(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2012-196222
(P2012-196222A)
(43)公開日　平成24年10月18日(2012.10.18)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12P 13/12 | (2006.01) | C12P | 13/12 | ZNAA | 4B024 |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A | 4B064 |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N | 1/15 | | 4B065 |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N | 1/19 | | |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | | |

審査請求 有　請求項の数 17　ＯＬ　外国語出願　（全 33 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-132254 (P2012-132254)
(22)出願日　平成24年6月11日 (2012.6.11)
(62)分割の表示　特願2008-548953 (P2008-548953)の分割
原出願日　平成18年1月4日 (2006.1.4)

(71)出願人　505311917
メタボリック　エクスプローラー
フランス国サン、ボージール、ビオポル、クレルモン－リマーニュ
(74)代理人　100117787
弁理士　勝沼　宏仁
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝
(74)代理人　100107342
弁理士　横田　修孝
(74)代理人　100111730
弁理士　伊藤　武泰
(72)発明者　ライナー、フィゲ
フランス国リオム、リュ、マリボー、２５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】硫酸透過酵素の発現が増強された微生物を用いてメチオニンおよびその前駆体ホモセリンまたはスクシニルホモセリンを製造するための方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】炭素源および硫黄源を含む適切な培養培地において微生物を培養することにより、メチオニンまたはその誘導体を製造するための方法を提供する。
【解決手段】システインおよび／もしくはＣ１単位の生成を増強する、ならびに／または、Ｃ１単位を１０ホモシステイン上へ転移させる能力を増大および／もしくは最適化するように改変されている微生物。発酵培地からメチオニンまたはその誘導体を単離する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
炭素源と硫黄源とを含む適切な培養培地内で微生物を培養し、該培養培地からメチオニンを回収することにより、メチオニン、その誘導体または前駆体を製造するための方法であって、該微生物が、システイン生成が増強されるように改変されている、方法。
【請求項２】
システイン生成に関与する少なくとも１つの遺伝子の発現が増大している、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
システイン生成に関与する少なくとも１つの遺伝子が、以下の遺伝子：
【表１】

| | |
|---|---|
| ｃｙｓＡ | 硫酸透過酵素 |
| ｃｙｓＵ，ｃｙｓＴ | 硫酸ＡＢＣ輸送系成分 |
| ｃｙｓＷ | 膜結合硫酸輸送タンパク質 |
| ｃｙｓＺ | ｃｙｓＫの上流のＯＲＦ |
| ｃｙｓＮ | ＡＴＰスルフリラーゼ |
| ｃｙｓＤ | 硫酸アデニリルトランスフェラーゼ |
| ｃｙｓＣ | 硫酸アデニリルキナーゼ |
| ｃｙｓＨ | 硫酸アデニリル還元酵素 |
| ｃｙｓＩ | 亜硫酸還元酵素、αサブユニット |
| ｃｙｓＪ | 亜硫酸還元酵素、βサブユニット |
| ｃｙｓＥ | セリンアセチルトランスフェラーゼ |
| ｃｙｓＫ | システインシンターゼ |
| ｃｙｓＭ | Ｏ－アセチルスルフヒドリラーゼ |
| ｃｙｓＺ | 硫酸輸送 |
| ｓｂｐ | ペリプラスム硫酸結合タンパク質 |

からなる群から選択される、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
少なくともｃｙｓＥの発現が増大している、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
少なくともｃｙｓＭの発現が増大している、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子の発現が増大しており、および／または異種プロモーターによって駆動される、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子が、以下の遺伝子：
・メチオニンシンターゼをコードするｍｅｔＥ、ｍｅｔＨ；

・５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素をコードするｍｅｔＦ；
・セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするｇｌｙＡ；および
・グリシン開裂複合体をコードするｇｃｖＴＨＰ、ｌｐｄ
からなる群から選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ｍｅｔＥ、ｍｅｔＨおよび／またはｍｅｔＦの発現が増大しており、および／または該遺伝子の少なくとも１つが異種プロモーターから発現する、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
システイン生合成のフローを最適化することによってγ脱離活性が低く保たれ、それにより副産物イソロイシンの生成が低下している、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
メチオニン生成に関与する更なる遺伝子の発現が増大している、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
メチオニン生成を低減する遺伝子の発現が減衰している、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
ｍｅｔＪ遺伝子によりコードされるメチオニンリプレッサーが欠失または変異しており、ならびに／またはＳ－アデノシルメチオニンおよび／もしくはメチオニンに対するフィードバック感度が低下した酵素をコードするホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（ＭｅｔＡ）対立遺伝子が株に組み込まれている、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
培養培地中の硫黄源が、硫酸塩、チオ硫酸塩、硫化水素、ジチオン酸塩、亜ジチオン酸塩、亜硫酸塩、または異なる供給源の組み合わせである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
培養培地中の硫黄源が、硫酸塩もしくはチオ硫酸塩、またはこれらの混合物である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
所望のアミノ酸／最終生成物の一部または全量（０～１００％）において任意に残存する発酵ブロスおよび／またはバイオマスの構成成分を単離する工程を含んでなる、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
メチオニンまたはその誘導体の発酵による製造に使用される微生物であって、該メチオニンまたは誘導体の製造において、システイン生成を増強するように最適化されている、微生物。
【請求項１７】
システイン生成に関与する少なくとも１つの遺伝子の発現が増大している、請求項１６に記載の微生物。
【請求項１８】
システイン生成に関与する少なくとも１つの遺伝子が、以下の遺伝子：

【表２】

| | |
|---|---|
| ｃｙｓＡ | 硫酸透過酵素 |
| ｃｙｓＵ，ｃｙｓＴ | 硫酸ＡＢＣ輸送系成分 |
| ｃｙｓＷ | 膜結合硫酸輸送タンパク質 |
| ｃｙｓＺ | ｃｙｓＫの上流のＯＲＦ |
| ｃｙｓＮ | ＡＴＰスルフリラーゼ |
| ｃｙｓＤ | 硫酸アデニリルトランスフェラーゼ |
| ｃｙｓＣ | 硫酸アデニリルキナーゼ |
| ｃｙｓＨ | 硫酸アデニリル還元酵素 |
| ｃｙｓＩ | 亜硫酸還元酵素、αサブユニット |
| ｃｙｓＪ | 亜硫酸還元酵素、βサブユニット |
| ｃｙｓＥ | セリンアセチルトランスフェラーゼ |
| ｃｙｓＫ | システインシンターゼ |
| ｃｙｓＭ | Ｏ－アセチルスルフヒドロラーゼ |
| ｃｙｓＺ | 硫酸輸送 |
| ｓｂｐ | ペリプラスム硫酸結合タンパク質 |

からなる群から選択される、請求項１７に記載の微生物。

【請求項１９】

少なくともｃｙｓＥの発現が増大している、請求項１７に記載の微生物。

【請求項２０】

少なくともｃｙｓＭの発現が増大している、請求項１７に記載の微生物。

【請求項２１】

Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子の発現が増大しており、および／または異種プロモーターによって駆動される、請求項１６～２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子が、以下の遺伝子：

・メチオニンシンターゼをコードするｍｅｔＥ、ｍｅｔＨ；
・５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素をコードするｍｅｔＦ；
・セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするｇｌｙＡ；および
・グリシン開裂複合体をコードするｇｃｖＴＨＰ、ｌｐｄ

からなる群から選択される、請求項２１に記載の微生物。

【請求項２３】

ｍｅｔＥ、ｍｅｔＨおよび／またはｍｅｔＦの発現が増大しており、および／または該遺伝子の少なくとも１つが異種プロモーターから発現する、請求項２１に記載の微生物。

【請求項２４】

システイン生合成のフローを最適化することによってγ脱離活性が低く保たれ、それに

より副産物イソロイシンの生成が低下している、請求項１６～２３のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項２５】
メチオニン生成に関与する更なる遺伝子の発現が増大している、請求項１６～２４のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項２６】
メチオニン生成を低減する遺伝子の発現が減衰している、請求項１６～２５のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項２７】
ｍｅｔＪ遺伝子によりコードされるメチオニンリプレッサーが欠失または変異しており、ならびに／またはＳ－アデノシルメチオニンおよび／もしくはメチオニンに対するフィードバック感度が低下した酵素をコードするホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（ＭｅｔＡ）対立遺伝子が組み込まれている、請求項１６～２６のいずれか一項に記載の微生物。
【発明の詳細な説明】
【発明の背景】
【０００１】
発明の分野
本発明は、炭素源および硫黄源を含む適切な培養培地内で微生物を培養することによってメチオニンまたはその誘導体を製造するための方法に関する。本発明の対象とする微生物は、システインおよび／もしくはＣ１単位の生成を増強するように、ならびに／またはホモシステイン上へＣ１単位を転移させる能力を増大もしくは最適化するように改変される。
【０００２】
背景技術
システイン、ホモシステイン、メチオニンまたはＳ－アデノシルメチオニンなどの硫黄含有化合物は、細胞代謝にとって重要であり、食品または飼料添加物および医薬品として使用されるべく工業的に製造される。特に、動物が合成することのできない必須アミノ酸であるメチオニンは、多くの身体機能において重要な役割を果たす。タンパク質生合成におけるその役割とは別に、メチオニンは、メチル基転移ならびにセレニウムおよび亜鉛のバイオアベイラビリティに関与している。メチオニンはまた、アレルギーやリウマチ熱のような疾患のための治療薬として直接的に用いられる。しかしながら、製造されるメチオニンの大部分は動物用飼料に添加されている。
【０００３】
ＢＳＥおよび鳥インフルエンザ（chicken flu）を理由に動物由来タンパク質の使用が減少するにつれ、純粋なメチオニンに対する需要が高まっている。化学的には、Ｄ，Ｌ－メチオニンは、通常、アクロレイン、メチルメルカプタンおよびシアン化水素から製造される。しかしながら、ラセミ混合物は、例えば鶏飼料用添加物において、純粋なＬ－メチオニンほど良好には機能しない(Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633)。純粋なＬ－メチオニンは、ラセミ型メチオニンから、例えばＮ－アセチル－Ｄ，Ｌ－メチオニンのアシラーゼ処理を行うことによって製造することができるが、製造コストは大幅に増加する。環境問題に関連して純粋なＬ－メチオニンに対する需要が高まりつつあるため、メチオニンの微生物生成は魅力的である。
【０００４】
微生物は、細胞成分の生合成を微調整する非常に複雑な調節機構を有しており、これにより最大の増殖率が得られる。結果として、必要量のアミノ酸などの代謝産物しか合成されず、通常、野生型株の培養上澄みにおいては検出できない。細菌は、主に酵素のフィードバッグ阻害、および遺伝子転写の抑制または活性化によりアミノ酸生合成を制御する。これらの調節経路に対するエフェクターは、ほとんどの場合、関連経路の最終産物である。結果として、微生物においてアミノ酸を過剰生成させる方策には、これら制御機構の調

節を解除することが必要となる。

【０００５】

Ｌ－メチオニン生合成経路は、多くの微生物においてよく知られている。メチオニンは、アミノ酸であるアスパラギン酸に由来するが、その合成には、システイン生合成およびＣ１代謝（Ｎ－メチルテトラヒドロフォレート）という更なる２つの経路の収束が必要である。アスパラギン酸は、一連の３種の反応によりホモセリンに変換される。次いで、ホモセリンはトレオニン／イソロイシンまたはメチオニン生合成経路へ入る。大腸菌（E.coli）において、メチオニン経路へ入るには、ホモセリンをアシル化してスクシニル－ホモセリンとすることが必要である。この活性化工程により、次いで、システインの濃縮が行われ、それによりチオエーテル含有シスタチオニンが生じ、これが加水分解されてホモシステインが得られる。$B_{12}$依存性または$B_{12}$独立性メチルトランスフェラーゼのいずれかにより最終的なメチル転移が行われて、メチオニンが生成される。

【０００６】

大腸菌におけるメチオニン生合成は、ＭｅｔＪおよびＭｅｔＲタンパク質のそれぞれを介してメチオニン生合成遺伝子を抑制および活性化することによって調節される（Neidhardt, F.C. (Ed. in Chief), R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B.Low, B. Magasanik, W.S.Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (eds), 1996, Eschericia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology; Weissbach et al., 1991 Mol. Microbiol., 5, 1593-1597において検討）。ＭｅｔＪは、そのコリプレッサーであるＳ－アデノシルメチオニンと共に、遺伝子ｍｅｔＡ、ｍｅｔＢ、ｍｅｔＣ、ｍｅｔＥおよびｍｅｔＦを調節することが知られている。メチオニン生成に関与する酵素をコードする他の遺伝子（例えば、ｇｌｙＡ、ｍｅｔＥ、ｍｅｔＨおよびｍｅｔＦ）は、ＭｅｔＲによって活性化されるが、ｍｅｔＡはＭｅｔＲによって抑制される。対応する酵素はすべて、Ｃ１単位の生成およびセリンからメチオニンへのＣ１単位の転移に関与している。セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするＧｌｙＡは、セリンのグリシンへの変換および補酵素テトラヒドロフォレート（ＴＨＦ）上へのＣ１単位の同時転移を触媒する。メチレン－ＴＨＦ形態であるＣ１単位をメチル－ＴＨＦに還元する必要があり、その後、メチル－ＴＨＦがホモシステイン上へ転移されてメチオニンが生成され得る。この反応は、ＭｅｔＦタンパク質によって触媒される。メチル基の転移は、ビタミンＢ１２を介してＭｅｔＨにより触媒されるか、またはＭｅｔＥによって直接触媒される。ＭｅｔＨ酵素は、ＭｅｔＥ酵素よりも数百倍高い触媒反応速度を有することが知られている。ビタミンＢ１２および故に活性ＭｅｔＨの不存在下で、ＭｅｔＥは、最大で全細胞タンパク質の５％を構成し得る。活性ＭｅｔＨの存在は、おそらく、通常はＭｅｔＲを介してｍｅｔＥ転写を活性化させるホモシステインの量を

低減することによりＭｅｔＥ活性を低下させる。故に、ＭｅｔＨを介したメチオニンの生成は、大量のＭｅｔＥを発現させないことにより、細胞のための重要な資源を節約する。ホモシステインの堆積は大腸菌にとって有毒であり(Tuite et al., 2005 J. Bacteriol, 187, 13, 4362-4371)、同時に、ＭｅｔＲを介したｍｅｔＡ発現に対する制御効果を有する。従って、酵素ＭｅｔＨおよび／またはＭｅｔＥの強い発現が、効果的なメチオニン生成にとって明らかに必要である。

【０００７】

大腸菌において、分解された硫黄は、システインに組み込まれ、次いでメチオニン前駆体であるＯ－スクシニル－ホモセリン上へ転移される。このプロセスは硫黄基転移（transulfuration）と呼ばれる（Neidhardt, F.C. (Ed. in Chief), R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (eds). 1996. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiologyにおいて検討）。システインは、Ｏ－アセチルセリンおよび$H_2S$から硫黄基転移により生成される。本プロセスは、生成物であるシステインが、ＣｙｓＥにコードされたセリントランスアセチラーゼに作用

することによって負のフィードバック制御を受ける。Ｏ－アセチル－セリンから同時に生成されるＮ－アセチル－セリンは、転写因子ＣｙｓＢと共に、硫黄化合物の輸送、それらの$Ｈ_2Ｓ$への還元および有機硫黄化合物であるシステイン（メチオニンと同様に必須アミノ酸である）内へのそれらの組み込みに関与する酵素をコードする遺伝子を活性化させる。

【０００８】

システインの不存在下では、ＭｅｔＢは、メチオニン前駆体Ｏ－スクシニルホモセリンの、アンモニア、α－ケトブチラートおよびスクシネートへの変換を触媒し、この反応はγ脱離と呼ばれる（Aitken & Kirsch, 2005, Arch Biochem Biophys 433, 166-75）。次いで、α－ケトブチラートはイソロイシンへと変換され得る。この副反応は、メチオニンの工業的製造には望ましくない。その理由は、これら２つのアミノ酸を分離するのは困難だからである。故に、低いγ脱離活性が、メチオニンの工業的製造にとって重要な態様である。米国仮特許出願ＵＳ６０／６５０，１２４（２００５年２月７日出願）には、酵素ＭｅｔＢを最適化することによってどのようにγ脱離を低減し得るかが記載されている。システイン生合成の流れを最適化することによっても、γ脱離を低下させ、従って副産物であるイソロイシンの生成を低減することができ、これは本発明の一つの実施態様を構成している。

【発明の開示】

【０００９】

本発明は、システインの生成が増大されていると共に、規定の炭素源および硫黄源上で増殖する微生物を用いた発酵による製造において、メチオニン、その前駆体またはその誘導生成物を製造するための方法に関する。

【００１０】

メチオニンの前駆体は、メチオニン特異的代謝経路の一部である代謝産物、またはこれら代謝産物から誘導され得るものと定義される。メチオニン特異的経路は、酵素ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（ＭｅｔＡ）によりホモセリンをスクシニルホモセリンへ転換することから始まる。

【００１１】

メチオニン誘導生成物は、メチオニン転換および／または分解経路から生じる。

【００１２】

システイン生成を増大させるために、本発明者らは、システイン生成に関与する遺伝子の発現を増強した。

【００１３】

用語「増強」は、本発明において、例えば、遺伝子コピー数を増大させる、強いプロモーターを使用する、または増大された活性を有する対立遺伝子を使用する、および、おそらくはこれらの方法を組み合わせることによって、対応するＤＮＡによりコードされる酵素の細胞内活性を増大させることを意味する。

【００１４】

本明細書中で使用される用語「増大された発現」または「増強された発現」はいずれも同様の意味を有する。

【００１５】

遺伝子の発現を増大させるために、該遺伝子は、染色体内で、または染色体外でコードされてもよい。染色体内では、当業者に知られている組み換え方法により導入され得る１つまたは複数のコピーがゲノム上にあってもよい。染色体外では、遺伝子は、複製起点が異なり、それに伴ってそれらの細胞内でのコピー数が異なる様々な種類のプラスミドに担持されていてもよい。それら遺伝子は、１～５個のコピー、約２０個または最大５００個のコピーとして存在してもよく、これらは、厳密な複製を有する低コピー数のプラスミド（ｐＳＣ１０１，ＲＫ２）、低コピー数のプラスミド（ｐＡＣＹＣ，ｐＲＳＦ１０１０）または高コピー数のプラスミド（ｐＳＫ　ｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ）に相当する。

【００１６】

本発明の好ましい実施態様において、遺伝子は、誘発因子分子により誘発される必要があるか、またはその必要がない、様々な強度のプロモーターを用いて発現させてもよい。これらのプロモーターは同種であっても、異種であってもよい。例としては、プロモーターＰｔｒｃ、Ｐｔａｃ、Ｐｌａｃ、λプロモーターｃＩまたは当業者に知られている他のプロモータが挙げられる。

【００１７】

標的遺伝子の発現は、対応するメッセンジャーＲＮＡ（Carrier and Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64）またはタンパク質（例えば、ＧＳＴタグ（Amersham Biosciences））を安定化または不安定化させる因子によって、促進または低減されてもよい。

【００１８】

本発明はまた、本発明に従って増強すべき遺伝子の１つまたは幾つかの対立遺伝子を含有する微生物に関する。

【００１９】

本発明の特定の実施態様では、システイン生成に関与する遺伝子の発現が増強される。

【００２０】

システイン生成に関与する遺伝子は、硫黄源の取り込み（import）、該硫黄源の硫化水素への転換、および硫化水素または硫黄源のシステインまたはその誘導体への同化に必要なタンパク質をコードする遺伝子を含む。

【００２１】

大腸菌において、これらのタンパク質は、以下の遺伝子（アクセッション番号および対応するポリペプチドの機能も示す）によってコードされる。

【００２２】

【表１】

| 遺伝子 | アクセッション番号 | 機能 |
|---|---|---|
| *cysA* | １７８８７６１ | 硫酸透過酵素 |
| *cysU*，ｃｙｓＴ | １７８８７６４ | 硫酸ＡＢＣ輸送系（transporter）成分 |
| *cysW* | １７８８７６２ | 膜結合硫酸輸送タンパク質 |
| *cysZ* | １７８８７５３ | ｃｙｓＫの上流のＯＲＦ |
| *cysN* | １７８９１０８ | ＡＴＰスルフリラーゼ |
| *cysD* | １７８９１０９ | 硫酸アデニリルトランスフェラーゼ |
| *cysC* | １７８９１０７ | 硫酸アデニリルキナーゼ |
| *cysH* | １７８９１２１ | 硫酸アデニリル還元酵素 |
| *cysI* | １７８９１２２ | 亜硫酸還元酵素、αサブユニット |
| *cysJ* | １７８９１２３ | 亜硫酸還元酵素、βサブユニット |
| *cysE* | １７９００３５ | セリンアセチルトランスフェラーゼ |
| *cysK* | １７８８７５４ | システインシンターゼ |
| *cysM* | ２３６７１３８ | Ｏ－アセチルセリンスルフヒドリラーゼ |
| ｃｙｓＺ | １７８８７５３ | 硫酸輸送 |
| ｓｂｐ | １７９０３５１ | ペリプラスム硫酸結合タンパク質 |

【００２３】

本発明の説明では、遺伝子およびタンパク質は、大腸菌の対応する遺伝子の名称を用いて識別される。しかしながら、特記されない限り、これら名称の使用は、本発明によるより包括的な意味を有し、他の生物、より特定的には微生物の、対応する遺伝子およびタン

パク質のすべてを包含する。

【００２４】

ＰＦＡＭ（アラインメントのタンパク質ファミリーデータベースおよび隠れマルコフモデル；http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/）は、タンパク質配列アラインメントを多数集めたものである。各ＰＦＡＭにより、多重アラインメントを視覚化し（タンパク質ドメインを参照のこと）、生物間の分布を評価し、他のデータベースへのアクセスを獲得し、既知のタンパク質構造を視覚化することができる。

【００２５】

３０個の主要な系統発生系を示す６６個の完全に配列決定されたゲノムからのタンパク質配列を比較することにより、ＣＯＧ（タンパク質のオーソロガス群のクラスター；http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/）が得られる。各ＣＯＧは、少なくとも３つの系から規定されるので、前に保存されたドメインを同定することができる。

【００２６】

相同配列およびそれらの相同性（％）を同定する手段は、当業者によく知られており、特にＢＬＡＳＴプログラムが挙げられる。このプログラムは、ウェブサイトhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/から、このウェブサイト上に示されたデフォルトパラメーターと共に利用することができる。次いで、例えばプログラムＣＬＵＳＴＡＬＷ(http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)またはＭＵＬＴＡＬＩＮ（http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl）を、これらウェブサイト上に示されたデフォルトパラメーターと共に用いて、得られた配列を活用する（例えば、整列させる）ことができる。

【００２７】

ＧｅｎＢａｎｋ上で得られる既知の遺伝子に関する参考番号を用いて、当業者は、他の生物、細菌株、酵母、菌類、哺乳類、植物などにおける同等の遺伝子を決定することができる。この常套作業は、有利には、他の微生物由来の遺伝子との配列アラインメントを行い、縮重プローブを設計して、他の生物における対応する遺伝子をクローニングすることにより決定することができるコンセンサス配列を使用して行われる。これらの分子生物学の常套手段は、当業者によく知られており、例えば、Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York)に記載されている。

【００２８】

一つの好ましい実施態様として、本発明の方法において用いられる微生物は、セリントランスアセチラーゼをコードするｃｙｓＥの発現を増大させるように改変される。

【００２９】

本発明はまた、本発明に従ってセリントランスアセチラーゼをコードする１つまたは幾つかの対立遺伝子を含有する微生物に関する。

【００３０】

かかる株は、γ－シスタチオニン合成（ＭｅｔＢにより触媒される反応）のための基質濃度を高めることによって、メチオニンに向かう流束を増大させることが可能なシステイン代謝を備えるという事実により特徴づけられる。システイン濃度が低いと、ＭｅｔＢ酵素は、スクシニル－ホモセリンからアンモニア、スクシネートおよびα－ケトブチラートを生成する。この反応はγ脱離と呼ばれる。システイン濃度が高くなると、α－ケトブチラートの生成量が低下し、故にメチオニンへの流動が増大する。

【００３１】

セリントランスアセチラーゼ活性の発現の増強は、セリンおよびアセチル－ＣｏＡを用いた酵素テストにおいて検証することができる。この反応は、セリントランスアセチラーゼ活性を含有するタンパク質抽出物を添加することにより開始され、Ｏ－アセチル－セリンの形成は、タンパク質沈殿およびシリル化試薬による誘導体化の後にＧＣ－ＭＳによってモニタリングされる。

【００３２】

本発明はまた、Ｏ－アセチルセリンスルフヒドリラーゼをコードするｃｙｓＭ遺伝子の

発現増強に関するものであり、これにより、チオ硫酸塩のスルホシステインへの組み込みが増加し、システイン生成が促進される。

【００３３】

故に、本発明は、システイン生成を最適化することにより、γ脱離を低下させ、従ってイソロイシン生成を低減させる方法を対象とする。

【００３４】

本発明による異種プロモーターは、改変した野生型プロモーター、または他の生物もしくは全体的に合成したプロモーターから得られる任意のプロモーターとして理解される。好ましくは、異種プロモーターはＰｔｒｃ、Ｐｔａｃ、λｃＩまたは当業者に知られている他のプロモーターなどの強いプロモーターである。

【００３５】

本発明の別の好ましい実施態様では、メチオニンまたはその誘導体を生成するために微生物を使用する方法が対象とされ、Ｃ１単位の生成および／またはＣ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する遺伝子の発現が増大または最適化される。

【００３６】

本発明によれば、最も高いメチオニン生成を得るように、関与遺伝子の発現レベルを適合させることによって、最適化が達成される。ほとんどの場合、これは、例えば、異種プロモーターを用いて関与遺伝子の発現ライブラリを作製し、スクリーニングして最良の生成株（producer）を得ることによって行われる。

【００３７】

本発明によれば、Ｃ１単位という用語は、メチル、メチレン、メテニルまたはホルミル基として、キャリア分子テトラヒドロフォレートに結合される単一の炭素原子をいう。

【００３８】

「転移させる能力」という用語は、Ｃ１単位をホモシステイン上に転移させる微生物の能力をいう。この能力は、本発明者らによって増強および／または最適化されたＭｅｔＦおよび／またはＭｅｔＨの活性により決定される。

【００３９】

Ｃ１単位の生成に関与する遺伝子は以下の通りである。

【００４０】

【表２】

| | | |
|---|---|---|
| *ｓｅｒ*Ａ | １７８９２７９ | ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ |
| *ｓｅｒ*Ｂ | １７９０８４９ | ホスホセリンホスファターゼ |
| *ｓｅｒ*Ｃ | １７８７１３６ | ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ |
| *ｇｌｙ*Ａ | １７８８９０２ | セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ |
| ｇｃｖＴ | １７８９２７２ | テトラヒドロフォレート依存性アミノメチルトランスフェラーゼ |
| ｇｃｖＨ | １７８９２７１ | グリシン開裂、アミノメチル基のキャリア |
| ｇｃｖＰ | １７８９２６９ | グリシンデヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化) |
| ｌｐｄ | １７８６３０７ | リポアミドデヒドロゲナーゼ |

【００４１】

ホモシステイン上へのＣ１単位の転移に関与する遺伝子は以下の通りである。

【００４２】

【表３】

| | | |
|---|---|---|
| *metF* | １７９０３７７ | ５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素 |
| *metH* | １７９０４５０ | Ｂ１２依存性ホモシステイン－Ｎ５－メチルテトラヒドロフォレートトランスメチラーゼ |
| *metE* | ２３６７３０４ | テトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸メチルトランスフェラーゼ |

【００４３】
本発明の特に好ましい実施態様では、メチオニンの製造に使用される微生物は、ｍｅｔＦもしくはｍｅｔＨ、またはその両方の発現を増大させるか、または異種プロモーターからｍｅｔＦを発現させるように改変される。
【００４４】
増強されたビタミンＢ１２依存性メチオニンシンターゼ（ＭｅｔＨ）活性は、ビタミンＢ１２およびＳＡＭの存在下、メチル－ＴＨＦおよびホモシステインを用いた酵素テストにおいて検証することができる。メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素活性を含有するタンパク質抽出物を添加することによって反応が開始され、メチオニン形成は、タンパク質沈殿およびシリル化試薬による誘導体化の後にＧＣ－ＭＳによってモニタリングされる。
【００４５】
メチオニン生合成に関与する更なる遺伝子の発現を増大させることによってメチオニン生成を更に増大させることができ、これもまた、本発明の目的である。
【００４６】
これらの遺伝子は以下の通りである。
【００４７】
【表４】

| | | |
|---|---|---|
| *metA* | １７９０４４３ | ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ |
| *metB* | １７９０３７５ | シスタチオニン－γ－シンターゼ |
| *metC* | １７８９３８３ | シスタチオニン－β－リアーゼ |
| *metF* | １７９０３７７ | ５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素 |
| *metR* | １７９０２６２ | *metE*、*metH*および*metF*の陽性調節遺伝子 |

【００４８】
更に、メチオニンを分解する、またはメチオニン生成経路から逸脱する経路における遺伝子の発現を低減するか、または該遺伝子を欠失させてもよい。
【００４９】
【表５】

| | | |
|---|---|---|
| *speD* | １７８６３１１ | Ｓ－アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ |
| *speC* | １７８９３３７ | オルニチンデカルボキシラーゼ |
| *astA* | １７８８０４３ | アルギニンスクシニルトランスフェラーゼ |
| *dapA* | １７８８８２３ | ジヒドロジピコリン酸シンターゼ |

【００５０】

アナプレロティック（補充）反応は、以下の遺伝子を発現させることによって促進してもよい。

【００５１】

【表６】

| | | |
|---|---|---|
| *ｐｐｃ* | １７９０３９３ | ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ |
| *ｐｐｓ* | １７８７９９４ | ホスホエノールピルビン酸シンターゼ |

【００５２】

酢酸塩消費反応は、以下の遺伝子を過剰発現させることによって促進してもよい。

【００５３】

【表７】

| | | |
|---|---|---|
| *ａｃｓ* | １７９０５０５ | アセチルーＣｏＡ合成酵素 |

【００５４】

Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の生成の更なる増加は、次の遺伝子の１つまたは幾つかを過剰発現させることによって達成することができる：ピルビン酸カルボキシラーゼ（例えばRhizobium etli（ｐｙｃ，Ｕ５１４３９））またはその相同体の１つ、好ましくはフィードバック感度が低下した、遺伝子ｔｈｒＡ（ホモセリンデヒドロゲナーゼ／アスパルトキナーゼ、１７８６１８３）、ｍｅｔＬ（ホモセリンデヒドロゲナーゼ／アスパルトキナーゼ、ｇ１７９０３７６）またはｌｙｓＣ（アスパルトキナーゼ、１７９０４５５）およびａｓｄ（アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ）によりコードされたホモセリン合成酵素。

【００５５】

Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の生成の更なる増加は、特許出願ＪＰ２０００１５７２６７－Ａ／３（ＧｅｎＢａｎｋ　１７９０３７３も参照）に示唆されているように、メチオニンレギュロンの下方調節を担うリプレッサータンパク質の遺伝子ＭｅｔＪを欠失させることによって達成される。

【００５６】

メチオニン生成は、国際特許出願ＷＯ２００５／１１１２０２（本明細書の一部とする）に記載されるように、その抑制因子ＳＡＭおよびメチオニンに対するフィードバック感度が低下したホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ対立遺伝子を使用することによって更に増大される。

【００５７】

Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の生成の増加は、以下の遺伝子の１つの活性を減衰させるか、または該遺伝子を欠失させることによって達成することができる。

【００５８】

「減衰」という用語は、本発明において、酵素の発現を低下させる、該酵素の安定性を低下させる、その分解を増大させる、および／または当業者に知られている他の解決策などの方策による、該酵素の細胞内活性の低下を意味する。

【００５９】

【表８】

| 遺伝子 | Ｇｅｎｂａｎｋ エントリー | 活性 |
|---|---|---|
| *ａｃｋ*Ａ | １７８８６３３ | 酢酸キナーゼ |
| *ｐｔａ* | １７８８６３５ | ホスホトランスアセチラーゼ |
| *ａｃｅ*Ｅ | １７８６３０４ | ピルビン酸デヒドロゲナーゼＥ１ |
| *ａｃｅ*Ｆ | １７８６３０５ | ピルビン酸デヒドロゲナーゼＥ２ |
| *ｌｐｄ* | １７８６３０７ | ピルビン酸デヒドロゲナーゼＥ３ |
| *ｓｕｃ*Ｃ | １７８６９４８ | スクシニルーＣｏＡ合成酵素、βサブユニット |
| *ｓｕｃ*Ｄ | １７８６９４９ | スクシニルーＣｏＡ合成酵素、αサブユニット |
| *ｐｃｋ* | １７８９８０７ | ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ |
| *ｐｙｋ*Ａ | １７８８１６０ | ピルビン酸キナーゼＩＩ |
| *ｐｙｋ*Ｆ | １７８７９６５ | ピルビン酸キナーゼＩ |
| *ｐｏｘ*Ｂ | １７８７０９６ | ピルビン酸オキシダーゼ |
| *ｉｌｖ*Ｂ | １７９０１０４ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩ、大サブユニット |
| *ｉｌｖ*Ｎ | １７９０１０３ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩ、小サブユニット |
| *ｉｌｖ*Ｇ | １７９０２０２ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩＩ、大サブユニット |
| | １７９０２０３ | |
| *ｉｌｖ*Ｍ | １７９０２０４ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩＩ、小サブユニット |
| *ｉｌｖ*Ｉ | １７８６２６５ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩＩＩ、大サブユニット |
| *ｉｌｖ*Ｈ | １７８６２６６ | アセトヒドロキシ酸シンターゼＩＩＩ、小サブユニット |
| *ａｒｏ*Ｆ | １７８８９５３ | ＤＡＨＰ合成酵素 |
| *ａｒｏ*Ｇ | １７８６９６９ | ＤＡＨＰ合成酵素 |
| *ａｒｏ*Ｈ | １７８７９９６ | ＤＡＨＰ合成酵素 |
| *ｔｈｒ*Ｂ | １７８６１８４ | ホモセリンキナーゼ |
| *ｔｈｒ*Ｃ | １７８６１８５ | トレオニンシンターゼ |
| *ｓｄａ*Ａ | １７８８１１６ | セリンデアミナーゼ |
| *ｓｄａ*Ｂ | １７８９１６１ | セリンデアミナーゼ |

【００６０】

メチオニン生成は、改変ｍｅｔＢ対立遺伝子を使用することによって更に増大させてもよく、この改変ｍｅｔＢ対立遺伝子は、優先的または排他的に$H_2S$を利用することにより、国際特許出願ＷＯ２００４／０７６６５９（その内容を、参照することにより本明細書の一部とする）に記載されているように、Ｏ－スクシニル－ホモセリンからホモシステインを生成する。

【００６１】

Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の発酵生成に使用される硫黄源は、次のいずれかまたはそれらの組み合わせであってもよい：硫酸塩、チオ硫酸塩、硫化水素、ジチオン酸塩、亜ジチオン酸塩、亜硫酸塩。

【００６２】

本発明の好ましい実施態様では、硫黄源は硫酸塩および／またはチオ硫酸塩である。

【００６３】

本発明はまた、Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の製造方法に関し、この方法は、上述のメチオニン生成微生物の発酵、メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物の濃縮、および発酵ブロスの所望生成物の単離を含む。

【００６４】

本発明によれば、「培養」および「発酵」という用語は、単純な炭素源を含有する適切な培養培地上での微生物の増殖を意味するものとして区別なく使用される。

【００６５】

本発明によれば、単純な炭素源は、微生物、特に細菌を普通に増殖させるために、当業者が使用できる炭素源である。特に、グルコース、ガラクトース、スクロース、ラクトースまたはモラスなどの吸収可能な糖、またはこれら糖の副産物であり得る。特に好ましい単純炭素源はグルコースである。別の好ましい単純炭素源はスクロースである。

【００６６】

当業者は、本発明による微生物のための培養条件を規定することができる。特に、細菌類は、２０℃～５５℃、好ましくは２５℃～４０℃、より特定的にはC.glutamicumの場合には約３０℃、および大腸菌の場合には約３７℃の温度で発酵される。

【００６７】

発酵は、使用する細菌に適合した既知の規定された組成を有する無機培養培地を備えた発酵槽において行われるのが一般的であり、該無機培養培地は、少なくとも１種の炭素源と、必要であれば代謝産物を生成するのに必要な補基質とを含有する。

【００６８】

特に、大腸菌用の無機培養培地は、Ｍ９培地（Anderson, 1946, Proc. Natl. Acd. Sci. USA 32:120-128）、Ｍ６３培地（Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）またはSchaeferらにより規定されるもののような培地（1999, Anal. Biochem. 270:88-96）と同一または同様の組成であり得る。

【００６９】

同様に、C.glutamicum用の無機培養培地は、ＢＭＣＧ培地（Liebl et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210）またはRiedelらにより記載されるような培地（2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583）と同一または同様の組成であり得る。これらの培地を補充して、変異により導入される栄養要求性を補うことができる。

【００７０】

発酵後、Ｌ－メチオニン、その前駆体またはその誘導化合物を回収し、必要であれば精製する。培養培地で生成した化合物（メチオニンなど）の回収および精製方法は、当業者によく知られている。

【００７１】

場合により、発酵生成物の精製を行っている間、０％～１００％のバイオマスを保持してもよい。

【００７２】

本発明はまた、メチオニンの発酵生成に合わせて最適化される微生物にも関する。

【００７３】

「最適化された微生物」という用語は、上述の改変が組み込まれて、所望の代謝産物を生成するため、および、おそらくは副産物の生成を最小限に抑えるために最良な工業的性能をもたらす微生物を指す。

【００７４】
好ましい実施態様では、前記生物は、大腸菌またはC.glutamicumまたはSaccharomyces cerevisiaeのいずれかである。
【００７５】
最も好ましい実施態様では、前記生物は大腸菌である。
【発明の具体的説明】
【００７６】
ｍｅｔＪ遺伝子にコードされるメチオニンリプレッサーがクロラムフェニコールカセットにより置換されており（ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ）、かつ、メチオニンおよびＳＡＭに対するフィードバック感度が低下したｍｅｔＡ対立遺伝子を有する（ｍｅｔＡ＊１１）大腸菌株が、２００４年５月１２日に出願されたＰＣＴ国際特許出願ＰＣＴ／ＩＢ０４／００１９０１に記載されている。この株に、以下の遺伝的改変を導入した。
【００７７】
ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：：Ｋｍの構築
異種Ｐｔｒｃプロモーターの制御下にｍｅｔＦ遺伝子をクローニングするために、Datsenko&Wanner(2000)により記載された相同組み換え法を用いた。この方法により、関与遺伝子近傍にクロラムフェニコールまたはカナマイシン耐性カセットを挿入することができる。この目的のため、以下のオリゴヌクレオチドを使用した。
【００７８】
【化１】

**PtrcmetF R（配列番号１）**

**GCCAGGCTCTGATTCAGGGCATCCCGCTGGCTGGCGTGAAAAAAGCTCAT*aatatacc***

***tccttattccacacattatacgagccggatgattaattgtcaacagctc*TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**

【００７９】
このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：
－遺伝子ｍｅｔＦの配列（４１３０２５９－４１６０１９５）と相同な領域（大文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）；
－ＲＢＳ（太字）、－３５および－１０ボックス（太字）を有するプロモーターＰｔｒｃ配列と相同な配列（斜体）；
－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。
【００８０】
【化２】

**Ptrc-metF F（配列番号２）**

**ccttcatctttacatctggacgtctaaacggatagatgtgcacaacacaacatataactacaagcgattgatgaggtaaggt*tcacactggctcac***

***cttcgggtgggcctttctgc*CATATGAATATCCTCCTTAG**

【００８１】
このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：
－　遺伝子ｍｅｔＦの領域の配列（４１３０１１４－４１３０１９５）と相同な領域（小文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）；
－バクテリオファージＴ７末端の配列（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ｖ０１１４６）と相同な領域（斜体、小文字）；
－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。
【００８２】
オリゴヌクレオチドＰｔｒｃ－ｍｅｔＦ　ＦおよびＰｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｒを使用して、プラスミドｐＫＤ４からカナマイシン耐性カセットを増幅した。次いで、得られたＰＣ

Ｒ産物をエレクトロポレーションにより株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ（ｐＫＤ４６）に導入した。この株では、発現したＲｅｄ組み換え酵素により相同組み換えが可能となる。カナマイシン耐性形質転換体を選択し、以下に規定されるオリゴヌクレオチドＰｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　ＦおよびＰｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　Ｒを用いたＰＣＲ分析により、耐性カセットの挿入を検証した。

【００８３】

Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　Ｆ（配列番号３）：GCCCGGTACTCATGTTTTCGGGTTTATGG（４１２９８６６～４１２９８９４の配列と相同である）；

Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　Ｒ（配列番号４）：CCGTTATTCCAGTAGTCGCGTGCAATGG（４１３０５２４～４１３０４９７の配列と相同である）。

【００８４】

得られた株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍと命名した。

【００８５】

プラスミドｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥの構築

ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１

ホモセリンの生成を促進するために、トレオニンに対するフィードバック耐性が低下したアスパルトキナーゼ／ホモセリンをコードするｔｈｒＡ＊を、プロモーターＰｔｒｃを用いてプラスミドｐＣＬ１９２０（Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15, p. 4631）から発現させた。プラスミドｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１を構築するために、以下のオリゴヌクレオチドを用いてゲノムＤＮＡからｔｈｒＡをＰＣＲ増幅した：

ＢｓｐＨ１　ｔｈｒＡ（配列番号５）：ttaTCATGAgagtgttgaagttcggcggtacatcagtggc；

Ｓｍａ１　ｔｈｒＡ（配列番号６）：ttaCCCGGGccgccgccccgagcacatcaaacccgacgc。

【００８６】

ＰＣＲ増幅した断片を、制限酵素ＢｓｐＨＩおよびＳｍａＩで切断し、ベクターｐＴＲＣ９９Ａ（Stratagene）のＮｃｏＩ／ＳｍａＩ部位にクローニングした。低コピーベクターからの発現のために、プラスミドｐＭＥ１０１を以下のように構築した。プラスミドｐＣＬ１９２０を、オリゴヌクレオチドＰＭＥ１０１ＦおよびＰＭＥ１０１Ｒを用いてＰＣＲ増幅し、ｌａｃＩ遺伝子を有するベクターｐＴＲＣ９９ＡからのＢｓｔＺ１７Ｉ－ＸｍｎＩ断片およびＰｔｒｃプロモーターを、増幅したベクター内に挿入した。得られたベクターおよびｔｈｒＡ遺伝子を有するベクターを、ＡｐａＩおよびＳｍａＩにより制限処理し、ｔｈｒＡ含有断片をベクターｐＭＥ１０１にクローニングした。フィードバック阻害からＴｈｒＡを解放するために、オリゴヌクレオチドＴｈｒＡＦ　Ｆ３１８ＳおよびＴｈｒＡＲ　Ｆ３１８Ｓを使用した部位特異的突然変異誘発（Stratagene）によって変異Ｆ３１８Ｓを導入することにより、ベクターｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１を得た。

【００８７】

ＰＭＥ１０１Ｆ（配列番号７）：Ccgacagtaagacgggtaagcctg；

ＰＭＥ１０１Ｒ（配列番号８）：Agcttagtaaagccctcgctag；

ＴｈｒＡＦ　Ｆ３１８Ｓ（ＳｍａＩ）（配列番号９）：Ccaatctgaataacatggcaatg[tcc]agcgtttctggcccggg；

ＴｈｒＡＲ　Ｆ３１８Ｓ（ＳｍａＩ）（配列番号１０）：Cccgggccagaaacgct[gga]cattgccatgttattcagattgg。

【００８８】

ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ

ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥを構築するために、オリゴヌクレオチドＯｍｅＢ００１およびＯｍｅ　Ｂ００２を用いたＰＣＲによりｃｙｓＥ遺伝子を増幅し、ＰＣＲ産物を制限酵素ＰｖｕＩＩで切断し、ベクターｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１のＳｍａＩ部位にクローニングし、結果としてベクターｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥを得た。

【００８９】

Ｏｍｅ　Ｂ００１＿ｃｙｓＥＲ－ＰｖｕＩＩ（配列番号１１）：
GGAGGGACAGCTG[ATACGAAAGAAGTCCGCGAACTGGCGC]；
Ｏｍｅ　Ｂ００２＿ｃｙｓＥＦ－ＰｖｕＩＩ（配列番号１２）：
Atacgcagctg[ggacattagatcccatccccatactcaaatgtatgg]。

【００９０】

ＰｖｕＩＩ部位には下線を引いた。括弧内の配列はｃｙｓＥ（Colibri）（３７８０４２３－３７８０３９７）に相当する。

【００９１】

ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ：：Ｋｍの構築

メチオニンの生成を促進するために、Ｐｔｒｃプロモーターを用いてｍｅｔＨ遺伝子を過剰発現させた。構築のために、以下のオリゴヌクレオチドを使用した。

【００９２】

【化３】

**DiclR-metHF（配列番号１３）**

**gcaccagaatacgttcatttaactgcgcacgcagttgttccactttgctgctcat*GTCTGTCCTCCAGTACATGCAACCCCA***

***CACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTC*TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**

【００９３】

このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：

－遺伝子ｍｅｔＨの配列（４２２１４６１－４２２１４０８）と相同な領域（小文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）

－ＲＢＳ（太字）、－３５および－１０ボックス（太字）を有するプロモーターＰｔｒｃ配列と相同な領域（斜体、大文字）；

－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。

【００９４】

【化４】

**iclR-metHF（配列番号１４）**

***GCTTTTACCACAGATGCGTTTATGCCAGTATGGTTTGTTGAATTTTTATTAAATCTGGGTTGAG***

***CGTGTCGGGAGCAAGT*CATATGAATATCCTCCTTAG**

【００９５】

このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：

－遺伝子ｍｅｔＨの領域の配列（４２２１３２７－４２２１４０６）と相同な領域（斜体、大文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）；

－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。

【００９６】

オリゴヌクレオチドＤｉｃｌＲ－ｍｅｔＨＦおよびｉｃｌＲ－ｍｅｔＨＦを使用して、プラスミドｐＫＤ４からカナマイシン耐性カセットを増幅した。次いで、得られたＰＣＲ産物を、エレクトロポレーションによって株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ（ｐＫＤ４６）に導入した。この株では、Ｒｅｄ組み換え酵素を発現させることにより、相同組み換えが可能となった。カナマイシン耐性形質転換体を選択し、以下に規定されるオリゴヌクレオチドｉｃｌＦおよびｉｃｌＲを用いたＰＣＲ分析によって、耐性カセットの挿入を検証した。

ｉｃｌＦ（配列番号１５）：CCTTTGAGGTCGCATGGCCAGTCGGC（４２２１５５８～４２２１５３３の配列と相同である）；

ｉｃｌＲ（配列番号１６）：GCTTTTTAATAGAGGCGTCGCCAGCTCCTTGCC(４２１９９１７～４２１９９４９の配列と相同である)。

【００９７】
得られた株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ：Ｋｍと命名した。
【００９８】
ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨの構築
株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨを構築するために、クロラムフェニコールおよびカナマイシン耐性カセットを、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ：Ｋｍから取り除いた。
【００９９】
クロラムフェニコール耐性カセットのＦＲＴ部位で作用するＦＬＰリコンビナーゼを担持するプラスミドｐＣＰ２０を、エレクトロポレーションにより組み換え株に導入した。４２℃での一連の培養後、２つのカセットの欠失をＰＣＲ分析により検証した。保持された株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨと命名した。
【０１００】
プロモーター構築物Ｐｔｒｃ：：ｍｅｔＦ：Ｋｍを株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ内に転移させるために、ファージＰ１形質導入法を用いた。以下のプロトコールを二段階で実施した：株ＭＧ１６５５　ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍのファージ溶解物を調製し、次いで、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ内へそれを形質導入した。
【０１０１】
ファージ溶解物Ｐ１の調製：
－１０ｍｌのＬＢ＋Ｋｍ　５０μｇ／ｍｌ＋グルコース　０．２％＋$CaCl_2$　５ｍＭに、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍの一夜培養物１００μｌを植菌する。
－３７℃で３０分間振とうしながらインキュベートする。
－株ＭＧ１６５５上で調製された１００μｌのファージ溶解物Ｐ１（約$1.10^9$ファージ／ｍｌ）を添加する。
－全ての細胞が溶解するまで、３７℃で３時間振とうする。
－２００μｌのクロロホルムを添加し、渦流動させる。
－４５００ｇで１０分間遠心分離にかけ、細胞片を取り除く。
－上澄みを殺菌チューブへ移し、２００μｌのクロロホルムを添加する。
－４℃で溶解物を保存する。
【０１０２】
形質導入
－ＬＢ培地における株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨの一夜培養物５ｍｌを１５００ｇで１０分間遠心分離にかける。
－２．５ｍｌの１０ｍＭ　$MgSO_4$および５ｍＭ　$CaCl_2$に細胞ペレットを懸濁させる。
－対照チューブ：細胞１００μｌ、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍのファージ Ｐ１　１００μｌ。
－試験チューブ：細胞１００μｌ、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍのファージ Ｐ１　１００μｌ。
－３０℃で３０分間、振とうせずにインキュベートする。
－各チューブに１Ｍ　酢酸ナトリウム１００μｌを添加し、渦流動させる。
－１ｍｌのＬＢを添加する。
－３７℃で１時間、振とうしながらインキュベートする。
－７０００ｒｐｍで３分間チューブを遠心分離にかけた後、ＬＢ＋Ｋｍ５０μｇ／ｍｌ

を皿の上に広げる。
－３７℃で一晩インキュベートする。
【０１０３】
株の検証
カナマイシン耐性形質転換体を選択し、プロモーター構築物Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍの存在を、上述のオリゴヌクレオチドＰｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　ＦおよびＰｔｒｃ－ｍｅｔＦｖ　Ｒを用いたＰＣＲ分析により検証した。保持された株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍと命名した。
【０１０４】
ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：：Ｋｍの構築
異種Ｐｔｒｃプロモーターの制御下にｃｙｓＭ遺伝子をクローニングするために、Datsenko&Wanner(2000)によって記載された相同組み換え法を用いた。本方法により、関連遺伝子の近傍にクロラムフェニコールまたはカナマイシン耐性カセットを挿入することができる。この目的のため、以下のオリゴヌクレオチドを使用した。
【０１０５】
【化５】
**Ptrc-cysM F**
**gcctgatgcgacgcttgcgcgtcttatcaggtctacaggttacaaaccttgcca*taatatacctccttaccacacattatacgagccggatgatt aattgtcaacagctc*CATATGAATATCCTCCTTAG**（配列番号１７）
【０１０６】
このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：
－遺伝子ｃｙｓＭの配列（２５３７６２７－２５３７６８１）と相同な領域（小文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）
－ＲＢＳ（太字）、－３５および－１０ボックス（太字）を有するプロモーターＰｔｒｃ配列と相同な領域（斜体、小文字）；
－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。
【０１０７】
【化６】
**Ptrc-cysM R**
**ggttgagtgaatgttaaacgcccggaggcgcttcccgcgatccgggcttttt*TATCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGC CTTTCTGC*TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG**（配列番号１８）
【０１０８】
このオリゴヌクレオチドは、以下の領域を有する：
－　遺伝子ｃｙｓＭの領域の配列（２５３７７３４－２５３７６８４）と相同な領域（小文字）（ウェブサイトhttp://genolist.pasteur.fr/Colibri/の参照配列）；
－バクテリオファージＴ７末端の配列（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ｖ０１１４６）と相同な領域（斜体、大文字）；
－カナマイシン耐性カセットの増幅用領域（大文字）（Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645における参照配列）。
【０１０９】
オリゴヌクレオチドＰｔｒｃ－ｃｙｓＭ　ＦおよびＰｔｒｃ－ｃｙｓＭ　Ｒを使用して、プラスミドｐＫＤ４からカナマイシン耐性カセットを増幅した。次いで、得られたＰＣＲ産物をエレクトロポレーションにより株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ（ｐＫＤ４６）に導入した。この株では、Ｒｅｄ組み換え酵素が発現し、それにより相同組み換えが可能となった。次いで、カナマイシン耐性形質転換体を選択し、以下に規定され

るオリゴヌクレオチドＰｔｒｃ－ｃｙｓＭｖ　ＦおよびＰｔｒｃ－ｃｙｓＭｖ　Ｒを用いたＰＣＲ分析により、耐性カセットの挿入を検証した。

【０１１０】

Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭｖ　Ｆ：ggtgacaagaatcagttccgc（２５３７２６２～２５３７２８２の配列と相同である）（配列番号１９）；

Ｐｔｒｃ－ｃｙｃＭｖ　Ｒ：GCGTTTATTCGTTGGTCTGC（２５３７８３３～２５３７８１４の配列と相同である）（配列番号２０）。

【０１１１】

得られた株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｊ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：：Ｋｍと命名した。

【０１１２】

ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：：Ｋｍの構築

株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：：Ｋｍを構築するために、上述のように、プラスミドｐＣＰ２０を用いて、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨからクロラムフェニコールおよびカナマイシン耐性カセットを取り除いた。保持された株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨと命名した。

【０１１３】

プロモーター構築物Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭを株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ内に移行させるために、ファージＰ１形質導入法を用いた。以下のプロトコールを二段階で実施した：株ＭＧ１６５５　ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：Ｋｍのファージ溶解物を調製し、次いで、上述のような株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ内へそれを形質導入した。保持された株は、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：Ｋｍと命名した。

【０１１４】

対立遺伝子ｍｅｔＡ＊１１およびΔｍｅｔＪによる、ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨの増強された発現と、ｍｅｔＦおよびｃｙｓＭの最適化された発現との組み合わせ

株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１）、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ：Ｋｍ（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ）、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：Ｋｍ（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ）およびＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：Ｋｍ（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ）を構築するために、プラスミド（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１）または（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ）を、形質転換により、株ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ：Ｋｍ、ＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ：：Ｃｍ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ：ＫｍおよびＭＧ１６５５　ｍｅｔＡ＊１１　ΔｍｅｔＪ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ　Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ　Ｐｔｒｃ－ｃｙｓＭ：Ｋｍに導入した。

【０１１５】

異種プロモーターの制御下における、ｃｙｓＥ、ｍｅｔＨおよび／またはｃｙｓＭおよび／またはｍｅｔＦの発現が増強されたメチオニン生成株の評価

小エルレンマイヤーフラスコ内で、初めに生産株を評価した。２．５ｇ／ｌグルコースを含むＬＢ培地内で前培養物を増殖させ、これを使用して、最小培地ＰＣ１に一夜培養物を植菌した。この培養物を供給し、０．０１ｇ．Ｌ$^{-1}$のビタミンＢ１２を補充した培地ＰＣ１に５０ｍｌの培養物を植菌しＯＤ６００を０．２とした。特に示した場合には、硫

酸アンモニウムの代わりに５．６ｇ／ｌのチオ硫酸アンモニウムを使用した。必要に応じて、スペクチノマイシンを１００ｍｇ／ｌの濃度で添加した。ＯＤ６００が４．５～５に達したら、ＯＰＡ／Ｆｍｏｃ誘導体化後にＨＰＬＣによって細胞外アミノ酸を定量し、他の関連代謝産物をシリル化後にＧＣ－ＭＳを用いて分析した。

【０１１６】

【表９】

表１：最小培地ＰＣ１の組成

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 g.L$^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 g.L$^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 g.L$^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 g.L$^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 g.L$^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 g.L$^{-1}$ |
| MgSO4.7H2O | 1.00 g.L$^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 g.L$^{-1}$ |
| CaCl2 2H2O | 0.04 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| K2HPO4 | 8.00 g.L$^{-1}$ |
| Na2HPO4 | 2.00 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2HPO4 | 8.00 g.L$^{-1}$ |
| NH4Cl | 0.13 g.L$^{-1}$ |
| NaOH 4M | ｐＨ６．８に調節 |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 g.L$^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| グルコース | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 g.L$^{-1}$ |
| MOPS | 5.00 g.L$^{-1}$ |

【０１１７】

表２に見られるように、メチオニンの量は、ｃｙｓＥ、ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨ、またはｃｙｓＥ、ｍｅｔＨの過剰発現およびｍｅｔＦの完全に変性された発現により増大する。ｃｙｓＭの発現が増強されることにより、メチオニン生成が更に増大し得る。幾つかの株は、チオ硫酸塩の存在下、より多くの量のメチオニンを生成した。ｃｙｓＥ、ｃｙｓＭおよびｍｅｔＨを過剰発現し、かつ、ｍｅｔＦ発現がチオ硫酸塩の存在下でＰｔｒｃプロモーターの制御下にある場合に、最も高いメチオニン生成が得られる。イソロイシン生成は、ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨの発現により劇的に低減され、これはγ脱離活性の低下を示している。ｃｙｓＭの過剰発現により、異種プロモーターからｃｙｓＥおよびｍｅｔＨを過剰発現させ、かつｍｅｔＦを発現させる株におけるγ脱離が低減される。

【０１１８】

【表１０】

表２：上述の株により、硫黄供給源として硫酸塩（Ｓ）またはチオ硫酸塩（Ｔ）を含むバッチ培養物において生成されたメチオニンおよびイソロイシン（ｍｍｏｌ／ｇ　ＤＷ）（ｎ．ｄ．は測定されず）

| 遺伝子型 | meth (mmol/g DW)(S) | meth (mmol/g DW)(T) | iso (mmol/g DW)(S) | iso (mmol/g DW)(T) |
|---|---|---|---|---|
| MG1655 metA*11 ΔmetJ (pME101-thrA*1) | 0.55 | 0.68 | 0.28 | 0.32 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ (pME101-thrA*1-cysE) | 1.02 | 0.86 | 0.15 | 0.23 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH:Km (pME101-thrA*1-cysE) | 1.23 | 1.19 | 0.07 | 0.1 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc-metF:Km (pME101-thrA*1-cysE) | 1.36 | 1.77 | 0.17 | 0.23 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc-metF Ptrc-cysM (pME101-thrA*1-cysE) | n.d. | 2.04 | n.d. | 0.02 |

【０１１９】

３．ＣｙｓＥおよびＭｅｔＨの酵素活性における変化の測定

ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨ発現における変化を検証するために、対応する酵素の活性を粗抽出物において測定した。

【０１２０】

酵素活性をｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定するために、大腸菌株を上述のような最小培地内で培養し、中対数期に回収した。冷リン酸カリウム緩衝液中に細胞を再懸濁し、氷上で超音波分解した（Ｂｒａｎｓｏｎソニファイアー、７０Ｗ）。遠心分離後、上澄みに含有されたタンパク質を定量した（Bradford, 1976）。

【０１２１】

セリンアセチルトランスフェラーゼ活性（ＣｙｓＥ）を測定するために、１００ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ７．５）、４ｍＭ　アセチル－ＣｏＡ、３０ｍＭ　Ｌ－セリン中で、１０μｌの抽出物を２５℃で１０分間アッセイした。タンパク質をアセトンで沈殿させ、シリル化試薬による誘導体化の後、ＧＣ－ＭＳによってＯ－アセチル－セリンを検出した。

【０１２２】

ビタミンＢ１２依存性メチオニンシンターゼ活性（ＭｅｔＨ）を測定するために、１００ｍＭ　リン酸カリウム（ｐＨ７．２）、１ｍＭ　ホモシステイン、０．２５ｍＭ　メチルテトラヒドロフォレート、５０μＭ　ビタミンＢ１２、２０μＭ　Ｓ－アデノシル－メチオニンおよび２５ｍＭ　ＤＴＴ中で、１００μｌの抽出物を３７℃で１０分間アッセイした。タンパク質をアセトンで沈殿させ、シリル化試薬による誘導体化の後、ＧＣ－ＭＳ

によって生成されたメチオニンを検出した。

【０１２３】

表３に見られるように、遺伝子ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨの過剰発現により、対応する酵素活性が増大する。故に、これら遺伝子の活性が増大することにより、メチオニン生成が増大する。

【０１２４】

【表１１】

表３：チオ硫酸塩の存在下で培養されたメチオニン生成株におけるセリンアセチルトランスフェラーゼ（ＣｙｓＥ）およびメチオニンシンターゼ（ＭｅｔＨ）の活性（ｍＵＩ／ｇＤＷ）

| 遺伝子型 | CysE | MetH |
|---|---|---|
| MG1655 metA*11 ΔmetJ (pME101-thrA*1) | 65 | 3.2 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ (pME101-thrA*1-cysE) | 453 | 1.2 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH (pME101-thrA*1-cysE) | 475 | 12 |
| MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc-metF:Km (pME101-thrA*1-cysE) | 292 | 6.8 |

【０１２５】

発酵条件下でのメチオニン生成の検証

次いで、供給バッチプロトコールを用いて、３００ｍｌの発酵槽（ＤＡＳＧＩＰ）において、製造条件下で目的の代謝産物の実質量を生成する株を試験した。

【０１２６】

この目的のため、２．５ｇ／ｌグルコースを含むＬＢ培地内で増殖された８時間培養物を用いて、最小培地ＰＣ１（上記参照のこと）に一晩前培養物を植菌した。１５０ｍｌの最小培地（Ｂ１）を発酵槽に充填し、バイオマス濃度がほぼ０．０９ｇ／ｌになるまで１．５ｍｌの濃縮した前培養物（９ｇ／ｌ～１２ｇ／ｌ）を植菌した。

【０１２７】

【表１２】

表４：最小培地Ｂ１の組成

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 $g.L^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 $g.L^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 $g.L^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 $g.L^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 $g.L^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 $g.L^{-1}$ |
| MgSO4.7H2O | 1.00 $g.L^{-1}$ |
| CaCl2 2H2O | 0.08 $g.L^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 5.00 $g.L^{-1}$ |
| K2HPO4 | 8.00 $g.L^{-1}$ |
| Na2HPO4 | 2.00 $g.L^{-1}$ |
| (NH4)2HPO4 | 8.00 $g.L^{-1}$ |
| NH4Cl | 0.13 $g.L^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 $g.L^{-1}$ |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 $g.L^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 $g.L^{-1}$ |
| グルコース | 5.00 $g.L^{-1}$ |
| PPG | 0.4 $mL.L^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 $g.L^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 $g.L^{-1}$ |
| NaOH 4M | ｐＨ６．８に調節 |

【０１２８】

【表１３】

表５：最小培地ＦＢタイプＴ１

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 $g.L^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 $g.L^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 $g.L^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 $g.L^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 $g.L^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 $g.L^{-1}$ |
| MgSO4 | 5.00 $g.L^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 $g.L^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 8.32 $g.L^{-1}$ |
| Na2SO4 | 8.95 $g.L^{-1}$ |
| (NH4)2S2O3 | 22.32 $g.L^{-1}$ |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 $g.L^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 $g.L^{-1}$ |
| グルコース | 500 $g.L^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 $g.L^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 $g.L^{-1}$ |
| NH4OH 28% | チオ硫酸塩を添加する前にｐＨ６．０に調節 |

【０１２９】

【表１４】

表６：最小培地ＦＢタイプＳ

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 g.L$^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 g.L$^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 g.L$^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 g.L$^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 g.L$^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 g.L$^{-1}$ |
| MgSO4 | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 20.0 g.L$^{-1}$ |
| Na2SO4 | 10.0 g.L$^{-1}$ |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 g.L$^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| グルコース | 500 g.L$^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 g.L$^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| NH4OH 28% | ｐＨ６．８に調節 |

【０１３０】

培養物の温度は３７℃で一定に保ち、ｐＨは、ＮＨ$_4$ＯＨ溶液を用いて、６．５～８、好ましくは６．７の値に永久的に調節した。攪拌速度は、バッチ段階中は６００ｒｐｍに保ち、供給バッチ段階の終わりに最大１０００ｒｐｍまで上げた。溶解酸素濃度は、ガスコントローラーを用いて２０％～４０％、好ましくは３０％飽和の値で維持した。細胞マスが０．９ｇ／ｌ～１．２ｇ／ｌの濃度に達したら、０．１ｍｌ／ｈ～１．５ｍｌ／ｈ、好ましくは０．４３ｍｌ／ｈの初期流速で供給バッチを開始し、最大で０．５ｍｌ／ｈ～５．８ｍｌ／ｈ、好ましくは１．７ｍｌ／ｈの流速値までＳ字状に流速を上げた（２４ｈ）。正確な供給条件は、以下の式により計算した：

【０１３１】

【数１】

$$Q(t) = p1 + \frac{p2}{1 + e^{-p3(t-p4)}}$$

【０１３２】

式中、Ｑ（ｔ）は、１５０ｍＬのバッチ容量についての供給流速（ｍＬ／ｈ）であり、

Ｐ１は、０．０２５～０．３５、好ましくは０．１００であり、

Ｐ２は、０．４００～５．６００、好ましくは１．６００であり、

Ｐ３は、０．０６８～０．９５、好ましくは０．２７０であり、

Ｐ４は、１．２５０～１７．５、好ましくは５．０００である。

【０１３３】

この場合、３００ｇ／ｌ～８００ｇ／ｌ（好ましくは５００ｇ／ｌ）の濃度でグルコースを含有するＦＢ培地を使用した。

【０１３４】
バイオマスの濃度が２０ｇ／ｌ～５０ｇ／ｌ(好ましくは３５ｇ／ｌ、４０～８０時間)の値に達したら、発酵を停止し、ＨＰＬＣによって細胞外メチオニンおよびイソロイシン濃度を測定した。
【０１３５】
【表１５】

表７：異種プロモーター下でｃｙｓＥおよびｍｅｔＨもしくはｍｅｔＦ、またはそれら３種の組み合わせを過剰発現させる株の供給バッチ発酵において得られたメチオニンタイター。ＲｅｆはMG１６５５　ｍｅｔＡ*１１　Δｍｅｔ Ｊに相当する。チオ硫酸塩（Ｔ）または硫酸塩（Ｓ）の存在下で株を増殖させた。

| 遺伝子型 | チオ硫酸塩／硫酸塩 | met(mM) | Iso(mM) |
|---|---|---|---|
| Ref+(pME101-thrA*1) | S | 70 mM | 25 mM |
| Ref+(pME101-thrA*1) | T | 94 mM | 35 mM |
| Ref+(pME101-thrA*1-cysE) | S | 74 mM | 2 mM |
| Ref+(pME101-thrA*1-cysE) | T | 101 mM | 0 mM |
| Ref+Ptrc-metH Ptrc-metF:Km (pME101-thrA*1-cysE) | T | 121 mM | 1 mM |

【０１３６】
表７に見られるように、異種プロモーターの制御下におけるｃｙｓＥ、ｃｙｓＥおよびｍｅｔＨ、ｃｙｓＥ、ｍｅｔＨおよびｍｅｔＦの発現の増強、またはチオ硫酸塩の存在下での株の増殖によりメチオニン生産が著しく増大し得る。イソロイシン生成は、ｃｙｓＥおよび／またはｍｅｔＨの過剰発現により著しく低減される。
【０１３７】
３００ｍＬの発酵槽において最も多量のメチオニンを生成した株を、その後、供給バッチプロトコールを用いて２．５ｌの発酵槽（PIERRE GUERIN）中で製造条件下で試験した。
【０１３８】
この目的のため、２．５ｇ／ｌのグルコースを含むＬＢ培地において増殖させた８時間培養物を使用して、最小培地ＰＣ１に一晩前培養物を植菌した。発酵槽を６００ｍｌの最小培地（Ｂ２）で充填し、６ｍｌの濃縮した前培養物（９ｇ／ｌ～１２ｇ／ｌ）を、０．９ｇ／ｌのバイオマスになるまで植菌した。
【０１３９】
培養物の温度は３７℃で一定に保ち、ｐＨは$NH_4OH$２８％溶液を用いて、６．３～８、好ましくは６．８の値に永久的に調節した。初期攪拌速度は、バッチ段階中は２００ｒｐｍに保ち、供給バッチ段階中は最大１２００ｒｐｍまで上げた。初期気流速度は、バッチ段階中は４０Ｎｌ／ｈに設定し、供給バッチ段階中は最大２５０Ｎｌ／ｈまで上げた。溶解酸素濃度は、攪拌速度および気流速度を上げることによって、２０％～４０％飽和、好ましくは３０％の値で維持した。バイオマス濃度が１．２ｇ／ｌ～１．５ｇ／ｌに達したら、０．５ｍｌ／ｈ～４ｍｌ／ｈ、好ましくは１．０ｍｌ／ｈの初期流速で供給バッチを開始し、最大で３ｍｌ／ｈ～３５ｍｌ／ｈ、好ましくは２０．１ｍｌ／ｈの流速値まで幾何級数的に流速を上げた（１５ｈ）。この時点で、流速を１０時間～４５時間、好ましくは３０時間一定に維持した。供給のために、３００ｇ／ｌ～８００ｇ／ｌ、好ましくは７５０ｇ／ｌの濃度でグルコースを含有するＦＢタイプＴ２を使用した（表８を参照）。

【０１４０】
バイオマスの濃度が４０ｇ／ｌ～１１０ｇ／ｌ、好ましくは９０ｇ／ｌの値に達したら、発酵を停止し、ＨＰＬＣを用いて細胞外メチオニン濃度を測定した。株ＭＧ１６５５ ｍｅｔＡ＊１１ ΔｍｅｔＪ Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＨ Ｐｔｒｃ－ｍｅｔＦ（ｐＭＥ１０１－ｔｈｒＡ＊１－ｃｙｓＥ）は、これらの条件下で１６９ｍＭのメチオニンを生成した。
【０１４１】
【表１６】

表８：最小培地ＦＢタイプＴ２

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 g.L$^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 g.L$^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 g.L$^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 g.L$^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 g.L$^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 g.L$^{-1}$ |
| MgSO4 | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 g.L$^{-1}$ |
| K2HPO4,3H2O | 3.93 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 5.54 g.L$^{-1}$ |
| Na2SO4 | 5.96 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2S2O3 | 33.48 g.L$^{-1}$ |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 g.L$^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| グルコース | 750 g.L$^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 g.L$^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| NH4OH 28% | チオ硫酸塩を添加する前にｐＨ６．０に調節 |

【０１４２】

【表１７】

表９：最小培地Ｂ２の組成

| 化合物 | 濃度 |
|---|---|
| ZnSO4.7H2O | 0.0040 g.L$^{-1}$ |
| CuCl2.2H2O | 0.0020 g.L$^{-1}$ |
| MnSO4.H2O | 0.0200 g.L$^{-1}$ |
| CoCl2.6H2O | 0.0080 g.L$^{-1}$ |
| H3BO3 | 0.0010 g.L$^{-1}$ |
| Na2MoO4.2H2O | 0.0004 g.L$^{-1}$ |
| MgSO4.7H2O | 1.00 g.L$^{-1}$ |
| CaCl2 2H2O | 0.16 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2SO4 | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| K2HPO4 | 15.00 g.L$^{-1}$ |
| Na2HPO4 | 2.00 g.L$^{-1}$ |
| (NH4)2HPO4 | 8.00 g.L$^{-1}$ |
| NH4Cl | 0.13 g.L$^{-1}$ |
| クエン酸 | 6.00 g.L$^{-1}$ |
| FeSO4, 7H2O | 0.04 g.L$^{-1}$ |
| チアミン | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| グルコース | 5.00 g.L$^{-1}$ |
| PPG | 0.4 mL.L$^{-1}$ |
| スペクチノマイシン | 0.2 g.L$^{-1}$ |
| ビタミンＢ１２（シアノコバラミン） | 0.01 g.L$^{-1}$ |
| ＮａOH 4M | ｐＨ６．８に調節 |

【配列表】

2012196222000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年7月6日(2012.7.6)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

炭素源と硫黄源とを含む適切な培養培地内で微生物を培養し、該培養培地からメチオニンを回収することにより、メチオニンを製造するための方法であって、

・前記微生物においてｃｙｓＥの発現が増大しており、かつ

・前記微生物においてｍｅｔＨの発現が増大している、方法。

【請求項２】

Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子が過剰発現しており、該遺伝子が以下の遺伝子：

・メチオニンシンターゼをコードするｍｅｔＥ；
・５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素をコードするｍｅｔＦ；
・セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするｇｌｙＡ；および
・グリシン開裂複合体をコードするｇｃｖＴＨＰ、ｌｐｄ
からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ｍｅｔＨおよびｍｅｔＦの発現が増大しており、および／または該遺伝子の少なくとも１つが異種プロモーターから発現する、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
γ脱離活性が低減され、それにより副産物イソロイシンの生成が低下している、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
メチオニン生成に関与する更なる遺伝子の発現が増大している、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
メチオニン生成を低減する遺伝子の発現が減衰している、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
ｍｅｔＪ遺伝子によりコードされるメチオニンリプレッサーが欠失または変異しており、ならびに／またはＳ－アデノシルメチオニンおよび／もしくはメチオニンに対するフィードバック感度が低下した酵素をコードするホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（ＭｅｔＡ）対立遺伝子が株に組み込まれている、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
培養培地中の硫黄源が、硫酸塩、チオ硫酸塩、硫化水素、ジチオン酸塩、亜ジチオン酸塩、亜硫酸塩、または異なる供給源の組み合わせである、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
培養培地中の硫黄源が、硫酸塩もしくはチオ硫酸塩、またはこれらの混合物である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
所望のアミノ酸／最終生成物の一部または全量（０～１００％）において任意に残存する発酵ブロスおよび／またはバイオマスの構成成分を単離する工程を含んでなる、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
メチオニンの発酵による製造に使用される微生物であって、少なくともシステイン生成に関与するｃｙｓＥの発現が増大しており、かつ、Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与するｍｅｔＨの発現が増大しており、および／または異種プロモーターによって駆動される、微生物。
【請求項１２】
Ｃ１単位の生成および該Ｃ１単位をホモシステイン上へ転移させる能力に関与する少なくとも１つの遺伝子が過剰発現しており、該遺伝子が以下の遺伝子：
・メチオニンシンターゼをコードするｍｅｔＥ；
・５，１０－メチレンテトラヒドロフォレート還元酵素をコードするｍｅｔＦ；
・セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするｇｌｙＡ；および
・グリシン開裂複合体をコードするｇｃｖＴＨＰ、ｌｐｄ
からなる群から選択される、請求項１１に記載の微生物。
【請求項１３】
ｍｅｔＨおよびｍｅｔＦの発現が増大しており、および／または該遺伝子の少なくとも１つが異種プロモーターから発現する、請求項１２に記載の微生物。

【請求項１４】
γ脱離活性が低減され、それにより副産物イソロイシンの生成が低下している、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項１５】
メチオニン生成に関与する更なる遺伝子の発現が増大している、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項１６】
メチオニン生成を低減する遺伝子の発現が減衰している、請求項１１～１５のいずれか一項に記載の微生物。
【請求項１７】
ｍｅｔＪ遺伝子によりコードされるメチオニンリプレッサーが欠失または変異しており、ならびに／またはＳ－アデノシルメチオニンおよび／もしくはメチオニンに対するフィードバック感度が低下した酵素をコードするホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（ＭｅｔＡ）対立遺伝子が組み込まれている、請求項１１～１６のいずれか一項に記載の微生物。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ　5/10* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/00　１０１ | |

(72)発明者　ファビアン、リュー
フランス国リオム、リュ、アミラル、グルベイル、２０ビス
(72)発明者　セリーヌ、レイノー
フランス国ダレ、アンパス、ド、ラ、スゥルス、５
(72)発明者　ミシェル、シャトー
フランス国リオム、ラ、ボメット、バ、ウ１
(72)発明者　フィリップ、スケイユ
フランス国デイム、シャン、デュ、ク ク

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA10 BA71 CA04 DA02 DA05 DA11 EA04 FA02
GA11 HA20
4B064 AE09 AE16 CA19 CC24 CD01 DA01 DA10 DA11
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA01 BB11 CA17 CA41 CA43 CA44

【外国語明細書】
2012196222000001.pdf