

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96180096.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1283797C

[22] 申请日 1996.12.18 [21] 申请号 96180096.8

[30] 优先权

[32] 1995.12.22 [33] DE [31] 19548222.0

[86] 国际申请 PCT/DE1996/002485 1996.12.18

[87] 国际公布 WO1997/023597 德 1997.7.3

[85] 进入国家阶段日期 1998.8.24

[71] 专利权人 于利奇研究中心有限公司

地址 联邦德国于利奇

[72] 发明人 M·维尔利克 L·艾格林

H·萨姆

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 齐曾度

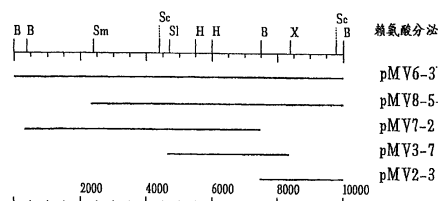
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称

通过提高外运载体的活性而进行微生物生产氨基酸的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种微生物生产氨基酸的方法。本发明涉及相应氨基酸生产微生物的相应氨基酸特异性外运载体活性和/或相应氨基酸特异性外运基因表达活性提高。根据本发明,发现了一种负责一给定的氨基酸的外运,在此基础上首次建立一种微生物生产氨基酸的方法,涉及相应氨基酸生产微生物的相应氨基酸特异性外运载体活性和/或相应氨基酸特异性外运基因表达活性提高由这种方法引起的外运载体的活性和表达的提高提高了分泌速度,从而提高了所需氨基酸的转运。



1. 微生物生产赖氨酸的方法，其特征在于，采用了具有提高的赖氨酸外运载体活性的微生物生产赖氨酸，其中该微生物具有提高的赖氨酸外运载体活性的原因，是由于按照表 2 的具有编码如表 3 中所示氨基酸的核苷酸序列的赖氨酸外运基因 LysE 的表达被提高，其中通过提高基因拷贝数来提高基因表达。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于，为了提高基因拷贝数，将外运基因构建到基因构建物中。

3. 权利要求 2 的方法，其特征在于，外运基因以低拷贝数构建到载体中。

4. 权利要求 2 或 3 的方法，其特征在于，外运基因构建到含有列入外运基因的调节性序列的基因构建物中。

5. 权利要求 1 的方法，其特征在于，赖氨酸外运基因的表达通过调节蛋白 Lys G 调节，该蛋白具有由编码表 1 所示氨基酸序列的核苷酸序列的氨基酸序列。

6. 权利要求 5 的方法，其特征在于调节蛋白 Lys G 编码核苷酸序列包含表 2 的 954 至 82 位核苷酸。

7. 权利要求 2 或 3 的方法，其特征在于，用含有该外运基因的基因构建物转化赖氨酸生产微生物。

8. 权利要求 7 的方法，其特征在于，用含有该外运基因的基因构建物转化棒杆菌属微生物。

9. 权利要求 7 的方法，其特征在于，采用这样的微生物用于转化，所述微生物中参与赖氨酸合成的酶是脱调节的。

10. 权利要求 2 或 3 的方法，其特征在于，外运基因是从棒杆菌属微生物中分离的。

11. 权利要求 1 的方法，其特征在于，外运基因序列是通过与表 3 的序列相对仗而鉴定的。

12. 权利要求 1 的方法，其特征在于，外运基因的表达通过转录信号的加强而提高。

13. 赖氨酸外运基因 LysE，其具有表 2 所示的 1016 - 1725 位核苷酸的核酸序列或编码如表 3 中所示氨基酸的 DNA。

14. 权利要求 13 的赖氨酸外运基因 LysE，其特征在于，其调节性基

因序列 LysG 表现为编码表 1 所示氨基酸序列的核苷酸序列。

15. 权利要求 14 的赖氨酸外运基因 LysE, 其特征在于, 该调节性基因序列 LysG 表现为表 2 中 954 到 82 位核苷酸的核苷酸序列。

16. 含有权利要求 13 的赖氨酸外运基因 LysE 的基因构建物。

17. 按照权利要求 16 的基因构建物, 其另外地含有具有编码表 1 所示氨基酸序列的核苷酸序列的调节性基因序列 LysG。

18. 含有权利要求 13 的赖氨酸外运基因 LysE 或权利要求 16 的基因构建物的载体。

19. 具有低拷贝数的权利要求 18 的载体。

20. 按照权利要求 18 的载体, 其另外地含有具有编码表 1 所示氨基酸序列的核苷酸序列的调节性基因序列 LysG 或权利要求 17 的基因构建物。

21. 含有权利要求 13 的赖氨酸外运基因 LysE 或权利要求 16 的基因构建物的转化细胞。

22. 权利要求 21 的转化细胞, 含有权利要求 18 的载体。

23. 权利要求 21 的转化细胞, 其特征在于, 其属于棒杆菌属。

24. 权利要求 21 的转化细胞, 其特征在于, 该转化细胞中参与赖氨酸合成的酶是脱调节的, 赖氨酸借助于由导入转化细胞的外运基因编码的外运载体, 而转运出细胞。

25. 权利要求 21 的转化细胞, 含有权利要求 20 的载体。

26. 如权利要求 13 - 15 中任一项定义的赖氨酸外运基因 LysE 在提高微生物氨基酸生产中的应用。

27. 权利要求 26 的应用, 其特征在于, 采用来自棒杆菌的外运基因。

28. 权利要求 26 的应用, 其特征在于, 棒杆菌被用作赖氨酸生产微生物。

通过提高外运载体的活性而进行微生物生产氨基酸的方法

本发明涉及根据权利要求 1 至 20 的细菌生产氨基酸的方法，根据权利要求 21 至 26 的外运基因(Ex - portgene)，根据权利要求 27 和 28 的调节基因，根据权利要求 29 和 30 的基因构建物，根据权利要求 31 至 33 的载体，根据权利要求 34 至 40 的转化细胞，41 和 42 的膜蛋白，以及根据权利要求 43 至 48 的应用。

氨基酸具有巨大的经济价值，其中氨基酸的多种应用是：例如 L - 赖氨酸、以及 L - 苏氨酸，和 L - 色氨酸作为饲料添加剂的需要，L - 谷氨酸盐作为调味品添加剂，L - 异亮氨酸和 L - 酪氨酸在制药工业中，L - 精氨酸和 L - 异亮氨酸作为药物，或 L - 谷氨酸盐和 L - 苯丙氨酸作为精细化学品的合成的起始材料的需要。

生产上述多种氨基酸的一种优选的方法是借助于微生物的生物技术生产；因为以此种方式直接生产具有生物活性和光学活性形式的氨基酸。而且可利用简单的和廉价的原材料。作为微生物可利用谷氨酸棒杆菌和其近亲 flavam 的各亚种，和乳发酵棒杆菌的各亚种(Liebl et al., Int J System Bacteriol (1991)41 : 255 - 260)，以及大肠杆菌和其近亲细菌。

这些细菌以正常的但仅以生长所需的量生产氨基酸，因此没有过量的氨基酸形成和分泌。这是基于，在细胞中氨基酸的生物合成以多种方式调控。已知的多种可能的方法是，通过切断调控机制而提高产物之生成。在这种方法中例如通过加入氨基酸类似物以切断生物合成的有效调节。描述了一种方法，其中利用的棒杆菌菌株是 L - 酪氨酸和 L - 苯丙氨酸类似物抗性的(JP 19037/1976 和 39517/1978)。同样，还描述了一种方法，采用 L - 赖氨酸或 L - 苏氨酸类似物抗性菌株，以克服调节机制(EP 0 205 849 131, 英国专利申请 GB 2,152,509 A)。

另外还知道通过重组 DNA 技术构建的微生物，借助于克隆和表达编码不再是可反馈抑制的关键酶的基因同样地消除生物合成的调节。例如已知的一种带有质粒编码的，反馈抗性的天冬氨酸盐激酶的 L - 赖氨酸生产菌株重组子(EP 0 381 527)。同样还描述了一种带有反馈抗性 Prephenat - 脱氢酶的 L - 苯丙氨酸生产菌株重组体(JP

124375/1986, EP 0 488 424)。此外还有通过过量表达编码氨基酸合成的非反馈敏感的酶的基因, 来得到提高的氨基酸的产量。例如通过提高二氢 2.6 吡啶二羧酸合成酶而提高赖氨酸合成(EP 0 197 335)。同样地, 还有通过提高苏氨酸脱氢酶的合成而得到提高的苏氨酸形成(EP 0 436 886 A1)。

其他用以提高氨基酸产量的努力以提高中心新陈代谢的细胞初级代谢物的制备为目的。如此的有, 通过重组技术得到转酮酶的过量表达, 使 L-色氨酸、L-酪氨酸, 或 L-苯丙氨酸的提高了的产物生成成为可能。(EP 0 600 463 A2)。另外导致在棒杆菌中诱导磷酸烯醇丙酮酸羧化酶活性的降低以改善芳香族氨基酸(EP 0 333 1145)的形成。

这些用于提高产率的多种努力总体上说来其目标在于, 克服氨基酸胞质合成的限制。而另一种限制则是在原则上考虑在细胞内形式的氨基酸输出至培养基中, 所以产生这样一种个别的倾向, 提高了氨基酸的输出因而提高了氨基酸生产的经济性。这样, 通过生物素缺乏(Biotinmangel)去垢剂或青霉素处理棒杆菌, 可改善细胞通透性。然而这种分泌方式(Ausschleusehilfe)只有在谷氨酸盐生产中是奏效的, 而以此种方式不能提高其它氨基酸的合成。而且菌株的进展是: 其分泌系统的活性由于化学或物理学突变而提高。因此, 例如获得了一种谷氨酸棒杆菌菌株、它由于分泌活性的改善特别适用于 L-赖氨酸的生产(DE 42 03 320)。

所有的迄今进行的用以提高细胞内生成的氨基酸的分泌试验的特点是, 通过基于选择的无目的的或非特异的方法而偶然地提高氨基酸的流出。唯一例外的是在德国专利申请号 195 23 279.8-41 描述的方法。该方法使完全有目的的提高细胞内生成的氨基酸的分泌成为可能, 在其中, 用于氨基酸输入的编码基因的表达被提高。这种现有的方法是基于这一认识, 用于氨基酸的输出的细胞输入蛋白, 尽管事实上天然的微生物体没有过量氨基酸生成、亦无分泌, 这一认识近于为这一假说打下基础: 氨基酸转运特异性输出基因或输出蛋白质根本就不存在, 然而, 氨基酸通过其他运输系统分泌出来。

迄今已知的输出体系输出有毒的金属离子, 毒性抗生素及高分子毒素。输出体系的构成相当复杂: 一般说来是整合到细胞质膜上的膜蛋白, 然而只起到输出部分反应作用, 因而猜想就输出而言, 还必需

另外有胞质外的助蛋白。(Dinh, T. et al., 允许大分子跨葛兰氏阴性菌外膜运输的胞质外蛋白家族 J. Bacteriol. 1994, 176:3825 - 3831). 另外还知道在胞外蛋白质的 sec - 依赖输出系统中, 至少有 6 个不同的蛋白质组分是输出所必需的。本领域技术现状近乎为以下假说打下基础, 即负责氨基酸外运的, 迄今未知的系统由多个蛋白质组分构成, 即多个基因负责氨基酸外运。在赖氨酸外运缺陷突变株中, 对此的提示有多种, 参见 Vrljic 等人的描述(J.Bacteriol(1995)177 : 4021 - 4027)。

现在出乎意料地发现, 只有一种唯一的, 特异的基因负责氨基酸外运, 因而本发明第一次提出用于微生物生产氨基酸的方法。在此方法中有目的地提高相应的氨基酸生产微生物外运基因的表达和/或外运载体的活性。由这种方法导致的、提高的外运载体的表达和活性带来了提高的分泌比率, 因而相应的氨基酸外运提高了。这样经改变的微生物的在培养基中也积累相应的氨基酸的提高了的份额。

为了提高外运载体的活性, 要特别提高氨基酸生产微生物的内源基因活性。酶活性的提高可以例如下述途径达到: 通过改变催化中心而提高底物转化或通过消除酶活抑制效应。另外可以通过提高酶的合成来提高酶活性, 例如通过基因扩增或通过阻断引起酶生物合成阻遏(reprimieren)的因子。内源基因的外运载体活性优选地通过内源外运基因的突变而提高。这样的突变或者按传统的方法无目的地得到, 例如 UV 照射或者致突变剂, 或者是有目的地, 借助于基因工程方法, 如缺失, 插入和/或核苷酸改变。

外源基因表达可以通过提高基因拷贝量和/或通过增加正向影响外运基因表达的调节因子而提高。调节因子的增强优选在转录水平上完成。特别是通过转录信号的提高。这样可以例如通过改变控制结构基因的启动子存到而提高启动子的效能。或者是在完整的启动子情形之下。更换更有效能的启动子。转录亦可以通过相应地影响列入外运基因的(zugeordneren)调节基因而加强, 如下面所进一步实施的。然而, 此外还可能增强翻译, 例如提高 mRNA 的稳定性。

为提高其基因拷贝数, 应该将外运基因构建到一个基因构建物如一个载体中, 优选具有低拷贝数的载体。该基因构建物尤其含有外运基因相关的调节性基因序列、优选是增强基因表达的调节序列。特别指明的调节性序列是编码表 1 所示氨基酸序列或其等位变异的核苷酸

序列,如表 2 中从 954 至 82 位核苷酸的核酸序列的调节序列或其基本上等功能的 DNA 序列。等位变异即等功能 DNA - 序列特别包含功能性衍生物,由相应序列通过一个或多个核苷酸缺失、插入和/或替换而获得,然而其仍保持调节蛋白活性或功能甚至于更高:通过调节性基因序列的突变来影响调节蛋白与 DNA 的结合的效力,其中 DNA 是调节蛋白所调节的外运基因的 DNA,因而转译增强,基因表达提高。另外作为调节性序列,还可能将所谓“增强子”列入外运基因,增强子是在必要时,提高 RNA - 聚合酶和 DNA 之间的相互作用而提高外运基因表达。

为将外运基因构建到基因构建物中,该外运基因优选地从棒杆菌属微生物菌株中分离,用含有该外运基因的基因构建物转化相应的氨基酸生产微生物菌株,优选棒状杆菌。相应的转化基因的分离和转化按常规方法完成:当转运基因(die Transporgen)是从棒杆菌中分离和克隆时,例如外运缺陷突变体同源互补的方法是适用的(J.

Bacteriol(1995)177 : 4021 - 4027)。在不能够直接克隆结构基因的情形下,首先将载体序列插入到转运基因中,以使随后经“质粒获救”分离无活性形式的片段。本发明相关的方法特别适合于来自谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 或谷氨酸棒状杆菌黄色变种 ATCC 14067 或谷氨酸棒状杆菌乳酸发酵变种 ATCC 13869。分离该基因并以已知载体体外重组以后(App/Env Microbiol(1989)55 : 684 - 688; Gene 102(1991)93 - 98),通过电穿孔(Liebl et al (1989)FENS Microbiol letl 65 : 299 - 309)或接合(Schafer et al(1990)J Bacteriol 172 : 1663 - 1666)而完成其在氨基酸生产菌株中的转化。为进行这种转染(die Ubertragung)优选采用低拷贝数的载体。而宿主细胞则优选采用这种氨基酸生产菌,在其相应的氨基酸合成中脱调节(deregulieren)和/或含有提高的中心物质转换代谢中的组分(das Anteil)。

分离之后,可获得具有这样的核苷酸序列的外运基因:其编码表 3 所示氨基酸序列或其等位变异(die Allelvariation),即具有表 2 的 1016 至 1725 位核苷酸的核酸序列,或其基本上等功能的 DNA 序列。在此还包括上文所定义的调节性序列的等位变异及等功能 DNA 序列特别是功能性衍生物。外运基因优选地用于本发明的方法中。

具有或不具有相连结的启动子或者列入或不列入调节基因的外

运基因可以连结在一个或多个 DNA - 序列之前或之后, 因而该基因可以被包含在基因构建物之中。

通过外运基因克隆可获得这样的质粒或载体: 其含有外运基因而且 - 如上文所述 - 适合于氨基酸生产菌的转化。通过转化而获得的细胞, 优选涉及谷氨酸棒杆菌的转化细胞, 含有以可复制形式的基因 - 即染色体上的附加的拷贝, 该基因拷贝通过同源重组而整合到基因组的任意座位上和/或在质粒或载体上存在。

已知多种序列, 其编码功能未知的膜蛋白。通过本发明相关的外运基因的制备, 例如具有表 2 中 1016 至 1725 位核苷酸的核酸序列的外运基因、及相应的外运蛋白, 即例如表 1 所示氨基酸序列的外运蛋白, 可以通过序列对仗(das Sequenzvergleich)鉴定其功能为转运氨基酸的膜蛋白。如此鉴定的外运基因可以随后按本发明相关的方法用于提高氨基酸生产。

由现有技术知道膜蛋白通常有 12 个, 部分有 4 个跨膜螺旋。现在惊奇地发现、负责或适合于氨基酸外运的膜蛋白具有 6 个跨膜螺旋(见表 3 所示的外运蛋白的氨基酸序列, 其中的 6 个跨膜区用下划线标出)。因而在此关系到一种迄今未被描述, 因而是一种新的膜蛋白。

实施例

a) 从谷氨酸棒杆菌中克隆外运基因和调节子

如 Scharzer 等人所述(FEMS Microbiol Lett(1989)65 : 299 - 304)从谷氨酸棒状菌 R127 中分离染色体 DNA。将其用限制酶 Saa 3A 酶切, 并如 Sambroo 等人(分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室出版社)所述通过蔗糖梯度离心拆分。将个别级分电泳, 以分析其大小, 将大约 6 - 10kb 片段大小的片段用于与载体 PJC₁ 连接。为此将载体 pJC₁ 用 BamHI 线性化和脱磷酸化。以此种 5ng 载体与 20ng 染色体 6 - 10kb 片段连接。将全部连接混合物通过电穿孔(FEMS Microbiol Lett(1989)65 : 299 - 304)转化外运缺陷型突变株 NA8 (J Bacteriol(1995) 177 : 4021 - 4027)。转化子将在含 15μg 卡那霉素/ml 的 LBHIS(FEMS Microbiol Lett(1989)65 : 299 - 304)上筛选。将这些转化子进行大规模质粒分析获得的总共 4500 个克隆中有 200 个先行筛选。确实其质粒的有无和大小。平均约有一半研究的卡那霉素抗性克隆带有平均大小为 8kb 的插入片段的重组质粒。因此在建立的基因

文库中,来自谷氨酸棒杆菌的任一X基因的出现几率是0.96。将4500个获得的转化子的每一个就其赖氨酸分泌的重新获得进行研究。就此采用Vrljic描述系统用于在谷氨酸棒状菌中诱导L-赖氨酸外泌(J Bacteriol(1995)177:4021-4027)。为此制备所谓的基本培养基指示平板,每升含有20g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5g 尿素, 1g KH_2PO_4 , 1g K_2HPO_4 , 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 42g 吗啉代丙磺酸, 1ml CaCl_2 (1g 1100ml), 750ml 蒸馏水, 1ml cg Spurensalze, 1ml 生物素(20mg/100l), pH7, 4% 葡萄糖, 1.8mg 原儿茶酸(Protocatechuic acid), 1mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02mg CaSO_4 , 0.002mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20g 琼脂, 及 10^7 细胞 1ml 赖氨酸营养缺陷型谷氨酸棒杆菌突变株 49/3 借助于牙签将所有起始 4500 个转化子点到指示平板上,用起始的不外泌的 NA8(J Bacteriol(1995)177:4021-4027)和起始菌株 R127。平行接种 2 个平板其中只有一个含有追加的 5mm L-甲硫氨酸,以诱导赖氨酸外泌。指示平板在 30℃ 温孵,在 15、24 和 48 小时观察。总共获得 29 个在加入甲硫氨酸培养基上,通过指示菌株 49/*-+/3 显示了生长场所(Wachstumshof)的克隆。这些克隆将个别的,亦是再次的如上文所述证实生长场所的再次获得,用此方法得到了两个克隆 NA8 pMV8-5-24 和 NA8 pMV6-3,其具有重新获得的赖氨酸分泌的能力。

如 Schwarzer 等人所述(Biol Technology(1990)9:84:87)从这些克隆中进行质粒制备。通过重新转化到 NA8 中,证实了 L-赖氨酸流出的质粒相关效应,这两个质粒将经限制性分析。质粒 pMV8-5-24 带有 8.3kb 的插入片段, pMV6-3 带有 9.5kb 的插入片段。插入片段的物理图谱见图 1 所示。

b)DNA-片段的亚克隆,该片段重构了赖氨酸外运

从质粒 pMV6-3 的插入片段利用确定的限制性酶切位点产生一个亚克隆。因此将 3.7kb Xho I-SalI-片段, 2.3kb BamHI 片段和 7.2kb BamHI 片段与相应酶切和处理的 pJC₁ 载体(Mol Gen Genet(1990)220:478-480)连接。用连接产物直接转化谷氨酸棒杆菌,如上述方法就赖氨酸外泌的重新获得检测转化子,通过质粒制备和限制性分析验证该亚克隆的存在。借助于此种方法,获得具有质粒 pMV2-3 较小亚克隆的菌株(各 1),这些菌株含有作为来自 pMV6-3

的 2.3kb BamHI 片段的将赖氨酸外运介导其中的片段。

c) 赖氨酸外运基因 Lys E 和其调节子 Lys G 的序列测定

按 Sanger 等人的双脱氧链中止法进行 2.3kb BamHI 片段的核苷酸测序(Proc Natl Acad Sci USA(1977) 74 : 5463 - 5467), 用 Pharmacia 自动读序测序试剂盒进行测序反应(Uppsala, Sweden)。用 Pharmacia - LKB(Piscataway, NJ, USA)的自动激光 - 荧光 DNA 测序仪(A.I.F)进行电泳分析。获得的核苷酸序列用德国癌症研究中心(Heidelberg)的 HUSAR(Release 3.0)软件包进行分析。核苷酸序列及分析的结果在表 2 中复述。该分析结果给出了该测序的 DNA 片段的两个全长的开放的读码框架(ORF)。ORF₁ 编码长度为 236 个氨基酸的一个蛋白质, ORF₂ 编码长度为 290 个氨基酸的蛋白质。从 ORF₁ 推导出的蛋白质显示出有大量的疏水氨基酸, 这正是膜结合蛋白的特征。表 3 中给出了用 PHD · HTM 软件程序(Protein Scienc(1995)4 : 521 - 533)详细分析的亲水和疏水氨基酸的分配。由此得出结论, 该蛋白质含有穿越膜的 6 个疏水螺旋区(das Helixbereich)。该蛋白质涉及所研究的氨基酸 L - 赖氨酸的外运。相应的基因在以下称为 lys E。相应地在表 2 中标出。ORF₂ 以与 ORF₁ 相反的方向转录。序列分析表明, ORF₂ 与构成了一个家族的调节基因有高度的同一性(Aun Rev Microbiol(1993)597 - 626)。该家庭的基因调节多种以正调节方式参与合成代谢与分解代谢过程的基因的表达。下文中将 ORF2 称为 lys G(Govern=Regulieren)。由于翻译(die Zuoranang), 以及因为 lys EZ 只能与 lys G 一起克隆(见 a)和亚克隆(见 b), lys G 是 lys E 的调节子, 同样参与赖氨酸外运。lys G 及其推导的氨基酸序列在表 2 及表 1 中给出。

d) 通过序列对仗鉴定一个来自大肠杆菌的未知膜蛋白

借助于表 3 的建立的序列, 对现有的序列文库进行搜寻, 以对于从序列区域推导的蛋白质进行功能划分。相应地将来自谷氨酸棒杆菌的赖氨酸外运的氨基酸序列, 借助于德国癌症研究中心(Heidelberg)的 HUSAR 软件包(Release 3.0), 与所有其中贮存的 DNA 序列推导出的蛋白质 - 序列进行对仗。来自于大肠杆菌的一个迄今未知功能的序列显示了 39.3% 同一的氨基酸, 和 64.9% 类似的氨基酸的高度同源性。对仗在图 2 中给出。这个来自大肠杆菌的迄今未被表征的开放读

码框架用此种方法被鉴定为氨基酸外运基因。

e) 提高细胞内积累的 L 赖氨酸的外运

用质粒 pMV2-3 转化菌株谷氨酸棒杆菌 NA8(J Bacteriol(1995)177 : 4021 - 4027)并比较菌株的 L - 赖氨酸的外泌。因而将 NA8 和 NA8 pMV2-3 先培养在如 Vrljic 等人(J Bacteriol(1995)177 : 4021 - 4027)描述的复合培养基, 然后分别接种发酵培养基 CGXII(J Bacteriol(1993)175 : 5595 - 5603)。该培养基含有补加的 5mM L - 甲硫氨酸, 以诱导细胞内 L - 赖氨酸合成。于 30℃ 140Upm 将床培养 24 小时后, 对胞内和胞外的 L - 赖氨酸进行测定。为了胞内测定进行硅油离心(die Silikonolzentrifagation)(Methods Enzymology LV(1979)547 - 567); 用高压液相色谱进行氨基酸测定(J Chromat(1983)266 : 471 - 482)。如图 3 所示, 该测定在不同时间点进行。根据所利用的方法, 积聚的细胞内的 L - 赖氨酸通过 pMV - 2 的增殖分泌和积累。据期细胞内现有的 L - 赖氨酸被强烈地减低。因而提出了一种利用已发现和描述的外运基因的方法, 对 L - 赖氨酸形成进行关键性的改进。

f. 通过 LysE 或 LysEG 提高 L - 赖氨酸的积累

含有 pJC₁ 中的定序为 2374bp BamHI 片段的亚克隆 pMV2 - 3 与相应的, pZ₁ 中载有 lysE 的 1173bp PvuII - HindII 片段的序列信息 CApp(Env Microbiol(1989)55 : 684 - 688)连接, 因而获得质粒 plysE。该质粒, 以及载有 LysE LysG 的质粒 pMV2 - 3 通过电穿孔导入谷氨酸棒杆菌菌株 d, 该菌株的染色体区域是缺失的。获得的菌株谷氨酸棒杆菌 d pMV2 - 3。谷氨酸棒杆菌 d plysE, 谷氨酸棒杆菌 pJC₁ 将如 e)中所述首先在复合培养基上生长, 然后在补加了 4% 葡萄糖和 5mM 的 L - 甲硫氨酸的生产基本培养基 CGXII 中培养, 且取样以测定积累的 L - 赖氨酸。如图 4 所示, 通过 LysE LysG 与对照相比较, 赖氨酸的积累提高了。通过这种方法, plysE 达到非常高的, 4.8 至 13.2mML 赖氨酸的积累。

图表说明:

表 1: 来自谷氨酸棒杆菌的赖氨酸外运 - 调节子的氨基酸序列, 具有 DNA - 结合蛋白的典型的螺旋 - 转折 - 螺旋基序。

表 2: (3 页):谷氨酸棒杆菌的赖氨酸外运和赖氨酸外运 - 调节子编码区

核苷酸序列。

表 3: 谷氨酸棒杆菌的赖氨酸外运的氨基酸序列, 具有鉴定的跨膜螺旋 TMH1 至 TMH6。

图 1: 在 pMV6-3 和 pMV8-5-24 中的通过克隆获得的 DNA 片段, 其起到赖氨酸分泌的作用, 以及从 pMV6-3 制备的亚克隆 pMV-2-3, 其亦起赖氨酸外泌作用并测序。B, BamHI; Sm, SmaI; SC, Sac I; Sl, Sal I; H, HindII; X, XbaI。

图 2. 来自谷氨酸棒杆菌的 LysE 的推导的氨基酸序列(上), 与来自大肠杆菌的迄今功能未知的基因产物(下)的对仗, 后者借此被鉴定为外运蛋白。

图 3. 通过 pMV 2-3 而对于谷氨酸棒杆菌 NA8 的赖氨酸外运的提高。上, 对照具有较小的赖氨酸外泌和大约是 150mM 的胞内积累。下, 通过 pMV2-3 的作用, 而有较高的外泌, 和胞内较低的大约 30mM 的积累。

图 4: 谷氨酸棒杆菌中, 通过 lysE lysG (pMV2-3) 造成的赖氨酸积累的提高(中间曲线)、及 LysE(plysE)造成的积累(上面曲线)。

表 1

1	MNPIQLDTLL	SIIDEGSFEG	ASLALSISPS	AVSQRVKALE	HHVGRVLVSR
				螺旋 - 转折 - 螺旋 - 基序	
51	TQPAKATEAG	EVLVQAARKM	VLLQAETKAQ	LSGRIAEIPL	TIINADSL
101	TWFPPVFN	EV	ASWGGATLTL	RLEDEAHTLS	LLRRGDVLGA
					VTREANPVAG
151	CEVVELGTNR	HLAIATPSLR	DAYMVDGKLD	WAAI4PVLRF	G
					PKDVLQDRDL
201	DGRVDGPVGR	RRVSIVPSAE	GFGEAIRRGL	GWGLLFETQA	AFMLKAGEVI
251	LLDEIPIDTP	MYWQRWRLES	RSLARLTDAV	VDAPIEGLRP	

GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCGCTTCTTCACTTTTGG	60
GGACTTGGAAGTCTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG	120
- P R L G E I A A D V V A	
CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA	180
D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T	
CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTCAAC	240
D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q	
CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTTGGAAGGCG	300
T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A	
GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG	360
S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D	
TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCCCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC	420
R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L	
AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCCGCGTA	480
K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M	
CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG	540
T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G	
ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTCTTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTGCGGTCGCA	600
L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T	
CTCGCAACGAGGTGGGGTTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC	660
L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L	
GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG	720
S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A	
AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTTGAAGTGGGCG	780
K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A	
AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC	840
E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L	
TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTCCGCGGAAG	900
A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E	

表 2

```

CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5'
5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT
  F S G E D I I S L L T D L Q I P N M
                                     <---LysG
                                     960
ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT
                                     M V
                                     LysE--->
                                     1020
GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG
  I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G
                                     1080
ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTGCGGTTCT
  P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L
                                     1140
TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTGTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT
  L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L
                                     1200
TTTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT
  L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L
                                     1260
GTTATGGTTTGGCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA
  L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q
                                     1320
GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTTCGGCGGT
  I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V
                                     1380
GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG
  A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W
                                     1440
GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA
  V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D
                                     1500
CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTCTGGCGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT
  A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F
                                     1560
CGCCGCTGGCGCGTTCGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC
  A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A
                                     1620
AGCATTGTCACGCCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC
  A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A
                                     1680

```

表 2 (续)

```

. 1740
      / orf3
      - N E R T K
5'   CTACTGGCGTAACCGGTAGTTTGACTACAACCTACCCAATCAAAAGCGCCCAAAA
AGTTGTGATGACCGCATTGGCCATCAAACCTGATGTTGATGGGTTAGTTTTCGCGGG 5'
V V M T A L A I K L M L M G -
      Lyse /

. 1800
CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACAACCTACGGCCGCAGCACCCCTTTAGAGTAGCTAGCG
S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

. 1860
GAGGTTGAGCCGCGAGTCTTTTGAGGTTCAACAACCTCACTTAGTTCGACAACAGGTCGAC
E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

. 1920
GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGACCAGTGCCATAGGCGCGGCATGAGAGGAAC
E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

. 1980
GAGCGCGTCGTGGGTACGTTTCGCGGTAGACGCGTTCCTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

. 2040
CAGTAACTCGAACGCCTGGTATAGTTATAACAAGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

. 2100
GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACTCGTC
K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

. 2160
CGGGACGCGTTACCACTCTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAACAACCGTCGACTGACGTT
G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L

. 2220
GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P

. 2280
GACTACTTAGTCTTCGCCCCTCGGGAGGAGGCGGTACTTGAGTCGGCGGAGGCGACACTC
Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

. 2340
GAGACCTGGCATCCTTCTTTATGGGTGCATTTCTCGGAAAGGTCTGCGTTGTTACAGTGC
E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

. 2374
      <-orf3/
GTTACGCATGTACCAAAGAAGGTTTCCTCATAGA
L A Y M T E E L P T D

```

表 2 (续)

表 3

1	<u>MVIMEIFITG LLLGASLLS IGPQNVLVK QGIKREGLIA VLLVCLISDV</u>	TMH1	TMH2
51	<u>ELFIAGTLGV DLLSNAPIV LDIMRWGGIA YLLMFAVMAA KDAMTNKVER</u>	TMH3	
101	PQIIETEPT VPDDTFLGGS AVATDTRMRV <u>RVEVSVTKOR VVVKPMLMAI</u>		
151	<u>VLTWLNPNAV LDAFVFIGGV GAQYGDTPW IFAAGAFAS LIWFPLVGEG</u>	TMH4	TMH5
201	<u>AAALSRPLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KLMLMG</u>	TMH6	

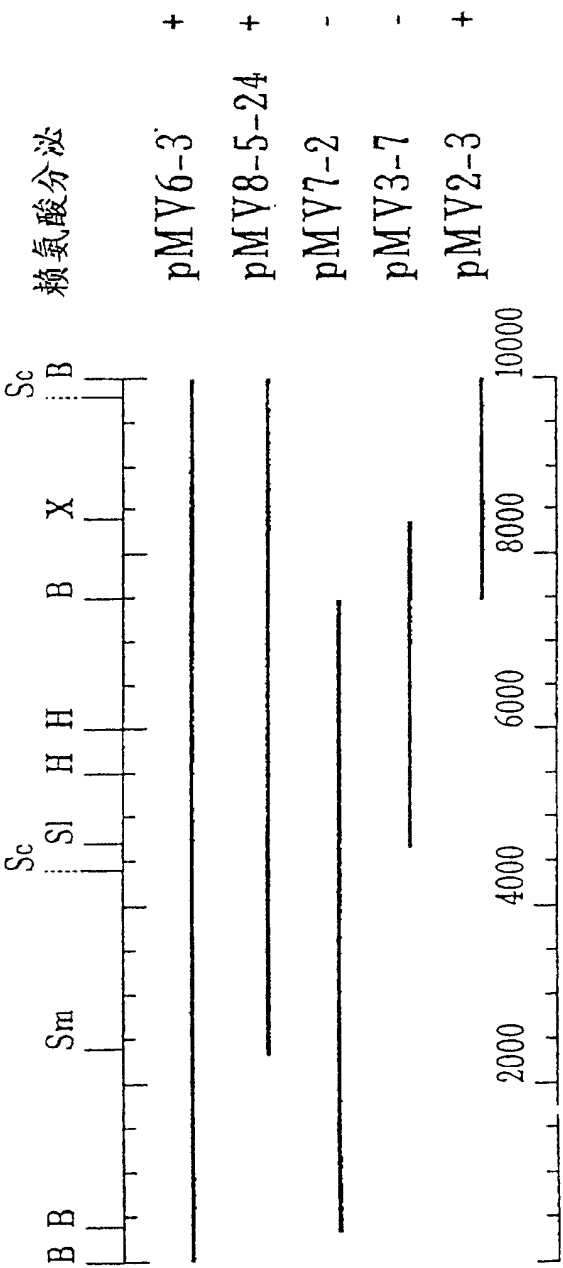


图1

图 2

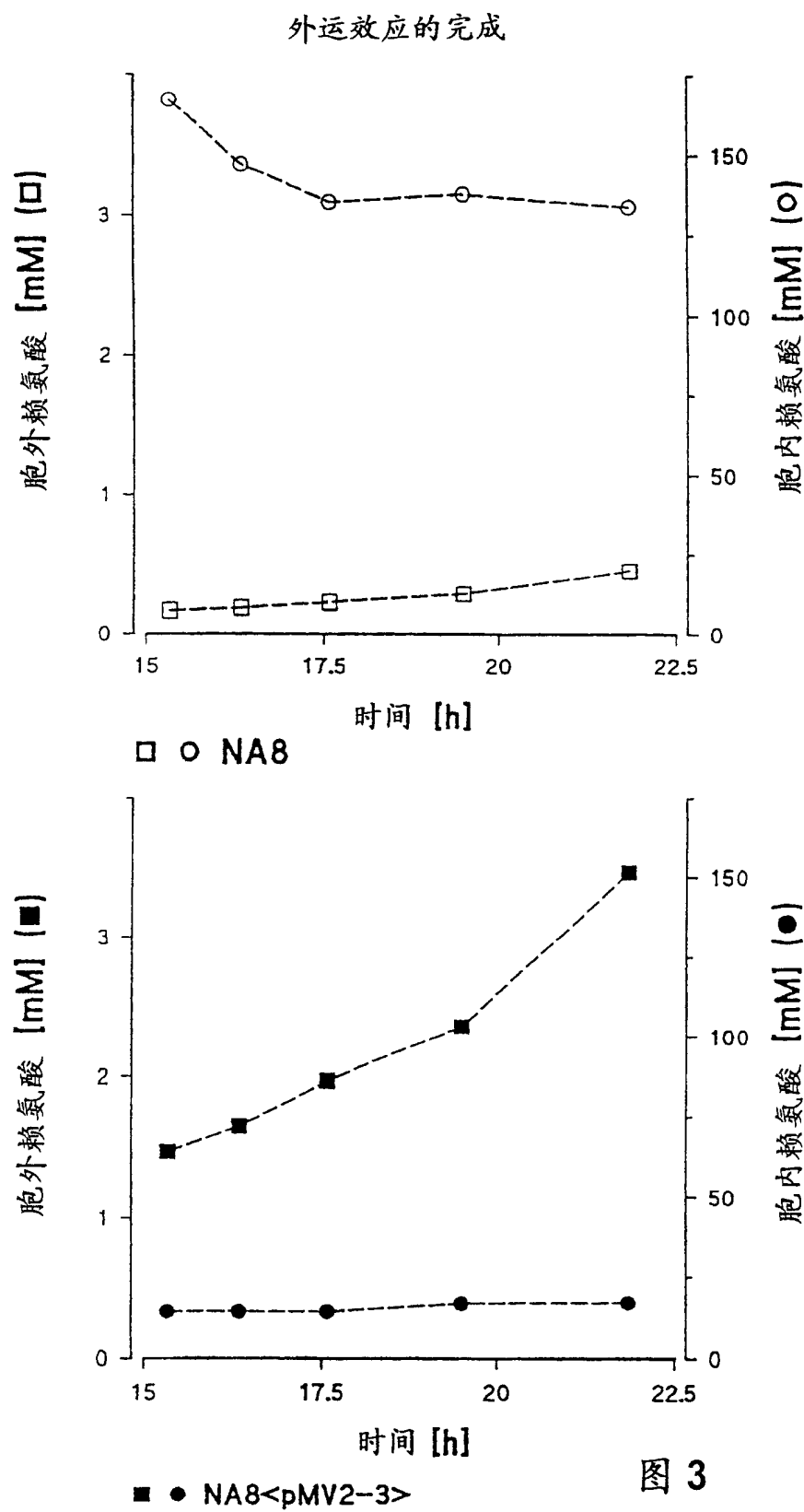


图 3

