

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5180060号  
(P5180060)

(45) 発行日 平成25年4月10日 (2013. 4. 10)

(24) 登録日 平成25年1月18日 (2013. 1. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/46 (2006. 01)

C 1 2 P 7/46

C O 8 G 69/26 (2006. 01)

C O 8 G 69/26

C O 8 G 63/16 (2006. 01)

C O 8 G 63/16

請求項の数 8 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2008-502748 (P2008-502748)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月23日 (2007. 2. 23)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/053360  
 (87) 国際公開番号 W02007/099867  
 (87) 国際公開日 平成19年9月7日 (2007. 9. 7)  
 審査請求日 平成22年1月7日 (2010. 1. 7)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-48060 (P2006-48060)  
 (32) 優先日 平成18年2月24日 (2006. 2. 24)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000005968  
 三菱化学株式会社  
 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号  
 (73) 特許権者 000000066  
 味の素株式会社  
 東京都中央区京橋1丁目15番1号  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実  
 (74) 代理人 100089244  
 弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機酸生産菌及び有機酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コハク酸生産能を有し、

プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性およびピルビン酸カルボキシラーゼ活性が該酵素の非改変株と比較して増強するように改変され、かつ、  
遺伝子破壊によりラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化するように改変されたコリネ型細菌。

【請求項2】

コハク酸生産能を有し、

プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が該酵素の非改変株と比較して増強するように改変され、  
遺伝子破壊によりラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化するように改変され、かつ、  
遺伝子破壊により、アセテートキナーゼ活性、ホスホトランスアセチラーゼ活性、アセチル-CoAヒドロラーゼ活性、およびピルベートオキシダーゼ活性が低減化するように改変されたことによって酢酸の生成が低減したコリネ型細菌。

【請求項3】

さらに、プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変され

10

20

た、請求項 2 に記載の コリネ型細菌。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載された コリネ型細菌 あるいはその処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオン又は二酸化炭素ガスを含む反応液中で有機原料に作用させることによって コハク酸 を生成させ、該 コハク酸 を採取する事を特徴とする コハク酸 の製造方法。

【請求項 5】

前記 コリネ型細菌 あるいはその処理物を嫌氣的雰囲気下で有機原料に作用させることを特徴とする、請求項 4 に記載の コハク酸 の製造方法。

【請求項 6】

前記 コリネ型細菌 あるいはその処理物を炭酸水素ナトリウムの存在下、有機原料に作用させることを特徴とする、請求項 4 または請求項 5 に記載の コハク酸 の製造方法。

10

【請求項 7】

前記有機原料が、グルコースまたはシュクロースである、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の コハク酸 の製造方法。

【請求項 8】

請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法により コハク酸 を製造する工程、及び前記工程で得られた コハク酸 を原料として重合反応を行う工程を含む、コハク酸 含有ポリマーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、コリネ型細菌等の有機酸生産菌、およびそれを用いたコハク酸などの有機酸の製造に関するものである。

【背景技術】

【0002】

コハク酸などの有機酸を発酵により生産する場合、通常、Anaerobiospirillum 属、Actinobacillus 属等の嫌気性細菌が用いられている（特許文献 1 及び 2、非特許文献 1）。嫌気性細菌を用いる場合は、生産物の収率が高いが、その一方では、増殖するために多くの栄養素を要求するために、培地中に多量の C S L（コーンステープリカー）などの有機窒素源を添加する必要がある。これらの有機窒素源を多量に添加することは培地コストの上昇をもたらすだけでなく、生産物を取り出す際の精製コストの上昇にもつながり経済的でない。

30

【0003】

また、コリネ型細菌のような好気性細菌を好気性条件下で一度培養し、菌体を増殖させた後、静止菌体として酸素を通気せずに有機酸を生産する方法も知られている（特許文献 3 及び 4）。この場合、菌体を増殖させるに当たっては、有機窒素の添加量が少なくてもよく、簡単な培地で十分増殖できるため経済的ではあるが、目的とする有機酸の生成量、生成濃度、及び菌体当たりの生産速度の向上、製造プロセスの簡略化等、改善の余地があった。また、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性を増強させた細菌を用いた有機酸の発酵生産などが報告されていたが（例えば、特許文献 5 参照）、さらなる有機酸発酵プロセスの開発が求められていた。

40

【0004】

2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ（ $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼとも呼ばれる）については、コリネ型細菌において活性が確認されたという報告（非特許文献 2）や、遺伝子がクローニングされたという報告（非特許文献 3）がある。また、2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低減した微生物を用いたアミノ酸の製造法が開示されている（特許文献 6）。

しかしながら、2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの活性を増強させた細菌を用いて有機酸を製造することは、これまで報告されていなかった。

【特許文献 1】米国特許第 5, 143, 834 号公報

50

【特許文献2】米国特許第5,504,004号公報

【特許文献3】特開平11-113588号公報

【特許文献4】特開平11-196888号公報

【特許文献5】特開平11-196887号公報

【特許文献6】国際公開第95/34672号パンフレット

【非特許文献1】International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49,207-216

【非特許文献2】Shiio I, Ujigawa-Takeda K. 1980. Presence and regulation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 44:1897-1904.

【非特許文献3】Usuda Y, Tujimoto N, Abe C, Asakura Y, Kimura E, Kawahara Y, O, Matsu i H. 1996. Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. Microbiology. 142:3347-54.

【発明の開示】

【0005】

本発明の課題は、より生産効率の高いコハク酸などの有機酸の製造方法を提供することにある。

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が増強するように改変された細菌あるいはその処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含む反応液中で有機原料に作用させることにより、有機原料の消費速度、コハク酸などの有機酸の生成速度、あるいは、収率が高まることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) コハク酸生産能を有し、プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性およびピルビン酸カルボキシラーゼ活性が該酵素の非改変株と比較して増強するように改変され、かつ、遺伝子破壊によりラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化するように改変されたコリネ型細菌。

(2) コハク酸生産能を有し、プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が該酵素の非改変株と比較して増強するように改変され、遺伝子破壊によりラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化するように改変され、かつ、遺伝子破壊により、アセテートキナーゼ活性、ホスホトランスアセチラーゼ活性、アセチル-CoAヒドロラーゼ活性、およびピルベートオキシダーゼ活性が低減化するように改変されたことによって酢酸の生成が低減したコリネ型細菌。

(3) さらに、プラスミドを用いた形質転換、染色体上への遺伝子導入およびプロモーター置換から選択される手段により、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変された、(2)のコリネ型細菌。

(4) (1)～(3)のいずれかのコリネ型細菌あるいはその処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオン又は二酸化炭素ガスを含む反応液中で有機原料に作用させることによってコハク酸を生成させ、該コハク酸を採取する事を特徴とするコハク酸の製造方法。

(5) 前記コリネ型細菌あるいはその処理物を嫌氣的雰囲気下で有機原料に作用させることを特徴とする、(4)のコハク酸の製造方法。

(6) 前記コリネ型細菌あるいはその処理物を炭酸水素ナトリウムの存在下、有機原料に作用させることを特徴とする、(4)または(5)のコハク酸の製造方法。

(7) 前記有機原料が、グルコースまたはシュクロースである、(4)～(6)のいずれかのコハク酸の製造方法。

(8) (4)～(7)のいずれかの方法によりコハク酸を製造する工程、及び前記工程で得られたコハク酸を原料として重合反応を行う工程を含む、コハク酸含有ポリマーの製造方法。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】プラスミドpC3.14の構築手順を示す図。

【図2】プラスミドpODH3.2の構築手順を示す図。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

10

本発明の細菌は、有機酸生産能を有し、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（以下、ODHとも呼ぶ）活性が非改変株と比較して増強するように改変された細菌である。

本発明において、「有機酸の生産能」とは、本発明の細菌を培養したときに、培地中に有機酸を蓄積する能力をいう。また、「有機酸」とは、TCA回路の代謝中間体の有機酸が挙げられ、例えば、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、クエン酸、イソクエン酸、シス-アコニット酸などが挙げられるが、この中でもコハク酸、リンゴ酸、フマル酸が好ましく、コハク酸がより好ましい。

このような細菌は、本来的に有機酸生産能を有する細菌又は育種により有機酸生産能を付与された細菌において、ODH活性を増強する改変を行ったものでもよいし、ODH活性を増強する改変を行うことにより有機酸生産能を有するようになったものでもよい。育種により有機酸生産能を付与する手段としては、例えば、変異処理、遺伝子組換え処理などが挙げられるが、より具体的には、後述するようなラクテートデヒドロゲナーゼ活性を低減するような改変やピルビン酸カルボキシラーゼ活性を増強するような改変などが挙げられる。

20

なお、本発明に用いる細菌は2種類以上の有機酸を生産する能力を有するものであってもよい。

【0010】

本発明の製造法に使用できる細菌は、有機酸生産能を有すれば特に限定されないが、コリネ型細菌（coryneform bacterium）、バチルス属細菌、エシェリヒア属細菌、ラクトバチルス属細菌、サクシノバチルス属細菌及びリゾビウム属細菌が好ましく、この中ではコリネ型細菌がより好ましい。

30

例えば、エシェリヒア属細菌としてはエシェリヒア・コリなどが挙げられ、ラクトバチルス属細菌としてはラクトバチルス・ヘルヴェチカスが挙げられ（J Appl Microbiol, 2001, 91, p846-852）、バチルス属細菌としては、バチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・プミルス、バチルス・ステアロサーモフィルス等が挙げられ、リゾビウム属細菌としては、リゾビウム・エトリ（*Rhizobium etli*）などが挙げられる。

コリネ型細菌は、これに分類されるものであれば特に制限されないが、コリネバクテリウム属に属する細菌、ブレビバクテリウム属に属する細菌又はアースロバクター属に属する細菌などが挙げられ、このうち好ましくは、コリネバクテリウム属又はブレビバクテリウム属に属するものが挙げられ、更に好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）、ブレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス（*Brevibacterium ammoniagenes*）又はブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（*Brevibacterium lactofermentum*）に分類される細菌が挙げられる。

40

【0011】

本発明に用いる細菌の親株の特に好ましい具体例としては、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233（FERM BP-1497）、同 MJ-233 AB-41（FERM BP-1498）、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 31831、及びブレビバクテリウム・ラク

50

トファーマンタム A T C C 1 3 8 6 9 等が挙げられる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムは、現在、コリネバクテリウム・グルタミカムに分類される場合もあることから (Lielbl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, vol. 41, p255-260)、本発明においては、ブレビバクテリウム・フラバム M J - 2 3 3 株、及びその変異株 M J - 2 3 3 A B - 4 1 株はそれぞれ、コリネバクテリウム・グルタミカム M J - 2 3 3 株及びコリネバクテリウム・グルタミカム M J - 2 3 3 A B - 4 1 株と同一の株であるものとする。

ブレビバクテリウム・フラバム M J - 2 3 3 は、1975年4月28日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所 (現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター) (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に受託番号 FERM P-306 8 として寄託され、1981年5月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-1497 の受託番号で寄託されている。

また、親株として用いられる上記細菌は、野生株だけでなく、UV照射やNTG処理等の通常の変異処理により得られる変異株、細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

#### 【0012】

本発明の細菌は、上記のような有機酸生産能を有する細菌を、ODH活性が増強するように改変することによって得ることができる。ただし、ODH活性増強のための改変を行った後に有産生産能を付与する改変を行ってもよい。

ここで、「ODH活性」とは、2-オキソグルタル酸 ( $\alpha$ -ケトグルタル酸) を酸化的に脱炭酸し、サクシニル-CoA (succinyl-CoA) を生成する反応を触媒する活性をいい、「ODH活性が増強する」とは、ODH非改変株と比較してODH活性が増強していることをいう。ODH活性は、ODH非改変株と比較して、単位菌体重量当たり1.5倍以上増強されていることが好ましく、2倍以上増強されていることがより好ましい。なお、ODH活性は、Shiioらの方法 (Isamu Shiio and Kyoko Ujigawa-Takeda, Agric.Biol.Chem., 44(8), 1897-1904, 1980) に従って測定することができる。

#### 【0013】

ODH遺伝子を用いたODH活性を増強させるための改変は、例えば、プラスミドなどを用いた形質転換、相同組換えなどによる染色体上へのODH遺伝子の組み込み、ODH遺伝子発現調節配列の改変などによって行うことができる。

プラスミドなどを用いた形質転換や相同組換えなどによってODH遺伝子を宿主細菌に導入する場合に用いることのできるODH遺伝子としては、宿主細菌に導入したときにODH活性を増加させる遺伝子、すなわち、ODH活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である限り特に限定されないが、例えば、配列番号3に示す塩基配列を有するコリネ型細菌由来のODH遺伝子 (odhA) を挙げることができる。ODH遺伝子は、ODH活性を有するタンパク質をコードする限り、上記塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、または上記塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有するDNAのようなホモログ遺伝子であってもよい。

ここで、ストリンジェントな条件としては、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

また、コリネ型細菌以外の細菌、または他の微生物又は動植物由来のODH遺伝子を使用することもできる。微生物または動植物由来のODH遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、ホモロジー等に基づいてODH活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものなどを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列にしたがって合成した遺伝子を使用することもできる。これらは、例えば、ハイブリダイゼーション法やPCR法によりそのプロモーターおよびORF部分を含む領域を増幅することによって、取得することができる。

#### 【0014】

上述したようなODH遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でODHの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。ここで、上記組み換えプラスミドにおいて、ODH遺伝子を発現させるためのプロモーターはODH遺伝子自身のプロモーターであってもよいが、宿主細菌で機能しうる他の強力なプロモーターに置換してもよい。例えば、tacプロモーターやtrcプロモーターなどの大腸菌由来のプロモーターが挙げられる。

#### 【0015】

コリネ型細菌にODH遺伝子を導入する場合、用いることができるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内での複製機能を司る遺伝子を少なくとも含むものであれば特に制限されない。その具体例としては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号明細書に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11、国際公開第95/34672号パンフレットに記載のpPK4等を挙げることができる。それらの中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とを有するものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX等が好適に使用される。

#### 【0016】

このようなプラスミドベクターの適当な部位にODH遺伝子を挿入して得られる組み換えベクターで、コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*)MJ-233株(FERM BP-1497)を形質転換することにより、ODH遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌が得られる。形質転換は、例えば、電気パルス法(Res. Microbiol., Vol.144, p.181-185, 1993)等の公知の方法によって行うことができる。

なお、ODH活性の増強は、公知の相同組換え法によって染色体上にODH遺伝子を多コピー組み込んで高発現化させることによって行うことができる。

以上、コリネ型細菌を用いる例を述べたが、他の細菌を用いる場合も同様の方法によって、ODH活性の増強を達成することができる。

#### 【0017】

また、ODH活性の増強は、宿主染色体上でプロモーターを置換することによっても達成しうる。プロモーター領域の配列情報は、例えば、GenBank Database Accession No. AP005276などから得ることができる。置換するプロモーターの種類は宿主細菌で機能しうるものであれば特に制限されないが、嫌気的条件下での転写活性抑制されないプロモーターが好ましく、例えば、大腸菌で用いられるtacプロモーターや、trcプロモーターなどが挙げられる。

プロモーター置換の方法としては、例えば、後述の実施例に示すようなsacB遺伝子を用いる方法(Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73)が挙げられる。

#### 【0018】

本発明においては、酢酸生産が低減するように改変された有機酸生産菌において、ODH活性を増強するように改変してもよい。酢酸生産が低減するように改変された有機酸生産菌においては、2-オキシグルタル酸が副生することがある。ODHは、2-オキシグルタル酸を酸化的に脱炭酸し、サクシニル-CoAを生成する反応を触媒するため、ODH活性を増強することによって、2-オキシグルタル酸の副生が低下し、目的の有機酸の生成量が増

加する。

酢酸生産が低減するような改変としては、たとえば、アセテートキナーゼ（以下、ACKとも呼ぶ）、ホスホトランスアセチラーゼ（以下、PTAとも呼ぶ）、アセチル-CoAハイドラーゼ（以下、ACHとも呼ぶ）、ピルベートオキシダーゼ（以下、POXBとも呼ぶ）の活性を低減するような改変が挙げられる。

酢酸はオキサロ酢酸及びオキサロ酢酸誘導体合成経路の中間体であるアセチル-CoAから生成されるため、酢酸合成経路をブロックして酢酸の副生を低減させるためには、上記酵素のいずれか一つあるいは全ての活性を低下させることが好ましい。

#### 【0019】

「PTA活性」とは、アセチル-CoAにリン酸を転移してアセチルリン酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「PTA活性が低下するように改変された」とは、PTA活性が、非改変株、例えば野生株の比活性よりも低くなったことをいう。PTA活性は非改変株と比較して、菌体当たり30%以下に低下していることが好ましく、菌体当たり10%以下に低下していることがより好ましい。また、PTA活性は完全に消失していてもよい。PTA活性が低下したことは、Klotzschらの方法（Klotzsch, H. R., Meth Enzymol. 12, 381-386(1969)）により、PTA活性を測定することによって確認することができる。

10

#### 【0020】

「ACK活性」は、アセチルリン酸とADPから酢酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「ACK活性が低下するように改変された」とは、ACK活性が、非改変株、例えば野生株の比活性よりも低くなったことをいう。ACK活性は非改変株と比較して、菌体当たり30%以下に低下していることが好ましく、菌体当たり10%以下に低下していることがより好ましい。また、ACK活性は完全に消失していてもよい。ACK活性が低下したことは、Ramponiらの方法（Ramponi G., Meth. Enzymol. 42,409-426(1975)）により、ACK活性を測定することによって確認することができる。

20

#### 【0021】

なお、コリネバクテリウム・グルタミカム（ブレビバクテリウム・フラバムに分類されるものも含む）においては、Microbiology. 1999 Feb;145 (Pt 2):503-13に記載されているように、両酵素はpta-ackオペロンにコードされているため、pta遺伝子を破壊した場合は、PTA及びACKの両酵素の活性を低下させることができる。

#### 【0022】

pta遺伝子の破壊は、公知の方法、例えば、相同組換えを利用する方法やsacB遺伝子を用いる方法（Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73）にしたがって行うことができる。pta遺伝子としては、例えば、配列番号7の塩基番号1～1383からなる塩基配列を含むDNAを挙げることができる。また、遺伝子破壊に用いる遺伝子は破壊対象のコリネ型細菌の染色体DNA上のpta遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していればよい。該配列の相同遺伝子も使用することができる。ここで、相同組換えを起こす程度の相同性とは、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を意味する。また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。

30

40

#### 【0023】

なお、ACK単独で活性低下させる場合、ack遺伝子を用いて改変してもよい。ack遺伝子としては、例えば、配列番号7の塩基番号1386～2579番目の塩基配列を有する遺伝子を挙げることができる。また、染色体上のack遺伝子と相同組換えを起こす程度に、該配列に対して相同性を有する遺伝子も使用することができる。ここで、相同組換えを起こす程度の相同性とは、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を意味する。また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。

なお、本発明において使用する細菌は、ODH活性を増強する改変に加え、上記改変のう

50

ちの2種類以上の改変を組み合わせて得られる細菌であってもよい。複数の改変を行う場合、その順番は問わない。

#### 【0024】

「ACH活性」は、アセチル-CoAと水から酢酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「ACH活性が低下するように改変された」とは、ACH活性が、非改変株、例えば野生株の比活性よりも低くなったことをいう。ACH活性は非改変株と比較して、菌体当たり50%以下、好ましくは30%以下、さらに望ましくは10%以下に低下されていることが好ましい。尚、「低下」には活性が完全に消失した場合も含まれる。ACH活性が低下したことは、Gergely, J., らの方法 (Gergely, J., Hele, P. & Ramkrishnan, C.V. (1952) J. Biol. Chem. 198 p323-334) を参考にしてACH活性を測定することによって確認することができる。なお、コリネ型細菌のACHをコードする遺伝子の例としては、GenBankに登録のコリネバクテリウム・グルタミカムの配列 (GenBank Accession No. NC\_003450のNCgl2480 (NC\_003450の2729376..2730884番目の相補鎖)) が挙げられる (W02005/113744)。コリネバクテリウム・グルタミカムのach遺伝子の配列を配列番号14の1037-2545に示す。また、染色体上のach遺伝子と相同組換えを起こす程度に、該配列に対して相同性を有する遺伝子も使用することができる。ここで、相同組換えを起こす程度の相同性とは、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を意味する。また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。

10

#### 【0025】

「POXB活性」は、ピルビン酸と水から酢酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「POXB活性が低下するように改変された」とは、POXB活性が、非改変株、例えば野生株の比活性よりも低くなったことをいう。POXB活性は非改変株と比較して、菌体当たり50%以下に低下していることが好ましく、30%以下に低下していることがより好ましく、10%以下に低下していることが特に好ましい。「低下」には活性が完全に消失した場合も含まれる。POXB活性が低下したことは、Chang らの方法 (Chang Y. and Cronan J. E. JR, J. Bacteriol. 151, 1279-1289 (1982)) により、POXB活性を測定することによって確認することができる。なお、コリネ型細菌のpoxB遺伝子の例としては、GenBankに登録されている配列 (GenBank Accession No. NC\_003450の2776766-2778505番目の相補鎖) が挙げられる (W02005/113745)。コリネバクテリウム・グルタミカムのpoxB遺伝子の配列を配列番号16の996-2735に示す。また、染色体上のpoxB遺伝子と相同組換えを起こす程度に、該配列に対して相同性を有する遺伝子も使用することができる。ここで、相同組換えを起こす程度の相同性とは、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を意味する。また、上記遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。

20

30

なお、ach遺伝子及びpoxB遺伝子の破壊は、上述のpta遺伝子の破壊と同様に、公知の方法により行うことができる。

#### 【0026】

本発明の細菌は、ODH活性の増強に加えて、ラクテートデヒドロゲナーゼ (以下、LDHとも呼ぶ) 活性が低減化するように改変された細菌であってもよい。このような細菌は、有機酸がコハク酸である場合に特に有効である。このような細菌は、例えば、LDH遺伝子が破壊された細菌を作製し、さらに該細菌をODH遺伝子を用いて改変することにより得ることができる。ただし、LDH活性低減化のための改変と、ODH活性増強のための改変はいずれを先に行ってもよい。

40

#### 【0027】

「LDH活性が低減された」とは、LDH遺伝子非改変株と比較してLDH活性が低下していることをいう。LDH活性は、非改変株と比較して、菌体当たり10%以下に低減化されていることが好ましい。また、LDH活性は完全に消失していてもよい。LDH活性が低減されたことは、公知の方法 (L. Kanarek and R. L. Hill, J. Biol. Chem. 239, 4202 (1964)) によ

50

りLDH活性を測定することによって確認することができる。コリネ型細菌のLDH活性の低減した株の具体的な製造方法としては、特開平11-206385号公報に記載されている染色体への相同組換えによる方法、あるいは、sacB遺伝子を用いる方法(Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73)等が挙げられる。

#### 【0028】

また、本発明に用いる細菌は、ODH活性の増強に加えて、ピルビン酸カルボキシラーゼ(以下、PCとも呼ぶ)の活性が増強するように改変された細菌であってもよい。「PC活性が増強される」とは、PC活性が野生株又は親株等の非改変株に対して好ましくは100%以上、より好ましくは300%以上増加していることをいう。PC活性は例えば、NADHの減少を測定する方法(WO2005/021770)により測定することができる。このよ

10

#### 【0029】

PC遺伝子の導入は、例えば、特開平11-196888号公報に記載の方法と同様にして、ピルビン酸カルボキシラーゼ(PC)遺伝子をコリネ型細菌中で高発現させることにより行うことができる。具体的なPC遺伝子遺伝子としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のPC遺伝子(Peters-Wendisch, P.G. et al. Microbiology, vol.144 (1998) p915-927(配列番号5))などを用いることができる。PC遺伝子は、PC活性を実質的に損なうことがない限り、配列番号5の塩基配列において、一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、又は欠失していてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明に用いることができる。さらに、配列番号5の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、または配列番号5の塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の相同性を有するDNAであって、PC活性を有するタンパク質をコードするDNAも好適に用いることができる。

20

#### 【0030】

また、コリネバクテリウム・グルタミカム以外の細菌、または他の細菌又は動植物由来のPC遺伝子を使用することもできる。特に、以下に示す細菌または動植物由来のPC遺伝子は、その配列が既知(以下に文献を示す)であり、上記と同様にしてハイブリダイゼーションにより、あるいはPCR法によりそのORF部分を増幅することによって、取得することができる。

30

ヒト [Biochem.Biophys.Res.Comm., 202, 1009-1014, (1994)]

マウス [Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 1766-1779, (1993)]

ラット [GENE, 165, 331-332, (1995)]

酵母; サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)

[Mol.Gen.Genet., 229, 307-315, (1991)]

シゾサッカロマイセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)

[DDBJ Accession No.; D78170]

バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)

[GENE, 191, 47-50, (1997)]

リゾビウム・エトリ (Rhizobium etli)

[J.Bacteriol., 178, 5960-5970, (1996)]

40

なお、PC活性の増強は上述したようなODHの活性増強と同様の方法にて行うことができる。

#### 【0031】

### 2. 有機酸の製造方法

本発明の有機酸の製造方法は、上記細菌またはその処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させ、有機酸を生成させ、これを採取する事の特徴とする有機酸の製造方法である。製造する有機酸は上述した有機

50

酸であるが、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸又はピルビン酸が好ましく、コハク酸がより好ましい。

#### 【0032】

有機酸の製造に上記細菌を用いるに当たっては、寒天培地等の固体培地で斜面培養したものを直接反応に用いても良いが、上記細菌を予め液体培地で培養（種培養）したものを用いるのが好ましい。種培養に用いる培地は、細菌の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩からなる組成に、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等の天然栄養源を添加した一般的な培地を用いることができる。種培養後の菌体は、遠心分離、膜分離等によって回収した後に、有機酸の製造反応に用いることが好ましい。なお、種培養した細菌を有機原料を含む培地で増殖させながら、有機原料と反応させることによって有機酸を製造してもよいし、予め増殖させて得られた菌体を有機原料を含む反応液中で有機原料と反応させることによって有機酸を製造してもよい。

10

#### 【0033】

本発明では細菌の菌体の処理物を使用することもできる。菌体の処理物としては、例えば、菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物、その遠心分離上清、又はその上清を硫酸処理等で部分精製した画分等が挙げられる。

#### 【0034】

本発明の製造方法に用いる有機原料としては、本細菌が資化してコハク酸などの有機酸を生成させうる炭素源であれば特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、グリセロール、シュクロース、サッカロース、デンプン、セルロース等の炭水化物；グリセリン、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース又はシュクロースが好ましく、特にグルコースが好ましい。

20

#### 【0035】

また、上記発酵性糖質を含有する澱粉糖化液、糖蜜なども使用される。これらの発酵性糖質は、単独でも組み合わせても使用できる。上記有機原料の使用濃度は特に限定されないが、コハク酸などの有機酸の生成を阻害しない範囲で可能な限り高くするのが有利であり、通常、5～30%（W/V）、好ましくは10～20%（W/V）の範囲内で反応が行われる。また、反応の進行に伴う上記有機原料の減少にあわせ、有機原料の追加添加を行っても良い。

30

#### 【0036】

上記有機原料を含む反応液としては特に限定されず、例えば、細菌を培養するための培地であってもよいし、リン酸緩衝液等の緩衝液であってもよい。反応液は、窒素源や無機塩などを含む水溶液であることが好ましい。ここで、窒素源としては、本細菌が資化してコハク酸などの有機酸を生成させうる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が挙げられる。また、ビオチン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加してもよい。また、反応時の発泡を抑えるために、培養液には市販の消泡剤を適量添加しておくことが望ましい。

40

#### 【0037】

反応液には、上記した有機原料、窒素源、無機塩などのほかに、炭酸イオン、重炭酸イオン又は二酸化炭素ガスを含有させる。炭酸イオン又は重炭酸イオンは、中和剤としても用いることのできる炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウムなどから供給されるが、必要に応じて、炭酸若しくは重炭酸又はこれらの塩或いは二酸化炭素ガスから供給することもできる。炭酸又は重炭酸の塩の具体例と

50

しては、例えば炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等が挙げられる。そして、炭酸イオン、重炭酸イオンは、1～500mM、好ましくは2～300mM、さらに好ましくは3～200mMの濃度で添加する。二酸化炭素ガスを含有させる場合は、溶液1L当たり50mg～25g、好ましくは100mg～15g、さらに好ましくは150mg～10gの二酸化炭素ガスを含有させる。

#### 【0038】

反応液のpHは、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等を添加することによって調整することができる。本反応におけるpHは、通常、pH5～10、好ましくはpH6～9.5であり、反応中にも必要に応じて反応液のpHはアルカリ性物質、炭酸塩、尿素などによって上記範囲内に調節する。

10

#### 【0039】

本反応に用いる細菌の生育至適温度は、通常、25℃～35℃である。反応時の温度は、通常、25℃～40℃、好ましくは30℃～37℃である。反応に用いる菌体の量は、特に規定されないが、1～700g/L、好ましくは10～500g/L、さらに好ましくは20～400g/Lが用いられる。反応時間は1時間～168時間が好ましく、3時間～72時間がより好ましい。

#### 【0040】

細菌の種培養時は、通気、攪拌し酸素を供給することが必要である。一方、コハク酸などの有機酸の生成反応は、通気、攪拌して行ってもよいが、通気せず、酸素を供給しない嫌氣的雰囲気下で行ってもよい。ここで言う嫌氣的雰囲気とは、溶液中の溶存酸素濃度を低く抑えて反応することを意味する。この場合、溶存酸素濃度として0～2ppm、好ましくは0～1ppm、さらに好ましくは0～0.5ppmで反応させることが望ましい。そのための方法としては、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不活性ガスを供給して反応させる、二酸化炭素ガス含有の不活性ガスを通気する等の方法を用いることができる。

20

#### 【0041】

以上のような細菌反応により、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸又はピルビン酸などの有機酸が反応液中に生成蓄積する。反応液（培養液）中に蓄積した有機酸は、常法に従って、反応液より採取することができる。具体的には、例えば、遠心分離、ろ過等により菌体等の固形物を除去した後、イオン交換樹脂等で脱塩し、その溶液から結晶化あるいはカラムクロマトグラフィーにより精製するなどして、有機酸を採取することができる。

30

#### 【0042】

さらに本発明においては、上記した本発明の方法により有機酸を製造した後に、得られた有機酸を原料として重合反応を行うことにより有機酸含有ポリマーを製造することができる。

近年、環境に配慮した工業製品が数を増す中、植物由来の原料を用いたポリマーに注目が集まってきており、本発明において製造されるコハク酸は、ポリエステルやポリアミドといったポリマーに加工されて用いる事が出来る。コハク酸含有ポリマーとして具体的には、ブタンジオールやエチレングリコールなどのジオールとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリエステル、ヘキサメチレンジアミンなどのジアミンとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリアミドなどが挙げられる。

40

また、本発明の製造法により得られるコハク酸または該コハク酸を含有する組成物は食品添加物や医薬品、化粧品などに用いることができる。

#### 【実施例1】

#### 【0043】

<ODHプラスミド増強株作製>

(A) MJ233株ゲノムDNAの抽出

A培地〔尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.

50

5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$  6 mg、ビオチン 200  $\mu\text{g}$ 、チアミン 100  $\mu\text{g}$ 、イーストエキストラクト 1 g、カザミノ酸 1 g、グルコース 20 g、蒸留水 1 L に溶解] 10 mL に、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株を対数増殖期後期まで培養し、遠心分離 (1000 g、5 分) により菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/mL の濃度にリゾチームを含む 10 mM NaCl / 20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) / 1 mM EDTA · 2 Na 溶液 0.15 mL に懸濁した。次に、上記懸濁液にプロテナーゼ K を、最終濃度が 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロフォルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 × g、20 分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3 M となるように添加した後、2 倍量のエタノールを加え混合した。遠心分離 (15,000 × g、2 分) により回収した沈殿物を 70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) - 1 mM EDTA · 2 Na 溶液 5 mL を加え、4℃で一晩静置し、以後の PCR の鋳型 DNA に使用した。

#### 【0044】

(B) ODH 遺伝子のクローニングと増強用プラスミドの構築

プロモーター領域を含むブレビバクテリウム・フラバム MJ 233 株由来 2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体 E1 コンポーネントの遺伝子 (odhA) の取得は上記 (A) で調製した DNA を鋳型とし、全ゲノム配列が報告されているコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13032 株の該遺伝子の配列 (GenBank Database Accession No. BA000036 の 1172498..1176271 の相補鎖) を基に設計した合成 DNA (配列番号 1 および配列番号 2) を用いた PCR によって行った。反応液組成: 鋳型 DNA 1  $\mu\text{L}$ 、Pfx DNA ポリメラーゼ (インビトロジェン社製) 0.5  $\mu\text{L}$ 、1 倍濃度添付バッファー、0.4  $\mu\text{M}$  各々プライマー、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.2 mM dNTPs を混合し、全量を 50  $\mu\text{L}$  とした。反応温度条件: DNA サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research 社製) を用い、94℃で10秒、68℃で5分からなるサイクルを 35 回繰り返した。但し、1 サイクル目の 94℃での保温は 2 分、最終サイクルの 68℃での保温は 10 分とした。PCR 反応終了後、Takara Ex Taq (宝バイオ) を 0.1  $\mu\text{L}$  加え、さらに 72℃で 30 分保温した。増幅産物の確認は、0.75% アガロース (SeaKem GTG agarose: FMC BioProducts 製) ゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、約 4.4 kb の断片を検出した。ゲルからの目的 DNA 断片の回収は、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) を用いて行った。回収した DNA 断片を、PCR 産物クローニングベクター pTZ7Blue T-Vector (Novagen 製) と混合し、ライゲーションキット ver. 2 (宝バイオ) を用いて連結後、得られたプラスミド DNA で大腸菌 (DH5 $\alpha$  株) を形質転換した。この様にして得られた組換え大腸菌を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリンおよび 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-Gal を含む LB 寒天培地に塗抹した。この培地上で白色のコロニーを形成したクローンを、常法により液体培養した後、プラスミド DNA を精製した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 SseI および BamHI で切断することにより、約 4.4 kb の挿入断片が認められ、これを pODH1.0 と命名した。

#### 【0045】

(C) pTZ4 と和合性を有するコリネ型細菌発現ベクターの構築

(i) ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子の導入

pTZ4 と共存可能なコリネ型細菌ベクターは、pTZ4 と和合性を示す複製領域を持つプラスミドベクター pC3 (Plasmid 3662 (1996)) のカナマイシン耐性遺伝子をストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子に置き換えることによって構築した。なお、pTZ4 とは、後述の MJ 233 / PC /  $\Delta$ LDH 株に導入されて

10

20

30

40

50

いるPC増幅用プラスミドのオリジナルプラスミドである。

ストレプトマイシン／スペクチノマイシン耐性遺伝子（大腸菌Tn7）の取得は、同遺伝子を有する植物形質転換用バイナリーベクターpLAN421（Plant Cell Reports 10, 286 (1991)）を鋳型としたPCRによって行った。

反応液組成：鋳型DNA 10ng、Pfx DNAポリメラーゼ（インビトロジェン社製）0.2 μL、1倍濃度添付バッファー、0.3 μM各々プライマー、（配列番号10および配列番号11で示した合成DNA）、1mM MgSO<sub>4</sub>、0.25 μMdNTPsを混合し、全量を20 μLとした。

反応温度条件：DNAサーマルサイクラー PTC-200（MJ Research社製）を用い、94℃で20秒、60℃で20秒、72℃で60秒からなるサイクルを20回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの72℃での保温は2分とした。

10

増幅産物の確認は、0.8%アガロース（SeaKem GTG agarose：FMC BioProducts製）ゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、937bpの断片を検出した。ゲルからの目的DNA断片の回収は、QIAQuick Gel Extraction Kit（QIAGEN製）を用いて行い、回収後同DNA断片を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ（T4 Polynucleotide Kinase：宝バイオ）により5'末端をリン酸化した。

pC3を制限酵素HindIIIおよびNruIで切断後、クレノウフラグメント（Klenow Fragment：宝バイオ）により両末端を平滑化したDNA断片の末端を、上記で調製したストレプトマイシン／スペクチノマイシン耐性遺伝子と混合し、ライゲーションキットver. 2（宝バイオ）を用いて結合した。得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5α株）を形質転換し、50 μg/mLスペクチノマイシンをLB寒天培地に塗抹した。得られたコロニーから、液体培養後、定法によりプラスミドDNAを調製し、配列番号10および配列番号11の合成DNAをプライマーとした上記PCRによって解析した結果、ストレプトマイシン／スペクチノマイシン耐性遺伝子が挿入されていることが確認され、これをpC3と命名した。

20

次に、pC3を制限酵素BamHIおよびPvuIIで切断して調製したDNA断片をクレノウフラグメントにて末端を平滑化し、これにpBglIIIリンカー（宝バイオ：CAGATCTG）を混合し、ライゲーションキットver. 2（宝バイオ）を用いて連結後、得られたプラスミドDNAで大腸菌（DH5α株）を形質転換し、50 μg/mLスペクチノマイシンを含むLB寒天培地に塗抹した。得られたコロニーから、液体培養後、定法によりプラスミドDNAを調製し、制限酵素BglIIIにて切断されるプラスミドを選抜し、これをpC3.1と命名した。

30

#### 【0046】

##### （ii）マルチクローニングサイトの導入

大腸菌プラスミドpT7Blue（Novagen社）を鋳型としてLacZマルチクローニングサイトを含むα-ペプチド遺伝子を配列番号12および配列番号13で示す合成DNAをプライマーとしたPCRにより調製した。

反応液組成：鋳型DNA 10ng、Pfx DNAポリメラーゼ（インビトロジェン社製）0.2 μL、1倍濃度添付バッファー、0.3 μM各々プライマー、1mM MgSO<sub>4</sub>、0.25 μMdNTPsを混合し、全量を20 μLとした。

40

反応温度条件：DNAサーマルサイクラー PTC-200（MJ Research社製）を用い、94℃で20秒、60℃で20秒、72℃で30秒からなるサイクルを20回繰り返した。但し、1サイクル目の94℃での保温は1分20秒、最終サイクルの72℃での保温は2分とした。

増幅産物の確認は、1.0%アガロース（SeaKem GTG agarose：FMC BioProducts製）ゲル電気泳動により分離後、臭化エチジウム染色により可視化することにより行い、5777bpの断片を検出した。ゲルからの目的DNA断片の回収は、QIAQuick Gel Extraction Kit（QIAGEN製）を

50

用いて行い、回収後同DNA断片を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 Polynucleotide Kinase: 宝バイオ) により5'末端をリン酸化した。

pC3. 1を制限酵素Pst IおよびHpa Iで切断後、クレノウフラグメント (Klenow Fragment: 宝バイオ) により末端を平滑化したDNA断片を、上記で調製したα-ペプチドの遺伝子断片と混合し、ライゲーションキットver. 2 (宝バイオ) を用いて結合した。得られたプラスミドDNAで大腸菌 (DH5α株) を形質転換し、50 μg/mL X-Galおよび50 μg/mL スペクチノマイシンを含むLB寒天培地に塗抹した。得られたコロニーの中から青色を呈するもの選抜し、液体培養後、定法によりプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAは、挿入したLacZマルチクローニングサイトに由来するEcoRVの切断部位を有することが確認され、これをpC3. 14と命名した (図1に構築手順を示す)。

10

#### 【0047】

次に、上記pODH1. 0を制限酵素Sse IおよびBamH Iで切断して生じた約4. 4 kbのDNA断片を0. 75% アガロースゲル電気泳動により分離、回収し、上記プラスミドpC3. 14を制限酵素Pst IおよびBamH Iで切断することによって調製したDNAと混合し、ライゲーションキットver. 2 (宝バイオ) を用いて連結した。このようにして得られたプラスミドDNAで大腸菌DH5α株を形質転換し、50 μg/mL スペクチノマイシンおよび50 μg/mL X-Galを含むLB寒天培地に塗抹した。この培地上で生育した白色コロニーを常法により液体培養した後、プラスミドDNAを精製した。得られたプラスミドDNAを制限酵素Sse IおよびBamH Iで切断することにより、約4. 4 kbの挿入断片が認められたものを選抜し、これをpODH3. 2と命名した (図2)。

20

#### 【0048】

##### (D) ODHプラスミド増強株の作製

ODH増強用プラスミドpODH3. 2のブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233/PC/ΔLDH株 (PC遺伝子が増強され、LDH遺伝子が破壊された株: 特開2005-95169: WO2005/21770) への導入は、電気パルス法 (Res. Microbiol. , Vol.144, p.181-185, 1993) によってそれぞれ行い、得られた形質転換体をストレプトマイシン10 μg/mLおよびカナマイシン25 μg/mLを含むLBG寒天培地 [トリプトン10 g、イーストエキストラクト5 g、NaCl 5 g、グルコース20 g、及び寒天15 gを蒸留水1 Lに溶解] に塗抹した。この培地上に生育したそれぞれの株から、常法により液体培養した後、プラスミドDNAを抽出、制限酵素切断による解析を行った結果、同株がpODH3. 2を保持していることを確認し、該株をブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ΔLDH株と命名した。

30

#### 【0049】

##### (E) ODH酵素活性測定

上記ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ΔLDH株をグルコース2%を含むA培地100 mlで終夜培養を行った。得られた培養液50 mlを4℃で4,000 rpm x 10 分の遠心分離により回収後、30 mlの100 mM TES-NaOH buffer (pH 7.5) で2回洗浄した。洗浄後の菌体は、10 mlのBufferA (100 mM TES-NaOH buffer (pH 7.5), 30% glycerol) に懸濁した。菌体懸濁液1 mlを破碎用15 ml フアルコンに移し、ガラスビーズ1 mgを加え、バイオラプター (コスモバイオ製) で4℃に冷却しながら超音波破碎 (Highレベルで1分破碎, 2分休止のサイクルを1サイクルとしてこれを7サイクル) を行った。この菌体破碎液を4℃で18,000 x g, 5 min遠心してビーズを除去後、さらに18,000 x g, 25 minの遠心を行い、得られた上清を粗酵素画分としてODH酵素活性測定に供した。なお、タンパク濃度の測定はBSA濃度を指標とし、Protein Assay (BIO-RAD, #500-0006) を用いて行った。

40

ODH活性測定は、Agric. Boil. Chem., 44(8), 1897-1904, 1980, I Shiio and K Ujigawa-Takedaに記載の方法を参考に、以下の通りに行った。まず、終濃度100 mM TES (DOJINDO, #344-02653)-NaOH buffer (pH 7.7), 0.2 mM coenzyme A (和光, #306-50481), 0.3

50

mM thiamin pyrophosphate (SIGMA, #C-8754), 5 mM 2-oxoglutarate (SIGMA, #305-72-6), 3 mM L-cysteine (和光, #033-05272), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (和光, #44047000)になるよう反応液を調製した。測定用キュベットに反応液を移した後、粗酵素液の添加により反応を開始し365 nmでの吸光度 ( $A_{365}$ ) の上昇を測定した。1Uは1分間に $A_{365}$ が1増加する時の酵素量とした。上記測定法によるブレビバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ $\Delta$ LDH株のODH比活性は0.028 U/mg-蛋白質であった。なお親株であるブレビバクテリウム・フラバムMJ233/PC/ $\Delta$ LDH株を同様に培養した菌体では、同活性は0.009 U/mg-蛋白質であり、ODH遺伝子プラスミド増強株では約3倍にODH活性が増加していることが確認された。

10

**【実施例2】****【0050】****<ODHプラスミド増強株評価>****(A) アンモニア嫌気条件**

尿素：4 g、硫酸アンモニウム：14 g、リン酸1カリウム：0.5 g、リン酸2カリウム0.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：0.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：20 mg、硫酸マンガン・水和物：20 mg、D-ビオチン：200  $\mu$ g、塩酸チアミン：200  $\mu$ g、酵母エキス：5 g、カザミノ酸：5 g、及び蒸留水：1000 mLの培地100 mLを500 mLの三角フラスコにいれ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やし、あらかじめ滅菌した50%グルコース水溶液を4 mL、無菌濾過した5%カナマイシン水溶液：50  $\mu$ L、無菌濾過した2%ストレプトマイシン水溶液：50  $\mu$ Lを添加し、実施例1の(D)で作製したブレビバクテリウム・フラバムMJ233/ODH/PC/ $\Delta$ LDH株を接種して24時間30℃にて種培養した。

20

硫酸アンモニウム：42 g、リン酸1カリウム：1.5 g、リン酸2カリウム1.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：1.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：60 mg、硫酸マンガン・水和物：60 mg、D-ビオチン：600  $\mu$ g、塩酸チアミン：600  $\mu$ g、酵母エキス15 g、カザミノ酸15 g、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：1 mL及び蒸留水：2500 mLの培地を5 Lの発酵槽に入れ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やした後、あらかじめ滅菌した12%グルコース水溶液：500 mL、無菌濾過した5%カナマイシン水溶液：1.5 mL、無菌濾過した2%ストレプトマイシン水溶液：1.5 mLを添加し、これに前述の種培養液を100 mL加えて、30℃に保温した。pHは2 M炭酸アンモニウムを用いて7.5に保ち、通気は毎分500 mL、攪拌は毎分500回転で16時間本培養を行った。

30

硫酸マグネシウム・7水和物：0.2 g、硫酸第一鉄・7水和物：8 mg、硫酸マンガン・水和物：8 mg、D-ビオチン：80  $\mu$ g、塩酸チアミン：80  $\mu$ g、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：1 mL及び蒸留水：200 mLの培地を500 mLの三角フラスコに入れ、120℃、20分加熱滅菌した。室温まで冷やした後、上記の本培養により得られた培養液を8000 rpm、5分の遠心分離により集菌した菌体に添加して、O.D. (660 nm) が60になるように再懸濁した。この懸濁液200 mLとあらかじめ滅菌した20%グルコース溶液200 mLを1 Lのジャーファーメンターに入れて混合し、35℃に保温した。pHは2 M炭酸アンモニウムを用いて7.6に保ち、無通気、毎分400回転で攪拌しながら反応を行った。反応開始後約47時間で反応を終了した。

40

その結果、ブレビバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ $\Delta$ LDH株は、MJ233/PC/ $\Delta$ LDH株と比較して、コハク酸収率が3.4%増大し、コハク酸の生産量に対するアミノ酸生産量が47%減少した。すなわち、ODHの増強により、明らかなコハク酸収率向上、アミノ酸収率低減の効果が見られた。

**【0051】****(B) ナトリウム嫌気条件**

尿素：4 g、硫酸アンモニウム：14 g、リン酸1カリウム：0.5 g、リン酸2カリ

50

ウム 0.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：0.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：20 mg、硫酸マンガン・水和物：20 mg、D-ビオチン：200 µg、塩酸チアミン：200 µg、酵母エキス：5 g、カザミノ酸：5 g、及び蒸留水：1000 mLの培地100 mLを500 mLの三角フラスコにいれ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やし、あらかじめ滅菌した50%グルコース水溶液を4 mL、無菌濾過した5%カナマイシン水溶液：50 µL、無菌濾過した2%ストレプトマイシン水溶液：50 µLを添加し、実施例1の(D)で作製したブレバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ΔLDH株を接種して24時間30℃にて種培養した。

硫酸アンモニウム：42 g、リン酸1カリウム：1.5 g、リン酸2カリウム1.5 g、硫酸マグネシウム・7水和物：1.5 g、硫酸第一鉄・7水和物：60 mg、硫酸マンガン・水和物：60 mg、D-ビオチン：600 µg、塩酸チアミン：600 µg、酵母エキス15 g、カザミノ酸15 g、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：1 mL及び蒸留水：2500 mLの培地を5 Lの発酵槽に入れ、120℃、20分加熱滅菌した。これを室温まで冷やした後、あらかじめ滅菌した12%グルコース水溶液：500 mL、無菌濾過した5%カナマイシン水溶液：1.5 mL、無菌濾過した2%ストレプトマイシン水溶液：1.5 mLを添加し、これに前述の種培養液を100 mL加えて、30℃に保温した。pHは2 M炭酸アンモニウムを用いて7.5に保ち、通気は毎分500 mL、攪拌は毎分500回転で16時間本培養を行った。

硫酸マグネシウム・7水和物：0.2 g、硫酸第一鉄・7水和物：8 mg、硫酸マンガン・水和物：8 mg、D-ビオチン：80 µg、塩酸チアミン：80 µg、消泡剤（アデカノールLG294：旭電化製）：1 mL及び蒸留水：200 mLの培地を500 mLの三角フラスコに入れ、120℃、20分加熱滅菌した。室温まで冷やした後、上記の本培養により得られた培養液を8000 rpm、5分の遠心分離により集菌した菌体に添加して、O.D. (660 nm)が60になるように再懸濁した。この懸濁液200 mLとあらかじめ滅菌した20%グルコース溶液200 mLを1 Lのジャーファーマンターに入れて混合し、35℃に保温した。pHは2 M炭酸ナトリウムを用いて7.6に保ち、無通気、毎分400回転で攪拌しながら反応を行った。反応開始後約47時間で反応を終了した。

その結果、ブレバクテリウム・フラバムMJ233/pODH/PC/ΔLDH株は、MJ233/PC/ΔLDH株と比較して、コハク酸収率が3.8%増大し、コハク酸生産量に対する酢酸生産量が27%減少した。すなわち、ODHの増強により、明らかなコハク酸収率向上、酢酸収率低減の効果が見られた。

### 【実施例3】

#### 【0052】

<酢酸生成が低減化された株のODH増強効果>

##### (A) ODH増幅株の作製

酢酸の生成が低減化された株の2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼの増強効果を確認した。酢酸生成が低減化された株として、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 (コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869) のラクテートデヒドロゲナーゼ (ldh)、アセチル-CoAヒドロラーゼ (ach)、ホスホトランスアセチラーゼ (pta)、アセテートキナーゼ (ack)、ピルビン酸オキシダーゼ (poxB) 活性を低減化した株 (2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)株)を用いた (国際公開W02005/113744、W02005/113745号パンフレット)。

ODH増幅用プラスミドとして、ODH遺伝子を含むpPKS-X (国際公開W095/34672号パンフレット)を、また対照としてそのベクターであるpPK4 (国際公開W095/34672号パンフレット)を用いて、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)株を電気パルス法により形質転換し、カナマイシン25 µg/mlを含むCM-Dex寒天培地 (グルコース 5g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.4g/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、MnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、pH7.5(KOH)に寒天1.5%を含む)に塗布し、31.5℃で約24時間培養した。出現

10

20

30

40

50

したコロニーを純化し、定法によりプラスミドを抽出し、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。酢酸低減株にODH増幅プラスミドを導入した株を2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)/pPKS-X、ベクターを導入した株を2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)/pPK4と名づけた。

#### 【0053】

##### (B) ODH 増幅株によるコハク酸生産

上述のODH増幅プラスミド導入株 (2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)/pPKS-X)、ベクター導入株 (2256 Δ (ldh,pta,ack,ach,poxB)/pPK4) をCM-Dex寒天培地にて培養し、得られた菌体をシード培地 3ml (グルコース 20g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 14g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、尿素 4g/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.02g/L、MnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.02g/L、

10

10  
 ビオチン 200 μg/L、VB1・HCl 200 μg/L、イーストエキストラクト 1g/L、カザミノ酸 1g/L) に接種し、好気条件にて31.5℃にて試験管で約8時間振とう培養を行った。その後、その試験管にメイン培地 3ml (グルコース200g/Lをフィルター過したものに、乾熱滅菌した炭酸マグネシウムを終濃度143g/Lとなるように混合) を接種し、通気を防ぐためシリコン栓で密栓し、31.5℃で約48時間振とうしつつコハク酸生産培養を行った。生成したコハク酸量を液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムはRezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex) を二本直列接続したものをを用い、サンプルは5mM p-トルエン

20

#### 【0054】

##### 【表1】

表1. ODH 増強によるコハク酸生産

| 菌株名                                    | Yield(%) | α-KG/SA(%) |
|----------------------------------------|----------|------------|
| 2256 Δ (ldh,pta,ack,poxB,ach)/(pPK4)   | 48.7     | 3.0        |
| 2256 Δ (ldh,pta,ack,poxB,ach)/(pPKS-X) | 51.4     | 1.6        |

30

#### 【0055】

ODH増幅株である2256 Δ (ldh,pta,ack,poxB,ach)/(pPKS-X) 株では対照株である2256 Δ (ldh,pta,ack,poxB,ach)/(pPK4) 株に比べて、収率は平均で約3%の向上が認められ、副生物のα-KGは約1/2の減少が認められた。このことから、酢酸の生成が低減するように改変されたコハク酸生産菌において、ODH活性を増強することにより、副生α-KGが低下し、コハク酸の生成量が増加することが示された。

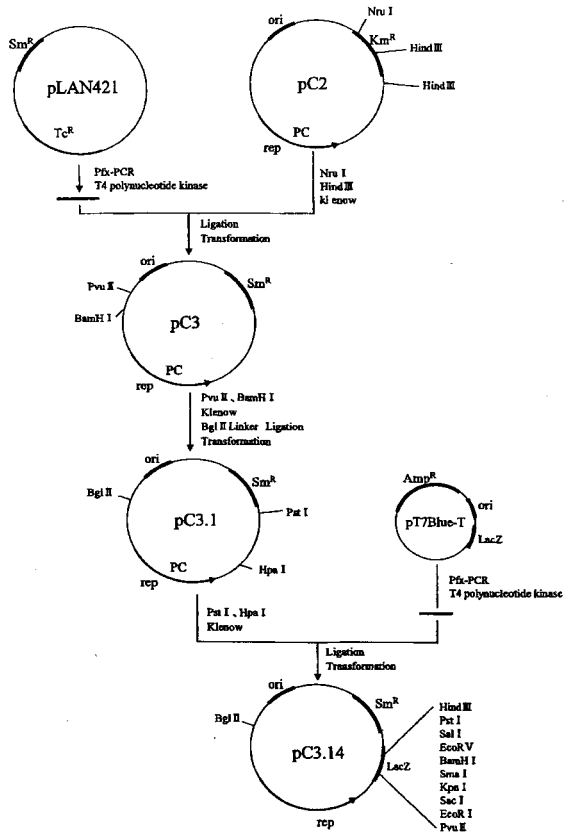
##### 【産業上の利用可能性】

#### 【0056】

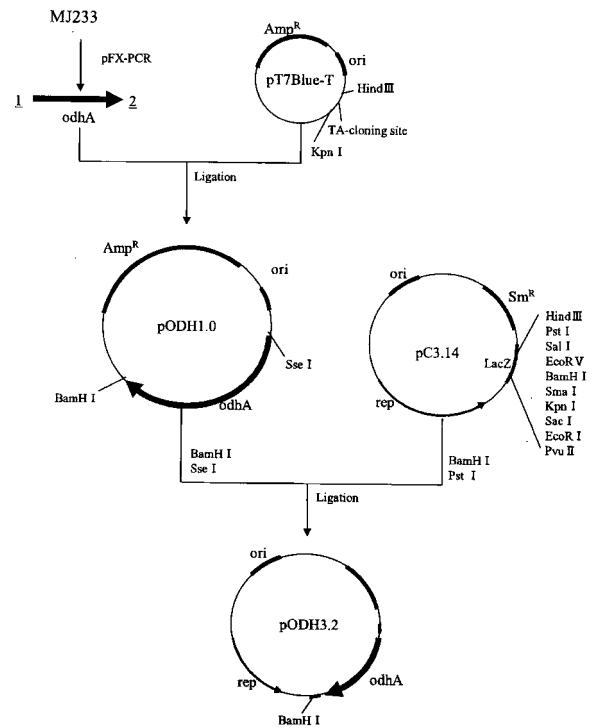
本発明の製造方法によれば、迅速かつ高効率でコハク酸などの有機酸を製造することができる。得られたコハク酸などの有機酸は食品添加物や医薬品、化粧品等に用いることができる。また、得られた有機酸を原料として重合反応を行うことにより有機酸含有ポリマーを製造することもできる。

40

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0005180060000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 村瀬 誠  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 青山 龍介  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 阪本 亜紀子  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 佐藤 砂奈恵  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 米倉 円佳  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 湯村 秀一  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 山岸 兼治  
日本国神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内
- (72)発明者 福井 啓太  
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 小関 智恵  
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 中村 純  
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 児島 宏之  
日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特開2006-238843 (JP, A)  
特開2006-320208 (JP, A)  
米国特許出願公開第2004/0152159 (US, A1)  
国際公開第2005/113744 (WO, A1)  
国際公開第2005/113745 (WO, A1)  
国際公開第2005/021770 (WO, A1)  
Eur. J. Biochem., 1984年, vol.141, p.351-9  
J. Biosci. Bioeng., 1999, Vol.87, No.1, p.28-36  
Microbiology, 1996, Vol.142 (Pt 12), p.3347-54

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/09