

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

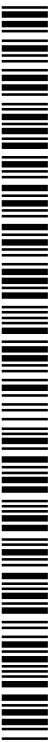


(43) 国際公開日  
2009年12月23日(23.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/154122 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/46 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01) C12P 7/54 (2006.01)  
C12P 7/06 (2006.01) C12P 7/56 (2006.01)  
C12P 7/18 (2006.01) C12P 13/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/060637
- (22) 国際出願日: 2009年6月10日(10.06.2009)
- (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 2008-157409 2008年6月17日(17.06.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人地球環境産業技術研究機構(RESEARCH INSTITUTE OF INNOVATIVE TECHNOLOGY FOR THE EARTH) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 湯川 英明 (YUKAWA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP). 乾 将行 (INUI, Masayuki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍(IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階 Osaka (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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(条約第21条(3))  
— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2009/154122 A1

(54) Title: CORYNEFORM BACTERIUM TRANSFORMANT HAVING IMPROVED D-XYLOSE-UTILIZING FUNCTION

(54) 発明の名称: D-キシロース利用機能が向上したコリネ型細菌形質転換体

(57) Abstract: Disclosed is a coryneform bacterium transformant characterized in that the coryneform bacterium transformant is produced by introducing a foreign gene encoding a protein having a sugar transporter function into a coryneform bacterium capable of utilizing D-xylose.

(57) 要約: シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に導入したことを特徴とする、コリネ型細菌形質転換体。

## 明 細 書

発明の名称：

**D-キシロース利用機能が向上したコリネ型細菌形質転換体**

### 技術分野

[0001] 本発明はD-キシロース利用技術に関する。さらに詳しくは、D-キシロース利用機能を向上するために特定の遺伝子操作が施されたコリネ型細菌形質転換体及びそれによる高効率的な有機化合物の製造技術に関する。

### 背景技術

[0002] セルロース系バイオマスは、生物的方法による各種の有機酸化合物、エタノール等の製造原料として有用である。セルロース系バイオマスは、コーンデンプン、砂糖などの糖質系バイオマスと異なり、安価に、農産廃棄物又は木質廃棄物として多種多様に入手可能であり、将来的にも、食糧資源確保の為の障害とはならない原料種であるからである。セルロース系バイオマスは、およそ、35質量%～45質量%のセルロース、30質量%～40質量%のヘミセルロース、10質量%のリグニンそして10質量%の他の成分から成っている。セルロースはグルコース（ヘキソース）のポリマーである。一方、ヘミセルロースでは、ペントースであるキシロース、アラビノース等が主要な構成成分である。

[0003] コーンストバー（Corn stover）、小麦わら（Wheat straw）、稲わら（Rice straw）、バガス（Bagasse）等のセルロース系バイオマスのヘミセルロース中ではD-キシロースがその大部分を占める。従って、セルロース系バイオマスの有効利用を図る上で、生物的方法による高効率なD-キシロース利用技術の確立が不可欠となっている。

[0004] セルロース系バイオマスの利用技術においては、まず、これらの原料をヘキソース、ペントース等の単糖類に糖化分解することが必要であるが、プロセス設計上、有機化合物産生培地にはこれら単糖類が共存することになる。通常、このような場合、ヘキソースによるペントースの所謂“グルコース抑

制”が起こり、ヘキソース及びペントースを並行的かつ同時に利用できなくなり（プロセス設計及び運転制御が複雑となる要因）、ペントース成分を含むセルロース系バイオマスの効率的な工業化利用技術確立の妨げとなっている。この点に関しても改良が望まれている。

[0005] ヘキソースであるグルコースを利用し、各種の有機化合物を発酵生産する多くの微生物はよく知られているところであるが、ペントースであるD-キシロースを利用し、エタノール等を産生することのできる微生物も幾つか知られている。

[0006] 特許文献1及び非特許文献1では、野生型ではD-キシロースを利用することができないサッカロミセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に、ピキア スティピティス (*Pichia stipitis*) 由来のキシロース レダクターゼ遺伝子及びキシリトール デヒドロゲナーゼ遺伝子、並びにサッカロミセス セレビシアエ由来のキシロキナーゼ遺伝子の3つの遺伝子をプラスミドにより導入するD-キシロース利用機能付与技術、及び得られる形質転換体サッカロミセス セレビシアエによるD-キシロース利用技術が開示されている。しかし、この形質転換体サッカロミセス セレビシアエはD-キシロースの利用速度が未だ不十分であり、且つ、D-グルコース及びD-キシロースの両糖の存在下では、D-キシロース利用に対してグルコース抑制（D-グルコース存在下では、D-キシロース利用能が非常に遅い）が観察されており、高効率なD-キシロース利用技術は未確立である。従って、これらの点に関する改良が望まれている。

[0007] 非特許文献2では、同じく、サッカロミセス セレビシアエを用いる技術として、カビであるピロマイセス スピージーズ (*Piromyces* sp.) 由来のキシロース イソメラーゼ遺伝子を発現するのに加えて、サッカロミセス セレビシアエ由来のキシロキナーゼ遺伝子、リブロース 5-ホスフェート イソメラーゼ遺伝子、リブロース 5-ホスフェート エミペラーゼ遺伝子、トランスケトララーゼ遺伝子、及びトランスアルドラーゼ遺伝子を高発現する、アルドース レダクターゼ遺伝子が破壊された形質転換体サッカロミセス

セレビシアエを作製し、さらに、この形質転換体を用いて嫌気キシロース制限ケモスタット (anaerobic, xylose-limited chimostat) と、続いて嫌気自動連続回分培養 (anaerobic automated sequencing-batch reactor) とを行なうことにより、D-キシロース取り込み及び資化速度が向上した変異株を単離する技術、及びこの株を用いたD-キシロース利用技術が開示されている。この技術では、上記の特許文献1及び非特許文献1の技術と比較して、D-キシロース利用速度は改善されたが十分とはいえず、さらに未だにD-グルコース及びD-キシロースの両糖の存在下では、D-キシロース利用に対してグルコース抑制が観察されている。従って、これらの点に関する改良が望まれている。

[0008] 特許文献2では、野生型ではD-キシロースを利用することができないザイモモナス モビリス (*Zymomonas mobilis*) に、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) 由来のキシロース イソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子及びトランスアルドラーゼ遺伝子の4つの遺伝子をプラスミドにより導入し、発現することにより得られる形質転換体ザイモモナス モビリスを用いるD-キシロース利用技術が開示されている。

また、特許文献3では、同様に、ザイモモナス モビリスに、エシェリヒア コリ由来のキシロース イソメラーゼ遺伝子、キシロキナーゼ遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子及びトランスアルドラーゼ遺伝子の4つの遺伝子を染色体に導入し、発現することにより得られる、導入した遺伝子がより安定な形質転換体ザイモモナス モビリスによるD-キシロース利用技術が開示されている。これらの公知技術においては、ヘキソースに対するペントースの同時利用性はある程度達成されてはいるものの、D-キシロースの消費速度 (利用速度) はD-グルコースの消費速度に比し、不十分であり、実用的な意味でのヘキソース及びペントース同時利用性技術としては更なる改良が求められている。

[0009] エシェリヒア コリの野生株ではD-キシロース等のペントースも利用で

きるが、D-グルコース及びD-キシロースの両糖の存在下では、D-キシロース利用に対して上記のグルコース抑制がかかることが知られている。非特許文献3と非特許文献4では、グルコース取り込みに関わるptsG (glucose phosphotransferase system (PTS) transport) 遺伝子を破壊することにより、D-グルコース及びD-キシロースの同時利用性を有する微生物が得られることが報告されている。しかしながら、エシェリヒア コリはプロセス運転条件の変動により、溶菌作用が起こり易いことも指摘されており、プロセス運転上の問題点がある。また、エシェリヒア コリを用いてエタノールを生産する場合、サッカロミセス セレビシアエ及びザイモモナス モビリスと比較して、エタノール耐性が低いことから、最終エタノール濃度が低いことが課題である（発酵液からのエタノール濃縮及び精製に多大のエネルギーを要する）。

[0010] コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) 及びその組換え株は、還元条件下の糖類からの有機酸等の有機化合物へのバイオ変換反応において、増殖することなく、有機化合物の生産が行えるので、糖類の有効利用上、有用な微生物である（特許文献4）。また、増殖の為に反応器容積を必要としないので、コンパクトな反応装置設計が可能である。本発明者等は、ザイモモナス モビリス由来のピルベート デカルボキシラーゼ遺伝子及びアルコール デヒドロゲナーゼ遺伝子をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) に導入し、導入遺伝子を発現させた形質転換体により、高効率にエタノールが生産される技術を開示している（非特許文献5）。

[0011] さらに、増殖を伴い物質生産を行う、例えばサッカロミセス セレビシアエ、ザイモモナス モビリス、エシェリヒア コリなどを用いた発酵法では、セルロース系バイオマス由来の原料糖類を得る為に必要な前処理工程において生成するフェノール類、フラン類、有機酸などの所謂“発酵阻害物質”（増殖阻害物質）による生産阻害を受けることが大きな課題となっている。コリネバクテリウム グルタミカムを用いる技術は、増殖を伴わずに有機

酸等の有機化合物へのバイオ変換反応が可能であることから、所謂“発酵阻害物質”（増殖阻害物質）による生産阻害を受けない利点を有することが明らかになっている（非特許文献6）。

[0012] しかしながら、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) の野生株は様々な利点を有するバイオ変換反応を可能とする能力を有するものの、本来の特性として、D-キシロース等のペントースを利用することができない。発明者らは、この点に関して、コリネバクテリウム グルタミカムに、エシェリヒア コリ由来のキシロース イソメラーゼ遺伝子及びキシロキナーゼ遺伝子を導入し、発現させることで、D-キシロースの利用能を付与する技術を開示している（非特許文献7）。

[0013] しかしながら、このD-キシロース利用能を有するコリネバクテリウム グルタミカム組換え株においても、D-グルコース利用速度と比較して、D-キシロース利用速度は充分とは云えず、さらなるD-キシロース利用速度の向上が求められていた。

[0014] 一方、発明者らは、セルロース系バイオマス原料に含まれているペントースの一つであるL-アラビノースの効率的な利用能をコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) に付与する技術を提案している（特許文献5）。

[0015] 特許文献5の技術においては、具体的には、L-アラビノース利用能を有さないコリネバクテリウム グルタミカムR (FERM P-18976)株に、エシェリヒア コリ由来のアラビノースイソメラーゼ遺伝子、リブロキナーゼ遺伝子、及びリブロース-5-ホスフェート4-エピメラーゼ遺伝子を導入して発現させたコリネバクテリウム グルタミカム形質転換体に、さらに、コリネバクテリウム グルタミカムATCC31831由来のL-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子を導入する。これにより創製された新たな形質転換体は、L-アラビノース利用速度を大幅に向上出来ると共に、D-グルコース及びL-アラビノースの両糖の存在下での、L-アラビノース利用に対するグルコース抑制が完全に解除され、D-グルコース及びL-アラビノース

を完全同時利用できるものである。

しかしながら、上述したように、D-グルコース及びD-キシロースの両糖の存在下でのD-キシロース利用に対するグルコース抑制が完全に解除され、D-キシロース及びD-グルコースを並行的かつ同時に効率よく利用できるコリネバクテリウム形質転換体は、未だ開発されていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0016] 特許文献1 : US patent 5, 789, 210  
特許文献2 : WO 0238740  
特許文献3 : US patent 7, 354, 755  
特許文献4 : PCT 公開公報 W001/96573 A1  
特許文献5 : 特願2007-222439 (特開2009-50236号公報)

#### 非特許文献

- [0017] 非特許文献1 : Applied and Environmental Microbiology、Vol. 64、1852-1859 (1998).  
非特許文献2 : FEMS Yeast Research、Vol. 5、925-934 (2005).  
非特許文献3 : Applied Microbiology and Biotchnology、Vol. 56、120-125 (2001).  
非特許文献4 : Applied Microbiology and Biotchnology、Vol. 57、186-191 (2001).  
非特許文献5 : Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology、Vol. 8、243-254. (2004).  
非特許文献6 : Applied and Environmental Microbiology、Vol. 73、2349-2353 (2007).  
非特許文献7 : Applied and Environmental Microbiology、Vol. 72、3418-3428 (2006).

#### 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

- [0018] 本発明は、セルロース系バイオマス資源の有効利用を図る上で必要なD-キシロースの利用機能が向上した組換え微生物、及び該微生物を用いる有機化合物の製造方法を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

- [0019] 前記の課題を解決すべく、本発明者は研究を重ね、コリネ型細菌に特定の外来遺伝子、すなわちシュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を導入することにより、創製される形質転換体がD-キシロースから有機化合物を効率よく生産することを見出した。

具体的には、上述したD-キシロースの利用能を付与したコリネバクテリウム グルタミカムに、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831由来のL-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子を導入したところ、思いもかけず、基質特異性が発現することもなく、D-キシロース利用速度が大幅に向上すると共に、D-グルコース及びD-キシロースの両糖の存在下での、D-キシロース利用に対するグルコース抑制が完全に解除され、D-グルコース及びD-キシロースの並行的かつ同時利用が可能となることを見出した。

- [0020] なお、本明細書中、コリネ型細菌形質転換体が「D-キシロース及びD-グルコース（又はD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノース）を並行的かつ同時利用することができる」、又は「同時利用性（能）を有する」とは、D-キシロース及びD-グルコース（又はD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノース）の混合糖を炭素源とする培地中で該形質転換体を用いて有機化合物を生成させた場合に、該形質転換体がほぼ同等の消費速度でもって、これら炭素源を並行的にかつ同時に利用できることを意味する。

- [0021] 本発明は、上記知見に基づき完成されたものであり、以下の微生物及び有機化合物の製造方法を提供する。本発明の組換え微生物は、優れたD-グルコース及びD-キシロースの同時利用性能を有しているので、セルロース系



バイオマス原料からの有用な有機化合物の生産プロセス設計及び運転が容易な技術を提供することに繋がる技術となるものである。

[0022] (1) シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に導入したことを特徴とする、コリネ型細菌形質転換体。

(2) シュガートランスポーター機能を有するタンパク質が、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーターである上記(1)記載のコリネ型細菌形質転換体。

(3) シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、配列番号13で示される塩基配列からなるDNA、又は配列番号13で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつシュガートランスポーター機能を有するポリペプチドをコードするDNAを用いる上記(1)又は(2)記載のコリネ型細菌形質転換体。

(4) D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、セロビオース利用性組換え株もしくは変異株であるFERM P-18979、FERM P-18977及びFERM P-18978、コハク酸生産組換え株であるFERM P-19446及びFERM P-19477、並びにエタノール生産組換え株であるFERM P-17887、FERM P-17888、FERM P-19361及びFERM P-19362からなる群より選択されるいずれか1種の菌株のコリネ型細菌であって、かつD-キシロース利用能が付与されているものであることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体。

(5) シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、バチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチラス リチェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチラス コアグランス (*Bacillus coagulans*)、

ラクトバチルス サケイ (*Lactobacillus sakei*)、ペディオコッカス ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、ラクトバチルス レウテリ (*Lactobacillus reuteri*)、オーシャノバチルス イヘエニス (*Oceanobacillus iheyensis*)、ラクトコッカス ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ラクトバチルス プランタリウム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ロイコノストック シテリウム (*Leuconostoc citreum*)、エンテロコッカス フェシウム (*Enterococcus faecium*)、クレブシエラ オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、及びサルモネラ ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) からなる群より選ばれる微生物由来の *araE* 遺伝子を用いる上記 (1) 又は (2) に記載のコリネ型細菌形質転換体。

(6) D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用することができる上記 (1) ~ (5) のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体。

(7) D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを並行的かつ同時利用することができる上記 (6) 記載のコリネ型細菌形質転換体。

(8) コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-*araE*/pCRA811 (受託番号 N I T E B P - 5 7 6) である上記 (1) 記載のコリネ型細菌形質転換体。

(9) コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-*araE*/Plac-*araBAD* (受託番号 N I T E B P - 5 7 7) である上記 (1) 記載のコリネ型細菌形質転換体。

(10) コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-*araE*- $\Delta$ Idh/pEthAra (受託番号 N I T E B P - 5 8 1) である上記 (1) 記載のコリネ型細菌形質転換体。

(11) D-キシロースを含有する培地中で上記 (1) ~ (10) のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体を用いて有機化合物を生成させる

工程と、同培地より有機化合物を回収する工程とを含む有機化合物の製造方法。

(12) 有機化合物が、エタノール、乳酸、コハク酸、キシリトール、酢酸及びアミノ酸からなる群より選ばれる1種以上であることを特徴とする上記(11)記載の有機化合物の製造方法。

### 発明の効果

[0023] 本発明により、D-キシロースの効率的な利用が可能となり、また、D-グルコースとD-キシロースとを並行的に同時に、かつ、同等の利用速度でもって利用できるため、セルロース系バイオマス資源の有用な有機化合物への有効利用を効率的な合理的プロセスにより実現することができる。

### 図面の簡単な説明

[0024] [図1] 図1は、実施例1、(1)項において作製したベクターpCRA811を示す模式図である。

[図2] 図2は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831におけるara gene mapを示す図である。

[図3] 図3は、実施例1、(3)項において作製したベクターInd11-araEの作製方法を示す図である。

[図4] 図4は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811 (図4(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811 (図4(2)) それぞれによる、好気条件下、単一炭素源としてD-キシロースを含有するBT培地における培養時の、D-キシロース消費及び増殖の経時変化を示す図である。

[図5] 図5は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811 (図5(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811 (図5(2)) それぞれによる、還元条件下、D-キシロース単一基質におけるD-キシロース消費及び乳酸生成の経時変化を示す図である。

[図6] 図6は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutami*

cum) R/pCRA811 (図6(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 (図6(2)) それぞれによる、好気条件下、炭素源としてD-グルコース及びD-キシロースを含有するBT培地における培養時の、D-グルコース及びD-キシロース消費、並びに増殖の経時変化を示す図である。

[図7] 図7は、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811 (図7(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 (図7(2)) それぞれによる、還元条件下、D-グルコース及びD-キシロースの含有比率2対1の混合糖におけるD-グルコース及びD-キシロース消費、並びに乳酸生成の経時変化を示す図である。

[図8] 図8は、実施例6、(1)項において作製したベクターPlac-araBADを示す模式図である。

[図9] 図9(1)及び(2)は、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5/Plac-araBAD (図9(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBAD (図9(2)) それぞれによる、還元条件下、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの含有比率5:2.5:1の混合糖における糖消費、並びに乳酸生成の経時変化を示す図である。

[図10] 図10は、実施例9において作製したベクターpEthAraを示す模式図である。

[図11] 図11は、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraによるD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの含有比率5:2.5:1の混合糖における糖消費及びエタノール生成の経時変化を示す図である。

### 発明を実施するための形態

#### [0025] (I) D-キシロース利用機能が向上したコリネ型細菌形質転換体

本発明のコリネ型細菌形質転換体は、シュガートランスポーター機能を有

するタンパク質をコードする外来性遺伝子を、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に導入したものである。

D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に、シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を導入することにより、該コリネ型細菌のD-キシロース利用能が顕著に向上する。このため、コリネ型細菌形質転換体はD-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用することができるものとなる。

[0026] 本発明でシュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を導入する、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌は、D-キシロース利用能が付与されているコリネ型細菌であれば特に限定されるものではない。コリネ型細菌の野生株は、D-キシロース等のペントースを利用することができない。コリネ型細菌にD-キシロース利用能を付与する方法としては特に限定されず、例えば、該コリネ型細菌に他の生物種由来のD-キシロース代謝関連遺伝子を導入する方法が挙げられる。

[0027] 原核生物及び一部のカビにおけるD-キシロースからD-キシロース-5-ホスフェートへの代謝は、具体的には、(a) D-キシロースからD-キシロースへの反応を触媒するキシロース イソメラーゼ（以下、酵素を「X y | A」、遺伝子を「x y | A」ともいう）、及び(b) D-キシロースからD-キシロース-5-ホスフェートへの反応を触媒するキシロキナーゼ（以下、酵素を「X y | B」、遺伝子を「x y | B」ともいう）の2つの酵素に触媒された2ステップの反応により行われる。本発明では該代謝系を用いることができる。これらの酵素をコードする上記(a)及び(b)の遺伝子をコリネ型細菌に導入することによりコリネ型細菌にD-キシロース利用能が付与されるが、該遺伝子がコードしているポリペプチドがD-キシロース代謝機能を有する限り、(a)及び(b)の遺伝子の由来微生物の種類、組み合わせ、及び導入の順番等は特に限定されない。

[0028] 例えば、発明者らは既に、コリネ型細菌に、D-キシロース代謝関連遺伝子として、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) 由来のキシロース イソ

メラーゼ遺伝子 (x y | A)、及びキシロキナーゼ遺伝子 (x y | B) を導入し、発現させることで、D-キシロースの利用能を付与する技術を開示している (Appl. Environ. Microbiol. Vol. 72, 3418-3428 (2006))。本発明においては、このような技術により作製されるD-キシロース利用能が付与されたコリネ型細菌を用いることができる。また、例えばD-キシロース利用能を付与する方法としては、上記のエシェリヒア コリ (Escherichia coli) 以外の生物種由来遺伝子を導入した形質転換体であってもよい。

[0029] 上記 (a) 及び (b) のD-キシロース代謝関連酵素をコードする遺伝子は、同じ遺伝子座上に存在していてもよく、又は、これら2つの遺伝子がそれぞれ別の遺伝子座上に存在していてもよい。2つの遺伝子が同じ遺伝子座上に存在している例としては、例えば、上記 (a) 及び (b) の遺伝子が連結して形成されたオペロンなどが挙げられる。

[0030] 上記 (a) 及び (b) の遺伝子は、通常、D-キシロースの代謝能を有する微生物に保有されている。本発明における (a) 及び (b) の遺伝子としては、エシェリヒア コリ (Escherichia coli)、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) (x y | B 遺伝子のみ保有)、バチラス サブチリス (Bacillus subtilis)、サルモネラ ティフィムリウム (Salmonella typhimurium)、バチラス ハロデュランス (Bacillus halodurans)、シノリゾビウム メリロツティ (Sinorhizobium meliloti)、及びアグロバクテリウム ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) からなる群より選ばれる同一又は異なる微生物由来の x y | A 遺伝子、及び x y | B 遺伝子を用いることが好ましい。

中でも本発明では、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) に由来する x y | A 遺伝子、及び x y | B 遺伝子の使用が最も好ましい。

[0031] D-キシロース代謝関連酵素をコードする遺伝子は、上記 (a) 及び (b) の遺伝子を含むDNA断片の塩基配列が既知であれば、その配列に従って合成したDNA断片を使用することができる。DNA配列が不明の場合であっても、D-キシロース代謝関連酵素タンパク質間で保存されているアミノ

酸配列をもとにハイブリダイゼーション法、PCR法により断片を取得することが可能である。さらに他の既知のD-キシロース代謝関連遺伝子配列を基に設計したミックスプライマーを用い、ディジェネレートPCRによって断片を取得することが可能である。

- [0032] D-キシロース代謝関連酵素をコードする遺伝子は、該遺伝子がコードしているポリペプチドのD-キシロース代謝活性が保持されている限り、塩基配列の一部が他の塩基に置換されていてもよく、削除されていてもよく、また新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されていてもよい。これらのD-キシロース代謝関連酵素をコードする遺伝子の誘導体のいずれも本発明に用いることができる。上記の塩基配列の一部とは、例えばアミノ酸残基換算で1乃至数个（通常1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個）であってよい。
- [0033] D-キシロース代謝関連酵素をコードする遺伝子の塩基配列は、原核生物由来、すなわち原核生物中に天然に存在するD-キシロース代謝関連酵素と同じアミノ酸配列を持つD-キシロース代謝関連酵素をコードしていることが好ましい。真核生物由来のD-キシロース代謝関連酵素に比べ、原核生物由来のD-キシロース代謝関連酵素の発現は、細菌においてD-キシロース代謝関連酵素が活性形態で発現する可能性を高める。
- [0034] 宿主となるコリネ型細菌としては、糖類の代謝変換機能を有しているものであればよく、特に限定されない。糖類の種類や目的有機化合物の種類によっては、コリネ型細菌が本来有していない糖類の取り込み、代謝経路又は目的有機化合物への変換経路等の新たな機能の導入を必要とする場合があるが、そのような場合には組換え技術や突然変異誘発処理等によりそれらの機能を付与すればよい。
- [0035] 本発明で用いられるコリネ型細菌とは、バーギーズ・マニュアル・デターミネイティブ・バクテリオロジー [Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 8, 599 (1974)] に定義されている一群の微生物であり、通常の好氣的条件で増殖するものならば特に限定されるものではない。具体例

を挙げれば、コリネバクテリウム属菌、ブレヴィバクテリウム属菌、アースロバクター属菌、マイコバクテリウム属菌又はマイクロコッカス属菌等が挙げられる。

[0036] さらに具体的には、コリネバクテリウム属菌としては、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、ATCC 13032、ATCC13058、ATCC13059、ATCC13060、ATCC13232、ATCC13286、ATCC13287、ATCC13655、ATCC13745、ATCC13746、ATCC13761、ATCC14020又はATCC31831等が挙げられる。

[0037] ブレヴィバクテリウム属菌としては、ブレヴィバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、ブレヴィバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) もしくはMJ-233 AB-41 (FERM BP-1498)、又はブレヴィバクテリウム アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6872等が挙げられる。

[0038] アースロバクター属菌としては、アースロバクター グロビフォルミス (*Aerthrobacter globiformis*) ATCC8010、ATCC4336、ATCC21056、ATCC31250、ATCC31738又はATCC35698等が挙げられる。

[0039] マイコバクテリウム属菌としては、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*) ATCC19210又はATCC27289等が挙げられる。

マイクロコッカス属菌としては、マイクロコッカス フロイデンライヒ (*Micrococcus freudenreichii*) NO. 239 (FERM P-13221)、マイクロコッカス ルテウス (*Micrococcus leuteus*) NO. 240 (FERM P-13222)、マイクロコッカス ウレアエ (*Micrococcus ureae*) IAM1010又はマイクロコッカス ロゼウス (*Micrococcus roseus*) IF03764等が挙げられる。

[0040] 好ましくは、細胞の中へ能動的に又は受動的にD-キシロースを輸送できるコリネ型細菌であることである。また、形質転換されるコリネ型細菌は、正常に機能する解糖経路とペントースリン酸経路とを有していることが好ましい。さらには、ピルビン酸から目的とする発酵産物、例えばコハク酸、酢酸又は乳酸に変換するための酵素を含有することが好ましい。さらに用いる



コリネ型細菌は、エタノール；乳酸、酢酸、ギ酸等のような有機酸；フルフラール、ヒドロキシメチルフルフラールのような糖分解産物に対して高い耐性を持っていることが好ましい。このような点から、本発明で用いられるコリネ型細菌としては、コリネバクテリウム グルタミカムR (FERM P-18976、特願2002-252190 (特開2004-089029号公報)) 又は、コリネバクテリウム グルタミカムATCC31831等が好ましい。

[0041] また、これらコリネ型細菌は自然界に存在する野生株の変異株 (例えば、セロビオース利用性変異株：FERM P-18977、FERM P-18978) (特願2002-252190 (特開2004-089029号公報)) 又は人為的な遺伝子組換え株等であってもよい。人為的な遺伝子組換え株としては、例えば、エタノール生産組換え株として、FERM P-17887 (FERM BP-7621)、FERM P-17888 (FERM BP-7622) (PCT/JPO1/04935 (国際公開WO01/096573)) 及びJ. Mol. Microbiol. Biotechnol., Vol8, 243-254 (2004) 記載株、すなわち日本国特許第42943735号に記載のFERM P-19361及びFERM P-19362等；セロビオース利用組換え株として、FERM P-18979 (特願2002-252190 (特開2004-089029号公報)) 等；コハク酸生産組換え株として、FERM P-19446 (すなわちFERM BP-10060) 及びFERM P-19477 (すなわちFERM BP-10061) (FERM P-19446及びFERM P-19477はそれぞれ、WO2005/010182A1に記載されているFERM BP-10060及びFERM BP-10061と同じ菌株である) 等が挙げられる。J. Mol. Microbiol. Biotechnol., Vol8, 243-254 (2004) 記載株 (日本国特許第42943735号に記載のFERM P-19361及びFERM P-19362) は、ザイモモナス モビリス由来のピルベートデカルボキシラーゼ遺伝子及びアルコール デヒドロゲナーゼ遺伝子をコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) に導入したコリネ型細菌形質転換体である。

[0042] 本発明においては、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、セロビオース利用性組換え株もしくは変異株 (FERM P-18979、FERM P-1

8977及びFERM P-18978)、コハク酸生産組換え株 (FERM P-19446及びFERM P-19477)、並びにエタノール生産組換え株 (FERM P-17887 (FERM BP-7621)、FERM P-17888 (FERM BP-7622) 及びJ. Mol. Microbiol. Biotechnol., Vol 8, 243-254 (2004) 記載の株 (すなわちFERM P-19361及びFERM P-19362)) からなる群より選択されるいずれか1種の菌株のコリネ型細菌であって、かつD-キシロース利用能が付与されているものであることが好ましい。

本発明において特に好ましいコリネ型細菌は、D-キシロース利用能が付与されたコリネバクテリウム グルタミカムR (FERM P-18976) である。

[0043] シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子

本発明では、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に、シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子 (シュガートランスポーター遺伝子ともいう) を導入する。これにより、コリネ型細菌形質転換体のD-キシロース利用能をより向上させることができる。シュガートランスポーター機能を有するタンパク質としては、ヘキソース及びペントースを輸送する機能を有するタンパク質であればよいが、中でも、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーターが好ましい。

[0044] 本発明においては、シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター機能を有するタンパク質をコードする遺伝子 (L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子ともいう) を用いることが好ましい。L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子は既知であり、*araE* と称されている。細菌では、以下に示す菌株等で *araE* 遺伝子配列や酵素特性が報告されている。バチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) [J. Bacteriol., Vol. 179, 7705-7711 (1997)]、クレブシエラ オキシトカ8017 (*Klebsiella oxytoca* 8017) [J. Bacteriol., Vol. 177, 5379-5380 (1995)]、エシェリヒア コリ [J. Biol. Chem., Vol. 263, 8003-8010 (1988)]。

[0045] 本発明におけるシュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子としては、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、バチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチラス リチェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチラス コアグランス (*Bacillus coagulans*)、ラクトバチルス サケイ (*Lactobacillus sakei*)、ペディオコッカス ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、ラクトバチルス レウテリ (*Lactobacillus reuteri*)、オーシャノバチルス イヘエニス (*Oceanobacillus iheyensis*)、ラクトコッカス ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ラクトバチルス プランタリウム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ロイコノストック シテリウム (*Leuconostoc citreum*)、エンテロコッカス フェシウム (*Enterococcus faecium*)、クレブシエラ オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、及びサルモネラ ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) からなる群より選ばれる微生物由来の *araE* 遺伝子を用いることができる。

[0046] 本発明に適したL-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター活性を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子としては、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC31831、エシェリヒア コリ、バチラス サブチリス、クレブシエラ オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、及びサルモネラ ティフィムリウムからなる群より選ばれる微生物由来の *araE* 遺伝子を用いることが好ましい。また、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子として、配列番号13で示されるDNA配列、又は配列番号13で示されるDNA配列と相補的な塩基配列からなるDNA配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつシュガートランスポーター機能（例えば、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター機能）を有するポリペプチドをコードするDNAを用いることが好ましい。すなわち本発明においては、

シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、配列番号13で示される塩基配列からなるDNA、又は配列番号13で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつシュガートランスポーター機能を有するポリペプチドをコードするDNAを用いることが好ましい。配列番号13の塩基配列のDNAは、コリネバクテリウム グルタミカムATCC31831等由来の遺伝子であり、araE遺伝子のDNAの塩基配列である。D-キシロース利用菌株におけるaraE遺伝子の適当な発現量の調節方法は、当業者には良く知られている。本発明においては、上記D-キシロース代謝関連酵素遺伝子、及びシュガートランスポーター遺伝子の由来微生物の種類、組み合わせ、及び導入の順番等は特に限定されない。

[0047] ここで、ストリンジェントな条件とは、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上の相同性が配列間に存在するときにハイブリダイゼーションが起こることを意味する。通常、完全ハイブリッドの融解温度（ $T_m$ ）より約5～30℃、好ましくは約10～25℃、より好ましくは、約15～20℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合をいう。ストリンジェントな条件については、J. Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), 特に11.45節”Conditions for Hybridization of Oligonucleotide Probes”に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。

本発明において、塩基配列間の相同性は、計算ソフト GENETYX（登録商標） Ver. 8（ジェネティックス社製）を用いて計算した値である。

[0048] なお、本発明において、あるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、例えば、配列番号13で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAは、配列番号13の塩基配列と約90%以上の配列相同性を有することが

好ましく、約95%以上の配列相同性を有することがより好ましく、約98%以上の配列相同性を有することが特に好ましい。

[0049] 本発明のコリネ型細菌形質転換体は、D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用するものであることが好ましく、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを並行的かつ同時利用するものであることがより好ましい。

[0050] 本発明のコリネ型細菌形質転換体は、例えば、上記のシュガートランスポーター遺伝子を、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に導入して形質転換することによって作製することができる。また、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを並行的かつ同時利用するコリネ型細菌形質転換体は、例えば、コリネ型細菌に、上述したD-キシロース代謝関連酵素遺伝子及びシュガートランスポーター遺伝子、並びにL-アラビノース代謝関連遺伝子を導入することにより作製することができる。L-アラビノース代謝関連遺伝子としては、例えば、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) のL-アラビノースイソメラーゼをコードする遺伝子、L-リブロキナーゼをコードする遺伝子及びL-リブロース-5-フォスフェイト-4-エピメラーゼをコードする遺伝子等が好適である。D-キシロース代謝関連酵素遺伝子、シュガートランスポーター遺伝子及びL-アラビノース代謝関連遺伝子の由来微生物の種類、組み合わせ、及び導入の順番等は特に限定されない。

[0051] ベクターの構築

まず、上記のシュガートランスポーター遺伝子、例えば、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーターをコードするDNA (*araE*、タンパク質を*AraE*ともいう) の配列をPCR (polymerase chain reaction) 法により増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーセットを作製する。このようなプライマーセットとしては、例えば配列番号14、15の塩基配列で示されるものなどが挙げられる。PCR法は、公知のPCR装置、例えばサーマルサイクラーなどを利用することができる。PCRのサイクルは、公知

の技術にしたがって行なわれてよく、例えば、変性、アニーリング、伸張を1サイクルとし、通常10～100サイクル、好ましくは、約20～50サイクルである。PCRの鋳型としては、シュガートランスポーター遺伝子を有する微生物から単離したDNAを用いて、PCR法によりAraEをコードするDNAのcDNAを合成することができる。PCR法によって得られた遺伝子は、適当なクローニングベクターに導入することができる。クローニング法としては、pGEM-T easy vector system (Promega社製)、TOPO TA-cloning system (Invitrogen社製)、Mighty Cloning Kit (Takara社製)などの商業的に入手可能なPCRクローニングシステムなどを使用することもできる。また、方法の1つの例を実施例で詳記するが、該領域を含むDNA断片を、既知のAraEをコードするDNAの塩基配列に基づいて適当に設計された合成プライマーを鋳型として用いたハイブリダイゼーション法により取得することもできる。

[0052] 次いで、PCR法で得られた遺伝子を含むクローニングベクターを、微生物、例えばエシェリヒア コリ JM109菌株などに導入し、該菌株を形質転換する。この形質転換された菌株を適当な抗生物質（例えばアンピシリン、クロラムフェニコールなど）を含む培地で培養し、培養物から菌体を回収する。回収された菌体からプラスミドDNAを抽出する。プラスミドDNAの抽出は、公知の技術によって行なうことができ、また市販のプラスミド抽出キットを用いて簡便に抽出することもできる。市販のプラスミド抽出キットとしては、キアクイックプラスミド精製キット（商品名：Qiaquick plasmid purification kit、キアゲン社製）などが挙げられる。この抽出されたプラスミドDNAの塩基配列を決定することにより、AraEをコードする遺伝子配列を確認することができる。DNAの塩基配列は、公知の方法、例えばジオキシヌクレオチド酵素法などにより決定することができる。また、キャピラリー電気泳動システムを用いて、検出には多蛍光技術を使用して塩基配列を決定することもできる。また、DNAシーケンサー、例えばABI PRISM 3730xl DNA Analyzer（アプライドバイオシステム社製）などを使用して

塩基配列を決定することもできる。

- [0053] 上記の方法は、遺伝子工学実験の常法に基づいて行なうことができる。種々の微生物のベクターや外来遺伝子の導入及び発現法は、多くの実験書に記載されているので〔例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> Edition) CSHL Press (2001)、又はCurrent protocols in molecular biology. Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)等〕、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入及び発現を行なうことができる。
- [0054] 次に、*araE* 遺伝子を、前述したD-キシロース利用能を有するコリネ型細菌において、プラスミド上又は染色体上で発現させる。例えば、プラスミドを用いて、これらの遺伝子は発現可能な制御配列下に導入される。ここで「制御配列下」とはこれらの遺伝子が、例えば、プロモーター、インデューサー、オペレーター、リボソーム結合部位及び転写ターミネーター等との共同作業により転写翻訳できることを意味する。このような目的で使用されるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内で自律複製機能を司る遺伝子を含むものであれば良い。その具体例としては、例えば、ブレブバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) 2256由来の pAM330 [特開昭58-67699号公報、Agric. Biol. Chem.、Vol. 48、2901-2903 (1984) 及びNucleic Acids Symp Ser.、Vol. 16、265-267 (1985)]、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13058由来のpHM1519 [Agric. Biol. Chem.、Vol. 48、2901-2903 (1984)] 及びpCRY30 [Appl. Environ. Microbiol.、Vol. 57、759-764 (1991)]、コリネバクテリウム グルタミカム T250由来のpCG4 [特開昭57-183799号公報、J. Bacteriol.、Vol. 159、306-311 (1984)]、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 (特開昭62-166890号公報) pEK0、pEC5、pEKEx1 [Gene、Vol. 102、93-98 (1991)] 等、あるいはそれらから誘導されるプラスミドなどが使用可能である。また、ベクターは、種々の制限酵素部位をその内部にもつマルチクローニングサイトを含んでいる、又は単一の制限酵素部位を含んでいることが好ましい。

[0055] 本発明においては、広範囲の種類のプロモーターを好適に用いることができる。このようなプロモーターは、酵母、細菌及び他の細胞供給源を含む多くの公知の供給源から得ることができ、コリネ型細菌において目的遺伝子の転写を開始させる機能を有する塩基配列であればいかなるものであってもよい。本発明に使用されるプロモーターとしては、効率の良い、非グルコース抑制プロモーターが好ましい。そのようなプロモーターの好適な例としては、例えば、コリネ型細菌で強力な構成的なプロモーターとして既知である、*l a c*、*t r c*、*t a c*プロモーター等が挙げられる。本発明に使用されるプロモーターは、必要に応じて、修飾して、その調節機構を変更することができる。また、目的遺伝子の下流に配置される制御配列下のターミネーターについても、コリネ型細菌においてその遺伝子の転写を終了させる機能を有する塩基配列であれば、いかなるものであってもよい。

[0056] 本発明のコリネ型細菌形質転換体の創製に使用されるプラスミドベクターの構築は、例えば、コリネバクテリウム *グルタミカム* ATCC31831の *a r a E* 遺伝子を用いる場合には、塩基配列が確認された該遺伝子を、適当なプロモーター、ターミネーター等の制御配列と連結後、上記例示されているいずれかのプラスミドベクターの適当な制限酵素部位に挿入することにより、行うことができる。詳細は、実施例に記載している。

[0057] 形質転換

目的遺伝子を含むプラスミドベクターのコリネ型細菌への導入方法としては、電気パルス法（エレクトロポレーション法）、 $C a C l _ 2$ 法等コリネ型細菌への目的遺伝子導入が可能な方法であれば特に限定されるものではない。その具体例として、例えば電気パルス法としては、公知の方法 [Agric. Biol. Chem.、Vol. 54、443-447 (1990) ] 又は [Res. Microbiol.、Vol. 144、181-185 (1993) ] を用いることができる。

[0058] 本発明のコリネ型細菌形質転換体の取得方法としては、常法に従い、目的遺伝子を含むプラスミドに薬剤耐性遺伝子等を組み入れて、適切な濃度の当該薬剤を含むプレート培地上に目的遺伝子導入処理を行ったコリネ型細菌を



塗布することにより形質転換されたコリネ型細菌を選抜することができる。  
その方法の具体例としては、例えば、[Agric. Biol. Chem.、Vol. 54、443-447 (1990)] 又は [Res. Microbiol.、Vol. 144、181-185 (1993)] に記載の方法等を挙げるることができる。

[0059] 上記の方法により創製されるコリネ型細菌の形質転換体の例としては、具体的には、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 (受託番号 N I T E B P - 5 7 6) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBAD (受託番号 N I T E B P - 5 7 7) (いずれも、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818)) に寄託済み。受託日: 2008年5月28日)、並びにコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAra (受託番号 N I T E B P - 5 8 1) (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818)) に寄託済み。受託日: 2008年6月4日) などが挙げられる。これらのコリネ型細菌の形質転換体は、D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用するものであるため、後述するようにD-キシロース及びD-グルコース資源を含む培地で好適に用いることができる。

[0060] 本発明で創製したコリネ型細菌形質転換体は、有機化合物生産性を向上させるために、ペントースリン酸経路の流量の増加; エタノール、浸透圧又は有機酸に対する耐性の増加及び副生物 (目的とする生成産物以外の炭素含有分子を意味すると理解される) 生産の減少からなる群から選択される特徴の1又は2以上を生じる遺伝子修飾をさらに含むことができる。そのような遺伝子修飾は、具体的には、外来性遺伝子の過剰発現及び/又は内在性遺伝子の不活化; 古典的突然変異誘起; スクリーニング及び/又は目的変異体の選別などにより導入することができる。

[0061] かくして創製された本発明のコリネ型細菌形質転換体は、D-キシロース

を原料として（TCA経路に存在するポリカルボン酸を製造する場合は、さらに炭酸イオン等も原料として）、モノカルボン酸、ジカルボン酸、ケトカルボン酸、ヒドロキシカルボン酸、アミノ酸、モノアルコール、ポリオール及びビタミン等の多様な有機化合物を、糖類の代謝速度を向上させる、又は糖類の代謝速度の経時低下を抑制すると同時に、高い生産速度と高い蓄積濃度をもって、反応液中に生成させることができるものである。

[0062] (I I) 有機化合物の製造方法

増殖培養工程

本発明のコリネ型細菌形質転換体を用いて有機化合物を製造する場合は、まず上述したコリネ型細菌形質転換体を好気条件下で増殖培養することが好ましい。

[0063] コリネ型細菌形質転換体の培養は、炭素源、窒素源及び無機塩等を含む通常の栄養培地を用いて行うことができる。培養には、炭素源として、例えばグルコース又は廃糖蜜等；窒素源として、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム又は尿素等をそれぞれ単独で又は2種以上を混合して用いることができる。また、無機塩として、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム又は硫酸マグネシウム等を使用することができる。この他にも必要に応じて、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸；ビオチン又はチアミン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に適宜添加することもできる。

[0064] 培養は、通気攪拌又は振盪等の好气的条件下、約15～45℃、好ましくは約25～37℃の温度で行うことができる。培養時の培地のpHは5～10付近、好ましくは6.5～8.5付近の範囲がよく、培養中のpH調整は、酸又はアルカリを添加することにより行うことができる。培養開始時の培地の炭素源濃度は、好ましくは約1～20%（W/V）、より好ましくは約2～5%（W/V）である。また、培養期間は通常1～7日間程度である。

[0065] 次いで、コリネ型細菌形質転換体の培養菌体を回収する。上記の如くして得られる培養物から培養菌体を回収分離する方法としては、特に限定されず

、例えば遠心分離、膜分離等の公知の方法を用いることができる。

[0066] 回収された培養菌体に対して処理を加え、得られる菌体処理物を次工程に用いてもよい。前記菌体処理物としては、培養菌体に何らかの処理が加えられたものであればよく、例えば、菌体をアクリルアミド又はカラギーナン等で固定化した固定化菌体等が挙げられる。

上記の如くして得られる培養物から回収分離されたコリネ型細菌形質転換体の培養菌体又はその菌体処理物を用いて、有機化合物を生成させる工程（有機化合物生成工程ともいう）を行う。

[0067] 有機化合物生成工程

有機化合物生成工程においては、D-キシロースを含有する培地（反応培地）中で、上記コリネ型細菌形質転換体を用いて有機化合物を生成させる。このような工程を含む有機化合物の製造方法も、本発明の1つである。

[0068] 反応培地には炭素源としてD-キシロースが含まれるが、D-キシロースに加えてD-グルコースも含むことができる。D-キシロース又はD-グルコースとしては、D-キシロース又はD-グルコースそのものでもよく、例えば、リグノセルロース、アラビナン、セルロース、デンプンなどのようなD-キシロース又はD-グルコース単位からなる炭水化物のオリゴマー又はポリマーでもよい。そのような炭水化物からD-キシロース又はD-グルコース単位を遊離させるために、適当な炭水化物分解酵素（キシラーナーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼなど）を、反応培地に加えてもよく、コリネ型細菌形質転換体に該酵素を生産させてもよい。

[0069] 反応培地は、D-キシロース及びD-グルコース以外の有機炭素源を含んでもよい。このような有機炭素源としては、本発明のコリネ型細菌形質転換体が生化学反応に利用できる糖類が挙げられる。

具体的には、糖類としては、（D-又はL-）アラビノース、ガラクトース、フルクトース又はマンノースなどの単糖類；セロビオース、ショ糖、ラクトース、マルトースなどの二糖類；デキストリン又は可溶性澱粉などの多糖類などが挙げられる。特に、C6糖やC5糖などの単糖類が好ましく、中

でも、L-アラビノースが好ましい。

[0070] より好ましくは、有機化合物の生成反応に用いられる反応培地組成は、コリネ型細菌形質転換体又はその処理物とその代謝機能を維持するために必要な成分、即ち、各種糖類等の炭素源；蛋白質合成に必要な窒素源；リン、カリウム又はナトリウム等の塩類；さらに鉄、マンガン又はカルシウム等の微量金属塩を含む。これらの添加量は所要反応時間、目的有機化合物生産物の種類又は用いられるコリネ型細菌形質転換体の種類等により適宜定めることができる。用いるコリネ型細菌形質転換体によっては特定のビタミン類の添加が好ましい場合もある。炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン、微量金属塩は、公知のもの、例えば増殖培養工程につき例示したものでよい。

培地のpHは、約6～8が好ましい。

[0071] コリネ型細菌形質転換体又はその菌体処理物とD-キシロースを含む炭素源との反応は、本発明のコリネ型細菌形質転換体又はその菌体処理物が活動できる温度条件下で行なわれることが好ましく、コリネ型細菌形質転換体又はその菌体処理物の種類などにより適宜選択することができる。温度は、通常、約25～35℃である。また、後述する反応系の炭酸ガス封入法にも関連して、反応培地に二酸化炭素又は各種の炭酸塩もしくは炭酸水素塩等の無機炭酸塩を糖類などの有機炭素源に加えて注入することが目的有機化合物によっては有効な場合もある。培地中の炭素源濃度としては特に限定されないが、通常、約0.1～30質量%、好ましくは約0.5～20質量%の濃度で使用される。また、炭素源における糖類の（D-キシロース／D-グルコース）混合比率（質量比）に関しては、糖類由来バイオマス原料種にもよるが、通常その比率は1／3～2／3程度である。また、例えば、反応培地中の炭素源に各種のC6糖類やC5糖類を含む場合、C6糖及びC5糖の混合比率（C5糖／C6糖の質量比）は、通常1／4～3／4程度である。

[0072] 有機化合物生成工程においては、反応培地が還元状態下にあることが好ましい。すなわちコリネ型細菌形質転換体又はその菌体処理物は、還元状態下の反応培地で目的有機化合物の生成反応に供せられることが好ましい。有機

化合物生成方式は、回分式、流加式、連続式いずれの生成方式も可能である。

[0073] 本発明において、還元状態下にある反応培地中でコリネ型細菌形質転換体を用いて有機化合物を生成させると、すなわち還元状態下の生化学反応により有機化合物を製造すると、本発明のコリネ型細菌形質転換体の増殖分裂が完全に抑制され、増殖に伴う分泌副生物の実質的な完全抑制を実現することができる。この観点からは、培養増殖工程から回収されたコリネ型細菌形質転換体又はその菌体処理物が反応培地に供せられるときには、コリネ型細菌細胞内外の好気増殖時の環境状態が反応培地にもたらされない方法や条件を用いることが好ましい。つまり、反応培地は、増殖培養過程で生成し、菌体内外に存在する生成物質を実質的に含有しないことが好ましい。より具体的には、増殖培養過程で生成し、菌体外に放出された分泌副生物、及び培養菌体内の好氣的代謝機能により生成し菌体内に残存する物質が、反応培地に実質的に存在しない状態であることが好ましい。このような状態は、例えば、増殖培養後の培養液を用いて遠心分離、膜分離等の方法を行うことによって、及び／又は培養後の菌体を還元状態下で2時間ないし10時間程度放置することで実現される。

[0074] 本工程においては、還元状態下の反応培地を用いることが好ましいが、反応培地は、固体状、半固体状又は液体状等いずれの形状を有していてもよい。

本発明における還元状態とは、反応系（反応培地）の酸化還元電位で規定され、反応培地の酸化還元電位がマイナス（-）の値であることを意味する。還元状態下にある反応培地の酸化還元電位は、好ましくは約-200mV~-500mV程度、より好ましくは約-250mV~-500mV程度である。

[0075] 反応培地の還元状態は簡便にはレサズリン指示薬（還元状態であれば、青色から無色への脱色）である程度推定できるが、正確には酸化還元電位差計（例えば、ORP Electrodes、BROADLEY JAMES社製）を用いて測定する。本発

明においては、反応培地に菌体又はその処理物を添加した直後から有機化合物を採取するまで、還元状態を維持していることが好ましいが、少なくとも有機化合物を採取する時点で反応培地が還元状態であればよい。反応時間の約50%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約90%以上の時間、反応培地が還元状態に保たれていることが好ましい。中でも、反応時間の約50%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約90%以上の時間、反応培地の酸化還元電位が約 $-200\text{ mV}$ ～ $-500\text{ mV}$ 程度に保たれていることが特に好ましい。

[0076] このような還元状態の実現は具体的には、前記の培養後の培養菌体調製方法、反応培地の調製方法、又は反応途中における還元状態の維持方法等によりなされる。還元状態下の反応培地の調製方法は、公知の方法を用いてよい。例えば、反応培地用水溶液の調製方法は、例えば硫酸還元微生物などの絶対嫌気性微生物用の培養液調製方法〔The dissimilatory sulfate-reducing bacteria, In The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, Ed. by Starr, M. P. et. al. Berlin, Springer Verlag, 926-940 (1981) や (農芸化学実験書 第三巻、京都大学農学部農芸化学教室編、1990年第26刷、産業図書株式会社出版)〕などを使用することができ、所望する還元状態の水溶液を得ることができる。

[0077] 反応培地の調製方法として、より具体的には反応培地を加熱処理又は減圧処理することにより溶解ガスを除去する方法等が挙げられる。より具体的には、約 $10\text{ mmHg}$ 以下、好ましくは約 $5\text{ mmHg}$ 以下、より好ましくは約 $3\text{ mmHg}$ 以下の減圧下で、約1～60分程度、好ましくは約5～40分程度、反応培地を処理することにより、溶解ガス、特に溶解酸素を除去し、還元条件下の反応培地を作製することができる。また、適当な還元剤（例えば、チオグリコール酸、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、メルカプト酢酸、チオール酢酸、グルタチオン、硫化ソーダ等）を添加して還元状態の反応培地を調製することもできる。また、場合により、これらの方法を適宜組み合わせることも有効な還元状態の反応培地を調製する方法となる。

- [0078] 反応途中における還元状態の維持方法としては、反応系外からの酸素の混入を可能な限り防止することが好ましく、反応系を窒素ガス等の不活性ガス、炭酸ガス等で封入する方法が通常用いられる。酸素混入をより効果的に防止する方法としては、反応途中においてコリネ型細菌形質転換体の菌体内の代謝機能を効率よく機能させるために、反応系のpH維持調整液の添加や各種栄養素溶解液を適宜添加する必要がある場合もあるが、このような場合には添加する溶液から酸素を予め除去しておくことが有効である。
- [0079] 最後に、上述のようにして反応培地で生成した有機化合物を採取する。その方法はバイオプロセスで用いられる公知の方法を用いることができる。そのような公知の方法として、有機化合物生成液の塩析法、再結晶法、有機溶媒抽出法、エステル化蒸留分離法、クロマトグラフィー分離法又は電気透析法等があり、生成有機化合物の特性に応じてその分離精製採取法は適宜定めることができる。
- [0080] 本発明の方法により製造することができる有機化合物としては、有機酸、アルコール、アミノ酸又はビタミン類等が挙げられる。有機酸としては例えば、酢酸、乳酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸、クエン酸、シスアコニット酸、イソクエン酸、イタコン酸、2-オキシグルタル酸又はシキミ酸などが挙げられる。アルコールとしては、例えば、エタノール、ブタノール、1,3-プロパンジオール、グリセロール、キシリトール、ソルビトール又は1,4-ブタンジオールなどが挙げられる。アミノ酸としては、例えば、バリン、ロイシン、アラニン、アスパラギン酸、リジン、イソロイシン又はスレオニンなどが挙げられる。本発明の方法は、エタノール、乳酸、コハク酸、キシリトール、酢酸及びアミノ酸からなる群より選ばれる1種以上の有機化合物の製造に好適である。
- [0081] 本発明はまた、前記の条件下における反応によりD-キシロース、又はD-グルコースとD-キシロースとの混合物を有機化合物にする能力が著しく改善されたD-キシロース利用コリネ型細菌形質転換体を提供する。

## 実施例

[0082] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0083] 実施例 1 コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811の創製

### (1) プラスミド pCRA811 構築方法

a) エシエリヒア コリ (Escherichia coli) JM109からの染色体DNAの抽出

エシエリヒア コリ (Escherichia coli) JM109を、L培地（トリプトン 10g、イーストエキストラクト 5g及びNaCl 5gを蒸留水 1Lに溶解）に、白金耳を用いて植菌後、対数増殖期まで37°Cで振盪培養し、菌体を集めた。DNAゲノム抽出キット（商品名：GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit、アマシャム社製）を用いて、取扱説明書に従い、集めた菌体から染色体DNAを回収した。

[0084] b) エシエリヒア コリ (Escherichia coli) からのD-キシロースイソメラーゼ遺伝子 (xyIA) 及びD-キシロキナーゼ遺伝子 (xyIB) のクローニング

エシエリヒア コリ (Escherichia coli) のキシロースイソメラーゼ遺伝子（以下、xyIAと記す）（配列番号1）、及びキシロキナーゼ遺伝子（以下、xyIBと記す）（配列番号2）の2つの遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

[0085] PCRに際して、xyIA遺伝子及びxyIB遺伝子をクローン化するべく、エシエリヒア コリ (Escherichia coli) の配列を基に、下記の一対のプライマーセットを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNAシンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

[0086] xyIA遺伝子増幅用プライマーセット



Primer 1: 5'-CTCTGAATTCACCTGATTATGGAGTTCAAT-3' (配列番号3)

Primer 2: 5'-CTCTCCCGGCATATCGATCGTTCCTTAAA-3' (配列番号4)

*xyIB*遺伝子増幅用プライマーセット

Primer 3: 5'-CTCTGAATTCCTTTAAGGAACGATCGATATG-3' (配列番号5)

Primer 4: 5'-CTCTCCCGGTTTCAGAATAAATTCATACTA-3' (配列番号6)

[0087] 尚、前者にはEcoRIサイトが、後者にはSmaIサイトがそれぞれ末端に付加されている。鋳型DNAには、上記の実施例1、(1)、a)項にて抽出したエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109の染色体DNAを用いた。

PCRは、パーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、DNAポリメラーゼ (商品名: Takara LA Taq HS DNA polymerase、宝酒造株式会社製) を用いて下記の条件で行なった。

[0088] 反応液:

(10×)PCR緩衝液: 10 $\mu$ L

2.5mM dNTP混合液: 16 $\mu$ L

鋳型DNA: 5 $\mu$ L (DNA含有量1 $\mu$ g以下)

上記の2種のプライマー: 各々 1 $\mu$ L (最終濃度0.25 $\mu$ M)

Takara LA Taq HS DNA polymerase: 1 $\mu$ L

DMSO: 10 $\mu$ L (最終濃度2%)

滅菌蒸留水: 57 $\mu$ L

以上を混合し、この100 $\mu$ Lの反応液をPCRにかけた。

[0089] PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 94 $^{\circ}$ C、1分

アニーリング過程: 55 $^{\circ}$ C、1分

エクステンション過程: 72 $^{\circ}$ C、2分

以上を1サイクルとし、30サイクル行なった。

上記で生成した反応液の一部を用いて1% (W/V) アガロースゲルにより電気泳動を行なったところ、それぞれ*xyIA*遺伝子及び*xyIB*遺伝子を含む、約1.4kb及び約1.6kbのDNA断片が検出できた。

[0090] 上述の制限酵素EcoRI及びSmaIで処理した約1.6kbの増幅産

物と、EcoRI及びSmaIで制限酵素処理をしたベクターpTrc99A (Pharmacia社製) とを混合し、これにライゲーションキット (商品名: Mighty Cloning Kit、宝酒造株式会社製) を添加後、取扱説明書に従い反応させた。このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology.、Vol. 53、159 (1970)] によりエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109を形質転換し、アンピシリン50 $\mu$ g/mL、X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside) 200 $\mu$ g/mL、IPTG (isopropyl 1-thio-beta-d-galactoside) 100 $\mu$ g/mLを含むL寒天培地 [組成: 寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記L培地と同一成分組成] に塗布した。この培地上で白色を呈する生育株を常法により液体培養し、培養液よりxyIA遺伝子を含む長さ約1.4kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを、プラスミド抽出キット (商品名: QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン社製) を用いて抽出した。

該xyIA遺伝子を含むプラスミドをpCRA801と命名した。

[0091] 制限酵素EcoRI及びSmaIで処理した約1.6kbの増幅産物も同様の方法でEcoRI及びSmaIで制限酵素処理をしたベクターpTrc99Aと連結し、該xyIB遺伝子を含むプラスミドpCRA802を構築した。

[0092] 構築したpCRA801を鋳型としてtrcプロモーター (Ptrc) に連結したxyIA遺伝子を含むDNA断片を用いて、下記に示すプライマーセットを用いたこと以外は上記と同じ条件でPCRを行なった。

Ptrc-xyIA遺伝子増幅用プライマーセット

Primer 5: 5'-CTCTAGATCTCCGACATCATAACGGTTCTG-3' (配列番号7)

Primer 6: 5'-CTCTGGATCCCTTCTCTCATCCGCCAAAAC-3' (配列番号8)

[0093] 制限酵素BglII及びBamHIで処理した約1.6kbの増幅産物も同様の方法でBglII及びBamHIで制限酵素処理をしたベクターコリネ型細菌-大腸菌シャトルベクターpCRB1 (特開2006-124

440) と連結し、該 *P t r c - x y l A* 遺伝子を含むプラスミド *p C R A 8 1 0* を構築した。

[0094] 構築した *p C R A 8 0 2* を鋳型として *t r c* プロモーター (*P t r c*) に連結した *x y l B* 遺伝子を含む DNA 断片を用いて、下記に示すプライマーセットを用いたこと以外は上記と同じ条件で PCR を行なった。

*P t r c - x y l B* 遺伝子増幅用プライマーセット

Primer 6: 5'-CTCTGGATCCCTTCTCTCATCCGCCAAAAC-3' (配列番号9)

Primer 7: 5'-CTCTIGATCACCGACATCATAACGGTTCTG-3' (配列番号10)

[0095] 制限酵素 *F b a I* 及び *B a m H I* で処理した約 1.7 kb の増幅産物も、選択培地にアンピシリンの代わりにクロラムフェニコールを使用する以外は、上記と同様の方法で *F b a I* 及び *B a m H I* で制限酵素処理をしたベクター *p C R A 8 1 0* と連結し、該 *P t r c - x y l B* 遺伝子を含むプラスミド *p C R A 8 1 1* (ベクター *p C R A 8 1 1*) を構築した (図 1)。

[0096] (2) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831 からの *a r a* オペロンの単離、及び *a r a E* の単離

a) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831 からの染色体 DNA の抽出

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831 からの染色体 DNA 抽出は、培地として表 1 に示す A 液体培地を使用することと、培養温度が 30°C であること以外は、上記のエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 と同様の条件で行なった。

[0097]

[表1]

A 液体培地(1 L)の組成	単位(g)
グルコース	40
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
カザミノ酸	7
酵素抽出物	2
尿素	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.006
MnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.0042
塩酸チアミン	0.0002
ビオチン	0.0002

[0098] b) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831からのL-アラビノース代謝関連遺伝子のクローニング

L-アラビノースを単一炭素源として良好な増殖を示したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831よりL-アラビノース代謝に関与する遺伝子のクローニングを試みた。データベースのホモロジー検索の結果より、3種のL-アラビノース代謝酵素L-アラビノースイソメラーゼ、L-リブロキナーゼ、L-リブローズ-5-フォスフェイト-4-エピメラーゼをコードする各遺伝子 *araA*、*araB*、*araD* の内、*araA* が最も異種間での保存性が高かった。そこで、この *araA* における保存領域の配列から以下の一对のプライマーセットを、アプライド・バイオシステムズ社製「394 DNA/RNAシンセサイザー」を用いて合成し、PCRに使用した。

[0099] *araA* 相同領域増幅用プライマーセット

primer 1 *araA*: 5'- GGIGAYAMIATGMGIIAIGTIGCIGTIAC -3' (配列番号11)

primer 2 *araA*: 5'- GTYTTCCARTCICCYTC -3' (配列番号12)

[0100] 鋳型DNAには、上記の実施例1、(2)、a)項にて抽出したコリネバ

クテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 31831の染色体DNAを用いた。PCRは、パーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、DNAポリメラーゼ（商品名：Takara LA Taq HS DNA polymerase、宝酒造株式会社製）を用いて下記の条件で行なった。

[0101] 反応液：

(10×)PCR緩衝液：5 $\mu$ L  
2.5mM dNTP混合液：8 $\mu$ L  
鋳型DNA：5 $\mu$ L (DNA含有量1 $\mu$ g以下)  
上記の2種のプライマー：各々 0.5 $\mu$ L (最終濃度0.25 $\mu$ M)  
Takara LA Taq HS DNA polymerase：0.5 $\mu$ L  
DMSO：5 $\mu$ L (最終濃度10%)  
滅菌蒸留水：26 $\mu$ L

以上を混合し、この50 $\mu$ Lの反応液をPCRにかけた。

[0102] PCRサイクル：

デナチュレーション過程：94 $^{\circ}$ C、1分  
アニーリング過程：37 $^{\circ}$ C、1分  
エクステンション過程：72 $^{\circ}$ C、1分

以上を1サイクルとし、30サイクル行なった。

[0103] 上記で生成した反応液を用いて1% (W/V) アガロースゲルにより電気泳動を行なったところ、araA相同領域を含む、約390bpのDNA断片が検出できた。

PCR増幅産物は、pGEM-T easy vector system (Promega社製) を用いて取扱説明書に従い反応させた。

[0104] このライゲーション溶液を用い、上記の実施例1、(1)、b)項と同様の条件、方法にてaraA相同領域を含有する長さ約390bpのDNA断片が挿入されたプラスミド取得した。このように作製されたプラスミドをシーケンスすることでDNA配列を決定した。こうして得た配列は、他の細菌で報告されているaraAの塩基配列と非常に高い相同性を示した。

[0105] 決定した配列から作製したプローブと、上記の実施例1、(2)、a)項

にて抽出したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831の染色体DNAを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、制限酵素XbaIで処理した断片において約9.9 kbの位置にシングルのバンドが検出できた。サザンハイブリダイゼーションの結果を基にコロニーダイハイブリダイゼーションを行ない、araAを含むXbaI断片と連結したプラスミドを作製した。このプラスミドをシーケンスすることでDNA配列を決定した。得られた配列を解析した結果、araB、araD、araAの順に並ぶ約4.0 kbのDNA配列を確認できた。またaraBの約2.5 kb上流にはL-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子araE (配列番号13)が存在していた(図2)。

[0106] c) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831からのL-アラビノース輸送系のプロトンシンポーター遺伝子 (araE) のクローニング

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831のaraE遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

[0107] PCRに際しては、以下の一对のプライマーセットを、アプライド・バイオシステムズ社製「394 DNA/RNAシンセサイザー」を用いて合成し、使用した。

araE遺伝子増幅用プライマーセット

araE(EcoRI)-Fw: 5'-CTCTGAATTCGGCCAATCGAAGGAGTAAT-3' (配列番号14)

araE(EcoRI)-Rv: 5'-CTCTGAATTCAGGCTAAGGAGTGTTAAGA-3' (配列番号15)

尚、いずれのプライマーにもEcoRIサイトが末端に付加されている。

[0108] 鋳型DNAには、上記の実施例1、(2)、a)項にて抽出したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831の染色体DNAを用いた。PCRは、パーキンエルマーシータス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、DNAポリメラーゼ(商品名: Pyrobest DNA polymerase、宝酒造株式会社製)を用いて下記の条件で行なった。

[0109] 反応液：

(10×)PCR緩衝液： 10 $\mu$ L  
2.5mM dNTP混合液： 8 $\mu$ L  
鋳型DNA： 2 $\mu$ L (DNA含有量500ng以下)  
上記の2種のプライマー： 各々 0.5 $\mu$ L (最終濃度0.2 $\mu$ M)  
Pyrobest DNA polymerase： 0.5 $\mu$ L  
滅菌蒸留水： 79 $\mu$ L

以上を混合し、この100 $\mu$ Lの反応液をPCRにかけた。

[0110] PCRサイクル：

デナチュレーション過程： 98 $^{\circ}$ C、10秒  
アニーリング過程： 55 $^{\circ}$ C、30秒  
エクステンション過程： 72 $^{\circ}$ C、2分

以上を1サイクルとし、30サイクル行なった。

[0111] 上記で生成した反応液を用いて1% (W/V) アガロースゲルにより電気泳動を行なったところ、araE遺伝子を含む、約1.7kbのDNA断片が検出できた。

上述のEcoRI制限酵素で処理した増幅産物と、EcoRIで制限酵素処理をしたpKK223-3 (ファルマシア社製) とを混合し、これにMighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製) を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0112] このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法によりエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109を形質転換し、アンピシリン50 $\mu$ g/mLを含むL寒天培地 [組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記L培地と同一成分組成] に塗布した。

この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりaraE遺伝子を含む長さ約1.7kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製) を用いて抽出した。

該araE遺伝子を含むプラスミドをpKK223-3-araE (図3) と命名した。

[0113] (3) マーカーレス用 *araE* 導入用ベクター *Ind-araE* の構築

次に、*araE* 遺伝子をコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R にマーカーレスで染色体に導入するために必要な DNA 領域を、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R の生育に必須でないとして報告されている配列 [Appl. Environ. Microbiol., Vol. 71, 3369-3372 (2005)] (SSI 領域) を基に決定した。この DNA 領域 (*Inde111* 領域) を以下の PCR 法により増幅した。

[0114] PCR に際しては、以下の一対のプライマーセットを、アプライド・バイオシステムズ社製「394 DNA/RNA シンセサイザー」を用いて合成し、使用した。

*araE* 遺伝子導入用 *Inde111* 領域増幅用プライマーセット

*Inde111(XbaI)-Fw1*: 5'-CTCTTCTAGACCTCAATAGAGTCTTCAGAT-3' (配列番号16)

*Inde111(XbaI)-Rv1*: 5'-CTCTTCTAGATGCTCAGTATGAATGGCCTT-3' (配列番号17)

尚、いずれのプライマーにも *XbaI* サイトが末端に付加されている。

[0115] 鋳型 DNA には、上記の実施例 1、(2)、a) 項と同様の方法で抽出したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R の染色体 DNA を用いた。PCR は、Takara LA Taq HS DNA polymerase を使用し、反応液に DMSO を使用しないことと、PCR サイクルを以下に示す条件で行なったこと以外は上記 (実施例 1、(2)、b) 項) と同様の条件で行なった。

[0116] PCR サイクル:

デナチュレーション過程: 94°C、30秒

アニーリング過程: 55°C、30秒

エクステンション過程: 72°C、3分

以上を 1 サイクルとし、30 サイクル行なった。

[0117] 上記で生成した反応液を用いて 1% (W/V) アガロースゲルにより電気泳動を行なったところ、*Inde111* 領域を含む、約 2.0 kb の DNA 断片が検出できた。



上述の制限酵素 Xba I で処理した増幅産物と、Xba I で制限酵素処理をしたマーカース遺伝子破壊用プラスミド pCRA725 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol.、 Vol. 8、243-254 (2004)、(特開2006-124440)] とを混合し、これにMighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製) を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0118] このライゲーション溶液を用い、形質転換体選定用培地の抗生物質としてクロラムフェニコールの代わりに、カナマイシン  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  を使用したこと以外は、上記の実施例 1、(1)、b) と同様の条件及び方法にて Indel11 領域を含有する長さ約  $2.0 \text{ kb}$  の DNA 断片が挿入されたプラスミドを取得した。

該 araE 遺伝子導入用 Indel11 領域を含むプラスミドを Ind11 LKS2-4 (図3) と命名した。

[0119] プラスミド pKK223-3-araE を EcoRI で処理後、アガロース電気泳動で分離し、ゲルから切り出した約  $2.0 \text{ kb}$  の遺伝子を含む DNA 断片をゲル抽出キット (商品名: Minelute Gel Extraction Kit、キアゲン社製) を用いて回収した。得られた DNA を、平滑末端処理キット (商品名: DNA Blunting Kit、宝酒造株式会社製) を用いて平滑末端処理を行ない、EcoRV で制限酵素処理をした Ind11 LKS2-4 を混合し、これにMighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製) を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0120] このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法によりエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 を形質転換、カナマイシン  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含む L 寒天培地 [組成: 寒天が  $1.5\%$  (W/V) 含まれていることを除けば上記 L 培地と同一成分組成] に塗布した。

[0121] この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より araE 遺伝子を含有する長さ約  $1.7 \text{ kb}$  の DNA 断片が挿入されたプラスミドを、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製) を用いて抽出した。

該 araE 遺伝子導入用プラスミドを Ind11-araE (図3) と命

名した。

[0122] (4) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)

I n d - a r a E の 作 製

a r a E 遺伝子導入用プラスミド I n d 1 1 - a r a E は、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R 内で複製不可能なプラスミドである。I n d 1 1 - a r a E を、電気パルス法 [Agric. Biol. Chem.、Vol. 54、443-447 (1990) 及び Res. Microbiol.、Vol. 144、181-185 (1993)] の方法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R へ導入し、カナマイシン 50  $\mu$ g/mL を含む A 寒天培地 [組成：寒天が 1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記 A 液体培地と同一成分組成] に塗布した。

[0123] さらに、上記の培地で得られた株を、スクロース 10% (W/V) を含有する表 2 に示す B T 寒天培地 [組成：寒天が 1.5% (W/V) 含まれていることを除けば B T 液体培地と同一成分組成] に塗布した。

[0124] [表2]

BT 液体培地(1 L)の組成	単位(g)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
尿素	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.006
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0042
塩酸チアミン	0.0002
ビオチン	0.0002

[0125] プラスミド I n d 1 1 - a r a E が染色体上の相同領域と 1 点相同組換えを起こした場合、I n d 1 1 - a r a E 上のカナマイシン耐性遺伝子の発現によるカナマイシン耐性と、バチラス サブチリス (Bacillus subtilis) の s a c R - s a c B 遺伝子の発現によるスクロース致死性を示すのに対し、

2点相同組換えを起こした場合は、Ind11-araE上のカナマイシン耐性遺伝子の脱落によるカナマイシン感受性と、sacR-sacB遺伝子の脱落によるスクロース含有培地での生育性を示す。従って、目的とするaraE遺伝子染色体導入株は、カナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を示す。

カナマイシン感受性及びスクロース含有培地生育性を示した株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araEと命名した。

[0126] (5) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811の構築

プラスミドpCRA811を上記の実施例1、(4)項に示した電気パルス法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Rとコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind11-araEへ導入し、クロラムフェニコール5  $\mu$ g/mLを含むA寒天培地〔組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記A液体培地と同一成分組成〕により、形質転換株コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811とを得た。尚、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811は、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センターに寄託した (受託日：2008年5月28日、受託番号：NITE BP-576)。

[0127] 実施例2 D-キシロースを単一炭素源とした培地を用いたコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811の好気培養

上記の実施例1、(5)項で作製したコリネバクテリウム グルタミカム (

*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811をそれぞれ用いて、D-キシロースを唯一の炭素源として含有するBT液体培地におけるD-キシロースの減少と菌の増殖とを検討した。該2菌株をそれぞれ、クロラムフェニコール5  $\mu$ g/mLを含むことを除けば上記A液体培地と同一成分組成培地10 mLに一白金耳植菌して33°C、13時間、200 rpmの条件で好氣的に培養後、上記で示したBT培地で2回洗浄し、単一炭素源として25 mM D-キシロースを含有する100 mLのBT培地にOD610が0.2になるように植菌した。D-キシロース濃度は、逐次培地の少量をサンプリングして液体クロマトグラフィーによる分析を行い、経時的な消費量の変動を調べた。結果を、図4(1)及び(2)に示す。図4(1)及び(2)において、白丸(○)は、OD610の変化を、黒丸(●)は、培地中のD-キシロース濃度の変化を、それぞれ示す。図4(1)は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811による、D-キシロース消費及び増殖の経時変化を示す図である。図4(2)は、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811による、D-キシロース消費及び増殖の経時変化を示す図である。結果、図4(1)及び(2)に示すように、好気条件下において、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811 (図4(2))のD-キシロース消費速度と増殖速度は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811 (図4(1))と比較して、著しく速くなった。

[0128] 実施例3 コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811のD-キシロースを単一基質とした還元条件下の糖消費及び乳酸生成反応

(1) 好気培養増殖

冷凍庫にて $-80^{\circ}\text{C}$ で保存してある上記の実施例1、(5)項で作製したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811を、それぞれプレート培養用培地であるクロラムフェニコール $5\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むA寒天培地〔組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記A液体培地と同一成分組成〕に塗布し、 $33^{\circ}\text{C}$ 、12時間暗所に静置した。

[0129] 上記のプレートで生育した該2種のコリネ型細菌株をそれぞれ、 $10\text{mL}$ のクロラムフェニコール $5\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むA液体培地が入った試験管に一白金耳植菌し、 $33^{\circ}\text{C}$ 、12時間、 $200\text{rpm}$ の条件で好氣的に培養した。

[0130] 上記の条件で生育した該2種の菌株をそれぞれ、好気培養増殖用培地であるクロラムフェニコール $5\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むA液体培地 $500\text{mL}$ が入っている容量 $1\text{L}$ の三角フラスコに移し、 $33^{\circ}\text{C}$ 、13時間、 $200\text{rpm}$ の条件で好氣的に培養した。このようにして培養増殖された菌体は、遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、10分、 $5,000\times g$ ) によって回収し、次の還元条件下の乳酸生成反応に供した。

[0131] (2) 還元条件下の糖消費及び有機酸生成反応

上記の実施例3、(1)項の好気培養増殖工程により回収された該2種の菌株それぞれの湿潤菌体  $4\text{g}$  (Dry cell換算約 $0.8\text{g}$ ) を、BT-U培地 (組成：尿素が含まれていないことを除けば上記BT液体培地と同一成分組成)  $80\text{mL}$ に懸濁後、 $100\text{mL}$ 容のバイアルに入れ、D-キシロース  $100\text{mM}$ を利用炭素源として加え、炭酸水素ナトリウム  $100\text{mM}$ を添加後、密閉した状態で $33^{\circ}\text{C}$ にてゆるく攪拌し、還元条件下の乳酸生成反応を行なった。

[0132] この間、 $2.5\text{N}$  (規定) 濃度の $\text{NH}_4\text{OH}$ 水溶液 ( $2.5\text{N}$  アンモニア水溶液) を使用して反応槽内の $\text{pH}$ を $7.5$ に常時維持した。

反応槽内のD-キシロース及び乳酸濃度は、逐次培地少量をサンプリングして液体クロマトグラフィーによる分析を行い、経時的な消費量及び生成量の変動をそれぞれ調べた。

[0133] その結果を図5(1)及び(2)に示す。図5(1)は、*araE*遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811による、D-キシロース消費及び乳酸生成の経時変化を示す図である。図5(2)は、*araE*遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-*araE*/pCRA811による、D-キシロース消費及び乳酸生成の経時変化を示す図である。図5(1)及び(2)において、黒丸(●)は、培地中のD-キシロース濃度の変化を、白丸(○)は、培地中の乳酸濃度の変化を、それぞれ示す。

[0134] 尚、D-キシロース消費速度及び乳酸生成速度は反応開始0時間から3時間後における単位時間当たりの消費量及び生成量である。コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811 (図5(1)) 及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-*araE*/pCRA811 (図5(2)) それぞれのD-キシロース消費速度及び乳酸生成速度は、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811が、D-キシロース消費速度15.1 mM/h及び乳酸生成速度18.5 mM/h、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-*araE*/pCRA811が、D-キシロース消費速度48.4 mM/h及び乳酸生成速度58.5 mM/hであった。

この結果より、還元条件下においても、*araE*遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-*araE*/pCRA811のD-キシロース消費速度及び乳酸生成速度はいずれも、*araE*遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811と比較して、著しく速くなったことが分かった。

[0135] 実施例4 D-グルコース及びD-キシロース混合糖を炭素源とした培地を用いたコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/

pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811の好気培養

上記の実施例 2 における炭素源を D-キシロースから、D-グルコース及び D-キシロースの混合物 (3.6 g/L 及び 3.6 g/L ; 存在比率 1 : 1) に代えて反応を行なう以外は、実施例 2 と同様の条件及び方法にて、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 の好気培養増殖及び糖消費を調べた。

[0136] 結果を、図 6 (1) 及び (2) に示す。図 6 (1) は、araE 遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811 による、D-グルコース及び D-キシロース消費、並びに増殖の経時変化を示す図である。図 6 (2) は、araE 遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 による、D-グルコース及び D-キシロース消費、並びに増殖の経時変化を示す図である。なお、図 6 (1) 及び (2) において、星印 (\*) は、OD<sub>610</sub> の変化を示す。黒丸 (●) は、培地中の D-グルコース濃度の変化を示す。白丸 (○) は、培地中の D-キシロース濃度の変化を示す。

[0137] この結果、図 6 (1) 及び (2) に示すように、好気条件下において、araE 遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 (図 6 (2)) の D-キシロース消費速度は、araE 遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811 (図 6 (1)) と比較して著しく速くなった。これにより、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 は、培地中の D-グルコース及び D-キシロースを 30 時間以内に完全に消費することができたのに対して、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811 では、同じ 30 時間でキシロースの残存が観察された。

[0138] さらに、好気培養において、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811は、D-グルコース及びD-キシロースの共存下では、D-キシロース利用に関してグルコース抑制が観察されるのに対して、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811は、D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用することが可能であった。

[0139] 実施例5 コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811のD-グルコース及びD-キシロース混合糖を基質とした還元条件下の糖消費及び乳酸生成反応

上記の実施例3における基質をD-キシロースから、D-グルコース及びD-キシロースの混合物(40 g/L及び20 g/L; 存在比率2:1)に代えて反応を行なう以外は、実施例3と同様の条件及び方法にて好気培養増殖後、還元条件下での反応を行なった。

[0140] 結果を、図7(1)及び(2)に示す。図7(1)は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811による、D-グルコース及びD-キシロース消費、並びに乳酸生成の経時変化を示す図である。図7(2)は、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811による、D-グルコース及びD-キシロース消費、並びに乳酸生成の経時変化を示す図である。なお、図7(1)及び(2)において、黒丸(●)は、培地中のキシロース濃度の変化を示す。星印(\*)は、培地中のD-グルコース濃度の変化を示す。白丸(○)は、培地中の乳酸濃度の変化を示す。

[0141] この結果、図7(1)及び(2)に示すように、還元条件下においても、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811(図7(2))のD-キシロース消費速度は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタ



ミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811 (図7(1))と比較して著しく速くなった。これにより、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811は、D-グルコース及びD-キシロースを8時間以内に完全に消費することができたのに対して、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811では、同じ8時間で著量のキシロースの残存が観察された。8時間後のコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811とコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811の生成した乳酸生成濃度はそれぞれ、339 mM及び431 mMと、後者が約1.3倍高かった。

[0142] さらに、還元条件下において、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R/pCRA811は、D-グルコース及びD-キシロースの共存下では、D-キシロース利用に関してグルコース抑制が観察されるのに対して、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Ind-araE/pCRA811は、D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用することが可能であった。

[0143] 実施例6 コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5/Plac-araBAD及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araE/Plac-araBADの構築

(1) Plac-araBADの構築方法

エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) のL-アラビノースイソメラーゼ (以下 araA と記す)、L-リブロキナーゼ (araB と記す)、L-リブローズ-5-フォスフェイト-4-エピメラーゼ (araD と記す) の3つの遺伝子は araB、araA、araD が順に連結したオペロン (araBAD) を形成している (配列番号18) [Gene, Vol. 47, 231-244 (1986)]。araBAD 遺伝子を含むDNA断片を以下のPCR法により増幅した。

[0144] PCRに際して、araBAD 遺伝子をクローン化するべく、エシェリヒ

ア コリ (Escherichia coli) の配列を基に、下記の一対のプライマーセットを、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製「394 DNA/RNA シンセサイザー (synthesizer)」を用いて合成し、使用した。

a r a B A D 遺伝子増幅用プライマーセット

Eco\_ara\_fw4\_Ecol: 5'-CTCTGAATTCACCCGTTTTTTGGATGGAG-3' (配列番号19)

Eco\_ara\_Rv2\_Sal: 5'-CTCTGTCGACGCCAGTGTCTCGGGTTAAGATA-3' (配列番号20)

尚、前者にはE c o R I サイトが、後者にはS a l I サイトがそれぞれ末端に付加されている。

[0145] 鋳型DNAには、上記の実施例1、(1)、a) 項にて抽出したエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109の染色体DNAを用いた。

PCRは、パーキンエルマーシートス社製の「DNAサーマルサイクラー」を用い、反応試薬として、DNAポリメラーゼ (商品名: PrimeSTAR HS DNA polymerase、宝酒造株式会社製) を用いて下記の条件で行なった。

[0146] 反応液:

(5×) PCR緩衝液: 10 μL

2. 5mM dNTP混合液: 4 μL

鋳型DNA: 1 μL (DNA含有量200ng以下)

上記の2種のプライマー: 各々 1 μL (最終濃度0.2 μM)

PrimeSTAR HS DNA polymerase: 0.5 μL

滅菌蒸留水: 33.5 μL

以上を混合し、この50 μLの反応液をPCRにかけた。

[0147] PCRサイクル:

デナチュレーション過程: 98°C、10秒

アニーリング過程: 55°C、10秒

エクステンション過程: 72°C、5分

以上を1サイクルとし、30サイクル行なった。

[0148] 上記で生成した反応液の一部を用いて1% (W/V) アガロースゲルによ

り電気泳動を行なったところ、*araBAD* 遺伝子を含む、約 4.5 kb の DNA 断片が検出できた。

上述の制限酵素 *EcoRI* 及び *SaI* で処理した増幅産物と、*EcoRI* 及び *SaI* で制限酵素処理をしたコリネ型細菌—大腸菌シャトルベクター *pCRB1* (特開 2006-124440) とを混合し、これにライゲーションキット (商品名: Mighty Cloning Kit、宝酒造株式会社製) を添加後、取扱説明書に従い反応させた。

[0149] このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法 [Journal of Molecular Biology.、Vol. 53、159 (1970)] によりエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 を形質転換し、クロラムフェニコール  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、*X-gal* (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside)  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  及び IPTG (isopropyl 1-thio-beta-d-galactoside)  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含む L 寒天培地 [組成: 寒天が 1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記 L 培地と同一成分組成] に塗布した。

[0150] この培地上で白色を呈する生育株を常法により液体培養し、培養液より *araBAD* 遺伝子を含む長さ約 4.5 kb の DNA 断片が挿入されたプラスミドを、プラスミド抽出キット (商品名: QIAprep Spin Miniprep Kit、キアゲン社製) を用いて抽出した。

該 *araBAD* 遺伝子を含むプラスミドを *Plac-araBAD* (図 8) と命名した。

[0151] (2) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5 及び コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-*Ind-araE* の構築方法

a) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R からの *SSI* 領域のクローニング

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R の *SSI* 領域に *D-キシロース* 代謝関連遺伝子 *xyIA* 及び *xyIB* 遺伝子の導入を行なうため、これらの DNA 領域を、表 3 に示したプライマー及びコリ

ネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) Rの染色体DNAを用いたPCR反応により増幅させた。PCRは、Takara LA Taq HS DNA polymeraseを使用し、上記の実施例1、(3)項と同条件で行なった

上記で生成した反応液を用いて1% (W/V) アガロースゲルにより電気泳動を行なったところ、約2.0から3.0 kbのDNA断片が検出できた。

[0152] 表3に示した制限酵素で処理した増幅産物と、同じ制限酵素で処理をしたマーカース遺伝子破壊用プラスミドpCRA725 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol.、Vol. 8、243-254 (2004)、(特開2006-124440)]とを混合し、これにMighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製)を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0153] このライゲーション溶液を用い、形質転換体選定用培地の抗生物質としてクロラムフェニコールの代わりに、カナマイシン50  $\mu$ g/mLを使用すること以外は、上記の実施例6、(1)項と同様の条件及び方法にて各SSI領域を含有する長さ約2.0から3.0 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを取得した。

[0154]

[表3]

SSI領域のクローニング用プライマー

Primer <sup>a</sup>	配列 番号	Target gene	Sequence (5' -3')	Overhanged restriction site
primer 1	21	Xyl3 region	CTCT <u>TCTAGAT</u> GATGAAGGTTTCCCGCCG	XbaI
primer 2	22	Xyl3 region	CTCT <u>TCTAGAT</u> CGTATACCCCTATGGGGTA	XbaI
primer 3*	23	Xyl3 region	CTCT <u>TCTAGAG</u> TTCCGCTTCGGAGAGAGAT	XbaI
primer 4*	24	Xyl3 region	CTCT <u>GAGCTCC</u> ACCGTCAGGTGAAATACCT	SacI
primer 5	25	Xyl7 region	CTCT <u>GAGCTCT</u> GATTGCACGATGGCGAAAA	SacI
primer 6	26	Xyl7 region	CTCT <u>GTCGAC</u> CTGCAACAAGTGAAAAAGA	Sall
primer 7*	27	Xyl7 region	CTCT <u>TCTAGAG</u> CTGCCGTAGCTTTTTGGGA	XbaI
primer 8*	28	Xyl7 region	CTCT <u>TCTCGAG</u> TACTCACCTTTTCGATCCGC	XhoI
primer 9	29	Xyl8 region	CTCT <u>GAGCTCG</u> TGAACATATCGGCATCGAG	SacI
primer 10	30	Xyl8 region	CTCT <u>GTCGAC</u> CTATGGCGTTCTATACTGCG	Sall
primer 11*	31	Xyl8 region	CTCT <u>TCTAGAT</u> ATGCAAGAAGCAAGCAAGT	XbaI
primer 12*	32	Xyl8 region	CTCT <u>TCTCGAG</u> TCTCATAAAAGTTCTCCGAT	XhoI
primer 13	33	Xyl4 region	CTCT <u>GAGCTCAG</u> CTGAGAGAAAAGCTTTTCG	SacI
primer 14	34	Xyl4 region	CTCT <u>GTCGACAG</u> AGACCGTAGAGCTAATCC	Sall
primer 15*	35	Xyl4 region	CTCT <u>TCTAGAG</u> TCTCTAAACCAAACAGGTG	XbaI
primer 16*	36	Xyl4 region	CTCT <u>TCTCGAG</u> AACCACCGAATAGCGCATGC	XhoI
primer 17	37	Xyl1 region	CTCT <u>GTCGAC</u> TCCGTGGACAATTTTCATCC	Sall
primer 18	38	Xyl1 region	CTCT <u>GCATGCA</u> AGCACACCAATTAGTAATG	SphI

[0155] 表1中、<sup>a</sup> アスタリスクは、インバースPCRのためのプライマーを示している。

表1において、<sup>b</sup> アンダーラインで示した塩基配列は、クローニング用に作製した制限酵素サイトを示している。

[0156] b) マーカーレス用 x y | A - x y | B 遺伝子導入用ベクターの構築

上記の実施例1、(1)項で作製したプラスミド pCRA811 を XbaI 及び XhoI で処理後、アガロース電気泳動で分離し、ゲルから切り出した約 3.3 kb の x y | A - x y | B 遺伝子を含む DNA 断片をゲル抽出キット (商品名: Minelute Gel Extraction Kit、キアゲン社製) を用いて回収した。得られた DNA を、XbaI 及び XhoI で制限酵素処理をした上記

実施例 6、(2)、a) 項で作製したプラスミドと混合し、これにMighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製) を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0157] このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法によりエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 を形質転換し、カナマイシン  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含む L 寒天培地 [組成: 寒天が 1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記 L 培地と同一成分組成] に塗布した。

[0158] この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液より  $x y | A - x y | B$  遺伝子を含有する長さ約 3.3 kb の DNA 断片が挿入されたプラスミドを、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製) を用いて抽出した。

[0159] c) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE 株の作製

上記の実施例 6、(2)、b) 項で作製した  $x y | A - x y | B$  遺伝子導入用プラスミドを上記の実施例 1、(3) の方法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R の S S I 領域に  $X y | 3, 7, 8, 4, 1, 11, 6$  の順番に導入した。最終的に得られた菌株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5 と命名した。

[0160] さらに、上記の実施例 1、(3) 項で作製した  $a r a E$  遺伝子導入用プラスミド  $I n d 1 1 - a r a E$  を上記と同様の方法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5 へ導入し得られた菌株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE と命名した。

[0161] (3) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5/Plac-araBAD 及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBAD の構築

プラスミド  $P l a c - a r a B A D$  を上記の実施例 1、(4) 項に示した電

気パルス法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araEそれぞれへ導入し、クロラムフェニコール  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含むA寒天培地〔組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記A液体培地と同一成分組成〕により、形質転換株コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5/Plac-araBAD及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araE/Plac-araBADを得た。尚、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araE/Plac-araBADは、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センターに寄託した (受託日：2008年5月28日、受託番号：NITE BP-577)。

[0162] 実施例7 コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5/Plac-araBAD及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araE/Plac-araBADのD-グルコース及びD-キシロース混合糖を基質とした還元条件下の糖消費及び乳酸生成反応

上記の実施例3と同様の条件及び方法にて、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5/Plac-araBAD及びコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5-Ind-araE/Plac-araBADそれぞれを好気培養増殖させた。その後、上記の実施例3における基質をD-キシロースから、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの混合物 (それぞれ  $32 \text{g}/\text{L}$ 、 $16 \text{g}/\text{L}$  及び  $6.4 \text{g}/\text{L}$ ; 存在比率5:2.5:1) に代えて行なう以外は、上記の実施例3と同様の条件及び方法にて、還元条件下での反応を行なった。

[0163] 結果を図9(1)及び(2)に示す。図9(1)は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) X5/Plac-araBADによる糖消費の経時変化を示す図である。図9(2)は、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (Co

rynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBADによる糖消費の経時変化を示す図である。図9(1)及び(2)において、黒丸(●)は、培地中のL-アラビノース濃度の変化を示す。三角(▲)は、培地中のD-キシロース濃度の変化を示す。星印(\*)は、培地中のD-グルコース濃度の変化を示す。白丸(○)は、培地中の乳酸濃度の変化を示す。

[0164] この結果、図9(1)及び(2)に示すように、還元条件下において、araE遺伝子を染色体に導入したコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBAD (図9(2))のD-キシロース及びL-アラビノース消費速度は、araE遺伝子を導入していないコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5/Plac-araBAD (図9(1))と比較して著しく速くなった。これにより、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBADは、培地中のD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの3種の糖を9時間以内に完全に消費することができたのに対して、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5/Plac-araBADは、同じ9時間でD-キシロース及びL-アラビノースの残存が観察された。9時間後のコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5/Plac-araBAD及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBADの生成した乳酸の濃度は、それぞれ342 mM及び374 mMであった。

[0165] さらに、還元条件下において、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBADは、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの3種の糖を並行的かつ同時利用することが可能であった。

[0166] 実施例8 コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811のD-グルコース及びD-キシロースの混合糖を基質とした還元条件下のコハク酸生成反応



上記の実施例 1、(5) 項で作製したコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811それぞれを、上記の実施例 5 と同様の条件及び方法にて、好気培養増殖後、還元条件下、コハク酸生成反応を行った。

[0167] その結果、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) R/pCRA811及びコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811の反応開始 3 時間後のコハク酸生成速度は、それぞれ 14.2 mM/h 及び 16.9 mM/h であった。

[0168] 実施例 9 コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind11-araE- $\Delta$ ldh/pEthAra の構築

(1) プラスミド pEthAra 構築方法

エタノール生産に必要なザイモナス モビリス (Zymomonas mobilis) のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (以下 adhB と記す) 及びピルベートデカルボキシラーゼ (pdc と記す) の 2 つの遺伝子 [Journal Mol Microbiol Biotechnol、Vol. 8、4 (2004)] を含むプラスミド pCRA723 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol.、Vol. 8、243-254 (2004)、(特開 2006-124440)] を制限酵素 BamHI 及び BglII で処理後、アガロース電気泳動で分離した。ゲルから切り出した約 4.0 kb の adhB-pdc 遺伝子を含む DNA 断片をゲル抽出キット (商品名: Minelute Gel Extraction Kit、キアゲン社製) を用いて回収した。得られた DNA を、平滑末端処理キット (商品名: DNA Blunting Kit、宝酒造株式会社製) を用いて平滑末端処理を行ない、SalI で制限酵素処理後、同じく平滑末端処理をした上記の実施例 6、(1) 項で作製したプラスミド Plac-araBAD を混合し、これに Mighty Cloning Kit (宝酒造株式会社製) を添加した後、取扱説明書に従い反応させた。

[0169] このライゲーション溶液を用い、塩化カルシウム法によりエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109 を形質転換し、クロラムフェニコール 5

0  $\mu$ g/mLを含むL寒天培地〔組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記L培地と同一成分組成〕に塗布した。

[0170] この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりadhB-pdc遺伝子を含有する長さ約4.0 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドを、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン社製) を用いて抽出した。作製したプラスミドをpEthAraと命名した(図10)。

[0171] (2) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldhの作製

乳酸デヒドロゲナーゼ(ldh)遺伝子をマーカーレス破壊するために、マーカーレスldh遺伝子破壊用プラスミドpCRA728 [J. Mol. Microbiol. Biotechnol., Vol. 8, 243-254 (2004)] を上記の実施例1、(3)の方法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind11-araEに導入した。最終的に得られた菌株をコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldhと命名した。

[0172] (3) コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraの構築

上記の実施例9、(1)項で作製したプラスミドpEthAraを、上記の実施例1、(4)項に示した電気パルス法に従って、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldhへ導入し、クロラムフェニコール5  $\mu$ g/mLを含むA寒天培地〔組成：寒天が1.5% (W/V) 含まれていることを除けば上記A液体培地と同一成分組成〕により、形質転換株コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraを得た。尚、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraは、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 (郵便番号292-0818) の独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センターに寄託した(受託日：2008年6月4日、受託番号：NITE BP-581)。

[0173] 実施例 10 コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraのD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノース混合糖を基質とした還元条件下の糖消費及びエタノール生成反応

上記の実施例 3 と同様の条件及び方法にて、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraを好気培養増殖後、上記の実施例 3 における基質をD-キシロースからD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの混合物 (32 g/L、16 g/L 及び6.4 g/L ; 存在比率5 : 2.5 : 1) に代えて行なう以外は、実施例 3 と同様の条件及び方法にて還元条件下での反応を行なった。

[0174] この結果、図 11 に示すように、還元条件下において、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraは、培地中のD-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの3種の糖を9時間以内に消費し、エタノールを生成した。この際の、3種の糖の消費速度は、実施例 7 におけるコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBADとほぼ同等であった。図 11 において、黒丸 (●) は、培地中のD-グルコース濃度の変化を示す。三角 (▲) は、培地中のD-キシロース濃度の変化を示す。黒い四角 (■) は、培地中のL-アラビノース濃度の変化を示す。白い四角 (◇) は、培地中のエタノール濃度の変化を示す。

[0175] さらに、還元条件下においてコリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAraは、D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースの3種の糖を並行的かつ同時利用することが可能であった。

### 産業上の利用可能性

[0176] 本発明は、セルロース系バイオマス資源からの有機化合物の製造に好適に利用することができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を、D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌に導入したことを特徴とする、コリネ型細菌形質転換体。
- [請求項2] シュガートランスポーター機能を有するタンパク質が、L-アラビノース輸送系のプロトンシンポーターである請求項1記載のコリネ型細菌形質転換体。
- [請求項3] シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、配列番号13で示される塩基配列からなるDNA、又は配列番号13で示される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつシュガートランスポーター機能を有するポリペプチドをコードするDNAを用いる請求項1又は2記載のコリネ型細菌形質転換体。
- [請求項4] D-キシロース利用能を有するコリネ型細菌が、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、セロビオース利用性組換え株もしくは変異株であるFERM P-18979、FERM P-18977及びFERM P-18978、コハク酸生産組換え株であるFERM P-19446及びFERM P-19477、並びにエタノール生産組換え株であるFERM P-17887、FERM P-17888、FERM P-19361及びFERM P-19362からなる群より選択されるいずれか1種の菌株のコリネ型細菌であって、かつD-キシロース利用能が付与されているものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体。
- [請求項5] シュガートランスポーター機能を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子として、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)、バチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチラス リチェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチラス コアグランス (*Bacillus coagulans*)、ラクトバチルス サケイ (*Lactobacillus*

us sakei)、ペディオコッカス ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus)、ラクトバチルス レウテリ (Lactobacillus reuteri)、オーシャノバチルス イヘエニス (Oceanobacillus iheyensis)、ラクトコッカス ラクティス (Lactococcus lactis)、ロイコノストック メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides)、ラクトバチルス プランタリウム (Lactobacillus plantarum)、ラクトバチルス ファーメンタム (Lactobacillus fermentum)、ラクトバチルス ブレビス (Lactobacillus brevis)、ロイコノストック シテリウム (Leuconostoc citreum)、エンテロコッカス フェシウム (Enterococcus faecium)、クレブシエラ オキシトカ (Klebsiella oxytoca)、及びサルモネラ ティフィムリウム (Salmonella typhimurium) からなる群より選ばれる微生物由来の araE 遺伝子を用いる請求項 1 又は 2 に記載のコリネ型細菌形質転換体。

[請求項6] D-グルコース及びD-キシロースを並行的かつ同時利用することができる請求項 1～5 のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体。

[請求項7] D-グルコース、D-キシロース及びL-アラビノースを並行的かつ同時利用することができる請求項 6 記載のコリネ型細菌形質転換体。

[請求項8] コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) Ind-araE/pCRA811 (受託番号 N I T E B P - 5 7 6) である請求項 1 記載のコリネ型細菌形質転換体。

[請求項9] コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE/Plac-araBAD (受託番号 N I T E B P - 5 7 7) である請求項 1 記載のコリネ型細菌形質転換体。

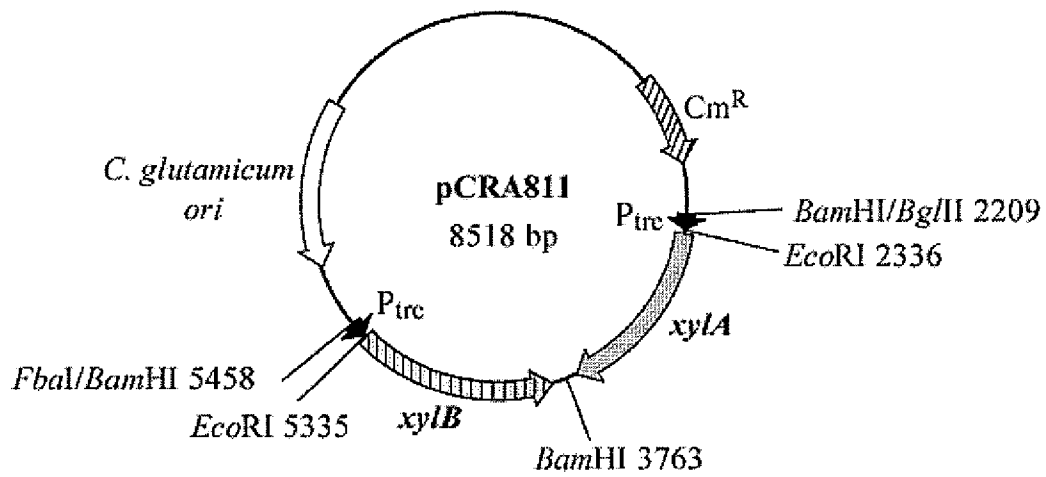
[請求項10] コリネ型細菌形質転換体が、コリネバクテリウム グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) X5-Ind-araE- $\Delta$ ldh/pEthAra (受託番号

N I T E B P - 5 8 1)である請求項 1 記載のコリネ型細菌形質転換体。

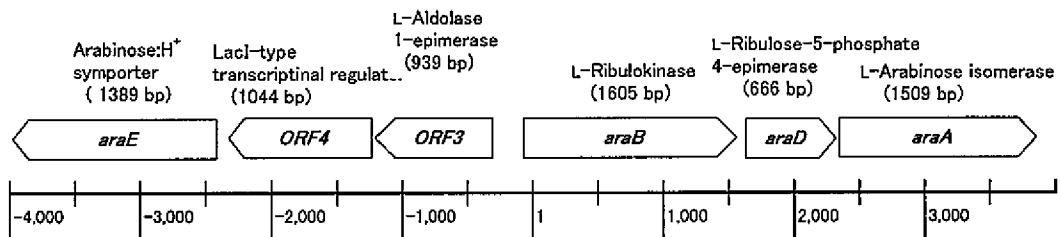
[請求項11] D-キシロースを含有する培地中で請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のコリネ型細菌形質転換体を用いて有機化合物を生成させる工程と、同培地より有機化合物を回収する工程とを含む有機化合物の製造方法。

[請求項12] 有機化合物が、エタノール、乳酸、コハク酸、キシリトール、酢酸及びアミノ酸からなる群より選ばれる 1 種以上であることを特徴とする請求項 1 1 記載の有機化合物の製造方法。

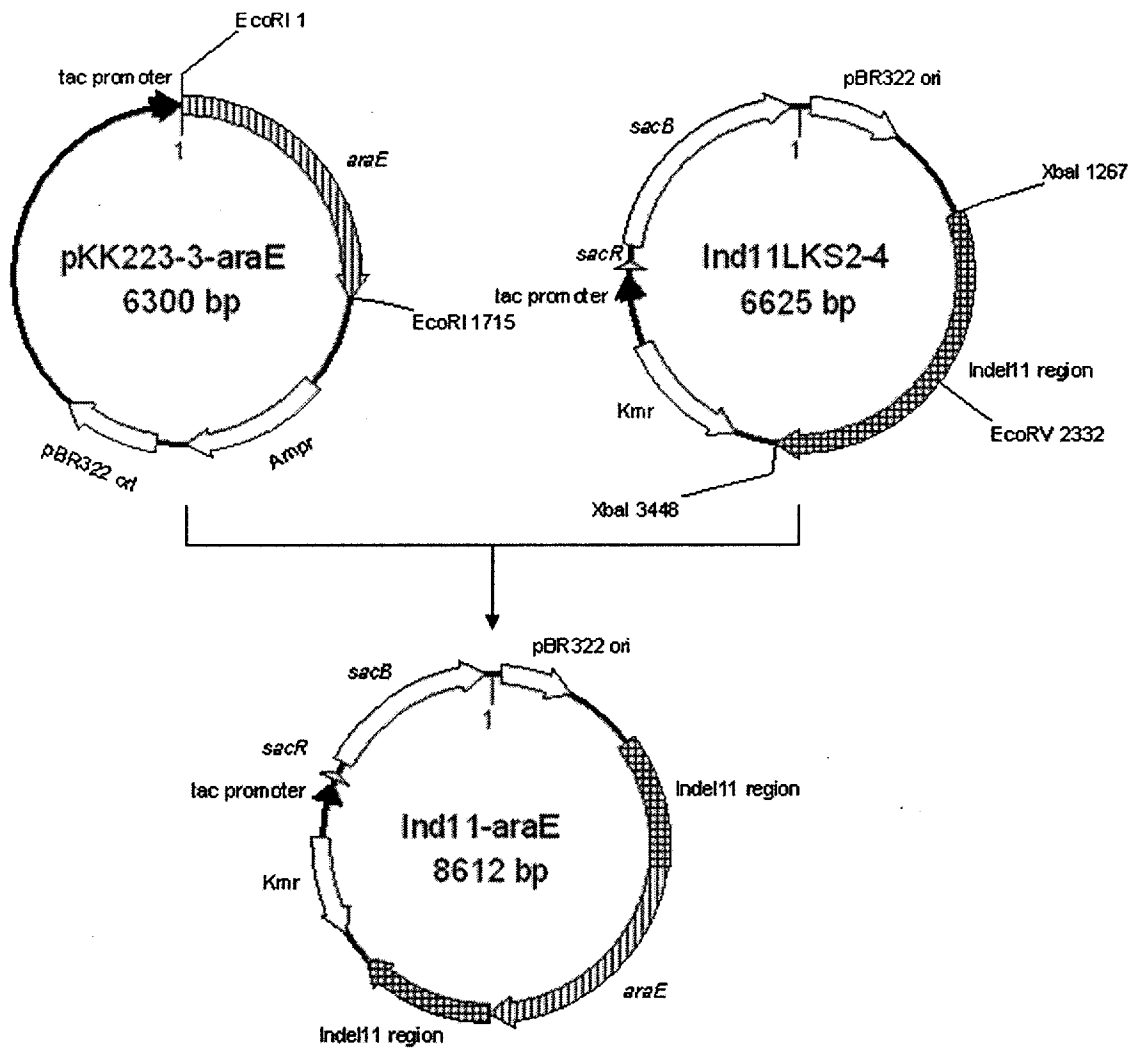
[図1]



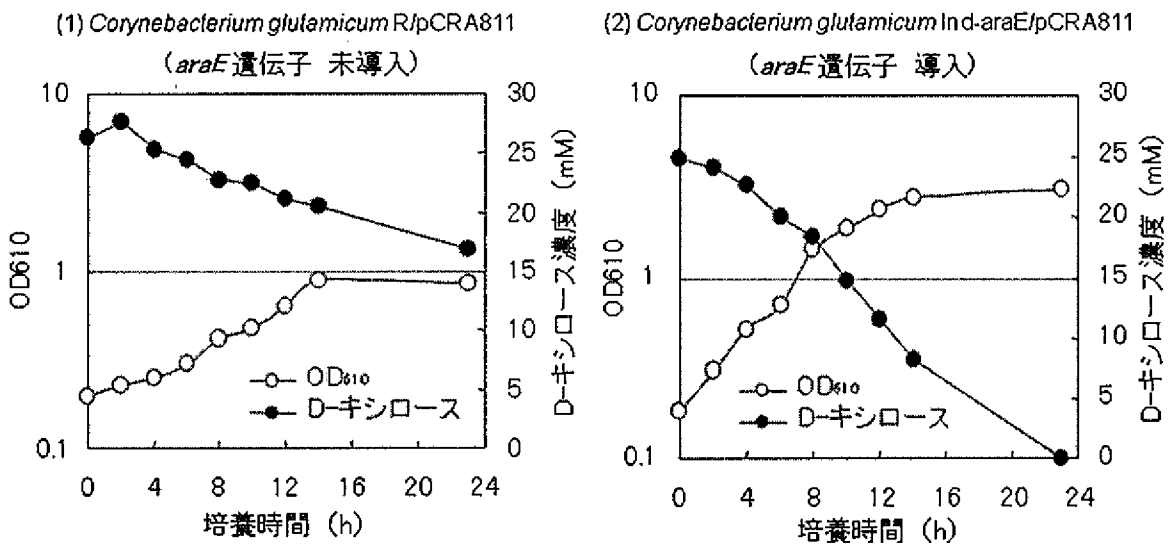
[図2]



[図3]

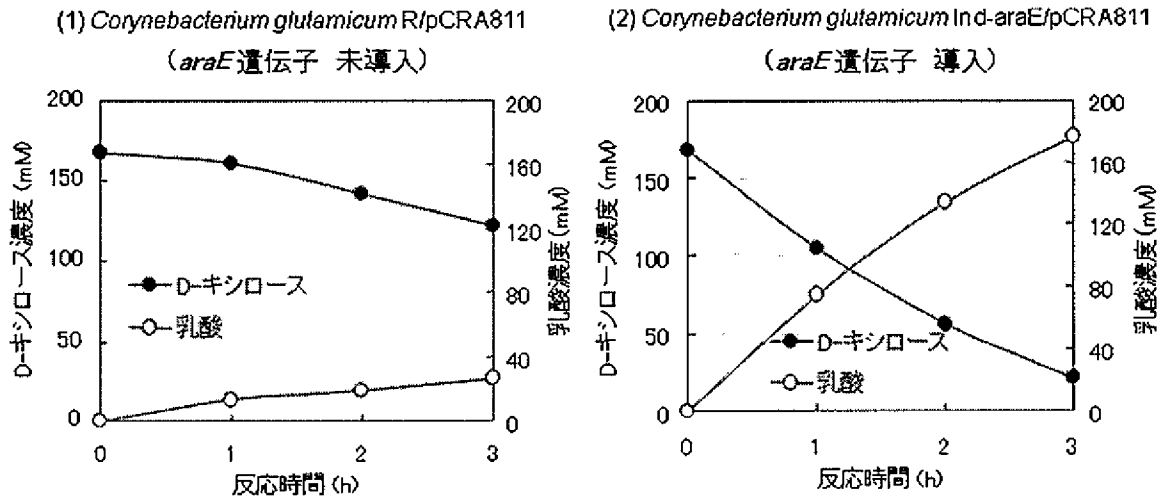


[図4]

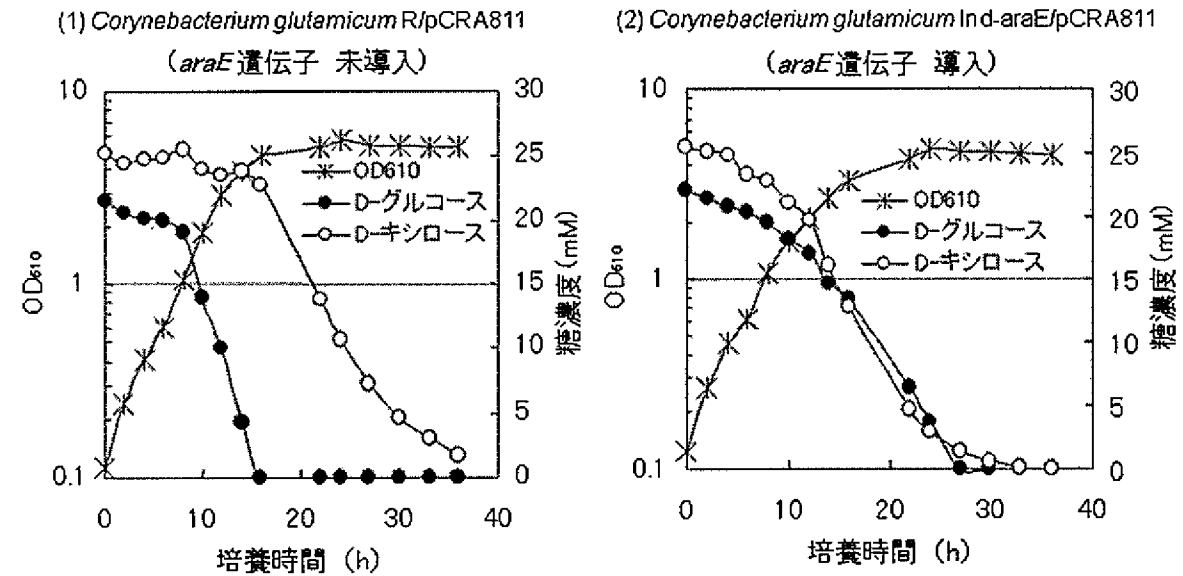




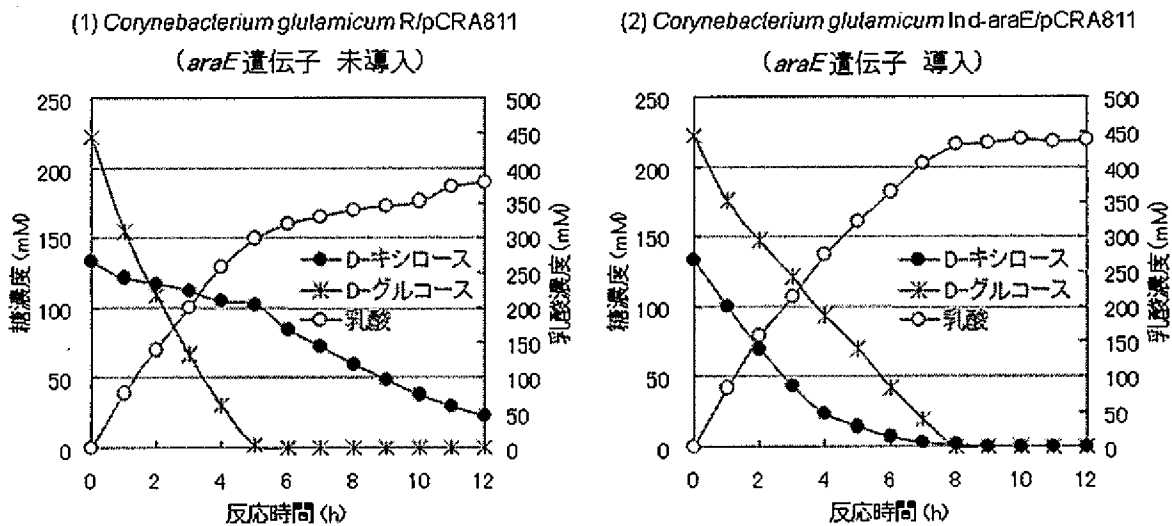
[図5]



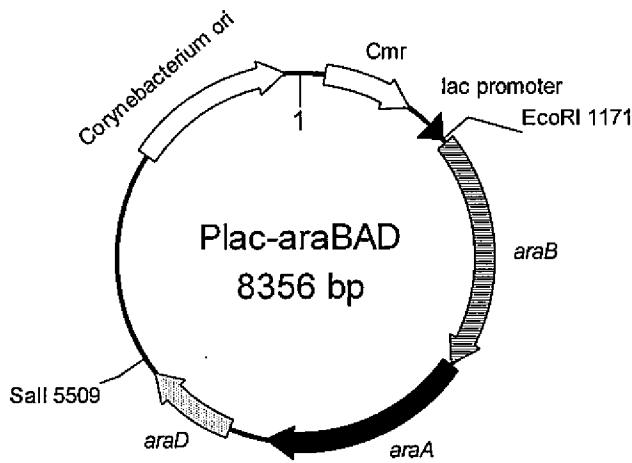
[図6]



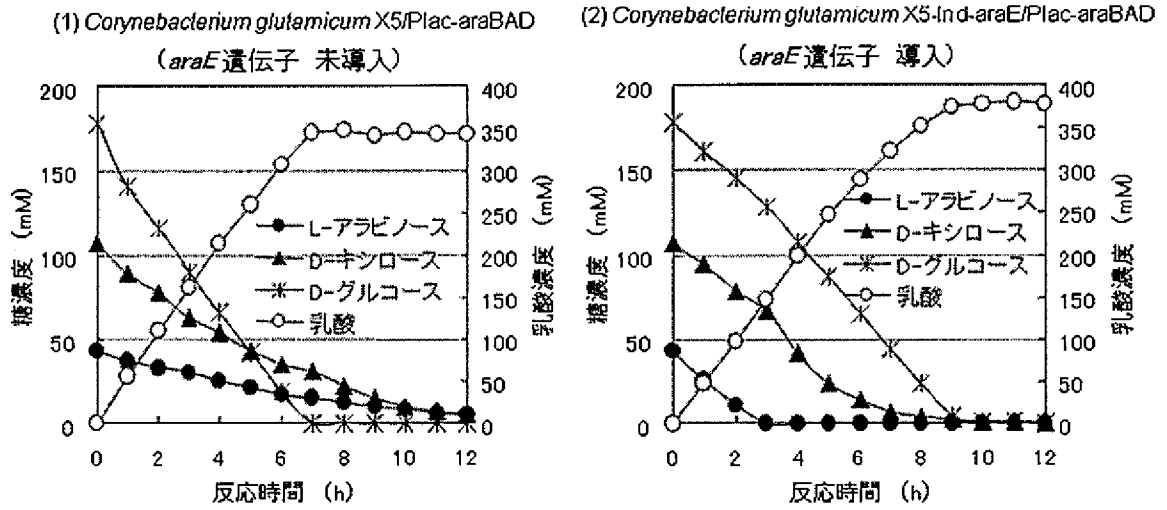
[図7]



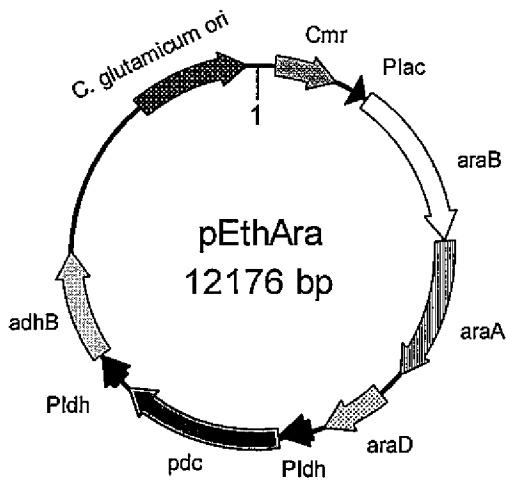
[図8]



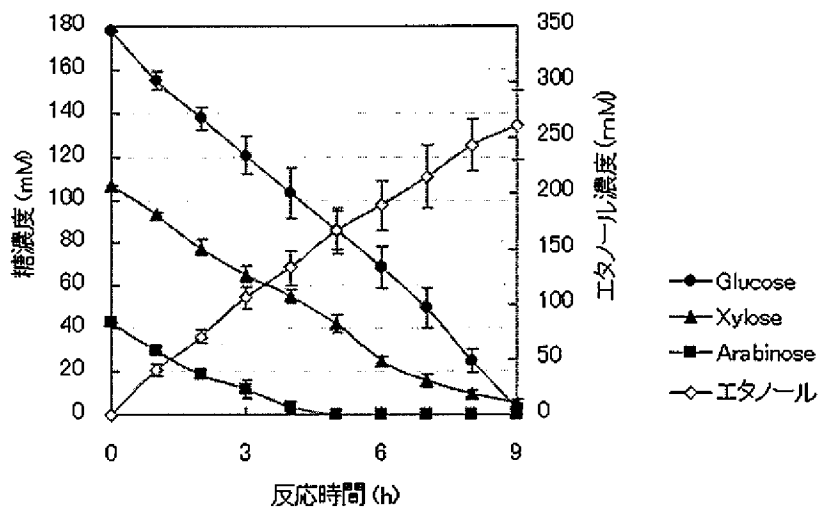
[図9]



[図10]



[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/06(2006.01)i, C12P7/18(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12P7/54(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12P13/04(2006.01)i 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) C12N1/21, C12N15/09, C12P7/06, C12P7/18, C12P7/46, C12P7/54, C12P7/56, C12P13/04 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) CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	KAWAGUCHI H., et al., Engineering of a xylose metabolic pathway in Corynebacterium glutamicum., Appl. Environ. Microbiol., 2006, Vol. 72, No. 5, p. 3418-3428	1, 2, 4-7, 11, 12/3, 8-10
Y/A	JP 2008-517583 A (Ajinomoto Co., Inc.), 29 May, 2008 (29.05.08), Claims; Par. Nos. [0006], [0007], [0010] to [0012], [0016]	1, 2, 4-7, 11, 12/3, 8-10
Y/A	SA-NOGUEIRA I., et al., Cloning, functional analysis, and transcriptional regulation of the Bacillus subtilis araE gene involved in L-arabinose utilization., J. Bacteriol., 1997, Vol. 179, No. 24, p. 7705-7711	1, 2, 4-7, 11, 12/3, 8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 June, 2009 (25.06.09)		Date of mailing of the international search report 07 July, 2009 (07.07.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060637

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2002-338596 A (Ajinomoto Co., Inc.), 27 November, 2002 (27.11.02), Par. Nos. [0002] to [0005], [0018]	1, 2, 4-7, 11, 12/3, 8-10
A	HERNANDEZ-MONTALVO V., et al., Characterization of sugar mixtures utilization by an Escherichia coli mutant devoid of the phosphotransferase system., Appl.Microbiol.Biotechnol., 2001, Vol. 57, No. 1-2, p. 186-191	1-12
A	NICHOLS N.N., et al., Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol., Appl.Microbiol. Biotechnol., 2001, Vol. 56, No. 1-2, p. 120-125	1-12
A	Miho SASAKI et al., "Kumikae Coryne-gata Saikin ni yoru Soft Biomass Yurai Kongoto no Doji Riyo", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2008 (05.03.08), page 267, 3A26p11	1-12
A	Hideo KAWAGUCHI et al., "Coryne-gata Saikin ni Okeru Arabinose Taisha Keiro no Kochiku", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2007 (05.03.07), page 43, 2A11a10	1-12
A	Shinsuke SAKAI et al., "Coryne-gata Saikin o Mochiita Kongo Torui kara no Bioethanol Seisan Process no Kochiku", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2007 (05.03.07), page 42, 2A11a09	1-12
A	Hideo KAWAGUCHI et al., "Coryne-gata Saikin ni Okeru xylose Taisha Keiro no Kochiku", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2006 (05.03.06), page 262, 3C29p13	1-12
A	JP 2003-512024 A (BASF AG.), 02 April, 2003 (02.04.03)	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2009/060637

JP 2008-517583 A	2008.05.29	EP 1807445 A WO 2006/043730 A1
JP 2002-338596 A	2002.11.27	WO 2000/037497 A1
JP 2003-512024 A	2003.04.02	JP 2003-512024 A JP 2003-517291 A JP 2004-534501 A JP 2006-141405 A JP 2007-202566 A JP 2007-236393 A JP 2007-252384 A JP 2007-252388 A JP 2007-252389 A JP 2007-252390 A JP 2007-267744 A JP 2007-267746 A JP 2007-289192 A US 2004/0180408 A1 US 6884614 B1 US 2005/0191733 A1 US 2005/0260707 A1 US 2006/0084152 A1 US 2006/0292674 A1 US 2007/0015251 A1 US 2007/0065914 A1 US 2007/0072265 A1 US 2007/0077622 A1 US 2007/0082383 A1 US 2007/0117183 A1 US 2007/0111290 A1 US 2007/0231259 A1 US 2008/0064067 A1 US 2005/0244935 A1 EP 1246922 A EP 1257649 A EP 1661987 A1 EP 1702980 A1 EP 1263963 A WO 2001/002583 A2 WO 2001/000843 A2 WO 2001/000844 A2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/06(2006.01)i, C12P7/18(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12P7/54(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i, C12P13/04(2006.01)i

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. C12N1/21, C12N15/09, C12P7/06, C12P7/18, C12P7/46, C12P7/54, C12P7/56, C12P13/04

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)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN),  
PubMed, JSTPlus (JDreamII),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
Y/ A	KAWAGUCHI H., et al., Engineering of a xylose metabolic pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ., Appl. Environ. Microbiol., 2006, Vol. 72, No. 5, p. 3418-3428	1, 2, 4-7, 11, 12/ 3, 8-10
Y/ A	JP 2008-517583 A (味の素株式会社) 2008.05.29, 特許請求の範囲、第【0006】、【0007】、【0010】 - 【0012】、【0016】欄	1, 2, 4-7, 11, 12/ 3, 8-10

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

- 「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
- 「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
- 「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)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「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
- 「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
- 「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
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.06.2009

国際調査報告の発送日

07.07.2009

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
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)

千葉 直紀

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3434

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
Y/ A	SA-NOGUEIRA I., et al., Cloning, functional analysis, and transcriptional regulation of the <i>Bacillus subtilis</i> araE gene involved in L-arabinose utilization., <i>J. Bacteriol.</i> , 1997, Vol. 179, No. 24, p. 7705-7711	1, 2, 4-7, 11, 12/ 3, 8-10
Y/ A	JP 2002-338596 A (味の素株式会社) 2002. 11. 27, 第【0002】 - 【0005】、【0018】欄	1, 2, 4-7, 11, 12/ 3, 8-10
A	HERNANDEZ-MONTALVO V., et al., Characterization of sugar mixtures utilization by an <i>Escherichia coli</i> mutant devoid of the phosphotransferase system., <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2001, Vol. 57, No. 1-2, p. 186-191	1-12
A	NICHOLS N.N., et al., Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol., <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2001, Vol. 56, No. 1-2, p. 120-125	1-12
A	佐々木 美穂, 他, 組換えコリネ型細菌によるソフトバイオマス由来混合糖の同時利用, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2008. 03. 05, p. 267, 3A26p11	1-12
A	川口 秀夫, 他, コリネ型細菌における arabinose 代謝経路の構築, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2007. 03. 05, p. 43, 2A11a10	1-12
A	酒井 伸介, 他, コリネ型細菌を用いた混合糖類からのバイオエタノール生産プロセスの構築, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2007. 03. 05, p. 42, 2A11a09	1-12
A	川口 秀夫, 他, コリネ型細菌における xylose 代謝経路の構築, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2006. 03. 05, p. 262, 3C29p13	1-12
A	JP 2003-512024 A (ビーエーエスエフ アクチエンゲゼルシャフト) 2003. 04. 02	1-12



JP 2008-517583 A	2008. 05. 29	EP 1807445 A WO 2006/043730 A1
JP 2002-338596 A	2002. 11. 27	WO 2000/037497 A1
JP 2003-512024 A	2003. 04. 02	JP 2003-512024 A JP 2003-517291 A JP 2004-534501 A JP 2006-141405 A JP 2007-202566 A JP 2007-236393 A JP 2007-252384 A JP 2007-252388 A JP 2007-252389 A JP 2007-252390 A JP 2007-267744 A JP 2007-267746 A JP 2007-289192 A US 2004/0180408 A1 US 6884614 B1 US 2005/0191733 A1 US 2005/0260707 A1 US 2006/0084152 A1 US 2006/0292674 A1 US 2007/0015251 A1 US 2007/0065914 A1 US 2007/0072265 A1 US 2007/0077622 A1 US 2007/0082383 A1 US 2007/0117183 A1 US 2007/0111290 A1 US 2007/0231259 A1 US 2008/0064067 A1 US 2005/0244935 A1 EP 1246922 A EP 1257649 A EP 1661987 A1 EP 1702980 A1 EP 1263963 A WO 2001/002583 A2 WO 2001/000843 A2 WO 2001/000844 A2