

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-192902

(P2016-192902A)

(43) 公開日 平成28年11月17日(2016.11.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 Z N A A	4B024
C12P 7/06 (2006.01)	C12P 7/06	4B064
C12P 13/08 (2006.01)	C12P 13/08	4B065
C12P 13/04 (2006.01)	C12P 13/04	
C12N 1/00 (2006.01)	C12N 1/00 F	

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-192414 (P2013-192414)
 (22) 出願日 平成25年9月17日 (2013.9.17)

(71) 出願人 000000066
 味の素株式会社
 東京都中央区京橋1丁目15番1号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 土井 秀高
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA17 BA71 BA80
 CA04 HA14

最終頁に続く

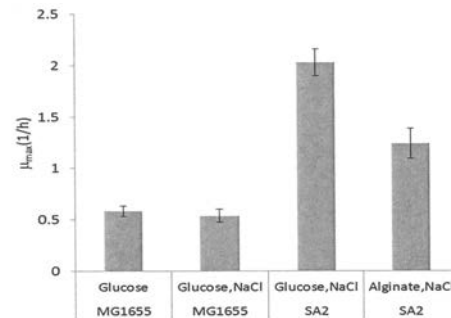
(54) 【発明の名称】 アルギン酸資化性微生物及び目的物質の製造法

(57) 【要約】

【課題】アルギン酸を資化できる微生物、及び、その微生物を用いて目的物質を発酵法により生産する方法を提供する。

【解決手段】目的物質生産能を有し、アルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌を海藻から得られた炭素源を含む培地中で培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、同培地から目的物質を回収することを特徴とする、目的物質の製造法。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌であり、16SリボソームRNA配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有する、ビブリオ属細菌。

【請求項 2】

前記16Sリボソームが配列番号1を有する、請求項1に記載のビブリオ属細菌。

【請求項 3】

アルギン酸を単一の炭素源として生育できることを特徴とする、請求項1または2に記載のビブリオ属細菌。

【請求項 4】

前記ビブリオ属細菌が、NITE P-01635株である、請求項1～3のいずれか一項に記載のビブリオ属細菌。

【請求項 5】

目的物質生産能を有し、かつアルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌を海藻類から抽出された炭素源を含む培地中で培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、同培地から目的物質を回収することを特徴とする、発酵法による目的物質の製造法。

【請求項 6】

前記アルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌が、16Sリボソーム配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有する細菌である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記アルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌が、16Sリボソーム配列が配列番号1を有する細菌である、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記アルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌が、NITE P-01635株である、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

前記目的物質が、L-リジン、L-オルニチン、L-L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリン、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、グリシン、L-スレオニン、L-セリン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン及びL-アスパラギンから選択される1種又はそれ以上のアミノ酸である、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記目的物質が、エタノールである、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記目的物質が、イソプロピルアルコール、アセトン、プロピレン、1,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1-プロパノール、1,3-プロパンジオール、1,2-プロパンジオール、エチレングリコール、およびイソブタノールからなる群より選択される、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記細菌がL-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強されたビブリオ属細菌である、請求項5～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記細菌がL-アミノ酸を排出するタンパク質の活性が増強されたビブリオ属細菌である、請求項5～9のいずれか一項の記載の方法。

【請求項 14】

前記L-アミノ酸を排出するタンパク質がybjLである、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記海藻類が褐藻類、紅藻類、および緑藻類に含まれる大型海藻であることを特徴とする、請求項5～14のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記海藻類から得られた炭素源がアルギン酸、セルロース、マンニトール、ペクチン、ガラクトロン酸、カラギーナン、寒天から選択される1種以上の炭素源であることを特徴とする、請求項5～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記海藻類から得られた糖類抽出物がアルギン酸を含有し、アルギン酸の加水分解をアルギン酸リアーゼによる酵素分解反応または酸による加水分解反応によって行ってから培養を行うことを特徴とする、請求項5～16のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、細菌を用いた海藻バイオマスの利用に際し、有用物質生産の発酵生産時の微生物宿主となる新規微生物にかかわる。

【背景技術】

【0002】

エタノールなどの燃料やL-アミノ酸などの食品、飼料、医薬品に用いられる物質の大量生産には微生物を用いた発酵法が用いられ、産業上有用である。

【0003】

微生物を用いた発酵の主原料にはサトウキビやトウモロコシといった食料穀物から生産される糖類、すなわち、グルコース、フラクトース、スクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等が使用されている。

20

【0004】

また、近年の世界的な人口増加による食料需要増などに起因する穀物価格上昇により、サトウキビやトウモロコシの茎や葉、ヤトロファ油などの非食料の陸上バイオマスから得られる糖類や油脂類も微生物を用いた発酵の主原料源として産業上有用である。

【0005】

しかしながら、非食料の陸上バイオマス生産には食料穀物生産と直接には競合しないものの、農地や農業用水、肥料利用などの点で食料穀物生産と間接的に競合するほか、世界的な土地収奪などの問題があることが課題として指摘されている（非特許文献1）。

【0006】

30

そこで、微生物を用いた発酵の主原料として海藻を中心とした海洋性バイオマスに着目が集まっている。海洋性バイオマスは農地や農業用水、肥料を使用せず生産できる上、海藻のうち褐藻類には非食料部分も含めてサトウキビの2倍、トウモロコシの5倍の単位面積あたりの発酵主原料生産能力があることが知られている（非特許文献2）。褐藻類は著量にD-マンヌロン酸とL-グルロン酸の重合多糖であるアルギン酸、グルコース、マンニトールといった糖類を蓄える。

【0007】

だが、褐藻類が蓄積する糖類を発酵の主原料とする上では、褐藻中の糖類の中に主たる成分として含むアルギン酸が微生物による資化が困難であることが産業上利用する上での課題として挙げられている（非特許文献3、非特許文献4、特許文献1、特許文献2）。すなわち、アルギン酸を資化できる微生物を入手することが褐藻類からの海洋性バイオマスを利用して有用物質を微生物によって発酵生産する上で重要であると考えられる。

40

【0008】

アルギン酸を単一の炭素源として資化し、迅速に生育できる微生物を新規に単離、入手できれば、海洋性バイオマスからの有用物質生産を行う微生物による発酵法の宿主微生物として有用性があるが、アルギン酸資化能を有するピブリオ属細菌を用いて目的物質を発酵法により生産する方法は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

50

【特許文献1】国際特許出願WO 2009/046375号

【特許文献2】国際特許出願WO 2011/024858号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Bringezu, et al. (2009) United Nations Environmental Programme

【非特許文献2】Somerville, et al. (2010) Science. 329, p790-792.

【非特許文献3】Takeda, et al. (2011) Energy Environ. Sci. 4 p2575-2581

【非特許文献4】Wargacki, et al. (2012) Science. 335.p308-313

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

本発明は、アルギン酸を資化できる微生物、及び、その微生物を用いて目的物質を発酵法により生産する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の発明者は、褐藻類を餌として日常的に摂取していると考えられるサザエ（学名：Turbo cornutus）の消化管から、アルギン酸を資化可能なビブリオ属細菌を分離した。さらに、アルギン酸資化可能なビブリオ属細菌にアミノ酸生産能を付与し、アミノ酸生産が可能なることを見出した。

【0013】

20

[1] アルギン酸資化能を有するビブリオ属に属する細菌であり、16SリボソームRNA配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有する、ビブリオ属細菌。

[2] 前記16Sリボソームが配列番号1を有する、前記記載のビブリオ属細菌。

[3] アルギン酸を単一の炭素源として生育できることを特徴とする、前記記載のビブリオ属細菌。

[4] 前記ビブリオ属細菌が、NITE P-01635株である、前記記載のビブリオ属細菌。

[5] 目的物質生産能を有し、かつアルギン酸資化能を有するビブリオ属細菌を海藻類由来のバイオマス海藻類から得られた炭素源から抽出された炭素源を含む培地中で培養し、該培地中に目的物質を生成蓄積させ、同培地から目的物質を回収することを特徴とする、発酵法による目的物質の製造法。

30

[6] 前記アルギン酸資化能を有する細菌が、16Sリボソーム配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有するビブリオ属細菌である、前記記載の方法。

[7] 前記アルギン酸資化能を有する細菌が、NITE P-01635株である、前記記載の方法。

[8] 前記目的物質が、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリン、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、グリシン、L-スレオニン、L-セリン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン及びL-アスパラギンから選択される1種又はそれ以上のアミノ酸である、前記記載の方法。

40

[9] 前記目的物質が、エタノールである、前記記載の方法。

[10] 前記目的物質が、イソプロピルアルコール、アセトン、プロピレン、1,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1-プロパノール、1,3-プロパンジオール、1,2-プロパンジオール、エチレングリコール、およびイソブタノールからなる群より選択される、前記記載の方法。

[11] 前記細菌がL-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強されたビブリオ属細菌である、前記記載の方法。

[12] 前記細菌がL-アミノ酸を排出するタンパク質の活性が増強されたビブリオ属細菌である、前記記載の方法。

50

[1 3] 前記 L - アミノ酸を排出するタンパク質が、ybjLである、前記記載の方法。

[1 4] 前記海藻類が褐藻類、紅藻類、および緑藻類に含まれる大型海藻であることを特徴とする、前記記載の方法。

[1 5] 前記海藻類から得られた炭素源がアルギン酸、セルロース、マンニトール、ペクチン、ガラクトロン酸、カラギーナン、寒天から選択される1種以上の炭素源である、前記記載の方法。

[1 6] 前記海藻類から得られた糖類抽出物がアルギン酸を含有することを特徴とする、前記記載の方法。

[1 7] 前記海藻類から得られた糖類抽出物がアルギン酸を含有し、アルギン酸の加水分解をアルギン酸加水分解酵素または酸による前処理によって行ってから培養を行うことを特徴とする、前記記載の方法。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

海洋性バイオマスからの有用物質生産が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】 *Vibrio* sp.SA2株と *Vibrio rumoiensis* Type strainとの16S rRNA遺伝子配列比較（上段が *Vibrio* sp.SA2株の配列、下段が *Vibrio rumoiensis* type strain S-株の配列、点線枠はギャップによる相違、実線枠は置換による相違）。

【図 2】 *Vibrio* sp. SA2株の16S rRNA遺伝子全長配列による分子系統樹（系統枝横の数字はブートストラップ値を示す）。

20

【図 3】 *Vibrio* sp. SA2株のアルギン酸ナトリウム最少培地での試験管培養結果（1: *Vibrio* sp. SA2株の波長600nmの濁度、2: MG1655株の波長600nmの濁度）。

【図 4】 グルコースまたはアルギン酸ナトリウムのみを炭素源とした最少液体培地での最大比増殖速度。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

< 1 > 本発明の細菌

本発明のビブリオ属細菌は、アルギン酸資化能を有するビブリオ属に属する細菌であり、16SリボソームRNA配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有する、ビブリオ属細菌である。

30

【 0 0 1 7 】

本発明においてアルギン酸とは、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸の重合多糖を意味する。本明細書において使用する「アルギン酸」という用語は、 α -1,4'-マンヌロノ-1,4'-L-グルロノグリカンとも呼ばれるD-マンヌロン酸(M)とL-グルロン酸(G)の2種のウロン酸のピラノース環が主として1-4結合した多糖を指す。アルギン酸中にはD-マンヌロン酸のホモポリマー（以下、「ポリ(M)」または「Mブロック」とも呼ぶ）、L-グルロン酸のホモポリマー（以下、「ポリ(G)」または「Gブロック」とも呼ぶ）、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸のヘテロポリマー（以下、「ポリ(MG)」または「MGブロック」とも呼ぶ）の領域が存在する。本発明のアルギン酸は、海藻類から取得されることが好ましい。

40

【 0 0 1 8 】

本発明において「海藻類」とは、アオサ、アオノリなどの緑藻植物、アマノリ、オゴノリなどの紅藻植物、コンブ、アラメ、カジメ、ワカメ、ホンダワラなどの褐藻植物等、およびこれらから選択される複数種の組み合わせを指す。特に好ましくは、Macroalgaeと呼ばれる大型藻類である、褐藻植物である。褐藻植物は、光合成の初期同化産物として糖アルコールであるマンニトールを多く貯蔵している点において好ましい。本発明において用いる褐藻植物には、褐藻綱カヤモノリ目(Scytosiphonales)、シオミドロ目(Ectocarpales)、ウイキョウモ目(Dictyosiphonales)、ナガマツモ目(Chordariales)、イソガワラ目(Ralfsiales)

50

es)、ケヤリモ目(Sporochnales)、ウルシグサ目(Desmarestiales)、コンブ目(Laminariales)、ムチモ目(Cutleriales)、ウスバオオギ目(Syringodermatales)、クロガシラ目(Sphacelariales)、アミジグサ目(Dictyotales)、チロプテリス目(Tilopteridales)、アスコセイラ目(Ascoseirales)、ヒバマタ目(Fucales)、ドゥルビアエラ目(Durvillaeales)に属するものが挙げられるが、好ましくはマコンブ(Laminaria japonica)である。マコンブは海洋バイオマスとして非常に生産量が高く、また大型であることから、目的物質生産のための原料として安定して大量に供給することができる。

【0019】

本発明において海藻は、生のもの、乾燥したもののいずれも利用することが可能であるが、好ましくは生のものを利用する。生の海藻を利用することによって、エネルギー消費量が極めて高い海藻の乾燥工程を省略することができ、また海藻糖化液を得る工程において水を別途添加する必要性がほとんどなく有利である。本発明において海藻は必要に応じて膨潤させてもよい。

【0020】

本発明において海藻は、必要に応じて細片化されていても良い。海藻の細片化は公知の方法によって行うことができ、例えば、ハサミ、ミキサー、超音波処理、フレンチプレス、石臼、乳鉢、ホモジナイザー、ガラスビーズ、ミリングマシーンなどを用いて所望の大きさになるまで細片化することができる。

【0021】

海藻に含まれるアルギン酸、セルロース、マンニトール、ペクチン、ガラクトロン酸、カラギーナン、寒天などの炭素源は海藻から以下の方法で抽出される。

(1)抽出工程

原料海藻をよく洗浄した後、アルカリを加えて加熱し、藻体中のアルギン酸を可溶化する。海藻に含まれているアルギン酸は、海水中のミネラルと塩をつくり、不溶性のゼリー状態で細胞壁間に充填されている。海藻にナトリウム塩を加えることで、アルギン酸の不溶性塩が水溶性のアルギン酸ナトリウムに置換され、藻体外に溶出する。

(2)ろ過工程

アルギン酸が十分に溶け出したら、ろ過して不溶性成分を除き、アルギン酸ナトリウムの溶液を得る。可溶化したアルギン酸の粘性により、抽出液は高い粘性を帯びる。これをろ過するためには大量の水を加えて希釈し、粘性を下げる。

(3)析出

アルギン酸ナトリウムの水溶液に酸を加えてpHを下げ、再び不溶性のアルギン酸として析出させる。酸の代わりにカルシウム塩を用いると、これも不溶性のアルギン酸カルシウムとして析出させることもできる。

(4)乾燥

析出したアルギン酸を脱水した後よく洗浄し、乾燥させてアルギン酸を得る。このアルギン酸をアルカリで中和すれば、アルギン酸塩となる。中和に用いるアルカリにナトリウムを使えばアルギン酸ナトリウムに、カリウムを使えばアルギン酸カリウムとなる。

【0022】

上記のような工程で取得されたアルギン酸は、アルギン酸リアーゼによる酵素分解反応または酸による加水分解反応を行った後に、培地の炭素源として用いることが望ましい。例えば、海藻から発酵の主たる原料となる炭素源を得るには、海藻に塩酸やリン酸のような無機酸、硫酸のようなスルホン酸、酢酸、ギ酸のようなカルボン酸といった酸を添加して酸処理することにより海藻中の多糖の分解、すなわち糖化を促した海藻糖化液を得ることができる。

【0023】

また、海藻から発酵の主たる原料となる炭素源を得るにはアルギン酸リアーゼ(EC.4.2.2.3)または λ -カラギナーゼ(Lambda-carrageenase、EC 3.2.1.162)またはペクチナーゼ

10

20

30

40

50

の酵素活性を持つ酵素で酵素処理することが望ましい。酵素処理することで海藻中の多糖の分解、すなわち糖化を促した海藻糖化液を得ることができる。

前述の海藻糖化液を得るための工程である海藻の細片化、膨潤、酸処理、酵素処理の工程はそれぞれを独立して連続して行ってもよいし、いずれかの工程を同時に行ってもよい。また、これらの工程の順序を変えて行ってもよい。

【0024】

アルギン酸リアーゼは、上述した酵素を利用することが出来、細胞内で直接発現させて使用することも出来るし、別途単離したアルギン酸リアーゼを海藻処理物と反応させてアルギン酸を得てもよい。

【0025】

ペクチナーゼはポリガラクトナーゼ、ペクチンリアーゼ、ペクチンエステラーゼ、ペクチンメチルエステラーゼなどが利用できる。

【0026】

海藻に含まれるセルロースは、アルギン酸を含む多糖類を抽出、分離した後に、セルラーゼを加えることによって分解することが出来る。本発明において、セルラーゼとは、エンド-1,4-β-D-グルコナーゼとも称し、セルロースの1,4-β-D-グルコシド結合を加水分解し、おもにセロビオースを生成する酵素を意味する。セルラーゼは、高等植物、細菌、糸状菌、木材腐朽菌、軟体動物などに存在する。本発明においては、セルラーゼの由来は問われず、微生物から抽出・精製したもの、或いは分子生物学的に製造したものをを用いることもできる。

【0027】

本発明の微生物は上記に例示される抽出工程により精製したアルギン酸塩を資化出来る微生物である。本発明においてアルギン酸塩とは、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸カリウムを意味し、本発明の微生物は、アルギン酸、アルギン酸塩を炭素源として最少培地で生育できる微生物が好ましい。例えば培地中のアルギン酸を0.5g/L以上、望ましくは1g/L以上、さらに望ましくは2.5g/L以上資化できる微生物が好ましい。本発明においては、微生物の栄養増殖に必要な成分を最小限に含む培地を最少培地とする。

【0028】

なお、本発明の微生物は、ビブリオ属細菌に属し、種名は、*Vibrio rumoiensis* または *Vibrio alginovora* から選択される。

【0029】

本発明の微生物は、16SリボソームRNA配列が配列番号1と95%以上の相同性を示す配列を有する特徴があるが、望ましくは96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の相同性を有することが好ましい。定義される16SリボソームRNAを有するかどうかは、例えば16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列データと既知種の配列データとを比較し、既知種の配列データとを比較し系統解析を行って決定することができる。系統解析及び系統樹の作成方法は、例えば以下の手順に従って行なう。

【0030】

まず細菌から鋳型となるゲノムDNAを抽出する。細菌からDNAを抽出する方法は公知であり、いずれの方法を使用してもよい。一般的には、細胞をリゾチームなどの細胞壁分解酵素で処理する方法、ガラスビーズによる物理的破壊方法、凍結融解を繰り返す処理方法などが使用される。また市販のDNA抽出用の試薬も使用することができる。ゲノムDNAは必ずしもインタクトな状態で抽出されなくてもよい。従って、試料のコンタミネーションの可能性が低く、操作が簡単で、迅速に行なうことのできる方法を適宜選択することができる。

【0031】

次にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により16SリボソームRNAをコードする標的DNAを増幅する。PCRにおいて使用されるプライマーの配列は、少なくともラクノスピラ科に属する全ての既知細菌の16SリボソームRNAをコードする標的DNAが増幅されるよう適宜設計することができるが、通常、生物種を超えて保存された配列からなる

10

20

30

40

50

プライマー（ユニバーサルプライマー）が使用される。またPCRの条件は特に限定されず、通常用いられる範囲内で適宜選択することができる。市販のPCR用試薬を使用して、添付の説明書に従って反応を行うことができる。

【0032】

PCRで増幅されたDNA断片は、必要に応じてスピンカラムなどを用いて精製されたのち、その塩基配列が決定される。塩基配列の決定は定法に従って行なうことができる。

【0033】

決定された塩基配列は、適当な遺伝子配列データベース及び相同性検索プログラムを用いて、既知の細菌16SリボソームDNA配列とのホモロジー検索を行うことにより、最も高い相同性を示す既知配列を抽出することができる。例えば、日本DNAデータバンク（DDBJ）のホームページを通じて、BLASTやFASTAが利用できる。プログラムとしてblastnやfastaを選択し、決定された塩基配列をクエリーとし、検索対象データベースとして16S rRNA（Prokaryotes）を選択して検索を実施すれば、高い相同性を示す既知配列が抽出され出力される。細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のデータセットを含む限り、いかなる他の遺伝子配列データベースも利用することができる。また、上記以外の自体公知の相同性検索プログラムを用いることもできる。

10

【0034】

増幅したDNAの塩基配列に基づき分子進化系統樹を推定し、単離された細菌の分類学的位置を特定することもできる。分子進化系統樹解析ソフトはインターネット等でも公開されており、それらを利用することができる（CLUSTAL W等）。系統樹解析の結果、単離された細菌がラクノスピラ科に属する細菌と同じクラスターにある場合、当該細菌を本発明のピブリオ属に属する細菌として同定することができる。

20

【0035】

本発明の微生物は、上記に示される海藻及び海藻を食源として生育する生物から取得される。例えば、サザエ、アワビ、タツナミガイ、ウマヅラハギ、ブダイ、マダイ、ベラ等から取得される。

【0036】

一態様において、本発明の細菌は、配列番号1で表される核酸配列と95%以上の相同性を有する核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子、好ましくは配列番号1で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を有する。ここで配列番号1は、後述するピブリオ属に属する本発明の細菌の1つ（NITE P-01635株）の16SリボソームRNA遺伝子の配列を示す。核酸配列間の相同性は、上記の相同性検索プログラムBLASTを使用して計算される

30

【0037】

細菌が上記16SリボソームRNA遺伝子を有することは、上述の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列の解析方法を用いて確認することができる。あるいは、下記に詳述する本発明の検出用試薬及び検出方法に従って、該遺伝子を特異的に検出し得るプライマー又はプローブを用いて、自体公知の方法（PCR、サザンブロッティング、DNAアレイ等）により調べることが出来る。

40

【0038】

本発明者が単離した、本発明の細菌の一例の菌株（NITE P-01635株 本明細書中では、Vibrio sp. SA2とも呼ぶ）は、受託番号NITE P-01635で、独立行政法人製品評価技術基盤機構（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に国内寄託されている（受託日：2013年6月13日）。

【0039】

なお、本発明の微生物は、さらに物質生産能を有するように改変されていることが好ましい。

【0040】

本発明において、目的物質とは、本発明の微生物を用いて、目的物質が生産されれば、

50

目的物質は問わないが、例えば、L-アミノ酸、核酸、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、プロピレン、1,3-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1-プロパノール、1,3-プロパンジオール、1,2-プロパンジオール、エチレングリコール、およびイソブタノールが望ましい。

【0041】

本発明において、L-アミノ酸とは、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリン、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、グリシン、L-スレオニン、L-セリン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン及びL-アスパラギンから選択される1種又はそれ以上のアミノ酸を意味する。

10

【0042】

本発明において、核酸とは、プリンヌクレオシド、およびプリンヌクレオチドが挙げられる。プリンヌクレオシドとしては、イノシン、グアノシン、キサンチン、およびアデノシンが挙げられる。本発明の細菌は、1種のプリンヌクレオシドの生産能を有していてもよく、2種またはそれ以上のプリンヌクレオシドの生産能を有していてもよい。本発明においては、1種のプリンヌクレオシドが製造されてもよく、2種またはそれ以上のプリンヌクレオシドが製造されてもよい。プリンヌクレオチドとしては、プリンヌクレオシドの5'-リン酸エステルが挙げられる。プリンヌクレオチドの5'-リン酸エステルとしては、イノシン酸(イノシン-5'-リン酸エステル; IMP)、グアニル酸(グアノシン-5'-リン酸エステル; GMP)、キサンチル酸(キサンチン-5'-リン酸エステル; XMP)、およびアデニル酸(アデノシン-5'-リン酸エステル; AMP)が挙げられる。

20

【0043】

本発明において、L-アミノ酸の生産能力を有するように改変するためには、以下の方法が選択される。

【0044】

<アミノ酸生産菌>

L-アミノ酸生産能を有するビブリオ属細菌は、上記のようなビブリオ属細菌の野生株にL-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するためには、従来のコリネ型細菌、エシェリヒア属細菌等の育種に使用されてきた、栄養要求性変異株、L-アミノ酸アナログ耐性、または代謝制御変異株、L-アミノ酸合成系酵素の活性が増強された組み換え株等の創製法を利用して育種することができる(アミノ酸発酵(株)学会出版センター)。L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、L-アミノ酸合成系酵素の活性の増強が組み合わせられてもよい。

30

以下、各種アミノ酸生産能を付与するための方法を例示する。

【0045】

L-リジン生産菌

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株(特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、又はオキサリジン、リジンハイドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン、-メチルリジン、-クロロカプロラクタム、DL--アミノ--カプロラクタム、-アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。特にL-リジンアナログとして、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)に耐性を有する変異株として育種することが好ましい。

40

【0046】

ビブリオ属細菌から変異株を得るための変異処理法としては、紫外線照射、またはN-

50

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する方法が挙げられる。また、ビブリオ属細菌の自然突然変異株を選択することによっても、L - アミノ酸生産能を有するビブリオ属細菌を得ることができる。

【0047】

L - アミノ酸アナログ耐性変異株は、例えば、変異処理したビブリオ属細菌を種々の濃度のL - アミノ酸アナログを含有する寒天培地に接種し、コロニーを形成する菌株を選択することにより、取得することができる。

【0048】

また、栄養要求性変異株は、ビブリオ属細菌のコロニーを目的の栄養物質(例えば、L - アミノ酸)を含む寒天培地に形成させ、これを前記栄養物質を含まない寒天培地にレブリカし、同栄養物質を含まない寒天培地で生育できない菌株を選択することにより、取得することができる。

【0049】

次に、L - リジン生合成系酵素の活性の増強によってL - リジン生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0050】

L - リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及び/又はアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

【0051】

ビブリオ属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及び/又はアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及び/又はアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、ビブリオ属で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをビブリオ属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及び/又はアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0052】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、ビブリオ属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)) K-12株及びビブリオ・ナトリージェンスIF015636株等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子(dapA、Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297 (1986))及びAKIIIをコードする遺伝子(lysC、Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986))は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12やビブリオ・ナトリージェンスIF015636等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。

【0053】

また、ビブリオ属の遺伝子は以下のGenBankのデータベースを利用することによって取得できる。

Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961 chromosome I, complete sequence; AE003852

Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961 chromosome II, complete sequence; AE003853

Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 chromosome I, complete sequence; BA000031

Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 chromosome II, complete sequence; BA000032

Vibrio fischeri ES114 chromosome I, complete sequence; CP000020

10

20

30

40

50

Vibrio fischeri ES114 chromosome II, complete sequence; CP000021
 Vibrio vulnificus CMCP6 chromosome I, complete sequence; AE016795
 Vibrio vulnificus CMCP6 chromosome II, complete sequence; AE016796
 Vibrio vulnificus YJ016 chromosome I, complete sequence; BA000037
 Vibrio vulnificus YJ016 chromosome II, complete sequence; BA000038

【 0 0 5 4 】

アルギン酸リアーゼ活性を持ちアルギン酸を分解できることが知られているビブリオ属細菌としては以下の微生物種を挙げることができる

Vibrio alginolyticus
 Vibrio splendidus
 Vibrio kanaloaei
 Vibrio pomeroyi
 Vibrio chagasii
 Vibrio lentus
 Vibrio cyclitrophicus
 Vibrio crassostreae
 Vibrio haliticolii

10

【 0 0 5 5 】

また、ビブリオ属の遺伝子は下記表に記載のGenBankのデータベースのIDを参照することによって取得できる。具体的には、NCBIのURL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> から下記表のAssembly IDを入力し、各々のAssembly IDについてWGS(Whole Genome Sequence) Projectのページからダウンロードすることによってビブリオ属の遺伝子を取得することができる。

20

【 0 0 5 6 】

【表 1 - 1】

表 1 - 1

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000400425.1	687838	
GCA_000400405.1	687798	
GCA_000400385.1	687758	
GCA_000400365.1	687718	
GCA_000400345.1	687678	10
GCA_000400325.1	687638	
GCA_000400305.1	687598	
GCA_000400285.1	687558	
GCA_000400265.1	687518	
GCA_000400245.1	687478	
GCA_000400225.1	687438	
GCA_000400205.1	687398	
GCA_000388025.1	672908	20
GCA_000390165.1	670918	
GCA_000387725.1	651438	
GCA_000387705.1	651418	
GCA_000387685.1	651398	
GCA_000387665.1	651378	
GCA_000387645.1	651358	
GCA_000387625.1	651338	
GCA_000387605.1	651318	30
GCA_000387585.1	651298	
GCA_000272105.1	390998	
GCA_000269765.1	388758	
GCA_000269745.1	388738	
GCA_000269725.1	388718	
GCA_000256485.1	404808	
GCA_000257185.1	367268	
GCA_000257165.1	367248	40
GCA_000195475.2	345468	
GCA_000354175.1	573118	
GCA_000347555.1	559258	
GCA_000342305.1	552488	
GCA_000338215.1	534938	
GCA_000316925.1	502608	

【 0 0 5 7 】

【表 1 - 2】

表 1 - 2

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000316985.1	502668	
GCA_000315135.1	500288	
GCA_000299635.1	427738	
GCA_000303175.1	438938	
GCA_000280885.1	406338	10
GCA_000275705.1	400088	
GCA_000272445.1	391338	
GCA_000272425.1	391318	
GCA_000272365.1	391258	
GCA_000272385.1	391278	
GCA_000272405.1	391298	
GCA_000272305.1	391198	
GCA_000272285.1	391178	20
GCA_000272345.1	391238	
GCA_000272325.1	391218	
GCA_000272265.1	391158	
GCA_000272245.1	391138	
GCA_000272125.1	391018	
GCA_000272225.1	391118	
GCA_000272085.1	390978	
GCA_000272205.1	391098	30
GCA_000272065.1	390958	
GCA_000272045.1	390938	
GCA_000272185.1	391078	
GCA_000272165.1	391058	
GCA_000272145.1	391038	
GCA_000287135.1	411338	
GCA_000287115.1	411318	
GCA_000287095.1	411298	40
GCA_000287155.1	411358	
GCA_000287075.1	411278	
GCA_000287055.1	411258	
GCA_000287035.1	411238	
GCA_000287015.1	411218	
GCA_000287195.1	411398	

【表 1 - 3】

表 1 - 3

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000286995.1	411198	
GCA_000286975.1	411178	
GCA_000286955.1	411158	
GCA_000257415.2	572558	
GCA_000256465.1	369678	10
GCA_000256445.1	369688	
GCA_000256425.1	369698	
GCA_000256405.1	369718	
GCA_000256385.1	369708	
GCA_000256365.1	369728	
GCA_000256345.1	369738	
GCA_000256325.1	369748	
GCA_000256305.1	369758	20
GCA_000256285.1	369768	
GCA_000256245.1	369788	
GCA_000256605.1	369668	
GCA_000256205.1	369798	
GCA_000256185.1	369808	
GCA_000256165.1	369818	
GCA_000256135.1	369828	
GCA_000256115.1	369838	30
GCA_000256095.1	370488	
GCA_000252345.2	432028	
GCA_000247005.1	354498	
GCA_000237785.2	340248	
GCA_000237745.2	340308	
GCA_000237725.2	340228	
GCA_000237705.2	340488	
GCA_000237685.2	340188	40
GCA_000237665.2	341088	
GCA_000237645.2	339688	
GCA_000237625.2	344228	
GCA_000237605.2	340628	
GCA_000237585.2	340008	
GCA_000237565.2	340068	

【表 1 - 4】

表 1 - 4

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000237545.2	339988	
GCA_000237525.2	341208	
GCA_000237505.2	343908	
GCA_000237485.2	341008	
GCA_000237465.2	340048	10
GCA_000237445.2	339828	
GCA_000237425.2	339808	
GCA_000237405.2	339668	
GCA_000348505.1	570068	
GCA_000348485.1	570118	
GCA_000348465.1	570128	
GCA_000348445.1	571148	
GCA_000348425.1	571128	20
GCA_000348405.1	571118	
GCA_000348385.1	571088	
GCA_000348365.1	571078	
GCA_000348345.1	571048	
GCA_000348325.1	571038	
GCA_000348305.1	571028	
GCA_000348285.1	570998	
GCA_000348265.1	570988	30
GCA_000348245.1	570958	
GCA_000348225.1	570948	
GCA_000348205.1	570938	
GCA_000348185.1	570908	
GCA_000348165.1	570898	
GCA_000348145.1	570888	
GCA_000348125.1	570878	
GCA_000348105.1	570868	40
GCA_000348085.1	570858	
GCA_000348065.1	570848	
GCA_000348045.1	570838	
GCA_000259935.1	373798	
GCA_000347495.1	558488	
GCA_000327105.3	555018	

【 0 0 6 0 】

【表 1 - 5】

表 1 - 5

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000327125.3	555038	
GCA_000327145.3	555048	
GCA_000327165.3	555008	
GCA_000327185.3	554958	
GCA_000327205.3	554998	10
GCA_000327225.3	554988	
GCA_000327245.3	554968	
GCA_000299535.1	427638	
GCA_000299515.1	427618	
GCA_000299495.1	427598	
GCA_000341445.1	541358	
GCA_000275645.1	395148	
GCA_000257415.1	367498	20
GCA_000237765.2	339328	
GCA_000223095.2	339048	
GCA_000166495.2	328438	
GCA_000166475.2	340908	
GCA_000338875.1	538258	
GCA_000338075.1	534948	
GCA_000334195.1	529738	
GCA_000318505.2	528248	30
GCA_000327245.2	528208	
GCA_000318485.2	528168	
GCA_000327225.2	528128	
GCA_000327205.2	528088	
GCA_000327185.2	528048	
GCA_000327165.2	528008	
GCA_000327145.2	527968	
GCA_000327125.2	527918	40
GCA_000327105.2	527848	
GCA_000330905.1	521758	
GCA_000328405.1	516618	
GCA_000327245.1	515378	
GCA_000327225.1	515338	
GCA_000327205.1	515298	

【表 1 - 6】

表 1 - 6

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000327185.1	515258	
GCA_000327165.1	515218	
GCA_000327145.1	515178	
GCA_000327125.1	515138	
GCA_000327105.1	515098	10
GCA_000318075.1	505058	
GCA_000318505.1	505198	
GCA_000318485.1	505178	
GCA_000303085.1	442508	
GCA_000303125.1	442478	
GCA_000279375.1	403218	
GCA_000303005.1	442538	
GCA_000279205.1	403228	20
GCA_000302895.1	442608	
GCA_000302875.1	442548	
GCA_000302855.1	442558	
GCA_000303105.1	442488	
GCA_000302835.1	442598	
GCA_000279955.1	403188	
GCA_000279185.1	403238	
GCA_000302755.1	442588	30
GCA_000302775.1	442578	
GCA_000303065.1	442518	
GCA_000279785.1	403198	
GCA_000303045.1	442498	
GCA_000302985.1	442568	
GCA_000302965.1	442528	
GCA_000279555.1	403208	
GCA_000222145.1	297418	40
GCA_000279285.1	400228	
GCA_000279265.1	400208	
GCA_000279455.1	400368	
GCA_000279435.1	400348	
GCA_000279415.1	400328	
GCA_000279395.1	400308	

【表 1 - 7】

表 1 - 7

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000281655.1	402598	
GCA_000279345.1	400288	
GCA_000279245.1	400188	
GCA_000279325.1	400268	
GCA_000279305.1	400248	10
GCA_000305755.1	445598	
GCA_000305735.1	445608	
GCA_000305715.1	445618	
GCA_000305695.1	445628	
GCA_000305625.1	449978	
GCA_000305545.1	450018	
GCA_000305645.1	449968	
GCA_000305605.1	443328	20
GCA_000305565.1	450008	
GCA_000305585.1	449988	
GCA_000305675.1	449958	
GCA_000305525.1	450028	
GCA_000305135.1	450348	
GCA_000305115.1	450448	
GCA_000305095.1	450438	
GCA_000305075.1	450428	30
GCA_000304795.1	441018	
GCA_000305055.1	450418	
GCA_000305195.1	450408	
GCA_000305015.1	450398	
GCA_000304995.1	450388	
GCA_000304955.1	450378	
GCA_000304775.1	440998	
GCA_000304935.1	450368	40
GCA_000304915.1	450358	
GCA_000304755.1	440978	
GCA_000259295.1	372098	
GCA_000234455.2	334828	
GCA_000234865.1	315908	
GCA_000234435.2	334588	

【表 1 - 8】

表 1 - 8

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000234885.1	315918	
GCA_000234905.1	315898	
GCA_000234415.2	343308	
GCA_000234395.2	334108	
GCA_000234925.1	315888	10
GCA_000234945.1	315878	
GCA_000234965.1	315868	
GCA_000234375.2	342808	
GCA_000222645.2	341648	
GCA_000222625.2	340808	
GCA_000221485.1	297158	
GCA_000221465.1	297148	
GCA_000221445.1	297138	20
GCA_000221425.1	297128	
GCA_000220785.2	334448	
GCA_000220765.2	334428	
GCA_000221405.1	297118	
GCA_000220745.2	334928	
GCA_000221385.1	297108	
GCA_000220725.2	334908	
GCA_000221365.1	297098	30
GCA_000221345.1	297088	
GCA_000195415.2	335888	
GCA_000166455.2	315778	
GCA_000256265.1	369778	
GCA_000259875.1	373738	
GCA_000195065.1	255188	
GCA_000257205.1	367288	
GCA_000021625.1	22428	40
GCA_000250855.1	359928	
GCA_000241385.1	325738	
GCA_000184325.1	237938	
GCA_000195225.2	306588	
GCA_000222685.2	300348	
GCA_000222665.2	300308	

【 0 0 6 4 】

【表 1 - 9】

表 1 - 9

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000222605.2	300268	
GCA_000222585.2	300228	
GCA_000222565.2	300188	
GCA_000217675.1	288828	
GCA_000039765.1	273878	10
GCA_000186585.1	241138	
GCA_000196095.1	256918	
GCA_000189275.2	252618	
GCA_000189255.2	252578	
GCA_000165125.2	235678	
GCA_000182685.1	231268	
GCA_000182465.1	230868	
GCA_000182385.1	230728	20
GCA_000182365.1	230688	
GCA_000182345.1	230648	
GCA_000181535.1	229298	
GCA_000176715.1	221458	
GCA_000176455.1	220938	
GCA_000176435.1	220898	
GCA_000176415.1	220858	
GCA_000176395.1	220818	30
GCA_000176375.1	220778	
GCA_000176235.1	220498	
GCA_000176215.1	220458	
GCA_000176175.1	220378	
GCA_000176155.1	220338	
GCA_000176135.1	220298	
GCA_000176055.1	220138	
GCA_000175995.1	220018	40
GCA_000175975.1	219978	
GCA_000175695.1	219418	
GCA_000174335.1	216758	
GCA_000174315.1	216718	
GCA_000174295.1	216678	
GCA_000174275.1	216638	

【表 1 - 1 0】

表 1 - 1 0

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000174255.1	216598	
GCA_000174235.1	216558	
GCA_000174115.1	216318	
GCA_000171815.1	211958	
GCA_000168935.1	206318	10
GCA_000168915.1	206278	
GCA_000168895.1	206238	
GCA_000167935.1	204398	
GCA_000166455.1	201958	
GCA_000158115.1	187118	
GCA_000154045.1	179038	
GCA_000154025.1	178998	
GCA_000154005.1	178958	20
GCA_000153985.1	178918	
GCA_000153965.1	178878	
GCA_000153945.1	178838	
GCA_000153865.1	178678	
GCA_000153785.1	178518	
GCA_000153505.1	177998	
GCA_000153005.1	176998	
GCA_000152765.1	176518	30
GCA_000152485.1	175958	
GCA_000152465.1	175918	
GCA_000152445.1	175878	
GCA_000152425.1	175838	
GCA_000091465.1	112098	
GCA_000024825.1	25628	
GCA_000426765.1	777318	
GCA_000464435.1	774868	40
GCA_000462975.1	773048	
GCA_000461895.1	771938	
GCA_000454475.1	764028	
GCA_000454455.1	764008	
GCA_000454265.1	763838	
GCA_000454245.1	763818	

【 0 0 6 6 】

【表 1 - 1 1】

表 1 - 1 1

GenBank Assembly ID (Accession version)	GenBank release ID	
GCA_000454225.1	763798	
GCA_000454205.1	763778	
GCA_000454185.1	763758	
GCA_000454165.1	763738	
GCA_000454145.1	763718	10
GCA_000442925.1	750228	
GCA_000438805.1	745598	
GCA_000438785.1	745578	
GCA_000022585.1	23388	
GCA_000021605.1	22408	
GCA_000430425.1	737928	
GCA_000430405.1	737908	
GCA_000418995.1	726938	20
GCA_000017705.1	18508	
GCA_000417905.1	719578	
GCA_000417625.1	719378	
GCA_000016245.1	17048	
GCA_000009745.1	10548	
GCA_000006745.1	7548	

30

【 0 0 6 7 】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L - リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。ビブリオ属由来の野生型DDPSはL - リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、ビブリオ属由来の野生型AKIIIはL - リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、ビブリオ属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL - リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。

【 0 0 6 8 】

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL - リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

40

【 0 0 6 9 】

また、アルパルトキナーゼをコードする遺伝子は、ホモログが存在することがあり、アスパルトキナーゼ活性を有する限り、遺伝子源は限定されない。

【 0 0 7 0 】

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしな

50

い条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度、温度で、1回、より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

【0071】

なお、アスパルトキナーゼ活性は、Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry(1968), 63(2), 139-148に記載される方法によって測定することができる。また遺伝子はいずれも野生型遺伝子には限られず、アスパルトキナーゼ活性を有する限り、各遺伝子の上記のオープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列において、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含むアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、変異体又は人為的な改変体であってもよい。ここで、「1若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個を意味する。上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、上記機能が維持される保存的変異である。保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。

10

【0072】

保存的変異の代表的なものは、保存的置換であり、保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

20

30

【0073】

各遺伝子の上記オープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有し、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする配列を用いることも出来る。なお、アミノ酸配列の相同性は、例えばKarlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993))やFASTA(Methods Enzymol., 183, 63 (1990))を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。

【0074】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

40

【0075】

また、ピブリオ属で機能するベクターとは、例えばピブリオ属で自律複製出来るプラスミドであれば、いずれでも用いることが出来る。ベクタープラスミドとしては、pUC系、pACYC184系、IncQ由来のoriを持つvector plasmidならどのようなものでも使用できる。選択に用いるマーカー遺伝子としてはTn903由来カナマイシン耐性遺伝子、Tn9由来クロラムフェニコール耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を用いることができる。

50

【 0 0 7 6 】

dapA及びlysCとピブリオ属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【 0 0 7 7 】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAとしては、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型アスパルトキナーゼをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換、323位のグリシン残基がアスパラギン残基に置換、318位のメチオニンがイソロイシンに置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる（これらの変異体については米国特許第5661012号及び第6040160号明細書参照）。変異型DNAはPCRなどによる部位特異的変異法により取得することができる。

10

【 0 0 7 8 】

なお、変異型変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする変異型dapA及び変異型アスパルトキナーゼをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80、pCAB1、pCABD2が知られている（米国特許第6040160号明細書）。RSFD80で形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109株（米国特許第6040160号明細書）は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター）に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

20

【 0 0 7 9 】

上記のように調製した組換えDNAをピブリオ属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)）が挙げられる。

【 0 0 8 0 】

DDPS活性及び/又はAK活性の増強は、dapA及び/又はlysCをピブリオ属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。ピブリオ属細菌の染色体DNA上にdapA及び/又はlysC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ことができる。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートなどが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び/又はlysC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。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及び/又はlysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及び/又はAK活性が増幅される。

30

【 0 0 8 1 】

DDPS活性及び/又はAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及び/又はlysC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、spac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。これらのプロモーターへの置換により、dapA及び/又はlysCの発現が強化されることによってもDDPS活性及び/又はAK活性が増幅される。発現調節配列の置換は、dapA及び/又はlysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

40

【 0 0 8 2 】

50

なお、DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、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の方法は、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。

【0083】

DDPS活性及び/又はAK活性の増強に加えて、他のL-リジン生合成に關与する酵素の活性を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(dapB)、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(ddh) (以上、国際公開第96/40934号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(ppc) (特開昭60-87788号公報)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspC) (特公平6-102028号公報)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ(dapF) (特開2003-135066号公報)、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素(asd) (国際公開第00/61723号パンフレット)等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ(特開2000-157276号公報)等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。尚、酵素名の後のカッコ内は、遺伝子名である(以下の記載においても同様)。

【0084】

本発明のビブリオ属細菌はL-リジン排出活性を増強させることによってL-リジン生産能が高められた細菌であってもよい。例えば、ybjE遺伝子の発現量を増加させること、lysE遺伝子の発現量を増加させることでL-リジン排出活性を高めることができる(特開2005-237379、WO97/23697号パンフレット)。

【0085】

さらに、本発明の細菌は、さらに、L-アミノ酸の生合成経路から分岐してL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性や、L-アミノ酸の合成又は蓄積に負に機能する酵素活性が低下または欠損していてもよい。L-リジン生産において、このような酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(cadA, ldcC)、マリックエンザイム等があり、該酵素の活性が低下または欠損した株は国際公開第WO95/23864号、第WO96/17930号パンフレット、第WO2005/010175号パンフレットを参照にして構築できる。

【0086】

これらの酵素活性を低下あるいは欠損させる方法としては、通常の変異処理法又は遺伝子組換え技術によって、ゲノム上の上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。このような変異の導入は、例えば、遺伝子組換えによって、ゲノム上の酵素をコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、ゲノム上の酵素をコードする領域にアミノ酸置換(ミスセンス変異)を導入すること、また終止コドンを導入すること(ナンセンス変異)、一~二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分、あるいは全領域を欠失させることによって達成出来る(J. Biol. Chem. 272:8611-8617(1997))。また、コード領域の全体又は一部が欠失したような変異酵素をコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、該遺伝子でゲノム上の正常遺伝子を置換すること、トランスポゾン、又はIS因子を該遺伝子に導入することによって酵素活性を低下または欠損させることができる。

【0087】

例えば、上記の酵素の活性を低下または欠損させるような変異を遺伝子組換えにより導入する為には、以下のような方法が用いられる。目的遺伝子の部分配列を改変し、正常に機能する酵素を産生しないようにした変異型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAでビブリオ属に属する細菌に形質転換し、変異型遺伝子とゲノム上の遺伝子で組換えを起こさせることにより、ゲノム上の目的遺伝子を変異型に置換することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換は、「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci

10

20

30

40

50

． U S A . 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法と ファージ由来の切り出しシステム (Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002)) とを組合わせた方法 (WO2005/010175号参照) 等の直鎖状 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 (米国特許第6303383号; 特開平05-007491号公報)。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入は、宿主上で複製能力を持たないプラスミドを用いても行うことができる。

【0088】

上記のような L - リジン生合成に関与する酵素活性を増強する方法、酵素活性を低下させる方法は、他の L - アミノ酸生産菌の育種にも同様に適用することができる。以下、他の L - アミノ酸生産菌の育種方法について述べる。

10

【0089】

L - トリプトファン生産菌は、例えば、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以上の活性が増強するように改変することによって構築できる。ここで、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、酵素活性をより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ビブリオ属に属する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。(国際公開第94/08031号パンフレット参照)

20

【0090】

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を導入する方法が挙げられる。(特開昭57-71397号公報、特開昭62-244382号公報、米国特許第4,371,614明細書)。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、及び サブユニットからなり、それぞれ trpA、trpB によってコードされている。

30

【0091】

また、トリプトファンオペロンのリプレッサーである trpR を欠損させたり、trpR に変異を導入することによっても好適な L - トリプトファン生産菌が得られる (米国特許第4,371,614号公報、国際公開第WO2005/056776号パンフレット)。

【0092】

さらに、L - トリプトファン生産菌は、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ように改変することによっても構築できる。

【0093】

また、L - トリプトファン生産菌としては、3 - フォスフォセリンフォスファターゼ (serB) 活性を増大した株 (US4,371,614) すること、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (pckA) を増大した株することによっても構築できる。

40

【0094】

L - トリプトファン、L - フェニルアラニン、L - チロシンは共に芳香族アミノ酸で生合成系が共通しており、芳香族アミノ酸の生合成系酵素をコードする遺伝子としては、デオキシアラビノ - ヘプツロン酸リン酸シンターゼ (aroG)、3 - デヒドロキネートシンターゼ (aroB)、シキミ酸デヒドラターゼ、シキミ酸キナーゼ (aroL)、5 - エノール酸ピルビン酸シキミ酸 3 - リン酸シンターゼ (aroA)、コリスミ酸シンターゼ (aroC) が挙げられる。(欧州出願公開763127号明細書) 従って、これらの酵素をコードする遺伝子をプラスミド、あるいはゲノム上で多コピー化することにより、芳香族アミノ酸の生産能を向上させ

50

ることができる。また、これらの遺伝子はチロシンリプレッサー (tyrR) によって制御されることが知られており、tyrR遺伝子を欠損させることによって、芳香族アミノ酸の生合成系酵素活性を上昇させてもよい。(欧州特許763127号明細書参照) また、それぞれのアミノ酸生産能を強化する場合、目的とする芳香族アミノ酸以外の生合成系を弱体化させてもよい。例えば、目的アミノ酸がL-トリプトファンの場合、L-フェニルアラニン生合成系、L-チロシン生合成系を弱体化させてもよい。(US4,371,614)

【0095】

また、3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ (aroF、aroG) は、芳香族アミノ酸によるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を受けないように改変してもよい。例えば、エシェリヒア・コリのaroFを用いる場合、N末端より147番目のL-アスパラギン酸または181番目のL-セリンを他のアミノ酸残基に、aroGの場合、N末端より146番目のL-アスパラギン酸、147番目のL-メチオニン、150番目のL-プロリンもしくは202番目のL-アラニンの1アミノ酸残基、または157番目のL-メチオニン及び219番目のL-アラニンの2アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換した変異型aroF、aroG遺伝子を宿主に導入することによって、芳香族アミノ酸生産菌を得ることができる。(EP0488424)

10

【0096】

L-フェニルアラニン生産菌としては、上述のような改変のほかに、tyrA、tyrRを欠損させた株や、フェニルアラニン排出遺伝子であるyddG、又はyedA遺伝子を増幅した株を用いることができる。

20

【0097】

L-スレオニン生産能を有するビブリオ属に属する細菌として好ましいものは、L-スレオニン生合成系酵素を強化するように改変することによって取得できる。L-スレオニン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、アスパルトキナーゼIII遺伝子 (lysC)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (asd)、thrオペロンにコードされるアスパルトキナーゼI遺伝子 (thrA)、ホモセリンキナーゼ遺伝子 (thrB)、スレオニンシンターゼ遺伝子 (thrC) が挙げられる。これらの遺伝子は2種類以上導入してもよい。L-スレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制されたビブリオ属に属する細菌に導入してもよい。例えば、スレオニンデヒドロゲナーゼ活性を低下させることによって、スレオニン分解を抑制することができる。

30

【0098】

L-スレオニン生合成系酵素は、最終産物のL-スレオニンによって酵素活性が抑制される。従って、L-スレオニン生産菌を構築するためには、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにL-スレオニン生合成系遺伝子を改変することが望ましい。thrA、thrB、thrC遺伝子は、スレオニンオペロンを構成しているが、スレオニンオペロンは、アテニューエーター構造を形成しており、スレオニンオペロンの発現は、培養液中のイソロイシン、スレオニンにより阻害を受け、また、アテニューエーションにより発現が抑制される。したがって、この改変は、アテニューエーション領域のリーダー配列あるいは、アテニューエーターを除去することにより達成出来る (Lynn, S. P., Burton, W. S., Donohue, T. J., Gould, R. M., Gumpert, R. I., and Gardner, J. F. J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); 国際公開第02/26993号パンフレット; 国際公開第2005/049808号パンフレット参照)。

40

【0099】

また、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにビブリオ属細菌を改変するために、L-アミノ-β-ヒドロキシ吉草酸 (AHV) に耐性を付与してもよい。

【0100】

また、アスパルトキナーゼIII遺伝子 (lysC) は、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないように改変した遺伝子を用いることが望ましい。このようなフィードバック阻害を受けないように改変したlysC遺伝子は、上述に記載した遺伝子より取得できる。

【0101】

50

L - スレオニン生合成系酵素以外にも、解糖系、TCA回路、呼吸鎖に関する遺伝子やそれらの遺伝子の発現を制御する遺伝子、糖の取り込み遺伝子を強化することもL - スレオニン生産菌の育種に好適である。これらのL - スレオニン生産に効果がある遺伝子としては、トランスヒドロナーゼ遺伝子 (pntAB) (欧州特許733712号明細書)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (pepC) (国際公開95/06114号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子 (pps) (欧州特許877090号明細書)、コリネ型細菌あるいはバチルス属細菌のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (国際公開99/18228号パンフレット、欧州出願公開1092776号明細書) が挙げられる。

【0102】

また、L - スレオニンに耐性を付与する遺伝子、及び/又はL - ホモセリンに耐性を付与する遺伝子の発現を強化することや、宿主にL - スレオニン耐性、及び/又はL - ホモセリン耐性を付与することも好適である。耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子 (Res. Microbiol. 154:123 - 135 (2003))、rhtB遺伝子 (欧州特許出願公開第0994190号明細書)、rhtC遺伝子 (欧州特許出願公開第1013765号明細書)、yfiK、yeaS遺伝子 (欧州特許出願公開第1016710号明細書) が挙げられる。また宿主にL - スレオニン耐性を付与する方法は、欧州特許出願公開第0994190号明細書や、国際公開第90/04636号パンフレット記載の方法を参照出来る。

10

【0103】

L - グルタミン酸生産能を有するビブリオ属細菌を構築するためには、L - グルタミン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増大するように改変することが望ましい。L - グルタミン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (以下、「GDH」ともいう) (gdhA)、グルタミンシンターゼ (glnA)、グルタミン酸シンターゼ (gltAB)、クエン酸シンターゼ (gltA)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (ppc)、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (aceEF, lpdA)、ピルビン酸キナーゼ (pykA, pykF)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ (ppsA)、エノラーゼ (eno)、ホスホグリセルムターゼ (pgmA, pgmI)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (pgk)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA)、トリオースリン酸イソメラーゼ (tpiA)、フルトースビスリン酸アルドラーゼ (fbp)、ホスホフルクトキナーゼ (pfkA, pfkB)、グルコースリン酸イソメラーゼ (pgi) などが挙げられる。これらの酵素遺伝子の中では、CS、PEPC及びGDHのいずれか1種以上が好ましく、3種全てがより好ましい。(米国特許6,197,559号、6,331,419号明細書、欧州特許0999282号明細書)

20

30

【0104】

また、さらに6 - ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2 - ケト - 3 - デオキシ - 6 - ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性、又はこれらの両方の活性が増大するように改変してもよい (欧州特許出願公開1352966号明細書) し、L - グルタミン酸を排出するタンパク質をコードするyhfK遺伝子 (W02005/085419号パンフレット) やybjL遺伝子 (W02008/133161号パンフレット) エシェリヒア・コリ由来のybjL遺伝子を配列番号2に、アミノ酸配列を配列番号3に示す。

【0105】

また、L - グルタミン酸生産能を有するビブリオ属に属する細菌としては、L - グルタミン酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させた細菌を用いてもよい。L - グルタミン酸の生合成経路から分岐してL - グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、2 - オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1 - ピロリンデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。この中では特に、2 - オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を低下又は欠損させることが好ましく、2 - オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を低下又は欠損した菌株は、欧州特許0952221号公報、0955368号公報、米国特許5,378,616号公報を参照にして構築することが出来る。

40

50

【0106】

L - ヒスチジン生産能を有する細菌としては、L - ヒスチジン生合成経路の酵素をコードする遺伝子の発現量が増大した細菌を用いてもよい。L - ヒスチジン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、ATP フォスホリボシルトランスフェラーゼ (hisG)、フォスホリボシルAMP サイクロヒドロラーゼ (hisI)、フォスホリボシル-ATP ピロフォスホヒドラーゼ (phosphoribosyl - ATP pyrophosphohydrolase) (hisIE)、フォスホリボシルフォルミミノ - 5 - アミノイミダゾールカルボキシアミドリボタイドイソメラーゼ (phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase) (hisA)、アミドトランスフェラーゼ (amidotransferase) (hisH)、ヒスチチノールフォスフェートアミノトランスフェラーゼ (hisC)、ヒスチチノールフォスファターゼ (hisB)、ヒスチチノールデヒドロゲナーゼ (hisD) 等が挙げられる。

10

【0107】

また、スルファグアニジン、D, L - 1,2,4-triazole-3-alanine、及びストレプトマイシン耐性を付与することによっても L - ヒスチジン生産菌が得られる (ロシア2119536号)。

【0108】

L - システイン生産菌を構築するためには、シスタチオニン - リアーゼ活性が低下するように改変すること (特開2003-169668号公報) や、L - システインによるフィードバック阻害が低減されたセリンアセチルトランスフェラーゼを保持させるように改変することが好ましい。(特開平11-155571号公報)

20

【0109】

L - アルギニン生産菌を得るためには、 β - メチルメチオニン、p - フルオロフェニルアラニン、D - アルギニン、アルギニンヒドロキサム酸、S - (2 - アミノエチル) - システイン、 β - メチルセリン、 β - 2 - チエニルアラニン、又はスルファグアニジンに耐性を有するように改変することが好ましい。また、L - アルギニンによるフィードバック阻害に耐性な変異を有し、かつ、高い活性を有するN - アセチルグルタミン酸シンターゼを保持するように改変することも、L - アルギニン生産菌の育種法として好適である。

【0110】

またL - アルギニン生産能を有するビブリオ属細菌として、L - アルギニン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現量を増大させた細菌を用いることができる。例えば、L - アルギニン生合成系酵素としては、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA)、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ (argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ)、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE) オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (argF)、アルギニノコハク酸シンターゼ (argG)、アルギニノコハク酸リアーゼ (argH) カルバモイルリン酸シンターゼ (carAB) が挙げられる。中でもN-アセチルグルタミン酸シンターゼ遺伝子 (argA) としては、野生型の15位~19位に相当するアミノ酸配列が置換され、L - アルギニンによるフィードバック阻害が解除された変異型酵素をコードする変異型遺伝子を用いるとより好適である (欧州出願公開1170361号明細書)。

30

40

【0111】

L - ロイシン生産菌は、ilvE遺伝子にコードされる分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼを不活性化させ、tyrB遺伝子にコードされる芳香族アミノ酸トランスアミナーゼの活性を増大させること (特開2004-024259)、または4-アザロイシン又は5,5,5 - トリフルオロロイシン耐性を有するように改変することによって取得することができる。また、L - ロイシンによるイソプロピルリンゴ酸シンターゼのフィードバック阻害が脱感作する用に改変すること、(欧州特許第1067191号明細書)、 β - 2 - チエニルアラニン及び β - ヒドロキシロイシンに耐性を有するように改変すること (米国特許第5,763,231号明細書) によっても好適なL - ロイシン生産菌を構築することができる。

【0112】

50

L - イソロイシン生産菌は、6 - ジメチルアミノプリン耐性（特開平5-304969号公報）、L - イソロイシンヒドロキサメート耐性（特開平5-130882号公報）、チアイソロイシン耐性（特開平5-130882号公報）、DL - エチオニン耐性（特開平5-130882号公報）、またはアルギニンヒドロキサメート耐性（特開平5-130882号公報）を付与することによって取得することができる。また、組換え体ビブリオ属細菌は、L - イソロイシン生合成酵素であるスレオニンデアミナーゼあるいはアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子をプラスミドで増強する方法（特開平2-458号公報、特開平2-42988号公報、特開平8-47397号公報）等によって得られる。

【0113】

L - バリン生産菌は、WO96/06926に記載されているような、生育のためにリボ酸を要求する変異またはノ及びプロトンATPaseを欠損する変異を有するように改変すること、あるいは、少なくとも*ilvG*、*ilvM*、*ilvE*及び*ilvD*の各遺伝子を発現し、*ilvGMEDA*オペロンを含むDNA断片を細胞内に導入することによって構築することができる。尚、*ilvGMEDA*オペロンは、L - バリン及びノ又はL - イソロイシン及びノ又はL - ロイシンによるオペロンの発現調節（アテニュエーション）を受けるので、生成するL - バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい（米国特許5,998,178号明細書）。また、*ilvGMEDA*オペロンは、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないことが好ましい。

10

【0114】

また、本発明に用いるL - アミノ酸生産菌は、固有の生合成系酵素をコードする遺伝子以外に、糖の取り込み、糖代謝（解糖系）、エネルギー代謝に関与する遺伝子が増幅されていてもよい。

20

【0115】

糖代謝に関与する遺伝子としては、解糖系酵素をコードする遺伝子や糖の取り込み遺伝子が挙げられ、グルコース6 - リン酸イソメラーゼ遺伝子（*pgi*；国際公開第01/02542号パンフレット）、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子（*pps*；欧州出願公開877090号明細書）、ホスホグルコムターゼ遺伝子（*pgm*；国際公開03/04598号パンフレット）、フルクトース二リン酸アルドラーゼ遺伝子（*fba*；国際公開03/04664号パンフレット）、ピルビン酸キナーゼ遺伝子（*pykF*；国際公開03/008609号パンフレット）、トランスアルドラーゼ遺伝子（*talB*；国際公開03/008611号パンフレット）、フマラーゼ遺伝子（*fum*；国際公開01/02545号パンフレット）、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子（*pps*；欧州出願公開877090号パンフレット）、non-PTSシュクロース取り込み遺伝子（*csc*；欧州出願公開149911号パンフレット）、シュクロース資化性遺伝子（*scrAB*オペロン；国際公開第90/04636号パンフレット）が挙げられる。

30

【0116】

エネルギー代謝に関与する遺伝子としては、トランスヒドロゲナーゼ遺伝子（*pntAB*；米国特許5,830,716号明細書）、cytochrome bo type oxidase遺伝子（*cyoB* 欧州特許出願公開1070376号明細書）が挙げられる。

【0117】

< イソプロピルアルコール生産菌 >

イソプロピルアルコール生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、イソプロピルアルコール生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように微生物を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、アセト酢酸デカルボキシラーゼ、イソプロピルアルコールデヒドロゲナーゼ、CoAトランスフェラーゼ、及びチオラーゼが挙げられる（WO2009/008377A1）。特に、これら4種酵素全ての活性を増強するのが好ましい。また、イソプロピルアルコール生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、*GntR*（*gntR*）の活性が低下するように微生物を改変する方法が挙げられる。*GntR*とは、グルコン酸の代謝系をコードするオペロンの発現を負に制御する転写因子を指す。同オペロンは、具体的には、グルコン酸の取り込み系とグルコン酸のリン酸化酵素をコードする。例えば、*エシェリヒア・コリ*には、2つの

40

50

グルコン酸の代謝系、GntI系とGntII系、が存在するが、GntRはそれら両方の発現を抑制する。

【0118】

イソプロピルアルコール生産能を有する微生物は、乳酸デヒドロゲナーゼの活性が低下するように改変されていてよい。このような改変により、酸素供給が制限された培養条件下においても、乳酸の生産が抑制され、イソプロピルアルコールを効率よく生産することができる。酸素供給が制限された培養条件とは、気体として空気のみを用いる場合には、一般的に0.02 vvm ~ 2.0 vvm (vvm; 通気容量 [mL] / 液容量 [mL] / 時間 [分])、回転数200 ~ 600 rpmのことをいう。

【0119】

<アセトン生産菌>

アセトンは、イソプロピルアルコール生産におけるイソプロピルアルコールの前駆体である。よって、アセトン生産能は、イソプロピルアルコール生産能を付与又は増強するための方法を一部利用することにより、付与又は増強することができる。例えば、アセトン生産能は、イソプロピルアルコールデヒドロゲナーゼ以外の上記例示したイソプロピルアルコール生合成系酵素、すなわちアセト酢酸デカルボキシラーゼ、CoAトランスフェラーゼ、及びチオラーゼ、から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように微生物を改変することにより、付与又は増強することができる。

【0120】

<エタノール生産菌>

また、エタノール生産能を有する微生物としては、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (ldhA) を欠損し、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pdc) およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (adhB) が導入された変異株や、同株のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (ppc) をさらに欠損させた株が挙げられる (*J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, 8, 243-254)。また、エタノール生産能を有する微生物としては、ピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子 (pfl) およびフマル酸レダクターゼ遺伝子 (frd) を欠損し、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (pdc) およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (adhB) が導入された株も挙げられる (*Ann N Y Acad Sci.* 2008, 1125, 363-372)。

【0121】

<2>本発明の製造法

本発明の目的物質の製造法は、上述の方法によって目的物質生産能を有するように育種されたピブリオ属に属する微生物を海藻から得られた炭素源を含む培地で培養して、目的物質を該培地中に生成蓄積させ、該培地又は菌体より目的物質を回収する方法である。

【0122】

使用する培地は、微生物を用いた目的物質の発酵生産において従来より用いられてきた培地を用いることができる。すなわち、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。ここで、炭素源としては、海藻から得られた炭素源を用いることができる。

【0123】

海藻から得られた炭素源とは、アルギン酸、セルロース、グルコース、マンニトール、ペクチン、ガラクトロン酸、カラギーナン、寒天が挙げられる。褐藻類ではアルギン酸とマンニトールとグルコースを5:8:1の割合で含む(20 January 2012 VOL335 SCIENCE)

培地には海藻から得られた炭素源が含まれていれば、その他の糖源例えば、グルコース、スクロース、フルクトース、グリセロール、エタノールが含まれていても構わない。

【0124】

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。有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求

10

20

30

40

50

物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、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。また、本発明の微生物を培養する際には、ある一定濃度の塩を含んでいることがなお好ましい。塩とは目的物質がカウンタイオンと結合して塩化したものでもよいし、食塩（NaClでもよい）なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0125】

また生育や生産性を向上させるようなL-アミノ酸を添加する場合がある。例えばL-リジン発酵の場合、L-スレオニン、L-ホモセリン、L-イソロイシンを、L-スレオニン発酵の場合、L-イソロイシン、L-リジン、L-グルタミン酸、L-ホモセリンを、L-トリプトファン発酵では、L-フェニルアラニン、L-チロシン等を添加することが好ましい。添加濃度は0.01-10g/L程度である。

10

【0126】

培養は好氣的条件下で1~7日間実施するのがよく、培養温度は24~37、培養中のpHは5~9がよい。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-アミノ酸の回収は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L-アミノ酸を回収することができる。

20

【0127】

尚、本発明においては、NaClを培地中に0.5%以上存在させることが好ましく、好ましくは0.5~4%、さらに好ましくは0.7~3.5%培地中に存在させることが好ましい。

【実施例】

【0128】

<実施例1>Vibrio sp. SA2株の取得

石川県七尾市灘浦地区で採取されたサザエをアルギン酸資化可能新規微生物のスクリーニングに用いた（採取された場所 北緯：37.0981 東経：137.0499付近の海）。

【0129】

120、0.15MPaで20分間オートクレーブ処理することにより滅菌したダイゴ人工海水SP溶液（和光純薬社製、組成は下記参照）に、前述のサザエの殻をハンマーで砕き、緑褐色の消化管内容物を青エーゼで1ループすくいにとって懸濁した。重合度2000以上のアルギン酸ナトリウム（和光純薬社製一級試薬 300-400cP カタログ番号：192-09995）のみを炭素源として含むアルギン酸ナトリウム選抜寒天培地（組成は下記参照）にサザエ消化管の懸濁液を適宜ダイゴ人工海水で希釈してプレーティングした。培養温度25で培養時間75時間静置培養し、多数のコロニー形成を確認した。

30

【0130】

エーゼでコロニーをかきとり、生理食塩水に懸濁した後生理食塩水で3回洗浄した後、新たに調製したアルギン酸ナトリウム選抜寒天培地にプレーティングし、培養温度37で培養時間50時間静置培養し、コロニー形成を確認した株をさらにアルギン酸ナトリウム選抜寒天培地でSIして、LB液体培地に15g/LのNaClを追加添加した培地4mLに懸濁して試験管培養を行った。培養温度は37、往復攪拌速度120rpmの条件で試験管振とう培養して吸光度600nmのODが0.3程度になったところで等量の滅菌20%グリセロールを加え-80で凍結してグリセロールストックを作製し、超低温庫で保存した。最も早期にシングルコロニーを形成した菌株をSA2株と命名した。

40

【0131】

ダイゴ人工海水SP組成

MgCl₂・6H₂O 9.474g/L

CaCl₂・2H₂O 1.328g/L

50

Na ₂ SO ₄	3.505g/L	
KCl	0.597g/L	
NaHCO ₃	0.171g/L	
KBr	0.085g/L	
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.034g/L	
SrCl ₂	0.012g/L	
NaF	3mg/L	
LiCl	1mg/L	
KI	0.07mg/L	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0002mg/L	10
AlCl ₃ · 6H ₂ O	0.008mg/L	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.006mg/L	
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.0002mg/L	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0008mg/L	
NaCl	20.747g/L	

【 0 1 3 2 】

アルギン酸ナトリウム選抜寒天培地 組成

アルギン酸ナトリウム	5g/L	
Na ₂ HPO ₄	6 g/L	
KH ₂ PO ₄	3 g/L	20
NaCl	0.5 g/L	
NH ₄ Cl	1 g/L	
NaCl	21.247g/L	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.246g/L	
Thiamine · HCl	10mg/L	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	9.474g/L	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.328g/L	
Na ₂ SO ₄	3.505g/L	
KCl	0.597g/L	
NaHCO ₃	0.171g/L	30
KBr	0.085g/L	
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.034g/L	
SrCl ₂	0.012g/L	
NaF	3mg/L	
LiCl	1mg/L	
KI	0.07mg/L	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0002mg/L	
AlCl ₃ · 6H ₂ O	0.008mg/L	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.006mg/L	
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.0002mg/L	40
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0008mg/L	
Bacto Agar	15g/L	

【 0 1 3 3 】

< 実施例 2 > Vibrio sp. SA2株の分子系統樹解析

SA2株のグリセロールストック50 μLをLB液体培地に15g/LのNaClを添加した寒天培地で37、16時間静置培養して得た菌体から、PurElute Bacterial Genomid Kit(Edgebio社製)を用いて全ゲノムDNAを抽出した。得られた全ゲノムDNAを次世代シーケンサーMiseq(イルミナ社製)にて分析し、BLAST解析(非特許文献 Altshul, et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: new generation of protein database search programs" (1997) Nucleic Acids Research. 25.p3389-3402)によって16S rRNA遺伝子全長の配列を取得した(配列

番号1)。その結果、SA2株は*Vibrio rumoiensis* type strain S-1株(DSM19141株)と16S rRNA遺伝子全長配列の比較において99.5%の相同性を示した(2塩基のギャップによる相違と6塩基の置換による相違を含む。図1)。

【0134】

得られたSA2株の16S rRNA遺伝子全長配列から分子系統樹推定ソフトウェアMEGA ver.5.0(非特許文献Tamura, et al. 'MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods' (2011) Mol. Biol. Evol. 28.p2731-2739)を用いて近隣結合法(非特許文献Saitou, et al. 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees' (1987) Mol. Biol. Evol. 4.p406-425)によって分子系統樹を作製した(図2)。近隣結合法に用いる塩基置換モデルとしてはKimura 2-parameter modelを用いた(非特許文献Tamura, 'A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences' (1980) J. Mol. Evol. 16.p111-120参照)。また作製した分子系統樹の樹形の信頼性を評価するため、1000回反復してブートストラップ法による検証を行った。(Felsenstein, 'Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap' (1985) Evolution. 39.p783-791参照)

10

【0135】

分子系統解析の結果、SA2株は*Vibrio*属の種によって形成されるクラスターに属することが明らかとなった。SA2株は、*Vibrio rumoiensis*、*Vibrio litoralis*、*Vibrio casei*により形成されるクラスターに属することがブートストラップ値98%で支持された。また、SA2株は*Vibrio rumoiensis*とクラスターを形成し、そのクラスターは89%のブートストラップ値で支持された。以上の結果より、SA2株は*Vibrio*属の近縁種であることが明らかになった。そのため、SA2株を*Vibrio* sp. SA2株(NITE P-01635株)と命名した。

20

【0136】

<実施例3> DNA-DNAハイブリダイゼーション法による*Vibrio* sp. SA2株の種の同定

Vibrio sp. SA2株(NITE P-01635株)は、BLAST解析から、16S rRNA遺伝子全長配列の相同性が、*Vibrio rumoiensis*と99.5%、*Vibrio litoralis*と97.9%、*Vibrio casei*と96.3%であった。16S rRNA遺伝子全長配列の相同性が98.7%未満の微生物種は別種であると判断できるとの報告があるため、*Vibrio* sp. SA2株は*Vibrio rumoiensis*とのみ同種の微生物である可能性が考えられた。(Stackebrandt, et al. 'Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards.' (2006) Microbiol. Today. 33.p152-155.)

30

【0137】

そこで発明者らは、DNA-DNAハイブリッド形成試験による*Vibrio* sp. SA2株の種の同定を*Vibrio* sp. SA2株と*Vibrio rumoiensis* type strainの間で固定側DNAとプローブ側DNAを交換して3回ずつ実施した。(川村好章著『細菌の系統分類と同定方法』(2000)日本細菌学雑誌.55.p545-584、鈴木健一朗ら編『微生物の分類・同定実験法 分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に』(2000)p34-47参照)

【0138】

その結果、*Vibrio* sp. SA2株と*Vibrio rumoiensis* type strainのゲノムDNAは36 - 39%の値を示し、平均で37.5%の相同値を示した(下記表2)。現在、微生物の種はDNA-DNAハイブリッド形成試験による相同値の比較の結果、70%以上の相同値を示す菌株同士を同種とすると定義されている(Wayne, et al. 'Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.' (1987) Int. J. Syst. Bacteriol. 37.p463-464.参照)。そのため、*Vibrio* sp. SA2株は*Vibrio rumoiensis* type strainと別種に属する新規種の微生物であるとわかった。

40

【0139】

【表 2】

表 2 DNA-DNAハイブリダイゼーション試験結果(相同値(%))

標識DNA(プローブ)側DNA

固定側DNA	<i>Vibrio</i> sp. SA2	<i>Vibrio rumoiensis</i> type strain
<i>Vibrio</i> sp. SA2	100	37
<i>Vibrio rumoiensis</i> type strain	38	100

【 0 1 4 0 】

10

< 実施例 4 > *Vibrio* sp. SA2株の最少培地での試験管培養

従来の*Vibrio rumoiensis*に属する微生物株の特徴として、40℃では高温すぎるため生育不可能であることと、アルギン酸リアーゼ活性を持たず、アルギン酸資化能がないことが報告されていた(Garrity, et al. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Edition PartB p526-527)。そこで、発明者らは*Vibrio* sp. SA2株(NITE P-01635株)のグリセロールストックと、比較対照株としてエシェリヒア・コリMG1655株(ATCC 47076株)のグリセロールストックをLB NaCl15g/L添加寒天培地に50µLずつプレティングし、シード培養として培養温度37℃で16時間静置培養した。シード培養後、寒天培地上で増殖した菌体をエーゼでかきとって1mLの滅菌生理食塩水に懸濁し、吸光度600nmの濁度を分光光度計U-2000(日立社製)で測定した。その後、メインの培養として下記に示す唯一の炭素源としてアルギン酸ナトリウムを添加した最少液体培地5mLに、吸光度600nmの濁度が0.05となるように植菌した。恒温振とう培養装置TVS062CA(アドバンテック社製)を用いて、37℃、70rpmの条件で連続9時間試験管培養を行なった。その結果、*Vibrio* sp. SA2株(NITE P-01635株)のアルギン酸資化による有意な生育が見られた。そのため、*Vibrio* sp. SA2株は従来の*Vibrio rumoiensis*に属する微生物株とは異なったアルギン酸資化能を有する新規微生物株であることが示された。

20

【 0 1 4 1 】

アルギン酸ナトリウム最少液体培地 組成

アルギン酸ナトリウム	2.5g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	15.5g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.246g/L
Thiamine・HCl	10mg/L

30

【 0 1 4 2 】

< 実施例 5 > *Vibrio* sp. SA2株の最少培地での比最大増殖速度測定

Vibrio sp. SA2株(NITE P-01635株)のグリセロールストックと、比較対照株としてエシェリヒア・コリMG1655株(ATCC 47076株)のグリセロールストックをLB NaCl 15g/L添加寒天培地に50µLずつプレティングし、シード培養として培養温度37℃で16時間静置培養した。シード培養後、寒天培地上で増殖した菌体をエーゼでかきとって1mLの滅菌生理食塩水に懸濁し、吸光度600nmの濁度を分光光度計U-2000(日立社製)で測定した。その後、上記に示す唯一の炭素源としてアルギン酸ナトリウムを添加した最少液体培地5mLに、吸光度600nmの濁度が0.05となるように植菌した。恒温振とう培養装置TVS062CA(アドバンテック社製)を用いて、37℃、70rpmの条件で連続24時間試験管培養を行なった。

40

【 0 1 4 3 】

同様の試験管培養をメインの培養に用いた培地を下記に示す2種の、グルコースを単一炭素源とするM9最少培地にそれぞれ変更して37℃、70rpmの条件で連続24時間試験管培養を行なった。結果を表3及び図3に示す。得られた生育のデータから、各々の条件での比最大増殖速度を測定した(図4)。その結果、アルギン酸ナトリウム最少液体培地でのVi

50

brio sp. SA2株の比最大増殖速度がエシェリヒア・コリMG1655株のグルコースM9液体培地での比増殖速度の約2倍であることが明らかとなった。

【 0 1 4 4 】

グルコースM9液体培地 組成

グルコース	2.5g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	0.5g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.246g/L
Thiamine・HCl	10mg/L

10

【 0 1 4 5 】

グルコースM9 NaCl液体培地 組成

グルコース	2.5g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	15.5g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.246g/L
Thiamine・HCl	10mg/L

20

【 0 1 4 6 】

【表 3】

表3 グルコースまたはアルギン酸ナトリウムを唯一炭素源とする最少培地での生育
(○：良好に生育、×：生育見られず)

メイン培養に用いた培地	MG1655	SA2
グルコースM9液体培地	○	×
グルコースM9 NaCl液体培地	○	○
アルギン酸ナトリウム最少液体培地	×	○

30

【 0 1 4 7 】

< 実施例 6 > Vibrio sp. SA2株のアルギン酸ナトリウム最少培地での生育可能温度測定

Vibrio sp. SA2株 (NITE P-01635株) のグリセロールストックと、比較対照株としてエシェリヒア・コリMG1655株 (ATCC 47076株) のグリセロールストックをLB NaCl15g/L添加寒天培地に50 μLずつプレーティングし、シード培養として培養温度37 °Cで16時間静置培養した。また、Vibrio rumoiensis S-1株 (DSM 19141株) のグリセロールストックをLB NaCl15g/L添加寒天培地に50 μLずつプレーティングし、シード培養として培養温度31.5 °Cで16時間静置培養した。シード培養後、寒天培地上で増殖した菌体をエーゼでかきとって1mLの滅菌生理食塩水に懸濁し、吸光度600nmの濁度を分光光度計U-2000 (日立社製) で測定した。その後、上記に示す唯一の炭素源としてアルギン酸ナトリウムを添加した最少液体培地5mLに、吸光度600nmの濁度が0.05となるように植菌した。恒温振とう培養装置TVS062 CA (アドバンテック社製) を用いて、培養温度条件を37 °Cから43 °Cまで1 °Cずつ変更した上、70rpmの条件で連続24時間試験管培養を行なった。その結果、表4に示すようにVibrio sp. SA2株 (NITE P-01635株) は40 °Cの培養温度でアルギン酸ナトリウム最少液体培地で良好に生育し、Vibrio sp. SA2株 (NITE P-01635株) が40 °Cでアルギン酸ナトリウムを資化可能な微生物であることが示された。以上の実験結果より、Vibrio sp. SA2株は従来のVibrio rumoiensisに属する微生物株とは異なった40 °Cの高温で生育可能なアルギン酸資化能を有する新規微生物種に属する新規微生物株であることが示された。

40

【 0 1 4 8 】

50

【表 4】

表 4 アルギン酸ナトリウムを唯一炭素源とする最少培地での生育可能温度測定結果
(○：良好に生育、×：生育見られず)

培養温度	Vibrio		
	MG1655	rumoiensis	SA2
37°C	×	×	○
38°C	×	×	○
39°C	×	×	○
40°C	×	×	○
41°C	×	×	×
42°C	×	×	×
43°C	×	×	×

10

【 0 1 4 9 】

<実施例 7> Vibrio sp. SA2株への L - グルタミン酸生産能付与

エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAをPurElute Bacterial Genomic kit(Edgebio社製)を用いて抽出した。得られたゲノムDNAをテンプレートとして、配列番号 3 に示した YbjLタンパク質をVibrio sp. SA2株において異種発現させるため、配列番号 4、配列番号 5 に示したプライマーでPCR反応を行い、増幅されたDNAを定法にしたがい精製し、制限酵素HindIII、Sallで消化したベクターpMW219(ニッポンジーン社製)にIn-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社製)を用いて連結して、ybjL増幅発現用プラスミドpMW219-ybjLを構築した。

20

【 0 1 5 0 】

Vibrio sp. SA2株を、LB NaCl 15g/L液体培地40mLで坂口フラスコ2本にてOD600nmが0.5前後まで培養温度37、攪拌速度120rpmにて振とう培養した。得られた培養液80mLを回転速度7000rpm、運転時間7min、温度4 の条件で遠心集菌した。氷上で冷やした滅菌された2mM HEPES、100mM Sucrose、5mM CaCl₂溶液15mLで2回洗浄(懸濁後、回転速度7000rpm、運転時間7min、温度4 の条件で遠心集菌)の後、滅菌された10%グリセロール溶液1mLに懸濁し、Vibrio sp. SA2株のエレクトロコンピテントセルを取得した。Vibrio sp. SA2株の100μLにエタノール沈殿したpMW219-ybjLプラスミドDNA(1μg以上)を加え、1.8kV 25μFでエレクトロポレーションして、Vibrio sp. SA2株にpMW219-ybjLを導入した。エレクトロポレーションしたエレクトロコンピテントセルに、LB NaCl 15g/L液体培地を0.5mL添加し、37 で2.5時間静置培養して回復培養としたあと、40 mg/Lのカナマイシンを含むLB NaCl 15g/L寒天培地で24時間静置培養を行い、コロニー形成を確認した。得られたコロニーをさらに40 mg/Lのカナマイシンを含むLB NaCl 15g/L寒天培地でSIして、40 mg/Lのカナマイシンを含むLB NaCl 15g/L液体培地4mLに懸濁して試験管培養を行った。培養温度は37、往復攪拌速度120rpmの条件で試験管振とう培養して吸光度600nmのODが0.3程度になったところで等量の滅菌20%グリセロールを加え-80 で冷凍してグリセロールストックを作製し、得られた株のグリセロールストックをVibrio sp. SA2/ pMW219-ybjL株のグリセロールストックと命名した。

30

40

【 0 1 5 1 】

アルギン酸ナトリウム5gを100mLの3N 硫酸に添加し、65 で3時間加温処理を行った。得られたアルギン酸ナトリウム加水分解物溶液をKOHを加えてpHが7.0となるように調製し、アルギン酸ナトリウム加水分解物糖液を取得した。得られたアルギン酸ナトリウム加水分解物糖液を用いて下記に示すアルギン酸ナトリウム加水分解物最少液体培地を調製した。

【 0 1 5 2 】

50

アルギン酸ナトリウム加水分解物最少液体培地 組成

アルギン酸ナトリウム加水分解物	2.5g/L
Na ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	15.5g/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.246g/L
Thiamine・HCl	10mg/L
カナマイシン	40mg/L

【 0 1 5 3 】

Vibrio sp. SA2/ pMW219-ybjL株のグリセロールストックを融解し、各100 μLを、40 mg/Lのカナマイシンを含むLB NaCl 15g/L寒天培地に均一に塗布し、30℃にて48時間静置培養した。得られたプレートのおよそ1/4量の菌体を、0.5mLの生理食塩水にけん濁し分光光度計U-2000（日立社製）で波長600nmの濁度を測定した。得られた菌を含むけん濁液を、L字試験管にはりこんだ5 mLの前述のアルギン酸ナトリウム加水分解物最少液体培地に、波長600nmの濁度が0.05になる液量を接種し、振とう培養装置TN-1506（アドバンテック東洋社製）で回転攪拌数70rpm、34℃において22時間培養した。培養終了後、培地中に蓄積したL-グルタミン酸の量をバイオテックアナライザーAS310（サクラ精機社製）を用いて測定した。

【 0 1 5 4 】

結果を表5に示す。表5に示すように、アルギン酸を単一の炭素源として資化できる微生物として単離したVibrio sp. SA2株に、pMW219-ybjLを導入してL-グルタミン酸生産能を付与した菌株は、アルギン酸を単一の炭素源とする培地にて著量のL-グルタミン酸を蓄積した。

【 0 1 5 5 】

【表5】

表5 Vibrio sp. SA2/ pMW219-ybjL株を用いたアルギン酸からのL-グルタミン酸の生産

結果

菌株

L-グルタミン酸蓄積(mg/L)

Vibrio sp. SA2/ pMW219株 1.7

Vibrio sp. SA2/ pMW219-ybjL 21.7

10

20

30

【配列表】

2016192902000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

Fターム(参考) 4B064 AC03 AE03 AE28 CA02 CC03 CD30 DA01 DA10 DA16
4B065 AA55X AC14 BA22 BB03 BB22 BC32 CA06 CA17 CA41 CA43
CA44 CA54