

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年11月3日 (03.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/103275 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/22, C12N 1/21 // 15:09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006005
- (22) 国際出願日: 2004年4月26日 (26.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

- LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 筧雅博 (KAKEHI, Masahiro) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 岩谷 真太郎 (IWATANI, Shintaro) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 中西 一夫 (NAKANISHI, Kazuo) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 臼井 直規 (USUI, Naoki) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,



WO 2005/103275 A1

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING L-TRYPTOPHAN ACCORDING TO FERMENTATION PROCESS

(54) 発明の名称: 発酵法によるL-トリプトファンの製造法

(57) Abstract: L-tryptophan is produced by incubating a microbe capable of producing L-tryptophan and capable of constitutive expression of maleate synthase-isocitrate lyase-isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase operon in a culture medium so as to generate and accumulate L-tryptophan in the culture medium and harvesting the l-tryptophan.

(57) 要約: L-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現する細菌を培地に培養し、同培地中にL-トリプトファンを生成蓄積せしめ、これを探取することにより、L-トリプトファンを製造する。

明細書

発酵法によるL-トリプトファンの製造法

技術分野

本発明は、発酵法によるL-トリプトファンの製造方法に関する。L-トリプトファンは、飼料添加物、輸液等の医薬品原料等として、産業上有用である。

背景技術

L-アミノ酸は、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。

微生物を利用したL-トリプトファンの製造法としては、組換え体エシェリヒア・コリを用いる方法が特開昭57-71397号公報又は米国特許第4371614号明細書に記載されており、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) の変異株を用いる方法が特公昭53-39517号公報又は特公昭62-34399号公報に記載されており、組換え体バチルス・ズブチリスを用いる方法が特開昭61-104790号公報又は特公昭62-34399号公報に記載されており、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属の変異株を用いる方法が特開昭57-174096号公報に記載されており、更に組換え体ブレビバクテリウム属を用いる方法が特開昭62-51980号公報に記載されている。

これらのL-トリプトファン生産菌の育種は、主として各種アミノ酸生合成の共通経路、及びそれに続くL-トリプトファンの生合成の固有の経路における反応を触媒する酵素の増強、あるいは、L-トリプトファンによる調節（フィードバック阻害）を回避することにより行われてきた。具体的には、微生物への栄養要求性の付与、薬剤耐性の付与、組換えDNA手法による生合成系酵素遺伝子の増幅などが行われてきた。このような生合成系酵素遺伝子としては、L-トリプトファンオペロン等が知られている（特開昭57-71397号公報、特開昭62-244382号公報、米国特許第4371614号明細書、欧州特許公開第9789073号明細書又は特開平5-244970号公報）。

一方、L-グルタミン酸生産能を有し、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロン（以下、「aceオペロン」ともいう）の発現が構成的になったエシェリヒア属細菌の変異株は、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ欠損による生育の低下が改善され（J. Bacteriol., 96, 2185-2186, 1968）、L-グルタミン酸の生産能が向上することが知られている（特開平5-244970号公報）。しかし、aceオペロンの発現と、L-トリプトファン生産能の関係については知られていない。

また、微生物を用いてタンパク質の大量発現を行う際に、炭素源としてフルクトースを用いると酢酸の副生が低減して菌体収率が上昇することが報告されている（Biotechnol. Prog., 15, 140-145 (1999)）。しかし、L-トリプトファンの生産に伴い、L-トリプトファン類似物質が副生し、L-トリプトファン収率に影響を及ぼすことについては知られていない。

発明の開示

本発明は、微生物のL-トリプトファン酸生産能を向上させ、効率的なL-トリプトファンの製造法を提供することを課題とする。

本発明者らは、エシェリヒア属細菌のL-トリプトファン生産能向上に関し鋭意研究を重ねた結果、L-トリプトファン生産に伴いJATと名付けたL-トリプトファン類似物質が副生すること、及び、aceオペロンを構成的に発現させること又はトリプトファンシンターゼ活性を増強することによって、JATの副生を低減させ、L-トリプトファンの収率を高めることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は以下のとおりである。

(1) L-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、又は同オペロンの発現が強化された細菌を培地に培養し、同培地中にL-トリプトファンアミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取する、L-トリプトファンの製造法。

(2) 前記細菌は、*iclR*遺伝子の発現量が低下又は消失することにより、前記オペロンが構成的に発現する細菌である、(1)の製造法。

(3) 前記細菌がエシェリヒア属細菌である、(1)又は(2)の製造法。

(4) *L*-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、又は同オペロンの発現が強化されたエシェリヒア属細菌。

(5) *iclR*遺伝子が破壊されたことにより前記オペロンが構成的に発現する(4)のエシェリヒア属細菌。

(6) *L*-トリプトファン生産能を有する細菌を培地中で培養して同培地中に*L*-トリプトファンを生成蓄積せしめ、*L*-トリプトファンを採取する*L*-トリプトファンの製造法において、前記細菌として、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、もしくは同オペロンの発現が強化された細菌、またはトリプトファンシンターゼの発現が強化された細菌を用いることにより、*L*-トリプトファン類似物質の副生を減少させる方法。

(7) *L*-トリプトファン類似物質がJATである、(6)の方法。

図面の簡単な説明

図1は温度感受性複製開始起点を有するプラスミドベクターpTS1の構造を示す図である。

図2は発酵生産物のODSカラムクロマトグラムを示す図である。数値は溶出時間(分)を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の*L*-トリプトファンの製造法に用いる細菌は、*L*-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現する

か、又は同オペロンの発現が強化された細菌である。

本発明に用いる細菌としては、エシェリヒア細菌、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属又はパントエア属、シュードモナス属、アースロバクター属、アエロバクター属に属する細菌等が挙げられる。これらの中では、エシェリヒア属細菌が好ましい。エシェリヒア属細菌として具体的には、エシェリヒア・コリが挙げられる。

本発明において「L-トリプトファン生産能」とは、細菌を培地に培養したときに、培地中に有意な量のL-トリプトファンを蓄積する能力、又は菌体中のL-トリプトファン含量を野生株又は非形質転換株に比べて増加させる能力をいう。

L-トリプトファン生産能を有する細菌は、変異株であっても、遺伝子組換え株であってもよい。変異株としては、L-トリプトファンの生合成に関与する酵素の細胞内の活性が上昇するような変異、具体的には酵素の発現量が上昇する変異、又はフィードバック阻害が解除される変異を有する変異株が挙げられる。変異株は、例えば、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤により、エシェリヒア属細菌の野生株又はその誘導体を処理することによって得ることができる。

一方、遺伝子組換え株としては、L-トリプトファンの生合成に関与する酵素をコードする遺伝子のコピー数が高められた株、該遺伝子の発現量が上昇するように発現調節配列が改変された株、又はフィードバック阻害が解除された酵素をコードする遺伝子が導入された株等が挙げられる。

L-トリプトファン生産能を有する細菌として好ましいものは、アントラニル酸合成酵素活性、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ活性もしくはトリプトファンシンターゼ活性のうち、1又は2以上の活性が増強された細菌である。

アントラニル酸合成酵素及びホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼは、それぞれL-トリプトファン及びL-セリンによるフィードバック阻害を受けるため、脱感作型の変異酵素を保持させることにより、酵素活性を強化することができる。具体的には、例えば、アントラニル酸合成酵素遺伝子 (trpE)、及び/又はホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (serA) を、フィードバック阻害を受け

ないように変異させ、得られた変異型遺伝子をエシェリヒア属細菌に導入することによって、脱感作型酵素を保持する細菌を取得することができる。

このような細菌としてより具体的には、脱感作型アントラニル酸合成酵素を保持するエシェリヒア・コリSV164に、脱感作型ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型serAを持つプラスミドpGH5 (W094/08031号参照) を導入することによって得られる形質転換株が挙げられる。

また、トリプトファンオペロンを含む組換えDNAが導入された細菌も、好適なL-トリプトファン生産菌である。具体的には、脱感作型アントラニル酸合成酵素をコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入されたエシェリヒア・コリが挙げられる (特開昭57-71397号、特開昭62-244382号、米国特許第4,371,614号)。また、トリプトファンオペロンのうち、トリプトファンシンターゼをコードする遺伝子 (trpBA) の発現を強化することによっても、L-トリプトファン生産能を向上又は付与することができる。トリプトファンシンターゼは、 α 及び β サブユニットからなり、それぞれtrpA (GenBank Accession No. V00364)、trpB (GenBank Accession No. V00365) によってコードされている。なお、トリプトファンシンターゼ活性は、Science 1958; 128(3328):p843-844に記載の方法によって測定することができる。trpAの塩基配列を配列番号15、trpBの塩基配列を配列番号17に示す。

また、L-トリプトファン生産能を有するエシェリヒア属細菌細胞内のホスホエノールピルビン酸の生産能を上昇させることによって、L-トリプトファン生産能を強化することができる (W097/08333号)。

前記の各酵素遺伝子又はオペロンは、当業者によく知られた通常の遺伝子の単離法にしたがって取得することができる。例えば、既知の配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリK-12株等のエシェリヒア属細菌の染色体DNAを鋳型にしてPCRを行うことにより、目的の遺伝子を取得することが可能である。

染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等、遺伝子のクローニング法及

び宿主への導入方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

遺伝子のコピー数を高めるには、目的遺伝子と細菌で機能するベクターを連結して組換えDNAを調製し、同組換えDNAで細菌を形質転換すればよい。また、形質転換は、D. A. 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。前記ベクターとしては、pUC19、pUC18、pUC118、pUC119、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pSTV28、pSTV29等が挙げられ、その他ファージベクターも使用することができる。

遺伝子のコピー数を高めることは、目的遺伝子を細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。細菌の染色体DNA上に目的遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

目的酵素の活性を上昇させるには、目的酵素をコードする遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される (特開平1-215280号公報参照)。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。

さらに、L-トリプトファン生産菌として、L-フェニルアラニン及びL-チロシン要求性の形質を有する菌株エシェリヒア・コリ AGX17(pGX44) [NRRL B-12263]、及びトリプトファンオペロンを含むプラスミドpGX50を保持する

AGX6 (pGX50) aroP [NRRL B-12264] (いずれも米国特許第 4, 371, 614号参照) 株が挙げられる。

本発明に用いる細菌は、上記のようなL-トリプトファン生産能を有する細菌であって、さらに、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロン (aceオペロン) が構成的に発現するか、又は同オペロンの発現が強化された細菌である。

マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロン (aceオペロン) が構成的に発現するとは、aceオペロンのプロモーターが、リプレッサータンパク質であるiclRにより抑制を受けないこと、抑制が解除されていることを意味する。

aceオペロンを構成的に発現していること、また同オペロンの発現が強化されていることは、aceオペロンがコードするタンパク質であるマレートシンターゼ (aceB)、イソシトレートリアーゼ (aceA)、イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼ (aceK) の酵素活性が非改変株、あるいは野生株と比べて増大していることによって確認出来る。

酵素活性の測定は、マレートシンターゼに関しては、グリオキシル酸に依存するアセチルCoAのチオエステル結合の分解を A_{232} の減少で測定する方法 (Dixon, G. H., Kornberg, H. L., 1960, *Biochem. J.*, 1;41:p217-233)、イソシトレートリアーゼに関しては、イソシトレートから生じるグリオキシル酸を2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体として測定する方法 (Roche, T. E., Williams J. O., 1970, *Biochim. Biophys. Acta*, 22;206(1): p193-195)、イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼに関しては、イソシトレートデヒドロゲナーゼに対するリン酸の脱着を ^{32}P を使用して測定する方法 (Wang, J. Y. J. and Koshland, D. E., Jr., 1982, *Arch Biochem. Biophys.*, 218, p59-67)などで確認出来る。

抑制を解除するためには、例えば、aceオペロン上のリプレッサー (iclR) の結合部位を、iclRが結合できないように改変すればよい。また、同オペロンのプロモーターを、iclRによって発現抑制を受けない強力なプロモーター (lacプロモーターなど) に置換することによって、抑制を解除することもできる。

また、iclR遺伝子の発現が低下又は欠失するように細菌を改変することによっ

て、aceオペロンの発現を構成的にすることもできる。具体的には、iclRをコードする遺伝子の発現調節配列を同遺伝子が発現しないように改変するか、同リプレッサーの機能が失われるようにコード領域を改変することによって、aceオペロンの発現の抑制を解除することができる。

iclR遺伝子は、エシェリヒア・コリ (EMBL/GenBank/DDBJ accession M31761, J. Bacteriol. 172, 2642-2649 (1990))、サルモネラ・チフィムリウム (EMBL/GenBank/DDBJ accession X52950, Nucleic Acids Res. 18, 3656-3656(1990)) 等で報告されている。また、iclR様遺伝子も、ストレプトマイセス・セリカラー (EMBL/GenBank/DDBJ accession AL117387, Mol. Microbiol. 21(1), 77-96(1996))、アシネトバクター Sp. NCIMB9871 (EMBL/GenBank/DDBJ accession AB026669) 等で報告されている。エシェリヒア・コリのiclR遺伝子の配列を配列番号5に示す。

前記iclRの発現もしくはiclRの機能を低下または消失させるには、細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、iclRの発現もしくはiclRの機能が低下又は消失した変異株を選択する方法が挙げられる。

また、変異処理の他に、iclR遺伝子の内部配列を欠失し、正常に機能するリプレッサーを産生しないように改変したiclR遺伝子 (欠失型iclR) を含むDNAで細菌を形質転換し、欠失型iclRと染色体上のiclRとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のiclRを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

欠失型iclRを、宿主染色体上のiclRと置換するには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と欠失型iclRとアンピシリン等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在

する*iclR*配列との組換えを起こし、染色体*iclR*と欠失型*iclR*との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカ）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常な*iclR*が優性であるので、形質転換株は正常なリプレッサーを発現する。

次に、染色体DNA上に欠失型*iclR*のみを残すために、2個の*iclR*の組換えにより1コピーの*iclR*を、ベクター部分（温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常な*iclR*が染色体DNA上に残され、欠失型*iclR*が切り出される場合と、反対に欠失型*iclR*が染色体DNA上に残され、正常な*iclR*が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上の*iclR*は、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型*iclR*が残った株を選択することによって、*iclR*が破壊された株を取得することができる。

また、本発明の細菌は*ace*オペロンの発現が強化されたものであってもよい。*ace*オペロンの発現の強化は、例えば、*ace*オペロンを含むDNAを*lac*プロモーターなどの強力なプロモーターに連結し、これをプラスミドや相同組換えによって細菌に導入することや、ファージDNAやトランスポゾンにより上記DNAを染色体上に多コピー存在させることによって行うことができる。*ace*オペロンを含むDNAとしては、GenBank Accession No. X12431 (AceBA) 及びM18974 (AceK) に登録されている塩基配列を含むDNAが挙げられる。AceBの遺伝子配列を配列番号9に、AceAの遺伝子配列を配列番号7に、AceKの遺伝子配列を配列番号11に示す。

上記のようにして得られる本発明の細菌を培地で培養し、L-トリプトファンを培地中に生成蓄積させ、該培地よりL-トリプトファンを採取することにより、L-トリプトファンを製造することができる。

本発明の細菌の培養は、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて常法により行

うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。尚、フルクトースを主要な炭素源として用いると、L-トリプトファンの対糖収率及び生産速度が向上する。

窒素源としては、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等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB1などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

培養は、用いる菌株に応じた条件で行えばよいが、具体的には、好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～7に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-トリプトファンの採取は、イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を適宜組み合わせることにより実施できる。

本発明の方法によれば、L-トリプトファンの生産に伴い副生するL-トリプトファン類似物質の産生が著しく減少する。すなわち、aceオペロンを構成的に発現させるか、もしくは同オペロンの発現を強化すること、又はトリプトファンシンターゼ活性を増強することによって、副生物の産生が減少する。L-トリプトファンの収率が向上するのは、その結果によると推定される。前記L-トリプトファン類似物質は、LC/MS、LC/NMRによる分析によって、以下の性質を有する物質であり、JATと名付けられた。

(1) LC/MSにより測定される分子量：189

(2) 化学式 $C_{11}H_{11}NO_2$

- (3) インドール骨格を有する。
- (4) 水酸基を有する。
- (5) ODSカラムクロマトグラフィー (L-column ODS 5 μm , $\Phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$; (財)化学物質評価研究機構)において、実施例4に示すリン酸バッファーとアセトニトリルの濃度勾配で溶出したときに、L-トリプトファンの直後に検出される (図2参照)。

したがって、本発明には、L-トリプトファン生産能を有する細菌を培地に培養し、同培地中にL-トリプトファンを生成蓄積せしめ、これを採取する、L-トリプトファンの製造法において、aceオペロンが構成的に発現するか、もしくは同オペロンの発現が強化されたエシェリヒア属細菌、またはトリプトファンシンターゼが強化された細菌を用いることにより、JAT副生を低減させ、L-トリプトファンの収率を高める方法も含まれる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例1. L-トリプトファン生産菌の構築

<1-1> serA遺伝子の導入

プラスミドpGH5 (国際公開第9408031号パンフレット) 上のホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (serA) の、トランスポゾンMudを用いた染色体上への挿入を試みた。MudIII1734を含有するプラスミドpCE1134 (特開平2-109985号公報) をBamHIで切断してlacオペロン含有DNA断片を除去し、平滑末端後SmaIリンカーを挿入した。このプラスミドをSmaIで再切断し自己閉環して得られたプラスミドをpMu1134と命名した。E. coli由来のserA遺伝子を含有するプラスミドpGH5からScaI、SalI切断にてserA含有DNA断片を切り出し、平滑末端後、上記のpMu1134のSmaIサイトに挿入することによって、pGH5由来のserA遺伝子が挿入されたMud (MudserAと命名) を搭載するプラスミドpMudserAを構築した。

L-トリプトファン生産菌SV164株 (国際公開第9408031号パンフレット) を受

容菌として、pMudserAを用いて定法に従いカナマイシン耐性付与を指標にしてMudserAを染色体上に転移させた菌株L1株を取得した。L1株は、サザンハイブリダイゼーション実験の結果、MudserAの挿入位置は一箇所のみと推定された。また、PCRによるMudserA含有染色体DNA断片のクローニングとその塩基配列決定にて、E. coli K-12染色体 (GenBank Accession No. U00096) 上のNo. 240,950の位置に挿入されていると同定された。

<1-2>trpオペロンの導入

次に、trpオペロンのトランスポゾンを用いた染色体上への挿入によるコピー数の追加を試みた。trpオペロン遺伝子はプラスミドpGX100より切り出した。pGX100は、pBR313に、脱感作型trpE遺伝子を有するE. coli MT^R#2株 (米国特許第4,371,614号明細書) 由来のDNA断片を挿入したものであり、XhoI、SmaI切断によって約7.6kbのtrpオペロン含有DNA断片を切り出すことができる。pGX100からXhoI、SmaI切断にてtrpオペロン含有DNA断片を切り出し、平滑末端後、上記のpCE1134のSmaIサイトに挿入した。同様のtrpオペロン含有DNA断片は、E. coli MT^R#2株染色体DNAより、配列表に記載した配列番号1及び2のプライマーを用いて直接PCR法によってクローニングすることも可能である。以上のようにして、MT^R#2株由来のtrpオペロン遺伝子が挿入されたMud (Mudtrp^Glacと命名) を搭載するプラスミドpMudtrp^Glac が構築された。

Mudtrp^Glacの染色体上への挿入によるコピー数の追加に先立ち、挿入株の選択マーカーとしてラクトース資化能相補を用いる目的で、宿主株へのラクトース資化能欠損の性質付与を実施した。L1株に、L-スレオニン生産菌B-3996 (特表平3-501682)の誘導株よりL1株にL-バリン耐性を導入した。定法に従い、PI形質導入実験を実施し、M9最小培地 (4g/L glucose、12.8g/L Na₂HPO₄·7H₂O、3g/L KH₂PO₄、0.5g/L NaCl、1g/L NH₄Cl、5mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂、1mg/L thiamine、20mg/L L-Phe、20mg/L L-Tyr、20mg/L L-Met、3mg/L pyridoxine、20mg/L L-Val、20mg/L tetracycline) に塗布し、出現したコロニーをVal耐性株とし、本菌株をL1ValRと名づけた。

ME8581株 (HfrH(valS←uxuAB):lacZ98::Tn10 relA1 thi-1、国立遺伝学研究所

に寄託) よりTn10由来のテトラサイクリン耐性を指標として、lacZ98::Tn10を定法に従いL1Va1RにP1形質導入した。得られた株は、予想通りラクトース資化能は欠損していた。次いで、ラクトース資化能は欠損しているが、Tn10自体は除去された株を取得するため、形質導入株からテトラサイクリン感受性株14-1-lac-tet^sを、レプリカ処理によって取得した。14-1-lac-tet^s株は、ラクトース資化能は欠損したままであった。サザンハイブリダイゼーション実験にて同株のTn10の状況を確認したところ、tet遺伝子にハイブリするバンドは検出されなかったが、Tn10のIS10領域にハイブリするバンドは検出されたので、本株ではlacZ遺伝子上にIS10が残存していると考えられた。

14-1-lac-tet^s株を受容菌として、pMudtrp^Glacを用いて定法に従いラクトース資化能相補を指標にしてMudtrp^Glacを染色体上に転移させた菌株N0. 202株を取得した。得られたトランスポゾン挿入株から挿入トランスポゾンあるいはトランスポゾン上の遺伝子が脱落しやすい場合には、栄養培地上で植え継ぎ、カナマイシン耐性、ラクトース資化能等を安定に保持する菌株を選択すればよい。No. 202株は、サザンハイブリダイゼーション実験の結果、Mudtrp^Glacの挿入位置は一箇所のみと推定された。また、PCRによるMudtrp^Glac含有染色体DNA断片のクローニングとその塩基配列決定にて、E. coli K-12染色体 (GenBank Accession No. U00096) 上のNo. 530, 249の位置に挿入されていると同定された。

実施例 2. Trp生産菌iclR破壊株の取得

< 2-1 > iclR破壊用プラスミド構築

Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、添付説明書にしたがってPCRを行いiclR断片を増幅した。その際、RNA/DNA maxi Kit (キアゲン) を用いて抽出したW3110ゲノムを鋳型とし、プライマーには配列表に示した配列番号3、配列番号4のオリゴヌクレオチドを用いた。PCR後の増幅DNA断片は、Wizard PCR Preps (プロメガ) を用いて精製した。精製したDNA断片を制限酵素EcoRI、HindIII (宝酒造) にて切断したのち、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行い精製した。この切断断片と、同酵素にて切断し精製したpUC18 (宝酒造) とを、DNA ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) をもちいて結合した。この結合反応液にてJM109コンピテン

ト細胞（宝酒造）を形質転換し、アンピシリン（Amp）（明治製菓）を50 µg/mL 含むLB寒天プレート（LB+Ampプレート）にまき、37°Cでコロニーを選択した。コロニーを50 µg/mL のAmpを含むLB培地で37°Cにて試験管培養し、自動プラスミド抽出機PI-50（クラボウ）を用いてプラスミド抽出を行った。

得られたプラスミドpUCic1Rを制限酵素*Eco*065I（宝酒造）にて切断した後、BKL kit（宝酒造）を用いて末端平滑化及び結合を行った。結合反応液にてJM109を形質転換し、上記のようにコロニーの選択、プラスミド抽出を行った。得られたプラスミドを*Eco*RI、*Hind*IIIで切断後精製し、同酵素で切断後精製した温度感受性プラスミドpTS1（pMAN031（J. Bacteriol. 162(3), 1196-1202）とpBR322（宝酒造）のそれぞれの*Pst* I-*Hind* III断片を繋ぎ換えたもの）と結合した。結合反応液にてJM109を形質転換し、LB+Ampプレートにて30°Cでコロニーを選択した。コロニーを50 µg/mL のAmpを含むLB培地で30°Cにて試験管培養し、上記のようにプラスミドを抽出した。*Eco*RI、*Hind*IIIで切断して目的長断片が得られるプラスミドを、*ic*1R破壊用プラスミドpTSΔ*ic*1Rとした。

< 2 - 2 > *ic*1R破壊株の取得

pTSΔ*ic*1RでNo. 202を形質転換し、LB+Ampプレートで30°Cでコロニーを選択した。30°Cで液体培養を一晩おこなった後 10^{-3} 希釈してLB+Ampプレートにまき、42°Cでコロニーを選択した。30°CでLB+Ampプレートに塗り広げた後、1/8プレート分の菌体をLB培地 2 mLに懸濁し、42°Cで4-5時間振とう培養した。 10^{-5} 希釈した菌体をLBプレートにまき得られたコロニーのうち数百コロニーをLBプレートとLB+Ampプレートに植菌し生育を確認することで、Amp感受性・耐性を確認した。Amp感受性株について配列番号3及び4のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてコロニーPCRを行い、増幅断片が*Eco*065Iにより切断されないものを*ic*1R欠損株（No. 202Δ*ic*1R）として取得した。

実施例 3. *trp*BA増幅株構築

配列表に記載した配列13及び14をプライマーとして上記と同様にPCR増幅、精製をおこなった。*Hind*III、*Sph*Iにて切断、精製後、同酵素で切断、精製したプラス

ミドpMW118（日本ジーン）と結合し、結合液にてJM109を形質転換した。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、*Hind*III、*Sph*I切断にて目的長の断片が得られるものをtrpBA増幅用プラスミド（pMW118trpBA）とした。

No. 202をプラスミドpMW118及びpMW118trpBAにて形質転換し、それぞれ形質転換体No. 202/pMW、No. 202/pMWtrpBAを得た。

実施例 4. iclR破壊株、trpBA増幅株のL-トリプトファン生産培養

これらNo. 202、No. 202 Δ iclR、No. 202/pMW、No. 202pMWtrpBAを用いて、500mlの三角フラスコに50mlのLBG培地（トリプトン1%、酵母抽出液0.5%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.5%）を張り込み、前培養を行った。30°Cで150回転で攪拌しながらの7~8時間の培養後にその前培養物の約1mlを300mlの種培地中に移行させた。種培地は、以下の組成のものを用いた。

グルコース	10g/L
KH ₂ PO ₄	2g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5g/L
大豆蛋白加水分解（全窒素として）	0.4g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10mg/L
MnSO ₄	10mg/L
L-メチオニン	50mg/L
L-フェニルアラニン	125mg/L
L-チロシン	125mg/L
ビタミンB ₁	5mg/L
ピリドキシン	30mg/L

（水酸化カリウムにてpH6.5に調節）。

この培地を1Lの小型発酵槽を用いて30°C、800回転で11~15時間培養させた。さらに発酵を主培養に移行した。主培養は1Lの小型発酵槽を用いて実施した。培地

は、以下の組成のものを用いた。

グルコース	15g/L
KH_2PO_4	1g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1g/L
大豆蛋白加水分解 (全窒素量)	0.75g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mg/L
MnSO_4	7.5mg/L
L-メチオニン	300mg/L
L-フェニルアラニン	1050mg/L
L-チロシン	1050mg/L
ビタミン B_1	5mg/L
ピリドキシン	30mg/L
塩化ナトリウム	0.5g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14.7mg/L
NH_4Cl	3.13g/L

種培養液30mlを小型発酵槽へ移送し、開始容量は約300mlであった。この培地をまず800回転で攪拌し、かつ滅菌フィルターにより滅菌した圧縮空気を1vvm通気した。また、培養期間中温度を31°Cで保持し、pHをアンモニアガスで6.7に保った。グルコース溶液700g/L (W/V) (オートクレーブで殺菌した) をポンプ輸送することによって小型発酵槽内のグルコース濃度を5~20g/Lに調節した。

上記培養におけるL-トリプトファン (Trp) の発酵成績を表1に示した。表1中、L-トリプトファンの発酵収率及び発酵生産性 (単位時間当たりの生産量) は、No. 202における値を1としたときの相対値で示した。また、JATの副生量に関しては、HPLCのTrpの面積から推定した。

No. 202及びNo. 202/pMWがJATの副生を示しているのに対し、No. 202 Δ iclR及びNo. 202/pMWtrpBAはこの副生がほとんど認められず、発酵収率並びに生産性が向上した。

表1. 202、202 Δ iclR、No. 202/pMW、No. 202pMWtrpBA株の発酵成績

菌株	Trp発酵収率 相対値	発酵生産性 相対値	JAT (mg/L)
No. 202	1	1	540
No. 202 Δ iclR	1.26	1.07	20
No. 202/pMW	1	0.89	289
No. 202/pMWtrpBA	1.13	1.12	48

なお、Trp及びJATの分析は以下のようにして行った。すなわち、20 μ Lの試料をL-column ODS-5 μ m, Φ 4.6 x 250 mmにインジェクションし、以下の条件で65分間溶出を行い、210nmの吸収を検出した。

バッファーA 25mM NaH₂PO₄ (リン酸でpH2.5に調整したもの):CH₃CN = 90:10

バッファーB 25mM NaH₂PO₄ (リン酸でpH2.5に調整したもの):CH₃CN = 60:40

バッファーC H₂O:CH₃CN = 30:70

温度40°C

流速1.0 mL/分

溶出条件

- (1) 0分 (A 100%) →32.5分 (A : B=65% : 35%) というリニアな濃度勾配
- (2) 32.5分 (A : B=65% : 35%) →38分 (C100%) というリニアな濃度勾配
- (3) 38-48分 (C100%)
- (4) 48分 (C 100%) →53分 (A 100%) というリニアな濃度勾配
- (5) 53-65分 (A 100%)

産業上の利用の可能性

本発明により、L-トリプトファンを効率よく製造することができる。また、L-トリプトファンの製造に伴う副生物の生成を減少させることができる。

請求の範囲

1. L-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、又は同オペロンの発現が強化された細菌を培地に培養し、同培地中にL-トリプトファンアミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取する、L-トリプトファンの製造法。

2. 前記細菌は、iclR遺伝子の発現量が低下又は消失することにより、前記オペロンが構成的に発現する細菌である、請求項1に記載の製造法。

3. 前記細菌がエシェリヒア属細菌である、請求項1又は2に記載のL-トリプトファンの製造法。

4. L-トリプトファン生産能を有し、かつ、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、又は同オペロンの発現が強化されたエシェリヒア属細菌。

5. iclR遺伝子が破壊されたことにより前記オペロンが構成的に発現する請求項4に記載のエシェリヒア属細菌。

6. L-トリプトファン生産能を有する細菌を培地中で培養して同培地中にL-トリプトファンを生成蓄積せしめ、L-トリプトファンを採取するL-トリプトファンの製造法において、前記細菌として、マレートシンターゼ・イソシトレートリアーゼ・イソシトレートデヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼオペロンが構成的に発現するか、もしくは同オペロンの発現が強化された細菌、またはトリプトファンシンターゼの発現が強化された細菌を用いることにより、L-トリプトファン類似物質の副生を減少させる方法。

7. L-トリプトファン類似物質がJATである、請求項6に記載の方法。

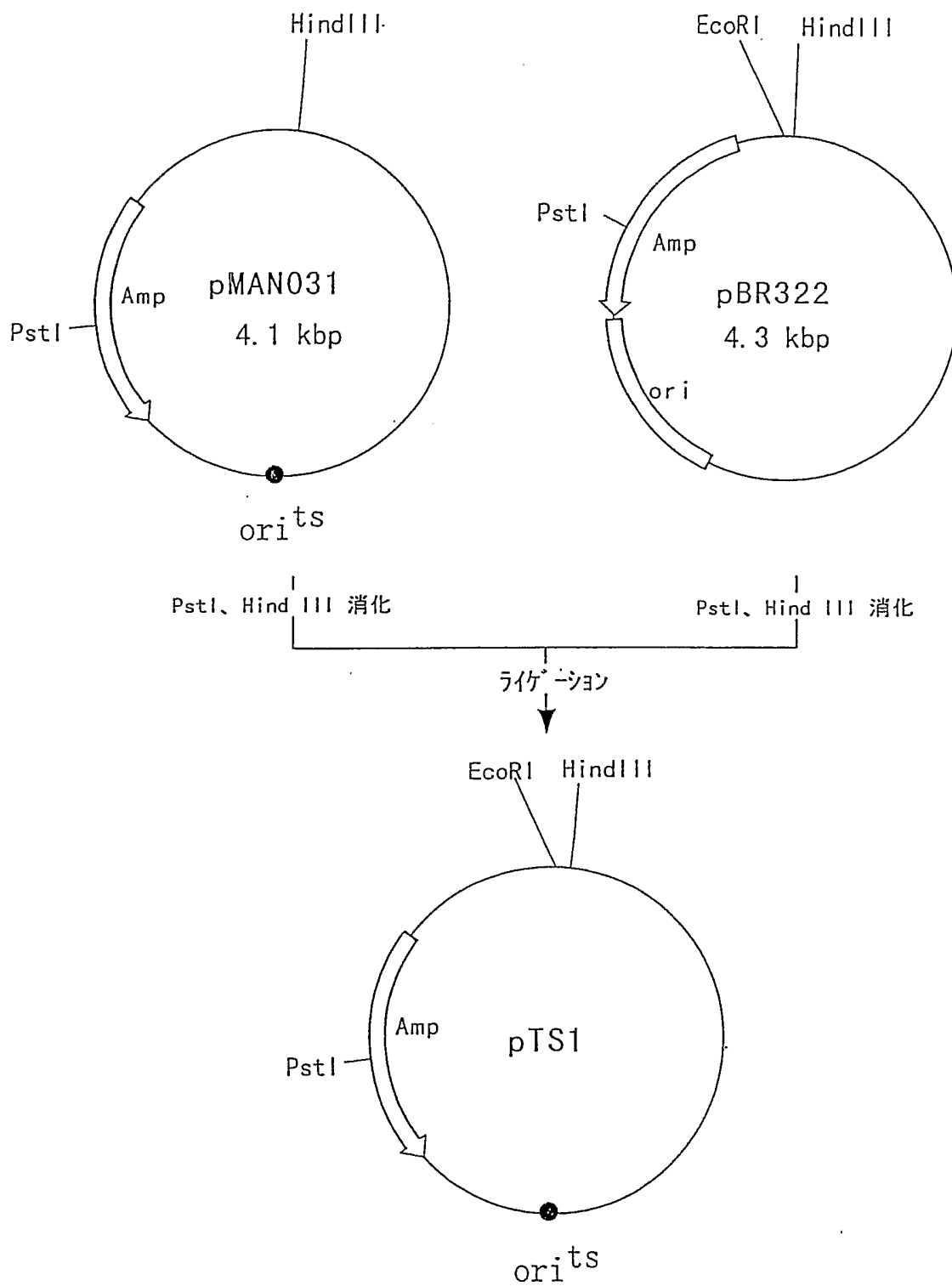


FIG. 1

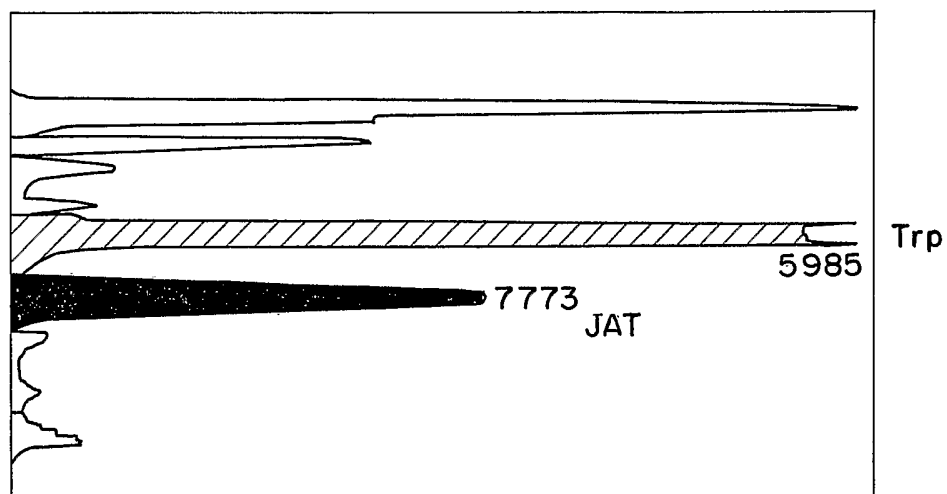


FIG. 2

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 発酵法によるL-トリプトファンの製造法

<130> C2630PC4070

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 1

gggttaattg tttttctgcg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 2

cgcactcga ctgcacggtg

20

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

2 / 28

<220>

<223> primer

<400> 3

gccgaattca agtgtgtgaa gtgtatg

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 4

gcccaagcttc aggtcgtggt cttatgc

27

<210> 5

<211> 864

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(864)

<223>

<400> 5

atg aaa atg att tcc acg ata cag aaa aaa gag act gtc atg gtc gca

48

Met Lys Met Ile Ser Thr Ile Gln Lys Lys Glu Thr Val Met Val Ala

1

5

10

15

ccc att ccc gcg aaa cgc ggc aga aaa ccc gcc gtt gcc acc gca cca

96

Pro Ile Pro Ala Lys Arg Gly Arg Lys Pro Ala Val Ala Thr Ala Pro

20

25

30

gcg act gga cag gtt cag tct tta acg cgt ggc ctg aaa tta ctg gag

144

Ala Thr Gly Gln Val Gln Ser Leu Thr Arg Gly Leu Lys Leu Leu Glu

35

40

45

tgg att gcc gaa tcc aat ggc agt gtg gca ctc acg gaa ctg gcg caa	192
Trp Ile Ala Glu Ser Asn Gly Ser Val Ala Leu Thr Glu Leu Ala Gln	
50 55 60	
caa gcc ggg tta ccc aat tcc acg acc cac cgc ctg cta acc acg atg	240
Gln Ala Gly Leu Pro Asn Ser Thr Thr His Arg Leu Leu Thr Thr Met	
65 70 75 80	
caa cag cag ggt ttc gtg cgt cag gtt ggc gaa ctg gga cat tgg gca	288
Gln Gln Gln Gly Phe Val Arg Gln Val Gly Glu Leu Gly His Trp Ala	
85 90 95	
atc ggc gca cat gcc ttt atg gtc ggc agc agc ttt ctc cag agc cgt	336
Ile Gly Ala His Ala Phe Met Val Gly Ser Ser Phe Leu Gln Ser Arg	
100 105 110	
aat ttg tta gcg att gtt cac cct atc ctg cgc aat cta atg gaa gag	384
Asn Leu Leu Ala Ile Val His Pro Ile Leu Arg Asn Leu Met Glu Glu	
115 120 125	
tct ggc gaa acg gtc aat atg gcg gtg ctt gat caa agc gat cac gaa	432
Ser Gly Glu Thr Val Asn Met Ala Val Leu Asp Gln Ser Asp His Glu	
130 135 140	
gcg att att atc gac cag gta cag tgt acg cat ctg atg cga atg tcc	480
Ala Ile Ile Ile Asp Gln Val Gln Cys Thr His Leu Met Arg Met Ser	
145 150 155 160	
gcg cct atc ggc ggt aaa ttg ccg atg cac gct tcc ggt gcg ggt aaa	528
Ala Pro Ile Gly Gly Lys Leu Pro Met His Ala Ser Gly Ala Gly Lys	
165 170 175	
gcc ttt tta gcc caa ctg agc gaa gaa cag gtg acg aag ctg ctg cac	576
Ala Phe Leu Ala Gln Leu Ser Glu Glu Gln Val Thr Lys Leu Leu His	
180 185 190	
cgc aaa ggg tta cat gcc tat acc cac gca acg ctg gtg tct cct gtg	624
Arg Lys Gly Leu His Ala Tyr Thr His Ala Thr Leu Val Ser Pro Val	
195 200 205	

cat tta aaa gaa gat ctc gcc caa acg cgc aaa cgg ggt tat tca ttt 672
 His Leu Lys Glu Asp Leu Ala Gln Thr Arg Lys Arg Gly Tyr Ser Phe
 210 215 220

gac gat gag gaa cat gca ctg ggg cta cgt tgc ctt gca gcg tgt att 720
 Asp Asp Glu Glu His Ala Leu Gly Leu Arg Cys Leu Ala Ala Cys Ile
 225 230 235 240

ttc gat gag cac cgt gaa ccg ttt gcc gca att tct att tcc gga ccg 768
 Phe Asp Glu His Arg Glu Pro Phe Ala Ala Ile Ser Ile Ser Gly Pro
 245 250 255

att tca cgt att acc gat gac cgc gtg acc gag ttt ggc gcg atg gtg 816
 Ile Ser Arg Ile Thr Asp Asp Arg Val Thr Glu Phe Gly Ala Met Val
 260 265 270

att aaa gcg gcg aag gaa gtg acg ctg gcg tac ggt gga atg cgc tga 864
 Ile Lys Ala Ala Lys Glu Val Thr Leu Ala Tyr Gly Gly Met Arg
 275 280 285

- <210> 6
- <211> 287
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

<400> 6
 Met Lys Met Ile Ser Thr Ile Gln Lys Lys Glu Thr Val Met Val Ala
 1 5 10 15
 Pro Ile Pro Ala Lys Arg Gly Arg Lys Pro Ala Val Ala Thr Ala Pro
 20 25 30
 Ala Thr Gly Gln Val Gln Ser Leu Thr Arg Gly Leu Lys Leu Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Ala Glu Ser Asn Gly Ser Val Ala Leu Thr Glu Leu Ala Gln
 50 55 60
 Gln Ala Gly Leu Pro Asn Ser Thr Thr His Arg Leu Leu Thr Thr Met
 65 70 75 80
 Gln Gln Gln Gly Phe Val Arg Gln Val Gly Glu Leu Gly His Trp Ala
 85 90 95
 Ile Gly Ala His Ala Phe Met Val Gly Ser Ser Phe Leu Gln Ser Arg
 100 105 110

Asn Leu Leu Ala Ile Val His Pro Ile Leu Arg Asn Leu Met Glu Glu
 115 120 125
 Ser Gly Glu Thr Val Asn Met Ala Val Leu Asp Gln Ser Asp His Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ile Ile Asp Gln Val Gln Cys Thr His Leu Met Arg Met Ser
 145 150 155 160
 Ala Pro Ile Gly Gly Lys Leu Pro Met His Ala Ser Gly Ala Gly Lys
 165 170 175
 Ala Phe Leu Ala Gln Leu Ser Glu Glu Gln Val Thr Lys Leu Leu His
 180 185 190
 Arg Lys Gly Leu His Ala Tyr Thr His Ala Thr Leu Val Ser Pro Val
 195 200 205
 His Leu Lys Glu Asp Leu Ala Gln Thr Arg Lys Arg Gly Tyr Ser Phe
 210 215 220
 Asp Asp Glu Glu His Ala Leu Gly Leu Arg Cys Leu Ala Ala Cys Ile
 225 230 235 240
 Phe Asp Glu His Arg Glu Pro Phe Ala Ala Ile Ser Ile Ser Gly Pro
 245 250 255
 Ile Ser Arg Ile Thr Asp Asp Arg Val Thr Glu Phe Gly Ala Met Val
 260 265 270
 Ile Lys Ala Ala Lys Glu Val Thr Leu Ala Tyr Gly Gly Met Arg
 275 280 285

<210> 7
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1305)
 <223>

<400> 7
 atg aaa acc cgt aca caa caa att gaa gaa tta cag aaa gag tgg act 48
 Met Lys Thr Arg Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Gln Lys Glu Trp Thr
 1 5 10 15

caa ccg cgt tgg gaa ggc att act cgc cca tac agt gcg gaa gat gtg 96
 Gln Pro Arg Trp Glu Gly Ile Thr Arg Pro Tyr Ser Ala Glu Asp Val

6 / 28

20	25	30	
gtg aaa tta cgc ggt tca gtc aat cct gaa tgc acg ctg gcg caa ctg			144
Val Lys Leu Arg Gly Ser Val Asn Pro Glu Cys Thr Leu Ala Gln Leu			
35	40	45	
ggc gca gcg aaa atg tgg cgt ctg ctg cac ggt gag tcg aaa aaa ggc			192
Gly Ala Ala Lys Met Trp Arg Leu Leu His Gly Glu Ser Lys Lys Gly			
50	55	60	
tac atc aac agc ctc ggc gca ctg act ggc ggt cag gcg ctg caa cag			240
Tyr Ile Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Gly Gly Gln Ala Leu Gln Gln			
65	70	75	80
gcg aaa gcg ggt att gaa gca gtc tat ctg tcg gga tgg cag gta gcg			288
Ala Lys Ala Gly Ile Glu Ala Val Tyr Leu Ser Gly Trp Gln Val Ala			
85	90	95	
gcg gac gct aac ctg gcg gcc agc atg tat ccg gat cag tcg ctc tat			336
Ala Asp Ala Asn Leu Ala Ala Ser Met Tyr Pro Asp Gln Ser Leu Tyr			
100	105	110	
ccg gca aac tcg gtg cca gct gtg gtg gag cgg atc aac aac acc ttc			384
Pro Ala Asn Ser Val Pro Ala Val Val Glu Arg Ile Asn Asn Thr Phe			
115	120	125	
cgt cgt gcc gat cag atc caa tgg tcc gcg ggc att gag ccg ggc gat			432
Arg Arg Ala Asp Gln Ile Gln Trp Ser Ala Gly Ile Glu Pro Gly Asp			
130	135	140	
ccg cgc tat gtc gat tac ttc ctg ccg atc gtt gcc gat gcg gaa gcc			480
Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Phe Leu Pro Ile Val Ala Asp Ala Glu Ala			
145	150	155	160
ggt ttt ggc ggt gtc ctg aat gcc ttt gaa ctg atg aaa gcg atg att			528
Gly Phe Gly Gly Val Leu Asn Ala Phe Glu Leu Met Lys Ala Met Ile			
165	170	175	
gaa gcc ggt gca gcg gca gtt cac ttc gaa gat cag ctg gcg tca gtg			576
Glu Ala Gly Ala Ala Ala Val His Phe Glu Asp Gln Leu Ala Ser Val			
180	185	190	

aag aaa tgc ggt cac atg ggc ggc aaa gtt tta gtg cca act cag gaa	624
Lys Lys Cys Gly His Met Gly Gly Lys Val Leu Val Pro Thr Gln Glu	
195 200 205	
gct att cag aaa ctg gtc gcg gcg cgt ctg gca gct gac gtg acg ggc	672
Ala Ile Gln Lys Leu Val Ala Ala Arg Leu Ala Ala Asp Val Thr Gly	
210 215 220	
gtt cca acc ctg ctg gtt gcc cgt acc gat gct gat gcg gcg gat ctg	720
Val Pro Thr Leu Leu Val Ala Arg Thr Asp Ala Asp Ala Ala Asp Leu	
225 230 235 240	
atc acc tcc gat tgc gac ccg tat gac agc gaa ttt att acc ggc gag	768
Ile Thr Ser Asp Cys Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Phe Ile Thr Gly Glu	
245 250 255	
cgt acc agt gaa ggc ttc ttc cgt act cat gcg ggc att gag caa gcg	816
Arg Thr Ser Glu Gly Phe Phe Arg Thr His Ala Gly Ile Glu Gln Ala	
260 265 270	
atc agc cgt ggc ctg gcg tat gcg cca tat gct gac ctg gtc tgg tgt	864
Ile Ser Arg Gly Leu Ala Tyr Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Val Trp Cys	
275 280 285	
gaa acc tcc acg ccg gat ctg gaa ctg gcg cgt cgc ttt gca caa gct	912
Glu Thr Ser Thr Pro Asp Leu Glu Leu Ala Arg Arg Phe Ala Gln Ala	
290 295 300	
atc cac gcg aaa tat ccg ggc aaa ctg ctg gct tat aac tgc tog ccg	960
Ile His Ala Lys Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Ala Tyr Asn Cys Ser Pro	
305 310 315 320	
tcg ttc aac tgg cag aaa aac ctc gac gac aaa act att gcc agc ttc	1008
Ser Phe Asn Trp Gln Lys Asn Leu Asp Asp Lys Thr Ile Ala Ser Phe	
325 330 335	
cag cag cag ctg tcg gat atg ggc tac aag ttc cag ttc atc acc ctg	1056
Gln Gln Gln Leu Ser Asp Met Gly Tyr Lys Phe Gln Phe Ile Thr Leu	
340 345 350	

gca ggt atc cac agc atg tgg ttc aac atg ttt gac ctg gca aac gcc 1104
 Ala Gly Ile His Ser Met Trp Phe Asn Met Phe Asp Leu Ala Asn Ala
 355 360 365

tat gcc cag ggc gag ggt atg aag cac tac gtt gag aaa gtg cag cag 1152
 Tyr Ala Gln Gly Glu Gly Met Lys His Tyr Val Glu Lys Val Gln Gln
 370 375 380

ccg gaa ttt gcc gcc gcg aaa gat ggc tat acc ttc gta tct cac cag 1200
 Pro Glu Phe Ala Ala Ala Lys Asp Gly Tyr Thr Phe Val Ser His Gln
 385 390 395 400

cag gaa gtg ggt aca ggt tac ttc gat aaa gtg acg act att att cag 1248
 Gln Glu Val Gly Thr Gly Tyr Phe Asp Lys Val Thr Thr Ile Ile Gln
 405 410 415

ggc ggc acg tct tca gtc acc gcg ctg acc ggc tcc act gaa gaa tcg 1296
 Gly Gly Thr Ser Ser Val Thr Ala Leu Thr Gly Ser Thr Glu Glu Ser
 420 425 430

cag ttc taa 1305
 Gln Phe

<210> 8

<211> 434

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 8

Met Lys Thr Arg Thr Gln Gln Ile Glu Glu Leu Gln Lys Glu Trp Thr
 1 5 10 15
 Gln Pro Arg Trp Glu Gly Ile Thr Arg Pro Tyr Ser Ala Glu Asp Val
 20 25 30
 Val Lys Leu Arg Gly Ser Val Asn Pro Glu Cys Thr Leu Ala Gln Leu
 35 40 45
 Gly Ala Ala Lys Met Trp Arg Leu Leu His Gly Glu Ser Lys Lys Gly
 50 55 60
 Tyr Ile Asn Ser Leu Gly Ala Leu Thr Gly Gly Gln Ala Leu Gln Gln
 65 70 75 80

ccg gta gag cgc aag atg gtg atc aac gcg ctc aac gcc aat gtg aaa	336
Pro Val Glu Arg Lys Met Val Ile Asn Ala Leu Asn Ala Asn Val Lys	
100 105 110	
gtc ttt atg gcc gat ttc gaa gat tca ctg gca cca gac tgg aac aaa	384
Val Phe Met Ala Asp Phe Glu Asp Ser Leu Ala Pro Asp Trp Asn Lys	
115 120 125	
gtg atc gac ggg caa att aac ctg cgt gat gcg gtt aac ggc acc atc	432
Val Ile Asp Gly Gln Ile Asn Leu Arg Asp Ala Val Asn Gly Thr Ile	
130 135 140	
agt tac acc aat gaa gca ggc aaa att tac cag ctc aag ccc aat cca	480
Ser Tyr Thr Asn Glu Ala Gly Lys Ile Tyr Gln Leu Lys Pro Asn Pro	
145 150 155 160	
gcg gtt ttg att tgt cgg gta cgc ggt ctg cac ttg ccg gaa aaa cat	528
Ala Val Leu Ile Cys Arg Val Arg Gly Leu His Leu Pro Glu Lys His	
165 170 175	
gtc acc tgg cgt ggt gag gca atc ccc ggc agc ctg ttt gat ttt gcg	576
Val Thr Trp Arg Gly Glu Ala Ile Pro Gly Ser Leu Phe Asp Phe Ala	
180 185 190	
ctc tat ttc ttc cac aac tat cag gca ctg ttg gca aag ggc agt ggt	624
Leu Tyr Phe Phe His Asn Tyr Gln Ala Leu Leu Ala Lys Gly Ser Gly	
195 200 205	
ccc tat ttc tat ctg ccg aaa acc cag tcc tgg cag gaa gcg gcc tgg	672
Pro Tyr Phe Tyr Leu Pro Lys Thr Gln Ser Trp Gln Glu Ala Ala Trp	
210 215 220	
tgg agc gaa gtc ttc agc tat gca gaa gat cgc ttt aat ctg ccg cgc	720
Trp Ser Glu Val Phe Ser Tyr Ala Glu Asp Arg Phe Asn Leu Pro Arg	
225 230 235 240	
ggc acc atc aag gcg acg ttg ctg att gaa acg ctg ccc gcc gtg ttc	768
Gly Thr Ile Lys Ala Thr Leu Leu Ile Glu Thr Leu Pro Ala Val Phe	
245 250 255	

13 / 28

Gly Met Arg Ala Asn Ile Arg Val Ala Val Gln Tyr Ile Glu Ala Trp
420 425 430

atc tct ggc aac ggc tgt gtg ccg att tat ggc ctg atg gaa gat gcg 1344
Ile Ser Gly Asn Gly Cys Val Pro Ile Tyr Gly Leu Met Glu Asp Ala
435 440 445

gcg acg gct gaa att tcc cgt acc tcg atc tgg cag tgg atc cat cat 1392
Ala Thr Ala Glu Ile Ser Arg Thr Ser Ile Trp Gln Trp Ile His His
450 455 460

caa aaa acg ttg agc aat ggc aaa ccg gtg acc aaa gcc ttg ttc cgc 1440
Gln Lys Thr Leu Ser Asn Gly Lys Pro Val Thr Lys Ala Leu Phe Arg
465 470 475 480

cag atg ctg ggc gaa gag atg aaa gtc att gcc agc gaa ctg ggc gaa 1488
Gln Met Leu Gly Glu Glu Met Lys Val Ile Ala Ser Glu Leu Gly Glu
485 490 495

gaa cgt ttc tcc cag ggg cgt ttt gac gat gcc gca cgc ttg atg gaa 1536
Glu Arg Phe Ser Gln Gly Arg Phe Asp Asp Ala Ala Arg Leu Met Glu
500 505 510

cag atc acc act tcc gat gag tta att gat ttc ctg acc ctg cca ggc 1584
Gln Ile Thr Thr Ser Asp Glu Leu Ile Asp Phe Leu Thr Leu Pro Gly
515 520 525

tac cgc ctg tta gcg taa 1602
Tyr Arg Leu Leu Ala
530

<210> 10

<211> 533

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

Met Thr Glu Gln Ala Thr Thr Thr Asp Glu Leu Ala Phe Thr Arg Pro
1 5 10 15
Tyr Gly Glu Gln Glu Lys Gln Ile Leu Thr Ala Glu Ala Val Glu Phe

Lys Ser Leu Glu Ala Asn Asn Gly His Asp Gly Thr Trp Ile Ala His
 355 360 365
 Pro Gly Leu Ala Asp Thr Ala Met Ala Val Phe Asn Asp Ile Leu Gly
 370 375 380
 Ser Arg Lys Asn Gln Leu Glu Val Met Arg Glu Gln Asp Ala Pro Ile
 385 390 395 400
 Thr Ala Asp Gln Leu Leu Ala Pro Cys Asp Gly Glu Arg Thr Glu Glu
 405 410 415
 Gly Met Arg Ala Asn Ile Arg Val Ala Val Gln Tyr Ile Glu Ala Trp
 420 425 430
 Ile Ser Gly Asn Gly Cys Val Pro Ile Tyr Gly Leu Met Glu Asp Ala
 435 440 445
 Ala Thr Ala Glu Ile Ser Arg Thr Ser Ile Trp Gln Trp Ile His His
 450 455 460
 Gln Lys Thr Leu Ser Asn Gly Lys Pro Val Thr Lys Ala Leu Phe Arg
 465 470 475 480
 Gln Met Leu Gly Glu Glu Met Lys Val Ile Ala Ser Glu Leu Gly Glu
 485 490 495
 Glu Arg Phe Ser Gln Gly Arg Phe Asp Asp Ala Ala Arg Leu Met Glu
 500 505 510
 Gln Ile Thr Thr Ser Asp Glu Leu Ile Asp Phe Leu Thr Leu Pro Gly
 515 520 525
 Tyr Arg Leu Leu Ala
 530

<210> 11
 <211> 1737
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1737)
 <223>

<400> 11
 atg ccg cgt ggc ctg gaa tta ttg att gct caa acc att ttg caa ggc
 Met Pro Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Ala Gln Thr Ile Leu Gln Gly
 1 5 10 15

16 / 28

ttc gat gct cag tat ggt cga ttc ctc gaa gtg acc tcc ggt gcg cag	96
Phe Asp Ala Gln Tyr Gly Arg Phe Leu Glu Val Thr Ser Gly Ala Gln	
20 25 30	
cag cgt ttc gaa cag gcc gac tgg cat gct gtc cag cag gcg atg aaa	144
Gln Arg Phe Glu Gln Ala Asp Trp His Ala Val Gln Gln Ala Met Lys	
35 40 45	
aac cgt atc cat ctt tac gat cat cac gtt ggt ctg gtc gtg gag caa	192
Asn Arg Ile His Leu Tyr Asp His His Val Gly Leu Val Val Glu Gln	
50 55 60	
ctg cgc tgc att act aac ggc caa agt acg gac gcg gca ttt tta cta	240
Leu Arg Cys Ile Thr Asn Gly Gln Ser Thr Asp Ala Ala Phe Leu Leu	
65 70 75 80	
cgt gtt aaa gag cat tac acc cgg ctg ttg ccg gat tac ccg cgc ttc	288
Arg Val Lys Glu His Tyr Thr Arg Leu Leu Pro Asp Tyr Pro Arg Phe	
85 90 95	
gag att gcg gag agc ttt ttt aac tcc gtg tac tgt cgg tta ttt gac	336
Glu Ile Ala Glu Ser Phe Phe Asn Ser Val Tyr Cys Arg Leu Phe Asp	
100 105 110	
cac cgc tcg ctt act ccc gag cgg ctt ttt atc ttt agc tct cag cca	384
His Arg Ser Leu Thr Pro Glu Arg Leu Phe Ile Phe Ser Ser Gln Pro	
115 120 125	
gag cgc cgc ttt cgt acc att ccc cgc ccg ctg gcg aaa gac ttt cac	432
Glu Arg Arg Phe Arg Thr Ile Pro Arg Pro Leu Ala Lys Asp Phe His	
130 135 140	
ccc gat cac ggc tgg gaa tct cta ctg atg cgc gtt atc agc gac cta	480
Pro Asp His Gly Trp Glu Ser Leu Leu Met Arg Val Ile Ser Asp Leu	
145 150 155 160	
ccg ctg cgc ctg cgc tgg cag aat aaa agc cgt gac atc cat tac att	528
Pro Leu Arg Leu Arg Trp Gln Asn Lys Ser Arg Asp Ile His Tyr Ile	
165 170 175	
att cgc cat ctg acg gaa acg ctg ggg aca gac aac ctc gcg gaa agt	576

17 / 28

Ile Arg His Leu Thr Glu Thr Leu Gly Thr Asp Asn Leu Ala Glu Ser	
180 185 190	
cat tta cag gtg gcg aac gaa ctg ttt tac cgc aat aaa gcc gcc tgg	624
His Leu Gln Val Ala Asn Glu Leu Phe Tyr Arg Asn Lys Ala Ala Trp	
195 200 205	
ctg gta ggc aaa ctg atc aca cct tcc ggc aca ttg cca ttt ttg ctg	672
Leu Val Gly Lys Leu Ile Thr Pro Ser Gly Thr Leu Pro Phe Leu Leu	
210 215 220	
ccg atc cac cag acg gac gac ggc gag tta ttt att gat acc tgc ctg	720
Pro Ile His Gln Thr Asp Asp Gly Glu Leu Phe Ile Asp Thr Cys Leu	
225 230 235 240	
acg acg acc gcc gaa gcg agc att gtt ttt ggc ttt gcg cgt tct tat	768
Thr Thr Thr Ala Glu Ala Ser Ile Val Phe Gly Phe Ala Arg Ser Tyr	
245 250 255	
ttt atg gtt tat gcg ccg ctg ccc gca gcg ctg gtc gag tgg cta cgg	816
Phe Met Val Tyr Ala Pro Leu Pro Ala Ala Leu Val Glu Trp Leu Arg	
260 265 270	
gaa att ctg cca ggt aaa acc acc gct gaa ttg tat atg gct atc gcc	864
Glu Ile Leu Pro Gly Lys Thr Thr Ala Glu Leu Tyr Met Ala Ile Gly	
275 280 285	
tgc cag aag cac gcc aaa acc gaa agc tac cgc gaa tat ctc gtt tat	912
Cys Gln Lys His Ala Lys Thr Glu Ser Tyr Arg Glu Tyr Leu Val Tyr	
290 295 300	
cta cag ggc tgt aat gag cag ttc att gaa gcg ccg ggt att cgt gga	960
Leu Gln Gly Cys Asn Glu Gln Phe Ile Glu Ala Pro Gly Ile Arg Gly	
305 310 315 320	
atg gtg atg ttg gtg ttt acg ctg ccg ggc ttt gat cgg gta ttc aaa	1008
Met Val Met Leu Val Phe Thr Leu Pro Gly Phe Asp Arg Val Phe Lys	
325 330 335	
gtc atc aaa gac agg ttc gcg ccg cag aaa gag atg tct gcc gct cac	1056
Val Ile Lys Asp Arg Phe Ala Pro Gln Lys Glu Met Ser Ala Ala His	

18 / 28

340	345	350	
gtt cgt gcc tgc tat caa ctg gtg aaa gag cac gat cgc gtg ggc cga			1104
Val Arg Ala Cys Tyr Gln Leu Val Lys Glu His Asp Arg Val Gly Arg			
355	360	365	
atg gcg gac acc cag gag ttt gaa aac ttt gtg ctg gag aag cgg cat			1152
Met Ala Asp Thr Gln Glu Phe Glu Asn Phe Val Leu Glu Lys Arg His			
370	375	380	
att tcc ccg gca tta atg gaa tta ctg ctt cag gaa gca gcg gaa aaa			1200
Ile Ser Pro Ala Leu Met Glu Leu Leu Leu Gln Glu Ala Ala Glu Lys			
385	390	395	400
atc acc gat ctc ggc gaa caa att gtg att cgc cat ctt tat att gag			1248
Ile Thr Asp Leu Gly Glu Gln Ile Val Ile Arg His Leu Tyr Ile Glu			
405	410	415	
cgg cgg atg gtg ccg ctc aat atc tgg ctg gaa caa gtg gaa ggt cag			1296
Arg Arg Met Val Pro Leu Asn Ile Trp Leu Glu Gln Val Glu Gly Gln			
420	425	430	
cag ttg cgc gac gcc att gaa gaa tac ggt aac gct att cgc cag ctt			1344
Gln Leu Arg Asp Ala Ile Glu Glu Tyr Gly Asn Ala Ile Arg Gln Leu			
435	440	445	
gcc gct gct aac att ttc cct ggc gac atg ctg ttt aaa aac ttc ggt			1392
Ala Ala Ala Asn Ile Phe Pro Gly Asp Met Leu Phe Lys Asn Phe Gly			
450	455	460	
gtc acc cgt cac ggg cgt gtg gtt ttt tat gat tac gat gaa att tgc			1440
Val Thr Arg His Gly Arg Val Val Phe Tyr Asp Tyr Asp Glu Ile Cys			
465	470	475	480
tac atg acg gaa gtg aat ttc cgc gac atc ccg ccg ccg cgc tat ccg			1488
Tyr Met Thr Glu Val Asn Phe Arg Asp Ile Pro Pro Pro Arg Tyr Pro			
485	490	495	
gaa gac gaa ctt gcc agc gaa ccg tgg tac agc gtc tcg ccg ggc gat			1536
Glu Asp Glu Leu Ala Ser Glu Pro Trp Tyr Ser Val Ser Pro Gly Asp			
500	505	510	

ggt ttc ccg gaa gag ttt cgc cac tgg cta tgc gcc gac ccg cgt att 1584
 Val Phe Pro Glu Glu Phe Arg His Trp Leu Cys Ala Asp Pro Arg Ile
 515 520 525

ggt ccg ctg ttt gaa gag atg cac gcc gac ctg ttc cgc gct gat tac 1632
 Gly Pro Leu Phe Glu Glu Met His Ala Asp Leu Phe Arg Ala Asp Tyr
 530 535 540

tgg cgc gca cta caa aac cgc ata cgt gaa ggg cat gtg gaa gat gtt 1680
 Trp Arg Ala Leu Gln Asn Arg Ile Arg Glu Gly His Val Glu Asp Val
 545 550 555 560

tat gcg tat cgg cgc agg caa aga ttt agc gta cgg tat ggg gag atg 1728
 Tyr Ala Tyr Arg Arg Arg Gln Arg Phe Ser Val Arg Tyr Gly Glu Met
 565 570 575

ctt ttt tga 1737
 Leu Phe

- <210> 12
- <211> 578
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

<400> 12
 Met Pro Arg Gly Leu Glu Leu Leu Ile Ala Gln Thr Ile Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Gln Tyr Gly Arg Phe Leu Glu Val Thr Ser Gly Ala Gln
 20 25 30
 Gln Arg Phe Glu Gln Ala Asp Trp His Ala Val Gln Gln Ala Met Lys
 35 40 45
 Asn Arg Ile His Leu Tyr Asp His His Val Gly Leu Val Val Glu Gln
 50 55 60
 Leu Arg Cys Ile Thr Asn Gly Gln Ser Thr Asp Ala Ala Phe Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Lys Glu His Tyr Thr Arg Leu Leu Pro Asp Tyr Pro Arg Phe
 85 90 95
 Glu Ile Ala Glu Ser Phe Phe Asn Ser Val Tyr Cys Arg Leu Phe Asp
 100 105 110
 His Arg Ser Leu Thr Pro Glu Arg Leu Phe Ile Phe Ser Ser Gln Pro

21 / 28

Ala Ala Ala Asn Ile Phe Pro Gly Asp Met Leu Phe Lys Asn Phe Gly
 450 455 460

Val Thr Arg His Gly Arg Val Val Phe Tyr Asp Tyr Asp Glu Ile Cys
 465 470 475 480

Tyr Met Thr Glu Val Asn Phe Arg Asp Ile Pro Pro Pro Arg Tyr Pro
 485 490 495

Glu Asp Glu Leu Ala Ser Glu Pro Trp Tyr Ser Val Ser Pro Gly Asp
 500 505 510

Val Phe Pro Glu Glu Phe Arg His Trp Leu Cys Ala Asp Pro Arg Ile
 515 520 525

Gly Pro Leu Phe Glu Glu Met His Ala Asp Leu Phe Arg Ala Asp Tyr
 530 535 540

Trp Arg Ala Leu Gln Asn Arg Ile Arg Glu Gly His Val Glu Asp Val
 545 550 555 560

Tyr Ala Tyr Arg Arg Arg Gln Arg Phe Ser Val Arg Tyr Gly Glu Met
 565 570 575

Leu Phe

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 13
 cgcgcatgca tgccgccagc ggaactg

27

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 14
 gccgaattcc gacgcgcta taattcc

27

22 / 28

<210> 15

<211> 807

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(807)

<223>

<400> 15

atg gaa cgc tac gaa tct ctg ttt gcc cag ttg aag gag cgc aaa gaa 48
 Met Glu Arg Tyr Glu Ser Leu Phe Ala Gln Leu Lys Glu Arg Lys Glu
 1 5 10 15

ggc gca ttc gtt cct ttc gtc acg ctc ggt gat ccg ggc att gag cag 96
 Gly Ala Phe Val Pro Phe Val Thr Leu Gly Asp Pro Gly Ile Glu Gln
 20 25 30

tca ttg aaa att atc gat acg cta att gaa gcc ggt gct gac gcg ctg 144
 Ser Leu Lys Ile Ile Asp Thr Leu Ile Glu Ala Gly Ala Asp Ala Leu
 35 40 45

gag tta ggt atc ccc ttc tcc gac cca ctg gcg gat ggc ccg acg att 192
 Glu Leu Gly Ile Pro Phe Ser Asp Pro Leu Ala Asp Gly Pro Thr Ile
 50 55 60

caa aac gcc act ctg cgc gcc ttt gcg gca ggt gtg act ccg gca caa 240
 Gln Asn Ala Thr Leu Arg Ala Phe Ala Ala Gly Val Thr Pro Ala Gln
 65 70 75 80

tgt ttt gaa atg ctg gca ctg att cgc cag aaa cac ccg acc att ccc 288
 Cys Phe Glu Met Leu Ala Leu Ile Arg Gln Lys His Pro Thr Ile Pro
 85 90 95

att ggc ctg ttg atg tat gcc aat ctg gtg ttt aac aaa ggc att gat 336
 Ile Gly Leu Leu Met Tyr Ala Asn Leu Val Phe Asn Lys Gly Ile Asp
 100 105 110

gag ttt tat gcc cag tgc gaa aaa gtc ggc gtc gat tcg gtg ctg gtt 384
 Glu Phe Tyr Ala Gln Cys Glu Lys Val Gly Val Asp Ser Val Leu Val

23 / 28

115	120	125	
gcc gat gtg cca gtt gaa gag tcc gcg ccc ttc cgc cag gcc gcg ttg			432
Ala Asp Val Pro Val Glu Glu Ser Ala Pro Phe Arg Gln Ala Ala Leu			
130	135	140	
cgt cat aat gtc gca cct atc ttc atc tgc ccg cca aat gcc gat gac			480
Arg His Asn Val Ala Pro Ile Phe Ile Cys Pro Pro Asn Ala Asp Asp			
145	150	155	160
gac ctg ctg cgc cag ata gcc tct tac ggt cgt ggt tac acc tat ttg			528
Asp Leu Leu Arg Gln Ile Ala Ser Tyr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr Leu			
165	170	175	
ctg tca cga gca ggc gtg acc ggc gca gaa aac cgc gcc gcg tta ccc			576
Leu Ser Arg Ala Gly Val Thr Gly Ala Glu Asn Arg Ala Ala Leu Pro			
180	185	190	
ctc aat cat ctg gtt gcg aag ctg aaa gag tac aac gct gca cct cca			624
Leu Asn His Leu Val Ala Lys Leu Lys Glu Tyr Asn Ala Ala Pro Pro			
195	200	205	
ttg cag gga ttt ggt att tcc gcc ccg gat cag gta aaa gca gcg att			672
Leu Gln Gly Phe Gly Ile Ser Ala Pro Asp Gln Val Lys Ala Ala Ile			
210	215	220	
gat gca gga gct gcg ggc gcg att tct ggt tcg gcc att gtt aaa atc			720
Asp Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ile Ser Gly Ser Ala Ile Val Lys Ile			
225	230	235	240
atc gag caa cat att aat gag cca gag aaa atg ctg gcg gca ctg aaa			768
Ile Glu Gln His Ile Asn Glu Pro Glu Lys Met Leu Ala Ala Leu Lys			
245	250	255	
gtt ttt gta caa ccg atg aaa gcg gcg acg cgc agt taa			807
Val Phe Val Gln Pro Met Lys Ala Ala Thr Arg Ser			
260	265		

<210> 16

<211> 268

<212> PRT

24 / 28

<213> Escherichia coli

<400> 16

Met Glu Arg Tyr Glu Ser Leu Phe Ala Gln Leu Lys Glu Arg Lys Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Phe Val Pro Phe Val Thr Leu Gly Asp Pro Gly Ile Glu Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Ile Ile Asp Thr Leu Ile Glu Ala Gly Ala Asp Ala Leu
 35 40 45
 Glu Leu Gly Ile Pro Phe Ser Asp Pro Leu Ala Asp Gly Pro Thr Ile
 50 55 60
 Gln Asn Ala Thr Leu Arg Ala Phe Ala Ala Gly Val Thr Pro Ala Gln
 65 70 75 80
 Cys Phe Glu Met Leu Ala Leu Ile Arg Gln Lys His Pro Thr Ile Pro
 85 90 95
 Ile Gly Leu Leu Met Tyr Ala Asn Leu Val Phe Asn Lys Gly Ile Asp
 100 105 110
 Glu Phe Tyr Ala Gln Cys Glu Lys Val Gly Val Asp Ser Val Leu Val
 115 120 125
 Ala Asp Val Pro Val Glu Glu Ser Ala Pro Phe Arg Gln Ala Ala Leu
 130 135 140
 Arg His Asn Val Ala Pro Ile Phe Ile Cys Pro Pro Asn Ala Asp Asp
 145 150 155 160
 Asp Leu Leu Arg Gln Ile Ala Ser Tyr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr Leu
 165 170 175
 Leu Ser Arg Ala Gly Val Thr Gly Ala Glu Asn Arg Ala Ala Leu Pro
 180 185 190
 Leu Asn His Leu Val Ala Lys Leu Lys Glu Tyr Asn Ala Ala Pro Pro
 195 200 205
 Leu Gln Gly Phe Gly Ile Ser Ala Pro Asp Gln Val Lys Ala Ala Ile
 210 215 220
 Asp Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ile Ser Gly Ser Ala Ile Val Lys Ile
 225 230 235 240
 Ile Glu Gln His Ile Asn Glu Pro Glu Lys Met Leu Ala Ala Leu Lys
 245 250 255
 Val Phe Val Gln Pro Met Lys Ala Ala Thr Arg Ser
 260 265

<210> 17

<211> 1194

<212> DNA

25 / 28

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1194)

<223>

<400> 17

atg aca aca tta ctt aac ccc tat ttt ggt gag ttt ggc ggc atg tac 48
 Met Thr Thr Leu Leu Asn Pro Tyr Phe Gly Glu Phe Gly Gly Met Tyr
 1 5 10 15

gtg cca caa atc ctg atg cct gct ctg cgc cag ctg gaa gaa gct ttt 96
 Val Pro Gln Ile Leu Met Pro Ala Leu Arg Gln Leu Glu Glu Ala Phe
 20 25 30

gtc agt gcg caa aaa gat cct gaa ttt cag gct cag ttc aac gac ctg 144
 Val Ser Ala Gln Lys Asp Pro Glu Phe Gln Ala Gln Phe Asn Asp Leu
 35 40 45

ctg aaa aac tat gcc ggg cgt cca acc gcg ctg acc aaa tgc cag aac 192
 Leu Lys Asn Tyr Ala Gly Arg Pro Thr Ala Leu Thr Lys Cys Gln Asn
 50 55 60

att aca gcc ggg acg aac acc acg ctg tat ctc aag cgt gaa gat ttg 240
 Ile Thr Ala Gly Thr Asn Thr Thr Leu Tyr Leu Lys Arg Glu Asp Leu
 65 70 75 80

ctg cac ggc ggc gcg cat aaa act aac cag gtg ctg ggg cag gcg ttg 288
 Leu His Gly Gly Ala His Lys Thr Asn Gln Val Leu Gly Gln Ala Leu
 85 90 95

ctg gcg aag cgg atg ggt aaa acc gaa atc atc gcc gaa acc ggt gcc 336
 Leu Ala Lys Arg Met Gly Lys Thr Glu Ile Ile Ala Glu Thr Gly Ala
 100 105 110

ggt cag cat ggc gtg gcg tcg gcc ctt gcc agc gcc ctg ctc ggc ctg 384
 Gly Gln His Gly Val Ala Ser Ala Leu Ala Ser Ala Leu Leu Gly Leu
 115 120 125

aaa tgc cgt att tat atg ggt gcc aaa gac gtt gaa cgc cag tcg cct 432

26 / 28

Lys Cys Arg Ile Tyr Met Gly Ala Lys Asp Val Glu Arg Gln Ser Pro	
130	135 140
aac gtt ttt cgt atg cgc tta atg ggt gcg gaa gtg atc ccg gtg cat	480
Asn Val Phe Arg Met Arg Leu Met Gly Ala Glu Val Ile Pro Val His	
145	150 155 160
agc ggt tcc gcg acg ctg aaa gat gcc tgt aac gag gcg ctg cgc gac	528
Ser Gly Ser Ala Thr Leu Lys Asp Ala Cys Asn Glu Ala Leu Arg Asp	
	165 170 175
tgg tcc ggt agt tac gaa acc gcg cac tat atg ctg ggc acc gca gct	576
Trp Ser Gly Ser Tyr Glu Thr Ala His Tyr Met Leu Gly Thr Ala Ala	
	180 185 190
ggc ccg cat cct tat ccg acc att gtg cgt gag ttt cag cgg atg att	624
Gly Pro His Pro Tyr Pro Thr Ile Val Arg Glu Phe Gln Arg Met Ile	
	195 200 205
ggc gaa gaa acc aaa gcg cag att ctg gaa aga gaa ggt cgc ctg ccg	672
Gly Glu Glu Thr Lys Ala Gln Ile Leu Glu Arg Glu Gly Arg Leu Pro	
	210 215 220
gat gcc gtt atc gcc tgt gtt ggc ggc ggt tcg aat gcc atc ggc atg	720
Asp Ala Val Ile Ala Cys Val Gly Gly Gly Ser Asn Ala Ile Gly Met	
	225 230 235 240
ttt gct gat ttc atc aat gaa acc aac gtc ggc ctg att ggt gtg gag	768
Phe Ala Asp Phe Ile Asn Glu Thr Asn Val Gly Leu Ile Gly Val Glu	
	245 250 255
cca ggt ggt cac ggt atc gaa act ggc gag cac ggc gca ccg cta aaa	816
Pro Gly Gly His Gly Ile Glu Thr Gly Glu His Gly Ala Pro Leu Lys	
	260 265 270
cat ggt cgc gtg ggt atc tat ttc ggt atg aaa gcg ccg atg atg caa	864
His Gly Arg Val Gly Ile Tyr Phe Gly Met Lys Ala Pro Met Met Gln	
	275 280 285
acc gaa gac ggg cag att gaa gaa tct tac tcc atc tcc gcc gga ctg	912
Thr Glu Asp Gly Gln Ile Glu Glu Ser Tyr Ser Ile Ser Ala Gly Leu	

27 / 28

290	295	300	
gat ttc ccg tct gtc ggc cca caa cac gcg tat ctt aac agc act gga			960
Asp Phe Pro Ser Val Gly Pro Gln His Ala Tyr Leu Asn Ser Thr Gly			
305	310	315	320
cgc gct gat tac gtg tct att acc gat gat gaa gcc ctt gaa gcc ttc			1008
Arg Ala Asp Tyr Val Ser Ile Thr Asp Asp Glu Ala Leu Glu Ala Phe			
	325	330	335
aaa acg ctg tgc ctg cac gaa ggg atc atc ccg gcg ctg gaa tcc tcc			1056
Lys Thr Leu Cys Leu His Glu Gly Ile Ile Pro Ala Leu Glu Ser Ser			
	340	345	350
cac gcc ctg gcc cat gcg ttg aaa atg atg cgc gaa aac ccg gat aaa			1104
His Ala Leu Ala His Ala Leu Lys Met Met Arg Glu Asn Pro Asp Lys			
	355	360	365
gag cag cta ctg gtg gtt aac ctt tcc ggt cgc ggc gat aaa gac atc			1152
Glu Gln Leu Leu Val Val Asn Leu Ser Gly Arg Gly Asp Lys Asp Ile			
	370	375	380
ttc acc gtt cac gat att ttg aaa gca cga ggg gaa atc tga			1194
Phe Thr Val His Asp Ile Leu Lys Ala Arg Gly Glu Ile			
385	390	395	
<210> 18			
<211> 397			
<212> PRT			
<213> Escherichia coli			
<400> 18			
Met Thr Thr Leu Leu Asn Pro Tyr Phe Gly Glu Phe Gly Gly Met Tyr			
1	5	10	15
Val Pro Gln Ile Leu Met Pro Ala Leu Arg Gln Leu Glu Glu Ala Phe			
	20	25	30
Val Ser Ala Gln Lys Asp Pro Glu Phe Gln Ala Gln Phe Asn Asp Leu			
	35	40	45
Leu Lys Asn Tyr Ala Gly Arg Pro Thr Ala Leu Thr Lys Cys Gln Asn			
	50	55	60
Ile Thr Ala Gly Thr Asn Thr Thr Leu Tyr Leu Lys Arg Glu Asp Leu			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12P13/22, C12N1/21//C12N15/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12P13/22, C12N1/21, 15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JICST)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 5-244970 A (Ajinomoto Co., Inc.), 24 September, 1993 (24.09.93), Particularly, Claim 2 & US 5378616 A & US 5393671 A	4-5/1-3, 6-7
X/A	MALOY S.R. et al., Genetic regulation of the glyoxylate shunt in Escherichia coli K-12. J.Bacteriol., 1982, 149(1), pages 173 to 180	4-5/1-3, 6-7
A	JP 2002-209596 A (Ajinomoto Co., Inc.), 30 July, 2002 (30.07.02), & EP 1225230 A1 & US 2002/0173011 A1 & US 2003/0138918 A1	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 July, 2004 (23.07.04)		Date of mailing of the international search report 10 August, 2004 (10.08.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12P13/22, C12N1/21 // C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ C12P13/22, C12N1/21, 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 5-244970 A(味の素株式会社)1993.09.24 特に、請求項2 & US 5378616 A & US 5393671 A	4-5/1-3, 6-7
X/A	MALOY S.R. et al., Genetic regulation of the glyoxylate shunt in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol., 1982, 149(1), p. 173-80	4-5/1-3, 6-7
A	JP 2002-209596 A(味の素株式会社)2002.07.30 & EP 1225230 A1 & US 2002/0173011 A1 & US 2003/0138918 A1	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
23.07.2004

国際調査報告の発送日
10.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 上條 肇
 4 B 3 1 3 1
 電話番号 03-3581-1101 内線 3448