

(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
2014 年 2 月 27 日(27.02.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/030655 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/072219
- (22) 国際出願日: 2013 年 8 月 20 日(20.08.2013)
- (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 2012-185680 2012 年 8 月 24 日(24.08.2012) JP
- (71) 出願人: 旭硝子株式会社 (ASAHI GLASS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 原 太志 (HARA Futoshi); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP). 木村 修一郎 (KIMURA Shuichiro); 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 旭硝子株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 濱田 百合子, 外 (HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング 10 階 栄光特許事務所 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, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 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))

(54) Title: TRANSFORMANT AND METHOD FOR PRODUCING SAME, AND METHOD FOR PRODUCING LACTIC ACID

(54) 発明の名称: 形質転換体およびその製造方法、ならびに乳酸の製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a transformant which can produce lactic acid with high productivity without requiring the neutralization with an alkaline agent; a method for producing the transformant; and a method for producing lactic acid using the transformant. That is, a transformant which is characterized in that the host of the transformant is *Schizosaccharomyces pombe*, a lactate dehydrogenase gene of *Lactobacillus pentosus* is integrated into the transformant, and a part of a gene group encoding pyruvate decarboxylase of the *Schizosaccharomyces pombe* host is deleted or deactivated; a method for producing the transformant; and a method for producing lactic acid using the transformant.

(57) 要約: アルカリによる中和を必要とせず、高い生産性で乳酸を産生できる形質転換体およびその製造方法、ならびに該形質転換体を用いた乳酸の製造方法の提供を目的とする。すなわち、シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とし、ラクトバチルス・ペントーサスの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれ、かつ前記シゾサッカロミセス・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活していることを特徴とする形質転換体、該形質転換体の製造方法、ならびに該形質転換体を用いた乳酸の製造方法である。

WO 2014/030655 A1

明 細 書

発明の名称：

形質転換体およびその製造方法、ならびに乳酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、形質転換体およびその製造方法、ならびに乳酸の製造方法に関する。より詳細には、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*、以下、「S. ポンベ」) に、ラクトバチルス・ペントーサス (*Lactobacillus pentosus*) の乳酸脱水素酵素遺伝子を組み込み、かつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させた形質転換体、該形質転換体の製造方法、および該形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法に関する。

[0002] 本願は、2012年8月24日に日本国に出願された特願2012-185680号に基づく優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0003] 乳酸は食品用途や、医療、化粧品等の化学原料用途に広く用いられている。また、乳酸を用いて得られるポリ乳酸は、微生物等により最終的に二酸化炭素と水にまで分解される生分解性プラスチックとして注目されている。そのため、乳酸を安価に高い生産性で製造することが必要である。

[0004] 乳酸の製造方法としては、乳酸菌により糖を発酵させ製造する生物学的方法が知られている。しかし、乳酸菌は耐酸性が低いため、この方法で高い生産性を得るには発酵により産生される乳酸をアルカリにより中和して乳酸塩とする必要がある。このようなアルカリによる中和は、乳酸塩から乳酸に戻す工程が必要となるため、製造工程が煩雑になり製造コストも高くなる。

[0005] アルカリによる中和を行わずに乳酸を得る方法としては、酵母に乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を導入した形質転換体を用いる方法がある。たとえば特許文献1には、S. ポンベに、ヒト等の哺乳動物由来の乳酸脱水素酵

素遺伝子が組み込まれ、かつS. ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させた形質転換体を培養することにより、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造し得ることが開示されている。また、特許文献2には、培養培地中で培養した際に本質的にエタノールを産生しないサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) のL-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を導入した形質転換体を培養することにより乳酸が得られることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2011/021629号

特許文献2：日本国特表2007-512018号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1に記載の形質転換体は、高濃度の糖存在下での乳酸産生に適し、かつ高密度発酵にも適しており、アルカリによる中和工程を行わずに、乳酸を従来になく高効率で製造できる。しかし、微生物を用いて工業上安定して乳酸を産生するためには、特許文献1に記載の形質転換体と同程度またはそれ以上の乳酸生産性を有する酵母が複数種類あることが好ましい。

[0008] そこで本発明では、アルカリによる中和を必要とせずに高い生産性で乳酸を産生できるS. ポンベの形質転換体および該形質転換体の製造方法を目的とする。

また、前記形質転換体を用いて、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造する方法を目的とする。

なお、本発明において乳酸とは生物学的方法で得られるL-乳酸をいう。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の第一の態様に係る形質転換体は、*S. ポンベ*を宿主とし、*ラクトバチルス・ペントーサス* (*Lactobacillus pentosus*) の乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれ、かつ前記 *S. ポンベ* 宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活していることを特徴とする。

本発明の第一の態様に係る形質転換体においては、さらに、ヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれていることが好ましい。また、前記形質転換体においては、前記欠失または失活しているピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子が *PDC2* 遺伝子であることが好ましい。さらに、前記乳酸脱水素酵素遺伝子は *S. ポンベ* の染色体に組み込まれていることが好ましい。

[0010] また、本発明の第二の態様に係る形質転換体の製造方法は、*S. ポンベ* を宿主とし、*S. ポンベ* 内で機能するプロモーターとターミネーターと *ラクトバチルス・ペントーサス* (*Lactobacillus pentosus*) の乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを有するベクターを用いて、前記発現カセットを前記宿主に導入して形質転換体を得ること、および、前記宿主としてピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活した宿主を用いるかまたは前記得られた形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させることを特徴とする、*ラクトバチルス・ペントーサス* の乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれかつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活している形質転換体を製造する方法である。

本発明の第二の態様に係る形質転換体の製造方法においては、前記宿主として、ヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれており、かつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活した宿主を用いるか、または前記得られた形質転換体にヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子を組み込んだ後、該形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させることが好ましい。

また、前記形質転換体の製造方法により得られた形質転換体を宿主とし、

S. ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターとヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを有するベクターを用いて、前記発現カセットを前記宿主に導入して形質転換体を得ることもできる。また、前記ベクターはさらにS. ポンベの染色体に対して相同組換えを行わせる組換え部位を有し、このベクターを使用して発現カセットをS. ポンベの染色体に導入することが好ましい。

また、前記形質転換体の製造方法においては、前記欠失または失活しているピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子がPDC2遺伝子であることが好ましい。

[0011] さらに、本発明の第三の態様に係る乳酸の製造方法は、前記形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する。

本発明の第三の態様に係る乳酸の製造方法において、濃度1～50質量%のグルコースを含む培養液を使用して培養を行うことが好ましい。また、前記形質転換体により産生される乳酸により、前記培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続することが好ましい。さらに、前記培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を0.1～5g（乾燥菌体換算）／Lとすることが好ましい。また、前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続することが好ましく、また、培養液中の乳酸を中和することなく培養液から乳酸を分離することが好ましい。

発明の効果

[0012] 本発明の第一の態様に係るS. ポンベの形質転換体は、アルカリによる中和を必要とせずに高い生産性で乳酸を産生できる。また、高濃度の糖、特にグルコース、フルクトース、スクロース、マルトース、の存在下での乳酸産生に適し、かつ高密度培養にも適している。

前記形質転換体は、本発明の第二の態様に係る形質転換体の製造方法により簡便に得ることができる。

また、本発明の第三の態様に係る乳酸の製造方法は、アルカリによる中和工程を行わずに高い生産性で乳酸を製造できる。

すなわち、本発明に係る形質転換体およびそれを用いた乳酸の製造方法は、低pHでもアルカリによる中和を行わずに高い生産性で乳酸を生産できるため、乳酸の工業的な製造方法として好適に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、組換えベクターpXL T-TL2の構造の模式図である。

[図2]図2は、組換えベクターpTf2 (MCS) -ura4の構造の模式図である。

[図3]図3は、組換えベクターpSL6の構造の模式図である。

[図4]図4は、組換えベクターpSL12の構造の模式図である。

[図5]図5は、組換えベクターpSL17の構造の模式図である。

[図6]図6は、実施例[例3]における、ジャーファーメンター培養中のOD660の経時変化を示すグラフである。図中の三角印は、試験管発酵のため、菌体を含む少量の培養液を抜き出した時点を示す。

[図7]図7は、実施例[例3]における、ジャーファーメンター培養中の乳酸濃度の経時変化を示すグラフである。図中の三角印は、試験管発酵のため、菌体を含む少量の培養液を抜き出した時点を示す。

[図8]図8は、実施例[例3]における、ジャーファーメンター培養中のグルコース濃度の経時変化を示すグラフである。図中の三角印は、試験管発酵のため、菌体を含む少量の培養液を抜き出した時点を示す。

[図9]図9は、実施例[例3]における、ジャーファーメンター培養中のエタノール濃度の経時変化を示すグラフである。図中の三角印は、試験管発酵のため、菌体を含む少量の培養液を抜き出した時点を示す。

[図10]図10は、実施例[例3]における、試験管発酵中の乳酸濃度の経時変化を示すグラフである。

[図11]図11は、実施例[例3]における、試験管発酵中のグルコース濃度の経時変化を示すグラフである。

[図12]図12は、実施例[例3]における、試験管発酵中のエタノール濃度の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] [形質転換体 A]

本発明の第一の態様に係る形質転換体（以下、「形質転換体 A」）は、シゾサッカロミセス・ポンベ（以下、S. ポンベともいう）を宿主とし、ラクトバチルス・ペントーサスの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれ、かつ S. ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活している、形質転換体である。

[0015] <S. ポンベ>

宿主である S. ポンベは、シゾサッカロミセス属に属する酵母（分裂酵母）であり、他の酵母に比べて特に耐酸性に優れる微生物である。また、S. ポンベは、サッカロミセス・セレビスエ等の他の酵母に比べ、高濃度のグルコース下における乳酸の生産性に優れ、高密度培養（大量の酵母を用いた培養）にも適していることがわかった。そのため、S. ポンベの形質転換体を用いることにより、極めて高い生産性で乳酸を製造できる。

なお、S. ポンベの染色体の全塩基配列は、サンガー研究所のデータベース「GeneDB」に「Schizosaccharomyces pombe Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)」として、収録され、公開されている。本明細書記載の S. ポンベの遺伝子の配列データは上記データベースから遺伝子名や上記系統名で検索して、入手できる。

[0016] <ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子>

S. ポンベにおけるピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子（ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子、以下「PDC 遺伝子」ともいう。）群には、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 をコードする遺伝子（以下、「PDC 1 遺伝子」という。）、ピルビン酸脱炭酸酵素 2 をコードする遺伝子（以下、「PDC 2 遺伝子」という。）、ピルビン酸脱炭酸酵素 3 をコードする遺伝子（以下、「PDC 3 遺伝子」という。）、ピルビン酸脱炭酸酵素 4 をコードする遺伝子（以下、「PDC 4 遺伝子」という。）の 4 種類がある。なかでも、S. ポンベに

においては、PDC 2 遺伝子とPDC 4 遺伝子が主要な機能を持つPDC 遺伝子である。各PDC 遺伝子の系統名は以下の通りである。

PDC 1 遺伝子 (P d c 1) ; SPAC13A11.06

PDC 2 遺伝子 (P d c 2) ; SPAC1F8.07c

PDC 3 遺伝子 (P d c 3) ; SPAC186.09

PDC 4 遺伝子 (P d c 4) ; SPAC3G9.11c

上記PDC 遺伝子の配列データは、前記S. ポンベ遺伝子データベースから遺伝子名や系統名で検索して入手できる。

[0017] 野生型S. ポンベでは、解糖系によりグルコースをピルビン酸まで代謝し、前述のPDC 遺伝子から発現されるピルビン酸脱炭酸酵素によりピルビン酸がアセトアルデヒドに変換され、次いで該アセトアルデヒドがアルコール脱水素酵素によりエタノールへと変換されることでエタノール発酵が行われる。また、野生型S. ポンベは機能を持った乳酸脱水素酵素遺伝子（乳酸脱水素酵素 (LDH) をコードする遺伝子、以下「LDH 遺伝子」ともいう。）を有していないことより、ピルビン酸から乳酸が生成するルートは存在しない。

一方、組み込まれたLDH 遺伝子から発現されるLDHは、ピルビン酸を乳酸に還元することにより乳酸を産生させる。そのため、野生型S. ポンベにLDH 遺伝子を組み込んで乳酸を産生できるようにしても、そのままではエタノール発酵と乳酸発酵の両方を行うことになるため、乳酸の生産性が十分に高くない。

[0018] 本発明に係る形質転換体Aは、前記ピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群のうち、一部が欠失または失活した染色体を有する。形質転換体のPDC 遺伝子群の一部が欠失または失活していることにより、形質転換体のエタノール発酵の効率が低下し、エタノールに変換されるピルビン酸量が少なくなるため、乳酸の生産性が向上する。ただし、PDC 遺伝子群を完全に欠失または失活させると、エタノール発酵が全く行えなくなって生育が阻害されるため、欠失または失活させるのはPDC 遺伝子群の一部とする。

[0019] 欠失または失活させるPDC遺伝子は、PDC2遺伝子であることが特に好ましい。PDC2遺伝子は、特に主要な機能を持つPDC遺伝子である。

前述のように、PDC遺伝子を全て欠失または失活させてしまうと、その形質転換体はエタノール発酵が行えなくなるために生育が阻害される。そのため、PDC遺伝子の欠失または失活は、生育に必要なエタノール発酵能を残して十分な形質転換体量が得られるようにしつつ、エタノール発酵能を低下させて乳酸の発酵効率を向上させられるように行わなければならない。この課題に対して本発明者等が検討を行った結果、PDC2遺伝子を欠失または失活させるとPDC4遺伝子がある程度活性化し、十分な形質転換体量が得られる程度のエタノール発酵能と、高い発酵効率での乳酸の生産が両立できることを見出した。

[0020] PDC遺伝子の欠失や失活は、公知の方法で行うことができる。たとえば、Latour法(Nucleic Acids Res誌、2006年、34巻、e11頁、国際公開第2007/063919号等に記載)を用いることによりPDC遺伝子を欠失させることができる。

また、PDC遺伝子の塩基配列の一部に欠失、挿入、置換、付加を起こすことにより、該PDC遺伝子を失活させることもできる。これらの欠失、挿入、置換、付加による変異は、それらのいずれか1つのみを起こしてもよく、2つ以上を起こしてもよい。

[0021] PDC遺伝子の一部に前記変異を導入する方法は、公知の方法を用いることができる。たとえば、変異剤を用いた突然変異分離法(酵母分子遺伝学実験法、1996年、学会出版センター)や、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を利用したランダム変異法(ピーシーアール・メソッズ・アプリケーション(PCR Methods Appl.)、1992年、第2巻、p. 28-33.)等が挙げられる。

[0022] また、一部に変異が導入されたPDC遺伝子は、温度感受性の変異型ピルビン酸脱炭酸酵素を発現するものであってもよい。温度感受性の変異型ピルビン酸脱炭酸酵素とは、ある培養温度においては野生型のピルビン酸脱炭酸

酵素と同等の活性を示すが、特定の培養温度以上になると活性の消失または低下が見られる酵素である。

このような変異型ピルビン酸脱炭酸酵素を発現する突然変異株は、温度により活性が制限されない条件下では野生型酵母と同等の生育速度を示し、活性が制限される特定の温度条件下において生育速度が著しく低下するものを選択することで得ることができる。

[0023] <LDH遺伝子>

本発明に係る形質転換体Aは、LDH遺伝子を有する。前記のように、S. ポンベは本来LDH遺伝子を有していない。したがって、S. ポンベ以外の生物のLDH遺伝子を遺伝子工学的方法でS. ポンベに導入して形質転換体を得る。

[0024] 本発明に係る形質転換体Aは、ラクトバチルス・ペントーサスのLDH (LpLDH) (GenBank accession number: D90340) 遺伝子を有する。なお、GenBankはNCBI (National Center For Biotechnology Information) のデータベースである。

[0025] 本発明に係る形質転換体Aに組み込まれるLpLDH遺伝子は、1つであってもよく、2以上であってもよい。LDH遺伝子を複数導入することにより、LDH遺伝子の発現効率を高めることができ、ひいては乳酸の生産効率が向上すると考えられる。

[0026] 本発明に係る形質転換体Aは、LpLDH遺伝子に加えて、他の生物種由来のLDH遺伝子が組み込まれていてもよい。ただし、後記実施例に示すように、PDC遺伝子群の一部が欠失または失活しているS. ポンベ形質転換体に組み込むことによって乳酸を産生する形質転換体を得られるLDH遺伝子は、限定される。当該他の生物種由来のLDH遺伝子としては、ヒト等の哺乳動物のLDH遺伝子、ペディオコッカス・アシディラクティシ (Pediococcus acidilactici) のLDH遺伝子 (PaLDH遺伝子) (GenBank accession number: Q59

645) が挙げられる。中でも、ヒトのLDH遺伝子(HsLDH)が好ましい。LpLDH遺伝子とHsLDH遺伝子を組み合わせて組み込むことにより、同数のHsLDH遺伝子を組み込んだ場合よりも、顕著に乳酸産生能が向上する。

[0027] [形質転換体の製造]

本発明に係る形質転換体Aは、PDC遺伝子群の一部が欠失または失活したS. ポンベを宿主とし、これにLpLDH遺伝子を遺伝子工学的方法でS. ポンベに導入して得られる。また、PDC遺伝子群が欠失も失活もしていないS. ポンベを宿主とし、該S. ポンベにLpLDH遺伝子を遺伝子工学的方法で導入して形質転換体を得て、その後得られた形質転換体のPDC遺伝子群の一部を欠失または失活させて、本発明に係る形質転換体Aを得ることもできる。後述の実施例では、前者の方法で目的の形質転換体を製造したが、後者の方法でもほぼ同等の形質転換体を製造できる。

[0028] 本発明に係る形質転換体Aが、LpLDH遺伝子とHsLDH遺伝子の両方が組み込まれている場合、該形質転換体は、前記の方法により得られた形質転換体（すなわち、LpLDH遺伝子が組み込まれており、かつPDC遺伝子群の一部が欠失または失活したS. ポンベ形質転換体）を宿主とし、該形質転換体にHsLDH遺伝子を遺伝子工学的方法で導入して得られる。また、HsLDH遺伝子が組み込まれており、かつPDC遺伝子群の一部が欠失または失活したS. ポンベ形質転換体を宿主とし、該S. ポンベ形質転換体にLpLDH遺伝子を遺伝子工学的方法で導入してもよい。さらに、PDC遺伝子群が欠失も失活もしていないS. ポンベを宿主とし、該S. ポンベに遺伝子工学的方法によりLpLDH遺伝子およびHsLDH遺伝子を同時または順次（順不同）導入して形質転換体を得て、その後得られた形質転換体のPDC遺伝子群の一部を欠失または失活させることによっても、本発明に係る形質転換体AのうちのLpLDH遺伝子とHsLDH遺伝子の両方が組み込まれたものを得られる。

[0029] 以下、PDC遺伝子群の一部が欠失または失活したS. ポンベを宿主とし

、これにL p L D H遺伝子（必要に応じて、L p L D H遺伝子とH s L D H遺伝子の両方）を遺伝子工学的方法で導入する方法を例に、形質転換体の製造方法を説明する。

[0030] <宿主>

宿主とするS. ポンベは、野生型であってもよく、用途に応じて特定の遺伝子を欠失または失活させた変異型であってもよい。特定の遺伝子を欠失または失活させる方法としては、公知の方法を用いられる。具体的には、L a t o u r法（N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h誌、第34巻、e 1 1ページ、2006年；国際公開第2007/063919号等に記載）を用いることにより遺伝子を欠失させられる。また、変異剤を用いた突然変異分離法（酵母分子遺伝学実験法、1996年、学会出版センター）や、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を利用したランダム変異法（P C R M e t h o d s A p p l i c a t i o n誌、第2巻、28-33ページ、1992年）等により遺伝子の一部に変異を導入することにより該遺伝子を失活させられる。特定遺伝子を欠失または失活させたシゾサッカロミセス属酵母宿主としては、たとえば、国際公開第2002/101038号、国際公開第2007/015470号等に記載されている。

また、特定の遺伝子の削除または不活性化を行う部分はO R F（オープンリーディングフレーム）部分であってもよく、発現調節配列部分であってもよい。特に好ましい方法は、構造遺伝子のO R F部分をマーカー遺伝子に置換するP C R媒介相同組換え法（Y e a s t誌、第14巻、943-951ページ、1998年）による削除または不活性化の方法である。

[0031] P D C遺伝子が欠失または失活した変異体は、本発明に係る形質転換体Aを製造するための宿主として好ましく使用できる。さらに、P D C遺伝子以外にさらにP D C遺伝子以外の特定遺伝子を欠失または失活させたS. ポンベを宿主とすることもできる。プロテアーゼ遺伝子等を欠失または失活させることにより異種蛋白質の発現効率を高めることができ、本発明における宿主に適用することにより乳酸の生産効率の向上が期待できる。

[0032] さらに宿主として使用する S. ポンベには、形質転換体を選択するためのマーカーを有するものを用いることが好ましい。たとえば、ある遺伝子が欠落していることにより特定の栄養成分が生育に必須である宿主を使用することが好ましい。目的遺伝子配列を含むベクターにより形質転換をして形質転換体を作製する場合、ベクターにこの欠落している遺伝子（栄養要求性相補マーカー）を組み込んでおくことにより、形質転換体では宿主の栄養要求性が消失する。この宿主と形質転換体の栄養要求性の相違により、両者を区別して形質転換体を得ることができる。

たとえば、オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（*ura4* 遺伝子）が欠失または失活してウラシル要求性となっているシゾサッカロミセス属酵母を宿主とし、*ura4* 遺伝子（栄養要求性相補マーカー）を有する発現ベクターにより形質転換した後、ウラシル要求性が消失したものを選択することにより、発現ベクターが組み込まれた形質転換体を得ることができる。宿主において欠落により栄養要求性となる遺伝子は、形質転換体の選択に用いられるものであれば *ura4* 遺伝子には限定されず、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*leu1* 遺伝子）等であってもよい。

[0033] また、PDC 遺伝子群が欠失も失活もしていない S. ポンベを形質転換体製造のための宿主として使用することもできる。この場合の宿主としては、PDC 遺伝子以外の前記のような遺伝子（栄養要求性マーカーやプロテアーゼ遺伝子など）が欠失または失活しているものを使用できる。該宿主を用いて形質転換体を製造した後、得られた形質転換体の PDC 遺伝子群の一部を欠失または失活させて、本発明に係る形質転換体 A を得ることができる。

[0034] <LDH 遺伝子導入方法>

遺伝子工学的方法で宿主に LDH 遺伝子を導入する方法としては、公知の方法を使用できる。S. ポンベを宿主としてこれに異種蛋白質の構造遺伝子を導入する方法としては、たとえば、日本国特開平 5 - 15380 号公報、国際公開第 95 / 09914 号、日本国特開平 10 - 234375 号公報、日本国特開 2000 - 262284 号公報、日本国特開 2005 - 1986

12号公報、国際公開第2011/021629号などに記載の方法を使用できる。

[0035] <発現カセット>

発現カセットとは、目的の蛋白質を発現するために必要なDNAの組み合わせであり、目的の蛋白質をコードする構造遺伝子と宿主内で機能するプロモーターとターミネーターを含む。本発明に係る形質転換体Aの製造において、LpLDH遺伝子またはHsLDH遺伝子の発現カセットは、それぞれ、LpLDH遺伝子またはHsLDH遺伝子とS. ポンベ内で機能するプロモーターとS. ポンベ内で機能するターミネーターを含む。該発現カセットは、5' -非翻訳領域、3' -非翻訳領域のいずれか1つ以上が含まれていてもよい。さらに、前記栄養要求性相補マーカが含まれていてもよい。好ましい発現カセットは、LDH遺伝子、プロモーター、ターミネーター、5' -非翻訳領域、3' -非翻訳領域、栄養要求性相補マーカを含む発現カセットである。1の発現カセットには複数のLDH遺伝子が存在していてもよい。1の発現カセット中のLDH遺伝子の数は1~8が好ましく、1~5がより好ましい。また、1の発現カセット中に複数のLDH遺伝子が含まれている場合、2種類以上のLDH遺伝子（たとえば、1または2以上のLpLDH遺伝子と、1または2以上のHsLDH遺伝子）を含んでいてもよい。

[0036] 発現カセットに含めるLpLDH遺伝子またはHsLDH遺伝子の遺伝子配列としては、野生型がコードする遺伝子をそのまま用いてもよいが、宿主として用いるS. ポンベ内での発現量を増大させるために、野生型の遺伝子配列を、S. ポンベにおいて使用頻度の高いコドンに改変してもよい。

[0037] S. ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターは、本発明に係る形質転換体Aにより乳酸が蓄積して酸性になっても（pH6以下になっても）、形質転換体内で機能してLDHの発現を維持できるものであればよい。S. ポンベ内で機能するプロモーターとしては、S. ポンベが本来有するプロモーター（転写開始活性が高いものが好ましい）やS. ポンベが本来有し

ないプロモーター（ウイルス由来のプロモーターなど）を使用できる。なお、プロモーターはベクター内に2種以上存在していてもよい。

[0038] S. ポンベが本来有するプロモーターとしては、たとえば、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター、チアミンの代謝に関与する *nm t 1* 遺伝子プロモーター、グルコースの代謝に関与するフルクトース-1、6-ビスホスファターゼ遺伝子プロモーター、カタボライト抑制に関与するインベルターゼ遺伝子のプロモーター（国際公開第99/23223号参照）、熱ショック蛋白質遺伝子プロモーター（国際公開第2007/26617号参照）などが挙げられる。

S. ポンベが本来有しないプロモーターとしては、たとえば、日本国特開平5-15380号公報、日本国特開平7-163373号公報、日本国特開平10-234375号公報に記載されている動物細胞ウイルス由来のプロモーターが挙げられ、hCMVプロモーター、SV40プロモーターが好ましい。

[0039] S. ポンベ内で機能するターミネーターとしては、S. ポンベが本来有するターミネーターやS. ポンベが本来有しないターミネーターを使用できる。なお、ターミネーターはベクター内に2種以上存在していてもよい。

ターミネーターとしては、たとえば、日本国特開平5-15380号公報、日本国特開平7-163373号公報、日本国特開平10-234375号公報に記載されているヒト由来のターミネーターが挙げられ、ヒトリポコルチンIのターミネーターが好ましい。

[0040] <発現ベクターA>

本発明に係る形質転換体Aは、LpLDH遺伝子を含む発現カセット、またはLpLDH遺伝子を含む発現カセットおよびHsLDH遺伝子を含む発現カセットの両方を、染色体中に有するか、または染色体外遺伝子として有する。発現カセットを染色体中に有するとは、宿主細胞の染色体中の1カ所以上に発現カセットが組み込まれていることであり、染色体外遺伝子として有するとは、発現カセットを含むプラスミドを細胞内に有するということである。

ある。L p L D H 遺伝子を含む発現カセットを含む形質転換体、または H s L D H 遺伝子を含む発現カセットを含む形質転換体は、それぞれ、各発現カセットを含む発現ベクターを用いて宿主である S. ポンベを形質転換することにより得られる。

なお、以下、L D H 遺伝子を含む発現カセットを含む発現ベクターを、本発明に係る「発現ベクター A」ということがある。

[0041] 発現ベクター A は、環状 D N A 構造または線状 D N A 構造を有するベクターに、該発現カセットを組み込むことにより製造できる。後述するように、該発現カセットが、宿主の細胞内で染色体外遺伝子として保持される形質転換体を作製する場合には、発現ベクター A は、シゾサッカロミセス属酵母内で複製されるための配列、即ち、自律複製配列 (Autonomously Replicating Sequence: A R S) を含むプラスミドであることが好ましく、該発現カセットが、宿主細胞の染色体中に組み込まれた形質転換体を作製する場合には、発現ベクター A は、線状 D N A 構造であり、かつ A R S を有していないものとして、宿主細胞へ導入されることが好ましい。たとえば、発現ベクター A は、線状 D N A からなるベクターであってもよく、宿主への導入時に、線状 D N A に切り開くための制限酵素認識配列を備える環状 D N A 構造のベクターであってもよい。また、発現ベクター A は、後述するような形質転換体を選択するためのマーカーを有することが好ましい。該マーカーとしては、たとえば、u r a 4 遺伝子 (栄養要求性相補マーカー)、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (l e u 1 遺伝子) が挙げられる。

[0042] 各 L D H 遺伝子は S. ポンベの染色体に導入することが好ましい。染色体に L D H 遺伝子を導入することにより継代の維持安定性に優れた形質転換体を得られる。また、L D H 遺伝子は染色体に複数導入することもできる。本発明に係る形質転換体 A において、染色体に組み込まれた L p L D H 遺伝子の数は 1 ~ 2 0 が好ましく、特に 1 ~ 8 が好ましい。また、本発明に係る形質転換体 A が H s L D H 遺伝子も有する場合、該形質転換体の染色体に組み

込まれたH s L D H遺伝子の数は1～20が好ましく、特に1～8が好ましい。

[0043] 染色体にL D H遺伝子を導入する方法としては、公知の方法を使用できる。たとえば、前記日本国特開2000-262284号公報に記載の方法で染色体にL D H遺伝子を複数導入できる。また、この方法で染色体にL D H遺伝子を1個導入することもできる。また、後述のように、染色体の複数の箇所に1個または複数のL D H遺伝子を導入することもできる。

L p L D H遺伝子またはH s L D H遺伝子をS. ポンベの染色体に導入する方法としては、各L D H遺伝子を有する発現カセットと組換え部位とを有するベクターを用い、相同組換え法により導入する方法が好ましい。

[0044] ベクターの組換え部位は、S. ポンベの染色体における相同組換えの標的部位に対して相同組換えを行わせることのできる塩基配列を有する部位である。また、標的部位は、S. ポンベの染色体内で発現カセットを組み込む標的となる部位である。標的部位は、ベクターの組換え部位を該標的部位に対して相同組換えを行わせる塩基配列とすることにより自由に設定できる。

前記組換え部位の塩基配列と標的部位の塩基配列との相同性は70%以上とすることが必要である。また、組換え部位の塩基配列と標的部位の塩基配列との相同性は、相同組換えが起きやすくなる点から、90%以上とすることが好ましく、95%以上であることがより好ましい。このような組換え部位を有するベクターを用いることにより、発現カセットが相同組換えにより標的部位に組み込まれる。

組換え部位の長さ（塩基数）は、20～2000bpであることが好ましい。組換え部位の長さが20bp以上であれば、相同組換えが起きやすくなる。また、組換え部位の長さが2000bp以下であれば、ベクターが長くなりすぎて相同組換えが起き難くなることを防ぎやすい。組換え部位の長さは100bp以上であることがより好ましく、200bp以上であることがさらに好ましい。また、組換え部位の長さは800bp以下であることがより好ましく、400bp以下であることがさらに好ましい。

[0045] 発現ベクターAは、前記発現カセットと組換え部位以外に他のDNA領域を有していてもよい。たとえば、大腸菌内での複製のために必要な「ori」と呼ばれる複製開始領域や抗生物質耐性遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子等）が挙げられる。これらは大腸菌を使用してベクターを構築する場合に通常必要とされる遺伝子である。ただし、上記複製開始領域は後述のようにベクターを宿主の染色体に組み込む際には除去されることが好ましい。

[0046] 染色体にLDH遺伝子を組み込む場合、発現ベクターAは、S. ポンベの細胞に導入する際には線状DNA構造で導入することが好ましい。すなわち、通常用いられるプラスミドDNAのような環状DNA構造を有するベクターである場合には、制限酵素でベクターを線状に切り開いた後にS. ポンベの細胞に導入することが好ましい。

この場合、環状DNA構造を有するベクターを切り開く位置は、組換え部位内とする。これにより、切り開かれたベクターの両端にそれぞれ組換え部位が部分的に存在することとなり、相同組換えによりベクター全体が染色体の標的部位に組み込まれる。

発現ベクターAは、両端それぞれに組換え部位の一部が存在するような線状DNA構造とすることができれば、環状DNA構造を有するベクターを切り開く方法以外の方法で構築してもよい。

[0047] 発現ベクターAとしては、たとえば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等の大腸菌由来のプラスミドを好適に用いることができる。

この場合、相同組換えに用いる際のプラスミドベクターは、大腸菌内での複製のために必要な「ori」と呼ばれる複製開始領域が除去されていることが好ましい。これにより、上述したベクターを染色体に組み込む際に、その組み込み効率を向上させることができる。

複製開始領域が除去されたベクターの構築方法は特に限定されないが、日本国特開2000-262284号公報に記載されている方法を用いることが好ましい。すなわち、組換え部位内の切断箇所に複製開始領域が挿入され

た前駆体ベクターを構築しておき、前述のように線状DNA構造とすると同時に複製開始領域が切り出されるようにする方法が好ましい。これにより、簡便に複製開始領域が除去されたベクターを得ることができる。

また、日本国特開平5-15380号公報、日本国特開平7-163373号公報、国際公開第96/23890号、日本国特開平10-234375号公報等に記載された発現ベクターやその構築方法を適用して、発現カセットおよび組換え部位を有する前駆体ベクターを構築し、さらに通常の遺伝子工学的手法で該前駆体ベクターから複製開始領域を除去して相同組換えに用いるベクターを得る方法であってもよい。

[0048] <標的部位>

発現ベクターAを組み込む標的部位は、S. ポンベの染色体中の1箇所に存在していてもよく、2箇所以上に存在していてもよい。標的部位が2箇所以上存在している場合、S. ポンベの染色体の2箇所以上に該ベクターを組み込める。また、1の発現カセット中のLDH遺伝子を複数とした場合には、標的部位の1箇所に複数のLDH遺伝子を組み込むことができる。さらに、2種以上の標的部位に、それぞれの標的部位に対応する組換え部位を有する2種以上のベクターを用いて、発現カセットを組み込むこともできる。該方法で、S. ポンベの染色体に複数のLDH遺伝子を組み込むことができ、これによりLDHの発現量を増大させ、乳酸の生産性を向上させることができる。たとえば、LpLDH遺伝子を含む発現カセットを第1の標的部位を有するベクターに組み込み、HsLDH遺伝子を含む発現カセットを第2の標的部位を有するベクターに組み込み、該ベクターを用いてPDC遺伝子群の一部が欠失または失活しているS. ポンベを宿主として形質転換することにより、本発明に係る形質転換体AのうちHsLDH遺伝子も有する形質転換体を得られる。

[0049] 1箇所の標的部位に発現カセットを組み込む場合、たとえば日本国特開2000-262284号公報に記載の方法記載の標的部位を使用できる。異なる組込み部位を有する2種以上のベクターを用いて、異なる標的部位にそ

れぞれベクターを組み込むことができる。しかし、染色体の2箇所以上にベクターを組み込む場合、この方法は煩雑である。

[0050] 染色体中に複数箇所存在する互いに実質的に同一の塩基配列部分を標的部位として、この複数箇所の標的部位にそれぞれベクターを組み込むことができれば、1種類のベクターを使用して染色体の2箇所以上にベクターを組み込むことができる。互いに実質的に同一の塩基配列とは、塩基配列の相同性が90%以上であることを意味する。標的部位同士の相同性は95%以上であることが好ましい。また、互いに実質的に同一である塩基配列の長さは、前記ベクターの組換え部位を包含する長さであり、1000bp以上であることが好ましい。1箇所の標的部位に複数のLDH遺伝子が組み込まれている場合に比較して、LDH遺伝子の組み込み数が同一であっても、複数存在する標的部位にLDH遺伝子が分散して組み込まれている場合には、形質転換体が増殖する際にLDH遺伝子が染色体から1度に脱落することが少なくなり、形質転換体の継代における維持安定性が向上する。

[0051] 染色体中に複数箇所存在する標的部位としては、トランスポゾン遺伝子Tf2が好ましい。Tf2は、S. ポンベの3本（一倍体）の染色体それぞれに合計13箇所存在するトランスポゾン遺伝子であり、長さ（塩基数）は約4900bpであり、それらの遺伝子間における塩基配列相同性は99.7%であることが知られている（下記文献参照）。

Nathan J. Bowen et al, "Retrotransposons and Their Recognition of pol II Promoters: A Comprehensive Survey of the Transposable Elements From the Complete Genome Sequence of Schizosaccharomyces pombe", Genome Res. 2003 13: 1984-1997

[0052] 染色体に13箇所存在するTf2の1箇所のみにベクターを組み込むことができる。この場合、2個以上のLDH遺伝子を有する発現ベクターAを組

み込むことにより、2個以上のLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。また、Tf2の2箇所以上に発現ベクターAを組み込むことにより、2個以上のLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。この場合、2個以上のLDH遺伝子を有する発現ベクターAを組み込むことにより、さらに多くのLDH遺伝子を有する形質転換体を得ることができる。Tf2の13箇所すべてに発現ベクターAが組み込まれると、形質転換体の生存や増殖に対する負荷が大きくなりすぎるおそれがある。好ましくは、13箇所のTf2の8箇所以下に発現ベクターAが組み込まれることが好ましく、5箇所以下に発現ベクターAが組み込まれることがより好ましい。

[0053] <形質転換方法>

形質転換方法は、公知の形質転換方法がいずれも用いられる。該形質転換方法としては、たとえば、酢酸リチウム法 [K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489 (1990)]、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、ガラスビーズ法など従来周知の方法や、日本国特開2005-198612号公報記載の方法が挙げられる。また、市販の酵母形質転換用キットを用いてもよい。

[0054] S. ポンベ宿主を相同組み換え法で形質転換する方法としては、公知の相同組み換え法を使用できる。本発明に係る形質転換体を製造する際の形質転換方法としては、上述のPDC遺伝子群の一部が欠失または失活したS. ポンベを宿主とし、その染色体に上述のベクターを用いて、発現カセットを相同組換えにより組み込む方法が好ましい。該方法によれば、本発明に係る形質転換体を簡便に製造できる。

[0055] 形質転換体の製造では、通常、相同組換えを行った後、得られた形質転換体を選択する。選択する方法としては、たとえば、以下に示す方法が挙げられる。前記栄養要求性マーカーにより形質転換体を選択できる培地によりスクリーニングし、得られたコロニーから複数を選択する。次に、それらを別々に液体培養した後、それぞれの培養液における異種蛋白質（本発明におい

ては、L p L D HまたはH s L D H)の発現量を調べ、該異種蛋白質の発現量がより多い形質転換体を選択する。それら選択した形質転換体に対してパルスフィールドゲル電気泳動法によるゲノム解析を行うことにより、染色体に組み込まれたベクターの数や発現カセットの数を調べられる。

染色体に組み込まれるベクターの数は組み込み条件などを調整することによりある程度は調整可能である。ベクターの大きさ(塩基数)や構造により、組み込み効率や組み込み数も変化すると考えられる。

[0056] 一般には発現カセットの数が多いほどL D Hの発現効率が高まり、ひいては乳酸の生産効率が高まると予想される。このため、S. ポンベの染色体に複数のL D H遺伝子を組み込むことによりL D Hの発現量を増大させ、乳酸の生産性を向上させることができると考えられる。しかし、発現カセットの数が多すぎると細胞の生存や増殖に対する負荷が増大し、ひいては乳酸生産効率が低下することも考えられる。一方で、1の発現カセットに複数の遺伝子を含ませることにより、染色体に組み込む発現カセットの数を抑えつつ、多数のL D H遺伝子を染色体に組み込むことができる。しかし、ベクターが大きくなると、染色体に組み込まれる確率が低下し、組み込まれるベクター数を多くすることが困難となり、ひいては形質転換体を得ること自体が困難となると考えられる。

[0057] そこで、本発明者等は、適度な大きさの発現カセットを染色体に比較的小数組み込んだ場合でも、より高い乳酸生産効率を有するS. ポンベ形質転換体を得るためには、S. ポンベにおける発現効率が高く、かつ発現したL D Hの活性も高い外来L D H遺伝子を選択して導入することが必要であると考えた。様々な微生物由来のL D H遺伝子を調べたところ、L p L D H遺伝子をP D C遺伝子群の一部が欠失または失活しているS. ポンベ形質転換体に組み込むことにより、H s L D H遺伝子を組み込んだ場合と同様に、乳酸生産効率が非常に高い形質転換体を得られることがわかった。さらに驚くべきことに、L p L D H遺伝子とH s L D H遺伝子をともに組み込むことによって、同数のH s L D H遺伝子を組み込んだ場合よりも乳酸生産効率が顕著に

高い形質転換体が得られた。

[0058] [乳酸の製造方法]

本発明に係る乳酸の製造方法は、前記本発明に係る形質転換体 A を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法である。

本発明に係る形質転換体 A を、糖を含む培養液中で培養することにより、解糖系により該糖から得られるピルビン酸が乳酸脱水素酵素により還元されて乳酸が産生され、培養液に産出された乳酸を培養液から取得することで乳酸を製造できる。

[0059] 乳酸の製造に用いる培養液としては、糖を含有する公知の酵母培養培地を用いることができ、さらに S. ポンベが資化しうる窒素源、無機塩類等を含有し、S. ポンベの培養を効率良く行えるものであればよい。培養液としては、天然培地を用いてもよく、合成培地を用いてもよい。

炭素源である糖としては、たとえば、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース等の糖が挙げられる。窒素源としては、たとえば、アンモニア、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機酸または無機酸のアンモニウム塩、ペプトン、カザミノ酸、イーストエキス等が挙げられる。無機塩類としては、たとえば、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。さらには、プロテオリピドなどの発酵促進因子などを含ませることができる。

[0060] 本発明に係る乳酸の製造方法では、糖として特にグルコースを含有する培養液を用いることが好ましい。培養初期の培養液（100質量%）中のグルコース濃度は1質量%以上が好ましく、1～50質量%がより好ましく、2～16質量%がさらに好ましい。培養によりグルコース濃度が低下することにより、必要によりグルコースを添加して培養を継続することが好ましい。培養終期のグルコース濃度は1質量%以下となってもよい。また、乳酸を分離しながら培養液を循環させて連続的に培養を行う場合には、上記グルコース濃度を維持することが好ましい。グルコース濃度を2質量%以上とすることにより、乳酸の生産性がより向上する。また、培養液中のグルコースを16

質量％以下とすることにより、乳酸の生産効率がより向上する。

[0061] また、乳酸製造の生産性を高くするために、高密度培養を行うことが好ましい。高密度培養では、培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を乾燥菌体重量換算値で表して0.1～5 g/Lとすることが好ましい。培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を乾燥菌体重量換算値で表して0.2～2 g/Lとすることがより好ましい。初発菌体濃度を高くすることにより短時間で高い生産性を達成できる。また、初発菌体濃度があまりに高すぎると菌体の凝集や精製効率の低下などの問題が生じるおそれがある。

なお、後述の実施例等で示す菌体濃度は、日本分光社製可視紫外分光器 V550 によって測定した波長 660 nm の光の吸光度 (OD 660) から換算した値である。660 nm における OD 660 = 1 は、分裂酵母乾燥重量の 0.2 g、湿重量の 0.8 g に相当する。

[0062] 培養には公知の酵母培養方法を用いることができ、たとえば振とう培養、攪拌培養等により行うことができる。

また、培養温度は、23～37℃であることが好ましい。また、培養時間は適宜決定できる。

また、培養は、回分培養であってもよく、連続培養であってもよい。たとえば、回分培養で培養を行った後、菌体を培養液から分離して、乳酸を含む培養液を取得できる。また、連続培養法では、たとえば、培養中の培養槽から培養液の一部を抜き出し、抜き出した培養液から乳酸を分離するとともに、培養上清を回収し、該培養上清にグルコースや新たな培養液を加えて培養槽に戻すことを繰り返して、連続的に培養する方法が挙げられる。連続培養を行うことにより、乳酸の生産性がより向上する。

[0063] 本発明に係る形質転換体 A 用いた乳酸の製造方法では、耐酸性に特に優れた S. ポンベを用いているため、乳酸の蓄積により低 pH (pH 2～4 程度) となっても中和を行わずに乳酸を生産できる。そのため、培養液の pH が 3.5 以下になった後も、さらに培養を継続する連続培養により乳酸を製造できる。培養終期の pH や連続培養における pH は、2～3.5 が好ましく

、特に2.3～3.5が好ましい。乳酸の生産性を高くするために、培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続することが好ましい。本発明に係る形質転換体Aは耐酸性が優れているため、該形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続できる。

[0064] 培養液からの乳酸の取得は、公知の方法を用いることができる。特に、培養液中の乳酸を中和することなく、培養液と乳酸を分離して、乳酸を取得することが好ましい。たとえば、培養終了後の培養液から遠心分離により菌体を分離し、pH1以下にした後にジエチルエーテルや酢酸エチル等により抽出する方法、イオン交換樹脂に吸着させて洗浄した後に溶出させる方法、活性炭を用いて不純物を除去する方法、酸触媒の存在下でアルコールと反応させた後に蒸留する方法、分離膜を用いて分離する方法が挙げられる。また、場合によっては培養液中の乳酸を中和した後培養液と乳酸塩を分離して、乳酸を取得することもできる。たとえば、培養液中の乳酸をカルシウム塩またはリチウム塩に変換し、この中和塩を晶析する方法で乳酸を取得することもできる。

[0065] 以上説明した本発明に係る乳酸の製造方法は、特に耐酸性に優れたS. ポンベを宿主とする形質転換体を用いるため、アルカリによる中和を行わなくても高い生産性で簡便に乳酸を製造できる。また、PDC遺伝子群の一部が欠失または失活していることでエタノール発酵の効率が低下しているため、乳酸の対糖収率（消費された糖の量に対する乳酸の生産量の割合）が向上する。本発明においては、乳酸の対糖収率を50%以上とすることが容易にできる。場合により、乳酸の対糖収率は70%以上にも達する。また、本発明に係る乳酸の製造方法は、高濃度のグルコース存在下、および高濃度の形質転換体による高密度培養にも適している。

実施例

[0066] 以下、実施例および比較例を示して本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の記載によっては限定されない。また、本実施例においては特に断りのない限り「%」は「質量%」を意味する。

[0067] [例1]

<S. ポンベPDC2遺伝子削除株の作製>

S. ポンベのウラシル要求性株ARC010株（遺伝子型：h⁻、leu1-32、ura4-D18）（国際公開第2007/015470号参照。）をLatour法（Nucleic Acids Res. 誌、2006年、34巻、e11頁、国際公開第2007/063919号に記載）に従って形質転換し、PDC2遺伝子（系統名：SPAC1F8.07c）を削除した削除株（IGF543株）を作製した。

削除断片の作製には、S. ポンベのARC032株（遺伝子型：h⁻）（国際公開第2007/015470号参照。）からDNeasy（キアゲン社製）によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表1に示す塩基配列を有する8種の合成オリゴDNA（オペロン社製）を使用した。

[0068] [表1]

pdc2削除断片の作製のためのオリゴDNA		
オリゴDNA	塩基配列	配列番号
UF	5'-CTCTCCAGCTCCATCCATAAG-3'	1
UR	5'-GACACAACCTTCCTACCAAAAGCCTTTCTGCCCATGTTTTCTGTC-3'	2
OF	5'-GCTTTTTGGTAGGAAGTTGTGTC-3'	3
OR	5'-AGTGGGATTTGTAGCTAAGCTGTATCCATTTGAGCCGTTTGTG-3'	4
DF	5'-AAGTTTCGTCAATATCACAAGCTGACAGAAAACATGGGCA GAAAG-3'	5
DR	5'-GTTCTTAGAAAAAGCAACTTTGG-3'	6
FF	5'-CATAAGCTTGCCACCACTTC-3'	7
FR	5'-GAAAAAGCAACTTTGGTATTCTGC-3'	8

[0069] 具体的には、UFとURでUP領域を、OFとORでOL領域を、DFとDRでDN領域をそれぞれKOD-Dash（東洋紡社製）を用いたPCR法によって作製したのち、さらにそれらを鋳型として、それぞれFFとFR

を用いた同様のPCR法によって全長の削除断片を作製した。全長の削除断片作製時には、表2に示す塩基配列を有する2種の合成オリゴDNA（オペロン社製）を用い、ARC032株より同様に調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、同様のPCR法によって調製したura4領域断片も鋳型として合わせて使用した。

[0070] [表2]

ura4断片の作製のためのオリゴDNA		
オリゴDNA	塩基配列	配列番号
F	5'-AGCTTAGCTACAAATCCCACT-3'	9
R	5'-AGCTTGTGATATTGACGAAACTT-3'	10

[0071] 得られたS. ポンベPDC2遺伝子削除株（IGF543株、h- leu1-32 ura4-D18 pdc2-D23）は生育速度が遅いものであった。そこで、その生育速度を回復すべく、IGF543株をYESプレート（イーストエキス0.5%/グルコース3%/SPサプリメント）にストリークして25℃にて培養し、得られたコロニーをYPD培地（イーストエキス1%/ペプトン2%/グルコース2%）に植え継ぎ25℃にて培養し、十分に生育した培養液を用いてグリセロールストックを作製し、-80℃にて保存した。上記作業を適切な生育速度が得られるまで繰り返し、生育速度の回復した株を作製した（名称はIGF543を継承）。

[0072] [例2]

<S. ポンベLDH遺伝子1コピー導入株の作製>

HsLDH遺伝子、LpLDH遺伝子、ラクトバチルス・ブルガリクス（*Lactobacillus bulgaricus*）のLDH遺伝子（LbLDH遺伝子）（GenBank accession number: ABJ57783）、ラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）のLDH遺伝子（LpLDH遺伝子）（GenBank accession number: P59390）、P

aLDH遺伝子、またはスタヒロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) のLDH遺伝子 (SaLDH遺伝子) (GenBank accession number: Q5HJD7) を導入したポンベ形質転換株を作製した。

具体的には、例1で作製したIGF543株 (S. ポンベの遺伝子削除株) を、HsLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTHsLDH、LpLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTLpLDH、LbLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTLbLDH、LpILDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTLpILDH、PaLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTPaLDH、またはSaLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpXLTSaLDHの制限酵素BsiWI消化物で、Bahlerらの方法 (Yeast誌、1998年、14巻、943-951頁) に従い形質転換した。

[0073] pXLTHsLDHは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、分裂酵母用組込型ベクターpXL4 (Idirisほか、Yeast誌、2006年、23巻、83-99頁) を制限酵素で二重消化して得られた断片を末端平滑化したのちにライゲーションして得られた分裂酵母用発現ベクターpXL1 (delta-neo) を、さらに制限酵素で二重消化して得られた断片を末端平滑化したのちに、ARCO10株ゲノムよりクローニングしたtop2遺伝子断片を挿入して、配列表の配列番号11にその配列 (5' → 3'、環状) を示すpXLTL2 (6312bp、図1) を作製した。

[0074] つぎに、岡山ベクター (文献: Okayama, H. and Berg, P.: A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. Mol. Cell. Bi

o l. 3 (1983) 280-289.) に組込まれたヒト線維芽細胞 cDNA ライブラリーを鋳型とし、5' -末端側に制限酵素 N c o I 認識配列を、3' -末端側に制限酵素 S a l I 認識配列を付加した表 3 に記載のプライマーセット (H s L D H - F、H s L D H - R、オペロン社製) を用いて、文献 (T s u j i b o ほか、E u r. J. B i o c h e m. 誌、1985 年、147 巻、9-15 頁) に記載のヒト L - 乳酸脱水素酵素構造遺伝子 (H s L D H - O R F) をコードする遺伝子断片を、P C R によって増幅した。当該 O R F 断片は、H s L D H (配列番号 14) をコードしていた。

[0075] [表3]

	配列	配列番号
HsLDH-F	5'-AAAACCATGGCAACTCTAAAGGATCAGCTGATTTAT-3'	12
HsLDH-R	5'-AAAAGGTACCTTAAAATTGCAGCTCCTTTTGGATCCC-3'	13
HsLDH	MATLKDQLIYNLLKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLA DELALVDVIEDKLKGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNVTANSK LVIITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPNCKLLIVS NPVDILTYVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHP LSCHGWVLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGTDKDKE QWKEVHKQVVESAYEVIKLGYSWAIGLSVADLAESIMKNLRRV HPVSTMIKGLYGIKDDVFLSVPCILGQNGISDLVKVTLTSEEEARL KKSADTLWGIQKELQF	14

[0076] 得られた増幅断片を、制限酵素 N c o I および S a l I を用いた二重消化ののち、日本国特開 2000-262284 号公報記載のマルチクローニングベクター p T L 2 M 5 の A f l i i i - S a l I 間に組み込み、L D H 発現ベクター p T L 2 H s L D H を作製した。さらに p T L 2 H s L D H より発現カセット (h C M V プロモーター/H s L D H - O R F / L P I ターミネーター) を制限酵素 S p e I および B s t 1 1 0 7 I を用いた二重消化によって切り出し、p X L T - T L 2 に組み込んで、p X L T - H s L D H を作製した。

[0077] pXL T-L pLDHは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、ラクトバチルス・ペントーサスNBRC106467株（NBRC（Biological Resource Center, NITE）より入手）の培養物からDNeasy（キアゲン社製）によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表4に記載の2種の合成オリゴDNA（LpLDH-F、LpLDH-R、オペロン社製）を使用し、KOD-Dash（東洋紡社製）を用いたPCR法によって、LpLDH遺伝子のORF断片を得た。当該ORF断片は、LpLDH（配列番号17）をコードしていた。

[0078] [表4]

	配列	配列番号
LpLDH-F	5'-AAAACCATGTCAAGCATGCCAAATCATCAAAAAG-3'	15
LpLDH-R	5'-AAAAGGTACCTTATTTGTTTTCTAATTCTGCTAAACCGTC G-3'	16
LpLDH	MSSMPNHQKVVLVG DGAVGSSYAFAMAQQGIAEEFVIVDVVKD RTKGDALDLEDAQAFTAPKKIYSGEYSDCKDADLVVITAGAPQK PGESRLDLVNKNLNLSSIVKPVVDSGFDGIFLVAANPVDILTYAT WKFSGF PKERVIGSGTSLDSSRLRVALGKQFNVDPRSV DAYIMG EHGDSEFAAYSTATIGTRPVRDVAKEQGVSDDDLAKLEDGVRNK AYDIINLKGATFYGIGTALMRISKAILRDENAVLPVGAYMDGQYGL NDIYIGTPAIIGGTGLKQIIESPLSADELKKMQDSAATLKKVLNDGL AELENK	17

[0079] 得られた増幅断片を、制限酵素NcoIおよびSallを用いた二重消化ののち、前記pTL2M5のAflIII-Sall間に組み込み、LDH発現ベクターpTL2LpLDHを作製した。さらにpTL2LpLDHより発現カセット（hCMVプロモーター／LpLDH-ORF／LPITターミネーター）を制限酵素SpeIおよびBst1107Iを用いた二重消化によって切り出し、pXL T-TL2に組み込んで、pXL T-LpLDH

を作製した。

[0080] pXL T-L bLDHは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、ラクトバチルス・ブルガリクスNBRC13953株（NBRCより入手）の培養物からDNeasy（キアゲン社製）によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表5に記載の2種の合成オリゴDNA（LbLDH-F、LbLDH-R、オペロン社製）を使用し、KOD-Dash（東洋紡社製）を用いたPCR法によって、LbLDH遺伝子のORF断片を得た。

[0081] [表5]

	配列	配列番号
LbLDH-F	5'-CAATTTTATTTATAAACAATGAGTAGAAAAGTCCTGCTGG TTG-3'	18
LbLDH-R	5'-CTCTAGAGGATCCCCGTTATCCTAAAGAGTCCAGGGTT GCC-3'	19

[0082] 得られた増幅断片を、制限酵素NcoIおよびSallを用いた二重消化ののち、前記pTL2M5のAflIII-Sall間に組み込み、LDH発現ベクターpTL2LbLDHを作製した。さらにpTL2LbLDHより発現カセット（hCMVプロモーター／LbLDH-ORF／LPITermiネーター）を制限酵素SpeIおよびBst1107Iを用いた二重消化によって切り出し、pXL T-TL2に組み込んで、pXL T-LbLDHを作製した。

[0083] pXL T-L pILDHは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、ラクトバチルス・プランタラムNBRC15891株（NBRCより入手）の培養物からDNeasy（キアゲン社製）によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表6に記載の2種の合成オリゴDNA（LpILDH-F、LpILDH-R、オペロン社製）を使用し、KOD-Dash（東洋紡社製）を用いたPCR法によって、LpILDH遺伝子のORF断片を得た。

[0084] [表6]

	配列	配列番号
LbLDH-F	5'-CAATTTTATTTATAAACAATGAGTAGAAAAGTCCTGCTGG TTG-3'	18
LbLDH-R	5'-CTCTAGAGGATCCCCGGTTATCCTAAAGAGTCCAGGGTT GCC-3'	19

[0085] 得られた増幅断片を、制限酵素NcoIおよびSallを用いた二重消化ののち、前記pTL2M5のAflIII-Sall間に組み込み、LDH発現ベクターpTL2LpLDHを作製した。さらにpTL2LpLDHより発現カセット(hCMVプロモーター/LpLDH-ORF/LPターミネーター)を制限酵素SpeIおよびBst1107Iを用いた二重消化によって切り出し、pXL-TL2に組み込んで、pXL-TLpLDHを作製した。

[0086] pXL-TPaLDHは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、ペディオコッカス・アシディラクティシNBRC3076株(NBRCより入手)の培養物からDNeasy(キアゲン社製)によって調製した全ゲノムDNAを鋳型とし、表7に記載の2種の合成オリゴDNA(PaLDH-F、PaLDH-R、オペロン社製)を使用し、KOD-Dash(東洋紡社製)を用いたPCR法によって、PaLDH遺伝子のORF断片を得た。

[0087] [表7]

	配列	配列番号
PaLDH-F	5'-GACACTTTTTCAAACATGATGTCTAATATTCAAAATCATC AAAAAGTTGTCC-3'	22
PaLDH-R	5'-CATGTGAAGCAGGTGTTATTTGTCTTGTTCAGCAAGA GCG-3'	23

[0088] 得られた増幅断片を、制限酵素NcoIおよびSallを用いた二重消化

ののち、前記 p T L 2 M 5 の A f l i i i i - S a l i 間に組み込み、L D H 発現ベクター p T L 2 P a L D H を作製した。さらに p T L 2 P a L D H より発現カセット（h C M V プロモーター／P a L D H - O R F ／L P i ターミネーター）を制限酵素 S p e l および B s t 1 1 0 7 I を用いた二重消化によって切り出し、p X L T - T L 2 に組み込んで、p X L T - P a L D H を作製した。

[0089] p X L T - S a L D H は、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、スタヒロコッカス・アウレウス N B R C 1 0 2 1 3 5 株（N B R C より入手）の培養物から D N e a s y （キアゲン社製）によって調製した全ゲノム D N A を鋳型とし、表 8 に記載の 2 種の合成オリゴ D N A （S a L D H - F、S a L D H - R、オペロン社製）を使用し、K O D - D a s h （東洋紡社製）を用いた P C R 法によって S a L D H 遺伝子の O R F 断片を得た。

[0090] [表8]

	配列	配列番号
SaLDH-F	5'-GACACTTTTTCAAACATGATGAAAACATTTGGTAAAAAGG TTGTATTAATCG-3'	24
SaLDH-R	5'-CATGTGAAGCAGGTGTTAGTCTTCTAATAAATATTTAATT GAATCAAATGTATCTTCTAATG-3'	25

[0091] 得られた増幅断片を、制限酵素 N c o I および S a l I を用いた二重消化ののち、前記 p T L 2 M 5 の A f l i i i i - S a l i 間に組み込み、L D H 発現ベクター p T L 2 S a L D H を作製した。さらに p T L 2 S a L D H より発現カセット（h C M V プロモーター／S a L D H - O R F ／L P i ターミネーター）を制限酵素 S p e l および B s t 1 1 0 7 I を用いた二重消化によって切り出し、p X L T - T L 2 に組み込んで、p X L T - S a L D H を作製した。

[0092]

[表9]

形質転換体株名	宿主株名	導入したLDH遺伝子名
ASP3509	IGF543	HsLDH
ASP3575	IGF543	LbLDH
ASP3521	IGF543	LpLDH
ASP3519	IGF543	LpILDH
ASP3517	IGF543	PaLDH
ASP3515	IGF543	SaLDH

[0093] <培養試験>

得られた各形質転換体をYPD6液体培地（イーストエキス1%、ペプトン2%、グルコース6%）に植菌して、温度32℃、振盪速度100rpmの条件下で24時間培養を行った。培養終了後、菌体を回収し、4.5mLの11.1%グルコース水溶液に初発菌体濃度を36g（乾燥菌体換算）／Lになるように接種し、温度32℃、振盪速度100rpmの条件下で3、6または24時間培養を行い、終了後、培養液中のグルコース、エタノールおよび乳酸の濃度（g／L）を測定した。測定結果ならびに該測定結果より計算した、乳酸の対糖収率（選択率、%）と生産速度（g／（L・h））を表10に示す。

[0094]

[表10]

形質転換 体に導入 したLDH 遺伝子	培養時間 [h]	グルコース 濃度 [g/l]	エタノール 濃度 [g/l]	乳酸濃度 [g/l]	乳酸の生 産速度 [g/lh]	乳酸の対 糖収率 [%]
HsLDH	6.0	0.0	12.3	83.2	13.9	74.9
LbLDH	6.0	0.0	51.9	0.0	0.0	0.0
LpLDH	3.0	7.7	9.2	78.9	26.3	76.4
LplLDH	6.0	0.0	55.2	0.0	0.0	0.0
PaLDH	6.0	14.5	34.7	22.0	3.7	22.8
SaLDH	24.0	35.1	35.0	0.0	0.0	0.0

[0095] この結果、H s L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 0 9株と、L p L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 2 1株と、P a L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 1 7株では、乳酸産生が確認された。特に、A S P 3 5 2 1株では、A S P 3 5 0 9株と同等の高い対糖収率であった。これに対して、L b L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 7 5株、L p l L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 1 9株、およびS a L D H遺伝子を導入したA S P 3 5 1 5株では、乳酸産生は確認されなかった。特にL p l L D H遺伝子は、L p L D H遺伝子と同じラクトバチルス属菌由来のL D H遺伝子であり、かつサッカロミセス・セレビスエに導入することによって乳酸産生株が得られるとされている（特許文献2参照。）にもかかわらず、乳酸産生株が得られなかった。

[0096] [例3]

<L D H遺伝子2コピー導入株の作製>

例1で作製したI G F 5 4 3株の染色体中の2箇所に、同種または異種の生物由来のL D H遺伝子を導入した形質転換体を作製し、それぞれの乳酸産生能を調べた。

具体的には、まず、例1で作製したI G F 5 4 3株（S. ポンベの遺伝子

削除株)を、H s L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-H s L D H、L p L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-L p L D H、L b L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-L b L D H、L p l L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-L p l L D H、P a L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-P a L D H、またはS a L D H遺伝子発現カセットを保持したT f 2多座組込型組換えベクターp T f 2-S a L D Hを用い、岡崎らの方法(O k a z a k iほか、N u c l e i c A c i d s R e s. 誌、1990年、18巻、6485-6489頁)により形質転換し、L e u 1座近傍にh C M Vプロモーターによって制御されたL D H遺伝子が1コピー導入されたS. ポンベL D H遺伝子1コピー導入株を作製した。H s L D H遺伝子が2コピー導入された株をA S P 2 9 1 4株、L p L D H遺伝子とH s L D H遺伝子が1コピーずつ導入された株をA S P 3 6 3 1株、L b L D H遺伝子とH s L D H遺伝子が1コピーずつ導入された株をA S P 3 6 1 9株、L p l L D H遺伝子とH s L D H遺伝子が1コピーずつ導入された株をA S P 3 6 2 2株、P a L D H遺伝子とH s L D H遺伝子が1コピーずつ導入された株をA S P 3 6 2 3株、S a L D H遺伝子とH s L D H遺伝子が1コピーずつ導入された株をA S P 3 6 2 1株とした。

[0097] p T f 2-H s L D Hは、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、S. ポンベの全ゲノムDNAを鋳型として、5'末端側に制限酵素B s i W Iの認識配列(C G T A C G)を導入した2種の合成オリゴDNA(T f 2-2-F、T f 2-2-R、オペロン社製)を使用したPCR法によって、S. ポンベのT f 2-2(G e n e D B収載の系統名S P A C 1 6 7. 08遺伝子)のDNA断片(約3950bp)を増幅した。増幅DNA断片の両末端を制限酵素B s i W Iで処理したものを、インサート断片として調製した。

これとは別に、染色体組込み用ベクター pXL4 (Idiris ほか、Yeast 誌、23 巻、83-99 頁、2006 年) を同じ制限酵素 BsiWI で消化し、アンピシリン耐性遺伝子 (ApR) と大腸菌の複製起点 (pBR322 ori) を含む領域 (約 2130 bp) の DNA 断片を得、さらに脱リン酸化処理したものを、ベクター断片として調製した。

前記インサート断片とベクター断片とをライゲースを用いて連結した後、大腸菌 DH5 (東洋紡社製) への形質転換後、構築ベクター pTf2-2 (6071 bp) を得た。

前記構築ベクター pTf2-2 を鋳型として、5' 末端側に制限酵素 KpnI、HindIII、XbaI、SalI の認識配列を持つ合成オリゴ DNA (MCS-Tf2-2-F、オペロン社製) と 5' 末端側に制限酵素 KpnI、StuI、XhoI、NheI の認識配列を持つ合成オリゴ DNA (MCS-Tf2-2-R、オペロン社製) を使用した PCR 法によって全長を増幅し、6060 bp の断片を得た。該断片の両末端を KpnI で消化した後に自己環状化することによって、トランスポゾン遺伝子 Tf2-2 配列の内部にさらにマルチクローニングサイト (MCS) を持つ 6058 bp のベクター pTf2 (MCS) を作製した。

S. ポンベのウラシル要求性マーカー ura4 (GeneDB 収載の系統名 SPCC330.05c、オロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子) の両端に制限酵素 KpnI および NheI の認識配列を付加した断片を PCR 法により作製し、該断片を制限酵素 KpnI および NheI を用いて二重消化して得られた 2206 bp の断片と、前記構築ベクター pTf2 (MCS) を制限酵素 KpnI および NheI を用いて二重消化して得られた 6040 bp の断片とをライゲーションにより連結し、トランスポゾン遺伝子 Tf2-2 配列の内部にさらにマルチクローニングサイト (MCS) と ura4 領域を持つ 7816 bp の Tf2 多座組込型組換えベクター pTf2 (MCS)-ura4 (図 2、配列番号 30) を作製した。

[表11]

	配列	配列番号
Tf2-2-F	5'- AAGGCCTCGTACGTGAAAGCAAGAGCAAAACGA -3'	26
Tf2-2-R	5'- AAGGCCTCGTACGTGCTTTGTCCGCTTGTAGC -3'	27
MCS-Tf2 -2-F	5'- GGGGTACCAAGCTTCTAGAGTCGACTCCGGTGCTACG ACACTTT -3'	28
MCS-Tf2 -2-R	5'- GGGGTACCAGGCCTCTCGAGGCTAGCCATTTCCAGCG TACATCCT -3'	29

[0099] 例2で作製したpTL2HsLDHより発現カセット（hCMVプロモーター／HsLDH-ORF／LPIターミネーター）を制限酵素SpeIおよびBst1107Iを用いた二重消化によって切り出し、pTf2（MCS）-ura4の制限酵素NheI-KpnI（末端平滑化）認識配列間に組み込んで、pTf2-HsLDHを作製した。

[0100] 同様に、例2で作製したpTL2LbLDH、pTL2LpLDH、pTL2LpILDH、pTL2PaLDH、およびpTL2SaLDHより発現カセットを制限酵素SpeIおよびBst1107Iを用いた二重消化によって切り出し、それぞれをpTf2（MCS）-ura4の制限酵素NheI-KpnI（末端平滑化）認識配列間に組み込んで、pTf2-LbLDH、pTf2-LpLDH、pTf2-LpILDH、pTf2-PaLDH、およびpTf2-SaLDHを作製した。

[0101] 次に、作製したS. ポンベLDH遺伝子1コピー導入株を、HsLDH遺伝子発現カセットを保持した単座組込型組換えベクターpSL17-HsLDHを用い、岡崎らの方法（Okazakiほか、Nucleic Acids Res. 誌、1990年、18巻、6485-6489頁）により形質転換し、Leu1座近傍にihcプロモーターによって制御されたHsLDH遺伝子をさらに1コピー導入したS. ポンベLDH遺伝子2コピー導入株を作製した。

[0102] pSL17-HsLDHは、例2で作製したpTL2HsLDHより、HsLDHのORF断片を制限酵素NcoIおよびSallを用いた二重消化によって切り出し、以下に示す工程で作製した単座組込型組換えベクターpSL17に組み込んで作製した。

[0103] 単座組込型組換えベクターpSL17は、以下に示す工程で作製した。すなわち、まず、公知の分裂酵母用組込型ベクターpSL6（図3、5960bp、配列番号31）のhCMVプロモーター領域を、S. ポンベのihc1遺伝子のプロモーター（ihc1プロモーター）と置換することにより、マルチクローニングベクターpSL12（図4、5847bp）を作製した。

[0104] 具体的には、まず、S. ポンベのihc1遺伝子中、ORFの5'末端（開始コドンATGのA）の上流1～501bpの領域（配列番号32）を、S. ポンベの野生株（ARC032株、ATCC38366、972h-相当）由来のゲノムDNAを鋳型とし、5'末端にBlnIの制限酵素認識配列を備えるフォワードプライマー（ihc1-promoter-F）と、5'末端にKpnIの制限酵素認識配列を備えるリバープライマー（ihc1-promoter-R）とを用いたPCRによって増幅し、該領域の5'末端にBlnI、3'末端にKpnIの制限酵素認識配列を備える断片（ihcプロモーター断片）を得た。

pSL6を制限酵素BlnIおよびKpnIで二重消化した断片に、ihcプロモーター断片を制限酵素BlnIおよびKpnIで二重消化した断片をライゲーションにより組み込み、分裂酵母用組込型ベクターpSL12（配列番号35）を得た。

[0105] 次いで、pSL12のLPターミネーター領域を、S. ポンベのihc1遺伝子のターミネーター（ihc1ターミネーター）と置換することにより、マルチクローニングベクターpSL17（図5、5831bp）を作製した。

[0106] 具体的には、まず、S. ポンベのihc1遺伝子中、ORFの3'末端（

終止コドンの3文字目)の下流1~200bpの領域(配列番号36)を、
S. ポンベの野生株(ARC032株、ATCC38366、972h-相当)由来のゲノムDNAを鋳型とし、In-fusionプライマー(ihc1-terminator-Fとihc1-terminator-R)を用いたPCRによって増幅し、ihcターミネーター領域を含む断片(ihcターミネーター断片)を得た。

pSL12を鋳型とし、In-fusionプライマー(pSL12-FとpSL12-R)を用いたPCRによって増幅し、pSL12の全長からLP1ターミネーター領域を欠損させた断片を得、当該断片にihcターミネーター断片をIn-fusionクローニングキット(製品名:In-Fusion HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer、タカラバイオ社製)を用いて組み込み、マルチクローニングベクターpSL17(配列番号41)を作製した。

[0107] [表12]

	配列	配列番号
ihc1-promoter-F	5'- AATTCCTAGGGGCTTCAACTAGCTCGGGAT -3'	33
ihc1-promoter-R	5'- AATTGGTACCGACACCTGCTTCACATTGTTTATA AATAAAATTGGAGTT -3'	34
ihc1-terminator-F	5'- CCTGCAGGCATGCAAGCTTATTGCTGCCAGTT GATTACCC -3'	37
ihc1-terminator-R	5'- GAAACGCGCGAGGCAGATCATTGTATGCTATGG GGTGTCGAC -3'	38
pSL12-F	5'- GTCGACACCCCATAGCATACAATGATCTGCCTC GCGCGTTTC -3'	39
pSL12-R	5'- GGGTAATCAACTGGGCAGCAATAAGCTTGCATG CCTGCAGG -3'	40

[0108] <HsLDH遺伝子1コピー導入株の作製>

作製したLDH遺伝子2コピー導入株の乳酸産生能を測定する際の比較対

象として、H s L D H 遺伝子 1 コピー導入株を作製した。

具体的には、例 1 で作製した I G F 5 4 3 株（S. ポンベの遺伝子削除株）を、H s L D H 遺伝子発現カセットを保持し、i h c 1 プロモーターを有する単座組込型組換えベクター p S L 1 7 - H s L D H の制限酵素 B s i W I 消化物で、B a h l e r らの方法（Y e a s t 誌、1 9 9 8 年、1 4 巻、9 4 3 - 9 5 1 頁）に従い形質転換し、L e u 1 座近傍に i h c プロモーターによって制御された H s L D H 遺伝子を 1 コピー導入した形質転換株を作製した。該形質転換株を A S P 3 5 0 9 株とした。

[0109] <培養試験>

例 2 と同様にして、各株をそれぞれ Y P D 6 液体培地に植菌して培養し、回収した菌体を 1 1. 1 % グルコース水溶液中で培養を行い、終了後、培養液中のグルコース、エタノールおよび乳酸の濃度（g / L）を測定した。培養時間、測定結果ならびに該測定結果より計算した、乳酸の対糖収率（選択率、%）と生産速度（g / (L · h)）を表 1 3 および表 1 4 に示す。

[0110]

[表13]

形質転換 体株名	形質転換 体に導入さ れているLD H遺伝子	培養 時間 [h]	グルコー ス濃度 [g/l]	エタノー ル濃度 [g/l]	乳酸濃 度 [g/l]	乳酸生 産速度 [g/(lh)]	乳酸の対 糖収率 [%]
ASP3509	HsLDH	3.0	15.3	10.1	76.1	25.4	68.6
ASP2914	HsLDH/ HsLDH	3.0	15.4	8.9	78.3	26.1	70.5
ASP3619	HsLDH/ LbLDH	3.0	19.0	10.2	72.2	24.1	65.0
ASP3631	HsLDH/ LpLDH	3.0	7.5	6.1	91.5	30.5	82.5
ASP3622	HsLDH/ LplLDH	3.0	23.4	11.7	64.8	21.6	58.4
ASP3623	HsLDH/ PaLDH	3.0	15.9	11.3	73.1	24.4	65.9
ASP3621	HsLDH/ SaLDH	3.0	18.7	10.2	72.5	24.2	65.3

[0111] [表14]

形質転換 体株名	形質転換体に導 入されているLDH 遺伝子	培養時間 [h]	グルコー ス濃度 [g/l]	エタノー ル濃度 [g/l]	乳酸濃度 [g/l]	乳酸の対 糖収率 [%]
ASP3509	HsLDH	5.0	0.0	13.0	80.0	72.1
ASP2914	HsLDH/HsLDH	5.0	0.0	5.5	85.4	77.0
ASP3631	HsLDH/LpLDH	10.5	0.0	5.0	93.7	84.5

[0112] この結果、培養時間が3時間経過した時点の乳酸の対糖収率は、H s L D H遺伝子を1コピーのみ導入したA S P 3 5 0 9株では68.6%であり、

H s L D H 遺伝子を 2 コピー導入した A S P 2 9 1 4 株では 7 0 . 5 % であり、2 コピー株のほうが 1 コピー株よりもやや乳酸産生能が高くなったことがわかった。これに対して、A S P 3 6 1 9 株、A S P 3 6 2 2 株、A S P 3 6 2 3 株、および A S P 3 6 2 1 株では、いずれも A S P 3 5 0 9 株よりも乳酸の対糖収率が低かった。特に、L p L D H 遺伝子 1 コピーと組み合わせた A S P 3 6 2 2 株では、明らかに A S P 3 5 0 9 株よりも乳酸産生能が低下していた。これに対して、H s L D H 遺伝子 1 コピーと L p L D H 遺伝子 1 コピーを導入した A S P 3 6 3 1 株では、乳酸の対糖収率が 8 2 . 5 % であり、A S P 3 5 0 9 株や A S P 2 9 1 4 株よりも顕著に乳酸産生能が向上していた。

[0113] また、乳酸の対糖収率が良好であった A S P 3 5 0 9 株、A S P 2 9 1 4 株、および A S P 3 6 3 1 株については、さらに培養を継続したところ、表 1 3 に示すように、A S P 3 5 0 9 株では 7 2 . 1 % であり、A S P 2 9 1 4 株では 7 7 . 0 % であり、A S P 3 6 3 1 株では 8 4 . 5 % であった。

[0114] H s L D H 遺伝子と L p L D H 遺伝子は、I G F 5 4 3 株に 1 コピーのみ導入した場合には、いずれも同程度の乳酸産生能であったにもかかわらず、H s L D H 遺伝子 1 コピーと L p L D H 遺伝子 1 コピーを導入した株は、H s L D H 遺伝子を 2 コピー導入した株よりも顕著に乳酸産生能が高かった。この理由は明らかではないが、一の酵母内に H s L D H と L p L D H が共に存在することにより、何らかの相乗的効果が得られるためではないかと推察される。

[0115] <ジャーファーマンターでの培養試験および試験管発酵試験>

作製した 2 コピー導入株である A S P 3 6 3 1 株および国際公開第 2 0 1 2 / 1 1 4 9 7 9 号記載の 1 コピー導入株である A S P 3 0 5 4 株の乳酸生産能を比較し評価した。より実生産に近い系として、ジャーファーマンターで培養した菌体を用いて発酵試験を実施した。

[0116] 試験管に入った 5 m L Y E S 培地 (p H 4 . 5) に、A S P 3 0 5 4 株または A S P 3 6 3 1 株を植菌し、各株について 2 0 本ずつの試験管を用いて

、32℃で24時間の振とう培養（前培養）を行った。

次いで、2 L ジャーファーマンター（2 基）を用いて、YPD 培地各 900 mL に、前培養で得られた各菌株の培養液 100 mL を加え、30℃で培養を開始した。10 N KOH の添加制御により、pH を 4.5 に保った。攪拌回転数は、溶存酸素濃度（DO）カスケード制御とし、DO を 1 ppm に保った。

培地中のグルコースを消費した時点で、培養液を一部拔出し、試験管での発酵試験を実施した。培養試験は54時間目まで継続した。測定した培養液中のOD₆₆₀値、乳酸、グルコースおよびエタノールの濃度（g/L）の結果を図6、図7、図8、および図9に示す。

[0117] ジャーファーマンター培養結果からASP3631株は、ASP3054株と比較して、菌体の増殖速度は若干遅かったが、エタノールは殆ど生産せず、L-乳酸生産量は2倍を示した。ASP3631株では、菌体増殖能は若干低下している傾向があったが、その一方で、グルコースから乳酸への代謝が強化されていることが確認された。

[0118] 試験管での発酵試験は、ジャーファーマンターから少量抜き出した培養液から菌体を回収し、4.5 mL の 11.1 質量%グルコース水溶液に初発菌体濃度を36 g（乾燥菌体換算）/L になるように接種し、温度32℃、振盪速度110 rpm の条件下で7時間発酵を行った。発酵終了後に測定した発酵液中の乳酸、グルコースおよびエタノールの濃度（g/L）を図10、図11、図12に示す。ならびに、試験管発酵での該測定結果より計算した、発酵培地中のグルコースを全て消費した時点での、乳酸の対糖収率（選択率、%）と生産速度（g / (L · h)）を表15に示す。

[0119]

[表15]

菌株	発酵時間 [h]	乳酸生産速度 [g/(lh)]	乳酸の対糖収率 [%]
ASP3054	6.0	12.8	76.0
ASP3631	7.0	13.0	86.0

[0120] ジャーファーマンターでの培養菌体を用いた試験管発酵試験において、ASP3631株では90g/Lと高い乳酸濃度を示した。より実生産に近い系であるジャーファーマンターでの培養菌体も、問題なく乳酸生産能を有することが確認された。ASP3631株の乳酸生産速度はASP3054株と同等であり、乳酸の対糖収率はASP3054株と比較して10%程度高い値を示した。対糖収率が向上したことにより、ASP3631株ではコスト優位性が高まったと考えられた。

[0121] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

請求の範囲

- [請求項1] シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) を宿主とし、ラクトバチルス・ペントーサス (*Lactobacillus pentosus*) の乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれ、かつ前記シゾサッカロミセス・ポンベ宿主のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活している、形質転換体。
- [請求項2] さらに、ヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれている、請求項1に記載の形質転換体。
- [請求項3] 欠失または失活しているピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子がPDC2遺伝子である、請求項1または2に記載の形質転換体。
- [請求項4] 前記乳酸脱水素酵素遺伝子がシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に組み込まれている、請求項1～3のいずれか一項に記載の形質転換体。
- [請求項5] シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) を宿主とし、シゾサッカロミセス・ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターとラクトバチルス・ペントーサス (*Lactobacillus pentosus*) の乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを有するベクターを用いて、前記発現カセットを前記宿主に導入して形質転換体を得て、
前記宿主としてピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活した宿主を用いるか、または前記得られた形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させる、
ラクトバチルス・ペントーサスの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれかつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活している形質転換体の製造方法。
- [請求項6] 前記宿主として、ヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれており

、かつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活した宿主を用いるか、または

前記得られた形質転換体にヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子を組み込んだ後、該形質転換体のピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部を欠失または失活させる、請求項5に記載の形質転換体の製造方法。

[請求項7] 請求項5に記載の形質転換体の製造方法により得られた形質転換体を宿主とし、シゾサッカロミセス・ポンベ内で機能するプロモーターとターミネーターとヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子とを含む発現カセットを有するベクターを用いて、前記発現カセットを前記宿主に導入して形質転換体を得る、ラクトバチルス・ペントーサスの乳酸脱水素酵素遺伝子およびヒトの乳酸脱水素酵素遺伝子が組み込まれかつピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子群の一部が欠失または失活している形質転換体の製造方法。

[請求項8] 欠失または失活しているピルビン酸脱炭酸酵素をコードする遺伝子がPDC2遺伝子である、請求項5～7のいずれか一項に記載の形質転換体の製造方法。

[請求項9] 前記ベクターがさらにシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に対して相同組換えを行わせる組換え部位を有し、このベクターを使用して発現カセットをシゾサッカロミセス・ポンベの染色体に導入する、請求項5～8のいずれか一項に記載の形質転換体の製造方法。

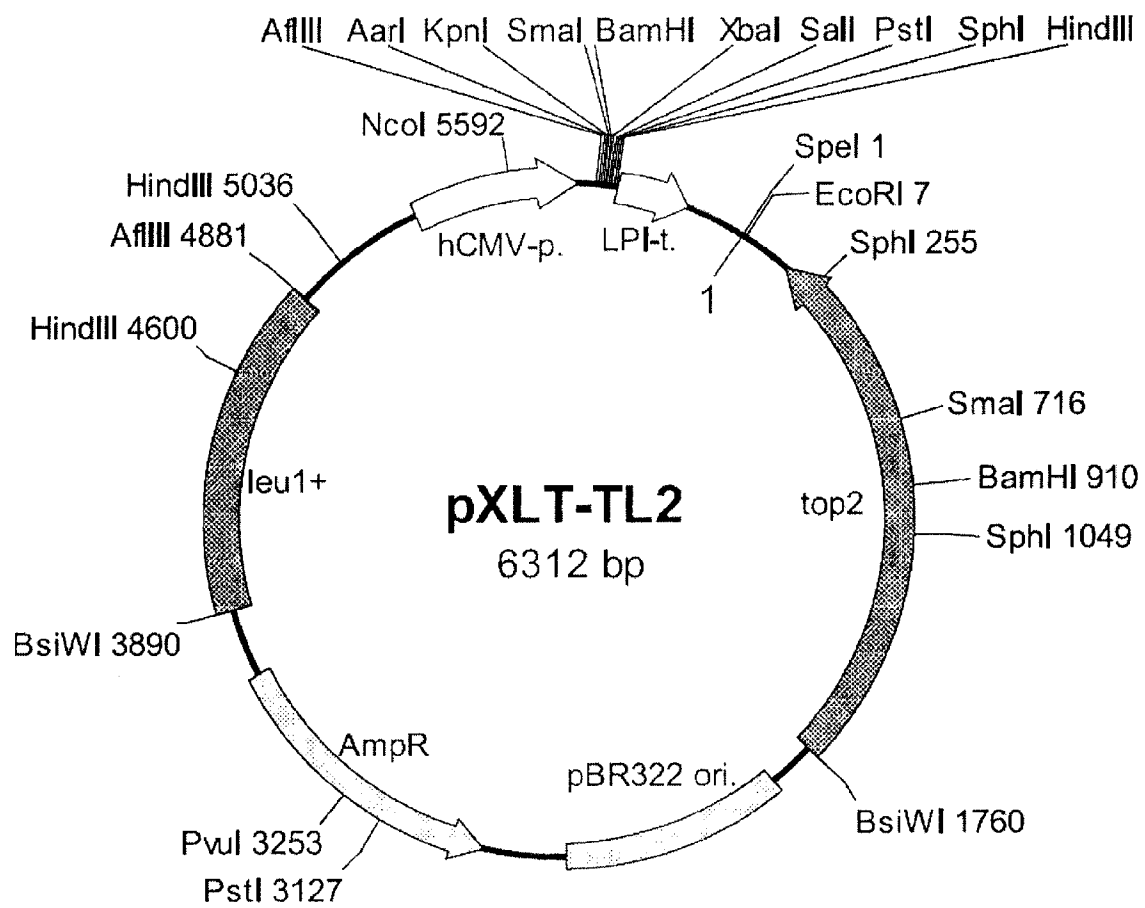
[請求項10] 請求項1～4のいずれか一項に記載の形質転換体を培養液中で培養し、該培養液から乳酸を取得する乳酸の製造方法。

[請求項11] 濃度1～50質量%のグルコースを含む培養液を使用して培養を行う、請求項10に記載の乳酸の製造方法。

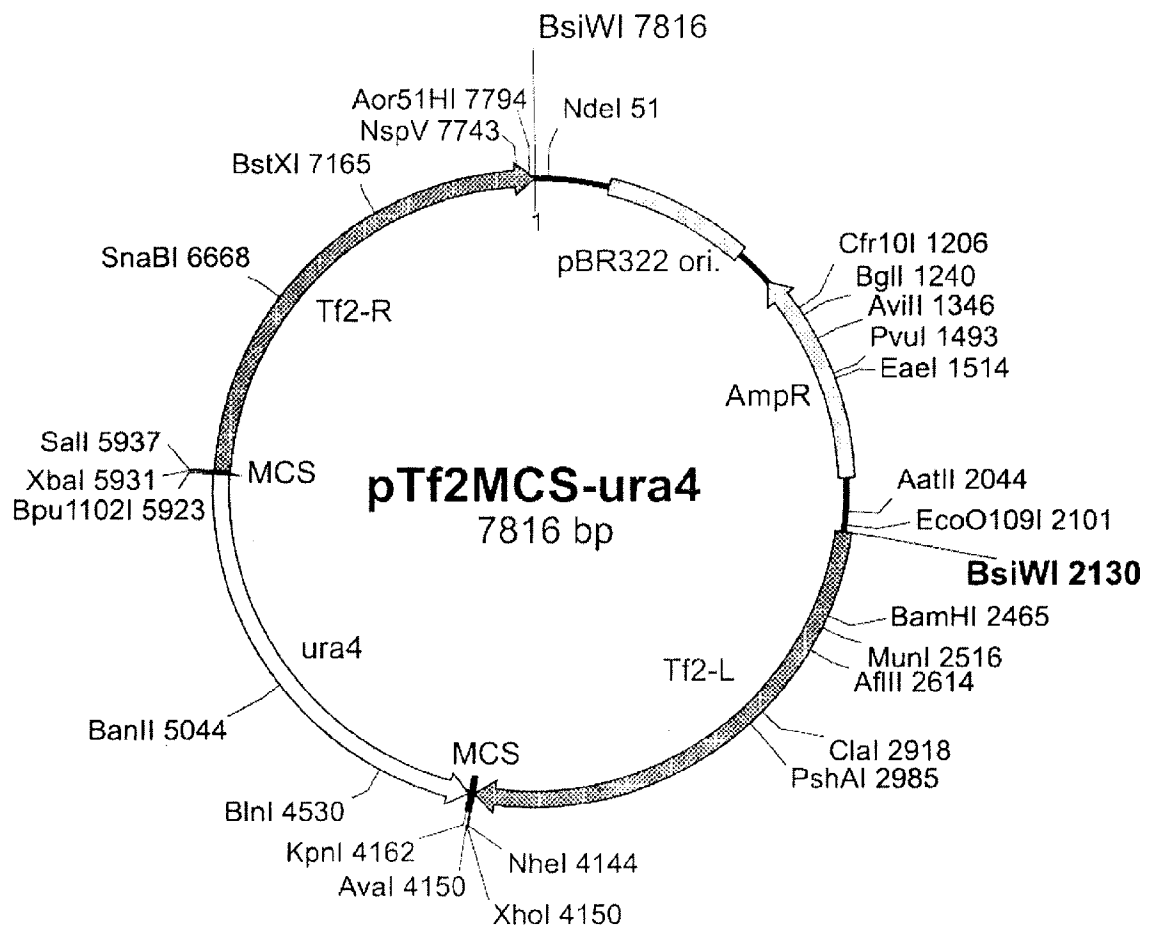
[請求項12] 前記形質転換体により産生される乳酸により、前記培養液のpHが3.5以下になった後にさらに培養を継続する、請求項10または11に記載の乳酸の製造方法。

- [請求項13] 前記培養液中の形質転換体の初発菌体濃度を0.1～5 g（乾燥菌体換算）／Lとする、請求項10～12のいずれか一項に記載の乳酸の製造方法。
- [請求項14] 前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく培養を継続する、請求項10～13のいずれか一項に記載の乳酸の製造方法。
- [請求項15] 前記形質転換体により産生された培養液中の乳酸を中和することなく、培養液から乳酸を分離する、請求項10～14のいずれか一項に記載の乳酸の製造方法。

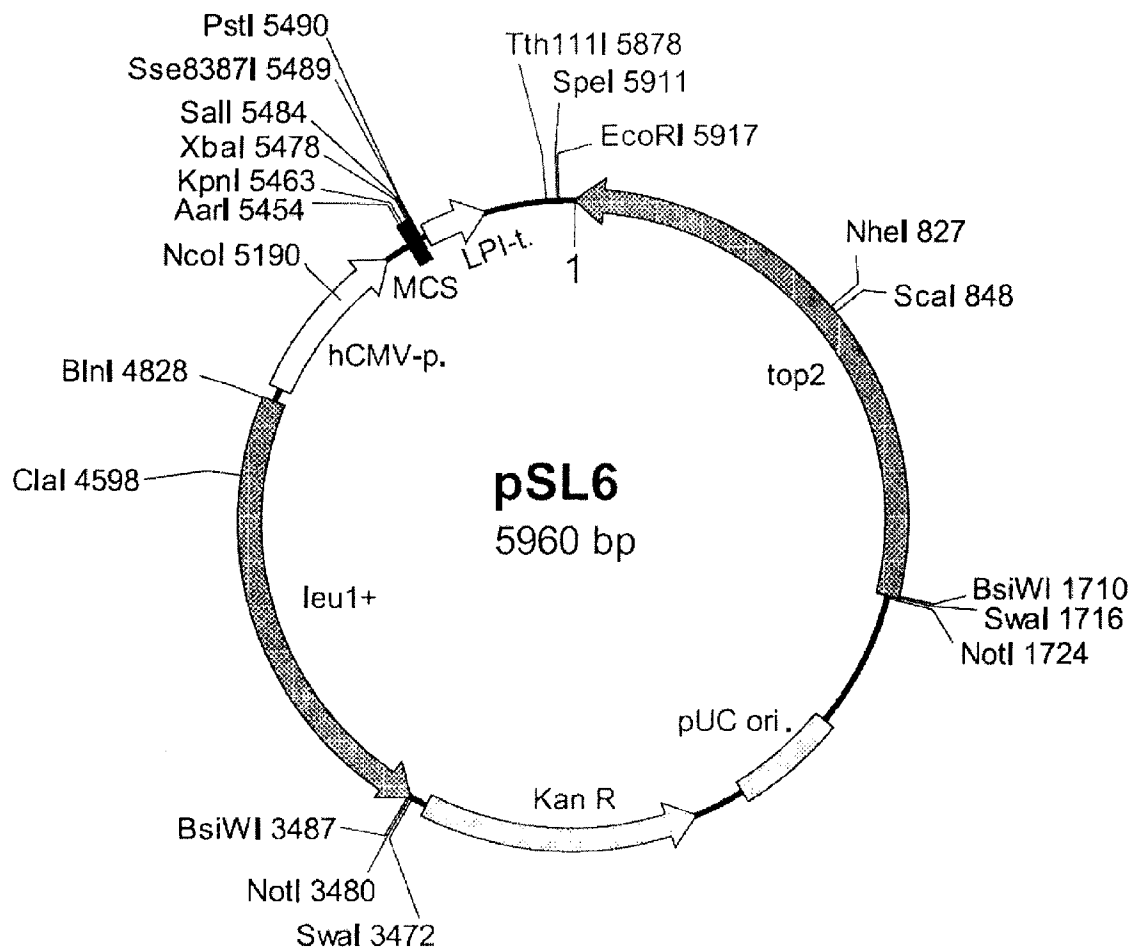
[図1]



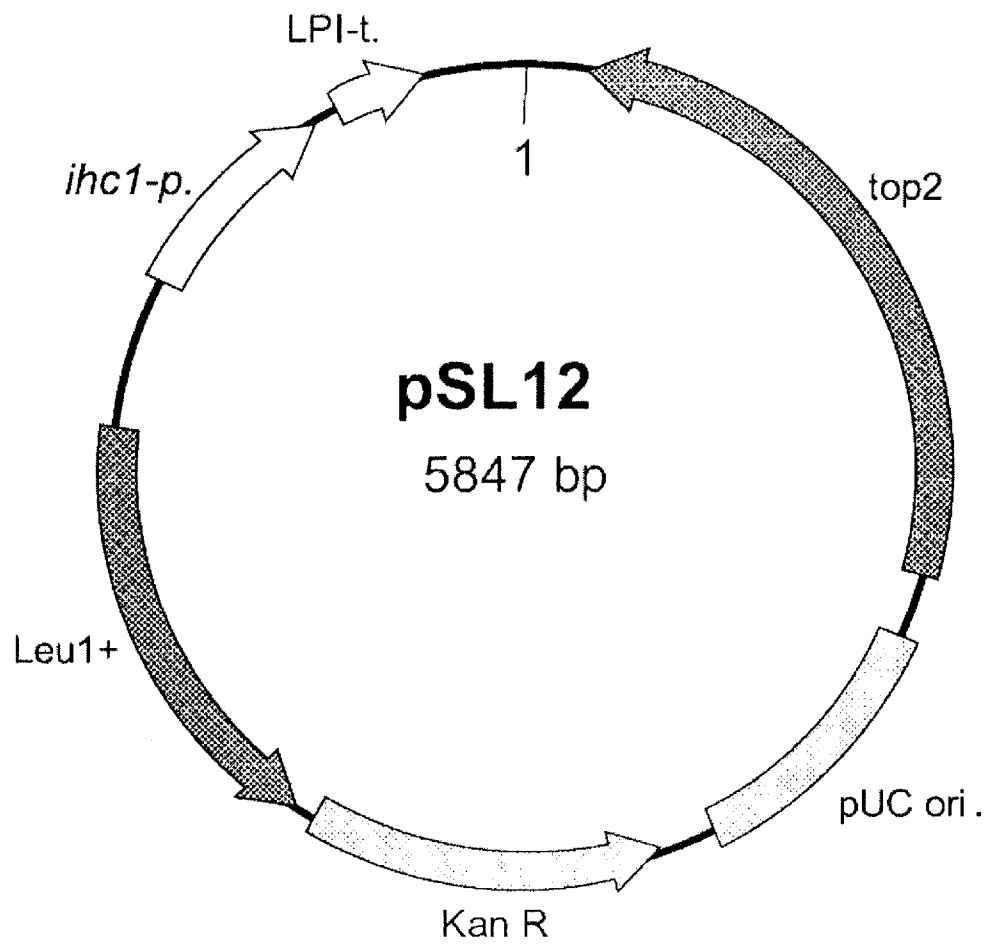
[図2]



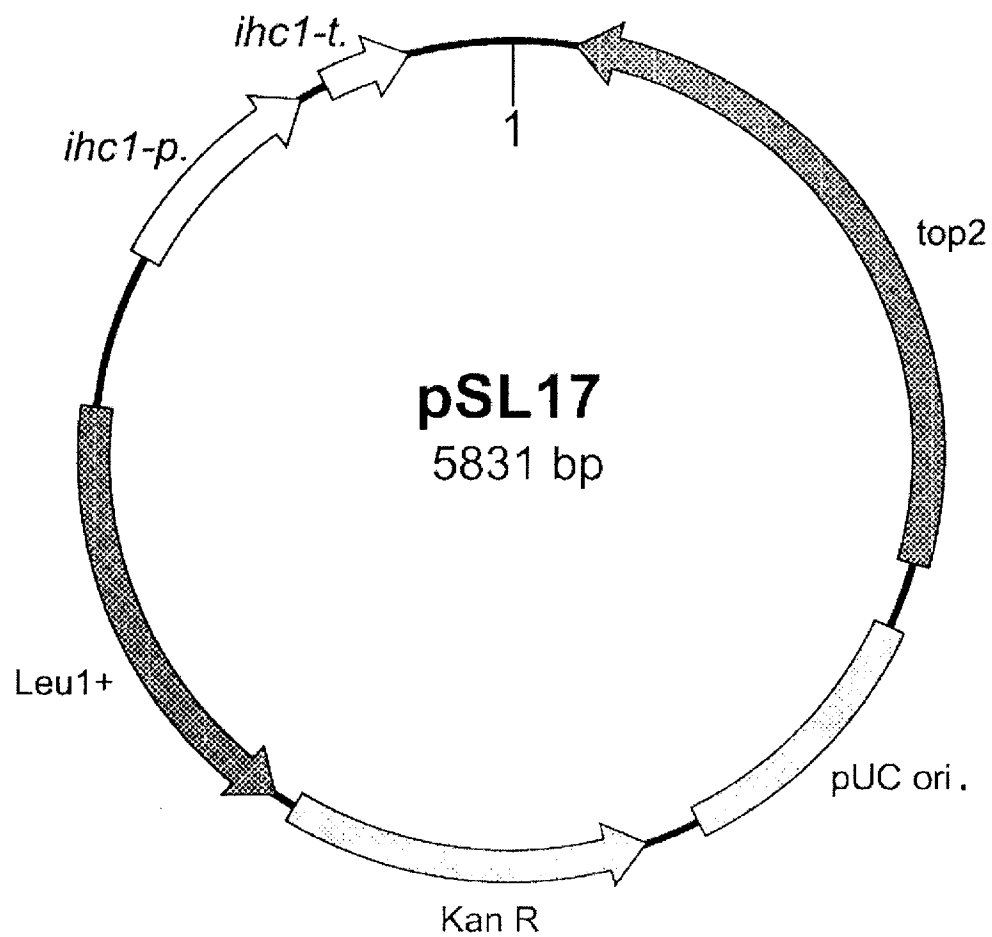
[図3]



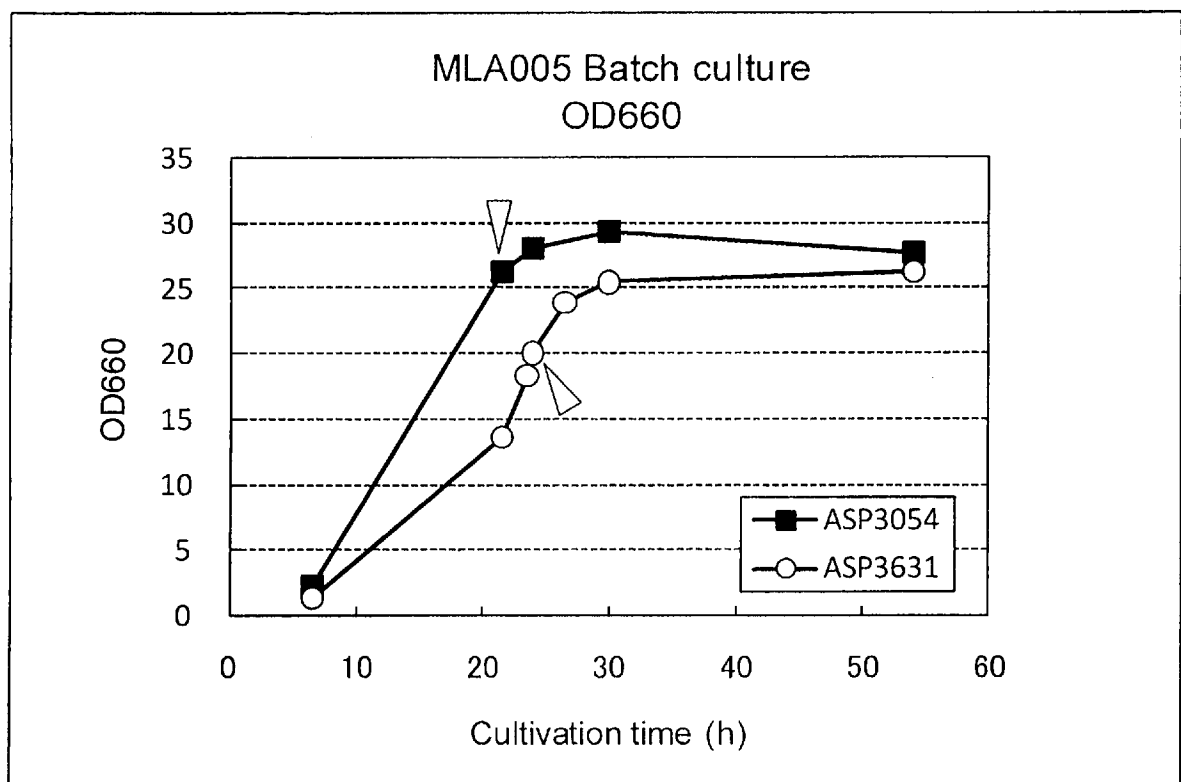
[図4]



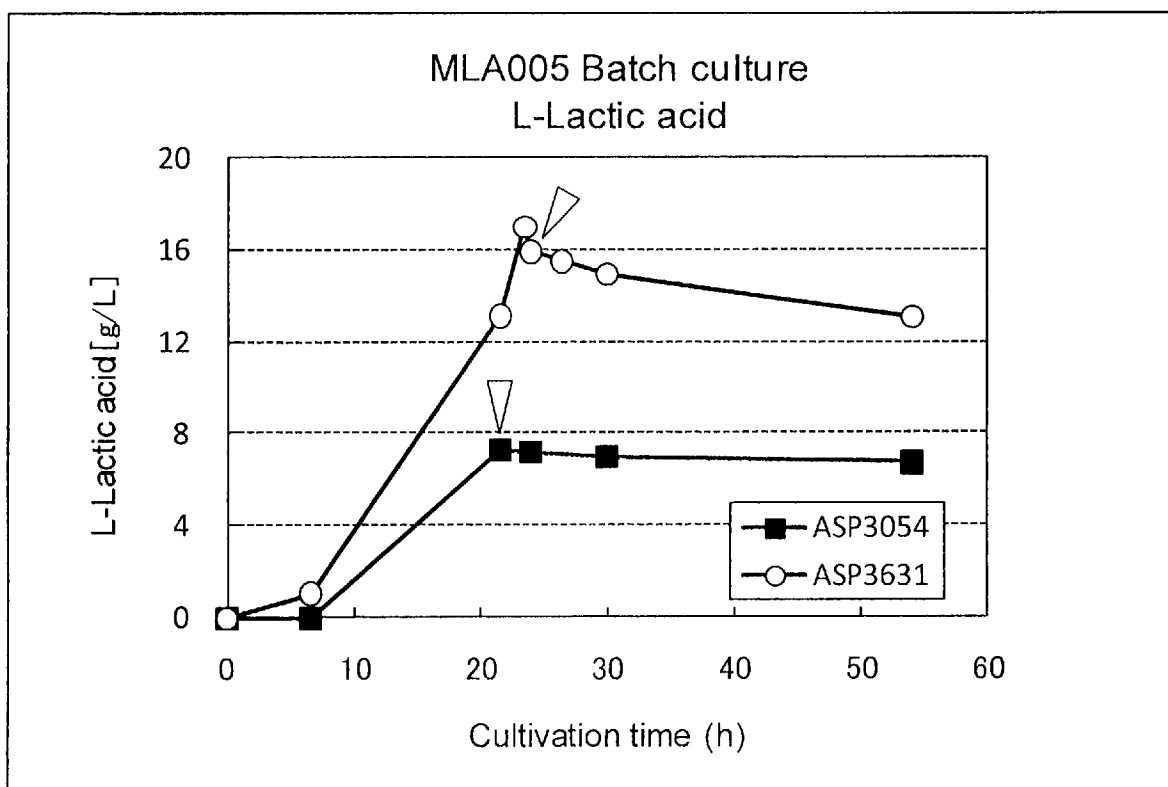
[図5]



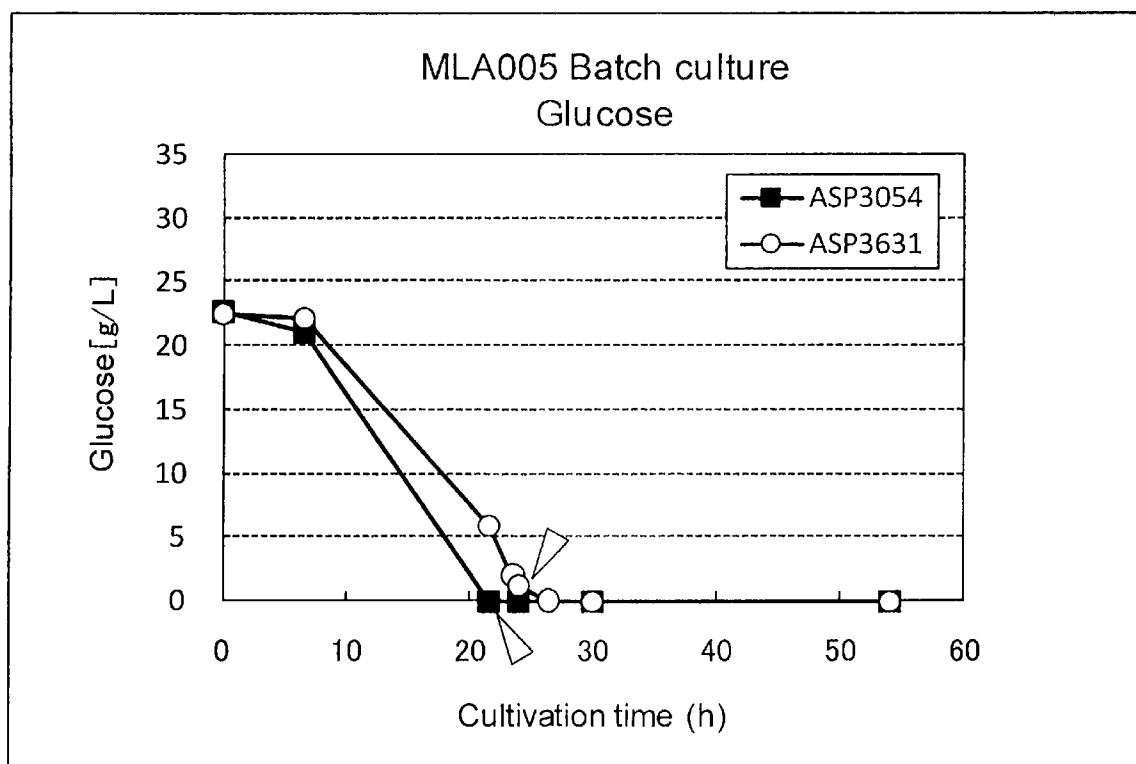
[図6]



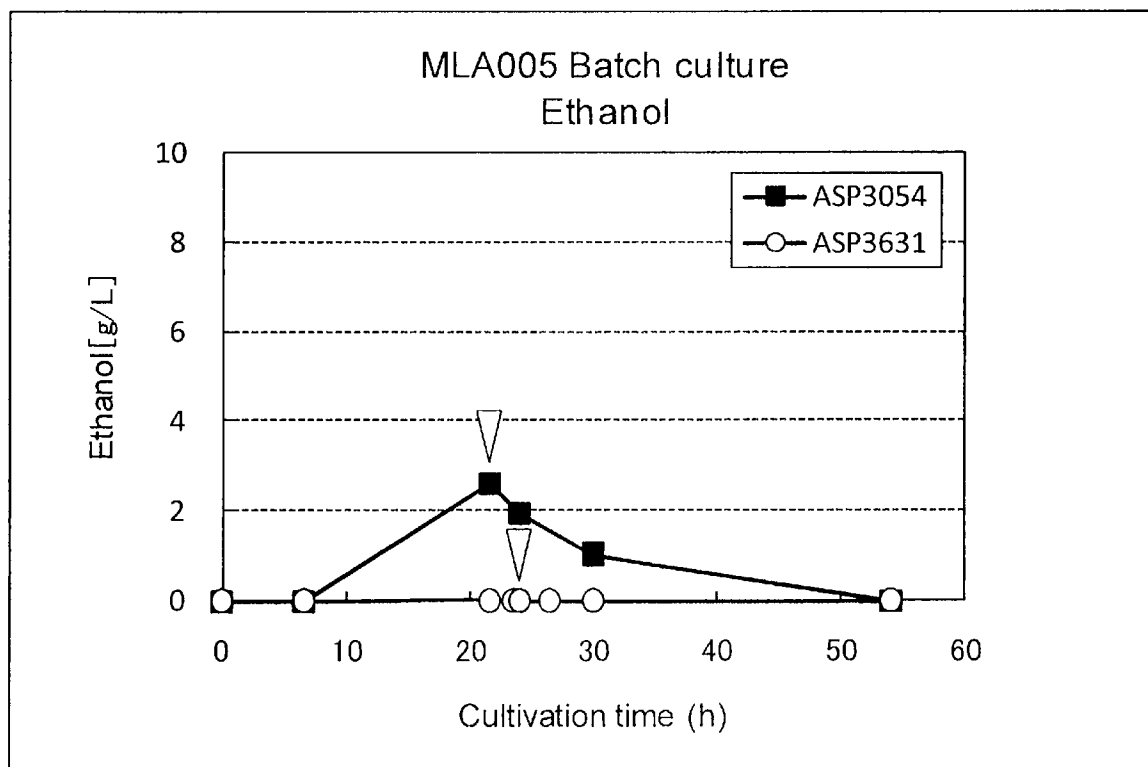
[図7]



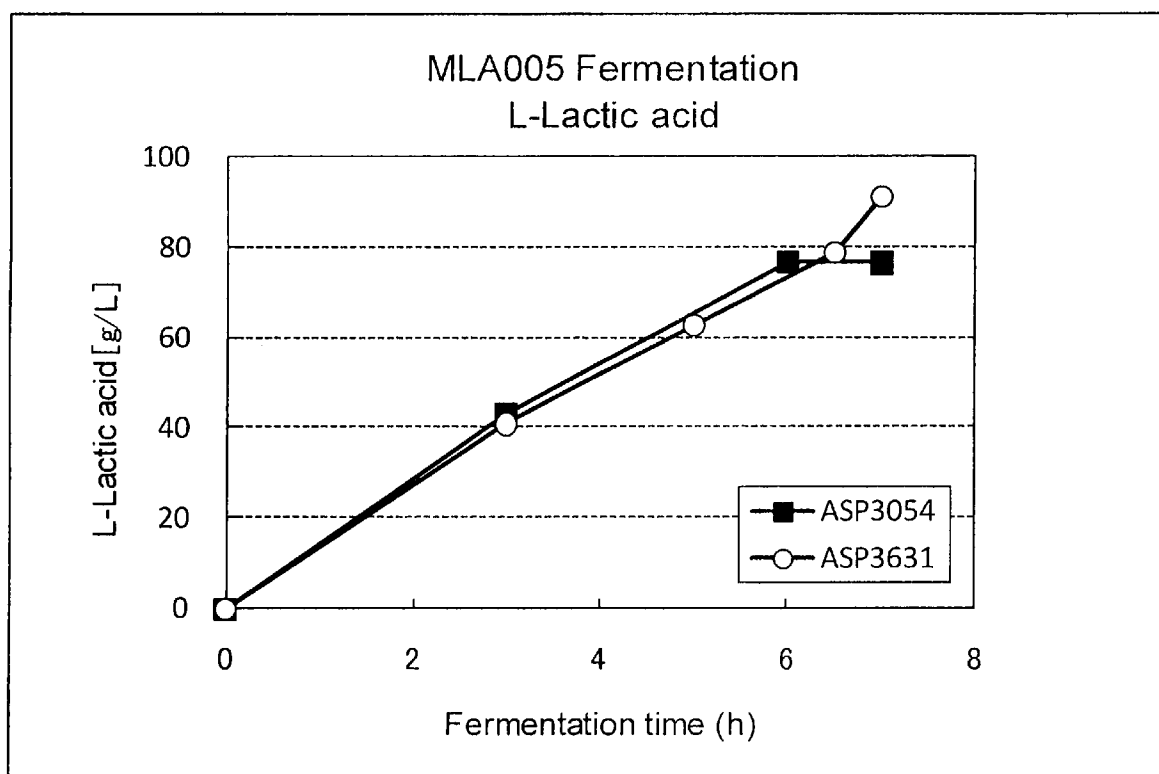
[図8]



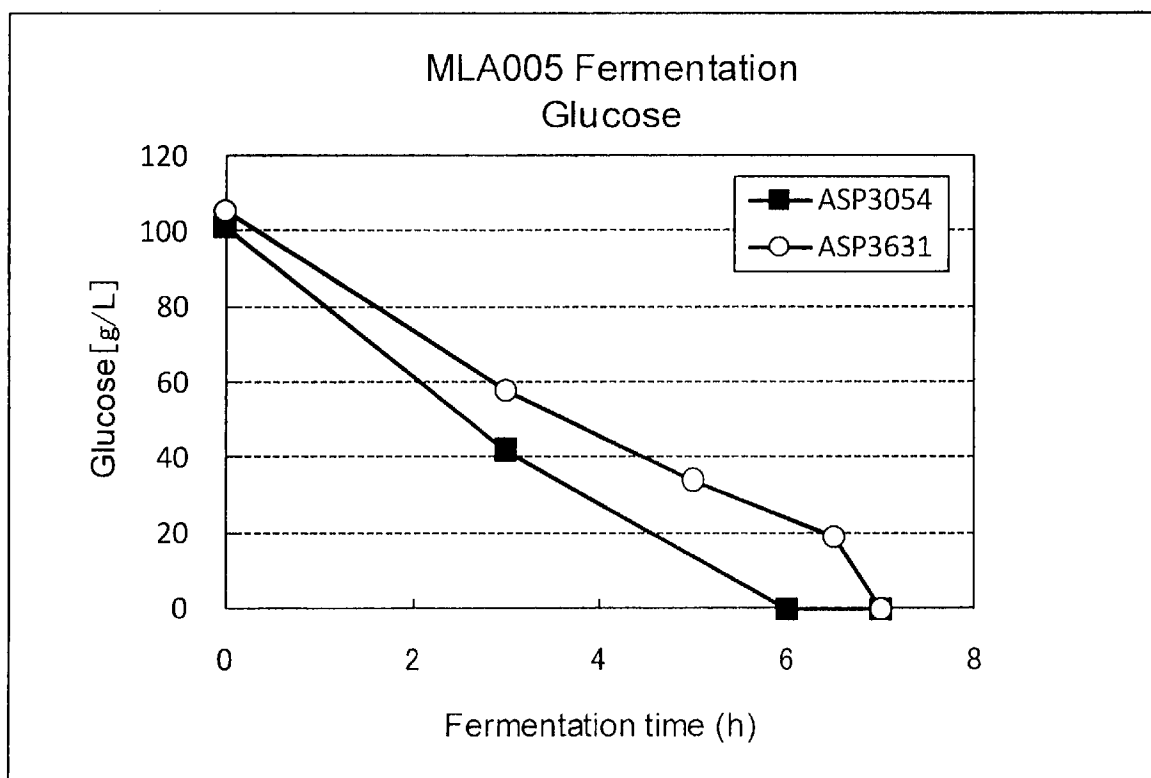
[図9]



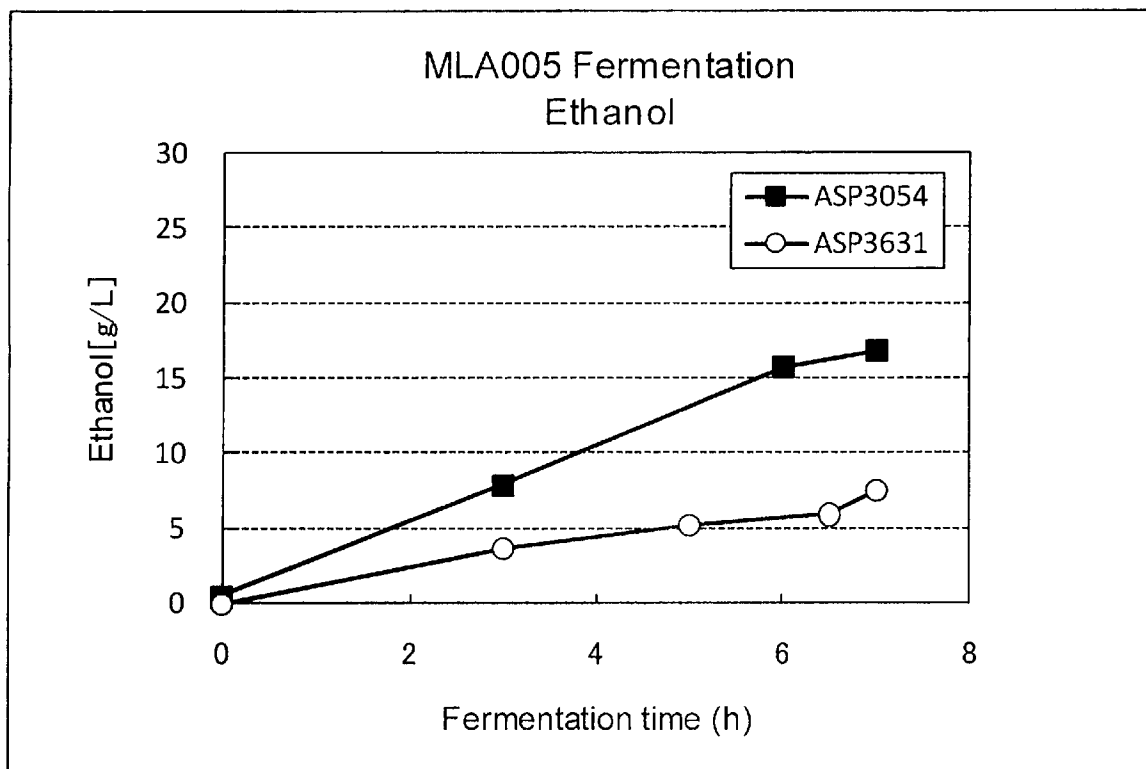
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/072219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i

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, C12N1/19, C12P7/56

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 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/021629 A1 (ASAHI GLASS CO., LTD.), 24 February 2011 (24.02.2011), entire text & US 2012/0214214 A1 & EP 2468860 A1	1-15
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. CCC16600 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CCC16600 > 19-SEP-2011 uploaded, [retrieved on 2013-09-30] Maldonado-Barragan, A., et al. Definition: L-lactate dehydrogenase 1 (L-LDH 1) [Lactobacillus pentosus IG1] entire text	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October, 2013 (23.10.13)

Date of mailing of the international search report

05 November, 2013 (05.11.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/072219

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. CCB83368 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CCB83368 > 17-AUG-2011 uploaded, [retrieved on 2013-09-30] Abriouel, H., et al. Definition: L-lactate dehydrogenase 1 (L-LDH 1) [Lactobacillus pentosus MP-10] entire text	1-15
Y	TAGUCHI, H., et al., D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family, 1991, The Journal of Biological Chemistry, Vol.266, No.19, p.12588-12594, fig. 4	1-15
A	Futoshi HARA et al., "Bunretsu Kobo o Mochiita Muchuwa deno L-Nyusan Seisan ni Okeru Taisha Seigyo", 32rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Yoshishu, 2009, 3P-0890, entire text	1-15
A	Futoshi HARA et al., "Lactate production using Schizosaccharomyces pombe", Abstracts of the 61st Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2009, page 190, 2Mp08, entire text	1-15
A	WO 2005/052174 A2 (A.E.STALEY MANUFACTURING CO.), 09 June 2005 (09.06.2005), entire text & JP 2007-512018 A & US 2005/0112737 A1 & EP 1689873 A	1-15

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P7/56(2006.01)i											
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（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, C12N1/19, C12P7/56											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1 9 2 2 - 1 9 9 6 年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1 9 7 1 - 2 0 1 3 年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1 9 9 6 - 2 0 1 3 年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1 9 9 4 - 2 0 1 3 年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年	日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年	日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年	日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年										
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年										
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年										
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 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） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, 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									
Y	WO 2011/021629 A1 (ASAHI GLASS COMPANY, LIMITED.) 2011.02.24, 全文 & US 2012/0214214 A1 & EP 2468860 A1	1 - 1 5									
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「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 2 3 . 1 0 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 0 5 . 1 1 . 2 0 1 3									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 9 6 3								

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
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. CCC16600 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CCC16600 > 19-SEP-2011 uploaded, [retrieved on 2013-09-30] Maldonado-Barragan, A., et al. Definition: L-lactate dehydrogenase 1 (L-LDH 1) [Lactobacillus pentosus IG1] 全文	1 - 1 5
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. CCB83368 < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CCB83368 > 17-AUG-2011 uploaded, [retrieved on 2013-09-30] Abriouel, H., et al. Definition: L-lactate dehydrogenase 1 (L-LDH 1) [Lactobacillus pentosus MP-10] 全文	1 - 1 5
Y	TAGUCHI, H., et al., D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family, 1991, The Journal of Biological Chemistry, Vol.266, No.19, p.12588-12594 図 4	1 - 1 5
A	原太志, et al., 分裂酵母を用いた無中和での L-乳酸生産における代謝制御, 第 3 2 回日本分子生物学会年会要旨集, 2009, 3P-0890 全文	1 - 1 5
A	原太志, et al., 分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> を用いた乳酸生産, 第 6 1 回日本生物工学会大会講演要旨集, 2009, p.190, 2Mp08 全文	1 - 1 5
A	WO 2005/052174 A2 (A.E.STALEY MANUFACTURING CO.) 2005.06.09, 全文 & JP 2007-512018 A & US 2005/0112737 A1 & EP 1689873 A	1 - 1 5