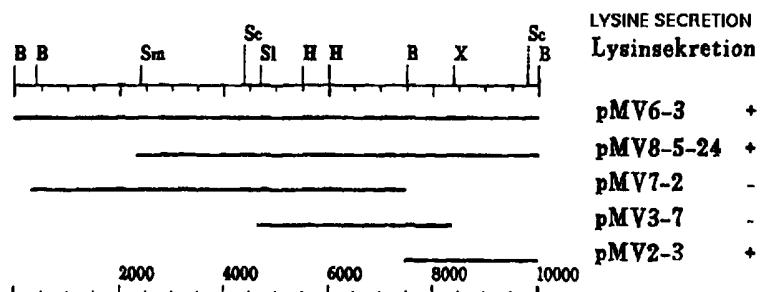




|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><br>C12N  |  | A2   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/23597</b>      |
|  |  |  | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juli 1997 (03.07.97) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/02485  |  | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |  |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 18. December 1996<br>(18.12.96)   |  |  |  |
| (30) Prioritätsdaten:<br>195 48 222.0 22. December 1995 (22.12.95) DE  |  | Veröffentlicht<br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>                                |  |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):<br>FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE];<br>Wilhelm-Johnen Strasse, D-52425 Jülich (DE).   |  |  |  |
| (72) Erfinder; und   |  |  |  |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VRLIJC, Marina [DE/DE];<br>Steinstrasser Allee 60, D-52428 Jülich (DE). EGTELING,<br>Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE).<br>SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-<br>52428 Jülich (DE). |  |  |  |
| (74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM<br>JÜLICH GMBH; Rechts- und Patentabteilung, D-52425<br>Jülich (DE).   |  |  |  |

(54) Title: PROCESS FOR THE MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS BY BOOSTED ACTIVITY OF EXPORT CARRIERS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DURCH GESTEIGERTE AKTIVITÄT VON EXPORTCARRIERN



## (57) Abstract

The invention pertains to a process for the microbial production of amino acids. The process in question involves boosting the export carrier activity and/or export gene expression of a micro-organism which produces the desired amino acid. According to the invention, it was found that a single specific gene is responsible for the export of a given amino acid, and on that basis a process for the microbial production of amino acids, involving the controlled boosting of the export gene expression and/or export carrier activity of a micro-organism which produces the amino acid in question, has been developed for the first time. The boosted expression or activity of the export carrier resulting from this process increases the secretion rate and thus increases transport of the desired amino acid.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Secretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien                       | GB | Vereinigtes Königreich            | MX | Mexiko                         |
| AT | Österreich                     | GE | Georgien                          | NE | Niger                          |
| AU | Australien                     | GN | Guinea                            | NL | Niederlande                    |
| BB | Barbados                       | GR | Griechenland                      | NO | Norwegen                       |
| BE | Belgien                        | HU | Ungarn                            | NZ | Neuseeland                     |
| BF | Burkina Faso                   | IE | Irland                            | PL | Polen                          |
| BG | Bulgarien                      | IT | Italien                           | PT | Portugal                       |
| BJ | Benin                          | JP | Japan                             | RO | Rumänien                       |
| BR | Brasilien                      | KE | Kenya                             | RU | Russische Föderation           |
| BY | Belarus                        | KG | Kirgisistan                       | SD | Sudan                          |
| CA | Kanada                         | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden                       |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea                    | SG | Singapur                       |
| CG | Kongo                          | KZ | Kasachstan                        | SI | Slowenien                      |
| CH | Schweiz                        | LI | Liechtenstein                     | SK | Slowakei                       |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LK | Sri Lanka                         | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LR | Liberia                           | SZ | Swasiland                      |
| CN | China                          | LK | Litauen                           | TD | Tschad                         |
| CS | Tschechoslowakei               | LU | Luxemburg                         | TG | Togo                           |
| CZ | Tschechische Republik          | LV | Lettland                          | TJ | Tadschikistan                  |
| DE | Deutschland                    | MC | Monaco                            | TT | Trinidad und Tobago            |
| DK | Dänemark                       | MD | Republik Moldau                   | UA | Ukraine                        |
| EE | Estland                        | MG | Madagaskar                        | UG | Uganda                         |
| ES | Spanien                        | ML | Mali                              | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland                       | MN | Mongolei                          | UZ | Usbekistan                     |
| FR | Frankreich                     | MR | Mauretanien                       | VN | Vietnam                        |
| GA | Gabon                          | MW | Malawi                            |    |                                |

## B e s c h r e i b u n g

5 Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren  
durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen  
Herstellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis  
10 20, Exportgene nach Anspruch 21 bis 26, Regulatorgene  
nach Anspruch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den An-  
sprüchen 29 und 30, Vektoren nach Anspruch 31 bis 33,  
transformierte Zellen nach Anspruch 34 bis 40, Membran-  
proteine gemäß Anspruch 41 und 42 sowie Verwendungen  
15 nach Anspruch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse,  
wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So  
wird z.B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-  
20 Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat  
als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der  
pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin  
als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als  
Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

25 Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser ver-  
schiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Her-  
stellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise  
wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive  
30 Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können  
einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden.  
Als Mikroorganismen werden z.B. *Corynebacterium*  
glutamicum und seine Verwandten ssp. *flavum* und ssp.  
*lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol

(1991) 41:255-260) wie auch Escherichia coli und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedene Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanalogen resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanalogen resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Pre-phenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpress-

sion von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threoninhydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primär-metabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 3331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei Coryne-bacterium durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des

Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein Corynebacterium glutamicum-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität 5 insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter 10 Aminosäuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es 15 erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export 20 von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß 25 aus der Zelle die Aminosäuren über andere Exportsysteme exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare 30 Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasma-membran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erfor-

derlich sind (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). Des weiteren ist bekannt, daß bei dem sec-abhängigen Exportsystem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic et al. beschriebenen (*J Bacteriol* (1995) 177: 4021-4027) verschiedenen, im Lysinexport defekten Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäureproduzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung

der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine 5 erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Exportcarrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des 10 endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), 15 Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).

Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturen vorgesetzten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirkung 20 erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Exportgen zugeordneten 25 Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der 30 m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist: So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Des Weiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium*, transformiert. Die Iso-

lierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus *Corynebacterium* eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* ATCC 14067 oder auch *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), erfolgt die Transformation in die Aminosäureproduzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) J Bacteriol 172: 1663-1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbe-

sondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

5

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten

10 ist.

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines 15 Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die 20 Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für 25 Membran-proteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungs-gemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z.B. das mit der 30 Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschlie-

ßend zur Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfundensgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine 5 besitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices 10 aufweisen (vgl. z.B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstrichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

15

### **Ausführungsbeispiele**

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*

20

Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten 25 und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die 30 Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6-10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6-10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligations-

ansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) mit 15 µg Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil, und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes x-beliebigen Gens aus *C. glutamicum* in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Transformanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljic beschriebene System zur Induktion der L-Lysinausscheidung in *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Dazu wurden sogenannte Minimalmedium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g Harnstoff, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 42 g Morpholinopropansulfosäure, 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1ml Cg Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH7, 4 % Glukose 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 1 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 0,02 mg  $\text{CuSO}_4$ , 0,002 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ , 20 g Agar-Agar, sowie  $10^7$  Zellen/ml der Lysin-auxotrophen *C. glutamicum* Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) und des Ausgangsstammes R127. Parallel

wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysinausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30 °C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikatorplatte einen Wachstumshof durch den Indikationsstamms 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszuscheiden.

Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Ausscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Figur 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionsschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb XhoI-SalI-Fragment, das 2,3 kb BamHI-Fragment und das 7,2 kb BamHI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJC1 (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt *C. glutamicum* NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung ge-

prüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Figur 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das 2,3 kb BamHI-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens *lysE* und dessen Regulatoren *lysG*

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb BamHI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchgeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), und die Sequenziereaktionen mit dem Auto-Read Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz DNA Sequenziergerät (A.L.F.) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm paket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober Aminosäuren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei die-

sem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als lysE bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedenen an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird ORF2 deswegen als lysG (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil lysE nur zusammen mit lysG kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist lysG Regulator von lysE und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen lysG und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins  
20 aus Escherichia coli durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzuordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *C. glutamicum* unter Zuhilfenahme des Programm pakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Protein-Sequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus *E. coli* ergab sich eine hohe Homologie von 39,3 % identischen Aminosäuren, und 64,9 % ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Figur 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offe-

ne Leseraster aus *E. coli* ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-  
5 Lysins

Der Stamm *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu 10 wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 5 mM L- 15 Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30 °C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugationen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547- 20 567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Figur 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute 25 zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert. Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysins stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und 30 beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch lysE oder lysEG

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp BamHI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Figur 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das lysE tragende 5 1173 bp PvuII-HindII Fragment in pZ1 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688) ligiert, und so das Plasmid plysE erhalten. Dieses Plasmid, sowie das lysElysG tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in C. glutamicum Stamm d eingeführt, indem chromosomalen Be- 10 reiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme C. glutamicum d pMV2-3, C. glutamicum d plysE, C. glutamicum pJC1 wurden wie unter e) beschrieben zu- nächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM 15 L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Figur 4 er- sichtlich, wird durch lysElysG eine Steigerung der Ly- sinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die plysE wird durch dieses Verfahren eine außerordentlich 20 gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin erreicht.

## Legenden der Tabellen und Figuren:

5 Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-  
Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*, mit dem für  
DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix Motif.

10 Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für  
den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codieren-  
den Bereichs aus *C. glutamicum*.

15 Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus  
*Corynebacterium glutamicum*, mit den identifizierten  
transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

Figur 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-  
Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion  
bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Sub-  
klon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt  
20 und sequenziert wurde. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; S1,  
SalI; H, HindII; X, XhoI.

25 Figur 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz  
von LysE aus *C. glutamicum* (oben), mit einem Genprodukt  
bislang unbekannter Funktion aus *Escherichia coli*  
(unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert  
ist.

30 Figur 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit *C.*  
*glutamicum* NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Aus-  
scheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa  
150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausschei-  
dung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30  
mM.

Figur 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in C.  
glutamicum durch lysElysG (pMV2-3) (mittlere Kurve),  
und die durch lysE (plysE) bedingte Akkumulation (obere  
5 Kurve).

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1                             | MNPIQLDTLL SIIDEGSSEG <u>ASLALSISPS AVSQRVKALE HHVGRVLVSR</u> |
| <b>Helix-Turn-Helix-Motiv</b> |   |
| 51                            | TQPAKATEAG EVLVQAARKM VLLOQAETKAAQ LSGRIAEPLITI TIANADSL      |
|                               |   |
| 101                           | TWFPPPVMEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRPGDVILGA VTRLEANPVAG      |
|                               |   |
| 151                           | CEVVELGTMR HLAIATPSLR DAYMVDGKLD WAZMPPVLRFG PKDVLQDRDL       |
|                               |   |
| 201                           | DGRVDGPVGR RRVSTIVPSAE GFGEAIRRGL GWGGLPE7QĀ APMLKAGEVI       |
|                               |   |
| 251                           | LLDEIPIIDTP MYWQFRWLES RSLARLTDAV VDAAIEGLRP                  |

Tabelle 1

60  
 GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCGTTCTTCACTTTTG  
 120  
 GGACTTGGAAAAGTCTTCATT**GAT**TCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG  
 - P R L G E I A A D V V A  
 180  
 CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGGTAGAACGGTTATGTAGCCACA  
 D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T  
 240  
 CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGGACGAAAATCGTACCCCTCGTCGAAC  
 D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q  
 300  
 CCAAAGCCCTTCTTCAGGGTTGGTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGGAGGCG  
 T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A  
 360  
 GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG  
 S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D  
 420  
 TGCCAGAACCTCGTGTAGAAACCCCTGGCTCGCATTCTGCCGTAGCGTCGGTTAGATC  
 R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L  
 480  
 AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA  
 K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M  
 540  
 CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAACGAAAGTGCCAACGGGAGG  
 T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G  
 600  
 ATTTTGTAGAGGTGGCGCGTCGTTCTTACACACCGCAAGTAGAAGGTTCGCGTCGCA  
 L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T  
 660  
 CTCGCAACGAGGTGGGTTCTTCGATGGAGCAACTGTGCCCTCCTTGGTACACCTATC  
 L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L  
 720  
 GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG  
 S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A  
 780  
 AAATCAAAGACGAACGTCGTTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTGAAGTGGCG  
 K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A  
 840  
 AAGCCAACGAAACCGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC  
 E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L  
 900  
 TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTACCTTCCGATTCTCCGCGGAAG  
 A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E

Tabelle 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

960

<---*LysG*

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACCTCGTTCACAGGTCAACTACCCCAAGTA-----5  
 5'---TGCCTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGTTCATGAAGCT  
 F S G E D I I S L L T D L Q I P N M

1020

ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTACTTAAGTACTTCCATAGGTACCGATGGT  
 M V  
*LysE*--->

1080

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

1140

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

1200

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

1260

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

1320

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

1380

GATCATTGAAGAACAGAACCAACCGTGCCGATGACACGCCCTTGGCGTTGGCGGT  
 I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V

1440

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

1500

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

1560

CGCGTTGTGTTATCGCGCGCGTCCGGCAAGCCTGATCTGGTCCCGCTGGTGGTTCGCGCAGC  
 A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F

1620

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

1680

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

Table 2 (fortgesetzt)

1740

orf3

- N E R T K

5' C T A C T G G C G T A A C C G G T A G 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  
A G T T G T G A T G A C C G 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 C 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 C 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 G C G T C G T G G G T A C G T T C G C G G T A G A C G C 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 G C 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 T A C C T T A T C G A A C C  
L N E 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 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 C 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 C 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

&lt;-orf3+

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

Tabelle 2 (fortgesetzt)

|     |   |      |
|-----|---|------|
| 1   | <u>MVIMEIFITG</u> <u>LLL GASLLS</u> <u>IGPQNVLVIK</u> <u>QGIKREGLIA</u> <u>VILLVCLISDV</u>    | TMH1 |
| 51  | <u>FLFIAGTLGV</u> <u>DLLSNAAPIV</u> <u>LDIMRWGGIA</u> <u>YLLMFAVMAA</u> <u>KDAMTNKVEA</u>     | TMH2 |
|     |   | TMH3 |
| 101 | <u>PQIIIEETEPT</u> <u>VPDDTPLGGSS</u> <u>AVATDTRNPRV</u> <u>RVEVSVDKQR</u> <u>WIVVKPMLMAI</u> |      |
| 151 | <u>VLTWLNPNAY</u> <u>LDAFVFIGGV</u> <u>GAQYGDGTGRW</u> <u>IEPAGAEAS</u> <u>LIWFPLVGGFG</u>    | TMH4 |
| 201 | <u>AAALSRPLSS</u> <u>PKVWWRWINVV</u> <u>VAVVMTALAI</u> <u>KIILIMG</u>                         | TMH5 |
|     |   | TMH6 |

Tabelle 3

## P a t e n t a n s p r ü c h e

5

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, durch gekennzeichnet, daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, durch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, durch gekennzeichnet, daß die Genexpression des Exportcarriers durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4, durch gekennzeichnet, daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, durch gekennzeichnet,

daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl eingebaut wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,  
5 durch gekennzeichnet,  
daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7,  
durch gekennzeichnet,  
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.  
15
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
durch gekennzeichnet,  
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweist.  
20
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9,  
25 durch gekennzeichnet,  
daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.  
25
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 10,  
durch gekennzeichnet,  
daß ein Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß für die Transformation ein Mikroorganismus  
5 eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der  
entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme de-  
reguliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,  
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß für die Transformation ein Mikroorganismus  
eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an  
Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13,  
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm  
der Gattung *Corynebacterium* isoliert wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprü-  
che,  
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der  
Sequenz eines bereits bekannten Exportgens iden-  
tifiziert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die von der zu identifizierenden Exportgense-  
30 quenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in  
Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder de-  
ren Allelvariationen verglichen wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung  
5 der Transkriptionssignale erhöht wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in  
10 Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren  
Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz  
eingesetzt wird.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidse-  
quenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2  
20 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-  
Sequenz eingesetzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche  
zur Herstellung von L-Lysin.
- 25 21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes  
Exportgen.
22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in  
Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren  
30 Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidse-  
quenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2

oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.

24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen.
25. Exportgen nach Anspruch 24,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die regulatorische Gensequenz eine für die in  
Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren  
Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz auf-  
weist.
26. Exportgen nach Anspruch 25,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleo-  
tidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabel-  
le 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkenden  
DNA-Sequenz aufweist.
27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-  
Exportcarrier kodierenden Exportgens geeignetes  
Regulatorgen mit einer für die in Tabelle 1 ange-  
gebene Aminosäuresequenz und deren Allelvaria-  
tionen kodierenden Nukleotidsequenz.
28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleo-  
tidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabel-  
le 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden  
DNA-Sequenz.
29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem  
der Ansprüche 21 bis 26.

30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28.
31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.  
5
32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.  
10
33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.  
15
34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29.  
20
35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 31 oder 32.  
25
36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.  
30
37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das in die transformierte Zelle übertragene Exportgen kodiert, aus der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind.  
35

38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie einen erhöhten Anteil an Zentralstoff-  
wechselmetaboliten enthält.  
5
39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbar-  
rer Form eine regulatorische Gensequenz nach An-  
spruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach An-  
spruch 30.  
10
40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend  
einen Vektor nach Anspruch 33.
- 15 41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membran-  
proteine mit 6 transmembranen Helices.
42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabel-  
le 3 angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabel-  
le 3 Bestandteil dieses Anspruches ist.  
20
43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der  
Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.
- 25 44. Verwendung nach Anspruch 43,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym  
mit erhöhter Exportcarrier-Aktivität kodiert,  
verwendet wird.  
30
45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus

mit einem Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.

46. Verwendung nach Anspruch 45,  
5 durch gekennzeichnet,  
daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische  
Gensequenzen trägt.
47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46,  
10 durch gekennzeichnet,  
daß ein Exportgen aus Corynebacterium verwendet  
wird.
48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47,  
15 durch gekennzeichnet,  
daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus  
Corynebacterium verwendet wird.

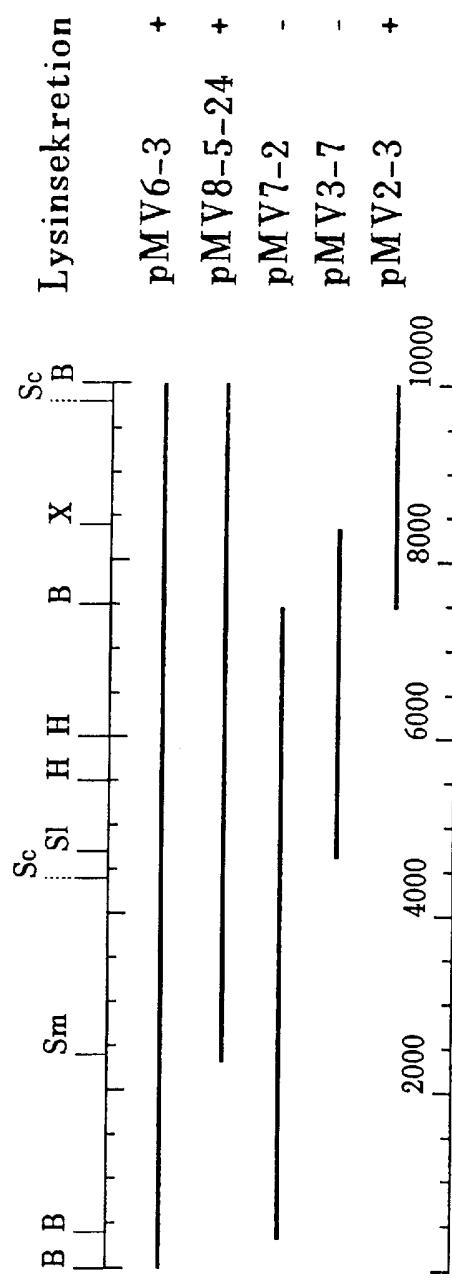


Figure 1

CgLysE 1 MVIMEIFITGLLLGASLLSIGPQNVLVIKQGIKREGGLIAVLLVCLISDV 50  
 EcYgga 1 .....MILPLGPQNAFVMNQGIRQYHIMIALLCAISDL 34

CgLysE 51 FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100  
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFGAFKTAMSSNIE. 83

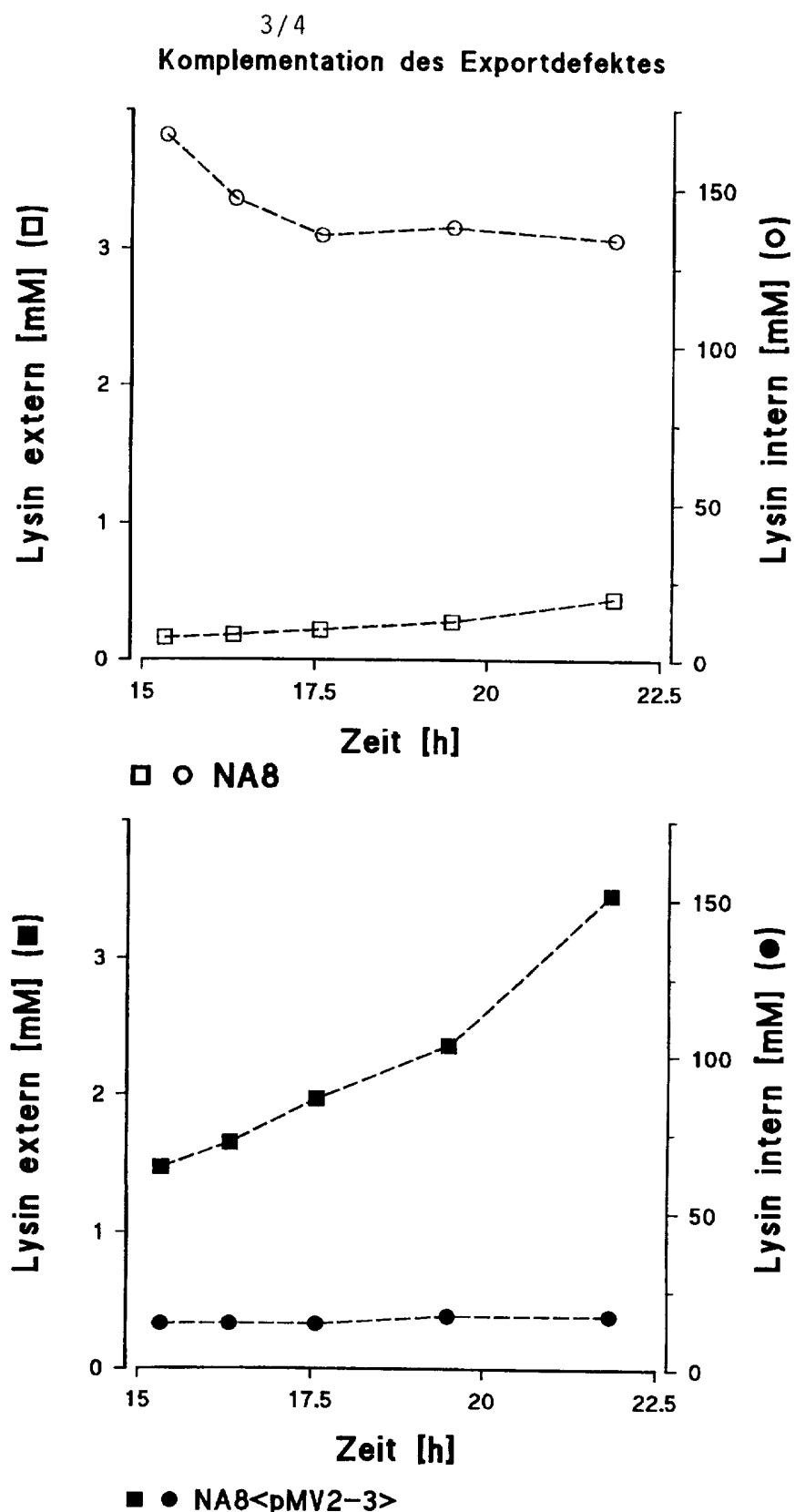
CgLysE 101 POIIIEETEPTVPDDTPLGGSAVATDTRNVRRVEVSDKORVWVKPMLMAI 150  
 EcYgga 84 .....LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

CgLysE 151 VLTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTGRWIFAAGAFAASLIWFPLVGFG 200  
 EcYgga 105 ..TWLNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFALGTISASFLWFFGLALL 152

CgLysE 201 AAALSRPLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIKLMMG..... 236  
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

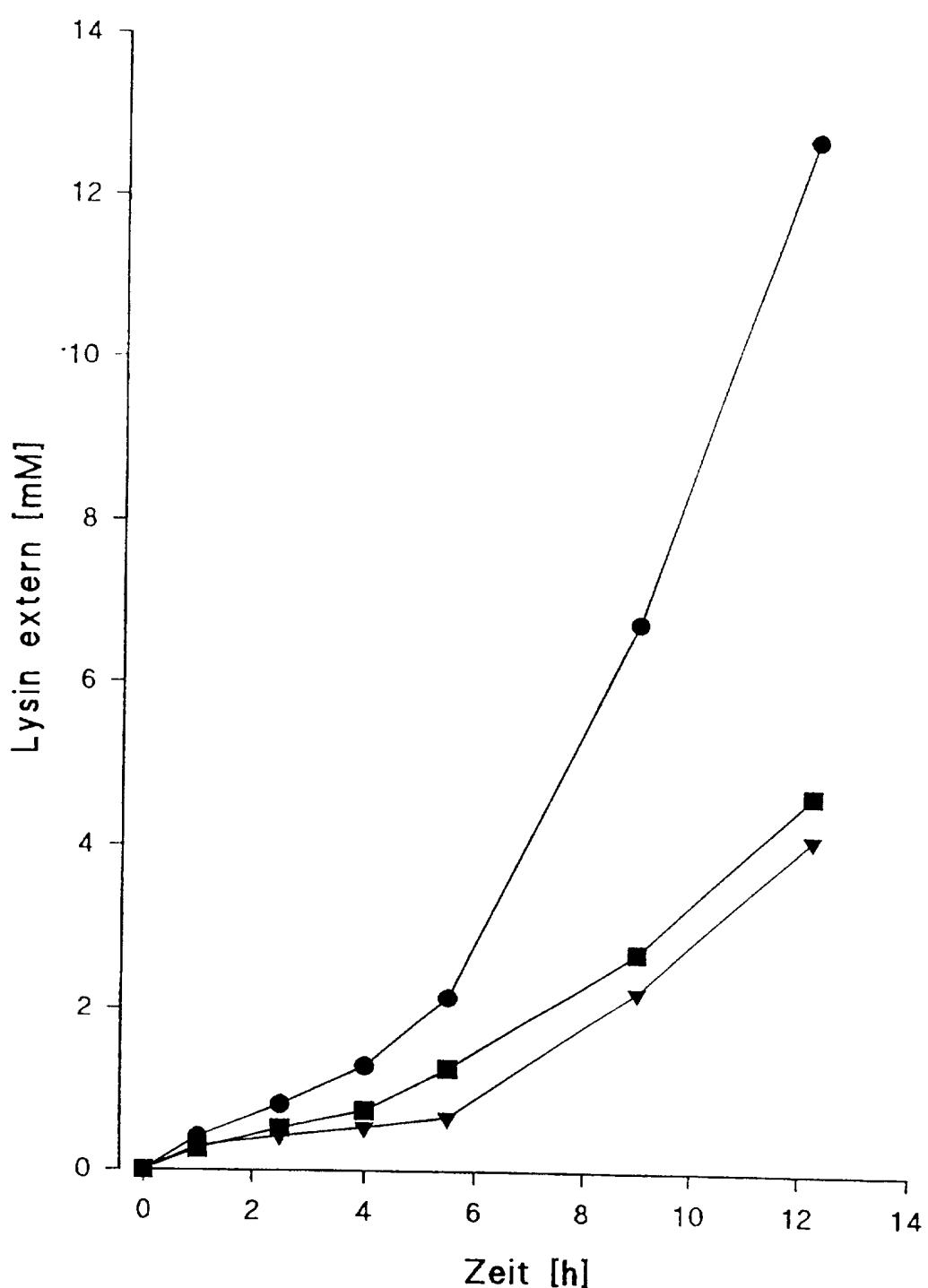
Figur 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)



Figur 3

4 / 4

**Figur 4**