(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009 年3 月12 日 (12.03.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/031565 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 13/22* (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/065834

(22) 国際出願日: 2008 年9 月3 日 (03.09.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-228733 2007 年9 月4 日 (04.09.2007) JP
2007147434 2007 年12 月21 日 (21.12.2007) RU

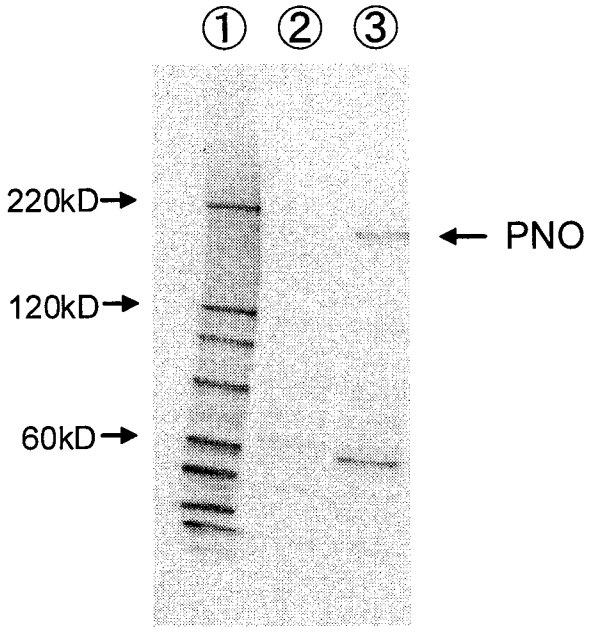
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 寺下 優 (TERASHITA, Masaru) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 臼田 佳弘 (USUDA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 松井 和彦 (MATSUI, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). ヤンポリスカヤ タチヤナ アブラモヴナ (YAMPOLSKAYA, Tatyana Abramovna) [RU/RU]; 123364 モスクワ ロドチナヤ ウル. ３１ ビルディング５ ナンバー７７ Moscow (RU). ストイノヴァ ナタリヤ ヴィクトロヴナ (STOYNOVA, Natalia Viktorovna) [RU/RU]; 123479 モスクワ ウル. ロゴヴァ ７ ビルディング２ ナンバー９ Moscow (RU). エリョーミナ ナタリヤ セルゲエヴナ (EREMINA, Natalia Sergeevna) [RU/RU]; 129336 モスクワ ウル. マルイギナ ８ ナンバー１９７ Moscow (RU). アリトマン イリナ ボリソヴナ (ALTMAN, Irina Borisovna) [RU/RU]; 119435 モスクワ バリシャヤ ピロゴフスカヤ ウル. ３５エー ナンバー６２ Moscow (RU). プチツィン レオニド ロマノヴィッチ (PTITSYN, Leonid
[続葉有]

(54) **Title:** AMINO ACID-PRODUCING MICROORGANISM AND METHOD OF PRODUCING AMINO ACID

(54) **発明の名称:** アミノ酸生産微生物及びアミノ酸の製造法

[図1]



(57) **Abstract:** An L-amino acid selected from the group consisting of L-lysine, L-threonine, L-tryptophan, L-phenylalanine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine and L-serine is produced by culturing a microorganism, which is capable of producing the above-described L-amino acid and has been modified so as to elevate the pyruvate synthase activity or the pyruvate:$NADP^+$ oxidoreductase activity, in a medium such as a medium containing ethanol or a fatty acid as the carbon source; thus producing and accumulating the L-amino acid as described above in the medium or within the microbial cells; and then collecting the L-amino acid from the medium or the microbial cells.

(57) 要約: Ｌ-リジン、Ｌ－スレオニン、Ｌ-トリプトファン、Ｌ-フェニルアラニン、Ｌ-バリン、Ｌ-ロイシン、Ｌ-イソロイシン、及びＬ-セリンからなる群より選ばれるＬ－アミノ酸生産能を有し、かつピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸：ＮＡＤＰ$^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された微生物を培地、例えばエタノールまたは脂肪酸を炭素源として含む培地で培養して、前記Ｌ-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりＬ-アミノ酸を採取する。

WO 2009/031565 A1

Romanovich) [RU/RU]; 115404 モスクワ リペツカヤ ウル．１０ビルディング２ナンバー１８８ Moscow (RU).

(74) 代理人: 川口 嘉之，外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則１３の２に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示.

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

アミノ酸生産微生物及びアミノ酸の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、L-アミノ酸を生産する微生物及びL-アミノ酸の製造法に関する。L-リジン、L-スレオニン及びL-トリプトファンは飼料添加物等として広く用いられている。また、L-フェニルアラニンは、甘味料の原料として使用されている。L-バリン、L-ロイシン、及びL-イソロイシンは、アミノ酸輸液やサプリメントに利用される。また、L-セリンは食品添加物や化粧品の原料などとして有用である。

背景技術

[0002] 微生物を用いた発酵法によってL-アミノ酸等の目的物質を製造するには、野生型微生物(野生株)を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法等がある。

[0003] 近年は、目的物質の発酵生産に組換えDNA技術を用いることが行われている。例えば、L-アミノ酸生合成系酵素、又はL-アミノ酸の排出もしくは耐性に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現を増強すること、又はL-アミノ酸生合成系への炭素源の流入を増強することによって、微生物のL-アミノ酸生産性を向上させることが行われている。

[0004] 上記のような技術として、例えばL-リジンでは、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ、アスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ等の酵素をコードする遺伝子の発現増強(特許文献1)、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(特許文献2)、及び、リンゴ酸酵素(マリックエンザイム)(特許文献3)の活性低下、等が知られている。

[0005] L-スレオニンでは、L-スレオニン及び/又はL-ホモセリンに対する耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子(特許文献4)、rhtB遺伝子(特許文献5)、rhtC遺伝子(特許文献6)、yfiK、yeaS遺伝子(特許文献7)が挙げられる。また、アスパルトキナー

ゼ、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、スレオニンシンターゼ、及び、アパルテートアミノトランスフェラーゼ(アスパルテートトランスアミナーゼ)をコードする遺伝子の発現増強(特許文献8)、スレオニンデヒドロゲナーゼの活性低下(特許文献9)、等が挙げられる。

[0006] L-トリプトファンでは、フォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼ、アントラニレートシンターゼのフィードバック阻害の解除(特許文献10)、トリプトファナーゼの欠損(特許文献11)等が知られている。

[0007] L-フェニルアラニンでは、コリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼのフィードバック阻害の解除(特許文献12)、及び、コリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼ及びチロシンリプレッサーの欠損(特許文献13)等が知られている。

[0008] L-バリンでは、生育にリポ酸を要求する、及び/または、H^+-ATPaseを欠失している変異株(特許文献14)等が、L-ロイシンではイソプロピルマレートシンターゼのフィードバック阻害の解除(特許文献15)等が、L-イソロイシンでは、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子等の発現強化(特許文献16)等が知られている。

[0009] L-セリンでは、セリンによるフィードバック阻害が低減された3-ホスフォグリセレートデヒドロゲナーゼを保持する菌株(特許文献17)、L-セリン生産能を有し、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性又はホスホセリントランスアミナーゼ活性の少なくとも一方が増強された細菌、さらにL-セリン分解能を欠失した細菌(特許文献18)、及び、アザセリンまたはβ-(2-チエニル)-DL-アラニンに耐性を有しL-セリン生産能を有する細菌(特許文献19)等が知られている。

特許文献1:米国特許第6,040,160号

特許文献2:米国特許第5,827,698号

特許文献3:WO2005/010175

特許文献4:米国特許第6,303,348号

特許文献5:欧州特許出願公開第0994190号

特許文献6:欧州特許出願公開第1013765号

特許文献7:欧州特許出願公開第1016710号

特許文献8:WO2006/123764

特許文献9:米国特許第7,179,623号

特許文献10:米国特許第6,180,373号

特許文献11:米国特許第4,371,614号

特許文献12:米国特許第5,354,672号

特許文献13:WO03/044191

特許文献14:米国特許第5,888,783号

特許文献15:米国特許第6,403,342号

特許文献16:米国特許第5,998,178号

特許文献17:米国特許第5,618,716号

特許文献18:米国特許第6,037,154号

特許文献19:米国特許第6,258,573号

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、L-アミノ酸を効率よく生産することのできる菌株を提供すること、及び該菌株を用いてL-アミノ酸を効率よく生産する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 従来のL-アミノ酸生産は、主として糖質を炭素源として、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによりアセチルCoAをTCAサイクルに供給することで成立している。しかし、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの反応は脱炭酸を伴うため、必ず1分子のCO_2が放出される。従って、さらに生産性を上昇させるためには、この脱炭酸を減少させることが必要であると本発明者は考えた。そして、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、エタノールや脂肪酸などのアセチルCoAを供給する物質を炭素源として、炭酸固定反応を触媒する酵素であるピルビン酸シンターゼ、あるいは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの酵素活性を上昇させることにより、さらには、ピルビン酸シンターゼの酵素活性に必要な還元型フェレドキシン又は還元型フラボドキシンをそれぞれの酸化型から生成する活性を有するフェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼの酵素活性を強化すること、あるいはフェレドキシン又はフラボドキシン産生能を

向上させることにより、L-アミノ酸の生産性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1)L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンからなる群より選ばれるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された微生物。

(2)ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された、前記微生物。

(3)ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された、前記微生物。

(4)ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子の発現量を増大させること、及び/または、同遺伝子の翻訳量を増大させることにより、ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大した、前記微生物。

(5)ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又はこれらの遺伝子の発現調節配列を改変することにより、ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大した、前記微生物。

(6)ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子が、下記(A)～(D)のいずれかに示すポリペプチド、下記(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチド、又は、下記(E)、(F)、(G)、(H)、(I)及び(J)のポリペプチドをコードする、前記微生物:

(A)配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B)配列番号2において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド。

(C)配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(D)配列番号4において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド。

(E)下記(E1)又は(E2)のポリペプチド:

(E1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(E2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(F)下記(F1)又は(F2)のポリペプチド:

(F1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(F2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(G)下記(G1)又は(G2)のポリペプチド:

(G1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(G2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(H)下記(H1)又は(H2)のポリペプチド:

(H1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(H2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)及び(G)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド。

(I)下記(I1)又は(I2)のポリペプチド:

(H1)配列番号65に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(H2)配列番号65において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形

成し得るポリペプチド。

(J) 下記(J1)又は(J2)のポリペプチド:

(J1)配列番号67に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(J2)配列番号67において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド。

(7)ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子が、下記(a)～(d)のいずれかのDNA、下記(e)、(f)、(g)及び(h)のDNA、または下記(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)のDNAを含む、前記微生物:

(a)配列番号1に示す塩基配列を有するDNA、

(b)配列番号1に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

(c)配列番号3に示す塩基配列を有するDNA、

(d)配列番号3に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(e) 下記(e1)又は(e2)のDNA:

(e1)配列番号56に示す塩基配列を有するDNA、

(e2)配列番号56に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(f)、(g)、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA、

(f) 下記(f1)又は(f2)のDNA:

(f1)配列番号58に示す塩基配列を有するDNA、

(f2)配列番号58に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(g)

、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA、

(g)下記(g1)又は(g2)のDNA:

(g1)配列番号60に示す塩基配列を有するDNA、

(g2)配列番号60に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA、

(h)下記(h1)又は(h2)のDNA:

(h1)配列番号62に示す塩基配列を有するDNA、

(h2)配列番号62に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、及び(g)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

(i)下記(i1)又は(i2)のDNA:

(h1)配列番号64に示す塩基配列を有するDNA、

(h2)配列番号64に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、(g)及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

(j)下記(j1)又は(j2)のDNA:

(j1)配列番号66に示す塩基配列を有するDNA、

(j2)配列番号66に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、(g)及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

(8)ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、下記(A)又は(B)に示すポリペプチドをコードする、前記微生物:

(A)配列番号6に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B)配列番号6において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有するポリペプチド。

(9)ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、下記(a)又は(b)のDNAを含む、前記微生物:

(a)配列番号5に示す塩基配列を有するDNA、

(b)配列番号5に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(10)フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼの活性が増大するように改変された、前記微生物。

(11)フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変された、前記微生物。

(12)マリックエンザイムの活性が低下するように改変された、前記微生物。

(13)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下するように改変された、前記微生物。

(14)好気的にエタノールを資化できるように改変された、前記微生物。

(15)微生物が、エシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、セラチア属からなる群より選ばれる属に属する細菌である、前記微生物。

(16)NAD型のマリックエンザイムとNADP型のマリックエンザイムの両方の活性が低下している前記微生物。

(17)微生物が、コリネ型細菌である前記微生物。

(18)前記微生物を培地で培養して、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンからなる群より選ばれるL-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法。

(19)前記培地が、エタノールまたは脂肪酸を炭素源として含有することを特徴とする、前記方法。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ(PNO)遺伝子の発現を示すウェスタンブロットの写真。レーン1:マーカー、レーン2:WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthrからの粗酵素抽出液、レーン3:WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr-PNOからの粗酵素抽出液

発明を実施するための最良の形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

＜1＞本発明の微生物

本発明の微生物は、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンからなる群より選ばれるL-アミノ酸生産能を有し、かつ、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された微生物である。

[0015] 本発明において「L-アミノ酸」とは、特記しない限り前記L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及び／またはL-セリンを意味する。

[0016] 「L-アミノ酸生産能」とは、本発明の微生物を培地中で培養したときに、L-アミノ酸を細胞又は培地から回収できる程度に、細胞又は培地中に生成、蓄積する能力をいう。本発明の微生物が生産するL-アミノ酸は、1種であってもよく、2種またはそれ以上のL-アミノ酸であってもよい。L-アミノ酸生産能を有する微生物としては、本来的にL-アミノ酸生産能を有するものであってもよいが、以下に示すような微生物を、変異法や組換えDNA技術を利用してL-アミノ酸生産能を有するように改変したものや、本発明の遺伝子を導入することによってL-アミノ酸生産能が付与された微生物であってもよい。

[0017] また、「ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大する」とは、もともとピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼを有している微生物において、これらの少なくとも一方の酵素の活性が増大すること、及び、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼを有していない微生物にこれらの少なくとも一方の酵素の活性を付与

することの両方を含む。

[0018] ＜1-1＞L-アミノ酸生産能の付与

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有する微生物を親株とし、ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ、又はこれらの両方の活性が増大するように改変することによって得ることができる。また、本発明の微生物は、ピルビン酸シンターゼ、またはピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された微生物を親株とし、L-アミノ酸生産能を付与又は増強することによって得ることができる。

[0019] 以下に、微生物にL-アミノ酸生産能を付与する方法及び本発明で使用することのできるL-アミノ酸生産能が付与された微生物を例示する。ただし、L-アミノ酸生産能を有する限り、これらに制限されない。

[0020] 本発明に用いる微生物としては、エシェリヒア(Escherichia)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、パントエア(Pantoea)、クレブシエラ(Klebsiella)属、セラチア(Serratia)属、エルビニア(Erwinia)属、サルモネラ(Salmonella)属、モルガネラ(Morganella)属などのγ-プロテオバクテリアに属する腸内細菌や、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型細菌、アリサイクロバチルス(Alicyclobacillus)属、バチルス(Bacillus)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属等に属する微生物が挙げられる。γ-プロテオバクテリアは、NCBI(National Center for Biotechnology Information)タキソノミーデータベース(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347)に開示されている分類により微生物に属するものが利用出来る。

[0021] エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)等が挙げられる。エシェリヒア・コリを遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、エシェリヒア・コリK-12株及びその誘導体であるエシェリヒア・コリ MG1655株(ATCC 47076)、及びW3110株(ATCC 27325)を用いることができる。エシェリヒア・コリK-12株は、1922年にスタンフォード大学で分離されたものであり、λファージの溶原菌であるとともに、F因子を持ち、接合等遺伝的組み換え体の作成が可能である汎用性の高い菌株である。またエシェリヒア・コリK-12株のゲノム配列は既に決定されており、遺伝子情報も自由に利

用出来る。エシェリヒア・コリK-12株や、誘導株を入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)より分譲を受けることができる(住所ATCC, Address: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America)。

[0022] 特に、パントエア属細菌、エルビニア属細菌、エンテロバクター属細菌は、γ-プロテオバクテリアに分類される細菌であり、分類学的に非常に近縁である(J. Gen. Appl. Microbiol. 1997, 43: 355-361; Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47: 1061-1067)。近年、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験等により、エンテロバクター属に属する細菌には、パントエア・アグロメランス(Pantoea agglomerans)又はパントエア・ディスパーサ(Pantoea dispersa)等に再分類されているものがある(Int. J. Syst. Bacteriol. 1989, 39: 337-345)。また、エルビニア属に属する細菌にはパントエア・アナナス(Pantoea ananas)、パントエア・スチューアルティに再分類されているものがある(Int. J. Syst. Bacteriol. 1993, 43: 162-173 参照)。

[0023] エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス(Enterobacter agglomerans)、エンテロバクター・アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)等が挙げられる。具体的には、欧州特許出願公開952221号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。エンテロバクター属の代表的な株として、エンテロバクター・アグロメランスATCC12287株が挙げられる。

[0024] パントエア属細菌の代表的な菌株として、パントエア・アナナティス、パントエア・スチューアルティ(Pantoea stewartii)パントエア・アグロメランス、パントエア・シトレア(Pantoea citrea)が挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0025] パントエア・アナナティスAJ13355株(FERM BP-6614)(欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13356株(FERM BP-6615)(欧州特許出願公開0952221号明細書)

尚、これらの菌株は、欧州特許出願公開0952221号明細書にはエンテロバクター・アグロメランスとして記載されているが、現在では、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。

[0026] エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロボーラ、エルビニア・カロトボーラが挙

げられ、クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラが挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0027] エルビニア・アミロボーラ ATCC15580株

エルビニア・カロトボーラ ATCC15713株

クレブシエラ・プランティコーラAJ13399株(FERM BP-6600)(欧州特許出願公開955368号明細書)

クレブシエラ・プランティコーラAJ13410株(FERM BP-6617)(欧州特許出願公開955368号明細書)

[0028] 本発明でいうコリネ型細菌は、バージーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌であって、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み(Liebl, W. et al. 1991, Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 255-260)、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。

[0029] L-グルタミン酸系アミノ酸の製造に好適に用いられるコリネ型細菌としては、例えば以下に示すものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム(コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

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

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレビバクテリウム・ディバリカタム(コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・フラバム(コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

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

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(コリネバクテリウム・アンモニアゲネス)

ブレビバクテリウム・アルバム

ブレビバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

[0030] 具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032

ブレビバクテリウム・フラバム(コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13826、ATCC14067

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13665、ATCC13869

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC6871

[0031] 本発明に用いる細菌は、エタノールの資化性を有する細菌であってもよい。このような細菌としては、元来エタノールの資化性を有する細菌、エタノールの資化性を付与された組換え株、又はエタノールの資化性が高まった変異株でもよい。エシェリヒア・コリにおいては、嫌気条件でエタノールを生成する酵素として、以下の反応を可逆的に触媒するアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼとアルコールデヒドロゲナーゼの活性を有するAdhEの存在が知られている。

アセチル-CoA + NADH + H^+ → アセトアルデヒド + NAD^+ + CoA

アセトアルデヒド + NADH + H^+ → エタノール + NAD^+

[0032] エシェリヒア・コリは好気条件ではエタノールは資化できないが、AdhEの変異によって、好気的にエタノールを資化出来るようになることが知られている(Clark D. P., and

Cronan, J. E. Jr. 1980. J. Bacteriol. 144: 179-184; Membrillo-Hernandez, J. et al. 2000. J. Biol. Chem. 275: 33869-33875)。このような変異を有するAdhE変異体として具体的には、エシェリヒア・コリのAdhEの568位のグルタミン酸残基がグルタミン酸及びアスパラギン酸以外のアミノ酸残基、例えばリジンで置換された変異体(Glu568Lys、E568K)がある。

[0033] さらに、前記AdhE変異体は、以下の追加的変異を含んでいてもよい。

A)560位のグルタミン酸残基の他のアミノ酸残基、例えばリジン残基への置換

B)566位のフェニルアラニン残基の他のアミノ酸残基、例えばバリン残基への置換、

C)22位のグルタミン酸残基、236位のメチオニン残基、461位のチロシン残基、554位のイソロイシン残基、及び786位のアラニン残基の他のアミノ酸残基、例えばそれぞれグリシン残基、バリン残基、システイン残基、セリン残基、及びバリン残基への置換、又は

D)上記変異の組合わせ。

[0034] コリネバクテリウム・グルタミカムは、複数のアルコールデヒドロゲナーゼを有しており、好気的にエタノールを資化できることが知られている(Pelechova, J. et al. 1980. Folia Microbiol (Praha) 25: 341-346)。

[0035] 本発明に用いる細菌は、油脂又は脂肪酸の資化性を有する細菌であってもよい。このような細菌としては、元来油脂もしくは脂肪酸の資化性を有する細菌、油脂もしくは脂肪酸の資化性を付与された組換え株、又は油脂もしくは脂肪酸の資化性が高まった変異株でもよい。エシェリヒア・コリにおいては、鎖長12以上の長鎖の脂肪酸を資化できることが知られている(Clark, D. P. and Cronan, J. E. 1996. In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology/Second Edition (Neidhardt, F. C. Ed.) pp. 343-357)。さらに、中鎖や短鎖の脂肪酸を利用できるようになったエシェリヒア・コリの変異株が知られている(Nunn, W. D. et al. 1979. J. Biol. Chem. 254: 9130-9134; Salanitro, J. P. and Wegener, W. S. 1971. J. Bacteriol. 108: 885-892)。

[0036] 本発明において、L-アミノ酸生産能を有する細菌とは、培地に培養したとき、L-アミノ酸を生産し、培地から回収できる程度に培地中に蓄積する能力を有する細菌をいう。好ましくは、目的とするL-アミノ酸を好ましくは0.5g/L以上、より好ましくは1.0g/L

以上の量で培地に蓄積させることができる細菌をいう。L-アミノ酸は、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンを含む。特に、L-リジン、L－スレオニン、L－バリン、L-トリプトファンが好ましい。

[0037] 以下、前記のような細菌にL-アミノ酸生産能を付与する方法、又は前記のような細菌のL-アミノ酸生産能を増強する方法について述べる。

[0038] L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸のアナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法を適用することができる(アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照)。ここで、L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2
種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

[0039] L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株を取得するには、親株又は野生株を通常の変異処理、すなわちX線や紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤処理などによって処理し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、かつL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって得ることができる。

[0040] また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、遺伝子組換えによって、酵素活性を増強することによっても行うことが出来る。酵素活性の増強は、例えば、L-アミノ酸の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を挙げることができる。遺伝子の発現を増強するための方法としては、遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えば微生物内でプラスミドの複製増殖機能を司

る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入した増幅プラスミドを導入すること、または、これらの遺伝子を染色体上で接合、転移等により多コピー化すること、またこれらの遺伝子のプロモーター領域に変異を導入することにより達成することもできる(国際公開パンフレットWO95/34672号参照)。

[0041] 上記増幅プラスミドまたは染色体上に目的遺伝子を導入する場合、これらの遺伝子を発現させるためのプロモーターはL-アミノ酸生産菌において機能するものであればいかなるプロモーターであっても良く、用いる遺伝子自身のプロモーターであってもよいし、改変したものでもよい。L-アミノ酸生産菌で強力に機能するプロモーターを適宜選択することや、プロモーターの-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることによっても遺伝子の発現量の調節が可能である。以上のような、酵素遺伝子の発現を増強する方法は、WO00/18935号パンフレット、欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。

[0042] 以下、細菌にL-アミノ酸生産能を付与する方法、及びL-アミノ酸生産能が付与された細菌について例示する。

[0043] L-リジン生産菌

エシェリヒア属に属するL-リジン生産菌の例としては、L-リジンアナログに耐性を有する変異株が挙げられる。L-リジンアナログはエシェリヒア属に属する細菌の生育を阻害するが、この阻害は、L-リジンが培地に共存するときには完全にまたは部分的に解除される。L-リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、γ-メチルリジン、α-クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、エシェリヒア属に属する細菌を通常の人工変異処理に付すことによって得ることができる。L-リジンの生産に有用な細菌株の具体例としては、Escherichia coli AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; 米国特許第4,346,170号参照)及び Escherichia coli VL611が挙げられる。これらの微生物では、アスパルトキナーゼのL-リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

[0044] WC196株は、Escherichia coliのL-リジン生産菌として使用できる。この菌株は、Escherichia coli K-12に由来するW3110株にAEC耐性を付与することにより育種された。

同株は、Escherichia coli AJ13069と命名され、1994年12月6日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-14690として寄託され、1995年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている(米国特許第5,827,698号)。

[0045] L-リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-リジン生合成系酵素の1種又は2種以上の活性が増強されている株も挙げられる。かかる酵素の例としては、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ(dapA)、アスパルトキナーゼ(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(dapB)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(ddh)(米国特許第6,040,160号)、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(ppc)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(aspC)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(asd)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ(dapF)、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ(dapD)、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ(dapE)及びアスパルターゼ(aspA)(EP 1253195 A)が挙げられるが、これらに限定されない。尚、酵素名の後のカッコ内は、遺伝子名である(以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ、及び、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼが特に好ましい。また、親株は、エネルギー効率に関与する遺伝子(cyo)(EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(pntAB)(米国特許第5,830,716号)、ybjE遺伝子(WO2005/073390)、または、これらの組み合わせの発現レベルが増大していてもよい。

[0046] L-リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損している株も挙げられる。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の例としては、ホモセリンデヒドロゲ

ナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(米国特許第5,827,698号)、及び、リンゴ酸酵素(マリックエンザイム)(WO2005/010175)が挙げられる。

[0047] 好ましいL-リジン生産菌として、エシェリヒア・コリWC196ΔmezpCABD2(WO2005/010175)やWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2(WO2006/078039)等が挙げられる。WC196ΔmezpCABD2株は、WC196株のリンゴ酸酵素(マリックエンザイム)をコードするsfcA及びb2463遺伝子を破壊することにより作製されたWC196Δmez株に、米国特許第6040160に記載されたプラスミドpCABD2を導入することにより得られた株である。WC196Δmez株は、WO2005/010175に詳細に記載されている。sfcA遺伝子及びb2463遺伝子の塩基配列、及び各遺伝子がコードするアミノ酸配列を、配列番号52～55に示す。

[0048] WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2株は、リジンデカルボキシラーゼをコードするcadA及びldcC遺伝子が破壊されたWC196株に、米国特許第6040160に記載されたプラスミドpCABD2が導入することにより得られた株である。pCABD2は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)をコードする変異型dapA遺伝子と、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子と、エシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードするdapB遺伝子と、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするddh遺伝子を含んでいる。

[0049] Lースレオニン生産菌

Lースレオニン生産能を有する微生物として好ましいものは、Lースレオニン生合成系酵素の1種又は2種以上の活性が増強された細菌が挙げられる。Lースレオニン生合成系酵素としては、アスパルトキナーゼIII(lysC)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(asd)、thrオペロンにコードされるアスパルトキナーゼI(thrA)、ホモセリンキナーゼ(thrB)、スレオニンシンターゼ(thrC)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(アスパルテートトランスアミナーゼ)(aspC)が挙げられる。カッコ内は、その遺伝子の略記号である(以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、アスパルトキナーゼIII、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アスパルトキナーゼI

、ホモセリンキナーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、及びスレオニンシンターゼが特に好ましい。Lースレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌に導入してもよい。スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌としては、例えば、スレオニンデヒドロゲナーゼ活性が欠損したTDH6株(特開2001－346578号、米国特許第7,179,623号)等が挙げられる。

[0050] Lースレオニン生合成系酵素は、最終産物のLースレオニンによって酵素活性が抑制される。従って、Lースレオニン生産菌を構築するためには、Lースレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにLースレオニン生合成系遺伝子を改変することが望ましい。また、上記thrA、thrB、thrC遺伝子は、スレオニンオペロンを構成しているが、スレオニンオペロンは、アテニュエーター構造を形成しており、スレオニンオペロンの発現は、培養液中のイソロイシン、スレオニンに阻害を受け、アテニュエーションにより発現が抑制される。この改変は、アテニュエーション領域のリーダー配列あるいは、アテニュエーターを除去することにより達成出来る(Lynn, S. P. et al., J. F. J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); 国際公開第02/26993号パンフレット; 国際公開第2005/049808号パンフレット参照)。

[0051] スレオニンオペロンの上流には、固有のプロモーターが存在するが、非天然のプロモーターに置換してもよいし(WO98/04715号パンフレット参照)、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるようなスレオニンオペロンを構築してもよい。(欧州特許第0593792号明細書参照)また、Lースレオニンによるフィードバック阻害を受けないように細菌を改変するために、α-amino-β-hydroxyvaleric acid (AHV)に耐性な菌株を選抜することも可能である。

[0052] このようにLースレオニンによるフィードバック阻害を受けないように改変されたスレオニンオペロンは、宿主内でコピー数が上昇しているか、あるいは強力なプロモーターに連結し、発現量が向上していることが好ましい。コピー数の上昇は、プラスミドによる増幅の他、トランスポゾン、Muーファージ等でゲノム上にスレオニンオペロンを転移させることによっても達成出来る。

[0053] Lースレオニン生合成系酵素以外にも、解糖系、TCA回路、呼吸鎖に関する遺伝

子や遺伝子の発現を制御する遺伝子、糖の取り込み遺伝子を強化することも好適である。これらのL－スレオニン生産に効果がある遺伝子としては、トランスヒドロナーゼ(pntAB)遺伝子(欧州特許733712号明細書)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(pepC)(国際公開95/06114号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子(pps)(欧州特許877090号明細書)、コリネ型細菌あるいはバチルス属細菌のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(国際公開99/18228号パンフレット、欧州出願公開1092776号明細書)が挙げられる。

[0054] また、L－スレオニンに耐性を付与する遺伝子、L－ホモセリンに耐性を付与する遺伝子の発現を強化することや、宿主にL－スレオニン耐性、L－ホモセリン耐性を付与することも好適である。耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子(Res. Microbiol. 154:123－135 (2003))、rhtB遺伝子(欧州特許出願公開第0994190号明細書)、rhtC遺伝子(欧州特許出願公開第1013765号明細書)、yfiK、yeaS遺伝子(欧州特許出願公開第1016710号明細書)が挙げられる。また宿主にL－スレオニン耐性を付与する方法は、欧州特許出願公開第0994190号明細書や、国際公開第90/04636号パンフレット記載の方法を参照出来る。

[0055] L－スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号)、E. coli 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (米国特許第5,631,157号)、E. coli NRRL-21593 (米国特許第5,939,307号)、E. coli FERM BP-3756 (米国特許第5,474,918号)、E. coli FERM BP-3519及びFERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978))、E. coli VL643及びVL2055 (EP 1149911 A)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0056] TDH-6株はthrC遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、そのilvA遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、rhtA遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異thrA遺伝子を含むthrA*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異thrA遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的

に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。B-3996株は、1987年11月19日、オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチビオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) に、受託番号B-3996で寄託されている。

[0057] E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、Lースレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミドpVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM)(1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-5318で国際寄託されている。

[0058] E. coliのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号337～2799, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号2801～3733, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC遺伝子との間に位置する。E. coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734～5020, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。これら三つの遺伝子は、全て、単一のスレオニンオペロンとして機能する。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニュエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去する(WO2005/049808, WO2003/097839)。

[0059] スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子、ならびに、thrB遺伝子及びthrC遺伝子は、

スレオニン生産株E. coli VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのオペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

[0060] E. coliのrhtA遺伝子は、グルタミン輸送系の要素をコードするglnHPQ オペロンに近いE. coli染色体の18分に存在する。rhtA遺伝子は、ORF1 (ybiF遺伝子, ヌクレオチド番号764～1651, GenBank accession number AAA218541, gi:440181)と同一であり、pexB遺伝子とompX遺伝子との間に位置する。ORF1によりコードされるタンパク質を発現するユニットは、rhtA遺伝子と呼ばれている(rht: ホモセリン及びスレオニンに耐性)。また、rhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG→A置換であることが判明している(ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjugation with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457, EP 1013765 A)。

[0061] E. coliのasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511～3571408, GenBank accession NC_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

[0062] また、E. coliのaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742～984932, GenBank accession NC_000913.1, gi:16128895)、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

[0063] L-トリプトファン生産菌

L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、変異trpS遺伝子によりコードされるトリプトファニル-tRNAシンテターゼが欠損したE. coli JP4735/pMU3028 (DSM10122)及びJP6015/pMU91 (DSM10123) (米国特許第5,756,345号)、セリンによるフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードするserAアレル及びトリプトファンによるフィードバック阻害を受けないアントラニレートシンターゼをコードするtrpEアレルを有するE. coli SV164 (pGH5) (米国特許第6,180,373号)、トリプトファナーゼが欠損したE. coli AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263

)及びAGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) (米国特許第4,371,614号)、フォスフォエノールピルビン酸生産能が増大したE. coli AGX17/pGX50,pACKG4-pps (WO9708333, 米国特許第6,319,696号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属するL-トリプトファン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

[0064] L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アントラニレートシンターゼ(trpE)、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ(serA)、3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ(aroG)、3-デヒドロキネートシンターゼ(aroB)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ(aroE)、シキミ酸キナーゼ(aroL)、5-エノール酸ピルビルシキミ酸3-リン酸シンターゼ(aroA)、コリスミ酸シンターゼ(aroC)、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼ及び、トリプトファンシンターゼ(trpAB)から選ばれる1種又は2種以上の酵素の活性が増強された株も挙げられる。プレフェン酸デヒドラターゼ及びコリスミ酸ムターゼは、2機能酵素(CM-PD)としてpheA遺伝子によってコードされている。これらの酵素の中では、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ、3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ、3-デヒドロキネートシンターゼ、シキミ酸キナーゼ、5-エノール酸ピルビルシキミ酸3-リン酸シンターゼ、コリスミ酸シンターゼ、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミン酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼが特に好ましい。アントラニレートシンターゼ及びフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼは共にL-トリプトファン及びL-セリンによるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を解除する変異をこれらの酵素に導入してもよい。このような変異を有する株の具体例としては、脱感作型アントラニレートシンターゼを保持するE. coli SV164、及び、フィードバック阻害が解除されたフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異serA遺伝子を含むプラスミドpGH5 (WO 94/08031)をE. coli SV164に導入することにより得られた形質転換株が挙げられる。

[0065] L-トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、阻害解除型アントラニレートシンターゼをコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入された株(特開昭57-71397号, 特開昭62-244382号, 米国特許第4,371,614号)も挙げら

れる。さらに、トリプトファンオペロン(trpBA)中のトリプトファンシンターゼをコードする遺伝子の発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を付与してもよい。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされるα及びβサブユニットからなる。さらに、イソシトレートリアーゼ-マレートシンターゼオペロンの発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を改良してもよい(WO2005/103275)。

[0066] L-フェニルアラニン生産菌

L-フェニルアラニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、コリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼ及びチロシンリプレッサーを欠損したE. coli AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197)(WO03/044191)、フィードバック阻害が解除されたコリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼをコードする変異型pheA34遺伝子を保持するE. coli HW1089 (ATCC 55371) (米国特許第 5,354,672号)、E. coli MWEC101-b (KR8903681)、E. coli NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146及びNRRL B-12147 (米国特許第4,407,952号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株として、フィードバック阻害が解除されたコリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼをコードする遺伝子を保持するE. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3566)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662)及びAJ 12604と命名されたE. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (FERM BP-3579)も使用できる(EP 488424 B1)。さらに、yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属するL-フェニルアラニン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1、WO03/044192)。

[0067] L-バリン生産菌

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvGMEDAオペロンを過剰発現するように改変された株(米国特許第5,998,178号)が挙げられるが、これらに限定されない。アテニュエーションに必要なilvGMEDAオペロンの領域を除去し、生産されるL-バリンによりオペロンの発現が減衰しないようにすることが好ましい。さら

に、オペロンのilvA遺伝子が破壊され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少することが好ましい。

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アミノアシルt-RNAシンテターゼの変異を有する変異株(米国特許第5,658,766号)も挙げられる。例えば、イソロイシンtRNAシンテターゼをコードするileS 遺伝子に変異を有するE. coli VL1970が使用できる。E. coli VL1970は、1988年6月24日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-4411で寄託されている。

さらに、生育にリポ酸を要求する、及び／または、H^+-ATPaseを欠失している変異株(WO96/06926、米国特許第5,888,783号)を親株として用いることができる。

また、エシェリヒア属に属するL－バリン生産菌として、H-81 (VKPM B-8066)、NRRL B-12287およびNRRL B-12288(米国特許4,391,907)、VKPM B-4411 (米国特許5,658,766)、VKPM B-7707 (欧州特許出願1016710A2)等も使用できる。H-81株は、2001年1月30日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-8066で寄託され、2002年2月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されている。

[0068] L-ロイシン生産菌

L-ロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ロイシン耐性のE. coli株 (例えば、57株 (VKPM B-7386, 米国特許第6,124,121号))またはβ-2-チエニルアラニン、3-ヒドロキシロイシン、4-アザロイシン、5,5,5-トリフルオロロイシンなどのロイシンアナログ耐性のE. coli株(特公昭62-34397号及び特開平8-70879号)、WO96/06926に記載された遺伝子工学的方法で得られたE. coli株、E. coli H-9068 (特開平8-70879号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0069] 本発明に用いる細菌は、L-ロイシン生合成に関与する遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、好ましくはL-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼ

をコードする変異leuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)に代表される、leuABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、b2682遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子)(EP 1239041 A2)が挙げられる。

[0070] L-イソロイシン生産菌

L-イソロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、6-ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシンヒドロキサメートなどのイソロイシンアナログに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオニン及び/またはアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号).が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼなどのL-イソロイシン生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号、FR 0356739、及び米国特許第5,998,178号)。

[0071] L-セリン生産菌

L-セリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、セリンによるフィードバック阻害が減少した3-ホスフォグリセレートデヒドロゲナーゼを保持するエシェリヒア・コリ(特許2584409号、米国特許第5,618,716号)が挙げられる。また、L-セリン生産能を有し、かつ、ホスホセリンホスファターゼ活性又はホスホセリントランスアミナーゼ活性の少なくとも一方が増強されたコリネ型細菌、さらにL-セリン分解能を欠失したコリネ型細菌(特開平11-253187号、米国特許第6,037,154号)、及び、アザセリンまたはβ-(2-チエニル)-DL-アラニンに耐性を有しL-セリン生産能を有するコリネ型細菌(特開平11-266881号、米国特許第6,258,573号)も使用できる。

[0072] 遺伝子組換えにより、上記のL-アミノ酸生産菌を育種する場合、使用する遺伝子は、上述した遺伝子情報を持つ遺伝子や、公知の配列を有する遺伝子に限られず、コードされるタンパク質の機能が損なわれない限り、その遺伝子のホモログや人為的な改変体等、保存的変異を有する遺伝子も使用することができる。すなわち、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1若しくは数個のアミ

ノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。「保存的変異」については、後述のピルビン酸シンターゼ等に関する記載が、上記遺伝子にも適用される。

[0073] ＜1-2＞ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性の増強

本発明の微生物は、上述したようなL-アミノ酸生産能を有する微生物を、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変した微生物である。ピルビン酸シンターゼの、あるいは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性が増大するように改変するには、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性が、親株、例えば野生株や非改変株と比べて増大するように改変することが好ましい。尚、前記したように、微生物が元来ピルビン酸シンターゼ活性を有していない場合、同酵素活性を有するように改変された微生物は、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性が、非改変株に比べて増大している。

[0074] 先にピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの酵素活性を高めるように細菌の改変を行った後に、L-アミノ酸生産能を付与してもよい。なお、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性の増強は、前記したような、遺伝子の発現を増強する方法によって行うことができる。すなわち、プロモーター改変を始めとする発現調節領域改変などによる、内因性ピルビン酸シンターゼ遺伝子、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子の発現増強によるものであってもよいし、ピルビン酸シンターゼ遺伝子、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子を含むプラスミドの細菌への導入、またはこれらの遺伝子の細菌染色体への導入などによる外因性ピルビン酸シンターゼ遺伝子の発現増強であってもよい。

[0075] 本発明における「ピルビン酸シンターゼ」とは、アセチル-CoAとCO_2からピルビン酸を生成する下記の反応を、電子供与体存在下、例えばフェレドキシンあるいはフラボドキシン存在下で可逆的に触媒する酵素(EC 1.2.7.1)を意味する。ピルビン酸シンターゼは、PSと略称されることもあり、ピルビン酸オキシドレダクターゼ、ピルビン酸フェ

レドキシンオキシドレダクターゼ、ピルビン酸フラボドキシンオキシドレダクターゼ、または、ピルビン酸オキシドレダクターゼと命名されている場合もある。電子供与体としては、フェレドキシンまたはフラボドキシンを用いることが出来る。

[0076] 還元型フェレドキシン + アセチル-CoA + CO_2 → 酸化型フェレドキシン + ピルビン酸 + CoA

[0077] ピルビン酸シンターゼの活性が増強されたことの確認は、増強前の微生物と、増強後の微生物より粗酵素液を調製し、そのピルビン酸シンターゼ活性を比較することにより達成される。ピルビン酸シンターゼの活性は、例えば、Yoonらの方法(Yoon, K. S. et al. 1997. Arch. Microbiol. 167: 275-279)に従って測定できる。例えば、電子受容体としての酸化型メチルビオロゲンとCoAと粗酵素液を含む反応液にピルビン酸を添加した際に、ピルビン酸の脱炭酸反応によって増大する還元型メチルビオロゲンの量を分光学的に測定することによって、測定可能である。酵素活性1ユニット(U)は1分間あたり1 μ molのメチルビオロゲンの還元量で表される。親株がピルビン酸シンターゼ活性を有している場合、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。また親株がピルビン酸シンターゼ活性を有していない場合には、ピルビン酸シンターゼ遺伝子を導入することにより、ピルビン酸シンターゼが生成されていればよいが、酵素活性が測定できる程度に強化されていることが好ましく、好ましくは0.001U/mg(菌体タンパク質)以上、より好ましくは0.005U/mg以上、さらに好ましくは0.01U/mg以上が望ましい。ピルビン酸シンターゼは、酸素に対して感受性であり、一般的に活性発現や測定は困難であることも多い(Buckel, W.and Golding, B. T. 2006. Ann. Rev. of Microbiol. 60: 27-49)。したがって、酵素活性の測定に際しては、実施例に記載したように、反応容器中の酸素濃度を低下させて酵素反応を行うことが好ましい。

[0078] ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子は、クロロビウム・テピダム(Chlorobium tepidum)、ハイドロジェノバクター・サーモファイラス(Hydrogenobacter thermophilus)等、還元的TCAサイクルを持つ細菌のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することが可能である。また、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)をはじめとする、腸内細菌群に属する細菌由来のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することも可能である。さらに

、ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子は、メタノコッカス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)、メタノカルドコッカス・ジャナスチ(Methanocaldococcus jannaschii)、メタノサーモバクター・サーマトトロフィカス(Methanothermobacter thermautotrophicus)などの独立栄養性メタン生成古細菌(autotrophic methanogens)のピルビン酸シンターゼ遺伝子を利用することが可能である。

[0079] 具体的には、クロロビウム・テピダム(Chlorobium tepidum)のピルビン酸シンターゼ遺伝子として、クロロビウム・テピダムのゲノム配列(GenBank Accession No. NC_002932)の塩基番号1534432～1537989に位置する、配列番号1に示す塩基配列を有する遺伝子を例示することができる。配列番号2には、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. AAC76906)。また、ハイドロジェノバクター・サーモファイラスのピルビン酸シンターゼは、δサブユニット(GenBank Accession No. BAA95604)、αサブユニット(GenBank Accession No. BAA95605)、βサブユニット(GenBank Accession No. BAA95606)、γサブユニット(GenBank Accession No. BAA95607)の4つのサブユニットによる複合体を形成していることが知られている(Ikeda, T. et al. 2006. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340: 76-82)。さらに、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)のゲノム配列(GenBank Accession No. NC 000915)の塩基番号1170138～1173296番に位置するHP1108、HP1109、HP1110、HP1111の4つの遺伝子からなるピルビン酸シンターゼ遺伝子、スルフォロバス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)のゲノム配列(GenBank Accession No. NC 002754)の塩基番号1047593～1044711番で示されるSSO1208、SSO7412、SSO1207、SSO1206の4つの遺伝子でコードされるピルビン酸シンターゼ遺伝子を例示することができる。さらに、ピルビン酸シンターゼ遺伝子は、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、クロロビウム(Chlorobium)属、デスルホバクター(Desulfobacter)属、アクイフェクス(Aquifex)属、ハイドロジェノバクター(Hydrogenobacter)属、サーモプロテウス(Thermoproteus)属、パイロバキュラム(Pyrobaculum)属細菌等からクローニングされるものであってもよい。

[0080] エシェリヒア・コリにおいては、K-12株のゲノム配列(GenBank Accession No. U00096)の塩基番号1435284～1438808に位置する、配列番号3に示す塩基配列を有する

ydbK遺伝子(b1378)が、配列上の相同性からピルビン酸フラボドキシンオキシドレダクターゼ、すなわちピルビン酸シンターゼをコードしていると予想されている。配列番号4には、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. AAC76906)。実施例に示したように、この遺伝子産物がピルビン酸シンターゼ活性を有し、同遺伝子の発現強化により、L-アミノ酸生産能が向上することが実証された。さらに、ピルビン酸シンターゼ遺伝子は、エシェリヒア・コリのピルビン酸シンターゼ遺伝子(ydbK)と高い相同性を有する、エシェリヒア属、サルモネラ属(Salmonella)、セラチア属(Serratia)、エンテロバクター属(Enterobacter)、シゲラ属(Shigella)、サイトロバクター属(Citrobacter)などの腸内細菌群に属するピルビン酸シンターゼ遺伝子であってもよい。

[0081] メタノコッカス・マリパルディス(Methanococcus maripaludis)のピルビン酸シンターゼは、メタノコッカス・マリパルディスのゲノム配列(GenBank Accession No. NC_005791)(Hendrickson, E. L. et al. 2004. J. Bacteriol. 186: 6956-6969)の塩基番号1462535～1466397に位置するporCDABEFオペロンにコードされている(Lin, W. C. et al. 2003. Arch. Microbiol. 179: 444-456)。このピルビン酸シンターゼは、γ、α、β、及びδの4つのサブユニットを含んでおり、これらのサブユニットに加えて、PorE及びPorFもピルビン酸シンターゼの活性に重要であることが知られている(Lin, W. and Whitman, W. B. 2004. Arch. Microbiol. 181: 68-73)。γサブユニットは、ゲノム配列の塩基番号1465867～1466397(相補鎖)のporA遺伝子にコードされており、配列番号56にその塩基配列を、配列番号57に同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988626)。δサブユニットは、ゲノム配列の塩基番号1465595～1465852(相補鎖)porB遺伝子にコードされており、配列番号58にその塩基配列を、配列番号59に同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988627)。αサブユニットは、ゲノム配列の塩基番号1464410～1465573(相補鎖)のporC遺伝子にコードされており、配列番号60にはその塩基配列を、配列番号61に同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988625)。βサブユニットは、ゲノム配列の塩基番号1463497～1464393(相補鎖)のporD遺伝子にコードされており、配列番号62にはその塩基配列を、配列番号63に同遺伝子が

コードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988624)。PorEは、ゲノム配列の塩基番号1462970～1463473(相補鎖)のporE遺伝子にコードされており、配列番号64にはその塩基配列を、配列番号65に同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988623)。PorFは、ゲノム配列の塩基番号1462535～1462951(相補鎖)のporF遺伝子にコードされており、配列番号66にはその塩基配列を、配列番号67に同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. NP_988622)。

独立栄養性のメタン生成古細菌のメタノカルドコッカス・ジャナスチ(Methanocaldococcus jannaschii)、メタノサーモバクター・サーマトトロフィカス(Methanothermobacter thermautotrophicus)なども同じ遺伝子構造のピルビン酸シンターゼ遺伝子を有していることが知られており、これらを利用することが可能である。

[0082] 本発明における「ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ」とは、アセチル-CoAとCO_2からピルビン酸を生成する下記の反応を、電子供与体存在下、例えばNADPHあるいはNADH存在下で可逆的に触媒する酵素(EC 1.2.1.15)を意味する。ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼは、PNOと略称されることもあり、ピルビン酸デヒドロゲナーゼと命名されている場合もある。しかしながら、本発明において「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性」というときは、後述するように、ピルビン酸を酸化的に脱炭酸し、アセチル-CoAを生成する反応を触媒する活性であり、この反応を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)は、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼとは別の酵素である。ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼは、電子供与体としては、NADPHあるいはNADHを用いることが出来る。

[0083] $NADPH + アセチル\text{-}CoA + CO_2 \rightarrow NADP^+ + ピルビン酸 + CoA$

[0084] ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増強されたことの確認は、増強前の微生物と、増強後の微生物より粗酵素液を調製し、そのピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を比較することにより達成される。ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性は、例えば、Inuiらの方法(Inui, H. et al. 1987. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135)に従って測定できる。例えば、電子受容体としての酸化型メチルビオロゲンとCoAと粗酵素液を含む反応液に、ピルビン酸を添加した際にピルビン酸の

脱炭酸反応によって増大する還元型メチルビオロゲンの量を分光学的に測定することによって、測定可能である。酵素活性1ユニット(U)は1分間あたり1μmolのメチルビオロゲンの還元量で表される。親株がピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有している場合、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。また親株がピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有していない場合には、ピルビン酸シンターゼ遺伝子を導入することにより、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼが生成されていればよいが、酵素活性が測定できる程度に強化されていることが好ましく、好ましくは0.001U/mg(菌体タンパク質)以上、より好ましくは0.005U/mg以上、さらに好ましくは0.01U/mg以上が望ましい。ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼは、酸素に対して感受性であり、一般的に活性発現や測定は困難であることも多い(Inui, H. et al. 1987. J. Biol. Chem. 262: 9130-9135; Rotte, C. et al. 2001. Mol. Biol. Evol. 18: 710-720)。失活などの理由により活性が測定できない場合には、実施例に記載したように、ウエスタンブロッティング等の手法によりタンパク質の発現を確認することが可能である。

[0085] ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、光合成真核微生物で原生動物にも分類されるユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis)のピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子(Nakazawa, M. et al. 2000. FEBS Lett. 479: 155-156)、原生生物クリプトスポルジウム・パルバム(Cryptosporidium parvum)のピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子(Rotte, C. et al. 2001. Mol. Biol. Evol. 18: 710-720)の他、珪藻タラシオシラ・スードナナ(Tharassiosira pseudonana)にも相同な遺伝子が存在する

ことが知られている(Ctrnacta, V. et al. 2006. J. Eukaryot. Microbiol. 53: 225-231)。

[0086] 具体的には、ユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis)のピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子として、配列番号5に示す塩基配列を有する遺伝子を例示することができる(GenBank Accession No. AB021127)。配列番号6には、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. BAB12024)。

[0087] 本発明の微生物は、ピルビン酸シンターゼの活性に必要な電子供与体の酸化型を

還元型にリサイクルする活性が、親株、例えば野生株や非改変株と比べて増大するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物でもよい。電子供与体の酸化型を還元型にリサイクルする活性としては、フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ活性を挙げることができる。また、電子供与体のリサイクル活性の増強に加えて、ピルビン酸シンターゼ活性が増大するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物でもよい。なお、上記親株は、本来内在的に電子供与体のリサイクル活性をコードする遺伝子を有しているものであってもよいし、本来は電子供与体のリサイクル活性を有さないが、当該活性をコードする遺伝子を導入することにより活性が付与され、L-アミノ酸生産能が向上するものであってもよい。

[0088] 「フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ」とは、以下の反応を可逆的に触媒する酵素(EC 1.18.1.2)をいう。

[0089] 還元型フェレドキシン + $NADP^+$ → 酸化型フェレドキシン + NADPH + H^+

[0090] 本反応は、可逆反応であり、NADPHと酸化型フェレドキシン存在下で、還元型フェレドキシンを産生することが可能である。フェレドキシンはフラボドキシンと代替可能でありフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼと命名されているものも同等の機能を有する。フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼは微生物から高等生物まで幅広く存在が確認されており(Carrillo, N. and Ceccarelli, E. A. 2003. Eur. J. Biochem. 270: 1900-1915; Ceccarelli, E. A. et al. 2004. Biochim. Biophys. Acta. 1698: 155-165参照)、フェレドキシン-$NADP^+$オキシドレダクターゼ、NADPH-フェレドキシンオキシドレダクターゼと命名されているものもある。

[0091] フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼの活性が増強されたことの確認は、改変前の微生物と、改変後の微生物より粗酵素液を調製し、そのフェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ活性を比較することにより達成される。フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼの活性は、例えば、Blaschkowskiらの方法(Blaschkowski, H. P. et al. 1982. Eur. J. Biochem. 123: 563-569)に従って測定できる。例えば、基質としてフェレドキシンを用い、減少するNADPH量を分光学的に測定することによって測定可能である。酵素活性1ユニット(U)は1分間あたり1 μ molのNADPHの酸化

量で表される。親株がフェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ活性を有している場合、親株の活性が十分高ければ、増強する必要はないが、親株と比較して、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上酵素活性が上昇していることが望ましい。

[0092] フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼをコードする遺伝子は、多くの生物種で見出されており、目的のL-アミノ酸生産株中で活性を有するものであれば使用することが可能である。エシェリヒア・コリではフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼとしてfpr遺伝子が同定されている(Bianchi, V. et al. 1993. J. Bacteriol. 175:1590-1595)。また、シュードモナス・プチダ(Psuedomonas putida)には、NADPH-プチダレドキシンレダクターゼ(Putidaredoxin reductase)遺伝子とプチダレドキシン(Putidaredoxin)遺伝子がオペロンとして存在することが知られている(Koga, H. et al. 1989. J. Biochem. (Tokyo) 106: 831-836)。

[0093] エシェリヒア・コリのフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼとしては、エシェリヒア・コリK-12株のゲノム配列(GenBank Accession No. U00096)の塩基番号4111749～4112495(相補鎖)に位置する、配列番号7に示す塩基配列を有するfpr遺伝子を例示することができる。配列番号8にはFprのアミノ酸配列を示した(GenBank Accession No. AAC76906)。また、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム配列(GenBank Accession No. BA00036)の塩基番号2526234～2527211にフェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ遺伝子が見出されている(GenBank Accession No. BAB99777)。

[0094] ピルビン酸シンターゼの活性には、フェレドキシン又はフラボドキシンが電子供与体として存在することが必要である。従って、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変することによって、ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された微生物であってもよい。

また、ピルビン酸シンターゼ活性、又は、フラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼ及びピルビン酸シンターゼ活性が増強するように改変することに加えて、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変してもよい。

[0095] 本発明における「フェレドキシン」とは、非ヘム鉄原子(Fe)と、硫黄原子を含み、4Fe-4S、3Fe-4S、あるいは、2Fe-2Sクラスターと呼ばれる鉄-硫黄クラスターを結合したタ

ンパク質で1電子の伝達体として機能するものを指す。「フラボドキシン」とはFMN(Flavin-mononucleotide)を補欠分子属として含む1あるいは2電子の伝達体として機能するものタンパク質を指す。フェレドキシンとフラボドキシンについては、McLeanらの文献に記載されている(McLean, K. J. et al. 2005. Biochem. Soc. Trans. 33: 796-801)。

[0096] なお、改変に用いる親株は、本来内在的にフェレドキシン又はフラボドキシンをコードする遺伝子を有しているものであってもよいし、本来はフェレドキシン又はフラボドキシン遺伝子を有さないが、フェレドキシン又はフラボドキシン遺伝子を導入することにより活性が付与され、L-アミノ酸生産能が向上するものであってもよい。

[0097] フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が親株、例えば野生株や非改変株と比べて向上していることの確認は、フェレドキシン又はフラボドキシンのmRNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認できる。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular CloningA Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。発現量については、野生株あるいは非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

[0098] また、フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が親株、例えば野生株や非改変株と比べて向上していることの確認は、SDS-PAGEや二次元電気泳動あるいは、抗体を用いたウェスタンブロットによって検出することが出来る(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。生産量については、野生株あるいは非改変株と比較して、向上していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

[0099] フェレドキシン及びフラボドキシンの活性は、適切な酸化還元反応系に加えることで測定することが可能である。例えば、Boyerらにより、産生されたフェレドキシンをフェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼにより還元し、生じた還元型フェレドキシンによるチトクロームCの還元を定量する方法が開示されている(Boyer, M. E. et al. 2006. Biotec

hnol. Bioeng. 94: 128-138)。また、フラボドキシンの活性は、フラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼを用いることで、同じ方法で測定が可能である。

[0100] フェレドキシン、又はフラボドキシンをコードする遺伝子は、広く分布しており、コードされるフェレドキシン又はフラボドキシンがピルビン酸シンターゼと電子供与体再生系が利用可能なものであれば、どのようなものでも用いることができる。例えば、エシェリヒア・コリには、2Fe-2Sクラスターを有するフェレドキシンをコードする遺伝子としてfdx遺伝子が存在し(Ta, D. T. and Vickery, L. E. 1992. J. Biol. Chem. 267:11120-11125)、4Fe-4Sクラスターを有するフェレドキシン遺伝子としてyfhL遺伝子が予想されている。また、フラボドキシン遺伝子としては、fldA遺伝子(Osborne, C. et al. 1991. J. Bacteriol. 173: 1729-1737)とfldB遺伝子(Gaudu, P. and Weiss, B. 2000. J. Bacteriol. 182:1788-1793)の存在が知られている。コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム配列(GenBank Accession No. BA00036)においては、塩基番号562643～562963番に複数のフェレドキシン遺伝子fdx(GenBank Accession No. BAB97942)及び塩基番号1148953～1149270番にfer(GenBank Accession No. BAB98495)が見出されている。また、クロロビウム・テピダムにおいては、多くのフェレドキシン遺伝子が存在するが、ピルビン酸シンターゼの電子受容体となる4Fe-4S型のフェレドキシン遺伝子としてフェレドキシンI及びフェレドキシンIIが同定されている(Yoon, K. S. et al. 2001. J. Biol. Chem. 276: 44027-44036)。ハイドロジェノバクター・サーモファイラス等、還元的TCAサイクルを持つ細菌由来のフェレドキシン遺伝子あるいはフラボドキシン遺伝子を用いることもできる。

[0101] 具体的には、エシェリヒア・コリのフェレドキシン遺伝子として、エシェリヒア・コリK-12株のゲノム配列(GenBank Accession No. U00096)の塩基番号2654770～2655105番(相補鎖)に位置する配列番号9に示すfdx遺伝子、及び塩基番号2697685～2697945番に位置する配列番号11に示すyfhL遺伝子を例示することができる。配列番号10及び配列番号12には、Fdx及びYfhLのアミノ酸配列を示した(それぞれ、GenBank Accession No. AAC75578及びAAC75615)。エシェリヒア・コリのフラボドキシン遺伝子としては、エシェリヒア・コリK-12株のゲノム配列(GenBank Accession No. U00096)の塩基番号710688～710158番(相補鎖)に位置する配列番号13に示すfldA遺伝子、

及び塩基番号3037877～3038398 番に位置する配列番号15に示すfldB遺伝子を例示することができる。配列番号14及び配列番号16には、fldA遺伝子及びfldB遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した(それぞれ、GenBank Accession No. AAC73778及びAAC75933)。

[0102] クロロビウム・テピダム(Chlorobium tepidum)のフェレドキシン遺伝子としては、クロロビウム・テピダムのゲノム配列(GenBank Accession No. NC_002932)の塩基番号1184078～1184266番に位置する配列番号17に示すフェレドキシンI遺伝子、及び塩基番号1184476～1184664番に位置する配列番号19に示すフェレドキシンII遺伝子を例示することができる。配列番号18及び配列番号20には、フェレドキシンI及びフェレドキシンIIがコードするアミノ酸配列を示した(それぞれ、GenBank Accession No. AAM72491及びAAM72490)。また、ハイドロジェノバクター・サーモファイラス(Hydrogenobacter thermophilus)のフェレドキシン遺伝子(GenBank Accession No. BAE02673)やスルフォロバス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)のゲノム配列中の塩基番号2345414～2345728番で示されるスルフォロバス・ソルファタリカスのフェレドキシン遺伝子を例示することができる。さらに、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、クロロビウム(Chlorobium)属、デスルホバクター(Desulfobacter)属、アクイフェクス(Aquifex)属、ハイドロジェノバクター(Hydrogenobacter)属、サーモプロテウス(Thermoproteus)属、パイロバキュラム(Pyrobaculum)属細菌等からクローニングされるものであってもよく、さらにはエンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、エルシニア属等のγ-プロテオバクテリア、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等のコリネ型細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等からクローニングされるものであってもよい。

[0103] これらのピルビン酸シンターゼ、フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ、フェレドキシン、フラボドキシンをコードする遺伝子(以後、総称して、本発明の遺伝子という)は、コードされるタンパク質の活性、すなわち、機能が損なわれない限り、その遺伝子のホモログや人為的な改変体等、保存的変異を有する遺伝子も使用することができる。すなわち、公知のタンパク質のアミノ酸配列、又は野生型のタンパク質のアミノ酸配

列において、1若しくは数個の位置で1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有する保存的バリアントをコードするものであってもよい。ここで、1若しくは数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、特に好ましくは1～5個である。

[0104] 上記変異は、機能的に変化しない中性変異である保存的置換が好ましい。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。

[0105] より具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、本発明の遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)によって生じるものも含まれる。

[0106] また、それぞれ本発明の遺伝子が導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したものでもよい。同様に本発明の遺伝子は、機能を有する限り、コードされるタンパク質のN末端側、及び／又は、C末端側が延長又は、削られていてもよい。例えば延長する長さは、アミノ酸残基で50以下、好ましくは20以下、より好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。

[0107] 上記のような保存的バリアントをコードする遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように塩基配列を改変することによって取得することができる。また、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては本発明の遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝子を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射するか、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンスルフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、本発明の遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutant又はvariant)によって生じるものも含まれる。これらの遺伝子が、機能を有するピルビン酸シンターゼ、フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ、フェレドキシン、又はフラボドキシンをコードしているかどうかは、例えば、これらの遺伝子をL-アミノ酸生産能を有する微生物に導入し、各遺伝子産物の活性を測定することによって確認できる。

[0108] 本発明の遺伝子は、上述の塩基配列を有するDNA、またはこれらの塩基配列を有するDNAから調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であり、かつピルビン酸シンターゼ、フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼ、フェレドキシン、又はフラボドキシンをコードするDNAであってもよい。

[0109] ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましく90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度、温度で、1回、より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。尚、本明細書において、「相同性」(homology)」は、「同一性」(identity)を指すことがある。

[0110] プローブは、本発明の遺伝子の一部の配列を有するものであってもよい。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応により作製することができる。なお、プローブに300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、上記の条件でハイブリダイズさせた後の洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

[0111] 上記の保存的バリアントに関する記載は、前記のL-アミノ酸生産能の付与について記載した酵素及び遺伝子にも適用される。

[0112] 上述のような本発明の遺伝子の発現を増強するための改変は、L-アミノ酸生産能の付与について記載した目的遺伝子の発現を増強する方法と同様にして行うことができる。本発明の遺伝子は、それらを保持する微生物の染色体DNAを鋳型にして、PCR法により取得することができる。

[0113] 例えば、クロロビウム・テピダムのピルビン酸シンターゼ遺伝子は、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号35、36に示すプライマーを用いて、クロロビウム・テピダムの染色体DNAを鋳型とするPCR法(polymerase chain reaction)法(White, T. J. et al. 1989. Trends Genet. 5: 185-189参照)によって、取得することができる。

エシェリヒア・コリのピルビン酸シンターゼ遺伝子は、配列番号3の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号38、39に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCRによって、取得することができる。

[0114] ユーグレナ・グラシリスのピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子は、配列番号5に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号40、41に示すプライマーを用いて、ユーグレナ・グラシリスの染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、取得することができる。

[0115] エシェリヒア・コリのフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼ遺伝子は、配列番号7の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号42、43に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、取得することができる。

[0116] エシェリヒア・コリのフェレドキシン遺伝子fdxは、配列番号9の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号44、45に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、取得することができる。

[0117] エシェリヒア・コリのフラボドキシン遺伝子fldAは、配列番号13の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、フラボドキシン遺伝子fldBは、配列番号15の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、エシェリヒア・コリの染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、各々取得することができる。

[0118] また、クロロビウム・テピダムのフェレドキシンI遺伝子は、配列番号17の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、フェレドキシンII遺伝子は、配列番号19の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、クロロビウム・テピダムの染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、各々取得することができる。

[0119] 他の微生物に由来する本発明の遺伝子も、上記の各遺伝子の配列情報、又は、その微生物において公知の遺伝子又はタンパク質の配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法、又は、前記配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法によって、微生物の染色体DNA又は染色体DNAライブラリーから、取得することができる。なお、染色体DNAは、DNA供与体である微生物から、例えば、斎藤、三浦の方法(Saito, H. and Miura, K. I. 1963. Biochem. Biophys. Acta, 72, 619-629; 生物工学実験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照)等により調製することができる。

[0120] 本発明の遺伝子、及びL-アミノ酸生合成系遺伝子の発現の増強は、上述したような方法により、形質転換や相同組み換えによって本発明の遺伝子のコピー数を高めたり、本発明の遺伝子の発現調節配列を改変したりすることによって達成することができる。また、本発明の遺伝子の発現の増強は、本発明の遺伝子の発現を上昇させるようなアクチベーターを増幅させるか、及び／又は、本発明の遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成出来る。

以下に、遺伝子の発現を増強する方法について説明する。

[0121] 1つ目の方法は、目的遺伝子のコピー数を高める方法である。例えば、目的遺伝子を適当なベクター上にクローニングし、得られたベクターを用いて宿主細菌を形質転

換することにより、該遺伝子のコピー数を高めることができる。

形質転換に用いるベクターとしては、使用する微生物で自律複製可能なプラスミドが挙げられる。例えば、腸内細菌群に属する微生物の中で自律複製可能なプラスミドとして、pUC19、pUC18、pBR322、RSF1010、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、pSTV28、pSTV29(pHSG、pSTVはタカラバイオ社より入手可能)、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218(pMWはニッポンジーン社より入手可能)等が挙げられる。また、コリネ型細菌用のプラスミドとしては、pAM330(特開昭58-67699号公報)、pHM1519(特開昭58-77895号公報)、pSFK6 (特開2000-262288号公報参照)、pVK7(米国特許出願公開明細書2003-0175912)、pAJ655、pAJ611、pAJ1844(特開昭58-192900号公報)、pCG1(特開昭57-134500号公報)、pCG2(特開昭58-35197号公報)、pCG4、pCG11(特開昭57-183799号公報)、pHK4(特開平5-7491号公報)などが挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。なお、プラスミドの代わりにファージDNAをベクターとして用いてもよい。

[0122] 形質転換法としては、例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A.,J. Mol. Biol. 1970, 53, 159-162)、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C. H. et al. 1997. Gene 1: 153-167)などが挙げられる。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S.and Choen, S.N., 1979. Mol. Gen. Genet. 168: 111-115; Bibb, M. J. et al. 1978. Nature 274: 398-400; Hinnen, A. et al. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933)も応用できる。また、電気パルス法(特開平2-207791号公報)によっても、微生物の形質転換を行うこともできる。

[0123] 遺伝子のコピー数を高めることは、目的遺伝子を微生物の染色体DNA上に多コピ

ー導入することによっても達成できる。微生物の染色体DNA上に遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して、相同組換え法(MillerI, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory)により行うことができる。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。さらに、Muファージを用いる方法(特開平2-109985号)で宿主染色体に目的遺伝子を組み込むこともできる。染色体上に目的遺伝子が転移したことの確認は、その遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行うことによって確認出来る。

[0124] 尚、遺伝子のコピー数を高める場合、目的遺伝子の産物の活性を増強できれば、コピー数は特に制限されないが、微生物がもともと目的遺伝子を有している場合は、2以上であることが好ましい。また、微生物が本発明の遺伝子をもともと有していない場合は、導入される遺伝子のコピー数は1であってもよいが、2以上であってもよい。

[0125] 2つ目の方法は、染色体DNA上またはプラスミド上において、目的遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を適切な強さのものに置換することによって目的遺伝子の発現を増強させる方法である。例えば、thrプロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、pLプロモーター、tacプロモーター等がよく用いられるプロモーターとして知られている。コリネ型細菌における高発現型プロモーターとしては、エロンゲーションファクターTu(EF-Tu)遺伝子tufのプロモーター、コシャペロニンGroES-シャペロニンGroEL、チオレドキシンレダクターゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターが挙げられる(WO2006/028063号公報、EP1697525号公報)。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、GoldsteinとDoiの論文(Goldstein, M. A. and Doi R. H. 1995. Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128)等に記載されている。

[0126] また、国際公開WO00/18935に開示されているように、遺伝子のプロモーター領域

に数塩基の塩基置換を導入し、適切な強度のものに改変することも可能である。発現調節配列の置換は、例えば、温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。エシェリヒア・コリや、パントエア・アナナティスに用いることが出来る、温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えばWO 99/03988号国際公開パンフレットに記載の温度感受性プラスミドpMAN997やその誘導体等が挙げられる。また、λファージのレッド・リコンビナーゼ(Red recombinase)を利用した「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A. and Wanner, B. L., 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645)や、Redドリブンインテグレーション法とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H. et al. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002))とを組合わせた方法(WO2005/010175号参照)等の直鎖状DNAを用いる方法によっても、発現調節配列の置換を行うことができる。なお、発現調節配列の改変は、上述したような遺伝子のコピー数を高める方法と組み合わせてもよい。

[0127] さらに、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによって、翻訳量を向上させることが可能である。

[0128] ピルビン酸シンターゼが複数のサブユニットからなる場合は、各々のサブユニットをコードする遺伝子の発現は、別個に増強してもよく、ポリシストロンとして同時に増強してもよい。また、遺伝子をベクターを用いて微生物に導入する場合、各サブユニットをコードする遺伝子は、単一のベクター分子に同時に担持させてもよく、異なるベクター分子に別個に担持させてもよい。また、遺伝子を染色体に挿入する場合も、各サブユニットをコードする遺伝子は、染色体上の同一部位に同時に挿入してもよく、異なる位置に別個に挿入してもよい。

[0129] また、本発明の微生物は、ピルビン酸シンターゼ、又はピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性の増強に加えて、マリックエンザイムの活性が低下していることが好ましい。本発明の微生物がエシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、又はセラチア属に属する細菌である場合は、特にマリックエンザイムの

活性を低下させることが好ましい。

[0130] 本発明において、マリックエンザイムの活性とは、リンゴ酸を酸化的に脱炭酸し、ピルビン酸を生成する反応を可逆的触媒する活性を意味する。上記反応は、NADPを電子受容体とするNADP型マリックエンザイム(malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) ($NADP^+$)とも表記される) (EC:1.1.1.40 b2463遺伝子(maeB遺伝子とも表記される) 配列番号54)、あるいは、NADを電子受容体とするNAD型マリックエンザイム(malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NAD+) とも表記される) (EC:1.1.1.38 sfcA遺伝子(maeA遺伝子とも表記される)配列番号52)の2種の酵素によって触媒される。マリックエンザイム活性の確認は、Bolognaらの方法(Bologna, F. P. et al. 2007. J. Bacteriol. 2007 189: 5937-5946)に従って測定することができる。

[0131] NADP-dependent malic enzyme : $NADP^+$ + malate → NADPH + CO_2 + pyruvate

NAD-dependent malic enzyme: NAD^+ + malate → NADH + CO_2 + pyruvate

[0132] 酵素活性の低下は、後述のピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性の低下と同様にして行うことができる。

[0133] 本発明においては、NADP型マリックエンザイムとNAD型マリックエンザイムの両方の活性を低下させることがより好ましく、特に、本発明の微生物がエシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、又はセラチア属に属する細菌である場合に、両方の型のマリックエンザイムの活性を低下させることが好ましい。

[0134] また、本発明の微生物は、ピルビン酸シンターゼ、又はピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性の増強に加えて、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下していることが好ましい。

[0135] 本発明において、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(以下、「PDH」ということがある)活性とは、ピルビン酸を酸化的に脱炭酸し、アセチル-CoA(acetyl-CoA)を生成する反応を触媒する活性を意味する。上記反応は、PDH(E1p:pyruvate dehydrogenase, EC:1.2.4.1 aceE遺伝子 配列番号46)、ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ(E2p:dihydrolipoyltransacetylase, EC:2.3.1.12 aceF遺伝子 配列番号48)、ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3:dihydrolipoamide dehydrogenase; EC:1.8.1.4 lpdA遺伝子 配

列番号50)の3種の酵素によって触媒される。すなわち、これらの3種類のサブユニットはそれぞれ以下の反応を触媒し、これら3つの反応を合わせた反応を触媒する活性をPDH活性という。PDH活性の確認は、VisserとStratingの方法(Visser, J. and Strating, M. 1982. Methods Enzymol. 89: 391-399)に従って測定することができる。

[0136] E1p: pyruvate + [dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase] lipoyllysine → [dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase] S-acetyldihydrolipoyllysine + CO_2

E2p: CoA + enzyme N6-(S-acetyldihydrolipoyl)lysine → acetyl-CoA + enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine

E3: protein N6-(dihydrolipoyl)lysine + NAD^+ → protein N6-(lipoyl)lysine + NADH + H^+

[0137] 酵素活性を低下させるには、具体的には、染色体上のPDHをコードする遺伝子、具体的にはaceE、aceF、及びlpdAの1又は2以上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、発現調節配列以外の非翻訳領域の改変によっても、遺伝子の発現量を低下させることができる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。また、遺伝子組換えにより、染色体上の酵素をコードする領域にアミノ酸置換(ミスセンス変異)を導入すること、また終始コドンを導入すること(ナンセンス変異)、あるいは一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入することによっても達成出来る(Wang, J. P. et al. 2006. J. Agric. Food Chem. 54: 9405-9410; Winkler, W. C. 2005. Curr. Opin. Chem. Biol. 9: 594-602; Qiu, Z. and Goodman, M. F. 1997. J. Biol. Chem. 272: 8611-8617; Wente, S. R. and Schachman, H. K. 1991. J. Biol. Chem. 266: 20833-20839)。

[0138] 本発明においては、相同組換えを利用して、染色体上の遺伝子の発現調節配列、例えばプロモーター領域、又はコード領域、もしくは非コード領域の一部又は全部を欠損させること、又はこれらの領域に他の配列を挿入することによって、細胞内の酵素活性を低下させることが好ましい。しかしながらPDH活性が低下するような改変であれば、X線もしくは紫外線を照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジ

ン等の変異剤による通常の変異処理による改変であってもよい。

[0139] 発現調節配列の改変は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上である。また、コード領域を欠失させる場合は、産生する酵素タンパク質の機能が低下又は欠失するのであれば、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域のいずれの領域であってもよく、コード領域全体であってよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の上流と下流のリーディングフレームは一致しないことが好ましい。

[0140] コード領域に他の配列を挿入する場合も、遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が、確実に酵素をコードする遺伝子を不活化することができる。挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、酵素タンパク質の機能を低下又は欠損させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子やL-アミノ酸生産に有用な遺伝子を搭載したトランスポゾン等が挙げられる。

[0141] 染色体上の遺伝子を上記のように改変するには、例えば、遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能する酵素タンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAで細菌を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子に置換することによって達成できる。欠失型遺伝子によってコードされる酵素タンパク質は、生成したとしても、野生型酵素タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は、前述のRedドリブンインテグレーション法、Redドリブンインテグレーション法とλファージ由来の切り出しシステムとを組合わせた方法等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミド、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスイサイドベクターを利用する方法（米国特許第6303383号、または特開平05-007491号）などによって行うことができる。

上記PDHの活性低下に関する記載は、前述した他の酵素の「活性の低下」、又は他の遺伝子の「破壊」にも、適用することできる。

[0142] また、本発明の微生物は、嫌気または微好気の条件で培養を行う場合には、ピルビ

ン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性の増強に加えて、嫌気または微好気の条件で有機酸またはエタノールを産生しないように改変された微生物であってもよい。ここで有機酸としては、乳酸、ギ酸、酢酸が挙げられる。有機酸またはエタノールを産生しないように改変する方法としては、ラクテートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を破壊する方法が挙げられる(Verumi, G. N. et al. 2002. J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 28: 325-332、特開2005-95169)。

[0143] また、本発明の微生物は、脂肪酸を炭素源として含む培地で培養する場合は、脂肪酸資化能力が高められていてもよい。脂肪酸資化能を高める手段としてには、例えば、fadR遺伝子の発現弱化もしくは欠損、脂肪酸資化に関与するfadL、fadE、fadD、fadB、及び/又はfadA遺伝子の発現増強、又はシトクロムbo型酸化酵素複合体(cytochrome bo terminal oxidase complex)の各サブユニットをコードする遺伝子群(Gennis, R. B. and Stewart, V. 1996. p. 217-261. In F. D. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C; Chepuri et al. 1990. J. Biol. Chem. 265: 11185-11192)であるcyoABCDEの発現増強等が挙げられる。

[0144] 「fadR遺伝子」は、腸内細菌群に見出される脂肪酸代謝を調節するDNA結合能を有する転写因子FadRをコードする遺伝子(DiRusso, C. C. et al. 1992. J. Biol. Chem. 267: 8685-8691; DiRusso, C. C. et al. 1993. Mol. Microbiol. 7: 311-322)であり、エシェリヒア・コリのfadR遺伝子は、エシェリヒア・コリのゲノム配列(Genbank Accession No. U00096)の塩基番号1234161～1234880に位置する、配列番号82に示す塩基配列を有する遺伝子を例示することができる。配列番号83には、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示した。

[0145] <2>本発明のL-アミノ酸の製造方法

本発明の方法は、本発明の微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を培地中または菌体内に生成蓄積させ、該培地または菌体よりL-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法である。

[0146] ここで本発明の方法は、回分培養(batch culture)、流加培養(Fed-batch culture)、連続培養法(continuous culture)のいずれも用いることができ、培地中のエタノール

または脂肪酸は初発培地に含まれていてもよいし、流加培地に含まれていてもよいし、これらの両方に含まれていてもよい。

[0147] ここで、本発明において上記流加培養とは、培養容器に培地を連続的または間欠的に流加し、培養終了時までその培地を容器から抜き取らない培養方法をいう。また連続培養とは、培養容器に培地を連続的または間欠的に流加するとともに容器から培地(通常、流加する培地と等量)を抜き取る方法をいう。また、初発培地とは、流加培養または連続培養において流加培地を流加させる前の回分培養(batch培養)に用いる培地(培養開始時の培地)のことを意味し、流加培地とは流加培養または連続培養を行う際に発酵槽に供給する培地を意味する。また、回分培養(batch培養)とは、一回毎に新たな培地を用意し、そこへ株を植えて収穫まで培地を加えない方法を意味する。

[0148] 炭素源としては、脱炭酸反応を伴わずにアセチルCoAを産生し得るものが好ましく、具体的には、エタノール、脂肪酸、あるいは、分解により脂肪酸を生じる油脂を含む脂肪酸エステル等が挙げられる。以下、前記炭素源としてエタノール又は脂肪酸を用いる場合について例示する。

[0149] エタノールは、分子式C_2H_5OHで表される一価のアルコールであり、純粋な物質としても利用されるし、エタノール発酵などで生じた培養液中のエタノール等、エタノールを含む混合物をそのまま用いることも可能である。

[0150] 脂肪酸は、一般式C_mH_nCOOHで表される一価のカルボン酸である。L-アミノ酸生産能を有する細菌に利用されうるものであれば、どんな鎖長でも構わず、どのような鎖長の脂肪酸をどのような比率で含んでいても構わない。好ましい脂肪酸は、オレイン酸($C_{17}H_{33}COOH$)及びパルミチン酸($C_{15}H_{31}COOH$)であり、オレイン酸が特に好ましい。オレイン酸は油脂の加水分解でオレイン酸を含む長鎖脂肪酸の混合物を得ることが可能である。本発明に用いられるオレイン酸は、パーム油などの油脂の加水分解物として得ることが可能で、動物油、植物油、廃食油やその他の混合油脂や、チョコレート等の脂肪分を含む食品から抽出されたもののいずれを用いてもよい。また、脂肪酸は、遊離の酸として利用可能であるが、ナトリウムやカリウムなどとのアルカリ金属塩あるいは、アンモニウム塩として用いることも可能である。

[0151] 本発明の方法で使用する培地に含まれるエタノール又は脂肪酸の量は、本発明の方法に使用する細菌が炭素源として資化できる限り幾らでもよいが、培地中に単独の炭素源として添加する場合、20w/v%以下、好ましくは10w/v%以下、さらに好ましくは2w/v%以下含むことが好ましい。また、エタノールまたは脂肪酸は培地中に炭素源として資化できるだけ含まれていればいずれでもよいが、培地中に単独の炭素源として添加する場合、0.001w/v%以上、好ましくは0.05w/v%以上、さらに好ましくは0.1w/v%以上含まれていることが望ましい。

[0152] また、流加培地として使用する場合は、エタノール又は脂肪酸を単独の炭素源として添加する場合、培地中に10w/v%以下、好ましくは5w/v%以下、さらに好ましくは1w/v%以下含むことが好ましく、0.001w/v%以上、好ましくは0.05w/v%以上、さらに好ましくは0.1w/v%以上含むことが好ましい。

[0153] なお、エタノールの濃度は、様々な方法で測定することが可能であるが、酵素法による測定が、簡便かつ一般的である(Swift, R. 2003. Addiction 98: 73-80)。脂肪酸の濃度は、ガスクロマトグラフィやHPLCなどの一般的な方法で測定することが可能である(Lehotay, S. J. and Hajslova, J. TrAC Trends Anal. Chem. 2002. 21: 686-697; Lin, J. T. et al. 1998. J. Chromatogr. A. 808: 43-49)。

[0154] さらに本発明の培地には、エタノールと脂肪酸を混合して添加してもよい。エタノールと脂肪酸の添加濃度は、本発明の方法に使用する細菌がこれらの脂肪酸を炭素源として資化できる限り幾らでもよいが、培地中にエタノールと脂肪酸の混合物のみを炭素源として添加する場合、あわせて20w/v%以下、好ましくは10w/v%以下、さらに好ましくは2w/v%以下含まれることが好ましい。また、エタノールと脂肪酸の混合物は、培地中に本発明に使用する細菌が炭素源として資化できるだけ含まれていればいずれでもよいが、培地中にエタノールと脂肪酸の混合物のみを炭素源として添加する場合、オレイン酸とあわせて0.001w/v%以上、好ましくは0.05w/v%以上、さらに好ましくは0.1w/v%以上含まれていることが望ましい。

[0155] また、エタノールと脂肪酸の混合比率は、本発明の方法に使用する細菌が炭素源として資化できる濃度であればいずれでもかまわないが、エタノール1に対して脂肪酸を2以下、好ましくは1.5以下、特に好ましくは1以下程度の割合で混合する。下

限は、脂肪酸を混合していればいずれでもよいが、エタノール1に対して、0．05以上、望ましくは0．1以上混合していることが好ましい。

[0156] さらに、本発明の方法に使用する培地には、エタノールもしくは脂肪酸、またはエタノールと脂肪酸の両方に加え、他の炭素源を添加してもよい。好ましいのは、グルコース、フラクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、廃糖蜜、澱粉加水分解物などの糖類、グリセロールなどの多価アルコール類、フマール酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類である。特にグルコース、スクロース、フルクトース、グリセロールが好ましい。グリセロールとしてバイオディーゼル燃料生産において産生される粗グリセロールを使用することもできる。炭素源は、1種でもよく、2種以上の混合物であってもよい。なお他の炭素源を用いる場合には、炭素源中のエタノールもしくは脂肪酸、またはエタノールと脂肪酸の混合物の比率は10重量%以上、好ましくは30重量%以上、より好ましくは50重量%以上であることが好ましい。

[0157] なお、本発明において、エタノールあるいは脂肪酸は、培養の全工程において一定濃度含まれてもよいし、流加培地のみあるいは初発培地のみに添加されていてもよく、その他の炭素源が充足していれば、一定時間エタノール又は脂肪酸が不足している期間があってもよい。一時的とは、例えば発酵全体の時間のうち10%、20%、最大で30%の時間で脂肪酸が不足していてもよい。

[0158] 培地中に添加するその他の成分としては、炭素源に加えて、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。本発明の培地中に含まれる窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ウレア等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができ、pH調整に用いられるアンモニアガス、アンモニア水も窒素源として利用できる。また、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンスティープリカー、大豆加水分解物等も利用出来る。培地中にこれらの窒素源を1種のみ含まれていてもよいし、2種以上含んでいてもよい。これらの窒素源は、初発培地にも流加培地にも用いることができる。また、初発培地、流加培地とも、同じ窒素源を用いてもよいし、流加培地の窒素源を初発培地と変更してもよい。

[0159] 本発明の培地には、炭素源、窒素源の他にリン酸源、硫黄源が含まれていることが

好ましい。リン酸源としては、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、ピロリン酸などのリン酸ポリマー等が利用出来る。また、硫黄源とは、硫黄原子を含んでいるものであればいずれでもよいが、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の硫酸塩、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が望ましく、なかでも硫酸アンモニウムが望ましい。

[0160] また、培地には、炭素源、窒素源、硫黄源の他に、増殖促進因子(増殖促進効果を持つ栄養素)が含まれていてもよい。増殖促進因子とは、微量金属類、アミノ酸、ビタミン、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用できる。微量金属類としては、鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等が挙げられ、ビタミンとしては、ビタミンB_1、ビタミンB_2、ビタミンB_6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB_{12}等が挙げられる。これらの増殖促進因子は初発培地に含まれていてもよいし、流加培地に含まれていてもよい。

[0161] また、培地には、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。特に本発明に用いることができるL-リジン生産菌は、後述のようにL-リジン生合成経路が強化されており、L-リジン分解能が弱化されているものが多いので、L-スレオニン、L-ホモセリン、L-イソロイシン、L-メチオニンから選ばれる1種又は2種以上を添加することが望ましい。初発培地と流加培地は、培地組成が同じであってもよく、異なっていてもよい。また、初発培地と流加培地は、培地組成が同じであってもよく、異なっていてもよい。さらには、流加培地の流加が多段階で行われる場合、各々の流加培地の組成は同じであってもよく、異なっていてもよい。

[0162] 培養は、発酵温度20～45℃、特に好ましくは33～42℃で通気培養を行うことが好ましい。ここで酸素濃度は、5～50%に、望ましくは10%程度に調節して行う。また、pHを5～9に制御し、通気培養を行うことが好ましい。培養中にpHが下がる場合には、例えば、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス、アンモニア水等のアルカリで中和することができる。このような条件下で、好ましくは10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-アミノ酸が蓄積される。蓄積されるL-アミノ酸の濃度は野生株より高く、培地中から採取・回収できる濃度であればいずれでもよい

が、50g/L以上、望ましくは75g/L以上、さらに望ましくは100g/L以上である。

[0163] 目的アミノ酸が塩基性アミノ酸である場合は、培養中のpHが6．5～9．0、培養終了時の培地のpHが7．2～9．0となるように制御し、発酵中の発酵槽内圧力が正となるように制御する、あるいは又は、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給して、培地中の重炭酸イオン及び／または炭酸イオンが少なくとも2g／L以上存在する培養期があるようにし、前期重炭酸イオン及び／または炭酸イオンを塩基性アミノ酸を主とするカチオンのカウンタイオンとする方法で発酵し、目的の塩基性アミノ酸を回収する方法で製造を行ってもよい（特開2002-065287号参照）。

[0164] 培養終了後の培養液からL-アミノ酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、イオン交換樹脂法及び沈殿法や、培養液から遠心分離等によって菌体を除去した後に、濃縮晶析することによって採取される。

[0165] 本発明においては、L-アミノ酸蓄積を一定以上に保つために、微生物の培養を種培養と本培養とに分けて行ってもよく、種培養をフラスコ等を用いたしんとう培養、又は回分培養で行い、本培養を流加培養、又は連続培養で行ってもよく、種培養、本培養ともに回分培養で行ってもよい。

[0166] 本発明において、流加培養、あるいは連続培養を行う際には、一時的にエタノールあるいは脂肪酸またはその他の炭素源の流加が停止するように間欠的に流加培地を流加してもよい。また、流加を行う時間の最大で30％以下、望ましくは20％以下、特に望ましくは10％以下で流加培地の供給を停止することが好ましい。流加培養液を間欠的に流加させる場合には、流加培地を一定時間添加し、2回目以降の添加はある添加期に先行する添加停止期において発酵培地中の炭素源が枯渇するときのpH上昇または溶存酸素濃度の上昇がコンピューターで検出されるときに開始するように制御を行い、培養槽内の基質濃度を常に自動的に低レベルに維持してもよい（米国特許5,912,113号明細書）。

[0167] 流加培養に用いられる流加培地は、エタノールまたは脂肪酸とその他の炭素源及び増殖促進効果を持つ栄養素（増殖促進因子）を含む培地が好ましく、発酵培地中の脂肪酸濃度が一定以下になるように制御してもよい。ここで一定濃度以下とは、10w/v%以下、好ましくは5w/v%以下、さらに好ましくは1w/v%以下になるように添加する

培地を調製することを意味する。

[0168] その他の炭素源としては、グルコース、スクロース、フルクトース、グリセロールが好ましく、増殖促進因子としては、窒素源、リン酸、アミノ酸等が好ましい。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ウレア等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができる。またリン酸源としては、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウムが使用でき、アミノ酸としては、栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。また、流加培地は1種でもよく、2種以上の培地を混合してもよい。2種以上の流加培地を用いる場合、それらの培地は混合して1つのフィード缶により流加させてもよいし、複数のフィード缶で流加させてもよい。

[0169] 本発明で連続培養法を用いる場合には、引き抜きは流加と同時に行ってもよいし、一部引き抜いたあとで流加を行ってもよい。また培養液をL-アミノ酸と細胞を含んだまま引き抜いて、細胞だけ発酵槽に戻す菌体を再利用する連続培養法でもよい(フランス特許2669935号明細書参照)。連続的あるいは間欠的に栄養源を流加する方法は流加培養と同様の方法が用いられる。

[0170] 菌体を再利用する連続培養法とは、予定したアミノ酸濃度に達したときに、発酵培地を間欠的にあるいは連続して引き抜き、L-アミノ酸のみを取り出し、菌体を含むろ過残留物を発酵槽中に再循環させる方法であり、例えばフランス特許2669935号明細書を参照にして実施することができる。

[0171] ここで、培養液を間欠的に引き抜く場合には、予定したL-アミノ酸濃度に到達したときに、L-アミノ酸を一部引き抜いて、新たに培地を流加して培養を行うとよい。また、添加する培地の量は、最終的に引き抜く前の培養液量と同量になるように設定することが好ましい。ここで同量とは、引き抜く前の培養液量と93～107%の程度の量を意味する。

[0172] 培養液を連続的に引き抜く場合には、栄養培地を流加させると同時に、あるいは流加させたあとに引き抜きを開始することが望ましく、例えば引き抜き開始時間としては流加を始めてから5時間以内、望ましくは3時間以内、さらに望ましくは1時間以内である。また引き抜く培養液量としては、流加させる量と同量で引き抜くことが好ましい。

実施例

[0173] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれにより制限されるものではない。

[0174] 〔実施例1〕＜エシェリヒア・コリ由来のアルコールデヒドロゲナーゼ(AdhE)変異株の構築＞

エシェリヒア・コリが、好気的にエタノールを資化出来るようにアルコールデヒドロゲナーゼAdhEの変異体の取得を行った。エシェリヒア・コリ由来の野生型AdhE遺伝子(adhe)の塩基配列とコードされるアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号21と配列番号22に示した。

[0175] ＜1-1＞エシェリヒア・コリMG1655::P_{L-tac}adhE株の構築

エシェリヒア・コリadhE遺伝子のプロモーター領域のP_{L-tac}による置換は、DatsenkoとWannerによって開発された「Red-driven integration」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645)とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H. et al. 2002. J. Bacteriol. 184: 5200-5203)によって実施した。

[0176] 本手法により目的とする遺伝子の一部を合成オリゴヌクレオチドの5'側に、抗生物質耐性遺伝子の一部を3'側にそれぞれデザインした合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて得られたPCR産物を用いて、一段階で遺伝子組み換え株を構築することができる。さらにλファージ由来の切り出しシステムを組み合わせることにより、遺伝子組み換え株に組み込んだ抗生物質耐性遺伝子を除去することが出来る。

[0177] P_{L-tac}とクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子をコードするcat遺伝子を含む断片を国際特許出願WO2006/043730記載のエシェリヒア・コリMG1655P_{L-tac}xylE株のゲノムを鋳型として、配列番号23と配列番号24に示したプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。配列番号23のプライマーはadhE遺伝子の上流領域に相補的な配列を含み、配列番号24のプライマーはadhE遺伝子の5'領域に相補的な配列を含んでいる。

[0178] P_{L-tac}の配列を配列番号25に示した。PCRにはGene Amp PCR System 2700 amplificatory (Applied Biosystems)とTaq DNA polymerase (Fermentas社)を用いた。得られ

た増幅断片をアガロースゲル電気泳動で精製、回収した。この断片を温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を保持するエシェリヒア・コリMG1655/pKD46株にエレクトロポレーションにより導入した。プラスミドpKD46(Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645)は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御されるλRed相同組換えシステムのRed レコンビナーゼをコードする遺伝子(γ、β、exo遺伝子)を含むλファージの合計2154塩基のDNAフラグメント(GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459、第31088番目～33241番目)を含む。プラスミドpKD46はPCR産物をMG1655株の染色体に組み込むために必要である。

[0179] 増幅したPCR産物をアガロースゲル電気泳動で精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリMG1655株にエレクトロポレーションにより導入した。エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。すなわち、100mg／Lのアンピシリンを含んだLB培地(トリプトン10g/L、Yeast extract 5g/L、NaCl 10g/L)中で30℃、一晩培養したMG1655/pKD46株を、アンピシリン(100mg/L)とL-アラビノース(10mM)を含んだ5mLのLB培地で100倍希釈した。得られた希釈物を30℃で通気しながらOD600が約0.6になるまで生育させた後、100倍に濃縮し、10%グリセロールで3回洗浄することによってエレクトロポレーションに使用できるようにした。エレクトロポレーションは70μLのコンピテントセルと約100ngのPCR産物を用いて行った。エレクトロポレーション後のセルは1mLのSOC培地(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)を加えて37℃で1時間培養した後、37℃でCm(クロラムフェニコール)(40mg/L)を含むLB寒天培地(トリプトン10g/L、Yeast extract 5g/L、NaCl 10g/L、寒天15g/L)上で平板培養し、Cm耐性組換え体を選択した。

[0180] Cm耐性株を2%エタノールを含むM9プレート培地(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)に植菌し、37℃、2-3日の培養で生育してきた株から約100クローンを選び、さらに、2%エタノールを含むM9プレート培地にて37℃で培養し、36時間以内に生育してきた株を選択した。これらの株のCm^R遺伝子とプロモーター領域の配列を調べるため、配列番号26と配列番号27に示したプライマーを用いてPCR法による増

幅を行った。adhE遺伝子のプロモーター領域にCm^R遺伝子を含んでいることが確認されたクローンの一つから、温度感受性プラスミドpKD46を37℃で培養することにより除去して、MG1655::P_{L-tac}adhE株を得た。

[0181] ＜1-2＞エシェリヒア・コリMG1655ΔadhE株の構築

エシェリヒア・コリMG1655(ATCC 700926)野生型のadhE遺伝子を、DatsenkoとWannerによって開発された方法により不活性型adhE遺伝子に置き換えた。カナマイシン耐性(Kan^R)遺伝子をコードするkan遺伝子を含む断片をプラスミドpACYC177 (GenBank/EMBL accession number X06402、Fermentas社)を鋳型として、配列番号28と配列番号29に示したプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。配列番号28のプライマーはadhE遺伝子の318 bp上流の領域に40塩基の相補的な配列を含み、配列番号29のプライマーはadhE遺伝子の3'側の領域に41塩基の相補的な配列を含んでいる。PCRにはGene Amp PCR System 2700 amplificatory (Applied Biosystems)とTaq DNA polymerase (Fermentas社)を用いた。得られた増幅断片をアガロースゲル電気泳動で精製、回収した。この断片をプラスミドpKD46を保持するエシェリヒア・コリMG1655/pKD46株にエレクトロポレーションにより導入した。

[0182] 20 μg/mlカナマイシンを含むLBプレート培地(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)上に生育してきたクローンのKm^R遺伝子の存在を確認するため、配列番号30と配列番号31に示したプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。adhE遺伝子領域にKm^R遺伝子を含んでいることが確認されたクローンの一つから、温度感受性プラスミドpKD46を37℃で培養することにより除去して、MG1655ΔadhE株を得た。

[0183] ＜1-3＞変異型アルコールデヒドロゲナーゼ($AdhE^*$)の構築

Glu568Lys (E568K)変異をAdhEに導入するため、adhE遺伝子の塩基配列の1662-1701と1703-1730に相補的で、1702位の塩基にg→aの変異が入った配列番号32に示したプライマーと、adhE遺伝子の塩基配列の3'末端側領域に相同的な配列番号33に示したプライマーを用いて、エシェリヒア・コリMG1655株ゲノムを鋳型としてPCRを行った。PCRにはGene Amp PCR System 2700 amplificatory (Applied Biosystems)と

Pyrobest DNA polymerase (宝酒造)を用いた。得られた1.05 kbpの増幅断片をアガロースゲル電気泳動で精製、回収した。

[0184] エシェリヒア・コリMG1655::P_{L-tac}adhE株ゲノムを鋳型として、配列番号34に示したプライマーと変異の導入された1.05 kbpの断片をプライマーとしてPCRを行った。配列番号34のプライマーは、adhE遺伝子の開始コドンから402-425 bp上流に位置するプライマーである。PCRにはGene Amp PCR System 2700 amplificatory (Applied Biosystems)とTaKaRa LA DNA polymerase (宝酒造)を用いた。得られた4.7 kbpの増幅断片をアガロースゲル電気泳動で精製、回収した。

[0185] 野生型のadhE遺伝子領域を変異型adhE遺伝子と組み換えるため、Cm^R遺伝子とP_{L-tac}下流の変異型adhE遺伝子を含む 4.7 kbp断片(cat-P_{L-tac}adhE*)を、DatsenkoとWannerの方法を用いて、MG1655 ΔadhE/pKD46株にエレクトロポレーションにより導入した。得られたクローンは2%エタノールを唯一の炭素源として含むM9プレート培地上で選抜した。生育してきたクローンのadhE遺伝子の配列を決定したところ、アミノ酸置換を伴う変異としてGlu568Lys (gag-aag)、Ile554Ser (atc-agc)、Glu22Gly (gaa-gga)、Met236Val (atg-gtg)、Tyr461Cys (tac-tgc)、及びAla786Val (gca-gta)が同定され、本クローンをMG1655::P_{L-tac}adhE*株と名付けた。

[0186] エシェリヒア・コリMG1655::P_{L-tac}adhE*株をドナーとして、$P1_{vir}$ファージをMG1655 Δtdh rhtA*株に感染させるP1トランスダクション(Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY)により、エタノール資化性を有するL-スレオニン生産株MG1655 Δtdh rhtA* P_{L-tac}adhE*株を得た。MG1655 Δtdh rhtA*株は、MG1655株より、DatsenkoとWannerの方法により、スレオニンデヒドロゲナーゼをコードするtdh遺伝子が破壊され、rhtA遺伝子に最小培地中で高濃度のスレオニンに対する耐性株VL614rhtA23(Livshits, V. A. et al. 2003. Res. Microbiol. 154:123-135)由来のrhtA23変異がP1トランスダクションにより導入されたL-スレオニン生産株である。

[0187] ＜1-4＞エシェリヒア・コリWC196 Δmez株由来アルコールデヒドロゲナーゼ(AdhE)変異株の構築

L-リジン生産菌にエタノール資化性を付与するため、MG1655 Δtdh rhtA* P_{L-tac}adh

E*株をドナーとして国際特許公報WO2005/010175に記載のL-リジン生産菌WC196ΔmezpCABD2株にP1トランスダクションを行い、エタノール資化性を有するL-リジン生産株WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2株を得た。WC196Δmez株は、リンゴ酸酵素(マリックエンザイム)をコードするsfcA及びb2463遺伝子が破壊されたWC196株である(WO2005/010175)。pCABD2は、米国特許No. 6,040,160に記載のL-リジンによるフィードバック阻害耐性であるdapA*遺伝子、L-リジンによるフィードバック阻害耐性であるlysC*遺伝子、dapB遺伝子、及びddh遺伝子を搭載したプラスミドである。

[0188] 〔実施例2〕<クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築と活性測定>

[0189] <2-1>クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築

クロロビウム・テピダムは、至適生育温度が48℃の中高温性独立栄養細菌であり、クロロビウム・テピダムTLS株のゲノム配列がEisenらによって明らかにされている(Eisen, J. A. et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 9509-9514)。この菌株からピルビン酸シンターゼ遺伝子を単離し、発現するプラスミドを構築した。

[0190] <2-2>クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株のピルビン酸シンターゼ活性の測定

クロロビウム・テピダムTLS株(ATCC49652)の染色体を鋳型として、配列番号35、36に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、ピルビン酸シンターゼ遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片をSacIで切断し、pSTV28(タカラバイオ社製)のSacI部位に挿入してプラスミドを構築し、pSTV-PSと名付けた。BigDye Terminator s v1.1 Cycle Sequencing Kitを使用してピルビン酸シンターゼ遺伝子の全長にPCRエラーがないことを確認した後、pSTV-PSからピルビン酸シンターゼ遺伝子をSacIで切り出してpMW-PthrのSacI部位に挿入し、ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現用プラスミドpMW-Pthr-PSを構築した。pMW-PthrはベクターpmW219(ニッポンジーン社製)のHindIIIサイトとXbaIサイトの間にエシェリヒア・コリK-12株のスレオニンオペロン(thrABC)のプロモーター領域(Pthr)を有しており、このプロモーターの下流に遺伝子をクローニングすることによって遺伝子発現が可能なプラスミドである。用いたスレオニ

ンオペロンのプロモーター配列を配列番号37に示した。

[0191] WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2に、pMW-Pthr-PS、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株を、WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr-PS、対照株をWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0192] 上述の株を20mg/Lのストレプトマイシン、及び40mg/Lのカナマイシンを含んだLB培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。菌体を遠心分離により回収し、50mM HEPES緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。懸濁液を超音波破砕機で破砕し、15000rpmで15分間遠心した後、得られた上清を粗酵素液とした。

粗酵素液中のタンパク質濃度をプロテインアッセイCBB溶液(ナカライテスク社製)を用いて測定し、250μg総タンパク質分の粗酵素液を活性測定に供した。

[0193] 活性測定は、以下のようにして行った。下記の反応溶液2mLに粗酵素液を加えて反応を行った。まず基質となるピルビン酸以外を全て含んだ反応溶液を分光測定用セルに加え、ゴム栓とアルミキャップを用いてセルを密閉した。シリンジを用いてアルゴンガスを5分間セルの中に吹き込みセル内の酸素濃度を低下させた後に、セルを分光光度計(日立社製U-3210 Spectrophotometer)にセットし、シリンジを用いてピルビン酸溶液を添加して反応を開始した。37℃で30分反応を行い、経時的に578nmの吸光度を測定することにより、還元型メチルビオロゲンの量の変化をみた。結果を表1に示す。表中、比活性の単位はU/mg proteinである。1Uは1分間当たり1nmolのメチルビオロゲンを還元する活性と定義した。

[0194] 〔反応液〕

$MgCl_2$	1mM
Dithiothreitol	1mM
メチルビオロゲン	5mM
CoA	0.25mM
ピルピン酸	10mM (測定開始直前に添加)
HEPES (pH8.0)	50mM

[0195] [表1]

表1

プラスミド	比活性
pMW-Pthr	0.0
pMW-Pthr-PS	1.2

[0196] 〔実施例3〕＜クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子増幅プラスミドの構築＞

ピルビン酸シンターゼ活性に必要な補酵素再生系として、エシェリヒア・コリ由来のフラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子とエシェリヒア・コリ由来のフェレドキシン遺伝子を用いて、これらの遺伝子とピルビン酸シンターゼ遺伝子の3つの遺伝子を同時に発現するプラスミドを構築した。エシェリヒア・コリのフェレドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子としてはfpr遺伝子、エシェリヒア・コリのフェレドキシン遺伝子としてはfdx遺伝子を用いた。

[0197] ＜3-1＞エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655株の染色体を鋳型として、配列番号42、43に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子断片を増幅した。遺伝子断片をSmaIで切断し、pMW-PthrのSmaI部位に挿入し、フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅用プラスミドを構築し、pMW-Pthr-fprと名付けた。

[0198] ＜3-2＞エシェリヒア・コリ由来フェレドキシンfdx遺伝子増幅プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655株の染色体を鋳型として、配列番号44、45に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、フェレドキシンfdx遺伝子断片を増幅した。遺伝子断片をEcoRIで切断し、pMW-PthrのEcoRI部位に挿入し、フェレドキシンfdx遺伝子増幅用プラスミドpMW-Pthr-fdxを構築した。

[0199] ＜3-3＞クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ

由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、フェレドキシンfdx遺伝子増幅用プラスミドの構築

pMW-Pthr-fprをSmaIで切断し、得られたfpr遺伝子断片を、pMW-Pthr-fdxをSmaIで処理したものと連結してpMW-Pthr-fpr-fdxを得た。次にpMW-Pthr-PSをSacIで切断し、得られたPS遺伝子断片を、pMW-Pthr-fpr-fdxをSacIで処理したものと連結して、クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、フェレドキシンfdx遺伝子発現増強プラスミドpMW-Pthr-fpr-PS-fdxを構築した。

[0200] 上記の各プラスミドにおいて、クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子はPthrによって、他の遺伝子もPthrからのリードスルーによって転写される。

[0201] 〔実施例4〕＜クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

[0202] ＜4-1＞クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子増幅プラスミドのWC196ΔmezΔ株への導入

WC196ΔmezΔ/pCABD2に、pMW-Pthr-fpr-PS-fdx、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現株を、WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-PS-fdx、対照株をWC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0203] ＜4-2＞クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW Pthr、WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-PS-f

dxの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のオレイン酸培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に72時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液中の生菌数についても計測した。2連の培養の平均値を表2に示す。クロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0204] 〔オレイン酸培地組成〕

オレイン酸ナトリウム 20g/L

Tween80 5g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

カナマイシン 40mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分、炭酸カルシウムは180℃、2時間以上乾熱滅菌。オレイン酸ナトリウムとTween80は混合し、殺菌して添加。$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。カナマイシン、ストレプトマイシンも別添加。

[0205] [表2]

表2

菌株	L-リジン(g/L)	生菌数(10^8/mL)
WC196Δmez/pCABD2/pMW-Pthr	1.77	22.3
WC196Δmez/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-PS-fdx	2.35	13.6

[0206] 〔実施例5〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築と活性測定＞

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムに見いだされているピルビン酸シンターゼ遺伝子と相同性を有するydbK遺伝子の発現プラスミドを構築し、活性を測定した。

[0207] ＜5-1＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655株の染色体を鋳型として、配列番号38、39に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、ピルビン酸シンターゼ遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片をKpnIで切断し、pSTV28（タカラバイオ社製）のKpnI部位に挿入してプラスミドを構築し、pSTV-ydbKと名付けた。BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitを使用してピルビン酸シンターゼ遺伝子の全長にPCRエラーがないことを確認した後、pSTV-ydbKからピルビン酸シンターゼ遺伝子をKpnIで切り出してpMW-PthrのKpnI部位に挿入し、ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現用プラスミドpMW-Pthr-ydbKを構築した。

[0208] ＜5-2＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株のピルビン酸シンターゼ活性の測定

WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2に、pMW-Pthr-ydbK、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株を、WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr-ydbK、対照株をWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0209] 上述の株を20mg/Lのストレプトマイシン、及び40mg/Lのカナマイシンを含んだLB培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。菌体を遠心分離により回収し、実施例2に記載のクロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株の活性測定法と同じ方法で、活性を測定した。結果を表3に示す。対照株WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthrではピルビン酸シンターゼの活性は確認されなかったが、エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr-ydbKでは8.0U/mgの活性が確認された。結果を表3に示す。比活性の単位は表1と同様である。

[0210] [表3]

表3

プラスミド	比活性
pMW-Pthr	0.0
pMW-Pthr-ydbK	8.0

[0211] 〔実施例6〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現プラスミドの構築＞

実施例3に記載のエシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子を含むプラスミドpMW-Pthr-fprをSmaIで切断し、得られたfpr遺伝子断片を、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子を含むプラスミドpMW-Pthr-fdxをSmaIで処理したものと連結してpMW-Pthr-fpr-fdxを得た。次にpMW-Pthr-ydbKをKpnIで切断し、得られたydbK遺伝子断片を、pMW-Pthr-fpr-fdxをKpnIで処理したものと連結して、エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、フェレドキシンfdx遺伝子発現増強プラスミドpMW-Pthr-fpr-ydbK-fdxを構築した。

[0212] 〔実施例7〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

[0213] ＜7-1＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子増幅プラスミドのWC196ΔmezadhE*株への導入

WC196ΔmezadhE*/pCABD2に、pMW-Pthr-fpr-ydbK-fdx、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子、ピルビン酸シンターゼ遺伝子、及びフェレドキ

シン遺伝子発現株を、WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-ydbK-fdx、対照株をWC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0214] ＜7-2＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthr、WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-ydbK-fdxの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩、培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のエタノール培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に96時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンと残存エタノールをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液の濁度についても測定した。

2連の培養の平均値を表4に示す。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-NADP$^+$リダクターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フェレドキシン遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0215] 〔エタノール培地組成〕

エタノール	20ml/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1g/L
$(NH_4)_2SO_4$	12g/L
KH_2PO_4	0.5g/L
酵母エキス	1g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g/L
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01g/L
カナマイシン	40mg/L
ストレプトマイシン	20mg/L
炭酸カルシウム	30g/L

pH7.0(KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。エタノール、カナマイシ

ン、ストレプトマイシンも別添加。

[0216] [表4]

表4

菌株	Lys(g/L)	EtOH(V/V%)	OD620
WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthr	2.47	0.00	14.7
WC196ΔmezP$_{L-tac}$adhE*/pCABD2/pMW-Pthr-fpr-ydbK-fdx	2.89	0.00	9.3

[0217] 〔実施例8〕＜ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現プラスミドの構築と発現の確認＞

ユーグレナ・グラシリスZ株は至適生育27℃の光合成原生生物である。これよりピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子を単離し、本遺伝子を発現するプラスミドを構築した。

[0218] ＜8-1＞ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現プラスミドの構築

ユーグレナ・グラシリスZ株(ATCC12894)よりRotteらの方法に従ってcDNAライブラリーを作製した(Rotte, C. et al. 2001. Mol. Biol. Evol. 18: 710-720)。本cDNAを鋳型として、配列番号40、41に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片KpnIで切断し、pUC19(タカラバイオ社製)のKpnI部位に挿入してプラスミドを構築し、pUC-PNOと名付けた。BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitを使用してピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子の全長にPCRエラーがないことを確認した後、pUC-PNOからピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼをKpnIで切り出してpMW-PthrのKpnI部位に挿入し、ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現用プラスミドpMW-Pthr-PNOを構築した。

[0219] ＜8-2＞ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現株のピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ発現の確認

WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2に、pMW-Pthr-PNO、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現株をWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pM

W-Pthr-PNO、対照株をWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW Pthrと名付けた。

[0220] 上述の株を20mg/Lのストレプトマイシン、及び40mg/Lのカナマイシンを含んだLB培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。培養液1mLを20mg/Lのストレプトマイシン、及び40mg/Lのカナマイシンを含んだLB培地20mLに接種し、37℃で5時間振とう培養した。菌体を遠心分離により回収し、1mLのPBSに懸濁した。懸濁液を超音波破砕機で破砕し、15000rpmで15分間遠心した後、得られた上清を粗抽出液とした。粗抽出液中のタンパク質濃度をプロテインアッセイCBB溶液(ナカライテスク社製)を用いて測定し、10μgのタンパク質を含む粗抽出液をサンプル調製に供した。サンプル調製は、粗抽出液にNuPAGE LDS サンプルバッファー(インビトロジェン社製)の濃度が1.1倍になるように加えた後、NuPAGE サンプルリデューシングエイジェント(インビトロジェン社製)を終濃度10%となるように加え、70℃で10分間加熱処理することで行った。調整したサンプルをNuPAGE Tris-Acetate ゲル3-8%(インビトロジェン社製)を用いて電気泳動した。マーカーとしてMagicMark XP Western Protein Standard(インビトロジェン社製)を使用した。

[0221] 電気泳動後のゲルをiBlot Gel Transfer Device(インビトロジェン社製)を用いてメンブレンに転写した。転写後のブロッキングから検出までの操作はWesternBreeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit(インビトロジェン社製)を用いて行った。まずメンブレンを30分間ブロッキング処理した後、純水で2回洗浄し、1000倍希釈した抗PNO血清溶液中にて1時間インキュベートした。メンブレンを洗浄液で3回洗浄し、二次抗体溶液中にて30分インキュベートした。メンブレンを洗浄液で3回洗浄し、さらに純水で2回洗浄した後、検出試薬をかけ、ルミノ・イメージアナライザーLAS-1000(富士フィルム社製)にて検出した。結果を図1に示す。WC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr-PNO株では200kD付近にPNOと推定されるバンドが検出された。一方、対照株のWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2/pMW-Pthr株ではそのようなバンドは検出されなかった。

[0222] 〔実施例9〕<ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果>

[0223] <9-1>ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝

子増幅プラスミドのWC196ΔmezΔ株への導入

WC196ΔmezΔ/pCABD2に、pMW-Pthr-PNO、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現株を、WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthr-PNO、対照株をWC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0224] ＜9-2＞ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthr、WC196ΔmezΔ/pCABD2/pMW-Pthr-PNOの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩、培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のオレイン酸培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に72時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液中の生菌数についても計測した。2連の培養の平均値を表5に示す。

ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸:NADP$^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0225] 〔オレイン酸培地組成〕

オレイン酸ナトリウム	20g/L
Tween80	5g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	12 g/L
KH_2PO_4	0.5g/L
酵母エキス	1g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g/L
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01g/L
カナマイシン	40mg/L
ストレプトマイシン	20mg/L
炭酸カルシウム	30g/L

pH7.0（KOHで調整） 殺菌条件：115℃、10分

オレイン酸ナトリウムとTween80は混合し、殺菌して添加。$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。カナマイシン、ストレプトマイシンも別添加。

[0226] [表5]

表５

菌株	Lys(g/L)	生菌数(10^8/mL)
WC196Δmez/pCABD2/pMW-Pthr	1.77	22.3
WC196Δmez/pCABD2/pMW-Pthr-PNO	2.41	15.9

[0227] 〔実施例10〕＜ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

＜10-1＞ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子増幅用プラスミドのWC196Δmez adhE*株への導入

WC196Δmez adhE*/pCABD2に、pMW-Pthr-PNO、比較対照用のベクターpMW-Pthrをエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、カナマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現株を、WC196Δmez adhE*/pCABD2/pMW-Pthr-PNO、対照株をWC196Δmez adhE*/pCABD2/pMW-Pthrと名付けた。

[0228] ＜10-2＞ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196Δmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-Pthr 、WC196Δmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-Pthr-PNOの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のエタノール培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に96時間培養した。培養96時間目に1mLをサンプリングし、培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5（王子計測機器）により測定した。また、培養液の濁度についても測定した。2連の培養の平均値を表6に示す。ユーグレナ・グラシリス由来ピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0229] 〔エタノール培地組成〕

エタノール 20ml/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12 g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

カナマイシン 40mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。エタノール、カナマイシン、ストレプトマイシンも別添加。

[0230] [表6]

表6

菌株	Lys (g/L)	EtOH(V/V%)	OD620
WC196ΔmezadhE*/pCABD2/pMW-Pthr	2.47	0.00	14.7
WC196ΔmezadhE*/pCABD2/pMW-Pthr-PNO	2.63	0.00	12.9

[0231] 〔実施例11〕<エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2の構築>

<11-1>エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔfadRの構築

エシェリヒア・コリの脂肪酸代謝を調節する転写因子FadRはfadR遺伝子(配列番号82)によってコードされている(DiRusso, C. C. et al. 1992. J. Biol. Chem. 267: 8685-8691)。エシェリヒア・コリのL-リジン生産株として国際特許公報WO2006/078039に記載のWC196ΔcadAΔldcC/pCABD2株よりfadR遺伝子の欠損株を構築した。

[0232] 脂肪酸代謝を調節する転写因子をコードするfadR遺伝子の欠失は、DatsenkoとWannerの方法(Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645)とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H. et al. 2002. J. Bact

eriol. 184: 5200-5203)によって行った。鋳型として、プラスミドpMW118-(λattL-Km^r-aλttR)(WO2006/093322)を用い、attLとattRの両端に対応する配列をプライマーの3'末端に、目的遺伝子であるfadR遺伝子の一部に対応するプライマーの5'末端に有する配列番号68及び69に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行った。

[0233] 増幅したPCR産物をアガロースゲル電気泳動で精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリWC196ΔcadAΔldcC株にエレクトロポレーションにより導入した。次に、pKD46プラスミドを除去するために、Km(カナマイシン)を含むLB寒天培地上、42℃で2回継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性を試験し、pKD46が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。アンピシリン感受性株の中からカナマイシン耐性遺伝子(kan)によって識別できるfadR遺伝子の欠失を、PCRによって確認した。得られたfadR欠損株をWC196ΔcadAΔldcCΔfadR::att-kan株と名づけた。

[0234] 次に、fadR遺伝子内に導入されたatt-kan遺伝子を除去するために、ヘルパープラスミド上述のpMW-intxis-ts(米国特許出願公開20060141586)を使用した。pMW-intxis-tsは、λファージのインテグラーゼ(Int)をコードする遺伝子、エクシジョナーゼ(Xis)をコードする遺伝子を搭載し、温度感受性の複製能を有するプラスミドである。

[0235] 上記で得られたWC196ΔcadAΔldcCΔfadR::att-kan株のコンピテントセルを常法に従って作製し、ヘルパープラスミドpMW-intxis-tsにて形質転換し、30℃で100 mg/Lのアンピシリンを含むLB寒天培地上にて平板培養し、アンピシリン耐性株を選択した。pMW-intxis-tsプラスミドを除去するために、LB寒天培地上、42℃で2回継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性、及びカナマイシン耐性を試験し、att-kan及びpMW-intxis-tsが脱落しているfadR破壊株であるカナマイシン、アンピシリン感受性株を取得した。この株をWC196ΔcadAΔldcCΔfadR株と名づけた。

[0236] <11-2>エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔfadRΔsfcAの構築

WC196ΔcadAΔldcCΔfadR株におけるsfcA遺伝子の欠失は、上記<11-1>の手法に則って、sfcA破壊用プライマーとして、配列番号70、71のプライマーを使用して

行った。これによって、WC196ΔcadAΔldcCΔfadRΔsfcA株を得た。

[0237] ＜11-3＞エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2の構築

WC196ΔcadAΔldcCΔfadRΔsfcA株におけるb2463遺伝子の欠失は、上記＜11-1＞の手法に則って、b2463破壊用プライマーとして、配列番号72、73のプライマーを使用して行った。これによって、WC196ΔcadAΔldcCΔfadRΔsfcAΔb2463株を得た。本株をWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR株と名づけた。この株にプラスミドpCABD2をエレクトロポレーションにより導入し、ストレプトマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。この株をWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株と名づけた

[0238] 〔実施例12〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現プラスミドの構築＞

＜12-1＞エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅用プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655株の染色体を鋳型として、配列番号42、43に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子断片を増幅した。遺伝子断片をSmaIで切断し、pMW-P_{L-tac}のSmaI部位に挿入し、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅用プラスミドを構築し、pMW-P_{L-tac}-fprと名付けた。pMW-P_{L-tac}は、WO2006/043730記載のエシェリヒア・コリMG1655P_{L-tac}xylE株のゲノムを鋳型として、配列番号84と配列番号85に示したプライマーを用いたPCR法により、P_{L-tac}を含む断片の増幅を行った後に、得られた遺伝子断片をHindIII及びSalIで切断後、同じくHindIII及びSalIで切断したpMW119（ニッポンジーン製）に挿入することにより構築したプラスミドである。本プラスミドではこのP_{L-tac}下流に遺伝子をクローニングし、発現させることが可能である。

[0239] ＜12-2＞エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現プラスミドへの、エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子の挿入

実施例5に記載したpSTV-ydbKからピルビン酸シンターゼ遺伝子ydbKをKpnIで切

り出してpMW-P_{L-tac}-fprのKpnI部位に挿入し、エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現プラスミドpMW-P_{L-tac}-fpr-ydbKを構築した。

[0240] 〔実施例13〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

＜13-1＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現プラスミドのWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株への導入

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株に、pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK、比較対照用のベクターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強株を、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK、対照株をWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0241] ＜13-2＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbKの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のオレイン酸培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に72時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5（王子計測機器）により測定した。また、培養液中の生菌数についても計測した。2連の培養の平均値を表7に示す。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0242] 〔オレイン酸培地組成〕

オレイン酸ナトリウム 10g/L

Tween80 5 g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

アンピシリン 100mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

オレイン酸ナトリウムとTween80は混合し、殺菌して添加。$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。カナマイシン、ストレプトマイシンも別添加。

[0243] [表7]

表7

菌株	Lys (g/L)	生菌数 (10^8/mL)
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}	3.17	6.00
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK	4.11	0.23

[0244] 〔実施例14〕<エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果>

<14-1>エシェリヒア・コリWC196ΔcadAΔldcC株由来アルコールデヒドロゲナーゼ(AdhE)変異株の構築

L-リジン生産菌にエタノール資化性を付与するため、MG1655ΔtdhrhtA*P_{L-tac}adhE*をドナーとしてL-リジン生産菌WC196ΔcadAΔldcC株にP1トランスダクションを行い、WC196ΔcadAΔldcCP_{L-tac}adhE*株を得た。

[0245] ＜14-2＞エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔsfcA P_{L-tac} adhE*の構築

WC196ΔcadAΔldcC adhE*株におけるsfcA遺伝子の欠失は、上記＜11-1＞の手法に則って、sfcA破壊用プライマーとして、配列番号70、71のプライマーを使用して行った。これによって、WC196ΔcadAΔldcCΔsfcA P_{L-tac} adhE*株を得た。

[0246] ＜14-3＞エシェリヒア・コリL-リジン生産株WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2の構築

WC196ΔcadAΔldcCΔsfcA adhE*株におけるb2463遺伝子の欠失は、上記＜11-1＞の手法に則って、b2463破壊用プライマーとして、配列番号72、73のプライマーを使用して行った。これによって、WC196ΔcadAΔldcCΔsfcAΔb2463 P_{L-tac} adhE*株を得た。本株をWC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*株と名づけた。この株にプラスミドpCABD2をエレクトロポレーションにより導入し、ストレプトマイシン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。この株をWC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2株と名づけた

[0247] ＜14-4＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現プラスミドのWC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2株への導入

WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2株に、pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK、比較対照用のベクターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強株を、WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK、対照株をWC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0248] ＜14-5＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}、WC196ΔcadAΔl

dcCΔmez P_{L-tac}adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbKの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のエタノール培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に120時間培養した。培養120時間目に1mLをサンプリングし、培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液の濁度についても測定した。2連の培養の平均値を表8に示す。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子、エシェリヒア・コリ由来フラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0249] 〔エタノール培地組成〕

エタノール 20mL/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

アンピシリン 100mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。エタノール、カナマイシン、ストレプトマイシンも別添加。

[0250] [表8]

表8

菌株	Lys (g/L)	EtOH (%V/V)	OD600
WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac}adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}	2.15	0.00	12.0
WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac}adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-fpr-ydbK	2.52	0.00	10.0

[0251] 〔実施例15〕<エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構

築と同遺伝子増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

＜15-1＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655株の染色体を鋳型として、配列番号74、75に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、ピルビン酸シンターゼ遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片をKpnIで切断し、pMW-P_{L-tac}のKpnI部位に挿入し、エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドpMW-P_{L-tac}-ydbKを構築した。

[0252] ＜15-2＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドのWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株への導入

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株に、pMW-P_{L-tac}-ydbK、比較対照用のベクターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株を、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-ydbK、対照株をWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0253] ＜15-3＞エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-ydbKの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のオレイン酸培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に72時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5（王子計測機器）により測定した。3連の培養の平均値を表9に示す。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0254] 〔オレイン酸培地組成〕

オレイン酸ナトリウム	10g/L
Tween80	5g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

アンピシリン 100mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

オレイン酸ナトリウムとTween80は混合し、殺菌して添加。$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。アンピシリン、ストレプトマイシンも別添加。

[0255] [表9]

表9

菌株	Lys (g/L)
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}	2.95
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-ydbK	4.05

[0256] 〔実施例16〕<メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ発現プラスミドの構築と活性測定>

<16-1>メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドの構築

メタノコッカス・マリパルディスATCC43000株の染色体を鋳型として、配列番号76、77に示されているオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、ピルビン酸シンターゼ遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片をSacIで切断し、pMW-P_{L-tac}のSacI部位に挿入し、メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドpMW-P_{L-tac}-MmPSを構築した。

[0257] <16-2>メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼの活性測定

エシェリヒア・コリJM109株(タカラバイオ)に、pMW-P_{L-tac}-MmPS、比較対照用のベク

ターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株をJM109/pMW-P_{L-tac}-MmPS、対照株をJM109/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0258] 上述の株を100mg/Lのアンピシリンを含んだLB培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。菌体を遠心分離により回収し、実施例2に記載のクロロビウム・テピダム由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株の活性測定法に従い活性を測定した。結果を表10に示す。対照株JM109/pMW-P_{L-tac}ではピルビン酸シンターゼの活性は確認されなかったが、メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現株JM109/pMW-P_{L-tac}-MmPSでは7.1U/mgの活性が確認された。比活性の単位は表1と同様である。

[表10]

表１０

プラスミド	比活性
pMW-P_{L-tac}	0.0
pMW-P_{L-tac}-MmPS	7.1

[0259] 〔実施例17〕＜メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子遺伝子発現増強のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

＜17-1＞メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現プラスミドのWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株への導入

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2株に、pMW-P_{L-tac}-MmPS、比較対照用のベクターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株を、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPS、対照株をWC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0260] ＜17-2＞メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強

のオレイン酸を炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}、WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPSの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のオレイン酸培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に72時間培養した。培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液中の生菌数についても計測した。3連の培養の平均値を表11に示す。メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0261] 〔オレイン酸培地組成〕

オレイン酸ナトリウム 10g/L

Tween80 5g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 12g/L

KH_2PO_4 0.5g/L

酵母エキス 1g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

アンピシリン 100mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0(KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

オレイン酸ナトリウムとTween80は混合し、殺菌して添加。$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。アンピシリン、ストレプトマイシンも別添加。

[0262] [表11]

表11

菌株	Lys (g/L)
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}	2.90
WC196ΔcadAΔldcCΔmezΔfadR/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPS	4.22

[0263] 〔実施例18〕＜メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果＞

＜18-1＞メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子遺伝子発現プラスミドのWC196ΔcadAΔldcCΔmez adhE*/pCABD2株への導入

WC196ΔcadAΔldcCΔmez adhE*/pCABD2株に、pMW-P_{L-tac}-MmPS、比較対照用のベクターpMW-P_{L-tac}をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入し、アンピシリン耐性を指標に形質転換体を取得し、プラスミドの導入を確認した。メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株を、WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPS、対照株をWC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}と名付けた。

[0264] ＜18-2＞メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-リジン生産能への効果

WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}、WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac} adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPSの両株をLBプレート培地に植菌して、37℃で一晩前培養した。プレート1/8枚分の菌体を500mL容坂口フラスコ中20mLの下記組成のエタノール培地に植菌し、37℃にて攪拌速度120rpmで好気的に96時間培養した。培養96時間目に1mLをサンプリングし、培地中に蓄積したL-リジンをバイオセンサーBF-5(王子計測機器)により測定した。また、培養液の濁度についても測定した。2連の培養の平均値を表12に示す。メタノコッカス・マリパルディス由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強株では対照に比してL-リジン蓄積の向上がみられた。

[0265] 〔エタノール培地組成〕

エタノール	20mL/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1g/L
$(NH_4)_2SO_4$	12g/L
KH_2PO_4	0.5g/L
酵母エキス	1g/L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L

アンピシリン 100mg/L

ストレプトマイシン 20mg/L

炭酸カルシウム 30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件:115℃、10分

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$と炭酸カルシウムはそれぞれ別殺菌し、添加。エタノール、アンピシリン、ストレプトマイシンも別添加。

[0266] [表12]

表１２

菌株	Lys (g/L)	EtOH (%V/V)	OD620
WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac}adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}	2.19	0.10	13.9
WC196ΔcadAΔldcCΔmez P_{L-tac}adhE*/pCABD2/pMW-P_{L-tac}-MmPS	2.67	0.14	12.0

[0267] 〔実施例19〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子高発現プラスミドpPL-ydbK3の構築＞

＜19－1＞エシェリヒア・コリMG1655 cat-PL-ydbK株の構築

エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子の高発現プラスミド作製のため、ゲノム上のydbK遺伝子のプロモーターをPLプロモーターに置換した。プロモーター置換は、DatsenkoとWannerの方法(Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645)とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H. et al. 2002. J. Bacteriol. 184: 5200-5203)によって行った。プライマーとしては、attRとydbK遺伝子の上流配列とBW25113 cat-PL-yddG 株ゲノム上のCm^r遺伝子に隣接して存在する領域の配列を有するydbK-attR(配列番号78)と、ydbK遺伝子の上流領域とBW25113 cat-PL-yddG 株ゲノムに存在するPLプロモーターの下流の領域の配列を有するPL-ydbK(配列番号79)を作製した。BW25113 cat-PL-yddG株については、欧州特許出願公開EP1449918A1あるいはロシア特許出願公開RU2222596に詳細に記載されている。BW25113 cat-PL-yddG株ゲノムを鋳型として、配列番号78及び79に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行った。得られたPCR産物はエシェリヒア・コリMG1655/pKD46株にエレクロポレーションにより導

入され、Cm耐性組換え体を選択した。pKD46を除去するため、Cmを含むLB平板培地に塗布され、42℃で培養を2度行った後、アンピシリン感受性株を選択した。こうして得られた株をMG1655 cat-PL-ydbK株と名付けた。

[0268] ＜19－2＞プラスミドpPL-ydbK3の構築

MG1655 cat-PL-ydbK株のゲノムをGenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich社)を用いて調製した。ゲノムDNAとプラスミドpMW119をSalIで切断した後、混合し連結した。反応液でMG1655株を形質転換し、Cm耐性株を選択した。cat-PL-ydbKの構築は、プラスミドDNAを鋳型とし、ydbKC1(配列番号80)とydbK CH2(配列番号81)をプライマーとしたPCRにより確認を行った。長さ11.2 kb の挿入を含むプラスミド pMW119 cat-PL-ydbK big-1を得た。プラスミドpMW119 cat-PL-ydbK big-1は制限酵素SmlI (New England Biolabs社)で切断した後、Klenov fragmentで標準的に処理した(Sambrook, J. et al. 1989. Molecular CloningA Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。pMW119をSmaIで切断した後、両プラスミドの切断物を混合し、連結した。反応液でMG1655株を形質転換して、Cm^r株を選択した。Cm耐性株よりプラスミドを抽出し、BamHI切断によって長さを確認した。こうして得られた6.7 kb のcat-PL-ydbK断片を有するプラスミド pPLydbK3を得た。

[0269] 〔実施例20〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-スレオニン生産能への効果＞

エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子の増幅のL-スレオニン生産能への効果を検討するため、実施例1にて作製したMG1655ΔtdhrhtA* P_{L-tac} adhE*をプラスミドpVIC40で形質転換した。プラスミドpVIC40は米国特許第5,705,371号に記載のL-スレオニン生産プラスミドである。MG1655ΔtdhrhtA* P_{L-tac} adhE* /pVIC40をさらにpPLydbK3で形質転換し、MG1655ΔtdhrhtA* P_{L-tac} adhE*/pVIC40/pPLydbK3株を得た。これらの株をnutrient brothで37℃にて18時間培養した後、0.1mlの培養液を20×200mmの試験管中 2 mlのL-スレオニン生産用エタノール培地に加え、32℃にて72時間旋回培養した。48時間目と72時間目に培地中のL-スレオニン量をbutanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1 (v/v)からなる移動層によるペーパークロマトグラフ

ィーを用いて調べた。アセトン溶液中2%ニンヒドリンを可視化試薬として用いた。L-スレオニンを含むスポットを切り取り0.5%の$CdCl_2$の水溶液中で溶出した後、540nmの吸収にて定量した。10本の試験管培養結果を表13に示した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強MG1655 Δtdh rhtA* P_{L-tac}adhE*/pVIC40/pPLydbK3は、非増強株MG1655 Δtdh rhtA* P_{L-tac}adhE*/pVIC40よりも高いL-スレオニン蓄積を示した。

[0270] 〔L-スレオニン生産用エタノール培地組成〕

Ethanol 20g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 22g/L

K_2HPO_4 2g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8g/L

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02g/L

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g/L

Thiamine hydrochloride 0.002g/L

Yeast extract 1.0g/L

$CaCO_3$ 30g/L

pH7.0、K_2HPO_4と$CaCO_3$はそれぞれ別殺菌し、添加。エタノールも別添加。

[0271] [表13]

表１３

菌株	48 hr		72 hr	
	OD_{550}	Thr (g/l)	OD_{550}	Thr (g/l)
MG1655 Δtdh rhtA* cat-P_{Ltac}-adhE*/pVIC40)	13.8±0.5	2.4±0.3	12.5	2.5±0.2
MG1655 Δtdh rhtA* cat-P_{Ltac}-adhE*/pVIC40/pPLydbK3	13.9±0.7	3.8±0.5	12.7	3.6±0.5

[0272] 〔実施例21〕＜エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強のエタノールを炭素源とした培養におけるL-バリン生産能への効果＞

エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強のL-バリン生産能に対する効果を検討するため、MG1655::P_{L-tac}adhE*株からL-バリン生産菌H-81株にP1トランスダクションを行いH-81 P_{L-tac}adhE*株を得た。さらにH-81 P_{L-tac}adhE*株をpPLydbK3で形質転換し、H-81 P_{L-tac}adhE*/pPLydbK3株を得た。これらの株をnutrient brot

hで37℃にて18時間培養した後、0.1mlの培養液を20×200mmの試験管中 2 mlのL-バリン生産用エタノール培地に加え、32℃にて72時間旋回培養した。48時間目と72時間目に培地中のL-バリン量をTLCにより定量した。0.11mmのSorbfilシリカゲルでコートされた蛍光試薬を含まない 10×15cmのTLCプレート(Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Russia)を用いて、propan-2-ol : ethylacetate : 25%アンモニア水 : 水 = 40 : 40 : 7 : 16 (v/v)からなる移動層により展開後、アセトン溶液中2%ニンヒドリンを可視化試薬として定量した。10本の試験管培養結果を表14に示した。エシェリヒア・コリ由来ピルビン酸シンターゼ遺伝子発現増強H-81 P_{L-tac} adhE*/pPLydbK3株は、非増強株H-81 P_{L-tac} adhE*株よりも高いL-バリン蓄積を示した。

[0273] L-バリン生産用エタノール培地

Ethanol 20g/L

$(NH_4)_2SO_4$ 15g/L

KH_2PO_4 1.5g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L

豆濃(総窒素として) 0.4g/L

$CaCO_3$ 25g/L

pH7.0、$CaCO_3$は別殺菌。エタノールも別添加。

[0274] [表14]

表１４

菌株	48 hr		72 hr	
	OD_{550}	Val (g/l)	OD_{550}	Val (g/l)
H-81 P_{Ltac}adhE*	5.5±0.5	1.1±0.1	12.4±0.6	1.6±0.1
H-81 P_{Ltac}adhE*/pPLydbK3	16.8±0.4	2.1±0.2	16.1±0.4	2.0±0.1

[0275] 〔配列表の説明〕

配列番号1:Chlorobium tepidumのピルビン酸シンターゼ遺伝子の塩基配列

配列番号2:Chlorobium tepidumのピルビン酸シンターゼのアミノ酸配列

配列番号3:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子(ydbK)の塩基配列

配列番号4:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ(YdbK)のアミノ酸配列

配列番号5:Euglena gracilisのピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子の塩

基配列

配列番号6:Euglena gracilisのピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼのアミノ酸配列

配列番号7:Escherichia coliのフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼ遺伝子(fpr)の塩基配列

配列番号8:Escherichia coliのフラボドキシン-$NADP^+$レダクターゼ遺伝子(fpr)がコードするアミノ酸配列

配列番号9:Escherichia coliのフェレドキシン遺伝子(fdx)の塩基配列

配列番号10:Escherichia coliのフェレドキシン遺伝子(fdx)がコードするアミノ酸配列

配列番号11:Escherichia coliのフェレドキシン遺伝子(yfhL)の塩基配列

配列番号12:Escherichia coliのフェレドキシン遺伝子(yhfL)がコードするアミノ酸配列

配列番号13:Escherichia coliのフラボドキシン遺伝子(fldA)の塩基配列

配列番号14:Escherichia coliのフラボドキシン遺伝子(fldA)がコードするアミノ酸配列

配列番号15:Escherichia coliのフラボドキシン遺伝子(fldB)の塩基配列

配列番号16:Escherichia coliのフラボドキシン遺伝子(fldB)がコードするアミノ酸配列

配列番号17:Chlorobium tepidumのフェレドキシンI遺伝子の塩基配列

配列番号18:Chlorobium tepidumのフェレドキシンI遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号19:Chlorobium tepidumのフェレドキシンII遺伝子の塩基配列

配列番号20:Chlorobium tepidumのフェレドキシンII遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号21:Escherichia coliのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(adhE)の塩基配列

配列番号22:Escherichia coliのアルコールデヒドロゲナーゼ(AdhE)のアミノ酸配列

配列番号23:P_{L-tac}とクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子増幅プライマー1

配列番号24:P_{L-tac}とクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子増幅プライマー2

配列番号25:P_{L-tac}の塩基配列

配列番号26:P_{L-tac}とクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子増幅プライマー3

配列番号27:P_{L-tac}とクロラムフェニコール耐性(Cm^R)遺伝子増幅プライマー4

配列番号28:カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子増幅プライマー1

配列番号29：カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子増幅プライマー2

配列番号30：カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子増幅プライマー3

配列番号31：カナマイシン耐性(Km^R)遺伝子増幅プライマー4

配列番号32：Escherichia coliの変異型アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号33：Escherichia coliの変異型アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号34：Escherichia coliの変異型アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子増幅プライマー3

配列番号35：Chlorobium tepidumのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号36：Chlorobium tepidumのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号37：Escherichia coliのスレオニンオペロンプロモーター配列

配列番号38：Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号39：Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号40：Euglena gracilisのピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号41：Euglena gracilisのピルビン酸：$NADP^+$オキシドレダクターゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号42：Escherichia coliのフラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅用プライマー1

配列番号43：Escherichia coliのフラボドキシン-$NADP^+$リダクターゼ遺伝子増幅用プライマー2

配列番号44：Escherichia coliのfdx遺伝子増幅用プライマー1

配列番号45：Escherichia coliのfdx遺伝子増幅用プライマー2

配列番号46：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼEp1サブユニット遺伝子（aceE）の塩基配列

配列番号47：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼEp1サブユニットのアミノ酸配列

配列番号48：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼE2サブユニット遺伝子（aceF）の塩基配列

配列番号49：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼE2サブユニットのアミノ酸配列

配列番号50：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼE3サブユニット遺伝子（lpdA）の塩基配列

配列番号51：Escherichia coliのピルビン酸デヒドロゲナーゼE3サブユニットのアミノ酸配列

配列番号52：Escherichia coliのNAD型マリックエンザイムをコードする遺伝子（sfcA）の塩基配列

配列番号53：Escherichia coliのsfcA遺伝子がコードするリンゴ酸酵素のアミノ酸配列

配列番号54：Escherichia coliのNADP型マリックエンザイムをコードする遺伝子（b2463）の塩基配列

配列番号55：Escherichia coliのb2463遺伝子がコードするリンゴ酸酵素のアミノ酸配列

配列番号56：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼγサブユニット遺伝子（porA）の塩基配列

配列番号57：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼγサブユニットのアミノ酸配列

配列番号58：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼδサブユニット遺伝子（porB）の塩基配列

配列番号59：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼδサブユニットのアミノ酸配列

配列番号60：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼαサブユニット遺伝子（porC）の塩基配列

配列番号61：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼαサブユニットのアミノ酸配列

配列番号62：Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼβサブユニット遺伝

子(porD)の塩基配列

配列番号63:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼβサブユニットのアミノ酸配列

配列番号64:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼporE遺伝子の塩基配列

配列番号65:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼPorEのアミノ酸配列

配列番号66:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼporF遺伝子の塩基配列

配列番号67:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼPorFのアミノ酸配列

配列番号68:fadR遺伝子破壊用PCRプライマー1

配列番号69:fadR遺伝子破壊用PCRプライマー2

配列番号70:sfcA遺伝子破壊用PCRプライマー1

配列番号71:sfcA遺伝子破壊用PCRプライマー2

配列番号72:b2463遺伝子破壊用PCRプライマー1

配列番号73:b2463遺伝子破壊用PCRプライマー2

配列番号74:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号75:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号76:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー1

配列番号77:Methanococcus maripaludisのピルビン酸シンターゼ遺伝子増幅プライマー2

配列番号78:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子プロモーター置換用増幅プライマー1

配列番号79:Escherichia coliのピルビン酸シンターゼ遺伝子プロモーター置換用増幅プライマー2

配列番号80:cat-PL-ydbK構造確認用プライマー1

配列番号81:cat-PL-ydbK構造確認用プライマー2

配列番号82:Escherichia coliのfadR遺伝子の塩基配列

配列番号83:Escherichia coliのFadRのアミノ酸配列

配列番号84:P_{L-tac}増幅プライマー1

配列番号85:P_{L-tac}増幅プライマー2

産業上の利用可能性

[0276] 本発明の微生物を用いることにより、L-アミノ酸を効率よく発酵生産することができる。また、本発明の方法は、好ましい形態においては、脱炭酸を抑制し、炭酸固定反応を利用することで、炭酸ガスの排出が低減できる、環境に配慮した方法である。

請求の範囲

[1] L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンからなる群より選ばれるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、ピルビン酸シンターゼ、または、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された微生物。

[2] ピルビン酸シンターゼの活性が増大するように改変された、請求項1に記載の微生物。

[3] ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大するように改変された、請求項1に記載の微生物。

[4] ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子の発現量を増大させること、及び/または、同遺伝子の翻訳量を増大させることにより、ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大した、請求項1～3のいずれか一項に記載の微生物。

[5] ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又はこれらの遺伝子の発現調節配列を改変することにより、ピルビン酸シンターゼ、もしくは、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼの活性が増大した、請求項4に記載の微生物。

[6] ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子が、下記(A)～(D)のいずれかに示すポリペプチド、下記(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチド、又は、下記(E)、(F)、(G)、(H)、(I)及び(J)のポリペプチドをコードする、請求項4又は5に記載の微生物:

(A)配列番号2に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B)配列番号2において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド。

(C)配列番号4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(D)配列番号4において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチド。

(E)下記(E1)又は(E2)のポリペプチド:

(E1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(E2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(F)下記(F1)又は(F2)のポリペプチド:

(F1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(F2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(G)下記(G1)又は(G2)のポリペプチド:

(G1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(G2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド、

(H)下記(H1)又は(H2)のポリペプチド:

(H1)配列番号57に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(H2)配列番号57において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)及び(G)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド。

(I)下記(I1)又は(I2)のポリペプチド:

(H1)配列番号65に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(H2)配列番号65において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド。

(J)下記(J1)又は(J2)のポリペプチド:

(J1)配列番号67に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(J2)配列番号67において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、少なくとも(E)、(F)、(G)及び(H)のポリペプチドと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体を形成し得るポリペプチド。

[7] ピルビン酸シンターゼをコードする遺伝子が、下記(a)～(d)のいずれかのDNA、下記(e)、(f)、(g)及び(h)のDNA、または下記(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)のDNAを含む、請求項4又は5に記載の微生物:

(a)配列番号1に示す塩基配列を有するDNA、

(b)配列番号1に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

(c)配列番号3に示す塩基配列を有するDNA、

(d)配列番号3に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(e)下記(e1)又は(e2)のDNA:

(e1)配列番号56に示す塩基配列を有するDNA、

(e2)配列番号56に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(f)、(g)、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA、

(f)下記(f1)又は(f2)のDNA:

(f1)配列番号58に示す塩基配列を有するDNA、

(f2)配列番号58に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(g)、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体

をコードし得るDNA、

(g)下記(g1)又は(g2)のDNA:

(g1)配列番号60に示す塩基配列を有するDNA、

(g2)配列番号60に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA、

(h)下記(h1)又は(h2)のDNA:

(h1)配列番号62に示す塩基配列を有するDNA、

(h2)配列番号62に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、及び(g)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

(i)下記(i1)又は(i2)のDNA:

(h1)配列番号64に示す塩基配列を有するDNA、

(h2)配列番号64に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、(g)及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

(j)下記(j1)又は(j2)のDNA:

(j1)配列番号66に示す塩基配列を有するDNA、

(j2)配列番号66に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも(e)、(f)、(g)及び(h)に示すDNAと共にピルビン酸シンターゼ活性を有するタンパク質複合体をコードし得るDNA。

[8] ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、下記(A)又は(B)に示すポリペプチドをコードする、請求項4又は5に記載の微生物:

(A)配列番号6に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B)配列番号6において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有するポリペプチド。

[9] ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、下記(a)又は(b)のDNAを含む、請求項4又は5に記載の微生物:

(a)配列番号5に示す塩基配列を有するDNA、

(b)配列番号5に示す塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

[10] フェレドキシン-$NADP^+$レダクターゼの活性が増大するように改変された、請求項1、または請求項2～7のいずれか一項に記載の微生物。

[11] フェレドキシン又はフラボドキシンの産生能が向上するように改変された、請求項1、請求項2～7、請求項10のいずれか一項に記載の微生物。

[12] マリックエンザイムの活性が低下するように改変された、請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物。

[13] ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下するように改変された、請求項1～12のいずれか一項に記載の微生物。

[14] 好気的にエタノールを資化できるように改変された、請求項1～13のいずれか一項に記載の微生物。

[15] 微生物が、エシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、セラチア属からなる群より選ばれる属に属する細菌である、請求項1～14のいずれか一項に記載の微生物。

[16] NAD型のマリックエンザイムとNADP型のマリックエンザイムの両方の活性が低下している請求項15に記載の微生物。

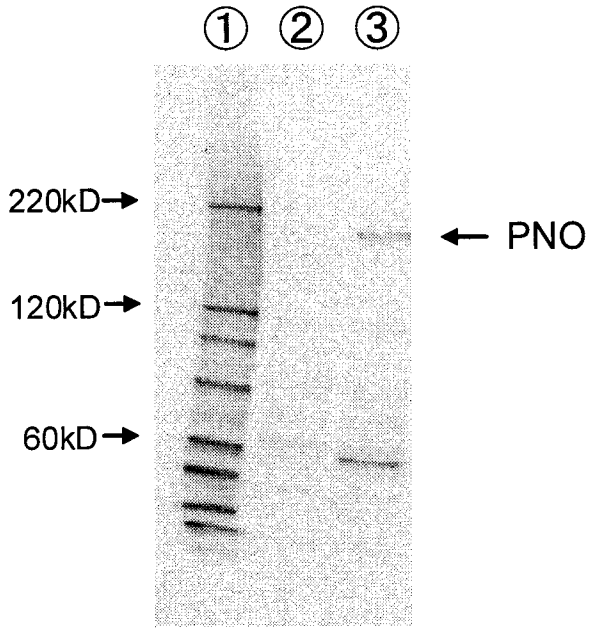
[17] 微生物が、コリネ型細菌である請求項1～14のいずれか一項に記載の微生物。

[18] 請求項1～17のいずれか一項に記載の微生物を培地で培養して、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、及びL-セリンからなる群より選ばれるL-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄

積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法。

[19] 前記培地が、エタノールまたは脂肪酸を炭素源として含有することを特徴とする、請求項18に記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/21(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P13/06*(2006.01)i, *C12P13/08*(2006.01)i, *C12P13/22*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1/21, C12N15/09, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	IKEDA, T. et al., Anabolic five subunit-type pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from Hydrogenobacter thermophilus TK-6., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Vol.340, p.76-82	1-2,4-5,15 3,6-14,16-19
X Y	WO 02/14522 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH), 21 February, 2002 (21.02.02), Full text & JP 2004-515223 A & US 2004/0101865 A1 & EP 1182259 A1	1,3-5,8-9,15 2,6-7,10-14, 16-19
Y	JP 2001-136991 A (Ajinomoto Co., Inc.), 22 May, 2001 (22.05.01), Full text & EP 1092776 A1 & RU 2207376 C	6-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September, 2008 (30.09.08)	07 October, 2008 (07.10.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/22829 A2 (DEGUSSA AG.), 21 March, 2002 (21.03.02), Full text & US 2002/0045224 A1 & EP 1317550 A1	6-19
Y	pyruvate flavodoxin/ferrodoxin oxidoreductase [Chlorobium tepidum TLS]., [online], GenBank, 2005.12.02, accession:NP_662511, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?21674446:NCBI:12250385>	6-7,10-19
Y	Probable pyruvate-flavodoxin oxidoreductase., [online], GenBank, 2007.07.10, accession:P52647, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?2506913:PROT:5053677>	6-7,10-19
Y	LIN, W. et al., The anabolic pyruvate oxidoreductase from Methanococcus maripaludis., Arch. Microbiol., 2003.06, Vol.179, No.6, p.444-456	6-7,10-19
Y	LIN, W. and WHITMAN, W. B., The importance of porE and porF in the anabolic pyruvate oxidoreductase of Methanococcus maripaludis., Arch. Microbiol., 2004.01, Vol.181, No.1, p.68-73	6-7,10-19
Y	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988627, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359070:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	pyruvate oxidoreductase (synthase) subunit delta [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988626, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359069:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	pyruvate oxidoreductase (synthase) subunit alpha [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988625, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359068:NCBI:12547452>	6-7,10-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/065834

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ferrodoxin oxidoreductase beta subunit [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988624, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359067:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	hypothetical protein, pyruvate oxidoreductase-associated [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988623, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359066:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	hypothetical protein MMP1502 [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988622, [retrieval date: 29 September, 2008 (29.09.08)], <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359065:NCBI:12547452>	6-7,10-19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０６５８３４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/06(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i, C12P13/22(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/21, C12N15/09, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００８年

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

WPI, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	IKEDA, T. et al., Anabolic five subunit-type pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from Hydrogenobacter thermophilus TK-6., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, Vol.340, p.76-82	1-2,4-5,15 3,6-14,16-19
X Y	WO 02/14522 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 2002.02.21, 全文 & JP 2004-515223 A & US 2004/0101865 A1 & EP 1182259 A1	1,3-5,8-9,15 2,6-7,10-14,16-19

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
３０．０９．２００８	０７．１０．２００８

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	高堀　栄二	４Ｂ	４１５５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	JP 2001-136991 A (味の素株式会社) 2001.05.22, 全文 & EP 1092776 A1 & RU 2207376 C	6-19
Y	WO 02/22829 A2 (DEGUSSA AG) 2002.03.21, 全文 & US 2002/0045224 A1 & EP 1317550 A1	6-19
Y	pyruvate flavodoxin/ferrodoxin oxidoreductase [Chlorobium tepidum TLS]., [online], GenBank, 2005.12.02, accession:NP_662511, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?21674446:NCBI:12250385>	6-7,10-19
Y	Probable pyruvate-flavodoxin oxidoreductase., [online], GenBank, 2007.07.10, accession:P52647, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?2506913:PROT:5053677>	6-7,10-19
Y	LIN, W. et al., The anabolic pyruvate oxidoreductase from Methanococcus maripaludis., Arch. Microbiol., 2003.06, Vol.179, No.6, p.444-456	6-7,10-19
Y	LIN, W. and WHITMAN, W. B., The importance of porE and porF in the anabolic pyruvate oxidoreductase of Methanococcus maripaludis., Arch. Microbiol., 2004.01, Vol.181, No.1, p.68-73	6-7,10-19
Y	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988627, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359070:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	pyruvate oxidoreductase (synthase) subunit delta [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988626, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359069:NCBI:12547452>	6-7,10-19

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	pyruvate oxidoreductase (synthase) subunit alpha [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988625, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359068:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	ferrodoxin oxidoreductase beta subunit [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988624, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359067:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	hypothetical protein, pyruvate oxidoreductase-associated [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988623, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359066:NCBI:12547452>	6-7,10-19
Y	hypothetical protein MMP1502 [Methanococcus maripaludis S2]., [online], GenBank, 2006.01.18, accession:NP_988622, [検索日:平成20年9月29日], <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?45359065:NCBI:12547452>	6-7,10-19

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

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

ａ．タイプ
- ☑ 配列表
- ☐ 配列表に関連するテーブル

ｂ．フォーマット
- ☐ 紙形式
- ☑ 電子形式

ｃ．提出時期
- ☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの
- ☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

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

３．補足意見：