

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4821606号
(P4821606)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21 Z N A
C 1 2 P	13/06 (2006.01)	C 1 2 P	13/06 B
C 1 2 P	13/10 (2006.01)	C 1 2 P	13/10 B
C 1 2 P	13/14 (2006.01)	C 1 2 P	13/14
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 5 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-507666 (P2006-507666)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成16年3月12日 (2004.3.12)		味の素株式会社
(65) 公表番号	特表2006-519613 (P2006-519613A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公表日	平成18年8月31日 (2006.8.31)	(74) 代理人	100100549
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/003377		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開番号	W02004/080386	(74) 代理人	100126505
(87) 国際公開日	平成16年9月23日 (2004.9.23)		弁理士 佐貫 伸一
審査請求日	平成19年3月8日 (2007.3.8)	(74) 代理人	100131392
(31) 優先権主張番号	2003106551		弁理士 丹羽 武司
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	(74) 代理人	100090516
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)		弁理士 松倉 秀実
(31) 優先権主張番号	2003136412	(74) 代理人	100089244
(32) 優先日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		弁理士 遠山 勉
(33) 優先権主張国	ロシア (RU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率的にL-グルタミン酸を生産するためのプロモーター変異による細菌のsucAB発現の最適化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

sucAB遺伝子を最適レベルに発現し、L-プロリンおよびL-ロイシンからなる群から選択されるL-アミノ酸を生産するエシェリヒア・コリを得る方法であって、以下の工程：
 (1) エシェリヒア・コリの染色体において、sucAB遺伝子自身のプロモーターの代わりにsucAB遺伝子発現用のプロモーターを含む *in vitro* で構築されたDNAフラグメントのセットを導入する工程、および
 (2) 親株よりも大量に前記L-アミノ酸を生産する能力を有するエシェリヒア・コリを選択する工程を含む方法。

【請求項2】

前記 *in vitro* で構築されたDNAフラグメントのセットは、無作為化配列を有するプロモーターを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記 *in vitro* で構築されたDNAフラグメントのセットは、既知の配列を有するプロモーターから構成される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

sucAB遺伝子を最適レベルに発現し、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、およびL-ロイシンからなる群から選択されるL-アミノ酸を生産するエシェリヒア・コリであって、sucAB遺伝子のプロモーターの-35領域の配列が、配列番号10において24番目から27番目の塩基がAGATまたはTTGCである配列を含む、エシ

エリヒア・コリ。

【請求項5】

L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、およびL-ロイシンからなる群から選択されるL-アミノ酸を製造する方法であって、培地中で請求項4に記載のエシエリヒア・コリを培養し、該培地中に前記L-アミノ酸を蓄積させる工程、および前記培地から前記L-アミノ酸を採取する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノ酸または核酸生産に有用な遺伝子を最適レベルに発現する細菌を得る方法、および上記細菌を用いて、L-アミノ酸または核酸を製造する方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

伝統的に、L-アミノ酸または核酸の生合成経路に関与する遺伝子産物の活性を高めることは、L-アミノ酸または核酸生産を増大するために使用される一般的な方法であった。この方法は、しばしば、標的化合物または類縁体に耐性である突然変異体を創出すること、生合成遺伝子の発現を高めること、生合成の産物および中間体によるフィードバック阻害に対する生合成酵素の感受性を解除すること、および他の経路のための標的化合物の前駆体を用いる酵素をコードする遺伝子を欠損した細菌株を創出すること、あるいは標的化合物の分解に関する遺伝子を欠損した細菌株を創出することにより達成されてきた。 20

【0003】

これらの操作は通常、生育できないか、または相当減じられた速度でのみ生育する株、あるいはアミノ酸のようなさらなる栄養素を必要とする株の創出をもたらす。例えば、幾つかの遺伝子が過度に高発現されると、細菌の生育が重度に阻害され、その結果、細菌の標的化合物を生産する能力を低減させることがある。

【0004】

-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを欠損するか、または減少したレベルの-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを保有するエシエリヒア属に属する微生物は、L-グルタミン酸を生産する能力を有することが知られている（米国特許第5,573,945号および同第5,908,768号）。しかし、これらの突然変異体は、好気性条件下でグルコース最小培地中において、生育することができないか、あるいは相当減少した速度でのみ生育する。メチオニンを補充したコハク酸またはリシンの添加は、生育を回復させるのに必要である。したがって、細菌がグルタミン酸を生産し、かつコハク酸、リシンまたはメチオニンのようなさらなる補充成分を含まない培地中で生育する能力を獲得するためには、-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼに関する最適な発現レベルの選択が必要である。 30

【0005】

他方で、コハク酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(sdhC D A B遺伝子)ならびに-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(sucA B遺伝子)およびスクシニル-CoAシンターゼ(sucC D遺伝子)をコードする遺伝子は、エシエリヒア・コリの染色体中に2つのプロモーターを含むクラスター： $P_{sdh} - sdhC D A B - P_{suc} - sucA B - sucC D$ を形成することが知られている(Park, S.J., Chao, G., and Gunsalus, R.P., J. Bact. 179, 4138-4142, 1997; Cunningham, L., and Guest, G.R., Microbiology, 144, 2113-2123, 1998)。このオペロン構築物に関する主要プロモーターは、sdhC遺伝子の upstream に位置する調節領域、すなわち P_{sdh} である。³⁸と複合体を形成するエシエリヒア・コリRNAポリメラーゼにより認識されるより弱い P_{suc} プロモーターは、さらなる弱い構成的レベルのsucA B C D遺伝子発現を提供する。後者のプロモーターの活性は、生育基質により比較的影響を受けない。さらに、嫌気環境およびarcAまたはfnr突然変異の影響は比較的小さい。ArcAタンパク質は、好氣的経路における遺伝子のネガティブ応答調節因子であり、Fnr(フマル酸および硝酸還元)タンパク質は、好気呼吸、嫌気呼吸および浸透圧平衡の転写調節に関与する。試験された潜在 40 50

的な調節因子の中でも、I H F タンパク質（組込み宿主因子、h i m A 遺伝子の産物）が、P_{s u c} 活性抑制に主要な役割を果たすと考えられる。A r c A および F r n タンパク質は、P_{s d h} プロモーターと相互作用し、I H F タンパク質は、より弱い P_{s u c} プロモーターと相互作用する。

【 0 0 0 6 】

種々の強度を有するラクトコッカス・ラクティス(Lactococcus lactis)に関する合成プロモーターのライブラリーの取得について記載されている(Jensen P.R., and Hammer K., Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64, No.1. 82-87 Biotechnol. Bioeng., 1998, 58, 2-3, 191-5)。ライブラリーは、- 3 5 から - 1 5 までの位置においてコンセンサス配列間に無作為化スペーサーを有する 3 8 個のオリゴヌクレオチドから構成される。得られたプロモーターの強度を評価するために、ライブラリーからのオリゴヌクレオチドが、
10
ガラクトシダーゼを含む発現ベクター p A K 8 0 にクローニングされた。人工プロモーターの大部分が非常に弱く(5 0 0 以下)、それらのうちたった 3 つが、約 2 , 0 0 0 相対ユニットの強度を有することが示された。しかし、合成プロモーターのライブラリーに関する実用的な応用は開示されていない。

【 0 0 0 7 】

アミノ酸または核酸生合成用遺伝子のプロモーター配列中に突然変異を導入することによりアミノ酸または核酸の生産性が改善されたコリネ型細菌を創製する方法は、欧州特許出願 1 0 3 3 4 0 7 A 1 に開示されている。突然変異プロモーターの最大 8 個の異なるバリエーションが、以下の遺伝子それぞれに使用された：グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(g d h) 遺伝子、クエン酸シンターゼ(g l t A) 遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(i c d) 遺伝子、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(p d h A) 遺伝子およびアルギニノコハク酸シンターゼ(a r g G) 遺伝子。欧州特許出願第 1 0 3 3 4 0 7 A 1 に記載される方法の欠点は、記載される突然変異それぞれが別個に、すなわち 1 つずつ調製されることである。また、この特許出願で開示される事例すべてにおける L - アミノ酸生産の増大は、酵素をコードする遺伝子のために限られた量の異なるプロモーターを用いて、ある特定の酵素の活性を増大させることにより達成された。このアプローチは、L - アミノ酸または核酸生産細菌を調製することに焦点を置いた作業の主流であり、L - アミノ酸または核酸の生産に必須の遺伝子のプロモーター活性の最適化または微調整に関連しない。
20

【 0 0 0 8 】

最適レベルに標的遺伝子を発現するように改変された細菌を用いた発酵による代謝産物生産のための遺伝子発現の最適化について記載する報告はない。
30

【 発明の開示 】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、細菌内の炭素または窒素の流れの分布に影響を及ぼすタンパク質をコードする標的遺伝子を最適レベルに発現する細菌を得る方法であって、(1) 上記細菌の染色体に、上記標的遺伝子自身の調節配列の代わりに上記標的遺伝子発現用の調節配列を含む i n v i t r o で構築された DNA フラグメントのセットを導入する工程、および(2) 所望の表現型を有する細菌を選択する工程を含む方法を提供することである。
40

【 0 0 1 0 】

本発明の更なる目的は、L - アミノ酸生産に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を最適レベルで発現する L - アミノ酸生産細菌であって、上記の方法により得られる L - アミノ酸生産細菌を提供することである。

【 0 0 1 1 】

本発明の更なる目的は、L - アミノ酸を生産する方法であって、(1) 培地中で上述の細菌を培養し、該培地中に L - アミノ酸を蓄積させる工程、および(2) 上記培地から L - アミノ酸を採取する工程を含む方法を提供することである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

本発明は、細菌内の炭素または窒素の流れの分布に影響を及ぼし、L - アミノ酸または
50

核酸生産に影響を及ぼす遺伝子を最適レベルに発現するL-アミノ酸生産細菌を得るための単純かつ明快な一段階の方法を提供する。本発明はさらに、生産を増大させることにより、L-アミノ酸または核酸生産に影響を及ぼす遺伝子を最適レベルに発現する細菌を提供する。本発明はまた、L-グルタミン酸のようなL-アミノ酸、またはL-アルギニン、L-プロリン、L-グルタミン、L-ロイシンなどのL-グルタミン酸に由来するL-アミノ酸を生産する方法、L-リシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ヒスチジン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-チロシンおよびL-フェニルアラニンのような、その生合成においてアミノ基の供与体としてL-グルタミン酸を必要とするL-アミノ酸を生産する方法、および核酸を生産する方法を提供する。

【0013】

本発明は、細菌染色体上において、標的遺伝子の天然型プロモーターを、「無作為化」プロモーター様配列で直接置換することにより達成された。この概念は、エシェリヒア・コリRNAポリメラーゼと⁷⁰との複合体により認識されるプロモーターの改変された「-35領域」を有する突然変異体が、転写開始の効率を有意に変化させるという十分確立された事実に基づいている。したがって、初期ランダムプロモーター様配列を用いて創出されるプロモーターの中で、種々の強度を有するプロモーターが得られ、プラスミドなしの株の生産性の直接評価により（および他の生理学的特性によっても）、最適な構築物が選択される。

【0014】

この一般的なアプローチは、L-グルタミン酸生産レベルを増大させるための組換えエシェリヒア・コリモデル株におけるsucAB遺伝子の発現の微調整に利用されている。遺伝子またはオペロンの発現の最大化ではなく最適化を達成することは、特に標的遺伝子の低発現が最終目的を達成するのに不十分であり、他方で相当する遺伝子の過剰発現が中性的な影響だけでなく、マイナスの影響も引き起こし得る場合、生物学的に活性な代謝産物を生産することが可能な種々の細菌株の構築において現実的な問題である。さらに、この重要な遺伝子活性の所望のレベルは未知である。微調整は、最適化を提供するのに極めて望ましく、したがって多数の変異体を試験しなくてはならない。この種の微調整を実施するための伝統的なアプローチには、組換えプラスミドへの標的遺伝子の分子クローニング、およびそれを種々のプロモーターの制御下に配置させること、得られた組換え株の評価が含まれる。プラスミドなしの改善された生産株が望ましい場合には、最良の変異体の

【0015】

1. 本発明の方法

本発明の方法は、細菌内の炭素の流れの分布に影響を及ぼし、結果としてL-アミノ酸生産に影響を及ぼす標的遺伝子を最適レベルに発現するL-アミノ酸生産細菌を得ることを包含し、これは、(1)細菌染色体に、上記標的遺伝子自身の調節配列の代わりに、上記標的遺伝子発現用の調節配列を含む*in vitro*で構築したDNAフラグメントのセットを導入すること、および(2)所望の表現型を有する細菌を選択することを包含する。

【0016】

本明細書中で使用する場合「発現」という用語は、遺伝子によりコードされるタンパク質産物の産生を意味する。

【0017】

「最適レベルに発現する」という用語は、所望の表現型を有する細菌をもたらす1又は複数の標的遺伝子の発現を意味する。

【0018】

「所望の表現型」という用語は、改善の対象である細菌の1つまたは幾つの特徴を包含する。好ましくは、所望の表現型は、細菌の、親株よりも大量にL-アミノ酸を生産する能力であり得る。また、所望の表現型は、栄養要求性または成長因子に関する他の要求性、あるいはそれらの組合せを補完するのに通常使用される添加剤を含有しない最小培地

10

20

30

40

50

で生育する能力であり得る。

【0019】

「炭素または窒素の流れの分布に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子」という用語は、炭素または窒素の代謝経路に関与するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。かかる遺伝子の例としては、解糖または窒素同化作用遺伝子、ペントースサイクル遺伝子、TCAサイクル遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。より具体的には、例としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホルホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルクトース二リン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ、イソプロピルリンゴ酸シンターゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。L-アミノ酸の生合成経路、核酸およびそれらの前駆体に関与する細菌遺伝子もまた包含される。

10

【0020】

「*in vitro*で構築されたDNAフラグメントのセット」という語句は、新たに合成されたDNAフラグメントの混合物または天然もしくは突然変異体の微生物から得られる既知のDNAフラグメントの混合物、DNAライブラリー、GenBank等を意味する。DNAフラグメントのセットは、新たに合成されたDNAフラグメントと、既知の配列、上述の種々の供給源から得られるDNAフラグメント、または化学合成により得られかつ無作為化配列を含む領域を有するDNAフラグメントとの直接混合により形成されてもよい。

20

【0021】

「無作為化配列」という語句は、DNAフラグメントの標準的な化学合成中に、ランダムヌクレオチド（通常、Nと称される、ここでNは、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンである）が、DNAフラグメントのある特定の位置、またはランダムヌクレオチド配列を有するDNAフラグメントの幾つかの領域に導入されることを意味する。DNAフラグメントは、「調節配列（regulatory element）」と呼ばれる配列を含む。

30

【0022】

「調節配列」という語句は、コード領域の上流、コード領域内、および/またはコード領域の下流に位置するヌクレオチド配列であって、細胞のタンパク質生合成機構とともにコード領域の転写および/または発現を制御する配列を指す。この語句は通常、プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、オペレーターまたはゲノムの他の配列を称する場合に使用され、これらは遺伝子発現レベルに影響を及ぼす。

【0023】

調節配列を含む上記DNAフラグメントの混合物は、自身の調節配列の代わりに、細菌の染色体に導入され、標的遺伝子を種々のレベルに発現する細菌細胞の集団を生じる。所望の表現型を有する細菌の選択は、標準的な最小培地中で生産されるL-アミノ酸の量の直接的な評価、または所望の表現型に必須の特徴を推定するのに適した他の方法により行われ得る。

40

【0024】

本明細書中で使用する場合「L-アミノ酸生産細菌」という語句は、野生型または親株よりも大量に、培地中で標的L-アミノ酸の蓄積をもたらすことが可能である細菌を意味し、好ましくは、微生物が、培地中で0.5g/L以上、より好ましくは1.0g/L以上の標的L-アミノ酸の蓄積をもたらすことが可能であることを意味する。

【0025】

「エシェリヒア属に属する細菌」という語句は、細菌が、微生物学の技術分野の当業者に既知の分類に従ってエシェリヒア属と分類されることを意味する。本発明で使用される

50

エシェリヒア属に属する微生物の例としては、エシェリヒア・コリ (E. coli) が挙げられるが、これに限定されない。

【0026】

酵素活性のレベルの決定、およびある特定条件に対する最適調節配列の選択には、当該技術分野でより高度な技術を必要とし、科学的推測または洞察に基づく調節配列の選択は、所望の結果または最適な結果を導き得ないこともありうる。さらに、種々の酵素活性レベルを有する限定された量の突然変異体を調製することは、かかる突然変異体は伝統的には1つずつ調製されることから、複雑でかつ時間を消費する。対照的に、本発明の方法は好適なことに、標的遺伝子に関して広範囲の発現レベルを有する細菌細胞の集団を生成する、染色体への人工または天然DNAフラグメントの組み込みの単純かつ明快な一段階プロセスを提供する。例えば、化学的に合成した調節配列のある特定の領域における4個のヌクレオチドの無作為化は、 4^4 個、すなわち256個の理論的に考え得る領域の変異体を提供する。

10

【0027】

さらに、酵素をコードする遺伝子を、細菌を宿主とするプラスミドへ導入することにより、標的酵素の活性を評価することは典型的である。しかし、細菌染色体に組み込まれた遺伝子の発現レベルと細菌を宿主とするプラスミドに導入された同遺伝子の発現レベルは同じでない場合がある。したがって、本発明の別の利点は、上記方法が、標的遺伝子の発現に関する最適条件下で細菌の評価および選択をし、次いで、さらなる操作なしでL-アミノ酸生産のために細菌を直接使用することが可能であることである。

20

【0028】

プラスミドDNAの調製、DNAの消化および連結、形質転換、プライマーとしてのオリゴヌクレオチドの選択等の方法は、当業者に既知である。これらの方法は、例えばSambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis. T., 「Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition」; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている。

【0029】

2. 本発明の細菌

本発明の細菌は、L-アミノ酸生産に影響を及ぼす遺伝子を最適レベルに発現するL-アミノ酸生産細菌である。かかる細菌は、本発明の方法により得られる。

30

【0030】

より具体的には、本発明の細菌は、L-グルタミン酸に由来するL-アミノ酸を生産し、かつL-グルタミン酸生産に影響を及ぼす遺伝子を最適レベルに発現する細菌である。L-アルギニン、L-プロリンおよびL-グルタミンはすべて、L-グルタミン酸に由来する。また、本発明の細菌は、L-グルタミン酸生産に影響を及ぼす遺伝子を最適レベルに発現するL-グルタミン酸生産細菌を包含する。さらに、L-グルタミン酸は、アミノ基の供与体として、L-ロイシン、L-リシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ヒスチジン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-チロシンおよびL-フェニルアラニンの生合成において重要な役割を果たす。したがって、遺伝子にコードされるアミノトランスフェラーゼへの窒素供与の向上は、L-ロイシン、L-リシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ヒスチジン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-チロシンおよびL-フェニルアラニンのような他のアミノ酸の生産に有効である。したがって、本発明の細菌は、L-アルギニン、L-プロリン、L-グルタミン、L-ロイシンを生産する細菌、およびL-リシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ヒスチジン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-チロシンまたはL-フェニルアラニンを生産する細菌を包含する。

40

【0031】

本発明の特定の実施形態は、組換えプラスミドpAYCTER1-cpgを含み、かつsucAB遺伝子を最適レベルに発現するようにさらに改変されたL-グルタミン酸生産エシェリヒア・コリ株702ilvA(VKPM B-8012)(欧州特許出願177

50

2433A1)である。プラスミドpAYCTER1-cpgは、標準的な方法により、エシェリヒア・コリ株K-12からクローニングされた、クエン酸シンターゼ(gltA遺伝子)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(ppc遺伝子)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(gdhA遺伝子)およびproBA-オペロン(グルタミン酸-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸5-キナーゼ)をコードする天然型遺伝子を有するRSF1010レプリコンの誘導体である。sucAB遺伝子発現の最適化は、本発明の方法により実施される。組換え株702ilvA[pAYCTER1-cpg]は、スレオニンデアミナーゼを欠損しており、生育のためにL-イソロイシンを要し、かつ培養中にL-プロリンおよびL-グルタミン酸を生産することが可能である。

【0032】

L-グルタミン酸を生産することが可能であり、かつ遺伝子発現の最適化の対象であり得るエシェリヒア属に属する細菌は、以下のエシェリヒア・コリ株により例示される：アスパラギン酸代謝拮抗物質に耐性であり、かつ-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を欠損する株、例えば、AF13199(FERM BP-5807)(米国特許第5,908,768号)、さらにL-グルタミン酸分解能が低下した株FERM P-12379(米国特許第5,393,671号)、エシェリヒア・コリ株AJ13138(FERM BP-5565)(米国特許第6,110,714号)等。L-グルタミン酸生産能は、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(日本国特許出願公開第61-268185、1986年)、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(日本国特許出願公開第62-166890、1987年；同第63-214189、1988年)、アコニット酸ヒドラターゼ(日本国特許出願公開第62-294086、1987年)、クエン酸シンターゼ(日本国特許出願公開第62-20585、1987年；同第63-119688、1988年)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(日本国出願公開第60-87788、1985年；同第62-55089、1987年)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルクトース二リン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ(日本国特許出願公開第63-102692、1988年)、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼ(国際公開99/07853号パンフレット)等を含むが、これらに限定されない酵素をコードするDNAを導入することにより付与され、あるいは高められる。さらに、本発明の細菌は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐しL-グルタミン酸以外の化合物を生成するための反応を触媒する酵素の活性を欠如するように変更されてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐しL-グルタミン酸以外の化合物を生成するための反応を触媒する酵素としては、-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

また、4-アザロイシンまたは5,5,5-トリフルオロロイシンに耐性であるエシェリヒア・コリ株H-9068(ATCC 21530)、H-9070(FERM BP-4704)およびH-9072(FERM BP-4706)(米国特許第5,744,331号)、L-ロイシンによるイソプロピルリンゴ酸シンターゼのフィードバック阻害が脱感作されたエシェリヒア・コリ株(欧州特許1067191)、-2-チエニルアラニンおよび-ヒドロキシロイシンに耐性であるエシェリヒア・コリ株AJ11478(米国特許第5,763,231号)、L-ロイシンに耐性であるエシェリヒア・コリ株57(VKPM B-7386、ロシア国特許第2140450)等のようなエシェリヒア属に属するL-ロイシン生産細菌を使用することが可能である。

【0034】

10

20

30

40

50

L - グルタミン酸および L - ロイシンに関する上記のような方法は、他の既知の L - アミノ酸を生産する細菌を得るために用いることもできる。

【 0 0 3 5 】

3 . L - アミノ酸の製造方法

L - アミノ酸を製造する方法は、培地中で本発明の細菌を培養し、培地中に L - アミノ酸を蓄積させる工程、および上記培地から L - アミノ酸を採取する工程を含む方法である。より具体的には、L - アミノ酸の製造方法は、培地中で本発明の細菌を培養し培地中に L - グルタミン酸を蓄積させる工程、および上記培地から L - グルタミン酸を採取する工程を含む L - グルタミン酸の製造方法を包含する。同様に、L - アミノ酸を生産する方法は、培地中で本発明の細菌を培養し培地中に L - グルタミン、L - アルギニン、L - プロリンまたは L - ロイシンを蓄積させる工程、および上記培地から L - グルタミン、L - アルギニン、L - プロリンまたは L - ロイシンを採取する工程を含む、L - グルタミン、L - アルギニン、L - プロリンまたは L - ロイシンの製造方法を包含する。

10

【 0 0 3 6 】

本発明では、培養、培地からの L - アミノ酸の採取および精製等は、アミノ酸が細菌を用いて生産される従来の発酵方法と同様の方法で実施される。

【 0 0 3 7 】

培養に使用される培地は、炭素源、窒素源、ミネラルおよび必要に応じて細菌が生育に要求する適切な量の栄養分を含むものであれば、合成培地または天然培地のいずれかであってもよい。炭素源としては、グルコースおよびスクロースのような各種炭水化物、および各種有機酸が挙げられる。選択した微生物の同化作用様式に応じて、エタノールおよびグリセロールを含むアルコールを使用してもよい。窒素源は、アンモニアおよび硫酸アンモニウムのような各種アンモニウム塩、アミンのような他の窒素化合物、ペプトン、ダイズ加水分解産物および消化された発酵微生物のような天然窒素源が挙げられる。ミネラルとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、塩化カルシウム等が挙げられる。ビタミンとしては、チアミン、酵母抽出物等が挙げられる。

20

【 0 0 3 8 】

培養は、好ましくは、通気を伴う振とう培養または攪拌培養のような好気性条件下で、20 ~ 40 °C、好ましくは 30 ~ 38 °C の温度で実施される。培地の pH は、通常 5 ~ 9、好ましくは 6.5 ~ 7.2 である。培地の pH は、アンモニア、炭酸カルシウム、各種酸、各種塩基、および緩衝液を用いて調整することができる。通常、1 ~ 5 日の培養期間により、液体培地中に標的 L - アミノ酸が蓄積する。

30

【 0 0 3 9 】

培養後、細胞のような固形分を、遠心分離または膜濾過により液体培地から除去することができ、L - アミノ酸は、イオン交換、濃縮および結晶化方法により採取および精製することができる。

【 0 0 4 0 】

< 実施例 >

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照して、より具体的に説明される。

40

【 実施例 1 】

【 0 0 4 1 】

エシェリヒア・コリ染色体上の *sucAB* 遺伝子の天然型上流領域の、合成 *P_{tac}** - プロモーターおよび *SDlacZ* を有するハイブリッド調節配列による置換

「Red 媒介性組換え (Red-mediated recombination)」または「Red 駆動型組込み (Red-driven integration)」とも呼ばれる Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97,6640-6645,2000) に記載された方法により、エシェリヒア・コリに由来する *lacZ* 遺伝子のシャイン - ダルガーノ配列 (*SD* 配列) に連結させた改変 *P_{tac}** - プロモーターを、天然型領域に代えて、*sucAB* コード領域の上流で、エシェリヒア・コリ株 702ilvA [pAYCTER - cpg] の染色体に組み込んだ。改

50

変 P_{tac}^* - プロモーターは、21 bp のラクトースオペレーター (O_{lac}) の最初の 11 bp のみを含んでおり、特異的な DNA - タンパク質相互作用に必須のヌクレオチドの非存在により、ラクトースレプレッサーと相互作用することができない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^R 、または cat) を含む人工 DNA フラグメントを、改変 P_{tac}^* - プロモーターの 5' 部分に連結させ、細菌染色体の相当する領域へ選択的に組込んだ。人工 DNA フラグメントの構築の方法を図 1 に表す。 $sucAB$ 遺伝子の上流に位置する置換された天然型領域の塩基配列を配列表 (配列番号 1) に示す。

【0042】

クロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^R) を有する上述の人工 DNA フラグメントの *in vitro* での構築は、複数の段階により実行された。まず、 P_{tac}^* - プロモーターの PCR による DNA 増幅を行い、上流に $BglII$ 制限部位を有し (次の遺伝子組換え構築の便宜のため、後述のとおり)、 $sucAB$ コード領域の N 末端に直接連結させたエシェリヒア・コリ $lacZ$ 遺伝子の SD 配列および ATG 開始コドンが下流に位置するようなプロモーターを含むフラグメントを得た。市販の組換えプラスミドである pDR540 (GenBank/EMBL アクセッション番号 U13847 号、「Pharmacia」、USA) を PCR 用の鋳型として使用した。化学的に合成したオリゴヌクレオチド P1 (配列番号 2) および P2 (配列番号 3) をプライマーとして用いて、PCR を行った。

【0043】

すべての場合で、PCR は、サーマルサイクラー Perkin-Elmer 2400 Gene Amp PCR システムを用いて行った。反応混合物は、総容量 50 μ l とし、10 \times PCR 緩衝液 («Fermentas」、リトアニア) を 5 μ l、 $MgCl_2$ を最終濃度 1.5 mM まで添加し、dNTP をそれぞれ 200 μ M、プライマーをそれぞれ 400 nM および Taq - ポリメラーゼ («Fermentas」、リトアニア) を 2 U 加えた。PCR 増幅に添加した鋳型 DNA の量は、標的 DNA フラグメント 0.2 ng を生じるように算出した。PCR の温度プロフィールは、以下の通りであった：95 で 5 分の初期の DNA 変性、続いて 95 で 30 秒の変性、55 で 30 秒のアニーリング、72 での伸長を 20 サイクル；72 で 2 分の最終的な重合。伸長時間は、Taq - ポリメラーゼに関する製造業者の指示に従って、かつ所望の増幅 DNA フラグメントの長さに応じて選択した。実施例では、伸長時間は 1.5 分であった。

【0044】

同時に、目的の第 2 DNA フラグメントの構築を行った。 Cm^R 遺伝子は、市販のプラスミド pACYC184 (Genbank/EMBL アクセッション番号 X06403 号、「Fermentas」、リトアニア) を鋳型として、かつ化学的に合成したオリゴヌクレオチド P3 (配列番号 4) および P4 (配列番号 5) をプライマーとして用いて増幅した。プライマー P3 は、 $BglII$ 制限部位を含み、 P_{tac}^* プロモーターを有する先に得られた DNA フラグメントを連結するために使用される。プライマー P4 は、細菌染色体への目的フラグメントのさらなる Red 媒介性組換えに必要な、エシェリヒア・コリ染色体中の $sucAB$ 遺伝子の調節領域の上流に位置するヌクレオチドに相補的な 36 個のヌクレオチドを含む。プライマー 4 は、配列番号 5 で表され、57 個のヌクレオチドから構成される。

【0045】

2 つの上述の増幅 DNA フラグメントを、 $BglII$ 制限エンドヌクレアーゼで処理した後、T4 DNA リガーゼを用いて連結した (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。最終的に、連結産物を、プライマー P1 および P4 を用いた PCR により増幅した。得られた DNA フラグメントをエタノールで精製して、エシェリヒア・コリ株 702 *ilvA* [pAYCTER1-cpg] の細菌染色体へのエレクトロポレーションおよび Red 媒介性組換えに使用した。エシェリヒア・コリ株 702 *ilvA* [pAYCTER1-cpg] は、L - グルタミン酸生産エシェリヒア・コリ株 702 *ilvA* (VKPM B - 8012) (欧州特許公開公報第 1772433 号) の誘導體であり、組換えプラスミド pAYCTER1-cpg を含む。プラスミ

10

20

30

40

50

ド p A Y C T E R 1 - c p g は、p A Y C T E R 3 ベクターの誘導体であり、これは、クエン酸シンターゼ (g l t A 遺伝子)、P E P カルボキシラーゼ (p p c 遺伝子)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (g d h A 遺伝子) をコードする天然型遺伝子、ならびに p r o B A オペロンを含む。なお、これらの遺伝子は、鋳型にエシェリヒア・コリ株 K - 1 2 の染色体 DNA を用い、P C R 産物のさらなるクローニングおよび構築に適した制限部位を隣接したプライマーを用いた P C R のような標準的な方法によりエシェリヒア・コリ株 K - 1 2 からクローニングすることができる。p A Y C T E R 3 ベクターは、p A Y C 3 2 の誘導体であり、中程度のコピー数であり、プラスミド R S F 1 0 1 0 に基づいて構築された非常に安定なベクターであり (Christoserdov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid, 1986, v. 16, pp. 161-167)、ストレプトマイシン耐性マーカを含む。p A Y C T E R 3 ベクターは、以下のように、p A Y C 3 2 プラスミドに、そのプロモーターに代わって、p U C 1 9 プラスミド由来のポリリンカーおよび強力なターミネーター r r n B を導入することにより構築された。まず、p U C 1 9 プラスミド由来のポリリンカーは、配列番号 6 および 7 で表されるプライマーを用いた P C R により得られた。得られた P C R 産物を E c o R I および B g l I I 制限エンドヌクレアーゼで処理した。ターミネーター r r n B もまた、配列番号 8 および 9 で表されるプライマーを用いた P C R により得られた。得られた P C R 産物を B g l I I および B c l I 制限エンドヌクレアーゼで処理した。次に、これらの 2 つの DNA フラグメントを、E c o R I および B c l I 制限エンドヌクレアーゼであらかじめ処理した p A Y C 3 2 プラスミドに連結させた。このようにして、p A Y C T E R 3 プラスミドが得られた。

【 0 0 4 6 】

熱感受性レプリコンを有する組換えプラスミド p K D 4 6 (Datsenko, K.A., Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6640-6645, 2000) を、R e d 媒介性組換え系に用いられるファージ 由来遺伝子のドナーとして使用した。C a 形質転換の標準的なプロトコル (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にしたがって、株 7 0 2 i l v A [p A Y C T E R 1 - c p g] の細胞を p K D 4 6 プラスミドで形質転換し、続いて 1 0 0 μ g / m l にまでアンピシリンを添加した L - 寒天 (トリプトン 1 0 g / l、酵母抽出物 5 g / l、NaCl 1 0 g / l、寒天 1 . 5 %) を有する対象プレートで形質転換体を選択した。プレートを 3 0 ° で一晩インキュベートして、得られたクローンをエレクトロコンピテント培養用に調製した。アンピシリン (1 0 0 μ g / m l)、ストレプトマイシン (2 5 μ g / m l) および S O B 培地 (酵母抽出物 5 g / l、NaCl 0 . 5 g / l、トリプトン 2 0 g / l、KCl 2 . 5 m M、MgCl₂ 1 0 m M) で 1 : 1 0 0 に希釈したアンピシリン (1 0 0 μ g / m l) およびストレプトマイシン (2 5 μ g / m l)、及びアラビノース (1 0 m M) (アラビノースは、ファージ 相同組換え系の遺伝子をコードするプラスミドを誘導するために使用される) を添加した液体 L B 培地中にて 3 0 ° で一晩、光学密度が O D₆₀₀ = 0 . 8 ~ 1 . 0 に達するように生育させた。細菌培養物 1 0 m l からの細胞を、新鮮な氷冷脱イオン水で 3 度、続いてグリセロール (1 0 %) 2 0 0 μ l で洗浄して、グリセロール (1 0 %) 4 0 μ l 中に懸濁させた。脱イオン水 5 μ l 中に溶解した上述の増幅 DNA フラグメント 0 . 5 μ g を上記細菌培養物に直接添加した後、エレクトロポレーション手順を行った。エレクトロポレーションは、エシェリヒア・コリ細胞に関する製造業者の指示に従い (パルス時間 - 4 ~ 5 ミリ秒、電界の強度 - 1 2 . 5 k V / s m)、 「Bio-Rad」 (米国) (第 1 6 5 - 2 0 9 8、バージョン 2 - 8 9) 製の細菌エレクトロ形質転換装置で行った。

【 0 0 4 7 】

S O C 培地 (酵母抽出物 5 g / l、トリプトン 2 0 g / l、NaCl 0 . 5 g / l、KCl 2 . 5 m M、MgCl₂ 1 0 m M、グルコース 2 0 m M) 1 m l を、エレクトロポレーションの直後に細胞懸濁液に添加した。続いて、電気ショックを受けた細胞を、攪拌しながら 3 7 ° で 2 時間生育させて、クロラムフェニコール (2 5 μ g / m l)

およびストレプトマイシン ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含有する L - 寒天を有するプレート上で、37 で一晩プレート培養した後、組換え体を選択した。

【0048】

得られた Cm^R および Sm^R クローンを、L - 寒天を有するプレート上でレプリカ平板培養を行い、42 で一晩生育させて、熱感受性「ヘルパー」プラスミド pKD46 を脱落させた。702 *ilvA* [pAYCTER1 - cpg] 株から選択された $\text{Ap}^S \text{Cm}^R \text{Sm}^R$ クローン中において、*sucAB* 遺伝子の天然調節領域の上記 *in vitro* で構築された人工 DNA フラグメントによる置換を PCR で確認した。

【実施例 2】

【0049】

- ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼの活性ならびに L - グルタミン酸および L - プロリンの生産に対する $P_{t a c}^*$ プロモーターの影響

L - 寒天プレートからの各株 702 *ilvA* [pAYCTER1 - cpg] および 702 *ilvA t a c^** [pAYCTER1 - cpg] の 1 掻き分を、 $10 \text{g}/\text{l}$ トリプトン、 $5 \text{g}/\text{l}$ 酵母抽出物、 $4 \text{g}/\text{l}$ NaCl および組換えプラスミド pAYCTER1 - cpg の安定化用の $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含有する培地 75ml を入れたエルレンマイヤーフラスコに接種して、攪拌しながら (回転速度: 140rpm) 37 で 6 時間インキュベートした。次に、得られた培養物 50ml を Jar 発酵器 (「Marubishi」、日本) に接種した。Jar 発酵器用の培地 (総容量 500ml) は、 $100 \text{g}/\text{l}$ グルコース、 $2 \text{g}/\text{l}$ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 、 $1 \text{g}/\text{l}$ $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 、 $0.4 \text{g}/\text{l}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.01 \text{g}/\text{l}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.01 \text{g}/\text{l}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.2 \text{g}/\text{l}$ L - イソロイシン、ダイズ加水分解産物 (総窒素 $0.2 \text{g}/\text{l}$)、 $0.0004 \text{g}/\text{l}$ チアミン $\cdot \text{HCl}$ から構成される (pH 6.7)。発酵工程では、35 にて 900rpm で攪拌通気し、pH は、 $\text{NH}_4 \text{OH}$ 溶液を添加することにより維持した。

【0050】

L - プロリンおよび L - グルタミン酸の量を、以下の条件下で高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により測定した: Luna C_{18} (2)、 $150 \times 3 \text{mm}$ 、5 U、温度: 17。溶離液: $\text{CH}_3 \text{CN} - 0.8\%$ (v/v)、 $\text{H}_3 \text{PO}_4 - 0.1\%$ (v/v)、 $\text{KH}_2 \text{PO}_4 - 10 \text{mM}$ 、 $n - \text{C}_8 \text{H}_{17} \text{SO}_3 \text{Na} - 3 \text{mM}$ 。流速 - $0.4 \text{ml}/\text{m}$ 、注入容量 $10 \mu\text{l}$ 。200 nm で検出。保持時間: グルタミン酸 - 9.3、プロリン - 12.1。

【0051】

得られた株中の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼの活性は、L - プロリンおよび L - グルタミン酸蓄積の測定に使用したのと同じ条件下で細胞を生育させた後に、標準的な手順に従って測定した (Amarasingham, C.R. & Davis, B.D., J. Biol. Chem. 1965. 240, 3664-3668)。データを表 1 に示す。

【0052】

表 1 のデータからわかるように、天然型 $P_{s u c}$ に代わる効率的な $P_{t a c}^*$ プロモーターの置換は、新規株の細胞において、その前駆体と比較した場合に最大 3 倍の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の増加をもたらした。

【0053】

しかしながら、新規株はほぼ完全に、L - グルタミン酸を過剰生産する能力を失った。L - プロリン蓄積は、非改変株と比較した場合に、新規株においてわずかに増加したが、L - グルタミン酸ファミリーのアミノ酸、例えば L - グルタミン酸および L - プロリンへのグルコース由来の炭素の総変換は、有意に減少した。

【0054】

これらの結果は、コンセンサス「- 10」および「- 35」領域を有する強力な構成的 $P_{t a c}^*$ プロモーターの使用が、- ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の最大 3 倍の増加、および付随して L - グルタミン酸生産の減少をもたらすことを明らかに示した。

10

20

30

40

50

野生型 P_{suc} プロモーターを含む株と比較した場合の上記株の生育速度の増加も観察された(表1)。これらの影響は、おそらくTCAサイクルを通じた流束の増加と、それに伴うより高レベルのATP合成に起因する。

【0055】

関連技術の説明で記載するように、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを欠損するか、または低レベルの α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを保有するエシェリヒア属に属するグルタミン酸生産突然変異体は、グルコース最小培地中で好気性条件下では生育することができないか、あるいは相当減じられた生育速度でのみ生育することが可能である。メチオニンを補充したコハク酸またはリシンの添加が生育の回復に必要である。したがって、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼに関する最適な発現レベルの選択は、細菌に、

10

【0056】

高レベルのL-グルタミン酸過剰生産および十分な生育速度を有する原栄養株を得るために、 P_{tac} プロモーターのコンセンサス「-35」領域を無作為化することによる $sucAB$ 遺伝子発現の最適化は、 P_{tac} プロモーターと比較して、転写開始効率の減少、それによる α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の減少およびL-グルタミン酸収率の増加をもたらすであろう。

【実施例3】

【0057】

無作為化領域を含む人工調節配列の調製、およびエシェリヒア・コリ染色体中における該人工配列による $sucAB$ 遺伝子の天然型上流領域の置換

20

無作為化「-35」領域を含む人工調節配列セットは、合成プライマーP1(配列番号2)およびPS(配列番号10)ならびに鋳型プラスミドpDR540を用いたPCRにより得られた。プライマーPS(配列番号10)は、51個のヌクレオチドを有し、該配列中で「n」という文字で表される4個のランダムヌクレオチドを有する領域を有する。得られた人工DNAフラグメントは、無作為化領域およびクロラムフェニコール耐性遺伝子(Cm^R)を有するハイブリッド調節配列を含んでいた。染色体へのこのフラグメントの組込みは、実施例1に記載した方法で実施した。

【0058】

L-寒天上で生育させた組換え体のコロニーは、種々のサイズおよび生育速度を有していた。選択は、L-グルタミン酸生産に基づいた。2つの最良のクローンである番号2および番号21は、それらがそれぞれ最高レベルのL-グルタミン酸生産を有したことから選択した。これらのクローンはまた、グルコース由来の炭素のL-グルタミン酸ファミリーのアミノ酸、例えばL-グルタミン酸およびL-プロリンへの高レベルの総変換を示した。これらのクローン由来のゲノムDNAを、ゲノムDNA単離キット(Sigma, USA)を用いて、製造業者の推奨に従って単離した。無作為化領域を含む人工調節配列を増幅するために、鋳型として単離DNAならびにプライマーP1(配列番号2)およびP4(配列番号5)を用いてPCRを実施した。両方の増幅産物の配列をサンガー法により決定した。クローン2および21の人工プロモーターをそれぞれ P_{tac-2} および P_{-tac-2} と称した。無作為化により得られる四量体の配列は、それぞれAGATおよびTTGCであった。

30

40

【実施例4】

【0059】

α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性ならびにL-グルタミン酸およびL-プロリン生産に対する人工調節配列の影響

クローン2および21を用いた発酵、L-グルタミン酸およびL-プロリン量の測定、ならびに α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の測定を、実施例2に記載するようにして行った。

【0060】

50

表1のデータから、より弱い天然型 P_{suc} に代わる最適化した長さを有する tac 様構成プロモーターの挿入は、L-グルタミン酸生産、およびグルコース由来の炭素のL-グルタミン酸ファミリーのアミノ酸、例えばL-グルタミン酸およびL-プロリンへの総変換が向上した変異株を選択することに役立つということが考えられた。さらに、該変異株は、好ましくは、コハク酸、リシンまたはメチオニンのようなさらなるサプリメントを含有せず、かつ炭素源としてグルコースを有する最小培地で良好に生育する能力を保有するであろう。表1でわかるように、 P_{tac-2} または P_{tac-21} プロモーターを含む選択された株に関して標準的な発酵条件下での培養により達成された光学密度は、野生型 P_{suc} プロモーター領域を含む株よりもほんのわずかに低かった。

【0061】

【表1】

株	プロモーター	SucAB 活性 (相対ユニット)	OD ₅₄₀	培養時間 (hr)	量		L-グルタミン酸ファミリーのグルコースからの全収量* (%)
					L-プロリン (g/l)	L-グルタミン酸 (g/l)	
702ilvA [pAYCTER1-cpg]	P_{suc}	90	37.8	25.5	18.0	8.1	37.3
702ilvA tac* [pAYCTER1-cpg]	P_{tac*}	300	41.4	27.1	21.1	0	33.8
2	P_{tac-2}	80	33.0	26.3	14.0	20.5	44.1
21	P_{tac-21}	55	33.0	27.0	12.5	25.2	46.5

*収量はL-グルタミン酸とL-プロリンの分子量 (MW) を考慮してL-グルタミン酸の量を元に次の式により計算した。

全収量 (%) = $\frac{\text{L-グルタミン酸の量} \times 100}{\text{グルコース量} + \text{L-プロリンの量} \times \frac{\text{L-グルタミン酸の分子量}}{\text{グルコース量}}}$

*収量はL-グルタミン酸とL-プロリンの分子量 (MW) を考慮してL-グルタミン酸の量を元に次の式により計算した。

全収量 (%) = $\frac{\text{L-グルタミン酸の量} \times 100}{\text{グルコース量} + \text{L-プロリンの量} \times \frac{\text{L-グルタミン酸の分子量}}{\text{グルコース量}}}$

【実施例5】

【0062】

- ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性およびL-ロイシン生産に対する人工 P_{tac-21} の影響

表1からわかるように、人工プロモーター P_{tac-21} は、最小の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を提供し、最良のL-グルタミン酸生産をもたらした。TCAサイクルに關与するSucAB酵素の活性の減少により、TCAサイクルにおけるアセチル-CoAの消費が減少される。アセチル-CoAは、L-ロイシンの前駆体であり、その結果アセチル-CoAの変更されたプールをL-ロイシン生合成に使用することができ、したがってL-ロイシン生産にプラスの影響を与えられられる。

【0063】

この説を支持するために、P1形質導入の標準的な手順(Sambrook et al., 「Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition」, Cold Spring Harbor Laboratory P

10

20

30

40

50

ress (1989))により、ドナーとしてエシェリヒア・コリ株21を用いて、*sucAB* 遺伝子の人工 P_{tac-21} プロモーターを、*Cm* 耐性を利用して、*L*-ロイシン生産エシェリヒア・コリ株へ形質導入した。*L*-ロイシン生産を変化させることの影響は、効率的な *L*-ロイシン生産株である *L*-ロイシン生産エシェリヒア・コリ株57 (VKPM B-7386、ロシア国特許第2140450号)のみで見られたため、その生産性はさらに改善された。株57は、試験管発酵で1.5~1.7 g/lの *L*-ロイシンを生産する。上述したように、この目的で、ロイシン栄養要求性は、*P1* ファージにより、エシェリヒア・コリ株C600 (*leu⁻*) (Appleyard R.K., Genetics, 39, 440-452 (1954))から株57の染色体へ導入された。続いて、株57 (*leu⁻*)におけるロイシンの欠損を、ドナーエシェリヒア・コリ株55由来の *leuA^{*}BCD* 遺伝子による *P1* 形質導入によって補完した。株55は、*leuA^{*}* 遺伝子を保有し、これはロイシンによるフィードバック阻害を免れた変異型 *l*-イソプロピルリンゴ酸シンターゼをコードする (ロシア国特許第2201454号)。株57 *leuA^{*}* において分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼの活性をコードする *ilvE* 遺伝子を不活性化し、さらに、得られた株57 *leuA^{*}ilvE⁻* において、*tyrB* でコードされる芳香族アミノ酸トランスアミナーゼの活性を、組換えプラスミド *pACYC-tyrB* による形質転換により高めた (ロシア国特許出願第2002116773号)。得られた株57 *leuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* は、試験管発酵で約9 g/lの *L*-ロイシンを生産した。

【0064】

P_{tac-21} プロモーターを、*P1* 形質導入の標準的な手順により、株57 *leuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* の染色体に導入した。得られた57 *sucleuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* 株による *L*-ロイシン生産は、試験管発酵で最大11.4 g/lにまで増大した。

【0065】

L-寒天を有するプレートからの株57 *leuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* および57 *sucleuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* それぞれの1掻き分を、60 g/l グルコース、15 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 、1.5 g/l KH_2PO_4 、1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.1 g/l チアミン・HCl、2 g/l $CaCO_3$ を含有する培地2 mlを入れた20×200 mmの試験管に接種して、攪拌しながら (回転速度 - 250 rpm) 34℃で72時間インキュベートした。

【0066】

L-ロイシンの量を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で測定した。HPLCに関する条件: Separon SGX C_{18} 、150×3.3 mm、5 μm、温度: 22℃。溶離液: CH_3CN - 15% (v/v)、 $Cu(CH_3COO)_2$ - 0.1 M。流速 - 0.3 ml/分、注入容量 0.5 μl。232 nmで検出。

【0067】

表2でわかるように、株57 *sucleuA^{*}ilvE⁻/pACYC-tyrB* の染色体上における人工 P_{tac-21} プロモーターによる天然型プロモーターの置換は、ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の減少および *L*-ロイシン生産の向上をもたらすことがわかった。

【0068】

【表2】

株	プロモーター	SucAB 活性 (相対ユニット)	<i>L</i> -ロイシンの量 (g/l)
57 <i>leuA[*]ilvE⁻/pACYC-tyrB</i>	天然型 P_{suc}	90	9.1
57 <i>leuA[*]ilvE⁻ suc/pACYC-tyrB</i>	P_{tac-21}	36	11.4

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

本発明をその好ましい実施形態を参照して記載してきたが、本発明の範囲を逸脱することなく、様々な変更を行うことができ、また等価物を使用することができることは当業者に明らかであろう。外国の優先権文書であるRU2003136412号を含む本明細書中で引用した参考文献はすべて、その全体が参照により本願の一部として援用される。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 0 】

本発明によれば、アミノ酸または核酸生産に有用な、最適レベルに遺伝子を発現する細菌、および当該細菌を用いてL-アミノ酸または核酸を製造する方法が提供される。本発明は、発酵産業において有用である。

10

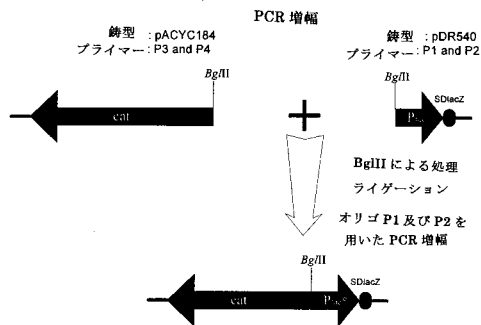
【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 1 】

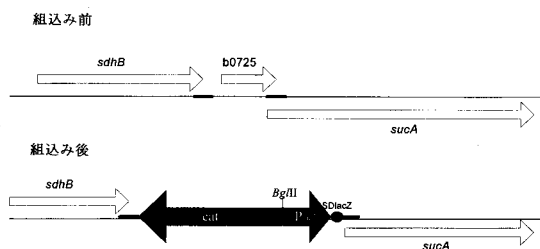
【図1】無作為化領域を有するハイブリッド調節配列およびクロラムフェニコール耐性遺伝子(cat)を含む人工DNAフラグメントの構築、ならびにハイブリッド調節配列のRed駆動型組み込み(Red-driven integration)を示す。

【 図 1 】

1. sucAB 遺伝子の天然型上流領域を置換するための PCR 増幅 DNA フラグメントのインビトロでの構築



2. 合成 P_{trac}*プロモーター及び SDlacZ を含むハイブリッド調節配列の Red 駆動型組み込み



【配列表】

0004821606000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 P 13/24 (2006.01) C 1 2 P 13/24 A

- (72)発明者 カタシュキナ, ジャンナ イオシフォヴナ
 ロシア連邦 モスクワ 1 1 5 3 0 4 ウル.エレヴァンスカヤ 1 3 ビルディング 1 ナン
 バー 5 8
- (72)発明者 ルンツ, マリヤ グリゴリエヴナ
 ロシア連邦 モスクワ 1 2 1 0 9 6 ウル.バルクラヤ 7 / 1 ナンバー 1 2 1
- (72)発明者 ドロシェンコ, ヴェーラ ゲオルギエヴナ
 ロシア連邦 モスクワ 1 1 3 6 2 8 ウル.ズナメンスキエ サトキ 7 ビルディング 2
 ナンバー 3 3 8
- (72)発明者 フォミナ, スヴェトラナ アレクサンドロヴナ
 ロシア連邦 モスクワ リージェン 1 4 2 2 9 0 プーシノ ミクロラヨン "ジー" 1 9
 ナンバー 7 0
- (72)発明者 スコロホドヴァ, アレクサンドラ ユリエヴナ
 ロシア連邦 モスクワ 1 1 5 3 0 4 カフカスキー ブルヴァー 2 9 ビルディング 1 ナ
 ンバー 1 2 3
- (72)発明者 イヴァノフスカヤ, リリナ ヴァレリエヴナ
 ロシア連邦 モスクワ 1 1 3 5 2 5 ドニエプロペトロフスカヤ ウル. 2 9 ナンバー 1 2
 4
- (72)発明者 マシュコ, セルゲイ ヴラジミロヴィッチ
 ロシア連邦 モスクワ 1 0 5 0 4 3 ニージュニャヤ ペルヴォマイスカヤ ウル. 5 ナン
 バー 1 6

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 3 4 6 7 2 (WO, A 1)
 Appl. Environ. Microbiol., 2 0 0 2 年, Vol.68, p.2397-403

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C12N 15/09