

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-528126

(P2017-528126A)

(43) 公表日 平成29年9月28日(2017.9.28)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N	1/21	Z N A 4 B 0 6 4
C 12 P 13/12 (2006.01)	C 12 P	13/12	B 4 B 0 6 5
C 12 P 13/04 (2006.01)	C 12 P	13/04	4 H 0 4 5
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 07 K 14/245 (2006.01)	C 07 K	14/245	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2017-507849 (P2017-507849)	(71) 出願人	513178894 シージェイ チェイルジエダン コーポレーション 大韓民国、ソウル 100-400、チュニング、トンホーロ、330
(86) (22) 出願日	平成27年8月10日 (2015.8.10)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月9日 (2017.2.9)	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(86) 國際出願番号	PCT/KR2015/008336	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宣
(87) 國際公開番号	W02016/024771	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(87) 國際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)	(74) 代理人	100163658 弁理士 小池 順造
(31) 優先権主張番号	10-2014-0104670		
(32) 優先日	平成26年8月12日 (2014.8.12)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

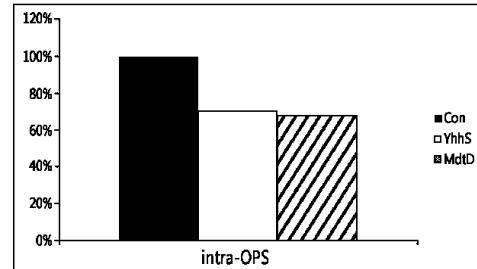
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 O-ホスホセリン生産微生物及びそれを用いたO-ホスホセリンまたはL-システイン生産方法

(57) 【要約】

本発明は、O-ホスホセリン (O-phosphoserine、OPS) の排出能を有するポリペプチドの活性が強化された微生物及び前記微生物を用いてO-ホスホセリン、システインまたはシスティン誘導体を生産する方法に関する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有する O - ホスホセリン (O-phosphoserine、OPS) の排出活性を示すポリペプチドの活性が内在的活性に比べて強化された、O - ホスホセリン生産微生物。

【請求項 2】

前記微生物は、さらにホスホセリンホスファターゼ (phosphoserine phosphatase、SerB) の活性が内在的活性に比べて弱化されたものである、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】

前記微生物は、さらにホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (phosphoglycerate dehydrogenase、SerA) またはホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (phosphoserine aminotransferase、SerC) の活性が内在的活性に比べて強化されたものである、請求項 1 に記載の微生物。 10

【請求項 4】

前記 O - ホスホセリン生産微生物が大腸菌である、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 5】

O - ホスホセリン (OPS) 排出活性を示し、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの活性が強化された、O - ホスホセリン生産微生物を培地で培養する段階、及び

前記 O - ホスホセリン生産微生物またはその培地から O - ホスホセリンを分離する段階を含む、O - ホスホセリンの生産方法。 20

【請求項 6】

前記 O - ホスホセリン生産微生物は、さらにホスホセリンホスファターゼ (phosphoserine phosphatase、SerB) の活性が内在的活性に比べて弱化されたものである、請求項 5 に記載の生産方法。

【請求項 7】

前記 O - ホスホセリン生産微生物は、さらにホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (phosphoglycerate dehydrogenase、SerA) またはホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (phosphoserine aminotransferase、SerC) の活性が内在的活性に比べて強化されたものである、請求項 5 に記載の生産方法。 30

【請求項 8】

前記 O - ホスホセリン生産微生物が大腸菌である、請求項 5 に記載の生産方法。

【請求項 9】

a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項の微生物を培地で培養して O - ホスホセリン (OPS) を生産する段階、及び b) O - ホスホセリンスルフヒドリラーゼ (O-Phosphoserine sulfhydrylase、OPSS) またはこれを発現する微生物の存在下で、前記 a) 段階で生産された O - ホスホセリンまたはこれを含む培地を硫化物と反応させる段階を含む、システインまたはその誘導体の生産方法。 40

【請求項 10】

前記硫化物が、Na₂S、NaSH、(NH₄)₂S、H₂S 及び Na₂S₂O₃ からなる群から選択される 1 つ以上である、請求項 9 に記載のシステインまたはその誘導体の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、O - ホスホセリンを生産する微生物及び前記微生物を用いて O - ホスホセリン、システインまたはシステイン誘導体を生産する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

L-システインは、あらゆる生物体の硫黄代謝において重要なアミノ酸であり、毛髪のケラチンなど生体内のタンパク質、グルタチオン、ビオチン、メチオニン及びその他の硫黄を含有した代謝産物の合成に使用されるだけでなく、コエンザイムA生合成の前駆物質として使用される。

【0003】

微生物を用いてL-システインを生産する方法としては、1)微生物を用いてD,L-ATCを生物学的に転換する方法、2)大腸菌を用いたL-システインを生産する直接発酵方法が知られている(特許文献1、非特許文献1)。3)また、微生物を用いてO-ホスホセリン(O-phosphoserine、以下「OPS」)を発酵生産した後、O-ホスホセリンスルフヒドリラーゼ(O-phosphoserine sulfhydrylase、以下「OPSS」)の触媒作用の下で、硫化物と反応してL-システインに転換させた方法が公知となっている(特許文献2)。

10

【0004】

ここで、前記3)の方法を用いて高収率のシステインを生産するためには、前駆体であるOPSを過量生産しなければならない。そこで、本発明者らはOPS生産菌株で生産されたOPSを細胞外に円滑に排出させることができる適切な排出因子を究明するために鋭意努力した。

【0005】

このような背景の下、本発明者らはOPS排出能を有するYhhS及びMdtDの両ポリペプチドを新たに解明し、OPS生産微生物で前記ポリペプチドの活性を強化させる場合、OPSを効果的に排出させることを確認し、本発明を完成した。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】欧洲登録特許EP0885962B

【特許文献2】韓国登録特許第10-1381048号公報

【特許文献3】報韓国公開特許第10-2012-0041115号公報

【特許文献4】韓国登録特許第10-0620092号公報

【特許文献5】欧洲特許EP0943687B

30

【特許文献6】米国公開公報第2012-0190081号公報

【特許文献7】韓国登録特許第10-1208267号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Wada M and Takagi H, Appl. Microbiol. Biochem., 73:48-54, 2006

【非特許文献2】Sambrook et al., 1989, *infra*

【非特許文献3】Ahmed Zahoor, Computation and structural biotechnology journal, v ol 3, 2012

【非特許文献4】Wendisch VF et al., Curr Opin Microbiol. 2006 Jun;9(3):268-74

【非特許文献5】Peters-Wendisch P et al., Appl Environ Microbiol. 2005 Nov;71(11):7139-44

40

【非特許文献6】Grant GA et al., J. Biol. Chem., 39: 5357-5361, 1999

【非特許文献7】Grant GA et al., Biochem., 39: 7316-7319, 2000

【非特許文献8】Grant GA et al., J. Biol. Chem., 276: 17844-17850, 2001

【非特許文献9】Peters-Wendisch P et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 437-441, 2002

【非特許文献10】Mino K and Ishikawa K, FEBS Letters, 551: 133-138, 2003

【非特許文献11】Burns KE et al., J. Am. Chem. Soc., 127: 11602-11603, 2005

【非特許文献12】van der Rest et al. 1999

【非特許文献13】Pao SS et al., Microbiol Mol Biol Rev. 62(1):1-34. 1998

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0008】**

本発明の一つの目的は、O P S 排出活性を示すポリペプチドの活性が内在的活性に比べて強化された、O P S 生産微生物を提供することにある。

【0009】

本発明の他の一つの目的は、前記O P S 生産微生物を培地で培養する段階及び前記微生物またはその培地からO P S を分離する段階を含む、O P S の生産方法を提供することにある。

【0010】

本発明のもう一つの目的は、前記ポリペプチドのO P S 生産または排出用途を提供することにある。 10

【0011】

本発明のもう一つの目的は、a) O P S 排出活性を示す前記ポリペプチドの活性が内在的活性に比べて強化された、O P S 生産微生物を培地で培養してO P S を生産する段階、及びb) O P S スルフヒドリラーゼまたはこれを発現する微生物の存在下で、前記a) 段階で生産されたO P S またはこれを含む培地を硫化物と反応させる段階を含む、システインまたはその誘導体の生産方法を提供することにある。

【発明の効果】**【0012】**

本発明の配列番号1または2のアミノ酸配列を有する新規なポリペプチドは、優れたO P S 排出能を有するため、これをO P S 生産微生物に適用する場合、O P S を高効率で生産することができ、L - システイン合成などに便利に利用することができる。 20

【図面の簡単な説明】**【0013】**

【図1】Y h h S 及びM d t D タンパク質の機能を強化させた本発明の組換え微生物の培養液から排出されたO P S をすべて除去した後、細胞内部のO P S をH P L C (high performance liquid chromatography) を用いて測定した結果をグラフで示したものである。

【発明を実施するための形態】**【0014】**

本発明の一態様は、配列番号1または2のアミノ酸配列を有する、O P S 排出活性を示すポリペプチドの活性が内在的活性に比べて強化された、O P S 生産微生物を提供する。 30

【0015】

本発明において、用語、「O - ホスホセリン (O-phosphoserine、以下「O P S 」) 」とは、セリン及びリン酸 (phosphoric acid) のエステル化合物であり、種々のタンパク質の構成要素である。特に、前記O P S はL - システインの前駆体であり、O P S スルフヒドリラーゼ (OPS sulphhydrylase、OPSS) の触媒作用の下で、硫化物と反応してシステインに変換することができる (特許文献2) 。

【0016】

本発明において、用語、「O P S 排出活性を示すポリペプチド」とは、細胞内のO P S を細胞外に排出する活性を有する膜タンパク質を意味し、具体的には、大腸菌由来の膜タンパク質であることができる。過量のO P S が存在する条件で生育の低下が解除される大腸菌から膜タンパク質2種が同定された。このように究明されたO P S 排出能を有する膜タンパク質は、具体的には、配列番号1のアミノ酸配列を有するY h h S M F S (major facilitator superfamily) トランスポーター、及び配列番号2のアミノ酸配列を有するY e g B M F S トランスポーターである。前記Y e g B M F S トランスポーターは、本発明においてM d t D と混用して使用することができる。前記タンパク質のO P S 排出活性は知られておらず、本発明で最初に究明された。 40

【0017】

また、前記ポリペプチドは、配列番号1または2で表されたアミノ酸配列であることができ、前記配列と70%以上、具体的には80%以上、より具体的には90%以上、より 50

一層具体的には95%以上の相同性を示すアミノ酸配列として、実質的に前記ポリペプチドと同一または相当するOPS排出能を示す膜タンパク質であれば制限なく含まれる。また、このような相同性を有する配列として実質的にOPS排出能を示すアミノ酸配列であれば、一部の配列が欠失、変形、置換または付加されたポリペプチド変異体も本発明の範囲内に含まれるのは自明である。

【0018】

また、前記O-ホスホセリン(O-phosphoserine、OPS)の排出活性能を有するポリペプチドのポリヌクレオチド配列は、前記配列番号1または2で表されたアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を含むことができる。前記ポリヌクレオチドは、コドンの縮退性(degeneracy)、または前記ポリペプチドを発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が行われることができる。前記ポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号3または4のポリヌクレオチド配列を有することができ、これと相同性が80%、具体的には90%以上の塩基配列を有することができる。しかし、これに限定されない。

10

【0019】

本発明において、用語、「相同性」とは、与えられたポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列と一致する程度を意味し、パーセンテージで表示することができる。本明細書において、与えられたポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列と同一または類似する活性を有するその相同性配列が「%相同性」で示される。例えば、スコア(score)、同一性(identity)及び類似度(similarity)などのパラメータ(parameter)を計算する標準ソフトウェア、具体的にはBLAST 2.0を利用したり、定義された厳格な条件の下でザザンハイブリダイゼイション実験により配列を比較して確認することができ、定義される適切な混成化条件は、当業者によく知られている方法で決定することができる(例えば、非特許文献2参照)。

20

【0020】

本発明の一具体例では、OPS生産能を有する微生物において、前記YhhSタンパク質(配列番号1)またはMdtDタンパク質(配列番号2)の活性を強化させる場合、陽性対照群であるRhtBタンパク質(特許文献3)、または比較群としてMFSトランスポーターであるEmrDまたはYcadを強化させた菌株に比べて優れたOPS排出活性を有することを確認した。前記「RhtB」はホモセリン/ホモセリンラクトンを排出する膜タンパク質であり、遺伝子rhtBでコードされる。OPS生産菌株において前記RhtBの活性を強化させた場合、OPS排出能が増加することを確認されたため(特許文献2)、これを陽性対照群として使用した。OPS生産菌株において前記RhtBタンパク質と本発明によるYhhSタンパク質及びMdtDタンパク質の活性をそれぞれ強化させたとき、本発明によるYhhSタンパク質及びMdtDタンパク質は、前記RhtBタンパク質と比較しても優れたOPS排出能を示した。また、用語「EmrD」及び用語「Ycad」は、大腸菌のMFSトランスポータータンパク質であり、それぞれemrD及びycad遺伝子でコードされる。前記EmrD及びYcadはYhhS及びMdtDタンパク質のようにMFSトランスポーターに属するタンパク質であり、MFSトランスポーターに属する他のタンパク質もOPS排出能を示すことができるかを確認するために比較群として使用した。その結果、EmrD及びYcadタンパク質は、YhhS及びMdtDタンパク質とは異なり、OPS排出能を示さないことを確認した。

30

【0021】

一方、本発明のポリペプチドは、OPS排出活性を有するため、OPS生産能を有する微生物において前記ポリペプチドの活性を内在的活性に比べて強化させる場合、OPSを効果的に生産することができる。

40

【0022】

本発明において、用語、「OPS生産」とは、OPSを菌株内で作り出すだけでなく、細胞内のOPSを細胞外、例えば、培地に排出することも含む概念であり、具体的にはOPSを細胞内から外に排出することを意味する。

50

【0023】

本発明において、用語、「内在的活性」とは、本来微生物が天然の状態、即ち、非変異状態で示すポリペプチドの活性状態を意味する。「内在的活性に比べて強化」とは、本来微生物が天然の状態で示すポリペプチドの活性と比較したとき、その活性が増加したことを意味し、特定のポリペプチドの活性を有さない微生物にポリペプチドの活性を付与することも含む概念である。

【0024】

前記「活性の強化」とは、特にこれに限定されないが、ポリペプチド自体の活性が増大され、本来の機能以上の効果を導出することを含むだけでなく、内在的遺伝子活性の増加、内部または外部要因から内在的遺伝子増幅、外部からの遺伝子導入、プロモーターの交換または変形及び突然変異による酵素活性の増加などによりその活性が増加することを含む。具体的には、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の細胞内コピー数の増加、前記ポリペプチドをコードする遺伝子発現調節配列を変形する方法、前記ポリペプチドの活性が増加するように突然変異された遺伝子で染色体上の前記ポリペプチドをコードする遺伝子を代替する方法及び前記ポリペプチドの活性が強化されるように、前記ポリペプチドをコードする染色体上の遺伝子に変異を導入させる方法等により行われることができ、前記記載の方法に制限されるものではない。このような活性を強化させる方法は、本明細書内の他のポリペプチドの活性強化時にも同様に参照することができる。

10

【0025】

前記において遺伝子のコピー数の増加は、特にこれに限定されないが、ベクターに作動可能に連結された形態で行われるか、または宿主細胞内の染色体に挿入されることにより行われることができる。具体的には、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主と無関係に複製され、機能することができるベクターが宿主細胞内に導入されるものであり得る。または、前記ポリヌクレオチドが作動可能に連結された、宿主細胞内の染色体内に前記ポリヌクレオチドを挿入することができるベクターが宿主細胞の染色体内に導入されるものであり得る。前記ポリヌクレオチドの染色体内への挿入は、当業界で知られている任意の方法、例えば、相同組換えにより行われることができる。本発明のベクターは、相同組換えを起こして染色体内に挿入されるため、前記染色体への挿入如何を確認するための選別マーカー(selection marker)をさらに含むことができる。選別マーカーは、ベクターに形質転換された細胞を選別、即ち、目的のポリヌクレオチドの挿入如何を確認するためのものであり、薬剤耐性、栄養要求性、細胞毒性剤に対する耐性または表面タンパク質の発現のような選択可能表現型を付与するマーカーが使用されることができ、これに限定されるものではない。選択剤(selective agent)が処理された環境では、選別マーカーを発現する細胞のみ生存するか、または他の表現形質を示すため、形質転換された細胞を選別することができる。

20

30

【0026】

前記ベクターは、適合した宿主内で目的タンパク質を発現させることができるように、適合した発現調節配列に作動可能に連結された、前記目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含有するDNA製造物であり得る。前記発現調節配列は、転写を開始することができるプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレーター配列、適合したmRNAリボゾーム結合部位をコードする配列、及び転写及び解読の終結を調節する配列を含む。ベクターは、適当な宿主細胞内に形質転換された後、宿主ゲノムとは無関係に複製または機能することができ、ゲノムそのものに統合することができる。

40

【0027】

本発明で使用されるベクターは、宿主細胞内で複製可能なものであれば特に限定されず、当業界において知られている任意のベクターを利用することができる。通常使用されるベクターの例としては、天然の状態または組換えされた状態のプラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージを挙げることができる。例えば、ファージベクターまたはコスミドベクターとしてpWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、

50

A S H I I 、 A P I I 、 t 1 0 、 t 1 1 、 C h a r o n 4 A 、 及び C h a r o n 2 1 A などを使用することができ、プラスミドベクターとして p B R 系、 p U C 系、 p B 1 u e s c r i p t I I 系、 p G E M 系、 p T Z 系、 p C L 系及び p E T 系などを使用することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明において、用語「形質転換」とは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞内に導入して宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドがコードするタンパク質を発現させることを意味する。形質転換されたポリヌクレオチドは、宿主細胞内に発現することができさえすれば、宿主細胞の染色体に挿入されて位置するか、染色体外に位置するかに關係なく、これらすべてを含む。また、前記ポリヌクレオチドは、標的タンパク質をコードするDNA及びRNAを含む。前記ポリヌクレオチドは、宿主細胞内に導入されて発現することができるものであれば、如何なる形態で導入されても關係ない。例えば、前記ポリヌクレオチドは、自体的に発現されるのに必要なすべての要素を含む遺伝子構造体である発現力セット(expression cassette)の形態で宿主細胞に導入されることが可能、これに限定されるものではない。前記発現力セットは、通常、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されているプロモーター(promoter)、転写終結シグナル、リボゾーム結合部位及び翻訳終結シグナルを含むことができる。前記発現力セットは、自体複製が可能な発現ベクターの形態であることができる。また、前記ポリヌクレオチドは、それ自体の形態で宿主細胞に導入され、宿主細胞で発現に必要な配列と作動可能に連結されているものあり得る。

10

20

【 0 0 2 9 】

また、前記において、用語「動作可能に連結」されたこととは、本発明の目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドの転写を開始及び媒介するようにするプロモーター配列と前記遺伝子配列が機能的に連結されていることを意味する。

【 0 0 3 0 】

次に、ポリヌクレオチドの発現が増加するように発現調節配列を変形することは、特にこれらに限定されないが、前記発現調節配列の活性を強化するように核酸配列を欠失、挿入、非保全的または保全的置換またはこれらの組み合わせで配列上の変化を誘導して実行したり、さらに強い活性を有する核酸配列と交換することにより行うことができる。前記発現調節配列は、特にこれに限定されないが、プロモーター、オペレーター配列、リボゾーム結合部位をコードする配列、転写及び解読の終結を調節する配列などを含むことができる。

30

【 0 0 3 1 】

前記ポリヌクレオチドの発現単位の上流には、本来のプロモーターの代わりに強力なプロモーターが連結することができ、これに限定されるものではない。公知となった強力なプロモーターの例には、c j 1 プロモーター(特許文献4)、l a c プロモーター、t r p プロモーター、t r c プロモーター、t a c プロモーター、ラムダファージP R プロモーター、P L プロモーター及びt e t プロモーターが含まれることができる。

【 0 0 3 2 】

また、染色体上のポリヌクレオチド配列の変形は、特にこれに限定されないが、前記ポリヌクレオチド配列の活性をさらに強化するように核酸配列を欠失、挿入、非保全的または保全的置換またはこれらの組み合わせで発現調節配列上の変異を誘導して行うか、またはさらに強い活性を有するように改良されたポリヌクレオチド配列と交換することにより行うことができる。

40

【 0 0 3 3 】

このようなタンパク質活性の導入及び増進は、相応するタンパク質の活性または濃度が野生型タンパク質や初期の微生物菌株における活性または濃度を基準として、一般に、少なくとも1%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%または500%、最大1000%または2000%まで増加され得ることあり得るが、これらに限定されるものではない。

50

【0034】

本発明において、用語「O P S 生産微生物」とは、O P S を生物内で生産することができる原核または真核微生物菌株であり、具体的には遺伝的操作によりO P S を蓄積することができる微生物を意味する。

【0035】

本発明の一具体例として、前記微生物は、配列番号1または2のポリペプチドの活性が増強される場合、O P S を排出することができる微生物であれば、特にその種類は限定されず、原核細胞または真核細胞の両方が可能であるか、具体的には原核細胞であり得る。例えば、エシェリキア (Escherichia) 属、エルウィニア (Erwinia) 属、セラチア (Serratia) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、及びブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属に属する微生物菌株が含まれることができ、具体的にはエシェリキア属微生物、その例として大腸菌が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に、前記エシェリキア属またはコリネバクテリウム属微生物の場合、L - セリンの生合成経路の酵素であるS e r A、S e r C 及びS e r B を利用して、O P S 及びL - セリンを生産することができる（非特許文献3～5）。

10

【0036】

また、前記O P S 生産微生物は、さらに、内在的ホスホセリンホスファターゼ (phosphoserine phosphatase、SerB) の活性が内在的活性に比べて弱化されたものであり得る。

【0037】

前記S e r B は、O P S をL - セリン (L-serine) に転換させる活性を有するため、前記S e r B 活性が弱化されるように変異された微生物は、O P S を蓄積する機能を有し、O P S の生産に有用に使用することができる。前記S e r B は、配列番号17または18で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり得るが、これに限定されるものではない。また、S e r B の活性を示す限り、前記アミノ酸配列と80%以上、具体的には90%以上、より具体的には95%以上、より具体的には99%以上の同一のアミノ酸配列を含むことができるが、これに制限されない。

20

【0038】

また、前記S e r B をコードするポリヌクレオチド配列は、前記配列番号17または18で表されたアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を有することができる。前記ポリヌクレオチドは、コドンの縮退性または前記ポリペプチドを発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が行われることができる。前記ポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号19または20のポリヌクレオチド配列を有することができ、これと相同性が80%、具体的には90%以上である塩基配列を有することができる。しかし、これに限定されない。

30

【0039】

本発明において、用語「内在的活性に比べて弱化」とは、本来微生物が天然の状態で有しているタンパク質の活性と比較したとき、その活性が減少したことを意味し、活性が除去された場合も含む。

【0040】

前記弱化は、前記タンパク質をコードする遺伝子の変異などによりタンパク質自体の活性が本来の微生物が有しているタンパク質の活性に比べて減少または除去された場合と、これをコードする遺伝子の発現阻害または翻訳 (translation) 阻害などにより細胞内において全体的なタンパク質活性の程度が天然型菌株に比べて低い場合、前記遺伝子の発現が全く行われない場合、及び発現されても活性がない場合も含む概念である。

40

【0041】

このようなタンパク質活性の弱化は、当該分野においてよく知られている多様な方法で達成することができる。前記方法の例として、前記タンパク質の活性が除去された場合を含め、前記酵素の活性が減少するように突然変異された遺伝子で染色体上の前記タンパク質をコードする遺伝子を代替する方法；前記タンパク質をコードする遺伝子の発現調節配

50

列を変形する方法；前記タンパク質をコードする染色体上の遺伝子の全体または一部を欠失させる方法；前記染色体上の遺伝子の転写体に相補的に結合して前記mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスRNA）を導入する方法；前記タンパク質をコードする遺伝子のSD配列の前段にSD配列と相補的な配列を人為的に付加して2次構造を形成させてリボゾーム（ribosome）の付着が不可能にする方法及び該当配列のORF（open reading frame）の3'末端に逆転写されるようにプロモーターを付加するRT（Reverse transcription engineering）方法などがあり、これらの組み合わせでも達成することができるが、前記の例により特に制限されるものではない。

【0042】

10

具体的には、タンパク質をコードする遺伝子の一部または全体を欠失する方法は、細菌内に染色体挿入用ベクターを利用して染色体内の内在的目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、一部の核酸配列が欠失されたポリヌクレオチドまたはマーカー遺伝子で交換することにより行うことができる。その一例として、相同組換えにより遺伝子を欠失させる方法を使用することができる。また、前記において「一部」とは、ポリヌクレオチドの種類によって異なるが、具体的には1～300個、好ましくは1～100個、さらには1～50個であり得るが、特にこれに制限されるものではない。

【0043】

20

また、発現調節配列を変形する方法は、前記発現調節配列の活性がさらに弱化されるように核酸配列を欠失、挿入、非保全的または保全的置換またはこれらの組み合わせで発現調節配列上の変異を誘導して行うか、さらに弱い活性を有する核酸配列と交換することにより行うことができる。前記発現調節配列には、プロモーター、オペレーター配列、リボゾーム結合部位をコードする配列、及び転写と解読の終結を調節する配列を含む。

【0044】

また、染色体上の遺伝子配列を変形する方法は、前記タンパク質の活性をさらに弱化されるように遺伝子配列を欠失、挿入、非保全的または保全的置換またはこれらの組み合わせで配列上の変化を誘導して行うか、さらに弱い活性を有するように改良された遺伝子配列または活性がないように改良された遺伝子配列と交換することにより行うことができる。

【0045】

30

また、前記OPSを生産する微生物は、さらにホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ（phosphoglycerate dehydrogenase、SerA）またはホスホセリンアミノトランスクレアーゼ（phosphoserine aminotransferase、SerC）の活性が内在的活性に比べて強化されたものであり得る。

【0046】

40

前記SerAは、3-ホスホグリセリン酸（3-phosphoglycerate）を3-ホスホヒドロキシピルビン酸（3-phospho-hydroxypyruvate）に転換する活性を有するタンパク質であり、前記SerAは野生型またはセリンに対するフィードバックが解除された変異体が使用されることができる。また、前記SerCは3-ホスホヒドロキシピルビン酸をOPSに転換する活性を有するタンパク質である。したがって、前記SerAまたはSerCの活性が強化された微生物は、OPS生産菌株として有用に使用されることができる。

【0047】

50

前記SerAは、これに限定されないが、配列番号21～26からなる群から選択されたアミノ酸配列を有することができる。前記配列番号21は、野生型SerAの配列であり、配列番号22～26は、セリンに対するフィードバックが解除された変異体の配列である。また、SerAの野生型またはセリンに対するフィードバックが解除された変異体の活性を示す限り、前記アミノ酸配列と80%以上、具体的には90%以上、より具体的には95%以上、さらに具体的には99%以上が同一のアミノ酸配列を含むことができるが、これに限定されない。前記フィードバックが解除された変異体は、前記SerAをコ

ードする遺伝子に挿入、置換などの方法により変異を導入し、セリンまたはグリシンによるフィードバック阻害からその活性を維持するか、または強化された場合を意味し、前記フィードバックが解除された変異体は、既によく知られている（非特許文献 6～9 及び特許文献 5）。

【0048】

また、前記 Ser A の野生型またはセリンに対するフィードバックが解除された変異体をコードするポリヌクレオチド配列は、前記配列番号 21～26 で表されたいずれか一つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を有することができるが、これに限定されない。前記ポリヌクレオチドは、コドンの縮退性により、または前記ポリペプチドを発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が行われることができる。前記ポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号 27～32 で表されたいずれか一つのポリヌクレオチド配列を有することができ、これと相同性が 80%、具体的には 90% 以上である塩基配列を有することができる。しかし、これに限定されない。

10

【0049】

前記 Ser C は、例えば、配列番号 33 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり得るが、これに限定されるものではない。また、Ser C の活性を示す限り、前記のアミノ酸配列と 80% 以上、具体的には 90% 以上、より具体的には 95% 以上、さらに具体的には 99% 以上が同一のアミノ酸配列を含むことができるが、これに制限されない。

20

【0050】

また、前記 Ser C をコードするポリヌクレオチド配列は、前記配列番号 33 に表されたアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を有することができる。前記ポリヌクレオチドは、コドンの縮退性、または前記ポリペプチドを発現させようとする生物で好まれるコドンを考慮し、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲内でコード領域に多様な変形が行われることができる。前記ポリヌクレオチド配列は、例えば、配列番号 34 のポリヌクレオチド配列を有することができ、これと相同性が 80%、具体的には 90% 以上である塩基配列を有することができる。しかし、これに限定されない。

【0051】

また、前記微生物は、さらに OPS の細胞内への流入または分解能力を減少させた微生物であることができる。

30

【0052】

前記のような OPS 生産微生物に関する内容は、前記で記述された内容以外にも、特許文献 2 または特許文献 5 などに開示された内容が本発明の参考資料として使用されることができる。

【0053】

本発明の他の一態様は、OPS 排出活性を示し、かつ配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの活性が強化された、OPS 生産微生物を培地で培養する段階、及び前記 O-ホスホセリン生産微生物またはその培地から O-ホスホセリンを分離する段階を含む、OPS の生産方法を提供する。

40

【0054】

本発明において、用語「培養」とは、前記微生物を適当に調節された環境条件で生育させることを意味する。本発明の培養過程は、当業界において知られている適当な培地と培養条件に応じて行われることができる。このような培養過程は選択された菌株に応じて当業者が容易に調整して使用することができる。具体的には、前記培養は、回分式、連続式及び流加式であることができるが、これに限定されるものではない。

【0055】

前記 Ser B 活性が内在的活性に比べて弱化された遺伝子組換え微生物の培養は、前記微生物のセリン要求性が誘導され、培地にグリシンまたはセリンがさらに含まれることができる。グリシンは、精製されたグリシン、グリシンを含むイースト抽出物、トリプトン

50

の形態で提供されることができ、培養液に含まれる濃度は、通常、0.1～10g/L、具体的には0.5～3g/Lであることができる。また、セリンは、精製されたセリン、セリンを含有するイースト抽出物、トリプトンなどの形態で提供されることができ、培養液に含まれる濃度は、通常、0.1～5g/L、具体的には0.1～1g/Lであることができる。

【0056】

前記培地に含まれる炭素源は、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、澱粉、セルロースのような糖及び炭水化物、大豆油、ひまわり油、ヒマシ油、ココナッツ油などのオイル及び脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸のような脂肪酸、グリセロール、エタノールのようなアルコール、酢酸のような有機酸が含まれることができ、これらの物質は個別にまたは混合物として使用されることができる。しかし、これに限定されるものではない。前記培地に含まれる窒素源として、ペプトン、イースト抽出物、肉汁、麦芽抽出物、トウモロコシ浸漬液、及び大豆、小麦のような有機窒素源及び尿素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、及び硝酸アンモニウムのような無機窒素源が含まれることができ、前記窒素源は、単独または組み合わせて使用することができる。しかし、これに限定されるものではない。前記培地に含まれるリン源として、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、及び対応するナトリウム-含有塩が含まれることができるが、これに限定されるものではない。また、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄のような金属塩を含むことができる。それ以外に、アミノ酸、ビタミン、及び適切な前駆体などが含まれることができる。前記培地または前駆体は、培養物に回分式または連続式で添加されることができるが、これに限定されるものではない。

10

20

30

40

【0057】

培養中に水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、アンモニア、リン酸及び硫酸のような化合物を培養物に適切な方法で添加し、培養物のpHを調整することができる。また、培養中には脂肪酸ポリグリコールエステルのような消泡剤を使用して気泡の生成を抑制することができる。また、培養物の好気状態を維持するために、培養物内に酸素または酸素含有ガスを注入したり、嫌気及び微好気状態を維持するために気体の注入なしに、あるいは窒素、水素または二酸化炭素ガスを注入することができる。培養物の温度は、通常27～37、具体的には30～35であることができる。培養期間は、所望の有用物質の生産量が得られるまで継続することができ、具体的には10～100時間であることができる。

【0058】

本発明は、前記培養段階で生産されたOPSをさらに分離及び精製することができ、その方法は、培養方法、例えば、回分式、連続式または流加式培養方法などに応じて当該分野において公知となった適切な方法を用いて培地から目的とするOPSを回収することができ、これに限定されない。

【0059】

本発明の他の一態様として、前記配列番号1または2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのOPS生産または排出用途を提供する。

【0060】

本発明の他の一態様として、a)前記配列番号1または2のアミノ酸配列を有する、OPS排出活性を示すポリペプチドの活性が内在的活性に比べて強化された、OPS生産微生物を培地で培養してOPSを生産する段階；及びb)OPSスルフヒドリラーゼ(0-phosphoserine sulfhydrylase、OPSS)またはこれを発現する微生物の存在下、前記a)段階で製造されたOPSまたはこれを含む培地を硫化物と反応させる段階を含む、システインまたはその誘導体の製造方法を提供する。

【0061】

本発明において、用語「OPSスルフヒドリラーゼ(0-phosphoserine sulfhydrylase、OPSS)」とは、OPSにチオール基(thiol group、SH基)を提供し、前記OPSを

50

システインに転換する反応を触媒するポリペプチドを意味する。前記酵素は、アエロパイラム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*)、マイコバクテリウム・チュバキュローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*)、トリコモナス・バギナリス (*Trichomonas vaginalis*) (非特許文献 10 及び非特許文献 11) で初めて明らかになった。また、前記 O P S S は、野生型 O P S S タンパク質だけでなく、前記 O P S S をコードするポリヌクレオチド配列中、一部の配列が欠失、置換または付加された配列であり、野生型 O P S S タンパク質の生物学的活性と同等またはそれ以上の活性を示す変異体タンパク質も含め、例えば、特許文献 2 及び特許文献 7 で開示された O P S S タンパク質及びその変異体タンパク質もすべて含まれる。

【0062】

10

前記硫化物は、当該技術分野において通常使用される固形だけではなく、pH、圧力、溶解度の差異により液体または気体の形態で提供され、スルフィド (sulfide, S²⁻)、チオ硫酸塩 (thiosulfate, S₂O₃²⁻) などの形態でチオール基 (thiol group, SH 基) に転換することができるすべての硫化物であれば、利用可能である。具体的には、チオール基を O P S に提供する Na₂S、NaSH、H₂S、(NH₄)₂S 及び Na₂S₂O₃ を用いることができる。前記反応は、一つの O P S 反応基に 1 つのチオール基を提供して 1 つのシステインあるいはシステイン誘導体を製造する反応であり、前記反応時、硫化物の添加量は O P S モル濃度の 0.1 ~ 3 倍できること、具体的には、1 ~ 2 倍であることができる。

【0063】

20

また、本発明では、さらに前記段階 b) の反応段階を通じて生産されたシステインを分離及び精製する段階を含む。この時、当該分野において公知となった適合した反応を用いて反応液から、目的とするシステインを分離及び精製して回収することができる。

【0064】

また、本発明の特徴は、配列番号 1 または 2 で表されるポリペプチドの活性を O P S 生産微生物で強化させて O P S を高収率で生産し、生産された O P S を O P S S と反応させてシステインを効果的に生産することであり、製造されたシステインは、また、当業界において公知となった化学的合成反応を通じてシステインの水素原子、または特定の原子団を変形させることにより多様なシステイン誘導体で生産することができる。

【0065】

30

本発明において、用語「誘導体」とは、任意の化合物の一部を化学的に変化させて得られる類似化合物であり、通常の化合物中、水素原子、または特定の原子団が、他の原子または原子団により置換された化合物を意味する。

本発明において、用語「システイン誘導体」とは、システインの水素原子、または特定の原子団が、他の原子または原子団により置換された化合物を意味する。その例として、システインのアミン基 (-NH₂) の窒素原子またはチオール基 (-SH) の硫黄原子に他の原子または原子団が付着された形態であることができ、その例として N A C (N-acetyl cysteine)、S C M C (S-Carboxymethylcysteine)、B O C - C Y S (M E) - O H、(R) - S - (2-アミノ-2-カルボキシエチル) - L - ホモシステイン、(R) - 2 - アミノ - 3 - スルホプロピオン酸、D - 2 - アミノ - 4 - (エチルチオ) 酪酸、3 - スルフィノ - L - アラニン、F m o c - C y s (B o c - m e t h y l) - O H、セレノ - L - システイン、S - (2 - チアゾリル) - L - システイン、S - (2 - チエニル) - L - システイン、S - (4 - トレイル) - L - システインなどがあるが、これらに限定されない。システインは、アセチル化剤 (acetylation agent) と反応して N A C (N - アセチルシステイン) で容易に合成することができ、塩基性条件下では、ハロ酢酸 (haloacetic acid) と反応させることにより S C M C (S-Carboxymethylcysteine) で合成することができる。前記システイン誘導体は、主に医薬品原料であり、鎮咳薬、咳抑制薬、気管支炎、気管支喘息と咽頭炎などの治療剤として使用される。

【実施例】

50

【0066】

以下、本発明を実施例により、より詳しく説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれら実施例により制限されるものではない。

【0067】

実施例1：YhhS MFSトランスポーター及びYegB MFSトランスポーターの同定

OPSの排出に関与する大腸菌の膜タンパク質を同定するために、Escherichia coli K12_W3110 (ATCC27325) のゲノムDNAライブラリを用いてスクリーニングを行った。

10

【0068】

OPSにより大腸菌の生育が低下する条件をセットアップ(set up)するためにOPSを生産するベース菌株を作製した。スクリーニングベース菌株は、大腸菌野生型菌株であるW3110において内在的ホスホセリンホスファターゼ(phosphoserine phosphatase、SerB)の活性が弱化されるように変異させた組換え微生物であり、KCCM11212P(「CA07-0012」とも命名、特許文献2及び特許文献5)と命名した菌株である。

【0069】

OPS生産菌株であるKCCM11212PをOPSを含む培地で培養させて、生育の低下(growth inhibition)を示す最適スクリーニング条件を確立した。W3110ゲノムライブラリプラスミドをCA07-0012電気穿孔法で形質転換させ(非特許文献12)、過量のOPSが添加された培地条件で生育の低下が解除されるコロニーを選別した。選別されたコロニーからプラスミドを獲得してシーケンス技法を利用して塩基配列を分析した。このことから、過量のOPS添加条件で生育の低下を解除させるに関与する大腸菌の膜タンパク質の2種を同定した。

20

【0070】

前記2種の大腸菌の膜タンパク質は、YhhS MFS(major facilitator superfamily)トランスポーター(配列番号1のアミノ酸配列、及び配列番号3の塩基配列)及びYegB MFSトランスポーター(配列番号2のアミノ酸配列、及び配列番号4の塩基配列)をそれぞれコードするyhhS及びmdtDで確認された(非特許文献13)。

30

【0071】

実施例2：yhhS 及びmdtD過発現ベクター製作

OPSによる生育の低下を解除させるに関与するYhhS MFSトランスポーター及びYegB MFSトランスポーターをOPS生産菌株でそれぞれ強化した場合、OPS排出能が向上するかを確認するために、それぞれ遺伝子の過発現ベクターを製作しようとした。また、ホモセリン及びホモセリンラクトントランスポーターであるRhtBをOPS生産菌株で強化した場合、OPS濃度が上昇することを確認したため(特許文献2)、これを陽性対照群(positive control)として用いた。そして、YhhS及びMdtdと同様に、MFS(major facilitator superfamily)に属する大腸菌膜タンパク質マルチ薬物放出トランスポーター(multidrug efflux transporter)EmrD及びYcadMFSトランスポーターを共に評価した。YhhS MFSトランスポーターをコードする遺伝子yhhS(配列番号3、Accession Numbers:b3473)及びYegB MFSトランスポーターをコードする遺伝子mdtD(配列番号4、Accession Numbers:b2077)断片は、W3110ゲノムDNAを鋳型としてPCRを通じて獲得した。

40

【0072】

それぞれの膜タンパク質遺伝子に対する過発現ベクターを作製するために使用したプライマー配列は下記表1に表記した通りである。

【0073】

【表1】

遺伝子	プライマー(5'→3')	配列番号	ベクター
<i>yhhS</i>	GATATCATGCCCGAACCGTAGC	5	pCL-PrhtB- <i>yhhS</i>
	AAGCTTTAAGATGATGAGGCGGCCT	6	
<i>mdtD</i>	GATATCATGACAGATCTCCGACAGC	7	pCL-PrhtB- <i>mdtD</i>
	AAGCTTCATTGCGCGCTCCTT	8	
<i>rhtB</i>	GATATCATGACCTTAGAATGGTGG	9	pCL-PrhtB- <i>rhtB</i>
	AAGCTTCACGCATGCCTGCCGA	10	
<i>emrD</i>	GATATCATGAAAAGGCAAAGAACGTCAA	11	pCL-PrhtB- <i>emrD</i>
	AAGCTTTAACGGGCTGCCCT	12	
<i>ycaD</i>	GATATCATGTCCACGTATAACCCAGCCTG	13	pCL-PrhtB- <i>ycaD</i>
	AAGCTTTACACGTGAGCAACGGGTTT	14	
pCL-1920	AAGCTTCGGGCCTTCGCTATTACGC	15	pCL-PrhtB
	AAGCTTAGGCTTACCCGTCTACTGTC	16	

【0074】

yhhS PCR は、配列番号 5 及び 6 のプライマーを、*mdtD* PCR は、配列番号 7 及び 8 を用いた。この時、使用したプライマーは、米国国立衛生研究所ジーンバンク (NIH GeneBank) に登録されている K12 W3110 の遺伝子 (GenBank accession number AP 003471) 及び周辺塩基配列に関する情報に基づいて作製した。

【0075】

rhtB、*emrD* 及び *ycaD* 遺伝子に対する PCR も前記表 1 に開示されたそれぞれのプライマー対を用いて該当遺伝子断片を増幅した。

【0076】

増幅された各遺伝子の断片は、制限酵素である *EcoRV* 及び *HindIII* を処理し、pCL1920 ベクター (GenBank No AB236930) に大腸菌の *rhtB* 遺伝子のプロモーター (PrhtB) が挿入されている pCL-PrhtB-ベクターの *EcoRV* 及び *HindIII* 制限酵素部位にそれぞれクローニングして、pCL-PrhtB-rhtB、pCL-PrhtB-yhhS、pCL-PrhtB-mdtD、pCL-PrhtB-emrD、pCL-PrhtB-ycaD を作製した。

【0077】

実施例 3 : *YhhS* MFS トランスポーター及び *YegB* MFS トランスポーターの強化菌株製作、及び OPS 生産能の評価

<実施例 3-1 : CA07-0012 を利用した *YhhS* MFS トランスポーター及び *YegB* MFS トランスポーター強化菌株製作、及び OPS 生産能の評価>

実施例 2 で製作された 5 種のプラスミドをそれぞれ OPS 生産株である CA07-0012 に導入した菌株を作製し、OPS の生産能を評価した。

【0078】

それぞれの菌株を LB 固体培地に塗抹した後、33 の培養器で一晩培養した。前記培養した菌株を表 2 の 25 mL の力価培地に接種した後、これを 34.5、200 rpm の培養器で 40 時間培養して、その結果を表 3 に示した。

【0079】

【表2】

組成物	濃度(リットル当たり)
グルコース	50 g
KH ₂ PO ₄	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	17 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg
L-グリシン	2.5 g
酵母エキス	3 g
炭酸カルシウム	30 g
pH	6.8

10

20

30

【0080】

【表3】

菌株名	OD562nm	消耗糖 (g/L)	0-ホスホセリン (g/L)
CA07-0012	35	32	1.1
CA07-0012/pCL-PrhtB-rhtB	40	35	1.3
CA07-0012/pCL-PrhtB-yhhS	37	34	2.1
CA07-0012/pCL-PrhtB-mdtD	41	32	1.8
CA07-0012/pCL-PrhtB-emrD	38	34	1.2
CA07-0012/pCL-PrhtB-ycdD	37	33	0.9

【0081】

前記表3で示されたように、大腸菌由来のCA07-0012菌株に大腸菌膜タンパク質の遺伝子をさらに導入した場合のうち、RhtB、YhhS及びMdtd強化株でOPSの生産量がCA07-0012に比べて増加した結果を示した。特に、本発明のYhhS強化株及びMdtd強化株の場合は、OPS濃度が150%以上に上昇することを確認した。一方、比較群であるEmrD強化株及びYcdD強化株の場合には、OPSの生産量を増加させない結果を示した。

40

【0082】

前記CA07-0012/pCL-PrhtB-yhhSと命名された菌株を大腸菌CA07-0266(Escherichia coli CA07-0266)と命名し、これをブダペスト条約の下の国際寄託機関である韓国微生物保存センターに2013年12月9日付けで寄託し、寄託番号KCCM11495Pが与えられた。

50

【0083】

また、前記 C A 0 7 - 0 0 1 2 / p C L - P r h t B - m d t D を大腸菌 C A 0 7 - 0 2 6 7 (Escherichia coli CA07-0267) と命名し、これをブダペスト条約の下の国際寄託機関である韓国微生物保存センターに 2 0 1 3 年 1 2 月 9 日付けで寄託して寄託番号 K C C M 1 1 4 9 6 P が与えられた。

【0084】

<実施例 3 - 2 : S e r A 及び S e r C 強化菌株を用いた Y h h S M F S トランスポーター及び Y e g B M F S トランスポーターの強化菌株製作及び O P S 生産能の評価>

また、O P S 生合成経路である S e r A (3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ、D-3-phosphoglycerate dehydrogenase) 及び S e r C (3 - ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ、3-phosphoserine aminotransferase) の活性を強化させることにより O P S 生産能が増加された O P S 生産菌株である C A 0 7 - 0 0 2 2 / p C L - P r m f - s e r A * (G 3 3 6 V) - (R B S) s e r C (特許文献 3) を用いて前記大腸菌の膜タンパク質遺伝子の効果を把握しようとし、その結果を下記の表 4 に示した。

10

【0085】

【表 4】

菌株名	OD562nm	消耗糖 (g/L)	0- ホスホセリン (g/L)
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)- (RBS)serC	30	27	2.4
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)- (RBS)serC-PrhtB-rhtB	32	28	2.8
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)- (RBS)serC-PrhtB-yhhS	28	26	4.0
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)- (RBS)serC-PrhtB-mdtD	27	27	3.5
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)- (RBS)serC-PrhtB-emrD	33	29	2.3
CA07-0022/pCL-Prmf- serA*(G336V)-(RBS)serC-PrhtB- ycaD	34	28	1.9

20

30

40

【0086】

前記表 4 で見られるように、大腸菌由来の C A 0 7 - 0 0 1 2 菌株より O P S 生産能の向上した C A 0 7 - 0 0 2 2 / p C L - P r m f - s e r A * (G 3 3 6 V) - (R B S) s e r C に、大腸菌の膜タンパク質遺伝子をさらに導入した菌株のうち、本発明の Y h h S 及び M d t D 強化株、及び陽性対照群である R h t B 強化株の場合、O P S の生産量が対照群に比べて増加することを再度確認することができた。特に、本発明の Y h h S 及び M d t D 強化株の場合、前記表 3 の結果と同様に、O P S 濃度が 1 4 5 % 以上上昇する結果を示した。一方、比較群である E r m D 強化群及び Y c a D 強化群の場合は、対照群に比べて O P S 生産量が減少した結果を示した。

【0087】

<実施例 3 - 3 : プロモーター強度による Y h h S M F S トランスポーター及び Y e g B M F S トランスポーターの強化菌株製作、及び O P S 生産能の評価>

また、O P S 濃度が対照群に比べて上昇した膜タンパク質 Y h h S 及び M d t D においてプロモーター強度を強化した時、排出能が向上するかどうかを確認するために、C A 0

50

7-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serCにYhhS及びMdtD遺伝子をさらに導入した。この時、rhtBプロモーター(PrhtB)より強いtrcプロモーター(Ptrc)を使用した。

【0088】

遺伝子YhhS及びMdtD断片は、pCL-PrhtB-geneをEcoRVとHindIIIで処理し、pCL1920ベクターにtrcプロモーターが挿入されているpCL-Ptrc-GFPベクターのEcoRVとHindIII制限酵素の部位にそれぞれクローニングし、pCL-Ptrc-yhhS及びpCL-Ptrc-mdtDを作製した。その後、各プラスミドを鋳型として、配列番号15及び配列番号16のプライマー対を用いてPCRを行い、HindIIIで制限酵素処理してpCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serCのHindIII制限酵素の部位にクローニングした。

10

【0089】

【表5】

菌株名	OD562nm	消耗糖 (g/L)	O- ホスホセリン (g/L)
CA07-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC	31	30	2.7
CA07-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC-Ptrc-yhhS	28	33	5.5
CA07-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC-Ptrc-mdtD	29	31	4.3

20

【0090】

その結果、前記表5で見られるように、プロモーターを強化して大腸菌膜タンパク質の発現を増加させた場合、対照群に比べて収率が150%以上に増加することを確認することができ、rhtBプロモーターを使用したときよりも、120%以上の収率が増加することを確認した。

30

【0091】

<実施例3-4：染色体上のプロモーター強度によるYhhS MFSトランスポーター及びYegB MFSトランスポーターの強化菌株製作、及びOPS生産能の評価>

また、染色体上でYhhS及びMdtDのプロモーターをより強力なプロモーターで変えた場合、排出能が向上するかを確認するために自己プロモーターをcJ1プロモーター(特許文献4)で置換された菌株を製作し、O-ホスホセリンの生産能を評価した。cJ1プロモーターを大腸菌の染色体に導入する方法は、一般的に用いられる下記方法で製作した。染色体にYhhS及びMdtDがプロモーターを置換するために製作した組換えベクターをOPS生産菌株であるCA07-0022/pCL-Prmf-serA* (G336V)-(RBS)serC(特許文献2)に形質転換させて、親菌株が有している自己プロモーター配列と前記ベクター上のプロモーター配列とを相同組換えを通じて置換することにより、染色体内にcJ1プロモーター配列を挿入させた。

40

【0092】

それぞれの菌株をLB固体培地に塗抹した後、33の培養器で一晩培養した菌株を、前記表2の25mLの力価培地に接種した後、これを34.5、200rpmの培養器で40時間培養し、その結果を下記表6に示した。

【0093】

【表6】

菌株名	OD562nm	消耗糖 (g/L)	0- ホスホセリン (g/L)
CA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC	30	29	2.7
CA07-0022::Pcj1_yhhs/pCL-Prmf- serA*(G336V)-(RBS)serC	28	30	3.5
CA07-0022::Pcj1_mdtD/pCL-Prmf- serA*(G336V)-(RBS)serC	29	31	3.2

10

【0094】

前記表6で示されたように、染色体上で各膜タンパク質の発現を増加させた場合、対照群に比べて収率が最大130%増加することを確認した。

【0095】

実施例4：YhhS MFSトランスポーター及びYegB MFSトランスポーターのOPS排出機能の確認

実施例3においてOPS生産が確認された前記フラスコサンプル中、膜タンパク質を強化させていない陰性対照群(negative control)であるCA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC、YhhS及びMdtDタンパク質を強化させたサンプルCA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC-Ptrc-yhhs及びCA07-0022/pCL-Prmf-serA*(G336V)-(RBS)serC-Ptrc-mdtDを用いて培地内に排出されたOPSをすべて除去した後、細胞のみを収集し細胞を破碎した。その後、細胞内のOPS濃度をHPLC(high performance liquid chromatography)機器を用いて測定して、その結果を図1に示した。

20

【0096】

その結果、図1で示されたように、本発明のYhhS及びMdtD強化株の場合、対照群に比べて細胞内のOPS濃度が30~40%まで減少することを確認し、YhhS及びMdtDタンパク質はOPSを細胞外に排出する役割をしていることを確認した。これにより、YhhS及びMdtDタンパク質を強化する場合、細胞内部のOPSを円滑に排出することにより、OPS生産能を向上させると判断された。

30

【0097】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されることがあることを理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

【0098】

40

国際様式

特許出願のためのブダペスト条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に従って発行された原寄託に関する受託証

受信 : C J 第一製糖株式会社

ソウル市中区東湖路 330 C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示		10
寄託者が添付した微生物識別の表示 :	国際寄託機関が付与した受託	
<i>Escherichia coli</i> CA07-0266	番号 : KCCM11495P	
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置		
項目 I に表示された微生物に関して次の事項が含まれている。		
<input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用するときは X で表示)		
III. 寄託及び受託		
本国際寄託機関は 2013 年 12 月 9 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。		
IV. 国際寄託機関		
名称 : 韓国微生物保存センター	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 :	
住所 : 韓国ソウル市西大門区弘済内-2街-ギル45、ユリムビル (郵便番号 120-861)	署名日 : 2013 年 12 月 9 日	

20

30

30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2014 年 08 月 11 日

弁理士 ソン・ミン 印

【 0099 】

国際様式

特許出願のためのブダペスト条約下の微生物受託証明

国際寄託機関により規則 7. 1 に従って発行された原寄託に関する受託証

受信 : C J 第一製糖株式会社

ソウル市中区東湖路 330 C J 第一製糖センター

I. 微生物の表示	
寄託者が添付した微生物識別の表示 : <i>Escherichia coli</i> CA07-0267	国際寄託機関が付与した受託番号 : K C C M 1 1 4 9 6 P
II. 科学的性質の説明及び／又は分類学上の位置	
項目 I に表示された微生物に関して次の事項が含まれている。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質の説明 <input type="checkbox"/> 提案された分類学上の位置 (適用するときは X で表示)	
III. 寄託及び受託	
本国際寄託機関は 2013 年 12 月 9 日に寄託された項目 I に表示された微生物を受託した。	
IV. 国際寄託機関	
名称 : 韓国微生物保存センター	国際寄託機関を代表する権限を有する者又は権限を付与された公務員の署名 :
住所 : 韓国ソウル市西大門区弘済内-2街-ギル45、ユリムビル (郵便番号 120-861)	署名日 : 2013 年 12 月 9 日

10

20

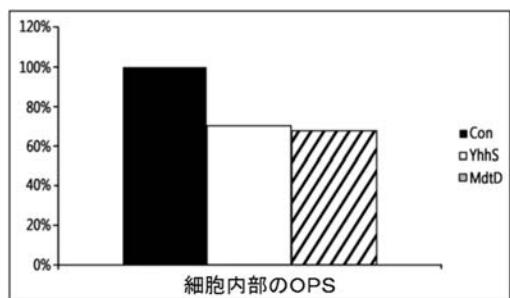
30

前記翻訳は原文の内容と相違ないことを証明する。

2014 年 08 月 11 日

弁理士 ソン・ミン 印

【図1】



【配列表】

2017528126000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2015/008336
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 1/21(2006.01)i, C12P 13/06(2006.01)i, C12P 13/12(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N 1/21; C12P 13/12; C12N 15/09; C12N 15/52; C12N 15/53; C12P 13/06</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: O-phosphoserine, discharge protein, conversion of formation, microbial		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0041115 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 30 April 2012 See claims 1 to 8	1-10
Y	Putative arabinose efflux transporter, NCBI Accession No. : WO_001300943 (20 October 2014) See sequence	1-10
Y	Efflux transporter, NCBI Accession No. :WP_000130850 (20 October 2014) See sequence	1-10
A	KR 10-2013-0068135 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 25 June 2013 See the entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 19 OCTOBER 2015 (19.10.2015)		Date of mailing of the international search report 21 OCTOBER 2015 (21.10.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seosan-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/008336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0041115 A	30/04/2012	CN 102906272 A EP 2444481 A1 JP 2013-543723A US 2012-0190081 A1 US 2012-0190082 A1 US 2012-0190083 A1 US 8557549 B2 WO 2012-053794 A2 WO 2012-053794 A3	30/01/2013 25/04/2012 09/12/2013 26/07/2012 26/07/2012 26/07/2012 15/10/2013 26/04/2012 19/07/2012
KR 10-2013-0068135 A	25/06/2013	CA 2859125 A1 CN 104039963 A EP 2792748 A2 JP 2015-500039A KR 10-1404325 B1 US 2015-0004657 A1 WO 2013-089478 A2 WO 2013-089478 A3	20/06/2013 10/09/2014 22/10/2014 05/01/2015 11/06/2014 01/01/2015 20/06/2013 20/06/2013

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2015/008336
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/21(2006.01)i, C12P 13/06(2006.01)i, C12P 13/12(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/21; C12P 13/12; C12N 15/09; C12N 15/52; C12N 15/53; C12P 13/06		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: O-포스포세린, 배출 단백질, 형질전환, 미생물		
C. 관련문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0041115 A (씨제이제일제당 (주)) 2012.04.30 청구항 1 내지 8 참조	1-10
Y	Putative arabinose efflux transporter, NCBI Accession No.: WO_001300943(2014.10.20.) 서열 참조	1-10
Y	Efflux transporter, NCBI Accession No.:WP_000130850(2014.10.20.) 서열 참조	1-10
A	KR 10-2013-0068135 A (씨제이제일제당 (주)) 2013.06.25 전체 참조	1-10
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 10월 19일 (19.10.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 10월 21일 (21.10.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김정태 전화 번호 +82-42-481-5495

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보국제출원번호
PCT/KR2015/008336

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0041115 A	2012/04/30	CN 102906272 A EP 2444481 A1 JP 2013-543723A US 2012-0190081 A1 US 2012-0190082 A1 US 2012-0190083 A1 US 8557549 B2 WO 2012-053794 A2 WO 2012-053794 A3	2013/01/30 2012/04/25 2013/12/09 2012/07/26 2012/07/26 2012/07/26 2013/10/15 2012/04/26 2012/07/19
KR 10-2013-0068135 A	2013/06/25	CA 2859125 A1 CN 104039963 A EP 2792748 A2 JP 2015-500039A KR 10-1404325 B1 US 2015-0004657 A1 WO 2013-089478 A2 WO 2013-089478 A3	2013/06/20 2014/09/10 2014/10/22 2015/01/05 2014/06/11 2015/01/01 2013/06/20 2013/06/20

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 キム、ソル

大韓民国、16424 キョンギ - ド、スウォン - シ、パルダル - グ、イルウォル - ロ 18ペオ
ン - ギル、18、202

(72)発明者 ヨー、イン ファ

大韓民国、22749 インチェオン、セオ - グ、チェオングナハヌル - ロ、17、382 - 21
04

(72)発明者 チャン、ジン ソーク

大韓民国、07524 ソウル、カンセオ - グ、ヘオジュン - ロ、47、206 - 704

(72)発明者 キム、ヒエ ウォン

大韓民国、13607 キョンギ - ド、セオングナン - シ、ブンダン - グ、バエクヒエオン - ロ、
206、417 - 506

F ターム(参考) 4B064 AE03 AE14 AG01 CA02 CA19 CC24 CD01 CD02 CD09 CD13

CD21 DA20

4B065 AA26X AA26Y AB01 AC14 AC15 BA02 BA03 BB02 BB03 BB12

BB15 BB29 BC02 BC03 BC09 BC26 CA17

4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA50 EA60 FA74