



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
  
ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 088**

(51) Int. Cl.:

**C12P 13/08** (2006.01)

**C07K 14/34** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96946220 .9**

(86) Fecha de presentación : **18.12.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0868527**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.1998**

(54) Título: **Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante un aumento de la actividad de vehículos de exportación.**

(30) Prioridad: **22.12.1995 DE 195 48 222**

(73) Titular/es: **Forschungszentrum Jülich GmbH  
52425 Jülich, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

(72) Inventor/es: **Vrijlinc, Marina;  
Eggeling, Lothar y  
Sahm, Hermann**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante un aumento de la actividad de vehículos de exportación.

5 La invención se refiere a un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos según las reivindicaciones 1 a 20, genes de exportación según las reivindicaciones 21 a 26, genes reguladores según la reivindicación 27 y 28, estructuras génicas según las reivindicaciones 29 y 30, vectores según la reivindicación 31 a 33, células transformadas según la reivindicación 34 a 40, proteínas de membrana según la reivindicación 41 y 42 así como a usos según la reivindicación 43 a 48.

10 Los aminoácidos son de gran interés económico, siendo múltiple el uso de aminoácidos: así se necesita por ejemplo L-lisina, tal como también L-treonina, y L-triptófano como aditivo de alimento para animales, L-glutamato como aditivo de condimentos, L-isoleucina y L-tirosina en la industria farmacéutica, L-arginina y L-isoleucina como medicamento, o L-glutamato y L-fenilalanina como sustancia de partida para la síntesis de productos químicos finos.

15 Un procedimiento preferido para la producción de estos aminoácidos más diversos es la producción biotecnológica por medio de microorganismos; entonces, de esta manera se obtiene directamente la forma ópticamente activa y biológicamente eficaz del aminoácido respectivo, y pueden utilizarse materias primas baratas y simples. Como microorganismos se utilizan por ejemplo *Corynebacterium glutamicum* y sus subespecies relacionadas *flavum* y subespecies *lactofermentum* (Liebl *et al.*, Int J System Bacteriol (1991) 41:255-260) tales como también *Escherichia coli* y bacterias relacionadas.

20 Estas bacterias producen los aminoácidos pero normalmente sólo en la cantidad necesaria para el crecimiento, de tal modo que no se segregan ni forma ningún aminoácido en exceso. Esto se basa en que la biosíntesis de los aminoácidos en la célula se controla de múltiples maneras. En consecuencia, se conocen ya procedimientos más diversos, para aumentar la formación de producto mediante la interrupción de los mecanismos de control. En el caso de estos procesos se utilizan por ejemplo análogos de aminoácidos, para interrumpir la regulación eficaz de la biosíntesis. Así se describe un procedimiento en el que se usan las cepas de *Corynebacterium*, que son resistentes frente a análogos de L-tirosina y L-fenilalanina (documentos JP 19037/1976 y 39517/1978). También se describen procedimientos en los que se utilizan bacterias resistentes contra análogos de L-lisina o también L-treonina, para superar los mecanismos de control (documento EP 0 205 849 B1, solicitud de patente del RU GB 2 152 509 A).

25 Además se conocen también microorganismos construidos mediante técnicas de ADN recombinante, en los que también se suprime la regulación de la biosíntesis, clonándose y expresándose los genes que codifican las enzimas esenciales que ya no pueden inhibirse por retroalimentación. Así se conoce por ejemplo una bacteria recombinante que produce L-lisina con aspartato cinasa resistente a la retroalimentación, codificada en el plásmido (documento EP 0 381 527). Además se describe una bacteria recombinante que produce L-fenilalanina con prefenatodeshidrogenasa resistente a la retroalimentación (documento JP 124375/1986, documento EP 0 488 424). Además se consiguieron 30 también rendimientos elevados de aminoácidos mediante la sobreexpresión de genes que no codifican para enzimas sensibles a la retroalimentación de la síntesis de aminoácidos. Así por ejemplo, se mejora la formación de Lisina mediante la síntesis elevada de la dihidropicolinatosintasa (documento EP 0 197 335). También se consigue una mejor formación de treonina mediante la síntesis elevada de la treoninadeshidratasa.

35 45 Ensayos adicionales para obtener un aumento de la producción de aminoácidos apuntan a una mejor preparación de los metabolitos primarios celulares del metabolismo central. Así se conoce que la sobreexpresión que se consigue mediante técnicas recombinantes de la transacetolasa posibilita una mejor formación de producto de L-triptófano, L-tirosina o L-fenilalanina (documento EP 0 600 463 A2). Además, la reducción de la actividad de fosfoenolpiruvato-carboxilasa en *Corynebacterium* conduce a una mejor formación de aminoácidos aromáticos (documento EP 0 3331 50. 145).

45 Estos múltiples ensayos para obtener un aumento de la productividad están dirigidos en general a superar entonces la limitación de la síntesis citosólica de los aminoácidos. Pero también, como una limitación adicional, se tiene en cuenta fundamentalmente la exportación de los aminoácidos formados en el interior de la célula en el medio de cultivo. Por tanto, hay planteamientos aislados para mejorar esta exportación y con esto la rentabilidad de la producción de aminoácidos. Así se ha elevado la permeabilidad celular en el caso de *Corynebacterium* mediante, deficiencia de biotina, tratamiento con penicilina o detergente. Sin embargo, estas ayudas para la extracción fueron exitosas exclusivamente en el caso de la producción de glutamato, mientras que no pudo mejorarse la síntesis de otros aminoácidos de esta manera. También se han desarrollado cepas de bacterias en las que la actividad del sistema de secreción se eleva debido a una mutación física o química. De ese modo se obtuvo, por ejemplo, una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que es adecuada especialmente para la producción de L-lisina mediante una mejor actividad de secreción (documento DE 42 03 320).

50 55 Todos los ensayos realizados hasta ahora para obtener un aumento de la secreción de aminoácidos formados en el interior de la célula se caracterizan en total porque puede conseguirse un eflujo más elevado de aminoácidos debido a los procedimientos escogidos no específicos o no dirigidos solamente por azar. En la solicitud de patente alemana número 195 23279.8-41 se describe únicamente un procedimiento que permite aumentar de manera muy selectiva la secreción de aminoácidos formados en el interior de la célula, aumentando la expresión de los genes que codifican

## ES 2 281 088 T3

la importación de aminoácidos. El conocimiento que sirve de base a esta estrategia, que la célula usa proteínas de importación para la exportación de aminoácidos, como también el hecho de que los microorganismos de la naturaleza no forman ni segregan aminoácidos en exceso, sugiere la suposición de que para el transporte de aminoácidos no existen en absoluto proteínas o genes de exportación específicos, sino que los aminoácidos se excretan de la célula a través de otros sistemas de exportación.

Los sistemas de exportación conocidos hasta ahora exportan iones metálicos venenosos, antibióticos tóxicos y toxinas de alto peso molecular. Estos sistemas de exportación están constituidos de manera relativamente compleja: por regla general son proteínas de membrana que participan en la membrana citoplasmática, que sin embargo provocan solamente una reacción parcial de la exportación, de tal modo que, seguramente, son necesarias proteínas auxiliares extracitoplasmáticas, adicionales para el transporte (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Además se sabe que en el caso del sistema de exportación dependiente de sec son esenciales al menos 6 componentes proteicos diferentes para las proteínas extracelulares. Este estado de la técnica sugiere que, de la misma manera los sistemas responsables de la exportación de aminoácidos, pero hasta ahora desconocidos, se componen de varios componentes proteicos, o que varios genes son responsables de la exportación de aminoácidos. Una indicación para esto podrían ser los diversos mutantes defectuosos en la exportación de lisina descritos por Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027).

Se encontró sorprendentemente ahora, que para la exportación de aminoácidos en cada caso sólo es responsable un único gen específico, de modo que por primera vez se proporciona un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos en el que se aumenta de manera controlada la expresión del gen de exportación y/o la actividad del vehículo de exportación de un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos. El aumento de la actividad o expresión, del vehículo de exportación que resulta de este modo de procedimiento conduce a una tasa de secreción elevada, de modo que se aumenta la exportación del correspondiente aminoácido. Los microorganismos modificados de tal modo acumulan también un porcentaje elevado del correspondiente aminoácido en el medio de cultivo.

Para obtener un aumento de la actividad del vehículo de exportación se aumenta especialmente la actividad endógena de un microorganismo que produce aminoácidos. Por ejemplo, puede conseguirse un aumento de la actividad enzimática, efectuando una conversión del sustrato más elevada mediante la modificación del centro catalítico o superponiendo la acción de los inhibidores enzimáticos. También puede provocarse una actividad enzimática mediante el aumento de la síntesis enzimática, por ejemplo mediante amplificaciones génicas o mediante la interrupción de factores que reprimen la biosíntesis enzimática. La actividad endógena del vehículo de exportación se aumenta mediante una mutación del gen de exportación endógeno. Las mutaciones de este tipo pueden producirse o bien de manera no dirigida según procedimientos clásicos, tales como por ejemplo mediante radiación UV o sustancias químicas desencadenantes de mutaciones, o bien de manera controlada por medio de procedimientos de tecnología de genes tales como delección (deleciones), inserción (inserciones) y/o intercambio(s) de nucleótidos.

La expresión del gen de exportación se aumenta mediante el aumento del número de copias génicas y/o mediante el refuerzo de los factores reguladores, que influyen de manera positiva en la expresión del gen de exportación. Así puede tener lugar un refuerzo de los elementos reguladores preferiblemente en el plano de la transcripción, aumentándose especialmente las señales de transcripción. Esto puede efectuarse por ejemplo, aumentando la actividad del promotor mediante el cambio de la secuencia promotora intercalada en el gen estructural o intercambiando el promotor completamente por promotores más eficaces. También puede llevarse a cabo un refuerzo de la transcripción mediante la influencia correspondiente de un gen regulador asociado al gen de exportación, tal como se expone a continuación de manera adicional. Sin embargo, además es posible el refuerzo de la traducción, mejorándose por ejemplo la estabilidad del ARNm.

Para obtener un aumento del número de copias génicas se incorpora el gen de exportación en un constructo génico o en un vector, preferiblemente en un vector con número de copias más pequeño. El constructo génico contiene especialmente secuencias génicas reguladoras asociadas al gen de exportación, preferiblemente aquellas que refuerzan la expresión génica. Las secuencias génicas reguladoras presentan especialmente una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la tabla 1 o sus variaciones de alelo o una secuencia de nucleótidos del nucleótido 954 al 82 según la tabla 2 o una secuencia de ADN fundamentalmente de acción similar. Las variaciones de alelo o las secuencias de ADN de acción similar presentan especialmente derivados funcionales que pueden obtenerse mediante delección (deleciones), inserción (inserciones) y/o sustitución (sustituciones) de nucleótidos a partir de las correspondientes secuencias, conservándose sin embargo la función o actividad de proteína reguladora o incluso elevándose: así, mediante la mutación de la secuencia génica reguladora puede influenciarse la eficacia de la unión de la proteína reguladora sobre el ADN del gen de exportación que ha de regularse, de tal modo que se refuerza la transcripción y por consiguiente se aumenta la expresión génica. Además, pueden estar asignadas al gen de exportación como secuencias reguladoras, pero también como los denominados "potenciadores" ("enhancer"), que producen también una expresión del gen de exportación elevada a través de una mejor interacción entre la ARN polimerasa y el ADN.

Para la incorporación del gen de exportación en el constructo génico se aisla preferiblemente el gen de exportación a partir de una cepa de microorganismos del género *Corynebacterium*, y con el constructo génico que contiene el gen de exportación se transforma una cepa de microorganismos que produce los correspondientes aminoácidos,

especialmente *Corynebacterium*. El aislamiento y transformación del correspondiente gen de transporte tiene lugar según procedimientos habituales: en el caso del aislamiento y clonación de un gen de transporte a partir de *Corynebacterium* es adecuado por ejemplo el procedimiento de la complementación homóloga de un mutante defectuoso de exportación (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Si no es posible la clonación directa del gen estructural, inicialmente

- 5 puede efectuarse también la inserción de secuencias de vectores en el gen de transporte para aislarlo después a través de “rescate en plásmido” en forma de fragmentos inactivos. Para el procedimiento según la invención son adecuados especialmente genes de *C. glutamicum* ATCC 13032 o *C. glutamicum* subespecie. *flavum* ATCC 14067 o también *C. glutamicum* subespecie *lactofermentum* ATCC 13869. Tras el aislamiento de los genes y su recombinación *in vitro* con vectores conocidos (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), se lleva a cabo la transformación en las cepas que producen aminoácidos mediante electroporación (Liebl *et al.* (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) o conjugación (Schäfer *et al.* (1990) J Bacteriol 172: 1663-1666). Para la transferencia se utilizan preferiblemente vectores con número de copias reducido. Como células huésped se utilizan preferiblemente productores de aminoácidos de este tipo, que están desregulados en la síntesis de los correspondientes aminoácidos y/o que contienen un porcentaje elevado en metabolitos del metabolismo central.

15 Tras el aislamiento pueden obtenerse genes de exportación con secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos indicada en la tabla 3 o sus variaciones de alelo o que presentan la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1016 al 1726 según la tabla 2 o una secuencia de ADN fundamentalmente de acción similar. También en el presente documento las variaciones de alelo o secuencias de ADN de acción similar comprenden especialmente derivados funcionales en el sentido indicado anteriormente para las secuencias reguladoras. En el procedimiento según la invención se utilizan preferiblemente estos genes de exportación.

20 Una o varias secuencias de ADN pueden estar intercaladas y/o conectadas al gen de exportación con o sin promotor intercalado o con o sin reguladores asociados, de tal modo que el gen está contenido en una estructura génica.

25 Mediante la clonación de genes de exportación pueden obtenerse plásmidos o vectores que contienen el gen de exportación y (tal como se mencionó anteriormente) que son adecuados para la transformación de un productor de aminoácidos. Las células que pueden obtenerse mediante transformación, en las que se trata preferiblemente de células transformadas de *Corynebacterium*, contienen el gen en forma que puede replicarse, es decir en copias adicionales del cromosoma, integrándose las copias génicas mediante recombinación homóloga en cualquier posición del genoma, y/o en un plásmido o vector.

30 Se conoce un gran número de secuencias que codifican una función desconocida de proteínas de membrana. Mediante la preparación de genes de exportación según la invención, tales como por ejemplo del gen de exportación con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1766 según la tabla 2, o con las correspondientes proteínas de exportación, como por ejemplo el gen con la secuencia de aminoácidos según la tabla 1, pueden identificarse ahora proteínas de membrana cuya función es el transporte de aminoácidos mediante la comparación de secuencias. El gen de exportación identificado con esto puede utilizarse a continuación para la mejora de la producción de aminoácidos según el procedimiento según la invención.

35 40 Las proteínas de membrana conocidas del estado de la técnica presentan por regla general 12 hélices transmembrana, en parte también 4. Se encontró ahora sorprendentemente que las proteínas de membrana adecuadas o responsables de la exportación de aminoácidos presentan 6 hélices transmembrana (compárese por ejemplo con la secuencia expuesta en la tabla 3 de una proteína de exportación en la que las 6 zonas transmembrana están señaladas mediante subrayado). Con esto se encuentra en este caso una clase de proteínas de membrana hasta ahora todavía no descrita y por consiguiente nueva.

### Ejemplos de realización

#### 50 a) Clonación de un gen de exportación y clonación de un regulador de *Corynebacterium glutamicum*

Se aisló ADN cromosómico de *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) tal como se describe por Scharzer *et al.* (Bio/Technology (1990) 9: 84-87). Se escindió con la enzima de restricción Sau3A y se separó mediante centrifugación en gradiente de sacarosa tal como se describe por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Se analizaron las fracciones individuales mediante electroforesis en gel para determinar su tamaño y se utilizó la fracción con un tamaño de fragmento de aproximadamente 6-10 kb para la ligación con el vector pJC1. Para esto, se linealizó y desfosforiló el vector pJC1 con BamHI. Se ligaron cinco ng del mismo con 20 ng de los fragmentos cromosómicos de 6-10 kb. Se transformó el mutante NA8 de defecto de exportación (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) con la mezcla básica de ligación total mediante electroporación (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304). Se seleccionaron los transformantes en LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) con 15 µg de kanamicina por ml. Se sometieron estos transformantes a análisis en plásmidos extensos, poniéndose por separado 200 de los 4500 clones obtenidos en total, y determinándose su porcentaje y tamaño en el plásmido. En promedio, un plásmido recombinante portaba aproximadamente la mitad de los clones resistentes a kanamicina sometidos a ensayo con un inserto de tamaño promedio de 8 kb. Con esto se obtuvo una probabilidad de 0,96 con respecto a la presencia de cada gen cualquiera x de *C. glutamicum* en el banco de genes construido. Se sometieron a prueba por separado todos los 4500 transformantes obtenidos para determinar la recuperación de la secreción de lisina. Para esto se utilizó el sistema descrito por Vrljic para obtener la inducción de la segregación de L-lisina en *Corynebacterium glutamicum* (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Para esto se produjeron

# ES 2 281 088 T3

las denominadas placas de indicador de medio mínimo, que contenían 20 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g de urea, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 42 g ácido morfolinopropansulfónico, 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  (1 g/100 ml), 750 ml de agua destilada, 1 ml de sales de trazas de Cg, 1 ml de biotina (20 mg/100 ml), pH 7, glucosa al 4%, 1,8 mg de ácido protocatélico, 1 mg de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 0,002

- 5 mg de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de agar-agar, así como  $10^7$  células/ml del mutante 49/3 de *C. glutamicum* auxotrófico para lisina, por litro. Se picaron por separado todos los 4500 transformantes originales por medio de palillos de dientes en las placas de indicador, con cada uno de los controles del NA8 no segregado originalmente (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) y de la cepa de partida R127. Paralelamente, se inocularon 2 placas respectivamente, de las que sólo una contenía además L-metionina, para inducir de ese modo la segregación de lisina. Se incubaron las placas de indicador a 30°C, y se sometieron a ensayo tras 15, 24 y 48 horas. En total se obtuvieron 29 clones que mostraban un cuadrante de crecimiento en una placa de indicador mezclada con metionina mediante la cepa de indicación 49/3. Se aislaron los clones, y después se sometieron a prueba de nuevo, tal como se describió anteriormente, para determinar la recuperación del cuadrante de crecimiento. De esta manera se obtuvieron los dos clones NA8 pMV8-5-24 y NA8 pMV6-3, que tenían la capacidad de recuperarse para segregar lisina.

15 Se realizaron preparaciones de plásmidos de estos clones, tal como se describe por Schwarzer *et al.* (Bio/Technology (1990) 9: 84-87). Mediante la retransformación en NA8, se comprobó el efecto asociado al plásmido de la segregación de L-lisina. Se sometieron a análisis de restricción ambos plásmidos. El plásmido pMV8-5-24 portaba un inserto de 8,3 kb, y el pMV6-3 uno de 9,5 kb. La figura 1 muestra el mapa físico del inserto.

- 20 b) *Subclonación de un fragmento de ADN que reconstituye la exportación de lisina*

Del inserto del plásmido pMV6-3 se produjeron subclones individuales con el uso de los sitios de corte de restricción determinados. Así se ligó el fragmento XhoI-SalI de 3,7 kb, el fragmento BamHI de 2,3 kb y el fragmento BamHI de 7,2 kb con el correspondiente vector pJC1 tratado y cortado (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480). Se transformó directamente *C. glutamicum* NA8 con los productos de ligación, se sometieron a prueba los transformantes tal como se describió anteriormente para determinar la recuperación de la segregación de lisina y se comprobó la presencia del subclón mediante la preparación de plásmidos y análisis de restricción. De esta manera se obtuvo la cepa con el plásmido pMV2-3 como subclón más pequeño (figura 1). Este fragmento que facilita la exportación de lisina contiene como inserto el fragmento BamHI-de 2,3 kb de pMV6-3.

- 30 c) *Secuencia del gen de exportación de lisina lysE y su regulador lysG*

Se realizó la secuencia de nucleótidos del fragmento BamHI de 2,3 kb según el procedimiento de terminación de la cadena didesoxi de Sanger *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), y las reacciones de secuencia con el kit de secuenciación Auto-Read de Pharmacia (Uppsala, Suecia). El análisis electroforético tuvo lugar con el dispositivo de secuencia de ADN de fluorescencia láser automático (A.L.F.) de Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, EE.UU.). Se analizó la secuencia de nucleótidos obtenida con el paquete de programa HUSAR (Versión 3.0) del centro de investigación del cáncer alemán (Deutschen Krebsforschungszentrums) (Heidelberg). La secuencia de nucleótidos y el resultado del análisis se reproducen en la tabla 2. El análisis dio dos marcos de lectura completamente abiertos (ORF) en el trozo de ADN secuenciado. ORF1 codifica para una proteína con una longitud de 236 aminoácidos, ORF2 para una con una longitud de 290 aminoácidos. La proteína derivada de ORF1 muestra un conglomerado de aminoácidos hidrófobos, tal como es característico para proteínas de membrana continua. El análisis detallado de la distribución de los aminoácidos hidrófobos e hidrófilos con el programa PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) se muestra en la tabla 3. De aquí se obtiene que la proteína contiene seis zonas de hélice hidrófobas, que atraviesan la membrana. Por consiguiente, en el caso de esta proteína, se trata del exportador buscado del aminoácido L-lisina. El correspondiente gen se denomina por ello a continuación como lysE. Se marca en la tabla 2 de manera correspondiente. ORF2 se transcribe en dirección contraria con respecto a ORF1. El análisis de secuencias muestra que ORF2 tiene alta identidad con los genes reguladores, que se agrupan como una familia (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Los genes de esta familia regulan la expresión de los genes más diversos que participan en los procesos catabólicos y anabólicos de manera positiva. A continuación, ORF2 se denomina por ello como lysG (Govern = Regular). Debido a esta asignación y porque lysE sólo podía clonarse (véase a)) y subclonarse (véase b)) junto con lysG, lysG es el regulador de lysE y por consiguiente también participa en la exportación de lisina. En la tabla 2 o tabla 1 también se muestra el gen lysG y su secuencia de aminoácidos derivada.

- 55 d) *Identificación de una proteína de membrana desconocida de *Escherichia coli* mediante comparación de secuencias*

Con las secuencias establecidas según la tabla 3, pueden examinarse los bancos de secuencias que ya existen para asignar de ese modo una función a las proteínas derivadas de las zonas secuenciadas. De manera correspondiente, 60 se compara la secuencia de aminoácidos del exportador de lisina de *C. glutamicum* con la utilización del paquete de programa HUSAR (versión 3.0) del centro de investigación del cáncer alemán (Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) con las secuencias de proteínas derivadas de todas las secuencias de ADN depositadas. Para obtener una única secuencia de función hasta ahora desconocida de *E. coli* se obtuvo una alta homología del 39,3% de aminoácidos idénticos y el 64,9% de aminoácidos similares. En la figura 2 se muestra la comparación. Con esto, el marco de lectura abierto no caracterizado hasta el momento de *E. coli* se identifica por medio de este procedimiento como un gen de exportación de aminoácidos.

# ES 2 281 088 T3

## e) Aumento de la exportación de L-lisina acumulada intracelularmente

Se transformó la cepa *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) con el plásmido pMV2-3, y se compararon las segregaciones de L-lisina de las cepas. Para esto, se pusieron NA8 y NA8pMV2-3 en medio complejo, 5 tal como se describe en Vrljic *et al.* (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027), y el medio de fermentación CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) se inoculó por separado respectivamente. El medio contenía además L-metionina 5 mM, para inducir la biosíntesis de L-lisina intracelular. Tras el cultivo durante 24 horas a 30°C en la mesa sacudidora 10 de rotación a 140 rpm, se realizó la determinación de L-lisina en el exterior e interior de la célula. Para la determinación en el interior de la célula se realizaron centrifugaciones en aceite de silicona (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); la determinación de los aminoácidos tuvo lugar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (J Chromat (1983) 266: 471-482). Estas determinaciones se realizaron a tiempos distintos, tal como se indica en la figura 3. De 15 manera correspondiente al procedimiento usado, se segregó y se acumula de manera aumentada la L-lisina acumulada en el interior de la célula de ese modo mediante pMV2-3. De manera correspondiente, se reduce fuertemente también según lo esperado la L-lisina existente en el interior de la célula. Por consiguiente, el uso del exportador descrito y descubierto representa un procedimiento para mejorar la formación de L-lisina determinada.

## f) Aumento de la acumulación de L-lisina mediante lysE o LysEG

Se ligó en pZ1 el fragmento PvuII-HindII de 1173 pb que porta el lysE correspondiente de la información de secuencia 20 del subclón pMV2-3, que contiene el fragmento BamHI de 2374 pb secuenciado en pJC1 (véase la figura 1) (Appl Env Microbiol(1989) 55: 684-688), y de ese modo se obtuvo el plásmido plysE. Se introdujo este plásmido, así como el plásmido pMV2-3 que porta la lysElysG mediante electroporación en la cepa d de *C. glutamicum*, detectándose 25 zonas cromosómicas. En primer lugar, las cepas obtenidas de *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d plysE, *C. glutamicum* pJC1 se disponen tal como se describió en e) en el medio complejo, después se cultivaron en medio mínimo de producción CGXII junto con glucosa al 4% y L-metionina 5 mM, y se tomaron muestras para la determinación 30 de L-lisina acumulada. Como puede apreciarse en la figura 4, se consigue mediante lysElysG un aumento de la acumulación de lisina en comparación con los controles. El plysE alcanza una acumulación extraordinariamente aumentada de 4,8 mediante este procedimiento hasta 13,2 mM de L-lisina.

## 30 Leyendas de las tablas y las figuras

Tabla 1: La secuencia de aminoácidos del regulador del exportador de lisina de *Corynebacterium glutamicum*, con el motivo de hélice-giro-hélice típico de las proteínas de unión a ADN.

35 Tabla 2 (tres lados): la secuencia de nucleótidos de la zona que codifica para el regulador de la exportación de lisina y del exportador de lisina de *C. glutamicum*.

Tabla 3: La secuencia de aminoácidos del exportador de lisina de *Corynebacterium glutamicum*, con las hélices transmembranas identificadas TMH1 a TMH6.

40 Figura 1: Los fragmentos de ADN obtenidos mediante la clonación en pMV6-3 y pMV8-5-24, que provocan la secreción de lisina, así como el subclón pMV2-3 producido a partir de pMV6-3, que se secuenció y provoca también la secreción de lisina. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; S1, SalI; H, HindII; X, XhoI.

45 Figura 2: Comparación de la secuencia de aminoácidos derivada de LysE de *C. glutamicum* (arriba) con un producto génico de función hasta el momento desconocida de *Escherichia coli* (abajo) que se identifica como vehículo de exportación.

50 Figura 3: Aumento de la exportación de lisina mediante pMV2-3 con *C. glutamicum* de NA8. Arriba, los controles con segregación y acumulación en el interior de la célula reducida de lisina hasta aproximadamente 150 mM. Abajo la alta segregación causada por pMV2-3 con acumulación sólo reducida en el interior de la célula de aproximadamente 30 mM.

55 Figura 4: El aumento de la acumulación de lisina en *C. glutamicum* mediante lysElysG (pMV2-3) (curva media), y la acumulación limitada mediante lysE (plysE) (curva superior).

Tabla 1

**MNPPIQLDTLL SIIDEGSFEG ASLALSISSPS AVSQRVKALE HHVGRVVLVSR**

**Motivo hélice-giro-hélice**

51	TQPAKATEAG EVLQAAARKM VLLQAEETKAO LSGRLAEIPL TIAINADSLS
101	TWFPPVFNEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDVLGA VTREANPVAG
151	CEWELEGTMR HLAIATPSLR DAYMDVGKLD WAAMPVLRFG PKDVQLQDRDL
201	DGRVVDGPVGR RRVSIIVPSAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA APMILKAGEVI
251	LLDEIPIDTP MYWQRWRLES RSLARLTDAV VDAAIEGLRP

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 281 088 T3

TABLA 2

5	GGTAAACGACTTCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCGCTTCACTTTG	60
10	GGACTTGGAAAAGTCTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG - P R L G E I A A D V V A	120
15	CAGACACTCAGATCGATCTAGATCTAAGGTCCCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T	180
20	CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCTAGTGAAGAGGGACGAAAATCGTACCCCTCGTCGAAC D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q	240
25	CCAAGCCCTCTTCAGGGGTTGGTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGGAGGGCG T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A	300
30	GCTGCCCTGTTACCTATGC CGGGACGCCGGGTGTCCTGGTAGCTGCCGCCAGGTCCAG S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D	360
35	TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCCTGGCTTCGCATTCTGCCGTAGCGTCGGTTAGATC R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L	420
40	AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA K G D V N Y A D R L S P T A I A L H R M	480
45	CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAACGAAAGTGCCTAACGGCAGG T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G	540
50	ATTTTGTAGAGGTGCGGGCTCGTCTTATTACACACCGCAAGTAGAAGGTTCGCGTCGCA L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T	600
55	CTCGCAACGAGGTGGGTTCTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTGGTACACCTATC L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L	660
60	GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCACGCG S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A	720
65	AAATCAAAGACGAAACGCTGTTGTGGTAAAGGCCGACGAAACGTGTTCCGTAAAGTGGCG K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A	780
70	AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCCATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L	840
75	TCGAAATTGCCGACTGAGTGGGGCTCCCCCTTACCTTCCGATTCCCTCCGGGAAG A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E	900

## ES 2 281 088 T3

TABLA 2 (continuación)

960

<---LyS<sup>G</sup>

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5  
 5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT  
 F S G E D I I S L L T D L Q I P N M

1020

ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTAAAGTACTTCCATAGGTACGTACGATGGT  
 M V  
 LyS<sup>E</sup>--->

1080

GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTGGGGGCCAGTCTTTACTGTCCATCGG  
 I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G

1140

ACCGCAGAATGTAATGGTGATTAACAAGGAATTAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTCT  
 P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L

1200

TCTCGTGTGTTAATTCTGACGTCTTTGTTCATGCCGGCACCTGGCGTTGATCT  
 L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L

1260

TTTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCCTCGATATTATGCCGTGGGTGGCATGGCTTACCT  
 L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L

1320

GTTATGGTTTCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAAGGTGGAAGGCCACA  
 L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q

1380

GATCATTGAAGAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCCTTGGCGGTTGGCGT  
 I I E E T B P T V P D D T P L G G S A V

1440

GGCCACTGACACCGCGCAACCGGTGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG  
 A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W

1500

GGTAAAGCCCATGTTGATGCCAATCGTGCCTGACCTGGTGAACCGAATGCCATTGG  
 V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D

1560

CGCGTTTGTGTTATCGGCCGCGTCGGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATT  
 A F V P I G G V G A Q Y G D T G R W I P

1620

CGCCGCTGGCGCGTCGGCGCAAGCCTGATCTGGTCCCGCTGGTGGGTTGGCGCAGC  
 A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A

1680

AGCATTGTCACGCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC  
 A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

60

65

## ES 2 281 088 T3

TABLA 2 (continuación)

1740

*orf3*

- N B R T K

5' C T A C T G G G C T A A C C G G T A G T T T G A C T A C A A C T A C C C A A T C A A A G C G C C C A A A  
A G T T G T G A T G A C C C A T T G G C C A T C A A A C T G A T G T G A T G G G T T A G T T T C G G G G G 5'  
V V M T A L A I K L M L M G -

*LysE* /

1800

C C T T A G C C A C C G G A A G C G G G T T A C A A C T A C G G C C G C A G C A C C C T T A G A G T A G C T A G C G  
S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

1860

G A G G T T G A G C C G C A G T C T T T G A G G T T C A A C A A C T C A C T T A G T T C C G A C A A C A G G T C G A C  
E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

1920

G A G T T G A C T G C T T C G T G G T T A G T T A C G T G A C C A G T G C C A T A G G C G G G C A T G A G A G G A A C  
E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

1980

G A G C C G C T C G T G G G T A C G T T C G C G G T A G A C C G G T T C A C T G A C G G G C G C A A G G A C C C G C T A  
E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

2040

C A G T A A C T C G A A C G C C T G G T A T A G T T A T A A C A A G T G C A A G T T G T A C G G G A G T C T G T C C C T  
D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

2100

G A A T G G G A C C G A C C G C G C C C T T G G G A G A C C T T A A G G T A G C T C T A T A A C A G G C A C T C G T C  
K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

2160

C G G G A C C G G T T C A C C A C T C T T C G T T A C T G C G G T T C T G G T A A C A A C C G T C G A C T G A C G T T  
G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

2220

G T T C A A G A G T G G C A G T A G C G G G C C A A G G A G G T G G G T T G C T A A T T A C C T T A T C G A A C C  
L N B G D D G P E E V W R N I I S Y S P

2280

G A C T A C T T A G T C T C G C C C G T C G G G A G G A G G C G G T A C T T G A G T C G G C G G A G G C G A C A C T C  
Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

2340

G A G A C C T G G C A T C T T C T T A T G G G T G C A T T T C T C G G A A A G G T C T G C G T T G T T A C A G T G C  
E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

2374

<-or<sup>2</sup>3+>

G T T A C G C A T G T A C C A A A G A A A G G T T T C C T C A T A G A  
L A Y M T R E L P T D

55

60

65

ES 2 281 088 T3

TABLA 3

5	
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	
	1 MVIME <u>IIFITG</u> LLLGASSLLS <u>IGPQNVLVIK</u> QGIKREGLIA <u>VLLVCLISDV</u> TMH1
	51 FLEFLAGTLGV DLLSNAAPIV LDIMRWGGIA YLLMFAYMAA KDAUTNKVEA TMH2
	101 PQIIEETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRY R'EVSWDKQR VTVVKPMMLMAI TMH3
	151 VLTWLNPNAY LDAFVFFIGGV GAQYCDTGRW IFAAGAFAS LIWFPLVGFG TMH4
	201 AAALSRLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KJMLMG TMH5
	TMH6

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos, en el que se aumenta la actividad del vehículo de exportación específica para los correspondientes aminoácidos de LysE con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2 y/o la expresión del gen de exportación específica para los correspondientes aminoácidos de lysE con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1726 según SEC ID No 1 de un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la expresión génica del vehículo de exportación lysE se aumenta mediante un aumento del número de copias génicas.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque para obtener un aumento del número de copias génicas el gen de exportación lysE se incorpora en un constructo génico.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el gen de exportación lysE se incorpora en un constructo génico que contiene la secuencia génica reguladora asignada para el gen de exportación.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG con una secuencia de aminoácidos según SEC ID No 5 es una de las secuencias génicas reguladoras.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado** porque un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos se transforma con el constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque un microorganismo del género *Corynebacterium* se transforma con el constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado** porque se utiliza un microorganismo para la transformación en el que se desregulan las enzimas que participan en la síntesis de los correspondientes aminoácidos.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado** porque se utiliza un microorganismo para la transformación, que contiene un porcentaje elevado de metabolitos del metabolismo central.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 10, **caracterizado** porque el gen de exportación lysE se aísla a partir de una cepa de microorganismos del género *Corynebacterium*.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se aumenta la expresión del gen de exportación lysE mediante el refuerzo de las señales de transcripción.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores para la producción de L-lisina.
14. Gen de exportación lysE que codifica un vehículo de exportación de aminoácidos LysE con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2.
15. Gen de exportación según la reivindicación 14, con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1726 según SEC ID No 1.
16. Gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 ó 15 que comprende secuencias génicas reguladoras.
17. Gen de exportación según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 5.
18. Gen de exportación según la reivindicación 17, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
19. Un gen regulador lysG adecuado para la regulación de un gen de exportación lysE que codifica un vehículo de exportación de aminoácidos con una secuencia de nucleótidos según SEC ID No 1, con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 5
20. Gen regulador según la reivindicación 19 con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
21. Constructo génico que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16.

## ES 2 281 088 T3

22. Constructo génico según la reivindicación 21 que contiene además una secuencia génica reguladora según la reivindicación 19 ó 20.
23. Vector que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16 o un constructo génico  
5 según la reivindicación 21.
24. Vector según la reivindicación 23, que contiene además una secuencia génica reguladora según la reivindicación 19 ó 20 o una constructo génico según la reivindicación 22.
- 10 25. Célula transformada que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16 en forma que puede replicarse o un constructo génico según la reivindicación 21.
26. Célula transformada según la reivindicación 25 que contiene un vector según la reivindicación 23.
- 15 27. Célula transformada según la reivindicación 25 ó 26 **caracterizada** porque pertenece al género de *Corynebacterium*.
28. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 27, **caracterizada** porque en ésta están desreguladas las enzimas que participan en la síntesis de los aminoácidos, que se extrae de la célula por medio del vehículo de  
20 exportación codificado por el gen de exportación lysE transferido en la célula transformada.
29. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 28 **caracterizada** porque contiene un elevado porcentaje de metabolitos del metabolismo central.
- 25 30. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 29 que contiene además una secuencia génica reguladora lysG según la reivindicación 19 ó 20 en forma que puede replicarse o un constructo génico según la reivindicación 22.
31. Célula transformada según la reivindicación 30 que contiene un vector según la reivindicación 24.
- 30 32. Un vehículo de exportación de aminoácidos LysE con 6 hélices transmembrana, codificado por un gen de exportación lysE con la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2.
33. Uso del gen de exportación lysE con una de las secuencias de nucleótidos según SEC ID No 1 para el aumento  
35 de la producción de aminoácidos de microorganismos.
34. Uso según la reivindicación 33, **caracterizado** porque se utiliza el gen de exportación lysE cuya expresión génica del vehículo de exportación lysE se aumenta mediante un aumento del número de copias génicas y/o mediante el uso de factores reguladores que influyen de manera positiva en la expresión del gen de exportación.  
40
35. Uso según la reivindicación 33 ó 34 **caracterizado** porque se transforma el microorganismo que produce aminoácidos con un constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.
36. Uso según la reivindicación 35, **caracterizado** porque el constructo génico porta además secuencias génicas reguladoras.  
45
37. Uso según una de las reivindicaciones 33 a 36, **caracterizado** porque se utiliza el gen de exportación lysE de *Corynebacterium*.
- 50 38. Uso según una de las reivindicaciones 33 a 37, **caracterizado** porque se utiliza *Corynebacterium* como microorganismo que produce aminoácidos.

55

60

65

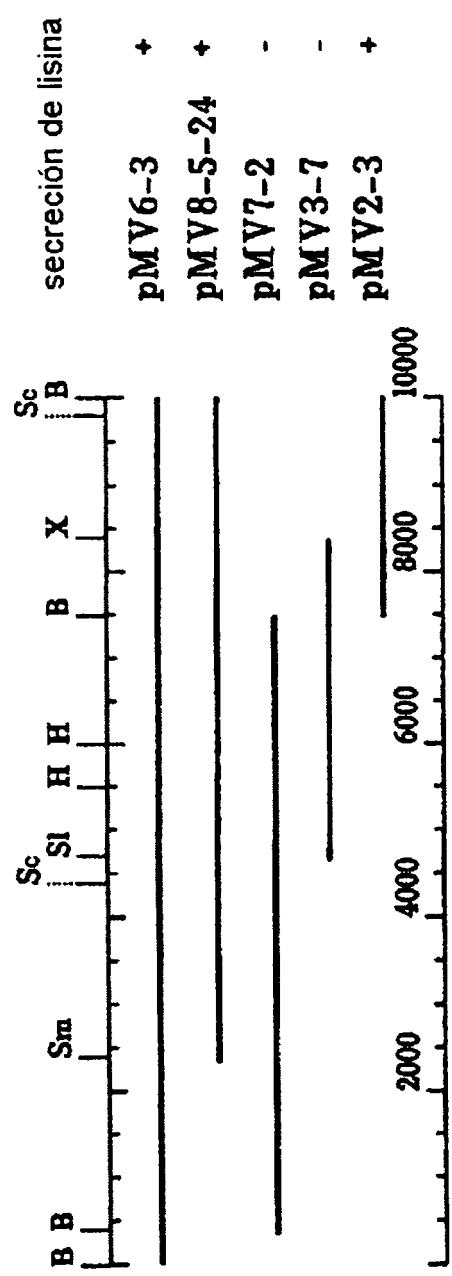


Figura 1

CgLyse	1	MVIMEIFIT <u>GLLGASLLL</u> SIGPQNVLVIKQGIKREG <u>LIAVLLVCLISDV</u>	50
EcYgga	1	..... <u>MILPLGPQNAFVMNQGIRRQYHIMIALLCAISDL</u>	34
CgLyse	51	<u>FLFIAGTLGV</u> DLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWF <u>AVMAAKDAMTNKVEA</u>	100
EcYgga	35	VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVA <u>FLLWYGF</u> GAFKTAMSSNIE.	83
CgLyse	101	PQIIEETEPTV <u>PDDT</u> PLGGS <u>AVATDTRNRVRVEVSVDKORVWVKPMLMAI</u>	150
EcYgga	84	..... <u>LASAEVMKQGRWK</u> .....IIATMLAV	104
CgLyse	151	<u>VLTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGD</u> TGRWIF <u>AAGAFAASLIWFPLVGFG</u>	200
EcYgga	105	.. <u>TWLNP</u> HVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRW <u>FALGTISASF</u> LWFFGLALL	152
CgLyse	201	<u>AAALSRPLSSPKVWRWINVVVAVVMTALA</u> I <u>KLM</u> MG.....	236
EcYgga	153	AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMFIALQLARDGIAHAQALFS	197

Figura 2

## Complementación del defecto de exportación

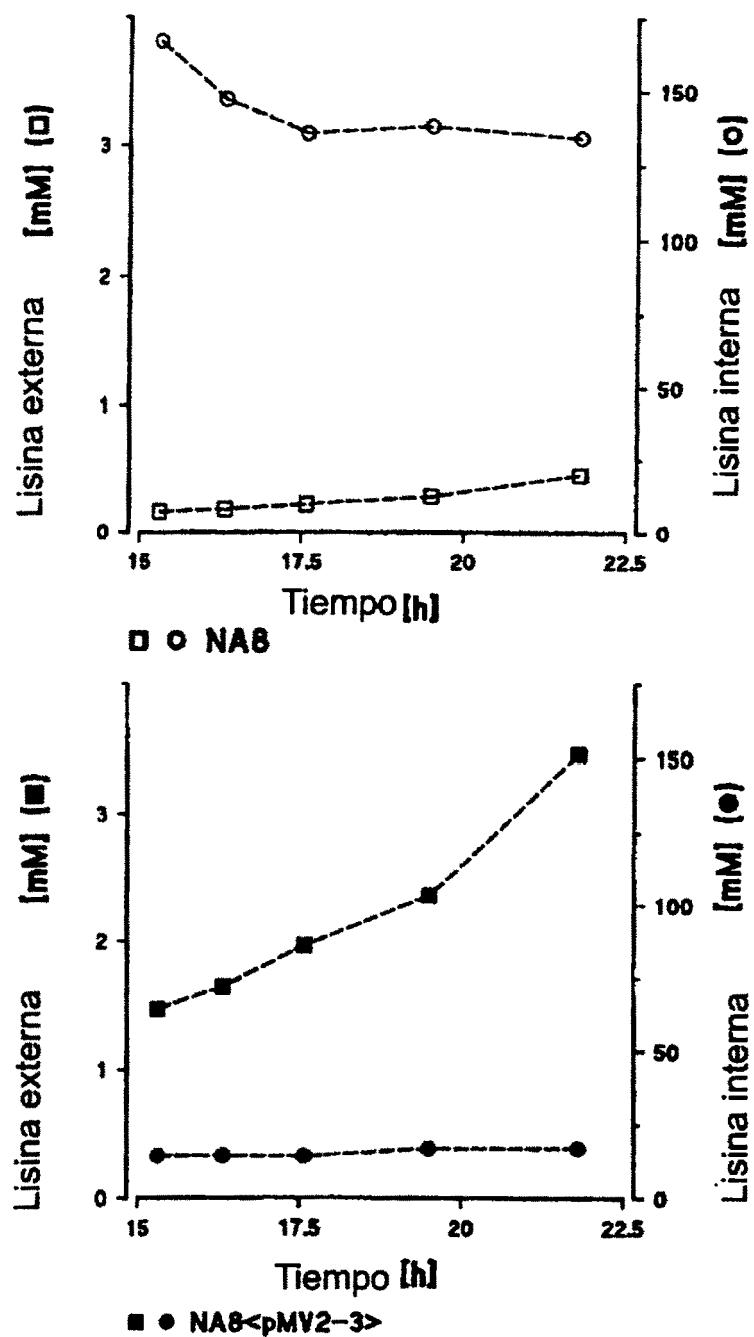


Figura 3

ES 2 281 088 T3

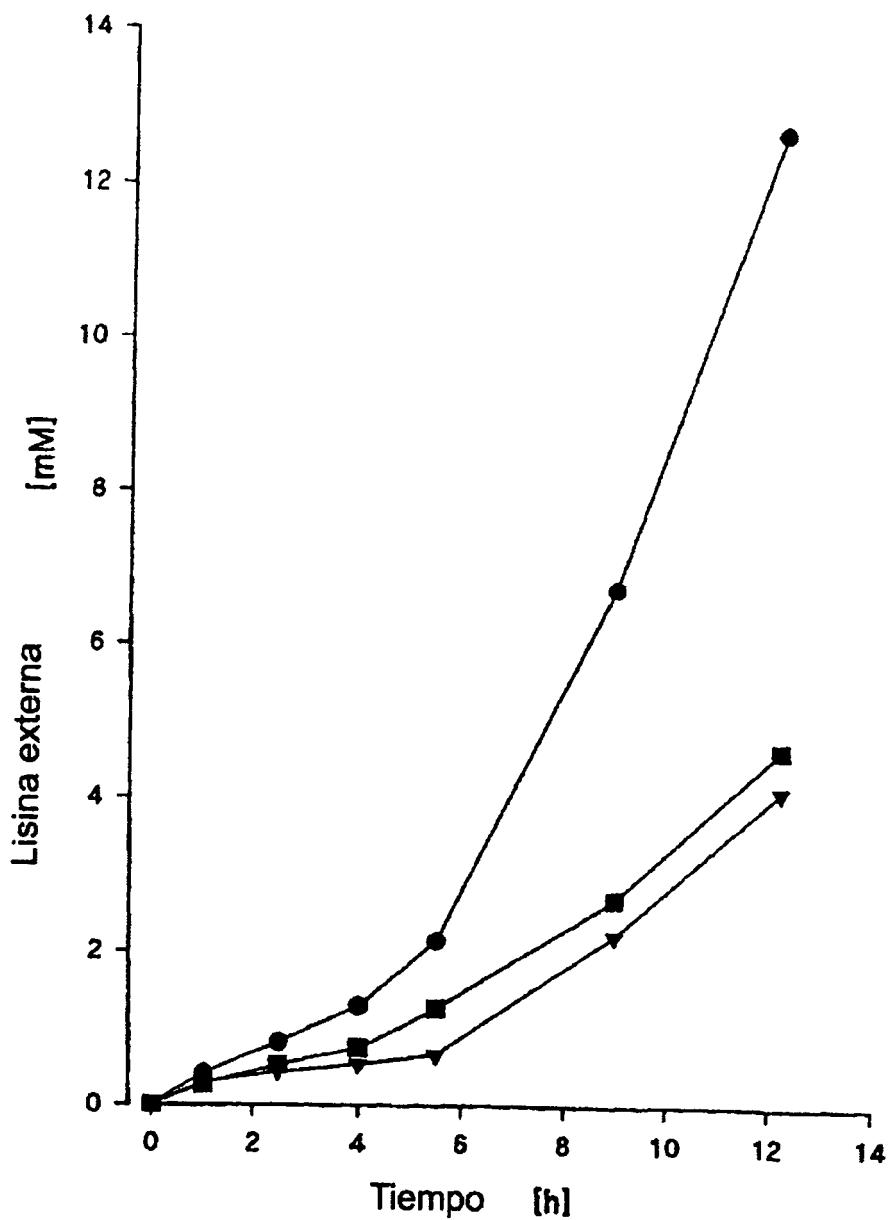


Figura 4

ES 2 281 088 T3

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH  
5 <120> Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante aumento de la actividad de vehículos de exportación

<130> 1

10 <140> PCT/DE96/02485  
<141> 18-12-1996

<160> 5  
15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
20 <211> 2374  
<212> ADN  
<213> *Corynebacterium glutamicum*  
25 <220> (LysE)  
<221> gen  
<222> CDS (1016)..(1726)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 088 T3

<400> 1

5 ccatttgcgt aagggtttac tctgcctggc ccaattccctg cgggcgaaga agtgaaaaac 60  
cctgaacctt ttcagaagta actaaggccg caatccctcg attgctgcat caacgacggc 120  
10 gtctgtgagt ctagctagag atcttagattc caggcgccat cgttgccaat acateggtgt 180  
gtcaatgggt atctcatcga ggaggatcac ttctcctgct ttttagcatgg gagcagctt 240  
15 ggtttcggga agaagtcccc aaccaaggcc tcggcgaatt gcctcaccaa aaccttccgc 300  
cgacgggaca atggatacgc gcctgcgcc cacaggacca tcgacgcgcc cgtccaggc 360  
acggtcttga agcacatctt tgggaccgaa gcgttaagacg ggcacatcgacg cccaatctag 420  
20 tttcccatca accatgttagg catcccgcaa tgagggggtt gcaatggcca agtggcgcac 480  
ggttccaagt tctactactt cacatcccgc cacgggattt gcttcacggg ttaccgcctc 540  
25 taaaacatct ccacgcccga gcaaggataa tgtgtgcgt tcatcttcca agcgcagcgt 600  
gagcgttgtt ccaccccaag aagctacetc gttgaacacg ggaggaaacc atgtggatag 660  
cgaatctgcg ttgatggcga tggtaacgg gatttcagca aggcgccag atagttgcgc 720  
30 ttttagttct gcttgcagca acaccatttt ccgcgcgtgt tgcacaagga cttcacccgc 780  
ttcggttgtt ttggccgggtt gggtgccgcga taccaacact cgacccacgt gatgctcgag 840  
35 agctttaacg cgctgactca ccgcccgggg ggaaaatggaa agggctaagg aggcgccttc 900  
gaagctgcct tcataatga ttgagagcaa agtgtccagt tgaatgggt tcataatgtt 960  
40 atattaaacc atgttaagaa ccaatcattt tacttaagta cttccatagg tcacg atg 1018  
Met  
1  
45 gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt ctt 1066

50

55

60

# ES 2 281 088 T3

	Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu		
	5	10	15
5	tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga att		1114
	Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile		
	20	25	30
10	aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct gac		1162
	Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp		
	35	40	45
15	gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc aat		1210
	Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn		
	50	55	60
	65		
	gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct tac		1258
	Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr		
	70	75	80
20	ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac aag		1306
	Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys		
	85	90	95
25	gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc gat		1354
	Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp		
	100	105	110
30	gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac cgg		1402
	Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg		
	115	120	125
	1450		
35	gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag ccc		1450
	Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro		
	130	135	140
	145		
	atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccc aat gcg tat ttg		1498
	Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu		
	150	155	160
40	gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac acc		1546
	Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr		
	165	170	175
	1594		
45	gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc tgg		1594
	Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp		
	180	185	190
	1642		
	ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg tcc		1642
	Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser		
	195	200	205
50	agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg atg		1690
	Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Ala Val Val Met		
	210	215	220
	225		
55	acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag ttttgcggg		1736
	Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly		
	230	235	
	1796		
60	tttggaaatc ggtggccttc gccccaaatgt tgatgcggc gtcgtggaa atctcatcga		1796
	tccgcctccaa ctccggcgtca gaaaaactcca agttgtttag tgaatcaagg ctgttgtcca		1856

ES 2 281 088 T3

gctgctcaac tgacgaagca ccaatcaatg cactggtcac ggtatccgcg ccgtactctc 1916  
cttgctcgcg cagcacccat gcaagcgcca tctgcgcaag tgactgcccg cgttcctggg 1976  
5 cgatgtcatt gagcttgcgg accatatcaa tattgttcac gttaaacatg ccctcagaca 2036  
gggacttacc ctggctggcg cggaaacct ctggaatcc atcgagatat ttgtccgtga 2096  
10 gcaggccctg cgcaagtggt gagaagcaa tgacgccaag accattgttg gcagctgact 2156  
gcaacaagtt ctcaccgtca tcgccccgtt cctccaccca acgattaatg atgaaatagc 2216  
15 ttggctgatg aatcagaagc gggcagccct cctccgcccataactcagcc gcctccgctg 2276  
tgagctctgg accgttagaa gaaataacca cgtaaagagc cttccagac gcaacaatgt 2336  
20 cacgcaatgc gtacatggtt tcttccaaag gagtatct 2374

20

<210> 2

<211> 236

25 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220> (LysE)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 088 T3

<400> 2

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly  
 20 25 30  
 Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 35 40 45  
 Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser  
 50 55 60  
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro  
 100 105 110  
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn  
 115 120 125  
 Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys  
 130 135 140  
 Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp  
 165 170 175  
 Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile  
 180 185 190  
 Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu  
 195 200 205  
 Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val  
 210 215 220  
 Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly  
 225 230 235

<210> 3

55 <211> 2374

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220> (complemento para <210> 1)

60 <221> no cierto

<222> CDS (2)..(652)

<223> orf3

65 <220>

<221> gen

# ES 2 281 088 T3

<222> CDS (1421)..(2293)

<223> LysG

5 <400> 3

	a gat act cct ttg gaa gaa acc atg tac gca ttg cgt gac att gtt gcg	49
10	Asp Thr Pro Leu Glu Thr Met Tyr Ala Leu Arg Asp Ile Val Ala	
	1 5 10 15	
	tct gga aag gct ctt tac gtg ggt att tct tcc tac ggt cca gag ctc	97
15	Ser Gly Lys Ala Leu Tyr Val Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Pro Glu Leu	
	20 25 30	
	aca gcg gag gcg gct gag ttc atg gcg gag ggc tgc ccg ctt ctg	145
20	Thr Ala Glu Ala Ala Glu Phe Met Ala Glu Glu Gly Cys Pro Leu Leu	
	35 40 45	
	att cat cag cca agc tat tcc atc att aat cgt tgg gtg gag gaa ccg	193
	Ile His Gln Pro Ser Tyr Ser Ile Ile Asn Arg Trp Val Glu Glu Pro	
	50 55 60	
25	ggc gat gac ggt gag aac ttg ttg cag tca gct gcc aac aat ggt ctt	241
	Gly Asp Asp Gly Glu Asn Leu Leu Gln Ser Ala Ala Asn Asn Gly Leu	
	65 70 75 80	
30	ggc gtc att gct ttc tca cca ctt gcg cag ggc ctg ctc acg gac aaa	289
	Gly Val Ile Ala Phe Ser Pro Leu Ala Gln Gly Leu Leu Thr Asp Lys	
	85 90 95	
35	tat ctc gat gga att cca gag ggt tcc cgc gcc agc cag ggt aag tcc	337
	Tyr Leu Asp Gly Ile Pro Glu Gly Ser Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser	
	100 105 110	
40	ctg tct gag ggc atg ttg aac gtg aac aat att gat atg gtc cgc aag	385
	Leu Ser Glu Gly Met Leu Asn Val Asn Asn Ile Asp Met Val Arg Lys	
	115 120 125	
	ctc aat gac atc gcc cag gaa cgc ggg cag tca ctt gcg cag atg gcg	433
	Leu Asn Asp Ile Ala Gln Glu Arg Gly Gln Ser Leu Ala Gln Met Ala	
	130 135 140	
45		

50

55

60

65

# ES 2 281 088 T3

	ctt gca tgg gtg ctg cgc gag caa gga gag tac ggc gcg gat acc gtg	481
	Leu Ala Trp Val Leu Arg Glu Gln Gly Glu Tyr Gly Ala Asp Thr Val	
5	145 150 155 160	
	acc agt gca ttg att ggt gct tcg tca gtt gag cag ctg gac aac agc	529
	Thr Ser Ala Leu Ile Gly Ala Ser Ser Val Glu Gln Leu Asp Asn Ser	
	165 170 175	
10	ctt gat tca ctc aac aac ttg gag ttt tct gac gcc gag ttg gag gcg	577
	Leu Asp Ser Leu Asn Asn Leu Glu Phe Ser Asp Ala Glu Leu Glu Ala	
	180 185 190	
15	atc gat gag att tcc cac gac gcc ggc atc aac att tgg gcg aag gcc	625
	Ile Asp Glu Ile Ser His Asp Ala Gly Ile Asn Ile Trp Ala Lys Ala	
	195 200 205	
20	acc gat tcc aaa acc cgc gaa aac taa cccatcaaca tcagtttgat	672
	Thr Asp Ser Lys Thr Arg Glu Asn	
	210 215	
	ggccaatgcg gtcatcacaa ctgccacgac gacgttgatc cagcgccaca ccttggggct	732
	ggacagcggg cgtgacaatg ctgctgcgcc gaaacccacc agcgggaacc agatcaggct	792
25	tgcgcgaac gcgcgcggg cgaaaatcca cctgtccggg tcgcccattt ggcgcgcac	852
	gcccggata aacacaaacg cgtccaaata cgcattcggg ttcaaccagg tcagcacat	912
	tgcacatcaac atgggctttt cccaaaccccg ctgttatcg acgctcacct ccacccgcac	972
30	ccgggttgcgc gtgtcagtgg ccacccggca accgccccaa ggcgtgtcat cgggcacggc	1032
	tgggtctgtt tcttcaatga tctgtggcgc ttccaccttgc ttgtcatgg cgtcttcgc	1092
	tgcacatgcg gcaaaaccata acaggtaaac gatgccaccc cagcgataa tatcgagcac	1152
35	gatcggcgcg gcattggaca aaagatcaac gcccagggtg cggcgatga aaaaaagac	1212
	gtcagaaatt aaacacacgaa gaagaaccgc aatgagtccct tcgcgttaa ttccctgttt	1272
40	aatcaccagt acattctgcg gtccgatgga cagtaaaaga ctggccccc aaagcagacc	1332
	tgtaatgaag atttccatga tcaccatcgat gacccatggaa agtacttaag taaaatgatt	1392
45	gtttcttaac atgggttaat atagctc atg aac ccc att caa ctg gac act	1444
	Met Asn Pro Ile Gln Leu Asp Thr	
	220 225	
	ttt ctc tca atc att gat gaa ggc agc ttc gaa ggc gcc tcc tta gcc	1492
50	Leu Leu Ser Ile Ile Asp Glu Gly Ser Phe Glu Gly Ala Ser Leu Ala	
	230 235 240	
	ctt tcc att tcc ccc tcg cgc gtg agt cag cgc gtt aaa gct ctc gag	1540
	Leu Ser Ile Ser Pro Ser Ala Val Ser Gln Arg Val Lys Ala Leu Glu	
	245 250 255	
55	cat cac gtg ggt cga gtg ttg gta tcg cgc acc caa ccg gcc aaa gca	1588
	His His Val Gly Arg Val Leu Val Ser Arg Thr Gln Pro Ala Lys Ala	
	260 265 270	
60	acc gaa gcg ggt gaa gtc ctt gtg caa gca gcg cgg aaa atg gtg ttg	1636
	Thr Glu Ala Gly Glu Val Leu Val Gln Ala Ala Arg Lys Met Val Leu	

# ES 2 281 088 T3

	275	280	285	
5	ctg caa gca gaa act aaa gcg caa cta tct gga cgc ctt gct gaa atc Leu Gln Ala Glu Thr Lys Ala Gln Leu Ser Gly Arg Leu Ala Glu Ile 290 295 300 305			1684
10	ccg tta acc atc gcc atc aac gca gat tcg cta tcc aca tgg ttt cct Pro Leu Thr Ile Ala Ile Asn Ala Asp Ser Leu Ser Thr Trp Phe Pro 310 315 320			1732
15	ccc gtg ttc aac gag gta gct tct tgg ggt gga gca acg ctc acg ctg Pro Val Phe Asn Glu Val Ala Ser Trp Gly Gly Ala Thr Leu Thr Leu 325 330 335			1780
20	cgc ttg gaa gat gaa gcg cac aca tta tcc ttg ctg cgg cgt gga gat Arg Leu Glu Asp Glu Ala His Thr Leu Ser Leu Leu Arg Arg Gly Asp 340 345 350			1828
25	gtt tta gga gcg gta acc cgt gaa gct aat ccc gtg gcg gga tgt gaa Val Leu Gly Ala Val Thr Arg Glu Ala Asn Pro Val Ala Gly Cys Glu 355 360 365			1876
30	gta gta gaa ctt gga acc atg cgc cac ttg gcc att gca acc ccc tca Val Val Glu Leu Gly Thr Met Arg His Leu Ala Ile Ala Thr Pro Ser 370 375 380 385			1924
35	ttg cgg gat gcc tac atg gtt gat ggg aaa cta gat tgg gct gcg atg Leu Arg Asp Ala Tyr Met Val Asp Gly Lys Leu Asp Trp Ala Ala Met 390 395 400			1972
40	ccc gtc tta cgc ttc ggt ccc aaa gat gtg ctt caa gac cgt gac ctg Pro Val Leu Arg Phe Gly Pro Lys Asp Val Leu Gln Asp Arg Asp Leu 405 410 415			2020
45	gac ggg cgc gtc gat ggt cct gtg ggg cgc agg cgc gta tcc att gtc Asp Gly Arg Val Asp Gly Pro Val Gly Arg Arg Val Ser Ile Val 420 425 430			2068
50	ccg tcc gcg gaa ggt ttt ggt gag gca att cgc cga ggc ctt ggt tgg Pro Ser Ala Glu Gly Phe Gly Glu Ala Ile Arg Arg Gly Leu Gly Trp 435 440 445			2116
55	gga ctt ctt ccc gaa acc caa gct gct ccc atg cta aaa gca gga gaa Gly Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ala Ala Pro Met Leu Lys Ala Gly Glu 450 455 460 465			2164
60	gtg atc ctc ctc gat gag ata ccc att gac aca ccc atg tat tgg caa Val Ile Leu Leu Asp Glu Ile Pro Ile Asp Thr Pro Met Tyr Trp Gln 470 475 480			2212
65	cga tgg cgc ctg gaa tct aga tct cta gct aga ctc aca gac gcc gtc Arg Trp Arg Leu Glu Ser Arg Ser Leu Ala Arg Leu Thr Asp Ala Val 485 490 495			2260
70	gtt gat gca gca atc gag gga ttg cgg cct tag ttacttctga aaaggttcag 2313 Val Asp Ala Ala Ile Glu Gly Leu Arg Pro 500 505			
75	ggtttttcac ttcttcgccc gcaggaattt ggccaggcag agtaaacacct tcagcaaatg 2373 g			2374

<210> 4  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*  
 <220> (orf3)

## ES 2 281 088 T3

&lt;400&gt; 4

	Asp Thr Pro Leu Glu Glu Thr Met Tyr Ala Leu Arg Asp Ile Val Ala			
5	1	5	10	15
	Ser Gly Lys Ala Leu Tyr Val Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Pro Glu Leu			
	20	25	30	
10	Thr Ala Glu Ala Ala Glu Phe Met Ala Glu Glu Gly Cys Pro Leu Leu			
	35	40	45	
15	Ile His Gln Pro Ser Tyr Ser Ile Ile Asn Arg Trp Val Glu Glu Pro			
	50	55	60	
	Gly Asp Asp Gly Glu Asn Leu Leu Gln Ser Ala Ala Asn Asn Gly Leu			
	65	70	75	80
20	Gly Val Ile Ala Phe Ser Pro Leu Ala Gln Gly Leu Leu Thr Asp Lys			
	85	90	95	
	Tyr Leu Asp Gly Ile Pro Glu Gly Ser Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser			
	100	105	110	
25	Leu Ser Glu Gly Met Leu Asn Val Asn Asn Ile Asp Met Val Arg Lys			
	115	120	125	
30	Leu Asn Asp Ile Ala Gln Glu Arg Gly Gln Ser Leu Ala Gln Met Ala			
	130	135	140	
	Leu Ala Trp Val Leu Arg Glu Gln Gly Glu Tyr Gly Ala Asp Thr Val			
	145	150	155	160
35	Thr Ser Ala Leu Ile Gly Ala Ser Ser Val Glu Gln Leu Asp Asn Ser			
	165	170	175	
40	Leu Asp Ser Leu Asn Asn Leu Glu Phe Ser Asp Ala Glu Leu Glu Ala			
	180	185	190	
	Ile Asp Glu Ile Ser His Asp Ala Gly Ile Asn Ile Trp Ala Lys Ala			
	195	200	205	
45	Thr Asp Ser Lys Thr Arg Glu Asn			
	210	215		

50 &lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 290

&lt;212&gt; PRT

55 <213> *Corynebacterium glutamicum*

&lt;220&gt; (LysG)

60

65

## ES 2 281 088 T3

&lt;400&gt; 5

5	Met Asn Pro Ile Gln Leu Asp Thr Leu Leu Ser Ile Ile Asp Glu Gly 1                   5                   10                   15
10	Ser Phe Glu Gly Ala Ser Leu Ala Leu Ser Ile Ser Pro Ser Ala Val 20                   25                   30
15	Ser Gln Arg Val Lys Ala Leu Glu His His Val Gly Arg Val Leu Val 35                   40                   45
20	Ser Arg Thr Gln Pro Ala Lys Ala Thr Glu Ala Gly Glu Val Leu Val 50                   55                   60
25	Gln Ala Ala Arg Lys Met Val Leu Leu Gln Ala Glu Thr Lys Ala Gln 65                   70                   75                   80
30	Leu Ser Gly Arg Leu Ala Glu Ile Pro Leu Thr Ile Ala Ile Asn Ala 85                   90                   95
35	Asp Ser Leu Ser Thr Trp Phe Pro Pro Val Phe Asn Glu Val Ala Ser 100               105               110
40	Trp Gly Gly Ala Thr Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asp Glu Ala His Thr 115               120               125
45	Leu Ser Leu Leu Arg Arg Gly Asp Val Leu Gly Ala Val Thr Arg Glu 130               135               140
50	Ala Asn Pro Val Ala Gly Cys Glu Val Val Glu Leu Gly Thr Met Arg 145               150               155               160
55	His Leu Ala Ile Ala Thr Pro Ser Leu Arg Asp Ala Tyr Met Val Asp 165               170               175
60	Gly Lys Leu Asp Trp Ala Ala Met Pro Val Leu Arg Phe Gly Pro Lys 180               185               190
65	Asp Val Leu Gln Asp Arg Asp Leu Asp Gly Arg Val Asp Gly Pro Val 195               200               205
70	Gly Arg Arg Arg Val Ser Ile Val Pro Ser Ala Glu Gly Phe Gly Glu 210               215               220
75	Ala Ile Arg Arg Gly Leu Gly Trp Gly Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ala 225               230               235               240
80	Ala Pro Met Leu Lys Ala Gly Glu Val Ile Leu Leu Asp Glu Ile Pro 245               250               255
85	Ile Asp Thr Pro Met Tyr Trp Gln Arg Trp Arg Leu Glu Ser Arg Ser 260               265               270
90	Leu Ala Arg Leu Thr Asp Ala Val Val Asp Ala Ala Ile Glu Gly Leu 275               280               285
95	Arg Pro 290