

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

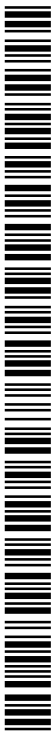


(43) 国際公開日
2010年3月11日(11.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/027022 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 13/14 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/065426
- (22) 国際出願日: 2009年9月3日(03.09.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-228859 2008年9月5日(05.09.2008) JP
- (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).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西尾 陽介(NISHIO, Yousuke) [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). 臼田 佳弘(USUDA, Yoshihiro) [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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告(条約第21条(3))
 - 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2010/027022 A1

(54) Title: BACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING L-AMINO ACID, AND METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACID

(54) 発明の名称: L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

(57) Abstract: A bacterium which belongs to the family *Enterobacteriaceae*, has an ability to produce an L-amino acid selected from L-glutamic acid, L-arginine and L-threonine, and is so modified that the activity of a protein encoded by ydcI gene can be decreased in a culture medium, thereby producing and accumulating the L-amino acid selected from L-glutamic acid, L-arginine and L-threonine in the culture medium or cells of the bacterium. Subsequently, the L-amino acid is collected from the culture medium or the cells.

(57) 要約: L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、ydcI遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化するよう改変された腸内細菌科に属する細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体より前記L-アミノ酸を回収する。

明 細 書

発明の名称： L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、微生物を用いたL-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選ばれるL-アミノ酸の製造法に関する。L-グルタミン酸及びL-アルギニンは調味料として産業上有用なL-アミノ酸である。L-スレオニンは飼料用アミノ酸として有用である。

背景技術

[0002] L-アミノ酸は、種々の微生物を用いた発酵法により工業生産されている。例えば、L-グルタミン酸は、主としてブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型細菌のL-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている（例えば、非特許文献1参照）。その他の微生物を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物（例えば、特許文献1参照）、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物（例えば、特許文献2参照）、バチルス属、シュードモナス属、セラチア属、アエロバクター・アエロゲネス（現エンテロバクター・アエロゲネス）等の微生物（例えば、特許文献3参照）、エシェリヒア・コリの変異株（例えば、特許文献1参照）等を用いる方法が知られている。また、クレブシエラ属、エルビニア属又はパントエア属、エンテロバクター属に属する微生物を用いたL-グルタミン酸の製造法も開示されている（例えば、特許文献2～4参照）。

[0003] 上記のような微生物を用いた発酵法によってL-アミノ酸等の目的物質を製造するには、野生型微生物（野生株）を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法等がある。

- [0004] さらに、近年は、目的物質の発酵生産に、組換えDNA技術を用いることが行われている。例えば、L-アミノ酸生合成系酵素をコードする遺伝子の発現を増強すること（特許文献5、特許文献6）、又はL-アミノ酸生合成系への炭素源の流入を増強すること（特許文献7）によって、微生物のL-アミノ酸生産性を向上させることが行われている。
- [0005] エシェリヒア・コリなどの腸内細菌群に見出されているタンパク質YdcIは、配列解析などからLysR型転写因子であると予測されている（非特許文献5、非特許文献6）。エシェリヒア・コリにおいてYdcIはydcI遺伝子によりコードされている（非特許文献7）。これまでにydcI遺伝子を増強した細菌を用いたL-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン生産の報告があるが（特許文献8）、この文献ではL-スレオニンについてはydcI遺伝子増幅株の効果が実証されていない。一方、ydcI遺伝子を欠損した細菌を用いたL-アミノ酸生産の報告はない。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開平5-244970号公報
特許文献2：米国特許第3,563,857号明細書
特許文献3：特公昭32-9393号公報
特許文献4：特開2000-189175号公報
特許文献5：米国特許第5168056号明細書
特許文献6：米国特許第5776736号明細書
特許文献7：米国特許第5906925号明細書
特許文献8：特願2007-141802号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：明石邦彦ら著 アミノ酸発酵、学会出版センター、195～215頁、1986年
非特許文献2：Laimonis A. Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978 July; 75(7):3216-19.

非特許文献3 : Laimonis A. Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981 Jan. ; 78(1):464-68.

非特許文献4 : Mark O. Walderhaug, J. Bacteriol., 1992 Apr. ; 174 (7) :2152-59.

非特許文献5 : Keseler, I. M. et al., "EcoCyc: A comprehensive database resource for Escherichia coli." Nucleic Acids Res. 2005, Vol.33, D334-337

非特許文献6 : Encyclopedia of Escherichia coli K-12 Genes and Metabolism, [online]、[平成19年4月12日検索]、インターネット<URL: <http://ecocyc.org/>>

非特許文献7 : Riley, M. et al., "Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005", Nucleic Acids Res. 2006, Vol.34, 1-9

発明の概要

- [0008] 本発明は、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選ばれるL-アミノ酸を効率よく生産することのできる腸内細菌科に属する細菌を提供すること、及び該細菌を用いて前記L-アミノ酸を効率よく生産する方法を提供することを課題とする。
- [0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、LysR型転写因子であると予測されているタンパク質をコードする、ydcI遺伝子の発現が低下するように細菌を改変することにより、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンの生産性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。
- (1) L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、ydcI遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化するよう改変された腸内細菌科に属する細菌。
 - (2) ydcI遺伝子の発現量を減少させることまたはydcI遺伝子を破壊

することにより、y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化された、前記細菌。

(3) y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号2、12または14に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2、12または14において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、DNA結合活性を有するタンパク質である、前記細菌。

(4) 前記y d c l遺伝子が、下記(a)または(b)に記載のDNAである、前記細菌：

(a) 配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218に示す塩基配列を含むDNA、

(b) 配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、DNA結合活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(5) エシェリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌またはパントエア属細菌である前記細菌。

(6) 前記いずれかの細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体より前記L-アミノ酸を回収することを特徴とする、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の製造法。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明の細菌

本発明の細菌は、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化するように改変された腸内細菌科に属

する細菌である。

ここで、「 L -グルタミン酸、 L -アルギニン及び L -スレオニンから選択される L -アミノ酸の生産能」とは、本発明の細菌を培地中で培養したときに、培地中または菌体内に前記 L -アミノ酸を生成し、培地中または菌体から回収できる程度に蓄積する能力をいう。本発明の細菌は L -グルタミン酸、 L -アルギニン及び L -スレオニンのうちの1種を生産する能力を有するものであってもよく、2種以上を生産できる能力を有するものであってもよい。前記 L -アミノ酸の生産能を有する細菌としては、本来的に前記 L -アミノ酸の生産能を有するものであってもよいが、下記のような細菌を、変異法や組換えDNA技術を利用して、前記 L -アミノ酸の生産能を有するように改変したものであってもよい。

[0012] <1-1> L -アミノ酸生産能の付与

以下に、細菌に L -グルタミン酸、 L -アルギニン及び L -スレオニンから選ばれる L -アミノ酸の生産能を付与する方法及び本発明で使用するのことができる前記 L -アミノ酸の生産能が付与された細菌を例示する。ただし、前記 L -アミノ酸の生産能を有する限り、これらに制限されない。

[0013] 本発明に用いる細菌としては、エシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、サルモネラ属、モルガネラ属など、腸内細菌科に属する細菌であって、前記 L -アミノ酸を生産する能力を有するものであれば、特に限定されない。具体的にはNCBI (National Center for Biotechnology Information) データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) に記載されている分類により腸内細菌科に属するものが利用できる。改変に用いる腸内細菌科細菌の親株としては、中でもエシェリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌、パントエア属細菌を用いることが望ましい。

[0014] 本発明のエシェリヒア属細菌を得るために用いるエシェリヒア属細菌の親株としては、特に限定されないが、具体的にはNeidhardtらの著書 (Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of

Escherichia coli K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition*, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.) に挙げられるものが利用できる。その中では、例えばエシェリヒア・コリが挙げられる。エシェリヒア・コリとしては具体的には、プロトタイプの野生株 K 1 2 株由来のエシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076) 等が挙げられる。

[0015] これらを手に入れるには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカatalogに記載されている。

[0016] エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられる。尚、近年、エンテロバクター・アグロメランスは、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) 又はパントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチューアルティ (*Pantoea stewartii*) に再分類されているものがある。本発明においては、腸内細菌科に分類されるものであれば、エンテロバクター属又はパントエア属のいずれに属するものであってもよい。

[0017] また、パントエア属細菌、エルビニア属細菌、エンテロバクター属細菌は、 γ -プロテオバクテリアに分類される細菌であり、分類学的に非常に近縁である (J Gen Appl Microbiol 1997 Dec;43(6) 355-361, International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1997, p1061-1067)。近年、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験等により、エンテロバクター属に属する細菌には、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) 又はパントエア・ディスペーサ (*Pantoea dispersa*) 等に再分類されているものがある (Int

ernational Journal of Systematic Bacteriology, July 1989;39(3).p.337-345)。また、エルビニア属に属する細菌にはパントエア・アナナス (*Pantoea ananas*)、パントエア・スチュワールティに再分類されているものがある (International Journal of Systematic Bacteriology, Jan 1993;43(1), p.162-173 参照)。

[0018] エンテロバクター属細菌としては、具体的には、欧州特許出願公開952221号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。

エンテロバクター属の代表的な株として、エンテロバクター・アグロメランスATCC12287株が挙げられる。

[0019] パントエア属細菌の代表的な菌株として、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュワールティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランス、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0020] パントエア・アナナティスAJ13355株 (FERM BP-6614) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13356株 (FERM BP-6615) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13601株 (FERM BP-7207) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

これらの株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランスと同一とされ、エンテロバクター・アグロメランスとして寄託されたが、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。

[0021] エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロポーラ、エルビニア・カロトポーラが挙げられ、クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラが挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0022] エルビニア・アミロポーラATCC15580株

エルビニア・カロトポーラATCC15713株

クレブシエラ・プランティコーラAJ13399株 (FERM BP-6600) (欧州特許出願公開955368号明細書)

クレブシエラ・プランティコーラAJ13410株 (FERM BP-6617) (欧州特許出願公開955368号明細書)

[0023] 以下、上記のような腸内細菌科に属する細菌に前記L-アミノ酸の生産能を付与する方法、又はこれらの細菌において前記L-アミノ酸の生産能を増強する方法について述べる。

[0024] L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる (アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77-100頁参照)。ここで、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、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わせられてもよい。

[0025] L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、L-アミノ酸のアナログ耐性株、又は代謝制御変異株を取得するには、親株又は野生株を通常の変異処理、すなわちX線や紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくはエチルメタンサルフォネート (EMS) 等の変異剤処理などによって処理し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、かつ目的のL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって得ることができる。

[0026] 以下、L-アミノ酸生産菌又はその構築方法を例として示す。

[0027] L-グルタミン酸生産菌

まず、L-グルタミン酸生産菌について例示する。

本発明のL-グルタミン酸生産菌を誘導するための親株の例としては、E.

coli VL334thrC⁺ (VKPM B-8961 : EP 1172433) などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。E. coli VL334 (VKPM B-1641) は、thrC遺伝子及びilvA遺伝子に変異を有するL-イソロイシン及びL-スレオニン要求性株である(米国特許第4,278,765号)。この株にthrC遺伝子の野生型アレルが、野生型E. coli K12株 (VKPM B-7) の細胞で増殖したバクテリオファージP1を用いる一般的形質導入法により導入された結果、L-イソロイシン要求性のL-グルタミン酸生産菌VL334thrC⁺ が得られた。

[0028] 細菌にL-グルタミン酸生産能を付与する、又は細菌のL-グルタミン酸生産能を増強するための改変の方法としては、例えば、L-グルタミン酸合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を挙げることができる。

L-グルタミン酸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)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(icdA)、アコニット酸ヒドラターゼ(acnA, acnB)、クエン酸シンターゼ(以下、「CS」ともいう)(gltA)、メチルクエン酸シンターゼ(以下「PRPC」ともいう)(prpC)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(以下、「PEPC」ともいう)(ppc)、ピルビン酸カルボキシラーゼ(pyc)、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。尚、酵素名後のカッコ内は、各酵素をコードする遺伝子名である(以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、CS又はPRPC、PEPCおよび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。(W02006/051660号パンフレット参照)。

- [0029] 以下に、目的遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を例示する。
- [0030] 1つ目の方法は、目的遺伝子のコピー数を高める方法である。例えば、目的遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて宿主細菌を形質転換することにより、該遺伝子のコピー数を高めることができる。例えば、目的遺伝子としてCSをコードする遺伝子（gl tA遺伝子）あるいはPRPCをコードする遺伝子（prpC遺伝子）、PEPCをコードする遺伝子（ppc遺伝子）、およびGDHをコードする遺伝子（gdhA遺伝子）を用いる場合、これらの遺伝子はエシェリヒア属細菌、及びコリネバクテリウム属細菌において、既に塩基配列が明らかにされていることから（Biochemistry、第22巻、5243～5249頁、1983年；J. Biochem.、第95巻、909～916頁、1984年；Gene、第27巻、193～199頁、1984年；Microbiology、第140巻、1817～1828頁、1994年；Mol. Gen. Genet.、第218巻、330～339頁、1989年；Molecular Microbiology、第6巻、317～326頁、1992年）、それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、腸内細菌科に属する細菌から染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。
- [0031] 形質転換に用いるプラスミドとしては、腸内細菌群に属する細菌の中で自律複製可能なプラスミド、例えばpUC19、pUC18、pBR322、RSF1010、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、pSTV28、pSTV29（pHSG、pSTVIはタカラバイオ社より入手可）、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218（pMWはニッポンジーン社より入手可）等が挙げられる。なお、プラスミドの代わりにファージDNAをベクターとして用いてもよい。上記CS又はPRPC、PEPCおよびGDHの活性を同時に増強するためのプラスミドとして、gl tA遺伝子、ppc遺伝子及びgdhA遺伝子が組み込まれたRSFCPG（欧州特許出願公開第0952221号明細書参照）、及びRSFCPGのgl tA遺伝子をprpCに置き換えたRSFPPG（WO2008/020654参照）が挙げられる。
- [0032] 形質転換法としては、例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、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))、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., *Gene*, 1, 153 (1977)) などが挙げられる。

あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S. N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., *Nature*, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 1929 (1978)) も応用できる。また、電気パルス法 (特開平2-207791号公報) によっても、細菌の形質転換を行うこともできる。

[0033] 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上に多コピー導入することによっても達成できる。細菌の染色体DNA上に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、相同組換え法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)) 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、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・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。さらに、Muファージを用いる方法 (特開平2-109985号) で宿主染色体に目的遺伝子を組み込むこともできる。

[0034] 2つ目の方法は、染色体DNA上またはプラスミド上において、目的遺伝子のプロモーター等の発現調節配列をより強力なものに置換することによって目的遺伝子の発現を増強させる方法である。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、PRプロモーター、lacUV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。また、国際公開W000/18935に開示さ

れているように、遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1, 105-128) 等に記載されている。

- [0035] 発現調節配列の置換は、例えば、温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。本発明の腸内細菌科に属する細菌に使用できる出来る、温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えばW0 99/03988号国際公開パンフレットに記載のプラスミドpMAN997等が挙げられる。
- [0036] さらに、リボソーム結合部位 (RBS) と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによって、翻訳量を向上させることが可能である。
- [0037] なお、発現調節配列の改変は、上述したような遺伝子のコピー数を高める方法と組み合わせてもよい。
- [0038] 上記のような遺伝子置換を行う方法としては、例えば「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. U S A.* 97:6640-6645 (2000)) や、Redドリブンインテグレーション法と λ 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 (W02005/010175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、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスイサイドベクターを利用する方法などがある (米国特許第6303383号明細書、または特開平05-007491号公報)。
- [0039] 尚、Redドリブンインテグレーションには、 λ Red遺伝子産物に耐性な菌株、例えばパントエア・アナナティスSC17(0)株を好適に用いることができる。同株は、2005年9月21日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダ

ストリアル・マイクロオーガニズム (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNI Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。

- [0040] 以上のような方法によりクエン酸シンターゼ遺伝子、メチルクエン酸シンターゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び／又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増強するように改変された細菌としては、特開平2001-333769号公報、特開2000-106869号公報、特開2000-189169号公報、特開2000-333769、特開2006-129840、国際公開2006/051660号パンフレット等に記載された細菌が例示できる。
- [0041] また、L-グルタミン酸生産能は、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を増強させることによっても付与することが出来る。6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性、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を上昇させた細菌としては、特開2003-274988に開示された細菌を挙げることが出来る。
- [0042] L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための改変は、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ることにより行ってもよい。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-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ) (sucA)、イソクエン酸リアーゼ (aceA)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta)、酢酸キナーゼ (ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (ilvG)、アセト乳酸シンターゼ (ilvI)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ (pfl)、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldh)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (gadAB)、1-ピロリン5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ (putA) などが挙げられる。この中では特に、2-オキソ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い。

[0043] 上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、あるいは遺伝子工学的手法によって、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。変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。遺伝子に変異が導入される部位は、酵素タンパク質をコードするコード領域であってもよく、プロモーター等の発現制御領域であってもよい。また、遺伝子工学的手法には、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等を用いる方法がある。

[0044] 細胞中の目的酵素の活性が低下または欠損していること、および活性の低下の程度は、候補株の菌体抽出液または精製画分の酵素活性を測定し、野生株と比較することによって確認することができる。例えば、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性は、Reedらの方法 (L. J. Reed and B. B. Mukherjee, *Methods in Enzymology* 1969, 13, p. 55-61) に従って測定することができる。

[0045] 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下したエシェリヒア属に属する細菌としては、以下の菌株が挙げられる (米国特許第5,378,616号及び第5,573,945号)。

エシェリヒア・コリW3110sucA::Kmr

エシェリヒア・コリAJ12624 (FERM BP-3853)

エシェリヒア・コリAJ12628 (FERM BP-3854)

エシェリヒア・コリAJ12949 (FERM BP-4881)

エシェリヒア・コリW3110sucA::Kmr は、エシェリヒア・コリW3110の2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (sucA遺伝子) を破壊することにより得られた株である。この株は、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼを完全に欠損している。

2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子としては、配列番号9の塩

基配列を有するエシェリヒア・コリのsucA遺伝子が例示されるが、配列番号9と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上の相同性を有するホモログ遺伝子であってもよい。

[0046] 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは低下した他の細菌としては、具体的には次のような株が挙げられる。

[0047] パントエア・アナナティスAJ13601 (FERM BP-7207 欧州特許公開明細書1078989)

パントエア・アナナティスAJ13356 (FERM BP-6615 米国特許6,331,419号)

パントエア・アナナティスSC17sucA (FERM BP-8646 国際公開パンフレットW02005/085419号)

クレブシエラ・プランティコーラ AJ13410 (FERM BP-6617 米国特許6,197,559号)

[0048] 尚、SC17sucA株は、低pHでL-グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として自然界より単離されたAJ13355株から、粘液質低生産変異株(SC17)を取得し、同株の2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(sucA)を破壊することによって得られた株である。AJ13601は、このSC17sucA株に、エシェリヒア・コリ由来のgl tA、ppc、gdhAの各遺伝子を含むプラスミドRSFCPG、及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のgl tA遺伝子を含むプラスミドpSTVCBを導入して得た株SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株から、さらに、低pHにおける高濃度L-グルタミン酸耐性株の選択、及び増殖度及びL-グルタミン酸生産能が高い株の選択によって、取得された菌株である(欧州特許出願公開0952221号明細書)。AJ13356は、AJ13355株の α KGDH-E1サブユニット遺伝子(sucA)を欠損させた株である。

AJ13355株及びAJ13356株は、平成10年2月19日に、工業技術院生命工学工業技術研究所(現名称、産業技術総合研究所特許生物寄託センター、住所 郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、それぞれ受託番号FERM P-16644、及びFERM P-16645として寄託され、平成11年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP

-6614、及びFERM BP-6615が付与されている。SC17sucA株は、プライベートナンバーAJ417が付与され、平成16年2月26日に産業技術総合研究所特許生物寄託センター（郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号FERM BP-08646として寄託されている。AJ13601株は、1999年8月18日に、工業技術院生命工学工業技術研究所（現名称、産業技術総合研究所特許生物寄託センター、住所 郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。

[0049] 上記パントエア・アナナティスAJ13355株、AJ13356株、AJ13601株、及び前述のクレブシエラ・プランティコーラAJ13399株は、酸性条件下で培養したときに液体培地中にL-グルタミン酸の飽和濃度を越える量のL-グルタミン酸を蓄積する能力を有する。

[0050] また、腸内細菌科のL-グルタミン酸生産能を向上させるためには、arcA遺伝子を欠損させる方法（米国特許7,090,998号公報）、グルタミン酸排出遺伝子であるyhfK遺伝子を増幅させる方法（W02005/085419パンフレット）も用いることができる。また、yggB遺伝子を用いる方法も利用できる（特開2007-097573号公報）。

[0051] 上記の酵素活性を増強又は欠損させる方法は、以下に示す他のアミノ酸の生産菌についても、同様に適用することができる。

[0052] L-アルギニン生産菌

本発明のL-アルギニン生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli 237株（VKPM B-7925）（米国特許出願公開2002/058315 A1）、及び、変異N-アセチルグルタメートシンターゼを保持するその誘導株（ロシア特許出願第2001112869号）、E. coli 382株（VKPM B-7926）（EP1170358A1）、N-アセチルグルタメートシンターゼをコードするargA遺伝子が導入されたアルギニン生産株（EP1170361A1）などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0053] 本発明のL-アルギニン生産菌を誘導するための親株の例としては、L-アルギニン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。このような遺伝子の例としては、N-アセチルグルタミルフォスフェートレダクターゼ遺伝子(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(argJ)、N-アセチルグルタメートキナーゼ遺伝子(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ遺伝子(argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(argF)、アルギノコハク酸シンテターゼ遺伝子(argG)、アルギノコハク酸リアーゼ遺伝子(argH)、カルバモイルフォスフェートシンテターゼ遺伝子(carAB)が挙げられる。

[0054] L-スレオニン生産菌

本発明のL-スレオニン生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号)、E. coli 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (米国特許第5,631,157号)、E. coli NRRL-21593 (米国特許第5,939,307号)、E. coli FERM BP-3756 (米国特許第5,474,918号)、E. coli FERM BP-3519及びFERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978))、E. coli VL643及びVL2055 (EP 1149911 A)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0055] TDH-6株はthrC遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、そのilvA遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、rhtA遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。VKPM B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異thrA遺伝子を含むthrA*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異thrA遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。VKPM B-3996株は、1987年11月19日、オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチビオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ロシアン・

ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-3996で寄託されている。

[0056] *E. coli* VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、本発明のL-スレオニン生産菌を誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミドpVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に、受託番号VKPM B-5318で寄託されている。

[0057] 好ましくは、本発明のL-スレオニン生産菌は、さらに、下記の遺伝子の1種以上の発現が増大するように改変されたものである。

- スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼ I をコードする変異thrA遺伝子
- ホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子
- スレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子
- 推定トランスメンブランタンパク質をコードするrhtA遺伝子
- アスパルテート- β -セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするasd遺伝子
- アスパルテートアミノトランスフェラーゼ (アスパルテートトランスアミナーゼ) をコードするaspC遺伝子

[0058] *E. coli*のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼ I をコードするthrA遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号337~2799, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、*E. coli* K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。*E. coli*のホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号2801~3733, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は

、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC遺伝子との間に位置する。E. coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734~5020, GenBank accession NC_000913.2, gi:49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。これら三つの遺伝子は、全て、単一のスレオニンオペロンとして機能する。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニューエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去する(WO2005/049808, WO2003/097839)。

[0059] スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼ I をコードする変異thrA遺伝子、ならびに、thrB遺伝子及びthrC遺伝子は、スレオニン生産株E. coli VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのアペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

[0060] rhtA遺伝子は、グルタミン輸送系の要素をコードするglnHPQ オペロンに近いE. coli染色体の18分に存在する。rhtA遺伝子は、ORF1 (ybiF遺伝子, ヌクレオチド番号764~1651, GenBank accession number AAA218541, gi:440181) と同一であり、pexB遺伝子とompX遺伝子との間に位置する。ORF1によりコードされるタンパク質を発現するユニットは、rhtA遺伝子と呼ばれている (rht: ホモセリン及びスレオニンに耐性)。また、rhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG→A置換であることが判明している (ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457, EP 1013765 A)。

[0061] E. coliのasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511~3571408, GenBank accession NC_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T. J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物

のasd遺伝子も同様に得ることができる。

[0062] また、E. coliのaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742~984932, GenBank accession NC_000913.1, gi:16128895)、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

[0063] <1-2> Y d c I 活性の弱化

本発明の細菌は、上述したようなL-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選ばれるL-アミノ酸の生産能を有する細菌において、y d c I 遺伝子がコードするタンパク質の活性が弱化するように変更された細菌である。なお、y d c I 遺伝子がコードするタンパク質の活性が弱化するように変更したのちに、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選ばれるL-アミノ酸の生産能を付与してもよい。

[0064] 前記のとおり、y d c I 遺伝子がコードするタンパク質はL y s R型転写因子であると予想されており、同タンパク質の活性は、DNA結合活性であると推定される。ここで、DNA結合活性とは、YdcIタンパク質が特定のDNA配列に結合する活性を意味する。

DNA結合活性は、例えば、Linda Jen-Jacobson, Structural-perturbation approaches to thermodynamics of site-specific protein-DNA interactions, Methods in Enzymology, Volume 259, 1995, Pages 305-344に記載された方法によって測定することができる。

[0065] 「y d c I 遺伝子によりコードされたタンパク質の活性が弱化するように変更された」とは、野生株、または親株のような非改変株に対して、細胞あたりのy d c I 遺伝子の発現量が低下した場合などが含まれる。ここで、y d c I 遺伝子の発現量が低下した場合にはY d c I タンパク質の翻訳量が低下した場合も含む。

ここで、対照となる非改変株、例えば野生株の腸内細菌科に属する細菌としては、エシェリヒア・コリMG1655株(ATCCNo.47076)、及びW3110株(ATCC No.27325)、パントエア・アナナティスAJ13335株(FERM BP-6615)などが挙げられる。

y d c I 遺伝子の発現が非改変株、例えば親株、又は野生株と比べて低下していることの確認は、mRNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。発現量については、非改変株と比較して、低下していればよいが、例えば非改変株と比べて1/2倍以下、より好ましくは1/3倍以下、さらに好ましくは1/5倍以下に低下していることが望ましい。また、y d c I 遺伝子の発現量の低下は、y d c I 遺伝子にコードされるタンパク質の量が非改変株と比較して低下していることによっても確認することができ、例えば抗体を用いてウェスタンブロットによって検出することが出来る。(Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。

[0066] y d c I 遺伝子としては、それぞれの細菌の染色体上に存在する y d c I 遺伝子を用いることができるが、例えば、配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするエシェリヒア・コリの y d c I 遺伝子 (配列番号1: GenBank Accession No. A64894 [GI: 7466846]) 又はそのホモログ遺伝子を例示することができる。また、配列番号12または14のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするパントエア・アナナティスの y d c I 遺伝子又はそれぞれのホモログ遺伝子を例示することができる。

[0067] y d c I ホモログ遺伝子とは、他の微生物由来で、エシェリヒア属細菌やパントエア属細菌の y d c I 遺伝子と構造が高い類似性を示し、宿主においてその発現を低下させた時にL-グルタミン酸またはL-アルギニンの生産能を向上させ、DNA結合活性を示すタンパク質をコードする遺伝子をいう。例えば y d c I のホモログとしては、シゲラ属、エンテロバクター属等の GenBank に登録されている遺伝子が挙げられる。さらに、y d c I 遺伝子は、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、ストレプトマイセス・セリカラ一等のストレプトマイセス属細菌、ラクトコッカス属やラクトバチルス属等の乳酸菌からクローニングされるものであってもよい。エシェリヒア属細

菌やパントエア属細菌の y d c I と相同性が高ければ、異なる遺伝子名が付与されているものでもよい。

[0068] また、y d c I 遺伝子ホモログは上記の配列情報に基づき、相同性が高い遺伝子を公知のデータベースから取得できる。アミノ酸配列および塩基配列の相同性は、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)。

[0069] また、本発明に用いる y d c I 遺伝子は、野生型遺伝子には限られず、コードされるタンパク質の機能、すなわちDNA結合活性が損なわれない限り、配列番号2、12、14の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配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

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、DNA結合活性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。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、As

n、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。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、y d c I 遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。

[0070] さらに、y d c I 遺伝子は、配列番号 2、12、または14の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、DNA結合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。

[0071] また、y d c I 遺伝子は、配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218の塩基配列の相補配列又はこれらの相補配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつDNA結合活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。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°C、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°C、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。

[0072] プローブとしては、配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218の相補配列の一部を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218の相補配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50°C、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0073] ydcI 遺伝子によってコードされるタンパク質の活性が弱化した細菌は、例えば、遺伝子組換え法を用いた相同組換え法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) により、染色体上の ydcI 遺伝子を、正常に機能しない ydcI 遺伝子 (以下、「破壊型 ydcI 遺伝子」ということがある) で置換することによって得ることができる。

[0074] 相同組換えの機構は以下のとおりである。染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体が染色体上に組み込まれる。この後さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により破壊された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、破壊型 ydcI 遺伝子が、染色体上の正常な ydcI 遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

[0075] このような相同組換えによる遺伝子破壊技術は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法、温度感受性プラスミドを用いる方法等が利用できる。また、薬剤耐性等のマーカ―遺伝子が内部に挿入されたydcI遺伝子を含み、かつ、目的とする細菌細胞内で複製できないプラスミドを用いることによっても、ydcI遺伝子の破壊を行うことができる。すなわち、前記プラスミドで形質転換され、薬剤耐性を獲得した形質転換体は、染色体DNA中にマーカ―遺伝子が組み込まれている。このマーカ―遺伝子は、その両端のydcI遺伝子配列と染色体上のこれらの遺伝子との相同組換えによって組み込まれる可能性が高いため、効率よく遺伝子破壊株を選択することができる。

[0076] エシェリヒア属細菌で機能する温度感受性プラスミドとしては、pMAN997 (WO 99/03988号国際公開パンフレット)、pHSG415、pHSG422 (Hashimoto-Gotoh, T. et al, Gene, 16, 227-235 (1981))等が挙げられる。

[0077] 遺伝子破壊に用いる破壊型ydcI遺伝子は、具体的には、制限酵素消化及び再結合によるこれらの遺伝子の一定領域の欠失、これらの遺伝子への他のDNA断片(マーカ―遺伝子等)の挿入、または部位特異的変異法(Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987))や次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理(Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75, 270 (1978))によって、ydcI遺伝子のコーディング領域またはプロモーター領域等の塩基配列の中に1つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることにより、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるか、又はydcI遺伝子の転写を低下または消失させることにより、取得することができる。これらの態様の中では、制限酵素消化及び再結

合により y d c I 遺伝子の一定領域を欠失させる方法、又はこれらの遺伝子へ他のDNA断片を挿入する方法が、確実性及び安定性の点から好ましい。

[0078] y d c I 遺伝子が破壊されたことは、サザンブロットィングやPCR法により、染色体上の遺伝子を解析することによって、確認することができる。

なお、各種遺伝子の取得、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、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1. 21 (1989)に記載されている。

[0079] また、機能を有するY d c Iタンパク質が産生されないようになった変異株は、 γ -プロテオバクテリアを紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸などの通常変異処理に用いられる変異剤によって処理することによって、も取得することができる。

[0080] <2>本発明のL-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の製造法

上記のようにして得られる、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、細胞内でY d c Iタンパク質の活性が弱化するように変更された細菌を培地に培養し、該培地又は菌体中に目的物質を生成蓄積させ、該培地又は菌体より前記L-アミノ酸を採取することにより、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸を製造することができる。

[0081] 培養に用いる培地は、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ることができる。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が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。

[0082] 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でき、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ることができる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができる。有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用でき、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

[0083] 特にL-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いる場合、培地中にパントテン酸を添加すると、より効率よく晶析できる（W02004/111258号パンフレット）。無機塩類としては、りん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用できる。

[0084] 培養は、好ましくは、発酵温度20～45℃、pHを3～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、例えば、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。このような条件下で、好ましくは10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に目的アミノ酸が蓄積される。

[0085] また、L-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いて、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら培養を行うことも出来る。L-グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0を挙げることができる。

[0086] また、L-グルタミン酸を培地中に析出させる場合には、予めL-グルタミン酸、L-リジンの結晶を種晶として添加しておくことにより効率よく晶析できる（欧州特許1233069号、欧州特許出願公開1624069号）。

[0087] 培養終了後の培養液からL-アミノ酸を採取する方法は、公知の回収方法

に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって採取される。L-グルタミン酸が析出するような条件下で培養した場合、培養液中に析出したL-グルタミン酸は、遠心分離又は濾過等により採取することができる。この場合、培地中に溶解しているL-グルタミン酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

[0088] なお、L-アルギニンを製造する際には、培養中のpHが6.5~9.0、培養終了時の培地のpHが7.2~9.0となるように制御し、発酵中の発酵槽内圧力が正となるように制御するか、又は、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給して、培地中の重炭酸イオン及び/または炭酸イオンが少なくとも2g/L以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び/または炭酸イオンを塩基性アミノ酸を主とするカチオンのカウンタイオンとする方法で発酵し、L-アルギニンを回収する方法で製造を行ってもよい（特開2002-065287号参照、米国特許出願公開第2002025564号）。

[0089] [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

[0090] <エシェリヒア・コリのsucA遺伝子、ydcI遺伝子二重破壊株の作成>

エシェリヒア・コリのsucA遺伝子の欠失は特開2004-89188（P2004-89188A）に記載のMG1655ΔsucAを用いた。ydcI遺伝子の欠失は、DatsenkoとWannerによって最初に開発された「Red-driven integration」と呼ばれる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645]によって行った。この方法によれば、目的とする遺伝子を合成オリゴヌクレオチドの5'側にデザインし、抗生物質耐性遺伝子を3'側にデザインした合成オリゴヌクレオチドを用いて得られたPCR産物を用いて、一段階で遺伝子破壊株を構築することが出来る。

- [0091] エシェリヒア・コリK-12株のゲノムDNAの全塩基配列は既に明らかにされている (Blattner F. R., Plunkett G., Bloch C. A. et al., Science, 227, 1453-1474 (1997))。既知のydcI遺伝子の塩基配列に基づいて遺伝子破壊株を作製した。
- [0092] PCRの鋳型として、プラスミドpMW118-attL-Cm-attRを使用した。pMW118-attL-Cm-attRは、pMW118(宝バイオ社製)に入ファージのアタッチメントサイトであるattL及びattR遺伝子と抗生物質耐性遺伝子であるcat遺伝子を挿入したプラスミドであり、attL-cat-attRの順で挿入されている。attL配列を配列番号3に、attR配列を配列番号4に示す。
- [0093] ydcI遺伝子及び鋳型プラスミドに抗生物質耐性を付与する遺伝子のそれぞれに近接する領域に、それぞれ相補的なプライマーを設計した。配列番号5および6示すような合成DNAプライマーを2本通常の方法で合成した。このプライマーを用いてpMW118-attL-Cm-attRをテンプレートに、PCRを行った。
- [0094] 増幅したPCR産物をQIAGEN PCR Purification Kit (Cat.No. 28104)で精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むMG1655 Δ sucA(以下M V1655 Δ sucA/pKD46と表記する)をエレクトロポレーションするために用いた。プラスミドpKD46[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645]は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御される λ Redシステムの遺伝子(λ 、 β 、exo遺伝子)を含む λ ファージの合計2154塩基のDNAフラグメント(GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459, 第31088番目~33241番目)を含む。プラスミドpKD46はPCR産物をMG1655 Δ sucAに組み込むために必要である。
- [0095] エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。100mg/Lのアンピシリンを含んだLB培地中で30°C、一晚培養したMG1655 Δ sucA/pKD46を、アンピシリンとL-アラビノース(1mM)を含んだ5mLのLB培地で100倍希釈した。得られた希釈物を30°Cで通気しながらOD600が約0.6になる

まで生育させた後、氷冷した1mM HEPES (pH7.0) で3回洗浄することによってエレクトロポレーションに使用できるようにした。エレクトロポレーションは50 μ Lのコンピテントセルと約100ngのPCR産物を用いて行った。エレクトロポレーション後のセルは1mLのSOC培地[モレキュラークロニング：実験室マニュアル第2版、Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年)]を加えて37°Cで1時間培養した後、LB寒天培地上、37°Cで平板培養し、クロラムフェニコール耐性組換え体を選択した。次に、pKD46プラスミドを除去するために、クロラムフェニコール入りのLB寒天培地上、37°Cで継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性を試験し、pKD46が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。クロラムフェニコール耐性遺伝子によって識別できる y d c I 遺伝子の欠失を含む変異体を、配列番号7と配列番号8に示す合成DNAを用いたPCRによって確認した。y d c I 遺伝子欠損株MG1655 Δ sucA, ydcI::catの細胞のDNAを鋳型にして得られたPCR産物の長さは野生株より長く、ydcI遺伝子内部にクロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入されていることが確認され、ydcI遺伝子が欠損されていることを確認できた。クロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入された y d c I 破壊株をMG1655 Δ sucA Δ ydcI株と名づけた。

実施例 2

[0096] <エシェリヒア属細菌 L-グルタミン酸生産株でのydcI欠損の効果>

y d c I 遺伝子破壊の L-グルタミン酸発酵への効果を検討するため、MG1655 Δ sucA Δ y d c I 株を、sucA 遺伝子欠損株MG1655 Δ sucAを対照として培養し、L-グルタミン酸生産量を測定した。以下に、そのための培地および培養方法ならびに分析方法を示す。

[0097] MG1655 Δ sucA Δ ydcI 及び対照株MG1655 Δ sucAをLB培地に植菌し、37°Cで一晩前培養した。プレート1/6枚分の菌体を500ml容三角フラスコ中50mlの培養下記組成のグルコース培地に植菌し、37°Cにて48時間培養した。培養後、培地中に蓄積したL-グルタミン酸を、バイオテックアナライザー（サクラ精機）により測定した。

[0098] [グルコース培地組成]

グルコース	40g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	1.0g/L
酵母エキス	2.0g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01g/L
Thiamine HCl	0.01g/L
クロラムフェニコール	25mg/L
炭酸カルシウム	30g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件 : 120°C、20分

[0099] 結果を表1に示す。対照のMG1655 Δ sucAに比べ、ydcI遺伝子を破壊したMG1655 Δ sucA Δ ydcIでは、L-グルタミン酸 (Glu) の収率が大幅に向上した。

[0100] [表1]

表1 : エシエリヒア属細菌L-グルタミン酸生産菌MG1655 Δ sucAにおけるydcIの欠損効果

株名	OD (600 nm)	Glu濃度 (g/l)
MG1655 Δ sucA	9.8	14.9
MG1655 Δ sucA Δ ydcI	10.2	16.1

実施例 3

[0101] <エシエリヒア・コリArg生産菌におけるydcI欠損効果の確認>

エシエリヒア・コリのArg生産菌は237株を使用した。237株は、エシエリヒア・コリK12 *ilvA* :: *Tn5*から1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジンにより誘導された、ピリミジンアナログである6-アザウラシルに耐性な変異株である。同株は、VKPM B-7925の名でロシア・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (住所 : Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd.

1) に2000年4月10日に寄託されている。237株における y d c I 遺伝子の欠失は実施例1に示す方法に従って行い、その結果 237 Δ y d c I 株が得られた。

[0102] 得られた 237 Δ y d c I 株について L-アルギニン収率を確認するため培養評価を行った。培養評価は試験管を使い、37°Cで50時間の振とう培養を行った。用いた培地の組成は、グルコース 60 g/L、(NH₄)₂SO₄ 25 g/L、酵母エキス 5 g/L、KH₂PO₄ 2 g/L、MgSO₄·7H₂O 1 g/L、CaCO₃ 25 g/L、Thiamine/HCl 0.1 mg/L、L-Threonine 0.5 g/L。培地中に蓄積した L-アルギニンの量を HPLC により測定した。HPLC の測定条件は、ジールサイエンス社製カラム INERTOSIL ODS-3 (4.0×250mm) を用い、使用したバッファーは 1 L 当たり 85%リン酸 5.765 g、98%ヘプタンスルホン酸ナトリウム 1.0 g を含み、水酸化ナトリウムで pH 4.5 に調整後、メタノールを 70 ml 添加し、1 L にメスアップした。

[0103] 結果を表 2 に示す。対照の 237 株に比べ、y d c I 遺伝子を破壊した 237 Δ y d c I では、L-アルギニン (A r g) の収率が大幅に向上した。

[0104] [表2]

表 2 : エシェリヒア属細菌 L-アルギニン生産菌 237 株における y d c I の欠損効果

株名	OD (600 nm)	A r g 濃度 (g/l)
237	13.8	2.1
237 Δ y d c I	13.9	2.9

実施例 4

[0105] <パントエア・アナナティスでの c 1 1 2 9、c 1 7 0 5 遺伝子破壊株の作成>

エシェリヒア・コリの y d c I 遺伝子産物とアミノ酸配列で 45%以上の一致度を持つパントエア・アナナティスの c 1 1 2 9 遺伝子、c 1 7 0 5 遺伝子を、パントエア・アナナティスにおける y d c I 遺伝子ホモログとして扱うこととした。配列番号 11、13 にパントエア・アナナティスの c 1 1 2

9 遺伝子、c 1 7 0 5 遺伝子の塩基配列を、配列番号 1 2、1 4 にアミノ酸配列を示す。パントエア・アナナティスの遺伝子破壊株作成に関しては、S C 1 7 (0) 株を利用した。同株は、2005年9月21日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNI Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。

[0106] c 1 1 2 9 遺伝子と c 1 7 0 5 遺伝子の欠失は、WO 2008/090770の方法に従った。「Red-driven integration」あるいは「Red-mediated integration」と呼ばれる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97. 6640-6645 (2000)) を利用した方法である。この方法によれば、目的とする遺伝子を合成オリゴヌクレオチドの5' 側にデザインし、抗生物質耐性遺伝子を3' 側にデザインした合成オリゴヌクレオチドを用いて得られたPCR産物を用いて、一段階で遺伝子破壊株を構築することが出来る。

[0107] PCRには、配列番号 1 5 と 1 6 及び 1 7 と 1 8 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして使い、pMW118-(λ attL-K^{mr}- λ attR) プラスミドを鋳型として使用した。WO 2008/090770に示されているように、プラスミドpMW118-(λ attL-K^{mr}- λ attR) は、pMW118(宝バイオ社製)に λ ファージのアタッチメントサイトであるattL及びattR遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドであり、attL-K^{mr}-attRの順で挿入されている。

[0108] 増幅したPCR産物を精製し、パントエア・アナナティス染色体への λ 依存インテグレーションに用いた。ヘルパープラスミドRSF-Red-TERを、 λ ファージRed遺伝子の担体として使用した。パントエア・アナナティスのエレクトロコンピテント細胞を得るために、RSF-Red-Terプラスミドで形質転換しS C 1 7 (0) 株を50 μ g / m l のクロラムフェニコールを含むLB培地で34°Cで一夜培養した。続いて、培養液を50 μ g / m l のクロラムフェニコールを含む新鮮なLB培地で100倍に希釈し、O D₆₀₀が0. 3になるまで34°Cで通気下で生育させた。その後、IPTGを1

mM添加し、 OD_{600} が0.7になるまで培養を続けた。10mMのサンプルを等量の脱イオン水で3回洗浄し、40 μ lの冷10%グリセロールに懸濁させた。エレクトロポレーションの直前に、5 μ lの脱イオン水に溶解させたインビトロ増幅DNA断片100–200ngを細胞懸濁液に加えた。作業は、細菌エレクトロポレーション装置（「BioRad」米国、カタログ番号165–2089、バージョン2–89）を用いて行った。

[0109] エレクトロポレーション後、直ちにグルコース（0.5%）を補填した1mlのLB培地を細胞懸濁液に加えた。そして、細胞を34°Cで2時間通気下で生育させ、25 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB固体培地にプレートし、34°Cで一夜インキュベートした。選択された Km^R のインテグラントを、IPTG（1mM）及びスクロース（5g/L）を添加したLB培地プレートにストリークし、34°Cで生育させて単一コロニーを形成させた。RSF–Red–TERヘルパープラスミドをインテグラントから除去するために、 Km^R 、 Cm^S バリエーションを単離した。カナマイシン耐性遺伝子によって識別できるc1129及びc1705遺伝子の欠失を含む変異体を、配列番号19と20及び配列番号21と22に示す合成DNAを用いたPCRによって確認した。c1129及びc1705遺伝子欠損株であるSC17(0) Δ c1129及びSC17(0) Δ c1705の細胞のDNAを鋳型にして得られたPCR産物の長さはSC17(0)株より長く、c1129及びc1705遺伝子内部にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることが確認され、c1129及びc1705遺伝子が欠損されていることを確認できた。カナマイシン耐性遺伝子が挿入されたc1129及びc1705破壊株をそれぞれSC17(0) Δ c1129株、SC17(0) Δ c1705株と名づけた。

[0110] この菌株からゲノムDNAを抽出し、エレクトロポレーションによりNA1株（WO 2008/090770）を形質転換した。NA1株は、AJ13601株（特開平2001–333769号公報参照）より、RSFCPGおよびpSTVCBの2つのプラスミドを除去し、L–グルタミン酸生産用プラスミドRSFPPGプラスミド（WO 2008/090770）を導入

することで取得した。なお、AJ13601株は、1999年8月18日に経済産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番3号）に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブタペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。また、RSFCPGおよびpSTVGBの両プラスミドは、特開2001-333769号公報に記載されているプラスミドである。RSFCPGは、エシェリヒア・コリ由来のgl tA、ppc、gdhAの各遺伝子を含むプラスミドである。pSTVGBは、pSTV29（宝酒造（株））にブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のgl tA遺伝子が挿入されたプラスミドである。

- [0111] SC17(0) Δ c1129及び SC17(0) Δ c1705のゲノムDNAを導入したNA1株を、L培地（バクトトリプトン10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g、寒天15 gを純水1Lに含む培地、pH7.0）に、最少培地成分（グルコース0.5g、硫酸マグネシウム2mM、リン酸一カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g 塩化アンモニウム1g リン酸2ナトリウム6gを純水1Lに含む培地）、および、40mg/Lのカナマイシン、12.5mg/Lのテトラサイクリン塩酸塩と25mg/Lのクロラムフェニコールを添加したプレートにて選択し、約20個のコロニーを形質転換体として取得した。これらの株はc1129遺伝子上、あるいはc1709遺伝子上に λ attL-Km^r- λ attR-Ptacの断片が挿入されており、そのうちのそれぞれ1クローンを選び、NA1 Δ c1129、NA1 Δ c1705と名付けた。

実施例 5

- [0112] <パントエア・アナナティス L-グルタミン酸生産株での c 1 1 2 9 遺伝子、及び c 1 7 0 5 遺伝子欠損の効果>
- c 1 1 2 9 及び c 1 7 0 5 遺伝子破壊の L-グルタミン酸発酵への効果を検討するため、NA1 Δ c1129株及びNA1 Δ c1705株を、NA1株を対照として培養し、L-グルタミン酸生産量を測定した。以下に、そのための培地および培養方法ならびに分析方法を示す。
- [0113] NA1 Δ c1129株、NA1 Δ c1705株及び対照株NA1をLBGM9培地に植菌し、34°Cで一晩前培養した。LBGM9培地組成は、Bacto Tryptone 10g/L, YE 5g/L, NaCl

10g/L, NaOH 40mg/L, Na₂HPO₄ 6g/L, KH₂PO₄ 3g/L, NaCl 0.5g/L, NH₄Cl 1g/L, Glc5g/L, 寒天15g/L である。プレート1/8枚分の菌体を試験管5mlの培養下記組成のグルコース培地に植菌し、34℃にて24時間培養した。培養後、培地中に蓄積したL-グルタミン酸を、バイオテックアナライザー（サクラ精機）により測定した。

[0114] [グルコース培地組成]

グルコース	30g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/L
KH ₂ PO ₄	2.0g/L
酵母エキス	2.0g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.02g/L
Thiamine HCl	0.01g/L
リジン	0.2g/L
メチオニン	0.2g/L
ジアミノピメリン酸	0.2g/L
炭酸カルシウム	20g/L

pH7.0 (KOHで調整) 殺菌条件：115℃、10分

[0115] 結果を表3に示す。対照のNA1に比べ、c1129遺伝子を破壊したNA1 Δc1129及びc1705遺伝子を破壊したNA1 Δc1705では、L-グルタミン酸 (Glu) の収率が大幅に向上した。

[0116] [表3]

表3. パントエア・アナナティスL-グルタミン酸生産菌NA1におけるc1129及びc1705の欠損効果

株名	OD (600 nm)	Glu濃度 (g/l)
NA1	21.9	7.1
NA1 Δc1129	23.5	8.6
NA1 Δc1705	22.5	9.0

実施例 6

[0117] エシエリヒア属細菌 L-スレオニン生産株での ydcI 増幅の効果

エシエリヒア・コリの L-スレオニン生産株として、エシエリヒア・コリ VKPM B-5318 株 (欧州特許第 0593792 号明細書参照) を用いることができる。この VKPM B-5318 株 (以下、「B-5318」と記載する) は、イソロイシン非要求性菌株であり、ラムダファージの温度感受性 C1 リプレッサー、PR プロモーターおよび Cro タンパク質の N 末端部分の下流に、本来持つ転写調節領域であるアテナニューエーター領域を欠失したスレオニンオペロンすなわちスレオニン生合成関与遺伝子が位置し、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるように構築された組換えプラスミド DNA を保持している。

[0118] B-5318 株における y d c I 遺伝子の欠失は実施例 1 に示す方法に従って行い、その結果 B-5318 Δ ydcI 株が得られる。

[0119] B-5318 Δ ydcI 株を 25 mg/L のカナマイシンを含む LB 培地にて OD600 が約 0.6 となるまで 37°C にて培養した後、培養液と等量の 40% グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注、-80°C に保存し、グリセロールストックとする。

[0120] これらの株のグリセロールストックを融解し、各 100 μ L を、25 mg/L のクロラムフェニコールを含む L プレートに均一に塗布し、37°C にて 24 時間培養する。得られたプレートのおよそ 1/8 量の菌体を、500 mL 容坂口フラスコの、25 mg/L のクロラムフェニコールを含む以下に記載の発酵培地 20 mL に接種し、往復振とう培養装置で 40°C において 18 時間培養する。培養後、培地中に蓄積した L-スレオニンの量をアミノ酸アナライザー L-8500 (Hitachi 社製) を用いて測定する。培養に用いる培地組成を以下に示す。

[0121] [エシエリヒア属細菌 L-スレオニン生産培地]

グルコース	40g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16g/L
KH ₂ PO ₄	1.0g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g/L

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g/L
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g/L
Yeast Extract	2.0g/L
CaCO ₃ (日本薬局方)	30g/L

KOHでpH7.0に調整し、120°Cで20分オートクレーブを行う。但し、グルコースとMgSO₄ · 7H₂Oは混合し、別殺菌する。CaCO₃は乾熱滅菌後に添加する。

[0122] ydcI欠損株B-5318ΔydcIは、対照のB-5318と比べて、生育とL-スレオニンの蓄積が上昇する。

[0123] [配列表の説明]

配列番号1 : E. coliのydcI遺伝子の塩基配列

配列番号2 : E. coliのydcI遺伝子によってコードされるアミノ酸配列

配列番号3 : attLの塩基配列

配列番号4 : attRの塩基配列

配列番号5 : ydcI破壊用5'プライマーの塩基配列

配列番号6 : ydcI破壊用3'プライマーの塩基配列

配列番号7 : ydcI破壊検出用5'プライマーの塩基配列

配列番号8 : ydcI破壊検出用3'プライマーの塩基配列

配列番号9 : E. coliのsucA遺伝子の塩基配列

配列番号10 : E. coliのsucA遺伝子によってコードされるアミノ酸配列

配列番号11 : パントエア・アナナティスのc1129遺伝子の塩基配列

配列番号12 : パントエア・アナナティスのc1129遺伝子によってコードされるアミノ酸配列

配列番号13 : パントエア・アナナティスのc1705遺伝子の塩基配列

配列番号14 : パントエア・アナナティスのc1705遺伝子によってコードされるアミノ酸配列

配列番号15 : c1129破壊用5'プライマーの塩基配列

配列番号 16 : c 1 1 2 9 破壊用 3' プライマーの塩基配列

配列番号 17 : c 1 1 2 9 破壊検出用 5' プライマーの塩基配列

配列番号 18 : c 1 1 2 9 破壊検出用 3' プライマーの塩基配列

配列番号 19 : c 1 7 0 5 破壊用 5' プライマーの塩基配列

配列番号 20 : c 1 7 0 5 破壊用 3' プライマーの塩基配列

配列番号 21 : c 1 7 0 5 破壊検出用 5' プライマーの塩基配列

配列番号 22 : c 1 7 0 5 破壊検出用 3' プライマーの塩基配列

請求の範囲

- [請求項1] L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の生産能を有し、かつ、y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化するように変更された腸内細菌科に属する細菌。
- [請求項2] y d c l遺伝子の発現量を減少させることまたはy d c l遺伝子を破壊することにより、y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が弱化された、請求項1に記載の細菌。
- [請求項3] y d c l遺伝子によりコードされるタンパク質が、配列番号2、12または14に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2、12または14において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、DNA結合活性を有するタンパク質である、請求項1または2に記載の細菌。
- [請求項4] 前記y d c l遺伝子が、下記(a)または(b)に記載のDNAである、請求項1～3のいずれかに記載の細菌：
- (a) 配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218に示す塩基配列を含むDNA、
- (b) 配列番号1の301-1221、配列番号11の301-1230または配列番号13の301-1218に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、DNA結合活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- [請求項5] エシェリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌またはパントエア属細菌である請求項1～4のいずれか一項に記載の細菌。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか一項に記載の細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体より

前記L-アミノ酸を回収することを特徴とする、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-スレオニンから選択されるL-アミノ酸の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P13/10(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)n		
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) C12N15/09, C12N1/21, C12P13/10, C12P13/14, C07K14/195		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	BABA, T., et al., Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection., Molecular Systems Biology, 2006, Vol.2, p.1-11	1-5/6
X/A	Database GenoBase [online], [retrieved on 2009-10-01]. < http://ecoli.naist.jp/GB6/info.jsp?id=JW5226 > ECK No.: ECK1416, Gene name: ydcI, Description:predicted DNA-binding transcriptional regulator.	1-5/6
A	WO 2007/100009 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 07 September, 2007 (07.09.07), & JP 2009-118740 A & US 2009/0093029 A & EP 2003209 A1	1-6
<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 01 October, 2009 (01.10.09)	Date of mailing of the international search report 13 October, 2009 (13.10.09)	
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.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P13/10(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)n		
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.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12P13/10, C12P13/14, C07K14/195		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年		
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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, UniProt/GenSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed		
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 請求項の番号
X/ A	BABA, T., et al., Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection., Molecular Systems Biology, 2006, Vol.2, p.1-11	1-5/ 6
X/ A	Database GenoBase [online], [retrieved on 2009-10-01]. < http://ecoli.naist.jp/GB6/info.jsp?id=JW5226 > ECK No.: ECK1416, Gene name: ydcI, Description: predicted DNA-binding transcriptional regulator.	1-5/ 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01. 10. 2009	国際調査報告の発送日 13. 10. 2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3963

C (続き) . 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 請求項の番号
A	WO 2007/100009 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2007.09.07, & JP 2009-118740 A & US 2009/0093029 A & EP 2003209 A1	1-6