

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7164112号  
(P7164112)

(45)発行日 令和4年11月1日(2022.11.1)

(24)登録日 令和4年10月24日(2022.10.24)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19 Z N A
C 1 2 P 7/6409(2022.01)	C 1 2 P 7/6409
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54

請求項の数 15 (全26頁)

(21)出願番号	特願2018-522065(P2018-522065)	(73)特許権者	505448855
(86)(22)出願日	平成28年10月27日(2016.10.27)		コリア リサーチ インスティテュート
(65)公表番号	特表2018-531615(P2018-531615 A)		オブ バイオサイエンス アンド バイオテクノロジー
(43)公表日	平成30年11月1日(2018.11.1)		KOREA RESEARCH INST
(86)国際出願番号	PCT/KR2016/012172		ITUTE OF BIOSCIENCE
(87)国際公開番号	WO2017/074063		AND BIOTECHNOLOGY
(87)国際公開日	平成29年5月4日(2017.5.4)		大韓民国 3 4 1 4 1 デジョン, ユソ
審査請求日	令和1年9月26日(2019.9.26)		ング, グァハク, 1 2 5
審判番号	不服2021-11472(P2021-11472/J 1)	(74)代理人	100107456
審判請求日	令和3年8月27日(2021.8.27)		弁理士 池田 成人
(31)優先権主張番号	10-2015-0149254	(74)代理人	100162352
(32)優先日	平成27年10月27日(2015.10.27)		弁理士 酒巻 順一郎
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100123995
	最終頁に続く		弁理士 野田 雅一
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 重鎖アミノカルボン酸の生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

炭化水素の - 酸化代謝経路と - 酸化代謝経路を何れも有している微生物において、  
- 酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び - 酸化代謝経路関連の  
遺伝子が除去され、また、 - トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれ、  
前記 - 酸化代謝経路関連の遺伝子はアシル - C o A オキシダーゼ遺伝子であり、  
前記微生物はヤロウミア属又はカンジダ属の酵母である、組換え微生物。

【請求項 2】

前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び - 酸化代謝経路関連の遺伝子は、微生物内に存在する全ての相同型遺伝子が除去された請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 3】

前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び - 酸化代謝経路関連の遺伝子は、当該微生物内に存在する一部の相同型遺伝子が除去された請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 4】

前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子は、F A L D H 1、F A L D H 2、F A L D H 3 及び F A L D H 4 遺伝子でなる群より選択される請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 5】

前記 F A L D H 1、F A L D H 2、F A L D H 3 及び F A L D H 4 遺伝子は、それぞれ配列番号 1 及び配列番号 4 でなる塩基配列を含む請求項 4 に記載の組換え微生物。

【請求項 6】

前記アシル - C o A オキシダーゼ遺伝子は、A C O 1、A C O 2、A C O 3、A C O 4、A C O 5 及び A C O 6 遺伝子でなる群より選択される請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 7】

前記 A C O 1、A C O 2、A C O 3、A C O 4、A C O 5 及び A C O 6 遺伝子は、それぞれ配列番号 5 及び配列番号 1 0 でなる塩基配列を含む請求項 6 に記載の組換え微生物。

【請求項 8】

前記 - トランスアミナーゼ遺伝子は、配列番号 1 1 でなる塩基配列を含む請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 9】

前記ヤロウシア属の酵母はヤロウシア・リポリティカである請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 1 0】

( 1 ) 請求項 1 から請求項 9 のいずれか一項に記載の組換え微生物を製造するステップと、

( 2 ) 前記組換え微生物に基質を処理して培養するステップとを含む重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【請求項 1 1】

前記基質は脂肪酸である請求項 1 0 に記載の重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【請求項 1 2】

前記脂肪酸は、炭素数 5 から 3 0 を有する脂肪酸である請求項 1 1 に記載の重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【請求項 1 3】

前記脂肪酸はドデカン酸である請求項 1 2 に記載の重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【請求項 1 4】

前記重鎖アミノカルボン酸は、炭素数 5 から 3 0 を有する重鎖アミノカルボン酸化合物である請求項 1 0 に記載の重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【請求項 1 5】

前記重鎖アミノカルボン酸は 1 2 - アミノドデカン酸である請求項 1 4 に記載の重鎖アミノカルボン酸の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、重鎖アミノカルボン酸の生産方法に関し、より詳しくは、 - 酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ ( f a t t y a l c o h o l d e h y d r o g e n a s e ) 遺伝子及び - 酸化代謝経路関連遺伝子が除去され、また、 - トランスアミナーゼ ( t r a n s a m i n a s e ) 遺伝子が組み込まれた組換え微生物を培養することで、脂肪酸から重鎖アミノカルボン酸を生産する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

バイオプラットフォーム化合物は、バイオマス由来の原料を基盤として生物学的または化学的転換を介して生産されたものであって、高分子モノマー、新素材などの合成に用いられている。

【0 0 0 3】

バイオプラットフォーム化合物のうち重鎖アミノカルボン酸は、ポリアミドの単量体として用いられる物質であって、前記ポリアミドは、脂肪族ポリアミド、芳香族ポリアミド、脂肪族環ポリアミドに分類される。脂肪族ポリアミドの代表的なものには、ナイロン 1 2、ナイロン 6 及びナイロン 6 6 などがあり、芳香族ポリアミドは、耐熱性をさらに向上させるために芳香族骨格を取り入れたものであって、アラミド ( a r a m i d ) という名として知られている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 4 】

ナイロンは、代表的なエンジニアリングプラスチック素材であって、1940年以後から高い結晶性と機械的強度、熱的安定性、優れた耐摩耗/耐摩擦特性などによってその需要と用途が絶え間なく増加している傾向であり、ナイロンの熱的、機械的性質を向上させるための多様な分野の研究が持続的に進められてきた。その中で、ナイロンの耐摩耗性の向上のためにワックス、黒鉛を含浸させる研究があり、その外にも高分子架橋による物性向上の研究が進められている。ナイロンの中でも、12-アミノドデカン酸 ( a m i n o d o d e c a n i c a c i d ) の重縮合方式で合成されるナイロン12は比重が小さく、低温特性及び耐摩耗性に優れ、紫外線の影響が少ないため耐候性が強く、また、他のナイロン樹脂 (ナイロン6、66) に比べて - C H <sub>2</sub> - 鎖の長さが非常に長いため、同一重量でアミド官能基と H <sub>2</sub> O の水素結合を有する確率が低いことから、ナイロン樹脂の最大の欠点である、水分吸湿による機械的強度の低下を防止することができるので、自動車用部品材料、航空機材料、耐熱性特殊繊維などに多様に適用されている (シン・ボムシク外、ポリマー、35(1):30-34、2011)。

10

## 【 0 0 0 5 】

12-アミノドデカン酸のような重鎖アミノカルボン酸の生産は、化学的合成や微生物発酵による生物学的方法で行われ得るところ、このような生物学的方法を利用する場合は、代謝工学技術を利用した新規の菌株開発及び発酵工程の最適化が求められる。

## 【 0 0 0 6 】

従来、重鎖アミノカルボン酸を生産することができる菌株には、 $\alpha$ -酸化代謝経路と $\beta$ -酸化代謝経路を共に有している微生物が利用可能であって、例えば、大腸菌から $\beta$ -アミノドデカン酸を生産する方法が知られている ( U S 2 0 1 0 / 0 3 2 4 2 5 7 A 1 ) 。しかし、重鎖アミノカルボン酸は、重鎖アルデヒドカルボン酸にアミン基を伝達する過程を更に取り入れて製造されるため、前記微生物を利用した重鎖アミノカルボン酸の生産においては、その収率が高くないという問題点があった。

20

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、 $\beta$ -酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び $\alpha$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\beta$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物、及び前記組換え微生物を培養することで、脂肪酸から重鎖アミノカルボン酸を生産する方法を提供することを目的とする。

30

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 8 】

前記技術的課題を達成するため、本発明は、 $\beta$ -酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び $\alpha$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\beta$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を提供する。

## 【 0 0 0 9 】

本発明の一具現例によれば、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び $\alpha$ -酸化代謝経路関連の遺伝子は、微生物内に存在する全ての相同型遺伝子が除去されたものが好ましいが、これに限定されるものではない。本発明の他の具現例によれば、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び $\alpha$ -酸化代謝経路関連の遺伝子は、当該微生物内に存在する一部の相同型遺伝子が除去されたものが好ましいが、これに限定されるものではない。

40

## 【 0 0 1 0 】

本発明の一具現例によれば、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子は、F A L D H 1、F A L D H 2、F A L D H 3 及び F A L D H 4 遺伝子でなる群より選択される遺伝子であってよいが、これらに限定されるものではない。

## 【 0 0 1 1 】

本発明の一具現例によれば、前記 $\alpha$ -酸化代謝経路関連の遺伝子はアシル - C o A オキシダーゼ遺伝子であってよいが、これに限定されるものではない。本発明の好ましい具現

50

例によれば、前記アシル - C o A オキシダーゼ遺伝子は、A C O 1、A C O 2、A C O 3、A C O 4、A C O 5 及び A C O 6 遺伝子でなる群より選択されてよいが、これらに限定されるものではない。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明の一具現例によれば、前記微生物は酵母または大腸菌であってよいが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい具現例によれば、前記酵母は、ヤロウシア属 (*Yarrowia* sp.)、サッカロマイセス属 (*Saccharomyces* sp.)、ピチア属 (*Pichia* sp.) 及びカンジダ属 (*Candida* sp.) でなる群より選択される酵母であってよいが、これらに限定されるものではない。本発明の他の好ましい具現例によれば、前記ヤロウシア属の酵母はヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) であってよいが、これに限定されるものではない。

10

#### 【 0 0 1 3 】

さらに、本発明は、  
- 酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  
- 酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、  
- トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を製造するステップと、(2) 前記組換え微生物に基質を処理して培養するステップとを含む重鎖アミノカルボン酸の生産方法を提供する。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の一具現例によれば、前記基質は脂肪酸であってよいが、これに限定されるものではない。本発明の好ましい具現例によれば、前記脂肪酸及び重鎖アミノカルボン酸は、炭素数 5 から 30、好ましくは炭素数 6 から 20、より好ましくは炭素数 8 から 16 を有してよいが、これらに限定されるものではない。本発明の他の好ましい具現例によれば、前記脂肪酸はドデカン酸であってよいが、これに限定されるものではない。本発明の他の好ましい具現例によれば、前記重鎖アミノカルボン酸は 12 - アミノドデカン酸であってよいが、これに限定されるものではない。

20

#### 【 発明の効果 】

#### 【 0 0 1 5 】

本発明に係る組換え微生物は、  
- 酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  
- 酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、  
- トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれることにより、脂肪酸のような基質から重鎖アミノカルボン酸、例えば、ナイロン 12 の原料になる 12 - アミノドデカン酸を高い収率で生産することができる。

30

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 1 6 】

【 図 1 】  
- 酸化及び  
- 酸化代謝反応と関連した生成物及び関連酵素の種類を示す図である。

【 図 2 】  
- 酸化と関連した脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  
- 酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、  
- トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物の製造過程を概略的に示した図である。

【 図 3 】 菌株改良のための遺伝子ノックアウトのために選別マーカーとして用いられる *ura3* 遺伝子と、ノックアウトカセットを挿入した後に *ura3* 遺伝子を除去するためのポップアウト (pop-out) とを有するベクターを概略的に示した図である。

40

【 図 4 】 本発明の形質転換微生物の製造に用いられたノックアウトカセットの製作過程を示す概路図である。

【 図 5 】 菌株改良のために  
- トランスアミナーゼ遺伝子が含まれている形質転換ベクターを概略的に示した図である。

【 図 6 】 本発明の形質転換微生物において、ノックアウト及び形質導入された遺伝子の種類を示すグラフである。

【 図 7 】 本発明の形質転換微生物が、基質であるドデカン酸から生成した重鎖アミノカルボン酸の量を示すグラフである。

【 図 8 】 本発明の Y 2 - 36 菌株をフラスコで培養した時、基質であるドデカン酸から生成した重鎖アミノカルボン酸の量を示すグラフである。

50

【図9】本発明のY2-36菌株において、基質であるドデカン酸から重鎖アミノカルボン酸が生成されたことを示すGC/MSデータである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

前記目的を達成するため、本発明は、 $\alpha$ -酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び $\beta$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\alpha$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を提供する。

【0018】

本発明において、前記『 $\alpha$ -酸化』という用語は、脂肪酸のメチル基末端が酸化してジカルボン酸が形成される代謝過程を意味し、『 $\beta$ -酸化』という用語は、カルボキシ基で  
10  
位の炭素原子が酸化してアセチルCoAを放出しながら、その都度、炭素原子数が2個  
少ない脂肪酸になるに伴って漸次分解されていく代謝過程を意味する。前記 $\alpha$ -酸化及び  
 $\beta$ -酸化の概念と、このような代謝過程に関与している酵素等に対しては、生化学分野  
の通常の技術者において広く知られている。例えば、 $\alpha$ -酸化において、脂肪酸が基質に  
利用される場合は、先ずシトクロムP450及びNADPH-シトクロムP450レダク  
ターゼ(reductase)の作用によって $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸が生成され、前記  
 $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸は、脂肪アルコールデヒドロゲナーゼ及び脂肪アルコールオキシダー  
ゼの作用によって $\alpha$ -アルデヒド脂肪酸が生成され、前記 $\alpha$ -アルデヒド脂肪酸は、脂肪  
アルデヒドデヒドロゲナーゼの作用によってジカルボン酸が製造される。また、 $\beta$ -酸化  
20  
においては、アシル-CoAオキシダーゼによって炭素原子数が2個少ない脂肪酸が生成  
される(図1を参照)。

【0019】

トランスアミナーゼ(TA、EC 2.6.1.X)は自然界に広く存在し、生物の窒  
素代謝でアミン基の転移に関与する酵素である。一般に、トランスアミナーゼは、 $\alpha$ -アミ  
ノ酸のアミノ基を除去して他の $\beta$ -ケト酸(keto acid)に転移する役割を担う  
。トランスアミナーゼは、広い基質特異性、高い光学選択性、速い反応速度、優れた安定  
性、そして補酵素の再生産が不要な点等の様々な優れた利点のため、光学的に純粋な非天  
然アミノ酸及びアミン化合物の生産のためにトランスアミナーゼが用いられている。トラ  
ンスアミナーゼは、Pfamデータベースに出るタンパク質の構造と多重配列整列(al  
i  
g  
n  
m  
e  
n  
t  
s)に基づいて5個のグループに分けることができるところ、この中、  
30  
 $\alpha$ -アミノ酸：ピルビン酸トランスアミナーゼ、オルニチン(ornithine)トラン  
スアミナーゼ、4-アミノブチル酸トランスアミナーゼなどを含んでいるグループIIIに属  
するトランスアミナーゼを $\beta$ -トランスアミナーゼという。一般的なトランスアミナーゼ  
とは違って、 $\beta$ -トランスアミナーゼは、アルファでない位置にアミン基があるアミノ酸  
またはカルボキシ基がないアミン化合物のアミン基を、2-ケトグルタル酸またはピルビ  
ン酸のようなアミン受容体に伝達する反応を行う。よって、 $\beta$ -トランスアミナーゼは、  
光学活性アミン化合物の生産に非常に有用な酵素として用いられ得る。例えば、 $\beta$ -トラ  
ンスアミナーゼは、1990年に米国のセルジーン社(Celgene Co.)がキラ  
ルアミンの最初合成に使用し、最近ではキラルアミンの非対称合成(asymmetric  
s  
y  
n  
t  
h  
e  
s  
i  
s)研究と動的分割(kinetic resolution)向上関  
40  
連の研究で重要に扱われており、2012年にドイツのエボニック社(Evonik)で  
クロモバクテリウム・ピオラセウム(Chromobacterium violaceum)DSM30191菌株の $\beta$ -トランスアミナーゼを利用して、12-オキソラウリ  
ン酸メチルエステルを12-アミノラウリン酸メチルエステルに転換させた例も知られて  
いる。

【0020】

本発明の一具現例によれば、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子は、当該微生物内に存在する全ての相同型遺伝子が除去されたものが好ましいが、場合によって、これらのうち一部の遺伝子が除去された組換え微生物も本発明において適用可能である。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の一具現例によれば、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子は、FALDH1、FALDH2、FALDH3及びFALDH4遺伝子でなる群より選択されてよいが、これらに限定されるものではない。前記FALDH1、FALDH2、FALDH3及びFALDH4遺伝子は、それぞれ配列番号1及び配列番号4でなる塩基配列を含むことができるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0022】

本発明の他の具現例によれば、前記 - 酸化代謝経路関連の遺伝子は、当該微生物内に存在する全ての相同型遺伝子が除去されたものが好ましいが、場合によって、これらのうち一部の遺伝子が除去された組換え微生物も本発明において適用可能である。前記 - 酸化代謝経路関連の遺伝子は、アシル - CoAオキシダーゼ遺伝子であるのが好ましく、前記アシル - CoAオキシダーゼ遺伝子は、ACO1、ACO2、ACO3、ACO4、ACO5及びACO6遺伝子でなる群より選択されてよいが、これらに限定されるものではない(図2参照)。本発明の他の好ましい具現例によれば、前記ACO1、ACO2、ACO3、ACO4、ACO5及びACO6遺伝子は、それぞれ配列番号5及び配列番号10でなる塩基配列を含むことができるが、これらに限定されるものではない。

10

#### 【0023】

本発明の他の具現例によれば、前記 - トランスアミナーゼ遺伝子は配列番号11でなる塩基配列を含むことができるが、これに限定されるものではない。

#### 【0024】

本発明において、本技術分野に公知の通常の遺伝子組換え技術を利用して、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び - 酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 - トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を製造することができる。本発明において、前記『除去』という用語は、当該遺伝子の一部または全部が物理的に除去されたことだけでなく、当該遺伝子から転写されたmRNAからタンパク質が作られない状態、及び当該遺伝子から発現されたタンパク質が機能できない状態なども包括的に含む意味として用いられる。また、前記『導入』という用語は、微生物のゲノム内に遺伝子が挿入されるか、または、微生物のゲノム内に遺伝子が挿入されていないまま当該遺伝子が発現される場合の全てを包括的に含む意味として用いられる。使用可能な遺伝子組換え技術には、形質転換(transformation)、形質導入(transduction)、形質移入(transfection)、微量注入(microinjection)、電気穿孔(electroporation)などの方法を例示することができるが、これらに限定されるものではない。

20

30

#### 【0025】

本発明において、使用可能な微生物は、 - 酸化及び - 酸化代謝の過程を全て有している任意の微生物が制限なく用いられてよく、例えば、酵母を含む真核生物及び大腸菌を含む原核生物などが用いられてよい。本発明の具現例によれば、前記微生物は酵母を用いるのが好ましく、前記酵母には、ヤロウシア属、サッカロマイセス属、ピチア属、カンジダ属などの酵母が制限なく用いられてよく、この中でもヤロウシア・リポリティカ、カンジダ・トロピカリス(Candida tropicalis)、カンジダ・インファンチコラ(Candida infanticola)、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、ピチア・アルコールフィア(Pichia alcoholophia)またはカンジダ・ミコデルマ(Candida mycoderma)を用いるのが好ましく、ヤロウシア・リポリティカを用いるのがさらに好ましい。

40

#### 【0026】

前記のように、脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び - 酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 - トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた微生物の場合、脂肪酸が基質に供給されると、シトクロムP450及びNADPH - シトクロムP450レダクターゼの作用によりカルボキシ基の反対側の末端が酸化してアルコールが形成された後、前記アルコールは、脂肪アルコールデヒドロゲナーゼ及び脂肪アルコールオキシダー

50

ゼの作用によりヒドロキシ基が酸化してアルデヒドが形成されるが、脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼが除去されているため、これ以上の酸化が起こることができなくなる。そして、前記のように形成された脂肪酸アルデヒドは、 $\alpha$ -トランスアミナーゼの作用によりアミン化されてアミノカルボン酸が形成される。

【0027】

また、本発明は、

(1)  $\alpha$ -酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  $\beta$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\alpha$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を製造するステップと、

(2) 前記組換え微生物に基質を処理して培養するステップとを含む重鎖アミノカルボン酸の生産方法を提供する。

10

【0028】

本発明において、前記  $\alpha$ -酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  $\beta$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\alpha$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を利用して脂肪酸アルデヒドの追加的な酸化及び  $\beta$ -酸化代謝を防止し、さらに、重鎖アルデヒド脂肪酸にアミン基を導入することで重鎖アミノカルボン酸を高い収率で生産することができる。前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び  $\beta$ -酸化代謝経路関連の遺伝子は、当該微生物内に存在する全ての相同型遺伝子が除去されているものが好ましいが、場合によって、これらのうち一部の遺伝子が除去された組換え微生物も本発明において適用可能である。

20

【0029】

本発明において、使用可能な微生物は、 $\alpha$ -酸化及び  $\beta$ -酸化代謝の過程を全て有している任意の微生物が制限なく用いられてよく、例えば、酵母を含む真核生物及び大腸菌を含む原核生物などが用いられてよい。本発明の具現例によれば、前記微生物は酵母を用いるのが好ましく、前記酵母には、ヤロウシア属、サッカロマイセス属、ピチア属、カンジダ属などの酵母が制限なく用いられてよく、この中でも、ヤロウシア・リポリティカ、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・インファンチコラ、サッカロマイセス・セレピシエ、ピチア・アルコールフィアまたはカンジダ・ミコデルマを用いるのが好ましく、ヤロウシア・リポリティカを用いるのがさらに好ましい。

【0030】

本発明において、本技術分野に公知の通常の遺伝子組換え技術を利用して、前記脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び  $\beta$ -酸化代謝経路関連の遺伝子が除去され、また、 $\alpha$ -トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた組換え微生物を製造することができる。本発明において、前記『除去』という用語は、当該遺伝子の一部または全部が物理的に除去されたことだけでなく、当該遺伝子から転写されたmRNAからタンパク質が作られない状態、及び当該遺伝子から発現されたタンパク質が機能できない状態なども包括的に含む意味として用いられる。また、前記『導入』という用語は、微生物のゲノム内に遺伝子が挿入されるか、または、微生物のゲノム内に遺伝子が挿入されていないまま当該遺伝子が発現される場合の全てを包括的に含む意味として用いられる。

30

【0031】

本発明において、『重鎖アミノカルボン酸』は、炭素数5から30、好ましくは8から16を有する重鎖アミノカルボン酸を全て含む意味として用いられる。本発明の好ましい具現例によれば、前記重鎖アミノカルボン酸は炭素数12の12-アミノドデカン酸であることが好ましいが、これに限定されるものではない。

40

【0032】

本発明において、ステップ(2)の基質は脂肪酸であってよいが、これに限定されるものではない。本発明の具現例によれば、前記脂肪酸には、炭素数5から30、好ましくは8から16を有する脂肪酸、より好ましくは炭素数12のドデカン酸が用いられてよいが、これに限定されるものではない。

【0033】

50

以下、実施例によって本発明を詳しく説明する。

【0034】

ただし、下記実施例は本発明を例示するためのものであるだけで、本発明の内容が下記実施例によって限定されるものではない。

【0035】

実施例1．ノックアウトカセットの製作

菌株の改良のための遺伝子ノックアウトのために選別マーカーとして用いられる *ura3* 遺伝子と、ノックアウトカセットを挿入した後に *ura3* 遺伝子を除去するためのポップアウトとを有するベクターを製作した(図3)。前記 *Ura3* 遺伝子にはヤロウイア由来の遺伝子を用い、菌株の改良に用いられたポップアウト領域は全て4種の配列で2種の遺伝子から参照して、一つはバシラス由来のグルタメート生産遺伝子、他の一つはサルモネラまたはクローニングベクター *pHUKH* 由来の *his* オペロンに關与した遺伝子を用いた。前記ポップアウトベクターの製作のために用いられたプライマーと配列は、下記表1に示した。

【0036】

【表1】

ポップアウトベクター			
名称		塩基配列	配列番号
HisG1	BglII F	a a t t g g g c c c a g a t c t c a g a c c g g t t c a g a c a g g a t	13
	EcoRI R	t c t c t g g g c g g a a t t c g g a g g t g c g g a t a t g a g g t a	14
	NotI F	t g T T T C T C G g c g g c c g c c a g a c c g g t t c a g a c a g g a t	15
	BamHI R	T C C A A C G C G T G G A T C C g g a g g t g c g g a t a t g a g g t a	16
HisG2	BglII F	a a t t g g g c c c a g a t c t a a c g c t a c c t c g a c c a g a a a	17
	EcoRI R	t c t c t g g g c g g a a t t c t c t t c t c g a t c g g c a g t a c c	18
	NotI F	t g T T T C T C G g c g g c c g c a a c g c t a c c t c g a c c a g a a a	19
	BamHI R	T C C A A C G C G T G G A T C C t c t t c t c g a t c g g c a g t a c c	20

10

20

30

40

50

g l t 2	B g l I I I F	a a t t g g g c c c a g a t c t T C A G A A C T T G C G C C G A T A A A	2 1
	E c o R I R	t c t c t g g g c g g a a t t c C T T T G C C A G C T A G A C C A T A G A G	2 2
	N o t I F	t g T T T C T C G g c g g c c g c T C A G A A C T T G C G C C G A T A A A	2 3
	B a m H I R	T C C A A C G C G T G G A T C C C T T T G C C A G C T A G A C C A T A G A G	2 4
g l t 3	B g l I I I F	a a t t g g g c c c a g a t c t A T T G G C G G G T T C G T T A C T T	2 5
	E c o R I R	t c t c t g g g c g g a a t t c C C T G G A A G A A G C C G T A T T A T C	2 6
	N o t I F	t g T T T C T C G g c g g c c g c A T T G G C G G G T T C G T T A C T T	2 7
	B a m H I R	T C C A A C G C G T G G A T C C C C T G G A A G A A G C C G T A T T A T C	2 8

10

20

30

## 【 0 0 3 7 】

ノックアウトカセットの製作は、図 4 に示す通りに進めた。まず、ヤロウニアのゲノム DNA からノックアウトさせる相同性領域 (homologous region、HR) の PCR と、ポップアウトベクターから 5' と 3' の二つの切れの PCR とをそれぞれ進めた。以後、5' HR と 3' HR のそれぞれを PO - ura 3 部位と整列 (align) PCR (2<sup>nd</sup> PCR) を進めてノックアウトカセットを製作した。それぞれの相同性領域を増幅するために用いたプライマーと配列は表 2 に示した。

## 【 0 0 3 8 】

40

50

【表 2】

遺伝子結実			
名称		塩基配列	配列番号
ACO1	F1	TTCCTCAATGGTGGAGAAGA	29
	R1	TCTTTATCCTGTCTGAACCG GTCTG GTACCATAGTCCTTGCCATG C	30
	F2	ATCGCTACCTCATATCCGCA CCTCC CTTCTGTCCCCCGAGTTTCT	31
	R2	AAGAAGGGCTTGAGAGTCG	32
ACO2	F1	CCCAACAACACTGGCAC	33
	R1	TCTTTATCCTGTCTGAACCG GTCTG CTCCTCATCGTAGATGGC	34
	F2	ATCGCTACCTCATATCCGCA CCTCC g a c a a g a c c c g a c a g g c	35
	R2	AGACCAGAGTCCTCTTCG	36

10

20

30

40

50

ACO3	F1	A c c t t c a c a g a g c c a c c c a	37
	R1	A T G G C T C T C T G G G C G g t g t t g g g g g t g t t g a t g a t g	38
	F2	T T G T T G T G T T T C T C G c a a g g t t c t c a t c g a g g c c t g	39
	R2	A g g a a a g g t c g a a g a g t g c t c t	40
ACO4	F1	A c t g c g a g a g c g a t c t g	41
	R1	T C T T T A T C C T G T C T G A A C C G G T C T G T T C A T G A G C A T G T A G T T T C G	42
	F2	A T C G C T A C C T C A T A T C C G C A C C T C C g a g g a c g a c a a a g c c g g a g	43
	R2	A G A G C A G A G T C C T C C T C A A	44
ACO5	F1	A A C T T C C T C A C A G G C A G C G A G C	45
	R1	A T G G C T C T C T G G G C G G A G T A G A G A G T G G G A G T T G A G G T C	46
	F2	t t g t t g t g t t t c t c g c c c c g t c a a g g a c g c t g a g	47
	R2	A C A G T A A G G T G G G G C T T G A C T C	48

10

20

30

40

50

ACO6	F 1	AGTCCCTCAACACGTTTACC G	49	10	
	R 1	TCTTTATCCTGTCTGAACCG GTCTG CCATTTAGTGGCAGCAACGT T	50		
	F 2	ATCGCTACCTCATATCCGCA CCTCC GAGCTCTGATCAACCGAACCC	51		
	R 2	AGGAAGGGTCTAATGACAGA	52		
FALDH1	F 1	AATCACTCCTCCTACGC	53	20	
	R 1	TCTTTATCCTGTCTGAACCG GTCTG TGGTCTCGGGGACACCTC	54		
	F 2	ATCGCTACCTCATATCCGCA CCTCC CCATCATCAAGCCCCGAA	55		30
	R 2	ACCGACATAATCTGAGCAAT	56		

FALDH2	F 1	A c c a c t a g g t g a g a t c g a g	5 7	
	R 1	T C T T T A T C C T G T C T G A A C C G G T C T G C T C C G A C A C T A C C G G A A C G C	5 8	
	F 2	A T C G C T A C C T C A T A T C C G C A C C T C C C T T G C T C C C A C A G T T G T T	5 9	10
	R 2	G A T C A C C C A G A A C C A T A G C	6 0	
FALDH3	F 1	G T G A C C C C C A C C A C G T C A C	6 1	
	R 1	T C T T T A T C C T G T C T G A A C C G G T C T G T T C T G A C A T T T T C A G C G C C A C	6 2	20
	F 2	A T C G C T A C C T C A T A T C C G C A C C T C C C C A T T A C G A G C G T T T G A C G G	6 3	
	R 2	C A G G G C T G G G G A C C A C C	6 4	30

40

50

FALDH4	F 1	T A C C G A C T G G A C C A G A T T C	6 5
	R 1	T C T T T A T C C T G T C T G A A C C G G T C T G C G G C A G T G G C A A T G A T C T T A C	6 6
	F 2	A T C G C T A C C T C A T A T C C G C A C C T C C G A C T C G A T T C A T C G C T C C T A C	6 7
	R 2	C A A A T C T T T C G G A A G A T T C G G	6 8

10

20

【 0 0 3 9 】

ポップアウト領域と ur a 3 を二つの切れに P C R するために用いたプライマーは表 3 に示した。

【 0 0 4 0 】

30

40

50

【表 3】

ポップアウトカセット			
名称		塩基配列	配列番号
H I S G 1	F	c a g a c c g g t t c a g a c a g g a t	69
	R	g g a g g t g c g g a t a t g a g g t a	70
H I S G 2	F	a a c g c t a c c t c g a c c a g a a a	71
	R	t c t t c t c g a t c g g c a g t a c c	72
g l t 2	F	T C A G A A C T T G C G C C G A T A A A	73
	R	C T T T G C C A G C T A G A C C A T A G A G	74
g l t 3	F	A T T G G C G G G T T C G T T A C T T	75
	R	C C T G G A A G A A G G C C G T A T T A T C	76
B i p a r t i t e	U l u r a 3 c s 2 B	A t g c c c t c c t a c g a a g c t c g a g c	77
	Y l u r a 3 F	C t c c c a a c g a g a a g c t g g c c	78

10

20

30

## 【0041】

## 実施例 2 . 形質導入ベクターの製作

- トランスアミナーゼをヤロウヰア菌株に挿入させるために図 5 に示した通りのベクターを製作し、このために用いたプライマーは表 4 に示した。

## 【0042】

40

50

【表 4】

トランスアミナーゼベクター		
名称	塩基配列	配列番号
EXP1-F	<u>ccaagcttggtaccgagctca</u> Ga gtttggcgcccgTTTTTc	79
EXP1-R	<u>CGTTGTTTTTGCATATGTGCTGT</u> AGATATGTCTTGTGTGTAA	80
TEF-F	<u>ccaagcttggtaccgagctca</u> aaa ctttggcaagaggctgca	81
TEF-R	<u>CGTTGTTTTTGCATATGTTT</u> GAA TGATTCTTATACTCAGAAG	82
ALK1-F	<u>ccaagcttggtaccgagctca</u> ga tctgtgcgccctctacagacc	83
ALK1-R	<u>CGTTGTTTTTGCATATG</u> agtgca ggagtattctggggagga	84
XPR2t-F2	<u>gtcgacgcaattaacagatag</u> tt tgccg	85
XPR2t-R3	<u>ctcgagggatcccggaaa</u> caaaa aacgacag	86
TA-F	<u>CATATG</u> CAAAAACAACGTA CTCCC	87
TA-R	<u>gtcgac</u> TTAGGCCAAACCGGG CTTTC	88

10

20

30

40

50

ATATG2-ER -F	<u>a c t c c t g c a c t C A T a t g t c c a a c</u> g c c c t c a a c c t g	89
XTATG2-ER -F	<u>c c a a t c c a a c a c a t a t g t c c a a c</u> g c c c t c a a c c t g	90
ER-R-1	<u>CGTTGTTTTTGCATAGAACCGCC</u> ACCGCCGCTACCGCCACCGCCCG AACCGCCACCGCCg a a t c g t g a a a t a t c c t t g g g c t	91
ER-R-2	<u>CGTTGTTTTTGCAT a t g A G A A C C</u> GCCACCGCCGCTACCGCCACCGC CCGAACCGCCACCGCCg a a t c g t g a a a t a t c c t t g g g c t	92
ETATG2-ER -1	<u>t g a t t a c g c c a a g c t t G a g t t t g</u> g c g c c c g t t t t t c	93
ETATG2-ER -2	<u>a c a g g t t g a g g g c g t t g g a c a t A</u> TGTGCTGTAGATATGTCTTGTGT GTAA	94
TTATG2-ER -1	<u>t g a t t a c g c c a a g c t t a a a c t t t</u> g g c a a a g a g g c t g	95
TTATG2-ER -2	<u>a c a g g t t g a g g g c g t t g g a c a t A</u> T G t t t g a a t g a t t c t t a t a c t c a g a a g	96
ER-F	<u>a t g t c c a a c g c c c t c a a c c t g</u>	97
ER-R-3	<u>CGTTGTTTTTGCATAGAACCGCC</u> ACCGCCGCTAC	98

10

20

30

40

## 【0043】

トランスアミナーゼカセットの製作は、ベクターから2切れのPCR産物を獲得した時、プロモーターからura3まで増幅してカセットの製作に用いたという点を除き、図4に示したものと同様の方法で進めた。カセットの製作のために用いたプライマーは、下記表5に示した。

## 【0044】

50

【表 5】

トランスアミナーゼカセット		
名称	塩基配列	配列番号
TA-FALDH4 -F1	TACCGACTGGACCCAGATTC	99
TA-FALDH4 -R1	CGGCAGTGGCAATGATCTTAC	100
TA-FALDH4 -F2	ctcctctatggtctagctggcaa agACTCGATTCATCGCTCCTAC	101
TA-FALDH4 -R2	CAAATCTTTCGGAAGATTCGG	102
ATATG2-F	gtcggtaagatcattgccactgc cgagatctgtgcgcctctacaga c	103
ETATG2-F	gtcggtaagatcattgccactgc cgGagtttggcgcccgtttttc	104
TTATG2-F	gtcggtaagatcattgccactgc cgaaactttggcaaagaggctgc	105
XTATG2-F	gtcggtaagatcattgccactgc cgacgcgtggagagtttgggtt	106

## 【0045】

本発明の組換え微生物菌株の改良のために用いた遺伝子配列等はそれぞれ配列リストに記載し、表 6 に要約した。

## 【0046】

10

20

30

40

50

【表 6】

遺伝子	配列番号	遺伝子	配列番号
FALDH1	1	ACO3	7
FALDH2	2	ACO4	8
FALDH3	3	ACO5	9
FALDH4	4	ACO6	10
ACO1	5	$\omega$ -トランスアミナーゼ	11
ACO2	6	Ura3	12

10

## 【0047】

## 実施例3．組換え微生物菌株の製作

前記実施例1で製造されたノックアウトカセット、及び実施例2で製造された形質導入ベクターを利用して、野生型ヤロウヰア菌株に存在する - 酸化代謝経路中の脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子及び - 酸化代謝経路関連の遺伝子の一部または全部が除去され、また、 - トランスアミナーゼ遺伝子が組み込まれた合計8種のノックアウト菌株を製作した(図6)。具体的に、遺伝子をノックアウトするか組み込む菌株をYPDプレートに塗抹して30℃で16~24時間培養した。培養された細胞をループで掻いてワンステップバッファ(45% PEG4000、100mM DTT、0.1L LiAc、25ug single-strand carrier DNA)100ulに入れてボルテックスした後、ノックアウトカセット及び形質導入ベクター(1ng以上)を添加して再びボルテックスし、39℃で1時間培養した。培養が終わったサンプルを選択培地(YNB w/oアミノ酸 6.7g/L、Glucose 20g/L)にロードした後、30℃で48時間培養して製作されたカセットが挿入された菌株を選択した。以後、選択された菌株のゲノム上にカセット等が正確に挿入されたのかを確認するため、表2の遺伝子欠失に含まれているプライマー等を利用して、PCRを介して確認した。

20

30

## 【0048】

カセットが挿入された菌株は、他のカセットの挿入を進めるためにポップアウト過程を進めた。選択培地から選択された菌株をYPD培地の2mlに接種して30℃で16時間以上培養した後、培養液200ulを5'FOA培地(YNB w/oアミノ酸 6.7g/L、Glucose 20g/L、5'FOA 0.8g/L、uracil 0.1g/L、uridine 0.1g/L)に塗抹して30℃で48時間培養した。5'FOA培地で育った菌株等は、YPDプレートとUDプレートにピック(picking)してYPDプレートで育った菌株等を選別し、再び表2のプライマー等を利用して、PCR過程を介しura3遺伝子が除去されたのか否かを確認した。Ura3が除去された菌株等は、他の遺伝子のノックアウトを進めた。

40

## 【0049】

## 実施例4．組換え微生物菌株の培養

培養テストする菌株を前日2mlのYPD培地(Bacto Laboratories、Yeast extract 10g/L、peptone 20g/L、glucose 20g/L)に接種して30℃、200rpmで一日間育てた。24-ウェルプレートに、表7に記載された組成を有する成長期培地(pH 6.0)2mlを入れ、前培養した培養液1%を接種した後、プレート攪拌機で30℃、450rpmで一日間培養した。一日間培養した菌株等を、表8に記載された転換期培地(pH 7.6)900ul

50

が注入された新しいプレートに900  $\mu$ lずつ接種しながら基質200  $\mu$ lを共に添加し、30、450 rpmで一日間培養した。このとき、基質には、DMSOに溶解されたドデカン酸10 g/Lを用いた。

【0050】

【表7】

成長期培地 pH 6.0		
成分	濃度 (g/L)	
グルコース	50	
YNB w/oアミノ酸	6.7	
酵母抽出物	10	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	
ウラシル	0.05	
0.1Mのホスフェートバッファ		
25°Cで0.1Mのカリウムホスフェートバッファの製造		
pH	1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> の体積 (ml)	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> の体積 (ml)
6.0	13.2	86.8

10

20

30

40

50

【表 8】

転換期培地 pH 7.6		
成分	濃度 (g/L)	
グルコース	30	
YNB w/o アミノ酸	6.7	
酵母抽出物	3	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	
ウラシル	0.05	
L-アラニン	10	
0.1Mのホスフェートバッファ		
25℃で0.1Mのカリウムホスフェートバッファの製造		
pH	1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> の体積 (ml)	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> の体積 (ml)
7.6	86.6	13.4

## 【0051】

その結果、 $\alpha$ -酸化代謝関連の遺伝子のみノックアウトされたY1-11菌株の場合、基質であるドデカン酸から12-アミノドデカン酸を生産することができなかったが、脂肪アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が更にノックアウトされて $\alpha$ -トランスアミナーゼが組み込まれたY2-20、Y-2-25、Y2-30、Y2-35、Y2-36及びY3-1菌株は、いずれも優れた12-アミノドデカン酸合成能力を見せた(図7)。さらに、前記Y2-36菌株は、フラスコで培養した時に8mg/L程度の12-アミノドデカン酸合成能力を見せた(図8)。以下の実験では、Y2-36菌株を利用した試料分析実験を行った。

## 【0052】

## 実施例5. 試料の分析

実施例4で12-アミノドデカン酸合成能力が最も優れたものと表れたY2-36菌株の培養液500 $\mu$ lに6N硫酸100 $\mu$ lを入れた後、メチル化反応のためにトルエン10%及び塩酸2.2%が含まれたメタノール500 $\mu$ lを添加し、100で1時間メチル化反応を行った。前記反応液に10Nの水酸化ナトリウム100 $\mu$ l及びジエチルエーテル500 $\mu$ lを入れて十分ボルテックス(vortexing)した後、12,000rpmで2分間遠心分離した。以後、溶媒層のみ分離して下記の分析条件でGC/MS分析を行った。

## 【0053】

## 分析の条件

- (1) 機器: Agilent 5975 MSD
- (2) コラム: HP-5MS
- (3) 温度: オープン(150 から 230 )
- (4) キャリアガス: He

( 5 ) 流速 : 1 m l / 分

【 0 0 5 4 】

その結果、本発明の組換え Y 2 - 3 6 菌株は、基質であるドデカン酸から 1 2 - アミノドデカン酸を合成することができることを確認した ( 図 9 ) 。

10

20

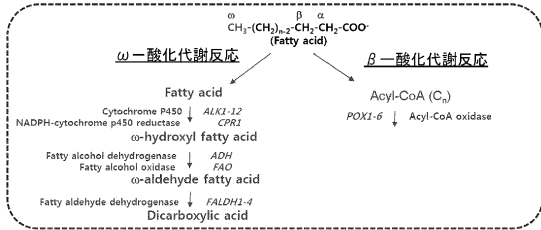
30

40

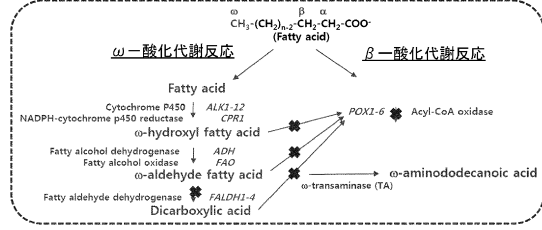
50

【 図面 】

【 図 1 】



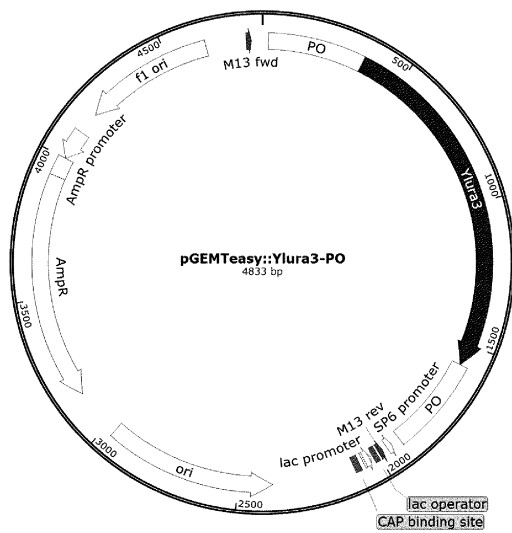
【 図 2 】



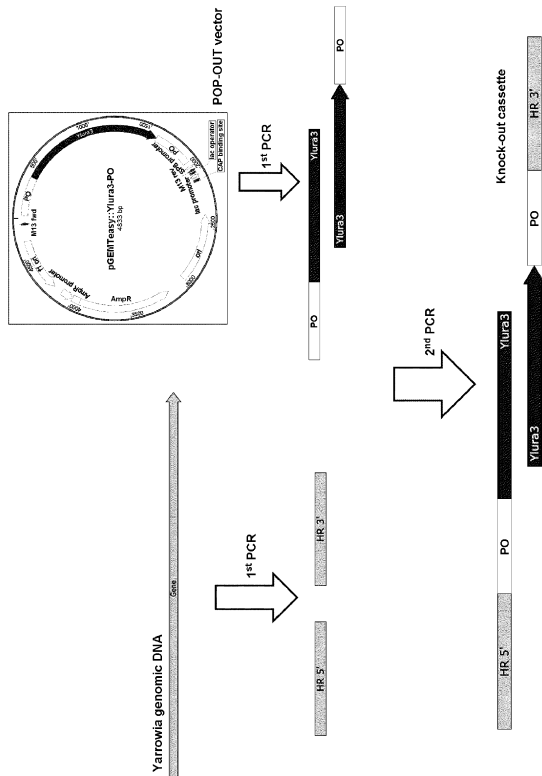
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

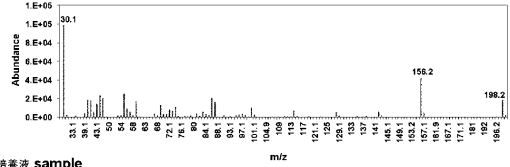
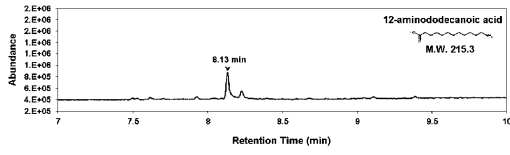
40

50



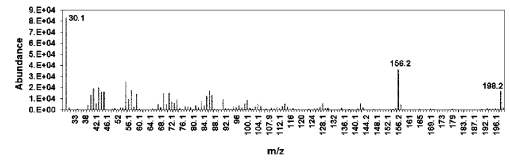
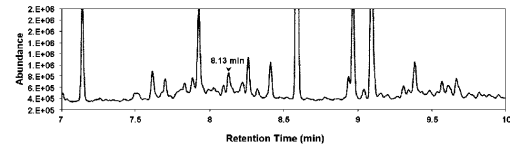
【 9 】

(a) Standard sample



10

(b) 培養液 sample



20

【 配列表 】

0007164112000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2016-0141019

(32)優先日 平成28年10月27日(2016.10.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

(74)代理人 100211199

弁理士 原田 さやか

(74)代理人 100165526

弁理士 阿部 寛

(72)発明者 アン, ジュン オ

大韓民国, デジョン 3 4 1 4 1, ユソング, グァハク口, 1 2 5

(72)発明者 リー, ホン ウェオン

大韓民国, デジョン 3 4 1 4 1, ユソング, グァハク口, 1 2 5

(72)発明者 バク, ギュ ヨン

大韓民国, デジョン 3 4 1 4 1, ユソング, グァハク口, 1 2 5

(72)発明者 ジャン, ミン ジョン

大韓民国, デジョン 3 4 1 4 1, ユソング, グァハク口, 1 2 5

(72)発明者 ジョン, ウー ユン

大韓民国, デジョン 3 4 1 4 1, ユソング, グァハク口, 1 2 5

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 宮岡 真衣

(56)参考文献 特表2011-505854(JP,A)

国際公開第2015/086684(WO,A1)

欧州特許出願公開第2706118(EP,A1)

Journal of Biological Chemistry, 2014年, Vol. 289, No. 48, p. 33275 - 33286

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12P 1/00 - 41/00

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/EMBASE(STN)

Pubmed

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq