

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5320692号
(P5320692)

(45) 発行日 平成25年10月23日 (2013. 10. 23)

(24) 登録日 平成25年7月26日 (2013. 7. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 P 7/56 (2006. 01)	C 1 2 P 7/56 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 7 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-163859 (P2007-163859)	(73) 特許権者	000003159
(22) 出願日	平成19年6月21日 (2007. 6. 21)		東レ株式会社
(65) 公開番号	特開2008-29329 (P2008-29329A)		東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(43) 公開日	平成20年2月14日 (2008. 2. 14)	(72) 発明者	澤井 健司
審査請求日	平成22年6月8日 (2010. 6. 8)		神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
(31) 優先権主張番号	特願2006-178048 (P2006-178048)		レ株式会社 基礎研究所内
(32) 優先日	平成18年6月28日 (2006. 6. 28)	(72) 発明者	澤井 秀樹
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
			レ株式会社 基礎研究所内
		(72) 発明者	園木 和典
			神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
			レ株式会社 基礎研究所内
		(72) 発明者	耳塚 孝
			神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東
			レ株式会社 基礎研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母及びL-乳酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゼノプス・レーピス (Xenopus laevis) 由来のL-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母。

【請求項 2】

前記L-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、配列番号1に示す核酸配列を有する遺伝子であることを特徴とする、請求項1に記載の酵母。

【請求項 3】

前記酵母がサッカロミセス (Saccharomyces) 属に属することを特徴とする、請求項1または2に記載の酵母。

【請求項 4】

前記酵母がサッカロミセス・セレビセ (Saccharomyces cerevisiae) であることを特徴とする、請求項1～3のいずれかの項に記載の酵母。

【請求項 5】

前記L-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、該遺伝子の発現を可能とするプロモーターの下流に導入されたことを特徴とする、請求項1～4のいずれかの項に記載の酵母。

【請求項 6】

前記L-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子 (PDC1 遺伝子) のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入されたことを特徴とする、請求項1～5いずれかの項に記載の酵母。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれかの項に記載の酵母を培養することを含む、L - 乳酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母及び該酵母を培養することを含む L - 乳酸の製造方法に関するものである。

【背景技術】

10

【0002】

最近、資源循環型社会の構築に向け、植物を原料としたポリマーに注目が集まっている。その中でも、ポリ乳酸（以下、PLAと略すことがある。）が、植物原料のポリマーとして優れた性質を有することが明らかになってきている。

【0003】

PLAの原料である乳酸は、従来ラクトバチラス（*Lactobacillus*）属やラクトコッカス（*Lactococcus*）属に代表される、いわゆる乳酸菌と総称される微生物を培養することにより製造されている。これらの乳酸菌は、糖からの乳酸の収率には優れているものの酸に対する耐性が低いことから、酸性物質である乳酸を多量に蓄積させるためには、炭酸カルシウムや水酸化アンモニウム、あるいは水酸化ナトリウムなどのアルカリで中和をしながら、培養を行わなければならない。

20

【0004】

しかしながら、この手段ではアルカリによる中和操作により、乳酸ナトリウムや乳酸カルシウムなどの乳酸塩が生じるため、その後の精製工程において乳酸塩を乳酸に戻す操作が必要になり、その処理にコストがかかっている。

【0005】

そこで中和コスト低減を目的として、酸に耐性のある酵母に乳酸を生産させる試みが報告されている（特許文献 1 ～ 5、非特許文献 1 ～ 3）。酵母は本来乳酸生産能を持たないことから、酵母による乳酸生産を可能にするためには、ピルビン酸を L - 乳酸に変換する酵素である L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子（以下、L - ldh 遺伝子と略すことがある。）を遺伝子組み換え技術を用い酵母に導入しなければならない。

30

【0006】

酵母に導入する L - ldh 遺伝子としては、従来よりウシ由来の L - ldh 遺伝子が検討されており（特許文献 3、特許文献 5 及び非特許文献 1 ～ 3）、乳酸菌由来の L - ldh 遺伝子よりも適していることが報告されている（非特許文献 3）。

【特許文献 1】特開 2001 - 204464 号公報

【特許文献 2】特開 2001 - 204468 号公報

【特許文献 3】特表 2001 - 516584 号公報

【特許文献 4】特開 2003 - 93060 号公報

【特許文献 5】特開 2003 - 259878 号公報

40

【非特許文献 1】ダニロ・ポロ（Danilo Porro）ら：「バイオテクノロジー プロGRESS（Biotechnol.Prog）」, 11 : p294-298 (1995)

【非特許文献 2】ダニロ・ポロ（Danilo Porro）ら：「アプライド アンド エンバイオロンメンタル マイクロバイオロジー（Applied and Environmental Microbiology）」, 65(9) : p4211-4215(1999)

【非特許文献 3】サトシ・サイトウ（Satoshi Saitoh）ら：「アプライド アンド エンバイオロンメンタル マイクロバイオロジー（Applied and Environmental Microbiology）」, 71(5) : p2789-2792 (2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 7 】

従来のウシ由来 L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することによる L - 乳酸の製造においては、例えばグルコースなどの原料糖から L - 乳酸への変換効率、例えば対糖収率は、乳酸菌を培養して得られる L - 乳酸の対糖収率よりも低く、低コストで L - 乳酸を製造可能にするためには対糖収率を上昇させる必要があった。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

上記課題を解決するために、本発明者らが鋭意検討した結果、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することにより、従来のウシ由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

10

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を提供するものである。ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母は、好ましくは、配列番号 1 に示す核酸配列を有する遺伝子が導入された酵母である。

20

【 0 0 1 0 】

本発明の別の好ましい態様によれば、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母は、サッカロミセス (Saccharomyces) 属に属する酵母であり、さらに好ましくはサッカロミセス・セレビセ (Saccharomyces cerevisiae) である。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の好ましい態様によれば、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が染色体上のビルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子 (PDC1 遺伝子) のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入された酵母である。

30

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、上記 ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素が導入された酵母を培養することを含む、L - 乳酸の製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、カエル由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することにより、従来のウシ由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造することができる。

40

【 0 0 1 4 】

本発明のカエル由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を既知の方法により改良し、該酵母を培養することにより更に高い対糖収率で L - 乳酸を製造することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 5 】

本発明は、カエル由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子 (L - l d h 遺伝子) が導入された酵母である。

【 0 0 1 6 】

50

本発明において、L - l d h 遺伝子とは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) とピルビン酸を L - 乳酸と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) に変換する活性を持つ L - 乳酸脱水素酵素をコードしている遺伝子である。

【0018】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子は、好ましくは、配列番号 1 に示す核酸配列を有する L - l d h 遺伝子である。

【0019】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子には、遺伝的多型性や、変異誘発などによる変異型の遺伝子も含まれる。ここでいう遺伝的多型性とは、遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものである。また、変異誘発とは、人工的に遺伝子に変異を導入することをいい、例えば、部位特異的変異導入用キット (Mutan-K (タカラバイオ社製)) を用いる方法や、ランダム変異導入用キット (BD Diversify PCR Random Mutagenesis (CLONTECH 社製)) を用いる方法などがある。

【0020】

本発明で使用する酵母は、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子を導入しうる酵母であれば制限はないが、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、クリベロミセス (*Kluyveromyces*) 属又はカンジダ (*Candida*) 属に属する酵母が挙げられる。好ましくは、サッカロミセス・セレビセ (*Saccharomyces cerevisiae*) であって、具体的には、NBRC10505 株、NBRC10506 株が好ましい。

【0021】

本発明のゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を酵母に導入する方法としては、例えば、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子をクローニングし、クローニングした該遺伝子を組み込んだ発現ベクターを酵母に形質転換する方法、クローニングした該遺伝子を染色体上の目的箇所に相同組換えで挿入する方法等が挙げられるが、これに限られるものではない。

【0022】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子をクローニングする方法としては特に制限はなく、既知の手法を用いることができる。例えば、既知の遺伝子情報に基づき、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて必要な遺伝領域を増幅取得する方法や、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーより相同性や酵素活性を指標としてクローニングする方法などが挙げられる。また、既知のタンパク質情報に基づき化学合成的又は遺伝子工学的に合成する方法も可能である。

【0023】

クローニングしたゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子を組み込む発現ベクターとしては、酵母で汎用的に利用される発現ベクターを用いることができる。酵母で汎用的に利用される発現ベクターとは、酵母細胞内での自立的複製に必要な配列、大腸菌細胞内での自立的複製に必要な配列、酵母選択マーカー及び大腸菌選択マーカーを有しており、また、組み込んだゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子を発現させるために、その発現を調節するオ

ペレーター、プロモーター、ターミネーター又はエンハンサー等のいわゆる調節配列をも有していることが望ましい。

【0024】

ここで、酵母細胞内での自立的複製に必要な配列とは、例えば、酵母の自立複製開始点（ARS1）とセントロメア配列の対もしくは酵母の2 μmプラスミドの複製開始点であり、大腸菌内での自立的複製に必要な配列とは、例えば、大腸菌のColE1複製開始点である。また、酵母選択マーカーとしては、URA3又はTRP1等の栄養要求性相補的遺伝子もしくはG418耐性遺伝子又はネオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられ、大腸菌の選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子又はカナマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。

10

【0025】

調節配列としては、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を発現可能なものであれば特に制限はないが、一例として酸性フォスファターゼ遺伝子（PHO5）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（TDH1, 2, 3）、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ADH1, 2, 3, 4, 5, 6, 7）遺伝子、ガラクトース代謝系遺伝子（GAL1, 7, 10）、シトクロムc遺伝子（CYC1）、トリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子（TPI1）、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子（PGK1）、ホスホフルクトースキナーゼ遺伝子（PFK1）、ビルビンデカルボキシラーゼ遺伝子（PDC1, 5, 6）などのプロモーター配列及びTDH3遺伝子などのターミネーター配列が挙げられる。

20

【0026】

上記発現ベクターのプロモーター下流にゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を導入することにより、該遺伝子が発現可能なベクターが得られる。得られたゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子発現ベクターを、後述する方法により酵母に形質転換することにより、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を酵母に導入することができる。

30

【0027】

また、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を染色体上に挿入することで、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を酵母に導入することができる。ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を染色体中に挿入する方法に特に制限はないが、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを後述する方法により酵母に形質転換し、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を非同組交換によって染色体中のランダムな位置に挿入する方法や、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを非同組交換により目的とする箇所に挿入する方法などを用いることができる。好ましくは、非同組交換による方法である。

40

【0028】

ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを染色体中の目的箇所に、好ましくはPDC1遺伝子のプロモーターの下流に非同組交換で挿入する方法としては、ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l dh遺伝子を含むDNAの上流及び下流に、導入目的箇所に相同的な部分を付加するようにデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR断片を後述する方法により酵母に形質転換する方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。また、形質転換株の選択を容易にするために、上記PCR断片には酵母選択マーカー

50

ーが含まれることが好ましい。

【0029】

ここで用いるPCR断片の調製は、例えば、下記(1)～(3)のステップ1～3の工程により行うことができる。その概略を図1に示す。

【0030】

(1)ステップ1：ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL - 1dh遺伝子の下流にターミネーターがつながったプラスミドを鋳型とし、プライマー1, 2をセットとしてゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL - 1dh遺伝子及びターミネーターを含む断片をPCRで増幅する。プライマー1は、導入目的箇所の上流側に相等的な配列40bp以上を付加するようデザインし、プライマー2は、ターミネーターより下流のプラスミド由来の配列をもとにデザインする。好ましくは、プライマー1に付加する導入目的箇所の上流側に相当する配列は、ビルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子(PDC1遺伝子)の上流に相当する配列である。

10

【0031】

(2)ステップ2：酵母選択マーカを持つプラスミド、例えばpRS424、pRS426等を鋳型として、プライマー3, 4をセットとして酵母選択マーカを含む断片をPCRで増幅する。プライマー3は、ステップ1のPCR断片のターミネーターより下流の配列と相同性のある配列が30bp以上を付加するようデザインし、プライマー4には、導入目的箇所の下流側に相当する配列40bp以上を付加するようデザインする。好ましくは、プライマー4に付加する導入目的箇所の下流側に相当する配列は、PDC1遺伝子の下流に相当する配列である。

20

【0032】

(3)ステップ3：ステップ1, 2で得られたPCR断片を混合したものを鋳型とし、プライマー1, 4をセットとしてPCRを行うことにより、両末端に導入目的箇所の上流側及び下流側に相当する配列が付加された、カエル由来L - 1dh遺伝子、ターミネーター及び酵母選択マーカを含むPCR断片が得られる。好ましくは、前記PCR断片は、両末端にPDC1遺伝子の上流及び下流に相当する配列が付加された、カエル由来のL - 1dh遺伝子、ターミネーター及びマーカ遺伝子を含むPCR断片である。

30

【0033】

上記で得られたゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL - 1dh遺伝子発現ベクターまたはPCR断片を酵母に導入するには、形質転換、形質導入、トランスフェクション、コトランスフェクションまたはエレクトロポレーション等の方法を用いることができる。具体的には、例えば、酢酸リチウムを用いる方法やプロトプラスト法等がある。

【0034】

得られた形質転換株の培養方法としては、例えば、「M.D. Rose et al., "Methods In Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)」等に記載されている既知の方法を用いることができる。カエル由来のL - 1dh遺伝子発現ベクター又はPCR断片が導入された酵母は、発現ベクター又はPCR断片が有する酵母選択マーカによって、栄養非添加培地又は薬剤添加培地で培養することにより選択することができる。

40

【0035】

本発明のゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL - 1dh遺伝子が導入された酵母を培養することにより、培地中にL - 乳酸を製造することができる。

【0036】

本発明のL - 乳酸の製造方法で使用する乳酸生産培地は、酵母が資化し得る炭素源、窒素源および無機塩類等を含有し、酵母の培養を効率的に行うことができる培地であれば、

50

天然培地および合成培地のいずれを用いても良い。

【 0 0 3 7 】

培地に含有される炭素源は、シュクロース、フラクトース、グルコース、ガラクトース、ラクトース、マルトース等の糖類、これら糖類を含有するデンプン、及び、デンプン加水分解物、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ハイテストモラセス、ケーンジュース、ケーンジュース抽出物または濃縮液、ケーンジュースからの精製または結晶化された原料糖、ケーンジュースからの精製または結晶化された精製糖、更には酢酸等の有機酸、エタノールなどのアルコール類、グリセリン等の糖の原料、またはこれらから選ばれる少なくとも１種類を含むものが好ましい。

【 0 0 3 8 】

前記の炭素源は、培養開始時に一括して添加してもよいし、培養中分割してあるいは連続的に添加することもできる。

【 0 0 3 9 】

本発明のＬ－乳酸の製造方法において、炭素源の濃度は、好ましくは、１Ｌ培養液に１０ｇ以上１０００ｇ以下であり、より好ましくは、１Ｌ培養液に５０ｇ以上３００ｇ以下であり、特に好ましくは、１Ｌ培養液に５０ｇ以上２００ｇ以下である。炭素源の濃度が、１Ｌ培養液に１０ｇ以上１０００ｇ以下であると、乳酸合成能力を有する酵母が正常に生育し、酵母の乳酸生産が効率的であるので、好ましい。

【 0 0 4 0 】

本発明のＬ－乳酸の製造方法では、使用する乳酸生産培地が、シュクロース、フラクトース、グルコース、ガラクトース、ラクトース、マルトースから選ばれる少なくとも１種類を含む乳酸生産培地であることが、より好ましい。また、乳酸の製造方法で使用する乳酸生産培地が、デンプン、及び、デンプン加水分解物、甘藷糖蜜、甜菜糖蜜、ハイテストモラセス、ケーンジュース、ケーンジュース抽出物または濃縮液、ケーンジュースからの精製または結晶化された原料糖、ケーンジュースからの精製または結晶化された精製糖、酢酸等の有機酸、エタノールなどのアルコール類、グリセリンから選ばれる少なくとも１種類を含む乳酸生産培地であることが、より好ましい。本発明では、これら発酵原料を必要に応じて希釈して用いることができる。

【 0 0 4 1 】

また、発酵原料に含有される窒素源は、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが好ましく使用される。

【 0 0 4 2 】

また、発酵原料に含有される無機塩として、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等を適宜添加することができる。

【 0 0 4 3 】

本発明のＬ－乳酸の製造方法で使用する乳酸生産培地は、必要に応じて、ポリエーテル系、アルコール系又はシリコン系等の消泡剤を使用することができる。

【 0 0 4 4 】

導入する発現ベクターを酵母内に保持させるのであれば、選択マーカーによる選択圧をかけた培地を用いることが好ましい。培地としては、例えば、ベクターの持つ選択マーカーに符号するアミノ酸を除去した合成培地などが挙げられる。特に好ましい培地は、炭素源としてグルコースを１～１０％、窒素源として「Yeast Nitrogen Base without amino acid」（DIFCO社製）を０．６７％含有し、適切なアミノ酸を添加した合成培地である。

【 0 0 4 5 】

Ｌ－乳酸の製造に際しては、まず、本発明の酵母を前培養し、前培養液を新しい培地に移して本培養することにより、培養液中にＬ－乳酸を製造することができる。培養温度は、菌株の増殖が実質的に阻害されず乳酸を生産し得る範囲であれば特に制限されるもので

10

20

30

40

50

ないが、好ましくは20～40の範囲の温度であり、より好ましくは25～35の範囲の温度であり、さらに好ましくは30である。培養には、静置、撹拌または振とうのいずれの方法も採用し得る。

【0046】

上記のような条件で本発明の酵母を培養することにより、培養液中にL-乳酸が得られる。得られたL-乳酸の測定法に特に制限はないが、例えば、HPLCを用いる方法や、F-キット（ロシュ社製）を用いる方法などがある。

【0047】

本発明において、L-乳酸脱水素酵素活性とは、ピルビン酸とNADHをL-乳酸とNAD⁺に変換する活性を示す。また限定されるわけではないが、L-乳酸脱水素酵素活性は比活性を指標として比較できる。すなわち、L-l d h遺伝子導入方法及び遺伝的バックグラウンドが同じ酵母を同条件で培養し、培養菌体から抽出したタンパク質を用いてNADHの減少に伴う340nmにおける吸光度の変化を測定する。その際に、室温において1分間あたりに1μmolのNADHを減少させる酵素量を1単位（Unit）と定義する事により、L-乳酸脱水素酵素の比活性は式（1）であらわせる。ここで、340は1分間あたりの340nmの吸光度の減少量、6.22はNADHのミリモル分子吸光係数である。

【0048】

【数1】

$$\text{比活性 (Unit/mg)} = \frac{\Delta 340 \times \text{全反応液量(ml)}}{\{\text{酵素液濃度(mg/ml)} \times \text{酵素液量(ml)}\} \times 6.22 \times \text{光路長(cm)}} \quad \cdots \cdots (1)$$

【実施例】

【0049】

以下、実施例をもって本発明の実施の態様を説明するが、これらは例示であり、本発明を何等制限するものではない。

【0050】

（実施例1：ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l d h遺伝子発現ベクターの作製）

ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l d h遺伝子として、配列番号1に示す核酸配列を有するL-l d h遺伝子を使用した。ゼノプス・レービス（Xenopus laevis）由来のL-l d h遺伝子のクローニングはPCR法により行った。PCRには、ゼノプス・レービスの腎臓由来cDNAライブラリー（STRATA GENE社製）より付属のプロトコールに従い調製したファージミドDNAを鋳型とした。

【0051】

PCR増幅反応には、KOD-Plus polymerase（東洋紡社製）を用い、反応バッファー、dNTPmixなどは付属のものを使用した。上記のように付属のプロトコールに従い調整したファージミドDNAを50ng/サンプル、プライマーを50pmol/サンプル、及びKOD-Plus polymeraseを1ユニット/サンプルになるように50μlの反応系に調製した。反応溶液をPCR増幅装置iCycler（BIO-RAD社製）により94の温度で5分熱変成させた後、94（熱変成）：30秒、55（プライマーのアニール）：30秒、68（相補鎖の伸張）：1分を1サイクルとして30サイクル行い、その後4の温度に冷却した。なお、遺伝子増幅用プライマー（配列番号3，4）には、5末端側にはSalI認識配列、3末端側にはNotI認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

【0052】

P C R 増幅断片を精製し、末端をT4 polynucleotide Kinase (タカラバイオ社製) によりリン酸化後、p U C 1 1 8 ベクター (制限酵素H i n c I I で切断し、切断面を脱リン酸化処理したもの) にライゲーションした。ライゲーションは、DNA Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ社製) を用いて行った。ライゲーション溶液を大腸菌D H 5 のコンピテント細胞 (タカラバイオ社製) に形質転換し、抗生物質アンピシリンを50 μg / mL を含むL B プレートに蒔いて一晚培養した。生育したコロニーについて、ミニプレップでプラスミドDNAを回収し、制限酵素S a l I 及びN o t I で切断し、カエル由来のL - l d h 遺伝子が挿入されているプラスミドを選抜した。これら一連の操作は、全て付属のプロトコールに従って行った。

【0053】

上記ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子が挿入されたp U C 1 1 8 ベクターを制限酵素S a l I 及びN o t I で切断し、DNA断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離、定法に従ってゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子を含む断片を精製した。得られたL - l d h 遺伝子を含む断片を、図2に示す発現ベクターp T R S 1 1 のX h o I / N o t I 切断部位にライゲーションし、上記と同様な方法でプラスミドDNAを回収し、制限酵素X h o I 及びN o t I で切断することにより、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子が挿入された発現ベクターを選抜した。以後、このようにして作製したゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子を組み込んだ発現ベクターをp T R S 1 0 2 とする。

【0054】

(比較例1: ウシ由来L - l d h 遺伝子発現ベクターの作製)

比較例として、ウシ由来のL - l d h 遺伝子が導入された酵母を作成した。

【0055】

ウシ由来L - l d h 遺伝子 (配列番号2) のクローニングはP C R 法にて行った。P C R には、ウシの骨格筋由来c D N A ライブラリー (STRATAGENE社製) より付属のプロトコールに従って調製したファージミドDNAを鋳型とし、実施例1と同条件の増幅反応を行った。なお、遺伝子増幅用プライマー (配列番号5, 6) には、5末端側にはX h o I 認識配列、3末端側にはN o t I 認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

【0056】

以下、実施例1で制限酵素S a l I を用いる箇所において制限酵素X h o I を用いることを除き、実施例1と同様な方法でウシ由来のL - l d h 遺伝子が挿入された発現ベクターを作製した。以後、このようにして作製したウシ由来のL - l d h 遺伝子を組み込んだ発現ベクターをp T R S 4 9 とする。

【0057】

(実施例2: ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子発現ベクターの酵母への導入)

実施例1のようにして得られたp T R S 1 0 2 を酵母サッカロミセス・セレビセN B R C 1 0 5 0 5 株のp d c 1 遺伝子を破壊した株 (以下、29 - 1 B 株と示す。) に形質転換した。形質転換は、YEASTMAKER YEAST Transformation System (C L O N T E C H 社製) を用いた酢酸リチウム法により行い、詳細は付属のプロトコールに従った。宿主とする29 - 1 B 株はウラシル合成能を欠損した株であり、p T R S 1 0 2 の持つU R A 3 遺伝子の働きにより、ウラシル非添加培地上でp T R S 1 0 2 の導入された形質転換株の選択が可能である。このようにして得られた形質転換株へのゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子発現ベクター導入の確認は、形質転換株から、ゲノムDNA抽出キットG e n とるくん (タカラバイオ社製) によりプラスミドDNAを含むゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPremix Taq (タカラバイオ社製) を用いたP C R により行った。確認用プライマーには、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL - l d h 遺伝子をクローニングした際に用いたプライマー (配

10

20

30

40

50

列番号 3, 4) を使用した。その結果、p T R S 1 0 2 を形質転換した株において、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来 L - l d h 遺伝子が導入されていることを確認した。以下、上記 p T R S 1 0 2 が導入された形質転換株を 2 9 - 1 B / p T R S 1 0 2 株とする。

【 0 0 5 8 】

(比較例 2 : ウシ由来の L - l d h 遺伝子発現ベクターの酵母への導入)

比較例 1 のようにして得られた p T R S 4 9 を、実施例 2 と同様な方法で 2 9 - 1 B に形質転換した。また、ウシ由来の L - l d h 遺伝子導入の確認も実施例 2 と同様な方法で行い、プライマーとして配列番号 5, 6 に示すオリゴヌクレオチドを用いた。以下、上記 p T R S 4 9 が導入された形質転換株を 2 9 - 1 B / p T R S 4 9 株とする。

【 0 0 5 9 】

(実施例 3 : ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子の P D C 1 遺伝子座への導入)

実施例 1 で得られた p T R S 1 0 2 を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 7, 8) をプライマーセットとした P C R により、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子及び T D H 3 ターミネーター配列を含む 1 . 3 k b の P C R 断片を増幅した (図 1 のステップ 1 に相当) 。ここで配列番号 7 は、P D C 1 遺伝子の開始コドンから上流 6 5 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

【 0 0 6 0 】

次に、プラスミド p R S 4 2 4 を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 1 0, 1 1) をプライマーセットとした P C R により、酵母選択マーカーである T R P 1 遺伝子を含む 1 . 2 k b の P C R 断片を増幅した (図 1 のステップ 2 に相当) 。ここで、配列番号 1 1 は、P D C 1 遺伝子の終始コドンから下流 6 5 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

【 0 0 6 1 】

それぞれの D N A 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製した。ここで得られた各 1 . 3 k b 断片、1 . 2 k b 断片を混合したものを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 7, 1 1) をプライマーセットとした P C R 法によって、カエル由来の L - l d h 遺伝子、T D H 3 ターミネーター及び T R P 1 遺伝子が連結された約 2 . 5 k b の P C R 断片を増幅した (図 1 のステップ 3 に相当) 。

【 0 0 6 2 】

上記の P C R 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製後、酵母サッカロミセス・セレビセ N B R C 1 0 5 0 5 株に形質転換し、トリプトファン非添加培地で培養することにより、カエル由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入されている形質転換株を選択した。

【 0 0 6 3 】

上記のようにして得られた形質転換株が、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入されている酵母であることの確認は下記のように行った。まず、形質転換株のゲノム D N A をゲノム D N A 抽出キット G e n とるくん (タカラバイオ社製) により調製し、これを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 1 1, 1 2) をプライマーセットとした P C R により、約 2 . 8 k b の増幅 D N A 断片が得られることで確認した。なお、非形質転換株では、上記 P C R によって約 2 . 1 k b の増幅 D N A 断片が得られる。以下、上記 ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入された形質転換株を、B 2 株とする。なお、P D C 1 遺伝子の上流及び下流配列は、S a c c h a r o m y c e s G e n o m e D a t a b a s e (URL: <http://www.yeastgenome.org/>) より取得することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

(比較例 3 : ウシ由来 L - 1 d h 遺伝子の P D C 1 遺伝子座への導入)

比較例 1 で得られた p T R S 4 9 を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 8 , 9) をプライマーセットとした P C R により、ウシ由来の L - 1 d h 遺伝子及び T D H 3 ターミネーターを含む 1 . 3 k b の P C R 断片を増幅した。ここで配列番号 9 は、配列番号 7 と同様に P D C 1 遺伝子の開始コドンから上流 6 5 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

【 0 0 6 5 】

上記の P C R 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製し、実施例 3 で得られた T R P 1 遺伝子を含む 1 . 2 k b の P C R 断片と混合し、オリゴヌクレオチド (配列番号 9 , 1 1) をプライマーセットとした P C R 法によって、ウシ由来の L - 1 d h 遺伝子、T D H 3 ターミネーター及び T R P 1 遺伝子が連結された約 2 . 5 k b の P C R 断片を増幅した。

10

【 0 0 6 6 】

上記の P C R 断片を実施例 3 と同様な方法で N B R C 1 0 5 0 5 株に形質転換し、トリプトファン非添加培地で培養することにより、ウシ由来 L - 1 d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入されている形質転換株を選択した。

【 0 0 6 7 】

上記のようにして得られた形質転換株が、ウシ由来の L - 1 d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入されている酵母であることの確認は、実施例 3 と同様の方法で行った。以下、上記ウシ由来の L - 1 d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入された形質転換株を、L 5 株とする。

20

【 0 0 6 8 】

(実施例 4 、 比較例 4 : L - 乳酸生産性テスト 1)

実施例 2 、 比較例 2 のようにして得られた 2 9 - 1 B / p T R S 1 0 2 株及び 2 9 - 1 B / p T R S 4 9 株を用いて L - 乳酸生産性テストを行った。

【 0 0 6 9 】

表 1 に示した組成の培地 (以下、S C 3 - U r a 培地と略す。) 1 0 m L を試験管に取り、そこに少量の 2 9 - 1 B / p T R S 1 0 2 株及び 2 9 - 1 B / p T R S 4 9 株を植菌し、3 0 ° で一晩培養した (前々培養) 。次に、S C 3 - U r a 培地 1 0 0 m L を 5 0 0 m L 容三角フラスコにいれ、各前々培養液をそれぞれ全量植菌し、3 0 ° で 2 4 時間振とう培養した (前培養) 。続いて、S C 3 - U r a 培地を 1 L 投入したミニジャーファメンター (丸菱バイオエンジニアリング社製、容量 5 L) に、前培養開始から 2 4 時間後の前培養液をそれぞれ全量植菌し、攪拌速度 (1 2 0 r p m) 、通気量 (0 . 1 L / m i n) 、温度 (3 0 °) 、p H (p H 5) を一定にして培養を行った (本培養) 。本培養開始後 4 0 時間の培養液を遠心分離し、得られた上清を膜濾過した後、下記に示す条件で H P L C により L - 乳酸量を測定した。

30

【 0 0 7 0 】

カラム : S h i m - P a c k S P R - H (島津社製)

移動相 : 5 m M p - トルエンスルホン酸 (流速 0 . 8 m L / m i n)

40

反応液 : 5 m M p - トルエンスルホン酸、2 0 m M ビストリス、0 . 1 m M E D T A ・ 2 N a (流速 0 . 8 m L / m i n)

検出方法 : 電気伝導度

温度 : 4 5 °

【 0 0 7 1 】

測定結果から算出した L - 乳酸の対糖収率を表 2 に示す。

【 0 0 7 2 】

【表 1】

グルコース	100g
Yeast Nitrogen Base w/o amino acid(Difco 社)	6. 7g
ロイシン、ウラシルを除く標準18種アミノ酸	152mg
ロイシン	760mg
イノシトール	152mg
p-アミノ安息香酸	16mg
アデニン	40mg
	単位は 1/liter

10

【 0 0 7 3 】

【表 2】

	酵母株	対糖収率(%)
実施例4	29-1B/pTRS102	39. 8
比較例4	29-1B/pTRS49	33. 6

20

【 0 0 7 4 】

(実施例 5、比較例 5 : L - 乳酸生産性テスト 2)

実施例 3、比較例 3 のようにして得られた B 2 株及び L 5 株を用いて、実施例 4 と同様な方法で L - 乳酸生産性テストを行った。培地として、表 1 に示したものに 1 5 2 m g / L のウラシルを追加した培地 (以下、S C 3 培地と略す。) を用いた。

【 0 0 7 5 】

S C 3 培地 1 0 m L を試験管に取り、そこに少量の B 2 株及び L 5 株を植菌し、3 0 で一晩培養した (前々培養) 。次に、S C 3 培地 1 0 0 m L を 5 0 0 m l 容三角フラスコにいれ、各前々培養液を全量植菌し、3 0 で 2 4 時間振とう培養した (前培養) 。続いて、S C 3 培地を 1 L 投入したミニジャーファメンター (丸菱バイオエンジニアリング社製、容量 5 L) に、前培養開始から 2 4 時間後の前培養液を全量植菌し、攪拌速度 (1 2 0 r p m) 、通気量 (0 . 1 L / m i n) 、温度 (3 0) 、p H (p H 5) を一定にして培養を行った (本培養) 。本培養開始後 3 0 時間の培養液を遠心分離し、得られた上清を膜濾過した後、実施例 4 と同様な条件で H P L C により L - 乳酸量を測定した。測定結果から算出した L - 乳酸の対糖収率を表 3 に示す。

30

【 0 0 7 6 】

【表 3】

	酵母株	対糖収率(%)
実施例5	B2	46. 8
比較例5	L5	33. 2

40

【 0 0 7 7 】

表 2 及び表 3 の結果から、ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することにより、ウシ由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造することができた。

50

【 0 0 7 8 】

(実施例 6 : ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子の T D H 3 遺伝子座への導入)

染色体中に挿入するゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子を T D H 3 プロモーターの下流に導入することで乳酸生産性の向上が可能であるか検討を行った。

【 0 0 7 9 】

実施例 3 と同様な方法でゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子を T D H 3 遺伝子座に導入するために、 p T R S 1 0 2 の T D H 3 ターミネーターを A D H 1 ターミネーターに変更したプラスミドを作製した。

10

【 0 0 8 0 】

まず、 N B R C 1 0 5 0 5 株からゲノム DNA 抽出キット G e n とるくん (タカラバイオ社製) によりゲノム DNA を抽出し、抽出したゲノム DNA を鋳型として、 A D H 1 ターミネーターのクローニングを P C R 法により行った。 P C R 増幅反応には、 K O D - P l u s p o l y m e r a s e (東洋紡社製) を用い、反応バッファー、 d N T P m i x などは付属のものを使用した。上記のように付属のプロトコールに従い調整したゲノム DNA を 5 0 n g / サンプル、プライマーを 5 0 p m o l / サンプル、及び K O D - P l u s p o l y m e r a s e を 1 ユニット / サンプルになるように 5 0 μ l の反応系に調製した。反応溶液を P C R 増幅装置 i C y c l e r (B I O - R A D 社製) により 9 4 の温度で 5 分熱変成させた後、 9 4 (熱変成) : 3 0 秒、 6 0 (プライマーのアニール) : 3 0 秒、 6 8 (相補鎖の伸張) : 1 分を 1 サイクルとして 3 0 サイクル行い、その後 4 の温度に冷却した。なお、遺伝子増幅用プライマー (配列番号 1 3 , 1 4) には、 5 末端側には N o t I 認識配列、 3 末端側には H i n d I I I 認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

20

【 0 0 8 1 】

P C R 増幅断片を精製し、末端を T 4 polynucleotide Kinase (タカラバイオ社製) によりリン酸化後、 p U C 1 1 8 ベクター (制限酵素 H i n c I I で切断し、切断面を脱リン酸化処理したもの) にライゲーションした。ライゲーションは、 DNA Ligation Kit Ver. 2 (タカラバイオ社製) を用いて行った。ライゲーション溶液を大腸菌 D H 5 のコンピテント細胞 (タカラバイオ社製) に形質転換し、抗生物質アンピシリンを 5 0 μ g / m L を含む L B プレートに蒔いて一晚培養した。生育したコロニーについて、ミニプレップでプラスミド DNA を回収し、制限酵素 N o t I 及び H i n d I I I で切断し、 A D H 1 ターミネーターが挿入されているプラスミドを選抜した。これら一連の操作は、全て付属のプロトコールに従い行った。作製したプラスミドを p U C 1 1 8 - A D H 1 t とする。

30

【 0 0 8 2 】

次に p U C 1 1 8 - A D H 1 t を制限酵素 N o t I 及び H i n d I I I で切断し、 DNA 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、定法に従い A D H 1 ターミネーターを含む断片を精製した。得られた A D H 1 ターミネーターを含む断片を、 p T R S 1 0 2 の N o t I / H i n d I I I 切断部位にライゲーションし、上記と同様な方法でプラスミド DNA を回収し、制限酵素 N o t I 及び H i n d I I I で切断することにより、 T D H 3 ターミネーターが A D H 1 ターミネーターに変更されたプラスミドを選抜した。以後、このようにして作製したプラスミドを p T R S 1 5 0 とする。

40

【 0 0 8 3 】

この p T R S 1 5 0 を鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 8 , 1 5) をプライマーセットとした P C R により、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子及び A D H 1 ターミネーター配列を含む 1 . 3 k b の P C R 断片を増幅した。ここで配列番号 1 5 のプライマーは、 T D H 3 遺伝子の開始コドンから上流 6 0 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

50

【 0 0 8 4 】

次に、プラスミド p R S 4 2 6 を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号 1 0 , 1 6 ）をプライマーセットとした P C R により、酵母選択マーカである U R A 3 遺伝子を含む 1 . 2 k b の P C R 断片を増幅した。ここで、配列番号 1 6 のプライマーは、T D H 3 遺伝子の終始コドンから下流 6 0 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

【 0 0 8 5 】

それぞれの P C R 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製した。ここで得られた各 1 . 3 k b 断片、1 . 2 k b 断片を混合したものを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号 1 5 , 1 6 ）をプライマーセットとした P C R 法によって、ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子、A D H 1 ターミネーター及び U R A 3 遺伝子が連結された約 2 . 5 k b の P C R 断片を増幅した。

10

【 0 0 8 6 】

上記の P C R 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製後、ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子が p d c 1 遺伝子座に導入された B 2 株に形質転換し、ウラシル非添加培地で培養することにより、ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の T D H 3 遺伝子プロモーターの下流に導入されている形質転換株を選択した。

20

【 0 0 8 7 】

上記のようにして得られた形質転換株が、ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の T D H 3 遺伝子プロモーターの下流に導入されている酵母であることの確認は下記のように行った。まず、形質転換株のゲノム D N A をゲノム D N A 抽出キット G e n とるくん（タカラバイオ社製）により調製し、これを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号 1 7 , 1 8 ）をプライマーセットとした P C R により、約 2 . 8 k b の増幅 D N A 断片が得られることで確認した。なお、非形質転換株では、上記 P C R によって約 2 . 1 k b の増幅 D N A 断片が得られる。以下、上記 ゼノプス・レービス (X e n o p u s l a e v i s) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の T D H 3 遺伝子プロモーターの下流に導入された形質転換株を B 3 株とする。なお、T D H 3 遺伝子座の上流及び下流配列は、S a c c h a r o m y c e s G e n o m e D a t a b a s e (URL : <http://www.yeastgenome.org/>) より取得することができる。

30

【 0 0 8 8 】

（実施例 7 : L - 乳酸生産性テスト 3 ）

実施例 6 のようにして得られた B 3 株を用いて、実施例 4 , 5 と同様な方法で L - 乳酸生産性テストを行った。培地として、実施例 5 と同様 S C 3 培地を用いた。

【 0 0 8 9 】

S C 3 培地 1 0 m L を試験管に取り、そこに少量の B 3 株を植菌し、3 0 で一晩培養した（前々培養）。次に、S C 3 培地 1 0 0 m L を 5 0 0 m L 容三角フラスコにいれ、各前々培養液を全量植菌し、3 0 で 2 4 時間振とう培養した（前培養）。続いて、S C 3 培地を 1 L 投入したミニジャーファメンター（丸菱バイオエンジニアリング社製、容量 5 L ）に、前培養開始から 2 4 時間後の前培養液を全量植菌し、攪拌速度（1 2 0 r p m ）、通気量（0 . 1 L / m i n ）、温度（3 0 ）、p H （p H 5 ）を一定にして培養を行った（本培養）。本培養開始後 3 0 時間の培養液を遠心分離し、得られた上清を膜濾過した後、実施例 4 と同様な条件で H P L C により L - 乳酸量を測定した。測定結果から算出した L - 乳酸の対糖収率及び実施例 5 で得られた B 2 株の対糖収率を表 4 に示す。

40

【 0 0 9 0 】

50

【表 4】

	酵母株	対糖収率(%)
実施例5	B2	46.8
実施例7	B3	50.7

【0091】

表4の結果から、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が染色体上のPDC1遺伝子のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入された酵母を改良することにより、より高い対糖収率でL-乳酸を製造可能な酵母が作出できた。

10

【0092】

また、本発明のゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL-LDH遺伝子が導入された酵母を既知の方法で更に改良し、該酵母を培養することでより高い対糖収率でL-乳酸を製造することが可能である。

【0093】

(実施例8、比較例6：L-乳酸脱水素酵素の活性)

20

実施例2、比較例2で得られた29-1B/pTRS102株及び29-1B/pTRS49株を用いて、pH5~7におけるゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来のL-乳酸脱水素酵素活性及びウシ由来のL-乳酸脱水素酵素活性を比較した。

【0094】

(a) 菌体からのタンパク質抽出

SC-Ura培地10mLを試験管に入れ、そこに少量の29-1B/pTRS102株及び29-1B/pTRS49株を植菌し、30℃で一晩培養した(前培養)。次に、SC-Ura培地20mLを100mL容坂口フラスコに入れ、そこに前培養液を2%植菌し、24時間振とう培養した(本培養)。本培養液10mLを遠心により集菌、10mLのリン酸バッファーで洗浄後、1mLのリン酸バッファーに懸濁した。上記菌体懸濁液をエッペンドルフチューブに移し、さらに等量のガラスビーズ(SIGMA社製、直径0.6mm)を加え、Micro Tube Mixer(TOMY社製)を用い4℃で菌体を破砕した。上記のようにして菌体を破砕した後、遠心して得られる上清をL-乳酸脱水素酵素液(以下、L-LDH酵素液と略す。)とした。

30

【0095】

(b) L-乳酸脱水素酵素活性測定

(a)で得られたL-LDH酵素液の濃度を、ウシIgG(1.38mg/mL、BIO-RAD社製)をスタンダードとして作製した検量線をもとにBCA Protein Assay Kit(PIERCE社製)により測定し、各L-LDH酵素液が0.5mg/mLになるように滅菌水で希釈した。次に、表5に示した割合の6水準の混合液(L-LDH酵素液及びNADHを除く)をセミマイクロキュベットに分注し、測定を始める直前にL-LDH酵素液及びNADHを加え混合した。ここで、2xBRバッファーとは、0.08M酢酸、リン酸、ホウ酸溶液を5N NaOHでpH5, 6, 7にそれぞれ調節した緩衝バッファーである。

40

【0096】

【表 5】

	ピルビン酸ナトリウム濃度 0.5mM	ピルビン酸ナトリウム濃度 1mM
L-LDH酵素液(0.5mg/mL)	100 μ L	100 μ L
2xBRバッファー(pH5, 6, 7)	250 μ L	250 μ L
15mM NADH	25 μ L(終濃度0.375mM)	25 μ L(終濃度0.375mM)
200mMピルビン酸ナトリウム	2.5 μ L	5 μ L
純水	622.5 μ L	620 μ L
計	1000 μ L	1000 μ L

10

【0097】

各水準での340nmにおける吸光度の減少を分光光度計(Ultrospec3300 Pro アマシャム社製)で測定し、得られた340の値を式(1)にあてはめ、それぞれ比活性を算出した。測定はpH5, 6, 7の3水準で行った。上記測定において、比較対象とするL-乳酸脱水素酵素の比活性がウシ由来のL-乳酸脱水素酵素の比活性よりも、pH3水準のうち2水準以上で高い場合、その比較対象とするL-乳酸脱水素酵素は、pH5~7においてウシ由来のL-乳酸脱水素酵素活性よりも高い活性を持つとする。算出結果を表6に示す。

20

【0098】

【表 6】

	酵母株	pH	ピルビン酸ナトリウム 濃度 0.5mM	ピルビン酸ナトリウム 濃度 1mM
実施例8	29-1B/pTRS102	5	5.67	5.29
実施例8	29-1B/pTRS102	6	8.2	7.73
実施例8	29-1B/pTRS102	7	7.72	8.74
比較例6	29-1B/pTRS49	5	1.75	2.16
比較例6	29-1B/pTRS49	6	6.52	6.46
比較例6	29-1B/pTRS49	7	5.64	6.6

30

40

【0099】

この結果から、pH5~7において、ゼノプス・レービス(*Xenopus laevis*)由来のL-乳酸脱水素酵素活性は、ウシ由来のL-乳酸脱水素酵素の活性よりも高いことがわかった。また、表2及び表3の結果から、本発明のゼノプス・レービス(*Xenopus laevis*)由来のL-l dh遺伝子が導入された酵母を培養することにより、ウシ由来のL-l dh遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率でL-乳酸を製造することができることがわかった。

【0100】

50

表2、表3及び表6に示す結果から、pH 5～7におけるL-乳酸脱水素酵素活性がウシ由来のL-乳酸脱水素酵素活性よりも高いL-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することにより、ウシ由来のL-l dh遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率でL-乳酸を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

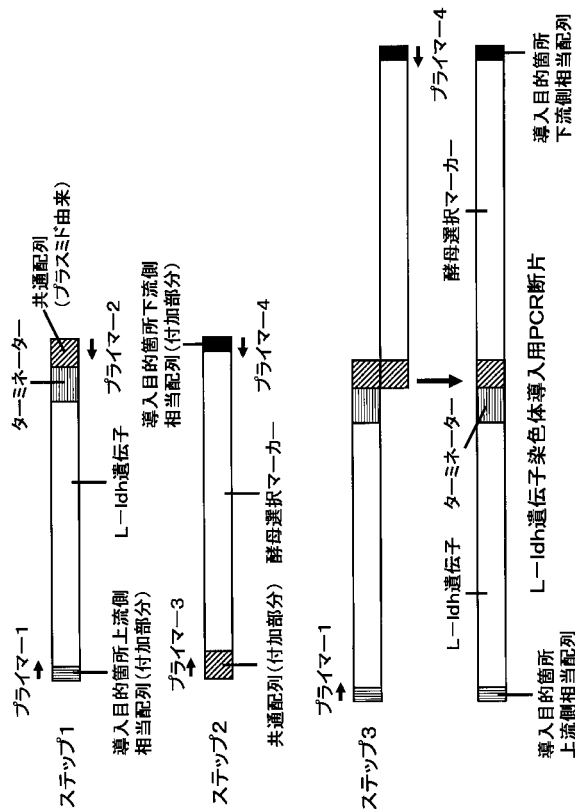
【0101】

【図1】図1は、PDC1遺伝子プロモーター下流にL-l dh遺伝子を導入する方法を説明する概略図である。

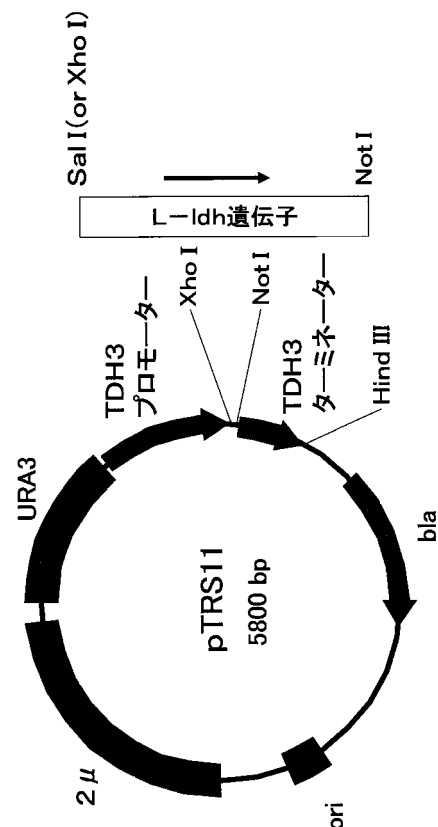
【図2】図2は、本発明で用いられる酵母発現ベクターpTRS11のフィジカルマップを示す図である。

10

【図1】



【図2】



【配列表】

0005320692000001.app

フロントページの続き

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 特表2005-528106(JP,A)
特表2001-516584(JP,A)
特開2003-259878(JP,A)
TSOI SCM et al., Database GenBank[online], Accession No.AF070953, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/5199134?sat=13&satkey=6737227>>, 09-OCT-2002 uploaded, 03-AUG-2012 retrieved, Title: *Xenopus laevis* lactate dehydrogenase A2 (Idha2) mRNA, complete cds
Proc Natl Acad Sci USA., 1994年, 第91巻, 9392-9396ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/19
C12N 15/00 - 15/90
C12P 7/56
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
Science Direct
WPI