

(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
2010年8月12日(12.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/090330 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 13/06 (2006.01) C12P 13/12 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12P 13/14 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01) C12P 13/22 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051886
- (22) 国際出願日: 2010年2月9日(09.02.2010)
- (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 2009-027881 2009年2月9日(09.02.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和発酵バイオ株式会社(KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6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): 田畑 和彦(TABATA, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒3050841 茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和発酵バイオ株式会社 バイオプロセス開発センター内 Ibaraki (JP). 妹尾 彰宏(SENOO, Akihiro) [JP/JP]; 〒3050841 茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和発酵バイオ株式会社 バイオプロセス開発センター内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪府中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 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, TH, 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, SM, 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))
— 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))

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-AMINO ACID

(54) 発明の名称: L-アミノ酸の製造法

(57) Abstract: Disclosed is a process for improving the efficiency of the fermentative production of an L-amino acid. Specifically disclosed is a process for producing an L-amino acid, which is characterized by comprising culturing a microorganism in which the activity of any one of the proteins [1] to [3] mentioned below is higher than that in the parent strain thereof in a culture medium to produce and accumulate the L-amino acid in the culture medium, and collecting the L-amino acid from the culture medium: [1] a protein which comprises an amino acid sequence depicted in any one of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8; [2] a protein which comprises an amino acid sequence produced by deleting, substituting or adding one or more amino acid residues in an amino acid sequence depicted in any one of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8 and which has an L-amino acid transport activity; and [3] a protein which comprises an amino acid sequence having a 80% or more homology with an amino acid sequence depicted in any one of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8 and which has an L-amino acid transport activity.

(57) 要約: 本発明は、L-アミノ酸の発酵生産の効率を向上させる方法を提供する。具体的には、以下の[1]~[3]のいずれか1つに記載の蛋白質の活性が親株より高い微生物を、培地に培養し、L-アミノ酸を生成させ、該L-アミノ酸を該培地中に蓄積せしめ、続いて該培地中から該L-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法を提供する。[1]配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質; [2]配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質; 又は[3]配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性があるアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質。



WO 2010/090330 A1

明 細 書

発明の名称： L-アミノ酸の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、L-アミノ酸を生産する能力を有し、かつL-アミノ酸輸送活性が親株よりも高い微生物を用いた、L-アミノ酸の製造法に関する。より具体的には、L-アミノ酸を菌体内から菌体外へ輸送する活性が親株よりも高い微生物を構築してL-アミノ酸を生成させ、生成L-アミノ酸を該微生物菌体内から菌体外へ効率よく排出させることにより、アミノ酸生産性を高める製造法に関する。

背景技術

[0002] 微生物を利用したアミノ酸の製造は、アミノ酸発酵と呼ばれ、応用微生物学の分野において、従来広く行われている。アミノ酸発酵においては、その最終ステップにおいては、アミノ酸輸送活性、すなわち、生成アミノ酸をいかに細菌の菌体外へ排出させるかが、アミノ酸生産性を左右する重大なプロセスとなっており、菌体外への排出効率を上げるための様々な工夫が、これまでになされてきた。

[0003] 微生物菌体内のアミノ酸を菌体外へ運ぶには、通常、生体エネルギーを用いた能動輸送が必要である。菌体内アミノ酸を菌体外へ排出する蛋白質（排出蛋白質）が同定され、該蛋白質の発現強化によってもアミノ酸の生産性を付与又は増強できる事が知られている。例えばL-リジン、L-アルギニン排出遺伝子(lysE)（非特許文献1参照）の発現を強化したコリネバクテリウム属微生物の菌株を用いたL-リジンの製造法（特許文献1参照）、L-スレオニン、L-ホモセリンの排出遺伝子(rhtA)（非特許文献2参照）、L-システイン、L-シスチン、N-アセチルセリン又はチアゾリン誘導体の排出遺伝子(ydeD/eamA)（非特許文献3参照）の発現を強化したエシェリヒア属微生物の菌株を用いたL-システイン、L-シスチン、N-アセチルセリン又はチアゾリン誘導体の製造法(特許文献2)、又はL-リジンの耐性に

関与するL-リジン排出遺伝子 (ybjE) の発現を強化したエシェリヒア属微生物の菌株を用いたL-リジンを始めとするL-アミノ酸の製造法 (特許文献3) などが知られている。

[0004] しかしながら、L-セリン及びL-グルタミンに関する排出蛋白質、及び該蛋白質の活性を強化したアミノ酸の製造法の報告は無い。

[0005] ところで、大腸菌のnorM遺伝子はキノロン (quinolone) 耐性に関わる排出ポンプ遺伝子であることが知られている (非特許文献4)。emrD遺伝子はSDS輸送遺伝子と報告されている (非特許文献5)。rarDは薬剤輸送遺伝子と予測されているが、いずれもアミノ酸排出活性があることは知られていない (非特許文献6)。一方で、eamA (ydeD) 遺伝子は、L-システイン、L-シスチン、N-アセチルセリン又はチアゾリン誘導体の排出活性を有する遺伝子であると報告されている (非特許文献3)。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開97/23597号パンフレット
特許文献2：特開平11-56381号公報
特許文献3：特開2005-237379号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Mol. Microbiol., 22, 815-826 (1996)
非特許文献2：Res. Microbiol., 154, 123-135 (2003)
非特許文献3：Mol. Microbiol., 36, 1101-1112 (2000)
非特許文献4：J. Antimicrob. Chemother., 51, 545-56 (2003)
非特許文献5：J. Bacteriol., 183, 5803-5812 (2001)
非特許文献6：Science, 308, 1321-1323 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明が解決しようとする課題は、L-アミノ酸輸送活性が親株よりも高

い微生物にL-アミノ酸を生成させることによる、L-アミノ酸の効率のよい製造法を提供することにある。より具体的には、これまでL-アミノ酸輸送活性を強化することによる製造法の報告がなかったL-セリン及びL-グルタミンを含む、5つの中性アミノ酸について、排出蛋白質の強化による、生産性の高い新規の製造法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔4〕に関する。

〔1〕 L-アミノ酸輸送活性を有する以下の〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の蛋白質の活性が親株より高い微生物を、培地に培養し、L-アミノ酸を生成させ、該L-アミノ酸を該培地中に蓄積せしめ、次いで該培地中から該L-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法。

〔1〕 配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

〔2〕 配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質

〔3〕 配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性があるアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質

〔2〕 微生物が以下の〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のDNAで形質転換された微生物、又は該DNA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された微生物である、〔1〕記載のL-アミノ酸の製造法。

〔1〕 〔1〕の〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA

〔2〕 配列番号1、3、5及び7のいずれかで表される塩基配列を有するDNA

〔3〕 配列番号1、3、5及び7のいずれかで表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下でハイブリダイズし、

かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNA

〔3〕微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、セラチア属、シュードモナス属又はストレプトマイセス属に属する微生物である、〔1〕又は〔2〕記載のL-アミノ酸の製造法。

〔4〕L-アミノ酸がL-セリン、L-グルタミン、L-システイン、L-フェニルアラニン及びL-スレオニンからなる群より選ばれるL-アミノ酸である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のL-アミノ酸の製造法。

発明の効果

[0010] 本発明の製造法は、L-アミノ酸のうち、とりわけ、L-セリン、L-グルタミン、L-システイン、L-フェニルアラニン又はL-スレオニンの製造において、生産性の高い製造法である。

本発明の製造法は、微生物の菌体内のL-アミノ酸を菌体外に輸送する活性を有する蛋白質の活性を強化することにより、該微生物を用いて効率よくL-セリン及びL-グルタミンを製造する方法である。またL-システイン、L-スレオニン及びL-フェニルアラニンについても、同様にL-アミノ酸輸送活性を高めることによる、新規の製造法を提供する。

[0011] 本発明の発明者は、大腸菌の公知の輸送遺伝子*norM*、*emrD*又は*rarD*が、アミノ酸を菌体外へ輸送する機能を有することを見出し、前記輸送遺伝子が、L-セリン若しくはL-グルタミン、又は、L-システイン、L-スレオニン、若しくはL-フェニルアラニンの製造に有利に利用可能であることを見出した。

また、L-アミノ酸輸送活性が知られていた*eamA*についても、L-セリンの輸送を担うことを新たに見出し、これを利用したL-セリンの製造法を考案した。

[0012] 本発明の方法によれば、前記アミノ酸輸送遺伝子の活性を高めると、生成L-アミノ酸の菌体外への選択的能動輸送により、L-アミノ酸の生産を顕著に向上させることができる。しかもL-アミノ酸製造に用いる微生物は、外膜の種類（細胞壁、莢膜又は粘液層などの有無）によらず、グラム陽性・

グラム陰性を問わない。つまり本発明の製造法は、コリネバクテリウム属、バチルス属、及びストレプトマイセス属等のグラム陽性菌、並びに、エシュリヒア属、セラチア属、及びシュードモナス属等のグラム陰性菌のどちらにおいても使用することができる、汎用性の高い製造法である。

[0013] 本発明の製造法により、L-セリン及びL-グルタミンの製造効率がこれまでより飛躍的に改善される。とりわけL-セリンは、非必須アミノ酸ながら、生体内において重要な役割を担うアミノ酸であり、医薬品分野や化粧品分野において、アミノ酸混合物の原料として、利用価値が高い。またL-グルタミンは、体内で胃腸や筋肉などの機能を正常に保つアミノ酸であり、抗アルコール症組成物などの原料となる。これらのL-アミノ酸の生産性の高い製造法が確立され、工業的な大量生産が可能になれば、産業上の利用可能性は非常に高い。

L-システイン、L-スレオニン及びL-フェニルアラニンについても、本発明の製造法により、より一層経済的な生産が可能となった。L-システインは、美白効果があるため化粧品の原料として、化粧品業界で非常に価値の高いアミノ酸である。L-スレオニン及びL-フェニルアラニンは、ともに必須アミノ酸であり、L-スレオニンはアミノ酸輸液及び健康食品の成分として、またL-フェニルアラニンは、低カロリー甘味料のアスパルテーム（アスパルチルフェニルアラニンのメチルエステル、砂糖の200倍の甘みを有する）の原料として、各々有用なアミノ酸であり、本発明の製造法による生産性の向上が期待される。

発明を実施するための形態

[0014] 1. 本発明の製造法に用いられる微生物

L-アミノ酸輸送活性が親株より高い微生物

L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が親株より高い微生物は、（
a）親株の染色体DNA上の、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAの改変により得られる、i）親株より該蛋白質の比活性が向上した微生物、及びii）親株よりL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の生

産量が向上した微生物、並びに（b）親株をL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAで形質転換して得られる微生物、である。なお、本明細書中における親株とは、野生株でも、変異株であってもよく、改変又は形質転換の対象である元株である。野生株とは、野生集団中で最も高頻度に観察される表現型をもつ株をいう。該親株としては例えば微生物が*Escherichia coli* である場合、*E. coli* K-12株、B株、B/r株、W株の野生株、又はその変異株をあげることができ、該変異株としては*E. coli* XL1-Blue、*E. coli* XL2-Blue、*E. coli* DH1、*E. coli* MC1000、*E. coli* ATCC12435、*E. coli* W1485、*E. coli* JM109、*E. coli* HB101、*E. coli* No.49、*E. coli* W3110、*E. coli* NY49、*E. coli* MP347、*E. coli* NM522、*E. coli* BL21、*E. coli* ME8415、*E. coli* ATCC9637 等をあげることができる。

[0015] L-アミノ輸送活性を有する蛋白質としては、以下の [1] ~ [3] のいずれかに記載の蛋白質：

[1] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質；

[2] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質；並びに

[3] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性があるアミノ酸配列を有し、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質；

をあげることができる。

ここで、配列番号 1、3、5、7 の各 DNA 配列は、各々、前記の大腸菌における *norM* 遺伝子、*emrD* 遺伝子、*rarD* 遺伝子及び *eamA* 遺伝子をコードしており、配列 2、4、6 及び 8 で表されるアミノ酸配列は、各々、前記遺伝子がコードする、*norM* 蛋白質、*emrD* 蛋白質、*rarD* 蛋白質及び *eamA* 蛋白質を表している。

[0016] 上記において、1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ

酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

- [0017] 欠失、置換又は付加されるアミノ酸残基の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換又は付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。
- [0018] 配列番号2、4、6及び8で表されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたとは、同一配列中の任意の位置において、1個又は複数個のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されていてもよい。
- [0019] アミノ酸残基の欠失又は付加が可能なアミノ酸の位置としては、例えば配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列のN末端側及びC末端側の10アミノ酸残基をあげることができる。
- [0020] 欠失、置換又は付加は同時に生じてよく、置換又は付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

[0021] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質としては、配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質であり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をあげることができる。

[0022] アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータ

一を用いる。これらの解析方法の具体的な手法はよく知られている。

- [0023] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質が、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質であることは、例えば DNA 組換え法を用いて活性を確認したい蛋白質を発現する形質転換体を作製し、ラベル化した L-アミノ酸、及び該形質転換体から調製できる反転膜小胞 [J. Biol. Chem., 277, 49841 (2002)] を用いる方法 [J. Biol. Chem., 280, 32254 (2005)] により確認することができる。
- [0024] また、配列番号 2、4、6 及び 8 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質が、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質であることは、例えば活性を確認したい蛋白質をコードする DNA で親株を形質転換することにより該親株より該蛋白質の活性が高い形質転換体を作製し、該親株又は該形質転換体の培養液中に生成、蓄積した L-アミノ酸の量を比較することによっても確認できる。
- [0025] 上記 (a) の i) の、親株の染色体 DNA 上の、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする DNA の改変により得られる、親株より該蛋白質の比活性が向上した微生物としては、親株が有する該蛋白質のアミノ酸配列において 1 アミノ酸以上、好ましくは 1 ~ 10 アミノ酸、より好ましくは 1 ~ 5 アミノ酸、さらに好ましくは 1 ~ 3 アミノ酸が置換しているアミノ酸配列を有する蛋白質を有しているため、親株の L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質と比較して、その活性が向上した変異型蛋白質を有する微生物をあげることができる。
- [0026] 上記 (a) の ii) の、親株の染色体 DNA 上の、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする DNA の改変により得られる、親株より L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の生産量が向上した微生物としては、親株の染色体 DNA 上に存在する該蛋白質をコードする遺伝子の転写調節領域又はプロモーター領域の塩基配列において 1 塩基以上、好ましくは 1 ~ 10 塩基

、より好ましくは1～5塩基、さらに好ましくは1～3塩基の塩基が置換しているプロモーター領域を有しているため、親株のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の生産量と比較して、該蛋白質の生産量が向上している微生物をあげることができる。

[0027] 上記(b)の親株をL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAで形質転換して得られる微生物としては：

[4] 上記[1]～[3]のいずれかに記載の蛋白質をコードするDNA；

[5] 配列番号1、3、5及び7のいずれかで表される塩基配列を有するDNA；又は

[6] 配列番号1、3、5及び7のいずれかで表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下でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNA；
を用いて親株を形質転換して得られる微生物をあげることができる。

[0028] 該微生物としては、外来のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAをi) 染色体DNA上に有する微生物、及びii) 染色体外に有する微生物をあげることができる。すなわち、i)の微生物は、親株がL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを保有していない場合は、新たに導入された該DNAを1つ又は2つ以上、染色体DNA上に有する微生物であり、親株がL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを元来保有する場合には、新たに導入された該DNAを含む2つ以上のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを染色体DNA上に有する微生物である。ii)の微生物は、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAをプラスミドDNA上に有する微生物である。

[0029] 本明細書において「L-アミノ酸輸送活性」とは、細胞内のL-アミノ酸を細胞外へ排出する活性をいう。

[0030] 上記の「ハイブリダイズする」とは、特定の塩基配列を有するDNA又は該DNAの一部にDNAがハイブリダイズすることである。したがって、該特定の塩基配列を有するDNA又はその一部は、ノーザン又はサザンブロッ

ト解析のプロープとして用いることができ、またPCR解析のオリゴヌクレオチドプライマーとして使用できるDNAである。プロープとして用いられるDNAとしては、少なくとも100塩基以上、好ましくは200塩基以上、より好ましくは500塩基以上のDNAをあげることができ、プライマーとして用いられるDNAとしては、少なくとも10塩基以上、好ましくは15塩基以上のDNAをあげることができる。

[0031] DNAのハイブリダイゼーション実験の方法はよく知られており、例えば当業者であれば本願明細書に従い、ハイブリダイゼーションの条件を決定することができる。該ハイブリダイゼーションの条件は、モレキュラー・クローニング第2版、第3版（2001年）、Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press (1994)、Immunology methods manual, Academic press (Molecular)に記載の他、多数の他の標準的な教科書に従っておこなうことができる。

[0032] 上記の「ストリンジेंटな条件」とは、DNAを固定化したフィルターとプロープDNAとを50%ホルムアミド、5×SSC（750mmol/lの塩化ナトリウム、75mmol/lのクエン酸ナトリウム）、50mmol/lのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、及び20μg/lの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で、42℃にて一晩インキュベートした後、例えば約65℃の0.2×SSC溶液中で該フィルターを洗浄する条件が好ましいが、より低いストリンジेंट条件を用いることもできる。ストリンジेंटな条件の変更は、ホルムアミドの濃度調整（ホルムアミドの濃度を下げるほど低ストリンジेंटになる）、塩濃度及び温度条件の変更により可能である。低ストリンジेंट条件としては、例えば6×SSCE（20×SSCEは、3mol/lの塩化ナトリウム、0.2mol/lのリン酸二水素ナトリウム、0.02mol/lのEDTA、pH7.4）、0.5%のSDS、30%のホルムアミド、100μg/lの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で、37℃で一晩インキュベートした後、50℃の1×SSC、0.1%SDS溶液を用いて洗浄する条件をあげることができる。また、さらに低いストリンジेंटな条件としては、上記した低ストリンジेंट条件におい

て、高塩濃度（例えば5×SSC）の溶液を用いてハイブリダイゼーションを行った後、洗浄する条件をあげることができる。

[0033] 上記した様々な条件は、ハイブリダイゼーション実験のバックグラウンドを抑えるために用いるブロッキング試薬を添加、又は変更することにより設定することもできる。上記したブロッキング試薬の添加は、条件を適合させるために、ハイブリダイゼーション条件の変更を伴ってもよい。

[0034] 上記したストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えば上記したBLASTやFASTA等を用いて上記したパラメータ等に基づいて計算したときに、配列番号1、3、5及び7のいずれかで表される塩基配列からなるDNAと少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

[0035] 2. 本発明で用いられる微生物の調製

(1) L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が親株より高い微生物の調製

L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が親株より高い微生物のうち、比活性が親株のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質より高い微生物は、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAをin vitroにおいて変異剤を用いた変異処理、又はエラープライムPCRなどに供することにより該DNAに変異を導入した後、該変異DNAを親株の染色体DNA上に存在する変異導入前のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAと公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 6640 (2000)] を用いて置換することにより該変異DNAを発現する改変体を作製し、上記した方法により親株と改変体のL-アミノ酸輸送活性を比較することにより取得することができる。

[0036] また、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が親株より高い微生物のうち、該蛋白質の生産量が親株の生産量より向上している微生物は、親株が有するL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写調

節領域及びプロモーター領域、例えば該蛋白質の開始コドンの上流側200bp、好ましくは100bpの塩基配列を有するDNAをin vitroにおける変異処理、又はエラープライムPCRなどに供することにより該DNAに変異を導入した後、該変異DNAを親株の染色体DNA上に存在する変異導入前のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写調節領域及びプロモーター領域と公知の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 6640 (2000)] を用いて置換することにより変異型の転写調節領域又はプロモーター領域を有する改変体を作製し、RT-PCR又はノーザンハイブリダイゼーションなどにより、親株と改変体のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写量を比較する方法、又はSDS-PAGEなどにより親株と改変体のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の生産量を比較する方法により確認することができる。

[0037] また、親株のL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター領域を公知の強力なプロモーター配列と置換することによっても、親株よりL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の生産量が向上した微生物を取得することもできる。

[0038] そのようなプロモーターとしては、E. coliで機能するtrpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、 P_{SE} プロモーター等の、エシェリヒア・コリやファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let1プロモーターなどの人為的に造成したプロモーターもあげることができる。

[0039] さらにバチルス (Bacillus) 属に属する微生物中で発現させるためのxylAプロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)] やCorynebacterium属に属する微生物中で発現させるためのP54-6プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)] なども用いることができる。

- [0040] 以下に、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAの取得法、及び親株を該DNAで形質転換して得られる微生物の調製法について詳細に説明する。
- [0041] (a) L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAの取得
L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAは、例えば配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの塩基配列に基づき設計することができるプローブDNAを用いた、E. coliなどの微生物の染色体DNAライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション、又は該塩基配列に基づき設計することができるプライマーDNAを用いた、微生物、好ましくはE. coliの染色体DNAを鋳型としたPCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)]により取得することができる。
- [0042] また、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する配列を検索し、該検索によって得られた塩基配列に基づき、該塩基配列を有する微生物の染色体DNA、cDNAライブラリー等から上記した方法によりL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを取得することもできる。
- [0043] 取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断し、常法によりベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入した後、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)]又は3700 DNAアナライザー (アプライドバイオシステムズ社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。
- [0044] 上記のベクターとしては、pBluescriptII KS(+) (ストラタジーン社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Res., 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) (

ストラタジーン社製)、pT7Blue(ノバジェン社製)、pCR II(インビトロジェン社製)及びpCR-TRAP(ジーンハンター社製)などをあげることができる。

。

[0045] 宿主細胞としては、Escherichia属に属する微生物などをあげることができる。Escherichia属に属する微生物としては、例えば、E. coli XL1-Blue、E. coli XL2-Blue、E. coli DH1、E. coli MC1000、E. coli ATCC 12435、E. coli W1485、E. coli JM109、E. coli HB101、E. coli No.49、E. coli W3110、E. coli NY49、E. coli MP347、E. coli NM522、E. coli BL21、E. coli M E8415等をあげることができる。

[0046] 組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

[0047] 塩基配列を決定した結果、取得されたDNAが部分長であった場合は、該部分長DNAをプローブに用いた、染色体DNAライブラリーに対するザンハイブリダイゼーション法等により、全長DNAを取得することができる。

。

更に、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

[0048] 上記のようにして取得されるDNAとして、例えば、配列番号2、4、6及び8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、及び配列番号1、3、5及び7のいずれかで表される塩基配列を有するDNAをあげることができる。

[0049] (b) L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質を発現するプラスミドベクターで形質転換された微生物の取得

上記(a)の方法で得られるL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコー

ドするDNAをもとにして、必要に応じて、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することにより、該蛋白質量が向上した形質転換体を取得することができる。

[0050] 該DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製する。

該組換え体DNAを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が宿主細胞、すなわち親株より向上した形質転換体を得ることができる。

[0051] 発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込みが可能で、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

[0052] 原核生物を宿主細胞として用いる場合は、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを有する組換え体DNAは、原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNA、転写終結配列より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

[0053] 発現ベクターとしては、pCold1(タカラバイオ社製)、pCDF-1b、pRSF-1b(いずれもノバジェン社製)、pMAL-c2x(ニューイングランドバイオラブス社製)、pGEX-4T-1(ジーイーヘルスケアバイオサイエンス社製)、pTrcHis(インビトロジェン社製)、pSE280(インビトロジェン社製)、pGEMEX-1(プロメガ社製)、pQE-30(キアゲン社製)、pET-3(ノバジェン社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(+), pBluescript II KS(-)(ストラタジーン社製)、pTrS30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS30(FERM BP-5

407)より調製]、pTrS32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)より調製]、pPAC31 (W098/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (タカラバイオ社製)、pUC118 (タカラバイオ社製)、pPA1 (特開昭63-233798)等を例示することができる。

[0054] プロモーターとしては、*E. coli*等の宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、*trp*プロモーター (P_{trp})、*lac*プロモーター (P_{lac})、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、 P_{SE} プロモーター等の、*E. coli*やファージ等に由来するプロモーター、*SPO1*プロモーター、*SPO2*プロモーター、*penP*プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター、*tac*プロモーター、*lacT7*プロモーター、*let1*プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

[0055] さらに*Bacillus*属に属する微生物中で発現させるための*xyIA*プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)] や*Corynebacterium*属に属する微生物中で発現させるための*P54-6*プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)] なども用いることができる。

[0056] リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0057] L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを発現ベクターに結合させた組換え体DNAにおいては、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0058] このような組換え体DNAとしては、例えば後述するpSnorM、pSemrD、pSrarD及びpSeamAをあげることができる。

[0059] 該組換え体DNAの宿主としては、原核生物、より好ましくは細菌をあげることができる。

原核生物としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、バチルス属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバク

テリウム (*Corynebacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アリシクロバチルス (*Alicyclobacillus*) 属、アナベナ (*Anabaena*) 属、アナシスティス (*Anacystis*) 属、アスロバクター (*Arthrobacter*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、クロマチウム (*Chromatium*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、フォルミディウム (*Phormidium*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドスピリウム (*Rhodospirillum*) 属、セネデスムス (*Scenedesmus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、シネコッカス (*Synechococcus*) 属、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属等に属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリ、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・コアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*)、ブレビバクテリウム・イマリオフィルム (*Brevibacterium immariophilum*)、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム (*Corynebacterium acetoacidophilum*)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィルム (*Microbacterium ammoniaphilum*)、セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンチコラ (*Serratia fonticola*)、セラチア・リケファシエンス (*Serratia liquefaciens*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiob*

acter)、アグロバクテリウム・リゾジーンズ (*Agrobacterium rhizogenes*)、アグロバクテリウム・ルビ (*Agrobacterium rubi*)、アナベナ・シリンドリカ (*Anabaena cylindrica*)、アナベナ・ドリオルム (*Anabaena doliolum*)、アナベナ・フロスクア (*Anabaena flos-aquae*)、アースロバクター・オーレッセンス (*Arthrobacter aurescens*)、アースロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*)、アースロバクター・グロブフォルミス (*Arthrobacter globiformis*)、アースロバクター・ヒドロカーボグルタミカス (*Arthrobacter hydrocarboglutamicus*)、アースロバクター・ミソレンス (*Arthrobacter mysorens*)、アースロバクター・ニコチアナ (*Arthrobacter nicotianae*)、アースロバクター・パラフィネウス (*Arthrobacter paraffineus*)、アースロバクター・プロトフォルミエ (*Arthrobacter protophormiae*)、アースロバクター・ロセオパラフィナス (*Arthrobacter roseoparaffinus*)、アースロバクター・スルフレウス (*Arthrobacter sulfureus*)、アースロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureafaciens*)、クロマチウム・ブデリ (*Chromatium buderi*)、クロマチウム・テピダム (*Chromatium tepidum*)、クロマチウム・ビノサム (*Chromatium vinosum*)、クロマチウム・ワーミンギ (*Chromatium warmingii*)、クロマチウム・フルビアタティレ (*Chromatium fluviatile*)、エルビニア・ウレドバラ (*Erwinia uredovora*)、エルビニア・カロトバラ (*Erwinia carotovora*)、エルビニア・アナス (*Erwinia ananas*)、エルビニア・ヘリコラ (*Erwinia herbicola*)、エルビニア・パンクタタ (*Erwinia punctata*)、エルビニア・テレウス (*Erwinia terreus*)、メチロバクテリウム・ロデシアナム (*Methylobacterium rhodesianum*)、メチロバクテリウム・エクソトルクエンス (*Methylobacterium extorquens*)、フォルミディウム・エスピー (*Phormidium* sp.) ATCC29409、ロドバクター・カプスラタス (*Rhodobacter capsulatus*)、ロドバクター・スフェロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*)、ロドシュードモナス・ブラスタカ (*Rhodopseudomonas blastica*)、ロドシュードモナス・マリナ (*Rhodopseudomonas marina*)、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas p*

alustris)、ロドスピリウム・リブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、ロドスピリウム・サレキシゲンス (*Rhodospirillum salexigens*)、ロドスピリウム・サリナラム (*Rhodospirillum salinarum*)、ストレプトマイセス・アンボファシエンス (*Streptomyces ambofaciens*)、ストレプトマイセス・オーレオファシエンス (*Streptomyces aureofaciens*)、ストレプトマイセス・アウレウス (*Streptomyces aureus*)、ストレプトマイセス・フンジシディカス (*Streptomyces fungicidicus*)、ストレプトマイセス・グリセオクロモゲナス (*Streptomyces griseochromogenes*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・オリボグリセウス (*Streptomyces olivogriseus*)、ストレプトマイセス・ラメウス (*Streptomyces rameus*)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (*Streptomyces tanashiensis*)、ストレプトマイセス・ビナセウス (*Streptomyces vinaceus*)、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 等をあげることができ、好ましい原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属又はストレプトマイセス属等に属する細菌、例えば上記したエシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属又はストレプトマイセス属等に属する種をあげることができ、より好ましい細菌としてはエシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・ラクトファーメンタム、コリネバクテリウム・フラバム、コリネバクテリウム・エフィシエンス、バチルス・サチルス、バチルス・メガテリウム、セラチア・マルセツセンス、シュードモナス・プチダ、シュードモナス・エルギノーサ、ストレプトマイセス・セリカラー又はストレプトマイセス・リビダンスをあげることができ、特に好ましくはエシェリヒア・コリをあげることができる。

[0060] (c) L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAが染色体DNAに組み込まれた微生物の取得

上記（a）の方法で得られるL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを染色体DNAの任意の位置に組み込むことにより、L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質の活性が親株より高い微生物を取得することもできる。

L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードするDNAを微生物の染色体DNAの任意の位置に組み込む方法としては、相同組換えを利用した方法をあげることができ、宿主、すなわち親株としてE. coliを用いる場合にはProc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 6640 (2000)に記載の方法をあげることができる。

[0061] （2）L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物の調製

本発明のL-アミノ酸の製造法で用いられる、L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物としては、該能力を有する微生物であればいずれの微生物であってもよい。自然界から分離された株自身が該能力を有する場合は、該株そのものであってよく、改変又は形質転換された変異株である場合は、公知の方法により所望のL-アミノ酸を生産する能力を人為的に付与した微生物などをあげることができる。

[0062] 当該公知の方法としては、

（a）アミノ酸の生合成を制御する機構の少なくとも1つを緩和又は解除する方法、

（b）アミノ酸の生合成に関与する酵素の少なくとも1つを発現強化する方法、

（c）アミノ酸の生合成に関与する酵素遺伝子の少なくとも1つのコピー数を増加させる方法、

（d）アミノ酸の生合成経路から該アミノ酸以外の代謝産物へ分岐する代謝経路の少なくとも1つを弱体化又は遮断する方法、及び

（e）野生型株に比べ、アミノ酸のアナログに対する耐性度が高い細胞株を選択する方法、

などをあげることができ、上記公知の方法は単独又は組み合わせて用いるこ

とができる。

[0063] 上記 (a) については、例えばAgric. Biol. Chem., 43, 105-111(1979)、J. Bacteriol., 110, 761-763(1972)及びAppl. Microbiol. Biotechnol., 39, 318-323(1993)などに、上記 (b) については、例えばAgric. Biol. Chem., 43, 105-111(1979)及びJ. Bacteriol., 110, 761-763(1972)などに、上記 (c) については、例えばAppl. Microbiol. Biotechnol., 39, 318-323(1993)及びAgric. Biol. Chem., 39, 371-377(1987)などに、上記 (d) については、例えばAppl. Environ. Microbiol., 38, 181-190(1979)及びAgric. Biol. Chem., 42, 1773-1778(1978)などに、上記 (e) については、例えばAgric. Biol. Chem., 36, 1675-1684(1972)、Agric. Biol. Chem., 41, 109-116(1977)、Agric. Biol. Chem., 37, 2013-2023(1973)及びAgric. Biol. Chem., 51, 2089-2094(1987)などに記載されている。上記文献等を参考に各種アミノ酸を生産する能力を有する微生物を調製することができる。

[0064] さらに上記 (a) ~ (e) のいずれか、又は組み合わせた方法によるアミノ酸を生産する能力を有する微生物の調製方法については、Biotechnology 2nd ed., Vol. 6, Products of Primary Metabolism (VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996) section 14a, 14bやAdvances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, 79, 1-35 (2003)、アミノ酸発酵、学会出版センター、相田 浩ら (1986) に多くの例が記載されており、また上記以外にも具体的なアミノ酸を生産する能力を有する微生物の調製方法は、特開2003-164297、Agric. Biol. Chem., 39, 153-160 (1975)、Agric. Biol. Chem., 39, 1149-1153(1975)、特開昭58-13599、J. Gen. Appl. Microbiol., 4, 272-283(1958)、特開昭63-94985、Agric. Biol. Chem., 37, 2013-2023(1973)、国際公開97/15673号パンフレット、特開昭56-18596、特開昭56-144092及び特表2003-511086など数多くの報告があり、上記文献等を参照することにより1種以上のアミノ酸を生産する能力を有する微生物を調製することができる。

[0065] 上記方法によって調製することができるアミノ酸を生産する能力を有する微生物としては、例えばL-セリン生産菌として、L-セリン分解と取り込

み活性を有するsdaA遺伝子、sdaB遺伝子、sdaC遺伝子及びglyA遺伝子が欠損し、かつL-セリンに対する脱感作型serA遺伝子の発現が強化された微生物、L-グルタミン生産菌として、glnE遺伝子が欠損した微生物、L-システイン生産菌として、例えば、L-システインに対する脱感作型cysE遺伝子を保持する微生物、L-フェニルアラニン生産菌として、L-フェニルアラニンの脱感作型pheA遺伝子及び/又はチロシンの脱感作型aroF遺伝子を発現する微生物など、L-スレオニン生産菌として、 α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸(AHV)耐性並びにL-イソロイシン、L-メチオニン及びL-プロリン要求性が付与された微生物をあげることができる。

[0066] 上記したアミノ酸を生成、蓄積する微生物としては、上記(a)～(e)の方法が適用することができる微生物又は上記遺伝的形質を有する微生物であればいずれの微生物であってもよく、好ましくは原核生物、より好ましくは細菌をあげることができる。該組換え体DNAの宿主としては、原核生物、より好ましくは細菌をあげることができる。

[0067] アミノ酸を生産する微生物の具体例としては、L-セリン生産株として、L-セリン分解酵素(sdaA、sdaB、glyA)及び取り込み系(sdaC)を欠損し、かつL-セリン脱感作型serA遺伝子発現プラスミドを保有する、エシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2株、L-グルタミン生産株として、国際公開06/001379号パンフレットまたは米国公開公報2005-0287626号パンフレットに記載のエシェリヒア・コリ JGLE1及びエシェリヒア・コリ JGLB E1など、L-システイン生産株として、L-セリン分解酵素(sdaA、sdaB)及び取り込み系(sdaC)を欠損し、染色体DNA上のcysE遺伝子がL-システイン脱感作型cysE遺伝子に置換され、かつL-システイン脱感作型cysE遺伝子発現プラスミドを保有するエシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1株、L-フェニルアラニン生産株として、L-フェニルアラニン脱感作型pheA遺伝子及びL-チロシン脱感作型aroF遺伝子発現プラスミドを保有するエシェリヒア・コリ NM522/pBpheAfbraroFfbr株など、L-スレオニン生産株として、ATCC21148、ATCC21277及びATCC21650などをあげることができ

る。

[0068] さらに、アミノ酸を生産する能力を有する微生物の具体例としては、L-グルタミン酸生産株としてFERM BP-5807及びATCC13032など、L-グルタミン生産株としてFERM P-4806及びATCC14751など、L-リジン生産株としてFERM P-5084及びATCC13286など、L-メチオニン生産株としてFERM P-5479、VKPM B-2175及びATCC21608など、L-イソロイシン生産株としてFERM BP-3757及びATCC14310など、L-バリン生産株としてATCC13005及びATCC19561など、L-ロイシン生産株としてFERM BP-4704及びATCC21302など、L-アラニン生産株としてFERM BP-4121及びATCC15108など、L-セリン生産株としてATCC21523及びFERM BP-6576など、L-プロリン生産株としてFERM BP-2807及びATCC19224など、L-アルギニン生産株としてFERM P-5616及びATCC21831など、L-オルニチン生産株としてATCC13232など、L-ヒスチジン生産株としてFERM BP-6674及びATCC21607など、L-トリプトファン生産株としてDSM10118、DSM10121、DSM10123及びFERM BP-1777など、L-フェニルアラニン生産株としてATCC13281及びATCC21669など、L-チロシン生産株としてATCC21652など、L-システイン生産株としてW3110/pHC34(特表2003-511086記載)など、L-4-ヒドロキシプロリン生産株としてW096/27669記載のエシェリヒア・コリSOL R/pRH71など、L-3-ヒドロキシプロリン生産株としてFERM BP-5026及びFERMBP-5409など、L-シトルリン生産株としてFERM P-5643及びFERM P-1645などをあげることができる。

[0069] なお、上記のFERM番号で表される菌株は、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(日本)、ATCC番号で表される菌株は、American Type Culture Collection(米国)、VKPM番号で表される菌株は、Russian National Collection of Industrial Microorganisms(ロシア)、DSM番号で表される菌株はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(ドイツ)からそれぞれ入手することができる。

[0070] 3. 本発明のL-アミノ酸の製造法

上記2記載の方法で調製できる微生物の培養物は、該微生物が資化し得る

炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える天然培地又は合成培地を用いて該微生物を培養することにより取得することができる。

[0071] 炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フルクトース、スクロース、これらを含みする糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕及び大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、及びその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

[0072] 培養は、通常振盪培養又は深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15~40°Cがよく、培養時間は、通常5時間~7日間である。培養中pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0073] プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

[0074] 上記のようにして構築された、L-アミノ酸を生産する能力を有し、かつ

L-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質を発現した微生物の形質転換体を、培地に培養し、L-アミノ酸を生成させる。生成されたL-アミノ酸は、上記の形質転換体が有するL-アミノ酸輸送活性により、菌体内から該培地中に効率よく輸送され、培地中に蓄積する。従って、該培養物中から該L-アミノ酸を採取することにより、目的のL-アミノ酸を効率よく製造することができる。

[0075] 水性媒体中、又は培養物中に蓄積されたL-アミノ酸の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法あるいは、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

[0076] 以下に示す方法でアミノ酸生産菌を作製した。

[0077] [1] 脱感作型serA遺伝子発現プラスミドの造成

エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号18及び19で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして用いてPCRを行った。PCRは、鋳型として0.1 μ gの染色体DNA、0.3 μ mol/Lの各プライマー、1 unitsのKOD-plus- DNAポリメラーゼ(東洋紡製)、5 μ LのKOD-plus- DNAポリメラーゼ用 \times 10緩衝液(東洋紡製)、100 μ mol/LのMgSO₄、各200 μ mol/LのdNTP (dATP、dGTP、dCTP及びdTTP) を含む反応液50 μ Lを調製し、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、68 $^{\circ}$ Cで2分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

[0078] PCRで得られた増幅DNA断片をBglIII及びHindIIIで、pTrs30をBamHI及びHindIIIで消化した後、ライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて両DNAを連結し、連結したDNAを用いてエシェリヒア・コリDH5 α 株を形質転換した。以上の方法でtrpプロモーター下流にserA遺伝子が連結されたプラスミドDNAを取得し、これをpTrs30-serAと命名した。

[0079] pTrs30-serAを鋳型とし、配列番号20及び21で表される塩基配列からなる5'側末端をリン酸基で修飾した合成DNAをプライマーセットとして用い、PCRを行った。

PCR反応は、鋳型として0.01 μ gのpTrs30-serAのDNAを用いるほか、上記と同様の条件及び反応液組成により行った。

PCR反応後、約5.8kbのDNA断片が増幅したことを確認し、該増幅DNA断片を常法に従って精製した。

上記で増幅した直鎖状のDNA断片をライゲーションキット（タカラバイオ社製）により連結して環状とし、該環状DNAを用いてエシェリヒア・コリ DH5 α 株を形質転換した。アンピシリン耐性を指標に形質転換体を選択し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを抽出した。

以上により、pTrs30のtrpプロモーター下流に、配列番号17で表されるアミノ酸配列の294番目のグリシンがレーバリンに置換された、レーセリン脱感作型serA遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを調製し、これをpSserAfbr1と命名した。

[0080] さらに、pSserAfbr1を鋳型とし、配列番号22及び23で表される塩基配列からなる5'側末端をリン酸基で修飾した合成DNAをプライマーセットとして、PCRを行った。

PCRの反応液の組成及び反応条件は上記と同様である。

増幅した直鎖状のDNA断片を連結して環状とし、該環状DNAを用いてエシェリヒア・コリ DH5 α 株を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドDNAを抽出した。

以上により、pTrs30のtrpプロモーター下流に、配列番号17で表されるアミノ酸配列の294番目のグリシンがレーバリンに、364番目のレーアスパラギンがレーアラニンに置換された、レーセリン脱感作型serA遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを調製し、これをpSserAfbr2と命名した。

[0081] [2] sdaA、sdaB、sdaC及びglyA遺伝子が欠損した微生物の作製

エシェリヒア・コリの染色体DNA上の特定遺伝子の欠損は、ラムダファージの相同組換え系を利用した方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 6641-6645 (2000)] に従って行った。以下に記載のプラスミドpKD46、pKD3及びpCP20は、エシェリヒア・コリ ジェネティック ストック センター（米国エー

ル大学) から該プラスミドを保持するエシェリヒア・コリ株を入手し、当該株から公知の方法により抽出して用いた。

[0082] (1) 遺伝子欠損用薬剤耐性遺伝子断片のクローニング

sdaA遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号24及び25、並びに26及び27で表される塩基配列からなるDNAを、sdaC-sdaB遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号28及び29、並びに30及び31で表される塩基配列からなるDNAを、glyA遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号32及び33、並びに34及び35で表される塩基配列からなるDNAをそれぞれ用い、エシェリヒア・コリATCC9637株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは0.1 μ gの染色体DNA、0.5 μ mol/Lの各プライマー、2.5unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4 μ LのPfu DNAポリメラーゼ用 \times 10緩衝液、200 μ mol/Lの各deoxyNTPを含む40 μ Lの反応液を用い、94 $^{\circ}$ Cで1分間、55 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間からなる工程を30回繰り返すことにより行った。

[0083] 該PCRにより、目的とするsdaA、sdaB、sdaC及びglyA各遺伝子欠損の上流及び下流域の相同配列断片(それぞれ、上流DNA断片、下流DNA断片という)を取得した。

[0084] 次に上記の各遺伝子の上流DNA断片、下流DNA断片、及びHindIIIで切断したpKD3を鋳型に、sdaA遺伝子欠損用DNA断片では配列番号24及び27で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして、sdaC-sdaB遺伝子欠損用DNA断片では配列番号28及び31で用いた表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして、glyA遺伝子欠損用DNA断片では配列番号32及び35で用いた表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして、クロスオーバーPCR法[J. Bacteriol., 179, 6228-6237 (1997)]により、中心部にpKD3のクロラムフェニコール耐性遺伝子部分が挿入し、3つのDNA断片が連結したDNA断片(sdaA、sdaB、sdaC及びglyA各遺伝子欠損用DNA断片)を取得した。

[0085] (2) sdaA遺伝子が欠損したエシェリヒア・コリの作製

エシェリヒア・コリATCC9637株をpKD46で形質転換し、得られた形質転換体をエシェリヒア・コリATCC9637/pKD46と命名した。

10mmol/LのL-アラビノースと50 μ g/mlのアンピシリンの存在下で培養して得られたエシェリヒア・コリATCC9637/pKD46に、エレクトロポレーション法により上記で取得したsdaA遺伝子欠損用DNA断片を導入し、クロラムフェニコール耐性を指標にしてエシェリヒア・コリATCC9637/pKD46の染色体DNA上に該DNA断片が相同組換えにより組込まれた形質転換体（該形質転換体をエシェリヒア・コリATCC9637/pKD46 sdaA::catと命名した）を選択した。

[0086] エシェリヒア・コリATCC9637/pKD46 sdaA::catを、25mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地 [LB培地[10g/l バクトトリプトン（ディフコ社製）、5g/l イーストエキス（ディフコ社製）、5g/l 塩化ナトリウム]に1.5%の寒天を加えたもの] に植菌し、42°Cで14時間培養した後、単コロニー分離した。得られた各コロニーを25mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地、及び100mg/lのアンピシリンを含むLB寒天培地にレプリカして37°Cで培養し、クロラムフェニコール耐性かつアンピシリン感受性を指標にしてpKD46が脱落した株（エシェリヒア・コリATCC9637 sdaA::cat）を選択した。

[0087] 次にエシェリヒア・コリATCC9637 sdaA::catをpCP20を用いて形質転換し、pCP20を保持する株（エシェリヒア・コリATCC9637/pCP20 sdaA::cat）を取得した。

エシェリヒア・コリATCC9637/pCP20 sdaA::catを薬剤無添加のLB寒天培地に植菌し、42°Cで14時間培養した後、単コロニー分離した。得られた各コロニーを薬剤無添加LB寒天培地、25mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地及び100mg/Lのアンピシリンを含むLB寒天培地にレプリカして、30°Cで培養し、クロラムフェニコール感受性かつアンピシリン感受性を示す株を数株選択した。

[0088] 上記で選択した各株からそれぞれ染色体DNAを調製し、染色体DNA上において、sdaA遺伝子の外側に位置するDNAの塩基配列に基づいて設計し

たDNAをプライマーセットとして用い、染色体DNAを鋳型にしたPCRを行った。PCRは、0.1gの染色体DNA、0.5 μ mol/Lの各プライマー、2.5 unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4 μ LのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200 μ mol/Lの各deoxyNTPを含む40 μ Lの反応液を用い、94°Cで1分間、55°Cで2分間、72°Cで3分間からなる工程を30回繰り返すことにより行った。

上記PCRにより染色体DNAよりsdaA遺伝子が欠損したことが確認できた株を、エシェリヒア・コリATCC9637sdaA株と命名した。

[0089] (3) sdaA、sdaB、sdaC及びglyA各遺伝子が多重欠損したエシェリヒア・コリの作製

(2) で得られたATCC9637sdaA株について、(1) で取得したsdaC-sdaB又はglyA 遺伝子欠損用クロラムフェニコール耐性遺伝子断片を用いて(2)で行った方法を繰り返すことにより、さらにsdaC、sdaB及びglyA遺伝子が欠損した株を作製した。

[0090] 上記方法により、各々の遺伝子欠損株が取得されたことは、上記(2)と同様、選択した各株からそれぞれ染色体DNAを調製し、染色体DNA上において、sdaC-sdaB又はglyA遺伝子の外側に位置するDNAの塩基配列に基づいて設計したDNAをプライマーセットとして用い、染色体DNAを鋳型にしたPCRにより確認した。

上記によりsdaA、sdaC-sdaB及びglyAの各遺伝子の多重遺伝子欠損株であると確認された株を、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABCglyA株と名付けた。

[0091] [3] エシェリヒア・コリ由来の脱感作型pheA遺伝子及び脱感作型aroF遺伝子発現プラスミドの構築

(1) 脱感作型pheA遺伝子発現プラスミドの造成

フェニルアラニンアナログ耐性変異導入により得られたフェニルアラニンの脱感作型pheA遺伝子を発現するプラスミドpE pheA 22 (特開昭61-260892) から脱感作型pheA遺伝子を、チロシン耐性変異導入により得られたチロシンの脱感作型aroF遺伝子を発現するプラスミドpE aroF 18 (特開昭62-65691) から脱感作型aroF遺伝子を取得し、以下の方法により発現プラスミドを構築

した。

[0092] 配列番号 36 及び配列番号 37 で表される塩基配列を有する合成 DNA をプライマーセットとし、プラスミド pE pheA 22 を鋳型として、PCR を行った。PCR は、10ng のプラスミド DNA、0.5 $\mu\text{mol/L}$ の各プライマー、2.5 units の Pfu DNA ポリメラーゼ、4 μL の Pfu DNA ポリメラーゼ用 $\times 10$ 緩衝液、200 $\mu\text{mol/L}$ の各 dNTP を含む反応液 40 μL を調製し、94°C で 1 分間、55°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、pheA 遺伝子断片に相当する約 1.1 kb の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルムを添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80°C に 30 分間放置した。該溶液を遠心分離し、得られた DNA の沈殿を 20 μL の TE に溶解した。

該溶解液 5 μL を用い、増幅した DNA を制限酵素 ClaI 及び BamHI で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより、pheA 遺伝子を含む 1.1 kb の DNA 断片を回収した。

trp プロモーターを含む発現ベクター pTrS30 0.2 μg を制限酵素 ClaI 及び BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、上記と同様の方法により 4.6 kb の DNA 断片を回収した。

[0093] 上記で得られた pheA 遺伝子を含む 1.1 kb の DNA 断片と 4.6 kb の DNA 断片とをライゲーションキットを用いて、16°C で 16 時間反応させ連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換した後、該形質転換体を 50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布して、30°C で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出して、脱感作型 pheA 遺伝子発現プラスミドが取得されていることを制限酵素消化により確認し、該プラスミドを pPHEA1 と命名した。

[0094] (2) 脱感作型 pheA 遺伝子及び脱感作型 aroF 遺伝子発現プラスミドの構築
配列番号 38 及び配列番号 39 で表される塩基配列を有する合成 DNA を

プライマーセットとして用い、プラスミドpE_aroF_18を鋳型としてPCRを行った。PCRは、上記(1)と同様の反応液組成及び反応条件により行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、aroF遺伝子断片に相当する約1.1kbの断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルムを添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80°Cに30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20μLのTEに溶解した。

該溶解液5μLを用い、増幅したDNAを制限酵素BglII及びBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIキットにより、脱感作型aroF遺伝子を含む1.1kbのDNA断片を回収した。

次に上記(1)で取得した脱感作型pheA遺伝子発現プラスミドpPHEA1_0.2μgを制限酵素BamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、上記と同様の方法により5.7kbのDNA断片を回収した。該5.7kbのDNA断片の末端脱リン酸化を、60°Cで30分間、アルカリホスファターゼ処理することにより行った。反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルムを添加、混合して遠心分離した後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80°Cに30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20μLのTEに溶解した。

[0095] 上記で得られた脱感作型aroF遺伝子を含む1.1kbのDNA断片とアルカリホスファターゼ処理した5.7kbのDNA断片とをライゲーションキットを用いて、16°Cで16時間反応させ連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換した後、50μg/mLのアmpiシリンを含むLB寒天培地に塗布して、30°Cで一晩培養した。

[0096] 生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、脱感作型aroF遺伝子が脱感作型pheA遺伝子と順向きに挿入された脱感作型aroF遺伝子及び脱感作型pheA 遺伝子発現プラスミドが取得されている

ことを制限酵素消化により確認し、該プラスミドをpBpheAfbraroFfbrと命名した。

[0097] [4] セリン分解及び取り込み系sdaA、sdaB、sdaC遺伝子が欠損し、染色体に脱感作型cysE遺伝子が置換された微生物の作製

(1) cysE遺伝子欠損用薬剤耐性遺伝子断片と脱感作型cysE遺伝子置換用遺伝子断片のクローニング

cysE遺伝子欠損用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号40及び41、並びに配列番号42及び43で表される塩基配列からなる合成DNAをそれぞれ用いて、エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型として[2](1)と同条件でPCRをそれぞれ行った。該PCRにより、目的とするcysE遺伝子欠損用の上流及び下流域の相同配列断片(それぞれ、上流DNA断片、下流DNA断片という)を取得した。

[0098] また、脱感作型cysE遺伝子置換用DNA断片増幅用プライマーセットとして配列番号40及び44で表される塩基配列からなる合成DNA、並びに配列番号43及び45で表される塩基配列からなる合成DNAをそれぞれプライマーセットとして用い、エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型として上記と同様にPCRを行い、脱感作型cysE置換用の上流及び下流域の相同配列断片(それぞれ、置換上流DNA断片、置換下流DNA断片という)を取得した。

[0099] 次にcysE遺伝子欠損用DNA断片取得のために、上記で取得したcysE遺伝子欠損用の上流DNA断片、下流DNA断片、及びHindIIIで切断したpKD3を鋳型に、配列番号40及び43で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットにクロスオーバーPCR法により、中心部にpKD3のクロラムフェニコール耐性遺伝子部分が挿入し、3つのDNA断片が連結したDNA断片を取得した。

[0100] また脱感作型cysE遺伝子置換用DNA断片取得のために、上記の置換上流DNA断片、置換下流DNA断片を鋳型に、配列番号40及び43で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットにクロスオーバーPCR法に

より、cysE遺伝子上に脱感作型の変異を含む2つのDNA断片が連結したDNA断片を取得した。

[0101] (2) 脱感作型cysE遺伝子に置換されたエシェリヒア・コリの作製

[2] (3) で得られたsdaA、sdaB、sdaCの各遺伝子が欠損したエシェリヒア・コリATCC9637sdaABC株をpKD46で形質転換し、得られた形質転換体をエシェリヒア・コリATCC9637sdaABC/pKD46と命名した。

[2] (2) と同様の方法で、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABC/pKD46の染色体DNA上に上記(1)のcysE遺伝子欠損用DNA断片が相同組換えにより組込まれた形質転換体(エシェリヒア・コリATCC9637sdaABC/pKD46 cysE::cat)を選択し、その後クロラムフェニコール耐性遺伝子の脱落した株を選択した。

上記で選択した各株からそれぞれ染色体DNAを調製し、染色体DNA上において、cysE遺伝子の外側に位置するDNAの塩基配列に基づいて設計したDNAをプライマーセットとして用い、[2] (2) 同様のPCRを行った。

上記PCRにおいて、cysE遺伝子を含まない、短い増幅断片を与えた株をcysE遺伝子欠損株とし、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE1株と命名した。

[0102] 次に、脱感作型cysE遺伝子の染色体上での置換を行った。

上記のエシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE1株をpKD46で形質転換し、得られた形質転換体をエシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE1/pKD46と命名した。

[2] (2) と同様の方法で、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE1/pKD46の染色体DNA上に上記(1)の脱感作型cysE遺伝子置換用DNA断片が相同組換えにより組込まれた形質転換体をM9+グルコース最小寒天培地[6g/L リン酸水素二ナトリウム、3g/L リン酸二水素カリウム、0.5g/L 塩化ナトリウム、1g/L 塩化アンモニウム、2g/L グルコース、1mM硫酸マグネシウム・7水和物、0.1mM 塩化カルシウム・2水和物、10mg/l ビタミンB₁、寒天15g/L

、そのうちグルコース、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、ビタミンB₁は個別滅菌し添加した]上での生育で選択した。

[0103] 上記で選択した各株からそれぞれ染色体DNAを調製し、染色体DNA上において、cysE遺伝子の外側に位置するDNAの塩基配列に基づいて設計したDNAをプライマーセットとして用い、[2] (2)と同様のPCRを行った。

上記PCRにおいてcysE遺伝子を含むDNA断片が増幅されたことにより、脱感作型cysE遺伝子置換株が取得されたことを確認し、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE256株と命名した。

[0104] [5] エシェリヒア・コリ由来の脱感作型cysE遺伝子発現プラスミドの構築

[4] で得られたエシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE256株をLB培地に植菌し30°Cで一晩静置培養した。培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の飽和フェノールを用いる方法により、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

配列番号46及び47で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして用い、鋳型として上記の染色体DNAを用いて、[1]と同様の条件及び反応液組成でPCRを行った。

上記PCRで得られた増幅DNA断片、及びpTrs30をそれぞれHindIII及びBamHIで消化した後、ライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて両DNAを連結し、連結体DNAを用いてエシェリヒア・コリDH5 α 株を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドDNAを抽出した。

以上の方法でtrpプロモーター下流に脱感作型cysE遺伝子が連結された発現ベクターを造成し、pScysEfbr1と命名した。

実施例

[0105] 以下、本発明の実施例を示すが、本発明は実施例に限定されるものではない。

[0106] 実施例1

(1) norM遺伝子発現プラスミドの造成

エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号9及び10で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして、PCRを行った。

PCRは、鋳型として0.1 μ gの染色体DNA、0.3 μ mol/Lの各プライマー、1 unitsのKOD-plus- DNAポリメラーゼ(東洋紡製)、5 μ LのKOD-plus- DNAポリメラーゼ用 \times 10緩衝液(東洋紡製)、100 μ mol/LのMgSO₄、各200 μ mol/LのdNTP (dATP、dGTP、dCTP及びdTTP)を含む反応液50 μ Lを調製し、94°Cで15秒間、55°Cで30秒間、68°Cで2分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

約1.4kbのDNA断片が増幅したことを確認し、該DNA断片を常法に従って精製した。

該DNA断片及び発現ベクターpTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)より調製可能]をそれぞれHindIII、BamHIで切断し、アガロース電気泳動によりDNA断片を分離した後、GENECLEAN II kit (BIO 101 社製)を用いて、制限酵素消化DNA断片をそれぞれ回収した。

回収して得られた約1.4kbのDNA断片及びpTrs30の制限酵素消化断片をライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。

連結後のDNAを用いてエシェリヒア・コリ DH5 α 株(東洋紡製)を形質転換し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を選択した。

選択した形質転換体より公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析し、得られたプラスミドが、発現ベクターpTrs30のtrpプロモーター下流に、配列番号1で表される塩基配列からなるnorM遺伝子が挿入された構造を有していることを確認した。当該プラスミドをpTrs30-norMと命名した。

プラスミドpTrs30-norM及び発現ベクターpSTV29(タカラバイオ社製)をそれぞれEcoRI、BamHIで切断し、上記と同様の方法により連結し、pSTV29に、trpプロモーター及びnorM遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドをpSnorMと命名した。

[0107] (2) emrD遺伝子発現プラスミドの造成

(1)と同様の反応液組成及び反応条件により、エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号11及び12で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして、PCRを行った。

PCRで得られた増幅DNA断片及びpTrs30をそれぞれHindIII及びSacIで消化した後、(1)と同様の方法でpTrs30のtrpプロモーター下流に配列番号3で表される塩基配列からなるemrD遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを取得した。この得られたプラスミドDNAをpTrs30-emrDと命名した。

上記で得られたpTrs30-emrD及びpSTV29をそれぞれEcoRI及びSacIで消化した後、(1)と同様の方法でpSTV29に、trpプロモーター及びemrD遺伝子が連結されたプラスミドDNAを調製した。得られたプラスミドDNAをpSemrDと命名した。

[0108] (3) rarD遺伝子発現プラスミドの造成

(1)と同様の反応液組成及び反応条件により、エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号13及び14で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして用いてPCRを行った。

PCRで得られた増幅DNA断片、及びpTrs30をそれぞれHindIII及びBamHIで消化した後、(1)と同様の方法でpTrs30のtrpプロモーター下流に配列番号5で表される塩基配列からなるrarD遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを調製し、これをpTrs30-rarDと命名した。

上記で得られたpTrs30-rarD及びpSTV29をそれぞれEcoRI及びBamHIで消化した後、(1)と同様の方法でpSTV29に、trpプロモーター及びrarD遺伝子が連結されたプラスミドDNAを造成し、これをpSrarDと命名した。

[0109] (4) eamA遺伝子発現プラスミドの造成

(1)と同様の反応液組成及び反応条件により、エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号15及び16で表される塩基配列からなる合成DNAをプライマーセットとして用いてPCRを行った。

PCRで得られた増幅DNA断片及びpTrs30をそれぞれHindIII及びBamHI

で消化した後、(1)と同様の方法でpTrs30のtrpプロモーター下流に配列番号7で表される塩基配列からなるeamA遺伝子が挿入された構造を有するプラスミド調製し、これをpTrs30-eamAと命名した。

上記で得られたpTrs30-eamA及びpSTV29をそれぞれEcoRI及びBamHIで消化した後、(1)と同様の方法で、pSTV29にtrpプロモーター及びeamA遺伝子が挿入された構造を有するプラスミドDNAを調製し、これをpSeamAと命名した。

[0110] 実施例2. L-セリン (L-Ser) の生産

アミノ酸生産株の作製 [2] で得られたATCC9637sdaABCglyA株に同 [1] で得られたpSserAfbr2を形質転換し、L-セリン生合成中間体 (3-phospho-hydroxy-pyruvate) 合成酵素活性を有する蛋白質を生産する能力を有するエシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2を取得した。

次に同 [1] で得られたpSnorM、pSemrD、pSrarD、pSeamA及びpSTV29を用いて、エシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2をそれぞれ形質転換し、得られた形質転換体をそれぞれエシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSnorM、ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSemrD、ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSrarD、ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSeamA及びATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSTV29を取得した。

[0111] 上記で得られた形質転換体を100 µg/mlのアンピシリン及び20 µg/mlのクロラムフェニコールを含む培地A[10g/L トリプトン(ディフコ)、5g/L Yeast extract(ディフコ)、5g/L塩化ナトリウム、1g/L リン酸二水素カリウム、3g/L リン酸水素二カリウム]が5ml入った太型試験管に接種し、30°Cで16時間培養した。

該培養液を100 µg/mlのアンピシリン及び20 µg/mlのクロラムフェニコールを含む培地B [0.72g/L Yeast extract、14.4g/L 硫酸アンモニウム、1.8g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、72mg/L 塩化カルシウム、100 µg/L ビタミンB₁、21.6mg/L 硫酸鉄・7水和物、7.2mg/L 硫酸マンガン、1.4mg/L 硫酸銅、3.6 mg/L 硫酸亜鉛、1.4mg/L 塩化ニッケル、1.4mg/L 塩化コバルト、21.6mg/L

パントテン酸カルシウム、14.4mg/L ニコチン酸、36mg/L チアミン、14.4mg/L ピリドキシン塩酸塩、72mg/L グリシン、21g/L 炭酸カルシウム、48g/L グルコース、0.56g/L リン酸二水素カリウム、2.88g/L リン酸水素二カリウム、0.6g/L リン酸水素二ナトリウム、pH無調製、グルコース、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウムは別個に蒸煮後添加した] が5ml入っている試験管に10%接種し、30°Cで24時間培養した後、該培養液を遠心分離して培養上清を取得した。

HPLCを用いて該培養上清中の生成物を分析した。結果を表1に示す。

[0112] [表1]

E. coli 菌株	OD ₆₆₀	L-Ser (mg/L)
ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSTV29	6.1	10.6
ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSnorM	5.8	14.4
ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSemrD	7.1	12.3
ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSrard	6.2	23.8
ATCC9637sdaABCglyA/pSserAfbr2/pSeamA	6.7	14.4

[0113] 表1に示した通り、norM遺伝子（配列番号1で表される。以下、配列番号のみで記す）、emrD遺伝子（配列番号3）、rarD遺伝子（配列番号5）、又はeamA遺伝子（配列番号7）の各遺伝子配列をそれぞれ有する発現プラスミドを導入し、それぞれnorM蛋白質（配列番号2）、emrD蛋白質（配列番号4）、rarD蛋白質（配列番号6）又はeamA蛋白質（配列番号8）の発現量を増加させた結果、いずれの場合も、培地中のL-セリンの蓄積量が増加した。

[0114] 実施例3. L-グルタミン (L-Gln) の生産

L-グルタミン生産株として公知のJGLE1株（国際公開06/001380号パンフレット、米国公開公報2008-0038786号パンフレット）を、アミノ酸生産菌の作製[1]で得られたpSnorM、pSrard及びpSTV29でそれぞれ形質転換し、得られた形質転換体をそれぞれエシェリヒア・コリ JGLE1/pSnorM、JGLE1/pSrard及びJGLE1/pSTV29と命名した。

[0115] 上記で得られた形質転換体を20µg/mlのクロラムフェニコールを含む8mlの

L B培地が入った太型試験管に接種し、30°Cで16時間培養した。

該培養液を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む培地C [16g/L リン酸水素二カリウム、14g/L リン酸二水素カリウム、2g/L 硫酸アンモニウム、1g/L クエン酸（無水）、1g/L カザミノ酸（ディフコ社製）、10g/L グルコース、10mg/L ビタミンB₁、2g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、10mg/L 硫酸マンガン・5水和物、50mg/L 硫酸鉄・7水和物、100mg/L L-プロリン、pH7.2に10mol/Lの水酸化ナトリウムで調整、グルコース、ビタミンB₁、硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸マンガン・5水和物、硫酸鉄・7水和物、L-プロリンは別個に蒸煮後添加した] が8ml入っている試験管に1%接種し、30°Cで24時間培養した後、該培養液を遠心分離して培養上清を取得した。

HPLCを用いて該培養上清中の生成物を分析した。結果を表2に示す。

[0116] [表2]

E. coli 菌株	OD ₆₆₀	L-Gln (mg/L)
JGLE1/pSTV29	2.6	122.2
JGLE1/pSnorM	2.2	141.0
JGLE1/pSrarD	2.1	497.4

[0117] 表2に示した通り、norM遺伝子（配列番号1）、又はrarD遺伝子（配列番号5）の各遺伝子配列をそれぞれ有する発現プラスミドを導入し、それぞれnorM蛋白質（配列番号2）又はrarD蛋白質（配列番号6）の発現量を増加させた結果、いずれの場合も培地中のL-グルタミンの蓄積量が増加した。

[0118] 実施例4. L-システイン（L-Cys）の生産

アミノ酸生産菌の作製 [4] で得られた、L-セリン分解酵素（sdaA、sdaB）及び取り込み系（sdaC）を欠損し、かつ染色体DNA上のcysE遺伝子が脱感作型cysE遺伝子に置換された、L-システイン脱感作型cysE遺伝子発現プラスミドを有するエシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE256株を、同 [5] で得られたpScysEfbr1で形質転換し、L-システイン生合成中間体（O-acetyl-L-serine）の合成酵素を生産する能力を有する菌株、エシェリヒア・コリATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1を取得した。

[0119] 次に実施例 1 で得られた pSrard、pSeamA 及び pSTV29 を用いて、エシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr を形質転換し、得られた形質転換体をそれぞれエシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSrard、エシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSeamA 及びエシェリヒア・コリ ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSTV29 と命名した。

上記で得られた形質転換体を 100 μ g/ml のアンピシリン及び 20 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む、実施例 2 と同じ培地 A が 5ml 入った太型試験管に接種し、30°C で 16 時間培養した。

該培養液を 100 μ g/ml のアンピシリン及び 20 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む、培地 D [グリシンを含まず、2g/L チオ硫酸を含む以外は、実施例 2 で使用した培地 B の組成と同じ] が 5ml 入った試験管に 10% 接種し、30°C で 24 時間培養した後、該培養液を遠心分離して培養上清を取得した。

HPLC を用いて該培養上清中の生成物を分析した。結果を表 3 に示す。

[0120] [表3]

E. coli 菌株	OD ₆₆₀	L-Cys (mg/L)
ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSTV29	63.0	73.4
ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSrard	34.6	134.3
ATCC9637sdaABCcysE256/pScysEfbr1/pSeamA	21.0	355.6

[0121] 表 3 に示した通り、rarD 遺伝子（配列番号 5）、又は eamA 遺伝子（配列番号 7）の各遺伝子配列をそれぞれ有する発現プラスミドを導入し、それぞれ rarD 蛋白質（配列番号 6）又は eamA 蛋白質（配列番号 8）の発現量を増加させた結果、いずれの場合も培地中の L-システインの蓄積量が増加した。

[0122] 実施例 5. L-スレオニン (L-Thr) の生産

L-スレオニンを生産する大腸菌株として報告のある ATCC21277 株 [米国特許 3,580,810 号] を、実施例 1 で得られた pSeamA 及び pSTV29 で形質転換し、得られた形質転換体を、それぞれエシェリヒア・コリ ATCC21277/pSeamA 及びエシェリヒア・コリ ATCC21277/pSTV29 と命名した。

[0123] 上記で得られた形質転換体を 20 μ g/ml のクロラムフェニコールを含む、実

実施例 2 と同じ培地Aが5ml 入った太型試験管に接種し、30°Cで16時間培養した。

該培養液を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む、培地E [グリシン、及びyeast extractを含まず、5g/L カザミノ酸を含む以外は、実施例 2 で使用した培地Bの組成と同じ] が5ml 入った試験管に10%接種し、30°Cで24 時間培養した後、該培養液を遠心分離して培養上清を取得した。

HPLCを用いて該培養上清中の生成物を分析した。結果を表 4 に示す。

[0124] [表4]

E. coli 菌株	OD ₆₀₀	L-Thr (mg/L)
ATCC21277/pSTV29	12.1	63.0
ATCC21277/pSeamA	7.5	110.6

[0125] 表 4 に示した通り、norM遺伝子（配列番号 1）の遺伝子配列を有する発現プラスミドを導入し、norM蛋白質（配列番号 2）の発現量を強化させた結果、培地中のL-スレオニンの蓄積量が増加した。

[0126] 実施例 6. L-フェニルアラニン (L-Phe) の生産

[3] (2) で作製した、脱感作型aroF遺伝子及び脱感作型pheA遺伝子が順向きに挿入された発現プラスミドpBpheAfbraroFfbrにて、NM522株を形質転換し、L-フェニルアラニン合成酵素を生産する形質転換体、エシェリヒア・コリ NM522/pBpheAfbraroFfbrを取得した。

[0127] 次に実施例 1 で得られたpSemrD、pSrarD及びpTV29を用いて、エシェリヒア・コリNM522/pBpheAfbraroFfbrを形質転換し、得られた形質転換体をそれぞれエシェリヒア・コリNM522/pBpheAfbraroFfbr/pSemrD、NM522/pBpheAfbraroFfbr/pSrarD及びNM522/pBpheAfbraroFfbr/pSTV29と命名した。

上記で得られた形質転換体を100 μ g/mlのアンピシリン及び20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む、実施例 2 と同じ培地Aが5ml 入った太型試験管に接種し、30°Cで16時間培養した。

該培養液を100 μ g/mlのアンピシリン及び20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む、培地F [グリシンを含まない事以外は、実施例 2 で使用した培地Bの

組成と同じ] が5ml入った試験管に10%接種し、30℃で24 時間培養した後、該培養液を遠心分離して培養上清を取得した。

HPLCを用いて該培養上清中の生成物を分析した。結果を表5に示す。

[0128] [表5]

E. coli 菌株	OD ₆₆₀	L-Phe (mg/L)
NM522/pBpheAfbraroFfbr/pSTV29	18.8	85.9
NM522/pBpheAfbraroFfbr/pSemrD	19.2	132.3
NM522/pBpheAfbraroFfbr/pSrard	11.6	103.0

[0129] 表5に示した通り、emrD遺伝子（配列番号3）、又はrarD遺伝子（配列番号5）の各遺伝子配列をそれぞれ有する発現プラスミドを導入し、それぞれmerD蛋白質（配列番号4）、又はrarD蛋白質（配列番号6）の発現量を増加させた結果、いずれの場合も培地中のL-フェニルアラニンの蓄積量が増加した。

産業上の利用可能性

[0130] 本発明の製造法により、L-アミノ酸の生産性の高い製造法が確立され、工業的な大量生産が可能になれば、産業上の利用可能性は非常に高い。例えば、L-セリンは、医薬品分野や化粧品分野において、アミノ酸混合物の原料として、利用価値が高く、L-グルタミンは、抗アルコール症組成物などの原料となる。また、L-システインは、化粧品業界で非常に価値の高いアミノ酸であり、L-スレオニン及びL-フェニルアラニンは、それぞれアミノ酸輸液及び健康食品の成分および低カロリー甘味料のアスパルテームの原料として有用である。

本出願は、日本で出願された特願2009-027881（出願日：平成21年2月9日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

配列表フリーテキスト

[0131] 配列番号9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号10－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 1 1 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 2 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 3 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 4 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 5 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 6 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 8 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 1 9 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 0 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 1 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 2 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 3 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 4 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 5 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 6 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 7 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 8 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 2 9 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 0 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 1 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 2 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 3 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 4 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 5 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 6 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 7 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 8 ー人工配列の説明：合成DNA
配列番号 3 9 ー人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 0 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 1 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 2 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 3 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 4 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 5 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 6 —人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 7 —人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

[請求項1] L-アミノ酸輸送活性を有する以下の [1] ~ [3] のいずれかに記載の蛋白質の活性が親株より高い微生物を、培地に培養し、L-アミノ酸を生成させ、該L-アミノ酸を該培地中に蓄積せしめ、次いで該培地中から該L-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法。

[1] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

[2] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質

[3] 配列番号 2、4、6 及び 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性があるアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質

[請求項2] 微生物が以下の [1] ~ [3] のいずれかに記載の DNA で形質転換された微生物、又は該 DNA 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された微生物である、請求項 1 記載の L-アミノ酸の製造法。

[1] 請求項 1 の [1] ~ [3] のいずれかに記載の蛋白質をコードする DNA

[2] 配列番号 1、3、5 及び 7 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA

[3] 配列番号 1、3、5 及び 7 のいずれかで表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下でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸輸送活性を有する蛋白質をコードする DNA

[請求項3] 微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、セラチア属、シュードモナス属又はストレプトマイセス属に属する微生物

物である、請求項 1 又は 2 記載の L-アミノ酸の製造法。

[請求項 4]

L-アミノ酸が L-セリン、L-グルタミン、L-システイン、L-フェニルアラニン及び L-スレオニンからなる群より選ばれる L-アミノ酸である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の L-アミノ酸の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P13/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i, C12P13/12(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i, C12P13/22(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)

C12P13/06, C12N15/09, C12P13/08, C12P13/12, C12P13/14, C12P13/22

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (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.
A	VRLJIC, M. et al., A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum., Mol. Microbiol., 1996, Vol.22, No.5, P.815-826, entire text	1-4
A	LIVSHITS, V. A., et al., Identification and characterization of the new gene rhtA involved in threonine and homoserine efflux in Escherichia coli., Res. Microbiol., 2003, Vol.154, P.123-135, entire text	1-4
A	DASSLER, T. et al., Identification of a major facilitator protein from Escherichia coli involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway., Mol. Microbiol., 2000, Vol.36, No.5, P.1101-1112, entire text	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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
21 April, 2010 (21.04.10)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2010 (11.05.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-237379 A (Ajinomoto Co., Inc.), 08 September 2005 (08.09.2005), entire text & US 2006/0019355 A1 & EP 1664318 A1 & WO 2005/073390 A2 & KR 10-2006-0084446 A & CN 101243177 A	1-4
A	WO 2001/053459 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 26 July 2001 (26.07.2001), entire text & EP 1253195 A1 & CN 1423691 A	1-4
A	JP 2002-537771 A (Forschungszentrum Juelich GmbH), 12 November 2002 (12.11.2002), entire text & US 7632663 B1 & EP 1155139 A1 & WO 2000/050624 A1 & DE 19907567 A1	1-4
A	LONG, F. et al., Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from Neisseria gonorrhoeae and YdhE from Escherichia coli., Antimicrob. Agents Chemother., 2008.09, Vol.52, No.9, P.3052-3060, entire text	1-4
A	OMOTE, H. et al., The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations., Trends Pharmacol. Sci., 2006.09, Vol.27, No.11, P.587-593, table 1	1-4
A	ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. et al., The NorM Efflux Pump of Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis Recognizes Antimicrobial Cationic Compounds., J. Bacteriol., 2003.02, Vol.185, No.3, P.1101-1106, entire text	1-4
A	WO 2008/044714 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 17 April 2008 (17.04.2008), entire text; particularly, paragraph [0004] & JP 2009-2401161 A	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051886

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of 1-4 which relate to a protein and DNA represented by SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:1, respectively.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051886

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The proteins respectively comprising the amino acid sequences depicted in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8 recited in claim 1 share no common chemical structure (amino acid sequence), and share only such a common function that they are proteins having an L-amino acid transport activity.

However, Documents 1-6 disclose proteins having an L-amino acid transport activity. Therefore, the matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.

Further, there is no other common matter which can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence, among the proteins respectively comprising the amino acid sequences depicted in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8 recited in claim 1.

Consequently, the above-stated group of inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and it is considered that the inventions include four groups of inventions respectively relating to different four proteins and different four DNA molecules respectively encoding the proteins.

Document 1: Mol. Microbiol., 1996, Vol. 22, No. 5, P. 815-826

Document 2: Res. Microbiol., 2003, Vol. 154, P. 123-135

Document 3: Mol. Microbiol., 2000, Vol. 36, No. 5, P. 1101-1112

Document 4: JP 2005-237379 A

Document 5: WO 2001/053459 A1

Document 6: JP 2002-537771 A

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P13/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i, C12P13/12(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i, C12P13/22(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. C12P13/06, C12N15/09, C12P13/08, C12P13/12, C12P13/14, C12P13/22

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(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
A	VRLJIC, M. et al., A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from Corynebacterium glutamicum., Mol. Microbiol., 1996, Vol.22, No. 5, P.815-826, 全文	1-4
A	LIVSHITS, V. A., et al., Identification and characterization of the new gene rhtA involved in threonine and homoserine efflux in Escherichia coli., Res. Microbiol., 2003, Vol.154, P.123-135, 全文	1-4

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、一般的な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

21.04.2010

国際調査報告の発送日

11.05.2010

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)	4B	4152
鈴木 崇之		
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

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
A	DASSLER, T. et al., Identification of a major facilitator protein from Escherichia coli involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway., Mol. Microbiol., 2000, Vol.36, No.5, P.1101-1112, 全文	1-4
A	JP 2005-237379 A (味の素株式会社) 2005.09.08, 全文 & US 2006/0019355 A1 & EP 1664318 A1 & WO 2005/073390 A2 & KR 10-2006-0084446 A & CN 101243177 A	1-4
A	WO 2001/053459 A1 (味の素株式会社) 2001.07.26, 全文 & EP 1253195 A1 & CN 1423691 A	1-4
A	JP 2002-537771 A (フォルシュングスツェントルム・ユーリッヒ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング) 2002.11.12, 全文 & US 7632663 B1 & EP 1155139 A1 & WO 2000/050624 A1 & DE 19907567 A1	1-4
A	LONG, F. et al., Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from Neisseria gonorrhoeae and YdhE from Escherichia coli., Antimicrob. Agents Chemother., 2008.09, Vol.52, No.9, P.3052-3060, 全文	1-4
A	OMOTE, H. et al., The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations., Trends Pharmacol. Sci., 2006.09, Vol.27, No.11, P.587-593, 表1	1-4
A	ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. et al., The NorM Efflux Pump of Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis Recognizes Antimicrobial Cationic Compounds., J. Bacteriol., 2003.02, Vol.185, No.3, P.1101-1106, 全文	1-4
A	WO 2008/044714 A1 (味の素株式会社) 2008.04.17, 全文、特に段落【0004】 & JP 2009-2401161 A	1-4

第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1-4における配列番号2及び1で表されるタンパク質及びDNAに係る発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項1に記載された配列番号2、4、6及び8に係るアミノ酸配列からなるタンパク質は、互いに共通の化学構造（アミノ酸配列）を有するものではなく、L-アミノ酸輸送活性を有するタンパク質であることにおいてのみ共通の機能を有する。

しかしながら、文献1-6には、L-アミノ酸輸送活性を有するタンパク質が記載されているから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。

そして、請求項1に記載された配列番号2、4、6及び8に係るアミノ酸配列からなるタンパク質の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえず、異なった4つのタンパク質及びそれぞれのタンパク質をコードする4つDNAに関する4個の発明からなる発明群であると認める。

文献1 : Mol. Microbiol., 1996, Vol. 22, No. 5, P. 815-826

文献2 : Res. Microbiol., 2003, Vol. 154, P. 123-135

文献3 : Mol. Microbiol., 2000, Vol. 36, No. 5, P. 1101-1112

文献4 : JP 2005-237379 A

文献5 : WO 2001/053459 A1

文献6 : JP 2002-537771 A