

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4294123号
(P4294123)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月17日(2009.4.17)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 P 17/18 (2006.01)	C 1 2 P 17/18	
C 1 2 P 13/24 (2006.01)	C 1 2 P 13/24	C
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
請求項の数 5 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願平10-187992
 (22) 出願日 平成10年7月3日(1998.7.3)
 (65) 公開番号 特開2000-14396(P2000-14396A)
 (43) 公開日 平成12年1月18日(2000.1.18)
 審査請求日 平成17年4月26日(2005.4.26)

微生物の受託番号 FERM BP-6399
 微生物の受託番号 FERM BP-4003

(73) 特許権者 308032666
 協和発酵バイオ株式会社
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
 (72) 発明者 池田 正人
 山口県防府市新田517-6
 (72) 発明者 岡本 和之
 山口県防府市協和町2-10-202
 (72) 発明者 中野 哲郎
 山口県防府市協和町2-2-206
 (72) 発明者 鎌田 望
 山口県防府市協和町1-2

審査官 六笠 紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホリボシルピロリン酸を経由して生合成される代謝産物の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属し、かつアデニン、L-ヒスチジンまたはリボフラビンの生産能を有する微生物のトランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させることを特徴とする、アデニン、L-ヒスチジンまたはリボフラビンの生産を増強させる方法。

【請求項2】

コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属し、アデニン、L-ヒスチジンまたはリボフラビンの生産能を有し、かつトランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物を培地に培養し、培養液中に、アデニン、L-ヒスチジンまたはリボフラビンを生成蓄積させ、採取することを特徴とする、アデニン、L-ヒスチジンまたはリボフラビンの製造方法。

【請求項3】

微生物が、コリネバクテリウム グルタミカム FERM BP-6399、又はコリネバクテリウム グルタミカム FERM BP-6399にコリネバクテリウム アンモニアゲネス FERM BP-4003が保有する組換え体プラスミドを導入して得られる微生物である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

コリネバクテリウム グルタミカム FERM BP-6399。

【請求項5】

コリネバクテリウム グルタミカム F E R M B P - 6 3 9 9 にコリネバクテリウム
アンモニアゲネス F E R M B P - 4 0 0 3 が保有する組換え体プラスミドを導入し
て得られる微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、トランスケトララーゼの活性を欠損、または親株に比べて低下させた変異株を用い、生合成経路上、ホスホリボシルピロリン酸（以下、P R P P と略す）から合成される有用物質を発酵法で製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

微生物の代謝経路上、P R P P から合成される有用物質としては、プリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、ピリミジンヌクレオシド、プリン塩基、ピリミジン塩基、フラビンヌクレオチド等の核酸関連物質、L - ヒスチジン、リボフラビン等が知られている。

【0003】

上記核酸関連物質、L - ヒスチジン、リボフラビン等は、これまで発酵法、発酵法および合成法を組合わせた方法等を用い、工業的に生産されている〔高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版（1996）；相田浩ら編、アミノ酸発酵、学会出版センター（1986）；特開平6-225776〕。

微生物において、P R P P はペントースリン酸経路の中間体リボース 5 - リン酸から P R P P 合成酵素によって生合成される。

【0004】

リボース 5 - リン酸の生合成経路としては、グルコース 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ反応経路の酸化了的ペントースリン酸経路が知られており、また、トランスケトララーゼ反応経路の非酸化了的ペントースリン酸経路上の酵素が全て可逆であることより、該非酸化了的ペントースリン酸経路も関与していると考えられている（図1）。

【0005】

既にエシェリヒアコリではリボース 5 - リン酸の生合成に、その両経路が関与していることがラベルしたグルコースの代謝実験によって明らかにされている〔Biochemistry, 12, 10, 1969 (1973)〕。さらに、エシェリヒア コリやコリネバクテリウム グルタミカムにおいて、グルコース 6 - リン酸デヒドロゲナーゼを欠損してもリボースの要求性を示さないことから、リボース 5 - リン酸はトランスケトララーゼ反応経路の非酸化了的ペントースリン酸経路によって供給されることが遺伝的にも示されている〔D. G. Fraenkel and R. T. Vinopal, Ann. Rev. Microbiol., 27, 69-100 (1973); E. D. Ihnen and A. L. Demain, J. Bacteriol., 98, 1151-1158 (1969)〕。

【0006】

上記知見は、トランスケトララーゼの活性を高めることにより、非酸化了的経路からリボース 5 - リン酸および P R P P への供給が高まり、P R P P から生合成される物質の生成量が向上することを推測させるものである。

また、パチルス サチルス等のパチルス属細菌のイノシン生産菌において、トランスケトララーゼの活性を欠損した株は、リボースを培地中に著量蓄積してしまい、プリンヌクレオチドの生産収率は低下することが報告されている〔K. Sasajima and M. Yoneda, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 2, 175-213 (1984)〕。

【0007】

上記知見もまた、P R P P から生合成される物質の生産にトランスケトララーゼの活性が必要であることを推測させるものである。

これまでに、生物全般にわたり、P R P P を経由して生合成されるいかなる代謝産物においても、該生物のトランスケトララーゼ活性を欠損または低下させることにより、これら代謝産物の生産効率を向上させることができるとの知見はない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

P R P Pを經由して生合成される代謝産物、特に、核酸関連物質、L - ヒスチジン、リボフラビン等は、その需要が増大しており、工業的により有利な製造法を開発することが強く望まれている。

【 0 0 0 9 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明の課題は、P R P Pを經由して生合成される代謝産物の工業的により有利な製造法を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

【 課題を解決するための手段 】

従来の生産菌の育種は、目的とする代謝産物の生合成に関わる末端生合成経路の代謝増強を主眼として進められ、大きな成功を収めてきた。

本発明者らは、更なる代謝産物の生産性向上には、該末端生合成経路の代謝増強とは別の改変、即ち、出発基質の供給能力やプールを高める中央代謝の改変が必要であると考え、微生物において中央代謝経路を操作することによる、種々の代謝産物へのカーボンフローに対する影響を鋭意検討した。

【 0 0 1 1 】

その結果、ペントースリン酸経路の酵素であるトランスケトラゼの活性を欠損させるか、または親株に比べて低下させることにより、生合成経路上、P R P Pを經由して生合成される代謝産物の生産効率を向上させることができることを見だし、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は下記、(1) ~ (8) に関する。

【 0 0 1 2 】

(1) コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属する微生物のトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させることを特徴とする、該微生物において、代謝経路上、P R P Pを經由して生合成される代謝産物の生産を増強させる方法。

(2) 増強される代謝産物が、プリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、ピリミジンヌクレオシド、プリン塩基、ピリミジン塩基、フラビンヌクレオチド、L - ヒスチジン、リボフラビン等である、上記(1)の方法。

【 0 0 1 3 】

(3) 微生物が、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p P H 8、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p F M 4 1、エシェリヒア コリ A I 8 0 / p F M 2 0 1 等である、上記(1)の方法。

(4) コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属し、かつトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物を培地に培養し、培養液中に、代謝経路上、P R P Pを經由して生合成される代謝産物から選ばれる1もしくは数個の代謝産物を生成蓄積させ、該代謝産物を採取することを特徴とする、該代謝産物の製造方法。

【 0 0 1 4 】

(5) 製造される代謝産物が、プリンヌクレオチド、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、ピリミジンヌクレオシド、プリン塩基、ピリミジン塩基、フラビンヌクレオチド、L - ヒスチジン、リボフラビン等である、上記(4)の方法。

(6) 微生物が、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p P H 8、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p F M 4 1、エシェリヒア コリ A I 8 0 / p F M 2 0 1 等である、上記(4)の方法。

【 0 0 1 5 】

(7) コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、かつトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物。

(8) 微生物が、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6、コリネバクテリウム

10

20

30

40

50

グルタミンウム T K T 6 / p P H 8、コリネバクテリウム グルタミンウム T K T 6 / p F M 4 1 等である、上記(7)の微生物。

以下に、本発明を詳細に説明する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明に用いられる微生物としては、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属し、かつトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた菌株であれば、変異株、細胞融合株、形質導入株あるいは組換えDNA技術を用いて造成した組換え株のいずれであってもよい。

【0017】

該微生物として、例えば、トランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた、コリネバクテリウム グルタミンウム、コリネバクテリウム アセトアシドフィラム、コリネバクテリウム ハーキュリス、コリネバクテリウムリリウム、コリネバクテリウム メラセコーラ、プレビバクテリウム ディバリカツム、プレビバクテリウム フラブム、プレビバクテリウム イマリオフィラム、プレビバクテリウム ラクトファーメンタム、プレビバクテリウム チオゲニタリス、エシェリヒアコリ等をあげることができる。

【0018】

該微生物として、好適には、アミノ酸発酵に用いられている、いわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌やエシェリヒアコリ、あるいは核酸発酵やリボフラビン発酵に用いられているコリネバクテリウムアンモニアゲネス等をあげることができる。

本発明の、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属し、かつトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物は、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属する公知の微生物に、トランスケトラゼの活性を欠損または低下させる変異を、通常の変異処理法、組換えDNA技術による遺伝子置換法、形質導入法あるいは細胞融合法を用いて付与することにより取得できる。

【0019】

具体的な例として、以下に記載の方法で本発明の菌株を取得することができる。

本発明の菌株は、シキミ酸要求性かつリボース非資化性を指標として選択することにより取得することができる。

コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびエシェリヒア属から選ばれる属に属する微生物を、通常の変異処理法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニンジン(NTG)や亜硝酸等の化学処理を施した後、親株では生育可能なグルコースを単一の炭素源として含む最少培地において、生育できないかもしくは生育不良であり、シキミ酸を添加した該最少培地では良好に生育する変異株を分離することにより、シキミ酸要求変異株を取得する。

【0020】

該シキミ酸要求変異株を、シキミ酸を含有しかつグルコースまたはリボースを単一の炭素源として含む最少培地にそれぞれ塗布し、グルコース培地では生育可能であるが、リボース培地では生育できないかもしくは生育不良である変異株を選択する。該菌株はトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下した変異株である。

以上の方法で、シキミ酸要求性に加えてリボース非資化性を有する、トランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた変異株を取得することができる。

【0021】

また、トランスケトラゼをコードする遺伝子をインビトロで破壊したトランスケトラゼ遺伝子を用いた通常の変異処理法によっても、トランスケトラゼ変異株を取得することができる。

トランスケトラゼをコードする遺伝子としては、公知のもの〔G. A. Sprenger, Biochim. Biophys. Acta., 1216, 307 (1993); A. Iida et al., J. Bacteriol., 175, 5375-5383 (1993); 特開平6 169785〕を利用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明の菌株は、シキミ酸要求性かつリボース非資化性を指標として選択することにより取得することができるが、トランスケトラーゼの活性が親株に比べて少しでも低下している菌株の中には、必ずしもシキミ酸の要求性やリボースの非資化性を備えてはいないものもある。しかしながら、該菌株も本発明の微生物としてあげることができる。

該微生物は、シキミ酸要求性を示すトランスケトラーゼ変異株から、さらにシキミ酸を全く要求しなくなった復帰変異、シキミ酸の要求量が減少した復帰変異、あるいはリボースの資化性が部分的または完全に回復した復帰変異等を誘導することによって取得することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の微生物は、代謝経路上、P R P Pを経由して生合成される代謝産物の生産が増強された微生物である。

上記微生物の具体的な例として、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6等をあげることができる。

更に、上記により取得した、トランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物に、P R P Pを経由して生合成される代謝産物から選ばれる、目的とする代謝産物の生産能を向上させる公知の方法、例えば変異手法や組換えDNA技術を用いて、分解経路や分岐経路を遮断したり、生合成経路上の鍵酵素のフィードバック調節の解除や活性増強を図る方法を用いることにより、目的とする代謝産物をより効率良く製造することができる菌株を取得することができる。

【 0 0 2 4 】

組換えDNA技術として、例えば、目的とする代謝産物の生合成遺伝子を含む組換え体プラスミドを宿主に導入することにより、該代謝産物の生産能の向上した菌株を取得することができる。

具体的には、ヒスチジンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミド、例えばp P H 8をトランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させたコリネバクテリウム グルタミカムに導入することにより、ヒスチジンを著量生産する株を取得することができる。具体的な菌株として、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p P H 8等をあげることができる。

【 0 0 2 5 】

リボフラビンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミド、例えばp F M 4 1をトランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させたコリネバクテリウム グルタミカムに導入することにより、リボフラビンを著量生産する株を取得することができる。具体的な菌株として、コリネバクテリウム グルタミカム T K T 6 / p F M 4 1等をあげることができる。

【 0 0 2 6 】

リボフラビンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミド、例えばp F M 2 0 1をトランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させたエシェリヒア コリに導入することにより、リボフラビンを著量生産する株を取得することができる。具体的な菌株として、エシェリヒア コリ A I 8 0 / p F M 2 0 1等をあげることができる。

【 0 0 2 7 】

変異手法として、例えば、以下に記載した方法を用いることにより、目的とする代謝産物の生産能の向上した菌株を取得することができる。

イノシンの製造ではアデニン要求性でかつプリンアナログの耐性を付与する方法〔発酵と工業、Vol.36、No.12、1036-1048、1978〕、イノシン酸の製造ではアデニンおよびグアニン要求性でかつマンガン非感受性を付与する方法〔高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版(1996)〕、グアノシンの製造ではアデニンおよびヒスチジン要求性でかつメチオニンスルホキシド、サイコフラニンおよびデコイニンの耐性を付与する方法〔高尾彰一ら編、応用微生物学、文永堂出版(1996)〕、ウリジンやシチジンなどのピリミジンヌクレオシドの製造ではピリミジンアナログの耐性を付与する方法〔バイオインダスト

10

20

30

40

50

リー、12, 6, 36-43 (1995)]、アデニンやウラシルなどの塩基の製造では2-フルオロアデニンなどのプリンアナログの耐性を付与する方法(農芸化学会誌、第48巻、第1号、63-68、1974; 同会誌、第52巻、第3号、129-133、1978)、L-ヒスチジンの製造では2-チアゾールアラニンや1, 2, 4-トリアゾールアラニンなどのヒスチジンアナログの耐性を付与する方法[相田浩ら編、アミノ酸発酵、学会出版センター(1986)]等をあげることができる。

【0028】

これらの公知の方法を用いてトランスケトラゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた微生物を改良することにより、目的とした代謝産物の生産能の向上した菌株を取得することができる。

本発明の微生物を培地に培養し、培養液中に、代謝経路上、PRPPを經由して生合成される代謝産物から選ばれる1もしくは数個の代謝産物を生成蓄積させ、該代謝産物を採取することにより、該代謝産物を製造することができる。

【0029】

本発明の微生物の培養は、通常の培養法に従って実施することができる。

使用培地としては、炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミン、その他使用菌株の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば、合成培地または天然培地のいずれも使用できる。用いる菌株が使用培地で生育にシキミ酸を要求する場合は、培地に少量のシキミ酸を添加すればよい。シキミ酸の代わりに芳香族アミノ酸を少量添加することによっても同様の目的を達成することができる。

【0030】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、グリセロール、澱粉、澱粉加水分解液、糖蜜等の炭水化物、ポリアルコール類、ピルビン酸、フマル酸、乳酸、酢酸等の各種有機酸が使用できる。さらに微生物の資化性によって、炭化水素、アルコール類等も用いることができる。

窒素源としては、アンモニアまたは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種無機および有機アンモニウム塩類、あるいは尿素および他の窒素含有物質、ならびにペプトン、NZ-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールまたはその消化物等の窒素含有有機物等をあげることができる。

【0031】

無機物としては、リン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、炭酸カルシウム等をあげることができる。

アミノ酸、ビタミンは使用する培地の炭素源、窒素源等によって異なるが、必要に応じ、添加することができる。

【0032】

培養は、振とう培養または通気攪拌培養等の好氣的条件下に行う。培養温度は、一般に20~40が好適である。培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養期間は通常1~5日間である。

培養液中に生成蓄積された、目的とする代謝産物は以下の方法で採取することができる。

【0033】

培養終了後、菌体を除去し、濃縮晶析する方法、活性炭処理法、あるいはイオン交換樹脂法等の公知の方法[遠藤 勲ら、化学工学会(編)「バイオセパレーションプロセス便覧」、共立出版(1996)]を用いることにより目的とする代謝産物を採取することができる。以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0034】

実施例1 コリネバクテリウム グルタミクムのトランスケトラゼ欠損変異株の取得
コリネバクテリウム グルタミクムL22〔野生株ATCC31833から誘導されたり

10

20

30

40

50

ゾチーム感受性変異株；R. Katsumata et al., Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., 4, 767 (1987)] をNB培地〔粉末ブイヨン20g、酵母エキス5gを水1Lに含み、pH 7.2に調整した培地〕3ml中に植菌し、30℃でOD₆₆₀が約0.6になるまで培養した。

【0035】

培養後、遠心分離により集菌し、得られた菌体を50mMトリスマレイン酸緩衝液(pH 6.0)で一回洗浄し、NTG 400mg/Lを含む同緩衝液3ml中、室温で20分間変異処理を行った。

該処理菌体を同緩衝液で2回遠心洗浄後、NB培地3ml中、30℃で1時間培養した。

【0036】

該培養液を生理食塩水で $10^{-5} \sim 10^{-6}$ に希釈し、得られた希釈液0.1mlをNB寒天培地〔NB培地に寒天を1.4%含む培地、pH 7.2〕に塗布し、30℃で2日間培養した。

寒天培地上に生育してきたコロニーを、最少寒天培地M1〔グルコース10g、(NH₄)H₂PO₄ 1g、KCl 0.2g、MgSO₄・7H₂O 0.2g、FeSO₄・7H₂O 10mg、MnSO₄・4~6H₂O 0.2mg、ZnSO₄・7H₂O 0.9mg、CuSO₄・5H₂O 0.4mg、Na₂B₄O₇・10H₂O 0.09mg、(NH₄)₆MoO₇O₂₄・4H₂O 0.04mg、ピオチン50mg、p-アミノ安息香酸2.5mg、チアミン塩酸塩1mgおよび寒天16gを水1Lに含み、pH 7.2に調整した培地〕およびシキミ酸50mg/Lを含むM1寒天培地に各々塗布し、培養した。

【0037】

最少寒天培地M1では生育せず、シキミ酸50mg/Lを含むM1寒天培地で生育できる株を、シキミ酸要求変異株として分離した。

分離されたシキミ酸要求変異株を、シキミ酸50mg/Lを含むM1寒天培地および該培地中のグルコースをリボースに置き換えた培地に各々塗布し、培養した。

【0038】

シキミ酸50mg/Lを含むM1寒天培地で生育するが、該培地中のグルコースをリボースに置き換えた培地では生育できない株を、シキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株として分離した。

分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株を、シキミ酸50mg/Lを含むM1培地で培養後、遠心分離して得た菌体から超音波破碎による公知の方法に従って粗酵素液を調製した〔M. Ikeda and R. Katsumata, Appl. Environ. Microbiol., 58, 781-785 (1992)〕。

【0039】

該粗酵素液を用いて、トランスケトラーゼの活性を以下のようにして測定した。

トリス 50mM (pH 7.5)、NADH 0.2mM、チアミンピロリン酸 0.01mM、MgCl₂ 1mM、キシルロース-5-リン酸 0.5mM、リブロース-5-リン酸 0.5mM、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびトリオースフォスフェートイソメラーゼ混合液(ペーリンガーマンハイム社製) 20mgを含む反応液に粗酵素液を加えて1.5mlとし、30℃で反応を行った。

【0040】

340nmにおけるNADHの吸光度の減少を測定することにより、生成されるグリセルアルデヒド-3-リン酸量を測定した。

該測定により、分離されたシキミ酸要求性でかつリボース非資化性の変異株より、グリセルアルデヒド-3-リン酸を全く生成しない、トランスケトラーゼ活性を欠損した変異株TKT6株を選択した。

【0041】

コリネバクテリウム グルタミカム TKT6株は、ブダベスト条約に基づいて、平成10年6月30日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-8566)にFERM BP-6399号として寄託さ

10

20

30

40

50

れている。

【 0 0 4 2 】

実施例 2 シキミ酸非要求性復帰株の分離

T K T 6 株を、N B 培地 3 m l 中、3 0 ° で 2 4 時間培養した。

培養後、遠心分離により集菌した。

得られた菌体を生理食塩水で 3 回遠心洗浄後、生理食塩水に菌濃度が約 $10^9 / \text{m l}$ になるように懸濁した。

【 0 0 4 3 】

該菌懸濁液 0 . 1 m l を M 1 寒天培地に塗布し、3 0 ° で 3 日間培養した。

該 M 1 寒天培地上で生育可能な株をシキミ酸非要求性復帰株として取得した。

シキミ酸非要求性復帰株はいずれも、リボース資化性およびトランスケトラーゼの活性ともに野生型に戻っていた。

該結果は、シキミ酸要求性およびリボース非資化性の両形質がトランスケトラーゼ活性の欠損に起因して生じていることを示している。

上記で取得されたシキミ酸非要求性復帰株（トランスケトラーゼ欠損変異の復帰株）の内の一株を R E V 3 と命名した。

【 0 0 4 4 】

実施例 3 コリネバクテリウム グルタミンクムのトランスケトラーゼ欠損変異株によるアデニンの製造

コリネバクテリウム グルタミンクム L 2 2、T K T 6 および R E V 3 のアデニンの製造を以下のように行った。

グルコース 1 0 g / L を添加した N B 培地 3 m l に、上記 3 株を各々植菌し、3 0 ° で 2 0 時間培養した。

【 0 0 4 5 】

各培養液 0 . 1 m l を、シキミ酸 1 0 0 m g / L の入った M 1 培地 5 m l を含む太型試験管にそれぞれ接種し、3 0 ° で 2 4 時間振とう培養した。

各培養液をろ過し、得られたろ液中のアデニンの生成量を、イオン交換カラム〔Shodex Asahipak GS-320 7E（旭化成社製）〕H P L C を用い、波長 2 5 4 n m における吸収強度を測定することにより求めた。

結果を第 1 表に示す。

【 0 0 4 6 】

【表 1】

第 1 表

菌 株	アデニン(m g / L)
L 2 2	0
T K T 6	1 1 7
R E V 3	0

トランスケトラーゼ活性を欠損した T K T 6 株のみ、培養液中にアデニンを分泌蓄積していた。

【 0 0 4 7 】

T K T 6 株から得られたトランスケトラーゼの復帰株 R E V 3 では再びアデニンを生産しなくなることから、T K T 6 株におけるアデニンの生成はトランスケトラーゼの欠損に起

困していることがわかる。

【0048】

実施例4 コリネバクテリウム グルタミンムのトランスケトラーゼ欠損変異株によるL-ヒスチジンの製造

トランスケトラーゼの欠損がコリネバクテリウム グルタミンムによるヒスチジン生産に与える効果を調べるため、L22株、TKT6株およびREV3株に、ヒスチジンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミドpPH8を導入してヒスチジン生産能を增強し、それら3株のヒスチジンの蓄積量を比較した。

【0049】

pPH8はコリネバクテリウム グルタミンムのプラスミドベクターpCG11のBgII部位にコリネバクテリウム グルタミンムのヒスチジン生合成に関する遺伝子を有する約10.6kbのDNA断片が挿入されたスペクチノマイシン耐性マーカートを有するプラスミドである。

pPH8を有するコリネバクテリウム グルタミンムは米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにコリネバクテリウム グルタミンムK32(ATCC39281)として寄託されている。

【0050】

pPH8は、ATCC39281株から通常のアルカリ溶解法〔J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)〕によって単離することができる。

pPH8のL22株、TKT6株およびREV3株への導入は、コリネ型細菌で一般的に用いられているプロトプラスト法〔R. Katsumata et al., J. Bacteriol., 159, 306-311 (1984)〕やジーン・パルサー装置(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)を用いたエレクトロポレーション法(電圧2.5kV、電気容量25mF、抵抗200Ω)〔J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)〕により実施することができ、本実験においてはプロトプラスト法を用いた。

【0051】

pPH8を保有するL22株、TKT6株およびREV3株を用いたヒスチジンの製造は以下のようにして行った。

スペクチノマイシンおよびシキミ酸をそれぞれ100mg/L添加したS5種培地〔グルコース 20g、ポリペプトン 15g、酵母エキス 15g、NaCl 2.5g、尿素 1gを水1Lに含み、pH7.2に調整した培地〕3mlに上記3株を各々植菌し、30℃で24時間振とう培養した。

【0052】

得られた各培養液0.5mlを、スペクチノマイシン100mg/Lおよびシキミ酸200mg/Lを添加したP1生産培地〔グルコース 60g、KH₂PO₄ 1g、K₂HPO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 1g、(NH₄)₂SO₄ 20g、コーン スチープ リカー 5g、MnSO₄ 10mg、ビオチン 30mg、CaCO₃ 20gを水1Lに含み、pH7.2に調整した培地〕5mlの入った大型試験管にそれぞれ接種し、30℃で72時間振とう培養した。

【0053】

各培養液をろ過し、得られたろ液中のL-ヒスチジンの生成量を、HPLCを用いたOPAポストカラム誘導体化法〔Anal. Chem., 51, 1338 (1979)〕により定量した。

結果を第2表に示す。

【0054】

【表2】

10

20

30

40

第 2 表

菌 株	L-ヒスチジン(g/L)
L 2 2 / p P H 8	1 . 6
T K T 6 / p P H 8	3 . 1
R E V 3 / p P H 8	1 . 6

10

T K T 6 / p P H 8 株では L 2 2 / p P H 8 株に比べ、L-ヒスチジンの蓄積量が約 2 倍に向上している。一方、R E V 3 / p P H 8 株の L-ヒスチジンの蓄積量は L 2 2 / p P H 8 株と同レベルであることから、T K T 6 / p P H 8 株における L-ヒスチジン生産性の向上はトランスケトラーゼの欠損に起因していることは明白である。

【 0 0 5 5 】

実施例 5 コリネバクテリウム グルタミンクムのトランスケトラーゼ欠損変異株によるリボフラビンの製造

20

トランスケトラーゼの欠損がコリネバクテリウム グルタミンクムによるリボフラビン生産に与える効果を調べるため、L 2 2 株、T K T 6 株および R E V 3 株に、リボフラビンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミド p F M 4 1 を導入してリボフラビン生産能を增强し、それら 3 株のリボフラビンの蓄積量を比較した。

【 0 0 5 6 】

p F M 4 1 はコリネバクテリウム グルタミンクムのプラスミドベクター p C G 1 1 の B g 1 I I 部位にコリネバクテリウム アンモニアゲネスのリボフラビン生合成に關与する遺伝子を有する約 4 . 2 k b の DNA 断片が挿入されたスペクチノマイシン耐性マーカーを有するプラスミドである。

p F M 4 1 を有するコリネバクテリウム アンモニアゲネスは工業技術院微生物工業技術研究所に、コリネバクテリウム アンモニアゲネス F M 4 1 (F E R M B P - 4 0 0 3) として寄託されている。

30

【 0 0 5 7 】

F M 4 1 株からの p F M 4 1 の単離および、p F M 4 1 の L 2 2 株、T K T 6 株および R E V 3 株への導入は、実施例 4 記載の方法に準じて実施した。

p F M 4 1 を保有する L 2 2 株、T K T 6 株および R E V 3 株を用いたリボフラビンの製造は以下のようにして行った。

スペクチノマイシンおよびシキミ酸をそれぞれ 1 0 0 m g / L 添加した S 5 種培地 3 m l に上記 3 株を各々植菌し、3 0 で 2 4 時間振とう培養した。

【 0 0 5 8 】

得られた各培養液 0 . 5 m l を、スペクチノマイシン 1 0 0 m g / L およびシキミ酸 2 0 0 m g / L を添加した P 1 生産培地 5 m l の入った太型試験管にそれぞれ接種し、3 0 で 7 2 時間振とう培養した。

40

各培養液をろ過し、得られたる液中のリボフラビンの生成量を、逆相カラム〔R P 1 8 (メルク社製)〕H P L C を用い、発光波長 5 3 0 n m および励起波長 4 5 0 n m における蛍光強度を測定することにより、定量した。

結果を第 3 表に示す。

【 0 0 5 9 】

【表 3】

第 3 表

菌 株	リボフラビン(m g /L)
L 2 2 / p F M 4 1	4 2
T K T 6 / p F M 4 1	1 0 8
R E V 3 / p F M 4 1	4 0

10

T K T 6 / p F M 4 1 株では L 2 2 / p F M 4 1 株に比べリボフラビンの蓄積量が 2 倍以上に向上している。一方、R E V 3 / p F M 4 1 株のリボフラビンの蓄積量は L 2 2 / p F M 4 1 株と同レベルであることから、T K T 6 / p F M 4 1 株におけるリボフラビン生産性の向上はトランスケトラーゼの欠損に起因していることは明白である。

【 0 0 6 0 】

実施例 6 エシェリヒア コリのトランスケトラーゼ活性低下株によるリボフラビンの製造

20

トランスケトラーゼの欠損がエシェリヒア コリによるリボフラビンの生産に与える効果を調べるため、エシェリヒア コリ E J 5 0 0 株およびそのトランスケトラーゼ変異株 A I 8 0 に、リボフラビンの生合成遺伝子を含む組換え体プラスミド p F M 2 0 1 を導入してリボフラビン生産能を付与し、両組換え株のリボフラビンの蓄積量を比較した。

【 0 0 6 1 】

A I 8 0 株は、E J 5 0 0 株 (W 3 1 1 0 c f s) から T n 1 0 の転移により得られたトランスケトラーゼ変異株で、2 つのトランスケトラーゼ遺伝子の内の一方の t k t A 遺伝子が T n 1 0 の挿入によって破壊されているため、トランスケトラーゼの活性が親株の約 3 0 % に低下している [A. Iida et al., J. Bacteriol., 175, 5375-5383 (1993)] 。

【 0 0 6 2 】

p F M 2 0 1 は、p U C 1 9 の l a c プロモーターの下流にコリネバクテリウム アンモニアゲネスのリボフラビン生合成に関与する遺伝子を含む D N A 断片が挿入されたアンピシリン耐性マーカーを有するプラスミドであり、特開平 6 2 2 5 7 7 6 に記載された方法で調製した。

30

p F M 2 0 1 の E J 5 0 0 株および A I 8 0 株への導入は、通常のエレクトロポレーション法やカルシウム法 [J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] により実施することができ、本実験においてはカルシウム法を用いた。

【 0 0 6 3 】

p F M 2 0 1 を保有する E J 5 0 0 株および A I 8 0 株のリボフラビンの製造は以下のように行った。

40

1 0 0 m g / L のアンピシリンを添加した L B 培地 [バクトトリプトン 1 0 g、酵母エキス 5 g、N a C l 5 g を水 1 L に含み、p H 7 . 2 に調整した培地] 3 m l に上記 2 株を各々植菌し、3 0 で 1 6 時間振とう培養した。

【 0 0 6 4 】

得られた各培養液 0 . 1 m l を、アンピシリンおよびシキミ酸をそれぞれ 1 0 0 m g / L 添加した P 6 生産培地 [グルコース 5 g、K H ₂ P O ₄ 3 g、M g S O ₄ · 7 H ₂ O 0 . 2 5 g、N a C l 5 g、N H ₄ C l 1 g、N a H P O ₄ 6 g、チアミン塩酸塩 4 m g を水 1 L に含み、p H 7 . 2 に調整した培地] 5 m l の入った太型試験管にそれぞれ接種し、3 7 で 2 4 時間振とう培養した。

50

【0065】

各培養液中のリボフラビンの生成量を実施例5記載の方法に準じて、HPLCを用いて定量した。

結果を第4表に示す。

【0066】

【表4】

第 4 表

菌 株	リボフラビン(mg/L)
E J 5 0 0 / p F M 2 0 1	1 4
A I 8 0 / p F M 2 0 1	2 5

10

A I 8 0 / p F M 2 0 1 株ではE J 5 0 0 / p F M 2 0 1 株に比べ、リボフラビンの蓄積量が約1.8倍に向上しており、トランスケトラーゼ活性を低下させることによりリボフラビンの生産性が向上することが示された。

20

【0067】

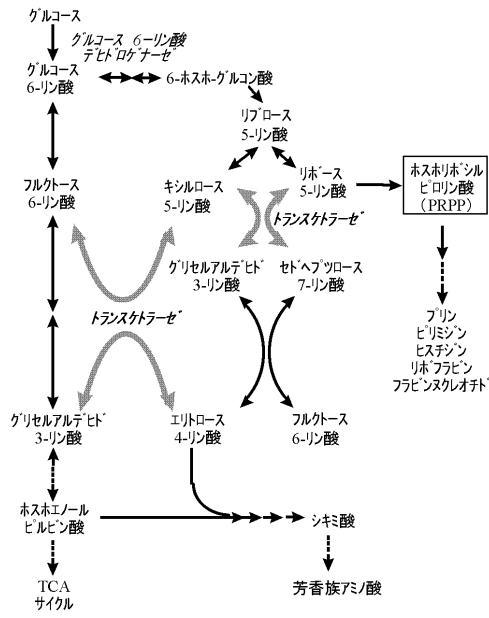
【発明の効果】

本発明によれば、トランスケトラーゼ活性を欠損、または親株に比べて低下させた変異株を用いることにより、PRPPを經由して生合成される代謝産物の工業的に有利な製造法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、グルコースからPRPPまでの代謝経路を示した図である。

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 R	1/13	(2006.01)	C 1 2 P	17/18	
C 1 2 R	1/15	(2006.01)	C 1 2 R	1:13	
C 1 2 R	1/19	(2006.01)	C 1 2 P	17/18	
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 P	17/18	
			C 1 2 R	1:19	
			C 1 2 N	1/20	A
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 N	1/21	
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 N	15/00	A
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 P	13/24	C
			C 1 2 R	1:13	
			C 1 2 P	13/24	C
			C 1 2 R	1:15	
			C 1 2 P	13/24	C
			C 1 2 R	1:19	

- (56)参考文献 特開平06 - 169785 (JP, A)
 特開平06 - 225776 (JP, A)
 Biochemistry, 1973年, vol.12, 1969-1977
 J Bacteriol., 1993年, vol.175, 5375-5383
 Appl Microbiol Biotechnol., 1997年, vol.48, 141-148
 化学と生物, 1985年, vol.23, 240-248

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
 C12P 17/10
 C12P 13/24
 C12P 17/18
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)