

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5758499号
(P5758499)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 Z N A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 13/06 (2006.01)

C 1 2 P 13/06 E

請求項の数 18 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2013-546021 (P2013-546021)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月21日(2011.12.21)
 (65) 公表番号 特表2014-502843 (P2014-502843A)
 (43) 公表日 平成26年2月6日(2014.2.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2011/009966
 (87) 国際公開番号 W02012/087039
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日(2012.6.28)
 審査請求日 平成25年6月21日(2013.6.21)
 (31) 優先権主張番号 10-2010-0131953
 (32) 優先日 平成22年12月21日(2010.12.21)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0139228
 (32) 優先日 平成23年12月21日(2011.12.21)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

(73) 特許権者 511023598
 シージェイ チェイルジェダン コーポレ
 イション
 大韓民国、ソウル 100-400、チュ
 ング、サンニムードン、292
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人HARAKENZO WOR
 LD PATENT & TRADEMA
 RK
 (72) 発明者 キム, ソ ヨン
 大韓民国, 427-736 キョンギード
 , クァチョン-シ, プリムードン, チュゴ
 ン アパートメント, 908-305

微生物の受託番号 KCCM KCCM11145P

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチド及びそれを発現する微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 17 のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは前記ポリペプチド配列と 95 % 以上の相同性を有するポリペプチドの開始メチオニンから 111 番目のアミノ酸が、グルタミン酸に置換されかつ 112 番目のアミノ酸がスレオニンまたはヒスチジンに置換されたホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有する、変異型ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、112 番目のアミノ酸がヒスチジンに置換されたものである、請求項 1 に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項 3】

前記変異型ポリペプチドが、配列番号 19 または 20 のアミノ酸配列を有するものである、請求項 1 または 2 に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドのアミノ酸を置換し、メチオニンに対するフィードバック調節が解除されたものである、請求項 1 に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項 5】

前記アミノ酸の置換が、29 番目のアミノ酸がプロリンに置換、114 番目のアミノ酸がグリシンに置換、140 番目のアミノ酸がセリンに置換、または前記 3 種のアミノ酸置換のうち、1 種以上を組み合わせたものである、請求項 4 に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、さらに、112番目のアミノ酸がスレオニンまたはヒスチジンに置換されたものである、請求項5に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項7】

前記変異型ポリペプチドが、配列番号22または23のアミノ酸配列を有するものである、請求項5または6に記載の変異型ポリペプチド。

【請求項8】

請求項1に記載の変異型ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号25、26、28および29の塩基配列のいずれか一つの塩基配列を有するものである、請求項8に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項10】

請求項8に記載のポリヌクレオチドが作動可能に連結された、組み換えベクター。

【請求項11】

請求項8に記載のポリヌクレオチドを含む、微生物。

【請求項12】

さらに、アセチル-CoAシンテターゼ(acetyl-CoA synthetase)の活性が内在的アセチル-CoAシンテターゼの活性に比べ強化され、またはパントテン酸キナーゼ(pantothenate kinase)の活性がCoAの蓄積によるフィードバック障害が解除されるように変形されたものである、請求項11に記載の微生物。

20

【請求項13】

さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼコード遺伝子(ppc)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼコード遺伝子(aspC)、及びアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼコード遺伝子(asd)からなる群から選ばれる一つ以上の遺伝子のコピー数が増加され、または前記遺伝子のプロモーターの活性が増進されたプロモーターに置換されるか、または活性が増進されるように変異された、請求項11に記載の微生物。

【請求項14】

請求項10に記載の組み換えベクターに形質変換された、微生物。

【請求項15】

前記微生物が、エシェリキア(Escherichia)属である、請求項14に記載の微生物。

30

【請求項16】

前記微生物が、大腸菌である、請求項15に記載の微生物。

【請求項17】

前記微生物が、受託番号KCCM11146P、KCCM11147P、KCCM11229P、またはKCCM11230Pである、請求項16に記載の微生物。

【請求項18】

請求項11乃至17のいずれか一項に記載の微生物を培養する段階、及び前記微生物培養過程において生成した - アセチルホモセリンを得る段階を含む、 - アセチルホモセリンの生産方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有するように変形されたポリペプチド、これをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む組み換えベクター、前記組み換えベクターに形質転換された微生物、及び前記微生物を用いたO-アセチルホモセリンの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

メチオニンは、生体内の必須アミノ酸の一種であり、飼料及び食品添加剤として広く用いられ、医薬用として輸液剤、医薬品の合成原料として用いられる。メチオニンは、コリ

50

ン（レシチン）とクレアチンのような化合物の前駆体として作用し、システインとタウリンの合成原料としても用いられる。また、メチオニンは、硫黄を与える役割をする。

【 0 0 0 3 】

S - アデノシル - メチオニンは、L - メチオニンに由来し、成体内においてメチル基を与える役割をし、脳の多様な神経伝達物質（neurotransmitter）の合成に関連している。メチオニン及び／またはS - アデノシル - L - メチオニン（SAM）は、成体内における肝と動脈において脂肪蓄積を抑制し、憂鬱、炎症、肝疾患、筋肉痛を緩和する等の多様な役割をする。

【 0 0 0 4 】

このようなメチオニンは、動物飼料を始めとして食品と医薬品において用いるために、化学合成と生物学的合成によって生産することができる。

10

【 0 0 0 5 】

化学合成は、主に、5 - (- メチルメルカプトエチル) - ヒダントイン (5 - (- methylmercaptoethyl) - hydantoin) を加水分解させる反応によって、L - メチオニンを生産する。しなしながら、このような化学合成によって生産されたメチオニンは、L - 型とD - 型が混合した形態で生産されるという短所があった。

【 0 0 0 6 】

生物学的合成として、特許文献1にはL - メチオニンを生産する方法として、微生物を作製するために、シスタチオニンシンターゼ（cystathionine synthase）に変異を加え、システインを用いずに、直接 H_2S または CH_3SH を用いて、ホモシステン若しくはメチオニンを合成する方法が開示されている。当該方法では、変異されたシスタチオニンシンターゼを直接細胞に導入し、細胞内のメチオニン合成過程によってメチオニンを合成した。しかしながら、この方法では、細胞内におけるメチオニンの代謝経路を用いるため、合成メチオニンによる阻害作用により、極めて少量のメチオニンの生産のみが可能であり、 H_2S または CH_3SH が細胞に毒性を引き起こすことから、実効性に劣るという問題があった。

20

【 0 0 0 7 】

上記した問題点を解決するために、本発明者等は、L - メチオニン前駆体から酵素転換反応により、L - メチオニンを生産する二段階工法を開発したことがある（特許文献2）。このような方法で、 H_2S または CH_3SH による細胞毒性の問題、及び生成したL - メチオニンによる代謝過程阻害作用の問題が解決された。これだけでなく、D - メチオニンとL - メチオニンの混合形態ではなく、L - メチオニンのみを選択的に生産することができるという特徴がある。

30

【 0 0 0 8 】

前記二段階工法では、メチオニン前駆体として用いられるO - スクシニルホモセリン（O-succinyl homoserine）とO - アセチルホモセリン（O-acetyl homoserine）が使用され得る。メチオニン転換反応の際に、前駆体に対するメチオニンの生産収率の側面から、O - アセチルホモセリンは、O - スクシニルホモセリンに比べて有利である。具体的に、O - アセチルホモセリンは、1モルから0.91モルのメチオニンを生産するのに対して、O - スクシニルホモセリンの場合は、1モルから0.68モルのメチオニンのみを生産することができる。したがって、O - アセチルホモセリンをメチオニン前駆体として用いると、最終のメチオニンの生産コストを低めるという効果が得られるので、メチオニンの経済的な大量生産のために、O - アセチルホモセリンを高収率で生産することが極めて重要である。

40

【 0 0 0 9 】

一方、微生物は、種類に応じて、メチオニン前駆体としてO - アセチルホモセリンまたはO - スクシニルホモセリンを用いるが、具体的に、エシェリキア（Escherichia）属、エンテロバクター（Enterobacter）属、サルモネラ（Salmonella）属、バシラス（Bacillus）属の微生物の場合は、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ（L-homoserine O-succinyl transferase）により、ホモセリンとスクシニルCoA（succinyl-coA）からO

50

- スクシニル - ホモセリンを合成し(非特許文献1)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、レプトスピラ (*Leptospira*) 属、デイノコッカス (*Deinococcus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属の微生物の場合は、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ (L-homoserine O-acetyl transferase) により、ホモセリンとアセチル CoA (acetyl-coA) から O - スクシニルホモセリンを合成する (非特許文献2)。

【0010】

したがって、実験用及び産業用目的の組み替えタンパク質を生産するために有用に使用されているエシェリキア (*Escherichia*) 属の微生物を用いて、O - アセチルホモセリントランスフェラーゼを発現させなければならない。しかしながら、食品用として用いられる製品を生産するために使用する微生物の場合は、外来遺伝子の導入に関する消費者の認識が悪く、外来遺伝子の導入に関する安定性を証明しなければならないという問題点が生じ得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】US 2005/0054060 A1

【特許文献2】PCT/KR 2007/003650

【特許文献3】PCT/W 2008/127240

【特許文献4】PCT/W 2005/108561

【特許文献5】KR 2006 - 0068505

【特許文献6】KR 2011 - 0023703

【特許文献7】PCT/KR 2005/00344

【特許文献8】EP 2108693 A2

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Biochemistry. 1999 Oct 26; 38(43): 14416-23

【非特許文献2】JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Mar. 2002, p.1277-1286

【非特許文献3】JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 1997, 4426-4428

【非特許文献4】Nucleic Acids Research, 1999, Vol.27, No.22 4409-4415

【非特許文献5】PNAS(2000)vol.97: 6640 - 6645

【非特許文献6】Nucleic Acids Res. 1988 August 11; 16(15): 7351-7367

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

そこで、本発明等は、メチオニン生産収率の側面において有利な - アセチルホモセリンを、外来遺伝子を導入することなく生産するエシェリキア (*Escherichia*) 属菌株を作製するために研究した結果、大腸菌 (*E. coli*) 由来のO - スクシニルホモセリントランスフェラーゼの111番目のアミノ酸をグルタミン酸に置換した変異型ポリペプチドの場合、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性が、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性に変換されたことが確認され、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の目的は、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ (Homoserine O-Succinyl transferase) 活性を有するポリペプチドを、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有するように変形させた変異型ポリペプチドを提供することにある。

【0015】

また、本発明の他の目的は、前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

また、本発明のさらに他の目的は、前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターを提供することにある。

【 0 0 1 7 】

また、本発明のさらに他の目的は、前記ポリヌクレオチドを含む微生物を提供することにある。

【 0 0 1 8 】

また、本発明のさらに他の目的は、前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターに形質転換された微生物を提供することにある。

【 0 0 1 9 】

また、本発明のさらに他の目的は、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドを発現する微生物を用いて、 - アセチルホモセリンを生産する方法を提供することにある。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

本発明によると、ホモセリンを - スクシニルホモセリンに転換する酵素を発現する微生物に、外来遺伝子を導入しなくても、ホモセリンから - スクシニルホモセリンを生産することができ、前記 - アセチルホモセリンは、メチオニン生産のための前駆体として用いられる。したがって、食品用として用いられるメチオニン製品を生産するために、本発明を適用すると、外来遺伝子の導入に対する消費者の不安、誤った認識、及び外来遺伝子の導入に対する安定性を証明しなければならないという問題点を解決することができるというメリットがある。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】本発明による変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターを示した図である。

【図 2 a】大腸菌変異体(variants)において現われるホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。

【図 2 b】大腸菌変異体(variants)において現われるホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。

【図 3 a】メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。比較対象は、野生型ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ、特許文献 3 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ m e t 1 0 A、m e t 1 1 A、及び 特許文献 4 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼである。

【図 3 b】メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。比較対象は、野生型ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ、特許文献 3 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ m e t 1 0 A、m e t 1 1 A、及び 特許文献 4 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼである。

【図 4 a】メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。比較対象は、野生型ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ、特許文献 3 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ m e t 1 0 A、m e t 1 1 A、及び 特許文献 4 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼである。

【図 4 b】メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸一次配列の相同性を比較した図である。比較対象は、

10

20

30

40

50

野生型ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ、特許文献3に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼmet10A、met11A、及び特許文献4に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼである。

【図5】染色体内のacsプロモータをproプロモータに交替するために、overlapping PCR法を用いたFRT-one step deletionのカセット作製図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

上述した目的を達成するための一つの態様として、本発明は、配列番号17のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは前記ポリペプチド配列と95%以上の相同性を有するポリペプチドの開始メチオニンから111番目のアミノ酸が、グルタミン酸に置換されたホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドを提供する。本発明において、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、下記の反応式のとおり、メチオニン生合成経路に存在するホモセリンとスクシニル - CoAを用いて、 - スクシニルホモセリンを合成する活性を有するポリペプチドを意味する。

【0023】

$$\text{Homoserine} + \text{Succinyl-CoA} \rightarrow \text{O-Succinyl-Homoserine}$$

前記ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、エンテロバクター属、サルモネラ属、シュドモナス属、バシラス属、エシェリキア属の微生物に由来するポリペプチドであってもよく、好ましくは、エシェリキア属微生物由来のホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドであってもよく、より好ましくは、大腸菌(E. coli)由来のホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドであってもよい。

【0024】

本発明において、前記ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、前記反応式に示した活性を有するポリペプチドであれば、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有する配列番号17のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそれと95%以上の相同性を有するポリペプチドを含んでもよい。

【0025】

本発明の実施例において、数種の大腸菌のホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼアミノ酸配列の相同性を比較した結果、数種の大腸菌に存在するホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼポリペプチドは、5%未満の変異を含む変異体が存在するが(すなわち、相互間に95%以上の相同性を有する)、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性では、大きな差がないことが認められる(図2)。このような結果は、本発明の配列番号17のポリペプチドと95%以上の相同性を有するポリペプチドも、同一のホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有することができることを示唆するものであり、これは、当業者にとって自明なことであり、本出願人は、これを視覚化したものである。

【0026】

本発明における用語の「変異型ポリペプチド」は、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列の一部が置換されることにより、野生型とは異なり、ホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを意味する。すなわち、本発明の変異型ポリペプチドは、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸を置換することにより、基質特異性がスクシニルCoAからアセチルCoAに変換された、すなわち、下記の反応式と同一の活性を示す変異型ポリペプチドを意味する。

【0027】

10

20

30

40

50

H o m o s e r i n e + A c e t y l - C o A O - A c e t y l H o m o s e r i n e

本発明において、前記変異型ポリペプチドは、配列番号１７で表われるポリペプチドまたは前記ポリペプチド配列と９５％以上の相同性を有するポリペプチドの開始メチオニンから１１１番目のアミノ酸がグルタミン酸に置換され（配列番号１８）、さらに１１２番目のアミノ酸がスレオニン（配列番号１９）またはヒスチジン（配列番号２０）に置換された変異型ポリペプチドであってもよい。

【００２８】

上記のように、さらに１１２番目のアミノ酸であるロイシンをスレオニンまたはヒスチジンに変換させた場合、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性が強化されることが確認できる（表２及び表３）。

【００２９】

好適な一具現例によると、前記変異型ポリペプチドは、配列番号１８乃至２０のアミノ酸配列のいずれか一つのアミノ酸配列を有するポリペプチドであってもよい。

【００３０】

本発明の実施例では、配列番号３９で表わされる塩基配列からなる大腸菌由来のmetA遺伝子によりコードされたホモセリンスクシニルトランスフェラーゼの１１１番のグリシンをグルタミン酸に置換したポリペプチドを発現することができるプラスミド、及び前記置換に加えて、１１２番のアミノ酸をスレオニンまたはヒスチジンに置換したポリペプチドを発現することができるプラスミドを作製した（実施例２）。

【００３１】

また、本発明の実験例を通じて、野生型metA遺伝子（配列番号３９）を含むプラスミドにより形質転換された菌株のCJM2 pCL_Pcj1_metA(wt)及びCJM3 pCL_Pcj1_metA(wt)によっては、
- スクシニルホモセリンのみが生成することが確認された。これに対して、本発明の変異型ポリペプチドをコードする遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された菌株によっては、
- アセチルホモセリンのみが蓄積されることが確認された（実験例２、表２及び表３）。

【００３２】

これにより、本発明の変異型ポリペプチドを発現する微生物は、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を示すための外来遺伝子を導入しなくても、メチオニン前駆体として、生産収率の高い
- アセチルホモセリンを生産することができるという利点がある。

【００３３】

本発明において、前記変異型ポリペプチドは、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸が置換され、メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異型ポリペプチドであってもよい。すなわち、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼは、培地に添加される微量のメチオニンによってフィードバック調節され、大部分の活性が抑制される特性を示すので、本発明の変異型ポリペプチドは、
- アセチルホモセリンの過量生産のために、メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異型ポリペプチドであってもよい。

【００３４】

本発明において、前記メチオニンに対するフィードバック調節を解除するためのアミノ酸置換は、特許文献３に開示された方法により行うことができ、具体的に、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドの２９番アミノ酸をプロリンに置換、１１４番アミノ酸をグリシンに置換、１４０番アミノ酸をセリンに置換または前記３種のアミノ酸置換の１種以上が組み合わせられたアミノ酸置換によって、メチオニンに対するフィードバック調節を解除することができる。好ましくは２種以上、最も好ましくは３種の全てのアミノ酸が置換されてもよい。

【００３５】

好適な一具現例によると、前記メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異型ポリペプチドは、配列番号２１乃至２３のアミノ酸配列のいずれか一つのアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有する変異型ポリペプチドであってもよい。

【0036】

本発明の実施例では、大腸菌由来のmetA遺伝子によりコードされたホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドの29、114番、及び140番のアミノ酸を、それぞれプロリン、グリシン、及びセリンに置換し、メチオニンに対するフィードバック調節を解除し、111番アミノ酸がグルタミン酸に置換された[pCL_Pcj1__metA#11(EL)]、111番及び112番アミノ酸が、それぞれグルタミン酸及びスレオニンに置換された[pCL_Pcj1__metA#11(ET)]、111番及び112番アミノ酸が、それぞれグルタミン酸及びヒスチジンに置換された[pCL_Pcj1__metA#11(EH)]のホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを作製した(実施例3)。

10

【0037】

また、本発明の実験例をみると、メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異型ポリペプチドを発現する菌株のうち、111番及び112番のアミノ酸が、それぞれグルタミン酸及びヒスチジンに置換されたCJM2 pCL_Pcj1__metA(#11)EH菌株及びCJM3 pCL_Pcj1__metA(#11)EH菌株の - アセチルホモセリンの生産量が11.1g/L及び24.8g/Lと高い - アセチルホモセリンの生産量を示し、外来のホモセリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を導入した菌株と類似した水準に、 - アセチルホモセリンが蓄積されることが確認された(実験例2、表

20

他の一態様として、本発明は、前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターを提供する。

【0038】

本発明において、前記ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド単量体(monomer)が共有結合により長鎖状に連なったポリヌクレオチドの重合体(polymer)であり、一定の長さ以上のDNAまたはRNA鎖であって、前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0039】

本発明において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号24乃至29の塩基配列のいずれか一つの塩基配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

30

【0040】

本発明において、前記組み換えベクターは、本発明の変異型ポリペプチドを発現させる微生物を作るために、宿主細胞にDNAを導入し、変異型ポリペプチドを発現させるための手段であって、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター等の公知の発現ベクターを用いることができ、ベクターは、DNA組み換え技術を用いた任意の公知の方法により、当業者が容易に製造することができる。

【0041】

本発明において、前記組み換えベクターは、pACYC177、pACYC184、pCL1920、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118ベクターを用いることができ、好ましくはpCL1920ベクターが用いることができる。

40

【0042】

前記「作動可能に連結された」は、発現調節配列が、変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の転写及び翻訳を調節するように連結されたものをいい、発現調節配列(プロモータを含む)の調節下で、ポリヌクレオチド配列が発現され、ポリヌクレオチド配列によりコードされる変異型ポリペプチドが生成するように正確な読み枠を維持させることを含む。

【0043】

また他の一態様として、本発明は、前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む微生物及び前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが作動可能

50

に連結された組み換えベクターに形質転換された微生物を提供する。

【 0 0 4 4 】

本発明における用語の「形質転換」とは、遺伝子を宿主細胞内に導入し、宿主細胞内において発現させるようにすることを意味し、形質転換された遺伝子は、宿主細胞内において発現されるものであれば、宿主細胞の染色体内に挿入されまたは染色体外に位置するもののいずれであってもよく、制限されずに含まれる。

【 0 0 4 5 】

また、前記遺伝子は、ポリペプチドをコード可能なポリヌクレオチドであり、DNA及びRNAを含む。前記遺伝子は、宿主細胞内に導入され、発現され得るものであれば、どんな形態で導入されたものであっても構わない。例えば、前記遺伝子は、それ自体内に発現するのに必要な全ての要素を含むポリヌクレオチド構造体である発現カセットの形態で宿主細胞に導入され得る。前記発現カセットは、通常、前記遺伝子に作動可能に連結されているプロモータ、転写終結シグナル、リボソーム結合部位及び翻訳終結シグナルを含む。前記発現カセットは、自己複製が可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、前記遺伝子は、それ自体またはポリヌクレオチド構造体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞における発現に必要な配列と作動可能に連結されているものであってもよい。

【 0 0 4 6 】

前記微生物は、変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むか、または変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターに形質転換され、変異型ポリペプチドを発現することができる原核微生物または真核微生物として、例えば、エシェリキア (*Escherichia*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、アエロバクター (*Aerobacter*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、エンテロバクター (*enterobacteria*) 属、チゴサッカロミセス (*zygosaccharomyces*) 属、レプトスピラ (*Leptospira*) 属、デイノコッカス (*Deinococcus*) 属、ピチア (*Pichia*) 属、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、トルロプシス (*Torulopsis*) 属、メチロバクター (*Methylobacter*) 属、サルモネラ (*salmonellar*) 属、ストレプトマイセス (*streptomyces*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ブレヴィバクテリウム (*brevibacterium*) 属、またはコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属の微生物であってもよい。

【 0 0 4 7 】

本発明において、前記微生物は、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを発現する微生物として、例えば、バシラス属、エシェリキア属、エンテロバクター属、サルモネラ属の微生物であってもよく、好ましくはエシェリキア属微生物であってもよく、より好ましくは大腸菌であってもよい。

【 0 0 4 8 】

本発明の実施例では、本発明の変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組み換えベクターに形質転換された大腸菌の C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A E L、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A E T、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A E H 菌株 (実施例 2 及び実験例 2)、及びメチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組み換えベクターに形質転換された大腸菌の C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E L、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E T、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E H 菌株を作製した (実施例 3 及び実験例 2)。前記菌株のうち、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E L、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E T、C J M 2 p C L _ P c j 1 _ m e t A (# 1 1) E H 菌株を、それぞれ C A 0 5 - 0 5 4 6、C A 0 5 - 0 5 4 7 及び C A 0 5 - 0 5 4 8 と命名し、2010 年 12 月 14 日に韓国微生物保存センターに寄託し、それぞれ寄託番号 K C C M 1 1 1 4 5 P、K C C M 1 1 1 4 6 P 及び K C C M 1 1 1 4 7 P を付与された。

【0049】

本発明は、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸が置換されたホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドを提供するので、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのみを発現する微生物に、本発明の変異型ポリペプチドを発現させると、ホモセリン - アセチルトランスフェラーゼをコードする *metX* 等の外来遺伝子の導入無しに、ホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを発現させることができるという利点を有する。

【0050】

本発明において、前記微生物は、 - アセチルホモセリンを過量生産するために、さらに、アセチル - C o A シンターゼ (acetyl-CoA synthetase) の活性が強化されたり、またはパントテン酸キナーゼ (pantothenate kinase) の活性が C o A の蓄積によるフィードバック阻害が解除されるように変形された微生物であってもよい。

10

【0051】

本発明において、アセチル - C o A シンターゼ、パントテン酸キナーゼは、多様な微生物から由来し、この活性を有したタンパク質をコードする遺伝子は、それぞれ *acs*、*coaA* と称する。

【0052】

本発明において、アセチル - C o A シンターゼの活性強化は、前記アセチル - C o A シンターゼをコードする *acs* 遺伝子のプロモーター領域及び 5' - UTR 部位の塩基配列を変形させることにより、遺伝子発現を増化させ、当該遺伝子の ORF 部位に変異を導入することにより、タンパク質の活性を増化させ、当該遺伝子を染色体上にさらに導入することにより、タンパク質の発現量を強化させ、当該遺伝子を自家プロモーターまたは活性が増進された別個のプロモーターと一緒に導入し、菌株に形質転換させることにより、タンパク質の発現量を増化させることができる。

20

【0053】

より具体的に、本発明は、活性が増進されたプロモーターへの置換、活性が増進されるようにプロモーターの変異誘発、または遺伝子コピー数の増加により、アセチル - C o A シンターゼ活性を強化させることができ、これにより、 - アセチルホモセリンの生産能を向上させる方法、及びこのような方法を用いて作製された大腸菌を提供することができる。前記活性が増進されたプロモーターに置換するために、活性が増進されたプロモーターと知られた *pTac*、*pTrc*、*pPro*、*pR*、*pL* 等のプロモーターが用いられる。

30

【0054】

好適な一具現例によると、本発明は、アセチル - C o A 生合成に関与する *acs* 遺伝子のプロモーターが、構成的発現プロモーターである *pro* プロモーターに置換され、前記 *acs* 遺伝子が過発現された、 - アセチルホモセリン生産菌株を提供することができる。前記 *pro* プロモーターは、配列番号 30 の全体または一部が用いられる。

【0055】

本発明は、さらに、C o A 生合成経路上において、C o A 蓄積によるフィードバック阻害が解除されたパントテン酸キナーゼ変異体が導入された微生物を提供することができる。より具体的に、前記パントテン酸キナーゼのアミノ酸配列において 106 番目の位置のアルギニンがアラニンに置換され (配列番号 40)、C o A 蓄積によるフィードバック阻害が解除されることにより、 - アセチルホモセリン生産能を向上させることができる。

40

【0056】

本発明において、前記微生物は、さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ暗号化遺伝子 (*ppc*)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ暗号化遺伝子 (*aspC*)、及びアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ暗号化遺伝子 (*asd*) からなる群から選ばれる一つ以上の遺伝子のコピー数が増加され、または前記遺伝子のプロモーターが活性が増進されたプロモーターに置換され、または活性が増進されるように変

50

異された微生物であってもよい。

【0057】

本発明において、前記一連の酵素は、下記の反応式に示すように、ホスホエノールピルビン酸塩から - アセチルホモセリンを合成する活性を有している。したがって、このような一連の活性を有する遺伝子の発現を強化する場合、細胞内に - アセチルホモセリンの蓄積を誘導することができる。

【0058】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (p p c)

$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{Phosphate}$

10

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (a s p c)

$\text{Oxaloacetate} + \text{Glutamate} \rightarrow \text{Aspartate} + \alpha\text{-ketoglutarate}$

アスパラギン酸キナーゼ (t h r A)

$\text{Aspartate} + \text{ATP} \rightarrow \text{Aspartyl-4-phosphate} + \text{ADP}$

アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (a s d)

$\text{Aspartyl-4-phosphate} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Aspartate-semialdehyde} + \text{Phosphate} + \text{NADP}^+$

ホモセリンデヒドロゲナーゼ (t h r A)

$\text{Aspartate-semialdehyde} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Homoserine}$

20

前記反応式において、アスパラギン酸キナーゼとホモセリンデヒドロゲナーゼの二つの役割をする酵素をコードする t h r A 遺伝子は、実験例 2 に示す C J M 2 菌株にフィードバック解除を通じた強化が既に行われた状態であり、残りの三つの酵素は、遺伝子のコピー数が増加されたり、または前記遺伝子のプロモーターを活性が増進されたプロモーターに置換したり、または活性が増進されるように変異させる方法で活性を強化させることができる。

【0059】

本発明における用語の「コピー数増加」は、目的遺伝子を染色体上にさらに導入し、または当該酵素の遺伝子を有するプラスミド導入する方法で行うことができる。

【0060】

30

本発明の実施例では、m e t A 及び m e t B の遺伝子が欠損した菌株である C J M 2 菌株の a c s プロモーターを欠損させ、p r o プロモーターに交替した C J M 2 - A P 菌株を作製し、C J M 2 - A P 菌株において f e e d b a c k r e s i s t a n t c o a A 形質を有するように形質を転換し、アセチル - c o A p o o l が過量増加されている C J M 2 - A P / C O 菌株を作製した後、p p c、a s p c、a s d の三つの遺伝子のコピー数が 2 コピー増幅した C J M 3 菌株を作製した。以降、本発明では、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E L)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E H)、及び p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E T) が導入された C J M 3 菌株を、それぞれ C A 0 5 - 0 5 7 8、C A 0 5 - 0 5 7 9、及び C A 0 5 - 0 5 8 0 と命名し、2011 年 12 月 12 日に韓国微生物保存センターに寄託し、それぞれ寄託番号 K C C M 1 1 2 2 8 P、K C C M 1 1 2 2 9 P、及び K C C M 1 1 2 3 0 P を付与された (実験例 2)

40

また他の一態様として、本発明は、前記変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む微生物、または変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された組み換えベクターに形質転換された微生物を培養する段階、及び前記微生物培養過程において生成された - アセチルホモセリンを得る段階を含む - アセチルホモセリンの生産方法を提供する。

【0061】

本発明において、変異型ポリペプチドを発現する前記微生物を用いて - アセチルホモセリンを生産することは、当業界において公知の適当な培地と培養条件によって行われる。このような培養過程は、当業者であれば、選択される菌株に応じて容易に調整して用い

50

ることができる。

【 0 0 6 2 】

培養方法の例として、バッチ式、連続式、及び流加培養が挙げられるが、これに限定されるものではなく、培養に用いられる培地は、特定の菌株の要求条件を適宜満足させることができる。

【 0 0 6 3 】

本発明において用いられる培地は、スクロース、ブドウ糖、グリセロール、酢酸のいずれか一つの炭素源、またはこれらの炭素源を複合的に用いることができ、用いられる窒素源は、ペプトン、酵母抽出物、肉汁、麦芽抽出物、とうもろこし浸漬液、及び大豆のような有機窒素源、及び要素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、及び硝酸アンモニウムのような無機窒素源が含まれる。これらの窒素源は、単独または組み合わせられて用いられる。

10

【 0 0 6 4 】

前記培地には、リン (P) 源として、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、及び対応するソジウム含有塩が含まれてもよい。また、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄のような金属塩を含んでもよい。これ以外に、アミノ酸、ビタミン、及び適切な前駆体等が含まれてもよく、これらの培地または前駆体は、培養物にバッチ式または連続式で加えられてもよい。また、培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸、及び硫酸のような化合物を培養物に適切な方式で添加し、培養物の pH を調整することができ、脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を用いて気泡生成を抑制することができる。

20

【 0 0 6 5 】

また、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素または酸素含有気体を注入したり、または嫌気及び未好気状態を維持するために、気体の注入無しに、または窒素、水素、または二酸化炭素ガスを注入することができる。培養物の温度は、27 乃至 37、好ましくは 30 乃至 35 であってもよい。培養期間は、所望の有用物質が生成される間は、続けて培養することができ、好ましくは 10 乃至 100 時間培養してもよい。

【 0 0 6 6 】

以下、本発明を実施例及び実験例によりさらに詳述する。但し、下記の実施例は、本発明の例示に過ぎず、本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

30

【実施例】

【 0 0 6 7 】

〔実施例 1〕

ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ及びホモセリン - アセチルトランスフェラーゼを含むプラスミドの作製

米国生物資源センター (American Type Culture Collection) から購買した大腸菌 W 3 1 1 0 菌株 (寄託番号 A T C C 9 6 3 7) の染色体を鋳型とし、配列番号 1 及び配列番号 2 のプライマーを用いて P C R を行うことにより、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼをコードする m e t A 遺伝子を増幅した。

【 0 0 6 8 】

40

P C R に用いたプライマーは、米国立衛生研究所ジーンバンク (NIH Gene Bank) に登録されている N C _ 0 0 0 9 1 3 の大腸菌の染色体の塩基番号に基づいて作製したので、配列番号 1 及び配列番号 2 のプライマーは、それぞれ制限酵素 E c o R V 部位及び H i n d I I I 部位を有している。

【 0 0 6 9 】

< 配列番号 1 >

5 ' A A T T G A T A T C A T G C C G A T T C G T G T G C C G G 3 '

< 配列番号 2 >

5 ' A A T T A A G C T T T T A A T C C A G C G T T G G A T T C A T G T G 3 '

デイノコッカスラジオデュランス (Deinococcus radiodurans) の染色体を鋳型とし、

50

配列番号 3 及び配列番号 4 のプライマーを用いて P C R を行うことにより、ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼをコードする *met A* 遺伝子 (配列番号 4 4) を増幅した。配列番号 3 及び配列番号 4 のプライマーは、それぞれ制限酵素 *E c o R V* 部位及び *H i n d I I I* 部位を有している。

【 0 0 7 0 】

< 配列番号 3 >

5 ' A A T T G A T A T C A T G A C C G C C G T G C T C G C 3 '

< 配列番号 4 >

5 ' A A T T A A G C T T T C A A C T C C T G A G A A A C G C C C C 3 '

P C R 条件は、9 4 で 3 分間変性後、9 4 で 3 0 秒間変性、5 6 で 3 0 秒間アニーリング、7 2 で 5 分間重合を 2 5 回繰り返した後、7 2 で 7 分間重合反応を行った。このように得られた P C R 産物及び *c j 1* プロモーター (特許文献 5) が入っている p C L 1 9 2 0 プラスミドに、それぞれ *E c o R V* 及び *H i n d I I I* の制限酵素を処理してクローニングした。クローニングされたプラスミドを用いて大腸菌の D H 5 を形質転換した後、スペクチノマイシン 5 0 μ g / m l を含む L B プレートにおいて形質転換された大腸菌の D H 5 を選別してプラスミドを得た。得られたプラスミドをそれぞれ p C L _ P *c j 1* _ *met A* 及び p C L _ P *c j 1* _ *met X d r* と命名した。

【 0 0 7 1 】

〔実施例 2〕

ホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドの作製 *site directed mutagenesis kit* (Stratagene、米国) を用いて、前記実施例 1 において作製した p C L _ P *c j 1* _ *met A* のプラスミドを鋳型とし、 - スクシニルトランスフェラーゼの 1 1 1 番のアミノ酸であるグリシン (G l y) をグルタミン酸 (G l u) に置換した。使用したプライマー配列は、以下のとおりである。

【 0 0 7 2 】

< 配列番号 5 >

5 ' t t g t a a c t g g t g c g c c g c t g g a a c t g g t g g g g t t t a a t g a t g t c 3 '

< 配列番号 6 >

5 ' g a c a t c a t t a a a c c c c a c c a g t t c c a g c g g c g c a c c a g t t a c a a 3 '

作製された変異の G 1 1 1 E *met A* の遺伝子を含むプラスミドを p C L _ P *c j 1* _ *met A* (E L) と命名した。

【 0 0 7 3 】

また、前記 - スクシニルトランスフェラーゼの 1 1 1 番のアミノ酸をグリシンからグルタミン酸に置換し、さらに 1 1 2 番のアミノ酸をロイシンからスレオニン (L 1 1 2 T) またはヒスチジン (L 1 1 2 H) に置換した。このとき、使用したプライマー配列は、以下のとおりである。

【 0 0 7 4 】

ロイシンをスレオニンに置換

< 配列番号 7 >

5 ' t g t a a c t g g t g c g c c g c t g g a a a c c g t g g g g t t t a a t g a t g t c g 3 '

< 配列番号 8 >

5 ' c g a c a t c a t t a a a c c c c a c g g t t t c c a g c g g c g c a c c a g t t a c a 3 '

ロイシンをヒスチジンに置換

< 配列番号 9 >

5 ' t g t a a c t g g t g c g c c g c t g g a a c a t g t g g g g t t t a a

t g a t g t c g 3'

< 配列番号 10 >

5' c g a c a t c a t t a a a c c c c a c a t g t t c c a g c g g c g c a c
c a g t t a c a 3'

作製されたプラスミドのうち、111番のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸に、112番のアミノ酸がロイシンからスレオニンに置換されたmet A遺伝子を含むプラスミドをpCL__Pcj1__met A (ET)と命名した。同様に、111番のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸に、112番のアミノ酸がロイシンからヒスチジンに置換されたmet A遺伝子を含むプラスミドをpCL__Pcj1__met A (EH)と命名した。

【0075】

10

〔実施例3〕

フィードバック調節解除 (feedback-resistance) されたホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドの作製

前記実施例1において作製されたpCL__Pcj1__met Aのプラスミドを鋳型とし、前記実施例2と同様の方法を用いてメチオニンに対するフィードバック調節が解除された特性を有するmet A遺伝子 (met A 11) を作製した。具体的に、特許文献3に開示された内容によって、-スクシニルトランスフェラーゼの29番のアミノ酸をセリンからフロリンに (S29P)、114番のアミノ酸をグルタミン酸からグリシンに (E114G)、140番のアミノ酸をフェニルアラニンからセリンに置換 (F140S) した。このとき、使用したプライマー配列は、以下のとおりである。

20

【0076】

セリンをフロリンに置換

< 配列番号 11 >

5' A T G A C A A C T T C T C G T G C G C C T G G T C A G G A A A T T C G 3'

< 配列番号 12 >

5' C G A A T T T C C T G A C C A G G C G C A C G A G A A G T T G T C A T 3'

グルタミン酸をグリシンに置換

< 配列番号 75 >

5' C G C C G C T G G G C C T G G T G G G G T T T A A T G A T G T C G C T 3'

< 配列番号 14 >

5' A G C G A C A T C A T T A A A C C C C A C C A G G C C C A G C G G C G 3'

フェニルアラニンをセリンに置換

< 配列番号 15 >

5' C A C G T C A C C T C G A C G C T G A G T G T C T G C T G G G C G G T 3'

< 配列番号 16 >

5' A C C G C C C A G C A G A C A C T C A G C G T C G A G G T G A C G T G 3'

30

40

それぞれの前記変異を順次導入し、3種の変異を全て導入したmet A (#11) 遺伝子を含むプラスミドを製造した後、pCL__Pcj1__met A #11と命名した。以降、前記作製されたpCL__Pcj1__met A #11のプラスミドを鋳型とし、前記実施例2のホモセリン - アセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドの変異を同様に有するポリペプチドを発現させるためのプラスミドを作製した。

作製されたプラスミドのうち、111番のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸に置換されたmet A #11遺伝子を含んだプラスミドをpCL__Pcj1__met A #11 (EL) に、111番のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸に、112番のアミノ酸がロイシンからスレオニンに置換されたmet A #11遺伝子を含んだプラスミドをpCL

50

— P c j 1 — m e t A # 1 1 (E T) に、 1 1 1 番のアミノ酸がグリシンからグルタミン酸に、 1 1 2 番のアミノ酸がロイシンからヒスチジンに置換された m e t A # 1 1 遺伝子を含むプラスミドを p C L — P c j 1 — m e t A # 1 1 (E H) と命名した。

【 0 0 7 7 】

実験例 1：大腸菌のホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ及びフィードバック調節解除された大腸菌のホモセリンスクシニルトランスフェラーゼの相同性の比較

大腸菌の変異体 (variants) E. coli O9:H4 (strain HS)、E. coli O139:H28 (strain E24377A)、及び E. coli O157:H7、E. coli (strain ATCC8739) において示されるホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼのアミノ酸の一次配列 [順に、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3] を C L C M a i n W o r k b e n c h (C L C b i o、デンマーク) プログラムを用いて比較してみた。

【 0 0 7 8 】

比較の結果、図 2 に示すように、大腸菌の変異体において示されるホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼのアミノ酸の一次配列は 5 % 未満の変異が現れることが分かった (図 2)。

【 0 0 7 9 】

また、メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼのアミノ酸の一次配列も、前記プログラムを用いて比較してみた。比較した一次配列は、野生型ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ、特許文献 3 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼ m e t 1 0 A、m e t 1 1 A、及び特許文献 4 に開示されたフィードバック調節解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼである。

比較の結果、図 3 及び図 4 に示すように、メチオニンに対するフィードバック調節が解除された変異ホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼのアミノ酸の一次配列は 5 % 未満の変異が存在することが分かった (図 3 及び図 4)。

このような結果は、大腸菌に存在するホモセリン - スクシニルトランスフェラーゼのポリペプチドは、相互間に 9 5 % 以上の相同性を有しており、5 % 未満の配列差にもかかわらず、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼの活性には、大きな差がないことが示される。

【 0 0 8 0 】

実験例 2：ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドの基質特異性及び活性比較試験

2 - 1：実験菌株の作製

2 - 1 - 1) m e t A 及び m e t A 遺伝子の欠損

- アセチルホモセリンを過量生産する変異型ポリペプチドの活性を比較するために、ホモセリンを蓄積し、生産された - アセチルホモセリンの利用性が欠損した菌株を作製した。前記菌株の作製は、特許文献 7 に明記されたスレオニン生産菌株である F T R 2 5 3 3 (K C C M 1 0 5 4 1) 菌株に基づいて、特許文献 8 に開示された実施例 1 - 1 乃至 1 - 4 の方法で、m e t A 及び m e t A 遺伝子が欠損した菌株を作製し、C J M 2 と命名した。C J M 2 は、菌株内にホモセリンが過量蓄積され、導入される遺伝子により、- アセチルホモセリンまたは - スクシニルホモセリンを生産可能な菌株である。

【 0 0 8 1 】

2 - 1 - 2) a c s p r o m o t e r の交替

- アセチルホモセリンを過量生産するために、大腸菌内にホモセリンとアセチル C o A の生成が円滑でなければならない。第一に、アセチル C o A の供給を円滑にするために、a c s (a c e t y l - c o A s y n t h e t a s e) 遺伝子のプロモータを配列番号 3 0 の構成的発現プロモータ (constitutive promoter) である p r o に置換し、目的遺伝子の常時過剰発現を誘導した。前記プロモータの交替のために、F R T - o n e - s t e p P C R の変形された方法を用いた (非特許文献 5)。図 5 に示すようなカセットを作

10

20

30

40

50

製するために、配列番号 31 と配列番号 33 を用いて、pKD3 (PNAS (2000) vol.97: 6640-6645) 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子 FRT カセットを PCR し、配列番号 32 と配列番号 34 を用いた pro プロモーター領域を PCR し、両 PCR の結果物を Overlapping PCR 法を用いて、一つのカセット (acs プロモータ欠損 - pro プロモータ交替カセット) として作製した (非特許文献6)。変性段階は 94 で 30 秒、アニーリング段階は 55 で 30 秒、延長段階は 72 で 1 分間実施し、これを 30 回行った。

【0082】

< 配列番号 31 >

5' AGGGGCTTCATCCGAATTGCGCCATTGTTGCAATGG
CGGTGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTTC 3' 10

< 配列番号 32 >

5' GATATTTCATATGGACCATGGCTCGAGCATAGCATTT
TTATCC 3'

< 配列番号 33 >

5' GGATAAAAATGCTATGCTCGAGCCATGGTCCATATG
AATATC 3'

< 配列番号 34 >

5' CGATGTTGGCAGGAATGGTGTGTTTGTGAATTTGGC
TCATATGTACCTTTCTCCTCTTTA 3' 20

その結果、得られた PCR 産物を 1.0% アガロースゲルにおいて電気泳動した後、約 1.2 kb サイズのバンドから DNA を精製した。回収された DNA 切片は、pKD46 ベクター (非特許文献5) に予め形質転換させた CJM2 菌株にエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションのために、pKD46 に形質転換された CJM2 菌株は、100 µg/L のアンピシリンと 5 mM のアラビノース (l-arabinose) が含まれた LB 培地を用いて、30 で D600 = 0.6 まで培養させた後、滅菌蒸留水で 1 回、10% グリセロールで 2 回洗浄して使用した。エレクトロポレーションは、2500 V で加えた。回収された菌株を 25 µg/L のクロラムフェニコールを含んだ LB 平板培地に塗抹し、37 で一晩培養した後、耐性を示す菌株を選別した。

【0083】

選別された菌株を鋳型とし、同一のプライマーを用いて同じ条件で PCR した後、1.0% アガロースゲル上において、遺伝子のサイズが 1.2 Kbであることを確認し、これにより、acs プロモーターの欠損及び pro プロモーターへの交替を確認した。確認された菌株は、さらに pCP20 ベクター (非特許文献5) に形質転換させ、LB 培地で培養し、さらに同様の条件の PCR によって、1.0% アガロースゲル上において、遺伝子のサイズが 150 bp と小さくなった最終の acs プロモーターの欠損及び pro プロモーターへの交替菌株を作製し、クロラムフェニコールマーカーが除去されたことが確認された。作製された菌株を CJM2 - AP と命名した。

【0084】

2-1-3) フィードバック抵抗性 coaA 代替 40

前記 CJM2 - AP 菌株において、feedback resistant coaA 形質を有するようにするために、w3110 gDNA を鋳型とし、制限酵素 EcoRI が含まれた配列番号 35 及び配列番号 36 のプライマーを用いた PCR を行い、パントテン酸キナーゼをコードする coaA 遺伝子を確保した。重合酵素は、PfuUltraTM の信頼性の高い DNA ポリマラーゼ (Stratagene) を使用し、PCR 条件は、変性 96、30 秒; アニーリング 50、30 秒; 及び重合反応 72、2 分を 30 回繰り返した。

【0085】

前記の方法で得られた coaA 遺伝子及び pSG76C プラスミド (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 1997, 4426-4428) にそれぞれ EcoRI 制限酵素を処理した後、連結し 50

た。前記方法で作製されたプラスミドを用いて、大腸菌のDH5 に形質転換した後、クロラムフェニコール 25 µg/ml を含むLBプレートにおいて、形質転換された大腸菌のDH5 を選別し、pSG-76C-coaAを得た。

【0086】

<配列番号35>

5' ATGAGTATAAAGAGCAAAAC 3'

<配列番号36>

5' TTATTTGCGTAGTCTGACC 3'

前記で得られたpSG-76C-coaAを用いてsite directed mutagenesis (Stratagene、米国)法で、配列番号37及び配列番号38のプライマーを用いてpSG-76C-coaA(R106A)を作製した。

【0087】

<配列番号37>

5' GGAAAAGTACAACCGCCgcccGTATTGCAGGCGCTATTT 3'

<配列番号38>

5' AATAGCGCCTGCAATACggcGGCGGTTGTACTTTTCC 3'

CJM2-AP菌株に前記pSG76C-coaA(R106A)プラスミドを形質転換し、LB-Cm(Yeast extract 10g/L、NaCl 5g/L、Tryptone 10g/L、クロラムフェニコール 25 µg/L)培地において培養した後、クロラムフェニコール耐性を有するコロニーを選抜した。選抜された形質転換体は、pSG76c-coaA(R106A)が遺伝体内のcoaA部分に1次で挿入された菌株である。

【0088】

確保されたcoaA(R106A)遺伝子が挿入された菌株をpSG76c内に存在するI-SceI部分を切断する制限酵素I-SceIを発現するベクターであるpASceP(非特許文献3)に形質転換し、LB-AP(Yeast extract 10g/L、NaCl 5g/L、Tryptone 10g/L、Ampicilline 100 µg/L)において生長する菌株を選別した。選別された菌株において配列番号35及び配列番号36のプライマーを用いてcoaA遺伝子を増幅し、増幅された遺伝子は、マクロジェン(韓国)シークエンスサービスを通じて、coaA(R106)に交替されたことが確認された(非特許文献4)。このように作製された菌株は、CJM2-AP/COと命名した。CJM2-AP/CO菌株は、ホモセリンだけでなく、Acetyl-coA poolが過量増加されている特性を示す菌株である。

【0089】

2-1-4)ホモセリン生合成経路のkey遺伝子コピー数

CJM2またはCJM2-AP/CO菌株は、ホモセリンが過量生産される菌株であるが、ホモセリンの生産性をより向上させるために、ppc、aspC、asdの三つの遺伝子のコピー数の増幅を試みた。特許文献6の実施例<1-1>乃至<1-3>に開示された方法であり、pSG76c-2ppc、pSG76c-2aspC、pSG76c-2asdのプラスミドを作製し、CJM2-AP/CO菌株に前記プラスミドを作製し、実施例<1-5>の方法で、前記三つの遺伝子を順次に2コピー増幅された菌株を作製した。このように作製された菌株は、CJM3と命名した。CJM3は、菌株内にホモセリンがCJM2菌株に比べてさらに過量蓄積され、導入されるプラスミドにより、-アセチルホモセリンまたは-スクシニルホモセリンを生産することができる菌株である。

【0090】

2-2:実験方法及び実験結果

CJM2とCJM3の2種の菌株をコンピテント細胞で作製し、コンピテント細胞に電気穿孔法(electroporation)で、pCL_Pcj1_mettX、pCL_Pcj1_me

10

20

30

40

50

t A、p C L _ P c j 1 _ m e t A (E L)、p C L _ P c j 1 _ m e t A (E H)、p C L _ P c j 1 _ m e t A (E T)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E L)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E H)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E T) の 9 種 の プラスミド をそれぞれ導入した。

【 0 0 9 1 】

このうち、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E L)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E H)、及び p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E T) が導入された C J M 2 菌株を、それぞれ C A 0 5 - 0 5 4 6、C A 0 5 - 0 5 4 7 及び C A 0 5 - 0 5 4 8 と命名し、2010年12月14日に韓国微生物保存センターに寄託し、それぞれ寄託番号 K C C M 1 1 1 4 5 P、K C C M 1 1 1 4 6 P、及び K C C M 1 1 1 4 7 P を付与された。

10

【 0 0 9 2 】

また、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E L)、p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E H)、及び p C L _ P c j 1 _ m e t A # 1 1 (E T) が導入された C J M 3 菌株を、それぞれ C A 0 5 - 0 5 7 8、C A 0 5 - 0 5 7 9 及び C A 0 5 - 0 5 8 0 と命名し、2011年12月12日に韓国微生物保存センターに寄託し、それぞれ寄託番号 K C C M 1 1 2 2 8 P、K C C M 1 1 2 2 9 P、及び K C C M 1 1 2 3 0 P を付与された。

【 0 0 9 3 】

以降、9種のプラスミドが導入されたそれぞれの菌株が生産するメチオニン前駆体の種類と生産量を比較するために、フラスコテストを行った。フラスコテストは、それぞれの菌株を L B プレートにおいて線条接種 (streaking) し、31 の培養器に16時間の間培養してから、単一コロニーを L B 培地の 3 m l に接種した後、200 r p m / 31 ま培養器において16時間の間培養することにより行った。

20

【 0 0 9 4 】

250 m l フラスコに、表1のメチオニン前駆体の生産培地 25 m l を入れ、予め培養した培養液を 500 μ l ずつ投入した。以降、フラスコを 200 r p m / 31 の培養器において40時間の間培養した後、H P L C を用いて、それぞれのプラスミドが導入された菌株から得られるメチオニン前駆体の種類及び量を比較し、その結果を表2 (C J M 2 系菌株についての結果) 及び表3 (C J M 3 系菌株についての結果) に示した。

【 0 0 9 5 】

【表1】

30

組成物	濃度 (リットル当り)
ブドウ糖	70 g
硫酸アンモニウム	25 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 m g
$\text{MnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	5 m g
ZnSO_4	5 m g
炭酸カルシウム	30 g
酵母エキス	2 g
メチオニン	0.3 g
スレオニン	1.5 g

40

【 0 0 9 6 】

【表 2】

変異体	OD	消耗量(g/L)	生産物(g/L)	生産量(g/L)
CJM2 pCL_Pcjl_metX	35.6	63.8	Oーアセチル ホモセリン	12.3
CJM2 pCL_Pcjl_metA(wt)	31.3	49.1	Oースクシニ ルホモセリン	2.7
CJM2 pCL_Pcjl_metA EL	32.6	48.3	Oーアセチル ホモセリン	2.5
CJM2 pCL_Pcjl_metA ET	33.6	50.2	Oーアセチル ホモセリン	2.0
CJM2 pCL_Pcjl_metA EH	31.9	47.5	Oーアセチル ホモセリン	3.1
CJM2 pCL_Pcjl_metA(#11)	29.5	56.2	Oースクシニ ルホモセリン	11.3
CJM2 pCL_Pcjl_metA(#11)EL	32.7	49.0	Oーアセチル ホモセリン	7.8
CJM2 pCL_Pcjl_metA(#11)ET	38	53.7	Oーアセチル ホモセリン	6
CJM2 pCL_Pcjl_metA(#11)EH	34.5	59.1	Oーアセチル ホモセリン	11.1

10

20

【 0 0 9 7 】

【表 3】

変異体	OD	消耗量(g/L)	生産物(g/L)	生産量(g/L)
CJM3 pCL_Pcjl_metX	17.2	67.0	Oーアセチル ホモセリン	23.7
CJM3 pCL_Pcjl_metA(wt)	18.8	60.5	Oースクシニ ルホモセリン	1.2
CJM3 pCL_Pcjl_metA EL	18.5	60.5	Oーアセチル ホモセリン	2.1
CJM3 pCL_Pcjl_metA ET	18.0	61.0	Oーアセチル ホモセリン	2.2
CJM3 pCL_Pcjl_metA EH	17.8	62.2	Oーアセチル ホモセリン	3.2
CJM3 pCL_Pcjl_metA(#11)	14.6	67.0	Oースクシニ ルホモセリン	16.1
CJM3 pCL_Pcjl_metA(#11)EL	17.1	63.2	Oーアセチル ホモセリン	12.5
CJM3 pCL_Pcjl_metA(#11)ET	18.2	65.1	Oーアセチル ホモセリン	16.7
CJM3 pCL_Pcjl_metA(#11)EH	19.0	67.8	Oーアセチル ホモセリン	24.8

30

40

【 0 0 9 8 】

50

その結果、表 2 及び表 3 に示すように、野生型 *metA* 遺伝子を含む *pCL_Pcj1__metA (wt)* によっては、 γ -スクシニルホモセリンのみが生産されたが、本発明による 3 種の変異 *metA* 遺伝子を含む菌株によっては、 γ -アセチルホモセリンのみが蓄積されることが確認された。すなわち、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸を置換することにより、ポリペプチドの活性がホモセリンアセチルトランスフェラーゼに変更されたことが確認された。

【0099】

また、CJM3 系菌株において、前記 3 種の変異のうち、アミノ酸配列 111 番がグルタミン酸に置換された場合 (EL) は、 γ -アセチルホモセリンの生産量が 2.1 g/L であったが、さらに、112 番のアミノ酸がヒスチジンに置換された場合 (EH) は、 3.2 g/L の γ -アセチルホモセリンが生産され、最も多量の γ -アセチルホモセリンが生産されたことが確認された。

10

【0100】

メチオニンに対するフィードバック調節が解除されたホモセリンアセチルトランスフェラーゼ活性を有する変異型ポリペプチドを発現する菌株でも、同一の傾向性を示した。具体的に、メチオニンに対するフィードバック調節が解除され、111 番及び 112 番のアミノ酸がそれぞれグルタミン酸及びヒスチジンに置換された *metA* 11 (EH) 遺伝子を導入した菌株において、 24.8 g/L の最も多量の γ -アセチルホモセリンが生産されており、これにより、外来遺伝子としてホモセリンアセチルトランスフェラーゼを導入した場合 (CJM3 *pCL_Pcj1__metX*、 23.7 g/L) に類似した水準に γ -アセチルホモセリンが蓄積されることを確認することができた。

20

【0101】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C.J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区南大門路 5 街 500

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0546	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11145P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		20
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		
III. 寄託及び受託		30
本国際寄託機関は、2010年12月14日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2010年12月14日	

上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2010年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

【0102】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区南大門路 5 街 500

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0547	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11146P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		20
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		
III. 寄託及び受託		30
本国際寄託機関は、2010年12月14日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2010年12月14日	

上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2010年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

【0103】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区南大門路 5 街 500

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0548	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11147P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		20
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		
III. 寄託及び受託		30
本国際寄託機関は、2010年12月14日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2010年12月14日	

上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2010年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

【0104】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則7. 1に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区双林洞 292

C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0578	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11228P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		20
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は、2011年12月12日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2011年12月12日	30

上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2011年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

【0105】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区双林洞 292

C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0579	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11229P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		20
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は、2011年12月12日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2011年12月12日	30

上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2011年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

【0106】

国 際 様 式

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に基づいて発行された原寄託に対する受託証

受信：C J 第一製糖株式会社

韓国ソウル市中区双林洞 292

C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者により添付された微生物識別についての表示： <i>Escherichia coli</i> CA05-0580	国際寄託機関によって与えられた受託番号： KCCM11230P	
II. 科学的性質の説明及び／または分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物について、下記の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用時、■表示)		20
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は、2011年12月12日付で寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国（郵便番号120-091） ソウル市西大門区弘済1洞 361-221 ユリムビル	国際寄託機関を代表すべき権限を有した者または権限を付与された公務員の署名 日付：2011年12月12日	30

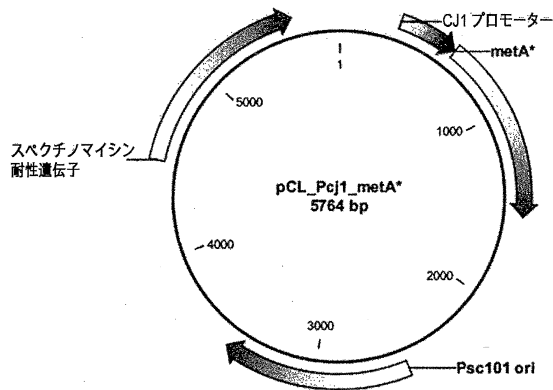
上記した翻訳は、原文の内容と相違ないことを証明する。

2011年12月21日

弁理士 孫ミン (印)

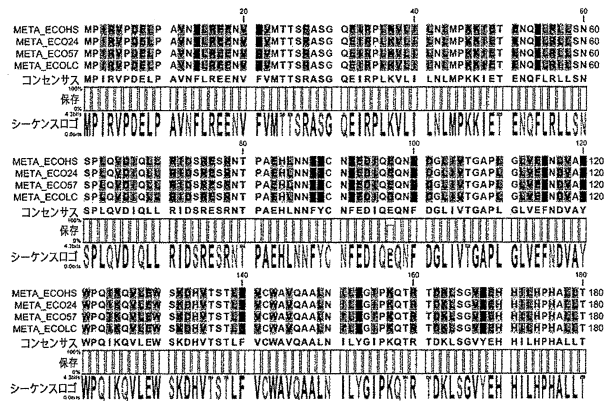
【図 1】

【図 1】



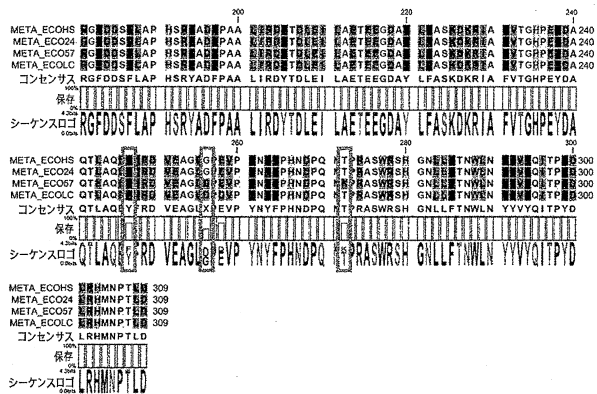
【図 2 a】

【図 2 a】



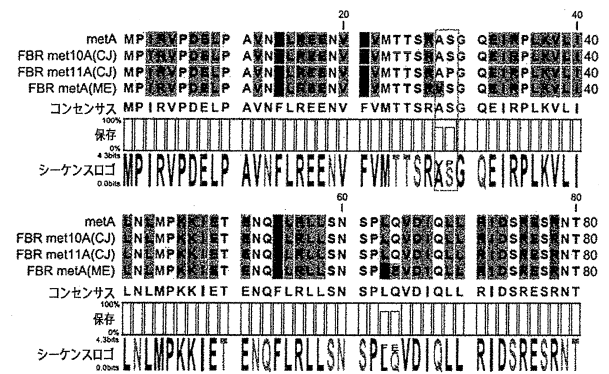
【図 2 b】

【図 2 b】



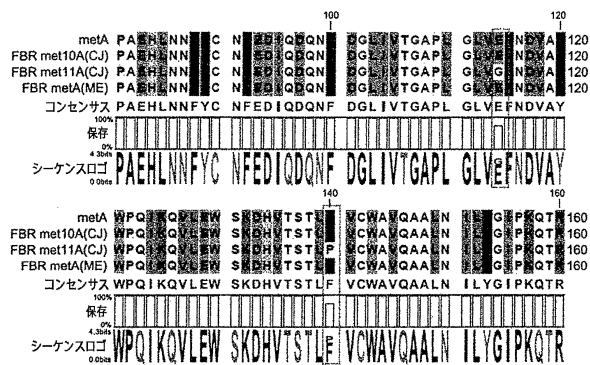
【図 3 a】

【図 3 a】



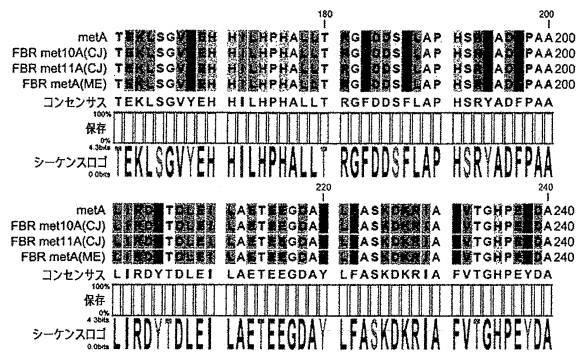
【図 3 b】

【図 3 b】



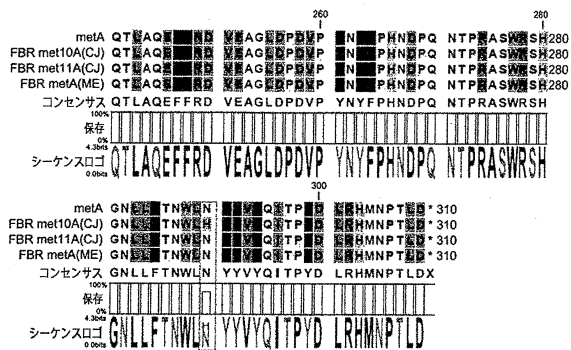
【図 4 a】

【図 4 a】



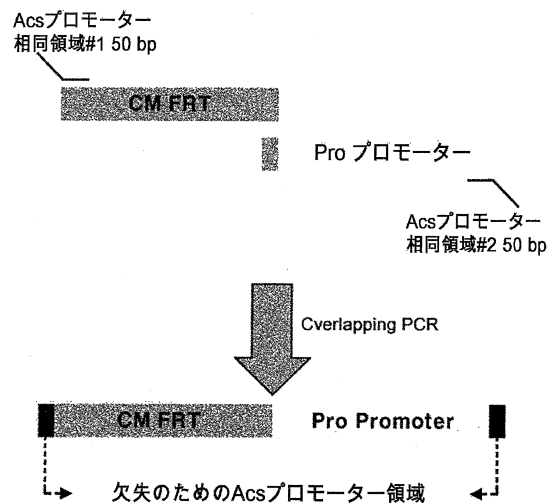
【図 4 b】

【図 4 b】



【図 5】

【図 5】



【配列表】

0005758499000001.app

フロントページの続き

微生物の受託番号 KCCM KCCM11146P

微生物の受託番号 KCCM KCCM11147P

微生物の受託番号 KCCM KCCM11228P

微生物の受託番号 KCCM KCCM11229P

微生物の受託番号 KCCM KCCM11230P

(72)発明者 シン, ヨン ウク

大韓民国, 448-972 キョンギ - ド, ヨンイン - シ, スジ - グ, チュクチョン 1 - トン, ヒョンデ ホームタウン 4チャ 3タンジ アパートメント, 433-902

(72)発明者 ソ, チャン イル

大韓民国, 403-090 インチョン, プピョン - グ, サムサン - ドン, イムグァン クデガ アパートメント, 103-1002

(72)発明者 ホ, イン ギョン

大韓民国, 157-031 ソウル, カンソ - グ, トウンチョン 1 - トン, トゥラビハウス, 101-1311

(72)発明者 キム, チュ ウン

大韓民国, 157-742 ソウル, カンソ - グ, カヤン 1 - トン, カヤン 2ダンジ アパートメント, 205-1111

(72)発明者 キム, ヒョン ア

大韓民国, 590-972 チョルラブク - ト, ナムウォン - シ, テサン - ミョン, シンゲ - リ, 138

(72)発明者 イ, ハン ジン

大韓民国, 136-767 ソウル, ソンブク - ク, チョンヌン 4 - ドン, テウ アパートメント, 102-304

(72)発明者 ナ, クァン ホ

大韓民国, 157-201 ソウル, カンソ - グ, カヤン 1 - トン, トシケパル アパートメント, 2ダンジ, 308

(72)発明者 ソン, ソン グァン

大韓民国, 139-925 ソウル, ノウォン - グ, チュンゲ 3 - ドン, コニョン 2チャ アパートメント, 106-1402

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 特開2009-247354(JP, A)

特開2009-060791(JP, A)

特表2010-523145(JP, A)

A single amino acid change is responsible for evolution of acyltransferase specificity in bacterial methionine biosynthesis. , J Biol Chem. , 2008年, 283(12), p.7561-7567

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/09

C12N 1/21

C12N 9/10

C12P 13/06

PubMed