

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5493854号  
(P5493854)

(45) 発行日 平成26年5月14日 (2014. 5. 14)

(24) 登録日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| (51) Int. Cl.                   | F 1                |
| <b>C 1 2 P 7/46 (2006. 01)</b>  | C 1 2 P 7/46 Z N A |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b> | C 1 2 N 15/00 A    |

請求項の数 14 (全 25 頁)

|               |                              |           |                     |
|---------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2009-509369 (P2009-509369) | (73) 特許権者 | 000000066           |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年4月10日 (2008. 4. 10)     |           | 味の素株式会社             |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP2008/057086            |           | 東京都中央区京橋1丁目15番1号    |
| (87) 国際公開番号   | W02008/126896                | (74) 代理人  | 100100549           |
| (87) 国際公開日    | 平成20年10月23日 (2008. 10. 23)   |           | 弁理士 川口 嘉之           |
| 審査請求日         | 平成23年4月11日 (2011. 4. 11)     | (74) 代理人  | 100089244           |
| (31) 優先権主張番号  | 特願2007-102668 (P2007-102668) |           | 弁理士 遠山 勉            |
| (32) 優先日      | 平成19年4月10日 (2007. 4. 10)     | (74) 代理人  | 100126505           |
| (33) 優先権主張国   | 日本国 (JP)                     |           | 弁理士 佐貫 伸一           |
| 微生物の受託番号      | IPOD FERM BP-10951           | (74) 代理人  | 100131392           |
|               |                              |           | 弁理士 丹羽 武司           |
|               |                              | (72) 発明者  | 福井 啓太               |
|               |                              |           | 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 |
|               |                              |           | 味の素株式会社内            |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 有機酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

有機酸生産能を有し、s u c E 1 遺伝子及びm d h 遺伝子の発現が増強するように改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させることによって有機酸を生成させ、該有機酸を採取することを特徴とし、

前記細菌の処理物は、固定化菌体、菌体破砕物、その遠心分離上清、又は該上清の画分であり、

前記s u c E 1 遺伝子が (a) 又は (b) に示すDNAである、有機酸の製造方法：

(a) 配列番号3の塩基番号571～2187、又は配列番号5の塩基配列を含むDNA

10

(b) 配列番号3の塩基番号571～2187、又は配列番号5に相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させるDNAであり、前記ストリンジントな条件は90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件である、DNA。

【請求項2】

前記細菌が、好気条件におけるs u c E 1 遺伝子及びm d h 遺伝子の発現量が、非改変株に比べて、それぞれ1.5倍以上となるように改変されている、請求項1に記載の方法

。

20

## 【請求項 3】

前記細菌が、コリネ型細菌、バチルス属細菌、及びリゾビウム属細菌からなる群より選ばれる細菌である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

s u c E 1 遺伝子及び／又は m d h 遺伝子のコピー数を高めること、これらの遺伝子の発現調節配列を改変すること、又は、これらの遺伝子のプロモーターを強力なプロモーターに置換することにより、これらの遺伝子の発現が増強された、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記強力なプロモーターが、構成発現型プロモーターである請求項 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 6】

前記強力なプロモーターが、エロンゲーションファクター T u、コシャペロニン G r o E S - シャペロニン G r o E L、チオレドキシンレダクターゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、ペルオキシレドキシン、グリセロール 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、2, 3 - ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼをコードする遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子のプロモーターである、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記 m d h 遺伝子が ( c ) 又は ( d ) に示す DNA である請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法：

20

( c ) 配列番号 1 3 の塩基番号 3 0 1 ～ 1 2 8 7 の塩基配列を含む DNA、

( d ) 配列番号 1 3 の塩基番号 3 0 1 ～ 1 2 8 7 に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、マレートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 8】

前記細菌が、さらにラクテートデヒドロゲナーゼ活性が、非改変株に比べて 1 0 % 以下に低減化するように改変されている、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記細菌が、さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変されている、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 1 0】

前記有機酸がコハク酸である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法によりコハク酸を製造する工程、及び得られたコハク酸を重合させる工程を含む、コハク酸含有ポリマーの製造方法。

## 【請求項 1 2】

前記細菌が、さらに、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が増強するように改変されている、請求項 1 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記有機酸が、リンゴ酸又はフマル酸である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 1 4】

前記細菌が、さらに、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が非改変株に比べて 1 0 % 以下に低減化するように改変されている、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、コリネ型細菌等の細菌を用いた有機酸の製造方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

50

コハク酸などの非アミノ有機酸を発酵により生産する場合、通常、Anaerobiospirillum 属、Actinobacillus 属等の嫌気性細菌が用いられている（特許文献 1 及び特許文献 2、非特許文献 1）。嫌気性細菌を用いる場合は、生産物の収率が高いが、その一方では、増殖するために多くの栄養素を要求するために、培地中に多量の C S L（コーンステープリカー）などの有機窒素源を添加する必要がある。これらの有機窒素源を多量に添加することは培地コストの上昇をもたらすだけでなく、生産物を取り出す際の精製コストの上昇にもつながり経済的でない。

#### 【0003】

また、コリネ型細菌のような好気性細菌を好気性条件下で培養し、菌体を増殖させた後、集菌、洗浄して得た静止菌体を用いて、酸素を通気せずに非アミノ有機酸を生産する方法も知られている（特許文献 3 及び特許文献 4）。このように、一般に、非アミノ有機酸の製造に好気性細菌を用いた場合は、好気条件で増殖させた菌体に嫌気条件下でコハク酸生産活性を付与するために、微好気条件で培養すること（微好気誘導）が必要である。この場合、菌体を増殖させるに当たっては、有機窒素の添加量が少なくてもよく、簡単な培地で十分増殖できるため経済的ではあるが、目的とする有機酸の生成量、生成濃度、及び菌体当たりの生産速度の向上、製造プロセスの簡略化等、改善の余地があった。また、組換え DNA 技術により非アミノ有機酸の生産能を増加させる技術が開示されている。例えば、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの活性を増強させた細菌を用いた非アミノ有機酸の発酵生産なども報告されている（例えば、特許文献 5）。

#### 【0004】

コリネ型細菌の全ゲノム配列が明らかにされ、その中に含まれる推定タンパク質コード配列についての機能予測がなされている（非特許文献 2）。本発明において sucE1 と呼ぶ遺伝子もその中の一つであるが、パーミアーゼをコードすると予想されているものの、その実際の機能は明らかにされておらず、コハク酸合成経路への関わりも全く知られていなかった。一方、マレートデヒドロゲナーゼに関しては、該酵素の活性を増強させた細菌を用いたコハク酸の製造方法は報告されていたが（特許文献 6）、該酵素をコードする mdh 遺伝子と、sucE1 遺伝子とともに増強することによる効果に関しては、これまで知られていなかった。

【特許文献 1】米国特許第 5, 142, 834 号公報

【特許文献 2】米国特許第 5, 504, 004 号公報

【特許文献 3】特開平 11-113588 号公報

【特許文献 4】特開平 11-196888 号公報

【特許文献 5】特開平 11-196887 号公報

【特許文献 6】特開 2006-320208 号公報

【非特許文献 1】International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, 207-216

【非特許文献 2】Appl. Microbiol. Biotechnol. 62 (2-3), 99-109 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

本発明の課題は、製造プロセスが簡略化された、細菌を用いた有機酸の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、sucE1 遺伝子と mdh 遺伝子の発現を増強するように改変された細菌は、微好気誘導の必要なく有機原料より有機酸を生成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0007】

すなわち本発明、以下のとおりである。

(1) 有機酸生産能を有し、sucE1 遺伝子及び mdh 遺伝子の発現が増強するように

改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させることによって有機酸を生成させ、該有機酸を採取することを特徴とする有機酸の製造方法。

(2) 前記細菌が、好気条件における *sucE1* 遺伝子及び *mdh* 遺伝子の発現量が、非改変株に比べて、それぞれ 1.5 倍以上となるように改変されている、前記方法。

(3) 前記細菌が、コリネ型細菌、バチルス属細菌、及びリゾビウム属細菌からなる群より選ばれる細菌である、前記方法。

(4) *sucE1* 遺伝子及び／又は *mdh* 遺伝子のコピー数を高めること、これらの遺伝子の発現調節配列を改変すること、又は、これらの遺伝子のプロモーターを強力なプロモーターに置換することにより、これらの遺伝子の発現が増強された、前記方法。

10

(5) 前記強力なプロモーターが、構成発現型プロモーターである前記方法。

(6) 前記強力なプロモーターが、エロンゲーションファクター *Tu*、コシャペロニン *GroES*、シャペロニン *GroEL*、チオレドキシシンレダクターゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、ペルオキシレドキシシン、グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ、2,3-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼをコードする遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子のプロモーターである、前記方法。

(7) 前記 *sucE1* 遺伝子が (a) 又は (b) に示す DNA である前記方法：

(a) 配列番号 3 の塩基番号 571～2187 の塩基配列を含む DNA、

(b) 配列番号 3 の塩基番号 571～2187 に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させる DNA。

20

(8) 前記 *mdh* 遺伝子が (c) 又は (d) に示す DNA である前記方法：

(c) 配列番号 13 の塩基番号 301～1287 の塩基配列を含む DNA、

(d) 配列番号 13 の塩基番号 301～1287 に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、マレートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(9) 前記細菌が、さらにラクテートデヒドロゲナーゼ活性が、非改変株に比べて 10% 以下に低減化するように改変されている、前記方法。

(10) 前記細菌が、さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼ活性が増強するように改変されている、前記方法。

30

(11) 前記有機酸がコハク酸である、前記方法。

(12) 前記方法によりコハク酸を製造する工程、及び得られたコハク酸を重合させる工程を含む、コハク酸含有ポリマーの製造方法。

(13) 前記細菌が、さらに、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が増強するように改変されている、前記方法。

(14) 前記有機酸が、リンゴ酸又はフマル酸である、前記方法。

(15) 前記細菌が、さらに、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が非改変株に比べて 10% 以下に低減化するように改変されている、前記方法。

【図面の簡単な説明】

40

【0008】

【図1】 *ldh* 遺伝子破壊用プラスミド *pBS4SΔldh56* の構築を示す図。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

〔本発明に用いる細菌〕

本発明の方法に用いられる細菌（以下、「本発明の細菌」ともいう）は、有機酸生産能を有し、*sucE1* 遺伝子と *mdh* 遺伝子の発現が増強するように改変された細菌である。このような細菌は有機酸生産能を有する細菌を親株として、*sucE1* 遺伝子と *mdh* 遺伝子の発現が同時に増強するように改変することにより得ることができる。また、親株が有機酸生産能を

50

有していない場合、有機酸の生産能を付与し、さらに、sucE1遺伝子とmdh遺伝子の発現が増強するように改変することによって得ることができる。さらに、sucE1遺伝子とmdh遺伝子の発現が増強するように改変された菌株に、有機酸の生産能を付与してもよい。

ここでいう有機酸は、TCA回路の代謝中間体の有機酸をいい、例えば、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、クエン酸、イソクエン酸、シス-アコニット酸などが挙げられるが、この中でもコハク酸、リンゴ酸、フマル酸が好ましく、コハク酸がより好ましい。

#### 【0010】

本発明に使用できる細菌の親株は、特に限定されないが、好気性細菌又は通性嫌気性細菌が好ましく、具体的にはコリネ型細菌 (coryneform bacterium)、バチルス属細菌、リゾビウム属細菌、又はエシェリヒア属細菌が好ましく、中でも、コリネ型細菌がより好ましい。コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム属に属する微生物、ブレビバクテリウム属に属する微生物又はアースロバクター属に属する微生物が挙げられ、このうち好ましくは、コリネバクテリウム属又はブレビバクテリウム属に属するものが挙げられ、更に好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum)、ブレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes) 又はブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium lactofermentum) に属する微生物が挙げられる。

#### 【0011】

上記細菌の親株の特に好ましい具体例としては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (Agric. Biol. Chem., 54 (2), 443-447, 1990)、MJ-233の変異株であるMJ-233 AB-41 (特開2003-235592号公報)、コリネバクテリウム・グルタミカム (コリネバクテリウム・エスピー、ブレビバクテリウム・フラバム) AJ110655 (FERM ABP-10951)、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6872、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC31831、ATCC13032及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869等が挙げられる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムは、現在、コリネバクテリウム・グルタミカムに分類される場合もあることから (Lielbl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, vol. 41, p255-260)、本発明においては、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株、MJ-233 AB-41株及びAJ110655株はそれぞれ、コリネバクテリウム・グルタミカムMJ-233株、MJ-233 AB-41株及びAJ110655株と同一の株であるものとする。

#### 【0012】

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ110655は、2008年2月15日に独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に受領番号FERM ABP-10951として寄託されている。なお、コリネバクテリウム・グルタミカムAJ110655株は、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株から構築されたLDH遺伝子欠損株であり、コリネバクテリウム・グルタミカムAJ110655株として寄託された。その後、16S rRNAの塩基配列解析などにより、コリネバクテリウム・グルタミカムとは異なる種であることが示唆されている。

#### 【0013】

本発明の方法に用いる細菌を得るための親株として用いられる細菌は、野生株だけでなく、UV照射やNTG処理等の通常の変異処理により得られる変異株、細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝学的手法により誘導される組換え株などのいずれの株であってもよい。

#### 【0014】

親株が有機酸生産能を有していない場合、変異処理や遺伝子組換えにより有機酸生産能を付与する。ただし、sucE1遺伝子とmdh遺伝子の発現を増強するための改変により有機酸生産能を有するようになる場合は、必ずしも他の手段によって有機酸生産能を付与する必要はない。

なお、ここでいう「有機酸生産能」とは、該細菌または該酸菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含有する反応液中で有機原料に作用させたときに

10

20

30

40

50

、反応液中に回収可能な程度に有機酸を蓄積する能力をいう。  
以下、具体的に微生物に有機酸生産能を付与する方法について例示する。

【0015】

〔コハク酸生産菌〕

育種によってコハク酸生産能を付与または増強するための方法としては、例えば、コハク酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を挙げることができる。コハク酸生合成に関与する酵素としては、例えば、後述するようなピルビン酸カルボキシラーゼや、特開2005-095169号公報に開示されたフマル酸レダクターゼなどが挙げられる。ピルビン酸カルボキシラーゼ、フマル酸レダクターゼ遺伝子を増幅した細菌は、特表2002-511250号公報、特開平11-196888号公報、特開2005-95169号公報などに記載されている。

10

【0016】

コハク酸生産能は、後述するように嫌気条件で発現する酵素であるラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することによっても付与又は増強することができる。また、細菌を紫外線、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンスルフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、コハク酸を生産する株を選抜する方法によってコハク酸生産能を付与してもよい。コハク酸生産能を有する変異株としては、特開2005-065641号公報に開示されているグルタミン酸要求性株などが挙げられる。

20

【0017】

本発明の方法に用いる細菌は、上記のようなコハク酸生産能を有する細菌を、sucE1遺伝子とmdh遺伝子の発現が増強するように改変することによって得ることができる。なお、コハク酸生産能を付与するための改変とsucE1遺伝子とmdh遺伝子の発現を増強するための改変はどちらを先に行ってもよい。

【0018】

〔sucE1遺伝子〕

sucE1遺伝子がコードするタンパク質(SucE; succinate exporter)は、パーミアーゼの一種と推測されており、細菌内でその発現を増強させた場合に細菌のコハク酸生産能を向上させるタンパク質である。

30

【0019】

sucE1遺伝子としては、Brevibacterium flavum MJ-233由来のsucE1遺伝子(配列番号3の塩基番号571~2187)、あるいはCorynebacterium glutamicum ATCC13032由来のsucE1遺伝子(配列番号5の塩基配列を有する遺伝子)、Corynebacterium efficiens YS314由来のsucE1遺伝子(配列番号7の塩基配列を有する遺伝子)、Corynebacterium diphtheriae gravis NCTC13129由来のsucE1遺伝子(配列番号11の塩基配列を有する遺伝子)などを挙げることができる。C. glutamicum ATCC13032のsucE1遺伝子は、GenBank Accession No. NC\_003450として登録されているゲノム配列中のNCgl2130として登録されている(アミノ酸配列はGenBank Accession No. NP\_601414)。C. efficiens YS314のsucE1遺伝子はGenBank Accession No. NC\_004369として登録されているゲノム配列中のCE2102として登録されている。C. diphtheriae gravis NCTC13129由来のsucE1遺伝子は、GenBank Accession No. NC\_002935のDIP0830として登録されている。

40

【0020】

また、sucE1遺伝子は、細菌においてその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることが出来る限り、他の微生物由来のsucE1のホモログ遺伝子を用いてもよい。sucE1遺伝子のホモログは、BLAST(<http://blast.genome.jp/>)等によって配列番号3の塩基番号571~2187の配列などを参照して、検索出来る。

【0021】

sucE1遺伝子は、上記のとおり、既にいくつかの配列が明らかにされているので、それらの塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、PCRにより得ることができる。例えば、配列番号1及び2に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型と

50

するPCR法（PCR：polymerase chain reaction；White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照）によって、*C. glutamicum*のsucE1の構造遺伝子と、その制御領域を含む隣接領域を取得することができる。他の微生物のsucE1のホモログも、同様にして取得され得る。

#### 【0022】

コリネ型細菌の種や菌株によってsucE1遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、本発明の方法に用いる細菌を得るために使用するsucE1遺伝子は、配列番号3の塩基番号571-2187の配列、配列番号5、7、又は11の配列を有する遺伝子に限られず、細菌内でその発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることができる限り、配列番号4、6、8、又は12のアミノ酸配列において、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする変異体又は人為的な改変体であってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から20個、好ましくは、2から10個、より好ましくは2から5個である。また、このようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、sucE1遺伝子を保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異（mutant又はvariant）によって生じるものも含まれる。

#### 【0023】

上記置換は機能的に変化しない中性変異である保存的置換が好ましい。保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe, Trp, Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu, Ile, Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln, Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys, Arg, His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp, Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser, Thr間でお互いに置換する変異である。より具体的には、保存的置換としては、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln, His又はLysへの置換、AsnからGlu, Gln, Lys, His又はAspへの置換、AspからAsn, Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn, Glu, Lys, His, Asp又はargへの置換、GluからGly, Asn, Gln, Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn, Lys, Gln, Arg又はTyrへの置換、IleからLeu, Met, Val又はPheへの置換、LeuからIle, Met, Val又はPheへの置換、LysからAsn, Glu, Gln, His又はArgへの置換、MetからIle, Leu, Val又はPheへの置換、PheからTrp, Tyr, Met, Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis, Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet, Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

#### 【0024】

さらに、sucE1遺伝子は、配列番号4、6、8、又は12のアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するタンパク質をコードし、かつ、発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させることが出来るタンパク質をコードする配列を用いることも出来る。また、それぞれ導入する宿主により、遺伝子の縮重性が異なるので、それぞれsucE1が導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したものでもよい。同様にsucE1遺伝子は、発現を増強することにより細菌のコハク酸生産能を向上させる機能を有する限り、N末端側、C末端側が延長したタンパク質、あるいは削られているタンパク質をコードする遺伝子でもよい。例えば延長・削除する長さは、アミノ酸残基で50以下、好ましくは20以下、より好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。より具体的には、配列番号4、6、8、又は12のアミノ酸配列のN末端側50アミノ酸から5アミノ酸、又はC末端側50アミノ酸から5アミノ酸が延長又は削除されたタンパク質をコードする遺伝子でもよい。

#### 【0025】

上記のようなsucE1遺伝子と相同な遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号3の塩基番号571～2187の塩基配列、配列番号5、7、又は11の塩基配列

10

20

30

40

50

を改変することによって取得することができる。また、以下のような従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、配列番号3の塩基番号571~2187の塩基配列、配列番号5、7、又は11に示す塩基配列をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝子を保持する微生物、例えばコリネ型細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンスルフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、エラープローンPCR、DNA shuffling、又はStEP-PCRによって、遺伝子組換えにより人工的にsucE1に変異を導入して活性の高いsucE1遺伝子を取得することが出来る(Firth, A.E., Patrick, W.M.; Bioinformatics 21, 3314-3315, 2005 Jun 2; Statistics of protein library construction.)。

10

#### 【0026】

なお、これらのsucE1相同遺伝子が発現を増強することによりコハク酸生産能を向上させるタンパク質をコードしているか否かは、例えば、これらの遺伝子を細菌の野生株に導入し、コハク酸の生産能が向上するかどうかを調べることにより、確かめることができる。

#### 【0027】

また、sucE1遺伝子は、配列番号3の塩基番号571~2187の配列、配列番号5、7、もしくは11の塩基配列に相補的な配列、又はこれらの配列から調製され得るプローブとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ発現を増強することにより、細菌のコハク酸生産能を向上させるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここで、「ストリンジ

20

#### 【0028】

プローブとして、配列番号3の塩基番号571~2187の配列、配列番号5、7、又は11の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、これらの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

30

#### 【0029】

「sucE1遺伝子の発現が増強するように改変された」とは、sucE1遺伝子非改変株、例えば親株あるいは野生株に対して細胞当たりのsucE1産物分子の数が増加した場合や、sucE1産物分子当たりの活性が上昇した場合などが該当する。なお、比較対象となる野生型のコリネ型細菌としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム(ブレバクテリウム・ラクトファermenタム) ATCC13869やATCC13032などが挙げられる(後述の他の遺伝子についても同様)。

40

#### 【0030】

sucE1遺伝子の発現量が上昇したことの確認は、sucE1のm-RNAの量を親株又は野生型のような非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる(Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor(USA), 2001))。sucE1遺伝子の発現量は、好気条件において、非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇して

50

いることが望ましい。本発明において「好気条件」とは、溶存酸素濃度が0.33ppm以上7ppm以下であり、1.5ppm以上7ppm以下であることが好ましい（アミノ酸発酵、明石邦彦ら）。

#### 【0031】

〔mdh遺伝子〕

mdh遺伝子としては、マレートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、配列番号13に示す塩基配列を有するブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株由来の遺伝子を挙げることができる。ここで、「マレートデヒドロゲナーゼ活性」とは、オギザロ酢酸を還元してリンゴ酸に変換する反応を触媒する活性をいい、「マレートデヒドロゲナーゼ活性が増強する」とは、マレートデヒドロゲナーゼ非改変株と比較してマレートデヒドロゲナーゼ活性が増強していることをいう。

10

#### 【0032】

また、mdh遺伝子は、マレートデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、他の微生物由来のmdhのホモログ遺伝子を用いてもよい。mdh遺伝子のホモログは、BLAST (<http://blast.genome.jp/>) 等によって配列番号13の塩基番号301～1384の配列などを参照して、検索出来る。

#### 【0033】

mdh遺伝子は、上記のとおり、既にいくつかの配列が明らかにされているので、それらの塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、PCRにより得ることができる。例えば、配列番号15及び16に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型とするPCR法、*C. glutamicum*のmdhの構造遺伝子と、その制御領域を含む接領域を取得することができる。他の微生物のmdhのホモログも、同様にして取得され得る。

20

#### 【0034】

上記したsucE1遺伝子及びそれによってコードされるタンパク質の変異体又は人為的な改変体に関する記載は、mdh遺伝子にも同様に適用される。また、これらの記載は、後述するLDH遺伝子、及びPC遺伝子にも同様に適用される。

#### 【0035】

「mdh遺伝子の発現が増強するように改変された」とは、sucE1遺伝子非改変株、例えば親株あるいは野生株に対して、mdh遺伝子がコードしているマレートデヒドロゲナーゼ活性が増強するように改変されたことを意味し、細胞当たりのマレートデヒドロゲナーゼ分子の数が増加した場合や、マレートデヒドロゲナーゼ1分子当たりの活性が上昇した場合などを含む。なお、野生型のコリネ型細菌としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム（ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）ATCC13869やATCC13032などが挙げられる。

30

#### 【0036】

mdh遺伝子の発現量が上昇したことの確認は、前記と同様にmdhのm-RNAの量を非改変株と比較することによって確認できる。また、マレートデヒドロゲナーゼ活性を非改変株と比較することによっても、mdh遺伝子の発現量の上昇を確認することができる。

sucE1遺伝子の発現量は、好気条件において、非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば非改変株と比べて1.5倍以上増強されていることが好ましく、2倍以上増強されていることがより好ましい。マレートデヒドロゲナーゼ活性は、後述するようなNADHの減少を測定する方法によって測定することができる。

40

#### 【0037】

〔sucE1遺伝子及びmdh遺伝子の発現増強〕

sucE1とmdh遺伝子の発現の増強は、これらの遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、これらの遺伝子を含む断片を、細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これで上述のような細菌を形質転換すればよい。また、遺伝子のコピー数の上昇は、該遺伝子を染色体上に1コピーあるいは複数コピー転移させることによって達成される。染色体上に該遺伝子が転移したことの確認は、該遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行う

50

ことによって確認出来る。

#### 【0038】

プラスミドベクターを用いる場合、sucE1遺伝子とmdh遺伝子は同じプラスミド上にあってもよく、異なるプラスミドに別々に存在していてもよい。また、sucE1遺伝子とmdh遺伝子の細菌への導入の順序は制限されず、同時であってもよい。

#### 【0039】

また、sucE1とmdh遺伝子の発現の増強は、これらの遺伝子の発現調節領域を改変することによっても達成出来る。例えば、これらの遺伝子のプロモーターの配列をより強いプロモーターに置換すること、又はこれらの遺伝子のプロモーター配列をコンセンサス配列に近づけることによって達成出来る（国際公開第W000/18935号パンフレット）。

10

#### 【0040】

以下、sucE1とmdh遺伝子の発現が増強するように改変する方法を具体的に示す。これらの方法は、Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor(USA), 2001) 等のマニュアルに従って実施出来る。

#### 【0041】

まず目的遺伝子を、コリネ型細菌などの染色体からPCR法などによりクローニングする。染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物学実験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照) 等により調製することができる。PCRに用いるオリゴヌクレオチドは上記の公知情報に基づいて合成でき、例えば配列番号1、2に記載の合成オリゴヌクレオチドを用いsucE1遺伝子を、配列番号15、16に記載の合成オリゴヌクレオチドを用いmdh遺伝子を増幅することが出来る。

20

#### 【0042】

PCR法により増幅された該遺伝子を含む遺伝子断片は、それを導入する細菌で自律複製可能な複製起点を有するベクターに組み込み、該組換えベクターで細菌を形質転換することによって増幅することができる。特にコリネ型細菌に導入する場合は、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリに導入しておくこと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pBR322、pACYC184、pMW219等が挙げられる。

30

#### 【0043】

コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号公報に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等、特開平10-215883号公報に記載のpVK7を挙げることができる。

#### 【0044】

これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

40

#### 【0045】

sucE1遺伝子とmdh遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組換えDNAを調製するには、該遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。この制限酵素サイトはあらかじめ該遺伝子の増幅に用いる合成オリゴヌクレオチドに導入されていてもよい。連結はT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

#### 【0046】

50

上記のように調製した組換えプラスミドを細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S.N., Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)) も応用できる。また、電気パルス法 (特開平2-207791号公報) や、接合伝達法 (Biotechnology (N Y). 1991 Jan;9(1):84-7) によっても、細菌の形質転換を行うことができる。

#### 【0047】

sucE1とmdh遺伝子のコピー数を高めることは、該遺伝子を細菌の染色体DNA上に複数コピー存在させることによっても達成できる。細菌の染色体DNA上に該を複数コピー導入するには、染色体DNA上に複数コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、該遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である (特開平2-109985号、特開平7-107976号、Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994)、Plasmid. 2000 Nov;44(3):285-91)。

#### 【0048】

また、宿主で複製できない複製起点、あるいは、宿主で複製出来ない複製起点と宿主への接合伝達能を有するプラスミドにsucE1遺伝子及び／又はmdh遺伝子を挿入して、得られたプラスミドを宿主に導入することによって、染色体上で増幅させる方法が考えられる。このようなプラスミドとしては、pSUP301 (Simo等, Bio/Technology 1, 784~791 (1983))、pK18mobまたはpK19mob (Schaefer等, Gene 145, 69~73 (1994))、pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA)、pCR2.1-TOP0 (Shuman (1994); Journal of Biological Chemistry 269: 32678~84; US-A 5487993)、pCR<sup>(R)</sup>Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534~541 (1993))、pEM1 (Schrumpf等, 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510~4516) またはpBGS8 (spratt等, 1986, Gene, 41: 337~342) 等が挙げられる。sucE1及び／又はmdh遺伝子を含むプラスミドベクターを細菌中に接合または形質転換によって導入し、各遺伝子を染色体に転移させる。接合法は、例えばSchaefer等 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756~759 (1994)) に記載されている。形質転換法は、例えばTheirbach等 (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356~362 (1988))、DunicanおよびShivinan (Bio/Technology 7, 1067~1070 (1989)) およびTauch等 (FEMS Microbiological Letters 123, 343~347 (1994)) に記載されている。

#### 【0049】

また、sucE1とmdhの発現を増強させる手段として、染色体DNA上またはプラスミド上のsucE1とmdhのプロモーター等の発現調節配列を、より強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、PS2プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128) 等に記載されている。前記強力なプロモーターは、構成発現型プロモーターであることがより好ましい。ここでいう構成発現型プロモーターとは、微好気誘導によって発現が変動しないプロモーターである。ここでいう微好気誘導とは、好気条件にて増殖させた菌体に嫌気条件下にてコハク酸生

10

20

30

40

50

産活性を付与するための微好気条件での培養である。微好気条件とは、通気時或いは無通気時に、溶存酸素濃度として2 ppm以下、好ましくは1 ppm以下、さらに好ましくは0.5 ppm以下であることが望ましい。また、嫌気条件とは、酸素以外のガスで窒素または炭酸ガス等のガスを吹き込んだ条件で、溶存酸素濃度として0.5 ppm以下の条件である。

#### 【0050】

微好気誘導によって発現が変動しないとは、微好気誘導前後のプロモーター活性の変動比が3倍以内であり、より好ましくは2倍以内であり、更に好ましくは1.5倍以内である。

構成発現型プロモーターとして具体的には、エロンゲーションファクターTu (EF-Tu) (配列番号45)、コシャペロニンGroES-シャペロニンGroEL (配列番号39)、チオレドキシンレダクターゼ (配列番号43)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (配列番号38)、ペルオキシレドキシン (配列番号40)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (配列番号42)、L-2,3-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ (配列番号41)、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ (配列番号44)、スーパーオキシドジスムターゼ (配列番号37)、等をコードする遺伝子のプロモーターが挙げられるが、この限りではない(W02006028063号公報、EP1697525号公報)。

#### 【0051】

なお、強力プロモーターへの置換は、sucE1、mdh遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

#### 【0052】

また、sucE1とmdhの発現を増強させる手段としては、これらの遺伝子の発現調節に関する因子、例えばオペレーターやリプレッサーを改変すること、又は強力なターミネーターを連結することによっても達成される(Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622)。また、国際公開W000/18935に開示されているように、目的遺伝子のプロモーター領域に塩基置換を導入し、よりコンセンサス配列に近づけることによっても、プロモーターを強化することが可能である。例えば、-35領域をTTGACA、又はTTGCCA配列に、-10領域をTATAAT、又はTATAAC配列に置換する。さらに、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。

#### 【0053】

また、遺伝子の発現の増強は、mRNAの生存時間を延長させることや、酵素タンパク質の細胞内での分解を防ぐことによっても達成可能である。sucE1とmdh遺伝子上流のプロモーター等の発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することも出来る。これらのプロモーター置換または改変により、sucE1とmdh遺伝子の発現が増強される。発現調節配列の置換は、例えば温度感受性プラスミドを用いて行うことができる。コリネ型酸菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2 (以上、特開2000-262288号公報)、pHSC4 (フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報) 等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細菌中で少なくとも25℃では自律複製することができるが、37℃では自律複製できない。なお、pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター) (〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

#### 【0054】

なお、発現調節配列の改変は、sucE1、mdh遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

#### 【0055】

〔他の性質の付与〕

本発明の細菌は、sucE1とmdhの発現上昇に加えて、ラクテートデヒドロゲナーゼ（LDH）活性が低減化するように改変されていてもよい。ここで、「ラクテートデヒドロゲナーゼ活性が低減化された」とは、LDH非改変株、例えば親株又は野生株と比較してLDH活性が低いことをいう。菌体当りのラクテートデヒドロゲナーゼ活性は、非改変株と比較して、10%以下に低減化されていることが好ましい。また、「低減化」には活性が完全に消失した場合も含まれる。LDH活性が低減化されたことは、公知の方法（L.Kanarek and R. L. Hill, J. Biol. Chem.239, 4202 (1964)）によりLDH活性を測定することによって確認することができる。LDH活性が低減化され、かつ、sucE1及びmdh遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、例えば後述の実施例のようにして、LDH遺伝子が破壊された細菌細菌を、sucE1、mdh遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することにより得ることができる。ただし、LDH活性低減化のための改変とsucE1、mdhの発現増強のため改変はどちらを先に

10

#### 【0056】

LDHの活性を低減化させるには、通常の変異処理法によって、染色体上のLDH遺伝子に、細胞中のLDH活性が低減化するような変異を導入すればよい。例えば、遺伝子組換えによって、染色体上のLDHをコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ（SD）配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、染色体上のLDHをコードする領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、また終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、一〜二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分あるいは全領域を欠失させることによって達成出来る（Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617 (1997)）。また、コード領域が欠失したような変異型LDHをコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、染色体上の正常型LDH遺伝子を置換すること（特開平11-206385号公報）、トランスポゾン、IS因子を該遺伝子に導入すること、あるいはSacB遺伝子を用いる方法（Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73）によってもLDH活性を低減化させることができる。

20

#### 【0057】

相同組換えを利用した遺伝子置換は既に確立しており、直鎖状DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある（米国特許第6303383号、又は特開平05-007491号公報）。

また、上記のような遺伝子破壊操作においては、遺伝子組み換えのマーカーとしてレバンシュークラーゼを用いることもできる（Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73）。

30

#### 【0058】

また、本発明の細菌は、sucE1、mdhの発現増強に加えて、ピルビン酸カルボキシラーゼ（PC）の活性が増強するように改変されていてもよい（特開平11-196888号公報）。「ピルビン酸カルボキシラーゼの活性が増強する」とは、PCの活性が野生株又は親株等の非改変株に比較して高いことをいう。PCの活性は例えば、NADHの減少を測定する方法により測定することができる。sucE1、mdh及びPC遺伝子の発現が増強された型細菌は、特開平11-196888号公報に記載の方法と同様にして、sucE1、mdh遺伝子及びPC遺伝子を細菌中で高発現させることにより作製することができる。

#### 【0059】

本発明の方法に使用されるPC遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、もしくは、PC活性を有するタンパク質をコードするDNA断片を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列にしたがって合成した遺伝子を使用することもできる。

40

#### 【0060】

PC遺伝子としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のPC遺伝子を用いることができる（Peters-Wendisch, P.G. et al. Microbiology, vol.144 (1998) p.915-927）（配列番号9）。また、PC遺伝子は、コードされるPCの機能、すなわち二酸化炭素固定に参与する性質を実質的に損なうことがない限り、変異体又は改変体であってもよい。

50

## 【0061】

また、コリネバクテリウム・グルタミカム以外の細菌、または他の微生物又は動植物由来のPC遺伝子を使用することもできる。特に、以下に示す微生物または動植物由来のPC遺伝子は、その配列が既知（以下に文献を示す）であり、ハイブリダイゼーションにより、あるいはPCR法によりそのORF部分を増幅することによって、取得することができる。

## 【0062】

ヒト [Biochem.Biophys.Res.Comm., 202, 1009-1014, (1994)]

マウス [Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 1766-1779, (1993)]

ラット [GENE, 165, 331-332, (1995)]

酵母；サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) [Mol.Gen.Genet., 10  
229, 307-315, (1991)]

シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) [DDBJ Accession No.;  
D78170]

バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) [GENE, 191, 47  
-50, (1997)]

リゾビウム・エトリ (*Rhizobium etli*) [J.Bacteriol., 178, 5960-5970, (1996)]

## 【0063】

PC遺伝子発現の増強は、上述したsucE1、mdh遺伝子の発現増強と同様にして行うことができる。

## 【0064】

20

本発明の細菌は、sucE1とmdhの発現上昇に加えて、アセチルCoAヒドロラーゼ(ACH)活性が低減化するように改変されていてもよい(WO2005/113744号公報)。

## 【0065】

「アセチルCoAヒドロラーゼ(ACH)活性」は、アセチルCoAと水から酢酸を生成する反応を触媒する活性をいい、ACH活性を低減化することにより、酢酸副生が低減することが知られている。「アセチルCoAヒドロラーゼ活性が低減化された」とは、ACH活性が、非改変株、例えば親株又は野生株の細菌の比活性よりも低いことをいう。菌体当たりのACH活性は非改変株と比較して、50%以下、好ましくは30%以下、さらに望ましくは菌体当たり10%以下に低減化されていることが好ましい。ACH活性は、Gergely,J.,らの方法(Gergely,J., Hele,P. & Ramkrishnan,C.V. (1952) J.Biol.Chem. 198 p323-334)を参考にして測定することが出来る。尚、「低減化」には活性が完全に消失した場合も含まれる。本発明のACH活性が低減化され、かつ、sucE1とmdh遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、ACH遺伝子が破壊された細菌を作製し、該細菌をsucE1、mdh遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することにより得ることができる。ただし、ACH活性低減化のための改変とsucE1、mdhの発現増強のため改変はどちらを先に行ってもよい。

30

## 【0066】

本発明の細菌は、sucE1とmdhの発現上昇に加えて、ホスホトランスアセチラーゼ(以下、PTA)、及びアセテートキナーゼ(以下、ACK)のいずれかの活性が低減化するように改変されていてもよい。ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)活性とは、アセチルCoAにリン酸を転移し、アセチルリン酸を生成する反応を触媒する活性(EC:2.3.1.8)を意味し、アセテートキナーゼ(ACK)活性とは、アセチルリン酸とADPから酢酸を生成反応を触媒する活性を意味(EC:2.7.2.1)する。「ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)活性が低減化した」とは、PTA非改変株と比較してPTA活性が低いことをいう。菌体当たりのPTA活性は、PTA非改変株や野生株と比較して低減化していればよいが、50%以下、さらに望ましくは10%以下に低減化されていることが好ましい。また、PTA活性は完全に欠損していてもよい。PTA活性が低減化したことは、Klotzschらの方法(Klotzsch, H. R., Meth Enzymol. 12, 381-386(1969))により、PTA活性を測定することによって確認することができる。また、「アセテートキナーゼ(ACK)活性が低減化した」とは、ACK非改変株と比較してACK活性が低いことをいう。菌体当たりのACK活性は、ACK非改変株や野生株と比較して低減化していればよいが、50%以下、さらに望ましくは10%以下に低減化されていることが好ましい

40

50

。また、ACK活性は完全に欠損していてもよい。ACK活性が低減化したことは、Irwin A. Roseの方法 (Rose, I.A., Meth. Enzymol. 1, 591-595(1955)) により、ACK活性を測定することによって確認することができる。

【0067】

本発明のPTA、ACKのいずれかの活性が低減化され、かつ、sucE1、mdh遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、例えばPTA、ACKのいずれかの遺伝子が破壊された細菌を作製し、該細菌をsucE1、mdh遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することにより得ることができる。ただし、PTA、ACKのいずれかの活性低減化のための改変とsucE1、mdhの発現増強のため改変はどちらを先に行ってもよい。

【0068】

本発明の細菌は、sucE1とmdhの発現上昇に加えて、ピルベートオキシダーゼ(POX)活性が低減化するように改変されていてもよい (WO2005/113745号)。

【0069】

「ピルベートオキシダーゼ活性」は、ピルビン酸と水から酢酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「ピルベートオキシダーゼ活性が低減化するように改変された」とは、POX活性が、POX非改変株と比較してPOX活性が低いことをいう。POX活性は非改変株と比較して、菌体当たり50%以下に低減化していることが好ましく、30%以下に低減化していることがより好ましく、10%以下に低減化していることが特に好ましい。「低減化」には活性が完全に消失した場合も含まれる。なお、活性の比較対照となる野生株のコリネ型細菌としては、例えば、野生株としてはブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869、非改変株としてはブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムΔldh株が挙げられる。POX活性は、Changらの方法 (Chang Y. and Cronan J. E. JR, J.Bacteriol.151,1279-1289 (1982)) により、活性を測定することによって確認することができる。本発明のPOX活性が低減化され、かつ、sucE1とmdh遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、POX遺伝子が破壊された細菌を作製し、該細菌をsucE1、mdh遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することにより得ることができる。ただし、POX活性低減化のための改変とsucE1、mdhの発現増強のため改変はどちらを先に行ってもよい。

【0070】

また有機酸がコハク酸の場合、本発明の細菌は、sucE1、mdhの発現増強に加えて、コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) の活性が増強するように改変されていてもよい (特開2005-095169号公報)。「コハク酸デヒドロゲナーゼの活性が増強する」とは、SDHの活性が野生株又は親株等の非改変株に比較して高いことをいう。SDHの活性は例えば、NADHの減少を測定する方法により測定することができる。sucE1、mdh及びSDH遺伝子の発現が増強されたコリネ型細菌は、特開平11-196888号公報に記載の方法と同様にして、sucE1、mdh遺伝子及びSDH遺伝子を細菌中で高発現させることにより作製することができる。

【0071】

本発明の方法に使用されるSDH遺伝子は、既にその塩基配列が決定されている遺伝子、もしくは、SDH活性を有するタンパク質をコードするDNA断片を微生物、動植物等の染色体より単離し、塩基配列を決定したものを使用することができる。また、塩基配列が決定された後には、その配列にしたがって合成した遺伝子を使用することもできる。コリネバクテリウム・グルタミカムのsdhオペロン (GenBank accession No.NCg10359 (sdhC) NCg10360 (sdhA) NCg10361 (sdhB))、及びブレビバクテリウム・フラバムのsdhオペロン (特開2005-095169号、EP1672077A1) の配列が開示されている。

一方、有機酸がリンゴ酸またはフマル酸の場合、本発明の細菌は、sucE1、mdhの発現増強に加えて、コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) の活性が低減化するように改変されていてもよい。エシェリヒア・コリでは、フマレートレダクターゼの活性が不十分である場合、嫌気条件下において、フマル酸の蓄積が増加することが知られている (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology(2002) 28, 325-332) 「コハク酸デヒドロゲナーゼの活性が低減化する」とは、SDHの活性が野生株又は親株等の非改変株に比較して低いことをいう。菌体当りのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、非改変株と比較して、10%

10

20

30

40

50

以下に低減化されていることが好ましい。SDHの活性は上述の方法にて測定することができる。

本発明の細菌は、上記「他の性質」を、1種有するものであってもよいし、任意の2種、又は3種以上有するものであってもよい。

#### 【0072】

〔有機酸の製造法〕

本発明の有機酸の製造法は、上記のような、有機酸生産能を有し、sucE1遺伝子及びmdh遺伝子の発現が増強するように改変された細菌または該細菌の処理物を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガスを含む反応液中で有機原料に作用させることによって有機酸を生成させ、該有機酸を採取する。

10

#### 【0073】

本発明の第一の形態では、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む培地で細菌を培養することにより、細菌の増殖と有機酸の生成が同時に行なわれる。この形態では、培地が前記反応液に相当する。尚、細菌の増殖と有機酸の生成が並行して行われてもよく、また、主として細菌が増殖する培養期と、主として有機酸が生成する培養期があってもよい。

#### 【0074】

また、本発明の第二の形態では、培地で培養して増殖させた菌体を、炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む反応液と共存させ、該反応液中で菌体を有機原料に作用させることによって有機酸を生成させる。この形態では、細菌の菌体の処理物を使用することもできる。菌体の処理物としては、例えば、菌体をアクリルアミド、カラギーナン等で固定化した固定化菌体、菌体を破碎した破碎物、その遠心分離上清、又はその上清を硫酸処理等で部分精製した画分等が挙げられる。

20

#### 【0075】

養に用いる細菌は、寒天培地等の固体培地で斜面培養したものであっても良いが、予め液体培地で培養（種培養）したものが好ましい。

#### 【0076】

なお、好気性細菌又は通性嫌気性細菌を用いる場合は、先ず菌体を好気的な条件で培養した後に、有機酸の生成反応に用いることが好ましい。また、従来の方法では、好気的な条件で培養した菌体を用いる場合は、菌体に有機酸生成活性を付与するために微好気誘導が必要であるが、本発明においては不要である。しかしながら、微好気誘導を行ってもよい。微好気誘導を行う場合は、菌の状態、微好気の度合いにより異なるが、15時間以内が好ましく、10時間以内がより好ましく、更に好ましくは4時間以内である。

30

#### 【0077】

培養に用いる培地は、通常微生物の培養に用いられる培地を用いることができる。例えば、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム等の無機塩からなる組成に、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等の天然栄養源を添加した一般的な培地を用いることができる。

#### 【0078】

前記本発明の第一の形態では、培地に添加する炭素源は、有機酸生成のための有機原料でもある。

40

前記本発明の第二の形態では、培養後の菌体は、遠心分離、膜分離等によって回収され、有機酸生成反応に用いられる。

#### 【0079】

本発明の方法に用いる有機原料としては、細菌が資化して有機酸を生成させうる炭素源であれば特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、グリセロール、シュクロース、サッカロース、デンプン、セルロース等の炭水化物；グリセリン、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、このうちグルコース、フルクトース、グリセロールが好ましく、特にグルコースが好ましい。

50

## 【0080】

また、上記発酵性糖質を含有する澱粉糖化液、糖蜜なども使用される。これらの発酵性糖質は、単独でも組み合わせても使用できる。上記有機原料の使用濃度は特に限定されないが、細菌の培養又は有機酸の生成を阻害しない範囲で可能な限り高くするのが有利である。通常、本発明の第1の形態では、有機原料の培地中の濃度は5～30% (W/V)、好ましくは10～20% (W/V) の範囲内である。また、本発明の第二の形態では、反応液中の有機原料の濃度は5～30% (W/V)、好ましくは10～20% (W/V) の範囲内である。また、培養又は反応の進行に伴う上記有機原料の減少にあわせ、有機原料の追加添加を行っても良い。

## 【0081】

上記炭酸イオン、重炭酸イオンまたは二酸化炭素ガス、および有機原料を含む反応液としては特に限定されず、例えば、細菌を培養するための培地であってもよいし、リン酸緩衝液等の緩衝液であってもよい。反応液は、窒素源や無機塩などを含む水溶液であることが好ましい。ここで、窒素源としては、本微生物が資化して有機酸を生成させる窒素源であれば特に限定されないが、具体的には、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、大豆加水分解物、カゼイン分解物、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの各種の有機、無機の窒素化合物が挙げられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カリウム、マンガン、鉄、亜鉛等の金属塩が用いられる。また、ビオチン、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等のビタミン類、ヌクレオチド、アミノ酸などの生育を促進する因子を必要に応じて添加する。また、反応時の発泡を抑えるために、培養液には市販の消泡剤を適量添加しておくことが望ましい。

## 【0082】

反応液のpHは、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等を添加することによって調整することができる。本反応におけるpHは、通常、pH5～10、好ましくはpH6～9.5であることが好ましいので、反応中も必要に応じて反応液のpHはアルカリ性物質、炭酸塩、尿素などによって上記範囲内に調節する。

## 【0083】

本発明で用いる反応液としては、水、緩衝液、培地等が用いられるが、培地が最も好ましい。培地には、例えば上記した有機原料と炭酸イオン、重炭酸イオン又は炭酸ガスを含むさせ、嫌気的条件下で反応させることができる。炭酸イオン又は重炭酸イオンは、中和剤としても用いることのできる炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウムから供給されるが、必要に応じて、炭酸若しくは重炭酸又はこれらの塩或いは炭酸ガスから供給することもできる。炭酸又は重炭酸の塩の具体例としては、例えば炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等が挙げられる。そして、炭酸イオン、重炭酸イオンは、0.001～5M、好ましくは0.1～3M、さらに好ましくは1～2Mの濃度で添加する。炭酸ガスを含む場合は、溶液1L当たり50mg～25g、好ましくは100mg～15g、さらに好ましくは150mg～10gの炭酸ガスを含むさせる。

## 【0084】

本反応に用いる細菌の生育至適温度は、通常、25℃～35℃である。反応時の温度は、通常、25℃～40℃、好ましくは30℃～37℃である。反応液中の菌体の量は、特に規定されないが、1～700g/L、好ましくは10～500g/L、さらに好ましくは20～400g/Lが用いられる。反応時間は1時間～168時間が好ましく、3時間～72時間がより好ましい。また、反応は、バッチ式でもよく、カラム式でもよい。

## 【0085】

細菌の培養時は、好気条件で行うことが好ましい。一方、有機酸の生成反応は、好気条件で行ってもよいが、微好気条件または嫌気条件化で行ってもよい。微好気条件または嫌気条件化での反応には、例えば反応容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス等の不

活性ガスを反応液に供給して反応させる、炭酸ガス含有の不活性ガスを反応液に通気する等の方法を用いることができる。

#### 【0086】

反応液（培養液）中に蓄積した有機酸は、常法に従って、反応液より分離・精製することができる。具体的には、遠心分離、ろ過等により菌体等の固形物を除去した後、イオン交換樹脂等で脱塩し、その溶液から結晶化あるいはカラムクロマトグラフィーによりコハク酸を分離・精製することができる。

#### 【0087】

さらに本発明において、目的とする有機酸がコハク酸である場合には、上記した本発明の方法によりコハク酸を製造した後に、得られたコハク酸を原料として重合反応を行うことによりコハク酸含有ポリマーを製造することができる。近年、環境に配慮した工業製品が数を増す中、植物由来の原料を用いたポリマーに注目が集まってきており、本発明において製造されるコハク酸は、ポリエステルやポリアミドといったポリマーに加工されて用いる事が出来る（特開平4-189822）。コハク酸含有ポリマーとして具体的には、ブタンジオールやエチレングリコールなどのジオールとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリエステル、ヘキサメチレンジアミンなどのジアミンとコハク酸を重合させて得られるコハク酸ポリアミドなどが挙げられる。また、本発明の製造法により得られるコハク酸もしくはコハク酸含有ポリマー、又はこれらを含む組成物は、食品添加物や医薬品、化粧品などに用いることができる。

#### 【実施例】

#### 【0088】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 【0089】

〔実施例1〕 sucE1遺伝子、mdh遺伝子増強株の構築

<sucE1増強プラスミドの構築>

ネイティブプロモーターをチオレドキシンレダクターゼ(TRR)プロモーターに置換したsucE1遺伝子断片の取得は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032のゲノム配列（GenBank Database Accession No. NC\_003450）のTRRとsucE1遺伝子周辺の塩基配列を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いた、クロスオーバーPCRで取得した。

#### 【0090】

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号17と18に示すプライマーを用いて、PCRによりネイティブプロモーターを含むsucE1断片を増幅した。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、94℃で3分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合60℃ 30秒、伸長72℃ 1分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。PCR産物は、Sse8387Iで処理後、pVK9のSse8387I部位に挿入し、ネイティブプロモーターを含むsucE1が搭載されたプラスミドpVK9sucE1を構築した。該プラスミドはXbaIとBstXIにて処理することにより、ネイティブプロモーターを含むsucE1のORFの一部を切り出すことが可能である。

#### 【0091】

また、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号19と20に示すプライマーを用いて、PCRによりsucE1のN末端側を含む断片(A)を増幅した。一方、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号21と22に示すプライマーを用いて、PCRによりチオレドキシンレダクターゼ (TRR) プロモーター断片(B)を増幅した。いずれも、PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(TaKaRa)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 20秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物(A)及び(B)を得た。配列番号19と22は互いに相補的である。

#### 【0092】

次に、断片(A)と(B)を鋳型にして、配列番号20と21に示すプライマーを用いて、クロス

オーバーPCRによりネイティブプロモーターがTRRプロモーターで置換されたsucE1のN末端側を含む断片を構築した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 40秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製し、XbaIとBstXIにて処理後、pVK9sucE1のXbaIとBstXI部位に挿入することにより、ネイティブプロモーターがTRRプロモーターで置換されたsucE1増幅プラスミド：pVK9:PTRR-sucE1を構築した。

#### 【0093】

なお、pVK9は、pHSG299(タカラバイオ)のAvaII部位を平滑末端化し、pHK4(特開平05-007491)に含まれるコリネ型細菌内で自律複製可能な領域をBamHIおよびKpnIで切り出し平滑末端化した断片を挿入したシャトルベクターである。

#### 【0094】

<mdh増強プラスミドの構築>

ネイティブプロモーターをエロンゲーションファクターTu(ET-Tu)プロモーターに置換したmdh遺伝子断片の取得は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032のゲノム配列(GenBank Database Accession No. NC\_003450)のEF-Tuとmdh遺伝子周辺の塩基配列を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いた、クロスオーバーPCRで取得した。

#### 【0095】

具体的には、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号23と24に示すプライマーを用いて、PCRによりネイティブプロモーターを含むmdh断片を増幅した。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、94℃で2分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合57℃ 30秒、伸長72℃ 1分30秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。XbaIとSse8387Iで処理後、pVK9のXbaIとSse8387I部位に挿入し、ネイティブプロモーターを含むmdhが搭載されたプラスミドpVK9mdhを構築した。該プラスミドはBamHIとMluIにて処理することにより、ネイティブプロモーターを含むmdhのORFの一部を切り出すことが可能である。

#### 【0096】

また、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号25と26に示すプライマーを用いて、PCRによりmdhのN末端側を含む断片(C)を増幅した。一方、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号27と28に示すプライマーを用いて、PCRによりEF-Tuプロモーター断片(D)を増幅した。いずれも、PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 20秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物(C)及び(D)を得た。配列番号25と28は互いに相補的である。

#### 【0097】

次に、断片(C)と(D)を鋳型にして、配列番号27と26に示すプライマーを用いて、クロスオーバーPCRによりネイティブプロモーターがEF-Tuプロモーターで置換されたmdhのN末端側を含む断片を構築した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 40秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製し、BamHIとMluIにて処理後、pVK9mdhのBamHIとMluI部位に挿入することにより、ネイティブプロモーターがEF-Tuプロモーターに置換されたmdh増幅プラスミド：pVK9:PEFTu-mdhを構築した。

#### 【0098】

<sucE1+mdh増強プラスミドの構築>

sucE1とmdhの両方を搭載したプラスミドは、次のように構築した。

まず、ネイティブプロモーターをET-Tuプロモーターに置換したmdh遺伝子断片の取得は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032のゲノム配列(GenBank Database Accession No. NC\_003450)のEF-Tuとmdh遺伝子周辺の塩基配列を参考に設

10

20

30

40

50

計した合成DNAをプライマーとして用いた、クロスオーバーPCRで取得した。

#### 【0099】

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号25と29に示すプライマーを用いて、PCRによりmdhのorfを含む断片(G)を増幅した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 1分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物(G)を得た。一方、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体を鋳型にして、配列番号30と28に示すプライマーを用いて、PCRによりEF-Tuプロモーター断片(H)を増幅した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 20秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物(H)を得た。配列番号25と27は互いに相補的である。

10

#### 【0100】

次に、断片(G)と(H)を鋳型にして、配列番号29と30に示すプライマーを用いて、クロスオーバーPCRによりネイティブプロモーターがEF-Tuプロモーターで置換されたmdhのorfを含む断片を構築した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、98℃で2分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合55℃ 5秒、伸長72℃ 1分20秒からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製し、SpeIとSse8387Iにて処理後、pVK9:PTRR-sucE1のSpeIとSse8387I部位に挿入することにより、sucE1とmdhの両方を搭載したプラスミド：pVK9:PTRR-sucE1+PEFTu-mdhを構築した。

20

#### 【0101】

MJ-233株以外の菌株、例えばコリネバクテリウム・グルタミカムAJ110655株の染色体DNAを鋳型に用いても、同様にしてsucE1とmdhの両方を搭載したプラスミドを構築することができる。

#### 【0102】

<ldh遺伝子破壊株の構築>

(A) ldh遺伝子破壊用断片のクローニング

ldh遺伝子のorfを欠失した遺伝子断片は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032のゲノム配列 (GenBank Database Accession No. NC\_003450) のNCg12817周辺の塩基配列を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いたクロスオーバーPCRで取得した。ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株 (ATCC13869) の染色体DNAを鋳型として、配列番号31、32の合成DNAをプライマーとしてPCRを行いldh遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、ldh遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号33、34の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、94℃で3分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合60℃ 30秒、伸長72℃ 1分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、各々のPCR産物を得た。配列番号32、33は互いに相補的である。次に内部配列を欠失したldh遺伝子断片を得るために、上記ldh N末側およびC末側の遺伝子産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列番号35、36の合成DNAをプライマーとしてPCRを行いldhのorfを欠失した増幅産物を得た。PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(Takara Bio Inc.)を用い、94℃で3分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合58℃ 30秒、伸長72℃ 2分からなるサイクルを30回繰り返すことにより、目的のPCR産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後BamHIで消化した後、遺伝子破壊用ベクターpBS4S (W02007046389 A1)のBamHI部位に挿入することによって、ldh遺伝子破壊用プラスミドpBS4SΔldh56を得た。該プラスミドの構築を図1に示す。

30

40

#### 【0103】

(B) ldh破壊株の作製

上記(A)で得られたpBS4SΔldh56はコリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域

50

を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233を電気パルス法により高濃度のプラスミドpBS4S  $\Delta$ ldh56を用いて形質転換し、カナマイシン50  $\mu$ g/mlを含むCM-Dex寒天培地（グルコース 5g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2 g/L、pH7.5(KOH)に寒天1.5%を含む）に塗布し、31.5℃で約24時間培養した。MJ-233の形質転換に用いたプラスミドは、damメチラーゼ欠損株であるエシェリヒア・コリSCS110 (stratagene)をpBS4S  $\Delta$ ldh56で形質転換し、この株から抽出したものをを用いた。出現したコロニーは該プラスミドのldh遺伝子断片とブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組換えを起こした結果、同ゲノムに該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびsacB遺伝子が挿入されている。

10

#### 【0104】

次にこれらの一回目の組換え体を、カナマイシンを含まないCM-Dex液体培地にて31.5℃で一晩培養し適当に希釈した後、カナマイシンを含まない10%ショ糖含有Dex-S10寒天培地（ショ糖 100g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、ビオチン 10  $\mu$ g/L、pH7.5(KOH)に寒天1.5%を含む）に塗布にし、31.5℃にて約24時間培養し、ショ糖に耐性を示すクローンを取得した。これらの株は、正常なsacB遺伝子を発現しなくなった株であり、その中には2回目の相同組換えによりpBS4S  $\Delta$ ldh56が脱落した株が含まれる。さらに、2回目の相同組換えを起こした株は、ldh遺伝子がpBS4S  $\Delta$ ldh56に由来する欠失型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。ldh遺伝子の変異型であるか野生型であるかの確認は、Dex-S10寒天培地にて培養して得られた菌体より染色体DNAを抽出し、PCRにてldh遺伝子の検出を行うことによって容易に確認できる。得られた2回組換え株のうち、ldh遺伝子をPCRで増幅するためのプライマー（配列番号31、34）を用いて増幅した際、MJ-233株の染色体DNAを鋳型にしたものよりもPCR産物の大きさが小さいものをldh欠損株として以降の実験に使用した。取得したldh欠損株をAJ110655と命名した。

20

#### 【0105】

<sucE1増幅株、mdh増幅株、sucE1+mdh増幅株の構築>

30

上記で得られたpVK9:PTRR-sucE1、pVK9:PEFTu-mdh、pVK9:PTRR-sucE1+PEFTu-mdhおよびpVK9を用いて、コリネバクテリウム・グルタミカムAJ110655株を電気パルス法により形質転換し、カナマイシン25  $\mu$ g/mlを含むCM-Dex寒天培地に塗布し、31.5℃で約24時間培養することで、それぞれのプラスミド導入株を得た。出現したコロニーを純化し、定法によりプラスミドを抽出することで、目的のプラスミドが導入されていることを確認した。

#### 【0106】

〔実施例2〕sucE1、mdh増幅株によるコハク酸生産

コリネバクテリウム・グルタミカムAJ110655株に、pVK9、sucE1遺伝子単独増強用プラスミドpVK9:PTRR-sucE1、mdh遺伝子単独増強用プラスミドpVK9:PEFTu-mdh、又はsucE1、mdh遺伝子同時増強用プラスミドpVK9:PTRR-sucE1+PEFTu-mdhを導入した株を用いて、コハク酸生産のための培養を以下のように行った。CM-Dexプレート培地にて培養して得たそれぞれの菌体をシード培地 20ml（グルコース 25g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L、尿素 4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L、ビオチン 200  $\mu$ g/L、VB1・HCl 200  $\mu$ g/L、イーストエキストラクト 1g/L、カザミノ酸 1g/L、カナマイシン25mg/L）に接種し、好気条件にて31.5℃にて坂口フラスコで約5時間（好気培養）または16時間（微好気誘導培養）振とう培養を行った。

40

#### 【0107】

その後、シード培養液700  $\mu$ lを分取し、直ちにマイクロチューブ（エッペンドルフ）中のメイン培地 700  $\mu$ l（グルコース200g/L、亜硫酸Na 30g/Lをフィルターろ過したものに、乾熱滅菌した炭酸マグネシウムを終濃度143g/Lとなるように混合）と混合し、31.5℃で

50

振とう培養を行った。48時間後に培養を停止し、生成したコハク酸量を、液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムはShim-pack SCR-102H (Simazu)を二本直列接続したものを、サンプルは5mM p-トルエンスルホン酸を用いて40℃で溶出した。溶出液を5mM p-トルエンスルホン酸および100 μM EDTAを含む20mM Bis-Tris水溶液を用いて中和し、CDD-10AD (Simazu)にて電気伝導度を測定することによりコハク酸を測定した。

#### 【0108】

微好気誘導を行った条件、すなわちシード培養16時間の微好気培養菌体を用いた場合、全ての形質転換株にて菌体当たりのコハク酸蓄積量が同等であった。一方微好気誘導を行わない条件、すなわちシード培養5時間の好気培養菌体を用いた場合、pVK9導入株、pVK9:PTRR-sucE1導入株、pVK9:PEFTu-mdh導入株はいずれもメイン培養時にコハク酸生成が認められないのに対し、pVK9:PTRR-sucE1+PEFTu-mdh導入株のみ微好気誘導菌体を用いた場合以上にコハク酸生成が認められた。結果を表1に示す。

#### 【0109】

この結果より、sucE1とmdhと同時に増強することにより、微好気誘導を行わない条件でコハク酸生成活性が付与されることが示され、コハク酸の発酵生産に有効であることが示された。

#### 【0110】

#### 【表1】

| 菌株                                 | コハク酸蓄積量 (g/L/0. D. 620=1あたり) |       |
|------------------------------------|------------------------------|-------|
|                                    | 好気菌体                         | 微好気菌体 |
| AJ110655/pVK9                      | 0.6                          | 1.6   |
| AJ110655/pVK9:PTRR-sucE1           | 0.7                          | 1.8   |
| AJ110655/pVK9:PEFTu-mdh            | 0.5                          | 1.9   |
| AJ110655/pVK9:PTRR-sucE1+PEFTu-mdh | 2.0                          | 1.7   |

#### 【0111】

#### 〔配列表の説明〕

配列番号1：sucE1遺伝子増幅用プライマー

配列番号2：sucE1遺伝子増幅用プライマー

配列番号3：B. flavum MJ-233のsucE1遺伝子の塩基配列

配列番号4：上記sucE1遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号5：C. glutamicum ATCC13032のsucE1遺伝子

配列番号6：上記sucE1遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号7：C. efficiens YS314由来のsucE1遺伝子の塩基配列

配列番号8：上記sucE1遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号9：C. glutamicumのPC遺伝子の塩基配列

配列番号10：上記PC遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号11：C. diphtheriae gravis NCTC13129のsucE1遺伝子がコードする塩基配列

配列番号12：上記sucE1遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号13：B. flavum MJ-233のmdh遺伝子の塩基配列

配列番号14：上記mdh遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号15：mdh遺伝子増幅用プライマー

配列番号16：mdh遺伝子増幅用プライマー

配列番号17：ネイティブプロモーターを含むsucE1断片増幅用プライマー

配列番号18：ネイティブプロモーターを含むsucE1断片増幅用プライマー

配列番号19：sucE1のN末端側を含む断片(A)増幅用プライマー

配列番号20：sucE1のN末端側を含む断片(A)増幅用プライマー

配列番号21：TRRプロモーター断片(B)増幅用プライマー

配列番号22：TRRプロモーター断片(B)増幅用プライマー配列番号23：ネイティブプロモーターを含むmdh断片増幅用プライマー

- 配列番号24：ネイティブプロモーターを含むmdh断片増幅用プライマー  
配列番号25：mdhのN末端側を含む断片(C)又は(G)増幅用プライマー  
配列番号26：mdhのN末端側を含む断片(C)増幅用プライマー  
配列番号27：EF-Tuプロモーター断片(D)増幅用プライマー  
配列番号28：EF-Tuプロモーター断片(D)又は(H)増幅用プライマー  
配列番号29：mdh遺伝子を含む断片(G)増幅用プライマー  
配列番号30：EF-Tuプロモーター断片(H)増幅用プライマー  
配列番号31：ldh遺伝子破壊断片(N末端側)作製用プライマー  
配列番号32：ldh遺伝子破壊断片(N末端側)作製用プライマー  
配列番号33：ldh遺伝子破壊断片(C末端側)作製用プライマー  
配列番号34：ldh遺伝子破壊断片(C末端側)作製用プライマー  
配列番号35：ldh遺伝子破壊断片作製用プライマー  
配列番号36：ldh遺伝子破壊断片作製用プライマー  
配列番号37：C. glutamicum ATCC13032のスーパーオキシドジスムターゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号38：C. glutamicum ATCC13032のホスホグリセリン酸ムターゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号39：C. glutamicum ATCC13032のGroES-GroELオペロンプロモーターの塩基配列  
配列番号40：C. glutamicum ATCC13032のペルオキシレドキシン遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号41：C. glutamicum ATCC13032のブタンジオールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号42：C. glutamicum ATCC13032のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号43：C. glutamicum ATCC13032のチオレドキシンレダクターゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号44：C. glutamicum ATCC13032のフルクトースビスリン酸アルドラーゼ遺伝子プロモーターの塩基配列  
配列番号45：B. flavum MJ-233のEF-Tu遺伝子プロモーターの塩基配列

10

20

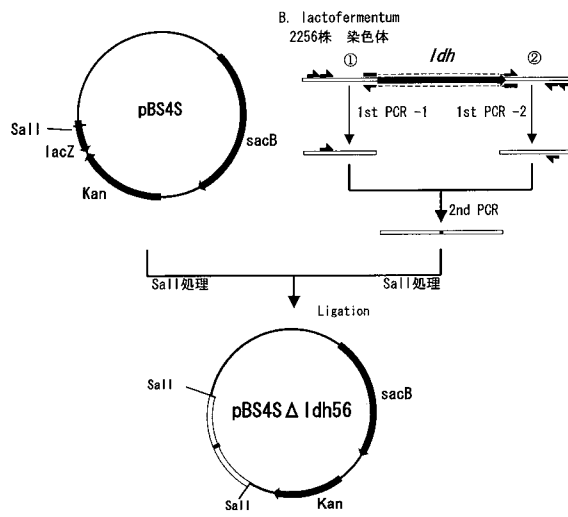
## 【産業上の利用可能性】

30

## 【0112】

本発明の製造方法によれば、好気培養菌体を用いて、微好気誘導の必要なく、有機原料より迅速かつ高効率で有機酸を製造することができる。得られた有機酸は食品添加物や医薬品、化粧品等に用いることができる。また、得られた有機酸を原料として重合反応を行うことにより有機酸含有ポリマーを製造することもできる。

【図 1】



【配列表】

0005493854000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 三原 洋子

日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 菅原 洋平

(56)参考文献 特開2002-191370 (JP, A)

特開2004-513603 (JP, A)

特開2006-320208 (JP, A)

国際公開第2007/046389 (WO, A1)

Biotechnol. Lett., 2006年, Vol.28, pp.89-93

Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003年, Vol.62, pp.99-109

Journal of Biotechnology, 2011年, Vol.154, pp.25-34

化学と生物, 2012年, Vol.50, No.2, pp.111-118

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 1/00-41/00

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

Caplus/WPIDS/MEDLINE/BIOSIS (STN)