(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6720194号
(P6720194)
(45)発行日　令和2年7月8日(2020.7.8)　(24)登録日　令和2年6月19日(2020.6.19)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C12N 15/55 | (2006.01) | C12N | 15/55 | ZNA |
| C12N 15/54 | (2006.01) | C12N | 15/54 | |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N | 1/21 | |
| C12P 13/06 | (2006.01) | C12P | 13/06 | D |

請求項の数 13　(全 87 頁)

(21)出願番号　特願2017-539612(P2017-539612)
(86)(22)出願日　平成28年1月27日(2016.1.27)
(65)公表番号　特表2018-503384(P2018-503384A)
(43)公表日　平成30年2月8日(2018.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/051701
(87)国際公開番号　WO2016/120326
(87)国際公開日　平成28年8月4日(2016.8.4)
審査請求日　平成30年11月21日(2018.11.21)
(31)優先権主張番号　15152643.1
(32)優先日　平成27年1月27日(2015.1.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　519199897
シスバイオ　エ・ペー・エス
ＣｙｓＢｉｏ　ＡｐＳ
デンマーク国　２８００　コンゲンス　リュンビュー　ケミトアヴェート　２２０
ケア・オブ　ダンマークス　テクニスク　ウニヴェアシテート
ｃ／ｏ　Ｄａｎｍａｒｋｓ　Ｔｅｋｎｉｓｋｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅｔ，　Ｋｅｍｉｔｏｒｖｅｔ　２２０，　２８００　Ｋｏｎｇｅｎｓ　Ｌｙｎｇｂｙ，　Ｄｅｎｍａｒｋ
(74)代理人　100114890
弁理士　アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

最終頁に続く

(54)【発明の名称】セリン分解経路が欠如した遺伝子組換え微生物を使用するＬ－セリンの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡを不活性化するように変性された、腸内細菌科に属する細菌。
【請求項２】
前記細菌は、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ、ホスホセリンホスファターゼおよびホスホセリンアミノトランスフェラーゼを過剰発現するように更に変性されている、請求項１に記載の細菌。
【請求項３】
前記細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも６．２５ｇ／Ｌの濃度で含んでいる最小培地中で成長できる、請求項１または２に記載の細菌。
【請求項４】
前記細菌は、少なくとも６．２５ｇ／Ｌの濃度でＬ－セリンを含んでいる最小培地中、対数増殖の間に、少なくとも０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる、請求項１から３までのいずれか１項に記載の細菌。
【請求項５】
前記細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ

、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７ＦおよびＳ３５７Ｈから成る群から選択され；かつＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、請求項１から４までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項６】

前記細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、請求項１から５までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項７】

Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；かつＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、請求項６に記載の細菌。

【請求項８】

前記細菌は、配列番号９に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外因性核酸分子を含む、請求項１から７までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項９】

前記細菌は、次のポリペプチド（ｉ）～（ｘｖ）：

（ｉ）配列番号１２に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１４３の位置でＤは他のアミノ酸に置換されている、

（ｉｉ）配列番号１３に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、８７の位置でＲは他のアミノ酸に置換されている、

（ｉｉｉ）配列番号１４に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１６４の位置でＶは他のアミノ酸に置換されている、

（ｉｖ）配列番号１５に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１３２の位置でＱは他のアミノ酸に置換されている、

（ｖ）配列番号１６に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１９の位置でＧは他のアミノ酸に置換されている、

（ｖｉ）配列番号１７に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、２２０の位置でＩは他のアミノ酸に置換されている、

（ｖｉｉ）配列番号１８に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、２０２の位置でＩは他のアミノ酸に置換されている、

（ｖｉｉｉ）配列番号１９に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、３３４の位置でＤは他のアミノ酸に置換されている、
（ｉｘ）配列番号２０に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１２０の位置でＶは他のアミノ酸に置換されている、
（ｘ）配列番号２２に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、
（ｘｉ）配列番号２４に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、
（ｘｉｉ）配列番号２５に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、５２０の位置でＰは他のアミノ酸に置換されている、
（ｘｉｉｉ）配列番号２６に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、２１８の位置でＴは他のアミノ酸に置換されている、
（ｘｉｖ）配列番号２７に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、その際、前記アミノ酸配列中、１７８の位置でＡは他のアミノ酸に置換されている、
および／または
（ｘｖ）配列番号２９に記載のアミノ酸配列に少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド
のいずれか１つを発現する、請求項１から８までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１０】

前記細菌は、大腸菌属に属する、請求項１から９までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１１】

前記細菌は、大腸菌である、請求項１から１０までのいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１２】

Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法において、該方法は、請求項１から１１までのいずれか１項に記載の細菌を培地中で培養することを含む、Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法。

【請求項１３】

Ｌ－セリン誘導体は、Ｌ－システイン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－グリシン、Ｏ－アセチルセリン、Ｌ－トリプトファン、チアミン、エタノールアミンおよびエチレングリコールから成る群から選択される、請求項１２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、一般に微生物工業ならびに特に遺伝子組換え細菌を使用するＬ－セリンの製造に関する。本発明は、遺伝子組換え微生物、例えば、Ｌ－セリンの分解に関与する酵素をコードする遺伝子の発現を不活性化のようなものにより減衰した細菌を提供し、この不活性化は、特に高収率でＬ－セリンを生産するのに適切なものにする。また本発明は、微生物ならびに更に詳細には細菌をより高濃度のセリンに対して耐性であることができるようにする方法を提供する。また本発明は、このような遺伝子組換え微生物を使用するＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法を提供する。

【０００２】

発明の背景

Ｌ－セリンは、化粧品、薬剤および医療産業で使用されているアミノ酸である。セリンの推定年間生産量は、３００～１０００トンである（Ｌｅｕｃｈｔｅｎｂｅｒｇｅｒ等、２００５年）。この化合物は、生化学物質の構成ブロックとしてのその潜在的有用性ゆえ

に上位３０の最も関心のある生化学物質のうち１つとして同定されている。現在の生産は、休止細胞を使用するグリセリンとメタノールの変換に基づいていて（Ｈａｇｉｓｈｉｔａ等、１９９６年）、その際、メチロトローフはメタノールをホルムアルデヒドに変換し、かつ分子の$CH_2$－ＯＨ単位は、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼを使用してグリシンに変換される（ｇｌｙＡ）。この発酵プロセスは時間がかかり、かつグリシンは高価な出発物質である。従って、グルコースからセリンを直接に低コストで生産する方法の開発は魅力的である。

【０００３】

セリンは、極めて高い理論収率で発酵によりグルコースから作られる可能性を秘めている（Ｂｕｒｇａｒｄ ａｎｄ Ｍａｒａｎａｓ、２００１年）。しかし、収率を高めるために幾つかの挑戦に取り組む必要があり、最も重要なものは生産生物中でのセリンの分解である。セリンは、大腸菌内で２つの鍵となる分解経路を有する。大腸菌内でのセリンからピルベートへの炭化は、３つのデアミナーゼ、すなわちｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧにより触媒されるのに対して、Ｃ．グルタミカムは、セリンに対して活性を有する１つだけのデアミナーゼ（ｓｄａＡ）を有する。両方の生物中では、セリンからグリシンの変換は、ｇｌｙＡによりコードされる。デアミナーゼだけのノックアウトによるセリン生産は、大腸菌（Ｌｉ等、２０１２年）とＣ．グルタミカム（Ｐｅｔｅｒｓ－Ｗｅｎｄｉｓｃｈ等、２００５年）において試みられていた。大腸菌内での１ｇ／Ｌグルコースから３．８ｍｇ／Ｌの一時的な蓄積は、経路遺伝子（ｓｅｒＡ）のうち１つだけが過剰発現した場合に観察された。Ｃ．グルタミカムのデアミナーゼの欠失は、セリン力価において重要ではなく、かつ一時的な増大しか生じない。最近の研究では、ＴＣＡ回路とグリコキシレートシャウントを摂動させることにより、３－ホスホグリセレートのフラックスを増大させる大腸菌が設計された（Ｇｕ等、２０１４）。結果として得られた１つだけのデアミナーゼ（ｓｄａＡ）が除去されている株は、７５ｇ／Ｌグルコースから８．４５ｇＬ－セリンを生産したと報告されている（１１．２％収率）。

【０００４】

Ｃ．グルタミカム中でのｇｌｙＡのダウンレギュレーション（Ｐｅｔｅｒｓ－Ｗｅｎｄｌｉｓｃｈ等、２００５年）は、４０ｇ／Ｌグルコースから９ｇ／Ｌセリンを生産したが、不安定な株を生じた。ｇｌｙＡは、セリンをグリシンに変換する重要な酵素であり、かつこの工程で一炭素単位はテトラヒドロ葉酸（ＴＨＦ）に転移し、これが補因子として使用される。葉酸経路の除去ならびに葉酸の供給は、安定なＣ．グルタミカムおよび３６ｇ／Ｌセリンの生産を生じるが、しかし比較的低い収率である（Ｓｔｏｌｚ等、２００７年）。

【０００５】

両方の主要なセリン分解経路（セリンからピルベートおよびセリンからグリシン）の欠如は、以前は達成されていなかった。更に、ピルベート分解経路が欠如した株の中ではセリンは、低濃度であっても毒性になることが公知である（Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｎｅｗｍａｎ、２００８年）。セリンは大腸菌内での分枝アミノ酸の生産を阻害し得ること（Ｈａｍａ等、１９９０年）、すなわちセリンから細胞にとって毒性であるヒドロキシピルベートおよびアクリレートへの変換を阻害し得ることが期待されている（ｄｅ Ｌｏｒｅｎｚｏ、２０１４年）。従って、Ｌ－セリンまたはその誘導体の効率的な生産には、セリン分解経路を除去し、かつセリンの毒性に関連する問題にとりかかる事の両方が望ましい。

【０００６】

発明の概要

本発明の課題は、Ｌ－セリンのより効率的な製造を可能にする手段を提供することである。より詳しくは、本発明の課題、より高い名目収率および改善された質量収率でＬ－セリンの生産を可能にする手段を提供することである。

【０００７】

この課題は、例えば、Ｌ－セリンの分解に関与する酵素をコードする遺伝子、特に遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの不活性化によりＬ－セリンの生産を増

大できるという発見により達成された。
【０００８】
よって本発明は第一の態様では、細菌、特にＬ－セリンを生産する能力のある細菌を提供する。その際、前記細菌は、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰し、かつセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性されている。
【０００９】
より詳しくは、本発明は遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの発現を例えば、これらの遺伝子の不活性化により減衰するように変性された細菌を提供する。
【００１０】
本発明は、第二の態様では、培養液中で上記のような細菌を培養することを含むＬ－セリンの製造方法を提供する。
【００１１】
本発明は、更なる態様で酵母、例えば、サッカロミセス・セレビアエ、特にＬ－セリンを生産する能力のある酵母を提供し、その際、前記酵母は、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰し、かつセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性されている。
【００１２】
より具体的には、本発明は酵母、サッカロミセス・セレビアエを提供するが、これは、遺伝子ＣＨＡ１、ＳＨＭ１およびＳＨＭ２の発現を、例えばこれらの遺伝子の不活性化により減衰するように変性されている。
【００１３】
本発明は更なる態様では、培地中で上記のような酵母を培養することを含むＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法を提供する。
【００１４】
本発明は、更なる態様で、（単離）核酸分子、例えば、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を有する配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいるベクターを提供する。
【００１５】
本発明は、更なる態様で、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を有する配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の相同性を有するアミノ酸配列を有する（単離）ポリペプチドを提供する。（単離）ポリペプチドは、本発明の細菌により発現されたもの（および単離型）であってよい。
【００１６】
本発明は、以下の項目によりまとめることができる：
１．セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するおよびセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性された細菌。
【００１７】
２．遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの発現が減衰されている、項目１に記載の細菌。
【００１８】
３．遺伝子の発現は、遺伝子の不活性化により減衰されている、項目１または２に記載の細菌。

【００１９】
４．前記細菌は、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ、ホスホセリンホスファターゼおよびホスホセリンアミノトランスフェラーゼを過剰発現するように更に変性されている、項目１から３までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２０】
５．前記細菌は、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から４までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２１】
６．前記細菌は、３－ホグリセリンアミノトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から５までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２２】
７．前記細菌は、ホスホセリンホスファターゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から６までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２３】
８．外因性核酸分子は、発現ベクターである、項目５から７までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２４】
９．外因性核酸は、細菌のゲノムに安定に導入される、項目５から７までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２５】
１０．前記細菌は、少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度でＬ－セリンを含んでいる最小培地中で成長できる、項目１から９までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２６】
１１．前記細菌は、少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度でＬ－セリンを含んでいる最小培地中、対数増殖の間に、少なくとも０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる、項目１から１０までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２７】
１２．前記細菌は、遺伝子ｙｄｅＤの過剰発現するように更に変性されている、項目１から１１までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２８】
１３．前記細菌は、遺伝子ｙｄｅＤのタンパク生成物をコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から１２までのいずれか１項に記載の細菌。
【００２９】
１４．外因性核酸は、発現ベクターである、項目１３に記載の細菌。
【００３０】
１５．外因性核酸は、細菌のゲノムに安定に導入される、項目１３に記載の細菌。
【００３１】
１６．前記細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、コードされたポリペプチド中Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および／またはコードされたポリペプチド中Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７ＫおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；かつＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３

５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目１から１５までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３２】

１７．前記細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される、項目１から１６までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３３】

１８．前記細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される、項目１から１７までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３４】

１９．前記細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子内、コードされているポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、その際、Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目１から１８までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３５】

２０．前記細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から１９までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３６】

２１．前記細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を有するアスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）突然変異体を発現する、項目１から２０までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３７】

２２．前記細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置にアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から１５までのいずれか１項に記載の細菌。

【００３８】

２３．Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６Ｒ、Ｙ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目２２に記載の細菌。

【００３９】

２４．前記細菌は、Ｙ３５６の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ

酸配列に少なくとも約９０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から２３までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４０】

２５．Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６Ｒ、Ｙ３５６Ｌから成る群から選択される、項目２４に記載の細菌。

【００４１】

２６．前記細菌は、Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外因性核酸分子を含む、項目１から２５までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４２】

２７．Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される、項目２６に記載の細菌。

【００４３】

２８．前記細菌は、Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む、項目１から２５までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４４】

２９．Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目２８に記載の細菌。

【００４５】

３０．前記細菌は、Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｄ１４３での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から２９までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４６】

３１．前記細菌は、ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｒ８７での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｒ８７Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３０までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４７】

３２．前記細菌は、ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｖ１６４での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３１までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４８】

３３．前記細菌は、ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｑ１３２での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｑ１３２Ｋ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３２までのいずれか１項に記載の細菌。

【００４９】

３４．前記細菌は、ｔｕｆＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｇ１９での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｇ１９Ｖ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３３までのいずれか１項に記載の

細菌。

【００５０】

３５．前記細菌は、ｃｙｃＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｉ２２０での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｉ２２０Ｖ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３４までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５１】

３６．前記細菌は、ｒｐｅ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｉ２０２での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｉ２０２Ｔ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３５までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５２】

３７．前記細菌は、ｙｏｊｌ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｄ３３４での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｄ３３４Ｈ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３６までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５３】

３８．前記細菌は、ｈｙａＦ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｖ１２０での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｖ１２０Ｇ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から３７までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５４】

３９．前記細菌は、遺伝子ｐｙｋＦの発現を減衰するように（例えば、遺伝子の不活性化により）更に変性されている、項目１から３８までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５５】

４０．前記細菌は、遺伝子ｍａｌＴの発現を減衰するように（例えば、遺伝子の不活性化により）更に変性されている、項目１から３９までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５６】

４１．前記細菌は、ｒｐｏＢ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｐ５２０での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｐ５２０Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から４０までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５７】

４２．前記細菌は、ｆｕｍＢ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ｔ２１８での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ｔ２１８Ｐ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から４１までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５８】

４３．前記細菌は、ｇｓｈＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中の位置Ａ１７８での非保存的アミノ酸置換のようなアミノ酸置換（例えばアミノ酸置換Ａ１７８Ｖ）の結果生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む、項目１から４２までのいずれか１項に記載の細菌。

【００５９】

４４．前記細菌は、遺伝子ｌａｍＢの発現を減衰するように（例えば、遺伝子の不活性化により）更に変性されている、項目１から４３までのいずれか１項に記載の細菌。

【００６０】

４５．前記細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されている参照ゲノムＥ．ｃｏｌｉ Ｋ１２ＭＧ１６５５中の８５００９２の位置に相応する位置から約２８５４塩基対の欠失を含む、項目１から４４までのいずれか１項に記載の細菌。

【００６１】
４６．欠失は、ｒｈｔＡの最初の５塩基対の欠失、遺伝子ｏｍｐＸとｙｂｉＰの完全な欠失、ｓＲＮＡ　ｒｙｂＡの２３９塩基対の欠失およびｍｎｔＳ遺伝子の７７塩基対の欠失を生じる、項目４５に記載の細菌。
【００６２】
４７．前記細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置３９６６１７４に相応する位置で、ラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入を含む、項目１から４６までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６３】
４８．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置２９４２６２９に相応する位置で１塩基対の挿入を含む、項目１から４７までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６４】
４９．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置２９４２８７８に相応する位置で、１３４２塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ４の挿入を含む、項目１から４８までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６５】
５０．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置２５９９８５４に相応する位置で、１塩基対の挿入を含む、項目１から４９までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６６】
５１．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置２４９２３２３に相応する位置で、ラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入を含む、項目１から５１までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６７】
５２．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置１２１５１８に相応する位置で、１１９５塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ５の挿入を含む、項目１から５１までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６８】
５３．細菌は、そのゲノム内に、ＮＣＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２で寄託されているＥ．ｃｏｌｉＫ１２ＭＧ１６５５参照ゲノム中の位置１６７３６７０に相応する位置で、ラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入を含む、項目１から５２までのいずれか１項に記載の細菌。
【００６９】
５４．細菌は、グルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性されている、項目１から５３までのいずれか１項に記載の細菌。
【００７０】
５５．ｚｗｆ遺伝子の発現は、減衰されている、項目５４に記載の細菌。
【００７１】
５６．遺伝子の発現は、遺伝子の不活性化により減衰されている、項目５４または５５に記載の細菌。
【００７２】
５７．細菌は、ｂｒｎＱ遺伝子によりコード化されたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは、位置３０８またはその上流の任意の位置で終了する、項目１から５６までのいずれか１項に記載の細菌。

【００７３】
５８．細菌は、更にｔｈｒＡ遺伝子によりコードされているポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中、３５７の位置でセリンは他のアミノ酸、例えばアルギニンにより置換されている、項目５４から５７までのいずれか１項に記載の細菌。
【００７４】
５９．前記細菌は、ｒｈｏ遺伝子によりコードされているポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは８７Ｒの位置で、他のアミノ酸、例えばＬにより置換されている、項目５４から５８までのいずれか１項に記載の細菌。
【００７５】
６０．前記細菌は、配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現するか、または配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現し、その際、前記アミノ酸配列は３５７の位置でセリンは他のアミノ酸、例えばアルギニンにより置換されている；
配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現するか、または配列番号１３に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現し、その際、前記アミノ酸配列は８７の位置でＲは他のアミノ酸、例えばＬにより置換されている；および
配列番号３２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現するか、または配列番号３２に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する、項目５４から５８までのいずれか１項に記載の細菌。
【００７６】
６１．前記細菌は、遺伝子ｂｒｎＱの発現を減衰するように更に変性されている（例えば、遺伝子の不活性化により）、項目１から５６までのいずれか１項に記載の細菌。
【００７７】
６２．前記細菌は、配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現するか、または配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現し、その際、前記アミノ酸配列は３５７の位置でセリンは他のアミノ酸、例えばアルギニンにより置換されている、項目６１に記載の細菌。
【００７８】
６３．前記細菌は、配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現するか、または配列番号１３に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現し、その際、前記アミノ酸配列は８７の位置でＲは他のアミノ酸、例えばＬにより置換されている、項目６１または６２に記載の細菌。
【００７９】
６４．前記細菌は、大腸菌属に属している、項目１から６３までのいずれか１項に記載の細菌。
【００８０】
６５．前記細菌は、大腸菌、アルセノフォナス（Ａｒｓｅｎｏｐｈｏｎｕｓ）、ビオストラチコラ（Ｂｉｏｓｔｒａｔｉｃｏｌａ）、ブレンネリア（Ｂｒｅｎｎｅｒｉａ）、ブフネラ（Ｂｕｃｈｎｅｒａ）、ブドビシア（Ｂｕｄｖｉｃｉａ）、ブティアウクセラ（Ｂｕｔｔｉａｕｘｅｌｌａ）、セデセア（Ｃｅｄｅｃｅａ）、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏ

ｂａｃｔｅｒ）、コセンゾエア（Ｃｏｓｅｎｚａｅａ）、クロノバクター（Ｃｒｏｎｏｂａｃｔｅｒ）、ディケヤ（Ｄｉｃｋｅｙａ）、エドワージエラ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）、エウィンゲラ（Ｅｗｉｎｇｅｌｌａ）、ギッブシエラ（Ｇｉｂｂｓｉｅｌｌａ）、ハフニア（Ｈａｆｎｉａ）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、レクレルシア（Ｌｅｃｌｅｒｃｉａ）、レミノレラ（Ｌｅｍｉｎｏｒｅｌｌａ）、ロンスダレア（Ｌｏｎｓｄａｌｅａ）、モングロビバクター（Ｍａｎｇｒｏｖｉｂａｃｔｅｒ）、モエレレッラ（Ｍｏｅｌｌｅｒｅｌｌａ）、モルガネラ（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ）、オベスムバクテリウム（Ｏｂｅｓｕｍｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）、ペクトバクテリウム（Ｐｅｃｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ファセオリバクター（Ｐｈａｓｅｏｌｉｂａｃｔｅｒ）、フォトルハブダス（Ｐｈｏｔｏｒｈａｂｄｕｓ）、プレシオモナス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ）、プロテウス（Ｐｒｏｔｅｕｓ）、ラーネラ（Ｒａｈｎｅｌｌａ）、ラオウルテラ（Ｒａｏｕｌｔｅｌｌａ）、サッカロバクター（Ｓａｃｃｈａｒｏｂａｃｔｅｒ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、サムソニア（Ｓａｍｓｏｎｉａ）、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、シムウェリア（Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ）、ソダーリス（Ｓｏｄａｌｉｓ）、タツメラ（Ｔａｔｕｍｅｌｌａ）、トルセリア（Ｔｈｏｒｓｅｌｌｉａ）、トラブルシエラ（Ｔｒａｂｕｌｓｉｅｌｌａ）、ウィグルスウォーチア（Ｗｉｇｇｌｅｓｗｏｒｔｈｉａ）、エルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）およびヨーケネラ（Ｙｏｋｅｎｅｌｌａ）から成る群から選択される属に属する、項目６４に記載の細菌。

【００８１】

６６．前記細菌は、大腸菌属に属している、項目６４または６５に記載の細菌。

【００８２】

６７．前記細菌は、大腸菌である、項目６６に記載の細菌。

【００８３】

６８．Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を製造する方法であって、該方法は、項目１から６７までのいずれか１項に記載の細菌を培地中で培養することを含む、Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を製造する方法。

【００８４】

６９．Ｌ－セリンを製造する方法である、項目６８に記載の方法。

【００８５】

７０．Ｌ－セリン誘導体を製造する方法である、項目６８に記載の方法。

【００８６】

７１．Ｌ－セリン誘導体は、Ｌ－システイン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－アルギニン、Ｏ－アセチルセリン、Ｌ－トリプトファン、チアミン、エタノールアミンおよびエチレングリコールから成る群から選択される、項目６８に記載の方法。

【００８７】

７２．Ｌ－システインを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００８８】

７３．Ｌ－メチオニンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００８９】

７４．Ｌ－グリシンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００９０】

７５．Ｏ－アセチルセリンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００９１】

７６．Ｌ－トリプトファンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００９２】

７７．チアミンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００９３】

７８．エタノールアミンを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。

【００９４】

７９．エチレングリコールを製造するための方法である、項目６８に記載の方法。
【００９５】
８０．更に培地からＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を回収することを含む、項目６８から８０までのいずれか１項に記載の方法。
【００９６】
８１．セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するために、かつセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するために変性された酵母。
【００９７】
８２．遺伝子ＣＨＡ１、ＳＨＭ１およびＳＨＭ２の発現が減衰されている、項目８１に記載の酵母。
【００９８】
８３．遺伝子の発現は、遺伝子の不活性化により減衰されている、項目８１または８２に記載の酵母。
【００９９】
８４．前記酵母は、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ、ホスホセリンホスファターゼおよびホスホセリンアミノトランスフェラーゼを過剰発現するように更に変性されている、項目８１から８３までのいずれか１項に記載の酵母。
【０１００】
８５．酵母は、サッカロミセス属に属している、項目８１から８４までのいずれか１項に記載の酵母。
【０１０１】
８６．酵母は、サッカロミセス・セレビアエである、項目８５に記載の酵母。
【０１０２】
８７．Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を製造する方法であり；次の
項目８１から８６までのいずれか１項に記載の酵母を培地中で培養する
ことを含む、Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を製造する方法。
【０１０３】
８８．（単離）核酸分子、例えば、ベクターであって、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置にアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、（単離）核酸分子。
【０１０４】
８９．ポリペプチドは、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置にアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有する、項目８８に記載の（単離）核酸分子。
【０１０５】
９０．アミノ酸置換はＹ３５６の位置である、項目８８または８９に記載の（単離）核酸分子。
【０１０６】
９１．アミノ酸置換はＳ３５７の位置である、項目８８から９０までのいずれか１項に記載の（単離）核酸分子。
【０１０７】
９２．アミノ酸置換はＳ３５９の位置である、項目８８から９１までのいずれか１項に記載の（単離）核酸分子。
【０１０８】
９３．Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５

６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目８８から９２までのいずれか１項に記載の（単離）核酸分子。

【０１０９】

９４．Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でのアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有する（単離）ポリペプチド。

【０１１０】

９５．ポリペプチドは、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有する、項目９４に記載の（単離）ポリペプチド。

【０１１１】

９６．アミノ酸置換は、Ｙ３５６の位置である、項目９４または９５に記載の（単離）ポリペプチド。

【０１１２】

９７．アミノ酸置換は、Ｓ３５７の位置である、項目９４から９６までのいずれか１項に記載の（単離）ポリペプチド。

【０１１３】

９８．アミノ酸置換は、Ｓ３５９の位置である、項目９４から９７までのいずれか１項に記載の（単離）ポリペプチド。

【０１１４】

９９．Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される、項目９４から９８までのいずれか１項に記載の（単離）ポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【０１１５】

【図１】図１は、大腸菌におけるセリン分解に関与する主要遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの欠失を示す図である。

【図２】図２は、構築物のベクターマップを示す図である。

【図３】図３は、バッチ発酵の際のセリン生産を示す図である。

【図４】図４は、Ｑ１（ＤＥ３）中でのエクスポーターｙｄｅＤの過剰発現を使用した成長プロフィールを示す図である。

【図５】図５は、１２．５ｇＬ－セリン中でのＱ１とＱ３の成長プロフィールを示す図である。

【図６】図６は、セリンに対する耐性を改善するための適応実験室進化（ＡＬＥ）実験。（Ａ）進化試験の間の成長速度。（Ｂ）高濃度セリンの存在での関連株の改善された成長

を示す図である。
【図７】図７は、セリンに対する耐性におけるｔｈｒＡ内の突然変異の効率を示す図である。
【図８】図８は、セリンに対する増大した耐性を引き起こす突然変異の同定を示す図である。
【図９】図９は、（Ａ）Ｑ１（ＤＥ３）とＱ３（ＤＥ３）株のフェドバッチ発酵の際の種々の時点で測定したセリン生産と細胞密度（ＯＤ６００ｎｍ）を示す図である。
【図１０】図１０は、（Ａ）ＡＬＥ８－８（ＤＥ３）株の細胞密度とセリン力価。（Ｂ）グルコースからの質量収率を示す図である。
【図１１】図１１は、ＴｈｒＡのそれぞれの位置３５６（１１Ａ）、３５７（１１Ｂ）および３５９（１１Ｃ）で観察された種々のアミノ酸置換（アミノ酸置換はそれぞれ１文字表記で示されている）を有する変異体大腸菌株の成長速度を示す図である。
【０１１６】
本発明を以下に具体的に説明する。
【０１１７】
発明の詳細な説明
本明細書中では特記されない限り、使用されている全ての工業的および科学的用語は、生化学、遺伝学および微生物学の分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。
【０１１８】
本明細書中で記載のものと類似のまたは同等の全ての方法および材料は、本明細書中で記載の適切な方法と材料を用いて、本発明の実施または試験で使用できる。本明細書で記載の全ての出版物、特許明細書、特許および他の参考文献を参照してそれらの全体を組込むことにする。矛盾する場合は定義を含めて本明細書が主流である。更に、材料、方法および実施例は、単に例証であり、特記されない限り制限する意図はない。
【０１１９】
本発明の実施は、特記されない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニックバイオロジー、微生物学ならびに組換えＤＮＡの通常の技術を使用することになり、これらは、当業者が備えている技能の範囲内である。このような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、分子生物における現行プロトコール（Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ Ｍ．ＡＵＳＵＢＥＬ，２０００，Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ ｓｏｎ Ｉｎｃ，米国議会図書館、ＵＳＡ）；分子クローニング：実験室マニュアル、第三版（Ｓａｍｂｒｏｏｋ等、２００１、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州：コールドスプリングハーバー研究所出版物）；オリゴヌクレオチド合成（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編集者、１９８４）；Ｍｕｌｌｉｓ等、米国特許第４６８３１９５号；核酸ハイブリダイゼーション（Ｂ．Ｄ．Ｈａｒｒｉｅｓ＆Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ等、１９８４）；転写と翻訳（Ｂ.Ｄ.Ｈａｍｅｓ＆ Ｓ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編集者、１９８４）；動物細胞の培養（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７）；固定化細胞および酵素（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９８６）；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ，分子クローニングの指針（１９８４）；免疫学における方法（シリーズ）（Ｊ．Ａｂｅｌｓｏｎ ａｎｄ Ｍ．Ｓｉｍｏｎ編集長、学術出版株式会社、ニューヨーク州）、特に１５４巻および１５５巻（Ｗｕ等、編集者）および１８５巻、“遺伝子発現技術”（Ｄ．Ｇｏｅｄｄｅｌ編集者）；哺乳類細胞に関する遺伝子移入ベクター（Ｊ．Ｈ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ編集者、１９８７，コールドスプリングハーバー研究所）；細胞と分子生物学における免疫化学法（Ｍａｙｅｒ ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ、編集、学会出版物、ロンドン、１９８７）；実験免疫学の参考書、１～４巻（編集者Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ＆Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ、１９８６）；およびマウス胚子の処置（コールドスプリングハーバー研究所出版物、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、１９８６）を参照のこと。
【０１２０】
本発明の細菌

上記のように、本発明はＬ－セリンの生産が、Ｌ－セリンの分解に関与する酵素をコードする遺伝子、とりわけ遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡを例えば不活性化することによって増大できるという発見に特に基づいている。

【０１２１】

従って、本発明は、細菌、特に、Ｌ－セリンを生産する能力のある細菌を提供し、その際、前記細菌は、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰し、かつセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性されている。

【０１２２】

より詳しくは、本発明は遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの発現を減衰するように変性された細菌を提供する。

【０１２３】

遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧは、Ｌ－セリンデアミナーゼＩ（ＳｄａＡ）、Ｌ－セリンデアミナーゼＩＩ（ＳｄａＢ）およびＬ－セリンデアミナーゼＩＩＩ（ＴｄｃＧ）をそれぞれコード化し、これらはＬ－セリン分解の経路において１段階だけを行い、セリンを基本的な細胞構成ブロックであるピルベートに変換する３つの酵素である。例えば、大腸菌のｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において、それぞれ登録番号ＥＧ１０９３０、ＥＧ１１６２３およびＧ７６２４で入手可能である。ｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧの代表的なヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号１から３に記載されている。

【０１２４】

遺伝子ｇｌｙＡは、セリンをグリシンに変換するセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ（ＧｌｙＡ）をコード化し、メチル基をテトラヒドロ葉酸に変換し、従って５，１０－メチレン－テトラヒドロ葉酸（５，１０－ｍＴＨＦ）が形成される。５，１０－ｍＴＨＦは、細胞中のＣ１単位の主要原であり、プリン、チミジン、メチオニン、コリンおよび脂肪の生合成においてＧｌｙＡを重要な酵素にする。ｇｌｙＡに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０４０８で入手可能である。ｇｌｙＡの代表的なヌクレオチド配列は、配列番号４に記載されている。

【０１２５】

遺伝子の発現は、遺伝子の不活性化により減衰させてもよい。従って、本発明による細菌は、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を不活性化し、かつセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を不活性化するように変性されたものであってもよい。特定の実施態様によれば、遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡの発現は、これらの遺伝子の不活性化により減衰される。従って、本発明による細菌は、遺伝子ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡを不活性化するように変性したものであることができる。

【０１２６】

染色体上の遺伝子への突然変異の導入により、該遺伝子によりコードされたタンパク質の細胞内活性が非変性株と比べて減少するようにして遺伝子の発現を減少させることができる。遺伝子の発現の減衰を生じる突然変異には、遺伝子によりコードされたタンパク質中の１つのアミノ酸置換を引き起こす１つのヌクレオチドまたはそれより多くの交換（ミスセンス突然変異）、ストップコドンの導入（ノンセンス突然変異）、フレームシフトを引き起こすヌクレオチドの欠失または挿入、薬物耐性遺伝子の挿入、または遺伝子の一部または全遺伝子の欠失（Ｑｉｕ　ａｎｄ　Ｇｏｏｄｍａｎ，１９９７;Ｋｗｏｎ等、２０００）が含まれる。発現は、発現調節配列、例えばプロモーター、Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ（ＳＤ）配列などの変性により減衰することもできる（ＷＯ９５／３４６７２）。

【０１２７】

例えば、以下の方法を使用して遺伝子組換えによる突然変異を導入してもよい。減少した活性を有する突然変異体タンパク質をコードする突然変異体遺伝子を調製することもで

きる。従って、染色体上の在来遺伝子は、相同組換えにより突然変異体遺伝子と置き換えられ、かつ結果として生じる株を選択できる。相同組換えを使用する遺伝子置換は、線状ＤＮＡを用いることにより、これは“ラムダ・レッド媒介遺伝子交換（ｌａｍｂｄａ－ｒｅｄ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）”（Ｄａｔｓｅｎｋｏ ａｎｄ Ｗａｎｎｅｒ,２０００）として公知である、または温度感応性の複製原点を含むプラスミドを用いることにより実施できる（米国特許第６３０３３８３号、またはＪＰ０５－００７４９１Ａ）。更に、遺伝子置換による部位特異的突然変異は、宿主中で複製できないプラスミドを用いて、上記のような相同組換えを使用して挿入することもできる。

【０１２８】

トランスポゾンまたはＩＳファクターを遺伝子のコード領域に挿入することにより（米国特許第５１７５１０７号）、または通常の方法、例えば、ＵＶ照射またはニトロソグアニジン（Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン）を用いる突然変異により、部位特異的突然変異、相同組換えを使用する遺伝子崩壊および／または遺伝子交換（Ｙｕ等、２０００；ａｎｄ Ｄａｔｓｅｎｋｏ ａｎｄ Ｗａｎｎｅｒ，２０００）、例えば“ラムダ－レッド媒介遺伝子交換”により遺伝子の発現を減衰することもできる。ラムダ・レッド媒介遺伝子交換は、本明細書で記載した１つまたは複数の遺伝子を不活性化する方法に特に適切である。よって、具体的な実施態様によれば、遺伝子の発現は、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を使用する遺伝子の不活性化により減衰される。

【０１２９】

図３に示されているように、セリン分解に関与する４つ全ての遺伝子（ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡ）の不活性化は、セリンからピルベートへの経路を介するＬ－セリン分解に関与する３つの遺伝子（ｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧ）だけの不活性と比較して、グルコースから最上の比生産性および最も高い収率を生じる。

【０１３０】

セリンは、遺伝子ｓｅｒＡ（３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする）、ｓｅｒＢ（ホスホセリンホスファターゼをコードする）およびｓｅｒＣ（ホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードする）によりコードされる３つの酵素を使用してグリセルアルデヒド－３－ホスフェートから製造される。Ｌ－セリンの生産を増大するために、これらの遺伝子を過剰発現してもよい。例えば、大腸菌のｓｅｒＡ、ｓｅｒＢおよびｓｅｒＣに関連する情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において、それぞれＥＧ１０９４４、ＥＧ１０９４５およびＥＧ１０９４６の登録番号で入手可能である。

【０１３１】

従って、特定の実施態様によれば、細菌を変性し、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ、ホスホセリンホスファターゼおよびホスホセリンアミノトランスフェラーゼを過剰発現するようにした。より具体的には、細菌は遺伝子ｓｅｒＡ、ｓｅｒＢおよびｓｅｒＣを過剰発現するように更に変性されている。これは、細菌に１つまたは複数の（例えば、２個または３個）の外因性の核酸分子、例えば、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列、ホスホセリンホスファターゼをコードするヌクレオチド配列および／またはホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる１つまたは複数のベクターを挿入することにより達成してもよい。

【０１３２】

３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼは、これが過剰発現されている細菌と同じ種から誘導されているか、またはこれが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されていてもよい（すなわち、これは異種である）。特定の実施態様によれば、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼは、これが過剰発現されているものと同じ種から誘導されている。特定のその他の実施態様によれば、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼは、これが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されている（すなわち、これは異種である）。

【０１３３】
特定の実施態様によれば、細菌は３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性の核酸分子を含む。外因性の核酸分子は、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでもよい。外因性核酸分子は、配列番号５に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。

【０１３４】
外因性核酸分子は、配列番号５に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％、または少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。外因性の核酸分子は、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチドを含んでいてもよく、その際、約１個～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号５に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。

【０１３５】
３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする突然変異体ｓｅｒＡ遺伝子を過剰発現する更なる利点は、セリンのフィードバック阻害に対する耐性である。これは、例えば、野生型３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ（ＳｅｒＡ）の最後の４個のＣ末端残基の欠失により達成してもよい。二者択一的に、ＳｅｒＡのフィードバック阻害は、３個の残基Ｈ３４４、Ｎ３４６およびＮ３６４をアラニンにする突然変異により除去できる。このような３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ突然変異体の代表的なアミノ酸配列は、配列番号６に記載されている。従って、具体的な実施態様によれば、細菌は、セリンのフィードバック阻害に対して耐性である３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。外因性核酸分子は、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。外因性核酸分子は、配列番号６に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチド

のそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号６に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、例えば、少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、約１～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号６に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を有する。

【０１３６】

ホスホセリンホスファターゼは、これが過剰発現されている細菌と同じ種から誘導されているか、またはこれが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されていてもよい（すなわち、これは異種である）。特定の実施態様によれば、ホスホセリンホスファターゼは、これが過剰発現されているものと同じ種から誘導されている。特定の他の実施態様によれば、ホスホセリンホスファターゼは、これが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されている（すなわち、これは異種である）。

【０１３７】

特定の実施態様によれば、細菌はホスホセリンホスファターゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。外因性核酸分子は、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。外因性核酸分子は、配列番号７に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンホスファターゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似した３－ホスホセリンホスファターゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数個、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンホスフェート活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したホスホセリンホスファターゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、約１～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンホスファターゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号７に記載のアミノ酸配列を含んでいる

ポリペプチドのそれに類似したホスホセリンホスファターゼ活性を有する。

【０１３８】

ホスホセリンアミノトランスフェラーゼは、これが過剰発現されている細菌と同じ種から誘導されているか、またはこれが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されていてもよい（すなわち、これは異種である）。特定の実施態様によれば、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼは、これが過剰発現されている細菌と同じ種から誘導されている。特定の他の実施態様によれば、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼは、これが過剰発現されているものとは異なる種から誘導されていてもよい（すなわち、これは異種である）。

【０１３９】

特定の実施態様によれば、細菌はホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。外因性核酸分子は、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。外因性核酸分子は、配列番号８に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したホスホセリンアミノトランスフェラーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したホスホセリンアミノトランスフェラーゼ活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、約１～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したホスホセリンアミノトランスフェラーゼ性を有する。

【０１４０】

細菌、例えば、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように、かつヒドロキシメチルトランスフェラーゼを有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように（例えば、遺伝子の不活性化により）変性した大腸菌は、セリンに対して低い耐性を示す。従って、セリンに対して増大した耐性を示す細菌を提供するのが望ましい。

【０１４１】

これに関して、本発明者は、ランダム突然変異によりおよび適応進化により細菌を進化させることにより、新規エクスポーターの過剰発現により生成物の毒性を減少させることができることを見出した。結果として、セリンに対して増大した耐性を有する細菌が提供される。本明細書中で使用されているような“増大した耐性”とは、Ｌ－セリンを少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）で細菌が成長できることを意味する。

【０１４２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約１２．５ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）で成長できる。具体的な実施態様によれば、細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約

１２．５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約２５ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で成長できる。具体的な実施態様によれば、細菌はＬ－セリンを少なくとも約２５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約４０ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で成長できる。特別な実施態様によれば、細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約４０ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約５０ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で成長できる。具体的な実施態様によれば、細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約７５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約１００ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）で成長できる。特別な実施態様によれば、細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約１００ｇ／Ｌの濃度で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で成長できる。

【０１４３】

有利には、最小培地、例えばＭ９最小培地は、２ｍＭグリシンと２ｇ／Ｌグルコースが補充される。細菌は、一般的に約３７℃で約２４～約４０時間の間、十分な通気を使用して培養される。

【０１４４】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約１２．５ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）で、対数増殖の間に少なくとも約０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる。具体的な実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約１２．５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約２５ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で、対数増殖の間に少なくとも約０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる。具体的な実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約２５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約５０ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）中で、対数増殖の間に少なくとも約０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる。

【０１４５】

有利には、最小培地、例えば、Ｍ９最小培地には、２ｍＭグリシンと２ｇ／Ｌグルコースが補充される。細菌は、一般的に約３７℃で約２４～約４０時間の間、３７℃で十分な通気を使用して培養される。

【０１４６】

具体的な実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｌ－セリンを少なくとも約２５ｇ／Ｌの濃度（例えば、少なくとも約５０ｇ／Ｌ）で含んでいる最小培地（例えば、Ｍ９最小培地）で、対数増殖の間に少なくとも約０．１$hr^{-1}$の成長速度で成長できる。

【０１４７】

細菌中で過剰発現した場合に、セリンに対する耐性が改善された新規エクスポーターは、遺伝子ｙｄｅＤによりコードされるＯ－アセチルセリン／システインエクスポートタンパク質である。大腸菌のｙｄｅＤに関する更なる情報は、例えば、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ．ｂｉｏｃｙｃ．ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１１６３９で入手可能である。このようなエクスポータータンパク質の代表的なアミノ酸配列は、配列番号９に記載されている。従って、本発明は遺伝子ｙｄｅＤを過剰発現するように変性した細菌を提供する。

【０１４８】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、遺伝子ｙｄｅＤのタンパク質産生物をコードするヌクレオチド配列を含んでいる発現ベクターのような外因性核酸分子を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。

【０１４９】

外因性核酸分子は、配列番号９に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドはＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より

有利には、ポリペプチドは、配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号９に記載のアミノ酸配列に約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは、Ｏ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドはＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、約１～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、Ｏ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号９に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。

【０１５０】

Ｃ末端に６個のヒスチジン残基の更なる伸長を含んでいる変性ＹｄｅＤポリペプチドは、配列番号１０に記載されている。具体的な実施態様によれば、細菌は、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。外因性核酸分子は、配列番号１０に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは、Ｏ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号１０に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。有利には、ポリペプチドは、Ｏ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドはＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。外因性核酸分子は、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペ

プチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよく、その際、約１～約５個、例えば約１～約３個のアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。有利には、ポリペプチドは、Ｏ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。より有利には、ポリペプチドは配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドのそれに類似したＯ－アセチルセリンおよび／またはシステイントランスポーター活性を有する。

【０１５１】

図４に示されているように、主要なセリン分解経路が欠如している大腸菌のような細菌の成長は、低濃度のセリンの存在でさえも、著しく成長を阻害する。ｙｄｅＤの過剰発現において、セリンに対する耐性も実質的に増大したので、ＹｄｅＤが細胞からセリンを輸送している可能性を示唆している。

【０１５２】

セリンに対する改善された耐性を有する本発明の細菌、例えば上記のように少なくとも約６．２５ｇ／Ｌの濃度でＬ－セリンを含んでいる最小培地中で成長可能なものは、ランダム突然変異によりまたは適応進化により得ることができる。各々の詳細は、それぞれ例４と５に提供されている。

【０１５３】

例えば、以下の方法の実施により適応進化を達成してもよい：実験の開始前に、適切なチューブを培地２５ｍｌで満たし、これをヒートブロック中、３７℃で保持する。制御された通気は、チューブ内に設置され、１８００ｒｐｍで回転する磁気タンブル撹拌機を使用して得られた。実験の開始時に、チューブのうち１つの中で、（出発株）の単一コロニーが一晩で成長し、かつ１００μＬアリコートを使用して、新たな培地２５ｍｌを含有しているチューブに播種した。細菌が成長するにつれて、６００ｎｍで複数のＯＤ測定を行った。ＯＤ測定値の対数にフィットする最小二乗線形回帰線の傾きを取ることにより成長速度を計算した。標的のＯＤが０．４に達し次第、培地１００μｌを使用して、培地２５ｍｌ含有の新たなチューブに播種した。このように、静止期に決して到達しないような標的細胞密度に達した後に、培養物を連続して（１日に２～３回）新たな培地含有のチューブに通した。実験は、３ｇＬ－セリンのＬ－セリン濃度で開始し、続いて所望の成長速度に達した後に、Ｌ－セリン６ｇ／Ｌに増大させた。一旦、集団が安定な表現型（すなわち、成長速度）に達成すると、Ｌ－セリンの濃度を１２ｇ／Ｌに増大させた。このプロセスをＬ－セリン２４、５０、７５および１００ｇ／Ｌを使用して反復して繰り返した。次に、更なる培養のために最後の集団をＬＢ－アガール上にプレーティングし、かつＬ－セリン耐性株を選択してもよい。先行方法は、それらの成長速度をモニタリングしながら数日にわたりマニュアル的にまたは進化する集団の繁殖を可能にする自動化システムを使用して行ってもよい。

【０１５４】

本明細書中での更なる実証として、本発明者は、Ｌ－セリンに対する耐性を確信する多くの遺伝子で有益な突然変異を同定した。各々の遺伝子と突然変異は、表Ｓ５に記載されている。

【０１５５】

このような遺伝子の１つは、アスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）をコードするｔｈｒＡである。例えば大腸菌のｔｈｒＡに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０９９８で入手可能である。野生型アスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）の代表的なアミノ酸配列は、配列１１に記載されている。例６と１０の実証として、アスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列に特定の突然変異を挿入する結果、セリンに対する耐性において極めて著しい増大を生じた（図７と１１）。特に、以下の突然変異は、利点があることが示された：Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒ。

【０１５６】

特定の実施態様によれば、本発明はＬ－セリンにより阻害されていないアスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）突然変異体を発現する細菌を提供する。

【０１５７】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、Ｌ－セリンに対する耐性が増大した１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、ｔｈｒＡ遺伝子内に、Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９から成る群から選択される位置でコードされたポリペプチド中に１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌が提供される。従って、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９から成る群から選択される位置で、１つまたは複数のアミノ酸置換を有するアスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）を発現してもよい。より具体的には、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９から成る群から選択される位置で、１つまたは複数のアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現してもよい。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は非保存的置換である。

【０１５８】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６の位置でアミノ酸置換を含む。具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。より具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０１５９】

その他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０１６０】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｃ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｃ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｔ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｔ置換を含む。

【０１６１】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｖ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｖ置換を含む。特定の実施態様によれば、ｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｓ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｓ置換を含む。

【０１６２】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｗ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｗ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｇ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｇ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｎ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｎ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｄ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｄ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｅ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｅ置換を含む。

【０１６３】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｆ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｆ置換を含む。

【０１６４】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ａ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｉ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ａ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｉ置換を含む。

【０１６５】

特定の実施態様によれば、細菌ｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｐ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｐ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｈ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｈ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｒ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｒ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｌ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｌ置換を含む。

【０１６６】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチド

を発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７の位置でアミノ酸置換を含む。具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。その他の具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７ＦおよびＳ３５７Ｈから成る群から選択される。より具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７ＮおよびＳ３５７Ｆから成る群から選択される。他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５７ＡとＳ３５７Ｆから成る群から選択される。

【０１６７】

特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｒ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｒ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｖ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｖ置換を含む。

【０１６８】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｐ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｐ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｇ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｇ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｌ置換を生じるｔｈｒＡ遺伝子内に１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｌ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｙ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｙ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ａ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ａ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｎ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｎ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｆ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｆ置換を含む。

【０１６９】

特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｈ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｈ置換を含む。

【０１７０】

特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｋ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌

は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｋ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｉ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｉ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｍ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｍ置換を含む。

【０１７１】

特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む。具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換はＳ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。他の具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。より具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換はＳ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。その他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。その他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９ＡおよびＳ３５９Ｅから成る群から選択される。その他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９ＴおよびＳ３５９Ａから成る群から選択される。その他のより具体的な実施態様によれば、アミノ酸置換は、Ｓ３５９ＲとＳ３５９Ａから成る群から選択される。

【０１７２】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｒ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｒ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｇ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｇ置換を含む。

【０１７３】

特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｍ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｍ置換を含む。特定の実施態様によれば、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｆ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｆ置換を含む。

【０１７４】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｔ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｔ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子

内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｐ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｐ置換を含む。

【０１７５】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｖ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｖ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｑ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｑ置換を含む。

【０１７６】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ａ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ａ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｃ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｃ置換を含む。

【０１７７】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｋ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｋ置換を含む。

【０１７８】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｅ置換を生じる。１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｅ置換を含む。

【０１７９】

特定の実施態様によれば、細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｌ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｌ置換を含む。

【０１８０】

特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換および／またはコードされたポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；

Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；および

Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８１】
特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換および／またはコードされたポリペプチド中Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６Ｒ、Ｙ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０１８２】
特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換および／またはコードされたポリペプチド中Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６ＨおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８３】
特定の実施態様によれば、本発明は、コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および／またはコードされたポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む細菌を提供する；その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８４】
特定の実施態様によれば、本発明は、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換およびコードされたポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６ＨおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８５】
特定の実施態様によれば、本発明はコードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換およびコードされたポリペプチド中

のＳ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０１８６】

特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換およびコードされたポリペプチド中Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む細菌を提供する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６ＦおよびＹ３５６Ａから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８７】

特定の実施態様によれば、本発明はｔｈｒＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、およびコードされたポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチドの置換を含む細菌を提供する；その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８８】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１８９】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６および／またはＳ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０１９０】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１９１】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１９２】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０１９３】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１９４】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０１９５】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６とＳ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６ＦおよびＹ３５６Ａから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０１９６】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６とＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６ＥおよびＹ３５６Ｆおよび Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。
【０１９７】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７およびＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。
【０１９８】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。
【０１９９】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがシステインに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがトレオニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがバリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがセリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがトリプトファンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがグルタミンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがグリシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがアスパラギンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。
【０２００】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがアスパラギン酸に置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがグルタミン酸に置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがフェニルアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがイソロイシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがプロリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがヒスチジンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５６の位置でチロシンがロイシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０１】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがバリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがプロリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがグリシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがロイシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがチロシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがアスパラギンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがフェニルアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがヒスチジンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０３】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがリジンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがイソロイシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５７の位置でセリンがメチオニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０４】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがグリシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様に

よれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがメチオニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがフェニルアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがトレオニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがプロリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがバリンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０５】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがグルタミンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがアラニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがシステインに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがリジンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがグルタミン酸に置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、３５９の位置でセリンがロイシンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２０６】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２０７】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６および／またはＳ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７ＫおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０２０８】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２０９】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２１０】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０２１１】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０２１２】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２１３】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６の位置でアミノ酸置換を含む配列

番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９３％、例えば少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０２１４】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９３％、例えば少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０２１５】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９３％、例えば少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２１６】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される。

【０２１７】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０２１８】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９５％、例えば少なくとも９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２１９】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例え

ば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２２０】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６とＳ３５７の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される。

【０２２１】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６とＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６Ｒ、Ｙ３５６Ｌから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２２２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｓ３５７とＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２２３】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択され；その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個の更なるアミノ酸残基は、置換、欠および／または挿入されている。

【０２２４】

細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現してもよく、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される；その際、約１～約５個、例えば約１～約３個の更なるアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。

【０２２５】

特定の実施態様によれば、本発明は、コードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む細菌を提供する。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドは、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個または３個の）アミノ酸置換を含んでいる。特定の実施態様によれば、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子内に、１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、結果として、コードされたポリペプチド中にＹ３５６ＣとＳ３５７Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を生じる細菌を提供する。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドは、コードされたポリペプチド中にＹ３５６ＣとＳ３５７Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を含む。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、コードされたポリペプチド中にＹ３５６ＣとＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡによりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドは、コードされたポリペプチド中にＹ３５６ＣとＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を含む。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、コードされたポリペプチド中にＳ３５７ＲとＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドは

、コードされたポリペプチド中にＳ３５７ＲとＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数の（例えば２個の）アミノ酸置換を含む。

【０２２６】

特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＹ３５６Ｃ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＹ３５６Ｃ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はコードされたポリペプチド中にＳ３５７Ｒ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌はｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５７Ｒ置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、コードされたポリペプチド中にＳ３５９Ｒ置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む。従って、本発明の細菌は、ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現してもよく、その際、前記ポリペプチドはＳ３５９Ｒ置換を含む。

【０２２７】

よって、本発明の細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を有するアスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）を発現してもよい。より具体的には、本発明の細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現してもよい。

【０２２８】

特定の実施態様によれば、細菌は３５６の位置でチロシンがシステインに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、細菌は３５７の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。特定の実施態様によれば、細菌は３５９の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２２９】

特定の実施態様によれば、細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３０】

特定の実施態様によれば、細菌は、３５６の位置でチロシンがシステインに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３１】

具体的な実施態様によれば、細菌は、３５６の位置でチロシンがシステインに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、例えば、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３２】

特定の実施態様によれば、細菌は、３５７の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現す

る。具体的な実施態様によれば、細菌は、３５７の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３３】

特定の実施態様によれば、細菌は、３５９の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３４】

具体的な実施態様によれば、細菌は、３５９の位置でセリンがアルギニンに置換されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０２３５】

特定の実施態様によれば、細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現し、その際、１つまたは複数の、例えば、約１～約５０個、約１～約４０個、約１～約３５個、約１～約３０個、約１～約２５個、約１～約２０個、約１～約１５個、約１～約１０個、約１～約５個、または約１～約３個の更なるアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている。細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択される１つまたは複数のアミノ酸置換を含み、その際、約１～約５個、または約１～約３個の更なるアミノ酸残基は、置換、欠失および／または挿入されている配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現してもよい。

【０２３６】

上記のＴｈｒＡポリペプチド突然変異体は、細菌に導入しておいた発現ベクターのような外因性核酸分子を用いて細菌により（過剰）発現されていてもよい。従って、特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、上記のようなアスパラギン酸キナーゼＩ／ホモセリンデヒドロゲナーゼＩ（ＴｈｒＡ）ポリペプチド突然変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。

【０２３７】

例えば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子、例えば発現ベクターを含んでいてもよい。従って、特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６ＨおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択され；Ｓ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９ＫおよびＳ３５９Ｅ、およびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２３８】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５

９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、例えば、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２３９】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２４０】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含む。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる外因性核酸分子を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６

Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２４１】

これに関連して、更に本発明は、上記のようなＴｈｒＡ突然変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでいる発現ベクターのような（単離）核酸分子を提供する。このような核酸を本発明の細菌に導入してもよい。特定の実施態様によれば、核酸分子は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【０２４２】

特定の実施態様によれば、核酸分子は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列に、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。特定の実施態様によれば、核酸分子は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでいる。特定の実施態様によれば、核酸分子は、Ｙ３５６、Ｓ３５７および／またはＳ３５９の位置でアミノ酸置換を含む配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、その際、Ｙ３５６の位置での置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；Ｓ３５７の位置での置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；およびＳ３５９の位置での置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される。

【０２４３】

（単離）核酸分子は、先に詳説したような外因性核酸であってもよい。（単離）核酸分子は、細菌細胞中で機能し、ｍＲＮＡ分子の生産を引き起こすプロモーターのような適切な調節エレメントを含んでいてもよく、かつこれは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作用的に連結している。適切な調節エレメントにおける更なる詳細は、“外因性”核酸分子に関して以下に提供され、かつ必要な変更を加えて適用される。

【０２４４】
本発明は、Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のＩｒｐに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０５４７で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｉｒｐ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中、１４３の位置でＤがＧに置換されている。Ｉｒｐ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１２に記載されている。具体的な実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１２に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１４３の位置でＤはＧに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２４５】
特定の実施態様によれば、本発明は、Ｉｒｐ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数の置換を含む細菌を提供する。より具体的には、Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中、Ｄ１４３の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１２に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１４３の位置でＤは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２４６】
また本発明は、ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌に関する情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０８４５で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌はｒｈｏ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中８７の位置でＲはＬに置換されている。

【０２４７】
ｒｈｏ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１３に記載されている。適切な実施態様によれば、本発明の細菌は配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１３に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中、８７の位置でＲはＬに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２４８】
特定の実施態様によれば、本発明は、ｒｈｏ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中、Ｒ８７の位置中にアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌が提供される。具体的な実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１３に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は８７の位置でＲは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２４９】
また本発明は、ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌に関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０２５８で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｅｎｏ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中１６４の位置でＶはＬに置換されている。ｅｎｏ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１４に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１４に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１４に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１６４の位置でＶはＬに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２５０】
特定の実施態様によれば、本発明は、ｅｎｏ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中、Ｖ１６４の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｅｎｏ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１４に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１４に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１６４の位置でＶは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２５１】
また本発明は、ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のａｒｇＰに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０４９０で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ａｒｇＰ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中１３２の位置でＱはＫに置換されている。ａｒｇＰ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１５に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１５に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１５に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１３２の位置でＱはＫに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２５２】
特定の実施態様によれば、本発明は、ａｒｇＰ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中のＱ１３２の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をａｒｇＰ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１５に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１５に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１３２の位置でＱは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２５３】
また本発明は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｇ１９Ｖを生じる１つまた

は複数のヌクレオチド置換をｔｕｆＡ遺伝子内に含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｔｕｆＡに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１１０３６で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｔｕｆＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中１９の位置でＧはＶに置換されている。ｔｕｆＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１６に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１６に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１９の位置でＧはＶに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２５４】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｔｕｆＡ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中、Ｇ１９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｕｆＡ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１６に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチド（その際、前記アミノ酸配列は１９の位置でＧは他のアミノ酸に置換されている）を発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２５５】

また本発明は、ｃｙｃＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｉ２２０Ｖを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｃｙｃＡに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１２５０４で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｃｙｃＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中２２０の位置でＩはＶに置換されている。ｃｙｃＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１７に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１７に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１７に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチド（その際、前記アミノ酸配列は２２０の位置でＩはＶに置換されている）を発現する。

【０２５６】

特定の実施態様によれば、本発明はｃｙｃＡ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中のＩ２２０の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｃｙｃＡ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１７に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は２２０の位置でＩは他のアミノ酸に置換されている）を有するポリペプチド、または配列番号１７に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２５７】

また本発明は、ｒｐｅ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｉ２０２Ｔを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｒｐｅに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において

登録番号Ｍ００４で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｒｐｅ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中２０２の位置でＩはＴに置換されている。ｒｐｅ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１８に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１８に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は２０２の位置でＩはＴに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２５８】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｒｐｅ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中の２０２Ｉの位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｒｐｅ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１８に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は２０２の位置でＩは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２５９】

また本発明は、ｙｏｊｌ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｄ３３４Ｈを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｙｏｊｌに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１２０７０で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｙｏｊｌ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中３３４の位置でＤはＨに置換されている。ｙｏｊｌ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号１９に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１９に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は３３４の位置でＤはＨに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２６０】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｙｏｊｌ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中のＤ３３４の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｙｏｊｌ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号１９に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は３３４の位置でＤは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２６１】

また本発明は、ｈｙａＦ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１２０Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｈｙａＦに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０４７３で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｈｙａＦ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチ

ド中１２０の位置でＶはＧに置換されている。ｈｙａＦ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２０に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２０に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１２０の位置でＶはＧに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２６２】

特定の実施態様によれば、本発明は、ｈｙａＦ遺伝子内にＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中のＶ１２０の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｈｙａＦ遺伝子内に含む細菌が提供される。

【０２６３】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２０に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は１２０の位置でＶは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２６４】

また本発明は、ｐｙｋＦ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｅ２５０＊（ここで、＊はストップコドンを示す）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。二者択一的に、ｐｙｋＦ遺伝子は、コードされたポリペプチドの終了を生じる位置２５０の上流の位置で１つまたは複数のヌクレオチド置換を含んでもよい。例えば、大腸菌のｐｙｋＦに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０８０４で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｐｙｋＦ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは位置２４９の後ろで、またはその上流の任意の位置で終了する。ｐｙｋＦ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２１に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２２に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２６５】

その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性させてｐｙｋＦ遺伝子の発現を減衰する（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０２６６】

また本発明は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｑ４２０＊（ここで、＊はストップコドンを示す）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｍａｌＴ遺伝子内に含む細菌を提供する。二者択一的に、コードされたポリペプチドの位置４２０の上流の位置で終了を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｍａｌＴ遺伝子に含んでもよい。例えば、大腸菌のｍａｌＴに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０５６２で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｍａｌＴ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは位置４１９の後ろで、またはその上流の任意の位置で終了する。ｍａｌＴ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２３

に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２４に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２４に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２６７】

その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性させてｍａｌＴ遺伝子の発現を減衰する（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、ここで上記のように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０２６８】

また本発明は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｐ５２０Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｒｐｏＢ遺伝子内に含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｒｐｏＢに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０８９４で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｒｐｏＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中で５２０の位置でＰはＬにより置換されている。ｒｐｏＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２５に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２５に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２５に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中の位置５２０でＰはＬに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２６９】

特定の実施態様によれば、本発明はＬ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｒｐｏＢ遺伝子内に含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中にＰ５２０の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｒｐｏＢ遺伝子内に含む細菌が提供される。

【０２７０】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２５に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２５に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は位置５２０でＰは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２７１】

また本発明は、コードされたポリペプチド中のアミノ酸置換Ｔ２１８Ｐを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｆｕｍＢ遺伝子内に含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｆｕｍＢに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０３５７で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｆｕｍＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中、２１８の位置でＴはＰに置換されている。ｆｕｍＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２６に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２６に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中、２１８の位置でＴはＰに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２７２】
特定の実施態様によれば、本発明はｆｕｍＢ遺伝子内に、Ｌ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌を提供する。より具体的には、ｆｕｍＢ遺伝子内にコードされたポリペプチド中にＴ２１８の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２６に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列は２１８の位置でＴはＰに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２７３】
また本発明は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ａ１７８Ｖを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｇｓｈＡ遺伝子内に含む細菌を提供する。例えば、大腸菌のｇｓｈＡに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０４１８で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｇｓｈＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中、位置１７８でＡはＶに置換されている。ｇｓｈＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２７に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２７に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中、１７８の位置でＡはＶに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２７４】
特定の実施態様によれば、本発明は、Ｌ－セリンに対する耐性を増大する１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数の置換をｇｓｈＡ遺伝子内に含む細菌を提供する。より具体的には、コードされたポリペプチド中のＡ１７８の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｇｓｈＡ遺伝子内に含む細菌が提供される。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２７に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中、１７８の位置でＡは他のアミノ酸に置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。有利には、１つまたは複数のアミノ酸置換は、非保存的置換である。

【０２７５】
また本発明は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｑ１１２＊（ここで、＊はストップコドンを示す）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｌａｍＢ遺伝子内に含む細菌を提供する。二者択一的にｌａｍＢ遺伝子は、位置１１２の上流の位置でコードされたポリペプチドの終了を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含んでもよい。例えば、大腸菌のｌａｍＢに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１０５２８で入手可能である。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｌａｍＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは１１１の位置の後で、またはその上流の任意の位置で終了する。ｌａｍＢ遺伝子によりコードされたポリペプチドの代表的なアミノ酸配列は、配列番号２８に記載されている。特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、配列番号２９に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号２９に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【０２７６】
その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性させてｌａｍＢ遺伝子の発現を減衰させる（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。
【０２７７】
本発明の細菌は、１つまたは複数の、例えば２個またはそれより多くの、３個またはそれより多くの、４個またはそれより多くの、または５個またはそれより多くの上記のような遺伝子突然変異を含んでいてもよい。
【０２７８】
例えば、細菌は、次のものから成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれ以上）の遺伝子突然変異を含んでいてもよい：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｄ１４３の位置でのアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｒ８７の位置でのアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｖ１６４の位置でのアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｖ１６４の位置でのアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換。
【０２７９】
例えば、細菌は、次のものから成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれより多く）の遺伝子突然変異を含んでいてもよい：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中アミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換。
【０２８０】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌はコードされたポリペプチド中のＹ３５６の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含み、前記置換は、Ｙ３５６Ｃ、Ｙ３５６Ｔ、Ｙ３５６Ｖ、Ｙ３５６Ｓ、Ｙ３５６Ｗ、Ｙ３５６Ｑ、Ｙ３５６Ｇ、Ｙ３５６Ｎ、Ｙ３５６Ｄ、Ｙ３５６Ｅ、Ｙ３５６Ｆ、Ｙ３５６Ａ、Ｙ３５６Ｉ、Ｙ３５６Ｐ、Ｙ３５６Ｈ、Ｙ３５６ＲおよびＹ３５６Ｌから成る群から選択され；コードされたポリペプチド中のＳ３５７の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、前記置換は、Ｓ３５７Ｒ、Ｓ３５７Ｖ、Ｓ３５７Ｐ、Ｓ３５７Ｇ、Ｓ３５７Ｌ、Ｓ３５７Ｙ、Ｓ３５７Ａ、Ｓ３５７Ｎ、Ｓ３５７Ｆ、Ｓ３５７Ｈ、Ｓ３５７Ｋ、Ｓ３５７ＩおよびＳ３５７Ｍから成る群から選択される；および／またはコードされたポリペプチド中のＳ３５９の位置でアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換を含み、前記置換は、Ｓ３５９Ｒ、Ｓ３５９Ｇ、Ｓ３５９Ｍ、Ｓ３５９Ｆ、Ｓ３５９Ｔ、Ｓ３５９Ｐ、Ｓ３５９Ｖ、Ｓ３５９Ｑ、Ｓ３５９Ａ、Ｓ３５９Ｃ、Ｓ３５９Ｋ、Ｓ３５９ＥおよびＳ３５９Ｌから成る群から選択される；ならびに次のもの：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｄ１４３の位置でのアミノ酸置換（例えばＤ１４３Ｇ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中Ｒ８７の位置でのアミノ酸置換（例えばＲ８７Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＶ１６４の位置でのアミノ酸置換（例

えばＶ１６４Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中のＶ１６４の位置でのアミノ酸置換（例えばＶ１６４Ｌ）を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換
から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれ以上）の遺伝子突然変異を含む。

【０２８１】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲおよびＳ３５９Ｒから成る群から選択されるコードされたポリペプチド中に１つまたは複数のアミノ酸置換を生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む；ならびに次のもの：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、または
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
から成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれより多く）の遺伝子突然変異を含む。

【０２８２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｙ３５６Ｃを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ内に含み；ならびに次のもの：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換
から成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれより多く）の遺伝子突然変異を含む。

【０２８３】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｓ３５７Ｒを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む；および次のもの：
Ｉｒｐ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
から成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれより多く）の遺伝子突然変異を含む。

【０２８４】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｓ３５９Ｒを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換をｔｈｒＡ遺伝子内に含む；お

よび次のもの：
ＩｒｐＡ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｄ１４３Ｇを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｒｈｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｒ８７Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
ｅｎｏ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、および
ａｒｇＰ遺伝子内に、コードされたポリペプチド中にアミノ酸置換Ｖ１６４Ｌを生じる１つまたは複数のヌクレオチド置換、
から成る群から選択される１つまたは複数（例えば２個またはそれより多く）の遺伝子突然変異を含む。

【０２８５】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌はそのゲノム内にｒｈｔＡ遺伝子の最初の５塩基対の欠失、遺伝子ｏｍｐＸとｙｂｉＰの完全な欠失、２３９塩基対のｓＲＮＡ　ｒｙｂＡの欠失および７７塩基対の遺伝子ｍｎｔＳの欠失を含む。特定の実施態様によれば、細菌はそのゲノム内に、ゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中、８５００９２の位置に相応する位置から約２８５４塩基対の欠失を含む。この欠失は、遺伝子ｒｈｔＡ遺伝子の最初の５塩基対の欠失、遺伝子ｏｍｐＸとｙｂｉＰの完全な欠失、２３９塩基対のｓＲＮＡ　ｒｙｂＡの欠失および７７塩基対の遺伝子ｍｎｔＳの欠失を生じる。このような欠失は、ラムダ・レッドまたはｃａｍ－ｓａｃＢ－系の使用により達成できる。

【０２８６】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、そのゲノム内で遺伝子ｔｒｘＡとｒｈｏの間の遺伝子間領域に、挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置３９６６１７４に相応する位置で、ラギング鎖中に挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を有する。具体的な実施態様によれば、細菌は更に、挿入配列の約９塩基上流と下流で重複を含む。

【０２８７】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、そのゲノム内で遺伝子ｇｃｖＡとｙｇｄｌの間の遺伝子間領域に１塩基対の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列中ＮＣ＿０００９１３中の位置２９４２６２９に相応する位置で、１塩基対の挿入を含む。

【０２８８】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、そのゲノム内で遺伝子ｇｃｖＡとｙｇｄｌの間の遺伝子間領域に、挿入配列エレメントＩＳ４（例えば、約１３４２塩基対の長さを有する）の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列中ＮＣ＿０００９１３中の位置２９４２８７８に相応する位置で、挿入配列エレメントＩＳ４（例えば、約１３４２塩基対の長さを有する）の挿入を含む。具体的な実施態様によれば、細菌は更に、挿入配列の約１３塩基対上流と下流で重複を含む。

【０２８９】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、そのゲノム内で遺伝子ｄａｐＡとｇｃｖＲの間の遺伝子間領域に１塩基対の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置２５９９８５４に相応する位置で、１塩基対の挿入を含む。

【０２９０】
特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、そのゲノム内に遺伝子ｆｒｃのトランケーションにつながる挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置２４９２３２３に相応する位置で、ラギング鎖中に挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を含む。具体的な実施態様によ

れば、細菌は更に、挿入配列の９塩基対上流と下流で重複を含む。

【０２９１】

その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性させてｆｒｃ遺伝子の発現を減衰する（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０２９２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌はそのゲノム内に遺伝子ａｒｏＰの大半の欠失につながる挿入配列エレメントＩＳ５（例えば、約１１９５塩基対の長さを有する）の挿入を含む。特定の実施態様によれば、細菌は、そのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置１２１５１８に相応する位置で、挿入配列エレメントＩＳ５（例えば、約１１９５塩基対の長さを有する）の挿入を含む。具体的な実施態様によれば、細菌は更に、挿入配列の４塩基対上流と下流で重複を含む。

【０２９３】

その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性させてａｒｏＰ遺伝子の発現を減衰した（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０２９４】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌はそのゲノム内に遺伝子ｍｄｔＪとｔｑｓＡの間の遺伝子間領域に、挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を含む。

【０２９５】

特定の実施態様によれば、細菌はそのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置１６７３６７０に相応する位置で、ラギング鎖中に挿入配列エレメントＩＳ１（例えば、約７６８塩基対の長さを有する）の挿入を含む。具体的な実施態様によれば、細菌は更に、挿入配列の９塩基対上流と下流で重複を含む。

【０２９６】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌はそのゲノム内に、遺伝子ｔｒｘＢとＩｒｐの間の遺伝子間領域にＣ→Ｔ置換のようなヌクレオチド置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はそのゲノム内にゲノム配列ＮＣ＿０００９１３中の位置９２３３２１に相応する位置で、Ｃ→Ｔ置換のようなヌクレオチド置換を含む。このような突然変異は、ｔｒｘＢの２７１塩基対上流と、Ｉｒｐの２７４塩基対上流である。

【０２９７】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌はそのゲノム内に、遺伝子ｙｆｔＢとｆｋｌＢの間の遺伝子間領域に、Ｔ→Ｃ置換のようなヌクレオチド置換を含む。特定の実施態様によれば、細菌はそのゲノム内に、ゲノム配列中ＮＣ＿０００９１３中の位置４４２８８７１に相応する位置で、Ｔ→Ｃ置換のようなヌクレオチド置換を含む。このような突然変異は、ｙｆｔＢの１５４塩基対上流とｆｋｌＢの６４塩基対上流である。

【０２９８】

本明細書中での更なる実証として（例えば、遺伝子の不活性化により）、リバースエンジニアリングした株においてグルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現の減衰（例えば、遺伝子の不活性化による）は、表Ｓ９（例８）に示されているように、グルコースからＬ－セリンの著しく増大した生産および収率を生じた。

【０２９９】

従って、特定の実施態様によれば、本発明の細菌を変性させて、グルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰した。より具体的には、本発明は遺伝子ｚｗｆの発現を減衰するように変性させておいた細菌を提供する。例えば、大腸菌のｚｗｆに関する更なる情報は、Ｅｃ

ｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１１２２１で入手可能である。ｚｗｆの代表的なヌクレオチド配列は、配列番号３０に記載されている。

【０３００】

遺伝子発現は、遺伝子の不活性化により減衰されてもよい。従って、本発明による細菌は、グルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を変性し不活性化したものであることができる（例えば、遺伝子の不活性化により）。

【０３０１】

遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０３０２】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌は、ｂｒｎＱ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは３０８の位置の後またはその上流の任意の位置で終了する。その他の特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性しｂｒｎＱ遺伝子の発現を減衰させた（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現の減衰およびより具体的には不活性化は、本明細書中で先に説明したように達成できる。例えば、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換を遺伝子発現の不活性化に使用してもよい。

【０３０３】

特定の実施態様によれば、本発明の細菌を更に変性してグルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰させた；ｔｈｒＡ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中３５７の位置でセリンはアルギニンに置換されている；ｒｈｏ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチド中８７の位置でＲはＬに置換されている；およびｂｒｎＱ遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現し、その際、前記ポリペプチドは３０８の位置の後ろで、またはその上流の任意の位置で終了する。二者択一的に、細菌を変性してｂｒｎＱ遺伝子の発現を減衰してもよい（例えば、遺伝子の不活性化により）。遺伝子発現を減衰する適切な方法は、先に説明してある。

【０３０４】

例えば、大腸菌のｂｒｎＱに関する更なる情報は、ＥｃｏＣｙｃ（ｗｗｗ.ｂｉｏｃｙｃ.ｏｒｇ）において登録番号ＥＧ１２１６８で入手可能である。ｂｒｎＱの代表的なアミノ酸配列は、配列番号３１に記載されている。

【０３０５】

具体的な実施態様によれば、細菌を更に変性して遺伝子ｚｗｆの発現を減衰させた（例えば、遺伝子の不活性化により）；配列番号１１に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１１に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中３５７の位置でセリンはアルギニンに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；

配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１３に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中８７の位置でＲはＬに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；および配列番号３２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号３２に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０３０６】

具体的な実施態様によれば、細菌を更に変性して遺伝子ｚｗｆとｂｒｎＱの発現を減衰させる（例えば、遺伝子の不活性化により）；および配列番号１１に記載のアミノ酸配列（その際、前記アミノ酸配列中３５７の位置でセリンはアルギニンに置換されている）を有するポリペプチドまたは配列番号１１に記載のアミノ酸配列に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する；配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号１３に記載のアミノ酸配列（前記アミノ酸配列中８７の位置でＲはＬに置換されている）に少なくとも約９０％、少なくとも約９３％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現する。

【０３０７】

先に詳説した通りに、本発明の細菌を変性して本明細書中で詳説したような特定のポリペプチドを過剰発現させるようにしてもよい。これは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む外因性核酸分子、例えば、ＤＮＡ分子を細菌に導入することを意味する。外因性核酸分子、例えば、ＤＮＡ分子を細菌細胞に導入する技術は、当業者に周知であり、かつとりわけ形質転換（例えば、ヒートショックまたは自然形質転換）を含む。

【０３０８】

細菌内でのポリペプチドの過剰発現を促進するために、外因性核酸分子は、適切な調節エレメント、例えば、プロモーターを含んでいてもよく、これは細菌細胞中で機能し、ｍＲＮＡの生産を引き起こし、かつこれは前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に作動的に連結する。

【０３０９】

本発明に従って有用なプロモーターは、ｍＲＮＡ分子の生産を引き起こす所定の宿主細胞中で機能する任意の公知のプロモーターである。このような多くのプロモーターは、当業者に公知である。このようなプロモーターには、通常は他の遺伝子と関連するプロモーターおよび／または細菌から単離されたプロモーターが含まれる。タンパク質発現用のプロモーターの使用は、分子生物学の専門家には一般的に公知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ等；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ: Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ, Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ,Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｎ.Ｙ.１９８９を参照のこと）。使用されるプロモーターは、誘発的であってよく、例えば、温度誘発性プロモーターであってよい（例えば、ｐＬまたはｐＲファージλプロモーター、それぞれは温度に敏感なλリプレッサーｃ１８５７により制御することができる）。

【０３１０】

プロモーターに関連して使用される“誘発性”という用語は、刺激が存在する場合に、例えば、温度変化または化学物質の存在で（“ケミカルインデューサー”）、プロモーターが作動的に連結したヌクレオチド配列の転写だけを導くことを意味する。ここで使用されているように、本発明による“化学的誘発”は、宿主細胞への外因性もしくは内因性物質（マクロ分子、例えば、タンパク質または核酸を含む）の物理的適用を意味する。これは、宿主細胞中に存在する標的プロモーターに、転写率を上げさせる効果を有する。二者択一的に、使用されるプロモーターは構成的であってよい。プロモーターに関連して使用される“構成的”という用語は、刺激（例えば、ヒートショック、化学物質など）が無くても作動的に連結したヌクレオチド配列の転写を導くことができることを意味する。

【０３１１】

温度誘発系は、例えば、熱感受性のリプレッサーにより抑制されるプロモーターの使用によりはたらく。これらのリプレッサーはより低温で、例えば３０℃で活性である。一方で、３７℃では正しくフォールドできないので不活性である。従って、このような回路は、関心のある遺伝子を直接制御するために使用できる（Ｓｔ－Ｐｉｅｒｒｅ等、２０１３）、またリプレッサーと一緒に遺伝子のゲノム挿入により使用できる。このような温度誘

発性発現系の例は、熱感受性Ｃ１８５７リプレッサーにより制御されるＰＬおよび／またはｐＲλファージプロモーターに基づいている。ゲノムに導入されたＤＥ系と類似して、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子の発現は、温度制御プロモーター系により制御してもよい（Ｍｅｒｔｅｎｓ等、１９９５）、一方で、関心のある遺伝子の発現はＴ７プロモーターを使用して制御できる。

【０３１２】

大腸菌のような細菌中で機能するプロモーターの限定されない例には、構成的および誘発性プロモーター、例えばＴ７プロモーター、β－ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ（ｐｈｏＡ）プロモーター、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、テトラサイクリンプロモーター、λ－ファージプロモーター、リボソームタンパク質プロモーターおよびハイブリッドプロモーター、例えばｔａｃプロモーターが含まれる。その他の細菌および合成タンパク質も適切である。

【０３１３】

プロモーターの他に、外因性核酸分子は更に、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）および３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）から選択される少なくとも１つの調節エレメントを含んでもよい。原核生物と真核生物から由来するこのような５’ＵＴＲｓと３’ＵＴＲｓの多くは、当業者に周知である。このような調節エレメントには、通常は他の遺伝子と関連する５’ＵＴＲｓと３’ＵＴＲｓおよび／または任意の細菌から単離された５’ＵＴＲｓと３’ＵＴＲｓが含まれる。

【０３１４】

通常は、５’ＵＴＲは、開始コドンから３～１０塩基対上流のシャイン・ダルガノ配列としても公知であるリボソーム結合部位（ＲＢＳ）を含む。

【０３１５】

外因性核酸分子は、ベクターまたはベクターの部分、例えば、発現ベクターであってもよい。通常は、このようなベクターは、細菌細胞内の染色体外に留まる。このことは、該ベクターが細菌の核または核様体領域の外側に見出されることを意味する。

【０３１６】

また本発明により、外因性核酸分子を細菌のゲノム中に安定して挿入することも企てられている。宿主細胞のゲノムへ安定して挿入するための手段、例えば、相同組換えは当業者に周知である。

【０３１７】

本発明に従う細菌は、任意の適切な細菌、例えばグラム陽性もしくはグラム陰性細菌から生産できる。

【０３１８】

本発明の細菌の誘導に使用できる細菌の例は、腸内細菌科の属、例えば、大腸菌、アルセノフォナス（Ａｒｓｅｎｏｐｈｏｎｕｓ）、ビオストラチコラ（Ｂｉｏｓｔｒａｔｉｃｏｌａ）、ブレンネリア（Ｂｒｅｎｎｅｒｉａ）、ブフネラ（Ｂｕｃｈｎｅｒａ）、ブドビシア（Ｂｕｄｖｉｃｉａ）、ブティアウクセラ（Ｂｕｔｔｉａｕｘｅｌｌａ）、セデセア（Ｃｅｄｅｃｅａ）、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）、コセンゾエア（Ｃｏｓｅｎｚａｅａ）、クロノバクター（Ｃｒｏｎｏｂａｃｔｅｒ）、ディケヤ（Ｄｉｃｋｅｙａ）、エドワージエラ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）、エウィンゲラ（Ｅｗｉｎｇｅｌｌａ）、ギッブシエラ（Ｇｉｂｂｓｉｅｌｌａ）、ハフニア（Ｈａｆｎｉａ）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、レクレルシア（Ｌｅｃｌｅｒｃｉａ）、レミノレラ（Ｌｅｍｉｎｏｒｅｌｌａ）、ロンスダレア（Ｌｏｎｓｄａｌｅａ）、モングロビバクター（Ｍａｎｇｒｏｖｉｂａｃｔｅｒ）、モエレレッラ（Ｍｏｅｌｌｅｒｅｌｌａ）、モルガネラ（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ）、オベスムバクテリウム（Ｏｂｅｓｕｍｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、パントエア（Ｐａｎｔｏｅａ）、ペクトバクテリウム（Ｐｅｃｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ファセオリバクター（Ｐｈａｓｅｏｌｉｂａｃｔｅｒ）、フォトルハブダス（Ｐｈｏｔｏｒｈａｂｄｕｓ）、プレシオモナス（Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ）、プロテウス（Ｐ

ｒｏｔｅｕｓ）、ラーネラ（Ｒａｈｎｅｌｌａ）、ラオウルテラ（Ｒａｏｕｌｔｅｌｌａ）、サッカロバクター（Ｓａｃｃｈａｒｏｂａｃｔｅｒ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、サムソニア（Ｓａｍｓｏｎｉａ）、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、シムウェリア（Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ）、ソダーリス（Ｓｏｄａｌｉｓ）、タツメラ（Ｔａｔｕｍｅｌｌａ）、トルセリア（Ｔｈｏｒｓｅｌｌｉａ）、トラブルシエラ（Ｔｒａｂｕｌｓｉｅｌｌａ）、ウィグルスウォーチア（Ｗｉｇｇｌｅｓｗｏｒｔｈｉａ）、エルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）およびヨーケネラ（Ｙｏｋｅｎｅｌｌａ）から成る群から選択される属に属する細菌である。

【０３１９】

その他の特定の実施態様によれば、細菌は、大腸菌、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ゲオバチルス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｍｏｎａｓ）、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、シゲラ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、アシネトバクター（Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ）、シトロバクター（Ｃｉｔｒｏｂａｃｔｅｒ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）、クルイベラ（Ｋｌｕｙｖｅｒａ）、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、セデセア（Ｃｅｄｅｃｅａ）、モルガネラ（Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ）、ハフニア（Ｈａｆｎｉａ）、エドワージエラ（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ）、プロビデンシア（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ）、プロテウス（Ｐｒｏｔｅｕｓ）およびエルシニア（Ｙｅｒｓｉｎｉａ）から選択される群から選択される属に属する。

【０３２０】

具体的な実施態様によれば、細菌は大腸菌属に属する。具体的な実施態様によれば、細菌は大腸菌である。本発明の細菌を誘導するために使用できる大腸菌属に属する細菌の限定されない例は、大腸菌Ｋ－１２（特に、亜株ＭＧ１６５５またはＷ３１１０）、ＢＬ２１、Ｗ、またはＣｒｏｏｋｓである。より具体的な実施態様によれば、細菌は大腸菌Ｋ－１２である。

【０３２１】

具体的な実施態様によれば、細菌はコリネバクテリウム属に属する。コリネバクテリウム属の細菌の限定されない例は、コリネバクテリウム・グルタミカムである。より具体的な実施態様によれば、細菌はコリネバクテリウム・グルタミカムである。

【０３２２】

その他の具体的な実施態様によれば、細菌はバチルス属に属する。バチルス属の細菌の限定されない例は、バチルス・サブチリス、バチルス・アミロリクエファシエンス、バチルス・リケニフォルミスおよびバチルス・モヤベンシスである。より具体的な実施態様によれば、細菌はバチルス・サブチリスである。その他のより具体的な実施態様によれば、細菌は、バチルス・リケニフォルミスである。

【０３２３】

具体的な実施態様によれば、細菌はラクトコッカス属に属する。ラクトコッカス属の細菌の限定されない例は、ラクトコッカス・ラクティスである。より具体的な実施態様によれば、細菌はラクトコッカス・ラクティスである。

【０３２４】

その他の具体的な実施態様によれば、細菌はストレプトマイセスに属する。ストレプトマイセス属の細菌の限定されない例は、ストレプトマイセス・リビダンス、ストレプトマイセス・セリカラー、またはストレプトマイセス・グリセウスである。より具体的な実施態様によれば、細菌はストレプトマイセス・リビダンスである。その他のより具体的な実施態様によれば、ストレプトマイセス・セリカラーである。その他のより具体的な実施態様によれば、細菌はストレプトマイセス・グリセウスである。

【０３２５】
その他の具体的な実施態様によれば、細菌はシュードモナス属に属する。シュードモナス属の細菌の限定されない例は、シュードモナス・プチダである。より具体的な実施態様によれば、細菌はシュードモナス・プチダである。
【０３２６】
本発明の方法
また本発明は、本発明による細菌を使用するＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の製造方法を提供し、前記方法は、本明細書中で詳説したような細菌の培地中での培養を含む。
【０３２７】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－セリンの製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－セリンの製造方法を提供し、前記方法は、本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＬ－セリンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３２８】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－セリン誘導体の製造方法を提供する。特に。本発明はＬ－セリン誘導体の製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。Ｌ－セリン誘導体は、Ｌ－システイン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－グリシン、Ｏ－アセチルセリン、Ｌ－トリプトファン、チアミン、エタノールアミンおよびエチレングリコールから成る群から選択されてもよい。該方法は、更にＬ－セリン誘導体を培地から回収することを含んでもよい。
【０３２９】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－システインの製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－システインの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＬ－システインを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３０】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－メチオニンの製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－メチオニンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＬ－メチオニンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３１】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－グリシンの製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－グリシンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＬ－グリシンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３２】
特定の実施態様によれば、本発明はＯ－アセチルセリンの製造方法を提供する。特に、本発明はＯ－アセチルセリンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＯ－アセチルセリンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３３】
特定の実施態様によれば、本発明はＬ－トリプトファンの製造方法を提供する。特に、本発明はＬ－トリプトファンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にＬ－トリプトファンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３４】
特定の実施態様によれば、本発明はチアミンの製造方法を提供する。特に、本発明はチアミンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にチアミンを培地から回収することを含んでもよい。

【０３３５】
特定の実施態様によれば、本発明はエタノールアミンの製造方法を提供する。特に、本発明はエタノールアミンの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にエタノールアミンを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３６】
特定の実施態様によれば、本発明はエチレングリコールの製造方法を提供する。特に、本発明はエチレングリコールの製造方法を提供し、前記方法は本明細書中で詳説したような細菌を培地中で培養することを含む。該方法は、更にエチレングリコールを培地から回収することを含んでもよい。
【０３３７】
使用される培地は、当該の細菌細胞を培養するために適切な通常の培地であってもよく、かつ従来技術の原則に従って構成されていてもよい。培地は、通常は個々の細菌の成長と生存に必要な全ての栄養素、例えば、炭素および窒素源ならびにその他の無機塩を含有するであろう。適切な培地、例えば、最小もしくは複合培地は市場の供給者から入手可能であるか、または公開されているレシピ、例えば、ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）の株カタログに従って調製してもよい。当業者に公知である限定されない標準培地には、ルリアベルターニ（ＬＢ）培地、サブローデキストロース（ＳＤ）培地、ＭＳ培地、酵母ペプトンデキストロース、ＢＭＭＹ、ＧＭＭＹまたは酵母麦芽エキス（ＹＭ）培地が含まれ、これらは全て市販されている。大腸菌細胞のような細菌細胞を培養するために適切な限定されない培地の例には、最小培地およびリッチ培地、例えば、ルリアブロス（ＬＢ）、Ｍ９培地、Ｍ１７培地、ＳＡ培地、ＭＯＰＳ培地、Ｔｅｒｒｉｆｉｃ培地、ＹＴおよびその他のものが含まれる。
【０３３８】
Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体の収率を更に上げるために、培地に更にＬ－トレオニンを補充してもよい。培地は、一般的にＬ－トレオニンを約０．０５～約１０ｇ／Ｌの濃度で、例えば、約０．０５～約５ｇ／ｌの濃度で、約０．０５～約２．５ｇ／Ｌの濃度で、約０．０５～約１ｇ／Ｌの濃度でまたは約０．０５～約０．５ｇ／Ｌの濃度で含有してもよい。特定の実施態様によれば、培地は、Ｌ－トレオニンを約０．０５～約５ｇ／Ｌの濃度で含有している。その他の特定の実施態様によれば、培地は、Ｌ－トレオニンを例えば、約０．０５～約２．５ｇ／Ｌの濃度で含有する。その他の特定の実施態様によれば、培地は、Ｌ－トレオニンを約０．０５～約１ｇ／Ｌの濃度で含有する。その他の特定の実施態様によれば、培地は、Ｌ－トレオニンを例えば、約０．０５～約０．５ｇ／Ｌの濃度で含有する。その他の特定の実施態様によれば、培地は、Ｌ－トレオニンを約０．１～約１ｇ／Ｌの濃度で含有する。その他の特定の実施態様によれば、培地はＬ－トレオニンを例えば、約０．２～約１ｇ／Ｌの濃度で含有する。
【０３３９】
炭素源は、当技術分野で公知の適切な任意の炭素基質および特に、細菌の培養および／または発酵で一般的に使用されている任意の炭素基質であってよい。適切に発酵可能な炭素基質の限定されない例は、五炭糖（アラビノースまたはキシロース）、六炭糖（例えば、グルコース）、アセテート、グリセロール、植物油、酵母エキス、ペプトン、カサミノ酸またはこれらの混合物である。特に関心のある炭素源は、グルコースのような六炭糖である。
【０３４０】
窒素源として、様々なアンモニウム塩、例えば、アンモニアおよび硫酸アンモニウム、その他の窒素化合物、例えばアミン、中性窒素源、例えばペプトン、大豆加水分解物、および消化発酵微生物を使用できる。ミネラルとして、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸鉄、硫酸マンガン、塩化カルシウムおよびそのようなものを使用できる。
【０３４１】

培養は、有利には通気条件下に行うことができ、例えば、約２０～約４０℃の温度で、例えば、約３０～３８℃、有利には約３７℃で振盪培養により、および通気しながら撹拌培養により行うことができる。培養のｐＨは、通常は約５～約９、例えば約６．５～７．５である。培養のｐＨは、アンモニア、炭酸カルシウム、様々な酸、様々な塩基ならびに緩衝液で調節できる。通常は１～５日間の培養は培地中にＬ－セリンの蓄積をもたらす。

【０３４２】

培養後に、細胞のような固体を遠心分離または膜濾過により培地から除去できる。Ｌ－セリンまたはＬ－セリン誘導体は、化学化合物を単離および精製する通常の方法により培地から回収できる。周知の精製造方法には、これに限定されるわけではないが、遠心分離または濾過、沈殿法、イオン交換、クロマトグラフ法、例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過クロマトグラフィーおよび結晶化法が含まれる。

【０３４３】

従って、本発明は本明細書中で詳説した方法により得られるＬ－セリンまたはＬ－セリン誘導体を提供する。

【０３４４】

その他の特定の定義

本明細書中で使用されているような“Ｌ－セリンを生産する能力のある細菌”という用語は、培地中でＬ－セリンを生産でき、かつ蓄積を生じることができる細菌を意味し、該細菌を２ｇ／Ｌグルコース、２ｍＭグリシンおよび１ｍＭトレオニンを補充した最小Ｍ９培地中で十分に通気しながら３７℃で４０時間培養した場合に、少なくとも０．４ｇ／Ｌの量の蓄積を生じることができることを意味する。

【０３４５】

本明細書中で使用されているような“セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性した細菌”というフレーズは、変性された細菌が、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドを少量含有するように細菌が変性されたことを意味する。より具体的には、このフレーズは細菌がセリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドを合成できないことを意味する。

【０３４６】

本明細書中で使用されているような“セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性した細菌”というフレーズは、変性された細菌が、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを少量含有するように細菌が変性されたことを意味する。より具体的には、このフレーズは、細菌がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを合成できないことを意味する。

【０３４７】

本明細書中で使用されているような“グルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性した細菌”というフレーズは、変性された細菌が、少量のグルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）を有するポリペプチドを含有するように細菌が変性されたことを意味する。より具体的には、このフレーズは、細菌がグルコース６－ホスフェート－１－デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）活性を有するポリペプチドを合成できないことを意味する。

【０３４８】

本明細書中で使用されているような“セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性した酵母”というフレーズは、変性された酵母が、セリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドを少量含有するように酵母が変性されたことを意味する。より具体的には、このフレーズは、酵母がセリンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドを合成できないことを意味する。

【０３４９】

本明細書中で使用されているような“セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性

を有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を減衰するように変性した酵母”というフレーズは、変性された酵母が、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを少量含有するように酵母を変性したことを意味する。より具体的には、このフレーズは、酵母がセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを合成できないことを意味する。

【０３５０】

“遺伝子の不活性化”というフレーズは、変性された遺伝子が完全に機能の無いタンパク質をコード化することを意味することができる。また、遺伝子配列の一部もしくは全体の欠失により、遺伝子のリーディングフレームのシフトにより、ミスセンス／ノンセンス突然変異の導入により、または遺伝子の隣接領域（遺伝子発現を制御する配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、アテニュエーター、リボソーム結合部位などを含む）の変性により、変性されたＤＮＡ領域が遺伝子を自然に発現できないようにすることもできる。有利には、関心のある遺伝子は、全体の遺伝子配列の一部または全体の欠失、例えば遺伝子交換により不活性化される。

【０３５１】

細菌の染色体上に遺伝子が存在するかまたは不在であるかは、ＰＣＲ、サザンブロッティングおよびそのようなものを含む周知の方法により検出できる。更に、ノーザンブロッティング、定量的ＲＴ－ＰＣＲおよびそのようなものを含む様々な周知の方法を使用して、遺伝子発現レベルは、遺伝子から転写されたｍＲＮＡの量の測定により評価することもできる。遺伝子によりコードされるタンパク質の量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥそれに続く免疫ブロットアッセイ（ウェスタンブロッティング分析）およびそのようなものを含む周知の方法により測定できる。

【０３５２】

本明細書中では“ポリペプチド”と“タンパク質”は、ほとんど同じ意味で使用され、長さまたは後翻訳変性（例えば、グリコシル化、リン酸化、脂質化、ミリスチル化、ユビキチン化など）に関わらずアミド結合により共有結合した少なくとも２つのアミノ酸のポリマーを意味する。この定義に含まれるものは、Ｄ－アミノ酸とＬ－アミノ酸ならびにＤ－アミノ酸とＬ－アミノ酸の混合物である。

【０３５３】

本明細書中では“核酸”または“ポリヌクレオチド”は、ほとんど同じ意味で使用され、長さまたは塩基の変性にかかわらず、ホスホジエステル結合により共有結合した少なくとも２つの核酸モノマーユニットまたは塩基（例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミン）のポリマーを意味する。

【０３５４】

例えば、宿主細胞、核酸またはポリペプチドに関して“組換体”または“非天然に生じる”という用語が使用される場合には、自然界には存在しない方法で変性された材料、または自然界に相当する材料または材料の天然型、またはこれに等しいが合成材料から生産もしくは誘導されたものおよび／または組換え技術を使用する操作により変性されたものを意味する。限定されない例には、とりわけ、細胞の天然（非組換体）型では見出されない遺伝子を発現する組換体宿主細胞、またはさもなければ異なるレベルで発現される在来遺伝子の発現が含まれる。

【０３５５】

本明細書で使用されているような“異種”とは、ポリペプチドが通常は宿主生物中では見出されないかまたは宿主生物により作られ（すなわち発現され）ないが、異なる種から由来することを意味する。

【０３５６】

“置換”または“置換された”とは、１つのアミノ酸残基を他のものと交換することによるポリペプチドの変性を意味し、例えば、ポリペプチド配列中でのセリン残基とグリシンまたはアラニン残基の交換は、アミノ酸置換である。ポリヌクレオチドに関連して使用する場合には、“置換”または“置換された”とは、１つのヌクレオチドを他のものと交

換することによるポリヌクレオチドの変性を意味し、例えば、ポリヌクレオチド配列中でのシトシンとチミンの交換は、ヌクレオチド置換である。

【０３５７】

ポリペプチドに関連して使用される場合には“保存的置換”とは、アミノ酸残基と類似の側鎖を有する異なる残基との置換を意味する。よって、ポリペプチド中のアミノ酸と、同じポリペプチド中のアミノ酸の置換もしくは、類似したクラスのアミノ酸の置換に通常は関わる。一例として、かつ限定されないものとして、脂肪族側鎖を有するアミノ酸は他の脂肪族アミノ酸と置換できる（例えば、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン）；ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸は、ヒドロキシル側鎖を有する他のアミノ酸と置換できる（例えば、セリンおよびトレオニン）；芳香族側鎖を有するアミノ酸は、芳香族側鎖を有する他のアミノ酸と置換できる（例えば、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびヒスチジン）；塩基性側鎖を有するアミノ酸は、塩基性側鎖を有する他のアミノ酸と置換できる（例えば、リジンおよびアルギニン）；酸性側鎖を有するアミノ酸は、酸性側鎖を有する他のアミノ酸と置換できる（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）；および疎水性または親水性アミノ酸は、それぞれ他の疎水性または親水性アミノ酸と交換される。

【０３５８】

ポリペプチドに関連して使用される場合の“非保存的置換”とは、ポリペプチド中のアミノ酸と、著しく異なる側鎖の特性を有するアミノ酸との置換を意味する。非保存的置換は、むしろ定義した群内よりは、定義した群間で使用してよく、かつ（ａ）置換（例えば、セリンをグリシンに）の周辺の場所でのペプチド骨格の構造、（ｂ）電荷または疎水性度、または（ｃ）側鎖の大きさに影響を与える。一例かつ制限されないものとして、例示的な非保存的置換は、塩基性または脂肪族アミノ酸と置換した酸性アミノ酸；小さなアミノ酸と置換した芳香族アミノ酸；および疎水性アミノ酸と置換した親水性アミノ酸であることができる。

【０３５９】

“欠失”または“欠失された”がポリペプチドに関連して使用される場合には、参照ポリペプチド中の１つまたは複数のアミノ酸の除去によるポリペプチドの変性を意味する。欠失は、酵素活性を保持しながらおよび／または設計された酵素の改善された特性を保持しながら、１個または複数のアミノ酸の除去、２個またはそれより多くのアミノ酸、５個またはそれより多くのアミノ酸、１０個またはそれより多くのアミノ酸、１５個またはそれより多くのアミノ酸、２０個またはそれより多くのアミノ酸の除去、ポリペプチドを形成しているアミノ酸の総数の１０％までの除去、アミノ酸の総数の２０％までの除去を含む。欠失は、ポリペプチドの内側部分および／または末端部分を支配することができ、様々な実施態様では、欠失は連続セグメントを含むことができるかまたは不連続的であることができる。

【０３６０】

“挿入”または“挿入された”がポリペプチドに関連して使用される場合には、１つまたは複数のアミノ酸を参照ポリペプチドに付加することによるポリペプチドの変性を意味する。挿入は、１つまたはそれより多くのアミノ酸、２個またはそれより多くのアミノ酸、５個またはそれより多くのアミノ酸、１０個またはそれより多くのアミノ酸、１５個またはそれより多くのアミノ酸、または２０個またはそれより多くのアミノ酸の付加を含むことができる。挿入は、ポリペプチドの内側の部分にあるか、またはカルボキシもしくはアミノ末端にあることができる。挿入は、アミノ酸の連続セグメントであるか、または参照ポリペプチド中で１つまたは複数のアミノ酸により分けられていてもよい。

【０３６１】

“発現”には、ポリペプチド（例えば、コードされた酵素）の生産に関与するいずれかの工程、これに限定されるわけではないが、転写、後転写変性、翻訳、後翻訳変性および分泌が含まれる。

【０３６２】

本明細書中で使用されているように、“ベクター”とは、これが結合した他の核酸分子を輸送できる核酸分子を意味する。ベクターの１つのタイプは、“プラスミド”であり、これは円形の二本鎖核酸ループであり、これに更なる核酸セグメントがライゲートできる。特定のベクターは遺伝子の発現を支配でき、これらの遺伝子にベクターが作動的に結合する。このようなベクターは、本明細書中では“発現ベクター”と称される。その他の特定のベクターは、外因性核酸分子が細菌のゲノムに挿入するのを促進させることができる。本明細書中では、このようなベクターは“形質転換ベクター”と称される。一般的に、組換え核酸技術で利用されるベクターは、しばしばプラスミドの形である。本明細書中では、“プラスミド”と“ベクター”は、ほとんど同じ意味で使用できる。それというのも、プラスミドが最も一般的に使用されるベクターの形であるからである。多数の適切なベクターは、当業者に公知であり、かつ市販されている。

【０３６３】

本明細書中で使用されているように“プロモーター”とは、ＤＮＡの配列、通常は構造遺伝子のコード領域の上流（５’）を意味し、これはＲＮＡポリメラーゼおよび転写の開始に必要であろうその他のファクターに認識部位と結合部位を提供することにより、コード領域の発現を制御する。プロモーターの選択は、関心のある核酸配列によるであろう。適切な“プロモーター”は、一般的に本発明の細菌中で転写の開始をサポートでき、ｍＲＮＡ分子の生産を引き起こすものである。

【０３６４】

本明細書中で使用されているように“作動的に結合する”とは、記載したコンポーネントが、意図した方法で機能できるようにする関係にある近位を意味する。コーディング配列に“作動的に結合した”コントロール配列は、コーディング配列がコントロール配列と適合する条件下に達成される。プロモーター配列は、これが遺伝子の転写開始部位に十分に近い場合に遺伝子に“作動的に連結”して遺伝子の転写を制御する。

【０３６５】

“配列相同性のパーセンテージ”、“％配列相同性”および“パーセント相同性”は、アミノ酸配列と参照アミノ酸配列の間の比較を参照するために本明細書では使用される。

【０３６６】

本明細書で使用されているような“％配列相同性”は、以下のように２つのアミノ酸配列から計算される：バージョン９のＧｅｎｅｔｉｃ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ‘ｓ　ＧＡＰ（グローバルアライメントプログラム）を使用し、１２個のギャップオープンペナルティー（ギャップの最初の空白に）と－４のギャップ伸長ペナルティー（ギャップ中、各々の更なる空白に）で、ｄｅｆａｕｌｔ　ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックス（以下を参照）を用いて配列は並べられる。整列後に、参照アミノ酸配列中のアミノ酸の数のパーセンテージとしてマッチした数を表示することによりパーセンテージ相同性を計算した。

【０３６７】

以下のＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスを使用した：

【表１】

| | Ala | Arg | Asn | Asp | Cys | Gln | Glu | Gly | His | Ile | Leu | Lys | Met | Phe | Pro | Ser | Thr | Trp | Tyr | Val |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arg | -1 | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | -2 | 0 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | -2 | -2 | 1 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cys | 0 | -3 | -3 | -3 | 9 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | -1 | 1 | 0 | 0 | -3 | 5 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | -1 | 0 | 0 | 2 | -4 | 2 | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | 0 | -2 | 0 | -1 | -3 | -2 | -2 | 6 | | | | | | | | | | | | |
| His | -2 | 0 | 1 | -1 | -3 | 0 | 0 | -2 | 8 | | | | | | | | | | | |
| Ile | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | 4 | | | | | | | | | | |
| Leu | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | 2 | 4 | | | | | | | | | |
| Lys | -1 | 2 | 0 | -1 | -3 | 1 | 1 | -2 | -1 | -3 | -2 | 5 | | | | | | | | |
| Met | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0 | -2 | -3 | -2 | 1 | 2 | -1 | 5 | | | | | | | |
| Phe | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0 | 0 | -3 | 0 | 6 | | | | | | |
| Pro | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | 7 | | | | | |
| Ser | 1 | -1 | 1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | -1 | -2 | -2 | 0 | -1 | -2 | -1 | 4 | | | | |
| Thr | 0 | -1 | 0 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1 | 5 | | | |
| Trp | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | 1 | -4 | -3 | -2 | 11 | | |
| Tyr | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | 2 | -1 | -1 | -2 | -1 | 3 | -3 | -2 | -2 | 2 | 7 | |
| Val | 0 | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | 3 | 1 | -2 | 1 | -1 | -2 | -2 | 0 | -3 | -1 | 4 |

【０３６８】

“参照配列”または“参照アミノ酸配列”とは、他の配列を比較した定義付けられた配列を意味する。本発明に関連して、参照アミノ酸配列は、例えば配列番号５または６に記載されているアミノ酸配列であってよい。

【０３６９】

本明細書で使用されているように“Ｌ－セリン誘導体”とは、Ｌ－セリンのアミノ基またはカルボキシ基での反応から、またはＬ－セリンの任意の水素とヘテロ原子の交換から生じるアミノ酸のような化合物を意味する。“Ｌ－セリン誘導体”の限定されない例には、Ｌ－システイン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－グリシン、Ｏ－アセチルセリン、Ｌ－トリプトファン、チアミン、エタノールアミンおよびエチレングリコールが含まれる。“Ｌ－セリン誘導体の”更なる例は、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｅｎｔｉｔｉｅｓ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（ＣｈＥＢＩ）［ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ.ｅｂｉ.ａｃ.ｕｋ／ｃｈｅｂｉ／ｉｎｉｔ.ｄｏ］により、例えば、ＣｈＥＢＩ　ＩＤ　ＣＨＥＢＩ：８４１３５で記載されている。

【０３７０】

本明細書中で数量的限界または範囲が記載される場合には、端点が含まれる。また、全ての数値および数量的限界内の部分範囲もしくは範囲は、あたかも明示されているかのように明確に含まれる。

【０３７１】

本発明を大まかに説明してきたので、特定の具体的な実施例の参照により更なる理解が得られるであろう。これらは本明細書中では説明の目的だけに提供されるのであり、特記されない限り制限する意図はない。

【０３７２】

実施例

本発明者等は、４つの全てのセリン分解遺伝子（ｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡ）が欠損した大腸菌のような細菌を構築できたことを初めて示した（例１）。前記株は、セリン経路をアップレギュレートした場合に一重および三重デアミナーゼノックアウトよりも、高いセリン生産収率を示した（例２）。しかし、得られた株はセリンに対して極めて低い耐性を有し、このことはｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧが欠失した大腸菌三重欠失株でも報告されていた（Ｚｈａｎｇ　ａｎｄ　Ｎｅｗｍａｎ，２００８）。発明者らは、更に新規エクスポーターの過剰発現により（例３）、ランダム突然変異により株を進化させることにより（例４）および適応進化（例５）により、生成物の毒性を減少できることを証明した。更に、原因となる突然変異を同定するために株をリバースエン

ジニアリングした（例６）。供給バッチ発酵の間に、耐性株は、親の四重欠失株と比べた場合に改善されたセリン生産を示した（１２．６ｇ／Ｌ、グルコースからの質量収率３６．７％）（例７）。これは、生産生物においてこれまでに報告されたグルコースからの最も高いセリン質量収率である。

【０３７３】

更に発明者らは、他の原因となる突然変異の存在で、ｚｗｆの欠失によるペントースリン酸経路の阻害が、セリン生産収率において更なる増大を導いたことを実証した（例８）。

【０３７４】

例１－重要な分解経路の欠失

セリンは、大腸菌において２つの重要な分解経路を有する：セリンからピルビン酸塩への変換、これは３つのデアミナーゼ、すなわちｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧによりコード化される。そしてセリンからグリシンへの変換、これはｇｌｙＡによりコードされる。ｇｌｙＡの欠失は、大腸菌をグリシンに対する栄養要求性にする。ｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧの欠失は、ラムダ・レッド媒介遺伝子交換法（Ｄａｔｓｅｎｋｏ ａｎｄ Ｗａｎｎｅｒ，２０００）の使用により定量的に行われた。これらの遺伝子の欠失に適用されるプロトコールは、Ｓａｗｉｔｚｋｅ等（２０１３）により記載されているプロトコールに類似している。カナマイシンカセットの増幅に使用したプライマーは、表Ｓ１に示されている。ＰＣＲ反応は、所定の遺伝子のＫＦとＫＲプライマーをそれぞれ２５０ｎＭ、ｄＮＴＰｍｉｘ２５０μＭ、Ｐｈｕｓｉｏｎポリメラーゼ４単位（Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）、ＨＦ緩衝液４０μｌおよびｐｋＤ４プラスミド１０ｎｇを含んだ。後続の２工程のＰＣＲプロトコールをＰＣＲ増幅に使用した：初期変性工程、９８℃で４０秒間、続いて、９８℃で１０秒間の変性を５サイクル、５５℃で３０秒間のアニーリング、７２℃で９０秒間の伸長、続いてこのサイクルを２０サイクル、その際、アニーリング温度を５５℃から６５℃に上げた。ＰＣＲ産物をカラム精製（Ｍａｃｈｅｒｅｙ Ｎａｇｅｌ、Ｄｕｒｎ、ドイツ）し、かつＮａｎｏｄｒｏｐ装置（Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）を使用して濃度を測定し、かつ一晩Ｄｐｎｌで消化を行った。大腸菌ＭＧ１６５５を親株として使用し、連続的なノックアウトを作製した。親株をｐｋＤ４６で形質転換し、２ＹＴ－ａｍｐ培地中３０℃および２５０ｒｐｍで成長させた。ｅｘｏ、βおよびγタンパク質の発現は、対数中期（Ｏ.Ｄ． ０．４～０．５）で２０ｍＭアラビノースの添加により誘発し、かつ更なる１時間のインキュベーションの後に細胞を収穫した。次に培養物を氷冷したファルコンチューブ５０ｍｌに移し、かつ６５００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離した。上澄みを捨て、かつ細胞を氷冷した１０％グリセロールで２回洗浄した。これらのエレクトロコンピテント細胞をカナマイシンカセット２００ｎｇで形質転換し、かつ形質転換体をＬＢ－ｋａｎプレート上にプレーティングした。カナマイシンカセットは、ｆｌｉｐｐａｓｅ遺伝子をコードするプラスミドｐｃｐ２０を使用した除去された。ループアウトをチェックするプライマーは、表２に示されている。ｇｌｙＡによりコードされるセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼは、Ｐ１ファージ系プロトコールを使用して検出した（Ｔｈｏｍａｓｏｎ等、２００７）。ｇｌｙＡ：：ｋａｎを棲息させるＫｅｉｏコレクションからの株（Ｂａｂａ等、２００６）を、０．２％グルコース、２５ｍＭ $CaCl_2$ および１ｍＭグリシン培地を補充したＬＢ－ｋａｎ５ｍｌ中で成長させた。初期の対数期（Ｏ.Ｄ.０．１）では、培養物をＰ１ファージ溶菌液で変換した。細胞溶菌のために培養物を３７℃および２５０ｒｐｍで３時間インキュベートし、かつ細胞を２５０ｒｐｍで溶液した。０．４５μＭフィルターの使用により、溶菌液を滅菌濾過した。ｓｄａＡ、ｓｄａＢおよびｔｄｃＧが欠失した大腸菌株の一夜培養物１ｍｌをＰ１塩溶液２００μＬ中に再懸濁させ、かつ上記溶菌液１００μＬと一緒に１時間インキュベートした。次に、２ｍＭグリシンと２００ｍＭクエン酸ナトリウムを補充した２ｍＬ ＬＢ培地中で細胞を一晩成長させた。２ｍＭグリシンと１０ｍＭクエン酸ナトリウムを補充したＬＢ－ｋａｎプレート上に細胞をプレーティングした。ファージの混入を回避するために、クローンを新たな

プレート上で筋を付け直し、かつ単離したクローンをカセット挿入についてチェックした。ループアウトは、ｐｃｐ２０プラスミドを使用して行った。結果として生じた四重欠失株（図１）をＱ１と称する。この実施例は、大腸菌中でｓｄａＡ、ｓｄａＢ、ｔｄｃＧおよびｇｌｙＡを欠失できることを実証する。これは以前には達成されなかったことであり、かつ予測できなかったことである。

【０３７５】

表Ｓ１：カナマイシンカセットの増幅に使用したプライマー

【表２】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| sdaA_KF | GCGCTGTTATTAGTTCGTTACTGGAAGTCCAGTCACCTTGTCAGGAGTATTATCGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| sdaA_KR | CGCCCATCCGTTGCAGATGGGCGAGTAAGAAGTATTAGTCACACTGGACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC |
| sdaB_KF | CGCTTTCGGGCGGCGCTTCCTCCGTTTTAACGCGATGTATTTCCTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| sdaB_KR | GGCCTCGCAAAACGAGGCCTTTGGAGAGCGATTAATCGCAGGCAACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC |
| tdcG_KF | CGTTCCGCTCCACTTCACTGAACGGCAATCCGAGGGTGTGGATATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| tdcG_KR | GTGCACCCAAGGATGAAAGCTGACAGCAATGTCAGCCGCAGACCACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC |
| glyA_KF | GTTAGCTGAGTCAGGAGATGCGGATGTTAAAGCGTGAAATGAACATTGCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG |
| glyA_KR | CAACGAGCACATTGACAGCAAATCACCGTTTCGCTTATGCGTAAACCGGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC |

【０３７６】

表Ｓ２：所定の遺伝子の欠失をチェックするために使用したプライマー

【表３】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| sdaA_cF | GCGCTGTTATTAGTTCGTTACTGGAAGTCC |
| sdaA_cR | CGCCCATCCGTTGCAGATGGGC |
| sdaB_cF | CGCTTTCGGGCGGCGCTTCCTC |
| sdaB_cR | GGCCTCGCAAAACGAGGCCTTTGG |
| tdcG_cF | CGTTCCGCTCCACTTCACTGAACGG |
| tdcG_cR | GTGCACCCAAGGATGAAAGCTGACAGC |
| glyA_cF | GTTAGCTGAGTCAGGAGATGCGGATGTT |
| glyA_cR | CAACGAGCACATTGACAGCAAATCACCG |

【０３７７】

例２－セリンを生産するためのセリン生合成経路の過剰発現

ｓｅｒＡ、ｓｅｒＢおよびｓｅｒＣによりにコードされた３つの酵素から大腸菌中でセリンを生産した。全ての遺伝子は、それぞれの遺伝子名を有するプライマー（表Ｓ３）を使用して大腸菌ＭＧ１６５５から単離した。ＰＣＲ１００μｌ混合物は、それぞれフォワードプライマーとリバースプライマー２５０ｎＭ、ｄＮＴＰ２５０μＭ、Ｐｈｕｓｉｏｎポリメラーゼ２単位、１×ＨＦ緩衝液、一夜培養物１μｌを含有した。後続の２工程ＰＣＲプロトコールをＰＣＲ増幅に使用した：初期変性工程、９８℃で４０秒間、続いて、９８℃で１０秒間の変性を５サイクル、５５℃でアニーリングを３０秒、７２℃で９０秒間の伸長、このサイクルを続いて２０サイクル、その際、アニーリング温度を５５℃から６５℃に上げた。カラム精製後に、遺伝子生成物とプラスミドをＦａｓｔ ｄｉｇｅｓｔ ｅｎｚｙｍｅ（Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）を

使用して消化した。１×ｆａｓｔ　ｄｉｇｅｓｔ　ｂｕｆｆｅｒ中の制限酵素それぞれ１μｌにより、ＰＣＲ産物約５００ｎｇまたはプラスミド１μｇに消化を行った。反応物を３時間インキュベートし、かつ次に再びカラム精製した。ｓｅｒＡには、ＮｃｏＩとＮｏｔＩを用いて二重消化を行い、一方でｓｅｒＣはＮｄｅＩとＰａｃＩで消化した。はじめに、ｓｅｒＡのクローニングがプラスミドｐＣＤＦ－Ｄｕｅｔ－ｓｅｒＡを生じるようにｐＣＤＦ－ＤｕｅｔをＮｃｏＩとＮｏｔＩで消化し、かつこのプラスミドを後でｓｅｒＣのクローニングに使用し、このようにｐＣＤＦ－Ｄｕｅｔ－ｓｅｒＡ－ｓｅｒＣを作製した。ＮｃｏＩとＰａｃＩ部位で、ｓｅｒＢをコード化する遺伝子をｐＡＣＹＣ－Ｄｕｅｔベクター中でクローン化しｐＡＣＹＣ－ｓｅｒＢを生じた。通常のライゲーション反応には、１×Ｔ４リガーゼ緩衝液、プラスミドＤＮＡ５０ｎｇおよびインサート１００ｎｇおよびＴ４ＤＮＡリガーゼ（Ｔｈｅｒｍｏｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ）０．３μｌ／１０μｌが含まれる。

【０３７８】

部位特異的突然変異（Ａｌ－Ｒａｂｉｅｅ等、１９９６）により、３つ残基Ｈ３４４、Ｎ３４６およびＮ３６４をアラニンへ突然変異させることにより、ｓｅｒＡのフィードバック阻害を取り除いた（表Ｓ４）。上記のようにマスターミックスを使用したが、マスターミックスを２つの等しいアリコートに分けたことだけを変更した。この後に、フォワードプライマーとリバースプライマープライマーを各アリコートに添加した。全部でｐＣＤＦ－Ｄｕｅｔ－ｓｅｒＡ－ｓｅｒＣプラスミド１００ｎｇをテンプレートとして使用した。２工程のＰＣＲプログラム：９８℃で４０秒間の初期変性、９８℃で１０秒間の変性、６０℃で３０秒間のアニーリング、７２℃で４分間と３０秒の伸長、かつこのサイクルを５回繰り返し、次に２つのアリコートを合わせ、かつ更に１５サイクル用に再分配した。ベクター骨格の取り換えを可能にするために、ｓｅｒＣの内部のＮｃｏＩ部位は、表Ｓ４に挙げられているプライマーを使用して同じアプローチにより除去した。

【０３７９】

図２は、プラスミド構築物のベクターマップを示している。

【０３８０】

表Ｓ３：セリン生産経路の増幅とクローニングに使用したプライマー

【表４】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| serA-NcoI | GGCCCATGGCAAAGGTATCGCTGGAG |
| serA NotI_R | ATTGCGGCCGCTTAGTACAGCAGACGGGCGCGA |
| serB_NcoI_F | GGCCCATGGCTAACATTACCTGGTGCG |
| serB_R_HindIII | GCCAAGCTT TTATTACTTCTGATTCAGGCTGCC |
| serB_PacI_R | GCCTTAATTAATTATTACTTCTGATTCAGGCTGCC |
| serC_F_NdeI | GGCCATATGATGGCTCAAATCTTCAATTTTAGTTCTGG |
| serC_R_PacI | GCCTTAATTAATCAT TAACCGTGACGGCGTTCGAAC |
| ydeD_F_NdeI | CCGCATATGTCGCGAAAAGATGGGGTG |
| ydeD_cHis_R-PacI | GCCTTAATTAATGATGATGATGATGATGACTTC CCACCT TTACCGCTT TACGCC |
| ydeD_NcoI_F1 | CCGCCATGGCGCGAAAAGATGGGGTG |

【０３８１】

表Ｓ４：セリン生産経路の部位特異的突然変異に使用したプライマー

【表５】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| serA N364A_F | CGAGCAGGGCGTCGCTATCGCCGCGCAATA |
| serA N364A_R | TATTGCGCGGCGATAGCGACGCCCTGCTCG |
| serA H344AN346A_F | CTGAT CACATCGCTGAAGCT CGTCCGGGCGTGC |
| serA H344AN346A_R | GCACGCCCGGACGAGCTTCAGCGATGTGCATCAG |
| serC_NcoIc_F | CAAGGTATTATTCTGTCATGGCGGTGGTCGCG |
| serC_NcoIc_R | CGCGACCACCGCCATGACAGAATAATACCTTG |

【０３８２】

バッチ発酵の間のＤＥ３挿入とセリン生産

セリン生産をＭ９最小培地中でチェックした。グルコースＭ９最小培地は、２ｇ／Ｌグルコース、０．１ｍＭ　$CaCl_2$、２．０ｍＭ　$MgSO_4$、１×微量元素溶液、および１×Ｍ９塩から成る。４０００×微量元素ストック溶液は、２７ｇ／Ｌ　$FeCl_3$＊６$H_2O$、２ｇ／Ｌ　$ZnCl_2$＊４$H_2O$、２ｇ／Ｌ　$CoCl_2$＊６$H_2O$、２ｇ／Ｌ　$NaMoO_4$＊２$H_2O$、１ｇ／Ｌ　$CaCl_2$＊$H_2O$、１．３ｇ／Ｌ　$CuCl_2$＊６$H_2O$、０．５ｇ／Ｌ　$H_3BO_3$およびｄｄ$H_2O$中に溶かした濃ＨＣｌから成り、かつ滅菌濾過した。１０×Ｍ９塩ストック溶液は、６８ｇ／Ｌ　無水$Na_2HPO_4$、３０ｇ／Ｌ　$KH_2PO4$、５ｇ／Ｌ　ＮａＣｌおよびｄｄ$H_2O$中に溶かした１０ｇ／Ｌ　$NH_4Cl$から成り、かつオートクレーブした。

【０３８３】

発現系としてｐＥＴベクターを使用するために、ラムダＤＥ３溶原化キット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｄａｍｓｔａｄｔ、ドイツ）を使用して、Ｔ７ポリメラーゼ含有ＤＥ３カセットを各欠失突然変異体のゲノムに挿入した。引き続き、一重（ΔｓｄａＡ）、三重（ΔｓｄａＡ、ΔｔｄｃＧ、ΔｓｄａＢ）および四重欠失（ΔｓｄａＡ、ΔｔｄｃＧ、ΔｓｄａＢおよびΔｇｌｙＡ）を有する株（ＭＧ１６５５（ＤＥ３））をｐＣＤＦ－Ｄｕｅｔ１－ｓｅｒＡｍｕｔ－ｓｅｒＣおよびｐＡＣＹＣ、ＳｅｒＢで形質転換した。結果として得られたグリセロールストックを０．１％グルコース含有および必要な抗生物質（スペクチノマイシンとクロラムフェニコール）を補充した２ＹＴ培地中で一晩成長させた。一夜培養物は、０．２％グルコース、１ｍＭトレオニン、必要な抗生物質を補充したＭ９培地を含有するフラスコ中にトリプリケートで播種した（４重欠失株には、２ｍＭグリシンも補充した）。フラスコを３７℃、２５０ｒｐｍでインキュベートした。培養物がＯ.Ｄ．０．５５～０．６５の光学密度に達成した後に、セリン生産を４０μＭ　ＩＰＴＧの添加により誘導した。Ｏ.Ｄ.測定とサンプリングは、その後６０時間にわたり通常の時間間隔で行った。カラム温度を３０℃に保持したこと以外は先に記載した方法を使用して試料を濾過し、かつグルコースと副生成物に関してＨＰＬＣを行った（Ｋｉｌｄｅｇａａｒｄ等、２０１４）。ＬＣＭＳを使用してセリン濃度を測定した。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ系は、ＣＴＣオートサンプラーモジュール、高圧混合ポンプおよびカラムモジュールから成る（Ａｄｖａｎｃｅ，Ｂｒｕｋｅｒ，Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ，ＵＳＡ）。注入体積は１μｌであった。クロマトグラフィーは、ＺＩＣ－ｃＨＩＬＩＣカラム、１５０ｍｍ×２．１ｍｍ、孔サイズ３μｍ（ＳｅＱｕａｎｔ，Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）において行った。分離カラムの前に、０．５μ深さのフィルターおよびガードカラム、フィルター（ＫｒｕｄＫａｔｃｈｅｒ　Ｃｌａｓｓｉｃ，ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ）およびガードカラムＺＩＣ－ｃＨＩＬＩＣ、２０×２．１ｍｍ（ＳｅＱｕａｎｔ，Ｍｅｒｃｋ）があった。溶出液Ａ：２０ｍＭ硝酸アンモニウム（ｍｉｌｌｉＱ中のギ酸でｐＨを３．５に調節した）。溶出液Ｂ：アセトニトリル。溶出液ＡとＢの全流量は、０．４ｍｌ／分であった。均一溶媒の溶出３５％および全運転時間は５分であった。滞留時間はセリンに関して２．８分であった。ＭＳ－ＭＳ検出は、大気圧イオン化（ＡＰＩ）インターフェースを備えたＥＶＯＱトリプル四重極装置（Ｂｒｕｋｅｒ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，ＵＳＡ）において行った。質量分析装置は、陽イオンモード（ＥＳＩ＋）においてエレクトロスプレーを用いて運転した。

このスプレー圧を４５００Ｖに調節した。コーンガス流は、２０リットル／ｈであり、かつコーン温度を３５０℃に調節した。温度は３５０℃で、加熱したプローブガス流を５０リットル／ｈに調節した。Ｎｅｂｕｌｉｚｅｒ流を５０リットル／ｈに調節し、かつ排気ガスを出した。アルゴンを１．５ｍトルの圧力で衝突ガスとして使用した。検出は、複合反応検出（ＭＲＭ）モードで行った。定量的移行１０６→６０であり、かつ定性的移行は１０６→７０であった。衝突エネルギーを双方の移行で７ｅＶに最適化した。セリンの検量基準物をセリン生産に使用する培地中で調製し、かつアセトニトリル中の０．２％ギ酸で５０：５０に希釈した。検量基準物の濃度は、０．００１～０．５ｇ／Ｌの範囲内であった。

【０３８４】

図３に示されているように、この実験は、Ｑ１（ＤＥ３）と称される大腸菌においてセリン分解に関与する４つ全ての遺伝子が、グルコースからの最上の比生産性と最も高い収率を生じたことを実証する。

【０３８５】

例３：トランスポーターの過剰発現による生成物毒性の減少

大腸菌における主要なセリン分解経路の欠如は、結果としてセリンに対する著しく減少した耐性を生じた。耐性を増大するために、セリンへの潜在的な特異性を有するトランスポーター（ｙｄｅＤ）を過剰発現し、かつ高濃度のセリンの成長の間に試験した。表Ｓ３に記載のプライマーならびに例１に挙げられているプロトコールを使用し、ＮｃｏＩとＰａｃＩ部位にてｙｄｅＤを増幅によりｐＣＤＦ－１ｂ中でクローン化した。

【０３８６】

Ｑ１（ＤＥ３）をｐＣＤＦ－１ｂ空ベクターとｐＣＤＦ－ｙｄｅＤ－ｃ－Ｈｉｓプラスミドを用いて形質転換した（図４）。形質転換体をＬＢ－スペクチノマイシンプレート上で選択した。これらの形質転換体の一夜培養物を、２ｍＭグリシン、２ｇ／Ｌグルコースおよびスペクトロマイシン（割合１：５０）を補充したＭ９培地中に播種した。培養物を０．４～０．５の広光学密度で３７℃および２５０ｒｐｍでインキュベートし、この後に、８００μｌを様々なセリン濃度（１２．５、２５および５０ｇ／Ｌ）を有するＭ９培地８００μｌ含有の４８ウェルＢｉｏｌｅｃｔｏｒプレートに添加した（Ｍ２Ｐ　ｌａｂｓ、Ｂａｅｓｗｉｅｌｅｒ、ドイツ）。ｙｄｅＤの発現は、１００μＭ　ＩＰＴＧで誘発した。次に、連続して振盪しながら３７℃および湿度７０％で、Ｂｉｏｌｅｃｔｏｒ装置（Ｍ２Ｐ　ｌａｂｓ，Ｂａｅｓｗｉｅｌｅｒ、ドイツ）中でモニターした。得られたものを２０％にセットし、かつ散乱強度を次の４時間にわたり５分おきに測定した。

【０３８７】

この実験は、低濃度のセリンの存在でも、主要なセリン分解経路が欠如した大腸菌の成長が著しく阻害されたことを実証した。ｙｄｅＤの過剰発現において、セリンに対する耐性は実質的に増大し（図４）、ＹｄｅＤが細胞からセリンを運び出した可能性を示唆している。

【０３８８】

例４－セリン耐性株に関するランダム突然変異

大腸菌中での主要セリン分解経路の不活性化は、セリンに対する著しく減少した耐性を生じた。耐性を増大するために、２ｍＭグリシンと３ｇＬ－セリンを補充したＭ９培地中でＱ１株（例１で得られた）を一晩成長させた。培地１ｍｌを６ウェルペトリ皿中に広げ、かつＵＶ照射に３０分間曝した（ＣＢＳ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）。次に、耐性突然変異体を増やすために、２ｍＭグリシン、２ｇ／Ｌグルコースおよび５０ｇ／Ｌセリンを補充した５ｍｌＭ９培地に培養物を添加した。該培養物を３７℃および２５０ｒｐｍで３日間インキュベートし、かつ次に耐性クローンの選択のために５０ｇ／Ｌセリンを補充したＭ９プレート上にプレーティングした。コロニーを単離し、かつ成長速度と耐性は以下の方法を使用して推定した：

【０３８９】

培養物を２×ＹＴ培地中で一晩成長させた。次に、これらを０．２％グルコースおよび

様々な濃度のセリン（３部構成にする）含有のＭ９培地１５０μＬと一緒に９６ウェルのフラットボトムマイクロタイタープレート中に播種した。全部で細胞１．５μＬ（１：１００）を接種源として使用した。必要に応じて、体積における小規模な変更は、細胞が等量になることを保証するように行われた。プレートをＭｉｃｒｏａｍｐの透明粘着フィルム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＵＫ）で密閉し、かつマイクロタイタープレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ　ＶＴ，ＵＳＡ）中でインキュベートした。連続的に振盪させながらリーダーを３７℃でセットし、かつＯ.Ｄを６３０ｎｍで５～１０分おきに３２時間にわたりモニターした。

【０３９０】

この実験は、ランダム突然変異をセリンに対する耐性を著しく増大するために使用できることを実証した（図５）。得られた株を以後Ｑ３と称する。

【０３９１】

例５：Ｌ－セリン耐性に関する適応進化

ランダム突然変異とは異なり、主要なセリン分解経路が不活性化されている株のセリン耐性は、適応進化によっても増大できることが実証された。Ｑ１株の７つの独立した集合を、２ｍＭグリシンを補充したＭ９最小培地中で適応進化させ、かつアミノ酸Ｌ－セリンの濃度を３７℃で６０日間にわたり増大させた。

【０３９２】

適応実験室進化（ＡＬＥ）実験は、自動化システムを使用して達成され、これはそれらの成長速度をモニタリングしながら何日にもわたり進化する集団の繁殖を可能にする。実験開始前に、必要な培地２５ｍｌ含有チューブをシステムに満たし、かつこれらをヒートブロック中３７℃で保持した。制御された通気は、管の内側に設置され、かつ１８００ｒｐｍでスピンする磁気タンブル撹拌機を使用して得られた。実験の開始時に、システムの内側に置かれたチューブのうち１つに単一のコロニーが一晩で成長し、かつ７つの独立したフラスコに播種するために、ロボティックスプラットフォームにより１００μＬアリコートを使用した。細菌が成長するにつれて、自動化システムは、各フラスコにおいて６００ｎｍで複数のＯＤ測定を行った。細菌が成長するにつれて、６００ｎｍで複数のＯＤ測定を行った。ＯＤ測定値の対数にフィットする最小二乗線形回帰線の傾きを取ることにより成長速度を自動的に計算した。標的のＯＤが０．４に達し次第、培養物１００μｌを使用して、新たなチューブに播種した。このように、静止期に決して達しないような標的の細胞密度に達した後に、培養物を連続して（１日に２～３回）新たな培地を有するフラスコに通した。所望の成長速度に達した後に、集団を３ｇ／Ｌセリンで初めにインキュベートし、培養物に６ｇ／ＬのＬ－セリンを補充した。集団が安定した表現型（すなわち、成長速度）に達した際に、Ｌ－セリン濃度は１２ｇ／Ｌに増大した。この方法を、反復的に２４、５０、７５および１００ｇ／ＬのＬ－セリンを使用して繰り返した。最終的な集団をＬＢ－アガールにプレーティングし、かつ各集団の２つのクローンを選択した。先に例５で記載したＭＴＰベースアッセイの使用により、高濃度のセリンの存在で成長を試験した場合に、進化した株は、著しく増大した耐性を有した。結果は図６に示されている。

【０３９３】

ゲノムＤＮＡの抽出、ライブラリーシーケンシングおよび分析

進化した各培養物の２つのクローンならびにランダムＵＶ－突然変異により進化した株（例５）をゲノムシーケンシングした。ＱＩＡａｍｐ　ＤＮＡ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ、ドイツ）を使用して、ゲノムＤＮＡを大腸菌株の一夜培養物１．５ｍｌから抽出した。ゲノムライブラリーは、ＴｒｕＳｅｑ(R)Ｎａｎｏ　ＤＮＡ　ＬＴサンプル作製キット（Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＩｎＣ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ　ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して作製した。

【０３９４】

簡単に述べると、５２．５μｌのＴＥ緩衝液中で希釈したゲノムＤＮＡ１００ｎｇを、デューティファクター５％、１７５Ｗピークインシデンスパワー、２００サイクル／バーストおよび５．５～６℃にて周波数掃引モード下に５０秒の滞留時間（３５０塩基対の平

均断片サイズに対するイルミナ社の推奨）でコバリスＥ２２０ウルトラソニケーター（Ｃｏｖａｒｉｓ、Ｂｒｉｇｈｔｏｎ、ＵＫ）においてＣｏｖａｒｉｓ Ｃｒｉｍｐ Ｃａｐマイクロチューブ中でフラグメント化した。断片化ＤＮＡの末端をＴ４ＤＮＡポリメラーゼ、Ｋｌｅｎｏｗ ＤＮＡポリメラーゼおよびＴ４ポリヌクレオチドキナーゼにより補修した。Ｋｌｅｎｏｗ ｅｘｏ ｍｉｎｕｓ酵素を使用し、次にＤＮＡ断片の３’末端“Ａ”塩基に加えた。ＤＮＡ断片の末端へのアダプターのライゲーションの後に、３００～４００塩基の範囲内のＤＮＡ断片をビーズ精製により回復した。最後に、アダプター変性ＤＮＡ断片を3サイクルーＰＣＲにより増やした。各ライブラリーの最終濃度は、Ｑｕｂｉｔ(R)２．０ ＦｌｏｒｏｍｅｔｅｒおよびＱｕｂｉｔ ＤＮＡ広範囲アッセイ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ,Ｐａｉｓｌｙ,ＵＫ）により測定した。平均ｄｓＤＮＡライブラリーサイズは、Ａｇｉｌｅｎｔ ＤＮＡ ７５００キットを使用してＡｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒにおいて決定した。ライブラリーを標準化し、かつ１０ｍＭトリスーＣｌ（ｐＨ８．０）中にプールし、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を足して１０ｎＭの最終濃度にした。０．２Ｎ ＮａＯＨ中で変性し、６００μｌ氷冷ＨＴ１緩衝液中の２０ライブラリーの１０ｐＭプールをＭｉＳｅｑ Ｒｅａｇｅｎｔ ｋｉｔ ｖ２ ３００ ｃｙｃｌｅｓで用意されたフローセル上に乗せ、かつペアエンドプロトコールおよび１５１ｎｔのリード長さを用いてＭｉｓｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＩｎＣ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）プラットフォーム上でシーケンシングした。

【０３９５】

ｂｒｅｓｅｑパイプライン（Ｄｅａｔｈｅｒａｇｅ ａｎｄ Ｂａｒｒｉｃ，２０１４）バージョン０．２３とＢｏｗｒｉｅ２（Ｌａｎｇｍｅａｄ ａｎｄ Ｓａｌｚｂｅｒｇ）を使用して、シーケンシングリードをマッピングし、かつ大腸菌Ｋ１２ ＭＧ１６５５参照ゲノムに対する配列変異体を同定した（ＮＩＢＩ登録番号ＮＣ＿０００９１３．２）。マニュアルに従って、株に存在する遺伝子欠失はゲノム中の失われたカバレッジ領域に基づいて評価した。ＭＧ１６５５ストック培養中（Ｆｒｅｄｄｏｌｉｎｏ等、２０１２）で見出される共通の変異体は更なる分析から取り除いた。全てのシーケンシング試料は、少なくとも２５倍の平均マップカバレッジを有していた。この実験は、表Ｓ５に示されているように、高濃度のセリンに対する増大した耐性を引き起こす突然変異を示している。

【０３９６】

表Ｓ５：増大したセリン耐性に関与する株で見出された突然変異。ゲノム配列の参照番号は、ＮＣ＿０００９１３である。

【表６－１】

| 遺伝子名 | 交換 | 注釈 | Q1 | Q3 | ALE5-4 | ALE5-8 | ALE6-1 | ALE6-2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| thrA | A->G | Y356C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

【表６－２】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| thrA | A->C | S357R | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| thrA | T->A | S359R | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| trxA/rho | IS1 -1 9 bp | 挿入[1] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rho | G->T | R87L | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| gcvA/ygdI | 1 bp | 挿入[2] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| gcvA/ygdI | IS4 1 13 bp | 挿入[3] | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| dapA/gcvR | 1 bp | 挿入[4] | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| lrp | A->G | D143G | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| trxB/lrp | C->T | 遺伝子間[9] (-271/-274) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| frc | IS1 -1 9 bp | 挿入[5] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| eno | C->G | V164L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| argP | C->A | Q132K | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| tufA | C->A | G19V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cycA | A->G | I220V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rhtA/ompX/ybiP/mntS | 2854 bp | 欠失[6] | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| rpe | A->G | I202T | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| ytfB/fklB | T->C | 遺伝子間[10] (-154/-64) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| yojL | G-->C | D334H | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| aroP | IS5 1 4 bp | 挿入[7] | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| hyaF | T->G | V120G | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| mdtJ/tqsA | IS1 -1 9 bp | 挿入[8] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| pykF | G->T | E250* | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| malT | C->T | Q420* | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| rpoB | C->T | P520L | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| fumB | T->G | T218P | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| gshA | G-->A | A178V | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| lamB | C-->T | Q112* | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | | | | | | | |
| **遺伝子名** | **交換** | **注釈** | **Q1** | **ALE8-3** | **ALE8-8** | **ALE9-3** | **ALE9-8** | |
| thrA | A->G | Y356C | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| thrA | A->C | S357R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| thrA | T->A | S359R | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| trxA/rho | IS1 -1 9 bp | 挿入[1] | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| rho | G->T | R87L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| gcvA/ygdI | 1 bp | 挿入[2] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| gcvA/ygdI | IS4 1 13 bp | 挿入[3] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| dapA/gcvR | 1 bp | 挿入[4] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| lrp | A->G | D143G | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| trxB/lrp | C->T | 遺伝子間[9] (-271/-274) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| frc | IS1 -1 9 bp | 挿入[5] | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| eno | C->G | V164L | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

【表６－３】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| argP | C->A | Q132K | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| tufA | C->A | G19V | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| cycA | A->G | I220V | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| rhtA/ompX/ybiP/mntS | 2854 bp | 欠失 [6] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| rpe | A->G | I202T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| ytfB/fklB | T->C | 遺伝子間 [10] (-154/-64) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| yojI | G-->C | D334H | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| aroP | IS5 1 4 bp | 挿入 [7] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| hyaF | T->G | V120G | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| mdtJ/tqsA | IS1 -1 9 bp | 挿入 [8] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| pykF | G->T | E250* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| malT | C->T | Q420* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| rpoB | C->T | P520L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| fumB | T->G | T218P | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| gshA | G-->A | A178V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| lamB | C-->T | Q112* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

【０３９７】

記号の説明：

＊：ストップコドンを示す

挿入[1]：ｔｒｘＡとｒｈｏの間の遺伝子間領域である位置３９６１７４でのラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入。挿入配列の９塩基対上流と下流の重複が観察される。

挿入[2]：遺伝子ｇｃｖＡとｙｇｄＩの間の遺伝子間領域である位置２９４２６２９での１塩基対の挿入。

挿入[3]：遺伝子ｇｃｖＡとｙｇｄＩの間の遺伝子間領域である位置２９４２８７８での１３４２塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ４の挿入。挿入配列の１３塩基対上流周辺と下流の重複が観察される。

挿入[4]：遺伝子ｄａｐＡとｇｃｖＲの間の遺伝子間領域である位置２５９９８５４での１塩基対の挿入。

挿入[5]：位置２４９２３２３でのラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入。これは、遺伝子ｆｒｃのトランケーションにつながる。挿入配列の９塩基対上流と下流で重複が観察される。

欠失[6]：位置８５００９２からの２８５４塩基対の欠失、これはｒｈｔＡの最初の５塩基対の欠失、遺伝子ｏｍｐＸとｙｂｉＰの完全な欠失、ｓＲＮＡ ｒｙｂＡの２３９ｂｐの欠失およびｍｎｔＳ遺伝子の７７塩基対の欠失を生じる。

挿入[7]：位置１２１５１８での１１９５塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ５の挿入、これはａｒｏＰの大半の欠失を生じる。

挿入[8]：遺伝子ｍｄｔＪとｔｑｓＡの間の遺伝子間領域である位置１６７３６７０でのラギング鎖中に７６８塩基対長さの挿入配列エレメントＩＳ１の挿入。挿入配列の９塩基対上流と下流で重複が観察される。

遺伝子間[9]：ｔｒｘＢとＩｒｐの間の遺伝子間領域である位置９２３３２１でのＣ→Ｔへの突然変異。

遺伝子間[10]：ｙｆｔＢとｆｋＩＶの間の遺伝子間領域である位置４４２８８７１でのＴ→Ｃへの突然変異。突然変異は、ｙｆｔＢの１５４塩基対上流とｆｋｌＢの６４塩基対上流である。

【０３９８】

例６－ｃａｍ－ｓａｃＢ系によるＡＬＥ突然変異のリバース・エンジニアリングおよび複合ゲノムエンジニアリング

セリンに対する増大した耐性を引き起こす突然変異を同定するために、以下に説明するような２つの異なる方法を使用して、例５で同定した突然変異をＱ１（ＤＥ３）株に挿入した。

【０３９９】

Ａ．ｔｈｒＡ突然変異の導入

ｔｈｒＡにおける突然変異をｃａｍ－ｓａｃＢベースの選択系を使用してＱ１（ＤＥ３）株のゲノムに導入した。ｃａｍ－ｓａｃＢは、組換え用のｅｘｏ、βおよびγ遺伝子が棲息するｐｋＤ４６プラスミドを使用して挿入した。カセット挿入に関するポジティブ選択は、クロラムフェノコール耐性用のクローンの選択により行われた。カセットの損失は、ＬＢ－クロラムフェノコールと１５％スクロース含有（ＮａＣｌ無し）ＬＢ－スクロースプレート上でのレプリカプレーティングクローンの選択により選択された。Ｃａｍ－ｓａｃＢカセットは、それぞれｔｈｒＡ＿ｃａｍｓａｃＢ＿ＦとＲ（表Ｓ６）プライマーを使用して増幅した。テンプレートおよび伸長時間とは別に、反応混合物とＰＣＲプログラムは、例１で記載したものと同じであった。伸長時間は２分と３０秒であるのに対して、テンプレートは、ｃａｍ－ｓａｃＢカセット含有の大腸菌培養物の一夜培養物１μｌであった。次にコンピテントＱ１（ＤＥ３）細胞をｔｈｒＡ－ｃａｍ－ｓａｃＢカセット２００ｎｇで形質転換し、かつ２時間後にＬＢ－クロラムフェニコール－アンプリコンプレート上にプレーティングし、かつ３０℃で一晩インキュベートした。単一コロニーを選び取り、かつ誘発の１時間後にエレクトロコンピテントにし（例１）、かつｔｈｒＡ対立遺伝子で形質転換した。回復の２時間後に、細胞をＬＢ－スクロース上にプレーティングし、かつ３７℃でインキュベートし、ｐｋＤ４６プラスミドを回復させた。各実験の２４個のクローンをＬＢ－クロラムフェニコールとＬＢプレート上に複製プレーティングした。クロラムフェニコールプレート上で成長しなかったクローンをカセットの損失について、コロニーＰＣＲによりチェックし、かつ引き続きＳａｎｇｅｒシーケンシングによりシーケンス化した。

【０４００】

ｔｈｒＡ突然変異体（Ｙ３５６Ｃ、Ｓ３５７ＲまたはＳ３５９Ｒ）を含んでいる全ての３つの株を２ｍＭグリシン、２ｇ／Ｌグルコースおよび６．２５ｇ／Ｌ　Ｌ－セリンを補充したＭ９培地中で成長させた。この実験では、バックグランドを測定値から引かず、その結果、Ｑ１株のＯＤに明らかな増大を生じた。しかし、これらの条件下では、Ｑ１株は著しい成長を示さなかった。他方で、各々のｔｈｒＡ突然変異は、Ｌ－セリンに対して類似かつ極めて著しい耐性の増大を生じ（図７）、親株Ｑ１とは異なり、これらを少なくとも６．２５ｇ／ＬのＬ－セリン濃度で成長できるようにする。全てのｔｈｒＡ突然変異体が同じ成長プロフィールを有するので、Ｓ３５７Ｒ突然変異体を以下に記載の複合ゲノムエンジニアリング用の親株（株Ｑ１（ＤＥ３）－ｔｈｒＡＳ３５７Ｒと称する）として選択した。

【０４０１】

表Ｓ６：ゲノム中でｔｈｒＡ突然変異のゲノム挿入に使用したプライマー

【表７】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| thrA_gF | ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCG |
| thrA_gR | TCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGGG |
| thrA_camsacB_F | ATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGTTTAAAATGAGACGTTGATCGGCACG |
| thrA_camsacB_R | TCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGGGTACGTAGCAGATCAGCAAAGACACCAAAGGGAAAACTGTCCATATGCAC |

【０４０２】

Ｂ．選択されたＡＬＥ突然変異の複合ゲノムエンジニアリング、スクリーニングおよびアンプリコンシーケンシング

セリンに対する増大した耐性を引き起こす突然変異を同定するために、複合ゲノムエンジニアリング（Ｗａｎｇ等、２０１１）を使用し、例５で示した選択突然変異をＱ１（ＤＥ３）－ｔｈｒＡＳ３５７Ｒ株に導入した。

【０４０３】

複合ゲノムエンジニアリングに適用したプロトコールは、Ｗａｎｇ　ａｎｄ　Ｃｈｕｒｃｈ（２０１１）により出版されている方法に類似していた。株Ｑ１（ＤＥ３）－ｔｈｒＡＳ３５７ＲをプラスミドｐＭＡ１で形質転換した（アラビノース誘発性プロモーターによる制御下にβタンパク質だけを含有）。クローンをＬＢ－アンプリコン上にプレーティングし、かつ３７℃でインキュベートした。コロニーをＴＹ－ａｍｐ－ｇｌｙ培地中、３７℃で一夜培養し、かつ翌日に新たなＴＹ－ｇｌｙ培地２５ｍｌ中に再度播種した。３７℃で０．４のＯ.Ｄ.に達した後に、アラビノースを添加し０．２％の最終濃度にした。細胞を３７℃および２５０ｒｐｍで更に１５分間再度インキュベートし、かつ次に１０％グリセロール（氷冷）での２回の洗浄によりエレクトロコンピテントにした。エレクトロコンピテントセルの最終的な容積を１０％グリセロールを使用して２００μｌに調節した。ｌｏｃｉを標的にしているプライマー（ＩｒｐＤ１４３Ｇ、ｅｎｏＶ１６４Ｌ、ａｒｇＰＱ１３２Ｋ、ｃｙｃＡ１２２０Ｖ、ｐｙｋＦ　Ｅ２５０＊、ｒｐｏＢ５２０Ｌ、ｇｃｖＡ＊、ｙｏｊＬ　Ｄ３３４Ｈ、ｒｈｏ　Ｒ８７Ｌ）は、表Ｓ７に挙げられている。全てのプライマーをプールし、かつ１０ｐｍｏｌ／μｌの最終濃度に調節した。細胞５０μｌには、この混合物１μｌを添加し、かつ電気泳動により形質転換した。形質転換した細胞を直接に２５ｍｌＴＹ－ｇｌｙ培地に添加し、かつ３７℃、２５０ｒｐｍで２時間インキュベートし、０．４のＯ.Ｄ.に達するようにし、続いて２回目の複合エンジニアリングとして上記のようなアラビノース誘発および形質転換を行った。このプロセスを６回繰り返した。複合エンジニアリングの６回目のラウンドの後に、細胞を一晩インキュベートした。得られた突然変異体のライブラリーを引き続き、セリン有りまたは無しのＭ９最小培地中で成長させた。このように、最小培地中で増大した成長速度を生じるかまたはセリンに対する増大した耐性を生じた突然変異を増やした：全部で一夜培養物１．５μｌを、２ｍＭグリシンおよび２ｇ／Ｌグルコースを補充したＭ９培地（最小培地）もしくは２ｍＭグリシン、２ｇ／Ｌグルコースおよび２５ｇ／Ｌセリンを有するＭ９培地（最小培地とセリン）の１５０μｌトリプリケートを含有しているマイクロタイタープレート中のウェルにトリプリケートで加えた。マイクロタイタープレートリーダーにおいて連続的に素早く振盪しながら３７℃で４０時間にわたり成長プロフィールをモニターした。光学密度を６３０ｎｍで５分おきに測定した。トリプリケートをプールし、かつアンプリコン作製のためのテンプレートとして使用した。ＰＣＲプログラムと反応組成物は、例１に記載されている。Ｉｌｌｕｍｉｎａプロトコールは、アンプリコンプロセシングに続いて行い、かつ次の遺伝子シーケンシングは例５に記載されている通りであった。得られたシーケンシングをコンピューターにより分析し、かつ様々な突然変異の富化を最小培地もしくはセリン有りの最小培地中のどちらかで突然変異の頻度として計算し、非選択ライブラリー中での突然変異の頻度で割った（図８）。この実験は、Ｉｒｐ、ｒｈｏ、ａｒｇＰおよびｅｎｏにおける突然変異が結果としてセリンに対する耐性を増大したことを示している。

【０４０４】

表Ｓ７：複合ゲノムエンジニアリングに使用したプライマー

【表８】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| lrpD143G | GCTTGACTTCTTCCATAACAACGTAAGTGCGCGTCCCGTTAACCCCAGGCAGACGC AGCAGGGTTTC |
| enoV164L | CCAACCGGCTGAATCATGAATTCTTGA ATGTCGAGATTATTATCAGCGTGCTCACCACCGTTGATGATG |
| argPQ132K | CTCAACTTGCAGGTAGAAGATGAAACGAGGAAAGAGAGGCTCCGCCGCGGCGA AGTGGTCGGC |
| cycAI220V | CAGCTCAATCCCCACGAAAGCTAATACGGCAACTTGAAAACCGGCAAAGAAGCCA CTTAAACCTTTC |
| pykFE250*** | GCATCATGGTTGCGCGTGGCGAC CTCGGCGTTTAGTGACCCTAAATCTTCGCCCAGAAGATGATGA |
| rpoBP520L | GATACGACGTTTGTGCGTAATTTCTGAGAGGAGATTATTTTGGTCCATAAACTGA GACAGCTG |
| gcvA*** | CTCGTAAGGCATTTAGCGGTGGTA ATGGTTATC ATTAGGCTATTAAACTTTGATGTTAAATG |
| yojLD334H | GGTGAGATTAATCGGACCAACGGAGAAGGCATTGTGTTGGTATGCAAACGTCAC GTTACGCAGCTCCAGC |
| rhoR87L | GAGATGGTATCACCAGTGCGGAGATTAAATCTTAGTATCTGAGAAGGGGAAACG TAGATGTCATCAG |

【０４０５】

表Ｓ８：アンプリコンシーケンシングに使用したプライマー

【表９】

| ﾌﾟﾗｲﾏｰ名 | 配列 |
|---|---|
| lrp_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGGTGATTTCGACTACCTGTTG |
| lrp_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGCGTCTTAATAACCAGACGAT |
| enoV164_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGTACGAGCACATCGCTGAAC |
| enoV164_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCATGCGGATGGCTTCTTTCAC |
| argP_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GACAGTCTGGCGACGTGGTTGCT |
| argP_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTATCGACAAGACAACTCGGCAGCG |
| cycA_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAGCGTCATTCGCGCATTTG |
| cycA_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTAATCGCGCGTGGCAGTG |
| pyfK_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCCTCAACAACTTCGACGA |
| pyfK_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAATCCAGCATCTGGGTCGC |
| rpoB_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAACGCCAAGCCGATTTCCG |
| rpoB_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTCGAACTTCGAAGCCTGC |
| gcvA_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGGTAGAAGCTCAACGGAC |
| gcvA_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTGCGGCATCAAAAACTCG |
| yojI_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTTTCAAAGCAGAGTTTCCGC |
| yojI_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTACCGTTGCCGCCAATCAG |
| rho_F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGGATGGATTTGGTTTCCTCC |
| rho_R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGCGCAAAATAGCGTTCACC |

【０４０６】

例７：フェドバッチ発酵の間の耐性がありおよび感染しやすい大腸菌によるセリン生産

ｐＡＣＹＣ－Ｄｕｅｔベクター中でセリン経路を伴うエクスポーターの発現を増加させるために、上記の例２と同じストラッテジーに従って新たなベクターを構築した。ｙｄｅＤ－Ｃ－Ｈｉｓのクローニング用のＮｃｏＩとＨｉｎｄＩＩＩ二重消化を使用してｓｅｒＢをクローン化し、続いてライゲーションした。次に、得られたベクター（ｐＡＣＹＣ－Ｄｕｅｔ－ｓｅｒＢ）に、ｙｄｅＤ－Ｃ－Ｈｉｓのクローニング用のＮｃｏＩとＰａｃＩにより二重消化を行った。両方の株Ｑ１（ＤＥ３）とＱ３（ＤＥ３）は、細胞を０．２％

グルコース補充の２×ＹＴ培地３０ｍｌ中で中期対数期まで成長させる（３７℃、２５０ｒｐｍ）ことによりエレクトロコンピテントにした。細胞を４℃、６５００ｒｐｍで５分間遠心分離することにより収穫し、かつ氷冷１０％グリセロールにより２回洗浄した。最後に細胞を１０％グリセロール５００μＬ中に再懸濁させ、かつ細胞５０μＬをセリン生産用にプラスミドｐｃＤＦ－Ｄｕｅｔ１－ｓｅｒＡｍｕｔ－ｓｅｒＣおよびｐＡＣＹＣ、ＳｅｒＢ－ｙｄｅＤ－ｃ－Ｈｉｓで形質転換した。

【０４０７】

セリン生産は、１Ｌ発酵槽（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ，Ｇｏｔｔｉｎｇｅｎ、ドイツ）中でのフェドバッチ発酵の際に実証された。培地は、２ｇ／Ｌ　$MgSO_4 * 7H_2O$、２ｇ／Ｌ　$KH_2PO_4$、５ｇ／Ｌ　$(NH_4)SO_4$、７．５ｇ／Ｌグルコース、２ｇ／Ｌ酵母エキス、０．６ｇ／Ｌグリシン、０．１２ｇ／Ｌチオニン、４×微量元素（例２で記載したような）、５０ｍｇ／Ｌスペクチノマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールを含有していた。大腸菌Ｑ１（ＤＥ３）株に関しては、誘発前に成長を促進するために初期グルコース濃度は１０ｇ／Ｌであった。供給物は、一般的には１４０ｇ／Ｌグルコース、２４ｇ／Ｌ硫酸アンモニウム、２ｇ／Ｌグリシン、０．１２ｇ／Ｌトレオニン、それぞれ２．５ｇ／Ｌの$MgSO_4 * 7H_2O$と$KH_2PO$、１×微量元素、５０ｍｇ／Ｌスペクチノマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェニコールを含有していたのに対して、一方でＱ１（ＤＥ３）株の供給物は、１２０ｇ／Ｌグルコースを含有していた。

【０４０８】

対数期の培養物は、５００ｍｌ培地を１：５０の播種比で播種するために使用した。培養物を３７℃、１０００ｒｐｍのバッフル速度および２０％空気飽和で一晩成長させた。培地中のグルコース濃度が２５０ｍｇ／Ｌを下回った後に８ｇ／ｈの供給速度を開始した。生産は、４０μＭ　ＩＰＴＧの添加により遅い対数期（Ｏ.Ｄ.７．５～９．５）で誘導され、かつ供給速度を６ｇ／ｈに下げた。試料を一定の間隔で取り、かつ先に記載したようにＨＰＬＣとＬＣＭＳ分析を行った。

【０４０９】

この実験は、フェドバッチ発酵の使用により、セリンを大腸菌中で高力価かつ高収率で生産できることを実証している（図９）。力価は、Ｑ１（ＤＥ３）とＱ３（ＤＥ３）株に関して６．８ｇ／Ｌおよび１２．５ｇ／Ｌであった。発酵は、Ｑ１（ＤＥ３）株中の２４．３％と比べると、Ｑ３（ＤＥ３）株でのグルコースから結果として、３６．７％という著しく高い質量収率を生じた（図９Ｂ）。このことは、セリンに対して耐性である生産株を使用して、より高い力価と収率を達成できることを示している。

【０４１０】

例８－増大したセリン生産を示すリバースエンジリアニングされた株

例６でリバースエンジリアニングされた株を例３で記載したようにセリン耐性に関してチェックした。最も良い耐性株（Ｆ７）をセリン生産に関してチェックし、かつ例５に記載されているようにゲノムシーケンス化した。セリン生産経路を過剰発現するためのプラスミドを例７に記載されているように導入した。振盪フラスコ実験を例２で記載されているように実施したが、グルコースの濃度が２．５ｇ／Ｌであったことだけが異なる。Ｏ．Ｄ．測定値とサンプリングは、一定の間隔で実施し、かつ例２に記載されている方法を使用して試料を分析した。意外にも、前記株は表Ｓ９に示されているようにグルコースからセリンの増大した生産と収率を生じた。ゲノム配列はｚｗｆの欠失を明確にし、これはペントースホスフェート経路で最初の酵素をコードする。更に、この株はｔｈｒＡＳ３５７ＲとｒｈｏＲ８７Ｌ突然変異を有していた。その上、株は分枝鎖アミノ酸エクスポーターｂｒｎＱのトランケーションを有した（１０５塩基対が４１９９８６の位置の始めに欠失された。４３９個のアミノ酸タンパク質を３０８個のアミノ酸の後にトランケートされた）。

【０４１１】

表Ｓ９：セリン生産におけるΔｚｗｆの効果

【表１０】

| | セリン濃度 g/L<br>(+/- 標準偏差 ) | グルコースからの収率<br>（ｇセリン／ｇグルコース） |
|---|---|---|
| ΔsdaA ΔsdaB ΔtdcG ΔglyA (Q1) | 0.925 (+/- 0.048) | 0.37 |
| ΔsdaA ΔsdaB ΔtdcG ΔglyA Δzwf Δbrnq thrA S357R rho R87L | **1.323 (+/- 0.06)** | **0.53** |

【０４１２】

例９－ＡＬＥ８による生産

ｐＥＴベクターを発現系として使用するために、λＤＥ３溶菌化キット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｄａｍｓｔａｄｔ、ドイツ）を使用してＴ７ポリメラーゼ含有のＤＥ３カセットをＡＬＥ８－８突然変異体（例５）のゲノムに挿入し、結果として株ＡＬＥ８－８（ＤＥ３）を生じた。引き続き、０．２％グルコースを補充した２×ＹＴ培地３０ｍｌ中で対数中期まで細胞を育てることにより（３７℃、２５０ｒｐｍ）ＡＬＥ８－８（ＤＥ３）をエレクトロコンピテントにした。細胞を４℃、６５００ｒｐｍで５分間の遠心分離により回収し、かつ氷冷１０％グリセロールにより２回洗浄した。最後に細胞を１０％グリセロール５００μＬ中に再懸濁させ、かつ細胞５０μＬをセリン生産用のプラスミドｐＣＤＦ－Ｄｕｅｔ１－ｓｅｒＡｍｕｔ－ｓｅｒＣおよびｐＡＣＹＣ、ＳｅｒＢで形質転換した。

【０４１３】

セリン生産は、例７で記載した１Ｌ発酵槽（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、Ｇｏｔｔｉｎｇｅｎ、ドイツ）中でのフェドバッチ発酵の際に実証された。培地は、２ｇ／Ｌ　$MgSO_4*7H_2O$、２ｇ／Ｌ　$KH_2PO_4$、５ｇＬ$(NH_4)_2SO_4$、１０ｇ／Ｌグルコース、２ｇ／Ｌ酵母エキス、０．６ｇ／Ｌグリシン、４×微量元素（例２に記載したような）、５０ｍｇ／Ｌスペクチノマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェノールを含有した。供給物の３７５ｇは、４００ｇ／Ｌグルコース、２４ｇ／Ｌ硫酸アンモニウム、２ｇ／Ｌグリシン、２．５ｇ／Ｌ　$MgSO_4*7H_2O$および$KH_2PO_4$　５ｇ／Ｌ、１×微量元素５０ｍｇ／Ｌ、５０ｍｇ／Ｌスペクチノマイシンおよび２５ｍｇ／Ｌクロラムフェノールを含有した。対数期の培養物を使用し、１：５０の播種比により５００ｍｌ培地に播種した。培養物を発酵槽中、３７℃、１０００ｒｐｍの撹拌速度および２０％空気飽和で成長させた。８０μＭ　ＩＰＴＧの添加により生産は、対数後期（Ｏ．Ｄ．８．５～９．５）で誘発し、かつ供給を８ｇ／ｈの速度で開始した。試料を一定の間隔で取り出し、かつ先に記載したようにＨＰＬＣとＬＣＭＳ分析を行った。

【０４１４】

この実験は、ＡＬＥ８－８（ＤＥ３）株において、高い細胞密度と高いセリン力価（５５．０ｇ／Ｌ）の両方が得られたことを示し（図１０Ａ）、グルコースからの質量収率は３６．０％であった（図１０Ｂ）。

【０４１５】

例１０－Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９の位置でのｔｈｒＡの過剰発現および部位飽和突然変異

部位飽和突然変異（ＳＳＭ）を使用し、選択されたアミノ酸残基を突然変異し他の全ての２０種のアミノ酸にすることができる。このことは、酵素活性におけるアミノ酸置換の効率、そして今度は表現型における効率を調査することを可能にする。ｔｈｒＡ遺伝子をプライマーｔｈｒＡ＿ＮｃｏＩ＿ＦおよびｔｈｒＡ＿ＨｉｎｄＩＩＩ（表Ｓ１０のプライマー配列）を使用してＭＧ－１６５５ｗｔ株から増幅し、かつＮｃｏＩとＨｉｎｄＩＩＩ酵素を使用してｐＡＣＹＣ－Ｄｕｅｔ１プラスミド中でクローン化した。クローン化のプロトコールは例２のｓｅｒＢのクローン化と同じであった。構築されたベクターは、ｐＡＣＹＣ－ｔｈｒＡであった。このプラスミドをＳＳＭのテンプレートとして使用した。ＡＬＥ株（Ｙ３５６、Ｓ３５７およびＳ３５９）中で観察されたｔｈｒＡ突然変異用のＳＳＭは、表Ｓ１０に挙げられたプライマーを使用して実施された。ＳＳＭプロトコールは、フィードバック・インテンシブｓｅｒＡの突然変異に関して例２に適用されたＳＤＭプロ

トコールと類似していた。ＰＣＲ産物をＤｐｎｌで消化し、かつＱ１（ＤＥ３）株中で形質転換し、これはこのゲノム中で野生型ｔｈｒＡ遺伝子を有し、かつ０．１％グルコースと４ｍＭグリシンを補充したＬＢ－クロラムフェノールプレート上にプレーティングした。クロラムフェニコールはプラスミドの安定のために以下の全ての培地で補充した。

【０４１６】

個々のコロニーを選び取り、０．１％グルコースと２ｍＭグリシンを補充した２×ＴＹ培地含有の９６ウェルＭＴＰプレートに播種した。各ＳＳＭライブラリーから９０個のコロニー（１マイクロタイタープレート（ＭＴＰ））を選び取った（全部で３プレート）。ｐＡＣＹＣ－Ｄｕｅｔ空ベクターとｐＡＣＹＣ－ｔｈｒＡｗｔが棲息するＱ１（ＤＥ３）株をコントロール株として各プレート中で播種した。このプレートを３７℃および３００ｒｐｍで一晩インキュベートした。このプレ培養プレートを播種源として使用し、これから１μＬを、０．２％グルコース、２ｍＭグリシンを補充したＭ９培地１００μＬ含有の新たな９６ウェルＭＴＰプレートに加えた。培養物を４時間インキュベートし、この後に、１ｍＭ　ＩＰＴＧ２５μＬを加えて発現を誘発した。引き続き、このプレートを２時間インキュベートし、かつ次に０．２％グルコース、２ｍＭグリシンおよび１２．５ｇ／Ｌ

Ｌ－セリン含有のＭ９培地を加え、このように６．２５ｇ／Ｌの最終セリン濃度に達した。次に、先に記載したように成長分析用にプレートを振盪させながらＭＴＰリーダー中でインキュベートした。各プレートから耐性を示す選択クローンを１つのプレートに回収し、かつこれらの株に関して耐性試験を繰り返した。耐性のあるクローンからのプラスミドをシーケンス化し、かつ成長速度を培養物の対数期から見積もった。このように、セリンに対する耐性を生じるアミノ酸置換の数を同定した（図１１）。図１１（Ａ～Ｃ）は、種々のアミノ酸置換を有する突然変異体株の成長速度が、それぞれＴｈｒＡの３５６、３５７および３５９の位置で観察されたことを示している（それぞれ１文字表記により表示）。野生型ｔｈｒＡ遺伝子を有する大腸菌の成長速度は、“ｗｔ”と表示してある。

【０４１７】

この実験は、在来のＴｈｒＡタンパク質中の３５６、３５７および３５９の位置でのアミノ酸置換が、Ｌ－セリンに対する変性株の増大した耐性を保証したことを実証している。更に、データはＴｈｒＡの突然変異体の過剰発現が、それらのゲノムに存在する在来のｔｈｒＡ遺伝子を有する株においてもＬ－セリンに対する耐性を増大できることを実証している。

【０４１８】

表Ｓ１０：ｔｈｒＡのクローニングおよび部位飽和突然変異（ＳＳＭ）に使用したプライマー

【表１１】

| | |
|---|---|
| thrA_NcoI_F | GCGCCATGGGAGTGTTGAAGTTCGGCG |
| thrA_HindIII_R | GCCAAGCTTTCAGACTCCTAACTTCCATGAGAGGG |
| thrA_Y356NNK_F | CGCAGAAACTGATGCTMNNTTCGGAAGATGATTGCG |
| thrA_Y356NNK_R | CGCAGAAACTGATGCTMNNTTCGGAAGATGATTGCG |
| thrA_S357NNK_F | CAATCATCTTCCGAATACNNKATCAGTTTCTGCGTTCC |
| thrA_S357NNK_R | GGAACGCAGAAACTGATMNNGTATTCGGAAGATGATTG |
| thrA_S359NNK_F | CCGAATACAGCATCNNKTTCTGCGTTCCAC |
| thrA_S359NNK_R | GTGGAACGCAGAAMNNGATGCTGTATTCGG |

【０４１９】

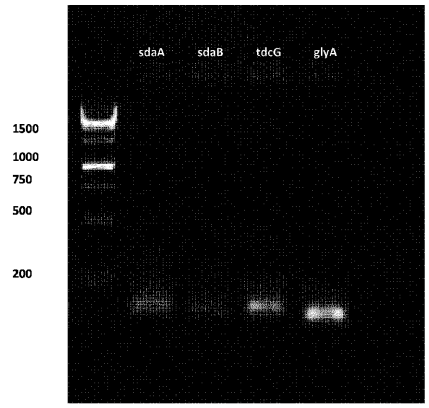
本説明中に引用された参考文献一覧

Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: Biotechnological production of amino ac

ids and derivatives: current status and prospects. Appl Microbiol Biotechnol 200 5, 69:1-8.
Hagishita T, Yoshida T, Izumi Y, Mitsunaga T: Efficient L-serine production from methanol and glycine by resting cells of Methylobacterium sp. strain MN43. Bios ci Biotechnol Biochem 1996, 60:1604-1607.
Burgard AP, Maranas CD: Probing the performance limits of the Escherichia coli m etabolic network subject to gene additions or deletions. Biotechnol Bioeng 2001, 74:364-375.
Li Y, Chen GK, Tong XW, Zhang HT, Liu XG, Liu YH, Lu FP: Construction of Escheri chia coli strains producing L-serine from glucose. Biotechnol Lett 2012, 34:1525 -1530.
Peters-Wendisch P, Stolz M, Etterich H, Kennerknecht N, Sahm H, Eggeling L: Meta bolic engineering of Corynebacterium glutamicum for L-serine production. Appl En viron Microbiol 2005, 71:7139-7144.
Gu P, Yang F, Su T, Li F, Li Y, Qi Q: Construction of an L-serine producing Esch erichia coli via metabolic engineering. J Ind Microbiol Biotechnol 2014, 41:1443 -1450.
Stolz M, Peters-Wendisch P, Etterich H, Gerharz T, Faurie R, Sahm H, Fersterra H , Eggeling L: Reduced folate supply as a key to enhanced L-serine production by Corynebacterium glutamicum. Appl Environ Microbiol 2007, 73:750-755.
Zhang X, Newman E: Deficiency in l-serine deaminase results in abnormal growth a nd cell division of Escherichia coli K-12. Mol Microbiol 2008, 69:870-881.
Hama H, Sumita Y, Kakutani Y, Tsuda M, Tsuchiya T: Target of serine inhibition i n Escherichia coli. Biochem Biophys Res Commun 1990, 168:1211-1216.
de Lorenzo V, Sekowska A, Danchin A: Chemical reactivity drives spatiotemporal o rganisation of bacterial metabolism. FEMS Microbiol Rev 2014.
Chowdhury A, Zomorrodi AR, Maranas CD: k-OptForce: integrating kinetics with flu x balance analysis for strain design. PLoS Comput Biol 2014, 10:e1003487.
von Kamp A, Klamt S: Enumeration of smallest intervention strategies in genome-s cale metabolic networks. PLoS Comput Biol 2014, 10:e1003378.
Qui Z and Goodman MF: The Escherichia coli polB locus is identical to dinA, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant. J Biol Chem. 1997, 272(13): 8611-8617.
Kwon DH, Pena JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J: Frameshift mutation s in rdxA and metronidazole resistance in North American Helicobacter pylori iso lates. J Antimicrob Chemother 2000, 46(5): 793-796
Yu D, Ellis HM, Lee E, Jenkins NA, Copeland NG, and Court DL: An efficient recom bination system for chromosome engineering in Escherichia coli. Proc Natl Acad S ci U S A 2000, 97: 5978-5983.
Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichi a coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97:6640-6645.
Sawitzke JA, Thomason LC, Bubunenko M, Li X, Costantino N, Court DL: Recombineer ing: using drug cassettes to knock out genes in vivo. Methods Enzymol 2013, 533: 79-102.
Thomason LC, Costantino N, Court DL: E. coli genome manipulation by P1 transduct ion. Curr Protoc Mol Biol 2007, Chapter 1:Unit 1 17.
Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wa nner BL, Mori H: Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene kno ckout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol 2006, 2:2006 0008.
Al-Rabiee R, Zhang Y, Grant GA: The mechanism of velocity modulated allosteric r

egulation in D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of ef fector binding site residues. J Biol Chem 1996, 271:23235-23238.
Kildegaard KR, Hallstrom BM, Blicher TH, Sonnenschein N, Jensen NB, Sherstyk S, Harrison SJ, Maury J, Herrgard MJ, Juncker AS, et al.: Evolution reveals a gluta thione-dependent mechanism of 3-hydroxypropionic acid tolerance. Metab Eng 2014, 26C:57-66.
Deatherage DE, Barrick JE: Identification of mutations in laboratory-evolved mic robes from next-generation sequencing data using breseq. Methods Mol Biol 2014, 1151:165-188.
Langmead B, Salzberg SL: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 2 012, 9:357-359.
Freddolino PL, Amini S, Tavazoie S: Newly identified genetic variations in commo n Escherichia coli MG1655 stock cultures. J Bacteriol 2012, 194:303-306.
Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM: Programming cel ls by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Nature 2009, 460:8 94-898.
Wang HH, Church GM: Multiplexed genome engineering and genotyping methods applic ations for synthetic biology and metabolic engineering. Methods Enzymol 2011, 49 8:409-426.
Mertens N, Remaut E, Fiers W. 1995. Tight transcriptional control mechanism ensu res stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. Bio technology (N Y) 13(2):175-9.
St-Pierre F, Cui L, Priest DG, Endy D, Dodd IB, Shearwin KE. 2013. One-step clon ing and chromosomal integration of DNA. ACS Synth Biol 2(9):537-41.

【図１】




【図２－１】

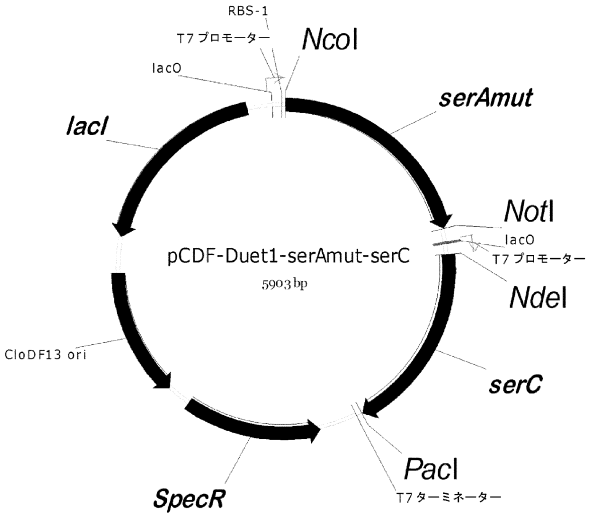
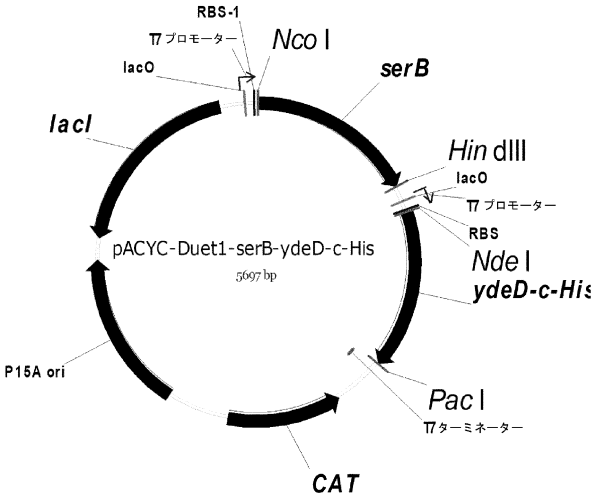


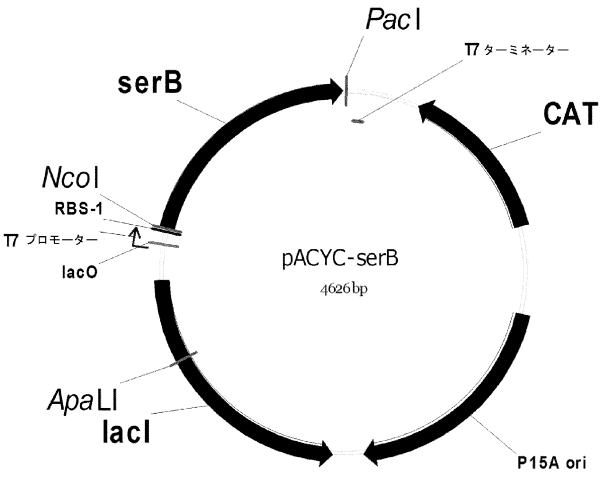

Figure 1

【図２－２】



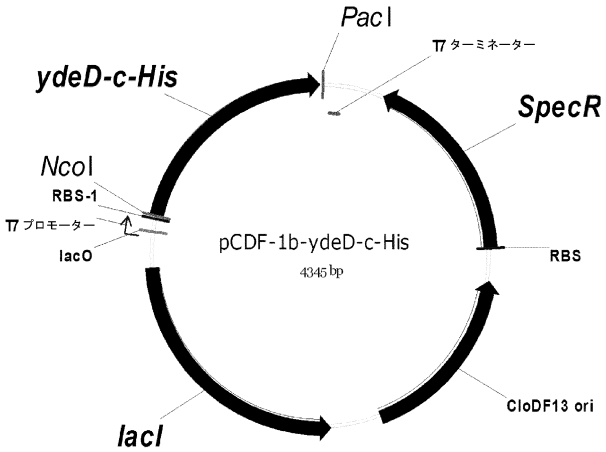

（続き）

【図２－３】



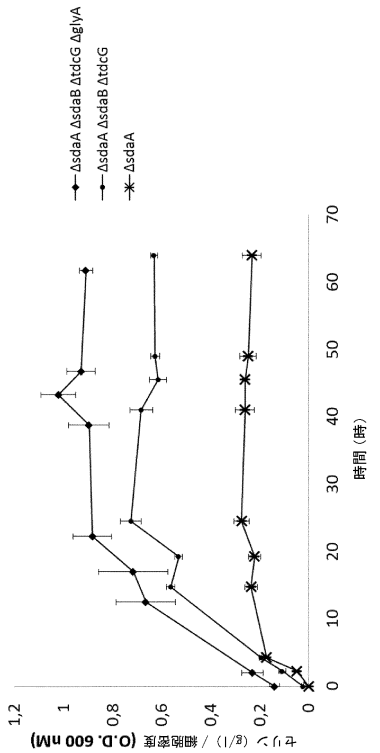

（続き）

【図２－４】



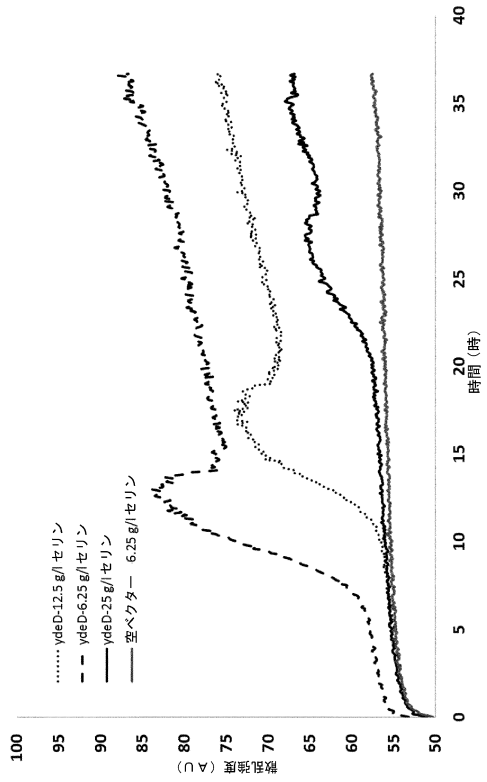

（続き）

【図３】

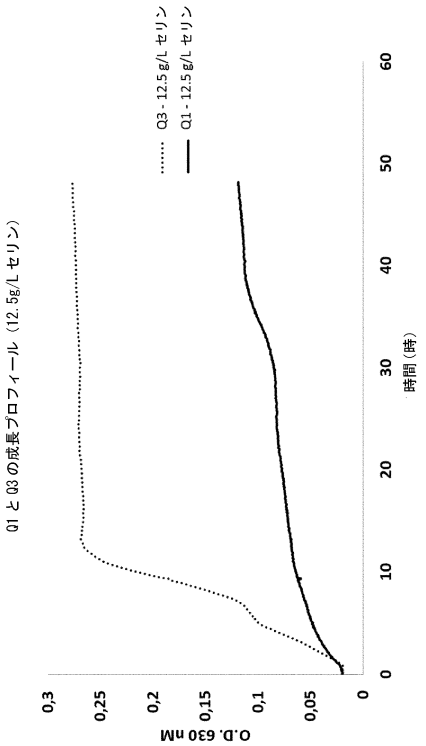



| | セリン濃度 g/L (+/-:標準偏差) | グルコースからの収率 (gセリン／gグルコース) |
|---|---|---|
| ΔsdaA ΔsdaB ΔtdcG ΔglyA (Ω1(DE3)) | 0.889 (+/- 0.057) | 0.445 |
| sdaAΔ sdaBΔ tdcGΔ ::(DE3) | 0.536 (+/- 0.019) | 0.268 |
| ΔsdaA ::(DE3) | 0.493 (+/- 0.033) | 0.247 |

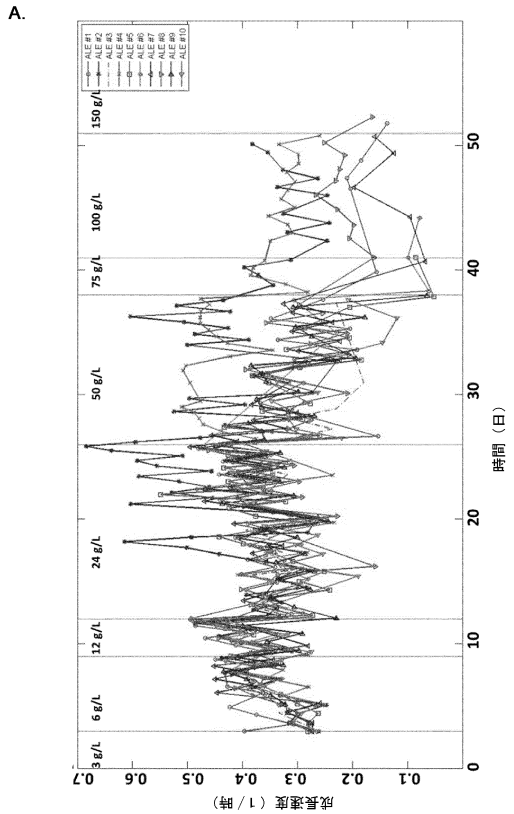
【図４】


Q1（DE3）におけるエクスポーター ydeD の過剰発現を用いた成長プロフィール
ydeD-12.5 g/l セリン
ydeD-6.25 g/l セリン
ydeD-25 g/l セリン
空ベクター 6.25 g/l セリン
散乱強度（ＡＵ）
時間（時）

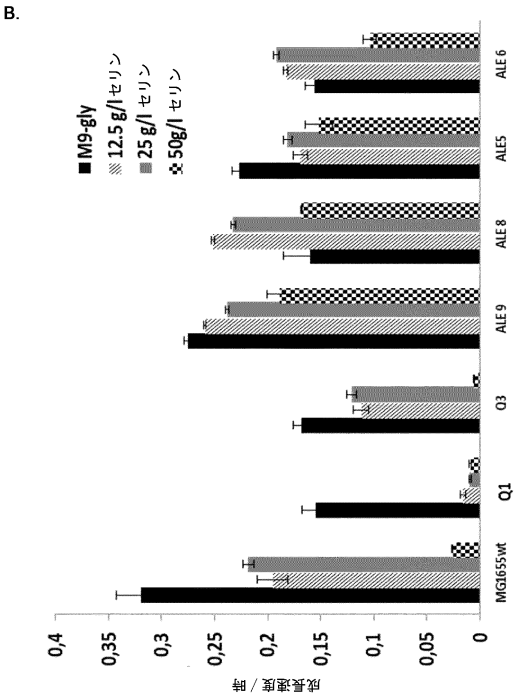
【図５】


Q1 と Q3 の成長プロフィール（12.5g/L セリン）
Q3 - 12.5 g/L セリン
Q1 - 12.5 g/L セリン
O.D. 630 nM
時間（時）

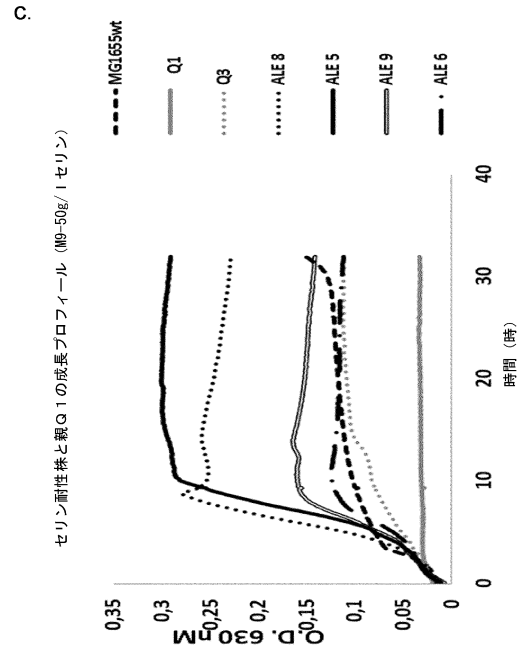
【図６－１】


A.
成長速度（1／時）
時間（日）
3 g/L
6 g/L
12 g/L
24 g/L
50 g/L
75 g/L
100 g/L
150 g/L

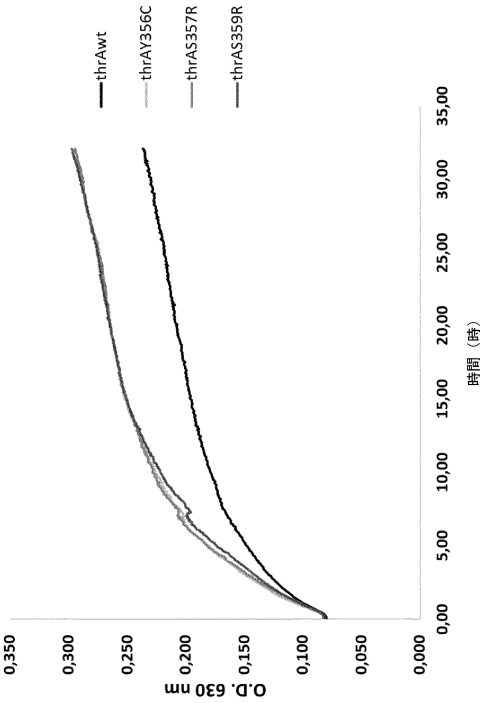
【図６－２】


B.
M9-gly
12.5 g/l セリン
25 g/l セリン
50g/l セリン
成長速度／時
MG1655wt
Q1
Q3
ALE 9
ALE 8
ALE5
ALE 6

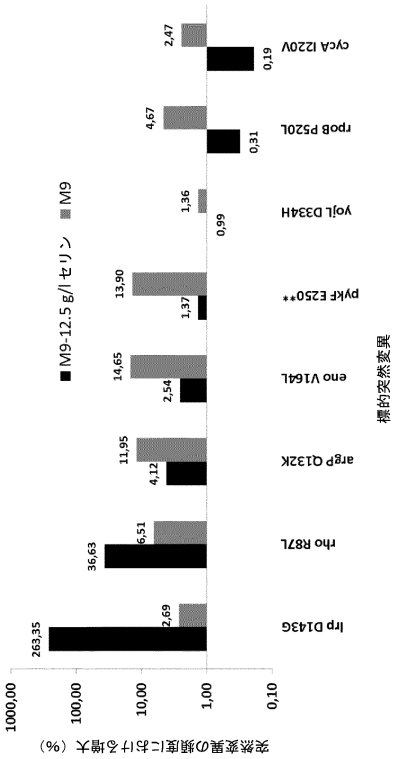
【図６－３】


C.
セリン耐性株と親Ｑ１の成長プロフィール（M9-50g/ｌセリン）
MG1655wt
Q1
Q3
ALE 8
ALE 5
ALE 9
ALE 6
O.D. 630nM
時間（時）

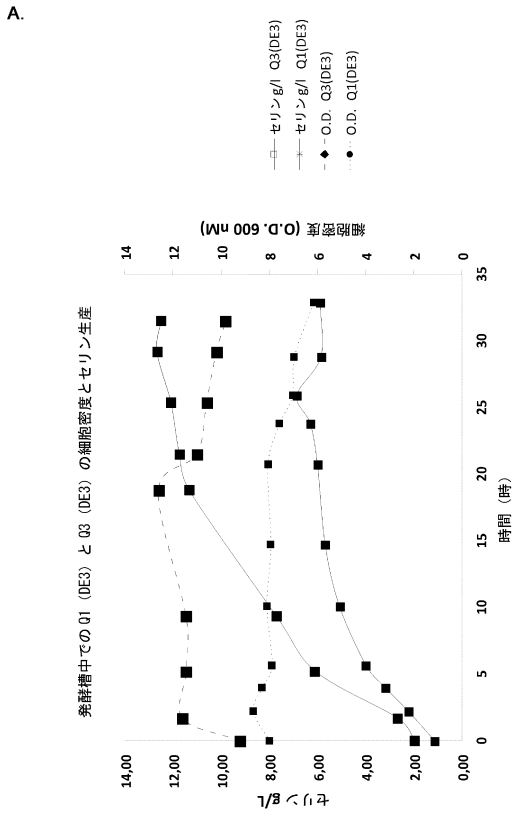
【図７】


thrAwt
thrAY356C
thrA357R
thrA359R
O.D. 630 nm
時間（時）

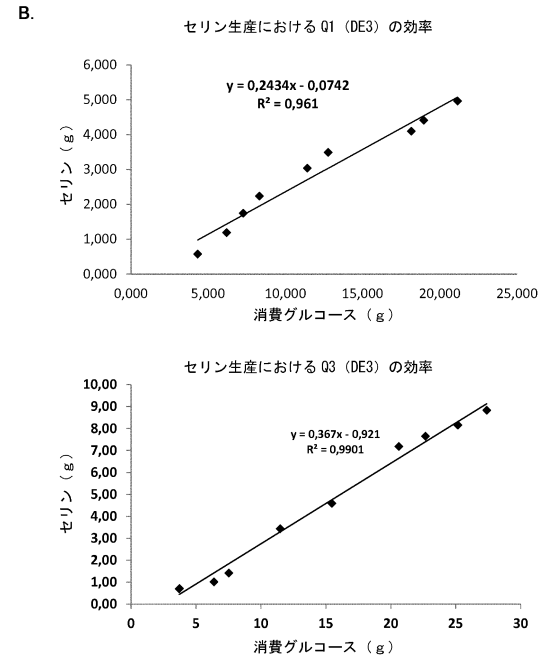
【図８】


M9-12.5 g/l セリン
M9
標的突然変異
発現変異の頻度における増大（%）
lrp D143G
rho R87L
argP Q132K
eno V164L
pykF E250*
yojL D334H
rpoB P520L
cycA I220V

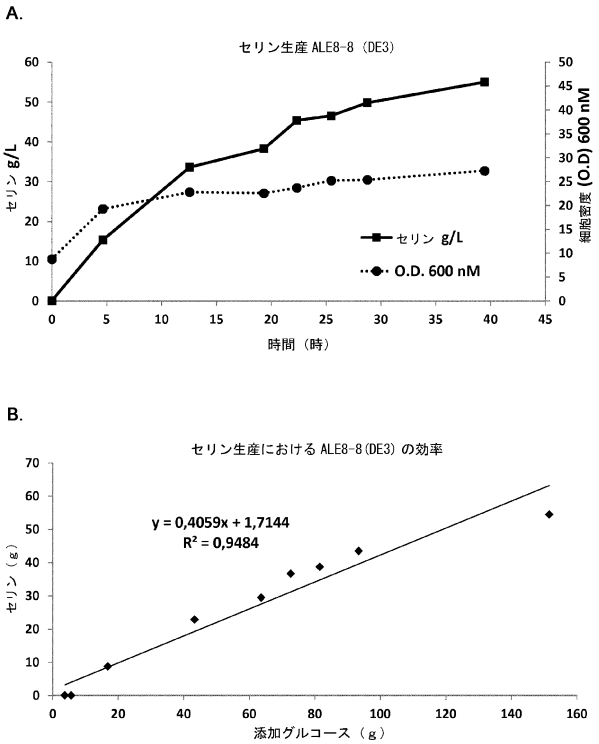
【図９－１】


A.
セリン g/l Q3(DE3)
セリン g/l Q1(DE3)
O.D. Q3(DE3)
O.D. Q1(DE3)
発酵槽中でのQ1（DE3）とQ3（DE3）の細胞密度とセリン生産
セリン g/L
細胞密度（O.D. 600 nM）
時間（時）

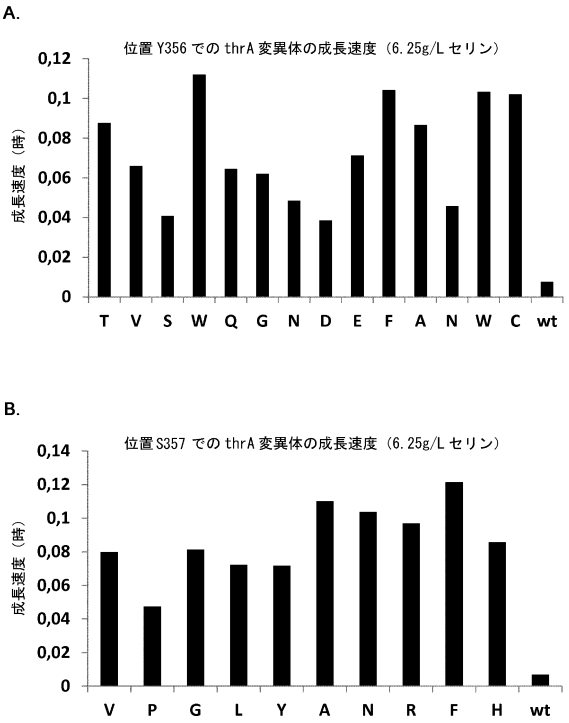
【図９－２】



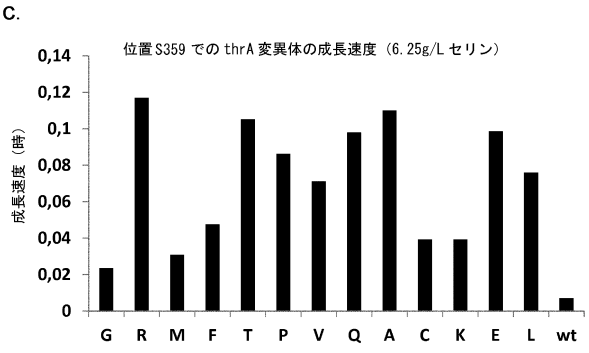

【図１０】




【図１１－１】




【図１１－２】



【配列表】
0006720194000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100098501
弁理士 森田 拓
(74)代理人 100116403
弁理士 前川 純一
(74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康
(74)代理人 100162880
弁理士 上島 類
(72)発明者 ヘマンシュ ムンダダ
デンマーク国 コンゲンス・ルングビュー クリスティアン ティエンデス アレ ６０ １ ティル・ホイラ
(72)発明者 アレクス トフトゴー ニルスン
デンマーク国 ロングステズ・キュスト ペンネヘーヴェ ３エー

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第２０１０／０９０３３０（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／１４４０１８（WO，Ａ１）
特表２０１８－５０３３８５（ＪＰ，Ａ）
Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol.71, No.11, p.7139-7144
Science China, Life Sciences, 2012, Vol.55, No.4, p.283-290
Biotechnol. Lett., 2012, Vol.34, p.1525-1530
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2014, Vol.41, p.1443-1450
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, Vol.168, No.3, p.1211-1216

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ １／００－ ７／０８
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ