

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7539871号
(P7539871)

(45)発行日 令和6年8月26日(2024.8.26)

(24)登録日 令和6年8月16日(2024.8.16)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	F I
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 10 (全74頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-517540(P2021-517540)
 (86)(22)出願日 令和2年3月20日(2020.3.20)
 (65)公表番号 特表2021-525108(P2021-525108)
 A)
 (43)公表日 令和3年9月24日(2021.9.24)
 (86)国際出願番号 PCT/KR2020/003855
 (87)国際公開番号 WO2020/204427
 (87)国際公開日 令和2年10月8日(2020.10.8)
 審査請求日 令和2年12月2日(2020.12.2)
 審判番号 不服2022-15461(P2022-15461/J
 1)
 審判請求日 令和4年9月29日(2022.9.29)
 (31)優先権主張番号 10-2019-0040397
 (32)優先日 平成31年4月5日(2019.4.5)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 最終頁に続く

(73)特許権者 513178894
 シージェイ チェイルジェダン コーポレーション
 大韓民国、0 4 5 6 0 ソウル、チュン - グ、トンホ - 口、3 3 0 (サンニム - ドン)
 (74)代理人 110000796
 弁理士法人三枝国際特許事務所
 チョン ムヨン
 大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ
 トンホ - 口 3 3 0
 (72)発明者 キム ヒョナ
 大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ
 トンホ - 口 3 3 0
 (72)発明者 ソ チャンイル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規 L - トリプトファン排出タンパク質変異体及びそれを用いて L - トリプトファンを生産する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列の 7 9 番目 ~ 8 3 番目のアミノ酸から選択される 1 つのアミノ酸がグリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸に置換され、置換後のアミノ酸配列が配列番号 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を有し、L - トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体。

【請求項 2】

前記置換後のアミノ酸は、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 に記載のタンパク質変異体。

【請求項 3】

前記置換後のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 に記載のタンパク質変異体。

【請求項 4】

前記置換後のアミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項 1 に記載のタンパク質変異体。

【請求項 5】

配列番号 1 のアミノ酸配列の (i) 7 9 番目のアミノ酸がアラニン、バリン、又はイソロイシンに置換され、(ii) 8 0 番目のアミノ酸がアラニン、バリン、ロイシン、又はイソロイシンに置換され、(iii) 8 1 番目のアミノ酸がアラニン、バリン、又はイソロイシンに置換され、(iv) 8 2 番目のアミノ酸がアラニン、バリン、ロイシン、又はイ

ソロイシンに置換され、あるいは(v) 8 3 番目のアミノ酸がアラニン、バリン、又はロイシンに置換され、置換後のアミノ酸配列が配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、L - トリプトファン排出活性を有する、請求項 1 に記載のタンパク質変異体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のタンパク質変異体を発現する、L - トリプトファンを生産する微生物。

10

【請求項 9】

前記微生物は、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) 又はエシェリキア属 (*Escherichia* sp.) 微生物である、請求項 8 に記載の L - トリプトファンを生産する微生物。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の微生物を培地で培養するステップと、前記培養した培地又は微生物から L - トリプトファンを回収するステップとを含む L - トリプトファン生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、トリプトファン排出活性を有する新規タンパク質変異体、前記タンパク質変異体を発現する、L - トリプトファンを生産する微生物、及び前記微生物を用いて L - トリプトファンを生産する方法に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

トリプトファンは、必須アミノ酸の一つであり、飼料添加剤、輸液剤などの医薬品原料や健康食品素材などとして広く用いられている。現在は微生物を用いた直接発酵法が L - トリプトファン生産に主に用いられている。

【0 0 0 3】

L - トリプトファン生産に用いられる微生物として、初期には化学的又は物理的突然変異によるアナログ耐性を示す選択菌株が主に用いられていたが、1990年代に遺伝子組換え技術が急速に発展し、分子レベルの調節機序が解明されることにより、遺伝子操作技法を用いた組換え菌株が主に用いられている。

30

【0 0 0 4】

一方、特定アミノ酸排出遺伝子の発現は、微生物における当該アミノ酸の生産性向上をもたらした。コリネバクテリウム属微生物の L - リシン排出遺伝子 (lysE) の発現強化は、リシンの生産性を向上させた (特許文献 1)。また、大腸菌における rhtC 遺伝子の強化は、L - レオニン (L-threonine) に対する耐性を向上させると共に、L - ホモセリン、L - レオニン、L - ロイシンの生産性を向上させた (特許文献 2)。大腸菌において機能が知られていない遺伝子である yahN 遺伝子、yeaS 遺伝子、yfik 遺伝子及び yggA 遺伝子を強化することにより、L - グルタミン酸、L - リシン、L - レオニン、L - アラニン、L - ヒスチジン、L - プロリン、L - アルギニン、L - バリン及び L - イソロイシンの生産性が向上するという特許 (EP 1 0 1 6 7 1 0 B 1、特許文献 3) も開示されている。

40

【0 0 0 5】

しかし、現在、L - トリプトファンに特異性を示す排出タンパク質は報告されていない。大腸菌の yddG 遺伝子が知られているが、L - トリプトファンより L - フェニルアラニンに高い特異性を示す (非特許文献 1)。また、L - アミノ酸発酵の生産菌株として主に用いられるコリネバクテリウム属微生物においては、L - トリプトファン又は芳香族アミノ酸排出遺伝子が全く報告されていない (非特許文献 2)。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】国際公開第97/023597号

【文献】欧州特許出願公開第1013765号明細書

【文献】欧州特許第1016710号明細書

【文献】韓国登録特許第10-0620092号公報

【文献】韓国登録特許第10-1783170号公報

【文献】韓国登録特許第10-1632642号公報

【文献】韓国登録特許第10-1126041号公報

10

【非特許文献】

【0007】

【文献】FEMS Microbiol Lett 275 (2007) 312-318

【文献】J Ind Microbiol Biotechnol. 2015 May; 42(5):787-97

【文献】Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444

【文献】Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277

【文献】Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453

【文献】Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)

【文献】Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990)

【文献】Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994

20

【文献】[CARILLO ETA/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073

【文献】Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482

【文献】Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)

30

【文献】Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745

【文献】J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

【文献】F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York

30

【文献】Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8

【文献】DG Gibson et al., NATURE METHODS, VOL.6 NO.5, MAY 2009, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix

【文献】Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545

【文献】JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 1987, p. 5330-5332

【文献】Nakamura J et al., Appl. Environ. Microbiol. 73(14): 4491-4498, 2007

【文献】J. Biochem. Mol. Biol. 32, 20-24 (1999)

【文献】One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products, Datsenko KA, Wanner BL., Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jun 6;97(12):6640-5

40

【文献】JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 1997, p. 4426-4428

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本出願では、L-トリプトファンを生産する微生物においてL-トリプトファンに特異性を有する新規トリプトファン排出タンパク質を発現させたところ、L-トリプトファン生産量が画期的に向上することを確認し、当該膜タンパク質のさらなる排出能向上のための変異導入によりL-トリプトファン生産量が画期的に向上することを確認し、本出願を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 9 】

本出願は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目に対応するアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が疎水性(hydrophobic)又は脂肪族(Aliphatic)アミノ酸に置換された、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体を提供することを目的とする。

【 0 0 1 0 】

また、本出願は、前記変異体をコードするポリヌクレオチドと、それを含むベクターを提供することを目的とする。

【 0 0 1 1 】

さらに、本出願は、前記タンパク質変異体を発現する、L-トリプトファンを生産する微生物を提供することを目的とする。 10

【 0 0 1 2 】

さらに、本出願は、前記微生物を培地で培養するステップを含むL-トリプトファン生産方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 3 】

さらに、本出願は、前記タンパク質変異体のL-トリプトファン生産増加用途を提供することを目的とする。

【発明の効果】**【 0 0 1 4 】**

本出願は、L-トリプトファンに特異性を有する新規排出遺伝子を見出し、L-トリプトファンを生産する微生物において前記遺伝子を発現させたところ、前記遺伝子を発現しない親菌株に比べてL-トリプトファン生産量が画期的に向上することが確認され、前記遺伝子によりコードされるタンパク質の変異体を見出し、L-トリプトファン生産量がさらに向上することが確認されたので、それによりL-トリプトファンを効果的に生産することができる。 20

【図面の簡単な説明】**【 0 0 1 5 】**

【図1】各糖消費量におけるコリネバクテリウム・グルタミカム変異株C A 0 4 - 8 3 5 2及びC A 0 4 - 8 4 0 5の細胞内のトリプトファン濃度を確認した図である。

【発明を実施するための形態】**【 0 0 1 6 】**

以下、本出願をより詳細に説明する。なお、本出願で開示される各説明及び実施形態はそれぞの他の説明及び実施形態にも適用される。すなわち、本出願で開示される様々な要素のあらゆる組み合わせが本出願に含まれる。また、以下の具体的な記述に本出願が限定されるものではない。 30

【 0 0 1 7 】

本出願の一態様は、配列番号1のアミノ酸配列において少なくとも1つの変異を含む、L-トリプトファン排出能を有するタンパク質変異体を提供する。

【 0 0 1 8 】

前記変異は、配列番号1のアミノ酸配列においてN末端から79番目～83番目のアミノ酸から選択される少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換される変異であってもよい。 40

【 0 0 1 9 】

前記タンパク質変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体であってもよい。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が疎水性アミノ酸又は脂肪族アミノ酸に置換された、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体であってもよい。

【 0 0 2 0 】

10

20

30

40

50

本出願における「L-トリプトファン (L-tryptophan)」とは、L-アミノ酸の1つであって、体内で合成されない必須アミノ酸であり、C₁₁H₁₂N₂O₂の化学式で表される芳香族L-アミノ酸を意味する。

【0021】

本出願における「L-トリプトファン排出能を有するタンパク質」、「L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質」とは、特異的にL-トリプトファンを細胞外に排出する活性を有する膜タンパク質を意味する。

【0022】

前記L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質は、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ (Herbaspirillum rhizosphaerae) 由来のL-トリプトファン排出活性を有するタンパク質であってもよい。前記ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ (Herbaspirillum rhizosphaerae) 由来のL-トリプトファン排出活性を有するタンパク質は、例えば配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質と混用されてもよい。

10

【0023】

ここで、「ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ (Herbaspirillum rhizosphaerae)」とは、ヘルバスピリラム属に属するグラム陰性菌であって、韓国内では鬱陵島などで分離された菌株であり、土壤内の根圏 (rhizosphere) から分離される。

【0024】

また、本出願のL-トリプトファン排出活性を有するタンパク質は、たとえ配列番号1のアミノ酸を含むタンパク質であると定義したとしても、配列番号1のアミノ酸配列の前後の無意味な配列付加、自然発生する突然変異、又はその非表現突然変異 (silent mutation) を除外するものではなく、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質と同一又は相当する活性を有するものであれば、本出願のL-トリプトファン排出活性を有するタンパク質に含まれることは当業者にとって自明である。具体的には、本願のL-トリプトファン排出活性を有するタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又はそれと80%、90%、95%もしくは97%以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、そのような相同性又は同一性を有し、前記タンパク質に相当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、改変、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願の変異対象となるタンパク質に含まれることは言うまでもない。

20

【0025】

すなわち、本出願に「特定配列番号で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質又はポリペプチド」、「特定配列番号で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質又はポリペプチド」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又は相当する活性を有するものであれば、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であっても本出願に用いられることは言うまでもない。例えば、「配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチド」は、それと同一又は相当する活性を有するものであれば、「配列番号1のアミノ酸配列からなるポリペプチド」に属することは言うまでもない。

30

【0026】

本出願が提供するL-トリプトファン排出能を有するタンパク質変異体とは、前述したL-トリプトファンタンパク質排出能を有するタンパク質の特異的位置のアミノ酸が置換され、L-トリプトファン排出能が変異前のタンパク質に比べて100%を超える変異体を意味する。

40

【0027】

本出願における「変異体 (variant)」とは、少なくとも1つのアミノ酸の保存的置換 (conservative substitution) 及び / 又は改変 (modification) により前記列挙した配列 (the recited sequence) とは異なるが、前記タンパク質の機能 (functions) 又は

50

特性 (properties) が維持されるタンパク質を意味する。変異体は、数個のアミノ酸置換、欠失又は付加により識別される配列 (identified sequence) とは異なる。このような変異体は、一般に前記タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸を改変し、前記改変したタンパク質の特性を評価することにより識別することができる。すなわち、変異体の能力は、本来のタンパク質 (native protein) より向上するか、変わらないか又は低下する。また、一部の変異体には、N 末端リーダー配列や膜貫通ドメイン (transmembrane domain) などの少なくとも 1 つの部分が除去された変異体も含まれる。他の変異体には、成熟タンパク質 (mature protein) の N 及び / 又は C 末端から一部分が除去された変異体も含まれる。前記「変異体」には、変異型、変形、変異したタンパク質、変異型ポリペプチド、変異などの用語 (英文表現では、modification、modified protein、modified polypeptide、mutant、mutein、divergent、variant など) が用いられるが、変異を意味する用語であればこれらに限定されるものではない。本出願の目的上、前記変異体は、天然の野生型又は非変異のタンパク質に比べて変異したタンパク質の活性が上昇したものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 2 8 】

本出願における「保存的置換 (conservative substitution)」とは、あるアミノ酸が類似した構造的及び / 又は化学的性質を有する他のアミノ酸に置換されることを意味する。前記変異体は、少なくとも 1 つの生物学的活性を依然として有する状態で、例えば少なくとも 1 つの保存的置換を有する。このようなアミノ酸置換は、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 (amphipathic nature) における類似性に基づいて発生し得る。例えば、電荷を帯びた側鎖 (electrically charged amino acid) を有するアミノ酸のうち正に荷電した (塩基性) アミノ酸としては、アルギニン、リシン及びヒスチジンが挙げられ、負に荷電した (酸性) アミノ酸としては、グルタミン酸及びアスパラギン酸が挙げられ、電荷を帯びていない側鎖 (uncharged amino acid) を有するアミノ酸のうち非極性アミノ酸 (nonpolar amino acid) としては、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、トリプトファン及びプロリンが挙げられ、極性 (polar) 又は親水性 (hydrophilic) アミノ酸としては、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンが挙げられ、芳香族アミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンが挙げられる。

【 0 0 2 9 】

また、変異体は、ポリペプチドの特性と二次構造に最小限の影響を及ぼすアミノ酸の欠失又は付加を含んでもよい。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) に関するタンパク質の N 末端のシグナル (又はリーダー) 配列に結合されてもよい。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に結合されてもよい。

【 0 0 3 0 】

前記「他のアミノ酸に置換」は、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸であれば限定されるものではない。すなわち、配列番号 1 のアミノ酸配列の N 末端から 79 番目のアミノ酸であるロイシンがロイシン以外の他のアミノ酸残基に置換されたもの、80 番目のアミノ酸であるセリンがセリン以外の他のアミノ酸残基に置換されたもの、81 番目のアミノ酸であるロイシンがロイシン以外の他のアミノ酸残基に置換されたもの、82 番目のアミノ酸であるセリンがセリン以外の他のアミノ酸残基に置換されたもの、又は 83 番目のアミノ酸であるイソロイシンがイソロイシン以外の他のアミノ酸残基に置換されたものであれば限定されるものではない。なお、本出願における「特定アミノ酸が置換された」とは、他のアミノ酸に置換されたと表記していなくても、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたことを意味することは言うまでもない。

【 0 0 3 1 】

あるいは、前記タンパク質変異体は、配列番号 1 のアミノ酸配列において 79 番目 ~ 8

10

20

30

40

50

3番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸以外の、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたものであってもよい。あるいは、前記タンパク質変異体は、電荷を帯びていない側鎖(uncharged amino acid)を有する、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換された変異体であってもよいが、これに限定されるものではない。

【0032】

あるいは、前記タンパク質変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が疎水性(hydrophobic)アミノ酸又は脂肪族(aliphatic)アミノ酸のうち、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換された変異体であってもよい。具体的には、前記タンパク質変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が疎水性(非極性)アミノ酸又は脂肪族アミノ酸のいずれかのアミノ酸に置換された変異体であってもよい。前記脂肪族アミノ酸は、例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸であってもよいが、これらに限定されるものではない。前記疎水性(非極性)アミノ酸は、例えばグリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンからなる群から選択されるアミノ酸であってもよいが、これらに限定されるものではない。

10

【0033】

あるいは、前記タンパク質変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸がサイズ(size)の小さいアミノ酸のうち、置換前のアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換された変異体であってもよいが、これらに限定されるものではない。

20

【0034】

本出願における「サイズの小さいアミノ酸」とは、20種のアミノ酸のうち、相対的にサイズの小さいアミノ酸であるグリシン、アラニン、セリン、トレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン及びアスパラギンが含まれるものであり、具体的にはグリシン、アラニン、セリン、トレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びプロリンを意味するが、これらに限定されるものではなく、より具体的にはグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン及びトレオニンを意味するが、これらに限定されるものではない。

30

【0035】

あるいは、前記タンパク質変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸がアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンからなる群から選択されるアミノ酸に置換された変異体であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0036】

具体的には、前記タンパク質変異体における他のアミノ酸への置換は、配列番号1のアミノ酸配列の79番目のアミノ酸であるロイシンのアラニン、バリン又はイソロイシンへの置換、80番目のアミノ酸であるセリンのアラニン、バリン、ロイシン又はイソロイシンへの置換、81番目のアミノ酸であるロイシンのアラニン、バリン又はイソロイシンへの置換、82番目のアミノ酸であるセリンのアラニン、バリン、ロイシン又はイソロイシンへの置換、83番目のアミノ酸であるイソロイシンのアラニン、バリン又はロイシンへの置換から選択される少なくとも1つの置換であってもよいが、これらに限定されるものではない。

40

【0037】

このような本出願のタンパク質変異体は、変異前のタンパク質より強化されたL-トリプトファン排出能を有する。

【0038】

本出願の配列番号1のN末端から79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体には、前記79番目～83番目に対

50

応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体が含まれることは言うまでもない。

【0039】

当業者であれば、当該技術分野で公知の配列アライメント、相同性又は同一性を確認する方法を用いて、任意の配列と本出願の配列番号1を比較することにより、任意の配列においてどの位置のアミノ酸が配列番号1の79番目～83番目に対応するアミノ酸であるか把握することができる。

【0040】

よって、本出願において特に記載していないくとも、「配列番号1の79番目～83番目のアミノ酸」に関して説明される内容は、任意の配列、例えば配列番号1と50%、60%、70%、80%又は90%以上の同一性を有する配列における「配列番号1の79番目～83番目のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸」にも適用されることは言うまでもない。

10

【0041】

例えば、本出願のタンパク質変異体は、前記79番目～83番目に対応する位置のアミノ酸が他のアミノ酸に置換され、配列番号1と70%、80%、90%又は95%以上の同一性を有するタンパク質変異体であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0042】

配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体は、配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列を含むものであってもよく、具体的には必須的に配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列からなる(*consisting essentially of*)ものであってもよく、より具体的には配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列からなるものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

20

【0043】

また、前記タンパク質変異体は、配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列、又は配列番号1のアミノ酸配列において、79番目～83番目のアミノ酸から選択される少なくとも1つのアミノ酸が固定されており、それと80%以上の相同性又は同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよいが、これらに限定されるものではない。具体的には、本出願の前記変異型ポリペプチドには、配列番号131～147、及び配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の相同性又は同一性を有するポリペプチドが含まれてもよい。また、そのような相同性又は同一性を有し、前記タンパク質に対応する効能を示すアミノ酸配列であれば、79番目～83番目のアミノ酸位置以外の一部の配列が欠失、改変、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に含まれることは言うまでもない。

30

【0044】

本出願における「相同性(homology)」又は「同一性(identity)」とは、2つの与えられたアミノ酸配列又は塩基配列が互いに関連する程度を意味し、百分率で表される。

【0045】

保存されている(*conserved*)ポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列相同性又は同一性は標準的な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用いられてもよい。実質的には、相同性を有するか(*homologous*)又は同じ(*identical*)配列は、中程度又は高いストリングエントな条件(*stringent conditions*)下において、一般に配列全体又は全長の少なくとも約50%、60%、70%、80%又は90%以上ハイブリダイズしてもよい。そのハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドがコドンの代わりに縮退コドンを有するようにするものであってもよい。

40

【0046】

任意の2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否かは、例えば非特許文献3のようなデフォルトパラメーターと「FASTA」プ

50

ログラムなどの公知のコンピュータアルゴリズムを用いて決定することができる。あるいは、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, 非特許文献4)(バージョン5.0.0又はそれ以降のバージョン)で行われるように、ニードルマン＝ウンシュ(Needleman-Wunsch)アルゴリズム(非特許文献5)を用いて決定することができる(GCGプログラムパッケージ(非特許文献6)、BLASTP、BLASTN、FASTA(非特許文献7, 8, 9)を含む)。例えば、国立生物工学情報センターのBLAST又はClustalWを用いて相同性、類似性又は同一性を決定することができる。

【0047】

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、例えば非特許文献10に開示されているように、非特許文献5などのGAPコンピュータプログラムを用いて、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つの配列のうち短いものにおける記号の総数で、類似する配列記号(すなわち、ヌクレオチド又はアミノ酸)の数を割った値と定義している。GAPプログラムのためのデフォルトパラメーターは、(1)一進法比較マトリクス(同一性は1、非同一性は0の値を含む)及び非特許文献11に開示されているように、非特許文献12の加重比較マトリクス(又はEDNAFULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリクス)と、(2)各ギャップに3.0のペナルティ、及び各ギャップの各記号に追加の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)と、(3)末端ギャップに無ペナルティとを含んでもよい。

【0048】

また、任意の2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否かは、定義されたストリンジエントな条件下にてサザンハイブリダイゼーション実験で配列を比較することにより確認することができ、定義される好適なハイブリダイゼーション条件は当該技術の範囲内であり、当業者に周知の方法(例えば、非特許文献13、14)で決定されてもよい。

【0049】

本出願における、タンパク質が「発現するように／する」とは、標的タンパク質が微生物内に導入されるか、微生物内で発現するように改変された状態を意味する。前記標的タンパク質が微生物内に存在するタンパク質の場合、内在性活性又は改変前の活性に比べて活性が強化された状態を意味する。本出願の目的上、「標的タンパク質」は、前述したL-トリプトファン排出能を有するタンパク質の変異体であってもよい。

【0050】

具体的には、「タンパク質の導入」とは、微生物が本来持っていた特定タンパク質の活性が現れるようにすること、又は当該タンパク質の内在性活性もしくは改変前の活性に比べて活性が向上することを意味する。例えば、特定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ることや、特定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てその活性が現れることであってもよい。また、「活性の強化」とは、微生物が有する特定タンパク質の内在性活性又は改変前の活性に比べて活性が向上することを意味する。「内在性活性」とは、自然要因又は人為的要因により遺伝的に変異して微生物の形質が変化する場合に、形質変化の前に親菌株が本来有していた特定タンパク質の活性を意味する。

【0051】

具体的には、本出願の活性強化は、前記タンパク質変異体をコードする遺伝子の細胞内のコピー数を増加する方法、前記タンパク質変異体をコードする遺伝子の発現調節配列に変異を導入する方法、前記L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体をコードする遺伝子の発現調節配列を活性が強力な配列に置換する方法、染色体上のL-トリプトファン排出活性を有する天然タンパク質をコードする遺伝子を前記タンパク質変異体をコードする遺伝子に代替する方法、前記タンパク質変異体の活性が強化されるように前記L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異をさらに導入

10

20

30

40

50

する方法、及び微生物にタンパク質変異体を導入する方法からなる群から選択される少なくとも1つの方法で行われるが、これらに限定されるものではない。

【0052】

前記遺伝子のコピー数を増加する方法は、特にこれらに限定されるものではないが、ベクターに作動可能に連結された形態で行われるか、宿主細胞内の染色体内に挿入されることにより行われてもよい。具体的には、本出願のタンパク質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、宿主に関係なく複製されて機能す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てもよく、前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主細胞内の染色体内に前記ポリヌクレオチドを挿入することのできるベクターが宿主細胞の染色体内に導入されることにより行われてもよい。前記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば相同組換えにより行うことができる。

10

【0053】

次に、ポリヌクレオチドの発現が増加するように発現調節配列を改変する方法は、特にこれらに限定されるものではないが、前記発現調節配列の活性がさらに強化されるように、核酸配列の欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより配列上の変異を誘導して行うこともでき、より高い活性を有する核酸配列に置換することにより行うこともできる。前記発現調節配列は、特にこれらに限定されるものではないが、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、転写及び翻訳の終結を調節する配列などが含まれてもよい。

20

【0054】

前記ポリヌクレオチド発現単位の上流には、本来のプロモーターに代えて強力なプロモーターが連結されてもよいが、これに限定されるものではない。公知の強力なプロモーターの例としては、c j 1 ~ c j 7 プロモーター（特許文献4）、l a c プロモーター、t r p プロモーター、t r c プロモーター、t a c プロモーター、ラムダファージP R プロモーター、P L プロモーター、t e t プロモーター、g a p A プロモーター、S P L 7 プロモーター、S P L 1 3 (s m 3) プロモーター（特許文献5）、O 2 プロモーター（特許文献6）、t k t プロモーター、y c c A プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0055】

また、染色体上のポリヌクレオチド配列を改変する方法は、特にこれらに限定されるものではないが、前記ポリヌクレオチド配列の活性がさらに強化されるように、核酸配列の欠失、挿入、非保存的もしくは保存的置換、又はそれらの組み合わせにより発現調節配列上の変異を誘導して行うこともでき、より高い活性を有するように改良されたポリヌクレオチド配列に置換することにより行うこともできる。

【0056】

このようなタンパク質活性の導入及び強化は、対応するタンパク質の活性又は濃度が野生型や非変形の微生物菌株におけるタンパク質の活性又は濃度に比べて、一般に少なくとも1%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%又は500%、最大で1000%又は2000%まで増加したものであってもよいが、これらに限定されるものではない。

40

【0057】

本出願の他の態様は、前記タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0058】

本出願における「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単位（monomer）が共有結合により長く鎖状につながったヌクレオチドの重合体（polymer）であって、所定の長さより長いDNA又はRNA鎖であり、より具体的には前記タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド断片を意味する。

【0059】

本出願のタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドは、L-トリプトファン排出

50

能を有するタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド配列であればいかなるものでもよい。

【0060】

本出願において、前記L-トリプトファン排出能を有するタンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子は、*wex*遺伝子であってもよく、ヘルバスピリラム・リゾスファエラ工由来であってもよく、具体的には配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列であってもよく、より具体的には配列番号2の塩基配列を含む配列であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0061】

本出願のタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドは、コドンの縮退(degeneracy)により、又は前記ポリペプチドを発現させようとする生物において好まれるコドンを考慮して、ポリペプチドのアミノ酸配列が変化しない範囲でコード領域に様々な改変を行うことができる。具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体をコードするポリヌクレオチド配列であればいかなるものでもよい。例えば、本出願のポリヌクレオチドは、本出願のタンパク質変異体、具体的には配列番号131～147のいずれかのアミノ酸配列を含むタンパク質、又はそれと相同性又は同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であってもよいが、これらに限定されるものではなく、より具体的には配列番号80、81、82、89、90、91、92、101、102、103、110、111、112、113、122、123及び124で表されるポリヌクレオチド配列のいずれかのポリヌクレオチド配列を含むものであってもよいが、これらに限定されるものではない。前記相同性又は同一性については前述した通りである。

10

【0062】

また、公知の遺伝子配列から調製されるプローブ、例えば前記ポリヌクレオチド配列の全部又は一部に対する相補配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることにより、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたタンパク質変異体をコードする配列であればいかなるものでもよい。

20

【0063】

前記「ストリンジエントな条件」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(例えば、非特許文献13)に具体的に記載されている。例えば、相同性の高い遺伝子同士、40%以上、具体的には90%以上、より具体的には95%以上、さらに具体的には97%以上、特に具体的には99%以上の相同性を有する遺伝子同士をハイブリダイズし、それより相同性の低い遺伝子同士をハイブリダイズしない条件、又は通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である、60、1×SSC、0.1%SDS、具体的には60、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度及び温度において、1回、具体的には2回～3回洗浄する条件が挙げられる。しかし、これらに限定されるものではなく、その目的に応じて当業者により適宜調節される。

30

【0064】

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厳格さに応じて塩基間のミスマッチ(mismatch)が可能であっても、2つのポリヌクレオチドが相補的配列を有することが求められる。「相補的」とは、互いにハイブリダイゼーションが可能なヌクレオチド塩基間の関係を表すために用いられる。例えば、DNAにおいて、アデノシ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。よって、本出願には、実質的に類似したポリヌクレオチド配列だけでなく、全配列に相補的な単離されたポリヌクレオチド断片が含まれてもよい。

40

【0065】

具体的には、相同性を有するポリヌクレオチドは、55のTm値でハイブリダイゼーションステップが行われるハイブリダイゼーション条件と前述した条件を用いて探知する

50

ことができる。また、前記 Tm 値は、60、63 又は 65 であってもよいが、これらに限定されるものではなく、その目的に応じて当業者により適宜調節される。

【0066】

ポリヌクレオチドをハイブリダイズする適切な厳格さはポリヌクレオチドの長さ及び相補性の程度に依存し、変数は当該技術分野で公知である（非特許文献 15 参照）。

【0067】

本出願のさらに他の態様は、前記タンパク質変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0068】

本出願における「ベクター」とは、好適な宿主内で標的タンパク質を発現させることができるように、好適な調節配列に作動可能に連結された前記標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有する DNA 産物を意味する。前記調節配列には、転写を開始するプロモーター、その転写を調節するための任意のオペレーター配列、好適な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列が含まれてもよい。ベクターは、好適な宿主細胞内に形質転換されると、宿主ゲノムに関係なく複製及び機能することができ、ゲノム自体に組み込まれてもよい。

10

【0069】

本出願に用いられるベクターは、特に限定されるものではなく、当該技術分野で公知の任意のベクターを用いることができる。通常用いら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は、pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、Charon21Aなどを用いることができ、プラスミドベクターとしては、pBR系、pUC系、pBlue script II系、pGEM系、pTZ系、pCL系、pET系などを用いることができる。具体的には、pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BACベクターなどを用いることができる。

20

【0070】

例えば、細胞内染色体導入用ベクターにより、染色体内に標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを変異したポリヌクレオチドに置換することができる。前記ポリヌクレオチドの染色体への挿入は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば相同組換えにより行うことができるが、これに限定されるものではない。前記染色体に挿入されたか否かを確認するための選択マーカー（selection marker）をさらに含んでもよい。選択マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選択、すなわち標的核酸分子が挿入されたか否か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、表面タンパク質の発現などの選択可能表現型を付与するマーカーが用いられてもよい。選択剤（selective agent）で処理した環境においては、選択マーカーを発現する細胞のみ生存するか、異なる表現形質を示すので、形質転換された細胞を選択することができる。

30

【0071】

また、本出願は、前記 L - トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体を発現する、L - トリプトファンを生産する微生物を提供することを目的とする。

40

【0072】

本出願における「L - トリプトファンを生産する微生物」とは、培地中の炭素源から L - トリプトファンを野生型又は非変異微生物と比較して過剰量で生産する微生物を意味する。また、前記 L - トリプトファンを生産する微生物は組換え微生物であってもよい。具体的には、L - トリプトファンを生産するものであればその種類が特に限定されるものではなく、エンテロバクター（Enterbacter）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、コリネバクテリウム（Corynebacterium）属及びブレビバクテリウム（Brevibacterium）属に属する微生物であってもよい。より具体的には、コリネバクテリウム（Coryne

50

bacterium) 属又はエシェリキア (Escherichia) 属に属する微生物であってもよい。

【0073】

さらに具体的には、エシェリキア属 (Escherichia) 微生物は大腸菌 (Escherichia coli) であってもよく、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属微生物はコリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) であってもよいが、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質が導入又は強化されてL-トリプトファン生産量を増加させる、エシェリキア属又はコリネバクテリウム属に属する微生物であればいかなるものでもよい。

【0074】

前記微生物においてL-トリプトファンの生産量を増加させるために、E4P (erythrose-4-phosphate) などの前駆体を持続的に供給し、エネルギーを効率的に利用できるようにtktA遺伝子の発現を強化したり、生合成経路における側枝経路を遮断することにより生合成を増加させる方法や、用いるATPを少なくする方法などを用いることができる。

10

【0075】

具体的には、本出願において、前記L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質又は前記タンパク質変異体を発現する / タンパク質変異体が発現するように改変された、L-トリプトファンを生産する微生物の親菌株は、L-トリプトファンを生産する微生物であれば特に限定されるものではない。L-トリプトファンを生産する微生物は、L-トリプトファン生合成経路を強化するために、競合経路の遺伝子、L-トリプトファンオペロンの芳香族経路のオペレーター、L-トリプトファン流入遺伝子、L-トリプトファン流入及び分解遺伝子の活性を低下又は不活性化させ、かつ / 又はL-トリプトファンオペロンの活性を過剰発現させる微生物であってもよい。具体的には、L-トリプトファン生合成遺伝子の (trpEDCBA) 発現を抑制するトリプトファン合成酵素群の調節遺伝子 (trpR)、又は細胞の外部のL-トリプトファンを細胞内に流入するMtr膜タンパク質の活性が内在性活性より低下したもの又は除去されたものであってもよい。

20

【0076】

前記目的を達成するための本出願のさらに他の態様は、前記タンパク質変異体を発現する、L-トリプトファンを生産する微生物を培地で培養するステップを含むトリプトファン生産方法に関する。

30

【0077】

前記L-トリプトファン、配列番号1のアミノ酸配列を含む、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質、タンパク質の発現、及び微生物については前述した通りである。

【0078】

本出願における「培養」とは、前記微生物を好適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、当該技術分野で公知の好適な培地と培養条件で行うことができる。このような培養過程は、当業者であれば選択される菌株に応じて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、連続及び流加培養であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0079】

本出願における「培地」とは、前記微生物を培養するために必要な栄養物質を主成分として混合した物質を意味し、生存及び発育に不可欠な水をはじめとする栄養物質や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他の培養条件は、通常の微生物の培養に用いられるものであればいかなるものでもよく、好適な炭素源、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する通常の培地中で好気性条件下にて温度、pHなどを調節して本出願の微生物を培養することができる。

40

【0080】

本出願における前記炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトースなどの炭水化物、マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコール、ピルビン酸、乳

50

酸、クエン酸などの有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リシンなどのアミノ酸などが挙げられる。また、デンプン加水分解物、糖蜜、ブラックストラップ糖蜜、米糠、キャッサバ、バガス、トウモロコシ浸漬液などの天然の有機栄養源を用いることができ、具体的にはグルコースや殺菌した前処理糖蜜（すなわち、還元糖に変換した糖蜜）などの炭水化物を用いることができ、その他適量の炭素源であればいかなるものでも用いることができる。これらの炭素源は、単独で用いることもでき、2種以上を組み合わせて用いることもできるが、これらに限定されるものではない。

【0081】

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無機窒素源と、グルタミン酸、メチオニン、グルタミンなどのアミノ酸、ペプトン、NZ-アミン、肉類抽出物、酵母抽出物、麦芽抽出物、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有機窒素源とを用いることができる。これらの窒素源は、単独で用いることもでき、2種以上を組み合わせて用いることもできるが、これらに限定されるものではない。

10

【0082】

前記リン源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム又はそれらに相当するナトリウム含有塩などが挙げられる。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を用いることができ、それ以外に、アミノ酸、ビタミン及び／又は好適な前駆体などを用いることができる。これらの構成成分又は前駆体は、培地に回分式又は連続式で添加することができる。しかし、これらに限定されるものではない。

20

【0083】

本出願において、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、硫酸などの化合物を培地に好適な方式で添加することにより、培地の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などの消泡剤を用いて気泡生成を抑制することができる。さらに、培地の好気状態を維持するために、培地中に酸素又は酸素含有気体を注入してもよく、嫌気及び微好気状態を維持するために、気体を注入しなくてもよく、窒素、水素又は二酸化炭素ガスを注入してもよいが、これらに限定されるものではない。

30

【0084】

培地の温度は、20～50、具体的には30～37であってもよいが、これらに限定されるものではない。培養期間は、有用物質の所望の生成量が得られるまで続けてもよく、具体的には10時間～100時間であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0085】

前記生産方法は、前記培養における培地又は前記微生物からL-トリプトファンを回収するステップを含んでもよい。

【0086】

前記トリプトファンを回収するステップは、本出願の微生物の培養法、例えば回分、連続、流加培養法などに応じて、当該技術分野で公知の好適な方法を用いて培地から目的とするL-トリプトファンを回収することができる。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、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、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、アフィニティーコロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー、HPLC及びこれらの組み合わせを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

40

【0087】

前記生産方法は、精製工程を含んでもよい。前記精製工程は、当該技術分野で公知の好適な方法により、回収したL-トリプトファンを精製することができる。

【0088】

50

本出願のさらに他の態様は、配列番号1のアミノ酸配列において79番目～83番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された、L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質変異体が発現するように微生物を改変することを含む、L-トリプトファン排出能を向上させる方法を提供する。

【0089】

本出願のさらに他の態様は、前記タンパク質変異体のL-トリプトファン排出能向上用途を提供する。

【0090】

本出願のさらに他の態様は、前記タンパク質変異体のL-トリプトファン生産増加用途を提供する。

10

【0091】

本出願のタンパク質変異体は、微生物のL-トリプトファン排出能を向上させることができるので、L-トリプトファン生産増加用途に用いることができる。前記タンパク質変異体、他のアミノ酸については前述した通りである。

【実施例】

【0092】

以下、実施例を挙げて本出願をより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は本出願を例示的に説明するためのものであり、本出願がこれらの実施例に限定されるものではない。

【0093】

実施例1 排出遺伝子の探索及び選択

20

大腸菌由来E a m A f a m i l yであるY d e Dのアミノ酸配列をq u e r y配列とし、N C B IとK e g g d a t a b a s eに基づいたP S I - B L A S T探索の結果、トリプトファンを排出する膜タンパク質と考えられる30種の候補遺伝子とそれを保有する生物を選定した。それらのうち生産菌株に適用できるバイオセーフティーレベル(Biosafety level)と確保可能性を考慮して、表1のように5種の生物を選定した。

【0094】

【表1】

芳香族アミノ酸排出膜タンパク質を保有するものと予想される微生物

順序	菌株	タンパク質登録番号	ゲノム登録番号	バイオセーフティーレベル
1	<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> (KCTC12558)	WP_0504787 45. 1	NZ_LFLU010 00012. 1	1
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (KCTC22466)	WP_0370224 29. 1	NC_018177. 1	1
3	<i>Alcaligenes faecalis</i> (KCTC2678)	WP_0459301 86. 1	NZ_CP01311 9. 1	1
4	<i>Cupriavidus necator</i> (KCTC22469)	WP_0116164 78. 1	AM260480. 1	1
5	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	WP_0001982 05. 1	NC_000913. 3	1

30

【0095】

40

50

実施例 2

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ (*Herbaspirillum rhizosphaerae*) 由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物の作製

実施例 1 で選定したヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) から膜タンパク質をコードする遺伝子及びその周辺の塩基配列に関する情報 (登録番号 NZ_LFLU01000012.1) を得た。

【0096】

確保した塩基配列に基づいて、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子をコリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム DNA に挿入するためのプライマーを合成した。ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を増幅するために、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ菌株の染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 3 と配列番号 4 のプライマーを用いて PCR を行った。重合酵素としては SolgTM Pfu-X DNA ポリメラーゼを用い、PCR 増幅条件は、95 で 2 分間の変性後、95 で 20 秒間の変性、62 で 40 秒間のアニーリング、72 で 1 分間の重合を 27 サイクル行い、その後 72 で 5 分間の重合反応を行うものとした。

【0097】

その結果、924 bp の遺伝子 (配列番号 2) を含む 956 bp の遺伝子断片が得られた。

配列番号 3 (wex-1)

T A G A G G A G A C A C A A C A T G A A T A G C A A G A A G G C C A C

配列番号 4 (wex-2)

g g c t c t t c c t g t t A G T C T A C A A A C A G T C C G C C A C

【0098】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来の gapA プロモーターを確保するために、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 5 と配列番号 6 のプライマーを用いて PCR を行った。重合酵素としては SolGent co. を用い、PCR 増幅条件は、95 で 2 分間の変性後、95 で 20 秒間の変性、62 で 40 秒間のアニーリング、72 で 30 秒間の重合を 27 サイクル行い、その後 72 で 5 分間の重合反応を行うものとした。

配列番号 5 (PgapA-1)

c c c t t c c g g t t A G T T T G A A G C C A G T G T G A G T T G C

配列番号 6 (PgapA(-wex)-2)

C T T C T T G C T A T T C A T G T T G T G T C T C C T C T A A A G A T T G T A

【0099】

増幅した gapA プロモーター部位とヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子断片、及び SacI 制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクター pDZTn (特許文献 7) は、ギブソンアセンブリ (非特許文献 16) 方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、pDZTn - PgapA - Hrh と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後 50 で 1 時間保存することにより行った。

【0100】

作製した pDZTn - PgapA - Hrh ベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869 菌株にエレクトロポレーション (非特許文献 17) により形質転換し、その後 2 次交差過程を経て、染色体上でトランスポゾン遺伝子の間に 1 コピーの PgapA - Hrh 遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号 7 と配列番号 8 のプライマーを用いた PCR 法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

配列番号 7 (Confirm_PgapA-wex-1)

C G G A T T A T G C C A A T G A T G T G

10

20

30

40

50

配列番号 8 (C o n f i r m _ P g a p A - w e x - 2)

C A C G A T C A C C A A C A T T C A G G

【 0 1 0 1 】

このようにして得た菌株をコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - H r h と命名した。

【 0 1 0 2 】

実施例 3

シュードモナス・スタッツエリ (*Pseudomonas stutzeri*) 由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物の作製

実施例 1 で選定したシュードモナス・スタッツエリ由来の膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有する。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) から当該遺伝子及びその周辺の塩基配列に関する情報 (登録番号 N C _ 0 1 8 1 7 7 . 1) を得た。

10

【 0 1 0 3 】

確保した塩基配列に基づいて、シュードモナス・スタッツエリ由来の遺伝子をコリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム D N A に挿入するためのプライマーを合成した。シュードモナス・スタッツエリ由来の遺伝子を増幅するために、シュードモナス・スタッツエリ菌株の染色体 D N A を鑄型とし、配列番号 1 1 と配列番号 1 2 のプライマーを用いて実施例 2 と同様に P C R を行った。

【 0 1 0 4 】

その結果、9 4 5 b p の排出遺伝子 (配列番号 1 0) を含む 9 7 7 b p の遺伝子断片が得られた。

20

配列番号 1 1 (P s t - 1)

T A G A G G A G A C A C A A C A T G A A A A A C C A G C G T A A A G C

配列番号 1 2 (P s t - 2)

g g c t c t t c c t g t t t A G T T T A T C C G T T T C G A C G C G G

【 0 1 0 5 】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来の g a p A プロモーターを用いるために、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 のゲノム D N A を鑄型とし、配列番号 5 と配列番号 1 3 のプライマーを用いて実施例 2 と同様に P C R を行った。

30

配列番号 1 3 (P g a p A (- P s t) - 2)

A C G C T G G T T T T C A T G T T G T G T C T C C T C T A A A G A T T G T A

【 0 1 0 6 】

増幅した g a p A プロモーター部位とシュードモナス・スタッツエリ由来の遺伝子断片、及び S c a I 制限酵素で切斷した染色体形質転換用ベクター p D Z T n は、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、 p D Z T n - P g a p A - P s t と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後 5 0 ℃ で 1 時間保存することにより行った。

【 0 1 0 7 】

作製した p D Z T n - P g a p A - P s t ベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後 2 次交差過程を経て、染色体上でトランスポゾン遺伝子の間に 1 コピーの P g a p A - P s t 遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号 7 と配列番号 8 のプライマーを用いた P C R 法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操縦を確認した。

40

【 0 1 0 8 】

このようにして得た菌株をコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - P s t と命名した。

【 0 1 0 9 】

実施例 4

50

アルカリゲネス・フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) 由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物の作製

実施例 1 で選定したアルカリゲネス・フェカリス由来の膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号 1 4 で表されるアミノ酸配列を有する。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) から当該遺伝子及びその周辺の塩基配列に関する情報 (登録番号 N Z_C P 0 1 3 1 1 9 . 1) を得た。

【0 1 1 0】

確保した塩基配列に基づいて、アルカリゲネス・フェカリス由来の遺伝子をコリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム DNA に挿入するためのプライマーを合成した。アルカリゲネス・フェカリス由来の遺伝子を増幅するために、アルカリゲネス・フェカリス菌株の染色体 DNA を鑄型とし、配列番号 1 6 と配列番号 1 7 のプライマーを用いて実施例 2 と同様に PCR を行った。

【0 1 1 1】

その結果、912 bp の排出遺伝子 (配列番号 1 5) を含む 943 bp の遺伝子断片が得られた。

配列番号 1 6 (Afa - 1)

T A G A G G A G A C A C A A C A T G A A G C A A T C T G A T A A G G C

配列番号 1 7 (Afa - 2)

g c t c t t c c t g t t A G T T C A G G C A G C G C T T T T A G T

【0 1 1 2】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来の gapA プロモーターを確保するために、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム DNA を鑄型とし、配列番号 5 と配列番号 1 8 のプライマーを用いて実施例 2 と同様に PCR を行った。

配列番号 1 8 (PgapA (- Afa) - 2)

A T C A G A T T G C T T C A T G T T G T G T C T C C T C T A A A G A T T G T A

【0 1 1 3】

増幅した gapA プロモーター部位とアルカリゲネス・フェカリス由来の遺伝子断片、及び ScaI 制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクター pDZTn は、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、pDZTn - PgapA - Afa と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後 50 °C で 1 時間保存することにより行った。

【0 1 1 4】

作製した pDZTn - PgapA - Afa ベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869 菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後 2 次交差過程を経て、染色体上でトランスポゾン遺伝子の間に 1 コピーの PgapA - Afa 遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号 7 と配列番号 8 のプライマーを用いた PCR 法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0 1 1 5】

このようにして得た菌株をコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869 : : PgapA - Afa と命名した。

【0 1 1 6】

実施例 5

カブリアビダス・ネカトール (*Cupriavidus necator*) 由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物の作製

実施例 1 で選定したカブリアビダス・ネカトール由来の膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号 1 9 で表されるアミノ酸配列を有する。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH GenBank) から当該遺伝子及びその周辺の塩基配列に関する情報 (登録番号 AM260480 . 1) を得た。

【0 1 1 7】

10

20

30

40

50

確保した塩基配列に基づいて、カブリアビダス・ネカトール由来の遺伝子をコリネバクテリウム・グルタミカムのゲノムDNAに挿入するためのプライマーを合成した。カブリアビダス・ネカトール由来の遺伝子を増幅するために、カブリアビダス・ネカトール菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号21と配列番号22のプライマーを用いて実施例2と同様にPCRを行った。

【0118】

その結果、945bpのカブリアビダス・ネカトール由来の遺伝子（配列番号20）を含む977bpの遺伝子断片が得られた。

配列番号21（Cne-1）

T A G A G G A G A C A C A A C A T G C A A A G C A A G A G C A A A G C

10

配列番号22（Cne-2）

g g c t c t t c c t g t t A G T T C A C G G T T C C T G G A C A C G

【0119】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来のgapAプロモーターを確保するために、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノムDNAを鑄型とし、配列番号5と配列番号23のプライマーを用いて実施例2と同様にPCRを行った。

配列番号23（PgapA（-Cne）-2）

G C T C T T G C T T G C A T G T T G T G T C T C C T C T A A A G A T T G T A

【0120】

増幅したgapAプロモーター部位とカブリアビダス・ネカトール由来の遺伝子断片、及びScaI制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクターpDTnは、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、pDTn-PgapA-Cneと命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後50度1時間保存することにより行った。

20

【0121】

作製したpDTn-PgapA-Cneベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCCC13869菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上でトランスポゾン遺伝子の間に1コピーのPgapA-Cne遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

30

【0122】

このようにして得た菌株をコリネバクテリウム・グルタミカムATCCC13869::PgapA-Cneと命名した。

【0123】

実施例6

大腸菌（Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655）由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物の作製

実施例1で選定した大腸菌由来の膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号24で表されるアミノ酸配列を有する。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク（NIH GenBank）から前記遺伝子及びその周辺の塩基配列に関する情報（登録番号NC_000913.3）を得た。

40

【0124】

確保した塩基配列に基づいて、大腸菌由来の遺伝子をコリネバクテリウム・グルタミカムのゲノムDNAに挿入するためのプライマーを合成した。大腸菌由来の遺伝子を増幅するために、大腸菌菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号26と配列番号27のプライマーを用いて実施例2と同様にPCRを行った。

【0125】

その結果、882bpの排出遺伝子（配列番号25）を含む913bpの遺伝子断片が得られた。

50

配列番号 26 (E c o - 1)

T A G A G G A G A C A C A A C A T G A C A C G A C A A A A A G C A A C

配列番号 27 (E c o - 2)

g c t c t t c c t g t t A G T T T A A C C A C G A C G T G T C G C C

【 0 1 2 6 】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来の g a p A プロモーターを確保するために、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 5 と配列番号 28 のプライマーを用いて実施例 2 と同様に PCR を行った。

配列番号 28 (P g a p A (- E c o) - 2)

T T T T T G T C G T G T C A T G T T G T G T C T C C T C T A A A G A T T G

【 0 1 2 7 】

増幅した g a p A プロモーター部位と大腸菌由来の遺伝子断片、及び S c a I 制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクター p D Z T n は、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、 p D Z T n - P g a p A - E c o と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後 50 ℃ で 1 時間保存することにより行った。

【 0 1 2 8 】

作製した p D Z T n - P g a p A - E c o ベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後 2 次交差過程を経て、染色体上でトランスポゾン遺伝子の間に 1 コピーの P g a p A - E c o 遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号 7 と配列番号 8 のプライマーを用いた PCR 法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【 0 1 2 9 】

このようにして得た菌株をコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 : : P g a p A - E c o と命名した。

【 0 1 3 0 】

実施例 7

様々な微生物由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物菌株の M I C 測定

実施例 2 ~ 6 で作製した 5 種のコリネバクテリウム・グルタミカム菌株 ATCC 13869 : : P g a p A - H r h 、 ATCC 13869 : : P g a p A - P s t 、 ATCC 13869 : : P g a p A - A f a 、 ATCC 13869 : : P g a p A - C n e 、 ATCC 13869 : : P g a p A - E c o がトリプトファン排出能の活性を有するか否かを確認するために、トリプトファンのアナログ (analogue) と他の芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンのアナログを用いた最小阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 実験を行った。5 種の膜タンパク質をコードする遺伝子を導入した菌株を最小液体培地において 30 ℃ で 24 時間培養し、その後 3×10^3 個及び 3×10^4 個の細胞に希釈してトリプトファンのアナログ又はフェニルアラニンのアナログを添加した最小固体培地においてスポット (spotting) 培養した。

【 0 1 3 1 】

最小阻止濃度実験のために、 2.5 mg / ml のパラフルオロフェニルアラニン (' -f luoro-DL-phenylalanine) 又は 0.25 ug / ml の 5 ' - フルオロトリプトファン (5 -f luoro-DL-tryptophan) を最小固体培地に添加し、 60 時間後に細胞の成長を観察した (表 2)。

【 0 1 3 2 】

選択した 5 種の遺伝子の導入において、 2.5 mg / ml の濃度のフェニルアラニンのアナログを添加する条件にて全て成長を可能にした。それらのうち、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ、アルカリゲネス・フェカリス、大腸菌由来の遺伝子の導入が最も良好な成長を示した。シュードモナス・スタッツェリ由来の遺伝子の導入は、前述した 3 種の菌株に比べて多少劣る成長を示し、カプリアビダス・ネカトール由来の遺伝子の導入は、

10

20

30

40

50

最も劣る成長を示した。同一条件にて、野生株 A T C C 1 3 8 6 9 においては成長しなかつた。また、0.25 μg / ml の濃度のトリプトファンのアナログを添加する条件にて、唯一ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子の導入において成長を可能にした。

【0133】

これらの結果から、選択した5種の遺伝子の導入は、活性の差はあるものの、全てフェニルアラニン及びそのアナログには耐性を示すのに対して、トリプトファン及びトリプトファンのアナログには唯一ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子が特異的に卓越した耐性を示すと判断される。よって、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子がコードする膜タンパク質のみトリプトファンに対する排出タンパク質として作用すると解釈される。

最小培地 (pH 7.2)

グルコース 10 g, K₂HPO₄ 1 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ 7H₂O 0.4 g, 尿素 2 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, NaCl 0.5 g, ニコチンアミド 5 μg, パントテン酸カルシウム 0.1 μg, ビオチン 0.2 μg, チアミン HCl 3 μg, Trace elements solution 1 ml (蒸留水 1 リットル中)

Trace elements solution

Na₂B₄O₇ 10H₂O 0.09 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₇ 4H₂O 0.04 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.01 g, CuSO₄ 5H₂O 0.27 g, MnCl₂ 4H₂O 0.01 g, FeCl₃ 6H₂O 1 g, CaCl₂ 0.01 g (蒸留水 1 リットル中)

【0134】

【表2】

フェニルアラニン又はトリプトファンのアナログを含む最小培地における、様々な微生物由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム・グルタミカム菌株の成長

菌株	成長	
	パラフルオロフェニルアラニン (2.5 mg / ml)	5' -フルオロトリプトファン (0.25 μg / ml)
A T C C 1 3 8 6 9	—	—
A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - H r h	++	+++
A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - P s t	++	—
A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - A f a	+++	—
A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - C n e	+	—
A T C C 1 3 8 6 9 : : P g a p A - E c o	+++	—

【0135】

実施例 8

10

20

30

40

50

様々な微生物由来の遺伝子を導入した大腸菌用発現ベクターの作製

大腸菌菌株においても、実施例1で選択した様々な微生物由来の遺伝子のトリプトファン又はそのアナログ耐性の確認のために、各遺伝子を大腸菌発現ベクターであるpCL1920にクローニングし、大腸菌菌株W3110のyccAプロモーターで発現させた。

【0136】

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子断片を確保するために、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号29と配列番号30を用いてPCRを行った。重合酵素としてはSolgTM Pfu-X DNAポリメラーゼ(SolGent co.)を用い、PCR増幅条件は、95度で2分間の変性後、95度で20秒間の変性、62度で40秒間のアニーリング、72度で1分間の重合を27サイクル行い、その後72度で5分間の重合反応を行うものとした。

配列番号29(Hrh-3)

ATAGAGAGTGACTCAATGAATAGCAAGAAGGCCAC

配列番号30(Hrh-4)

TCGAGCTCGGTACCCCTACAAACAGTCCGCCAC

【0137】

大腸菌W3110由来のyccAプロモーターを確保するために、大腸菌W3110のゲノムDNAを鑄型とし、配列番号31と配列番号32を用いてPCRを行った。重合酵素としてはSolgTM Pfu-X DNAポリメラーゼ(SolGent co.)を用い、PCR増幅条件は、95度で2分間の変性後、95度で20秒間の変性、62度で40秒間のアニーリング、72度で10秒間の重合を27サイクル行い、その後72度で5分間の重合反応を行うものとした。

配列番号31(PyccA-1)

CTCTAGAGGATCCCCCTTCCAGATCAAATGCGTAA

配列番号32(PyccA(-Hrh)-2)

CTTCTTGCTATTCAATTGAGTCACCTCTATGACAG

【0138】

増幅したyccAプロモーター部位とヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子断片、及びSmaI制限酵素で切断したpCL1920 vector(pSC101 ori, Sp^r)は、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、pCL1920-PyccA-Hrhと命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後50度で1時間保存することにより行った。得られたpCL1920-PyccA-Hrhを野生型大腸菌W3110に導入し、前記遺伝子が発現する形質転換体であるW3110/pCL1920-PyccA-Hrhを作製した。

【0139】

シュードモナス・スタッツエリ菌株由来の遺伝子断片を確保するために、シュードモナス・スタッツエリ菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号33と配列番号34を用いてPCRを行った。また、大腸菌W3110由来のyccAプロモーターを確保するためにプライマー配列番号35を用いたこと以外の全ての実行方法は、前記ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ菌株の遺伝子断片を確保するために用いたものと同一にした。

配列番号33(Pst-3)

ATAGAGAGTGACTCAATGAAAAACCAAGCGTAAAGC

配列番号34(Pst-4)

TCGAGCTCGGTACCCCTTATCCGTTTCGACGCCG

配列番号35(PyccA(-Pst)-2)

ACGCTGGTTTCATTGAGTCACCTCTATGACAG

【0140】

このように組換えプラスミドを得て、pCL1920-PyccA-Pstと命名した。また、発現ベクターpCL1920-PyccA-Pstを野生型大腸菌W3110に

10

20

30

40

50

導入し、前記遺伝子が発現する形質転換体であるW 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - P s t を作製した。

【0 1 4 1】

アルカリゲネス・フェカリス菌株由来の遺伝子が発現する形質転換体を作製する過程は前記過程と同一であり、断片を確保するためのアルカリゲネス・フェカリス菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号36と配列番号37を用いたことと、y c c Aプロモーターを確保するためにプライマー配列番号38を用いたことのみ異なる。

配列番号36 (A f a - 3)

A T A G A G A G T G A C T C A A T G A A G C A A T C T G A T A A G G C

配列番号37 (A f a - 4)

T C G A G G C T C G G T A C C C T C A G G C A G C G C T T T T A G T

配列番号38 (P y c c A (- A f a) - 2)

A T C A G A T T G C T T C A T T G A G T C A C T C T C T A T G A C A G

【0 1 4 2】

このようにアルカリゲネス・フェカリス由来の遺伝子がクローニングされた組換えプラスミドを得て、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - A f a と命名した。また、発現ベクターp C L 1 9 2 0 - P y c c A - A f a を野生型大腸菌W 3 1 1 0 に導入した形質転換体であるW 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - A f a を作製した。

【0 1 4 3】

カブリアビダス・ネカトール菌株由来の遺伝子断片を確保するために、カブリアビダス・ネカトール菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号39と配列番号40を用いてPCRを行った。また、大腸菌W 3 1 1 0 由来のy c c Aプロモーターを確保するためにプライマー配列番号41を用いたこと以外の全ての実行方法は、前記ヘルバスピリラム・リゾスファエラ工菌株の遺伝子断片を確保するために用いたものと同一にした。

配列番号39 (C n e - 3)

A T A G A G A G T G A C T C A A T G C A A A G C A A G G A G C A A A G C

配列番号40 (C n e - 4)

T C G A G G C T C G G T A C C C T C A C G G T T C C T G G A C A C G

配列番号41 (P y c c A (- C n e) - 2)

G C T C T T G C T T G C A T T G A G T C A C T C T C T A T G A C A G

【0 1 4 4】

このように組換えプラスミドを得て、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - C n e と命名した。また、発現ベクターp C L 1 9 2 0 - P y c c A - C n e を野生型大腸菌W 3 1 1 0 に導入し、前記遺伝子が発現する形質転換体であるW 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - C n e を作製した。

【0 1 4 5】

大腸菌菌株の遺伝子断片を確保するために、E s c h e r i c h i a c o l i s t r . K - 1 2 s u b s t r . M G 1 6 5 5 菌株の染色体DNAを鑄型とし、配列番号42と配列番号43を用いてPCRを行った。また、大腸菌W 3 1 1 0 由来のy c c Aプロモーターを確保するためにプライマー配列番号44を用いたこと以外の全ての実行方法は、前記ヘルバスピリラム・リゾスファエラ工菌株の遺伝子断片を確保するために用いたものと同一にした。

配列番号42 (E c o - 3)

A T A G A G A G T G A C T C A A T G A C A C G A C A A A A A G C A A C

配列番号43 (E c o - 4)

T C G A G G C T C G G T A C C C T T A A C C A C G A C G T G T C G C C

配列番号44 (P y c c A (- E c o) - 2)

T T T T T G T C G T G T C A T T G A G T C A C T C T C T A T G A C A G

【0 1 4 6】

このように組換えプラスミドを得て、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - E c o と命名した

10

20

30

40

50

。また、発現ベクター p C L 1 9 2 0 - P y c c A - E c o を野生型大腸菌 W 3 1 1 0 に導入し、前記遺伝子が発現する形質転換体である W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - E c o を作製した。

【 0 1 4 7 】

実施例 9

様々な微生物由来の膜タンパク質遺伝子を過剰発現する大腸菌の M I C 測定

実施例 8 で作製した 5 種の遺伝子を過剰発現する大腸菌菌株 W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - H r h 、 W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - P s t 、 W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - A f a 、 W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - C n e 、 W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - E c o の耐性確認のために、トリプトファンとフェニルアラニンのアナログ (analogue) を用いた最小阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 実験を行った。5 種の遺伝子を過剰発現する大腸菌菌株は、5 0 μ g / ml のスペクチノマイシン (spectinomycin) を添加した M 9 最小液体培地において 37 ℃ で 15 時間培養し、その後 10^4 個及び 10^5 個の細胞に希釈してトリプトファンのアナログ又はフェニルアラニンのアナログを添加した M 9 グルコース最小固体培地 (5 0 μ g / ml のスペクチノマイシン添加) においてスポット (spotting) 培養した。最小阻止濃度実験のために、2 mg / ml のパラフルオロフェニルアラニン (p'-fluoro-DL-phenylalanine) 又は 0.7 μ g / ml の 5'-フルオロトリプトファン (5'-fluoro-DL-tryptophan) を M 9 最小固体培地に添加し、48 時間後に細胞の成長を観察した (表 3)。

【 0 1 4 8 】

フェニルアラニンのアナログを添加する条件にて、大腸菌菌株は、コリネグルタミカム菌株と同様に、大腸菌由来の遺伝子の過剰発現において卓越した成長を示し、アルカリゲネス・フェカリス由来の遺伝子の過剰発現においても大きな成長を可能にした。しかし、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ、シュードモナス・スタッツェリ、カブリアビダス・ネカトール由来の遺伝子の過剰発現においては、対照群である W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 と共に成長しなかった。それに対して、選択した 5 種の遺伝子の過剰発現において、トリプトファンのアナログを添加する条件にて全て成長を可能にした。それらのうち、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子の過剰発現が最も良好な成長を可能にし、アルカリゲネス・フェカリスと大腸菌由来の排出遺伝子の過剰発現がそれに次ぐ成長を示した。シュードモナス・スタッツェリとカブリアビダス・ネカトール由来の排出遺伝子の過剰発現は、僅かな成長を示した。

【 0 1 4 9 】

大腸菌菌株における、選択した 5 種の遺伝子過剰発現は、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株の M I C 実験の結果と同様の様相を呈した。ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子は、コリネグルタミカム菌株と大腸菌の両方においてトリプトファン又はトリプトファンのアナログに特異的に卓越した耐性を示し、大腸菌由来の排出遺伝子は、トリプトファンに比べてフェニルアラニン及びそのアナログに対してより高い排出耐性を示した。よって、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子は、コリネグルタミカム菌株と大腸菌の両方においてトリプトファンに対して特異的に卓越した排出能を示すと判断される。

【 0 1 5 0 】

10

20

30

40

50

【表3】

フェニルアラニン又はトリプトファンのアナログを含む最小培地における、各遺伝子を過剰発現する大腸菌菌株の成長

菌株	成長	
	パラフルオロフェニルアラニン (2.5 mg / ml)	5' -フルオロトリプトファン (0.7 ug / ml)
W3110 / pCL192 0	—	—
W3110 / pCL192 0 - PyccA-Hrh	—	+++
W3110 / pCL192 0 - PyccA-Pst	—	+
W3110 / pCL192 0 - PyccA-Afa	++	++
W3110 / pCL192 0 - PyccA-Cne	—	+
W3110 / pCL192 0 - PyccA-Eco	+++	++

【0151】

30

参考例1：L - トリプトファンを生産するコリネバクテリウム属微生物の作製

L - トリプトファン生産菌株は、野生種のコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 から開発した。野生型のコリネバクテリウム・グルタミカムは L - トリプトファンを生産できないか、生産したとしても極微量の L - トリプトファンを生産するにすぎないので、生産に必須の生合成経路を強化した菌株を親菌株として用いることを試みた。具体的には、L - トリプトファン生合成遺伝子のオペロン (operon) におけるプロモーター強化により発現を向上させた。また、TrpEタンパク質のフィードバック阻害 (feed back inhibition) を解消するために、TrpEの38番目のアミノ酸であるセリン (Serine) をアルギニン (Arginine) に置換した (非特許文献 18)。

【0152】

40

このような遺伝子操作のために、まず染色体の相同組換え (Homologous recombination) が生じる TrpEプロモーターの上流 (Upstream) と TrpEの38番目の変異の下流 (Downstream) 領域を得た。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカムの染色体DNAを鑄型とし、配列番号45と配列番号46のプライマーを用いて、TrpEプロモーターの上流 (Upstream) 領域をPCRにより得て、配列番号47と配列番号48のプライマーを用いて、TrpEの38番目の変異の下流 (Downstream) 領域の遺伝子断片をPCRにより得た。

配列番号45 (Psp17 - TrpE (S38R) - L - 1)

T C G A G C T C G G T A C C C A A A C A A C T G C G A C G T G T G T C

配列番号46 (Psp17 - TrpE (S38R) - L - 2)

50

CATGAAAGCGCCGGTACCTTAATCATTTTGGGTTCT
配列番号47 (Psp17-trpE (S38R) - R-1)
GCCCTGTTGGAACGCGCTGATATCACCAACCAAGAA
配列番号48 (Psp17-trpE (S38R) - R-2)
CTCTAGAGGATCCCCAGATGTCACCGTTGTAAATG

【0153】

重合酵素としては SolgTM Pfu-X DNAポリメラーゼを用い、PCR増幅条件は、95で5分間の変性後、95で30秒間の変性、60で30秒間のアニーリング、72で60秒間の重合を30サイクル行い、その後72で5分間の重合反応を行うものとした。

10

【0154】

合成して作製したプロモーターSPL7(配列番号49)を鋳型とし、配列番号50と配列番号51のプライマーを用いてPCRを行った。

配列番号50 (Psp17-1)
CCCAAAAAATGATTAAAGGTACCGGGCGCTTCATGTCATGTC
配列番号51 (Psp17-2)
GGGATTCTGCTCATGATATCTGTTTGATCTCCCTCC

【0155】

重合酵素としては SolgTM Pfu-X DNAポリメラーゼ(SolGent co.)を用い、PCR増幅条件は、95で5分間の変性後、95で30秒間の変性、60で30秒間のアニーリング、72で30秒間の重合を30サイクル行い、その後72で5分間の重合反応を行うものとした。

20

【0156】

コリネバクテリウム・グルタミカム由来のtrpEの1番目のアミノ酸～38番目の変異アミノ酸を含む前部の断片を確保するために、コリネバクテリウム・グルタミカムのゲノムDNAを鋳型とし、配列番号52と配列番号53のプライマーを用いてPCRを行った。

配列番号52 (trpE (S38R) - 1)
ATCAAAACAGATATCATGAGCACGAAATCCCCATGTT
配列番号53 (trpE (S38R) - 2)
GTGGTGATATCAGCGCGTTCCAACAGGGCTGCATC

30

【0157】

重合酵素としては SolgTM Pfu-X DNAポリメラーゼを用い、PCR増幅条件は、95で5分間の変性後、95で30秒間の変性、60で30秒間のアニーリング、72で30秒間の重合を30サイクル行い、その後72で5分間の重合反応を行うものとした。

【0158】

増幅したtrpEプロモーターの上流とtrpEの38番目の変異の下流領域、SPL7プロモーターとtrpEの前部の断片、及びSmaI制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクターpDZは、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、pDZ-PSPL7-trpE (S38R)と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後50で1時間保存することにより行った。

40

【0159】

作製したpDZ-PSPL7-trpE (S38R)ベクターを野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上でtrpEのプロモーターをより強いプロモーターであるSPL7プロモーターに置換し、TrpEの38番目のアミノ酸をセリンからアルギニンに置換した菌株を得た。遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域を増幅する配列番号54と配列番号55を用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより当

50

該遺伝的操作を確認し、それを C A 0 4 - 8 3 2 5 と命名した。

配列番号 54 (C o n f i r m _ P s p l 7 - t r p E (S 3 8 R) - 1)

G A A G A A G A G G C T G C A G A T G

配列番号 55 (C o n f i r m _ P s p l 7 - t r p E (S 3 8 R) - 2)

G A T C A G C G C C A T C A T G T T

【 0 1 6 0 】

トリプトファン生産は芳香族アミノ酸代謝経路に起因し、その代謝経路はホスホエノールピルビン酸 (Phosphoenolpyruvate) とエリトロース 4 - リン酸 (Erythrose 4-phosphate) の縮合反応で始まる。よって、2種類の前駆体の円滑な供給はトリプトファンの生産向上に必須であり、相対的に不足することが知られているエリトロース 4 - リン酸の円滑な供給のために、t k t 遺伝子の過剰発現を行った。 10

【 0 1 6 1 】

このような遺伝子操作のために、コリネバクテリウム・グルタミカムの染色体DNAを鑄型とし、プライマー配列番号 56 と配列番号 57 を用いて、t k t 遺伝子をさらに挿入する上流 (Upstream) 領域を PCR により得て、配列番号 58 と配列番号 59 を用いて、t k t 遺伝子をさらに挿入する下流 (Downstream) 領域の遺伝子断片を PCR により得た。 20

配列番号 56 (P n - t k t _ L - 1)

T C G A G C T C G G T A C C C A A A C T T T G A G T G G G T G C G T G

配列番号 57 (P n - t k t _ L - 2)

T C G A G C T A C G A G G G C G G T T C C C A G C C C T T C A T T A G

配列番号 58 (P n - t k t _ R - 1)

A T T A A C G G T T A A T T G A T T C T G G A C G T C A T G A C T A C

配列番号 59 (P n - t k t _ R - 2)

C T C T A G A G G A T C C C C G C C T C G A T G A T G C A G T C G T C

【 0 1 6 2 】

重合酵素としては S o l g TM P f u - X DNA ポリメラーゼを用い、PCR 増幅条件は、95 で 2 分間の変性後、95 で 20 秒間の変性、62 で 40 秒間のアニーリング、72 で 30 秒間の重合を 27 サイクル行い、その後 72 で 5 分間の重合反応を行うものとした。 30

【 0 1 6 3 】

t k t 遺伝子とプロモーターを確保するために、野生種のコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 の染色体DNAを鑄型とし、配列番号 60 と配列番号 61 を用いて、t k t プロモーターを含む t k t 遺伝子断片を PCR により得た。 40

配列番号 60 (P n - t k t - 1)

G A A G G G C T G G G A A C C G C C C T C G T A G C T C G A G A G T T

配列番号 61 (P n - t k t - 2)

C A T G A C G T C C A G A A T C A A T T A A C C G T T A A T G G A G T C C

【 0 1 6 4 】

重合酵素としては S o l g TM P f u - X DNA ポリメラーゼを用い、PCR 増幅条件は、95 で 2 分間の変性後、95 で 20 秒間の変性、62 で 40 秒間のアニーリング、72 で 1 分 20 秒間の重合を 27 サイクル行い、その後 72 で 5 分間の重合反応を行うものとした。 50

【 0 1 6 5 】

増幅した t k t 遺伝子をさらに挿入する上流と t k t 遺伝子をさらに挿入する下流領域、t k t プロモーターを含む t k t 遺伝子、及び S m a I 制限酵素で切断した染色体形質転換用ベクター p D Z は、ギブソンアセンブリ方法を用いてクローニングすることにより組換えプラスミドを得て、p D Z - P n - t k t と命名した。クローニングは、ギブソンアセンブリ試薬と各遺伝子断片を計算されたモル数で混合し、その後 50 で 1 時間保存することにより行った。

【0166】

作製したpDZ-Pn-tktベクターをCA04-8325菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上にtktプロモーターを含むtkt遺伝子を挿入した菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅するプライマー配列番号62と配列番号63を用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより当該遺伝的操作を確認し、それをCA04-8352と命名した。菌株CA04-8352は、ブダペスト条約上の国際寄託機関である韓国微生物保存センター（KCCM）に2018年2月2日付けで寄託番号KCCM12218Pとして国際寄託した。

配列番号62 (Confirm_Pn-tkt-1)

A C C C A G A A C C C C A A A T T T T C

配列番号63 (Confirm_Pn-tkt-2)

T T G A G T T C G A C A A C T T T G G

10

【0167】

実施例10

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエと大腸菌由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム属微生物のトリプトファン生産

実施例7においてトリプトファンのアナログ（analogue）を用いた最小阻止濃度で優れた活性を示したヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を、参考例1で作製したトリプトファン生産菌株であるCA04-8352に導入した。そのために、実施例2で作製したヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子導入用ベクターpDZTn-PgapA-Hrhをトリプトファン生産菌株であるCA04-8352菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、実施例2と同様の過程を経て、トランスポゾン遺伝子の間に1コピーのヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を挿入した菌株を得た。これをCA04-8405と命名した。

20

【0168】

また、大腸菌由来の遺伝子を対照群としてトリプトファン生産菌株CA04-8352に導入した。実施例6で作製した大腸菌由来の遺伝子導入用ベクターpDZTn-PgapA-Ecoをトリプトファン生産菌株であるCA04-8352菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、実施例6と同様の過程を経て、トランスポゾン遺伝子の間に1コピーの大腸菌由来の排出遺伝子を挿入した菌株を得た。これをCA04-8406と命名した。

30

【0169】

前記過程で作製したCA04-8405とCA04-8406は、参考例1で作製したCA04-8352を対照群として、トリプトファン生産量を確認するために次の方法で培養した。種培地25mlを含有する250mlのコーナーバッフルフラスコに各菌株を接種し、30、200rpmで20時間振盪培養した。次に、生産培地25mlを含有する250mlのコーナーバッフルフラスコに1mlの種培養液を接種し、30、200rpmで24時間振盪培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

40

種培地（pH7.0）

グルコース20g、ペプトン10g、酵母抽出物5g、尿素1.5g、KH₂PO₄4g、K₂HPO₄8g、MgSO₄7H₂O 0.5g、ビオチン100μg、チアミンHCl 1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド2000μg（蒸留水1リットル中）

生産培地（pH7.0）

グルコース30g、(NH₄)₂SO₄ 15g、MgSO₄7H₂O 1.2g、KH₂PO₄ 1g、酵母抽出物5g、ビオチン900μg、チアミン塩酸塩4500μg、パントテン酸カルシウム4500μg、CaCO₃ 30g（蒸留水1リットル中）

【0170】

50

【表4】

コリネバクテリウム・グルタミカムL-トリプトファン生産菌株 (CA04-8352)、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を挿入した生産菌株 (CA04-8405)、大腸菌由来の遺伝子を挿入した生産菌株 (CA04-8406) のL-トリプトファン生産量の確認

OD 562	トリプトファン 生産量 (g / L)	トリプトファン 収率 (g / g g 1 c, %)
CA04-8352	56.5	0.25
CA04-8405	52.3	1.52
CA04-8406	56.1	0.24
		0.80

【0171】

CA04-8352、CA04-8405、CA04-8406における培地中のL-トリプトファン生産の結果を表4に示す。ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を導入したCA04-8405菌株は、フラスコ培養において最終的に1.52g/LのL-トリプトファンを生産した。これは、対照群であるCA04-8352菌株に比べて約5倍に向上した数値である。これは、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子がコリネバクテリウム・グルタミカム菌株においてL-トリプトファン生産を大幅に向上させることを意味するものである。それに対して、大腸菌由来の遺伝子を導入したCA04-8406菌株のトリプトファン生産量は0.23g/Lであり、親菌株であるCA04-8352菌株のトリプトファン生産量とほぼ同じであった。実施例7及び9における、トリプトファンとフェニルアラニンのアナログ (analogue) を用いた最小阻止濃度実験において確認されたように、大腸菌由来の遺伝子はトリプトファンよりフェニルアラニンに特異性を示す排出遺伝子であると判断される。菌株CA04-8405は、ブダペスト条約上の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (KCCM) に2017年8月21日付けで寄託番号KCCM12099P (CA04-8405) として国際寄託した。

【0172】

実施例11

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム・グルタミカムにおける細胞内トリプトファン代謝体の分析

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を導入したコリネバクテリウム・グルタミカムトリプトファン生産菌株CA04-8405においてトリプトファン排出能が向上することにより細胞内のトリプトファン濃度が低下するかを明確に確認するために、CA04-8405と親菌株CA04-8352を対象として、有機溶媒を用いた抽出方法により細胞内のトリプトファン濃度を測定した。

【0173】

細胞内代謝物 (intracellular metabolite) の分析は、文献 (非特許文献19) に記載されている方法により行った。

【0174】

まず、コリネバクテリウム・グルタミカム変異株CA04-8352及びCA04-8405は、種培地25mLを含有する250mLのコーナーバッフルフラスコに各菌株を接種し、30、200rpmで20時間振盪培養した。次に、生産培地25mLを含有する250mLのコーナーバッフルフラスコに1mLの種培養液を接種し、30、20

0 rpmで振盪培養した。細胞内のトリプトファン濃度は糖消費量に応じて全3段階で確認し、各段階の培養細胞は急速真空濾過 (rapid vacuum filtration, Durapore HV, 0.45 μm; Millipore, Billerica, MA) により培養液から細胞を分離した。細胞が吸着したフィルターを10mlの精製水で2回洗浄し、その後5μMモルホリノエタンスルホン酸 (morpholine ethanesulfonic acid) 及び5μMメチオニンスルホン (methionine sulfone) を含有するメタノールに10分間浸漬した。こうして得られた1.6mlの細胞抽出物に1.6mlのクロロホルムと0.64μlの精製水を混ぜ合わせ、その後水相 (aqueous phase) のみスピンカラム (spin column) にかけてタンパク質汚染物を除去した。濾過した抽出液をキャピラリー電気泳動質量分析計 (capillary electrophoresis mass spectrometry) で分析した。その結果を図1に示す。

10

【0175】

図1に示すように、CA04-8405は、親菌株CA04-8352と比較して細胞内のトリプトファン濃度が33~41%のレベルに減少することが確認された。これは、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子が発現し、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株の細胞内で生成されたトリプトファンが細胞外に円滑に排出されることにより、CA04-8405菌株の細胞内のトリプトファン濃度が低下したものと判断される。よって、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子は、トリプトファンに特異的な排出能を有する膜タンパク質をコードする遺伝子であることが確認された。

【0176】

参考例2：L-トリプトファンを生産するエシェリキア属微生物の作製

20

エシェリキア属L-トリプトファン生産菌株は、野生型の大腸菌W3110から開発した。L-トリプトファン排出活性を有するタンパク質が発現するように改変することによりL-トリプトファンの生産量が画期的に増加するかを確認するために、L-トリプトファンを生産するように作製した菌株を親菌株として用いた。具体的には、コリストメート (Chorismate) からのL-トリプトファン生産に関与するL-トリプトファン生合成遺伝子の(trpEDCBA)発現は、TrpRにより抑制される。よって、それをコードするtrpR遺伝子を除去した。また、L-トリプトファン生産向上に伴うTrpEポリペチドのフィードバック阻害 (feedback inhibition) を解消するために、TrpEのN末端から21番目のアミノ酸であるプロリン (Proline) をセリン (Serine) に置換した (非特許文献20)。

30

【0177】

Mtr膜タンパク質は細胞の外部のL-トリプトファンを細胞内に流入させる役割を果たし、TnaAタンパク質は細胞内のL-トリプトファンと水分子をインドール (Indole) 、ピルビン酸 (pyruvate) 、アンモニア (NH₃) に分解する役割を果たす。よって、L-トリプトファン生産を阻害して分解するmtrとtnaA遺伝子を除去した。

【0178】

このような遺伝子の除去のために、ラムダレッド組換え (-red recombination, 非特許文献21) 方法を用いた。mtr遺伝子の除去のために、pKD4ベクターを鋳型とし、配列番号64と配列番号65のプライマーを用いて、FRT-kanamycin-FRT cassetteと染色体上の相同組換えが生じるmtr遺伝子の両側の相同な50bpの塩基対が結合された遺伝子断片 (1580bp) をPCRにより得た。pKD4ベクターのカナマイシン抗生剤マーカーは、ターゲット遺伝子の除去及び抗生剤遺伝子挿入の確認のために用いた。FRT部位は、ターゲット遺伝子を除去した後に抗生剤マーカーを除去する役割を果たす。

40

【0179】

重合酵素としてはS oligo-TM-Pfu-XDNAポリメラーゼを用い、PCR増幅条件は、95℃で2分間の変性後、95℃で20秒間の変性、62℃で40秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合を27サイクル行い、その後72℃で5分間の重合反応を行うものとした。

配列番号64 (mtr cassette-1)

50

T G C A A T G C A T A A C A A C G C A G T C G C A C T A T T T T T C A C T G G
A G A G A A G C C C T G T G T A G G C T G G A G G C T G C T T C

配列番号 65 (m t r c a s s e t t e - 2)

T G C A A T G C A T A A C A A C G C A G T C G C A C T A T T T T T C A C T G G
A G A G A A G C C C T G T C C A T A T G A A T A T C C T C C T

【 0 1 8 0 】

ラムダレッドリコンビナーゼ (g a m , b e t , e x o) を発現する p K D 4 6 ベクターを大腸菌 W 3 1 1 0 菌株にエレクトロポレーションにより形質転換し、 5 0 m g / L のカナマイシンを含む L B 固体培地に塗抹した。 p K D 4 6 ベクターの形質転換が確認された大腸菌 W 3 1 1 0 菌株は、 3 0 で O D 6 0 0 が約 0 . 1 になったときに 1 0 m M の L - アラビノース (L-arabinose) 添加により組換え酵素発現を誘導し、 O D 6 0 0 が約 0 . 6 になったときにコンピテントセルとして準備され、その後前記過程で得られた F R T - k a n a m y c i n - F R T c a s s e t t e と m t r 遺伝子の両側の相同な 5 0 b p の塩基対が結合された線形遺伝子断片をエレクトロポレーションにより形質転換した。 2 5 m g / L のカナマイシンを含む L B 固体培地で生育したコロニーは、配列番号 6 6 と配列番号 6 7 を用いてコロニー - P C R を行い、 7 8 2 b p の遺伝子断片が作製されるコロニーを選択した。

配列番号 66 (C o n f i r m _ C a s s e t t e - 1)

G G G C A G G A T C T C C T G T C A T C

配列番号 67 (C o n f i r m _ m t r - 2)

A A A T G T C G G A T A A G G C A C C G

【 0 1 8 1 】

相同組換えが生じて m t r 遺伝子が除去された菌株は、カナマイシン抗生剤マーカーの除去のためにコンピテントセルとして準備され、その後 p C P 2 0 ベクターを用いてエレクトロポレーションにより形質転換した。 p C P 2 0 ベクターは、 F L P タンパク質を発現し、カナマイシン抗生剤の両側の F R T 部位を認識して染色体上に結合することにより、 F R T 部位間の抗生剤マーカーを除去する。 1 0 0 m g / L のアンピシリン (Ampicillin) と 2 5 m g / L のクロラムフェニコール (Chloramphenicol) を含む L B 固体培地で成長した p C P 2 0 ベクター形質転換菌株を 3 0 の L B 液体培地で 1 時間培養し、その後 4 2 で 1 5 時間追加培養して L B 固体培地に塗抹した。生育したコロニーは、 1 0 0 m g / L のアンピシリン (Ampicillin) と 2 5 m g / L のクロラムフェニコール (Chloramphenicol) を含む L B 固体培地、 1 2 . 5 m g / L のカナマイシンを含む L B 固体培地、抗生剤を含まない L B 固体培地に培養し、抗生剤を含まない L B 固体培地でのみ生育したコロニーを選択した。ゲノムシーケンシングにより m t r 遺伝子の除去を最終確認し、これを C A 0 4 - 9 3 0 0 と命名した。

【 0 1 8 2 】

t n a A 遺伝子の除去のために、前記方法と同様に遺伝子操作を行った。 p K D 4 ベクターを鋳型とし、配列番号 6 8 と配列番号 6 9 を用いて、 F R T - k a n a m y c i n - F R T c a s s e t t e と染色体上の相同組換えが生じる t n a A 遺伝子の両側の相同な 5 0 b p の塩基対が結合された遺伝子断片 (1 5 8 0 b p) を P C R により得た。重合酵素としては S o l g T M P f u - X D N A ポリメラーゼを用い、 P C R 増幅条件は、 9 5 で 2 分間の変性後、 9 5 で 2 0 秒間の変性、 6 2 で 4 0 秒間のアニーリング、 7 2 で 1 分間の重合を 2 7 サイクル行い、その後 7 2 で 5 分間の重合反応を行うものとした。

配列番号 68 (t n a A c a s s e t t e - 1)

T G T A A T A T T C A C A G G G A T C A C T G T A A T T A A A A T A A A T G A
A G G A T T A T G T A G T G T A G G C T G G A G G C T G C T T C

配列番号 69 (t n a A c a s s e t t e - 2)

T G T A G G G T A A G A G A G T G G C T A A C A T C C T T A T A G C C A C T C
T G T A G T A T T A A G T C C A T A T G A A T A T C C T C C T

10

20

30

40

50

【0183】

pKD46ベクターの形質転換を確認し、10mMのL-アラビノース添加により組換え酵素を発現するCA04-9300菌株は、エレクトロポレーションにより前記過程で得られたFRT-kanamycin-FRT cassetteとtnaA遺伝子の両側の相同な50bpの塩基対が結合された線形遺伝子断片を形質転換した。25mg/Lのカナマイシンを含むLB固体培地で生育したコロニーは、配列番号66と配列番号70を用いてコロニーPCRを行い、787bpの遺伝子断片が作製されるコロニーを選択した。

配列番号70 (Confirm_tnaA-2)

ACATCCTTATAGCCACTCTG

【0184】

10

相同組換えが生じてtnaA遺伝子が除去された菌株は、カナマイシン抗生剤マーカーの除去のためにコンピテントセルとして準備され、その後pCP20ベクターを形質転換し、FLPタンパク質の発現によりカナマイシン抗生剤マーカーが除去された菌株を作製した。ゲノムシーケンシングによりtnaA遺伝子の除去を最終確認し、これをCA04-9301と命名した。

【0185】

trpR遺伝子の除去のために、pKD4ベクターを鋳型とし、配列番号71と配列番号72のプライマーを用いて、FRT-kanamycin-FRT cassetteと染色体上の相同組換えが生じるtrpR遺伝子の両側の相同な50bpの塩基対が結合された遺伝子断片(1580bp)をPCRにより得た。重合酵素としてはS oligoTM P fu-X DNAポリメラーゼを用い、PCR増幅条件は、95℃で2分間の変性後、95℃で20秒間の変性、62℃で40秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合を27サイクル行い、その後72℃で5分間の重合反応を行うものとした。

20

配列番号71 (trpR cassette-1)

TACAAACCAGGGAGGCATTGCTTCCTCCGCTAACAAAT
GGCGACATATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

配列番号72 (trpR cassette-2)

GCAATTGGTGCACGATGCCATGATGCGGCCACGTCATTATCA
GGCTACAAAGTCCATATGAATATCCTCCT

【0186】

30

pKD46ベクターの形質転換を確認し、10mMのL-アラビノース添加により組換え酵素を発現するCA04-9301菌株は、エレクトロポレーションにより前記過程で得られたFRT-kanamycin-FRT cassetteとtrpR遺伝子の両側の相同な50bpの塩基対が結合された線形遺伝子断片を形質転換した。25mg/Lのカナマイシンを含むLB固体培地で生育したコロニーは、配列番号66と配列番号73のプライマーを用いてコロニーPCRを行い、838bpの遺伝子断片が作製されるコロニーを選択した。

配列番号73 (Confirm_trpR-2)

AGGACGGATAAGGGCGTTCAC

【0187】

40

相同組換えが生じてtrpR遺伝子が除去された菌株は、カナマイシン抗生剤マーカーの除去のためにコンピテントセルとして準備され、その後pCP20ベクターを形質転換し、FLPタンパク質の発現によりカナマイシン抗生剤マーカーが除去された菌株を作製した。ゲノムシーケンシングによりtrpR遺伝子の除去を最終確認し、これをCA04-9307と命名した。

【0188】

前記CA04-9307菌株において、feedback resistant trpE形質を持たせるために、大腸菌W3110 gDNAを鋳型とし、制限酵素EcoRIを含む配列番号74、配列番号75を用いて、EcoRI配列を含むtrpE遺伝子断片(1575bp)をPCRにより得た。重合酵素としてはS oligoTM P fu-X DNAポ

50

リメラーゼを用い、PCR増幅条件は、95℃で2分間の変性後、95℃で20秒間の変性、62℃で1分間のアニーリング、72℃で1分間の重合を27サイクルを行い、その後72℃で5分間の重合反応を行うものとした。

配列番号74 (trpE-1)

GAATTCAATGCAAAACACAAAAACCGAC

配列番号75 (trpE-2)

GAATTCTCAGAAAGTCTCCGTGCA

【0189】

前記方法で得たtrpE遺伝子及びpSG76-Cプラスミド(非特許文献22)をそれぞれEcoRI制限酵素で処理してクローニングした。クローニングしたプラスミドを大腸菌DH5⁺にエレクトロポレーションにより形質転換し、クロラムフェニコール(chloramphenicol)25μg/mlを含むLBプレートから形質転換された大腸菌DH5⁺を選択してpSG76-C-trpEプラスミドを得た。

10

【0190】

前述したように得たpSG76-C-trpEプラスミドを用いて、site-directed mutagenesis(Stratagene,米国)方法により配列番号76、配列番号77のプライマーでpSG76-C-trpE(P21S)を作製した。

配列番号76 (trpE(P21S)-1)

CGCTTATCGCGACAATTCCACCGCGCTTTTACCCAG

配列番号77 (trpE(P21S)-2)

CTGGTGAAAAAGCGCGGTGGAATTGTCGCGATAAGCG

20

【0191】

CA04-9307菌株にpSG76-C-trpE(P21S)プラスミドを形質転換してLB-Cm(Yeast extract 10g/L, NaCl 5g/L, Tryptone 10g/L, Chloramphenicol 25ug/L)培地で培養し、その後クロラムフェニコール耐性を有するコロニーを選択した。選択した形質転換体は、pSG76-C-trpE(P21S)プラスミドがゲノム内のtrpE部分に1次挿入された菌株である。確保したtrpE(P21S)遺伝子を挿入した菌株に、pSG76-Cプラスミド内に存在するI-SceI部分を切断する制限酵素I-SceIを発現するプラスミドであるpAScep(非特許文献22)を形質転換し、LB-Ap(Yeast extract 10g/L, NaCl 5g/L, Tryptone 10g/L, Ampicilline 100ug/L)で生長する菌株を選択した。選択した菌株において、配列番号74、配列番号75のプライマーを用いてtrpE遺伝子を増幅し、増幅した遺伝子は、シーケンシングによりtrpE(P21S)に交換されたことを確認した。このように作製した菌株をCA04-4303と命名した。

30

【0192】

実施例12

ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を導入したエシェリキア属微生物のL-トリプトファン生産

実施例8で作製したpCL1920-PycmA-Hrhを参照例2で作製したCA04-4303に導入し、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子が過剰発現する形質転換体であるCA04-4306を作製した。また、対照群としてpCL1920ベクターをCA04-4303に形質転換した。この2つの菌株CA04-4303/pCL1920、CA04-4306のL-トリプトファン生産量を確認するために、50mg/Lのスペクチノマイシン(Spectinomycin)を含むLB液体培地に12時間培養した。次に、生産培地25mlを含有する250mlのコーナーバッフルフラスコに初期OD₆₀₀値が0.01になるように接種し、37℃、200rpmで48時間振盪培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

40

【0193】

CA04-4303/pCL1920とCA04-4306における培地中のL-トリ

50

プロトファン生産の結果を表5に示す。ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子を導入して過剰発現したCA04-4306は、フラスコ培養において最終的に2.1g/LのL-トリプトファンを生産した。これは、対照群に比べて約50%向上した数値である。これは、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の排出遺伝子が大腸菌菌株においてもL-トリプトファンを排出し、生産を大幅に向上させることを意味するものである。

生産培地 (pH 7.0)

グルコース 70g, (NH₄)₂SO₄ 20g, MgSO₄ 7H₂O 1g, KH₂PO₄ 2g, 酵母抽出物 2.5g, Na-citrate 5g, NaCl 1g, CaCO₃ 40g (蒸留水 1リットル中)。

【0194】

10

【表5】

大腸菌由来のL-トリプトファン生産菌株 (CA04-4303) とヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の排出遺伝子を過剰発現する生産菌株 (CA04-4306) のL-トリプトファン生産量の確認

	OD 600	トリプトファン 生産量 (g/L)	トリプトファン 収率 (g/g g LC, %)
CA04-4303 / pCL1920	43.7	1.4	2.0
CA04-4306	42	2.1	3.0

【0195】

よって、実施例7と9の結果から分かるように、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子は、L-トリプトファン及びそのアナログに特異的に卓越した耐性を示し、実施例10と12の結果から分かるように、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子は、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株と大腸菌菌株の両方においてL-トリプトファン生産を向上させた。また、実施例11においては、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子が実質的に細胞の外部にトリプトファンを排出することが示された。よって、ヘルバスピリラム・リゾスファエラエ由来の遺伝子をトリプトファンエクスポート (Tryptophan (W) exporter, wex) と命名した。

20

【0196】

実施例13

Random mutagenesisを用いたWex排出能の改良

本実施例は、野生型wex遺伝子にランダム突然変異誘発 (random mutagenesis) システムを適用するためにエラープローンPCR (error-prone PCR) を行い、エラープローンPCRを行う際にdiversify PCR random mutagenesis kit (米国, CLONTECH) を用いた。ランダム突然変異を導入したwex変異体を確保するために、実施例8で作製したpCL1920-PyccA-wexを鋳型とし、配列番号78と79を用いてエラープローンPCRを行った。変異率 (mutation rate) の条件選定のために、次の通りMnSO₄濃度を変えた2つの組成でエラープローンPCRを行った。

30

配列番号78 (wex-1)

A C T C T A G A G G A T C C C C T T C C A G A T C A A A T G C G T A A

配列番号79 (wex-2)

A T T C G A G C T C G G T A C C C C T A C A A A C A G T C C G C C A C

【0197】

40

50

【表6】

エラープローンPCR (error-prone PCR) の組成 (単位: u l)

Case #	1	2
10X Titanium taq Buffer	5	5
MnSO ₄ (8mM)	1	2
dGTP (2mM)	1	1
50 X diversify dNTP Mix	1	1
Titanium Taq Polymerase	1	1
Primer mix	2	2
Template DNA (1ng/u l)	1	1
PCR grade water	38	37
Total volume	50	50

【0198】

【表7】

エラープローンPCRのcycle

Cycle	Temperature	Time
1	94 °C	30 sec
25	94 °C	30 sec
	68 °C	1 min
1	68 °C	1 min

【0199】

表6と表7の条件で行ったエラープローンPCRの産物とSma I制限酵素で切断したpCL1920により、ギブソンアセンブリ（非特許文献16）方法を用いて組換え変異プラスミドライプラリーを得た。前記方法で得た変異ライプラリー（mutant library）pCL1920-PycCA-Hrh、pCL1920を大腸菌（Escherichia coli）W3110細胞に形質転換し、50 μg/Lのスペクチノマイシンを含むLB平板培地で培養し、その後変異ライプラリー50個のコロニーを選択し、変異率（mutation rate）及び様々な位置における変異発生の有無を判断するためにシーケンシング（sequencing）を行った。シーケンシングの結果、case #1の条件の変異率は1.3kb-1であり、case #2の条件では2.5kb-1であった。Case #1、2はどちらも変異ライプラリー（mutant library）の確保に適した変異率を有すると判断し、前記条件で作製したライプラリーを用いて有効変異選択作業を行った。

【0200】

L-トリプトファン（L-Tryptophan）のアナログである5'-フルオロトリプトファンを50 μg/mLで含むM9最小培地（minimal media）を96ディープウェルプレート（deep-well plate）に300 uLずつ分注し、その後前述したように形質転換したW3110/pCL1920-PycCA-Hrh、W3110/pCL1920、W3110/pCL1920-PycCA-wex変異ライプラリーコロニーを接種した。培養は1200 rpm/37°の条件で行い、16時間培養後に600 nmの波長でODを測定した。ほとんどの変異ライプラリーは、ディープウェルプレートにおいて、コントロール

菌株 (W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0, W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - H r h) と同様に、成長がほとんど観察されなかった。そのうち生育が向上した 51 種のコロニーを選択し、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異型プラスミド (plasmid) をそれぞれ抽出し、その後大腸菌 W 3 1 1 0 菌株に再形質転換して再現性評価を行い、共通して 5' - フルオロトリプトファンを 50 u g / m L で含む M 9 最小培地において特異的に成長が向上した 10 種の菌株を観察し、OD を記録した。

【0201】

【表 8】

L-トリプトファンのアナログを含む最小培地において成長が向上した w e x ライブライリー

	Optical density (OD ₆₀₀)
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0	0. 189
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - H r h	0. 393
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (1-3 8 G)	0. 791
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (1-4 6 D)	1. 026
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (2-1 10 C)	0. 748
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (2-12 8 C)	0. 773
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (2-15 6 B)	0. 825
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (2-18 3 F)	0. 921
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (3-3 6 D)	0. 831
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (3-6 11 F)	0. 749
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (5-5 10 B)	0. 766
W 3 1 1 0 / p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異ライブライリー (5-18 6 B)	0. 783

【0202】

選択した 10 種の変異株から p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異型プラスミド (

10

20

30

40

50

plasmid) を抽出し、その後変異の確認のために sequencingを行った。その結果、変異はプロモーター (Promoter) 領域でないコード配列 (CDS) において発生することが確認された。また、10種の変異株のうち8種において、発生した変異の位置が Wex膜タンパク質のアミノ酸配列の79番目のロイシン (Leucine) から83番目のイソロイシン (Isoleucine) までに集中していることが確認され、ほとんどの変異は、疎水性 (Hydrophobic) アミノ酸、脂肪族 (Aliphatic) アミノ酸、又は相対的にサイズの小さいL-アミノ酸に置換されたものであることが確認された。よって、Wex膜タンパク質アミノ酸配列の79番目から83番目までの位置がL-トリプトファン排出能向上のための変異導入の核心領域であると判断され、当該配列のアミノ酸を様々な疎水性 (Hydrophobic) アミノ酸、脂肪族 (Aliphatic) アミノ酸、又は相対的にサイズの小さいL-アミノ酸に置換してその活性を向上させる試みを行った。 10

【0203】

実施例14

コリネバクテリウム属微生物におけるWex配列の79番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) の疎水性アミノ酸への置換

Wex膜タンパク質のアミノ酸配列の79番目のアミノ酸であるロイシン (以下、79番目のロイシン又は79番目という) を他の疎水性アミノ酸に置換することによりL-トリプトファン排出改善の有効性について検証した。ロイシン以外の3種の他のアミノ酸への変異を与えるために、実施例2で作製したpDZTn-PgapA-Hrhを錆型とし、Site-Directed Mutagenesisを行った。Site-Directed Mutagenesisは次の方法で行った。 20

【0204】

【表9】

Site-Direction Mutagenesis PCRの組成

	単位 (u1)
10X pfu-X Buffer	5
10mM dNTP Mix	1
pfu-X Polymerase	1
Mutagenic forward primer(5pmol)	2
Mutagenic reverse primer(5pmol)	2
pDZTn-PgapA-Hrh (template DNA, 200ng/u1)	1
dH2O	38
Total	50

【0205】

40

30

40

50

【表 10】

Site-Direction Mutagenesis PCR cycle

Cycle	Temperature	Time
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 sec
	60 °C	50 sec
	68 °C	9 min
1	68 °C	7 min

10

【0206】

Wexアミノ酸配列の79番目のアミノ酸であるロイシンを他の疎水性アミノ酸であるアラニン(A)(配列番号80, 配列番号131)、バリン(V)(配列番号81, 配列番号132)、イソロイシン(I)(配列番号82, 配列番号133)に置換するために、表11に示す各mutagenic primerセットを用いて表9に示すPCR mixtureを作製し、表10のcycleでPCRを行った。PCR終了後に、Dpn I制限酵素1μlを添加して37℃で1時間処理した。Dpn Iで処理したDNA 3μl DH5a competent cellにtransformationしてpDZTn-PgapA-wex変異型プラスミドを確保し、シーケンシングにより表11に示す各変異に交換されたことを確認した。

20

【0207】

30

40

50

【表11】

コリネバクテリウム属微生物導入のためのW_exアミノ酸配列の79番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列
p D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 A	8 3	G T G T C C T A C G A A C T C T G C G C A T C G C T C T C C A T C G G T T A T G
	8 4	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A T G C G C A G A G T T C G T A G G A C A C
p D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 V	8 5	G T G T C C T A C G A A C T C T G C G T G T C G C T C T C C A T C G G T T A T G
	8 6	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A C A C G C A G A G T T C G T A G G A C A C
p D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 I	8 7	G T G T C C T A C G A A C T C T G C A T C T C G C T C T C C A T C G G T T A T G
	8 8	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A G A T G C A G A G T T C G T A G G A C A C

【0208】

表11のように作製したp D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 A、p D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 V、p D Z T n - P g a p A - w e x L 7 9 Iベクターを参考例1で作製したCA04-8352にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上で変異型w_ex遺伝子を挿入した3種の菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0209】

このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-8352(w_ex L 7 9 A)、CA04-8352(w_ex L 7 9 V)、CA04-8352(w_ex L 7 9 I)と命名した。

【0210】

CA04-8352、CA04-8405、CA04-8352(w_ex L 7 9 A)、CA04-8352(w_ex L 7 9 V)、CA04-8352(w_ex L 7 9 I)菌株

10

20

30

40

50

は、トリプトファン生産量を確認するために、実施例10と同様に培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

【0211】

【表12】

コリネバクテリウム・グルタミカムL-トリプトファン生産菌株 (CA04-8352)、L-トリプトファン排出遺伝子 (We x) を挿入した菌株 (CA04-8405)、We xアミノ酸配列の79番目のアミノ酸の変異菌株 (CA04-8352 (we x L79A)、CA04-8352 (we x L79V)、CA04-8352 (we x L79I)) のL-トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g/L)	トリプトファン収率 (g/g, %)	野生型We xと比較した収率向上 (Δ, %p)
CA04-8352	0.25	0.83	—
CA04-8405	1.52	5.07	—
CA04-8352 (we x L79A)	2.41	8.02	2.95
CA04-8352 (we x L79V)	2.02	6.73	1.66
CA04-8352 (we x L79I)	2.00	6.66	1.59

10

20

30

【0212】

表12に示すように、野生型We xを挿入したCA04-8405と比較して、We xアミノ酸配列の79番目のロイシンを他の疎水性アミノ酸に置換した3種の変異は、全て1.59%p ~ 2.95%pの発酵収率向上を示した。特に、we x L79A変異株においてL-トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、We xアミノ酸配列の79番目のロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換がWe xのL-トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【0213】

実施例15

コリネバクテリウム属微生物におけるWe x配列の80番目のアミノ酸であるセリン (Serine) の疎水性アミノ酸への置換

We x膜タンパク質のアミノ酸配列の80番目のアミノ酸であるセリン (以下、80番目のセリンという) を疎水性アミノ酸に置換することによりL-トリプトファン排出改善の有効性について検証した。4種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例14と同様にpDZTn-PgapA-we xを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesisを行った。

【0214】

また、We xアミノ酸配列の80番目のセリンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号89, 配列番号134)、バリン (V) (配列番号90, 配列番号135)、ロイシン (L) (配列番号91, 配列番号136)、イソロイシン (I) (配列番号92

40

50

, 配列番号 137) に置換するために、実施例 14 と同様の方法を行った。p D Z T n - P g a p A - w e x 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 13 に示す。

【0215】

【表 13】

コリネバクテリウム属微生物導入のための W e x アミノ酸配列の 80 番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のための mutagenic primer セット

変異型 W e x プラスミド	配列番号 #	塩基配列	
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 A	9 3	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G G C A C T C T C C A T C G G T T A T G C C	10
	9 4	G G C A T A A C C G A T G G A G A G T G C C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 V	9 5	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G G T G C T C T C C A T C G G T T A T G C C	20
	9 6	G G C A T A A C C G A T G G A G A G C A C C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 L	9 7	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G C T G C T C T C C A T C G G T T A T G C C	30
	9 8	G G C A T A A C C G A T G G A G A G C A G C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 I	9 9	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G A T C C T C T C C A T C G G T T A T G C C	40
	1 0 0	G G C A T A A C C G A T G G A G A G G A T C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	

【0216】

表 13 のように作製した p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 A、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 V、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 L、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 0 I ベクターを C A 0 4 - 8 3 5 2 にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、その後 2 次交差過程を経て、染色体上で変異型 w e x 遺伝子を挿

入した4種の菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0217】

このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-8352(wexS80A)、CA04-8352(wexS80V)、CA04-8352(wexS80L)、CA04-8352(wexS80I)と命名した。

【0218】

CA04-8352、CA04-8405、CA04-8352(wexS80A)、CA04-8352(wexS80V)、CA04-8352(wexS80L)、CA04-8352(wexS80I)菌株は、トリプトファン生産量を確認するために、実施例10と同様に培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

【0219】

【表14】

コリネバクテリウム・グルタミカムL-トリプトファン生産菌株(CA04-8352)、L-トリプトファン排出遺伝子(Wex)を挿入した菌株(CA04-8405)、Wexアミノ酸配列の80番目のアミノ酸の変異菌株(CA04-8352(wexS80A)、CA04-8352(wexS80V)、CA04-8352(wexS80L)、CA04-8352(wexS80I))のL-トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量(g/L)	トリプトファン収率(g/g, %)	野生型Wexと比較した収率向上(Δ, %p)
CA04-8352	0.25	0.83	—
CA04-8405	1.52	5.07	—
CA04-8352 (wexS80A)	2.21	7.36	2.29
CA04-8352 (wexS80V)	2.31	7.69	2.62
CA04-8352 (wexS80L)	2.28	7.61	2.54
CA04-8352 (wexS80I)	2.12	7.06	1.99

【0220】

表14に示すように、野生型Wexを挿入したCA04-8405と比較して、Wexアミノ酸配列の80番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した4種の変異は、全て1.99%p~2.62%pの発酵収率向上を示した。特に、wexS80V変異株にお

10

20

30

40

50

いて L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果も、We x アミノ酸配列の 80 番目のセリンの他の疎水性アミノ酸への置換がWe x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味する。

【0221】

実施例 16

コリネバクテリウム属微生物におけるWe x 配列の 81 番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) の疎水性アミノ酸への置換

We x 膜タンパク質のアミノ酸配列の 81 番目のアミノ酸であるロイシン (以下、81 番目のロイシンという) を他の疎水性アミノ酸に置換することにより L - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。ロイシン以外の 3 種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例 14 と同様に pDZTn - PgApA - we x を鋳型とし、Site - Directed Mutagenesis を行った。

10

【0222】

また、We x アミノ酸配列の 81 番目のロイシンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号 101, 配列番号 138)、バリン (V) (配列番号 102, 配列番号 139)、イソロイシン (I) (配列番号 103, 配列番号 140) に置換するため、実施例 14 と同様の方法を行った。pDZTn - PgApA - we x 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 15 に示す。

【0223】

20

30

40

50

【表 15】

コリネバクテリウム属微生物導入のためのW_exアミノ酸配列の81番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列	
p D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 A	104	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G G C A T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	10
	105	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A T G C C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	
p D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 V	106	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G G T G T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	20
	107	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A C A C C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	
p D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 I	108	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G A T C T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	30
	109	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A G A T C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	

【0224】

表15のように作製したp D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 A、p D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 V、p D Z T n - P g a p A - w e x L 8 1 IベクターをCA04-8352にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上で変異型w_ex遺伝子を挿入した3種の菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたPCR法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0225】

このようにして得た形質転換菌株をそれぞれ C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 A) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 I) と命名した。

【 0 2 2 6 】

C A 0 4 - 8 3 5 2 、 C A 0 4 - 8 4 0 5 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 A) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 I) 菌株は、トリプトファン生産量を確認するために、実施例 1 0 と同様に培養した。培養終了後に、H P L C により L - トリプトファンの生産量を測定した。

【 0 2 2 7 】

【表 1 6 】

コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2) 、 L - トリプトファン排出遺伝子 (W e x) を挿入した菌株 (C A 0 4 - 8 4 0 5) 、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のアミノ酸の変異菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 A) , C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 V) , C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 I)) の L - トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g / L)	トリプトファン収率 (g / g c , %)	野生型 W e x と比較した収率向上 (Δ , % p)
C A 0 4 - 8 3 5 2	0. 2 5	0. 8 3	—
C A 0 4 - 8 4 0 5	1. 5 2	5. 0 7	—
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 A)	2. 3 8	7. 9 4	2. 8 7
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 V)	2. 1 3	7. 1 0	2. 0 3
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 I)	2. 2 1	7. 3 6	2. 2 9

【 0 2 2 8 】

表 1 6 に示すように、野生型 W e x を挿入した C A 0 4 - 8 4 0 5 と比較して、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 3 種の変異は、全て 2. 0 3 % p ~ 2. 8 7 % p の発酵収率向上を示した。特に、 w e x L 8 1 A 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果も、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換が W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味する。

【 0 2 2 9 】

実施例 1 7

コリネバクテリウム属微生物における W e x 配列の 8 2 番目のアミノ酸であるセリン (S erine) の疎水性アミノ酸への置換

W e x 膜タンパク質のアミノ酸配列の 8 2 番目のアミノ酸であるセリン (以下、 8 2 番目のセリンという) を疎水性アミノ酸に置換することにより L - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。4 種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例

10

20

30

40

50

14と同様に p D Z T n - P g a p A - w e x を鋳型とし、 Site - Directed Mutagenesis を行った。

【 0 2 3 0 】

また、 W e x アミノ酸配列の 82 番目のセリンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号 110 , 配列番号 141) 、バリン (V) (配列番号 111 , 配列番号 142) 、ロイシン (L) (配列番号 112 , 配列番号 143) 、イソロイシン (I) (配列番号 113 , 配列番号 144) に置換するために、実施例 14 と同様の方法を行った。 p D Z T n - P g a p A - w e x 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 17 に示す。

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

50

【表17】

コリネバクテリウム属微生物導入のためのW_exアミノ酸配列の82番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 A	114	C G A A C T C T G C C T G T C G C T C G C A A T C G G T T A T G C C A A T A C A G
	115	C T G T A T T G G C A T A A C C G A T T G C G A G C G A C A G G C A G A G T T C G
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 V	116	C G A A C T C T G C C T G T C G C T C G T G A T C G G T T A T G C C A A T A C A G
	117	C T G T A T T G G C A T A A C C G A T C A C G A G C G A C A G G C A G A G T T C G
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 L	118	C G A A C T C T G C C T G T C G C T C C T G A T C G G T T A T G C C A A T A C A G
	119	C T G T A T T G G C A T A A C C G A T C A G G A G C G A C A G G C A G A G T T C G
p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 I	120	C G A A C T C T G C C T G T C G C T C A T C A T C G G T T A T G C C A A T A C A G
	121	C T G T A T T G G C A T A A C C G A T G A T G A G C G A C A G G C A G A G T T C G

【0232】

表17のように作製したp D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 A、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 V、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 L、p D Z T n - P g a p A - w e x S 8 2 IベクターをC A 0 4 - 8 3 5 2にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上で変異型w_ex遺伝子を挿入した4種の菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたP C R法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0233】

10

20

30

40

50

このようにして得た形質転換菌株をそれぞれ C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 A)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 V)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 L)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 I) と命名した。

【0234】

C A 0 4 - 8 3 5 2、C A 0 4 - 8 4 0 5、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 A)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 V)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 L)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 I) 菌株は、トリプトファン生産量を確認するために、実施例 10 と同様に培養した。培養終了後に、H P L C により L - トリプトファンの生産量を測定した。

【0235】

【表 18】

コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2)、L - トリプトファン排出遺伝子 (W e x) を挿入した菌株 (C A 0 4 - 8 4 0 5)、W e x アミノ酸配列の 8 2 番目のアミノ酸の変異菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 A)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 V)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 L)、C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 I)) の L - トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g / L)	トリプトファン収率 (g / g ₁ c, %)	野生型 W e x と比較した収率向上 (Δ, % p)
C A 0 4 - 8 3 5 2	0. 2 5	0. 8 3	—
C A 0 4 - 8 4 0 5	1. 5 2	5. 0 7	—
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 A)	2. 3 5	7. 8 3	2. 7 6
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 V)	2. 1 8	7. 2 8	2. 2 1
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 L)	1. 9 4	6. 4 7	1. 4 0
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 I)	2. 0 0	6. 6 6	1. 5 9

【0236】

表 18 に示すように、野生型 W e x を挿入した C A 0 4 - 8 4 0 5 と比較して、W e x アミノ酸配列の 8 2 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 4 種の変異は、全て 1. 4 0 % p ~ 2. 7 6 % p の発酵収率向上を示した。特に、w e x S 8 2 A 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果も、W e x アミノ酸配列の 8 2 番目のセリンの他の疎水性アミノ酸への置換が W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味する。

【0237】

10

20

30

40

50

実施例 18

コリネバクテリウム属微生物におけるWe x配列の83番目のアミノ酸であるイソロイシン(Isoleucine)の疎水性アミノ酸への置換

We x膜タンパク質のアミノ酸配列の83番目のアミノ酸であるイソロイシン(以下、83番目のイソロイシンという)を他の疎水性アミノ酸に置換することによりL-トリプトファン排出改善の有効性について検証した。イソロイシン以外の3種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例14と同様にpDZTn-PgapA-wexを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesisを行った。

【0238】

また、We xアミノ酸配列の83番目のイソロイシンを疎水性アミノ酸であるアラニン(A)(配列番号122,配列番号145)、バリン(V)(配列番号123,配列番号146)、ロイシン(L)(配列番号124,配列番号147)に置換するために、実施例14と同様の方法を行った。pDZTn-PgapA-wex変異型プラスミドを確保するために用いたmutagenic primerセットと変異形態を表19に示す。

【0239】

10

20

30

40

50

【表19】

コリネバクテリウム属微生物導入のためのW_exアミノ酸配列の83番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのm u t a g e n i c p r i m e r セット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列	
p D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 A	125	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C G C A G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	10
	126	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C T G C G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	
p D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 V	127	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C G T G G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	20
	128	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C C A C G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	
p D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 L	129	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C C T G G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	30
	130	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C C A G G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	40

【0240】

表19のように作製したp D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 A、p D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 V、p D Z T n - P g a p A - w e x I 8 3 LベクターをC A 0 4 - 8 3 5 2にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、その後2次交差過程を経て、染色体上で変異型w_ex遺伝子を挿入した3種の菌株を得た。当該遺伝子を挿入した相同組換えの上流領域及び下流領域の外部部位をそれぞれ増幅する配列番号7と配列番号8のプライマーを用いたP C R法とゲノムシーケンシングにより、当該遺伝的操作を確認した。

【0241】

このようにして得た形質転換菌株をそれぞれ C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 A) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 L) と命名した。

【 0 2 4 2 】

C A 0 4 - 8 3 5 2 、 C A 0 4 - 8 4 0 5 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 A) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 L) 菌株は、トリプトファン生産量を確認するために、実施例 1 0 と同様に培養した。培養終了後に、H P L C により L - トリプトファンの生産量を測定した。

【 0 2 4 3 】

【表 2 0 】

コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2) 、 L - トリプトファン排出遺伝子 (W e x) を挿入した菌株 (C A 0 4 - 8 4 0 5) 、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のアミノ酸の変異菌株 (C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 A) , C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 V) , C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 L)) の L - トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g / L)	トリプトファン収率 (g / g l c , %)	野生型 W e x と比較した収率向上 (Δ , % p)
C A 0 4 - 8 3 5 2	0 . 2 5	0 . 8 3	—
C A 0 4 - 8 4 0 5	1 . 5 2	5 . 0 7	—
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 A)	2 . 0 4	6 . 8 0	1 . 7 3
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 V)	2 . 2 2	7 . 3 9	2 . 3 2
C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 L)	2 . 2 3	7 . 4 3	2 . 3 6

【 0 2 4 4 】

表 2 0 に示すように、野生型 W e x を挿入した C A 0 4 - 8 4 0 5 と比較して、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 3 種の変異は、全て 1 . 7 3 % p ~ 2 . 3 6 % p の発酵収率向上を示した。特に、 w e x I 8 3 L 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果も、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のイソロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換が W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味する。実施例 2 ~ 6 から分かるように、 W e x 膜タンパク質アミノ酸配列の 7 9 番目から 8 3 番目までの疎水性アミノ酸への置換は、コリネバクテリウム・グルタミカム菌株における L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させる。

【 0 2 4 5 】

本出願の変異型 w e x を導入した菌株 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 7 9 I) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 0 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x L 8 1 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x S 8 2 V) 、 C A 0 4 - 8 3 5 2 (w e x I 8 3 L) は、それぞれ

10

20

30

40

50

C M 0 5 - 9 0 2 2 、 C M 0 5 - 9 0 2 3 、 C M 0 5 - 9 0 2 4 、 C M 0 5 - 9 0 2 5 、 C M 0 5 - 9 0 2 6 と命名し、ブダペスト条約上の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (KCCM) に2019年3月29日付けで寄託番号 K C C M 1 2 4 7 5 P 、 K C C M 1 2 4 7 6 P 、 K C C M 1 2 4 7 7 P 、 K C C M 1 2 4 7 8 P 、 K C C M 1 2 4 7 9 P として国際寄託した。

【0246】

実施例 19

エシェリキア属微生物におけるW e x 配列の79番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) の疎水性アミノ酸への置換

実施例 14 ~ 18 において示した、コリネバクテリウム属微生物におけるW e x 変異導入によるL - トリプトファン排出能の活性向上効果をエシェリキア属微生物において再確認した。

【0247】

コリネバクテリウム属微生物の場合と同様に、エシェリキア属微生物において、W e x 膜タンパク質のアミノ酸配列の79番目のアミノ酸であるロイシンを他の疎水性アミノ酸に置換することによりL - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。ロイシン以外の3種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例8で作製したpCL1920-PyccA-Hrhを鋳型とし、Site - Directed Mutagenesisを行った。Site - Directed Mutagenesisは次の方法で行った。

【0248】

【表21】

Site - Direction Mutagenesis PCRの組成

	単位 (u1)
10X pfu-X Buffer	5
10mM dNTP Mix	1
pfu-X Polymerase	1
Mutagenic forward primer(5pmol)	2
Mutagenic reverse primer(5pmol)	2
pCL1920-PyccA-wex (template DNA, 200ng/u1)	1
dH2O	38
Total	50

【0249】

10

20

30

40

50

【表22】

Site-Direction Mutagenesis PCR cycle

Cycle	Temperature	Time
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 sec
	60 °C	50 sec
	68 °C	6 min
1	68 °C	7 min

10

【0250】

Wexアミノ酸配列の79番目のロイシンを他の疎水性アミノ酸であるアラニン(A)（配列番号80, 配列番号131）、バリン(V)（配列番号81, 配列番号132）、イソロイシン(I)（配列番号82, 配列番号133）に置換するために、表23に示す各mutagenic primerセットを用いて表21に示すPCR mixtureを作製し、表22のcycleでPCRを行った。PCR終了後に、DpnI制限酵素1 μlを添加して37℃で1時間処理した。DpnIで処理したDNA 3 μl DH5α competent cellにtransformationしてpCL1920-PgapA-wex変異型プラスミドを確保し、シーケンシングにより表23に示す各変異に交換されたことを確認した。

20

【0251】

30

40

50

【表23】

エシェリキア属微生物における発現のためのW_exアミノ酸配列の79番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列	
pCL1920-Pyc cA-wex L79A	83	G T G T C C T A C G A A C T C T G C G C A T C G C T C T C C A T C G G T T A T G	10
	84	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A T G C G C A G A G T T C G T A G G A C A C	
pCL1920-Pyc cA-wex L79V	85	G T G T C C T A C G A A C T C T G C G T G T C G C T C T C C A T C G G T T A T G	20
	86	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A C A C G C A G A G T T C G T A G G A C A C	
pCL1920-Pyc cA-wex L79I	87	G T G T C C T A C G A A C T C T G C A T C T C G C T C T C C A T C G G T T A T G	30
	88	C A T A A C C G A T G G A G A G C G A G A T G C A G A G T T C G T A G G A C A C	

【0252】

表23のように作製したpCL1920-Pyc cA-wex L79A、pCL1920-Pyc cA-wex L79V、pCL1920-Pyc cA-wex L79IベクターをCA04-4303にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、wexの79番目のアミノ酸の各変異型遺伝子をそれぞれ導入した3種の菌株を得た。このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-4303(wex L79A)、CA04-4303(wex L79V)、CA04-4303(wex L79I)と命名した。

【0253】

実施例12で作製したCA04-4303(pCL1920)とCA04-4306を対照群として用いて、CA04-4303(wex L79A)、CA04-4303(wex L79V)、CA04-4303(wex L79I)菌株のL-トリプトファン生産量を確認するために、実施例12と同様に培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

【0254】

40
45
50

【表24】

大腸菌L-トリプトファン生産菌株 (CA04-4303 (pCL1920))、
L-トリプトファン排出遺伝子 (Wex) を発現する菌株 (CA04-4306)、
Wexアミノ酸配列の79番目のアミノ酸の変異菌株 (CA04-4303 (wex L79A))、CA04-4303 (wex L79V)、CA04-4303 (wex L79I)) のL-トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g/L)	トリプトファン収率 (g/g, %)	野生型Wexと比較した収率向上 (Δ, %p)
CA04-4303 (pCL1920)	1.4	2.0	—
CA04-4306	2.1	3.0	—
CA04-4303 (wex L79A)	3.2	4.5	1.5
CA04-4303 (wex L79V)	2.5	3.6	0.6
CA04-4303 (wex L79I)	2.7	3.9	0.9

【0255】

表24に示すように、野生型Wexを挿入したCA04-4306と比較して、Wexアミノ酸配列の79番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した3種の変異は、全て0.6%p~1.5%pの発酵収率向上を示した。特に、コリネバクテリウム・グルタミカムL-トリプトファン生産株と同様に、大腸菌の場合もwex L79A変異株においてL-トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、Wexアミノ酸配列の79番目のロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換が、コリネバクテリウム属微生物においてだけでなく、エシェリキア属微生物においてもWexのL-トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【0256】

実施例20

エシェリキア属微生物におけるWex配列の80番目のアミノ酸であるセリン (Serine) の疎水性アミノ酸への置換

エシェリキア属微生物において、Wex膜タンパク質のアミノ酸配列の80番目のセリンを他の疎水性アミノ酸に置換することによりL-トリプトファン排出改善の有効性について検証した。4種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例19と同様にpCL1920-PyccA-wexを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesisを行った。

【0257】

また、Wexアミノ酸配列の80番目のセリンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号89, 配列番号134)、バリン (V) (配列番号90, 配列番号135)、

10

20

30

40

50

ロイシン (L) (配列番号 91, 配列番号 136)、イソロイシン (I) (配列番号 92, 配列番号 137) に置換するために、実施例 19 と同様の方法を行った。pCL1920-Pyc c A-wex 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 25 に示す。

【0258】

【表 25】

エシェリキア属微生物における発現のための Wex アミノ酸配列の 80 番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のための mutagenic primer セット

変異型 Wex プラスミド	配列番号 #	塩基配列	
pCL1920-Pyc c A-wex S80A	93	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G G C A C T C T C C A T C G G T T A T G C C	10
	94	G G C A T A A C C G A T G G A G A G T G C C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
pCL1920-Pyc c A-wex S80V	95	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G G T G C T C T C C A T C G G T T A T G C C	20
	96	G G C A T A A C C G A T G G A G A G C A C C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
pCL1920-Pyc c A-wex S80L	97	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G C T G C T C T C C A T C G G T T A T G C C	30
	98	G G C A T A A C C G A T G G A G A G C A G C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	
pCL1920-Pyc c A-wex S80I	99	G T C C T A C G A A C T C T G C C T G A T C C T C T C C A T C G G T T A T G C C	40
	100	G G C A T A A C C G A T G G A G A G G A T C A G G C A G A G T T C G T A G G A C	

【0259】

表 25 のように作製した pCL1920-Pyc c A-wex S80A、pCL1920-Pyc c A-wex S80V、pCL1920-Pyc c A-wex S80L、pCL1920-Pyc c A-wex S80I ベクターを CA04-4303 にそれぞれ工

レクトロポレーションにより形質転換し、*wex*の80番目のアミノ酸の各変異型遺伝子をそれぞれ導入した4種の菌株を得た。このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-4303 (*wex S80A*)、CA04-4303 (*wex S80V*)、CA04-4303 (*wex S80L*)、CA04-4303 (*wex S80I*)と命名した。

【0260】

CA04-4303 (*pCL1920*)、CA04-4306、CA04-4303 (*wex S80A*)、CA04-4303 (*wex S80V*)、CA04-4303 (*wex S80L*)、CA04-4303 (*wex S80I*)菌株のL-トリプトファン生産量を確認するために、実施例12と同様に培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

【0261】

【表26】

大腸菌L-トリプトファン生産菌株 (CA04-4303 (*pCL1920*))、L-トリプトファン排出遺伝子 (*Wex*)を発現する菌株 (CA04-4306)、*Wex*アミノ酸配列の80番目のアミノ酸の変異菌株 (CA04-4303 (*wex S80A*)、CA04-4303 (*wex S80V*)、CA04-4303 (*wex S80L*)、CA04-4303 (*wex S80I*))のL-トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g/L)	トリプトファン収率 (g/g, %)	野生型 <i>Wex</i> と比較した収率向上 (Δ , % p)
CA04-4303 (<i>pCL1920</i>)	1.4	2.0	—
CA04-4306	2.1	3.0	—
CA04-4303 (<i>wex S80A</i>)	2.7	3.9	0.9
CA04-4303 (<i>wex S80V</i>)	2.9	4.2	1.2
CA04-4303 (<i>wex S80L</i>)	2.6	3.7	0.7
CA04-4303 (<i>wex S80I</i>)	2.3	3.3	0.3

【0262】

表26に示すように、野生型 *Wex*を挿入したCA04-4306と比較して、*Wex*アミノ酸配列の80番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した4種の変異は、全て0.3% p ~ 1.2% pの発酵収率向上を示した。特に、コリネバクテリウム・グルタミカムL-トリプトファン生産株と同様に、大腸菌の場合も *wex S80V*変異株においてL-トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、*Wex*アミノ酸配

10

20

30

40

50

列の 80 番目のセリンの他の疎水性アミノ酸への置換が、コリネバクテリウム属微生物においてだけでなく、エシェリキア属微生物においても W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【 0 2 6 3 】

実施例 2 1

エシェリキア属微生物における W e x 配列の 81 番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) の疎水性アミノ酸への置換

エシェリキア属微生物において、W e x 膜タンパク質のアミノ酸配列の 81 番目のロイシンを他の疎水性アミノ酸に置換することにより L - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。ロイシン以外の 3 種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例 19 と同様に p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x を鋳型とし、Site - Directed Mutagenesis を行った。

10

【 0 2 6 4 】

また、W e x アミノ酸配列の 81 番目のロイシンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号 101, 配列番号 138)、バリン (V) (配列番号 102, 配列番号 139)、イソロイシン (I) (配列番号 103, 配列番号 140) に置換するため、実施例 19 と同様の方法を行った。p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 27 に示す。

【 0 2 6 5 】

20

30

40

50

【表27】

エシエリキア属微生物における発現のためのW_exアミノ酸配列の81番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型W _e xプラスミド	配列番号 #	塩基配列	
pCL1920-Pyc cA-wex L81A	104	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G G C A T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	10
	105	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A T G C C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	
pCL1920-Pyc cA-wex L81V	106	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G G T G T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	20
	107	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A C A C C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	
pCL1920-Pyc cA-wex L81I	108	C C T A C G A A C T C T G C C T G T C G A T C T C C A T C G G T T A T G C C A A T A C	30
	109	G T A T T G G C A T A A C C G A T G G A G A T C G A C A G G C A G A G T T C G T A G G	

【0266】

表27のように作製したpCL1920-Pyc cA-wex L81A、pCL1920-Pyc cA-wex L81V、pCL1920-Pyc cA-wex L81IベクターをCA04-4303にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、wexの81番目のアミノ酸の各変異型遺伝子をそれぞれ導入した3種の菌株を得た。このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-4303(wex L81A)、CA04-4303(wex L81V)、CA04-4303(wex L81I)と命名した。

【0267】

CA04-4303(pCL1920)、CA04-4306、CA04-4303(

W e x L 8 1 A) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 V) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 I) 菌株の L - トリプトファン生産量を確認するために、実施例 1 2 と同様に培養した。培養終了後に、H P L C により L - トリプトファンの生産量を測定した。

【 0 2 6 8 】

【表 2 8 】

大腸菌 L - トリプトファン生産菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 3 (p C L 1 9 2 0)) 、 L - トリプトファン排出遺伝子 (W e x) を発現する菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 6) 、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のアミノ酸の変異菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 A) , C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 V) , C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 I)) の L - トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g / L)	トリプトファン収率 (g / g 1 c , %)	野生型 W e x と比較した収率向上 (Δ , % p)
C A 0 4 - 4 3 0 3 (p C L 1 9 2 0)	1. 4	2. 0	—
C A 0 4 - 4 3 0 6	2. 1	3. 0	—
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 A)	3. 4	4. 8	1. 8
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 V)	2. 9	4. 1	1. 1
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x L 8 1 I)	2. 8	4. 0	1. 0

【 0 2 6 9 】

表 2 8 に示すように、野生型 W e x を挿入した C A 0 4 - 4 3 0 6 と比較して、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 3 種の変異は、全て 1. 0 % p ~ 1. 8 % p の発酵収率向上を示した。特に、コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産株と同様に、大腸菌の場合も w e x L 8 1 A 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、 W e x アミノ酸配列の 8 1 番目のロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換が、コリネバクテリウム属微生物においてだけでなく、エシェリキア属微生物においても W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【 0 2 7 0 】

実施例 2 2

エシェリキア属微生物における W e x 配列の 8 2 番目のアミノ酸であるセリン (Serine) の疎水性アミノ酸への置換

エシェリキア属微生物において、 W e x 膜タンパク質のアミノ酸配列の 8 2 番目のアミノ酸であるセリンを他の疎水性アミノ酸に置換することにより L - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。4 種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例 1 9 と同様に p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x を鋳型とし、 S i t e - D i r e c

10

20

30

40

50

ted Mutagenesisを行った。

【0271】

また、Wexアミノ酸配列の82番目のセリンを疎水性アミノ酸であるアラニン(A)（配列番号110, 配列番号141）、バリン(V)（配列番号111, 配列番号142）、ロイシン(L)（配列番号112, 配列番号143）、イソロイシン(I)（配列番号113, 配列番号144）に置換するために、実施例19と同様の方法を行った。pCL1920-Pyc cA-wex変異型プラスミドを確保するために用いたmutagenic primerセットと変異形態を表29に示す。

【0272】

【表29】

エシェリキア属微生物における発現のためのWexアミノ酸配列の82番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primerセット

変異型Wexプラスミド	配列番号 #	塩基配列
pCL1920-Pyc cA-wex S82A	114	CGAACCTCTGCCCTGT CGCTCGCAATCGGT TATGCCAATACAG
	115	CTGTATTGGCATAA CCGATTGCGAGCGA CAGGCAGAGTTCG
pCL1920-Pyc cA-wex S82V	116	CGAACCTCTGCCCTGT CGCTCGTGAATCGGT TATGCCAATACAG
	117	CTGTATTGGCATAA CCGATCACGAGCGA CAGGCAGAGTTCG
pCL1920-Pyc cA-wex S82L	118	CGAACCTCTGCCCTGT CGCTCCCTGATCGGT TATGCCAATACAG
	119	CTGTATTGGCATAA CCGATCAGGAGCGA CAGGCAGAGTTCG
pCL1920-Pyc cA-wex S82I	120	CGAACCTCTGCCCTGT CGCTCATCATCGGT TATGCCAATACAG
	121	CTGTATTGGCATAA CCGATGATGAGCGA CAGGCAGAGTTCG

10

20

30

40

50

【0273】

表29のように作製したpCL1920-PyccA-wexS82A、pCL1920-PyccA-wexS82V、pCL1920-PyccA-wexS82L、pCL1920-PyccA-wexS82IベクターをCA04-4303にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、wexの82番目のアミノ酸の各変異型遺伝子をそれぞれ導入した4種の菌株を得た。このようにして得た形質転換菌株をそれぞれCA04-4303(wexS82A)、CA04-4303(wexS82V)、CA04-4303(wexS82L)、CA04-4303(wexS82I)と命名した。

【0274】

CA04-4303(pCL1920)、CA04-4306、CA04-4303(wexS82A)、CA04-4303(wexS82V)、CA04-4303(wexS82L)、CA04-4303(wexS82I)菌株のL-トリプトファン生産量を確認するために、実施例12と同様に培養した。培養終了後に、HPLCによりL-トリプトファンの生産量を測定した。

【0275】

【表30】

大腸菌L-トリプトファン生産菌株(CA04-4303(pCL1920))、L-トリプトファン排出遺伝子(Wex)を発現する菌株(CA04-4306)、Wexアミノ酸配列の82番目のアミノ酸の変異菌株(CA04-4303(wexS82A)、CA04-4303(wexS82V)、CA04-4303(wexS82L)、CA04-4303(wexS82I))のL-トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量(g/L)	トリプトファン収率(g/g, %)	野生型Wexと比較した収率向上(Δ, %p)
CA04-4303(pCL1920)	1.4	2.0	—
CA04-4306	2.1	3.0	—
CA04-4303(wexS82A)	2.9	4.2	1.2
CA04-4303(wexS82V)	3.1	4.4	1.4
CA04-4303(wexS82L)	2.4	3.4	0.4
CA04-4303(wexS82I)	2.2	3.2	0.2

【0276】

表30に示すように、野生型Wexを挿入したCA04-4306と比較して、Wex

10

20

30

40

50

アミノ酸配列の 82 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 4 種の変異は、全て 0.2% p ~ 1.4% p の発酵収率向上を示した。コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産株とは異なり、大腸菌の場合は *wex S82V* 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、*Wex* アミノ酸配列の 82 番目のセリンの他の疎水性アミノ酸への置換が、コリネバクテリウム属微生物においてだけでなく、エシェリキア属微生物においても *Wex* の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【0277】

実施例 23

エシェリキア属微生物における *Wex* 配列の 83 番目のアミノ酸であるイソロイシン (I soleucine) の疎水性アミノ酸への置換

10

エシェリキア属微生物において、*Wex* 膜タンパク質のアミノ酸配列の 83 番目のアミノ酸であるイソロイシンを他の疎水性アミノ酸に置換することにより L - トリプトファン排出改善の有効性について検証した。イソロイシン以外の 3 種の他の疎水性アミノ酸への変異を与えるために、実施例 19 と同様に *pCL1920-PyccA-wex* を鋳型とし、Site-Directed Mutagenesis を行った。

【0278】

また、*Wex* アミノ酸配列の 83 番目のイソロイシンを疎水性アミノ酸であるアラニン (A) (配列番号 122, 配列番号 145)、バリン (V) (配列番号 123, 配列番号 146)、ロイシン (L) (配列番号 124, 配列番号 147) に置換するため、実施例 19 と同様の方法を行った。*pCL1920-PyccA-wex* 変異型プラスミドを確保するために用いた mutagenic primer セットと変異形態を表 31 に示す。

20

【0279】

30

40

50

【表 3 1】

エシエリキア属微生物における発現のためのW e x アミノ酸配列の 83 番目のアミノ酸の変異型プラスミドの作製のためのmutagenic primer セット

変異型W e x プラスミド	配列番号 #	塩基配列	
p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 A	1 2 5	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C G C A G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	10
	1 2 6	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C T G C G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	
p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 V	1 2 7	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C G T G G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	20
	1 2 8	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C C A C G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	
p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 L	1 2 9	G A A C T C T G C C T G T C G C T C T C C C T G G G T T A T G C C A A T A C A G G C A G G	30
	1 3 0	C C T G C C T G T A T T G G C A T A A C C C A G G G A G A G C G A C A G G C A G A G T T C	40

【0280】

表31のように作製したp C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 A、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 V、p C L 1 9 2 0 - P y c c A - w e x I 8 3 L ベクターをC A 0 4 - 4 3 0 3 にそれぞれエレクトロポレーションにより形質転換し、w e x の83番目のアミノ酸の各変異型遺伝子をそれぞれ導入した3種の菌株を得た。このようにして得た形質転換菌株をそれぞれC A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 A)、C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 V)、C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 L)と命名した。

【0281】

C A 0 4 - 4 3 0 3 (p C L 1 9 2 0)、C A 0 4 - 4 3 0 6、C A 0 4 - 4 3 0 3 (

W e x I 8 3 A) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 V) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 L) 菌株の L - トリプトファン生産量を確認するために、実施例 1 2 と同様に培養した。培養終了後に、H P L C により L - トリプトファンの生産量を測定した。

【 0 2 8 2 】

【表 3 2 】

大腸菌 L - トリプトファン生産菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 3 (p C L 1 9 2 0)) 、 L - トリプトファン排出遺伝子 (W e x) を発現する菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 6) 、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のアミノ酸の変異菌株 (C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 A)) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 V) 、 C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 L)) の L - トリプトファン生産量の確認

菌株名	トリプトファン生産量 (g / L)	トリプトファン収率 (g / g 1 c , %)	野生型 W e x と比較した収率向上 (Δ , % p)
C A 0 4 - 4 3 0 3 (p C L 1 9 2 0)	1. 4	2. 0	—
C A 0 4 - 4 3 0 6	2. 1	3. 0	—
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 A)	2. 2	3. 2	0. 2
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 V)	2. 3	3. 3	0. 3
C A 0 4 - 4 3 0 3 (w e x I 8 3 L)	2. 6	3. 7	0. 7

【 0 2 8 3 】

表 3 2 に示すように、野生型 W e x を挿入した C A 0 4 - 4 3 0 6 と比較して、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のアミノ酸を他の疎水性アミノ酸に置換した 3 種の変異は、全て 0. 2 % p ~ 0. 7 % p の発酵収率向上を示した。特に、コリネバクテリウム・グルタミカム L - トリプトファン生産株と同様に、大腸菌の場合も w e x I 8 3 L 変異株において L - トリプトファン発酵収率の向上が最大であった。これらの結果は、 W e x アミノ酸配列の 8 3 番目のロイシンの他の疎水性アミノ酸への置換が、コリネバクテリウム属微生物においてだけでなく、エシェリキア属微生物においても W e x の L - トリプトファン排出能の活性を大幅に向上させることを意味するものである。

【 0 2 8 4 】

以上の説明から、本出願の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できることを理解するであろう。なお、前記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。本出願には、明細書ではなく請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態が含まれるものと解釈すべきである。

【 0 2 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明
国際様式

宛先：C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA04-8405	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM12099P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2017 年 8 月 21 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 カ街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2017 年 8 月 21 日

20

30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2018 年 2 月 22 日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【0286】

50

【表34】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

宛先：C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CA04-8352	国際寄託機関が付与した受託番号： K C C M 1 2 2 1 8 P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2018 年 2 月 2 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 号街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2018 年 2 月 2 日

20

30

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関が取得した状態の日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019 年 4 月 4 日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【0287】

50

【表 3 5】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

宛先 : C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM05-9022	国際寄託機関が付与した受託番号 : KCCM 12475P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2019 年 3 月 29 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は に項目 I に表示された微生物を受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター 住所 : 大韓民国ソウル市西大门区 弘済内 2 号街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 : 署名日 : 2019 年 3 月 29 日

20

30

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関の寄託証を取得した日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019 年 4 月 4 日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【0288】

50

【表 3 6】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

宛先 : C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM05-9023	国際寄託機関が付与した受託番号 : KCCM 12476P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2019 年 3 月 29 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は に項目 I に表示された微生物を受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター 住所 : 大韓民国ソウル市西大门区 弘済内 2 号街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 : 署名日 : 2019 年 3 月 29 日

20

30

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関の寄託証を取得した日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019 年 4 月 4 日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【0289】

50

【表37】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明
国際様式

宛先 : C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM05-9024	国際寄託機関が付与した受託番号 : KCCM 12477P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2019年3月29日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は に項目 I に表示された微生物を受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター 住所 : 大韓民国ソウル市西大門区 弘済内2カ街45ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 : 署名日 : 2019年3月29日

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関の寄託証を取得した日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019年4月4日
弁理士 ソン・ミン 印

【0290】

【表 3 8】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

宛先 : C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM05-9025	国際寄託機関が付与した受託番号 : KCCM 12478P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2019 年 3 月 29 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は に項目 I に表示された微生物を受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター 住所 : 大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 カ街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 : 署名日 : 2019 年 3 月 29 日

20

30

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関の寄託証を取得した日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019 年 4 月 4 日

弁理士 ソン・ミン 印

40

【0291】

50

【表 3 9】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

宛先 : C J 第一製糖株式会社,
大韓民国ソウル市中区
東湖路 330, C J 第一製糖
センター
郵便番号 100-400

国際寄託機関により規則
7. 1 に従って発行された
原寄託についての受託証

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Corynebacterium glutamicum</i> CM05-9026	国際寄託機関が付与した受託番号 : KCCM 12479P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2019 年 3 月 29 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。 ¹	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託機関は に項目 I に表示された微生物を受託し、原寄託のブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を に受領した。	
V. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター 住所 : 大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 カ街 45 ユリムビル 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 : 署名日 : 2019 年 3 月 29 日

¹ 規則 6. 4 (d) によれば、前記日付は国際寄託機関の寄託証を取得した日付である。

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2019 年 4 月 4 日
弁理士 ソン・ミン 印

10

20

30

40

50

【図面】

【図1】



【配列表】

0007539871000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 P	13/22 (2006.01)	C 1 2 P	13/22
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10 2 0 0 Z

韓国(KR)

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

(72)発明者 イ イムサン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

(72)発明者 キム ジウォン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

(72)発明者 キム テヨン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

(72)発明者 ソン ソンクァン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

(72)発明者 チヨン キヨン

大韓民国 0 4 5 6 0 ソウル チュン - グ トンホ - 口 3 3 0

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 名和 大輔

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 7 / 0 2 6 9 5 8 (WO , A 1)

特開2 0 1 7 - 0 1 8 0 9 4 (JP , A)

特許第4 3 0 5 1 8 4 (JP , B 2)

Jian Wang, et al., Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of L-tryptophan., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013年, Vol. 97, p. 7587 - 7596

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C07K1/00-19/00

C12N

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)