

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6578056号
(P6578056)

(45) 発行日 令和1年9月18日(2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日(2019.8.30)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 P	13/06	(2006.01)	C 1 2 P	13/06	B
C 1 2 N	15/01	(2006.01)	C 1 2 N	15/01	Z

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2018-510395 (P2018-510395)	(73) 特許権者	513178894
(86) (22) 出願日	平成28年8月25日 (2016.8.25)		シージェイ チェイルジェダン コーポレーション
(65) 公表番号	特表2018-525012 (P2018-525012A)		大韓民国、ソウル 100-400、チュング、トンホーロ、330
(43) 公表日	平成30年9月6日 (2018.9.6)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/009438		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02017/034343	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成29年3月2日 (2017.3.2)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成30年2月23日 (2018.2.23)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	10-2015-0119785		弁理士 鎌田 光宣
(32) 優先日	平成27年8月25日 (2015.8.25)	(74) 代理人	100121212
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		弁理士 田村 弥栄子
微生物の受託番号	KCCM KCCM11661P	(74) 代理人	100163658
微生物の受託番号	KCCM KCCM11662P		弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-ロイシンを生産する微生物及びこれを用いたL-ロイシンの生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

受託番号 K C C M 1 1 6 6 1 P 変異株及び受託番号 K C C M 1 1 6 6 2 P 変異株からなる群から選択された L ロイシン生産能を有するコリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) 変異株。

【請求項2】

前記変異株が、L ロイシン及びその誘導体に対して耐性を有するものである、請求項1に記載の変異株。

【請求項3】

前記 L ロイシン誘導体が、ノルロイシン (Norleucine、NL) である、請求項2に記載の変異株。

【請求項4】

請求項1に記載の変異株を培養する段階及び前記変異株またはその培養物から L ロイシンを回収する段階を含む L ロイシンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、L ロイシンの生産能を有する微生物及びこれを用いた L ロイシンの製造方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acid) は、L バリン、L ロイシン、L イソロイシンの3種を称し、主に筋肉で代謝されて活動時にエネルギー源として使用されると知られている。分岐鎖アミノ酸が活動時の筋肉の維持及び増量に重要な役割をすると知られてから、その使用量が増加している。特に、L ロイシンは必須アミノ酸の一種であって、医薬、食品、飼料添加物及び工業薬品などに広範囲に用いられる。

【 0 0 0 3 】

一方、微生物を用いた分岐鎖アミノ酸の生産は、主にエシェリキア属微生物またはコリネバクテリウム属微生物を介して行われ、ピルビン酸からいくつかの段階を経てケトイソカプロン酸 (2 ketoisocaproate) を前駆体として生合成されると知られている (特許文献1及び特許文献2)。しかしながら、前記ロイシン生合成に関与する酵素は、最終産物であるL ロイシンまたはその誘導体によるフィードバック阻害が発生し、工業的にL ロイシンを大量製造するのに問題点があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 4 】

【特許文献1】韓国特許登録番号第10 0220018号

【特許文献2】韓国特許登録番号第10 0438146号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

本発明者らは、従来の菌株よりも収率がよいL ロイシン生産微生物を開発するために鋭意努力した結果、グルタミン酸生産微生物を用いて得られた変異株がロイシン誘導体であるノルロイシン (Norleucine、NL) に対して耐性を有し、L ロイシンまたはその誘導体に対するフィードバック阻害が解除されて、より高い収率でL ロイシンを生産するという事実を発見し、本出願を完成した。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本出願の一つの目的は、新規なL ロイシン生産能を有するコリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) 変異株を提供することにある。

【 0 0 0 7 】

本出願の他の目的は、前記変異株を用いてL ロイシンを製造する方法を提供することにある。

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本出願のコリネ型微生物は、L ロイシン及びその誘導体に対する耐性を有することにより、L ロイシンのフィードバック阻害を受けず、L ロイシンの生産能が親菌株に比べて向上された微生物である。したがって、前記微生物を用いる本出願のL ロイシンの製造方法によれば、L ロイシンを高効率及び高収率で製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図1】本出願の最終産物であるL ロイシンの生合成経路を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

本出願は、一つの形態として、新規なL ロイシン生産能を有するコリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) 変異株を提供する。具体的には、L ロイシン生産用コリネバクテリウム・グルタミカム変異株KCCM11661PまたはKCCM11662Pを提供する。

【 0 0 1 1 】

本出願で用語、「L ロイシン」は、必須アミノ酸の1つであって、構造的にL バリ

10

20

30

40

50

ン、L イソロイシンと共に分岐鎖アミノ酸に該当する化学式 $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ である L アミノ酸を意味する。

【0012】

一方、微生物における L ロイシンの生合成は、図1に示した生合成過程を介してピルビン酸からアセト乳酸 (acetolactic acid)、ジヒドロキシイソ吉草酸 (dihydroxy isovaleric acid)、ケトイソ吉草酸 (ketoisovaleric acid)、2 イソプロピルリンゴ酸 (isopropylmalic acid)、3 イソプロピルリンゴ酸 (isopropylmalic acid)、ケトイソカプロン酸 (isocaproic acid) を経由して生合成されることが知られている。また、このような生合成過程は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (acetohydroxy acid synthase)、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (acetohydroxy acid isomeroeductase)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (dihydroxy acid dehydratase)、イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (isopropylmalic acid synthase)、イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ (isopropylmalic acid dehydratase)、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (isopropylmalic acid dehydrogenase)、トランスアミナーゼ B (transaminase B) のような酵素によって触媒されて生合成される。しかし、前記酵素は分岐鎖アミノ酸、すなわち、L バリン、L イソロイシン、L ロイシンはその生合成過程に同一に用いられるため、1つの分岐鎖アミノ酸を発酵を通じて工業的に製造するのは困難である。また、最終産物である L ロイシンまたはその誘導体によるフィードバック阻害が発生して工業的に L ロイシンを大量製造するのに問題点があった。そこで、本出願の前記変異株は、L ロイシンまたはその誘導体に耐性を有しうる。

【0013】

本出願で用語、「誘導体」は、本出願の最終産物である L ロイシンの生合成に関連してフィードバック阻害を誘発し、微生物から L ロイシンの生産能を阻害しうると公知された化合物を意味してもよい。その例として、イソロイシン (isoleucine)、テルロイシン (terleucine)、ノルロイシン (norleucine)、シクロロイシン (cycloleucine) などが挙げられるが、これに限定されない。具体的に、前記変異株はロイシン、イソロイシン、テルロイシン、ノルロイシン及びシクロロイシンからなる群から選択された1つ以上の物質に耐性を有してもよく、より具体的に、ノルロイシンに耐性を有してもよい。

【0014】

一般的に、細胞内で一定濃度以上の L ロイシンが蓄積されると、L ロイシン生合成が阻害されると知られている。したがって、前記誘導体に対して耐性を有する菌株は L ロイシンによる阻害が解除されて、高濃度の L ロイシンでも L ロイシンを生成することができる。

【0015】

本出願の L ロイシンの生産能を有する微生物は、親菌株を突然変異させて目的の変異株を得ることができる。このとき、微生物の突然変異誘発は、当該分野で広く知られている様々な手段によって行うことができ、物理的または化学的突然変異の発生のいずれかの方法を用いてもよい。例えば、本出願に適合した化学的突然変異の誘発要因として、N メチル N' ニトロ N ニトロソグアニジン (N Methyl N' nitro N nitrosoguanidine、NTG)、ジエポキシブタン、エチルメタンスルホネート、マスタード化合物、ヒドラジン及び亜硝酸を用いてもよいが、これらの化合物に限定されるものではない。また、物理的な突然変異の誘発要因は、紫外線及びガンマ線を用いてもよいが、これに限定されるものではない。

【0016】

突然変異誘発の際に、親菌株は特定サイズの生存個体群を残す程度の濃度で突然変異の誘発因子によって影響を受ける。前記サイズは、突然変異の誘発因子の種類に応じて変化し、突然変異の因子が一定の殺生率で生存個体群内で誘発する突然変異の量に依存する。例えば、NTGの場合、殺生率は出発個体群の10%~50%程度を残すことができる。亜硝酸による突然変異の発生は、出発個体群の0.01%~0.1%程度を残すことができ、紫外線による突然変異の発生は、約1.0%程度を残すことができるが、これに限定

10

20

30

40

50

されるものではない。

【0017】

本出願は、もう一つの様態として、前記変異株を培養する段階及び前記変異株またはその培養物からL ロイシンを回収する段階を含むL ロイシンの製造方法を提供する。

【0018】

本出願の用語、「培養」は、微生物を適当に人工的に調節した環境条件で生育させることを意味する。本出願の微生物を培養する方法は、当業界に広く知られているコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) の培養方法を用いて行ってもよい。具体的に、前記培養方法の例には、回分式培養 (batch culture)、連続式培養 (continuous culture) と流加式培養 (fed batch culture) が含まれるが、これに限定されるものではない。これらの様々な方法は、例えば、「Biochemical Engineering」(James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991) などに開示されている。

10

【0019】

本出願の用語、「培養物」は、微生物を適当に人工的に調節した環境条件下で生育中であるか、または生育完了された培地を含む物質を意味する。狭い意味で前記培養物には生育された微生物は含まないが、広い意味では含まれてもよい。前記「培養物」は、微生物の培養のために組成された培地成分と一緒に微生物が生育中に培地内に排出させた様々な物質を含み、具体的に目的物質であるロイシンが含まれている。

【0020】

培養に使用される培地は、適切な方法で特定菌株の要件を満たす必要がある。コリネバクテリア菌株の培養培地は公知となっている(例えば、Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981)。使用されてもよい糖源としては、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、でん粉、セルロースのような糖及び炭水化物、大豆油、ひまわり油、ヒマシ油、ココナッツ油のような油及び脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸のような脂肪酸、グリセロール、エタノールのようなアルコール、酢酸のような有機酸が含まれてもよいが、これに限定されない。これらの物質は、個別に、または混合物として使用してもよい。使用されてもよい窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、肉汁、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液、大豆、小麦及び尿素または無機化合物、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウムが含まれてもよいが、これに限定されない。窒素源も、個別に、または混合物として使用してもよい。使用されてもよいリン源としては、リン酸二水素カリウムまたはリン酸水素二カリウムまたは相応するナトリウム含有塩が含まれてもよいが、これに限定されない。また、培養培地は成長に必要な硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄のような金属塩を含んでもよい。その他、前記物質に加えて、アミノ酸及びビタミンのような必須成長物質が含まれてもよい。また、培養培地に適切な前駆体を使用されてもよい。前記の原料は、培養過程で培養物に適切な方法によって回分式または連続式で添加されてもよい。

20

30

【0021】

一方、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアのような基礎化合物またはリン酸または硫酸のような酸化合物を適切な方法で用いて培養物のpHを調節してもよい。また、脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を用いて気泡生成を抑制してもよい。好気状態を維持するために培養物内に酸素または酸素含有気体(例えば、空気)を注入する。培養物の温度は、通常20 ~ 45 であってもよい。培養は、目的のL ロイシンの生成量が最大に得られるまで続ける。この目的に、通常、10 ~ 160 時間で達成される。L ロイシンは培養培地中に排出されたり、細胞中に含まれていてもよい。

40

【0022】

本出願で用いられるL ロイシンの回収方法は、当業界で知られている方法、例えば、遠心分離、ろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化及びHPLCなどを用いてもよいが、これらの例に限定されるものではない。

50

【実施例】

【0023】

以下、本出願を下記の実施例により詳細に説明する。但し、下記の実施例は、本出願を例示するものに過ぎず、本出願の内容が下記実施例により限定されるものではない。

【0024】

実施例1：人工変異法による変異株の選別

L ロイシンの生産能を有する微生物変異株を得るために下記のような方法を用いて微生物の変異を誘導した。

【0025】

具体的には、親菌株であるグルタミン酸を生産するコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 4 0 6 7 とコリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 8 6 9 を活性化培地で16時間培養し、活性化された菌株を121 で5分間滅菌した種培地に接種して、14時間培養した後、培養液5mlを回収した。回収した培養液を100mMクエン酸緩衝溶液(citric buffer)で洗浄した後、NTG(N Methyl N' nitro N nitrosoguanidine)を最終濃度200mg/Lとなるよう添加した後、20分間処理して100mMリン酸緩衝溶液(phosphate buffer)で洗浄した。NTGで処理された菌株を最小培地に塗抹して死滅率を計算した結果、死滅率は85%であった。

10

【0026】

L ロイシンの誘導体に該当するノルロイシン(Norleucine、NL)に対する耐性変異株を選別するために、NTGが処理された菌株をNLの最終濃度がそれぞれ20mM、30mM、40mM及び50mMになるように添加された最小培地に塗抹し、30 で5日間培養してNL耐性変異株を獲得した。

20

【0027】

前記の方法で得られた変異株は、コリネバクテリウム・グルタミカム K C J 24 (Corynebacterium glutamicum KCJ 24)とコリネバクテリウム・グルタミカム K C J 28 (Corynebacterium glutamicum KCJ 28)と命名し、2015年1月22日付でブダペスト条約下の国際寄託機関である韓国微生物保存センターに寄託し、それぞれ受託番号K C C M 1 1 6 6 1 P 及び K C C M 1 1 6 6 2 P を与えられた。

【0028】

実施例1及び2で用いた培地の組成は下記の通りである。

30

【0029】

<活性化培地>

肉汁1%、ポリペプトン1%、塩化ナトリウム0.5%、酵母エキス1%、寒天2%、pH7.2

【0030】

<種培地>

グルコース5%、バクトペプトン1%、塩化ナトリウム0.25%、酵母エキス1%、要素0.4%、pH7.2

【0031】

<最小培地>

グルコース1.0%、硫酸アンモニウム0.4%、硫酸マグネシウム0.04%、リン酸第1カリウム0.1%、尿素0.1%、チアミン0.001%、ビオチン200µg/L、寒天2%、pH7.0

40

【0032】

実施例2：L ロイシン生産用変異株のL ロイシン生産性の調査

前記実施例1で得られた高濃度NL耐性変異株であるコリネバクテリウム・グルタミカム K C J 24 及びコリネバクテリウム・グルタミカム K C J 28 のL ロイシン生産性を確認するために、下記のような方法で培養した。

【0033】

種培地25mlを含有する250mlコーナーバツフル付フラスコに親菌株であるコリ

50

ネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067 (Corynebacterium glutamicum ATCC 14067)、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 (Corynebacterium glutamicum ATCC 13869) 及び前記変異株 2 種をそれぞれ接種した後、30 で 20 時間、200 rpm で振とう培養して種培養液を得た。その後、下記の生産培地 24 ml を含有する 250 ml コーナーバツフル付フラスコに 1 ml の種培養液を接種し、30、72 時間、200 rpm で培養して L-ロイシンを製造した。

【0034】

本実施例 2 で用いた生産培地の組成は下記の通りである。

【0035】

<生産培地>

グルコース 5%、硫酸アンモニウム 2%、第 1 リン酸カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.05%、CSL (トウモロコシ浸漬液) 2.0%、ビオチン 200 µg/L、pH 7.2

【0036】

培養終了後、液体高速クロマトグラフィーを用いて L-ロイシンの生産量を測定し、実験した各菌株に対する培養液中の L-ロイシン濃度は、下記表 1 に示した。

【0037】

【表 1】

コリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-24 及びコリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-28 の L-ロイシン生産性の比較

	コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067 (親菌株)	コリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-24 (変異株)	コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 (親菌株)	コリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-28 (変異株)
L-ロイシン濃度 (g/L)	0.1	2.7	0.3	3.1

【0038】

その結果、前記表 1 に示したように、親菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067 とコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 は、それぞれ 0.1 及び 0.3 g/L の濃度で L-ロイシンを生産したが、本出願による変異株コリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-24 とコリネバクテリウム・グルタミカム KCJ-28 は、それぞれ 2.7、3.1 g/L の濃度で L-ロイシンを生産して、親菌株に比べて約 10 倍以上 L-ロイシン生産性が増加したことを確認した。

【0039】

前記の結果は、L-ロイシン及びノルロイシンに対する耐性を有する変異株が、結果的にロイシンまたはその誘導体に対するフィードバック阻害を受けず、L-ロイシンを高効率及び高収率で生産しうることを意味する。

【0040】

10

20

30

40

特許出願のためのブダペスト条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

国際寄託機関により規則 7. 1 に従って発行された原寄託についての受託証

宛先：C J 第一製糖株式会社

大韓民国ソウル特別市中区東湖路 3 3 0, C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-24	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM11661P	
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)		20
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は 2015 年 1 月 22 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル特別市西大門区弘済1洞ユリムビル3 61-221 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は 権限を付与された者の署名： 署名日：2015年1月22日	30

 上記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2015年8月25日

弁理士 ソン・ミン 印

10

20

30

40

特許出願のためのブダペスト条約に基づく微生物の受託証明

国際様式

国際寄託機関により規則 7. 1 に従って発行された原寄託についての受託証

宛先：C J 第一製糖株式会社

大韓民国ソウル特別市中区東湖路 3 3 0, C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> KC J-2 8	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM11662P	
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 <input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)		20
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は 2015 年 1 月 22 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル特別市西大門区弘済1洞ユリムビル3 61-221 郵便番号 120-861	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は 権限を付与された者の署名： 署名日：2015年1月22日	30

 上記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2015年8月25日

弁理士 ソン・ミン 印

10

20

30

40

フロントページの続き

- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 ソン、ピョン チョル
大韓民国、17072 キョンギ - ド、ヨンイン - シ、キフン - グ、クムファ - ロ 58ボン - ギル、10、403 - 1001
- (72)発明者 イ、チ ヘ
大韓民国、13922 キョンギ - ド、アニャン - シ、トンアン - グ、クアナク - デロ、121、105 - 504
- (72)発明者 チョン、エ チ
大韓民国、07025 ソウル、トンジャク - グ、トンジャク - デロ 1 - ギル、45 - 1、1010ホ
- (72)発明者 キム、チヨ ヒュン
大韓民国、14052 キョンギ - ド、アニャン - シ、トンアン - グ、タルアン - ロ、124、403 - 1501
- (72)発明者 キム、ヘ ウオン
大韓民国、13607 キョンギ - ド、ソンナム - シ、プンダン - グ、ペクヒョン - ロ、206、417 - 506

審査官 斉藤 貴子

- (56)参考文献 韓国公開特許第10 - 1998 - 0039740 (KR, A)
米国特許第03865690 (US, A)
特公昭48 - 024275 (JP, B1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|-------|
| C12N | 1/20 |
| C12P | 13/06 |
| C12N | 15/00 |