

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 851 575

②① N° 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.

③① Priorité : 25.02.03 JP 00347185.

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.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

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

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 impliqué 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 methylophilus*, 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*.

Un objet de la présente invention est de proposer
15 une protéine sélectionnée parmi le 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
20 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 bactérie *Methylophilus*.

Il est encore un autre objet de la présente invention de proposer une bactérie *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 bactérie *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 bactérie *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 bactérie *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, NCBI : 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
20 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 délétés.
30

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

methylophilus 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 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 *Methylophilus methylophilus* 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 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 methylophilus*, la production de L-lysine fut améliorée et la présente invention fut ainsi réalisée.

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

Lysine décarboxylase de la présente invention et ADN 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 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 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).

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 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 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 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 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

5 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

10 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

15 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, MFá1, SUC2, PHO5, GAL1, GAL4 (Lecture of Biochemical

20 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

25 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

30 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 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.

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 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 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 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 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 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)).

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 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 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 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.

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
5 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
10 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,
15 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
20 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
25 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
30 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*
10 *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 substantiellement 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 substantiellement 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 *lyseE24* mentionné plus haut est un exemple du *lyseE* mutant qui code pour un peptide contenant les trois premières hélices hydrophobes et pour un peptide contenant les trois dernières hélices hydrophobes. Le gène *lyseE24* 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 *lyseE24* 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 bactérie *Methylophilus*. Les résultats indiquent que l'introduction du gène *lyseE24* dans une bactérie *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 *lyseE* 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 bactérie 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.

20 Afin d'introduire un gène souhaité, tel qu'un gène 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 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. 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 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 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 décarboxylase soit réduite ou éliminée.

Production de L-lysine

La culture de la bactérie *Methylophilus* dans laquelle l'activité de la lysine décarboxylase est 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 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 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'hydrolysate d'amidon, 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 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 % (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 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'hydrolysate 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
5 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
10 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
15 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
20 échangeuses d'ions, un procédé de précipitation, etc. en combinaison.

Exemples

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

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

30 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 $\mu\text{g/L}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 $\mu\text{g/L}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 23 $\mu\text{g/L}$ 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*.

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

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

L'ADN chromosomique obtenu dans l'exemple 1 fut
10 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 methylotrophus* à gène *ldc* déficient

Puis, le fragment de gène pour l'interruption génétique décrite ci-dessus fut introduit dans la souche de *Methylophilus methylotrophus* 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 methylotrophus* 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 l'électroporation. Puis, environ 1 µg 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 µl des cellules à modifier et des impulsions électriques furent appliquées avec des conditions de 18,5 kV/cm, 25 µF 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.

Ensuite, ce bouillon de culture fut appliqué au milieu d'agar SEII contenant 20 µg/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 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 µl d'eau stérilisée, à laquelle on ajouta 5 µl de Protéïnase K à 1 mg/ml et 25 µm 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 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 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 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 complétée par l'addition de 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.

20

Un milieu constitué de 4 ml de milieu SEII liquide 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 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

30

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 utilisé, 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 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 *Eco*Ri et *Pst*I et ajouté à une solution de phénol/chloroforme, puis 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 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 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 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 *EcoRI* et *EcoT221*. 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, 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 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 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 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 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 compléter l'auxotrophie de la cadavérine de la 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 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 *Pst*I fut ligaturé au côté N-terminal) ayant les séquences représentées par les SEQ ID 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 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 *Pst*I (Takara Shuzo). De manière séparée, le vecteur pRStac fut digéré avec la *Sse*83871, 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 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 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 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 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 pas se développer. Ce résultat indique que la LDC (lysine décarboxylase) de *E. coli* pouvait compléter l'auxotrophie de la cadavérine de la souche à orf#3098 déficient de *Methylophilus methylotrophus*.

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 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 pRSlyseE24 pour l'expression de *lyseE* 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 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.

15 Le fragment de gène *lyseE* fut également amplifié par PCR en utilisant un chromosome extrait de la souche *Brevibacterium lactofermentum* 2556 (ATCC 13869) comme matrice et les amorces représentées par les SEQ ID NOS : 19 et 20 (dénaturation à 94 °C pendant 20 secondes, recuit à 55 °C pendant 30 secondes et réaction 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 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 *lyseE* 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 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 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 pRSlyseE. Dans la pRSlyseE, le gène *lyse* fut positionné de telle sorte que sa direction de transcription soit la même que celle du promoteur *tac*.

La pRSlyseE obtenu ainsi que décrit ci-dessus fut introduite dans une souche de *Methylophilus methylotrophus* AS1 (NCIMB10515) par électroporation (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)). En conséquence, un transformant put 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 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 L-lysine à des bactéries *Methylophilus*, c'est-à-dire qui pouvait fonctionner, put être obtenu par l'analyse de la pRSlyseE introduite avec une mutation.

Ce gène *lyse* mutant fut appelé gène *lyse*24. La séquence de nucléotides du gène *lyse*24 fut analysée et il fut découvert que la mutation n'entraînait pas une substitution d'acides aminés, mais une mutation non-sens 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 *lyse*24, une T (thymine) fut insérée après une G (guanine) à la position 355 du gène *lyse* de type sauvage représenté par le SEQ ID NO : 21. La séquence de nucléotides de *lyse*24 et la séquence d'acides aminés codée par celle-ci sont représentées par les SEQ ID NOS : 23 et 24. Le plasmide portant *lyse*24 fut appelé pRSlyse24.

15

(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 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 *Sse*83871 et *Xba*I, ajoutée à une solution de phénol/chloroforme et mélangée à celle-ci 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 et séparés sur un gel d'agarose à 0,8 % afin de recueillir un fragment d'ADN d'environ 9 kbp.

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 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 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 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, 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 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 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**.

10 Le pRSlysE24 préparé dans l'exemple 4, (1) fut 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 (Taraka 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 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 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 (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 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 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 cgcgagtgcac tggatatcgcg a

31

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de séquence artificielle : amorce

<400> 2

gcggtaccac tgtataaata gcaaaggcaa c

31

<210> 3

<211> 2964

<212> ADN

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

<221> CDS

<222> (684)..(2930)

<400> 3

gatatacgga tgagcattaa gtctgacaaa tggatacgca gaatggctga acaacacggc 60
 atgattgagc cgtttgagcc caagcttgta cgtgagacca atggccagaa gattgtttct 120
 tatggcacct cttcttacgg ttacgatata cgttgtgctg acgaattccg cgtatttacc 180
 aatatcaaca gcaccatagt tgacccaag caatttgacc cgcagtcgtt tgtcgaggtc 240
 tccggcaaaag gctattgcgt gattccccct aactcatttg cactggcgcg cacggtagag 300
 tatttccgta ttctcgcgtc tgtactgact gtatgcctcg gcaagtcgac ttatgcgcgt 360
 tgcggcatta tcgtcaacgt caccctctt gaaccagagt gggaaggcta tgtcacacta 420
 gagttcagca acaccacacc gctaccgcc aaaatttatg ctggcgaagg ctgtgcgcaa 480
 gtgctgttct ttgagtctga tgaaatctgt gaaacgagct acaaagaccg tgggtgtaaa 540
 taccagggtc aaattggcgt gaccctgcca aaaatataac ggcaacattg aacaataacc 600
 tgacattcac caagggcacg gtgcaaagca aatgctttct ctgtgccctt gtgtcttgat 660
 ttttagcgga 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	761
Asp Glu Asp Phe Arg Ser Glu Asn Ser Ser Gly Leu Gly Ile Arg Val	
15 20 25	
ctg gcg aaa gcc atc gaa gat gag ggc ctg gaa gtg ctt ggc gtc acc	809
Leu Ala Lys Ala Ile Glu Asp Glu Gly Leu Glu Val Leu Gly Val Thr	
30 35 40	
agc tat ggc gac ctg acc tct ttc gcc cag cag caa agc cgt gca tca	857
Ser Tyr Gly Asp Leu Thr Ser Phe Ala Gln Gln Gln Ser Arg Ala Ser	
45 50 55	
gcc ttt atc ctg tgc att gat gat gag gaa atc gtt gag gag aaa ccg	905
Ala Phe Ile Leu Ser Ile Asp Glu Glu Ile Val Glu Glu Lys Pro	
60 65 70	
gaa gcc att gag caa ctg cgt aac ttt gtg cag gaa atc cgt tac cgc	953
Glu Ala Ile Glu Gln Leu Arg Asn Phe Val Gln Glu Ile Arg Tyr Arg	
75 80 85 90	
aac gag gaa atc ccc att ttc ctg cat ggc gaa acc cgt acc agc cgt	1001
Asn Glu Glu Ile Pro Ile Phe Leu His Gly Glu Thr Arg Thr Ser Arg	
95 100 105	
cac atc cct aac gat gtg ttg cgc gag ttg cac ggc ttt atc cat atg	1049
His Ile Pro Asn Asp Val Leu Arg Glu Leu His Gly Phe Ile His Met	
110 115 120	
aat gaa gac acg cct gag ttt gtg gcg cgc ctg att atc cgc gaa gcc	1097
Asn Glu Asp Thr Pro Glu Phe Val Ala Arg Leu Ile Ile Arg Glu Ala	
125 130 135	
aaa gcc tac ctg gac agc ttg cca ccg ccc ttc ttc aag gca ctc act	1145
Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Leu Pro Pro Pro Phe Phe Lys Ala Leu Thr	
140 145 150	
cat tac gcg gct gat ggc tct tat tca tgg cac tgt cct ggt cac tgc	1193
His Tyr Ala Ala Asp Gly Ser Tyr Ser Trp His Cys Pro Gly His Ser	
155 160 165 170	
ggt ggc gta gcc ttt ctg aaa tcc cca gtc ggg cag atg ttc cac cag	1241
Gly Gly Val Ala Phe Leu Lys Ser Pro Val Gly Gln Met Phe His Gln	
175 180 185	
ttt ttt ggc gag aac atg ctg cgt gca gac gtg tgt aat gcg gta gat	1289
Phe Phe Gly Glu Asn Met Leu Arg Ala Asp Val Cys Asn Ala Val Asp	
190 195 200	
gaa tta ggc caa tta ctg gat cac acc ggc ccg gtg gcc gct tct gag	1337
Glu Leu Gly Gln Leu Leu Asp His Thr Gly Pro Val Ala Ala Ser Glu	
205 210 215	
cgc aac gct gcg cgc atc tac aac tgc gac cat ttg tac ttt gtc act	1385
Arg Asn Ala Ala Arg Ile Tyr Asn Cys Asp His Leu Tyr Phe Val Thr	
220 225 230	
aac ggc acc tca aca tgc aac aag att gtc tgg aac tca acc gtg gcg	1433
Asn Gly Thr Ser Thr Ser Asn Lys Ile Val Trp Asn Ser Thr Val Ala	
235 240 245 250	
ccg ggt gat att gta gtg gtt gat cgt aac tgc cat aaa tcc gta ttg	1481
Pro Gly Asp Ile Val Val Val Asp Arg Asn Cys His Lys Ser Val Leu	
255 260 265	
cac tcc atc att atg acg ggt gcc gtg ccc gtg ttc ctg atg cca acg	1529
His Ser Ile Ile Met Thr Gly Ala Val Pro Val Phe Leu Met Pro Thr	
270 275 280	
cgc aac cat ttc ggc att atc ggg cct atc cca aaa agt gaa ttc gcc	1577
Arg Asn His Phe Gly Ile Ile Gly Pro Ile Pro Lys Ser Glu Phe Ala	
285 290 295	
tgg gaa aac atc cag aaa aag atc gca cgc aac ccg ttt gcc acc gac	1625
Trp Glu Asn Ile Gln Lys Lys Ile Ala Arg Asn Pro Phe Ala Thr Asp	
300 305 310	
aaa aat gcc aag cca cgc gtg ctg acc att aca cag tcc acc tat gat	1673
Lys Asn Ala Lys Pro Arg Val Leu Thr Ile Thr Gln Ser Thr Tyr Asp	
315 320 325 330	
ggc gtg ttg tat aac gtg gaa gaa atc aag gaa atg ctg gat ggc aaa	1721
Gly Val Leu Tyr Asn Val Glu Glu Ile Lys Glu Met Leu Asp Gly Lys	
335 340 345	
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		
					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		
					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		
					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 atttttagtt tcactcagca gtttttctac 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 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 gcaagtgcgtg ttctttgagt

30

<210> 6

<211> 64

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

```

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

<400> 6
ccagcctaca caatcgctca agacgtgtaa tgcacgcatg gtagtcacca taaaagtcac 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 gcgcgcgagt 60
ttaa 64

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

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

<400> 8
ggttggtatc agtgtagaca cggttgcaag 30

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

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

<400> 9
gcattacacg tcttgagcga ttgtgtaggc 30

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

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

<400> 10
ggaacactta acggctgaca tgggaattag 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
 ttgcgcaaa 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
 gccctgcagg 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

```

aggggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac 39

<210> 18
<211> 58
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

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

<400> 18
cggatgcac tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacia ttccacac 58

<210> 19
<211> 64
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

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

<400> 19
catttcctgc aggcacaagga gatgagcgtg atggtgatca tggaaatctt cattacaggt 60
ctgc 64

<210> 20
<211> 50
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

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

<400> 20
gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg 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 gcg 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 gcc 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 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 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

```

```
<210> 24
<211> 124
<212> PRT
<213> Brevibacterium lactofermentum
```

<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	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	Val	Phe	Gly	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		
cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat		36
•		