

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4523939号
(P4523939)

(45) 発行日 平成22年8月11日 (2010. 8. 11)

(24) 登録日 平成22年6月4日 (2010. 6. 4)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 P 7/42 (2006. 01)

C 1 2 P 7/42

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 7 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2006-512744 (P2006-512744)
 (86) (22) 出願日 平成17年4月19日 (2005. 4. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2005/007416
 (87) 国際公開番号 W02005/106005
 (87) 国際公開日 平成17年11月10日 (2005. 11. 10)
 審査請求日 平成18年7月27日 (2006. 7. 27)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-131352 (P2004-131352)
 (32) 優先日 平成16年4月27日 (2004. 4. 27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 000005887
 三井化学株式会社
 東京都港区東新橋一丁目5番2号
 (74) 代理人 100110928
 弁理士 速水 進治
 (74) 代理人 100127074
 弁理士 佐藤 浩司
 (72) 発明者 和田 光史
 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式
 会社内
 (72) 発明者 望月 大資
 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式
 会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒドロキシカルボン酸類の生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微生物を利用することを特徴とする、末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコール類を基質としたヒドロキシカルボン酸類の生産方法であって、

前記微生物は、ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入することで該ラクトアルデヒドレダクターゼの活性が付与又は強化されており、且つ、該微生物が本来有しているグリコール酸オキシダーゼ活性が不活化或いは低減されている、且つ/またはビルベートホルメートリアーゼ活性が不活化または低減されており、

前記脂肪族多価アルコール類が、エチレングリコール、グリセロール及びジエチレングリコールのいずれかであることを特徴とするヒドロキシカルボン酸類の生産方法。

【請求項 2】

前記微生物は、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能するプロモーターと機能的に連結することで該ラクトアルデヒドレダクターゼを発現することを特徴とする請求項 1 に記載の生産方法。

【請求項 3】

前記微生物は、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼ及びラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入することで該ラクトアルデヒドレダクターゼ及び該

10

20

ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼの両活性がそれぞれ付与又は強化されており、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子及び前記ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能するプロモーターと機能的に連結することで該ラクトアルデヒドレダクターゼ及び該ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをそれぞれ発現することを特徴とする請求項 2 に記載のヒドロキシカルボン酸類の生産方法。

【請求項 4】

解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能する前記プロモーターが、グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターであることを特徴とする請求項 2 又は請求項 3 に記載の生産方法。

10

【請求項 5】

ヒドロキシカルボン酸が光学活性を有するヒドロキシカルボン酸であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の生産方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の生産方法に利用される微生物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 に記載の生産方法を利用することにより、エチレングリコールを基質として収率 95 % 以上、生産速度 2 g / L / 時間以上でグリコール酸水溶液を得る方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリコール酸を始めとするヒドロキシカルボン酸を生産する微生物と、それを用いたグリコール酸を始めとするヒドロキシカルボン酸生産方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ヒドロキシカルボン酸類の中にはポリマー原料や医薬中間体として有用で、その効率的な生産方法が求められているものがある。

【0003】

30

その一例としてグリコール酸 (α -ヒドロキシ酢酸) が挙げられる。グリコール酸は、洗浄剤や化粧品原料として利用されてきたが、近年、ガスバリア性ポリマーや医療用ポリマーとして有用なポリグリコール酸の原料として注目されている。ガスバリア性材料として注目されている理由はポリグリコール酸層は、高い酸素ガスバリア性を有しており、酸素の存在下で変質しやすい食品や炭酸飲料を包装するための材料としての性能を備えているからである。

【0004】

将来的にポリグリコール酸が工業的規模で実生産されるためには、その原料であるグリコール酸が高純度かつ安価に供給されねばならない。しかしながら現行市販されている化学合成品のグリコール酸は少なからず夾雑物を含んでおり、ポリマー原料としては純度的に問題がある。なぜならこれらの夾雑物はグリコール酸の脱水縮合反応を阻害するのみならず、夾雑物の一つであるメトキシ酢酸が発癌性の疑いのある化合物であり、食品や飲料の包材中に含まれることが望ましくないからである。無論、精製によって夾雑物を除くことは技術的には可能であるが、実際にそのような精製品は価格が高くなり、安価な包材原料としては現実的でない。

40

【0005】

化学合成品のグリコール酸に見られる上記の問題点を回避するため、エチレングリコール (以下、EG と呼ぶことがある) を原料としたバイオ法によるグリコール酸製造の試みが行われている。特開平 10 - 174593 号公報及び特開平 10 - 174594 号公報において、エチレングリコール含有培地に、ピシア (Pichia) 属、ロードトルラ (Rhodot

50

orula) 属、スポロボロマイセス (Sporobolomyces) 属、クリベロマイセス (Kluyveromyces) 属、トルロプシス (Torulopsis) 属に属する酵母、ノカルディア (Nocardia) 属に属する菌株、ロドコッカス (Rhodococcus) 属に属する菌株、またはエシェリヒア・コリ B (Escherichia

coli B) 株を培養し、培養液中からグリコール酸を分離・採取することを特徴とする微生物によるグリコール酸の生産方法が開示されている。なおエシェリヒア・コリ K 1 2 (Escherichia

coli K12) 株についてはグリコール酸の収率が低いことが開示されている。特開平 1 0 - 1 7 4 5 9 3 号公報及び特開平 1 0 - 1 7 4 5 9 4 号公報の実施例に記載されているグリコール酸生産方法の中でグリコール酸蓄積濃度が最も高いものは、ピシア・ナガニシイ (Pichia

naganishii) を用いた方法であり、3 0 時間の反応で 3 5 . 3 g / L のグリコール酸が得られている。ピシア・ナガニシイを用いたグリコール酸生産については更に、反応条件の改善がなされ、1 2 0 時間の反応で 1 0 5 g / L のグリコール酸が得られることが文献 (Kataoka, M., et al., Biosci. Biotechnol.

Biochem., Vol. 65(10), pp. 2265-2270(2001)) で報告されている。要するにピシア・ナガニシイを用いた生産方法では、エチレングリコールからグリコール酸への反応時間が 1 2 0 時間と長く、このことはグリコール酸の製造コストの上昇を招来するため工業規模の実生産を想定した場合には更なる反応時間の短縮が必要であった。そしてさらにこの生産方法においては使用する微生物が生産する副生有機酸が混入し、その後の精製工程や脱水縮合反応に支障をきたすという問題点も存在した。

【 0 0 0 6 】

微生物によるエチレングリコールからグリコール酸に至る代謝反応については、ボロナットらがエシェリヒア・コリを用いた研究結果を開示している (Boronat, A., et al., J. Bacteriol., Vol. 153 (1), pp. 134-139, (1983))。すなわちエチレングリコールからグリコールアルデヒドへの反応と、グリコールアルデヒドからグリコール酸への反応の二段階の代謝経路である。ボロナットらは、1, 2 - プロパンジオール (以下 P D O と呼ぶことがある) からラクトアルデヒドへの反応触媒酵素プロパンジオールオキシドレクターゼ (以下、P D O 酸化還元酵素と呼ぶことがある) が、エチレングリコールをも基質とすることに着目した (Boronat, A., et

al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 672, pp. 98-107, (1981))。P D O 酸化還元酵素活性が突然変異により向上した菌株の中から、グリコールアルデヒドからグリコール酸への反応触媒酵素グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ (以下 G A L 脱水素酵素と呼ぶことがある) 活性が向上した菌株を単離したのである。なお以下の表 (表 1) は、ボロナットらの論文から引用したものである。

【 0 0 0 7 】

【表 1】

表 1

菌株	P D O 酸化還元 酵素活性 (U / m g タンパク 質)	G A L 脱水素酵 素活性 (U / m g タンパク質)	P D O 資化能	E G 資化能
G 1 株 (対象株)	0 . 0 0 5	0 . 1 4 5	無	無
G 3 株	0 . 1 3 0	0 . 1 6 5	有	無
E G 3 株	0 . 4 1 5	0 . 5 6 0	(未記載)	有

【 0 0 0 8 】

対象株エシェリヒア・コリ G 1 株は 1, 2 - プロパンジオールとエチレングリコールのどちらも資化できない。それに対して P D O 酸化還元酵素活性が顕著に向上した突然変異

株である G 3 株は P D O 資化能を獲得したが、依然 E G を資化できなかった。この結果に基づいてポロナットらは、G 3 株が E G を資化できない理由は、G A L 脱水素酵素活性が不十分なためにグリコールアルデヒドからグリコール酸の反応が進まないためではないかと推論した。そして G A L 脱水素酵素活性が顕著に向上した突然変異株 E G 3 株を単離し、この株が E G を資化することから、彼等の推論が正しいと結論した。換言すれば、ポロナットらは E G からグリコール酸を生成するためには、G A L 脱水素酵素活性が十分に存在していなくてはならないと主張しているのである。

【 0 0 0 9 】

それに対して本明細書で開示している新たな知見は、E G からグリコール酸を生成するためには、G A L 脱水素酵素の活性向上は必ずしも必要ではなく、P D O 酸化還元酵素の活性向上のみで良いというものである。このような差異が生じた原因としては、ポロナットらが E G 3 株において G A L 脱水素酵素活性の向上のみに着目し、P D O 酸化還元酵素活性も同時に向上していることに注意を払わなかったことが挙げられる。我々の知見に基づいてポロナットらの実験結果を考察し直せば、E G 3 株が E G 資化能を獲得できたのは、G A L 脱水素酵素の活性が向上したからではなく、P D O 酸化還元酵素の活性が向上したからであるということになる。

【 0 0 1 0 】

さらにポロナットらの報告の中では、E G 3 株においては基質である E G と共にグリコール酸が存在する条件下では中間体であるグリコールアルデヒドが蓄積することが示されている。このことはつまりエシェリヒア・コリを用いたバイオ法によって E G を原料としてグリコール酸を製造した際には、中間体のグリコールアルデヒドが夾雑物として蓄積するという不具合が生じることを示している。

【 0 0 1 1 】

以上のことから過去の知見においては、エシェリヒア・コリを用いて E G からグリコール酸を製造する際には、G A L 脱水素酵素の活性向上が必要不可欠であること、および製造したグリコール酸には中間体のグリコールアルデヒドが蓄積することが示されている。そのような理由から、G A L 脱水素酵素活性の向上なしに、グリコール酸を選択的に製造可能であること、さらには中間体グリコールアルデヒドを含まない効率のよいグリコール酸製造が可能であるということは当業者といえども容易には推測できないことであった。

【 0 0 1 2 】

グリコール酸以外のヒドロキシカルボン酸の例として、グリセリン酸についても種々製法検討がなされてきた。なかでも、安価なグリセロールを原料としてグリセリン酸を製造する方法については、特開平 5—331100 号公報において Pt 触媒を用いた化学合成法、特開平 1—168292 号公報においてグルコノバクター (Gluconobacter) 属微生物によるバイオ法が開示されている。前者の Pt 触媒を用いる方法では反応の選択率が 80 % 程度と決して十分ではなく、相当量の副生物が生じること、さらに反応温度を厳密に制御する必要性が示されている。後者のバイオ法においてはグリセリンを原料とした D - グリセリン酸の製法が記載されているが、この製法では菌体の調製ならびに反応に 4 日間という長時間を要することが問題点として挙げられ、また製造したグリセリン酸中には使用した微生物由来の副生有機酸が相当量混入することが容易に想像できる。ちなみに L - グリセリン酸の製造方法に関しては知られていない。

【 0 0 1 3 】

さらにヒドロキシカルボン酸の一例としてヒドロキシエトキシ酢酸のバイオ法による製造については特開昭 59 - 85296 号公報においてジエチレングリコール含有培地に、キャンディダ属 (Candida)、トルロプシス (Torulopsis) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、ハンセヌラ (Hansenula) 属、デバリオミセス (Debaryomyces) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、ピシア (Pichia) 属に属する酵母を培養し、培養液中からヒドロキシエトキシ酢酸を分離・採取する方法が開示されている。この生産方法においては培養に長時間を要することと、さらには相当量のジグリコール酸が副生することが示されており、ヒドロ

10

20

30

40

50

キシエトキシ酢酸の分離・精製に多大な労力を要することが容易に想像される。

【0014】

【特許文献1】

特開平10-174593号公報

【特許文献2】

特開平10-174594号公報

【特許文献3】

特開平5-331100号公報

【特許文献4】

特開平1-168292号公報

10

【特許文献5】

特開昭59-85296号公報

【非特許文献1】

Kataoka, M., et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 65(10), pp.2265-2270, (2001)

【非特許文献2】

Boronat, A., et.al., J. Bacteriol., Vol. 153 (1), pp.134-139, (1983)

【非特許文献3】

Boronat, A., et.al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 672, pp.98-107, (1981)

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

以上のとおり、従来のグリコール酸をはじめとする各種ヒドロキシカルボン酸の生産法の欠点は、総じて化学合成法では得られるヒドロキシカルボン酸が多く、夾雑物を含み純度が低いことであり、バイオ法では反応時間が長く生産設備の単位時間当たりの生産性が低くなり生産コストが高くなり、また副生有機酸が混入することである。

以上の点に鑑み、本発明の解決すべき課題は、グリコール酸をはじめとするヒドロキシカルボン酸類を短時間で安価に且つ大量に供給し、かつ副生物を低減させ純度を向上させることにある。

【課題を解決するための手段】

30

【0016】

本発明者らは上記課題を解決するための改善策として、従来のバイオ法でのグリコール酸の生産に使用されていた自然界から選別された微生物の代替として、エチレングリコールからグリコールアルデヒドへの反応を触媒する酵素をコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入する手法などにより改変された、該酵素の活性のみを十分に強化した微生物を利用して、エチレングリコールからグリコール酸を生産する方法が本発明の目的に合うことを見出した。そして更にエチレングリコールからグリコールアルデヒドの反応を触媒する酵素と、グリコールアルデヒドからグリコール酸の反応を触媒する酵素の両活性を、2種の該酵素をコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入することで強化した微生物を利用することで、エチレングリコールからグリコールアルデヒドへの反応を触媒する酵素のみを強化した微生物に比べ菌体の培養に要するグルコース量を削減することができるとい

40

いう予想し得なかった好ましい効果を見出した。さらに、上記の微生物に関してグリコール酸からグリオキシル酸の反応を触媒する酵素、かつ/またはピルビン酸からギ酸の反応を触媒する酵素の活性を低減させることで、シュウ酸や酢酸といった副生有機酸の低減が可能となり、より純度の高い(副生有機酸の少ない)グリコール酸を生産可能であること、さらに詳細は不明であるがこれら2種の酵素活性低減により、細胞内の状況がよりグリコール酸生産に好適となりグリコール酸生産性が有意に向上することを見出した。またこれらの微生物はグリコール酸以外のヒドロキシカルボン酸を生産する方法へも利用可能であることを見出した。

【0017】

50

即ち、本発明は以下の〔１〕から〔７〕に記載のとおりである。

〔１〕 微生物を利用することを特徴とする、末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコール類を基質としたヒドロキシカルボン酸類の生産方法であって、

前記微生物は、ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入することで該ラクトアルデヒドレダクターゼの活性が付与又は強化されており、且つ、該微生物が本来有しているグリコール酸オキシダーゼ活性が不活化或いは低減されている、且つ/またはピルベートホルメートリアーゼ活性が不活化または低減されており、

前記脂肪族多価アルコール類が、エチレングリコール、グリセロール及びジエチレングリコールのいずれかであることを特徴とするヒドロキシカルボン酸類の生産方法。

〔２〕 前記微生物は、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能するプロモーターと機能的に連結することで該ラクトアルデヒドレダクターゼを発現することを特徴とする〔１〕に記載の生産方法。

〔３〕 前記微生物は、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼ及びラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をプラスミドの形態で導入することで該ラクトアルデヒドレダクターゼ及び該ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼの両活性がそれぞれ付与又は強化されており、

前記ラクトアルデヒドレダクターゼをコードする遺伝子及び前記ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能するプロモーターと機能的に連結することで該ラクトアルデヒドレダクターゼ及び該ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼをそれぞれ発現することを特徴とする〔２〕に記載のヒドロキシカルボン酸類の生産方法。

〔４〕 解糖系、核酸生合成系、又はアミノ酸生合成系に関わるタンパク質の発現を司る遺伝子のプロモーターのうち恒常的に前記微生物内で機能する前記プロモーターが、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターであることを特徴とする〔２〕又は〔３〕に記載の生産方法。

〔５〕 ヒドロキシカルボン酸が光学活性を有するヒドロキシカルボン酸であることを特徴とする〔１〕～〔４〕の何れか一項に記載の生産方法。

〔６〕 〔１〕～〔５〕の何れか一項に記載の生産方法に利用される微生物。

〔７〕 〔１〕～〔４〕に記載の生産方法を利用することにより、エチレングリコールを基質として収率９５％以上、生産速度２ｇ／Ｌ／時間以上でグリコール酸水溶液を得る方法。

【００１８】

本発明により夾雑物の少ないグリコール酸をこれまでに知られているよりもはるかに短時間で高生産する微生物が創出され、ポリマー原料用途として使用可能な高純度なグリコール酸を安価に工業生産することが可能となる。また上記生産方法を応用することでグリコール酸以外のヒドロキシカルボン酸の生産も可能である。

【００１９】

またグリコール酸生産に関しては、公知情報と相反して活性を強化すべき標的酵素が１種類のみでグリコール酸の高生産が可能となることから、酵素活性の強化に必要な労力を低減させるとともに、人為的な複数種の酵素活性の強化のために生じるストレスによる導入遺伝子の脱落をはじめとする宿主微生物への好まざる悪影響を回避することが可能となる。

【００２０】

またヒドロキシカルボン酸類の生産に供する微生物の培養に必要なグルコースを低減させることでより製造コストの低減させる手法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図 1】実施例 3 における反応液中のグリコール酸蓄積量の経時変化を示したグラフである。図中、三角はエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 / p G A P f u c O 株の結果を示し、丸はエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 野生株の結果を示す。

【図 2】実施例 4 における反応液中のグリコール酸蓄積量の経時変化を示したグラフである。図中、四角はエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 / p G A P f u c O - a l d A 株の結果を示し、丸はエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 野生株の結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 2 】

以下に本発明を詳しく説明する。

【 0 0 2 3 】

本発明においてエチレングリコールからグリコールアルデヒドへの反応を触媒する酵素とは、エチレングリコールを反応基質としてグリコールアルデヒドを生成し得る酵素であれば特に制限はなく、そのような酵素全てを指す。そのようなものとして、ラクトアルデヒドレダクターゼが例示される。

【 0 0 2 4 】

本発明においてある標的酵素の活性を付与した微生物とは、該酵素活性を全く有していない該微生物に何らかの方法によって該酵素活性が与えられた微生物を指し、本発明においてある標的酵素の活性を強化した微生物とは、野生型の該微生物と比較して有意に該酵素の活性が向上している微生物を指す。これらの微生物は、例えば該酵素をコードする遺伝子を遺伝子組換え技術を用いて野生型の微生物（又は組換え前の微生物）に導入する等の方法を用いて作出することができる。野生型の微生物（又は組換え前の微生物）に該遺伝子を導入する方法としては、該遺伝子をプラスミドの形態で微生物に導入することが例示できる。微生物への遺伝子の導入に用いられるゲノム DNA の調製、プラスミドの調製、DNA の切断および連結、形質転換、PCR (Polymerase Chain Reaction)、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設計、合成等の方法は、当業者によく知られている通常の方法で行うことができる。これらの方法は、Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", ColdSpring Harbor Laboratory Press, (1989) 等に記載されている。

【 0 0 2 5 】

本発明において微生物とは、末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコールからヒドロキシカルボン酸を生産する能力を本来有するか否かに関わらず、何らかの手段を用いることにより末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコールからヒドロキシカルボン酸を生産する能力を有し得る微生物の総称を意味する。このようなものとしてエシェリヒア・コリが例示される。

【 0 0 2 6 】

本発明において、末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコール類とは、炭素鎖の末端に水酸基を有し、かつ分子内に 2 つ以上の水酸基を有する脂肪族化合物であればその構造に特に制限はないが、そのような化合物としてエチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、グリセロール、1, 3 - プロパンジオール、1, 2 - ブタンジオール、1, 3 - ブタンジオール、1, 4 - ブタンジオール、1, 2, 4 - ブタントリオールなどが例示できる。

【 0 0 2 7 】

本発明においてある標的酵素をコードする遺伝子を微生物に導入するにあたっての「プラスミドの形態で」とは該遺伝子をベクターに連結し組換えプラスミドを作成し、これを形質転換等の方法で該微生物に導入する事を意味する。また本発明の実施例記載のように恒常的に微生物内で機能する強力なプロモーターと目的遺伝子を機能的に連結した際には、プラスミドが有するレプリコンの性質により微生物細胞当たりのコピー数が一般的に少ないといわれるプラスミドを利用することでも本発明の目的を達し得る。そのようなレプリコンを有するプラスミドとして p A C Y C 1 8 4 (GenBank accessio

10

20

30

40

50

n number X06403)などが例示できる。

【0028】

本発明においてグリコールアルデヒドからグリコール酸への反応を触媒する酵素とは、グリコールアルデヒドを反応基質としてグリコール酸を生成し得る酵素であれば特に制限はなく、そのような酵素全てを指す。そのようなものとして、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼが例示される。

【0029】

本発明における解糖系、核酸生合成系、またはアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとは、恒常的に微生物内で機能する強力なプロモーターで、かつグルコース存在下でも発現の抑制を受けにくいプロモーターで、具体的にはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(以下GAPDHと呼ぶことがある)のプロモーターやセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのプロモーターが例示できる。

10

【0030】

本発明におけるプロモーターとはσ因子を有するRNAポリメラーゼが結合し、転写を開始する部位を意味する。例えばエシェリヒア・コリ由来のGAPDHプロモーターはGenBank accession number X02662の塩基配列情報において、397-440に記されている。

【0031】

本発明において、遺伝子が機能的にプロモーターと連結しているとは、当該遺伝子がプロモーターの制御下にあり、遺伝子の発現がプロモーターの制御によりなされるように該遺伝子とプロモーターが結合していることを意味する。

20

【0032】

本発明におけるラクトアルデヒドレダクターゼとは、国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号1.1.1.77に分類され、1.2-プロパンジオールから、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下でラクトアルデヒドを生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を指す。

【0033】

本発明におけるラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼとは、国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号1.2.1.22に分類され、ラクトアルデヒドから、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下で乳酸を生成する反応を触媒する酵素の総称を指し、且つ国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号1.2.1.21に分類され、グリコールアルデヒドから、補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの存在下でグリコール酸を生成する反応を触媒する酵素グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼの総称も併せて指すものである。なぜならば大腸菌を用いた先行文献で、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼとグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼは同一の酵素であることが報告されているからである(Caballero, E., et al., J. Biol. Chem., 258(12), 7788-7792(1983))。

30

【0034】

本発明におけるグリコール酸オキシダーゼ(以下glcDEFと呼ぶことがある)とは、国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号1.1.3.15に分類され、グリコール酸からグリオキシル酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を指す。

40

【0035】

本発明におけるピルベートホルメトリアーゼ(以下pflBと呼ぶことがある)とは、国際生化学連合(I.U.B.)酵素委員会報告に準拠した酵素番号2.3.1.54に分類され、ピルビン酸からギ酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素の総称を指す。

【0036】

本発明におけるglcDEFやpflBの酵素機能の不活化とは、その酵素活性が完全に消失することを意味する。本発明におけるglcDEFやpflBの酵素機能の低減とは、その酵素活性の一部が消失することを意味する。酵素機能を不活化、或いは低減する

50

には、そのタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入するか、欠失させる、あるいはそのタンパク質を特異的に不活化する薬剤を添加する、紫外線を照射する、などの方法がある。具体的にはエシェリヒア・コリMT-11023株がg1cDEF遺伝子とpflB遺伝子の破壊によりこれらの酵素機能が不活化した微生物として例示できる。

【0037】

エシェリヒア・コリMT-11023株は遺伝子破壊によりg1cDEF、pflBが不活化しているため、これを用いて容易に本発明を実施することが可能である。本菌株は、FERM BP-10293の寄託番号で、茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、特許手続き上の微生物の寄託等の国際承認に関するブタペスト条約に基づいて、平成17年3月10日より寄託されている。

10

【0038】

本発明の生産方法を実施するに際しては、通常エチレングリコールからグリコールアルデヒドへの反応を触媒する酵素の活性を付与又は強化した微生物を培地を用いて培養して増殖させて必要量の微生物菌体を得る。

【0039】

本発明に係る培養に使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じてその他の有機微量成分を含有する培地であれば特に制限は無い。炭素源としては、グルコース、フルクトース、糖蜜などの糖類、フマル酸、クエン酸、コハク酸などの有機酸、メタノール、エタノール、グリセロールなどのアルコール類、その他が適宜使用される。窒素源としては、有機アンモニウム塩、無機アンモニウム塩、アンモニアガス、アンモニア水等の無機体窒素源、及び蛋白質加水分解物等の有機体窒素源、その他が適宜使用される。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、リン酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、その他が必要に応じて適宜使用される。有機微量成分としては、ビタミン、アミノ酸等及びこれらを含有する酵母エキス、ペプトン、コーンステープリカー、カゼイン分解物、その他が適宜使用される。

20

なお、本発明に係る培養に使用される培地としては、工業的生産に供する点を考慮すれば液体培地が好ましい。

【0040】

本発明に係る微生物の培養に際して、培養条件は特別の制限はなく、例えば、好気条件下でpH6~8、温度25~40の範囲内でpHと温度を適切に制御しながら培養した場合、培養に必要な時間は50時間以内である。

30

【0041】

本発明に係るヒドロキシカルボン酸生産反応に使用される反応液は基質となる末端に水酸基を有する脂肪族多価アルコールを添加し得る（或いは含有する）液体であれば特に制限はなく、リン酸カリウム緩衝液などの緩衝液や、前述の微生物の培養に用いた培地、及び純水を例示することができる。本発明においてはこのような液体に先に培養により得られた微生物菌体を接触させて反応を行う。微生物菌体は、培養が終わった培養液そのものを使用する外、培養液から菌体のみを回収して使用する方法が例示できる。

40

【0042】

本発明のヒドロキシカルボン酸類の生産方法における反応に際して、反応条件は特別の制限はないが、例えば、pH6~9、温度20~40の範囲内でpHと温度を適切に制御しながら反応することが好ましい。

【0043】

以上のようにして得られた反応液液中に蓄積したヒドロキシカルボン酸を回収する方法としては、特に制限はないが、例えば反応液から菌体を遠心分離などで除去した後、合成吸着樹脂を用いる方法や沈殿剤を用いる方法、その他通常の採取分離方法でヒドロキシカルボン酸を分離する方法が採用できる。

【実施例1】

【0044】

50

エシェリヒア・コリ由来ラクトアルデヒドレダクターゼ発現ベクターおよび該発現ベクター形質転換体の構築

エシェリヒア・コリのラクトアルデヒドレダクターゼのアミノ酸配列と遺伝子（以下、fucOと略することがある）の塩基配列はすでに報告されている（GenBank accession number M31059）。fucOを取得するために、エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてCGAATTC GAGAAAGTCTTATGATGGCTAACAGAAATGATTC TG（配列番号1）、及びGTGAAGCTTGCATTTACCAAGGCGGTATGG（配列番号2）によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.2 kbpのfucOフラグメントを得た。さらに、グリセルアルデヒド 3 - リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase) (GAPDH) プロモーターを取得するためエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてAACGAATTC TCGCAATGATTTGACACGATTC（配列番号3）、及びACAGAAATTCGCTATTTGTAGTGAATAAAAGG（配列番号4）によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約100 bpのGAPDHプロモーターをコードするDNAフラグメントを得た。上記の2つのDNAフラグメントとプラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5株に形質転換し、アンピシリン50 µg / mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン50 µg / mLを含むLB液体培地で37 °Cで一晩培養し、得られた菌体からプラスミドpGAPfucOを回収した。このプラスミドpGAPfucOをエシェリヒア・コリMG1655株に形質転換し、アンピシリン50 µg / mLを含むLB寒天プレートで37 °Cで一晩培養することによりMG1655 / pGAPfucO株を得た。

なおエシェリヒア・コリMG1655株、エシェリヒア・コリDH5株はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

【実施例2】

【0045】

ラクトアルデヒドレダクターゼ、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ同時発現ベクターおよび該発現ベクター形質転換体の構築

エシェリヒア・コリのラクトアルデヒドレダクターゼのアミノ酸配列と遺伝子（以下、fucOと略することがある）の塩基配列はすでに報告されている（GenBank accession number M31059）。またエシェリヒア・コリのラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と遺伝子（以下、aldAと略することがある）の塩基配列もすでに報告されている（GenBank accession number M64541）。fucOを取得するためにエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてGCTCTAGACGGAGAAAGTCTTATGATGGCTAACAGAAATGATTC TG（配列番号5）、及びGTGAAGCTTGCATTTACCAAGGCGGTATGG（配列番号2）によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素XbaI及びHindIIIで消化することで約1.2 kbpのfucOフラグメントを得た。さらに、aldAを取得するためにエシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをテンプレートに用いてCGAATTC GAGAAAGTCTTATGTCAGTACCCGTTCAACATCC（配列番号6）、及びGCTCTAGACTCTTTCTCACTCAATTAAGACTG（配列番号7）によりPCR法で増幅し、得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRI及びXbaIで消化することで約1.5 kbpのaldAフラグメントを得た。さらに実施例1と同様にグリセルアルデヒド 3 - リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase) (GAPDH) プロモーターをコードするフラグメントを得た。上記の3つのDNAフラグメントとプラスミドpUC1

8を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5株に形質転換し、アンピシリン50μg/mLを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをアンピシリン50μg/mLを含むLB液体培地で37℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドpGAPfucO-aldAを回収した。このプラスミドpGAPfucO-aldAをエシェリヒア・コリMG1655株に形質転換し、アンピシリン50μg/mLを含むLB寒天プレートで37℃で一晩培養することによりMG1655/pGAPfucO-aldA株を得た。

【実施例3】

【0046】

エシェリヒア・コリMG1655/pGAPfucO株、エシェリヒア・コリMG1655野生株によるグリコール酸生産

前培養として三角フラスコに入れたLB Broth, Miller培養液(Difco 244620) 25mLに実施例1において得られたエシェリヒア・コリMG1655/pGAPfucO株、エシェリヒア・コリMG1655野生株を植菌し、一晩、培養温度35℃、120rpmで攪拌培養を行った。各々の前培養液全量を、表2(表2)に示す組成の培地475gの入った1L容の培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に移し、培養を行った。培養は大気圧下、通気量1vvm、攪拌速度800rpm、培養温度35℃、pH7.2(NH₃水溶液で調整)で行った。培養開始後24時間の菌体を遠心分離(8000rpm、20分間)により集菌し、1mMリン酸カリウム緩衝液pH7.2で洗浄後、同緩衝液で懸濁し最終液量を500mLとした。懸濁液をABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に移し、エチレングリコールを5g/時間の速度で添加し、22時間反応を行った。反応は大気圧下、通気量1vvm、攪拌速度800rpm、反応温度35℃、pH7.2(NH₃水溶液で調整)で行った。得られた反応液中のグリコール酸蓄積量をHPLCで定法に従って測定した。結果を図1(図1)に示す。

エシェリヒア・コリMG1655/pGAPfucO株において22時間で106g/Lのグリコール酸の蓄積が確認され、エチレングリコールからグリコール酸に至るまでの中間体であるグリコールアルデヒドは検出されなかった。一方野生株では反応22時間後においてもグリコール酸は検出されなかった。

【0047】

【表2】

10

20

30

表2 培地組成

ポリペプトン	7 g / L
グルコース	30 g / L
Fe_2SO_4	0.09 g / L
K_2HPO_4	2 g / L
KH_2PO_4	2 g / L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g / L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5 g / L

(残部：水)

【実施例4】

【0048】

エシェリヒア・コリMG1655 / pGAPfucO - aldA株、エシェリヒア・コリMG1655野生株によるグリコール酸生産

実施例2で得られたエシェリヒア・コリMG1655 / pGAPfucO - aldA株、エシェリヒア・コリMG1655野生株を実施例3と同様に培養した。培養開始後24時間以降、培養中の培養槽に直接エチレングリコールを5g / 時間の速度で22時間添加することで反応を行った。得られた培養液中のグリコール酸蓄積量をHPLCで定法に従って測定した。結果を図2（図2）に示す。

【0049】

エシェリヒア・コリMG1655 / pGAPfucO - aldA株において、エチレングリコール添加開始後22時間で110g / Lのグリコール酸の蓄積が確認され、エチレングリコールからグリコール酸に至るまでの中間体であるグリコールアルデヒドは検出されなかった。一方野生株ではエチレングリコール添加開始後22時間においてもグリコール酸は検出されなかった。

【実施例5】

【0050】

エシェリヒア・コリMG1655 aldA欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank accession number U00096）、エシェリヒア・コリのラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と遺伝子（以下、aldAと略することがある）の塩基配列もすでに報告されている（GenBank accession number M64541）。エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAのaldA近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、TACTGCAGTGATCCTTG CAGGC AATGC（配列番号8）とGGTCTAGAAATCATCAGAGAGACGGGAATCG（配列番号9）、GGTCTAGAAATGAGTGAAAGAGGCGGAG（配列番号10）とAAGGTACCGATGCTGGTGCGAAGAGAGG（配列番号11）を用いてPCRを行った。得られたDNAフラグメントをそれぞれ、制限酵素PstIとXbaI、XbaIとKpnIで消化することにより、それぞれ約800bp、700bpのフラグメントを得た。このDNAフラグメントを温度感受性クローニングベクター

10

20

30

40

50

p T H 1 8 c s 1 (G e n B a n k a c c e s s i o n n u m b e r A B 0 1 9 6 1 0) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] を P s t I、K p n I で消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、D H 5 株に 3 0 で形質転換し、クロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 液体培地で 3 0 で一晚培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。

【 0 0 5 1 】

このプラスミドをエシェリヒア・コリ M G 1 6 5 5 株に 3 0 で形質転換し、クロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに 3 0 で一晚培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 液体培地に接種し、3 0 で一晚培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに塗布し、4 2 で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まない L B 液体培地で 3 0 で一晚培養し、さらに薬剤を含まない L B 寒天プレートに塗布して 4 2 で生育するコロニーを得た。

10

【 0 0 5 2 】

出現したコロニーの中から無作為に 1 0 0 コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まない L B 寒天プレートとクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに生育させ、薬剤を含まない L B 寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体 D N A から P C R により a l d A を含む約 3 . 2 k b 断片を増幅させ、a l d A が欠失している株を選抜し、得られた株を M G 1 6 5 5 a l d A 欠失株 (以下 a l d A と略することがある) と命名した。

20

【 実施例 6 】

【 0 0 5 3 】

a l d A / p G A P f u c O 株の構築

実施例 1 において得られたプラスミド p G A P f u c O を実施例 5 において得られた a l d A 株、に形質転換し、アンピシリン 5 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートで 3 7 で一晚培養することで a l d A / p G A P f u c O 株を得た。

【 0 0 5 4 】

a l d A / p G A P f u c O 株によるグリコール酸生産

実施例 3 と同様に a l d A / p G A P f u c O 株、M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O 株をそれぞれ培養し、集菌、洗浄の後、得られた菌体に対し、実施例 3 と同様にエチレングリコールを添加し、1 0 時間反応を行った。反応により a l d A / p G A P f u c O 株において 6 4 . 8 g、M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O 株において 6 4 . 2 g のグリコール酸蓄積が確認された。グリコール酸の生産にラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼが必ずしも必要ないことが示された。

30

【 実施例 8 】

【 0 0 5 5 】

エシェリヒア・コリ M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O - a l d A 株、エシェリヒア・コリ M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O 株の菌体増殖比較

40

実施例 2 で得られたエシェリヒア・コリ M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O - a l d A 株、実施例 1 で得られたエシェリヒア・コリ M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O 株を実施例 3 と同様に培養した。ただし表 1 (表 1) に示す培地組成のうちグルコース量を 7 0 g / L として実施した。2 4 時間培養した後、全培養液を遠心分離することで集菌し得られた湿菌体重量を測定した。また、培地中の残存グルコース量を定法に従って測定し、菌体の増殖に要したグルコース量を算出した。結果を表 3 (表 3) に示す。

【 0 0 5 6 】

2 種類の菌株間で得られた菌体重量はほぼ同様であるにもかかわらず、その際に必要とするグルコース量が M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O - a l d A 株において二割以上少な

50

くてすむことが示された。実施例 7 においてグリコール酸生産においてラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼは必ずしも必要無い事を示したが、該酵素活性の強化によってグリコール酸生産において必要となるグルコース量の低減に効果があることが確認された。

【 0 0 5 7 】

【表 3】

表 3

	MG 1 6 5 5 / p G A P f u c O株	MG 1 6 5 5 / p G A P f u c O-a l d A株
湿菌体重量 (g)	4 5. 3	4 5. 5
消費グルコース量 (g)	3 1. 6	2 4. 5

10

【実施例 9】

【 0 0 5 8 】

エシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株ゲノム上 f u c O プロモーターの G A P D H プロモーターへの置換

エシェリヒア・コリのゲノム DNA の全塩基配列は公知であり (G e n B a n k a c c e s s i o n n u m b e r U 0 0 0 9 6)、エシェリヒア・コリの f u c O の塩基配列も報告されている (G e n B a n k a c c e s s i o n n u m b e r M 3 1 0 5 9)。エシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株の f u c O の 5 ' 近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、G C T C T A G A C C T T C T C C T T G T T G C T T T A C G (配列番号 1 2) と A A C T G C A G A G A G A G G T A G C T A A T G G A A C G (配列番号 1 3) を用いて、エシェリヒア・コリゲノム DNA を鋳型として P C R を行うことにより約 6 5 0 b p の DNA 断片を増幅した。

20

【 0 0 5 9 】

また、エシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株のグリセルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) プロモーターの配列情報に基づいて作製された G G T C T A G A G C A A T G A T T G A C A C G A T T C G (配列番号 1 4) とエシェリヒア・コリ MG 1 6 5 5 株の f u c O の配列情報に基づいて作製された C A G G T A C C A T C C T T A T C A C C A G C A A C C (配列番号 1 5) を用いて、実施例 1 で作製した発現ベクター p G A P f u c O を鋳型として P C R を行い、G A P D H プロモーターと f u c O の開始コード近傍領域からなる約 7 3 0 b p の DNA フラグメントを得た。

30

【 0 0 6 0 】

上記により得られたフラグメントをそれぞれ、制限酵素 P s t I と X b a I、X b a I と K p n I で消化し、このフラグメントを温度感受性プラスミド p T H 1 8 c s 1 (G e n B a n k a c c e s s i o n n u m b e r A B 0 1 9 6 1 0) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene,

241, 185-191 (2000)] を P s t I と K p n I で消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、D H 5 株に 3 0 ° で形質転換し、クロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 液体培地で 3 0 ° で一晚培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドを MG 1 6 5 5 株に 3 0 ° で形質転換し、クロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに 3 0 ° で一晚培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 液体培地に接種し、3 0 ° で一晚培養した。次にこれらの培養菌体得られるようにクロラムフェニコール 1 0 μ g / m l を含む L B 寒天プレートに塗布し、4 2 ° で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まない L B 液体培地で 3 0 ° で一晚培養し、さらに薬剤を含まない L B 寒天プレートに塗布して 4 2 ° で生育するコロニーを得た。

40

【 0 0 6 1 】

50

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、クロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりGAPDHプロモーターとfucO部分配列を含む約730bp断片を増幅させ、fucOプロモーター領域がGAPDHプロモーターに置換されている株を選抜し、以上を満足するクローンをMG1655 fucO欠失GAPpfucOゲノム挿入株と命名した。

【実施例10】

【0062】

MG1655 fucO欠失GAPpfucOゲノム挿入株によるグリコール酸生産

10

実施例3と同様にエシェリヒア・MG1655 fucO欠失GAPpfucOゲノム挿入株を培養し、集菌、洗浄の後、得られた菌体に対し、実施例3と同様にエチレングリコールを添加し、24時間反応を行った。グリコール酸の蓄積は確認されなかった。

【実施例11】

【0063】

低コピーベクターを用いたfucO発現ベクターの構築

エシェリヒア・コリMG1655株のグリセルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)プロモーターの配列情報に基づいて作製されたAACGAATTCTTCGCAATGATTTGACACGATTC(配列番号3)とエシェリヒア・コリMG1655株のfucOの配列情報に基づいて作製されたGTGAAGCTTGCAATTTACCA GGC GG TATGG(配列番号2)を用いて、実施例1で作製した発現ベクターpGAPpfucOを鋳型としてPCRを行い、GAPDHプロモーターとfucOからなる約1300bpのDNAフラグメントを得た。

20

【0064】

このDNAフラグメントとプラスミドpACYC184(GenBank accession number X06403)を制限酵素HincIIで消化することで得られるフラグメントを混合し、リガーゼを用いて結合した後、エシェリヒア・コリDH5株に形質転換し、クロラムフェニコール20 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール20 μ g/mlを含むLB液体培地で37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、得られた菌体からプラスミドpACYCfucOを回収した。このプラスミドpACYCfucOをエシェリヒア・コリMG1655株に形質転換し、クロラムフェニコール20 μ g/mlを含むLB寒天プレートで37 $^{\circ}$ Cで一晩培養することによりMG1655/pACYCfucO株を得た。

30

【実施例12】

【0065】

MG1655/pACYCfucO株によるグリコール酸生産

実施例3と同様にエシェリヒア・MG1655/pACYCfucO株を培養し、集菌、洗浄の後、得られた菌体に対し、実施例3と同様にエチレングリコールを添加し、9時間反応を行った。反応により28gのグリコール酸が蓄積した。

【実施例13】

【0066】

MG1655野生株、MG1655 fucO欠失GAPpfucOゲノム挿入株、MG1655/pACYCfucO株、MG1655/pGAPfucO株のラクトアルデヒドレダクターゼ活性測定

それぞれの菌株を実施例3と同様に培養した。培養後の菌体を集菌、洗浄の後、50mMリン酸カリウム緩衝液pH7.4に懸濁し、超音波破碎した。破碎後の菌体抽出液を遠心分離し、その上清をラクトアルデヒドレダクターゼ活性測定に用いた。活性測定は基質にエチレングリコールを用い、反応により生成する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの増加を分光光度計で測定することで実施した。反応に用いた可溶性タンパク質重量当たりの1分間の還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの生成量を算出し、

40

50

MG1655野生株の値を1とした際の結果を表4（表4）に示す。

【0067】

MG1655 f u c O 欠失 G A P p f u c O ゲノム挿入株においてもラクトアルデヒドレダクターゼ活性がMG1655野生株の18倍と有意に上昇しているものの、グリコール酸生産にはその活性上昇は十分ではなく、少なくとも低コピーベクターの導入により活性を強化した場合の1700倍程度の活性上昇が、ラクトアルデヒドレダクターゼ単独強化によるグリコール酸生産に必要であることが示された。

【0068】

【表4】

表4

	MG1655野生株	MG1655 f u c O 欠失 G A P p f u c O ゲノム挿入株	MG1655 / p A C Y C f u c O 株	MG1655 / p G A P f u c O 株
ラクトアルデヒドレダクターゼ相対活性	1	18.3	1783.7	3724.1

【実施例14】

【0069】

エシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株、エシェリヒア・コリMG1655野生株によるL-グリセリン酸生産

実施例3と同様にエシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株、およびエシェリヒア・コリMG1655野生株を培養し、集菌、洗浄の後、得られた菌体に対し、実施例3においてエチレングリコールを添加する代わりにグリセロールを150 g / L の濃度となるよう一括添加し、最終液量を500 ml として24時間反応を行った。得られた培養液中のL-グリセリン酸蓄積量を光学異性体分割用カラムを用いHPLCで定法にしたがって測定した。エシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株において24時間で67 g / L のL-グリセリン酸の蓄積が確認された。エシェリヒア・コリMG1655野生株においてはL-グリセリン酸の蓄積は確認されなかった。

【実施例15】

【0070】

エシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株、エシェリヒア・コリMG1655野生株によるヒドロキシエトキシ酢酸生産

実施例3と同様にエシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株、エシェリヒア・コリMG1655野生株を培養した。培養開始後24時間の菌体を遠心分離（8000 rpm、20分間）により集菌し、1 mMリン酸カリウム緩衝液 pH 7.2 で洗浄した。洗浄後の菌体約300 mg を同緩衝液で懸濁し終濃度100 mM のジエチレングリコール存在下、最終液量4 ml で18時間反応を行った。反応は大気圧下、反応温度37℃でマグネティックスターラーにより攪拌しつつ行った。得られた反応液中のヒドロキシエトキシ酢酸をHPLCで定法に従って測定した。エシェリヒア・コリMG1655 / p G A P f u c O 株において1 g / L のヒドロキシエトキシ酢酸の蓄積が確認された。ジグリコール酸をはじめとするジエチレングリコール由来の副生物は検出されなかった。またエシェリヒア・コリMG1655野生株においてはヒドロキシエトキシ酢酸の蓄積は確認されなかった。

【実施例16】

【0071】

エシェリヒア・コリMG1655 g l c D E F 遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア・コリのゲノムDNAの全塩基配列は公知であり（GenBank a

10

20

30

40

50

ccession number U00096)、エシェリヒア・コリの g l c D E F 遺伝子の塩基配列もすでに報告されている (GenBank accession number L43490)。エシェリヒア・コリ MG1655 株のゲノム DNA の g l c D E F 遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、T T G G T A C C G T T C T G C C A G C A A C T G A C G (配列番号 16) と T G T C T A G A G T A C C T C T G T G C G T C A C T G G (配列番号 17)、G C T C T A G A C G C T T T G T T G T G T T G T G T G G (配列番号 18) と A A C T G C A G G A T C G G T C A A T G A T T G C A G C (配列番号 19) を用いて P C R を行った。得られた DNA フラグメントをそれぞれ、制限酵素 K p n I と X b a I、X b a I と P s t I で消化することにより、それぞれ約 670 bp、790 bp のフラグメントを得た。この DNA フラグメントを温度感受性クローニングベクター p T H 18 c s 1 (GenBank accession number A B 019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] を K p n I、P s t I で消化して得られるフラグメントと混合し、リガーゼを用いて結合した後、D H 5 株に 30 で形質転換し、クロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 液体培地で 30 で一晚培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドを p T H g l c D E F と命名した。

10

【0072】

プラスミド p T H g l c D E F をエシェリヒア・コリ MG1655 株に 30 で形質転換し、クロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 寒天プレートに 30 で一晚培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 液体培地に接種し、30 で一晚培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 寒天プレートに塗布し、42 で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まない L B 液体培地で 30 で一晚培養し、さらに薬剤を含まない L B 寒天プレートに塗布して 42 で生育するコロニーを得た。

20

【0073】

出現したコロニーの中から無作為に 100 コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まない L B 寒天プレートとクロラムフェニコール 10 μg / ml を含む L B 寒天プレートに生育させ、薬剤を含まない L B 寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体 DNA から P C R により g l c D E F 遺伝子を含む約 3.8 kb 断片を増幅させ、g l c D E F 遺伝子領域が欠失している株を選抜し、得られた株を MG1655 g l c D E F 遺伝子欠失株 (以下 g l c D E F 株と略することがある) と命名した。

30

【実施例 17】

【0074】

エシェリヒア・コリ MG1655 p f l B 遺伝子欠失株の作製

エシェリヒア・コリの p f l B 遺伝子の塩基配列はすでに報告されている (GenBank accession number X08035)。MG1655 株の染色体 DNA の p f l B 遺伝子近傍領域の遺伝子情報に基づいて作成された、G C A C G A A A G C T T T G A T T A C G (配列番号 20) と T T A T T G C A T G C T T A G A T T T G A C T G A A A T C G (配列番号 21)、T T A T T G C A T G C T T A T T T A C T G C G T A C T T C G (配列番号 22) と A A G G C C T A C G A A A A G C T G C A G (配列番号 23) を用いて P C R を行った。得られた DNA フラグメントをそれぞれ、制限酵素 H i n d I I I と S p h I、S p h I と P s t I で消化することにより、それぞれ約 1770 bp、約 1340 bp のフラグメントを得た。この DNA フラグメントを温度感受性クローニングベクター p T H 18 c s 1 (GenBank accession number A B 019610) [Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)] を H i n d I I I、P s t I で消化して得られるフラグメントと

40

50

混合し、リガーゼを用いて結合した後、DH5株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。得られたコロニーをクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB液体培地で30℃で一晩培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。このプラスミドをエシェリヒア・コリMG1655株に30℃で形質転換し、クロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに30℃で一晩培養し、形質転換体を得た。得られた形質転換体をクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB液体培地に接種し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体を得られるようにクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。得られたコロニーを薬剤を含まないLB液体培地で30℃で一晩培養し、さらに薬剤を含まないLB寒天プレートに塗布して42℃で生育するコロニーを得た。

10

【0075】

出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれを薬剤を含まないLB寒天プレートとクロラムフェニコール10μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、薬剤を含まないLB寒天プレートにのみ生育するクロラムフェニコール感受性のクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpflB遺伝子を含む約2.0kb断片を増幅させ、pflB遺伝子領域が欠失している株を選抜し、得られた株をMG1655 pflB遺伝子欠失株（以下 pflB株と略することがある）と命名した。

20

【実施例18】

【0076】

エシェリヒア・コリMG1655 pflB & glcDEF 遺伝子欠失株の作製

実施例16において得られたプラスミドpTH glcDEFを pflB株に形質転換し、最終的にMG1655 pflB & glcDEF 遺伝子欠失株（以下 pflB glcDEF株と略することがある）を得た。詳細な方法は実施例16に記載された方法に準じた。

【実施例19】

【0077】

glcDEF / pGAPfucO株、pflB / pGAPfucO株、 pflB glcDEF / pGAPfucO株の構築

30

実施例1において得られたプラスミドpGAPfucOを実施例16において得られたglcDEF株、実施例17で得られたpflB株、および実施例18で得られたpflB glcDEF株にそれぞれ形質転換し、アンピシリン50μg/mlを含むLB寒天プレートで37℃で一晩培養することで glcDEF / pGAPfucO株、pflB / pGAPfucO株、 pflB glcDEF / pGAPfucO株を得た。

【実施例20】

【0078】

glcDEF / pGAPfucO株、pflB / pGAPfucO株、 pflB glcDEF / pGAPfucO株によるグリコール酸生産

40

実施例3で得られたMG1655 / pGAPfucO株、実施例19において得られたglcDEF / pGAPfucO株、pflB / pGAPfucO株、 pflB glcDEF / pGAPfucO株について実施例3と同様に培養を行った。培養開始後24時間の菌体を遠心分離（8000rpm、20分間）により集菌し、蒸留水で洗浄した。洗浄後の集菌体を75g秤量し、エチレングリコール150gと共に蒸留水に懸濁し最終液量を1500mlとした。懸濁液をABLE社製培養装置DPC-2の培養槽に移し、22時間反応を行った。反応は大気圧下、通気量0.7vvm、攪拌速度800rpm、反応温度35℃、pH7.2（NH₃水溶液で調整）で行った。得られた反応液中のグリコール酸およびシュウ酸、酢酸の蓄積量、さらにエチレングリコールの残存量をHPLCで定法に従って測定した。結果を表5（表5）に示す。glcDEF遺伝子、且つ／

50

または p f l B 遺伝子の欠失によりシュウ酸、酢酸といった副生有機酸の低減が可能となり、さらにエチレングリコールの転化率が向上し、グリコール酸の生産性が飛躍的に向上した。

【 0 0 7 9 】

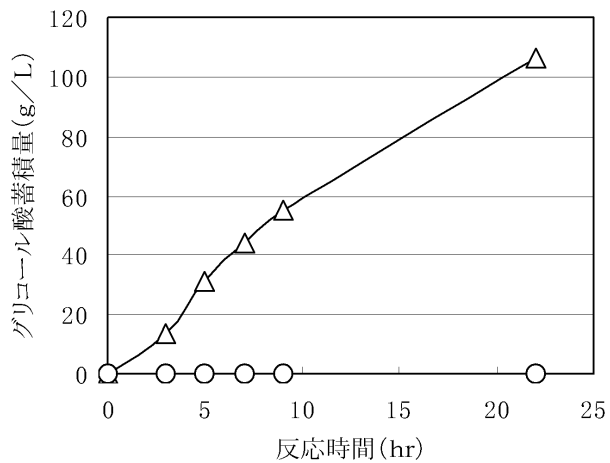
【表 5】

表 5

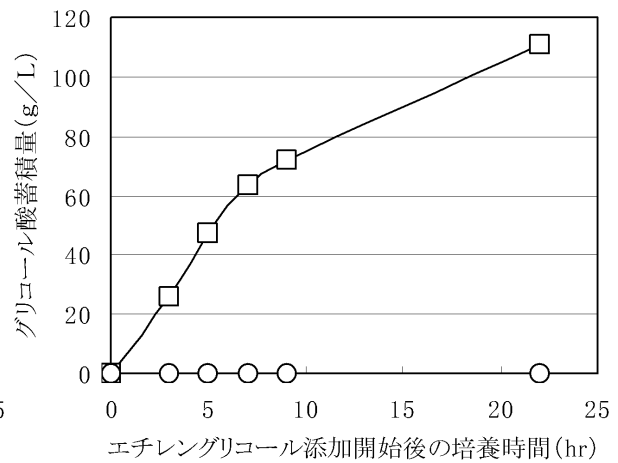
	M G 1 6 5 5 / p G A P f u c O株	△g l c D E F / p G A P f u c O株	△p f l B / p G A P f u c O 株	△p f l B △g l c D E F / p G A P f u c O 株
グリコール酸 (g)	1 0 2 . 0	1 8 0 . 2	1 7 6 . 7	1 7 9 . 4
エチレングリ コール (g)	6 0 . 5	(検出されず)	0 . 5	(検出されず)
シュウ酸 (g)	4 . 0 6	1 . 1 1	2 . 8 8	1 . 2 3
酢酸 (g)	0 . 1 3	0 . 1 8	0 . 1 0	0 . 1 0

10

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0004523939000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 高橋 均
千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
- (72)発明者 森重 敬
千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
- (72)発明者 高橋 克幸
千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内

審査官 小川 明日香

- (56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 0 8 4 2 8 (W O , A 1)
特開平 1 0 - 1 7 4 5 9 3 (J P , A)
特開昭 5 4 - 1 1 9 0 8 9 (J P , A)
J Bacteriol. , 1 9 8 3 年 , Vol.153 , pp.134-139
J Bacteriol. , 1 9 8 9 年 , Vol.171 , pp.6097-6105
J Bacteriol. , 1 9 9 1 年 , Vol.173 , pp.6118-6123
J Biol Chem. , 1 9 8 3 年 , Vol.258 , pp.7788-7792
J Bacteriol. , 1 9 9 6 年 , Vol.178 , pp.2051-2059
Eur J Biochem. , 1 9 8 8 年 , Vol.177 , pp.153-158
Biosci Biotechnol Biochem. , 2 0 0 1 年 , Vol.65 , pp.2265-2270

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12P 7/42
C12N 1/21
C12N 15/09
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)