(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3997631号

(P3997631)

(45)発行日　平成19年10月24日(2007.10.24)　(24)登録日　平成19年8月17日(2007.8.17)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 9/04	(2006.01)	C12N	9/04	Z
C12P 13/06	(2006.01)	C12P	13/06	D
C12R 1/13	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 6　(全 38 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平10-353513
(22)出願日　平成10年12月11日(1998.12.11)
(65)公開番号　特開平11-266881
(43)公開日　平成11年10月5日(1999.10.5)
審査請求日　平成16年5月24日(2004.5.24)
(31)優先権主張番号　特願平10-3751
(32)優先日　平成10年1月12日(1998.1.12)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

微生物の受託番号　FERM　P-16471
微生物の受託番号　FERM　P-16472

(73)特許権者　000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋１丁目１５番１号
(74)代理人　100089244
弁理士　遠山　勉
(74)代理人　100090516
弁理士　松倉　秀実
(74)代理人　100100549
弁理士　川口　嘉之
(72)発明者　菅　美喜子
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者　杉本　雅一
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】発酵法によるＬ－セリンの製造法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列表配列番号１２に記載されるアミノ酸配列、または同配列に、１または複数のアミノ酸の置換、付加または欠失が生じたアミノ酸配列からなるＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼにおいて、配列番号１２に記載されるアミノ酸配列の３２５番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換したことを特徴とする、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除されたＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ。

【請求項２】

配列表配列番号１４に記載されるアミノ酸配列からなる請求項１記載のＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ。

【請求項３】

請求項１または２記載のＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ。

【請求項４】

配列表配列番号１３に記載される塩基配列からなる請求項３記載のＤＮＡ。

【請求項５】

請求項３または４記載のＤＮＡを含む組み換えＤＮＡを保持するコリネ型細菌。

【請求項６】

請求項５記載の細菌を培地に培養し、培地中にＬ－セリンを蓄積させ、培地中から当該Ｌ

－セリンを回収することを特徴とするＬ－セリンの製造法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は医薬品・化学品・化粧品分野で使用されるアミノ酸混合物を製造するために用いられるＬ－セリンの製造法、同製造法を構成するコリネ型細菌、Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ（Ｄ－３－Ｐｈｏｓｐｈｏｇｌｙｃｅｒａｔｅ Ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ、以下「３－ＰＧＤＨ」ということがある）及び同３－ＰＧＤＨをコードするＤＮＡに関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
従来の発酵法によるＬ－セリンの製造法としては、グリシン及び糖からＬ－セリンに変換できる菌株を使用して、３０ｇ／Ｌのグリシンを有する培地で最高１４ｇ／ＬのＬ－セリンを製造したという報告がある。この方法におけるグリシンからＬ－セリンへの変換収率は４６％に相当する（Ｋｕｂｏｔａ Ｋ. Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４９，７～１２，１９８５）。また、グリシンとメタノールからＬ－セリンに変換できる菌株を使用して、１００ｇ／Ｌのグリシンから５３ｇ／ＬのＬ－セリンが生産できる（Ｔ．Ｙｏｓｈｉｄａ ｅｔ ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｆｅｒｍｅｎｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｖｏｌ．７９，Ｎｏ．２，１８１－１８３．１９９５）。また、ノカルディア属細菌を使用する方法では、セリンハイドロキサメイトやアザセリン等の耐性菌を育種することによりＬ－セリン生産能が改善されることが知られている（特公昭５７－１２３５号）。しかし、これらの方法はＬ－セリンの前駆体であるグリシンを使用しなければならず、操作が煩雑でコスト的にも不利であった。
【０００３】
Ｌ－セリンを糖より直接発酵でき、かつ培地にＬ－セリンの前駆体を添加する必要のない菌株として、Ｄ－セリン、α－メチル－セリン、ｏ－メチルセリン、イソセリン、セリンハイドロキサメイト、３－クロロアラニンに耐性なコリネバクテリウム グルタミカムが知られているが、そのＬ－セリン蓄積は０．８ｇ／Ｌと極めて低いものであり（農芸化学会誌、第４８巻、第３号、ｐ２０１－２０８，１９７４）、工業的にＬ－セリンの直接発酵を行うには更なる菌株改良が望まれた。
【０００４】
一方、コリネ型細菌において、菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド（米国特許第４５１４５０２号参照）、遺伝子の菌体への導入方法（特開平２－２０７７９１号等）が開示されており、これらの技術を用いたＬ－スレオニンまたはＬ－イソロイシン生産菌育成の可能性が開示されている（米国特許第４４５２８９０号、及び米国特許第４４４２２０８号参照）。また、Ｌ－リジン生産菌育成に関しても、ベクタープラスミドにＬ－リジン生合成に関与する遺伝子を組み込み、菌体内で増幅させる技術（特開昭５６－１６０９９７号などがある）が知られている。
【０００５】
エシェリヒア コリではＬ－セリン生合成に関与する酵素のうち、野生型ではフィードバック阻害を受ける酵素について、フィードバック阻害が解除された変異を有する酵素遺伝子を導入してＬ－セリン生産性を向上させた例も知られている（特許２５８４４０９号）。このような遺伝子として具体的には、３－ＰＧＤＨ遺伝子（以下、３－ＰＧＤＨタンパクをコードする遺伝子を「ｓｅｒＡ」ともいう。）が知られている。
【０００６】
また、コリネ型細菌においては３－ＰＧＤＨ遺伝子の増幅がＬ－トリプトファン生産性に影響を与える例が知られている（特開平３－７５９１号）。
【０００７】
【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、糖をＬ－セリンに変換する微生物を提供し、同微生物が有するＬ－セリンへの変換能を利用して培養液中にＬ－セリンを蓄積させる方法を提供することであり、すなわち、工業的に実施するのに有利なＬ－セリンの製造方法を提供することである。

【０００８】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述の課題を解決すべくＬ－セリンの製造法について鋭意研究を重ねた結果、Ｌ－セリン生産能を有するコリネ型細菌、特に好ましくはさらにＬ－セリン分解能を欠失した同細菌を親株としてアザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を示す変異株を採取し、同株を用いてＬ－セリン発酵を行い培養液中のＬ－セリン蓄積が飛躍的に向上することを見いだし、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【０００９】

すなわち本発明は、アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有しＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌である。

さらに本発明は、コリネ型細菌に由来し、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除されたＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ；アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有しＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌からえられうる同Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ；配列表配列番号１２に記載されるアミノ酸配列、または同配列に、１または複数のアミノ酸置換、付加または欠失が生じたアミノ酸配列を有するＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼにおいて、配列番号１２に記載されるアミノ酸配列の３２５番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換したことを特徴とする同Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ；および、配列表配列番号１４に記載されるアミノ酸配列を有する同Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼである。

以 上

【００１０】

さらに本発明は、前記Ｄ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ、および、配列表配列番号１３に記載される塩基配列を有する同ＤＮＡである。

さらに本発明は、前記ＤＮＡを含む組み換えＤＮＡを保持するコリネ型細菌である。

さらに、前記細菌を培地に培養し、培地中にＬ－セリンを蓄積させ、培地中から当該Ｌ－セリンを回収することを特徴とするＬ－セリンの製造法である。

【００１１】

上記アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有しＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２４及びＡＪ１３３２７またはブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２５が挙げられる。

【００１２】

【発明の実施の形態】

本発明においてコリネ型細菌とは、バージーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Ｂｅｒｇｅｙ’ｓ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｖｅ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ）第８版５９９頁（１９７４）に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌であり、コリネバクテリウム属細菌、および従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌、さらにコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属及びミクロバクテリウム属細菌を含む。

【００１３】

本発明のアザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有しＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌、さらに好ましくは同細菌のうちＬ－セリン分解能を欠失しているコリネ型細菌は、野生型あるいはＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌を親株として人工的に変異、誘導される。

【００１４】
アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有しＬ－セリン分解能を欠失しＬ－セリン生産能を有するコリネ型細菌の採取は、例えば次のようにして行うことができる。すなわち親株としてブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７を通常の方法で変異処理（Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジンへの接触等）に付して、Ｌ－セリン分解能を欠失した変異株を得、さらにこの変異株を親株としてアザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン耐性菌を採取する。このような方法により得られた変異株の中にＬ－セリンを高濃度で蓄積する菌株が得られる。
アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性を有する菌株は、後述する変異型ｓｅｒＡを親株またはＬ－セリン分解能を欠失した変異株に導入することによっても、得られうる。
【００１５】
アザセリン耐性とは、アザセリンを含有する培地において野生株よりも速い生育を示す性質をいうが、例えば、０．２５ｇ／Ｌのアザセリンを含有する固体培地上で、３０℃、４～５日でコロニーを形成できる株はアザセリン耐性を有する。
【００１６】
同様にβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン耐性とは、β－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンを含有する培地において野生株よりも速い生育を示す性質をいうが、例えば、０．２５ｇ／Ｌのβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンを含有する固体培地上で、３０℃、４～５日でコロニーを形成できる株はβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン耐性を有する。
【００１７】
３－ＰＧＤＨは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ）を補酵素として、３－ホスホグリセレートが３－ホスホヒドロキシピルビン酸に酸化される反応を触媒する。
【００１８】
３－ＰＧＤＨの活性を測定するには、例えば、逆反応における補酵素$NADH_2$の減少（Ｅ．Ｓｕｇｉｍｏｔｏ　ａｎｄ　Ｌ．Ｉ．Ｐｉｚｅｒ，ＪＢＣ，２４３，２０８１，１９６８）や、順反応における補酵素$NADH_2$の生成（Ｓａｌａｃｈ　Ｈ．Ｊ．Ｍｅｔｈｏｄ　ｉｎ　ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　ｖ９，２１６－２２０，１９６６）を３４０ｎｍの吸光度で測定することによって行うことができる。
【００１９】
３－ＰＧＤＨは、、コリネ型細菌の培養液から菌体を回収し、回収された菌体を超音波処理後超遠心をかけて破砕し、遠心分離によって得られる上澄から常法によって精製される。すなわち、硫安沈殿、ゲル濾過、陽イオン樹脂クロマトグラフィー、陰イオン樹脂クロマトグラフィー、逆層クロマトグラフィーなどによって、３－ＰＧＤＨ活性を有する画分を濃縮していくことによって、３－ＰＧＤＨを精製できる。
【００２０】
野生型のコリネ型細菌由来の３－ＰＧＤＨはＬ－セリンによるフィードバック阻害を受け、１０ｍＭのＬ－セリン存在下ではその活性がほぼ完全に阻害される。Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除された３－ＰＧＤＨとは、１０ｍＭのＬ－セリン存在下でもＬ－セリン非存在下における活性の２０％以上、好ましくは４０％以上、さらに好ましくは９０％以上の活性を有する３－ＰＧＤＨをいう。後述の実施例に示されるブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２７由来の３－ＰＧＤＨは８０ｍＭのＬ－セリン存在下で活性をほぼ１００％維持しており、最も好ましい３－ＰＧＤＨの一つである。
【００２１】
野生型のコリネ型細菌由来の３－ＰＧＤＨ（以下、これをコードするＤＮＡを「野生型ｓｅｒＡ」ともいう）は配列表の配列番号１２記載のアミノ酸配列を有する。Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除された３－ＰＧＤＨ（以下、これをコードするＤＮＡを「変異型ｓｅｒＡ」ともいう）として具体的には、配列表配列番号１２に記載されるアミノ酸配列、または同配列に１または複数のアミノ酸置換、付加または欠失が生じたアミノ酸

配列を有するＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼにおいて、配列番号１２に記載されるアミノ酸配列の３２５番目のグルタミン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換したことを特徴とするＤ－３－ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼが挙げられる。同他のアミノ酸残基として最も好ましいものはリジン残基である。

【００２２】

コリネ型細菌からｓｅｒＡ遺伝子を含むＤＮＡ断片を単離するには、例えば、斎藤、三浦の方法（Ｈ．Ｓａｉｔｏ ａｎｄ Ｋ．Ｍｉｕｒａ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，７２，６１９，（１９６３））等により染色体ＤＮＡを調製し、ポリメラーゼチェインリアクション法（ＰＣＲ：ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ；Ｗｈｉｔｅ，Ｔ．Ｊ．ｅｔ ａｌ ；Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．５，１８５（１９８９）参照）により、ｓｅｒＡ遺伝子を増幅することによって行うことができる。例えば、配列表配列番号１１のＯＲＦ（１７２～１７０５）を含むＤＮＡ断片を増幅できるよう、配列表の１番目の塩基からＡＴＧ直前の塩基の範囲から任意に２０～３０塩基を選択してプライマーの一つとする。また、終始コドン直下流の塩基から配列表の最後の塩基に至る範囲から任意に２０～３０塩基を選択してプライマーのもう一つとする。

【００２３】

上記のようにして３－ＰＧＤＨ野生株からｓｅｒＡを単離すれば野生型ｓｅｒＡが得られ、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除された３－ＰＧＤＨを保持する変異株（３－ＰＧＤＨ変異株）からｓｅｒＡを単離すれば変異型ｓｅｒＡが得られる。具体的には、野生型ｓｅｒＡは配列表の配列番号１１に記載される配列を有し、変異型ｓｅｒＡは配列番号１３に記載される配列を有する。

【００２４】

ＰＣＲ法により増幅されたｓｅｒＡを、エシェリヒア コリ及び／又はコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターＤＮＡに接続して組み換えＤＮＡを調製し、これをエシェリヒア コリ細胞に導入しておくと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自律複製可能なものが好ましく、例えば pＵＣ１９、ｐＵＣ１８、ｐＢＲ３２２、ｐＨＳＧ２９９、ｐＨＳＧ３９９、ｐＨＳＧ３９８、ＲＳＦ１０１０等が挙げられる。

【００２５】

組み換えＤＮＡの調製はトランスポゾン（ＷＯ０２／０２６２７国際公開パンフレット、ＷＯ９３／１８１５１国際公開パンフレット、欧州特許公開０４４５３８５号、特開平６－４６８６７号、Ｖｅｒｔｅｓ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１１，７３９－７４６（１９９４）、Ｂｏｎａｍｙ，Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１４，５７１－５８１（１９９４）、Ｖｅｒｔｅｓ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，２４５，３９７－４０５（１９９４）、Ｊａｇａｒ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ，１２６，１－６（１９９５）、特開平７－１０７９７６号、特開平７－３２７６８０号等）やファージベクター、染色体組み換え（Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙｐｒｅｓｓ（１９７２）；Ｍａｔｓｕｙａｍａ，Ｓ．ａｎｄ Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ，Ｓ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６２，１１９６（１９８５））等を利用することによっても行うことができる。

【００２６】

また、これらのベクターにコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつＤＮＡ断片を挿入すると、エシェリヒア コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。なお、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をかっこ内に示した。

ｐＨＣ４　　エシェリヒア　コリＡＪ１２６１７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－３５３２）
ｐＡＪ６５５　エシェリヒア　コリＡＪ１１８８２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３６）
コリネバクテリウム　グルタミカムＳＲ８２０１（ＡＴＣＣ３９１３５）
ｐＡＪ１８４４　エシェリヒア　コリＡＪ１１８８３（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３７）
コリネバクテリウム　グルタミカムＳＲ８２０２（ＡＴＣＣ３９１３６）
ｐＡＪ６１１　エシェリヒア　コリＡＪ１１８８４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１３８）
ｐＡＪ３１４８　コリネバクテリウム　グルタミカムＳＲ８２０３（ＡＴＣＣ３９１３７）
ｐＡＪ４４０　バチルス　ズブチリスＡＪ１１９０１（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１４０）

【００２７】

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びＳＤＳを用いて溶菌し、３００００×ｇで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド－エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【００２８】

エシェリヒア　コリにプラスミドを導入して形質転換するには　Ｄ．Ｍ．Ｍｏｒｒｉｓｏｎの方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，　６８，３２６，　１９７９）あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してＤＮＡの透過性を増す方法（Ｍａｎｄｅｌ，Ｍ．　ａｎｄ　Ｈｉｇａ，Ａ．，Ｊ．Ｍｏｌ．，Ｂｉｏｌ．，５３，１５９（１９７０））等により行うことができる。

【００２９】

コリネ型細菌にプラスミドを導入して形質転換するには、電気パルス法（杉本ら、特開平２－２０７７９１号　公報）によって行うことができる。

【００３０】

上記ＤＮＡを導入するコリネ型細菌の例としては、例えば次のような野生株が挙げられる。

コリネバクテリウム　アセトアシドフィルム	ＡＴＣＣ１３８７０
コリネバクテリウム　アセトグルタミカム	ＡＴＣＣ１５８０６
コリネバクテリウム　カルナエ	ＡＴＣＣ１５９９１
コリネバクテリウム　グルタミカム	ＡＴＣＣ１３０３２
（ブレビバクテリウム　ディバリカタム）	ＡＴＣＣ１４０２０
（ブレビバクテリウム　ラクトファーメンタム）	ＡＴＣＣ１３８６９
（コリネバクテリウム　リリウム）	ＡＴＣＣ１５９９０
（ブレビバクテリウム　フラバム）	ＡＴＣＣ１４０６７
コリネバクテリウム　メラセコーラ	ＡＴＣＣ１７９６５
ブレビバクテリウム　サッカロリティクム	ＡＴＣＣ１４０６６
ブレビバクテリウム　インマリオフィルム	ＡＴＣＣ１４０６８
ブレビバクテリウム　ロゼウム	ＡＴＣＣ１３８２５
ブレビバクテリウム　チオゲニタリス	ＡＴＣＣ１９２４０
ミクロバクテリウム　アンモニアフィラム	ＡＴＣＣ１５３５４
コリネバクテリウム　サーモアミノゲネス	ＡＪ１２３４０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１５３９）

【００３１】

上記のようなコリネ型細菌に、変異型ｓｅｒＡを含む組換えＤＮＡを導入して得られる形質転換株は、Ｌ－セリンによるフィードバック阻害が解除された３－ＰＧＤＨを産生する。また、同形質転換株は、アザセリンまたはβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに対する耐性を有する。

【００３２】

本発明の菌株を用いてＬ－セリンを生産するには次のような方法が用いられる。使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、及び必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有

機微量栄養素を適宜含有する通常の液体培地が使用される。炭素源としては、グルコース、シュークロース、フラクトース、ガラクトース等の糖類、これら糖類を含有する澱粉糖化液、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ハイテストモラセス、さらには酢酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類、グリセリン等も使用される。窒素源としてはアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、コーンスティープリカー、酵母または酵母エキス、ペプトン等のペプチド類等が使用される。無機イオンとしてはリン酸イオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン等が適宜添加される。また本発明の微生物にアミノ酸等の要求性物質がある場合には、その要求物質を添加しなければならない。

【００３３】

微生物の培養は通常ｐＨ５～８、温度２５～４０℃の範囲で好気的条件下で行われる。培養液のｐＨは、無機あるいは有機の酸、アルカリ性物質、さらには尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガスなどによって上記範囲内のあらかじめ定められた値に調節する。

【００３４】

発酵液からＬ－セリンを採取するには、例えば菌体を分離除去し、イオン交換樹脂処理あるいは濃縮冷却晶析法、膜分離法、その他公知の方法を組み合わせることにより行われる。不純物を除くためには常法の活性炭吸着法及び再結晶法を用いて精製してもよい。

【００３５】

【実施例】

【００３６】

（実施例１）新規Ｌ－セリン生産菌ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２４およびＡＪ１３３２７の構築

ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２４およびＡＪ１３３２７は野生型株ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ　１４０６７から得られたＬ－セリンの分解能が欠失したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７から構築された。

【００３７】

変異株を得るためには、ブイヨン培地（魚肉エキス１ｇ、ポリペプトン１ｇ、酵母エキス０．５ｇ、食塩０．５ｇを水１Ｌに含みｐＨ７．０に調整した培地）で一昼夜増殖させた菌体を、１００ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）に懸濁し（１ｍｌ当たり10^{9}－10^{10}個の菌体を含む）、これに２００μｇ／ｍｌ濃度となるようにＮＧ（Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン）を加えて３０℃で３０分間保持した。このようにしてＮＧ処理した菌体を同緩衝液で十分洗浄した。

【００３８】

ＮＧ処理した菌体からＬ－セリン分解能のない菌株を選択するためには、洗浄したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ　１４０６７のＮＧ菌体をブイヨン寒天培地に塗布し、３０℃、２４時間培養してコロニーを形成させた。次にブイヨン寒天培地のコロニーを原版にして、最少培地と選択用最少培地にレプリカを行い、最少培地で生育し選択用最少培地で生育しない菌株を探した。最少培地は純水１Ｌ当たりグルコース２０ｇ、硫酸アンモニウム１ｇ、リン酸２水素カリウム１ｇ、尿素２．５ｇ、硫酸マグネシウム・７水和物０．４ｇ、硫酸鉄（ＩＩ）・７水和物０．０１ｇ、硫酸マンガン・４～５水和物０．０１ｇ、ビオチン５０μｇ、塩酸チアミン２００μｇ、ニコチン酸アミド２００μｇ、寒天２．０ｇを含有する培地で、選択用最少培地は、純粋１Ｌ当たり硫酸アンモニウム１ｇ、リン酸２水素カリウム１ｇ、尿素２．５ｇ、硫酸マグネシウム・７水和物０．４ｇ、硫酸鉄（ＩＩ）・７水和物０．０１ｇ、硫酸マンガン・４～５水和物０．０１ｇ、ビオチン５０μｇ、塩酸チアミン２００μｇ、ニコチン酸アミド２００μｇ、Ｌ－セリン０．５ｇ、寒天２．０ｇを含有する培地であった。このような方法で得られた変異株の中には、Ｌ－セリンの分解能がない菌株が多く見いだされ、その１株としてブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７を取得した。

【００３９】

ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７を親株にして、ＮＧ処理した菌株からアザセリン耐性株を選択するため、洗浄したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７のＮＧ処理菌体を選択用最少培地に接種した。選択用最少培地は純水１Ｌ当たりグルコース２０ｇ、硫酸アンモニウム１ｇ、リン酸２水素カリウム１ｇ、尿素２．５ｇ、硫酸マグネシウム・７水和物０．４ｇ、硫酸鉄（ＩＩ）・７水和物０．０１ｇ、硫酸マンガン・４～５水和物０．０１ｇ、ビオチン５０μｇ、塩酸チアミン２００μｇ、ニコチン酸アミド２００μｇ、アザセリン２５０ｍｇを含有する培地である。ＮＧ処理変異株を同培地上で３０℃で５～１０日間培養した。このようにして得られた菌液をブイヨン寒天培地に塗布し、３０℃、２４時間培養しコロニーを形成させた。コロニーを形成する株の中からアザセリンに耐性な菌株を取得した。得られた変異株の中には、高収率で著量のＬ－セリンを蓄積する菌株が多く見いだされ、それらよりブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２４およびＡＪ１３３２７の２株を取得した。本菌株らは０．２５ｇ／Ｌのアザセリン存在下で生育可能であることを確認した。

【００４０】

（実施例２）新規Ｌ－セリン生産菌ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２５の構築

ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２５は野生型株ブレビバクテリウムフラバム　ＡＴＣＣ　１４０６７から得られたＬ－セリンの分解能が欠失したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７から構築された。

【００４１】

ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７を親株にして、ＮＧ処理した菌株からβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン耐性株を選択するため、洗浄したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７のＮＧ処理菌体を選択用最少培地に接種した。選択用最少培地は純水１Ｌ当たりグルコース２０ｇ、硫酸アンモニウム１ｇ、リン酸２水素カリウム１ｇ、尿素２．５ｇ、硫酸マグネシウム・７水和物０．４ｇ、硫酸鉄（ＩＩ）・７水和物０．０１ｇ、硫酸マンガン・４～５水和物０．０１ｇ、ビオチン５０μｇ、塩酸チアミン２００μｇ、ニコチン酸アミド２００μｇ、β－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン２５０ｍｇを含有する培地である。ＮＧ処理変異株を同培地上で３０℃で５～１０日間培養した。このようにして得られた菌液をブイヨン寒天培地に塗布し、３０℃、２４時間培養しコロニーを形成させた。コロニーを形成する株の中からβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニンに耐性な菌株を取得した。得られた変異株の中には、高収率で著量のＬ－セリンを蓄積する菌株が多く見いだされ、その１株としてブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２５を取得した。本菌株は０．２５ｇ／Ｌのβ－（２－チエニル）－ＤＬ－アラニン存在下で生育可能であることを確認した。

【００４２】

（実施例３）新規Ｌ－セリン生産菌ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２４、ＡＪ１３３２５およびＡＪ１３３２７によるＬ－セリンの生産

ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２４、ＡＪ１３３２５およびＡＪ１３３２７をブイヨン寒天培地で３０℃、２４時間培養し、次いで表１の組成の発酵培地２０ｍｌを含有する５００ｍｌ振とうフラスコに白金耳で接種した。対照として親株であるブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７およびＡＪ１３３７７を同様に接種した。培地は水酸化カリウムでｐＨ７．０に調整後１１５℃、１５分間オートクレーブ殺菌した。殺菌冷却後、１８０℃、３時間乾熱殺菌した炭酸カルシウム５ｇ／Ｌ添加した。

【００４３】

【表１】

表１

成　分	１Ｌ当たりの含量
グルコース	１１０．０　ｇ
リン酸２水素カリウム	０．４　ｇ
硫酸マグネシウム・７水和物	０．４　ｇ
硫酸鉄（II）・７水和物	０．０１ｇ
硫酸マンガン・４～５水和物	０．０１ｇ
硫酸アンモニウム	２５．０　ｇ
塩酸チアミン	１００　μｇ
ビオチン	１００　μｇ
大豆タンパク質塩酸加水分解物（「味液」（登録商標））	４０　ｍｌ
ｐＨ	７．０

【００４４】
生産物であるＬ－セリンの測定は、高速液体クロマトグラフィー（日立Ｌ－８５００アミノ酸分析装置）によって行った。その結果、ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２４、ＡＪ１３３２５およびＡＪ１３３２７はＬ－セリンをそれぞれ１５．２ｇ／Ｌ、１４．３ｇ／Ｌ、１５．４ｇ／Ｌ　培地中に蓄積した。一方、対照として培養したブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７およびＡＪ１３３７７のＬ－セリン蓄積量はそれぞれ０ｇ／Ｌ、５．０ｇ／Ｌであった。
【００４５】
ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２４の培養液は遠心分離後、定法によりカチオン交換樹脂による脱塩処理を行い、その後カチオン交換樹脂及びアニオン交換樹脂によるクロマト分離を用いて副生物を除き、晶析処理による精製を行い、９９％以上の純度のＬ－セリン結晶をブロスからの収率５５％で得た。
【００４６】
（実施例４）３－ＰＧＤＨ活性の測定
ブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３２４、ＡＪ１３３２５およびＡＪ１３３２７をブイヨン寒天培地で３０℃、２４時間培養し、次いで表２の組成の接種用培地５０ｍｌを含有する５００ｍｌ振とうフラスコの中に白金耳で接種した。対照として親株であるブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７、ＡＪ１３３７７を同様に接種した。接種用培地は水酸化ナトリウムでｐＨ５．５に調整し、１１５℃、１５分間オートクレーブ殺菌した後使用した。
【００４７】
【表２】

表２

成　分	１Ｌ当たりの含量
グルコース	３０．０　ｇ
リン酸二水素カリウム	１．０　ｇ
硫酸マグネシウム・７水和物	０．４　ｇ
硫酸第一鉄・７水和物	０．０１ｇ
硫酸マンガン４～５水和物	０．０１ｇ
硫酸アンモニウム	３．０　ｇ
大豆タンパク質塩酸加水分解物（「味液」（登録商標））	３．０ｍｌ
塩酸チアミン	２００　μｇ
ビオチン	５０　μｇ
尿素	３．０　ｇ
酵母エキス	２．０　ｇ
ｐＨ	５．５

【００４８】
各菌株を培養した培養液から菌体を回収した後、生理食塩水で２度洗浄し、２ｍＭのジチオスレイトールを含む５０ｍＭリン酸ナトリウムバッファー　ｐＨ７．０で懸濁した。氷冷後、超音波破砕機で菌体を破砕し、破砕液を超遠心分離機にかけた。超遠心は４５，０００ｒｐｍで１時間行い、粗酵素液を得た。
【００４９】
３－ＰＧＤＨの酵素活性測定はＳａｌａｃｈ　Ｈ．Ｊ．らの方法（Ｍｅｔｈｏｄ　ｉｎ　ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　ｖ９，２１６－２２０，１９６６）に従った。
【００５０】
あらかじめ２５℃に暖めておいた０．０１５Ｍ　ＮＡＤ　０．４ｍｌ、０．２５Ｍ　ＥＤＴＡ（ｐＨ９　ＮａＯＨ）０．１２ｍｌ、０．０５Ｍ　Ｇｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ（ｐＨ６　ＫＯＨ）０．１ｍｌ、１Ｍ　Ｈｙｄｒａｄｉｎｅ（ｐＨ９Ａｃｅｔａｔｅ）０．５ｍｌ、１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ９　ＨＣｌ）０．６ｍｌ、適当な濃度のＬ－セリン（０～４０ｍＭ）を加え、水を加えて２．３ｍｌに調整し、その後粗酵素液を０．２ｍｌ加え、５分間保温し、０．１Ｍ　３－ＰＧＡ（３－ホスホグリセリン酸二ナトリウム塩、ｐＨ７　ＮａＯＨ）を０．５ｍｌ加え、撹拌後３４０ｎｍの吸光度を３０秒間測定した。反応は２５℃で行った。
【００５１】
活性の測定には日立Ｕ－２０００Ａ　Ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒを使用した。
【００５２】
図１に測定結果を示す。野生株であるＡＴＣＣ１４０６７に比べＡＪ１３３７７はＬ－セリンに対する感受性が緩和されていた。ＡＪ１３３２４では更に感受性が緩和されており

、ＡＪ１３３２５もほぼ同等であった。ＡＪ１３３２７では感受性が大幅に緩和され８０ｍＭのＬ－セリン存在下でも阻害は完全に解除されていた。

【００５３】

Ｌ－セリンによる３－ＰＧＤＨの阻害の解除についてはエシェリヒア　コリの例（トサ（Ｔｏｓａ）及びピッツア（Ｐｉｚｅｒ）、Ｊ．　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１０６：９７２～９８２（１９７１）、又は特表平６－５１０９１１）があるが、これほど高濃度のＬ－セリンの存在下で阻害が完全解除されている例はない。

【００５４】

（実施例５）コリネ型細菌由来の野生型及び変異型ｓｅｒＡのクローニング

実施例４で示されたように、ＡＪ１３３２７ではＬ－セリンによるフィードバック阻害が完全に解除されていた。そこで、ＡＴＣＣ１４０６７由来の野生型、及びＡＪ１３３２７由来の変異型３－ＰＧＤＨをコードするｓｅｒＡ遺伝子をクローニングして、変異点を明らかにし、また３－ＰＧＤＨの増幅効果を確認することとした。

【００５５】

ブレビバクテリウム　フラバムの染色体よりＰＣＲ法を用いてｓｅｒＡを増幅するためには対応するプライマーを作製しなければならない。ブレビバクテリウムのｓｅｒＡ遺伝子のクローニング及び塩基配列については報告されていないため、コリネバクテリウム由来のｓｅｒＡの配列を利用することとした。コリネバクテリウム由来のｓｅｒＡ断片がクローニングされている菌株コリネバクテリウム　グルタミカム　Ｋ８２（ＦＥＲＭ　ＢＰ－２４４４、特開平３－７５９１号公報参照）からＷｉｚａｒｄ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を使用してプラスミド　ｐＤＴＳ９９０１を抽出し、制限酵素ＢａｍＨＩ（宝酒造（株）製）でｓｅｒＡを含む約１．４ｋｂのＤＮＡ断片を切り出した。

【００５６】

遺伝子断片のクローン化用ベクターとしては、新規に構築したコリネ型細菌用クローニングベクターｐＶＫ７を用いた。ｐＶＫ７は、以下のようにして、エシェリヒア　コリ用ベクターであるｐＨＳＧ２９９（Ｋｍｒ；Ｔａｋｅｓｈｉｔａ，　Ｓ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，　６１，　６３－７４，　（１９８７）、特開平１０－２１５８８３号参照）にブレビバクテリウム　ラクトファーメンタムのクリプティックプラスミドであるｐＡＭ３３０を結合することによって構築した。ｐＨＳＧ２９９を一箇所切断酵素であるＡｖａＩＩ（宝酒造（株）製）にて切断し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼにて平滑末端化したのち、ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造（株）製）にて切断し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼにて平滑末端化したｐＡＭ３３０と接続した。ｐＨＳＧ２９９に対するｐＡＭ３３０の挿入方向により、生成した２種類のプラスミドをｐＶＫ６、ｐＶＫ７と命名し、ｐＶＫ７を以下の実験に用いた。ｐＶＫ７は、エシェリヒア　コリ及びブレビバクテリウム　ラクトファーメンタムの細胞中で自律複製可能であり、かつ、ｐＨＳＧ２９９由来のマルチプルクローニングサイトとｌａｃＺ’を保持している。ｐＶＫ６及びｐＶＫ７の構築の過程を図２に示す。

【００５７】

構築したシャトルベクターｐＶＫ７にｓｅｒＡを含む約１．４ｋｂのＤＮＡ断片を接続した。ｐＤＴＳ９９０１を制限酵素ＢａｍＨＩ（宝酒造（株）製）にて切断し、同じく制限酵素ＢａｍＨＩにて切断したｐＶＫ７と接続した。ＤＮＡの接続はＤＮＡライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行った。

【００５８】

シークエンス反応にはＰＣＲ　サーマルサイクラー　ＭＰ型（宝酒造（株）製）を用い、Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　ＳｅｑｕｅｎｃｉｎｇＦＳ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＰＥＲＫＩＮ　ＥＬＭＥＲ社製）を使用した。ＤＮＡプライマーとしてはＭ１３（－２１）、ＲＶプライマー（宝酒造（株）製）を使用した。得られた配列を配列表の配列番号１に示す。この配列によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号２に示す。

【００５９】

決定した塩基配列に基づいてプライマーを合成し、ブレビバクテリウム　フラバム変異株ＡＪ１３３２７の染色体ＤＮＡを鋳型にしてＰＣＲ法によりｓｅｒＡを増幅した。ここで遺伝子増幅に用いるために合成したＮ末側のＤＮＡプライマーの配列を配列表の配列番号３に、Ｃ末側を配列番号４に示す。

【００６０】

ブレビバクテリウム　フラバムの染色体ＤＮＡの調製にはＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｂａｃｔｅｒｉａｌ）（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｃｏｒｐ．製）を使用し、調製方法は添付のプロトコールに従った。

【００６１】

ＰＣＲ反応にはＰＣＲ　サーマルサイクラー　ＭＰ型（宝酒造（株）製）を用い、ＴａＫａＲａ　Ｔａｑ（宝酒造（株）製）を使用した。

【００６２】

ＰＣＲ産物はＯｒｉｇｉｎａｌ　ＴＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を使用して直接プラスミドｐＣＲ２．１ベクターにライゲーションして、ＩＮＶαＦ’のＣｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｃｅｌｌを用いて形質転換を行い、Ｘ－Ｇａｌ（５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－ガラクトシド）４０μｇ／ｍｌおよびカナマイシン２５μｇ／ｍｌを含むＬ培地（バクトトリプトン１０ｇ／Ｌ、バクトイーストエキストラクト５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌ１５ｇ／Ｌ、寒天１５ｇ／Ｌ）に塗布し、一晩培養後、出現した白色のコロニーをつり上げ、単コロニー分離して、形質転換株を得た。

【００６３】

形質転換株からプラスミドを抽出し、ＰＣＲ法によりｓｅｒＡ断片の挿入が確認できたものについては制限酵素ＥｃｏＲＩ処理を行いシャトルベクター　ｐＶＫ７につなぎかえた。これの塩基配列を決定したところＣ末端側には完全長の配列が含まれていないと考えられた。得られた配列は配列表の配列番号１３の、５’側はさらに２７７塩基上流、３’側は１１３４番目の塩基までにあたる。

【００６４】

ｓｅｒＡ遺伝子全長を含む断片を取得するため、ＴａＫａＲａ　ＬＡ　ＰＣＲ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（宝酒造（株）製）を使用し、添付のプロトコールに従ってブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３２７の染色体ＤＮＡから欠損部分のクローニングを行った。

【００６５】

まず、調製した染色体ＤＮＡを各種制限酵素で完全消化し、ライゲーション反応によりこれらにそれぞれ対応する制限酵素サイトを持つカセットを連結した。カセットプライマー（Ｃ１）（配列表配列番号５）と、ＤＮＡ上の既知領域に相補的なプライマー（Ｓ１）（配列表配列番号６）を用いて１回目のＰＣＲを行った。反応液の一部を用いて、内側のプライマーＣ２（配列表配列番号７）とＳ２（配列表配列番号８）で２回目のＰＣＲを行い、目的のＤＮＡのみを増幅させた。

【００６６】

制限酵素としてＥｃｏＲＩ（宝酒造（株）製）を使用した際に目的ＤＮＡの増幅が確認され、このＰＣＲ産物の塩基配列を直接決定した。得られた塩基配列に基づきＣ末側をコードするプライマーを作製し、野生型としてブレビバクテリウム　フラバム　ＡＴＣＣ１４０６７、変異型としてＡＪ１３３２７からｓｅｒＡ全長を含む断片の取得を行った。ここで使用したＮ末側のＤＮＡプライマーの配列を配列表の配列番号９に、作製したＣ末側のＤＮＡプライマーの配列を配列表の配列番号１０に示す。

【００６７】

得られた野生型ｓｅｒＡ及び変異型ｓｅｒＡ全長を含む遺伝子断片をＯｒｉｇｉｎａｌＴＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）を用いて、ＥｃｏＲＩ切断したシャトルベクターｐＶＫ７に接続した。各遺伝子断片を搭載したプラスミドを各々作製し、塩基配列の決定を行った。野生型の配列を配列表の配列番号１１に、変異型の配列を

配列表の配列番号１３に示す。これらの配列によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号１２及び１４にそれぞれ示す。決定したこれらの塩基配列を比較したところ変異型ｓｅｒＡでは１０８７番目のＧがＡに変異しており、この結果アミノ酸配列では３２５番目のグルタミン酸がリジンに変化していることが確認された。

【００６８】

（実施例６）３－ＰＧＤＨ遺伝子を含むプラスミドのブレビバクテリウム　フラバムへの導入

野生型ｓｅｒＡ又は変異型ｓｅｒＡを搭載したプラスミドをブレビバクテリウム　フラバム　ＡＪ１３３７７にそれぞれ導入した。プラスミドの導入の方法は、電気パルス法（杉本ら、特開平２－２０７７９１号公報）によった。形質転換体の選択は２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含む完全培地にて行った。

【００６９】

（実施例７）形質転換体によるＬ－セリンの生産

野生型ｓｅｒＡ又は変異型ｓｅｒＡ全長を含む遺伝子断片を搭載したプラスミドが導入された形質転換体をそれぞれ実施例３に従い５００ｍｌ振とうフラスコを用いて培養し、生産物であるＬ－セリンの測定を行った。対照として宿主であるＡＪ１３３７７株についても同様に培養を行った。

野生型ｓｅｒＡを導入した形質転換体ではＬ－セリン生産能に影響は認められなかったが、変異型ｓｅｒＡを導入した形質転換体ではＬ－セリン生産能の向上が確認された（表３）。

【表３】

菌　株	増幅遺伝子	Ｌ－セリン蓄積量（ｇ／Ｌ）
	－	５．０
ＡＪ１３３７７	serA	５．０
	serA*	１２．０

serA*：変異型serA遺伝子

【００７０】

ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３７７は、平成９年１０月１５日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東１丁目１番３号）に寄託され、受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１６４７１が付与され、平成１０年１１月２０日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６５７６が付与されている。

また、変異型ｓｅｒＡを含むプラスミドをブレビバクテリウム　フラバムＡＴＣＣ１４０６７に保持させた。同プラスミド保持株は、ブレビバクテリウム　フラバムＡＪ１３３７８と命名されて、平成９年１０月１５日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東１丁目１番３号）に寄託されており、受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１６４７２が付与され、平成１０年１１月２０日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－６５７７が付与されている。

【発明の効果】

本発明により、糖からＬ－セリンを生成するコリネ型細菌が提供される。同コリネ型細菌は、工業的に有利なＬ－セリンの製造法に利用することができる。

【００７１】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc)

〈120〉 発酵法によるＬ－セリンの製造法

〈130〉 P-6039

〈141〉 1998-12-11

〈150〉 JP 10-3751

〈151〉 1998-01-12

〈160〉 14

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

【００７２】

〈210〉 1

〈211〉 1432

〈212〉 DNA

〈213〉 Corynebacterium glutamicum

〈220〉

〈221〉 CDS

〈222〉 (398)..(1432)

〈400〉 1

```
ggatccggac acacgtgaca aaattgtaga aaattggatg attttgtcac gcctgtctgg 60
tttagctctg gttcgggacg ggcgtggaat ggaggtagcg caccgagacc ttgacccgcg 120
gcccgacaag ccaaaagtcc ccaaaacaaa cccacctcgc cggagacgtg aataaaattc 180
gcagctcatt ccatcagcgt aaacgcagct ttttgcatgg tgagacacct ttgggggtaa 240
atctcacagc atgaatctct gggttagatg actttctggg tgggggaggg tttagaatgt 300
ttctagtcgc acgccaaaac ccggcgtgga cacgtctgca gccgacgcgg tcgtgcctgt 360
tgtaggcgga cattcctagt ttttccagga gtaactt gtg agc cag aat ggc cgt  415
                                    Val Ser Gln Asn Gly Arg
                                      1               5
ccg gta gtc ctc atc gcc gat aag ctt gcg cag tcc act gtt gac gcg   463
Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala Gln Ser Thr Val Asp Ala
            10                  15                  20
ctt gga gat gca gta gaa gtc cgt tgg gtt gac gga cct aac cgc cca   511
Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val Asp Gly Pro Asn Arg Pro
        25                  30                  35
gaa ctg ctt gat gca gtt aag gaa gcg gac gca ctg ctc gtg cgt tct   559
Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp Ala Leu Leu Val Arg Ser
    40                  45                  50
gct acc act gtc gat gct gaa gtc atc gcc gct gcc cct aac ttg aag   607
Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala Ala Ala Pro Asn Leu Lys
55                  60                  65                  70
```

atc gtc ggt cgt gcc ggc gtg ggc ttg gac aac gtt gac atc cct gct 655
Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp Asn Val Asp Ile Pro Ala
75 80 85

gcc act gaa gct ggc gtc atg gtt gct aac gca ccg acc tct aac att 703
Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn Ala Pro Thr Ser Asn Ile
90 95 100

cac tct gct tgt gag cac gca att tct ttg ctg ctg tct act gct cgc 751
His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu Leu Leu Ser Thr Ala Arg
105 110 115

cag atc cct gct gct gat gcg acg ctg cgt gag ggc gag tgg aag cgg 799
Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg Glu Gly Glu Trp Lys Arg
120 125 130

tct tct ttc aac ggt gtg gaa att ttc gga aaa act gtc ggt atc gtc 847
Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly Lys Thr Val Gly Ile Val
135 140 145 150

ggt ttt ggc cac att ggt cag ttg ttt gct cag cgt ctt gct gcg ttt 895
Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala Gln Arg Leu Ala Ala Phe
155 160 165

gag acc acc att gtt gct tac gat cct tac gcc aac cct gct cgt gca 943
Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr Ala Asn Pro Ala Arg Ala
170 175 180

gct cag ctg aac gtt gag ttg gtt gag ttg gat gag ctg atg agc cgt 991
Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu Asp Glu Leu Met Ser Arg
185 190 195

tct gac ttt gtc acc att cac ctt cct aag acc aag gaa act gct ggc 1039
Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys Thr Lys Glu Thr Ala Gly
200 205 210

atg ttt gat gcg cag ctc ctt gct aag tcc aag aag ggc cag atc atc 1087
Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ile Ile

```
215                 220                 225                 230
atc aac gct gct cgt ggt ggc ctt gtt gat gag cag gct ttg gct gat   1135
Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp Glu Gln Ala Leu Ala Asp
                235                 240                 245
gcg att gag tcc ggt cac att cgt ggc gct ggt ttc gat gtg tac tcc   1183
Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala Gly Phe Asp Val Tyr Ser
            250                 255                 260
acc gag cct tgc act gat tct cct ttg ttc aag ttg cct cag gtt gtt   1231
Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe Lys Leu Pro Gln Val Val
        265                 270                 275
gtg act cct cac ttg ggt gct tct act gaa gag gct cag gat cgt gcg   1279
Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu Glu Ala Gln Asp Arg Ala
    280                 285                 290
ggt act gac gtt gct gat tct gtg ctc aag gcg ctg gct ggc gag ttc   1327
Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys Ala Leu Ala Gly Glu Phe
295                 300                 305                 310
gtg gcg gat gct gtg aac gtt tcc ggt ggt cgc gtg ggc gaa gag gtt   1375
Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly Arg Val Gly Glu Glu Val
                315                 320                 325
gct gtg tgg atg gat ctg gct cgc aag ctt ggt ctt ctt gct ggc aag   1423
Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu Gly Leu Leu Ala Gly Lys
            330                 335                 340
ctt gtc gac                                                      1432
Leu Val Asp
        345
```

【００７３】

〈210〉 2
〈211〉 345
〈212〉 PRT
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉 2

```
Val Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1               5                  10                  15
Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
            20                  25                  30
Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
        35                  40                  45
Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
    50                  55                  60
Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65                  70                  75                  80
Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
                85                  90                  95
Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
            100                 105                 110
Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
        115                 120                 125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
    130                 135                 140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145                 150                 155                 160
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
                165                 170                 175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
            180                 185                 190
```

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320
Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335
Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp
340 345

【００７４】

〈210〉 3

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 3

ggacacacgt gacaaaattg tag 23

【００７５】

〈210〉 4

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 4

gccagcaaga agaccaagct tgc 23

【００７６】

〈210〉 5

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 5

gtacatattg tcgttagaac gcgtaatacg actca 35

【００７７】

〈210〉 6

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 6

tcatcaacgc tgctcgtggt ggc 23

【００７８】

〈210〉 7

〈211〉 35

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 7

cgttagaacg cgtaatacga ctcactatag ggaga 35

【００７９】

〈210〉 8

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 8

gacgttgctg attctgtgct caa 23

【００８０】

〈210〉 9

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 9

gggagggttt agaatgtttc tag 23

【００８１】

〈210〉 10

〈211〉 23

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:Primer

〈400〉 10

ggttcaagca aatggatctc taa 23

【００８２】

〈210〉 11
〈211〉 1730
〈212〉 DNA
〈213〉 Brevibacterium flavum
〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (115)..(1704)
〈400〉 11

```
gggagggttt agaatgtttc tagtcgcacg ccaaaacccg gcgtggacac gtctgcagcc 60
gacgcggtcg tgcctgttgt aggcggacat tcctagtttt tccaggagta actt gtg   117
                                                            Val
                                                              1
agc cag aat ggc cgt ccg gta gtc ctc atc gcc gat aag ctt gcg cag   165
Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala Gln
             5                  10                  15
tcc act gtt gac gcg ctt gga gat gca gta gaa gtc cgt tgg gtt gac   213
Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val Asp
        20                  25                  30
gga cct aac cgc cca gaa ctg ctt gat aca gtt aag gaa gcg gac gca   261
Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Thr Val Lys Glu Ala Asp Ala
    35                  40                  45
ctg ctc gtg cgt tct gct acc act gtc gat gct gaa gtc atc gcc gct   309
Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala Ala
50                  55                  60                  65
gcc cct aac ttg aag atc gtc ggt cgt gcc ggc gtg ggc ttg gac aac   357
Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp Asn
                70                  75                  80
gtt gac atc cct gct gcc act gaa gct ggc gtc atg gtt gct aac gca   405
Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn Ala
```

```
            85                  90                  95
ccg acc tct aac att cac tct gct tgt gag cac gca att tct ttg ctg   453
Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu Leu
        100                 105                 110
ctg tct act gct cgc cag atc cct gct gct gat gcg acg ctg cgt gag   501
Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg Glu
    115                 120                 125
ggc gag tgg aag cgg tct tct ttc aac ggt gtg gaa att ttc gga aaa   549
Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly Lys
130                 135                 140                 145
act gtc ggt atc gtc ggt ttt ggc cac att ggt cag ttg ttt gct cag   597
Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala Gln
                150                 155                 160
cgt ctt gct gcg ttt gag acc acc att gtt gct tac gat cct tac gct   645
Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr Ala
            165                 170                 175
aac cct gct cgt gcg gct cag ctg aac gtt gag ttg gtt gag ttg gat   693
Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu Asp
        180                 185                 190
gag ctg atg agc cgt tct gac ttt gtc acc att cac ctt cct aag acc   741
Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys Thr
    195                 200                 205
aag gaa act gct ggc atg ttt gat gcg cag ctc ctt gct aag tcc aag   789
Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser Lys
210                 215                 220                 225
aag ggc cag atc atc atc aac gct gct cgt ggt ggc ctt gtt gat gaa   837
Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp Glu
                230                 235                 240
cag gct ttg gct gat gcg att gag tcc ggt cac att cgt ggc gct ggt   885
```

```
Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala Gly
            245                 250                 255
ttc gat gtg tac tcc acc gag cct tgc act gat tct cct ttg ttc aag   933
Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe Lys
        260                 265                 270
ttg cct cag gtt gtt gtg act cct cac ttg ggt gct tct act gaa gag   981
Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu Glu
    275                 280                 285
gct cag gat cgt gcg ggt act gac gtt gct gat tct gtg ctc aag gcg   1029
Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys Ala
290                 295                 300                 305
ctg gct ggc gag ttc gtg gcg gat gct gtg aac gtt tcc ggt ggt cgc   1077
Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly Arg
                310                 315                 320
gtg ggc gaa gag gtt gct gtg tgg atg gat ctg gct cgc aag ctt ggt   1125
Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu Gly
            325                 330                 335
ctt ctt gct ggc aag ctt gtc gac gcc gcc cca gtc tcc att gag gtt   1173
Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu Val
        340                 345                 350
gag gct cga ggc gag ctt tct tcc gag cag gtc gat gca ctt ggt ttg   1221
Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly Leu
    355                 360                 365
tcc gct gtt cgt ggt ttg ttc tcc gga att atc gaa gag tcc gtt act   1269
Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val Thr
370                 375                 380                 385
ttc gtc aac gct cct cgc att gct gaa gag cgt ggc ctg gac atc tcc   1317
Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile Ser
                390                 395                 400
```

```
gtg aag acc aac tct gag tct gtt act cac cgt tcc gtc ctg cag gtc   1365
Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln Val
            405                 410                 415
aag gtc att act ggc agc ggc gcg agc gca act gtt gtt ggt gcc ctg   1413
Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala Leu
        420                 425                 430
act ggt ctt gag cgc gtt gag aag atc acc cgc atc aat ggc cgt ggc   1461
Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg Gly
    435                 440                 445
ctg gat ctg cgc gca gag ggt ctg aac ctc ttc ctg cag tac act gac   1509
Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr Asp
450                 455                 460                 465
gct cct ggt gca ctg ggt acc gtt ggt acc aag ctg ggt gct gct ggc   1557
Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala Gly
                470                 475                 480
atc aac atc gag gct gct gcg ttg act cag gct gag aag ggt gac ggc   1605
Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp Gly
            485                 490                 495
gct gtc ctg atc ctg cgt gtt gag tcc gct gtc tcc gaa gag ctg gaa   1653
Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu Glu
        500                 505                 510
gct gaa atc aac gct gag ttg ggt gct act tcc ttc cag gtt gat ctt   1701
Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp Leu
    515                 520                 525
gac taattagaga tccattttct agaacc                                 1730
Asp
530
```

【００８３】

〈210〉 12

〈211〉 530

〈212〉 PRT

〈213〉 Brevibacterium flavum

〈400〉 12

```
Val Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1               5                  10                  15
Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
            20                  25                  30
Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Thr Val Lys Glu Ala Asp
        35                  40                  45
Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
    50                  55                  60
Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65                  70                  75                  80
Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
                85                  90                  95
Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
            100                 105                 110
Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
        115                 120                 125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
    130                 135                 140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145                 150                 155                 160
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
                165                 170                 175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
            180                 185                 190
```

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320
Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335
Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350
Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365
Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380
Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400
Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415
Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala

420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg

435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr

450 455 460

Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala

465 470 475 480

Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp

485 490 495

Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu

500 505 510

Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp

515 520 525

Leu Asp

530

【００８４】

〈210〉 13
〈211〉 1730
〈212〉 DNA
〈213〉 Brevibacterium flavum
〈220〉
〈221〉 CDS
〈222〉 (115)..(1704)
〈400〉 13

```
gggagggttt agaatgtttc tagtcgcacg ccaaaacccg gcgtggacac gtctgcagcc 60
gacgcggtcg tgcctgttgt aggcggacat tcctagtttt tccaggagta actt gtg   117
                                                            Val
                                                              1
agc cag aat ggc cgt ccg gta gtc ctc atc gcc gat aag ctt gcg cag   165
Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala Gln
             5                  10                  15
tcc act gtt gac gcg ctt gga gat gca gta gaa gtc cgt tgg gtt gac   213
Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val Asp
        20                  25                  30
gga cct aac cgc cca gaa ctg ctt gat aca gtt aag gaa gcg gac gca   261
Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Thr Val Lys Glu Ala Asp Ala
    35                  40                  45
ctg ctc gtg cgt tct gct acc act gtc gat gct gaa gtc atc gcc gct   309
Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala Ala
50                  55                  60                  65
gcc cct aac ttg aag atc gtc ggt cgt gcc ggc gtg ggc ttg gac aac   357
Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp Asn
                70                  75                  80
gtt gac atc cct gct gcc act gaa gct ggc gtc atg gtt gct aac gca   405
Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn Ala
```

```
            85                  90                  95
ccg acc tct aac att cac tct gct tgt gag cac gca att tct ttg ctg   453
Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu Leu
        100                 105                 110
ctg tct act gct cgc cag atc cct gct gct gat gcg acg ctg cgt gag   501
Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg Glu
    115                 120                 125
ggc gag tgg aag cgg tct tct ttc aac ggt gtg gaa att ttc gga aaa   549
Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly Lys
130                 135                 140                 145
act gtc ggt atc gtc ggt ttt ggc cac att ggt cag ttg ttt gct cag   597
Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala Gln
                150                 155                 160
cgt ctt gct gcg ttt gag acc acc att gtt gct tac gat cct tac gct   645
Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr Ala
            165                 170                 175
aac cct gct cgt gcg gct cag ctg aac gtt gag ttg gtt gag ttg gat   693
Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu Asp
        180                 185                 190
gag ctg atg agc cgt tct gac ttt gtc acc att cac ctt cct aag acc   741
Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys Thr
    195                 200                 205
aag gaa act gct ggc atg ttt gat gcg cag ctc ctt gct aag tcc aag   789
Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser Lys
210                 215                 220                 225
aag ggc cag atc atc atc aac gct gct cgt ggt ggc ctt gtt gat gaa   837
Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp Glu
                230                 235                 240
cag gct ttg gct gat gcg att gag tcc ggt cac att cgt ggc gct ggt   885
```

```
Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala Gly
            245                 250                 255
ttc gat gtg tac tcc acc gag cct tgc act gat tct cct ttg ttc aag   933
Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe Lys
        260                 265                 270
ttg cct cag gtt gtt gtg act cct cac ttg ggt gct tct act gaa gag   981
Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu Glu
    275                 280                 285
gct cag gat cgt gcg ggt act gac gtt gct gat tct gtg ctc aag gcg   1029
Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys Ala
290                 295                 300                 305
ctg gct ggc gag ttc gtg gcg gat gct gtg aac gtt tcc ggt ggt cgc   1077
Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly Arg
                310                 315                 320
gtg ggc gaa aag gtt gct gtg tgg atg gat ctg gct cgc aag ctt ggt   1125
Val Gly Glu Lys Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu Gly
            325                 330                 335
ctt ctt gct ggc aag ctt gtc gac gcc gcc cca gtc tcc att gag gtt   1173
Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu Val
        340                 345                 350
gag gct cga ggc gag ctt tct tcc gag cag gtc gat gca ctt ggt ttg   1221
Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly Leu
    355                 360                 365
tcc gct gtt cgt ggt ttg ttc tcc gga att atc gaa gag tcc gtt act   1269
Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val Thr
370                 375                 380                 385
ttc gtc aac gct cct cgc att gct gaa gag cgt ggc ctg gac atc tcc   1317
Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile Ser
                390                 395                 400
```

```
gtg aag acc aac tct gag tct gtt act cac cgt tcc gtc ctg cag gtc   1365
Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln Val
            405                 410                 415
aag gtc att act ggc agc ggc gcg agc gca act gtt gtt ggt gcc ctg   1413
Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala Leu
        420                 425                 430
act ggt ctt gag cgc gtt gag aag atc acc cgc atc aat ggc cgt ggc   1461
Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg Gly
    435                 440                 445
ctg gat ctg cgc gca gag ggt ctg aac ctc ttc ctg cag tac act gac   1509
Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr Asp
450                 455                 460                 465
gct cct ggt gca ctg ggt acc gtt ggt acc aag ctg ggt gct gct ggc   1557
Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala Gly
                470                 475                 480
atc aac atc gag gct gct gcg ttg act cag gct gag aag ggt gac ggc   1605
Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp Gly
            485                 490                 495
gct gtc ctg atc ctg cgt gtt gag tcc gct gtc tcc gaa gag ctg gaa   1653
Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu Glu
        500                 505                 510
gct gaa atc aac gct gag ttg ggt gct act tcc ttc cag gtt gat ctt   1701
Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp Leu
    515                 520                 525
gac taattagaga tccattttct agaacc                                 1730
Asp
530
```

【００８５】

〈210〉 14

〈211〉 530

〈212〉 PRT

〈213〉 Brevibacterium flavum

〈400〉 14

```
Val Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1               5                  10                  15
Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
            20                  25                  30
Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Thr Val Lys Glu Ala Asp
        35                  40                  45
Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
    50                  55                  60
Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65                  70                  75                  80
Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
                85                  90                  95
Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
            100                 105                 110
Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
        115                 120                 125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
    130                 135                 140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145                 150                 155                 160
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
                165                 170                 175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
            180                 185                 190
```

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320
Arg Val Gly Glu Lys Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335
Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350
Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365
Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380
Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400
Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415
Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala

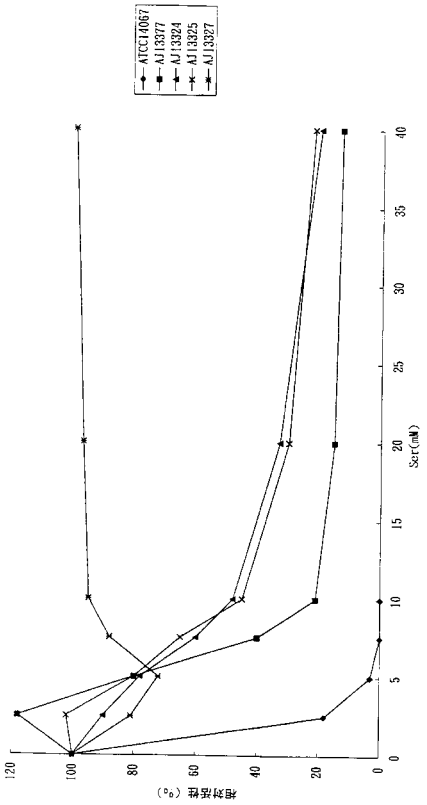
420 425 430
Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
435 440 445
Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr
450 455 460
Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala
465 470 475 480
Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp
485 490 495
Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu
500 505 510
Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp
515 520 525
Leu Asp
530

【図面の簡単な説明】

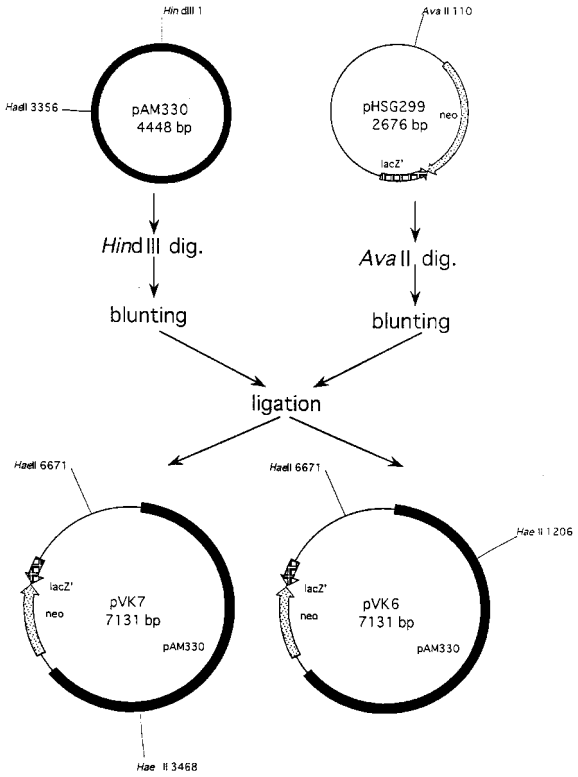
【図１】各種株由来の３－ＰＧＤＨのＬ－セリンによるフィードバック阻害の様子を示す。横軸は、酵素液中に存在するＬ－セリンの濃度を示す。縦軸は、Ｌ－セリンが存在しない時の３－ＰＧＤＨ活性に対する、Ｌ－セリンが存在するときの３－ＰＧＤＨ活性を百分率で示す。◆はＡＴＣＣ１４０６７株由来の３－ＰＧＤＨがＬ－セリンによって受けるフィードバック阻害の様子を示す。■はＡＪ１３３７７株由来の３－ＰＧＤＨがＬ－セリンによって受けるフィードバック阻害の様子を示す。▲はＡＪ１３３２４株由来の３－ＰＧＤＨがＬ－セリンによって受けるフィードバック阻害の様子を示す。×はＡＪ１３３２５株由来の３－ＰＧＤＨがＬ－セリンによって受けるフィードバック阻害の様子を示す。＊はＡＪ１３３２７株由来の３－ＰＧＤＨのがＬ－セリンによって受けるフィードバック阻害の様子を示す。

【図２】プラスミドｐＶＫ７およびｐＶＫ６の構築図。

【図１】


ATCC14067
AJ13377
AJ13324
AJ13325
AJ13327
Scr(mM)
相対活性（%）

【図２】


Hin dIII 1
Ava II 110
HaeII 3356
pAM330
4448 bp
pHSG299
2676 bp
neo
lacZ'
HindIII dig.
AvaII dig.
blunting
blunting
ligation
HaeII 6671
HaeII 6671
lacZ'
neo
pVK7
7131 bp
pAM330
lacZ'
neo
pVK6
7131 bp
pAM330
Hae II 1206
Hae II 3468

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12R	*1/15*	*(2006.01)*	C12R	1:13	
			C12N	1/21	
			C12R	1:15	
			C12P	13/06	D
			C12R	1:13	
			C12P	13/06	D
			C12R	1:15	

(72)発明者 大住 剛
東京都中央区京橋１－１５－１味の素株式会社内
(72)発明者 中松 亘
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 日比野 渉
神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１味の素株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 伊藤 美佳
三重県四日市市大字日永１７３０番地味の素株式会社東海工場内

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特開昭６０－１３３８７９（ＪＰ，Ａ）
特公昭５７－００１２３５（ＪＰ，Ｂ１）
特公昭５１－０３３１８８（ＪＰ，Ｂ１）
特開平０５－０４９４６５（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/04
C12P 13/06
C12R 1/13
C12R 1/15
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)
JSTPlus(JDream2)