

(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
2010 年 6 月 24 日(24.06.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/070909 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) C12P 7/58 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/006953
- (22) 国際出願日: 2009 年 12 月 17 日(17.12.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-320867 2008 年 12 月 17 日(17.12.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松下一信(MATSUSHITA, Kazunobu) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). イチポンサイチャナ(ITTIPON, Saichana) [TH/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). 外山博英(TOYAMA, Hirohide) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). 足立収生(ADACHI, Osao) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 国立大学法人山口大学農学部内 Yamaguchi (JP). デュアンティップムーンマンミー(DUANGTIP, Moonmangmee) [TH/TH]; 10140 バンコックトゥンクル区バーンモットプラチャウティット通り 1 2 6 キングモンクット工科大学トンブリ校理学部内 Bangkok (TH).
- (74) 代理人: 廣田雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))
 - 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: HIGH-TEMPERATURE-RESISTANT BACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING 5-KETOGLUCONIC ACID, AND METHOD FOR PRODUCING 5-KETOGLUCONIC ACID USING THE HIGH-TEMPERATURE-RESISTANT BACTERIUM

(54) 発明の名称: 5-ケトグルコン酸産生能を有する高温耐性菌、及び高温耐性菌を用いた5-ケトグルコン酸の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a high-temperature-resistant bacterium which can be applied to the industrial production of 5KGA. Specifically disclosed are: a high-temperature-resistant bacterium which belongs to the genus *Gluconobacter* and is capable of producing 5KGA at 30 to 38°C, or a mutant strain of the high-temperature-resistant bacterium which is produced by disrupting an FAD-GADH gene in the high-temperature-resistant bacterium; and a method for producing 5KGA, which is characterized by culturing the high-temperature-resistant bacterium at 30 to 37°C in the presence of PQQ and/or a Ca ion to produce 5KGA and collecting 5KGA.

(57) 要約: 工業的な5KGA生産に応用できる高温耐性菌を提供することをその主な課題とする。グルコンバクター属に属し、30~38°Cで5KGA産生能を有する高温耐性菌、またはFAD-GADH遺伝子を破壊した変異株である高温耐性菌を提供し、該高温耐性菌を、PQQおよび/またはCaイオン存在下、30~37°Cで培養して5KGAを生産させ、5KGAを採取することを特徴とする、5KGAの製造方法を提供する。



WO 2010/070909 A1

明 細 書

発明の名称：

５－ケトグルコン酸産生能を有する高温耐性菌、及び高温耐性菌を用いた
５－ケトグルコン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、高温で５－ケトグルコン酸（５ＫＧＡ）産生能を有する高温耐性菌、及び該高温耐性菌を用いた５ＫＧＡの製造法に関する。

背景技術

[0002] グルコノバクターは、糖、糖アルコール、糖酸などの広い範囲の化合物を酸化することができ、酸化された産物を高い収率で培地中に蓄積できる酢酸菌の種類である。これらの酸化反応に関与する酵素は、Ｄ－グルコース、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、グリセロール、グルコン酸、ケトグルコン酸等それぞれの脱水素酵素である。それら全ての脱水素酵素は、細胞質膜表層に固く結合しており、基質から引き抜かれた電子は、ユビキノンを介して末端のユビキノン酸化酵素へ伝達され、その電子伝達反応に伴って生物エネルギーを生成する。

[0003] Ｄ－グルコースのケト－Ｄ－グルコン酸への酸化は、細胞膜外に存在する酵素により触媒されることが知られている。Ｄ－グルコースは、膜結合ピロロキノリンキノン（ＰＱＱ）－グルコース脱水素酵素により、グルコノーδ－ラクトンへ酸化され、グルコノーδ－ラクトンは、グルコノラクトナーゼにより、Ｄ－グルコン酸へ変換される。グルコノバクター菌で見られたケトグルコン酸の形成は、膜結合グルコン酸脱水素酵素の２つのタイプにより触媒されることを本発明者らは報告している（非特許文献１）。１つは、ＦＡＤ含有２－ケトグルコン酸生産酵素、すなわちＦＡＤ－グルコン酸脱水素酵素（ＦＡＤ－ＧＡＤＨ：Gluconate 2-dehydrogenase flavoprotein）、もう１つは、ＰＱＱ含有５ケト－Ｄ－ケトグルコン酸生産酵素、すなわちＰＱＱ－グリセロール脱水素酵素（ＰＱＱ－ＧＬＤＨ：Pyrroloquinoline quinone-

glycerol dehydrogenase) である (図 1)。また、FAD-GADH が、3 つのサブユニットを持つことは、Shinagawa らにより報告されており (非特許文献 2)、3 つのサブユニットとは、FAD 含有脱水素酵素サブユニット、three-heme 含有チトクローム C サブユニット、そして未公知の小さなサブユニットである。5 KGA 生産を触媒する後者の酵素は、PQQ 含有ポリオール脱水素酵素と同一であることが、Matsushita らにより明らかにされており (非特許文献 3)、PQQ-GLDH は、D-アラビトール脱水素酵素、D-ソルビトール脱水素酵素、あるいはグリセロール脱水素酵素など、種々の糖アルコールの酸化酵素として知られている。PQQ-GLDH は、多方面の基質と反応できるが、いわゆる「Bertrand-Hudson 法」に従って反応が触媒される高い立体特異性をもつ。この酵素は、5 KGA を D-グルコン酸から生産するために、D-グルコン酸の C 5 位置だけを酸化することができるが、D-グルコン酸との酵素親和性は低い。この酵素の遺伝子は、グルコノバクター・サブオキシダンス IFO 3255 からクローニングされ、2 つのオープンリーディングフレームが見出された。1 つは、5-膜貫通領域の疎水性領域蛋白をコードすると推定され、もう 1 つは、いくつかの PQQ 依存酵素に類似した脱水素酵素サブユニットをコードしていて、特に膜結合グルコース脱水素酵素の PQQ ドメインに類似している。一方、細胞質に位置する 2 KGA 還元酵素や 5 KGA 還元酵素は、輸送蛋白により、細胞質に輸送された後で、2 KGA や 5 KGA をそれぞれ D-グルコン酸へ変換し、資化するために機能している。

[0004] 5 KGA は酒石酸、キシリ酸、ビタミン C や重要な香料化合物などの原料となる有用な物質である (非特許文献 4)。Grey らは、5 KGA を使用したビタミン C の生産方法を提供しており、今日工業的に行われている Reichsteind 法よりも、緩和な条件下で工業的に製造可能な方法である (特許文献 1、2)。

[0005] ほとんどのグルコノバクター菌株は、D-グルコースから 2 KGA と 5 KGA を生産する。このように、グルコノバクター菌による 5 KGA は、主な

副生産物として 2 K G A を生産し、2 つのケトグルコン酸の生産は生体内で競合する。本発明者らは、D-グルコースの基質に対し、変換率が 80%以上である 5 K G A を特異的に生産するグルコノバクター菌を野生株から選別する方法を報告した（特許文献 3）。また、2 K G A 生産が F A D-G A D H 遺伝子に触媒されることから、グルコノバクター・オキシダンス 621 H（グルコノバクター・サブオキシダンス I F O 12528 と同一）の F A D-G A D H 欠損変異株を作製し、D-グルコースからほとんど特異的に 5 K G A を生産させたという報告がある（非特許文献 5）。しかしながら、この常温菌株を使った 5 K G A の生産のための最適温度は 20℃ 近辺である。工業的規模の培養工程では、培養温度の上昇を下げるための冷却装置が必要である。コスト削減の面からも、より高温で 5 K G A を生産する菌株が望まれている。本発明者らは、タイ国において、種々の材料から得られた菌株について高温耐性を有するグルコノバクター属菌を報告した（非特許文献 6）。しかしながら、高い 5 K G A 生産株については明らかにしていない。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献 1：米国特許公報第 2 4 2 1 6 2 1 号
特許文献 2：米国特許公報第 2 4 2 1 6 1 2 号
特許文献 3：特開 2 0 0 8 - 2 3 7 1 9 1 号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献 1：Matsushita, K., et al, 1994. p. 247-301. In D.W.T.A.H. Rose(ed.), Advance In Microbial Physiology, vol.36. Academic Press Ltd., London
非特許文献 2：Shinagawa, E., et al, Agricultural Biological Chemistry 48:1517-1522, 1984
非特許文献 3：Matsushita, K., et al, Applied and Environmental Microbiology 69:1959-1966, 2003
非特許文献 4：Salusjarvi, T., et al, Applied Microbiology and Biotechnol

ology 65:306-314, 2004

非特許文献5: Elfari, M., et al, Applied Microbiology and Biotechnology 66:668-674, 2005

非特許文献6: Moonmangmee, D., et al, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64:2306-2315, 2000

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、工業的な5 K G A生産に応用できる高温耐性菌を提供することをその主な課題とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者等は、常温菌が生育できない37℃の高温で生育し、5 K G Aを生産できる菌株をスクリーニングするため、グルコノバクター属の保存菌株やタイ国等からの分離菌株の合わせて1500株について、グルコースーグルコン酸培地を用いて、培地中に茶色化合物を生産しない株で、かつレゾルシノール法にて発色する菌株として、新規な3種の高5 K G A産生能を有する高温耐性グルコノバクター属菌（野生株）を分離した。さらに、非特許文献5記載の三親接合法なる煩雑な方法を使わず、エレクトロポレーション法という簡便な方法を用いて、上記の高5 K G A産生能を有する高温耐性野生株のFAD-GADH遺伝子系の破壊を行うことにより、5 K G Aを特異的に生産できる高温耐性変異株を作出し、本発明を完成させた。

- [0010] すなわち、本発明は以下の(1)～(6)を提供する。

- [0011] (1) グルコノバクター属に属する5-ケート-D-グルコン酸(5 K G A)産生能を有する高温耐性野生株、又はその変異株であって、20 g グルコース、20 g グルコン酸ナトリウム、3 g ポリペプトン、3 g 酵母エキスを蒸留水で1 Lとする2%グルコースーグルコン酸培地で37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5 K G A濃度が45 mM以上となることを特徴とする5 K G A産生能を有する高温耐性菌。

- [0012] (2) 変異株が、FAD-グルコン酸脱水素酵素 (FAD-GADH) 遺伝子を破壊した変異株であることを特徴とする上記 (1) に記載の高温耐性菌。
- [0013] (3) FAD-GADH 遺伝子を破壊した変異株が、2% グルコース-グルコン酸培地で、30℃及び37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5KGA濃度がそれぞれ170mM以上及び90mM以上となる5KGA産生能を有する変異株であることを特徴とする上記 (2) に記載の高温耐性菌。
- [0014] (4) FAD-GADH 遺伝子を破壊した変異株が、配列番号7, 8, 9に示す塩基配列を有するDNA断片を増幅して得られたPCR産物に、カナマイシンカセットを挿入したプラスミドを細胞内に導入して相同組み換えを行うことにより構築した株であることを特徴とする上記 (2) に記載の高温耐性菌。
- [0015] (5) グルコノバクター・フラテウリ THE42株 (受託番号 NITE BP-655)、グルコノバクター・フラテウリ THG42株 (受託番号 NITE BP-657)、グルコノバクター・フラテウリ THF55株 (受託番号 NITE BP-659)、グルコノバクター・フラテウリ THE42 gndG::Km株 (受託番号 NITE BP-656)、グルコノバクター・フラテウリ THG42 gndG::Km株 (受託番号 NITE BP-658)、グルコノバクター・フラテウリ THF55 gndG::Km株 (受託番号 NITE BP-660) から選ばれる1種以上の5-ケート-D-グルコン酸産生能を有する高温耐性菌。
- [0016] (6) 上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の高温耐性菌を、ピロロキノリンキノン及び/又はCaイオン存在下、30~37℃で培養して5KGAを生産させ、5KGAを採取することを特徴とする、5KGAの製造方法。

発明の効果

- [0017] 本発明により、有用な工業製品の原料となる5KGAを、高温条件下で培養することが可能となり、培養中の適正な温度を維持するために、常温菌で

は必要とされる高い冷却コストを削減することができる。また、5 K G A 産生能を有する高温耐性変異株は5 K G A を特異的に生産するため、精製工程が容易で工業的に有利である。

図面の簡単な説明

[0018] [図1] グルコースから5 K G A 及び2 K G A を生成する酵素反応を示す図面である。

[図2] 分離された高温耐性グルコノバクター属菌による培地中の2 K G A と5 K G A の生産を示す図面に代わる写真である。(1 : D-グルコース、2 : N a G A、3 : 2 K G A、4 : 5 K G A、5 : 培地、6 : T H E 4 2、7 : T H F 5 5、8 : T H G 4 2、9 : T H E 4 2、10 : T H F 5 5、11 : T H G 4 2、ただし、6-8は30℃で、9-11は37℃で培養した。)

[図3] 高温耐性グルコノバクター・フラテウリ T H F 5 5 株から得られたゲノム断片の模式図である。

[図4] 高温耐性グルコノバクター属菌のカナマイシン耐性カセットでの変異をP C Rで確認したことを示す図面に代わる写真である。(M : マーカーであるλ D N A、1 : T H E 4 2、2 : T H E 4 2 g n d G : : K m、3 : T H F 5 5、4 : T H F 5 5 g n d G : : K m、5 : T H G 4 2、6 : T H G 4 2 g n d G : : K m)

[図5] 高温耐性グルコノバクター属菌のF A D 欠損株による2 K G A と5 K G A の生産を示す図面に代わる写真である。(1 : D-グルコース、2 : N a G A、3 : 2 K G A、4 : 5 K G A、5 : 培地、6 : T H E 4 2 g n d G : : K m、7 : T H F 5 5 g n d G : : K m、8 : T H G 4 2 g n d G : : K m、9 : T H E 4 2 g n d G : : K m、10 : T H F 5 5 g n d G : : K m、11 : T H G 4 2 g n d G : : K m、ただし、6-8は30℃で、9-11は37℃で培養した。)

[図6] 高温耐性グルコノバクター属菌のD-アラビトールとD-グルコースに対する膜結合酵素の活性を示す図面である。(a : 30℃で培養、b : 37℃で培養、グレイのカラム : コファクター無添加で培養したD-アラビトール)

ルの活性、黒のカラム：15 μ MPQQと10mMCaCl₂添加で培養したD-アラビトールの活性、白のカラム：コファクター無添加で培養したD-グルコースの活性、斜線のカラム：15 μ MPQQと10mMCaCl₂添加で培養したD-グルコースの活性)

[図7]高温耐性グルコノバクター属菌のケトグルコン酸生産を示す図面である。(a：30℃で培養、b：37℃で培養、グレイのカラム：2KGA濃度、黒のカラム：5KGA濃度)

[図8]高温耐性グルコノバクター・フラテウリ THF55株の37℃での培養において、菌の生育と5KGA生産へのCaCl₂の添加効果を示す図面である。(a：生育曲線(黒の四角：0mM、黒のダイヤモンド型2.5mM、白の三角：5mM、4方クロス：7.5mM、6方クロス：10mM)、b：5KGA生産量)

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の高温耐性菌としては、20gグルコース、20gグルコン酸ナトリウム、3gポリペプトン、3g酵母エキスを蒸留水で1Lとする2%グルコース-グルコン酸培地で37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5KGA濃度が45mM以上となるグルコノバクター属に属する5KGA産生能を有する高温耐性野生株、又はその変異株であれば特に制限されないが、2%グルコース-グルコン酸培地で30℃で48時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5KGA濃度が50mM以上、特に55mM以上となるグルコノバクター属に属する5KGA産生能を有する高温耐性野生株やその変異株が好ましい。上記レゾルシノール試薬を用いた測定方法としては、後述の実施例に記載されているように、Methods in Enzymology vol.3 p.248~249に記載の方法や農芸化学実験書(増補)第2巻、京都大学農学部農芸化学教室編、682頁に記載の方法に準じた方法を例示することができる。また、上記グルコノバクター属菌としては、例えばグルコノバクター・サブオキシダンス(*Gluconobacter suboxydans*)、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobac*

ter oxydans)、グルコノバクター・フラテウリ (*Gluconobacter frateurii*) などがあげられる。

[0020] 本発明の高温耐性野生株は、以下のスクリーニング法で得ることができる。すなわち、初期スクリーニングとして、適切な培地、例えばポテト寒天培地に保存した高温耐性グルコノバクター属菌から1つのコロニーをグルコース-グルコン酸培地に接種し、30℃～37℃で2～3日間培養し、培地中に茶色の化合物を生産した菌株を2,5-ジケトグルコン酸(2,5-DKG A)生産株として除外する。2,5-DKG Aは、いくつかのグルコノバクター属菌に存在する膜結合FAD-2-ケトグルコン酸脱水素酵素により触媒された2-KGA酸化産物である。2,5-DKG Aを多く生産する菌株は、2-KGAを多く形成し、5-KGA形成は低いと予想されるため、それらの菌株は除くことが望ましい。残りの菌について、さらに30～38℃で、グルコース-グルコン酸培地で培養し、培養液の5-KGAを定量することで、5-KGA生産株を選ぶ。5-KGAの生産量は、例えば、還元反応により発色するレゾルシノール試薬による発色反応などで調べることができる。このようにしてスクリーニングされた高温耐性グルコノバクター属の野生株として、グルコノバクター・フラテウリ THE 42株、グルコノバクター・フラテウリ THG 42株、グルコノバクター・フラテウリ THF 55株を好適に例示することができる。

[0021] 上記の高温耐性グルコノバクター属の野生株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に2008年10月9日に寄託されている。受託番号は、グルコノバクター・フラテウリ THE 42株が、受託番号 NITE BP-655、グルコノバクター・フラテウリ THG 42株が、受託番号 NITE BP-657、グルコノバクター・フラテウリ THF 55株が、受託番号 NITE BP-659である。

[0022] 本発明の高温で5-KGA生産能を有する高温耐性グルコノバクター属菌の変異株は、親株として上記野生株だけではなく、2,5-DKG A生産株から

も選ぶことができ、親株の2 K G Aを形成に関与する酵素であるF A D－G A D H遺伝子を破壊することによって、特異的に5 K G Aの生産を行うよう改変されたものを好適に例示することができる。F A D－G A D H遺伝子が破壊された欠損株は、野生株の染色体上のF A D－G A D H遺伝子、又はその一部のD N A配列を欠失、あるいは該遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子を挿入するなどして正常に機能する酵素を産生しないように修飾した遺伝子を含むD N Aで菌を形質転換し、染色体上の正常な遺伝子との間で相同組換えを起こさせることにより、染色体上のF A D－G A D H遺伝子を破壊することによって作製することができる。このような相同組換えの遺伝子置換による遺伝子破壊は、直鎖状D N Aやプラスミドを用いる方法として既に確立している。本発明の高温耐性グルコノバクター属菌のF A D－G A D H遺伝子破壊株の作製は、例えば、以下の操作方法、手順で行なうことができる。

[0023] 1) 高温耐性グルコノバクター属菌からD N Aの抽出を行う。高温耐性グルコノバクター属菌のからのゲノムD N A抽出法は、Sambrookらの方法 (Sambrook, J., et al, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) により行うことができる。

[0024] 2) ターゲットとなるF A D－G A D H遺伝子のクローニングをする。F A D－G A D H遺伝子のクローニングは、常温性グルコノバクター属菌や、エルビニア菌のG A D Hの遺伝子の中の脱水素酵素サブユニットに維持されている領域からデザインしたプライマーを用いたP C R法や、F A D－G A D H遺伝子を用いたハイブリダイゼーションにより行うことができるが、最も効率的な方法としては、グルコノバクター・オキシダンス 6 2 1 Hのゲノムで報告されている、F A D－G A D H遺伝子の配列を基にデザインしたプライマーを用い、1) で得られたゲノムD N Aを鋳型としてP C Rを行い、F A D－G A D H遺伝子の全長を含む遺伝子をP C Rにより増幅・取得することができる。クローニングした遺伝子の全配列は、A B I P R I S M 3 1 0 (PE Biosystems社製) を使用して、G E N E T Y X－M A C (Soft

ware Development, Tokyo, Japan) や Clone Manager (Scientific and Educational Software, Cary, NC) などのソフトウェアで解析し、配列データを得ることができる。また、ホモロジー検索や整列解析 (alignment) は、それぞれ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) や CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/clustalw) を使用して得ることができる。

- [0025] 本発明の FAD-GADH 遺伝子をクローニングして得られる DNA 断片としては、gndF (配列番号 7)、gndG (配列番号 8)、gndH (配列番号 9) などを挙げるができるが、中でも、触媒部位を含むサブユニットをコードしている gndG を好適に例示することができる。これらの DNA 断片は増幅して、FAD-GADH 遺伝子破壊用プラスミドに使用することができる。
- [0026] 3) クローニングした遺伝子の配列情報を基に、FAD-GADH 遺伝子破壊用プラスミドを作製する。FAD-GADH 遺伝子の破壊用プラスミドの作製は、高温耐性グルコノバクター属菌内で複製不可能な pGEM-T Easy Vector 等の大腸菌ベクターに、PCR で増幅した FAD-GADH 遺伝子を組み込み、得られた DNA の制限酵素サイトに、カナマイシン等の薬剤耐性物質等からなるカセットを挿入して作製することができる。
- [0027] 4) ついで、プラスミド導入による FAD-GADH 遺伝子破壊株の作製を行う。FAD-GADH 遺伝子破壊株の作製は、上記遺伝子破壊用プラスミドを、高温耐性グルコノバクター属菌への電気パルス法 (Agric. Biol. Chem., 54:443-447, 1990、Res. Microbiol., 144:181-185, 1993) や、プラスミドを接合法 (transconjugation) などの高効率遺伝子導入法により細胞内に導入し、染色体への相同性組換えにより、FAD-GADH 遺伝子を破壊 (又は不活性化) することにより行うことができる。FAD-GADH 遺伝子の破壊の確認は、薬剤耐性遺伝子断片が染色体に挿入されている菌株を、適切な濃度の当該薬剤を含むプレート培地上に塗布することにより形質転換された高温耐性グルコノバクター属菌を選抜し、選抜した菌株で 2 KGA

生産のための酵素活性が消失していることを確認することにより行うことができる。

[0028] 上記の如くして作製された、FAD-GADH遺伝子を破壊した変異株としては、2%グルコース-グルコン酸培地で、30℃及び37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5KGA濃度がそれぞれ150mM以上、好ましくは170mM以上、及び80mM以上、好ましくは90mM以上となる5KGA産生能を有する変異株を好適に例示することができる。また、本発明の形質転換した高温耐性グルコノバクター属菌は、適切な培地、例えばポテト寒天培地（20gグリセロール、5gグルコース、10g酵母エキス、10gポリペプトン、2g寒天、1000mlのポテトエキスを蒸留水で1Lとする）で、0～5℃の低温で保存しておくことができる。長期間の保存は50%グリセロールを含むポテト培地を用い、-80℃で行うことができる。

[0029] 本発明の形質転換した高温耐性グルコノバクター属菌の変異株としては次の菌があげられる。グルコノバクター・フラテウリ THE42株（受託番号 NITE BP-655）の変異株が、グルコノバクター・フラテウリ THE42 gndG::Km株で、受託番号 NITE BP-656として、また、グルコノバクター・フラテウリ THG42株（受託番号 NITE BP-657）の変異株は、グルコノバクター・フラテウリ THG42 gndG::Km株で、受託番号 NITE BP-658として、さらに、グルコノバクター・フラテウリ THF55株（受託番号 NITE BP-659）の変異株は、グルコノバクター・フラテウリ THF55 gndG::Kmで、受託番号 NITE BP-660として、それぞれ独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に2008年10月9日に寄託されている。

[0030] 本発明の5KGAの生産においては、本発明の高温耐性グルコノバクター属菌の野生株又は変異株を、好気条件下で増殖培養し、培地中に5KGAを

生成蓄積させることができる。

[0031] 本発明の高温耐性グルコノバクター属菌の培養は、炭素源、窒素源及び無機塩等を含む通常の栄養培地を用いて行うことができる。炭素源として、例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトースやマンノースなどの単糖類、ラクトース、シュクロース、マルトースなどの二糖類、グルコン酸ナトリウムやグルコン酸ポタジウムなどのグルコン酸塩、グリセリン、マルチトール、ラクリトール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、アラビトールなどの糖アルコール類が用いられ、このうち、グルコース又はグルコン酸が好ましく、グルコースが最も好ましい。

[0032] 窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム又は尿素等をそれぞれ単独もしくは混合して用いることができる。また、無機塩として、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム又は硫酸マグネシウム等を使用することができる。この他にも必要に応じて、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、ポテトエキス、コーンステープリカー等の各種栄養素を培地に適宜添加することもできる。

[0033] また、本発明においては、5 K G Aの生産に関わる酵素のために培地にコファクターを添加することが好ましい。本発明の5 K G Aの生産に関わるP Q Q - G L D Hは、高温耐性グルコノバクター属菌を高温で生育するとき、酵素の構造的な変化を起こすことが明らかになっている。そのため、培地にコファクターを補充することにより酵素の活性を高い状態で維持することができる。コファクターとしては、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、アンモニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオンがあげられ、これらのイオンは、塩化マグネシウム、炭酸マグネシウム、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどの化合物で培地中に添加することができる。好ましい化合物としては、塩化マグネシウム、炭酸マグネシウム、塩化カルシウム、炭酸カルシウムであり、最も好ましいのは、塩化カルシウムである。これらの化合物の培地への添加量は、1 ~ 5 0 m M、好ましくは5 m Mである。

- [0034] さらに、本発明における5 K G Aの生産に関わる酵素活性のため、培地に添加するコファクターとして、補酵素のピロロキノリンキノン（P Q Q）があげられる。酵素活性を維持するために、補酵素の培地への補充を行い、5 K G Aの生産を高めることができる。P Q Qの添加量は、0. 1～1 0 0 μ M、好ましくは1～1 0 μ Mを培地中に添加する。P Q Qは上記マグネシウムイオン、カルシウムイオン、アンモニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン等と併用することができる。
- [0035] 培養は、通常、通気攪拌又は振盪等の好氣的条件下、2 8℃～3 8℃、好ましくは3 0～3 7℃の温度で行うことができる。培養時のp Hは約5～7の範囲がよく、培養中のp H調整は酸又はアルカリを添加することにより行うことができる。培養期間は、1～7日間、好ましくは2～5日間行うことにより5 K G Aが得られる。5 K G Aの生産は、最初の成長段階で見られるが、最も高い生産量は、成長安定期に見られる。
- [0036] 本発明の高温耐性グルコノバクター属菌の培養菌体及び培地からの5 K G Aの回収は、一般的な発酵生産法に準じて行うことができ、例えば遠心分離、膜分離、カラムクロマトグラフィー等の公知の方法を用いることができる。
- [0037] 以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げるが本発明はこれに限定されない。

実施例 1

- [0038] <グルコノバクター菌の高温耐性5 K G A生産株のスクリーニング>

1. 野生株のスクリーニング

スクリーニング実験に使用する全てのグルコノバクター菌は、タイ国の種々の材料からMoonmangmee, D. らの方法（Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64: 2306-2315, 2000）で分離し、ポテト寒天培地（2 0 g グリセロール、5 g グルコース、1 0 g 酵母エキス、1 0 g ポリペプトン、2 g 寒天、1 0 0 m l のポテトエキスを蒸留水で1 Lとする）に保存した。初期スクリーニングのために、分離菌全てから1つのコロニーを2%グルコース

ーグルコン酸培地（20 g グルコース、20 g グルコン酸ナトリウム、3 g ポリペプトン、3 g 酵母エキスを蒸留水で1 Lとする）に接種し、30℃で48時間、又は37℃で60時間培養し、培地中に茶色の化合物を生産した菌株を2, 5-ジケトグルコン酸生産株として除外した。その後、200 μ l の培地と、1 ml のレゾルシノール（Resorcinol）試薬（0.5% Resorcinol 49 ml、濃塩酸168 ml、蒸留水273 ml）とを、80℃で20分間反応させた。レゾルシノール試薬とD-グルコースの反応生成物は赤い化合物で、5 KGAの場合は黒い茶系緑色の沈殿が生じた。一方、D-グルコン酸と2 KGAは確認反応生産物には見出されなかった。高温耐性の5 KGA生産株として最も優れた菌株を得るために、初期スクリーニングで分離した24株の菌（表1）をポテト培地（20 g グリセロール、5 g グルコース、10 g 酵母エキス、10 g ポリペプトン、100 ml のポテトエキスを蒸留水で1 Lとする）で1日予備培養し、その後、培養液10 μ l を2%グルコース-グルコン酸培地の1 ml に接種し、30℃で36時間、又は37℃で48時間培養した。培養液は、レゾルシノール試薬で反応させた。さらに、生育と5 KGA蓄積は、反応で生じた反応生産物の吸光度を測定することにより比較した。

[0039] 2. 2 KGAと5 KGAの決定

2 KGAと5 KGAは、それぞれ2 KGA還元酵素と5 KGA還元酵素により、Saichana. lらの方法（Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71: 2478-2486, 2007）に準じて酵素的に定量した。2 KGAと5 KGAの定性分析は、薄層クロマトグラフィー分析で行った。サンプルはシリカゲル60プレート（メルク製）にスポットし、酢酸エチル：酢酸：メタノール：無イオン水（6：1.5：1.5：1）を含む溶媒で展開した。プレートを乾燥し、発色試薬（2 g のジフェニルアミン、2 ml のアニリン、100 ml のアセトン、15 ml のリン酸の使用前調整液）をスプレーし、発色するまで120℃で10～20分間加熱した。5 KGAと2 KGAは、それぞれ濃紫色と、赤褐色のスポットとして現れた。

[0040] 3. スクリーニング結果

24分離株の中の3株、THE42, THF55, THG42について、
30℃、37℃の両方で5KGAの高い生産が見られた(表1)。

[0041] [表1]

菌株	30℃		37℃	
	グルコースの消費	5KGA	グルコースの消費	5KGA
TH216	High	+	Medium	+
THB10	Medium	+++	Weak	-
THC11	High	+++	Medium	+
THE20	High	+	Weak	+
THE42	High	++++	High	+++
THF5	Medium	+	Medium	+
THF32	High	+++	Weak	+
THF37	Medium	+	Medium	+
THF52	High	++	Medium	+
THF53	High	+	Medium	+
THF54	High	++	High	+
THF55	High	++++	High	+++
THF56	High	+++	Weak	+
THF67	Medium	++++	Medium	+
THF68	High	++	Medium	+
THF71	High	++	Medium	+
THF74	High	++	Medium	+
THF77	High	++	Medium	+
THF82	High	++	Medium	+
THF83	High	++	Medium	+
THG27	High	++	Medium	+
THG28	High	++	Medium	+
THG30	High	++	Medium	+
THG42	High	+++	High	+++

+: レゾルシノール試薬による黒い茶系緑色の沈殿の量

-: 未検出

[0042] 選ばれた3つの高温耐性菌による5KGAの形成は、図2のTLCにより確認し、3つの菌株の生育と生産の特徴については、30℃と37℃におけ

る2KGAと5KGA生産を、常温菌の5KGA生産グルコノバクター・サブオキシダンス IFO12528 菌と、比較して検討した。結果を表2に示した。3つの高温耐性菌は、生育も、主生産物として2KGAを生産することも同じであった。30℃、48時間の培養で、常温菌は高温耐性菌に比べ、低い生育、低い2KGA生産、高い5KGA生産を示した。37℃では、30℃よりも全ての菌の生育が遅いことから、2KGAと5KGAの生産物を高めるために培養時間を72時間とした。常温菌は、37℃でほとんど成長せず、低い2KGAと5KGAの生産を示した。この温度で3つの高温耐性菌は、30℃と比較して、生育、及び2KGAと5KGAの生産は低いものの、常温菌では不可能であった37℃での成長と5KGA生産の可能性を示した。

[0043] [表2]

生育条件	菌株	生育 (Klett Unit)	2KGA (mM)	5KGA (mM)
30 °C	IFO12528	222	39.14	148
48 hours	THE42	297	123	58.3
	THF55	290	122	58.9
	THG42	285	122	68.4
37°C	IFO12528	53	1.52	8.79
72 hours	THE42	275	109	50.0
	THF55	265	116	47.4
	THG42	265	111	53.4

実施例 2

[0044] <高温耐性グルコノバクター菌の変異株の作製>

高温耐性グルコノバクター菌について、特異的に5KGAを生産する菌を作製した。2KGAはFAD-グルコン酸脱水素酵素（FAD-GADH）

により生成される。5 K G A と競合して、主生産物に 2 K G A を生産する分離した高温耐性グルコノバクター菌において、F A D－G A D H 遺伝子を破壊することにより、2 K G A 生産を排除した。以下のクローニングに使用するプライマーは、表 3 に示した。

[0045] [表3]

プライマー	塩基配列	
gndL-F	5'-CCGTCAACTCGCAGCCTTTCTGC-3'	配列番号 1
gndL-R	5'-GCGGGCAGGATATTCACGTTGGG-3'	配列番号 2
F-igL-1	5'-TAGGTGACGCCGTAATCCTG-3'	配列番号 3
R-igL-2	5'-TCGGATACCATCCCTATTC-3'	配列番号 4
F-gnDH-3	5'-TCATGGACTGGGTCAATCAG-3'	配列番号 5
R-gnDH-2	5'-TGCAAGCAAAGGCCAGGATT-3'	配列番号 6

[0046] 1. 高温耐性グルコノバクター菌から F A D－グルコン酸脱水素酵素遺伝子のクローニング

F A D－G A D H 構造遺伝子は、グルコノバクター・オキシダンス 6 2 1 H のゲノム配列中で報告されている (Nature Biotechnology 23: 195-200, 2005)。3つのサブユニット (脱水素酵素サブユニット、チトクロムサブユニット、小サブユニット) から構成されている。この F A D－G A D H 遺伝子の配列を基にデザインした g n d L－F プライマー (配列番号 1) と g n d L－R のプライマー (配列番号 2) を P C R 用プライマーとした。この配列は、エルビニア・シプリペディ (Journal of Bacteriology 179: 6566-6572, 1997)、グルコノバクター・ジオキシアセトニカス I F O 3 2 7 1 (Microbiology 73: 6551-6556, 2007)、グルコノバクター・オキシダンス 6 2 1 H (Nature Biotechnology 23: 195-200, 2005) の G A D H 遺伝子の中の脱水素酵素サブユニットに保存されている領域から設計した。このプライマーペアを、各高温耐性菌のゲノム D N A を鋳型として使用し、PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads kit (GE Healthcare社製) を用いて P C R を行った。P C

Rは、mGeneAmpPCR System 2400 (Perkin Elmer社製)を用い、PCRの温度サイクルは、以下のように行った。95℃で30秒を1サイクル、その後、95℃で30秒、55℃で1分、68℃で1分を25サイクル行い、すべてのサイクルが終了すると最後は37℃に保った。DNA断片は、アガロースゲルで分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany)やMagExtractor DNA fragment purification kit (Toyobo, Tokyo, Japan)で精製した。この結果、PCRの525bp生産物が得られた。この配列は、グルコノバクター・オキシダンス 621HのFAD-GADH遺伝子の脱水素酵素サブユニットであるGOX1231と相同性が見られた。

[0047] 遺伝子の全配列を得るために、上記PCR生産物をシーケンスして得られた配列からデザインした特異的なプライマーペアである、F-i g L-1 (配列番号3)とF-i g L-2 (配列番号4)を用い、ゲノムDNAのEcoRI消化物の再環状化したものを鋳型として、TaKaRa LA Taq™ (タカラバイオ社製)に2mM MgCl₂と0.5%DMSOを添加してPCRを行った。95℃で30秒を1サイクル、その後、95℃で30秒、55℃で1分、68℃で6分を25サイクル行い、すべてのサイクルが終了すると最後は37℃に保った。脱水素酵素と小サブユニットの遺伝子の全配列は、ゲノムDNAのSacI I又はEcoRI消化物を再環状化したものを鋳型として、プライマーのF-i g L-1 (配列番号3)とR-i g L-2 (配列番号4)で増幅した。

チトクロームCサブユニットの遺伝子は、in vitroクローニング法から得られた。

[0048] 各菌株から得られたFAD-GADH遺伝子由来と予測される3つのORF (gndF、gndG、gndH)と、機能不明のタンパク質をコードする3ORFを含む6kb以上の断片をシーケンスし、配列を同定した。配列は、ABI PRISM 310 (PE Biosystems社製)を使用して行った。配列データは、GENETYX-MAC (Software Development社製)やClone Manager (Scientific and Educational Software社製)を使用して解析した。ホモ

ロジー検索や整列解析 (alignment) は、それぞれ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) と CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/clustalw) を使用して行った。1例として THF55 菌株から得られた断片地図を図3に示した。ORF-1、ORF-2、ORF-3は、グルコノバクター・オキシダンス 621Hのゲノムで示されている GOX1234、GOX1233、GOX1229でコード化されている機能不明タンパク質に相同性を示した。gndF、gndG、gndHの3つのORFは、ゲノムでFAD-GADH遺伝子と確認されたGOX1232、GOX1231、GOX1230に76%、89%、68%の同一性があった。この研究で得られた配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にAccession No. AB478873として登録済みである。

[0049] 決定したGndFのアミノ酸配列は、N末端に、Berks, B. C. らが報告した (Molecular Microbiology 35: 260-274, 2000)、2つのアルギニン残基を含むtat依存の特殊なシグナル配列が存在することがわかった。GndFはまた、FAD-GADHの小サブユニットとして、Toyama, Hらの報告 (Applied and Environmental Microbiology 73:6551-6556, 2007) で明らかにされたグルコノバクター・ジオキシアセトニカス IFO3271のGndSへ44%の同一性を示した。

[0050] 決定したGndGのアミノ酸配列は、いくつかのFAD含有酵素に同様の配列がみられるように、N末端にFADが結合するためのシグナルであるグリシンボックス (G x G x x G) を示した。GndGは、コファクターとしてのFADと結合する蛋白ファミリーであるグルコース-メタノール-コリン (GMC) 酸化還元酵素ファミリーの中に維持された領域配列を持っていた。また、前記Toyama, Hらが見出したグルコノバクター・ジオキシアセトニカス IFO3271のFAD-GADHの脱水素酵素サブユニットのGndLと61%の同一性を示した。

[0051] GndHは、アルコール脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素のように、グルコノバクター菌で見出される膜結合の多くのチ

トクロームcサブユニットと類似し、3つのヘムc結合モチーフ(CxxCH)配列を示した。さらに、グルコノバクター・ジオキシアセトニカス IF O 3 2 7 1 (20) のGndCに44%の同一性を示した。

[0052] 2. 高温耐性グルコノバクター属菌のFAD-GADH依存変異株の構築

テンプレートとするゲノムDNAは、Marmurの方法(J. Mol. Biol. 3: 208-218, 1961)に準じて、対数増殖期におけるグルコノバクター菌から分離した。gndGの破壊のためのプラスミドは、大腸菌 DH5 α 株から、QIA Prep Spin Miniprep kit (Qiagen社製)を使用して調製した。

F-gndH-3プライマー(配列番号5)とR-gndH-2プライマー(配列番号6)を使用し、テンプレートのゲノムDNAを増幅して得られた1.9kbのPCR断片のSmaIサイトに、pTKmからKmrカセットを含むEcoRV断片を挿入することにより構築した(pGEM-CARF::Km)。制限酵素切断パターンの分析により、KmrカセットはgndGと同じ転写方向に挿入したことを確認した。作製したプラスミドをエレクトロポレーションで、グルコノバクター菌へ導入し、導入した細胞は、遺伝子組み換えのために30℃で6時間、ポテト培地で培養した。2~3日後、カナマイシン50 μ g/mlを含むSG寒天培地(1%ソルビトール、1%グリセロール、0.3%ポリペプトン、0.3%酵母エキス、2%寒天)上に得られたコロニーをピックアップしてカナマイシン50 μ g/mlを含む1mlのSG培地(1%ソルビトール、1%グリセロール、0.3%ポリペプトン、0.3%酵母エキス)へ接種した。その後、変異株は、カナマイシン50 μ g/mlと、アンピシリン50 μ g/ml添加又は無添加の2つの新しい寒天培地に接種し、カナマイシン耐性コロニーでアンピシリンに耐性を示さないものを選抜した。Kmrカセットの挿入領域をカバーして増幅するプライマーを用いたPCRで遺伝子破壊を確かめた(図4)。その結果、THE42, THF55, THG42株からのgndG:Km変異株が得られ、3つの変異株全ては、TLC分析から2KGA生産性がないことを確認した(図5)。

[0053] 3. 酵素活性による変異株の確認

野生株と変異株のD-アラビトールやグルコースに対する膜結合酵素活性は、30℃と37℃で生育させた細胞から膜分画により調製し、Toyama, Hらの方法 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 69: 1120-1129, 2005) で行った。膜結合酵素活性は、フェリシアナイドとPMSを用いた還元活性により測定し、フェリシアナイド還元酵素活性、あるいはPMS-DCIP還元酵素活性として表した (図6a, b)。

[0054] フェリシアナイド還元酵素活性は、カリウムフェリシアナイドを電子受容体として測定した。25℃で、0.1Mの基質、McIlvaine buffer (McB, pH 5.0)、及び適当な量の酵素液を含む0.9mlの反応液を、5分間インキュベート後、0.1Mのカリウムフェリシアナイドの0.1mlを添加し、攪拌した。一定時間のインキュベート後、0.5ml Dupanoul試薬 (0.3% $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、8.1%リン酸、0.3%SDS) を添加して反応を止めた。色が安定するため20分間放置した後、混合液の総量が5mlになるよう3.5mlの蒸留水で希釈し、分光光度計U2000 (日立製作所社製) で、660nmの吸光度を測定した。酵素活性の1ユニットは、1分間に1μモルの基質を酸化した酵素の量とした。

[0055] 膜画分のフェナジンメソスルフェイト (PMS) 還元活性は、25℃で、1mlの反応液中、100mMの基質、0.2mMのPMS、1.2mMの NaN_3 、適量の酵素、McB (pH 5.0) を、0.11mMの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) とカップリング反応させ、600nmの青色の退色を分光光度計U2000 (日立製作所社製) で測定した。酵素活性の1ユニットは、このアッセイ系で1分間に1μモルの基質を酸化した酵素の量とした。

[0056] 図6aに示すように、30℃で生育した野生株と変異株のD-アラビトール脱水素酵素活性は、同じであったが、D-グルコン酸脱水素酵素活性は変異株で野生株の30%以上減少した。活性の減少は、FAD-GADHの脱水素酵素サブユニットをコードするgndG遺伝子の不活性化によるのであ

り、D-グルコン酸に反応するPQQ-GLDH活性はそのまま維持した。図6bでは、野生株と変異株において、37℃で生育した細胞からの膜結合酵素活性が、30℃での活性より低く、変異株のD-アラビトール脱水素酵素活性は野生株と同じであったが、変異株におけるD-グルコン酸脱水素酵素活性が、30℃の場合と同じように減少したことを示した。また、37℃では、PQQの添加により、野生株と変異株両方で、活性が2倍以上増加した。このことは、菌が高温で生育するときに、PQQ-GLDHに必要なPQQが不足していることを示している。

実施例 3

[0057] <FAD-GADH欠損変異株による5KGAの生産>

野生株と変異株は、2%グルコース-2%グルコン酸培地で30℃と37℃で培養し、2KGAと5KGAの生産量を培養時間に沿って測定した（図7a, b）。37℃における野生株の生育は30℃よりわずかに低く、30℃と37℃両方で主生産物として2KGAを生産しており、生産量も5KGAの2倍以上であった。2つの生産物の生産は、最初の生育段階から見られたが、最も高い生産量は、生育定常期に見られた。30℃では、2KGAと5KGAの減少が培養60時間以降に見られたが、これは37℃の培養では見られなかった。gndG::Km変異株による5KGAの生産を、野生株と比較した場合、30℃で、3つの変異株全てで、5KGA生産が主で2KGA生産はわずかとなった。2KGAと5KGAの最も高い生産量は、野生株と同様に60時間後に見られた。37℃においても、変異株はやはり5KGAを主に生産し、2KGAの生産はわずかであったが、生産量は30℃での生産量の半分であった。最終的な変換の収量は、37℃、96時間培養で原料の50%であった。

実施例 4

[0058] <高温での5KGA生産の改良>

37℃での野生株と変異株のPQQ-GLDH活性はコファクター（PQQ及び／又はCa²⁺）の添加に依存する。そこで、種々の濃度のCaCl₂を

グルコノバクター属 THF55 (gndG::Km) の培地に添加して、37℃で培養した結果 (図8a)、培養3日後に5KGAの蓄積を確認した。CaCl₂添加による生育への効果は認められないが、5mMのCaCl₂添加で、5KGAの生産に高い効果を起こした。これは原料の90%が5KGAに変換される収率であった。5mMより高い濃度のCaCl₂添加では、5KGA生産は減少し、生育もわずかに阻害された。この結果より、37℃の培養において、5KGA生産を増加させる適正なCaCl₂の添加濃度は5mMであった (図8b)。

産業上の利用可能性

- [0059] 本発明の菌株を用いた5KGAの発酵生産法は、高温条件下で培養することにより、培地を冷却する必要がなくなり、コストを大幅に削減することができる。また、本発明のグルコノバクター属菌の変異株は、5KGAを特異的に生産するため精製工程が容易になることから、本発明の新規な菌株は、工業的に利用される可能性が高い。

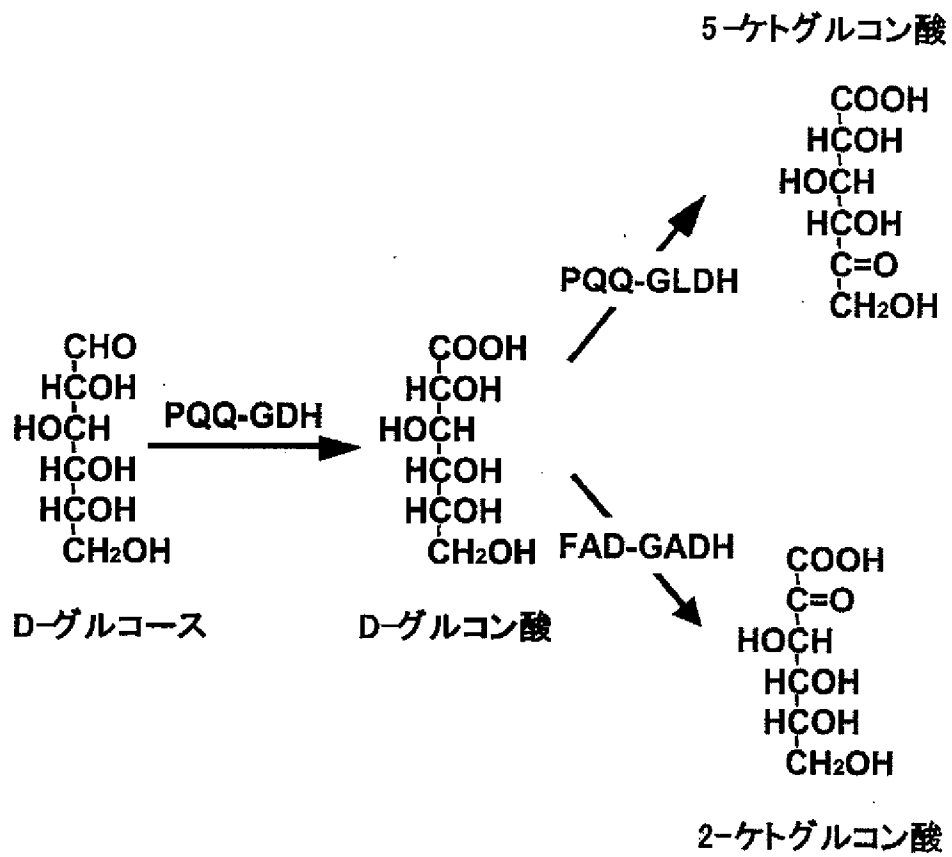
請求の範囲

- [請求項1] グルコノバクター属に属する5-ケト-D-グルコン酸（5 K G A）
産生能を有する高温耐性野生株、又はその変異株であって、20 g グルコース、20 g グルコン酸ナトリウム、3 g ポリペプトン、3 g 酵母エキスを蒸留水で1 Lとする2%グルコース-グルコン酸培地で37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5 K G A濃度が45 mM以上となることを特徴とする5 K G A産生能を有する高温耐性菌。
- [請求項2] 変異株が、F A D-グルコン酸脱水素酵素（F A D-G A D H）遺伝子を破壊した変異株であることを特徴とする請求項1に記載の高温耐性菌。
- [請求項3] F A D-G A D H遺伝子を破壊した変異株が、2%グルコース-グルコン酸培地で、30℃及び37℃で72時間培養したとき、レゾルシノール試薬を用いて測定した培養上清中の5 K G A濃度がそれぞれ170 mM以上及び90 mM以上となる5 K G A産生能を有する変異株であることを特徴とする請求項2に記載の高温耐性菌。
- [請求項4] F A D-G A D H遺伝子を破壊した変異株が、配列番号7, 8, 9に示す塩基配列を有するDNA断片を増幅して得られたPCR産物に、カナマイシンカセットを挿入したプラスミドを細胞内に導入して相同組み換えを行うことにより構築した株であることを特徴とする請求項2に記載の高温耐性菌。
- [請求項5] グルコノバクター・フラテウリ T H E 4 2 株（受託番号 N I T E B P-6 5 5）、グルコノバクター・フラテウリ T H G 4 2 株（受託番号 N I T E B P-6 5 7）、グルコノバクター・フラテウリ T H F 5 5 株（受託番号 N I T E B P-6 5 9）、グルコノバクター・フラテウリ T H E 4 2 g n d G : : K m 株（受託番号 N I T E B P-6 5 6）、グルコノバクター・フラテウリ T H G 4 2 g n d G : : K m 株（受託番号 N I T E B P-6 5 8）

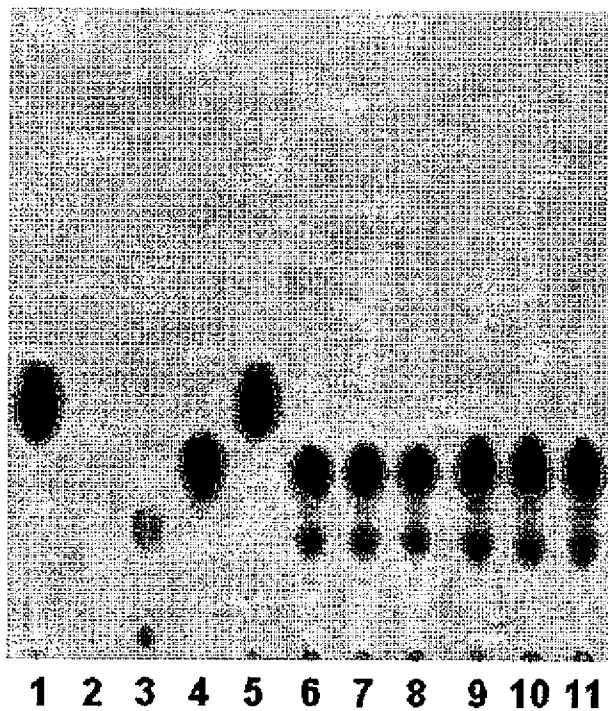
、グルコノバクター・フラテウリ THF55 gndG::Km株
(受託番号 NITE BP-660) から選ばれる1種以上の5-
ケト-D-グルコン酸産生能を有する高温耐性菌。

[請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載の高温耐性菌を、ピロロキノリンキノ
ン及び/又はCaイオン存在下、30～37℃で培養して5KGAを
生産させ、5KGAを採取することを特徴とする、5KGAの製造方
法。

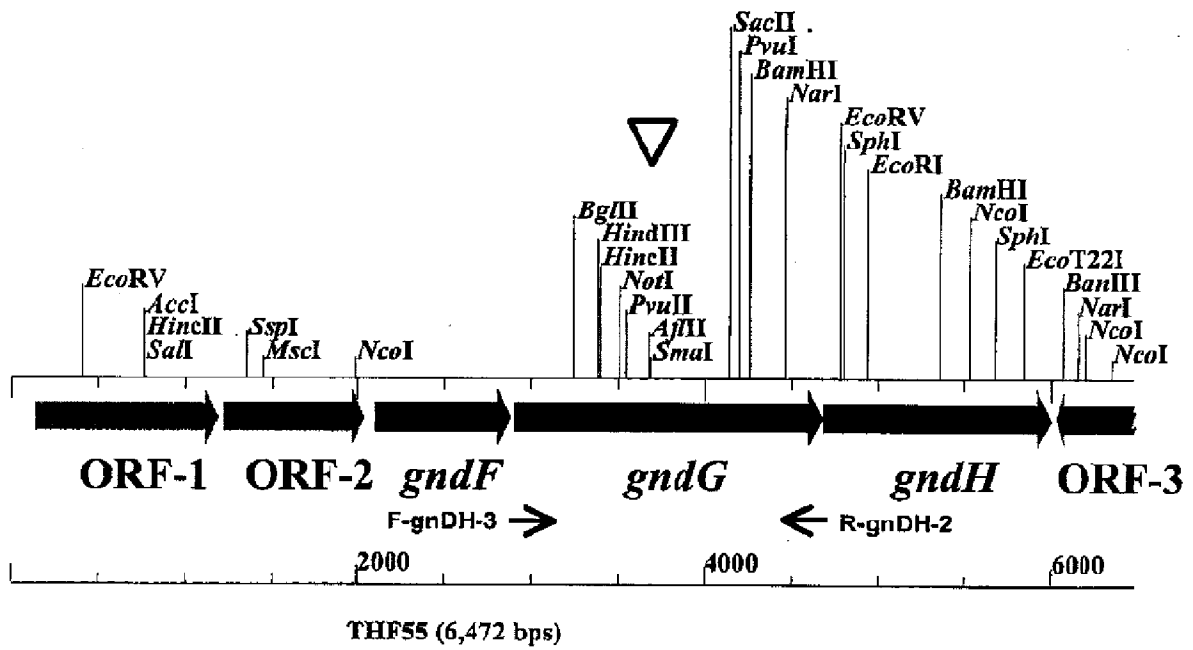
[図1]



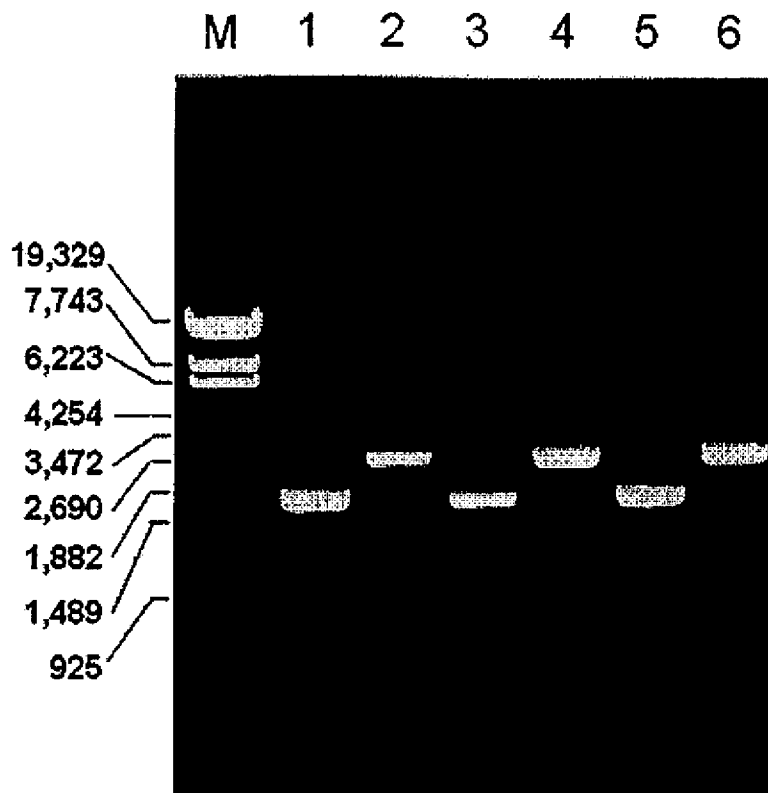
[図2]



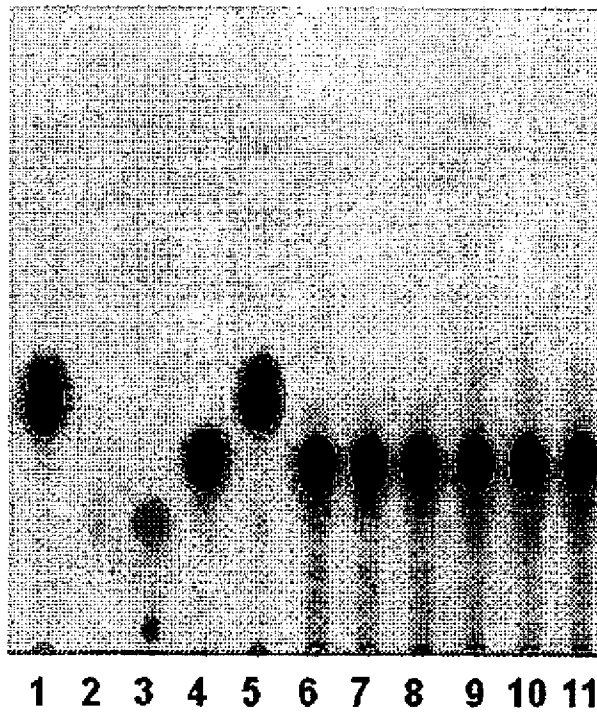
[図3]



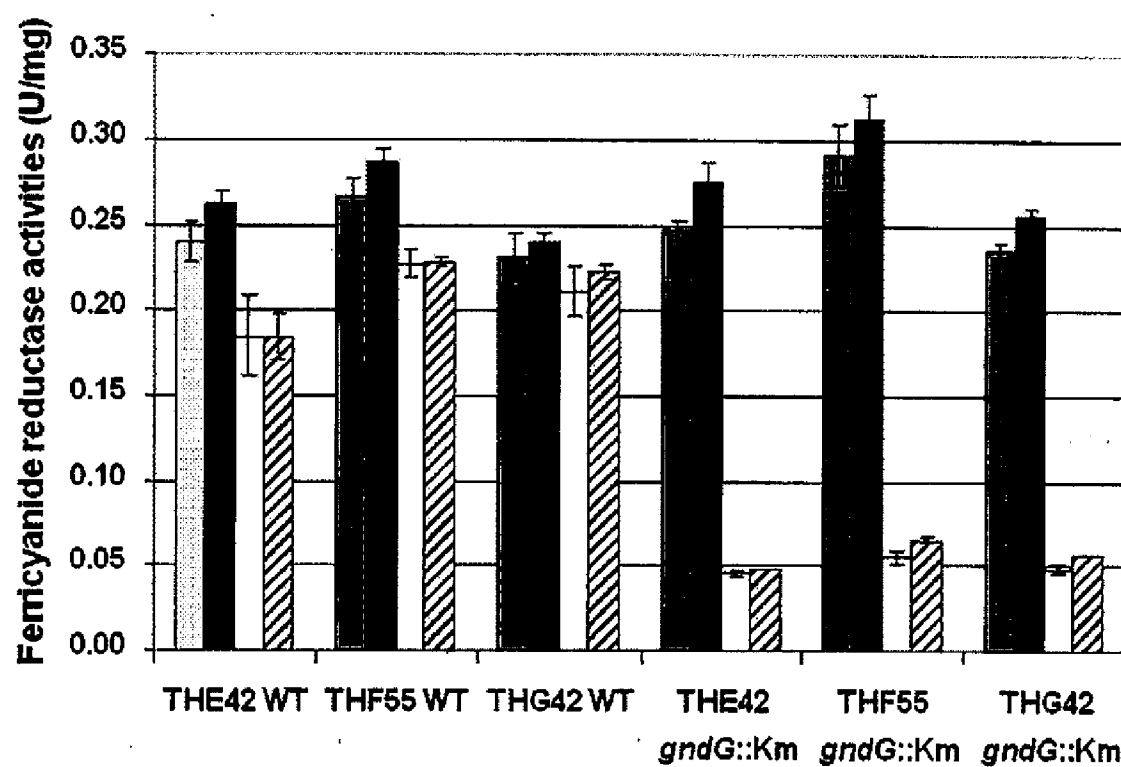
[図4]



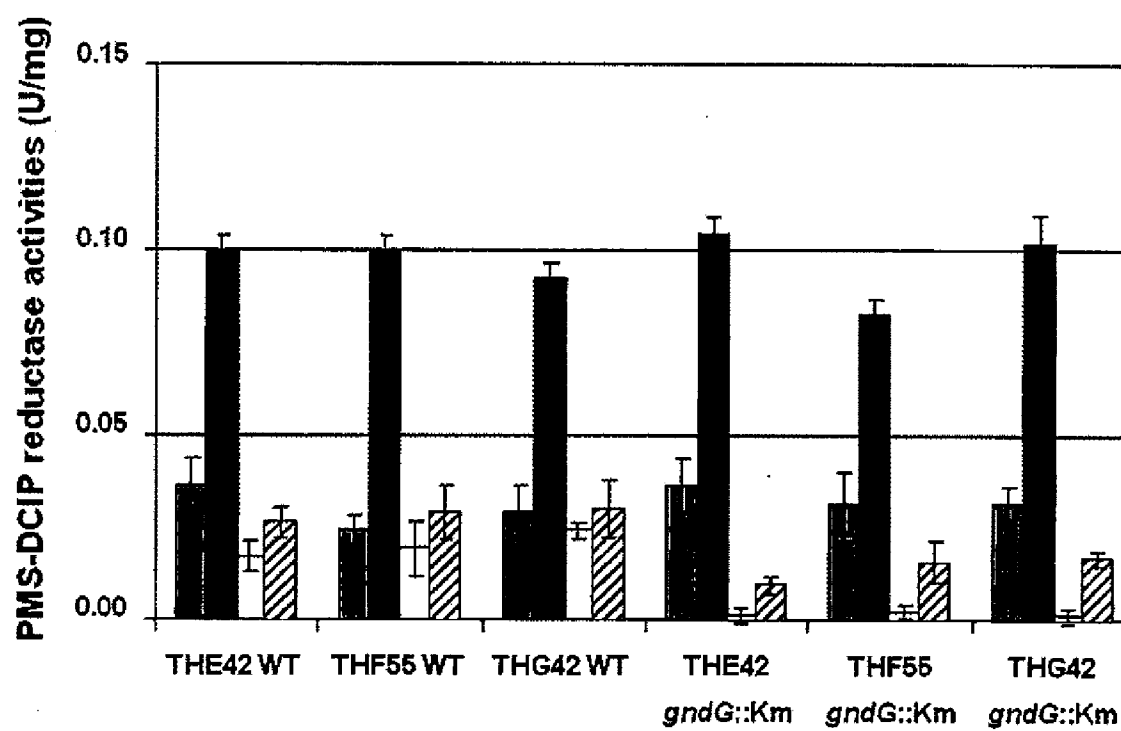
[図5]



[図6]

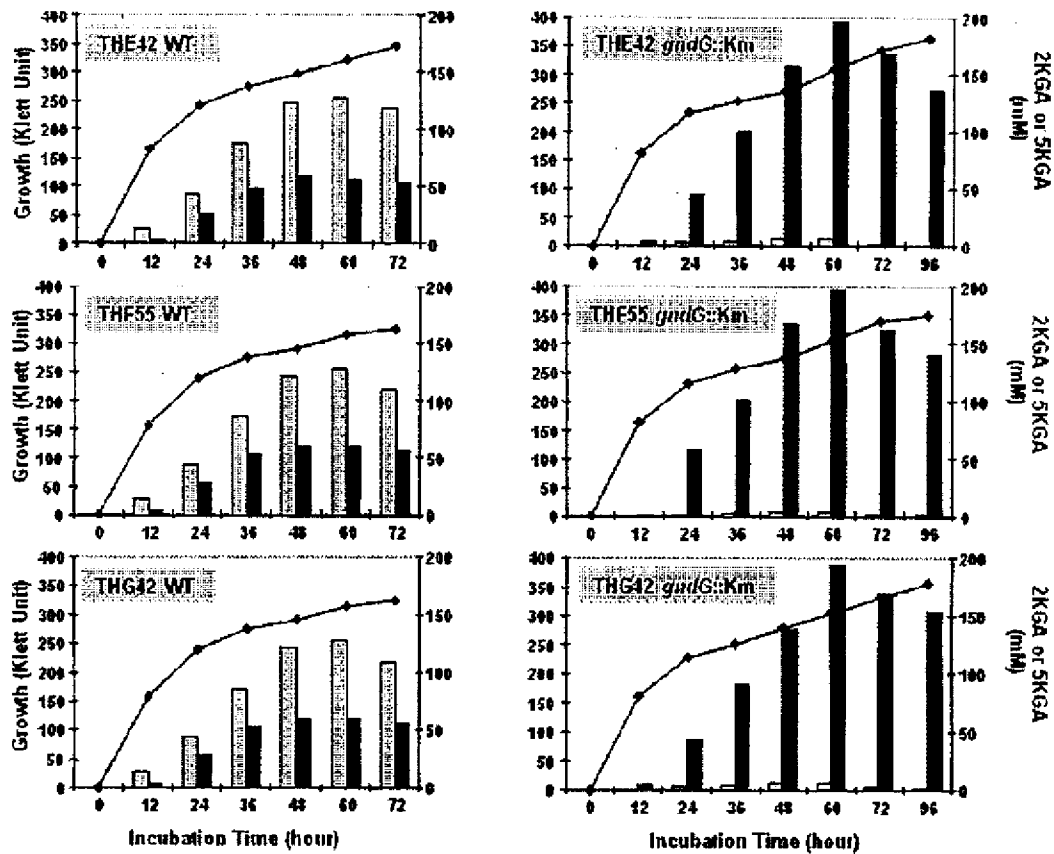


(a)

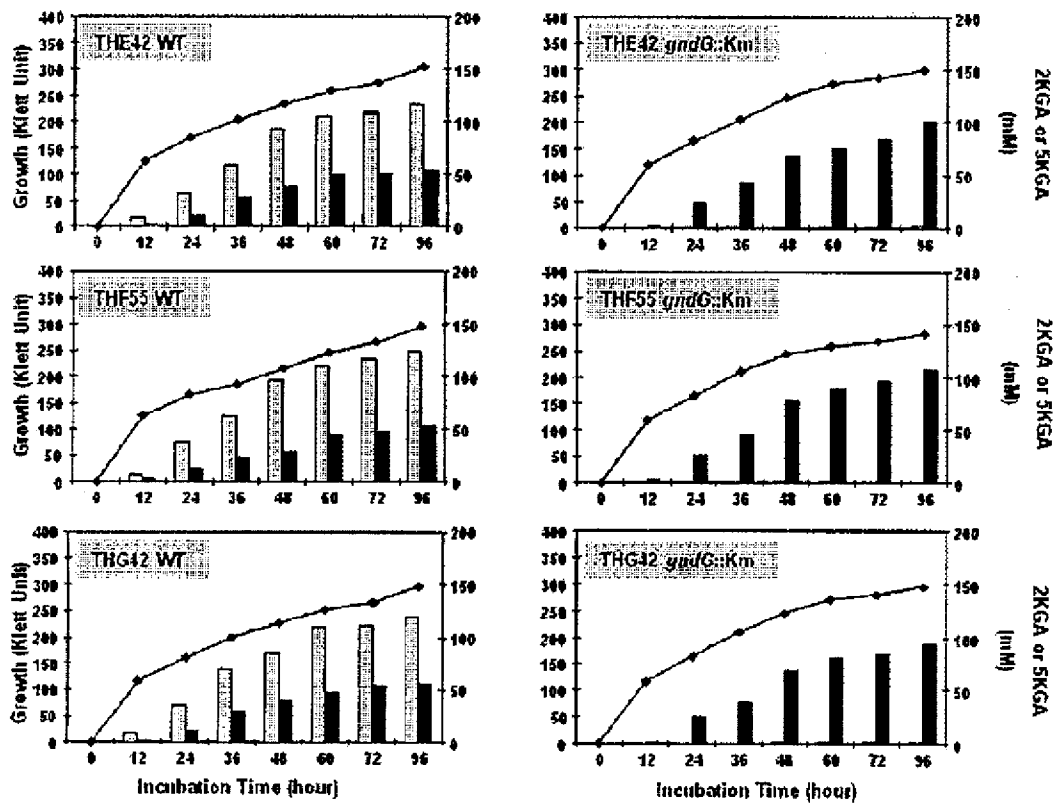


(b)

[図7]

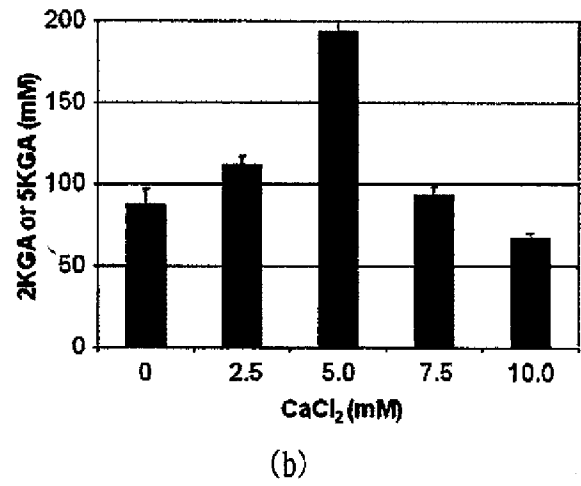
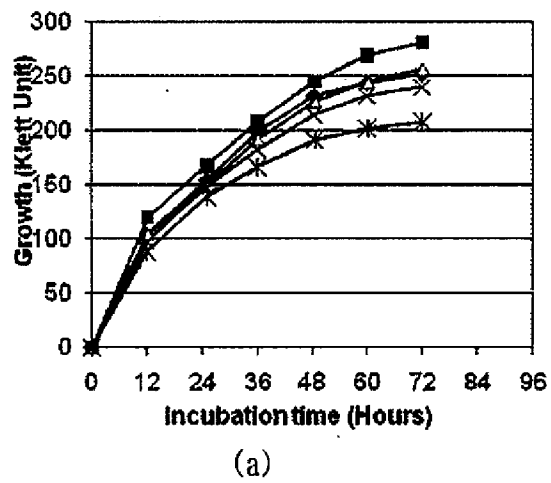


(a)



(b)

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/58(2006.01)i

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)

C12N1/21, C12N15/09, C12P7/58

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	TOYAMA H., Microbial biochemistry for stable 5-keto-gluconate fermentation., Rep. Noda Inst. Sci. Res., 2007.03.01, no. 50, p. 63-65, Fig. 1	1, 5/1-6
Y	Kazunobu MATSUSHITA, "Thailand de Bunri sareta Tainetsusei Sakusankin no Kino Kaiseki to sono Riyo", Bioscience & Industry, 01 March 2008 (01.03.2008), vol.66, no.3, pages 130 to 134, page 132, right column, line 12 - 133 (4th chapter)	1-6
Y	SHINAGAWA E., et al., Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone(PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase., J. Mol. Catal. B Enzym., 1999.03.11, vol. 6, no. 3, p. 341-350, Abstract, Fig. 5, 6	1-6



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

"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

07 January, 2010 (07.01.10)

Date of mailing of the international search report

19 January, 2010 (19.01.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006953

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SAICHANA I., et al., Screening of thermotolerant gluconobacter strains for production of 5-keto-D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase., Appl. Environ. Microbiol., 2009.07, vol. 75, no. 13, p. 4240-4247, entire text	1-6
P,X	SAICHANA I., et al., Production of 5-keto-D-gluconic acid by thermotolerant gluconobacter strains defective in FAD-gluconate dehydrogenase., Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2009 (05.03.2009), vol.2009, page 260 (3P0755A), entire text	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/58(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12N1/21, C12N15/09, C12P7/58

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

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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
X/Y	TOYAMA H., Microbial biochemistry for stable 5-keto-gluconate fermentation., Rep. Noda Inst. Sci. Res., 2007.03.01, no. 50, p. 63-65, Fig. 1	1, 5/1-6
Y	松下一信, タイで分離された耐熱性酢酸菌の機能解析とその利用, バイオサイエンスとインダストリー, 2008.03.01, vol. 66, no. 3, p. 130-134, p. 132 右欄第 12 行目-133 (第 4 章)	1-6

☒ 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
「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矛盾するものではなく、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

0 7 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

中野 あい

4 B

3 7 5 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 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
Y	SHINAGAWA E., et al., Production of 5-keto-D-gluconate by acetic acid bacteria is catalyzed by pyrroloquinoline quinone(PQQ)-dependent membrane-bound D-gluconate dehydrogenase., J. Mol. Catal. B Enzym., 1999.03.11, vol. 6, no. 3, p. 341-350, Abstract, Fig. 5,6	1-6
PX	SAICHANA I., et al., Screening of thermotolerant gluconobacter strains for production of 5-keto-D-gluconic acid and disruption of flavin adenine dinucleotide-containing D-gluconate dehydrogenase., Appl. Environ. Microbiol., 2009.07, vol. 75, no. 13, p. 4240-4247, 全文	1-6
PX	SAICHANA I., et al., Production of 5-keto-D-gluconic acid by thermotolerant gluconobacter strains defective in FAD-gluconate dehydrogenase., 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2009.03.05, vol. 2009, p. 260 (3P0755A), 全文	1-6

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、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 紙形式

☒ 電子形式

c. 提出時期

☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：