(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年7月3日(03.07.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/141838 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01) *C12P 13/14* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/047152

(22) 国際出願日： 2023年12月28日(28.12.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(71) 出願人: 味の素株式会社 (**AJINOMOTO CO., INC.**) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 (JP).

(72) 発明者: ▲浜▼野 小関 智恵(**HAMANO KOSEKI, Chie**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 (JP). 井上 公太(**INOUE, Kota**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 (JP). 大西 史人(**ONISHI, Fumito**); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人秀和特許事務所 (**IP FIRM SHUWA**); 〒1050001 東京都港区虎ノ門五丁目１１番２号 オランダヒルズ森タワー１４階 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** L-GLUTAMIC ACID-PRODUCING BACTERIUM AND METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID

(54) 発明の名称： Ｌ－グルタミン酸生産菌およびＬ－グルタミン酸の製造方法

(57) **Abstract:** Provided are a method for producing L-glutamic acid, and bacterium used therein. L-glutamic acid is produced by culturing, in a culture medium, a Corynebacterium having L-glutamic acid-producing ability, the Corynebacterium being modified so as to retain a mutant acetyl-CoA hydrolase gene that codes for a mutant acetyl-CoA hydrolase and having a substitution of a serine residue at position 383 in an amino acid sequence of a wild-type acetyl-CoA hydrolase to another amino acid residue, and collecting L-glutamic acid from the culture medium and/or a bacterial cell.

(57) 要約：Ｌ－グルタミン酸の製造方法およびそれに用いる細菌を提供する。Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されているコリネ型細菌を、培地で培養し、該培地および／または該菌体よりＬ－グルタミン酸を採取することにより、Ｌ－グルタミン酸を製造する。

WO 2025/141838 A1

明　細　書

発明の名称 ：

Ｌ－グルタミン酸生産菌およびＬ－グルタミン酸の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、発酵工業に関し、詳しくは、Ｌ－グルタミン酸の製造方法およびそれに用いる細菌に関する。Ｌ－グルタミン酸は、調味料原料等として産業上有用である。

背景技術

[0002]　Ｌ－アミノ酸は、例えば、Ｌ－アミノ酸生産能を有する細菌等の微生物を用いた発酵法により工業生産されている（非特許文献１）。そのような微生物としては、例えば、自然界から分離した菌株やそれらの変異株が用いられている。また、組換えＤＮＡ技術により微生物のＬ－アミノ酸生産能を向上させることができる。

[0003]　アセチルCoAヒドロラーゼ（Acetyl-CoA hydrolase）は、アセチルCoAを加水分解して補酵素Aと酢酸を生成する反応および／またはその逆反応を触媒する活性を有する酵素であり（非特許文献２）、該酵素活性を低下させることにより、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－バリンおよびアラニンの生産能が増強されることが知られている（特許文献１）。しかしながら、該酵素のアミノ酸配列内の特定の変異が、Ｌ－グルタミン酸生産能の増強に寄与することは知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2006-149214号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：明石邦彦ら著　アミノ酸発酵、学会出版センター、１９５～２１５頁、１９８６年

非特許文献2：KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）ウェブサ

イト：https://www.genome.jp/entry/3.1.2.1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、細菌のＬ－グルタミン酸生産能を向上させる新規な技術を開発し、効率的なＬ－グルタミン酸の製造方法およびそれに用いる細菌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

[0007] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、アセチルCoAヒドロラーゼ（Acetyl-CoA hydrolase）が特定の変異を有するようにコリネ型細菌を改変することにより、同細菌のＬ－グルタミン酸生産能を向上させることができることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

［１］

Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、

野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されている、

コリネ型細菌。

［２］

前記他のアミノ酸が、リシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、システイン、ヒスチジンまたはメチオニンである、［１］に記載のコリネ型細菌。

［３］

前記他のアミノ酸がシステインである、［１］に記載のコリネ型細菌。

［４］

前記野生型アセチルCoAヒドロラーゼが、下記（ａ）、（ｂ）または（ｃ）に記載のタンパク質である、［１］～［３］のいずれかに記載のコリネ型細

菌。

（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ｂ）配列番号２に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質；

（ｃ）配列番号２に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

［５］

前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム（Corynebacterium）属に属する細菌である、［１］～［４］のいずれかに記載のコリネ型細菌。

［６］

前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム・グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）である、［１］～［４］のいずれかに記載のコリネ型細菌。

［７］

変異型yggB遺伝子を保持するように改変されており、

前記変異型yggB遺伝子が、配列番号８のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／また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る、［１］～［６］のいずれかに記載のコリネ型細菌。

［８］

前記変異型yggB遺伝子が、配列番号１０の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る、［７］に記載のコリネ型細菌。

［９］

Ｌ－グルタミン酸の製造方法であって、

［１］～［８］のいずれかに記載のコリネ型細菌を培地で培養し、前記培地中および／または前記細菌の菌体内にＬ－グルタミン酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体よりＬ－グルタミン酸を採取すること、

を含む、

製造方法。

［１０］

野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

［１１］

前記他のアミノ酸が、リシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、システイン、ヒスチジンまたはメチオニンである、［１０］に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

［１２］

前記他のアミノ酸がシステインである、［１０］に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

［１３］

前記野生型アセチルCoAヒドロラーゼが、下記（ａ）、（ｂ）または（ｃ）に記載のタンパク質である、［１０］～［１２］のいずれかに記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ｂ）配列番号２に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質；

（ｃ）配列番号２に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

［１４］

［１０］～［１３］のいずれかに記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株および変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株における、Ｌ－グルタミン酸の蓄積量を示す図。
[図2]野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株および変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株における、Ｌ－グルタミン酸の対糖収率を示す図。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0011] 本発明の方法は、Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－グルタミン酸を蓄積すること、および該培地および／または該菌体よりＬ－グルタミン酸を採取すること、を含むＬ－グルタミン酸の製造方法であって、前記コリネ型細菌が、特定の遺伝子変異を保持するように改変されている、製造方法である。同方法に用いられる細菌を、「本発明の細菌」ともいう。

[0012] ＜１＞本発明の細菌

本発明の細菌は、特定の遺伝子変異を保持するように改変されている、Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌である。

[0013] ＜１－１＞Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌

本発明において、「Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌」とは、培地で培養したときに、Ｌ－グルタミン酸を生成し、回収できる程度に培地中および／または菌体内に蓄積する能力を有するコリネ型細菌をいう。Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌は、非改変株よりも多い量のＬ－グルタミン酸を培地中および／または菌体内に蓄積することができるコリネ型細菌であってよい。「非改変株」とは、特定の遺伝子変異を保持するように改変されていない対照株をいう。すなわち、非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。また、Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌は、好ましくは０．５ｇ／Ｌ以上、より好ましくは１．０ｇ／Ｌ以上の量の目的とするＬ－アミノ酸を培地に蓄積することができるコリネ型細菌であってもよい。

[0014] 本発明の細菌は、Ｌ－グルタミン酸を単独で、あるいはＬ－グルタミン酸とＬ－グルタミン酸以外の１種またはそれ以上のアミノ酸、例えばL体のアミノ酸（Ｌ－アミノ酸ともいう）等、の混合物として、生産し得る。Ｌ－アミノ酸としては、特に制限されないが、Ｌ－アラニン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－シトルリン、Ｌ－システイン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－グルタミン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－オルニチン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシンおよびＬ－バリンが挙げられる。

[0015] 本発明において、「グルタミン酸」、「アミノ酸」という用語は、特記しない限り、それぞれＬ－グルタミン酸、Ｌ－アミノ酸を意味する。

また、本発明において、「Ｌ－グルタミン酸」、「Ｌ－アミノ酸」という用語は、特記しない限り、フリー体のＬ－グルタミン酸、フリー体のＬ－アミノ酸、それらの塩、またはそれらの混合物を意味する。塩については後述する。

[0016] コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム（Corynebacterium）属、ブレビバクテリウム（Brevibacterium）属およびミクロバクテリウム（Microbacterium）属等の属に属する細菌が挙げられる。

[0017] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような種が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム（Corynebacterium acetoacidophilum）

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム（Corynebacterium acetoglutamicum）

コリネバクテリウム・アルカノリティカム（Corynebacterium alkanolyticum）

コリネバクテリウム・カルナエ（Corynebacterium callunae）

コリネバクテリウム・クレナタム（Corynebacterium crenatum）

コリネバクテリウム・グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）

コリネバクテリウム・リリウム（Corynebacterium lilium）

コリネバクテリウム・メラセコーラ（Corynebacterium melassecola）

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス（コリネバクテリウム・エフィシエンス）（Corynebacterium thermoaminogenes（Corynebacterium efficiens））

コリネバクテリウム・ハーキュリス（Corynebacterium herculis）

ブレビバクテリウム・ディバリカタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）（Brevibacterium divaricatum（Corynebacterium glutamicum））

ブレビバクテリウム・フラバム（コリネバクテリウム・グルタミカム）（Brevibacterium flavum（Corynebacterium glutamicum））

ブレビバクテリウム・イマリオフィラム（Brevibacterium immariophilum）

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）（Brevibacterium lactofermentum（Corynebacterium glutamicum））

ブレビバクテリウム・ロゼウム（Brevibacterium roseum）

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム（Brevibacterium saccharolyticum）

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス（Brevibacterium thiogenitalis）

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス（コリネバクテリウム・スタティオニス）（Corynebacterium ammoniagenes（Corynebacterium stationis））

ブレビバクテリウム・アルバム（Brevibacterium album）

ブレビバクテリウム・セリナム（Brevibacterium cerinum）

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム（Microbacterium ammoniaphilum）

[0018] コリネ型細菌としては、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）（旧名称：ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（Brevibacterium lactofermentum））が挙げられる。

[0019] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium crenatum AS1.542

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (Corynebacterium thermoaminogenes) AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (Corynebacterium glutamicum) ATCC 14020

Brevibacterium flavum (Corynebacterium glutamicum) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (Corynebacterium glutamicum) ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagenes (Corynebacterium stationis) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

[0020] コリネ型細菌として、さらに特には、Brevibacterium lactofermentum（新名称：Corynebacterium glutamicum）ATCC 13869が挙げられる。

また、コリネ型細菌として、Corynebacterium glutamicum ATCC 13869のld

hA遺伝子とsucA遺伝子を欠損し、yggB遺伝子にIS変異（V419::IS）を有する、C. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株が挙げられる(WO2014/185430)。

[0021] なお、コリネバクテリウム属細菌には、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に統合された細菌（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991)）も含まれる。また、コリネバクテリウム・スタティオニスには、従来コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに分類されていたが、16S rRNAの塩基配列解析等によりコリネバクテリウム・スタティオニスに再分類された細菌も含まれる（Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879(2010)）。

[0022] 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）より分譲を受けることができる。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この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。また、これらの菌株は、例えば、各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。

[0023] 本発明の細菌は、本来的にＬ－グルタミン酸生産能を有するものであってもよく、Ｌ－グルタミン酸生産能を保持するように改変されたものであってもよい。Ｌ－グルタミン酸生産能を有する細菌は、例えば、上記のような細菌にＬ－グルタミン酸生産能を付与することにより、または、上記のような細菌のＬ－グルタミン酸生産能を増強することにより、取得できる。

[0024] Ｌ－グルタミン酸生産能の付与または増強は、従来、コリネ型細菌またはエシェリヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法により行うことができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第７７～１００頁参照）。そのような方法としては、例えば、栄養要求性変異株の取得、Ｌ－グルタミン酸のアナログ耐性株の取得、代謝制御変異株の取得、Ｌ－グルタミン酸の生合成系酵素の活性が増強された組換

え株の創製が挙げられる。Ｌ－グルタミン酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独であってもよく、２種または３種以上であってもよい。また、Ｌ－グルタミン酸生産菌の育種において、活性が増強されるＬ－グルタミン酸生合成系酵素も、単独であってもよく、２種または３種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の活性の増強が組み合わされてもよい。

[0025] Ｌ－グルタミン酸生産能を有する栄養要求性変異株、アナログ耐性株または代謝制御変異株は、親株または野生株を通常の変異原処理に供し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性または代謝制御変異を示し、且つＬ－グルタミン酸生産能を有するものを選択することによって取得できる。通常の変異原処理としては、Ｘ線や紫外線の照射、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）、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。

[0026] また、Ｌ－グルタミン酸生産能の付与または増強は、Ｌ－グルタミン酸の生合成に関与する酵素の活性を増強することによっても行うことができる。酵素活性の増強は、例えば、同酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変することにより行うことができる。遺伝子の発現を増強する方法は、WO00/18935やEP1010755A等に記載されている。

[0027] また、Ｌ－グルタミン酸生産能の付与または増強は、Ｌ－グルタミン酸の生合成経路から分岐してＬ－グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下させることによっても行うことができる。なお、ここでいう「Ｌ－グルタミン酸の生合成経路から分岐してＬ－グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素」には、Ｌ－グルタミン酸の分解に関与する酵素も含まれる。

[0028] 以下、Ｌ－グルタミン酸生産菌、およびＬ－グルタミン酸生産能を付与または増強する方法について具体的に例示する。なお、以下に例示するような

Ｌ－グルタミン酸生産菌が有する性質およびＬ－グルタミン酸生産能を付与または増強するための改変は、いずれも、単独で用いてもよく、適宜組み合わせて用いてもよい。

[0029] Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強するための方法としては、例えば、Ｌ－グルタミン酸生合成系酵素から選択される１種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（gdhA）、グルタミンシンテターゼ（glnA）、グルタミン酸シンターゼ（gltBD）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（icdA）、アコニテートヒドラターゼ（acnA, acnB）、クエン酸シンターゼ（gltA）、メチルクエン酸シンターゼ（prpC）、ピルビン酸カルボキシラーゼ（pyc）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（aceEF, lpdA）、ピルビン酸キナーゼ（pykA, pykF）、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ（ppsA）、エノラーゼ（eno）、ホスホグリセロムターゼ（pgmA, pgmI）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（pgk）、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（gapA）、トリオースリン酸イソメラーゼ（tpiA）、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ（fbp）、グルコースリン酸イソメラーゼ（pgi）、６－ホスホグルコン酸デヒドラターゼ（edd）、２－ケト－３－デオキシ－６－ホスホグルコン酸アルドラーゼ（eda）、トランスヒドロゲナーゼ（pntAB）が挙げられる。なお、カッコ内は、その酵素をコードする遺伝子の一例である（以下の記載においても同様）。これらの酵素の中では、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼおよびメチルクエン酸シンターゼから選択される１種またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。

[0030] グルタミン酸シンターゼ遺伝子（gltBD）の発現が増大するように改変されたコリネ型細菌としては、WO99/07853に開示されたものが挙げられる。

[0031] また、Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強するための方法としては、例えば、Ｌ－グルタミン酸の生合成経路から分岐してＬ－グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される１種またはそれ以

上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、イソクエン酸リアーゼ（aceA）、α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（sucA, odhA）、アセト乳酸シンターゼ（ilvI）、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ（pfl）、乳酸デヒドロゲナーゼ（ldh）、アルコールデヒドロゲナーゼ（adh）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（gadAB）、コハク酸デヒドロゲナーゼ（sdhABCD）が挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を低下または欠損させることが好ましい。

[0032] α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌、およびそれらの取得方法は、WO2008/075483に記載されている。α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌として、具体的には、例えば、下記の株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) L30-2株（特開2006-340603号公報）

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) ΔS株（WO95/34672）

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) AJ12821 (FERM BP-4172；仏国特許発明第9401748号明細書）

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ12822 (FERM BP-4173；仏国特許発明第9401748号明細書）

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174；仏国特許発明第9401748号明細書）

[0033] また、Ｌ－グルタミン酸生産菌またはそれを誘導するための親株としては、α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（sucA）活性およびコハク酸デヒドロゲナーゼ（sdh）活性の両方が低下または欠損した株も挙げられる（特開2010-041920号公報）。そのような株として、具体的には、例えば、Corynebacterium glutamicum ATCC14067株のodhAsdhA二重欠損株（Corynebacterium glutamicum 8L3GΔSDH株）が挙げられる（特開2010-041920号公報）。

[0034] また、コリネ型細菌について、Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強する方法としては、有機酸アナログや呼吸阻害剤などへの耐性を付与する方法や、細胞壁合成阻害剤に対する感受性を付与する方法も挙げられる。そのような方法として、具体的には、例えば、モノフルオロ酢酸耐性を付与する方法（特開昭50-113209号公報）、アデニン耐性またはチミン耐性を付与する方法（特開昭57-065198号公報）、ウレアーゼを弱化させる方法（特開昭52-038088号公報）、マロン酸耐性を付与する方法（特開昭52-038088号公報）、ベンゾピロン類またはナフトキノン類への耐性を付与する方法（特開昭56-1889号公報）、HOQNO耐性を付与する方法（特開昭56-140895号公報）、α-ケトマロン酸耐性を付与する方法（特開昭57-2689号公報）、グアニジン耐性を付与する方法（特開昭56-35981号公報）、ペニシリンに対する感受性を付与する方法（特開平4-88994号公報）が挙げられる。

[0035] このような耐性菌または感受性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ3949 (FERM BP-2632；特開昭50-113209号公報)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736；特開昭57-065198号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ11355 (FERM P-5007；特開昭56-1889号公報)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020；特開昭56-1889号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ11217 (FERM P-4318；特開昭57-2689号公報)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319；特開昭57-2689号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ11564 (FERM P-5472；特開昭56-140895号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ11439 (FERM P-5136；特開昭56-35981号公報)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004；特開平04-88994号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) AJ11426 (FERM P-5123；特開平56-048890号公報)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137；特開平56-048890号公報)

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) AJ11796 (FERM P-6402；特開平58-158192号公報)

[0036] Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強する方法としては、例えば、細菌の細胞からＬ－グルタミン酸を排出する活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。Ｌ－グルタミン酸を排出する活性は、例えば、Ｌ－グルタミン酸を排出する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り、増大させることができる。各種アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、b2682遺伝子（ygaZ）、b2683遺伝子（ygaH）、b1242遺伝子（ychE）、b3434遺伝子（yhgN）が挙げられる（特開2002-300874号公報）。

[0037] また、Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強する方法としては、例えば、糖代謝に関与するタンパク質やエネルギー代謝に関与するタンパク質の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。

[0038] 糖代謝に関与するタンパク質としては、糖の取り込みに関与するタンパク質や解糖系酵素が挙げられる。糖代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、グルコース６－リン酸イソメラーゼ遺伝子（pgi；WO01/02542）、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（pyc；WO99/18228, EP1092776A）、ホスホグルコムターゼ遺伝子（pgm；WO03/04598）、フルクトース二リン酸アルドラーゼ遺伝子（pfkB, fbp；WO03/04664）、トランスアルドラーゼ遺伝子（talB；WO03/008611）、フマラーゼ遺伝子（fum；WO01/02545）、non-PTSス

クロース取り込み遺伝子（csc；EP1149911A）、スクロース資化性遺伝子（scrABオペロン；米国特許第7179623号明細書）が挙げられる。

[0039] エネルギー代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、トランスヒドロゲナーゼ遺伝子（pntAB；米国特許第5830716号明細書）、チトクロムbo型オキシダーゼ（cytochrome bo type oxidase）遺伝子（cyoB；EP1070376A）が挙げられる。

[0040] また、コリネ型細菌について、Ｌ－グルタミン酸生産能を付与または増強する方法としては、yggB遺伝子の発現を増強する方法やコード領域内に変異を導入した変異型yggB遺伝子を導入する方法も挙げられる（WO2006/070944）。すなわち、本発明の細菌は、yggB遺伝子の発現が増大するように改変されていてもよく、変異型yggB遺伝子を保持する（有する）ように改変されていてもよい。

[0041] yggB遺伝子は、メカノセンシティブチャネル（mechanosensitive channel）をコードする遺伝子である。yggB遺伝子としては、コリネ型細菌のyggB遺伝子が挙げられる。コリネ型細菌のyggB遺伝子として、具体的には、例えば、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14967、Corynebacterium melassecola ATCC17965のyggB遺伝子が挙げられる（WO2006/070944）。Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium callunae ATCC 15991のyggB遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank Accession No. NC_003450で登録されているゲノム配列中、1,336,091～1,337,692の配列の相補配列に相当し、NCgl1221とも呼ばれる。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のyggB遺伝子にコードされるYggBタンパク質は、GenBank accession No. NP_600492として登録されている。また、Corynebacterium glutamicum 2256（ATCC 13869）のyggB遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするYggBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号７および配列番号８に示す。

[0042] 本発明において、後述する「特定の変異」を有するyggB遺伝子を変異型yggB遺伝子、それによりコードされるタンパク質を変異型YggBタンパク質ともい

う。また、本発明において、後述する「特定の変異」を有さないyggB遺伝子を野生型yggB遺伝子、それによりコードされるタンパク質を野生型YggBタンパク質ともいう。なお、YggBタンパク質にあっては、yggB遺伝子における「特定の変異」により引き起こされるアミノ酸配列の変化を「特定の変異」ともいう。ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、「特定の変異」を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型YggBタンパク質としては、上記例示したYggBタンパク質、例えば配列番号８に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、が挙げられる。また、野生型YggBタンパク質としては、上記例示したYggBタンパク質の保存的バリアント（元の機能が維持されたバリアント）であって、「特定の変異」を有しないものも挙げられる。YggBタンパク質についての「元の機能」とは、例えば、メカノセンシティブチャネル（mechanosensitive channel）としての機能であってもよく、コリネ型細菌において発現を上昇させた際にコリネ型細菌のＬ－グルタミン酸生産能を向上させる性質であってもよい。

[0043] 「特定の変異」は、上述したような野生型YggBタンパク質のアミノ酸配列を変化させ、コリネ型細菌のＬ－グルタミン酸生産能を向上させる変異であれば、特に制限されない。「特定の変異」としては、C末端側変異や膜貫通領域の変異が挙げられる（WO2006/070944）。また、「特定の変異」は、それらの変異の組み合わせであってもよい。

[0044] （１）C末端側変異

C末端側変異は、野生型yggB遺伝子中の、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基をコードする領域における変異である。C末端側変異は、同領域中の１またはそれ以上の箇所に導入されてよい。C末端側変異により引き起こされるアミノ酸配列の変化の種類は特に制限されない。C末端側変異は、例えば、アミノ酸残基の置換（ミスセンス変異）、アミノ酸残基の挿入、アミノ酸残基の欠失、ストップコドンの出現（ナンセンス変異）、フレームシフト変異、またはそれらの組み合わせを引き起こすものであってよい。C末端側変異としては、例えば、インサーションシーケンス（以下、「IS」ともい

う）やトランスポゾン等の塩基配列の挿入が好ましい。

[0045] （１－１）塩基配列の挿入

C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419位のバリン残基をコードする箇所に塩基配列が挿入される変異（2A-1型変異）が挙げられる。2A-1型変異は、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基の一部または全部の欠失または置換を引き起こすものであってよい。2A-1型変異を有する変異型yggB遺伝子として、具体的には、例えば、配列番号７の1255位の「G」の次にＩＳが挿入され、元の野生型YggBタンパク質（配列番号８）よりも短い全長423アミノ残基の変異型YggBタンパク質をコードするyggB遺伝子が挙げられる。この変異型yggB遺伝子（V419::IS）の塩基配列、および同遺伝子がコードする変異型YggBタンパク質（V419::IS）のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号９および配列番号１０に示す。配列番号９中、1～1269位が変異型YggBタンパク質（V419::IS）のＣＤＳである。変異型yggB遺伝子（V419::IS）を有するＬ－グルタミン酸生産菌として、具体的には、例えば、C. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株（WO2014/185430）が挙げられる。

[0046] （１－２）プロリン残基の置換

C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位に存在するプロリン残基を他のアミノ酸に置換する変異も挙げられる。そのようなプロリン残基としては、野生型YggBタンパク質の424位、437位、453位、457位、462位、469位、484位、489位、497位、515位、529位、および533位のプロリン残基が挙げられる。中でも、424位および／または437位のプロリン残基を他のアミノ酸に置換するのが好ましい。「他のアミノ酸」は、プロリン以外の天然型アミノ酸であれば特に制限されない。「他のアミノ酸」としては、Lys、Glu、Thr、Val、Leu、Ile、Ser、Asp、Asn、Gln、Arg、Cys、Met、Phe、Trp、Tyr、Gly、Ala、Hisが挙げられる。例えば、424位のプロリン残基は、好ましくは疎水性アミノ酸（Ala、Gly、Val、Leu、またはIle）に置換されてよく、より好ましくは分岐鎖アミノ酸（Leu、Val、またはIle）に置換さ

れてよい。また、例えば、437位のプロリン残基は、好ましくは側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr）に置換されてよく、より好ましくはSerに置換されてよい。

[0047] （２）膜貫通領域の変異

YggBタンパク質は、５個の膜貫通領域を有していると推測される。膜貫通領域はそれぞれ、野生型YggBタンパク質の1～23位（第１膜貫通領域）、25～47位（第２膜貫通領域）、62～84位（第３膜貫通領域）、86～108位（第４膜貫通領域）、110～132位（第５膜貫通領域）のアミノ酸残基に相当する。膜貫通領域の変異は、野生型yggB遺伝子中の、これら膜貫通領域をコードする領域における変異である。膜貫通領域の変異は、同領域中の１またはそれ以上の箇所に導入されてよい。膜貫通領域の変異は、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入または逆位を引き起こすものであって、且つ、フレームシフト変異およびナンセンス変異を伴わないものが好ましい。「１若しくは数個」とは、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、特に好ましくは１～３個を意味する。膜貫通領域の変異としては、野生型YggBタンパク質の、１４位のロイシン残基と１５位のトリプトファン残基間に１または数個のアミノ酸（例えば、Cys-Ser-Leu）を挿入する変異、１００位のアラニン残基を他のアミノ酸残基（例えば、側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr）、好ましくはThr）へ置換する変異、１１１位のアラニン残基を他のアミノ酸残基（例えば、Valまたは側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr）、好ましくはValまたはThr）へ置換する変異などが挙げられる。

[0048] 本発明において、「野生型YggBタンパク質のＸ位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号８におけるＸ位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。アミノ酸配列における「Ｘ位」とは、同アミノ酸配列のN末端から数えてＸ番目の位置を意味し、N末端のアミノ酸残基が１位のアミノ酸残基である。なお、アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示すものであって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその絶対的な位置は前後する

ことがある。例えば、「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」とは、配列番号８における419位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味し、419位よりもN末端側の１アミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から418番目のアミノ酸残基が「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」であるものとする。また、419位よりもN末端側に１アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から420番目のアミノ酸残基が「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」であるものとする。具体的には、例えば、Corynebacterium glutamicum ATCC14967株のYggBタンパク質においては、419～529位のアミノ酸残基が、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基に相当する。また、例えばCorynebacterium callunaeのYggBタンパク質における98位のアラニン残基が、野生型YggBタンパク質の100位のアラニン残基に相当する。

[0049] 任意のYggBタンパク質のアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号８におけるＸ位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、該YggBタンパク質のアミノ酸配列と配列番号８のアミノ酸配列とのアライメントを行うことにより決定できる。アライメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して行うことができる。具体的なソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASISや、ゼネティックス製のGENETYXなどが挙げられる（Elizabeth C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24(1), 72-96, 1991；Barton GJ et al., Journal of molecular biology, 198(2), 327-37. 1987）。

[0050] 変異型yggB遺伝子は、野生型yggB遺伝子を上述の「特定の変異」を有するよう改変することにより取得できる。ＤＮＡの改変は公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、ＤＮＡの目的部位に目的の変異を導入す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)）や、ファージを用いる方法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. In Enzymol., 154, 350 (1987)；Kunkel, T. A. et al., Meth. In Enzymol., 154, 367 (1987)）が挙げられる。また、変

異型yggB遺伝子は、化学合成によっても取得できる。

[0051] 変異型yggB遺伝子を有するようにコリネ型細菌を改変することは、変異型yggB遺伝子をコリネ型細菌に導入することにより達成できる。また、変異型yggB遺伝子を有するようにコリネ型細菌を改変することは、自然変異や変異原処理により細菌が有するyggB遺伝子に変異を導入することによっても達成できる。

[0052] ＜１－２＞変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子に関する改変

本発明のコリネ型細菌は、野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されている。

なお、本発明のコリネ型細菌は、上記のようなL－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌において変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されたものでもよいし、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されたコリネ型細菌においてL－グルタミン酸生産能を付与することで得られるコリネ型細菌であってもよい。また、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変することでL－グルタミン酸生産能を有するようになったコリネ型細菌も含まれる。

[0053] アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、アセチルCoAヒドロラーゼ（Acetyl-CoA hydrolase）をコードする遺伝子である。アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子としては、コリネ型細菌のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が挙げられる。コリネ型細菌のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子としては、具体的には、例えば、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14967、Corynebacterium melassecola ATCC17965のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が挙げられる。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank Accession No. NC_003450で登録されているゲノム配列中、2,729,376～2,730,884の配列の相補配列に相当し、NCgl2480とも呼ばれ

る。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子にコードされるアセチルCoAヒドロラーゼは、GenBank accession No. WP_003858947.1として登録されている。また、Corynebacterium glutamicum 2256（ATCC 13869）の野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードするアセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号１および配列番号２に示す。

[0054] 「アセチルCoAヒドロラーゼ（Acetyl-CoA hydrolase）」とは、アセチルCoAを加水分解して補酵素Aと酢酸を生成する反応および／またはその逆反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC 3.1.2.1）。同活性を、「アセチルCoAヒドロラーゼ活性」ともいう。アセチルCoAヒドロラーゼ活性は、具体的には、アセチルCoAとH_2Oを補酵素Aと酢酸に変換する反応および／またはその逆反応を触媒する活性であってよい。アセチルCoAヒドロラーゼを「アセチルCoAデアシラーゼ（Acetyl-CoA deacylase）」ともいう。アセチルCoAヒドロラーゼをコードする遺伝子としては、NCgl2480遺伝子が挙げられる。改変される細菌が有するNCgl2480遺伝子等のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるアセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。

[0055] 本発明において、後述する「特定の遺伝子変異」を有するアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子、それによりコードされるタンパク質を変異型アセチルCoAヒドロラーゼともいう。また、本発明において、後述する「特定の遺伝子変異」を有さないアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子、それによりコードされるタンパク質を野生型アセチルCoAヒドロラーゼともいう。なお、アセチルCoAヒドロラーゼにあっては、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子における「特定の遺伝子変異」により引き起こされるアミノ酸配列の変化を「特定の遺伝子変異」ともいう。ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、「特定の遺伝子変異」を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型アセチルCoAヒドロラーゼとしては、上記例示

したアセチルCoAヒドロラーゼ、例えば配列番号２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、が挙げられる。また、野生型アセチルCoAヒドロラーゼとしては、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼの保存的バリアント（元の機能が維持されたバリアント）であって、「特定の遺伝子変異」を有しないものも挙げられる。

[0056] 「特定の遺伝子変異」は、上述した野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列を変化させ、コリネ型細菌のＬ－グルタミン酸生産能を向上させる変異である。具体的には、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子中の、野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列の383位のアミノ酸残基における変異である。

[0057] 野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列の383位のアミノ酸残基における変異としては、例えば、アミノ酸残基の置換（ミスセンス変異）が挙げられる。

[0058] 野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のアミノ酸残基における変異としては、例えば、野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のセリン残基を他のアミノ酸残基に置換する変異が挙げられる。「他のアミノ酸」は、セリン以外の天然型アミノ酸であれば特に制限されない。「他のアミノ酸」としては、Lys、Glu、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Asp、Asn、Gln、Arg、Cys、Met、Phe、Trp、Tyr、Pro、Ala、Hisが挙げられる。例えば、383位のセリン残基は、好ましくは親水性アミノ酸（Lys、Glu、Thr、Asp、Asn、Gln、Arg、CysまたはHis）に置換されてもよく、より好ましくはCysに置換されてもよい。また、例えば、383位のセリン残基は、好ましくは含硫アミノ酸（CysまたはMet）に置換されてもよく、より好ましくはCysに置換されてもよい。

[0059] 本発明において、「野生型アセチルCoAヒドロラーゼのＸ位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号２におけるＸ位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。アミノ酸配列における「Ｘ位」とは、同アミノ酸配列のN末端から数えてＸ番目の位置を意味し、N末端のアミノ酸残基が１位のアミノ酸残基である。なお、アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示す

ものであって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその絶対的な位置は前後することがある。例えば、「野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のアミノ酸残基」とは、配列番号２における383位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味し、383位よりもN末端側の１アミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から382番目のアミノ酸残基が「野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のアミノ酸残基」であるものとする。また、383位よりもN末端側に１アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から384番目のアミノ酸残基が「野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のアミノ酸残基」であるものとする。

[0060] 任意のアセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号２におけるＸ位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、該アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列と配列番号２のアミノ酸配列とのアライメントを行うことにより決定できる。アライメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して行うことができる。具体的なソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASISや、ゼネティックス製のGENETYXなどが挙げられる（Elizabeth C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24(1), 72-96, 1991；Barton GJ et al., Journal of molecular biology, 198(2), 327-37. 1987）。

[0061] 変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を上述の「特定の遺伝子変異」を有するよう改変することにより取得できる。ＤＮＡの改変は公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、ＤＮＡの目的部位に目的の変異を導入す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)）や、ファージを用いる方法（Kramer,W. and Frits, H. J., Meth. In Enzymol., 154, 350 (1987)；Kunkel, T. A. et al., Meth. In Enzymol., 154, 367 (1987)）が挙げられる。また、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、化学合成によっても取得できる。

[0062] 野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、例えば、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号１に示す塩基配列）を有する遺伝子であってよい。また、アセチルCoAヒドロラーゼは、例えば、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列（例えば、配列番号２に示すアミノ酸配列）を有するタンパク質であってよい。なお、「（アミノ酸または塩基）配列を有する」という表現は、特記しない限り、該「（アミノ酸または塩基）配列を含む」ことを意味し、該「（アミノ酸または塩基）配列からなる」場合も包含する。

[0063] 野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子はまた、元の機能が維持されている限り、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子（例えば、配列番号１に示す塩基配列を有する遺伝子）のバリアントであってもよい。同様に、アセチルCoAヒドロラーゼは、元の機能が維持されている限り、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ（例えば、配列番号２に示すアミノ酸配列を有するタンパク質）のバリアントであってもよい。なお、そのような元の機能が維持されたバリアントを「保存的バリアント」という場合がある。「アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子」という用語は、それぞれ、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子に加えて、それらの保存的バリアントを包含するものとする。同様に、「アセチルCoAヒドロラーゼ」という用語は、それぞれ、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼに加えて、それらの保存的バリアントを包含するものとする。保存的バリアントとしては、例えば、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子やアセチルCoAヒドロラーゼのホモログや人為的な改変体が挙げられる。

[0064] 「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリアントが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（例えば活性や性質）に対応する機能（例えば活性や性質）を有することをいう。遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリアントが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることをいう。すなわち、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、アセチルCoAヒドロラー

ゼ遺伝子のバリアントが、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードすることを意味してよい。また、アセチルCoAヒドロラーゼについての「元の機能が維持されている」とは、アセチルCoAヒドロラーゼのバリアントが、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有することを意味してよい。

[0065] アセチルCoAヒドロラーゼ活性は、例えば、酵素を対応する基質（例えばアセチルCoAとH_2O）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えば補酵素Aと酢酸）の生成を測定することにより、測定することができる。

[0066] 以下、保存的バリアントについて例示する。

[0067] アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のホモログまたはアセチルCoAヒドロラーゼのホモログは、例えば、上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列または上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸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、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のホモログは、例えば、各種生物の染色体を鋳型にして、これら公知のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基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。

[0068] アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列（例えば、配列番号２に示すアミノ酸配列）において、１若しくは数個の位置での１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するアセチルCoAヒドロラーゼをコードする遺伝子であってもよい。例えば、コードされるタンパク質は、そのＮ末端および／またはＣ末端が、延長または短縮されていてもよい。なお上記「１または数個」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種類によっても異なるが、具体的には、例えば、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、特に好ましくは１～３個を意味する。

[0069] 上記の１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／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またはThrへの置換、ArgからGln、HisまたはLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、HisまたはAspへの置換、AspからAsn、GluまたはGlnへの置換、CysからSerまたはAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、AspまたはArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、LysまたはAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、ArgまたはTyrへの置換、IleからLeu、Met、ValまたはPheへの置換、LeuからIle、Met、ValまたはPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、HisまたはArgへの置換、MetからIle、Leu、ValまたはPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、IleまたはLeuへの置換、SerからThrまたはAlaへの置換、ThrからSerまたはAlaへの置換、TrpからPheまたはTyrへの置換、TyrからHis、PheまたはTrpへの置換、および、ValからMet、Ileまたは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、挿入または付加には、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またはvariant）によって生じるものも含まれる。

[0070] また、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列全体に対して、例えば、50%以上、65%以上、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%以上の同一性を有する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。

[0071] また、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記塩基配列（例えば、配列番号１に示す塩基配列）から調製され得るプ

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する遺伝子（例えば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、同一性が高いDNA同士、例えば、50%以上、65%以上、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%以上の同一性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより同一性が低い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。

[0072] 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、上述の遺伝子を含む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、プローブとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。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。

[0073] また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、任意のコドンをそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。すなわち、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、遺伝コードの縮重による上記例示したアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のバリアントであってもよい。例えば、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変されてよい。

[0074] なお、アミノ酸配列間の「同一性」とは、blastpによりデフォルト設定のScoring Parameters (Matrix：BLOSUM62；Gap Costs：Existence＝11, Extension＝1；Compositional Adjustments：Conditional compositional score ma

trix adjustment）を用いて算出されるアミノ酸配列間の同一性を意味する。また、塩基配列間の「同一性」とは、blastnによりデフォルト設定のScoring Parameters（Match/Mismatch Scores＝1,-2；Gap Costs＝Linear）を用いて算出される塩基配列間の同一性を意味する。

[0075] 上記の遺伝子やタンパク質の保存的バリアントに関する記載は、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。すなわち、Ｌ－グルタミン酸生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、例えば、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を有していてよい。また、Ｌ－グルタミン酸生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の保存的バリアントであってもよい。具体的には、例えば、Ｌ－グルタミン酸生産菌の育種に使用される遺伝子は、元の機能が維持されている限り、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、１若しくは数個の位置での１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入また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。

[0076] 前記変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変する方法としては、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のコード領域内に前記383位のセリン残基を置換する変異を導入した変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子をコリネ型細菌に導入する方法、コリネ型細菌が有する野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のコード領域内に同変異を導入する方法等が挙げられる。

[0077] 変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を有するようにコリネ型細菌を改変することは、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子をコリネ型細菌に導入することにより達成できる。なお、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を有するようにコリネ型細菌を改変することは、自然変異や変異原処理によりコリネ型細菌が有するアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子に変異を導入することによっても達成できる。

[0078] 変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のコリネ型細菌への導入は、宿主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, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory）。相同組み換えを利用する遺伝子導入法としては、例えば、Redドリブンインテグレーション（Red-driven integration）法（Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)）等の直鎖状ＤＮＡを用いる方法、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法、ファージを用いたtransduction法が挙げられる。具体的には、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含む組換えＤＮＡで宿主を形質転換し、宿主の染色体上の標的部位と相同組み換えを起こすことにより、該遺伝子を宿主の染色体上に導入することができる。相同組換えに用いる組換えＤＮＡの構造は、所望の態様で相同組換えが起こるものであれば特に制限されない。例えば、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含む線状ＤＮＡであって、該遺伝子の両端に染色体上の標的部位の上流および下流に相同な塩基配列をそれぞれ備える線状ＤＮＡで宿主を形質転換して、標的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、標的部位を該遺伝子に置換することができる。相同組換えに用いる組換えＤＮＡは、形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子を備えていてよい。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塩基配列を標的として相同組み換えを行うことで、染色体へ変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体上に多数のコピーが存在する塩基配列としては、反復DNA配列（repetitive DNA）、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピートが挙げられる。また、目的物質の生産に不要な遺伝子等の染色体上の適当な塩基配列を標的として相同組み換えを行ってもよい。また、遺伝子は、トランスポゾンやMini-Mu

を用いて染色体上にランダムに導入することもできる（特開平2-109985号公報、米国特許第5882888号明細書、EP805867B1）。なお、このような相同組み換えを利用した染色体の改変手法は、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の導入に限られず、発現調節配列の改変等の、染色体の任意の改変に利用できる。

[0079] 染色体上に変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部また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、また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。

[0080] また、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子のコリネ型細菌への導入は、同遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。例えば、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含むＤＮＡ断片を、宿主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、該発現ベクターで宿主を形質転換することにより、同遺伝子をコリネ型細菌へ導入することができる。変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含むＤＮＡ断片は、例えば、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ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。また、形質転換体を選択するために、ベクターは抗生物質耐性遺伝子などのマーカーを有することが好ましい。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーターやターミネーターを備えていてもよい。ベクターは、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。コリネ型細菌で自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ；pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ；これらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド；pCRY30（特開平3-210184号公報）；pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE、およ

びpCRY3KX（特開平2-72876号公報、米国特許5185262号明細書）；pCRY2およびpCRY3（特開平1-191686号公報）；pAJ655、pAJ611、およびpAJ1844（特開昭58-192900号公報）；pCG1（特開昭57-134500号公報）；pCG2（特開昭58-35197号公報）；pCG4およびpCG11（特開昭57-183799号公報）；pVK7（特開平10-215883号公報）；pVK9（米国特許出願公開第2006/0141588号明細書）；pVC7（特開平9-070291号公報）；pVS7（WO2013/069634）が挙げられる。

[0081] 遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に宿主に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、宿主で機能するプロモーターによる制御を受けて発現するように保持されていればよい。プロモーターは、宿主において機能するものであれば特に制限されない。「宿主において機能するプロモーター」とは、宿主においてプロモーター活性を有するプロモーターをいう。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。

[0082] 遺伝子の下流には、転写終結用のターミネーターを配置することができる。ターミネーターは、宿主において機能するものであれば特に制限されない。ターミネーターは、宿主由来のターミネーターであってもよく、異種由来のターミネーターであってもよい。ターミネーターは、導入する遺伝子の固有のターミネーターであってもよく、他の遺伝子のターミネーターであってもよい。

[0083] 各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターに関しては、例えば「微生物学基礎講座８　遺伝子工学、共立出版、1987年」に詳細に記載されており、それらを利用することが可能である。

[0084] 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、発現可能に宿主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またはそれ以上のタンパク質（例えば酵素）をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一のタンパク質複合体（例えば酵素複合体）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。

[0085] ＜２＞本発明のＬ－グルタミン酸の製造方法

本発明の方法は、＜１＞の項に記載の本発明の細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－グルタミン酸を蓄積すること、および該培地および／または該菌体よりＬ－グルタミン酸を採取すること、を含むＬ－グルタミン酸の製造方法である。Ｌ－グルタミン酸については上述した通りである。本発明においては、Ｌ－グルタミン酸が単独で製造されてもよく、Ｌ－グルタミン酸とＬ－グルタミン酸以外の１種またはそれ以上のアミノ酸、例えばL体のアミノ酸（Ｌ－アミノ酸ともいう）等、が製造されてもよい。

[0086] 使用する培地は、本発明の細菌が増殖でき、Ｌ－グルタミン酸が生産される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、コリネ型細菌等の細菌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、使用する細菌の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0087] 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、スクロース、ラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、マルトース、イソマルトース、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、特に、糖類が挙げられる。炭素源として、さらに特には、グ

ルコースやフルクトースが挙げられる。グルコースやフルクトース等の糖類は、単独で、あるいは他の炭素源と組み合わせて、炭素源として用いられてよい。炭素源としては、例えば、フルクトースを構成糖とする糖が用いられてもよい。フルクトースを構成糖とする糖としては、フルクトース、スクロース、フルクトオリゴ糖が挙げられる。フルクトースを構成糖とする糖は、単独で、あるいは他の炭素源と組み合わせて、炭素源として用いられてよい。なお、炭素源としては、植物由来原料を好適に用いることができる。植物としては、例えば、トウモロコシ、米、小麦、大豆、サトウキビ、ビート、綿が挙げられる。植物由来原料としては、例えば、根、茎、幹、枝、葉、花、種子等の器官、それらを含む植物体、それら植物器官の分解産物が挙げられる。植物由来原料の利用形態は特に制限されず、例えば、未加工品、絞り汁、粉砕物、精製物等のいずれの形態でも利用できる。炭素源としては、例えば、ケインモラセス、ビートモラセス、ハイテストモラセス、シトラスモラセス、または転化糖を用いてもよいし、セルロース、デンプン、コーン、シリアル、タピオカ、キャッサバ等の天然原料の加水分解物を用いてもよい。また、キシロース等の五炭糖、グルコース等の六炭糖またはそれらの混合物は、例えば、植物バイオマスから取得して利用できる。具体的には、これらの糖類は、植物バイオマスを、水蒸気処理、濃酸加水分解、希酸加水分解、セルラーゼ等の酵素による加水分解、アルカリ処理等の処理に供することにより取得できる。なお、ヘミセルロースは一般的にセルロースよりも加水分解されやすいため、植物バイオマス中のヘミセルロースを予め加水分解して五炭糖を遊離させ、次いで、セルロースを加水分解して六炭糖を生成してもよい。また、キシロースは、例えば、本発明の細菌にグルコース等の六炭糖からキシロースへの変換経路を保有させて、六炭糖からの変換により供給してもよい。炭素源としては、具体的には、例えば、グルコースを単独で用いてもよいし、グルコースとフルクトースやグルコースとスクロースなど２種の炭素源を任意の比率（例えば、重量比で３：７～７：３）で混合したものを用いてもよい。

[0088] 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、植物タンパク質加水分解物（HVP；例えば、大豆タンパク質分解物、大豆醤油、エンドウ豆醤油等）等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。pH調整に用いられるアンモニアガスやアンモニア水を窒素源として利用してもよい。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て用いてもよい。

[0089] 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て用いてもよい。

[0090] 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て用いてもよい。

[0091] 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金属類；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、ビオチン、葉酸等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、植物タンパク質加水分解物（HVP；例えば、大豆タンパク質分解物、大豆醤油、エンドウ豆醤油等）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、消泡剤、培地の浸透圧調整物質、浸透圧補償物質等が挙げられる。消泡剤としては、シリコーン系消泡剤（オイル型、溶液型、オイルコンパウンド型、エマルジョン型、自己乳化型など）、アルコール系消泡剤、オイル系消泡剤、ポリエーテル系消泡剤、植物油（綿実油、亜麻仁油、大豆油、オリーブ油、ヒマシ油、ココナッツ油など）等が挙げられる。消泡剤としては、液状、ペースト状、固体状、パウダー状、エマルジョン状、ワックス

状など、いずれの形状のものも用いることができる。培地の浸透圧調整物質としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの塩類や、微生物が資化できない多糖類（ソルビトール、デキストリンなど）が挙げられる。浸透圧補償物質としては、カリウムイオン、ベタイン（グリシンベタイン）、廃糖蜜（特に甜菜廃糖蜜）、グルタミン酸、トレハロース等が挙げられる。また、水溶性セルロース誘導体、水溶性ポリビニル化合物、極性有機溶媒溶解性ポリビニル化合物、水溶性澱粉誘導体、アルギン酸塩、およびポリアクリル酸塩からなる群より選ばれるポリマーも培地に添加してよい成分として挙げられる。これら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て用いてもよい。

[0092] 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。

[0093] また、培地中のビオチン量を制限することや、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加することも好ましい。

[0094] 培養条件は、本発明の細菌が増殖でき、Ｌ－グルタミン酸が生産される限り、特に制限されない。培養は、例えば、コリネ型細菌等の細菌の培養に用いられる通常の条件で行うことができる。培養条件は、使用する細菌の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0095] 培養は、液体培地を用いて行うことができる。液体培養の方法としては、例えば、「バイオテクノロジー教科書シリーズ　１３　培養工学、吉田 敏臣、コロナ社、1998年」に記載の方法を利用することが可能である。すなわち、液体培養としては、例えば、表面培養、深部培養、膜（透析膜やフォローファーバーなど）分離型培養、または固定化微生物培養などを利用することが可能である。また、培養装置としては、例えば、通気撹拌型培養装置、エアリフト型培養装置、充填層型培養装置、または流動層型培養装置などを利用することが可能である。培養の際には、「発酵工学の基礎、学会出版センター、1988年」に記載の方法を利用することが可能である。培養の際には、本発明の細菌を寒天培地等の固体培地で培養したものを直接液体培地に接種

してもよく、本発明の細菌を液体培地で種培養したものを本培養用の液体培地に接種してもよい。すなわち、培養は、種培養と本培養とに分けて行われてもよい。その場合、種培養と本培養の培養条件は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。培養開始時に培地に含有される本発明の細菌の量は特に制限されない。本培養は、例えば、本培養の培地に、種培養液を1～50%（v/v）植菌することにより行ってよい。また、例えば、種培養工程は、本培養工程に必要な菌量を得るために、2段以上の種培養工程を含んでいてもよい。また、種培養液は、本培養の培養開始時にのみ植菌してもよく、本培養の開始時に加えて、さらに本培養の培養途中に追加で植菌してもよい。

[0096] 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。組み合わせとしては、例えば、流加培養を2段以上繋いだ培養や連続培養を2段以上繋いだ培養等が挙げられる。なお、培養開始時の培地を、「初発培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系（発酵槽）に供給する培地を、「流加培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系に流加培地を供給することを、「流加」ともいう。なお、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合、例えば、種培養と本培養を、共に回分培養で行ってもよい。また、例えば、種培養を回分培養で行い、本培養を流加培養または連続培養で行ってもよい。また、例えば、種培養を流加培養で行い、本培養を回分培養で行ってもよい。流加培地は、例えば、培養槽上部の培地液面に接していない箇所から供給してもよく、培養槽の中部や培養槽の下部など培地内部の箇所から供給してもよく、培養槽上部と中部のそれぞれから供給してもよい。流加培地を培地内部の箇所から供給する態様は、例えば、特許第6097869号に開示されている。

[0097] 本発明において、各培地成分は、初発培地、流加培地またはその両方に含有されていてよい。初発培地に含有される成分の種類は、流加培地に含有される成分の種類と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、初発培地に含有される各成分の濃度は、流加培地に含有される各成分の濃度と、

同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、含有する成分の種類および／または濃度の異なる２種またはそれ以上の流加培地を用いてもよい。例えば、複数回の流加が間欠的に行われる場合、各回の流加培地に含有される成分の種類および／または濃度は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。例えば、初発培地の炭素源をグルコースとし、流加培地の炭素源をスクロースとしてもよい。

[0098] 培地の殺菌は行ってもよく、行わなくてもよい。培地の殺菌は、雑菌汚染（コンタミネーション）を防ぐ目的で行ってもよい。培地の殺菌は、滅菌や除菌と言い換えることができる。培地の殺菌方法としては、高温高圧条件での殺菌、ＵＶ照射による殺菌、フィルターまたは膜を用いた除菌等が挙げられる。培地の殺菌は、回分的に行われてもよく、連続的に行われてもよい。例えば、高温高圧条件での殺菌が回分的に行われる方法として、オートクレーブ殺菌や培養槽内で行われる回分殺菌等が挙げられる。また、例えば、高温高圧条件での殺菌が連続的に行われる方法として、プレート型熱交換器を具備した連続殺菌等が挙げられる。また、糖の殺菌は、他の培地成分と同時に行ってもよく、他の成分と分けて行ってもよい。好ましくは、糖とその他の成分は、分けて殺菌してよい。

[0099] 培地中の炭素源の濃度は、本発明の細菌が増殖でき、Ｌ－グルタミン酸が生産される限り、特に制限されない。培地中の炭素源の濃度は、例えば、Ｌ－グルタミン酸の生産が阻害されない範囲で可能な限り高くしてよい。培地中の炭素源の濃度は、例えば、初発濃度（初発培地中の濃度）として、１～５０w/v%、好ましくは１～３０w/v%、より好ましくは３～１０w/v%であってよい。また、適宜、炭素源を追加で培地に添加してもよい。例えば、発酵の進行に伴う炭素源の消費に応じて、炭素源を追加で培地に添加してもよい。また、流加培養や連続培養において、炭素源の供給量は、充足条件（本発明の細菌の炭素資化量（能）よりも過剰な量を供給する条件）または制限条件（本発明の細菌の炭素資化量（能）よりも不足した量を供給する条件）となる量であってよい。

[0100] 培養は、例えば、液体培地を用いて、好気条件または微好気条件で実施してよい。「好気条件」とは、液体培地中の溶存酸素濃度が、酸素膜電極による検出限界である0.33 ppm以上であることをいい、好ましくは1.5 ppm以上であることであってよい。好気条件での酸素濃度は、例えば、飽和酸素濃度に対して5～50%、好ましくは10%程度に制御されてもよい。「微好気条件」とは、培地中の溶存酸素濃度が、0.33 ppm未満である条件を意味してよい。微好気条件での培地中の溶存酸素濃度は、例えば、0.30 ppm以下、0.25 ppm以下、0.20 ppm以下、0.15 ppm以下、0.10 ppm以下、または0.05 ppm以下であってもよい。微好気条件での酸素濃度は、例えば、飽和酸素濃度に対して5%未満、3.75%以下、3.125%以下、2.5%以下、1.875%以下、1.25%以下、または0.8125%以下に制御されてもよい。培養は、具体的には、通気培養、振盪培養、撹拌培養またはそれらの組み合わせで行うことができる。培地のpHは、例えば、pH3～10、好ましくはpH4.0～9.5であってよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整することができる。培地のpHは、アンモニアガス、アンモニア水、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の各種アルカリ性または酸性物質を用いて調整することができる。培養温度は、例えば、20～40℃、好ましくは25℃～37℃であってよい。本培養において、培養温度は、2段階以上に変化させてもよい。例えば、Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2002) 28, 333-337にて開示されているように、培養温度を33℃から37～40℃へと高温側にシフトさせてもよい。培養期間は、例えば、10時間～120時間であってよい。培養は、例えば、培地中の炭素源が消費されるまで、あるいは本発明の細菌の活性がなくなるまで、継続してもよい。このような条件下で本発明の細菌を培養することにより、培地中および／または菌体内にＬ－グルタミン酸が蓄積する。

[0101] また、Ｌ－グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いて、培地中にＬ－グルタミン酸を析出させながら培養を行うこともできる。Ｌ－

グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0の条件が挙げられる（EP1078989A）。また、Ｌ－グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、パントテン酸を培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（WO2004/111258）。また、Ｌ－グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、Ｌ－グルタミン酸の結晶を種晶として培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（EP1233069A）。また、Ｌ－グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、Ｌ－グルタミン酸の結晶およびＬ－リジンの結晶を種晶として培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（EP1624069A）。

[0102] 発酵液は、例えば、液体サイクロンで処理することができる。液体サイクロンとしては、例えば、一般的形状で、円筒部直径が10～110 mmの、セラミック製、ステンレス鋼製または樹脂製のものを用いることができる。液体サイクロンへの発酵液のフィード量は、例えば、発酵液中の菌体濃度やＬ－グルタミン酸濃度に応じて設定することができる。液体サイクロンへの発酵液のフィード量は、例えば、2～1200 L/minであってよい。

[0103] Ｌ－グルタミン酸が生成したことは、化合物の検出または同定に用いられる公知の手法により確認することができる。そのような手法としては、例えば、HPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。

[0104] 発酵液からのＬ－グルタミン酸の回収は、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（Nagai, H. et al., Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710）、沈殿法、膜分離法（特開平9-164323号公報、特開平9-173792号公報）、晶析法（WO2008/078448、WO2008/078646）が挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。なお、菌体内にＬ－グルタミン酸が蓄積する場合には、例えば、菌体を超音波などにより破砕し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清から、

イオン交換樹脂法などによってＬ－グルタミン酸を回収することができる。回収されるＬ－グルタミン酸は、フリー体、その塩またはそれらの混合物であってよい。塩としては、例えば、硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩が挙げられる。具体的には、例えば、フリー体のＬ－グルタミン酸、Ｌ－グルタミン酸ナトリウム（例えばmonosodium L-glutamate；ＭＳＧ）、Ｌ－グルタミン酸アンモニウム（例えばmonoammonium L-glutamate）またはそれらの混合物であってもよい。例えば、発酵液中のＬ－グルタミン酸アンモニウムを酸を加えて晶析させ、結晶に等モルの水酸化ナトリウムを添加することでＬ－グルタミン酸ナトリウム（ＭＳＧ）が得られる。なお、晶析前後に活性炭を加えて脱色してもよい（グルタミン酸ナトリウムの工業晶析　日本海水学会誌　56巻　5号　川喜田哲哉参照）。Ｌ－グルタミン酸ナトリウム結晶は、例えば、うま味調味料として用いることができる。Ｌ－グルタミン酸ナトリウム結晶は、同様にうま味を有するグアニル酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウム等の核酸と混合して調味料として用いてもよい。

[0105]　また、Ｌ－グルタミン酸が培地中に析出する場合は、遠心分離または濾過等により回収することができる。また、培地中に析出したＬ－グルタミン酸は、培地中に溶解しているＬ－グルタミン酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

[0106]　なお、回収されるＬ－グルタミン酸は、Ｌ－グルタミン酸以外に、細菌菌体、培地成分、水分および細菌の代謝副産物等の成分を含んでいてもよい。Ｌ－グルタミン酸は、所望の程度に精製されていてもよい。回収されるＬ－グルタミン酸の純度は、例えば、50％（w/w）以上、好ましくは85％（w/w）以上、特に好ましくは95％（w/w）以上であってよい（特許1214636号、米国特許第5431933号明細書、米国特許第4956471号明細書、米国特許第4777051号明細書、米国特許第4946654号明細書、米国特許第5840358号明細書、米国特許第6238714号明細書、米国特許出願公開第2005/0025878号明細書）。

実施例

[0107] 以下、非限定的な実施例を参照して本発明をさらに具体的に説明する。

[0108] ＜１＞Corynebacterium glutamicumの改変株の構築

＜１－１＞野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクターの構築

野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を有するC. glutamicum ATCC 13869（2256株）の染色体DNAを鋳型として、配列番号５および配列番号６のプライマーを用いたPCRにより、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含むDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片とbamHIおよびpstIで切断したpVK9（米国特許出願公開第2006/0141588号明細書）とをインフュージョン反応で連結することによって、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクター（pVK9-Acetyl-CoA hydrolase (WT)）を得た。

野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードする野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号１および配列番号２に示す。

[0109] ＜１－２＞変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクターの構築

野生型アセチルCoAヒドロラーゼの383位のセリン残基をシステイン残基に置換する変異（S383C）を有する変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含むC. glutamicum ATCC 13869（2256株）派生株の染色体DNAを鋳型として、配列番号５および配列番号６のプライマーを用いたPCRにより、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を含むDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片とbamHIおよびpstIで切断したpVK9とをインフュージョン反応で連結することによって、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクター（pVK9-Acetyl-CoA hydrolase (S383C)）を得た。

変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列、および同遺伝子がコードする変異型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号３および配列番号４に示す。

[0110] ＜１－３＞Corynebacterium glutamicumの改変株の構築

構築した各変異型遺伝子導入用ベクターでC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株（WO2014/185430）を形質転換する。得られた形質転換体からWO200

6/057450に記載の方法に従って菌株の選択を行い、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株および変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株を得る。

[0111] 構築した野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクター（pVK9-Acetyl-CoA hydrolase（WT））および変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入用ベクター（pVK9-Acetyl-CoA hydrolase（S383C））をそれぞれ単独でC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株に導入することで、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株および変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株を得た。また、pVK9を単独でC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株に導入することで、対照株を得た。

[0112] なお、C. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株は、C. glutamicum 2256株（ATCC 13869）から誘導されたＬ－グルタミン酸生産株であり、ldhA遺伝子とsucA遺伝子を欠損し、yggB遺伝子にIS変異（V419::IS）を有する。

[0113] ＜２＞Ｌ－グルタミン酸生産培養

構築した各菌株（すなわち、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株および対照株）を用いてＬ－グルタミン酸生産培養を実施した。使用した培地の組成を表１に示す。

[0114]

[表1]

表１　培地組成

Glucose	80 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	30 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4 g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g/L
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01 g/L
VB_1	200 μg/L
Biotin	60 μg/L
豆濃	0.48 g/L
$CaCO_3$	50 g/L

KOHでpH8.0に調整した上記組成の培地を作製し、オートクレーブ(121℃、20min)により滅菌した。滅菌後の培地に乾熱滅菌（180℃、6時間）した炭酸カルシウムを終濃度50 g/Lとなるように添加して培養に用いた。

[0115] 各菌株を500 mL容量の坂口フラスコに張り込んだ上記培地（50 g/L炭酸カルシウムを含む）20 mLに植菌し、31.5℃のボックスシェーカー（ABLE ML-190）を用いて120 rpmで振盪培養した。培養開始25時間後に培養液のサンプリングを実施した。サンプリングした培養液の0.05 mlを4.95 mlの0.1N HCl溶液に加えることで100倍希釈し、620 nmの吸光度（OD）を測定した。また、サンプリングした培養液を15,000 rpmで1分間遠心分離した後、上清中のＬ－グルタミン酸濃度をバイオテックアナライザーBF7（王子計測器株式会社）を用いて定量し、Ｌ－グルタミン酸の対糖収率を算出した。

[0116] 結果を図１および図２に示す。変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株は、野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子導入株よりも高いＬ－グルタミン酸の蓄積量およびＬ－グルタミン酸の対糖収率を示した（図１および図２）。

産業上の利用可能性

[0117] 本発明によれば、コリネ型細菌のＬ－アミノ酸生産能を向上させることができ、Ｌ－アミノ酸を効率よく製造することができる。

[0118] 〔配列表の説明〕

配列番号１：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)の野生型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列

配列番号２：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)の野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列

配列番号３：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列

配列番号４：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)の変異型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列

配列番号５および配列番号６：プライマー

配列番号７：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869) の野生型yggB遺伝子の塩基配列

配列番号８：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869) の野生型YggBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号９：変異型yggB遺伝子（V419::IS）の塩基配列

配列番号１０：変異型YggBタンパク質（V419::IS）のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] Ｌ－グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、

野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子を保持するように改変されている、

コリネ型細菌。

[請求項2] 前記他のアミノ酸が、リシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、システイン、ヒスチジンまたはメチオニンである、請求項１に記載のコリネ型細菌。

[請求項3] 前記他のアミノ酸がシステインである、請求項１に記載のコリネ型細菌。

[請求項4] 前記野生型アセチルCoAヒドロラーゼが、下記（ａ）、（ｂ）または（ｃ）に記載のタンパク質である、請求項１～３のいずれか一項に記載のコリネ型細菌。

（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ｂ）配列番号２に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質；

（ｃ）配列番号２に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項5] 前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム（Corynebacterium）属に属する細菌である、請求項１～４のいずれか一項に記載のコリネ型細菌。

[請求項6] 前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム・グルタミカム（Corynebacterium glutamicum）である、請求項１～４のいずれか一項に記載のコリネ型細菌。

[請求項7] 変異型yggB遺伝子を保持するように改変されており、

前記変異型yggB遺伝子が、配列番号８のアミノ酸配列において１または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／また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る、請求項１～６のいずれか一項に記載のコリネ型細菌。

[請求項8] 前記変異型yggB遺伝子が、配列番号１０の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る、請求項７に記載のコリネ型細菌。

[請求項9] Ｌ－グルタミン酸の製造方法であって、

請求項１～８のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地で培養し、前記培地中および／または前記細菌の菌体内にＬ－グルタミン酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体よりＬ－グルタミン酸を採取すること、

を含む、

製造方法。

[請求項10] 野生型アセチルCoAヒドロラーゼのアミノ酸配列における383位のセリン残基の他のアミノ酸残基への置換を有する、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

[請求項11] 前記他のアミノ酸が、リシン、グルタミン酸、スレオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、システイン、ヒスチジンまたはメチオニンである、請求項１０に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

[請求項12] 前記他のアミノ酸がシステインである、請求項１０に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ。

[請求項13] 前記アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子がコードするタンパク質が、下記（ａ）、（ｂ）または（ｃ）に記載のタンパク質である、請求項１０～１２のいずれか一項に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼ

。

（ａ）配列番号２に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

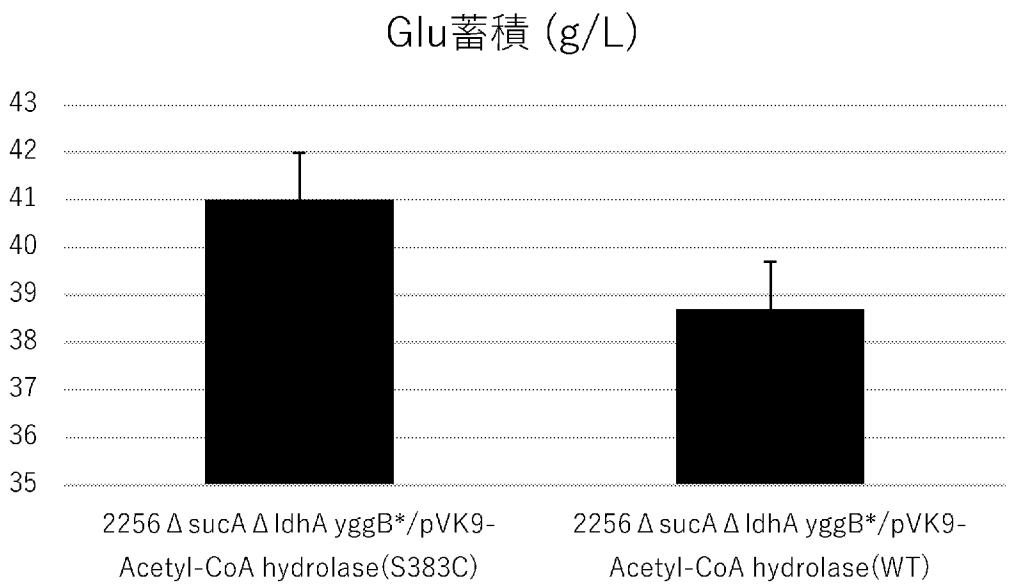
（ｂ）配列番号２に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質；

（ｃ）配列番号２に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

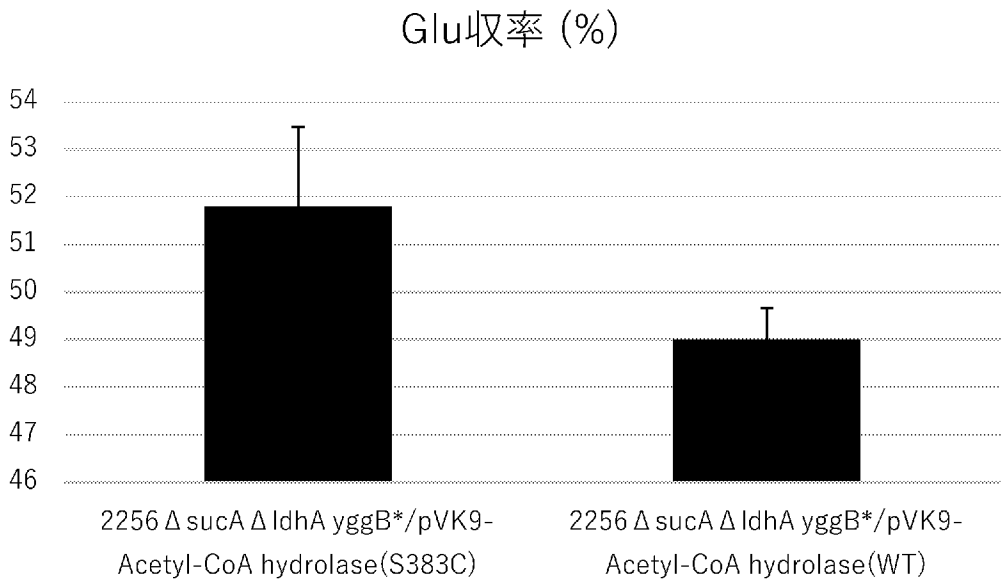
[請求項14] 請求項１０～１３のいずれか一項に記載の変異型アセチルCoAヒドロラーゼをコードする、変異型アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子。

WO 2025/141838 PCT/JP2023/047152

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/047152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; ***C12N 9/14***(2006.01)i; ***C12N 15/55***(2006.01)i; ***C12P 13/14***(2006.01)i
FI: C12N1/21 ZNA; C12N9/14; C12N15/55; C12P13/14 A

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/00-7/08; C12N9/00-9/99; C12N15/00-15/90; C12P1/00-41/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-149214 A (AJINOMOTO CO., INC.) 15 June 2006 (2006-06-15) claims, examples 3-4	1-14
A	JP 2007-97573 A (AJINOMOTO CO., INC.) 19 April 2007 (2007-04-19) claims, paragraphs [0030]-[0079], examples	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 March 2024	**19 March 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/047152

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/047152

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2006-149214 A	15 June 2006	US 2007/0254345 A1 claims, examples 3-4	
JP 2007-97573 A	19 April 2007	US 2006/0141588 A1 claims, paragraphs [0162]-[0289], examples	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/047152

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/14(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i
FI: C12N1/21 ZNA; C12N9/14; C12N15/55; C12P13/14 A

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N1/00-7/08; C12N9/00-9/99; C12N15/00-15/90; C12P1/00-41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2006-149214 A (味の素株式会社) 15.06.2006 (2006-06-15) 特許請求の範囲、実施例３－４	1-14
A	JP 2007-97573 A (味の素株式会社) 19.04.2007 (2007-04-19) 特許請求の範囲、段落［００３０］－［００７９］、実施例	1-14

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.03.2024	19.03.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

小林　薫 4B 6114

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/047152

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/047152

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2006-149214 A	15.06.2006	US 2007/0254345 A1 Claims、Examples 3-4	
JP 2007-97573 A	19.04.2007	US 2006/0141588 A1 Claims、段落[0162]-[0289]、Examples	