

(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
2014 年 1 月 9 日(09.01.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/007273 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01) *C12P 13/14* (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01) *C12P 13/20* (2006.01)
C12P 9/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068205
- (22) 国際出願日: 2013 年 7 月 3 日(03.07.2013)
- (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 2012-149431 2012 年 7 月 3 日(03.07.2012) JP
- (71) 出願人: 株式会社ジナリス (GENARIS, INC.)
[JP/JP]; 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町
7 5 番地 1 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 飯田 甲悟(IIDA Kougo); 〒2230052 神奈
川県横浜市港北区綱島東 4-10-18 ラム
ズ綱島東 501 Kanagawa (JP). 岩崎 卓己(IWA-
SAKI Takumi); 〒2210864 神奈川県横浜市神奈川
区菅田町 3 9 2 コーポ井上 2 0 2 Kanagawa
(JP). 西 達也(NISHI Tatsunari); 〒1450074 東京都
大田区東嶺町 3 9-1 5 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS
& CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番
7 号 京橋日殖ビル 8 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: USEFUL MICROORGANISM, AND METHOD FOR PRODUCING DESIRED SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 有用微生物および目的物質の製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a microbial strain which enables the reduction of the amount of a metabolite (M) converted from a compound (P) which is an intermediate metabolite and also enables the highly efficient accumulation of the compound (P) in a culture medium to which the metabolite (M) or an end product produced from the metabolite (M) is not added. The present invention provides a prokaryote having all of the properties mentioned in items (a) to (d) defined in the description, for the purpose of accumulating a compound (P), which is an intermediate metabolite, by controlling the expression amount of an enzyme (X) capable of converting the compound (P) into a metabolite (M), which is a compound essential for growth, in a biosynthesis pathway for producing the metabolite (M) from a carbon source.

(57) 要約: 本発明の課題は、中間代謝物である化合物 P から代謝物 M への転換量を減少させ、しかも代謝物 M または代謝物 M から生成する最終産物を添加しない培地中で化合物 P を効率よく蓄積できる菌株を提供することである。本発明によれば、炭素源から生育に必須な代謝物 M を生成する生合成経路において中間代謝物である化合物 P を代謝物 M に転換する酵素 X の発現量を調節することにより化合物 P を蓄積させるために、本明細書に規定する (a) から (d) に記載の性質をすべて有する原核生物が提供される。

WO 2014/007273 A1

明 細 書

発明の名称：有用微生物および目的物質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、有機酸やアミノ酸などの有用物質を効率よく製造するための微生物および該微生物を用いた有用物質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 栄養要求変異や代謝調節変異の導入、または組換えDNA技術などを用いて、有機酸、アミノ酸、核酸、ビタミンなどの有用化合物を効率よく製造する微生物を取得する方法が開発されている。図1に示すように、炭素源から中間代謝物である化合物Pを経由して生育に必須な代謝物Mを生成する生合成経路または代謝経路において、化合物Pを効率よく生産させるためには、化合物Pを代謝物Mに転換する酵素Xの活性を欠損させた栄養要求変異株を取得する方法がよく用いられてきた。しかしながら、該変異株を用いて目的の化合物Pを生産する場合、代謝物Mまたは代謝物Mから生成する最終産物を培地に添加する必要がある、製造コストが高くなるという問題点があった。

[0003] たとえば、図2に示すシキミ酸経路の中間代謝物であるシキミ酸を、シキミ酸キナーゼ活性を欠損させたエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を用いて効率よく生産できることが報告されている（特許文献1、非特許文献1）。ただし、該微生物を用いた場合、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンの要求性に加えて、パラヒドロキシ安息香酸、パラアミノ安息香酸および2, 3-ジヒドロキシ安息香酸の要求性が生じるために、これら6種類の化合物を培地に添加する必要があるという問題点があった。また、シキミ酸経路の中間代謝物である3-デヒドロシキミ酸を、シキミ酸脱水素活性を欠損させたエシェリヒア・コリを用いて効率よく生産できることが報告されているが、該微生物も上記6種類の化合物の要求性が生じるという問題点があった（特許文献2、非特許文献2）。

[0004] N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンやエチルメタンサル

フォン酸などの変異剤を用いた処理やUVや放射線の照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによって変異を導入することによって、化合物Pから代謝物Mに転換する酵素Xの量を減少させる変異を導入して代謝物Mの生成量が減少させることにより、化合物Pの量を増加させることも可能である。この場合、酵素Xの活性が残存することにより化合物Pの一部が常に代謝物Mに転換するために、化合物Pの生産量を最大化する条件を見出すことは容易でない。

[0005] 本発明では、酵素Xをコードする遺伝子xの転写を人為的にリプレッサーの制御下に置いて代謝物Mの生成量を制御することにより、代謝物Mまたは代謝物Mから生成する最終産物を培地に添加せずに、化合物Pを効率よく生産する方法を開示するが、遺伝子xの本来のプロモーターではなく、リプレッサーにより転写抑制がかかる別のプロモーターを利用して遺伝子xの転写量を制御することにより化合物Pの生産量を向上させた事例は報告されていない。

[0006] 微生物を用いて有用化合物を製造する場合、炭素源から中間代謝物である化合物Pを経由して生育に必須な代謝物Mを生成する生合成経路または代謝経路において、該経路上の化合物Pから分岐する経路により該有用化合物を生産させる方法が用いられることも多い。この方法を用いる場合にも、上記酵素Xの活性を欠損させた栄養要求変異株を取得する方法がよく用いられてきたが、代謝物Mまたは代謝物Mから生成する最終産物を培地に添加する必要があり、製造コストが高くなるという問題点があった。

[0007] 多数の分岐経路を持つシキミ酸経路（図2）を用いる目的物質の生産に関しては、たとえば、トリプトファン生産菌株の多くは、中間代謝物であるコリスミン酸がチロシンやフェニルアラニンの合成経路に流れないようにするために、チロシンおよびフェニルアラニンの要求性を有することが知られている（特許文献3、非特許文献3と4）。また、フェニルアラニン生産菌はチロシンの要求性を有することが知られている（特許文献4と5、非特許文献5）。したがって、目的の芳香族アミノ酸を製造するときには、別の芳香

族アミノ酸を培地に添加する必要がある。

[0008] 3-デオキシシキミ酸（以下、DHSと略す）からシキミ酸（代謝物M）に転換する酵素を欠損させ、しかもシキミ酸経路の出発物質である3-デオキシ-D-アラビノーヘプツロソン酸-7-リン酸（以下、DAHPPと略す）の生成量を増加させた変異株を造成することにより、約40 g/Lのプロトカテク酸を生産できることも報告されている（非特許文献6）。ただし、該変異株を用いた場合、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンの要求性に加えて、パラヒドロキシ安息香酸、パラアミノ安息香酸および2, 3-ジヒドロキシ安息香酸の要求性が生じるために、これら6種類の化合物を培地に添加する必要があるという問題点があった。また、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌（特許文献6）またはブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属細菌（特許文献7と8）に変異を導入することにより、プロトカク酸生産菌も取得されているが、これら変異株はプロトカテク酸の生産に対してチロシンなどの栄養源が必要である。さらに、これら変異株のプロトカテク酸の生産量の最高値は約13 g/Lであり、上述の芳香族アミノ酸栄養要求変異株の生産量よりも低い（特許文献8）。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：United States Patent 6,472,169
特許文献2：United States Patent 5,821,266
特許文献3：特許第4, 305, 184号公報
特許文献4：特開平5-49489号公報
特許文献5：特開平5-304971号公報
特許文献6：特公昭45-39036号公報
特許文献7：特開昭50-89592号公報
特許文献8：特開昭60-98989号公報

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Biotechnol. Prog. 19, 808 (2003)

非特許文献2 : Biotechnol. Bioeng. 64, 61 (1999)

非特許文献3 : Agric. Biol. Chem. 39, 343 (1975)

非特許文献4 : Appl Environ Microbiol. 65, 2497 (1999)

非特許文献5 : Agric. Biol. Chem. 37, 2013 (1973)

非特許文献6 : J. Am. Chem. Soc. 127, 2874 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、炭素源から中間代謝物である化合物Pを介して生育に必要な代謝物Mを生成する生合成経路または代謝経路を有する微生物を用いて化合物Pを生産する際に、化合物Pから代謝物Mへの転換量を減少させ、しかも代謝物Mまたは代謝物Mから生成する最終産物を添加しない培地中で化合物Pを効率よく蓄積できる菌株を取得する方法（図1）を提供することであり、さらに、蓄積した化合物Pをもとに酵素Yにより化合物Qを生産する方法（図3）を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032株（以下、ATCC13032株と略記する）を用いて目的物質であるDHSを効率よく生産する菌株を造成する研究において、上記課題を解決することを試みた。まず、グルコースからDHS（化合物P）に至る生合成経路に関わる複数の酵素の発現を増強し、さらにDHSからプロトカテク酸への転換を促すDHS脱水酵素（酵素Y）をコードする遺伝子qsuB（cg0502）遺伝子の転写をtuf（cg0587）遺伝子のプロモーター（以下、Tuプロモーターと略す）の制御下に置いたNSH株をもとに、DHSからシキミ酸（代謝物M）への転換を促すシキミ酸脱水素酵素（酵素X）をコードするaroE3（cg1835）遺伝子に欠失変異を導入したNSHΔaroE3株を造成したところ、NSHΔaroE3株の増殖は、3種類の芳香族アミノ酸（トリプトファン、フェニルアラニンおよびチロシン）を添加しないと極端に遅くなることを確認した。このNSHΔaroE3株は3種類の芳香族アミノ酸とシキミ酸を添加した培地中で培養するこ

とにより、0.5 g/Lのプロトカテク酸を生産することを確認した。次に、このNSH Δ aroE3株をもとに、活性型シキミ酸脱水素酵素遺伝子（aroE3遺伝子）の発現をvanR（cg2615）遺伝子がコードするリプレッサー（以下、VanRリプレッサーと略す）により制御するために、aroE3遺伝子をvanA（cg2616）遺伝子のプロモーター（以下、vanAプロモーターと略す）に連結したDNAを染色体に組み込んだNSH Δ aroE3__vanE3株を造成した。このNSH Δ aroE3__vanE3株は、3種類の芳香族アミノ酸とシキミ酸を添加しない合成培地中で生育できる上、16.6 g/Lのプロトカテク酸が生産することを見出し、本発明の課題を解決するに至った。また、このNSH Δ aroE3株をもとに、aroE3遺伝子の発現をrhcR（cg1308）遺伝子がコードするリプレッサー（以下、RhcRリプレッサーと略す）により制御する菌株を造成したところ、11.2 g/Lののプロトカテク酸の生産性が確認され、VanRリプレッサー以外のリプレッサーを利用することによっても優れているプロトカテク酸の生産性が得られることを見出した。

[0013] 次に、NSH Δ aroE3株のaroE3遺伝子欠失変異に加えて、DHSからシキミ酸（代謝物M）への転換を促すシキミ酸脱水素酵素をコードするqsuD（cg0504）遺伝子とDHS脱水酵素をコードするqsuB遺伝子にも欠失変異を導入したNSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株を造成したところ、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株は3種類の芳香族アミノ酸とビタミンK2とパラアミノ安息香酸を添加しないと増殖できないことを確認した。このNSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株はこれらの添加物を加えた培地中で培養することにより、7.7 g/LのDHSを生産することを確認した。NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株の構築と同様の手順で、NSH Δ aroE3__vanE3株をもとに、qsuD遺伝子とqsuB遺伝子に欠失変異を導入したNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB Δ qsuD株を造成した。このNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB Δ qsuD株をもとに、benA（cg2637）遺伝子のプロモーターとVanRリプレッサーをコードするvanR遺伝子を連結したDNAを染色体に組み込んだPben-vanR株を造成したところ、Pben-vanR株は、これら添加物を含まない合成培地中で生育できる上、15.4 g/LのDHSを生産することを見出し、本発明の課題を解決するに至った。

[0014] すなわち、本発明は以下の（１）～（２４）に関する。

（１）炭素源から生育に必須な代謝物Mを生成する生合成経路において中間代謝物である化合物Pを代謝物Mに転換する酵素Xの発現量を調節することにより化合物Pを蓄積させるために、以下の（a）から（d）に記載の性質をすべて有する原核生物。

（a）該原核生物が利用できる炭素源から化合物Pに至る生合成に関わる酵素群のうち、いずれか１つ以上の酵素の活性が該原核生物の野生株と比べて増強している。

（b）酵素Xのタンパク質をコードする野生型遺伝子xの翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中に１個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、酵素Xの活性が欠損または低下している。

（c）前記遺伝子xの転写を促す本来のプロモーターとは異なっており、かつリプレッサーRのタンパク質により転写が抑制されるプロモーターAにより、活性型酵素XをコードするDNAの転写が制御される。

（d）リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zを１コピー以上有し、該遺伝子の転写が該遺伝子の本来のプロモーターおよび／または該プロモーターとは異なる誘導プロモーターBにより制御される。

[0015] （２）性質（b）に記載の遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中の置換変異が、該プロモーターの全域または一部の領域を、性質（c）に記載のプロモーターAのDNAと置換する変異であることを特徴とする、（１）に記載の原核生物。

（３）前記原核生物が有する化合物Pを代謝する酵素のうち、酵素X以外のいずれか１つ以上の代謝酵素の活性が欠損または低下していることを特徴とする、（１）または（２）に記載の原核生物。

（４）前記プロモーターBが、フェルラ酸、バニリン酸、バニリン、安息香酸、３-ヒドロキシ安息香酸、レゾルシノール、４-ヒドロキシ安息香酸、２，４-ジヒドロキシ安息香酸、フラクトースおよびスクロースからなる群

から選ばれる化合物の添加により誘導されるプロモーターであることを特徴とする、(1) から (3) のいずれか一項に記載の原核生物。

[0016] (5) 前記リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zが、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株のvanR (cg2615) 遺伝子、pcaR (cg2624) 遺伝子、またはrhcR (cg1308) 遺伝子であることを特徴とする、(1) から (4) のいずれか一項に記載の原核生物。

(6) 前記プロモーターAが、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株のvanA (cg2616) 遺伝子のプロモーター、pobA (cg1226) 遺伝子のプロモーター、pcaH (cg2631) 遺伝子のプロモーター、またはrhcH (cg1309) 遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、(1) から (5) のいずれか一項に記載の原核生物。

[0017] (7) (1) から (6) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養することを特徴とする、化合物Pの製造方法。

(8) (1) から (6) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させることを特徴とする、化合物Pの製造方法。

(9) (1) から (6) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写抑制を解除した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させることを特徴とする、化合物Pの製造方法。

[0018] (10) 前記化合物Pおよび前記代謝物Mの組み合わせが、以下(f) から (i) のいずれかであることを特徴とする、(7) から (9) のいずれか一項に記載の化合物Pの製造方法。

(f) 化合物Pが3-デヒドロシキミ酸であり、代謝物Mがシキミ酸である

。

(g) 化合物Pがグルタミン酸であり、代謝物MがN-アセチルグルタミン酸または γ -グルタミルリン酸である。

(h) 化合物Pがアスパラギン酸であり、代謝物Mが β -アルパルチルリン酸である。

(i) 化合物Pがセリンであり、代謝物Mがグリシンである。

[0019] (11) 蓄積する化合物Pを酵素Yにより化合物Qに転換するために、(a) から(d)に記載の性質に加えて下記の性質(e)を有することを特徴する、(1)から(6)のいずれか一項に記載の原核生物。

(e) 酵素Yのタンパク質をコードする遺伝子yの翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子yの転写を促すプロモーター領域の中に1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、化合物Pから化合物Qへの転換能が増強している、もしくは遺伝子yの発現が野生型とは異なる制御を受けている。

[0020] (12) 前記原核生物が有する化合物Qを代謝する酵素のうち、いずれか1つ以上の代謝酵素の活性が欠損または低下していることを特徴とする、(11)に記載の原核生物。

(13) 性質(e)に記載の遺伝子yの転写を促すプロモーター領域の中の置換変異が、該プロモーターの全域または一部の領域を、該遺伝子の転写を促す本来のプロモーターおよびプロモーターAとは異なるプロモーターCのDNAと置換する変異であることを特徴とする、(11)または(12)に記載の原核生物。

[0021] (14) 前記プロモーターCがプロモーターBと同一である、または前記プロモーターCがプロモーターBの転写を制御するタンパク質による転写制御を受けることを特徴とする、(13)に記載の原核生物。

(15) 前記プロモーターCが誘導プロモーターであることを特徴とする、(13)または(14)に記載の原核生物。

(16) 前記プロモーターCが、フェルラ酸、バニリン酸、バニリン、安息

香酸、3-ヒドロキシ安息香酸、レゾルシノール、4-ヒドロキシ安息香酸、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、フラクトースおよびスクロースからなる群から選ばれる化合物の添加により誘導されるプロモーターであることを特徴とする、(15)に記載の原核生物。

[0022] (17) (11) から (16) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養することを特徴とする、化合物Qの製造方法。

(18) (11) から (16) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させ、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、化合物Qの製造方法。

[0023] (19) (11) から (16) のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写抑制を解除した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させ、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、化合物Qの製造方法。

(20) (11) から (16) のいずれか一項に記載の原核生物を炭素源の存在下で培養した後、前記プロモーターCの転写を誘導する処理を加えることにより前記酵素Yの発現量を増加させることにより、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、(17) から (19) のいずれか一項に記載の化合物Qの製造方法。

[0024] (21) 前記化合物P、前記化合物Qおよび前記代謝物Mの組み合わせが、以下(j) から (w) のいずれかであることを特徴とする、(17) から (20) のいずれか一項に記載の化合物Qの製造方法。

(j) 化合物Pが3-デヒドロシキミ酸であり、化合物Qがプロトカテク酸であり、代謝物Mがシキミ酸である。

(k) 化合物Pがコリスミン酸であり、化合物Qがアントラニル酸であり、

代謝物Mがプレフェン酸である。

(l) 化合物Pがプレフェン酸であり、化合物Qが4-ヒドロキシフェニルピルビン酸であり、代謝物Mがフェニルピルビン酸である。

(m) 化合物Pがプレフェン酸であり、化合物Qがアロゲン酸であり、代謝物Mがフェニルピルビン酸である。

(n) 化合物Pがプレフェン酸であり、化合物Qがフェニルピルビン酸であり、代謝物Mが4-ヒドロキシフェニルピルビン酸またはアロゲン酸である。

(o) 化合物Pが2-オキソイソ吉草酸であり、化合物Qが2-イソプロピルリンゴ酸であ、代謝物Mがバリンである。

(p) 化合物Pが2-オキソイソ吉草酸であり、化合物Qがバリンであり、代謝物Mが2-イソプロピルリンゴ酸である。

(q) 化合物Pがグルタミン酸であり、化合物Qが γ -グルタミルリン酸であり、代謝物MがN-アセチルグルタミン酸である。

(r) 化合物Pがグルタミン酸であり、化合物QがN-アセチルグルタミン酸であり、代謝物Mが γ -グルタミルリン酸である。

(s) 化合物Pがアスパラギン酸であり、化合物Qがアスパラギンであり、代謝物Mが β -アルパルチルリン酸である。

(t) 化合物Pがアスパラギン酸 β -セミアルデヒドあり、化合物Qが2,3-ジヒドロジピコリン酸であり、代謝物Mがホモセリンである。

(u) 化合物Pがホモセリンあり、化合物QがO-アセチルホモセリンであり、代謝物Mがホモセリンリン酸である。

(v) 化合物Pがホモセリンであり、化合物Qがホモセリンリン酸であり、代謝物MがO-アセチルホモセリンである。

(w) 化合物Pがセリンであり、化合物QがO-アセチルセリンであり、代謝物Mがグリシンである。

[0025] (22) 前記酵素Xがシキミ酸脱水素酵素であり、かつ前記酵素Yが3-デヒドロシキミ酸脱水素酵素であることを特徴とする、(21)の(j)に記載

のプロトカテク酸の製造方法。

(23) プロトカテク酸2, 3-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子、プロトカテク酸3, 4-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子、プロトカテク酸4, 5-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子およびプロトカテク酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子について、該遺伝子の翻訳領域またはその転写・翻訳調節領域の中に、1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することにより、プロトカテク酸の代謝活性が欠損または低下している性質であることを特徴とする、(22)に記載のプロトカテク酸の製造方法。

(24) コリネバクテリウム・グルタミカムまたはエッシェリヒア・コリである、(1)から(6)のいずれか一項または(11)から(16)のいずれか一項に記載の原核生物。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、グルコースなどの炭素源をもとに、DHSやプロトカテク酸などの有用有機化合物を効率よく生産する微生物を取得することができる。また、本発明の微生物を用いれば、芳香族アミノ酸を含まない培地を用いてDHSやプロトカテク酸などを効率よく製造することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]遺伝子 z の産物であるリプレッサーRによって酵素X（化合物Pから代謝物Mへの転換を司る酵素）の発現を制御することにより、炭素源から生育に必須な代謝物Mに至る生合成経路上の中間代謝物である目的の化合物Pを製造する方法を示す図。

[図2]炭素源からの芳香族アミノ酸の生合成に関わるシキミ酸経路を示す図。

[図3]遺伝子 z の産物であるリプレッサーRによって酵素の発現を制御することにより、炭素源から生育に必須な代謝物Mに至る生合成経路上の目的の化合物Pを製造するとともに、化合物Pから化合物Qへの転換を司る酵素Yを発現させることにより目的の化合物Qを製造する方法を示す図。

[図4]リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制により酵素Xの発現が

低く維持し、代謝物Mの生産量を制限することにより、化合物Pを効率よく生産できることを示す図。

[図5]培養前期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制が解除されることにより酵素Xが正常に生産されるが、培養後期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制が回復することにより、酵素Xの発現量が大きく減少し、化合物Pが蓄積することを示す図。

[図6]培養前期は、リプレッサーRの量が少ないためにプロモーターAの転写により酵素Xが正常に生産されるが、培養後期は、リプレッサーRの量が増えるために酵素Xの発現量が大きく減少し化合物Pが蓄積することを示す図。

[図7]プロモーターBの制御下にある遺伝子zがコードするリプレッサーRによりプロモーターの転写が抑制されるために、酵素Xの発現量が大きく減少し、化合物Pが蓄積し、さらに化合物Pを遺伝子zの産物である酵素Yの作用により化合物Qに転換することを示す図。

[図8]培養前期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制が解除されることにより酵素Xが正常に生産されるが、培養後期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制が回復することにより酵素Xの発現量が大きく減少し蓄積する化合物Pが、酵素Yの作用により化合物Qに転換することを示す図。

[図9]培養前期は、リプレッサーRの量が少ないためにプロモーターAの転写により酵素Xが正常に生産されるが、培養後期は、リプレッサーRの量が増えるために酵素Xの発現量が大きく減少し蓄積する化合物Pが、酵素Yの作用により化合物Qに転換することを示す図。

[図10]培養前期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制により酵素Xの発現が低く維持し、代謝物Mの生産量を制限することにより、微生物を増殖させながら少量の化合物Pを生産できるが、培養後期は、化合物Pを化合物Qに転換する酵素Yを誘導発現させて酵素Yの発現量を増加させることにより、化合物Qの生産量を増加させることを示す図。

[図11]培養前期は、リプレッサーRによるプロモーターAの転写抑制により酵素Xの発現が低く維持し、代謝物Mの生産量を制限することにより、微生物を増殖させながら少量の化合物Pを生産できるが、培養後期は、リプレッサーRを誘導発現させて化合物Pの蓄積量を増加させるとともに、蓄積した化合物Pを化合物Qに転換する酵素Yを誘導発現させて酵素Yの発現量を増加させることにより、化合物Qの生産量を増加させることを示す図。

発明を実施するための形態

[0028] 以下に、図1と図3を用いながら、本発明を詳細に説明する。

本発明の微生物は、炭素源から生育に必須な代謝物Mに至る生合成経路上の中間代謝物である目的の化合物Pを効率よく製造するために用いる微生物であり、以下に示す4つの性質(a)～(d)を有する。該微生物は、遺伝子発現制御のためにリプレッサーRによる転写抑制系が発達している原核生物であることが好ましい。

(a) 該微生物が利用できる炭素源から化合物Pに至る生合成に関わる酵素群のうち、いずれか1つ以上の酵素の活性が該原核生物の野生株と比べて増強している。

(b) 化合物Pを代謝物Mに転換する酵素Xのタンパク質をコードする野生型遺伝子xの翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中に1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、酵素Xの活性が欠損または低下している。

(c) 前記遺伝子xの転写を促す本来のプロモーターとは異なっており、かつリプレッサーRのタンパク質により転写が抑制されるプロモーターAにより、活性型酵素XをコードするDNAの転写が制御される。

(d) リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zを1コピー以上有し、該遺伝子の転写が該遺伝子の本来のプロモーターおよび／または該プロモーターとは異なる誘導プロモーターBにより制御される。

[0029] グルコースなどの炭素源から化合物Pまでの生合成経路に関わる酵素群のいずれか1つ以上の酵素について、以下のようにして酵素活性の増強および

／または酵素タンパク質の量の増加を行うことにより、本発明で利用する微生物に性質（a）を付与することができる。すなわち、該酵素タンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始領域への変異導入、該遺伝子のプロモーター領域への変異導入、該プロモーターの他の強いプロモーターへの置換、マルチコピープラスミドへのクローニングなどによる該遺伝子の増幅、該遺伝子の転写を正に制御するタンパク質の発現増加、および／または該遺伝子の転写を負に制御するタンパク質の発現減少・欠損などの方法により、該酵素活性の増強および／または該酵素タンパク質の量の増加を行うことにより化合物Pの生成量を増加させることができる。もしくは、下流の代謝物によりフィードバック阻害を受ける酵素の場合には、そのフィードバック阻害を解除するアミノ酸の変異を酵素タンパク質に導入することによっても化合物Pの生成量を増加させることができる。これらのDNAまたはタンパク質への変異導入については、変異誘起処理などによって行うこともできるが、組換えDNA技術や相同組換え技術を用いても行うことができる。

[0030] 性質（b）の付与については、変異誘起処理や組換えDNA技術などを用いて酵素Xの活性を欠損させることができるが、好ましくは、相同組換え技術を用いて野生型遺伝子xの翻訳領域内に欠失変異を導入する。この場合、翻訳領域全部を欠失させると、極性効果により下流の遺伝子発現を阻害することがあるので、翻訳領域の5'側部分と3'側部分を残してインフレームで翻訳領域内に欠失変異を導入することが望ましい。また、遺伝子xの翻訳開始領域周辺または遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中に、1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することによっても、酵素Xの活性を欠損させることができる。また、遺伝子xの転写を促す本来のプロモーター領域を性質（c）に記載のプロモーターAのDNAと置換することによって、性質（b）と性質（c）を同時に付与してもよい。

[0031] 性質（c）は、リプレッサーRにより転写が抑制されるプロモーターAの制御下に活性型酵素Xのタンパク質をコードするDNAを置くことにより付与できる。プロモーターAは、前記遺伝子xの転写を促す本来のプロモーターと

は異なるプロモーターであり、かつリプレッサーRにより転写が抑制されるならば、いかなるプロモーターであってよい。好ましくは、エシェリヒア・コリK-12株内でリプレッサーRにより抑制されるプロモーターAとしては、λファージのcI857遺伝子産物により転写抑制を受けるpLプロモーターまたはpRプロモーター、lacI遺伝子産物により転写抑制を受けるlacプロモーター、もしくはgalR遺伝子産物により転写抑制を受けるgalオペロンのプロモーターが挙げられる。また、ATCC13032株内でリプレッサーRにより抑制されるプロモーターAとしては、vanR (cg2615) 遺伝子（以下、vanR遺伝子という）の産物（以下、VanRリプレッサーと略す）により転写抑制を受けるvanAプロモーター、rhcR (cg1308) 遺伝子（以下、rhcR遺伝子という）の産物（以下、RhcRリプレッサーと略す）により転写抑制を受けるrhcH (cg1309) 遺伝子（以下、rhcH遺伝子という）のプロモーター（以下、rhcHプロモーターと略す）、もしくはpcaR (cg2624) 遺伝子（以下、pcaR遺伝子という）の産物（以下、PcaRリプレッサーと略す）により転写抑制を受けるpcaI (cg2623) 遺伝子（以下、pcaI遺伝子という）のプロモーター（以下、pcaIプロモーターと略す）が挙げられる。なお、遺伝子xは、本発明の微生物由来の遺伝子を用いてもよいし、本発明の微生物とは異なる原核生物または真核生物由来の遺伝子を用いてもよい。

[0032] 本発明の微生物は、性質（b）と性質（c）の付与により、通常の状態では酵素Xの発現量は低い。しかしながら、該微生物は、性質（a）の付与により、化合物Pの量を増加させる変異を有しているために、生育に必要な量の代謝物Mを生産できる。化合物Pの生成量が極端に低く、生育が悪い場合には、リプレッサーRによる転写抑制を解除し、酵素Xの発現量を上昇させることにより該微生物の生育を良くすることができる。

[0033] 性質（d）は、リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zの野生型発現ユニットだけでなく、遺伝子zを該遺伝子のプロモーターとは異なる誘導プロモーターBの制御下に置いた遺伝子zの発現ユニットを造成することによっても付与することができる。本発明の微生物に対して、遺伝子zの

野生型発現ユニットに加えて、誘導プロモーターBの制御下に置いた遺伝子 z の発現ユニットを組み込んでもよい。リプレッサーRについては、原核生物由来のリプレッサーであれば、いかなるリプレッサーを用いることができるが、誘導物質の添加や温度変化などにより抑制を解除できるリプレッサーの利用が好ましい。具体的には、本発明の微生物としてエシェリヒア・コリK-12株を用いる場合には、たとえば、38℃以上の培養により誘導がかかる λ ファージのcI857遺伝子、ラクトースの添加により誘導がかかるlacI遺伝子、ガラクトースの添加により誘導がかかるgalR遺伝子、もしくはテトラサイクリンの添加により誘導がかかるtetR遺伝子がコードするリプレッサーなどを用いることができる。本発明の微生物としてATCC13032株を用いる場合には、たとえば、フェルラ酸、バニリン酸またはバニリンの添加により抑制が解除されるVanRリプレッサー、レゾルシノールまたは2, 4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により抑制が解除されるRhcRリプレッサー、もしくは4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により抑制が解除されるPcaRリプレッサーを用いることができる。

[0034] プロモーターBとしては、原核生物由来の誘導プロモーターであれば、いかなるプロモーターを用いることができる。具体的には、エシェリヒア・コリK-12株で遺伝子 z を発現させる場合には、 λ ファージのpLプロモーターまたはpRプロモーター、lacプロモーター、galオペロンのプロモーター、trpオペロンのプロモーター、もしくはaraBAD プロモーターなどを用いることができる。また、ATCC13032株で遺伝子 z を発現させるときには、フェルラ酸、バニリン酸またはバニリンの添加により誘導がかかるvanAプロモーター、レゾルシノールまたは2, 4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるrhcHプロモーター、4-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるpcaIプロモーター、3-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるnagI (cg3351) 遺伝子（以下、nadI遺伝子という）のプロモーター（以下、nagIプロモーターと略す）、安息香酸の添加により誘導がかかるbenA (cg2637) 遺伝子（以下、benA遺伝子という）のプロモーター（以下、benAプロモーターと略す）

）、もしくはフラクトースまたはスクロースのいずれかの添加により誘導がかかるcg2118遺伝子のプロモーターまたはptsS（cg2925）遺伝子（以下、ptsS遺伝子という）のプロモーターを用いることができる。

[0035] 本発明の微生物が酵素X以外に化合物Pを代謝する酵素活性を有しており、化合物Pの製造において該化合物の蓄積量が減少する可能性がある場合には、変異誘起処理または組換えDNA技術により、該微生物が有する化合物Pの代謝酵素のうち、いずれか1つ以上の代謝酵素の活性を欠損または低下させることが好ましい。

[0036] 本発明の微生物は、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、アルスロバクター (Arthrobacter) 属、ノカルディオイダセアエ (Nocardioidaceae) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、アミコカクトプシス (Amycolatopsis) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、キネオコッカス (Kineococcus) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、パントアエ (Pantoea) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属およびエシェリヒア (Escherichia) 属のいずれかに属する原核生物であることが好ましい。さらに好ましくは、本発明の微生物は、アミノ酸の発酵生産でよく用いられるコリネバクテリウム・グルタミカムまたは性状が詳しく解析されているエッシェリヒア・コリである。

[0037] 本発明の微生物を用いた化合物Pの製造方法は、たとえば、炭素源を含む培地中でプロモーターAの転写を抑制した状態で培養することにより、目的の化合物Pを製造する方法が挙げられる。本発明の微生物では、酵素Xの発現を制御しているプロモーターAの転写量がリプレッサーRにより低く抑えられているために、代謝物Mの生産量が制限され、化合物Pを効率よく生産することができる（図4）。

[0038] 本発明の製造方法において、酵素Xの発現を制御しているプロモーターAの転写量が低いために該微生物の生育が遅い場合には、化合物Pの製造工程を培養前期と培養後期と2期に分けることにより目的の化合物Pを製造する

ことも可能である。すなわち、炭素源を含む培地に該微生物を接種した後、リプレッサーRの性質に応じて誘導物質の添加もしくは培養温度の上昇または低下などにより転写抑制を解除することにより、酵素Xの発現量を増やして培養を続ける。その後、適切な時期にリプレッサーRによる抑制を回復させて、酵素Xの発現を抑制することにより、化合物Pの生産量を増加させることができる（図5）。誘導物質の添加により誘導されるプロモーターAを用いた場合には、該誘導物質の添加量を調節して培養後期に該誘導物質を枯渇させることにより、リプレッサーRによる抑制を回復させることができる。培養温度の上昇または低下により誘導がかかるプロモーターAを用いた場合には、リプレッサーRによる抑制が起こる温度に培養温度を戻すことにより、リプレッサーRによる抑制を回復させることができる。

[0039] 好ましくは、リプレッサーRの発現を誘導プロモーターBの制御下に置いた本発明の微生物を用いて、化合物Pの製造工程を培養前期と培養後期の2期に分けることにより目的の化合物Pを製造する。すなわち、炭素源を含む培地に該微生物を接種し、菌体を増殖させた後に、誘導プロモーターBの性質に応じて誘導物質の添加もしくは培養温度の上昇または低下により誘導プロモーターBを活性化してリプレッサーRの生成量を増加させることにより、代謝物Mの生産を抑制し、化合物Pの生産量を増加させる（図6）。

[0040] 以上のように、本発明の微生物による製造方法を用いると、該微生物の増殖の状態または化合物Pが該微生物に与える影響に応じて、同一の微生物を用いて培養方法を変えることによって容易に化合物Pの生産量を最大化することができる。

[0041] 炭素源としては、本発明の微生物が利用できる炭素源であれば、いかなる炭素源も用いることができる。たとえば、グルコース、スクロース、フラクトース等の糖類、エタノール、メタノール等のアルコール類、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸等の有機酸類、グリセロール、廃糖蜜等が用いることができる。

[0042] 化合物Pは、炭素源から生育に必須な代謝物を生成する生合成経路上の代

謝物であれば、いかなる有機化合物であってもよい。たとえば、DHS、グルタミン酸、アルパラギン酸およびセリンなどが挙げられる。

[0043] DHSは、シキミ酸（代謝物M）を生成するシキミ酸脱水素酵素（酵素X）の発現を制御することにより生産できる。DHSは、抗酸化剤として有用であるほか（United States Patent 5,821,266）、微生物を用いてプロトカテク酸やシキミ酸などを製造するときの原料として利用できる。

[0044] 有用なアミノ酸であるグルタミン酸は、N-アセチルグルタミン酸（代謝物M）を生成するミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ（酵素X）または γ -グルタミルリン酸（代謝物M）を生成する γ -グルタミルキナーゼ（酵素X）の発現を制御することにより生産できる。

[0045] 有用なアミノ酸であるアスパラギン酸は、 β -アルパルチルリン酸（代謝物M）を生成するアスパルトキナーゼ（酵素X）またはアスパラギン（代謝物M）を生成するアスパラギン合成酵素（酵素X）の発現を制御することにより生産できる。

[0046] 有用なアミノ酸であるセリンは、グリシン（代謝物M）を生成するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ（酵素X）またはO-アセチルセリン（代謝物M）を生成するセリントランスフェラーゼ（酵素X）の発現を制御することにより生産できる。

[0047] ここで、より具体的な例として、DHSを効率よく生産するATCC13032株由来の菌株について詳しく述べる。なお、ATCC13032株のゲノム配列については、ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション（以下、NCBIと略記する）のジェンバンク（GenBank；以下、GBと略記する）データベースから、GBアクセッション番号BX927147として得ることができる。また、これとほぼ同じゲノム配列は、GBアクセッション番号NC_003450としても得ることができるが、本明細書ではGBアクセッション番号BX927147の塩基番号および遺伝子名に従って塩基の位置と遺伝子名を記載する。

[0048] DHSを生産するATCC13032株由来の菌株とは、下記の性質（a a）～（d

d) を持つ微生物である。

(a a) 該菌株が利用できる炭素源から D H S (化合物 P) に至る生合成に関わる酵素群のうち、いずれか 1 つ以上の酵素の活性が野生株と比べて増強している。

(b b) D H S をシキミ酸 (代謝物 M) に転換するシキミ酸脱水素酵素 (酵素 X) のタンパク質をコードする野生型遺伝子 (遺伝子 x) の翻訳領域または翻訳調節領域、もしくは該遺伝子の転写を促すプロモーター領域の中に、1 個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、D H S からシキミ酸への転換能が欠損または低下している。ATCC13032株は、活性型シキミ酸脱水素酵素をコードする遺伝子として、aroE3 (cg1835) 遺伝子 (相補鎖塩基番号1,726,078~1,726,908のDNA領域)、aroE1 (cg1283) 遺伝子 (相補鎖塩基番号1,182,337~1,183,143のDNA領域) およびqsuD (cg0504) 遺伝子 (塩基番号446,537~447,388のDNA領域) の3種類を有しているが、D H S からシキミ酸への変換に主要な役割を果たしているaroE3遺伝子に変異を導入し、該遺伝子の活性型シキミ酸脱水素酵素の発現が欠損あるいは低下することによっても性質 b b を付与することができる。さらに、aroE3遺伝子の変異に加えて、qsuD遺伝子および／またはaroE1遺伝子についても該遺伝子の活性型シキミ酸脱水素酵素の発現が欠損あるいは低下する変異を導入することにより、性質 b b を付与してもよい。

(c c) 前記遺伝子 x の転写を促す本来のプロモーターとは異なっており、かつリプレッサー R のタンパク質により転写が抑制されるプロモーター A により、活性型酵素 X をコードする DNA の転写が制御される。

(d d) リプレッサー R のタンパク質をコードする遺伝子 z を 1 コピー以上有し、該遺伝子の転写が該遺伝子の本来のプロモーターおよび／または該プロモーターとは異なる誘導プロモーター B により制御される。

[0049] リプレッサー R としては、上述したように、フェルラ酸、バニリン酸またはバニリンの添加により抑制が解除される VanR リプレッサー、レゾルシノールまたは 2, 4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により抑制が解除される RhcR

リプレッサー、もしくは4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により抑制が解除されるPcaRリプレッサーを用いることができる。

[0050] プロモーターAとしては、ATCC13032株内でリプレッサーRにより抑制されるプロモーターAとしては、VanRリプレッサーにより転写抑制を受けるvanAプロモーター、RhcRリプレッサーにより転写抑制を受けるrhcHプロモーター、もしくはPcaRリプレッサーにより転写抑制を受けるpcaI遺伝子のプロモーターが挙げられる。

[0051] プロモーターBとしては、フェルラ酸、バニリン酸またはバニリンの添加により誘導がかかるvanAプロモーター、レゾルシノールまたは2, 4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるrhcHプロモーター、4-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるpcaIプロモーター、3-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるnagIプロモーター、安息香酸の添加により誘導がかかるbenAプロモーター、もしくはフラクトースまたはスクロースのいずれかの添加により誘導がかかるcg2118遺伝子のプロモーターまたはptsSプロモーターを用いることができる。

[0052] シキミ酸脱水素酵素（酵素X）のタンパク質をコードするaroE3遺伝子（遺伝子x）の転写を促す本来のプロモーター領域を性質（cc）に記載のプロモーターAのDNAと置換することによって、性質（bb）と性質（cc）を同時に付与してもよい。

[0053] 上記性質（aa）の付与については、公知の知見に基づいて、DAH PからDHSを生成する経路を強化させる変異、またはDAH Pの生成量を増加させる変異を導入すればよい。

[0054] DAHPは、3-デヒドロキナ酸合成酵素により3-デヒドロキナ酸（以下、DHQと略記する）に転換され、さらにDHQはDHQ脱水酵素によりDHSに転換される。したがって、DHQ合成酵素をコードする遺伝子aroB（cg1827）遺伝子（以下、aroB遺伝子という）および／またはDHQ脱水酵素をコードするaroD（cg0503）遺伝子（以下、aroD遺伝子という）の転写・翻訳調節領域に変異を導入することにより、DHQ合成酵素および／または

D H Q脱水酵素の発現量を増強させ、D H S量を増加させることができる。たとえば、aroB遺伝子および／またはaroD遺伝子の転写を促す本来のプロモーターを、プロモーター活性が強いTuプロモーターと置換することにより、D H S量を増加させることができる。

[0055] また、D A H P量を増加させることによっても、D H S量を増加させることができる。D A H P量を増加させる方法としては、D A H P合成酵素に対する芳香族アミノ酸によるフィードバック阻害の解除、D A H P合成酵素の発現量の増強、もしくはD A H P合成酵素の基質であるエリスロース４－リン酸（以下、E 4 Pと略記する）またはホスホエノールピルビン酸（以下、P E Pと略記する）の量を増加させる方法があげられる。

[0056] D A H P合成酵素は、トリプトファン、チロシンまたはフェニルアラニンによってフィードバック阻害を受けることが多い。D A H P合成酵素にアミノ置換変異などを導入することによりフィードバック阻害が解除できることが知られているので、aroF (cg1129) 遺伝子（以下、aroF遺伝子という）およびaroG (cg2391) 遺伝子（以下、aroG遺伝子という）などのD A H P合成酵素遺伝子に変異を導入してD A H P量を増加させることができる。

[0057] D A H P合成酵素の発現量を増強する方法としては、D A H P合成酵素をコードする遺伝子の転写・翻訳調節領域に変異を導入する方法があげられる。たとえば、D A H P合成酵素をコードする遺伝子の転写を促す本来のプロモーターを、Tuプロモーターと置換することにより、D A H P量を増加させることができる。

[0058] D A H P合成酵素の基質であるE 4 Pの量を増加させる方法としては、トランスケトララーゼをコードするtkt (cg1774) 遺伝子（以下、tkt遺伝子という）、トランスアルドラーゼをコードするtal (cg1776) 遺伝子（以下、cg1776遺伝子という）、またはグルコース－６－リン酸１－脱水素酵素をコードするzwf (cg1778) 遺伝子などのペントースリン酸経路に関わる酵素遺伝子の転写・翻訳調節領域に変異を導入して該遺伝子の発現を増強する方法があげられる。

- [0059] また、D A H P合成酵素の基質であるP E Pの量を増加させる方法としては、P E P合成酵素をコードするpps (cg0644) 遺伝子またはP E Pカルボキシキナーゼをコードするpck (cg3169) 遺伝子の転写・翻訳調節領域に変異を導入して該遺伝子の発現を増強する方法があげられる。
- [0060] さらに、ピルビン酸キナーゼをコードするpyk (cg2291) 遺伝子、P E Pカルボキシラーゼをコードするppc (cg1787) 遺伝子、またはグルコースなどの糖の取り込みに関与するホストランスフェラーゼをコードする遺伝子群 (cg2117遺伝子など) のいずれかの遺伝子の翻訳領域または該遺伝子の転写・翻訳調節領域に変異を導入し、P E Pの変換を抑制することにより、P E Pの量を増加させることができる。
- [0061] 上記性質 (a a) を付与するために単独の遺伝子に変異を導入してもよいが、D H Sの生成量をより一層向上させるために、上記遺伝子のうち複数の遺伝子に変異を入れる方が好ましい。
- [0062] 上述の性質 (a a) ~ (d d) を有するATCC13032株由来の菌株は、グルコースなどの炭素源をもとにD H Sを生産できる。D H Q脱水酵素をコードするaroD遺伝子がD H Sをプロトカテク酸に転換するD H S脱水酵素をコードするqsuB (cg0502) 遺伝子 (以下、qsuB遺伝子という) とオペロンを形成しているので、性質 (a a) を付与するために、プロモーター置換によりaroD遺伝子の発現を増加させると、qsuB遺伝子の発現も増加することにより、蓄積したD H Sの一部がプロトカテク酸に転換してしまう。プロトカテク酸への転換を抑制するには、qsuB遺伝子の翻訳領域または該遺伝子の転写・翻訳調節領域に変異を導入することが望ましい。
- [0063] 本発明の微生物が、上記の4つの性質 (a) ~ (d) に加えて、以下の性質 (e) を有すると、該微生物を用いることにより、炭素源から生育に必須な代謝物Mに至る生合成経路上の化合物Pを化合物Qに転換することにより、目的の化合物Qを効率よく製造することができる。
- (e) 化合物Pから化合物Qに転換する酵素Yのタンパク質をコードする遺伝子yの翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子yの転写を促す

ロモーター領域の中に1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、化合物Pから化合物Qへの転換能が増強している、もしくは遺伝子yの発現が野生型とは異なる制御を受けている。

[0064] 性質(e)については、酵素Yの発現量が野生型の状態では十分でないことが多いので、該遺伝子yの翻訳調節領域または遺伝子yの転写を促すプロモーター領域の中に1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することにより、酵素Yの発現量を増強させる、または遺伝子yの転写を野生型プロモーターの制御とは異なる制御下に置くことによって、性質(e)を付与することができる。また、分岐経路の最初の酵素は最終産物によるフィードバック阻害を受けることも多いので、遺伝子yの翻訳領域内に変異を導入することにより該フィードバック阻害を解除することにより、酵素Yの活性を増強することによっても性質(e)を付与することができる。

[0065] 好ましくは、遺伝子yの転写を促すプロモーターの全域または一部の領域を、該遺伝子の転写を促す本来のプロモーターおよびプロモーターAとは異なるプロモーターCのDNAと置換することによって性質(e)を付与することができる。

[0066] プロモーターCとしては、遺伝子yの本来のプロモーターとは異なり、かつプロモーターAとも異なるプロモーターを用いることができる。プロモーターCとしては構成的発現プロモーターを用いることもできるが、誘導プロモーターを用いることが好ましい。誘導プロモーターとしては、上述の性質(d)の付与で用いられるプロモーターBの例として挙げたプロモーターのいずれかを用いることもできる。

[0067] 即ち、プロモーターCとしては、 λ ファージのpLプロモーターまたはpRプロモーター、lacプロモーター、galオペロンのプロモーター、trpオペロンのプロモーター、もしくはaraBADプロモーターなど、あるいはフェルラ酸、バニリン酸またはバニリンの添加により誘導がかかるvanAプロモーター、レゾルシノールまたは2,4-ジヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるrchHプロモーター、4-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるpcaIプ

ロモーター、3-ヒドロキシ安息香酸の添加により誘導がかかるnagIプロモーター、安息香酸の添加により誘導がかかるbenAプロモーター、もしくはフラクトースまたはスクロースのいずれかの添加により誘導がかかるcg2118遺伝子のプロモーターまたはptsSプロモーターを用いることができる。

[0068] 性質(e)の付与で用いられるプロモーターCは、性質(d)の付与で用いられるプロモーターBと同一であってもよい。また、該プロモーターCは、該プロモーターBの転写を制御するタンパク質による転写制御を受けるプロモーターであってもよい。

[0069] 本発明の微生物が化合物Qを代謝する酵素活性を有しているために、化合物Pの製造において該化合物の蓄積量が減少する可能性がある場合には、変異誘起処理または組換えDNA技術により、該微生物が有する化合物Pの代謝酵素のうち、いずれか1つ以上の代謝酵素の活性を欠損または低下させることが好ましい。

[0070] 本発明の微生物を用いた化合物Qの製造方法は、たとえば、炭素源を含む培地中でプロモーターAの転写を抑制した状態で培養することにより、化合物Qを製造する方法が挙げられる。本発明の微生物では、酵素Xの発現を制御しているプロモーターAの転写量がリプレッサーRにより低く抑えられているために、代謝物Mの生産量が制限され、化合物Pから化合物Qを効率よく生産することができる(図7)。

[0071] 本発明の製造方法において、酵素Xの発現を制御しているプロモーターAの転写量が低いために該微生物の生育が遅い場合には、化合物Qの製造工程を培養前期と培養後期と2期に分けることにより化合物Qを製造することが好ましい。すなわち、該微生物を炭素源を含む培地に接種した後、リプレッサーRの性質に応じて誘導物質の添加もしくは培養温度の上昇または低下などにより転写抑制を解除することにより、酵素Xの発現量を増やして培養を続ける。その後、適切な時期にリプレッサーRによる抑制を回復させて、酵素Xの発現を抑制することにより、化合物Pからの化合物Qの生成量を増加させることができる(図8)。誘導物質の添加により誘導されるプロモータ

ーAを用いた場合には、該誘導物質の添加量を調節して培養後期に該誘導物質を枯渇させることにより、リプレッサーRによる抑制を回復させることができる。培養温度の上昇または低下により誘導がかかるプロモーターAを用いた場合には、リプレッサーRによる抑制が起こる温度に培養温度を戻すことにより、リプレッサーRによる抑制を回復させることができる。

[0072] 好ましくは、リプレッサーRの発現を誘導プロモーターBの制御下に置いた本発明の微生物を用いて、化合物Qの製造工程を培養前期と培養後期の2期に分けることにより化合物Qを製造する。すなわち、該微生物を炭素源を含む培地に接種し、菌体を増殖させた後に、誘導プロモーターBの性質に応じて誘導物質の添加もしくは培養温度の上昇または低下により誘導プロモーターBを活性化してリプレッサーRの生成量を増加させることにより、代謝物Mの生産を抑制し、化合物Pからの化合物Qの生成量を増加させることができる（図9）。

[0073] 本発明の製造方法において、化合物Qが本発明の微生物の増殖に影響を与える場合には、酵素Yの発現を誘導プロモーターCの制御下に置いた微生物を用いて、化合物Qの製造工程を培養前期と培養後期の2期に分けることにより化合物Qを製造することが好ましい。すなわち、該微生物を炭素源を含む培地に接種し、菌体を増殖させた後に、誘導プロモーターCの性質に応じて、誘導物質の添加もしくは培養温度の上昇または低下により誘導プロモーターCの転写を活性化して酵素Yの生成量を増加させることにより、化合物Pからの化合物Qの生成量を増加させることができる（図10）。さらに、培養後期に誘導プロモーターCの転写を活性化して酵素Yの生成量を増加させるとともに、誘導プロモーターBを活性化してリプレッサーRの生成量を増加させることにより、代謝物Mの生産を抑制し、化合物Pからの化合物Qの生成量を増加させてもよい（図11）。

[0074] この場合、プロモーターCとプロモーターBを同一のプロモーターにすることにより、プロモーターCの誘導をプロモーターBの誘導と同じ時期に行うことができる。また、プロモーターCとプロモーターBを同一の制御タン

パク質により転写制御を受けるプロモーター群の中から選ぶ場合には、それぞれが異なるプロモーターであっても、プロモーターCの誘導をプロモーターBの誘導と同じ時期に行うことができる。

[0075] 以上のように、本発明の微生物による製造方法を用いると、該微生物の増殖の状態または化合物Qが該微生物に与える影響に応じて、同一の微生物を用いて培養方法を変えることによって容易に化合物Qの生産量を最大化することができる。

[0076] 本発明の微生物を用いて製造できる化合物Qに関しては、炭素源から化合物Pを経由して生育に必須な代謝物Mを生成する生合成経路または代謝経路において、化合物Pから分岐した経路により化合物Qを生成できれば、いかなる化合物も製造することができる。

[0077] 化合物Pは、炭素源から生育に必須な代謝物を生成する生合成経路上の代謝物であれば、いかなる有機化合物であってもよい。たとえば、DHS、コリスミン酸、プレフェン酸、2-オキシイソ吉草酸、グルタミン酸、アルパラギン酸、アスパラギン酸β-セミアルデヒド、ホモセリンおよびセリンなどが挙げられる。化合物Qは、化合物Pを酵素Yにより転換することにより得られる物質であれば、いかなる有機化合物であってもよい。たとえば、プロトカテク酸、アントラニル酸、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、アロゲン酸、フェニルピルビン酸、2-イソプロピルリンゴ酸、バリン、γ-グルタミルリン酸、N-アセチルグルタミン酸、アスパラギン、2,3-ジヒドロジピコリン酸およびO-アセチルホモセリンなどが挙げられる。

[0078] 化合物PがDHSである場合、シキミ酸脱水素酵素（酵素X）によりシキミ酸（代謝物M）が生成するが、DHS脱水素酵素（酵素Y）によりプロトカテク酸（化合物P）を生産することができる。プロトカテク酸は、医薬、農薬、香料等の原料になるほか、新しいプラスチックの原料として期待されている2-ピロン-4,6-ジカルボン酸を微生物を用いて製造するときの原料として利用できる。

[0079] 化合物Pがコリスミン酸である場合、コリスミン酸ムターゼ（酵素X）に

よりプレフェン酸（代謝物M）が生成するが、アントラニル酸合成酵素（酵素Y）によりアントラニル酸（化合物P）を生産することができる。アントラニル酸は芳香族アミノ酸であるトリプトファンなどの合成原料となり、該微生物がトリプトファンの生合成経路を持っていれば、トリプトファンを直接生産することもできる。

[0080] 化合物Pがプレフェン酸である場合、プレフェン酸脱水酵素（酵素X）によりフェニルピルビン酸（代謝物M）が生成するが、本発明の微生物がエシェリヒア・コリK-12株などではプレフェン酸脱水素酵素（酵素Y）により4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（化合物Q）を生産することができる。4-ヒドロキシフェニルピルビン酸は芳香族アミノ酸であるチロシンの合成原料となり、該微生物が4-ヒドロキシフェニルピルビン酸からのチロシンの生合成経路を持っていれば、チロシンを直接生産することもできる。

[0081] 化合物Pがプレフェン酸である場合、プレフェン酸脱水酵素（酵素X）によりフェニルピルビン酸（代謝物M）が生成するが、本発明の微生物がコリネバクテリウム・グルタミカクなどではプレフェン酸アミノトランスフェラーゼ（酵素Y）によりアロゲン酸（化合物Q）を生産することができる。アロゲン酸は芳香族アミノ酸であるチロシンの合成原料となり、該微生物がアロゲン酸からのチロシンの生合成経路を持っていれば、チロシンを直接生産することもできる。

[0082] 化合物Pがプレフェン酸である場合、本発明の微生物がエシェリヒア・コリK-12株などではプレフェン酸脱水素酵素（酵素X）により4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（代謝物M）が生成し、本発明の微生物がコリネバクテリウム・グルタミカクなどではプレフェン酸脱水素酵素（酵素X）によりアロゲン酸（代謝物M）が生成するが、プレフェン酸脱水酵素（酵素Y）によりフェニルピルビン酸（化合物Q）を生産することができる。フェニルピルビン酸は芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンの合成原料となり、該微生物がフェニルアラニンの生合成経路を持っていれば、フェニルアラニンを直接生産することもできる。

- [0083] 化合物Pが2-オキソイソ吉草酸である場合、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（酵素X）によりバリン（代謝物M）が生成するが、2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素（酵素Y）により2-イソプロピルリンゴ酸（化合物Q）を生産することができる。2-イソプロピルリンゴ酸はロイシンの合成原料となり、該微生物がロイシンの生合成経路を持っていれば、ロイシンを直接生産することもできる。
- [0084] 化合物Pが2-オキソイソ吉草酸である場合、2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素（酵素X）により2-イソプロピルリンゴ酸（代謝物M）が生成するが、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（酵素Y）によりバリン（化合物Q）を生産することができる。
- [0085] 化合物Pがグルタミン酸である場合、アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ（酵素X）によりN-アセチルグルタミン酸（代謝物M）が生成するが、 γ -グルタミルキナーゼ（酵素Y）により γ -グルタミルリン酸（化合物Q）を生産することができる。 γ -グルタミルリン酸はプロリンの合成原料となり、該微生物がプロリンの生合成経路を持っていれば、プロリンを直接生産することもできる。
- [0086] 化合物Pがグルタミン酸である場合、 γ -グルタミルキナーゼ（酵素X）により γ -グルタミルリン酸（代謝物M）が生成するが、アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ（酵素Y）によりN-アセチルグルタミン酸（化合物Q）を生産することができる。N-アセチルグルタミン酸はアルギニンの合成原料となり、該微生物がアルギニンの生合成経路を持っていれば、アルギニンを直接生産することもできる。
- [0087] 化合物Pがアスパラギン酸である場合、アスパルトキナーゼ（酵素X）により β -アルパルチルリン酸（代謝物M）が生成するが、アスパラギン合成酵素（酵素Y）によりアスパラギン（化合物Q）を生産することができる。
- [0088] 化合物Pがアスパラギン酸 β -セミアルデヒドである場合、ホモセリン脱水素酵素（酵素X）によりホモセリン（代謝物M）が生成するが、ジヒドロキシピロリン酸合成酵素（酵素Y）により2, 3-ジヒドロジピコリン酸（

化合物Q)を生産することができる。2, 3-ジヒドロジピコリン酸はリジンの合成原料となり、該微生物が2, 3-ジヒドロジピコリン酸からリジンを合成する生合成経路を持っていれば、リジンを直接生産することもできる。

[0089] 化合物Pがホモセリンである場合、ホモセリンキナーゼ(酵素X)によりホモセリンリン酸(代謝物M)が生成するが、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ(酵素Y)によりO-アセチルホモセリン(化合物Q)を生産することができる。O-アセチルホモセリンはメチオニンの合成原料となり、該微生物がメチオニンの生合成経路を持っていれば、メチオニンを直接生産することもできる。

[0090] 化合物Pがホモセリンである場合、ホモセリンアセチルトランスフェラーゼ(酵素X)によりO-アセチルホモセリン(代謝物M)を生成するが、ホモセリンキナーゼ(酵素X)によりホモセリンリン酸(化合物Q)を生産することができる。ホモセリンリン酸はトレオニンやイソロイシンの合成原料となり、該微生物がイソロイシンの生合成経路を持っていれば、トレオニンやイソロイシンを直接生産することもできる。

[0091] 化合物Pがセリンである場合、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(酵素X)によりグリシン(代謝物M)が生成するが、セリントランスフェラーゼ(酵素Y)によりO-アセチルセリン(化合物Q)を生産することができる。O-アセチルセリンはシステインの合成原料となり、該微生物がシステインの生合成経路を持っていれば、システインを直接生産することもできる。

[0092] 上記の化合物Qの生産に関わる酵素Yをコードする遺伝子は、本発明の微生物由来の遺伝子を用いてもよいし、本発明の微生物とは異なる原核生物または真核生物由来の遺伝子を用いてもよい。たとえば、本発明の微生物を用いてプロトカテク酸を製造するときには、ATCC13032株はDHS脱水酵素遺伝子を持っているので、該遺伝子産物をプロトカテク酸の生産に用いればよいが、エシェリヒア・コリK-12株はDHS脱水酵素遺伝子を持っていないので

、他の微生物由来のDHS脱水酵素遺伝子を用いる必要がある。

[0093] ここで、より具体的な例として、上述のATCC13032株由来のDHS生産菌株に性質（e e）を付与することにより造成できるプロトカテク酸を効率よく生産する菌株について詳しく述べる。

[0094] プロトカテク酸を生産するATCC13032株由来の菌株とは、上述の性質（a a）～（d d）に加えて、下記の性質（e e）を有する微生物である。

（e e）DHSからプロトカテク酸に転換するDHS脱水酵素（酵素Y）のタンパク質をコードするqsuB遺伝子（遺伝子y；塩基番号444,184～446,040）の転写を促す本来のプロモーターとは異なり、かつプロモーターAとも異なるプロモーターCによりqsuB遺伝子の転写が制御される。

[0095] 上述の性質（a a）～（e e）を有するATCC13032株由来の菌株は、グルコースなどの炭素源をもとにプロトカテク酸を生産できるが、該菌株はプロトカテク酸ジオキシゲナーゼを有しているので、生成したプロトカテク酸を分解してプロトカテク酸の量が減少させる可能性がある。したがって、プロトカテク酸4，5－ジオキシゲナーゼ・アルファサブユニット・タンパク質をコードするpcaG（cg2630）遺伝子（相補鎖塩基番号2,511,382～2,511,996）および／またはプロトカテク酸4，5－ジオキシゲナーゼ・ベータサブユニット・タンパク質をコードするpcaH（cg2631）遺伝子（相補鎖塩基番号2,512,008～2,512,700）の翻訳領域または該遺伝子の転写・翻訳調節領域の中に、1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することにより、該酵素が有する分解活性を欠損または低下させることが好ましい。

[0096] また、該菌株は、プロトカテク酸の5位を水酸化し、没食子酸への変換を触媒するパラヒドロキシ安息香酸ヒドロキシラーゼを有しているので、生成したプロトカテク酸の一部を没食子酸に転換する可能性がある。したがって、パラヒドロキシ安息香酸ヒドロキシラーゼ・タンパク質をコードするpobB（cg1226）遺伝子（相補鎖塩基番号1,126,301～1,127,488）の翻訳領域または該遺伝子の転写・翻訳調節領域の中に、1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することにより、該パラヒドロキシ安息香酸ヒドロキ

シラーゼが有する水酸化活性を欠損または低下させることが好ましい。

[0097] 以下に、本発明の微生物の造成にあたり、DNAクローニングと変異導入株造成の方法について述べる。なお、上述のように、本発明の微生物は、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、アルスロバクター属、ノカルディオイダセアエ属、ミクロバクテリウム属、ストレプトマイセス属、アミコカクトプシス属、ロドコッカス属、キネオコッカス属、アシネトバクター属、シュードモナス属、パントアエ属、クレブシエラ属およびエシェリヒアに属する微生物であるなら、いずれの微生物も用いることができるが、ATCC13032株について変異導入の方法について詳しく説明する。なお、DNAクローニングと変異を導入するために用いる宿主菌としては、主にエシェリヒア・コリK-12株を用いる。

[0098] 上記のエシェリヒア・コリK-12株とATCC13032株は、それぞれエシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌の培養に通常用いられる公知の方法により培養する。培養後、公知の方法（例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法）により、該微生物の染色体DNAを単離・精製する。制限酵素消化法、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法、または合成DNAを用いたハイブリダイゼーション法などにより、該染色体DNAから上記プロモーターまたは代謝酵素などをコードするDNAを含む断片を取得することができる。

[0099] DNAクローニングや変異導入のためにDNAを連結するためのエシェリヒア・コリ用ベクターとしては、エシェリヒア・コリK-12株などにおいて自立複製可能なベクターであればプラスミドベクター、ファージベクター等いずれも使用可能であるが、具体的には、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pUC18、pBR322等を用いることができる。

[0100] 上記ベクターの宿主として用いるエシェリヒア・コリは、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができるが、具体的には、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、エシェリヒア・コリJM109、エシェリ

ヒア・コリBL21等をあげることができる。

[0101] コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、アルスロバクター属、ノカルディオイダセアエ属、ミクロバクテリウム属、ストレプトマイセス属、アミコカクトプシス属、ロドコッカス属、キネオコッカス属、アシネトバクター属、シュードモナス属、パントアエ属、クレブシエラ属およびエシェリヒア属に属する微生物の中に、上記DNAを導入するときは、これら微生物の中で自立複製可能なベクターを用いる。好ましくは、該微生物のいずれかとエシェリヒア・コリK-12株の両方の微生物の中で自立複製可能なシャトル・ベクターを用いて、組換えDNAを宿主となる該微生物に導入することができる。

[0102] コリネバクテリウム属細菌で自立複製可能なシャトル・ベクターとしては、pAM330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM1519（特開昭58-77895号公報参照）等が挙げられる。また、これらのベクターからコリネバクテリウム内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、エシェリヒア・コリーコリネバクテリウム用シャトル・ベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリおよびコリネバクテリウムの両方で自律複製可能なベクターとして使用することができる。たとえば、エシェリヒア・コリ用ベクターであるpHSG298（タカラバイオ社製）に、コリネバクテリウム属株でプラスミドを複製させるための複製領域として、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13058株が有するプラスミドpHM1519の複製領域を挿入することにより、当該シャトル・ベクターを構築することができる。当該シャトル・ベクターを保持できる。ATCC13032株とコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13058株は、独立行政法人・製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門（以下、N I T Eと略記する）より入手することができる。

[0103] DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、電トロポレーション法〔Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。コリネバクテリウム・グルタミカムへのDNAの導入は、van der Restらの方法〔Appl. Micr

obiol. Biotechnol., 52, 541 (1999)) によっても行うことができる。

[0104] 上記のようにして得られた形質転換体からDNAを抽出し、該DNAに含まれる本発明のDNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定には、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕または3730xl型DNAアナライザー（アプライド・バイオシステムズ社製）等の塩基配列分析装置を用いることができる。

[0105] また、上記において決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することによっても目的とするDNAを調製することもできる。

[0106] 目的のフェノタイプを有する菌株は、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンやエチルメタンサルホン酸などの変異剤を用いた処理やUVや放射線の照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによって変異を導入することによって得られる。あるいは、該菌株は、変異を導入する領域のDNAをクローニングして、試験管内（イン・ビトロ）でDNAに変異を導入する。大きな置換変異を導入する場合には、該菌株内で複製可能なベクターに置換すべきDNAを乗せたプラスミドを構築した後に、該プラスミドを該菌株に導入する、または該プラスミドと染色体DNAとの間の相同組換えにより、置換変異を導入することもできる。導入する変異の種類については、目的のフェノタイプが現れるならば、塩基置換変異、欠失変異、挿入変異または大きなDNA断片との置換変異のいずれでもよく、かつ変異の大きさについても、1塩基以上であれば、いかなる大きさの変異であってもよい。以下、変異の導入方法は特記しない限り、上記の方法を用いる。

[0107] 本発明の微生物において、プロモーターや転写制御タンパク質以外で遺伝子の発現量を調節する必要があるときには、リボソーム結合配列と翻訳開始コドンの間の距離の調整、翻訳開始コドンの周囲の配列の改変、または翻訳領域内の塩基配列の改変などにより該遺伝子の翻訳開始効率を調節することができる。

[0108] このようにして得られる変異を導入するためのDNAは、通常エシェリヒア・

コリ内で複製可能なプラスミドに挿入した後、上述したDNAの導入法を用いて宿主菌であるコリネバクテリウム・グルタミカムに導入する。該プラスミドが温度感受性ベクターである場合には高温培養選択により、また宿主菌内で発現しうるカナマイシン耐性など抗生物質耐性マーカーを有する場合には、該抗生物質耐性選択により、1回交差型相同組換え体を選別する。該DNA断片と相同な染色体の領域において2回交差型相同組換えによって該DNAが置換された変異株を得るには、通常W Jagerら〔J. Bacteriol. 174, 5462 (1992)〕が開発したバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 168株のレバンスクラゼ遺伝子 (sacB遺伝子) を用いる方法を用いることができる。スクロース耐性選択を用いる。本方法を用いると、バチルス・サブチリス168株のsacB遺伝子を発現させたコリネバクテリウム・グルタミカムはスクロースを含む培地では致死性的になるので、2回交差型相同組換えによってレバンスクラゼ遺伝子を失った変異株をスクロース耐性選択によって得ることができる。

[0109] 本発明の微生物の培養は、炭素源、窒素源、無機塩、各種ビタミン等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばブドウ糖、ショ糖、果糖等の糖類、エタノール、メタノール等のアルコール類、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸等の有機酸類、グリセロール、廃糖蜜等が用いられる。窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独または混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

[0110] 培養は、通常、通気攪拌、振とう等の好気条件下で行う。培養温度は、本発明の微生物が生育し得る温度であれば特に制限はなく、また、培養途中のpHについても本発明の微生物が生育し得るpHであれば特に制限はない。培養中のpH調整は、酸またはアルカリを添加して行うことができる。

[0111] 培養終了後の培養液中の目的の有機化合物は、必要に応じて遠心分離等に

より該培養液から菌体等の不溶成分を除いた後、例えば、酢酸エチル等の有機溶媒による抽出法、活性炭を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、晶析法、塩析などの沈殿法、蒸留法等の方法を単独でまたは組み合わせることによって目的の有機化合物を採取することができる。

実施例

[0112] 以下に、本発明の微生物として、化合物PとしてDHSを効率よく生産するATCC13032株の菌株の造成と該微生物によるDHSの製造法について実施例により具体的に述べる。また、本発明の微生物として、化合物Qとしてプロトカテク酸を効率よく生産するATCC13032株の菌株の造成と該微生物によるプロトカテク酸の製造法について実施例により具体的に述べる。なお、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0113] 実施例1. Pben-vanR株とNSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株のDHS生産性の比較

以下のようにして、qsuB遺伝子のインフレーム欠失変異によりDHSからプロトカテク酸への転換能を失い、benAプロモーターの制御下にあるvanR遺伝子がコードするVanRリプレッサーによりaroE3遺伝子の発現が抑制されるPben-vanR株（参考例11）、およびqsuB遺伝子とqsuD遺伝子とaroE3遺伝子のインフレーム欠失変異により、DHSからシキミ酸への転換能とDHSからプロトカテク酸への転換能を失ったNSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株（参考例10）を3Lジャーファーマンターで培養し、DHSの生産性試験を行った。なお、これらの菌株は、DAH PからDHSの合成に関わる4種類の遺伝子（aroF、aroG、aroBおよびaroD遺伝子）の転写がTuプロモーターによって制御されるために、野生株と比べてDHS生成量が向上している。

[0114] これら菌株の前々培養および前培養用の培地としては、CGXII培地（硫酸アンモニウム 20 g/L、尿素 5 g/L、リン酸二水素カリウム 1 g/L、リン酸水素二カリウム 1 g/L、硫酸マグネシウム・7水和物0.25 g/L、塩化カルシウム 10 mg/L、硫酸第一鉄・7水和物 10 mg/L、硫酸マンガン・5水和物10 mg/L、硫酸亜鉛・7水和物1 mg/L、硫酸銅 0.2 mg/L、塩化ニッケル・6水和物 0.02 mg/L、ビオチン 0.2 mg/L、グルコース 20 g/L、プロトカテク酸 30 mg

/L、pH7.0)を用いた。これら菌株の前々培養液1%を前培養液に接種した後、30℃で24時間培養した。前培養液を吸光度600nmが3.0になるようにCGXII培地で希釈した後、3 Lジャーファーマンター（エイブル株式会社製BMS-03NP2）内の本培養用培地（0.9 L）に1%だけ摂取した。本培養用培地としては、2.1 g/Lの無水クエン酸と1.0 g/Lの硫酸鉄・7H₂Oを含むCGXII培地であるCGCF培地を用いた。以下、DHSならびにプロトカテク酸の生産実験は特記しない限りこの方法を用いて行った。

[0115] なお、NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株は、CGXII培地とCGCF培地では極めて生育が悪いために、0.5 g/Lのトリプトファン、0.4 g/Lのフェニルアラニン、0.45 g/Lのチロシン、17 mg/Lのシキミ酸、45 mg/LのビタミンK2 および14 mg/Lのパラアミノ安息香酸をこれらの培地に添加して培養した。本培養開始後に適時培養液を採取して、5%アセトニトリル水溶液で1000倍に希釈し、高速液体クロマトグラフィー（Waters社、LCT Premier XE）を用いて表1の分離条件で分析した後に、濃度既知のDHS水溶液（DHSはSigma社から購入）を対照としたDHSピークの面積の比をもとに算出した。以下、DHSの定量はこの方法を用いて測定した。

[0116] Pben-vanR株については、本培養開始時に終濃度5 mMの安息香酸を添加し、38時間後にグルコースを4.0 g/時間の割合で添加し、さらに48時間培養した。一方、NSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株は、本培養開始後45.5時間の時点でグルコースを6.0 g/時間の割合で添加し、さらに16.5時間培養した。Pben-vanR株とNSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株のDHSの生産量はそれぞれ培養開始後86時間目と62時間目に最大化し、これら菌株のDHSの最大生産量はそれぞれ15.4 g/Lと7.7 g/Lであった。この結果より、aroE遺伝子の発現をVanRリプレッサーで人為的に制御できるPben-vanR株は、芳香族アミノ酸などを含む培地中で培養したNSHΔaroE3ΔqsuBΔqsuD株と比較して、芳香族アミノ酸などを含まない培地中で培養してもDHSの生産性が優れていることは明らかになった。

[0117]

[表1]

表1. LCT Premier XEのHPLC分析条件

HPLC分離カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters社製、内径2.1 mm、長さ50 mm)	
カラム温度	40℃	
溶媒流速	0.4 ml/分	
移動相A	水	
移動相B	アセトニトリル	
グラジエント条件	0分 (開始)	2% 移動相B
	0.75分	5% 移動相B
	1.75分	30% 移動相B
	1.76分	5% 移動相B
	2.50分	5% 移動相B

[0118] 実施例2. NSHΔaroE3株およびNSHΔaroE3__vanE3株を用いたプロトカテク酸の生産

以下のようにして、aroE3遺伝子にインフレーム欠失変異を有するNSHΔaroE3株（参考例7参照）、ならびに該菌株をもとにVanRリプレッサーの制御下でaroE3遺伝子を発現するように改変したNSHΔaroE3__vanE3株（参考例8参照）を、3 Lジャーファーマンターで培養してプロトカテク酸の生産量を比較した。

[0119] これら菌株をCGXII培地で培養した培養液を、吸光度600nmが3.0になるようにCGXII培地で希釈した後、3 Lジャーファーマンター内のCGCF培地（0.9 L）に1%だけ接種した。なお、NSHΔaroE3株は、aroE3遺伝子の欠失変異によりCGXII培地とCGCF培地では極めて生育が悪いために、50 mg/Lのトリプトファン、50 mg/Lのフェニルアラニン、50 mg/Lのチロシンおよび17 mg/Lのシキミ酸をこれら培地に添加して培養した。本培養開始後24時間の時点でグルコースを2.0 g/時間の割合で添加し、さらに62.5時間培養した。本培養開始後に適時培養液を採取して、培養液を5%アセトニトリル水溶液で1000倍に希釈し、高速液体クロマトグラフィー（Water社、LCT Premier XE）を用いて表1の分離条件で分析した後に、濃度既知のプロトカテク酸水溶液（プロトカテク酸は和光純薬工業株式会社から購入）を対照としたプロトカテク酸ピークの面

積の比をもとに算出した。以下、プロカテク酸の定量はこの方法を用いて測定した。その結果、NSH Δ aroE3株とNSH Δ aroE3__vanE3株のプロトカテク酸の生産量はそれぞれ培養開始後48時間目と62.5時間目に最大化し、これら菌株のプロトカテク酸の最大生産量はそれぞれ0.5 g/Lと16.6 g/Lであった。この結果より、aroE遺伝子の発現をVanRリプレッサーで制御する菌株を芳香族アミノ酸とシキミ酸を含まない培地中で培養すると、芳香族アミノ酸とシキミ酸を含む培地中で培養したNSH Δ aroE3株のプロトカテク酸の生産量と比較して、約33倍のプロトカテク酸を生産することが明らかになった。

[0120] 実施例3. NSH Δ aroE3__vanE3株とNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株を用いたプロトカテク酸の生産

以下のようにして、上述のNSH Δ aroE3__vanE3株（参考例8）、qsuB遺伝子の発現を安息香酸の添加により誘導できるように育種したNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株（参考例12）、ならびにqsuB遺伝子およびvanR遺伝子の発現を安息香酸の添加により誘導できるように育種したNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株（参考例13）を、それぞれ3 Lジャーファーマンターを用いて培養することによりプロトカテク酸の生産量を比較した。NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株については本培養開始後14.5時間の時点で安息香酸を終濃度5 mM添加することによりqsuB遺伝子を誘導し、またNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株については本培養開始後15.5時間の時点で安息香酸を終濃度5 mM添加することによりqsuB遺伝子とvanR遺伝子を誘導した。NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株、およびNSH Δ aroE3__vanE3株については、それぞれ本培養開始後14.5時間、15.5時間および18.5時間の時点でグルコースを3.5 g/時間の割合で添加し、本培養開始より62時間後に培養を終了した。その結果、NSH Δ aroE3__vanE3株、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株のプロトカテク酸の生産量はそれぞれ培養開始後43.8時間目と43.8時間目と38.5時間目に最大化し、これら菌株の

プロトカテク酸の最大生産量はそれぞれ8.5 g/L、8.6 g/L、15.2 g/Lであった。この結果から、VanRリプレッサーの制御下でaroE3遺伝子を発現する菌株は著量のプロトカテク酸を蓄積できるとともに、VanRリプレッサー量を増加させてaroE3遺伝子の発現抑制を強化した方が、プロトカテク酸の生産性が高いことが明らかになった。

[0121] 実施例4. NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株とtkk株を用いたプロトカテク酸の生産

以下のようにして、上述のNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株（参考例13）および該菌株のトランスケトラゼ発現を強化したtkk株（参考例14）をそれぞれ3 Lジャーファーマンターを用いて培養することによりプロトカテク酸の生産量を比較した。それぞれの菌株ともに、本培養開始後17時間の時点で安息香酸を終濃度5 mM添加し、また本培養開始後24時間の時点でグルコースを4.5 g/時間の割合で添加し、培養開始から64時間後に培養を終了した。その結果、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株とtkk株のプロトカテク酸の生産量はそれぞれ培養開始後40時間目と45時間目に最大化し、これら菌株のプロトカテク酸の最大生産量はそれぞれ14.8 g/L、20.0 g/Lであった。この結果から、VanRリプレッサーによるaroE遺伝子の発現制御に加えて、トランスケトラゼ発現を増強すると、プロトカテク酸の生産性が向上することが明らかになった。

[0122] 実施例5. RhoRリプレッサーによる制御系を利用したプロトカテク酸の生産

上述の実施例はすべてVanRリプレッサーによりaroE3遺伝子の発現を制御した生産実験であったが、VanRリプレッサーの代わりにRhoRリプレッサーによりaroE3遺伝子の発現を制御し、かつnagIプロモーターの制御下でqsuB遺伝子とrhoR遺伝子を発現するPnag-qsuB-rhoR株（参考例17）を用いて、nagIプロモーターの転写誘導の有無によるプロトカテク酸の生産性の差を、以下のようにして調べた。Pnag-qsuB-rhoR株のnagIプロモーターの転写を誘導する場合には、本培養開始後16.5時間の時点で3-ヒドロキシ安息香酸を5 mMになるように添加し、20.5時間の時点でグルコースを4.9 g/時間の割合で添加し

、培養開始から62.5時間後に培養を終了した。Pnag-qsuB-rhcR株のnagIプロモーターの転写を誘導しない場合には、3-ヒドロキシ安息香酸を添加せずに、培養開始から62.5時間後に培養を終了した。その結果、。その結果、nagIプロモーターの転写誘導を行ったPnag-qsuB-rhcR株のnagIプロモーターの転写誘導を行わないPnag-qsuB-rhcR株のプロトカテク酸の生産量はそれぞれ培養開始後47.5時間目と43.5時間目に最大化し、それぞれのプロトカテク酸の最大生産量は11.2 g/L、8.4 g/Lであった。この結果より、RhcRリプレッサーによってaroE3遺伝子とqsuB遺伝子の発現を制御した場合でも著量のプロトカテク酸が生産できるとともに、培養後期にRhcRリプレッサーの量を増強した方がプロトカテク酸の生産性が高くなることが明らかになった。

[0123] 参考例 1. 大腸菌-コリネバクテリウム属細菌用シャトル・ベクターpHCG298の構築

プラスミドpHM1519を保持するコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13058株は、N I T Eより入手し、プラスミドpHM1519を常法により単離した。続いて、ATCC13032株中で機能するカナマイシン耐性遺伝子を保持する大腸菌用ベクターpHSG298（タカラバイオ株式会社製）に制限酵素BglII部位とNcoI部位を付加するために2種類のDNA（配列番号1と2）を合成した。これらDNAをpHSG298のKpnI部位とPstI部位の間に挿入し、プラスミドpHSG298BNを構築した。続いて、プラスミドpHM1519から、プラスミド複製領域を含む約3.1 kbのBglII断片をBglII消化により切り出し、pHSG298BNのBglII部位に挿入することにより、プラスミドpHCG100を構築した。このpHCG100を制限酵素BglIIとNcoIによって消化した後、Blunting Highキット（東洋紡績株式会社製）を用いて制限酵素切断末端を平滑末端に変えた。pHCG100由来の約1.9 kbのBglII（平滑末端）-NcoI（平滑末端）断片を精製した後、pHSG298のStuI部位に挿入することにより、大腸菌-コリネバクテリウム用シャトル・ベクターpHCG298を構築した。

[0124] 参考例 2. レバンスクラゼ構成的発現プラスミドpHKPsacB1の構築

コリネバクテリウム属細菌において2回交差型相同組換えにより目的DNA領

域を染色体の特定領域に組み込むときに用いるレバンスクラゼ遺伝子を構成的に発現するプラスミドpHKPsacB1を以下のようにして構築した。

[0125] 1. レバンスクラゼ遺伝子のクローニング

2 回交差型相同組換えにより目的DNA領域が染色体の特定領域に組み込まれた株を選別するため、宿主細胞に対して致死的に機能するレバンスクラゼをコードするバチルス・サブチリス168株のsacB遺伝子を選別マーカーとして用いることにした。バチルス・サブチリス168株は、理化学研究所微生物系統保存施設よりIAM2118株として入手した。また、バチルス・サブチリス168株のゲノム配列情報（GBアクセッション番号：NC_000964）をNCBIよりインターネット経由で取得した。バチルス・サブチリス168株の染色体DNAを染色体DNA抽出キット（RBC Bioscience社製）を用いて精製した。この染色体DNA（100 ng）を鋳型として、2種類のDNAプライマー（配列番号3と4）を用いてPCR反応を行うことにより、sacB遺伝子を含む増幅DNA断片を得た。続いて、Taq DNAポリメラーゼを用いて増幅DNA断片の3'末端へA残基を付加した。増幅DNA断片をゲル電気泳動後に回収し、精製した後、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、sacB遺伝子を保持するプラスミドpTBSACB1を構築した。

[0126] 2. プラスミドpHKPsacB1の構築

配列番号5～12で表わされる8本の合成DNAを合成した後に、これら合成DNAをpT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、sacB遺伝子を構成的に発現するプラスミドpTRKD2を構築した。続いて、上記1で取得したプラスミドpTBSACB1上のsacB遺伝子領域を制限酵素HindIIIとKpnIならびに制限酵素KpnIとXbaIを用いて消化することより、sacB遺伝子領域から由来する1.0 kbのHindIII-KpnI断片と0.4 kbのKpnI-XbaI断片を得た。これら2つのDNA断片を、上で取得したpTRKD2由来の0.2 kbのHindIII-SphI断片ともに、大腸菌用クローニングベクターpHSG298（タカラバイオ社製）のSphI部位とXbaI部位の間に挿入することにより、sacB遺伝子構成的発現プラスミドpHKPsacB1を構築した。プラスミドpHKPsacB1は、コリネバクテリウム属細菌の染色体DNAと相同性が

高いDNAを運ぶときには、染色体DNAとプラスミドの間で相同組換えを起こり、プラスミド全体が染色体上に取り込まれる。そのために得られた菌株がカナマイシン耐性かつスクロース感受性の表現型を示す。その後、2回交差型相同組換えが起こると、プラスミド由来DNA領域が染色体上から排除される。その結果、当該細菌はカナマイシン感受性かつスクロース耐性の表現型を示す。

[0127] 参考例 3. ATCC13032株の修飾・制限酵素遺伝子を破壊したHT23株の作製

1. DNA修飾・制限酵素遺伝子破壊用プラスミドの構築

以下のようにして、ATCC13032株をもとに、DNA修飾・制限酵素遺伝子を破壊したHT23株を造成した。ATCC13032株は、N I T E よりNBRC12168株として入手した。また、下記の実施例で示す塩基番号は、ATCC13032株のゲノム配列の塩基番号であり、該ゲノム配列情報については、N C B I のG Bデータベースから、アクセッション番号NC_006958としてインターネット経由で取得した。また、ATCC13032株を含むコリネバクテリウム属細菌の培養は、特記しない限り、CGYE培地（硫酸アンモニウム 20 g/L、尿素 5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.25 g/L、酵母エキス 1 g/L、CaCl₂ 10 mg/L、FeSO₄・7H₂O 10 mg/L、MnSO₄・5H₂O 10 mg/L、ZnSO₄・7H₂O 1 mg/L、CuSO₄ 0.2 mg/L、NiCl₂・6H₂O 0.02 mg/L、ビオチン 0.2 mg/L、グルコース 20 g/L、pH7）を用いて行った。

[0128] ATCC13032株が保有するDNA修飾酵素をコードするcglIM (cg1996) 遺伝子（塩基番号1,879,784~1,880,875）、ならびに2つの制限酵素をコードするcglIR (cg1997) 遺伝子（塩基番号1,880,884~1,881,960）およびcglIIR (cg1998) 遺伝子（塩基番号1,881,962~1,883,860）はゲノム上に連続して存在している。これら3遺伝子の発現を欠損させるために、該菌株の染色体DNAの一部（塩基番号1,879,784~1,883,860）を以下の手順で欠失させた。

[0129] DNA修飾・制限酵素遺伝子の5' フランキング領域（塩基番号1,878,625~1,879,745）を増幅させるために2種類のプライマー（配列番号13と14）を合成した。ATCC13032株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを

用いるPCR法により該5' フランキング領域を増幅した。Taq DNAポリメラーゼによって増幅DNA断片の3' 末端にA 残基を付加した後、増幅DNA断片をゲル電気泳動法により精製し、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、該5' フランキング領域を保持するプラスミドpTUSR1Fを構築した。次に、DNA修飾・制限酵素遺伝子領域の3' フランキング領域（塩基番号1,883,891~1,885,298）を増幅させるために、2種類のプライマー（配列番号15と16）を合成した。ATCC13032株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法により該3' フランキング領域を増幅した。Taq DNAポリメラーゼによって増幅DNA断片の3' 末端にA 残基を付加した後、増幅DNA断片をゲル電気泳動法により精製し、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、該3' フランキング領域を保持するプラスミドpTDSR1Rを構築した。続いて、プラスミドpTUSR1Fから上記5' フランキング領域を含む約1.1 kbのBamHI-XhoI断片を調製した。また、プラスミドpTUSR1Rから上記3' フランキング領域を含む約1.4 kbのXbaI-XhoI断片を調製した。さらにプラスミドpHKPsacB1（参考例2の2）からsacB遺伝子構成的発現領域を含む約1.6 kbのBamHI-SphI断片を調製した。これら3断片を大腸菌用クローニングベクターpHSG298のBamHI部位とXbaI部位の間に挿入し、DNA修飾・制限酵素遺伝子破壊用プラスミドpHKSD0977-9を構築した。

[0130] 2. DNA修飾・制限酵素遺伝子破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKSD0977-9をATCC13032株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、SCR株を取得した。配列番号13と16のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりSCR株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、SCR株はプラスミドpHKSD0977-9がDNA修飾・制限酵素遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0131] SCR株を1 mLのLB液体培地（10 g/l トリプトン、5 g/l 酵母エキス、10 g/l 塩化ナトリウム）の中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含

有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、HT23株を得た。配列番号13と14のプライマーを用いるPCR法により、HT23株が予想通りDNA修飾・制限酵素遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0132] 参考例4. *pcaH*・*pcaG*遺伝子の破壊株の造成

以下のようにして、参考例3で造成したHT23株をもとに、プロトカテク酸4,5-ジオキシゲナーゼをコードする*pcaH*・*pcaG*遺伝子を欠損させるために、ATCC13032株の染色体DNAの一部（相補鎖塩基番号2,511,382~2,512,700）を欠失したDRHG株を造成した。

[0133] 1. *pcaH*・*pcaG*遺伝子破壊用プラスミドの構築

HT23株の*pcaH*・*pcaG*遺伝子の5'フランキング領域（塩基番号2,512,743~2,513,990）を増幅するための2種類のプライマー（配列番号17と18）を合成した。HT23株の染色体DNA（100 ng）を鋳型として、これらのプライマーを用いるPCR法により該5'フランキング領域を増幅した。続いて、Taq DNAポリメラーゼによって増幅DNA断片の3'末端にA残基を付加した後、増幅DNA断片をゲル電気泳動法により精製し、pT7Blue-Tベクター（ノバジェン社製）に組み込むことにより、該5'フランキング領域を持つプラスミドpTPCAUSR1Fを構築した。同様にして、HT23株の3'フランキング領域（相補鎖塩基番号2,510,015~2,511,377）を増幅するための2種類のプライマー（配列番号19と20）を合成し、HT23株の精製染色体DNAを鋳型としてこれらのプライマーを用いるPCR法により該3'フランキング領域を増幅した。Taq DNAポリメラーゼによって増幅DNA断片の3'末端にA残基を付加した後、増幅DNA断片をゲル電気泳動法により精製し、pT7Blue-Tベクターに組み込むことにより、該3'フランキング領域を持つプラスミドpTPCADSR1Rを構築した。制限酵素消化によりpTPCAUSR1Fから上記5'フランキング領域を含む約1.3 kbのEcoRI-MluI断片を調製した。また、制限酵素消化によりpTPCADSR1Rから上記3'フランキング領域を含む約1.4 kbのMluI-BamHI断片を調製した。さらに、制限酵素消化によりプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）から*sacB*遺伝子領域を含む約1.6 kbのBamHI-SphI断片を調製した後、これら3つの断片を大腸菌

用クローニングベクターpHSG298のEcoRI部位とSphI部位の間に挿入し、遺伝子破壊用プラスミドpHKSDPHG1を構築した。

[0134] 2. DRHG株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKSDPHG1をHT23株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、SCRHG株を取得した。配列番号21と22のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりSCRHG株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、SCRHG株はプラスミドpHKSDPHG1がpcaH・pcaG遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0135] SCRHG株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、DRHG株を得た。配列番号23と24のプライマーセットを用いるPCR法により、DRHG株が予想通りpcaH・pcaG遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。なお、配列番号25と26のプライマーを用いたPCR反応を行ったところ、増幅DNA断片が得られなかったことから、DRHG株はsacB遺伝子を欠損していることも確認できた。

[0136] 参考例5. pobB遺伝子の破壊株の造成

パラヒドロキシ安息香酸ヒドロキシゲナーゼをコードするpobB遺伝子を破壊し、プロトカテク酸から没食子酸の生成を抑制するために、参考例4で造成したDRHG株をもとに、染色体DNAの一部（相補鎖塩基番号1,126,301～1,127,488b）を欠失したDRHG145株を以下のようにして造成した。

[0137] 1. pobB遺伝子破壊用プラスミドの構築

pobB遺伝子の3' フランキング領域を（塩基番号1,125,101～1,126,300）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SphI部位とXbaI部位を付加するために、2種類のDNAプライマー（配列番号27と28）を合成した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりpobB遺伝子の3' フランキング領域を増幅した。次に、pobB遺伝子の5' フラン

キング領域（塩基番号1,127,505～1,128,687）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素XbaI部位とSalI部位を付加するために2種類のDNAプライマー（配列番号29と30）を合成した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりpobB遺伝子の5'フランキング領域を増幅した。3'フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素SphIとXbaIで消化し、また5'フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素XbaIとSalIで消化した後、これらのDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSphI部位とSalI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacBΔpobBを得た。

[0138] 2. pobB遺伝子破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacBΔpobBをDRHG株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、DRHG_Km株を取得した。配列番号27と30のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりDRHG_Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、これら菌株はプラスミドpHKPsacBΔpobBがpobB遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0139] DRHG_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、DRHG145株を得た。配列番号27と30のプライマーを用いるPCR法により、DRHG145株が予想通りpobB遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0140] 参考例6. aroF遺伝子、aroG遺伝子、aroB遺伝子およびaroD遺伝子の転写をTuプロモーターの制御下に置いたNSH株の造成

以下の4段階で、D A H PからD H Sの合成に関わる4種類の遺伝子（aroF、aroG、aroBおよびaroD遺伝子）の転写を、ATCC13032株のTuプロモーター（塩基番号526,013～526,374）の制御下に置くことにより、D H S生成量を増強したNSH株を造成した。

[0141] 1. qsuB遺伝子、aroD遺伝子およびqsuD遺伝子のプロモーターをTuプロモ-

ターと置換したNUA株の作製

ATCC13032株のqsuB遺伝子、aroD遺伝子、qsuD遺伝子はオペロン構造を形成しており（以下、aroオペロンという）、同一の制御因子（cg0500遺伝子産物）により、発現量が調節されている。参考例5で造成したDRHG145株をもとに、このaroオペロンのプロモーター領域（塩基番号441,597～442,756）を転写活性が強いTuプロモーターと置換したNUA株を以下のようにして造成した。

[0142] （１）cg0500遺伝子とaroプロモーターの領域をTuプロモーターと置換するためのプラスミドの構築

cg0500遺伝子の5' フランキング領域（塩基番号440,437～441,596）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SphI部位とRsrII部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号31と32）を合成した。aroプロモーターの3' フランキング領域（塩基番号442,757～443,916）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素PfoI部位とSbfI部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号33と34）を合成した。また、Tuプロモーター領域を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素RsrII部位とPfoI部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号35と36）を合成した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これら3組のプライマーセットを用いるPCR法によりcg0500遺伝子の5' フランキング領域、aroオペロンのプロモーター領域の3' フランキング領域、およびTuプロモーターを増幅した。

[0143] cg0500遺伝子の5' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素SphIとRsrIIで消化し、またaroオペロンのプロモーター領域の3' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素PfoIとSbfIで消化し、またTuプロモーターの増幅DNA断片を制限酵素RsrIIとPfoIで消化した後、これらの制限酵素によって得られた3種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクロニングサイト内にあるSbfI部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__aro-Ntuを得た。

[0144] （２）プラスミドpHKPsacB__aro-Ntuを用いた相同組換え体の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、pHKPsacB__Ntu-aroを

DRHG145株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、DRHG145_Km株を取得した。配列番号31と34のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりDRHG145_Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、DRHG145_Km株はプラスミドpHKPsacB_Ntu-aroがcg0500遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0145] DRHG145_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NUA株を得た。配列番号37のプライマーを合成し、これと配列番号36のプライマーと、配列番号31と34のプライマーを用いるPCR法により、DRHG145株が予想通りcg0500遺伝子とaroプロモーターがTuプロモーターと置換されている株2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0146] 2. aroG遺伝子のプロモーターをTuプロモーターと置換したNDSGU株の造成
D A H P合成酵素をコードするaroG遺伝子のプロモーター領域をTuプロモーター領域と置換したNDSGU株を以下のようにしてNUA株をもとに造成した。

（1）aroGプロモーター置換用プラスミドの構築

aroG遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域（相補鎖塩基番号2,280,842～2,282,206）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SphI部位とRsrII部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号38と39）を合成した。aroG遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域（相補鎖塩基番号2,279,366～2,280,754）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素PfoI部位とSbfI部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号40と41）を合成した。また、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりaroG遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域と3' フランキング領域をそれぞれ増幅した。これとは別に、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして配列番号35と36のプライマーを用いるPCR法によりTuプロモーターを増幅した。

[0147] aroG遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵

素SphIとRsrIIで消化し、またaroG遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素PfoIとSbfIで消化し、またTuプロモーターの増幅DNA断片を制限酵素RsrIIとPfoIで消化した後、これらの制限酵素によって得られた3種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSbfI部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__aroG-Ntuを得た。

[0148] (2) プラスミドpHKPsacB__aroG-Ntuを用いた相同組換え体の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、プラスミドpHKPsacB__aroG-NtuをNUA株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、NUA__Km株を取得した。配列番号38と41のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNUA__Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NUA__Km株はプラスミドpHKPsacB__aroG-NtuがaroG遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0149] NUA__Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NDSGU株を得た。配列番号38と41のプライマーならびに配列番号35と36のプライマーを用いるPCR法により、NDSGU株が予想通りaroGプロモーター領域がTuプロモーターに置換されている2回交差型相同組換え体であることを確認した。さらに、aroG遺伝子の5' フランキング領域の外側のDNAプライマー（配列番号42）および3' フランキング領域の外側のDNAプライマー（配列番号43）を合成し、これらプライマーを用いるPCR法によってもaroGプロモーター領域がTuプロモーターと置換されている2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0150] 3. aroB遺伝子のプロモーターをTuプロモーターと置換したNSU株の造成

DHQ合成酵素をコードするaroB遺伝子のプロモーター領域をTuプロモーター領域と置換したNSU株を以下のようにしてNDSGU株をもとに造成した。

(1) aroBプロモーター置換用プラスミドの構築

aroB遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域（相補鎖塩基番号1,720,573~1,721,670）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SphI部位とRsrII部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号44と45）を合成した。aroB遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域（相補鎖塩基番号1,719,404~1,720,501）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素PfoI部位とSbfI部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号46と47）を合成した。また、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用い、PCR法によりaroB遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域と3' フランキング領域をそれぞれ増幅した。これとは別に、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして配列番号35と16のプライマーを用いるPCR法によりTuプロモーターを増幅した。

[0151] aroB遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素SphIとRsrIIで消化し、またaroB遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素PfoIとSbfIで消化し、またTuプロモーターの増幅DNA断片を制限酵素RsrIIとPfoIで消化した後、これらの制限酵素によって得られた3種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSbfI部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__aroB-Ntuを得た。

[0152] (2) プラスミドpHKPsacB__aroB-Ntuを用いた相同組換え体の造成
エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__aroB-NtuをNDSGU株に導入して、カナマイシン耐性で選択することにより、NDSGU__Km株を取得した。得られたNDSGU__Km株が目的の1回交差型相同組換え体であることを確認するために、aroB遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域の上流の一部と3' フランキング領域の下流の一部に基づく2種類のプライマー（配列番号48と49）を合成した。NDSGU__Km株の染色体DNAを鋳型として、配列番号48と49のプライマー、配列番号35と36のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNDSGU__Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたこ

とから、NDSGU_Km株はプラスミドpHKPsacB_aroB-NtuがaroB遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0153] NDSGU_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSU株を得た。配列番号44と47のプライマー、配列番号48と49のプライマー、ならびに配列番号35と36のプライマーを用いるPCR法により、NSU株が予想通りaroBプロモーター領域がTuプロモーターに置換されている2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0154] 4. aroF遺伝子のプロモーターをTuプロモーターと置換したNSH株の造成

DHQ脱水酵素をコードするaroF遺伝子のプロモーター領域をTuプロモーター領域と置換したNSH株を、以下のようにしてNSU株をもとに造成した。

(1) aroFプロモーター置換用プラスミドの構築

aroF遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域（相補鎖塩基番号1,046,619~1,047,863）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SphI部位とRsrII部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号50と51）を合成した。aroB遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域（相補鎖塩基番号1,046,619~1,047,863）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素PfoI部位とSbfI部位を付加するために2種類のプライマー（配列番号52と53）を合成した。また、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりaroF遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域と3' フランキング領域をそれぞれ増幅した。これとは別に、DRHG株の染色体DNAを鋳型にして配列番号35と36のプライマーを用いるPCR法によりTuプロモーターを増幅した。

[0155] aroF遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素SphIとRsrIIで消化し、またaroF遺伝子のプロモーターの3' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素PfoIとSbfIで消化し、またTuプロモーターの増幅DNA断片を制限酵素RsrIIとPfoIで消化した後、これらの制限酵素によって得られた3種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチ

クローニングサイト内にあるSbfI部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__aroF-Ntuを得た。

[0156] (2) プラスミドpHKPsacB__aroF-Ntuを用いた相同組換え体の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__aroF-NtuをNSU株に導入して、カナマイシン耐性で選択することにより、NSU__Km株を取得した。得られたNSU__Km株が目的の1回交差型相同組換え体であることを確認するために、aroF遺伝子のプロモーターの5' フランキング領域の上流の一部と3' フランキング領域の下流の一部に基づく2種類のプライマー（配列番号54と55）を合成した。NSU__Km株の染色体DNAを鋳型として、配列番号54と55のプライマー、配列番号35と36のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNSU__Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSU__Km株はプラスミドpHKPsacB__aroF-NtuがaroF遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0157] NSU__Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH株を得た。配列番号50と53のプライマー、配列番号54と55のプライマー、ならびに配列番号35と36のプライマーを用いるPCR法により、NSU株が予想通りaroBプロモーター領域がTuプロモーターと置換されている2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0158] 参考例7. シキミ酸脱水素酵素をコードするaroE1遺伝子およびaroE3遺伝子のインフレーション破壊株の造成

ATCC13032株が保有する3種類のシキミ酸脱水素酵素のうち、生育に影響を与える可能性があるaroE1遺伝子とaroE3遺伝子にインフレーション欠失変異を導入した菌株（インフレーション欠失変異を導入した菌株（以下、必要に応じて、インフレーション破壊株とも呼ぶ）を以下のようにして造成した。なお、インフレーション欠失変異、すなわちインフレーション破壊とは、翻訳領域内に3塩基の倍数の長さの欠失を導入した変異のことをいう。

[0159] 1. aroE1遺伝子のインフレーション破壊用プラスミドの構築

aroE1遺伝子の5' フランキング領域を（塩基番号1,183,128~1,184,160）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号56と57）を合成した。なお、配列番号56のプライマーには制限酵素SphI部位を導入した。DRH G株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりaroE1遺伝子の5' フランキング領域を増幅した。次に、aroE1遺伝子の3' フランキング領域（塩基番号1,181,390~1,182,365）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号58と59）を合成した。なお、配列番号59のプライマーには制限酵素SbfI部位を導入した。

[0160] このようにして得られたaroE1遺伝子の5' フランキング領域の増幅DNAと3' フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型としてDNAプライマー（配列番号56と59）を用いてオーバーラップPCR法による増幅反応を行った後、制限酵素SphIとSbfIで消化反応を行った。生じたDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内の制限酵素部位SbfI - SphI間に導入し、プラスミドpHKPsacBΔaroE1を得た。なお、プラスミドpHKPsacBΔaroE1は、aroE1遺伝子領域のうち、相補鎖塩基番号1,181,390~1,184,160の領域が欠失している構造を有する。

[0161] 2. aroE1遺伝子のインフレーション破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacBΔaroE1をNSH株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、NSH_Km株を取得した。得られたNSH_Km株が目的の1回交差型相同組換え体であることを確認するために、aroE1遺伝子5' フランキング領域の上流の一部と3' フランキング領域の下流の一部に基づく2種類のプライマー（配列番号60と61）を合成した。配列番号56と59のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNSH_Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSH_Km株はプラスミドpHKPsacBΔaroE1がaroE1遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0162] NSH_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE1株を得た。配列番号60と61のプライマーを用いるPCR法により、NSH Δ aroE1株が予想通りaroE1遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0163] 3. aroE3遺伝子のインフレイム破壊用プラスミドの構築

aroE3遺伝子の5' フランキング領域を（塩基番号1,726,887~1,727,845）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号62と63）を合成した。なお、配列番号62のプライマーには制限酵素SphI部位を導入した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりaroE3遺伝子の5' フランキング領域を増幅した。次に、aroE3遺伝子の3' フランキング領域（塩基番号1,725,101~1,726,094）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号64と65）を合成した。なお、配列番号65のプライマーには制限酵素SbfI部位を導入した。このようにして得られたaroE3遺伝子の5' フランキング領域の増幅DNAと3' フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号62と65のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素SphIとSbfIによる消化反応を行った。生じたDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内の制限酵素SbfI 部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB Δ aroE3を得た。なお、プラスミドpHKPsacB Δ aroE3は、aroE3遺伝子領域のうち、相補鎖塩基番号1,726,095~1,726,886の領域が欠失している構造を有する。

[0164] 4. aroE3遺伝子のインフレイム破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB Δ aroE3をNSH株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、NSH_Km2株を取得した。得られたNSH_Km2株が目的の1回交差型相同組換え体であることを確認するために、aroE3遺伝子5' フランキング領域の上流の一部と3' フランキング領域の下流の一部に基づく2種類のプライマー（配列番

号66と67)を合成した。配列番号62と65のプライマー、配列番号66と67のプライマー、ならびにsacB遺伝子確認用プライマー(配列番号3と4)を用いるPCR法によりNSH_Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSH_Km2株はプラスミドpHKPsacBΔaroE3がaroE3遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0165] NSH_Km2株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSHΔaroE3株を得た。配列番号66と67のプライマーを用いるPCR法により、NSHΔaroE3株が予想通りaroE3遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0166] 5. aroE1遺伝子とaroE3遺伝子の2重破壊株の造成

NSHΔaroE1菌をもとに、上述の「aroE3遺伝子のインフレーム破壊株の造成」と同じ手法で、aroE3遺伝子もインフレームで破壊した2重破壊株(NSHΔaroE1ΔaroE3株と命名)を造成した。

[0167] 6. NSHΔaroE1株、NSHΔaroE3株およびNSHΔaroE1ΔaroE3株の芳香族アミノ酸の要求性試験

上述のようにして造成したNSH株、NSHΔaroE1株、NSHΔaroE3株およびNSHΔaroE1ΔaroE3株の4株について、以下のようにして芳香族アミノ酸の要求性試験を行った。

[0168] 各菌株を前培養培地のLB培地に植菌し、30℃で終夜培養した後、CGXII培地に2%を植えついだ。また、CGXII培地にシキミ酸、トリプトファン、ファニルアラニン、チロシンをそれぞれ終濃度50 mg/Lずつ添加した培養実験も並行して行った。その結果、NSH株、NSHΔaroE1株はCGXII培地で正常に生育するが、NSHΔaroE3株とNSHΔaroE1ΔaroE3株は生育しないことを確認した。また、NSHΔaroE3株とNSHΔaroE1ΔaroE3株はCGXII培地にシキミ酸、トリプトファン、ファニルアラニンおよびチロシンを添加すると生育が回復することを見出し、シキミ酸脱水素酵素をコードする主たる遺伝子がaroE3遺伝子であることを確認した。

[0169] 参考例 8. vanAプロモーターの制御下でaroE3遺伝子を発現するプロトカテク酸生産菌株NSH Δ aroE3__vanE3の造成

ATCC13032株のバニリン酸脱メチル酵素をコードする遺伝子はcg2616（以下vanA遺伝子と略す。塩基番号2,496,775～2,497,905 bp：大きさ1,131 bp）とcg2617（以下vanB遺伝子と略す。塩基番号2,497,909～2,498,886 bp：大きさ978 bp）である。また2,496,775～2,498,886 bpをvanAB遺伝子領域と略す。またvanA遺伝子とvanB遺伝子を制御しているリプレッサーはcg2615（以下vanR遺伝子と略す。相補鎖塩基番号2,496,013～2,496,591 bp：大きさ579 bp）が既知である。vanR遺伝子により、aroE3遺伝子をvanA遺伝子とvanB遺伝子領域に導入し、aroE3遺伝子をvanR遺伝子制御下に置換した。親株は、上記参考例7に示すNSH Δ aroE3株を用いた。

[0170] 1. vanAB遺伝子領域とaroE3遺伝子の置換用ベクターの構築

ATCC13032株のvanAB遺伝子領域をaroE3遺伝子に置換するために以下の手順で置換用ベクターを構築した。まず、ATCC13032株のゲノム配列をもとに、vanAB遺伝子領域の5' フランキング領域（塩基番号2,495,799～2,496,774 bp：大きさ976bp）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号68と配列番号69）を合成し、vanAB遺伝子領域の3' フランキング領域（塩基番号2,498,887～2,499,870 bp：大きさ984bp）を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号70と配列番号71）を合成した。これらのプライマーを用いて菌株NSHの染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりvanAB遺伝子の5' フランキング領域、vanAB遺伝子の3' フランキング領域を増幅した。vanAB遺伝子の5' フランキング領域を増幅するとともに配列番号68のDNAプライマーに制限酵素サイトSphIを導入し、vanAB遺伝子の3' フランキング領域を増幅するとともに配列番号71のDNAプライマーに制限酵素サイトSbfIを導入した。またaroE3遺伝子を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号72と配列番号73）を合成した。aroE3遺伝子を増幅するとともに、配列番号72のDNAプライマーにvanAB遺伝子領域の5' フランキング領域の3' 末端の15 bpを付加し、配列番号73のDNAプライマーにvanAB遺伝子領域の3' フラ

ンキング領域の5'末端の15 bpを付加し増幅した。増幅した5'フランキン
グ領域、aroE3遺伝子を混合したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー(配列
番号68と配列番号73)を用い、また増幅した3'フランキング領域、aroE
3遺伝子を混合したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー(配列番号72と配
列番号71)を用い、オーバーラップPCR法で増幅した。それぞれ増幅したDNA
断片を制限酵素SphIとaroE3遺伝子内部制限酵素サイトAscIおよびSbfIとaroE
3遺伝子内部制限酵素サイトAscIで消化し、プラスミドpHKPsacB1(参考例2
参照)のマルチクローニングサイト内の制限酵素部位SbfI - SphI間に導入し
、プラスミドpHKPsacB__vanR__Pvan-aroE3を得た。

[0171] 2. vanAB遺伝子領域とaroE3遺伝子の置換株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHK
PsacB__vanR__Pvan-aroE3を菌株NSHΔaroE3に導入して、カナマイシン耐性株
NSHΔaroE3を取得した。得られたカナマイシン耐性株の染色体DNA上(塩基番
号2,495,799~2,499,870 bp: 大きさ4,071 bp)領域のうち塩基番号2,496,77
5~2,498,886 bpがaroE3遺伝子に置換していることを確認するために以下の
実験を行った。vanAB遺伝子の5'フランキング領域の112 bp外側と3'フラ
ンキング領域の106 bp外側にDNAプライマー(配列番号74と配列番号75)
を作製し、vanAB遺伝子の5'フランキング領域と3'フランキング領域を増
幅する際に使用したDNAプライマー(配列番号68と配列番号71)を用いて菌
株NSHΔaroE3のカナマイシン耐性株のコロニーを直接鋳型としたPCRを行った
。

菌株NSHΔaroE3のカナマイシン耐性株の染色体DNAを鋳型にし、配列番号74
と配列番号71のDNAプライマーで増幅したPCRによって取得される増幅DNA断
片が4,194 bp、配列番号68と配列番号75のDNAプライマーで増幅したPCR
によって取得される増幅DNA断片は2,905 bpであった。もしくは配列番号74
と配列番号71のDNAプライマーで増幅したPCRによって取得される増幅DNA断
片が2,913bp、配列番号68と配列番号75のDNAプライマーで増幅したPCRに
よって取得される増幅DNA断片は4,186 bpであった。またsacB遺伝子領域が、

PCR法による解析などによって確認されたことから、菌株NSH Δ aroE3は1回交差型相同組換え体であることがわかった。

[0172] 菌株NSH Δ aroE3の1回交差型相同組換え体をLB液体培地1 mLで24時間培養した後、少量を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養した。増殖した菌株NSH Δ aroE3が保持する染色体DNAはsacB遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、vanAB遺伝子領域がaroE3遺伝子と置換していると予想されNSH Δ aroE3__vanE3株と命名した。この菌株NSH Δ aroE3__vanE3について、2種類のDNAプライマー（配列番号74と配列番号75）を用いたPCR法により、vanAB遺伝子領域がaroE3遺伝子に置換しており予想通り2回交差型相同組換え体であった。

[0173] 3. 菌株NSH Δ aroE3__vanE3の生育確認

17.5 mg/Lのシキミ酸、50 mg/Lのトリプトファン、50 mg/Lのファニルアラニン、50 mg/Lのチロシン、10 mg/Lのパラヒドロキシ安息香酸および10 mg/Lのパラアミノ安息香酸（以下、6種類の添加物という）を加えたCGXII培地および6種類の添加物を加えないCGXII培地を用いて、菌株NSH Δ aroE3__vanE3とNSH Δ aroE3の生育性試験を行った。その結果、菌株NSH Δ aroE3__vanE3は前者の培地では正常に増殖したが、後者の培地では培養中期までの生育速度が遅かった。一方、菌株NSH Δ aroE3は前者の培地では増殖したが、後者の培地では増殖しなかった。また、6種類の添加物を加えないCGXII培地にフェルラ酸またはバニリン酸またはバニリンを50 μ M以上添加して、菌株NSH Δ aroE3__vanE3を培養したときには、正常に増殖することがわかった。

[0174] 参考例9. D H S脱水酵素遺伝子のインフレイム破壊株の作製

参考例6、7および8に示すNSH株、NSH Δ aroE3株およびNSH Δ aroE3__vanE3株を親株として、qsuB遺伝子にインフレイム欠失変異を導入することにより、D H Sからプロトカテク酸への転換を遮断した菌株を以下のようにして作成した。

[0175] 1. qsuB遺伝子破壊用プラスミドの構築

qsuB遺伝子の5' フランキング領域（塩基番号443, 184~444, 207）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SbfI部位とXbaI部位を付加するた

めに2種類のDNAプライマー（配列番号76と77）を合成した。また、*qsuB*遺伝子の3'フランキング領域（塩基番号446,032~447,053）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素XbaI部位とSalI部位を付加するために2種類のDNAプライマー（配列番号78と79）を合成した。NSH株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法により*qsuB*遺伝子の5'フランキング領域と3'フランキング領域を増幅した。5'フランキング領域増幅物を制限酵素SbfIおよびXbaIで消化し、また3'フランキング領域増幅物を制限酵素XbaIおよびSalIで消化した後、これらのDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSbfI部位とSalI部位の間に導入し、*qsuB*遺伝子破壊用プラスミドであるpHKPsacBΔ*qsuB*を得た。

[0176] 2. *qsuB*遺伝子破壊株の造成

上述のプラスミドpHKPsacBΔ*qsuB*をNSH株、NSHΔ*aroE3*株およびNSHΔ*aroE3*__*vanE3*株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、それぞれの菌株からNSH__*qsuB*__Km株、NSHΔ*aroE3*__*qsuB*__Km株およびNSHΔ*aroE3*__*vanE3*__*qsuB*__Km株を取得した。取得した菌株をPCR法により解析するために、*qsuB*遺伝子の5'フランキング領域の上流の配列に一致するDNAプライマー（配列番号80）と3'フランキング領域の下流の配列に一致するDNAプライマー（配列番号81）を合成し、配列番号79と80のプライマー、配列番号76と81のプライマーを用いるPCR法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いたPCR法による解析でも予想通りの結果が得られたことから、これら菌株はプラスミドpHKPsacBΔ*qsuB*が*qsuB*遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0177] NSHΔ*qsuB*__Km株、NSHΔ*aroE3*Δ*qsuB*__Km株、およびNSHΔ*aroE3*__*vanE3*Δ*qsuB*__Km株をそれぞれ1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、それぞれの菌株からNSHΔ*qsuB*株、NSHΔ*aroE3*Δ*qsuB*株、およびNSHΔ*aroE3*__*vanE3*Δ*qsuB*株を得た。配列番号80と81のプライマーならびに*sacB*遺伝子確認用プライ

マー（配列番号3と4）を用いるPCR法により、これら菌株が*qsuB*遺伝子内の領域（塩基番号444,208～446,031）を欠失している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0178] 参考例10. シキミ酸脱水酵素遺伝子のインフレーム破壊株の造成

NSH Δ aroE3 Δ qsuB株およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB株をもとに、残存するシキミ酸脱水酵素活性を低減するために、シキミ酸脱水酵素をコードする*qsuD*遺伝子にインフレーム欠失変異を導入した菌株を以下のようにして造成した。

[0179] 1. *qsuD*遺伝子のインフレーム破壊用プラスミドの構築

*qsuD*遺伝子の5'フランキング領域を（塩基番号443,644～446,553、ただし444,199～446,031の領域は*qsuB*のインフレーム破壊領域である）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号82と83）を合成した。なお、配列番号82のプライマーには制限酵素SbfI部位を導入した。NSH Δ qsuB株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法により*qsuD*遺伝子の5'フランキング領域を増幅した。次に、*qsuD*遺伝子の3'フランキング領域（塩基番号447,385～448,441）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号84と85）を合成した。なお、配列番号85のプライマーには制限酵素XhoI部位を導入した。このようにして得られたaroE遺伝子の5'フランキング領域の増幅DNAと3'フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型としてDNAプライマー（配列番号82と85）を用いてオーバーラップPCR法による増幅反応を行った後、制限酵素SbfIとXhoIで消化反応を行った。生じたDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内の制限酵素部位SbfI - SalI間に導入し、プラスミドpHKPsacB Δ qsuDを得た。なお、プラスミドpHKPsacB Δ qsuDは、*qsuD*遺伝子領域のうち、塩基番号446,554～447,384の領域が欠失している構造を有する。

[0180] 2. *qsuD*遺伝子のインフレーム破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB Δ qsuDをNSH Δ aroE3 Δ qsuB株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB株に導

入し、カナマイシン耐性で選択することにより、NSH Δ aroE3 Δ qsuB__Km株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__km株を取得した。得られたNSH Δ aroE3 Δ qsuB__Km株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__km株が目的の1回交差型相同組換え体であることを確認するために、qsuD遺伝子5' フランキング領域の上流の一部と3' フランキング領域の下流の一部に基づく2種類のプライマー（配列番号86と87）を合成した。配列番号86と85のプライマー、配列番号82と87ならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNSH Δ aroE3 Δ qsuB__Km株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSH Δ aroE3 Δ qsuB__Km株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__km株はプラスミドpHKPsacB Δ qsuDがqsuD遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0181] NSH Δ aroE3 Δ qsuB__Km株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB Δ qsuD株を得た。配列番号86と87のプライマーを用いるPCR法により、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE株、およびNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB Δ qsuD株が予想通りaroE遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0182] 3. NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株の芳香族アミノ酸の要求性試験

上述のようにして造成したNSH株、NSH Δ aroE3株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE1株、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株の6株について、以下のようにして芳香族アミノ酸の要求性試験を行った。

[0183] 17.5 mg/Lのシキミ酸、50 mg/Lのトリプトファン、50 mg/Lのファニルアラニン、50 mg/Lのチロシンを添加した前培養培地のCGXII培地に各菌株を植菌し、30℃で終夜培養した後、2回洗浄し、本培養培地CGXII培地にOD600が約0.05になるように植えついだ。本培養培地であるCGXII培地に17.5 mg/Lのシキ

ミ酸、50 mg/Lのトリプトファン、50 mg/Lのファニルアラニン、50 mg/Lのチロシンを添加した培養実験も並行して行った。その結果、NSH株、NSH Δ aroE3株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ aroE1株、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB株、NSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株の6株のうちNSH Δ aroE3 Δ qsuB Δ qsuD株のみがシキミ酸、トリプトファン、ファニルアラニン、チロシンを添加したときにのみ生育したことから、qsuD遺伝子の欠失により残存するシキミ酸脱水酵素の活性がほとんど消失したことがわかった。

[0184] 参考例 11. VanRリプレッサーの誘導発現によってaroE3遺伝子の発現を制御できるDHS生産菌株の造成

参考例 10で造成したNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB Δ qsuD株のbenABCD遺伝子領域をvanR遺伝子と置換することにより、benAプロモーターの制御下でvanR遺伝子を発現する菌株を造成した。

[0185] 1. benABCD遺伝子領域をvanR遺伝子と置換するためのプラスミドの構築

benABCD遺伝子領域の5' フランキング領域（塩基番号2,515,963~2,516,969）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号88と89）を合成し、またbenABCD遺伝子領域の3' フランキング領域（塩基番号2,521,372~2,522,498）を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号90と91）を合成した。なお、配列番号88と91のプライマーはそれぞれ制限酵素SalI部位とSbfI部位を持つ。HT23株（参考例3）の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりbenABCD遺伝子の5' フランキング領域と3' フランキング領域を増幅した。また、vanR遺伝子を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号92と93）を合成した。HT23株の染色体DNAを鋳型にして配列番号92と93のプライマーを用いるPCR法によりvanR遺伝子領域を増幅した。このようにして得られたbenABCD遺伝子の5' フランキング領域の増幅DNAとqsuB遺伝子領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号88と93のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素SalIとNarIによる消化により、配列番号88のプライマー内のSalI部位とvanR遺伝子内部のNarI部位で切断されたDNA断片を得

た。また、vanR遺伝子領域の増幅DNAとbenABCD遺伝子の3' フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号91と92のプライマーを用いたオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素NarIとSbfIによる消化により、vanR遺伝子内部のNarI部位と配列番号91のプライマー内のSbfI部位で切断されたDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSalI部位とSbfI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__Pben-vanRを得た。

[0186] 2. benABCD遺伝子領域をvanR遺伝子に置換した菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__Pben-vanRをNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuBΔqsuD株に導入してカナマイシン耐性となったNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuBΔqsuD株__Km株を取得した。続いて、NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuBΔqsuD株__Km株をPCR法により解析するために、vanR遺伝子の5' フランキング領域の上流の配列に一致するプライマー（配列番号94）と3' フランキング領域の下流の配列に一致するプライマー（配列番号95）を合成した後、配列番号94と91のプライマーならびに配列番号88と95のプライマーを用いるPCR法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いたPCR法による解析でも、予想通りの結果が得られたことから、NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuBΔqsuD株__Km株はプラスミドpHKPsacB__Pben-vanR がbenABCD遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0187] NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuBΔqsuD株__Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、Pben-vanR株を得た。配列番号94と95のプライマーを用いるPCR法により、Pben-vanR株はbenABCD遺伝子領域がvanR遺伝子に置換した2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0188] 参考例12. benAプロモーターの制御下でqsuB遺伝子を発現するプロトカテク酸生産菌NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB株の造成

以下のようにして、参考例9で造成したNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB株のbenA

BCD遺伝子オペロン領域をqsuB遺伝子と置換することにより、benAプロモーターの制御下でqsuB遺伝子を発現する菌株を造成した。

[0189] 1. benABCD遺伝子領域をqsuB遺伝子と置換するためのプラスミドの構築

benABCD遺伝子領域の5' フランキング領域を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号88と89）を利用し、またbenABCD遺伝子領域の3' フランキング領域を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号90と91）を利用した。HT23株（参考例3）の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりbenABCD遺伝子の5' フランキング領域と3' フランキング領域を増幅した。また、qsuB遺伝子を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号96と97）を合成し、HT23株の染色体DNAを鋳型にしてこれらプライマーを用いるPCR法によりqsuB遺伝子領域を増幅した。このようにして得られたbenABCD遺伝子の5' フランキング領域の増幅DNAとqsuB遺伝子領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号88と97のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素SalIとNarIによる消化により、配列番号88のプライマー内のSalI部位とqsuB遺伝子内部のNarI部位で切断されたDNA断片を得た。また、qsuB遺伝子領域の増幅DNAとbenABCD遺伝子の3' フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号91と96のプライマーを用いたオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素NarIとSbfIによる消化により、qsuB遺伝子内部のNarI部位と配列番号91のプライマー内のSbfI部位で切断されたDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSalI部位とSbfI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__Pben-qsuBを得た。

[0190] 2. benABCD遺伝子領域をqsuB遺伝子に置換した菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__Pben-qsuBをNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB株に導入してカナマイシン耐性となったNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Km株を取得した。続いて、NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Km株をPCR法により解析するために、qsuB遺伝子の5' フラン

キング領域の上流の配列に一致するプライマー（配列番号 98）と 3' フランキング領域の下流の配列に一致するプライマー（配列番号 99）を合成した後、配列番号 88 と 99 のプライマーならびに配列番号 91 と 98 のプライマーを用いる PCR 法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いた PCR 法による解析でも、予想通りの結果が得られたことから、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Km 株はプラスミド pHKPsacB__Pben-qsuB が benABCD 遺伝子領域に導入された 1 回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0191] NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Km 株を 1 mL の LB 液体培地中で 24 時間培養し、培養液の一部を 10% スクロース含有 LB 寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB 株を得た。配列番号 88 と 99 のプライマーならびに配列番号 91 と 98 のプライマーを用いる PCR 法により、benABCD 遺伝子領域が qsuB 遺伝子に置換した 2 回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0192] 参考例 13. benA プロモーターの制御下で qsuB 遺伝子と vanR 遺伝子を発現するプロトカテク酸生産菌 NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR 株の造成
参考例 12 で造成した NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB 株をもとに、qsuB 遺伝子とオペロン構造を保持する形で vanR 遺伝子を導入した。qsuB 遺伝子とオペロン構造を保持することにより、benA プロモーターの制御下で qsuB 遺伝子と vanR 遺伝子を発現する菌株を以下のようにして造成した。

[0193] 1. vanR 遺伝子を qsuB 遺伝子の下流に挿入するためのプラスミドの構築
vanR 遺伝子挿入領域の 5' フランキング領域（塩基番号 2,520,333~2,521,374）を増幅させるために 2 種類の DNA プライマー（配列番号 100 と 101）を合成し、また vanR 遺伝子挿入領域の 3' フランキング領域（塩基番号 2,521,372~2,522,498）を増幅するために 2 種類の DNA プライマー（配列番号 102 と 103）を合成した。なお、配列番号 100 と 103 のプライマーはそれぞれ制限酵素 SalI 部位と SbfI 部位を持つ。NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB 株の染色体 DNA を鋳型にして、これらのプライマーを用いる PCR 法により vanR 遺伝子挿入領域の 5' フランキング領域と 3' フランキング領域を増

幅した。また、vanR遺伝子を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号104と105）を合成し、HT23株（参考例3）の染色体DNAを鋳型にしてこれらプライマーを用いるPCR法によりvanR遺伝子領域を増幅した。このようにして得られたvanR遺伝子挿入領域の5'フランキング領域の増幅DNAとvanR遺伝子領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号100と105のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素SalIとBamHIによる消化により、配列番号100のプライマー内のSalI部位とvanR遺伝子内部のBamHI部位で切断されたDNA断片を得た。また、vanR遺伝子領域の増幅DNAとvanR遺伝子挿入領域の3'フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号104と103のプライマーを用いたオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素BamHIとSbfIによる消化により、vanR遺伝子内部のBamHI部位と配列番号103のプライマー内のSbfI部位で切断されたDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSalI部位とSbfI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB_Pben-qsuB-vanRを得た。

[0194] 2. vanR遺伝子をqsuB遺伝子の下流に挿入した菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB_Pben-qsuB-vanRをNSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB株に導入してカナマイシン耐性となったNSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB株_Km株を取得した。続いて、NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB株_Km株をPCR法により解析するために、vanR遺伝子導入領域の5'フランキング領域の上流の配列に一致するプライマー（配列番号106）と3'フランキング領域の下流の配列に一致するプライマー（配列番号107）を合成した後、配列番号100と103のプライマーを用いるPCR法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いたPCR法による解析でも、予想通りの結果が得られたことから、NSHΔaroE3_vanE3ΔqsuB_Pben-qsuB株_Km株はプラスミドpHKPsacB_Pben-qsuB-vanRがvanR遺伝子挿入領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0195] NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB株_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株を得た。配列番号106と107のプライマーを用いるPCR法により、benABCD遺伝子領域のqsuB遺伝子下流にvanR遺伝子を挿入された2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0196] 参考例14. tkt遺伝子を構成的に発現するプロトカテク酸生産菌tkt株の造成

参考例13で造成したNSH Δ aroE3__vanE3 Δ qsuB__Pben-qsuB-vanR株を親株として、エリトロース-4-リン酸の合成に関わるtkt遺伝子をTuプロモーター（参考例6）に連結した転写ユニット（以下、Ptu-tkt転写ユニットと略す）をDNA修飾・制限酵素遺伝子の破壊部位に挿入したtkt株を以下のようにして造成した。

[0197] 1. Ptu-tkt転写ユニットを構築するためのプラスミドの構築

DNA修飾・制限酵素遺伝子の破壊部位の5' フランキング領域（塩基番号1,885,120~1,883,861）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号108と109）を合成し、DNA修飾・制限酵素遺伝子の破壊部位の3' フランキング領域（塩基番号1,879,744~1,878,664）を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号110と111）を合成した。またTuプロモーターを増幅させるためにDNAプライマー（配列番号112と36）を、tkt遺伝子を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号113と114）を合成した。なお、配列番号108と111のプライマーはそれぞれ制限酵素SbfI部位とSalI部位を持つ。

[0198] 参考例HT23株（参考例3）の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりDNA修飾・制限酵素遺伝子の破壊部位の5' フランキング領域と3' フランキング領域を増幅した。得られた5' フランキング領域の増幅DNAとtkt遺伝子の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号108と113のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、

制限酵素SbfIとPfoIによる消化により、配列番号108のプライマー内のSbfI部位と、配列番号113のプライマー内のPfoI部位で切断されたDNA断片を得た。また、Tuプロモーターの増幅DNAと3'フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号36と111のプライマーを用いたオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素PfoとSalIによる消化により、配列番号36のプライマー内のPfoI部位と、配列番号111のプライマー内のSalI部位で切断されたDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるSbfI部位とSalI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__Ptu-tktを得た。

[0199] 2. Ptu-tkt転写ユニットを組み込んだ菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__Ptu-tktをNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB-vanR株に導入してカナマイシン耐性となったNSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB-vanR株__Km株を取得した。続いて、NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB-vanR株__Km株をPCR法により解析するために、5'フランキング領域の上流の配列に一致するプライマー（配列番号115）と3'フランキング領域の下流の配列に一致するプライマー（配列番号116）を合成した後、配列番号115と116のプライマーならびに配列番号108と111のプライマーを用いるPCR法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いたPCR法による解析でも、予想通りの結果が得られたことから、NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB-vanR株__Km株はプラスミドpHKPsacB__Ptu-tktが導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0200] NSHΔaroE3__vanE3ΔqsuB__Pben-qsuB-vanR株__Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、tkt株を得た。配列番号115と116のプライマーならびに配列番号108と111のプライマーを用いるPCR法と、増幅断片の制限酵素消化により、Ptu-tkt転写ユニットがDNA修飾・制限酵素遺伝子の破壊部位に組み込まれた2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0201] 参考例 1 5. rhcHプロモーターの制御下でaroE3遺伝子を発現する菌株の造成
cg1309遺伝子からcg1311遺伝子までの領域（以下、rhcHMD遺伝子領域と略す）をaroE3遺伝子で置換した菌株を以下のように造成した。

[0202] 1. genH遺伝子破壊用プラスミドの構築

3-ヒドロキシ安息香酸 6-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子であるcg3354遺伝子（以下、genH遺伝子という）の5' フランキング領域を（塩基番号3,201,424~3,202,403）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素KpnI部位とSbfI部位を付加するために、2種類のDNAプライマー（配列番号117と118）を合成した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりgenH遺伝子の5' フランキング領域を増幅した。次に、genH遺伝子の3' フランキング領域（塩基番号3,203,894~3,204,901）を増幅するとともに、増幅断片の両端に制限酵素SbfI部位とSalI部位を付加するために2種類のDNAプライマー（配列番号119と120）を合成した。DRHG株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりgenH遺伝子の3' フランキング領域を増幅した。5' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素KpnIとSbfIで消化し、また3' フランキング領域の増幅DNA断片を制限酵素SbfIとSalIで消化した後、これらのDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内にあるKpnI部位とSalI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacBΔgenHを得た。

[0203] 2. genH遺伝子破壊株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacBΔgenHをNSHΔaroE3株に導入し、カナマイシン耐性で選択することにより、NSHΔaroE3_Km株を取得した。配列番号117と120のプライマーならびにsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNSHΔaroE3_Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、これら菌株はプラスミドpHKPsacBΔgenHがgenH遺伝子領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0204] NSHΔaroE3_Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を1

0%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE3 Δ genH株を得た。配列番号117と120のプライマーを用いるPCR法により、NSH Δ aroE3 Δ genH株が予想通りgenH遺伝子を欠損している2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0205] 3. rhcHMD遺伝子領域とaroE3遺伝子の置換用ベクターの構築

rhcHMD遺伝子領域の5'フランキング領域（塩基番号1,213,341~1,214,736）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号121と配列番号122）を合成した。なお、配列番号121のプライマーには制限酵素SbfI部位を導入した。NSH株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりrhcHMD遺伝子領域の5'フランキング領域を増幅した。次に、rhcHMD遺伝子の3'フランキング領域（塩基番号1,218,296~1,219,545）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号123と配列番号124）を合成した。なお、配列番号124のプライマーには制限酵素SalI部位を導入した。

[0206] またaroE3遺伝子を増幅するために配列番号125と配列番号126のDNAプライマーを合成した。rhcHMD遺伝子領域の5'フランキング領域、aroE3遺伝子を増幅したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー（配列番号121と配列番号126）を用い、オーバーラップPCR法による増幅反応を行った。また3'フランキング領域、aroE3遺伝子を増幅したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー（配列番号125と配列番号124）を用い、オーバーラップPCR法で増幅した。それぞれ増幅したDNA断片をSbfIとAvrIIおよびAvrIIとSalIで消化し、プラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内の制限酵素部位SbfI-SalI間に導入し、プラスミドpHKPsacB__rhcR__Prhc-rhcE3を得た。

[0207] 4. rhcHMD遺伝子領域とaroE3遺伝子の置換株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__rhcR__Prhc-rhcE3を上述の菌株NSH Δ aroE3 Δ genH株に導入し、カナマイシン耐性で選択することによりNSH Δ aroE3 Δ genH__Km株を取得した。

配列番号 1 2 7 と配列番号 1 2 8 のDNAプライマーと、配列番号 1 2 1 と配列番号 1 2 4 のプライマーと sacB 遺伝子確認用プライマー（配列番号 3 と 4）を用いる PCR 法により NSH Δ aroE3 Δ genH__Km 株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSH Δ aroE3 Δ genH__Km 株はプラスミド pHKPsacB__rhcR__Prhc-rhcE3 が rhcHMD 遺伝子領域に導入された 1 回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0208] NSH Δ aroE3 Δ genH 株の 1 回交差型相同組換え体を 1 mL の LB 液体培地中で 24 時間培養し、培養液の一部を 10% スクロース含有 LB 寒天培地上で塗抹培養することにより、NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株を得た。配列番号 1 2 7 と 1 2 8 のプライマーを用いる PCR 法により、NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株の rhcHMD 遺伝子領域が aroE3 遺伝子に置換しており、予想通り 2 回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0209] 5. NSH Δ aroE3__vanE3 株と NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株のアミノ酸の要求性試験

造成した NSH 株、NSH Δ aroE3 株、NSH Δ aroE3__vanE3 株、NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株について、以下のようにして芳香族アミノ酸の要求性試験を行った。

[0210] 各菌株を前培養培地の CGXII 培地に植菌し、30℃で終夜培養した後、2 回洗浄し、本培養培地 CGXII 培地に吸光度 600nm が約 0.1 になるように植えついだ。また、CGXII 培地にシキミ酸（17.5 mg/L）、トリプトファン（50 mg/L）、ファニルアラニン（50 mg/L）およびチロシン（50 mg/L）を添加した培養実験も並行して行った。その結果、NSH 株は CGXII 培地では正常に生育したが、NSH Δ aroE3 株は極めて生育が遅かったことが明らかになった。また NSH Δ aroE3__vanE3 株と NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株は培養初期から中期にかけて生育が遅れ、培養終期に生育が回復することを確認した。また、NSH Δ aroE3__vanE3 株もしくは NSH Δ aroE3 Δ genH__rhcE3 株は CGXII 培地にシキミ酸、トリプトファン、ファニルアラニンおよびチロシンを添加すると生育が回復することを確認した。これらの結果から、VanR リプレッサーと RhcR リプレッサーはともに a

roE3遺伝子の発現を制御できることを見出した。

[0211] 参考例 1 6. nagIプロモーターの制御下でrhcR遺伝子を発現する菌株の造成
rhcR遺伝子がコードするRhcRリプレッサーによりaroE3遺伝子の転写を制御する系を構築ために、nagIプロモーターの制御下でrhcR遺伝子を発現する菌株を以下のようにして造成した。

[0212] 1. nagIKL遺伝子オペロン領域とrhcR遺伝子の置換用ベクターの構築

以下のようにして、上記で造成したNSH Δ aroE3 Δ genH株のnagIKL遺伝子オペロン領域をrhcR遺伝子と置換することにより、nagIプロモーターの制御下でrhcR遺伝子を発現する菌株を造成した。

[0213] nagIKL遺伝子オペロン領域の5' フランキング領域（相補鎖塩基番号3,199,996~3,200,904）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号129と配列番号130）を合成した。なお、配列番号129のプライマーには制限酵素SbfI部位を導入した。NSH株の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりnagIKL遺伝子オペロン領域の5' フランキング領域を増幅した。次に、nagIKL遺伝子オペロン領域の3' フランキング領域（相補鎖塩基番号3,196,321~3,197,306）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号131と配列番号132）を合成した。なお、配列番号132のプライマーには制限酵素SalI部位を導入した。

[0214] またrhcR遺伝子を増幅するために配列番号133と配列番号134のDNAプライマーを合成した。nagIKL遺伝子オペロン領域の5' フランキング領域、rhcR遺伝子を増幅したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー（配列番号133と配列番号134）を用い、オーバーラップPCR法による増幅反応を行った。また3' フランキング領域、rhcR遺伝子を増幅したDNA断片を鋳型として、DNAプライマー（配列番号132と配列番号133）を用い、オーバーラップPCR法で増幅した。それぞれ増幅したDNA断片をSbfIとAvrIIおよびAvrII とSalIで消化し、プラスミドpHKPsacB1（参考例2参照）のマルチクローニングサイト内の制限酵素部位SbfI-SalI間に導入し、プラスミドpHKPsacB__Pnag-rhcRを得た。

[0215] 2. nagIプロモーターの制御下でrhcR遺伝子を発現する菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHK PsacB__Pnag-rhcRを菌株NSHΔaroE3ΔgenH__rhcE3に導入し、カナマイシン耐性で選択することによりNSHΔaroE3ΔgenH__rhcE3__Km株を取得した。配列番号135と配列番号136のDNAプライマーと、配列番号129と配列番号132のプライマーとsacB遺伝子確認用プライマー（配列番号3と4）を用いるPCR法によりNSHΔaroE3ΔgenH__rhcE3__Km株を解析したところ、予想通りの結果が得られたことから、NSHΔaroE3ΔgenH__rhcE3__Km株はプラスミドpHKPsacB__Pnag-rhcRがnagIKL遺伝子オペロン領域に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0216] NSHΔaroE3ΔgenH__rhcE3株の1回交差型相同組換え体を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、Pnag-rhcR株を得た。配列番号135と配列番号136のプライマーを用いるPCR法により、Pnag-rhcR株のnagIKL遺伝子領域がrhcR遺伝子に置換しており、予想通り2回交差型相同組換え体であることを確認した。

[0217] 参考例17. nagIプロモーターの制御下でqsuB遺伝子とrhcR遺伝子を発現するプロトカテク酸生産菌Pnag-qsuB-rhcR株の造成

qsuB遺伝子をPnag-rhcR株のnagIプロモーター制御下に導入した菌株を以下のようにして造成した。

[0218] 1. qsuB遺伝子をnagIプロモーターの下流に導入するためのプラスミドの構築

qsuB遺伝子導入領域の5' フランキング領域（塩基番号3,199,996~3,200,904）を増幅させるために2種類のDNAプライマー（配列番号137と138）を合成し、またqsuB遺伝子導入領域の3' フランキング領域（塩基番号3,198,925~3,199,995 この領域はrhcR遺伝子に置換されている）を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号139と140）を合成した。なお、配列番号137と140のプライマーはそれぞれ制限酵素SbfI部位とSphI部

位を持つ。Pnag-rhcR株（参考例 1 6）の染色体DNAを鋳型にして、これらのプライマーを用いるPCR法によりqsuB遺伝子導入領域の5' フランキング領域と3' フランキング領域を増幅した。また、qsuB遺伝子を増幅するために2種類のDNAプライマー（配列番号 1 4 1 と 1 4 2）を合成し、HT23株（参考例 3）の染色体DNAを鋳型にしてこれらプライマーを用いるPCR法によりqsuB遺伝子領域を増幅した。このようにして得られたqsuB遺伝子導入領域の5' フランキング領域の増幅DNAとqsuB遺伝子領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号 1 3 7 と 1 4 2 のプライマーを用いるオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素 SbfIとXhoIによる消化により、配列番号 1 3 7 のプライマー内のSbfI部位とqsuB遺伝子内部のXhoI部位で切断されたDNA断片を得た。また、qsuB遺伝子領域の増幅DNA とqsuB遺伝子導入領域の3' フランキング領域の増幅DNAの混合物を鋳型として、配列番号 1 4 0 と 1 4 1 のプライマーを用いたオーバーラップPCR法により増幅反応を行った後、制限酵素 XhoIとSphIによる消化により、qsuB遺伝子内部のXhoI部位と配列番号 1 4 0 のプライマー内のSphI部位で切断されたDNA断片を得た。これら2種類のDNA断片をプラスミドpHKPsacB1（参考例 2 参照）のマルチクローニングサイト内にあるSbfI部位とSphI部位の間に導入し、プラスミドpHKPsacB__Pnag-qsuB-rhcRを得た。

[0219] 2. nagIプロモーターの制御下でqsuB遺伝子とrhcR遺伝子を発現する菌株の造成

エレクトロポレーションによる形質転換法を用いて、上述のプラスミドpHKPsacB__Pnag-qsuB-rhcRをPnag-rhcR株に導入してカナマイシン耐性となったPnag-rhcR株__Km株を取得した。続いて、Pnag-rhcR株__Km株をPCR法により解析するために、qsuB遺伝子導入領域の5' フランキング領域の上流の配列に一致するプライマー（配列番号 1 4 3）と3' フランキング領域の下流の配列に一致するプライマー（配列番号 1 4 4）を合成した後、配列番号 1 3 7 と 1 4 0 のプライマーを用いるPCR法によって解析した。いずれのプライマーセットを用いたPCR法による解析でも、予想通りの結果が得られたことから、

Pnag-rhcR株__Km株はプラスミドpHKPsacB__Pnag-qsuB-rhcRがnagIプロモーターの下流に導入された1回交差型相同組換え体であることを確認した。

- [0220] Pnag-rhcR株__Km株を1 mLのLB液体培地中で24時間培養し、培養液の一部を10%スクロース含有LB寒天培地上で塗抹培養することにより、Pnag-qsuB-rhcR株を得た。配列番号143と144のプライマーを用いるPCR法により、qsuB遺伝子がnagIプロモーターの下流に導入された2回交差型相同組換え体であることを確認した。

請求の範囲

- [請求項1] 炭素源から生育に必須な代謝物Mを生成する生合成経路において中間代謝物である化合物Pを代謝物Mに転換する酵素Xの発現量を調節することにより化合物Pを蓄積させるために、以下の（a）から（d）に記載の性質をすべて有する原核生物。
- （a）該原核生物が利用できる炭素源から化合物Pに至る生合成に関わる酵素群のうち、いずれか1つ以上の酵素の活性が該原核生物の野生株と比べて増強している。
- （b）酵素Xのタンパク質をコードする野生型遺伝子xの翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中に1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、酵素Xの活性が欠損または低下している。
- （c）前記遺伝子xの転写を促す本来のプロモーターとは異っており、かつリプレッサーRのタンパク質により転写が抑制されるプロモーターAにより、活性型酵素XをコードするDNAの転写が制御される。
- （d）リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zを1コピー以上有し、該遺伝子の転写が該遺伝子の本来のプロモーターおよび／または該プロモーターとは異なる誘導プロモーターBにより制御される。
- [請求項2] 性質（b）に記載の遺伝子xの転写を促すプロモーター領域の中の置換変異が、該プロモーターの全域または一部の領域を、性質（c）に記載のプロモーターAのDNAと置換する変異であることを特徴とする、請求項1に記載の原核生物。
- [請求項3] 前記原核生物が有する化合物Pを代謝する酵素のうち、酵素X以外のいずれか1つ以上の代謝酵素の活性が欠損または低下していることを特徴とする、請求項1または2に記載の原核生物。
- [請求項4] 前記プロモーターBが、フェルラ酸、バニリン酸、バニリン、安息香

酸、3-ヒドロキシ安息香酸、レゾルシノール、4-ヒドロキシ安息香酸、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、フラクトースおよびスクロースからなる群から選ばれる化合物の添加により誘導されるプロモーターであることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の原核生物。

[請求項5] 前記リプレッサーRのタンパク質をコードする遺伝子zが、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株のvanR (cg2615) 遺伝子、pcaR (cg2624) 遺伝子、またはrhcR (cg1308) 遺伝子であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の原核生物。

[請求項6] 前記プロモーターAが、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株のvanA (cg2616) 遺伝子のプロモーター、pobA (cg1226) 遺伝子のプロモーター、pcaH (cg2631) 遺伝子のプロモーター、またはrhcH (cg1309) 遺伝子のプロモーターであることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の原核生物。

[請求項7] 請求項1から6のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養することを特徴とする、化合物Pの製造方法。

[請求項8] 請求項1から6のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させることを特徴とする、化合物Pの製造方法。

[請求項9] 請求項1から6のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写抑制を解除した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させることを特徴とする、化合物Pの製造方法。

[請求項10] 前記化合物Pおよび前記代謝物Mの組み合わせが、以下(f)から(

i) のいずれかであることを特徴とする、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の化合物 P の製造方法。

(f) 化合物 P が 3-デヒドロシキミ酸であり、代謝物 M がシキミ酸である。

(g) 化合物 P がグルタミン酸であり、代謝物 M が N-アセチルグルタミン酸または γ -グルタミルリン酸である。

(h) 化合物 P がアスパラギン酸であり、代謝物 M が β -アルパルチルリン酸である。

(i) 化合物 P がセリンであり、代謝物 M がグリシンである。

[請求項11] 蓄積する化合物 P を酵素 Y により化合物 Q に転換するために、(a) から (d) に記載の性質に加えて下記の性質 (e) を有することを特徴する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の原核生物。

(e) 酵素 Y のタンパク質をコードする遺伝子 y の翻訳領域、該遺伝子の翻訳調節領域または遺伝子 y の転写を促すプロモーター領域の中に 1 個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を有することにより、化合物 P から化合物 Q への転換能が増強している、もしくは遺伝子 y の発現が野生型とは異なる制御を受けている。

[請求項12] 前記原核生物が有する化合物 Q を代謝する酵素のうち、いずれか 1 つ以上の代謝酵素の活性が欠損または低下していることを特徴とする、請求項 11 に記載の原核生物。

[請求項13] 性質 (e) に記載の遺伝子 y の転写を促すプロモーター領域の中の置換変異が、該プロモーターの全域または一部の領域を、該遺伝子の転写を促す本来のプロモーターおよびプロモーター A とは異なるプロモーター C の DNA と置換する変異であることを特徴とする、請求項 11 または 12 に記載の原核生物。

[請求項14] 前記プロモーター C がプロモーター B と同一である、または前記プロモーター C がプロモーター B の転写を制御するタンパク質による転写制御を受けることを特徴とする、請求項 13 に記載の原核生物。

- [請求項15] 前記プロモーターCが誘導プロモーターであることを特徴とする、請求項13または14に記載の原核生物。
- [請求項16] 前記プロモーターCが、フェルラ酸、バニリン酸、バニリン、安息香酸、3-ヒドロキシ安息香酸、レゾルシノール、4-ヒドロキシ安息香酸、2,4-ジヒドロキシ安息香酸、フラクトースおよびスクロースからなる群から選ばれる化合物の添加により誘導されるプロモーターであることを特徴とする、請求項15に記載の原核生物。
- [請求項17] 請求項11から16のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養することを特徴とする、化合物Qの製造方法。
- [請求項18] 請求項11から16のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写を抑制した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させ、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、化合物Qの製造方法。
- [請求項19] 請求項11から16のいずれか一項に記載の原核生物をプロモーターAの転写抑制を解除した状態で炭素源の存在下で培養した後、プロモーターBの転写を誘導する処理を加えることによりリプレッサーRのタンパク質の発現量を増加させることにより、代謝物Mの生成量を減少させ、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、化合物Qの製造方法。
- [請求項20] 請求項11から16のいずれか一項に記載の原核生物を炭素源の存在下で培養した後、前記プロモーターCの転写を誘導する処理を加えることにより前記酵素Yの発現量を増加させることにより、化合物Qの生成量を増加させることを特徴とする、請求項17から19のいずれか一項に記載の化合物Qの製造方法。
- [請求項21] 前記化合物P、前記化合物Qおよび前記代謝物Mの組み合わせが、以

下 (j) から (w) のいずれかであることを特徴とする、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の化合物 Q の製造方法。

(j) 化合物 P が 3-デヒドロシキミ酸であり、化合物 Q がプロトカテク酸であり、代謝物 M がシキミ酸である。

(k) 化合物 P がコリスミン酸であり、化合物 Q がアントラニル酸であり、代謝物 M がプレフェン酸である。

(l) 化合物 P がプレフェン酸であり、化合物 Q が 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸であり、代謝物 M がフェニルピルビン酸である。

(m) 化合物 P がプレフェン酸であり、化合物 Q がアロゲン酸であり、代謝物 M がフェニルピルビン酸である。

(n) 化合物 P がプレフェン酸であり、化合物 Q がフェニルピルビン酸であり、代謝物 M が 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸またはアロゲン酸である。

(o) 化合物 P が 2-オキソイソ吉草酸であり、化合物 Q が 2-イソプロピルリンゴ酸であ、代謝物 M がバリンである。

(p) 化合物 P が 2-オキソイソ吉草酸であり、化合物 Q がバリンであり、代謝物 M が 2-イソプロピルリンゴ酸である。

(q) 化合物 P がグルタミン酸であり、化合物 Q が γ -グルタミルリン酸であり、代謝物 M が N-アセチルグルタミン酸である。

(r) 化合物 P がグルタミン酸であり、化合物 Q が N-アセチルグルタミン酸であり、代謝物 M が γ -グルタミルリン酸である。

(s) 化合物 P がアスパラギン酸であり、化合物 Q がアスパラギンであり、代謝物 M が β -アルパルチルリン酸である。

(t) 化合物 P がアスパラギン酸 β -セミアルデヒドあり、化合物 Q が 2, 3-ジヒドロジピコリン酸であり、代謝物 M がホモセリンである。

(u) 化合物 P がホモセリンあり、化合物 Q が O-アセチルホモセリンであり、代謝物 M がホモセリンリン酸である。

(v) 化合物Pがホモセリンであり、化合物Qがホモセリンリン酸であり、代謝物MがO-アセチルホモセリンである。

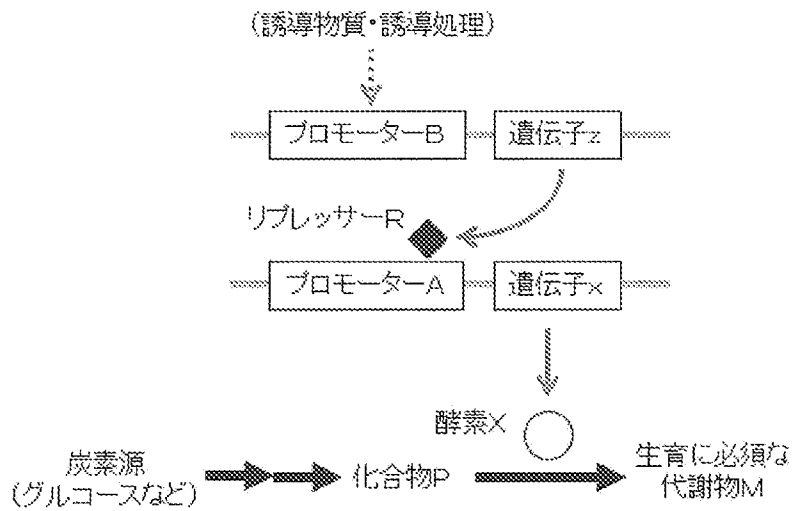
(w) 化合物Pがセリンであり、化合物QがO-アセチルセリンであり、代謝物Mがグリシンである。

[請求項22] 前記酵素Xがシキミ酸脱水素酵素であり、かつ前記酵素Yが3-デヒドロシキミ酸脱水素酵素であることを特徴とする、請求項21の(j)に記載のプロトカテク酸の製造方法。

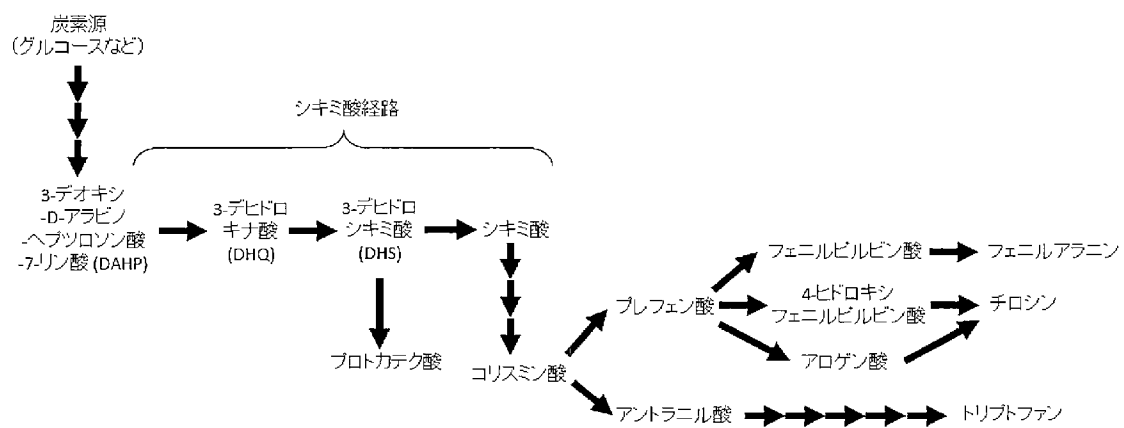
[請求項23] プロトカテク酸2, 3-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子、プロトカテク酸3, 4-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子、プロトカテク酸4, 5-ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子およびプロトカテク酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子について、該遺伝子の翻訳領域またはその転写・翻訳調節領域の中に、1個以上の塩基の置換、欠失または付加による変異を導入することにより、プロトカテク酸の代謝活性が欠損または低下している性質であることを特徴とする、請求項22に記載のプロトカテク酸の製造方法。

[請求項24] コリネバクテリウム・グルタミカムまたはエッシェリヒア・コリである、請求項1から6のいずれか一項または請求項11から16のいずれか一項に記載の原核生物。

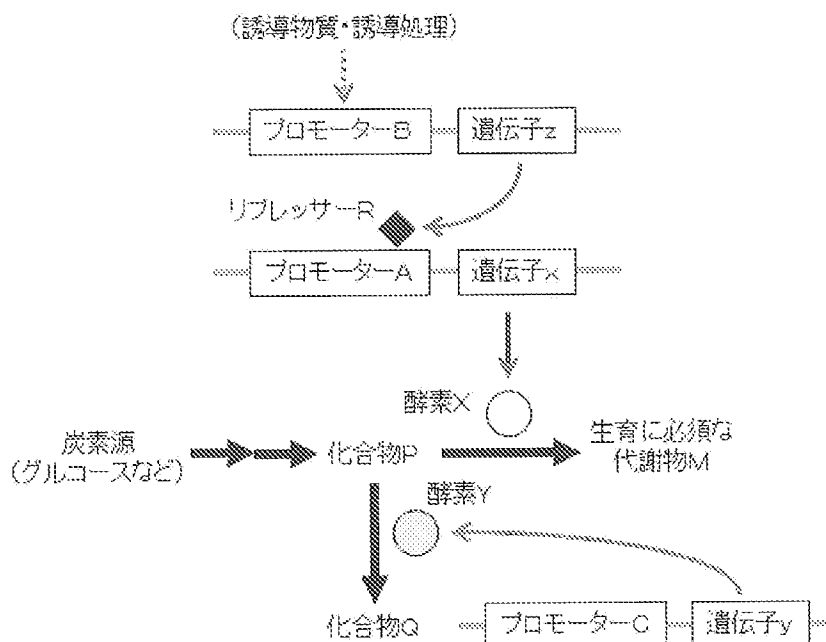
[図1]



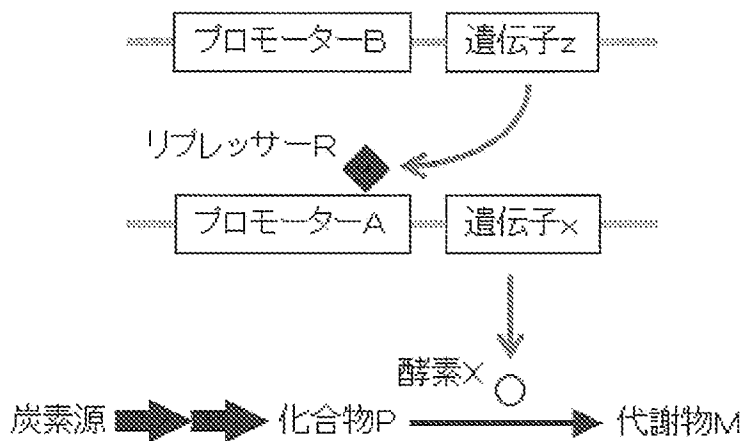
[図2]



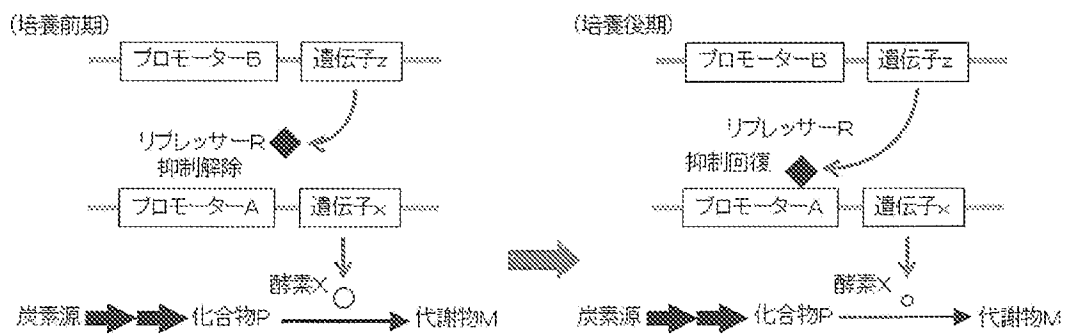
[図3]



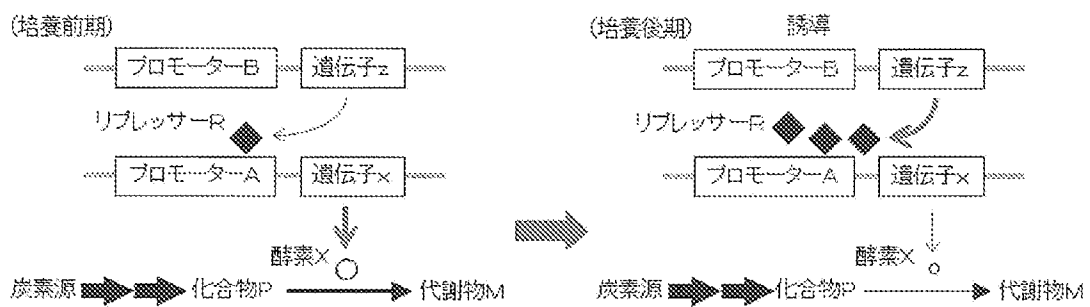
[図4]



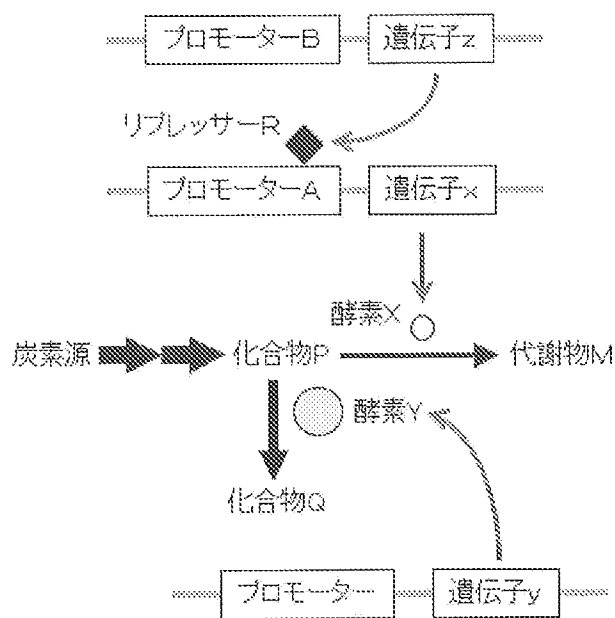
[図5]



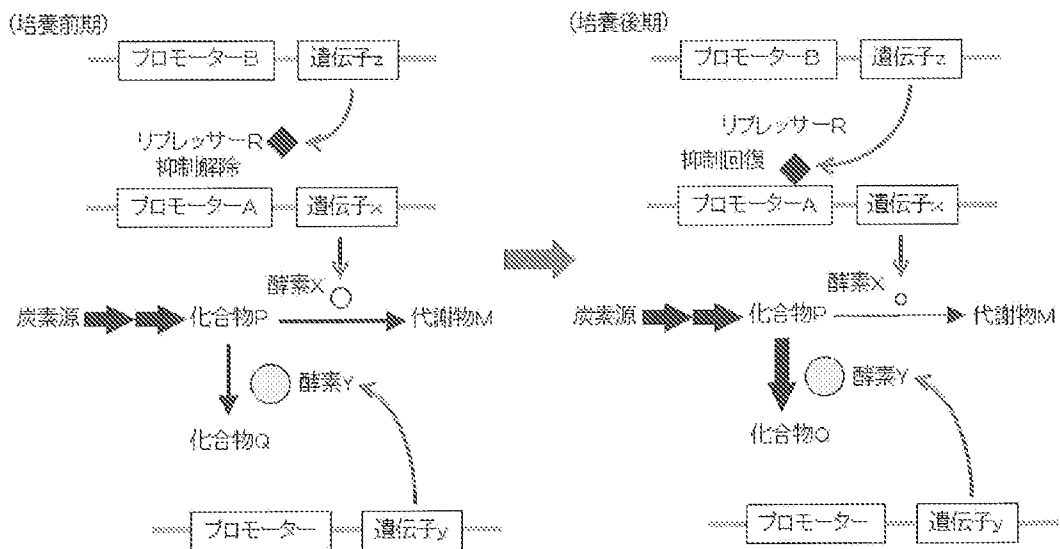
[図6]



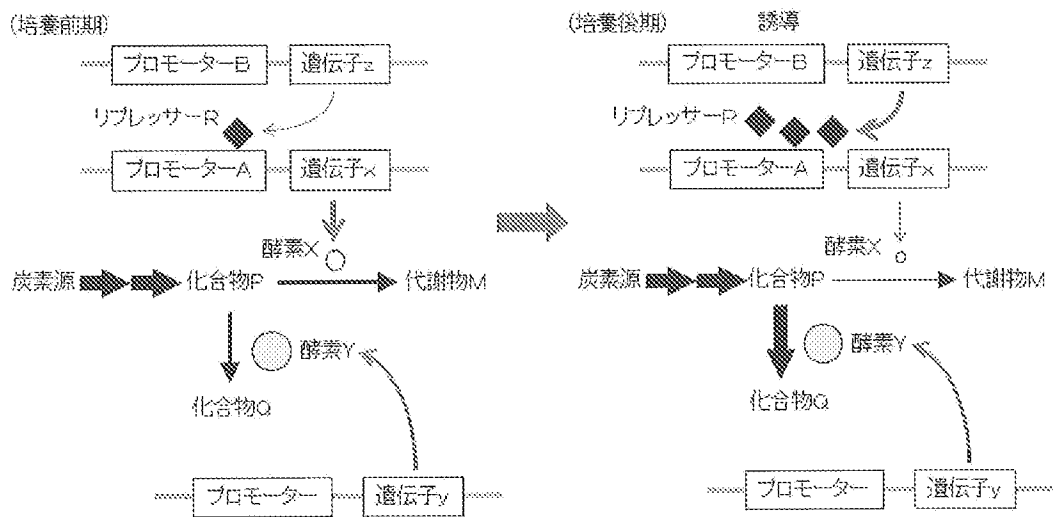
[図7]



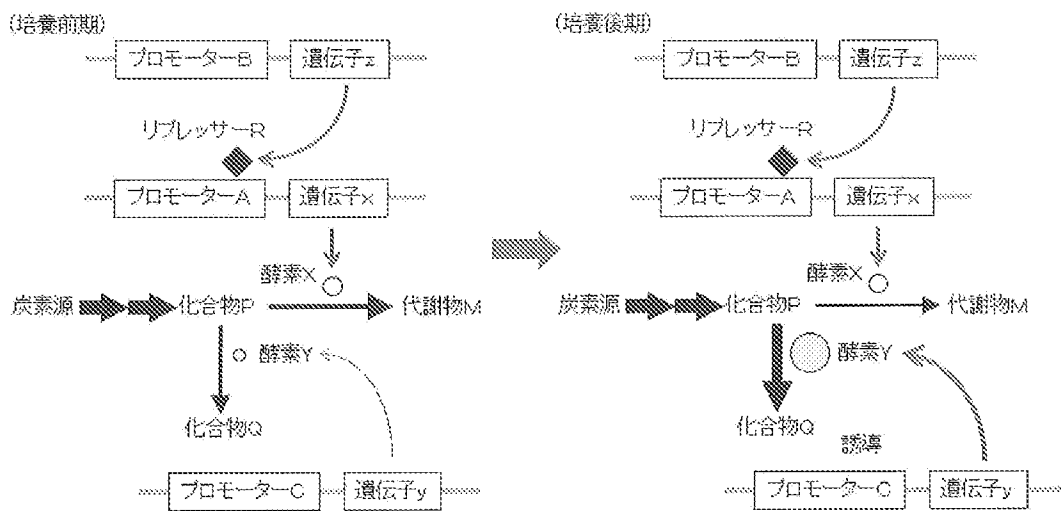
[図8]



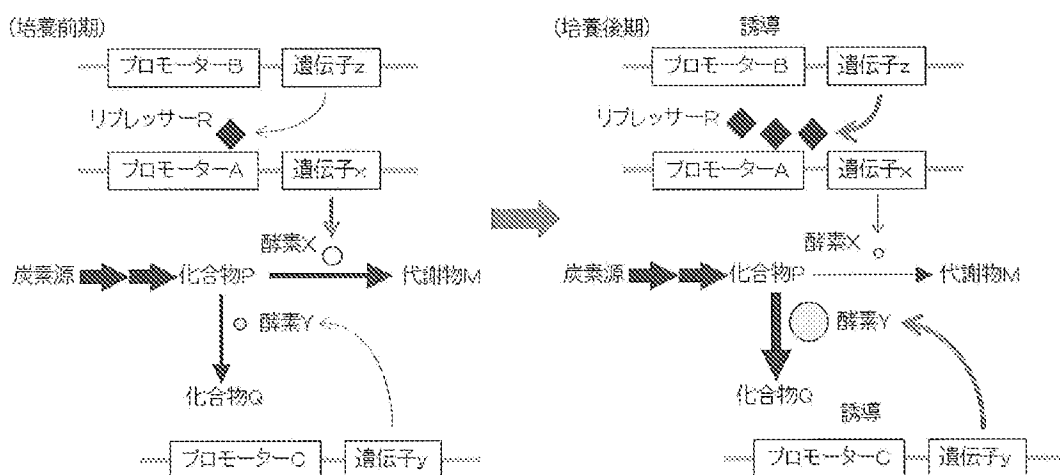
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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, C12P7/42, C12P7/46, C12P9/00, C12P13/00, C12P13/02, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/14, C12P13/20, C12N15/09, C12R1/15, C12R1/19

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, CiNii, CA/MEDLINE/ BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-207094 A (Genaris, Inc.), 24 September 2010 (24.09.2010), entire text (Family: none)	1-24
Y	LI, K. and FROST, J. W., Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D- glucose carbon sources, Biotechnol. Prog., 1999, Vol.15, No.5, pages 876-883.	1-24
Y	JP 2000-295996 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 24 October 2000 (24.10.2000), entire text & US 2002/0192746 A1 & US 2004/0259212 A1 & EP 1029926 A1	1-24

☒ 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
30 September, 2013 (30.09.13)

Date of mailing of the international search report
08 October, 2013 (08.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068205

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 2011/138006 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH), 10 November 2011 (10.11.2011), entire text & EP 2566963 A	1-24
Y	JP 2006-508684 A (Akzo Nobel N.V.), 16 March 2006 (16.03.2006), entire text & US 2006/0172423 A1 & EP 1570063 A & WO 2004/055189 A1	1-24
Y	TERAMOTO, H. et al., Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in Corynebacterium glutamicum, Appl. Environ. Microbiol., 2009, Vol.75, No.11, pages 3461-3468.	1-24
Y	US 5272073 A (JOHN W. FROST), 21 December 1993 (21.12.1993), entire text (Family: none)	1-24
A	MORAWSKI, B. et al., Repression of Acinetobacter vanillate demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators, FEMS Microbiol. Lett., 2000, Vol.187, pages 65-68.	1-24
A	JP 60-98989 A (Ajinomoto Co., Inc.), 01 June 1985 (01.06.1985), entire text (Family: none)	1-24
A	JP 2007-300809 A (Yamaguchi University), 22 November 2007 (22.11.2007), entire text (Family: none)	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/068205

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

*C12N1/21(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i,
C12P9/00(2006.01)i, C12P13/00(2006.01)i, C12P13/02(2006.01)i,
C12P13/06(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i,
C12P13/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12R1/15(2006.01)n,
C12R1/19(2006.01)n*

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

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N1/21, C12P7/42, C12P7/46, C12P9/00, C12P13/00, C12P13/02, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/14, C12P13/20, C12N15/09, C12R1/15, C12R1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII)、PubMed、CiNii、CA/MEDLINE/ BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-207094 A (株式会社ジナリス) 2010. 09. 24, 全文 (ファミリーなし)	1-24
Y	LI, K. and FROST, J. W., Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources, Biotechnol. Prog., 1999, Vol. 15, No. 5, pages 876-883.	1-24

☒ 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

3 0 . 0 9 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

白井 美香保

4 N

4 5 0 2

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2000-295996 A (協和醗酵工業株式会社) 2000.10.24, 全文 & US 2002/0192746 A1 & US 2004/0259212 A1 & EP 1029926 A1	1-24
Y	WO 2011/138006 A1 (FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH) 2011.11.10, 全文 & EP 2566963 A	1-24
Y	JP 2006-508684 A (アクゾ・ノベル・エヌ・ベー) 2006.03.16, 全文 & US 2006/0172423 A1 & EP 1570063 A & WO 2004/055189 A1	1-24
Y	TERAMOTO, H. et al., Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in <i>Corynebacterium glutamicum</i> , Appl. Environ. Microbiol., 2009, Vol.75, No.11, pages 3461-3468.	1-24
Y	US 5272073 A (JOHN W. FROST) 1993.12.21, 全文 (ファミリーなし)	1-24
A	MORAWSKI, B. et al., Repression of <i>Acinetobacter vanillate</i> demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators, FEMS Microbiol. Lett., 2000, Vol.187, pages 65-68.	1-24
A	JP 60-98989 A (味の素株式会社) 1985.06.01, 全文 (ファミリーなし)	1-24
A	JP 2007-300809 A (国立大学法人山口大学) 2007.11.22, 全文 (ファミリーなし)	1-24

発明の属する分野の分類

C12N1/21(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12P9/00(2006.01)i,
C12P13/00(2006.01)i, C12P13/02(2006.01)i, C12P13/06(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i,
C12P13/14(2006.01)i, C12P13/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12R1/15(2006.01)n,
C12R1/19(2006.01)n