



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 454** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 P 13/06, C 12 N 1/21, 15/31, 15/63// (C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99114325/13, 09.07.1999

(24) Дата начала действия патента: 09.07.1999

(46) Дата публикации: 27.03.2003

(56) Ссылки: SU 751829 A, 30.07.80. US 5744331, 28.04.1998.

(98) Адрес для переписки:
117279, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.55А, ЗАО
"Фирма "Центр патентных услуг", Е.А. Харченко,
рег.№ 157

(71) Заявитель:

Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
Аджиното-Генетика"

(72) Изобретатель: Гусятинер М.М.,
Лунц М.Г., Козлов Ю.И., Ивановская
Л.В., Ворошилова Э.Б.

(73) Патентообладатель:

Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
Аджиното-Генетика"

(54) МУТАНТНАЯ АЛЬФА-ИЗОПРОПИЛМАЛАТ СИНТАЗА (IPMS), ДНК, КОДИРУЮЩАЯ МУТАНТНУЮ IPMS, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI*, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ЛЕЙЦИНА

(57)

Изобретение относится к биотехнологии. Мутантная альфа-изопропилмалат синтаза (IPMS) получена путем делеции, замещения, инсерции или добавления одного или нескольких аминокислотных остатков, при этом свойства мутантной IPMS идентичны природному белку. ДНК, кодирующая IPMS дикого типа, имеет мутацию, позволяющую

IPMS утратить чувствительность к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи. ДНК трансформирует штамм *Escherichia coli*, который культивируют для получения L-лейцина. Изобретение позволяет увеличить выход L-лейцина, который используется в качестве пищевой добавки, реагента, ростового фактора. 4 с. и 2 з.п. ф-лы, 3 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 454** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 P 13/06, C 12 N 1/21,**
15/31, 15/63/(C 12 N 1/21, C 12 R
1:19)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99114325/13 , 09.07.1999

(24) Effective date for property rights: 09.07.1999

(46) Date of publication: 27.03.2003

(98) Mail address:
117279, Moskva, ul. Miklukho-Maklaja, d.55A,
ZAO "Firma "Tsentr patentnykh uslug", E.A.
Kharchenko, reg.№ 157

(71) Applicant:

Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
Adzhinomoto-Genetika"

(72) Inventor: Gusjatiner M.M.,
Lunts M.G., Kozlov Ju.I., Ivanovskaja
L.V., Voroshilova Eh.B.

(73) Proprietor:

Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo
"Nauchno-issledovatel'skij institut
Adzhinomoto-Genetika"

(54) **MUTANT ALPHA-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE (IPMS), DNA ENCODING MUTANT IPMS, METHOD OF PREPARING ESCHERICHIA COLI STRAIN, METHOD OF L-LEUCINE PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic engineering, enzymes, biochemistry.
SUBSTANCE: mutant alpha-isopropylmalate synthase (IPMS) is obtained by deletion, substitution, insertion or addition of one or some amino acid residues. Properties of mutant IPMS are identical with natural DNA encoding IPMS of wild type and comprises

mutation that allows to loss sensitivity to inhibitory effect by L-leucine by feedback inhibition mechanism. DNA transforms Escherichia coli strain that is cultured for L-leucine preparing. Invention ensures to increase the yield of L-leucine that is used as food supplement, reagent and growth factor. EFFECT: improved method of strain and L-leucine preparing. 6 cl, 3 tbl

RU 2 201 454 C2

RU 2 201 454 C2

Изобретение относится к ДНК, кодирующей мутантную альфа-изопротилмалат синтазу, а также к способу получения штамма *Escherichia coli* - продуцента L-лейцина, содержащего мутантную альфа-изопротилмалат синтазу, и способу получения L-лейцина с использованием указанного штамма. L-лейцин является незаменимой аминокислотой, которая может использоваться в виде питательной добавки в пищу человека или корм животных, применяется в качестве реагента или вещества в медицине, фармацевтической или химической промышленности или в качестве ростового фактора при получении других аминокислот, таких как лизин.

В прошлом L-лейцин получали методом ферментации, первоначально используя микроорганизмы, принадлежащие к роду *Brevibacterium*, *Corynebacterium* или *Serratia*, либо их мутанты, продуцирующие L-лейцин (Amino acid fermentation, JAPAN SCIENTIFIC SOCIETY'S PRESS, pp.397-422, 1986).

Наиболее высокий уровень накопления L-лейцина был достигнут при использовании штамма VKPM B-2736 *Brevibacterium flavum*. На содержащих сахарозу средах за 72 часа ферментации в лабораторном ферментере данный штамм продуцирует L-лейцин с концентрацией до 26 грамм/литр (смотри Авторское свидетельство СССР 1394711). Штамм *Brevibacterium lactofermentum* 34 продуцирует до 34 г/л L-лейцина на среде, содержащей глюкозу (смотри Appl. Environ. Microbiol., 51, стр. 1024 (1986)).

Как указывалось выше, эффективность получения L-лейцина была несколько повышена, однако для обеспечения в будущем растущих потребностей в L-лейцине существует необходимость разработать более эффективный и экономичный способ получения L-лейцина.

С другой стороны, как показывают данные генетического анализа и результаты исследования большого числа генетического материала, в качестве эффективных продуцентов L-лейцина потенциально могут использоваться принадлежащие к роду *Escherichia* микроорганизмы, отличающиеся высокой скоростью роста. Тем не менее, имеется мало свидетельств, в которых описывается получение L-лейцина с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*.

В качестве штаммов бактерии рода *Escherichia*, продуцирующих L-лейцин, известен штамм, обладающий устойчивостью к бета-тиенилаланину и бета-гидроксилейцину (смотри публикацию японского патента 62-34397 (1987), и штамм, обладающий устойчивостью к 4-азалейцину или 5,5,5-трифторлейцину (смотри выложенную японскую патентную заявку 8-70879 (1996)).

Тем не менее, до настоящего времени не известно ни бактерий рода *Escherichia*, обладающих устойчивостью к L-лейцину, ни какой-либо зависимости между устойчивостью к L-лейцину и способностью продуцировать L-лейцин.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Созданное с учетом вышеизложенного настоящее изобретение имеет целью повысить эффективность получения

L-лейцина с использованием штамма бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, а также обеспечить эффективный и экономичный способ получения L-лейцина.

В результате тщательных исследований, направленных на достижение указанной выше цели, авторы настоящего изобретения установили, что утрата чувствительности альфа-изопротилмалат синтазы (далее IPMS) к ингибированию ее активности L-лейцином по типу обратной связи обеспечивает более высокую эффективность получения L-лейцина, и, таким образом, совершили настоящее изобретение.

Более точно в настоящем изобретении предложены:

1. Мутантная альфа-изопротилмалат синтаза (IPMS) (также именуемая далее как "IPMS согласно настоящему изобретению") с аминокислотной последовательностью, приведенной в перечне последовательностей под 2, тип замещения у которой выбран из группы, включающей:

- (a) замещение остатка треонина в положении 482,
- (b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386,
- (c) замещение остатка пролина в положении 428,
- (d) замещение остатка глицина в положении 479,
- (e) замещение остатка глицина в положении 462;

у которой чувствительность к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи утрачена.

2. Мутантная альфа-изопротилмалат синтаза по п. 1, отличающаяся тем, что упомянутое замещение выбрано из группы, включающей:

- (a) замещение остатка треонина в положении 482 остатком изолейцина,
- (b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386 остатком лизина,
- (c) замещение остатка пролина в положении 428 остатком пролина,
- (d) замещение остатка цистеина в положении 479 остатком глицина,
- (e) замещение остатка глицина в положении 462 остатком аспарагиновой кислоты.

3. Мутантная альфа-изопротилмалат синтаза по п.п. 1, отличающаяся тем, что в ней произведена делеция, замещение, инсерция или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков, при этом активность альфа-изопротилмалат синтазы и утрата чувствительности IPMS к ингибированию по типу обратной связи в указанном белке такие же, как в IPMS по п.1.

Также в настоящем изобретении предложена ДНК, кодирующая мутантную IPMS. Предпочтительной ДНК (далее также именуемой - "ДНК согласно настоящему изобретению") является ДНК, кодирующая мутантную IPMS, в которой тип замещения выбран из группы, включающей:

- (a') замещение остатка треонина в положении 482 остатком изолейцина, (b') замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386 остатком лизина,
- (c') замещение остатка пролина в положении 428 остатком лейцина,
- (d') замещение остатка глицина в положении 479 остатком цистеина, и

(е') замещение остатка глицина в положении 462 остатком аспарагиновой кислоты.

В число конкретных примеров ДНК согласно настоящему изобретению входит ДНК с нуклеотидной последовательностью, приведенной в перечне последовательностей под 1, при этом такая последовательность имеет мутацию, выбранную из группы, включающей:

(i) мутацию цитозина в положении 1445 на тимин,

(ii) мутацию гуанина в положении 1156 на аденин,

(iii) мутацию цитозина в положении 1283 на тимин,

(iv) мутацию гуанина в положении 1435 на тимин и

(v) мутацию гуанина в положении 1385 на аденин.

В настоящем изобретении также предложен способ получения штамма бактерии - продуцента L-лейцина, в котором указанный штамм получают путем трансформации штамма бактерии вышеописанной ДНК.

Предпочтительно микроорганизм согласно настоящему изобретению относится к роду *Escherichia*. Более предпочтительно микроорганизм согласно настоящему изобретению представляет собой *Escherichia coli*.

В настоящем изобретении также предложен способ получения L-лейцина путем культивирования штамма бактерии - продуцента L-лейцина в питательной среде с последующим выделением L-лейцина из культуральной жидкости, в котором используют штамм, полученный вышеуказанным способом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

<1> IPMS согласно настоящему изобретению.

Альфа-изопропилмалат синтаза (IPMS) является ферментом, участвующим в первой реакции синтеза L-лейцина и осуществляющим конденсацию ацетильной группы ацетил-кофермента А с альфа-кетоизовалератом с образованием альфа-изопропилмалата. IPMS согласно настоящему изобретению является мутантная альфа-изопропилмалат синтаза, у которой чувствительность к ингибированию L-лейцина по типу обратной связи утрачена. Более конкретно, IPMS согласно настоящему изобретению является мутантная альфа-изопропилмалат синтаза с аминокислотной последовательностью, приведенной в перечне последовательностей под 2, тип замещения у которой выбран из группы, включающей:

(а) замещение остатка треонина в положении 482,

(b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386,

(c) замещение остатка пролина в положении 428,

(d) замещение остатка глицина в положении 479,

(е) замещение остатка глицина в положении 462;

у которой чувствительность к ингибированию L-лейцина по типу обратной

связи утрачена.

Более конкретно, IPMS согласно настоящему изобретению является мутантная альфа-изопропилмалат синтаза, у которой упомянутое замещение выбрано из группы, включающей:

(а) замещение остатка треонина в положении 482 остатком изолейцина,

(b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386 остатком лизина,

(c) замещение остатка пролина в положении 428 остатком пролина,

(d) замещение остатка цистеина в положении 479 остатком глицина,

(е) замещение остатка глицина в положении 462 остатком аспарагиновой кислоты.

Также IPMS согласно настоящему изобретению является мутантная альфа-изопропилмалат синтаза, у которой произведена делеция, замещение, инсерция или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков, при этом активность альфа-изопропилмалат синтазы и утрата чувствительности IPMS к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи в указанном белке такие же, как в вышеописанной IPMS. К подобным вариантам (мутантам) IPMS также относятся варианты (мутанты), которые могут существовать в естественных условиях в виду природного разнообразия и видовых различий.

<2> ДНК согласно настоящему изобретению

ДНК, кодирующая IPMS дикого типа, согласно настоящему изобретению имеет мутацию, благодаря которой происходит утрата чувствительности IPMS, кодируемой этой ДНК, к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи.

Выражение "утрата чувствительности к ингибированию лейцином по типу обратной связи" означает, что подавление по типу обратной связи снижается. Степень снижения подавления по типу обратной связи можно определить путем измерения степени снижения подавления активности IPMS под воздействием L-лейцина и ее сравнения с таковой у дикого штамма или родительского штамма.

Примерами IPMS служат ферменты, полученные из бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, в особенности IPMS, полученная из *E. coli*. Примерами мутаций, вызывающих утрату чувствительности IPMS к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи, служат следующие типы замещений (а) - (е) в аминокислотной последовательности, приведенной в перечне последовательностей под 2:

(а) замещение остатка треонина в положении 482,

(b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386,

(c) замещение остатка пролина в положении 428,

(d) замещение остатка глицина в положении 479 и

(е) замещение остатка глицина в положении 462.

Предпочтительно замещения выбирают из группы, включающей:

(а') замещение остатка треонина в положении 482 остатком изолейцина,

(b') замещение остатка глутаминовой

кислоты в положении 386 остатком лизина,
(с') замещение остатка пролина в
положении 428 остатком лейцина,
(d') замещение остатка глицина в
положении 479 остатком цистеина, и
(е') замещение остатка глицина в
положении 462 остатком аспарагиновой
кислоты.

Примером ДНК, кодирующей IPMS дикого
типа, служит ДНК, кодирующая IPMS,
полученную из бактерий, принадлежащих к
роду *Escherichia*. В особенности таким
примером служит ДНК, кодирующая
аминокислотную последовательность,
приведенную в перечне последовательностей
под 2, а также ДНК с нуклеотидной
последовательностью, приведенной в
перечне последовательностей под 1. В число
ДНК согласно настоящему изобретению
включены те из последовательностей, у
которых имеется мутация в нуклеотидной
последовательности, вызывающая описанное
выше замещение аминокислотных остатков.
Может быть использован любой кодон,
соответствующий замещенному
аминокислотному остатку, независимо от его
вида при условии, что он кодирует
идентичный аминокислотный остаток.

В число конкретных примеров ДНК
согласно настоящему изобретению входят
ДНК с нуклеотидной последовательностью,
приведенной в перечне последовательностей
под 1, при этом у такой последовательности
имеется мутация, выбранная из группы,
включающей:

- (i) мутацию цитозина в положении 1445 на
тимин,
- (ii) мутацию гуанина в положении 1156 на
аденин,
- (iii) мутацию цитозина в положении 1283
на тимин,
- (iv) мутацию гуанина в положении 1435 на
тимин и
- (v) мутацию гуанина в положении 1385 на
аденин.

Кроме того, IPMS в различных бактериях и
бактериальных штаммах могут иметь
различия в последовательностях, однако в
число ДНК согласно настоящему изобретению
также включены ДНК, кодирующие такие виды
IPMS, у которых имеется замещение, делеция
или инсерция аминокислотного
остатка/остатков в положении/положениях, не
зависящих от активности ферментов. Иными
словами, в число ДНК согласно настоящему
изобретению также включена ДНК,
кодирующая белок, имеющий
аминокислотную последовательность
мутантной IPMS, при этом у такой
последовательности имеется делеция,
замещение, инсерция или добавление одного
или нескольких аминокислотных остатков,
активность IPMS сохранена, но подавление
активности L- лейцином по типу обратной
связи в упомянутом белке утрачено таким же
образом, как в мутантной IPMS. В их число
входят ДНК, мутации у которых могут
происходить естественным путем, в частности
мутации, основанные на различиях между
отдельными микроорганизмами, их видами и
родами, содержащими IPMS (мутанты или
варианты).

Способ получения ДНК, кодирующей
мутантные IPMS, заключается в следующем.

- (1) Получение гена IPMS дикого типа

Предпочтительным примером
микроорганизма, донора такой ДНК,
содержащего ген IPMS дикого типа или ген
IPMS с иной мутацией описанного выше типа,
служит микроорганизм, принадлежащий к
роду *Escherichia*. В особенности, могут
использоваться микроорганизмы, описанные в
книге, автором которой является Neidhardt и
др. (смотри Neidhardt, F.C. et al.,
Escherichia coli and Salmonella Typhimurium,
American Society for Microbiology,
Washington D.C., 1208, таблица 1). В
частности, примерами служат штаммы *E. coli*
K-12, JM109 и MC1061. В случае когда в
качестве донорского микроорганизма для ДНК
используется штамм дикого типа, содержащий
ген IPMS, может быть получена ДНК,
содержащая ген IPMS дикого типа.

Ниже будет описан пример получения
ДНК, содержащей ген IPMS. Во-первых,
выращивают *E. coli*, содержащую ген IPMS
дикого типа, например, штамм K-12, с целью
получения культуры. Процесс выращивания
описанного выше микроорганизма может
осуществляться обычным методом
твердофазного культивирования, однако
предпочтительно выращивание осуществляют
методом жидкофазного культивирования с
оценкой эффективности в процессе сбора
бактерий. Для этого может использоваться
среда, в которую добавлен один и несколько
источников азота, таких как дрожжевой
экстракт, пептон, мясной экстракт,
кукурузный настой и вытяжка из соевых бобов
или зерен пшеницы, а также одна или
несколько неорганических солей, таких как
дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия,
сульфат магния, хлорид натрия, хлорид
магния, хлорид железа (II), сульфат железа
(II) или хлорид марганца и дополнительно в
соответствующем количестве добавлены
сахара, витамины и аналогичные вещества.
Предпочтительно, чтобы исходный уровень
рН среды находился в пределах от 6 до 8.
Культивирование осуществляют в течение от
4 до 24 часов при температуре от 30 до 42°C,
предпочтительно около 37°C, методом
глубинного культивирования с аэрацией и
перемешиванием, методом качалочного
культивирования, стационарного
культивирования или аналогичным.

Полученную таким образом культуру в
течение 5 минут подвергают
центрифугированию, например, со скоростью
3000 оборотов в минуту с целью получения
дебриса штамма K-12 *E. coli*. Из дебриса
может быть получена хромосомная ДНК,
например, по методу Saito и Miura (смотри
Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963) или
по методу K. S. Kirby (смотри *Biochem. J.*,
64, 405(1956)).

С целью отделить ген IPMS от полученной
таким способом хромосомной ДНК создают
библиотеку хромосомной ДНК. Во-первых, с
целью получения смеси различных
фрагментов хромосомную ДНК подвергают
частичному расщеплению с помощью
соответствующего фермента рестрикции.
Могут использоваться самые разнообразные
виды ферментов рестрикции при условии, что
процесс расщепления регулируется временем
реакции вырезания и тому подобным образом.
Например, для обеспечения расщепления
хромосомной ДНК ее инкубируют различные
периоды времени (от 1 минуты до 2 часов) в

присутствии Sau3AI с концентрацией фермента от 1 до 10 единиц/мл при температуре не ниже 30°C, предпочтительно 37°C.

Затем с целью получения рекомбинантной ДНК полученные фрагменты ДНК сшивают с векторной ДНК, способной к автономной репликации в клетках бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*. В частности, с целью полного переваривания, вырезания и расщепления векторной ДНК ее при температуре не ниже 30 °C в течение не менее 1 часа, предпочтительно от 1 до 3 часов, подвергают воздействию фермента рестрикции с концентрацией от 1 до 100 единиц/мл, например BamHI, продуцирующего конечную нуклеотидную последовательность, являющуюся комплементарной по отношению к последовательности, продуцированной ферментом рестрикции Sau3AI, использованным для вырезания хромосомной ДНК. Далее с целью получения рекомбинантной ДНК смесь фрагментов хромосомной ДНК, полученную описанным выше способом, смешивают с расщепленной и разрезанной векторной ДНК, которую при температуре от 4 до 16°C в течение не менее 1 часа, предпочтительно от 4 до 24 часов, подвергают воздействию ДНК-лигазы, предпочтительно ДНК-лигазы T4 с концентрацией фермента от 1 до 100 единиц/мл.

Полученную рекомбинантную ДНК используют для трансформации микроорганизма, принадлежащего к роду *Escherichia*, например мутантного штамма, дефектного по IPMS, такого как штамм *Escherichia coli*, K-12, предпочтительно штамм JE7627 (ponB704, dacB12, pfv +, tonA2, dapA, lysA, str, malA38, metBI, ilvH611, leuA371, proA3, lac-3, tsx-76) с целью получения библиотеки хромосомной ДНК. Трансформация может быть осуществлена, например, по методу D. M. Morrison (смотри *Methods in Enzymology* 68, 326 (1979)) или по методу, в котором с целью повышения проницаемости ДНК клетки-реципиенты бактерий подвергают воздействию хлорида кальция (смотри Mandel, M. и Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970)). Штамм JE7627 имеется в наличии в Национальном институте генетики (Mishima-shi, Shizuoka-ken, Japan).

Из полученной библиотеки хромосомной ДНК получают штамм бактерии, содержащий рекомбинантную ДНК гена IPMS, который выбирают из штаммов с повышенной активностью IPMS или штаммов, в которых ауксотрофность, являющаяся результатом дефекта в гене IPMS, комплементирована. Например, для мутантного штамма с дефектом в IPMS требуется L-лейцин. Таким образом, когда в качестве хозяина используется мутантный штамм, дефектный по IPMS, фрагмент ДНК, содержащий ген IPMS, может быть получен путем выделения штамма бактерии, становящегося способным к росту, на среде, не содержащей L-лейцина, и извлечения рекомбинантной ДНК из штамма бактерии.

Получить подтверждение того, содержится ли фактически рекомбинантная ДНК, в которой ген IPMS клонирован, в штамме-кандидате, содержащем рекомбинантную ДНК, которая содержит ген IPMS, можно путем приготовления клеточного

экстракта из штамма-кандидата и получения из него неочищенного ферментного раствора с целью удостовериться, увеличилась ли активность IPMS. Процедура измерения активности ферментов IPMS может быть осуществлена по методу Kohlaw и др. (смотри *J. Biol. Chem.*, 244, 2218 (1969)).

Рекомбинантная ДНК, в которой осуществлена инсерция ДНК, содержащей ген IPMS, в векторную ДНК, может быть выделена из описанного выше штамма бактерии, например, по методу P. Guerry и др. (смотри *J. Bacteriol.*, 116, 1064 (1973)) или по методу D.B. Clewell (смотри *J. Bacteriol.*, 110, 667 (1972)).

Получение гена IPMS дикого типа может быть также осуществлено путем получения хромосомной ДНК из штамма, содержащего ген IPMS, по методу Saito и Miura или аналогичному методу, а амплификация гена IPMS - методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (смотри White, T.J. и др.; *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)). Затравки ДНК для реакции амплификации должны быть комплементарны обоим 3'-концевым областям двухцепочечной молекулы ДНК, содержащей область гена IPMS или часть его. В случае, когда амплификации подвергается лишь область, занятая частью гена IPMS, в качестве затравок необходимо использовать фрагменты ДНК, дающие возможность выделить из библиотеки хромосомных ДНК фрагмент ДНК, содержащий ген IPMS целиком. В случае, когда амплификации подвергается область, содержащая весь ген IPMS целиком, продукты ПЦР, включающие фрагменты ДНК, содержащие амплифицированный ген IPMS, подвергают электрофорезу в геле агарозы, из которого затем извлекают нужный фрагмент ДНК. Таким образом, может быть извлечен фрагмент ДНК, содержащий ген IPMS.

Соответствующие затравки ДНК могут быть получены на основе, например, последовательности, известной для *E. coli* (регистрационный номер EMBL D10483 или AE000117). В частности, предпочтительными являются затравки, способные амплифицировать область, содержащую 1572 нуклеотида, кодирующих ген IPMS. Синтез затравок может быть осуществлен обычным методом, таким как фосфорамидитный метод (смотри *Tetrahedron Letters*, 22, 1859 (1981)) с использованием промышленно производимого синтезатора ДНК (например, синтезатора ДНК модели 380B производства Applied Biosystems). Кроме того, ПЦР может быть осуществлена с использованием промышленно производимой установки ПЦР (например, термоблока для проведения реакций модели PJ2000 производства Takara Shuzo Co., Ltd.) в соответствии с методикой, указанной поставщиком.

Что касается гена IPMS, амплифицированного методом ПЦР, в случае когда он лигирован с векторной ДНК, способной к автономной репликации в клетках бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, и введен в клетки бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, облегчается осуществление таких операций, как введение мутации в ген IPMS. Используемая векторная ДНК, способ трансформации и способ подтверждения наличия гена IPMS аналогичны способам, применяемым в описанных выше операциях.

Данные о выделении гена IPMS смотри у Hertberg, K.M. и др., Gene, 8, стр. 135-152 (1980), Davis, M.G. и др., J. Bacteriol., 129, стр. 1078-1090 (1977) и т.д.

Как упоминалось выше, способ получения гена IPMS может быть использован для получения мутантных генов в том случае, когда микроорганизм, содержащий IPMS дикого типа, подвергают мутагенезу с целью получения мутантного штамма, продуцирующего мутантную IPMS, а мутантный ген получают из мутантного штамма.

(2) Введение мутации в ген IPMS

Примером осуществления мутации, такой как замещение, инсерция или делеция аминокислотных остатков служит метод рекомбинантной ПЦР (смотри Higuchi, R., стр. 61, "PCR Technology" (Издательство Erlich, H.A. Eds., Stockton press (1989)), а также метод сайт-направленного мутагенеза (смотри Kramer, W. и Frits, H.J., Meth. in Enzymol, 154, 350 (1987); Kunkel T.A. и др., Meth. in Enzymol, 154, 367 (1987)). С помощью данных методов в нужном месте может быть вызвана целевая мутация.

Кроме того, при химическом синтезе целевого гена в соответствующий ген возможно ввести определенную мутацию или произвольную мутацию.

Помимо этого предлагается метод, в процессе осуществления которого ген IPMS на хромосоме или плазмиде непосредственно обрабатывается гидроксиламином (смотри Hashimoto, T. и Sekiguchi, M., J. Bacteriol., 159, 1039 (1984)). В качестве альтернативы возможно использовать метод, согласно которому содержащую ген IPMS бактерию, принадлежащую к роду Escherichia, подвергают облучению ультрафиолетом, или метод, основанный на обработке с помощью химического агента, такого как N-метил-N'-нитрозогуанидин или азотистая кислота. С помощью данных методов может быть вызвана произвольная мутация.

Что касается метода отбора мутантного гена, сначала рекомбинантную ДНК, включающую фрагмент ДНК, содержащий ген IPMS и векторную ДНК, непосредственно подвергают мутационной обработке гидроксиламином или другим веществом. Затем ею трансформируют, например, штамм E. coli W3110. Затем трансформированные штаммы культивируют на минимальной среде, такой как M9, содержащей в качестве аналога L-лейцина 4-аза-D,L-лейцин или 3-гидроксин-D,L-лейцин. Штаммы, несущие рекомбинантную ДНК, содержащую ген IPMS дикого типа, не способны синтезировать L-лейцин, и их рост подавляется, так как IPMS, экспрессированная из рекомбинантной ДНК, ингибируется аналогом L-лейцина. В отличие от этого штамм, несущий рекомбинантную ДНК, содержащую ген IPMS, в котором ингибирование активности L-лейцином нарушено, содержит мутантный фермент, кодированный геном IPMS, в упомянутой выше рекомбинантной ДНК и не ингибируемый аналогом L-лейцина. Таким образом, он должен обладать способностью к росту на минимальной среде, в которую добавлен аналог L-лейцина. Данное свойство может быть использовано для отбора штамма, обладающего способностью к росту в присутствии аналога L-лейцина, то есть

штамма, несущего рекомбинантную ДНК, содержащую мутантный ген IPMS, ингибирование активности в котором нарушено.

Полученный таким способом мутантный ген может быть введен в качестве рекомбинантной ДНК в соответствующий микроорганизм-хозяин и экспрессирован. Таким образом, может быть получен микроорганизм, у которого IPMS утратила чувствительность к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи. Хозяином предпочтительно является микроорганизм, принадлежащий к роду Escherichia, примером которого служит E. coli.

В качестве альтернативы фрагмент с мутантным геном IPMS может быть извлечен из рекомбинантной ДНК и вставлен в другой вектор.

Предпочтительной векторной ДНК, которая может быть использована в настоящем изобретении, является плазмидная векторная ДНК, примерами которой служат векторы pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pMW119, pMW118, pMW219 и pMW218. Кроме того, могут быть также использованы векторы на основе фаговой ДНК.

Затем с целью эффективной экспрессии мутантного гена IPMS перед последовательностью ДНК, кодирующей мутантную IPMS, может быть встроены другой действующий в таких микроорганизмах промотор, такой как lac, trp и P_L, либо может быть использован содержащийся в гене IPMS промотор как таковой или после его амплификации.

Дополнительно, как описывалось выше, мутантный ген может быть введен в векторную ДНК, способную к автономной репликации, при этом его вводят в микроорганизм-хозяин, в котором он содержится в качестве экстрахромосомной ДНК, такой как плаزمид. В качестве альтернативы мутантный ген может быть интегрирован в хромосому микроорганизма-хозяина методом трансдукции с использованием транспозона (смотри Berg, D. E. и Berg, C.M., Bio/Technol., 1,417 (1983)), Mu-фагов (смотри выложенный японский патент No. 2-109985) или гомологичной рекомбинации (смотри "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Lab. (1972)).

<3> Способ получения штамма бактерии - продуцента L-лейцина.

Способом получения штамма бактерии - продуцента L-лейцина согласно настоящему изобретению является способ получения штамма бактерии - продуцента L-лейцина путем трансформации с помощью ДНК согласно настоящему изобретению.

Трансформация с помощью ДНК согласно настоящему изобретению может быть осуществлена в соответствии с обычными и известными способами. Например, фрагмент, включающий ДНК согласно настоящему изобретению, сшивают с вектором, функционирующим в микроорганизме-хозяине (подлежащем трансформации) с целью получения рекомбинантной ДНК, а рекомбинантную ДНК вводят в микроорганизм-хозяин. Вектор может быть соответствующим образом выбран в зависимости от микроорганизма-хозяина.

Введение рекомбинантной ДНК осуществляют в соответствии с обычными и известными способами. Например, возможно использовать способ, согласно которому клетки-реципиенты (как сообщается, *Escherichia coli* K-12) подвергают обработке хлоридом кальция с целью повышения их проницаемости для ДНК (смотри Mandel, M. и Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)), а также способ, согласно которому компетентные клетки (как сообщается, *Bacillus subtilis*) получают из клеток на стадии пролиферации с целью введения в них ДНК (смотри Duncan, C.H., Wilson, G.F. и Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)). Также в качестве альтернативы возможно применить способ, в котором с целью введения рекомбинантной ДНК в реципиенты ДНК, такие как *Bacillus subtilis*, актиномицеты и дрожжи, клетки-реципиенты ДНК преобразуют в протопласты или сферопласты, легко инкорпорирующие рекомбинантную ДНК (смотри Chang, S. и Choen, S.N., Molec. Genet., 168, 11 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. и Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. и Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)). Также может быть использован способ электроимпульсов (смотри выложенную японскую патентную заявку 2-207791 (1990)). Соответствующий способ введения может быть выбран в зависимости от микроорганизма-хозяина. В частности, примерами вектора и способа введения служат описанные выше в разделе <2>.

Используемый в данном описании оборот "обладающий способностью продуцировать L-лейцин" означает способность к накоплению L-лейцина в подходящей для этого среде предпочтительно в таком количестве, что L-лейцин может быть легко извлечен из такой среды.

Бактерии, использующиеся в настоящем изобретении, принадлежат предпочтительно к роду *Escherichia*. Их примером служит *E. coli*. Примером бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia* и обладающей способностью к продукции L-лейцина, могут служить бактерии, обладающие устойчивостью к аналогу лейцина, такому как бета-2-тиенилаланин, 3-гидроксилейцин, 4-азалецин и 5,5,5-трифторлейцин, описанным в японской патентной публикации 62-34397 (1987 г.) и выложенной японской патентной заявке 8-70879 (1996 г.), а также бактерия, которая может быть выведена методом генной инженерии, как это описано в заявке WO96/06926.

В бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, L-лейцин синтезируется в специальном пути биосинтеза, который отвечает от конечного интермедиата (2-кетоизовалериата) валиновой биосинтетической системы. В бактерии, относящейся к роду *Escherichia*, конечная стадия биосинтеза L-валина и L-лейцина осуществляется группой ферментов, кодированных опероном *ilvGMEDA* и опероном *leuABCD* соответственно.

Оперон *leuABCD* включает гены *leuA*, *leuB*, *leuC* и *leuD*. При этом ген *leuA* кодирует IPMS, ген *leuB* кодирует бета-изопротилмалат дегидрогеназу, ген *leuC* и ген *leuD* кодируют альфа-изопротилмалат изомеразу. Из перечисленных ферментов IPMS

катализирует реакцию синтеза альфа-изопротилмалат, из альфа-кетоизовалериата, альфа-изопротилмалат изомеразы катализирует реакцию изомеризации альфа-изопротилмалата в бета-изопротилмалат, а бета-изопротилмалат дегидрогеназа катализирует реакцию дегидрогенизации бета-изопротилмалата в альфа-кетоизокапроновую кислоту, являющуюся конечным промежуточным продуктом биосинтеза L-лейцина.

Из числа упомянутых выше реакций, проходящих в процессе биосинтеза L-лейцина, стадией, определяющей скорость, является реакция синтеза альфа-изопротилмалата, катализируемая альфа-изопротилмалат синтазой, подверженной ингибированию L-лейцином по типу обратной связи. Таким образом, трансформация с помощью ДНК, кодирующей IPMS, десенсибилизированную к ингибированию по типу обратной связи, может придать микроорганизму способность продуцировать L-лейцин или улучшить его способность продуцировать L-лейцин.

У бактерии, использующейся в настоящем изобретении и относящейся к роду *Escherichia*, активность одного или нескольких ферментов биосинтеза L-лейцина может быть усилена с помощью обычной мутационной обработки или методами генной инженерии. Такое усиление активности фермента может быть осуществлено за счет введения в плазмиду, фag или транспозон бактерии, относящейся к роду *Escherichia*, рекомбинантной ДНК, полученной в результате инсерции фрагмента ДНК, содержащего целый оперон *ilvGMEDA* и/или оперон *leuABCD* или их части.

Анализ нуклеотидной последовательности оперона *leuABCD* был дан в Nucleic Acid Res., 20, 3305-3308 (1992). Полная последовательность оперона *leuABCD* зарегистрирована в базе данных (регистрационный номер DDBJ D10483, адрес в интернете: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>). Фрагмент ДНК, включающий оперон *leuABCD*, может быть получен за счет амплификации фрагмента ДНК методом ПЦР (полимеразной цепной реакцией, смотри White, T.J. и др.; Trends Genet., 5, 185 (1989)), в процессе которой олигонуклеотиды, полученные на основе описанной выше последовательности, используют в качестве затравок, а хромосомная ДНК бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, используется в качестве матрицы для ПЦР. В качестве альтернативы оперон *leuABCD* может быть также получен методом скрининга библиотеки хромосомных ДНК бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, на основе гибридизации за счет использования олигонуклеотидного зонда, полученного на основе описанных выше последовательностей.

Полная нуклеотидная последовательность оперона *ilvGMEDA* и нуклеотидная последовательность области, расположенной перед опероном, описаны в Nucleic Acid Res., 15, 2137-2155 (1987) и Gene, 97, 21-27 (1991) соответственно. Фрагмент ДНК, содержащий оперон *ilvGMEDA*, может быть получен в результате осуществления ПЦР или гибридизации с использованием

олигонуклеотидного зонда или затравок, полученных на основе описанной выше последовательности. В связи с этим в случае, когда с целью получения оперона *UvGMEDA* используется штамм *Escherichia coli* K-12 или его производные, предпочтительно использовать штамм с обратной мутацией гена *ilvG*, рамка в котором восстановлена таким образом, чтобы восстановилась активность синтазы ацетогидроксикислот. Способы получения оперона *ilvGMEDA* и способ амплификации оперона в клетке бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, полностью описаны в заявке WO96/06926 и французском патенте 2627508 соответственно.

<4> Способ получения L-лейцина

С высокой эффективностью L-лейцин может быть получен путем выращивания штамма бактерии, полученной способом, описанным выше, в питательной среде с последующим выделением L-лейцина из культуральной жидкости.

В процессе осуществления способа получения L-лейцина согласно настоящему изобретению выращивание бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, извлечение L-лейцина из культуральной жидкости и его очистка могут быть произведены аналогично способу обычной ферментации, которым L-лейцин получают с использованием штаммов бактерий. Среда, используемая для выращивания, может представлять собой синтетическую либо натуральную среду при условии, что она содержит источники углерода и азота и, если необходимо соответствующее количество питательных веществ, необходимых для роста используемой бактерии. К источникам углерода относятся один или несколько различных углеводов, таких как глюкоза и сахароза и различные органические кислоты. В зависимости от типа ассимиляции используемой бактерии, могут использоваться спирты, такие как этанол и глицерин. В качестве источника азота могут быть использованы различные соли аммония, такие как аммиак, сульфат аммония, другие азотистые соединения, такие как амины, натуральный источник азота, такой как пептон, продукт гидролиза соевых бобов или переваренный ферментативный микроб. В качестве минеральных веществ могут быть использованы фосфат калия, сульфат магния, хлорид натрия, сульфат железа (II), сульфат марганца или карбонат кальция.

Выращивание осуществляют предпочтительно в аэробных условиях, таких как качалочная культура, а также аэрационная и перешиваемая культура при температуре от 20 до 40 °C, предпочтительно от 30 до 38 °C. Уровень pH культуры обычно составляет от 5 до 9, предпочтительно от 6,5 до 7,2. Уровень pH может быть отрегулирован с помощью аммиака, карбоната кальция, различных кислот, различных щелочей и буферов. Как правило, в результате выращивания в течение от 1 до 3 суток в жидкой среде происходит накопление целевого L-лейцина.

После выращивания нерастворимые вещества, такие как клетки, удаляют из жидкой среды путем центрифугирования и фильтрации через мембрану, после чего целевой L-лейцин может быть собран и очищен методом ионного обмена,

концентрации и осаждения.

Микроорганизм согласно настоящему изобретению может использоваться в качестве продуцирующего L-лейцин штамма или в качестве исходного источника для выведения штамма - продуцента L-лейцина. Настоящее изобретение позволяет получать L-лейцин более эффективно по сравнению с ранее известным способом получения L-лейцина с использованием микроорганизмов.

Примеры

Ниже настоящее изобретение будет более конкретно проиллюстрировано со ссылкой на Примеры.

Пример 1: Получение ДНК, кодирующей мутантную IPMS.

<1> Получение продуцирующих L-лейцин штаммов.

Из стандартного лабораторного штамма *E. coli* дикого типа K-12 описанным ниже методом отбора были получены штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие L-лейцин. Клетки штамма *E. coli* K-12 в течение 30 мин при температуре 37 °C подвергались обработке раствором мутагена, содержащим 0,2 мг/мл

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина. Затем клетки были дважды промыты 0,8-процентным раствором NaCl и помещены на чашки с агаризованной средой M9, содержащей 1 мг/мл 4-азалейцина - аналога L-лейцина. Выросшие через 5 суток инкубации при температуре 37 °C колонии были собраны и была проверена их способность продуцировать L-лейцин. Продукентами L-лейцина оказались штаммы 9, 68, 58, 55 и 15.

<2> Получение гена *leuA* из штаммов - продуцентов L-лейцина.

Методом клонирования *in vivo* с использованием дефектного бактериофага Mu d5005 (смотри Groisman, E. A. и др., J. Bacteriol., 168, 357 (1986)) были получены ген *leuA* из выделенного мутанта 55 - продуцента лейцина и ген *leuA* штамма *E. coli* из дикого типа K-12. Затем перекрывающиеся фрагменты клонированного таким способом гена *leuA* были амплифицированы методом ПЦР с использованием ДНК-затравок *leuA1* и *leuA2*, *leuA3* и *leuA4*, *leuA5* и *leuA6*, *leuA7* и *leuA8*, *leuA9* и *leuA10* соответственно, как это показано в таблице 1.

Такие же затравки ДНК были без предварительного клонирования использованы для амплификации генов *leuA*, выделенных из хромосом штаммов 9, 68, 58 и 15. Последовательности нуклеотидов полученных фрагментов были определены методом дидезокси-терминации роста цепи.

Выделенные из штаммов 9, 68, 58 и 15 гены *leuA* содержали мутации, проиллюстрированные в таблице 2.

Клетки штаммов выращивали в течение 10 часов при температуре 32 °C в среде, содержащей глюкозу (6%), сульфат аммония (1,5%), дигидрофосфат калия (0,2%), сульфат магния (0,1%), мел (2,5%) и тиамин (0,1 мг/л). Методом дезинтеграции ультразвуком были получены клеточные экстракты, а в качестве ферментного препарата был использован осадок, высаженный сульфатом аммония. Удельная активность IPMS была определена по методу Kohlaw и др. (смотри J. Biol. Chem., 244, 2218 (1969)). I₅₀ -

концентрация лейцина, при которой происходит 50-процентное ингибирование активности ферментов. Способность к продукции L-лейцина была определена после 48-часового культивирования в описанной выше среде.

Результаты в суммированном виде приведены в таблице 2.

Пример 2: Производство L-лейцина полученными трансформантами.

Штамм *E. coli* C600 (*leu*⁻) (смотри Appleyard R.K., Genetics, 39,440-452 (1954) и штамм *E. coli* K-12 были подвергнуты трансдукции фагами P1, выращенными на продуцирующих лейцин штаммах 9, 68, 58, 55 и 15. Были получены трансдуктанты *Leu*⁺, подвергнутые испытанию на способность продуцировать L-лейцин. Его результаты приведены в таблице 3.

Перечень последовательностей приведен в конце описания.

Формула изобретения:

1. Мутантная альфа-изопропилмалат синтаза (IPMS) с аминокислотной последовательностью, приведенной в перечне последовательностей под 2, тип замещения у которой выбран из группы, включающей (а) замещение остатка треонина в положении 482, (b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386, (с) замещение остатка пролина в положении 428, (d) замещение остатка глицина в положении 479, (е) замещение остатка глицина в положении 462; у которой чувствительность к ингибированию L-лейцина по типу обратной связи утрачена.

2. Мутантная альфа-изопропилмалат синтаза по п. 1, отличающаяся тем, что упомянутое замещение выбрано из группы, включающей (а) замещение остатка треонина

в положении 482 остатком изолейцина, (b) замещение остатка глутаминовой кислоты в положении 386 остатком лизина, (с) замещение остатка пролина в положении 428 остатком пролина, (d) замещение остатка глицина в положении 479 остатком глицина, (е) замещение остатка глицина в положении 462 остатком аспарагиновой кислоты.

3. Мутантная альфа-изопропилмалат синтаза по п. 1, отличающаяся тем, что в ней произведена делеция, замещение, инсерция или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков, при этом активность альфа-изопропилмалат синтазы и утраты чувствительности к ингибированию L-лейцином по типу обратной связи в указанном белке такие же, как в белке по п. 1.

4. ДНК, кодирующая мутантную IPMS по п. 1, с нуклеотидной последовательностью, приведенной в перечне последовательностей под 1, при этом такая последовательность имеет мутацию, выбранную из группы, включающей (i) мутацию цитозина в положении 1445 на тимин, (ii) мутацию гуанина в положении 1156 на аденин, (iii) мутацию цитозина в положении 1283 на тимин, (iv) мутацию гуанина в положении 1435 на тимин, и (v) мутацию гуанина в положении 1385 на аденин.

5. Способ получения штамма *Escherichia coli* - продуцента L-лейцина, отличающийся тем, что указанный штамм получают путем трансформации штамма бактерии ДНК по п. 4.

6. Способ получения L-лейцина путем культивирования штамма бактерии - продуцента L-лейцина в питательной среде с последующим выделением L-лейцина из культуральной жидкости, отличающийся тем, что используют штамм бактерии, полученный способом по п. 5.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> ДНК, КОДИРУЮЩАЯ МУТАНТНУЮ ИЗОПРОПИЛМАЛАТ СИНТАЗУ,
СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММА ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТА
L-ЛЕЙЦИНА И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ЛЕЙЦИНА

<140> RU 99114325

<141> 1999-07-09

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1572

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1569)

<400> 1

atg agc cag caa gtc att att ttc gat acc aca ttg cgc gac ggt gaa	48
Met Ser Gln Gln Val Ile Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu	
1 5 10 15	
cag gcg tta cag gca agc ttg agt gtg aaa gaa aaa ctg caa att gcg	96
Gln Ala Leu Gln Ala Ser Leu Ser Val Lys Glu Lys Leu Gln Ile Ala	
20 25 30	
ctg gcc ctt gag cgt atg ggt gtt gac gtg atg gaa gtc ggt ttc ccc	144
Leu Ala Leu Glu Arg Met Gly Val Asp Val Met Glu Val Gly Phe Pro	
35 40 45	
gtc tct tcg ccg ggc gat ttt gaa tcg gtg caa acc atc gcc cgc cag	192
Val Ser Ser Pro Gly Asp Phe Glu Ser Val Gln Thr Ile Ala Arg Gln	
50 55 60	
gtt aaa aac agc cgc gta tgt gcg tta gct cgc tgc gtg gaa aaa gat	240
Val Lys Asn Ser Arg Val Cys Ala Leu Ala Arg Cys Val Glu Lys Asp	
65 70 75 80	
atc gac gtg gcg gcc gaa tcc ctg aaa gtc gcc gaa gcc ttc cgt att	288
Ile Asp Val Ala Ala Glu Ser Leu Lys Val Ala Glu Ala Phe Arg Ile	
85 90 95	
cat acc ttt att gcc act tcg cca atg cac atc gcc acc aag ctg cgc	336
His Thr Phe Ile Ala Thr Ser Pro Met His Ile Ala Thr Lys Leu Arg	
100 105 110	
agc acg ctg gac gag gtg atc gaa cgc gct atc tat atg gtg aaa cgc	384
Ser Thr Leu Asp Glu Val Ile Glu Arg Ala Ile Tyr Met Val Lys Arg	
115 120 125	
gcc cgt aat tac acc gat gat gtt gaa ttt tct tgc gaa gat gcc ggg	432

Ala Arg Asn Tyr Thr Asp Asp Val Glu Phe Ser Cys Glu Asp Ala Gly	
130 135 140	
cgt aca ccc att gcc gat ctg gcg cga gtg gtc gaa gcg gcg att aat	480
Arg Thr Pro Ile Ala Asp Leu Ala Arg Val Val Glu Ala Ala Ile Asn	
145 150 155 160	
gcc ggt gcc acc acc atc aac att ccg gac acc gtg ggc tac acc atg	528
Ala Gly Ala Thr Thr Ile Asn Ile Pro Asp Thr Val Gly Tyr Thr Met	
165 170 175	
ccg ttt gag ttc gcc gga atc atc agc ggc ctg tat gaa cgc gtg cct	576
Pro Phe Glu Phe Ala Gly Ile Ile Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Val Pro	
180 185 190	
aac atc gac aaa gcc att atc tcc gta cat acc cac gac gat ttg ggc	624
Asn Ile Asp Lys Ala Ile Ile Ser Val His Thr His Asp Asp Leu Gly	
195 200 205	
ctg gcg gtc gga aac tca ctg gcg gcg gta cat gcc ggt gca cgc cag	672
Leu Ala Val Gly Asn Ser Leu Ala Ala Val His Ala Gly Ala Arg Gln	
210 215 220	
gtg gaa gcc gca atg aac ggg atc ggc gag cgt gcc gga aac tgt tcc	720
Val Glu Gly Ala Met Asn Gly Ile Gly Glu Arg Ala Gly Asn Cys Ser	
225 230 235 240	
ctg gaa gaa gtc atc atg gcg atc aaa gtt cgt aag gat att ctc aac	768
Leu Glu Glu Val Ile Met Ala Ile Lys Val Arg Lys Asp Ile Leu Asn	
245 250 255	
gtc cac acc gcc att aat cac cag gag ata tgg cgc acc agc cag tta	816
Val His Thr Ala Ile Asn His Gln Glu Ile Trp Arg Thr Ser Gln Leu	
260 265 270	
gtt agc cag att tgt aat atg ccg atc ccg gca aac aaa gcc att gtt	864
Val Ser Gln Ile Cys Asn Met Pro Ile Pro Ala Asn Lys Ala Ile Val	
275 280 285	
ggc agc gcc gca ttc gca cac tcc tcc ggt ata cac cag gat ggc gtg	912
Gly Ser Gly Ala Phe Ala His Ser Ser Gly Ile His Gln Asp Gly Val	
290 295 300	
ctg aaa aac cgc gaa aac tac gaa atc atg aca cca gaa tct att ggt	960
Leu Lys Asn Arg Glu Asn Tyr Glu Ile Met Thr Pro Glu Ser Ile Gly	
305 310 315 320	
ctg aac caa atc cag ctg aat ctg acc tct cgt tcc ggg cgt gcg gcg	1008
Leu Asn Gln Ile Gln Leu Asn Leu Thr Ser Arg Ser Gly Arg Ala Ala	
325 330 335	
gtg aaa cat cgc atg gat gag atg ggg tat aaa gaa agt gaa tat aat	1056
Val Lys His Arg Met Asp Glu Met Gly Tyr Lys Glu Ser Glu Tyr Asn	
340 345 350	
tta gac aat ttg tac gat gct ttc ctg aag ctg gcg gac aaa aaa ggt	1104
Leu Asp Asn Leu Tyr Asp Ala Phe Leu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Gly	
355 360 365	
cag gtg ttt gat tac gat ctg gag gcg ctg gcc ttc atc ggt aag cag	1152

Gln	Val	Phe	Asp	Tyr	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Phe	Ile	Gly	Lys	Gln		
	370					375					380						
caa	gaa	gag	ccg	gag	cat	ttc	cgt	ctg	gat	tac	ttc	agc	gtg	cag	tct	1200	
Gln	Glu	Glu	Pro	Glu	His	Phe	Arg	Leu	Asp	Tyr	Phe	Ser	Val	Gln	Ser	400	
385					390					395							
ggc	tct	aac	gat	atc	gcc	acc	gcc	gcc	gtc	aaa	ctg	gcc	tgt	ggc	gaa	1248	
Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Cys	Gly	Glu	415	
				405					410								
gaa	gtc	aaa	gca	gaa	gcc	gcc	aac	ggc	aac	ggc	ccg	gtc	gat	gcc	gtc	1296	
Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Val	430	
			420					425									
tat	cag	gca	att	aac	cgc	atc	act	gaa	tat	aac	gtc	gaa	ctg	gtg	aaa	1344	
Tyr	Gln	Ala	Ile	Asn	Arg	Ile	Thr	Glu	Tyr	Asn	Val	Glu	Leu	Val	Lys	445	
		435					440										
tac	agc	ctg	acc	gcc	aaa	ggc	cac	ggc	aaa	gat	gcg	ctg	ggc	cag	gtg	1392	
Tyr	Ser	Leu	Thr	Ala	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Asp	Ala	Leu	Gly	Gln	Val	460	
	450					455											
gat	atc	gtc	gct	aac	tac	aac	ggc	cgc	cgc	ttc	cac	ggc	gtc	ggc	ctg	1440	
Asp	Ile	Val	Ala	Asn	Tyr	Asn	Gly	Arg	Arg	Phe	His	Gly	Val	Gly	Leu	480	
465					470					475							
gct	acc	gat	att	gtc	gag	tca	tct	gcc	aaa	gcc	atg	gtg	cac	gtt	ctg	1488	
Ala	Thr	Asp	Ile	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Ala	Met	Val	His	Val	Leu	495	
				485					490								
aac	aat	atc	tgg	cgt	gcc	gca	gaa	gtc	gaa	aaa	gag	ttg	caa	cgc	aaa	1536	
Asn	Asn	Ile	Trp	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	510	
			500					505									
gct	caa	cac	aac	gaa	aac	aac	aag	gaa	acc	gtg	tga					1572	
Ala	Gln	His	Asn	Glu	Asn	Asn	Lys	Glu	Thr	Val							
		515					520										

<210> 2
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 2
 Met Ser Gln Gln Val Ile Ile Phe Asp Thr Thr Leu Arg Asp Gly Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Gln Ala Ser Leu Ser Val Lys Glu Lys Leu Gln Ile Ala
 20 25 30
 Leu Ala Leu Glu Arg Met Gly Val Asp Val Met Glu Val Gly Phe Pro
 35 40 45
 Val Ser Ser Pro Gly Asp Phe Glu Ser Val Gln Thr Ile Ala Arg Gln
 50 55 60
 Val Lys Asn Ser Arg Val Cys Ala Leu Ala Arg Cys Val Glu Lys Asp
 65 70 75 80
 Ile Asp Val Ala Ala Glu Ser Leu Lys Val Ala Glu Ala Phe Arg Ile
 85 90 95
 His Thr Phe Ile Ala Thr Ser Pro Met His Ile Ala Thr Lys Leu Arg
 100 105 110

Ser	Thr	Leu	Asp	Glu	Val	Ile	Glu	Arg	Ala	Ile	Tyr	Met	Val	Lys	Arg
		115					120					125			
Ala	Arg	Asn	Tyr	Thr	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Ser	Cys	Glu	Asp	Ala	Gly
		130				135					140				
Arg	Thr	Pro	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Arg	Val	Val	Glu	Ala	Ala	Ile	Asn
145					150					155				160	
Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	Asn	Ile	Pro	Asp	Thr	Val	Gly	Tyr	Thr	Met
				165					170					175	
Pro	Phe	Glu	Phe	Ala	Gly	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Tyr	Glu	Arg	Val	Pro
			180					185					190		
Asn	Ile	Asp	Lys	Ala	Ile	Ile	Ser	Val	His	Thr	His	Asp	Asp	Leu	Gly
		195					200					205			
Leu	Ala	Val	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Ala	Val	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln
		210				215					220				
Val	Glu	Gly	Ala	Met	Asn	Gly	Ile	Gly	Glu	Arg	Ala	Gly	Asn	Cys	Ser
225					230					235				240	
Leu	Glu	Glu	Val	Ile	Met	Ala	Ile	Lys	Val	Arg	Lys	Asp	Ile	Leu	Asn
				245					250					255	
Val	His	Thr	Ala	Ile	Asn	His	Gln	Glu	Ile	Trp	Arg	Thr	Ser	Gln	Leu
			260					265					270		
Val	Ser	Gln	Ile	Cys	Asn	Met	Pro	Ile	Pro	Ala	Asn	Lys	Ala	Ile	Val
		275					280					285			
Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Ala	His	Ser	Ser	Gly	Ile	His	Gln	Asp	Gly	Val
		290				295					300				
Leu	Lys	Asn	Arg	Glu	Asn	Tyr	Glu	Ile	Met	Thr	Pro	Glu	Ser	Ile	Gly
305					310					315				320	
Leu	Asn	Gln	Ile	Gln	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Ala
				325					330					335	
Val	Lys	His	Arg	Met	Asp	Glu	Met	Gly	Tyr	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Asn
			340					345					350		
Leu	Asp	Asn	Leu	Tyr	Asp	Ala	Phe	Leu	Lys	Leu	Ala	Asp	Lys	Lys	Gly
		355					360					365			
Gln	Val	Phe	Asp	Tyr	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Phe	Ile	Gly	Lys	Gln
		370				375					380				
Gln	Glu	Glu	Pro	Glu	His	Phe	Arg	Leu	Asp	Tyr	Phe	Ser	Val	Gln	Ser
385					390					395				400	
Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Cys	Gly	Glu
				405					410					415	
Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Val
			420					425					430		
Tyr	Gln	Ala	Ile	Asn	Arg	Ile	Thr	Glu	Tyr	Asn	Val	Glu	Leu	Val	Lys
		435					440					445			
Tyr	Ser	Leu	Thr	Ala	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Asp	Ala	Leu	Gly	Gln	Val
		450				455					460				
Asp															

```
<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
```

RU ? 2 0 1 4 5 4 C 2

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 3

ccaataaccgt cccccggc

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 4

ggtgaaatac agcctgacc

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 5

gtgatgcggt taattgcctg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 6

tgacctctcg ttcgggggcgt

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 7

gattcagctg gatttggttc

20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 8

cgacgatrtg ggccctggcg

19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 9

ggcatgtacc gccgccagtg a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 10

gaagccttcc gtattcatac c

21

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 11

cagcttggtg gcgatgtgc

19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 12

gcccgaagcg aggcgctct

19

Таблица 1

Номер	Структура (5' – 3')	№ в Списке последовательностей
LeuA1	ccaataaccgtcccccggc	3
LeuA2	ggtgaaatacagcctgacc	4
LeuA3	gtgatgcgggtaattgcctg	5
LeuA4	tgacctctcggtcgggcgt	6
LeuA5	gattcagctggattgggttc	7
LeuA6	cgacgattgggcctggcg	8
LeuA7	ggcatgtaccgccgccagtga	9
LeuA8	gaagccttcggtattcatacc	10
LeuA9	cagcttggtggcgatgtgc	11
LeuA10	gcccgaagcgaggcgctct	12

Таблица 2

Штамм	Замещение аминокислоты (замещение нуклеотида)	IPMS		Выход лейцина (г/л)
		Удельная активность (нмол/мин/мг белка)	I ₅₀ (mM)	
К-12 (дикий)	Отсутствует	9	0,2	0,0
9	Thr ₄₈₂ -> Ile (C ₁₄₄₅ -> T)	25	1,4	0,8
68	Glu ₃₈₆ -> Lys (G ₁₁₅₆ -> A)	21	1,4	2,3
58	{Pro ₄₂₈ -> Leu (C ₁₃₈₅ -> T)	29	2,5	1,0
55	Gly ₄₇₉ -> Cys (G ₁₄₃₅ -> T)	10	8,2	5,2
15	Gly ₄₆₂ -> Asp (G ₁₃₈₅ -> A)	9	>10,0	1,0

Таблица 3

Штамм-донор	Выход L-лейцина* (г/л)
<i>E. coli</i> К-12	0
9	0,55
68	0,6
58	0,3
15	1,0
55	1,3

* Выход L-лейцина был определен после 48-часового культивирования при температуре 32 °С. Показатели выхода представляют собой средний результат 10 измерений для каждого вида штаммов – трансдуктантов.