮退 (codon degeneracy) により、配列番号3のアミノ酸配列からなるポリペプチド、又はそれと相溶性もしくは同一性を有するポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチドも含まれることは言うまでもない。

【0041】

また、公知の遺伝子配列から調製されるプローブ、例えば前記塩基配列の全部又は一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることにより、配列番号1のアミノ酸配列において156番目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体をコードする配列であればいかなるものでもよい。

【0042】

前記「ストリンジェントな条件 (stringent condition)」とは、ポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。このような条件は、文献 (例えば、非特許文献11) に具体的に記載されている。例えば、相溶性 (homology) もしくは同一性 (identity) の高い遺伝子同士、80%以上、85%以上、具体的には90%以上、より具体的には95%以上、さらに具体的には97%以上、特に具体的には99%以上の相溶性もしくは同一性を有する遺伝子同士をハイブリダイズし、それより相溶性もしくは同一性の低い遺伝子同士をハイブリダイズしない条件、又は通常のサザンハイブリダイゼーション (southern hybridization) の洗浄条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、具体的には60℃、0.1×SSC、0.1%SDS、より具体的には68℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度及び温度において、1回、具体的には2回～3回洗浄する条件が挙げられる。

【0043】

ハイブリダイゼーションは、たとえハイブリダイゼーションの厳格さに応じて塩基間のミスマッチ (mismatch) が可能であっても、2つの核酸が相補的配列を有することが求められる。「相補的」とは、互いにハイブリダイゼーションが可能なヌクレオチド塩基間の関係を表すために用いられるものである。例えば、DNAにおいて、アデニンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。よって、本出願には、実質的に類似する核酸配列だけでなく、全配列に相補的な単離された核酸フラグメントが含まれてもよい。

【0044】

具体的には、相溶性又は同一性を有するポリヌクレオチドは、55℃のT_m値でハイブリダイゼーションステップを含むハイブリダイゼーション条件と前述した条件を用いて検知することができる。また、前記T_m値は、60℃、63℃又は65℃であってもよいが、これらに限定されるものではなく、その目的に応じて当業者により適宜調節される。

【0045】

ポリヌクレオチドをハイブリダイズする適切な厳格さはポリヌクレオチドの長さ及び相補性の程度に依存し、変数は当該技術分野で公知である (非特許文献12参照)。

【0046】

本出願における「ベクター」とは、好適な宿主内で標的変異型タンパク質を発現させることができるように、好適な調節配列に作動可能に連結された前記標的変異型タンパク質

10

20

30

40

50

をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA産物を意味する。前記調節配列には、転写を開始するプロモーター、その転写を調節するための任意のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列が含まれる。ベクターは、好適な宿主細胞内に形質転換されると、宿主ゲノムに関係なく複製及び機能することができ、ゲノム自体に組み込まれる。

【0047】

本出願に用いられるベクターは、特に限定されるものではなく、当該技術分野で公知の任意のベクターが用いられる。通常用いられるベクターの例としては、天然状態又は組換え状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージが挙げられる。例えば、ファージベクター又はコスミドベクターとしては、pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、Charon21Aなどを用いることができ、プラスミドベクターとしては、pBR系、pUC系、pBluescriptII系、pGEM系、pTZ系、pCL系、pET系などを用いることができる。具体的には、pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BACベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

【0048】

例えば、細胞内染色体導入用ベクターにより、染色体内で標的変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチドを変異したポリヌクレオチドに置換することができる。前記ポリヌクレオチドの染色体への挿入は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば相同組換え(homologous recombination)により行うことができるが、これに限定されるものではない。前記ポリヌクレオチドは、染色体に挿入されたか否かを確認するための選択マーカー(selection marker)をさらに含んでもよい。選択マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選択、すなわち標的核酸分子が挿入されたか否かを確認するためのものであり、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性、表面変異型タンパク質の発現などの選択可能表現型を付与するマーカーが用いられる。選択剤(selective agent)で処理した環境においては、選択マーカーを発現する細胞のみ生存するか、異なる表現形質を示すので、形質転換された細胞を選択することができる。

【0049】

本出願のさらに他の態様は、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体、前記変異体をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含むベクターの少なくとも1つを含む微生物を提供する。

【0050】

具体的には、前記微生物は、変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換することにより製造される微生物であるが、これに限定されるものではない。

【0051】

本出願における「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞に導入することにより、宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現させることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内で発現するものであれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、染色体外に位置するかに関係なく、いかなるものでもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNAやRNAを含むものである。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞に導入されて発現するものであれば、いかなる形態で導入されるものでもよい。例えば、前記ポリヌクレオチドは、自ら発現する上で必要な全ての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット(expression cassette)の形態で宿主細胞に導入される。通常、前記発現カセットは、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター(promoter)、転写終結シグナル、リボソーム結合部位及び翻訳終結シグナルを含む。前記発現カセットは、自己複製可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞において発現に必要な配列と作動可能に連結されたものであってもよいが、これに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0052】

また、前記「作動可能に連結」されたものとは、本出願の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介するプロモーター配列と前記遺伝子配列が機能的に連結されたものを意味する。

【0053】

本出願の微生物は、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体、それをコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含むベクターの少なくとも1つを含み、ロイシン生産能を有する微生物であるが、これに限定されるものではない。前記微生物は、自然にロイシン生産能を有する微生物、又はロイシン生産能のない親株にロイシン生産能が付与された微生物であるが、これらに限定されるものではない。

10

【0054】

本出願の目的上、前記微生物は、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体を発現し、ロイシンを生産する微生物であればいかなるものでもよい。

【0055】

本出願における、タンパク質が「発現するように／する／させる」とは、標的タンパク質が微生物に導入されるか、微生物で発現するように改変された状態を意味する。前記標的タンパク質が微生物中に存在するタンパク質の場合、内在性活性又は改変前の活性に比べてその活性が強化された状態を意味する。本出願の目的上、「標的タンパク質」は、前述した分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体であってもよい。

【0056】

20

具体的には、「タンパク質の導入」とは、微生物が本来持っていなかった特定タンパク質の活性が現れるようにすること、又は当該タンパク質の内在性活性もしくは改変前の活性に比べて向上した活性が現れるようにすることを意味する。例えば、特定タンパク質をコードするポリヌクレオチドが微生物中の染色体に導入されることや、特定タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが微生物に導入されてその活性が現れることであってもよい。

【0057】

また、「活性の強化」とは、微生物が有する特定タンパク質の内在性活性又は改変前の活性に比べて活性が向上することを意味する。「内在性活性」とは、自然要因又は人為的要因により遺伝的に変異して微生物の形質が変化する場合に、形質変化の前に親株が本来有していた特定タンパク質の活性を意味する。一実施例において、タンパク質活性の強化は、前記タンパク質をコードする遺伝子の発現強化により達成することができるが、これに限定されるものではない。

30

【0058】

具体的には、本出願において、前記タンパク質変異体の活性強化は、前記タンパク質変異体をコードする遺伝子の細胞内のコピー数を増加する方法、前記タンパク質変異体をコードする遺伝子の発現調節配列に変異を導入する方法、前記タンパク質変異体をコードする遺伝子の発現調節配列を活性が強力な配列に置換する方法、染色体上の分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有する天然タンパク質をコードする遺伝子を前記タンパク質変異体をコードする遺伝子に代替する方法、前記タンパク質変異体の活性が強化されるように前記変異体をコードする遺伝子に変異をさらに導入する方法、及び微生物にタンパク質変異体を導入する方法からなる群から選択される少なくとも1つの方法で行われるが、これらに限定されるものではない。

40

【0059】

次に、ポリヌクレオチドの発現が増加するように発現調節配列を改変する方法は、特にこれらに限定されるものではないが、前記発現調節配列の活性がさらに強化されるように、核酸配列の欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより配列上の変異を誘導して行うこともでき、より強い活性を有する核酸配列に置換することにより行うこともできる。前記発現調節配列には、特にこれらに限定されるものではないが、プロモーター、オペレーター配列、リボソーム結合部位をコードする配列、転写及び

50

翻訳の終結を調節する配列などが含まれる。

【0060】

前記ポリヌクレオチド発現単位の上流には、本来のプロモーターに代えて強力なプロモーターが連結されるが、これに限定されるものではない。公知の強力なプロモーターの例としては、*cj1*～*cj7*プロモーター（特許文献2）、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*プロモーター、*tac*プロモーター、ラムダファージPRプロモーター、PLプロモーター、*tet*プロモーター、*gapA*プロモーター、SPL7プロモーター、SPL13（*sm3*）プロモーター（特許文献3）、O2プロモーター（特許文献4）、*tkt*プロモーター、*yccA*プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0061】

また、染色体上のポリヌクレオチド配列の改変は、特にこれらに限定されるものではないが、前記ポリヌクレオチド配列の活性がさらに強化されるように、核酸配列の欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより発現調節配列上の変異を誘導して行うこともでき、より高い活性を有するように改良されたポリヌクレオチド配列に置換することにより行うこともできる。

【0062】

このようなタンパク質活性の導入及び強化とは、対応するタンパク質の活性又は濃度が野生型や非改変の微生物菌株におけるタンパク質の活性又は濃度に比べて、一般に少なくとも1%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%又は500%、最大で1000%又は2000%まで増加することを意味するが、これらに限定されるものではない。

20

【0063】

前記微生物は、タンパク質変異体を含むか、タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換されて変異体を発現する微生物であればいかなるものでもよい。具体的には、エシェリキア属（*Escherichia* sp.）、セラチア属（*Serratia* sp.）、エルウィニア属（*Erwinia* sp.）、エンテロバクター属（*Enterobacteria* sp.）、サルモネラ属（*Salmonella* sp.）、ストレプトマイセス属（*Streptomyces* sp.）、シュードモナス属（*Pseudomonas* sp.）、ブレヴィバクテリウム属（*Brevibacterium* sp.）属、コリネバクテリウム属（*Corynebacterium* sp.）などの微生物菌株が含まれ、より具体的にはコリネバクテリウム属微生物であり、さらに具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）であるが、これらに限定されるものではない。

30

【0064】

本出願の微生物は、ロイシンを生産する微生物であってもよい。

【0065】

本出願における「ロイシンを生産する微生物」とは、自然にロイシン生産能を有する微生物、又はロイシン生産能のない親株にロイシン生産能が付与された微生物を意味する。また、前記ロイシンを生産する微生物は、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体、それをコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含むベクターの少なくとも1つにより遺伝的に改変された微生物、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体又はそれをコードするポリヌクレオチドを発現するように改変された微生物、前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体又はそれをコードするポリヌクレオチドを発現する組換え微生物であるが、これらに限定されるものではない。

40

【0066】

前記ロイシンを生産する微生物は、タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換されて変異体を発現する微生物であり、本出願の目的上、前記微生物は、*ilvE*変異体を含み、ロイシンを生産する微生物であればいかなるものでもよい。具体的には、エシェリキア属（*Escherichia* sp.）、セラチア属（*Serratia* sp.）、エルウィニア属（*Erwinia* sp.）、エ

50

ンテロバクター属 (*Enterobacteria* sp.)、サルモネラ属 (*Salmonella* sp.)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium* sp.) 属、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) などの微生物菌株が含まれ、より具体的にはコリネバクテリウム属微生物であり、さらに具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) であるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

本出願における「ロイシンを生産するコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) 微生物」とは、野生型のもの又は変異によりロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物を意味する。コリネバクテリウム属微生物がロイシンをある程度生産することは知られているが、ロイシン生産能が非常に低く、これを工業的に生産するには困難がある。よって、本出願における、ロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物とは、天然微生物自体又は外部ロイシン生産機序に関する遺伝子が挿入されるか、内在性遺伝子の活性が強化、弱化又は不活性化することにより、向上したロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物を意味する。本出願の目的上、前記ロイシンを生産する微生物は、本出願の前記分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体を含み、ロイシン生産能が向上することを特徴とする微生物であってもよい。一実施例において、前記微生物は、天然の野生型菌株、親株、又は本出願の変異体を含まない微生物に比べてロイシン生産能が向上するものであってもよい。

【0068】

本出願における「改変前の菌株」又は「改変前の微生物」とは、微生物に自然に発生し得る突然変異を含む菌株を除外するものではなく、野生型菌株もしくは天然菌株自体、又は自然要因もしくは人為的要因により遺伝的に変異して形質が変化する前の菌株を意味する。前記「改変前の菌株」又は「改変前の微生物」は、「非変異菌株」、「非改変菌株」、「非変異微生物」、「非改変微生物」又は「基準微生物」と混用される。

【0069】

一実施例において、前記コリネバクテリウム属微生物は、ロイシン生合成経路の遺伝子の発現が強化されるか、ロイシン分解経路に参与する遺伝子の発現が弱化／不活性化されたものであり、具体的にはイソプロピルリンゴ酸シンターゼ (isopropylmalate synthase) 活性がさらに強化された、ロイシンを生産するコリネバクテリウム属微生物であるが、これに限定されるものではない。タンパク質活性の強化については前述した通りである。

【0070】

本出願における「タンパク質活性の弱化／不活性化」とは、酵素又はタンパク質の発現が天然の野生型菌株、親株、又は当該タンパク質が改変されていない菌株に比べて全く発現しないことや、発現してもその活性がなくなるか、減少することを意味する。ここで、前記減少は、前記タンパク質をコードする遺伝子の変異、発現調節配列の改変、遺伝子の一部又は全部の欠損などによりタンパク質の活性が本来微生物が有するタンパク質の活性より減少した場合や、それをコードする遺伝子の発現阻害、翻訳 (translation) 阻害などにより細胞内で全体的なタンパク質の活性の程度が天然の菌株又は改変前の菌株より低下した場合や、それらの組み合わせを含む概念である。本出願における前記不活性化／弱化は、当該分野で公知の様々な方法の適用により達成することができる。前記方法の例として、1) 前記タンパク質をコードする前記遺伝子の全部又は一部を欠失させる方法、2) 前記タンパク質をコードする前記遺伝子の発現が減少するように発現調節配列を改変する方法、3) 前記タンパク質の活性が除去又は弱化するようにタンパク質をコードする前記遺伝子配列を改変する方法、4) 前記タンパク質をコードする前記遺伝子の転写産物に相補的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、アンチセンスRNA) を導入する方法、5) 前記タンパク質をコードする前記遺伝子のシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列の前にシャイン・ダルガノ配列と相補的な配列を付加することにより2次構造物を形成させてリボソーム (ribosome) の付着を不可能にする方法、6) 前記タンパク質をコードする前記遺伝子のポリヌクレオチド配列のORF (open reading frame)

e) の 3' 末端に逆転写するようにプロモーターを付加する方法 (Reverse transcription engineering, RTE) などが挙げられ、それらの組み合わせによっても達成することができるが、前記例に特に限定されるものではなく、当該技術分野で公知の不活性化／弱化方法を適宜選択して適用することができる。

【0071】

本出願のさらに他の態様は、前記微生物を培養するステップを含むロイシン生産方法を提供する。

【0072】

前記方法における前記微生物を培養するステップは、特に限定されるものではないが、公知の回分培養法、連続培養法、流加培養法などにより行うことができる。ここで、培養条件は、特にこれらに限定されるものではないが、塩基性化合物 (例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニア) 又は酸性化合物 (例えば、リン酸又は硫酸) を用いて適正 pH (例えば、pH 5~9、具体的には pH 6~8、最も具体的には pH 6.8) に調節し、酸素又は酸素含有ガス混合物を培養物に導入して好気性条件を維持する。培養温度は 20~45℃、具体的には 25~40℃ に維持し、約 10~160 時間培養するが、これらに限定されるものではない。前記培養により生産されたロイシンは、培地中に分泌されるか、又は細胞に残留する。

【0073】

また、用いられる培養用培地は、炭素供給源として糖及び炭水化物 (例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、モラセス (molasses)、デンプン及びセルロース)、油脂 (例えば、大豆油、ヒマワリ油、落花生油及びココナッツ油)、脂肪酸 (例えば、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸)、アルコール (例えば、グリセリン及びエタノール)、有機酸 (例えば、酢酸) などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。窒素供給源としては、窒素含有有機化合物 (例えば、ペプトン、酵母エキス、肉汁、麦芽エキス、トウモロコシ浸漬液、大豆粕及び尿素)、無機化合物 (例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム) などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。リン供給源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、それに相当するナトリウム含有塩などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。また、培地は、その他金属塩 (例えば、硫酸マグネシウム又は硫酸鉄)、アミノ酸、ビタミンなどの必須成長促進物質を含んでもよい。

【0074】

前記生産方法は、培養した微生物又は培養培地からロイシンを回収するステップをさらに含んでもよい。

【0075】

ロイシンを分離又は回収する方法は、培養方法に応じて、当該分野で公知の好適な方法を用いて培養液から目的とするアミノ酸を回収 (collect) することができる。例えば、遠心分離、濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化、HPLC などが用いられ、当該分野で公知の好適な方法を用いて培地又は微生物から目的とするロイシンを回収することができる。

【0076】

本出願のさらに他の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列の N 末端から 156 番目のバリン (V: valine) アミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched amino acid aminotransferase) 変異体を発現するように微生物を改変することを含む、ロイシン生産能を向上させる方法を提供する。

【0077】

本出願のさらに他の態様は、前記タンパク質変異体のロイシン生産増加のための使用を提供する。

【0078】

10

20

30

40

50

前記タンパク質変異体については前述した通りである。

【実施例】

【0079】

以下、実施例及び実験例を挙げて本出願をより詳細に説明する。しかし、これらの実施例及び実験例は本出願を例示するものにすぎず、本出願がこれらの実施例及び実験例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0080】

i l v E 変異の発見

1-1. i l v E を含むベクターの作製

分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched-chain amino acid aminotransferase) 活性を有する i l v E 変異ライブラリーを作製するために、まず i l v E の一部を含む組換えベクターを作製した。野生型 i l v E のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号 1 及び 2 に示す。コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) A T C C 1 3 0 3 2 の染色体を鋳型とし、配列番号 5 及び 6 のプライマーを用いて P C R を行い、その増幅産物を T O P O C l o n i n g K i t (Invitrogen) で大腸菌ベクター p C R 2 . 1 にクローニングして p C R - i l v E を得た。

【0081】

1-2. i l v E 変異ライブラリーの作製

実施例 1-1 で作製したベクターに基づいて i l v E 変異ライブラリーを作製した。ライブラリーは、e r r o r - p r o n e P C R k i t (clontech Diversify(R) PCR Random Mutagenesis Kit) を用いて作製した。変異が発生する条件で、配列番号 5 及び 6 をプライマーとして P C R 反応を行った。具体的には、1 0 0 0 b p 当たり 0 ~ 3 つの変異が発生する条件で、9 4 ° C で 3 0 秒間の p r e - h e a t i n g 後に、9 4 ° C で 3 0 秒間、6 8 ° C で 1 分 3 0 秒間の過程を 2 5 回繰り返した。ここで、得られた P C R 産物を m e g a p r i m e r (5 0 0 ~ 1 2 5 n g) として、9 5 ° C で 5 0 秒間、6 0 ° C で 5 0 秒間、6 8 ° C で 1 2 分間の過程を 2 5 回繰り返し、その後 D p n I で処理し、大腸菌 D H 5 α に形質転換してカナマイシン (2 5 m g / L) を含有する L B 固体培地に塗抹した。形質転換したコロニー 2 0 種を選択してプラスミドを得て、ポリヌクレオチド配列を分析した結果、2 m u t a t i o n s / k b の頻度で異なる位置に変異が導入されたことが確認された。約 2 0 , 0 0 0 個の形質転換した大腸菌コロニーを採取してプラスミドを抽出し、これを p T O P O - i l v E - l i b r a r y と命名した。

【実施例2】

【0082】

ロイシン生産株におけるライブラリーの評価及び変異体の選択

一般に、コリネバクテリウム属野生型の菌株は、ロイシンを生産するとしても非常に微量を生産するにすぎない。よって、A T C C 1 3 0 3 2 由来のロイシン生産菌株を作製し、実施例 1-2 で作製したライブラリーベクターを導入して変異体を選択した。

【0083】

2-1. ロイシン生産株 C A 1 3 - 8 1 0 0 菌株の作製

野生型コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 由来のロイシン生産菌株を作製するために、イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (isopropylmalate synthase, 以下「I P M S」という) 変異体を導入した菌株 C A 1 3 - 8 1 0 0 菌株を作製した。

【0084】

具体的には、前記変異体は、イソプロピルリンゴ酸シンターゼをコードする l e u A 遺伝子の 1 6 7 3 番目のヌクレオチドの G が A に置換され、I P M S タンパク質の 5 5 8 番目のアミノ酸であるアルギニンがヒスチジンに置換される変異と、1 6 8 2 番目、1 6 8 3 番目のヌクレオチドである G C が A T に置換され、5 6 1 番目のアミノ酸であるグリシンがアスパラギン酸に置換される変異とを含む (特許文献 1) 。

【0085】

10

20

30

40

50

前記 *leuA* 変異を含む *pDC-leuA* (R558H, G561D) ベクターを野生型 ATCC 13032 に形質転換し、相同性配列の組換えにより染色体上にベクターが挿入された菌株は、カナマイシン (kanamycin) 25 mg/L を含有する培地から選択した。

【0086】

選択した1次菌株にさらに2次交差 (cross-over) を行い、*leuA* 遺伝子の変異が導入された菌株を選定した。最終的に形質転換した菌株に変異が導入されたか否かは、配列番号7及び8のプライマーを用いてPCRを行い、その後塩基配列を分析することにより判断し、変異が導入されたことが確認された。

【0087】

pDC-leuA (R558H, G561D) ベクターで形質転換した ATCC 13032 *leuA* (R558H, G561D) 菌株を CA13-8100 と命名した。

【0088】

2-2. ライブラリーの評価及び変異株の選択

実施例1-2で作製した *pTOPO-ilvE-library* を実施例2-1で作製したロイシン生産株 CA13-8100 にエレクトロポレーションで形質転換し、その後カナマイシン 25 mg/L を含有する栄養培地に塗抹して変異遺伝子が挿入された菌株 10,000 個のコロニーを確保し、各コロニーを CA13-8100/*pTOPO-ilvE* (mt) 1~CA13-8100/*pTOPO-ilvE* (mt) 10000 と命名した。

【0089】

確保した10,000個のコロニーのうち、ロイシン生産が増加したコロニーを確認するために、各コロニーに対して次の方法で発酵力価評価を行った。

・栄養培地：グルコース 10 g, 肉汁 5 g, ポリペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 2.5 g, 酵母エキス 5 g, 寒天 20 g, 尿素 2 g (蒸留水 1 リットル中)

・生産培地：グルコース 50 g, 硫酸アンモニウム 20 g, コーンステープソリッド (Corn Steep Solids) 20 g, リン酸水素ニカリウム 1 g, 硫酸マグネシウム 7 水塩 0.5 g, ビオチン 100 µg, チアミン HCl 1 mg, 炭酸カルシウム 15 g (蒸留水 1 リットル中), pH 7.0

【0090】

加圧殺菌した生産培地 25 ml と 25 µg/ml のカナマイシンを含有する 250 ml のコーナーバッフルフラスコに各コロニーを白金耳で接種し、その後 30℃ にて 200 rpm で 60 時間振盪培養した。培養終了後に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, SHIMADU LC20A) を用いた方法によりロイシン生産量を測定し、CA13-8100 菌株に比べてロイシン生産能が最も向上した菌株1種を選択した。選択した菌株から生産されたロイシン濃度を表1に示す。

【0091】

【表1】

菌株名	ロイシン (g/L)
CA13-8100	3.4
CA13-8100/ <i>pTOPO-ilvE</i> (mt) 3012	3.97

【0092】

2-3. 選択した変異株の突然変異の確認

実施例2-2で選択した菌株の遺伝子変異を確認するために、配列番号9及び10のプライマーを用いて、CA13-8100/*pTOPO-ilvE* (mt) 3012 菌株に

においてPCRとシーケンシングを行い、i l v E遺伝子を野生型ATCC13032のi l v Eと比較した。前記菌株は、i l v E遺伝子に変異を含むことが確認された。

【0093】

具体的には、CA13-8100/pTOPO__i l v E (mt) 3012菌株は、i l v E遺伝子の503番目のヌクレオチドであるTがCに置換されていることが確認された（配列番号4）。これは、i l v Eのアミノ酸配列において156番目のバリンがアラニンに置換される変異である（配列番号3）。よって、以下の実施例においては、前記変異がコリネバクテリウム属微生物のロイシン生産量に影響を及ぼすか否かについて確認する。

【実施例3】

【0094】

i l v E選択変異のロイシン生産能の確認

3-1. i l v E変異を含む挿入ベクターの作製

実施例2で選択した変異を菌株に導入するために、挿入用ベクターを作製した。i l v E (V156A) 変異導入用ベクターの作製には、部位特異的突然変異誘発 (Site directed mutagenesis) 法を用いた。コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体を鋳型とし、配列番号11及び12のプライマー、配列番号13及び14のプライマー対を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で5分間の変性後、94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分30秒間の重合を30サイクル行い、次いで72℃で5分間の重合反応を行うものとした。その結果、得られた遺伝子断片をPstI及びXbaI制限酵素で切断した線状のpDCベクターとIn-Fusion酵素を用いてDNA断片間の末端15 baseの相同配列をfusionさせてクローニングし、156番目のアミノ酸であるバリン (Val) をアラニン (Ala) に置換するベクターpDC-i l v E (V156A) を作製した。

【0095】

3-2. CA13-8100菌株及びATCC13032へのi l v E変異体の導入及びロイシン生産能の確認

ロイシン生産菌株であるCA13-8100を実施例3-1で作製したpDC-i l v E (V156A) ベクターで形質転換し、相同性配列の組換えにより染色体上にベクターが挿入された菌株は、カナマイシン (kanamycin) 25 mg/L を含有する培地から選択した。選択した1次菌株にさらに2次交差 (cross-over) を行い、目標遺伝子の変異が導入された菌株を選定した。最終的に形質転換した菌株にi l v E遺伝子変異が導入されたか否かは、配列番号9及び10のプライマーを用いてPCRを行い、その後塩基配列を分析することにより判断し、菌株にi l v E変異が導入されたことが確認された。作製されたCA13-8100__i l v E__V156AをCA13-8107と命名した。

【0096】

また、同様に、野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032を前記pDC-i l v E (V156A) ベクターで形質転換し、作製された菌株ATCC13032__i l v E__V156AをCA13-8106と命名した。

【0097】

前述したように作製したCA13-8106及びCA13-8107菌株のロイシン生産能を評価した。実施例2-2と同様にフラスコ培養を行い、培養終了後にHPLCを用いた方法によりロイシン生産量を測定した。培養結果を表2に示す。

【0098】

10

20

30

40

50

【表 2】

菌株名	ロイシン (g/L)
ATCC13032	0.14
ATCC13032__i l v E__V156A:CA 13-8106	0.19
ATCC13032__l e u A__ (R558H, G 561D) :CA13-8100	3.4
CA13-8100__i l v E__V156A:CA 13-8107	4.1

10

【0099】

表2に示すように、ロイシン生産菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカムCA13-8100は、親株であるコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032に比べてロイシン生産能が著しく向上することが確認された。また、CA13-8100菌株にi l v E V156A変異を導入したCA13-8107菌株は、親株CA13-8100に比べてロイシン生産能が120%向上することが確認された。さらに、野生型ATCC13032をベースに変異を導入したCA13-8106菌株も、野生型に比べてロイシン生産が135%増加することが確認された。

20

【0100】

これらの結果から、branched-chain amino acid aminotransferaseであるi l v Eのアミノ酸配列において、前記156番目位置のアミノ酸がi l v E酵素活性に重要な位置であることが確認された。

【0101】

前記CA13-8107菌株は、ブダペスト条約上の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM) に2019年11月15日付けで寄託番号KCCM12630Pとして寄託した。

30

【0102】

3-3. コリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11661P、KCCM11662P菌株へのi l v E変異体の導入及びロイシン生産能の確認

実施例3-1で作製した組換えベクターpDC-i l v E (V156A) を染色体上での相同組換えによりロイシン生産菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11661P (特許文献5)、KCCM11662P (特許文献5) に形質転換した。前述した2つの菌株は、野生型のコリネバクテリウム・グルタミカムATCC14067と、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) で処理することによりロイシン生産能を付与した変異株である。最終的に形質転換した菌株を対象に、配列番号9及び10のプライマーを用いてPCRを行い、その後塩基配列を分析することにより、i l v E遺伝子に変異が導入されたことが確認された。前記組換え菌株をコリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11661P__i l v E__V156A及びKCCM11662P__i l v E__V156Aと命名した。前記菌株のロイシン生成能を確認するために、実施例2-2と同様にフラスコ培養を行い、培養終了後にHPLCを用いた方法によりロイシン生産量を測定した。測定したロイシンの濃度を表3に示す。

40

【0103】

50

【表 3】

菌株名	ロイシン (g/L)
KCCM11661P	2.7
KCCM11661P__ilvE__V156A	3.3
KCCM11662P	3.0
KCCM11662P__ilvE__V156A	3.6

10

【0104】

これらの結果から、分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (branched-chain amino acid aminotransferase) である ilvE のアミノ酸配列において、156番目位置のアミノ酸が ilvE 酵素活性に重要な位置であることが確認され、特に前記位置のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するとロイシン生産能が向上することが確認された。

【0105】

以上の説明から、本出願の属する技術分野の当業者であれば、本出願がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解するであろう。なお、前記実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本出願には、明細書ではなく請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態が含まれるものと解釈すべきである。

20

【0106】

30

40

50

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国 際 様 式

宛先：C J 第一製糖株式会社、

大韓民国ソウル市中区

東湖路330 C J 第一製糖センター

郵便番号100-400

国際寄託機関により規則7. 1に

従って発行された原寄託について

の受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA13-8107	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM12630P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 ☐ 科学的性質の説明 ☐ 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は2019年11月15日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は項目 I に表示された微生物を _____ に受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を _____ に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル市西大門区 弘済内2カ街45ユリムビル 郵便番号120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者 又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2019年11月15日

20

30

¹ 規則6. 4 (d) によれば、上記日付は国際寄託機関が取得した状態の日付である。

上記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019年12月5日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【配列表】

0007378621000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 P 13/06 (2006.01)

F I

C 1 2 P 13/06

B

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(74)代理人 100125081

弁理士 小合 宗一

(72)発明者 ペ、ヒョンジョン

大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュング、トンホー口、3 3 0

(72)発明者 キム、ジュ ウン

大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュング、トンホー口、3 3 0

(72)発明者 ペク、ミン ジ

大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュング、トンホー口、3 3 0

(72)発明者 イ、ジ ヘ

大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュング、トンホー口、3 3 0

審査官 藤山 純

(56)参考文献 特開 2 0 0 4 - 0 2 4 2 5 9 (J P, A)

特開昭 6 3 - 1 2 9 9 8 6 (J P, A)

中国特許出願公開第 1 0 9 4 0 2 0 3 4 (C N, A)

中国特許出願公開第 1 0 9 2 9 4 9 6 6 (C N, A)

米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 0 0 0 5 4 (U S, A 1)

Definition: branched-chain amino acid aminotransferase, Database NCBI [online], 2019年
06月01日, [retrieved on 2023-05-15], <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/64851756>
2?sat=5&satkey=328452409> , Accession no. WP_026209313

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 5 4

C 0 7 K 1 4 / 3 4

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 9 / 1 0

C 1 2 P 1 3 / 0 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q