

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6938795号
(P6938795)

(45) 発行日 令和3年9月22日 (2021.9.22)

(24) 登録日 令和3年9月3日 (2021.9.3)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53	
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N 9/06	Z N A B
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 13/12 (2006.01)	C 1 2 P 13/12	A
C 1 2 P 13/06 (2006.01)	C 1 2 P 13/06	C
請求項の数 15 (全 29 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-542785 (P2020-542785)	(73) 特許権者	508139664
(86) (22) 出願日	令和1年5月21日 (2019.5.21)		シージェイ チェイルジェダン コーポレーション
(65) 公表番号	特表2021-513341 (P2021-513341A)		C J C H E I L J E D A N G C O R P O R A T I O N
(43) 公表日	令和3年5月27日 (2021.5.27)		大韓民国ソウル市中区東湖路330 シージェイ チェイル ジェダンセンター
(86) 国際出願番号	PCT/KR2019/006083		C J C h e i l j e d a n g C e n t e r , 3 3 0 , D o n g h o - r o , J u n g - g u , S e o u l , R e p u b l i c O f K o r e a
(87) 国際公開番号	W02019/231159		
(87) 国際公開日	令和1年12月5日 (2019.12.5)	(74) 代理人	110000176
審査請求日	令和2年8月7日 (2020.8.7)		一色国際特許業務法人
(31) 優先権主張番号	10-2018-0060445		
(32) 優先日	平成30年5月28日 (2018.5.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		
微生物の受託番号	KCCM KCCM12119P		
微生物の受託番号	KCCM KCCM12120P		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ、及びそれを用いたホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列において、285番目のアミノ酸がイソロイシンに置換されるか、398番目のアミノ酸がグルタミンに置換されるか、又はそれらの組み合わせにより置換された変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ。

【請求項2】

前記配列番号1のアミノ酸配列において、さらに378番目のアミノ酸がトリプトファンに置換された、請求項1に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】

請求項1または2に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項1または2に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むコリネバクテリウム属微生物。

【請求項5】

前記コリネバクテリウム属微生物は、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を生産する、請求項4に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項6】

前記ホモセリン由来L-アミノ酸は、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチルホモセリン及びL-メチオニンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求

10

20

項 5 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 7】

前記コリネバクテリウム属微生物は L-アラニンを生産する、請求項 4 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 8】

前記コリネバクテリウム属微生物はコリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項 4 に記載のコリネバクテリウム属微生物。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の微生物を培地で培養する工程と、前記培養した微生物又は培養した培地からホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸を回収する工程とを含む、ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の生産方法。

10

【請求項 10】

前記ホモセリン由来 L-アミノ酸は、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン及び L-メチオニンからなる群から選択される少なくとも 1 種である、請求項 9 に記載のホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の生産方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸生産用組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコリネバクテリウム属微生物から培養するステップを含む、ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の排出増加方法。

20

【請求項 13】

ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、請求項 1 に記載の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの使用。

【請求項 14】

ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、請求項 3 に記載のポリヌクレオチドの使用。

【請求項 15】

ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、請求項 4 に記載のコリネバクテリウム属微生物の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼに関し、具体的にはホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであって、前記アミノ酸置換は、285 番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398 番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、もしくはそれらの組み合わせを含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ、それを用いてホモセリンもしくはホモセリン由来 L-アミノ酸を生産する方法、ホモセリンもしくはホモセリン由来 L-アミノ酸生産用組成物、ホモセリンもしくはホモセリン由来 L-アミノ酸の排出増加方法、又は前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの用途に関する。

40

【背景技術】

【0002】

L-アミノ酸のうち L-トレオニン、L-イソロイシン及び L-メチオニンは、アスパラギン酸セミアルデヒド (aspartate-semialdehyde, 以下、ASA) からホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase, 以下、Hom, EC: 1. 1. 1. 3) により生成されたホモセリンを共通に用いる。よって、前記アミノ酸を発酵法により生産するためには、生合成経路で用いられる酵素の活性を一定レベル以上に維持することは必須で

50

あり、それについての集中的な研究が行われてきた。

【0003】

特に、L-リシン及びL-トレオニン生合成経路の分岐点で作用するホモセリンデヒドロゲナーゼは、L-トレオニン及びL-イソロイシンにより活性が調節されることが知られている。L-トレオニンによるフィードバック阻害が脱感作されたHom及びそれを用いたL-トレオニンの生産方法については従来から複数の報告がある。1991年にドイツのEikmannsらは、Homの378番目のアミノ酸残基であるグリシンがグルタミン酸に置換されて脱感作されたHomを報告しており（非特許文献1）、1991年に米国のArcherらは、フレームシフト突然変異によりHomのC末端が損傷を受けると脱感作特性を示すことを報告している（非特許文献2）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】 韓国登録特許第0159812号公報

【特許文献2】 韓国登録特許第10-0057684号公報

【特許文献3】 韓国登録特許第10-0924065号公報

【特許文献4】 韓国公開特許第2008-0025355号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 Eikmanns BJ et al., Appl. Microbial Biotechnol. 34: 617-622, 1991 20

【非特許文献2】 Archer JA et al., Gene 107: 53-59, 1991

【非特許文献3】 J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989

【非特許文献4】 F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York

【非特許文献5】 Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8

【非特許文献6】 Appl. Environ. Microbiol., Dec. 1996, p.4345-4351

【非特許文献7】 Peoples et al., Mol. Biol. 2(1):63-72, 1988

【非特許文献8】 Takeda et al., Hum. Mutation, 2, 112-117 (1993) 30

【非特許文献9】 J. Biotechnol. 103:51-65, 2003

【非特許文献10】 van der Rest et al., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、トレオニンによるフィードバック阻害の脱感作に関する研究を重ねた結果、変異型Homをコードする新規遺伝子を分離し、前記新規遺伝子が形質導入された微生物においてL-アミノ酸生産能が向上することを確認し、本出願を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本出願は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸もしくは398番目のアミノ酸の他のアミノ酸への置換、又はそれらの組み合わせによる置換を含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供することを目的とする。

【0008】

また、本出願は、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを提供することを目的とする。

【0009】

50

さらに、本出願は、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むコリネバクテリウム属微生物を提供することを目的とする。

【0010】

さらに、本出願は、前記微生物を培地で培養するステップと、前記培養された微生物又は培地からホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を回収するステップとを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産方法を提供することを目的とする。

【0011】

さらに、本出願は、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産用組成物を提供することを目的とする。

【0012】

さらに、本出願は、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコリネバクテリウム属微生物から培養するステップを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の排出増加方法を提供することを目的とする。

【0013】

さらに、本出願は、本出願のホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの用途を提供することを目的とする。

【0014】

さらに、本出願は、本出願のホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記ポリヌクレオチドの用途を提供することを目的とする。

【0015】

さらに、本出願は、本出願のホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記コリネバクテリウム属微生物の用途を提供することを目的とする。

【発明の効果】

【0016】

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、天然又は野生型に比べて最終産物によるフィードバック阻害が脱感作されるので、より効率的なホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の大量生産に広く活用することができる。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、これらを具体的に説明する。なお、本出願で開示される各説明及び実施形態はそれぞれ他の説明及び実施形態にも適用される。すなわち、本出願で開示される様々な要素のあらゆる組み合わせが本出願に含まれる。また、以下の具体的な記述に本出願が限定されるものではない。

【0018】

前記目的を達成するための本出願の一態様は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸もしくは398番目のアミノ酸の他のアミノ酸への置換、又はそれらの組み合わせによる置換を含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供する。

【0019】

具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、又はそれらの組み合わせによる置換を含むホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体を提供する。より具体的には、配列番号1のアミノ酸配列において、285番目のアミノ酸がイソロイシンに置換されるか、398番目のアミノ酸がグルタミンに置換されるか、又はそれらの組み合わせにより置換された変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを提供する。

【0020】

本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase, EC:1.1.1.3) とは、植物、微生物においてメチオニン、トレオニン、イソロイシン生合成の共通の中間物質であるホモセリンの合成を触媒する酵素を意味し、ホモセリン脱水素酵素ともいう。本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼは、前記変換活性を有するタンパク質であればその由来はいかなるものでもよく、任意の有機体（植物、微生物など）に由来する酵素を用いることができる。具体的には、前記ホモセリンデヒドロゲナーゼは、コリネバクテリウム属微生物由来であってもよく、より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム (corynebacterium glutamicum) 由来であってもよい。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質と混用されてもよい。

10

【0021】

本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼを確保する方法には、当該分野で周知の様々な方法を適用することができる。その方法の例として、タンパク質発現に通常広く用いられるコリネバクテリウム属微生物からタンパク質を高効率で確保できるように、コドン最適化をはじめとする遺伝子合成技術や、微生物の大量のゲノム情報に基づいた生物情報学的方法による有用酵素資源のスクリーニングにより確保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

【0022】

本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列、例えば配列番号1のアミノ酸配列、アミノ酸配列の前後の無意味な配列付加、自然に発生する突然変異、又はその非表現突然変異 (silent mutation) を除外するものではなく、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質と同一又は相当する活性を有するものであれば、本願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に含まれる。具体的には、本願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列、又はそれと80%、90%、95%もしくは97%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。

30

【0023】

また、本出願において「特定配列番号で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質又はポリペプチド」と記載されているとしても、そのような相同性を有して前記タンパク質に相当する効能を示すアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本出願に含まれることは言うまでもない。例えば、本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質は、コリネバクテリウム・グルタミカム (corynebacterium glutamicum) 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼであってもよい。より具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号1)、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 14067 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号49)、又はコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13869 由来のホモセリンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列 (配列番号50) であってもよい。前記配列を有するホモセリンデヒドロゲナーゼは、互いに80%、90%、95%又は97%以上の相同性を示し、ホモセリンデヒドロゲナーゼに相当する効能を示すので、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に含まれることは言うまでもない。

40

【0024】

前記「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド部分 (moiety) 間の同一性の割合を意味する。与えられたアミノ酸配列又は塩基配列に一致する程度を意味し、百分率で表されてもよい。本明細書において、与えられたアミノ酸配列又は塩基配列と同一又は類似の活性を有するその相同性配列は「%相同性」で表される。一部分から他の部分までの配列間の相同性は周知の当該技術により決定されてもよい。例えば、スコア (sc

50

ore)、同一性(identity)、類似度(similarity)などのパラメーター(parameter)を計算する標準ソフトウェア、具体的にはBLAST 2.0を用いるか、定義されたストリンジェントな条件下にてサザンハイブリダイゼーション実験で配列を比較することにより確認することができ、定義される好適なハイブリダイゼーション条件は当該技術の範囲内であり、当業者に周知の方法(例えば、非特許文献3、4)で決定されてもよい。

【0025】

本出願における「変異」、「変異型」又は「変異体」とは、遺伝的又は非遺伝的に1つの安定した表現型の変化を示す培養物や個体を意味する。具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に対応するアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸が変異し、その活性が野生型、天然又は非変異のものと比較して効率的に増加した変異体や、イソロイシン、トレオニン、それらのアナログ又は誘導体に対するフィードバック阻害が解除された変異体や、活性増加とフィードバック阻害の解除の両方がもたらされた変異体を意味する。

10

【0026】

本出願における変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、「変異したホモセリンデヒドロゲナーゼ」や「ホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体」と混用されてもよい。なお、このような変異体は、天然に存在しない(non-naturally occurring)ものであってもよい。

【0027】

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、具体的には、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型タンパク質であって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、又はそれらの組み合わせを含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであってよい。前記ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列は、前述した通りであり、例えば配列番号1のアミノ酸配列であってよい。また、前記285番目のアミノ酸は、トレオニンがイソロイシンに置換されたものであってもよく、前記398番目のアミノ酸は、アルギニンがグルタミンに置換されたものであってもよい。

20

【0028】

さらに、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型タンパク質であって、前記アミノ酸置換は、378番目のアミノ酸のトリプトファンへの置換を含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであってよい。さらに、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型タンパク質であって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、又はそれらの組み合わせによる置換を含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼが、さらに378番目のアミノ酸のトリプトファンへの置換を含むものであってもよい。より具体的には、前記378番目のアミノ酸は、グリシンがトリプトファンに置換されたものであってもよい。

30

【0029】

さらに具体的には、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、配列番号1のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型タンパク質であって、前記アミノ酸置換は、285番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、又はそれらの組み合わせを含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであってよい。例えば、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、配列番号10、11、12又は13のアミノ酸配列を含むタンパク質であってよい。また、前記配列の前後の無意味な配列付加、自然に発生する突然変異、又はその非表現突然変異(silent mutation)を除外するものではなく、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼと同一又は相当する活性を有するものであれば、本願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質に含まれる。具体的には、本願の変異型ホモ

40

50

セリンデヒドロゲナーゼは、配列番号10、11、12もしくは13のアミノ酸配列、又はそれと80%、90%、95%もしくは97%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本出願において「特定配列番号で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質又はポリペプチド」と記載されているとしても、そのような相同性を有して前記タンパク質に相当する効能を示すアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本出願に含まれることは言うまでもない。

【0030】

また、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸置換を含むポリペプチドを有する変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼであって、285番目のアミノ酸又は398番目のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異を含み、ホモセリンデヒドロゲナーゼに相当する効能を示すタンパク質も本出願に含まれることは言うまでもない。

【0031】

さらに、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼは、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有する野生型又は天然タンパク質や非変性タンパク質とは異なり、最終産物であるイソロイシン、トレオニン、メチオニン、ホモセリン又はそれらの誘導体もしくはアナログによるフィードバック阻害が解除又は脱感作された特徴を有するものであってもよい。本出願における「フィードバック阻害(feedback inhibition)」とは、代謝の最終産物がそれより前の段階の反応を阻害することを意味する。よって、ホモセリンデヒドロゲナーゼのフィードバック阻害を解除又は脱感作すると、そうしていないものに比べて微生物のホモセリン及びホモセリン由来L-アミノ酸の生産性を向上させることができる。

【0032】

前記ホモセリン由来L-アミノ酸とは、L-ホモセリンを前駆体として生合成されるL-アミノ酸を意味し、L-ホモセリンから生合成される物質であればいかなるものでもよい。前記ホモセリン由来L-アミノ酸は、ホモセリン由来L-アミノ酸だけでなく、その誘導体も含まれる。例えば、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン、O-ホスホ-L-ホモセリン、L-メチオニン及び／又はL-グリシンであってもよいが、これらに限定されるものではない。より具体的には、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン及び／又はL-メチオニンであってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0033】

本出願の他の態様は、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0034】

前記ホモセリンデヒドロゲナーゼ、変異型については前述した通りである。

【0035】

本出願における「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチド単量体(monomer)が共有結合により長く鎖状につながったヌクレオチドの重合体(polymer)であって、所定の長さより長いDNA又はRNA鎖であり、より具体的には前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチド断片を意味する。本出願の変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有する変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であればいかなるものでもよい。

【0036】

本出願におけるホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、具体的にはコリネバクテリウム属微生物由来であってもよく、より具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカム由来であってもよい。しかし、これらに限定されるものではない。

【0037】

また、前記タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、コドンの縮退 (degeneracy) により、又は前記タンパク質を発現させようとする生物において好まれるコドンを検討して、タンパク質のアミノ酸配列が変化しない範囲でコード領域に様々な改変を行うことができる。具体的には、前記タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列、又はそれと 80 %、90 %、95 % もしくは 97 % 以上の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであってもよい。また、そのような相同性を有して実質的に前記タンパク質と同一又は相当する効能を示すタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列であれば、一部の配列が欠失、改変、置換又は付加されたポリヌクレオチド配列も本出願に含まれることは言うまでもない。本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列であってもよい。例えば、配列番号 48 のポリヌクレオチド配列であってもよいが、これに限定されるものではない。また、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であってもよく、具体的には配列番号 10、11、12 又は 13 をコードするポリヌクレオチド配列であってもよい。例えば、配列番号 6、7、8、9 のポリヌクレオチド配列であってもよいが、これらに限定されるものではない。

【0038】

あるいは、公知の遺伝子配列から調製されるプローブ、例えば前記ポリヌクレオチド配列の全部又は一部に対する相補配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズすることにより、本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質をコードする配列であればいかなるものでもよい。前記「ストリンジントな条件」とは、ポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。このような条件は文献 (例えば、非特許文献 5) に具体的に記載されている。例えば、相同性の高い遺伝子同士、80 % 以上、具体的には 90 % 以上、より具体的には 95 % 以上、さらに具体的には 97 % 以上、特に具体的には 99 % 以上の相同性を有する遺伝子同士をハイブリダイズし、それより相同性の低い遺伝子同士をハイブリダイズしない条件、又は通常のサザンハイブリダイゼーションの洗浄条件である 60 °C、1 × SSC、0.1 % SDS、具体的には 60 °C、0.1 × SSC、0.1 % SDS、より具体的には 68 °C、0.1 × SSC、0.1 % SDS に相当する塩濃度及び温度において、1 回、具体的には 2 回～3 回洗浄する条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、たとえハイブリダイゼーションの厳格さに応じて塩基間のミスマッチ (mismatch) が可能であっても、2 つのポリヌクレオチドが相補的配列を有することが求められる。「相補的」とは、互いにハイブリダイゼーションが可能なヌクレオチド塩基間の関係を表すために用いられるものである。例えば、DNA において、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。よって、本出願には、実質的に類似したヌクレオチド配列だけでなく、全配列に相補的な単離されたヌクレオチド断片が含まれてもよい。具体的には、相同性を有するポリヌクレオチドは、55 °C の T_m 値でハイブリダイゼーションステップが行われるハイブリダイゼーション条件と前述した条件を用いて検知することができる。また、前記 T_m 値は、60 °C、63 °C 又は 65 °C であってもよいが、これらに限定されるものではなく、その目的に応じて当業者により適宜調節されてもよい。ポリヌクレオチドをハイブリダイズする適切な厳格さはポリヌクレオチドの長さ及び相補性の程度に依存し、変数は当該技術分野で公知である (非特許文献 5 参照)。

【0039】

本出願のさらに他の態様は、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物を提供する。具体的には、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、ホモセリン又はホモセリン由来 L-アミノ酸を生産するコリネバクテリウム属 (the genus of *Corynebacterium*) 微生物を提供する。また、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、L-アラニンを生産するコリネバクテリウム属 (the genus of *Corynebacterium*) 微生物を提供する。しかし、これらに限定されるものではない。

【0040】

前記ホモセリンデヒドロゲナーゼ、変異体については前述した通りである。

【0041】

具体的には、本出願における変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物とは、自然にホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産能を有する微生物、又はホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産能のない親株にホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産能が付与された微生物を意味する。より具体的には、前記ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、配列番号1のアミノ酸配列において、285番目のアミノ酸のイソロイシンへの置換、398番目のアミノ酸のグルタミンへの置換、又はそれらの組み合わせによる置換を含む変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現する微生物であってもよいが、これらに限定されるものではない。前記微生物は、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを含むか、又は変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換されて変異型ポリペプチドを発現する細胞又は微生物であり、本出願の目的上、前記宿主細胞又は微生物は、前記変異型ポリペプチドを含み、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を生産する微生物であればいかなるものでもよい。

10

【0042】

本出願の変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、野生型又は非変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性を有するタンパク質を含む微生物に比べて、ホモセリン、ホモセリン由来L-アミノ酸又はL-アラニンの生産能が向上するので、これらの微生物からホモセリン、ホモセリン由来L-アミノ酸又はL-アラニンを高収率で得ることができる。

20

【0043】

本出願における前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、その種類が特に限定されるものではなく、エンテロバクター (Enterbacter) 属、エシェリキア (Escherichia) 属、エルウィニア (Erwinia) 属、セラチア (Serratia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属及びブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属に属する微生物であってもよい。より具体的には、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属に属する微生物であってもよい。

30

【0044】

本出願における「コリネバクテリウム属微生物」とは、具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum)、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (Corynebacterium thermoaminogenes)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (Corynebacterium efficiens) などであるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。より具体的には、本出願におけるコリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) であってもよい。

【0045】

一方、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが導入された微生物であってもよい。具体的には、前記導入は、形質転換により行われてもよいが、これに限定されるものではない。

40

【0046】

本出願における「ベクター」とは、好適な宿主内で標的タンパク質を発現させることができるように、好適な調節配列に作動可能に連結された前記標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA産物を意味する。前記調節配列には、転写を開始するプロモーター、その転写を調節するための任意のオペレータ配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列が

50

含まれてもよい。ベクターは、好適な宿主細胞内に形質転換されると、宿主ゲノムに関係なく複製又は機能することができ、ゲノム自体に組み込まれる。

【0047】

本出願に用いられるベクターは、宿主細胞内で複製可能なものであれば特に限定されるものではなく、当該技術分野で公知の任意のベクターを用いることができる。通常用いられるベクターの例としては、天然状態又は組換え状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージが挙げられる。例えば、ファージベクター又はコスミドベクターとしては、pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、Charon21Aなどを用いることができ、プラスミドベクターとしては、pBR系、pUC系、pBluescriptII系、pGEM系、pTZ系、pCL系、pET系などを用いることができる。具体的には、pACYC177、pACYC184、pCL、pECG117、pUC19、pBR322、pMW118、pCC1BACベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

【0048】

本出願に使用可能なベクターは、特に限定されるものではなく、公知の発現ベクターを用いることができる。また、細胞内染色体挿入用ベクターにより、染色体内に標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することができる。前記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当該技術分野で公知の任意の方法、例えば相同組換えにより行うことができるが、これに限定されるものではない。前記染色体に挿入されたか否かを確認するための選択マーカー (selection marker) をさらに含んでもよい。選択マーカーは、ベクターで形質転換された細胞を選択、すなわち標的ポリヌクレオチド分子が挿入されたか否かを確認するためのものであり、薬物耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性、表面タンパク質の発現などの選択可能表現型を付与するマーカーが用いられてもよい。選択剤 (selective agent) で処理した環境においては、選択マーカーを発現する細胞のみ生存するか、異なる表現形質を示すので、形質転換された細胞を選択することができる。

【0049】

本出願における「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に導入することにより、宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現させることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内で発現するものであれば、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置するか、染色体外に位置するかに関係なく、それらが全て含まれるものである。また、前記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNAやRNAを含むものである。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現するものであれば、いかなる形態で導入されるものでもよい。例えば、前記ポリヌクレオチドは、自ら発現する上で必要な全ての要素を含む遺伝子構造体である発現カセット (expression cassette) の形態で宿主細胞に導入されてもよい。通常、前記発現カセットは、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター (promoter)、転写終結シグナル、リボソーム結合部位及び翻訳終結シグナルを含む。前記発現カセットは、自己複製可能な発現ベクターの形態であってもよい。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞において発現に必要な配列と作動可能に連結されたものであってもよいが、これに限定されるものではない。前記形質転換する方法は、ポリヌクレオチドを細胞内に導入するいかなる方法であってもよく、当該分野において公知であるように、宿主細胞に適した標準技術を選択して行うことができる。例えば、エレクトロポレーション (electroporation)、リン酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 CaHPO_4 、又は $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 沈殿、塩化カルシウム (CaCl_2) 沈殿、微量注入法 (microinjection)、ポリエチレングリコール (PEG) 法、DEAE-デキストラン法、カチオン性リポソーム法、酢酸リチウム-DMSO法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0050】

また、前記「作動可能に連結」されたものとは、本出願の標的タンパク質をコードする

ポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介するプロモーター配列と前記ポリヌクレオチド配列が機能的に連結されたものを意味する。作動可能な連結は当該技術分野で公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することができ、部位特異的DNA切断及び連結は当該技術分野の切断及び連結酵素などを用いて作製することができるが、これらに限定されるものではない。

【0051】

前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む微生物は、コリネバクテリウム属微生物が前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むように形質転換されたものであってもよい。前記コリネバクテリウム属微生物には、例えば2-amino-3-hydroxy-valerate (AHV) に耐性を有する菌株、トレオニン生合成経路において最初の重要な酵素として作用するaspartate kinase (lysC) のフィードバック阻害 (feedback inhibition) を解除するために、lysCの377番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) がリシン (Lysine) に置換され、L-トレオニンを生産する菌株、前記L-トレオニンを生産する菌株においてL-トレオニンデヒドラターゼ (L-threonine dehydratase, isoleucine生合成経路の最初の酵素) をコードする遺伝子ilvAの323番目のアミノ酸がアラニンに置換され、L-イソロイシンを生産する菌株 (非特許文献6)、O-アセチルホモセリン分解経路のO-アセチルホモセリンチオールリアーゼ (O-acetylhomoserine(thiol)-lyase) 及びシスタチオニンγ-シンターゼ (cystathionine gamma-synthase) タンパク質が不活性化され、O-アセチルホモセリンを生産する菌株、又はメチオニンシステイン転写調節因子タンパク質が不活性化され、メチオニンを生産する菌株が含まれてもよいが、これらに限定されるものではない。

【0052】

本出願のさらに他の態様は、前記微生物を培地で培養するステップと、前記培養した微生物又は培養した培地からホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を回収するステップとを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産方法を提供する。

【0053】

前記微生物は、前述したように、本出願のホモセリンデヒドロゲナーゼ変異体を含むコリネバクテリウム属微生物であってもよく、より具体的にはコリネバクテリウム・グルタミカムであってもよい。また、前記コリネバクテリウム属微生物又はコリネバクテリウム・グルタミカムは、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を生産する微生物であってもよい。前記ホモセリン由来L-アミノ酸には、ホモセリン由来L-アミノ酸だけでなく、その誘導体も含まれる。例えば、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン、O-ホスホ-L-ホモセリン、L-メチオニン及び／又はL-グリシンであってもよいが、これらに限定されるものではない。より具体的には、L-トレオニン、L-イソロイシン、O-アセチル-L-ホモセリン、O-スクシニル-L-ホモセリン及び／又はL-メチオニンであってもよいが、これらに限定されるものではない。また、前記コリネバクテリウム属微生物又はコリネバクテリウム・グルタミカムは、L-アラニンを生産する微生物であってもよい。

【0054】

前記ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸は、本出願の前記微生物が生産したホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の培養液、又は精製した形態であってもよい。また、それ自体の形態だけでなく、その塩の形態も全て含まれることは当業者にとって自明である。

【0055】

前記ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を生産する方法は、当該技術分野で公知の最適化された培養条件及び酵素活性条件において当業者が容易に決定することができる。

【0056】

前記方法における前記微生物を培養するステップは、特に限定されるものではないが、公知の回分培養法、連続培養法、流加培養法などにより行うことができる。ここで、培養

10

20

30

40

50

条件は、特にこれらに限定されるものではないが、塩基性化合物（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニア）又は酸性化合物（例えば、リン酸又は硫酸）を用いて適正pH（例えば、pH 5～9、具体的にはpH 6～8、最も具体的にはpH 6.8）に調節し、酸素又は酸素含有ガス混合物を培養物に導入して好気性条件を維持することができる。培養温度は20℃～45℃、具体的には25℃～40℃に維持し、約10～160時間培養してもよいが、これらに限定されるものではない。前記培養により生産されたトレオニン、イソロイシン又はアセチルホモセリンは、培地中に分泌されるか、又は細胞内に残留する。

【0057】

また、用いられる培養用培地は、炭素供給源として糖及び炭水化物（例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、モラセス、デンプン及びセルロース）、油脂及び脂肪（例えば、大豆油、ヒマワリ油、落花生油及びココナッツ油）、脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸）、アルコール（例えば、グリセリン及びエタノール）及び有機酸（例えば、酢酸）などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。窒素供給源としては、窒素含有有機化合物（例えば、ペプトン、酵母抽出液、肉汁、麦芽抽出液、トウモロコシ浸漬液、大豆粕及びウレア）、無機化合物（例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム及び硝酸アンモニウム）などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。リン供給源としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、それらに相当するナトリウム含有塩などを個別に又は混合して用いることができるが、これらに限定されるものではない。また、培地は、その他金属塩（例えば、硫酸マグネシウム又は硫酸鉄）、アミノ酸、ビタミンなどの必須成長促進物質を含んでもよい。

【0058】

本出願の前記培養ステップで生産されたホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を回収する方法は、培養方法に応じて、当該分野で公知の好適な方法を用いて培養液から目的とする産物を回収することができる。例えば、遠心分離、濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化、HPLCなどが用いられ、当該分野で公知の好適な方法を用いて培地又は微生物から標的物質であるホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を回収することができる。また、前記回収ステップは、精製工程をさらに含んでもよく、当該分野で公知の好適な方法を用いて行うことができる。

【0059】

本出願のさらに他の態様は、変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産用組成物を提供する。

【0060】

前記ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産用組成物とは、本出願のポリヌクレオチドによりホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸を生産する組成物を意味する。例えば、前記組成物には、前記ポリヌクレオチドが含まれ、さらに前記ポリヌクレオチドを作動させることのできる構成が全て含まれる。前記ポリヌクレオチドは、導入された宿主細胞において作動可能に連結された遺伝子を発現させることができるようにベクター内に含まれる形態であってもよい。

【0061】

また、前記組成物は、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸生産用組成物に通常用いられる任意の好適な賦形剤をさらに含んでもよい。このような賦形剤としては、例えば保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0062】

本出願のさらに他の態様は、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコリネバクテリウム属微生物から培養するステップを含む、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の排出増加方法を提供する。

【0063】

前記「変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ」、「コリネバクテリウム属微生物」、「培養」及び「ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸」については前述した通りである。

【0064】

本出願のさらに他の態様は、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼの用途を提供する。

【0065】

本出願のさらに他の態様は、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドの用途を提供する。

10

【0066】

本出願のさらに他の態様は、ホモセリン又はホモセリン由来L-アミノ酸の生産用組成物の製造のための、前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼを含むコリネバクテリウム属微生物の用途を提供する。

【実施例】

【0067】

以下、実施例を挙げて本発明の構成及び効果をより詳細に説明する。これらの実施例はあくまで本発明を例示するものにすぎず、本発明がこれらの実施例に限定されるものではない。

20

【実施例1】

【0068】

人工変異法によるAHV耐性微生物のスクリーニング

本実施例においては、コリネバクテリウム・グルタミカムKFC C10881（特許文献1）を親株として、ホモセリンデヒドロゲナーゼ（homoserine dehydrogenase, 以下、Hom, EC: 1. 1. 1. 3）のL-トレオニンによるフィードバック阻害を解除するために、L-トレオニンアナログである2-amino-3-hydroxy-valerate（以下、AHV）に対する耐性を付与する実験を行った。

【0069】

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: 以下、NTG）を用いた人工変異法により変異を誘導した。種培地で18時間培養したKFC C10881菌株を種培地4mlに接種し、OD₆₆₀が約1.0になるまで培養した。培養液を遠心分離して菌体を回収し、その後50mMのTris-malate緩衝液（pH6.5）で2回洗浄し、最後に4mlの同じ緩衝液に懸濁した。菌体懸濁液に最終濃度150mg/lになるようにNTG溶液（2mg/ml in 0.05M Tris-malate緩衝液（pH6.5））を添加して室温で20分間静置し、その後遠心分離により菌体を回収し、NTG除去のために同じ緩衝液で2回洗浄した。最終的に、洗浄した菌体を20%グリセリン溶液4mlに懸濁し、使用するまで-70℃で保管した。3g/lのAHVを含む最小培地にNTG処理菌株を塗抹し、前記過程により155株のAHV耐性KFC C10881菌株を得た。

30

40

種培地（pH7.0）

グルコース20g, ペプトン10g, 酵母抽出物5g, 尿素1.5g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, ビオチン100μg, チアミンHCl 1000μg, パントテン酸カルシウム2000μg, ニコチンアミド2000μg（蒸留水1リットル中）

最小培地（pH7.2）

グルコース5g, KH₂PO₄ 1g, (NH₄)₂SO₄ 5g, MgSO₄·7H₂O 0.4g, NaCl 0.5g, ビオチン200μg, チアミンHCl 100μg, パントテン酸カルシウム100μg, ニコチンアミド0.03g, 尿素2g, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.09mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₇·4H₂O 0.04mg, ZnSO₄·7H₂O 0.0

50

1 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, CaCl_2 0.01 mg (蒸留水1リットル中)

【実施例2】

【0070】

AHV耐性KFCC10881菌株に対するL-トレオニン生産試験

実施例1で得た155株のAHV耐性菌株に対してL-トレオニン生産能試験を行った。種培地25mlを含有する250mlのコーナーバッフルフラスコに実施例1で得た155株の菌株を接種し、その後30℃、200rpmで20時間振盪培養した。次のL-トレオニン生産培地24mlを含有する250mlのコーナーバッフルフラスコに1mlの種培養液を接種し、30℃、200rpmで48時間振盪培養した。

10

L-トレオニン生産培地 (pH7.2)

グルコース30g, KH_2PO_4 2g, Urea 3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40g, Peptone 2.5g, CSL (Sigma) 5g (10ml), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, Leucine 400mg, CaCO_3 20g (蒸留水1リットル中)

【0071】

培養終了後に、生産された様々なアミノ酸の生産量をHPLCにより測定した。実験を行った155株の菌株のうち、L-トレオニン生産能に優れる上位22株に対するアミノ酸の培養液中の濃度を表1に示す。前記過程により確認した22株の候補をそれぞれKFCC10881-1~KFCC10881-22と命名した。

【0072】

20

【表 1】

優れた A H V 耐性菌株の L-トレオニン生産実験

	OD	Thr	Hse	Gly	Ala	Ile	Lys	Thr+Hse+ Gly+Ile
KFCC10881	58.5	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	13.3	0.4
KFCC10881-1	60.1	2.0	1.5	2.8	1.6	2.7	5.7	7.7
KFCC10881-2	57.1	3.0	2.2	0.8	3.1	1.3	12.5	7.3
KFCC10881-3	47.3	2.8	2.3	0.8	3.4	1.4	10.5	7.3
KFCC10881-4	51.7	3.2	2.1	0.8	3.2	1.3	13.4	7.4
KFCC10881-5	58.4	3.1	2.2	0.8	3.3	1.3	12.4	7.4
KFCC10881-6	52.6	3.4	2.5	0.7	3.4	1.0	12.8	7.6
KFCC10881-7	14.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.6	11.1	1.5
KFCC10881-8	55.8	3.0	2.0	0.8	3.3	1.3	13.0	7.1
KFCC10881-9	44.3	3.2	2.8	0.6	3.1	0.9	12.6	7.5
KFCC10881-10	47.5	3.7	3.0	0.7	3.4	0.8	12.6	8.2
KFCC10881-11	57.0	2.7	1.8	0.7	3.4	1.2	11.6	6.4
KFCC10881-12	51.8	3.3	3.5	0.6	3.2	0.9	12.4	8.3
KFCC10881-13	49.8	3.0	2.3	0.7	3.4	1.3	12.8	7.3
KFCC10881-14	62.7	2.4	2.1	2.5	3.2	3.0	3.3	10.0
KFCC10881-15	62.4	2.9	2.7	0.7	3.2	1.1	12.3	7.4
KFCC10881-16	59.6	2.8	2.5	0.8	3.3	1.3	11.4	7.4
KFCC10881-17	24.1	0.1	0.2	0.2	1.6	0.2	10.4	0.7
KFCC10881-18	60.5	2.6	2.5	0.7	3.2	1.0	12.3	6.8
KFCC10881-19	60.0	3.0	1.9	2.8	2.7	3.0	5.4	9.3
KFCC10881-20	65.8	2.7	2.0	0.8	3.4	1.4	13.0	6.9
KFCC10881-21	17.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.6	11.1	1.5
KFCC10881-22	60.1	3.5	1.9	2.0	2.5	2.8	2.7	10.2

【0073】

表 1 に示すように、A H V 耐性を有する 22 種の菌株が生産する L-トレオニン、L-ホモセリン、L-グリシン、L-アラニン、L-イソロイシンは対照群に比べて増加したのに対して、L-リシンは減少した。

【0074】

L-トレオニンと L-リシンの生合成経路は、アスパラギン酸セミアルデヒド (aspartate-semialdehyde, 以下、A S A) を分岐点として分かれる。すなわち、L-トレオニン生産量が増加するにつれて、L-リシン生産量は減少する。よって、L-トレオニン生産量が増加するにつれて、L-トレオニン生合成経路の副産物であるホモセリン (H s e)、L-グリシン (G l y)、L-イソロイシン (I l e) も増加するので、それらの生産

10

20

30

40

50

量の合計 (Th r + H s e + G l y + I l e) も確認した。

【0075】

よって、前記AHV耐性菌株のうち、Lーリシン生産量が減少し、Lートレオニン生産量が多く、Th r + H s e + G l y + I l eの総生産量が多い4種の菌株 (K F C C 1 0 8 8 1 - 1、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 4、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 9及びK F C C 1 0 8 8 1 - 2 2) を最も優れたAHV耐性菌株として選択した。

【実施例3】

【0076】

K F C C 1 0 8 8 1由来トレオニン生産能に優れる菌株の塩基配列分析

実施例1で選択した菌株におけるLートレオニン生合成酵素の塩基配列の分析を次のように行った。K E G G (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) が提供する遺伝子情報に基づいて、コリネバクテリウム・グルタミカム A T C C 1 3 0 3 2 のホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする h o m の塩基配列 (配列番号1, N C g l 1 1 3 6)、ホモセリンキナーゼをコードする t h r B の塩基配列 (配列番号2, 遺伝子番号 N C g l 1 1 3 7) をそれぞれ確保した。h o m と t h r B は、オペロン構造をとることが知られている (非特許文献7)。

10

【0077】

選択した菌株の h o m - t h r B オペロンを含むDNA断片を確保するために、菌株の菌体を鋳型とし、配列番号3及び4のプライマー組み合わせによりPCRを行った。PCR反応のための重合酵素としてはP f u U l t r a T M 高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いた。PCR条件は、96℃で30秒間の変性、52℃で30秒間のアニーリング、72℃で3分間の重合反応を30サイクル行うものとした。その結果、配列番号1の開始コドンの上流にプロモーター部位を有する300bpの塩基配列を含み、配列番号2の終止コドンの下流の200bpを含む2778bpの遺伝子断片が増幅された (配列番号5)。

20

【0078】

前述したように作製したプライマーを用いて、A B I P R I S M 3 7 3 0 X L A n a l y z e r (96 capillary type, Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。K F C C 1 0 8 8 1 - 1 内の h o m - t h r B オペロンの h o m に相当する塩基配列は、配列番号1の854番目の塩基であるシトシンがチアミンに変異し、トレオニン残基をコードする A C T 遺伝子コドンがイソロイシン残基をコードする A T T 遺伝子コドンに変異したことが分かった (以下、T 2 8 5 I 変異; 配列番号6)。また、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 4 内の h o m - t h r B オペロンに相当する塩基配列は、配列番号1の1193番目の塩基であるグアニンがアデニンに変異し、アルギニン残基をコードする C G A 遺伝子コドンがグルタミン残基をコードする C A A 遺伝子コドンに変異したことが分かった (以下、R 3 9 8 Q 変異; 配列番号7)。さらに、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 9 内の h o m - t h r B オペロンに相当する塩基配列は、配列番号1の1132番目の塩基であるグアニンがシトシンに変異し、グリシン残基をコードする G G G 遺伝子コドンがトリプトファン残基をコードする T G G 遺伝子コドンに変異したことが分かった (以下、G 3 7 8 W 変異; 配列番号8)。さらに、K F C C 1 0 8 8 1 - 2 2 内の h o m - t h r B オペロンに相当する塩基配列は、配列番号1の1132番目の塩基であるグアニンがアデニンに変異し、1134番目の塩基であるグアニンがシトシンに変異し、グリシン残基をコードする G G G 遺伝子コドンがセリン残基をコードする A G C 遺伝子コドンに変異したことが分かった (以下、G 3 7 8 S 変異; 配列番号9)。一方、配列番号2に相当する t h r B においては変異が発見されなかった。

30

40

【0079】

これらの塩基配列分析結果をまとめると、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 内で発現する H o m (配列番号10) は285番目のアミノ酸残基であるトレオニンがイソロイシンに変異し (以下、T 2 8 5 I 変異)、K F C C 1 0 8 8 1 - 1 4 内に発現する H o m (配列番号11) は398番目のアミノ酸残基であるアルギニンがグルタミンに変異し (以下、R 3 9

50

8 Q 変異)、K F C C 1 0 8 8 1-1 9 内に発現するH o m (配列番号1 2) は3 7 8 番目のアミノ酸残基であるグリシンがトリプトファンに変異し(以下、G 3 7 8 W 変異)、K F C C 1 0 8 8 1-2 2 内に発現するH o m (配列番号1 3) は3 7 8 番目のアミノ酸残基であるグリシンがセリンに変異し(以下、G 3 7 8 S 変異)、L-トレオニンによるフィードバック阻害が脱感作されたことが分かった。

【実施例4】

【0080】

新規ホモセリンデヒドロゲナーゼ導入菌株の作製

実施例2で確認した変異体T 2 8 5 I、R 3 9 8 Q、G 3 7 8 W、G 3 7 8 Sが野生型菌株に導入された菌株を作製するために、配列番号1 4及び1 5のプライマーを作製した。

【0081】

T 2 8 5 I、R 3 9 8 Q、G 3 7 8 W、G 3 7 8 S h o m変異がそれぞれ導入された菌株を作製するために、K F C C 1 0 8 1 1-1、K F C C 1 0 8 1 1-1 4、K F C C 1 0 8 1 1-1 9、K F C C 1 0 8 1 1-2 2 菌株からそれぞれ抽出したゲノムDNAを鋳型とし、配列番号1 4及び1 5のプライマーを用いてそれぞれPCRを行った。PCR反応のための重合酵素としてはP f u U l t r aTM高信頼DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いた。PCR条件は、9 5℃で3 0秒間の変性、5 5℃で3 0秒間のアニーリング、7 2℃で2分間の重合反応を2 8サイクル行うものとした。その結果、1 3 3 8 b pのh o m遺伝子の約3 0 0 b pのプロモーター部位を含む1 6 6 8 b pの遺伝子断片がそれぞれ得られた。Q U I A G E N社のPCR P u r i f i c a t i o n k i tを用いて増幅産物を精製し、ベクター作製のための挿入DNA断片として用いた。一方、制限酵素s m a Iで処理し、その後6 5℃で2 0分間熱処理したp D Zベクターと、前記PCRにより増幅した挿入DNA断片のモル濃度(M)の比が1:2になるように、タカラ(TaKaRa)のI n f u s i o n C l o n i n g K i tを用いて、提供されたマニュアルに従ってクローニングすることにより、T 2 8 5 I、R 3 9 8 Q、G 3 7 8 W、G 3 7 8 S変異を染色体上に導入するためのベクターp D Z-T 2 8 5 I、p D Z-R 3 9 8 Q、p D Z-G 3 7 8 W、p D Z-G 3 7 8 Sを作製した。

【0082】

作製された各ベクターをエレクトロポレーションによりコリネバクテリウム・グルタミカムA T C C 1 3 0 3 2に形質転換し、2次交差過程を経て、染色体上で各変異型塩基に置換された菌株が得られた。適切に置換されたか否かは、次に挙げるプライマー組み合わせを用いて、M A S A (Mutant Allele Specific Amplification) PCR法(非特許文献8)により、各変異型配列に一致するプライマー組み合わせ(C T R-T 2 8 5 I:配列番号1 6及び1 7, C T R-R 3 9 8 Q:配列番号1 6及び1 8, C T R-G 3 7 8 W:配列番号1 6及び1 9, C T R-G 3 7 8 S:配列番号1 6及び2 0)から増幅される菌株を選択することにより1次決定した。選択した菌株のh o m配列分析は、配列番号1 6及び2 1を用いて、実施例2と同様に変異型配列分析を行うことにより、2次確認した。各変異型塩基に置換された菌株をC T R-T 2 8 5 I、C T R-R 3 9 8 Q、C T R-G 3 7 8 W、C T R-G 3 7 8 Sと命名した。

【実施例5】

【0083】

ホモセリンデヒドロゲナーゼ酵素活性の測定

前述したように作製した菌株を対象にH o m酵素活性を測定した。実施例4で作製したC T R-T 2 8 5 I、C T R-R 3 9 8 Q、C T R-G 3 7 8 W、C T R-G 3 7 8 S、及び対照群としての野生型菌株(A T C C 1 3 0 3 2)を下記種培地2 5 m lに接種し、その後対数期の後半まで培養した。遠心分離により菌体を回収し、0.1 Mのp o t a s s i u m p h o s p h a t e (p H 7. 6)緩衝液で2回洗浄し、その後3 0%の濃度のグリセリンを含有する同じ緩衝液2 m lに最終懸濁した。菌体懸濁液を一般的なガラスビーズボルテックス法により1 0分間物理的に破碎し、その後2回の遠心分離(1 3, 0

0 0 r p m, 4 ° C, 3 0 分) により上清を回収し、H o m酵素活性の測定のための粗酵素液 (crude extract) として用いた。H o m酵素活性の測定のために、酵素活性測定用反応液 (p o t a s s i u m p h o s p h a t e (p H 7 . 0) 緩衝液, 2 5 m M N A D P H, 5 m M a s p a r t a t e s e m i - a l d e h y d e) 0 . 9 m l に粗酵素液 0 . 1 m l を添加し、3 0 ° Cで反応させた。H o m酵素活性 (U) は、L - トレオニンの有無 (0 m M, 1 0 m M) による1分当たり消費したN A D P H u m o l 数により決定した。酵素活性の測定結果を表2に示す。

【0 0 8 4】

【表2】

H o m酵素活性 (U) 及びL - トレオニンによる脱感作の測定

菌株	L - トレオニン添加量 (mM) による 酵素活性 (U)	
	0 m M	1 0 m M
A T C C 1 3 0 3 2	0 . 9 2	0 . 0 2
C T R - T 2 8 5 I	1 . 1 1	0 . 8 2
C T R - R 3 9 8 Q	1 . 3 1	1 . 1 2
C T R - G 3 7 8 W	1 . 3 9	1 . 2 1
C T R - G 3 7 8 S	1 . 3 8	1 . 2 2

【0 0 8 5】

実験の結果、T 2 8 5 I、R 3 9 8 Q、G 3 7 8 W、G 3 7 8 S変異をそれぞれ含むH o mにおいて、1 0 m MのL - トレオニンを含む条件では、野生型H o mとは異なり、活性抑制の程度が減少し、L - トレオニンに対して脱感作されたことが分かった。

【実施例6】

【0 0 8 6】

L - トレオニン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物菌株の作製及び評価

野生種コリネバクテリウム・グルタミカムA T C C 1 3 0 3 2からL - トレオニン生産菌株を作製した。具体的には、トレオニン生合成経路において最初の重要な酵素として作用するa s p a r t a t e k i n a s e (l y s C) のフィードバック阻害 (feedback inhibition) を解除するために、l y s Cの3 7 7番目のアミノ酸であるロイシン (Leucine) をリシン (Lysine) に置換した (配列番号2 2) 。

【0 0 8 7】

より具体的には、l y s C (L 3 7 7 K) 変異が導入された菌株を作製するために、A T C C 1 3 0 3 2の染色体を鋳型とし、配列番号2 3及び2 4、又は配列番号2 5及び2 6のプライマーを用いてP C Rをそれぞれ行った。P C R反応のための重合酵素としてはP f u U l t r a TM高信頼DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いた。P C R条件は、9 5 ° Cで3 0秒間の変性、5 5 ° Cで3 0秒間のアニーリング、7 2 ° Cで1分間の重合反応を2 8サイクル行うものとした。その結果、l y s C遺伝子の変異を中心に、5'末端上流の5 1 5 b pのDNA断片と、3'末端下流の5 3 8 b pのDNA断片がそれぞれ得られた。増幅された2種類のDNA断片を鋳型とし、配列番号2 3及び2 6のプライマーでP C Rを行った。P C R条件は、9 5 ° Cで5分間の変性後、9 5 ° Cで3 0秒間の変性、5 5 ° Cで3 0秒間のアニーリング、7 2 ° Cで2分間の重合を2 8サイクル行い、その後7 2 ° Cで5分間の重合反応を行うものとした。その結果、3 7 7番目のロイシンがリシンに置換されたアスパルトキナーゼ変異体をコードするl y s C遺伝子の変異を含む1 0 2 3 b pのDNA断片が増幅された。Q U I A G E N社のP C R P u r i f i c a t i o n k i tを用いて増幅産物を精製し、ベクター作製のための挿入DNA断片として用いた。一

10

20

30

40

50

方、制限酵素 *sma*I で処理し、その後 65℃ で 20 分間熱処理した pDZ ベクターと、前記 PCR により増幅した挿入 DNA 断片のモル濃度 (M) の比が 1 : 2 になるように、タカラ (TaKaRa) の *Infusion Cloning Kit* を用いて、提供されたマニュアルに従ってクローニングすることにより、L377K 変異を染色体上に導入するためのベクター pDZ-L377K を作製した。

【0088】

作製されたベクターをエレクトロポレーションにより ATCC13032 に形質転換し、2 次交差過程を経て、染色体上で各塩基変異が変異型塩基に置換された菌株が得られた。これを CJP1 と命名した。

【0089】

前記菌株の L-トレオニン生産の変化を明確に確認するために、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserin dehydrogenase) をコードする遺伝子に実施例 4 で確認した変異をそれぞれ導入した。具体的には、T285I、R398Q、G378W、G378S 変異を CTR-L377K 菌株にそれぞれ導入するために、実施例 4 で作製した pDZ-T285I、pDZ-R398Q、pDZ-G378W、pDZ-G378S ベクターをエレクトロポレーションにより CJP1 に形質転換し、実施例 4 と同様に 2 次交差過程を経て、染色体上で各塩基変異が変異型塩基に置換された菌株を得た。各変異型塩基に置換された菌株を CJP1-T285I、CJP1-R398Q、CJP1-G378W、CJP1-G378S と命名した。

【0090】

菌株 CJP1-T285I、CJP1-R398Q は、2017 年 9 月 26 日付けでブダペスト条約上の国際寄託機関である韓国微生物保存センター (KCCM) にそれぞれ寄託番号 KCCM12119P、KCCM12120P として国際寄託した。

【0091】

【表 3】

作製した 4 種の菌株の L-トレオニン生産能の確認

菌株	Amino acid (g/l)	
	Thr	Lys
CJP1	0.40	3.60
CJP1-T285I	1.10	3.00
CJP1-R398Q	1.21	2.75
CJP1-G378W	1.30	2.68
CJP1-G378S	1.25	2.78

【0092】

その結果、各変異を導入した菌株は、対照群である CJP1 菌株に比べて L-リシン生産量が減少し、L-トレオニン生産量がそれぞれ 0.7~0.9 g/L 増加した。

【0093】

一方、T285I、R398Q 変異を同時に含む菌株を得るために、pDZ-R398Q ベクターを CJP1-T285I 菌株に形質転換し、前記と同様に菌株を得た (CJP1-T285I, R398Q)。また、G378W、R398Q 変異を同時に含む菌株を得るために、pDZ-R398Q ベクターを CJP1-G378W に形質転換し、前記と同様に菌株を得た (CJP1-G378W, R398Q)。さらに、T285I、G378W 変異を同時に含む菌株を得るために、pDZ-G378W ベクターを CJP1-T285I に形質転換し、前記と同様に菌株を得た (CJP1-T285I, G378W)。実施例 2 と同様に L-トレオニン生産能試験を行った。それを表 4 に示す。

【0094】

【表4】

作製した3種の菌株のL-トレオニン生産能の確認

菌株	Amino acid (g/l)	
	Thr	Lys
CJP1	0.41	3.55
CJP1-G378W	1.30	2.68
CJP1-T285I, R398Q	1.41	2.65
CJP1-G378W, R398Q	2.12	1.92
CJP1-T285I, G378W	1.92	2.15

10

【0095】

その結果、本発明の変異を2種導入したものにおいて、前述した実施例で最も高いThr生産能を示したCJP1-G378Wより高いThr生産能が確認された。2つの変異を導入した菌株は、対照群であるCJP1菌株に比べて、トレオニン生産量がそれぞれ1.1～1.7g/L増加したので、Homの脱感作効果が大幅に向上することが確認された。

20

【実施例7】

【0096】

L-イソロイシン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物菌株の作製及び評価

イソロイシン生産菌株を作製するために、実施例6で作製した菌株において、公知のL-トレオニンデヒドラターゼ (L-threonine dehydratase, isoleucine生合成経路の最初の酵素) をコードする変異遺伝子 *ilvA* (V323A) (非特許文献6) の発現を強化するためのベクターを作製した。

【0097】

具体的には、*ilvA* 遺伝子を対象とする変異導入ベクターを作製するために、変異位置を中心に5'末端上流を増幅するためのプライマー対 (配列番号27及び28) と、3'末端下流を増幅するためのプライマー対 (配列番号29及び30) を考案した。配列番号27及び30のプライマーは、各末端にBamHI制限酵素部位 (下線表示) を挿入し、配列番号28及び29のプライマーは、交差するように考案した部位にヌクレオチド置換変異 (下線表示) が位置するようにした。

30

【0098】

【表5】

配列番号	塩基配列
27	ACGGATCC CAGACTCCAAAGCAAAAGCG
28	ACACCACG G CAGAACCAAGGTGCAAAGGACA
29	CTGGTTCTG C CGTGGTGTGCATCATCTCTG
30	ACGGATCC AACCAAACTTGCTCACACTC

40

50

【0099】

野生型の染色体を鋳型とし、配列番号27及び28、配列番号29及び30のプライマーを用いてPCRを行った。PCR条件は、95℃で5分間の変性後、95℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、72℃で30秒間の重合を30サイクル行い、その後72℃で7分間の重合反応を行うものとした。その結果、ilvA遺伝子の変異を中心に、5'末端上流の627bpのDNA断片と、3'末端下流の608bpのDNA断片が得られた。増幅された2つのDNA断片を鋳型とし、配列番号27及び30のプライマーでPCRを行った。95℃で5分間の変性後、95℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、72℃で60秒間の重合を30サイクル行い、その後72℃で7分間の重合反応を行った。その結果、323番目のバリンがアラニンに置換されたI 10

【0100】

pECCG117-ilvA(V323A)ベクターを実施例6で作製したCJP1-T285I, R398Q、CJP1-G378W, R398Q、CJP1-T285I, G378W菌株にエレクトロポレーションで導入し、その後カナマイシン(Kanamycin) 25mg/Lを含有する選択培地に塗抹して形質転換株を得た。実施例2のフラスコ培養法と同様に培養し、培養液中のL-イソロイシン濃度を分析した。それを表6に示す。 20

【0101】

【表6】

作製した菌株の評価

菌株	L-イソロイシン (g/L)
CJP1/pECCG117-ilvA(V323A)	0.7
CJP1-G378W/pECCG117-ilvA(V323A)	0.9
CJP1-T285I, R398Q/pECCG117-ilvA(V323A)	1.1
CJP1-G378W, R398Q/pECCG117-ilvA(V323A)	1.2
CJP1-T285I, G378W/pECCG117-ilvA(V323A)	1.0

【0102】

その結果、hom(G378W)変異を含む菌株において、対照群菌株に比べてL-イソロイシン生産能が0.2g/L向上することが確認された。また、2つの変異が同時に導入されたhom変異を含む菌株は、対照群菌株に比べてL-イソロイシン生産能が0.3~0.5g/L向上し、とりわけT285I、R398Qの2つの変異の両方を含むCJP1-T285I, R398Q/pECCG117-ilvA(V323A)菌株において、1.1g/LのL-イソロイシンが生産された。

【実施例8】

10

20

30

40

50

【0103】

変異型Homに置換されたO-アセチル-ホモセリン(OAH)生産菌株の作製及び評価

8-1: 変異型Homに置換されたATCC13032菌株の作製

実施例7と同様に、ATCC13032菌株にT285I及びR398Qの2種の変異を導入し、その菌株をATCC13032::Hom^{FBR}と命名した。

【0104】

8-2: metB遺伝子の欠損

本実施例においては、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体DNAを鋳型としたPCRにより、O-アセチル-ホモセリン分解経路のシスタチオニγγ-シンターゼ(cystathionine gamma-synthase)をコードするmetB遺伝子を確保した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク(NIH GenBank)からmetB遺伝子の塩基配列情報(NCBI登録番号Ncg12360, 配列番号31)を確保し、それに基づいてmetB遺伝子のN-terminal部分とlinker sequenceを含有するプライマー(配列番号32, 33)、C-terminal部分とlinker部分を含有するプライマー(配列番号34, 35)を合成した。コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体DNAを鋳型とし、配列番号32及び33と配列番号34及び35のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。重合酵素としてはPfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いた。PCR条件は、96℃で30秒間の変性、53℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合反応を30サイクル行うものとした。その結果、metB遺伝子のN-terminal部分とlinkerを含有する500bpの増幅された遺伝子と、metB遺伝子のC-terminal部分とlinkerを含有する500bpの増幅された遺伝子が得られた。

【0105】

前述したように得られた増幅された2つの遺伝子を鋳型としてPCRを行った。PCR条件は、96℃で60秒間の変性、50℃で60秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合反応を10サイクル行い、その後配列番号32及び35を添加して20サイクル行うものとした。その結果、metB遺伝子のN-terminal-linker-C-terminalを含有するmetB不活性化カセットである1000bpsの増幅されたΔmetB遺伝子が得られた。前記PCRにより得られたmetB遺伝子を末端に含まれる制限酵素XbaI、SalIで処理し、制限酵素XbaI、SalIで処理したpDZ(特許文献3)ベクターにライゲーション(ligation)によりクローニングし、最終的にmetB不活性化カセットがクローニングされたpDZ-ΔmetB組換えベクターを作製した。

【0106】

作製したpDZ-ΔmetBベクターをコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、ATCC13032::Hom^{FBR}に形質転換し、2次交差過程を経て、染色体上でmetB遺伝子が不活性化されたコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032ΔmetB、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetBを得た。不活性化されたmetB遺伝子は、配列番号32及び35のプライマーを用いたPCRを行い、その後metB遺伝子が不活性化されていないATCC13032との比較により最終確認した。

【0107】

8-3: metY遺伝子の欠損

本実施例においては、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体DNAを鋳型としたPCRにより、O-アセチル-ホモセリン分解経路のO-アセチル-ホモセリンチオールリアーゼ(O-acetylhomoserine(thiol)-lyase)をコードするmetY遺伝子を確保した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク(NIH GenBank)からmetY遺伝子の塩基配列情報(NCBI登録番号Ncg10625, 配列番号36)を確保し、それに基づいてmetY遺伝子のN-terminal部分とlinker sequence

nceを含有するプライマー（配列番号37, 38）、C-terminal部分とlinker部分を含有するプライマー（配列番号39, 40）を合成した。

【0108】

コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体DNAを鋳型とし、配列番号37及び38、配列番号39及び40のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。重合酵素としてはPfuUltraTM高信頼DNAポリメラーゼ（Stratagene）を用いた。PCR条件は、96℃で30秒間の変性、53℃で30秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合反応を30サイクル行うものとした。その結果、metY遺伝子のN-terminal部分とlinkerを含有する500bpの増幅された遺伝子と、metY遺伝子のC-terminal部分とlinkerを含有する500bpの増幅された遺伝子が得られた。前述したように得られた増幅された2つの遺伝子を鋳型としてPCRを行った。PCR条件は、96℃で60秒間の変性、50℃で60秒間のアニーリング、72℃で1分間の重合反応を10サイクル行い、その後配列番号37及び40のプライマーを添加して20サイクル行うものとした。その結果、metY遺伝子のN-terminal-linker-C-terminalを含有するmetB不活性化カセットである1000bpsの増幅されたΔmetY遺伝子が得られた。

10

【0109】

前記PCRにより得られたmetY遺伝子を末端に含まれる制限酵素XbaI、SalIで処理し、制限酵素XbaI、SalIで処理したpDZ（特許文献4）ベクターにライゲーション（ligation）によりクローニングし、最終的にmetY不活性化カセットがクローニングされたpDZ-ΔmetY組換えベクターを作製した。

20

【0110】

作製したpDZ-ΔmetYベクターをコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、ATCC13032::Hom^{FBR}、ATCC13032ΔmetB、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetB菌株に形質転換し、2次交差過程を経て、染色体上でmetY遺伝子が不活性化されたコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032ΔmetY、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetY、ATCC13032ΔmetBΔmetY、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetBΔmetYを得た。不活性化されたmetY遺伝子は、配列番号37及び40のプライマーを用いたPCRを行い、その後metY遺伝子が不活性化されていないATCC13032との比較により最終確認した。

30

【0111】

8-4：O-アセチルホモセリン生産菌株の作製及び評価

実施例8-1～8-3で作製した、metB、metY、metBY遺伝子が欠損して変異型hom遺伝子に置換されたATCC13032、ATCC13032ΔmetB、ATCC13032ΔmetY、ATCC13032ΔmetBΔmetY、ATCC13032::Hom^{FBR}、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetB、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetY、ATCC13032::Hom^{FBR}ΔmetBΔmetY菌株のO-アセチルホモセリン生産能を比較した。

【0112】

40

具体的には、32℃の培養器にてLB固体培地で一晚培養した単一コロニーを25mlのO-アセチルホモセリン力価培地に1白金耳ずつ接種し、32℃、250rpmで42～64時間培養した。培養物からO-アセチルホモセリンをHPLCにより分析した。分析結果を表7に示す。

L-O-アセチルホモセリン生産培地（pH7.2）

グルコース30g, KH₂PO₄ 2g, Urea 3g, (NH₄)₂SO₄ 40g, Peptone 2.5g, CSL (Sigma) 5g (10ml), MgSO₄·7H₂O 0.5g, Methionine 400mg, Leucine 400mg, CaCO₃ 20g（蒸留水1リットル中）

【0113】

50

【表 7】

Ｏ－アセチル－ホモセリン生産の評価

S t r a i n s		O－A H p r o d u c t i o n (g / L)
A T C C 1 3 0 3 2	—	0 . 0
	m e t B	0 . 3
	m e t Y	0 . 3
	m e t B Y	0 . 5
A T C C 1 3 0 3 2 : : H o m ^F ^{B R} (T 2 8 5 I + R 3 9 8 Q)	—	0 . 0
	m e t B	1 . 2
	m e t Y	1 . 4
	m e t B Y	3 . 5

10

【 0 1 1 4 】

その結果、表 7 に示すように、対照群菌株である *Corynebacteria glutamicum* ATCC 13032 を培養しても O－アセチル－L－ホモセリンが蓄積されないのに対して、met B、met Y、met BY が不活性化された ATCC 13032 Δmet B、ATCC 13032 Δmet Y、ATCC 13032 Δmet B Δmet Y 菌株においては、それぞれ 0 . 3、0 . 3、0 . 5 g / L の O－アセチル－L－ホモセリンが蓄積されることが確認された。

20

【 0 1 1 5 】

また、hom 遺伝子を mutant 形態に置換した ATCC 13032 : : Hom^{FBR} 菌株、前記菌株において met B、met Y、met BY がそれぞれ不活性化された ATCC 13032 : : Hom^{FBR} Δmet B、ATCC 13032 : : Hom^{FBR} Δmet Y、ATCC 13032 : : Hom^{FBR} Δmet B Δmet Y 菌株においては、それぞれ 1 . 2、1 . 4、3 . 5 g / L の O－アセチル－L－ホモセリンが蓄積されることが確認された。

30

【 0 1 1 6 】

よって、これらの結果から、本発明の変異型 hom を用いると、ホモセリンを前駆体として用いる標的アミノ酸の生産量が大幅に向上することが確認された。

【実施例 9】

【 0 1 1 7 】

メチオニン (Met) 生産菌株の作製及び評価

9－1 : mcbR 遺伝子の欠損のための組換えベクターの作製

本実施例においては、メチオニン生産菌株を作製するために、実施例 6 で作製した菌株において公知のメチオニンシステイン転写調節因子タンパク質をコードする mcbR (非特許文献 9) を不活性化するベクターを作製した。

40

【 0 1 1 8 】

具体的には、mcbR 遺伝子をコリネバクテリウム ATCC 13032 染色体上で欠損させるために、次の方法で組換えプラスミドベクターを作製した。米国国立衛生研究所の遺伝子バンク (NIH Genbank) に報告されている塩基配列に基づいて、コリネバクテリウム・グルタミカムの mcbR 遺伝子及び周辺配列 (配列番号 41) を確保した。

【 0 1 1 9 】

mcbR 遺伝子を欠損させるために、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 の染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 42 及び 43、配列番号 44 及び 45 のプラ

50

イマーを用いてPCRを行った。PCR条件は、95℃で5分間の変性後、95℃で30秒間の変性、53℃で30秒間のアニーリング、72℃で30秒間の重合を30サイクル行い、その後72℃で7分間の重合反応を行うものとした。その結果、それぞれ700bpのDNA断片が得られた。

【0120】

コリネバクテリウム・グルタミカム中で複製が不可能なpDZベクター（特許文献3）と前述したように増幅されたmcbR遺伝子断片を染色体導入用制限酵素SmaIで処理し、次いでDNAリガーゼを用いて連結し、その後大腸菌DH5αに形質転換し、カナマイシン（25mg/l）を含むLB固体培地に塗抹した。PCRにより標的遺伝子が欠損した断片が挿入されたベクターで形質転換されたコロニーを選択し、その後プラスミド抽出法によりプラスミドを得て、pDZ-ΔmcbRと命名した。

10

【0121】

9-2：L-メチオニン生産能を有するコリネバクテリウム属微生物菌株の作製及び評価

実施例9で作製したpDZ-ΔmcbRベクターを、染色体上での相同組換えにより実施例6で作製したCJP1-G378W、CJP1-T285I、R398Q、CJP1-G378W、R398Q、CJP1-T285I、G378W、及びCJP1菌株に、エレクトロポレーションにより形質転換した（非特許文献10）。その後、X-galを含む固体培地において2次組換えを行った。2次組換えが終了した前記コリネバクテリウム・グルタミカム形質転換株を対象に、プライマー46とプライマー47を用いたPCRにより、mcbR遺伝子が欠損した菌株を確認した。その組換え菌株をそれぞれコリネバクテリウム・グルタミカムCJP1-G378W/ΔmcbR、CJP1-T285I、R398Q/ΔmcbR、CJP1-G378W、R398Q/ΔmcbR、CJP1-T285I、G378W/ΔmcbR、CJP1/ΔmcbRと命名した。

20

【0122】

前述したように作製したCJP1-G378W/ΔmcbR、CJP1-T285I、R398Q/ΔmcbR、CJP1-G378W、R398Q/ΔmcbR、CJP1-T285I、G378W/ΔmcbR菌株のL-メチオニン生産能を分析するために、親株であるコリネバクテリウム・グルタミカムCJP1/ΔmcbR菌株と共に、次のように培養した。

30

【0123】

下記種培地25mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコにコリネバクテリウム・グルタミカムCJP1/ΔmcbRと本発明の菌株であるコリネバクテリウム・グルタミカムCJP1-G378W/ΔmcbR、CJP1-T285I、R398Q/ΔmcbR、CJP1-G378W、R398Q/ΔmcbR、CJP1-T285I、G378W/ΔmcbRを接種し、30℃、200rpmで20時間振盪培養した。次に、生産培地24mlを含有する250mlのコナーバッフルフラスコに1mlの種培養液を接種し、30℃、200rpmで48時間振盪培養した。前記種培地及び生産培地の組成は、それぞれ次の通りである。

<種培地（pH7.0）>

40

グルコース20g、ペプトン10g、酵母抽出物5g、尿素1.5g、KH₂PO₄ 4g、K₂HPO₄ 8g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、ビオチン100μg、チアミンHCl 1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド2000μg（蒸留水1リットル中）

<生産培地（pH8.0）>

グルコース50g、(NH₄)₂S₂O₃ 12g、Yeast extract 5g、KH₂PO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 1.2g、ビオチン100μg、チアミン塩酸塩1000μg、パントテン酸カルシウム2000μg、ニコチンアミド3000μg、CaCO₃ 30g（蒸留水1リットル中）

【0124】

50

前記培養方法で培養し、培養液中のL-メチオニン濃度を分析した。それを表8に示す。

【0125】

【表8】

作製した菌株の評価

菌株	L-メチオニン (g/L)
C J P 1 / Δ m c b R	0.01
C J P 1 - G 3 7 8 W / Δ m c b R	0.13
C J P 1 - T 2 8 5 I , R 3 9 8 Q / Δ m c b R	0.18
C J P 1 - G 3 7 8 W , R 3 9 8 Q / Δ m c b R	0.20
C J P 1 - T 2 8 5 I , G 3 7 8 W / Δ m c b R	0.17

10

【0126】

その結果、G 3 7 8 W h o m変異を含む菌株において、対照群菌株に比べてL-メチオニン生産能が0.12 g/L向上することが確認された。また、2つの変異が同時に導入されたh o m変異を含む菌株は、対照菌菌株に比べてL-メチオニン生産能が0.16 ~ 0.19 g/L向上することが確認された。

20

【0127】

これらの結果から、本発明の変異型h o mを用いると、L-メチオニン生産量が大幅に向上することが確認された。

【0128】

以上の説明から、本出願の属する技術分野の当業者であれば、本出願がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解するであろう。なお、前記実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものではないことを理解すべきである。本出願には、明細書ではなく請求の範囲の意味及び範囲とその等価概念から導かれるあらゆる変更や変形された形態が含まれるものと解釈すべきである。

30

【0129】

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明

国 際 様 式

宛先：C J 第一製糖株式会社，

大韓民国ソウル市中区

東湖路 3 3 0，C J 第一製糖センター

郵便番号 1 0 0 - 4 0 0

国際寄託機関により規則 7 . 1

に従って発行された原寄託につ
いての受託証

10

I . 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CJP1-T285I	国際寄託機関が付与した受託番号： K C C M 1 2 1 1 9 P
II . 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 ☐ 科学的性質の説明 ☐ 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III . 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2 0 1 7 年 9 月 2 6 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV . 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 カ街 4 5 ユリムビル 郵便番号 1 2 0 - 8 6 1	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2 0 1 7 年 9 月 2 6 日

20

30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2 0 1 8 年 5 月 2 8 日

弁理士 ソン・ミン 印

【 0 1 3 0 】

40

特許出願のためのブダペスト国際条約に基づく微生物の受託証明
国 際 様 式

宛先：C J 第一製糖株式会社，

大韓民国ソウル市中区

東湖路 3 3 0，C J 第一製糖センター

郵便番号 1 0 0 - 4 0 0

国際寄託機関により規則 7. 1

に従って発行された原寄託につ

いての受託証

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示： <i>Corynebacterium glutamicum</i> CJP1-R398Q	国際寄託機関が付与した受託番号： K C C M 1 2 1 2 0 P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に次の事項が含まれている。 ☐ 科学的性質の説明 ☐ 提案された分類学上の位置 (適用する場合は×で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2 0 1 7 年 9 月 2 6 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：大韓民国ソウル市西大門区 弘済内 2 カ街 4 5 ユリムビル 郵便番号 1 2 0 - 8 6 1	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名： 署名日：2 0 1 7 年 9 月 2 6 日

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2 0 1 8 年 5 月 2 8 日

弁理士 ソン・ミン 印

【配列表】

0006938795000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 P	13/08	(2006.01)	C 1 2 P	13/08
			C 1 2 P	13/06
				C
				Z

(72)発明者 キム, ヒョ チン
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 ホ, ラン
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 イム, サン チョ
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 キム, ヒョン ア
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 キム, ヒョン チュン
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 ソ, チャン イル
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 リ, ソン ピン
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

(72)発明者 リ, チ サン
大韓民国 ソウル チュン－グ トンホーロ 3 3 0

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 特表2007-525951 (JP, A)
FEMS Microbiol. Rev., 1995, 16(2-3), pp.243-252
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1996, 782, pp.25-39

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q