

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3708543号
(P3708543)

(45) 発行日 平成17年10月19日(2005.10.19)

(24) 登録日 平成17年8月12日(2005.8.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/00
//(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:01)

C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/00
C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:01

請求項の数 17 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-511257	(73) 特許権者	ロンザ アーゲー
(86) (22) 出願日	平成6年10月7日(1994.10.7)		スイス国、シーエイチー4052 パーゼル、ミュンヘンシュタイナーシュトラッセ 38
(65) 公表番号	特表平9-503390	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦
(43) 公表日	平成9年4月8日(1997.4.8)	(74) 代理人	弁理士 村松 貞男
(86) 国際出願番号	PCT/EP1994/003317	(74) 代理人	弁理士 坪井 淳
(87) 国際公開番号	W01995/010613	(74) 代理人	弁理士 橋本 良郎
(87) 国際公開日	平成7年4月20日(1995.4.20)	(74) 代理人	弁理士 白根 俊郎
審査請求日	平成13年8月23日(2001.8.23)		
(31) 優先権主張番号	3036/93		
(32) 優先日	平成5年10月8日(1993.10.8)		
(33) 優先権主張国	スイス(CH)		
(31) 優先権主張番号	36/94		
(32) 優先日	平成6年1月6日(1994.1.6)		
(33) 優先権主張国	スイス(CH)		
微生物の受託番号	DSM 8726		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プチロペタイン/クロトノペタイン-L-カルニチン代謝のための遺伝子およびそのL-カルニチンの微生物学的生産への使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-カルニチンの生合成のための遺伝子 b c o C , b c o A / B および b c o D の 1 種または 2 種以上からなる分離された DNA 断片であって、 - プチロペタイン - C o A - デヒドロゲナーゼ (b c o C)、 - プチロペタイン/クロトノペタイン - C o A - シンセターゼ (b c o A / B) またはクロトノペタイン - C o A - ヒドロラーゼ (b c o D) をコードするものであり、下記から選ばれたものである DNA 断片:

a) 寄託番号 D S M 8 2 7 6 とし て 寄 託 さ れ た リ ゾ ビ ウ ム / ア グ ロ バ ク テ リ ウ ム H K 1 3 4 9 中 の プ ラ ス ミ ド p V K 1 0 0 q 中 に 挿 入 さ れ た 1 0 . 6 k b E c o R I 断 片、 お よ び
b) 上 記 1 0 . 6 k b E c o R I 断 片 を 混 合 し、 - プ チ ロ ペ タ イ ン - C o A - デ ヒ ド ロ
ゲ ナ ー ゼ、 - プ チ ロ ペ タ イ ン / ク ロ ト ノ ペ タ イ ン - C o A - シ ン セ タ ー ゼ お よ び (ま た
は) ク ロ ト ノ ペ タ イ ン - C o A - ヒ ド ロ ラ ー ゼ の 活 性 を 有 す る 酵 素 を コ ー ド す る 断 片。

【請求項2】

- プチロペタイン/クロトノペタイン代謝に割り当てられ、ポテンシャル輸送蛋白質をコードする遺伝子 b c o T を付加的に有する請求の範囲第1項のDNA断片。

【請求項3】

遺伝子 b c o C , b c o A / B , b c o D および場合によっては b c o T が、エシエリチア、シュードモナス、アグロバクテリウム、リゾビウムおよびリゾビウム/アグロバクテリウム属の微生物から誘導されたものである請求の範囲第1項または第2項のいずれかのDNA断片。

10

【請求項 4】

遺伝子が、発現に必要な遺伝子コントロール要素と操作的に結合されている請求の範囲第 1 項ないし第 3 項のいずれかの DNA 断片。

【請求項 5】

L - カルニチン生合成の遺伝子が、*bcoC* , *bcoA / B* および *bcoD* の順に配列され、単一転写ユニットとして存在する請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれかの DNA 断片。

【請求項 6】

L - カルニチン生合成の遺伝子が、*bcoC* , *bcoA / B* , *bcoD* および *bcoT* の順に配列され、単一転写ユニットとして存在する請求の範囲第 1 項ないし第 4 項のいずれかの DNA 断片。

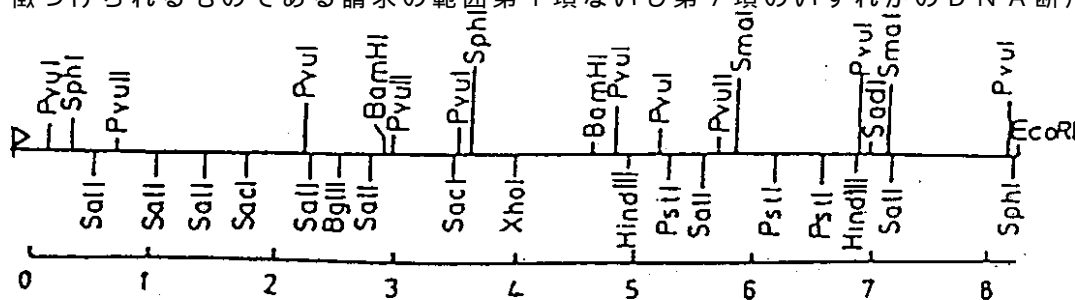
10

【請求項 7】

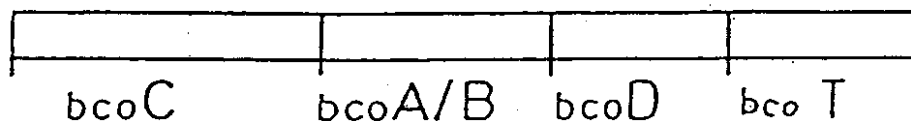
遺伝子制御要素が、天然の *bco* オペロンのプロモーター P_{bco} からなる請求の範囲第 4 項ないし第 6 項のいずれかの DNA 断片。

【請求項 8】

遺伝子 *bcoC* , *bcoA / B* , *bcoD* および *bcoT* が、下記の制限地図によって特徴づけられるものである請求の範囲第 1 項ないし第 7 項のいずれかの DNA 断片。



20



30

【請求項 9】

請求の範囲第 1 項ないし第 8 項のいずれかによる DNA 断片からなるベクター。

【請求項 10】

寄託番号 D S M 8 7 2 6 をもって寄託されたリゾビウム / アグロバクテリウム H K 1 3 4 9 内に預けられたプラスミド p V K 1 0 0 q、第 3 図の制限地図によって特徴づけられるプラスミド p V K 1 0 1 1、および第 4 図の制限地図によって特徴づけられるプラスミド p A Z 1 0 1 のいずれかである請求の範囲第 9 項のベクター。

【請求項 11】

請求の範囲第 1 項ないし第 10 項のいずれかに従う DNA 断片またはベクターを含有する組換え微生物。

40

【請求項 12】

L - カルニチン代謝の能力が完全に、または部分的に抑制されたことを特徴とする請求の範囲第 11 項の微生物。

【請求項 13】

組換えの能力が低減されていることを特徴とする請求の範囲第 11 項および第 12 項のいずれかの微生物。

【請求項 14】

エシエリチア、シュードモナス、アグロバイテリウム、リゾビウム、コマモナスおよびリ

50

ゾビウム／アグロバクテリウム属の微生物からえらんだ請求の範囲第11項ないし第13項のいずれかの微生物。

【請求項15】

寄託番号DSM8726をもって寄託されたリゾビウム／アグロバクテリウムHK1349であって、プラスミドpVK100qを有するもの、第3図の制限地図により特徴づけられるプラスミドpVK1011、または第4図の制限地図によって特徴づけられるプラスミドpAZ101、およびL-カルニチン生合成の能力を有する微生物から誘導された遺伝子的変種および突然変異種。

【請求項16】

リゾビウム／アグロバクテリウムHK1349.4であって、リゾビウム／アグロバクテリウムHK1349中に寄託番号DSM8726で寄託してあるプラスミドpVK100q、図3の制限地図によって特徴づけられるプラスミドpVK1011、または図4の制限地図によって特徴づけられるプラスミドpAZ101を含有するもの、ならびにそれらから誘導されるL-カルニチン生合成能力を有する遺伝子的変種および突然変異種。

【請求項17】

L-カルニチン製造のバイオ技術的方法であって、クロトノベタインおよび（または）-ブチロベタインを適当な炭素および窒素源の存在下に、請求の範囲11～16のいずれかに記載の微生物を手段として発酵させ、L-カルニチンを分離回収することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、-ブチロベタイン／クロトノベタイン-L-カルニチンの遺伝子の発現のための組換え遺伝子物質、この組換え遺伝子物質を有する微生物、およびそのような微生物をL-カルニチン生産の微生物学的プロセスに使用することに関する。

L-カルニチンは天然のビタミン類似物質であって、人間の代謝にきわめて重要である。脂肪酸の利用において、L-カルニチンはミトコンドリア膜を通過させる物質として、またそれによって代謝エネルギーを輸送するものとして、不可欠である。L-カルニチンが生体内で適切な量生産されなければ、その欠乏症を避けるために、食品中に添加しなければならない。とくに幼児の食品には、幼児は未だ自身でL-カルニチンを生合成することができないので、L-カルニチンは不可欠な栄養素である。

L-カルニチン製剤は、医薬製品においても活性成分として使用される。L-カルニチンの補給は、カルニチン欠乏の場合、およびその他の治療上の指示に従って、とくに心臓の不調などの場合に処方される。

高等な生物体内でのL-カルニチンの生合成は知られていて、代謝のさらなる機能および重要性が、積極的な研究活動の対象になっている。微生物とくにシュードモナス層に関して記述されている代謝経路（-ブチロベタインヒドロキシラーゼ触媒作用、リンデシュテットほか、*Biochemistry* 16, 2181-2188, 1977）に加えて、L-カルニチンは、ある種の微生物たとえばアグロバクテリウム／リゾビウムSP.の代謝中間生産物として形成される。

EP-A-0158194は、L-カルニチンの微生物学的生産であって、たとえば-ブチロベタインから出発して、伝統的な微生物学的選択方法によってL-カルニチルデヒドロゲナーゼ陰性の生産変異種を得、それを使用して、相対的によいL-カルニチン収量が20～30時間の反応時間内に得られる方法を開示している。容積／時間収率に関してこの方法をさらに最適化することは、しかし、この古典的な微生物学的方法による限り不可能である。

それゆえ、本発明の目的は、L-カルニチン生産のより経済的なバイオ技術的方法であって、L-カルニチンが顕著に短い反応時間で、かつ、むしろよりよい収率をもって得られる方法を提供することにある。

-ブチロベタイン／クロトノベタイン代謝に関する研究の結果、5種の遺伝子が同定されるに至った。すなわち**bc o A**, **bc o C**, **bc o D**, **bc o E**および**bc o T**であって、これら -ブチロベタイン／クロトノベタイン代謝経路の酵素類をコードし、とく

10

20

30

40

50

に、いわゆるブチロペタイン - L - カルニチンオペロン (b c o) と呼ばれるオペロン中に含まれている。この関連において、略号は下記の意味を有する。

b c o A / B : - ブチロペタイン - C o A - シンセターゼ (b o c A) / クロトノペタイン - C o A - シンセターゼ (b c o B)、すなわち、 - ブチロペタイン - C o A - シンセターゼ活性およびクロトノペタイン - C o A - シンセターゼ活性の両方を有する酵素生産物をコードする唯一の遺伝子、

b c o C : - クロトノペタイン - C o A デヒドロゲナーゼ遺伝子、

b c o D : クロトノペタイン - C o A ヒドラーゼ遺伝子、

b c o E : L - カルニチルデヒドロゲナーゼ遺伝子、そして

b c o T : 輸送システムのポテンシャル遺伝子。

10

遺伝子 b c o A / B , b c o C および b c o D の遺伝子生産物は L - カルニチンの生合成に関連するが、一方、b c o E は、代謝中間生成物 L - カルニチル - C o A のペタインへの分解をひきおこすカルニチンデヒドロゲナーゼをコードし、b c o T は、ブチロペタイン代謝に割り当てられた輸送システムの輸送タンパク質をコードすると推測されている。この遺伝子は、L - カルニチン生合成に不可欠なものではない。

本発明は従って、 - ブチロペタイン / クロトノペタイン代謝における L - カルニチン生合成のための酵素類をコードする遺伝子、b c o C , b c o A / B および b c o D の 1 種または 2 種以上からなる DNA 断片およびベクターに関し、場合によっては、さらにポテンシャル輸送遺伝子 b c o T にも関する。

本発明はさらに、これら DNA 断片および (または) ベクターを含有する微生物にも関する。本発明はまた、本発明の微生物を使用する L - カルニチン生産のバイオ技術的方法に関する。

20

本明細書および請求の範囲中で使用される b c o A / B , b c o C , b c o D および b c o T の表示は、定義されたように、野生種の生物のもつ遺伝子であって上記した酵素活性を有する - ブチロペタイン / クロトノペタイン - L - カルニチン代謝の酵素をコードするもの、とくにブチロペタイン - L - カルニチン (b c o) オペロンと、その機能的に同様な遺伝子的変種すなわち、野生種の生物の遺伝子から誘導され、その遺伝子生産物が生物学的機能に関しては本質的に変化を受けていないものとの、両方から成る。機能的に同等な遺伝子的変種および突然変異種は、このようにして、たとえば遺伝子コードの既知のデジェネレーションとの関連における塩基変換、たとえば人工的な遺伝子配列を、発現を生じさせるべきある種の微生物の好ましいコドン使用に適合させるために、生産することができる。変種および突然変異種は、さらに、塩基またはコドンの削除、挿入および置換を、このようにして変性させられた遺伝子の遺伝子生産物を、生物学的機能に関しては本質的に変化させない程度に止めておいたものを包含する。ここで包含されるのは、たとえば、野生種の配列に対して高度の、たとえば 70 % を超える均一性を有し、野生種の配列の補体とストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、たとえば 50 ~ 70 の温度および 0 . 5 ~ 1 . 5 モルの塩濃度において、ハイブリッド形成可能な遺伝子配列である。

30

ここで使用される転写ユニットの話は、遺伝子がひとつの転写方向に配置され、ふつうの転写コントロール下に中断されない転写として転写されるような DNA 配列をするものと理解されるべきであり、遺伝子に加えて DNA 配列とは、追加的に遺伝子発現に必要な遺伝子コントロール要素、たとえばプロモーターおよび染色体固定サイトを有するものである。

40

本発明は、下記の図面により、より詳細に説明される。

図 1 は、 - ブチロペタインまたはクロトノペタイン - L - カルニチン代謝経路における酵素を示す。

図 2 は、b c o オペロンを有するリゾビウム / アグロバクテリウムからの 10 . 6 kb の DNA 断片の制限地図を示す。

図 3 および図 4 は、プラスミド p V K 1 0 1 1 および p A Z 1 0 1 を示し、矢印は b c o 遺伝子および b e u 遺伝子 (ペタイン利用遺伝子 : E P - A - 0 5 4 3 3 4 4) の位置お

50

よび方向を示す。

図5は、recA 宿主株の生産のための出発物質と考えられる、プラスミド pCC49 を示す。

図6は、プラスミド pVK1011, pAZ101, pVK100q および pAZ7 の構成スキームを示す。

図7は、recA 宿主株の構成スキームを示す。

- ブチロペタイン/クロトノペタイン - L - カルニチン代謝経路における遺伝子 bcoA/B, bcoC, bcoD および bcoT を単離するために使用される出発物質としては、ブチロペタインおよび(または)クロトノペタインを図1に従って代謝するすべての微生物を使用することができる。適当な株は、エシェリチア、シュードモナス、アグロバクテリウム、リゾビウム および アグロバクテリウム/リゾビウム 属の微生物であって、最後のものが好ましい。アグロバクテリウム/リゾビウム 属の好ましい微生物の例は、アグロバクテリウム/リゾビウム sp. HK4 (DSM2938) 株であって、これに関しては EP - A - 0158194 に記述されている。これらの微生物はとくに好適に使用され、カルニチンデヒドロゲナーゼ陰性、すなわち、たとえば bcoE 遺伝子を有しないか、または欠陥のある bcoE 遺伝子(以下、bcoE とも記す)しか有しないものである。カルニチンデヒドロゲナーゼ陰性の好ましい微生物の例は、すでに EP - A - 0158194 に記述されている アグロバクテリウム/リゾビウム sp. HK13C (DSM2903) 種および HK1331b (DSM3225) 種、または EP - A - 0543344 に記述されている アグロバクテリウム/リゾビウム sp. HK1349 (DSM3944) 種である。

- ブチロペタイン/クロトノペタイン - L - カルニチン代謝の遺伝子 bcoA/B, bcoC, bcoD および bcoT は、微生物の染色体中で、微生物を、トランスポゾン挿入変異処理し、それによって - ブチロペタイン/クロトノペタイン - L - カルニチン代謝の遺伝子を、適宜のラベルたとえばカナマイシン(Km)耐性ラベルを用いて標識づけることによって、局在化させることができる。このようにしてラベルをつけられた、ブチロペタイン代謝の中間体としてはもはや使用できない突然変異種は、ついで単離することができる。このようにして、- ブチロペタイン/クロトノペタイン - L - カルニチン代謝の遺伝子をその機能に関して同定し、関連づけることができる。標識づけされた遺伝子は、ついでクローンをつくり、適当な制限酵素を使用してさらに詳細に特徴づけることができる。完全な遺伝子または本発明に従うDNA断片の単離は、ついで、対応する非変異種微生物の遺伝子バンクから出発して行なうことができ、その微生物から bco 遺伝子またはその断片を単離して、既知の方法よりクローン化して得た、上記の突然変異した株の遺伝子とハイブリダイゼーションすることにより、単離して同定することができる。得られた遺伝子は、続いて所望のベクター中にクローン化し、制限酵素の助けを借りて制限地図に描くことができる。

遺伝子 bcoA/B, bcoC および bcoD だけが、L - カルニチンの生合成に関与する。従って、これら遺伝子の存在だけがL - カルニチンの生産にとって必要である。選択した出発条件たとえば選択した出発原料または選択した生産株によって、L - カルニチン生産に使用したDNA断片およびベクターは、1種または2種以上のL - カルニチン生合成の遺伝子を含有することができる。

遺伝子 bcoA/B, bcoC および bcoD に加えて、本発明に従うDNA断片およびベクターは、所望であれば、ポテンシャル輸送遺伝子 bcoT を含むことができる。

L - カルニチンデヒドロゲナーゼ遺伝子すなわち bcoE 遺伝子の存在は、望ましくない。というのは、その存在下にL - カルニチンの分解が生じるからである。しかし、欠陥のある bcoE (bcoE) の存在は、無害である。

好都合なことに、L - カルニチンの生産に使用するためのL - カルニチン生合成の遺伝子、すなわち bcoC, bcoA/B および bcoD、そして場合によってはポテンシャル輸送遺伝子 bcoT は、1個のDNA断片またはベクター分子中に共に存在する。たとえば、好ましくは、遺伝子制御要素から常用の5' - 3' 方向の下流において、bcoC

10

20

30

40

50

, b c o A / B および b c o D の配列、または b c o C , b c o A / B , b c o D および b c o T の配列であって、天然に生じるブチロペタイン - L - カルニチンオペロンの配置に対応する、上記した単一転写ユニット中に存在する。このような転写ユニット中の遺伝子 b c o C , b c o A / B , b c o D および b c o T は、たとえば、図 2 の制限地図の対応するセクションによって特徴づけられる。

b c o 遺伝子の転写または発現は、適宜の、好ましくは協力的なプロモーターのコントロールの下で好都合に起る。プロモーターの選択は所望の発現条件に依存し、たとえば、本質的なまたは誘起された発現が望ましいか否かによって、あるいは発現を起すべき微生物の種類によって異なる。適切なプロモーターは、たとえば天然のブチロペタイン - L - カルニチンオペロンのプロモーター P_{bco} である。L - カルニチン生合成に關与する b c o 遺 10
伝子の単離を行なう場合は、たとえば、欠陥のある b c o E (b c o E) 遺伝子を有する微生物から、有利にはたとえば全 b c o オペロンを単離して b c o E 遺伝子およびこれらの微生物からの關連する遺伝子制御要素のクローンをつくることができ、ついで、適当な微生物中で L - カルニチン生産に利用することができる。変異された b c o E 遺伝子を有するこの種の転写ユニット、たとえば リゾビウム / アグロバクテリウム HK 1 3 4 9 から単離されるようなものは、場合によっては、すなわち b c o E の欠陥が、たとえばポイント変異にだけ帰せられ、制限分解サイトには関係がないのであれば、図 2 に示した制限地図によって特徴づけられるのもであってもよい。発現に適当なプロモーターの別の例は、たとえば、プロモーター P_{Nm} . P_{S1} (M . L a b e s e t a l . , G e n e , 20
8 9 , 37-46 , 1 9 9 0) , trp プロモータ (A m a n n e t a l . , G e n e , 2 5 , 167-178 , 1 9 8 3) , lac プロモーター (A m a n n e t a l . , G e n e , 2 5 , 167-178 , 1 9 8 3) および tac プロモータ、上記 trp および lac プロモーターのハイブリッドであって、本質的な、または誘起されたプロモーター (R u s s e l l および B e n n e t t , G e n e , 2 0 , 231-243 , 1 9 8 2) として使用することができる。

L - カルニチン生産に使用するための適当な生産株の中で、本発明に従う、前記 b c o 遺伝子を包含する DNA 断片は、好ましくは単一の転写ユニットとともに、既知の技術の助けを借りて好都合に既知の適当なベクター中に、とりわけ発現ベクターたとえばファージまたはプラスミド中に組み込まれる。使用するベクターは、自律的かつ自己複製的ベクターであつてもよいし、あるいはまた、いわゆるインテグレーションベクターであつてもよい。 30
インテグレーションベクターは、この關連において、たとえば、受容株のゲノム配列に相同の配列を少なくとも 1 個もち、この配列に相同的な組換えによって外来の遺伝子の受容株のゲノム中への挿入を許すようなプラスミドを意味するものと解すべきである。自律的かつ自己複製的ベクターが好ましく使用される。

選択されるベクターの特性によって、L - カルニチン生合成の酵素のための遺伝子を、種々の生物体内で発現させることができる。適当なベクター特定の宿主スペクトルを有するベクターと、広い宿主スペクトル (広い宿主範囲) を有するベクターのどちらでも、また前記した集積ベクターのいずれでもよい。

使用される広い宿主範囲のベクターは、グラム陰性の細菌に適するすべてのベクターであることができる。そのような広い宿主範囲のベクターの例は、p V K 1 0 0 (K n a u f および N e s t e r , P l a s m i d , 8 , 45-54 , 1 9 8 2) , p M E 2 8 5 (H a a s および I t o h , G e n e , 3 6 , 27-36 , 1 9 8 5) および p K T 2 4 0 (B a g d a s a r i a n e t a l . , G e n e , 2 5 , 273-282 , 1 9 8 3) またはこれらの誘導体である。使用される p V K 1 0 0 の誘導体は、たとえば、p V K 1 0 0 1 であることができ、使用される p M E 2 8 5 の誘導体は、たとえば p A Z 1 0 であることができ、使用される p K T 2 4 0 の誘導体は、たとえば p L O 3 2 (すでに E p - A - 0 5 4 3 3 4 4 に記述されている) であることができる。 40

リゾビウム / アグロバクテリウム の場合に使用される集積ベクターは、p A C Y C 1 8 4 または p B R 3 2 2 (C o m a i e t a l . , P l a s m i d , 1 0 , 21-30 , 1 9 8 3) にもとづくベクターであることができる。 50

このようにして、たとえばプラスミド pVK100q, pVK1011 (図3), pAZ7, pAZ7::beu, pAZ101 (図4) および pLO41 が得られる。プラスミド pVK100q は、1993年11月16日に、ドイツチェン・ザンメルグ・フュア・ミクロオルガニズメン・ウント・ツェルクルトゥーレン・GmbH D-38124 ブラウンシュヴァイク・マシェローダヴェク1bに、リゾビウム/アグロバクテリウム HK1349中に、寄託番号 DSM8726として寄託されている。

発酵のための生産株すなわち L-カルニチン生産株の生産のために f

、本発明に従う DNA断片またはベクターを、所望であり、かつ発現に適切な宿主株の中に取り込まなければならぬ。この目的のために、常用されているそれ自体は既知の手法で、本発明に従う DNA断片を含有するベクターを使用して、好都合に微生物が形質転換される。そうすると微生物は、本発明に従う DNA断片を、ベクター分子上またはその染色体中に集積して含む。

10

適当な生産株は、L-カルニチンをクロトノベタインおよび(または) -ブチロベタインから生産することができ、その L-カルニチン分解(代謝分解)の能力が完全に、または部分的に抑制されたもののすべてである。L-カルニチン代謝分解が抑制されている微生物は、たとえば、カルニチンデヒドロゲナーゼ陰性の菌株、つまりその中のカルニチンデヒドロゲナーゼ遺伝子 bcoE が、たとえば突然変異や削除によってスイッチオフされている菌株、および(または) L, D-カルニチンラセマーゼ陰性であって L-カルニチンデヒドロラターゼ陰性である菌株である。

適当な宿主菌株は、好ましくは高い基質および出発物質許容度をもつものであって、たとえば、エシェリチア、シュードモナス、アグロバクテリウム、リゾビウム、コマモナス および リゾビウム/アグロバクテリウム 属の微生物であり、最後のものが好ましい。すでに記述した リゾビウム/アグロバクテリウム sp. 種の微生物 HX13, HK1331b および HK1349、ならびに、HK1349、4種(EP-A-0543344に記述されている)がとくに好適である。

20

L-カルニチンの収量が、組換えのための宿主菌株の能力すなわちその組換え傾向および組換え頻度が減少すると、さらに改善できることが、上記に続いて判明した。染色体相同性にもとづいてベクターとの組換えが、それによって制限される。宿主菌株の組換え能力は、たとえば既知の方法でその recA 遺伝子を特定の突然変異(recA 突然変異)させることによって、減少させることができる。その組換え能力を低下させたとくに好ましい微生物は、リゾビウム/アグロバクテリウム sp. 種、たとえば本発明に従って前記のようにして得られる リゾビウム/アグロバクテリウム HK1349.49株である。

30

適当な生産株は、このようにして、たとえば リゾビウム/アグロバクテリウム HK1349, HK1349.9 および HK1349.49 種であり、いずれも、プラスミド pVK100q, pVK1001, pAZ7, pAZ::beu, pAZ101 または pLO41 を含有するものである。

形質転換された宿主菌株(生産菌株)は、ベクターまたは DNA断片上に位置するマーカージン遺伝子に起因して菌株がそれに対して耐性をもつ抗生物質を添加した、選択的栄養培地から単離される。EP-A-0543344に従う微生物を生産菌株として使用するとき、すなわちベタイン利用のための染色体遺伝子コーディングが変異を受け、ベタイン利用のための遺伝子コーディングを含むプラスミドと形質転換を受けている微生物もまた、ベタイン利用に関して選択使用することができる。ベタイン利用に関して選択可能な微生物の例は、すでに述べた HK1349.4 および HK1349.49 であって、これらは、たとえばプラスミド pLO41, pAZ101, pAZ7::beu または pVK1011 を含有する。

40

L-カルニチンのバイオ技術による生産は、本発明に従う DNA断片またはベクターを含有する微生物を利用して実施する。L-カルニチンの製造方法は、それ自体は既知の、たとえば EP-A-0158194 に記述された方法で、たとえば -ブチロベタインから出発して、適当な炭素源および窒素源の存在下に実施する。使用できる炭素源および窒素源は、たとえば、グルタミン酸塩、酢酸塩およびベタイン、またはグリセリンおよびベタ

50

インである。バイオ技術による生産がベタイン利用に関して選択可能な微生物を手段とするならば、ベタインが唯一の窒素源として利用される。

培養およびそれに続くL-カルニチンの単離は、EP-A-0158194に記述された方法と同様な方法によって実施できる。

既存の手法において、培地中の栄養素を変更することによって、また培養条件を個々の微生物に適合させることによって、L-カルニチンの収量は、さらに改善することができる。

実施例 1

トランスポゾン挿入突然変異種 (Tn⁵) の生産およびその表現形的同定

野生種の リゾビウム / アグロバクテリウム HK4 株 (DSM 2938, EP-B-0158194) を選択圧力により突発的に変異させ、ストレプトマイシン (Sm, 1000 μg/ml) 耐性をもたせた。この耐性は、選択を行なわなくても50世代にわたって明らかに安定であり、選択マーカーとして利用された。

E. コリ S17-1 / pSUP2021 (R. Simon et al., *Biotec hnology*, 1983, 1, 784-790) の TsS ドナー培養物 0.2 ml を、受容体培養物 HK4 の 2 ml と混合し、遠心分離にかけた。細胞を 0.9% 塩水 (NaCl 溶液) で洗い、0.9% 塩水 100 μl 中に再懸濁させた。受容体菌株とドナー菌株との接合を、一夜、30°C において乾いた栄養寒天の上で行なった。収穫された細胞は、受容体 (Sm^R) およびトランスポゾン (ネオマイシン耐性 (Nm^R)) のための選択媒体上に希釈してのせた。

Tn⁵ 変異体を、栄養寒天上で、Sm (1000 μg/ml) および Nn (100 μg/ml) を使用して得た。突然変異種の表現形上の同定を、図1に従ってプチロベタイン代謝中間生産物を最小限培地中の炭素 (C) 源としての不利用を検知することによって行なった。

実施例 2

Tn⁵ で標識をつけた DNA 断片の HK4 ゲノムからのクローニング

Tn⁵ 変異を行なった HK4 (5 μg) から単離されたゲノム DNA を、EcoRI (4 U / μg) で完全に消化した。pBR325 (2.5 μg) (Gene, 1977, 2, 95-115) を、EcoRI による完全な消化ののち、アルカリ性のフォスファターゼで処理した。ゲノム DNA および pBR325 を T4-DNA リガーゼを T4-DNA 400 μl のリゲーション緩衝液 (20 mM - トリス HCl, pH 7.2, 10 mM - DTT (ジチオスレイトール)、10 mM - MgCl₂, 0.6 mM - ATP) 中のリガーゼ (0.2 U / μg DNA) と混合したのち、組換えハイブリッドプラスミドが得られた。

接合混合物をいくつかに分けたものを、E. coli ED8654 (Barek et al., *Mol. Gen. Genet.*, 145, 199-207, 1976) の形質転換に使用した (Cohen et al., 1972, *PNAS*, 69, 2110-2114)。トランスフォーマントは、栄養培地中でアンピシリン (Ap, 100 μg/ml) およびカナマイシン (Km, 25 μg/ml) に対する耐性によって選択された。選択されたハイブリッドプラスミドはすべて、Tn⁵ で標識された HK4 挿入部を担持していた。挿入部は、図2の制限地図に対応して、種々の制限酵素によって地図化された。制限地図の比較から、種々の表現形を有する Tn⁵ 突然変異種のシリーズにおける同じゲノム断片中へのトランスポゾン挿入を確認した。

この観察結果を、同一に解裂したプラスミド DNA のサザンプロットハイブリダイゼーション ("Gentechnische Methoden" 「遺伝子工学の方法」 S. Bertram および H. G. Gassen 編、G. Fischer Verlag, 1991, 219f)、およびそれに続く電気泳動分離によって確認することができた。使用したプローブは、トランスポゾン突然変異種からクローン化した DNA のサブ断片である。

実施例 3

ラムダファージ中のゲノム HK4 遺伝子バンクの構成

DNA がラムダファージ中に包まれるためには、40 ~ 52 kb のサイズと「コスサイト」

が必要である。ゲノムHK4遺伝子バンクをラムダファージ中に構成するために、コスミドベクターpVK100 (KnaufおよびNester, 1982, Plasmid, 8, 45-54)を使用した。これはサイズ23 kbであり、従って17~29 kbの間のDNA断片のクローニングを可能にする。

pVK100をEcoRIと消化し、デフォスホリレートしてから、部分的にEcoRIと消化したHK4 DNAに接合した。HK4 DNAの部分的消化のための理論的EcoRI濃度は、DNA 0.58 U/μgまたは反応混合物0.02 U/μgとして試験消化の手段によって決定された。HK4 DNAの8.5 μgを反応混合物中で使用した。17 kbより大きいサイズ範囲のDNA断片は、アガロース電気泳動ゲルから分離した。接合は、100 ngのコスミドベクターと400 ngのパッセンジャーDNAとを含有する10 μlの容積の中で行なった。ついで「インピトロ・パッケージング」を、Promega Biotech社の混合物中で、製造業者の定めた手順に従って、2時間にわたり、25で実施した。EcoRI S17-1のトランスフェクションの後、コスミドベクターのKm耐性に関して選別を行なった。1バッチを使用して、約5500のコロニー(個々のクローン)が得られた。この遺伝子バンクのコロニーを冷凍媒体(栄養イーストブロス、NYB、オキソイドおよび50%グリセリン)の中に入れた各1000クローンほどのバッチ5箇に分け、-70で貯蔵した。この遺伝子バンクの増殖を、各バッチの50 μgを使用して、NYB 10 ml中で一夜培養し分画することによって行なった。

10

実施例 4

HK4 コスミド遺伝子バンクのスクリーニング、bco遺伝子担持コスミドクロンのHK突然変異種のコロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーションまたは直接相補による同定

20

クローニングされたTn5標識をもつDNA断片を、直接ハイブリダイゼーションのプロープとして使用することが可能であった。

適切なDNA配列を有するクローンはハイブリダイゼーション信号を出し、HK4突然変異種の各場合において、欠陥のある遺伝子の相補に導いた。種々の突然変異種からのDNAのクロスハイブリダイゼーションが、10.6 kbのDNA断片(図2)上におけるブチロバタイン代謝遺伝子の、若干の「クラスタリング」を裏付けた。

コロニーハイブリダイゼーションは、常法(S. BertramおよびH. G. Gassen, 1991, *ibid*, 211f)に従って実施した。ドットプロットングも、既知の方法(S. BertranおよびH. G. Gassen, 1991, *ibid*, 217f)に従って実施した。

30

実施例 5

HK突然変異種の相補

固定されたペプチド鎖にもとづく分子サイズを考慮に入れてブチロバタイン代謝の個々の遺伝子の正確な局在化を行なったのち、個々の突然変異種の特定の遺伝子セクションによる相補を行なうことができた。

特定の発現プラスミドpVK100::HK-DNAを、E. coli S17-1のリゾビウム/アグロバクテリウムsp. HK4株への、実施例1に従う接合を経由して一体化した。この株は、異なる代謝段階(図1参照)のための突然変異を含んでいる。ドナーのプロリン(pro)要求性およびベクターの抗生物質耐性(Km^RTC「テトラサイクリン^R」)にもとづいて、選別を行なった。

40

実施例 6

6.1 HK1349 (DSM3994)およびその誘導体からのbco断片のクローニング

生産菌株の遺伝子供給量効果および生産性の向上を達成するため、HK1349 (DSM3944, EP-A-054334)からのbcoオペロンのクローニングを行なった。この菌株においては、全bcoオペロンが完全な形で含有されているが、カルニチン-CoA-デヒドロゲナーゼのための第一の遺伝子bcoEが変異を受けている。bcoオペロンを有し、この株から得られたDNA断片は、このようなわけで、発現ベクターの複

50

写数が多いという点で、生産性向上にとって理想的である。

クローニングは、E. coli S17-1において、EP-A-0543344の実施例3に対応する既知の方法に従って実施した。この目的のために、10.6 kbのbcoオペロンをHK1349 遺伝子バンクから単離し、pVK100 中にリゲーションした。その結果、プラスミドpVK100q (図6のスキーム参照) が得られた。選別を、E. coli S17-1 中で、NYB Km (25 µg/ml) 上で実施した。挿入の正しさは、HK 突然変異種に関して、実施例5に記載した方法に従って同定した。HK1349 からのEcoRI-開裂DNAを電気泳動的に分離し、サイズ範囲1.6 kbの断片をゲルから単離した。単離した断片をEcoRI-開裂pVK100 中にリゲーションした。

このハイブリッドプラスミド混合物を使用してE. coli S17-I (プロリン要求性) を形質転換し、栄養寒天Km (25 µg/ml) 上で選別した。ベクターからのハイブリッドプラスミドクローンおよびサイズ10.6 kbのbcoオペロンを担持するDNA断片を、「パッチ・マッチング」法により、プチロベタイン-COA-シンセターゼ陰性突然変異種 (HK4V4) 上、C源およびN源として0.2% (w/v) のプチロベタインを含有する最小限培地上で同定した。正確なクローンは、このタイプを突然変異種中に接合的転移の後、このC源を利用して細胞を相補する能力があった。このようにして同定されたクローンpVK100qは、直接、生産プラスミドとして、またはさらなるサブクローニングのためのbcoオペロンを有するDNA断片のリザーバーとして使用された。

6.2 pAZ101, pAZ7, pVK1011およびpVK100q, pLO41およびpAZ7: : beuの構成

pAZ101, pAZ7, pVK1011およびpVK100qを、図6の構成スキームに従って構成した。pLO41は、pLO32 (EP-A-0543344) から出発してbco遺伝子 (10.6 kb EcoRI/EcoRI断片) の挿入により、またプラスミドpAZ7: : beuはpAZ7 (図6) から出発してbeu遺伝子 (3 kbサイズ、PstI/PstI-断片、EP-A-0543344) の挿入により、それぞれ構成した。対応する制限酵素は、DNA 3~5 U/µgとともに、製造者の指示に従って使用した。プラスミドpVK100qはbco遺伝子をpVK100 (KnaufおよびNester, *ibid*) 中に挿入することにより得られた。出発プラスミドpVK100s1 (構成スキームは図6) は、EcoRIプラスミドpVK100s (EP-A-0543344) の削除クローニングによって得た。

実施例7

recA 変異のHK1349.4への導入

7.1 recA をコードする遺伝子バンククローンの同定

ゲノムHK4 コスミド遺伝子バンク中に、コロニーハイブリダイゼーション法 (S. BertramおよびH. G. Gassen, 1991, *ibid*, 221f) の助けを借りて、recA-エンコーディングクローンを採取した。ハイブリダイゼーションに使用したプローブは、リゾビウムレグミノサルム (*leguminosarum*) (W. Selbitschka et al., *Mol. Gen. Genet.*, 299, 1991, 86-95) からのクローンされたrecA 遺伝子である。標識をつけたコスミドクローンを単離し、EcoRI消化後得られたEcoRI DNA挿入断片を対象に、recA 相同性配列をrecA プローブ (S. BertramおよびH. G. Gassen, 1991, *ibid*, 219f) に対するサザンプロットハイブリダイゼーションによって探索した。このようにして標識をつけられたEcoRI断片は、同じ程度まで開裂されたベクターpVK100 中にリゲーションされた。得られたハイブリッドプラスミドpVK100r1, E. coli S17-1細胞を、DNA複製のために形質転換した。

7.2 染色体recA 遺伝子の不活性化のための、カナマイシン耐性遺伝子のHK1349.4への導入

EcoRI断片のサイズ11.0 kbのものを、pVK100r1からpACYC184 (A. C. Y. ChangおよびS. N. Cohen, *J. Bacteriol.*, 134, 1978, 1141-1156) のEcoRIとともに開裂させたものの中に再クローンした。

10

20

30

40

50

所定の制限地図に対応して、BglII-NruI開裂サブ断片で、サイズ3.1 kb、recAプロンプトに対してサザンブロットハイブリダイゼーションで標識をつけたものを、BamHI-HindIII開裂をしたベクター-pWS233中にクローニングした。pWS233は「遺伝子置換え」ベクターであって、W. Selbitschka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 1993, 615-618に記述されている。

Tn5 (pSUP2021, R. Simon et al., Biotechnol. 1, 1983, ibid)からの、Km耐性をコードしたXhoI-DNA断片を、得られたプラスミドpCC45のXhoI開裂サイトへクローニングした。その結果、pCC49が生じた。W. Selbitschka et al., 1993, ibidの方法と同様にして、「遺伝子の置換え」を、つぎのように実施した。

エクスポネンシャルHK1349.4培養物3mlをエクスポネンシャルドナー培養物(S17-1/pCC49)1mlと合わせ、遠心分離にかけて、0.9% NaCl溶液で洗浄した。細胞を30で、NYB50µl中、栄養寒天上で一夜、インキュベータ中に置いた。0.9% NaCl溶液中に再懸濁した細胞を、適宜の稀釈度で選択媒体に適用した。Sm耐性受容体HK1349.4のトランス接合体が、Sm(1000µg/ml)およびNm(150µg/ml)を使用して栄養寒天上に得られ、「置換え」ベクター上の遺伝子sacREに対応する5%シクロース感受性が複合媒体中で認められた。

トランス接合体を栄養寒天上で選択圧力を加えることなく培養した後、二重組換えが低い頻度(10^{-8})で生じた。約一週間後、媒体中で5%シクロース許容性をもち、Nm耐性は保存したがゲンタマイシン(Gm)感受性(ベクターマーカー)を再びもつに至った細胞を単離することができた。

この表現形は、対立遺伝子マーカー交換を確認するものであり、HK1349.4のrecA変異を示すものである。recA突然変異種が典型的にもつ表現形(たとえばUV感受性)を観察することができる。

このようにして得たHK1349.49株において、相同的配置(相同的組換え)をもったプラスミドの染色体組込みの傾向は、明瞭に減少した。この菌株はそれゆえ、実施例6.2に示したハイブリッドプラスミドにとって、高度に適切な宿主である。

実施例 8

バイオ形質転換

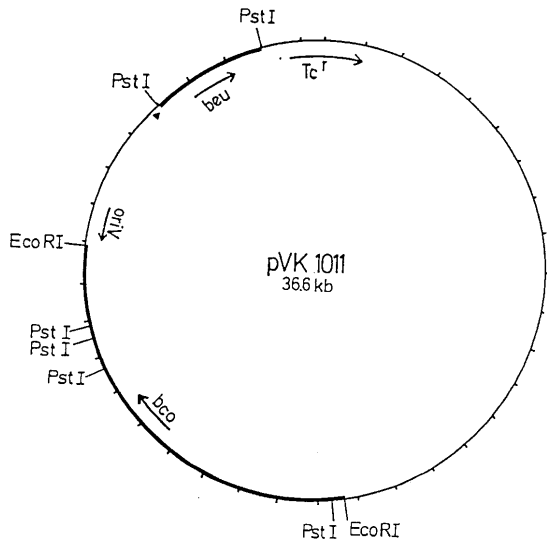
バイオ形質転換を、振動フラスコ(100ml)中、Nを含まず、0.2%(w/v)の-ブチロペタイン(出発物質)を含有し、C源として0.4%(w/v)のグリセリンを含有する最少限媒体(MM:Kullla et al., Arch. Microbiol., 1983, 135, pp.1-7)を使用して行なった。N源および追加的なC源として、0.2%(w/v)のL-グルタミン酸塩(ペタイン利用に関して陰性の菌株に対し)、または0.2%(w/v)のペタインを添加した。

本発明に従って使用した生産株は、HK1349.4/pLO41, HK1349.4/pVK1011, HK1349.4/pAZ7::beu, HK1349.4/pAZ101, HK1349/pVK100qおよびHK1349/pAZ7である。

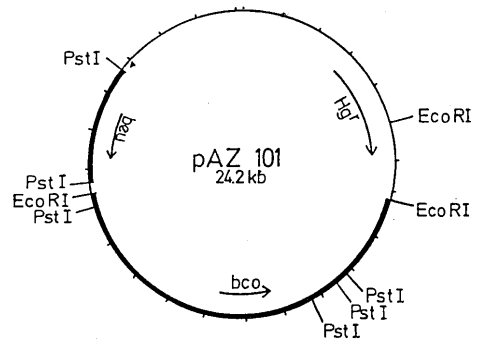
結果を、EP-A-0543344により既知であるHK13の誘導体HK1349(DSM 3944)およびHK1349.4と比較して、表1にまとめて示す。

-ブチロペタインからのL-カルニチンの生成は、DTNB(5,5'-ジチオビス(2-ニトロベンゾエート))法(H. K. Bergmeyer, 1994, 『酵素分析の方法』“Methoden der enzymatischen Analyse”フエアラーク・ヒエミー, ヴァインハイム, 1810fに記載)に従って行なった。

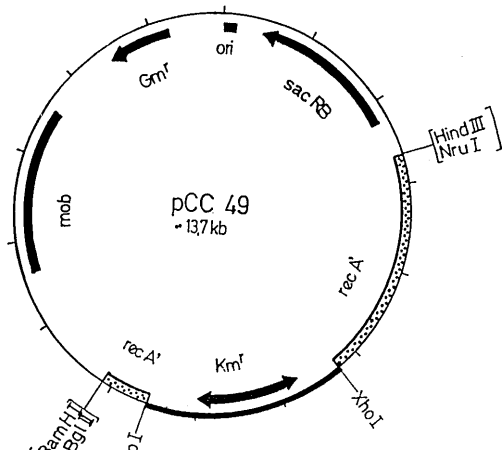
【 図 3 】
Fig. 3



【 図 4 】
Fig. 4

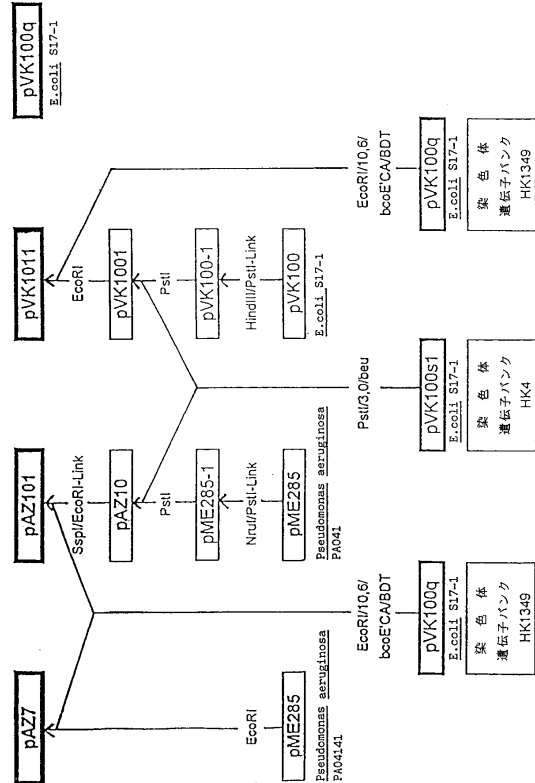


【 図 5 】
Fig. 5



【 図 6 】
Fig. 6

Fig. 6 *beau* および (または) *bcn* を使用する組換え体ハイブリッドプラスミドの構成



recA⁻およびbeu⁻宿主菌株の構成

【 7 】

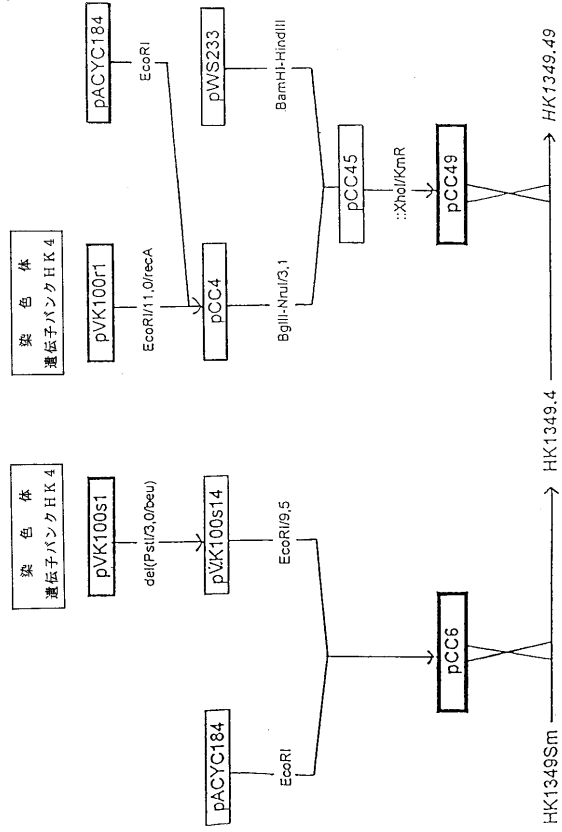


Fig. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷(C 1 2 P 13/00
C 1 2 R 1:01)

F I

C 1 2 P 13/00
C 1 2 R 1:01

(72)発明者 ツインマーマン, トーマス

スイス国 C H 3 9 0 4 ナーテアス フルカシュトラーセ 9

(72)発明者 ヴェアレン, ヨーゼフ

スイス国 C H 3 9 1 6 フェアデン プラッツフィス(番地なし)

審査官 斎藤 真由美

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12N 15/00 - 90

C12P 1/00 - 21/08

C12N 1/00 - 9/99

C07K 1/00 - 19/00

G01N 33/50 - 98

PubMed, MEDLINE(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

EUROPAT(QUESTEL)