

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年4月26日 (26.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/046389 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12P 7/40 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01) C12R 1/41 (2006.01)  
C12R 1/07 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/320675
- (22) 国際出願日: 2006年10月17日 (17.10.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2005-303213  
2005年10月18日 (18.10.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP). 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝四丁目14番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小関 智恵 (KOSEKI, Chie) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 福井 啓太 (FUKUI, Keita) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 中村 純 (NAKAMURA, Jun) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 児島 宏之 (KOJIMA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF SUCCINIC ACID

(54) 発明の名称: コハク酸の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a process for production of succinic acid, which comprises the step of reacting a bacterium which has been modified so as to increase the expression of a sucE1 gene or a product produced by any treatment of the bacterium with an organic raw material in a reaction solution containing a carbonate ion, a bicarbonate ion or carbon dioxide gas to thereby yield the desired succinic acid.

(57) 要約: sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させ、コハク酸を生成させる。

WO 2007/046389 A1

## 明 細 書

### コハク酸の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、コリネ型細菌等の細菌を用いたコハク酸の製造方法に関するものである。

### 背景技術

[0002] コハク酸などの非アミノ有機酸を発酵により生産する場合、通常、*Anaerobiospirillum*属、*Actinobacillus*属等の嫌気性細菌が用いられている(特許文献1及び特許文献2、非特許文献1)。嫌気性細菌を用いる場合は、生産物の収率が高いが、その一方では、増殖するために多くの栄養素を要求するために、培地中に多量のCSL(コーンステープリカー)などの有機窒素源を添加する必要がある。これらの有機窒素源を多量に添加することは培地コストの上昇をもたらすだけでなく、生産物を取り出す際の精製コストの上昇にもつながり経済的でない。

[0003] また、コリネ型細菌のような好気性細菌を好気性条件下で一度培養し、菌体を増殖させた後、集菌、洗浄し、静止菌体として酸素を通気せずに非アミノ有機酸を生産する方法も知られている(特許文献3及び特許文献4)。この場合、菌体を増殖させるに当たっては、有機窒素の添加量が少なくてもよく、簡単な培地で十分増殖できるため経済的ではあるが、目的とする有機酸の生成量、生成濃度、及び菌体当たりの生産速度の向上、製造プロセスの簡略化等、改善の余地があった。また、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性を増強させた細菌を用いた非アミノ有機酸の発酵生産なども報告されていた(例えば、特許文献5)。

コリネ型細菌の全ゲノム配列が明らかにされ、その中に含まれる推定タンパク質コード配列についての機能予測がなされている(非特許文献2)。本発明においてsucE1と呼ぶ遺伝子もその中の一つであるが、パーミアーゼをコードすると予想されているものの、その実際の機能は明らかにされておらず、コハク酸合成経路への関わりも全く知られていなかった。

特許文献1:米国特許第5, 142, 834号公報

特許文献2:米国特許第5, 504, 004号公報

特許文献3:特開平11-113588号公報

特許文献4:特開平11-196888号公報

特許文献5:特開平11-196887号公報

非特許文献1:International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49,207-216

非特許文献2:Appl. Microbiol. Biotechnol. 62 (2-3), 99-109 (2003)

### 発明の開示

[0004] 本発明の課題は、より生産効率の高いコハク酸の製造方法を提供することにある。

[0005] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌あるいはその処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させることにより、有機原料の消費速度、コハク酸の生成速度、あるいは、収率が高まることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させることによりコハク酸を生成させ、該コハク酸を採取することを特徴とするコハク酸の製造方法。

(2) 前記細菌が、コリネ型細菌、バチルス属細菌、又はリゾビウム属細菌からなる群より選ばれるいずれかの細菌である、(1)の方法。

(3) 前記細菌が、sucE1遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変することにより該遺伝子の発現が増強するように改変された細菌である(1)又は(2)の製造方法。

(4) 前記sucE1遺伝子が(a)又は(b)に示すDNAである(1)～(3)のいずれかの製造方法:

(a) 配列番号15の塩基番号571～2187の塩基配列を含むDNA、

(b) 配列番号15の塩基番号571～2187の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を

向上させるDNA。

(5)前記細菌が、さらに、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性が、非改変株に比べて10%以下に低減化するように改変された細菌である、(1)～(4)のいずれかの方法。

(6)前記細菌が、さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変された細菌である、(1)～(5)のいずれかの方法。

(7) (1)～(6)のいずれかの方法によりコハク酸を製造する工程、及び得られたコハク酸を重合させる工程を含む、コハク酸含有ポリマーの製造方法。

### 図面の簡単な説明

[0007] [図1]遺伝子破壊用プラスミドpBS3の構築を示す図。○で囲まれた数字はその配列番号のプライマーを示す。

[図2]遺伝子破壊用プラスミドpBS4の構築を示す図。○で囲まれた数字はその配列番号のプライマーを示す。

[図3]sucE1欠損用プラスミドの構築を示す図。○で囲まれた数字はその配列番号のプライマーを示す。

[図4]sucE1増幅用プラスミドの構築を示す図。○で囲まれた数字はその配列番号のプライマーを示す。

### 発明を実施するための最良の形態

[0008] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の方法に用いられる細菌は、コハク酸生産能を有し、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌である。このような細菌はコハク酸生産能を有する親株において、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変することにより得ることができる。また、親株がコハク酸生産能を有していない場合、コハク酸の生産能を付与し、さらに、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変することによって得ることができる。

本発明に使用できる細菌の親株は、特に限定されないが、コリネ型細菌(coryneform bacterium)、バチルス属細菌、又はリゾビウム属細菌、エシエリヒア属細菌が好ましく、中でも、コリネ型細菌がより好ましい。コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム属に属する微生物、ブレヴィバクテリウム属に属する微生物又はアースロバクター属に属する微生物が挙げられ、このうち好ましくは、コリネバクテリウム属又はブレヴィバクテリ

ウム属に属するものが挙げられ、更に好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、ブレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*)又はブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*)に属する微生物が挙げられる。

[0009] 上記細菌の親株の特に好ましい具体例としては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、同MJ-233 AB-41(FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6872、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC31831、ATCC13032及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869等が挙げられる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムは、現在、コリネバクテリウム・グルタミカムに分類される場合もあることから(Lielbl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, vol. 41, p255-260)、本発明においては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株、及びその変異株MJ-233 AB-41株はそれぞれ、コリネバクテリウム・グルタミカムMJ-233株及びMJ-233 AB-41株と同一の株であるものとする。

なお、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233は、1975年4月28日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター)(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERMP-3068として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-1497の受託番号で寄託されている。

[0010] 本発明の方法に用いる細菌を得るための親株として用いられる細菌は、野生株だけでなく、UV照射やNTG処理等の通常の変異処理により得られる変異株、細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

[0011] 親株がコハク酸生産能を有していない場合、変異処理や遺伝子組換えによりコハク酸生産能を付与する。ただし、sucE1遺伝子の発現を増強するための改変によりコハク酸生産能を有するようになる場合は、必ずしもコハク酸生産能を付与する必要はない。

なお、ここでいう「コハク酸生産能」とは、該細菌を培地で培養したときに、培地中に回収可能な程度にコハク酸を蓄積する能力をいう。

育種によってコハク酸生産能を付与または増強するための方法としては、例えば、コハク酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。コハク酸に関与する酵素としては、例えば、後述するようなピルビン酸カルボキシラーゼや、特開2005-095169号公報に開示されたフマル酸レダクターゼなどが挙げられる。ピルビン酸カルボキシラーゼ、フマル酸レダクターゼ遺伝子を増幅した細菌は、特表2002-511250号公報、特開平11-196888号公報、特開2005-95169号公報などに記載されている。

- [0012] コハク酸生産能を付与するための改変は、後述するように嫌気条件で発現する酵素であるラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することによっても達成できる。また、細菌を紫外線、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンсульフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、コハク酸を生産する株を選抜する方法によってコハク酸生産能を付与してもよい。コハク酸生産能を有する変異株としては、特開2005-065641号公報に開示されているグルタミン酸要求性株などが挙げられる。
- [0013] 本発明の方法に用いる細菌は、上記のようなコハク酸生産能を有する細菌を、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変することによって得ることができる。なお、コハク酸生産能を付与するための改変とsucE1遺伝子の発現を増強するための改変はどちらを先に行ってもよい。
- [0014] sucE1遺伝子がコードするタンパク質(sucE;succinate exporter)は、Permeaseの一種と推測されており、細菌内でその発現を増強させた場合に細菌の「コハク酸生産能」を向上させるタンパク質である。
- [0015] 本発明の方法に用いる細菌を得るために使用するsucE1遺伝子としては、*Brevibacterium flavum* MJ233由来のsucE1遺伝子(配列番号15の塩基番号571~2187)、あるいは*C. glutamicum* ATCC13032由来のsucE1遺伝子(配列番号17の塩基配列)、*C. efficiens* YS314由来のsucE1遺伝子(配列番号19の塩基配列)、*C. diphtheriae* gravis NCTC13129由来のsucE1遺伝子(配列番号23の塩基配列)などを挙げることができる。

*C. glutamicum* ATCC13032のsucE1遺伝子は、GenBank Accession No. NC#003450として登録されているゲノム配列中のNCgl2130として登録されている。(アミノ酸配列はGenBank Accession No. NP#601414)。*C. efficiens* YS314のsucE1遺伝子はGenBank Accession No. NC#004369として登録されているゲノム配列中のCE2102として登録されている。*C. diphtheriae gravis* NCTC13129由来のsucE1遺伝子は、GenBank Accession No. NC#002935のDIP0830として登録されている。

また、本発明の方法に用いる細菌を得るために使用するsucE1遺伝子は、細菌においてその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることが出来る限り、他の微生物由来のsucE1のホモログ遺伝子を用いてもよい。sucE1遺伝子のホモログは、BLAST等によって配列番号15の塩基番号571～2187の配列などを参照して、検索出来る(//blast.genome.jp/)。

[0016] sucE1遺伝子は、上記のとおり、既にいくつかの配列が明らかにされているので、それらの塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて得ることができる。例えば、配列番号13及び14に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型とするPCR法(PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照)によって、*C. glutamicum*のsucE1とsucE1の制御領域を含む、その隣接領域を取得することができる。他の微生物のsucE1のホモログも同様にして取得される。

[0017] コリネ型細菌の種や菌株によってsucE1遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、本発明の方法に用いる細菌を得るために使用するsucE1遺伝子は、配列番号15の塩基番号571-2187の配列、配列番号17、または19の配列を有する遺伝子に限られず、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることができる限り、配列番号16、18、20のアミノ酸配列において、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする変異体又は人為的な改変体であってもよい。ここで、「1若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には1から20個、好ましくは、1から10個、より好ましくは1から5個である。また、このようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、su

cE1遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)によって生じるものも含まれる。

上記置換は機能的に変化しない中性変異である保存的置換が好ましい。保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、phe,trp,tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、leu,ile,val間で、極性アミノ酸である場合には、gln,asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、lys,arg,his間で、酸性アミノ酸である場合には、asp,glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、ser,thr間でお互いに置換する変異である。より具体的には、保存的置換としては、alaからser又はthrへの置換、argからgln、his又はlysへの置換、asnからglu、gln、lys、his又はaspへの置換、aspからasn、glu又はglnへの置換、cysからser又はalaへの置換、glnからasn、glu、lys、his、asp又はargへの置換、gluからgly、asn、gln、lys又はaspへの置換、glyからproへの置換、hisからasn、lys、gln、arg又はtyrへの置換、ileからleu、met、val又はpheへの置換、leuからile、met、val又はpheへの置換、lysからasn、glu、gln、his又はargへの置換、metからile、leu、val又はpheへの置換、pheからtrp、tyr、met、ile又はleuへの置換、serからthr又はalaへの置換、thrからser又はalaへの置換、trpからphe又はtyrへの置換、tyrからhis、phe又はtrpへの置換、及び、valからmet、ile又はleuへの置換が挙げられる。

[0018] さらに、sucE1遺伝子は、配列番号16、18、20のアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するタンパク質をコードし、かつ、発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることが出来るタンパク質をコードする配列を用いることも出来る。また、それぞれ導入する宿主により、遺伝子の縮重性が異なるので、それぞれsucE1が導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したのももよい。同様にsucE1遺伝子は、発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させる機能を有する限り、N末端側、C末端側が延長したタンパク質、あるいは削られているタンパク質をコードする遺伝子でもよい。例えば延長・削除する長さは、アミノ酸残基で50以下、好ましくは20以下、より好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。より具体的には、配列番号16,18または20のアミノ酸配列のN末端側50アミノ酸から5アミノ酸、又はC



末端側50アミノ酸から5アミノ酸が延長又は削除されたタンパク質をコードする遺伝子でもよい。

- [0019] このようなsucE1遺伝子と相同な遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号15の塩基番号571～2187の塩基配列、配列番号17、19の塩基配列、を改変することによって取得することができる。また、以下のような従来知られている変異処理によっても取得される。変異処理としては、配列番号15の塩基番号571～2187の塩基配列、配列番号17、または19に示す塩基配列をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝子を保持する微生物、例えばコリネ型細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンсульフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法、エラープローンPCR、DNA shuffling、StEP-PCRによって、遺伝子組換えにより人工的にsucE1に変異を導入して活性の高いsucE1遺伝子を取得することが出来る。(Firth AE, Patrick WM;Bioinformatics. 2005 Jun 2; Statistics of protein library construction.)

なお、これらのsucE1相同遺伝子が発現を増強することによりコハク酸生産能を向上させるタンパク質をコードしているか否かは、例えば、これらの遺伝子をコリネ型細菌の野生株に導入し、コハク酸の生産能が向上するかどうかを調べることにより、確かめることができる。

- [0020] また、sucE1遺伝子は、配列番号15の塩基番号571～2187の配列、配列番号17もしくは19の配列の相補配列又はこれらの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ発現を増強することにより、細菌のコハク酸生産能を向上させるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それよ

り相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSさらに好ましくは、68°C、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度、温度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

プローブとして、配列番号15の塩基番号571～2187の配列、配列番号17又は19の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、これらの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

[0021] 上記のようなsucE1遺伝子について、その発現量が増強するように細菌を改変する。

ここで、「sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された」とは、親株、あるいは野生株に対して細胞当たりのSucE1産物分子の数が増加した場合や、SucE1産物分子当たりの活性が上昇した場合などが該当する。なお、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム(ブレヴィバクテリウム・ラクトファエメンタム)ATCC13869やATCC13032などが挙げられる。

sucE1遺伝子の発現量が増強したことの確認は、sucE1のm-RNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる(Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor(USA), 2001))。発現量については、野生株あるいは非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

[0022] sucE1遺伝子の発現量の増強は、sucE1遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、sucE1遺伝子を含む断片を、コリネ型細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを上述のようなコハク酸生産能を有するコリネ型細菌に導入して形質転換すればよい。また、野生

型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にコハク酸生産能を付与してもよい。また、コピー数の上昇は、sucE1をコードする遺伝子を染色体上に1コピーあるいは複数コピー転移させることによっても達成される。染色体上にsucE1遺伝子が転移したことの確認は、sucE1遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行うことによっても確認出来る。

[0023] また、sucE1遺伝子の発現の増強は、sucE1遺伝子の発現調節領域を改変することによっても達成出来る。例えば、sucE1のプロモーターの配列をより強いプロモーターに置換すること、プロモーター配列をコンセンサスに近づけることによっても達成出来る。(国際公開第WO00/18935号パンフレット)

[0024] 以下、コハク酸生産能を有し、sucE1遺伝子の発現量が上昇するように改変した微生物の構築方法を示す。これらの方法は、Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor(USA), 2001)等のマニュアルに従って実施出来る。

[0025] 同遺伝子の発現量の増強は、sucE1遺伝子のコピー数を高めることによっても達成でき、コピー数を高めることは、以下のようにプラスミドでsucE1遺伝子を増幅することによっても達成出来る。まずsucE1遺伝子を、コリネ型細菌などの染色体からクローニングする。

染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照)等により調製することができる。PCRに用いるオリゴヌクレオチドは上記の公知情報に基づいて合成でき、例えば配列番号13、14に記載の合成オリゴヌクレオチドを用いsucE1遺伝子を増幅することが出来る。

[0026] PCR法により増幅されたsucE1遺伝子を含む遺伝子断片は、増幅する微生物で自律複製可能な複製起点を有するベクターに組み込み、該ベクターで細菌を形質転換することによっても増幅することが好ましい。特にコリネ型細菌に導入する場合は、エシェリヒア・コリ及び/またはコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリに導入しておくこと、後

の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pBR322、pACYC184、pMW219等が挙げられる。

[0027] コリネ型細菌を宿主として用いる場合、上記DNAをコリネ型細菌で機能するベクターに導入する。コリネ型細菌で機能するベクターとは、例えばコリネ型細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等、特開平10-215883号公報に記載のpVK7を挙げることができる。

[0028] また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

[0029] sucE1遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組換えDNAを調製するには、sucE1の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。この制限酵素サイトはあらかじめsucE1の増幅に用いる合成オリゴヌクレオチドに導入されていてもよい。連結はT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

[0030] 上記のように調製した組換えプラスミドを細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel,M.and Higa,A.,J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製し

てDNAを導入する方法(Duncan,C.H.,Wilson,G.A.and Young,F.E., Gene, 1, 153 (1977))がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S.andChoen,S.N.,Mol.Gen.Genet.,168,111(1979);Bibb,M.J.,Ward,J.M.andHopwood, O.A.,Nature, 274, 398 (1978);Hinnen,A.,Hicks,J.B.and Fink,G.R.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929(1978))も応用できる。また、電気パルス法(特開平2-207791号公報)や、接合伝達法(Biotechnology (N Y). 1991 Jan;9(1):84-7).によっても、細菌の形質転換を行うことができる。

[0031] sucE1のコピー数を高めることは、sucE1を細菌の染色体DNA上に複数コピー存在させることによっても達成できる。細菌の染色体DNA上にsucE1を複数コピー導入するには、染色体DNA上に複数コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、sucE1をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。(特開平2-109985号、特開平7-107976号、Mol.Gen.Genet.,245, 397-405 (1994)、Plasmid. 2000 Nov;44(3):285-91)。

[0032] また、宿主で複製できない複製起点あるいは、宿主で複製出来ない複製起点と宿主への接合伝達能を有するプラスミドにsucE1遺伝子を導入して、染色体上で増幅させる方法が考えられる。例えば用いることが出来るベクターは、pSUP301(Simo等, Bio/Technology 1, 784~791 (1983) )、pK18mobまたはpK19mob(Schaefer等, Gene 145, 69~73 (1994) )、pGEM-T(Promega corporation, Madison, WI, USA)、pCR2.1-TOPO(Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269: 32678~84; US-A 5487993)、pCR<sup>(R)</sup>Blunt(Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534~541 (1993))、pEM1(Schrumpf等,1991, Journal of Bacteriology 173: 4510~4516)またはpBGS8(spratt等, 1986, Gene, 41:337~342)等が挙げられる。sucE1遺伝子を含むプラスミドベクターを細菌中に接合ま

たは形質転換によって転移させる。接合法は、例えばSchaefer等 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756~759 (1994)) に記載されている。形質転換法は、例えばTheirbach等 (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356~362 (1988))、DuncanおよびShivinan (Bio/Technology 7, 1067~1070 (1989)) および Tauch 等 (FEMS Microbiological Letters 123, 343~347 (1994)) に記載されている。

[0033] また、sucE1の活性を上昇させる手段として染色体DNA上またはプラスミド上のsucE1のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換すること、sucE1の発現調節に関与する因子、例えばオペレーターやリプレッサーを改変すること、強力なターミネーターを連結することによっても達成される。(Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171:4617-4622) 例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、PS2プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128) 等に記載されている。また、国際公開WO00/18935に開示されているように、目的遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、よりコンセンサスに近づける配列に置換し、強力なものに改変することも可能である。例えば、-35領域をTTGACA、TTGCCA配列に、-10領域をTATAAT、TATAAC配列に置換することが考えられる。さらに、リボソーム結合部位 (RBS) と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。

[0034] また、発現量の上昇は、m-RNAの生存時間を延長させることや、酵素タンパク質の細胞内での分解を防ぐことによっても達成可能である。sucE1遺伝子上流のプロモーター等の発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することも出来る。これらのプロモーター置換または改変によりsucE1遺伝子の発現が強化される。発現調節配列の置換は、例えば温度感受性プラスミドを用いて行うことができる。コリネ型酸菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2 (以上、特開2000-262288号公報)、pHSC4 (フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報) 等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細

菌中で少なくとも25°Cでは自律複製することができるが、37°Cでは自律複製できない。なお、pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター)(〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

なお、発現調節配列の改変は、sucE1遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

[0035] 本方法においては、sucEの発現上昇に加えて、ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)活性が低減化するように改変された細菌株を用いるとより有効である。ここで、「ラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化された」とは、ラクテートデヒドロゲナーゼ非改変株と比較してラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低下していることをいう。ラクテートデヒドロゲナーゼ活性は、ラクテートデヒドロゲナーゼ非改変株と比較して、菌体当たり10%以下に低減化されていることが好ましい。また、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性は完全に欠損していてもよい。ラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化されたことは、公知の方法(L.Kanarek and R.L.Hill, J. Biol. Chem.239, 4202 (1964))によりラクテートデヒドロゲナーゼ活性を測定することによって確認することができる。コリネ型細菌のラクテートデヒドロゲナーゼ活性の低減化した変異株の具体的な製造方法としては、特開平11-206385号公報に記載されている染色体への相同組換えによる方法、あるいは、本明細書実施例に記載のSacB遺伝子を用いる方法(Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73)等が挙げられる。本発明のラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化されsucE1遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、例えば後述の実施例2のようにして、LDH遺伝子が破壊された細菌を作製し、該細菌をsucE1遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することにより得ることができる。ただし、LDH活性低減化のための改変操作とsucE1の発現増強のため改変操作はどちらを先に行ってもよい。

[0036] LDHの活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、染色体上のLDH遺伝子に、細胞中のLDH活性が低下または欠損するような変異を導入すれ

ばよい。例えば、遺伝子組換えによって、染色体上のLDHをコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、染色体上のLDHをコードする領域にアミノ酸置換(ミスセンス変異)を導入すること、また終始コドンを導入すること(ナンセンス変異)、一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分あるいは全領域を欠失させることによっても達成出来る(Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617(1997))。また、コード領域が欠失したような変異型LDHをコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、染色体上の正常型LDH遺伝子を置換すること、トランスポゾン、IS因子を該遺伝子に導入することによってもLDH活性を低下または欠損させることができる。

[0037] 例えば、LDH活性を低下または欠損させるような変異を遺伝子組換えにより導入する為には、以下のような方法が用いられる。LDH遺伝子の部分配列を改変し、正常に機能する酵素を産生しないようにした変異型LDH遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、変異型遺伝子と染色体上の遺伝子で組換えを起こさせることにより、染色体上のLDH遺伝子を変異型に置換することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入は既に確立しており、直鎖状DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある(米国特許第6303383号、又は特開平05-007491号公報)。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入は、宿主中で複製能力を持たないプラスミドを用いても行うことが出来る。なお、コリネ型細菌の温度感受性プラスミドとしては、上記、p48K及びpSFKT2(以上、米国特許第6303383号参照)、pHSC4(フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報参照)等が挙げられる。

また、上記のような遺伝子破壊操作においては、遺伝子組み換えのマーカースとしてレバンシュークラゼを用いることもできる(Schafer,A.et al.Gene 145 (1994)69-73)。

[0038] また、本反応においては、sucE1の発現増強加えて、ピルビン酸カルボキシラーゼの活性が増強するように改変された細菌を用いてもよい。「ピルビン酸カルボキシラー



ぜの活性が増強される」とは、ピルビン酸カルボキシラーゼの活性が野生株又は親株等の非改変株に対して増加していることをいう。ピルビン酸カルボキシラーゼの活性は例えば、後述するようなNADHの減少を測定する方法により測定することができる。sucE1及びピルビン酸カルボキシラーゼの発現が増強されたコリネ型細菌は、特開平11-196888号公報に記載の方法と同様にして、sucE1遺伝子及びピルビン酸カルボキシラーゼ(PC)遺伝子をコリネ型細菌中で高発現させることにより作製することができる。

[0039] 本発明の方法に使用されるPC遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、もしくは、PC活性を有するタンパク質をコードするDNA断片を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列にしたがって合成した遺伝子を使用することもできる。

[0040] PC遺伝子としては、例えば、コリネ型細菌コリネバクテリウム・グルタミカム由来のPC遺伝子を用いることができる(Peters-Wendisch, P.G. et al. Microbiology, vol.144 (1998) p915-927) (配列番号21)。また、PC遺伝子は、コードされるPCの機能、すなわち二酸化炭素固定に関与する性質を実質的に損なうことがない限り、配列番号21の塩基配列において、一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明に用いることができる。配列番号21の塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズするDNA、または配列番号21の塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有するDNAであって、PC活性を有するタンパク質をコードするDNAも好適に用いることができる。ここで、ストリンジントな条件としては、通常のコリネハイブリダイゼーションの洗いの条件である60°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

[0041] また、コリネバクテリウム・グルタミカム以外の細菌、または他の微生物又は動植物由来のPC遺伝子を使用することもできる。特に、以下に示す微生物または動植物由

来のPC遺伝子は、その配列が既知(以下に文献を示す)であり、上記と同様にしてハイブリダイゼーションにより、あるいはPCR法によりそのORF部分を増幅することによって、取得することができる。

ヒト [Biochem.Biophys.Res.Comm., 202, 1009-1014, (1994)]

マウス[Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 1766-1779, (1993)]

ラット[GENE, 165, 331-332, (1995)]

酵母; サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)

[Mol.Gen.Genet., 229, 307-315, (1991)]

シズサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)

[DDBJ Accession No.; D78170]

バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)

[GENE, 191, 47-50, (1997)]

リゾビウム・エトリ (*Rhizobium etli*)

[J.Bacteriol., 178, 5960-5970, (1996)]

なお、PC遺伝子発現の増強は、上述したsucE1遺伝子の発現増強と同様にして行うことができる。

[0042] 本発明では、上記のような、コハク酸生産能を有し、sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌を用いてコハク酸の製造を行う。

コハク酸の製造反応に上記細菌を用いるに当たっては、寒天培地等の固体培地で斜面培養したものを直接反応に用いても良いが、上記細菌を予め液体培地で培養(種培養)したものをを用いるのが好ましい。このように種培養した細菌を炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む培地で増殖させながら、有機原料と反応させることによってもコハク酸を製造することができる。また、増殖させて得られた菌体を炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む反応液中で有機原料と反応させることによってもコハク酸を製造することができる。なお、好気性コリネ型細菌を本発明の方法に用いるためには、先ず菌体を通常の好気的な条件で培養した後用いることが好ましい。培養に用いる培地は、通常微生物の培養に用いられる培地を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、リ

ン酸カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩からなる組成に、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等の天然栄養源を添加した一般的な培地を用いることができる。培養後の菌体は、遠心分離、膜分離等によって回収され、反応に用いられる。

- [0043] 本発明では細菌の菌体の処理物を使用することもできる。菌体の処理物としては、例えば、菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物、その遠心分離上清、又はその上清を硫酸処理等で部分精製した画分等が挙げられる。
- [0044] 本発明の製造方法に用いる有機原料としては、本微生物が資化してコハク酸を生成させうる炭素源であれば特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、グリセロール、シュクロース、サッカロース、デンプン、セルロース等の炭水化物；グリセリン、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース、フルクトース、グリセロールが好ましく、特にグルコースが好ましい。
- [0045] また、上記発酵性糖質を含有する澱粉糖化液、糖蜜なども使用される。これらの発酵性糖質は、単独でも組み合わせても使用できる。上記有機原料の使用濃度は特に限定されないが、コハク酸の生成を阻害しない範囲で可能な限り高くするのが有利であり、通常、5～30% (W/V)、好ましくは10～20% (W/V) の範囲内で反応が行われる。また、反応の進行に伴う上記有機原料の減少にあわせ、有機原料の追加添加を行っても良い。
- [0046] 上記炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む反応液としては特に限定されず、例えば、細菌を培養するための培地であつてもよいし、リン酸緩衝液等の緩衝液であつてもよい。反応液は、窒素源や無機塩などを含む水溶液であることが好ましい。ここで、窒素源としては、本微生物が資化してコハク酸を生成させうる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステーパーリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が用いられる。また、ビオチン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン

類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加する。また、反応時の発泡を抑えるために、培養液には市販の消泡剤を適量添加しておくことが望ましい。

- [0047] 反応液のpHは、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等を添加することによって調整することができる。本反応におけるpHは、通常、pH5～10、好ましくはpH6～9.5であることが好ましいので、反応中も必要に応じて反応液のpHはアルカリ性物質、炭酸塩、尿素などによって上記範囲内に調節する。
- [0048] 本発明で用いる反応液としては、水、緩衝液、培地等が用いられるが、培地が最も好ましい。培地には、例えば上記した有機原料と炭酸イオン、重炭酸イオン又は二酸化炭素ガスを含有させ、嫌氣的条件で反応させることができる。炭酸イオン又は重炭酸イオンは、中和剤としても用いることのできる炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウムから供給されるが、必要に応じて、炭酸若しくは重炭酸又はこれらの塩或いは二酸化炭素ガスから供給することもできる。炭酸又は重炭酸の塩の具体例としては、例えば炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等が挙げられる。そして、炭酸イオン、重炭酸イオンは、0.001～5M、好ましくは0.1～3M、さらに好ましくは1～2Mの濃度で添加する。二酸化炭素ガスを含有させる場合は、溶液1L当たり50mg～25g、好ましくは100mg～15g、さらに好ましくは150mg～10gの二酸化炭素ガスを含有させる。
- [0049] 本反応に用いる細菌の生育至適温度は、通常、25℃～35℃である。反応時の温度は、通常、25℃～40℃、好ましくは30℃～37℃である。反応に用いる菌体の量は、特に規定されないが、1～700g/L、好ましくは10～500g/L、さらに好ましくは20～400g/Lが用いられる。反応時間は1時間～168時間が好ましく、3時間～72時間がより好ましい。
- [0050] 細菌の培養時は、通気、攪拌し酸素を供給することが必要である。一方、コハク酸の生成反応は、通気、攪拌して行ってもよいが、通気せず、酸素を供給しない嫌氣的雰囲気下で行ってもよい。ここで言う嫌氣的雰囲気とは、溶液中の溶存酸素濃度を

低く抑えて反応することを意味する。この場合、溶存酸素濃度として0～2ppm、好ましくは0～1ppm、さらに好ましくは0～0.5ppmで反応させることが望ましい。そのための方法としては、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不活性ガスを供給して反応させる、二酸化炭素ガス含有の不活性ガスを通気する等の方法を用いることができる。

[0051] 反応液(培養液)中に蓄積したコハク酸は、常法に従って、反応液より分離・精製することができる。具体的には、遠心分離、ろ過等により菌体等の固形物を除去した後、イオン交換樹脂等で脱塩し、その溶液から結晶化あるいはカラムクロマトグラフィーによりコハク酸を分離・精製することができる。

[0052] さらに本発明においては、上記した本発明の方法によりコハク酸を製造した後に、得られたコハク酸を原料として重合反応を行うことによりコハク酸含有ポリマーを製造することができる。近年、環境に配慮した工業製品が数を増す中、植物由来の原料を用いたポリマーに注目が集まってきており、本発明において製造されるコハク酸は、ポリエステルやポリアミドといったポリマーに加工されて用いる事が出来る。コハク酸含有ポリマーとして具体的には、ブタンジオールやエチレングリコールなどのジオールとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリエステル、ヘキサメチレンジアミンなどのジアミンとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリアミドなどが挙げられる。また、本発明の製造法により得られるコハク酸または該コハク酸を含有する組成物は食品添加物や医薬品、化粧品などに用いることができる。

## 実施例 1

[0053] < 遺伝子破壊用ベクターの構築 >

### (A) pBS3の構築

バチルス・ズブチリスの染色体DNAを鋳型として配列表配列番号1と2をプライマーとして用いて、PCRにより取得した。PCR反応は、LA taq(TaKaRa)を用い、94℃で5分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合49℃ 30秒、伸長72℃ 2分からなるサイクルを25回繰り返した。生成したPCR産物を常法により精製後BglIIとBamHIで消化し、平滑化した。

この断片をpHSG299のAvaIIで消化後、平滑化した部位に挿入した。このDNAを用い

て、エシエリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造)を用いて形質転換を行い、カナマイシン(以下、Kmと略す)25  $\mu$  g/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニーを分離し形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS3と命名した。pBS3の構築過程を図1に示す。

[0054] (B) pBS4Sの構築

pBS3上に存在するKm耐性遺伝子配列中のSmaI部位をアミノ基置換を伴わない塩基置換によりKm耐性遺伝子を破壊したプラスミドをクロスオーバーPCRで取得した。まず、pBS3を鋳型として配列表配列番号3, 4の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、Km耐性遺伝子のN末端側の増幅産物を得る。一方Km耐性遺伝子のC末端側の増幅産物を得るためにpBS3を鋳型として配列表配列番号5, 6の合成DNAを鋳型としてPCRを行う。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(TaKaRa)を用い、98  $^{\circ}$ Cで5分保温を1サイクル行った後、変性98 $^{\circ}$ C 10秒、会合57 $^{\circ}$ C 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 1分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。

配列表配列番号4と5は部分的に相補的であり、またこの配列内に存在するSmaI部位はアミノ酸置換を伴わない塩基置換を施すことにより破壊されている。次にSmaI部位が破壊された変異型Km耐性遺伝子断片を得るために、上記Km耐性遺伝子N末端側及びC末端側の遺伝子産物を、それぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表配列番号3, 6の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い変異導入されたKm耐性遺伝子増幅産物を得た。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(TaKaRa)を用い、98  $^{\circ}$ Cで5分保温を1サイクル行った後、変性98 $^{\circ}$ C 10秒、会合57 $^{\circ}$ C 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 1.5分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。生成したPCR産物を常法により精製後BanIIで消化し、上記のpBS3のBanII部位に挿入した。このDNAを用いて、エシエリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造)を用いて形質転換を行い、Km 25  $\mu$  g/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS4Sと命名した。pBS4Sの構築過程を図2に示す。

## 実施例 2

### [0055] < sucE1 遺伝子破壊株の構築 >

#### (A) sucE1 遺伝子破壊用断片のクローニング

ブレビバクテリウム・フラバムMJ233株由来のsucE1遺伝子のorfを欠失した遺伝子断片は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 (Genbank Database Accession No. NC#003450)のNCgl2130周辺の塩基配列を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いたクロスオーバーPCRで取得した。具体的にはブレビバクテリウム・フラバムMJ233株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号7、8の合成DNAをプライマーとしてPCRを行いsucE1遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、sucE1遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233株のゲノムDNAを鋳型とし、配列表配列番号9、10の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。PCR反応は、Pyrobest DNAPolymerase(TaKaRa)を用い、94℃で3分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合60℃ 30秒、伸長72℃ 1分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得ることができる。配列表配列番号8と9は互いに相補的であり、sucE1のorfの全配列を欠損させた構造となっている。次に内部配列を欠失したsucE1遺伝子断片を得るために、上記sucE1N末側およびC末側の遺伝子産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表配列番号11と12の合成DNAをプライマーとしてPCRを行いsucE1のorfを欠失した増幅産物を得た。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(TaKaRa)を用い、94℃で3分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合58℃ 30秒、伸長72℃ 2分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得ることができる。生成したPCR産物を常法により精製後BamHIで消化した後、上記実施例1(B)で構築したpBS4SのBamHI部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造)を用いて形質転換を行い、IPTG 100  $\mu$  M、X-Gal 40  $\mu$  g/mlおよびKm 25  $\mu$  g/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS4S  $\Delta$  sucE1と命名した。該プラスミドの構築図を図3に示す。

## [0056] (B) sucE1破壊株の作成

上記(A)で得られたpBS4S  $\Delta$  sucE1はコリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。プレビバクテリウム・フラバムMJ233  $\Delta$  LDH株(特開2005-95169記載のMJ233/ $\Delta$  LDH株)を電気パルス法により高濃度のプラスミドpBS4S  $\Delta$  sucE1を用いて形質転換し、カナマイシン50  $\mu$ g/mlを含むCM-Dex寒天培地(グルコース 5g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、pH7.5(KOH)に寒天1.5%を含む)に塗布し、31.5°Cで約24時間培養した。プラスミドは、エシエリヒア・コリSCS110(stratagene)をpBS4S  $\Delta$  sucE1で形質転換し、この株から抽出したものをを用いた。出現したコロニーは該プラスミドのsucE1遺伝子断片とプレビバクテリウム・フラバムMJ233株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組換えを起こした結果、同ゲノムに該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびSacB遺伝子が挿入されている。

次にこれらの一回目の組換え体を、カナマイシンを含まないCM-Dex液体培地にて31.5°Cで一晩培養し適当に希釈した後、カナマイシンを含まない10%ショ糖含有Dex-S10寒天培地(ショ糖 100g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、ビオチン 10  $\mu$ g/L、pH7.5(KOH)に寒天1.5%を含む)に塗布にし、31.5°Cにて約24時間培養し、ショ糖に耐性を示すクローンを取得した。これらの株は、正常なsacB遺伝子を発現しなくなった株であり、その中には2回目の相同組換えによりpBS4S  $\Delta$  sucE1が脱落した株が含まれる。さらに、2回目の相同組換えを起こした株は、sucE1遺伝子がpBS4S  $\Delta$  sucE1に由来する欠失型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。sucE1遺伝子の変異型であるか野生型であるかの確認は、Dex-S10寒天培地にて培養して得られた菌体より染色体DNAを抽出し、PCRにてsucE1遺伝子の検出を行うことによって容易に確認できる。得られた2回組換え株のうち、sucE1遺伝子をPCRで増幅するためのプライマー(配列表配列番号



7および配列表配列番号10)を用いて増幅した際、MJ233株の染色体DNAを鋳型にしたものよりもPCR産物の大きさが小さいものをsucE1欠損株として以降の実験に使用した。取得したsucE1欠損株をMJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1と命名した。

### 実施例 3

#### [0057] < sucE1増幅株の構築 >

##### (A) sucE1遺伝子のクローニング

ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233株由来のsucE1遺伝子増幅プラスミドは以下のようにして構築した。コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 (Genbank Database Accession No.NC003450)のNCgl2130周辺の塩基配列を参考に設計した配列表配列番号13、14の合成DNAをプライマーとして、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233株のゲノムDNAを鋳型とし、PCRを行う。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase (TaKaRa)を用い、94 °Cで3分保温を1サイクル行った後、変性94°C 30秒、会合60°C 30秒、伸長72°C 2.5分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得ることができる。生成したPCR産物を常法により精製後Sse8387Iで消化した後、pVK9のSse8387I部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造)を用いて形質転換を行い、IPTG 100  $\mu$  M、X-Gal 40  $\mu$  g/mlおよびKm 25  $\mu$  g/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、図4の構成のプラスミドをpVKsucE1と命名した。なお、pVK9は、pHSG299(タカラバイオ)のAvaII部位を平滑末端化し、pHK4(特開平05-007491)に含まれるコリネ型細菌内で自律複製可能な領域をBamHIおよびKpnIで切り出し平滑末端化した断片を挿入したシャトルベクターである。

#### [0058] (B) sucE1増幅株の作成

上記(A)で得られたpVKsucE1およびpVK9を用いて、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233  $\Delta$  LDH株およびMJ233  $\Delta$  LDH  $\Delta$  sucE1株を電気パルス法により形質転換し、カナマイシン25  $\mu$  g/mlを含むCM-Dex寒天培地(グルコース 5g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.4g/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、MnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、pH7.5(KOH)

に寒天1.5%を含む)に塗布し、31.5°Cで約24時間培養した。出現したコロニーを純化し、定法によりプラスミドを抽出し、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。

#### 実施例 4

##### [0059] < sucE1 改変株によるコハク酸生産 >

ブレヴィバクテリウム・フラバム MJ233  $\Delta$ ldh 株 (WO2005/021770) に pVK9 または pVK9sucE1 を導入した株、および MJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1 株 に pVK9 または pVK9sucE1 を導入した株を用いてコハク酸生産のための培養を以下のように行った。CM-Dex プレート培地にて培養して得た菌体をシード培地 20ml (グルコース 20g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L、尿素 4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L、ビオチン 200  $\mu$ g/L、VB1 $\cdot$ HCl 200  $\mu$ g/L、イーストエキス 1g/L、カザミノ酸 1g/L) に接種し、好気条件にて 31.5°C にて坂口フラスコで約 8 時間振とう培養を行った。

その後、シード培養液 700  $\mu$ l を分取し、直ちにエッペンチューブ中のメイン培地 700  $\mu$ l (グルコース 200g/L、亜硫酸 Na 30g/L をフィルターろ過したものに、乾熱滅菌した炭酸マグネシウムを最終濃度 143g/L となるように混合) と混合し、31.5°C で振とう培養をおこなった。48 時間後に培養を停止し、生成したコハク酸量を、液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムは Shim-pack SCR-102H (Simadzu) を二本直列接続したものを用い、サンプルは 5mM p-トルエンスルホン酸を用いて 40°C で溶出した。溶出液を 5mM p-トルエンスルホン酸および 100  $\mu$ M EDTA を含む 20mM Bis-Tris 水溶液を用いて中和し、CDD-10AD (Simadzu) にて電気伝導度を測定することによりコハク酸を測定した。各菌株について、複数検体の評価を行った結果を表 1 に示した。

MJ233  $\Delta$ ldh/pVK9sucE1 は、MJ233  $\Delta$ ldh/pVK9 に比べ、約 1.5 倍のコハク酸の蓄積を示した。このことから、sucE1 の発現量の増加がコハク酸の発酵生産に有効であることが示された。

一方、MJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1/pVK9 株では、全くコハク酸の蓄積が認められなくなった。これは、sucE1 遺伝子がコハク酸生産菌から失われると、著しくコハク酸生産能を損なうことを意味する。sucE1 を欠失した株に sucE1 をプラスミドで相補した株 MJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1/pVKsucE1 では、MJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1/pVK9 よりも高いコハク酸蓄積が認

められた。pVK9は細胞内のコピー数が約10コピーであることから、MJ233  $\Delta$ ldh  $\Delta$  sucE1にpVK9sucE1を導入すると、sucE1の発現量としては野生型よりも上回る事となる。この結果からも、sucE1の発現増強がコハク酸生産に有効であることが示された。

[0060] [表1]

表1. sucE1改変株によるコハク酸生産

| 菌株名称                                        | コハク酸蓄積(g/L)     |
|---------------------------------------------|-----------------|
| MJ233 $\Delta$ ldh/pVK9                     | 20.5 $\pm$ 2.00 |
| MJ233 $\Delta$ ldh/pVK9sucE1                | 32.3 $\pm$ 0.12 |
| MJ233 $\Delta$ ldh $\Delta$ sucE1/pVK9      | 0.0             |
| MJ233 $\Delta$ ldh $\Delta$ sucE1/pVK9sucE1 | 32.5 $\pm$ 0.30 |

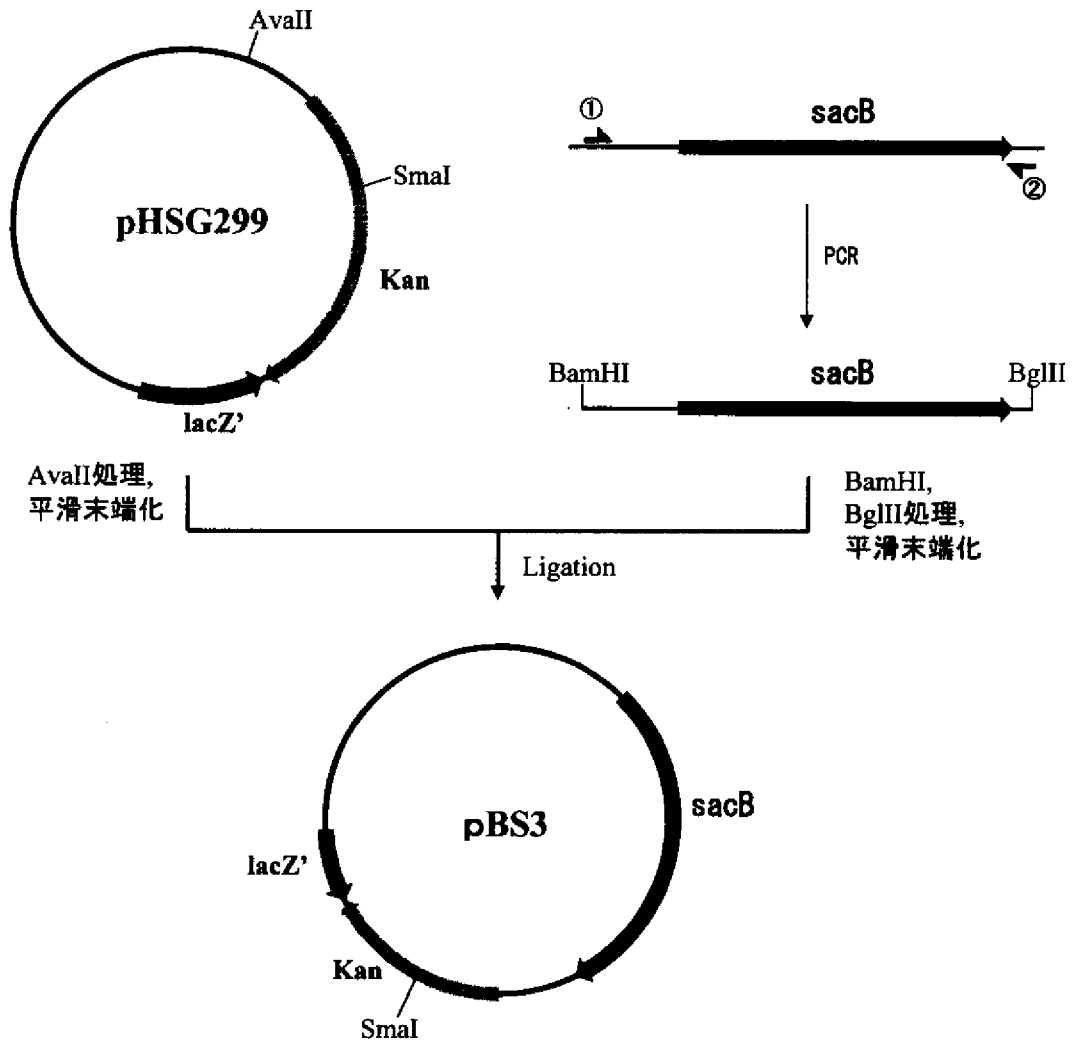
### 産業上の利用の可能性

[0061] 本発明の製造方法によれば、迅速かつ高効率でコハク酸を製造することができる。得られたコハク酸は食品添加物や医薬品、化粧品等に用いることができる。また、得られたコハク酸を原料として重合反応を行うことによりコハク酸含有ポリマーを製造することもできる。

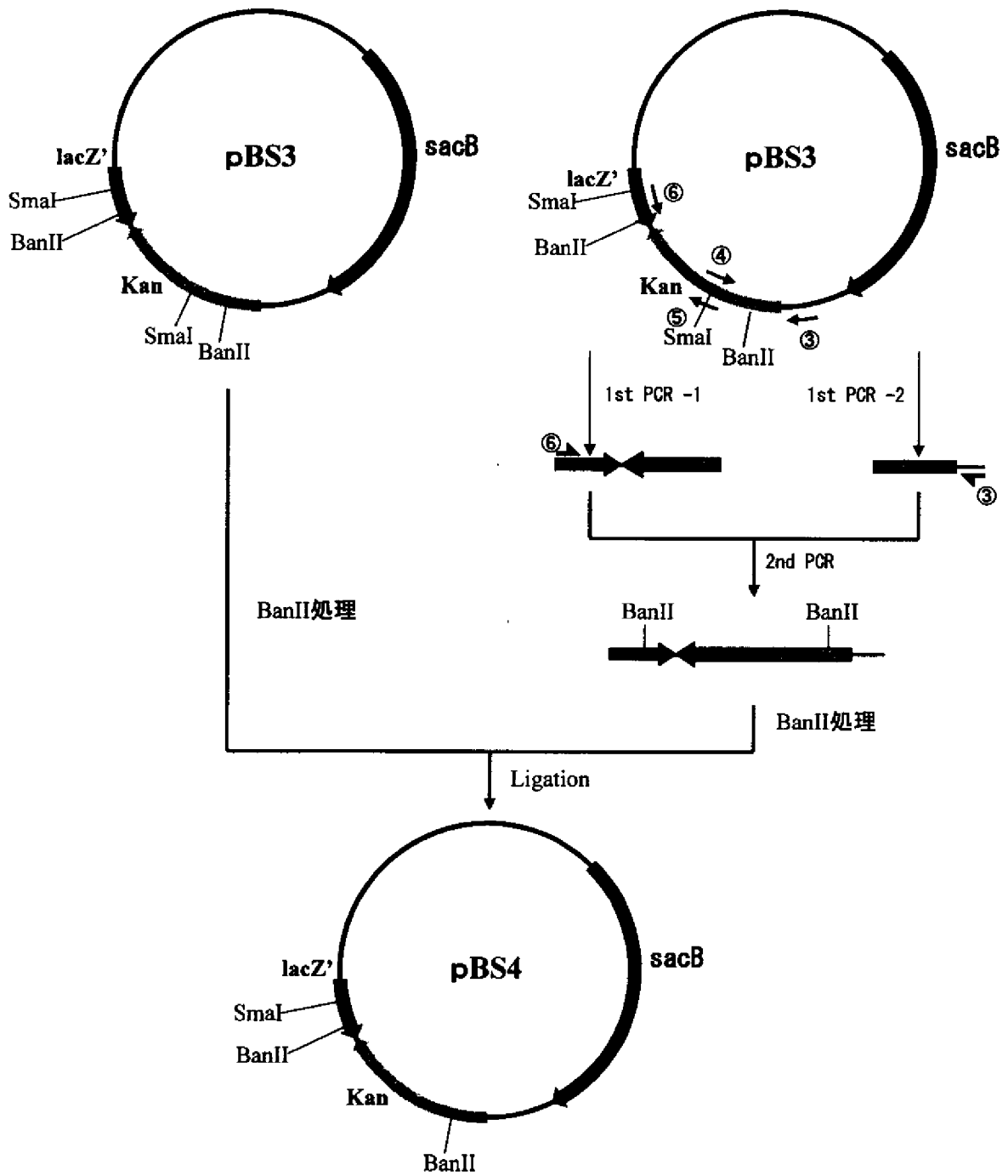
## 請求の範囲

- [1] sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させることによってコハク酸を生成させ、該コハク酸を採取することを特徴とするコハク酸の製造方法。
- [2] 前記細菌が、コリネ型細菌、バチルス属細菌、又はリゾビウム属細菌からなる群より選ばれるいずれかの細菌である、請求項1に記載の方法。
- [3] 前記細菌が、sucE1遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変することにより該遺伝子の発現が増強するように改変された細菌である請求項1又は2に記載の製造方法。
- [4] 前記sucE1遺伝子が(a)又は(b)に示すDNAである請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法：  
(a)配列番号15の塩基番号571～2187の塩基配列を含むDNA、  
(b)配列番号15の塩基番号571～2187の相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させるDNA。
- [5] 前記細菌が、さらに、ラクテートデヒドロゲナーゼ活性が、非改変株に比べて10%以下に低減化するように改変された細菌である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [6] 前記細菌が、さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変された細菌である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の方法によりコハク酸を製造する工程、及び得られたコハク酸を重合させる工程を含む、コハク酸含有ポリマーの製造方法。

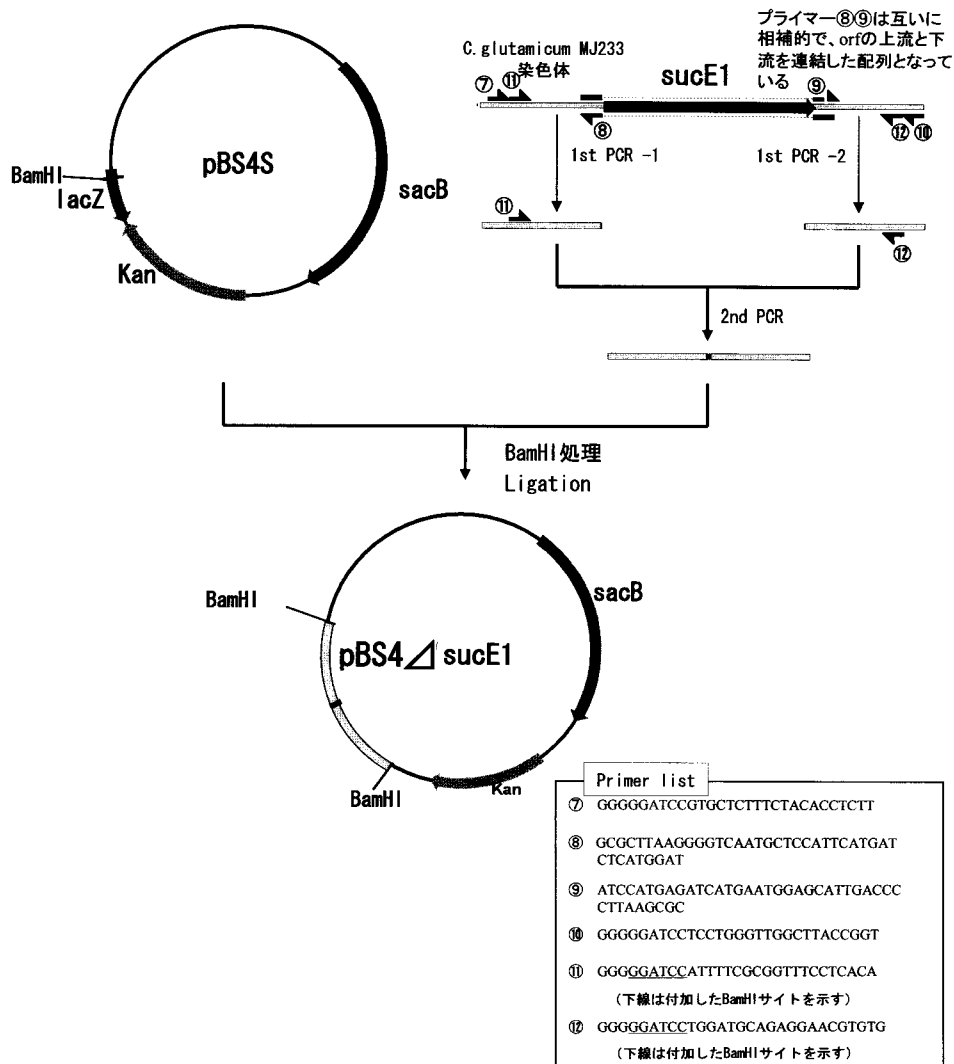
[图1]



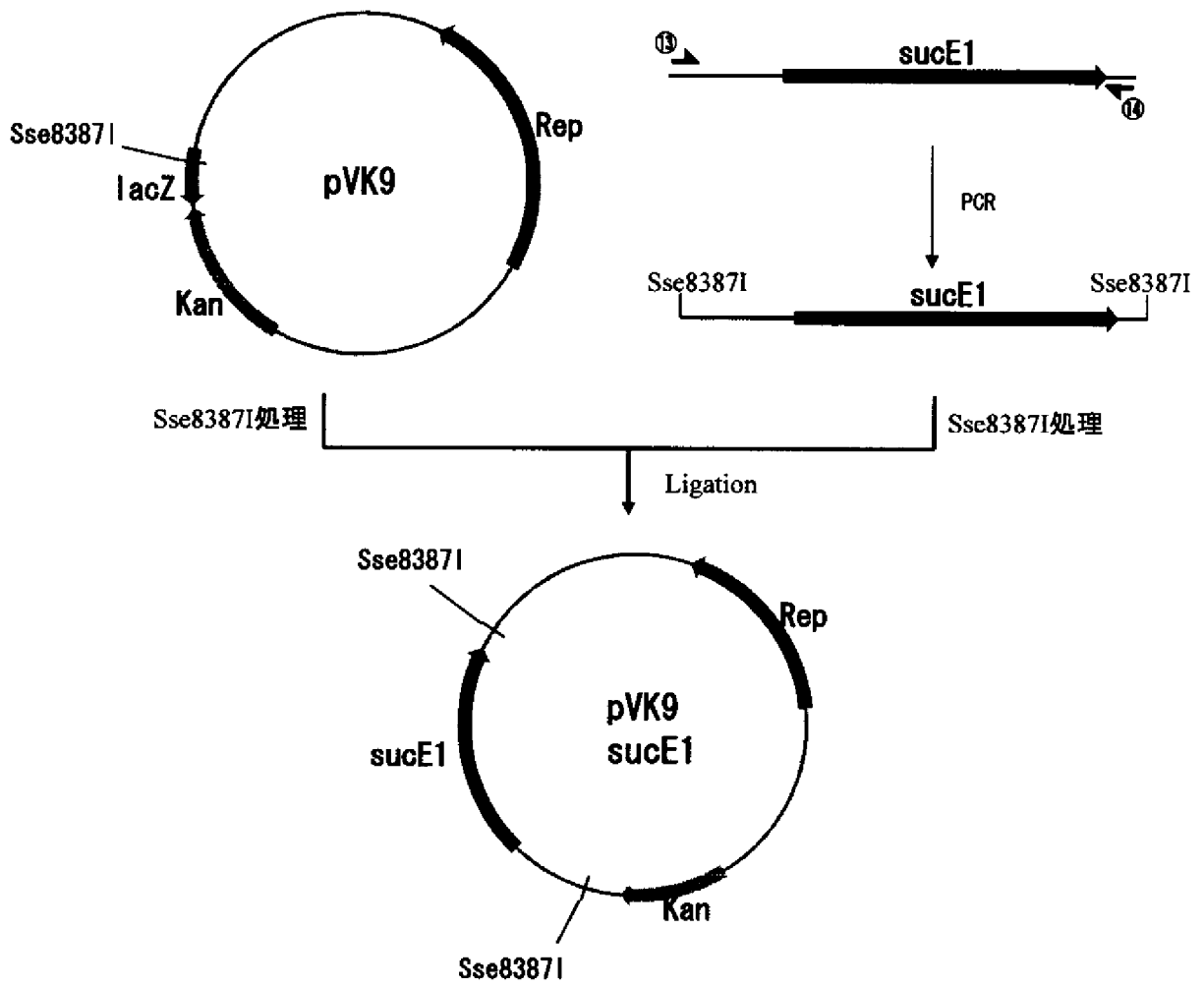
[図2]



[図3]



[図4]





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/320675

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
*C12P7/40*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12R1/07*(2006.01)n, *C12R1/15*  
 (2006.01)n, *C12R1/41*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
*C12P7/40*, *C12N15/09*, *C12R1/07*, *C12R1/15*, *C12R1/41*

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq,  
 JSTPlus (JDream2)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2003-517291 A (BASF AG.),<br>27 May, 2003 (27.05.03),<br>Full text<br>& WO 01/00844 A3                                                                                                | 1-7                   |
| A         | Ikeda M. et al., The <i>Corynebacterium glutamicum</i><br>genome: features and impacts on biotechnological<br>processes, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003,<br>Vol.62, No.2-3, p.99-109 | 1-7                   |
| A         | WO 2005/010182 A1 (Research Institute of<br>Innovative Technology for the Earth),<br>03 February, 2005 (03.02.05),<br>Full text<br>& EP 1647594 A1                                       | 1-7                   |

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                           |                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>22 December, 2006 (22.12.06) | Date of mailing of the international search report<br>09 January, 2007 (09.01.07) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                |                    |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No.                                                  | Telephone No.      |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/320675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 2005/026349 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.),<br>24 March, 2005 (24.03.05),<br>Full text<br>& EP 1672067 A1                                                                                                                         | 1-7                   |
| A         | JP 2002-511250 A (The University of Georgia<br>Research Foundation, Inc.),<br>16 April, 2002 (16.04.02),<br>Full text<br>& WO 99/53035 A                      & EP 1073722 A1                                                        | 1-7                   |
| A         | JP 11-196888 A (Mitsubishi Chemical Corp.),<br>27 July, 1999 (27.07.99),<br>Full text<br>(Family: none)                                                                                                                              | 1-7                   |
| A         | JP 2005-027533 A (Mitsubishi Chemical Corp.),<br>03 February, 2005 (03.02.05),<br>Full text<br>& WO 2005/005649 A1                      & US 2006/172401 A1                                                                          | 1-7                   |
| A         | Kalinowski J. et al., The complete<br>Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 genome<br>sequence and its impact on the production of<br>L-aspartate-derived amino acids and vitamins,<br>J. Biotechnol., 2003, Vol.104, No.1-3, p.5-25 | 1-7                   |
| E,A       | JP 2006-320278 A (Research Institute of<br>Innovative Technology for the Earth),<br>30 November, 2006 (30.11.06),<br>Full text<br>(Family: none)                                                                                     | 1-7                   |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P7/40(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12R1/07(2006.01)n, C12R1/15(2006.01)n, C12R1/41(2006.01)n

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P7/40, C12N15/09, C12R1/07, C12R1/15, C12R1/41

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JDream2)

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                |                  |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                              | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A               | JP 2003-517291 A (ビーエーエスエフ アクチェンゲゼルシャフト)<br>2003.05.27, 全文<br>& WO 01/00844 A3                                                                                                 | 1-7              |
| A               | Ikeda M. et al., The Corynebacterium glutamicum genome: features<br>and impacts on biotechnological processes, Appl. Microbiol.<br>Biotechnol., 2003, Vol.62, No.2-3, p.99-109 | 1-7              |

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

|                                                               |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| * 引用文献のカテゴリー                                                  | の日の後に公表された文献                                                       |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」同一パテントファミリー文献                                                   |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                    |

|                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| 国際調査を完了した日<br>22.12.2006 | 国際調査報告の発送日<br>09.01.2007 |
|--------------------------|--------------------------|

|                                                                         |                                                        |    |      |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----|------|
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>松田 芳子<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4N | 3126 |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----|------|

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                          |                  |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                        | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | WO 2005/010182 A1 (財団法人地球環境産業技術研究機構)<br>2005.02.03, 全文<br>& EP 1647594 A1                                                                                                                                                                | 1-7              |
| A                     | WO 2005/026349 A1 (三菱化学株式会社) 2005.03.24, 全文<br>& EP 1672067 A1                                                                                                                                                                           | 1-7              |
| A                     | JP 2002-511250 A (ザ ユニバーシティ オブ ジョージア リサ<br>ーチファウンデーション, インコーポレイテッド) 2002.04.16,<br>全文<br>& WO 99/53035 A<br>& EP 1073722 A1                                                                                                              | 1-7              |
| A                     | JP 11-196888 A (三菱化学株式会社) 1999.07.27, 全文<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                                                                    | 1-7              |
| A                     | JP 2005-027533 A (三菱化学株式会社) 2005.02.03, 全文<br>& WO 2005/005649 A1<br>& US 2006/172401 A1                                                                                                                                                 | 1-7              |
| A                     | Kalinowski J. et al., The complete <i>Corynebacterium glutamicum</i><br>ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of<br>L-aspartate-derived amino acids and vitamins, J. Biotechnol.,<br>2003, Vol.104, No.1-3, p.5-25 | 1-7              |
| E A                   | JP 2006-320278 A (財団法人地球環境産業技術研究機構) 2006.11.30,<br>全文 (ファミリーなし)                                                                                                                                                                          | 1-7              |