

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-169595

(P2017-169595A)

(43) 公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 13/10 (2006.01)	C 1 2 P 13/10 Z N A B	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 請求項の数 5 O L 外国語出願 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2017-132669 (P2017-132669)	(71) 出願人	513212442
(22) 出願日	平成29年7月6日 (2017.7.6)		シージェイ チェイルジェダン コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2016-510620 (P2016-510620) の分割		C J C H E I L J E D A N G C O R P O R A T I O N
原出願日	平成26年4月23日 (2014.4.23)		大韓民国 ソウル チュング ドンホーロ 330 シージェイ・チェイルジェダン・センター
(31) 優先権主張番号	10-2013-0044723		C J C h e i l j e d a n g C e n t e r , 3 3 0 , D o n g h o - r o , J u n g - g u , S e o u l , R e p u b l i c o f K o r e a
(32) 優先日	平成25年4月23日 (2013.4.23)	(74) 代理人	100108453
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

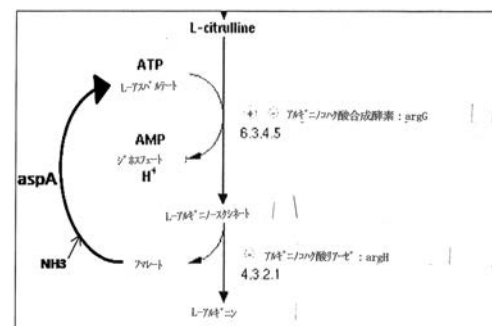
(54) 【発明の名称】 L-アルギニン産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物およびこれを用いたL-アルギニンの産生方法

(57) 【要約】

【課題】本発明の目的は、L-アルギニンの産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供することである。本発明の他の目的は、前記コリネバクテリウム属微生物を用いてL-アルギニンを産生する方法を提供することである。

【解決手段】本発明は、アスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が強化されてL-アルギニン産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物および前記コリネバクテリウム属微生物を用いてL-アルギニンを産生する方法に関する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アスパラギン酸アンモニアリアーゼ及びアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が強化された、L - アルギニン産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を培養培地で培養するステップと、

前記培養によって得られる培養培地から L - アルギニンを分離するステップと、
を含む、L - アルギニンを産生する方法。

【請求項 2】

前記アスパラギン酸アンモニアリアーゼは、コリネバクテリウム属微生物またはエシェリキア属微生物に由来するものである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記アスパラギン酸アンモニアリアーゼは、配列番号 2 1 または配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アスパラギン酸アミノ基転移酵素は、配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記コリネバクテリウム属微生物は、コリネバクテリウムグルタミカムである、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、L - アルギニン産生能が向上した組み換えコリネバクテリウム属微生物およびこの微生物を用いて L - アルギニンを産生する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

L - アルギニンは、植物の種子やニンニク中に遊離状態で含有されており、アミノ酸類強化剤としても用いられ、医薬品、食品などにも広く用いられる。医薬用には、肝機能促進剤、脳機能促進剤、男性不妊治療剤、総合アミノ酸製剤などに用いられており、食品用には、かまぼこ添加剤、健康飲料添加剤、高血圧患者の食塩代替用に最近脚光を浴びている物質である。

30

【0003】

コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属微生物は、環状段階経路を通じて L - アルギニンの生合成が行われ、L - アルギニンは、L - グルタメートから N - アセチルグルタメート (N - acetylglutamate)、N - アセチルグルタミルホスフェート (N - acetylglutamyl phosphate)、N - アセチルグルタメートセミアルデヒド (N - acetylglutamate semialdehyde)、N - アセチルオルニチン (N - acetylornithine)、オルニチン (ornithine)、シトルリン (citrulline) およびアルギノスクシネート (argininosuccinate) を経て合成される。

40

【0004】

また、コリネバクテリウムグルタミカムは、細胞内のアルギニンによってフィードバック阻害を受けることが知られており (Vehary Sakanyan, et al, Microbiology, 142: 9 - 108, 1996)、高い歩留まりの L - アルギニンを産生するのに限界があることが報告されている。

【0005】

池田らは、アルギニンの発酵に際して発酵培地の上にシトルリンが蓄積されることを報告した (Appl Environ Microbiol. 2009 Mar; 75 (6): 1635 - 41. Epub 2009 Jan 9)。

【0006】

50

前記生合成過程において、シトルリンはアスパルテートと結合してアルギノスクシネートとなり、フマレートを放出してアルギニンとなる。ここで、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ (aspartate ammonia-lyase、aspA) は、フマレート及びアンモニアからアスパルテートを合成する酵素であり (図1)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate amino transferase、aspB) は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アミノ酪酸などの様々なL-アミノ酸からアミノ基を α -ケトグルタル酸、 α -ケトイソ吉草酸などのケト酸に転移させることにより様々なL-アミノ酸を合成する触媒の機能を有する酵素である。

【0007】

メンケルらは、大腸菌のaspAをユリネ型微生物に取り込んだ場合、アスパルテートの利用性が増加してL-リシンの産生が増加すると報告した (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 1989, p. 684-688)。

10

【0008】

そこで、本発明者らは、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ酵素および/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素の発現を強化させてシトルリンと結合するアスパルテートの流入を増やすことにより、L-アルギニンの産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供することができるということを見出し、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0009】

【非特許文献1】Vehary Sakanyan, et al, Microbiology, 142:9-108, 1996

【非特許文献2】Appl Environ Microbiol. 2009 Mar; 75(6):1635-41. Epub 2009 Jan 9

【非特許文献3】APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 1989, p. 684-688

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

30

本発明の目的は、L-アルギニンの産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供することである。

【0011】

本発明の他の目的は、前記コリネバクテリウム属微生物を用いてL-アルギニンを産生する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記目的を達成するために、本発明は、アスパラギン酸アンモニアリアーゼの活性が強化されてL-アルギニン産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供する。

【0013】

40

また、本発明は、前記コリネバクテリウム属微生物を培養してL-アルギニンを産生する方法を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明は、アスパラギン酸アンモニアリアーゼ活性が強化されたり、ここにさらにアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が強化されたりしてL-アルギニン産生能が向上した組み換えコリネバクテリウム属微生物を提供し、前記組み換えコリネバクテリウム属微生物は、L-アルギニンを高い歩留まりにて産生することができるので、産業上に有効に利用可能である。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 図 1 は、シトルリンからアルギニン合成する経路およびフマレートからアスパルテートを合成する経路を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 6 】

以下、本発明について詳細に説明する。

【 0 0 1 7 】

本発明は、L - アルギニンの産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明において、前記用語「L - アルギニン産生能 (L - a r g i n i n e p r o d u c t i v i t y) 」とは、本発明のコリネバクテリウム属微生物を培地中において培養するとき、培地中にL - アルギニンを蓄積する能力のことをいう。このようなL - アルギニン産生能は、コリネバクテリウム属微生物の野生型菌株の特性、または人為的な変異により添加または増強された特性であり得る。

【 0 0 1 9 】

例えば、L - アルギニンの産生能を与えるために、コリネバクテリウム属微生物は、アルギニンヒドロキサメートに耐性を有するように育種されてもよく、コハク酸に対して栄養要求性を有するか、あるいは、核酸塩基同族体に対して耐性を有するように育種されてもよく、アルギニンを物質代謝させることができず、アルギニン拮抗剤およびカナバニンに耐性を有し、リシンに栄養要求性を有するように育種されてもよく、アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、酵母アルギニン、D - アルギニンおよびカナバニンに耐性を有するように、または、アルギニンヒドロキサメートおよび6 - アザウラシルに耐性を有するように育種されてもよく、カナバニンに耐性を有するように育種されてもよい。

【 0 0 2 0 】

また、L - アルギニンの産生能は、L - アルギニン生合成酵素を暗号化させる遺伝子の発現が増進されるようにコリネバクテリウム属微生物を変形して与えてもよい。L - アルギニン生合成酵素の例としては、N - アセチルグルタミルホスフェートリダクターゼ (a r g C) 、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (a r g J) 、N - アセチルグルタメートキナーゼ (a r g B) 、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (a r g D) 、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (a r g F) 、アルギニノコハク酸合成酵素 (a r g G) 、アルギニノコハク酸リアーゼ (a r g H) およびカルバモイルホスフェート合成酵素が挙げられる。これらのアルギニン生合成酵素はA r g オペロン (a r g C J B D F R G H) の上に存在し、a r g Rにより暗号化されたアルギニンリプレッサーにより調節される (J B a c t e r i o l . 2 0 0 2 D e c ; 1 8 4 (2 3) : 6 6 0 2 - 1 4 .) 。このため、アルギニンリプレッサーを弱化させることにより (U S 2 0 0 2 - 0 0 4 5 2 2 3) 、または前記生合成関係の遺伝子のうちのいずれか一つ以上の遺伝子を過発現させることによりL - アルギニン産生能を与えることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明において、L - アルギニン産生能を有するコリネバクテリウム属微生物は、L - アルギニンを産生する能力を有している限り、特に制限されない。好ましくは、L - アルギニンを産生し得るコリネバクテリウムグルタミクムであってもよく、さらに好ましくは、コリネバクテリウムグルタミクムK C C M 1 0 7 4 1 (大韓民国特許登録番号0 7 9 1 6 5 9) およびコリネバクテリウムグルタミクムA T C C 2 1 8 3 1であってもよい。

【 0 0 2 2 】

上記の目的を達成するための一つの態様として、本発明は、アスパラギン酸アンモニアリアーゼの活性が強化されてL - アルギニン産生能が向上したコリネバクテリウム属微生物を提供する。

【 0 0 2 3 】

アスパラギン酸アンモニアリアーゼ (a s p A) は、フマレートおよびアンモニアから

10

20

30

40

50

アスパルテートを合成する酵素であるため、前記アスパラギン酸アンモニアリアーゼの発現の強化によりアスパルテートの合成が増加され、増加されたアスパルテートによりL-アルギニンの産生能が高くなる。

【0024】

本発明において、前記アスパラギン酸アンモニアリアーゼは、前記活性を有する酵素であれば、いかなる微生物由来の酵素であっても活用可能であり、好ましくは、エシェリキア属微生物またはユリネ型微生物由来の酵素、さらに好ましくは、大腸菌またはコリネバクテリウムグルタミカム由来の酵素を活用することができる。前記アスパラギン酸アンモニアリアーゼは、具体的に、配列番号21または配列番号22に記載のアミノ酸配列を有し得る。前記配列番号21のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム属微生物由来のアスパラギン酸アンモニアリアーゼは、配列番号23に記載の塩基配列を有するaspA (NCgl1446)により暗号化され、前記配列番号22のアミノ酸配列を有するエシェリキア属微生物由来のアスパラギン酸アンモニアリアーゼは、配列番号24に記載の塩基配列を有するaspA (NCBIGENEID: 12933698)により暗号化される。

10

【0025】

本発明において提示したアスパラギン酸アンモニアリアーゼの活性を有するタンパク質である限り、前記タンパク質のアミノ酸配列に対して80%以上、好ましくは、90%以上、さらに好ましくは、95%以上、特に好ましくは、97%以上の同一性を有するアスパラギン酸アンモニアリアーゼもまた本発明に含まれる。前記アミノ酸配列に対する同一性は、例えば、文献によるアルゴリズムBLAST [参照: KarlinおよびAltschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)]やPearson

20

【0026】

によるFASTA [参照: Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このようなアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発された [参照: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]。

【0027】

上記の目的を達成するための他の態様として、本発明は、さらに、アスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が強化されたコリネバクテリウム属微生物を提供する。

30

【0028】

本発明において、前記アスパラギン酸アミノ基転移酵素は、コリネバクテリウム属微生物から由来するものであり、配列番号25のアミノ酸配列を有し、配列番号26の塩基配列を有するaspB (NCgl0237)により暗号化される。

【0029】

本発明において提示したアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性を有するタンパク質である限り、前記タンパク質のアミノ酸配列に対して80%以上、好ましくは、90%以上、さらに好ましくは、95%以上、特に好ましくは、97%以上の同一性を有するアスパラギン酸アミノ基転移酵素もまた本発明に含まれる。上述したように、前記アミノ酸配列に対する同一性は、例えば、文献によるアルゴリズムBLAST [参照: KarlinおよびAltschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)]やPearson

40

【0030】

によるFASTA [参照: Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このようなアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発された [参照: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]。

【0031】

上記の目的を達成するためのさらに他の態様として、本発明は、アスパラギン酸アンモ

50

ニアリアーゼおよびアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が両方とも強化されたコリネバクテリウム属微生物を提供する。

【0032】

本発明は、L-アルギニン産生能を有するコリネバクテリウム属微生物において、アスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性が本来の活性よりも強化(または、増加)されたことを特徴とする。

【0033】

前記用語「本来の活性」とは、前記酵素の活性を調節するためのいかなる遺伝的操作や変形がないL-アルギニン産生能を有するコリネバクテリウム属微生物が有している活性のことをいう。なお、前記「強化」または「増加」とは、L-アルギニン産生能がL-アルギニン産生能を有するコリネバクテリウム属微生物の本来の活性よりも向上したことをいう。

10

【0034】

本発明の活性強化(または、増加)は、当該分野における周知の様々な方法が適用可能である。その方法の例としては、アスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素をコーディングするポリヌクレオチドをベクターシステムに取り込む方法などによりアスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素をコーディングする塩基配列のコピー数を増加させる方法、強いプロモーターに取り替える方法、プロモーターに変異を取り込む方法および遺伝子変異による方法などが挙げられるが、本発明はこれらに何ら限定されない。

20

【0035】

一つの具体的な実施形態において、L-アルギニン産生能を有するコリネバクテリウム属微生物のアスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素の活性を強化させるために、アスパラギン酸アンモニアリアーゼおよび/またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素を暗号化させる遺伝子をベクターに取り込み、コリネバクテリウム属微生物を形質転換させることにより前記遺伝子のコピー数を増加させる方法が使用可能である。

【0036】

本発明において、前記用語「形質転換」とは、目的タンパク質を暗号化させるポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に取り込んで宿主細胞内において前記ポリヌクレオチドが暗号化させるタンパク質が発現できるようにすることをいう。取り込まれたポリヌクレオチドは、宿主細胞内において発現できる限り、宿主細胞の染色体内に挿入されて位置してもよく、染色体外に位置してもよい。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に取り込まれて発現可能なものである限り、いかなる形で取り込まれても構わない。

30

【0037】

本発明の実施形態においては、前記遺伝子を含む組み換えベクターを宿主微生物に取り込んで形質転換された微生物を製造し、2次交差過程を経て前記遺伝子を染色体内に2コピー含むL-アルギニン産生菌株を分離した。

【0038】

本発明において、前記用語「ベクター」とは、好適な宿主内において目的タンパク質を発現させるように好適な調節配列に作動可能なように連結された前記目的タンパク質を暗号化させるポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA製造物のことをいう。前記調節配列は、転写を開始し得るプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコーディングする配列および転写および解読の終結を調節する配列を含む。ベクターは、適当な宿主内に形質転換された後、宿主ゲノムとは無関係に複製または機能することができ、ゲノムそのものに取り込まれ得る。

40

【0039】

本発明において用いられるベクターは、宿主中において複製可能なものであれば、特に制限がなく、当業界において周知の任意のベクターが使用可能である。通常的に用いられ

50

るベクターの例としては、天然状態あるいは組み換え状態のプラスミド、コスミド、ウィルスおよびバクテリオファージが挙げられる。

【0040】

本発明の方法により形質転換されたコリネバクテリウムグルタミカム(KCCM11351P)菌株は、L-アルギニンの産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミカムATCC21831の染色体からPCRにより得られたアスパラギン酸アンモニアリアーゼをコーディングするaspAをベクターに挿入した後、L-アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミカムKCCM10741Pに取り込むことにより、aspAの発現を増加させた形質転換済み微生物である。本発明による方法により形質転換された前記菌株KCCM11351Pは、aspAの過発現を通じてL-アルギニンを高い歩留まりにて産生することができるということを確認した。

10

【0041】

上記の目的を達成するための一つの態様として、本発明はまた、前記形質転換済みコリネバクテリウム属微生物を培養してL-アルギニンを産生する方法を提供する。

【0042】

本発明のL-アルギニンを製造する方法において、前記形質転換済みL-アルギニン過発現微生物の培養過程は、当業界において周知の適当な培地および培養条件により行われる。このような培養過程は、当業者であれば、選択される菌株に応じて手軽に調整して用いることができる。前記培養方法の例には、回分式培養(batch culture)、連続式培養(continuous culture)および流加式培養(fed-batch culture)が含まれるが、これらに限定されるものではない。このような様々な培養方法は、例えば、「Biochemical Engineering」(James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991)などに開示されている。

20

【0043】

本発明において用いられる培地は、原糖若しくは葡萄糖を主な炭素源として用い、原糖を多量含む糖蜜もまた炭素源として使用可能であり、その他の適正量の炭素源は様々な利用可能であり、好ましくは、精製葡萄糖を用いる。使用可能な窒素源の例としては、ペプトン、酵母エキス、肉汁、麦芽エキス、トウモロコシ浸漬液および大豆麦などの有機窒素源およびヨウ素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウムおよび硝酸アンモニウムなどの無機窒素源が挙げられ、好ましくは、ペプトンを用いる。これらの窒素源は、単独でまたは組み合わせて使用可能である。前記培地には、リン源として、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウムおよび対応するナトリウム含有塩が含まれ得る。なお、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄などの金属塩を含み得る。これらに加えて、アミノ酸、ビタミンおよび適切な前駆体などが含まれ得る。これらの培地または前駆体は、培養物に回分式または連続式により添加可能である。

30

【0044】

培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸および硫酸などの化合物を培養物に適切な方式を用いて添加して、培養物のpHを調整することができる。また、培養中には脂肪酸ポリグリコールエステルなどの消泡剤を用いて気泡の生成を抑えることができる。さらに、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素または酸素含有ガス(例えば、空気)を注入する。培養物の温度は、普通、20~45、好ましくは、25~40である。培養期間は、所望のL-アルギニン産生量が得られるまで続き、好ましくは、10~160時間である。

40

【0045】

培養物からのL-アルギニンの分離は、当業界において周知の通常の方法により行われる。このような分離方法としては、遠心分離、ろ過、イオン交換クロマトグラフィおよび結晶化などの方法が用いられる。例えば、培養物を低速にて遠心分離してバイオマスを除去し、得られた上澄液をイオン交換クロマトグラフィを用いて分離することができる。

【0046】

50

以下、本発明を実施例を挙げてより詳細に説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例により制限されることはない。

【実施例】

【0047】

実施例1：L - アルギニン産生における a s p A 遺伝子の影響の確認

a s p A が L - アルギニン産生に主な遺伝子であるか否かを確認するために、a s p A 欠損ベクターを製作し、L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P (大韓民国特許登録第 0 7 9 1 6 5 9 号) に形質転換して L - アルギニン産生能を評価した。

10

【0048】

(1) a s p A 欠損ベクターの製作

染色体においてアスパラギン酸アンモニアリアーゼをコーディングする遺伝子である a s p A (N c g l 1 4 4 6) 遺伝子を欠失させるために、キアゲン社製のゲノミック - ティップシステム (Q I A G E N Genomic - tip system) を用いて米国生物資源センター (A m e r i c a n Type Culture Collection : A T C C) から購買したコリネバクテリウムグルタミクム A T C C 2 1 8 3 1 の染色体を抽出し、この染色体を鋳型として交差 P C R を行った。

【0049】

具体的に、配列番号 1 および 2 のプライマーを用いて 9 4 で 1 分間変性、5 8 で 3 0 秒間アニ - リング、7 2 で 6 0 秒間重合する条件を P f u ポリメラーゼで 3 0 回繰り返し行う P C R 法を用いて、5 ' 領域に X m a I 制限酵素部位を有する約 7 9 8 b p の断片を増幅した。その後、配列番号 3 および 4 のプライマーを用いて、前記 P C R 法により 3 ' 領域に X b a I 制限酵素部位を有する約 8 2 9 b p 塩基対の断片を増幅した。得られた D N A 断片は、GeneA11^R Expi^{T M} GEL SVキット (韓国ソウル) で分離した後、交差 P C R のための鋳型として用いた。

20

【0050】

前記 a s p A の欠失を含む D N A 断片を確保するために、配列番号 1 および 4 のプライマーを用いて上記のようにして得た二つの D N A 断片を鋳型として交差 P C R を行った。具体的に、前記 P C R 法を用いて約 1 5 8 3 b p 断片を増幅した。増幅された断片は、制限酵素 X m a I および X b a I で処理した後、同じ酵素で処理された p D ベクターと結さ

30

つとしてベクター p D K O 1 4 4 6 を製作した。

【0051】

(2) 組み換え菌株の製造

前記製作された p D K O 1 4 4 6 ベクターを L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P に形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上において a s p A が欠失した L - アルギニン産生菌株を得た。選別された菌株を K C C M 1 0 7 4 1 Δ a s p A と命名した。

【0052】

(3) 組み換え菌株の L - アルギニン産生能の確認

40

前記製造された組み換え L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 Δ a s p A を用いて a s p A の欠失が L - アルギニン産生能に及ぼす影響を把握するために下記の方法を用いて培養した。

【0053】

このとき、対照群としては、宿主細胞であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P を培養して用い、産生培地 2 5 m l を含有する 2 5 0 m l コーナーバッフルフラスコに 1 白金耳の菌株を接種し、3 0 で 4 8 時間 2 0 0 r p m にて培養した。培養が終わった後、H P L C を用いて L - アルギニンの産生量を測定し、その結果を下記表 1 に示す。

【0054】

50

< 産生培地 >

葡萄糖 6 %、硫酸アンモニウム 3 %、第 1 のリン酸カリウム 0 . 1 %、硫酸マグネシウム 7 水塩 0 . 2 %、C S L (トウモロコシ浸漬液) 1 . 5 %、N a C l 1 %、酵母エキス 0 . 5 %、ピオチン 1 0 0 m g / L、p H 7 . 2

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

L - アルギニン産生能の比較

菌株	OD	アルギニン濃度 (g / L)
K C C M 1 0 7 4 1 P	9 1	3 . 0
K C C M 1 0 7 4 1 P Δ a s p A	1 0 1	2 . 4

10

【 0 0 5 6 】

前記表 1 に示すように、a s p A が欠損した菌株は、L - アルギニンの産生能が低下するということを確認し、a s p A が L - アルギニンの産生に当たって主な遺伝子であることを確認した。

【 0 0 5 7 】

実施例 2 : コリネバクテリウム由来の a s p A を取り込んだベクターの製作

20

コリネバクテリウム由来のアスパラギン酸アンモニアリアーゼをコーディングする遺伝子である a s p A (N c g l 1 4 4 6) の 2 コピーベクターを製作するために、コリネバクテリウムグルタミクム A T C C 2 1 8 3 1 染色体を鋳型として配列番号 5 および 6 のプライマー、配列番号 7 および 8 のプライマーを用いて P C R を行って a s p A がそれぞれ含まれている D N A 断片を確保した。

【 0 0 5 8 】

具体的に、配列番号 5 および 6 のプライマーを用いて 9 4 で 1 分間変性、5 8 で 3 0 秒間アニーリング、7 2 で 2 分間重合する条件を P f u ポリメラーゼで 3 0 回繰り返し行う P C R 法を用いて、5 ' 領域に X m a I および 3 ' 領域に B a m H I 制限酵素部位を有する約 1 8 9 3 b p の断片を増幅した。二番目に、配列番号 7 および 8 のプライマーを用いて、前記 P C R 法により 5 ' 領域に B a m H I および 3 ' 領域に X b a I 制限酵素部位を有する約 1 8 8 5 b p 塩基対の断片を増幅した。

30

【 0 0 5 9 】

得られた D N A 断片は G e n e A l l ^R E x p i n ^{T M} G E L S V キット (韓国ソウル) で分離した後、最初の断片は X m a I および B a m H I で処理し、二番目の断片は B a m H I および X b a I で処理し、p D ベクターは X m a I および X b a I で処理した。制限酵素が処理された p D ベクターおよび二つの D N A 断片を結さつて p D 1 4 4 6 - 2 X ベクターを製作した。

【 0 0 6 0 】

実施例 3 : a s p A の発現が強化された組み換え菌株の製造

40

前記実施例 2 において製作された p D 1 4 4 6 - 2 X ベクターを L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P およびコリネバクテリウムグルタミクム A T C C 2 1 8 3 1 にそれぞれ形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上において a s p A が 2 コピー含まれている L - アルギニン産生菌株を得た。得られた菌株をそれぞれ K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p A _ 2 X および A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p A _ 2 X と命名した。

【 0 0 6 1 】

実施例 4 : コリネバクテリウム由来の a s p B が取り込まれたベクターの製作

アスパラギン酸アミノ基転移酵素をコーディングする遺伝子である a s p B (N c g l 0 2 3 7) 2 コピーベクターを製作するために、コリネバクテリウムグルタミクム A T C

50

C 2 1 8 3 1 染色体を鋳型として配列番号 9 および 1 0 のプライマー、配列番号 1 1 および 1 2 のプライマーを用いて P C R を行って a s p B がそれぞれ含まれている D N A 断片を確保した。

【 0 0 6 2 】

具体的に、配列番号 9 および 1 0 のプライマーを用いて、9 4 で 1 分間変性、5 8 で 3 0 秒間アニーリング、7 2 で 2 分間重合する条件を P f u ポリメラーゼで 3 0 回繰り返し行う P C R 法を用いて、5 ' 領域に X m a I および 3 ' 領域に N d e I 制限酵素部位を有する約 1 6 9 2 b p の断片を増幅した。二番目に、配列番号 1 1 および 1 2 のプライマーを用いて、前記 P C R 法により 5 ' 領域に N d e I および 3 ' 領域に S p e I 制限酵素部位を有する約 1 6 4 3 b p の断片を増幅した。

10

【 0 0 6 3 】

得られた D N A 断片は、Gene A l l ^R E x p i n ^{T M} G E L S V キット (韓国ソウル) で分離した後、最初の断片は X m a I および N d e I で処理し、二番目の断片は N d e I および S p e I で処理し、p D ベクターは、X m a I および X b a I で処理した。制限酵素が処理された p D ベクターおよび二つの D N A 断片を 3 断片結さつして p D 0 2 3 7 - 2 X ベクターを製作した。

【 0 0 6 4 】

実施例 5 : a s p B の発現が強化された菌株の製造

前記実施例 4 において製作された p D 0 2 3 7 - 2 X ベクターを L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P、コリネバクテリウムグルタミクム A T C C 2 1 8 3 1 にそれぞれ形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上において a s p B が 2 コピー含まれている L - アルギニン産生菌株を得た。得られた菌株をそれぞれ K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p B __ 2 X および A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p B __ 2 X と命名した。

20

【 0 0 6 5 】

実施例 6 : a s p A および a s p B の発現が強化された菌株の製造

前記実施例 4 において製作された p D 0 2 3 7 - 2 X ベクターを前記実施例 3 において製造された組み換え微生物である K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p A __ 2 X および A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p A __ 2 X にそれぞれ形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上において a s p A および a s p B が 2 コピー含まれている L - アルギニン産生菌株を得た。得られた菌株をそれぞれ K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p A __ 2 X : : a s p B __ 2 X および A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p A __ 2 X : : a s p B __ 2 X と命名した。

30

【 0 0 6 6 】

実施例 7 : L - アルギニン産生能の評価

前記実施例 3、5 および 6 において製造された L - アルギニン産生菌株コリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p A __ 2 X、A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p A __ 2 X、K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p B __ 2 X、A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p B __ 2 X、K C C M 1 0 7 4 1 P : : a s p A __ 2 X : : a s p B __ 2 X および A T C C 2 1 8 3 1 : : a s p A __ 2 X : : a s p B __ 2 X を用いて、a s p A 強化または a s p B 強化または a s p A および a s p B 同時強化が L - アルギニンの産生能に及ぼす影響を把握するために下記の方法を用いて培養した。

40

【 0 0 6 7 】

このとき、対照群としては、宿主細胞であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P および A T C C 2 1 8 3 1 を培養して用い、実施例 1 における産生培地 2 5 m l を含有する 2 5 0 m l コナーバツフルフラスコに 1 白金耳の菌株を接種し、3 0 で 4 8 時間 2 0 0 r p m にて培養した。培養が終わった後、H P L C を用いて L - アルギニンの産生量を測定し、その結果を下記表 2 に示す。

【 0 0 6 8 】

【表 2】

菌株別のアルギニン産生能の比較

菌株	OD	アルギニン濃度 (g/L)
KCCM10741 P	91	3.0
KCCM10741 P : : <i>aspA</i> __2X	90	3.9
KCCM10741 P : : <i>aspB</i> __2X	93	3.4
KCCM10741 P : : <i>aspA</i> __2X : : <i>aspB</i> __2X	93	3.7
ATCC21831	102	4.2
ATCC21831 : : <i>aspA</i> __2X	102	5.0
ATCC21831 : : <i>aspB</i> __2X	105	4.7
ATCC21831 : : <i>aspA</i> __2X : : <i>a</i> <i>spB</i> __2X	104	5.1

10

20

【0069】

前記表 2 に示すように、*aspA* が 2 コピー取り込まれた場合、二つの由来コリネバクテリウムグルタミクムにおいて両方とも L - アルギニン産生能が向上する結果を示した。特に、KCCM10741 P : : *aspA*__2X の場合に、対照群に比べて L - アルギニン産生能が 30 % と大幅に向上し、これを 2013 年 01 月 21 日付けで大韓民国ソウル特別市西大門区弘済 1 洞 361-221 番地に所在する国際寄託機関である韓国種菌協会付設韓国微生物保存センターに受託番号 KCCM11351P で寄託した。

【0070】

30

実施例 8 : エシェリキア属由来の *aspA* が取り込まれたベクターの製作

エシェリキア属由来のアスパラギン酸アンモニアリアーゼをコーディングする遺伝子である *aspA* (NCBI - GeneID : 12933698) を L - アルギニン産生能を有するコリネバクテリウムグルタミクムの染色体の内部に取り込むために、グルタメートエキスポーターとして知られている Ncg11221 部位 (site) を用いた (yggB : Appl Environ Microbiol. 2007 Jul; 73 (14) : 4491 - 8)。

【0071】

Ncg11221 部位にエシェリキア属由来の *aspA* が取り込まれたベクターを製作するために、まず、Ncg11221 の部位特異的な遺伝子欠失を含む pDKO1221 ベクターを製作した。

40

【0072】

Ncg11221 の部位特異的な遺伝子が消失された DNA 断片を確保するために、コリネバクテリウムグルタミクム ATCC21831 の染色体を抽出し、この染色体を鋳型として交差 PCR を行った。具体的に、配列番号 13 および 14 のプライマーを用いて、94 で 1 分間変性、58 で 30 秒間アニーリング、72 で 60 秒間重合する条件を Pfu ポリメラーゼで 30 回繰り返し行う PCR 法を用いて、5' 領域に EcoRI 制限酵素部位を有する約 789 bp の断片を増幅した。二番目に、配列番号 15 および 16 のプライマーを用いて、前記 PCR 法により 3' 領域に PstI 制限酵素部位を有する約 835 bp 塩基対の断片を増幅した。得られた DNA 断片は、GeneA11^R Expi

50

n^{T M} G E L S Vキット（韓国ソウル）で分離した後、交差 P C R のための鋳型として用いた。

【 0 0 7 3 】

前記内部的 N c g l 1 2 2 1 の内部的な遺伝子消失を含む D N A 断片を確保するために、配列番号 1 3 および 1 6 のプライマーを用いて、上記のようにして得た二つの D N A 断片を鋳型として交差 P C R を行った。具体的に、前記 P C R 法を用いて約 1 6 0 2 b p 断片を増幅した。増幅された断片は、制限酵素 E c o R I および P s t I で処理した後、同じ制限酵素で処理された p D ベクターと結さつして p D K O 1 2 2 1 ベクターを製作した。

【 0 0 7 4 】

前記製作された p D K O 1 2 2 1 ベクターを用いて、エシェリキア属 a s p A が取り込まれたベクターを製作した。コリネバクテリウムグルタミカムにおいて作動する c j 7 プロモーターは、p 1 1 7 p c j 7 - g f p（大韓民国特許出願第 1 0 - 2 0 0 4 - 0 1 0 7 2 1 5 号）を鋳型として配列番号 1 7 および 1 8 のプライマーを用いて 9 4 で 1 分間変性、5 8 で 3 0 秒間アニーリング、7 2 で 3 0 秒間重合する条件を P f u ポリメラーゼで 3 0 回繰り返し行う P C R 法を用いて 5 ' 領域に B a m H I 制限酵素部位を有する約 5 2 4 b p の断片を増幅した。エシェリキア属 a s p A は、エシェリキアコリ W 3 1 1 0 染色体をキアゲン社製のゲノミック・ティップシステムを用いて抽出し、この染色体を鋳型として配列番号 1 9 および 2 0 のプライマーを用いて前記 P C R 法を用いて 3 ' 領域に X b a I 制限酵素部位を有する約 1 6 0 7 b p の断片を増幅した。得られた D N A 断片は、Gene A l l^R E x p i n^{T M} G E L S Vキット（韓国ソウル）で分離した後、交差 P C R のための鋳型として用いた。

【 0 0 7 5 】

前記エシェリキア属由来 a s p A の D N A 断片を確保するために、配列番号 1 7 および 2 0 のプライマーを用いて、上記のようにして得た二つの D N A 断片を鋳型として交差 P C R を行った。具体的に、前記 P C R 法を用いて約 2 0 9 5 b p 断片を増幅した。増幅された断片は、制限酵素 B a m H I および X b a I で処理した後、同じ酵素で処理された p D K O 1 2 2 1 ベクターと結さつして p D K O 1 2 2 1 - E C __ a s p A ベクターを製作した。

【 0 0 7 6 】

実施例 9：エシェリキア属由来 a s p A の発現が強化された組み換え菌株の製造

前記製作された p D K O 1 2 2 1 - E C __ a s p A ベクターを L - アルギニン産生菌株コリネバクテリウムグルタミカム K C C M 1 0 7 4 1 P および A T C C 2 1 8 3 1 に形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上においてエシェリキア属由来 a s p A 遺伝子が含まれている L - アルギニン産生菌株を得た。得られた菌株のそれぞれを K C C M 1 0 7 4 1 P Δ N c g l 1 2 2 1 - E C __ a s p A および A T C C 2 1 8 3 1 Δ N c g l 1 2 2 1 - E C __ a s p A と命名した。また、前記製作された p D K O 1 2 2 1 ベクターを L - アルギニン産生菌株コリネバクテリウムグルタミカム K C C M 1 0 7 4 1 P および A T C C 2 1 8 3 1 に形質転換し、2 次交差過程を経て染色体上において N C g l 1 2 2 1 が欠失した K C C M 1 0 7 4 1 P Δ N c g l 1 2 2 1 および A T C C 2 1 8 3 1 Δ N c g l 1 2 2 1 菌株を得た。

【 0 0 7 7 】

実施例 1 0：エシェリキア属由来 a s p A の発現が強化された組み換え菌株の L - アルギニン産生能の評価

前記実施例 9 において製造された L - アルギニン産生菌株であるコリネバクテリウムグルタミカム K C C M 1 0 7 4 1 P Δ N c g l 1 2 2 1 - E C __ a s p A および A T C C 2 1 8 3 1 Δ N c g l 1 2 2 1 - E C __ a s p A を用いて、大腸菌由来の a s p A の取り込みが L - アルギニン産生能に及ぼす影響を把握するために、下記のような方法を用いて培養した。

【 0 0 7 8 】

このとき、対照群としては、宿主細胞であるコリネバクテリウムグルタミクム K C C M 1 0 7 4 1 P、A T C C 2 1 8 3 1、K C C M 1 0 7 4 1 P Δ N c g l 1 1 2 2 1 および A T C C 2 1 8 3 1 Δ N c g l 1 1 2 2 1 を培養して用い、産生培地（注 1）2 5 m l を含有する 2 5 0 m l コナーバッフルフラスコに 1 白金耳の菌株を接種し、3 0 で 4 8 時間 2 0 0 r p m にて培養した。培養が終わった後、H P L C を用いて L - アルギニンの産生量を測定し、その結果を下記表 3 に示す。

【 0 0 7 9 】

【表 3】

アルギニン産生能の比較

菌株	OD	アルギニン濃度 (g/L)
KCCM10741 P	91	3.0
KCCM10741PΔNcgl11221	90	3.0
KCCM10741PΔNcgl11221-E C__aspA	94	3.6
ATCC21831	102	4.2
ATCC21831ΔNcgl11221	103	4.1
ATCC21831ΔNcgl11221-EC __aspA	107	4.7

10

20

【 0 0 8 0 】

前記表 3 に示すように、エシェリキア属由来の a s p A が取り込まれた場合にも、二つの由来のコリネバクテリウムグルタミクムにおいて L - アルギニン産生能が向上するということを確認することができた。

30

【 0 0 8 1 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野における当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須的特徴を変更することなく他の具体的な形態にて実施可能であるということが理解できる筈である。これと関連して、上述した実施形態はあらゆる面において例示的なものであり、限定的なものではないと理解されるべきである。本発明の範囲は、前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味および範囲並びにその等価概念から導き出されるあらゆる変更例または変形例が本発明の範囲に含まれるものと解釈されるべきである。

【 0 0 8 2 】

[受託番号]

寄託機関名：韓国微生物保存センター（海外）

受託番号：K C C M 1 1 3 5 1 P

受託日：2 0 1 3 年 0 1 月 2 1 日

[受託証の写し]

40

出願人又は代理人 ファイル参照番号 P P 1 3 - 0 1 4 9	国際出願番号
---	--------

寄託された微細物又はその他の生物学的物質の表示事項

(特許協力条約規則第13条の2)

A. 下記の表示事項は、明細書 <u>23</u> 頁 <u>1</u> 行目に記載された寄託された微生物又はその他の生物学的物質に関するものである。	
B. 寄託物の確認 これ以外の寄託物は次の別途のページに記載する□	
寄託機関の名称 韓国微生物保存センター	
寄託機関の住所（郵便番号および国名を含む） 〒120-091 韓国ソウル特別市西大門区弘済1洞361-221番地ユリムビル	
寄託日 2013年01月21日	寄託番号 KCCM11351P
C. 追加的表示事項（記載事項がなければ空欄で提出する） 別途の続葉に続く□	
D. 表示事項が指定している指定国（表示事項が全ての指定国のための事項ではない場合）	
E. 表示事項の別途の提出（記載事項がなければ空欄で提出する）	
下記の表示事項は追って国際事務局に提出されるものである（表示事項の一般的な性質を特定すること）	

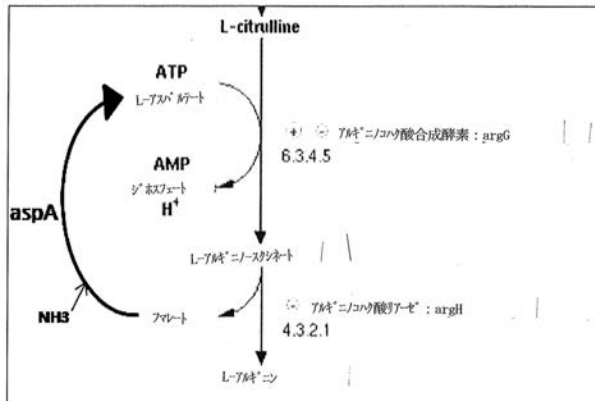
10

20

30

受理官庁使用欄	国際事務局使用欄
□当該用紙は国際出願とともに受け付けられた	□当該用紙は国際出願とともに受け付けられた
担当官	担当官

【 図 1 】



【 配 列 表 】

2017169595000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
- (74)代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
- (72)発明者 ヒュン・エ・ベ
大韓民国・ソウル・１５８－８３１・ヤンチョン－グ・ゴムダルレ－ロ・６－ギル・５－１・クム
ホ・ブラウン－ヴィル・２０１
- (72)発明者 ミン・ギョン・カン
大韓民国・ソウル・１３５－８２８・カンナム－グ・ナムブスンフワン－ロ・２９１２・ゲボ・２
－チャ・ウスン・アパート・１３－９０６
- (72)発明者 ハン・ヒョン・イ
大韓民国・ソウル・１２１－８５０・マポ－グ・ワールド・カップ・ブク－ロ・２３３・ソンサン
・シヨン・アパート・９－４０５
- (72)発明者 ヘ・ウォン・キム
大韓民国・キョンギ－ド・４６３－８１８・ソンナム－シ・ブンダン－グ・ドルマ－ロ・４７６ボ
ン－ギル・３１・ヒョジャチョン・フワソン・アパート・６０８－１２０２
- (72)発明者 スン・グン・イ
大韓民国・ソウル・１５７－８０１・ガンソ－グ・ガンソ－ロ・７６－ギル・９－１０・メール・
ドミトリー・オブ・シージェイ
- F ターム(参考) 4B064 AE24 CA02 CA19 CA21 CC24 DA01 DA10 DA16
4B065 AA24X AA24Y AA26Y AB01 AC14 BA01 CA17 CA41 CA44

【外国語明細書】
2017169595000001.pdf