

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7222098号

(P7222098)

(45)発行日 令和5年2月14日(2023.2.14)

(24)登録日 令和5年2月6日(2023.2.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/53

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

C 1 2 N 9/04

Z N A

C 1 2 N 15/52 (2006.01)

C 1 2 N 15/52

Z

C 1 2 P 13/06 (2006.01)

C 1 2 P 13/06

C

請求項の数 12 (全24頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-535988(P2021-535988)

(86)(22)出願日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(65)公表番号 特表2022-515181(P2022-515181
A)

(43)公表日 令和4年2月17日(2022.2.17)

(86)国際出願番号 PCT/KR2019/004250

(87)国際公開番号 WO2020/130236

(87)国際公開日 令和2年6月25日(2020.6.25)

審査請求日 令和3年6月18日(2021.6.18)

(31)優先権主張番号 10-2018-0167599

(32)優先日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

微生物の受託番号 KCCM KCCM12000P

KCCM KCCM12418P

(73)特許権者 514199250

シージェイ チェイルジェダング コーポ
レイション大韓民国 ソウル 0 4 5 6 0 ジュング
- グ ドングホ - ロ 3 3 0

(74)代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74)代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74)代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 クォン、ス ヨン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ及びそれを用いたホモセリンまたはホモセリン由来 L
- アミノ酸の生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 8 のアミノ酸配列からなる変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属微生物。

【請求項 4】

前記コリネバクテリウム属微生物は、ホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸を生産する、請求項 3 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 5】

前記ホモセリン由来 L - アミノ酸は、L - スレオニン、L - イソロイシン、O - アセチルホモセリン及び L - メチオニンからなる群から選択される 1 種以上である、請求項 4 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 6】

前記コリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) である、請求項 3 に記載の微生物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むコリネバクテリウム (Cory

10

20

nebacterium) 属微生物を培地で培養することを含む、ホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸の生産方法。

【請求項 8】

前記培養された微生物または培養された培地からホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸を回収することをさらに含む、請求項 7 に記載のホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸の生産方法。

【請求項 9】

前記ホモセリン由来 L - アミノ酸は L - スレオニン、L - イソロイシン、O - アセチル - L - ホモセリン及び L - メチオニンからなる群から選択される 1 種以上である、請求項 7 に記載のホモセリンまたはホモセリン由来 L アミノ酸の生産方法。

10

【請求項 10】

前記コリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) である、請求項 7 に記載のホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸の生産方法。

【請求項 11】

微生物において請求項 1 の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を強化することを含む、ホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸の生産増加方法。

【請求項 12】

ホモセリンまたはホモセリン由来 L - アミノ酸の生産を増加させるための、請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼに関し、具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであり、上記アミノ酸置換は、407番目のアミノ酸がヒスチジンで置換されたことを含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ及びそれを用いてホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸を生産する方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

L-アミノ酸中、L-スレオニン、L-イソロイシン及びL-メチオニンは、アスパラギン酸セミアルデヒド (aspartate-semialdehyde、以下、ASA) でホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase、以下、Hom, EC:1.1.1.3) により生成されたホモセリンを共通に用いる。従って、上記アミノ酸を醗酵法で生産するためには、生合成経路で用いられる酵素の活性を一定水準以上に維持することが必須であり、これに関する集中的な研究が行われてきた。

【0003】

特に、L-リシンとL-スレオニン生合成経路の分岐点で作用するホモセリンデヒドロゲナーゼは、L-スレオニン及びL-イソロイシンにより活性が調節されることが知られている。L-スレオニンによるフィードバック抑制に脱感作化されたHom及びそれを用いたL-スレオニンの生産方法に関しては、従来いくつかの報告があった。1991年にドイツのEikmannなどはHomの378番目のアミノ酸残基であるグリシンがグルタメートに転換されて脱感作化されたHomを報告し (Eikmanns BJ et al., Appl. Microbial Biotechnol. 34: 617-622, 1991 (非特許文献1))、1991年に米国のArcherなどはフレームシフト突然変異によりHomのC-末端が損傷する場合、脱感作化の特性を示すことを報告した (Archer JA et al., Gene 107: 53-59, 1991 (非特許文献2))。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

50

【文献】韓国登録特許第 10 - 0620092 号公報

韓国登録特許第 10 - 1783170 号公報

韓国登録特許第 10 - 1632642 号公報

韓国登録特許第 0159812 号公報

韓国登録特許第 0924065 号公報

韓国登録特許第 10 - 0057684 号公報

【非特許文献】

【0005】

【文献】Eikmanns BJ et al., Appl. Microbial Biotechnol. 34: 617-622, 1991

Archer JA et al., Gene 107: 53-59, 1991

10

J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York

Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8

Appl. Environ. Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351

Peoples et al., Mol. Biol. 2(1):63-72, 1988

Takeda et al., Hum. Mutation, 2, 112-117 (1993)

J. Biotechnol. 103: 1-65, 2003

van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52: 41-545, 1999

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、スレオニンによるフィードバック阻害脱感作化の研究を行った中、変異型 Hom をコードする新規遺伝子を分離し、上記新規遺伝子が形質導入された微生物で L-アミノ酸生産能が向上することを確認することにより本出願を完成した。

【0007】

本出願の一つの目的は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において 407 番目のアミノ酸がヒスチジンで置換された、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供することにある。

30

【0008】

本出願の更に他の一つの目的は、上記変異型デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

本出願の更に他の一つの目的は、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、コリネバクテリウム属微生物を提供することにある。

【0009】

本出願の更に他の一つの目的は、上記微生物を培地で培養する段階;上記培養された微生物または培地からホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸を回収する段階を含む、ホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸の生産方法を提供することにある。

【0010】

40

本出願のもう一つの目的は、微生物において上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を強化することを含むホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸の生産増加方法を提供することにある。

【0011】

本出願のもう一つの目的は、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの、ホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸の生産増加用途を提供することにある。

発明の効果

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、天然型または野生型に比べて最終産物によるフィードバック抑制が脱感作化され、より効率のよいホモセリンまたはホモセリン由来 L-アミノ酸の大量生産に広く活用され得るものである。

50

【課題を解決するための手段】

【0012】

これを具体的に説明すると、次の通りである。一方、本出願で開示されたそれぞれの説明及び実施形態は、それぞれの異なる説明及び実施形態にも適用され得る。即ち、本出願において開示された多様な要素の全ての組み合わせが本出願の範疇に属する。また、下記の具体的な記述により本出願の範疇が制限されるとは見られない。

【0013】

上記目的を達成するための本出願の一つの様態は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであり、上記アミノ酸置換は407番目のアミノ酸が異なるアミノ酸で置換されたことを含む、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供する。

10

【0014】

具体的には、配列番号1のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであり、上記アミノ酸置換は407番目のアミノ酸がヒスチジンで置換されたことを含む、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供する。より具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において407番目のアミノ酸がヒスチジンで置換された、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供する。

【0015】

本出願においてホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase, EC:1.1.1.3) は、植物、微生物においてメチオニン、スレオニン、イソロイシン生合成の共通中間物質であるホモセリンの合成を触媒する酵素を意味し、ホモセリン脱水素酵素とも呼ばれる。本出願においてホモセリンデヒドロゲナーゼは、上記転換活性を有するタンパク質であれば、由来に関係なく含まれてもよく、任意の有機体 (植物及び微生物等) に由来する酵素を用いることができる。具体的には、上記ホモセリンデヒドロゲナーゼは、コリネバクテリウム属微生物由来であってもよく、より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) 由来であってもよい。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。上記配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号1のアミノ酸配列で構成されるタンパク質と混用され得る。

20

30

【0016】

本出願において、ホモセリンデヒドロゲナーゼを確保する方法は、当該分野でよく知られている多様な方法が適用可能である。その方法の例としては、タンパク質の発現に通常広く用いられるコリネバクテリウム属の微生物においてタンパク質を高効率で確保することができるようにコドン最適化が含まれた遺伝子合成技術、そして微生物の大量ゲノム情報を基盤に生物情報学的方法により有用酵素資源のスクリーニング方法を通じて確保することができ、これに制限されるものではない。

【0017】

本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列、例えば、配列番号1のアミノ酸配列、前後への無意味な配列の追加または自然に発生し得る突然変異、あるいはその潜在性突然変異 (silent mutation) を除くものではなく、上記配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質と互いに同一または対応する活性を有する場合であれば、本願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に該当する。具体的な例としては、本願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列またはこれと80%、90%、95%、または97%以上の相同性を有するアミノ酸配列で構成されるタンパク質であってもよい。

40

【0018】

また、本出願において「特定の配列番号で記載されたアミノ酸配列を含むタンパク質ま

50

たはポリペプチド」と記載されているとしても、このような相同性を有し、上記タンパク質に対応する効能を示すアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本出願の範囲内に含まれることは自明である。例えば、本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、コリネバクテリウム・グルタミクム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼであってもよい。より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13032 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号1)、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC14067 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号40)、またはコリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13869 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号41) であってもよい。上記配列を有するホモセリンデヒドロゲナーゼは互いに80%、90%、95%、または97%以上の相同性を示し、ホモセリンデヒドロゲナーゼとして対応する効能を示すため、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に含まれることは自明である。

10

【0019】

上記「相同性」は、二つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドモイエティ (moiety) 間の同一性のパーセントをいう。与えられたアミノ酸配列または塩基配列と一致する程度を意味し、百分率で表される。本明細書において、与えられたアミノ酸配列または塩基配列と同一または類似の活性を有するその相同性配列が「%相同性」で表される。一つのモイエティからもう一つのモイエティまでの配列間の相同性は、知られている当該技術により決定され得る。例えば、点数 (score)、同一性 (identity) 及び類似度 (similarity) などのパラメータ (parameter) を計算する標準ソフトウェア、具体的には、BLAST 2.0を用いたり、定義されたストリンジェントな条件下でサザンハイブリダイゼーション実験により配列を比較することにより確認することができ、定義される適切なハイブリダイゼーション条件は、該当技術範囲内であり、当業者によく知られている方法 (例えば、J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (非特許文献3); F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (非特許文献4)) で決定され得る。

20

【0020】

本出願において用語「変異」、「変異型」または「変異体」は、遺伝的または非遺伝的に一つの安定した表現型の変化を示す培養物や個体を意味する。具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に対応するアミノ酸配列上において一つ以上のアミノ酸が変異され、その活性が野生型、天然型または非変異型と比較して効率よく増加したり、イソロイシン、スレオニン、これらの類似体または誘導体に対するフィードバック阻害が解除されたり活性増加とフィードバック阻害解除がいずれも行われた変異体を意味してもよい。

30

【0021】

本出願において変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、「変異されたホモセリンデヒドロゲナーゼ」、または「ホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体」で混用され得る。一方、このような変異体は、非自然的な (non-naturally occurring) ものであってもよい。

40

【0022】

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型タンパク質であり、上記アミノ酸置換は、407番目のアミノ酸がヒスチジンで置換されたことを含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであってもよい。上記ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列は、先に説明した通りであり、例えば、配列番号1のアミノ酸配列であってもよい。また、上記「407番目のアミノ酸」は、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から407番のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸を意味するものであってもよく、具体的には、配列番号1のアミノ酸配列のN末端から407番のアミノ酸を意味してもよい。上記407番目のアミノ酸は、アルギ

50

ニンがヒスチジンで置換されたものであってもよい。より具体的には、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、配列番号8のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。また、上記配列前後への無意味な配列の追加または自然に発生し得る突然変異、あるいはその潜在性突然変異 (silent mutation) を除くものではなく、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼと互いに同一または対応する活性を有する場合であれば、本願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に該当する。具体的な例としては、本願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、配列番号8のアミノ酸配列または上記配列番号8のアミノ酸配列においてN末端から407番のアミノ酸は固定され、これと80%、90%、95%、または97%以上の相同性を有するアミノ酸配列で構成されるタンパク質であってもよい。

10

【0023】

また、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有する野生型または天然型タンパク質、または不変型タンパク質とは異なり、最終産物であるイソロイシン、スレオニン、メチオニン、ホモセリンまたはこれらの誘導体または類似体によるフィードバック阻害が解除されたり脱感作された特徴を有するものであってもよい。本出願において用語、「フィードバック阻害 (feedback inhibition)」とは、代謝の最終産物がそれより前段階にある反応を阻害することをいう。従って、ホモセリンデヒドロゲナーゼのフィードバック阻害を解除したり脱感作する場合、そうでない場合に比べて微生物のホモセリン及びホモセリン由来L-アミノ酸の生産性を高めることができる。

20

【0024】

上記ホモセリン由来L-アミノ酸は、L-ホモセリンを前駆体として生合成できるL-アミノ酸を意味し、L-ホモセリンから生合成され得る物質であれば制限されない。上記ホモセリン由来L-アミノ酸は、ホモセリン由来L-アミノ酸だけでなく、その誘導体も含み得る。例えば、L-スレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン、O-ホスホ-L-ホモセリン、L-メチオニン及び/又はL-グリシンであってもよいが、これに制限されない。より具体的には、L-スレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン及び/又はL-メチオニンであってもよいが、これに制限されない。

【0025】

本出願のもう一つの様態は、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

上記ホモセリンデヒドロゲナーゼ、変異型については上記で説明した通りである。

【0026】

本出願において用語、「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単位体 (monomer) が共有結合により長く鎖状につながったヌクレオチドの重合体 (polymer) で、一定の長さ以上のDNAまたはRNA鎖であり、より具体的には、変異型上記ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド断片を意味する。本出願の変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を有する変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であれば制限なく含まれ得る。

40

【0027】

本出願においてホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、具体的には、コリネバクテリウム属微生物由来であってもよく、より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム由来であってもよい。しかし、これに制限されるものではない。

【0028】

また、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、コドンの縮退性 (degeneracy) により、または上記タンパク質を発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、タンパク質のアミノ酸配列を変化させない範囲内でコーディング領域で多様な変形が行われ得る。具体的には、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列またはこれと80

50

%、90%、95%、または97%以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであってもよい。また、このような相同性を有し、実質的に上記タンパク質と同一または対応する効能を示すタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたポリヌクレオチド配列も本出願の範囲内に含まれることは自明である。本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号1のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列であってもよい。例えば、配列番号2のポリヌクレオチド配列であってもよいが、これに制限されるものではない。また、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドは配列番号1のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であってもよく、具体的には、配列番号8をコードするポリヌクレオチド配列であってもよい。例えば、配列番号7のポリヌクレオチド配列であってもよいが、これに制限されるものではない。

10

【0029】

または公知の遺伝子配列から製造され得るプローブ、例えば、上記ポリヌクレオチド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にハイブリッド化し、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質をコードする配列であれば、制限なく含まれ得る。上記「ストリンジェントな条件」とは、ポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。このような条件は文献（例えば、J. Sambrook et al., 同上）に、具体的に記載されている。例えば、相同性の高い遺伝子同士、80%以上、具体的には90%以上、より具体的には95%以上、さらに具体的には97%以上、特に具体的には99%以上の相同性を有する遺伝子同士ハイブリッド化し、それより相同性の低い遺伝子同士ハイブリッド化しない条件、または通常のサザンハイブリッド化の洗浄条件である60、1×SSC、0.1% SDS、具体的には、60、0.1×SSC、0.1% SDS、より具体的には68、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度及び温度で1回、具体的には2回～3回洗浄する条件を列挙することができる。ハイブリダイゼーションは、たとえハイブリダイゼーションの厳格さにより塩基間のミスマッチ（mismatch）が可能であっても、2つのポリヌクレオチドが相補的配列を有することを要求する。用語、「相補的」とは、互いにハイブリダイゼーションが可能なヌクレオチドの塩基間の関係を記述するのに用いられる。例えば、DNAに関し、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。従って、本出願は、また、実質的に類似のヌクレオチド配列だけでなく全体配列に相補的な単離されたヌクレオチド断片を含み得る。具体的には、相同性を有するポリヌクレオチドは、55のTm値でハイブリダイゼーション段階を含むハイブリダイゼーション条件を用い、上述した条件を用いて探知することができる。また、上記Tm値は60、63または65であってもよいが、これに制限されるものではなく、その目的に応じて当業者により適宜調節され得る。ポリヌクレオチドをハイブリダイズする適切な厳格さは、ポリヌクレオチドの長さ及び相補性程度に依存し、変数は該当技術分野によく知られている（Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8を参照（非特許文献5））。

20

30

【0030】

本出願の更に他の一つの様態は、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物を提供する。具体的には、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を生産するコリネバクテリウム属（the genus of *Corynebacterium*）微生物を提供する。

40

【0031】

上記ホモセリンデヒドロゲナーゼ、変異体については上記で説明した通りである。

具体的には、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は自然にホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸生産能を有している微生物またはホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸の生産能がない母菌株にホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸の生産能が付与された微生物を意味する。具体的には、上記ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、配列番号1のアミノ酸配列において407番目のアミノ酸がヒスチ

50

ジンで置換された変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現する微生物であってもよいが、これに制限されない。上記微生物は、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを含めたり、または変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換され、変異型ポリペプチドを発現できる細胞または微生物であり、本出願の目的上、上記宿主細胞または微生物は、上記変異型ポリペプチドを含めてホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を生産できる微生物であれば、いずれも可能である。

【0032】

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、野生型または非変型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質を含む微生物に比べてホモセリン、ホモセリン由来L-アミノ酸の生産能が向上するため、これら微生物からホモセリン、ホモセリン由来L-アミノ酸を高収率で得ることができる。

10

【0033】

本出願において上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、その種類が特に制限されないが、エンテロバクター (Enterobacter) 属、エシェリキア (Escherichia) 属、エルウィニア (Erwinia) 属、セラチア (Serratia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属及びブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属に属する微生物であってもよい。より具体的には、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属に属する微生物であってもよい。

20

【0034】

本出願において「コリネバクテリウム属微生物」は、具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム (Brevibacterium lactofermentum)、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)、コリネバクテリウム・テルモアミノゲネス (Corynebacterium thermoaminogenes)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (Corynebacterium efficiens) などであるが、必ずしもこれに限定されるものではない。さらに具体的には、本出願においてコリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) であってもよい。

【0035】

一方、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが導入された微生物であってもよい。具体的には、上記導入は、形質転換により行われ得るが、これに制限されない。

30

【0036】

本出願で用いられた用語「ベクター」とは、適した宿主内で目的タンパク質を発現させるように、適した調節配列に作動可能に連結された上記目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA製造物を意味する。上記調節配列は、転写を開始できるプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレータ配列、適したmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び解読の終結を調節する配列を含み得る。ベクターは、適当な宿主細胞内に形質転換された後、宿主ゲノムと関係なく複製されたり機能することができ、ゲノムそのものに統合することができる。

40

【0037】

本出願で用いられるベクターは、宿主細胞内で複製可能であれば特に限定されず、当業界において知られた任意のベクターを用いることができる。通常用いられるベクターの例としては、天然状態であるか、組み換えられた状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージを挙げることができる。例えば、ファージベクターまたはコスミドベクターとしてpWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、及びCharon21Aなどを用いることができ、プラスミドベクターとしてpBR系、pUC系、pBluescriptII系、pGEM系、pTZ系、pCL系及びpET系などを用いることができる。具体的には、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、p

50

MW118、pCC1BACベクターなどを用いることができるが、これに制限されない。

【0038】

本出願で使用可能なベクターは特に制限されるものでなく、公知となった発現ベクターを用いることができる。また、細胞内染色体挿入用ベクターを通じて染色体内に目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入させることができる。上記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当業界において知られた任意の方法、例えば、相同組換えにより行われ得るが、これに限定されない。上記染色体挿入如何を確認するための選別マーカー (selection marker) をさらに含み得る。選別マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選別、即ち、目的ポリヌクレオチド分子の挿入有無を確認するためのものであり、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を付与するマーカーが用いられる。選択剤 (selective agent) が処理された環境では選別マーカーを発現する細胞のみ生存したり、異なる表現形質を示すため、形質転換された細胞を選別することができる。

10

【0039】

本出願において用語「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に導入し、宿主細胞内で上記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質が発現できるようにすることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内で発現され得るならば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置したり、染色体外に位置したりに関係なくこれらをいずれも含み得る。また、上記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNA及びRNAを含む。上記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現され得るならば、いかなる形態で導入されても問題ない。例えば、上記ポリヌクレオチドは独自に発現されるのに必要な全ての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入され得る。上記発現カセットは、通常、上記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されているプロモーター (promoter)、転写終結信号、リボソーム結合部位及び翻訳終結信号を含み得る。上記発現カセットは、自体複製が可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、上記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞において発現に必要な配列と作動可能に連結されているものであってもよいが、これに限定されない。上記形質転換する方法は、ポリヌクレオチドを細胞内に導入するいかなる方法も含まれ、宿主細胞により当分野において公知となった通り、適した標準技術を選択して行うことができる。例えば、電気穿孔法 (electroporation)、リン酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 または $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 沈殿、塩化カルシウム (CaCl_2) 沈殿、マイクロインジェクション法 (microinjection)、ポリエチレングリコール (PEG) 法、DEAE-デキストラン法、カチオンリボソーム法、及び酢酸リチウム-DMSO法などがあるが、これに制限されない。

20

30

【0040】

また、上記において用語「作動可能に連結」されたとは、本出願の目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介させるプロモーター配列と上記ポリヌクレオチド配列が機能的に連結されていることを意味する。作動可能な連結は、当業界の公知となった遺伝子組換え技術を用いて製造することができ、部位特異的DNA切断及び連結は、当業界の切断及び連結酵素などを用いて製作することができるが、これに制限されない。

40

【0041】

上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、コリネバクテリウム属の微生物に上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むように形質転換されたものであってもよい。上記コリネバクテリウム属微生物は、例示的に2-アミノ-3-ヒドロキシ-吉草酸 (AHV) に耐性を有する菌株;スレオニン生合成経路で最初の重要な酵素として作用するアスパラギン酸キナーゼ (lysC) のフィードバック阻害 (feedback inhibition) の解消のためにlysCの377番のアミノ酸であるロイシン (Leucine) をリシン (Lysine) で置換し、L-スレオニンを生産する菌株;上記L-スレオニンを生産する菌株においてL-スレオニンデヒドラターゼ (L-threonine dehydratase, イソロイシン生合成経路の最初の酵素) をコード

50

する遺伝子*ilvA*の323番目のアミノ酸をアラニンで置換し、L-イソロイシンを生産する菌株 (Appl. Environ. Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351 (非特許文献6)); O-アセチル-ホモセリン分解経路のO-アセチル-ホモセリンチオールリアーゼ (O-acetylhomoserine (thiol)-lyase) 及び、シスタチオニンガンマシンターゼ (cystathionine gamma-synthase) タンパク質が不活性化され、O-アセチルホモセリンを生産する菌株; またはメチオニンシステイン転写調節因子タンパク質が不活性化され、メチオニンを生産する菌株が含まれてもよいが、これに制限されるものではない。

【0042】

本出願の更に他の一つの様態は、記述された微生物を培地で培養することを含む、ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸の生産方法を提供する。

10

上記L-アミノ酸生産方法は、上記培養された微生物または培養された培地からホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を回収することをさらに含み得る。

【0043】

上記微生物は、上記で説明した通り、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体を含むコリネバクテリウム属微生物であってもよく、より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミクムであってもよい。また、上記コリネバクテリウム属微生物またはコリネバクテリウム・グルタミクムは、ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を生産する微生物であってもよい。上記ホモセリン由来L-アミノ酸は、ホモセリン由来L-アミノ酸だけでなく、この誘導体も含み得る。例えば、L-スレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン、O-ホスホ-L-ホモセリン、L-メチオニン及び/又はL-グリシンであってもよいが、これに制限されない。より具体的には、L-スレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン及び/又はL-メチオニンであってもよいが、これに制限されない。

20

【0044】

上記ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸は、本出願の記述された微生物が生産したホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸培養液であるか、精製された形態であってもよい。また、それ自体の形態だけでなく、その塩の形態も全て含むことは、当業者に自明である。

【0045】

上記ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を生産する方法は、当業界において公知となった最適化された培養条件及び酵素活性の条件で当業者により容易に決定され得る。

30

【0046】

上記方法において、上記微生物を培養する段階は、特に制限されないが、公知となった回分式培養方法、連続式培養方法、流加式培養方法などにより行われ得る。この時、培養条件は、特にこれに制限されないが、塩基性化合物 (例: 水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたはアンモニア) または酸性化合物 (例: リン酸または硫酸) を用いて適正pH (例えば、pH5~9、具体的にはpH6~8、最も具体的にはpH6.8) を調節することができ、酸素または酸素含有ガス混合物を培養物に導入させて好気性の条件を維持することができる。培養温度は20 ~ 45、具体的には25 ~ 40を維持することができ、約10~160時間培養することができるが、これに制限されるものではない。上記培養により生産されたスレオニン、イソロイシン、またはアセチルホモセリンは、培地中に分泌されたり細胞内に残留することができる。

40

【0047】

併せて、用いられる培養用培地は、炭素供給源としては、糖及び炭水化物 (例: グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、モラセス、澱粉及びセルロース)、油脂及び脂肪 (例: 大豆油、ひまわり種子油、ピーナッツ油及びココナッツ油)、脂肪酸 (例: パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸)、アルコール (例: グリセロール及びエタノール) 及び有機酸 (例: 酢酸) などを個別に用いたり、または混合して用いられるが、これに制限されない。窒素供給源としては、窒素含有有機化合物 (例: ペプトン、酵母抽出液、肉汁、麦芽抽出液、トウモロコシ浸漬液、大豆粕粉及びウレア)、

50

または無機化合物（例：硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム）などを個別に用いたり、または混合して用いられるが、これに制限されない。リン供給源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、これに対応するナトリウム含有塩などを個別に用いたり、または混合して用いられるが、これに制限されない。また、培地にはその他の金属塩（例：硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄）、アミノ酸及びビタミンのような必須成長促進物質を含み得る。

【 0 0 4 8 】

本出願の上記培養段階で生産されたホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を回収する方法は、培養方法により当該分野において公知となった適した方法を用いて培養液から目的とする産物を得ることができる。例えば、遠心分離、濾過、アニオン交換クロマトグラフィ、結晶化及びHPLCなどが用いられ、当該分野において公知となった適した方法を用いて培地または微生物から目的物質であるホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸を回収することができる。また、上記回収段階は、追加の精製工程を含んでもよく、当該分野において公知となった適した方法を用いて行われ得る。

10

【 0 0 4 9 】

本出願のもう一つの様態は、上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの、ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸生産増加用途を提供する。

本出願のもう一つの様態は、微生物において上記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を強化することを含む、ホモセリンまたはホモセリン由来L-アミノ酸の生産増加方法を提供する。

20

【 0 0 5 0 】

本出願において用語、タンパク質が「発現されるように／される」とは、目的タンパク質が微生物内に導入されたり、微生物内に存在するタンパク質の場合、内在的または変形前に比べてその活性が強化された状態を意味する。

【 0 0 5 1 】

具体的には、「タンパク質の導入」とは、微生物が本来有していなかった特定タンパク質の活性を示すようになること、または当該タンパク質の内在的活性または変形前の活性に比べて向上した活性を示すようになることを意味する。例えば、特定タンパク質をコードするポリヌクレオチドが微生物内に染色体として導入されたり、特定タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが微生物内に導入され、その活性が示されるものであってもよい。また、「活性の強化」とは、微生物が有する特定タンパク質の内在的活性または変形前の活性に比べて活性が向上したことを意味する。「内在的活性」とは、自然な、または人為的要因による遺伝的変異により微生物の形質が変化する場合、形質変化前に母菌株が本来有していた特定タンパク質の活性をいう。

30

【 0 0 5 2 】

具体的には、本出願の活性強化は、上記タンパク質変異体をコードする遺伝子の細胞内コピー数の増加、上記タンパク質変異体を暗号化する遺伝子の発現調節配列に変異を導入する方法、上記タンパク質変異体を暗号化する遺伝子発現調節の配列を活性が強力な配列に交替する方法、染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を有する自然型タンパク質をコードする遺伝子を、上記タンパク質変異体を暗号化する遺伝子に変える方法、上記タンパク質変異体の活性が強化されるように上記ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異を追加で導入する方法、及び微生物に上記タンパク質変異体を導入する方法からなる群から選択されるいずれか一つ以上の方法で行われてもよいが、これに制限されない。

40

【 0 0 5 3 】

上記において遺伝子のコピー数の増加は、特にこれに制限されないが、ベクターに作動可能に連結された形態で行われたり、宿主細胞内の染色体内に挿入されることにより行われてもよい。具体的には、本出願のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主と無関係に複製されて機能できるベクターが宿主細胞内に導入されるものであってもよい。または、上記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主細胞

50

内の染色体内に上記ポリヌクレオチドを挿入させるベクターが宿主細胞の染色体内に導入されるものであってもよい。上記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当業界において知られた任意の方法、例えば、相同組換えにより行われてもよい。

【 0 0 5 4 】

次に、ポリヌクレオチドの発現が増加するように発現調節配列を変形することは、特にこれに制限されないが、上記発現調節配列の活性をさらに強化するように核酸の配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換またはこれらの組み合わせにより配列上の変異を誘導して行ったり、さらに強い活性を有する核酸配列で交替することにより行われてもよい。上記発現調節配列は、特にこれに制限されないが、プロモーター、オペレータ配列、リボソーム結合部位をコードする配列、転写及び解読の終結を調節する配列などを含んでもよい。

10

【 0 0 5 5 】

上記ポリヌクレオチド発現単位の上部には、本来のプロモーターの代わりに強力なプロモーターが連結され得、これに限定されるものではない。公知となった強力なプロモーターの例としては、cjl-cj7プロモーター（韓国登録特許第10-0620092号公報（特許文献1））、1acプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージPRプロモーター、P_Lプロモーター、tetプロモーター、gapAプロモーター、SPL7プロモーター、SPL13（sm3）プロモーター（韓国登録特許第10-1783170号公報（特許文献2））、O2プロモーター（韓国登録特許第10-1632642号公報（特許文献3））、tklプロモーター及びyccAプロモーターなどがあるが、これに限定されるものではない。

20

【 0 0 5 6 】

併せて、染色体上のポリヌクレオチド配列の変形は、特にこれに制限されないが、上記ポリヌクレオチド配列の活性をさらに強化するように核酸の配列を欠失、挿入、非保存的または保存的置換またはこれらの組み合わせにより発現調節配列上の変異を誘導して行ったり、さらに強い活性を有するように改良されたポリヌクレオチド配列に交替することにより行われてもよい。

【 0 0 5 7 】

このようなタンパク質活性の導入及び強化は、対応するタンパク質の活性または濃度が野生型や非変型微生物菌株におけるタンパク質の活性または濃度を基準として一般に、最小1%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%または500%、最大1000%または2000%まで増加するものであってもよいが、これに制限されるものではない。

30

【 0 0 5 8 】

上記ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列、407番目のアミノ酸及び微生物に関しては前述した通りである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 9 】

以下、本出願を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これら実施例は、本出願を例示的に説明するためのものであり、本出願の範囲がこれら実施例に限定されるものではない。

40

【 0 0 6 0 】

実施例1：人工変異法を通じたAHV耐性微生物スクリーニング

本実施例では、コリネバクテリウム・グルタミカムKFCC10881（韓国登録特許第0159812号公報（特許文献4））を母菌株としてホモセリンデヒドロゲナーゼ（homoserine dehydrogenase、以下、Hom, EC:1.1.1.3）のL-スレオニンによるフィードバック抑制を解除するために、L-スレオニン類似体である2-アミノ-3-ヒドロキシ-吉草酸（以下、Alv）に対する耐性を付与する実験を実施した。

【 0 0 6 1 】

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

50

e: 下、NTG)を用いた人工変異法で変異を誘導した。種培地で18時間培養したKFCC10881菌株を種培地4mlに接種した後、OD₆₆₀が約1.0になるまで培養した。培養液を遠心分離して菌体を回収した後、50mMトリス-マレイン酸緩衝溶液(pH6.5)で2回洗浄し、最終4mlの同一の緩衝溶液で懸濁した。菌体懸濁液に最終濃度150mg/lになるようにNTG溶液(2mg/ml in 0.05Mトリス-マレイン酸緩衝溶液(pH6.5))を添加して室温で20分間静置した後、遠心分離を通じて菌体を除去し、NTGの除去のために、同一の緩衝溶液で2回洗浄した。最終的に洗浄した菌体を20%のグリセロール溶液4mlに懸濁した後、使用前まで-70℃で保管した。NTG処理菌株を3g/lのAHVを含む最小培地に塗抹し、上記過程を通じて126株のKFCC10881由来AHV耐性菌株を獲得した。

【0062】

種培地(pH7.0)

ブドウ糖20g、ペプトン10g、酵母抽出物5g、尿素1.5g、KH₂PO₄ 4g、K₂HPO₄ 8g、MgSO₄ 7H₂O 0.5g、ビオチン100μg、チアミンHCl 1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド2000μg(蒸留水1リットル基準)

最小培地(pH7.2)

ブドウ糖5g、KH₂PO₄ 1g、(NH₄)₂SO₄ 5g、MgSO₄ 7H₂O 0.4g、NaCl 0.5g、ビオチン200μg、チアミンHCl 100μg、パントテン酸カルシウム100μg、ニコチンアミド0.03g、尿素2g、Na₂B₄O₇ 10H₂O 0.09mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₇ 4H₂O 0.04mg、ZnSO₄ 7H₂O 0.01mg、CuSO₄ 5H₂O、MnCl₂ 4H₂O 0.01mg、FeCl₃ 6H₂O 1mg、CaCl₂ 0.01mg(蒸留水1リットル基準)

実施例2: KFCC10881由来AHV耐性菌株に対するL-スレオニン生産テスト

実施例1で獲得した126株のAHV耐性菌株に対してL-スレオニン生産能テストを進めた。種培地25mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコに実施例1で獲得した126株の菌株を接種した後、30℃で20時間200rpmで振盪培養した。下記L-スレオニン生産培地24mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコに1mlの種培養液を接種し、30℃で48時間200rpmで振盪培養した。

【0063】

L-スレオニン生産培地(pH7.2)

ブドウ糖30g、KH₂PO₄ 2g、尿素3g、(NH₄)₂SO₄ 40g、ペプトン2.5g、CSL(Sigma) 5g(10ml)、MgSO₄ 7H₂O 0.5g、ロイシン400mg、CaCO₃ 20g(蒸留水1リットル基準)

培養終了後にHPLCを用いて生産された種々のアミノ酸の生産量を測定した。実験した126株の菌株中、L-スレオニン生産能に優れたことが示された上位5株に対するアミノ酸の培養液内濃度を表1に示した。上記過程を通じて確認された5株の候補をそれぞれKFCC10881-1~KFCC10881-5と命名した。

【0064】

【表1】

優れたAHV耐性菌株L-スレオニン生産実験

	OD	Thr	Hse	Gly	Ile	Lys	Thr+Hse +Gly+Ile
KFCC10881	60.1	0.0	0.1	0.2	0.0	12.3	0.3
KFCC10881-1	53.6	4.1	1.3	1.4	1.2	2.0	8.0
KFCC10881-2	53.3	2.2	0.9	1.0	1.1	8.3	5.2
KFCC10881-3	68.5	1.5	1.2	1.1	0.2	10.8	4.0
KFCC10881-4	59.1	1.2	0.9	1.0	0.7	1.9	3.8
KFCC10881-5	49.6	2.4	1.1	1.2	0.9	5.4	5.6

【0065】

表1の結果のように、AHV耐性を有する5種の菌株が生産するL-スレオニン、L-ホモセリン、L-グリシン、L-イソロイシンは、対照群比で増加した一方、L-リシンは減少する結果を示した。

【0066】

L-スレオニンとL-リシンの生合成経路は、アスパラギン酸セミアルデヒド (aspartate-semialdehyde、以下、ASA) を起点に分かれる。即ち、L-スレオニンの生産量が増えるほどL-リシンの生産量は減少する。これによりL-スレオニン生産量が増加するほどL-スレオニン生合成経路上、副産物になり得るホモセリン (Hse)、L-グリシン (Gly)、L-イソロイシン (Ile) も増加しうするため、これらの生産量の総合 (Thr+Hse+Gly+Ile) も確認した。

10

【0067】

従って、上記AHV耐性菌株中、L-リシンの生産量が減少し、L-スレオニンの生産量が高く、Thr+Hse+Gly+Ileの全体生産量が高い菌株 (KFCC10881-1) を最も優れたAHV耐性菌株として選別した。

【0068】

実施例3：KFCC10881由来スレオニン生産能に優れた菌株の塩基配列分析

上記実施例2で選別した菌株のL-スレオニン生合成酵素の塩基配列を分析するために、次のように進行した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) から提供する遺伝子情報に基づいてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032のホモセリンデヒドロゲナーゼをコードしているhomの塩基配列 (配列番号2, NCg11136)、ホモセリンキナーゼをコードしているthrBの塩基配列 (配列番号3, NCg11137) をそれぞれ確保した。homとthrBはオペロン構造をなしていることが知られている (Peoples et al., Mol. Biol. 2(1): 3-72, 1988 (非特許文献7))。

20

【0069】

選別された菌株のhom-thrBオペロンを含むDNA断片を確保するために、菌株の菌体を鋳型として用いて配列番号4及び配列番号5のプライマー組合わせによりPCRを行った。PCR反応のためのポリメラーゼとしては、PfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、PCR条件は変性96℃、30秒間; アニール52℃、30秒間; 及び重合反応72℃、3分間を30回反復した。その結果、配列番号2の開始コドンの上段にプロモーター部位を含む300bpの塩基配列を含めて配列番号3の終結コドン下段200bpを含む2778bpの遺伝子断片を増幅することができた (配列番号6)。

30

【0070】

上記製作されたプライマーを用いてABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type, Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。KFCC10881-1内のhom-thrBオペロン中、homに該当する塩基配列は配列番号2の1220番目の塩基グアニンがアデニンに変異され、アルギニン残基をコードするCGT遺伝子コドンがヒスチジン残基をコードするCAT遺伝子コドンに変異されたことが分かった (以下、R407H変異; 配列番号7)。一方、配列番号3に該当するthrBでは変異が発見されなかった。

【0071】

上記塩基配列分析の結果を総合してみる時、結果的にKFCC10881-1内で発現されるHom (配列番号8) は407番目のアミノ酸残基であるアルギニンがヒスチジン (以下、R407H変異) に変異されることにより、L-スレオニンによるフィードバック抑制に脱感作化されたことが分かった。

40

【0072】

実施例4：新規ホモセリンデヒドロゲナーゼ導入菌株の製作

上記実施例2で確認した変異体 (R407H) が野生型菌株由来に導入された菌株を製作するために、配列番号9及び配列番号10のプライマーを製作した。

【0073】

R407H hom変異が導入された菌株を製作するために、KFCC10811-1菌株から抽出したゲノムDNAを鋳型として配列番号9及び配列番号10のプライマーを用いてPCRを行った

50

。PCR反応のためのポリメラーゼとしてはPfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、PCR条件は変性95℃、30秒間;アニーリング55℃、30秒間;及び重合反応72℃、2分間を28回反復した。その結果、1338bpのhom遺伝子の約300bpプロモーター部位を含む1668bpの遺伝子断片をそれぞれ得た。増幅産物をQIAGEN社のPCR Purification kitを用いて精製し、ベクター製作のための挿入DNA断片として用いた。一方、制限酵素smalで処理した後、65℃で20分間熱処理したpDZ (韓国登録特許第0924065号公報 (特許文献5)) ベクターと上記PCRを通じて増幅した挿入DNA断片のモル濃度 (M) 比率が1:2になるようにしてタカラ (TaKaRa) のInfusion Cloning Kitを用いて提供されたマニュアルによりクローニングすることにより、R407H変異を染色体上に導入するためのベクターpDZ-R407Hを製作した。

10

【0074】

製作されたベクターを電気穿孔法によりコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上でそれぞれ変異型塩基で置換されている菌株を得た。適切な置換如何は以下のプライマー組合わせを用い、MASA (Mutant Allele Specific Amplification) PCR技法 (Takeda et al., Hum. Mutation, 2, 112-117 (1993) (非特許文献8)) を用いて変異型配列に符合するプライマー組合わせ (配列番号11及び配列番号12) では増幅される菌株を選別することにより1次決定し、選別された菌株のhom配列分析は、配列番号11及び配列番号13のプライマー組合わせを用いて実施例2と同様の方法で変異型配列分析することにより2次確認した。変異型塩基で置換された菌株はCA09-0900と命名した。

20

【0075】

上記菌株CA09-0900は、2018年12月14日付でブダペスト条約下の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (KCCM) に国際寄託し、KCCM12418Pとして寄託番号の付与を受けた。

【0076】

実施例5: ホモセリンドヒドロゲナーゼ酵素活性の測定

上記製作した菌株を対象にHom酵素活性を測定した。実施例4で製作されたCA09-0900及び対照群として野生型菌株 (ATCC13032) を下記種培地25mlに接種した後、対数期の後半部まで培養した。遠心分離を通じて菌体を回収し、0.1Mリン酸カリウム (pH7.6) 緩衝溶液で2回洗浄した後、30%の濃度でグリセロールを含有している同一緩衝溶液2mlで最終懸濁した。菌体懸濁液を一般的なガラスビードボルテックス法で10分間物理的に破碎した後、2回の遠心分離 (13,000rpm, 4℃、30分間) を通じて上清を回収し、Hom酵素活性の測定のための粗酵素液 (crude extract) として用いた。Hom酵素活性の測定のために酵素活性測定用反応液 (リン酸カリウム (pH7.0) 緩衝溶液、25 mM NADPH, 5 mM アスパラギン酸セミアルデヒド) 0.9mlの粗酵素液を添加した後、30℃で反応した。Hom酵素活性Uは、L-スレオニンの有無 (0mM, 10mM) により1分当たり消耗したNADPH μ mol数で定義し、酵素活性測定結果は、下記表2の通りである。

30

【0077】

【表2】

Hom酵素活性 (U) 及びL-スレオニンによる脱感作化の測定

40

菌株	L-スレオニン添加量 (mM) による酵素活性 (U)	
	0 mM	10 mM
ATCC13032	0.91	0.02
CA09-0900	1.37	1.23

【0078】

実験の結果、R407H変異を含めているHomの場合、10mMのL-スレオニンが含まれている条件で野生型Homとは異なって活性抑制程度が減少し、L-スレオニンに対して脱感作

50

化されていることが分かった。

【 0 0 7 9 】

実施例6：L-スレオニン生産能を有するコリネバクテリウム属の微生物菌株の製作及び評価

野生種コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032からL-スレオニン生産菌株を開発した。具体的には、スレオニン生合成経路で最初の重要な酵素として作用するアスパラギン酸キナーゼ (lysC) のフィードバック阻害 (feedback inhibition) の解消のために lysC の377番のアミノ酸であるロイシン (Leucine) をリシン (Lysine) で置換した (配列番号14)。

【 0 0 8 0 】

さらに具体的には、lysC (L377K) 変異が導入された菌株を製作するために、ATCC13032の染色体を鋳型として配列番号15及び配列番号16あるいは配列番号17及び配列番号18のプライマーを用いてPCRをそれぞれ行った。PCR反応のためのポリメラーゼとしてはPfuUltra™高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、PCR条件は変性95、30秒間; アニーリング55、30秒間; 及び重合反応72、1分間を28回反復した。その結果、lysC遺伝子の変異を中心に5'上段部位の515bp DNA断片と3'下段部位の538bpのDNA断片をそれぞれ得た。増幅された2種類のDNA切片を鋳型とし、配列番号15及び配列番号18のプライマーでPCRを行った。PCR条件は95で5分間変性後、95で30秒間の変性、55で30秒間のアニーリング、72で2分間の重合を28回反復した後、72で5分間の重合反応を行った。その結果、377番目のロイシンがリシンで置換されたアスパルトキナーゼ変異体をコードするlysC遺伝子の変異を含む1023bpのDNA断片が増幅された。増幅産物をQIAGEN社のPCR Purification kitを用いて精製し、ベクター製作のための挿入DNA断片として用いた。一方、制限酵素smalで処理した後、65で20分間熱処理したpDZベクター (韓国登録特許第0924065号公報 (特許文献5)) と上記PCRを通じて増幅した挿入DNA断片のモル濃度 (M) の比率が1:2になるようにしてタカラ (TaKaRa) のInfusion Cloning Kitを用いて提供されたマニュアルによりクローニングすることにより、L377K変異を染色体上に導入するためのベクターpDZ-L377Kを製作した。

【 0 0 8 1 】

製作されたベクターを電気穿孔法でATCC13032に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上で各塩基変異が変異型塩基で置換されている菌株を得、これをCJP1と命名した。上記CJP1は、CA01-2307と命名され、2017年3月29日付でブダペスト条約下の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (KCCM) に寄託し、受託番号KCCM12000Pの付与を受けた。

【 0 0 8 2 】

上記菌株のL-スレオニン生産変化を明確に確認するために、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase) をコードする遺伝子に上記実施例4で確認した変異を導入した。具体的には、R407H変異をCJP1菌株に導入するために、実施例4で製作されたpDZ-R407Hベクターを電気穿孔法でCJP1に形質転換し、実施例4と同様の方法で2次交差過程を経て染色体上で塩基変異が変異型塩基で置換されている菌株を得た。変異型塩基で置換された菌株はCJP1-R407Hと命名した。

【 0 0 8 3 】

【表3】

製作菌株のL-スレオニン生産能の確認

菌株	アミノ酸 (g/l)	
	Thr	Lys
CJP1	0.36	3.62
CJP1-R407H	1.50	2.47

【 0 0 8 4 】

その結果、変異を導入した菌株は対照群であるCJP1菌株比L-リシンの生産量が減少し、L-スレオニンの生産量が1.14g/L増加し、従って、Homの脱感作化効果が大きく向上したことを確認することができた。

【0085】

実施例7：L-イソロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物菌株の製作及び評価

イソロイシン生産菌株を製作するために、実施例6で製作された菌株で既に公知となったL-スレオニンデヒドラターゼ（L-threonine dehydratase, イソロイシン生合成経路の最初の酵素）をコードする変異遺伝子*ilvA*（V323A）（Appl. Environ. Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351（非特許文献6））の発現を強化するためのベクターを製作した。

【0086】

具体的には、*ilvA*遺伝子を対象に変異導入ベクターを製作するために、変異位置を中心に5'上段部位を増幅するためのプライマー対（配列番号19及び20）と3'下段部位を増幅するためのプライマー対（配列番号21及び22）を考案した。配列番号19及び22のプライマーは各末端にBamH I 制限酵素部位を挿入し、配列番号20及び21のプライマーは互いに交差するように考案した部位にヌクレオチド置換変異が位置するようにした。

【0087】

野生型の染色体を鋳型として配列番号19及び配列番号20、配列番号21及び配列番号22のプライマーを用いてPCRを行った。PCR条件は95℃で5分間変性後、95℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、72℃で30秒間の重合を30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、*ilvA*遺伝子の変異を中心に5'上段部位の627bp DNA断片と3'下段部位の608bpのDNA断片を得た。

【0088】

増幅された2種類のDNA切片を鋳型とし、配列番号19及び配列番号22のプライマーでPCRを行った。95℃で5分間変性後、95℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、72℃で60秒間の重合を30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、323番目のバリンがアラニンで置換された*ilvA*変異体をコードする*ilvA*遺伝子の変異を含む1217bpのDNA断片が増幅された。pECCG117（韓国登録特許第10-0057684号公報（特許文献6））ベクターと1011 bpのDNA断片を制限酵素BamH I で処理し、DNA接合酵素を用いて連結した後、クローニングすることによりプラスミドを獲得し、これをpECCG117-*ilvA*（V323A）と命名した。

【0089】

pECCG117-*ilvA*（V323A）ベクターを実施例6で製作されたCJP1-R407H菌株に電気穿孔法で導入した後、カナマイシン（kanamycin）25mg/Lを含有した選別培地に塗抹して形質転換株を獲得した。実施例2に示したフラスコ培養法と同様の方法で培養し、培養液中のL-イソロイシン濃度を分析して表4に示した。

【0090】

【表4】

製作菌株のL-イソロイシン生産能の確認

菌株	L-イソロイシン(g/L)
CJP1/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	0.7
CJP1-R407H/pECCG117- <i>ilvA</i> (V323A)	1.4

【0091】

その結果、*hom*（R407H）変異を含む菌株で対照群菌株比L-イソロイシン生産能が0.7g/L向上したことを確認することができた。

実施例8：変異型Homで置換されたO-アセチル-ホモセリン（OAH）生産菌株の製作及び評価

8-1.変異型Homで置換されたATCC13032菌株の製作

上記実施例4と同様の方法で、ATCC13032菌株のhom遺伝子にR407H変異を導入し、その菌株をATCC13032::Hom^{FBR}と命名した。

【0092】

8-2. metB遺伝子の欠損

本実施例ではコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の染色体DNAを鋳型にしたPCRを通じて、O-アセチル-ホモセリン分解経路のシスタチオンガンマシンターゼ (cystathionine gamma-synthase) をコードするmetB遺伝子を確保した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) を根拠としてmetB遺伝子の塩基配列情報 (NCBI登録番号Ncg12360、配列番号23) を確保し、これに基づいてmetB遺伝子のN末端部分とリンカー配列を含有するプライマー (配列番号24、25)、C末端部分とリンカー部分を含有するプライマー (配列番号26、27) を合成した。コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の染色体DNAを鋳型とし、上記配列番号24と25及び26と27のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。ポリメラーゼはPfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、PCR条件は変性96℃、30秒間;アニーリング53℃、30秒間;及び重合反応72℃、1分間を30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、metB遺伝子のN末端部分とリンカーを含有した500bpの増幅された遺伝子とmetB遺伝子のC末端部分とリンカーを含有した500bpの増幅された遺伝子を獲得した。

【0093】

上記に獲得した増幅された2遺伝子を鋳型とし、配列番号24及び27プライマーを用いてPCRを行い、PCR条件は変性96℃、60秒間;アニーリング50℃、60秒間;及び重合反応72℃、1分間を30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、metB遺伝子のN末端-リンカー-C末端を含有したmetB不活性化カセットである1000bpsの増幅されたΔmetB遺伝子を獲得した。上記PCRを通じて獲得したmetB遺伝子に、末端に含まれた制限酵素XbaI, SalIを処理し、制限酵素XbaI, SalIが処理されたpDZベクターに接合 (ligation) を通じてクローニングし、最終的にmetB不活性化カセットがクローニングされたpDZ-ΔmetB組換えベクターを製作した。

【0094】

製作されたpDZ-ΔmetBベクターをコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032, ATCC13032::Hom^{FBR}に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上でmetB遺伝子が不活性化されたコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 ΔmetB, ATCC13032::Hom^{FBR} ΔmetBを得た。不活性化されたmetB遺伝子は配列番号24と27のプライマーを用いたPCRを行った後、metB遺伝子が不活性化されないATCC13032と比較を通じて最終確認した。

【0095】

8-3. metY遺伝子の欠損

本実施例ではコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の染色体DNAを鋳型にしたPCRを通じて、O-アセチル-ホモセリン分解経路のO-アセチル-ホモセリンチオールリアーゼ (O-acetylhomoserine (thiol)-lyase) をコードするmetY遺伝子を確保した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) を根拠としてmetY遺伝子の塩基配列情報 (NCBI登録番号Nogl0625、配列番号28) を確保し、これに基づいてmetY遺伝子のN末端部分とリンカー配列を含有するプライマー (配列番号29、30)、C末端部分とリンカー部分を含有するプライマー (配列番号31、32) を合成した。

【0096】

コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の染色体DNAを鋳型とし、上記配列番号29と30及び配列番号31と32のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。ポリメラーゼはPfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用い、PCR条件は変性96℃、30秒間;アニーリング53℃、30秒間;及び重合反応72℃、1分間を30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、metY遺伝子のN末端部分とリンカーを含有した500bpの増幅された遺伝子とmetY遺伝子のC末端部分とリンカーを含有した500bp増幅された遺伝子を獲得した。上記に獲得した増幅された2遺伝子を鋳型とし、配列

番号29及び32のプライマーを用いてPCRを行い、PCR条件は変性96℃、60秒間;アニーリング50℃、60秒間;及び重合反応72℃、1分間を10回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、metY遺伝子のN末端-リンカー-C末端を含有したmetY不活性化カセットである1000bpsの増幅された Δ metY遺伝子を獲得した。

【0097】

上記PCRを通じて獲得したmetY遺伝子に、末端に含まれた制限酵素XbaI, SalIを処理し、制限酵素XbaI, SalIが処理されたpDZベクターに接合(ligation)を通じてクローニングし、最終的にmetY不活性化カセットがクローニングされたpDZ- Δ metY組換えベクターを製作した。

【0098】

製作されたpDZ- Δ metYベクターをコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032, ATCC13032::Hom^{FBR}, ATCC13032 Δ metB, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB菌株に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上でmetY遺伝子が不活性化されたコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 Δ metY, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metY, ATCC13032 Δ metB Δ metY, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB Δ metYを得た。不活性化されたmetY遺伝子は配列番号29と32のプライマーを用いたPCRを行った後、metY遺伝子が不活性化されないATCC13032と比較を通じて最終確認した。

【0099】

8-4.O-アセチル-ホモセリン生産菌株の製作及び評価

実施例8-1～8-3で製作された、metB, metY, metBY遺伝子が欠損し、変異型hom遺伝子で置換されたATCC13032, ATCC13032 Δ metB, ATCC13032 Δ metY, ATCC13032 Δ metB Δ metY, ATCC13032::Hom^{FBR}, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metY, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB Δ metY菌株のO-アセチル-ホモセリン生産能を比較した。

【0100】

具体的には、32℃のインキュベーターでLB固体培地で一晩中培養した単一コロニーを25mlのO-アセチル-ホモセリン力価培地に1白金耳ずつ接種し、32℃で250rpmで42-64時間培養した。培養物からO-アセチル-ホモセリンをHPLCにより分析した。分析結果を下記表5に示した。

【0101】

O-アセチル-L-ホモセリン生産培地 (pH7.2)

ブドウ糖30g, KH₂PO₄2g, 尿素3g, (NH₄)₂SO₄ 40g, ペプトン2.5g, CSL (Sigma) 5g (10 ml), MgSO₄·7H₂O 0.5g, メチオニン400mg, ロイシン400mg, CaCO₃ 20g (蒸留水1リットル基準)

【0102】

【表5】

O-アセチル-ホモセリン生産評価

菌株		O-AH 生産量 (g/L)
ATCC13032	—	0.0
	metB	0.3
	metY	0.3
	metBY	0.5
ATCC13032::Hom ^{FBR} (R407 H)	—	0.0
	metB	1.3
	metY	1.5
	metBY	3.7

【0103】

その結果、上記表5のように対照群菌株であるコリネバクテリウムATCC13032を培養時にO-アセチル-L-ホモセリンが蓄積されない一方、metB, metY, metBYが不活性化されたATCC13032 Δ metB, ATCC13032 Δ metY, ATCC13032 Δ metB Δ metY菌株ではそれぞれ0.3, 0.3, 0.5g/LのO-アセチル-L-ホモセリンが蓄積されたことを確認した。

【0104】

また、hom遺伝子をR407Hの形態で置換したATCC13032::Hom^{FBR}菌株、上記菌株でmetB, metY, metBYがそれぞれ不活性化されたATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metY, ATCC13032::Hom^{FBR} Δ metB Δ metY菌株の場合、それぞれ1.3, 1.5, 3.7g/LのO-アセチル-L-ホモセリンが蓄積されたことを確認することができた。

【0105】

従って、上記結果から本発明の変異型homを用いてホモセリンを前駆体として用いる目的のアミノ酸の生産量を大きく向上させることを確認した。

実施例9：L-メチオニン生産菌株の製作及び評価

実施例9-1：mcbR遺伝子欠損のための組換えベクター製作

本実施例ではメチオニン生産菌株を製作するために、実施例6で製作された菌株で既に公知となったメチオニンシステイン転写調節因子タンパク質をコードするmcbR (J. Biotechnol. 103: 51-65, 2003 (非特許文献9))の不活性化のためにベクターを製作した。

【0106】

具体的には、mcbR遺伝子をコリネバクテリウムATCC13032染色体上で欠損させるために、下記方法で組換えプラスミドベクターを製作した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH Genbank) に報告された塩基配列に基づいてコリネバクテリウム・グルタミクムのmcbR遺伝子及び周辺配列 (配列番号33) を確保した。

【0107】

欠損したmcbR遺伝子を獲得するための目的で、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC 13032の染色体DNAを鋳型として配列番号34及び配列番号35、配列番号36及び配列番号37のプライマーを用いてPCRを行った。PCR条件は95℃で5分間変性後、95℃で30秒間の変性、53℃で306秒間のアニーリング、72℃で30回反復した後、72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、それぞれ700bp DNA断片を得た。

【0108】

コリネバクテリウム・グルタミクム内で複製が不可能なpDZベクターと上記増幅したmcbR遺伝子の断片を染色体導入用制限酵素smalで処理した後、DNA接合酵素を用いて連結した後、大腸菌DH5 α に形質転換し、カナマイシン (25mg/l) が含まれたLB固体培地に塗抹した。PCRを通じて目的とした遺伝子の欠損した断片が挿入されたベクターで形質転換されたコロニーを選別した後、プラスミド抽出法を用いてプラスミドを獲得し、pDZ-mcbRと命名した。

【0109】

実施例9-2：L-メチオニン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物菌株の製作及び評価

上記実施例9-1で製作されたpDZ-mcbRベクターを染色体上での相同組換えにより実施例6で製作されたCJP1-R407HとCJP1菌株に電気穿孔法で形質転換させた (van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52: 41-545, 1999 (非特許文献10))。その後、X-galを含む固体培地で2次組換えを行った。2次組換えが完了した上記コリネバクテリウム・グルタミクム形質転換株を対象にプライマー (配列番号38及び39) を用いてPCR法を通じてmcbR遺伝子が欠損した菌株を確認した。本組換え菌株は、それぞれコリネバクテリウム・グルタミクムCJP1-R407H mcbR, CJP1 mcbRと命名した。

【0110】

上記製作されたCJP1-R407H mcbR菌株のL-メチオニン生産能を分析するために、母菌株であるコリネバクテリウム・グルタミクムCJP1 mcbR菌株と共に下記のような方法で培養した。

【0111】

下記25mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコにコリネバクテリウム・グル

10

20

30

40

50

タミクムCJP1 *mcbR*と発明菌株のコリネバクテリウム・グルタミクムCJP1-R407H *mcbR*を接種し、30℃で20時間、200rpmで振盪培養した。その後、生産培地24mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコに1mlの種培養液を接種し、30℃で48時間、200rpmで振盪培養した。上記種培地と生産培地の組成は、それぞれ下記の通りである。

【0112】

種培地 (pH7.0)

ブドウ糖20g、ペプトン10g、酵母抽出物5g、尿素1.5g、KH₂PO₄ 4g、K₂HPO₄ 8g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、ビオチン100μg、チアミンHCl 1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド2000μg (蒸留水1リットル基準)

生産培地 (pH8.0)

ブドウ糖50g、(NH₄)₂S₂O₃ 12g、酵母抽出物5g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 1.2g、ビオチン100μg、チアミン塩酸塩1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド3000μg、CaCO₃ 30g (蒸留水1リットル基準)。

【0113】

上記培養方法で培養して培養液中のL-メチオニン濃度を分析して表6に示した。

【0114】

【表6】

製作菌株のL-メチオニン生産能の確認

菌株	L-メチオニン (g/L)
CJP1Δ <i>mcbR</i>	0.01
CJP1-R407HΔ <i>mcbR</i>	0.19

【0115】

その結果、R407H *hom*変異を含む菌株で対照群菌株対比L-メチオニン生産能が0.18g/L向上したことを確認することができた。

上記結果から本発明の変異型*hom*を用いてL-メチオニンの生産量を大きく向上させられることを確認した。

【0116】

以上の説明から、本出願が属する技術分野の当業者であれば、本出願がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されることがあることを理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本出願の範囲は上記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本出願の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

【0117】

10

20

30

40

50

【表 7】

特許出願のためのブダペスト条約下の微生物受託証明

国 際 様 式

受信：C J 第一製糖株式会社

大韓民国ソウル市中区

東湖路 3 3 0 C J 第一製糖センター

(〒)100-400

国際寄託機関により規則 7. 1 に従っ
て発行された原寄託に関する受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA01-2307	国際寄託機関が付与した受託番号：KKCCM12000P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に関して次の事項が含まれている。 ☐ 科学的性質の説明 ☐ 提案された分類学上の位置 (適用するときはXで表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2 0 1 7 年 3 月 2 9 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 国際寄託機関	
名称： 韓国微生物保存センター 住所： 韓国ソウル市西大門区弘済ネ- 2 街-ギル 4 5、ユリムビル (郵便番号 1 2 0 - 8 6 1)	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名： 署名日： 2 0 1 7 年 3 月 2 9 日

20

30

上記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2 0 1 8 年 1 2 月 2 1 日

弁理士 ソン・ミン 印

【 0 1 1 8 】

40

50

【表 8】

特許出願のためのブダペスト条約下の微生物受託証明

国 際 様 式

受信：C J 第一製糖株式会社

大韓民国ソウル市中区

国際寄託機関により規則 7. 1 に従っ

東湖路 3 3 0 C J 第一製糖センター

て発行された原寄託に関する受託証

(〒)100-400

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA09-0900	国際寄託機関が付与した受託番号： KKCCM12418P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に関して次の事項が含まれている。 ☐ 科学的性質の説明 ☐ 提案された分類学上の位置 (適用するときは X で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2 0 1 8 年 1 2 月 1 4 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 転換要請の受領	
上記項目 I に表示された微生物は、 に本国際寄託機関に受託され、原寄託をブダペスト条約下の寄託に転換するための要請を から受けた。	
V. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：韓国ソウル市西大門区 弘済ネ 2 街ギル 4 5、ユリムビル (郵便番号) 0 3 6 4 1	国際寄託機関を代表する権限を有する者 又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2 0 1 8 年 1 2 月 1 4 日

20

30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2 0 1 8 年 1 2 月 2 1 日

弁理士 ソン・ミン 印

【配列表】

40

0007222098000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 13/08 (2006.01)

C 1 2 P 13/06

E

C 1 2 P 13/12 (2006.01)

C 1 2 P 13/08

C

C 1 2 P 13/12

A

- グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 イ、グァン ウ

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 ホ、ラン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 キム、キョンリム

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 ベク、ミナ

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 ソン、スン - ジュ

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

(72)発明者 イ、ジェミン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - ロ 3 3 0

審査官 進士 千尋

(56)参考文献

Homoserine dehydrogenase, 2018年, [05-DEC-2018], Retrieved from UniProtKB/TrEMBL, [online], Accession no.A0A2U1T9L0, [Retrieved on 16 May 2022]

Homoserine dehydrogenase, 2018年, [05-DEC-2018], Retrieved from UniProtKB/TrEMBL, [online], Accession no.A0A1N6QHA4, [Retrieved on 16 May 2022]

Journal of Bacteriology, 1991, Vol.173, No.10, pp.3228-3230

Annals of the New York Academy of Sciences, Volume782, Issue1, Pages 25-39

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 5 3

C 1 2 N 9 / 0 4

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 P 1 3 / 0 6

C 1 2 P 1 3 / 1 2

C 1 2 P 1 3 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q