

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) Nº de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 851 575

(21) Nº d'enregistrement national : 04 01873

(51) Int Cl⁷ : C 12 N 9/88, C 12 N 15/60, 1/21, C 12 P 13/08

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.02.04.

(30) Priorité : 25.02.03 JP 00347185.

(71) Demandeur(s) : AJINOMOTO CO INC — JP.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 27.08.04 Bulletin 04/35.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : HIRANO SEIKO et YASUEDA
HISASHI.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) NOUVEAU GENE DE LA LYSINE DECARBOXYLASE ET PROCEDE DE PRODUCTION DE LA L-LYSINE.

(57) Une bactérie *Methylophilus* dans laquelle un gène
ayant une séquence de nucléotides identique à un ADN co-
dant pour une protéine définie dans les paragraphes (A) et
(B) suivant ou un gène ayant une homologie avec l'ADN à
un degré tel qu'une recombinaison homologue avec l'ADN
intervient, est interrompu, l'expression du gène étant ainsi
réduite ou éliminée, est cultivée dans un milieu contenant
du méthanol comme source principale de carbone afin de
produire et d'accumuler de la L-lysine dans la culture et la
L-lysine est recueillie à partir de la culture:

(A) une protéine qui présente la séquence d'acides ami-
nés SEQ ID NO: 4;

(B) une protéine qui présente la séquence d'acides ami-
nés SEQ ID NO: 4 comprenant la substitution, la délétion,
l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides
aminés et présente une activité de lysine décarboxylase.

FR 2 851 575 - A1



La présente invention concerne un nouveau gène de la lysine décarboxylase de la bactérie *Methylophilus* qui est impliquée dans la décomposition de la L-lysine. La présente invention concerne également une bactérie 5 *Methylophilus* dans laquelle l'expression du gène décrit ci-dessus est supprimée et un procédé de production de L-lysine utilisant cette bactérie.

La lysine décarboxylase est une enzyme qui catalyse la réaction produisant de la cadavérine par 10 décarboxylation de la L-lysine. Par exemple, dans *Escherichia coli* (*E. coli*), il existe deux enzymes appelées CadA et Ldc (WO96 17930). De plus, d'après les informations sur les séquences génétiques des génomes ou des résultats d'expériences, il a été suggéré que la 15 lysine décarboxylase était présente dans différentes bactéries, notamment le *Bacillus halodulans*, le *Bacillus subtilis*, le *Vibrio cholerae*, le *Salmonella typhimurium*, le *Selenomonas ruminantium*, le *Nicotiana glutinosa* etc. (base de données KEGG (version 25.0, janvier 2003), Y. 20 Yakatsuka et al., Journal of Bacteriology, vol. 182, pp. 6732-6741 (2000), Y.-S. Lee et Y.-D. Cho, The Biochemical Journal, vol. 360, pp. 657-665 (2001)). Cependant, l'existence de l'enzyme s'est révélée incertaine dans les bactéries utilisant du méthanol.

25 Cependant, on connaît un procédé de production de L-lysine utilisant une bactérie *Methylophilus* et comprenant la culture d'une souche mutante résistante à un analogue de lysine, tel que AEC (S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine) ou une souche recombinante abritant un vecteur ayant de 30 l'ADN portant des informations génétiques impliquées dans la biosynthèse de L-lysine (WO00 61723). Toutefois, on ne connaît pas de gène codant pour la lysine décarboxylase

dérivée des bactéries *Methylophilus* et il n'a été signalé aucune production de L-lysine utilisant une bactérie *Methylophilus* dans laquelle l'expression d'un tel gène est supprimée ou éliminée.

5 Un objet de la présente invention est d'obtenir un gène de la lysine décarboxylase de *Methylophilus methylotrophus*, qui est une bactérie utilisant du méthanol et d'utiliser un tel gène afin de créer une bactérie produisant de la L-lysine appartenant au genre 10 *Methylophilus* dans laquelle l'expression du gène de la lysine décarboxylase dans la cellule est supprimée. Un autre objet est de proposer un procédé de production de L-lysine en cultivant cette bactérie *Methylophilus*.

15 Un objet de la présente invention est de proposer une protéine sélectionnée parmi le groupe constitué de :

 (A) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 ;

20 (B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présente une activité de lysine décarboxylase.

 Un autre objet de la présente invention est de proposer un ADN codant pour la protéine décrite ci-dessus.

25 Un autre objet de la présente invention est de proposer l'ADN décrit ci-dessus, lequel ADN est sélectionné parmi le groupe constitué de :

 (a) un ADN qui présente la séquence de nucléotides des nucléotides 684 à 2930 dans la SEQ ID NO : 3 ;

30 (b) un ADN qui peut être hybridé avec un ADN présentant la séquence de nucléotides des nucléotides 684 à 2930 dans la SEQ ID NO : 3 sous des conditions

rigoureuses, et code pour une protéine ayant une activité de lysine décarboxylase.

Il est encore un autre objet de la présente invention de proposer l'ADN décrit ci-dessus qui est 5 dérivé d'un chromosome d'une bactéries *Methylophilus*.

Il est encore un autre objet de la présente invention de proposer une bactéries *Methylophilus* qui soit capable de produire de la L-lysine et soit modifiée de telle sorte que l'activité de la lysine décarboxylase 10 intracellulaire soit réduite ou éliminée.

Un autre objet de la présente invention est de proposer la bactéries *Methylophilus* décrite ci-dessus, dans laquelle un gène sur un chromosome ayant une séquence de nucléotides identique à l'ADN décrit est 15 interrompu ou un gène sur un chromosome ayant une homologie avec l'ADN décrit ci-dessus à un degré tel qu'une recombinaison homologue avec l'ADN intervient est interrompu, l'expression du gène est ainsi supprimée et l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire est 20 réduite ou éliminée.

Un autre objet de la présente invention est de proposer un procédé de production de L-lysine comprenant les étapes consistant à cultiver la bactéries *Methylophilus* décrite ci-dessus dans un milieu contenant 25 du méthanol en tant que source principale de carbone afin de produire et d'accumuler de la L-lysine dans la culture et à recueillir la L-lysine à partir de la culture.

Selon la présente invention, il devient possible de proposer une nouvelle lysine décarboxylase et un gène 30 codant pour cette enzyme. De plus, en cultivant une bactéries *Methylophilus* qui a la capacité de produire de

la L-lysine et dans laquelle l'expression du gène est supprimée, la L-lysine peut être produite efficacement.

Les inventeurs de la présente invention menèrent des recherches afin de déterminer si la lysine décarboxylase existait dans les bactéries *Methylophilus* et, en conséquence, ils découvrirent un cadre ouvert de lecture (ci-après abrégé en « orf ») ayant une homologie avec un gène connu de la lysine décarboxylase dérivé d'une séquence d'ADN du génome de *Methylophilus methylotrophus*.

10 Concernant l'homologie de la séquence d'acides aminés codée par le gène, une homologie (proportion d'acides aminés identiques) de 38,18 % par rapport au produit *cadA* de *Escherichia coli* (*E. coli* K12, NCBI : AAC77092) et une homologie de 37,85 % par rapport au produit *ldcC* de cette

15 même bactérie (*E. coli* K12, NBCI : AAC733297) furent découvertes. De plus, la séquence d'acides aminés codée par l'orf présentait également une homologie d'environ 38,11 % par rapport à l'arginine décarboxylase qui est le produit génétique de *adiA* de *Escherichia coli* (*E. coli* K12, NCBI : AAC77078), et le nouveau gène *ldc* fut donc identifié.

Par conséquent, les présents inventeurs tentèrent d'interrompre l'orf du *Methylophilus methylotrophus* afin d'analyser sa fonction. De ce fait, la souche obtenue ne

25 se développa plus dans le milieu SEII, dans lequel une souche de type sauvage de *Methylophilus methylotrophus* peut généralement se développer. Il s'agit d'un résultat inattendu, car *Escherichia coli* et d'autres bactéries ne présentent pas d'auxotrophie particulière, même si *cadA* et *ldcC* sont déletés.

Du fait qu'il fut considéré qu'il existait un nutriment qui était devenu essentiel au *Methylophilus*

methylotrophus en raison de la déficience de l'orf et n'était pas contenu dans les composants du milieu SEII, de la cadavérine, qui est un produit de dégradation de la L-lysine, ou de l'agmatine, qui est un produit de 5 dégradation de la L-arginine, furent ajoutés au milieu de la manière appropriée. En conséquence, la souche ne présentant pas d'orf fut capable de se développer dans le milieu.

Par conséquent, il fut découvert que dans le 10 *Methylophilus methylotrophus* la protéine codée par cet orf était essentielle à la croissance dans un milieu minimal typique et que de la cadavérine ou de l'agmatine étaient nécessaires à la croissance d'une souche ne présentant pas cet orf. Sur la base de ce qui précède, le 15 gène contenant cet orf fut appelé un gène *ldc*.

De plus, lorsque l'expression du gène *ldc* fut supprimée dans une souche produisant de la L-lysine qui fut cultivée à partir de *Methylophilus methylotrophus*, la production de L-lysine fut améliorée et la présente 20 invention fut ainsi réalisée.

Ci-après, la présente invention sera expliquée en détails.

Lysine décarboxylase de la présente invention et ADN 25 codant pour celle-ci

La lysine décarboxylase de la présente invention est une protéine définie dans les paragraphes (A) ou (B) suivants :

(A) une protéine qui présente la séquence d'acides 30 aminés de SEQ ID NO : 4 ;

(B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la

délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présente une activité de lysine décarboxylase.

L'ADN de la présente invention code pour la protéine 5 définie aux paragraphes (A) et (B) ci-dessus.

L'ADN de la présente invention (ci-après également appelé le « gène *ldc* ») peut être isolé et obtenu à partir d'un ADN chromosomique d'une bactérie *Methylophilus*, par exemple *Methylophilus methylotrophus*.

10 Une souche de type sauvage de *Methylophilus methylotrophus*, la souche AS1 (NCIMB No. 10515), est disponible auprès du National Collections of Industrial and Marine Bacteria (adresse : NCIMB Lts., Torry Research Station, 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Royaume-Uni).

15 Bien qu'un procédé de culture typique pour cette souche soit décrit dans le catalogue du NCIMB, elle peut également être cultivée dans le milieu SEII décrit dans les sections d'exemples.

L'ADN génomique de la souche AS1 peut être préparé 20 par un procédé connu et un kit disponible dans le commerce afin de préparer le génome peut être utilisé.

L'ADN de la présente invention peut être obtenu en synthétisant des amorces sur la base de la séquence de nucléotides des nucléotides 684 à 2930 dans la SEQ ID NO : 25 3, puis en amplifiant l'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant un ADN chromosomique d'une bactérie, telle qu'une bactérie *Methylophilus methylotrophus*, comme matrice. De plus, l'ADN de la présente invention peut également être obtenu 30 par hybridation sur colonie en utilisant une sonde préparée sur la base de la séquence nucléotidique

mentionnée précédemment ou un fragment partiel amplifié par PCR en tant que sonde.

Les techniques de préparation de la banque d'ADN génomique, l'hybridation, la PCR, la préparation d'ADN 5 plasmique, la digestion et la ligature d'ADN, la transformation etc. utilisées afin de cloner l'ADN de la présente invention sont décrites dans Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, troisième édition (2001).

10 Des exemples des amorces utilisées pour la PCR mentionnée précédemment comprennent, de manière non exhaustive, des oligonucléotides de SEQ ID NOS : 1 et 2.

La séquence d'oligonucléotides du gène *ldc* isolé du génome de *Methylophilus methylotrophus*, qui fut obtenu 15 ainsi que décrit ci-dessus, est représentée par le SEQ ID NO : 3. De plus, la séquence d'acides aminés de la lysine décarboxylase ainsi codée est représentée par la SEQ ID NO : 4.

De même que pour la séquence d'acides aminés 20 mentionnée ci-dessus, on rechercha dans une banque de données connue les séquences d'acides aminés ayant une homologie avec celle-ci. En conséquence, deux types de lysine décarboxylases (codées par *cadA* et *ldcC*) et d'arginine décarboxylase (codée par *adiA*) de *Escherichia coli* présentaient des homologies de 38,18 %, 37,85 % et 25 38,11 %, respectivement, avec la séquence d'acides aminés mentionnée précédemment. Les homologies furent calculées comme les proportions des résidus d'acides aminés identiques par rapport au nombre total de résidus 30 d'acides aminés des régions utilisées pour la comparaison.

L'ADN de la présente invention peut coder pour une séquence d'acides aminés comprenant la substitution, la

délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés à une ou plusieurs positions, dans la mesure où l'activité de la lysine décarboxylase codée n'est pas substantiellement dégradée. Le terme 5 « plusieurs » tel qu'utilisé ici varie en fonction des positions des résidus d'acides aminés dans les structures tridimensionnelles de la protéine et des types d'acide aminé. Cependant, la séquence d'acides aminés peut être une séquence démontrant 70 % ou plus, de préférence 80 % 10 ou plus, de préférence encore 90 % ou plus d'homologie avec la séquence entière d'acides aminés constituant la lysine décarboxylase et ayant l'activité de lysine décarboxylase. Précisément, « plusieurs » représente de préférence une valeur située entre 2 et 20, de préférence 15 encore entre 2 et 10. L'activité de lysine décarboxylase mentionnée précédemment correspond à une activité de catalyse de la réaction produisant de la cadavérine par décarboxylation de la L-lysine.

Un ADN codant pour une protéine substantiellement 20 identique à la lysine décarboxylase mentionnée précédemment peut être obtenu en modifiant la séquence de nucléotides représentée par SEQ ID NO : 3. Par exemple, une mutagenèse dirigée peut être utilisée de sorte qu'une substitution, une délétion, une insertion ou une addition 25 d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés intervienne au niveau d'un site spécifique. De plus, un ADN modifié ainsi que décrit ci-dessus peut également être obtenu par des traitements de mutation conventionnels connus. Des exemples de ces traitements de mutation comprennent un 30 procédé de traitement du gène *ldc* *in vitro* avec de l'hydroxylamine ou l'équivalent, un procédé de traitement d'un microorganisme, par exemple une bactérie *Escherichia*,

contenant le gène *ldc* avec un rayonnement ultraviolet ou un agent de mutagenèse utilisé dans un traitement de mutation courant, tel que la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ou l'EMS.

5 La substitution, la délétion, l'insertion, l'addition, l'inversion ou l'équivalent de nucléotides décrite ci-dessus comprend également une mutation naturelle sur la base, par exemple, d'une différence individuelle ou d'une différence chez des espèces de 10 microorganismes qui contiennent le gène *ldc*.

Un ADN codant pour substantiellement la même protéine que la lysine décarboxylase peut être obtenu en exprimant un ADN présentant une mutation tel que décrit ci-dessus dans une cellule appropriée et en examinant 15 l'activité de la lysine décarboxylase exprimée. Un ADN codant pour substantiellement la même protéine que la lysine décarboxylase peut également être obtenu en isolant un ADN pouvant être hybridé avec un ADN présentant la séquence de nucléotides correspondant aux 20 nucléotides 684 à 2930 de la séquence de nucléotides représentée par le SEQ ID NO : 3 ou une sonde qui peut être préparée à partir de la séquence de nucléotides sous des conditions rigoureuses et en codant une protéine ayant l'activité de la lysine décarboxylase à partir 25 d'une cellule abritant le gène *ldc* ayant une mutation.

Les « conditions rigoureuses » comprennent des conditions sous lesquelles un hybride dit spécifique est formé et un hybride non spécifique n'est pas formé. Il est difficile d'exprimer clairement cette condition en 30 utilisant une valeur numérique. Cependant, par exemple, les conditions rigoureuses comprennent une condition sous laquelle des ADN présentant une homologie élevée, par

exemple des ADN présentant une homologie de 70 % ou plus, de préférence, de 80 % ou plus, de préférence encore de 90 % ou plus, de manière préférée entre toutes de 95 % ou plus, s'hybrident les uns avec les autres, et des ADN 5 ayant une homologie inférieure à ce qui précède ne s'hybrident pas les uns avec les autres. En variante, les conditions rigoureuses comprennent une condition selon laquelle les ADN s'hybrident les uns avec les autres à une concentration en sel correspondant aux conditions de 10 lavage typiques d'une hybridation de Southern, c'est-à-dire 1 x SSC, 0,1 % de SDS, de préférence 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS, à 60 °C.

Une séquence partielle du gène *ldc* peut également être utilisée comme sonde. Une telle sonde peut être 15 produite par PCR en utilisant des oligonucléotides préparés sur la base de la séquence de nucléotides du gène comme des amorces et un fragment d'ADN contenant le gène comme une matrice en utilisant des procédés bien connus de l'homme du métier. Lorsqu'un fragment d'ADN 20 d'une longueur d'environ 300 bp est utilisé comme sonde, les conditions de lavage de l'hybridation peuvent par exemple être de 50 °C, 2 x SSC et 0,1 % de SDS.

L'activité de la lysine décarboxylase peut être mesurée par le procédé décrit dans Y.-S. Lee et Y.-D. Cho, 25 The Biochemical Journal, vol. 360, pp. 656-665 (2001).

Outre pour la construction d'une souche interrompue par le gène *ldc* ainsi que décrit plus bas, le gène *ldc* de la présente invention peut être utilisé, par exemple, pour la production de la lysine décarboxylase de la 30 présente invention. C'est-à-dire que la lysine décarboxylase peut être produite en introduisant le gène *ldc* chez un microorganisme hôte approprié afin de

permettre l'expression du gène. Cela peut être réalisé de la même manière qu'avec un procédé courant de production d'une protéine utile par des techniques de recombinaison génétique. Cela signifie qu'un ADN codant pour la lysine décarboxylase peut être inséré dans un vecteur comprenant un promoteur approprié, un hôte tel que *Escherichia coli* peut être transformé avec le vecteur recombinant obtenu, et le transformant peut être cultivé afin de permettre l'expression du gène mentionné précédemment. Des exemples d'hôte comprennent, de manière non exhaustive, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, une levure, etc. Le promoteur peut être un promoteur quelconque qui fonctionne dans l'hôte utilisé et des exemples comprennent lac, trp, tac, trc, recA, T7 (Lecture of Biochemical Experiments, nouvelle édition, vol. 1, Protein, VI Synthesis and Expression, publié par la Japanese Biochemical Society, p. 166, Yasueda, Matsui, 1992, publié par Tokyo Kagaku Dojin), PGK, ADH1, GPD, MF₁, SUC2, PHO5, GAL1, GAL4 (Lecture of Biochemical Experiments, nouvelle édition, vol. 1, Protein, VI Synthesis and Expression, publié par la Japanese Biochemical Society, p. 215, Sakai et al., 1992, publié par Tokyo Kagaku Dojin), etc.

La lysine décarboxylase peut être recueillie chez un microorganisme hôte de la même manière que celle utilisée pour la production d'une protéine recombinante ordinaire.

Bactérie *Methylophilus* de la présente invention

La bactérie de la présente invention est une bactérie *Methylophilus* ayant la capacité de produire de la L-lysine et étant modifiée de telle sorte que

l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire soit réduite ou éliminée.

Un exemple de bactérie *Methylophilus* est le *Methylophilus methylotrophus*. La « capacité à produire de la L-lysine » mentionnée dans la présente invention correspond à une capacité de la bactérie de la présente invention à provoquer l'accumulation d'une quantité significative de L-lysine dans un milieu lorsque la bactérie est cultivée dans ce milieu.

La réduction ou l'élimination de l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire est obtenue, par exemple, en supprimant l'expression du gène *ldc*. La réduction ou l'élimination de l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire peut également être obtenue en modifiant la structure de l'enzyme lysine décarboxylase codée par le gène afin de réduire ou d'éliminer l'activité spécifique de la lysine décarboxylase. Des exemples du procédé permettant d'obtenir une bactérie *Methylophilus* dans laquelle l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire soit réduite ou éliminée comprennent un procédé consistant à traiter une bactérie *Methylophilus* avec un rayonnement ultraviolet ou un agent de mutagenèse utilisé dans un traitement de mutagenèse ordinaire, tel que de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ou de l'EMS et à sélectionner une souche mutante présentant une activité de lysine décarboxylase réduite.

Un mode de réalisation préféré de la bactérie de la présente invention est une bactérie *Methylophilus* dans laquelle le gène *ldc* sur un chromosome est interrompu, l'expression du gène est donc supprimée et l'activité de la lysine décarboxylase intracellulaire est réduite ou

éliminée. Le gène *ldc* mentionné dans ce mode de réalisation comprend un gène codant pour la lysine décarboxylase ayant la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 4 et un gène ayant une homologie avec ce gène à un tel degré qu'une recombinaison homologue intervient avec le gène ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4. L'homologie mentionnée ci-dessus à un tel degré qu'une recombinaison homologue intervient est de préférence une homologie de 90 % ou plus, de préférence encore de 95 % ou plus, de manière particulièrement préférée de 99 % ou plus.

Le gène *ldc* sur un chromosome peut être interrompu par un procédé fondé sur la substitution génétique utilisant la recombinaison homologue (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972) ; Matsuyama, S. & Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196 (1985)) ainsi que décrit dans les sections d'exemples. La capacité à provoquer une recombinaison homologue est une propriété que possèdent généralement les bactéries et les inventeurs de la présente invention découvrirent que la substitution génétique utilisant la recombinaison homologue était possible chez les bactéries *Methylophilus*. Précisément, une bactérie *Methylophilus* est transformée avec un ADN contenant le gène *ldc* modifié de manière à ne pas produire la lysine décarboxylase qui fonctionne normalement (gène *ldc* de type délétion) et une recombinaison est provoquée entre le gène *ldc* de type délétion et le gène *ldc* sur un chromosome. Ensuite, si la recombinaison intervient à nouveau au niveau d'un site sur le chromosome auquel le plasmide est incorporé, le plasmide est éliminé du chromosome. Suivant le site au niveau duquel la recombinaison intervient, le gène de

type délétion peut alors être fixé sur le chromosome, et le gène natif peut être éliminé du chromosome ainsi que le plasmide, ou le gène natif peut être fixé sur le chromosome, et le gène de type délétion peut être éliminé 5 du chromosome ainsi que le plasmide. En sélectionnant une souche dans laquelle ce qui précède intervient, une souche dans laquelle le gène de type délétion est substitué au gène natif sur le chromosome peut être obtenu.

10 De plus, les inventeurs de la présente invention découvrirent également que, dans le *Methylophilus methylotrophus*, l'introduction d'un gène homologue à un gène souhaité sur un chromosome sous la forme d'un fragment d'ADN linéaire provoquait une recombinaison 15 homologue sur le fragment d'ADN linéaire introduit dans la cellule, que la substitution génétique pouvait ainsi être obtenue, et qu'une telle technique pouvait également être appliquée. Un exemple de substitution génétique réalisée en utilisant cette technique est décrit dans les 20 sections d'exemples.

Des exemples du gène *ldc* de type délétion mentionné plus haut comprennent des gènes dans lesquels une substitution, une délétion, une insertion, une addition ou une inversion d'un ou de plusieurs nucléotides sont 25 provoquées dans la séquence de nucléotides de la région codante et l'activité spécifique de la protéine codée est ainsi réduite ou éliminée, ainsi que les gènes dont la portion interne ou la portion finale de la région codante est délétée, les gènes dans lesquels une autre séquence 30 est insérée dans la région codante, etc. Des exemples d'autres séquences comprennent des gènes marqueurs, tels que le gène de résistance à la kanamycine.

L'expression du gène *ldc* sur un chromosome peut également être réduite ou éliminée en introduisant une substitution, une délétion, une insertion, une addition ou une inversion d'un ou plusieurs nucléotides dans une 5 séquence d'amorce du gène afin de réduire l'activité de l'amorce, supprimant ainsi l'expression du gène au niveau de la transcription (voir Rosenberg, M. & Court, D., Ann. Rev. Genetics, 13, p. 319 (1979) ; Youderian, P., Bouvier, S. & Sussking, M., Cell, 30, pp. 843-853 (1982)).

10 De plus, l'expression du gène *ldc* peut également être supprimée au niveau de la traduction en introduisant une substitution, une délétion, une insertion, une addition ou une inversion d'un ou de plusieurs nucléotides dans une région située entre la séquence SD 15 et le codon de départ du gène (voir Dunn, J. J., Buzash-Pollert, E. & Studier, F. W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, p. 2743 (1978)).

La modification d'un promoteur ou d'une région entre la séquence SD et le codon de départ décrite ci-dessus 20 peut être réalisée de la même manière que pour la substitution génétique mentionnée plus haut. Une mutagenèse dirigée (Kramer, W. & Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)) et un traitement avec un agent chimique, tel que l'hyposulfite de sodium ou 25 l'hydroxylamine (Shortle, D. et Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270 (1978)) peuvent être utilisés spécifiquement afin d'introduire une substitution, une délétion, une insertion, une addition ou une inversion de nucléotides dans un gène.

30 La mutagenèse dirigée est un procédé utilisant des oligonucléotides synthétiques qui peuvent introduire une substitution, une délétion, une insertion, une addition

ou une inversion arbitraires dans des paires de bases spécifiques. Afin d'utiliser ce procédé, un plasmide abritant un gène souhaité qui est cloné et présente une séquence nucléotidique d'ADN connue est tout d'abord 5 dénaturé afin de préparer un brin simple. Puis, un oligonucléotide synthétique complémentaire d'une région où on souhaite introduire une mutation est synthétisé. Dans cette synthèse, la séquence de l'oligonucléotide synthétique n'est pas préparée comme une séquence 10 totalement complémentaire, mais est préparée de manière à comprendre la substitution, la délétion, l'insertion, l'addition ou l'inversion d'un nucléotide ou de plusieurs nucléotides arbitraires. Ensuite, l'ADN simple brin et l'oligonucléotide synthétique comprenant la substitution, 15 la délétion, l'insertion, l'addition ou l'inversion d'un nucléotide ou de plusieurs nucléotides arbitraires sont liés, et un plasmide double brin complet est synthétisé en utilisant un fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et de la ligase T4 et est introduit dans des cellules 20 compétentes de *Escherichia coli*. Certains des transformants obtenus ainsi que décrit ci-dessus auraient un plasmide contenant le gène dans lequel la substitution, la délétion, l'insertion, l'addition ou l'inversion d'un nucléotide ou de plusieurs nucléotides arbitraires est 25 fixée. Un procédé semblable qui permet l'introduction d'une mutation dans un gène souhaité et permet donc la modification ou l'interruption du gène comprend le procédé de PCR recombinant (PCR Technology, Stockton Press (1989)).

30 En remplaçant le gène natif sur un chromosome d'une bactérie *Methylophilus* par le gène introduit avec une mutation et ainsi modifié ou interrompu tel que décrit

ci-dessus, l'expression du gène *ldc* dans la cellule peut être supprimée.

La bactérie *Methylophilus* ayant une activité de lysine décarboxylase réduite ou éliminée est une bactérie 5 *Methylophilus* ayant la capacité de produire de la L-lysine. Une bactérie *Methylophilus* ayant la capacité de produire de la L-lysine, par exemple une souche de *Methylophilus methylotrophus*, peut être obtenue en soumettant une souche qui ne présente pas la capacité de 10 produire de la L-lysine ou présente une faible capacité à produire de la L-lysine à un traitement de mutagenèse afin de lui conférer une résistance à un analogue de la L-lysine, tel que la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine (ci-après désigné par « AEC »). Des exemples du procédé pour 15 le traitement de mutagenèse comprennent, de manière non exhaustive, des procédés de traitements de cellules de *Escherichia coli* avec un agent de mutagenèse chimique, tel que le NTG ou l'EMS ou avec une exposition à un rayonnement ultraviolet ou l'équivalent. Des exemples 20 spécifiques de cette souche comprennent le *Methylophilus methylotrophus* AJ13608. Cette souche fut cultivée en conférant la résistance à l'AEC à la souche de *Methylophilus methylotrophus* AS1. Le *Methylophilus methylotrophus* AJ13608 fut déposé au National Institute 25 of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (actuellement, l'agence administrative indépendante, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, 30 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japon) le 10 juin 1999 et reçut le numéro d'accès FERM P-17416. Puis, le dépôt fut transformé en un dépôt

international selon les dispositions du traité de Budapest du 31 mars 2000 et reçut le numéro d'accès FERM BP-7112.

Un *Methylophilus methylotrophus* ayant la capacité de produire de la L-lysine peut également être cultivé en introduisant un ADN portant des informations génétiques impliquées dans la biosynthèse de L-lysine ou en améliorant l'expression de l'ADN avec une technique de recombinaison génétique. Le gène ou les gènes à introduire codent pour une enzyme de la voie biosynthétique de la L-lysine telle que la dihydrodipicolinate synthase et la succinyle diaminopimélate transaminase. Dans le cas d'un gène d'enzyme souffrant d'une rétro-inhibition par la L-lysine, telle que la dihydrodipicolinate synthase, il est préférable d'utiliser un gène mutant codant pour l'enzyme pour laquelle l'inhibition est désensibilisée.

De plus, une capacité à produire de la L-lysine peut également être améliorée en augmentant l'activité d'une protéine impliquée dans la sécrétion de L-lysine. Par exemple, comme protéine impliquée dans la sécrétion de L-lysine, la protéine LysE codée par le gène *lysE* est connue (M. Viljic, H. Sahm et L. Eggeling, Molecular Microbiology 22, pp. 815-826 (1996) ; publication de brevet international WO97 23597). Les inventeurs de la présente invention confirmèrent que même si un *lysE* de type sauvage dérivé des bactéries *Brevibacterium* ne fonctionnait pas du tout dans les bactéries *Methylophilus*, il pouvait être modifié afin de fonctionner dans les bactéries *Methylophilus*. Des exemples de ces variantes de la protéine LysE comprennent LysE24 décrite dans les sections d'exemples (voir US 2003 0124687-A1).

La protéine LysE qui est codée par le gène *lysE* présente six régions hélicoïdales hydrophobes. On pense que certaines de ces régions hydrophobes sont des domaines transmembranaires. On pense également qu'une 5 région située entre les troisième et quatrième régions par rapport à l'extrémité N-terminale est hydrophile et présente une structure en boucle. La séquence de nucléotides du *lysE* de type sauvage et la séquence d'acides aminés de la protéine LysE de *Brevibacterium lactofermentum* sont représentées par les SEQ ID NOS : 21 et 22. Dans cette séquence d'acides aminés, les régions hélicoïdales hydrophobes correspondent aux acides aminés 5-20, 37-58, 67-93, 146-168, 181-203 et 211-232. La région en boucle correspond aux acides aminés 94 à 145.

15 Les inventeurs de la présente invention découvrirent que le gène *lysE* était létal dans les bactéries *Methylophilus*, mais qu'un ADN codant pour une variante de la protéine LysE qui ne présentait pas la région en boucle ou n'était实质iellement constituée que des 20 hélices hydrophobes augmentait la sécrétion de L-lysine à l'extérieur des cellules de bactérie utilisant du méthanol (US 2003 0124687 A1). Le *lysE24* code pour cette protéine LysE mutante ne présentant pas la région en boucle mentionnée plus haut qui est contenue dans une 25 protéine LysE de type sauvage ou qui n'est constituée实质iellement que des hélices hydrophobes.

La LysE mutante mentionnée ci-dessus n'est pas particulièrement limitée dans la mesure où elle présente une ou plusieurs hélices hydrophobes et, lorsqu'elle est 30 exprimée dans une bactérie utilisant du méthanol, provoque une sécrétion accrue de L-lysine. Précisément, un ADN codant pour une LysE mutante qui possède toutes

les hélices hydrophobes, de la première à la sixième, par rapport à l'extrémité N-terminale est englobée. Plus précisément, un ADN codant pour un peptide contenant les trois premières hélices hydrophobes par rapport à l'extrémité N-terminale et codant pour un peptide contenant les trois dernières hélices par rapport à l'extrémité N-terminale est englobé. Le *lysE24* mentionné plus haut est un exemple du *lysE* mutant qui code pour un peptide contenant les trois premières hélices hydrophobes et pour un peptide contenant les trois dernières hélices hydrophobes. Le gène *lysE24* est introduit par une mutation avec un codon stop en aval de la région codant pour la troisième hélice hydrophobe. Les inventeurs de la présente invention confirmèrent que si une région en aval de ce codon stop était délétée, le gène *lysE24* mutant ne provoquait pas l'accumulation de L-lysine dans le milieu lorsqu'il était exprimé dans la souche de *Methylophilus methylotrophus* AS1. Par conséquent, on pense qu'un peptide contenant les trois premières hélices hydrophobes et un peptide contenant les trois dernières hélices hydrophobes sont traduits séparément et fonctionnent dans une bactéries *Methylophilus*. Les résultats indiquent que l'introduction du gène *lysE24* dans une bactéries *Methylophilus* entraînera l'amélioration de la production de L-lysine.

Un microorganisme quelconque peut être utilisé afin de générer un ADN codant pour une protéine impliquée dans la sécrétion de L-lysine à l'extérieur d'une cellule, c'est-à-dire le gène *lysE* ou son gène homologue, dans la mesure où il possède une variante du gène qui peut exprimer l'activité de la L-lysine dans une bactéries utilisant du méthanol.

Précisément, des exemples de ces microorganismes comprennent, de manière non exhaustive, une bactérie de type corynebactérie, telle que *Corynebacterium glutamicum* et *Brevibacterium lactofermentum*, des bactéries 5 *Escherichia* telles que *Escherichia coli*, des bactéries *Pseudomonas* telles que *Pseudomonas aerugina*, des bactéries *Mycobacterium* telles que *Mycobacterium tuberculosis*, etc.

Afin d'augmenter l'expression du gène de sécrétion 10 de L-lysine dans une bactérie utilisant du méthanol, le fragment de gène est ligaturé à un vecteur qui est capable de fonctionner dans une bactérie *Methylophilus*, de préférence un vecteur de type multicopie afin de préparer un ADN recombinant qui est ensuite utilisé afin 15 de transformer la bactérie hôte utilisant du méthanol. En variante, le gène peut être incorporé dans un transposon et introduit dans un chromosome. De plus, un promoteur qui induit une transcription puissante dans une bactérie utilisant du méthanol peut être ligaturé en amont du gène.

Afin d'introduire un gène souhaité, tel qu'un gène 20 de biosynthèse de L-lysine ou un gène de sécrétion de L-lysine dans les bactéries *Methylophilus* et d'augmenter son expression, le gène peut être ligaturé à un vecteur pouvant se répliquer de manière autonome dans une cellule 25 de bactéries *Methylophilus* afin de préparer un ADN recombinant qui est ensuite utilisé afin de transformer le *Methylophilus methylotrophus*, par exemple par électroporation. De plus, il est également possible d'incorporer un gène souhaité dans un chromosome hôte par 30 un procédé utilisant une transduction, un transposon (D.E. Berg, et C.M. Berg, Bio/Technol., 1, p. 417 (1983)), un phage Mu (brevet japonais mis à l'inspection publique

(Kokai) No. 2 109985) ou une recombinaison homologue (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)).

Les vecteurs pouvant se répliquer de manière 5 autonome dans les bactéries *Methylophilus* comprennent, de manière non exhaustive, RSF1010, qui est un vecteur à large gamme d'hôtes et les dérivés de celui-ci, par exemple pAYC32 (Chistorardov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid, 16, pp. 161-167 (1986)) et pMFY42 (Gene, 44, p. 10 53 (1990)), pBBR1 et ceux dérivés des dérivés de celui-ci (Kovach, M.E., et al., Gene, 166, pp. 175-176 (1995)), pRK310 et ceux dérivés des dérivés de celui-ci (Edts, Murrell, J.C., et Dalton, H., Methane and methanol 15 utilizers, Plenum Press, pp. 183-206 (1992)), etc.

Une bactérie *Methylophilus* qui a la capacité de produire de la L-lysine et dans laquelle l'activité de lysine décarboxylase est réduite ou éliminée peut être obtenue en conférant la capacité de produire de la L-lysine à une bactérie *Methylophilus* dans laquelle 20 l'activité de lysine décarboxylase est réduite ou éliminée. De plus, une bactérie telle que mentionnée ci-dessus peut également être obtenue en modifiant une bactérie *Methylophilus* ayant la capacité de produire de la L-lysine de sorte que l'activité de lysine 25 décarboxylase soit réduite ou éliminée.

Production de L-lysine

La culture de la bactérie *Methylophilus* dans laquelle l'activité de la lysine décarboxylase est 30 réduite ou éliminée obtenue ainsi que décrit ci-dessus dans le milieu contenant du méthanol comme source principale de carbone entraîne la production d'une

quantité significative de L-lysine et l'accumulation de la L-lysine produite dans le milieu. Par conséquent, l'utilisation de la bactérie *Methylophilus* de la présente invention ayant la capacité de produire de la L-lysine 5 dans laquelle l'activité de la lysine décarboxylase est réduite ou éliminée est efficace quant à l'amélioration de l'accumulation de L-lysine.

Le milieu utilisé pour la production de L-lysine est un milieu typique qui contient une source de carbone, une 10 source d'azote, des ions inorganiques et d'autres nutriments organiques à l'état de traces selon les besoins. La principale source de carbone est le méthanol. Cependant, des sucres, tels que le glucose, le lactose, le galactose, le fructose et de l'hydrolysat d'amidon, 15 des alcools, tels que le glycérol et le sorbitol, et des acides organiques, tels que l'acide fumarique, l'acide citrique, l'acide succinique et l'acide pyruvique peuvent être utilisés ensemble. L'expression « le méthanol est utilisé comme source principale de carbone » signifie que 20 la teneur en méthanol dans la source de carbone totale est de 50 % (M/M) ou plus, de préférence de 80 % (M/M) ou plus, de la source de carbone totale. Si le méthanol est utilisé comme source de carbone, la concentration de celui-ci est généralement située entre 0,001 % et 4 % 25 (M/V), de préférence entre 0,1 % et 2 % (M/V). De plus, lorsque du glucose, etc. est ajouté, la concentration de celui-ci est généralement située entre 0,1 % et 3 % (M/M), de préférence entre 0,1 % et 1 % (M/V).

Comme source d'azote, des sels d'ammonium 30 inorganiques, tels que du sulfate d'ammonium, du chlorure d'ammonium et du phosphate d'ammonium, une source d'azote

organique, telle que de l'hydrolysat de soja, de l'ammoniac, de l'ammoniaque, etc. peuvent être utilisés.

Comme ions inorganiques (ou sources de ceux-ci), une faible quantité de phosphate de potassium, de sulfate de magnésium, d'ions fer, d'ions manganèse, etc. est ajoutée au milieu. Comme nutriments organiques à l'état de traces, de la vitamine B₁, de l'extrait de levure, etc. peuvent être ajoutés au milieu dans des quantités appropriées.

La culture est de préférence mise en œuvre pendant environ 16 à 72 heures sous des conditions aérobies. La température de la culture est contrôlée de manière à se situer entre 25 °C et 45 °C et le pH est contrôlé de manière à se situer entre 5 et 8 au cours de la culture. Des substances acides ou alcalines inorganiques ou organiques, de l'ammoniac, etc. peuvent être utilisés afin d'ajuster le pH.

Après la fin de la culture, la L-lysine peut être recueillie à partir d'un bouillon de fermentation, par exemple par des procédés typiques utilisant des résines échangeuses d'ions, un procédé de précipitation, etc. en combinaison.

Exemples

Ci-après, la présente invention sera expliquée plus en détails en faisant référence aux exemples non limitatifs suivants.

Exemple 1 : clonage du gène de la lysine décarboxylase (ldc) de *Methylophilus methylotrophus*

Afin d'obtenir un ADN chromosomique à partir de la souche sauvage de *Methylophilus methylotrophus* AS1, la souche AS1 fut inoculée dans 50 mL du milieu SEII

(composition : 5,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,9 g/L de K_2HPO_4 , 1,56 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 72 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 23 $\mu\text{g}/\text{L}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 9,7 mg/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 % (V/V) de méthanol) et cultivée pendant la nuit à 37 °C avec agitation. Puis, le bouillon de culture fut centrifugé afin de recueillir les cellules. Un ADN chromosomique fut préparé à partir des cellules obtenues en utilisant un kit disponible dans le commerce (Genomic DNA Purification Kit (produit par Edge Biosystems)) suivant le manuel d'utilisation joint.

L'ADN chromosomique fut utilisé comme une matrice avec les amorces d'ADN de SEQ ID NOS : 1 et 2 afin de mettre en œuvre une PCR (un cycle consistant en une dénaturation à 98 °C pendant 10 secondes, un recuit à 55 °C pendant 30 secondes, une extension à 72 °C pendant 3 minutes fut répété pendant 25 cycles). De la pyrobest polymérase (Takara Shuzo) fut utilisée. En conséquence, un fragment d'ADN ayant une taille d'environ 3,0 kilobases (ci-après abrégé par « kbp ») fut obtenu.

Puis, le fragment obtenu fut séquencé par le procédé décrit dans Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, troisième édition (2001). Il devint évident que la région du site de l'enzyme de restriction *EcoRV* au site de l'enzyme de restriction *DdeI* sur le fragment d'ADN présentait la séquence de nucléotides représentée par le SEQ ID NO : 3. Dans cette séquence d'ADN, un cadre ouvert de lecture (ci-après abrégé par « orf ») codant la séquence d'acides aminés représentée par le SEQ ID NO : 4 était contenu. Cet orf fut appelé orf#3098. Le gène

codant pour la séquence d'acides aminés représentée par le SEQ ID NO : 4 fut appelé le gène *ldc*.

5 Exemple 2 : Préparation de la souche de *Methylophilus methylotrophus* à gène *ldc* interrompu

(1) Préparation du fragment pour l'interruption du gène *ldc*

10 L'ADN chromosomique obtenu dans l'exemple 1 fut utilisé comme une matrice ainsi que les amorces d'ADN représentées par les SEQ ID NOS : 5 et 6 afin de mettre en œuvre une PCR (conditions de réaction : du TaKaRa Ex Taq fut utilisé, un cycle constitué d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, d'un recuit à 60 °C pendant 30 15 secondes et d'une réaction d'extension de brin d'ADN à 72 °C pendant 2 minutes fut répété pendant 25 cycles), donnant ainsi un fragment d'environ 1,3 kb. Une PCR fut également mise en œuvre en utilisant les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 7 et 8 sous les mêmes 20 conditions afin d'obtenir un fragment d'ADN ayant une taille d'environ 2,0 kb.

Une PCR fut également mise en œuvre en utilisant le plasmide pKD4 (No. d'accès GenBank AY048743, Datsenko, K.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (12), 25 6640-6645 (2000)) comme une matrice et les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 9 et 10 sous les mêmes conditions que mentionnées ci-dessus afin d'obtenir un fragment d'ADN contenant un gène de résistance à la kanamycine (Km') (environ 1,5 kb).

30 Les trois types de fragments d'ADN décrits ci-dessus furent mélangés et utilisés comme matrice ainsi que les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 11 et 12 afin

de mettre en œuvre une PCR (conditions de réaction : du TaKaRa Ex Taq fut utilisé, un cycle constitué d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, d'un recuit à 60 °C pendant 30 secondes et d'une réaction d'extension de brin d'ADN à 72 °C pendant 4 minutes et 30 secondes fut répété pendant 25 cycles), donnant ainsi un fragment d'environ 4,7 kb. Ce fragment contenait le gène *ldc* interrompu avec le gène de résistance à la kanamycine. Ce fragment fut purifié en utilisant un kit disponible dans le commerce (Wizard PCR Preps DNA Purification System produit par Promega), puis soumis à une précipitation à l'éthanol et les précipités furent dissous dans une solution de TE (10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM d'une solution d'EDTA). Cette solution d'ADN fut utilisée dans l'opération suivante comme un fragment pour l'interruption génétique.

(2) Acquisition de la souche de *Methylophilus methylotrophicus* à gène *ldc* déficient

Puis, le fragment de gène pour l'interruption génétique décrite ci-dessus fut introduit dans la souche de *Methylophilus methylotrophicus* AS1. Le procédé d'électroporation (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)) fut utilisé pour la transformation. La procédure spécifique fut la suivante.

La souche de *Methylophilus methylotrophicus* AS1 fut cultivée dans le milieu liquide SEII (concentration en méthanol : 0,5 % (V/V)) à 37 °C pendant 16 heures avec agitation et 20 ml du bouillon de culture furent centrifugés à 10000 tr/mn pendant 10 minutes afin de recueillir les cellules. Les cellules furent ajoutées à 1 mM de tampon HEPES (pH 7,2, 20 ml), suspendues dans

celui-ci et centrifugées, et cette opération fut réalisée deux fois. Finalement, 1 ml du même tampon fut ajouté aux cellules afin de préparer une suspension de cellules et celles-ci furent utilisées comme cellules à modifier pour 5 l'électroporation. Puis, environ 1 μ g du fragment d'ADN mentionné ci-dessus contenant le gène *ldc* interrompu avec le gène de résistance à la kanamycine (*ldc* ; Km^R) fut ajouté à 100 μ l des cellules à modifier et des impulsions électriques furent appliquées avec des conditions de 10 18,5 kV/cm, 25 μ F et 200 U afin de procéder à une électroporation et ainsi introduire le fragment d'ADN dans les cellules. Le milieu liquide SEII fut immédiatement ajouté à cette suspension de cellules et les cellules furent cultivées à 37 °C pendant 3 heures.

15 Ensuite, ce bouillon de culture fut appliqué au milieu d'agar SEII contenant 20 μ g/ml de kanamycine et incubé à 37 °C. Après une culture de 48 heures, plusieurs dizaines de colonies apparurent sur la plaque. Parmi celles-ci, 20 souches furent sélectionnées au hasard et 20 l'interruption du gène souhaité dans ces souches fut confirmée par un procédé de détection fondé sur le procédé de PCR. C'est-à-dire que les colonies mentionnées ci-dessus qui apparurent furent chacune suspendues dans 20 μ l d'eau stérilisée, à laquelle on ajouta 5 μ l de 25 Protéinase K à 1 mg/ml et 25 μ m d'une solution P (solution contenant 40 mM de Tris, 0,5 % de Tween 20, 1 % de Nonidet P-40, 1 mM d'EDTA (ajusté à un pH de 8,0 avec du HCl)), agitées et incubées à 60 °C pendant 20 minutes et à 95 °C pendant 5 minutes. Ce mélange de réaction fut 30 utilisé comme une matrice ainsi que les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 11 et 12 afin de réaliser une PCR (conditions de réactions : du TaKaRa Ex

Taq fut utilisé, un cycle constitué d'une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, d'un recuit à 60 °C pendant 30 secondes et d'une réaction d'extension de brin d'ADN à 72 °C pendant 4 minutes et 30 secondes fut répété pendant 5 25 cycles), confirmant ainsi l'interruption du gène souhaité. En conséquence, il fut découvert que 10 souches étaient les souches avec le gène interrompu souhaité. Une souche parmi celles-ci fut donc appelée la souche DLC10 (souche MLDC) et utilisée dans les expériences suivantes.

10

(3) Phénotype de la souche à gène *ldc* déficient

La souche DLC10 préparée dans le paragraphe (2) ci-dessus était une souche sélectionnée comme une souche qui pouvait se développer sur le milieu d'agar SEII contenant 15 de la kanamycine. Cependant, il fut découvert qu'elle ne pouvait pas continuer à se développer lorsqu'elle était soumise à une sous-culture sur le même milieu d'agar. Par conséquent, on chercha à savoir si l'inhibition de la croissance pouvait être complémentée par l'addition de 20 cadavérine (CAD) et d'agmatine (AGM), qui sont des produits de réaction de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine décarboxylase (ADC), respectivement, au milieu.

Un milieu constitué de 4 ml de milieu SEII liquide 25 contenant 20 µg/ml de kanamycine et auquel on ajouta de la cadavérine ou de l'agmatine à une concentration de 1 g/l fut préparé. Puis, la souche DLC10 mentionnée plus haut fut inoculée au milieu et cultivée à 37 °C avec agitation à 116 tr/mn, et la croissance fut examinée. En 30 conséquence, il fut découvert que la souche DLC10 ne pouvait pas se développer sur le milieu qui ne présentait pas de cadavérine ni d'agmatine, tandis que la souche

pouvait se développer sur le milieu contenant l'une de ces substances. De plus, l'addition de cadavérine montra un meilleur effet de restauration de la croissance comparée à l'addition d'agmatine.

5

(4) Confirmation de la complémentation de la souche à *ldc* déficient par l'introduction de l'orf#3098

On vérifia que l'auxotrophie de la cadavérine pour la croissance de la souche à *ldc* déficient mentionnée ci-dessus pouvait être complémentée par l'introduction de l'orf #3098 obtenu dans l'exemple 1. Tout d'abord, un plasmide destiné à introduire de l'ADN ne contenant que l'orf #3098 dans la souche à *ldc* déficient fut préparé. L'ADN chromosomique décrit dans l'exemple 1 fut utilisé comme matrice, ainsi que les amorces d'ADN ayant la séquence représentée par les SEQ ID NOS : 13 et 14 (le site *Sse8371* fut ligaturé à l'extrémité 5') afin de réaliser une PCR (conditions de la réaction d'amplification : une Pyrobest ADN polymérase produite par Takara Shuzo fut utilisée, un cycle constitué d'une dénaturation à 98 °C pendant 10 secondes, d'un recuit à 55 °C pendant 30 secondes et d'une réaction d'extension de brin d'ADN à 72 °C pendant 3 minutes fut répété pendant 25 cycles). Le fragment d'ADN obtenu ayant un site d'environ 3 kb fut digéré par l'enzyme de restriction *Sse83871* (Takara Shuzo). Ce fragment d'ADN fut ligaturé avec le vecteur pRStac digéré de la même manière avec *Sse8371*, puis soumis à un traitement de déphosphorylation (un kit de ligature Ver. 2 produit par Takara Shuzo fut utilisé). Le plasmide portant l'orf #3098 (dans la direction avant par rapport au promoteur

tac) préparé ainsi que décrit ci-dessus fut appelé pRS-orf#3098.

Le pRStac fut construit en introduisant le promoteur tac dans un plasmide pRS connu (voir la publication de brevet international en japonais (Kohyo) No. 3 501682). pRS est un plasmide ayant le segment de vecteur du plasmide pVIC40 (publication de brevet international WO90 04636, publication de brevet international en japonais No. 3 501682) et obtenu à partir de pVIC40 en 10 délétant une région d'ADN codant pour l'opéron de thréonine contenu dans le plasmide. Le plasmide pVIC40 est dérivé d'un vecteur plasmidique à large gamme d'hôtes pAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid, 1986, 16, 161-167), qui est un dérivé de RSF1010.

Tout d'abord, le plasmide pRStac possédant le promoteur tac fut construit à partir de pRS. Le vecteur pRS fut digéré avec les enzymes de restriction EcoRI et PstI et ajouté à une solution de phénol/chloroforme, puis mélangé afin de terminer la réaction. Après que le 20 mélange de réaction fut centrifugé, la couche supérieure fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol et séparés sur du gel d'agarose à 0,8 %. Un fragment d'ADN de 8 kilopaires de bases fut recueilli en utilisant un EASY TRAP Ver. 2 (kit de 25 collection d'ADN, Takara Shuzo). Par ailleurs, la région du promoteur tac fut amplifiée par PCR en utilisant le plasmide pKK223-3 (vecteur d'expression, Pharmacia) comme matrice et les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 17 et 18 (un cycle constitué d'une dénaturation à 94 °C 30 pendant 20 secondes, d'un recuit à 55 °C pendant 30 secondes et d'une réaction d'extension à 72 °C pendant 60 secondes fut répété pendant 30 cycles). De la Pyrobest

DNA polymérase (Takara Shuzo) fut utilisée pour la PCR. Le fragment d'ADN contenant le promoteur *tac* amplifié fut purifié en utilisant une PCR prép. (Promega), puis digéré au niveau des sites de l'enzyme de restriction préparés 5 au préalable dans les amorces, c'est-à-dire au niveau des sites *Eco*RI et *Eco*T221. Ensuite, le mélange de réaction fut ajouté à une solution de phénol/chloroforme et mélangé afin de terminer la réaction. Après que le mélange de réaction fut centrifugé, la couche supérieure 10 fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol et séparés sur un gel d'agarose à 0,8 %. Un fragment d'ADN d'environ 0,15 kbp fut recueilli en utilisant un EASY TRAP Ver. 2.

Le produit de digestion du vecteur pRS préparé ainsi 15 que décrit ci-dessus et la région du promoteur *tac* furent ligaturés en utilisant un kit de ligature d'ADN Ver. 2 (Takara Shuzo). Cette solution de réaction de ligature fut utilisée afin de transformer *Escherichia coli* (cellules compétentes de *E. coli* JM109, Takara Shuzo). 20 Les cellules furent déposées sur un milieu d'agar LB contenant 20 mg/L de streptomycine et incubées pendant la nuit à 37 °C. Les colonies qui apparurent sur le milieu d'agar furent chacune incubées dans un milieu liquide de LB contenant 20 mg/L de streptomycine et cultivées à 25 37 °C pendant 8 heures avec agitation. L'ADN plasmidique fut extrait de chaque bouillon de culture par le procédé à l'alkali-SDS et la structure de chaque plasmide fut confirmée par digestion avec des enzymes de restriction afin d'obtenir pRStac. Un plasmide dans lequel les 30 directions de transcription du gène de résistance à la streptomycine sur le vecteur pRS et du promoteur *tac*

furent identiques l'une à l'autre fut sélectionné comme pRStac.

En utilisant le plasmide pRS-orf#3098 préparé ainsi que décrit ci-dessus ou pRStac comme plasmide de contrôle, 5 la souche DLC10 fut transformée par électroporation et sélectionnée sur le milieu d'agar SEII (contenant 20 µg/ml de kanamycine, 50 µg/ml de streptomycine et 1 g/l de cadavérine).

Lorsque la souche DLC10/pRS-orf#3098 sélectionnée 10 fut inoculée dans le milieu d'agar SEII ne contenant pas de cadavérine (contenant 20 µg/ml de kanamycine et 50 µg/ml de streptomycine), la croissance de la souche introduite de pRStac-orf#3098 fut possible, tandis que la souche DLC10/pRStac comme souche de contrôle ne put pas 15 se développer. De plus, les plasmides furent extraits de la souche DLC10/pRS-orf#3098 en utilisant un Wizard Minipreps produit par Promega et confirmés par électrophorèse. En conséquence, il fut confirmé que la souche abritait le plasmide souhaité et il fut ainsi 20 découvert que la protéine codée par orf#3098 sur le plasmide agissait en trans et que la complémentation était donc atteinte. On peut considérer que les résultats ci-dessus indiquaient que la déficience d'orf#3098 elle-même conférait à la cadavérine une auxotrophie pour la 25 croissance de la souche.

Exemple 3 : Complémentation de la déficience d'orf#3098 dans la bactérie *Methylophilus methylotrophus* par l'introduction du gène *ldcC* dérivé de *E. coli*

(1) Préparation du plasmide portant le gène *ldcC* dérivé de *E.coli*

Afin de déterminer si un gène *ldcC* dérivé de *E. coli* pouvait complémenter l'auxotrophie de la cadavérine de la 5 souche DLC10 pour la croissance, un plasmide portant *ldcC* dérivé de *E.coli* fut tout d'abord préparé. La souche *E. coli* W3110 fut cultivée pendant la nuit à 37 °C dans le milieu LB (10 g/l de trypton, 5 g/l d'extrait de levure, 10 g/l de NaCl) et un ADN chromosomique fut préparé à 10 partir des cellules obtenues en utilisant un kit de purification d'ADN génomique produit par Edge BioSystems. Cet ADN chromosomique fut utilisé comme une matrice avec les amorces d'ADN (le site *PstI* fut ligaturé au côté N-terminal) ayant les séquences représentées pas les SEQ ID 15 NOS : 15 et 16 (J. Bacteriol., 179 (14), 4486-4492 (1997)) afin de réaliser une PCR (conditions de réaction d'amplification : de la Pyrobest ADN polymérase produite par Takara Shuzo fut utilisée, un cycle constitué d'une dénaturation à 98 °C pendant 10 secondes, d'un recuit à 20 60 °C pendant 30 secondes et d'une réaction d'extension de brin d'ADN à 72 °C pendant 2 minutes fut répété pendant 25 cycles). Le fragment d'ADN obtenu ayant une taille d'environ 2,3 kb fut digéré avec l'enzyme de restriction *PstI* (Takara Shuzo). De manière séparée, le 25 vecteur pRStac fut digéré avec la *Sse83871*, puis soumis à un traitement de déphosphorylation et ligaturé avec le fragment de PCR mentionné plus haut (un kit de ligature Ver. 2 produit par Takara Shuzo fut utilisé). Le plasmide portant *ldcC* de *E.coli* préparé ainsi que décrit plus haut 30 fut appelé pRS-*ldcC*-F (portant *ldcC* dans la direction avant par rapport au promoteur tac) ou pRS-*ldcC*-R

(portant *ldcC* dans la direction inverse par rapport au promoteur *tac*).

(2) Confirmation de la complémentation de la déficience

5 d'orf#3098 de la souche DLC10 par LDC dérivé de *E.coli*

La souche DLC10 fut transformée avec chacun des deux plasmides préparés ainsi que décrit ci-dessus par électroporation, et les transformants furent sélectionnés sur le milieu d'agar SEII (contenant 20 µg/ml de 10 kanamycine, 50 µg/ml de streptomycine et 1 g/l de cadavérine). En conséquence, aucun transformant ne put être obtenu avec pRStac-*ldcC-F*, et un transformant ne put être obtenu qu'avec pRStac-*ldcC-R*.

Cette souche DLC10/pRStac-*ldcC-R* fut appliquée au 15 milieu d'agar SEII ne contenant pas de cadavérine (contenant 20 µg/ml de kanamycine et 50 µg/ml de streptomycine), et il fut confirmé que la souche DLC10/pRStac-*ldcC-R* pouvait se développer, tandis que la souche DLC10/pRS-tac comme souche de contrôle ne pouvait 20 pas se développer. Ce résultat indique que la LDC (lysine décarboxylase) de *E. coli* pouvait complémenter l'auxotrophie de la cadavérine de la souche à orf#3098 déficient de *Methylophilus methylotrophus*.

25 Exemple 4 : Production de L-lysine par la souche de *Methylophilus methylotrophus* à orf#3098 (gène *ldc*) interrompu

(1) Construction du plasmide pRSlysE24 pour la production
30 de L-lysine

Afin d'introduire le gène *lysE* qui code pour une protéine montrant une activité excrétant de la lysine

dans une *Corynebacterium glutamicum* dans une bactérie *Methylophilus*, un plasmide pRSlysE24 pour l'expression de *lysE* fut construit en utilisant le pRStac mentionné ci-dessus.

5 Le pRStac préparé dans l'exemple 2, (4) fut digéré avec la *Sse83871* (Takara Shuzo) et *SapI* (New England Biolabs) et ajouté à une solution de phénol/chloroforme et mélangé afin de terminer la réaction. Après que le mélange de réaction fut centrifugé, la couche supérieure 10 fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol et séparés sur un gel d'agarose à 0,8 % afin d'obtenir un fragment d'ADN d'environ 9,0 kbp.

Le fragment de gène *lysE* fut également amplifié par 15 PCR en utilisant un chromosome extrait de la souche *Brevibacterium lactofermentum* 2556 (ATCC 13869) comme matrice et les amorce repräsentées par les SEQ ID NOS : 19 et 20 (dénaturation à 94 °C pendant 20 secondes, recuit à 55 °C pendant 30 secondes et réaction 20 d'extension à 72 °C pendant 90 secondes). De la Pyrobest ADN polymérase (Takara Shuzo) fut utilisée pour la PCR. Le fragment obtenu fut purifié en utilisant une PCR prép. (Promega), puis digéré avec les enzymes de restriction *Sse83871* et *SapI*. Le mélange de réaction fut ajouté à une 25 solution de phénol/chloroforme et mélangé afin de terminer la réaction. Après que le mélange de réaction fut centrifugé, la couche supérieure fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol, purifiés sur un gel d'agarose à 0,8 % et recueillis.

30 Le produit de digestion du vecteur pRStac et le fragment de la région du gène *lysE* préparé ainsi que décrit plus haut furent ligaturés en utilisant un kit de

ligature d'ADN Ver. 2 (Takara Shuzo). Cette solution de réaction de ligature fut utilisée afin de transformer *Escherichia coli* (cellules compétentes de *E. coli* JM109, Takara Shuzo). Les cellules furent déposées sur un milieu 5 d'agar LB contenant 20 mg/L de streptomycine et incubées pendant la nuit à 37 °C. Les colonies qui apparurent sur le milieu d'agar furent chacune inoculées dans le milieu liquide LB contenant 20 mg/L de streptomycine et cultivées à 37 °C pendant 8 heures avec agitation. Un ADN 10 plasmique fut extrait de chaque bouillon de culture par le procédé à l'alkali-SDS et la structure du plasmide fut confirmée par digestion avec des enzymes de restriction et détermination de la séquence de nucléotides afin d'obtenir la pRSlysE. Dans la pRSlysE, le gène *lysE* fut 15 positionné de telle sorte que sa direction de transcription soit la même que celle du promoteur tac.

La pRSlysE obtenu ainsi que décrit ci-dessus fut introduite dans une souche de *Methylophilus methylotrophus* AS1 (NCIMB10515) par électroporation 20 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)). En conséquence, un transformant fut à peine être obtenu. De plus, lorsque des séquences de nucléotides de plasmides extraits de plusieurs souches qui pourraient former des colonies furent examinées, une mutation fut introduite 25 dans le gène *lysE*. Et lorsque les colonies furent cultivées, la L-lysine ne s'accumula pas dans les surnageants de culture. Cependant, lorsque de nombreuses colonies furent encore examinées, un gène *lysE* de type mutant qui pouvait conférer une capacité à produire de la 30 L-lysine à des bactéries *Methylophilus*, c'est-à-dire qui pouvait fonctionner, fut obtenu par l'analyse de la pRSlysE introduite avec une mutation.

Ce gène *lysE* mutant fut appelé gène *lysE24*. La séquence de nucléotides du gène *lysE24* fut analysée et il fut découvert que la mutation n'entraînait pas une substitution d'acides aminés, mais une mutation non-sens 5 introduisant un codon stop autour du centre de la région de traduction du *lysE*. La séquence de nucléotides du gène *lysE* de type sauvage et la séquence d'acides aminés codés par celle-ci sont représentées par les SEQ ID NOS : 21 et 22. Dans *lysE24*, une T (thymine) fut insérée après une G 10 (guanine) à la position 355 du gène *lysE* de type sauvage représenté par le SEQ ID NO : 21. La séquence de nucléotides de *lysE24* et la séquence d'acides aminés codée par celle-ci sont représentées par les SEQ ID NOS : 15 23 et 24. Le plasmide portant *lysE24* fut appelé pRSlysE24.

(2) Préparation du plasmide pRSdapA possédant le gène *dapA⁺*

On prépara un plasmide possédant un gène codant pour la dihydrodipicolinate synthase qui ne fut pas soumis à 20 une rétro-inhibition par la L-lysine (*dapA⁺*) en tant que gène pour l'enzyme du système de biosynthèse de L-lysine.

La pRStac préparée dans l'exemple 2, (4) fut digérée avec *Sse83871* et *XbaI*, ajoutée à une solution de phénol/chloroforme et mélangée à celle-ci afin de 25 terminer la réaction. Après que le mélange de réaction fut centrifugé, la couche supérieure fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol et séparés sur un gel d'agarose à 0,8 % afin de recueillir un fragment d'ADN d'environ 9 kbp.

30 Le plasmide RSFD80 connu (voir WO90 16042) contenant ce gène fut utilisé comme une matrice afin d'amplifier *dapA⁺* par PCR en utilisant les amorces représentées par

les SEQ ID NOS : 25 et 26 (dénaturation à 94 °C pendant 20 secondes, recuit à 55 °C pendant 30 secondes et réaction d'extension à 72 °C pendant 60 secondes). De la Pyrobest ADN polymérase (Takara Shuzo) fut utilisée pour 5 la PCR. Le fragment *dapA** obtenu fut purifié en utilisant une PCR prép. (Promega), puis digéré avec les enzymes de restriction *Sse83871* et *XbaI*. Le mélange de réaction fut ajouté à une solution de phénol/chloroforme et mélangé afin de terminer la réaction. Après que le mélange de 10 réaction fut centrifugé, la couche supérieure fut recueillie et les ADN furent recueillis par précipitation à l'éthanol et séparés sur un gel d'agarose à 0,8 % afin de recueillir un fragment d'ADN d'environ 0,1 kbp.

Le produit de digestion du vecteur pRStac et le 15 fragment de la région génétique *dapA** préparé ainsi que décrit plus haut furent ligaturés en utilisant un kit de ligature d'ADN Ver. 2 (Takara Shuzo). Cette solution de réaction de ligature fut utilisée afin de transformer *Escherichia coli* (cellules compétentes de *E. coli* JM109, 20 Takara Shuzo). Les cellules furent déposées sur un milieu d'agar LB contenant 20 mg/L de streptomycine et incubées pendant la nuit à 37 °C. Les colonies qui apparurent sur le milieu d'agar furent chacune inoculées dans le milieu liquide LB contenant 20 mg/L de streptomycine et 25 cultivées à 37 °C pendant 8 heures avec agitation. Un ADN plasmique fut extrait du bouillon de culture par le procédé à l'alkali-SDS et la structure du plasmide fut confirmée par digestion avec des enzymes de restriction et détermination de la séquence de nucléotides afin 30 d'obtenir un plasmide pRSdapA. Dans le plasmide pRSdapA, le gène *dapA** fut positionné de telle sorte que sa

direction de transcription soit la même que celle du promoteur *tac*.

5 (3) Construction du plasmide pRSlysEdapA possédant le gène *lysE24* et le gène *dapA**

Un plasmide constitué du plasmide pRSlysE24 dans lequel on inséra le gène *dapA** fut construit afin d'évaluer l'effet de la combinaison de *lysE24* et de *dapA**.

Le pRSlysE24 préparé dans l'exemple 4, (1) fut 10 digéré avec une enzyme de restriction *SapI* et coupé franchement aux extrémités en utilisant un DNA Blunting Kit (Takara Shuzo). De plus, le plasmide pRSdapA préparé dans l'exemple 4, (2) fut digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SapI*, et un fragment d'environ 1 kbp 15 contenant le promoteur *tac* et la région *dapA** fut séparé sur un gel d'agarose de 0,8 %. Ce fragment fut recueilli en utilisant un EASY TRAP Ver. 2 (Takara Shuzo). Ce fragment fut coupé franchement aux extrémités ainsi que décrit précédemment et ligaturé au produit de digestion 20 de pRSlysE24 mentionné plus haut en utilisant un kit de ligature d'ADN Ver. 2 (Takara Shuzo).

La solution de réaction de ligature mentionnée ci-dessus fut utilisée afin de transformer *Escherichia coli* (cellules compétentes de *E. coli* JM109, Taraka Shuzo). 25 Les cellules furent déposées sur un milieu d'agar LB contenant 20 mg/L de streptomycine et incubées pendant la nuit à 37 °C. Les colonies qui apparurent sur le milieu d'agar furent chacune inoculées dans un milieu liquide de LB contenant 20 mg/L de streptomycine et cultivées à 30 37 °C pendant 8 heures avec agitation. L'ADN plasmique fut extrait de ce bouillon de culture par le procédé à l'alkali-SDS, et la structure du plasmide fut confirmée

par digestion avec des enzymes de restriction et détermination de la séquence des nucléotides afin d'obtenir un plasmide pRSlysEdapA. Dans ce plasmide, le gène *lysE24* et le gène *dapA** furent placés de sorte que 5 leur direction de transcription soit la même.

La souche *E. coli* JM109 transformée avec le plasmide pRSlysEdapA fut appelée AJ13832, et cette souche fut déposée auprès de l'agence administrative indépendant, National Institute of Advanced Industrial Science and 10 Technology, International Patent Organism Depositary le 4 juin 2001 et reçut le numéro d'accès FERM P-18371. Puis, le dépôt fut transformé en un dépôt international sous les dispositions du traité de Budapest le 13 mai 2002 et reçut le numéro d'accès FERM BP-8042.

15

(4) Introduction du plasmide produisant la L-lysine dans la souche à orf#3098 (*ldc*) déficient de *Methylophilus methylotrophus* et production de L-lysine

L'influence de la déficience du gène *ldc* sur la 20 production de L-lysine du *Methylophilus methylotrophus* fut étudiée. Tout d'abord, du fait que la souche DLC10 préparée dans l'exemple 2 fut préparée à partir d'une souche de type sauvage, la capacité de production de L-lysine ne fut pas modifiée. Par conséquent, afin de 25 vérifier effectivement l'influence de la déficience du *ldc* sur la production de L-lysine, une souche à *ldc* interrompu fut produite à partir de la souche de *Methylophilus methylotrophus* AS1 introduite avec pRSlysEdapA de la même manière que celle de l'exemple 2, 30 (2). La souche obtenue fut appelée une souche DLC12/pRSlysEdapA.

La souche AS1/pRSlysEdapA comme souche de contrôle et la souche DLC12/pRSlysEdapA furent appliquées au milieu d'agar SEII contenant 50 µg/ml de streptomycine et le milieu d'agar SEII contenant 50 µg/ml de streptomycine 5 et 1 g/l de cadavérine, respectivement, et furent cultivées pendant la nuit à 37 °C. Puis, les cellules sur environ 3 cm² (centimètres carrés) de chaque surface de milieu furent grattées, incubées dans 20 ml du milieu de production SEII contenant 1 g/l de cadavérine (contenant 10 50 µg/ml de streptomycine) et cultivée à 37 °C pendant 67 heures avec agitation. Après la fin de la culture, les cellules furent retirées par centrifugation, et la concentration en L-lysine dans le surnageant de culture fut déterminée en utilisant un analyseur d'acides aminés 15 (Nihon Bunko, chromatographie liquide à haute performance). En conséquence, la souche AS1/pRSlysEdapA accumula 1,26 g/L de L-lysine dans le milieu, et la souche DLC12/pRSlysEdapA accumula 1,79 g/L de L-lysine dans le milieu. Par conséquent, il put être confirmé que 20 la déficience de *ldc* pouvait améliorer la production de L-lysine.

Si l'invention a été décrite en détails en faisant référence à des modes de réalisation préférés de celle-ci, il apparaîtra évident à l'homme du métier que différents 25 changements peuvent être apportés et que des équivalents peuvent être utilisés sans s'éloigner de la portée de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Protéine sélectionnée dans le groupe constitué
5 de :

(A) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 4 ;

(B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la 10 délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présente une activité de lysine décarboxylase.

2. Protéine sélectionnée dans le groupe constitué de :

15 (A) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 ;

(B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs 20 résidus d'acides aminés,

moyennant quoi ladite protéine présente une activité de lysine décarboxylase et a une homologie d'au moins 90 % avec le SEQ ID NO : 4.

3. ADN codant pour une protéine sélectionnée dans le 25 groupe constitué de :

(A) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 ;

(B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la 30 délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présente une activité de lysine décarboxylase.

4. ADN codant pour une protéine sélectionnée dans le groupe constitué de :

(A) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 ;

5 (B) une protéine qui présente la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4 comprenant la substitution, la délétion, l'insertion ou l'addition d'un ou de plusieurs acides aminés,

moyennant quoi ladite protéine présente une activité 10 de lysine décarboxylase et a une homologie d'au moins 90 % avec le SEQ ID NO : 4.

5. ADN selon la revendication 3, sélectionné dans le groupe constitué de :

(a) un ADN qui présente la séquence de nucléotides 15 des nucléotides 684 à 2930 dans la SEQ ID NO : 3 ;

(b) un ADN qui peut être hybridé avec un ADN présentant la séquence de nucléotides des nucléotides 684 à 2930 dans la SEQ ID NO : 3 sous des conditions stringentes, et code pour une protéine ayant une activité 20 de lysine décarboxylase.

6. ADN selon la revendication 3, qui est dérivé d'un chromosome d'une bactérie *Methylophilus*.

7. Bactérie *Methylophilus* qui produit de la L-lysine et est modifiée de telle sorte que l'activité de la 25 lysine décarboxylase intracellulaire de la protéine selon la revendication 1 ou 2 est réduite ou éliminée.

8. Bactérie *Methylophilus* qui produit de la L-lysine, dans laquelle un gène sur un chromosome ayant une séquence de nucléotides identique à l'ADN selon la 30 revendication 3 est interrompu, ou un gène sur un chromosome ayant une homologie avec l'ADN selon la revendication 3 à un degré tel qu'une recombinaison

homologue avec l'ADN intervient, est interrompu, l'expression dudit gène est ainsi supprimée et l'activité de lysine décarboxylase intracellulaire est réduite ou éliminée.

5 9. Procédé de production de L-lysine, comprenant les étapes consistant à cultiver la bactérie *Methylophilus* selon la revendication 8 dans un milieu contenant du méthanol comme source principale de carbone entraînant l'accumulation de L-lysine dans la culture, et à
10 recueillir la L-lysine de la culture.

LISTE DES SEQUENCES

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Nouveau gène de la lysine décarboxylase et procédé de production de L-lysine

<130> OP1634

<150> JP 2003-47185

<151> 2003-02-25

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 1

gcgagctcag cgcgagtgac tggatatacg a

31

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 2

gcggtaaccac tgtataaataa gcaaaggcaa c

31

<210> 3

<211> 2964

<212> ADN

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

<221> CDS

<222> (684)..(2930)

<400> 3

gatatcgaa tgagcattaa gtctgacaaa tggatacgca gaatggctga acaacacggc 60
 atgattgagc cgaaaatgttgc caagcttgcgat cgtgagatca atggccagaa gattgtttct 120
 tatggcaccc ttcttacgg ttacgatatac cggtgtgcg acgaattccg cgtatattacc 180
 aatatcaaca gcaccatagt tgaccccaag caatttgacc cgcaatcggtt tgtcgaggtc 240
 tccggcaag gctattgcgt gattccccct aactcatttg cactggcgcc cacggtagag 300
 tatttccgtt ttcctcgctc tgtaactgact gtatgcctcg gcaagtgcac ttatgcgcgt 360
 tgcggcatta tcgtcaacgt caccggccat gaaccagagt gggaggcta tgtcacacta 420
 gagttcagca acaccacacc gctacccgccc aaaatttatg ctggcgaagg ctgtgcgcaa 480
 gtgtcggttct ttgagtctga tgaaatctgt gaaacgagct acaaagaccg tggggtaaa 540
 taccagggtc aaattggcgat gaccctgcca aaaatataac ggcaacattg aacaataacc 600
 tgacattcac caagggcaccg gtgcaaaagca aatgtttct ctgtgcctt gtgtcttgat 660
 tttagcggtt aaggatttat tgc atg aaa ttt aga ttc cct atc gtc att att 713

Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile

1

5

10

gac gag gac ttc cgc tcc gag aac tct tcc ggc ctg ggc atc cgt gtg Asp Glu Asp Phe Arg Ser Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val 15 20 25	761
ctg gcg aaa gcc atc gaa gat gag ggc ctg gaa gtg ctt ggc gtc acc Leu Ala Lys Ala Ile Glu Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr 30 35 40	809
agc tat ggc gac ctg acc tct ttc gcc cag cag caa agc cgt gca tca Ser Tyr Gly Asp Leu Thr Ser Phe Ala Gln Gln Gln Ser Arg Ala Ser 45 50 55	857
gcc ttt atc ctg tcg att gat gat gag gaa atc gtt gag gag aaa ccg Ala Phe Ile Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro 60 65 70	905
gaa gcc att gag caa ctg cgt aac ttt gtg cag gaa atc cgt tac cgc Glu Ala Ile Glu Gln Leu Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg 75 80 85 90	953
aac gag gaa atc ccc att ttc ctg cat ggc gaa acc cgt acc agc cgt Asn Glu Glu Ile Pro Ile Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg 95 100 105	1001
cac atc cct aac gat gtg ttg cgc gag ttg cac ggc ttt atc cat atg His Ile Pro Asn Asp Val Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met 110 115 120	1049
aat gaa gac acg cct gag ttt gtg gcg cgc ctg att atc cgc gaa gcc Asn Glu Asp Thr Pro Glu Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala 125 130 135	1097
aaa gcc tac ctg gac agc ttg cca ccg ccc ttc aag gca ctc act Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Leu Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr 140 145 150	1145
cat tac gcg gct gat ggc tct tat tca tgg cac tgt cct ggt cac tcg His Tyr Ala Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser 155 160 165 170	1193
ggt ggc gta gcc ttt ctg aaa tcc cca gtc ggg cag atg ttc cac cag Gly Gly Val Ala Phe Leu Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln 175 180 185	1241
ttt ttt ggc gag aac atg ctg cgt gca gac gtg tgt aat gcg gta gat Phe Phe Gly Glu Asn Met Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp 190 195 200	1289
gaa tta ggc caa tta ctg gat cac acc ggc ccg gtg gcc gct tct gag Glu Leu Gly Gln Leu Leu Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu 205 210 215	1337
cgc aac gct gcg cgc atc tac aac tgc gac cat ttg tac ttt gtc act Arg Asn Ala Ala Arg Ile Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr 220 225 230	1385
aac ggc acc tca aca tcg aac aag att gtc tgg aac tca acc gtg gcg Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala 235 240 245 250	1433
ccg ggt gat att gta gtg gtt gat cgt aac tgc cat aaa tcc gta ttg Pro Gly Asp Ile Val Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu 255 260 265	1481
cac tcc atc att atg acg ggt gcc gtg ccc gtg ttc ctg atg cca acg His Ser Ile Ile Met Thr Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr 270 275 280	1529
cgc aac cat ttc ggc att atc ggg cct atc cca aaa agt gaa ttc gcc Arg Asn His Phe Gly Ile Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala 285 290 295	1577
tgg gaa aac atc cag aaa aag atc gca cgc aac ccg ttt gcc acc gac Trp Glu Asn Ile Gln Lys Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp 300 305 310	1625
aaa aat gcc aag cca cgc gtg ctg acc att aca cag tcc acc tat gat Lys Asn Ala Lys Pro Arg Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp 315 320 325 330	1673
ggc gtg ttg tat aac gtg gaa gaa atc aag gaa atg ctg gat ggc aaa Gly Val Leu Tyr Asn Val Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys 335 340 345	1721
att gac acc ctg cac ttt gac gaa gcc tgg ttg cca cat gcg acc ttc	1769

Ile Asp Thr Leu His Phe Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe			
350	355	360	
cat gac ttt tat ggt gac tac cat gcg att ggc gct gac cgc cca cgc			1817
His Asp Phe Tyr Gly Asp Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg			
365	370	375	
tgt aaa gaa tcc atg gtg ttc tcc acc cag tcc acg cac aaa cta ttg			1865
Cys Lys Glu Ser Met Val Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu			
380	385	390	
gca ggc cta agc cag gcc tcg cag att ctg gta cag gat gcc gac cag			1913
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln			
395	400	405	410
aac cgc ctg gac cgt gac gtg ttc aac gaa gcc tat ttg atg cac acc			1961
Asn Arg Leu Asp Arg Asp Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr			
415	420	425	
tcc acc agc ccg caa tat tca att att gcc agc tgc gac gtc gct gct			2009
Ser Thr Ser Pro Gln Tyr Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala			
430	435	440	
gcc atg atg gaa gcc cct ggt ggc acc gcc ctg gta gaa gaa tcc ctc			2057
Ala Met Met Glu Ala Pro Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu			
445	450	455	
aaa gaa gcg ttg gac ttc cgc cgc gcc atg cgc aag gtc gac gaa gaa			2105
Lys Glu Ala Leu Asp Phe Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu			
460	465	470	
tgg ggc aca gac tgg tgg ttt aaa gtc tgg ggt cca act gac ctg tcc			2153
Trp Gly Thr Asp Trp Trp Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser			
475	480	485	490
gaa gac ggc ctg gaa gaa cgt gac gcg tgg atg ctc aaa gcc aat gaa			2201
Glu Asp Gly Leu Glu Glu Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu			
495	500	505	
cgc tgg cat ggc ttc ggc aac ctg gcc gaa ggc ttt aac atg ctg gat			2249
Arg Trp His Gly Phe Gly Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp			
510	515	520	
ccg atc aaa gcc acc atc atc acc cca gga cta gac gta gaa ggc gac			2297
Pro Ile Lys Ala Thr Ile Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp			
525	530	535	
ttt tcc gat gaa ttc ggc atc ccc gct gcc att gtc acc aag tac ctg			2345
Phe Ser Asp Glu Phe Gly Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu			
540	545	550	
gct gaa cac ggt gtg atc gtt gaa aaa acc ggt tta tac tca ttc ttt			2393
Ala Glu His Gly Val Ile Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe			
555	560	565	570
atc atg ttc acc atc ggc att acc aaa ggc cgc tgg aac acg atg gtg			2441
Ile Met Phe Thr Ile Gly Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val			
575	580	585	
gcc gcg tta caa caa ttt aaa gac gac tac gac aag aat cag ccg ctg			2489
Ala Ala Leu Gln Gln Phe Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu			
590	595	600	
tgg aaa gtg ctg cct gag ttt gta cag aaa cat cca cgc tat gaa cgc			2537
Trp Lys Val Leu Pro Glu Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg			
605	610	615	
gta ggc ctg aaa gat cta tgc acg cag att cat gaa gtt tac aaa gct			2585
Val Gly Leu Lys Asp Leu Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala			
620	625	630	
aac gac gta gca cgc ctg acc aca gaa atg tac ctg tct gac atg gtg			2633
Asn Asp Val Ala Arg Leu Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val			
635	640	645	650
cca gcc atg aaa ccg acc gat gct ttc tca aaa atg gcg cat cgc aaa			2681
Pro Ala Met Lys Pro Thr Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys			
655	660	665	
att gaa cgc gta gcc att gat gac ctc gaa ggc cgc gtc act gca gtg			2729
Ile Glu Arg Val Ala Ile Asp Asp Leu Glu Gly Arg Val Thr Ala Val			
670	675	680	
ctg tta acg ccc tat ccg cca ggc atc ccg ttg ctg atc cct ggc gaa			2777
Leu Leu Thr Pro Tyr Pro Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu			

685	690	695	
cgc ttt aac aaa gtc att gtg aac tac ctc aag ttt gcg cgc gag ttt			2825
Arg Phe Asn Lys Val Ile Val Asn Tyr Leu Lys Phe Ala Arg Glu Phe			
700	705	710	
aat gag aaa ttc cca ggc ttt gag acg gat aac cat gga tta gtg aag			2873
Asn Glu Lys Phe Pro Gly Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys			
715	720	725	730
caa ata gtc gat ggt aaa gcc gtg tat tat gtg gat tgc gtg aag caa			2921
Gln Ile Val Asp Gly Lys Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln			
735	740	745	
gaa gat taa attttttagtt tcactcagca gttttctac tgag			2964
Glu Asp			
<210> 4			
<211> 748			
<212> PRT			
<213> Methylophilus methylotrophus			
<400> 4			
Met Lys Phe Arg Phe Pro Ile Val Ile Ile Asp Glu Asp Phe Arg Ser			
1	5	10	15
Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val Leu Ala Lys Ala Ile Glu			
20	25	30	
Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr Ser Tyr Gly Asp Leu Thr			
35	40	45	
Ser Phe Ala Gln Gln Ser Arg Ala Ser Ala Phe Ile Leu Ser Ile			
50	55	60	
Asp Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro Glu Ala Ile Glu Gln Leu			
65	70	75	80
Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Asn Glu Glu Ile Pro Ile			
85	90	95	
Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg His Ile Pro Asn Asp Val			
100	105	110	
Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met Asn Glu Asp Thr Pro Glu			
115	120	125	
Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala Lys Ala Tyr Leu Asp Ser			
130	135	140	
Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr His Tyr Ala Ala Asp Gly			
145	150	155	160
Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser Gly Gly Val Ala Phe Leu			
165	170	175	
Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln Phe Phe Gly Glu Asn Met			
180	185	190	
Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp Glu Leu Gly Gln Leu Leu			
195	200	205	
Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu Arg Asn Ala Ala Arg Ile			
210	215	220	
Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr Asn Gly Thr Ser Thr Ser			
225	230	235	240
Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala Pro Gly Asp Ile Val Val			
245	250	255	
Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu His Ser Ile Ile Met Thr			
260	265	270	
Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr Arg Asn His Phe Gly Ile			
275	280	285	
Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala Trp Glu Asn Ile Gln Lys			
290	295	300	
Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp Lys Asn Ala Lys Pro Arg			
305	310	315	320
Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp Gly Val Leu Tyr Asn Val			
325	330	335	
Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys Ile Asp Thr Leu His Phe			
340	345	350	
Asp Glu Ala Trp Leu Pro His Ala Thr Phe His Asp Phe Tyr Gly Asp			
355	360	365	

Tyr His Ala Ile Gly Ala Asp Arg Pro Arg Cys Lys Glu Ser Met Val
 370 375 380
 Phe Ser Thr Gln Ser Thr His Lys Leu Leu Ala Gly Leu Ser Gln Ala
 385 390 395 400
 Ser Gln Ile Leu Val Gln Asp Ala Asp Gln Asn Arg Leu Asp Arg Asp
 405 410 415
 Val Phe Asn Glu Ala Tyr Leu Met His Thr Ser Thr Ser Pro Gln Tyr
 420 425 430
 Ser Ile Ile Ala Ser Cys Asp Val Ala Ala Ala Met Met Glu Ala Pro
 435 440 445
 Gly Gly Thr Ala Leu Val Glu Glu Ser Leu Lys Glu Ala Leu Asp Phe
 450 455 460
 Arg Arg Ala Met Arg Lys Val Asp Glu Glu Trp Gly Thr Asp Trp Trp
 465 470 475 480
 Phe Lys Val Trp Gly Pro Thr Asp Leu Ser Glu Asp Gly Leu Glu Glu
 485 490 495
 Arg Asp Ala Trp Met Leu Lys Ala Asn Glu Arg Trp His Gly Phe Gly
 500 505 510
 Asn Leu Ala Glu Gly Phe Asn Met Leu Asp Pro Ile Lys Ala Thr Ile
 515 520 525
 Ile Thr Pro Gly Leu Asp Val Glu Gly Asp Phe Ser Asp Glu Phe Gly
 530 535 540
 Ile Pro Ala Ala Ile Val Thr Lys Tyr Leu Ala Glu His Gly Val Ile
 545 550 555 560
 Val Glu Lys Thr Gly Leu Tyr Ser Phe Phe Ile Met Phe Thr Ile Gly
 565 570 575
 Ile Thr Lys Gly Arg Trp Asn Thr Met Val Ala Ala Leu Gln Gln Phe
 580 585 590
 Lys Asp Asp Tyr Asp Lys Asn Gln Pro Leu Trp Lys Val Leu Pro Glu
 595 600 605
 Phe Val Gln Lys His Pro Arg Tyr Glu Arg Val Gly Leu Lys Asp Leu
 610 615 620
 Cys Thr Gln Ile His Glu Val Tyr Lys Ala Asn Asp Val Ala Arg Leu
 625 630 635 640
 Thr Thr Glu Met Tyr Leu Ser Asp Met Val Pro Ala Met Lys Pro Thr
 645 650 655
 Asp Ala Phe Ser Lys Met Ala His Arg Lys Ile Glu Arg Val Ala Ile
 660 665 670
 Asp Asp Leu Glu Gly Arg Val Thr Ala Val Leu Leu Thr Pro Tyr Pro
 675 680 685
 Pro Gly Ile Pro Leu Leu Ile Pro Gly Glu Arg Phe Asn Lys Val Ile
 690 695 700
 Val Asn Tyr Leu Lys Phe Ala Arg Glu Phe Asn Glu Lys Phe Pro Gly
 705 710 715 720
 Phe Glu Thr Asp Asn His Gly Leu Val Lys Gln Ile Val Asp Gly Lys
 725 730 735
 Ala Val Tyr Tyr Val Asp Cys Val Lys Gln Glu Asp
 740 745

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 5

aaggctgtgc gcaagtgctg ttctttgagt

30

<210> 6

<211> 64

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

```

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 6
ccagcctaca caatcgctca agacgtgtaa tgcacgcattg gtagtcacca taaaagtcat 60
ggaa                                         64

<210> 7
<211> 64
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 7
ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt ccatgaacta cctcaagttt ggcgcgcgagt 60
ttaa                                         64

<210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 8
ggttggatc agttagaca cggttgcaag                                         30

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 9
gcattacacg tcttgagcga ttgtgttaggc                                         30

<210> 10
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 10
ggaacactta acggctgaca tggaaattag cc                                         32

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 11
aacctgacat tcaccaaggg cacggtgcaa                                         30

```

<210> 12		
<211> 30		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 12		
tttgcgcaaa agcatcgatt atccttcccc	30	
<210> 13		
<211> 33		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 13		
gccctgcagg agcgcgagtg actggatatc gga	33	
<210> 14		
<211> 32		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 14		
gcctgcagg ctgtataaat agcaaaggca ac	32	
<210> 15		
<211> 35		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 15		
gcctgcagta aggaaggatt ttccaggagg aacac	35	
<210> 16		
<211> 38		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 16		
gcctgcagaa gctttgctca ccgcataatc cgtcgcaa	38	
<210> 17		
<211> 39		
<212> ADN		
<213> Séquence artificielle		
<220>		
<223> Description de séquence artificielle : amorce		
<400> 17		

agggaattcc ccgttctgga taatgtttt tgccggac	39
<210> 18	
<211> 58	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de séquence artificielle : amorce	
<400> 18	
cgatgcac tagatgttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacac	58
<210> 19	
<211> 64	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de séquence artificielle : amorce	
<400> 19	
catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggatca tggaaatctt cattacaggt	60
ctgc	64
<210> 20	
<211> 50	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de séquence artificielle : amorce	
<400> 20	
ggcgagacta gaagagctcc aaaaccgcg aaaactaacc catcaacatc	50
<210> 21	
<211> 711	
<212> ADN	
<213> Brevibacterium lactofermentum	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(711)	
<400> 21	
atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt	48
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser	
1 5 10 15	
ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga	96
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly	
20 25 30	
att aag cgc gaa gga ctc att ggc gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct	144
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser	
35 40 45	
gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc	192
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser	
50 55 60	
aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct	240
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac	288
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn	

85	90	95	
aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc			336
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro			
100	105	110	
gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac			384
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn			
115	120	125	
cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag			432
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys			
130	135	140	
ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat			480
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr			
145	150	155	160
ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac			528
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp			
165	170	175	
acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc			576
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile			
180	185	190	
tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca ttg tca cgc ccg ctg			624
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu			
195	200	205	
tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg			672
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val			
210	215	220	
atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag			711
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly			
225	230	235	

<210> 22

<211> 236

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 22

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly			
20	25	30	
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser			
35	40	45	
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser			
50	55	60	
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala			
65	70	75	80
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn			
85	90	95	
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro			
100	105	110	
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn			
115	120	125	
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys			
130	135	140	
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr			
145	150	155	160
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp			
165	170	175	
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile			
180	185	190	
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu			
195	200	205	
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val			
210	215	220	
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly			

225	230	235		
<210> 23				
<211> 712				
<212> ADN				
<213> <i>Brevibacterium lactofermentum</i>				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1)...(375)				
<400> 23				
atg	gtg	atc	atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt	48
Met	Val	Ile	Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser	
1	5	10	15	
ctt	ttg	ctg	tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga	96
Leu	Leu	Leu	Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly	
20	25	30		
att	aag	cgc	gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgg att tta att tct	144
Ile	Lys	Arg	Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser	
35	40	45		
gac	gtc	ttt	ttg atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc	192
Asp	Val	Phe	Leu Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser	
50	55	60		
aat	gcc	gca	ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct	240
Asn	Ala	Ala	Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala	
65	70	75	80	
tac	ctg	tta	tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac	288
Tyr	Leu	Leu	Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn	
85	90	95		
aag	gtg	gaa	gca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc	336
Lys	Val	Glu	Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro	
100	105	110		
gat	gac	acg	cct ttg ggc gtg ttc ggc ggt ggc cac tga cacgcgcac	385
Asp	Asp	Thr	Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly His	
115	120	125		
cggtgcggg	tggaggtgag	cgtcgataag	cagcgggttt gggtaagcc catgttgc	445
gcaatcg	tgacctgggt	gaacccgaat	gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcg	505
ggcg	tcggcg	cgcaatacgg	cgacaccgga cggggattt tcggcgctgg cgcgttcgc	565
gcaagc	cctga	tctggttccc	gctgggtgggt ttggcgcag cagcattgtc acgcccgtc	625
tccag	ccccca	agggtggcg	ctggatcaac gtctcgtgg cagttgtat gaccgcattt	685
gccat	caaac	tgtatgtat	gggttag	712
<210> 24				
<211> 124				
<212> PRT				
<213> <i>Brevibacterium lactofermentum</i>				
<400> 24				
Met	Val	Ile	Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser	
1	5	10	15	
Leu	Leu	Leu	Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly	
20	25	30		
Ile	Lys	Arg	Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser	
35	40	45		
Asp	Val	Phe	Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser	
50	55	60		
Asn	Ala	Ala	Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala	
65	70	75	80	
Tyr	Leu	Leu	Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn	
85	90	95		
Lys	Val	Glu	Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro	
100	105	110		
Asp	Asp	Thr	Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly His	

115

120

<210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 25
tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt

35

<210> 26
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 26
cattcttagat cccttaaactt tacagcaaac cggcat

36

•