



(19) **HU**

**MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**  
**Magyar Szabadalmi Hivatal**

(11) Lajstromszám: **224 409**

(13) **B1**

## SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 97 02361**

(51) Int. Cl.7: **C 12 N 15/09**

(22) A bejelentés napja: **1997. 12. 05.**

(40) A közzététel napja: **1999. 06. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2005. 08. 29.**

(30) Elsőbbségi adatok:

**8-325658**                      **1996. 12. 05.**      **JP**

(73) Jogosult:

**Ajinomoto Co., Inc., Tokió (JP)**

(72) Feltalálók:

**Sugimoto, Masakazu, Kawasaki-shi,  
Kanagawa (JP);  
Hayakawa, Atsushi, Kawasaki-shi,  
Kanagawa (JP);  
Yoshihara, Yasuhiko, Kawasaki-shi,  
Kanagawa (JP);  
Nakamatsu, Tsuyoshi, Kawasaki-shi,  
Kanagawa (JP)**

(74) Képvisező:

**dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és  
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54)

**Eljárás L-lizin előállítására**

(57) Kivonat

A találmány tárgyát korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon replikálódni képes rekombináns DNS képezi, amely egy olyan aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciát kódol, amely aszpartokinázban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolósos gátlással szembeni érzékenység lényegesen le van csökkentve, valamint tartalmaz egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát; továbbá korineform baktériumok, amelyek olyan aszpartokinázt hordoznak, amely aszpartokinázban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolósos gátlással szembeni érzékenység lényege-

sen le van csökkentve, és amely baktérium tartalmaz egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló, fokozott aktivitású DNS-szekvenciát; valamint eljárás L-lizin termelésére, azzal jellemezve, hogy az említett korineform baktériumot megfelelő tápközegben tenyésztik, ami lehetővé teszi L-lizin termelődését és felhalmozódását a baktériumsejt-tenyészetben, majd az L-lizint a tenyészetből kinyerik.

A találmány szerinti megoldás alkalmas L-lizin ipari méretekben történő hatékony előállítására.

**HU 224 409 B1**

A találmány tárgya eljárás L-lizin előállítására egy mikroorganizmus tenyésztése révén, amely mikroorganizmus előállítása egy aminosavak vagy rokon vegyületek fermentációs előállítására alkalmas korineform baktérium módosításával, génebeszeti módszereken alapuló eljárásokkal történt. A találmány tárgyát képezik továbbá az említett módosított korineform baktériumok, valamint L-lizin-bioszintézisgéneket tartalmazó rekombináns DNS-ek, amelyek segítségével az említett módosítás megtörtént.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható L-lizin ipari előállítására fermentációs módszerekkel.

A takarmánydúsítóként használt L-lizint általában egy, a korineform baktériumok közé tartozó L-lizin-termelő mutáns törzs alkalmazásával állítják elő fermentációs módszerekkel. A jelenleg ismert különböző L-lizin-termelő baktériumokat mesterséges mutációval állították elő a korineform baktériumokhoz tartozó vad típusú törzsekből kiindulva.

Ami a korineform baktériumokat illeti, eddig feltártak egy baktériumsejtekben autonóm módon replikálódni képes plazmidvektort, amely drogrezisztencia-markergéneket hordoz (4 514 502-es számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), valamint egy eljárást gén baktériumsejtekbe történő bejuttatására (például 2-207791-es számú közzétett japán szabadalmi leírás). Feltártak továbbá egy lehetőséget arra, hogy L-treonint és L-izoleucint termelő baktériumokat a fent leírt módszerekkel tenyésztenek (4452890-es és 4442208-es számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). L-lizin-termelő baktérium tenyésztésére ismert egy eljárás, amely során egy, az L-lizin bioszintézisében szerepet játszó gént építenek be egy plazmidvektorba annak érdekében, hogy baktériumsejtekben amplifikálják a gént (például 56-160997-es számú közzétett japán szabadalmi leírás).

Az L-lizin bioszintézisében szerepet játszó ismert gének például a dihidropikolinát reduktásgénje (7-75578-as számú közzétett japán szabadalmi leírás) és a diamino-pimelát dehidrogenásgénje [Ishino, S. és munkatársai, *Nucleic Acids. Res.*, 15, 3917, (1987)], ebben az esetben az L-lizin bioszintézisében részt vevő gént klónozták, továbbá a foszfoenol-piruvát karboxilásgénje (60-87788-as számú közzétett japán szabadalmi leírás), a dihidrodipikolinát szintásgénje (6-55149-es számú japán szabadalmi leírás) és a diamino-pimelát dekarboxilásgénje (60-62994-es számú közzétett japán szabadalmi leírás).

Ismeretes olyan eset is, amelynél az L-lizin bioszintézisében részt vevő egyik enzim vad típusára visszacsatolós gátlás jellemző. Ebben az esetben az L-lizin-előállítás termelékenységét egy olyan enzimgén bejuttatásával növelték meg, amely a visszacsatoló gátlásra való érzékenységet lecsökkentő mutációt tartalmazott. Ilyen gén például az aszpartokinásgén. (WO 94/25605-ös számú nemzetközi közzétételi irat).

A fent leírtak szerint sikert értek el az L-lizin bioszintetikus rendszerének génjei amplifikálása, illetve mutáns gének bevitele révén. Ilyen sikernek könyvelhető

el például az, hogy egy olyan mutáns aszpartokináz génjét tartalmazó korineform baktérium, amely aszpartokináznak így lecsökken az érzékenysége lizin és treonin együttes gátló hatásával szemben, számottevő mennyiségű L-lizint termel (kb. 25 g/l-t). Ennek a baktériumnak azonban a szaporodási sebessége kisebb, mint amelyik a vad típusú aszpartokinásgént hordozza. Azt is közölték, hogy az L-lizin előállításának termelékenysége tovább javítható azzal, hogy a mutáns aszpartokináz génjének bevitele mellett dihidropikolinát-szintáz-gént is visznek be [Applied and Environmental Microbiology, 57(6), 1746, (1991)]. Egy ilyen baktérium növekedési sebessége azonban tovább csökken.

Eddig nem közöltek még olyan esetet, amelyben egy, az L-lizin bioszintetikus rendszer részét képező gén aktivitásának fokozása mellett a baktérium szaporodási sebességét is növelni szándékoztak volna. Jelen körülmények között a korineform baktériumokat tekintve egy eset sem ismeretes, ahol az L-lizin-termelés jelentős javítása az L-lizin bioszintézisgénének kombinálásával ne okozta volna a szaporodás sebességének csökkenését.

A találmány szerinti megoldás célja L-lizin-termelés javítása korineform baktériumban az L-lizin-bioszintézis génjei vagy azok kombinációi aktivitásának fokozásával anélkül, hogy a korineform baktérium szaporodási sebessége csökkenne. Amikor az előállítani kívánt anyagot fermentációs módszerekkel, mikroorganizmus alkalmazásával termeltetjük, az előállítás sebessége, valamint az előállítani kívánt anyag kitermelése (a bevitt anyagmennyiséghez viszonyítva) különösen jelentős tényezők. Egy előállítani kívánt anyagot lényegesen olcsóbban állíthatunk elő, ha megnöveljük az előállítás sebességét a fermentációs készülék egységnyi kapacitásához képest. A fentiek szerint tehát ipari szempontból különösen fontos, hogy a fermentáció révén elért kitermelés és a termelés sebessége kompatibilisek legyenek egymással. A találmány szerinti megoldás célja a fent leírt probléma megoldása, valamint L-lizin előállítása fermentációval és korineform baktérium alkalmazásával.

A találmány szerinti megoldás elve azon a tényen alapul, hogy egy korineform baktérium szaporodási sebességét és L-lizint termelő sebességét egyidejűleg megnövelhetjük azáltal, ha egyszerre juttatunk be egy olyan aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciát, amelynek L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenységét lényegesen lecsökkentettük és egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát. Ez a növekedés ahhoz az esethez képest történik meg, amikor a fenti DNS-szekvenciákat önmagukban expresszáltatjuk.

A találmány első szempontja szerint a találmány tárgyát képezi egy korineform baktériumok sejteiben autonóm módon replikálódni képes rekombináns DNS, amely tartalmaz egy olyan aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciát, amely aszpartokinázban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük, vala-

mint egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát. A találmány tárgyát képezi továbbá egy további, a foszfoenol-piruvát-karboxilázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó rekombináns DNS.

A találmány második szempontja szerint a találmány tárgyát képezi egy L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlás tekintetében lényegesen lecsökkentett érzékenységű aszpartokináz génjét hordozó korineform baktérium, amely egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló fokozott aktivitású DNS-szekvenciát tartalmaz. A találmány tárgyát képezi továbbá egy korineform baktérium, amely tartalmaz egy további, a foszfoenol-piruvát-karboxilázt kódoló DNS-szekvenciát.

A találmány harmadik szempontja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás L-lizin előállítására, azzal jellemezve, hogy a több lépésből álló eljárás során a fent leírt korineform baktériumok közül bármelyiket megfelelő tápközegben tenyésztjük, hogy L-lizin keletkezessen és szaporodhasson fel a baktériumtenyészetben, és az L-lizint kinyerjük a tenyészetből.

A továbbiakban az aszpartokinázt „AK”-nak jelöljük, az AK-t kódoló gént „lysC”-nek, az olyan AK-t, amelyben az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük, „mutáns AK”-nak, és az olyan gént, amelyik a mutáns AK-t kódolja, mutáns lysC-nek, amennyiben szükséges. Hasonlóképpen, a diamino-pimelát-dekarboxilázt „DDC”-nek jelöljük a továbbiakban, a DDC-t kódoló gént „lysA”-nak, a foszfoenol-piruvát-karboxilázt „PEPC”-nek, és a PEPC-t kódoló gént „ppc”-nek, amennyiben szükséges.

A korineform baktériumok a találmányi leírásban a mikroorganizmusok egy olyan csoportját jelentik – összhangban a [Berge's Manual of Determinative Bacteriology, 8. kiad. 559, (1974)] meghatározásával –, amelyek aerob, Gram-pozitív, savnak nem ellenálló, pálcika alakú baktériumok, amelyek nem képesek spórák képzésére. A korineform baktériumok magukban foglalják a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó baktériumokat, azokat a mind ez ideig a *Brevibacterium* nemzetségbe sorolt baktériumokat, amelyeket jelenleg a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó baktériumokkal együtt soroltak be, valamint a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó baktériumokkal közeli rokonságban levő *Brevibacterium* nemzetségbe tartozó baktériumokat.

A találmány szerinti megoldás megvalósítása révén a korineform baktérium L-lizin-termelő képességét és a termelt L-lizin mennyiségét növelni lehet.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábra bemutatja a mutáns lysC-t tartalmazó p399AK9B és p399AKYB plazmidok elkészítésének folyamatát.

A 2. ábra bemutatja a lysA-t tartalmazó p299LYSA plazmid elkészítésének folyamatát.

A 3. ábra bemutatja a lysA-t és a Brevi. ori.-t (*Brevibacterium*-eredetű replikációs

origó) tartalmazó pLYSAB plazmid elkészítésének folyamatát.

A 4. ábra bemutatja a PEPC struktúrgént tartalmazó pAKPFds plazmid elkészítésének folyamatát.

Az 5. ábra bemutatja a korineform baktériumokhoz használható új klónozóvektorok, a pVK6 és a pVK7 elkészítésének folyamatát.

A 6. ábra bemutatja a vad típusú, nagymértékben expresszáldó ppc-t tartalmazó pPwm plazmid elkészítésének folyamatát.

A 7. ábra bemutatja a mutáns lysC-t, lysA-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pCL plazmid elkészítésének folyamatát.

A 8. ábra bemutatja a dapA-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pDPSB plazmid elkészítésének folyamatát.

A 9. ábra bemutatja a dapB-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pDPRB plazmid elkészítésének folyamatát.

A 10. ábra bemutatja a ddh-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pPK4D plazmid elkészítésének folyamatát.

A 11. ábra bemutatja a lysC-t, dapA-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pCRCAB plazmid elkészítésének folyamatát.

A 12. ábra bemutatja a mutáns lysC-t, dapB-t és a Brevi. ori.-t tartalmazó pCB plazmid elkészítésének folyamatát.

A 13. ábra bemutatja a mutáns lysC-t és a ddh-t tartalmazó pCD plazmid elkészítésének folyamatát.

1. Az L-lizin-bioszintézis találmány szerinti megoldásban alkalmazott génjeinek előállítása

Az L-lizin-bioszintézis találmány szerinti megoldásban alkalmazott génjeit a következő lépések során nyertük: baktériumból mint DNS-donorból kromoszomális DNS-t tisztítottunk, kromoszomális DNS-könyvtárat készítettünk plazmidvektor vagy hasonló alkalmazásával, kiválasztottunk egy, a kívánt gént hordozó törzset, majd a kiválasztott törzsből kinyertük a rekombináns DNS-t amelybe a gént inszertáltuk. A DNS-donor, amelyből a találmány szerinti megoldásban alkalmazott L-lizin-bioszintézisgén származik, bármi lehet, feltéve, hogy a kiválasztott L-lizin-bioszintézisgén olyan enzimet kódol, amely korineform baktériumsejtekben működőképes. A DNS-donor azonban előnyösen egy korineform baktérium.

A korineform baktériumból származó lysC-, dapA- és a ppc-gének közül mindegyik szekvenciája ismert. Ennek megfelelően előállíthatjuk őket a polimeráz-láncreakció (PCR) [White, T. J. és munkatársai, Trends. Genet. 5, 185, (1989)] módszerével amplifikálást végezve.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazott L-lizin-bioszintézisgének mindegyike előállítható az alábbiakban példaképpen bemutatott módszerek valamelyikével.

(1) Mutáns *lysC* előállítás

A mutáns *lysC*-t tartalmazó DNS-fragmenst előállíthatjuk egy olyan mutáns törzsből, amelyben az AK L-lizin és L-treonin okozta szinergikus visszacsatolós gátlással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük (WO 94/25605-ös számú nemzetközi közzétételi irat). Egy ilyen mutáns törzset úgy kaphatunk, hogy például egy korineform baktérium vad típusú törzse sejtjeinek egy csoportját mutációt okozó kezelésnek vetjük alá. Ilyen szokványos mutációs kezelés például az ultrabolya fényel történő besugárzás vagy egy mutációt okozó szer, például az N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (NTG) alkalmazása. Az AK-aktivitást Miyajima és munkatársai által leírt módszer szerint végezhetjük [Journal of Biochemistry 63(2), 139, (1968)]. Ilyen mutáns törzsként legelőnyösebben egy L-lizin-termelő baktériumot, az AJ3445-öt (FERM P-1944) alkalmazhatjuk, amelyet a *Brevibacterium lactofermentum* ATTC13869 (amelynek jelenlegi, megváltozott neve *Corynebacterium glutamicum*) vad típusú törzsének mutációs kezelésével hozhatunk létre.

Egy másik lehetőség mutáns *lysC* előállítására az, hogy a plazmid-DNS-t, ami a vad típusú *lysC*-t tartalmazza *in vitro* mutációs kezelésnek vetjük alá. Más szempontból ugyanis pontosan ismerjük a mutációt, ami az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentti (WO 94/25605-ös számú nemzetközi közzétételi irat). Ennek megfelelően a mutáns *lysC*-t előállíthatjuk a vad típusú *lysC*-ből ennek az ismeretnek az alapján például a helyspecifikus mutagenézis módszerével.

Egy *lysC*-t tartalmazó fragmenst izolálhatunk egy korineform baktériumból úgy, hogy kromoszomális DNS-t állítunk elő Saito és Kimura módszerével például [Biochem. Biophys. Acta, 72, 619, (1963)], majd a *lysC*-t a PCR-módszerrel amplifikáljuk [White, T. J. és munkatársai, Trends. Genet. 5, 185, (1989)].

A DNS-láncindítókra példák a szekvencialistában az 1-es és a 2-es azonosító számon megadott 23 és 21 tagú nukleotidszekvenciák. Ezekkel például a *Corynebacterium glutamicum* ismert *lysC*-szekvenciájából 1643 bp-nyit lehet amplifikálni [Molecular Microbiology 5(5), 1197, (1991); Mol. Gen. Genet., 224, 317, (1990)]. A DNS-t szokványos módszerrel, például az „Applied Biosystems model 380B” DNS-szintetizáló készülékét alkalmazva szintetizálhatjuk meg [Tetrahedron Letters 22, 1859, (1981)]. A PCR-t elvégezhetjük egy „DNA Thermal Cycler Model PJ2000” PCR-készüléket (Takara Shuzo) alkalmazva Tag DNS-polimeráz segítségével, a forgalmazó cég által javasolt módszer alapján.

A PCR segítségével amplifikált *lysC*-t előnyösen olyan vektor-DNS-sel ligáljuk, amelyik autonóm módon replikálódni képes *E. coli* és/vagy valamely korineform baktérium sejtjeiben. Így tehát rekombináns DNS-t készítünk, amelyet visszajuttatunk az *E. coli*-sejtekbe. Ezek az előkészületek megkönnyítik a soron következő műveleteket. Az *E. coli*-sejtekben autonóm módon replikálódni képes vektor előnyösen egy plazmidvektor, amelyik előnyösen autonóm módon replikálódni képes

olyan gazdasejtekbe, amelyek például a következő plazmidokat hordozzák: pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010.

Ha egy olyan DNS-fragmenst inszertálunk ezekbe a vektorokba, amely képessé teszi őket korineform baktériumban való autonóm módon történő replikálódásra, úgynevezett átviteli („shuttle”) vektorként alkalmazható vektorokhoz jutunk, amelyek autonóm módon replikálódni képesek mind *E. coli*-ban, mind korineform baktériumban.

Ilyen átviteli vektorok az alábbiak. A vektorokat hordozó mikroorganizmusokat és azok nyilvántartási számait nemzetközi deponálási hatóságoknál (zárójelben) szintén feltüntetjük.

- 5 pH4: *Escherichia coli* AJ12617 (FERM BP-3532)  
 5 pAJ655: *Escherichia coli* AJ11882 (FERM BP-136)  
*Corynebacterium glutamicum* SR8201 (ATCC 39135)  
 10 pAJ1844: *Escherichia coli* AJ11883 (FERM BP-137)  
*Corynebacterium glutamicum* SR8202 (ATCC 39136)  
 20 pAJ611: *Escherichia coli* AJ11884 (FERM BP-138)  
 pAJ3148: *Corynebacterium glutamicum* SR8203 (ATCC 39137)  
 25 pAJ440: *Bacillus subtilis* AJ11901 (FERM BP-140)

Ezek a vektorok az alább leírtak szerint nyerhetők ki a deponált mikroorganizmusokból. A növekedésük logaritmus fázisában összegyűjtött sejteket lizozim és SDS jelenlétében feltárjuk, majd a feltárt sejteket 30 000 g-vel lecentrifugáljuk. A felülúszóhoz polietilén-glikolt adunk, majd cézium-bromidos egyensúlyi sűrűséggradiens-centrifugálással frakcionáljuk és tisztítjuk etídium-bromid jelenlétében.

Az *E. coli*-sejteket transzformálhatjuk például plazmid bejuttatásával, amit végezhetünk például D. L. Morrison módszerével [Methods in Enzymology, 68, 326, (1970)], vagy egy másik módszerrel, ahol a befogadó sejtet kalcium-kloriddal kezeljük, hogy a DNS-sel szembeni áteresztőképességét megnöveljük [M. Mandel és A. Higa, J. Mol. Biol., 53, 159, (1970)].

A vad típusú *lysC*-t egy AK-ra nézve vad típusú törzsből kaphatjuk meg *lysC* a fent leírtak szerinti izolálásával, a mutáns *lysC*-t pedig úgy, hogy egy AK-ra nézve mutáns törzsből izolálunk *lysC*-t, ugyancsak a fentiek alapján.

A vad típusú *lysC*-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciájára példa a szekvencialistában a 3-as azonosító számon megadott szekvencia. A vad típusú AK-fehérje  $\alpha$ -alegységének nukleotidszekvenciájából származtatott aminosavszekvenciáját a DNS-szekvenciával együtt mutatja a szekvencialistában a 4-es azonosító számon megadott szekvencia. Az aminosavszekvenciát önmagában a szekvencialistában az 5-ös azonosító számon megadott szekvencia mutatja. A vad típusú AK-fehérje  $\beta$ -alegységének nukleotidszekvenciájából származtatott aminosavszekvenciáját a DNS-szekvenciával együtt mutatja a szekvencialistában a 6-os azonosító számon megadott szekvencia. Az aminosavszekvenciát önmagában a szekvencialistában a 7-es azonosító számon megadott szekvencia

mutatja. Az alegységek mindegyikében GTG a kezdő kodon, itt azonban az ennek megfelelő aminosav a metionin. Az ennek a kodonnak megfelelő aminosav lehet mindazonáltal metionin, valin és formil-metionin egyaránt.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazott mutáns lysC bármilyen lehet, feltéve, hogy olyan AK-t kódol, ahol az L-lizin és L-treonin okozta szinergikus visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lényegesen le van csökkentve. A mutáns lysC-re példa azonban az, amely olyan AK-t kódol, ahol az aminosavak közül a vad típusú AK  $\alpha$ -alegységének N-terminálisától számított 279. alaninnak megfelelő aminosav más, de nem savas aminosavra van kicserélve, és a  $\beta$ -alegységének N-terminálisától számított 30. alaninnak megfelelő aminosav más, de nem savas aminosavra van kicserélve. A vad típusú AK  $\alpha$ -alegységének aminosavszekvenciája a szekvencialistában az 5-ös azonosító számon megadott szekvencia, míg a  $\beta$ -alegységének aminosavszekvenciája a szekvencialistában a 7-es azonosító számon megadott szekvencia.

A nem savas, alanintól különböző aminosavak előnyösen például a következők lehetnek: treonin, arginin, cisztein, fenil-alanin, prolin, szerin, tirozin és valin.

A helyettesítő aminosavnak megfelelő kodon nem csupán egyféle lehet, de az adott aminosavat kell kódolnia. Megjósolható, hogy a vad típusú AK-k aminosavszekvenciái kismértékben eltérhetnek egymástól baktériumfajonként és baktériumtörzsenként. Azok az AK-k, amelyek egy vagy több helyen mutációt hajtottak végre, és így egy vagy több aminosavat például szubsztituáltak, deletáltak vagy inszertáltak, de ez a fentiekkel egybehangzóan nem volt hatással az enzim aktivitására, szintén alkalmazhatók a találmány szerinti megoldás megvalósítása során. Spontán mutációt tartalmazó AK-t kódoló DNS-t olyan DNS izolálásával nyerhetünk, amelyik képes hibridizálni például a szekvencialistában a 3-as azonosító számon megadott nukleotidszekvencia egy részével sztringens körülmények között. A leírásban használt „sztringens körülmények” alatt olyan körülményeket értünk, amelyek között a kívánt specifikus hibrid keletkezik, de más nonspecifikus hibridizáció nem következik be. Nem könnyű ezeket a körülményeket számértékekkel világosan kifejezni. Ilyenekre példaképpen megemlíthetünk azonban olyan körülményeket, amelyek közepette nagymértékű homológiát mutató nukleinsavak, például nem kevesebb mint 90%-ban homológ DNS-ek hibridizálnak egymással, és ennél kisebb homológiát mutató nukleinsavak nem hibridizálnak egymással, vagy olyan körülményeket, ahol a hőmérséklet egy teljesen összeilleszkedett hibrid olvadási hőmérséklete, és annál 30 °C-kal alacsonyabb hőmérséklet között, előnyösen az olvadási hőmérséklet és annál 20 °C-kal alacsonyabb hőmérséklet között van, a sókoncentráció pedig megfelel  $1 \times \text{SSC}$ -nek, előnyösen pedig  $0,1 \times \text{SSC}$ -nek.

Egyéb AK-akat, amelyeken mesterséges mutációt végzünk, például egy vagy több aminosav szubsztitúcióját, delécióját vagy inszercióját, szintén alkalmazhatunk, feltéve, hogy a mutáció nem fejt ki lényeges befo-

lyást az AK-aktivitásra, és az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lecsökkentett mivoltára. Mesterséges mutációt hordozó, AK-t kódoló DNS-t úgy kaphatunk, hogy a nukleotidszekvenciát szubsztitúcióval, delécióval vagy inszercióval egy adott helyen módosítjuk például helyspecifikus mutagenezissel. Hasonlóképpen, mutációt hordozó lysC-t valamilyen ismert, mutációt okozó kezelési módszerrel (mutagénkezeléssel) állíthatunk elő. Ilyen módszer például a lysC-t tartalmazó DNS *in vitro* kezelése hidroxil-aminnal vagy hasonlóval, például a lysC-t tartalmazó DNS-t hordozó mikroorganizmus kezelése mutagénekkel, mint például az ultrabolya-besugárzás vagy a szokványos mesterséges mutagenezis során alkalmazott mutagén szer, mint például az N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (NTG) vagy a salétromsav. A mutagénkezelés után a mutált helyet meghatározhatjuk úgy, hogy kiválasztunk egy DNS-t vagy mikroorganizmust, amely olyan AK-aktivitással rendelkező AK-t kódol vagy termel, amely AK aminosavszekvenciáját megváltoztattuk a mutagénkezelésnek alávetett DNS által kódolt vagy mikroorganizmus által termelt AK-hoz képest. A bejuttatott mutáció helye bármi lehet, feltéve, hogy az AK-aktivitásra és az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lényegesen lecsökkentett mivoltára nincs lényeges hatása. A mutációk száma és minősége a helytől és a megváltoztatott aminosav minőségétől, illetve a fehérje térszerkezetében elfoglalt helyétől függően változó, és nem korlátozza más, csupán az a feltétel, hogy ne legyen lényeges hatása az AK-aktivitásra és az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lényegesen lecsökkentett mivoltára. A mutációk száma általában 1–20-ig terjedhet, előnyösen 1–10-ig.

A p399AK9B lysC-ben mutáns plazmid AJ12036 törzsbe (FERM BP-734) mint vad típusú *Brevibacterium lactofermentum* törzsbe történt bejuttatásával kapott AJ12691-es törzset 1992. április 10-én helyeztük letétbe FERM P-12918 nyilvántartási számon a „National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry” Intézetnél (1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan), majd 1995. február 10-én a Budapesti Egyezménynek megfelelően is letétbe helyeztük a FERM BP-4999-es nyilvántartási számon.

#### (2) lysA előállítás

Egy lysA-t tartalmazó DNS-fragmenst korineform baktérium kromoszómájából PCR segítségével állíthatunk elő. A DNS-donor bármely korineform baktérium lehet, a leírásban példaképpen a *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es törzs szerepel.

A korineform baktériumokban a lysA és az argS (arginil-tRNS szintázgénje) egy operont alkot. A lysA expresszióját az argS-től 5'-irányban elhelyezkedő promóter irányítja [Journal of Bacteriology, nov., 7356 (1993)]. Ezen génnek DNS-szekvenciái a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismertek [Molecular Microbiology 4 (11), 1819, (1990); Molecular and General

Genetics, 212, 112 (1988)], ennek alapján pedig PCR-láncindítók készíthetők. Ilyen PCR-láncindítók például azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok, amelyek a szekvencialistában a 8-as azonosító számon, valamint a 9-es azonosító számon vannak megadva. Előbbiek megfelelnek a Molecular Microbiology alábbi cikkében a 11-es és a 33-as számon megadott oligonukleotidoknak [Molecular Microbiology 4 (11), 1819, (1990)], utóbbiak (a 9-es azonosító számon megadottak) megfelelnek a Molecular and General Genetics alábbi cikkében az 1370-es és az 1392-es számon megadott oligonukleotidoknak [Molecular and General Genetics, 212, 112 (1988)]. A DNS szintézise, a PCR, valamint a kapott lysA-t tartalmazó plazmid előállításának ugyanúgy végezhető el, mint azt fent a lysC esetében leírtuk.

Az alábbiakban leírt példában egy promotert, az argS-t és lysA-t tartalmazó DNS-fragmentet alkalmaztuk a lysA aktivitásának fokozására. Az argS azonban nem képezi a találmány szerinti megoldás nélkülözhetetlen elemét. Alkalmazhatunk egy olyan DNS-fragmentet is, amelyben a lysA-t közvetlenül a promoter közelébe ligáltuk, tőle 3'-irányban. Az argS-t és a lysA-t tartalmazó DNS-fragmentek nukleotidszekvenciája, valamint a nukleotidszekvencia által kódolt származtatott aminosavszekvencia a szekvencialistában a 11-es azonosító számon van megadva, a lysA által kódolt aminosavszekvencia pedig a 12-es azonosító számon. Az ezeket az aminosavszekvenciákat kódoló DNS-fragmenteken kívül a találmány szerinti megoldásban alkalmazhatunk a szekvencialistában a 12-es azonosító számon megadott szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciákat kódoló DNS-fragmenteket is, nevezetesen olyan aminosavszekvenciákat, amelyekben egy vagy több aminosavat szubsztituáltunk, deletáltunk vagy inszertáltunk, feltéve, hogy ennek nem volt lényeges hatása a DDC-aktivitásra. Spontán vagy mesterséges mutációt tartalmazó lysA-t ugyanolyan módon kaphatunk, mint spontán vagy mesterséges mutációt tartalmazó AK-t kódoló DNS-t, amelyben a mutációnak nincs hatása az AK aktivitására és az L-lizin és L-treonin okozta szinergikus visszacsatolással szembeni érzékenység lényegesen lecsökkentett miniváltára.

### (3) ppc előállítása

Egy ppc-t tartalmazó DNS-fragmentet korineform baktérium kromoszómájából PCR segítségével állíthatunk elő. A DNS-donor bármely korineform baktérium lehet, a leírásban példaképpen a *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es törzs szerepel.

A ppc-gén DNS-szekvenciája a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert [O'Regan, M. és munkatársai, Gene, 77, 237, (1989)], és ennek alapján PCR-láncindítót készíthetünk. Ilyen PCR-láncindítók például azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok, amelyek a szekvencialistában a 13-as azonosító számon, valamint a 14-es azonosító számon vannak megadva. A DNS szintézise, a PCR, valamint a ppc-t tartalmazó plazmid előállítása ugyanúgy történhet, amint azt fent a lysC esetében leírtuk.

A ppc-t tartalmazó DNS-fragmentek nukleotidszekvenciája, valamint a nukleotidszekvencia által kódolt származtatott aminosavszekvencia a szekvencialistában a 15-ös azonosító számon van megadva. Az aminosavszekvenciát önmagában mutatja a szekvencialista 16-os azonosító száma. Az ezeket az aminosavszekvenciákat kódoló DNS-fragmenteken kívül a találmány szerinti megoldásban alkalmazhatunk a szekvencialistában a 16-os azonosító számon megadott szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciákat kódoló DNS-fragmenteket is, nevezetesen olyan aminosavszekvenciákat, amelyekben egy vagy több aminosavat szubsztituáltunk, deletáltunk vagy inszertáltunk, feltéve, hogy ennek nem volt lényeges hatása a PEPC-aktivitásra. Spontán vagy mesterséges mutációt tartalmazó lysA-t ugyanolyan módon kaphatunk, mint spontán vagy mesterséges mutációt tartalmazó olyan AK-t kódoló DNS-t, amely AK-ban az L-lizin és L-treonin okozta szinergikus visszacsatolással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük.

Egy korineform baktériumból származó ppc egy operont alkot a gap (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz), a pgk- (foszfoglicerát-kináz) és a tpi- (triozofoszfát-izomeráz) géekkel, a ppc a tpi-től 3'-irányban helyezkedik el. A ppc expresszióját a pgk-tól 5'-irányban elhelyezkedő promoter szabályozza [Schwinde, J. W. és munkatársai, J. Bacteriol., 175 (12), 3905, (1993)]. Így tehát, a fent leírt lysA-hoz hasonlóan a ppc-t a pgk-val és a tpi-vel együtt amplifikálhatjuk PCR segítségével a pgk-t, a tpi-t és a ppc-t tartalmazó DNS-fragment alkalmazásával. Amint azt az alább leírt példában bemutatjuk, lehetséges egy olyan DNS-fragment alkalmazása is, amelyik csupán a PEPC génjének kódoló régióját, valamint egy attól 3'-irányban elhelyezkedő megfelelő promotert tartalmaz. A promoter lehet például a lysC promotere, az *E. coli*-ból származó tac-promoter, valamint a trc-promoter.

### 2. A találmány szerinti rekombináns DNS és korineform baktérium

A találmány szerinti rekombináns DNS autonóm módon replikálódni képes korineform baktériumok sejtjeiben, tartalmaz egy olyan aszpartokináz kódoló DNS-szekvenciát, amelyben az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük, valamint egy diamino-pimelinát-dekarboxiláz kódoló DNS-szekvenciát. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a rekombináns DNS a fenti DNS-szekvenciákon kívül tartalmaz továbbá egy foszfoenol-piruvát-karboxiláz kódoló DNS-szekvenciát is.

A találmány szerinti korineform baktérium hordoz egy aszpartokinázgént (mutáns AK) is, amely AK-ban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük, és benne a diamino-pimelinát-dekarboxiláz kódoló (lysA) DNS aktivitása fokozott. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti korineform baktériumra az jellemző, hogy szintén fokozott génaktivitású foszfoenol-piruvát-karboxiláz kódoló DNS-t (ppc) tartalmaz.

A „fokozott aktivitású” a leírásban használt értelemben azt jelenti, hogy a DNS által kódolt enzim intracelluláris aktivitása megnövekedett, például a gén kópiaszámának növelése, erős promoter alkalmazása, nagy specifikus aktivitású enzimet kódoló gén alkalmazása vagy ezen módszerek kombinálása révén.

A mutáns AK-t hordozó korineform baktérium termelheti a mutáns aszpartokinázt mutáció eredményeképpen, vagy lehet olyan is, amely a mutáns lysC bejuttatásával van transzformálva.

A fent leírt DNS bejuttatására alkalmas korineform baktériumokra szolgáljanak példaként az alábbi lizin-termelő vad típusú törzsek:

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870;  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806;  
*Corynebacterium callunae* ATCC15991;  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032;  
*(Brevibacterium divaricatum)* ATCC14020;  
*(Brevibacterium lactofermentum)* ATCC13869;  
*(Corynebacterium lilium)* ATCC15990;  
*(Corynebacterium flavum)* ATCC14067;  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965;  
*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066;  
*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068;  
*Brevibacterium roseum* ATCC13825;  
*Brevibacterium thiogenitalis* ATCC19240;  
*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354;  
*Corynebacterium thermoaminogenes* AJ12340 (FERM BP-1539).

A fenti baktériumtörzseken kívül mások is alkalmazhatók gazdaként, ilyenek lehetnek például L-lizin termelésére képes mutáns törzsek, amelyek a korábban említett törzsek leszármazottai. Ilyen mesterséges mutáns törzsek például a következők: S-(2-amino-metil)-ciszteinnel (a továbbiakban „AEC”) szemben rezisztens mutáns törzsek, ilyen például a *Brevibacterium lactofermentum* AJ11087 (NRRL B-1147) (56-1914-es, 56-1915-ös, 57-14157-es, 57-14158-as, 57-30474-es, 58-10075-ös, 59-4993-as, 61-35840-es, 62-24074-es, 62-36673-as, 5-11958-as, 7-112437-es és 7-112438-as számú japán szabadalmi leírások); mutáns törzsek, amelyek növekedéséhez aminosavak, például L-homoszerin szükségesek (48-28078-as és 56-6499-es számú japán szabadalmi leírások); mutáns törzsek, amelyek AEC-vel szemben rezisztensek és növekedésükhöz aminosavak, például L-leucin, L-homoszerin, L-prolin, L-szerin, L-arginin, L-alanin és L-valin szükségesek (3708395-ös és 3825472-es számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás); L-lizint termelő mutáns törzsek, amelyek DL- $\alpha$ -amino-kaprolaktámmal,  $\alpha$ -amino-lauril-laktámmal, aszpartátanalógokkal, „szulfa”-hatóanyagokkal, kinoidokkal és N-lauril-leucinnel szemben ellenállóak; L-lizint termelő mutáns törzsek, amelyek oxalacetát-dekarboxiláz és a légzőrendszer enzimeinek inhibitoraival szemben ellenállóak (50-53588-as, 50-31093-as, 52-102498-as, 53-9394-es, 53-86089-es, 55-9783-as, 55-9759-es, 56-32995-ös és 56-39778-as számú japán közzétételi iratok, és 53-43591-es és 53-1833-as számú japán szabadalmi leírások); L-lizint termelő mutáns törzsek, amelyek növekedéséhez inozi-

tol vagy ecetsav szükséges (55-9784-es és 56-8692-es számú japán közzétételi iratok); L-lizint termelő mutáns törzsek, amelyek érzékenységet mutatnak fluor-piroszőlősavval és 34 °C-nál nem alacsonyabb hőmérséklettel szemben (55-9783-as és a 53-86090-es számú japán közzétételi iratok); valamint a *Brevibacterium* és a *Corynebacterium* nemzetségekhez tartozó mutáns törzsek, amelyek etilén-glikollal szemben rezisztensek és L-lizint termelnek (4411997-es számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A találmány egy konkrét megvalósítási módja szerint, annak érdekében, hogy – amint azt fent leírtuk – egy gazdasejtben fokozzuk az L-lizin bioszintetikus rendszere géneinek aktivitását, a géneket plazmidvektor, transzpozon, fágvektor vagy hasonló alkalmazásával bejuttatjuk a gazdasejtbe. A bejuttatásától azt várjuk, hogy még kis kópiaszámú vektorok esetén is génaktivitást fokozó hatása legyen. Előnyösen azonban nagy kópiaszámú vektort alkalmazunk. A vektorok lehetnek például plazmidvektorok, mint például a fent leírt pAJ655, pAJ1844, pAJ611, pAJ3148, pAJ440. Lehetnek emellett transzpozonok is, mint amelyek például a következő hivatkozásokban szerepelnek: WO02/02627-es és WO93/18151-es számú nemzetközi közzétételi iratok; 445385-ös számú európai szabadalmi leírás; 6-46867-es számú közzétett japán szabadalmi leírás; Vertes, A. A. és munkatársai, Mol. Microbiol., 11, 739–746 (1994); Bonamy, C. és munkatársai, Mol. Microbiol., 14, 571–581 (1994); Vertes, A. A. és munkatársai, Mol. Gen. Genet., 245, 397–405, (1994); Jagar, W. és munkatársai, FEMS Microbiology Letters, 126, 1–6 (1995); 7-107976-os és 7-327680-as számú közzétett japán szabadalmi leírások, valamint hasonlóak.

A találmány szerinti megoldás megvalósítása során nem az az egyetlen lehetőség, hogy a mutáns lysC aktivitását fokozzuk. Alkalmazhatunk olyan törzset is, ahol a kromoszomális DNS-en elhelyezkedő lysC tartalmaz mutációt, vagy amelyben a mutáns lysC be van építve a kromoszomális DNS-be. Egy másik lehetőség, hogy a mutáns lysC-t plazmidvektor alkalmazásával juttatjuk be. Másfelől előnyösen a lysA és a ppc aktivitását is fokozzuk, a hatékony L-lizin-termelés érdekében.

A lysC-, a lysA- és a ppc-gének mindegyikét egymást követően bejuttathatjuk a gazdasejtbe, sorrendben különböző vektorokat alkalmazva. Más megközelítésben, két- vagy háromféle gén egyetlen vektor alkalmazásával kombinálva is bejuttatható. Amennyiben különböző vektorokat alkalmazunk, a gének bármely sorrendben bejuttathatók, előnyösen azonban olyan vektorokat alkalmazunk, amelyek stabilan fennmaradnak és replikálódnak a gazdasejtben, és amelyek képesek egymás mellett párhuzamosan létezni.

Mutáns AK-t hordozó korineform baktériumot, amelyik a fokozott aktivitású lysA-t is tartalmazza, úgy kaphatunk, hogy például egy korineform baktériumba mint gazdasejtbe mutáns lysC-t, lysA-t és ppc-t tartalmazó, korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon replikálódó rekombináns DNS-t juttatunk.

Olyan korineform baktériumot, amely a mutáns lysC és lysA mellett fokozott aktivitású ppc-t is tartalmaz, úgy kaphatunk, hogy például egy korineform baktériumba mint gazdasejtbe lysC-t, lysA-t és ppc-t tartalmazó, korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon replikálódó rekombináns DNS-t juttatunk. Ezenfelül olyan korineform baktériumot, amely fokozott aktivitású mutáns lysC-t, lysA-t és ppc-t is tartalmaz, úgy kaphatunk, hogy fokozott aktivitású mutáns lysC-t és lysA-t tartalmazó korineform baktériumsejtekbe ppc-t tartalmazó, korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon replikálódó rekombináns DNS-t juttatunk.

A fent említett rekombináns DNS-eket úgy kaphatjuk meg például, hogy minden egyes – L-lizin bioszintézisében részt vevő – gént egy vektorba (például plazmid-, transzpozon- vagy fágvektorba) inszertálunk a fent leírtak szerint.

Amennyiben plazmidot alkalmazunk vektorként, a rekombináns DNS-t bejuttathatjuk a gazdasejtbe elektromos pulzus módszerével [Sugimoto és munkatársai, 2-207791-es számú közzétett japán szabadalmi leírás]. Gén amplifikálását transzpozonnal úgy végezhetjük el, hogy egy plazmidot hordozó transzpozont juttatunk be a gazdasejtbe, és indukáljuk a transzpozon átugrását.

### (3) Eljárás L-lizin termelésére

L-lizint hatékonyan termelhetünk úgy, hogy a fent leírtak szerint a fokozott aktivitású, L-lizin bioszintéziséhez szükséges géneket hordozó korineform baktériumot megfelelő tápközegben tenyésztjük, így lehetővé téve L-lizin termelődését és felhalmozódását a baktériumsejt-kultúrában, majd az L-lizint kinyerjük a kultúrából.

Az alkalmazható tápközeg lehet például egy közönséges tápközeg, amelyik szénforrást, nitrogénforrást, szerves ionokat és nem kötelezően egyéb szerves komponenseket tartalmaz.

Szénforrásként cukrokat, mint például glükózt, fruktózt, szacharózt, melaszt és keményítőhidrolizátumot alkalmazhatunk, valamint szerves savakat, mint például fumársavat, citromsavat és borostyánkősavat.

Nitrogénforrásként alkalmazhatunk ammóniumsókat, mint például az ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát; szerves eredetű nitrogént, például szójabab-hidrolizátumot; ammóniagáz vagy vizes ammóniát.

Szerves, nyomnyi mennyiségben szükséges anyagokat biztosító tápanyagforrásként kívánatos például B<sub>1</sub>-vitamint, L-homoszerint, élesztőkivonatot vagy hasonlót alkalmazni megfelelő mennyiségben. A fentiek mellett kálium-foszfátot, magnézium-szulfátot, vas- és magnéziumiont stb. adunk kis mennyiségben a tápközeghez, ha szükséges.

A tenyésztést előnyösen aerob körülmények között végezzük 30–90 órán keresztül. A tenyésztési hőmérsékletet előnyösen 25 °C és 90 °C közé állítjuk be, a pH-t pedig 5 °C és 8 °C közé. Szerves vagy szervesetlen, savas vagy bázikus anyagok, ammóniagáz vagy hasonlók egyaránt alkalmazhatók a pH-beállítás során.

Az L-lizint kinyerhetjük a tenyészetből a szokványos ioncsere módszerének, kicsapási módszereknek, valamint egyéb módszerek kombinálásával.

Az alábbiakban példák segítségével a találmány szerinti megoldást közelebbről is ismertetjük.

### 1. példa: Vad típusú és mutáns lysC-gén előállítására *Brevibacterium lactofermentum*-ból (1) Vad típusú és mutáns lysC-gének, valamint az őket tartalmazó plazmidok előállítására

A *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 és egy, az ATCC13869-es törzsből kiindulva mutációs kezeléssel kapott L-lizin-termelő törzs, az AJ3445 (FERM P-1944) szolgáltak kromoszomális DNS donorjaként. Az AJ3445-ös törzset mutációnak vetettük alá, aminek során a lysC-t megváltoztattuk úgy, hogy az AK-ban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolások gátlással szembeni érzékenységet lényegesen lecsökkentettük [Journal of Biochemistry, 68, 701, (1970)].

A lysC-t tartalmazó DNS-fragmenst kromoszomális DNS-ből amplifikáltuk PCR-módszerrel [„polimerase chain reaction”, polimeráz-láncreakció, ld. White, T. J. és munkatársai Trends. Genet., 5, 185, (1989)]. Az amplifikáláshoz használt DNS-láncindítókként a szekvencialistában az 1-es és 2-es azonosító számon megadott szekvenciájú 23 tagú egyesszálú DNS-eket szintetizáltuk meg, hogy velük egy kb. 1643 bp hosszúságú, a lysC-t kódoló régiót amplifikáljuk a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert szekvencia alapján [Molecular Microbiology 5 (5), 1197, (1991); Mol. Gen. Genet., 224, 317, (1990)]. A DNS-t a szokványos módon szintetizáltuk meg egy „model 380B” (Applied Biosystems) szintetizálókészüléket és a foszforamidit-módszert alkalmazva [Tetrahedron Letters 22, 1859, (1981)].

A gén PCR-rel történő amplifikálását egy „DNA Thermal Cycler Model PJ2000” készülék (Takara Shuzo) végeztük, Taq-polimerázt alkalmazva a forgalmazó utasításai szerint. Az 1643 bp hosszúságú gén-fragmens amplifikálásának sikeres mivoltáról agaróz-gélelektroforézis segítségével győződünk meg. Ezután a gélből kivágott fragmenst a szokványos módszerrel tisztítottuk, majd NruI (Takara Shuzo) és EcoRI (Takara Shuzo) restriktív enzimekkel megemésztettük.

A gén-fragmens számára klónozóvektorként a pHSG399-et [Takeshita, S. és munkatársai, Gene, 61, 63–74 (1987)] alkalmaztuk. A pHSG399-et Smal (Takara Shuzo) és EcoRI restriktív enzimekkel megemésztettük, és az amplifikált lysC-fragmenssel ligáltuk. A DNS ligálását a „DNA ligation kit” (Takara Shuzo) segítségével végeztük el a feltüntetett módszer alapján. Ilyenformán olyan plazmidokat állítottunk elő, amelyekben a *Brevibacterium lactofermentum* kromoszómából amplifikált lysC-fragmenseket pHSG399-cel ligáltuk. Az ATCC13869-ből (vad típusú törzs) származó lysC-t tartalmazó plazmidot p399AKY-nak jelöltük, azt a plazmidot pedig, amelyik az AJ3463-ből származó (L-lizin-termelő baktérium) plazmidot tartalmazta p399AK9-nek.

A p399AKY-ba és a p399AK9-be olyan DNS-fragmenst inszertáltunk, ami egy plazmidot képessé tesz autonóm módon replikálódni *Corynebacterium* nemzetséghez tartozó baktériumokban (a leírásban használt értelemben a „Brevi.-ori.” ilyen DNS-fragmenst jelöl), így rendre olyan lysC-t tartalmazó plazmidokat állítva elő, amelyek képesek autonóm módon replikálódni *Corynebacterium* nemzetséghez tartozó baktériumokban. A Brevi.-ori.-t a pHK4 plazmidvektorból állítottuk elő, ami tartalmazza a Brevi.-ori.-t és autonóm módon replikálódik mind *Escherichia coli*, mind a *Corynebacterium* nemzetséghez tartozó baktériumok sejtjeiben. A pHK4-et a pHC4 Kpnl-gyel (Takara Shuzo) és BamHI-gyel (Takara Shuzo) végzett emésztésével, a Brevi.-ori.-fragmens extrahálásával és az előzőleg szintén Kpnl-gyel és BamHI-gyel megemésztett pHSG298-cal (5-7491-es számú közzétett japán szabadalmi leírás) való ligálással állítottuk elő. A pHK4 a gazdasejtet ellenállóvá teszi kamamicinnel szemben. A pHK4-et hordozó *Escherichia coli*-törzset *Escherichia coli* AJ13136-nak jelöltük, és 1995. augusztus 1-jén helyeztük letétbe FERM BP-5186-os nyilvántartási számon a „National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry” Intézetnél (1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305 Japan).

A pHK4-et Kpnl és BamHI restriktációs enzimekkel megemésztettük, és a hasított végeket tompa végűvé tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A tompa vég kialakítása után foszforilált BamHI-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk a tompa végekhez, ezzel a módosítással elérve azt, hogy a Brevi.-ori.-szakasznak megfelelő DNS-fragmens pHK4-ből csupán BamHI-gyel végzett emésztéssel is kivágható legyen. Ez utóbbi plazmidot emésztettük BamHI-gyel, és a kapott Brevi.-ori. DNS-fragmenst ligáltuk az előzőleg rendre szintén BamHI-gyel emésztett p399AKY-nal és p399AK9-cel. Így a lysC-t tartalmazó és *Corynebacterium* nemzetséghez tartozó baktériumsejtekben autonóm módon replikálódni képes plazmidokat hoztunk létre.

A vad típusú lysC-gént tartalmazó, p399AKY-ból származó plazmidot p399AKYB-nek, a p399AK9-ből származót p399AK9B-nek jelöltük. A p399AKYB és a p399AK9B létrehozásának folyamatát az 1. ábra szemlélteti. A mutáns lysC-t tartalmazó p399AK9B-nek a vad típusú *Brevibacterium lactofermentum* (AJ12036-os törzs, FERM BP-734) történt bejuttatásával kapott AJ12691-es törzset 1992. április 10-én helyeztük letétbe FERM P-12918 nyilvántartási számon a „National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry” Intézetnél (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan), majd 1995. február 10-én a Budapesti Egyezménynek megfelelően is letétbe helyeztünk a FERM BP-4999-es nyilvántartási számon.

(2) A *Brevibacterium lactofermentum*-ból származó vad típusú és a mutáns lysC nukleotidszekvenciájának meghatározása

A vad típusú lysC-t tartalmazó p399AKY és a mutáns lysC-t tartalmazó p399AK9 plazmidokat a megfelelő transzformánsokból tisztítottuk a vad típusú és a mutáns lysC nukleotidszekvenciájának meghatározása érdekében. A nukleotidszekvencia meghatározását Sanger és munkatársai módszerével végeztük [Sanger, F. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977)].

A vad típusú lysC p399AKY által kódolt nukleotidszekvenciáját a szekvencialistában a 3-as azonosító számon adtuk meg. Másfelől, a mutáns lysC p399AK9 által kódolt nukleotidszekvenciája csupán egy nukleotidban tartalmaz mutációt, nevezetesen az 1051. G A-ra változott a szekvencialistában a 3-as azonosító számon megadott, vad típusú lysC-nek megfelelő szekvenciához képest. Ismert, hogy a *Corynebacterium glutamicum* lysC-génjének két alegységéből áll ( $\alpha$  és  $\beta$ ), amelyek azonos DNS-szálon azonos leolvasási fázisban vannak kódolva [Kalinowsky, J. és munkatársai, Molecular Microbiology 5(5), 1197 (1991)]. A homológiából ítélve feltételezhetjük, hogy a találmány szerinti génszekvencia szintén két alegységet kódol ( $\alpha$  és  $\beta$ ), amelyek kódolórégiói azonos DNS-szálon azonos leolvasási fázisban helyezkednek el.

A vad típusú AK-fehére  $\alpha$ -alegysége DNS-ének nukleotidszekvenciájából származtatott aminosavszekvenciát a szekvencialistában a 4-es azonosító számon adtuk meg a DNS-szekvenciával együtt. Az aminosavszekvenciát önmagában a szekvencialistában az 5-ös azonosító számon adtuk meg. A vad típusú AK-fehére  $\beta$ -alegysége DNS-ének nukleotidszekvenciájából származtatott aminosavszekvenciát a szekvencialistában a 6-os azonosító számon adtuk meg a DNS-szekvenciával együtt. Az aminosavszekvenciát önmagában a szekvencialistában a 7-es azonosító számon adtuk meg. Az alegységek mindegyikében GTG a kezdő kodon, itt azonban az ennek megfelelő aminosav a metionin. Az ennek a kodonnak megfelelő aminosav lehet mindazonáltal metionin, valin és formil-metionin egyaránt.

Másfelől, a mutáns lysC szekvenciájában a mutáció egy olyan szubsztitúciót jelent, ahol a mutáns lysC olyan AK-t kódol, amelyben a vad típusú AK  $\alpha$ -alegységének N-terminálisától számított 279. alanin treoninra van kicserélve, és a  $\beta$ -alegység N-terminálisától számított 30. alanin treoninra van kicserélve. (A szekvencialistában az 5-ös és a 7-es azonosító számon megadott szekvenciák.)

2. példa: lysA előállítás *Brevibacterium lactofermentum*-ból

(1) lysA előállítás és a lysA-t tartalmazó plazmid elkészítése

A *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es vad típusú törzset alkalmaztuk kromoszomális DNS-donorként. A kromoszomális DNS-t az ATCC13869-es törzsből nyertük a szokványos módon. Az argS-t, lysA-t és az őket tartalmazó operon egy promoterét a kromoszomális DNS-ből amplifikáltuk PCR segítségével.

Amplifikáláshoz használt DNS-láncindítókként azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok szolgáltak, amelyek a szekvencialistában a 8-as, valamint a 9-es azonosító számon vannak megadva. Ezekkel amplifikáltunk egy kb. 3,6 kb hosszúságú régiót, amely a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert szekvencia alapján megállapíthatóan az arginil-tRNS szintáz és a DDC-t kódolja [Molecular Microbiology 4 (11), 1819, (1990) Molecular and General Genetics, 212, 112 (1988)]. A DNS szintézise és a PCR ugyanúgy végezhető el, mint azt fent az 1. példában leírtuk. A pontosan 3579 bp hosszúságú génfragmens amplifikálásához a pHSG399-et használtuk. A pHSG399-et SmaI restriktions enzimmel (Takara Shuzo) emésztettük, majd az amplifikált lysA-t tartalmazó DNS-fragmenssel ligáltuk. Az így kapott plazmidot, amely tartalmazta az ATCC13869-ből származó lysA-t, p399LYSA-nak jelöltük.

A lysA-t tartalmazó DNS-fragmenst a p399LYSA KpnI-gyel (Takara Shuzo) végzett emésztése során kaptuk meg. Ezt a DNS-fragmenst a pHSG299-be ligáltuk, amelyet előzőleg KpnI-gyel és BamHI-gyel emésztettünk meg. A kapott plazmidot p299LYSA-nak jelöltük. A p299LYSA elkészítésének folyamatát a 2. ábra mutatja.

A Brevi.-ori.-t beépítettük a kapott p299LYSA plazmidba, ezáltal egy lysA-t tartalmazó, korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes plazmidot hoztunk létre. A pHK4-et KpnI- és BamHI-enzimokkal emésztettük, majd a hasított végeket tompa végűvé tettük. A tompa végek kialakítását a „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) segítségével végeztük a feltüntetett módszer alkalmazásával. A tompa vég kialakítása után foszforilált KpnI-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk a tompa végekhez, ezzel a módosítással elérve azt, hogy a Brevi.-ori.-szakasznak megfelelő DNS-fragmens pHK4-ből csupán KpnI-gyel végzett emésztéssel is kivágható legyen. Ez utóbbi plazmidot emésztettük KpnI-gyel, és a kapott Brevi.-ori. DNS-fragmenst ligáltuk az előzőleg szintén KpnI-gyel emésztett p299LYSA-val, ezzel egy lysA-t tartalmazó, korineform baktériumsejtekben autonóm módon replikálódni képes plazmidot nyerve. A kapott plazmidot pLYSAB-nak jelöltük. A pLYSAB elkészítésének folyamatát a 3. ábra mutatja be.

(2) A *Brevibacterium lactofermentum* ből származó lysA nukleotidszekvenciájának meghatározása

A p299LYSA plazmid DNS-ét izoláltuk és nukleotidszekvenciáját meghatároztuk az 1. példában leírtakkal azonos módon. A meghatározott nukleotidszekvenciát és a nukleotidszekvencia által kódolt aminosavszekvenciát a szekvencialistában a 10-es azonosító számon adtuk meg. A nukleotidszekvencia részét képező gének, az argS, illetve a lysA által kódolt aminosavszekvenciákat a szekvencialistában rendre a 11-es és a 12-es azonosító számon adtuk meg.

3. példa: ppc előállítás *Brevibacterium lactofermentum* ből

(1) A ppc előállítás

A *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es vad típusú törzset alkalmaztuk DNS-donorként. A kro-

moszomális DNS-t az ATCC13869-es törzsből nyertük a szokványos módon. A ppc-t tartalmazó DNS-fragmenst a kromoszomális DNS-ből izoláltuk PCR segítségével. Amplifikáláshoz használt DNS-láncindítókként azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok szolgáltak, amelyek a szekvencialistában a 13-as, valamint a 14-es azonosító számon vannak megadva. Ezekkel amplifikáltunk egy kb. 3,3 kb hosszúságú régiót, amely a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert szekvencia alapján megállapíthatóan a PEPC-t kódolja [O'Regan, M. és munkatársai, Gene, 77, 237, (1989)]. A DNS szintézisét és a PCR-t ugyanúgy végeztük, amint azt az 1. példában leírtuk.

A kb. 3300 bp hosszúságú génfragmenst agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a gélből extrahált fragmenst szokványos módon tisztítottuk, és Sall restriktions enzimmel (Takara Shuzo) emésztettük. A pHSG399-et alkalmaztuk a ppc klónozóvektoraként. A pHSG399-et Sall restriktions enzimmel emésztettük, majd az amplifikált ppc-t tartalmazó DNS-fragmenssel ligáltuk. A fent leírtak szerint kapott plazmidot, amely tehát az ATCC13869-ből származó ppc-t tartalmazza, pPCF-nek jelöltük.

(2) A ppc-gén ligálása lysC-promoterrel

A fent leírtak szerint nyert pPCF-et megemésztettük DraI (Takara Shuzo) restriktions enzimmel. Miután egy kb. 150 bp hosszúságú, a PEPC-struktúrgéntől 5'-irányban elhelyezkedő DNS-fragmenst eltávolítottunk, a plazmidot önmagával ligáltuk, és így a pPCFds-plazmidhoz jutottunk. A pPCFds-et Sall restriktions enzimmel emésztettük, majd a hasított végeket tompa végűvé tettük. A tompa végek kialakítását a „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) segítségével végeztük a feltüntetett módszer alkalmazásával.

Az 1. példában leírtak alapján nyert, vad típusú lysC-t tartalmazó p399AKYB-t ApaI (Takara Shuzo) és PstI (Takara Shuzo) restriktions enzimekkel emésztettük, majd a hasított végeket ugyanúgy, mint fent, tompa végűvé tettük. A kapott két DNS-fragmens közötti kisebb fragmens tartalmazza a Brevi.-ori.-t és a lysC-t. Ezt a fragmenst a pPCFds Sall-es emésztésével kapott és tompa végűvé tett fent említett fragmenssel ligáltuk a „DNA Ligation kit” reagenskészletet (Takara Shuzo) alkalmazva.

A ligálóelegyben levő DNS-t bejuttattuk a *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es törzsbe az elektromos pulzus módszer segítségével (Sugimoto és munkatársai, 2-207791-es számú közzétett japán szabadalmi leírás). A transzformánsokat 5 µg/ml klór-aminofenikolt tartalmazó teljes médiumon szelektáltuk. A transzformánsokból plazmid DNS-t tisztítottunk, amit azután EcoRI-gyel emésztettünk, hogy egy olyan plazmidhoz juthassunk, amelyben a lysC-promoter a ppc-struktúrgénnel ligálva van, mégpedig normális orientációban. A kapott plazmidot pAKPFds-nek neveztük el. A pAKPFds létrehozásának folyamatát a 4. ábra mutatja. A lysC-vel ligált ppc-t innentől a leírásban használt értelemben „vad típusú nagymértékben expresszálódó ppc”-nek nevezzük.

(3) Vad típusú nagymértékben expresszáldó ppc inszertálása vektorba

A fentiek szerint vad típusú nagymértékben expresszáldó ppc-t PCR-rel amplifikáltuk, hogy egy olyan vektorba inszertálhassuk, amely a Brevi.-ori.-tól különböző korineform baktériumokban autonóm replikálódásra képesé tevő replikációs origót tartalmaz. DNS-láncindítóként egy, a lysC promoterrégiójának megfelelő oligonukleotidot szintetizáltunk (a szekvenzialistában a 7-es azonosító számon megadott szekvencia) a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert lysC szekvenciája alapján [Molecular Microbiology 5(5), 1197, (1991); Mol. Gen. Genet., 224, 317, (1990)], valamint megszentizáltunk egy másik, a ppc-régióknak megfelelő oligonukleotidot is (szekvenzialistában a 8-as azonosító számon megadott szekvencia) a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert ppc szekvenciája alapján [O'Regan, M. és munkatársai, Gene, 77, 237, (1989)]. Ezeket a láncindítókat úgy terveztük, hogy velük egy, a vad típusú nagymértékben expresszáldó ppc-t tartalmazó 3 150 bp hosszúságú fragmenst lehessen amplifikálni, és az amplifikált DNS-fragmens végei KpnI-enzimmel emészthetők legyenek. A DNS szintézisét és a PCR-t ugyanúgy végeztük el, mint az 1. példa esetében.

A pVK7-et, ami egy, a korineform baktériumokhoz használható új klónozóvektor, alkalmaztuk a vad típusú nagymértékben expresszáldó ppc bejuttatására korineform baktériumba. A pVK7-et úgy készítettük el, hogy a pHSG299-et, egy *E. coli*-hoz használható vektort [Km<sup>r</sup>; Takeshita, S. és munkatársai, Gene, 61, 63 (1987)] a pAM330-cal, egy *Brevibacterium lactofermentum*-ban működőképes kriptikus plazmiddal ligáltuk az alább leírtak szerint. A pHSG299-et Avall restriktív enzimmel (Takara Shuzo) emésztettük, T4 DNS-polimeráz segítségével tompa végűvé tettük, majd az előzőleg HindIII-mal (Takara Shuzo) emésztett és T4 DNS-polimeráz segítségével tompa végűvé tett pAM330-cal ligáltuk. A pAM330 a pHSG299-ben elfoglalt orientációja alapján a két kapott plazmidot pVK6-nak és pVK7-nek neveztük el. A további kísérletekben a pVK7-et használtuk. A pVK7 *E. coli* és *Brevibacterium lactofermentum* sejtjeiben egyaránt autonóm módon replikálódni képes és lacZ'-t és a pHSG299-ből származó többszörös klónozóhelyet tartalmaz. A pVK6 és a pVK7 elkészítésének folyamatát az 5. ábra mutatja be.

Egy kb. 3 150 bp hosszúságú amplifikált génfragmenst mutattunk ki agaróz-gélelektroforézissal, majd a gélből kivágott fragmenst szokványos módon tisztítottuk és KpnI restriktív enzimmel (Takara Shuzo) emésztettük. A DNS-fragmenst pVK7-tel ligáltuk, amit előzőleg szintén KpnI-gyel emésztettünk meg. Az így előállított plazmidot pPwm-nek jelöltük. A pPwm elkészítésének folyamatát a 6. ábra mutatja be.

4. példa: A mutáns lysC-t és lysA-t kombinálva tartalmazó plazmid elkészítése

A mutáns lysC-t, lysA-t és egy korineform baktériumokban működőképes replikációs origót tartalmazó

plazmidot a mutáns lysC-t és a Brevi.-ori.-t tartalmazó p399AK9B plazmidból és a lysA-t tartalmazó p299LYSA plazmidból kiindulva készítettük el. A p299LYSA-t BamHI és KpnI restriktív enzimekkel (Takara Shuzo) emésztettük, majd tompa végűvé tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A kapott DNS-fragmenst a p399AK9B-vel ligáltuk, amit előzőleg Sall-gyel emésztettünk és tompa végűvé tettünk. Így tehát egy lysC-t és lysA-t tartalmazó, korineform baktériumsejtekben autonóm módon replikálódni képes plazmidot állítottunk elő, amit pCL-nek jelöltünk. A pCL előállításának folyamatát a 7. ábra mutatja be.

1. összehasonlító példa: dapA, dapB és ddh előállítása *Brevibacterium lactofermentum*-ból

A lysC-n, lysA-n és ppc-n kívül más L-lizin-bioszintézis géneket is előállítottunk, nevezetesen a dapA-t (dihidropikolinát szintázgénje), a dapB-t (dihidropikolinát redukázgénje) és a ddh-t (diamino-pimelát dehidrogenázgénje) az alábbiak szerint.

(1) A dapA előállítása és a dapA-t tartalmazó plazmid elkészítése

A vad típusú *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es törzset használtuk a kromoszomális DNS donorjaként. A kromoszomális DNS-t az ATCC13869-es törzsből a szokványos módon állítottuk elő. A dapA-t tartalmazó DNS-fragmenst a kromoszomális DNS-ből PCR segítségével amplifikáltuk. DNS-láncindítókként azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok szolgáltak, amelyek a szekvenzialistában a 21-es, valamint a 22-es azonosító számon vannak megadva. Ezekkel amplifikáltunk egy kb. 1,5 kb hosszúságú régiót, amely a *Corynebacterium glutamicum* esetében ismert szekvencia alapján megállapíthatóan a DDPS-t kódolja [Nucleic Acids. Res., 18 (21), 6421, (1990); EMBL nyilvántartási szám: X53993]. A DNS szintézisét és a PCR-t az 1. példában leírtak szerint végeztük el. A pCR1000 plazmidot [Invitrogen, ld. még Bio/Technology 9, 657 (1991)] alkalmaztuk az 1,411 bp hosszúságú amplifikált génfragmens klónozóvektoraként, és ezt ligáltuk az amplifikált dapA-fragmensel. A DNS ligálását a „DNA ligation kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) segítségével végeztük el a feltüntetett módszer alapján. Így tehát egy olyan plazmidot készítettünk, amelyben a *Brevibacterium lactofermentum* kromoszómájából amplifikált 1,411 bp hosszúságú dapA-fragmenst a pCR1000-rel ligáltuk. A fent leírt plazmidot, amelyben a dapA az ATCC13869-ből származott, pCRDAPA-nak jelöltük.

A pCRDAPA *E. coli* JM109-es törzsbé történt bejuttatásával kapott AJ13106-os törzset 1995. május 26-án helyeztük letétbe nemzetközileg a Budapesti Egyezménynek megfelelően a FERM BP-5113 nyilvántartási számon a „National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry” Intézetnél (1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305 Japan).

A Brevi.-ori.-t bejuttattuk az elkészített pCRDAPA-plazmidba, ezzel az így létrehozott plazmid képessé vált autonóm módon replikálódni korineform baktériumsejtekben. A pHK4-et KpnI és BamHI restrikciós enzimekkel (Takara Shuzo) emésztettük, a hasított végeket pedig tompa végekké tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A tompa végek kialakítása után egy foszforilált Smal-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk hozzájuk, hogy ezzel a módosítással a Brevi.-ori.-szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHKI-ből Smal-gyel kivághatóvá váljék. Ezt a plazmidot emésztettük Smal-gyel, és a kapott Brevi.-ori. DNS-fragmenst az előzőleg szintén Smal-gyel megemésztett pCRDAPA-plazmiddal ligáltuk, hogy korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes dapA-t tartalmazó plazmidhoz jussunk. Ezt a plazmidot jelöltük pDPSB-nek. A pDPSB(Km<sup>r</sup>) elkészítésének folyamatát mutatja be a 8. ábra.

(2) A *dapB* előállítás és a *dapB*-t tartalmazó plazmid elkészítése

A vad típusú *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869-es törzset használtuk a kromoszomális DNS donorként. A kromoszomális DNS-t az ATCC13869-es törzsből a szokványos módon állítottuk elő. A *dapB*-t tartalmazó DNS-fragmenst a kromoszomális DNS-ből PCR segítségével amplifikáltuk. DNS-láncindítókként azok a 23 bázispárból álló DNS-szakaszok szolgáltak, amelyek a szekvencialistában a 19-es, valamint a 20-as azonosító számon vannak megadva. Ezekkel amplifikáltunk egy kb. 2,0 kb hosszúságú régiót, amely a *Brevibacterium lactofermentum* esetében ismert szekvenciája alapján a DDP-*r*-t kódolja [Journal of Bacteriology, 175 (9), 2743, (1993)]. A DNS szintézisét és a PCR-t az 1. példában leírtak szerint végeztük el. A 2001 bp hosszúságú amplifikált génfragmenshez klónozóvektorként a pCR-Script-vektort (Invitrogen) használtuk, ezt ligáltuk az amplifikált *dapB*-fragmenssel. Így tehát egy olyan plazmidot készítettünk, amelyben a *Brevibacterium lactofermentum* kromoszómájából amplifikált 2001 bp hosszúságú *dapB*-fragmenst a pCR-Scripttel ligáltuk. A fent leírt plazmidot, amelyben a *dapB* az ATCC13869-ből származott, pCRDAPB-nek jelöltük.

A pCRDAPB *E. coli* JM109-es törzsbe történt bejuttatásával kapott AJ13107-es törzset 1995. május 26-án helyeztük letétbe nemzetközileg a Budapesti Egyetemnek megfelelően a FERM BP-5114 nyilvántartási számon a „National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry” Intézetnél (1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305 Japan).

Egy, a DDP-*r*-struktúrgént tartalmazó 1101 bp hosszúságú fragmenst úgy kaptunk meg, hogy a pCRDAPB-t emésztettük EcoRV-tel és SphI-gyel. Ezt a fragmenst ligáltuk az előzőleg HincII-vel és SphI-gyel megemésztett pHSG399-be, ezzel újabb plazmidot kapva, amelyet p399DPR-nek jelöltünk.

Annak érdekében, hogy a korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes, *dapB*-t tartalmazó plazmidot kapjunk, Brevi.-ori.-t juttattunk be az elkészített p399DPR plazmidba. A pHK4-et megemésztettük KpnI restrikciós enzimmel (Takara Shuzo), majd a hasított végeket tompa végekké tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A tompa végek kialakítása után egy foszforilált BmaHI-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk hozzájuk, hogy ezzel a módosítással a Brevi.-ori.-szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4-ből BmaHI-gyel kivághatóvá váljék. Ezt a plazmidot emésztettük BmaHI-gyel, és a kapott Brevi.-ori. DNS-fragmenst az előzőleg szintén BmaHI-gyel megemésztett p399DPR plazmiddal ligáltuk, hogy korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes *dapB*-t tartalmazó plazmidhoz jussunk. Ezt a plazmidot jelöltük pDPRB-nek. A pDPRB elkészítésének folyamatát mutatja be a 9. ábra.

(3) A *ddh* előállítás és a *ddh*-t tartalmazó plazmid elkészítése

A *ddh*-gént a *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 kromoszomális DNS-éből a *ddh*-gén amplifikálásával nyertük PCR-módszerrel két oligonukleotid láncindító alkalmazásával (a szekvencialistában a 23-as és a 24-es azonosító számon megadott szekvenciák), amelyeket a *Corynebacterium glutamicum* *ddh*-génjének ismert szekvenciája alapján készítettünk el [Ishino, S. és munkatársai, Nucleic Acids. Res., 15, 3917, (1987)]. A kapott amplifikált DNS-fragmenst EcoT22I és Aval restrikciós enzimekkel emésztettük majd a hasított végeket tompa végűvé tettük. A fragmenst ezután a pMW119-vektor Smal hasítóhelyére inszertáltuk, így kaptuk a pDDH-plazmidot.

Ezután a pDDH-t Sall-gyel és EcoRI-gyel emésztettük, majd a tompa végek kialakítása következett. A kapott fragmenst előzőleg Smal-gyel emésztett pUC19-cel ligáltuk. Az így kapott plazmidot pUC18DDH-val jelöltük.

Annak érdekében, hogy korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes, *ddh*-t tartalmazó plazmidot nyerjünk, a Brevi.-ori.-t pUC18DDH-ba juttattuk be. A pHK4-et KpnI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettük, a hasított végeket pedig tompa végűvé tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A tompa végek kialakítása után egy foszforilált PstI-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk hozzájuk, hogy a fragmenst a pHSG299 PstI-helyére inszertálhassuk. A fent leírt módon elkészített plazmidot pPK4-nek jelöltük. Ezután a pUC18DDH-t megemésztettük XbaI-gyel és KpnI-gyel, majd a kapott fragmenst az előzőleg szintén XbaI-gyel és KpnI-gyel emésztett pPK4-*r*-gyel ligáltuk. Így tehát egy korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes, *ddh*-t tartalmazó plazmidot készítettünk. Ezt a plazmidot pPK4D-nek jelöltük. A pPK4D elkészítésének folyamatát a 10. ábra mutatja be.

2. összehasonlító példa: Mutáns *lysC*-t, valamint *dapA*-t, *dapB*-t vagy *ddh*-t kombinálva tartalmazó plazmid elkészítése

(1) Mutáns *lysC*-t és *dapA*-t kombinálva tartalmazó plazmid elkészítése

Egy mutáns *lysC*-t *dapA*-t és korineform baktériumokban működőképes replikációs origót tartalmazó plazmidot készítettünk a *dapA*-t tartalmazó pCRDAPA-plazmidból és a mutáns *lysC*-t, valamint a Brevi.-ori.-t tartalmazó p399AK9B-plazmidból kiindulva. A p399AK9B-t teljesen megemésztettük Sall-gyellel, majd a végeket tompává tettük. Egy EcoRI-linkert ligáltunk hozzájuk egy olyan plazmid létrehozása érdekében, ahol a Sall-helyet EcoRI-hellyé alakítottuk át. A kapott plazmidot p399AK9BSE-nek jelöltük. A mutáns *lysC*-t és a Brevi.-ori.-t egy fragmensként kivágtuk EcoRI-gyellel részlegesen emésztve a p399AK9BSE-t. Ezt a fragmenst ligáltuk az előzetesen EcoRI-gyellel emésztett pCRDAPA-val. A kapott plazmidot pCRCAB-nek jelöltük. Ez a plazmid autonóm módon replikálódni képes *E. coli*-ban és korineform baktériumokban, a gazdasejtnek kanamicinrezisztenciát biztosít, továbbá a mutáns *lysC*-t és a *dapA*-t kombinálva tartalmazza. A pCRCAB elkészítésének folyamatát a 11. ábra mutatja be.

(2) Mutáns *lysC*-t és *dapB*-t kombinálva tartalmazó plazmid elkészítése

A mutáns *lysC*-t és a *dapB*-t tartalmazó plazmidot a mutáns *lysC*-t tartalmazó p399AK9 és a *dapB*-t tartalmazó p399DPR-plazmidokból kiindulva készítettük el. A p399DPR-plazmid EcoRV-tel és SphI-gyellel történt emésztésével a DDRP struktúrgénjét tartalmazó 1101 bp hosszúságú fragmenst nyertünk. Ezt a fragmenst ligáltuk az előzőleg Sall-gyellel megemésztett, tompa végűvé tett és SphI-gyellel tovább emésztett p399AK9-cel, hogy olyan plazmidot készíthessünk, amelyik a mutáns *lysC*-t és a *dapB*-t kombinálva tartalmazza. Ezt a plazmidot jelöltük p399AKDDPR-nek.

Ezután bejuttattuk a Brevi.-ori.-t a kapott p399AKDDPR-be. A Brevi.-ori.-t tartalmazó pHK4 plazmidot KpnI restrikciós enzimmel emésztettük (Takara Shuzo), a hasított végeket pedig tompa végekké tettük. A tompa végek kialakítását „DNA Blunting kit” reagenskészlet (Takara Shuzo) alkalmazásával végeztük el a feltüntetett módszer szerint. A tompa végek kialakítása után egy foszforilált BamHI-linkert (Takara Shuzo) ligáltunk hozzájuk, hogy ezzel a módosítással a Brevi.-ori.-szakaszhoz megfelelő DNS-fragmens a pHK4-ből BamHI-gyellel kivághatóvá váljék. Ezt a plazmidot emésztettük BamHI-gyellel, és a kapott Brevi.-ori. DNS-fragmenst az előzőleg szintén BamHI-gyellel megemésztett p399AKDDPR-plazmiddal ligáltuk, hogy korineform baktériumban autonóm módon replikálódni képes mutáns *lysC*-t és *dapB*-t tartalmazó plazmidhoz jussunk. Ezt a plazmidot jelöltük pCB-nek. A pCB elkészítésének folyamatát mutatja be a 12. ábra.

(3) Mutáns *lysC*-t és *ddh*-t kombinálva tartalmazó plazmid elkészítése

Egy mutáns *lysC*-t, *ddh*-t, valamint egy korineform baktériumokban működőképes replikációs origót tartal-

mazó plazmidot készítettünk a *ddh*-t tartalmazó pUC18DDH és a mutáns *lysC*-t, valamint a Brevi.-ori.-t tartalmazó p399AK9B-plazmidok felhasználásával. A pUC18DDH-t EcoRI restrikciós enzimmel (Takara Shuzo) emésztettük, tompa végűvé tettük és Sall-helyet tartalmazó polilinkerrel ligáltuk, hogy EcoRI-hely helyett Sall-helyet építsünk ki. A kapott plazmidot Sall-gyellel emésztettük, így egy *ddh*-t tartalmazó DNS-fragmenst kaptunk.

5 Ezt a plazmidot emésztettük azután Sall-gyellel, és ligáltuk a *ddh*-t tartalmazó DNS-fragmenssel. Ily módon egy korineform baktériumokban autonóm módon replikálódni képes mutáns *lysC*-t, *ddh*-t és Brevi.-ori.-t tartalmazó plazmidhoz jutottunk. Ezt a plazmidot jelöltük pCD-nek. A pCD elkészítésének folyamatát mutatja be a 13. ábra.

5. példa. Az L-lizin bioszintézisének génjeit tartalmazó plazmidok bejuttatása a *Brevibacterium lactofermentum* L-lizin-termelő baktériumba

20 Az L-lizin bioszintetikus rendszerének génjeit tartalmazó, fent leírt módon elkészített plazmidokat, nevezetesen a p399AK9B-t (Cm<sup>r</sup>), a pLYSAB-t (Cm<sup>r</sup>), a pPwm-et (Km<sup>r</sup>), a pCRCAB-t (Km<sup>r</sup>), a pCB-t (Cm<sup>r</sup>), a pCD-t (Cm<sup>r</sup>) és a pCL-t (Cm<sup>r</sup>) a *Brevibacterium lactofermentum* AJ11087 (NRRL B-11470) L-lizin-termelő baktériumtörzsbe juttattuk be. Az AJ11082-es törzs AEC-rezisztens. A plazmidokat elektromos pulzus módszerrel (Sugomoto és munkatársai, 2-207791-es számú közzétett japán szabadalmi leírás) juttattuk be. A transzformánsokat a megfelelő plazmidok drogrezisztencia-markerei alapján szelektáltuk. A transzformánsok szelekcióját 5 µg/ml klór-amfenikolt tartalmazó teljes tápközegben végeztük amennyiben klór-amfenikol-rezisztenciagént tartalmazó plazmidot juttattunk be a sejtekbe, olyan esetben pedig, amikor a bejuttatott plazmid kanamicinrezisztencia-gént tartalmazott, 25 µg/ml kanamicint tartalmazó tápközegben.

35 Az egyik törzs esetében, ahol a mutáns *lysC* és a *lysA* aktivitásának fokozódását figyeltük meg a kapott transzformánsok között, a törzsbe pPwm-plazmidot (Km<sup>r</sup>) juttattunk be olyan törzset nyerve így, amelyben a mutáns *lysC*, a *lysA* és a *ppc* aktivitása egyaránt fokozódott (AJ11082/pCL/pPwm). A transzformánsok szelekcióját 5 µg/ml klór-amfenikolt és 25 µg/ml kanamicint tartalmazó teljes tápközegben végeztük.

6. példa: L-lizin termelése

50 Az 5. példában leírt, előállított transzformánsok mindegyikét L-lizin termelésére alkalmas tápközegben végeztük, hogy az L-lizin-termelő képességet szamszerűen is jellemezni tudjuk. Az L-lizin termelésére alkalmas tápközegnek az alábbiakban adjuk meg az összetételét és előállításának módját.

55 Az alábbi komponenseket (kalcium-karbonát kivételével) feloldottuk (1 L-ben), és a pH-t 8,0-ra állítottuk be KOH-dal. A tápközeget 115 °C-on sterilizáltuk 15 percig, a szárított kalcium-karbonátot (50 g), amit előzőleg külön sterilizáltunk forró levegővel, ezután adtuk hozzá.

glükóz	100 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
biotin	500 µg
tiamin	2000 µg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
nikotinamid	5 mg
fehérjehidrolizátum (Mamenou)	30 ml
kalcium-karbonát	50 g

A különböző típusú transzformánsok mindegyikét, valamint a kiindulási törzseket a fent leírt összetételű tápközegbe oltottuk le, és 31,5 °C-on, himbán rázatva tenyésztettük őket. A tenyésztés ideje 40, illetve 72 óra volt, a termelt L-lizin mennyiségét a különböző esetekben az 1. táblázatban tüntettük fel. A táblázatban lysC\* mutáns lysC-t jelent.

1. táblázat

L-lizin felhalmozódása 40, illetve 72 órás tenyésztés után			
Baktériumtörzs/ plazmid	Bejuttatott gén	A termelt L-lizin koncentrációja (g/l)	
		40 óra múlva	72 óra múlva
AJ11082		22,0	29,8
AJ11082/p399AK9B	lysC*	16,8	34,5
AJ11082/pLYSAB	lysA	19,8	32,5
AJ11082/pPwm	ppc	20,7	28,9
AJ11082/pCRCAB	lysC*, dapA	19,7	36,5
AJ11082/pCB	lysC*, dapB	23,3	35,0
AJ11082/pCD	lysC*, ddh	15,0	27,0
AJ11082/pCL	lysC*, lysA	24,0	44,0
AJ11082/pCL/pPwm	lysC*, lysA, ppc	25,0	45,2

Amint az látható, amikor a mutáns lysC-, lysA- vagy ppc-gének aktivitását önmagában fokoztuk, vagy amikor a mutáns lysC és a dapA vagy a ddh aktivitását őket kombinálva fokoztuk, a termelt L-lizin mennyisége nagyobb volt vagy nem változott a kiindulási törzs által termelt mennyiséghez képest 72 órás tenyésztés után, 40 órás tenyésztés után azonban a termelt L-lizin mennyisége kisebb volt, mint a kiindulási törzs által termelt mennyiség. Rövid idejű tenyésztés után tehát az L-lizin-termelés sebessége csökkent. Hasonlóképpen, amikor mutáns lysC és ddh aktivitását őket kombinálva fokoztuk, a termelt L-lizin mennyisége kisebb volt, mint a kiindulási törzs által termelt mennyiség akár 40, akár 72 órás tenyésztés után. Ezzel szemben annak a törzsnek az esetében, ahol a dapB és a mutáns lysC

aktivitását őket kombinálva fokoztuk, a sejtszaporodás sebessége nőtt, a rövid idejű tenyésztés során az L-lizin termelődésének sebessége helyreállt, a hosszú idejű tenyésztés során felhalmozódott L-lizin mennyisége pedig szintén nőtt. Annak a törzsnek az esetében, ahol a mutáns lysC, a lysA és a ppc aktivitását őket kombinálva fokoztuk, az L-lizin-termelő képesség tovább javult.

## SZEKVENCIALISTA

A szekvencialistában szereplő kötetlen szövegrészek fordítása:

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

15 LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

20 A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

A 13. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

A 14. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

25 LEÍRÁSA: „szintetikus DNS”

A 17. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

A 18. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

30 A 19. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

A 20. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

A 21. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

35 LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

A 22. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

A 23. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

40 A 24. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

LEÍRÁS: „szintetikus DNS”

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

45

1. Rekombináns DNS, amely korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon replikálódni képes, és tartalmaz egy aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciát, amely aszpartokinázban az L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lényegesen le van csökkentve, valamint tartalmaz egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát.

50

2. Az 1. igénypont szerinti rekombináns DNS, amely L-lizin és L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szemben lényegesen lecsökkentett érzékenységű aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciaként korineform baktériumból származó mutáns aszpartokinázt kódol, és amely aszpartokinázban az α-alegység N-terminálisától számított, a szekvencialistában az 5-ös azonosító számon megadott aminosavszekvencia sze-

60

rinti 279., alaninnak megfelelő aminosav alanintól eltérő, nem savas aminosavra van kicserélve, és a  $\beta$ -al egység N-terminálisától számított, a szekvencialistában a 7-es azonosító számon megadott aminosavszekvencia szerinti 30., alaninnak megfelelő aminosav alanintól eltérő, nem savas aminosavra van kicserélve.

3. Az 1. igénypont szerinti rekombináns DNS, amely diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciaként a szekvencialistában a 12-es azonosító számon megadott aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, vagy olyan aminosavszekvenciát kódoló DNS-t, amely aminosavszekvencia lényegében megegyezik a szekvencialistában a 12-es azonosító számon megadott aminosavszekvenciával.

4. Az 1. igénypont szerinti rekombináns DNS, amely tartalmaz továbbá egy foszfoenol-piruvát-karboxilázt kódoló DNS-szekvenciát is.

5. Korineform baktérium, amely olyan aszpartokinázt hordoz, amely aszpartokinázban az L-lizin és

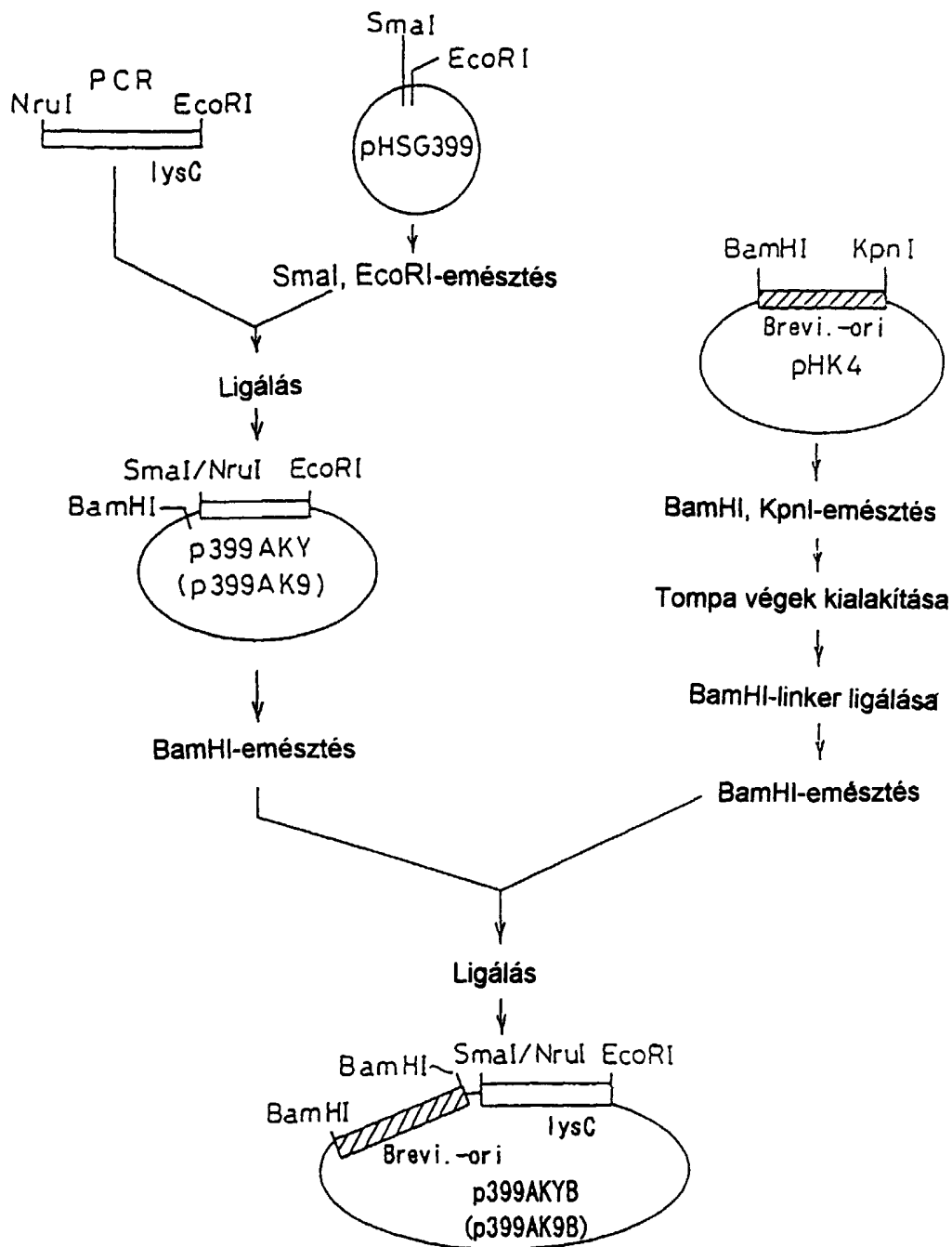
L-treonin okozta visszacsatolós gátlással szembeni érzékenység lényegesen le van csökkentve, és amely baktérium tartalmaz egy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló, fokozott aktivitású DNS-szekvenciát.

5 6. Az 5. igénypont szerinti korineform baktérium, amely 1. igénypont szerinti rekombináns DNS bejuttatása útján van transzformálva.

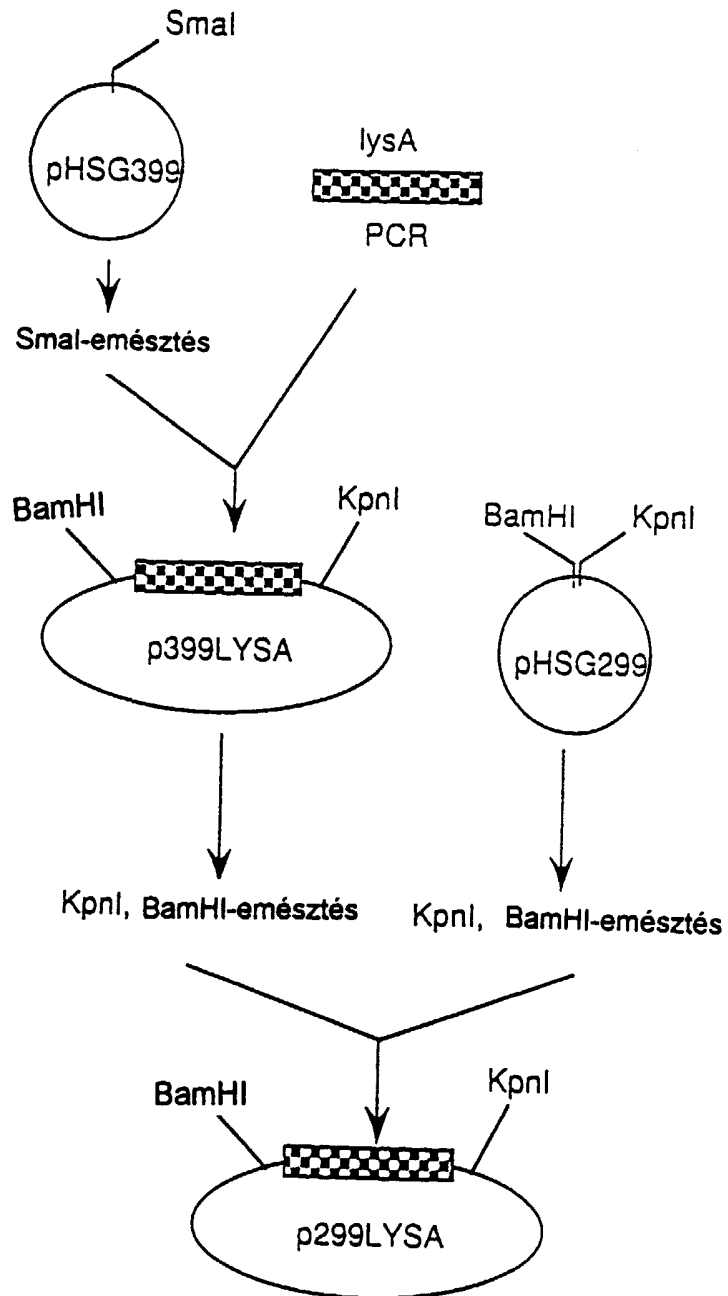
10 7. Az 5. igénypont szerinti korineform baktérium, amely tartalmaz továbbá egy foszfoenol-piruvát-karboxilázt kódoló, fokozott aktivitású DNS-szekvenciát.

8. A 7. igénypont szerinti korineform baktérium, amely 4. igénypont szerinti rekombináns DNS bejuttatása útján van transzformálva.

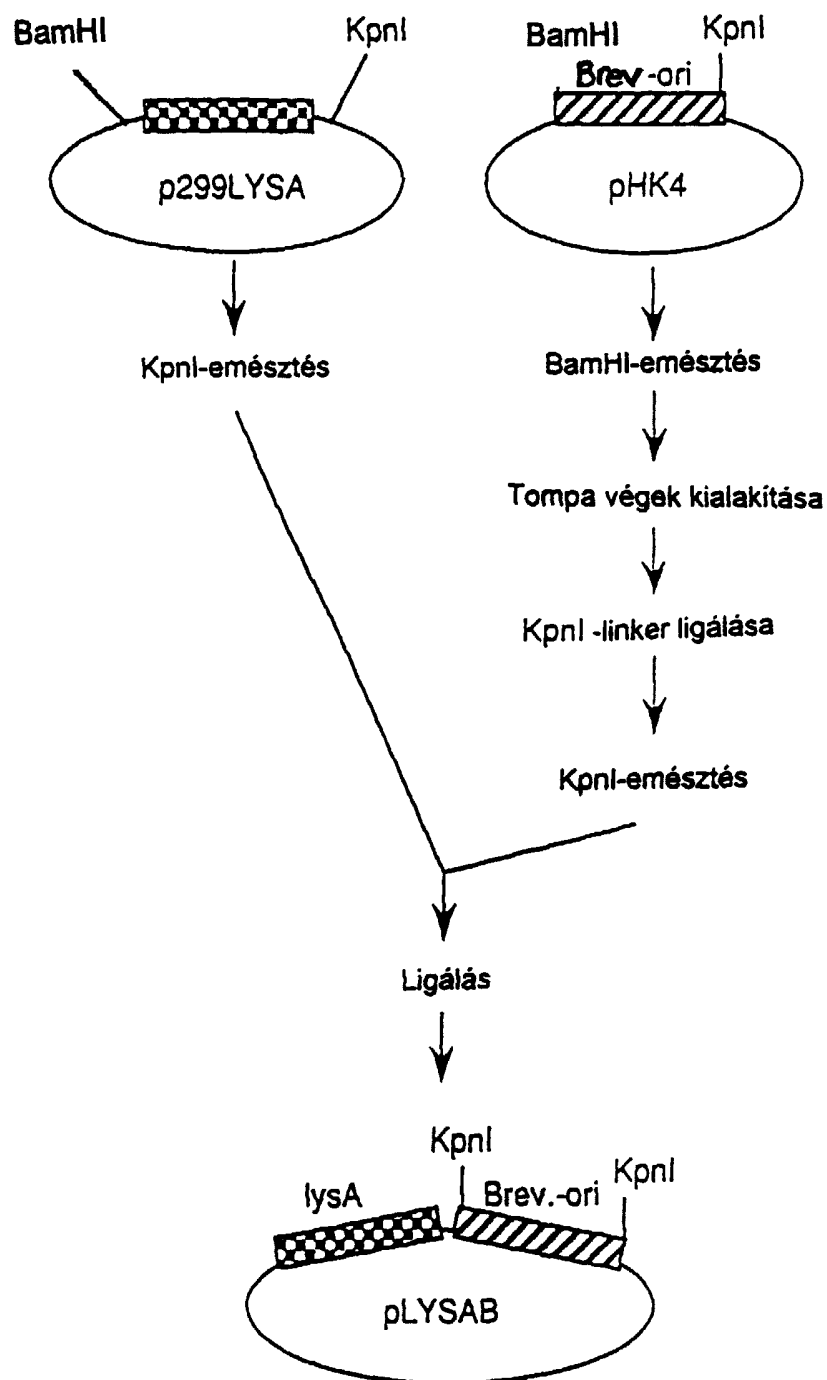
15 9. Eljárás L-lizin termelésére, *azzal jellemezve*, hogy 5. igénypont szerinti korineform baktériumot megfelelő tápközegben tenyésztünk, és így L-lizin termelődését és felhalmozódását váltjuk ki a baktériumsejt-tenyészetben, majd az L-lizint a tenyészetből kinyerjük.



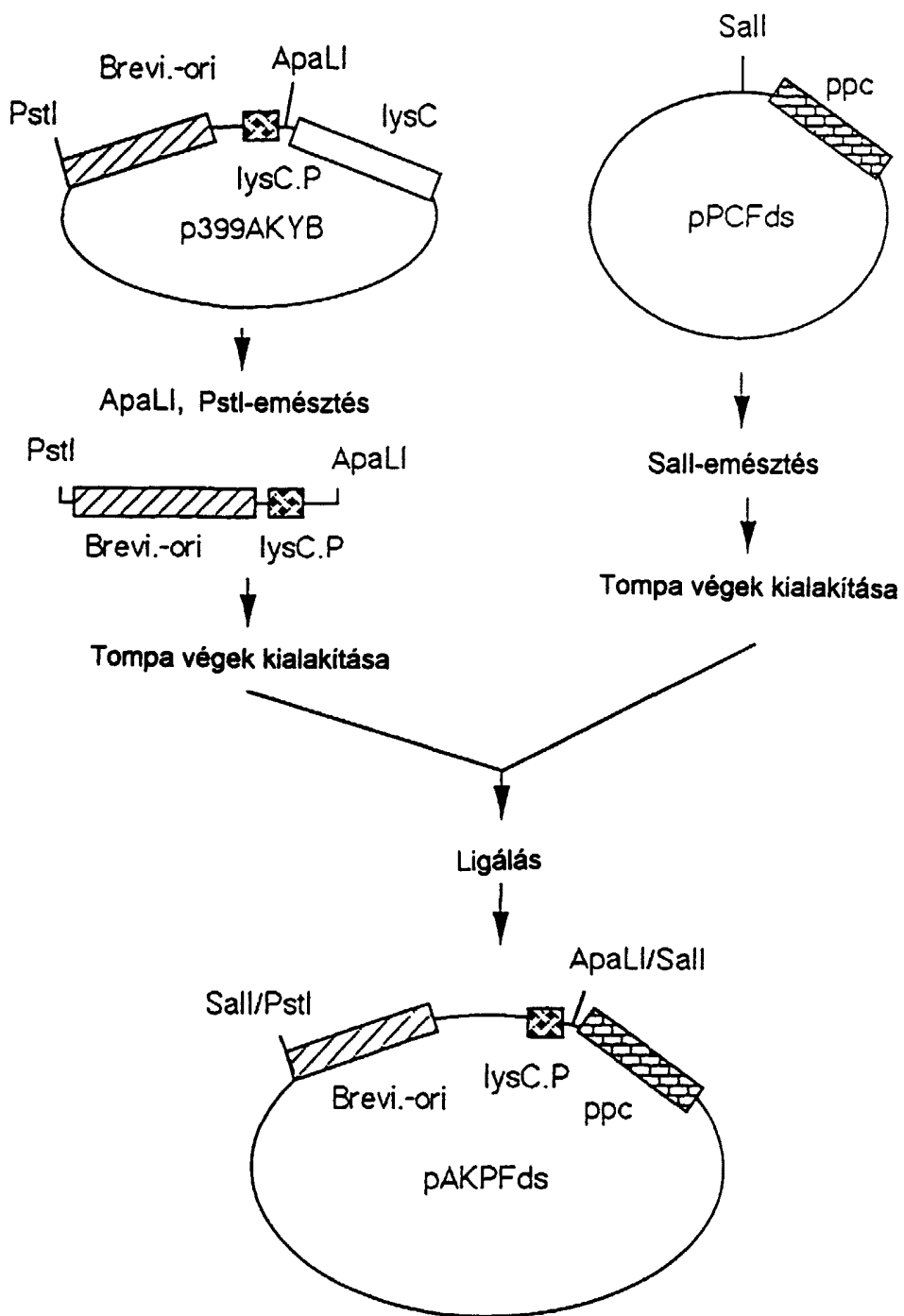
1. ábra



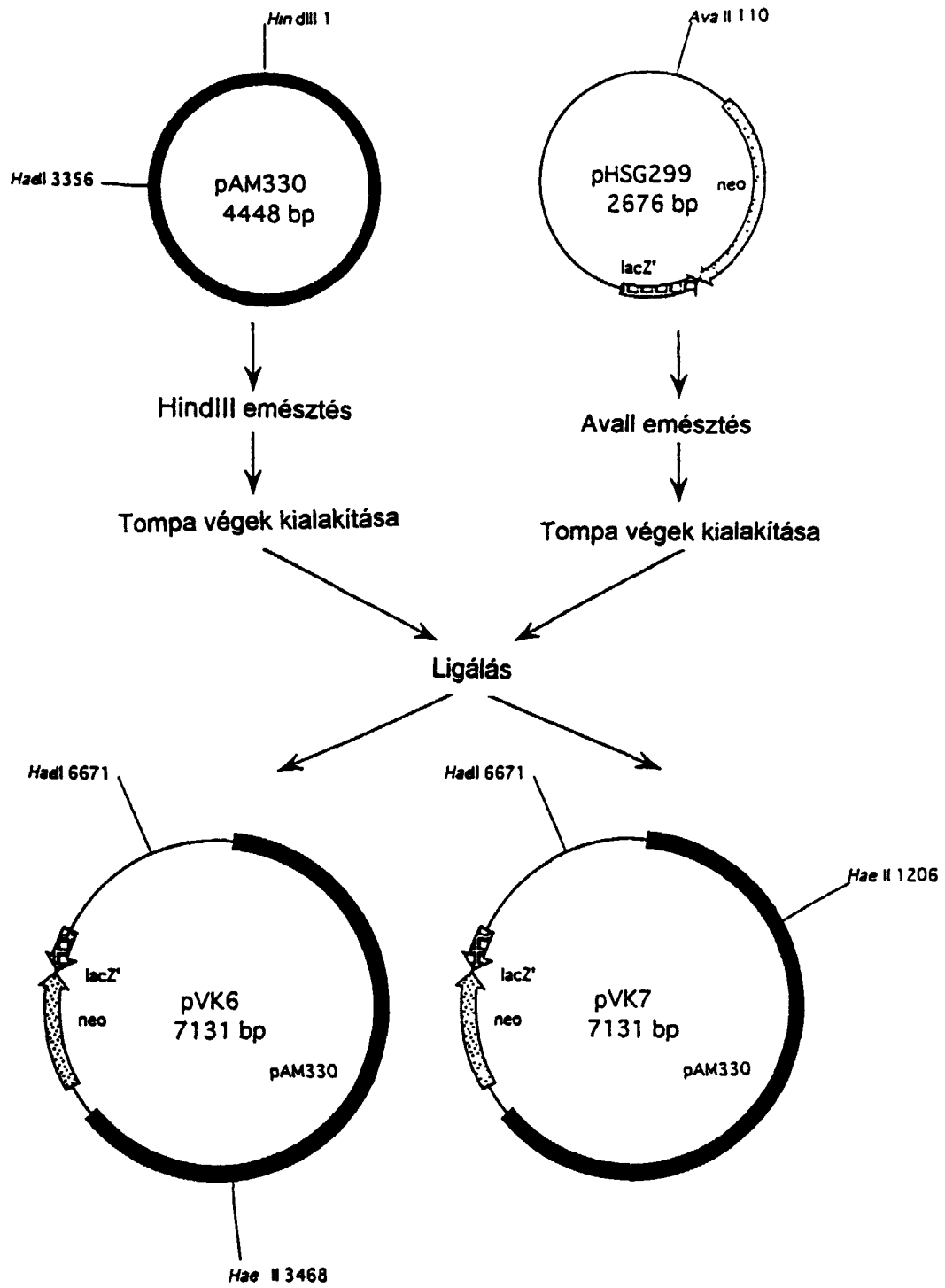
2. ábra



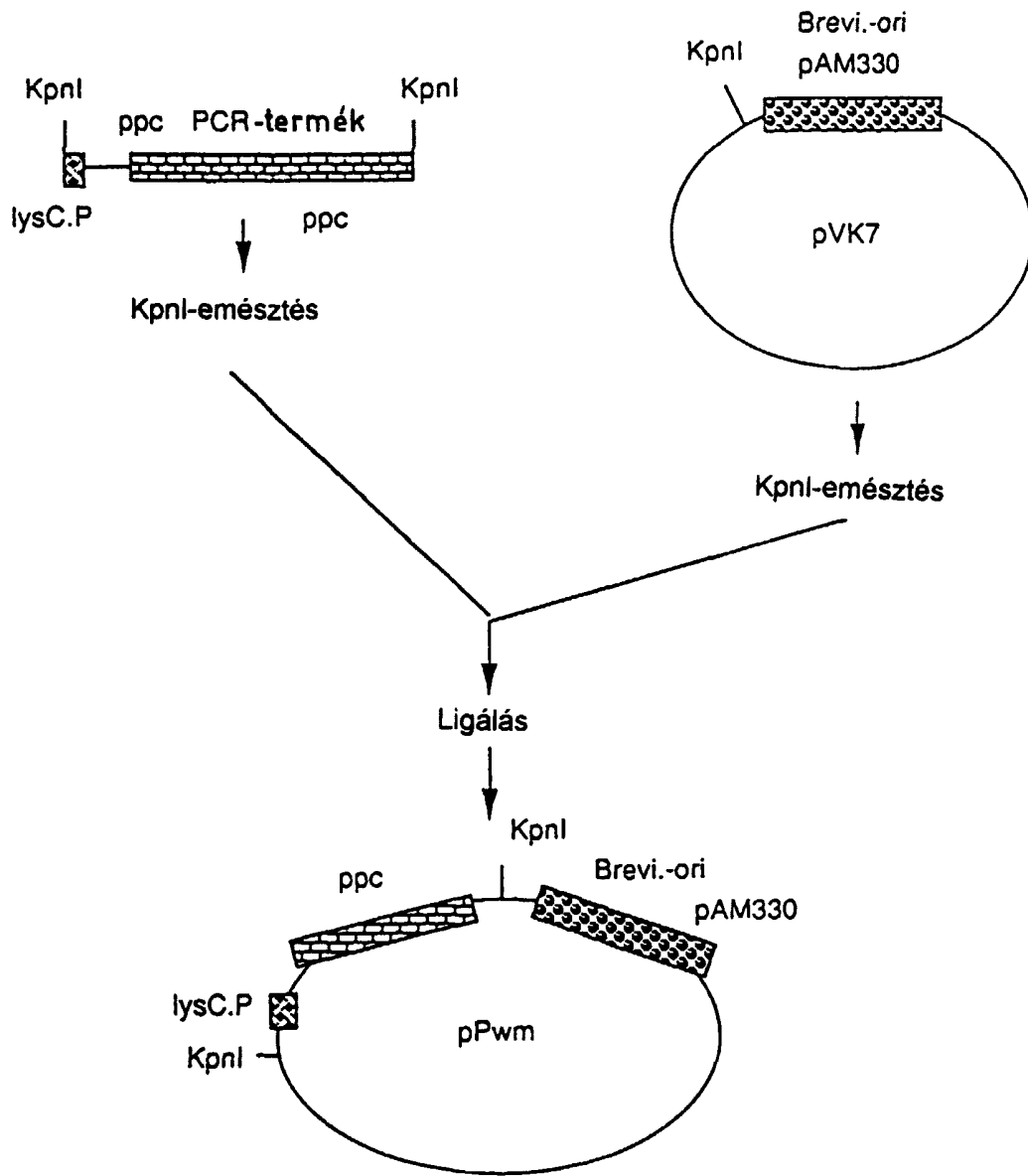
3. ábra



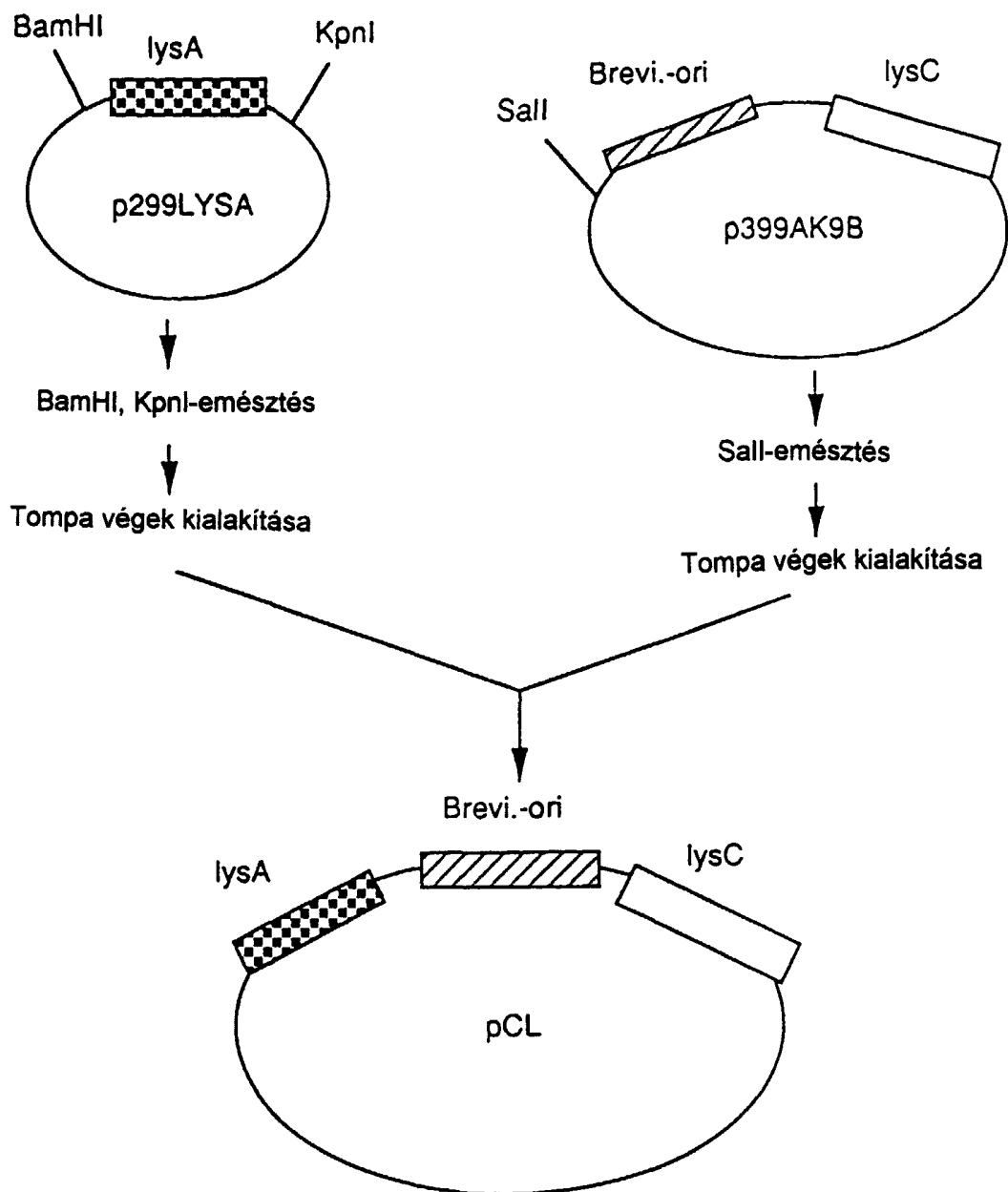
4. ábra



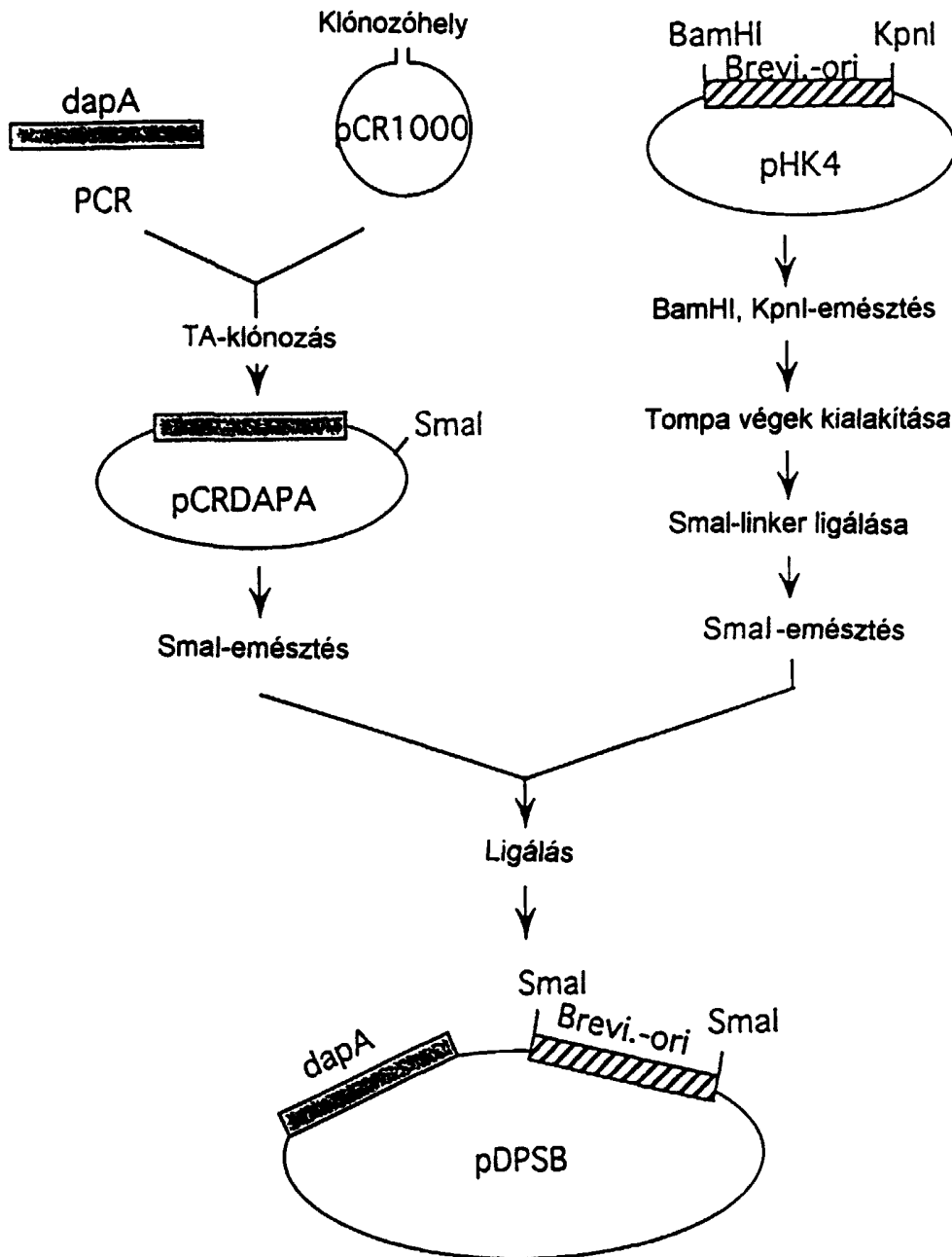
5. ábra



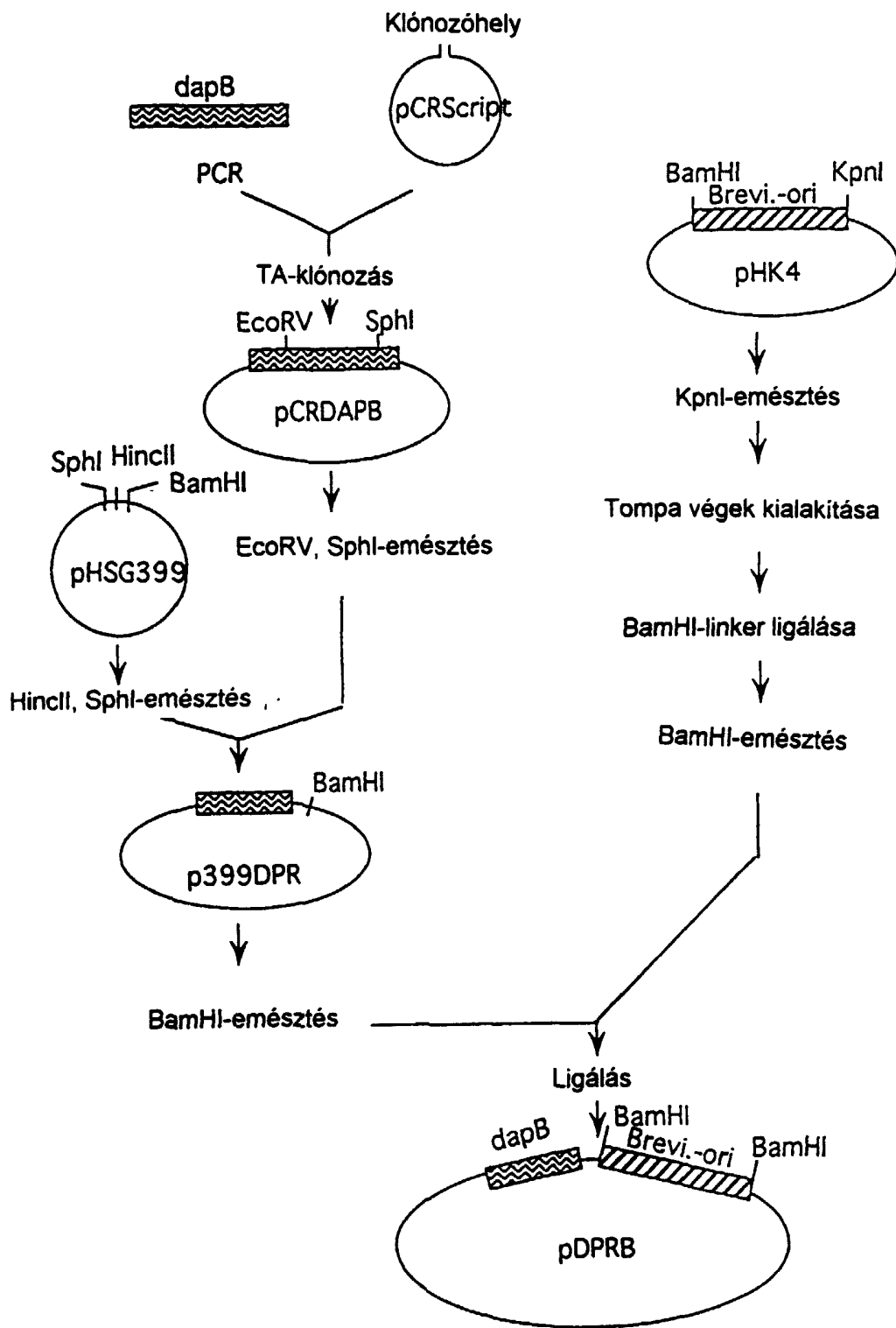
6. ábra



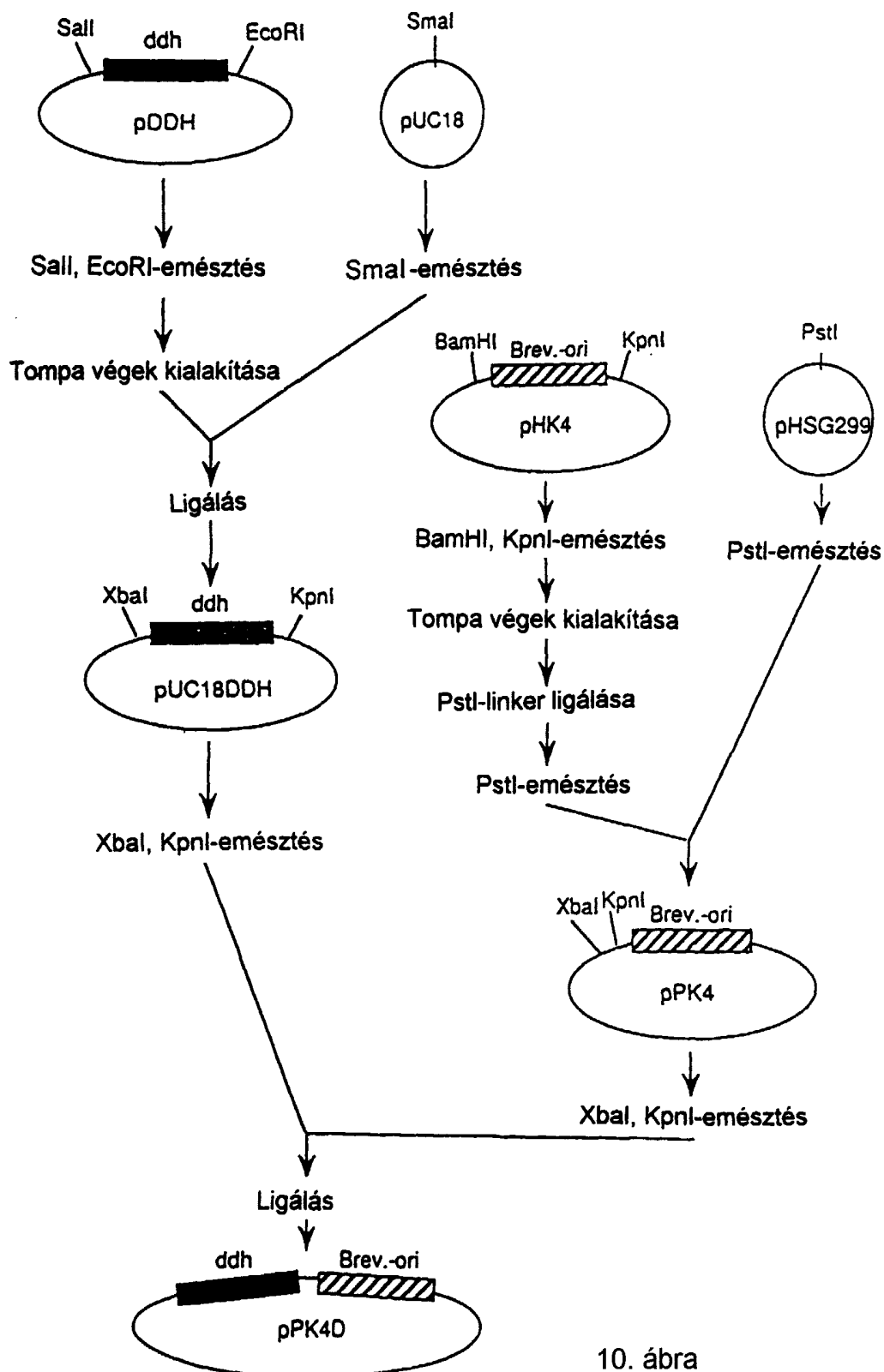
7. ábra



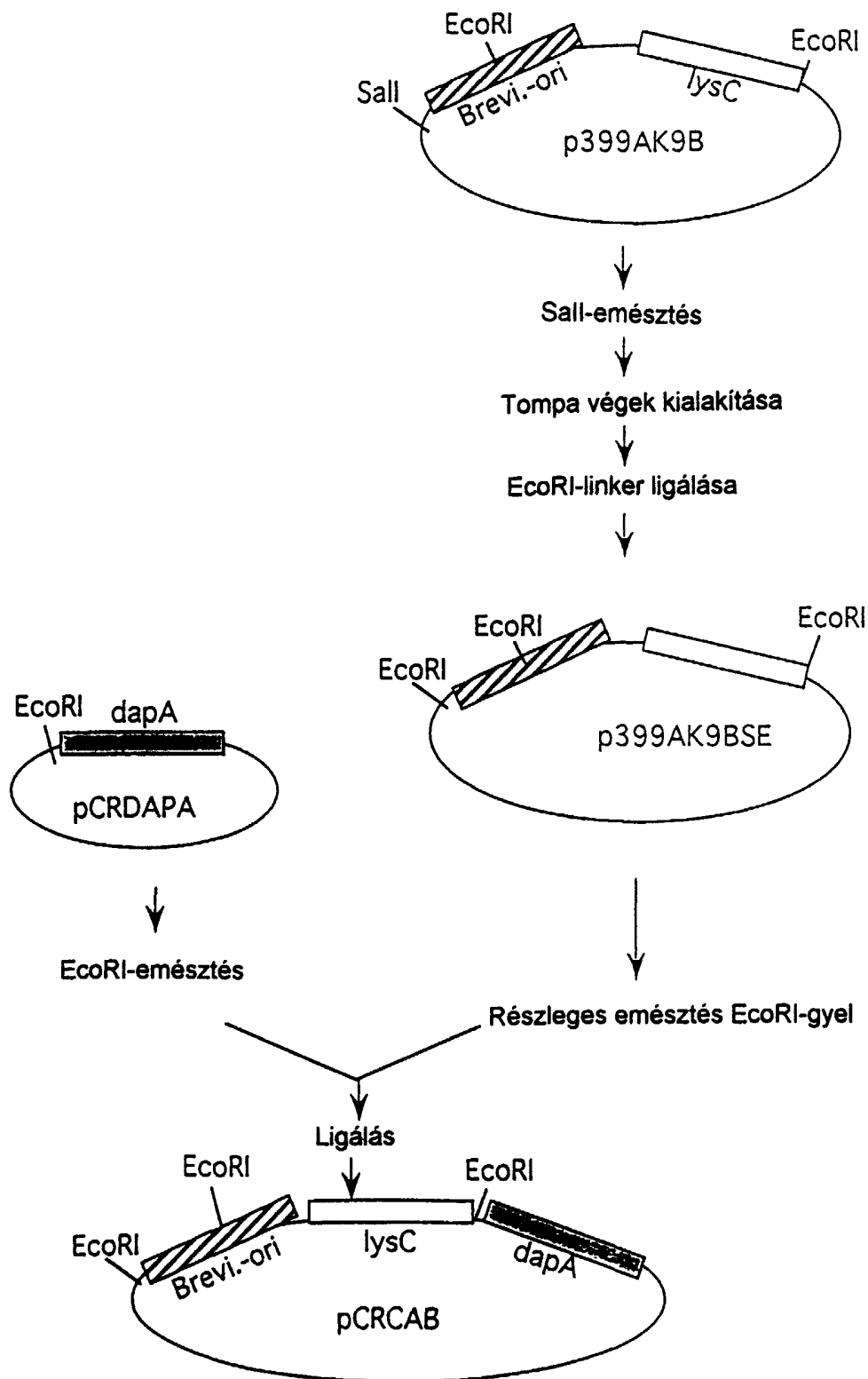
8. ábra



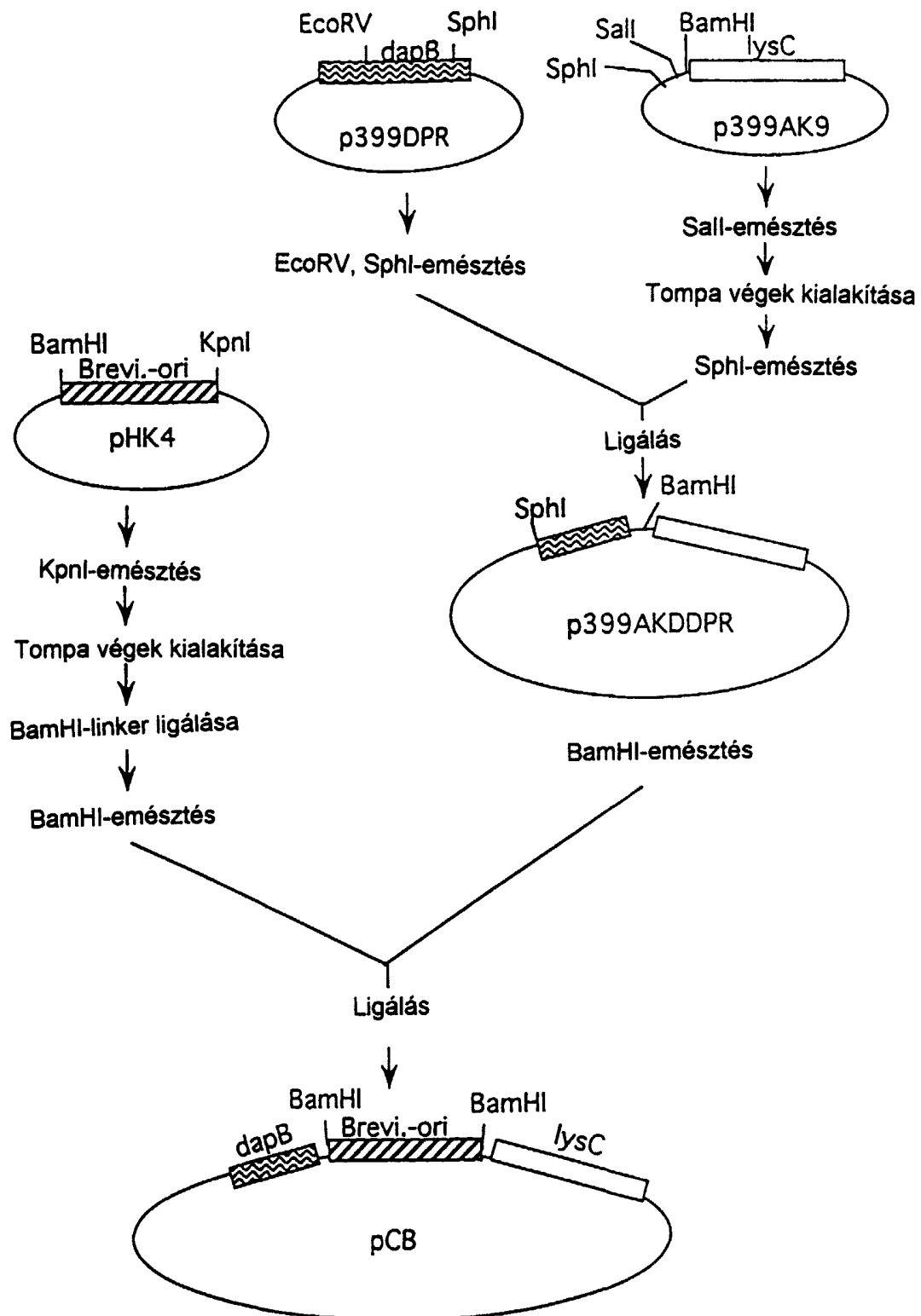
9. ábra



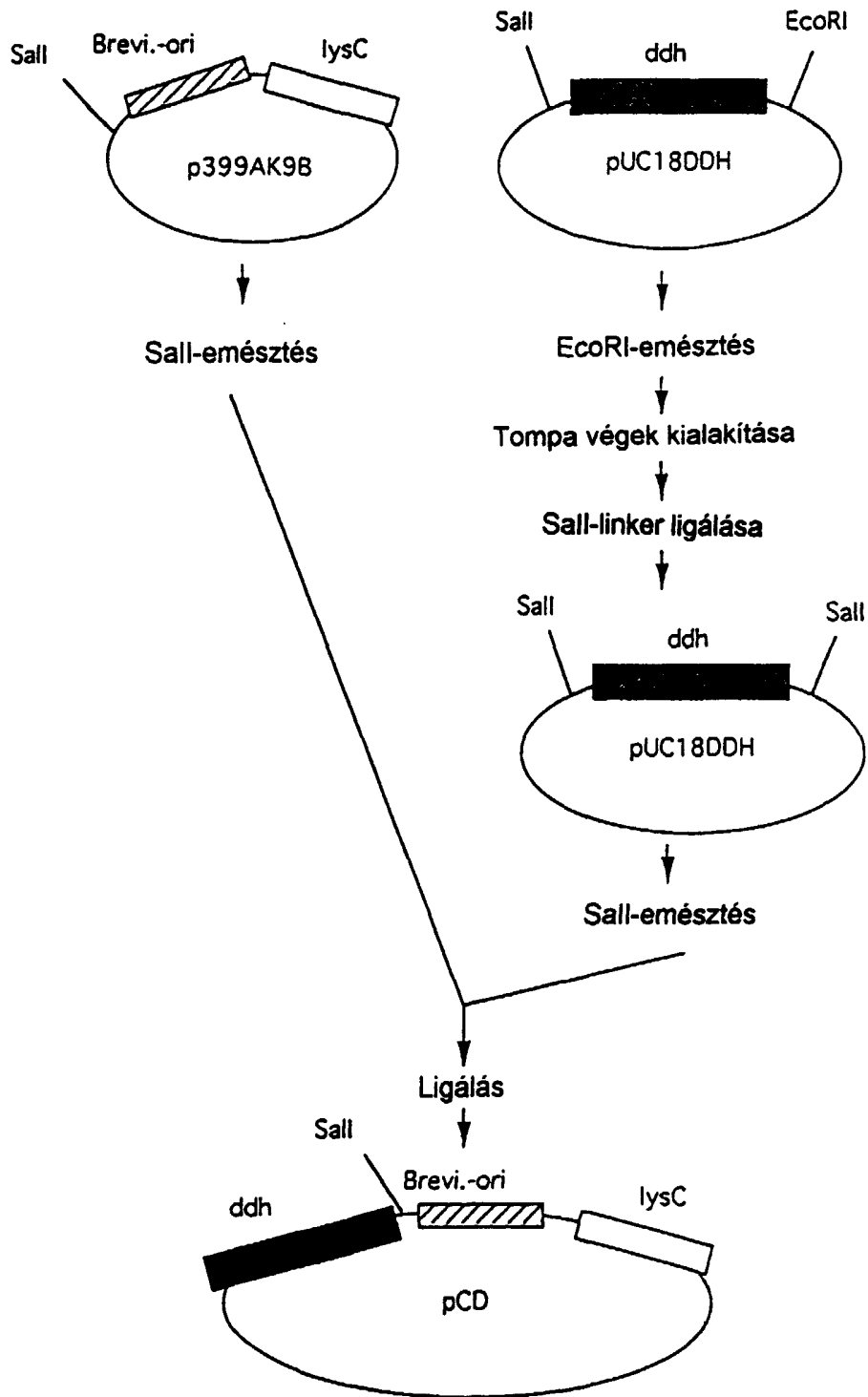
10. ábra



11. ábra



12. ábra



13. ábra