

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4265093号
(P4265093)

(45) 発行日 平成21年5月20日 (2009. 5. 20)

(24) 登録日 平成21年2月27日 (2009. 2. 27)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/06 (2006. 01)	C 1 2 P 13/06 C
C 1 2 P 13/08 (2006. 01)	C 1 2 P 13/08 C

請求項の数 8 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2000-244921 (P2000-244921)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成12年8月11日 (2000. 8. 11)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2002-51787 (P2002-51787A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成14年2月19日 (2002. 2. 19)	(74) 代理人	100089244
審査請求日	平成18年3月24日 (2006. 3. 24)		弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スレオニン及びイソロイシンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L-スレオニン又はL-イソロイシンを生産する能力を有し、かつ、細胞内のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性及びトランスヒドロゲナーゼ活性が増強されていることを特徴とするエシェリヒア属細菌。

【請求項 2】

スレオニンオペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強され、L-スレオニン生産能を有する請求項 1 記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 3】

スレオニンオペロンが *thrABC* である請求項 2 記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 4】

ilv オペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強され、L-イソロイシン生産能を有する請求項 1 記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 5】

アスパルターゼ活性が増強された請求項 1～4 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 6】

各々の酵素の活性の増強が、各々の酵素をコードする遺伝子又はオペロンのコピー数を高める、又は細胞内の前記遺伝子又はオペロンの発現を増強するように発現調節配列を改変することによるものである請求項 1～5 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌。

10

20

【請求項 7】

前記遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である請求項 6 記載のエシェリヒア属細菌。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載のエシェリヒア属細菌を培地に培養し、培地中にスレオニン又はイソロイシンを生成蓄積せしめ、スレオニン又はイソロイシンを該培地から採取することを特徴とするスレオニン又はイソロイシンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵工業に関するものであり、L-スレオニン又はL-イソロイシンを生産するエシェリヒア属細菌、及び同細菌を用いてL-スレオニン又はL-イソロイシンを製造する方法に関する。

10

【0002】

【従来の技術】

従来、L-スレオニン及びL-イソロイシン等のL-アミノ酸は、これらのL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌などの微生物を用いて発酵法により工業生産されている。これらのアミノ酸生産菌は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株、あるいは遺伝子組換えによりL-アミノ酸合成酵素が増強された組換え体が用いられている。

【0003】

20

具体的には、例えばL-スレオニンの製造法としては、エシェリヒア属細菌の変異株を用いるものに特開平5-304969号があり、組換え体エシェリヒア・コリを用いるものに特公平1-29559号、特開平2-109985号、特開昭56-15696号、および特表平3-501682号がある。コリネバクテリウム属細菌の変異株を用いるものには、特開昭62-239996号があり、組換え体コリネバクテリウム属細菌を用いるものには特開昭61-195695号が報告されている。また、特開昭55-131397号公報、特開昭59-31691号公報、特開昭56-15696号公報、および特表平3-501682号公報には、スレオニンオペロンを含有する組換えプラスミドにより形質転換された菌株によるL-スレオニンを製造する方法が示されている。

【0004】

30

また、L-イソロイシンの製造法としては、エシェリヒア・コリを用いるものに特開平5-130882号があり、エシェリヒア・コリの組換え体を用いるものには特開平2-458号がある。また、コリネバクテリウム属細菌の変異株を用いるものとしては特公平3-62395号があり、コリネバクテリウム属の組換え体を用いるものには特公平5-47196号が報告されている。また、エシェリヒア・コリ由来のL-スレオニンによる阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼI-ホモセリンドヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子を含むthrABCオペロンと、L-イソロイシンによる阻害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードするilvA遺伝子を含みかつアテニュエーションに必要な領域が除去されたilvGMEDAオペロンとを導入することにより、L-イソロイシン生産性を付与することができることが知られている（特開平8-47397参照）。

40

【0005】

ところで、エシェリヒア・コリのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子は配列が知られており（Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki H. J. Biochem. 95, 909-916 (1984)）、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が実質的に解除されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ及びその遺伝子の利用法が開示されている（W095/06114）。また、コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産性の向上を目的として、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を強化した例が知られている（特開昭60-87788号）。さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を、他の酵素遺伝子とともに増強することにより、アミノ酸生産性を向上させる技術が開示されている。例えば、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を欠失したコリネ型細菌にお

50

いて、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、クエン酸合成酵素遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を強化し、L-グルタミン酸生産能を向上させた例が報告されている（W096/06180）。一方、エシェリヒア・コリでは、スレオニンオペロンを含有する組換えプラスミドにより形質転換されたエシェリヒア・コリのL-スレオニン生産菌B-3996株において野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を導入しても、L-スレオニンの生産能はあまり増大しなかったことが開示されている（W095/06114）。

【0006】

また、微生物細胞内のニコチンアミド・ヌクレオチド・トランスヒドロゲナーゼ（以下、「トランスヒドロゲナーゼ」と呼ぶことがある）の酵素活性を上昇させ、微生物の還元型ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド・リン酸生産能を上昇させることにより、アミノ酸等の物質の生産性を改善することができることが開示されている（W095/11985）。同公報には、スレオニンオペロンを含有する組換えプラスミドにより形質転換されたエシェリヒア・コリにおいてトランスヒドロゲナーゼ遺伝子を強化することによって、L-スレオニン生産能が向上する例が示されている。尚、トランスヒドロゲナーゼ活性の上昇により生産性が改善されるアミノ酸として、L-イソロイシンが挙げられている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、エシェリヒア属細菌のL-スレオニン又はL-イソロイシンを生産する能力を向上させることを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性とトランスヒドロゲナーゼ活性を併せて増強することにより、L-スレオニン又はL-イソロイシンの生産能が顕著に増大することを見出し、さらに、アスパルターゼ活性を増強することによって一層生産能が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0009】

（１）L-スレオニン又はL-イソロイシンを生産する能力を有し、かつ、細胞内のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性及びトランスヒドロゲナーゼ活性が増強されていることを特徴とするエシェリヒア属細菌。

（２）スレオニンオペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強され、L-スレオニン生産能を有する（１）のエシェリヒア属細菌。

（３）スレオニンオペロンがt h r A B Cである（２）のエシェリヒア属細菌。

（４）i l v オペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強され、L-イソロイシン生産能を有する（１）のエシェリヒア属細菌。

（５）アスパルターゼ活性が増強された（１）～（４）のいずれかのエシェリヒア属細菌。

（６）各々の酵素の活性の増強が、各々の酵素をコードする遺伝子又はオペロンのコピー数を高める、又は細胞内の前記遺伝子又はオペロンの発現を増強するように発現調節配列を改変することによるものである（１）～（５）のいずれかのエシェリヒア属細菌。

（７）前記遺伝子がエシェリヒア属細菌由来である（６）のエシェリヒア属細菌。

（８）（１）～（７）のいずれかのエシェリヒア属細菌を培地に培養し、培地中にスレオニン又はイソロイシンを生成蓄積せしめ、スレオニン又はイソロイシンを該培地から採取することを特徴とするスレオニン又はイソロイシンの製造法。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のエシェリヒア属細菌は、L-スレオニン又はL-イソロイシンを生産する能力を有し、かつ、細胞内のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、「P E P C」

10

20

30

40

50

ともいう) 活性及びトランスヒドロゲナーゼ(以下、「T H Y」ともいう) 活性が増強されていることを特徴とするエシェリヒア属細菌である。

【0011】

エシェリヒア属細菌としては、具体的にはナイトハルトらの著書(Neidhardt,F.C. et.al .,Escherichia coli and Salmonella Typhimurium,American Society for Microbiology, Washington D.C.,1208, table 1) にあげられるものが利用できる。たとえば、エシェリヒア・コリが挙げられる。

【0012】

ここで「L-スレオニン又はL-イソロイシンを生産する能力を有する」とは、培養したときに培地中にL-スレオニン又はL-イソロイシンを蓄積する能力を有することをいう。このL-スレオニン又はL-イソロイシン生産能は、野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

10

【0013】

本発明のエシェリヒア属細菌は、さらに細胞内のアスパルターゼ(L-アスパラギン酸アンモニアリアーゼ、以下「A s p A」ともいう) 活性が増強されていてもよい。

【0014】

エシェリヒア属細菌においてP E P C、T H Y又はA s p Aの活性を高めるには、P E P C、T H Y又はA s p Aをコードする遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて、宿主となるエシェリヒア・属細菌を形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のP E P C、T H Y又はA s p Aをコードする遺伝子(以下、おのこの順に「ppc遺伝子」、「pntAB遺伝子」、「apsA遺伝子」と略する) のコピー数が上昇し、その結果P E P C、T H Y又はA s p Aの活性が高められる。

20

【0015】

ppc遺伝子、pntAB遺伝子、及びapsA遺伝子は、ppc遺伝子及びpntAB遺伝子、又はこれらの遺伝子とaspA遺伝子の組合せで、エシェリヒア造細菌に導入される。これらの遺伝子は、一種類のプラスミド上に2種又は3種の遺伝子がクローン化されて宿主に導入されるか、あるいは共存可能な2種類または3種類のプラスミド上に別々にクローン化されて宿主に導入される。

【0016】

P E P C、T H Y又はA s p A活性を高めることは、ppc遺伝子、pntAB遺伝子、及びapsA遺伝子を、宿主となる上記出発親株の染色体D N A上に多コピー存在させることによって達成できる。エシェリヒア属細菌の染色体D N A上にppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子を多コピーで導入するには、レペティティブD N A、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピート等、染色体D N A上に多コピー存在する配列が利用できる。あるいは、ppc遺伝子、pntAB遺伝子又はapsA遺伝子をトランスポゾンに搭載して、これを転移させて染色体D N A上に多コピー導入することも可能である。形質転換株の細胞内のppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子のコピー数が上昇し、その結果P E P C、T H YまたはA s p A活性が高められる。

30

【0017】

P E P C、T H Y又はA s p A活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、ppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される(特開平1-215280号公報参照)。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、t r cプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、ppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子の発現が強化されることによってP E P C、T H Y又はA s p A活性が増強される。発現調節配列の増強は、ppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

40

【0018】

ppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子の供給源となる生物としては、P E P C、T H

50

Y又はA s p A活性を有する生物ならいかなる生物でも良い。なかでも原核生物である細菌、たとえばエンテロバクター属、クレブシエラ属、エルビニア属、セラチア属、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、バチルス属に属する細菌が好ましい。具体的な例としては、エシェリヒア・コリが挙げられる。ppc遺伝子、pntAB遺伝子、又はapsA遺伝子は、上記のような微生物の染色体DNAより得ることができる。

【0019】

エシェリヒア・コリのppc遺伝子は、この遺伝子を有するプラスミドpS2 (Sabe, H. et al., Gene, 31, 279 (1984))、あるいはpT2から得ることができる。pS2をAatIIとAflIIIで切断することにより、ppc遺伝子を有するDNA断片が得られる。また、pT2をSmaIとScaIで切断することによってもppc遺伝子を有するDNA断片を得ることができる。pT2を保持するE. coli F15株 (AJ12873) は、平成5年7月15日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、FERM P-13752の受託番号で寄託され、平成6年7月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4732の受託番号が付与されている。

【0020】

pntAB遺伝子は、この遺伝子を含むプラスミドpMW::THY (W095/11985) をSmaI及びHindIIIで切断することにより、得ることができる。pMW::THYプラスミドを保持するエシェリヒア・コリAJ12929株は、平成5年10月4日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号) に、受託番号FERM P-13890として寄託されており、平成6年9月14日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、FERM BP-4798として寄託されている。尚、エシェリヒア・コリのトランスヒドロゲナーゼは2つのサブユニットからなり、それぞれpntA、pntBによってコードされている。

【0021】

本発明のエシェリヒア属細菌は、L-スレオニン又はL-イソロイシン生産能を有するものであれば特に制限されないが、具体的には例えば、スレオニンオペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強されたことによりL-スレオニン生産能を有するエシェリヒア属細菌、及び、それに加えてilvオペロン又はその一部がコードする酵素の活性が増強されたことによりL-イソロイシン生産能を有するエシェリヒア属細菌が挙げられる。

【0022】

スレオニンオペロン又はその一部としては、thrABC又はそれらの一部が挙げられる。また、ilvオペロン又はその一部としては、ilvGMEDA又はそれらの一部が挙げられる。

【0023】

L-スレオニン生産能を有するエシェリヒア・コリとして具体的には、エシェリヒア・コリVKPM B-3996 (1987年11月19日にオール・ユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチバイオティクス (All-Union Scientific Center of Antibiotics) (Nagatinskaya Street 3-A, 113105 Moscow, Russian Federation) に、登録番号RIA 1867のもとに寄託されている。米国特許第5,175,107号参照)、エシェリヒア・コリAJ11335 (特開昭55-131397) 等が挙げられる。VKPM B-3996株は、ストレプトマイシン耐性マーカーを有する広域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167を参照のこと) にスレオニン生合成系遺伝子 (スレオニンオペロン: thrABC) を挿入して得られたプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット) を保持している。同オペロン中のthrAがコードするアスパルトキナーゼI-ホモセリンデヒドロゲナーゼIは、L-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されている。

【0024】

また、L-イソロイシン生産能を有するエシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリKX141 (VKPM B-4781) (欧州特許出願公開第519,113号参照)、エシェリヒア・コリAJ12919 (特開平8-47397号) また、VKPM B-3996株においてilvオペロンを増幅した株も、好適なL-イソロイシン生産菌である。

【0025】

スレオニオペロンは、thrA、thrB、thrCの各遺伝子を有しており、各々順にアスパルトキナーゼIーホモセリンデヒドロゲナーゼI、ホモセリンキナーゼ、スレオニンシンターゼをコードしている。これらのうち、アスパルトキナーゼIーホモセリンデヒドロゲナーゼIは、Lースレオニンによる障害が実質的に解除されていることが好ましい。

【0026】

ilvGMEDAオペロンは、ilvG、ilvM、ilvE、ilvD、ilvAの各遺伝子を有しており、各々順に、アセトヒドロキシ酸シンターゼのアイソザイムIIの大サブユニット、小サブユニット、トランスアミナーゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ及びスレオニンデアミナーゼをコードしている。ilvGMEDAオペロンは、Lーバリン及び／又はLーイソロイシン及び／又はLーロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、Lーイソロイシン生産菌においては、生成するLーイソロイシンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていてもよい。ilvGMEDAオペロンとしては、エシェリヒア属細菌由来のもの、特にE. coli由来のilvGMEDAオペロンが挙げられる。ilvGMEDAオペロンについては、W096/26289に詳細に記載されている。ilvGMEDAオペロンは、アテニュエーションに必要な領域が除去されていることが好ましく、同オペロンがコードする各酵素のうち、スレオニンデアミナーゼはLーイソロイシンによる障害が実質的に解除されていることが好ましい（特開平8-47397参照）。

スレオニンオペロンもしくはilvオペロン又はそれらの一部がコードする酵素の活性の増強は、PEPC、THY及びAspAと同様にして行うことができる。

【0027】

本発明に用いる微生物は、上記の性質に加えて、目的のアミノ酸生合成に関与する経路を司る酵素遺伝子の増強、あるいはフィードバック障害を受ける酵素の脱感作型（障害解除型）酵素をコードする遺伝子あるいはオペロンを導入すると、一層Lーアミノ酸生産能が向上する場合がある。

【0028】

上記のようにしてPEPC及びTHY、ならびに必要なに応じてAspAが増強され、Lースレオニン又はLーイソロイシンを生産する能力を有するエシェリヒア属細菌を培地に培養し、培地中にスレオニン又はイソロイシンを生成蓄積せしめ、スレオニン又はイソロイシンを該培地から採取することにより、スレオニン又はイソロイシンを製造することができる。

【0029】

培養に使用する培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースもしくはでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールもしくはソルビトールなどのアルコール類、またはフマル酸、クエン酸もしくはコハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0030】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムもしくはリン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、またはアンモニア水等を用いることができる。

【0031】

有機微量栄養源としては、ビタミンB₁などの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガニオン等が少量添加される。

【0032】

培養は、好気的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は25℃～45℃に、培養中pHは5～8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0033】

10

20

30

40

50

発酵液からのL-スレオニン又はL-イソロイシンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0035】

【実施例1】

各種遺伝子を含むプラスミドの作製

(1) aspA遺伝子を含むプラスミド (pMW118::aspA) の作製

エシェリヒア・コリW3110株の染色体DNAを鋳型とし、下記のプライマーを用いたPCRにより、aspA遺伝子を含むDNA断片を増幅した。

10

プライマー1 : 5'-TGATCAGCGAAACACTTTTA-3' (配列番号1)

プライマー2 : 5'-CAGCAAACTATGATGAGAA-3' (配列番号2)

得られた増幅断片を、pMW118(ニッポンジーン社)のSmaI切断部位に挿入し、pMW118::aspAを取得した(図1)。

【0036】

(2) pntAB遺伝子とppc遺伝子を含むプラスミド (pPTS) の作製

W095/11985記載のpntAB遺伝子を含むプラスミドpMW::THYをSmaI及びHindIIIで切断し、pntABを含むDNA断片を回収した。次にW095/16042記載のppc遺伝子を含むプラスミドpppcをXbaIで切断後、両端を平滑末端化し、更にHindIIIで切断し、ここに前記のpntABを含むDNA断片を挿入して、プラスミドpPTSを得た(図2)。

20

【0037】

(3) aspA遺伝子及びppc遺伝子を含むプラスミド (pAPW) の作製

pMW118::aspAをSacIで切断後、両端を平滑末端化し、更にHindIIIで切断することにより、aspAを含むDNA断片を得た。次に、前記pppcをXbaIで切断後、両端を平滑末端化し、更にHindIIIで切断し、前記のaspAここに先のaspAを含むDNA断片を挿入して、pAPWを得た(図3)。

【0038】

(4) aspA遺伝子、pntAB遺伝子、及びppc遺伝子を含むプラスミド (pAPT) の作製

pMW::THYをSmaI及びHindIIIで切断することにより、pntABを含むDNA断片を取得した。次に前記pAPWをXbaIで切断後、両端を平滑末端化し、更にHindIIIで切断し、ここに前記pntABを含む断片を挿入することにより、pAPTを得た(図4)。

30

【0039】

(5) ilvGMEDAオペロンを含むプラスミド (pMWD5) の作製

ilvGMEDAオペロンを含むDNA断片は、W096/26289に記載のilvGMEDオペロンを含むプラスミドpMWD5から調製した。pMWD5は、以下のようにして構築された。

【0040】

エシェリヒア・コリMI162株より、染色体DNAを抽出した。該染色体DNAを制限酵素HindIIIで切断した。ilvGM遺伝子を含むHindIII-HindIII DNA断片は4.8kbの長さであることが判明している。そこで4.8kb前後の長さを有するHindIII-HindIII DNA断片と、プラスミドベクターpBR322(宝酒造(株)より購入)をHindIIIで切断して得られるDNA断片とを連結した。

40

【0041】

得られたDNA連結反応混合物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損株であるエシェリヒア・コリMI262(CGSC5769)株に導入した。形質転換されてアセトヒドロキシ酸シンターゼ欠損の形質が相補された株を選択し、その株が保有するプラスミドを単離した。同プラスミドの構造を解析した結果、pBR322のHindIII部位にilvGM遺伝子及びilvE遺伝子の5'末端側の一部を含む4.8kbのDNA断片が挿入されていた。同プラスミドをpBRGM7と命名した。

50

【0042】

Gene 97, 21, (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 922, (1981) と J. Bacteriol. 149, 294, (1982) に報告されている *ilvGM* 遺伝子の塩基配列を参考にして、配列表配列番号3と配列番号4に記載した合成オリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして、MI162株の染色体DNAを鋳型として、PCR法にてDNAの増幅を行った。同断片を断片(A)とする。

【0043】

同様に、Gene 97, 21, (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 922, (1981) と J. Bacteriol. 149, 294, (1982) に報告されている塩基配列を参考にして、配列表配列番号5と配列番号6に記載した合成オリゴヌクレオチドを合成した。両DNAをプライマーとして、MI162株の染色体DNAを鋳型として、PCR法にてDNAの増幅を行った。同断片を断片(B)とする。

【0044】

断片(A)をSmaIで消化して得られる大断片と、ベクターpUC18(宝酒造)をSmaIで消化して得られるDNA断片とを連結してプラスミドpUCAを作製した。断片(B)をKpnIで消化して得られる大断片と、pHSG399(宝酒造)をHincII及びKpnIで消化して得られる大断片とを連結してプラスミドpHSGBを作製した。

【0045】

プラスミドpUCAをKpnIで消化し、DNAポリメラーゼIの大フラグメント(クレノーフラグメント)を用いて切断端を平滑末端化し、さらにPstIで消化し、最終的に断片(A)を含むDNA断片を単離した。プラスミドpHSGBをHindIIIで消化し、DNAポリメラーゼIの大フラグメント(クレノーフラグメント)を用いて切断端を平滑末端化し、さらにPstIで消化し、最終的に断片(B)を含むDNA断片を単離した。両DNA断片を連結し、プラスミドpHSGSKを作製した。

【0046】

pHSGSKに搭載される、断片(A)及び断片(B)に由来するSmaI-KpnI断片を断片(C)と命名した。断片(C)は、*ilvGM* 遺伝子を含む4.8kbのHindIII-HindIII断片をSmaIとKpnIで切断して得られる断片に相当し、プロモーター、SD配列及び*ilvG* 遺伝子上流域を含むが、リーダー配列からアテニュエーター領域に至る配列約0.2kbを欠いている。以上、pHSGSKを構築する手順を図5にまとめた。

【0047】

プラスミドpHSGSKをSmaIとKpnIで消化することにより断片(C)を得、プラスミドpBRGM7をSmaIとKpnIで消化することにより大DNA断片を得、両者を連結した。得られたプラスミドをpdGM1と命名した。pdGM1に搭載される、*ilvGM* 遺伝子を含む4.6kbのHindIII-HindIII断片は、アテニュエーションに必要な領域を欠いている。アテニュエーションに必要な領域を欠いた*ilvGM* 遺伝子を、本実施例及び図面において「 $\Delta attGM$ 」と表現する。以上、pdGM1を構築する手順を図6にまとめた。

【0048】

特開平2-458号公報に記載されているプラスミドpDRIA4は、エシェリヒア属細菌で自律複製可能でありかつブレビバクテリウム属細菌で自律複製可能なシャトルベクターpDR1120と、*E. coli* K-12由来のスレオニンデアミナーゼをコードする*ilvA* 遺伝子及び*ilvD* 遺伝子の3'末端側の一部を含むBamHI-BamHI断片とが結合されて調製される。なお同BamHI-BamHI断片は、特開平2-458号公報では、2.3kbと記載されているが、現在では2.75kbであることが判明している。プラスミドpDRIA4はブレビバクテリウム・フラバムAJ12358 (FERM P-9764) あるいはブレビバクテリウム・フラバムAJ12359 (FERM P-9765) の染色体DNA外に存在する。これらの株から常法によりプラスミドpDRIA4を調製できる。

【0049】

プラスミドpDRIA4上のBamHI-BamHI 2.75kbのDNA断片中、L-イソロイシンによる障害が実質的に解除されたスレオニンデアミナーゼをコードする*ilvA* 遺伝子を含むHindIII-BamHI断片を調製し、ベクターpMW119(ニッポンジーン社製)をHindIII及びBamHIで切

10

20

30

40

50

断して得られるDNA断片と連結した。こうして作製されたプラスミドをpMWA1と命名した。

【0050】

プラスミドpMWA1をHindIIIで切断して得られるDNA断片と、プラスミドpdGM1をHindIIIで切断して得られるilvGM遺伝子を含むDNA断片とを連結した。プラスミド上に存在する制限酵素認識部位の位置を解析することによって、ilvGM遺伝子の転写方向とilvA遺伝子の転写方向とが同方向となったものを選択し、これをプラスミドpMWGMA2と命名した。pMWGMA2は、アテニュエーターを除去されたilvGM遺伝子、ilvE遺伝子の5'末端側の一部、及びilvD遺伝子の3'末端側の一部を有している。以上、pMWGMA2を構築する手順を図7にまとめた。

【0051】

エシェリヒア・コリMI162株の染色体DNAを調製し、これをSalI及びPstIで切断してDNA断片混合物を調製した。一方、ベクターpUC19（宝酒造社）をSalI及びPstIで切断してDNA断片を調製した。DNA断片混合物とpUC19が切断されて得られるDNA断片とを連結し、DNA混合物を得た。同DNA混合物を、トランスアミナーゼB欠損株であるAB2070株（J. Bacteriol. 109, 703, 1972、エシェリヒア・コリ ジェネティックス トックセンターから分譲。CGS C2070）に導入し、形質転換されて分岐鎖アミノ酸要求性が回復した株を選択した。同株よりプラスミドを調製したところ、プラスミドpUC19がSalI及びPstIで切断して得られるDNA断片と、ilvE遺伝子を含むSalI-PstI DNA断片が連結されていた。このプラスミドをpUCE1と命名した。pUCE1は、ilvM遺伝子の3'末端側の一部、ilvE遺伝子、及びilvD遺伝子の5'末端側の一部を有している。

【0052】

pMWGMA2をHindIIIで部分消化してDNA断片混合物を調製した。一方、pUCE1をHindIIIで切断し、ilvE遺伝子の一部とilvD遺伝子の5'末端側の一部とを含む1.7kbのHindIII-HindIII DNA断片を調製した。両者を連結して得られるDNA混合物を用いてジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ilvD遺伝子産物）欠損株AB1280株を形質転換し、形質転換された株のうち分岐鎖アミノ酸要求性が消失したものを選択した。同形質転換株から、プラスミドを調製したところ、pMWGMA2が $\Delta attGM$ とilvAとの間に存在するHindIII部位でのみ切断されて得られるDNA断片と、pUCE1に由来するilvE遺伝子の一部とilvD遺伝子の一部とを含む1.7kbのHindIII-HindIII DNA断片が連結されており、ilvGMEDAオペロンが再生されていた。こうして得られるプラスミドをpMWD5と命名した。以上、pMWD5を構築する手順を図4にまとめた。

【0053】

以上の様にして得られたプラスミドpMWD5(Ap^r)は、pMW119をベクターとしており、アテニュエーションに必要な領域が除去されたilvGMEDAオペロンを搭載したプラスミドである。

【0054】

(6) ilvGMEDAオペロン及びaspA遺伝子を含むプラスミド(pMWD5-aspA)の作製
pMW118::aspAをSacIとHindIIIで切断後、平滑末端化し、aspAを含むDNA断片を取得した。pMWD5をAflIIIで切断後、平滑末端化し、ここに前記aspAを含むDNA断片を挿入してpMWD5-aspAを得た(図9)。

【0055】

(7) ilvGMEDAオペロン及びpntAB遺伝子を含むプラスミド(pMWD5-THY)の作製
pMW::THYをSmaIとHindIIIで切断後、平滑末端化し、pntABを含むDNA断片を取得した。pMWD5をAflIIIで切断後、平滑末端化し、ここに前記pntABを含むDNA断片を挿入し、pMWD5-THYを得た(図9)。

【0056】

(8) ilvGMEDAオペロン及びppc遺伝子を含むプラスミド(pMWD5-ppc)の作製
pppcをSacIとXbaIで切断後、平滑末端化し、ppcを含むDNA断片を取得した。pMWD5をAflIIIで切断後、平滑末端化し、ここに前記ppcを含むDNA断片を挿入し、pMWD5-ppcを得た(図9)。

【0057】

(9) ilvGMEDAオペロン、pntAB遺伝子及びppc遺伝子を含むプラスミド (pMWD5-PTS) の作製

pPTSをSacIとHindIIIで切断後、平滑末端化し、ppc及びpntABを含むDNA断片を取得した。pMWD5をAflIIIで切断後、平滑末端化し、ここに前記ppc及びpntABを含むDNA断片を挿入し、pMWD5-PTSを得た (図9)。

【0058】

(10) ilvGMEDAオペロン、aspA遺伝子、pntAB遺伝子、及びppc遺伝子を含むプラスミド (pMWD5-APT) の作製

pAPTをSacIとHindIIIで切断後、平滑末端化し、ppc、pntAB及びaspAを含むDNA断片を取得した。pMWD5をAflIIIで切断後、平滑末端化し、ここに前記ppc、pntAB及びaspAを含むDNA断片を挿入しpMWD5-APTを得た (図9)。

【0059】

【実施例2】

各種プラスミドを保持するエシェリヒア・コリによるアミノ酸生産

(1) L-スレオニンの生産

実施例1で得られた各種プラスミドをエシェリヒア・コリVKPM B-3996に導入した。これらの株を、以下の条件で培養した。

【0060】

培養は、表1記載の組成を有する培地を用い、培養時間38時間、温度37℃、攪拌114~116rpmでおこなった。表1中、A成分、B成分、C成分は別々に調製して殺菌し、冷却後、A成分16/20容量、B成分4/20容量、C成分30g/Lとなるように混合した。培地中のL-スレオニン蓄積量を測定した結果を表2に示した。L-スレオニン生産性エシェリヒア属細菌において、細胞内のTHY活性及びPEPC活性を増強することにより、L-スレオニン生産性が改善されることが判明した。また、さらにAspA活性を増強することにより、一層L-スレオニン生産性が向上することが判明した。

【0061】

【表1】

表1 スレオニン生産培地

		(g/L)	
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	16	
	KH ₂ PO ₄	1	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01	
	Yeast Ext. (Difco)	2	
	L-メチオニン	0.5	
KOHでpH7.0に調整し、115℃で10分オートクレーブ (16/20容)			
B	20% グルコース	115℃で10分オートクレーブ (4/20容)	
C	局方 CaCO ₃	180℃で2日乾熱 (30g/L)	
	抗生物質 (ストレプトマイシン 100μg/ml, アリシリン 50μg/ml)		

【0062】

【表 2】

表 2

宿主	プラスミド	L-スレオニン蓄積量(g/L)
B-3996	pMW118	14.0
	pppc	14.5
	pMW::THY	15.0
	pMW118::aspA	14.0
	pPTS	16.8
	pAPT	17.2

【0063】

(2) L-イソロイシンの生産

実施例 1 で得られた各種プラスミドをエシェリヒア・コリ VKPM B-3996 に導入した。これらの株を、以下の条件で培養した。

【0064】

培養は、L-イソロイシン生産用培地（グルコース 40 g、硫酸アンモニウム 16 g、リン酸一カリウム 1 g、硫酸マグネシウム 7 水和物 1 g、硫酸第一鉄 7 水和物 0.01 g、塩化マンガン 4 水和物 0.01 g、酵母抽出物 2 g、炭酸カルシウム 40 g を水 1 L 中に含む。pH = 7.0）を用いて、37℃で 24 時間培養した。培地中の L-イソロイシンを高速液体クロマトグラフィーにより定量した。結果を表 3 に示す。

【0065】

L-イソロイシン生産性エシェリヒア属細菌において、細胞内の THY 活性及び PEP C 活性を増強することにより、L-イソロイシン生産性が改善されることが判明した。また、さらに Asp A 活性を増強することにより、一層 L-イソロイシン生産性が向上することが判明した。

【0066】

【表 3】

表 3

宿主	プラスミド	L-イソロイシン蓄積量(g/L)
B-3996	pMWD5	10.0
	pMWD5-ppc	9.9
	pMWD5-THY	10.4
	pMWD5-aspA	10.0
	pMWD5-PTS	10.8
	pMWD5-APT	11.2

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

【発明の効果】

本発明により、エシェリヒア属細菌のL-スレオニン又はL-イソロイシンの生産能を向上させることができる。

【 0 0 6 8 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)	10
<120> スレオニン及びイソロイシンの製造法	
<130> P-7615	
<140>	
<141> 2000-08-11	20
<160> 6	
<170> PatentIn Ver. 2.0	
<210> 1	
<211> 20	30
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:primer	
<400> 1	40
tgatcagcga aacacttita	20
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

cagcaaacta tgatgagaa

19

10

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

taacatcact gagatcatgt tg

22

<210> 4

<211> 21

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

tcttttcttg catcttgttc g

21

40

〈210〉 5

〈211〉 22

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

10

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 5

tctgtttctc aagattcagg ac

22

〈210〉 6

〈211〉 19

20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer

〈400〉 6

30

cgccggtaaa ccaaaaccc

19

【図面の簡単な説明】

【図 1】 aspA遺伝子を含むプラスミドpMW118::aspAの構築過程を示す図。

【図 2】 pntAB遺伝子とppc遺伝子を含むプラスミド（pPTS）の構築過程を示す図。

【図 3】 aspA遺伝子及びppc遺伝子を含むプラスミド（pAPW）の構築過程を示す図。

【図 4】 aspA遺伝子、pntAB遺伝子、及びppc遺伝子を含むプラスミド（pAPT）の構築過程を示す図。

【図 5】 プラスミドpHSGSKの構築過程を示す図。

40

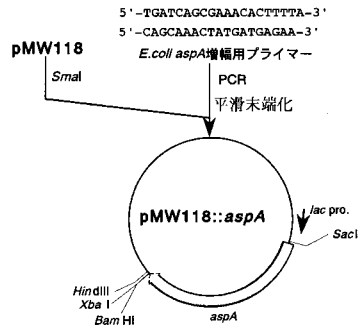
【図 6】 プラスミドpdGM1の構築過程を示す図。

【図 7】 プラスミドpMWGMA2の構築過程を示す図。

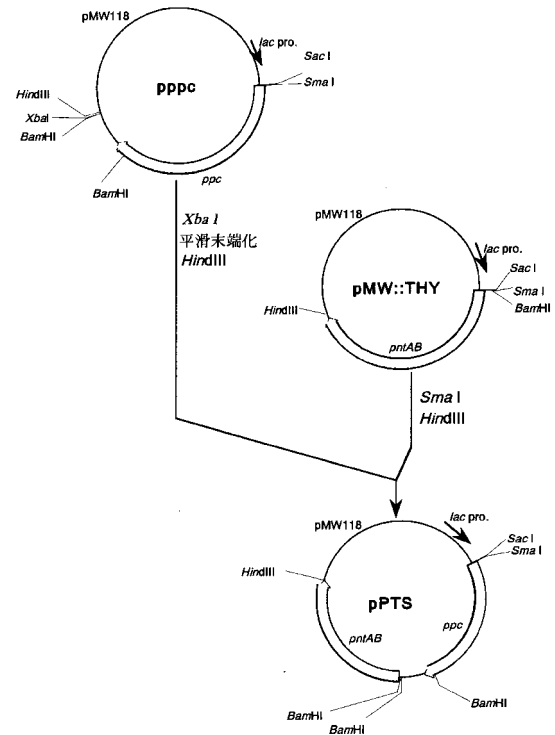
【図 8】 プラスミドpMWD5の構築過程を示す図。

【図 9】 pMWD5-aspA、pMWD5-THY、pMWD5-ppc、pMWD5-PTS、pMWD5-APTの構築過程を示す図。

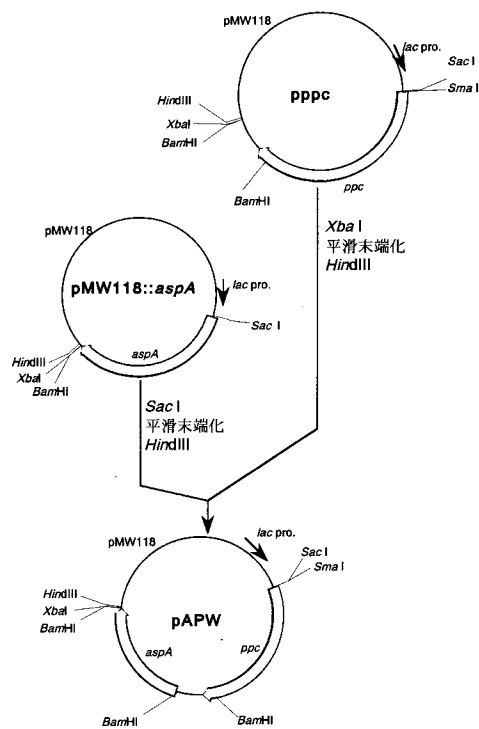
【図 1】



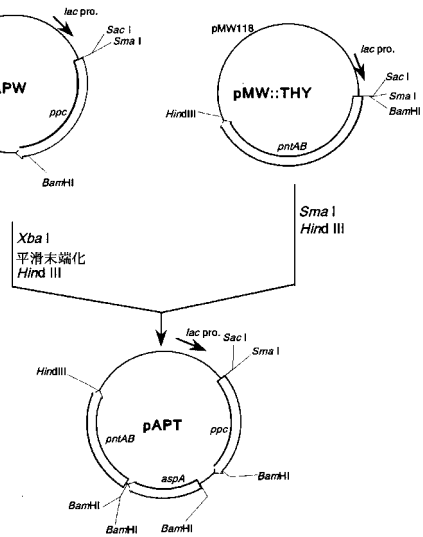
【図 2】



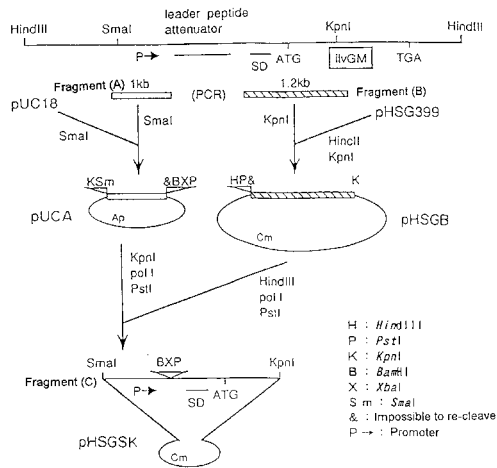
【図 3】



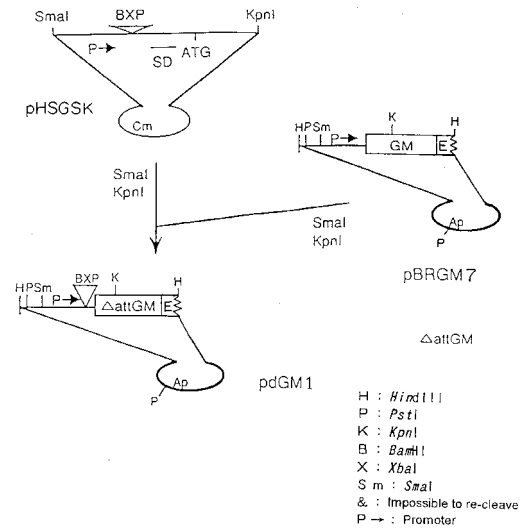
【図 4】



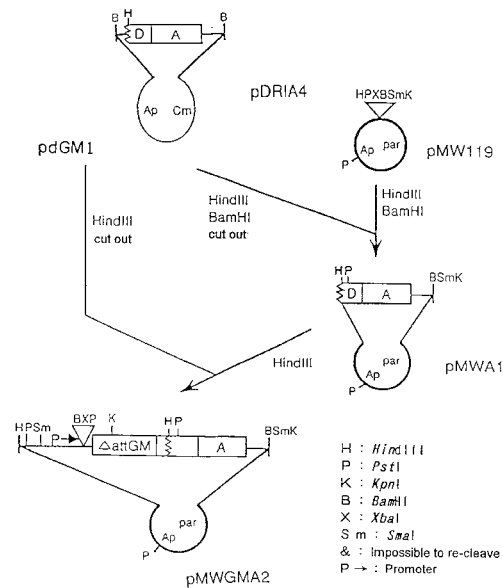
【図 5】



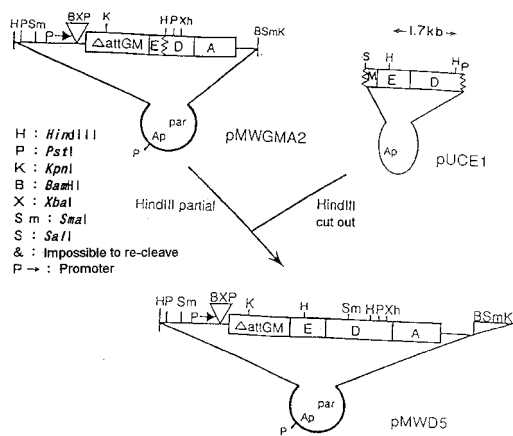
【図 6】



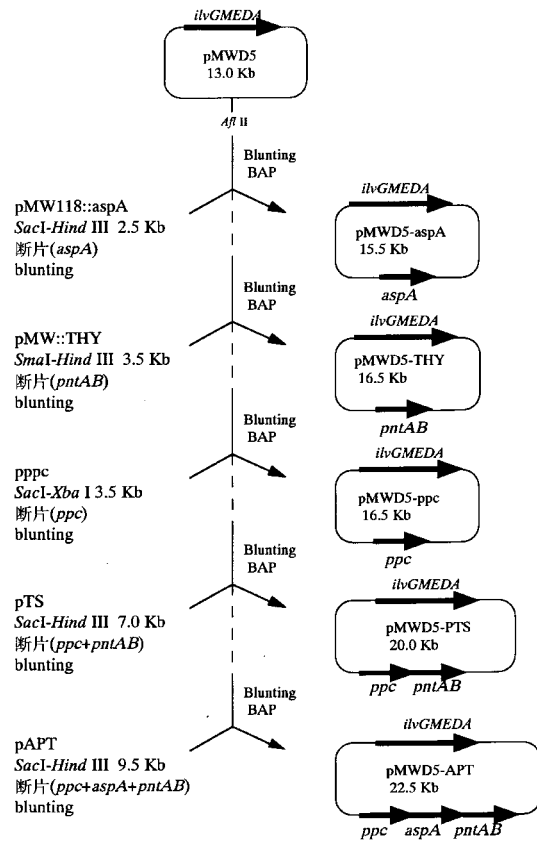
【図 7】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

- (72)発明者 宮田 由理
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内
- (72)発明者 中井 勇太
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内
- (72)発明者 中西 一夫
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内
- (72)発明者 伊藤 久生
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内
- (72)発明者 児島 宏之
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内
- (72)発明者 倉橋 修
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵技術研究所内

審査官 山中 隆幸

- (56)参考文献 国際公開第95/011985 (WO, A1)
国際公開第95/006114 (WO, A1)
特表平03-501682 (JP, A)
特開平08-047397 (JP, A)
特開平01-160487 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
Science Direct
JSTPlus(JDreamII)