



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 801 T2** 2006.10.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 796 912 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 801.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP95/02481**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 938 648.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/017930**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.12.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.06.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.09.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **22.02.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.10.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/60** (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

30638694 09.12.1994 JP

(73) Patentinhaber:

Ajinomoto Co., Inc., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, DK, ES, FR, GB, IT, NL

(72) Erfinder:

**KIKUCHI, Inc., YoshimiAjinomoto Co.,
Kawasaki-kuKawasaki-shiKanagawa 210, JP;
SUZUKI, Inc., TomokoAjinomoto Co.,
Kawasaki-kuKawasaki-shiKanagawa 210, JP;
KOJIMA, Inc., HiroyukiAjinomoto Co.,
Kawasaki-kuKawasaki-shiKanagawa 210, JP**

(54) Bezeichnung: **NEUES LYSIN DECARBOXYLASEGEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-LYSIN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Lysin-Decarboxylasegen von *Escherichia coli*, das für die Zersetzung von L-Lysin zuständig ist, einen Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* mit beschränkter Expression des Gens und/oder eines anderen Lysin-Decarboxylasegens, das als *cadA*-Gen bekannt ist und ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin unter Verwendung dieses Mikroorganismus. In jüngerer Zeit hat sich die Nachfrage nach L-Lysin als Futterzusatz lebhaft erhöht.

Technischer Hintergrund

[0002] Lysin-Decarboxylase, welches die Reaktion zur Bildung von Cadaverin durch Decarboxylierung von L-Lysin katalysiert, ist als L-Lysin-abbauendes Enzym von *Escherichia coli* bekannt. Über die Nukleotidsequenz dieses als *cadA* bezeichneten Gens und die durch das Gen kodierte Aminosäuresequenz wurde bereits berichtet (Meng, S. und Bennett, G. N., *J. Bacteriol.*, 174, 2659 (1992)). Es gibt zwei Berichte über Lysin-Decarboxylase, für die ein anderes Gen als *cadA* von *Escherichia coli* kodiert, welche beschreiben, dass schwache Aktivität in einem Mutantenstamm von *Escherichia coli* festgestellt wurde (Goldemberg, S. H., *J. Bacteriol.*, 141, 1428 (1980); Wertheimer, S. J. und Leifer, Z., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114, 882 (1983)). Von S. H. Goldemberg wurde jedoch über diese Aktivität berichtet, dass die Aktivität des Enzyms nach einer 4-minütigen Wärmebehandlung bei 60°C um etwa 30% abnahm, während von S. J. Wertheimer berichtet wurde, dass keine solche Erscheinung beobachtet wurde. Das Vorliegen der zweiten Lysin-Decarboxylase ist daher ungewiss.

[0003] Andererseits wird L-Lysin mit Hilfe von bekannten Verfahren unter Verwendung von *Escherichia coli* hergestellt, die ein Verfahren einschließen, bei dem ein gegenüber einem Lysin-Analogon resistenter Mutantenstamm oder ein rekombinanter Stamm, der einen Vektor mit einer eingefügten Desoxyribonukleinsäure einschließt, welche die genetische Information für die L-Lysin-Biosynthese trägt, kultiviert wird (Japanische offene Patentanmeldung Nr. 56-18596). Es gibt jedoch keinerlei Bericht über die Produktion von L-Lysin unter Verwendung eines Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* mit einer eingeschränkten Expression des Lysin-Decarboxylasegens.

[0004] B. Lereverend et al., *Proc. Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms*, 4 Meet., 1982, S. 113 offenbaren eine *Escherichia coli*-Mutante mit Lysin-Überproduktion, die eine *cadA*-Mutation trägt, welche die Aktivität der Lysin-Decarboxylase beeinflusst und somit den Lysin-Katabolismus vermindert.

[0005] K. Igarashi et. al., *J. Bacteriol.*, Band 166, Nr. 1, 1986, S. 128-124 beschreiben das Vorhandensein von zwei Arten der Lysin-Decarboxylaseaktivität in *E. coli*. Eine ist die normale induzierbare Lysin-Decarboxylase und eine weitere ist Ornithin-Decarboxylase, die durch das *speC*-Gen kodiert wird.

Offenbarung der Erfindung

[0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein neues Lysin-Decarboxylasegen von *Escherichia coli* zu erhalten, einen L-Lysin produzierenden Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* zu erzeugen, der eingeschränkter Expression des Gens und/oder des *cadA*-Gens aufweist und ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin durch Kultivieren des Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* bereitzustellen.

[0007] Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die beigefügten Patentansprüche gelöst.

[0008] Als die Erfinder einen Stamm von *Escherichia coli* erzeugten, in welchem das *cadA*-Gen als bekanntes Lysin-Decarboxylasegen zerstört war, wurde festgestellt, dass Cadaverin als Abbauprodukt von L-Lysin durch Lysin-Decarboxylase in diesem Mikrobenstamm immer noch produziert wurde. Die Erfinder haben daher angenommen, dass in *Escherichia coli* ein neues Lysin-Decarboxylasegen vorhanden sein würde und dass dieses die fermentative Herstellung von L-Lysin unter Verwendung eines Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* stark beeinflussen würde. Als Ergebnis von Versuchen, das Gen zu klonieren, haben die Erfinder erfolgreich ein neues Lysin-Decarboxylasegen erhalten, das sich von dem *cadA*-Gen unterscheidet. Es wurde außerdem gefunden, dass die Aktivität zum Abbau von L-Lysin merklich vermindert oder verschwunden war und dass die Produktivität für L-Lysin wesentlich verbessert wurde, indem die Expression dieses Gens und die Expression des *cadA*-Gens in einem L-Lysin bildenden Mikroorganismus von *Escherichia coli* beschränkt wurde. Somit wurde die Erfindung fertig gestellt.

[0009] Die Erfindung stellt ein neues Gen aus *Escherichia coli*, welches für Lysindecaboxylase kodiert, bereit. Dieses Gen wurde als "Idc"-Gen bezeichnet.

[0010] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Mikroorganismus, welcher der Gattung *Escherichia* angehört, bereit, der Produktivität für L-Lysin hat und in den Zellen verminderte oder beseitigte Lysindecaboxylaseaktivität aufweist.

[0011] Gemäß einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin bereitgestellt, welches als Stufen das Züchten des vorstehend beschriebenen Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* in einem flüssigen Medium, um L-Lysin zu produzieren und in der Kulturflüssigkeit anzureichern, und Gewinnen dieses umfasst.

[0012] Der vorstehend beschriebene Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* umfasst einen Mikroorganismus, in welchem die Lysindecaboxylaseaktivität in den Zellen verringert oder beseitigt ist, indem die Expression des Idc-Gens und/oder des cadA-Gens eingeschränkt ist.

[0013] Die vorliegende Erfindung wird nachstehend ausführlich beschrieben.

<1> Herstellung eines DNA-Fragments, welches das neue Lysindecaboxylasegen enthält

[0014] Ein DNA-Fragment, welches das neue Lysindecaboxylasegen (Idc) gemäß der Erfindung enthält, kann wie folgt aus einem zugänglichen Stamm von *Escherichia coli*, beispielsweise dem Stamm K-12 oder einem davon abgeleiteten Stamm, erhalten werden.

[0015] Zuerst wird das cadA-Gen, welches das Gen der bekannten Lysindecaboxylase ist, unter Verwendung einer Methode der Polymerasekettenreaktion (nachstehend als "PCR-Methode" bezeichnet) aus der chromosomalen DNA des Stammes W3110 erhalten, der von *Escherichia coli* K-12 abgeleitet ist. Die Nukleotidsequenz des cadA-Gens und die durch dieses kodierte Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO:5 und 6 gezeigt. DNA-Fragmente mit Sequenzen ähnlich dem cadA-Gen werden aus einer chromosomalen DNA-Bibliothek von *Escherichia coli* W3110 gemäß einer Methode unter Verwendung eines Plasmidvektors oder eines Phagenvektors kloniert, um zu bestätigen, ob das neue Lysindecaboxylasegen in den DNA-Fragmenten enthalten ist. Die Bestätigung der Tatsache, dass das betreffende Gen enthalten ist, kann mit Hilfe einer Southern-Hybridisierungsmethode erhalten werden, wobei eine durch die PCR-Methode hergestellte Sonde verwendet wird.

[0016] Die Nukleotidsequenz des in dem so erhaltenen DNA-Fragment enthaltenen Gens wird wie folgt bestimmt. Zuerst wird das DNA-Fragment mit einem Plasmidvektor ligiert, der in Zellen von *Escherichia coli* autonom replizierbar ist, um eine rekombinante DNA herzustellen, welche in kompetente Zellen von *Escherichia coli* eingeschleust wird. Der erhaltene Transformant wird in einem flüssigen Medium kultiviert und die rekombinante DNA wird aus den vermehrten Zellen gewonnen. Eine ganze Nukleotidsequenz des in der gewonnenen rekombinanten DNA enthaltenen DNA-Fragments wird mit Hilfe der Dideoxy-Methode bestimmt (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977)). Die Struktur der DNA wird analysiert, um vorhandene Positionen des Promotors, Operators, SD-Sequenz, Startkodon, Terminationskodon, offenen Leseraster und so weiter zu bestimmen.

[0017] Das neue Lysindecaboxylasegen gemäß der Erfindung hat eine Sequenz von dem 1005-1007. ATG bis 3141-3143. GGA der gesamten Nukleotidsequenz des DNA-Fragments, das in SEQ ID NO:3 in der Sequenzliste gezeigt ist. Dieses Gen kodiert für Lysindecaboxylase mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO:4 in der Sequenzliste gezeigt ist. Es wurde gefunden, dass die Homologie zwischen der neuen Lysindecaboxylase und der durch das cadA-Gen kodierten Lysindecaboxylase 69,4% ist.

[0018] Das erfindungsgemäße Gen kann ein solches sein, das für Lysindecaboxylase mit der Aminosäuresequenz kodiert, die in SEQ ID NO:4 in Sequenzliste gezeigt ist, deren Nukleotidsequenz nicht auf die oben beschriebene Nukleotidsequenz beschränkt ist. Die durch das erfindungsgemäße Gen kodierte Lysindecaboxylase kann eine Substitution, Deletion oder Insertion von drei oder weniger Aminosäureresten in der vorstehend beschriebenen Aminosäuresequenz haben, ohne dass eine wesentliche Beeinträchtigung der Lysindecaboxylaseaktivität auftritt. Gene, welche für Lysindecaboxylase kodieren, die eine solche Deletion, Insertion oder Substitution hat, können aus Varianten, spontanen Mutantenstämmen oder künstlichen Mutantenstämmen von *Escherichia coli* oder von anderen Mikroorganismen der Gattung *Escherichia* erhalten werden, die nicht *Escherichia coli* sind. Die Mutantengene, welche für Lysindecaboxylase kodieren, die Deletionen, Inser-

tionen oder Substitutionen hat, können auch dadurch erhalten werden, dass eine in vitro-Mutationsbehandlung oder eine ortsgerichtete Mutagenesebehandlung für das Gen, welches für Lysindecaboxylase mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert, durchgeführt wird. Diese Mutationsbehandlungen können mit Hilfe von Methoden durchgeführt werden, die dem Fachmann des beschriebenen Gebiets gut bekannt sind.

[0019] Das Gen, welches für Lysindecaboxylase mit einer Substitution, Deletion oder Insertion von drei oder weniger Aminosäureresten kodiert, umfasst solche, die sich von dem "Idc-Gen" ableiten und die als im Wesentlichen das Gleiche wie das Idc-Gen betrachtet werden können. Es ist nicht beabsichtigt, die Bedeutung dieser Gene mit unterschiedlichen Ursprüngen auszudehnen.

[0020] Es ist für den Fachmann leicht ersichtlich, dass beispielsweise das cadA-Gen, welches für das Protein kodiert, das sich in nicht weniger als 200 Aminosäureresten von dem unterscheidet, das die in SEQ ID NO:4 gezeigte Aminosäuresequenz hat, verschieden von dem erfindungsgemäßen Gen ist und dass die Gene, die für Proteine mit gleichwertiger Lysindecaboxylaseaktivität kodieren, von der vorliegenden Erfindung umfasst werden, selbst wenn sie im Hinblick auf zwei oder drei Aminosäureresten verschieden von dem sind, das die Aminosäuresequenz hat, die in SEQ ID NO:4 gezeigt ist.

<2> Erzeugen eines Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit eingeschränkter Expression des Lysindecaboxylasegens

[0021] Der Mikroorganismus der Gattung Escherichia gemäß der Erfindung ist ein Mikroorganismus, welcher der Gattung Escherichia angehört, in welchem die Lysindecaboxylaseaktivität in den Zellen verringert oder beseitigt ist. Zu den Mikroorganismen der Gattung Escherichia gehört Escherichia coli. Die Lysindecaboxylaseaktivität in den Zellen wird beispielsweise dadurch verringert oder beseitigt, dass die Expression eines oder beider des neuen Lysindecaboxylasegens (Idc) und des bekannten cadA-Gens, das vorher beschrieben wurde, beschränkt wird. Alternativ kann die Lysindecaboxylaseaktivität in den Zellen auch dadurch verringert oder beseitigt werden, dass die spezifischen Aktivitäten der durch diese Gene kodierten Lysindecaboxylaseenzyme vermindert oder beseitigt werden, indem die Struktur der Enzyme modifiziert wird.

[0022] Zu den Mitteln zum Beschränken der Expression des Idc-Gens und des bekannten cadA-Gens gehört beispielsweise eine Methode zum Beschränken der Expression der Gene auf der Transkriptions-Stufe, indem die Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in den Promotorsequenzen dieser Gene verursacht wird und die Promotoraktivitäten vermindert werden (M. Rosenberg und D. Court, Ann. Rev. Genetics 13 (1979) S. 319, und P. Youderian, S. Bouvier und M. Susskind, Cell 30 (1982) S. 843-853). Alternativ kann die Expression dieser Gene in der Translations-Stufe beschränkt werden, indem man die Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in den Bereich zwischen einer SD-Sequenz und einem Startkodon bewirkt (J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert und F. W. Studier, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75 (1978) S. 2743). Um außerdem die spezifische Aktivität des Lysindecaboxylaseenzym zu verringern oder zu beseitigen existiert eine Methode, in der der kodierende Bereich des Lysindecaboxylasegens modifiziert oder zerstört wird, indem die Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in der Nukleotidsequenz in dem kodierenden Bereich modifiziert oder zerstört wird.

[0023] Das Gen, in dem Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion verursacht wird, kann ein Idc-Gen oder cadA-Gen sein, das Substitution, Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Aminosäurereste besitzt, welche die wesentliche Aktivität der kodierten Lysindecaboxylase nicht beeinträchtigt, zusätzlich zu dem Idc-Gen oder dem cadA-Gen.

[0024] Das Verfahren zum Verursachen der Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion in dem Gen umfasst speziell eine ortsgerichtete Mutagenesemethode (Kramer, W. und Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)), und eine Behandlung mit Hilfe eines chemischen Mittels, wie Natriumhyposulfit und Hydroxylamin (Shortle, D. und Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 270 (1978)).

[0025] Die Methode der ortsgerichteten Mutagenese ist eine Methode, bei der ein synthetisches Oligonukleotid verwendet wird, die eine Technik darstellt, welche die Einführung einer beliebigen Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion in ein beliebiges und limitiertes Nukleotidpaar ermöglicht. Zur Anwendung dieser Methode wird zuerst ein Einzelstrang durch Denaturieren eines Plasmids hergestellt, das das klonierte betreffende Gen mit einer bestimmten Nukleotidsequenz der DNA hat. Dann wird ein synthetisches Oligonukleotid synthetisiert, das zu dem zu mutierenden Bereich komplementär ist. Bei diesem Verfahren lässt man jedoch das synthetische Oligonukleotid nicht eine vollständig komplementäre Sequenz haben, sondern dieses

wird so ausgebildet, dass es eine optionale Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion aufweist. Danach wird die einsträngige DNA mit dem synthetischen Oligonukleotid, welches die optionale Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion hat, verbunden. Ein vollständiges doppelsträngiges Plasmid wird unter Verwendung von T4 Ligase und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I synthetisiert und in kompetente Zellen von *Escherichia coli* eingeschleust. Einige der so erhaltenen Transformanten haben ein Plasmid, welches ein Gen enthält, in welchem die optionale Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion fixiert ist. Als ähnliche Methode, die zur Einführung einer Mutation in ein Gen befähigt ist, um dieses zu modifizieren oder zu zerstören, kann eine rekombinante PCR-Methode erwähnt werden (PCR Technology, Stockton press (1989)).

[0026] Die Methode unter Verwendung des chemischen Mittels ist eine Methode, bei der eine Mutation, die Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion einschließt, regellos in ein DNA-Fragment eingeführt wird, indem das DNA-Fragment, welches das betreffende Gen enthält, direkt mit Natriumhyposulfit, Hydroxylamin oder dergleichen behandelt wird.

[0027] Die Expression des *ldc*-Gens und/oder des *cadA*-Gens in Zellen kann eingeschränkt werden, indem ein normales Gen auf dem Chromosom eines Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* durch das modifizierte oder zerstörte Gen ersetzt wird, welches durch die oben beschriebene Einführung einer Mutation erhalten wird. Die Methode zum Ersatz des Gens umschließt Methoden, welche die homologe Rekombination ausnutzen (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. und Mizushima, S., *J. Bacteriol.*, 162, 1196 (1985)). Die homologe Rekombination beruht auf einer Fähigkeit, welche Mikroorganismen der Gattung *Escherichia* im Allgemeinen besitzen. Wenn ein Plasmid oder dergleichen, das homolog mit einer Sequenz auf dem Chromosom ist, in Zellen eingeschleust wird, tritt Rekombination mit einer gewissen Häufigkeit an einer Stelle der Sequenz, welche die Homologie aufweist, ein und das gesamte eingeschleuste Plasmid wird in das Chromosom eingebaut. Wenn danach weitere Rekombination an der Stelle der Sequenz, die Homologie aufweist, auf dem Chromosom auftritt, fällt das Plasmid wieder aus dem Chromosom heraus. Während dieses Vorgangs wird jedoch das Gen mit der eingeführten Mutation gelegentlich bevorzugt auf dem Chromosom fixiert, in Abhängigkeit von der Stelle, an der die Rekombination stattfindet, und das ursprüngliche normale Gen löst sich zusammen mit dem Plasmid von dem Chromosom. Die Selektion solcher Mikrobenstämme ermöglicht es, einen Mikrobenstamm zu erhalten, in welchem das normale Gen auf dem Chromosom durch das modifizierte oder zerstörte Gen ersetzt ist, welches durch Einführung einer Mutation erhalten wurde, die Nukleotid-Substitution, -Deletion, -Insertion, -Addition oder -Inversion hat.

[0028] Der Mikroorganismus der Gattung *Escherichia*, welcher dem Genaustausch unterworfen werden soll, ist ein Mikroorganismus mit L-Lysin-Produktivität. Der Mikroorganismus der Gattung *Escherichia* mit L-Lysin-Produktivität, beispielsweise ein Mikroorganismus von *Escherichia coli* kann erhalten werden, indem ein Stamm, der keine L-Lysin-Produktivität hat, einer Mutationsbehandlung unterworfen wird, um ihm Resistenz gegen ein Lysin-Analogon, wie S-(2-Aminoethyl)-L-cystein (nachstehend als "AEC" bezeichnet) zu verleihen. Methoden der Mutationsbehandlung schließen Methoden ein, bei denen die Zellen von *Escherichia coli* einer Behandlung mit einem chemischen Mittel, wie N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin oder salpetriger Säure, oder einer Behandlung durch Bestrahlung mit Ultraviolettlicht, Strahlung oder dergleichen, unterworfen werden. Zu solchen Mikrobenstämmen gehört speziell *Escherichia coli* AJ13069 (FERM P-14690). Dieser Mikrobenstamm wurde erzeugt, indem der von *Escherichia coli* K-12 abstammende Stamm W3110 mit AEC-Resistenz ausgestattet wurde. *Escherichia coli* AJ13069 wurde bei dem National Institute of Bioscience and Human Technology der Agency of Industrial Science and Technology (Post-Code:305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibarakiken, Japan) unter der Hinterlegungsnummer FERM P-14690 am 6. Dezember 1994 hinterlegt und am 29. September 1995 in die internationale Hinterlegung nach dem Budapester Vertrag übergeführt, wobei er die Hinterlegungsnummer FERM BP-5252 erhielt.

[0029] Ein Mikrobenstamm von *Escherichia coli* mit L-Lysin-Produktivität kann auch dadurch erzeugt werden, dass man mit Hilfe der Genrekombinationstechnik DNA, welche die genetische Information für die Biosynthese von L-Lysin trägt, einführt und verstärkt. Das einzuführende Gen ist ein Gen, welches für Enzyme auf dem Biosyntheseweg von L-Lysin kodiert, wie Aspartokinase, Dihydrodipicolinat-Synthetase, Dihydrodipicolinat-Reduktase, Succinyl-diaminopimelat-Transaminase, und Succinyl-diaminopimelat-Deacylase. Im Fall eines Gens des Enzyms, welches der Rückkopplungshemmung durch L-Lysin unterliegt, wie Aspartokinase und Dihydrodipicolinat-Synthetase, ist es wünschenswert ein Gen des Mutantentyps zu verwenden, welches für ein Enzym kodiert, welches gegen eine solche Hemmung desensibilisiert ist. Um das Gen einzuführen und zu verstärken ist eine Methode zugänglich, bei der das Gen mit einem Vektor ligiert wird, der sich in Zellen von *Escherichia coli* autonom replizieren lässt, um rekombinante DNA herzustellen, mit der *Escherichia coli* transformiert wird. Alternativ kann das Gen auch mit Hilfe einer Methode unter Verwendung von Transduktion, Transposon (Berg,

D. E. und Berg, C. M., Bio/Technol., 1, 417 (1983)), Mu-Phage (Japanische Patentveröffentlichung Nr. 2-109985), oder homologer Rekombination (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) in das Chromosom eines Wirts eingefügt werden.

[0030] Andere Methoden zur Herstellung des Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit einer zerstörten Funktion des Gens umfassen eine Methode zum Erzielen einer Genmutation, bei der Zellen des Mikroorganismus der Gattung Escherichia, die das Gen enthalten, einer Behandlung mit einem chemischen Mittel, wie N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin oder salpetriger Säure oder einer Behandlung durch Bestrahlen mit Ultraviolettlicht, Strahlung oder dergleichen, unterworfen werden.

[0031] In dem nachstehend beschriebenen Beispiel wurde ein Stamm von Escherichia coli mit einer zerstörten Funktion des Lysindecaboxylasegens erzeugt, indem ein Teil seiner kodierenden Region entfernt wurde, an dessen Stelle ein Arzneimittel-Resistenzgen eingefügt wurde, um ein Lysindecaboxylasegen zu erhalten, welches verwendet wurde, um ein Lysindecaboxylasegen auf dem Chromosom von Escherichia coli gemäß der Methode der homologen Rekombination, die vorstehend beschrieben wurde, zu ersetzen.

[0032] Es ist möglich, die Expression des neuen Lysindecaboxylasegens gemäß der Erfindung oder des cadA-Gens zu beschränken oder die Expression beider Gene in einem Mikrobenstamm zu beschränken. Die Expression des Lysindecaboxylasegens kann gemäß der vorstehend beschriebenen Methode in dem Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit L-Lysin-Produktivität beschränkt werden oder L-Lysin-Produktivität kann dem Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit einer eingeschränkten Expression des Lysindecaboxylasegens verliehen werden.

<3> Herstellung von L-Lysin unter Verwendung eines Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit eingeschränkter Expression des Lysindecaboxylasegens

[0033] Eine beträchtliche Menge an L-Lysin wird in einer Kulturflüssigkeit gebildet und angereichert, wenn ein Mikroorganismus der Gattung Escherichia mit einer eingeschränkten Expression des Lysindecaboxylasegens kultiviert wird, der wie vorstehend beschrieben ist, erhalten wurde. Die angereicherte Menge an L-Lysin wird erhöht, indem nur die Expression des bekannten cadA-Gens eingeschränkt wird. Für eine Erhöhung der angereicherten Menge an L-Lysin ist es jedoch wirksamer, die Expression des erfindungsgemäßen neuen Lysindecaboxylasegens zu beschränken. Das bevorzugteste Ergebnis für die Produktion von L-Lysin wird erhalten, wenn ein Mikrobenstamm verwendet wird, in welchem die Expression sowohl des cadA-Gens, als auch des neuen Gens der vorliegenden Erfindung eingeschränkt ist.

[0034] Das für die Herstellung von L-Lysin zu verwendende Medium ist ein übliches Medium, das eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Ionen und gegebenenfalls andere organische Spurennährstoffe enthält. Es ist möglich, als Kohlenstoffquelle Zucker, wie Glucose, Lactose, Galactose, Fructose und Stärkehydrolysat, Alkohole, wie Glycerin und Sorbit und organische Säuren, wie Fumarsäure, Citronensäure und Bernsteinsäure, zu verwenden. Als Stickstoffquelle können anorganische Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid und Ammoniumphosphat, organische Stickstoffquellen, wie Sojabohnenhydrolysat, gasförmiges Ammoniak und wässriges Ammoniak verwendet werden. Als anorganische Ionen werden Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Eisenionen, Manganionen und so weiter in kleinen Mengen zugesetzt. Außerdem ist es wünschenswert, Vitamin B₁, Hefeextrakt oder dergleichen in geeigneten Mengen als organische Spurennährstoffe zuzugeben.

[0035] Die Kultivierung erfolgt vorzugsweise unter aeroben Bedingungen während etwa 16-72 Stunden. Die Kulturtemperatur wird auf 30°C bis 45°C eingestellt und der pH wird während der Kultur auf 5-7 eingestellt. Zum Einstellen des pH-Werts können anorganische oder organische, saure oder alkalische Substanzen oder gasförmiges Ammoniak oder dergleichen verwendet werden.

[0036] Nach Beendigung der Kultur kann die Gewinnung des L-Lysins aus der Kulturflüssigkeit in geeigneter Weise durch Kombinieren einer üblichen Ionenaustauschmethode, einer Fällungsmethode und andere bekannter Methoden durchgeführt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0037] [Fig. 1](#) zeigt die Struktur des Plasmids pUC6F5HH5, welches das neue Lysindecaboxylasegen enthält.

[0038] [Fig. 2](#) zeigt die Struktur eines temperaturempfindlichen Plasmids pTS6F5HH5, welches das neue Lysin-Decarboxylasegen enthält, und die Konstruktion des Plasmids pTS6F5HH5Cm, in welchem ein Teil des Gens durch ein Fragment ersetzt ist, das ein Chloramphenicol-Resistenzgen enthält.

[0039] [Fig. 3](#) zeigt einen Vergleich der Aktivitäten zur Zersetzung von L-Lysin in einem Stamm WC196, der ein normales Lysin-Decarboxylasegen enthält, und der Stämme WC196C, WC196L, und WC196LC mit zerstörten Lysin-Decarboxylasegenen.

Beste Ausführungsform der Erfindung

[0040] Die vorliegende Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf Beispiele ausführlicher erläutert.

Beispiel 1

(1) Klonieren des neuen Lysin-Decarboxylasegens

[0041] Chromosomale DNA wurde nach einer üblichen Methode aus Zellen des Stammes W3110 von *Escherichia coli* K-12 extrahiert, die von dem National Institute of Genetics (Yata 1111, Mishimashi, Shizuoka-ken, Japan) erhalten wurden. Andererseits wurden zwei synthetische DNA-Primer, wie sie in SEQ ID NO:1 und 2 in der Sequenzliste gezeigt sind, mit Hilfe einer üblichen Methode auf Basis der Nukleotidsequenz des *cadA*-Gens (siehe SEQ ID NO:5) synthetisiert, die von Meng, S. und Bennett, G. N., J. Bacteriol., 174, 2659 (1992) beschrieben ist. Diese hatten Sequenzen, die homolog mit einem Bereich stromabwärts vom 5'-Terminal und einem Teil des 3'-Terminal des *cadA*-Gens waren. Die chromosomale DNA und die DNA-Primer wurden zur Durchführung der PCR-Methode nach der Methode von Erlich et al. (PCR Technology, Stockton press (1989)) verwendet. Dabei wurde ein DNA-Fragment von 2,1 kbp erhalten, welches fast alle Teile des *cadA*-Gens enthielt. Dieses Fragment wurde mit "Random Primer Labeling Kit" (hergestellt von Takara Shuzo) und [α - 32 P]dCTP (hergestellt von Amersham Japan) markiert, um eine Sonde für die Hybridisierung herzustellen.

[0042] Dann wurde die Hybridisierung mit Hilfe einer üblichen Methode (Molecular Cloning (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) unter Verwendung der hergestellten Sonde und von *Escherichia coli*/Gene Mapping Membrane (hergestellt von Takara Shuzo) durchgeführt. Eine Bibliothek von Kohara et al. (Lambdaphagen-Bibliothek der chromosomalen DNA von *Escherichia coli*: vergleiche Kohara, Y. et al. Cell, 50, 495-508 (1987)) war an *Escherichia coli*/Gene Mapping Membrane, adsorbiert worden. Klone von Lambdaphagen mit Sequenzen ähnlich dem *cadA*-Gen wurden durch Schwächen der Bedingung zum Waschen der Sonde ($2 \times$ SSC, 55°C, 30 Minuten) selektiert, als die Hybridisierung durchgeführt war. Als Ergebnis konnten schwache Signale von drei Klonen von E2B8, 6F5H, und 10F9 zusätzlich zu starken Signalen von Klonen, welche die *cadA*-Genregion enthalten (21H11, 5G7) erhalten werden. Insertionssequenzen der drei Klone des Lambdaphagen E2B8, 6F5H, und 10F9 bleiben auf dem Chromosom von *Escherichia coli*, während sie einander überlappen. Lambdaphagen-DNA 6F5H aus der Bibliothek von Kohara et al. (Kohara, Y. et al. Cell, 50, 495-508 (1987)) wurde mit Hilfe einer üblichen Methode abgetrennt, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, um eine Southern-Hybridisierung unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Sonde durchzuführen, wie sie vorstehend beschrieben wurde. Dabei wurde gefunden, dass eine dem *cadA*-Gen ähnliche Sequenz in einem DNA-Fragment von etwa 5 kbp vorhanden war, das durch Verdauung mit HindIII erhalten wurde.

[0043] Das durch Verdauung der Lambdaphagen-DNA 6F5H mit HindIII erhaltene Fragment von etwa 5 kbp wurde unter Verwendung von T4 DNA-Ligase mit einem HindIII-Verdauungsprodukt des Plasmids pUC19 (hergestellt von Takara Shuzo) ligiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde verwendet, um *Escherichia coli* JM109 (hergestellt von Takara Shuzo) zu transformieren, wobei Ampicillinresistente Stämme erhalten wurden, die auf einem Vollmedium (das 10 g Polypepton, 5 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid in 1 l Wasser enthielt), dem 50 mg/ml Ampicillin zugesetzt waren, wuchsen. Davon wurde ein Mikrobenstamm erhalten, der ein Plasmid mit der Insertion des Fragments von etwa 5 kbp enthielt, das durch Verdauen der Lambdaphagen-DNA 6F5H mit HindIII erhalten wurde. Ein Plasmid wurde aus den Zellen extrahiert und es wurde Plasmid pUC6F5HH5 erhalten. [Fig. 1](#) zeigt die Struktur des Plasmids pUC6F5HH5.

[0044] *Escherichia coli* JM109/pUC6F5HH5, der dieses Plasmid enthielt, wurde als AJ13068 bezeichnet, unter der Hinterlegungsnummer FERM P-14689 am 6. Dezember 1994 bei dem National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology hinterlegt, am 29. September 1995 in eine internationale Hinterlegung nach dem Budapester Vertrag übergeführt, und erhielt die Hinterlegungsnummer FERM BP-5251.

(2) Bestimmung der Nukleotidsequenz des neuen Lysindecaboxylasegens

[0045] Die Nukleotidsequenz einer Region zwischen den Schnittstellen der Enzyme ClaI und HindIII des erhaltenen pUC6F5HH5 wurde mit Hilfe einer Methode bestimmt, die in Molecular Cloning (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory press (1989) beschrieben ist. Dabei wurde gefunden, dass die in SEQ ID NO:3 in der Sequenzliste gezeigte Nukleotidsequenz kodiert wurde. Diese DNA-Sequenz enthält ein offenes Leseraster, welches für die Aminosäuresequenz kodiert, die in SEQ ID NO:4 in der Sequenzliste gezeigt ist.

(3) Herstellung von Escherichia coli mit L-Lysin-Produktivität

[0046] Escherichia coli W3110 wurde 4 Stunden bei 37°C in einem Vollmedium (das 10 g Polypepton, 5 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid in 1 l Wasser enthielt) kultiviert, wobei Mikrobenzellen erhalten wurden, die 30 Minuten lang bei 37°C in einer Lösung von N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin mit einer Konzentration von 200 µg/ml einer Mutationsbehandlung unterworfen wurden, gewaschen und dann auf ein Minimalmedium aufgetragen wurden (das 7 g Dinatriumhydrogenphosphat, 3 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1 g Ammoniumchlorid, 0,5 g Natriumchlorid, 5 g Glucose, 0,25 g Magnesiumsulfat-heptahydrat, und 15 g Agar in 1 l Wasser enthielt), dem 5 g/l AEC zugesetzt waren. AEC-resistente Stämme wurden durch Abtrennung von Kolonien erhalten, die nach 48-stündigem Kultivieren bei 37°C erschienen waren. Als ein Stamm unter diesen hatte Stamm WC196 L-Lysin-Produktivität. Stamm WC196 wurde als AJ13069 bezeichnet, am 6. Dezember 1994 unter der Hinterlegungsnummer FERM P-14690 bei dem National Institute of Bioscience and Human Technology der Agency of Industrial Science and Technology hinterlegt, am 29. September 1995 in eine internationale Hinterlegung nach dem Budapester Vertrag übergeführt und erhielt die Hinterlegungsnummer FERM BP-5252.

(4) Erzeugen eines Stammes WC196 mit zerstörter Funktion des neuen Lysindecaboxylasegens

[0047] Das vorstehend beschriebene Fragment von etwa 5 kbp, das durch Verdauen der Lambdaphagen-DNA 6F5H mit HindIII erhalten wurde, wurde mit einem HindIII-Verdauungsprodukt eines temperaturempfindlichen Plasmids pMAN031 (Yasueda, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 211 (1991)) unter Verwendung von T4 DNA-Ligase ligiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde zur Transformation von Escherichia coli JM109 verwendet, wonach eine Kultivierung während 24 Stunden bei 37°C auf einem Vollmedium, dem 50 mg/l Ampicillin zugesetzt waren, durchgeführt wurde, um Ampicillin-resistente Stämme zu züchten. Dabei wurde ein Mikrobenstamm erhalten, der ein Plasmid mit der Insertion des Fragments von etwa 5 kbp enthielt, das durch Verdauen der Lambdaphagen-DNA 6F5H mit HindIII erhalten wurde. Das Plasmid wurde aus den Zellen dieses Stammes extrahiert, wobei ein Plasmid pTS6F5HH5 erhalten wurde. Das Plasmid pTS6F5HH5 wurde mit EcoRV verdaut, um ein DNA-Fragment von etwa 1 kbp zu entfernen. Dann wurde T4 Ligase verwendet, um ein Fragment mit einem Chloramphenicol-Resistenzgen von etwa 1 kbp einzuschleusen, das durch Verdauen von pHSG399 (hergestellt von Takara Shuzo) mit Accl erhalten wurde. Somit wurde ein Plasmid pTS6F5HH5Cm konstruiert. Als Ergebnis des vorstehend beschriebenen Vorgangs wurde erfolgreich die Konstruktion des Plasmids durchgeführt, das ein DNA-Fragment mit zerstörter Funktion des neuen Lysindecaboxylasegens hatte. [Fig. 2](#) zeigt die Struktur des Plasmids pTS6F5HH5 und das Plasmid pTS6F5HH5Cm.

[0048] Danach wurde ein Stamm erzeugt, in welchem das neue Lysindecaboxylasegen auf dem Chromosom des Stammes WC196 durch das DNA-Fragment mit zerstörter Funktion des neuen Lysindecaboxylasegens mit Hilfe einer allgemeinen homologen Rekombinationstechnik ersetzt wurde (Matsuyama, S. und Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) wobei die Eigenschaft der Temperaturempfindlichkeit des Plasmids pTS6F5HH5Cm ausgenutzt wurde. Dabei wurde Stamm WC196 mit dem Plasmid pTS6F5HH5Cm transformiert, wobei zuerst ein Stamm erhalten wurde, der bei 30°C resistent gegen Ampicillin und resistent gegen Chloramphenicol war. Dieser Stamm wurde dann verwendet, um einen Stamm zu erhalten, der bei 42°C resistent gegen Ampicillin und resistent gegen Chloramphenicol war. Weiterhin wurde dieser Stamm verwendet, um einen Stamm zu erhalten, der bei 30°C empfindlich gegen Ampicillin und resistent gegen Chloramphenicol war. Somit wurde der oben beschriebene Stamm erzeugt, in welchem das neue Lysindecaboxylasegen auf dem Chromosom des Stammes WC196 durch das DNA-Fragment mit zerstörter Funktion des neuen Lysindecaboxylasegens ersetzt war. Dieser Stamm wurde als Stamm WC196L bezeichnet.

(5) Erzeugen des Stammes WC196 und des Stammes WC196L mit fehlendem cadA-Gen

[0049] Escherichia coli, in welchem cadA als das bekannte Lysindecaboxylasegen zerstört ist, ist bereits bekannt, einschließlich zum Beispiel des Stammes GNB10181, der von Escherichia coli K-12 abgeleitet ist (siehe Auger, E. A. et al., Mol. Microbiol., 3, 609 (1989); dieser Mikrobenstamm ist beispielsweise von dem E. coli Genetic Stock Center (Connecticut, USA) erhältlich). Es hat sich gezeigt, dass in diesem Mikrobenstamm die

Region des *cadA*-Gens fehlt. Somit wurde die Eigenschaft der *cadA*-Gen-Defizienz des Stammes GNB10181 mit Hilfe einer allgemeinen Methode unter Verwendung des P1-Phagen (A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992)) in den Stamm WC196 transduziert, wobei der Stamm WC196C erzeugt wurde. Die Defizienz des *cadA*-Gens des Stammes WC196 wurde durch Southern-Hybridisierung bestätigt. Außerdem wurde mit Hilfe einer ähnlichen Methode wie der vorstehend beschriebenen der Stamm WC196LC mit einer Defizienz des *cadA*-Gens aus Stamm WC196L erzeugt.

Beispiel 2

(1) Bestätigung der Aktivität zum Abbau von L-Lysin der Stämme WC196, WC196C, WC196L und WC196LC

[0050] Die vier erzeugten, oben beschriebenen Stämme wurden 17 Stunden bei 37°C unter Verwendung eines Mediums für die L-Lysin-Produktion kultiviert (enthaltend 40 g Glucose, 16 g Ammoniumsulfat, 1 g Kaliumdihydrogenphosphat, 2 g Hefeextrakt, 10 mg Mangansulfat-tetra-bis-pentahydrat und 10 mg Eisensulfatheptahydrat in 1 l Wasser, der pH war mit Kaliumhydroxid auf 7,0 eingestellt, wonach 30 g gesondert sterilisiertes Calciumcarbonat zugesetzt wurden). Die gewonnenen Mikrobenzellen wurden zweimal mit einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen, in einem Medium zum Prüfen des Abbaus von L-Lysin (enthaltend 17 g Dinatriumhydrogenphosphat-dodecahydrat, 3 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Natriumchlorid und 10 g L-Lysin-hydrochlorid in 1 l Wasser) suspendiert und 31 Stunden bei 37°C kultiviert.

[0051] Die [Fig. 3](#) zeigt die Veränderung der in den Kulturflüssigkeiten verbliebenen Mengen von L-Lysin im Verlauf der Zeit. Die Menge an L-Lysin wurde unter Verwendung des Biotech Analyzers AS-210 (Produkt der Asahi Chemical Industry) quantitativ bestimmt. Im Stamm WC196 wurde ein bedeutender Abbau von L-Lysin beobachtet. Jedoch war die Abbauaktivität in WC196C mit der Defizienz des *cadA*-Gens als bekanntes Lysin-decarboxylasegen etwas vermindert. In den Stämmen WC196L und WC196LC, in denen die Funktion des neuen Lysin-decarboxylasegens zerstört war, wurde kein Abbau von L-Lysin beobachtet. Bei allen der Mikrobenstämmen verminderte sich das in der Kulturflüssigkeit verbliebene L-Lysin während einer Kultivierungsdauer bis etwa 3 Stunden. Diese Erscheinung wurde jedoch durch den Einschluss von L-Lysin in Mikrobenzellen, nicht jedoch durch Abbau verursacht.

(2) Produktion von L-Lysin durch die Stämme WC196, WC196C, WC196L und WC196LC

[0052] Die vier oben beschriebenen Stämme wurden 20 Stunden bei 37°C in dem vorstehend beschriebenen Medium für die Produktion von L-Lysin kultiviert. Die in den Kulturflüssigkeiten gebildeten und angereicherten Mengen an L-Lysin und Cadaverin wurden bestimmt. Die Menge des L-Lysins wurde unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Biotech Analyzers AS-210 quantitativ bestimmt. Die Menge an Cadaverin wurde mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie quantitativ bestimmt.

[0053] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt. Die Anreicherung von L-Lysin war erhöht und die Anreicherung von Cadaverin als Zersetzungsprodukt von L-Lysin war vermindert in dem Stamm WC196C, dessen *cadA*-Gen zerstört war, im Vergleich mit Stamm WC196, und in dem Stamm WC196L, in dem die Funktion des neuen Lysin-decarboxylasegens zerstört war, im Vergleich mit den Stämmen WC196 und WC196C. Die Anreicherung von L-Lysin war noch weiter erhöht und die Anreicherung von Cadaverin als Zersetzungsprodukt von L-Lysin wurde nicht festgestellt in dem Stamm WC196LC, in welchem die Funktion der beiden Lysin-decarboxylasegene zerstört war.

Tabelle 1

<u>Mikrobenstamm</u>	<u>Anreicherung von</u>	<u>Anreicherung von</u>
	<u>L-Lysin</u>	<u>Cadaverin</u>
	<u>(g/l)</u>	<u>(g/l)</u>
WC196	1,4	0,6
WC196C	1,9	0,4
WC196L	2,3	0,1
WC196LC	3,3	nicht festgestellt

Beispiel 3

[0054] Escherichia coli WC196LC, dessen Aktivität zur Zersetzung von L-Lysin beseitigt war, wurde mit pUC6F5HH5, welches das neue Lysindecaboxylasegen enthielt, transformiert, wobei ein Ampicillin-resistenter Stamm erhalten wurde. Der Stamm WC196LC und der Stamm WC196LC/pUC6F5HH5 wurden 16 Stunden bei 37°C in einem Medium für die L-Lysin-Produktion kultiviert, dem 5 g/l L-Lysin zugesetzt waren, und die Menge des gebildeten Cadaverins wurde bestimmt.

[0055] Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt. Der Stamm WC196LC konnte L-Lysin nicht in Cadaverin umwandeln, während WC196LC/pUC6F5HH5 die Fähigkeit zur Umwandlung von L-Lysin in Cadaverin hatte.

Tabelle 2

<u>Mikrobenstamm</u>	<u>Gebildete Menge an Cadaverin</u> <u>(g/l)</u>
WC196LC	nicht festgestellt
WC196LC/pUC6F5HH5	0,93

Industrielle Anwendbarkeit

[0056] Das erfindungsgemäße neue Lysindecaboxylasegen trägt zur Zersetzung von L-Lysin in Escherichia coli bei. L-Lysin kann preiswert und wirksam durch Kultivieren des Bakteriums der Gattung Escherichia mit L-Lysin-Produktivität hergestellt werden, das eingeschränkte Expression des oben beschriebenen Gens und/oder des cadA-Gens zeigt.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: AJINOMOTO Co., Inc.
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: NEUES LYSIN DECARBOXYLASE GEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-LYSIN
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6
- (iv) BRIEFADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Ajinomoto Co., Ltd.
 - (B) STRASSE: 15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
 - (C) ORT: Tokyo 104
 - (D) STAAT:
 - (E) LAND: Japan
 - (F) POSTLEITZAHL:
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: FastSEQ Version 1.5
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: 95 938 648.3
 - (B) ANMELDETAG: 05.12.94
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: 6-306386
 - (B) ANMELDETAG: 09.12.94
- (viii) ANGABEN ZUM VERTRETER:
 - (A) NAME: Strehl Schübel-Hopf & Partner
 - (B) VERTRETERNUMMER: 94
- (ix) TELEKOMMUNIKATION:
 - (A) TELEFON: [49] (89) 223911
 - (B) TELEFAX: [49] (89) 22 39 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:1:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einfachstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1:

TGGATAACCA CACCGCGTCT 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:2:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basen
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einfachstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2:

GGAAGGATCA TATTGGCGTT 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:3:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
 (A) LÄNGE: 3269 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: genomische DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
 (B) STAMM: W3110
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 1005..3143
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3:

```

ATCGATTCTC TGA CTGCGGT TAGCCGTCAG GATGAGAAAC TGGATATTAA CATCGATGAA      60
GAAGTGCATC GTCTGCGTGA AAAAAGCGTA GAACTGACAC GTAAAAATCTT CGCCGATCTC      120
GGTGCATGGC AGATTGCGCA ACTGGCACGC CATCCACAGC GTCCTTATAC CCTGGATTAC      180
GTTGCGCTGG CATTTGATGA ATTTGACGAA CTGGCTGGCG ACCGCGCGTA TGCAGACGAT      240
AAAGCTATCG TCGGTGGTAT CGCCCGTCTC GATGGTCGTC CGGTGATGAT CATTTGGTCAT      300
CAAAAAGGTC GTGAAACCAA AGAAAAAATT CGCCGTAAC TTGGTATGCC AGCGCCAGAA      360
GGTTACCGCA AAGCACTGCG TCTGATGCAA ATGGCTGAAC GCTTTAAGAT GCCTATCATC      420
ACCTTTATCG ACACCCCGGG GGCTTATCCT GGCGTGGGCG CAGAAGAGCG TGCTCAGTCT      480
GAAGCCATTG CACGCAACCT GCGTGAAATG TCTCGCCTCG GCGTACCGGT AGTTTGACG      540
GTTATCGGTG AAGGTGGTTC TGGCGGTGCG CTGGCGATTG GCGTGGGCGA TAAAGTGAAT      600
ATGCTGCAAT ACAGCACCTA TTCCGTTATC TCGCCGGAAG GTTGTGCGTC CATTTCTGTGG      660
AAGAGCGCCG ACAAAGCGCC GCTGGCGGCT GAAGCGATGG GTATCATTGC TCCGCGTCTG      720
AAAGAACTGA AACTGATCGA CTCCATCATC CCGGAACCAC TGGGTGGTGC TCACCGTAAC      780
CCGGAAGCGA TGGCGGCATC GTTGAAGCG CAACTGCTGG CGGATCTGGC CGATCTCGAC      840
GTGTTAAGCA CTGAAGATTT AAAAAATCGT CGTTATCAGC GCCTGATGAG CTACGGTTAC      900
GCGTAATTCG CAAAAGTTCT GAAAAAGGGT CACTTCGGTG GCCCTTTTTT ATCGCCACGG      960
TTTGAGCAGG CTATGATTAA GGAAGGATTT TCCAGGAGGA ACAC ATG AAC ATC ATT      1016
                                     Met Asn Ile Ile
                                     1
GCC ATT ATG GGA CCG CAT GGC GTC TTT TAT AAA GAT GAG CCC ATC AAA      1064
Ala Ile Met Gly Pro His Gly Val Phe Tyr Lys Asp Glu Pro Ile Lys
   5                10                15                20
GAA CTG GAG TCG GCG CTG GTG GCG CAA GGC TTT CAG ATT ATC TGG CCA      1112
Glu Leu Glu Ser Ala Leu Val Ala Gln Gly Phe Gln Ile Ile Trp Pro
                25                30                35
CAA AAC AGC GTT GAT TTG CTG AAA TTT ATC GAG CAT AAC CCT CGA ATT      1160
Gln Asn Ser Val Asp Leu Leu Lys Phe Ile Glu His Asn Pro Arg Ile
                40                45                50
TGC GGC GTG ATT TTT GAC TGG GAT GAG TAC AGT CTC GAT TTA TGT AGC      1208
Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Glu Tyr Ser Leu Asp Leu Cys Ser
                55                60                65
GAT ATC AAT CAG CTT AAT GAA TAT CTC CCG CTT TAT GCC TTC ATC AAC      1256
Asp Ile Asn Gln Leu Asn Glu Tyr Leu Pro Leu Tyr Ala Phe Ile Asn
                70                75                80
ACC CAC TCG ACG ATG GAT GTC AGC GTG CAG GAT ATG CGG ATG GCG CTC      1304
Thr His Ser Thr Met Asp Val Ser Val Gln Asp Met Arg Met Ala Leu
                85                90                95                100
TGG TTT TTT GAA TAT GCG CTG GGG CAG GCG GAA GAT ATC GCC ATT CGT      1352
Trp Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Gln Ala Glu Asp Ile Ala Ile Arg
                105                110                115
ATG CGT CAG TAC ACC GAC GAA TAT CTT GAT AAC ATT ACA CCG CCG TTC      1400
Met Arg Gln Tyr Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Asn Ile Thr Pro Pro Phe
                120                125                130
ACG AAA GCC TTG TTT ACC TAC GTC AAA GAG CGG AAG TAC ACC TTT TGT      1448
Thr Lys Ala Leu Phe Thr Tyr Val Lys Glu Arg Lys Tyr Thr Phe Cys

```

DE 695 34 801 T2 2006.10.05

		135					140					145					
ACG	CCG	GGG	CAT	ATG	GGC	GGC	ACC	GCA	TAT	CAA	AAA	AGC	CCG	GTT	GGC		1496
Thr	Pro	Gly	His	Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gln	Lys	Ser	Pro	Val	Gly		
	150					155					160						
TGT	CTG	TTT	TAT	GAT	TTT	TTC	GGC	GGG	AAT	ACT	CTT	AAG	GCT	GAT	GTC		1544
Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Asp	Val		
165				170					175						180		
TCT	ATT	TCG	GTC	ACC	GAG	CTT	GGT	TCG	TTG	CTC	GAC	CAC	ACC	GGG	CCA		1592
Ser	Ile	Ser	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	His	Thr	Gly	Pro		
				185				190						195			
CAC	CTG	GAA	GCG	GAA	GAG	TAC	ATC	GCG	CGG	ACT	TTT	GGC	GCG	GAA	CAG		1640
His	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Arg	Thr	Phe	Gly	Ala	Glu	Gln		
			200					205					210				
AGT	TAT	ATC	GTT	ACC	AAC	GGA	ACA	TCG	ACG	TCG	AAC	AAA	ATT	GTG	GGT		1688
Ser	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Ile	Val	Gly		
	215					220					225						
ATG	TAC	GCC	GCG	CCA	TCC	GGC	AGT	ACG	CTG	TTG	ATC	GAC	CGC	AAT	TGT		1736
Met	Tyr	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	Arg	Asn	Cys		
	230					235					240						
CAT	AAA	TCG	CTG	GCG	CAT	CTG	TTG	ATG	ATG	AAC	GAT	GTA	GTG	CCA	GTC		1784
His	Lys	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Leu	Met	Met	Asn	Asp	Val	Val	Pro	Val		
245					250					255					260		
TGG	CTG	AAA	CCG	ACG	CGT	AAT	GCG	TTG	GGG	ATT	CTT	GGT	GGG	ATC	CCG		1832
Trp	Leu	Lys	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro		
				265					270					275			
CGC	CGT	GAA	TTT	ACT	CGC	GAC	AGC	ATC	GAA	GAG	AAA	GTC	GCT	GCT	ACC		1880
Arg	Arg	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Ser	Ile	Glu	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Thr		
				280				285					290				
ACG	CAA	GCA	CAA	TGG	CCG	GTT	CAT	GCG	GTG	ATC	ACC	AAC	TCC	ACC	TAT		1928
Thr	Gln	Ala	Gln	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr	Asn	Ser	Thr	Tyr		
		295				300					305						
GAT	GGC	TTG	CTC	TAC	AAC	ACC	GAC	TGG	ATC	AAA	CAG	ACG	CTG	GAT	GTC		1976
Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Trp	Ile	Lys	Gln	Thr	Leu	Asp	Val		
	310					315					320						
CCG	TCG	ATT	CAC	TTC	GAT	TCT	GCC	TGG	GTG	CCG	TAC	ACC	CAT	TTT	CAT		2024
Pro	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr	Thr	His	Phe	His		
					330					335					340		
CCG	ATC	TAC	CAG	GGT	AAA	AGT	GGT	ATG	AGC	GGC	GAG	CGT	GTT	GCG	GGA		2072
Pro	Ile	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ser	Gly	Met	Ser	Gly	Glu	Arg	Val	Ala	Gly		
				345					350					355			
AAA	GTG	ATC	TTC	GAA	ACG	CAA	TCG	ACC	CAC	AAA	ATG	CTG	GCG	GCG	TTA		2120
Lys	Val	Ile	Phe	Glu	Thr	Gln	Ser	Thr	His	Lys	Met	Leu	Ala	Ala	Leu		
			360					365				370					
TCG	CAG	GCT	TCG	CTG	ATC	CAC	ATT	AAA	GGC	GAG	TAT	GAC	GAA	GAG	GCC		2168
Ser	Gln	Ala	Ser	Leu	Ile	His	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Ala		
		375					380					385					
TTT	AAC	GAA	GCC	TTT	ATG	ATG	CAT	ACC	ACC	ACC	TCG	CCC	AGT	TAT	CCC		2216
Phe	Asn	Glu	Ala	Phe	Met	Met	His	Thr	Thr	Thr	Ser	Pro	Ser	Tyr	Pro		
	390					395					400						
ATT	GTT	GCT	TCG	GTT	GAG	ACG	GCG	GCG	GCG	ATG	CTG	CGT	GGT	AAT	CCG		2264
Ile	Val	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Leu	Arg	Gly	Asn	Pro		
	405				410					415					420		
GGC	AAA	CGG	CTG	ATT	AAC	CGT	TCA	GTA	GAA	CGA	GCT	CTG	CAT	TTT	CGC		2312
Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Arg	Ser	Val	Glu	Arg	Ala	Leu	His	Phe	Arg		
				425					430					435			
AAA	GAG	GTC	CAG	CGG	CTG	CGG	GAA	GAG	TCT	GAC	GGT	TGG	TTT	TTC	GAT		2360
Lys	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Gly	Trp	Phe	Phe	Asp		
			440					445				450					
ATC	TGG	CAA	CCG	CCG	CAG	GTG	GAT	GAA	GCC	GAA	TGC	TGG	CCC	GTT	GCG		2408
Ile	Trp	Gln	Pro	Pro	Gln	Val	Asp	Glu	Ala	Glu	Cys	Trp	Pro	Val	Ala		

455	460	465	
CCT GGC GAA CAG TGG CAC GGC TTT AAC GAT GCG GAT GCC GAT CAT ATG			2456
Pro Gly Glu Gln Trp His Gly Phe Asn Asp Ala Asp Ala Asp His Met			
470	475	480	
TTT CTC GAT CCG GTT AAA GTC ACT ATT TTG ACA CCG GGG ATG GAC GAG			2504
Phe Leu Asp Pro Val Lys Val Thr Ile Leu Thr Pro Gly Met Asp Glu			
485	490	495	500
CAG GGC AAT ATG AGC GAG GAG GGG ATC CCG GCG GCG CTG GTA GCA AAA			2552
Gln Gly Asn Met Ser Glu Glu Gly Ile Pro Ala Ala Leu Val Ala Lys			
505	510	515	
TTC CTC GAC GAA CGT GGG ATC GTA GTA GAG AAA ACC GGC CCT TAT AAC			2600
Phe Leu Asp Glu Arg Gly Ile Val Val Glu Lys Thr Gly Pro Tyr Asn			
520	525	530	
CTG CTG TTT CTC TTT AGT ATT GGC ATC GAT AAA ACC AAA GCA ATG GGA			2648
Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ile Gly Ile Asp Lys Thr Lys Ala Met Gly			
535	540	545	
TTA TTG CGT GGG TTG ACG GAA TTC AAA CGC TCT TAC GAT CTC AAC CTG			2696
Leu Leu Arg Gly Leu Thr Glu Phe Lys Arg Ser Tyr Asp Leu Asn Leu			
550	555	560	
CGG ATC AAA AAT ATG CTA CCC GAT CTC TAT GCA GAA GAT CCC GAT TTC			2744
Arg Ile Lys Asn Met Leu Pro Asp Leu Tyr Ala Glu Asp Pro Asp Phe			
565	570	575	580
TAC CGC AAT ATG CGT ATT CAG GAT CTG GCA CAA GGG ATC CAT AAG CTG			2792
Tyr Arg Asn Met Arg Ile Gln Asp Leu Ala Gln Gly Ile His Lys Leu			
585	590	595	
ATT CGT AAA CAC GAT CTT CCC GGT TTG ATG TTG CGG GCA TTC GAT ACT			2840
Ile Arg Lys His Asp Leu Pro Gly Leu Met Leu Arg Ala Phe Asp Thr			
600	605	610	
TTG CCG GAG ATG ATC ATG ACG CCA CAT CAG GCA TGG CAA CGA CAA ATT			2888
Leu Pro Glu Met Ile Met Thr Pro His Gln Ala Trp Gln Arg Gln Ile			
615	620	625	
AAA GGC GAA GTA GAA ACC ATT GCG CTG GAA CAA CTG GTC GGT AGA GTA			2936
Lys Gly Glu Val Glu Thr Ile Ala Leu Glu Gln Leu Val Gly Arg Val			
630	635	640	
TCG GCA AAT ATG ATC CTG CCT TAT CCA CCG GGC GTA CCG CTG TTG ATG			2984
Ser Ala Asn Met Ile Leu Pro Tyr Pro Pro Gly Val Pro Leu Leu Met			
645	650	655	660
CCT GGA GAA ATG CTG ACC AAA GAG AGC CGC ACA GTA CTC GAT TTT CTA			3032
Pro Gly Glu Met Leu Thr Lys Glu Ser Arg Thr Val Leu Asp Phe Leu			
665	670	675	
CTG ATG CTT TGT TCC GTC GGG CAA CAT TAC CCC GGT TTT GAA ACG GAT			3080
Leu Met Leu Cys Ser Val Gly Gln His Tyr Pro Gly Phe Glu Thr Asp			
680	685	690	
ATT CAC GGC GCG AAA CAG GAC GAA GAC GGC GTT TAC CGC GTA CGA GTC			3128
Ile His Gly Ala Lys Gln Asp Glu Asp Gly Val Tyr Arg Val Arg Val			
695	700	705	
CTA AAA ATG GCG GGA TAACTTGCCA GAGCGGCTTC CGGGCGAGTA ACGTTCTGTT			3183
Leu Lys Met Ala Gly			
710			
AACAAATAAA GGAGACGTTA TGCTGGGTTT AAAACAGGTT CACCATATTG CGATTATTGC			3243
GACGGATTAT GCGGTGAGCA AAGCTT			3269

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 713 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(ix) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:4:

Met Asn Ile Ile Ala Ile Met Gly Pro His Gly Val Phe Tyr Lys Asp

1				5					10				15		
Glu	Pro	Ile	Lys	Glu	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Gly	Phe	Gln
			20					25					30		
Ile	Ile	Trp	Pro	Gln	Asn	Ser	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	Glu	His
		35					40					45			
Asn	Pro	Arg	Ile	Cys	Gly	Val	Ile	Phe	Asp	Trp	Asp	Glu	Tyr	Ser	Leu
	50					55					60				
Asp	Leu	Cys	Ser	Asp	Ile	Asn	Gln	Leu	Asn	Glu	Tyr	Leu	Pro	Leu	Tyr
65					70					75					80
Ala	Phe	Ile	Asn	Thr	His	Ser	Thr	Met	Asp	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Met
				85					90					95	
Arg	Met	Ala	Leu	Trp	Phe	Phe	Glu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Glu	Asp
			100						105				110		
Ile	Ala	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Tyr	Thr	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asn	Ile
	115						120					125			
Thr	Pro	Pro	Phe	Thr	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Tyr	Val	Lys	Glu	Arg	Lys
	130					135					140				
Tyr	Thr	Phe	Cys	Thr	Pro	Gly	His	Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Gln	Lys
145					150					155					160
Ser	Pro	Val	Gly	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Gly	Asn	Thr	Leu
			165					170						175	
Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Ile	Ser	Val	Thr	Glu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp
		180						185					190		
His	Thr	Gly	Pro	His	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Tyr	Ile	Ala	Arg	Thr	Phe
	195						200					205			
Gly	Ala	Glu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Asn
	210					215					220				
Lys	Ile	Val	Gly	Met	Tyr	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Ile
225					230					235					240
Asp	Arg	Asn	Cys	His	Lys	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Leu	Met	Met	Asn	Asp
			245					250						255	
Val	Val	Pro	Val	Trp	Leu	Lys	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Leu	Gly	Ile	Leu
			260					265					270		
Gly	Gly	Ile	Pro	Arg	Arg	Glu	Phe	Thr	Arg	Asp	Ser	Ile	Glu	Glu	Lys
		275					280					285			
Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Gln	Ala	Gln	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr
	290					295					300				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Trp	Ile	Lys	Gln
305					310					315					320
Thr	Leu	Asp	Val	Pro	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr
			325						330					335	
Thr	His	Phe	His	Pro	Ile	Tyr	Gln	Gly	Lys	Ser	Gly	Met	Ser	Gly	Glu
		340						345					350		
Arg	Val	Ala	Gly	Lys	Val	Ile	Phe	Glu	Thr	Gln	Ser	Thr	His	Lys	Met
		355					360					365			
Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Leu	Ile	His	Ile	Lys	Gly	Glu	Tyr
	370					375					380				
Asp	Glu	Glu	Ala	Phe	Asn	Glu	Ala	Phe	Met	Met	His	Thr	Thr	Thr	Ser
385					390				395						400
Pro	Ser	Tyr	Pro	Ile	Val	Ala	Ser	Val	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Leu
			405					410						415	
Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Arg	Ser	Val	Glu	Arg	Ala
		420						425					430		
Leu	His	Phe	Arg	Lys	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ser	Asp	Gly
		435					440					445			
Trp	Phe	Phe	Asp	Ile	Trp	Gln	Pro	Pro	Gln	Val	Asp	Glu	Ala	Glu	Cys
	450					455					460				
Trp	Pro	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Gln	Trp	His	Gly	Phe	Asn	Asp	Ala	Asp
465					470				475						480
Ala	Asp	His	Met	Phe	Leu	Asp	Pro	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Leu	Thr	Pro

				485					490					495			
Gly	Met	Asp	Glu	Gln	Gly	Asn	Met	Ser	Glu	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	Ala		
			500					505					510				
Leu	Val	Ala	Lys	Phe	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr		
		515					520					525					
Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr		
	530					535					540						
Lys	Ala	Met	Gly	Leu	Leu	Arg	Gly	Leu	Thr	Glu	Phe	Lys	Arg	Ser	Tyr		
545					550					555					560		
Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Asp	Leu	Tyr	Ala	Glu		
			565						570					575			
Asp	Pro	Asp	Phe	Tyr	Arg	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Ala	Gln	Gly		
			580					585					590				
Ile	His	Lys	Leu	Ile	Arg	Lys	His	Asp	Leu	Pro	Gly	Leu	Met	Leu	Arg		
		595				600						605					
Ala	Phe	Asp	Thr	Leu	Pro	Glu	Met	Ile	Met	Thr	Pro	His	Gln	Ala	Trp		
	610					615					620						
Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Thr	Ile	Ala	Leu	Glu	Gln	Leu		
625					630					635					640		
Val	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val		
			645					650						655			
Pro	Leu	Leu	Met	Pro	Gly	Glu	Met	Leu	Thr	Lys	Glu	Ser	Arg	Thr	Val		
		660						665					670				
Leu	Asp	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Cys	Ser	Val	Gly	Gln	His	Tyr	Pro	Gly		
	675					680						685					
Phe	Glu	Thr	Asp	Ile	His	Gly	Ala	Lys	Gln	Asp	Glu	Asp	Gly	Val	Tyr		
590					695					700							
Arg	Val	Arg	Val	Leu	Lys	Met	Ala	Gly									
705				710													

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 2145 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(B) STAMM: CS520

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..2145

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:5:

ATG AAC GTT ATT GCA ATA TTG AAT CAC ATG GGG GTT TAT TTT AAA GAA	48
Met Asn Val Ile Ala Ile Leu Asn His Met Gly Val Tyr Phe Lys Glu	
1 5 10 15	
GAA CCC ATC CGT GAA CTT CAT CGC GCG CTT GAA CGT CTG AAC TTC CAG	96
Glu Pro Ile Arg Glu Leu His Arg Ala Leu Glu Arg Leu Asn Phe Gln	
20 25 30	
ATT GTT TAC CCG AAC GAC CGT GAC GAC TTA TTA AAA CTG ATC GAA AAC	144
Ile Val Tyr Pro Asn Asp Arg Asp Asp Leu Leu Lys Leu Ile Glu Asn	
35 40 45	
AAT GCG CGT CTG TGC GGC GTT ATT TTT GAC TGG GAT AAA TAT AAT CTC	192
Asn Ala Arg Leu Cys Gly Val Ile Phe Asp Trp Asp Lys Tyr Asn Leu	
50 55 60	
GAG CTG TGC GAA GAA ATT AGC AAA ATG AAC GAG AAC CTG CCG TTG TAC	240
Glu Leu Cys Glu Glu Ile Ser Lys Met Asn Glu Asn Leu Pro Leu Tyr	

65	70	75	80	
GCG TTC GCT AAT ACG TAT TCC ACT CTC GAT GTA AGC CTG AAT GAC CTG				288
Ala Phe Ala Asn Thr Tyr Ser Thr Leu Asp Val Ser Leu Asn Asp Leu				
85	90	95		
CGT TTA CAG ATT AGC TTC TTT GAA TAT GCG CTG GGT GCT GCT GAA GAT				336
Arg Leu Gln Ile Ser Phe Phe Glu Tyr Ala Leu Gly Ala Ala Glu Asp				
100	105	110		
ATT GCT AAT AAG ATC AAG CAG ACC ACT GAC GAA TAT ATC AAC ACT ATT				384
Ile Ala Asn Lys Ile Lys Gln Thr Thr Asp Glu Tyr Ile Asn Thr Ile				
115	120	125		
CTG CCT CCG CTG ACT AAA GCA CTG TTT AAA TAT GTT CGT GAA GGT AAA				432
Leu Pro Pro Leu Thr Lys Ala Leu Phe Lys Tyr Val Arg Glu Gly Lys				
130	135	140		
TAT ACT TTC TGT ACT CCT GGT CAC ATG GGC GGT ACT GCA TTC CAG AAA				480
Tyr Thr Phe Cys Thr Pro Gly His Met Gly Gly Thr Ala Phe Gln Lys				
145	150	155	160	
AGC CCG GTA GGT AGC CTG TTC TAT GAT TTC TTT GGT CCG AAT ACC ATG				528
Ser Pro Val Gly Ser Leu Phe Tyr Asp Phe Phe Gly Pro Asn Thr Met				
165	170	175		
AAA TCT GAT ATT TCC ATT TCA GTA TCT GAA CTG GGT TCT CTG CTG GAT				576
Lys Ser Asp Ile Ser Ile Ser Val Ser Glu Leu Gly Ser Leu Leu Asp				
180	185	190		
CAC AGT GGT CCA CAC AAA GAA GCA GAA CAG TAT ATC GCT CGC GTC TTT				624
His Ser Gly Pro His Lys Glu Ala Glu Gln Tyr Ile Ala Arg Val Phe				
195	200	205		
AAC GCA GAC CGC AGC TAC ATG GTG ACC AAC GGT ACT TCC ACT GCG AAC				672
Asn Ala Asp Arg Ser Tyr Met Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ala Asn				
210	215	220		
AAA ATT GTT GGT ATG TAC TCT GCT CCA GCA GGC AGC ACC ATT CTG ATT				720
Lys Ile Val Gly Met Tyr Ser Ala Pro Ala Gly Ser Thr Ile Leu Ile				
225	230	235	240	
GAC CGT AAC TGC CAC AAA TCG CTG ACC CAC CTG ATG ATG ATG AGC GAT				768
Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Leu Thr His Leu Met Met Met Ser Asp				
245	250	255		
GTT ACG CCA ATC TAT TTC CGC CCG ACC CGT AAC GCT TAC GGT ATT CTT				816
Val Thr Pro Ile Tyr Phe Arg Pro Thr Arg Asn Ala Tyr Gly Ile Leu				
260	265	270		
GGT GGT ATC CCA CAG AGT GAA TTC CAG CAC GCT ACC ATT GCT AAG CGC				864
Gly Gly Ile Pro Gln Ser Glu Phe Gln His Ala Thr Ile Ala Lys Arg				
275	280	285		
GTG AAA GAA ACA CCA AAC GCA ACC TGG CCG GTA CAT GCT GTA ATT ACC				912
Val Lys Glu Thr Pro Asn Ala Thr Trp Pro Val His Ala Val Ile Thr				
290	295	300		
AAC TCT ACC TAT GAT GGT CTG CTG TAC AAC ACC GAC TTC ATC AAG AAA				960
Asn Ser Thr Tyr Asp Gly Leu Leu Tyr Asn Thr Asp Phe Ile Lys Lys				
305	310	315	320	
ACA CTG GAT GTG AAA TCC ATC CAC TTT GAC TCC GCG TGG GTG CCT TAC				1008
Thr Leu Asp Val Lys Ser Ile His Phe Asp Ser Ala Trp Val Pro Tyr				
325	330	335		
ACC AAC TTC TCA CCG ATT TAC GAA GGT AAA TGC GGT ATG AGC GGT GGC				1056
Thr Asn Phe Ser Pro Ile Tyr Glu Gly Lys Cys Gly Met Ser Gly Gly				
340	345	350		
CGT GTA GAA GGG AAA GTG ATT TAC GAA ACC CAG TCC ACT CAC AAA CTG				1104
Arg Val Glu Gly Lys Val Ile Tyr Glu Thr Gln Ser Thr His Lys Leu				
355	360	365		
CTG GCG GCG TTC TCT CAG GCT TCC ATG ATC CAC GTT AAA GGT GAC GTA				1152
Leu Ala Ala Phe Ser Gln Ala Ser Met Ile His Val Lys Gly Asp Val				
370	375	380		
AAC GAA GAA ACC TTT AAC GAA GCC TAC ATG ATG CAC ACC ACC ACT TCT				1200
Asn Glu Glu Thr Phe Asn Glu Ala Tyr Met Met His Thr Thr Thr Ser				

385					390					395					400	
CCG	CAC	TAC	GGT	ATC	GTG	GCG	TCC	ACT	GAA	ACC	GCT	GCG	GCG	ATG	ATG	1248
Pro	His	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Met	
			405						410					415		
AAA	GGC	AAT	GCA	GGT	AAG	CGT	CTG	ATC	AAC	GGT	TCT	ATT	GAA	CGT	GCG	1296
Lys	Gly	Asn	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	
			420						425					430		
ATC	AAA	TTC	CGT	AAA	GAG	ATC	AAA	CGT	CTG	AGA	ACG	GAA	TCT	GAT	GGC	1344
Ile	Lys	Phe	Arg	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Arg	Thr	Glu	Ser	Asp	Gly	
			435						440					445		
TGG	TTC	TTT	GAT	GTA	TGG	CAG	CCG	GAT	CAT	ATC	GAT	ACG	ACT	GAA	TGC	1392
Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gln	Pro	Asp	His	Ile	Asp	Thr	Thr	Glu	Cys	
			450						455					460		
TGG	CCG	CTG	CGT	TCT	GAC	AGC	ACC	TGG	CAC	GGC	TTC	AAA	AAC	ATC	GAT	1440
Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Trp	His	Gly	Phe	Lys	Asn	Ile	Asp	
			465						470					480		
AAC	GAG	CAC	ATG	TAT	CTT	GAC	CCG	ATC	AAA	GTC	ACC	CTG	CTG	ACT	CCG	1488
Asn	Glu	His	Met	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ile	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro	
			485						490					495		
GGG	ATG	GAA	AAA	GAC	GGC	ACC	ATG	AGC	GAC	TTT	GGT	ATT	CCG	GCC	AGC	1536
Gly	Met	Glu	Lys	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Asp	Phe	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	
			500						505					510		
ATC	GTG	GCG	AAA	TAC	CTC	GAC	GAA	CAT	GGC	ATC	GTT	GTT	GAG	AAA	ACC	1584
Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	His	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr	
			515						520					525		
GGT	CCG	TAT	AAC	CTG	CTG	TTC	CTG	TTC	AGC	ATC	GGT	ATC	GAT	AAG	ACC	1632
Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr	
			530						535					540		
AAA	GCA	CTG	AGC	CTG	CTG	CGT	GCT	CTG	ACT	GAC	TTT	AAA	CGT	GCG	TTC	1680
Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Phe	Lys	Arg	Ala	Phe	
			545						550					560		
GAC	CTG	AAC	CTG	CGT	GTG	AAA	AAC	ATG	CTG	CCG	TCT	CTG	TAT	CGT	GAA	1728
Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Tyr	Arg	Glu	
			565						570					575		
GAT	CCT	GAA	TTC	TAT	GAA	AAC	ATG	CGT	ATT	CAG	GAA	CTG	GCT	CAG	AAT	1776
Asp	Pro	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Asn	
			580						585					590		
ATC	CAC	AAA	CTG	ATT	GTT	CAC	CAC	AAT	CTG	CCG	GAT	CTG	ATG	TAT	CGC	1824
Ile	His	Lys	Leu	Ile	Val	His	His	Asn	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Tyr	Arg	
			595						600					605		
GCA	TTT	GAA	GTG	CTG	CCG	ACG	ATG	GTA	ATG	ACT	CCG	TAT	GCT	GCA	TTC	1872
Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Met	Thr	Pro	Tyr	Ala	Ala	Phe	
			610						615					620		
CAG	AAA	GAG	CTG	CAC	GGT	ATG	ACC	GAA	GAA	GTT	TAC	CTC	GAC	GAA	ATG	1920
Gln	Lys	Glu	Leu	His	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Met	
			625						630					640		
GTA	GGT	CGT	ATT	AAC	GCC	AAT	ATG	ATC	CTT	CCG	TAC	CCG	CCG	GGA	GTT	1968
Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Ala	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val	
			645						650					655		
CCT	CTG	GTA	ATG	CCG	GGT	GAA	ATG	ATC	ACC	GAA	GAA	AGC	CGT	CCG	GTT	2016
Pro	Leu	Val	Met	Pro	Gly	Glu	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ser	Arg	Pro	Val	
			660						665					670		
CTG	GAG	TTC	CTG	CAG	ATG	CTG	TGT	GAA	ATC	GGC	GCT	CAC	TAT	CCG	GGC	2064
Leu	Glu	Phe	Leu	Gln	Met	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Tyr	Pro	Gly	
			675						680					685		
TTT	GAA	ACC	GAT	ATT	CAC	GGT	GCA	TAC	CGT	CAG	GCT	GAT	GGC	CGC	TAT	2112
Phe	Glu	Thr	Asp	Ile	His	Gly	Ala	Tyr	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Arg	Tyr	
			690						695					700		
ACC	GTT	AAG	GTA	TTG	AAA	GAA	GAA	AGC	AAA	AAA						2145
Thr	Val	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Lys						

705

710

715

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR:6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 715 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(ix) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:6:

Met	Asn	Val	Ile	Ala	Ile	Leu	Asn	His	Met	Gly	Val	Tyr	Phe	Lys	Glu
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ile	Arg	Glu	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Asn	Phe	Gln
			20					25					30		
Ile	Val	Tyr	Pro	Asn	Asp	Arg	Asp	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ile	Glu	Asn
			35				40					45			
Asn	Ala	Arg	Leu	Cys	Gly	Val	Ile	Phe	Asp	Trp	Asp	Lys	Tyr	Asn	Leu
			50			55				60					
Glu	Leu	Cys	Glu	Glu	Ile	Ser	Lys	Met	Asn	Glu	Asn	Leu	Pro	Leu	Tyr
65					70				75						80
Ala	Phe	Ala	Asn	Thr	Tyr	Ser	Thr	Leu	Asp	Val	Ser	Leu	Asn	Asp	Leu
			85						90					95	
Arg	Leu	Gln	Ile	Ser	Phe	Phe	Glu	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Glu	Asp
			100				105						110		
Ile	Ala	Asn	Lys	Ile	Lys	Gln	Thr	Thr	Asp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Thr	Ile
		115				120						125			
Leu	Pro	Pro	Leu	Thr	Lys	Ala	Leu	Phe	Lys	Tyr	Val	Arg	Glu	Gly	Lys
			130			135					140				
Tyr	Thr	Phe	Cys	Thr	Pro	Gly	His	Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Gln	Lys
145					150				155						160
Ser	Pro	Val	Gly	Ser	Leu	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Gly	Pro	Asn	Thr	Met
			165					170						175	
Lys	Ser	Asp	Ile	Ser	Ile	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp
			180					185					190		
His	Ser	Gly	Pro	His	Lys	Glu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Ile	Ala	Arg	Val	Phe
		195				200						205			
Asn	Ala	Asp	Arg	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Ala	Asn
		210				215					220				
Lys	Ile	Val	Gly	Met	Tyr	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Thr	Ile	Leu	Ile
225					230					235					240
Asp	Arg	Asn	Cys	His	Lys	Ser	Leu	Thr	His	Leu	Met	Met	Met	Ser	Asp
			245						250					255	
Val	Thr	Pro	Ile	Tyr	Phe	Arg	Pro	Thr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Gly	Ile	Leu
			260					265					270		
Gly	Gly	Ile	Pro	Gln	Ser	Glu	Phe	Gln	His	Ala	Thr	Ile	Ala	Lys	Arg
		275				280						285			
Val	Lys	Glu	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Trp	Pro	Val	His	Ala	Val	Ile	Thr
		290				295					300				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Phe	Ile	Lys	Lys
305					310				315						320
Thr	Leu	Asp	Val	Lys	Ser	Ile	His	Phe	Asp	Ser	Ala	Trp	Val	Pro	Tyr
			325						330					335	
Thr	Asn	Phe	Ser	Pro	Ile	Tyr	Glu	Gly	Lys	Cys	Gly	Met	Ser	Gly	Gly
			340					345					350		
Arg	Val	Glu	Gly	Lys	Val	Ile	Tyr	Glu	Thr	Gln	Ser	Thr	His	Lys	Leu
		355				360						365			
Leu	Ala	Ala	Phe	Ser	Gln	Ala	Ser	Met	Ile	His	Val	Lys	Gly	Asp	Val
		370				375					380				
Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Asn	Glu	Ala	Tyr	Met	Met	His	Thr	Thr	Thr	Ser
385					390				395						400
Pro	His	Tyr	Gly	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Met	Met

				405					410				415				
Lys	Gly	Asn	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala		
			420					425					430				
Ile	Lys	Phe	Arg	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Arg	Thr	Glu	Ser	Asp	Gly		
		435					440					445					
Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gln	Pro	Asp	His	Ile	Asp	Thr	Thr	Glu	Cys		
	450					455					460						
Trp	Pro	Leu	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Trp	His	Gly	Phe	Lys	Asn	Ile	Asp		
465					470					475					480		
Asn	Glu	His	Met	Tyr	Leu	Asp	Pro	Ile	Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Pro		
			485					490						495			
Gly	Met	Glu	Lys	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Asp	Phe	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser		
		500						505					510				
Ile	Val	Ala	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	His	Gly	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Thr		
	515						520					525					
Gly	Pro	Tyr	Asn	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Lys	Thr		
	530					535					540						
Lys	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Phe	Lys	Arg	Ala	Phe		
545					550					555					560		
Asp	Leu	Asn	Leu	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Leu	Pro	Ser	Leu	Tyr	Arg	Glu		
			565					570						575			
Asp	Pro	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Met	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Asn		
		580						585					590				
Ile	His	Lys	Leu	Ile	Val	His	His	Asn	Leu	Pro	Asp	Leu	Met	Tyr	Arg		
	595						600					605					
Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Met	Thr	Pro	Tyr	Ala	Ala	Phe		
	610					615					620						
Gln	Lys	Glu	Leu	His	Gly	Met	Thr	Glu	Glu	Val	Tyr	Leu	Asp	Glu	Met		
625					630					635					640		
Val	Gly	Arg	Ile	Asn	Ala	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Tyr	Pro	Pro	Gly	Val		
			645					650						655			
Pro	Leu	Val	Met	Pro	Gly	Glu	Met	Ile	Thr	Glu	Glu	Ser	Arg	Pro	Val		
		660					665						670				
Leu	Glu	Phe	Leu	Gln	Met	Leu	Cys	Glu	Ile	Gly	Ala	His	Tyr	Pro	Gly		
	675					680					685						
Phe	Glu	Thr	Asp	Ile	His	Gly	Ala	Tyr	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Arg	Tyr		
	690					695				700							
Thr	Val	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Lys							
705					710					715							

Patentansprüche

1. Gen, das für Lysindecaboxylase mit der in (A) oder (B) definierten Aminosäuresequenz kodiert:
(A) Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls,
(B) Aminosäuresequenz mit Substitution, Deletion oder Insertion von 3 Aminosäureresten oder weniger in der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:4 des Sequenzprotokolls und mit Lysindecaboxylaseaktivität.
2. Gen nach Anspruch 1, worin das Gen eine Nukleotidsequenz von dem Nukleotid 1005 bis zu dem Nukleotid 3143 der SEQ ID NO:3 des Sequenzprotokolls aufweist.
3. DNA-Fragment, das ein Gen nach Anspruch 1 oder 2 enthält.
4. Verfahren zum Verringern oder Beseitigen der Aktivität der Lysindecaboxylase, die durch das Gen nach Anspruch 1 oder 2 kodiert wird, wobei das Gen nach Anspruch 1 oder 2 durch Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in einer Nukleotidsequenz in dem Gen modifiziert ist.
5. Mikroorganismus der Gattung Escherichia, worin das Gen nach Anspruch 1 oder 2, eine Promotorsequenz des Gens oder eine Region zwischen einer SD-Sequenz und einem Initiationskodon des Gens durch Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in der Nukleotidsequenz des Gens, der Promotorsequenz oder der Region zwischen einer SD-Sequenz und einem Initiationskodon modifiziert ist, wobei die Aktivität einer durch das Gen kodierten Lysindecaboxylase in Zellen verringert oder beseitigt worden ist.

6. Mikroorganismus nach Anspruch 5, worin der Mikroorganismus *Escherichia coli* ist.

7. Mikroorganismus nach Anspruch 5 oder 6, worin das *cadA*-Gen, das für Lysindecaboxylase mit der in SEQ ID NO:6 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert, eine Promotorsequenz des *cadA*-Gens oder eine Region zwischen einer SD-Sequenz und einem Initiationskodon des *cadA*-Gens durch Substitution, Deletion, Insertion, Addition oder Inversion eines oder mehrerer Nukleotide in der Nukleotidsequenz des *cadA*-Gens, der Promotorsequenz des *cadA*-Gens oder der Region zwischen einer SD-Sequenz und einem Initiationskodon des *cadA*-Gens modifiziert ist, wobei die Aktivität einer durch das *cadA*-Gen kodierten Lysindecaboxylase zusätzlich verringert oder beseitigt worden ist.

8. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 5, 6 und 7, welcher zur Gattung *Escherichia* gehört und L-Lysinproduktivität hat.

9. Verfahren zum Herstellen von L-Lysin, welches die Stufe umfasst, bei der ein Mikroorganismus nach Anspruch 8 in einem flüssigen Medium kultiviert wird.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

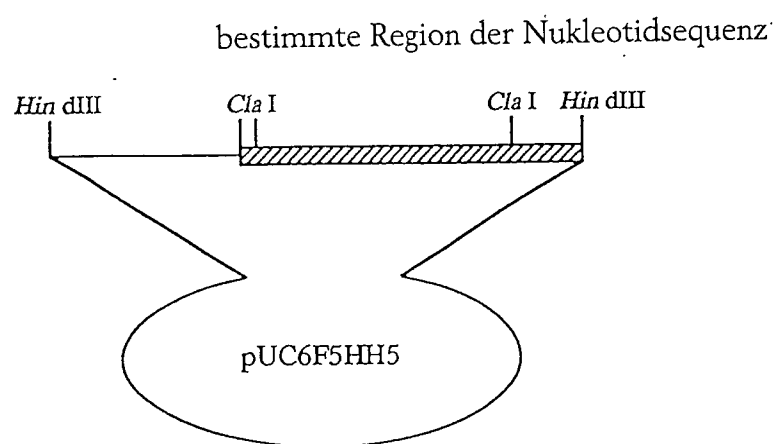


FIG. 2

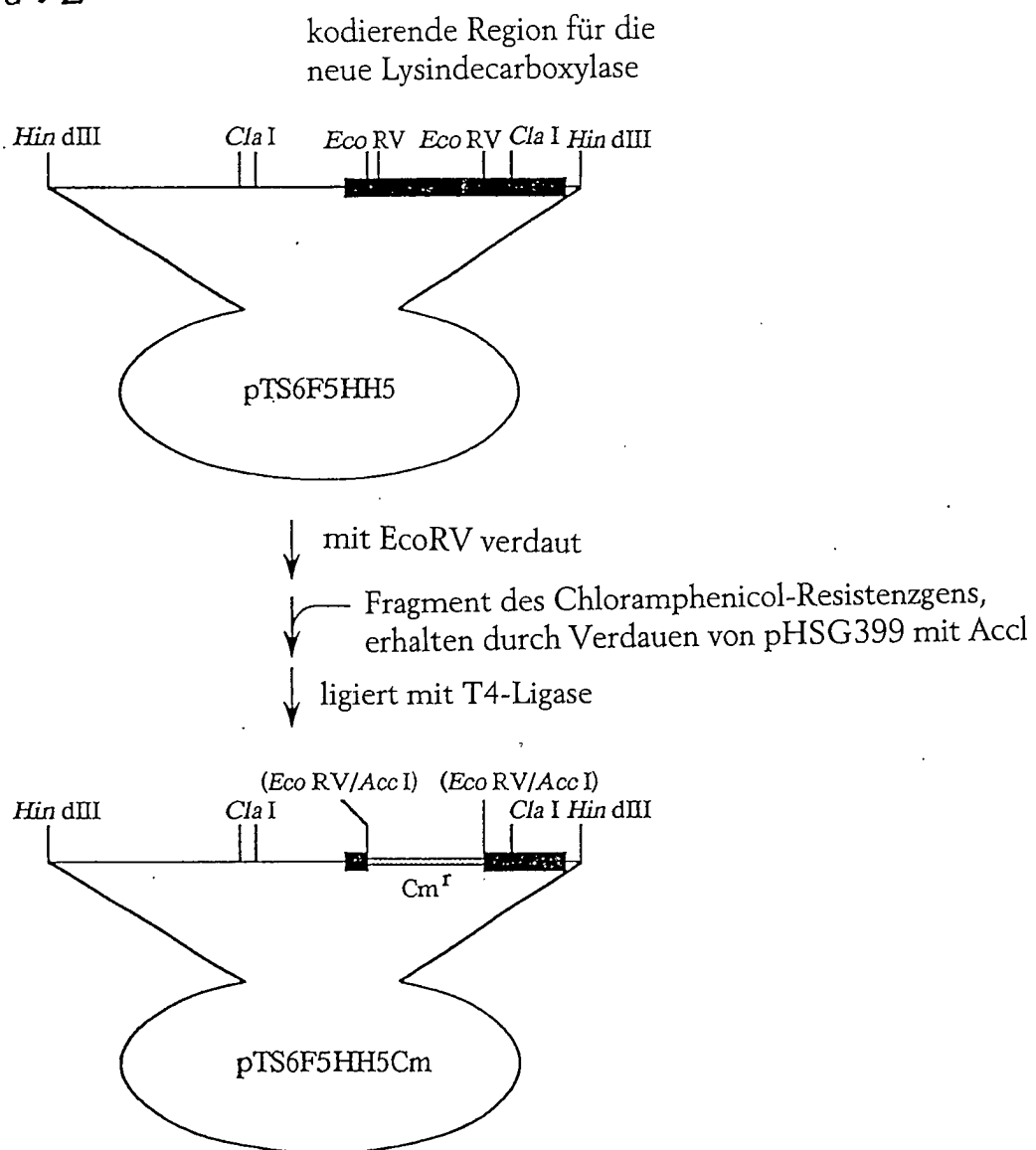


FIG. 3

