

(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
2017年12月14日(14.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/213142 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 11/00 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/020997
- (22) 国際出願日: 2017年6月6日(06.06.2017)
- (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 2016-113930 2016年6月7日(07.06.2016) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山上 優 (YAMAKAMI, Suguru); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 知念 秋人 (CHINEN, Akito); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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))
— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING HYPOTAURINE OR TAURINE

(54) 発明の名称: ヒポタウリンまたはタウリンの製造法

(57) Abstract: Provided is a method for producing hypotaurine and/or taurine. Hypotaurine and/or taurine are produced by: incubating in culture medium a microorganism capable of producing L-cysteine, the microorganism being modified so as to increase cysteine dioxygenase activity and sulfinolalanine decarboxylase activity; and harvesting the hypotaurine and/or taurine.

(57) 要約: ヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造法を提供する。システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されたL-システイン生産能を有する微生物を培地で培養し、ヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取することにより、ヒポタウリンおよび／またはタウリンを製造する。



WO 2017/213142 A1

明 細 書

発明の名称：ヒポタウリンまたはタウリンの製造法

技術分野

[0001] 本発明は、微生物を用いた発酵法によるヒポタウリンやタウリン等のタウリン類の製造法に関する。ヒポタウリンやタウリンは、医薬品、化粧品、及び食品分野で利用されている。

背景技術

[0002] ヒポタウリンは、例えば、化学合成により製造されている。また、タウリンは、例えば、化学合成により、あるいは天然物からの抽出により、製造されている。

[0003] また、酵素法や発酵法等の生物を利用したタウリン類の製造も試みられている。これまでに報告されているタウリン類の生合成経路を図1に示す。図1に示した通り、タウリン類の生合成経路としては、大きく分けて、システインを由来とする経路と、アセチルリン酸を由来とする経路が挙げられる。

[0004] 一般に、タウリン類の生合成経路は真核生物が有する代謝経路であり、図1に示した代謝経路をコードする遺伝子の一部もしくは大部分は、一部の病原性細菌等を除き、細菌には存在しない。例えば、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、パントエア・アナナティス等のパントエア属細菌、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・エッフィシエンス、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス等のコリネバクテリウム属細菌等の細菌の多くは、図1に示した代謝経路の遺伝子の一部もしくは大部分が存在しない。なお、培養により培養液中にタウリンを蓄積するバチルス属細菌及びコリネ属細菌が報告されているものの（特許文献1）、同細菌において図1で示した代謝経路をコードする遺伝子は確認されておらず、同細菌においてタウリンがどのような代謝経路により生合成されるかは不明である。

[0005] 図1の代謝経路のうち、アセチルリン酸を由来とする経路については、Sulfoacetaldehyde Acetyltransferase活性及びtaurine-pyruvate Aminotransfe

rase活性を増強したE. coliを用いてタウリンを発酵生産したことが報告されている（特許文献2）。

[0006] しかしながら、システインを由来とする経路を利用したタウリン類の発酵生産についての報告はない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開昭63-202393号公報

特許文献2：韓国特許10-1214632

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、微生物を利用した効率的なヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、システインジオキシゲナーゼ活性とスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように微生物を改変することによって同微生物のヒポタウリン生産能を向上させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

ヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造法であって、

システイン生産能を有する微生物を培地で培養すること、および

ヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取すること、を含み、

前記微生物が、非改変株と比較して、システインジオキシゲナーゼの活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性が増大するように改変されている、方法。

[2]

前記微生物を培地で培養し、ヒポタウリンおよび／またはタウリンを該培

地中に蓄積すること、および

該培地よりヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取すること、
を含むヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造方法である、前記方法

。

[3]

前記微生物を培地で培養し、ヒポタウリンを該培地中に蓄積すること、
前記ヒポタウリンをタウリンに変換すること、および
前記タウリンを採取すること、
を含むタウリンの製造方法である、前記方法。

[4]

ヒポタウリンのタウリンへの変換が、酸化反応により実施される、前記方法。

[5]

前記システインジオキシゲナーゼおよび／またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼが、真核生物由来の酵素である、前記方法。

[6]

前記システインジオキシゲナーゼが、下記 (a) 、 (b) 、または (c)
に記載のタンパク質である、前記方法：

(a) 配列番号 1 4 、 1 6 、 1 8 、または 2 0 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 1 4 、 1 6 、 1 8 、または 2 0 に示すアミノ酸配列において、
1 ～ 1 0 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、システインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 1 4 、 1 6 、 1 8 、または 2 0 に示すアミノ酸配列に対して
7 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、システインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[7]

前記スルフィノアラニンデカルボキシラーゼが、下記（a）、（b）、または（c）に記載のタンパク質である、前記方法：

（a）配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（b）配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質；

（c）配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

[8]

システインジオキシゲナーゼをコードする遺伝子およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、システインジオキシゲナーゼの活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性が増大した、前記方法。

[9]

前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、及び／又は該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇した、前記方法。

[10]

前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、タウリン取り込み系の活性が低下するように改変されている、前記方法。

[11]

前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、タウリン分解系の活性が低下するように改変されている、前記方法。

[12]

前記タウリン分解系が、タウリンジオキシゲナーゼである、前記方法。

[13]

前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、Ｌーシステイン生合成系酵素の活性が増大するように改変されている、前記方法。

[1 4]

前記Ｌーシステイン生合成系酵素が、セリンアセチルトランスフェラーゼおよび／または３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼである、前記方法。

[1 5]

セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の発現が増大することにより、および／または、Ｌーシステインによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を前記微生物に保持させることにより、セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が増大した、前記方法。

[1 6]

３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現が増大することにより、および／または、Ｌーセリンによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を前記微生物に保持させることにより、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性が増大した、前記方法。

[1 7]

前記微生物が、Ｌーシステインによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および／またはＬーセリンによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を保持するように改変されている、前記方法。

[1 8]

前記微生物が、腸内細菌科に属する細菌またはコリネ型細菌である、前記方法。

[1 9]

前記微生物が、パントエア属細菌またはエシェリヒア属細菌である、前記方法。

[20]

前記微生物が、パントエア・アナナティスまたはエシェリヒア・コリである、前記方法。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]既知のタウリン類生合成経路を示す図。四角内には、各ステップを触媒する酵素または各ステップに関与する反応機構を示した。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0013] 本発明の方法は、Ｌ－システイン生産能を有する微生物を用いたタウリンおよび／またはヒポタウリンの製造方法であって、前記微生物が、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されている、方法である。同方法に用いられる微生物を、「本発明の微生物」ともいう。タウリンおよびヒポタウリンを総称して、「タウリン類」ともいう。

[0014] <1>本発明の微生物

本発明の微生物は、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変された、Ｌ－システイン生産能を有する微生物である。

[0015] <1-1>Ｌ－システイン生産能を有する微生物

本発明において、「Ｌ－システイン生産能を有する微生物」とは、培地で培養したときに、Ｌ－システインを生合成する能力を有する微生物をいう。本発明において、タウリン類は、Ｌ－システインを中間体として生成され得る。よって、Ｌ－システイン生産能を有する微生物は、例えば、タウリン類の中間体として必要な量のＬ－システインを生合成する能力を有する微生物であってよい。Ｌ－システイン生産能を有する微生物は、Ｌ－システインを培地中および／または菌体内に産物として蓄積してもよく、しなくてもよい。

。すなわち、生合成されたＬ－システインは、速やかに消費されてもよい。生合成されたＬ－システインは、例えば、タウリン類に変換されてよい。すなわち、本発明において、Ｌ－システイン生産能は、例えば、タウリン類の生産能として測定されてもよい。

[0016] また、本発明の微生物は、タウリン類の生産能を有する微生物でもある。本発明において、「タウリン類の生産能を有する微生物」とは、培地で培養したときに、タウリン類を生成し、回収できる程度に培地中に蓄積する能力を有する微生物をいう。タウリン類の生産能を有する微生物は、非改変株よりも多い量のタウリン類を培地に蓄積することができる微生物であってよい。「非改変株」とは、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されていない対照株をいう。すなわち、非改変株としては、野生株や親株、例えば*Escherichia coli* K-12 MG1655株 (ATCC 47076) や*Pantoea ananatis* AJ13355株 (FERM BP-6614)、が挙げられる。また、タウリン類の生産能を有する微生物は、例えば、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上、 $3\text{ }\mu\text{M}$ 以上、 $10\text{ }\mu\text{M}$ 以上、 $50\text{ }\mu\text{M}$ 以上、または $100\text{ }\mu\text{M}$ 以上の量のタウリン類を培地に蓄積することができる微生物であってもよい。なお、「微生物がタウリンを生成し培地中に蓄積する」ことには、微生物がヒポタウリンを培地中に生成し、培地中のヒポタウリンがタウリンに変換され、以て、タウリンが培地中に蓄積する場合も包含される。本発明の微生物は、ヒポタウリンおよびタウリンのいずれか一方の生産能を有していてもよく、その両方の生産能を有していてもよい。

[0017] 本発明において、「タウリン類」という用語は、特記しない限り、フリー体のタウリン類、その塩、またはそれらの混合物を意味する。塩については後述する。

[0018] 微生物としては、細菌や酵母が挙げられる。

[0019] 細菌としては、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) に属する細菌やコリネ型細菌が挙げられる。

[0020] 腸内細菌科に属する細菌としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、エン

テロバクター (*Enterobacter*) 属、パントエア (*Pantoea*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、エルビニア (*Erwinia*) 属、フォトラブダス (*Photorhabdus*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、モルガネラ (*Morganella*) 等の属に属する細菌が挙げられる。具体的には、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) で用いられている分類法により腸内細菌科に分類されている細菌を用いることができる。

[0021] エシェリヒア属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりエシェリヒア属に分類されている細菌が挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、Neidhardtらの著書 (Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に記載されたものが挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) が挙げられる。エシェリヒア・コリとしては、例えば、W3110株 (ATCC 27325) やMG1655株 (ATCC 47076) 等のエシェリヒア・コリK-12株；エシェリヒア・コリK5株 (ATCC 23506) ；BL21(DE 3)株等のエシェリヒア・コリB株；およびそれらの派生株が挙げられる。

[0022] エンテロバクター属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりエンテロバクター属に分類されている細菌が挙げられる。エンテロバクター属細菌としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*) やエンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) が挙げられる。エンテロバクター・アグロメランスとして、具体的には、例えば、エンテロバクター・アグロメランスATCC12287株が挙げられる。エンテロバクター・アエロゲネスとして、具体的には、例えば、エンテロバクター・アエロゲネスATCC13048株、NBRC12010

株 (Biotechnol Bioeng. 2007 Mar 27; 98(2) 340-348)、AJ110637株 (FERM BP-10955) が挙げられる。また、エンテロバクター属細菌としては、例えば、欧州特許出願公開EP0952221号明細書に記載されたものが挙げられる。なお、*Enterobacter agglomerans*には、*Pantoea agglomerans*と分類されているものも存在する。

[0023] パントエア属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりパントエア属に分類されている細菌が挙げられる。パントエア属細菌としては、例えば、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュワールティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が挙げられる。パントエア・アナナティスとして、具体的には、例えば、パントエア・アナナティス LMG20103株、AJ13355株 (FERM BP-6614)、AJ13356株 (FERM BP-6615)、AJ13601株 (FERM BP-7207)、SC17株 (FERM BP-11091)、SC17(0)株 (VKPM B-9246)、及びSC17sucA株 (FERM BP-8646) が挙げられる。なお、エンテロバクター属細菌やエルビニア属細菌には、パントエア属に再分類されたものもある (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989); Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993))。例えば、エンテロバクター・アグロメランスのある種のものは、最近、16S rRNAの塩基配列分析等に基づき、パントエア・アグロメランス、パントエア・アナナティス、パントエア・ステワールティ等に再分類された (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 337-345 (1989))。本発明において、パントエア属細菌には、このようにパントエア属に再分類された細菌も含まれる。

[0024] エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロボーラ (*Erwinia amylovora*)、エルビニア・カロトボーラ (*Erwinia carotovora*) が挙げられる。クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラ (*Klebsiella planticola*) が挙げられる。

[0025] コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、およびマイクロバクテリウム (*Microba*

cterium) 属等の属に属する細菌が挙げられる。

[0026] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような種が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (*Corynebacterium acetoacidophilum*)

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (*Corynebacterium acetoglutamicum*)

コリネバクテリウム・アルカノリティカム (*Corynebacterium alkanolyticum*)

コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)

コリネバクテリウム・クレナタム (*Corynebacterium crenatum*)

コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

コリネバクテリウム・リリウム (*Corynebacterium lilium*)

コリネバクテリウム・メラセコーラ (*Corynebacterium melassecola*)

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

コリネバクテリウム・ハーキュリス (*Corynebacterium herculis*)

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium divaricatum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・ロゼウム (*Brevibacterium roseum*)

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*)

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス (*Brevibacterium thiogenitalis*)
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・スタティオ
ニス) (*Corynebacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium stationis*))
ブレビバクテリウム・アルバム (*Brevibacterium album*)
ブレビバクテリウム・セリナム (*Brevibacterium cerinum*)
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniaphilum*
)

[0027] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium crenatum AS1.542

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 1
3869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340
(FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826, ATCC 1
4067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

[0028] なお、コリネバクテリウム属細菌には、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に統合された細菌 (*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 255(1991)) も含まれる。また、コリネバクテリウム・スタティオニスには、従来コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに分類されていたが、16S rRNAの塩基配列解析等によりコリネバクテリウム・スタティオニスに再分類された細菌も含まれる (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 874-879(2010))。

[0029] 酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロミセス属、キャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) 等のキャンディダ属、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等のピヒア属、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等のハンゼヌラ属、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカロミセス属等の属に属する酵母が挙げられる。

[0030] これらの菌株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、これらの菌株は、例えば、各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。

[0031] 本発明の微生物は、本来的にL-システイン生産能を有するものであってもよく、L-システイン生産能を有するように改変されたものであってもよ

い。すなわち、例えば、上記のような微生物を、そのまま、あるいは適宜改変して、L-システイン生産能を有する微生物として利用できる。L-システイン生産能を有する微生物は、例えば、上記のような微生物にL-システイン生産能を付与することにより、または、上記のような微生物のL-システイン生産能を増強することにより、取得できる。

[0032] L-システイン生産能の付与または増強は、従来、腸内細菌科に属する細菌又はエシェリヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法により行うことができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。そのような方法としては、例えば、栄養要求性変異株の取得、L-アミノ酸のアナログ耐性株の取得、代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸の生合成系酵素の活性が増強された組換え株の創製が挙げられる。L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、L-アミノ酸生産菌の育種において、活性が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の活性の増強が組み合わされてもよい。

[0033] L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株は、親株又は野生株を通常の変異処理に供し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、且つL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって取得できる。通常の変異処理としては、X線や紫外線の照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG）、エチルメタンサルフォネート（EMS）、メチルメタンサルフォネート（MMS）等の変異剤による処理が挙げられる。

[0034] また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL-アミノ酸の生合成に関与する酵素の活性を増強することによっても行うことができる。酵素

活性の増強は、例えば、同酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように微生物を改変することにより行うことができる。遺伝子の発現を増強する方法は、W000/18935号パンフレット、欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。酵素活性を増強する詳細な手法については後述する。

[0035] また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下させることによっても行うことができる。なお、ここでいう「目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素」には、目的のアミノ酸の分解に関与する酵素も含まれる。酵素活性を低下させる手法については後述する。

[0036] 以下、L-システイン生産菌、およびL-システイン生産能を付与または増強する方法について具体的に例示する。なお、以下に例示するようなL-システイン生産菌が有する性質およびL-システイン生産能を付与または増強するための改変は、いずれも、単独で用いてもよく、適宜組み合わせ用いてもよい。

[0037] L-システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-システインの生合成系が強化されるように微生物を改変する方法が挙げられる。「L-システインの生合成系を強化する」とは、L-システインの生合成に関与する酵素（L-システイン生合成系酵素ともいう）から選択される1またはそれ以上の酵素の活性を増強することをいう。L-システイン生合成系酵素としては、L-システイン生合成経路の酵素、および同経路の基質となる化合物の生成に関与する酵素が挙げられる。L-システイン生合成系酵素として、具体的には、セリンアセチルトランスフェラーゼ（SAT）や3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ（PGD）が挙げられる。SATおよびPGDをコードする遺伝子を、それぞれSAT遺伝子およびPGD遺伝子ともいう。L-システイン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、例えば、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌由来の遺伝子や、その他各種生物由来の

遺伝子のいずれも使用することができる。例えば、SAT遺伝子として、cysE遺伝子がエシェリヒア・コリの野生株及びＬ－システイン分泌変異株よりクローニングされ、塩基配列が明らかになっている（Denk, D. and Boeck, A., J. General Microbiol., 133, 515-525 (1987)）。また、例えば、PGD遺伝子として、エシェリヒア・コリ等の各種生物のserA遺伝子が知られている。エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のcysE遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするCysEタンパク質（SAT）のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号23および24に示す。また、エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のserA遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするSerAタンパク質（PGD）のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号25および26に示す。

[0038] また、SATはＬ－システインによるフィードバック阻害を受けるため、このフィードバック阻害が低減又は解除されたSATを利用してもよい。「フィードバック阻害が低減又は解除されている」ことを「フィードバック阻害に耐性」ともいう。本発明において、Ｌ－システインによるフィードバック阻害が低減又は解除されたSATを「変異型SAT」ともいう。また、変異型SATをコードする遺伝子を「変異型SAT遺伝子」ともいう。すなわち、Ｌ－システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、変異型SAT遺伝子を保持するように微生物を改変する方法も挙げられる。すなわち、本発明の微生物は、変異型SAT遺伝子を保持するように改変されていてもよい。変異型SAT遺伝子を微生物に保持させることによって、SAT活性を増強することができ得る。変異型SATとしては、野生型SATの256位のメチオニン残基をリジン残基及びロイシン残基以外のアミノ酸残基に置換する変異を有するSATや、野生型SATの256位のメチオニン残基からC末端側の領域を欠失する変異を有するSATが挙げられる（特開平11-155571）。前記「リジン残基及びロイシン残基以外のアミノ酸残基」としては、通常のタンパク質を構成するアミノ酸のうち、メチオニン残基、リジン残基、及びロイシン残基を除く17種類のアミノ酸残基が挙げられる。前記「リジン残基及びロイシン残基以外のアミノ酸残基」として、具体的には、イソロイシン残基およびグルタミン酸残基が挙げられる。

。また、変異型SATとしては、野生型SATの89～96位のアミノ酸残基に1又は複数の変異を有するSAT（米国特許公開第20050112731(A1)）、野生型SATの95位のバリン残基及び96位のアスパラギン酸残基を、各々アルギニン残基及びプロリン残基に置換する変異を有するSAT（変異型遺伝子名cysE5、米国特許公開第20050112731(A1)）、及び野生型SATの167位のスレオニン残基をアラニン残基に置換する変異を有するSAT（変異型遺伝子名cysEX、米国特許第6218168号、米国特許公開第20050112731(A1)）も挙げられる。「野生型SAT」とは、上述の変異（レーシステインによるフィードバック阻害に耐性となる変異）を有していないSATをいう。ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、上述の変異を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型SATとしては、エシェリヒア・コリ等の各種生物由来のSATが挙げられる。また、野生型SATとしては、エシェリヒア・コリ等の各種生物由来のSATの保存的バリエーション（元の機能が維持されたバリエーション）であって、上述の変異を有しないものも挙げられる。SATについての「元の機能」とは、SAT活性をいう。256位のメチオニン残基をグルタミン酸残基に置換した変異型SATをコードする変異型cysEを含むプラスミドpCEM256Eを保持するエシェリヒア・コリJM39-8株（*E. coli* JM39-8(pCEM256E)、プライベートナンバー：AJ13391）は、1997年11月20日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（現、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター、郵便番号：292-0818、住所：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、FERM P-16527の受託番号のもとで寄託され、2002年7月8日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-8112が付与されている。

[0039] また、変異型SATは、上記のようにレーシステインによるフィードバック阻害に耐性となるように改変されたものであってもよいが、元来フィードバック阻害を受けないものであってもよい。例えば、シロイヌナズナのSATは、レーシステインによるフィードバック阻害を受けないことが知られており、本発明に好適に用いることができる。シロイヌナズナ由来のSAT遺伝子を含むプ

ラスミドとして、pEAS-m (FEMS Microbiol. Lett., 179 (1999) 453-459) が知られている。

[0040] また、PGDはL-セリンによるフィードバック阻害を受けるため、このフィードバック阻害が低減又は解除されたPGDを利用してもよい。本発明において、L-セリンによるフィードバック阻害が低減又は解除されたPGDを「変異型PGD」ともいう。また、変異型PGDをコードする遺伝子を「変異型PGD遺伝子」ともいう。すなわち、L-システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、変異型PGD遺伝子を保持するように微生物を改変する方法も挙げられる。すなわち、本発明の微生物は、変異型PGD遺伝子を保持するように改変されていてもよい。変異型PGD遺伝子を微生物に保持させることによって、PGD活性を増強することができ得る。変異型PGDとしては、野生型PGDの410位（N末端）のチロシン残基を欠失する変異を有するPGD（変異型遺伝子名serA5、米国特許第6,180,373号）が挙げられる。「野生型PGD」とは、上述の変異（L-セリンによるフィードバック阻害に耐性となる変異）を有していないPGDをいう。ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、上述の変異を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型PGDとしては、エシェリヒア・コリ等の各種生物由来のPGDが挙げられる。また、野生型PGDとしては、エシェリヒア・コリ等の各種生物由来のPGDの保存的バリエーション（元の機能が維持されたバリエーション）であって、上述の変異を有しないものも挙げられる。PGDについての「元の機能」とは、PGD活性をいう。

[0041] 本発明において、「野生型SATのX位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号24におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。また、本発明において、「野生型PGDのX位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号26におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。アミノ酸配列における「X位」とは、同アミノ酸配列のN末端から数えてX番目の位置を意味し、N末端のアミノ酸残基が1位のアミノ酸残基である。なお、アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示すもので

あって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその絶対的な位置は前後することがある。例えば、「野生型SATの167位のスレオニン残基」とは、配列番号24における167位のスレオニン残基に相当するアミノ酸残基を意味し、167位よりもN末端側の1アミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から166番目のアミノ酸残基が「野生型SATの167位のスレオニン残基」であるものとする。また、167位よりもN末端側に1アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から168番目のアミノ酸残基が「野生型SATの167位のスレオニン残基」であるものとする。

[0042] 任意のSATのアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号24におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、当該SATのアミノ酸配列と配列番号24のアミノ酸配列とのアライメントを行うことにより決定できる。任意のPGDのアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号26におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、当該PGDのアミノ酸配列と配列番号26のアミノ酸配列とのアライメントを行うことにより決定できる。アライメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して行うことができる。具体的なソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASISや、ゼネティックス製のGENETYXなどが挙げられる (Elizabeth C. Tyler et al., *Computers and Biomedical Research*, 24(1), 72-96, 1991; Barton GJ et al., *Journal of molecular biology*, 198(2), 327-37, 1987)。

[0043] 変異型遺伝子（すなわち、変異型SAT遺伝子または変異型PGD遺伝子）は、野生型遺伝子（すなわち、野生型SAT遺伝子または野生型PGD遺伝子）を変異型タンパク質（すなわち、変異型SATまたは変異型PGD）をコードするよう改変することにより取得できる。DNAの改変は公知の手法により行うことができる。具体的には、例えば、DNAの目的部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in *PCR technology*, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., *Meth. in Enzymol.*, 154, 382 (1987)) や、ファージを用いる方法 (Kramer, W. an

d Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987) ; Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、変異型遺伝子は、化学合成によっても取得できる。変異後のコドンは、目的のアミノ酸をコードするものであれば特に制限されないが、宿主で使用頻度の高いコドンを使用することが好ましい。

[0044] 変異型遺伝子を保持するように微生物を改変することは、変異型遺伝子を微生物に導入することにより達成できる。また、変異型遺伝子を保持するように微生物を改変することは、自然変異や変異原処理により微生物が有する遺伝子に変異を導入することによっても達成できる。

[0045] また、硫酸塩／チオ硫酸塩輸送系タンパク質群をコードするcysPTWAMクラスター遺伝子の発現を増強することによっても、L-システイン生産能を付与又は増強することができる（特開2005-137369号公報、EP1528108号明細書）。

[0046] また、硫化物は、cysK遺伝子およびcysM遺伝子それぞれによりコードされるO-アセチルセリン（チオール）-リアーゼAおよびBにより触媒される反応を介してO-アセチル-L-セリンに取り込まれ、L-システインが産生する。したがって、これらの酵素はL-システイン生合成経路の酵素に含まれ、これらの酵素をコードする遺伝子の発現を増強することによっても、L-システイン生産能を付与又は増強することができる。

[0047] また、L-システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-システインの分解系が抑制されるように微生物を改変する方法も挙げられる。「L-システイン分解系を抑制する」とは、L-システインの分解に関与するタンパク質（L-システイン分解酵素ともいう）から選択される1またはそれ以上のタンパク質の活性を増強することをいう。L-システイン分解酵素としては、特に制限されないが、metC遺伝子にコードされるシスタチオニン-β-リアーゼ（特開平11-155571号、Chandra et. al., Biochemistry, 21 (1982) 3064-3069）、tnaA遺伝子にコードされるトリプトファンナーゼ（特開2003-169668、Austin Newton et. al., J. Biol. Chem. 24

0 (1965) 1211-1218)、cysM遺伝子にコードされるO-アセチルセリン スルフィドヒドラーゼB (特開2005-245311)、malY遺伝子にコードされるMalY (特開2005-245311) パントエア・アナナティスのd0191遺伝子にコードされるシステインデスルフィドラーゼ (特開2009-232844) が挙げられる。

[0048] L-システイン生産菌又はそれを誘導するための親株の例として、具体的には、例えば、変異型SATをコードする種々のcysEアレルで形質転換されたE. coli JM15 (米国特許第6,218,168号)、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする遺伝子の発現が増強されたE. coli W3110 (米国特許第5,972,663号)、システインデスルフィドラーゼ活性が低下したE. coli (特開平11-155571号公報)、cysB遺伝子によりコードされるシステインレギュロンの正の転写制御因子の活性が上昇したE. coli W3110 (W001/27307)、ydeD遺伝子、変異型cysE遺伝子 (cysEX遺伝子)、および変異型serA遺伝子 (serA5遺伝子) を含むプラスミドpACYC-DES (特開2005-137369 (US20050124049 (A1)、EP1528108(A1))) を保持するE. coli等のE. coli株が挙げられる。なお、pACYC-DESは、上記3遺伝子をpACYC184に挿入することによって得られたプラスミドであり、各遺伝子はompAプロモーター (PompA) により制御される。

[0049] L-システイン生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、例えば、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を有してよい。また、L-システイン生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションであってもよい。具体的には、例えば、L-システイン生産菌の育種に使用される遺伝子は、元の機能が維持されている限り、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションについては、後述するシステインジオキシゲナーゼ遺伝子お

よびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子、並びにそれらがコードするタンパク質の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。

[0050] <1-2>システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性の増強

本発明の微生物は、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されている。本発明の微生物は、具体的には、非改変株と比較して、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されている。本発明の微生物は、L-システイン生産能を有する微生物を、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変することにより取得できる。また、本発明の微生物は、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように微生物を改変した後に、L-システイン生産能を付与または増強することによっても取得できる。本発明の微生物を構築するための改変は、任意の順番で行うことができる。

[0051] システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように微生物を改変することによって、微生物のタウリン類の生産能を向上させることができる。本発明の微生物は、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変される前からタウリン類の生産能を有していてもよく、有していなくてもよい。すなわち、本発明の微生物は、例えば、システインジオキシゲナーゼ活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されたことにより、タウリン類の生産能を獲得したものであってもよい。

[0052] 以下に、システインジオキシゲナーゼおよびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ、並びにそれらをコードする遺伝子について説明する。

[0053] 「システインジオキシゲナーゼ」とは、L-システインと酸素から3-スルフィノアラニンを生成する反応を触媒する酵素（EC 1.13.11.20）をいう。

同反応を触媒する活性を、「システインジオキシゲナーゼ活性」ともいう。すなわち、「システインジオキシゲナーゼ」とは、言い換えると、システインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質（酵素）である。システインジオキシゲナーゼ活性は、例えば、公知の手法（THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 282, NO. 5, pp. 3391-3402, February 2, 2007）により測定することができる。システインジオキシゲナーゼは、さらに、システアミンと酸素からヒポタウリンを生成する反応を触媒する活性を有していてもよい。システインジオキシゲナーゼは、システインオキシダーゼとも呼ばれる。また、システインジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を、「システインジオキシゲナーゼ遺伝子」ともいう。

[0054] システインジオキシゲナーゼ遺伝子としては、CD01遺伝子、CDG1遺伝子、CDG2遺伝子、cdo遺伝子、およびyubC遺伝子と呼ばれる遺伝子が挙げられる。システインジオキシゲナーゼ遺伝子の由来は、すなわちシステインジオキシゲナーゼの由来は、特に制限されない。システインジオキシゲナーゼ遺伝子は、例えば、真核生物、具体的には多細胞生物、より具体的には高等動物に由来するものであってもよい。システインジオキシゲナーゼ遺伝子として、具体的には、例えば、ホモ・サピエンス（Homo sapiens）、ボース・タウルス（Bos taurus）、ガッルス・ガッルス（Gallus gallus）、カプラ・ヒルカス（Capra hircus）のCD01遺伝子が挙げられる。すなわち、システインジオキシゲナーゼとしては、それらシステインジオキシゲナーゼ遺伝子にコードされるタンパク質が挙げられる。CD01遺伝子、CDG1遺伝子、およびCDG2遺伝子は真核生物が保有する遺伝子であり、その遺伝子の内部にイントロンを含む場合がある。一方、cdo遺伝子やyubC遺伝子は原核生物が保有する遺伝子であり、一般的に、イントロンを含まない。イントロンを含む遺伝子の場合、エキソン部分は、mRNAから逆転写酵素を用いて得られるcDNAの塩基配列に基づき推定することが可能である。

[0055] 例えば、ホモ・サピエンスの全ゲノムDNA配列は公知であり、cDNAについても網羅的に解析されている（Proc Natl Acad Sci U S A, 2002 Dec 24;99(26

):16899-903. Epub 2002 Dec 11. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.)。ホモ・サピエンスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子であるCD01は、NCBI Reference Sequence:NC_000005.10に記載のchromosome 5の115816954-115804733位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号14 (=NCBI Reference Sequence: NP_001792.2) に示す。

[0056] 例えば、ボース・タウルの全ゲノムDNA配列は公知であり、cDNAについても網羅的に解析されている (BMC Genomics. 2005 Nov 23;6:166. Characterization of 954 bovine full-CDS cDNA sequences. Harhay GP1, Sonstegard TS, Keele JW, Heaton MP, Clawson ML, Snelling WM, Wiedmann RT, Van Tassell CP, Smith TP.)。ボース・タウルのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子であるCD01は、chromosome 10に存在し、NCBI Reference Sequence: AC_000167.1の4606919-4598430位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号16 (=NCBI Reference Sequence: NP_001029637.1) に示す。

[0057] 例えば、ガッルス・ガッルスの全ゲノムDNA配列は公知であり、ガッルス・ガッルスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子であるCD01については、chromosome Zに存在し、NCBI Reference Sequence: NC_006127.3の72766594-72776618位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号18 (=NCBI Reference Sequence: XP_424964.2) に示す。

[0058] 例えば、カプラ・ヒルカスの全ゲノムDNA配列は公知であり、カプラ・ヒルカスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子であるCD01については、chromosome 10に存在し、NCBI Reference Sequence: NC_022302.1の4489575-4478589位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号20 (=NCBI Reference Sequence: XP_005685100.1) に示す。

[0059] システインジオキシゲナーゼ遺伝子としては、例えば原核生物における異種発現の観点から、一般的に、イントロンを含まないシステインジオキシゲナーゼ遺伝子を好適に用いることができる。例えば、イントロンを含むシステインジオキシゲナーゼ遺伝子を、イントロンを含まないように改変して利用してもよい。エシェリヒア・コリでの異種発現用に改変された、イントロンを含まないホモ・サピエンス (*Homo sapiens*)、ボース・タウルス (*Bos taurus*)、ガッルス・ガッルス (*Gallus gallus*)、およびカプラ・ヒルカス (*Capra hircus*) のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子の塩基配列の一例を、それぞれ、配列番号 1、2、3、および 4 の塩基配列の一部として取得できる。

[0060] 上記したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子にコードされたシステインジオキシゲナーゼタンパク質のアミノ酸配列の同一性を表 1 に示す。

[0061] [表1]

表 1 システインジオキシゲナーゼタンパク質のアミノ酸配列の同一性

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Capra hircus</i>
<i>Homo sapiens</i>	–	93%	78%	92%
<i>Bos taurus</i>	93%	–	76%	99%
<i>Gallus gallus</i>	78%	76%	–	75%
<i>Capra hircus</i>	92%	99%	75%	–

[0062] 「スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ」とは、3-スルフィノアラニンからヒポタウリンと炭酸を生成する反応を触媒する酵素 (EC 1.13.11.20) をいう。同反応を触媒する活性を、「スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性」ともいう。すなわち、「スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ」とは、言い換えると、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質 (酵素) である。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性は、例えば、公知の手法 (Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jul; 79(14): 4270-4274.) により測定することができる。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼは、さらに、システイン酸からタウリンと炭酸を生成する反応を触媒する活性を有していてもよい。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼは、3

ースルフィノーレーアラニンカルボキシラーゼ、スルフォアラニンデカルボキシラーゼ、システインスルフィネートデカルボキシラーゼ、システイン酸デカルボキシラーゼ、システックデカルボキシラーゼ、システインスルフィネートデカルボキシラーゼ、レーシステイン酸デカルボキシラーゼ、またはシステインスルフィネートデカルボキシラーゼとも呼ばれる。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子を、「スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子」ともいう。

[0063] スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子としては、GADL1遺伝子、CSAD遺伝子、Csad遺伝子、csad遺伝子、およびgad1遺伝子と呼ばれる遺伝子が挙げられる。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の由来は、すなわちスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの由来は、特に制限されない。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、例えば、真核生物、具体的には多細胞生物、より具体的には高等動物に由来するものであってもよい。スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子として、具体的には、例えば、ホモ・サピエンス (*Homo sapiens*)、ボース・タウルス (*Bos taurus*)、カプラ・ヒルカス (*Capra hircus*) のCSAD遺伝子や、ガッルス・ガッルス (*Gallus gallus*) のGADL1遺伝子が挙げられる。すなわち、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼとしては、それらスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子にコードされるタンパク質が挙げられる。GADL1遺伝子、CSAD遺伝子、Csad遺伝子、csad遺伝子、およびgad1遺伝子は真核生物が保有する遺伝子であり、その遺伝子の内部にイントロンを含む場合がある。イントロンを含む遺伝子の場合、エキソン部分は、mRNAから逆転写酵素を用いて得られるcDNAの塩基配列に基づき推定することが可能である。

[0064] 例えば、ホモ・サピエンスの全ゲノムDNA配列は公知であり、cDNAについても網羅的に解析されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24;99(26):16899-903. Epub 2002 Dec 11. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.)。ホモ・サピエンスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子であるCSADは、NCB

I Reference Sequence: NC_000012.12に記載のchromosome 12の、53180909-53157663位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号13 (NCBI Reference Sequence: NP_001231634.1) に示す。

[0065] 例えば、ボース・タウルスの全ゲノムDNA配列は公知であり、ボース・タウルスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子であるCSADは、chromosome 10に存在し、NCBI Reference Sequence: AC_000162.1の26984918-27013327位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号15 (=NCBI Reference Sequence: XP_001788403.2) に示す。

[0066] 例えば、ガッルス・ガッルスの全ゲノムDNA配列は公知であり、ガッルス・ガッルスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子であるGADL1は、chromosome 2に存在し、NCBI Reference Sequence: NC_006089.3の40694521-40463081位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号17 (=NCBI Reference Sequence: XP_003640783.2) に示す。

[0067] 例えば、カプラ・ヒルカスの全ゲノムDNA配列は公知であり、カプラ・ヒルカスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子であるCSADは、chromosome 5に存在し、NCBI Reference Sequence: NC_022297.1の26083269-26107661位の配列に相当する。同遺伝子のエキソン部分にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を配列番号19 (=NCBI Reference Sequence: XP_005679979.1) に示す。

[0068] スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子としては、例えば原核生物における異種発現の観点から、一般的に、イントロンを含まないスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を好適に用いることができる。例えば、イントロンを含むスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を、イントロンを含まないように改変して利用してもよい。エシェリヒア・コリでの異種発現用に改変された、イントロンを含まないホモ・サピエンス (Homo sapi

ens)、ボース・タウルス (*Bos taurus*)、ガッルス・ガッルス (*Gallus gallus*)、およびカプラ・ヒルカス (*Capra hircus*) のスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列の一例を、それぞれ、配列番号 1、2、3、および 4 の塩基配列の一部として取得できる。

[0069] 上記したスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子にコードされたスルフィノアラニンデカルボキシラーゼタンパク質のアミノ酸配列の同一性を表 2 に示す。

[0070] [表2]

表 2 スルフィノアラニンデカルボキシラーゼタンパク質のアミノ酸配列の同一性

	Homo sapiens	Bos taurus	Gallus gallus	Capra hircus
Homo sapiens	–	91%	59%	91%
Bos taurus	91%	–	61%	99%
Gallus gallus	59%	61%	–	61%
Capra hircus	91%	99%	61%	–

[0071] システインジオキシゲナーゼ遺伝子は、例えば、上記例示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子の塩基配列（例えば配列番号 1、2、3、または 4 に示す塩基配列の一部）を有する遺伝子であってよい。また、システインジオキシゲナーゼは、例えば、上記例示したシステインジオキシゲナーゼのアミノ酸配列（例えば配列番号 14、16、18、または 20 に示すアミノ酸配列）を有するタンパク質であってよい。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、例えば、上記例示したスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列（例えば配列番号 1、2、3、または 4 に示す塩基配列の一部）を有する遺伝子であってよい。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼは、例えば、上記例示したスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列（例えば配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列）を有するタンパク質であってよい。なお、「（アミノ酸または塩基）配列を有する」という表現は、当該「（アミノ酸または塩基）配列を含む」場合および当該「（アミノ酸または塩基）配列からなる」場合を包含する。

[0072] システインジオキシゲナーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子のバリエントであってもよい。同様に、システインジオキシゲナーゼは、元の機能が維持されている限り、上記例示したシステインジオキシゲナーゼのバリエントであってもよい。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子のバリエントであってもよい。同様に、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼは、元の機能が維持されている限り、上記例示したスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのバリエントであってもよい。なお、そのような元の機能が維持されたバリエントを「保存的バリエント」という場合がある。本発明において、上記遺伝子名で特定される遺伝子およびそれに対応する名称で特定されるタンパク質には、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質に加えて、その保存的バリエントが含まれるものとする。すなわち、例えば、「CD01遺伝子」という用語は、上記例示したCD01遺伝子（例えば、ホモ・サピエンス、ボース・タウルス、ガッルス・ガッルス、カブラ・ヒルカスのCD01遺伝子）に加えて、その保存的バリエントを包含するものとする。同様に、例えば、「Cdo1タンパク質」という用語は、上記例示したCdo1タンパク質（例えば、ホモ・サピエンス、ボース・タウルス、ガッルス・ガッルス、カブラ・ヒルカスのCD01遺伝子にコードされるタンパク質）に加えて、その保存的バリエントを包含するものとする。保存的バリエントとしては、例えば、上記例示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子、並びにそれらがコードするタンパク質のホモログや人為的な改変体が挙げられる。

[0073] 「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリエントが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（活性や性質）に対応する機能（活性や性質）を有することをいう。遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエントが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることをいう。システインジオキシゲナーゼ遺伝子についての「元

の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションがシステインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードすることをいう。また、システインジオキシゲナーゼについての「元の機能が維持されている」とは、タンパク質のバリエーションがシステインジオキシゲナーゼ活性を有することをいう。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションがスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードすることをいう。また、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼについての「元の機能が維持されている」とは、タンパク質のバリエーションがスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有することをいう。

[0074] 以下、保存的バリエーションについて例示する。

[0075] システインジオキシゲナーゼ遺伝子もしくはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子のホモログまたはシステインジオキシゲナーゼもしくはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのホモログは、例えば、上記例示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子もしくはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列または上記例示したシステインジオキシゲナーゼもしくはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子のホモログは、例えば、各種生物の染色体を鋳型にして、これら公知のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いたPCRにより取得することができる。

[0076] システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列（例えば、システインジオキシゲナーゼについて配列番号14、16、18、または20に示すアミノ酸配列、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼにつ

いて配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列) において、1 若しくは数個の位置での 1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、コードされるタンパク質は、その N 末端および／または C 末端が、延長または短縮されていてもよい。なお上記「1 又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には、例えば、1～50 個、1～40 個、1～30 個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～3 個を意味する。

[0077] 上記の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr 間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val 間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn 間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His 間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu 間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr 間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、Ala から Ser 又は Thr への置換、Arg から Gln、His 又は Lys への置換、Asn から Glu、Gln、Lys、His 又は Asp への置換、Asp から Asn、Glu 又は Gln への置換、Cys から Ser 又は Ala への置換、Gln から Asn、Glu、Lys、His、Asp 又は Arg への置換、Glu から Gly、Asn、Gln、Lys 又は Asp への置換、Gly から Pro への置換、His から Asn、Lys、Gln、Arg 又は Tyr への置換、Ile から Leu、Met、Val 又は Phe への置換、Leu から Ile、Met、Val 又は Phe への置換、Lys から Asn、Glu、Gln、His 又は Arg への置換、Met から Ile、Leu、Val 又は Phe への置換、Phe から Trp、Tyr、Met、Ile 又は Leu への置換、Ser から Thr 又は Ala への置換、Thr から Ser 又は Ala への置換、Trp から Phe 又は Tyr への置換、Tyr から His、Phe 又は Trp への置換、及び、Val から Met、Ile 又は Leu への置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺

伝子が由来する生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。

[0078] また、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列全体に対して、例えば、50%以上、65%以上、70%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」 (homology) は、「同一性」 (identity) を意味する。

[0079] また、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記塩基配列 (例えば配列番号 1、2、3、または 4 に示す塩基配列の一部) から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列、とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば、50%以上、65%以上、70%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

[0080] 上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、上述の遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プロ

ープとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。プローブとして300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0081] また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、任意のコドンとそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。すなわち、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、コドンの縮重による上記例示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子のバリエーションであってもよい。例えば、システインジオキシゲナーゼ遺伝子またはスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンと有するように改変されてよい。

[0082] 2つの配列間の配列同一性のパーセンテージは、例えば、数学的アルゴリズムを用いて決定できる。このような数学的アルゴリズムの限定されない例としては、Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17のアルゴリズム、Smith et al (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所ホモロジーアルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453のホモロジーアライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448の類似性を検索する方法、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載されているような、改良された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズムが挙げられる。

[0083] これらの数学的アルゴリズムに基づくプログラムを利用して、配列同一性を決定するための配列比較（アラインメント）を行うことができる。プログラムは、適宜、コンピュータにより実行することができる。このようなプログラムとしては、特に限定されないが、PC/GeneプログラムのCLUSTAL (Intelligenetics, Mountain View, Calif.から入手可能)、ALIGNプログラム (Version 2.0)、並びにWisconsin Genetics Software Package, Version 8 (Gen

etics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USAから入手可能) のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、及びTFASTAが挙げられる。これらのプログラムを用いたアライメントは、例えば、初期パラメーターを用いて行うことができる。CLUSTALプログラムについては、Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244、Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153、Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90、Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65、及びPearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331によく記載されている。

[0084] 対象のタンパク質をコードするヌクレオチド配列と相同性があるヌクレオチド配列を得るために、具体的には、例えば、BLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12にて行うことができる。対象のタンパク質と相同性があるアミノ酸配列を得るために、具体的には、例えば、BLASTタンパク質検索を、BLASTXプログラム、スコア=50、ワード長=3にて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索やBLASTタンパク質検索については、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。また、比較を目的としてギャップを加えたアライメントを得るために、Gapped BLAST (BLAST 2.0) を利用できる。また、PSI-BLAST (BLAST 2.0) を、配列間の離間した関係を検出する反復検索を行うのに利用できる。Gapped BLASTおよびPSI-BLASTについては、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、またはPSI-BLASTを利用する場合、例えば、各プログラム（例えば、ヌクレオチド配列に対してBLASTN、アミノ酸配列に対してBLASTX）の初期パラメーターが用いられ得る。アライメントは、手動にて行われてもよい。

[0085] 2つの配列間の配列同一性は、2つの配列を最大一致となるように整列したときに2つの配列間で一致する残基の比率として算出される。

[0086] なお、上記の遺伝子やタンパク質の保存的バリエーションに関する記載は、ラーシステイン生合成系酵素等の任意のタンパク質、およびそれらをコードする遺伝子にも準用できる。

[0087] <1-3>その他の改変

本発明の微生物は、さらに、タウリン取り込み系の活性が低下するように改変されていてもよい。「タウリン取り込み系」とは、タウリンを細胞外から細胞内へ取り込む機能を有するタンパク質をいう。同機能を「タウリン取り込み活性」ともいう。タウリン取り込み活性は、例えば、公知の手法 (Eichhorn E et.al., J Bacteriol. 2000 May;182(10):2687-95.) により測定することができる。また、タウリン取り込み系をコードする遺伝子を「タウリン取り込み系遺伝子」ともいう。タウリン取り込み系遺伝子としては、tauABC遺伝子が挙げられる。エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のtauABC遺伝子の塩基配列を配列番号27、29、および31に、同遺伝子がコードするTauABCタンパク質のアミノ酸配列を配列番号28、30、および32に、それぞれ示す。パントエア・アナナティスAJ13355株のtauABC遺伝子の塩基配列を配列番号35、37、および39に、同遺伝子がコードするTauABCタンパク質のアミノ酸配列を配列番号36、38、および40に、それぞれ示す。

[0088] また、本発明の微生物は、さらに、タウリン分解系の活性が低下するように改変されていてもよい。「タウリン分解系」とは、タウリンを分解する機能を有するタンパク質をいう。同機能を「タウリン分解活性」ともいう。タウリン分解系をコードする遺伝子を「タウリン分解系遺伝子」ともいう。タウリン分解系としては、タウリンジオキシゲナーゼ (taurine dioxygenase) が挙げられる。「タウリンジオキシゲナーゼ」とは、タウリンと2-オキソグルタル酸と酸素から亜硫酸とアミノアセトアルデヒドとコハク酸と二酸化炭素を生成する反応を触媒する酵素 (EC 1.14.11.17) をいう。同反応を触媒する活性を、「タウリンジオキシゲナーゼ活性」ともいう。すなわち、「タウリンジオキシゲナーゼ」とは、言い換えると、タウリンジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質 (酵素) である。タウリンジオキシゲナーゼ活性は、例えば、公知の手法 (Eichhorn E et.al., J Biol Chem. 1997 Sep 12;272(37):23031-6.) により測定することができる。また、タウリンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を、「タウリンジオキシゲナーゼ遺伝子」ともいう。

。タウリンジオキシゲナーゼ遺伝子としては、tauD遺伝子が挙げられる。エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のtauD遺伝子の塩基配列を配列番号33に、同遺伝子がコードするTauDタンパク質のアミノ酸配列を配列番号34に、それぞれ示す。パントエア・アナナティスAJ13355株のtauD遺伝子の塩基配列を配列番号41に、同遺伝子がコードするTauDタンパク質のアミノ酸配列を配列番号42に、それぞれ示す。なお、tauD遺伝子は、tauABC遺伝子とtauABCDオペロンを構成している場合がある。その場合、タウリン取り込み系の活性とタウリン分解系の活性を低下させるためにtauABCDオペロンをまとめて破壊等（例えば欠損）してもよい。

[0089] これら他の改変は、特に、本発明の微生物の存在下でタウリンを製造する場合に有効であり得る。

[0090] 上記のような他の改変に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、例えば、上記例示した塩基配列およびアミノ酸配列を有してよい。また、上記のような他の改変に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質（例えば、上記例示した塩基配列およびアミノ酸配列を有する遺伝子およびタンパク質）の保存的バリエーションであってもよい。具体的には、例えば、上記のような他の改変に使用される遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したアミノ酸配列や公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。「tauABCD遺伝子（tauABCDオペロン）」および「TauABCDタンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示したtauABCD遺伝子およびTauABCDタンパク質に加えて、その保存的バリエーションを包含するものとする。遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションについては、前述のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子、並びにそれらがコードするタンパク質の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。

[0091] <1-4>タンパク質の活性を増大させる手法

以下に、システインジオキシゲナーゼやスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ等のタンパク質の活性を増大させる手法について説明する。

- [0092] 「タンパク質の活性が増大する」とは、同タンパク質の活性が非改変株と比較して増大することを意味する。「タンパク質の活性が増大する」とは、具体的には、同タンパク質の細胞当たりの活性が非改変株と比較して増大することを意味してよい。ここでいう「非改変株」とは、標的のタンパク質の活性が増大するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。非改変株として、具体的には、各微生物種の基準株 (type strain) が挙げられる。また、非改変株として、具体的には、微生物の説明において例示した株も挙げられる。すなわち、一態様において、タンパク質の活性は、基準株 (すなわち本発明の微生物が属する種の基準株) と比較して増大してよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、エシェリヒア・コリMG1655株と比較して増大してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、パントエア・アナナティスAJ13355株と比較して増大してもよい。なお、「タンパク質の活性が増大する」ことを、「タンパク質の活性が増強される」ともいう。「タンパク質の活性が増大する」とは、より具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が増加していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が增大していることを意味してよい。すなわち、「タンパク質の活性が増大する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量 (mRNA量) または翻訳量 (タンパク質の量) を意味してもよい。また、「タンパク質の活性が増大する」とは、もともと標的のタンパク質の活性を有する菌株において同タンパク質の活性を増大させることだけでなく、もともと標的のタンパク質の活性が存在しない菌株に同タンパク質の活性を付与することを含む。また、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、宿主が本来有する標的のタンパク質の活性を低下または消失させた上で、好適な標的のタンパク質の活性を付与してもよい。

[0093] タンパク質の活性の増大の程度は、タンパク質の活性が非改変株と比較して増大していれば特に制限されない。タンパク質の活性は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、非改変株が標的のタンパク質の活性を有していない場合は、同タンパク質をコードする遺伝子を導入することにより同タンパク質が生成されていればよいが、例えば、同タンパク質はその酵素活性が測定できる程度に生産されていてよい。

[0094] タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることによって達成できる。「遺伝子の発現が上昇する」とは、同遺伝子の発現が野生株や親株等の非改変株と比較して増大することを意味する。「遺伝子の発現が上昇する」とは、具体的には、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変株と比較して増大することを意味してよい。「遺伝子の発現が上昇する」とは、より具体的には、遺伝子の転写量（mRNA量）が増大すること、および／または、遺伝子の翻訳量（タンパク質の量）が増大することを意味してよい。なお、「遺伝子の発現が上昇する」ことを、「遺伝子の発現が増強される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、「遺伝子の発現が上昇する」とは、もともと標的の遺伝子が発現している菌株において同遺伝子の発現量を上昇させることだけでなく、もともと標的の遺伝子が発現していない菌株において、同遺伝子を発現させることを含む。すなわち、「遺伝子の発現が上昇する」とは、例えば、標的の遺伝子を保持しない菌株に同遺伝子を導入し、同遺伝子を発現させることを含む。

[0095] 遺伝子の発現の上昇は、例えば、遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。

[0096] 遺伝子のコピー数の増加は、宿主の染色体へ同遺伝子を導入することにより達成できる。染色体への遺伝子の導入は、例えば、相同組み換えを利用して行うことができる（Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics,

1972, Cold Spring Harbor Laboratory)。相同組み換えを利用する遺伝子導入法としては、例えば、Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration) 法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) 等の直鎖状DNAを用いる方法、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法、ファージを用いたtransduction法が挙げられる。遺伝子は、1コピーのみ導入されてもよく、2コピーまたはそれ以上導入されてもよい。例えば、染色体上に多数のコピーが存在する配列を標的として相同組み換えを行うことで、染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体上に多数のコピーが存在する配列としては、反復DNA配列 (repetitive DNA)、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピートが挙げられる。また、目的物質の生産に不要な遺伝子等の染色体上の適当な配列を標的として相同組み換えを行ってもよい。また、遺伝子は、トランスポゾンやMini-Muを用いて染色体上にランダムに導入することもできる (特開平2-109985号公報、US5,882,888、EP805867B1)。

[0097] 染色体上に標的遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部又は一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は同遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認できる。

[0098] また、遺伝子のコピー数の増加は、同遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。例えば、標的遺伝子を含むDNA断片を、宿主で機能するベクターと連結して同遺伝子の発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主を形質転換することにより、同遺伝子のコピー数を増加させることができる。標的遺伝子を含むDNA断片は、例えば、標的遺伝子を有する微生物のゲノムDNAを鋳型とするPCRにより取得できる。ベクターとしては、宿主の細胞内において自律複製可能なベクターを用いることができる。ベクターは、マルチコピーベクターであるのが好ましい。また、

形質転換体を選択するために、ベクターは抗生物質耐性遺伝子などのマーカーを有することが好ましい。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーターやターミネーターを備えていてもよい。ベクターは、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。エシェリヒア・コリ等の腸内細菌科の細菌において自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pBR322、pSTV29（いずれもタカラバイオ社より入手可）、pACYC184、pMW219（ニッポンジーン社）、pTrc99A（ファルマシア社）、pPROK系ベクター（クロンテック社）、pKK233-2（クロンテック社製）、pET系ベクター（ノバジェン社）、pQE系ベクター（キアゲン社）、pCold TF DNA（タカラバイオ社）、pACYC系ベクター、広宿主域ベクターRSF1010が挙げられる。コリネ型細菌で自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pHM1519（Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)）；pAM330（Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)）；これらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド；特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号明細書公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11；特開平10-215883号公報に記載のpVK7；特開平9-070291号公報に記載のpVC7が挙げられる。

[0099] 遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に宿主に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、宿主で機能するプロモーター配列による制御を受けて発現するように導入されていればよい。プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、導入する遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の

遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターとしては、例えば、後述するような、より強力なプロモーターを利用してもよい。

[0100] 遺伝子の下流には、転写終結用のターミネーターを配置することができる。ターミネーターは、宿主において機能するものであれば特に制限されない。ターミネーターは、宿主由来のターミネーターであってもよく、異種由来のターミネーターであってもよい。ターミネーターは、導入する遺伝子の固有のターミネーターであってもよく、他の遺伝子のターミネーターであってもよい。ターミネーターとして、具体的には、例えば、T7ターミネーター、T4ターミネーター、fdファージターミネーター、tetターミネーター、およびtrpAターミネーターが挙げられる。

[0101] 各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターに関しては、例えば「微生物学基礎講座8 遺伝子工学、共立出版、1987年」に詳細に記載されており、それらを利用することが可能である。

[0102] また、2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に宿主に保持されていればよい。例えば、各遺伝子は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各遺伝子は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。また、2またはそれ以上の遺伝子でオペロンを構成して導入してもよい。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」としては、例えば、2またはそれ以上のタンパク質をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一のタンパク質複合体を構成する2またはそれ以上のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、およびそれらの組み合わせが挙げられる。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」として、具体的には、例えば、システインジオキシゲナーゼ遺伝子とスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を導入する場合が挙げられる。

[0103] 導入される遺伝子は、宿主で機能するタンパク質をコードするものであれば特に制限されない。導入される遺伝子は、宿主由来の遺伝子であってもよ

く、異種由来の遺伝子であってもよい。導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、同遺伝子を有する生物のゲノムDNAや同遺伝子を搭載するプラスミド等を鋳型として、PCRにより取得することができる。また、導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて全合成してもよい (Gene, 60(1), 115-127 (1987))。取得した遺伝子は、そのまま、あるいは適宜改変して、利用することができる。すなわち、遺伝子を改変することにより、該遺伝子のバリエーションを取得できる。遺伝子の改変は公知の手法により行うことができる。例えば、部位特異的変異法により、DNAの目的部位に目的の変異を導入することができる。すなわち、例えば、部位特異的変異法により、コードされるタンパク質が特定の部位においてアミノ酸残基の置換、欠失、挿入または付加を含むように、遺伝子のコード領域を改変することができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) や、ファージを用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、遺伝子のバリエーションを全合成してもよい。

[0104] なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、遺伝子の発現を上昇させることによりタンパク質の活性を増大させる場合、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強してもよく、一部の発現のみを増強してもよい。通常は、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強するのが好ましい。また、複合体を構成する各サブユニットは、複合体が目的のタンパク質の機能を有する限り、1種の生物由来であってもよく、2種またはそれ以上の異なる生物由来であってもよい。すなわち、例えば、複数のサブユニットをコードする

、同一の生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよく、それぞれ異なる生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよい。

[0105] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の転写効率を向上させることにより達成できる。また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の翻訳効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の転写効率や翻訳効率の向上は、例えば、発現調節配列の改変により達成できる。「発現調節配列」とは、遺伝子の発現に影響する部位の総称である。発現調節配列としては、例えば、プロモーター、シャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）、およびRBSと開始コドンとの間のスペーサー領域が挙げられる。発現調節配列は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することができる。これら発現調節配列の改変は、例えば、温度感受性ベクターを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法（W02005/010175）により行うことができる。

[0106] 遺伝子の転写効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。「より強力なプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも向上するプロモーターを意味する。より強力なプロモーターとしては、例えば、公知の高発現プロモーターであるT7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、thrプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、tetプロモーター、araBADプロモーター、rpoHプロモーター、msrAプロモーター、Bifidobacterium由来のPm1プロモーター、PRプロモーター、およびPLプロモーターが挙げられる。また、コリネ型細菌で利用できるより強力なプロモーターとしては、人為的に設計変更されたP54-6プロモーター（Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679(2000)）、コリネ型細菌内で酢酸、エタノール、ピルビン酸等で誘導できるpta、aceA、aceB、adh、amyEプロモーター、コリネ型細菌内で発現量が多い強力なプロモーターであるcspB、SOD、tuf（EF-Tu）プロモーター（Journal of Biotechnology 104 (2003) 311-323, Appl Environ Microbiol. 2005 Dec;71(12):8587-96.）、lacプロ

モーター、tacプロモーター、trcプロモーターが挙げられる。また、より強力なプロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得してもよい。例えば、プロモーター領域内の-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることにより、プロモーターの活性を高めることができる（国際公開第00/18935号）。高活性型プロモーターとしては、各種tac様プロモーター（Katashkina JI et al, Russian Federation Patent application 2006134574）やpnlp8プロモーター（W02 010/027045）が挙げられる。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文（Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)）等に記載されている。

[0107] 遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のシャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）をより強力なSD配列に置換することにより達成できる。「より強力なSD配列」とは、mRNAの翻訳が、もともと存在している野生型のSD配列よりも向上するSD配列を意味する。より強力なSD配列としては、例えば、ファージT7由来の遺伝子10のRBSが挙げられる（Olins P. O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235）。さらに、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域、特に開始コドンのすぐ上流の配列（5'-UTR）における数個のヌクレオチドの置換、あるいは挿入、あるいは欠失がmRNAの安定性および翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによっても遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。

[0108] 遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、コドンの改変によっても達成できる。例えば、遺伝子中に存在するレアコドンを、より高頻度で利用される同義コドンに置き換えることにより、遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。すなわち、導入される遺伝子は、例えば、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変されてよい。コドンの置換は、例えば、DNAの目的の部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法により行うことができる。また、コドンが置換された遺伝子断片を全合成しても

よい。種々の生物におけるコドンの使用頻度は、「コドン使用データベース」 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)) に開示されている。

[0109] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、または、遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成できる。

[0110] 上記のような遺伝子の発現を上昇させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

[0111] また、タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、タンパク質の比活性を増強することによっても達成できる。比活性の増強には、フィードバック阻害の低減および解除も含まれる。比活性が増強されたタンパク質は、例えば、種々の生物を探索し取得することができる。また、在来 of タンパク質に変異を導入することで高活性型のものを取得してもよい。導入される変異は、例えば、タンパク質の1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されるものであってよい。変異の導入は、例えば、上述したような部位特異的変異法により行うことができる。また、変異の導入は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、エチルメタンスルフォネート(EMS)、およびメチルメタンスルフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。また、in vitroでDNAを直接ヒドロキシルアミンで処理し、ランダム変異を誘発してもよい。比活性の増強は、単独で用いてもよく、上記のような遺伝子の発現を増強する手法と任意に組み合わせで用いてもよい。

[0112] 形質転換の方法は特に限定されず、従来知られた方法を用いることができる。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 1970, 53, 159-162) や、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製

してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., 1997. *Gene* 1: 153-167) を用いることができる。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類、及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S. N., 1979. *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115; Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A. 1978. *Nature* 274: 398-400; Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933) も応用できる。あるいは、コリネ型細菌について報告されているような、電気パルス法 (特開平2-207791) を利用することもできる。

[0113] タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

[0114] タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子の転写量が上昇したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が上昇したことを確認することにより確認できる。

[0115] 遺伝子の転写量が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株または親株等の非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としてはノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0116] タンパク質の量が上昇したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる (*Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇して

よい。

[0117] 上記したタンパク質の活性を増大させる手法は、システインジオキシゲナーゼやスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性増強に加えて、任意のタンパク質、例えばL-システイン生合成系酵素、の活性増強や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現増強に利用できる。

[0118] <1-5>タンパク質の活性を低下させる手法

以下に、タウリン取り込み系やタウリン分解系等のタンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

[0119] 「タンパク質の活性が低下する」とは、同タンパク質の活性が非改変株と比較して低下することを意味する。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、同タンパク質の細胞当たりの活性が非改変株と比較して低下することを意味してよい。ここでいう「非改変株」とは、標的のタンパク質の活性が低下するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。非改変株として、具体的には、各微生物種の基準株 (type strain) が挙げられる。また、非改変株として、具体的には、微生物の説明において例示した株も挙げられる。すなわち、一態様において、タンパク質の活性は、基準株 (すなわち本発明の微生物が属する種の基準株) と比較して低下してよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、エシェリヒア・コリMG1655株と比較して低下してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、パントエア・アナナティスAJ13355株と比較して低下してもよい。なお、「タンパク質の活性が低下する」ことには、同タンパク質の活性が完全に消失している場合も包含される。「タンパク質の活性が低下する」とは、より具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が低下していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が低下していることを意味してよい。すなわち、「タンパク質の活性が低下する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量 (mRNA量

）または翻訳量（タンパク質の量）を意味してもよい。なお、「タンパク質の細胞当たりの分子数が低下している」ことには、同タンパク質が全く存在していない場合が含まれる。また、「タンパク質の分子当たりの機能が低下している」ことには、同タンパク質の分子当たりの機能が完全に消失している場合が含まれる。タンパク質の活性の低下の程度は、タンパク質の活性が非改変株と比較して低下していれば特に制限されない。タンパク質の活性は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0120] タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることにより達成できる。「遺伝子の発現が低下する」とは、同遺伝子の発現が野生株や親株等の非改変株と比較して低下することを意味する。「遺伝子の発現が低下する」とは、具体的には、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変株と比較して低下することを意味してよい。「遺伝子の発現が低下する」とは、より具体的には、遺伝子の転写量（mRNA量）が低下すること、および／または、遺伝子の翻訳量（タンパク質の量）が低下することを意味してよい。「遺伝子の発現が低下する」ことには、同遺伝子が全く発現していない場合が含まれる。なお、「遺伝子の発現が低下する」ことを、「遺伝子の発現が弱化される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0121] 遺伝子の発現の低下は、例えば、転写効率の低下によるものであってもよく、翻訳効率の低下によるものであってもよく、それらの組み合わせによるものであってもよい。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーター、シャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。遺伝子の転写効率の低下は、例えば、染色体上の

遺伝子のプロモーターをより弱いプロモーターに置換することにより達成できる。「より弱いプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも弱化するプロモーターを意味する。より弱いプロモーターとしては、例えば、誘導型のプロモーターが挙げられる。すなわち、誘導型のプロモーターは、非誘導条件下（例えば、誘導物質の非存在下）でより弱いプロモーターとして機能し得る。また、発現調節配列の一部または全部を欠失させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、発現制御に関わる因子を操作することによっても達成できる。発現制御に関わる因子としては、転写や翻訳制御に関わる低分子（誘導物質、阻害物質など）、タンパク質（転写因子など）、核酸（siRNAなど）等が挙げられる。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のコード領域に遺伝子の発現が低下するような変異を導入することによっても達成できる。例えば、遺伝子のコード領域のコドン、宿主においてより低頻度で利用される同義コドンに置き換えることによって、遺伝子の発現を低下させることができる。また、例えば、後述するような遺伝子の破壊により、遺伝子の発現自体が低下し得る。

[0122] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより達成できる。「遺伝子が破壊される」とは、正常に機能するタンパク質を産生しないように同遺伝子が改変されることを意味する。「正常に機能するタンパク質を産生しない」ことには、同遺伝子からタンパク質が全く産生されない場合や、同遺伝子から分子当たりの機能（活性や性質）が低下又は消失したタンパク質が産生される場合が含まれる。

[0123] 遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させることにより達成できる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。タンパク質の活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域等のいずれの領域であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺

伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。

[0124] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終止コドンを導入すること（ナンセンス変異）、あるいは1～2塩基を付加または欠失するフレームシフト変異を導入すること等によっても達成できる（Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617(1997), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515(1998), Journal of Biological Chemistry 26 116, 20833-20839(1991)）。

[0125] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域に他の配列を挿入することによっても達成できる。挿入部位は遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子や目的物質の生産に有用な遺伝子が挙げられる。

[0126] 染色体上の遺伝子を上記のように改変することは、例えば、正常に機能するタンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子を含む組換えDNAで宿主を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の野生型遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の野生型遺伝子を欠失型遺伝子に置換することによって達成できる。その際、組換えDNAには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませておくことが操作がしやすい。欠失型遺伝子としては、遺伝子の全領域あるいは一部の領域を欠失した遺伝子、ミスセンス変異を導入した遺伝子、ナンセンス変異を導入した遺伝子、フレームシフト変異を導入した遺伝子、トランスポゾンやマーカー遺伝子等の挿入配列を導入した遺伝子が挙げられる。欠失型遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても、野生

型タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法とλファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002))とを組み合わせた方法(W02005/010175号参照)等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法などがある(米国特許第6303383号、特開平05-007491号)。

[0127] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、エチルメタンスルフォネート(EMS)、およびメチルメタンスルフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。

[0128] なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。また、タンパク質に複数のアイソザイムが存在する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、複数のアイソザイムの全ての活性を低下させてもよく、一部のみを活性を低下させてもよい。すなわち、例えば、それらのアイソザイムをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。

[0129] タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

[0130] タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の

発現が低下したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が低下したことは、同遺伝子の転写量が低下したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が低下したことを確認することにより確認できる。

[0131] 遺伝子の転写量が低下したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことが出来る。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001))。mRNAの量は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0132] タンパク質の量が低下したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことが出来る (Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001))。タンパク質の量は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0133] 遺伝子が破壊されたことは、破壊に用いた手段に応じて、同遺伝子の一部または全部の塩基配列、制限酵素地図、または全長等を決定することで確認できる。

[0134] 上記したタンパク質の活性を低下させる手法は、タウリン取り込み系やタウリン分解系の活性低下に加えて、任意のタンパク質、例えばレーシステインの生合成経路から分岐してレーシステイン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素、の活性低下や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現低下に利用できる。

[0135] <2>本発明の方法

本発明の方法は、本発明の微生物を用いたタウリン類の製造方法である。本発明の方法は、具体的には、本発明の微生物を培地で培養すること、およびタウリン類を採取すること、を含むタウリン類の製造方法である。本発明においては、ヒポタウリンおよびタウリンのいずれか一方が製造されてもよ

く、その両方が製造されてもよい。

[0136] 使用する培地は、本発明の微生物が増殖でき、タウリン類が生産される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、細菌や酵母等の微生物の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。培地としては、例えば、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有する培地を用いることができる。培地成分の種類や濃度は、使用する微生物の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0137] 炭素源として、具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、廃糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマスの加水分解物等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類、グリセロール、粗グリセロール、エタノール等のアルコール類、脂肪酸類が挙げられる。なお、炭素源としては、植物由来原料を好適に用いることができる。植物としては、例えば、トウモロコシ、米、小麦、大豆、サトウキビ、ビート、綿が挙げられる。植物由来原料としては、例えば、根、茎、幹、枝、葉、花、種子等の器官、それらを含む植物体、それら植物器官の分解産物が挙げられる。植物由来原料の利用形態は特に制限されず、例えば、未加工品、絞り汁、粉碎物、生成物等のいずれの形態でも利用できる。また、キシロース等の5炭糖、グルコース等の6炭糖、またはそれらの混合物は、例えば、植物バイオマスから取得して利用できる。具体的には、これらの糖類は、植物バイオマスを、水蒸気処理、濃酸加水分解、希酸加水分解、セルラーゼ等の酵素による加水分解、アルカリ処理等の処理に供することにより取得できる。なお、ヘミセルロースは一般的にセルロースよりも加水分解されやすいため、植物バイオマス中のヘミセルロースを予め加水分解して5炭糖を遊離させ、次いで、セルロースを加水分解して6炭糖を生成させてもよい。また、キシロースは、例えば、本発明の微生物にグルコース等の6炭糖からキシロースへの変換経路を保有させて、6炭糖からの変換により供給してもよい。炭素源としては、1種の炭素源を用い

てもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせ用いてもよい。

[0138] 窒素源として、具体的には、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆タンパク質分解物等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。pH調整に用いられるアンモニアガスやアンモニア水を窒素源として利用してもよい。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせ用いてもよい。

[0139] リン酸源として、具体的には、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上のリン酸源を組み合わせ用いてもよい。

[0140] 硫黄源として、具体的には、例えば、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせ用いてもよい。

[0141] その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量元素類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク質分解物等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分や無機成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせ用いてもよい。

[0142] また、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、培地に要求される栄養素を補添することが好ましい。

[0143] 培養条件は、本発明の微生物が増殖でき、タウリン類が生産される限り、特に制限されない。培養は、例えば、細菌や酵母等の微生物の培養に用いられる通常の条件で行うことができる。培養条件は、使用する微生物の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0144] 培養は、液体培地を用いて行うことができる。培養の際には、本発明の微生物を寒天培地等の固体培地で培養したものを直接液体培地に接種してもよく、本発明の微生物を液体培地で種培養したものを本培養用の液体培地に接種してもよい。すなわち、培養は、種培養と本培養とに分けて行われてもよい。その場合、種培養と本培養の培養条件は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。培養開始時に培地に含有される本発明の微生物の量は特に制限されない。本培養は、例えば、本培養の培地に、種培養液を1～50% (v/v) 植菌することにより行ってよい。

[0145] 培養は、回分培養 (batch culture)、流加培養 (Fed-batch culture)、連続培養 (continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。なお、培養開始時の培地を、「初発培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系（発酵槽）に供給する培地を、「流加培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系に流加培地を供給することを、「流加」ともいう。なお、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合、例えば、種培養と本培養を、共に回分培養で行ってもよい。また、例えば、種培養を回分培養で行い、本培養を流加培養または連続培養で行ってもよい。

[0146] 培養は、例えば、好気条件で行うことができる。好気条件とは、液体培地中の溶存酸素濃度が、酸素膜電極による検出限界である0.33ppm以上であることをいい、好ましくは1.5ppm以上であることであってよい。酸素濃度は、例えば、飽和酸素濃度の5～50%、好ましくは10%程度に制御されてもよい。好気条件での培養は、具体的には、通気培養、振盪培養、攪拌培養、またはそれらの組み合わせで行うことができる。培地のpHは、例えば、pH3～10、好ましくはpH5～8であってよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整することができる。培地のpHは、アンモニアガス、アンモニア水、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の各種アルカリ性または酸性物質を用いて調整することができる。培養温度は、例えば、2

0～40℃、好ましくは25℃～37℃であってよい。培養期間は、例えば、10時間～120時間であってよい。培養は、例えば、培地中の炭素源が消費されるまで、あるいは本発明の微生物の活性がなくなるまで、継続してもよい。このような条件下で本発明の微生物を培養することにより、培地中にタウリン類が蓄積する。

[0147] 培地中に蓄積するタウリン類は、ヒポタウリンおよびタウリンのいずれか一方であってもよく、その両方であってもよい。例えば、ヒポタウリンが培地中に生成し蓄積してもよい。また、場合によっては、例えば、培地中に生成したヒポタウリンの一部または全部がタウリンへと変換され、以て、タウリンが培地中に蓄積してもよい。ヒポタウリンは、例えば、自然酸化によりタウリンへと変換され得る。特に、アルカリ条件下で、ヒポタウリンのタウリンへの酸化が促進され得る (Silvestro D et al., In Vitro Reactions of Hypotaurine, Chapter Taurine 2, Volume 403 of the series Advances in Experimental Medicine and Biology pp 3-8, 1996)。培地中に蓄積したタウリン類は、適宜採取することができる。すなわち、本発明の方法の一態様は、本発明の微生物を培地で培養し、ヒポタウリンおよび／またはタウリンを該培地中に蓄積すること、および該培地よりヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取すること、を含むヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造方法である。同態様を、「本発明の方法の第1の態様」ともいう。

[0148] また、ヒポタウリンが培地に蓄積する場合、ヒポタウリンをタウリンに変換することができ、さらに、生成したタウリンを採取することができる。すなわち、本発明の方法の一態様は、本発明の微生物を培地で培養し、ヒポタウリンを該培地中に蓄積すること、前記ヒポタウリンをタウリンに変換すること、および前記タウリンを採取すること、を含むタウリンの製造方法である。同態様を、「本発明の方法の第2の態様」ともいう。ヒポタウリンをタウリンに変換することを「変換反応」ともいう。ヒポタウリンは、培地に含まれたまま変換反応に供してもよく、培地から回収してから変換反応に供してもよい。また、ヒポタウリンは、適宜処理を行ってから変換反応に供して

もよい。処理としては、例えば、希釈、濃縮、凍結、融解、乾燥等が挙げられる。これらの処理は、適宜組み合わせて行ってもよい。ヒポタウリンは、酸化反応によりタウリンへと変換することができる。すなわち、変換反応は、酸化反応により実施できる。酸化反応を実施する手法は、ヒポタウリンを酸化してタウリンを生成できるものであれば特に制限されない。酸化反応を実施する手法として、具体的には、例えば、アルカリ処理 (Silvestro D et al., *In Vitro Reactions of Hypotaurine*, Chapter Taurine 2, Volume 403 of the series *Advances in Experimental Medicine and Biology* pp 3-8, 1996)、フェントン試薬を用いる方法 (Silvestro D et al., *Hypotaurine Oxidation: An HPLC-Mass Approach*, Chapter Taurine 3, Volume 442 of the series *Advances in Experimental Medicine and Biology* pp 3-8)、過酸化亜硫酸を用いる方法 (Mario Fontana et al., *Biochem J.* 2005 Jul 1; 389(Pt 1): 233-240.)、光により励起させた一重項酸素を用いる方法 (Laura Pecci et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254, 661-665 (1999))、亜塩素酸塩または二酸化塩素を用いる方法 (Martincigh, B. S. et al., *Antioxidant chemistry: Hypotaurine-aurine oxidation by chlorite*. *J. Phys. Chem. A.* 1998; 102:9838-9846) が挙げられる。「アルカリ処理」とは、対象物をアルカリ条件下に置く処理をいう。すなわち、ヒポタウリンをアルカリ条件下に置くことにより、ヒポタウリンをタウリンに変換することができる。例えば、ヒポタウリンを含有する発酵液のpHをアルカリ性に調整してもよいし、発酵液から回収したヒポタウリンをアルカリ性の液体と混和してもよい。アルカリ処理には、NaOHやKOH等のアルカリ性物質を利用することができる。アルカリ処理の条件 (pH、温度、時間、等) は、ヒポタウリンからタウリンへの変換が進行する限り、特に制限されない。アルカリ処理のpHは、例えば、pH 8.5以上、pH 10.5以上、またはpH 11.5以上であってよい。アルカリ処理の温度は、例えば、0℃～100℃であってよく、室温であってもよい。アルカリ処理の時間は、例えば、1分～72時間、10分～48時間、30分～24時間であってよい。酸化反応を

実施する他の手法の実施条件も適宜設定できる。変換反応の反応系（変換反応の反応液）中に生成したタウリンは、適宜採取することができる。

[0149] タウリン類の存在は、化合物の検出または同定に用いられる公知の手法により確認することができる。そのような手法としては、例えば、HPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。

[0150] 発酵液または反応液からのタウリン類の回収（採取）は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法（Nagai, H. et al., Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710）、沈殿法、膜分離法（特開平9-164323号、特開平9-173792号）、晶析法（W02008/078448、W02008/078646）が挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。なお、菌体内にタウリン類が蓄積する場合には、例えば、菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清から、イオン交換樹脂法などによってタウリン類を回収することができる。回収されるタウリン類は、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってよい。塩としては、例えば、硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩が挙げられる。

[0151] 尚、回収されるタウリン類は、タウリン類以外に、微生物菌体、培地成分、水分、及び微生物の代謝副産物、反応液成分等の成分を含んでいてもよい。タウリン類は、所望の程度に精製されていてもよい。回収されるタウリン類の純度は、例えば50%（w/w）以上、好ましくは85%（w/w）以上、特に好ましくは95%（w/w）以上であってよい（JP1214636B, USP5,431,933, USP4,956,471, USP4,777,051, USP4,946,654, USP5,840,358, USP6,238,714, US2005/0025878）。

[0152] タウリン類は、タウリン類の誘導体の製造に用いることもできる。ヒポタウリンは、例えば、上述した通り、タウリンに変換することができる。また、タウリンは、例えば、グルタウリンの製造に用いることができる。

実施例

[0153] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれにより制限されるものではない。

[0154] <1>システインジオキシゲナーゼ活性及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性の増強株の構築

<1-1>システインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドの構築

以下の手順により、ホモ・サピエンス、ボース・タウルス、ガッルス・ガッルス、カブラ・ヒルカス由来の、システインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を人工的にDNA合成することにより取得し、それらの遺伝子の発現プラスミドを構築した。なお、各遺伝子配列は、エシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従い改変した。なお、遺伝子の由来となる上記各生物とエシェリヒア・コリにおいて、コドンと対応するアミノ酸の組み合わせは同じであるとされている。よって、エシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従い各遺伝子配列を改変しても、改変前と同じアミノ酸配列を有するタンパク質が発現する。

[0155] <1-1-1>ホモ・サピエンス由来のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドの構築

合成するべきDNA配列として、5'末端から、HindIII制限部位、tacプロモーター、SalI制限部位、ホモ・サピエンス由来のスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードするGADL1遺伝子、RBS配列、ホモ・サピエンス由来のシステインジオキシゲナーゼをコードするCD01遺伝子、XbaI制限部位を保有するDNA配列をデザインした。その際、GADL1遺伝子およびCD01遺伝子がエシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従いそれらの遺伝子のDNA配列を改変した。また、DNA配列を改変した結果、合成するDNA配列には両端以外にHindIII、SalI、及びXbaI制限部

位が生じないようにデザインした。このようにしてデザインされたDNA配列をHSA-GCと名付け、配列番号1に示した。また、tacプロモーターの塩基配列を配列番号21に、RBS配列を配列番号22に、それぞれ示す。

[0156] <1-1-2>ボース・タウルス由来のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドの構築

合成すべきDNA配列として、5'末端から、HindIII制限部位、tacプロモーター、SalI制限部位、ボース・タウルス由来のスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードするGADL1遺伝子、RBS配列、ボース・タウルス由来のシステインジオキシゲナーゼをコードするCD01遺伝子、XbaI制限部位を保有するDNA配列をデザインした。その際、GADL1遺伝子およびCD01遺伝子がエシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従いそれらの遺伝子のDNA配列を改変した。また、DNA配列を改変した結果、合成するDNA配列には両端以外にHindIII、SalI、及びXbaI制限部位が生じないようにデザインした。このようにしてデザインされたDNA配列をBTA-GCと名付け、配列番号2に示した。

[0157] <1-1-3>ガッルス・ガッルス由来のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドの構築

合成すべきDNA配列として、5'末端から、HindIII制限部位、tacプロモーター、SalI制限部位、ガッルス・ガッルス由来のスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードするGADL1遺伝子、RBS配列、ガッルス・ガッルス由来のシステインジオキシゲナーゼをコードするCD01遺伝子、XbaI制限部位を保有するDNA配列をデザインした。その際、GADL1遺伝子およびCD01遺伝子がエシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従いそれらの遺伝子のDNA配列を改変した。また、DNA配列を改変した結果、合成するDNA配列には両端以外にHindIII、SalI、及びXbaI制限部位が生じないようにデザインした。このようにしてデザインされたDNA配

列をGGA-GCと名付け、配列番号3に示した。

[0158] <1-1-4>カプラ・ヒルカス由来のシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドの構築

合成すべきDNA配列として、5'末端から、HindIII制限部位、tacプロモーター、SalI制限部位、カプラ・ヒルカス由来のスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードするGADL1遺伝子、RBS配列、カプラ・ヒルカス由来のシステインジオキシゲナーゼをコードするCD01遺伝子、XbaI制限部位を保有するDNA配列をデザインした。その際、GADL1遺伝子およびCD01遺伝子がエシェリヒア・コリにおいて高発現されるよう、エシェリヒア・コリのコドン使用頻度等に従いそれらの遺伝子のDNA配列を改変した。また、DNA配列を改変した結果、合成するDNA配列には両端以外にHindIII、SalI、及びXbaI制限部位が生じないようにデザインした。このようにしてデザインされたDNA配列をCHX-GCと名付け、配列番号4に示した。

[0159] 配列番号1～4に示したDNA配列の合成は、Genscript社に委託した。さらに、合成されたDNA断片をHindIII-XbaI制限部位を用いてそれぞれpMW219に挿入し、システインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミドを得た。用いたDNA配列と得られたプラスミドを表3に示す。

[0160] [表3]

表3 システインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミド

HindIII-XbaI 制限部位に挿入された DNA 配列	プラスミドの名前
HSA-GC	pMW-HSA
BTA-GC	pMW-BTA
GGA-GC	pMW-GGA
CHX-GC	pMW-CHX

[0161] <1-2>エシェリヒア・コリMG1655株のtauABCDオペロンの欠失

エシェリヒア・コリK-12 MG1655株 (ATCC 47076) を親株として、tauABCD

オペロンの欠失株を構築した。エシェリヒア・コリMG1655株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（住所12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America）より入手できる。

[0162] エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number NC_000913.3）、タウリンABCトランスポーターをコードするtauABC遺伝子及びタウリンジオキシゲナーゼをコードするtauD遺伝子の塩基配列も報告されている。すなわちtauABC遺伝子群はGenBank accession number NC_000913.3に記載のエシェリヒア・コリMG1655株のゲノム配列の塩基番号385232～387798に相当し、tauD遺伝子の塩基配列は387795～388646に相当する。

[0163] エシェリヒア・コリMG1655株のtauABCDオペロンの欠損は、「Redドリブンインテグレーション（Red-driven integration）」と呼ばれる方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol.97, No.12, p6640-6645）とλファージ由来の切り出しシステム（J. Bacteriol. 2002 Sep; 184(18): 5200-3. Interactions between integrase and excisionase in the phage lambda excisive nucleoprotein complex. Cho EH, Gumpert RI, Gardner JF.）によって行った。手順を以下に示す。

[0164] tauABCDオペロンの欠損用DNA断片を、pMW118-attL-Tc-attR（WO2005/010175、特開2005-58227）を鋳型として、配列番号5と配列番号6のオリゴヌクレオチドを用いてPCRにより増幅した。なお、pMW118-attL-Tc-attRは、pMW118（宝バイオ社製）に、λファージのアタッチメントサイトであるattL及びattR遺伝子と抗生物質耐性遺伝子であるテトラサイクリン耐性遺伝子をattL-tet-attRの順に挿入したプラスミドである。PCRにより増幅されたDNA断片をWizard PCR Prep DNA Purification System（Promega社製）を用いて精製した。

[0165] 上記の通り増幅および精製されたDNA断片を、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリMG1655株にエレクトロポレーションにより導入した。プラスミドpKD46（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000,

vol. 97, No. 12, p6640-6645) は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御される λ Red相同組換えシステムのRedレコンビナーゼをコードする遺伝子 (γ 、 β 、exo遺伝子) を含む、 λ ファージの合計2154塩基のDNAフラグメント (GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459, 塩基番号31088~33241の領域) が挿入されたプラスミドである。プラスミドpKD46は遺伝子欠損用DNA断片をMG1655株の染色体に組み込むために必要である。

[0166] エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。まず、100 mg/Lのアンピシリンを含んだL培地 (10 g/L Bacto tryptone, 5 g/L Bacto Yeast extract, 5 g/L NaCl) で、pKD46を導入したエシェリヒア・コリMG1655株を30℃で一晩培養した。この培養液50 μ Lを100 mg/Lのアンピシリンと10 mMのL-アラビノースを含んだ5 mLのL培地に植菌した。これを30℃で通気しながら600nmにおける吸光度 (OD600) が約0.6になるまで生育させた後、菌体を回収し、10%グリセロールで3回洗浄した後に100倍に濃縮することによってエレクトロポレーション用のコンピテントセルを得た。エレクトロポレーションは70 μ Lのコンピテントセルと約1000 ngのDNA断片を用いて行った。エレクトロポレーション後のセルは1 mLのSOC培地 (モレキュラークローニング: 実験室マニュアル第2版、Sambrook, J. ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年)) を加えて37℃で2.5時間培養した後、37℃で25 mg/Lのテトラサイクリン塩酸塩を含むLアガロースプレート (10 g/L Bacto tryptone, 5 g/L Bacto Yeast extract, 5 g/L NaCl, 2%アガロース) で平板培養し、テトラサイクリン耐性となった株を選択した。選択された株のtauABCDオペロンが欠失していることは、選択された株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号7と配列番号8で示したプライマーを用いてPCRを行うことによって確認した。さらに、得られた変異体のアンピシリン耐性を試験し、pKD46が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。このようにして得られた、tauABCDオペロンの欠失が確認された株をEcoTと名づけた。

[0167] <1-3> Pantoea ananatisのtauABCDオペロンの欠失

P. ananatis AJ13355株 (FERM BP-6614) を親株として、tauABCDオペロン

の欠失株を構築した。P. ananatis AJ13355株は、1998年2月19日に、工業技術院生命工学工業技術研究所（現、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター、郵便番号：292-0818、住所：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、受託番号FERM P-16644として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614が付与されている。

[0168] P. ananatis AJ13355株のゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number NC_017531.1）、タウリンABCトランスポーターをコードするtauABC遺伝子及びタウリンジオキシゲナーゼをコードするtauD遺伝子の塩基配列も報告されている。すなわちtauABC遺伝子群はGenBank accession number NC_017531.1に記載のP. ananatis AJ13355株のゲノム配列の塩基番号3442656～3440062に相当し、tauD遺伝子の塩基配列は3440260～3439226に相当する。

[0169] P. ananatis AJ13355株のtauABCDオペロンの欠失は、P. ananatis SC17(0)株からRed-driven integrationによりtauABCDオペロンを欠失させて得られた株の染色体DNAを、エレクトロポレーションでP. ananatis AJ13355株に導入することで実施した。手順を以下に示す。

[0170] P. ananatis AJ13355株のtauABCDオペロンの欠損用DNA断片を、pMW118-attL-Tc-attR (W02005/010175、特開2005-58227) を鋳型として、配列番号9と配列番号10のオリゴヌクレオチドを用いてPCRにより増幅した。PCRにより増幅されたDNA断片をWizard PCR Prep DNA Purification System (Promega社製) を用いて精製し、後のエレクトロポレーションへ用いた。

[0171] Red-driven integrationの宿主菌株としては、P. ananatis SC17(0)/RSF-Red-TER株 (W02008/075483) を用いた。P. ananatis SC17(0)/RSF-Red-TER株は、λファージ由来の3つのRed遺伝子 (gam, bet, 及びexo) の産物に対して耐性のP. ananatis SC17(0)株 (VKPM B-9246, ロシア連邦出願第2006134574号) に、λファージ由来の3つのRed遺伝子を発現するヘルパープラスミドRSF-Red-TERが導入された菌株である (W02008/075483)。SC17(0)株は、20

05年9月21日にRussian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), FGUP GosNII Genetika, 住所: 1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117 545, Russia)に受託番号VKPM B-9246で寄託された後、2006年10月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されている。

[0172] エレクトロポレーション用のコンピテントセルを取得するために、*P. ananatis* SC17(0)/RSF-Red-TER株を、50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地で34°Cで一夜生育させた。その後、培養物を、50 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む新鮮なL培地で100倍に希釈し、通気しながら34°CでOD₆₀₀が0.3となるまで生育させた。その後、IPTGを1 mMとなるよう添加し、OD₆₀₀=0.7となるまで培養を継続した。10mlのサンプルを、同量の氷冷した10%グリセリンで3回洗浄し、70 μ lの10%冷グリセリンに再懸濁し、エレクトロポレーション用のコンピテントセルを得た。先に増幅および精製した500~700ngのDNA断片を、コンピテントセルに添加した。エレクトロポレーションは、細菌のエレクトロトランスフォーメーション (electrotransformation) 用の装置 (BioRad, USA, カタログ番号165-2089, バージョン2-89) を使用して実行した。以下のパルスパラメータを適用した: 20 kV/cmの電界強度; 5 msecのパルス時間。エレクトロポレーションの後、直ちにL培地を細胞懸濁物に添加した。その後、細胞を、34°Cで2時間通気しながら生育させ、次いで、25 μ g/mlのテトラサイクリン塩酸塩を含有するLアガロースプレートに塗布し、34°Cで一夜インキュベートした。生育したテトラサイクリン耐性株の染色体構造を配列番号1 1及び1 2を用いたPCRによって検証し、tauABCDオペロンが欠失されたことが認められた株をSC17(0) Δ tauABCD::tetと名付けた。

[0173] SC17(0) Δ tauABCD::tetより抽出されたゲノムDNAをエレクトロポレーション法により*P. ananatis* AJ13355株へ導入し、25 μ g/mlのテトラサイクリン塩酸塩を含有するLアガロースプレートに塗布し、34°Cで一夜インキュベートした。生育したテトラサイクリン耐性株の染色体構造を配列番号1 1及び1 2を用いたPCRによって検証し、tauABCDオペロンが欠失されたことが認められた株をPanTと名付けた。

[0174] <1-4>E. coli及びP. ananatis由来の評価株の構築

EcoT及びPanTに、表3に示したシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現用プラスミド及びベクタープラスミドpMW219をそれぞれ定法に従ってエレクトロポレーションにより導入した。導入後、25 mg/Lのカナマイシンを含むLアガロースプレート（10 g/L Bacto tryptone, 5 g/L Bacto Yeast extract, 5 g/L NaCl, 2%アガロース）で一晩34℃にて平板培養し、カナマイシン耐性となった株を4株ずつ選択した。各宿主とプラスミドの組み合わせについて、4株から1株を選択し、評価株とした。このようにして得られたE. coli及びP. ananatis由来の評価株の一覧を表4に示す。

[0175] [表4]

表4 E. coli 及び P. ananatis 由来の評価株の一覧

名称	母株	導入プラスミド
EcoT/pMW219	EcoT	pMW219
EcoT/pMW-HSA		pMW-HSA
EcoT/pMW-BTA		pMW-BTA
EcoT/pMW-GGA		pMW-GGA
EcoT/pMW-CHX		pMW-CHX
PanT/pMW219	PanT	pMW219
PanT/pMW-HSA		pMW-HSA
PanT/pMW-BTA		pMW-BTA
PanT/pMW-GGA		pMW-GGA
PanT/pMW-CHX		pMW-CHX

[0176] <2>評価株によるタウリン類の生産

表4に示した各評価株を用いてタウリン類（ヒポタウリンとタウリン）の生産培養を行い、生産されるタウリン類の量を比較した。培養では、下記組成のタウリン類生産培地にプラスミドの抗生物質耐性マーカーに対応した抗生物質であるカナマイシンを終濃度25mg/Lとなるように添加して用いた。

[0177] [タウリン類生産培地]（各成分の濃度は最終濃度）

成分1：

(NH₄)₂SO₄ 15 g/LKH₂PO₄ 1.5 g/L

MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L

チアミン塩酸塩 0.1 mg/L

成分 2 :

FeSO₄ · 7H₂O 1.7 mg/L

Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.15 mg/L

CoCl₂ · 6H₂O 0.7 mg/L

MnCl · 4H₂O 1.6 mg/L

ZnSO₄ · 7H₂O 0.3 mg/L

CuSO₄ · 5H₂O 0.25 mg/L

成分 3 :

トリプトン 0.6 g/L

イーストエキストラクト 0.3 g/L

NaCl 0.6 g/L

成分 4 :

炭酸カルシウム 20 g/L

成分 5 :

Ｌ－ヒスチジン塩酸塩一水和物 135 mg/L

成分 6 :

チオ硫酸ナトリウム 4 g/L

成分 7 :

ピリドキシン塩酸塩 2 mg/L

成分 8 :

グルコース 40 g/L

各成分について、10倍（成分 1）、1000倍（成分 2）、100/6倍（成分 3）、100倍（成分 5）、350/4倍（成分 6）、1000倍（成分 7）、10倍（成分 8）のストック溶液を作製しておき、使用時に混合し滅菌水で規定の量までメスアップして最終濃度となるように調製した。殺菌は、110℃、30分のオートクレーブ（成分 1、2、3、5、8）、180℃、5時間以上の乾熱滅菌（成

分4)、及びフィルター滅菌(成分6、7)により行った。

[0178] タウリン類生産培養は以下の手順で行った。各評価株を25 mg/Lのカナマイシンを含むLアガロースプレートに塗り広げ、34℃で一晩前培養を行った後、10マイクロリッターサイズの植菌用ループ(NUNC社ブルーループ)でプレート上約7 cm分の菌体を3回掻き取り(3ループ)、大試験管(内径23 mm、長さ20 cm)に2 mL張りこんだ上記タウリン類生産培地中に植菌し、培養開始時点での菌体量が各評価株でほぼ同じになるよう調整した。32℃にて振盪培養を行い、48時間後に培養を終了した。グルコースアナライザー(SAKURA BIOTECH ANALYZER AS210)を用いて培地中のグルコースを測定し、培養終了後の培地中のグルコースが完全に消費されていることを確認した。その後、培養終了後の培地を遠心分離して上清を回収し、回収した上清を0.1 mol/Lの塩酸で5倍希釈して生産されたタウリン類及びシステインの定量に用いた。定量は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社において、キャピラリー電気泳動-質量分析(CE-MS)法により実施した。各株とも4連で実験を行った。ヒポタウリン、タウリン、及びシステインの蓄積濃度の平均値と標準偏差を表5に示す。

[0179] [表5]

表5 培養後のヒポタウリン、タウリン、およびシステインの蓄積濃度

株名	Cysteine (μ M)	Hypotaurine (μ M)	Taurine (μ M)
EcoT/pMW219	2.0 (+/- 0.2)	0.0 (+/- 0.0)	0.0 (+/- 0.0)
EcoT/pMW-HSA	0.0 (+/- 0.0)	3.5 (+/- 0.4)	0.0 (+/- 0.0)
EcoT/pMW-BTA	1.5 (+/- 0.08)	110 (+/- 15)	0.0 (+/- 0.0)
EcoT/pMW-GGA	1.0 (+/- 0.3)	4.0 (+/- 0.4)	0.0 (+/- 0.0)
EcoT/pMW-CHX	1.0 (+/- 0.4)	140 (+/- 15)	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW219	0.0 (+/- 0.0)	0.0 (+/- 0.0)	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW-HSA	0.0 (+/- 0.0)	1.5 (+/- 0.1)	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW-BTA	0.0 (+/- 0.0)	450 (+/- 100)	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW-GGA	0.0 (+/- 0.0)	2.0 (+/- 0.04)	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW-CHX	0.0 (+/- 0.0)	190 (+/- 330)	0.0 (+/- 0.0)

[0180] 表5に示した通り、EcoTやPanTのいずれを母株にした場合にも、pMW219を導入した株ではヒポタウリンの蓄積は全く認められなかったのに対し、各種

システインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子の発現プラスミドを導入した株ではヒポタウリンの蓄積が認められた。また、いずれの株でも、タウリンが蓄積は認められなかった。このことから、システインジオキシゲナーゼ及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性強化によってヒポタウリンの生産を向上させることが可能であることが示された。また、上記培養条件では発酵中にヒポタウリンの酸化は生じず、生成したヒポタウリンをヒポタウリンとして蓄積させることが可能であることが示された。

[0181] <3>ヒポタウリンからのタウリンの生産

引き続き、発酵培地中に蓄積したヒポタウリンがタウリンへ変換可能であるかを検証した。具体的には、前記のEcoT/pMW219、EcoT/pMW-BTA、PanT/pMW219、PanT/pMW-BTAを培養した培養終了後培地を遠心分離して上清を回収し、回収した上清を0.1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液で5倍希釈してタウリンの定量に用いた。定量は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社において、キャピラリー電気泳動-質量分析（CE-MS）法により実施した。各株とも4連で実験を行った。タウリン蓄積濃度の平均値と標準偏差を表6に示す。

[0182] [表6]

表6 タウリン蓄積濃度

培養液の由来	Taurine (μ M)
EcoT/pMW219	0.0 (+/- 0.0)
EcoT/pMW-BTA	3.3 (+/- 0.08)
PanT/pMW219	0.0 (+/- 0.0)
PanT/pMW-BTA	4.1 (+/- 3.3)

[0183] 表6に示した通り、培養液中に生産されたヒポタウリンがアルカリ条件下でタウリンへ変換されることが示された。なお、EcoT/pMW-BTAおよびPanT/pMW-BTAともに、ヒポタウリンの一部はタウリンに変換されずに残存していた。

産業上の利用可能性

[0184] 本発明により、ヒポタウリンおよび／またはタウリンを効率よく製造する

ことができる。

[0185] 〔配列表の説明〕

配列番号 1 : ホモ・サピエンスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号 2 : ボース・タウルスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号 3 : ガッルス・ガッルスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号 4 : カブラ・ヒルカスのシステインジオキシゲナーゼ遺伝子及びスルフィノアラニンデカルボキシラーゼ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列

配列番号 5 ~ 12 : プライマー

配列番号 13 : ホモ・サピエンスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列

配列番号 14 : ホモ・サピエンスのシステインジオキシゲナーゼのアミノ酸配列

配列番号 15 : ボース・タウルスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列

配列番号 16 : ボース・タウルスのシステインジオキシゲナーゼのアミノ酸配列

配列番号 17 : ガッルス・ガッルスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列

配列番号 18 : ガッルス・ガッルスのシステインジオキシゲナーゼのアミノ酸配列

配列番号 19 : カブラ・ヒルカスのスルフィノアラニンデカルボキシラーゼのアミノ酸配列

配列番号 20 : カブラ・ヒルカスのシステインジオキシゲナーゼのアミノ酸配列

配列番号 21 : tacプロモーター

配列番号 2 2 : RBS配列

配列番号 2 3 : *Escherichia coli* K-12 MG1655の野生型cysE遺伝子（野生型SAT遺伝子）の塩基配列

配列番号 2 4 : *Escherichia coli* K-12 MG1655の野生型CysEタンパク質（野生型SAT）のアミノ酸配列

配列番号 2 5 : *Escherichia coli* K-12 MG1655の野生型serA遺伝子（野生型PGD遺伝子）の塩基配列

配列番号 2 6 : *Escherichia coli* K-12 MG1655の野生型SerAタンパク質（野生型PGD）のアミノ酸配列

配列番号 2 7 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のtauA遺伝子の塩基配列

配列番号 2 8 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のTauAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 2 9 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のtauB遺伝子の塩基配列

配列番号 3 0 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のTauBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 3 1 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のtauC遺伝子の塩基配列

配列番号 3 2 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のTauCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 3 3 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のtauD遺伝子の塩基配列

配列番号 3 4 : *Escherichia coli* K-12 MG1655のTauDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 3 5 : *Pantoea ananatis* AJ13355のtauA遺伝子の塩基配列

配列番号 3 6 : *Pantoea ananatis* AJ13355のTauAタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 3 7 : *Pantoea ananatis* AJ13355のtauB遺伝子の塩基配列

配列番号 3 8 : *Pantoea ananatis* AJ13355のTauBタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 3 9 : *Pantoea ananatis* AJ13355のtauC遺伝子の塩基配列

配列番号 4 0 : *Pantoea ananatis* AJ13355のTauCタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 4 1 : *Pantoea ananatis* AJ13355のtauD遺伝子の塩基配列

配列番号 4 2 : *Pantoea ananatis* AJ13355のTauDタンパク質のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] ヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造法であって、
 L-システイン生産能を有する微生物を培地で培養すること、および
 ヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取すること、を含み、
 前記微生物が、非改変株と比較して、システインジオキシゲナーゼ
 の活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性が増大す
 るように改変されている、方法。
- [請求項2] 前記微生物を培地で培養し、ヒポタウリンおよび／またはタウリン
 を該培地中に蓄積すること、および
 該培地よりヒポタウリンおよび／またはタウリンを採取すること、
 を含むヒポタウリンおよび／またはタウリンの製造方法である、請
 求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記微生物を培地で培養し、ヒポタウリンを該培地中に蓄積するこ
 と、
 前記ヒポタウリンをタウリンに変換すること、および
 前記タウリンを採取すること、
 を含むタウリンの製造方法である、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] ヒポタウリンのタウリンへの変換が、酸化反応により実施される、
 請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記システインジオキシゲナーゼおよび／またはスルフィノアラニ
 ンデカルボキシラーゼが、真核生物由来の酵素である、請求項1～4
 のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記システインジオキシゲナーゼが、下記（a）、（b）、または
 （c）に記載のタンパク質である、請求項1～5のいずれか一項に記
 載の方法：
 （a）配列番号14、16、18、または20に示すアミノ酸配列を
 含むタンパク質；

(b) 配列番号 14、16、18、または 20 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、システインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 14、16、18、または 20 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、システインジオキシゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項7] 前記スルフィノアラニンデカルボキシラーゼが、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法：

(a) 配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 13、15、17、または 19 に示すアミノ酸配列に対して 70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、スルフィノアラニンデカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項8] システインジオキシゲナーゼをコードする遺伝子およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、システインジオキシゲナーゼの活性およびスルフィノアラニンデカルボキシラーゼの活性が増大した、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、及び／又は該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇した、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10] 前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、タウリン取り込み系

の活性が低下するように改変されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、タウリン分解系の活性が低下するように改変されている、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] 前記タウリン分解系が、タウリンジオキシゲナーゼである、請求項 11 に記載の方法。

[請求項13] 前記微生物が、さらに、非改変株と比較して、Ｌ－システイン生合成系酵素の活性が増大するように改変されている、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項14] 前記Ｌ－システイン生合成系酵素が、セリンアセチルトランスフェラーゼおよび／または３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼである、請求項 13 に記載の方法。

[請求項15] セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の発現が増大することにより、および／または、Ｌ－システインによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を前記微生物に保持させることにより、セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が増大した、請求項 14 に記載の方法。

[請求項16] ３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現が増大することにより、および／または、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を前記微生物に保持させることにより、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性が増大した、請求項 14 または 15 に記載の方法。

[請求項17] 前記微生物が、Ｌ－システインによるフィードバック阻害が低減または解除された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および／またはＬ－セリンによるフィードバック阻害が低減

または解除された変異型 3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を保持するように改変されている、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項18] 前記微生物が、腸内細菌科に属する細菌またはコリネ型細菌である、請求項 1 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項19] 前記微生物が、パントエア属細菌またはエシェリヒア属細菌である、請求項 18 に記載の方法。

[請求項20] 前記微生物が、パントエア・アナナティスまたはエシェリヒア・コリである、請求項 19 に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P11/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12R1/19(2006.01)n

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)

C12P11/00, C12N15/09, C12R1/19

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0222148 A1 (TURANO, Frank J.), 30 August 2012 (30.08.2012), claims; abstract; paragraphs [0028], [0230] to [0233]	1, 5, 8, 9, 18-20
Y	& US 2016/0158168 A1 & WO 2011/053764 A2	2-20
Y	HONJOH, K. et al., Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from Cyprinus carpio, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinatase decarboxylase in Saccharomyces cerevisiae, Amino Acids, 2010, Vol.38, pages 1173-1183, ISSN 0939-4451(Print), 1438-2199(Online), page 1173, summary, page 1174, left column, 2nd line from the bottom to right column, line 17	13-20

☒ 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
24 August 2017 (24.08.17)

Date of mailing of the international search report
05 September 2017 (05.09.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020997

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1214632 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 13 December 2010 (13.12.2010), abstract; paragraphs [0013], [0014], [0020] to [0023], [0089] to [0094] (Family: none)	2-5, 8-12, 18-20
Y	JP 2014-131487 A (Ajinomoto Co., Inc.), 17 July 2014 (17.07.2014), claims; paragraphs [0003], [0023] to [0040] & WO 2012/144472 A1 & EP 2700716 A1 claims; paragraphs [0003], [0022] to [0039]	13-20
Y	JP 2010-193788 A (Ajinomoto Co., Inc.), 09 September 2010 (09.09.2010), claims; paragraphs [0018] to [0028] & US 2010/0216196 A1 claims; paragraphs [0041] to [0051]	13-20
Y	Cysteine sulfinic acid decarboxylase isoform 2 [Homo sapiens], Database GenBank, [online], NP_001231634, 2015.09.23, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347659021?sat=4&satkey=149823658 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Cysteine dioxygenase type 1 isoform 2 [Homo sapiens], Database GenBank, [online], NP_001792, 2016.04.21, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/56786147?sat=4&satkey=161425255 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine sulfinic acid decarboxylase [Bos taurus], Database GenBank, [online], XP_001788403, 2016.01.26, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001788403.2 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Cysteine dioxygenase type 1 [Bos taurus], Database GenBank, [online], NP_001029637, 2015.01.04, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/77735881?sat=4&satkey=132463985 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020997

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Predicted: acidic amino acid decarboxylase GADL1 [Gallus gallus], Database GenBank, [online], XP_004939481, 2016.01.04, [retrieval date 2017.08.21], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004939481.1 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine dioxygenase type 1 [Gallus gallus], Database GenBank, [online], XP_424964, 2016.01.04, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_424934.2 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine sulfinic acid decarboxylase isoform X1 [Capra hircus], Database GenBank, [online], XP_005679979, 2013.09.30, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_005679979.1?report=genpept >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine dioxygenase type 1 [Capra hircus], Database GenBank, [online], XP_005685100, 2015.09.10, [retrieval date 2017.08.15], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/548480889?sat=4&satkey=148279296 >, particularly, columns of DEFINITION, FEATURES, ORIGIN	6-9, 18-20
P, X	WO 2017/083351 A1 (KNIPBIO, INC.), 18 May 2017 (18.05.2017),	1, 5, 8, 9, 18-20
P, Y	claims; abstract; paragraphs [251] to [255]; tables 1, 2 (Family: none)	2-20
A	WO 2008/114673 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 25 September 2008 (25.09.2008), entire text & US 2010/0233759 A1 & US 2012/0142057 A1 & US 2014/0335565 A1 & WO 2008/114673 A1 & EP 2135946 A1	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P11/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12R1/19(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P11/00, C12N15/09, 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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、PubMed、DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	US 2012/0222148 A1 (TURANO, Frank J.) 2012.08.30, 特許請求の範囲, 要約, 段落0028, 0230~0233 & US 2016/0158168 A1 & WO 2011/053764 A2	1, 5, 8, 9, 18-20 2-20

☒ 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

24.08.2017

国際調査報告の発送日

05.09.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
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

4N

4502

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	HONJOH, K. et al., Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from Cyprinus carpio, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinic acid decarboxylase in Saccharomyces cerevisiae, Amino Acids, 2010, Vol.38, pages 1173-1183, ISSN 0939-4451(Print), 1438-2199(Online), 第1173頁要旨, 第1174頁左欄下から第2行～右欄第17行	13-20
Y	KR 10-1214632 B1 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2010.12.13, 要約, 段落0013, 0014, 0020～0023、 0089～0094 (ファミリーなし)	2-5, 8-12, 18-20
Y	JP 2014-131487 A (味の素株式会社) 2014.07.17, 特許請求の範囲, 段落0003, 0023～0040 & WO 2012/144472 A1 & EP 2700716 A1, 特許請求の範囲, 段落0003, 0022～0039	13-20
Y	JP 2010-193788 A (味の素株式会社) 2010.09.09, 特許請求の範囲, 段落0018～0028 & US 2010/0216196 A1, 特許請求の範囲, 段落0041～0051	13-20
Y	Cysteine sulfinic acid decarboxylase isoform 2 [Homo sapiens], Database GenBank, [online], NP_001231634, 2015.09.23, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347659021?sat=4&satkey=149823658 >, 特にDEFINITION欄, FEATURES欄, ORIGIN欄	6-9, 18-20
Y	Cysteine dioxygenase type 1 isoform 2 [Homo sapiens], Database GenBank, [online], NP_001792, 2016.04.21, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/56786147?sat=4&satkey=161425255 >, 特にDEFINITION欄, FEATURES欄, ORIGIN欄	6-9, 18-20

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	Predicted: cysteine sulfinic acid decarboxylase [Bos taurus], Database GenBank, [online], XP_001788403, 2016.01.26, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001788403.2 >, 特にD E F I N I T I O N欄, F E A T U R E S欄, O R I G I N欄	6-9, 18-20
Y	Cysteine dioxygenase type 1 [Bos taurus], Database GenBank, [online], NP_001029637, 2015.01.04, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/77735881?sat=4&satkey=132463985 >, 特にD E F I N I T I O N欄, F E A T U R E S欄, O R I G I N欄	6-9, 18-20
Y	Predicted: acidic amino acid decarboxylase GADL1 [Gallus gallus], Database GenBank, [online], XP_004939481, 2016.01.04, [検索日 2017.08.21], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_004939481.1 >, 特にD E F I N I T I O N欄, F E A T U R E S欄, O R I G I N欄	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine dioxygenase type 1 [Gallus gallus], Database GenBank, [online], XP_424964, 2016.01.04, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_424934.2 >, 特にD E F I N I T I O N欄, F E A T U R E S欄, O R I G I N欄	6-9, 18-20
Y	Predicted: cysteine sulfinic acid decarboxylase isoform X1 [Capra hircus], Database GenBank, [online], XP_005679979, 2013.09.30, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_005679979.1?report=genpept >, 特にD E F I N I T I O N欄, F E A T U R E S欄, O R I G I N欄	6-9, 18-20

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	Predicted: cysteine dioxygenase type 1 [Capra hircus], Database GenBank, [online], XP_005685100, 2015.09.10, [検索日 2017.08.15], インターネット: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/548480889?sat=4&satkey=148279296 >, 特にDEFINITION欄, FEATURES欄, ORIGIN欄	6-9, 18-20
P, X	WO 2017/083351 A1 (KNIPBIO, INC)	1, 5, 8, 9, 18-20
P, Y	2017.05.18, 特許請求の範囲, 要約, 段落251~255, 表1, 表2 (ファミリーなし)	2-20
A	WO 2008/114673 A1 (中外製薬株式会社) 2008.09.25, 全文 & US 2010/0233759 A1 & US 2012/0142057 A1 & US 2014/0335565 A1 & WO 2008/114673 A1 & EP 2135946 A1	1-20