

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7620123号
(P7620123)

(45)発行日 令和7年1月22日(2025.1.22)

(24)登録日 令和7年1月14日(2025.1.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11 Z Z N A
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 P	13/08 (2006.01)	C 1 2 P	13/08 A
請求項の数 4 (全14頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-566852(P2023-566852)	(73)特許権者	514199250
(86)(22)出願日	令和3年5月28日(2021.5.28)		シージェイ チェイルジェダン グ コーポ
(65)公表番号	特表2024-515390(P2024-515390 A)		レイション
(43)公表日	令和6年4月9日(2024.4.9)		大韓民国 ソウル 0 4 5 6 0 ジュン グ
(86)国際出願番号	PCT/KR2021/006681	(74)代理人	100105957
(87)国際公開番号	WO2022/231056		弁理士 恩田 誠
(87)国際公開日	令和4年11月3日(2022.11.3)	(74)代理人	100068755
審査請求日	令和5年12月27日(2023.12.27)		弁理士 恩田 博宣
(31)優先権主張番号	10-2021-0056580	(74)代理人	100142907
(32)優先日	令和3年4月30日(2021.4.30)		弁理士 本田 淳
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(74)代理人	100152489
(31)優先権主張番号	10-2021-0067391		弁理士 中村 美樹
(32)優先日	令和3年5月26日(2021.5.26)	(72)発明者	ホン、イン ピョ
最終頁に続く			大韓民国 1 7 3 8 4 キョンギード イ
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 Lーリシン生産能が向上したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株及びそれを用いた Lーリシン生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
配列番号1のトランスクリプターゼをコードする遺伝子のプロモーター配列のー83～ー74領域における塩基配列がc c a a t t a a c cからt g t g g t a t c aに置換された、プロモーター。

【請求項2】
配列番号1のトランスクリプターゼをコードする遺伝子のプロモーター配列のー83～ー74領域における塩基配列がc c a a t t a a c cからt g t g g t a t c aに置換され、Lーリシン生産能が向上した、コリネバクテリウム・グルタミカム (C o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m) 変異株。

【請求項3】
前記変異株は、配列番号3で表される塩基配列を含むものである、請求項2に記載のコリネバクテリウム・グルタミカム変異株。

【請求項4】
Lーリシンを生産する方法であって、
a) 請求項2に記載の前記変異株を培地で培養するステップと、
b) 前記変異株又は前記変異株を培養した前記培地からLーリシンを回収するステップとを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Ｌーリシン生産能が向上したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株及びそれを用いたＬーリシン生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

Ｌーリシンは、ヒトや動物の体内で合成されない必須アミノ酸であるので外部から供給されなければならない、一般に細菌や酵母などの微生物を用いた発酵により生産される。Ｌーリシンの生産には、自然状態で得られた野生型菌株や、そのＬーリシン生産能が向上するように改変された変異株が用いられる。最近では、Ｌーリシンの生産効率を改善するために、Ｌーアミノ酸及びその他の有用物質の生産に多く用いられる大腸菌、コリネバクテリウムなどの微生物を対象に遺伝子組換え技術を適用することにより、優れたＬーリシン生産能を有する様々な組換え菌株又は変異株及びそれらを用いたＬーリシン生産方法が開発されている。

10

【0003】

特許文献１及び２によれば、Ｌーリシンの生産に関与する酵素を含むタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列又はアミノ酸配列を変更してその遺伝子の発現を増加させるか、不要な遺伝子を欠失させることにより、Ｌーリシン生産能を向上させることができる。また、特許文献３には、Ｌーリシンの生産に関与する酵素をコードする遺伝子の発現を増加させるために、遺伝子の既存のプロモーターを活性の強いプロモーターに変更する方法が開示されている。

20

【0004】

このように、Ｌーリシン生産能を向上させる様々な方法が開発されているが、Ｌーリシンの生産に直接、間接的に関与する酵素、転写因子、輸送タンパク質などのタンパク質の種類が数十種に及ぶので、このようなタンパク質の活性変化によりＬーリシン生産能が向上するか否かに関して依然として多くの研究が求められている現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】韓国登録特許第１０－０８３８０３８号公報

【文献】韓国登録特許第１０－２１３９８０６号公報

30

【文献】韓国公開特許第１０－２０２０－００２６８８１号公報

【文献】韓国登録特許第１０－１５０４９００号公報

【非特許文献】

【0006】

【文献】Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D. C., USA, 1981

【文献】Sambrook, J. 等 (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press. volume 2. 13.36~13.39

40

【文献】Shaw等, 1991. Biochemistry. 30(44):10806

【文献】Kim等, Journal of Microbiological Methods 84 (2011) 128-130

【文献】Tauch等, FEMS Microbiology letters 123 (1994) 343-347

【文献】Schäfer等, Gene 145 (1994) 69-73

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

50

本発明は、Ｌーリシン生産能が向上したコリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）変異株を提供することを目的とする。

また、本発明は、前記変異株を用いたＬーリシン生産方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株を用いてＬーリシン生産能が向上した新たな変異株を開発すべく研究を重ねた結果、Ｌーリシン生合成経路に關与するトランスケトラーゼをコードする *tkt* 遺伝子のプロモーター中の特定位置の塩基配列を置換すると、Ｌーリシン生産量が増加することを確認し、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明の一態様は、トランスケトラーゼの活性が強化されてＬーリシン生産能が向上したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を提供する。

本発明における「トランスケトラーゼ（*transketolase*）」とは、ペントースリン酸経路においてキシロースリン酸からリボースリン酸にケトール基（ HOCH_2CO^- ）を転移してセドヘプツロースリン酸を形成する反応を触媒する酵素を意味する。このようなトランスケトラーゼをコードする遺伝子は、トランスアルドラーゼ（*transaldolase*）、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（*glucose-6-phosphate dehydrogenase*）及び６－ホスホグルコノラクトナーゼ（*6-phosphogluconolactonase*）をコードする遺伝子とオペロン（*operon*）を構成し、そのオペロンは１つのプロモーターにより遺伝子発現が調節される。

【0010】

本発明の一具体例によれば、前記トランスケトラーゼは、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属菌株に由来するものであってもよい。具体的には、前記コリネバクテリウム属菌株は、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・クルジラクチス（*Corynebacterium crudilactis*）、コリネバクテリウム・デセルティ（*Corynebacterium deserti*）、コリネバクテリウム・カルナエ（*Corynebacterium callunae*）、コリネバクテリウム・スラナレアエ（*Corynebacterium suranareeae*）、コリネバクテリウム・ルブリカンティス（*Corynebacterium lubricantis*）、コリネバクテリウム・ドサネンス（*Corynebacterium doosane*）、コリネバクテリウム・エフィシエンス（*Corynebacterium efficiens*）、コリネバクテリウム・ウテレキ（*Corynebacterium uterequi*）、コリネバクテリウム・スタティオニス（*Corynebacterium stationis*）、コリネバクテリウム・パカエンセ（*Corynebacterium pacaense*）、コリネバクテリウム・シングラレ（*Corynebacterium singulare*）、コリネバクテリウム・ヒュミレデュセンス（*Corynebacterium humireducens*）、コリネバクテリウム・マリヌム（*Corynebacterium marinum*）、コリネバクテリウム・ハロトレランス（*Corynebacterium halotolerans*）、コリネバクテリウム・スフェニスコルム（*Corynebacterium spheniscorum*）、コリネバクテリウム・フレイブルゲンズ（*Corynebacterium freiburgense*）、コリネバクテリウム・ストリアツム（*Corynebacterium striatum*）、コリネバクテリウム・カニス（*Corynebacterium canis*）、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス（*Corynebacterium ammoniagenes*）、コリネバクテリウム・レナーレ（*Corynebacterium renale*）、コリネバクテリウム・ポルティソリ（*Corynebacterium pollutisoli*）、コリネバクテリウム・イミタンス（*Corynebacterium imitans*）、コリネバクテリウム

10

20

30

40

50

・カスピウム (*Corynebacterium caspium*)、コリネバクテリウム・テストディノリス (*Corynebacterium testudinoris*)、コリネバクテリウム・シュードペラーギ (*Corynebacterium pseudopelargi*) 又はコリネバクテリウム・フラベッセンス (*Corynebacterium flavescens*) であるが、これらに限定されるものではない。

【0011】

本発明における「活性の強化」とは、目的とする酵素、転写因子、輸送タンパク質などのタンパク質をコードする遺伝子の発現を新たに導入又は増大することにより、野生型菌株又は改変前の菌株に比べて発現量を増加させることを意味する。このような活性の強化には、遺伝子をコードするヌクレオチドの置換、挿入、欠失又はそれらの組み合わせにより本来の微生物が有するタンパク質の活性よりタンパク質自体の活性が向上することや、それをコードする遺伝子の発現の増加や翻訳の増加などにより細胞内で全体的な酵素活性の程度が野生型菌株又は改変前の菌株に比べて上昇することや、それらの組み合わせが含まれる。

【0012】

本発明の一具体例によれば、前記トランスケトララーゼの活性強化は、トランスケトララーゼをコードする遺伝子のプロモーターに位置特異的変異を誘発することであってもよい。

本発明の一具体例によれば、前記トランスケトララーゼをコードする遺伝子のプロモーターは、配列番号1の塩基配列で表されるものであってもよい。

【0013】

本発明における「プロモーター」とは、標的遺伝子のmRNA転写を開始し、RNAポリメラーゼ (polymerase) に対する結合部位を含み、遺伝子の転写を調節するDNAの特定部位を意味し、一般に転写開始点より上流 (upstream) に位置する。原核生物におけるプロモーターは、RNAポリメラーゼが結合する転写開始点付近の部位と定義され、一般に転写開始点の上流の-10領域及び-35領域に位置する塩基対が、離れた2つの短い塩基配列で構成される。本発明におけるプロモーター変異は、野生型プロモーターに比べて活性が向上するように改良するものであり、転写開始点の上流に位置するプロモーター領域内で変異を誘発することにより、下流 (downstream) に位置する遺伝子の発現を増加させることができる。

【0014】

本発明の一具体例によれば、前記トランスケトララーゼの活性強化は、トランスケトララーゼをコードする遺伝子のプロモーター配列中の転写開始点の上流の-300~-10領域の少なくとも1つの塩基が置換されることであってもよい。

【0015】

より具体的には、本発明におけるプロモーター変異は、-300~-10領域の少なくとも1つの塩基、好ましくは-250~-50領域、-230~-200領域、-190~-160領域、又は-90~-60領域の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又は10の塩基が連続的又は非連続的に置換されることであってもよい。

【0016】

本発明の一実施例によれば、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株のトランスケトララーゼをコードするtkt遺伝子のプロモーター配列において-83~-74領域の塩基配列をccaat taa ccからtg t g c t g t c aに置換することにより、tkt遺伝子の新たなプロモーター配列を有するコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を得た。このようなコリネバクテリウム・グルタミカム変異株は、配列番号2の塩基配列で表されるtkt遺伝子の変異したプロモーターを含むものであってもよい。

【0017】

本発明の一実施例によれば、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株のトランスケトララーゼをコードするtkt遺伝子のプロモーター配列において-83~-74領域の塩基配列をccaat taa ccからtg t g g t a t c aに置換することにより、tkt遺伝子の新たなプロモーター配列を有するコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を得た。

このようなコリネバクテリウム・グルタミカム変異株は、配列番号3の塩基配列で表される t k t 遺伝子の変異したプロモーターを含むものであってもよい。

【0018】

本発明における「生産能が向上した」ものとは、親株に比べてLーリシンの生産性が向上したものを意味する。前記親株とは、変異の対象となる野生型又は変異株を意味し、直接変異の対象となるものや、組換えベクターなどにより形質転換される対象となるものが含まれる。本発明において、親株は、野生型コリネバクテリウム・グルタミカム菌株、又は野生型から変異した菌株であってもよい。

【0019】

本発明の一具体例によれば、前記親株は、リシンの生産に関与する遺伝子（例えば、l y s C、z w f 及び h o m 遺伝子）の配列に変異が誘発された変異株であって、韓国微生物保存センター（K o r e a n C u l t u r e C e n t e r o f M i c r o o r g a n i s m s）に2021年4月2日付けで受託番号K C C M 1 2 9 6 9 Pとして寄託したコリネバクテリウム・グルタミカム菌株（以下「コリネバクテリウム・グルタミカムD S 1 菌株」という）であってもよい。

【0020】

このような本発明のLーリシン生産能が向上したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株は、トランスケトララーゼをコードする遺伝子の変異したプロモーター配列を含むものであってもよい。

【0021】

本発明の一具体例によれば、前記変異株は、配列番号2～4で表される塩基配列のいずれかをトランスケトララーゼ遺伝子のプロモーター配列として含むものであってもよい。

本発明の一実施例によれば、前記変異株は、トランスケトララーゼをコードする t k t 遺伝子のプロモーター変異を含むことにより、親株より向上したLーリシン生産能を示し、特に親株に比べてLーリシン生産量が5%以上、具体的には5～40%、より具体的には10～30%増加するので、菌株培養液1リットル当たり65～90g、好ましくは70～80gのLーリシンを生産することができる。また、前記変異株は、変異位置が異なる従来の t k t 遺伝子のプロモーター変異株に比べてLーリシン生産量が約4%以上増加するので、高収率でLーリシンを生産することができる。

【0022】

本発明の一具体例によるコリネバクテリウム・グルタミカム変異株は、親株にトランスケトララーゼをコードする遺伝子のプロモーター配列が一部置換された変異体を含む組換えベクターにより実現される。

【0023】

本発明における「一部」とは、塩基配列又はポリヌクレオチド配列の全部ではないことを意味し、1～300個、好ましくは1～100個、より好ましくは1～50個であるが、これらに限定されるものではない。

【0024】

本発明における「変異体」とは、Lーリシンの生合成に関与するトランスケトララーゼ遺伝子のプロモーター配列中の-300～-10領域の少なくとも1つの塩基が置換されたプロモーター変異体を意味する。

【0025】

本発明の一具体例によれば、トランスケトララーゼ遺伝子のプロモーター配列中の-83～-74領域の塩基配列が t g t g c t g t c a に置換された変異体は配列番号2の塩基配列を有するものであってもよく、t g t g g t a t c a に置換された変異体は配列番号3の塩基配列を有するものであってもよい。

【0026】

本発明における「ベクター」とは、好適な宿主細胞において標的タンパク質を発現する発現ベクターであって、遺伝子挿入物が発現するように作動可能に連結された（o p e r a b l y l i n k e d）必須の調節因子を含む遺伝子構築物を意味する。ここで、「作

10

20

30

40

50

動可能に連結された」ものとは、発現が必要な遺伝子とその調節配列が互いに機能的に結合されて遺伝子発現を可能にする方法により連結されたものを意味し、「調節因子」には、転写を行うためのプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列が含まれる。このようなベクターには、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクター、ウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0027】

本発明における「組換えベクター」は、好適な宿主細胞内に形質転換されると、宿主細胞のゲノムに関係なく複製されるか、又はゲノム自体に組み込まれる。ここで、前記「好適な宿主細胞」は、ベクターが複製可能なものであって、複製が開始される特定塩基配列である複製起点を含むものであってもよい。

【0028】

前記形質転換は、宿主細胞に応じて好適なベクター導入技術を選択することにより、目的とする遺伝子を宿主細胞内で発現させることができる。例えば、ベクター導入は、エレクトロポレーション(electroporation)、熱ショック(heat shock)、リン酸カルシウム(CaPO₄)沈殿、塩化カルシウム(CaCl₂)沈殿、微量注入法(microinjection)、ポリエチレングリコール(PEG)法、DEAE-デキストラン法、カチオン性リボソーム法、酢酸リチウム-DMSO法又はそれらの組み合わせにより行うことができる。形質転換された遺伝子は、宿主細胞内で発現するものであれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、染色体外に位置するかに関係なく、いかなるものでもよい。

【0029】

前記宿主細胞には、生体内又は試験管内で本発明の組換えベクター又はポリヌクレオチドでトランスフェクション、形質転換又は感染された細胞が含まれる。本発明の組換えベクターを含む宿主細胞は、組換え宿主細胞、組換え細胞又は組換え微生物である。

【0030】

また、本発明による組換えベクターは、選択マーカー(selection marker)を含んでもよい。前記選択マーカーはベクターで形質転換された形質転換体(宿主細胞)を選択するためのものであり、前記選択マーカーで処理した培地では選択マーカーを発現する細胞のみ生存するので、形質転換された細胞を選択することができる。前記選択マーカーの代表的な例としては、カナマイシン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコールなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0031】

本発明の形質転換用組換えベクターに挿入された遺伝子は、相同組換え交差によりコリネバクテリウム属微生物などの宿主細胞内に置換される。

本発明の一具体例によれば、前記宿主細胞は、コリネバクテリウム属菌株であってもよく、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)菌株であってもよい。

【0032】

また、本発明の他の態様は、a) 前記コリネバクテリウム・グルタミカム変異株を培地で培養するステップと、b) 前記変異株又は変異株を培養した培地からL-リシンを回収するステップとを含むL-リシン生産方法を提供する。

【0033】

前記培養は、当該技術分野で公知の好適な培地と培養条件で行うことができ、通常の技術者であれば培地及び培養条件を容易に調整して用いることができる。具体的には、前記培地は液体培地であるが、これに限定されるものではない。培養方法は、例えば回分培養(batch culture)、連続培養(continuous culture)、流加培養(fed-batch culture)又はその組み合わせであるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明の一具体例によれば、前記培地は、好適な方法で特定菌株の要件を満たすものでなければならず、通常の技術者により適宜変更されるものである。コリネバクテリウム属菌株の培養培地は、公知の文献（非特許文献1）に開示されているが、これに限定されるものではない。

【0035】

本発明の一具体例によれば、培地に様々な炭素源、窒素源及び微量元素成分を含んでもよい。用いることのできる炭素源としては、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、デンプン、セルロースなどの糖及び炭水化物、大豆油、ヒマワリ油、ヒマシ油、ココナッツ油などの油脂、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸などの脂肪酸、グリセリン、エタノールなどのアルコール、酢酸などの有機酸が挙げられる。これらの物質は、単独で用いることもでき、混合物として用いることもできるが、これらに限定されるものではない。用いることのできる窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、肉汁、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液、黄粉及び尿素、又は無機化合物、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、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムが挙げられる。窒素源も、単独で用いることもでき、混合物として用いることもできるが、これらに限定されるものではない。用いることのできるリン源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、又はそれらに相当するナトリウム含有塩が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、培養培地は、成長に必要な硫酸マグネシウム、硫酸鉄などの金属塩を含有してもよいが、これらに限定されるものではない。その他に、アミノ酸、ビタミンなどの必須成長物質が用いられてもよい。また、培養培地に好適な前駆体が用いられてもよい。前記培地又は個別成分は、培養過程において培養液に好適な方法でバッチ毎に又は継続して添加されるが、これらに限定されるものではない。

【0036】

本発明の一具体例によれば、培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸、硫酸などの化合物を微生物培養液に好適な方法で添加して培養液のpHを調整してもよい。また、培養中に脂肪酸ポリグリコールエステルなどの消泡剤を用いて気泡生成を抑制してもよい。さらに、培養液の好気状態を維持するために、培養液中に酸素又は酸素含有気体（例えば、空気）を注入してもよい。培養液の温度は、通常20℃～45℃、例えば25℃～40℃である。培養期間は、有用物質の所望の生産量が得られるまで続けられ、例えば10～160時間であってもよい。

【0037】

本発明の一具体例によれば、前述したように培養した変異株及び変異株を培養した培地からL-リシンを回収するステップは、培養方法に応じて、当該分野で公知の好適な方法を用いて培地から生産されたL-リシンを収集又は回収するものであってもよい。例えば、遠心分離、濾過、抽出、噴霧、乾燥、蒸発、沈殿、結晶化、電気泳動、分別溶解（例えば、硫酸アンモニウム沈殿）、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、疎水性及びサイズ排除）などの方法が用いられるが、これらに限定されるものではない。

【0038】

本発明の一具体例によれば、リシンを回収するステップは、培養培地を低速で遠心分離することによりバイオマスを除去し、得られた上清をイオン交換クロマトグラフィーにより分離するものであってもよい。

【0039】

本発明の一具体例によれば、前記L-リシンを回収するステップは、L-リシンを精製する工程を含んでもよい。

【発明の効果】

【0040】

本発明によるコリネバクテリウム・グルタミカム変異株は、トランスケトラゼをコー

10

20

30

40

50

ドする遺伝子の発現を増加又は強化することにより、親株に比べてＬーリシンの生産収率を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【００４１】

【図１】本発明の一実施例によりトランスケトラゼプロモーターの－８３～－７４領域の塩基配列が $t g t g c t g t c a$ に置換された変異を含む $p C G I (P t k t 83-1)$ ベクターの構造を示す図である。

【図２】トランスケトラゼプロモーターの－８３～－７４領域の塩基配列が $t g t g g t a t c a$ に置換された変異を含む $p C G I (P t k t 83-7)$ ベクターの構造を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

以下、本発明をより詳細に説明する。しかし、これらの説明は本発明の理解を助けるために例示するものにすぎず、本発明がこれらに限定されるものではない。

【実施例１】コリネバクテリウム・グルタミカム変異株の作製

トランスケトラゼの活性が強化されたコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を作製するために、コリネバクテリウム・グルタミカム $D S 1$ 菌株を用いてランダム突然変異を誘発した。

【００４３】

１－１．突然変異の誘発

コリネバクテリウム・グルタミカム $D S 1$ 菌株を $C M$ 液体培地（グルコース $5 g$ 、 $N a C l 2.5 g$ 、酵母抽出物 $5.0 g$ 、ウレア（ $u r e a$ ） $1.0 g$ 、ポリペプトン $10.0 g$ 及びビーフ（ $b e e f$ ）抽出物 $5.0 g$ 含有、 $p H 6.8$ ） $50 m l$ の入ったフラスコに接種し、突然変異誘発物質である N －メチル－ N' －ニトロ－ N －ニトロソグアニジン（ $N-m e t h y l -N'-n i t r o-N-n i t r o s o g u a n i d i n e$ ， $N T G$ ）を最終濃度 $300 \mu g / m l$ になるように添加し、その後 $30^{\circ} C$ 、 $200 r p m$ で 20 時間振盪培養した。培養終了後に、培養液を $12,000 r p m$ で 10 分間遠心分離して上清を除去し、生理食塩水（ $s a l i n e$ ）で 1 回洗浄し、リン酸緩衝液（ $p h o s p h a t e b u f f e r$ ）でさらに 3 回洗浄した。それをリン酸緩衝液 $5 m l$ に懸濁し、その後種培養固体培地（ $C M$ 液体培地に寒天 $15 g / l$ 及びリシン 8% をさらに加えたもの）に塗抹し、 $30^{\circ} C$ で 30 時間培養してコロニー（ $c o l o n y$ ） 100 個を分離した。

【００４４】

１－２．Ｌーリシン生産能が向上した変異株の選択及び変異ライブラリーの作製

分離したコロニー 100 個を表 1 のリシン生産液体培地 $10 m l$ の入ったフラスコにそれぞれ 5% ずつ接種し、 $30^{\circ} C$ 、 $200 r p m$ で 30 時間振盪培養した。各培養液において $O D 610 n m$ で吸光度を測定して菌体生育の程度を確認し、 $H P L C$ （ $S h i m a z u$ ，日本）によりＬーリシンの生産量を測定した。このようにＬーリシン生産量を比較してＬーリシンを $67.0 g / l$ 以上生産するコロニーを選択し、そのリシン関連主要遺伝子及びプロモーター領域の塩基配列分析を行い、 $t k t$ 遺伝子プロモーターの変異を有する菌株を確認した。

【００４５】

10

20

30

40

50

【表 1】

組成	含有量 (1 L 中)
グルコース	100g
硫酸アンモニウム	55g
KH_2PO_4	1.1g
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.2g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	180mg
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	180mg
チアミン・HCl	9mg
ビオチン	1.8mg
CaCO_3	5%
pH	7.0

10

【実施例 2】 t k t プロモーターの改良

2-1. プロモーターの改良：変異の導入

実施例 1 で選択した t k t プロモーター上の位置を含む最大 15 個の塩基配列の変形を有する 30 個の候補配列を非特許文献 2 の方法で合成し、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 の t k t プロモーター配列（配列番号 1 参照）と合成された t k t プロモーター領域をそれぞれ C A T (c h l o r a m p h e n i c o l a c e t y l t r a n s f e r a s e) レポーターベクター p S K 1 - C A T ベクター内にクローニングした。DNA クローニング時のオリエンテーション (o r i e n t a t i o n) と変異発生の有無は、DNA シーケンシングにより確認した。このように作製した変異ライブラリーを p S K 1 - t k t 1 ~ p S K 1 - t k t 3 0 と命名した。最終的にコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 に形質転換し、プロモーター活性を比較、検討した。

20

【0046】

2-2. コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 への p S K 1 - C A T 構造体の形質導入

30

シーケンス分析により確認した各 p S K - t k t クローンを前述したように作製し、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 に形質転換 (t r a n s f o r m a t i o n) するために、水溶性細胞を作製した。100ml の B H I S 培地に 10ml の培養したコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 を接種して 30℃ で一晩培養し、その後再び 100ml の CM 液体培地に O D 600 が 0.3 になるように接種し、18℃、120rpm で O D 600 が 0.8 になるまで約 28 時間培養した。培養液を 4℃、6000rpm で 10 分間遠心分離して細胞を回収し、20ml の 10% グリセリン溶液に懸濁して遠心分離する過程を 3 回繰り返した。回収した細胞を再び 10% グリセリン溶液に懸濁して 100μl ずつ E チューブに分注し、-70℃ d e e p f r e e z e r に用いるまで保管した。コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 水溶性細胞 100μl に DNA 1μg を添加し、冷却したエレクトロポレーションキュベット (e l e c t r o p o r a t i o n c u v e t t e) に添加し、Bio-Rad 社のマイクロパルサー (M i c r o P u l s e r) を用いてエレクトロポレーションを行った。パルス (P u l s e) 直後に、46℃で予熱 (p r e - w a r m i n g) した CM 液体培地 1ml を添加して細胞を回収し、氷 (i c e) 上で 2 分間反応させ、その後 30℃ のインキュベータにて 180rpm で培養した。また、カナマイシン (50μg / ml) を添加した B H I S アガープレート (a g a r p l a t e) に 100μl 塗抹し、その後 30℃ の培養器で培養した。

40

【0047】

2-3. C A T 分析

50

t k tプロモーター領域変異体のCAT分析 (chloramphenicol acetyltransferase assay) は、Shaw方法 (非特許文献3) で測定して行った。簡単に要約すると、形質転換されたコリネバクテリウム・グルタミカム菌株をカナマイシン (kanamycin) (50 μg/ml) 添加CM液体培地で培養し、その後細胞を回収してタンパク質ライセート (protein lysate) を確保した。各protein 5 μgに0.1M Tris-HCl buffer (pH7.8)、0.4mg/mlの5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; Sigma D8130)、0.1mM Acetyl CoA (Sigma A2056) 及び0.1mM chloramphenicolを添加してRTで15分間反応させ、その後OD 412 nmで吸光度を測定した。このように、CAT活性が野生型t k tプロモーター配列と比較して向上したP t k t 83-1及びP t k t 83-7を選択した。

10

【0048】

P t k t 83-1及びP t k t 83-7は、トランスケトラゼをコードするt k t遺伝子のプロモーター配列において-83~-74領域の塩基配列がそれぞれt g t g c t g t c a、t g t g g t a t c aに置換されていた。以下、コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株を用いて、t k t遺伝子のプロモーター変異によるL-リシン生産性向上を検証するための実験を行った。

【0049】

【実施例3】コリネバクテリウム・グルタミカムDS1のプロモーター変異株の作製
トランスケトラゼの活性が強化されたコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を作製するために、コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株及びE. coli DH5a (HIT Competent cells (商標), Cat No. RH618) を用いた。

20

【0050】

前記コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株は、蒸留水1Lにグルコース5g、NaCl 2.5g、酵母抽出物5.0g、ウレア (urea) 1.0g、ポリペプトン10.0g及びビーフ (beef) 抽出物5.0gの組成のCM-broth培地 (pH6.8) において温度30℃で培養した。

【0051】

前記E. coli DH5aは、蒸留水1Lにトリプトン10.0g、NaCl 10.0g及び酵母抽出物5.0gの組成のLB培地において温度37℃で培養した。

30

カナマイシン (kanamycin) 及びストレプトマイシン (streptomycin) は、シグマ (Sigma) 社の製品を用いた。DNAシーケンシング分析は、マクロジェン (株) に依頼して分析した。

【0052】

3-1. 組換えベクターの作製

菌株の五炭糖代謝に関与するトランスケトラゼの活性を強化してリシン生産性を向上させるために、トランスケトラゼの強化を導入した。本実施例において用いた方法は、トランスケトラゼをコードするt k t遺伝子の発現を増加させるために、t k t遺伝子のプロモーターに特異的な変異を誘発するものであった。t k t遺伝子のプロモーターの-83~-74領域の塩基配列をc c a a t t a a c cからt g t g c t g t c aに置換するために変異配列を含むプライマーを作製し、実施例1で選択したコリネバクテリウム・グルタミカムDS1変異株のゲノムにおけるt k t遺伝子プロモーターの変異部分を中心として左アーム696bp領域と右アーム697bp領域をPCRで増幅し、オーバーラップPCR (overlap PCR) 方法で連結し、その後組換えベクターであるpCGI (非特許文献4参照) にクローニングした。前記プラスミドをpCGI (P t k t 83-1) と命名した (図1参照)。前記プラスミドを作製するために、各遺伝子断片の増幅に表2のプライマーを用いた。

40

【0053】

50

【表 2】

プライマー (primer) (5' - 3')		配列番号
Ptk1-1F	ggaattccctgggcttcgttagcgc	4
Ptk183-1-F2	cctttgccaatttgaatgtgtgtcataagtcgtagatctg	5
Ptk183-1-R1	cagatctacgacttatgacagcacattcaaatttgcaaagg	6
Ptk1-R2	gggatccctcacgacgagcagccatgg	7

以下、詳細に説明する。コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株の genomic DNAから、当該プライマーを用いて、次の条件下にてPCRを行った。Thermocycler (TP600, TAKARA BIO Inc., 日本) を用いて、各デオキシヌクレオシド三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 μM を添加した反応液に、オリゴヌクレオチド 1 pM、コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株の染色体DNA 10 ng を鋳型 (template) とし、pfu-X DNAポリメラーゼ混合物 (Solgent, 韓国) 1 ユニットの存在下で25~30サイクル (cycle) 行った。PCR条件は、(i) 変性 (denaturation) ステップ: 94℃で30秒間、(ii) アニーリング (annealing) ステップ: 58℃で30秒間、及び (iii) 伸長 (extension) ステップ: 72℃で1~2分間 (1 kb 当たり2分間の重合時間を付与する) とした。

【0054】

このように作製した遺伝子断片をBamHI、EcoRI制限酵素とDNA Ligation kit Ver2.1 (Takara, 日本) によりpCGIベクターにクローニングした。前記ベクターを大腸菌 (E. coli) DH5aに形質転換し、50 μg / ml のカナマイシンを含有するLB寒天プレート上に塗抹し、37℃で24時間培養した。最終的に形成されたコロニーを分離してインサート (insert) が正確にベクターに存在するか否かを確認し、その後そのベクターを分離してコリネバクテリウム・グルタミカム菌株の組換えに用いた。

【0055】

3-2. 変異株の作製

前記pCGI (Ptk183-1) ベクターを用いて、変異菌株であるDS1-Ptk183-1菌株を作製した。前記ベクターの最終濃度が1 μg / μl 以上になるように準備し、コリネバクテリウム・グルタミカムDS1菌株にエレクトロポレーション (非特許文献5参照) により1次組換えを誘導した。ここで、カナマイシンを20 μg / μl 含有するCM寒天プレートにエレクトロポレーションした菌株を塗抹してコロニーを分離し、その後ゲノムにおける誘導位置に好適に挿入されたか否かをPCR及び塩基配列分析により確認した。このように分離した菌株にさらに2次組換えを誘導するために、ストレプトマイシンを含有するCM寒天液体培地に接種して一晩以上培養し、同一濃度のストレプトマイシンを含有する寒天培地に塗抹してコロニーを分離した。最終的に分離したコロニーにおけるカナマイシンに対する耐性の有無を確認し、その後抗生剤に対して耐性のない菌株のうちtkt遺伝子に変異が導入されたか否かを塩基配列分析により確認した (非特許文献6参照)。最終的に、変異tkt遺伝子を導入したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株 (DS1-Ptk183-10) を得た。

【0056】

【実施例4】コリネバクテリウム・グルタミカム変異株の作製

tkt遺伝子のプロモーターの-83~-74領域の塩基配列をccaattaacからtgtaggtatcaに置換したことを除いて、実施例3と同様にコリネバクテリウム・グルタミカム変異株を作製した。

【0057】

ここで、プラスミドを作製するために、各遺伝子断片の増幅に表3のプライマーを用い、作製したプラスミドpCGI (Ptk183-7) ベクターを用いて変異菌株であるD

S 1 - P t k t 8 3 - 7 菌株を作製した。最終的に、変異 t k t 遺伝子を導入したコリネバクテリウム・グルタミカム変異株 (D S 1 - P t k t 8 3 - 7) を得た。

【 0 0 5 8 】

【表 3】

プライマー (primer) (5' - 3')		配列番号
Ptkt-1F	ggaattccctgggcttcgttagcgc	4
Ptkt83-7-F2	cctttgccaaatttgaatgtggtatcataagtcgtagatctg	8
Ptkt83-7-R1	cagatctacgacttatgataccacattcaaatttggcaaagg	9
Ptkt-R2	gggatccctcagcagcagcagccatgg	7

10

比較例 1 . コリネバクテリウム・グルタミカム変異株

特許文献 4 に開示されている、野生型コリネバクテリウム・グルタミカム菌株の t k t 遺伝子プロモーター配列において - 2 1 7 ~ - 2 0 6 領域に A T T G A T C A C A C C から C C C T G A C T A C A A A への変異が誘発された変異株 (P t k t 2 1 7) を用いた。

【 0 0 5 9 】

実験例 1 . 変異株の L - リシン生産性の比較

親株であるコリネバクテリウム・グルタミカム D S 1 菌株、実施例 3 及び 4 で作製したリシン生産変異株である D S 1 - P t k t 8 3 - 1 及び D S 1 - P t k t 8 3 - 7 菌株、及び比較例 1 の従来のリシン生産変異株である P t k t 2 1 7 菌株の L - リシン生産性を実施例 1 - 2 と同様に比較した。その結果を表 4 に示す。

20

【 0 0 6 0 】

【表 4】

菌株	L - リシン (g / L)
親株 (DS1)	64. 2
変異株 (Ptkt217)	69. 9
変異株 (DS1-Ptkt83-1)	73. 0
変異株 (DS1-Ptkt83-7)	75. 1

30

表 4 に示すように、コリネバクテリウム・グルタミカム変異株である D S 1 - P t k t 8 3 - 1 及び D S 1 - P t k t 8 3 - 7 菌株は、リシン生合成経路の強化のために t k t 遺伝子のプロモーター配列の特定位置 (- 8 3 ~ - 7 4 領域) が最適の塩基配列に置換されることにより、親株であるコリネバクテリウム・グルタミカム D S 1 菌株に比べて L - リシンの生産性がそれぞれ約 1 4 %、1 7 % ずつ向上することが確認された。

【 0 0 6 1 】

また、コリネバクテリウム・グルタミカム変異株である D S 1 - P t k t 8 3 - 1 及び D S 1 - P t k t 8 3 - 7 菌株は、変異位置 (- 2 1 7 ~ - 2 0 6 領域) 及び配列 (C C C T G A C T A C A A A) が異なる従来の変異株である P t k t 2 1 7 に比べて L - リシンの生産性がそれぞれ約 4 %、7 % ずつ向上することが確認された。

40

【 0 0 6 2 】

これらの結果から、プロモーターの - 8 3 ~ - 7 4 領域の変異がもたらす t k t 遺伝子の発現強化は、リシン生合成能を強化することにより、菌株の L - リシン生産能を向上させることが分かる。

【 0 0 6 3 】

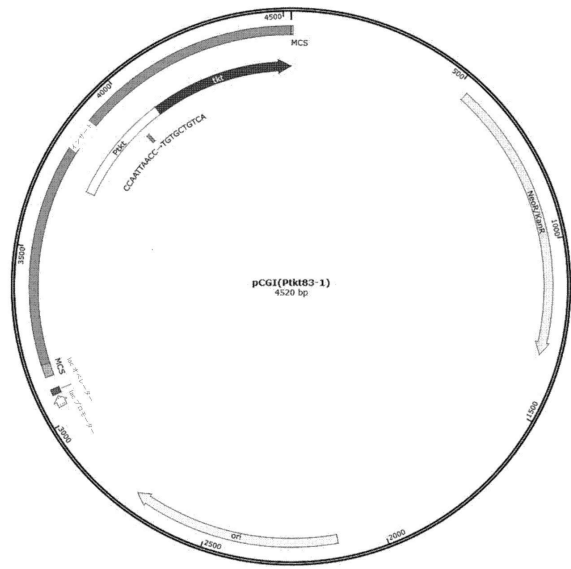
以上、本発明の好ましい実施例を挙げて説明した。本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、本発明がその本質的な特性から逸脱しない範囲で変形が可能であることを理解するであろう。よって、開示された実施例は本発明を説明するものであり、本発明を限定するものではない。本発明の範囲は、これらの説明ではなく、請求の

50

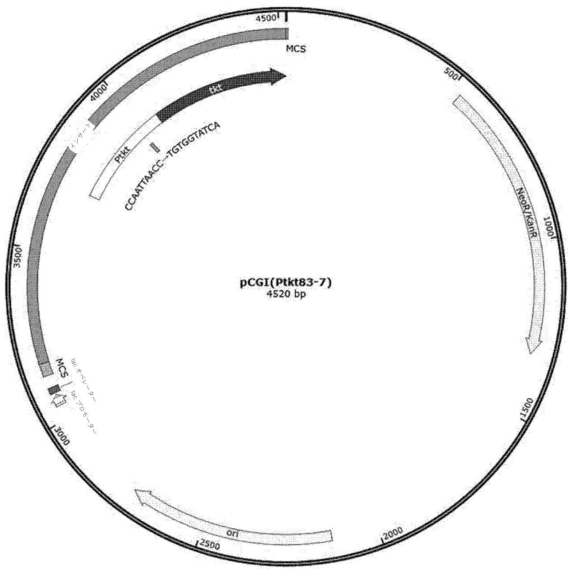
範囲により規定されるものであり、その均等な範囲内にあるあらゆる相違点は本発明に含まれるものと解釈されるべきである。

【図面】

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0007620123000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/77 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/77

Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

チョン－シ マジャン－ミョン チュンブ－デロ 6 9 7

(72)発明者

イ、ソン ヒ

大韓民国 1 6 9 2 3 キョンギード ヨンイン－シ スジ－グ ジンサン－ロ 9 0 5 1 1－4 0 3

(72)発明者

キム、ハ ウン

大韓民国 4 4 9 3 2 ウルサン ウルチュ－グン ポムソー－ウップ チャンゴム－ギル 8 8 1 0 7
－2 5 0 2

(72)発明者

パク、ソク ヒョン

大韓民国 1 2 2 5 8 キョンギード ナミヤンジュ－シ キョンチュン－ロ 4 6 8－4 0 1 0 8
－9 0 4

(72)発明者

パク、ジュン ヒョン

大韓民国 1 3 5 2 3 キョンギード ソンナム－シ プンダン－グ タンチョン－ロ 9 5 4 0 8－
6 0 4

審査官 山内 達人

(56)参考文献

韓国公開特許第10－2015－0001341 (KR, A)

特表2015－500660 (JP, A)

特表2015－504688 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 1 2 P

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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

S w i s s P r o t / G e n e S e q