

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-101875
(P2006-101875A)

(43) 公開日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 5 0
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B O 6 4
C 1 2 P 13/14 (2006.01)	C 1 2 P 13/14 A	4 B O 6 5
C 1 2 R 1/15 (2006.01)	C 1 2 P 13/14 A	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-262178 (P2005-262178)	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成17年9月9日(2005.9.9)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	特願2004-264458 (P2004-264458)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(32) 優先日	平成16年9月10日(2004.9.10)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	中村 純 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
		(72) 発明者	平野 聖子 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

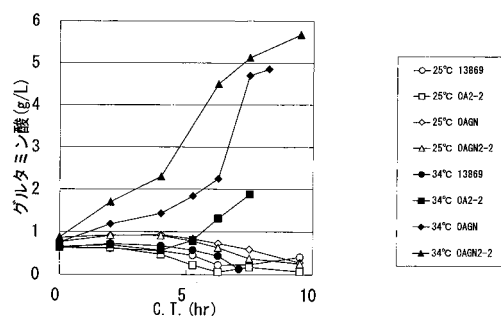
(54) 【発明の名称】 L-グルタミン酸生産菌及びL-グルタミン酸の製造方法

(57) 【要約】

【課題】効率よくL-グルタミン酸を製造する。

【解決手段】L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ染色体上の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニットをコードするodhA遺伝子のコード領域内、または発現制御領域内に変異が導入されたことにより、菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が、非改変株または野生株の菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の二分の一以下に低下したことを特徴とするコリネ型細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-グルタミン酸を回収する。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ染色体上の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニットをコードするodhA遺伝子のコード領域内、または発現制御領域内に変異が導入されたことにより、菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が、非改変株または野生株の菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の二分の一以下に低下したことを特徴とするコリネ型細菌。

【請求項 2】

前記odhA遺伝子が以下の(A)~(D)のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子である、請求項1に記載のコリネ型細菌： 10

(A) 配列番号10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(B) 配列番号10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質。

(C) 配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(D) 配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質。 20

【請求項 3】

前記数個が2~20個である、請求項2に記載のコリネ型細菌。

【請求項 4】

前記odhA遺伝子が以下の(a)~(d)のいずれかに記載の遺伝子である、請求項1に記載のコリネ型細菌：

(a) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443~4213の塩基配列を有する遺伝子、

(b) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443~4213の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。 30

(c) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号551~4213の塩基配列を有する遺伝子、

(d) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号551~4213の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 5】

前記変異が前記odhA遺伝子のチアミンピロリン酸結合領域をコードする領域に導入されたことを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。 40

【請求項 6】

前記変異が、配列番号9に記載の塩基配列において、2534-2548番目の領域に導入されたことを特徴とする、請求項1~4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。

【請求項 7】

前記変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、698-702番目のアミノ酸残基のうちいずれか1以上のアミノ酸残基を欠失させる変異である、請求項1~4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。

【請求項 8】

前記変異が配列番号10に記載のアミノ酸配列において、698番目のLys残基、699番目のL 50

eu残基、700番目のArg残基、702のTyr残基から選択される残基を他のアミノ酸に置換する変異である、請求項1～4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。

【請求項9】

前記変異が、配列番号9に記載の塩基配列において、1094-1111番目の領域に導入されたことを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。

【請求項10】

前記変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、218～224番目のアミノ酸残基のうちの1または2以上のアミノ酸残基を欠失させる変異である、請求項1～4のいずれか1項に記載のコリネ型細菌。

【請求項11】

請求項1～10のいずれか1項に記載のコリネ型細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体からL-グルタミン酸を回収することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【請求項12】

下記(e)～(f)のいずれかに記載の遺伝子である、変異型 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子：

(e) 配列番号11、13、もしくは15の塩基番号443～4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号443～4210に示す塩基配列を有する遺伝子

(f) 配列番号11、13、もしくは15の塩基番号443～4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号443～4210に示す塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

(g) 配列番号11、13、もしくは15の塩基番号551～4213、または配列番号44、46、もしくは48に示す塩基配列の塩基番号551～4210の塩基配列を有する遺伝子、又は

(h) 配列番号11、13、もしくは15の塩基番号551～4213、または配列番号44、46、もしくは48に示す塩基配列の塩基番号551～4210の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項13】

下記(E)～(H)のいずれかに記載のタンパク質である変異型 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ：

(E) 配列番号12、14、16、45、47又は49に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(F) 配列番号12、14、16、45、47又は49に示すアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質、

(G) 配列番号12、45、47又は49に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1256のアミノ酸配列、配列番号14に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1255のアミノ酸配列、または配列番号16に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1254のアミノ酸配列を有するタンパク質、

10

20

30

40

50

(H) 配列番号12、45、47又は49に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1256のアミノ酸配列、配列番号14に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1255のアミノ酸配列、または配列番号16に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1254のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2_o及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、発酵工業に関し、詳しくは、L-グルタミン酸の製造法及びそれに用いる細菌に関する。L-グルタミン酸は調味料原料等として広く用いられる。

【背景技術】

【0002】

従来、L-グルタミン酸は、L-グルタミン酸生産能を有するブレヴィバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのコリネ型細菌は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。

【0003】

20

また、組換えDNA技術によりL-グルタミン酸の生合成酵素の活性を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。例えば、クエン酸シンターゼ遺伝子を増幅したコリネ型細菌(特許文献1)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼなどの遺伝子を増幅したコリネ型細菌(特許文献2)が報告されている。

【0004】

発酵法による物質生産において、目的物質を充分量確保するためには、微生物の菌体量を確保する必要があり、微生物の生育を低下させず、目的物質の生合成を強化した菌株を育種する必要がある。L-グルタミン酸生産においては、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼを低下させることが好適なことが明らかになっているが(特許文献3、特許文献4)、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損させると、TCAサイクルにより得られる生体エネルギーが減少し生育が遅延することによって、十分な菌体量が得られず、結果として十分なL-グルタミン酸の収量が得られないという改善すべき点があった。

30

【特許文献1】特公平7-121228号公報

【特許文献2】特開2000-106869号公報

【特許文献3】特開平6-237779号公報

【特許文献4】国際公開95/34672号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、コリネ型細菌を用いたL-グルタミン酸の製造において、L-グルタミン酸生産性を向上させる新規な技術を提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、L-グルタミン酸分解活性が低下し、かつ、通常の増殖能を有する変異体を得ることができれば、そのような変異体を用いることにより効率よくL-グルタミン酸を生産できると考えた。このような考えに基いて鋭意検討した結果、本発明者らは、コリネ型細菌の染色体上の α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE1_oサブユニットをコードするodhA遺伝子に変異を導入することによって、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下し、かつ、野生株同等の生育能を保持した変異株を取得した。このような変異株が高いL-グルタミン酸生産能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

50

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ染色体上の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニットをコードするodhA遺伝子のコード領域内、または発現制御領域内に変異が導入されたことにより、菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が、非改変株または野生株の菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の二分の一以下に低下したことを特徴とするコリネ型細菌。

(2) 前記odhA遺伝子が以下の(A)~(D)のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子である、(1)のコリネ型細菌：

(A) 配列番号10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(B) 配列番号10に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質。

(C) 配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(D) 配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質。

(3) 前記数個が2~20個である、(2)のコリネ型細菌。

(4) 前記odhA遺伝子が以下の(a)~(d)のいずれかに記載の遺伝子である、(1)のコリネ型細菌：

(a) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443~4213の塩基配列を有する遺伝子、

(b) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443~4213の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

(c) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号551~4213の塩基配列を有する遺伝子、

(d) 配列番号9に示す塩基配列の塩基番号551~4213の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE10サブユニット活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

(5) 前記変異が前記odhA遺伝子のチアミンピロリン酸結合部位をコードする領域に導入されたことを特徴とする(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

(6) 前記変異が、配列番号9に記載の塩基配列において、2534-2548番目の領域に導入されたことを特徴とする、(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

(7) 前記変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、698-702番目のアミノ酸残基のうちいずれか1以上のアミノ酸残基を欠失させる変異である、(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

(8) 前記変異が配列番号10に記載のアミノ酸配列において、698番目のLys残基、699番目のLeu残基、700番目のArg残基、702のTyr残基から選択される残基を他のアミノ酸に置換する変異である、(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

(9) 前記変異が、配列番号9に記載の塩基配列において、1094-1111番目の領域に導入されたことを特徴とする、(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

(10) 前記変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、218~224番目のアミノ酸残基のうち1または2以上のアミノ酸残基を欠失させる変異である、(1)~(4)のいずれかのコリネ型細菌。

10

20

30

40

50

(11)(1)～(10)のいずれかのコリネ型細菌を培地で培養して、L-グルタミン酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体からL-グルタミン酸を回収することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

(12)下記(e)～(f)のいずれかに記載の遺伝子である、変異型 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子：

(e)配列番号11、13、もしくは15の塩基番号443～4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号443～4210に示す塩基配列を有する遺伝子

(f)配列番号11、13、もしくは15の塩基番号443～4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号443～4210に示す塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

(g)配列番号11、13、もしくは15の塩基番号551～4213、または配列番号44、46、もしくは48に示す塩基配列の塩基番号551～4210の塩基配列を有する遺伝子、又は

(h)配列番号11、13、もしくは15の塩基番号551～4213、または配列番号44、46、もしくは48に示す塩基配列の塩基番号551～4210の塩基配列を有するポリヌクレオチド又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質をコードする遺伝子。

(13)下記(E)～(H)のいずれかに記載のタンパク質である変異型 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ：

(E)配列番号12、14、16、45、47又は49に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(F)配列番号12、14、16、45、47又は49に示すアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質、

(G)配列番号12、45、47又は49に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1256のアミノ酸配列、配列番号14に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1255のアミノ酸配列、または配列番号16に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1254のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(H)配列番号12、45、47又は49に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1256のアミノ酸配列、配列番号14に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1255のアミノ酸配列、または配列番号16に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37～1254のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2₀及びE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の二分の一以下の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を示すタンパク質。

【発明の効果】

【0008】

本発明の変異株を用いることにより、L-グルタミン酸を効率よく生産することができる。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】

< 1 > 本発明のコリネ型細菌

本発明のコリネ型細菌は、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌であって、生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ染色体上の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（以下、 - KGDHとも呼ぶ）のE1 α サブユニットをコードするodhA遺伝子のコード領域内、または発現制御領域内に変異が導入されたことにより、菌体内 - KGDH活性が、非改変株または野生株の菌体内 - KGDH活性の二分の一以下に低下したことを特徴とするコリネ型細菌である。 10

【0011】

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来プレバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0012】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム 20
 コリネバクテリウム・カルナエ
 コリネバクテリウム・グルタミカム
 コリネバクテリウム・リリウム
 コリネバクテリウム・メラセコーラ
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス（コリネバクテリウム・エフィシエンス）
 コリネバクテリウム・ハーキュリス
 プレバクテリウム・ディバリカタム
 プレバクテリウム・フラバム
 プレバクテリウム・インマリオフィラム
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム） 30
 プレバクテリウム・ロゼウム
 プレバクテリウム・サッカロリティカム
 プレバクテリウム・チオゲニタリス
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス
 プレバクテリウム・アルバム
 プレバクテリウム・セリヌム
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム
 具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

【0013】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870 40
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060, ATCC13869
 コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990
 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868
 プレバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020
 プレバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-2205) 50

ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ATCC13869

ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871、ATCC6872

ブレバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

10

【0014】

これらを手に入れるには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、1987年10月27日付けで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FERM BP-1539の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されている。また、AJ12418株は、1989年1月5日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2205の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されて

20

【0015】

本発明において、「L-グルタミン酸生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-グルタミン酸を蓄積する能力をいう。このL-グルタミン酸生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。さらに、後述するようにして - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのサブユニットE1 α をコードするodhAに変異が導入されることによって、L-グルタミン酸生産能が付与されてもよい。

【0016】

育種によってL-グルタミン酸生産能を付与するための方法としては、例えば、L-グルタミン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現を増強するように改変する方法を挙げることができる。L-グルタミン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、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、ホスホグリセルムターゼ、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、フルトースビス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などが挙げられる。

30

【0017】

これらの遺伝子の発現を増強するための方法としては、これらの遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子配列を少なくとも含むプラスミドに組込み、該プラスミドを菌体内に導入すること、または、これらの遺伝子を染色体上で接合、転移等により多コピー化すること、またこれらの遺伝子のプロモーター領域に変異を導入することにより達成することもできる（国際公開パンフレットW0/0018935号参照）。

40

【0018】

上記プラスミドを用いるか、または染色体上で多コピー化させる場合、これらの遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌において機能するものであればいかなるプロモーターであっても良く、例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、tr

50

cプロモーター、tacプロモーター、PS2プロモーターなどが挙げられる。また、用いる遺伝子自身のプロモーターであってもよい。プロモーターを適宜選択することによっても、遺伝子の発現量の調節が可能である。

以上のような方法により、クエン酸シントラーゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び/又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増強するように改変された微生物としては、特開平2001-333769号公報、特開2000-106869号公報、特開2000-189169号公報、特開2001-333769等に記載された微生物が例示できる。

【0019】

L-グルタミン酸生産能を付与するための改変は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることにより行ってもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、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トラーゼ、アセト乳酸シントラーゼ、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などが挙げられる。

上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、染色体上の上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損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、染色体上の酵素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、染色体上の酵素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)、1~2塩基を付加または欠失させるフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分を欠失させることによっても達成出来る。(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酵素をコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、該遺伝子で染色体上の正常遺伝子を置換することによっても酵素活性を低下または欠損させることができる。

【0020】

L-グルタミン酸生産能を付与または増強する別の方法として、有機酸アナログや呼吸阻害剤などへの耐性を付与する方法や細胞壁合成阻害剤に対する感受性を付与する方法も挙げられる。例えば、ベンゾピロンまたはナフトキノン類に耐性を付与する方法(特開昭56-1889)、HOQNO耐性を付与する方法(特開昭56-140895)、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法(特開昭57-2689)、グアニジン耐性を付与する方法(特開昭56-35981)、ペニシリンに対する感受性を付与する方法(特開平4-88994)などが挙げられる。

このような耐性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

ブレバクテリウム・フラバムAJ11355(FERM P-5007; 特開昭56-1889号公報参照)

コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11368(FERM P-5020; 特開昭56-1889号公報参照)

ブレバクテリウム・フラバムAJ11217(FERM P-4318; 特開昭57-2689号公報参照)

コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11218(FERM P-4319; 特開昭57-2689号公報参照)

ブレバクテリウム・フラバムAJ11564(FERM P-5472; 特開昭56-140895号公報参照)

ブレバクテリウム・フラバムAJ11439(FERM P-5136; 特開昭56-35981号公報参照)

コリネバクテリウム・グルタミカムH7684(FERM BP-3004; 特開平04-88994号公報参照)

【0021】

本発明のコリネ型細菌は、上記のようなL-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌において、染色体上のKGDHのE10サブユニットをコードするodhA遺伝子に変異を導入し、変異が導入されたコリネ型細菌の中から、生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ、菌体内KGDH活性が、非改変株または野生株の菌体内KGDH活性の二分の一以下に低下したものを選択することによって得ることができる。なお、本発明のコリネ型細菌の育種に際しては、L-グルタミン酸生産能の付与と染色体上のodhA

10

20

30

40

50

遺伝子への変異導入はどちらを先に行ってもよく、また、本発明のコリネ型細菌は、染色体odhA遺伝子への変異導入により、上記性質とL-グルタミン酸生産能の両方を有するようになったものでもよい。

【0022】

本発明において、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(α -K D G H)活性とは、 α -ケトグルタル酸(2-オキソグルタル酸)を酸化的に脱炭酸し、サクシニル-CoA(succinyl-CoA)を生成する反応を触媒する活性を意味する。上記反応は、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(E1o EC1.2.4.2)、ジヒドロリポアミドS-サクシニルトランスフェラーゼ(E2o dihydrolipoamide-S-succinyltransferase EC:2.3.1.61)、ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3 dihydrolipoamide dehydrogenase EC:1.8.1.4)の3種の酵素によって触媒される。すなわち、これらの3種類のサブユニットはそれぞれ以下の反応を触媒し、これら3つの反応をあわせた反応を触媒する活性を α -K D G H活性という。

E1o: 2-oxoglutarate + [dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase]lipoyllysine = [dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase]S-succinylidihydrolipoyllysine + CO₂

E2o: CoA + enzymeN6-(S-succinylidihydrolipoyl)lysine=succinyl-CoA + enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine

E3: protein N6-(dihydrolipoyl)lysine + NAD⁺ = protein N6-(lipoyl)lysine+ NADH + H⁺

エシェリヒア・コリ等では、この3種それぞれの酵素活性を有するサブユニットタンパク質が複合体を形成している。

【0023】

コリネ型細菌では、E1oサブユニットはodhA遺伝子によってコードされ、E3サブユニットはlpd遺伝子(GenBank Accession No. Y16642;配列番号17)によってコードされている。一方、E2oサブユニットは、E1oサブユニットとともに2機能性タンパク質としてodhA遺伝子にコードされているか(Usuda et al., Microbiology 1996 142, 3347-3354参照)、あるいはodhA遺伝子とは別のGenBank Accession No. NC_003450のNCgl2126として登録されている遺伝子(配列番号27)によってコードされていると推測されている。従って、本発明のodhA遺伝子は、E1oサブユニットをコードする遺伝子であるが、併せてE2oをコードしていてもよい。

なお、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼは、オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ(oxoglutarate dehydrogenase)、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ(2-oxoglutarate dehydrogenase)とも呼ばれる。

【0024】

本発明のコリネ型細菌は、染色体上のodhA遺伝子のコード領域内あるいは発現制御領域内に変異が導入されている。odhA遺伝子としては、例えば、配列番号10に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を挙げることができる。また、配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸番号37のValは、コドンはgtg(配列番号9の塩基番号551~553)であるものの、Metとして翻訳され、ここからE1oサブユニットタンパク質の翻訳が開始する可能性がある。したがって、odhA遺伝子は配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。なお、開始コドンがいずれであるにしても、odhA遺伝子は少なくとも配列番号10に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする部分を含んでいればよい。また、odhA遺伝子は配列番号51のアミノ酸配列をコードする遺伝子であってもよい。

また、 α -K D G HのE1oサブユニット活性を示すタンパク質であって、配列番号10、配列番号10のアミノ酸番号37~1257のアミノ酸配列、または配列番号51のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。ここで、数個とは、2~20個が好ましく、2

10

20

30

40

50

～ 10個がより好ましく、2～5個が特に好ましい。

より具体的には、配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443～4213、配列番号9に示す塩基配列の塩基番号551～4213の塩基配列、または配列番号50の塩基配列を有する遺伝子を挙げることができる。また、Genbankやゲノムデータベースに登録されているコリネ型細菌のodhA遺伝子あるいは、sucA遺伝子を挙げることができる。(Genbank Accession No.NCgl1084, CE1190)

また、コリネ型細菌の種や菌株によってodhA遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、 α -KGDHのE1 α サブユニット活性を示すタンパク質をコードする限り、配列番号9に示す塩基配列の塩基番号443～4213、配列番号9の塩基番号551～4213、もしくは配列番号50の塩基配列を有するポリヌクレオチドまたは該塩基配列の一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子であってもよい。ここでストリンジェントな条件としては例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件が挙げられ、具体的には、60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。なお、 α -KGDHのE1 α サブユニット単独の活性は、Masseyらの方法(Biochim. Biophys. Acta 38,447-460)によって測定することができる。

【0025】

本発明において「染色体上のodhA遺伝子に変異が導入された」とは、染色体上のodhA遺伝子に変異型odhA遺伝子と置換されることにより、染色体上のodhA遺伝子に変異が導入された状態と実質的に同じ状態になった場合も含む。

上記のような変異はodhA遺伝子のコード領域だけでなく、発現調節領域に導入されてもよい。発現調節領域とは、プロモーターやオペレーターなどの領域を含む。odhAの発現を直接支配する発現制御領域は、odhAの開始コドン直前の領域であり、配列番号9に示す塩基配列の塩基番号1～442の領域が挙げられ、中でもプロモーターやSD配列に変異を導入することが有効である。プロモーター領域やSD配列は、GENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いることや、Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128等に記載されている方法で検索できる。

【0026】

「 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が非改変株、野生株の二分の一以下に低下するように改変された」とは、例えば、細胞当たり(単位タンパク質重量当たり)の前記活性が、同条件で培養された非改変株、野生型のコリネ型細菌のそれよりも二分の一以下に低下するように改変されたことをいう。例えば、細胞当たりの α -KGDH分子の数が減少した場合や、 α -KGDH分子当たりの活性が減少した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばプレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869である。活性は、改変株の生育を低下させない活性であればいずれもよいが、完全に消失しないことが望ましく、親株あるいは野生株に対して50～99%、望ましくは60～99%、さらに望ましくは70～99%低下していることが好ましい。

なお、 α -KGDH(複合体)活性は、Shiioらの方法(Isamu Shiio and Kyoko Ujigawa-Takeda, Agric.Biol.Chem.,44(8),1897-1904,1980)に従って測定することができる。

【0027】

コリネ型細菌の α -KGDH活性が減少すると、同コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産能が向上する。本発明において、「コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産能が向上する」とは、具体的には、 α -KGDH活性が野生株又は非改変株の二分の一以下に低下するような変異が導入されたコリネ型細菌の菌株を培地で培養したときに、野生株又は非改変株よりも、L-グルタミン酸の培地中の蓄積量が多いか、又は、L-グルタミン酸の生産速度が高いことを言う。

【0028】

生育が野生株または非改変株と同等とは、好ましくは、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株などの野生株または非改変株と同等の生育を示すことを言う。

ここで「同等」とは、80%以上、より好ましくは90%以上であることをいう。野生株との生育の比較は、例えば、変異を導入した株及び野生株をそれぞれ培地に同じ細胞数、接種し、一定時間経過後の生菌数を比較することによって行うことができる。生菌数は、液体培地を用いる場合、一定時間経過後の波長600の光学密度(OD)または菌体重量などに基いて算出することができ、プレートなどの固体培地を用いる場合、一定時間経過後に出現するコロニーの数に基いて算出することができる。

なお、本発明のコリネ型細菌の生育は少なくともある特定の温度(例えば低温)において野生株または非改変株と同等であればよい。すなわち、後述の実施例で示すGN2-2株のように、低温(例えば25~30)で野生株または非改変株と同等の生育を示すが、高温(例えば、34~40)では野生株または非改変株よりも生育が低下したコリネ型細菌も、本発明のコリネ型細菌に含まれる。

10

【0029】

上記のような染色体上のodhA遺伝子に変異を導入する方法としては、例えば、コリネ型細菌にX線や紫外線を照射する方法、またはコリネ型細菌をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。またエラ-プロ-ンPCR、DNA shuffling、StEP-PCRによって、遺伝子組換えにより人工的にodhAに変異を導入してodhA遺伝子を取得することも出来る。(Firth AE, Patrick WM; Bioinformatics. 2005 Jun 2; Statistics of protein library construction.)

【0030】

変異型odhA遺伝子に上述のような変異を導入するためには、例えば、変異型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、変異型遺伝子と染色体上の野生型遺伝子で相同組換えを起こさせることにより、染色体上の野生型遺伝子を変異型遺伝子におきかえることによって達成できる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、DatsenkoとWannerによって開発された「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645)の直鎖状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号明細書、または特開平05-007491号公報)。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は、宿主で複製能力を持たないプラスミドや、コリネ型細菌に接合伝達可能なプラスミドを用いて行うことが出来る。

20

30

【0031】

例えば、コリネ型細菌で温度感受性を示すプラスミドとしては、コリネ型細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号公報参照)、pHSC4(フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報参照)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。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

40

【0032】

コリネ型細菌内で複製能を持たないプラスミドは、エシェリヒア・コリで複製能力を持つプラスミドが好ましく、例えば、pHSG299(宝バイオ社製)pHSG399(宝バイオ社製)等が挙げられる。また接合伝達可能なプラスミドとしては、pK19mobsacB(J. Bacteriology 174:5462-65(1992))が挙げられる。

【0033】

変異型odhA遺伝子の導入は以下のような方法で行う。変異型odhA遺伝子は以下の方法によって取得出来る。odhA遺伝子は、コリネ型細菌から例えば、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)で染色体DNAをし、Genbank等、公知

50

のデ - タベ - スを用いて構築されたオリゴヌクレオチドを使用したPCR法によって取得出来る。変異型遺伝子は、オーバーラップエクステンションPCR法によって取得できる。(Urban, A., Neukirchen, S. and Jaeger, K. E., A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res*, 25, 2227-8. (1997)).

【0034】

次に変異型遺伝子をコリネ型細菌で温度感受性を示すプラスミドやコリネ型細菌で複製できないプラスミドに導入し、組換えプラスミドでコリネ型細菌を形質転換する。形質転換は、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の透過性を増加させる方法(Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970))があり、パチルス・ズブチル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整しDNAを導入する方法(Dancan, C.H., Wilson, G.A and Young, F.E., *Gene*, 1, 153 (1977))がある。あるいは、パチルス・ズブチルス、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DNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Choen, S.N., *Molec. 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、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法(杉本ら、特開平2 - 207791号公報)によっても行うことができる。

【0035】

上記のようにして得られた形質転換体は、コリネ型細菌で複製能を持たないプラスミドで形質転換した場合には、プラスミド上の変異型odhA遺伝子と染色体上の野生型odhA遺伝子と組換えを起こしている。また、温度感受性プラスミドを用いた場合には、形質転換体を温度感受性複製起点が機能しない温度(25)で培養し、プラスミドを導入した株を取得する。プラスミド導入株を高温で培養し、温度感受性プラスミドを脱落させ、抗生物質を含有するプレートに本菌株を塗布する。温度感受性プラスミドは高温で複製できないので、プラスミドが脱落した菌株は、抗生物質を含有したプレートでは生育出来ないが、ごくわずかの頻度であるが、プラスミド上の変異型odhA遺伝子と染色体上のodhA遺伝子と組換えを起こした菌株が出現する。

【0036】

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するodhA遺伝子配列との組換えを起こし、染色体の変異型odhA遺伝子と野生型odhA遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分(ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マ - カ -)を挟んだ状態で染色体に挿入されている。

【0037】

次に、染色体DNA上に変異型odhA遺伝子のみを残すために、ベクター部分(温度感受性複製起点及び薬剤耐性マ - カ - を含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常な変異型odhA遺伝子が染色体DNA上に残され、野生型odhA遺伝子が切り出される場合と、反対に変異型odhA遺伝子が染色体DNA上に残され、野生型odhA遺伝子が切り出される場合がある。PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に変異型odhA遺伝子が残った株を選択することによって、変異型odhA遺伝子が導入された株を取得することができる。

【0038】

またコリネ型細菌で致死的に機能するレバンシュ - クラ - ゼをコードするsacB遺伝子を相同組換えのマーカ - として用いてもよい。(Schafer, A. et al. *Gene* 145 (1994) 69 - 73)。すなわち、コリネ型細菌では、レバンシュ - クラ - ゼを発現させると、シュ - クロ - スを資化することによって生成したレバンが致死的に働き、生育することが出来ない。従って、レバンシュ - クラ - ゼを搭載したベクターが染色体上に残ったままの菌株をシュ - クロ - ス含有プレートで培養すると生育できず、ベクターが脱落した菌株のみシュ - クロ -

10

20

30

40

50

ス含有プレ - トで選択することが出来る。

【 0 0 3 9 】

sacB遺伝子又はその相同遺伝子は、以下のような配列の遺伝子を用いることが出来る。

バチルス・ズブチルス：sacB GenBank Accession Number X02730 (配列番号19)

バチルス・アミロリキュファシエンス：sacB GenBank Accession Number X52988

ザイモナス・モピリス：sacB GenBank Accession Number L33402

バチルス・ステアロサ - モフィラス：surB GenBank Accession Number U34874

ラクトバチルス・サンフランシセンシス：frfA GenBank Accession Number AJ508391

アセトバクタ - ・キシリナス：lsxA GenBank Accession Number AB034152

グルコンアセトバクタ - ・ジアゾトロフィカス：lsdA GenBank Accession Number L41732 10

【 0 0 4 0 】

< 2 > 本発明の変異

染色体上の - K G D HのサブユニットをコードするodhA遺伝子における変異は、菌体内 - K G D H活性を、非改変株または野生株の菌体内 - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の二分の一以下に低下させる変異であって、該変異を含む - K G D H遺伝子を保持する細菌が野生株と同等に生育できる変異である。本発明の変異型odhA遺伝子がコードする変異型 - K G D H E1oサブユニットは、 - K G D HのE2oサブユニットおよびE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生型 - K G D H (複合体) または非改変型 - K G D H (複合体) の二分の一以下の - K G D H活性を示す。さらに、変異型odhAがコードする該タンパク質をコリネ型細菌に保持させた場合に、該コリネ型細菌が野生株と同等の生育を示すようなタンパク質が好ましい。 20

例えば、具体例には以下のような変異が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

(1) チアミノピロリン酸結合領域の変異

この変異は、補酵素であるチアミノピロリン酸の結合領域に導入された変異であり、チアミノピロリン酸結合領域とは、odhA遺伝子 (配列番号9) の2498番目 ~ 2584番目の塩基によってコードされる領域 (配列番号10の686G-714D) をいう。配列番号10の686 ~ 688番目のGly-Leu-Gly残基、および713-714番目のAsn-Asn残基がチアミノピロリン酸結合部位であり、このチアミノピロリン酸結合部位や、チアミノピロリン酸結合部位の間の配列に変異を導入することが好ましい。 30

【 0 0 4 2 】

チアミノピロリン酸結合領域の変異は、odhA遺伝子 (配列番号9) において、2534-2548番目の領域に変異が導入されたものであってもよい (この変異をGN型変異と呼ぶ)。GN型変異は、好ましくは、配列番号10に記載のアミノ酸配列の698-702番目に記載のアミノ酸残基 (Lys, Leu, Arg, Gly, Tyr) のうち、いずれか1以上のアミノ酸残基の欠失及び/又は、1以上のアミノ酸残基の置換を伴う変異が好ましい。

【 0 0 4 3 】

アミノ酸の欠失を伴う変異の一例としては、配列番号10に記載のアミノ酸残基の701番目のGly残基を欠失させる変異が挙げられる。この変異が導入された変異型odhA遺伝子の塩基配列を配列番号13の塩基番号443 ~ 4213、配列番号44、46、48の塩基番号443 ~ 4210 (または配列番号13の塩基番号551 ~ 4213、配列番号44、46、48の塩基番号551 ~ 4210) に、アミノ酸配列を配列番号14、45、47、49 (または配列番号14のアミノ酸番号37 ~ 1255、配列番号45、47、49のアミノ酸番号37 ~ 1256) に示す。ここで、配列番号13の配列においては、配列番号9の2538番のt、2543 - 2547番のggctaが欠失している。 40

【 0 0 4 4 】

アミノ酸残基の置換を伴う変異としては、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、698番目のLys残基、699番目のLeu残基、700番目のArg残基、702番目のTyrから選択される1又はそれ以上の残基を他のアミノ酸に置換する変異が望ましい。ここで他のアミノ酸とは、天然型アミノ酸であればいずれのアミノ酸でもよく、Lys, Glu, Thr, Val, Leu, Ile, Ser, 50

Asp, Asn, Gln, Arg, Cys, Met, Phe, Trp, Tyr, Gly, Ala, Pro, Hisから選択される残基に置換すればよい。特に、698番目のLys残基は、塩基性アミノ酸残基 (Arg, His) 以外のアミノ酸に、699番目のLeu残基は、脂肪族疎水性アミノ酸残基 (Ile, Val) 以外のアミノ酸残基に、700番目のArg残基は、塩基性アミノ酸残基以外 (Lys, His) 以外のアミノ酸残基に、702番目のTyr残基は、ヒドロキシル基を有するアミノ酸以外 (Ser, Thr) のアミノ酸残基に置換することが望ましい。

中でも、698番目のLys残基は、脂肪族疎水性アミノ酸残基 (Ile, Leu, Val) に置換することが望ましく、699番目のLeu残基は、側鎖にヒドロキシル基を持つSer, Thr, Tyr残基に置換することが望ましく、700番目のArg残基は、側鎖にS原子を有するCys, Met残基に置換することが望ましく、また、702番目のTyr残基は、脂肪族疎水性アミノ酸残 (Ile, Leu, Val) に置換することが望ましい。 10

【0045】

また、GN型変異は配列番号10に記載のアミノ酸配列における701番目のGly残基の欠失と698番目のLys残基、699番目のLeu残基、700番目のArg残基、702番目のTyrから選択される1又はそれ以上の残基を他のアミノ酸に置換する変異とを組み合わせてもよい。これらの残基が置換された変異型odhA遺伝子をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号44, 46, 48の塩基番号443~4210に(または配列番号44, 46, 48の塩基番号551~4210)、変異型OdhAのアミノ酸配列を配列番号45, 47, 49(または配列番号45, 47, 49のアミノ酸番号37~1256)に示す。該GN型変異と同じアミノ酸置換及びアミノ酸欠失を生じさせる変異、すなわち、染色体上のodhA遺伝子塩基配列を、配列番号14のアミノ酸配列をコードする塩基配列にするその他の変異も本発明の範囲に含まれる。 20

【0046】

(2) 2-2型変異

この変異は、odhA遺伝子(配列番号9)の1094-1111番目の領域に導入されたものであり、好ましくは、配列番号10に記載のアミノ酸配列の218-224番目のアミノ酸残基(Asp-Val-Ile-Asp-Gly-Lys-Pro)のうち1または2以上のアミノ酸残基を欠失させる変異及び/又は1または2以上のアミノ酸残基を置換する変異である。より好ましくは、odhA遺伝子(配列番号9)の1094-1098番目のgacgtを欠失させ、かつ、1110-1111番のagをggccに置換する変異である。この変異を有するodhA遺伝子の塩基配列を配列番号11の塩基番号443~4213(または配列番号11の塩基番号551~4213)に示す。該遺伝子にコードされる変異型odhAのアミノ酸配列を配列番号12(または配列番号12のアミノ酸番号37~1256)に示す。 30

アミノ酸残基の欠失を伴う変異としては、配列番号10に記載のアミノ酸残基の218番目のAsp残基を欠失させる変異が好ましい。この変異を有するodhA遺伝子の塩基配列を配列番号11の塩基番号443~4213(または配列番号11の塩基番号551~4213)に示す。該遺伝子にコードされる変異型odhAのアミノ酸配列を配列番号12(または配列番号12のアミノ酸番号37~1256)に示す。

【0047】

アミノ酸残基の置換を伴う変異としては、配列番号10に記載のアミノ酸配列において219番目のVal残基、220番目のIle残基、221番目のAsp残基、222番目のGly残基、223番目のLys残基から選択される1又はそれ以上の残基を他のアミノ酸に置換する変異が望ましい。ここで他のアミノ酸とは、天然型アミノ酸であればいずれのアミノ酸でもよLys, Glu, Thr, Val, Leu, Ile, Ser, Asp, Asn, Gln, Arg, Cys, Met, Phe, Trp, Tyr, Gly, Ala, Pro, Hisから選択される残基に置換すればよい。特に、219番目のVal残基は、脂肪族疎水性アミノ酸残基 (Ile, Leu) 以外のアミノ酸残基に、220番目のIle残基も脂肪族疎水性アミノ酸残基 (Ile, Val) 以外のアミノ酸残基に、221番目のAsp残基は、酸性アミノ酸残基以外のアミノ酸残基 (Glu)、222番目のGly残基は単純構造のアミノ酸残基 (Ala) 以外に置換することが望ましい。 40

置換されるアミノ酸残基は、219-221番目のアミノ酸残基は、塩基性アミノ酸残基への置 50

換 (His,Arg,Lys) が望ましく、222番目のGly残基は、側鎖にアミド基を持つアミノ酸残基 (Asp,Gln)、223番目のLys残基は単純構造のアミノ酸残基 (Gly,Ala) に置換することが望ましい。

なお、該2-2型変異と同じアミノ酸置換及びアミノ酸欠失を生じさせる変異、すなわち、染色体上のodhA遺伝子塩基配列を、配列番号12のアミノ酸配列をコードする塩基配列にするその他の変異も本発明の範囲に含まれる。

【0048】

(3) GN+2-2型変異

この変異は上記GN型変異と2-2型変異の両方を含む変異である。この変異を有する - KGDH遺伝子の塩基配列及び該遺伝子にコードされる変異酵素のアミノ酸配列の一例を、それぞれ配列番号15の塩基番号443~4213 (または配列番号15の塩基番号551~4213) に示す。該遺伝子にコードされる変異型 - KGDHのアミノ酸配列を配列番号16 (または配列番号16のアミノ酸番号37~1254) に示す。

なお、該GN+2-2型変異と同じアミノ酸置換及びアミノ酸欠失を生じさせる変異、すなわち、染色体上のodhA遺伝子塩基配列を、配列番号16のアミノ酸配列をコードする塩基配列にするその他の変異も本発明の範囲に含まれる。

【0049】

その他の変異型odhA遺伝子についても、後述の実施例5に示すATCC13869-L株のようなygg遺伝子変異株などを用いてスクリーニングすることができる。すなわち、odhA遺伝子にランダムに変異を導入し、得られた変異型odhA遺伝子でygg遺伝子変異株を形質転換し、形質転換株の中から生育が非改変株または野生株と同等以上であり、かつ、菌体内 - KGDH活性が、非改変株または野生株の菌体内 - KGDH活性の二分の一以下に低下した株を選択し、選択された株において導入されているodhA遺伝子の塩基配列を決定すればよい。

【0050】

なお、これらのアミノ酸配列において上述の変異箇所以外の領域に、酵素活性に影響を与えないアミノ酸が置換されたり、アミノ酸が同種のアミノ酸に置換される変異が導入されていても、上記の性質が維持されると考えられるため、 - KGDHのE20サブユニットおよびE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の - KGDH複合体の二分の一以下の - KGDH活性を示す限りにおいて、上述の変異型遺伝子、例えば配列番号12, 14, 16, 45, 47, もしくは49 (または配列番号12, 45, 47, もしくは49のアミノ酸番号37~1256, 配列番号14のアミノ酸番号37~1255, 配列番号16のアミノ酸番号37~1254) のアミノ酸配列において、上述のGN型変異、2-2型変異以外の領域に、1または数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列をコードする遺伝子であってもよい。ここで、数個とは、2~20個が好ましく、2~10個がより好ましく、2~5個が特に好ましい。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、odhA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。例えば、配列番号51のアミノ酸配列において上記GN型変異や2-2型変異に対応する位置に変異を有するタンパク質をコードする変異型odhA遺伝子も本発明において使用できる。なお、配列番号51のアミノ酸配列においてどの位置がGN型変異や2-2型変異に相当するかは、配列番号10と配列番号51のアミノ酸配列を比較することで容易に理解できる。

【0051】

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、alaからser又はthrへの置換、argからgln,his又はlysへの

10

20

30

40

50

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への置換が例示される。

なお、 Δ -KGDH複合体とは、E1 α サブユニットとE2 α サブユニットがodhA遺伝子にコードされている場合、配列番号10のタンパク質及び配列番号18のタンパク質からなる複合体を挙げることができ、E1 α サブユニットがodhA遺伝子に、E2 α サブユニットが配列番号27の遺伝子にコードされている場合、配列番号10のタンパク質、配列番号18のタンパク質及び配列番号28のタンパク質からなる複合体を挙げることができる。

本発明の変異型odhA遺伝子は、上述の変異を有し、 Δ -KGDHのE2 α サブユニットおよびE3サブユニットタンパク質と複合体を形成することにより、野生株または非改変株の Δ -KGDH複合体の二分の一以下の Δ -KGDH活性を示す限りにおいて、配列番号11、13、もしくは15の塩基番号443~4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号443~4210（または配列番号11、13、もしくは15の塩基番号551~4213、または配列番号44、46、もしくは48の塩基番号551~4210）の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子であってもよい。ここでストリンジェントな条件としては例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件が挙げられ、具体的には、60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2~3回洗浄する条件が挙げられる。

【0052】

<3>本発明のL-グルタミン酸の製造方法

本発明のコリネ型細菌を培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積せしめ、L-グルタミン酸を該培地から採取することにより、L-グルタミン酸を製造することが出来る。本発明の製造方法においては、本発明のコリネ型細菌を、例えば、20~45℃で、8~120時間培養する。なお、実施例に示すGN2-2株のような低温では野生株と同等の生育を示すが、高温では生育が低下した本発明のコリネ型細菌を用いる場合、該コリネ型細菌を低温、例えば、25~30℃で8~30時間培養して増殖させ、ついで、得られた菌体を、高温、例えば、34~40℃で、16~48時間保持することによってL-グルタミン酸を生産させることが好ましい。

【0053】

培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いることができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株が利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

【0054】

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用でき、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いることができる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができる。有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用でき、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。無機塩類としてはりん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用できる。

10

20

30

40

50

【0055】

培養は、好ましくは、pHを3～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、例えば、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。このような条件下で、好ましくは10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-グルタミン酸が蓄積される。

【0056】

また、L-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いて、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら培養を行うことも出来る。L-グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0を挙げることができる(例えばEP1233069, EP1233070参照)。

10

【0057】

培養終了後の培養液からL-グルタミン酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって採取される。L-グルタミン酸が析出するような条件下で培養した場合、培養液中に析出したL-グルタミン酸は、遠心分離又は濾過等により採取することができる。この場合、培地中に溶解しているL-グルタミン酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

【0058】

[実施例]

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されない。

20

【実施例1】

【0059】

<1> sacB搭載遺伝子置換用ベクターの構築

(A) pBS3の構築

sacB遺伝子(配列番号19)をバチルス・ズブチリスの染色体DNAを鋳型として配列番号21と22をプライマーとして用いて、PCRにより取得した。PCR反応は、LA taq(TaKaRa)を用い、94 で5分保温を1サイクル行った後、変性94 30秒、会合49 30秒、伸長72 2分からなるサイクルを25回繰り返した。生成したPCR産物を常法により精製後BglIIとBamHIで消化し、平滑化した。この断片をpHSG299のAvaIIで消化後、平滑化した部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝バイオ社製)を用いて形質転換を行い、カナマイシン(以下、Kmと略す)25μg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニーを分離し形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS3と命名した。pBS3の構築過程を図1に示す。

30

【0060】

(B) pBS4Sの構築

pBS3上に存在するカナマイシン耐性遺伝子配列中のSmaI部位をアミノ基置換を伴わない塩基置換によりカナマイシン耐性遺伝子を破壊したプラスミドをクロスオーバーPCRで取得した。まず、pBS3を鋳型として配列番号23, 24の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、カナマイシン耐性遺伝子のN末端側の増幅産物を得る。一方Km耐性遺伝子のC末端側の増幅産物を得るためにpBS3を鋳型として配列番号25, 26の合成DNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(宝バイオ社製)を用い、98 で5分保温を1サイクル行った後、変性98 10秒、会合57 30秒、伸長72 1分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。配列番号24と25は部分的に相補的であり、またこの配列内に存在するSmaI部位はアミノ酸置換を伴わない塩基置換を施すことにより破壊されている。次にSmaI部位が破壊された変異型カナマイシン耐性遺伝子断片を得るために、上記カナマイシン耐性遺伝子N末端側及びC末端側の遺伝子産物を、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23, 26の合成DNAをプライマ

40

50

ーとしてPCRを行い変異導入されたKm耐性遺伝子増幅産物を得た。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(宝バイオ社)を用い、98 で5分保温を1サイクル行った後、変性98 10秒、会合57 30秒、伸長72 1.5分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。

【0061】

PCR産物を常法により精製後BanIIで消化し、上記のpBS3のBanII部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝バイオ社製宝バイオ社製)を用いて形質転換を行い、カナマイシン25 μ g/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS4Sと命名した。pBS4Sの構築過程を図2に示す。

10

【0062】

<2>C. glutamicum ATCC13869へのodhA変異点(GN型)の導入

コリネ型細菌のL-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼをコードしているodhAの配列は既に明らかになっている(Microbiology 142, 3347-3354, (1996)、GenBank accession No. D84102)。

本発明者らが育種に成功したL-グルタミン酸生産菌GN株は、odhA遺伝子(配列番号9)内の遺伝子番号2538番、2543-2547番の遺伝子が欠失していることが塩基配列の解析によりわかった(表1)。

【0063】

20

【表1】

表1

菌株名	odhA 配列
ATCC13869	GCT AAG CTG CGT GGC TAC GAC GTC GGA GGC ACC ATC
OAGN	GCT AAG C-G CGT --- --C GAC GTC GGA GGC ACC ATC
菌株名	α -KGDH 配列
ATCC13869	Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr Ile
OAGN	Ala Lys Arg Val --- --- Asp Val Gly Gly Thr Ile

30

【0064】

そこで、この2538番、2543-2547番の塩基の欠失変異をC. glutamicum 2256(ATCC13869)へ導入するための変異導入用プラスミドを作製した。L-グルタミン酸生産菌GN株からBacterial Genomic DNA Purif.Kit((株)エムエステクノシステムズ製)を用いて染色体を抽出し、この染色体を鋳型として配列番号1、2に記載のプライマーを用いたPCRを行い(反応条件は、Pyrobest polymerase(タカラバイオ製)を用いて、変性98 10秒、会合50 30秒、伸張反応72 3minの条件で30サイクル)、約2.75kbの断片を増幅した。なお、プライマーは5'側にBamHI配列を連結し、GenBank accession No.D84102記載の遺伝子番号1521-4270の領域が増幅されるように設計している。増幅した断片をBamHIによる完全分解を行い、同じくBamHIによって完全分解したpBS4Sベクターと連結反応を行い(Li 40

40

【0065】

電気パルス法(特開平2-207791)にてC. glutamicum ATCC13869へpBSOAGNを導入し、カナマイシン25 μ 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、酵母エキス 10g/l、KH₂PO₄ 1g/l、MgSO₄·7H₂O 0.4g/l、FeSO₄·7H₂O 0.01g/l、MnSO₄·4-5H₂O 0.01g/l、尿素 3g/l、大豆蛋白加水分解液1.2g/l、寒天 20g/l、NaOHを用いてpH7.5に調整)上に塗布した。25 にて培養後、生育してきた株を、PCRを用いて、染色体上に相同組換えによってpBSOAGNが組み込まれた1回組換え株であることを確認した。なお1回組換え株であることの確認は、候補株の染色体を鋳型にし、pBS4S上の特異的配列(配列番 50

50

号3)と染色体上の配列(配列番号4)をプライマーにしたPCRを行うことによって、容易に確認することが出来る(非組み換え株の染色体上にはpBS4Sの配列が存在していないため、PCRによって増幅される断片が出現しないことから判別可能となる)。取得した1回組換え株をカナマイシン25 μ g/mlを含むCM-Dex液体培地にて25、一昼夜培養し、この培養液を適宜希釈してS10プレート(上記記載のCM-Dex培地のグルコース5g/lをシュークロース10g/lに変更した組成)に塗布した。S10プレート上で生育し、且つカナマイシン感受性を示す株を数株選択後、これら株のodhA配列に目的通りの変異が導入されているのか、Sangerの方法(J.Mol.Biol.,143,161,(1980))にて確認を行った。具体的な塩基配列の決定はBigDye terminator sequencing kit(Applied Biosystems製)を用いて、genetic Analyzer ABI310(Applied Biosystems製)で解析した。このようにして取得した変異導入株をATCC13869 OAGNと命名した。 10

【0066】

<3> C. glutamicum ATCC13869へのodhA変異点(2-2型)の導入

本発明者らが育種に成功したL-グルタミン酸生産菌2-2株は、odhA遺伝子内の遺伝子番号1094-1098番の塩基が欠失し、1110-1111番のagがggccに置換された配列を保持していることが塩基配列の解析によりわかった(表2)。

【0067】

【表2】

表2

菌株名	odhA 配列
ATCC13869	AAC TCC TAC GAC GTC ATC GAC GGC AAG CCA ACC CTG
OA2-2	AAC TCC TAC --- CAT CGA CGG CAG GCC CCA ACC CTG
菌株名	α -KGDH 配列
ATCC13869	Asn Ser Tyr Asp Val Ile Asp Gly Lys Pro Thr Leu
OA2-2	Asn Ser Tyr --- His Arg Arg Gln Ala Pro Thr Leu

20

【0068】

そこで、この変異をC. glutamicum 2256(ATCC13869)へ導入するための変異導入用プラスミドを作製した。L-グルタミン酸生産菌2-2株からBacterial Genomic DNA Purif.Kit((株)エムエステクノシステムズ製)を用いて染色体を抽出し、この染色体を鋳型として配列番号5、6に記載のプライマーを用いたPCRを行い(反応条件は、TaKaRa Ex Taq(タカラバイオ製)を用いて、変性94 30秒、会合55 10秒、伸張反応72 2minの条件を25サイクル)、約2.0kbの断片を増幅した。なお、プライマーは5'側にBamHI配列を連結し、GenBank accession No.D84102記載の遺伝子番号51-2150の領域が増幅されるように設計している。増幅した断片をBamHIによる完全分解を行い、同じくBamHIによって完全分解したpBS4Sベクターと連結反応を行い(Ligation kit Ver.2、タカラバイオ製を使用)、pBSOA2-2を構築した(構築図は図4に記載)。実施例1の<2>に示した手順と同様の操作を行い、odhA変異導入株を取得した(ATCC13869 OA2-2と命名)。 30

【0069】

40

<4> ATCC13869 OAGNへのodhA変異点(2-2型)の導入

実施例1の<2>にて作製したATCC13869 OAGN株に、実施例1の<3>にて構築したプラスミドpBSOA2-2を用いて、実施例11の<2>に記載した手順と同様の操作を行い、2-2型変異が導入されたATCC13869 OAGN2-2株を取得した。以下、2-2変異とGN変異の二重変異をGN2-2変異とも言う。

【0070】

なお、実施例1の<2>~<4>において作製した変異株は、L-グルタミン酸生産菌GN株もしくは2-2株を鋳型にしたPCRを行うことによって作製した変異導入用プラスミドを用いて作製したが、タカラバイオ製Mutan-Super Express Kmによって作製した変異導入用プラスミドを用いても作製可能である。例えば実施例1の<2>で作製したpBSOAGNと同様 50

の構成のプラスミドを構築するためには、まず配列番号2と配列番号5に示す合成DNAをプライマーとしてPCRを行いodhA断片を調製し、Mutan-Super Express Kmに付属のプラスミドpKF19kのBamHI部位にクローニングした後、5'末端がリン酸化された配列番号7の合成DNAとMutan-Super Express Kmに添付されているセレクションプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物でsup0のE.coli例えばMV1184株を形質転換することで変異型odhA断片を含むプラスミドを構築する。次にこの断片をBamHIで切り出しpBS4Sベクターに搭載すればpBSOAGNと同様のプラスミドを構築出来る。

同様に、2-2変異を導入するためには、上記と同様の方法で5'末端がリン酸化された配列番号7の合成DNAの代わりに5'末端がリン酸化された配列番号8の合成DNAを用いることでpBSOA2-2と同様のプラスミドが構築できる。またGN2-2変異を導入する為には、前述の方法で構築したpBSOAGNもしくはpBSOA2-2より変異型odhA断片を切り出して再度pKF19kにクローニングし、もう一方の変異をさらに導入すればよい。

10

【実施例2】

【0071】

ATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2のグルタミン酸分解能力の比較

野生型odhAを保持する株は、培地中のグルタミン酸を資化するが、odhA遺伝子がコードしている - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が弱体化あるいは欠失株では、そのグルタミン酸分解能力が低下することが推定される。この性質を利用し、実施例1の<2>~<4>において作製したodhA変異株ATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2のグルタミン酸分解能を測定した。各菌株をCM-Dexプレートで一昼夜25℃にて培養し、グルタミン酸ナトリウム 20g/l、(NH₄)₂SO₄ 2.64g/l、KH₂PO₄ 0.5g/l、K₂HPO₄ 0.5g/l、MgSO₄・7H₂O 0.25g/l、FeSO₄・7H₂O 0.01g/l、MnSO₄・4-5H₂O 0.01g/l、CaCl₂ 0.01g/l、CuSO₄ 0.02mg/l、MOPS 40g/l、プロトカテク酸 0.03g/l、ビタミンB1 200μg/l、ピオチン 300μg/l (NaOHを用いてpH6.7に調整)の組成からなる液体培地に接種後、25℃及び34℃にて50時間培養を行った。培養開始前、25、50時間後のグルタミン酸量を測定し、グルタミン酸の分解量を25℃、34℃で培養した菌体で比較した。その結果を表3に記載した。特にGN2-2変異株は培養温度を34℃に上げるによりグルタミン酸の分解量は低下したことから、GN2-2変異の導入により - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が高温でより弱化する性質を付与できることが示唆された。

20

【0072】

30

【表3】

< 表3 グルタミン酸分解量 >

	25時間		50時間	
	25℃	34℃	25℃	34℃
ATCC13869	15	15	15.4	15.4
OAGN	3.8	5.8	9.4	10.0
OA2-2	11.7	15.1	15.4	15.4
OAGN2-2	0.7	0.5	4.9	1.0

(単位: g/l)

【実施例3】

40

【0073】

ATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の比較

後述の実施例4にて培養した培養液(培養開始4時間後)を用いてATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2の - ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の測定を行った。活性測定方法については、Agric.Biol.Chem.,44(8), p1897 (1980)に従った。具体的には、菌体を0.2%塩化カリウムにて洗浄後、100mM TES-NaOH(pH7.5)、30%グリセロール溶液に懸濁した。Bioruptorを用いて超音波破碎後、遠心分離(1000xg、30分)を行って未破碎菌体を取り除き、Sephadex-G25を用いて同バッファーにてゲルろ過した。このようにして調製したものを粗酵素液とした。100mM TES-NaOH(pH7.7)、5mM MgCl₂、0.2mM CoA、0.3mMコカルボキシラーゼ、1mM - ケトグルタル酸、3mM L-システイン、1mM アセチルピリジン - アデニ

50

ン - ジヌクレオチドを含む反応系に粗酵素液を添加し、31.5 における365nmの吸収を日立分光光度計U-2001にて測定した。粗酵素液のタンパク質濃度の測定には、Protein Assay (Bio-Rad製)を用い、標準タンパク質には牛血清アルブミンを用いた。

活性測定の結果を表4に記載した。GN型変異、2-2型変異、GN2-2型変異を導入することにより、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性はATCC13869と比較して低下し、特にGN2-2変異導入株においては、顕著な活性低下が認められた。以上のことからGN型変異、2-2型変異、GN2-2型変異は α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を弱化させる変異であることが明らかとなった。

【0074】

【表4】

< 表4 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性 >

	培養温度 25°C	培養温度 34°C
ATCC13869	0.036	0.021
OAGN	0.001	0.002
OA2-2	0.007	0.009
OAGN2-2	0.001>	0.001>

単位 (△ABS/min/mg)

10

【実施例4】

【0075】

ATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2のL-グルタミン酸生産能の比較

ATCC13869 OAGN、OA2-2、OAGN2-2のL-グルタミン酸生産能をジャーファーマンターで検証した。まず、上記4株をCM-Dex寒天培地で25 で一昼夜培養を行い、滅菌したシード培地(グルコース60g/l、H₃PO₄ 1.54g/l、KOH 1.45g/l、MgSO₄・7H₂O 0.9g/l、FeSO₄・7H₂O 0.01g/l、ビタミンB1 670μg/l、ビオチン 3200μg/l、DL-Met 0.28g/L、大豆蛋白加水分解液1.54g/l、消泡剤AZ-20R 0.1ml/l)300mlに接種し、25 で糖を完全に消費するまで培養した。なお、培養中は1/1VVM通気で溶存酸素濃度が5%以下にならないように攪拌し、培養時のpHはアンモニアガスを用いてpH7.2となるように制御した。次に、得られたシード培養液30mlを滅菌した本培養培地(グルコース80g/l、KH₂PO₄ 3.46g/l、MgSO₄・7H₂O 1.0g/l、FeSO₄・7H₂O 0.01g/l、MnSO₄・4-5H₂O 0.01g/l、ビタミンB1 230μg/l、ビオチン 525μg/l、大豆蛋白加水分解液0.35g/l、消泡剤AZ-20R 0.2ml/l)270mlに接種し25 または34 で培養した。なお、通気は1/1VVMで行い、溶存酸素濃度が5%以下にならないように攪拌し、培養時のpHはアンモニアガスを用いてpH7.3となるように制御した。

20

30

培養開始後約7.5時間目のL-グルタミン酸蓄積を表5に、培養経時のL-グルタミン酸蓄積、菌体量、残糖の変化を図5、6、7にそれぞれ示した。ATCC13869はどの培養温度においてもL-グルタミン酸を蓄積しないが、OAGN、OAGN2-2変異導入株ではL-グルタミン酸を蓄積するようになり、特に34 で培養を行うと、L-グルタミン酸蓄積量が増大した。また、各変異導入株の低温での生育は野生型と同程度であった。

以上より、GN型変異、2-2型変異、GN2-2型変異はL-グルタミン酸生成向上に効果があり、特にGN2-2型変異は、最も高いL-グルタミン酸生成向上効果を付与する変異であることを確認出来た。

40

【0076】

【表 5】

< 表 5 odhA 変異導入株のL-グルタミン酸生成量 >

	25°C Glu(g/L)	34°C Glu(g/L)
ATCC13869	0.24	0.13
OAGN	0.18	1.88
OA2-2	0.59	4.70
OAGN2-2	0.38	5.13

10

【実施例 5】

【0077】

yggB変異株を用いたodhA変異株のスクリーニング

< L30型YggB変異株の構築 >

まず、ATCC13869株よりyggB遺伝子に変異をもつ株を構築した。yggB遺伝子のL30型変異は、野生型yggB遺伝子(C. glutamicumの野生型遺伝子を配列番号29に示す)の1768番目のCがTに置換された変異である。この変異が導入された変異型yggB遺伝子の塩基配列を配列番号31に、該遺伝子にコードされる変異型YggBのアミノ酸配列を配列番号32に示す。

実施例1と同様の方法にて、L30型変異が導入されたyggB変異株を構築した。具体的には、配列番号33に示す合成DNAと配列番号34に示す合成DNAをプライマーとして、ATCC13869株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、yggB遺伝子のN末端側断片を調製した。同様に配列番号35と配列番号36の合成DNAをプライマーとして、yggB遺伝子のC末端側断片を調製した。続いてN末端側断片とC末端側断片を等量混合したものを鋳型として、配列番号37と配列番号35の合成DNAをプライマーとしてPCRを行うことによりL30型yggB遺伝子の部分断片を取得した。得られた変異型yggB遺伝子断片をSacIで処理してpBS4SのSacI部位に挿入することにより、変異導入用のプラスミドを構築した。このようにして得られたpBS4 YggB-Lを実施例1記載の方法と同様にATCC13869株の染色体に挿入した後、脱落させた。得られたカナマイシン感受性株のyggB遺伝子の配列を決定し、L30型に置換された株を選択することにより、L30型変異を有する株を得た。配列番号31のyggB遺伝子の配列を持つ株をATCC13869-L株とした。

20

30

このATCC13869-L株は変異型odhA遺伝子のスクリーニング及び評価に用いることができる。

【0078】

< yggB odhA二重変異株の構築 >

次に、ATCC13869-L株のodhA遺伝子に表6に示す変異を導入した株を構築した。なお、表6では、配列番号9の塩基番号2528~2562に相当する領域の配列を示した。また、表7では配列番号10のアミノ酸番号696~707に相当する領域の配列を示した。

配列番号42の塩基配列を有する変異型odhA遺伝子が導入されたL30sucA8株を構築するには以下のようにすればよい。まず配列番号2と配列番号5に示す合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、odhA断片を調整する。得られたodhA断片をBamHI処理して、タカラバイオ製Mutan-Super Express Kmに付属のプラスミドpKF19mのBamHI部位にクローニングした後、5'末端がリン酸化された配列番号38の合成DNAとMutan-Super Express Kmに添付されているセレクションプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物でsup0のE.coli例えばMV1184株を形質転換することで変異型odhA断片を含むプラスミドを構築する。次にこの断片をBamHIで切り出し、pBS4SのBamHI部位に挿入することで変異導入用プラスミドが構築できる。このプラスミドを用いて実施例1記載の方法と同様にしてATCC13869-L株を形質転換し、染色体に変異導入用プラスミドが挿入された株を取得する。次に、これらの染色体にプラスミドが挿入された株から、スクロースに耐性を示し、かつカナマイシンに

40

50

感受性を示す株を分離する。さらにodhAの配列を確認し、目的フレームシフトが導入された株を選択することによりodhA遺伝子が欠損したL30sucA8(odhA8)株が構築できる。

【0079】

また、以下の方法でyggB変異株を用いて、他のodhA変異株を得ることができる。

配列番号44の塩基配列を有する変異型odhA遺伝子が導入されたL30sucA801株の取得には、5'末端がリン酸化された配列番号38の合成DNAの代わりに5'末端がリン酸化された配列番号39の合成DNAを用いて上記方法を適用すればよい。

配列番号46の塩基配列を有する変異型odhA遺伝子が導入されたL30sucA805株の取得には、5'末端がリン酸化された配列番号38の合成DNAの代わりに5'末端がリン酸化された配列番号40の合成DNAを用いて上記方法を適用すればよい。

配列番号48の塩基配列を有する変異型odhA遺伝子が導入されたL30sucA77株の取得には、5'末端がリン酸化された配列番号38の合成DNAの代わりに5'末端がリン酸化された配列番号41の合成DNAを用いて上記方法を適用すればよい。

【0080】

L30sucA8株のodhA遺伝子はフレームシフト変異であるために、KGDH活性を有さない。しかし、L30sucA801株、L30sucA805株、L30sucA77株はodhA遺伝子に欠失があるものの、フレームシフトが起こらない変異となっており、KGDH活性を有している(データは示さず)。

【0081】

【表6】

<表6. 変異型odhAの部分配列>

菌株名	odhA 配列
ATCC13869-L	CTG GCT AAG CTG CGT GGC TAC GAC GTC GGA GGC ACC
L30sucA8	CTG GCT AAG CTG CGT C GAC GTC GGA GGC ACC
L30sucA801	CTG GCT AAG CTG CGT CTC GAC GTC GGA GGC ACC
L30sucA805	CTG GCT AAA AGC TGC GTC GAC GTC GGA GGC ACC
L30sucA77	CTG GCT ATA AGC TGC GTC GAC GTC GGA GGC ACC

【0082】

【表7】

<表7. 変異型 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼの部分配列>

菌株名	α -KGDH 配列
Wild	Leu Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr
L30sucA8(Δ sucA)	Leu Ala Lys Leu Arg Arg Arg Arg Arg His
L30sucA801	Leu Ala Lys Leu Arg --- Leu Asp Val Gly Gly Thr
L30sucA805	Leu Ala Lys Ser Cys --- Val Asp Val Gly Gly Thr
L30sucA77	Leu Ala Ile Ser Cys --- Val Asp Val Gly Gly Thr

【0083】

<odhA改変株のL-グルタミン酸生産培養>

これらのodhA改変株のL-グルタミン酸生産能を、坂口フラスコを用いた培養を行うことにより検証した。表4に示した株をCM-Dex寒天培地で31.5 で一昼夜培養を行い、フラスコ培地(グルコース60g/l、硫酸22.5g/l、KH₂PO₄ 1g/l、MgSO₄·7H₂O 0.4g/l、FeSO₄·7H₂O 0.01g/l、MnSO₄·4-5H₂O 0.01g/l、ビタミンB1 200 μ g/l、大豆蛋白加水分解液0.48g/l、ピオチン300 μ g/l、KOHを用いてpH8.0に調整)20mlに1/6プレート分の菌体を接種し、予め乾熱滅菌しておいた炭酸カルシウム1gを添加した後、31.5、速度115rpmで振とう培養を行った。培養開始19時間目のL-グルタミン酸蓄積を表8に示した。odhA改変株の中には、ATCC13869-L株とほぼ同等のL-グルタミン酸蓄積のものも含まれていたが、suc

10

20

30

40

50

A801, sucA805, sucA77株はsucA8株よりも高いL-グルタミン酸蓄積を示した。これらの結果から、L-グルタミン酸の効率よい生産には KGDH活性のファインチューニングが有効であり、そのためにはodhA遺伝子のチアミンピロリン酸結合部位近傍に変異を導入する方法が有効であることが示された。

【 0 0 8 4 】

【表 8】

<表 8. odhA 改変株による L-グルタミン酸生産>

菌株名	Glu (g/L)
ATCC13869-L	4.9
L30sucA8	19.8
L30sucA801	22.1
L30sucA805	23.8
L30sucA77	21.6

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 5 】

【図 1】 プラスミド pBS3 の構築手順を示す図。

【図 2】 プラスミド pBS4S の構築手順を示す図。

【図 3】 プラスミド pBS0AGN の構築を示す図。

【図 4】 プラスミド pBS0A2-2 の構築を示す図。

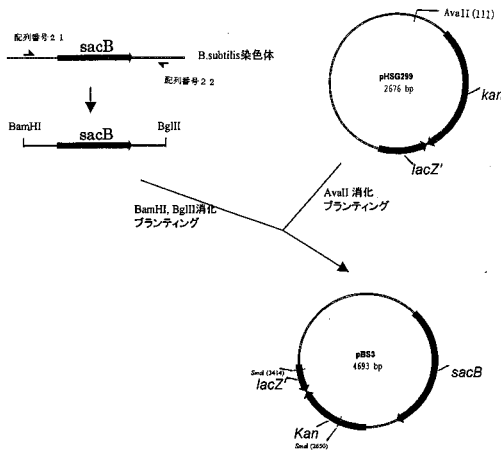
【図 5】 各菌株の培養時の L - グルタミン酸濃度の変化を示す図。

【図 6】 各菌株の菌体量の変化を示す図。

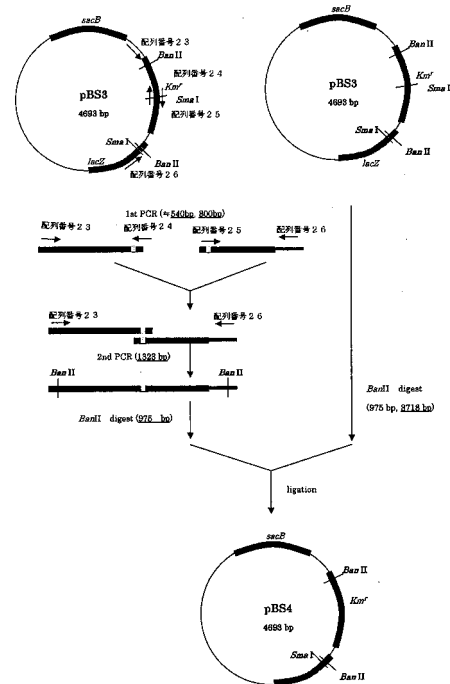
【図 7】 各菌株の培養時の残糖量の変化を示す図。

20

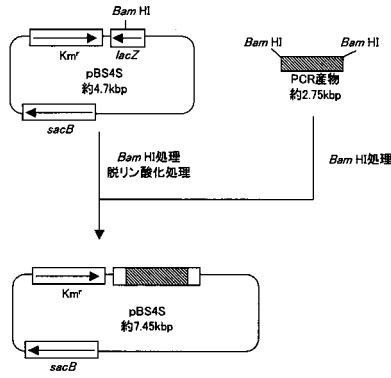
【 図 1 】



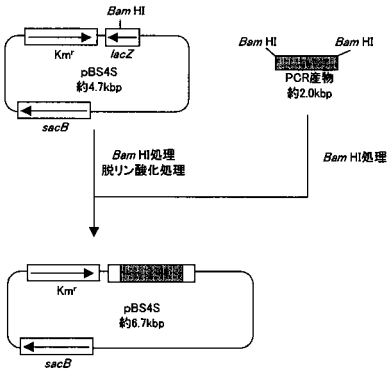
【 図 2 】



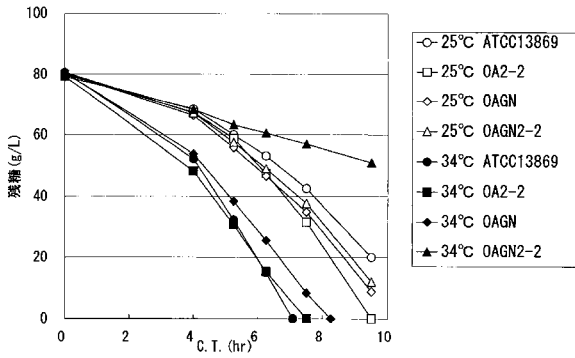
【 図 3 】



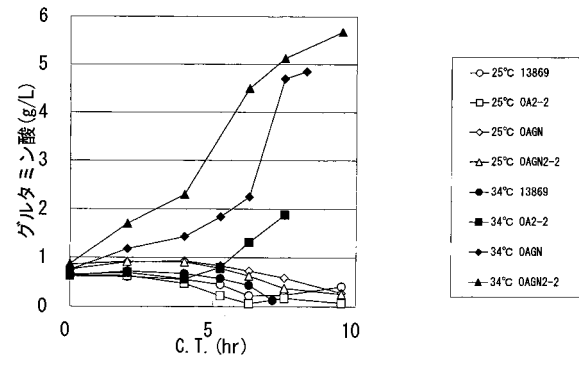
【 図 4 】



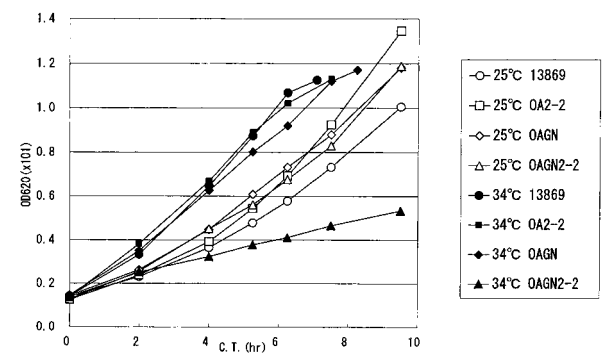
【 図 7 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2006101875000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 R 1:15

(72)発明者 山口 美喜子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

(72)発明者 伊藤 久生

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA08 BA74 CA02 DA10 EA04 GA14

4B050 CC04 DD02 LL10

4B064 AE19 CA02 CA19 CC24 DA10

4B065 AA15Y AA24X AA24Y AB01 AC14 BA02 BA03 CA17 CA60