

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-501552

(P2025-501552A)

(43)公表日 令和7年1月22日(2025.1.22)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
		審査請求 有	予備審査請求 未請求 (全34頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号	特願2024-537371(P2024-537371)	(71)出願人	514199250
(86)(22)出願日	令和4年12月6日(2022.12.6)		シージェイ チェイルジェダング コーポ レイション
(85)翻訳文提出日	令和6年7月8日(2024.7.8)		大韓民国 ソウル 0 4 5 6 0 ジュング グ ドングホ ロ 3 3 0
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/019684	(74)代理人	100105957
(87)国際公開番号	WO2023/121055		弁理士 恩田 誠
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)	(74)代理人	100068755
(31)優先権主張番号	10-2021-0184151		弁理士 恩田 博宣
(32)優先日	令和3年12月21日(2021.12.21)	(74)代理人	100142907
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		弁理士 本田 淳
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ, ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く	(74)代理人	100152489
			弁理士 中村 美樹
		(72)発明者	キム、ヒジョン
			大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L - イソロイシン生産微生物及びそれを用いた L - イソロイシン生産方法

(57)【要約】

本出願は、外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G l u t a m a t e d e h y d r o g e n a s e) をコードする遺伝子が導入された L - イソロイシン生産能を有する微生物、前記微生物を用いた L - イソロイシン生産方法及び前記微生物を含む L - イソロイシン生産用組成物に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) をコードする遺伝子が導入された、L-イソロイシン生産能を有する微生物。

【請求項 2】

前記バチルス・サブチルス由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号 2 及び 4 のヌクレオチド配列を有するものである、請求項 1 に記載の微生物。 10

【請求項 3】

前記微生物は、L-イソロイシン生成量に比べて -アミノ酪酸 (*-aminobutyric acid, AABA*) の生成量が減少するものである、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 4】

前記微生物は、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属微生物である、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 5】

前記コリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) である、請求項 4 に記載の微生物。 20

【請求項 6】

バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物を培地で培養する段階を含む、L-イソロイシンの生産方法。

【請求項 7】

前記培養された微生物又は培養培地から L-イソロイシンを回収する段階をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 8】

前記バチルス・サブチルス由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号 2 及び 4 のヌクレオチド配列を有するものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法は、L-イソロイシン生成量に比べて -アミノ酪酸 (*-aminobutyric acid, AABA*) の生成量が減少するものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物を含む、L-イソロイシン生産用組成物。 40

【請求項 11】

前記バチルス・サブチルス由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号 2 及び 4 のヌクレオチド配列を有するものである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記組成物は、L-イソロイシン生成量に比べて -アミノ酪酸 (*-aminobu* 50

tyric acid, AABA)の生成量が減少するものである、請求項11に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) をコードする遺伝子が導入されたL-イソロイシン生産能を有する微生物、前記微生物を用いたL-イソロイシン生産方法及び前記微生物を含むL-イソロイシン生産用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

L-イソロイシン (L-isoleucine) は、合計20種類のアミノ酸中、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid) の一種類であり、必須アミノ酸に分類されて動物飼料、食品添加物及び医薬分野に用いられる。L-イソロイシンは、代謝後のエネルギー生成、ヘモグロビン生成、血糖調節、筋肉の生成及び修復などの機能をするため、輸液剤、栄養剤、スポーツ栄養剤だけでなく、動物飼料でも使用が増加している。

【0003】

L-イソロイシン生産のためには、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) と大腸菌 (Escherichia coli) が代表的な微生物として用いられている。この微生物においてL-イソロイシンは、異なる分岐鎖アミノ酸であるL-バリン、L-ロイシンと主な生合成経路を共有している。L-イソロイシンの生合成経路を調べると、解糖過程 (Glycolysis) で生成されるピルビン酸 (pyruvate) とアスパラギン酸 (Aspartate, Aspartic acid) 由来のアミノ酸であるL-スレオニンから生成された2-ケト酪酸 (2-ketobutyrate) が前駆体として使用され、最終的にL-イソロイシンが生産される。

【0004】

L-アミノ酸の生産のために、多様な微生物及びその変異体を用いる方法が知られている (特許文献1)。しかし、変異体を用いる方法の場合、L-イソロイシンを除いた副産物が多数生成され、これは、精製段階でL-イソロイシンの純度を低下させる問題がある。

【0005】

これに関連し、L-イソロイシンの純度を高めるために、L-イソロイシン精製方法などが知られているが (特許文献2)、前記精製方法は、別途の追加の精製過程が求められる短所があり、L-イソロイシンの純度を増加させる方法の開発が必要なのが現状である。

【0006】

一方、L-グルタミン酸は、L-イソロイシンを含むアミノ酸を合成するにおいてアミン基を提供する前駆体である。アミノ酸を生産するにおいて前駆体であるL-グルタミン酸合成強化が必須であるが、L-イソロイシンを生産する微生物においてグルタミン酸を生成することが知られているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) を強化する場合、イソロイシンの中間物質である2-ケト酪酸 (2-ketobutyrate) の脱水素反応を通じて副産物であるL-アミノ酪酸 (L-aminobutyric acid, AABA) を生成する副反応が起きるため (非特許文献1)、これにより、L-イソロイシンの純度及び生合成効率が低下する問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

10

20

30

40

50

- 【特許文献1】米国特許第10113190号明細書
- 【特許文献2】米国特許第6072083号明細書
- 【特許文献3】米国特許第7662943号明細書
- 【特許文献4】米国特許第10584338号明細書
- 【特許文献5】米国特許第10273491号明細書
- 【特許文献6】韓国公開特許第10-2020-0136813号公報
- 【特許文献7】韓国登録特許第10-1996769号公報
- 【特許文献8】韓国登録特許第10-1335789号公報
- 【非特許文献】
- 【0008】 10
- 【非特許文献1】Microb Cell Fact. 2017 Mar 23; 16(1): 51
- 【非特許文献2】Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444
- 【非特許文献3】Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277
- 【非特許文献4】Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453
- 【非特許文献5】Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984) 20
- 【非特許文献6】Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990)
- 【非特許文献7】Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994
- 【非特許文献8】[CARILLO ETA/。] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073
- 【非特許文献9】Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2: 482
- 【非特許文献10】Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) 30
- 【非特許文献11】Gribskov et al (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745
- 【非特許文献12】Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16
- 【非特許文献13】Sambrook et al. Molecular Cloning 2012 40
- 【非特許文献14】J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 【非特許文献15】F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8
- 【非特許文献16】Journal of Biotechnology 104, 5-25 Jorn Kalinowski et al, 2003
- 【発明の概要】 50

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明者らは、外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物、前記微生物を用いた L-イソロイシン生産方法及び前記微生物を含む L-イソロイシン生産用組成物を開発し、本出願を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本出願の一つの目的は、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) 又はロドスピリルム目 (Rhodospirillales) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物を提供することにある。

10

【0011】

本出願のもう一つの目的は、前記微生物を培地で培養する段階を含む L-イソロイシンの生産方法を提供することにある。

本出願の他の一つの目的は、前記微生物を含む L-イソロイシン生産用組成物を提供することにある。

【発明の効果】

【0012】

本出願の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物は、副産物が少なく生成され、高収率で L-イソロイシンを生産することができ、L-イソロイシンの産業的生産に有用に活用することができる。

20

【発明を実施するための形態】

【0013】

これを具体的に説明すると、次の通りである。一方、本出願で開示されたそれぞれの説明及び実施形態はそれぞれの異なる説明及び実施形態にも適用できる。即ち、本出願で開示された多様な要素の全ての組み合わせが本出願の範囲に属する。また、下記の具体的な記述によって本出願のカテゴリが制限されるとは見られない。

【0014】

また、当該技術分野における通常の知識を有する者であれば、通常の実験のみを用いて本出願に記載された本発明の特定の態様に関する多くの等価物を認識し、又は確認することができる。また、このような等価物は、本出願に含まれることが意図される。

30

【0015】

本出願の一態様は、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) 又はロドスピリルム目 (Rhodospirillales) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (Glutamate dehydrogenase) をコードする遺伝子が導入された L-イソロイシン生産能を有する微生物を提供する。

【0016】

本出願において用語、「L-イソロイシン」とは、必須アミノ酸の一つであり、構造的に L-バリン、L-ロイシンと共に分岐鎖アミノ酸に該当する化学式 $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ である L-アミノ酸を意味する。

40

【0017】

本出願において用語、「菌株 (又は、微生物)」は、野生型微生物や天然又は人為的に遺伝的変形が起きた微生物を全て含み、外部遺伝子が挿入されるか、又は内在的遺伝子の活性が強化されたり不活性化されるなどの原因により特定の機序が弱化又は強化された微生物であり、目的とするポリペプチド、タンパク質又は産物の生産のために遺伝的変形 (modification) を含む微生物であってもよい。

【0018】

本出願において用語、「L-イソロイシン生産能を有する微生物」とは、天然に L-イ

50

ソロイシンの生産能を有している微生物又はL-イソロイシンの生産能がない親株にL-イソロイシンの生産能が付与された微生物を意味する。具体的には、前記微生物は、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) をコードする遺伝子が導入された、L-イソロイシンを生産する微生物であってもよいが、これに制限されない。

【0019】

具体的には、前記「L-イソロイシンを生産する微生物」は、野生型微生物や天然又は人為的に遺伝的変形が起きた微生物を全て含む。さらに具体的には、外部遺伝子が挿入されるか、又は内在的遺伝子の活性が強化されたり不活性化されるなどの原因により特定の機序が弱化又は強化された微生物であり、目的とするL-イソロイシン生産のために、遺伝的変異が起きたりL-イソロイシン生産活性を強化させた微生物であってもよい。本出願の目的上、前記L-イソロイシン生産能を有する微生物は、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) をコードする遺伝子が導入され、目的とするL-イソロイシン生産能が増加したことを特徴とし、遺伝的に変形された微生物又は組換え微生物であってもよいが、これに制限されない。

10

【0020】

本出願において用語、活性の「導入」とは、微生物が本来有していなかった遺伝子とその微生物内で発現することにより特定のタンパク質の活性を示すこと又は当該タンパク質の内在的活性又は変形前の活性に比べて増加又は向上した活性を示すことを意味する。例えば、特定のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが微生物内の染色体に導入されたり、特定のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが微生物内に導入され、その活性が示されることであってもよい。

20

【0021】

一例として、前記生産能が増加した組換え菌株は、変異前の親株又はgdhタンパク質の内在的活性を有する非変形微生物のL-イソロイシン生産能に比べて約1%以上、具体的には、約1%以上、約2%以上、約3%以上、約4%以上、約5%以上、約6%以上、約7%以上、約8%以上、約8.1%以上、約8.2%以上又は約8.3%以上(上限値に特別な制限はなく、例えば、約100%以下、約50%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下又は約10%以下であってもよい)増加されたものであってもよいが、変異前の親株又は非変形微生物の生産能に比べて+値の増加量を有する限り、これに制限されない。他の例において、前記生産能が増加した組換え菌株は、変異前の親株又は非変形微生物に比べて、L-イソロイシン生産能が約1.01倍以上、約1.02倍以上、約1.03倍以上、約1.04倍以上、約1.05倍以上、約1.06倍以上、約1.07倍以上又は約1.08倍以上(上限値に特別な制限はなく、例えば、約10倍以下、約5倍以下、約3倍以下、約2倍以下、約1.5倍以下又は約1.1倍以下であってもよい)増加されたものであってもよいが、これに制限されない。

30

【0022】

本出願において用語、「非変形微生物」は、微生物に自然に起こり得る突然変異を含む菌株を除くものではなく、野生型菌株又は天然型菌株自体であるか、天然又は人為的要因による遺伝的変異で形質が変化する前の菌株を意味する。例えば、前記非変形微生物は、本明細書に記載された外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が導入される前の菌株を意味する。前記「非変形微生物」は、「変形前の菌株」、「変形前の微生物」、「非変異菌株」、「非変形菌株」、「非変異微生物」又は「基準微生物」と混用され得る。

40

【0023】

本出願のまた他の一例として、本出願の微生物は、L-イソロイシンを生産できる微生物であってもよく、その種類に特に制限されない。本出願の微生物は、原核細胞又は真核細胞がいずれも可能であるが、具体的には、原核細胞であってもよい。前記原核細胞は、

50

一例としてコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリキア (*Escherichia*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属及びブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する微生物菌株を含むことができ、具体的には、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属微生物であってもよい。

【0024】

本出願において「コリネバクテリウム属微生物」は、全てのコリネバクテリウム属微生物を含むことができる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・クルジラクチス (*Corynebacterium crudilactis*)、コリネバクテリウム・デセルティ (*Corynebacterium deserti*)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム・スタチオニス (*Corynebacterium stationis*)、コリネバクテリウム・シングラレ (*Corynebacterium singularae*)、コリネバクテリウム・ハロトレランス (*Corynebacterium halotolerans*)、コリネバクテリウム・ストリアツム (*Corynebacterium striatum*)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・ポルティソリ (*Corynebacterium pollutisoli*)、コリネバクテリウム・イミタンス (*Corynebacterium imitans*)、コリネバクテリウム・テスツディノリス (*Corynebacterium testudinoris*) 又はコリネバクテリウム・フラベッセンス (*Corynebacterium flavescens*) であってもよく、さらに具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカムであってもよい。

【0025】

本出願において用語、「グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*)」は、L-イソロイシン生合成の前駆体であるグルタミン酸を合成する酵素であり、本出願において前記「グルタミン酸デヒドロゲナーゼ」は「gdh」、「rocG」と混用され得る。

【0026】

本出願において用語、「グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質」及び「グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子」には、前記のようなグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有する任意のタンパク質及びこれをコードする任意の遺伝子が制限なく含まれ得る。具体的には、前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼは当業界に公知となっており、前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼのタンパク質及び遺伝子配列は、公知のデータベースから得ることができ、その例としてNCBIのGenBankなどがあるが、これに制限されるものではない。

【0027】

一方、L-グルタミン酸は、L-イソロイシンを含むアミノ酸を合成するにおいてアミン基を提供する前駆体である。アミノ酸を生産するにおいて前駆体であるL-グルタミン酸の合成強化が必須であるが、L-イソロイシンを生産する微生物からグルタミン酸を生成することが知られている前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*Glutamate dehydrogenase*) を強化する場合、イソロイシンの中間物質である2-ケト酪酸 (2-ketobutyrate) の脱水素反応を通じて副産物である -アミノ酪酸 (-aminobutyric acid, AABA) を生成する副反応が起きるため (*Microb Cell Fact.* 2017 Mar 23; 16(1): 51)、これにより、L-イソロイシンの純度及び生合成効率が低下する問題がある。

【0028】

本出願のL-イソロイシン生産能を有する微生物は、バチルス・サブチルス (*Bacillus*)

l l u s s u b t i l i s) 又はロドスピリルム目 (*R h o d o s p i r i l l a l e s*) 由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*G l u t a m a t e d e h y d r o g e n a s e*) をコードする遺伝子が導入されることにより、副産物生成量が減少する。前記副産物は、 γ -アミノ酪酸 (γ -*a m i n o b u t y r i c a c i d*, A A B A) であってもよい。前記副産物生成量の減少は、野生型微生物に比べて、L-イソロイシン生成量に比べて γ -アミノ酪酸 (γ -*a m i n o b u t y r i c a c i d*, A A B A) の生成量が減少したことを意味するが、これに制限されない。

【0029】

本出願の目的上、前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、バチルス・サブチルス (*B a c i l l u s s u b t i l i s*) 又はロドスピリルム目 (*R h o d o s p i r i l l a l e s*) 由来であってもよい。具体的には、前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、配列番号1又は配列番号3で記載されたアミノ酸配列を有するか、及び/又は含むか、前記アミノ酸配列で必須で構成されるか (*e s s e n t i a l l y c o n s i s t i n g o f*)、構成されてもよい。

10

【0030】

また、本出願のグルタミン酸デヒドロゲナーゼは、前記配列番号1又は配列番号3で記載されたアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.7%又は99.9%以上の相同性又は同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。また、そのような相同性又は同一性を有し、本出願のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに対応する効能を示すアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換、保存的置換又は付加されたアミノ酸配列を有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼも本出願の範囲内に含まれることは自明である。

20

【0031】

本出願において「特定の配列番号で記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド又はタンパク質」、「特定の配列番号で記載されたアミノ酸配列からなるポリペプチド又はタンパク質」又は「特定の配列番号で記載されたアミノ酸配列を有するポリペプチド又はタンパク質」と記載されていても、当該配列番号のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一もしくは相当する活性を有する場合であれば、一部の配列が欠失、変形、置換、保存的置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本出願で用いられることは自明である。例えば、前記アミノ酸配列のN末端及び/又はC末端にタンパク質の機能を変更しない配列の追加、自然に起こり得る突然変異、そのサイレント突然変異 (*s i l e n t m u t a t i o n*) 又は保存的置換を有する場合である。

30

【0032】

例えば、前記アミノ酸配列のN末端、C末端及び/又は内部に本出願のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの機能を変更しない配列の追加又は欠失、自然に起こり得る突然変異、サイレント突然変異 (*s i l e n t m u t a t i o n*) 又は保存的置換を有する場合である。

【0033】

本出願において用語「保存的置換 (*c o n s e r v a t i v e s u b s t i t u t i o n*)」は、あるアミノ酸を類似した構造的及び/又は化学的性質を有するもう一つのアミノ酸で置換させることを意味する。このようなアミノ酸の置換は、一般に、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び/又は両親媒性 (*a m p h i p a t h i c n a t u r e*) における類似性に基づいて発生する。例えば、正で荷電された (塩基性) アミノ酸はアルギニン、リシン、及びヒスチジンを含み; 負で荷電された (酸性) アミノ酸はグルタミン酸及びアスパルテートを含み; 芳香族アミノ酸はフェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンを含み、疎水性アミノ酸はアラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンを含む。また、アミノ酸は、電荷を帯びる (*e l e c t r i c a l l y c h a r g e d*) 側鎖を有するアミノ酸と電荷を帯びない (*u n c h a r g e d*) 側鎖を有するアミノ酸に分類することができ、電荷を帯びる側鎖を有するアミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニ

40

50

ン、ヒスチジンを含み、電荷を帯びない側鎖を有するアミノ酸は再び非極性 (nonpolar) アミノ酸又は極性アミノ酸 (polar) に分類することができ、非極性アミノ酸はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、極性アミノ酸はセリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンを含むものに分類することができる。通常、保存性置換は、生成されたポリペプチドの活性にほとんど影響を及ぼさないか、又は影響を及ぼさない。通常、保存的置換は、タンパク質又はポリペプチドの活性にほとんど影響を及ぼさないか、又は影響を及ぼさない。

【0034】

また、グルタミン酸デヒドロゲナーゼは、ポリペプチドの特性と2次構造に最小限の影響を有するアミノ酸の欠失又は付加を含むことができる。例えば、ポリペプチドは、翻訳と同時に (co-translationally) 又は翻訳後に (post-translationally) タンパク質の移転 (transfer) に関与するタンパク質 N 末端のシグナル (又はリーダー) 配列とコンジュゲートすることができる。また、前記ポリペプチドは、ポリペプチドを確認、精製、又は合成できるように他の配列又はリンカーとコンジュゲートすることができる。

10

【0035】

本出願において用語、「相同性 (homology)」又は「同一性 (identity)」は、二つの与えられたアミノ酸配列又は塩基配列相互間の類似の程度を意味し、百分率で表すことができる。用語の相同性及び同一性は、しばしば互換的に使用することができる。

20

【0036】

保存された (conserved) ポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列の相同性又は同一性は、標準配列アルゴリズムにより決定され、用いられるプログラムにより確立されたデフォルトギャップペナルティが共に利用できる。実質的に、相同性を有したり (homologous) 又は同一の (identical) 配列は、一般に、配列の全体又は一部分と中程度又は高いストリンジエントな条件 (stringent conditions) でハイブリダイズすることができる。ハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドにおける一般のコドン又はコドン縮退性を考慮したコドンを含むポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションも含まれることが自明である。

30

【0037】

任意の二つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列が相同性、類似性又は同一性を有するかどうかは、例えば、Pearson et al (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444 でのようなデフォルトパラメータを利用して「FASTA」プログラムなどの既知のコンピュータアルゴリズムを利用して決定することができる。又は、EMBOSS パッケージのニードルマンプログラム (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276 - 277) (バージョン 5.0.0 又は以降のバージョン) で行われるような、ニードルマン - ウンシュ (Needleman - Wunsch) アルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443 - 453) を使用して決定されることができる (GCG プログラムパッケージ (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.][F.][ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994、及び [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073 を含む)。例えば、国立生物工学情報データベースセンターの BLAST 又は ClustalW を利用して相同性、類似性又は同一性を決定することがで

40

50

きる。

【0038】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドの相同性、類似性又は同一性は、例えば、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2: 482 において公知となっているように、例えば、Needleman et al. (1970)、J Mol Biol. 48: 443 のようなGAPコンピュータプログラムを利用して配列情報を比較することにより決定することができる。要約すると、GAPプログラムは、2つの配列中、より短いものにおける記号の総数であり、類似の配列された記号(即ち、ヌクレオチド又はアミノ酸)の数を除した値と定義することができる。GAPプログラムのためのデフォルトパラメータは、(1)二進法比較マトリックス(同一性のために1、そして非同一性のために0の値を含む)及びSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 - 358 (1979)により開示されているように、Grubskov et al (1986) Nucl. Acids Res. 14: 674 5の加重比較マトリックス(又はEDNAFULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックス); (2)各ギャップのための3.0のペナルティ及び各ギャップにおいて各記号のための追加の0.10ペナルティ(又はギャップ開放ペナルティ10、ギャップ延長ペナルティ0.5); 及び(3)末端ギャップのための無ペナルティを含むことができる。

10

20

【0039】

本出願において、用語「対応する(corresponding to)」とは、ポリペプチドで列挙される位置のアミノ酸残基であるか、又はポリペプチドで列挙される残基と類似又は同一又は相同のアミノ酸残基を指す。対応する位置のアミノ酸を確認することは、特定配列を参照する配列の特定アミノ酸を決定することであってもよい。本出願に用いられた「対応領域」とは、一般に、関連タンパク質又は参照(reference)タンパク質における類似又は対応する位置を指す。

【0040】

例えば、任意のアミノ酸配列を配列番号1と整列(align)させ、これに基づいて前記アミノ酸配列の各アミノ酸残基は、配列番号1のアミノ酸残基と対応するアミノ酸残基の数字位置を参照して番号付けすることができる。例えば、本出願に記載されているような配列整列アルゴリズムは、クエリシーケンス(「参照配列」ともいう)と比較してアミノ酸の位置、又は置換、挿入又は欠失などの変形が発生する位置を確認することができる。

30

【0041】

このような整列には、例えば、Needleman - Wunschアルゴリズム(Needleman及びWunsch、1970、J. Mol. Biol. 48: 443 - 453)、EMBOSSパッケージのNeedlemanプログラム(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000)、Trends Genet. 16: 276 - 277)などを利用することができるが、これに制限されず、当業界に知られている配列整列プログラム、ペアワイズ配列(pairwise sequence)比較アルゴリズムなどを適切に用いることができる。

40

【0042】

本出願において用語、「内在的」活性とは、本来微生物が天然の状態又は当該タンパク質の変形前に有しているタンパク質の活性状態を意味する。これは、「変形前の活性」と混用され得る。

【0043】

本出願において用語、ポリペプチド活性の「強化」とは、ポリペプチドの活性が内在的活性に比べて増加することを意味する。前記強化は、活性化(activation)、

50

上方制御 (up-regulation)、過剰発現 (overexpression)、増加 (increase) などの用語と混用され得る。ここで、活性化、強化、上方制御、過剰発現、増加は、本来有していなかった活性を示すこと、又は内在的活性又は変形前の活性に比べて向上した活性を示すことを全て含むことができる。前記「内在的活性」は、天然又は人為的要因による遺伝的変異により形質が変化する場合、形質変化前の親株又は非変形微生物が本来有していた特定ポリペプチドの活性を意味する。これは、「変形前の活性」と混用され得る。ポリペプチドの活性が内在的活性に比べて「強化」、「上方制御」、「過剰発現」又は「増加」するとは、形質変化前の親株又は非変形微生物が本来有していた特定ポリペプチドの活性及び/又は濃度(発現量)に比べて向上したことを意味する。

10

【0044】

前記強化は、外来のポリペプチドを導入するか、又は内在的なポリペプチドの活性強化及び/又は濃度(発現量)を通じて達成することができる。前記ポリペプチドの活性の強化有無は、当該ポリペプチドの活性度、発現量又は当該ポリペプチドから排出される産物の量の増加から確認することができる。

【0045】

前記ポリペプチドの活性の強化は、当該分野によく知られた多様な方法の適用が可能であり、目的ポリペプチドの活性を変形前の微生物より強化させることができる限り、制限されない。具体的には、分子生物学の日常的方法である当業界の通常技術者によく知られた遺伝子工学及び/又はタンパク質工学を利用したことであってもよいが、これに制限されない(例えば、Sitnicka et al. Functional Analysis of Genes. Advances in Cell Biology. 2010, Vol. 2. 1-16, Sambrook et al. Molecular Cloning 2012など)。

20

【0046】

具体的には、本出願のポリペプチドの強化は

- 1) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの細胞内コピー数の増加;
 - 2) ポリペプチドをコードする染色体上の遺伝子発現調節領域の変形(例えば、発現調節領域内変異発生、より強い活性を有する配列での交換、又はより強い活性を有する配列の挿入);
 - 3) ポリペプチドをコードする遺伝子転写体の開始コドン又は5'UTR領域をコードする塩基配列の変形;
 - 4) ポリペプチド活性が強化されるように前記ポリペプチドのアミノ酸配列の変形;
 - 5) ポリペプチド活性が強化されるように前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変形(例えば、ポリペプチドの活性が強化されるように変形されたポリペプチドをコードするように前記ポリペプチド遺伝子のポリヌクレオチド配列の変形);
 - 6) ポリペプチドの活性を示す外来ポリペプチド又はこれをコードする外来ポリヌクレオチドの導入;
 - 7) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコドン最適化;
 - 8) ポリペプチドの三次構造を分析し、露出部位を選択して変形したり化学的に修飾;
- 又は
- 9) 前記1)~8)から選択された2以上の組み合わせであってもよいが、これに、特に制限されるものではない。

30

40

【0047】

より具体的には、

前記1)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの細胞内コピー数の増加は、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主と関係がなく複製され、機能できるベクターの宿主細胞内への導入により達成されることであってもよい。又は、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが宿主細胞内の染色体内に1コピー又は2コピー以上の導入により達成されることであってもよい。前記染色体内への

50

導入は、宿主細胞内の染色体内に前記ポリヌクレオチドを挿入させるベクターが宿主細胞内に導入されることにより行われるが、これに制限されない。前記ベクターは、前述した通りである。

【0048】

前記2)ポリペプチドをコードする染色体上の遺伝子発現調節領域(又は発現調節配列)を活性が強力な配列での交換は、例えば、前記発現調節領域の活性をさらに強化するように欠失、挿入、非保存的若しくは保存的置換又はそれらの組み合わせにより配列上の変異発生、又はより強い活性を有する配列への交換であってもよい。前記発現調節領域は、特にこれに制限されないが、プロモーター、オペレーター配列、リボソーム結合部位をコードする配列、そして転写及び解読の終結を調節する配列などを含むことができる。一例として、本来のプロモーターを強力なプロモーターで交換させることであってもよいが、これに制限されない。

10

【0049】

公知となった強力なプロモーターの例としては、CJ1~CJ7プロモーター(米国特許第7662943号明細書)、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、gapAプロモーター、SPL7プロモーター、SPL13(sm3)プロモーター(米国特許第10584338号明細書)、O2プロモーター(米国特許第10273491号明細書)、tktpromoter、yccAプロモーターなどがあるが、これに制限されない。

20

【0050】

前記3)ポリペプチドをコードする遺伝子転写体の開始コドン又は5'UTR領域をコードする塩基配列変形は、例えば、内在的開始コドンに比べてポリペプチド発現率がさらに高い他の開始コドンをコードする塩基配列で置換することであってもよいが、これに制限されない。

【0051】

前記4)及び5)のアミノ酸配列又はポリヌクレオチド配列の変形は、ポリペプチドの活性を強化するように前記ポリペプチドのアミノ酸配列又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を欠失、挿入、非保存的若しくは保存的置換又はそれらの組み合わせにより配列上の変異発生、又はより強い活性を有するように改良されたアミノ酸配列又はポリヌクレオチド配列又は活性が増加するように改良されたアミノ酸配列又はポリヌクレオチド配列への交換であってもよいが、これに限定されるものではない。前記交換は、具体的には、相同組換えによりポリヌクレオチドを染色体内に挿入することにより行われてもよいが、これに制限されない。この時に使用されるベクターは、染色体の挿入有無を確認するための選別マーカー(selection marker)をさらに含んでもよい。前記選別マーカーは、前述した通りである。

30

【0052】

前記6)ポリペプチドの活性を示す外来ポリヌクレオチドの導入は、前記ポリペプチドと同一/類似の活性を示すポリペプチドをコードする外来ポリヌクレオチドの宿主細胞内導入であってもよい。前記外来ポリヌクレオチドは、前記ポリペプチドと同一/類似の活性を示す限り、その由来や配列に制限がない。前記導入に利用される方法は、公知となった形質転換方法を当業者が適切に選択して行われ、宿主細胞内で前記導入されたポリヌクレオチドが発現することによりポリペプチドが生成され、その活性が増加することができる。

40

【0053】

前記7)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコドン最適化は、内在ポリヌクレオチドが宿主細胞内で転写又は翻訳が増加するようにコドン最適化したことであるか、又は外来ポリヌクレオチドが宿主細胞内で最適化された転写、翻訳が行われるように、そのコドンを最適化したものであってもよい。

【0054】

50

前記 8) ポリペプチドの三次構造を分析し、露出部位を選択して変形したり化学的に修飾するのは、例えば、分析しようとするポリペプチドの配列情報を公知のタンパク質の配列情報が格納されたデータベースと比較することにより、配列の類似性程度に応じて鑄型タンパク質の候補を決定し、これに基づいて構造を確認し、変形したり化学的に修飾する露出部位を選択して変形又は修飾することであってもよい。

【 0 0 5 5 】

このようなポリペプチド活性の強化は、対応するポリペプチドの活性又は濃度発現量が野生型や変形前の微生物菌株で発現したポリペプチドの活性又は濃度を基準として増加したり、当該ポリペプチドから生産される産物の量の増加されたものであってもよいが、これに制限されるものではない。

10

【 0 0 5 6 】

具体的には、本出願の目的上、前記微生物は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼのタンパク質活性を強化させるために、パチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性を有する外来ポリヌクレオチドを導入させることができる。

【 0 0 5 7 】

本出願において用語、「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単位体 (*monomer*) が共有結合によって長く鎖状につながったヌクレオチドの重合体 (*polymer*) で一定の長さ以上の DNA 又は RNA 鎖であり、より具体的には、前記変異体をコードするポリヌクレオチド断片を意味する。

20

【 0 0 5 8 】

本出願によるポリヌクレオチドは、パチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) 又はロドスピリルム目 (*Rhodospirillales*) 由来であることを特徴とし、具体的には、前記ポリヌクレオチドは、配列番号 1 又は配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことができ、より具体的には、前記パチルス・サブチルス由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；は、それぞれ配列番号 2 及び 4 のヌクレオチド配列を有するものであってもよいが、これに制限されるものではない。前記配列番号 2 又は配列番号 4 の塩基配列は、公知のデータベースから得ることができ、その例として NCBI の GenBank などがあるが、これに制限されるものではない。

30

【 0 0 5 9 】

本出願において、前記配列番号 2 又は配列番号 4 の塩基配列を含む遺伝子は、配列番号 2 又は配列番号 4 の塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 2 又は配列番号 4 の塩基配列を有する遺伝子又はポリヌクレオチド、配列番号 2 又は配列番号 4 の塩基配列からなる遺伝子又はポリヌクレオチドと混用され得る。

【 0 0 6 0 】

本出願のポリヌクレオチドは、コドンの縮退性 (*degeneracy*) 又は本出願の変異体を発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、本出願の変異体のアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が行われる。具体的には、本出願のポリヌクレオチドは、配列番号 2 又は配列番号 4 の配列と同一性が 70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、及び 100% 未満である塩基配列を有するか、含むか、又は配列番号 2 又は配列番号 4 の配列と同一性が 70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、及び 100% 未満である塩基配列からなるか、又は必須で構成されてもよいが、これに制限されない。

40

【 0 0 6 1 】

また、本出願のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子配列から製造されるプローブ、例えば、本出願のポリヌクレオチド配列の全体又は一部に対する相補配列とストリンジェント

50

な条件下にハイブリダイズすることができる配列であれば、制限なく含まれ得る。前記「ストリンジентな条件 (stringent condition)」とは、ポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。このような条件は、文献 (J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F. M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 参照) に具体的に記載されている。例えば、相同性又は同一性が高いポリヌクレオチド同士、70%以上、75%以上、6%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の相同性又は同一性を有するポリヌクレオチド同士ハイブリダイゼーションし、それより相同性又は同一性が低いポリヌクレオチド同士ハイブリダイゼーションしない条件、又は通常のサザンハイブリダイゼーション (southern hybridization) の洗浄条件である60、1×SSC、0.1% SDS、具体的には、60、0.1×SSC、0.1% SDS、より具体的には、68、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度及び温度で、1回、具体的に二回～三回洗浄する条件を列挙することができる。

【0062】

ハイブリダイゼーションは、たとえハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに応じて塩基間のミスマッチ (mismatch) が可能であっても、二つの核酸が相補的配列を有することを要求する。用語、「相補的」は、互いにハイブリダイズ可能なヌクレオチド塩基間の関係を記述するのに用いられる。例えば、DNAに関し、アデニンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって、本出願のポリヌクレオチドはまた、実質的に類似の核酸配列だけでなく、全体配列に相補的な単離された核酸断片を含むことができる。

【0063】

具体的には、本出願のポリヌクレオチドと相同性又は同一性を有するポリヌクレオチドは55のT_m値でハイブリダイゼーション段階を含むハイブリダイゼーション条件を用い、上述の条件を用いて探知することができる。また、前記T_m値は60、63又は65であってもよいが、これに制限されるのではなく、その目的に応じて当業者により適切に調節されることができる。

【0064】

前記ポリヌクレオチドをハイブリダイズする適切なストリンジエンシーは、ポリヌクレオチドの長さ及び相補性程度に依存し、変数は当該技術分野によく知られている (例えば、J. Sambrook et al., 同上)。

【0065】

本出願の目的上、前記微生物は、前記外来ポリヌクレオチドを宿主で発現させるための発現ベクターを含むことにより、前記グルタミン酸デヒドロゲナーゼのタンパク質活性が内在的活性に比べて強化されたものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0066】

本出願のベクターは、適した宿主内で目的ポリペプチドを発現させるように適した発現調節領域 (又は発現調節配列) に作動可能に連結された前記目的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含むDNA製造物を含むことができる。前記発現調節領域は、転写を開始できるプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレーター配列、適したmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び解読の終結を調節する配列を含むことができる。ベクターは、適当な宿主細胞内に形質転換された後、宿主ゲノムと関係がなく複製又は機能することができ、ゲノムそのものに統合することができる。

10

20

30

40

50

【0067】

本出願で用いられるベクターは、特に限定されず、当業界に知られている任意のベクターを利用することができる。通常使用されるベクターの例としては、天然状態又は組換え状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージが挙げられる。例えば、ファージベクター又はコスミドベクターとして pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、及び Charon21A などを使用することができる。プラスミドベクターとして pDZ系、pBR系、pUC系、pBluescriptII系、pGEM系、pTZ系、pCL系、pSK系、pSKH系及び pET系などを使用することができる。具体的には、pDZ、pDC、pDCM2、pACYC177、pACYC184、pCL、pSK、pSKH130、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BACベクターなどを使用することができる。

10

【0068】

一例として細胞内における染色体挿入用ベクターを通じて目的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを染色体内に挿入することができる。前記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当業界に知られている任意の方法、例えば、相同組換え (homologous recombination) により行われてもよいが、これに限定されない。前記染色体の挿入有無を確認するための選別マーカー (selection marker) をさらに含んでもよい。前記選別マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選別、即ち、目的核酸分子の挿入有無を確認するためのものであり、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性又は表面ポリペプチドの発現のような選択可能表現型を付与するマーカーが用いられる。選択剤 (selective agent) が処理された環境では、選別マーカーを発現する細胞のみが生存するか、又は他の表現形質を示すため、形質転換された細胞を選別することができる。

20

【0069】

本出願において用語「形質転換」は、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞あるいは微生物内に導入し、宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドが発現できるようにすることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは宿主細胞内で発現できれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、又は染色体外に位置するかに関係なく、それらの全部を含み得る。また、前記ポリヌクレオチドは、目的ポリペプチドをコードするDNA及び/又はRNAを含む。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現できるものであれば、如何なる形態でも導入することができる。例えば、前記ポリヌクレオチドは、自主的に発現するのに必要な全ての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入することができる。前記発現カセットは、通常、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されているプロモーター (promoter)、転写終結信号、リボソーム結合部位及び翻訳終結信号を含むことができる。前記発現カセットは、自己複製が可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入されて宿主細胞で発現に必要な配列と作動可能に連結されているものであってもよく、これに制限されない。

30

40

【0070】

また、前記において用語「作動可能に連結」されたとは、本出願の目的変異体をコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介させるプロモーター配列と前記ポリヌクレオチド配列が機能的に連結されていることを意味する。

【0071】

本出願の微生物においてポリヌクレオチドの一部又は全部の変形は、(a) 微生物内の染色体挿入用ベクターを利用した相同組換え又は遺伝子はさみ (engineered nuclease, e.g., CRISPR-Cas9) を利用したゲノム編集及び/又は (b) 紫外線及び放射線などのような光及び/又は化学物質処理により誘導されてもよいが、これに制限されない。前記遺伝子の一部又は全部の変形方法には、DNA組換え技

50

術による方法が含まれてもよい。例えば、目的遺伝子と相同性があるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列又はベクターを前記微生物に注入して相同組換え (homologous recombination) が起きるようにして遺伝子の一部又は全部の欠損が行われる。前記注入されるヌクレオチド配列又はベクターは優性選別マーカーを含んでもよいが、これに制限されるものではない。

【0072】

一方、本出願の具体的な実施様態においてコリネバクテリウム属微生物は、さらに活性が強化された L - イソロイシン生合成経路に關与する酵素を含むことができる。

本出願において用語「L - イソロイシン生合成経路に關与する酵素」には、アスパラギン酸キナーゼ (aspartate kinase, lysC 遺伝子)、アスパラギン酸 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate - semialdehyde dehydrogenase, asd 遺伝子)、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase, hom 遺伝子)、ホモセリンキナーゼ (homoserine kinase, thrB 遺伝子)、スレオニンシンターゼ (threonine synthase, thrC 遺伝子)、スレオニンデヒドラターゼ (threonine dehydratase, ilvA 遺伝子)、アミノトランスフェラーゼ (aminotransferase, ilvE 遺伝子) などが含まれてもよいが、これで制限されるものではない。

10

【0073】

本出願の他の一態様は、前記微生物を培地で培養する段階を含む L - イソロイシンの生産方法を提供する。

20

前記微生物、L - イソロイシンについては、前述した通りである。

【0074】

具体的には、前記パチルス・サブチルス由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外來グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；は、それぞれ配列番号 2 及び 4 のヌクレオチド配列を有してもよいが、これに制限されるものではない。

【0075】

具体的には、前記方法は、L - イソロイシン生成量に比べて - アミノ酪酸 (- aminobutyric acid, AABA) の生成量が減少することであってもよいが、これに制限されるものではない。

30

【0076】

本出願において用語、「培養」とは、本出願の微生物を適当に調節された環境条件で生育させることを意味する。本出願の培養過程は、当業界に知られている適当な培地と培養条件に応じて行われる。このような培養過程は、選択される菌株により当業者が容易に調整して用いることができる。具体的には、前記培養は、回分式、連続式及び流加式であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0077】

本出願において用語、「培地」とは、本出願の微生物を培養するために必要とする栄養物質を主成分で混合した物質を意味し、生存及び発育に不可欠な水を始めとして栄養物質及び発育因子などを供給する。具体的には、本出願の微生物の培養に用いられる培地及びその他培養条件は、通常微生物の培養に使用される培地であれば、特別な制限なくいずれも用いられるが、本出願の微生物を適当な炭素源、窒素源、リン源、無機化合物、アミノ酸及び / 又はビタミンなどを含有した通常培地内で好気性の条件下で温度、pHなどを調節して培養することができる。

40

【0078】

本出願において前記炭素源としては、グルコース、サッカロース、ラクトース、フルクトース、スクロース、マルトースなどのような炭水化物；マンニトール、ソルビトールなどのような糖アルコール、ピルビン酸、乳酸、クエン酸などのような有機酸；グルタミン酸、メチオニン、リシンなどのようなアミノ酸などが含まれ得る。また、澱粉加水分解物

50

、糖蜜、ブラックストラップ糖蜜、米ぬか、キャッサバ、バガス及びトウモロコシ浸漬液のような天然の有機栄養源を使用することができ、具体的には、グルコース及び殺菌された前処理糖蜜（即ち、還元糖に転換された糖蜜）などのような炭水化物が用いられ、その他の適量の炭素源を制限なく多様に利用することができる。これら炭素源は、単独で用いられても2種以上が組合わせて用いられもよく、これに限定されるものではない。

【0079】

前記窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどのような無機窒素源；グルタミン酸、メチオニン、グルタミンなどのようなアミノ酸、ペプトン、N Z - アミン、肉類エキス、酵母抽出物、麦芽エキス、トウモロコシ浸漬液、カゼイン加水分解物、魚類又はその分解生成物、脱脂大豆ケーキ又はその分解生成物などのような有機窒素源が用いられる。これら窒素源は、単独で用いられても2種以上が組合わせて用いられもよく、これに限定されるものではない。

10

【0080】

前記リン源としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、又はこれに対応するナトリウム含有塩などが含まれ得る。無機化合物としては、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化鉄、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸マンガン、炭酸カルシウムなどが用いられて、その他にアミノ酸、ビタミン及び/又は適切な前駆体などが含まれ得る。これら構成成分又は前駆体は、培地に回分式又は連続式で添加されてもよい。しかし、これに限定されるものではない。

20

【0081】

本出願においては、微生物の培養中に、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸、硫酸などのような化合物を培養物に適切な方式で添加し、培養物のpHを調整することができる。また、培養中には、脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を用いて気泡の生成を抑制することができる。また、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素又は酸素含有気体を注入したり嫌気及び微好気状態を維持するために気体の注入なしに、あるいは窒素、水素又は二酸化炭素ガスを注入することができるが、これに制限されない。

【0082】

培養水の温度は25 ~ 40 であってもよく、より具体的には、28 ~ 37 であってもよいが、これに制限されない。培養期間は、目的とする有用物質の生成量が得られるまで続けることができ、具体的には、1時間~100時間であってもよいが、これに制限されない。

30

【0083】

本出願の培養により生産されたL - イソロイシンは、培地中に分泌されたり細胞内に残留する。

本出願のL - イソロイシン生産方法は、本出願の微生物を準備する段階、前記微生物を培養するための培地を準備する段階、又はそれらの組み合わせ（順は無関係、in any order）を、例えば、前記培養段階の前に、さらに含んでもよい。

【0084】

本出願のL - イソロイシン生産方法は、前記培養による培地（培養が行われた培地）又は微生物からL - イソロイシンを回収する段階をさらに含んでもよい。前記回収する段階は、前記培養段階の後にさらに含まれてもよい。

40

【0085】

前記回収は、本出願の微生物の培養方法、例えば、回分式、連続式又は流加式培養方法などにより当該技術分野に公知となった適切な方法を用いて目的とするL - イソロイシンを収集（collect）することであってもよい。例えば、遠心分離、濾過、結晶化タンパク質沈殿剤による処理（塩析法）、抽出、超音波破碎、限外濾過、透析法、モレキュラーシーブクロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー、H

50

PLC又はこれらの方法を組み合わせて用いられてもよく、当該分野に公知となった適切な方法を利用して培地又は微生物から目的とするL-イソロイシンを回収することができる。

【0086】

また、本出願のL-イソロイシン生産方法は、追加的に精製段階を含むことができる。前記精製は、当該技術分野に公知となった適切な方法を行うことができる。一例において、本出願のL-イソロイシン生産方法が回収段階と精製段階の両方を含む場合、前記回収段階と精製段階は、手順に関係なく連続的又は非連続的に行われたり、同時に又は一つの段階に統合されて行われてもよいが、これに制限されるものではない。

【0087】

本出願のもう一つの態様は、前記微生物を含むL-イソロイシン生産用組成物を提供する。

前記微生物、L-イソロイシンについては、前述した通りである。

【0088】

具体的には、前記バチルス・サブチルス由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；及びロドスピリルム目由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子；は、それぞれ配列番号2及び4のヌクレオチド配列を有するものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0089】

具体的には、前記方法は、L-イソロイシン生成量に比べて - アミノ酪酸 (- a m i n o b u t y r i c a c i d , A A B A) の生成量が減少することであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0090】

本出願の組成物は、L-イソロイシン生産用組成物に通常使用される任意の適した賦形剤をさらに含んでもよく、このような賦形剤は、例えば、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤又は等張化剤などであってもよいが、これに限定されるものではない。

【0091】

本出願のもう一つの態様は、本出願のバチルス・サブチルス (B a c i l l u s s u b t i l i s) 又はロドスピリルム目 (R h o d o s p i r i l l a l e s) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G l u t a m a t e d e h y d r o g e n a s e) をコードする遺伝子が導入されたL-イソロイシン生産能を有する微生物のL-イソロイシン生産用途を提供することである。

【実施例】

【0092】

以下、本出願を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これら実施例は、本出願を例示的に説明するためのものであり、本出願の範囲がこれら実施例に限定されるものではない。

【0093】

実施例1：外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G l u t a m a t e d e h y d r o g e n a s e) 導入のための組換えベクターの製作

コリネバクテリウム・グルタミカム染色体内に外来g d h過剰発現ベクターを挿入するために、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいてトランスポゾンコードする遺伝子として知られたN C g l 2 8 7 2を挿入s i t eとして用いた (J o u r n a l o f B i o t e c h n o l o g y 1 0 4 , 5 - 2 5 J o r n K a l i n o w s k i e t a l , 2 0 0 3) 。 N C g l 2 8 7 2 遺伝子を外来g d hで置換するために、N C g l 2 8 7 2 欠損及びターゲット遺伝子挿入ベクターを製作した。ベクターを製作するために、A T C C 1 3 0 3 2 の染色体を鋳型として配列番号5と配列番号6、配列番号7と配列番号8のプライマー対を用いてP C Rをそれぞれ行った。P C R反応のためのポリメラーゼとしては、P f u U l t r a T MハイフィデリティD N Aポリメラーゼ (S t r a t a g

10

20

30

40

50

e ne) を用い、PCR 条件は、95 で30 秒間変性；55 で30 秒間変性；及び72 で1 分間の重合反応であり、このような条件の変性、アニーリング、及び重合反応を28 回繰り返した。その結果、それぞれ623 bp、620 bp のDNA 断片を得た。得られたDNA 産物をPCR 精製キット(PCR Purification kit, QIAGEN) を用いて精製し、熱処理したpDCM2 ベクター(韓国公開特許第10-2020-0136813 号公報) とインフュージョンクローニングキット(Infusion Cloning Kit, TaKaRa) を用いて提供されたマニュアルによりクローニングすることによりNCgl2872 欠損及びターゲット遺伝子挿入用ベクターpDCM2 N2872 を製作した。

【0094】

親株であるコリネバクテリウム・グルタミカムのgdh プロモーターを有する外来gdh が導入された菌株を製作するために、コリネバクテリウム・グルタミカムATC13032、大腸菌、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*)、ロドスピリルム目(*Rhodospirillales*) 及びマイコバクテリウム・スメグマチス(*Mycobacterium smegmatis*) の染色体をそれぞれ鋳型としてそれぞれ配列番号9 及び配列番号10；又は配列番号9 及び配列番号11；又は配列番号12 及び配列番号13；又は配列番号14 及び配列番号15；又は配列番号16 及び配列番号17；又は配列番号18 及び配列番号19；のプライマーを用いてPCR をそれぞれ行った。前記それぞれのPCR を行うために使用されたプライマー配列は、下記表1 に示した通りである。

【0095】

10

20

30

40

50

【表 1】

配列番号	名称	配列
5	primer	tgaattcgagctcggtacccAGGCGCAGGGCCGGG
6	primer	gggCAACGCCACACGCAGCG
7	primer	AgggGCCCCGCTGAAGTCATC
8	primer	gactctagaggatccccGCAGATCCAGTCCATCCC
9	primer	CTGCGTGTGGGCGTTGcccTACCAATTCCATTTGAGGGC
10	primer	GATTCCTCGTCCCA
11	primer	ATGACTTCAGCGGGGcccTTAGATGACGCCCTGTGCCA
12	primer	GATGGGAACGAGGAAATCATGGATCAGACATATTCTCT
13	primer	GATGACTTCAGCGGGGcccTTAAATCACACCCTGCGCC
14	primer	GATGGGAACGAGGAAATCATGTCAGCAAAGCAAGTCTC
15	primer	GATGACTTCAGCGGGGcccTTAGACCCATCCGCGGAA
16	primer	GATGGGAACGAGGAAATCATGTCTAAAAGCCACAGCGG
17	primer	GATGACTTCAGCGGGGcccTTAAACCACACCTTCCGC
18	primer	GATGGGAACGAGGAAATCATGAGCGAACTACACCCCAA
19	primer	GATGACTTCAGCGGGGcccTCAGATGAGCCCGAGTGCG

10

20

30

【0096】

PCR反応のためのポリメラーゼとしては、PfuUltraTMハイフィデリティDNAポリメラーゼ(Stratagene)を用い、PCR条件は、95 で30秒間変性；55 で30秒間変性；及び72 で1分間の重合反応であり、このような条件の変性、アニーリング、及び重合反応を28回繰り返した。その結果、gdhプロモーター部位の519bp DNA断片、プロモーターを含むコリネバクテリウム・グルタミカムATC13032 gdh部位の1882bp DNA断片、大腸菌のgdh部位の1382bp DNA断片、パチルス・サブチルスgdh(rocg)部位の1313bp DNA断片、Rhodospirillales gdh部位の1424bp DNA断片、Mycobacterium smegmatis gdh部位の1388bp DNA断片をそれぞれ得た。

40

50

【0097】

増幅されたプロモーターと外来 *gdh* DNA 切片を鋳型として配列番号 9 及び配列番号 13；又は配列番号 9 及び配列番号 15；又は配列番号 9 及び配列番号 17；又は配列番号 9 及び配列番号 19；のプライマーで PCR を行った。PCR 条件として 95 で 5 分間変性の後、95 で 30 秒間変性；55 で 30 秒間アニーリング；及び 72 で 2 分間重合を 28 回繰り返した後、72 で 5 分間重合反応を行った。

【0098】

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 *gdh* プロモーターをもって外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする 2 Kb の外来 *gdh* DNA 断片が増幅された。増幅産物を PCR 精製キット (PCR Purification kit, QUIAGEN) を用いて精製し、ベクター製作のための挿入 DNA 断片として用いた。精製した増幅産物を制限酵素 *sma*I で処理した後、65 で 20 分間熱処理した pDCM2 N2872 ベクターと前記増幅産物である挿入 DNA 断片のモル濃度 (M) 比率が 1 : 2 になるようにし、インフュージョンクローニングキット (Infusion Cloning Kit, Takara) を用いて提供されたマニュアルによりクローニングして外来 *gdh* を染色体上に導入するためのベクター pDCM2 N2872 : : Pn__*gdh* (c.g1)、pDCM2 N2872 : : Pn__*gdh* (E.coli)、pDCM2 N2872 : : Pn__*rocG* (B.su)、pDCM2 N2872 : : Pn__*gdh* (rhodospirillales)、pDCM2 N2872 : : Pn__*gdh* (m.sm) を製作した。

【0099】

実施例 2 : L - イソロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属菌株の製作

野生型のコリネバクテリウム・グルタミカムは、L - イソロイシンを生産する能力はあるが、過量生産は行わない。これに対し、本出願の目的に応じて L - イソロイシン生産能を増加させる遺伝形質を確認するために、L - イソロイシン生産能が増加した菌株を活用することにした。

【0100】

まず、野生型コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 から L - イソロイシン生産菌株を開発した。具体的には、L - イソロイシン生合成経路でイソロイシンの前駆体であるスレオニンのフィードバック阻害解消のために、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (*homoserine dehydrogenase*) をコードする遺伝子 *hom* を変異し、ホモセリンデヒドロゲナーゼの 407 番目のアミノ酸であるアルギニンをヒスチジンで置換した (韓国登録特許第 10 - 1996769 号公報)。具体的には、*hom* (R407H) をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 20 に示した。

【0101】

具体的には、*hom* (R407H) 変異が導入された菌株を製作するために、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 の染色体を鋳型として配列番号 21 及び配列番号 22；又は配列番号 23 及び配列番号 24 のプライマーを用いて PCR をそれぞれ行った。前記それぞれの PCR を行うために使用されたプライマー配列は、下記表 2 に示した通りである。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 2】

配列番号	名称	配列
21	primer	TCGAGCTCGGTACCCCGCTTTTGCATCATCGAGC
22	primer	CACGATCAGATGTGCATCATCAT
23	primer	ATGATGATGCACATCTGATCGTG
24	primer	CTCTAGAGGATCCCGAGCATCTTCCAAAACCTTG

10

【0103】

PCR反応のためのポリメラーゼとしては、PfuUltraTMハイフィデリティDNAポリメラーゼ(Stratagene)を用い、PCR条件は、95℃で30秒間変性；55℃で30秒間アニーリング；及び重合反応72℃で1分間の重合反応であり、このような条件の変性、アニーリング、及び重合反応を28回繰り返した。その結果、hom遺伝子の変異を中心に5'上段部位の1000bp DNA断片と3'下段部位の1000bpのDNA断片をそれぞれ得た。

20

【0104】

増幅された二種類のDNA切片を鋳型とし、配列番号21及び配列番号24のプライマーでPCRを行った。PCR条件として95℃で5分間変性の後、95℃で30秒間変性；55℃で30秒間アニーリング；及び72℃で2分間重合を28回繰り返した後、72℃で5分間重合反応を行った。

【0105】

その結果、407番目のアルギニンがヒスチジンで置換されたホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体をコードするhom遺伝子の変異を含む2kbのDNA断片が増幅された。増幅産物をPCR精製キット(PCR Purification kit, QUIAGEN)を用いて精製し、ベクター製作のための挿入DNA断片として用いた。精製した増幅産物を制限酵素SmaIで処理した後、65℃で20分間熱処理したpDCM2ベクターと前記増幅産物である挿入DNA断片のモル濃度(M)比率が1:2になるようにし、インフュージョンクローニングキット(Infusion Cloning Kit, Takara)を用いて提供されたマニュアルによりクローニングしてhom(R407H)変異を染色体上に導入するためのベクターpDCM2-R407Hを製作した。

30

【0106】

製作されたベクターをエレクトロポレーションでコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上でhom(R407H)変異を含む菌株を得、これをコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 hom(R407H)と命名した。

40

【0107】

製作したATCC13032 hom(R407H)菌株にL-イソロイシンに対するフィードバック解除と活性を増加させるために、L-スレオニンデヒドラターゼ(L-threonine dehydratase)をコードする遺伝子であるilvAを変異し、L-スレオニンデヒドラターゼ(配列番号25)の381番目のアミノ酸であるスレオニンをアラニンで置換及び383番目のアミノ酸であるフェニルアラニンをアラニンで置換した。また、ilvA(T381A+F383A)が導入された菌株を製作した。

【0108】

具体的には、前記ilvA(T381A+F383A)変異が導入された菌株を製作す

50

るために、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 の染色体を鋳型として配列番号 2 6 及び配列番号 2 7 ; 又は配列番号 2 8 及び配列番号 2 9 のプライマーを用いて P C R をそれぞれ行った。前記それぞれの P C R を行うために使用されたプライマー配列は、下記表 3 に示した通りである。

【 0 1 0 9 】

【表 3】

配列番号	名称	配列
26	primer	TCGAGCTCGGTACCCATGAGTGAAACATACGTGTC
27	primer	GCGCTTGAGGTACTCtgcCAGCGcGATGTCATCATCCGG
28	primer	CCGGATGATGACATCgCGCTGgcaGAGTACCTCAAGCGC
29	primer	CTCTAGAGGATCCCCCGTCAACCGACACCTCCACA

10

【 0 1 1 0 】

P C R 反応のためのポリメラーゼとしては、P f u U l t r a T M ハイフィデリティ D N A ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を使い、P C R 条件は、9 5 で 3 0 秒間変性 ; 5 5 で 3 0 秒間変性 ; 及び 7 2 で 1 分間の重合反応であり、このような条件の変性、アニーリング、及び重合反応を 2 8 回繰り返した。その結果、i l v A 遺伝子の変異を中心に 5 ' 上端部位の 1 1 2 6 b p D N A 断片と 3 ' 下端部位の 2 8 6 b p の D N A 断片をそれぞれ得た。

20

【 0 1 1 1 】

増幅された二種類の D N A 切片を鋳型とし、配列番号 2 6 及び配列番号 2 9 のプライマーで P C R を行った。P C R 条件として 9 5 で 5 分間変性の後、9 5 で 3 0 秒間変性 ; 5 5 で 3 0 秒間アニーリング ; 及び 7 2 で 2 分間重合を 2 8 回繰り返した後、7 2

30

【 0 1 1 2 】

その結果、3 8 1 番目のスレオニンがアラニンで、及び 3 8 3 番目フェニルアラニンがアラニンで置換された L - スレオニンデヒドラターゼ変異体をコードする i l v A 遺伝子の変異を含む 1 . 4 k b の D N A 断片が増幅された。増幅産物を P C R 精製キット (P C R P u r i f i c a t i o n k i t , Q U I A G E N) を用いて精製し、ベクター製作のための挿入 D N A 断片として用いた。精製した増幅産物を制限酵素 s m a I で処理した後、6 5 で 2 0 分間熱処理した p D C M 2 ベクターと前記増幅産物である挿入 D N A 断片のモル濃度 (M) 比率が 1 : 2 になるようにし、インフュージョンクローニングキット (I n f u s i o n C l o n i n g K i t , T a K a R a) を用いて提供されたマ

40

【 0 1 1 3 】

製作されたベクターをエレクトロポレーションでコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 h o m (R 4 0 7 H) に形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上で i l v A (T 3 8 1 A + F 3 8 3 A) 変異を含む菌株を得、これをコリネバクテリウム・グルタミカム C A 1 0 - 3 1 0 1 と命名した。

【 0 1 1 4 】

参考に、前記 i l v A (T 3 8 1 A + F 3 8 3 A) を L - イソロイシン生産菌株に導入することが L - イソロイシンに対するフィードバック解除と活性を増加させて L - イソロ

50

イシンの生産性効率を増加させるかどうかを確認するために、次のような実験を行った。具体的には、NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 処理されたL-イソロイシン生産菌株であるKCCM11248P、韓国登録特許第10-1335789号公報) 菌株に前記ilvA (T381A+F383A) 変異を電気パルス法で導入したKCCM11248P/pECCG117-ilvA (T381A+F383A) 菌株培養液中のL-イソロイシン及びL-スレオニン濃度を測定した結果を下記表4に示した。

【0115】

【表4】

菌株名	L-イソロイシン(g/L)	L-スレオニン(g/L)
KCCM11248P	1.5	0.5
KCCM11248P/pECCG117-ilvA(F383A)	2.8	0.6
KCCM11248P/pECCG117-ilvA(T381A+F383A)	4.0	0.0

10

【0116】

前記表3に示されるように、ilvA (T381A+F383A) 変異を導入したKCCM11248P/pECCG117-ilvA (T381A+F383A) 菌株は、KCCM11248P又はKCCM11248P/pECCG117-ilvA (F383A) 菌株に比べてL-イソロイシン生産が顕著に増加し、L-スレオニン分解率が高いことを確認した。言い換えれば、本出願の目的上、ilvA (T381A+F383A) 変異は、L-イソロイシンに対するフィードバック解除と活性を増加させるために導入したことが確認された。

20

【0117】

実施例3：外来gdhが導入されたL-イソロイシン菌株の製作及びイソロイシン生産能の評価

30

前記実施例1で製作されたベクターをエレクトロポレーションで前記実施例2で製作したコリネバクテリウム・グルタミカムCA10-3101に形質転換し、2次交差過程を経て染色体上で外来gdhが導入された菌株を得、配列番号30及び配列番号31を通じて導入有無を確認した。前記PCRを行うために使用されたプライマー配列は、下記表に示した通りである。

【0118】

【表5】

配列番号	名称	配列
30	primer	AACTGATGCCTGAGGACAAG
31	primer	GCTTGATACCGAAGCAAACC

40

【0119】

CA10-3101 N2872が導入された菌株をCA10-3135と、CA10-3101 N2872::Pn_gdh (C.g1)が導入された菌株をCA10-3136と、CA10-3101 N2872::Pn_gdh (eco)が導入された菌株をCA10-3137と、CA10-3101 N2872::Pn_rocG (B.

50

s u) が導入された菌株を CA10-3138 と、CA10-3101 N2872 : : Pn_gdh (rhodospirillales) が導入された菌株を CA10-3139 と、CA10-3101 N2872 : : Pn_gdh (m. sm) が導入された菌株を CA10-3140 と命名した。

【0120】

製作された6種の菌株のL-イソロイシン生産性の増加及び副産物 - アミノ酪酸 (- aminobutyric acid, AABA) の低減効果を確認するために、それぞれの菌株を下記のような方法で発酵力価の評価を進めた。イソロイシン生産培地25mlを含有する250mlのコナーバフフルフラスコに親株及び前記変異株を接種した後、32 で60時間200rpmで振盪培養してL-イソロイシンを製造した。

10

【0121】

本実施例で用いた生産培地の組成は、下記の通りである。

<生産培地>

ブドウ糖10%、酵母抽出物0.2%、硫酸アンモニウム1.6%、第一リン酸カリウム0.1%、硫酸マグネシウム7水塩0.1%、硫酸鉄7水塩10mg/l、硫酸マンガン1水塩10mg/l、ピオチン200µg/l、pH7.2

培養終了後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてL-イソロイシン、アルファ-アミノ酪酸 (AABA) の生産量を測定し、濃度は、下記表6に示した。

【0122】

【表6】

20

	L-イソロイシン濃度 (g/L)	AABA濃度 (g/L)
CA10-3101(親株)	2.4	0.8
CA10-3135	2.5	1.6
CA10-3136	2.6	1.4
CA10-3137	2.5	1.7
CA10-3138	2.6	0.8
CA10-3139	2.5	0.7
CA10-3140	2.7	2.1

30

40

【0123】

その結果、前記表6に示されるように、親株に比べてL-イソロイシンはCA10-3136、CA10-3138は8.3%、CA10-3135、CA10-3137、CA10-3139は4.2%、CA10-3140は12.5%増加することを確認した。副産物であるAABAは親株に比べてCA10-3135は100%、CA10-31

50

36は75%、CA10-3137は112.5%、CA10-3140は162.5%増加し、CA10-3138は親株と同一であり、CA10-3139は12.5%減少したことを確認した。

【0124】

これにより、親株であるコリネバクテリウム・グルタミカムCA10-3101に比べてrocG(b.su)及びgdh(rhodospirillales)導入株(CA10-3138, CA10-3139)においてL-イソロイシン生成量に比べて - アミノ酪酸(-aminobutyric acid, AABA)の生成量が減少したことを確認した。また、コリネバクテリウム・グルタミカムATC13032 gdh導入株CA10-3135に比べてL-イソロイシン生成量は同等水準であるが、 - アミノ酪酸(-aminobutyric acid, AABA)の生成量が減少したことを確認した。したがって、多様な外来gdh遺伝子中、rocG(b.su)及びgdh(rhodospirillales)由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が導入される場合、L-イソロイシンの生産は維持しながら副産物を減少させ、L-イソロイシンの発酵純度を高めることを確認した。

10

【0125】

実施例4：L-イソロイシン生産菌株コリネバクテリウム・グルタミカムKCCM11248P菌株において外来gdh強化株の製作及び評価

前記実施例3で確認したL-イソロイシン生産能の増加及び副産物の減少に効果的なrocG(b.su由来)及びgdh(rhodospirillales由来)をNTG(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)処理されたL-イソロイシン生産菌株であるKCJI-38(KCCM11248P、韓国登録特許第10-1335789号公報)菌株に電気パルス法で導入した後、カナマイシン25mg/Lを含有した選別培地に塗抹して形質転換し、2次交差過程を経て染色体上で外来gdh導入株を得た。その後、前記実施例3と同様の方法で培養液中のL-イソロイシンと副産物濃度を測定し、その結果を下記表7に示した。

20

【0126】

【表7】

	L-イソロイシン 濃度 (g/L)	AABA濃度 (g/L)
KCCM11248P (親株)	1.4	0.7
KCCM11248P ΔN2872::Pn_gdh(C.g1)	1.6	1.4
KCCM11248P ΔN2872::Pn_ rocG(B.su)	1.6	0.7
KCCM11248P ΔN2872::Pn_gdh(rhodospirillales)	1.7	0.6

30

40

【0127】

前記表7に示されるように、親株であるKCCM11248Pに比べてrocG(b.su)由来のgdh(rhodospirillales)導入株に比べてL-イソロイシン濃度が約20%増加し、AABA濃度が約50%減少したことを確認した。

50

s u) 及び g d h (r h o d o s p i r i l l a l e s) 導入株において副産物 A A B A が減少することを確認した。具体的には、L - イソロイシンの濃度と A A B A の濃度がいずれも増加する K C C M 1 1 2 4 8 P N 2 8 7 2 : : P n _ g d h (C . g l) 菌株と異なって K C C M 1 1 2 4 8 P N 2 8 7 2 : : P n _ r o c G (B . s u) 、 K C C M 1 1 2 4 8 P N 2 8 7 2 : : P n _ g d h (r h o d o s p i r i l l a l e s) 菌株の場合には、L - イソロイシン生産性を維持し、副産物である A A B A が減少し、L - イソロイシンの発酵純度が高められることが確認された。

【 0 1 2 8 】

これにより、本出願のパチルス・サブチルス (B a c i l l u s s u b t i l i s) 又はロドスピリルム目 (R h o d o s p i r i l l a l e s) 由来の外来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (G l u t a m a t e d e h y d r o g e n a s e) をコードする遺伝子が導入された微生物が L - イソロイシンの純度を増加させ、高収率で L - イソロイシンを生産できることを確認した。

10

【 0 1 2 9 】

以上の説明から、本出願が属する技術分野の当業者であれば、本出願がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されることが理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本出願の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更又は変形された形態が本出願の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

20

【 配列表 】

2025501552000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/019684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/06(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/54(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 9/04(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 13/04(2006.01); C12P 13/06(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 글루타메이트 디하이드로게네이스(Glutamate dehydrogenase), 바실러스 서브틸러스(Bacillus subtilis), 로도스피릴라레스(Rhodospirillales), L-이소류신(L-isoleucine), α-아미노부티릭산(α-aminobutyric acid, AABA)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Y. et al. Improvement of L-Leucine Production in Corynebacterium glutamicum by Altering the Redox Flux. International Journal of Molecular Sciences. 2019, vol. 20, no. 8, thesis no. 2020, inner pp. 1-14. See abstract.	1-12
A	CN 109536428 A (WUHAN GRAND HOYO CO., LTD.) 29 March 2019 (2019-03-29) See claim 1.	1-12
A	KR 10-1751967 B1 (DAESANG CORPORATION) 30 June 2017 (2017-06-30) See claims 1 and 2.	1-12
A	BÖRMANN, E. R. et al. Molecular analysis of the Corynebacterium glutamicum gdh gene encoding glutamate dehydrogenase. Molecular Microbiology. 1992, vol. 6, no. 3, pp. 317-326. See abstract.	1-12
A	KR 10-2017-0047725 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 08 May 2017 (2017-05-08) See entire document.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 14 March 2023	Date of mailing of the international search report 15 March 2023	
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/019684

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2016-202182 A (AJINOMOTO CO., INC.) 08 December 2016 (2016-12-08) See entire document.	1-12
A	JP 2020-115860 A (AJINOMOTO CO., INC.) 06 August 2020 (2020-08-06) See entire document.	1-12

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/019684

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109536428	A	29 March 2019	CN	109536428	B	30 August 2022
KR	10-1751967	B1	30 June 2017	KR	10-2017-0051616	A	12 May 2017
KR	10-2017-0047725	A	08 May 2017	BR	112018008062	A2	13 November 2018
				CA	3002790	A1	27 April 2017
				CA	3002790	C	04 May 2021
				CN	108368514	A	03 August 2018
				EP	3369821	A1	05 September 2018
				JP	2018-531033	A	25 October 2018
				JP	2020-146059	A	17 September 2020
				JP	6785303	B2	18 November 2020
				KR	10-1747542	B1	15 June 2017
				PH	12018500838	A1	29 October 2018
				RU	2698394	C1	26 August 2019
				US	2019-0024060	A1	24 January 2019
				WO	2017-069578	A1	27 April 2017
JP	2016-202182	A	08 December 2016	BR	102016008872	A2	04 June 2019
				BR	102016008872	A8	22 April 2020
				EP	3085705	A1	26 October 2016
				EP	3085705	B1	13 June 2018
				JP	6766426	B2	14 October 2020
				RU	2015114955	A	10 November 2016
				US	2016-0312254	A1	27 October 2016
				US	9896704	B2	20 February 2018
JP	2020-115860	A	06 August 2020	BR	102020001764	A2	08 February 2022
				CN	111484963	A	04 August 2020
				EP	3686216	A1	29 July 2020
				US	10787691	B2	29 September 2020
				US	2020-0239920	A1	30 July 2020

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/019684

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/77(2006.01)i; C12N 9/06(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/77(2006.01); C12N 1/21(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/54(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 9/04(2006.01); C12N 9/10(2006.01); C12P 13/04(2006.01); C12P 13/06(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글루타메이트 디하이드로게네이스(<i>Glutamate dehydrogenase</i>), 바실러스 서브틸러스(<i>Bacillus subtilis</i>), 로도스피릴라레스(<i>Rhodospirillales</i>), L-이소루신(<i>L-isoleucine</i>), α -아미노부티릭산(<i>α-aminobutyric acid</i> , AABA)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WANG, Y. 등, Improvement of L-Leucine Production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> by Altering the Redox Flux, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2019년, 20권, 8호, 논문번호 2020, 내부페이지 1-14 요약	1-12
A	CN 109536428 A (WUHAN GRAND HOYO CO., LTD.) 2019.03.29 청구항 1	1-12
A	KR 10-1751967 B1 (대상 주식회사) 2017.06.30 청구항 1, 2	1-12
A	BÖRMANN, E. R. 등, Molecular analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>gdh</i> gene encoding glutamate dehydrogenase, <i>Molecular Microbiology</i> , 1992년, 6권, 3호, 페이지 317-326 요약	1-12
A	KR 10-2017-0047725 A (씨제이제일제당(주)) 2017.05.08 전체 문헌	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.		<input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년03월14일(14.03.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년03월15일(15.03.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

서적 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/019684

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2016-202182 A (AJINOMOTO CO., INC.) 2016.12.08 전체 문헌	1-12
A	JP 2020-115860 A (AJINOMOTO CO., INC.) 2020.08.06 전체 문헌	1-12

10

20

30

40

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/019684

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 109536428 A	2019/03/29	CN 109536428 B	2022/08/30
KR 10-1751967 B1	2017/06/30	KR 10-2017-0051616 A	2017/05/12
KR 10-2017-0047725 A	2017/05/08	BR 112018008062 A2	2018/11/13
		CA 3002790 A1	2017/04/27
		CA 3002790 C	2021/05/04
		CN 108368514 A	2018/08/03
		EP 3369821 A1	2018/09/05
		JP 2018-531033 A	2018/10/25
		JP 2020-146059 A	2020/09/17
		JP 6785303 B2	2020/11/18
		KR 10-1747542 B1	2017/06/15
		PH 12018500838 A1	2018/10/29
		RU 2698394 C1	2019/08/26
		US 2019-0024060 A1	2019/01/24
		WO 2017-069578 A1	2017/04/27
JP 2016-202182 A	2016/12/08	BR 102016008872 A2	2019/06/04
		BR 102016008872 A8	2020/04/22
		EP 3085705 A1	2016/10/26
		EP 3085705 B1	2018/06/13
		JP 6766426 B2	2020/10/14
		RU 2015114955 A	2016/11/10
		US 2016-0312254 A1	2016/10/27
		US 9896704 B2	2018/02/20
JP 2020-115860 A	2020/08/06	BR 102020001764 A2	2022/02/08
		CN 111484963 A	2020/08/04
		EP 3686216 A1	2020/07/29
		US 10787691 B2	2020/09/29
		US 2020-0239920 A1	2020/07/30

10

20

30

40

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/53

C 1 2 P 13/06 (2006.01)

C 1 2 P 13/06

C

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M
Y,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY
,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- グ ドングホ - □ 3 3 0

(72)発明者

チョン、キ ヨン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - □ 3 3 0

(72)発明者

キム、ヒヨン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - □ 3 3 0

(72)発明者

チェ、ウソン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル ジュング - グ ドングホ - □ 3 3 0

F ターム (参考)

4B064 AE07 CA02 CA19 CB11 CC24 DA01 DA10 DA11

4B065 AA01X AA01Y AA19Y AA24X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02

CA17 CA41 CA43 CA44