

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6489014号
(P6489014)

(45) 発行日 平成31年3月27日 (2019. 3. 27)

(24) 登録日 平成31年3月8日 (2019. 3. 8)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 N 1/16 (2006. 01)

C 1 2 N 1/16 G

C 1 2 N 15/52 (2006. 01)

C 1 2 N 15/52

C 1 2 N 15/54 (2006. 01)

C 1 2 N 15/54

A 2 3 L 31/15 (2016. 01)

A 2 3 L 31/15

請求項の数 10 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2015-526372 (P2015-526372)

(86) (22) 出願日 平成26年7月9日 (2014. 7. 9)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/068283

(87) 国際公開番号 W02015/005378

(87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015. 1. 15)

審査請求日 平成29年7月5日 (2017. 7. 5)

(31) 優先権主張番号 特願2013-146315 (P2013-146315)

(32) 優先日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(31) 優先権主張番号 特願2014-3606 (P2014-3606)

(32) 優先日 平成26年1月10日 (2014. 1. 10)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11299

(73) 特許権者 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(74) 代理人 100100549

弁理士 川口 嘉之

(74) 代理人 100126505

弁理士 佐貫 伸一

(74) 代理人 100131392

弁理士 丹羽 武司

(72) 発明者 森田 京

日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1

味の素株式会社内

(72) 発明者 西内 博章

日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1

味の素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Abu、 γ -Glu-Abu、及び/又は γ -Glu-Abu-Glyを高含有する酵母

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内のアセト乳酸シンターゼ活性が低下するよう改変された、 α -アミノ酪酸 (Abu) 関連化合物を高含有する酵母であって、前記Abu関連化合物が、Abu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyからなる群より選択される1種またはそれ以上の化合物であり、さらに、 α -ケト酪酸合成酵素およびアミノ基転移酵素からなる群より選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように改変されている、酵母。

【請求項2】

前記Abu関連化合物の高含有が、該Abu関連化合物を0.4 μ mol/g-DCW以上の量で含有することである、請求項1に記載の酵母。

【請求項3】

前記 α -ケト酪酸合成酵素が、CHA1遺伝子によってコードされる酵素である、請求項1または2に記載の酵母。

【請求項4】

前記アミノ基転移酵素が、BAT1遺伝子によってコードされる酵素である、請求項1～3のいずれか1項に記載の酵母。

【請求項5】

さらに、 γ -グルタミルシステイン合成酵素活性が増大するように改変されている、請求項1～4のいずれか1項に記載の酵母。

10

20

【請求項 6】

サッカロミセス属酵母またはキャンディダ属酵母である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の酵母。

【請求項 7】

サッカロミセス・セレビシエまたはキャンディダ・ユティリスである、請求項 6 に記載の酵母。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の酵母を原料として用いて酵母エキスを調製することを含む、酵母エキスの製造方法。

【請求項 9】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の酵母を培地で培養すること、および培養物から Abu 関連化合物を回収することを含む、Abu 関連化合物の製造方法。

【請求項 10】

前記 Abu 関連化合物が γ -Glu-Abu および／または γ -Glu-Abu-Gly である、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Abu、 γ -Glu-Abu、及び／又は γ -Glu-Abu-Gly を高含有する酵母および酵母エキスに関わるものである。当該酵母及び酵母エキスは、調味料や健康食品等の食品分野にて有用である。

【背景技術】

【0002】

アセト乳酸シンターゼは、2 分子のピルビン酸からアセト乳酸および CO_2 を生成する反応、および、ピルビン酸および α -ケト酪酸 (α -KB) から α -アセトヒドロキシ酪酸および CO_2 を生成する反応を触媒する酵素として知られている。酵母のアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子としては ILV2 及び ILV6 が知られており、ILV2 が活性サブユニットを、ILV6 が調節サブユニットを、それぞれコードする。

【0003】

細菌においては、アセト乳酸シンターゼを欠損させることにより、細胞内の α -KB の蓄積量が増大することが知られている（非特許文献 1）。

【0004】

また、醸造酵母においては、アセト乳酸シンターゼをコードする ILV2 遺伝子、特にビール酵母に特徴的な nonScILV2 遺伝子、の発現量を抑制することによって、製品のオフフレーバーとなるビシナルジケトン類、特にダイアセチル、の生産量が低減されることが知られている（特許文献 1）。

【0005】

α -アミノ酪酸 (Abu) は、アミノ基転移酵素の作用により、 α -KB から生成する。よって、 α -ケト酪酸合成酵素やアミノ基転移酵素等の Abu の生合成に関与する酵素の活性を増強することにより、細胞内の Abu や γ -Glu-Abu の蓄積量を増大させることができる（特許文献 2）。

【0006】

しかしながら、アセト乳酸シンターゼ活性と、細胞内の Abu、 γ -Glu-Abu、及び／又は γ -Glu-Abu-Gly の蓄積量との関係は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】 特表 2009-527218 号公報

【特許文献 2】 国際公開第 2012/046731 号パンフレット

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0008】

【非特許文献1】Bioessays. (3):125-130 (1987)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、Abu、 γ -Glu-Abu、及び／又は γ -Glu-Abu-Glyを高含有する酵母および酵母エキスを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、 α -ケト酪酸合成酵素およびアミノ基転移酵素の活性を増強した酵母において、アセト乳酸シンターゼの活性を低下させることによって、酵母細胞内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの蓄積量が増大することを見出し、本発明を完成させた。

10

【0011】

すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

細胞内のアセト乳酸シンターゼ活性が低下するよう改変された、 α -アミノ酪酸 (Abu) 関連化合物を高含有する酵母であって、

前記Abu関連化合物が、Abu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyからなる群より選択される1種またはそれ以上の化合物である、酵母。

20

[2]

さらに、 α -ケト酪酸合成酵素およびアミノ基転移酵素からなる群より選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように改変されている、[1]に記載の酵母。

[3]

前記 α -ケト酪酸合成酵素が、CHA1遺伝子によってコードされる酵素である、[2]に記載の酵母。

[4]

前記アミノ基転移酵素が、BAT1遺伝子によってコードされる酵素である、[2]に記載の酵母。

[5]

30

さらに、 γ -グルタミルシステイン合成酵素活性が増大するように改変されている、[1]～[4]のいずれかに記載の酵母。

[6]

サッカロミセス属酵母またはキャンディダ属酵母である、[1]～[5]のいずれかに記載の酵母。

[7]

サッカロミセス・セレビシエまたはキャンディダ・ユティリスである、[6]に記載の酵母。

[8]

[1]～[7]のいずれかに記載の酵母を原料として用いて酵母エキスを調製することを含む、酵母エキスの製造方法。

40

[9]

[1]～[7]のいずれかに記載の酵母を培地で培養すること、および培養物からAbu関連化合物を回収することを含む、Abu関連化合物の製造方法。

[10]

前記Abu関連化合物が γ -Glu-Abuおよび／または γ -Glu-Abu-Glyである、[9]に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、M007Y株（親株）とM013Y株（ILV2プロモーター置換株）をSD培地で培養

50

したときのILV2 mRNA発現量を示す図である。データは、内部標準であるACT1 mRNA量に対するILV2 mRNA量の比率として示す。

【図2】図2は、M007Y株（親株）とM013Y株（ILV2プロモーター置換株）をSD培地で培養した時の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量を示す図である。データは、乾燥菌体重量当たりの各化合物の含量（ $\mu\text{mol/g-DCW}$ ）として示す。図中、黒色が γ -Glu-Abu、斜線がAbu、灰色が γ -Glu-Abu-Glyを示す。

【図3】図3は、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株（ILV2破壊株）をイソロイシン及びバリンを添加したSD培地で培養したときのILV2 mRNA発現量を示す図である。データは、内部標準であるACT1 mRNA量に対するILV2 mRNA量の比率として示す。

【図4】図4は、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株（ILV2破壊株）をイソロイシン及びバリンを添加したSD培地で培養した時の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量を示す図である。データは、乾燥菌体重量当たりの各化合物の含量（ $\mu\text{mol/g-DCW}$ ）として示す。図中、黒色が γ -Glu-Abu、斜線がAbu、灰色が γ -Glu-Abu-Glyを示す。

【図5】図5は、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株（ILV2破壊株）をイソロイシン及びバリンを添加したSDTE培地で培養した時の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量を示す図である。データは、乾燥菌体重量当たりの各化合物の含量（ $\mu\text{mol/g-DCW}$ ）として示す。図中、黒色が γ -Glu-Abu、斜線がAbu、灰色が γ -Glu-Abu-Glyを示す。

【図6】図6は、Y006Y株（親株）及びM015Y株（ILV2破壊株）をイソロイシン及びバリンを添加したSD培地で培養した時の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量を示す図である。データは、乾燥菌体重量当たりの各化合物の含量（ $\mu\text{mol/g-DCW}$ ）として示す。図中、黒色が γ -Glu-Abu、斜線がAbu、灰色が γ -Glu-Abu-Glyを示す。

【図7】図7は、Y006Y株（親株）及びM015Y株（ILV2破壊株）をイソロイシン及びバリンを添加したSDTE培地で培養した時の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量を示す図である。データは、乾燥菌体重量当たりの各化合物の含量（ $\mu\text{mol/g-DCW}$ ）として示す。図中、黒色が γ -Glu-Abu、斜線がAbu、灰色が γ -Glu-Abu-Glyを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

<1>本発明の酵母

<1-1>本発明の酵母

本発明の酵母は、細胞内のアセト乳酸シンターゼ活性が低下するよう改変された、 α -アミノ酪酸（Abu）関連化合物を高含有する酵母である。

【0015】

本発明において、「Abu関連化合物」とは、Abu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyからなる群より選択される化合物をいう。なお、本発明において、AbuおよびGluはL体である。

【0016】

「Abu関連化合物を高含有する」とは、本発明の酵母を培地中で培養したときに、Abu関連化合物を、検出できる程度に細胞内に生成および蓄積することをいう。本発明の酵母は、非改変株よりも多い量のAbu関連化合物を細胞内に蓄積することができる酵母であってよい。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。また、本発明の酵母は、 $0.4\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上、 $1\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上、 $2\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上、 $3\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上、 $5\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上、または $10\mu\text{mol/g-DCW}$ 以上の量でAbu関連化合物を細胞内に蓄積することができる酵母であってよい。本発明においては、1種のAbu関連化合物が生成蓄積されてもよく、2種またはそれ以上のAbu関連化合物が生成蓄積されてもよい。

【0017】

本発明の酵母は、酵母の適当な菌株、例えば後述する菌株を改変することで取得することができる。

【0018】

本発明の酵母は、出芽酵母であってもよく、分裂酵母であってもよい。出芽酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス属、キャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) 等のキャンディダ属、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等のピヒア属、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等のハンゼヌラ属等に属する酵母を例示することができる。分裂酵母としては、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカロミセス属等に属する酵母を例示することができる。中でも、酵母エキスの生産によく用いられているサッカロミセス・セレビシエやキャンディダ・ユティリスが好ましい。本発明の酵母は、1 倍体でもよいし、2 倍性またはそれ以上の倍数性を有するものであってもよい。

【0019】

サッカロミセス・セレビシエとしては、例えば、サッカロミセス・セレビシエY006株 (FERM BP-11299) が挙げられる。Y006株は、2010年8月18日に、産業技術総合研究所特許生物寄託センター (現、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター、郵便番号: 292-0818、住所: 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室) に国際寄託され、受託番号FERM BP-11299が付与されている。

【0020】

また、サッカロミセス・セレビシエとしては、例えば、サッカロミセス・セレビシエBY 4743株 (ATCC 201390) やサッカロミセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) も挙げられる。また、キャンディダ・ユティリスとしては、例えば、キャンディダ・ユティリスATCC 22023株を用いることができる。これらの菌株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より入手できる。すなわち、各菌株に対応する登録番号を利用して分譲を受けることができる (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。

【0021】

<1-2>アセト乳酸シンターゼの活性低下

本発明の酵母は、細胞内のアセト乳酸シンターゼ活性が低下するよう改変されている。

【0022】

本発明において、「アセト乳酸シンターゼ」とは、ピルビン酸および α -ケト酪酸 (α -KB) から α -アセトヒドロキシ酪酸および CO_2 を生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう (EC 2.2.1.6)。また、同活性を「アセト乳酸シンターゼ活性」ともいう。本発明において、アセト乳酸シンターゼは、2分子のピルビン酸からアセト乳酸および CO_2 を生成する反応を触媒する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。アセト乳酸シンターゼ活性は、例えば、アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子を破壊することにより、低下させることができる。タンパク質の活性を低下させる詳細な手法は後述する。

【0023】

アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子としては、アセト乳酸シンターゼの活性サブユニットをコードするILV2遺伝子が挙げられる。ILV2遺伝子にコードされるタンパク質を、Ilv2タンパク質またはIlv2pともいう。

【0024】

サッカロミセス・セレビシエのILV2遺伝子の塩基配列は、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) に開示されている。また、サッカロミセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のILV2遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank accession NC_001145として登録されている染色体XIIIの配列中、484084~486147の配列に相当する。また、サッカロミセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のIlv2タンパク質は、GenBank accession NP_013826として登録されている。サッカロミセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のILV2遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするIlv2タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号15および16に示す。

10

20

30

40

50

【0025】

また、例えば、サッカロミセス・セレビスエY006株 (FERM BP-11299) は、2コピーのLV2遺伝子を有する。

【0026】

アセト乳酸シンターゼ活性が低下したことは、例えば、改変前の酵母と改変後の酵母よりそれぞれ粗酵素液を調製し、そのアセト乳酸シンターゼ活性を比較することにより、確認できる。アセト乳酸シンターゼ活性は、例えば、公知の方法 (F.C. Stormer and H.E. Umbarger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 5, 587-592(1964)) により測定できる。

【0027】

アセト乳酸シンターゼは、元の機能が維持されている限り、上記アセト乳酸シンターゼ、例えば配列番号16に示すアミノ酸配列を含むタンパク質、のバリエーションであってもよい。なお、そのようなバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。保存的バリエーションとしては、例えば、上記アセト乳酸シンターゼ、例えば配列番号16に示すアミノ酸配列を含むタンパク質、のホモログや人為的な改変体が挙げられる。

【0028】

「元の機能が維持されている」とは、タンパク質のバリエーションが、元のタンパク質の活性に対応する活性を有することをいう。すなわち、アセト乳酸シンターゼについての「元の機能が維持されている」とは、タンパク質のバリエーションが、アセト乳酸シンターゼ活性を有することをいう。

【0029】

上記アセト乳酸シンターゼのホモログをコードする遺伝子は、例えば、上記アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子の塩基配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、上記アセト乳酸シンターゼのホモログをコードする遺伝子は、例えば、酵母の染色体を鋳型にして、これら公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

【0030】

アセト乳酸シンターゼの保存的バリエーションをコードする遺伝子は、例えば、以下のような遺伝子であってもよい。すなわち、アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子は、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする限りにおいて、上記アミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。この場合、対応する活性は、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加される前のタンパク質に対して、通常70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上が維持され得る。なお上記「1又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、具体的には、1~50個、1~40個、1~30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個を意味する。

【0031】

上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又

10

20

30

40

50

はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異（mutant又はvariant）によって生じるものも含まれる。

【0032】

さらに、上記のような保存的変異を有する遺伝子は、上記アミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつ、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」（homology）は、「同一性」（identity）を指すことがある。

10

【0033】

また、アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子は、公知の遺伝子配列から調製されるプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

20

【0034】

上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

30

【0035】

また、アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子は、任意のコドンがそれと等価のコドンに置換されたものであってもよい。

【0036】

なお、上記の遺伝子やタンパク質の保存的バリエーションに関する記載は、Chalタンパク質等の任意のタンパク質、およびそれらをコードする遺伝子にも準用できる。

【0037】

40

<1-3>その他の改変

本発明の酵母は、さらに、他の改変を有していてもよい。他の改変は、生成蓄積するAbu関連化合物の種類等に応じて適宜選択することができる。本発明において、本発明の酵母を構築するための改変は、任意の順番で行うことができる。

【0038】

例えば、本発明の酵母は、Abuの生合成能が増強されるよう、改変されていてよい。そのような改変により、細胞内のAbu関連化合物の含有量が高まると期待される。Abuの生合成能は、Abuの生合成に関与する酵素の活性を増大させることにより、増強できる。Abuの生合成に関与する酵素としては、 α -ケト酪酸合成酵素やアミノ基転移酵素が挙げられる。本発明においては、Abuの生合成に関与する1種の酵素の活性を増大させてもよく、Abu

50

の生合成に関与する2種またはそれ以上の酵素の活性を増大させてもよい。酵素の活性は、例えば、酵素をコードする遺伝子の発現を増強することより、増大させることができる。タンパク質の活性を増大させる詳細な手法は後述する。

【0039】

ここでいう「 α -ケト酪酸合成酵素」とは、L-スレオニンから α -ケト酪酸を生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。 α -ケト酪酸合成酵素としては、例えば、セリン/スレオニンデアミナーゼ (serine/threonine deaminase) やスレオニンデアミナーゼ (threonine deaminase) が挙げられる。セリン/スレオニンデアミナーゼをコードする遺伝子としては、CHA1遺伝子が挙げられる。スレオニンデアミナーゼをコードする遺伝子としては、ILV1遺伝子が挙げられる。これらの中では、例えば、CHA1遺伝子にコードされるセリン/スレオニンデアミナーゼの活性を増大させるのが好ましい。本発明においては、1種の α -ケト酪酸合成酵素の活性を増大させてもよく、2種またはそれ以上の α -ケト酪酸合成酵素の活性を増大させてもよい。

10

【0040】

サッカロマイセス・セレビシエのCHA1遺伝子 (システムティックネーム: YCL064C) およびILV1遺伝子 (システムティックネーム: YER086W) の塩基配列は、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) に開示されている。サッカロマイセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のCHA1遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするCha1タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号17および18に示す。サッカロマイセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のILV1遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするIlv1タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号19および20に示す。

20

【0041】

ここでいう「アミノ基転移酵素」とは、アミノ基転移反応により、 α -ケト酪酸からAbuを生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。アミノ基転移酵素としては、例えば、アラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (alanine:glyoxylate aminotransferase)、分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ (branched-chain amino acid transaminase)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase)、 γ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ (gamma-aminobutyrate transaminase) が挙げられる。アラニン:グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子としては、AGX1遺伝子が挙げられる。分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子としては、BAT1およびBAT2遺伝子が挙げられる。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子としては、AAT1およびAAT2遺伝子が挙げられる。 γ -アミノ酪酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子としては、UGA1遺伝子が挙げられる。これらの中では、例えば、BAT1にコードされる分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼの活性を増大させるのが好ましい。本発明においては、1種のアミノ基転移酵素の活性を増大させてもよく、2種またはそれ以上のアミノ基転移酵素の活性を増大させてもよい。

30

【0042】

サッカロマイセス・セレビシエのAGX1遺伝子 (システムティックネーム: YFL030W)、BAT1遺伝子 (システムティックネーム: YHR208W)、BAT2遺伝子 (システムティックネーム: YJR148W)、AAT1遺伝子 (システムティックネーム: YKL106W)、AAT2遺伝子 (システムティックネーム: YLR027C)、およびUGA1遺伝子 (システムティックネーム: YGR019W) の塩基配列は、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) に開示されている。サッカロマイセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のBAT1遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするBat1タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号21および22に示す。

40

【0043】

また、本発明の酵母は、細胞内の γ -グルタミルシステイン合成酵素 (gamma glutamyl cysteine synthetase) の活性が増大または低下するよう、改変されていてよい。ここでいう「 γ -グルタミルシステイン合成酵素」とは、L-GluおよびAbuを基質として認識し、 γ -Glu-Abuを生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質であってよい。 γ -グルタ

50

ミルシステイン合成酵素は、L-GluおよびL-Cysを基質として認識し、 γ -グルタミルシステイン (γ -Glu-Cys) を生成する反応を触媒する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。例えば、 γ -Glu-Abuおよび／または γ -Glu-Abu-Glyを細胞内に生成蓄積させる場合に、 γ -グルタミルシステイン合成酵素の活性を増大させてよい。また、例えば、 γ -Glu-Abuおよび／または γ -Glu-Abu-Glyを細胞内に生成蓄積させない場合に、 γ -グルタミルシステイン合成酵素の活性を低下させてよい。 γ -グルタミルシステイン合成酵素の活性の増強については、例えば、米国特許第7553638号、大竹康之ら（バイオサイエンスとインダストリー、第50巻第10号、第989～994頁、1992年）等が開示されている。

【0044】

また、本発明の酵母は、細胞内のグルタチオン合成酵素 (glutathione synthase) の活性が増大または低下するよう、改変されていてよい。ここでいう「グルタチオン合成酵素」とは、 γ -Glu-AbuおよびGlyを基質として認識し、 γ -Glu-Abu-Glyを生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質であってよい。グルタチオン合成酵素は、 γ -Glu-CysおよびGlyを基質として認識し、グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) を生成する反応を触媒する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。例えば、 γ -Glu-Abu-Glyを細胞内に生成蓄積させる場合に、グルタチオン合成酵素の活性を増大させてよい。また、例えば、 γ -Glu-Abu-Glyを細胞内に生成蓄積させない場合に、グルタチオン合成酵素の活性を低下させてよい。

【0045】

γ -グルタミルシステイン合成酵素をコードする遺伝子としては、GSH1遺伝子が挙げられる。グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子としては、GSH2遺伝子が挙げられる。サッカロミセス・セレビシエのGSH1遺伝子およびGSH2遺伝子の塩基配列は、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) に開示されている。また、キャンディダ・ユティリスのGSH1遺伝子およびGSH2遺伝子の塩基配列は、米国特許第7553638号に開示されている。サッカロミセス・セレビシエS288C株 (ATCC 26108) のGSH1遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするGsh1タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号23および24に示す。

【0046】

また、本発明の酵母は、細胞内のペプチド分解酵素の活性が低下するよう、改変されていてよい。ここでいう「ペプチド分解酵素」とは、 γ -Glu-Abuおよび／または γ -Glu-Abu-Glyを加水分解する反応を触媒する活性を有するタンパク質であってよい。ペプチド分解酵素としては、例えば、DUG1遺伝子、DUG2遺伝子、DUG3遺伝子、およびECM38遺伝子にコードされるタンパク質が挙げられる（特開2012-213376）。なお、DUG1遺伝子、DUG2遺伝子、およびDUG3遺伝子にそれぞれコードされるDug1p、Dug2p、およびDug3pは、DUG複合体を形成して機能する。DUG複合体によるグルタチオンの分解には、Dug1p、Dug2p、およびDug3pの全てが必要であることが知られており (Ganguli D. et al., Genetics. 2007 Mar; 175(3): 1137-51)、Dug1p、Dug2p、およびDug3pから選択される1またはそれ以上のタンパク質の活性を低下させることでDUG複合体の活性を低下させることができる。これらの内、少なくともDug2pの活性を低下させるのが好ましい。本発明においては、1種のペプチド分解酵素の活性を低下させてもよく、2種またはそれ以上のペプチド分解酵素の活性を低下させてもよい。サッカロミセス・セレビシエのDUG1遺伝子、DUG2遺伝子、DUG3遺伝子、およびECM38遺伝子の塩基配列は、Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) に開示されている。

【0047】

なお、これら「他の改変」に使用される遺伝子も、元の機能が維持されたタンパク質をコードする限り、上記例示した遺伝子や公知の塩基配列を有する遺伝子に限られず、そのバリエーションであってもよい。遺伝子やタンパク質のバリエーションについては、先述したアセト乳酸シンターゼおよびそれをコードする遺伝子の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合は、各サブユニットについての「元の機能が維持されている」とは、各サブユニットが残りの

10

20

30

40

50

サブユニットと複合体を形成し、当該複合体が対応する活性を有することによってよい。すなわち、例えば、DUG複合体の各サブユニットについての「元の機能が維持されている」とは、各サブユニットが残りのサブユニットと複合体を形成し、当該複合体がペプチド分解活性を有することによってよい。

【0048】

上述したような各種改変は、突然変異処理や遺伝子工学により実施できる。サッカロマイセス・セレビシエの遺伝子工学の具体的手法は、多くの書籍に記されている。また、キャンディダ・ユティリスについても、近年各種の方法が報告されており、それらを用いてよい。例えば、ケミカルエンジニアリング1999年6月号(23p-28p、三沢典彦)、FEMS Microbiology Letters (Luis Rodriguez et al., 165 (1998) 335-340)、W098/07873、特開平8-173170、W095/32289、Journal of Bacteriology (KEIJI KONDO et al., Vol.177 No. 24 (1995) 7171-7177)、W098/14600、特開2006-75122、特開2006-75123、特開2007-089441、特開2006-101867などの先行文献にその具体的な手法が記されているので適宜参考にすることができる。

【0049】

<1-4>タンパク質の活性を増大させる手法

以下に、タンパク質の活性を増大させる手法について説明する。

【0050】

「タンパク質の活性が増大する」とは、同タンパク質の細胞当たりの活性が野生株や親株等の非改変株に対して増大していることを意味する。なお、「タンパク質の活性が増大する」ことを、「タンパク質の活性が増強される」ともいう。「タンパク質の活性が増大する」とは、具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が増加していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が増大していることをいう。すなわち、「タンパク質の活性が増大する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量(mRNA量)または翻訳量(タンパク質の量)を意味してもよい。また、「タンパク質の活性が増大する」とは、もともと標的のタンパク質の活性を有する菌株において同タンパク質の活性を増大させることだけでなく、もともと標的のタンパク質の活性が存在しない菌株に同タンパク質の活性を付与することを含む。また、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、酵母が本来有する標的のタンパク質の活性を低下または消失させた上で、好適な標的のタンパク質の活性を付与してもよい。

【0051】

タンパク質の活性は、非改変株と比較して増大していれば特に制限されないが、例えば、非改変株と比較して、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、非改変株が標的のタンパク質の活性を有していない場合は、同タンパク質をコードする遺伝子を導入することにより同タンパク質が生成されていればよいが、例えば、同タンパク質はその酵素活性が測定できる程度に生産されていてよい。

【0052】

タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることによって達成される。なお、「遺伝子の発現が上昇する」ことを、「遺伝子の発現が増強される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株と比較して、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、「遺伝子の発現が上昇する」とは、もともと標的の遺伝子が発現している菌株において同遺伝子の発現量を上昇させることだけでなく、もともと標的の遺伝子が発現していない菌株において、同遺伝子を発現させることを含む。すなわち、「遺伝子の発現が上昇する」とは、例えば、標的の遺伝子を保持しない菌株に同遺伝子を導入し、同遺伝子を発現させることを含む。

【0053】

遺伝子の発現の上昇は、例えば、遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。

【0054】

遺伝子のコピー数の増加は、宿主微生物の染色体へ同遺伝子を導入することにより達成できる。染色体への遺伝子の導入は、例えば、相同組み換えを利用して行うことができる (Miller I, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory)。遺伝子は、1コピーのみ導入されてもよく、2コピーまたはそれ以上導入されてもよい。例えば、染色体上に多数のコピーが存在する配列を標的として相同組み換えを行うことで、染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体中に多数のコピーが存在する配列としては、特有の短い繰り返し配列からなる自律複製配列 (ARS) や、約150コピー存在するrDNA配列が挙げられる。ARSを含むプラスミドを用いて酵母の形質転換を行った例が、国際公開95/32289号パンフレットに記載されている。また、トランスポゾンに遺伝子を組み込み、それを染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入するよう転移させてもよい。

10

【0055】

染色体上に標的遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部又は一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は同遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認できる。

【0056】

また、遺伝子のコピー数の増加は、標的遺伝子を含むベクターを宿主微生物に導入することによっても達成できる。例えば、標的遺伝子を含むDNA断片を、宿主微生物で機能するベクターと連結して同遺伝子の発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主微生物を形質転換することにより、同遺伝子のコピー数を増加させることができる。標的遺伝子を含むDNA断片は、例えば、標的遺伝子を有する微生物のゲノムDNAを鋳型とするPCRにより取得できる。ベクターとしては、宿主微生物の細胞内において自律複製可能なベクターを用いることができる。ベクターは、マルチコピーベクターであるのが好ましい。酵母細胞内で機能するベクターとしては、例えば、CEN4の複製開始点を持つプラスミドや2 μ m DNAの複製開始点を持つマルチコピー型プラスミドが挙げられる。酵母細胞内で機能するベクターとして、具体的には、例えば、pAUR123 (タカラバイオ社製) やpYES2 (インビトロジェン社) が挙げられる。

20

【0057】

遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に本発明の酵母に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、本発明の酵母で機能するプロモーター配列による制御を受けて発現するように導入されていればよい。プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、導入する遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターは、利用するベクターにもともと搭載されているプロモーターであってもよい。プロモーターとしては、例えば、後述するような、より強力なプロモーターを利用してもよい。

30

【0058】

また、2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に本発明の酵母に保持されていればよい。例えば、各遺伝子は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各遺伝子は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。また、2またはそれ以上の遺伝子でオペロンを構成して導入してもよい。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」としては、例えば、2またはそれ以上の酵素をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一の酵素を構成する2またはそれ以上のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0059】

導入される遺伝子は、宿主で機能するタンパク質をコードするものであれば特に制限されない。導入される遺伝子は、宿主由来の遺伝子であってもよく、異種由来の遺伝子であってもよい。導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプラ

50

イマーを用い、同遺伝子を有する生物のゲノムDNAや同遺伝子を搭載するプラスミド等を鋳型として、PCRにより取得することができる。また、導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて全合成してもよい。

【0060】

なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、遺伝子の発現を上昇させることによりタンパク質の活性を増大させる場合、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強してもよく、一部の発現のみを増強してもよい。通常は、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強するのが好ましい。また、複合体を構成する各サブユニットは、複合体が目的のタンパク質の機能を有する限り、1種の生物由来であってもよく、2種またはそれ以上の異なる生物由来であってもよい。すなわち、例えば、複数のサブユニットをコードする、同一の生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよく、それぞれ異なる生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよい。

10

【0061】

また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の転写効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の転写効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。「より強力なプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも向上するプロモーターを意味する。より強力なプロモーターとしては、例えば、公知の高発現プロモーターである、PGK1、PDC1、TDH3、TEF1、HXT7、ADH1等の遺伝子のプロモーターが挙げられる。また、より強力なプロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得してもよい。

20

【0062】

また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の翻訳効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、コドンの改変によって達成できる。すなわち、遺伝子の異種発現を行う場合等には、遺伝子中に存在するレアコドンを、より高頻度で利用される同義コドンに置き換えることにより、遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。コドンの置換は、例えば、DNAの目的の部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法により行うことができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) が挙げられる。また、コドンが置換された遺伝子断片を全合成してもよい。種々の生物におけるコドンの使用頻度は、「コドン使用データベース」 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)) に開示されている。

30

【0063】

また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、または、遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成できる。

【0064】

上記のような遺伝子の発現を上昇させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

40

【0065】

また、タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、タンパク質の比活性を増強することによっても達成できる。比活性の増強には、フィードバック阻害の低減および解除も含まれる。比活性が増強されたタンパク質は、例えば、種々の生物を探索し取得することができる。また、在来タンパク質に変異を導入することで高活性型のものを取得してもよい。導入される変異は、例えば、タンパク質の1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されるものであってよい。変異の導入は、例えば、上述したような部位特異的変異法により行うことができる。また、変異の導入は、

50

例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、エチルメタンスルフォネート(EMS)、およびメチルメタンスルフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。また、in vitroでDNAを直接ヒドロキシルアミンで処理し、ランダム変異を誘発してもよい。比活性の増強は、単独で用いてもよく、上記のような遺伝子の発現を増強させる手法と任意に組み合わせて用いてもよい。

【0066】

本発明の酵母が2倍体以上の倍数性を有する場合であって、染色体の改変によりタンパク質の活性を増大させる場合には、本発明の酵母は、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、タンパク質の活性が増大するように改変された染色体と野生型染色体とをヘテロで有していてもよく、タンパク質の活性が増大するように改変された染色体をホモで有していてもよい。

10

【0067】

酵母の形質転換法としては、プロトプラスト法、KU法(H.Ito et al., J. Bacteriol., 153-163 (1983))、KUR法(発酵と工業 vol.43, p.630-637 (1985))、エレクトロポレーション法(Luis et al., FEMS Microbiology Letters 165 (1998) 335-340)、キャリアDNAを用いる方法(Gietz R.D. and Schiestl R.H., Methods Mol. Cell. Biol. 5:255-269 (1995))等、通常酵母の形質転換に用いられる方法を採用することができる。また、酵母の孢子形成、1倍体酵母の分離、等の操作については、「化学と生物 実験ライン31 酵母の実験技術」、初版、廣川書店；「バイオマニュアルシリーズ10 酵母による遺伝子実験法」初版、羊土社等に記載されている。

20

【0068】

タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

【0069】

タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子の転写量が上昇したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が上昇したことを確認することにより確認できる。

【0070】

遺伝子の転写量が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株または親株等の非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としてはノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

30

【0071】

タンパク質の量が上昇したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる(Molecular cloning(Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

40

【0072】

上記したタンパク質の活性を増大させる手法は、任意のタンパク質、例えばアミノ基転移酵素、の活性増強や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現増強に利用できる。

【0073】

<1-5>タンパク質の活性を低下させる手法

以下に、タンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

【0074】

「タンパク質の活性が低下する」とは、同タンパク質の細胞当たりの活性が野生株や親

50

株等の非改変株と比較して減少していることを意味し、活性が完全に消失している場合を含む。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が低下していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が低下していることをいう。すなわち、「タンパク質の活性が低下する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量（mRNA量）または翻訳量（タンパク質の量）を意味してもよい。なお、「タンパク質の細胞当たりの分子数が低下している」ことには、同タンパク質が全く存在していない場合が含まれる。また、「タンパク質の分子当たりの機能が低下している」ことには、同タンパク質の分子当たりの機能が完全に消失している場合が含まれる。タンパク質の活性は、非改変株と比較して低下していれば特に制限されないが、例えば、非改変株と比較して、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

10

【0075】

タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることにより達成される。「遺伝子の発現が低下する」ことには、同遺伝子が全く発現していない場合が含まれる。なお、「遺伝子の発現が低下する」ことを、「遺伝子の発現が弱体化される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株と比較して、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

【0076】

遺伝子の発現の低下は、例えば、転写効率の低下によるものであってもよく、翻訳効率の低下によるものであってもよく、それらの組み合わせによるものであってもよい。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。また、染色体上の遺伝子のプロモーターをより弱いプロモーターに置換してもよい。「より弱いプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも弱化するプロモーターを意味する。より弱いプロモーターとしては、例えば、各種誘導型のプロモーターを利用することができる。すなわち、誘導型のプロモーターは、誘導物質の非存在下で、より弱いプロモーターとして機能し得る。誘導型のプロモーターとしては、例えば、ガラクトース誘導性のガラクトキナーゼ遺伝子（GAL1）のプロモーターが挙げられる。また、発現調節配列の一部または全部を欠失させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、発現制御に関わる因子を操作することによっても達成できる。発現制御に関わる因子としては、転写や翻訳制御に関わる低分子（誘導物質、阻害物質など）、タンパク質（転写因子など）、核酸（siRNAなど）等が挙げられる。

20

30

【0077】

また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより達成できる。遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させることにより達成できる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。タンパク質の活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域等のいずれの領域であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。

40

【0078】

また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終止コドンを導入すること（ナンセンス変異）、あるいは1～2塩基を付加または欠失するフレームシフト変異を導入すること等によっても達成できる（Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617(1997), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515(1998), Journal of Biological Chemistry 26 116, 20833-20839(1991)）。

50

【0079】

また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域に他の配列を挿入することによっても達成できる。挿入部位は遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子や目的物質の生産に有用な遺伝子が挙げられる。

【0080】

染色体上の遺伝子を上記のように改変することは、例えば、遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能するタンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子を含む組換えDNAで微生物を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の野生型遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の野生型遺伝子を欠失型遺伝子に置換することによって達成できる。その際、組換えDNAには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませておくことが操作がしやすい。欠失型遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても、野生型タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。

【0081】

用いる組換えDNAの構造によっては、相同組換えの結果として、野生型遺伝子と欠失型遺伝子とが組換えDNAの他の部分（例えば、ベクター部分及びマーカー遺伝子）を挟んだ状態で染色体に挿入される場合がある。この状態では野生型遺伝子が機能するため、当該2個の遺伝子間で再度相同組換えを起こさせ、1コピーの遺伝子を、ベクター部分及びマーカー遺伝子とともに染色体DNAから脱落させ、欠失型遺伝子が残ったものを選択する必要がある。

【0082】

また、例えば、任意の配列を含む線状DNAであって、当該任意の配列の両端に染色体上の置換対象部位の上流および下流の配列を備える線状DNAで酵母を形質転換して、置換対象部位の上流および下流でそれぞれ相同組換えを起こさせることにより、1ステップで置換対象部位を当該任意の配列に置換することができる。当該任意の配列としては、例えば、マーカー遺伝子を含む配列を用いることができる。マーカー遺伝子は、その後、必要により除去してもよい。マーカー遺伝子を除去する場合には、マーカー遺伝子を効率的に除去できるよう、相同組み換え用の配列をマーカー遺伝子の両端に付加しておいてもよい。

【0083】

また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG）、エチルメタンスルフォネート（EMS）、およびメチルメタンスルフォネート（MMS）等の変異剤による処理が挙げられる。

【0084】

なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。また、タンパク質に複数のアイソザイムが存在する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、複数のアイソザイムの全ての活性を低下させてもよく、一部のみを活性を低下させてもよい。すなわち、例えば、それらのアイソザイムをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。また、例えば、それらのアイソザイムをコードする複数の遺伝子の内、一部を破壊し、残りの発現を低下させてもよい。

【0085】

本発明の酵母が2倍体以上の倍数性を有する場合には、本発明の酵母は、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、タンパク質の活性が低下するように改変された染色体と

10

20

30

40

50

野生型染色体とをヘテロで有していてもよく、タンパク質の活性が低下するように改変された染色体をホモで有していてもよい。通常は、本発明の酵母は、タンパク質の活性が低下するように改変された遺伝子をホモで有しているのが好ましい。

【0086】

タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

【0087】

タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が低下したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が低下したことは、同遺伝子の転写量が低下したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が低下したことを確認することにより確認できる。

10

【0088】

遺伝子の転写量が低下したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことが出来る。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

【0089】

タンパク質の量が低下したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことが出来る (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

20

【0090】

遺伝子が破壊されたことは、破壊に用いた手段に応じて、同遺伝子の一部または全部の塩基配列、制限酵素地図、または全長等を決定することで確認できる。

【0091】

上記したタンパク質の活性を低下させる手法は、任意のタンパク質、例えばアセト乳酸シンターゼ、の活性低下や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現低下に利用できる。

30

【0092】

<2>酵母エキスの製造法

本発明の酵母は、酵母エキスを製造するための原料として利用できる。すなわち、本発明は、本発明の酵母を原料として用いて酵母エキスを調製することを含む、酵母エキスの製造方法を提供する。本発明の酵母を原料として製造される酵母エキスを、「本発明の酵母エキス」ともいう。本発明の酵母エキスは、本発明の酵母を原料として用いる以外は、通常の酵母エキスと同様に製造することができる。以下、本発明の酵母エキスを製造する方法を説明する。

【0093】

まず、本発明の酵母を培地で培養する。使用する培地は、本発明の酵母が増殖でき、Abu関連化合物が生成蓄積される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、酵母の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。培地として、具体的には、例えば、SD培地、SG培地、SDTE培地が挙げられるが、これらに限定されない。培地としては、例えば、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有する培地を用いることができる。培地成分の種類や濃度は、使用する酵母の種類や生成蓄積するAbu関連化合物の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

40

【0094】

炭素源は、本発明の酵母が資化してAbu関連化合物を生成し得るものであれば、特に限定されない。炭素源として、具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、スクロー

50

ス、ラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、廃糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマスの加水分解物等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸等の有機酸類、グリセロール、粗グリセロール、エタノール等のアルコール類、脂肪酸類が挙げられる。炭素源としては、1種の炭素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせ用いてもよい。

【0095】

窒素源として、具体的には、例えば、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等のアンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆タンパク質分解物等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせ用いてもよい。

10

【0096】

リン酸源として、具体的には、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上のリン酸源を組み合わせ用いてもよい。

【0097】

硫黄源として、具体的には、例えば、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせ用いてもよい。

【0098】

20

その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量元素類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク質分解物等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分や無機成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせ用いてもよい。

【0099】

また、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、培地に要求される栄養素を補添することが好ましい。例えば、アセト乳酸シンターゼ活性が低下した株の培養には、イソロイシンやバリンを補填した培地を用いるのが好ましい。

30

【0100】

また、本発明の酵母は、Abu関連化合物が補填されていない培地で培養した場合でも、菌体内にAbu関連化合物を生成蓄積できるが、培地にAbu関連化合物を補添してもよい。培地に補填されるAbu関連化合物は、1種であってもよく、2種またはそれ以上であってもよい。

【0101】

培養条件は、本発明の酵母が増殖でき、Abu関連化合物が生成蓄積される限り、特に制限されない。培養は、例えば、酵母の培養に用いられる通常のことで行うことができる。培養条件は、使用する酵母の種類や生成蓄積するAbu関連化合物の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

40

【0102】

培養は、例えば、液体培地を用いて、通気培養または振盪培養により、好氣的に行うことができる。培養温度は、例えば、25～35℃、より好ましくは27～33℃、さらに好ましくは28～32℃であってよい。培養期間は、例えば、5時間以上、10時間以上、または15時間以上であってよく、120時間以下、72時間以下、または48時間以下であってよい。培養は、回分培養(batch culture)、流加培養(Fed-batch culture)、連続培養(continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。

【0103】

上記のようにして本発明の酵母を培養することにより、酵母の細胞内にAbu関連化合物

50

が蓄積し、Abu関連化合物を高含有する酵母が得られる。

【0104】

得られた酵母からの酵母エキスの調製は、通常の酵母エキスの調製と同様にして行えばよい。酵母エキスは、酵母菌体を熱水抽出したものを処理したものでもよいし、酵母菌体を消化したものを処理したものでもよい。また、必要に応じて得られた酵母エキスを濃縮してもよいし、乾燥し粉末の形態にしてもよい。

【0105】

上記のようにして、Abu関連化合物を高含有する酵母エキス（本発明の酵母エキス）が得られる。本発明の酵母エキスは、酵母エキス中の固形分全量に対し、Abu関連化合物を乾燥重量として一定量含む。本発明の酵母エキスは、例えばAbuを、好ましくは0.1重量%以上、より好ましくは0.5重量%以上、さらに好ましくは1.0重量%以上、特に好ましくは5.0重量%以上含有してよい。また、本発明の酵母エキスは、例えば γ -Glu-Abuを、好ましくは0.1重量%以上、より好ましくは1.0重量%以上、さらに好ましくは2.0重量%以上、特に好ましくは20重量%以上含有してよい。また、本発明の酵母エキスは、例えば γ -Glu-Abu-Glyを、好ましくは0.1重量%以上、より好ましくは0.5重量%以上、さらに好ましくは1.0重量%以上、特に好ましくは2重量%以上含有してよい。

【0106】

<3> Abu関連化合物の製造法

また、本発明の酵母の培養物からAbu関連化合物を回収することもできる。すなわち、本発明は、本発明の酵母を培地で培養すること、および培養物からAbu関連化合物を回収することを含む、Abu関連化合物の製造方法を提供する。培養方法は上述した通りである。本発明においては、例えば、菌体内に蓄積したAbu関連化合物を回収することができる。また、Abu関連化合物が培地にも蓄積する場合は、培地に蓄積したAbu関連化合物を回収してもよい。

【0107】

Abu関連化合物の回収は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法、膜処理法、沈殿法、および晶析法が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせる用いることができる。なお、菌体内に蓄積したAbu関連化合物を回収する場合は、例えば、菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去し、得られた上清からイオン交換樹脂法等によりAbu関連化合物を回収することができる。回収されるAbu関連化合物は、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってよい。

【0108】

塩は、経口摂取可能なものであれば特に制限されない。例えば、カルボキシル基等の酸性基に対する塩としては、具体的には、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸との塩が挙げられる。また、例えば、アミノ基等の塩基性基に対する塩としては、具体的には、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸、メチルマロン酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩が挙げられる。なお、塩としては、1種の塩を用いてもよく、2種またはそれ以上の塩を組み合わせる用いてもよい。

【0109】

尚、回収されるAbu関連化合物は、Abu関連化合物以外に、例えば、酵母菌体、培地成分、水分、及び酵母の代謝副産物等の成分を含んでいてもよい。回収されたAbu関連化合物の純度は、例えば、30% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w)

以上、90% (w/w) 以上、または95% (w/w) 以上であってよい。

【0110】

<4>本発明の飲食品

上記のようにして得られるAbu関連化合物および／または酵母エキ스는、飲食品の製造に用いることができる。すなわち、本発明は、上記方法により得られるAbu関連化合物および／または酵母エキスを飲食品またはその原料に添加することを含む、飲食品の製造方法を提供する。このようにして製造される飲食品を、「本発明の飲食品」ともいう。また、一態様においては、Abu関連化合物および／または酵母エキスの添加により、飲食品に「コク味」を付与することができる。飲食品としては、例えば、アルコール飲料、パン食品、発酵食品調味料が挙げられる。

10

【0111】

本発明の飲食品は、Abu関連化合物および／または酵母エキスを添加すること以外は、通常の飲食品と同様の原料を用い、同様の方法によって製造することができる。このような原料としては、例えば、アルコール飲料では米、大麦、コーンスターチ等が、パン食品では小麦粉、砂糖、食塩、バター、発酵用酵母菌等が、発酵食品調味料では大豆、小麦等が挙げられる。Abu関連化合物および／または酵母エキスの添加は、飲食品の製造工程のいずれの段階で行われてもよい。すなわち、Abu関連化合物および／または酵母エキ스는、飲食品の原料に添加されてもよく、製造途中の飲食品に添加されてもよく、完成した飲食品に添加されてもよい。また、酵母エキスもしくはその濃縮物、またはそれらを乾燥したものは、それ自体で発酵食品調味料として用いることもできる。

20

【0112】

Abu関連化合物および／または酵母エキスの添加量は特に制限されず、飲食品の種類や飲食品の摂取態様等の諸条件に応じて適宜設定することができる。Abu関連化合物および／または酵母エキ스는、飲食品またはその原料に対して、Abu関連化合物量に換算して、例えば、1 ppm (w/w) 以上、100 ppm (w/w) 以上、または1% (w/w) 以上添加してよい。また、Abu関連化合物および／または酵母エキ스는、飲食品またはその原料に対して、Abu関連化合物量に換算して、例えば、100% (w/w) 以下、10% (w/w) 以下、または1% (w/w) 以下添加してよい。

【実施例】

【0113】

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

30

【0114】

<実施例1> 2-アミノ酪酸生合成系酵素の活性が増強され、かつアセト乳酸シンターゼ遺伝子 (ILV2) 発現が弱化されたM013Y株の構築

2-アミノ酪酸生成能強化を目的として、2-アミノ酪酸生合成系酵素の活性が増強され、かつアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子 (ILV2) の発現を弱化した酵母株 (M013Y株) を、以下の手順により作製した。

【0115】

親株として、*Saccharomyces cerevisiae* AG1 ura3-株 (特開2012-213376) を用いた。AG1 ura3-株は、*Saccharomyces cerevisiae* Y006株 (FERM BP-11299) のγ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子 (GSH1) の発現増強株である。AG1 ura3-株は、URA3遺伝子を欠損しており、ウラシル要求性を示す。

40

【0116】

Sofyanovichらの方法 (Olga A. Sofyanovich et al: A New Method for Repeated “Self-Cloning” Promoter Replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biotechnol., 48, 218-227 (2011)) に基づき、AG1 ura3-株の分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素遺伝子 (BAT1) のプロモーターを構成発現プロモーターであるグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素遺伝子 (TDH3) のプロモーター領域 (以下、pTDH3ともいう) に置換した株を作製した。手順を以下に示す。5'端にBAT1の上流配列を有する配列番号1のプライマー (5'-GCCAGGCGTTGATACTTTGTGCAGATTTTCATACCGCTGTCGCTATTATTACTGATGAATTGGCTCTCTTTTGTTTAA

50

TCTTAACCCAACTGCACAGA -3')、及びBAT1遺伝子の開始コドンから始まる一部のORF内配列を有する配列番号2のプライマー (5' - TTGGATGCATCTAATGGGGCACCAGTAGCGAGTGTCTGATGGA GAATTTCCCAACTTCAAGGAATGTCTCTGCAACATTTGTTTATGTGTGTTTATTC -3') を用い、pUC19-URA3-pTDH3-URA3プラスミド (前述のSofyanovichらの報告に記載) を鋳型にPCRを行い、TDH3プロモーターに挟まれたURA3を有するDNA断片を得た。PCRの条件は、熱変性 (94°C、10 sec)、アニーリング (60°C、10 sec)、伸張 (72°C、4 min)、25 cycleとした。このDNA断片でAG1 ura3-株を形質転換し、ウラシルを含有しないSD平板培地に塗布した。生育した形質転換体から、BAT1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を取得した。以下にSD培地の調製方法を示す。SD平板培地はSD培地にBacto-agarを2%となるよう加えて作製した。

10

【0117】

[SD培地組成]

D(+)-グルコース	20 g
10 x YNB	100 mL
MilliQ水	up to 1 L
	1 L

SD培地は、オートクレーブ滅菌したグルコースとフィルター滅菌したYNBを上記組成になるように混合し、オートクレーブ滅菌したMilliQ水でメスアップして調製した。

10 x YNBは次のようにして調製した。MilliQ水1 Lに対し17 gのDifco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate及び50 gの硫酸アンモニウムを溶解させ、pH5.2になるように調整し、フィルター滅菌した。ビタミンの分解を防ぐため冷暗所に保管した。

20

【0118】

URA3遺伝子が欠損した株は5-フルオロオロト酸 (5-FOA) 耐性を示すため、5-FOAを含有する培地を利用してURA3選択マーカーが除去された株を選抜できる。そこで、BAT1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を、ウラシル添加SD培地で一晚培養し、適量を5-FOA平板培地に塗布した。生育したコロニーから、導入された2つのTDH3プロモーター間の相同組換えにより、URA3が除去され、BAT1のプロモーターがTDH3プロモーターに置換された株 (AG1 pTDH3-BAT1 ura3- 株) を取得した。なお、5-FOA平板培地は以下のように調製した。

30

【0119】

[5-FOA平板培地組成]

酵母生育培地パウチ SD/-Ura Broth	2 pouches
Uracil	50 mg
5-FOA	1 g
10 x YNB	100 mL
Bacto-agar	20 g
MilliQ水	up to 1 L
	1 L

酵母生育培地パウチ SD/-Ura Broth (クロンテック社)、Uracil、5-FOA、及び10 x YNBを混合し、MilliQ水で500 mLにメスアップしてフィルター滅菌したものと、Bacto-agarをMilliQ水で500 mLにメスアップしオートクレーブ滅菌したものとを混合して、5-FOA平板培地を作製した。

40

【0120】

次に、同じくSofyanovichらの方法に基づき、上記の方法で得られたAG1 pTDH1-BAT1 ura3-株のセリン脱アミノ化酵素遺伝子 (CHA1) のプロモーターを構成発現プロモーターであるpTDH3に置換した株を作製した。手順を以下に示す。なお、AG1 pTDH3-BAT1 ura3-株はURA3遺伝子の欠損株でありウラシル要求性を示す。5'端にCHA1の上流配列を有する配列番号3のプライマー (5' - GAGTACTAATCACC CGGAACGAACTAATGAGTCCTCTGCGCGGAGACATGATTC CGCATGGGCGGCTCCTGTTAAGCCTCTTAACCCAACTGCACAGA-3')、及びCHA1遺伝子の開始コドンか

50

ら始まる一部のORF内配列を有する配列番号4のプライマー（5' - TATTTCAAGAAAAATTGTGCA GAAGCCTTTCCGGGAAGAATTGACGTAATAATGGTGTGTTTATTGTAGACTATCGACATTTGTTTATGTGTGTTTATTC -3'）を用い、pUC19-URA3-pTDH3-URA3プラスミドを鋳型にPCRを行い、TDH3プロモーターに挟まれたURA3を有するDNA断片を得た。PCRの条件は、熱変性（94℃、10 sec）、アニーリング（60℃、10 sec）、伸張（72℃、4 min）、25 cycleとした。このDNA断片でAG1 pTDH3-BAT1 ura3-株を形質転換し、ウラシルを含有しないSD平板培地に塗布した。生育した形質転換体から、CHA1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を取得した。更に、CHA1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を、ウラシル添加SD培地で一晚培養し、適量を5-FOA平板培地に塗布した。生育したコロニーから、導入された2つのTDH3プロモーター間の相同組換えにより、URA3が除去され、CHA1のプロモーターがTDH3プロモーターに置換された株（AG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 ura3- 株）を取得した。

【0121】

次に、同じくSofyanovichらの方法に基づき、上記の方法で得られたAG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 ura3-株のスレオニン脱アミノ化酵素遺伝子（ILV1）のプロモーターを構成発現プロモーターであるpTDH3に置換した株を作製した。手順を以下に示す。なお、AG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 ura3-株はURA3遺伝子の欠損株でありウラシル要求性を示す。5'端にILV1の上流配列を有する配列番号5のプライマー（5' -CTCTTTATTGCATATTATCTCTGCTATTTTGTG ACGTTCAATTTTAATTGACGCGAAAAAGAAAAATAAGAAGGGCAAATCTTAACCCAACTGCACAGA -3'）、及びILV1遺伝子の開始コドンから始まる一部のORF内配列を有する配列番号6のプライマー（5' - AGGTTCAATCCAGACACTTTGGACTGTTTACCTTGCCGAACAACCGTACATAATGGTTGCTTTAGTAGAGTAGCTGACATTTGTTTATGTGTGTTTATTC -3'）を用い、pUC19-URA3-pTDH3-URA3プラスミドを鋳型にPCRを行い、TDH3プロモーターに挟まれたURA3を有するDNA断片を得た。PCRの条件は、熱変性（94℃、10 sec）、アニーリング（60℃、10 sec）、伸張（72℃、4 min）、25 cycleとした。このDNA断片でAG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 ura3-株を形質転換し、ウラシルを含有しないSD平板培地に塗布した。生育した形質転換体から、ILV1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を取得した。更に、ILV1プロモーターがpTDH3-URA3-pTDH3に置換された株を、ウラシル添加SD培地で一晚培養し、適量を5-FOA平板培地に塗布した。生育したコロニーから、導入された2つのTDH3プロモーター間の相同組換えにより、URA3が除去され、ILV1のプロモーターがTDH3プロモーターに置換された株（AG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 pTDH3-ILV1 ura3- 株）を取得した。以下、本菌株をM007Y-ura3Δ0株と称し、常法（特開2012-213376）に基づきM007Y-ura3Δ0株にURA3遺伝子を相補した菌株をM007Y株と称す。

【0122】

このM007Y-ura3Δ0株を親株に、同じくSofyanovichらの方法に基づき、アセト乳酸シンターゼ遺伝子（ILV2）のプロモーターをガラクトース誘導性のガラクトキナーゼ遺伝子（GAL1）のプロモーター（以下、pGAL1ともいう）に置換した株を作製した。手順を以下に示す。5'端にILV2の上流配列を有する配列番号7のプライマー（5' - TATCTGGTTGATATATAT GCTATCATTTATTTTCTTATCAAGTTTCCAAATTTCTAATCCTTTCTCCACCATCCCTAATTCTTAACCCAACTGCACAG A -3'）、及びILV2遺伝子の開始コドンから始まる一部のORF内配列を有する配列番号8のプライマー（5' - GGTGTGTTGCGGTATGCTATATGTTGAAAGCAACGCTTAATAGCGAAGTTTTTTAGCGTAGAT TGTCTGATCATGTTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTA-3'）を用い、pUC19-URA3-pGAL1-URA3プラスミド（前述のSofyanovichらの報告に記載）を鋳型にPCRを行い、GAL1プロモーターに挟まれたURA3を有するDNA断片を得た。PCRの条件は、熱変性（94℃、10 sec）、アニーリング（60℃、10 sec）、伸張（72℃、4 min）、25 cycleとした。このDNA断片でM007Y-ura3Δ0株を形質転換し、ウラシルを含有しないSG平板培地に塗布した。生育した形質転換体から、ILV2プロモーターがpGAL1-URA3-pGAL1に置換された株を取得した。以下にSG培地の調整方法を示す。SG平板培地はSG培地にBacto-agarを2%となるよう加えて作製した。

【0123】

[SG培地組成]

D(+)-ガラクトース

20 g

10

20

30

40

50

10 x YNB	100 mL
MilliQ水	up to 1 L
	1 L

SG培地は、オートクレーブ滅菌したグルコースとフィルター滅菌したYNBを上記組成になるように混合し、オートクレーブ滅菌したMilliQ水でメスアップして調製した。

【0124】

次に、ILV2プロモーターがpGAL1-URA3-pGAL1に置換された株を、ウラシル添加SG培地で一晚培養し、適量を5-FOA平板培地に塗布した。生育したコロニーから、導入された2つのGAL1プロモーター間の相同組換えにより、URA3が除去され、ILV2のプロモーターがGAL1プロモーターに置換された株（AG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 pTDH3-ILV1 pGAL1-ILV2 ura3 - 株）を取得した。以下、本菌株をM013Y-ura3 Δ0株と称し、常法に基づきM013Y-ura3 Δ0株にURA3遺伝子を相補した菌株をM013Y株と称す。

10

【0125】

<実施例2> M007Y株とM013Y株のILV2遺伝子のmRNA発現量及びAbu関連化合物量の解析

（1）培養およびサンプリング

実施例1で構築したM007Y株及びM013Y株を、各々、500 mL容坂口フラスコに50 mL張り込んだSD培地に1エーゼ分植菌し、30℃、120 rpmで24時間振とう培養した。

【0126】

得られた培養液の吸光度を測定し、OD600が0.01になるように、500 mL容坂口フラスコに70 mL張り込んだSD培地に植菌し、30℃、120 rpmで約18時間振とう培養した（本培養）。なお、吸光度は、BECKMAN COULTER社のDU640 SPECTROPHOTOMETERを用いて測定した。OD600が1.5になるタイミングで培養液をサンプリングした。

20

【0127】

（2）M007Y株及びM013Y株のILV2 mRNA発現量の解析

上記方法にて得られた培養液4 mLに含まれる菌体を遠心分離によって採取した。上清は可能な限り取り除き、菌体を1 mLの水に懸濁した。再度遠心分離により菌体を集菌し1 mLの水に懸濁した。この操作を2回繰り返すことにより得られた酵母菌体から、キアゲン社のRNeasy Mini Kitを用いてTotal RNAを回収した。抽出したRNAのうち500 ngを、タカラバイオ社のPrimeScript RT reagent Kitにて37℃で15分反応させ、cDNAを作製した。この際、RT-PCRのネガティブコントロールとして用いるため、逆転写酵素を入れずに反応を行ったサンプルを用意した。

30

【0128】

続いて、アプライド・バイオシステム社のPower SYBR Greenを用いて反応液を調製した。ILV2のcDNAの検出には配列番号9および10に示すプライマーを用いた。また、配列番号11および12に示すプライマーでACT1のcDNAを増幅し内部標準とした。cDNA液は10倍希釈液、50倍希釈液、100倍希釈液、及び500倍希釈液の4つの希釈率の異なる液を用いた。RT-PCR反応には、アプライド・バイオシステムズ社の7500 Real Time PCR Systemを用いた。

【0129】

上記方法にて定量RT-PCRを行った結果、図1に示す通り、ILV2プロモーターを置換したM013Y株は、親株のM007Y株と比較して、ILV2 mRNA発現量が低下していることが明らかになった。この結果より、ILV2プロモーターを置換したM013Y株においては、グルコースを炭素源とするSD培地においてGAL1プロモーターからの発現が誘導されず、ILV2 mRNA発現が抑制されていることが確認された。

40

【0130】

（3）M007Y株及びM013Y株の菌体内のAbu、γ-Glu-Abu、及びγ-Glu-Abu-Gly含量の解析

得られた培養液から、40 ODunit（OD600が1である培養液1 mLに含まれる菌体を1 ODunitと定義する。）分の菌体を遠心分離により採取した。上清は可能な限り取り除き、残った菌体を45 mLのmilliQ水に懸濁した。再度遠心分離により菌体を集菌し、45 mLのmilliQ水に再懸濁した。この操作を累計3回繰り返すことにより、菌体から培地成分を完全に除去した。得られた洗浄菌体は、約1.5 mLのmilliQ水に懸濁し、70℃で10分間加熱した。こ

50

の工程にて菌体内に含まれるエキスを抽出した。次に、遠心操作によりエキスを含む画分と菌体残渣を分離した。

【0131】

エキスを含有する画分から10kDaの遠心濾過膜（MILLIPORE社：Amicon Ultra - 0.5 mL 10 K（カタログ番号UFC501096））を用いて細胞デブリを除去し、得られた濾液を解析サンプルとした。

【0132】

サンプル中のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量は、公知の方法（W02011/129462の実施例1）に準じて、サンプル中の当該化合物をAQC試薬にて誘導体化し、LC-MS/MSにより測定した。W02011/129462の実施例1に記載の測定条件からの変更点は、下記の通りである。

変更点1：サンプルの誘導体化時に使用する5 μ Mの内部標準物質として、5 μ Mの3-methyl-His-d2（シグマ社、安定同位体で標識されている。）と5 μ MのGly-d2（シグマ社、安定同位体で標識されている。）からなる標準液を用いた。

変更点2：下記表1に記載の質量を質量分析計での選択イオンに用いた。

変更点3：定量を行うための内部標準物質として、Abuの誘導体化物の測定には3-methyl-His-d3の誘導体化物を、 γ -Glu-Abu又は γ -Glu-Abu-Glyの誘導体化物の測定にGly-d2の誘導体化物を、各々用いた。なお、 γ -Glu-Abuの定量の際に、極まれにサンプルによって夾雑ピークが見られた場合は、第二のマスアナライザーでの選択イオンを、145.2、或いは、104.1に変更して定量した。

【0133】

【表1】

表1

誘導体化物	第一のマスアナライザー (Q1)	第二のマスアナライザー (Q3)
Abu	274.2	171.1
γ -Glu-Abu	403.4	171.1
γ -Glu-Abu-Gly	460.4	171.1
Gly-d2	248	171.1

【0134】

また、乾燥菌体重量は、洗浄菌体を4時間、104℃で乾燥させてから測定した。

【0135】

このようにして測定した一定量の培養液に含まれるAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの濃度を乾燥菌体重量で割り、乾燥菌体重量あたりのAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの含量を算出した。

【0136】

その結果、図2に示すように、M013Y株では親株であるM007Y株と比較して菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量が上昇した。このように、酵母のアセト乳酸シンターゼ酵素活性を弱化させることにより、酵母細胞内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの含量を高められることが判明した。また、本実施例においては、本培養にてOD600=1.5になるタイミングは両菌株共に15時間目であり、アセト乳酸シンターゼ遺伝子の発現弱化による生育の悪化は認められなかった。詳細な解析から、M007Y株にはILV2遺伝子が2コピー以上存在することが推測された。

【0137】

<実施例3> アセト乳酸シンターゼ遺伝子（ILV2）発現がさらに弱化したM014Y株の構築

上述の通り、M007Y株には、ILV2遺伝子が2コピー以上存在することが推測された。そこで、以下の手順により、M013Y株を親株にもう1コピーのILV2遺伝子を破壊し、アセト乳酸シンターゼ活性がさらに低下した株（M014Y）を作製した。

【0138】

(1) ILV2遺伝子破壊株の構築

ILV2の開始コドンより上流80塩基を付加した配列番号13のプライマー（5'- GTTACAATAG AAAGTATTTTACAAAATCTAAACCCCTTTGAGCTAAGAGGAGATAAATACAACAGAATCAATTTTCAAAAGGGCAACGGTT CATCATC -3'）及びILV2の終止コドンより下流80塩基を付加した配列番号14のプライマー

（5'- TATAAGAAGCACGATTAAATAATAATAAAGTCTGCATTTTTTACTGAAAATGCTTTTGAAATAAATGTTTTTGA AATATTAGATATATATACGCCAG -3'）を用い、*Saccharomyces cerevisiae* S288C株のゲノムDNAを鋳型として、URA3遺伝子を含むDNA断片を増幅した。なお、S288C株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（NBRC：NITE Biological Resource Center；〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）にNBRC1136の番号で保存されており、分譲を受けることができる。また、同株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America）にもATCC26108の番号で保存されており、分譲を受けることができる。PCRの条件は、熱変性（94℃、10 sec）、アニーリング（50℃、10 sec）、伸張（72℃、3min）、30 cycleとした。得られたDNA断片でM013Y-ura3Δ株を形質転換し、ウラシルを含有しないSD培地に塗布した。生育した形質転換体からILV2遺伝子を欠損した株（AG1 pTDH3-BAT1 pTDH3-CHA1 pTDH3-ILV1 pGAL1-ILV2 *ilv2::URA3*株）を得た。以下、本菌株をM014Y株と称する。

【0139】

(2) M014Y株のイソロイシン及びバリンに対する要求性の確認

実施例1で構築したM007Y株及びM013Y株、本実施例で構築したM014Y株を、バリン及びイソロイシンを含まないSD平板培地に植菌し、生育の有無を評価した。その結果、M007Y株及びM013Y株が生育可能であった一方で、M014Y株は生育不可能であることが明らかになった（表2）。すなわち、M014Y株は、ILV2破壊によりイソロイシン及びバリン要求性となっていることが確認された。

【0140】

【表2】

表2

菌株	SD平板培地での生育
M007Y（親株）	生育可能
M013Y（ILV2プロモーター置換株）	生育可能
M014Y（ILV2遺伝子破壊株）	生育できず

【0141】

<実施例4> M014Y株のILV2遺伝子のmRNA発現量及びAbu関連化合物量の解析

(1) 培養およびサンプリング

実施例3で構築したM014Y株（ILV2破壊株）ならびに実施例1で構築したM007Y株（親株）及びM013Y（ILV2プロモーター置換株）を、各々、500 mL容坂口フラスコに50 mL張り込んだイソロイシン及びバリンを添加したSD培地に1 ユーゼ分植菌し、30℃、120rpmで24時間振とう培養した。得られた培養液の吸光度を測定し、初発OD600が0.01になるように、500 mL容坂口フラスコに70 mL張り込んだSD培地に植菌し、30℃、120rpmで培養した。なお、吸光度は、BECKMAN COULTER社のDU640 SPECTROPHOTOMETERを用いて測定した。OD600が1.5になるタイミングで培養液をサンプリングした。OD600が1.5になるタイミングは、M007Y株及びM013Y株では18時間、M014Y株では47時間であった。

【0142】

(2) M014Y株のILV2 mRNA発現量の解析

実施例2（2）と同様の方法で、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株のILV2 mRNA発現量を解析したところ、図3に示す通り、M014Y株のILV2 mRNA発現量は、M007Y株及びM013Y株と比較して大幅に減少していた。

【0143】

(3) M014Y株の菌体内のAbu、γ-Glu-Abu、及びγ-Glu-Abu-Gly含量の解析

実施例 2 (3) と同様の方法で、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの含量を測定したところ、図 4 に示す通り、M014Y株の菌体内のこれら化合物の含量は、M007Y株及びM013Y株と比較して大幅に上昇していた。すなわち、アセト乳酸シンターゼの活性の低下により、酵母細胞内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの蓄積量が大幅に増加することが判明した。

【0144】

<実施例 5> 取得菌株のSDTE培地での培養評価

次に、M007Y株、M013Y株、及びM014Y株を評価する為にSDTE培地を設計した。SDTE培地は以下のように調製した。

【0145】

[SDTE培地組成]

D(+)-グルコース	20 g
Thr	1 g
Glu	1 g
10 x YNB (-硫酸アンモニウム)	100 mL
水	up to 1 L
	1 L

10 x YNB (-硫酸アンモニウム) は次のようにして調製した。MilliQ水1 Lに対し17 gのDifco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfateを溶解させ、pH5.2になるように調整し、フィルター滅菌した。保存する場合は冷暗所で行なった。

【0146】

このSDTE培地にイソロイシン及びバリンを添加した培地にて、実施例 1 で構築したM007Y及びM013Y株、実施例 3 で構築したM014Y株を培養し、実施例 2 (3) と同様の方法で菌体内のAbu関連化合物の含量を測定した。その結果、M014Y株の菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量は、M007Y及びM013Y株と比較して大幅に上昇していた(図 5)。このことから、培地条件によらず、アセト乳酸シンターゼ活性の低下が、酵母菌体内でのAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの蓄積に効果的であることが明らかになった。

【0147】

<実施例 6> 2-アミノ酪酸生合成酵素の活性が増強されておらず、アセト乳酸シンターゼ遺伝子(ILV2)の発現が弱化した株の構築

実施例 4 において、2-アミノ酪酸生合成酵素(α -ケト酪酸合成酵素及びアミノ基転移酵素)の活性および γ -グルタミルシステイン合成酵素活性が増大するように改変した酵母(M014Y株)において、アセト乳酸シンターゼ活性が低下するように改変することにより、酵母細胞内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Glyの蓄積量が大幅に増加することが判明した。そこで、本実施例では、2-アミノ酪酸生合成経路酵素および γ -グルタミルシステイン合成酵素の活性の増強なしに、アセト乳酸シンターゼ活性の低下のみで酵母菌体内のAbu、 γ -Glu-Abu、及び γ -Glu-Abu-Gly含量が上昇するかを検討した。

【0148】

(1) ILV2遺伝子破壊株の構築

アセト乳酸シンターゼ活性の低下を目的に、*Saccharomyces cerevisiae* Y006株(FERM BP-11299)のアセト乳酸シンターゼ遺伝子(ILV2)を破壊した株を以下の手順により作製した。

【0149】

まず、配列番号 25 (GACAGTAAACGCAGGTTAT) および 26 (TCTAGAAGAGTTGTTATTTTC) に示すプライマーを用い、YEAST KNOCK OUT STRAIN COLLECTION (フナコシ、YCS1056) のILV2破壊株ゲノムを鋳型に、カナマイシン耐性遺伝子カセットKanMXに置換されたILV2を含む領域を増幅した。PCRの条件は、熱変性(94°C, 10 sec)、アニーリング(50°C, 10 sec)、伸張(72°C, 3 min)、25 cycleとした。次に、エタノール沈殿によってDNA断片を精製した後、Y006株を形質転換し、G418を添加したYPD平板培地に菌体を塗布した。生育した形質転換体からILV2遺伝子がKanMXに置換された株(ILV2::KanMX株)を取得した。以

10

20

30

40

50

下、本菌株をM015Y株と称する。以下にYPD培地の調製方法を示す。YPD平板培地はYPD培地にBacto-agarを2%となるよう加えて作製した。

【0150】

[YPD培地組成]

D(+)-グルコース	20 g
Yeast extract	10 g
Polypeptone	20 g
MilliQ水	up to 1 L
	1 L

G418二硫酸塩（シグマ社）を200 mg/Lとなるように添加して使用した。

10

【0151】

(2) M015Y株のイソロイシン及びバリンに対する要求性の確認

本実施例で構築したM015Y株と親株のY006株を、バリン及びイソロイシンを含まないSD平板培地に植菌し、生育の有無を評価した。その結果、Y006株が生育可能であった一方で、M015Y株は生育不可能であることが明らかになった（表3）。すなわち、M015Y株は、ILV2破壊によりイソロイシン及びバリン要求性となっていることが確認された。

【0152】

【表3】

表3

菌株	SD平板培地での生育
Y006（親株）	生育可能
M015Y株（ILV2遺伝子破壊株）	生育できず

20

【0153】

<実施例7> M015Y株のSD培地及びSDTE培地での培養評価

次に、SD培地及びSDTE培地にイソロイシン及びバリンを添加した培地にて、M015Y株とY006株を培養し、実施例2(3)と同様の方法で菌体内のAbu関連化合物の含量を測定した。その結果、SD培地で培養した条件において、M015Y株の菌体内のAbu及びγ-Glu-Abu含量は、親株のY006株と比較して大幅に上昇していた（図6）。また、SDTE培地で培養した条件においては、Abu、γ-Glu-Abu、及びγ-Glu-Abu-Gly含量の増加が観察された（図7）。このことから、2-アミノ酪酸生合成経路酵素（α-ケト酪酸合成酵素及びアミノ基転移酵素）の活性およびγ-グルタミルシステイン合成酵素活性が増大するように改変していない酵母においても、アセト乳酸シンターゼ活性の低下が、酵母菌体内でのAbu、γ-Glu-Abu、及び／又はγ-Glu-Abu-Glyの蓄積に効果的であることが明らかになった。

30

【産業上の利用可能性】

【0154】

本発明により、Abu、γ-Glu-Abu、及び／又はγ-Glu-Abu-Glyを高含有する酵母および酵母エキスが提供される。

【0155】

<配列表の説明>

40

配列番号1～14：プライマー

配列番号15：Saccharomyces cerevisiae S288CのILV2遺伝子の塩基配列

配列番号16：Saccharomyces cerevisiae S288CのIlv2タンパク質のアミノ酸配列

配列番号17：Saccharomyces cerevisiae S288CのCHA1遺伝子の塩基配列

配列番号18：Saccharomyces cerevisiae S288CのCha1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号19：Saccharomyces cerevisiae S288CのILV1遺伝子の塩基配列

配列番号20：Saccharomyces cerevisiae S288CのIlv1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号21：Saccharomyces cerevisiae S288CのBAT1遺伝子の塩基配列

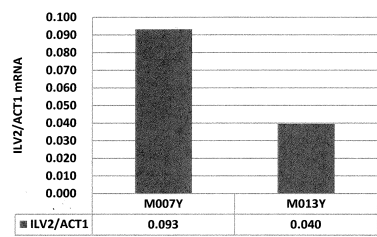
配列番号22：Saccharomyces cerevisiae S288CのBat1タンパク質のアミノ酸配列

配列番号23：Saccharomyces cerevisiae S288CのGSH1遺伝子の塩基配列

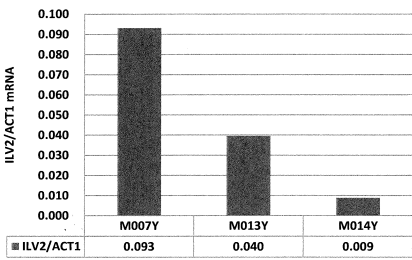
50

配列番号 2 4 : *Saccharomyces cerevisiae* S288CのGsh1タンパク質のアミノ酸配列
配列番号 2 5 ~ 2 6 : プライマー

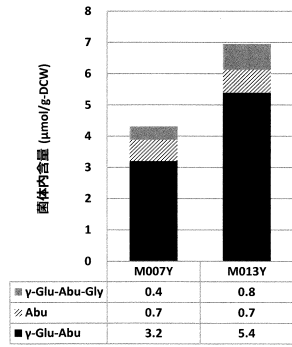
【図 1】



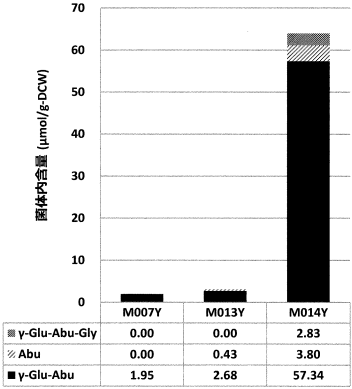
【図 3】



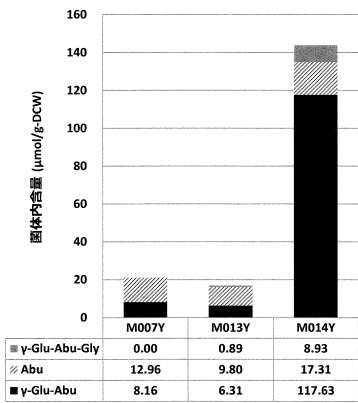
【図 2】



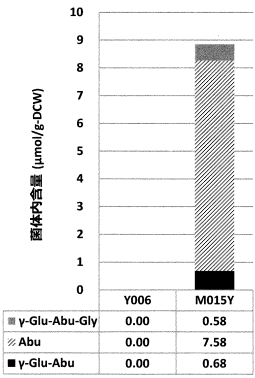
【図 4】



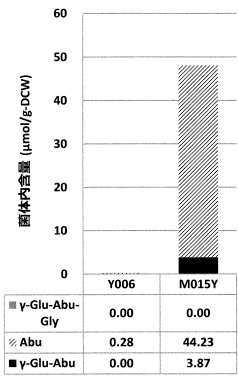
【図 5】



【図 7】



【図 6】



【配列表】

0006489014000001.app

フロントページの続き

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2009-527218 (JP, A)

LIU, Z., et al., Constructing an Amylolytic Brewing Yeast *Saccharomyces pastorianus* Suitable for Accelerated Brewing, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004年, Vol. 98, No. 6, p. 414-419

WANG, Z-Y., et al., Construction of self-cloning industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production, *International Journal of Food Science & Technology*, 2008年, Vol. 43, p. 989-994

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

WPIDS/WPIX (STN)