(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2004-222569
(P2004-222569A)
(43)公開日　平成16年8月12日(2004.8.12)

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	A	4B024
C12N 1/21	C12N 1/21	ZNA	4B064
C12P 13/00	C12P 13/00		4B065

審査請求 未請求　請求項の数 24　OL　（全 34 頁）

(21)出願番号　特願2003-13213(P2003-13213)
(22)出願日　平成15年1月22日(2003.1.22)

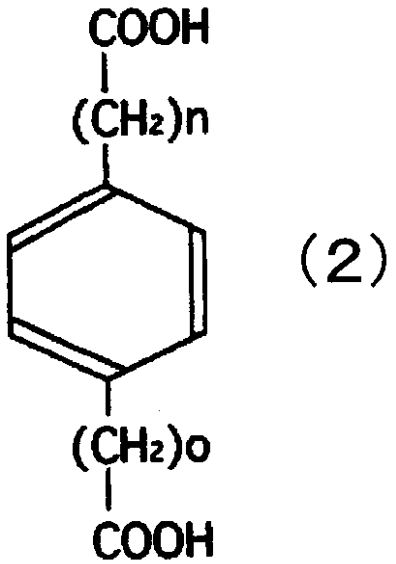
(71)出願人　000003159
東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町２丁目２番１号
(72)発明者　耳塚　孝
愛知県名古屋市港区大江町９番地の１　東レ株式会社名古屋事業場内
(72)発明者　畠平　智子
愛知県名古屋市港区大江町９番地の１　東レ株式会社名古屋事業場内
(72)発明者　澤井　秀樹
愛知県名古屋市港区大江町９番地の１　東レ株式会社名古屋事業場内
(72)発明者　山田　勝成
愛知県名古屋市港区大江町９番地の１　東レ株式会社名古屋事業場内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】コリネ型細菌、ならびにカダベリンもしくはその塩およびそれらの製造方法

(57)【要約】
【課題】コリネ型細菌を遺伝子工学的手法を用い、カダベリン発酵を可能にし、該組み換えコリネ型細菌をカダベリン発酵し、その発酵液から高純度のカダベリンを単離する。
【解決手段】本発明の課題は、Ｌ－リジン脱炭酸酵素活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性の少なくともいずれか１つの特徴を有するコリネ型細菌を培養し、この培養液から濃縮、有機溶媒添加、ろ過、晶析、抽出、蒸留等適宜組み合わせることによりカダベリン、カダベリン二塩酸塩もしくカダベリン・ジカルボン酸塩を製造することによって解決される。
【選択図】なし

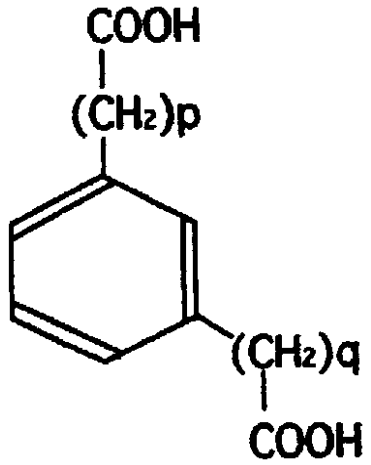
【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｌ－リジン脱炭酸酵素活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性の少なくともいずれか１つの特徴を有しているコリネ型細菌。
【請求項２】
該コリネ型細菌が、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していること特徴とする請求項１に記載のコリネ型細菌。
【請求項３】
該コリネ型細菌が、遺伝子挿入変異生成によりホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していることを特徴とする請求項１または２に記載のコリネ型細菌。
【請求項４】
該遺伝子挿入が、Ｌ－リジン脱炭酸酵素遺伝子発現カセット（プロモーターおよびＬ－リジン脱炭酸酵素遺伝子）の挿入であることを特徴とする請求項３に記載のコリネ型細菌。
【請求項５】
該コリネ型細菌の属が、コリネバクテリウム属およびブレビバクテリウム属からなる群より選ばれる少なくとも１つの属であることを特徴とする請求項１から４のいずれかに記載のコリネ型細菌。
【請求項６】
配列番号１５記載のアミノ酸配列において３１１番目のアミノ酸残基がＴｈｒ以外のアミノ酸に置換された変異アスパルトキナーゼ遺伝子を有することを特徴とする請求項１から５のいずれかに記載のコリネ型細菌。
【請求項７】
請求項１から６のいずれかに記載のコリネ型細菌を増殖させる工程と、その菌体の培養上清からカダベリンまたはその塩を回収、精製する工程からなることを特徴とするカダベリンまたはその塩の製造方法。
【請求項８】
請求項１から６のいずれかに記載のコリネ型細菌を増殖させる工程と、その菌体の培養上清をアルカリでｐＨ１２から１４にし、極性有機溶媒でカダベリンを抽出回収することを特徴とするカダベリンの製造方法。
【請求項９】
該アルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよび水酸化カルシウムよりなる群より選ばれる少なくとも１つであることを特徴とする請求項８記載のカダベリンの製造方法。
【請求項１０】
該極性有機溶媒が、アニリン水溶液、シクロヘキサノン、１－オクタノール、イソブチルアルコール、シクロヘキサノールおよびクロロホルムよりなる群より選ばれる少なくとも１つであることを特徴とする請求項８または９のいずれかに記載のカダベリンの製造方法。
【請求項１１】
請求項１から６のいずれかに記載のコリネ型細菌を塩酸により培養液のｐＨを維持し増殖させる工程と、その菌体の培養上清から晶析工程によりカダベリン二塩酸塩を回収することを特徴とするカダベリン二塩酸塩の製造方法。
【請求項１２】
請求項１から６のいずれかに記載のコリネ型細菌をジカルボン酸により培養液のｐＨを維持し増殖させる工程と、その菌体の培養上清から晶析工程によりカダベリン・ジカルボン酸塩を回収することを特徴とするカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項１３】
該ジカルボン酸が、官能基としては２つのカルボキシル基のみを有する脂肪族および／または芳香族のジカルボン酸であることを特徴とする請求項１２に記載のカダベリン・ジカ

ルボン酸塩の製造方法。
【請求項１４】
該ジカルボン酸が、
以下の一般式（１）、（２）または（３）で示されるジカルボン酸のいずれかであることを特徴とする請求項１２に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_m$－ＣＯＯＨ　　（１）
（但し、一般式（１）において、ｍ＝０～１６）
【化１】



(2)

【化２】



(3)

（但し、一般式（２）、（３）において、ｎ，ｏ，ｐ，ｑ＝０～５）
【請求項１５】
該一般式（１）において、
ｍ＝０～１０
、および／または、該一般式（２）および／または（３）において、
ｎ，ｏ，ｐ，ｑ＝０～１
のいずれかであることを特徴とする請求項１２に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項１６】
該ジカルボン酸が、アジピン酸、セバシン酸、１，１２－ドデカンジカルボン酸、コハク酸、イソフタル酸またはテレフタル酸のいずれかであることを特徴とする請求項１２に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項１７】

該培養液から、カダベリン・ジカルボン酸塩を晶析する際に、有機溶媒を添加することを特徴とする請求項１２から１６のいずれかに記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項１８】
該有機溶媒が、アルコール類、ケトン類およびニトリル類よりなる群より選ばれる少なくとも１つであることを特徴とする請求項１７に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項１９】
該有機溶媒が、炭素数６以下の脂肪族アルコール類、炭素数６以下の脂肪族ケトン類および炭素数６以下の脂肪族ニトリル類よりなる群から選ばれる少なくとも１つであることを特徴とする請求項１７に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項２０】
該有機溶媒が、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノール、イソプロパノール、アセトニトリルおよびアセトンよりなる群から選ばれる少なくとも１つであることを特徴とする請求項１７に記載のカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法。
【請求項２１】
請求項７～２０のいずれかに記載の方法にて製造された、２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩。
【請求項２２】
請求項７～２０のいずれかに記載の方法にて製造された、トリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が０．００６重量％以下のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩
【請求項２３】
請求項７～２０のいずれかに記載の方法にて製造された、２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下かつトリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が０．００６％以下のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩
【請求項２４】
請求項１から２０のいずれか１項記載の方法で得られるカダベリン、カダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩、または請求項２１から２３のいずれか１項記載のカダベリン、カダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩を原料として含有するポリアミド。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、カダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩とそれらの製造法ならびに前記製造法に好適に用いられる細菌に関するものである。カダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩はポリアミドの原料として期待され、需要が高まりつつある。
【０００２】
【従来の技術】
従来、Ｌ－リジンを微量のテトラリン過酸化物を含むシクロヘキサノール中で煮沸することによりカダベリンが得られることが知られている（非特許文献１参照。）。しかしながら高温反応であるために大量のエネルギーおよび有機溶媒が必要であるうえに、反応収率が非常に低い（３６％）。
【０００３】
また、２－シクロヘキセン－１－オンなどのビニルケトン類を触媒としてリジンから合成する方法が知られている（非特許文献２参照。）。
【０００４】
さらにＬ－リジンを、３－メチル－シクロヘキセノンを触媒にナトリウムメトキシドを含

むシクロヘキサノール中で１５５℃、３時間加熱攪拌することによりカダベリンが得られることが知られている（特許文献１参照。）。

【０００５】

また、この方法によって得られるカダベリンには不純物として、トリ－ｎ－ブチルアミンや２，３，４，５－テトラヒドロピリジンといった塩基性化合物が含有されている。

【０００６】

また、カダベリンは生体内に普遍的に存在する生体アミンであり、その生合成系が解明されつつある（非特許文献３参照。）。その生合成経路はＬ－リジンからカダベリンの脱炭酸反応を触媒するＬ－リジン脱炭酸酵素（以下ＬＤＣと略す）が知られている。例えばその遺伝子として、エシェリシア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）由来のＬＤＣ遺伝子が知られている（非特許文献４参照。）。

【０００７】

また、カダベリンの組み換え大腸菌での発酵による製造方法（特許文献２参照）および組み換え大腸菌での酵素法による製造方法（特許文献３参照）が知られている。

【０００８】

また、ポリアミドは、原料であるフリーのジアミンおよびフリーのジカルボン酸を、各々を精製した後、等モル混合し重合反応を行い製造していた。従来のジアミンおよびジカルボン酸は石油由来の原料を用いるため、溶媒を特に用いることなくフリーのジアミンおよびジカルボン酸が得られた（非特許文献５参照。）。そのため水溶液からのジアミン・ジカルボン酸の晶析を検討する必要はなかった。

【０００９】

しかし、化学合成法とは異なる発酵によりポリアミド原料を製造するためには、溶媒として水を使うことが一般的であり、また発酵を行うためには溶液のｐＨの調整が一般的に必要である。これら中和剤としてはアルカリ金属水酸化物または無機酸が一般的に用いられ、それらの塩としてジアミンまたはジカルボン酸が晶析されている。例えば、ジカルボン酸であるコハク酸の発酵による製法などでは、コハク酸カルシウムとして晶析し精製している（特許文献４参照。）。

【００１０】

一方で、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属に属する微生物を用いた発酵法によるＬ－リジンの製造法としては以下の方法が知られている。

（１）Ｌ－リジン生産変異株を用いる方法としては、例えば、Ｓ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン（以下、ＡＥＣと略す）耐性変異株（非特許文献６参照。）、Ｌ－ホモセリン要求変異株（非特許文献６参照。）、呼吸系阻害剤耐性変異株（特許文献５参照。）、ピリミジンアナログ耐性変異株（特許文献６参照。）、プリンアナログ耐性変異株（特許文献７参照。）等が知られている。

（２）遺伝子組換え技術を用いた組換え菌による方法としては、コリネバクテリウム属に属する微生物において、自立複製し、選択可能な表現型を与えるマーカー遺伝子を有するベクタープラスミド、およびそれを効率良く該細菌に導入する方法が開示されており、それらを用いてＬ－リジンの合成に関与する遺伝子の細胞内コピー数を増し、Ｌ－リジンを効率良く製造する方法が開示されている（特許文献８参照。）。

【００１１】

Ｌ－リジンの生合成制御としては、Ｌ－アスパラギン酸からアスパラチルリン酸の生合成を触媒するアスパルトキナーゼ（以下、ＡＫと略す）に対するＬ－リジンとＬ－スレオニンによる協奏的フィードバック阻害が最も良く知られている。このフィードバック阻害が解除された変異型ＡＫ（以下、脱感作型ＡＫと略す）をコードする遺伝子（以下、脱感作型ＡＫ遺伝子と略す）を有するコリネバクテリウム属に属する微生物では、ＡＥＣ耐性を獲得し、Ｌ－リジンを菌体外に分泌することが知られている（非特許文献６参照。）。さらにＬ－リジンおよびＬ－スレオニンによる協奏フィードバック阻害およびＬ－リジン単独によるフィードバック阻害から解除された脱感作型ＡＫについても知られている（特許文献９参照。）。

【００１２】
また、ホモセリン要求性は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性が欠損することで得られることが知られている（非特許文献６参照。）。
【００１３】
しかしながら、カダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩の製造について実際的な製造技術は確立されておらず、高純度のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を製造する方法の開発が望まれている。
【００１４】
【特許文献１】
特開昭６０－２３３２８号公報第１１～１２頁
【００１５】
【特許文献２】
特開２００２－２２３７７０号公報第５頁
【００１６】
【特許文献３】
特開２００２－２２３７７１号公報第４～５頁
【００１７】
【特許文献４】
特開昭６２－２９４０９０号公報第６頁
【００１８】
【特許文献５】
特公平５－５５１１４号公報第１～４頁
【００１９】
【特許文献６】
特開昭５９－８８０９４号公報第１～３頁
【００２０】
【特許文献７】
特公昭６３－０６２１９９号公報第１～５頁
【００２１】
【特許文献８】
特公平５－１１９５９号公報第７～１９頁
【００２２】
【特許文献９】
ＷＯ００／６３３８８号公報第１０～２９頁
【００２３】
【非特許文献１】
須山正，金尾清造，「アミノ酸の脱炭酸（第４報）」，薬学雑誌，１９６５年，第８５巻，第６号，ｐ．５３１－５３３
【００２４】
【非特許文献２】
ミツノリハシモト（Ｍｉｔｓｕｎｏｒｉ　Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ）、外４名，「ケミストリーレターズ（Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ）」，１９８６年，ｐ．８９３－８９６
【００２５】
【非特許文献３】
セリアホワイトテーバー（Ｃｅｌｉａ　ｗｈｉｔｅ　ｔａｂｏｒ）、外１名，「マイクロバイオロジカルレビューズ（Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ）」，１９８５年，第４９巻，ｐ．８１－９９
【００２６】
【非特許文献４】

シユアンメング（Ｓｈｉ－ｙｕａｎｍｅｎｇ）、外１名，「ジャーナルオブバクテリオロジー（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ）」，１９９２年，第１７４巻，ｐ．２６５９－２６６９

【００２７】

【非特許文献５】

向山光昭著，「工業有機化学」，第４版，東京化学同人，ｐ．２７０－２７３，２７５－２８１

【００２８】

【非特許文献６】相田浩，「アミノ酸発酵」，学会出版センター，１９８６年，ｐ．２７３－３０５

【００２９】

【発明が解決しようとする課題】

トリ－ｎ－ブチルアミンおよび２，３，４，５－テトラヒドロピリジンが多く含有されているカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩をポリマーの原料とする場合、たとえば、カダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を含む原料からポリアミドを加熱重縮合で合成する際には、反応温度が高温であるため、カダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩に含まれるトリ－ｎ－ブチルアミンや２，３，４，５－テトラヒドロピリジンなどの塩基性化合物がポリアミドの分解反応を起こし得られたポリアミドに耐熱性が不足するといった問題点がある。

【００３０】

さらに、トリ－ｎ－ブチルアミンは、水性生物に有毒で、魚類に対する致死量は２０から４０ｍｇ／ｌであるといった問題点もある。

【００３１】

本発明の課題は、このような不純物の少ないカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を、発酵によりカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を製造する方法を提供することである。

【００３２】

【課題を解決するための手段】

上記問題点を解決するために、本発明者らは、発酵によりカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩の製造方法について鋭意研究を行った結果、Ｌ－リジン脱炭酸酵素活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性の少なくともいずれか１つの特徴を有しているコリネ型細菌を増殖させ、その菌体の培養上清からカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を得られることを見出した。

【００３３】

すなわち、本発明は、「（１）Ｌ－リジン脱炭酸酵素活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性の少なくともいずれか１つの特徴を有しているコリネ型細菌。

（２）該微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清からカダベリンを回収、精製する工程からなることを特徴とするカダベリンまたはその塩の製造方法。

（３）２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩。

（４）トリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が０．００６重量％以下のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩。

（５）上記（２）の方法で得られたカダベリンまたはその塩または上記（３）あるいは（４）記載のカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を原料として含有するポリアミド。」である。

【００３４】

【発明の実施の形態】

カダベリンとは１，５－ペンタンジアミンのことであり、ポリマー原料として有用な化合物である。

【００３５】

本発明におけるコリネ型細菌としてはアグロコッカス（Ａｇｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、グロマイセス（Ａｇｒｏｍｙｃｅｓ）属、アースロバクター（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）属、オーレオバクテリウム（Ａｕｒｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ブレビバクテリウム（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、セルロモナス（Ｃｅｌｌｕｌｏｍｏｎａｓ）属、クラビバクター（Ｃｌａｖｉｂａｃｔｅｒ）属、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ミクロバクテリウム（Ｍｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ラサイバクター（Ｒａｔｈａｙｉｂａｃｔｅｒ）属、テラバクター（Ｔｅｒｒａｂａｃｔｅｒ）属、ツリセラ（Ｔｕｒｉｃｅｌｌａ）属に属する細菌があげられる。好ましくは、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属に属する細菌をあげることができる。具体例として、例えば下記の菌株が用いられる。コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３０３２、コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３８６９、コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３８７０、コリネバクテリウム・カルナエＡＴＣＣ１５９９１、コリネバクテリウム・アセトグルタミカムＡＴＣＣ１５８０６があげられる。

【００３６】

これら野生型株はＬ－リジン、あるいはＬ－リジンとＬ－スレオニンによるフィードバック阻害がかかる、フィードバック阻害の解除された菌株を取得する方法としては、例えば、野生型株に、変異操作［例えばＮ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン（ＮＴＧ）を用いる方法；微生物実験マニュアル、１９８６年、１３１頁、講談社サイエンティフィック社］を施した後、ＡＥＣ耐性を指標に選択され、Ｌ－リジン生産性となった変異株から取得する方法をあげることができる。好適な変異株としては、コリネバクテリウム・グルタミカム野生型株ＡＴＣＣ１３０３２より変異処理により誘導されたＬ－リジン生産菌、あるいは野生型ＡＫ遺伝子を取得した後、上記ＮＴＧ法あるいは試験管内変異法（「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」，１９７８年，第１４５巻，ｐ．１０１）によって該遺伝子に変異を誘起し、ＡＥＣ耐性を有し、かつＬ－リジン生産性を指標に脱感作した脱感作型ＡＫ遺伝子を含む株等をあげることができる。

【００３７】

野生型株にＡＥＣ耐性を付与する更に好ましい方法として、遺伝子工学的手法を用いる方法である。遺伝子工学的手法を用いる方法に特に制限はなく、例えばコリネ型細菌で複製可能な組み換え体ＤＮＡを用いる方法、または相同組換えによって染色体中の目的遺伝子を組み換える方法である。配列番号１５記載のアミノ酸配列において３１１番目のアミノ酸残基がＴｈｒ以外のアミノ酸に置換された変異アスパルトキナーゼ遺伝子を有することによりＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性を獲得することができる。

【００３８】

コリネ型細菌で複製可能な組換え体ＤＮＡ作製のために用いられるベクターとしては、コリネ型細菌中で自立複製しうるものであればいかなるものでも良い。具体的には、ｐＣＧ１（特開昭５７－１３４５００号公報）、ｐＣＧ２（特開昭５８－３５１９７号公報）、ｐＣＧ４（特開昭５７－１８３７９９号公報）、ｐＣＧ１１（特開昭５７－１３４５００号公報）、ｐＣＧ１１６、ｐＣＥ５４、ｐＣＢ１０１（いずれも特開昭５８－１０５９９９号公報）、ｐＣＥ５１、ｐＣＥ５２、ｐＣＥ５３（「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ」，１９８４年，第１９６巻，ｐ．１７５）等があげられる。好適にはｐＣＧ１１６などのようにサイズが比較的小さく、クローニング部位を多数有し、薬剤耐性遺伝子などの選択可能なマーカー遺伝子を持つものが用いられる。

【００３９】

上記組換え体ＤＮＡをコリネ型細菌へ導入するための方法として、プロトプラスト法（例えば、特開昭５７－１８６４９２号公報および特開昭５７－１８６４９号公報）、電気穿孔法（「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ」，１９９３年，第１７５巻

，ｐ．４０９６）等をあげることができる。
【００４０】
更に好ましい遺伝子工学的手法は、コリネ型細菌の染色体にあるＡＫ遺伝子を脱感作型ＡＫ遺伝子に相同組み換えにより組み換える方法である。さらに、脱感作型ＡＫ遺伝子は、ＡＫ遺伝子に望みの変異導入する技法（例えば、ストラタジーン社ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅサイトダイレクテッド・ミュータジェネシス・キットを用いる方法）で取得することが好ましい。
【００４１】
また、野生型株はホモセリン栄養要求性はない。ホモセリン栄養要求性株を取得する方法としては、先の例と同様に例えば、野生型株から変異操作を施した後、ホモセリン栄養要求性を指標に選択され、Ｌ－リジン生産性となった変異株から取得する方法をあげることができる。
【００４２】
また野生型株にホモセリン栄養要求性を付与する更に好ましい方法として、相同組換えによって染色体中のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子（以下ＨＯＭ遺伝子と略す）にその他の遺伝子を挿入する方法等によりホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損させる方法があげられる。その他の遺伝子に特に制限はない。好ましくはＬＤＣ遺伝子であり、更に好ましくはＬＤＣ遺伝子が野生型株で構成的に発現できるプロモーターとカセットになっているものである。
【００４３】
ＡＫ遺伝子、ＨＯＭ遺伝子およびＬＤＣ遺伝子は、これら遺伝子を含む株より、例えば斎藤らの方法（「Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ」，１９６３年，第７２巻，ｐ．６１９）により単離することで取得することができる。即ち、染色体ＤＮＡを調製し、これを適当な制限酵素で切断する。切断後、得られた切断断片を微生物内で自立複製可能なベクター（例えばプラスミド）に連結し、これをこれら酵素活性が欠損した宿主微生物に導入する。該微生物よりこれら活性を発現するようになった形質転換株を単離し、該形質転換株より該遺伝子を単離することにより取得することができる。
【００４４】
該宿主微生物としては、これら遺伝子が発現可能な微生物であれば、いずれも用いることができる。好適には大腸菌があげられる。自立複製可能なベクターとしては、該ベクターを導入した微生物中で自立複製できるものならばいかなるものでも良い。例えば、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＨＳＧ２９８、ｐＨＳＧ２９９、ｐＨＳＧ３９６、ｐＨＳＧ３９８等の大腸菌中で自立複製可能なベクターをあげることができる。ベクターとこれら遺伝子を含むＤＮＡ断片との連結は、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ等を用いる通常の方法で行なうことができる。
【００４５】
宿主への導入は例えば大腸菌の場合、ハナハンらの方法（「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ＭｏｌｅｃｕｌａｒＢｉｏｌｏｇｙ」，１９８３年，第１６６巻，ｐ．５５７）等により行なうことができる。
【００４６】
好ましくは、以下の方法によりＡＫ遺伝子、ＨＯＭ遺伝子およびＬＤＣ遺伝子を単離取得できる。
【００４７】
既に公知のコリネバクテリウム・グルタミカム由来ＡＫ遺伝子の塩基配列情報、ＨＯＭ遺伝子の塩基配列情報、またすでに公知の大腸菌由来のＬＤＣ遺伝子の塩基配列情報を基にオリゴマーＤＮＡを合成し、該ＤＮＡをプライマーとして用い、ＰＣＲ法により該遺伝子を含むＤＮＡ断片を増幅単離する。該ＤＮＡ断片を選択マーカー遺伝子を有するベクターに連結して大腸菌、コリネ型細菌等の適当な宿主微生物に導入する。該微生物より導入したベクターを単離することにより、ＡＫ遺伝子、ＨＯＭ遺伝子およびＬＤＣ遺伝子を取得

することができる。宿主微生物にこれら酵素の欠損株を用いる必要はなく取得できる。
【００４８】
ＬＤＣは、Ｌ－リジンをカダベリンに転換させる酵素であり、エシェリシア・コリＫ１２株をはじめとするエシェリシア属微生物のみならず、多くの生物に存在することが知られている。
【００４９】
本発明において使用されるＬＤＣ遺伝子に特に制限はないが、例えば、バシラス・ハロドゥランス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｈａｌｏｄｕｒａｎｓ）、バシラス・サブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、エシェリシア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、セレノモナス・ルミナンチウム（Ｓｅｌｅｎｏｍｏｎａｓ ｒｕｍｉｎａｍｔｉｕｍ）、ビブリオ・コレラ（Ｖｉｂｒｉｏｃｈｏｌｅｒａｅ）、ビブリオ・パラヘモリティカス（Ｖｉｂｒｉｏ ｐａｒａｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）、ストレプトマイセス・コエリカーラ（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｃｏｅｌｉｃｏｌｏｒ）、ストレプトマイセス・ピロサス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｉｌｏｓｕｓ）、エイケネラ・コロデンス（Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ ｃｏｒｒｏｄｅｎｓ）、イユバクテリウム・アシダミノフィルム（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｉｄａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ）、サルモネラ・ティフィムリウム（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、ハフニア・アルベイ（Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉ）、ナイセリア・メニンギチデス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、テルモプラズマ・アシドフィルム（Ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｍａ ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ）、またはピロコッカス・アビシ（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ａｂｙｓｓｉ）由来のものが好ましく用いられる。さらに好ましくは安全性の認められているエシェリシア・コリ由来のものである。
【００５０】
本発明で用いられるコリネ型細菌は、ＬＤＣ活性を有し、かつホモセリン栄養要求性またはＡＥＣ耐性の少なくともいずれか１つの特性を有しており、好ましくは、ＬＤＣ活性を有し、かつホモセリン栄養要求性とＡＥＣ耐性を有しているコリネ型細菌である。
【００５１】
これらコリネ型細菌を培養するとカダベリンを培養液中に生成蓄積させることができる。
【００５２】
培養培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含む通常の栄養培地を用いることができる。
【００５３】
炭素源としては、例えばグルコース、果糖、シュークロース、マルトース、でんぷん加水分解物等の糖類、エタノールなどのアルコール類、酢酸、乳酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。
【００５４】
窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、尿素、その他窒素含有化合物、ならびに肉エキス、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、大豆加水分解物等の窒素含有有機物を用いることができる。
【００５５】
無機塩としてはリン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム等を用いることができる。
【００５６】
その他、必要に応じて、ビオチン、チアミン、ビタミンＢ６等の微量栄養源を加えることができる。これら微量栄養源は、肉エキス、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、カザミノ酸等の培地添加物で代用することもできる。
【００５７】
培養条件にも特に制限はなく、振とう培養、深部通気撹拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は一般に２５℃～４２℃に、特に好ましくは２８℃～３８℃である。培養時間に

特に制限はなく、通常１日から６日間である。

【００５８】

このカダベリン発酵において培養ｐＨ調整にはアンモニアおよび塩酸またはジカルボン酸を使用することが好ましく。これら中和剤を用い培養ｐＨを５～８に、特に好ましくはｐＨ６．５～７．５に制御するのがよい。なお中和剤の状態に制限はなく、気体、液体、固体または水溶液で使用される。特に好ましくは水溶液である。

【００５９】

中和剤として用いるジカルボン酸に特に制限はなく、好ましくは、

官能基としては２つのカルボキシル基のみを有する脂肪族および／または芳香族のジカルボン酸である。官能基としては２つのカルボキシル基のみを有する脂肪族または芳香族のジカルボン酸とは、前記２つのカルボキシル基以外には、実質上、官能基が存在しないものである。ここでいう官能基とは、ポリアミド重合反応（反応条件としては、例えば、反応温度２５０～２７０℃、圧力１０～２０ｋｇ／ｃｍ^{2}で反応時間１から５時間）の際にアミノ基やカルボキシル基等と反応して、ポリマーの分岐を引き起こしたり、ポリマーの結晶化度を低下（結晶化度８０％以下）させるような基を指す。例えばアミノ基やカルボキシル基がこれに該当するが、それ以外には、酸性基（スルホン酸基、リン酸基、フェノール性水酸基等）や塩基性基（ヒドラジノ基等）やプロトニックな極性基（水酸基等）や開裂性を有する基（エポシキ基、過酸化基等）やその他反応性の高い基（イソシアナート基等）が該当することが多い。一方、ハロゲン置換基や芳香族性置換基は比較的安定であり、エーテル、エステル、アミド等も安定であり、官能性が低い場合が多い。

【００６０】

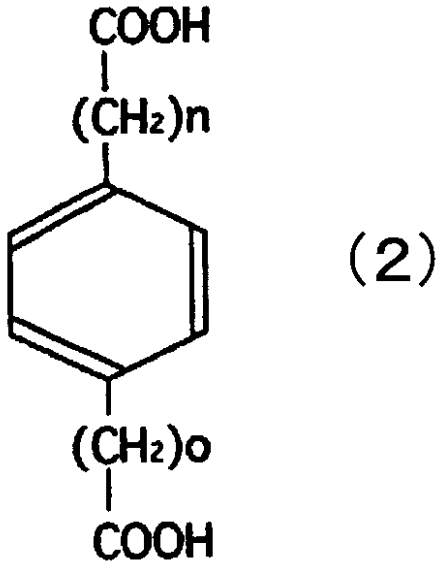
ジカルボン酸として、より好ましくは、以下の一般式（１）、（２）または（３）で示されるジカルボン酸である。

ＨＯＯＣ－（ＣＨ$_2$）$_m$－ＣＯＯＨ　　（１）

（但し、一般式（１）において、ｍ＝０～１６）

【００６１】

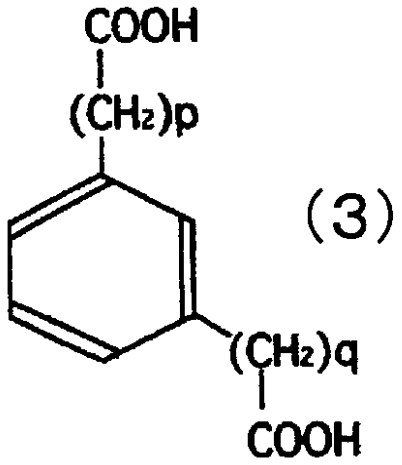
【化３】



(2)

【００６２】

【化４】



(3)

【００６３】
（但し、一般式（２）、（３）において、ｎ，ｏ，ｐ，ｑ＝０～５）
更に好ましくは
一般式（１）において、
ｍ＝０～１０
、および／または、該一般式（２）および／または（３）において、
ｎ，ｏ，ｐ，ｑ＝０～１
である。
【００６４】
より更に好ましくは、アジピン酸、セバシン酸、１，１２－ドデカンジカルボン酸、コハク酸、イソフタル酸、テレフタル酸である。
【００６５】
コリネ型細菌が増殖し、発酵が十分進んでカダベリンが生成した後、菌体と培養上清を分離（分離方法としては、菌体を沈殿除去（遠心分離等）、濾別しても良いし、あるいは始めから菌体を保持材等で分離・保持あるいは固定化していても良い）して、カダベリン発酵液を得る。
【００６６】
このように得られたカダベリン発酵液からカダベリンまたはカダベリン二塩酸塩またはカダベリン・ジカルボン酸塩を採取する方法に制限はない。
【００６７】
例えば発酵液からカダベリンを回収する際には、カダベリン発酵の際の中和剤に制限はない。発酵液をアルカリでｐＨ１２から１４にし、極性有機溶媒で抽出すれば良い。
【００６８】
用いるアルカリに特に制限はない。好ましくは水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、および／または水酸化カルシウムを用いることができる。
【００６９】
用いる極性有機溶媒に特に制限はない。好ましくはアニリン水溶液、シクロヘキサノン、１－オクタノール、イソブチルアルコール、シクロヘキサノール、および／またはクロロホルムを用いることができる。
【００７０】
抽出した極性有機溶媒を蒸留等の通常の方法で溶媒とカダベリンを分離すればよい。
【００７１】
それに対し、カダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩を回収する際には、カダベリン発酵の際の中和剤は好適な中和剤を選択することが好ましい。
【００７２】
例えばカダベリン二塩酸塩の場合では、中和剤は塩酸を用いることが好ましい。同様にカダベリン・ジカルボン酸塩の場合では、中和剤は先に述べたジカルボン酸を用いることが

好ましい。
【００７３】
このように中和剤を選択することで望みのカダベリン塩を回収することができる。
【００７４】
例えば、カダベリン・ジカルボン酸塩を得る方法としては、中和剤を選択し得られた発酵液を濃縮し、有機溶媒を添加した晶析操作により採取できる。
【００７５】
晶析操作前に発酵液中のカダベリンとジカルボン酸を等モルに調整することが好ましい。更に好ましくはジカルボン酸を過剰に加える方がよい。
【００７６】
発酵液に添加する有機溶媒は、アルコール類、ケトン類またはニトリル類が好ましい。更に好ましくは、炭素数６以下の脂肪族アルコール類、炭素数６以下の脂肪族ケトン類または炭素数６以下の脂肪族ニトリル類である。
【００７７】
例えば有機溶媒の具体的例として、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノール、イソプロパノール、アセトニトリルおよび／またはアセトン等があげられる。
【００７８】
その他、有機溶媒は単独である必要はなく、混合溶媒で有っても良い。例えば、エタノール・アセトン混合液等があげられる。
【００７９】
用いる有機溶媒量は特に限定されないが、発酵液の重量に対して通常０．１～５倍、より好ましくは０．３～２倍が使用される。あるいは、カダベリン・ジカルボン酸塩重量に対して、好ましくは１～１０（より好ましくは３～７）倍である。発酵液と有機溶媒との接触方法は任意であり、バッチ法であっても連続法であってもよい。
【００８０】
晶析を効率的に行うために、および釜効率を良くするために発酵液は濃縮するのが好ましい。濃縮の程度は、無機塩およびカダベリン・ジカルボン酸塩が結晶として析出しない程度が好ましい。発酵液中のカダベリン・ジカルボン酸塩濃度、その他の塩濃度によって濃縮の程度は変わるが、重量基準で１／４～１／３０まで濃縮するのが好ましく、１／１０～１／２０まで濃縮するのがより好ましい。
【００８１】
濃縮方法は常圧濃縮、減圧濃縮のいずれでもよいが、濃縮時の液温は通常、水の沸点以下で行われる。かかる液温とするとカダベリン・ジカルボン酸塩が分解する恐れがない。このようにして、製造されたカダベリン・ジカルボン酸塩は、カダベリン１分子とジカルボン酸１分子よりなる塩であると考えて良いが、何等他の形態を排除するものでもなく、例えばカダベリン２分子とジカルボン酸２分子より形成された塩等が含まれていても良い。
【００８２】
次いで、濃縮工程で濃縮された発酵液に有機溶媒を添加し、析出した結晶を遠心分離などの通常の固液分離の方法によって取り除き、この有機溶媒からカダベリン・ジカルボン酸塩を通常の晶析分離操作によりカダベリン・ジカルボン酸塩を単離する。例えば、有機溶媒を添加した濃縮液をそのまま冷却してカダベリン・ジカルボン酸塩を晶析した後、結晶を遠心分離などの通常の固液分離の方法によって単離すると高純度のカダベリン・ジカルボン酸塩を得ることができる。
【００８３】
晶析行程でカダベリン・ジカルボン酸塩から分離された有機溶媒は晶析操作にリサイクルすることが好ましい。
【００８４】
かくして単離したカダベリン・ジカルボン酸塩は再度既知の晶析精製方法で、つまり、有機溶媒で均一溶液とした後、その均一液を冷却したり、熱時ろ過したろ液を冷却したりし

てカダベリン・ジカルボン酸塩を結晶化させ、高純度品にできる。
【００８５】
このようにして得られたカダベリンもしくはカダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩は、トリ－ｎ－ブチルアミンおよび２，３，４，５－テトラヒドロピリジンなどの不純物が少ない。本発明の方法で製造することで、以下の方法で分析した場合に、トリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が、０．００６重量％以下のカダベリンもしくはカダベリン二塩酸塩もしくはカタベリン・ジカルボン酸塩が得られる。さらに、以下の方法で分析した場合に、２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下のものが得られる。さらに、トリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が、０．００６重量％以下であり、かつ、２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下のものが得られる。
【００８６】
トリ－ｎ－ブチルアミンおよび２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの分析は、ＧＣ－ＭＳ法によって以下の条件で行う。
【００８７】
ＧＣ－ＭＳ：ＨＰ６９８０／ＨＰ５９７３Ａ
カラム：ＮＵＫＯＬ　３０ｍ×０．２４ｍｍＩ．Ｄ．　０．２μｍ　Ｆｉｌｍ
オーブン：１２０℃（一定）
インジェクト：２００℃（Ｓｐｌｉｔ　１０：１）
流速：Ｈｅ　２．４ｍｌ／ｍｉｎ（一定）
ＭＳ：２３０℃（ＳＣＡＮ　ｍ／ｚ＝３０から４００）
このようにして得られたカダベリンもしくはカダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩は、ポリアミドの原料として有用である。
【００８８】
ポリアミドの製造方法としては、カダベリンとジカルボン酸の塩、および水の混合物を、加熱して脱水反応を進行させる加熱重縮合法が用いられる。また、加熱重縮合後、固相重合することによって、分子量を上昇させることも可能である。固相重合は、１００℃から融点の温度範囲で、真空中、あるいは不活性ガス中で加熱することにより進行し、加熱重縮合では分子量が不十分なポリアミドを高分子量化することができる。
【００８９】
本発明で得られるカダベリンもしくはカダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩をポリアミドの原料とすることで、耐熱性の高いポリアミドが得られる。
【００９０】
なお、本発明においてＬＤＣ活性は、後述の実施例１の条件でＴＲ－ＣＡＤ１株の活性の、好ましくは０．０１倍（より好ましくは０．０５倍、更に好ましくは０．１倍）以上である。
【００９１】
【実施例】
以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例の記載に限定されるものではない。
【００９２】
［カダベリン濃度のＨＰＬＣによる分析方法］
使用カラム：ＣＡＰＣＥＬＬ　ＰＡＫ　Ｃ１８（資生堂）
移動相：０．１％（ｗ／ｗ）リン酸水溶液：アセトニトリル＝４．５：５．５
検出：ＵＶ３６０ｎｍ
サンプル前処理：分析サンプル２５μｌに内標として１，４－ジアミノブタン（０．０３Ｍ）を２５μｌ、炭酸水素ナトリウム（０．０７５Ｍ）を１５０μｌおよび２，４－ジニトロフルオロベンゼン（０．２Ｍ）のエタノール溶液を添加混合し３７℃で１時間保温する。上記反応溶液５０μｌを１ｍｌアセトニトリルに溶解後、１０，０００ｒｐｍで５分間遠心した後の上清１０μｌをＨＰＬＣ分析した。

【００９３】
［アジピン酸濃度のＨＰＬＣによる分析方法］
使用カラム：ＳＣＲ－１０１Ｈ（島津製作所）
移動相：０．０２５％（ｖ／ｖ）硫酸水溶液
検出：ＵＶ２１４ｎｍ
サンプル前処理：分析サンプルを、検量線が直線性を有することができる範囲内の濃度となるように、水で希釈し、１０μｌをＨＰＬＣ分析した。
【００９４】
実施例１（Ｌ－リジン脱炭酸活性を有し、かつホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損しているコリネバクテリウム・グルタミカムの作製）、比較例１
（１）ＨＯＭ遺伝子のクローニング
ＨＯＭ活性を欠損させるために、Ｎ末端から３００アミノ酸領域に該当する遺伝子をクローニングを行った。
【００９５】
データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているＨＯＭ遺伝子（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＢＡ０００００３６）の塩基配列を参考にオリゴヌクレオチドプライマー５’－ｇａａｇａａｔｔｃｔａａａｃｃｔｃａｇｃａｔｃｔｇｃｃｃｃ－３’（配列番号：１）および５’－ｇａａｇｇａｔｃｃａａａａｇｇａｃｔｔｇｔｔｔａｃｃｇａｃｇｃ－３’（配列番号：２）を合成した。コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３０３２から常法に従い調整したゲノムＤＮＡの溶液を増幅鋳型として０．２ｍｌのミクロ遠心チューブに０．２μｌづつ取り、各プライマーを２０ｐｍｏｌ、トリス塩酸緩衝液ｐＨ８．０（２０ｍＭ）、塩化カリウム（２．５ｍＭ）、ゼラチン（１００μｇ／ｍｌ）、各ｄＮＴＰ（５０μＭ）、ＬＡＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（２単位）（宝酒造製）となるように各試薬を加え、全量を５０μｌとした。ＤＮＡの変性条件を９４℃、３０秒、プライマーのアニーリング条件を５５℃、３０秒、ＤＮＡプライマーの伸長反応条件を７２℃、３分の各条件でＢｉｏＲａｄ社のサーマルサイクラーを用い、３０サイクルポリメラーゼ連鎖反応反応させた（以下ＰＣＲ法と略す）。尚、本実施例におけるＰＣＲ法は特に断らない限り、本条件にて行った。このＰＣＲ法により得られた産物を１％アガロースにて電気泳動し、ＨＯＭ遺伝子を含む約０．９ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キット（ＢＩＯ１０１社製）により精製した。この断片を、制限酵素のＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化し、得られた０．９ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＢａｍＨＩ断片を、予めＥｃｏＲＩおよびＢａｍＨＩで消化しておいたｐＨＳＧ２９８（宝酒造製）のＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ間隙にライゲーションキットｖｅｒ．１（宝酒造社製）を用いて挿入し、得られたプラスミドをｐＨＯＭ１と命名した。
（２）ＬＤＣ発現カセットの作成
まず、ＬＤＣをコリネバクテリウム・グルタミカムで構成的に発現させるためのプロモーターとしてカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターのクローニングを行った。
【００９６】
データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているｐＨＳＧ２９９（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｍ１９４１５）の塩基配列を参考にオリゴヌクレオチドプライマー５’－ｇａａｃｃｇｃｇｇｃｃｔｇａａｔｃｇｃｃｃｃａｔｃａｔｃｃ－３’（配列番号：３）および５’－ｇａａｃｃａｔｇｇｃｃｃｃｔｔｇｔａｔｔａｃｔｇ－３’（配列番号：４）を合成した。プラスミドｐＨＳＧ２９９を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：３）、（配列番号：４）をプライマーセットとしたＰＣＲ法により得られた産物を１％アガロースゲル電気泳動し、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域を含む０．３ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。この断片を、プラスミドベクターｐＴ７ｂｌｕｅ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＥｃｏＲＶ切断部位の３’－末端にＴ塩基が付加された間隙に、ライゲーションキットｖｅｒ．１を用いて挿入し、得られたプラスミドのうち制限酵素のＨｉｎｄＩＩＩおよびＳａｃＩＩで消化した際に３．２ｋｂの単一断片になるプラスミドをｐＫＭＰ１と命名した。

【００９７】
次に、ＬＤＣ遺伝子のクローニングを行った。
【００９８】
データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているＬＤＣ遺伝子（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｍ７６４１１）の塩基配列を参考にオリゴヌクレオチドプライマー５’－ｇａａｃｃａｔｇｇａｃｇｔｔａｔｔｇｃａａ－３’（配列番号：５）、５’－ｇａａｃｃｇｃｇｇｔｔａｔｔｔｔｔｔｇｃｔｔｔｃｔｔｃｔｔｔｔ－３’（配列番号：６）を合成した。エシェリシア・コリＡＴＣＣ１０７９８から常法に従い調整したゲノムＤＮＡの溶液を増幅鋳型としてオリゴヌクレオチド（配列番号：５）、（配列番号：６）をプライマーセットとしたＰＣＲ法により得られた産物を１％アガロースゲル電気泳動し、ＬＤＣ遺伝子を含む２．１ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。この断片を、プラスミドベクターｐＴ７ｂｌｕｅのＥｃｏＲＶ切断部位の３’－末端にＴ塩基が付加された間隙に、ライゲーションキットｖｅｒ．１を用いて挿入し、得られたプラスミドのうちＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで消化した際に４．０ｋｂの単一断片になるプラスミドをｐＣＡＤＡと命名した。
【００９９】
最後に、ｐＫＭＰ１をＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで消化し、この産物を１．２％アガロースゲル電気泳動し、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーター領域を含む０．３ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。こうして得られたＨｉｎｄＩＩＩ－ＮｃｏＩ断片を、予めＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで消化しておいたｐＣＡＤＡのＨｉｎｄＩＩＩ／ＮｃｏＩ間隙にライゲーションキットｖｅｒ．１を用い挿入し、得られたプラスミドをｐＴＭ１００と命名した。
（３）ＨＯＭ遺伝子破壊およびＬＤＣ遺伝子発現ベクターの作成
ｐＴＭ１００をＳａｃＩＩで消化し、この産物を１．０％アガロースゲル電気泳動し、ＬＤＣ発現カセットを含む２．４ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。こうして得られたＳａｃＩＩ断片を、予めＳａｃＩＩで消化しておいたｐＨＯＭ１のＳａｃＩＩ間隙にライゲーションキットｖｅｒ．１を用い挿入し、得られたプラスミドをｐＴＭ１０１と命名した（図１）。
（４）ｐＴＭ１０１の染色体への組み込み
コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３０３２（以下ＡＴＣＣ１３０３２株と略す）にプラスミドｐＴＭ１０１を、電気穿孔法［ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ，６５，ｐ．２９９（１９８９）］により導入し、カナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）が添加されているＬＢ（トリプトン（１０ｇ／ｌ）（Ｂａｃｔｏ社製）、酵母エキス（５ｇ／ｌ）（Ｂａｃｔｏ社製）、塩化ナトリウム（１０ｇ／ｌ））寒天培地上で選択した。
【０１００】
こうして選択された形質転換体から常法に従いゲノムＤＮＡ溶液を調整した。このゲノムＤＮＡを鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：５）（配列番号：６）をプライマーセットとして用いたＰＣＲ法を行い、得られた産物を１．０％アガロースゲルにて電気泳動したところ、２．１ｋｂの単一のバンドが観察された。このことから、選択された形質転換体が、ＨＯＭ遺伝子座に、ＬＤＣ遺伝子が挿入されていることが確認できた。この形質転換体を、コリネバクテリウム・グルタミカムＴＲ－ＣＡＤ１（以下ＴＲ－ＣＡＤ１株と略す）と命名した。
（５）ＴＲ－ＣＡＤ１株のＬＤＣ活性およびＨＯＭ活性の確認
まず、ＴＲ－ＣＡＤ１株（実施例１）がＬＤＣ活性を有しているかどうかを検査した。ＬＢ培地で１３０３２株（比較例１）を培養し、またカナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）が添加されているＬＢ培地でＴＲ－ＣＡＤ１株を培養し、得られたそれぞれの菌体をリン酸緩衝液ｐＨ．６．０（５０ｍＭ）で洗浄し、超音波照射することでそれぞれの細胞破砕液を得た。この細胞破砕液を適量、Ｌ－リジン塩酸塩（５０ｍＭ）（シグマアルドリッチ社製）、ピリドキサルリン酸一水和物（０．０５ｍＭ）（シグマアルドリッチ社製）、リン酸

緩衝液ｐＨ６．０（５０ｍＭ）よりなる反応液に溶解した。３０℃、１０分間反応させた後に、生成したカダベリンをＨＰＬＣにより分析した。また細胞破砕液中のタンパク質測定を、ローリー法（Ｌｏｕｒｙ　ｅｔ．ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９３，ｐ．２６５－２７５，（１９５１））によって測定した。

【０１０１】

酵素活性を、Ｌ－リジンをカダベリンに１分間に１ｎｍｏｌの変換するとき１Ｕとし、結果をタンパク質重量当たりの比活性で表１に示した。

【０１０２】

【表１】

表１

比較例No.と実施例No.	コリネ型細菌名	LDC活性 [mU/mg]
比較例１	ATCC13032	0
実施例１	TR-CAD1	512

【０１０３】

１３０３２株はＬＤＣ活性を有していないが、ＴＲ－ＣＡＤ１株はＬＤＣ活性を有していた。

【０１０４】

次に、ＴＲ－ＣＡＤ１株のＨＯＭ活性を欠損しているかどうかを検査した。

【０１０５】

ＬＢ培地で１３０３２株を培養し、またカナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）が添加されているＬＢ培地でＴＲ－ＣＡＤ１株を培養し、得られたそれぞれの菌体を生理食塩水で洗浄し、超音波照射することで得られるそれぞれの細胞破砕液を、トリス・ＨＣｌｐＨ７．０（１００ｍＭ）、硫酸アンモニウム（０．８Ｍ）、ＤＴＴ（１ｍＭ）、グリセリン（３０（ｖ／ｖ）％）より成る緩衝液に対して透析させた。こうして得られるそれぞれの酵素製剤を用いて、ＮＡＤＰＨの吸光度測定によりその消費量を定量し、表２のように、ＨＯＭ活性を測定した。タンパク質測定を、ローリー法によって測定した。

【０１０６】

【表２】

表２

物質添加順	物質	濃度	実施
1	トリス・HCl pH7.0/DTT	100mM/1mM	
2	NADPH	0.2mM	
3	酵素製剤	様々	
4	D,L-アスパルテイト-β-セミアルデヒド	4mM	ホモセリンデヒドロゲナーゼ反応開始

【０１０７】

酵素活性を、Ｌ－アスパルテイト－β－セミアルデヒドをＬ－ホモセリンに１分間に１ｎｍｏｌの変換するとき１Ｕとし、結果をタンパク質重量当たりの比活性で表３に示した。

【０１０８】

【表３】

表３

比較例No.と実施例No.	コリネ型細菌名	HOM活性[U/mg]
比較例１	ATCC13032	169
実施例１	TR-CAD1	0

【０１０９】
１３０３２株はＨＯＭ活性を有しているが、ＴＲ－ＣＡＤ１株はＨＯＭ活性を欠損していた。
【０１１０】
さらに、ＴＲ－ＣＡＤ１株がホモセリンを要求しているかどうかを検査した。このために、ＡＴＣＣ１３０３２株およびＴＲ－ＣＡＤ１株を、最少寒天培地（Ｋａｔｓｕｍａｔａ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ，１５９，ｐ．３０６－３１１，（１９８４））、Ｄ，Ｌ－ホモセリン（Ｄ，Ｌ－Ｈｓｅ）（２００μｇ／ｍｌ）を有する最少寒天培地、Ｌ－メチオニン（Ｌ－Ｍｅｔ）（１００μｇ／ｍｌ）およびＬ－スレオニン（Ｌ－Ｔｈｒ）（１００μｇ／ｍｌ）を有する最少寒天培地上、およびＬ－メチオニン、Ｌ－スレオニン（各１００μｇ／ｍｌ）およびカナマイシン（Ｋｍ）（１０μｇ／ｍｌ）を有する最少寒天培地上で培養し、かつ増殖を３０℃で２４時間の培養後に判定した。結果を表４にまとめる。
【０１１１】
【表４】
表４

比較例No.と実施例No.	コリネ型細菌名	最小寒天培地への添加物			
		添加物無し	D,L-Hse	L-Met、L-Thr	L-Met、L-Thr、Km
比較例１	ATCC13032	＋	＋	＋	－
実施例１	TR-CAD1	－	＋	＋	＋

記号解説：＋＝増殖、－＝増殖無し

【０１１２】
１３０３２株はホモセリンを要求しないが、ＴＲ－ＣＡＤ１株は、ホモセリンを要求した。
【０１１３】
こうしてＴＲ－ＣＡＤ１株はＬＤＣ活性を有し、かつＨＯＭ活性を欠損（ホモセリン栄養要求性）しているコリネバクテリウム・グルタミカムが作製できた。
【０１１４】
実施例２（Ｌ－リジン脱炭酸活性を有し、かつホモセリン要求性を有し、かつＳ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン耐性を有するコリネバクテリウム・グルタミカムの作製）
（１）脱感作型ＡＫ遺伝子の作成
ＡＫ遺伝子に変異を導入し、脱感作型ＡＫ遺伝子を作成するためにＡＫ遺伝子をクローニングを行った。
【０１１５】
データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているＡＫ遺伝子（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＢＡ０００００３６）の塩基配列を参考にオリゴヌクレオチドプライマー５’－ａｃａ

ｇａａｔｔｃｇｔｇｇｃｃｃｔｇｇｔｃｇｔａｃａｇａａ－３’（配列番号：７）および５’－ｃａｔｃｔｃｇａｇｔｔａｇｃｇｔｃｃｇｇｔｇｃｃｔｇｃａｔ－３’（配列番号：８）を合成した。コリネバクテリウム・グルタミカムＡＴＣＣ１３０３２から常法に従い調整したゲノムＤＮＡの溶液を増幅鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：７）、（配列番号：８）をプライマーセットとしたＰＣＲ法により得られた産物を１％アガロースゲル電気泳動し、ＡＫ遺伝子を含む約１．３ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。この断片を、ＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩで消化し、得られた１．３ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＸｈｏＩ断片を、予めＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩで消化しておいたｐＨＳＧ３９６（宝酒造製）のＥｃｏＲＩ／ＸｈｏＩ間隙にライゲーションキットｖｅｒ．１を用いて挿入し、得られたプラスミドをｐＡＫ１と命名した。

【０１１６】

次に、クローニングしたＡＫ遺伝子の９３１番目から９３３番目のａｃｃ（Ｔｈｒ）をａｔｇ（Ｉｌｅ）に変異させるためにオリゴヌクレオチドプライマー５’－ｃｇａｃａｔｃａｔｃｔｔｃａｃｃｔｇｃｃ－３’（配列番号：９）および５’－ｇｇｃａｇｇｔｇａａｇａｔｇａｔｇｔｃｇ－３’（配列番号：１０）を合成した。ｐＡＫ１を増幅鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：９）、（配列番号：１０）をプライマーセットとしてＱｕｉｋＣｈａｎｇｅサイトダイレクテッド・ミュータジェネシス・キット（ストラタジーン社製）を用い得られたプラスミドをｐＴＭ１０２と命名した（図２）。このｐＴＭ１０２中のＡＫ遺伝子を常法によりシークエンスしたところ、目的通り９３１番目から９３３番目のａｃｃ（Ｔｈｒ）をａｔｇ（Ｉｌｅ）に変異されており、脱感作型ＡＫ遺伝子が作成できていることが確認できた。

（２）ｐＴＭ１０２の染色体への組み込み

データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているｐＦＫ３９８（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｄ２９８２６）の塩基配列を参考にクロラムフェニコール耐性遺伝子のオリゴヌクレオチドプライマー５’－ａｃｇｇｔｃｇａｃｔｃｇｃａｇａａｔａａａｔａａａｔｃｃｔｇｇｔｇ－３’（配列番号：１１）および５’－ａｔｇａｇｇｃｃｔｇａｇａｇｇｃｇｇｔｔｔｇｃｇｔａｔｔｇｇａ－３’（配列番号：１２）を合成した。

【０１１７】

ＴＲ－ＣＡＤ１株にプラスミドｐＴＭ１０２を、電気穿孔法により導入し、カナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）およびクロラムフェニコール（１０μｇ／ｍｌ）が添加されているＬＢ寒天培地上で選択した。

【０１１８】

こうして選択された形質転換体から常法に従いゲノムＤＮＡ溶液を調整した。このゲノムＤＮＡを鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：１１）（配列番号：１２）をプライマーセットとして用いたＰＣＲ法を行い、得られた産物を１．０％アガロースゲルにて電気泳動したところ、１．０ｋｂの単一のバンドが観察された。このことから、選択された形質転換体が、ＡＫ遺伝子座に、クロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入されていることが確認できた。この形質転換体を、コリネバクテリウム・グルタミカムＴＲ－ＣＡＤ２（以下ＴＲ－ＣＡＤ２株と略す）と命名した。

（３）脱感作型ＡＫ遺伝子のＴＲ－ＣＡＤ２株の染色体上への導入の確認

データベース（ＧｅｎＢａｎｋ）に登録されているＡＫ遺伝子（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＢＡ０００００３６）の塩基配列を参考に、ＡＫのＮ末端より上流０．１ｋｂのオリゴヌクレオチドプライマー５’－ｔｔｇｇａａｃｇｃｇｔｃｃｃａｇｔｇｇｃ－３’（配列番号：１３）を合成した。

【０１１９】

ＴＲ－ＣＡＤ２株から常法に従いゲノムＤＮＡ溶液を調整した。このゲノムＤＮＡを鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：１２）（配列番号：１３）をプライマーセットとして用いたＰＣＲ法を行い、得られた産物を１．０％アガロースゲルにて電気泳動し、ＡＫ遺伝子およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む３．１ｋｂのＤＮＡ断片をゲルから切り出しジーン・クリーン・キットにより精製した。この断片を、プラスミドベク

ターｐＴ７ｂｌｕｅのＥｃｏＲＶ切断部位の３’－末端にＴ塩基が付加された間隙に、ライゲーションキットｖｅｒ．１を用いて挿入し、得られたプラスミドをｐＡＫ２と命名した。このｐＡＫ２中のＡＫ遺伝子を常法によりシークエンスしたところ、目的通りの変異が含まれていることが確認できたため、ＴＲ－ＣＡＤ２株は染色体上で発現可能な脱感作型ＡＫ遺伝子が導入できたことが確認できた。

（４）ＴＲ－ＣＡＤ２株のＡＥＣ耐性の確認

ＴＲ－ＣＡＤ２株がＡＥＣ耐性であるかどうかを検査した。このために、ＡＴＣＣ１３０３２株およびＴＲ－ＣＡＤ２株を、最少寒天培地（Ｋａｔｓｕｍａｔａ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ，１５９，ｐ．３０６－３１１，（１９８４））、Ｄ，Ｌ－ホモセリン（Ｄ，Ｌ－Ｈｓｅ）（２００μｇ／ｍｌ）を有する最小寒天培地上およびＤ，Ｌ－ホモセリン、ＡＥＣ（５０μｇ／ｍｌ）を有する最少寒天培地上で培養し、かつ増殖を３０℃で２４時間の培養後に判定した。結果を表５にまとめる。

【０１２０】

【表５】

表5

比較例No.と実施例No.	コリネ型細菌名	最小寒天培地への添加物		
		添加物無し	D,L-Hse	D,L-Hse、AEC
比較例1	ATCC13032	＋	＋	－
実施例1	TR-CAD1	－	＋	－
実施例2	TR-CAD2	－	＋	＋

記号解説：＋＝増殖、－＝増殖無し

【０１２１】

１３０３２株はＡＥＣ耐性がないが、ＴＲ－ＣＡＤ２株は、ＡＥＣ耐性であった。

【０１２２】

こうしてＴＲ－ＣＡＤ２株はＬＤＣ活性を有し、かつＨＯＭ活性を欠損（ホモセリン栄養要求性）し、かつＡＥＣ耐性であるコリネバクテリウム・グルタミカムが作製できた。

【０１２３】

実施例３および４、比較例２（カダベリン発酵）

ＡＴＣＣ１３０３２株（比較例２）、ＴＲ－ＣＡＤ１株（実施例３）およびＴＲ－ＣＡＤ２株（実施例４）を滅菌ＬＢ培地（ＡＴＣＣ１３０３２株は無添加、ＴＲ－ＣＡＤ１株はカナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）添加、ＴＲ－ＣＡＤ２株はカナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）およびクロラムフェニコール（１０μｇ／ｍｌ）添加）５ｍｌに１白金耳植菌し、３０℃で２４時間振とうして前々培養を行った。

【０１２４】

この前々培養液を前々培養と同じ培地５０ｍｌに全量植菌し、３０℃、振幅３０ｃｍで、１８０ｒｐｍの条件下で２４時間培養して前培養を行った。

【０１２５】

次に表６に示す発酵培地９５０ｍｌに前培養液全量を植菌し、滅菌した空気を１ｖｖｍで通気しながら、３０℃、攪拌翼回転数８００ｒｐｍ、ｐＨを７に調整しながら３０時間培養を行った。中和剤として塩酸水溶液（３Ｍ）およびアンモニア水（３Ｍ）で行った。培養終了後、４℃、８，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離することで菌体を除去し、培養上清を回収した。この培養上清中のカダベリンをＨＰＬＣにより分析した。その結果を表７に示す。

【０１２６】

【表６】

表6

物質	培地中の濃度
グルコース	100.0 g/l
クエン酸	1.0 g/l
尿素	15.0 g/l
リン酸二水素カリウム	0.5 g/l
リン酸水素二カリウム	0.5 g/l
硫酸マグネシウム	0.5 g/l
L-スレオニン	0.8 g/l
L-メチオニン	0.6 g/l
L-ロイシン	1.5 g/l
硫酸鉄七水和物	6.0 mg/l
硫酸マンガン一水和物	4.2 mg/l
ビオチン	1.0 mg/l
チアミン	2.0 mg/l
3Mアンモニア水でpH7に調整	

【０１２７】
【表７】

表7

比較例No.と実施例No.	コリネ型細菌名	カダベリン[g/l]
比較例２	ATCC13032	0.0
実施例３	TR-CAD1	2.6
実施例４	TR-CAD2	8.5

【０１２８】
その結果、ＴＲ－ＣＡＤ１株およびＴＲ－ＣＡＤ２株でカダベリン発酵が行えた。
【０１２９】
実施例５（カダベリンの精製）
実施例４に示す方法でＴＲ－ＣＡＤ２株をカダベリン発酵した。この培養上清中に、総量として３９ｇのカダベリンを生成した。
【０１３０】
次にこの発酵液に水酸化ナトリウムを添加し、ｐＨを１３にした。次にクロロホルムを発酵液と等量加え、クロロホルム相にカダベリンを抽出した。最後にこのクロロホルム相を、減圧蒸留（３０ｍｍＨｇ、８０℃）することによりフリーのカダベリン１８．５ｇを単離した。
【０１３１】
実施例６（カダベリン二塩酸塩の精製）
実施例４に示す方法でＴＲ－ＣＡＤ２株をカダベリン発酵した。この培養上清中に、総量として３９ｇのカダベリンを生成した。
【０１３２】

次にその発酵液に塩酸を添加しｐＨ４．０とし、２Ｌ３つ口フラスコ内で減圧下で水を留去した。スラリーの粘度が上昇し攪拌操作性が悪化し始めたところで濃縮を終了した。素早く８０ｇのエタノール（シグマアルドリッチ社製）を加え、６５℃まで加熱し溶解させた。溶解せずに析出した結晶をろ過により固液分離した。その後均一に溶解したエタノールを徐々に冷却し、晶析、固液分離、乾燥した。カダベリン二塩酸塩の結晶４６．８ｇを得た。

【０１３３】

実施例７（カダベリン・アジピン酸塩の精製）

ＴＲ－ＣＡＤ２株を滅菌ＬＢ培地（カナマイシン（２５μｇ／ｍｌ）およびクロラムフェニコール（１０μｇ／ｍｌ）添加）５ｍｌに１白金耳植菌し、３０℃で２４時間振とうして前々培養を行った。

【０１３４】

この前々培養液を前々培養と同じ培地５０ｍｌに全量植菌し、３０℃、振幅３０ｃｍで、１８０ｒｐｍの条件下で２４時間培養して前培養を行った。

【０１３５】

次に表６に示した発酵培地９５０ｍｌに前培養液全量を植菌し、滅菌した空気を１ｖｖｍで通気しながら、３０℃、攪拌翼回転数８００ｒｐｍ、ｐＨを７に調整しながら３０時間培養を行った。中和剤として滅菌したアジピン酸水溶液（１０ｇ／ｌ）およびアンモニア水（３Ｍ）で行った。培養終了後、４℃、８，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離することで菌体を除去し、培養上清を回収した。この培養上清中のカダベリンをＨＰＬＣにより分析した。この培養上清中に、総量として４２ｇのカダベリンを生成した。

【０１３６】

次にその発酵液にアジピン酸を添加しｐＨ４．５とし、２Ｌ３つ口フラスコ内で減圧下で水を留去した。スラリーの粘度が上昇し攪拌操作性が悪化し始めたところで濃縮を終了した。素早く８０ｇのエタノール（シグマアルドリッチ社製）を加え、６５℃まで加熱し溶解させた。溶解せずに析出した結晶をろ過により固液分離した。その後均一に溶解したエタノールを徐々に冷却し、晶析、固液分離、乾燥した。こうしてカダベリン・アジピン酸塩の結晶７１．３ｇを得た。得られた結晶を水に溶解させカダベリン濃度およびアジピン酸濃度をＨＰＬＣで分析したところ、等モル塩であることがわかった。

【０１３７】

比較例３（既存の化学合成法によるカダベリンの調製）

Ｌ－リジン一塩酸塩２０ｇ（フルカ社製）シクロヘキサノール１００ｍｌ（シグマアルドリッチジャパン製）に懸濁し、次いで２８％ナトリウムメトキシド／メタノール溶液（シグマアルドリッチジャパン製）２１．２ｍｌ、２－シクロヘキセン－１－オン１ｍｌ（シグマアルドリッチジャパン製）を加え、１５５℃で３時間加熱撹拌した。反応終了後、反応混合物に塩化水素４ｇ（シグマアルドリッチジャパン製）を含むイソプロパノール溶液２０ｍｌ（シグマアルドリッチジャパン製）を加え、析出した生成物を回収し、乾燥することによりカダベリン二塩酸塩を得た（特開昭６０－２３３２８号公報の実施例３記載の方法）。得られたカダベリン二塩酸塩を水に溶解させ、この水溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を添加することによってカダベリン二塩酸塩をカダベリンに変換し、クロロホルムで抽出して、減圧蒸留（３０ｍｍＨｇ、８０℃）することにより、カダベリンを得た。この単離したカダベリンと等モルのアジピン酸を水に一旦溶解させ減圧下で乾燥することでカダベリン・アジピン酸の等モル塩である結晶を得た。

【０１３８】

実施例８，９および１０　比較例３（不純物の同定）

実施例５，６および７で得られたカダベリン、カダベリン二塩酸塩およびカダベリン・アジピン酸塩の不純物の分析を、下記に示す条件でＧＣ－ＭＳ法により行い、比較例３で調製したカダベリン・アジピン酸塩の不純物分析と比較した結果を表８に示す。

【０１３９】

ＧＣ－ＭＳ：ＨＰ６９８０／ＨＰ５９７３Ａ

カラム：ＮＵＫＯＬ　３０ｍ×０．２４ｍｍＩ．Ｄ．　０．２μｍ　Ｆｉｌｍ
オーブン：１２０℃（一定）
インジェクト：２００℃（Ｓｐｌｉｔ　１０：１）
流速：Ｈｅ　２．４ｍｌ／ｍｉｎ（一定）
ＭＳ：２３０℃（ＳＣＡＮ　ｍ／ｚ＝３０から４００）
【０１４０】
【表８】

表８

実施例No.と比較例No.	２，３，４，５－テトラヒドロピリジン[wt%]	トリ-ｎ-ブチルアミン[wt%]
実施例８	0.205	検出限界以下
実施例９	0.632	検出限界以下
実施例１０	0.655	検出限界以下
比較例３	1.514	0.007

【０１４１】
この結果、カダベリン発酵を行い生成したカダベリンを、カダベリン、カダベリン二塩酸塩およびカダベリン・アジピン酸塩に精製することにより、水性生物に有毒で、また酸と接触すると反応してしまうトリ－ｎ－ブチルアミンの含有量が０．００６重量％以下かつ２，３，４，５－テトラヒドロピリジンの含有量が１．４重量％以下の高純度カダベリン、カダベリン二塩酸塩およびカダベリン・アジピン酸塩が得られた。
【０１４２】
実施例１１（ポリアミドの合成）
実施例７の方法で得られたカダベリン・アジピン酸塩を水に溶解させの５０重量％水溶液５０．０ｇを調整した。この溶液を試験管に仕込み、オートクレーブに入れて、密閉し、窒素置換した。ジャケット温度を２６５℃に設定し、加熱を開始した。缶内圧力が１７．５ｋｇ／ｃｍ２に到達した後、缶内圧力を１７．５ｋｇ／ｃｍ２で３時間保持した。その後、ジャケット温度を２７５℃に設定し、２時間かけて缶内圧力を常圧に放圧した。その後、缶内温度が２４５℃に到達した時点で、加熱を停止した。室温に放冷後、試験管をオートクレーブから取り出し、ポリアミドを得た。
【０１４３】
比較例４
比較例３の方法で得られたカダベリン・アジピン酸塩を水に溶解させ５０重量％水溶液５０．０ｇを調整し用いる以外は、実施例１１と全く同様の方法でポリアミドを得た。
【０１４４】
実施例１２（ポリアミドの評価）
実施例１１で得られたポリアミドおよび比較例４で得られたポリアミドを下記に示す方法で比較評価した。その結果を表９に示す。
【０１４５】
［ポリアミド中の２，３，４，５－テトラヒドロピリジン、およびトリ－ｎ－ブチルアミンの定量（ＧＣ－ＭＳ）］
ポリアミド約１５ｇを精秤して、メタノールでソックスレー抽出し、その抽出液を、下記条件でＧＣ－ＭＳ分析して、ポリアミド中に含まれる２，３，４，５－テトラヒドロピリジン、およびトリ－ｎ－ブチルアミンを定量した。
装置：ヒューレットパッカード製　ＨＰ５８９０質量検出器
カラム：５％－ジフェニル－９５％－ジメチルポリシロキサン
カラム温度：Ｉｎｉｔｉａｌ　１００℃

Ｆｉｎａｌ　　２５０℃
昇温速度：１０℃／ｍｉｎ
注入口温度：２３０℃
検出器温度：２８０℃
キャリアガス：ヘリウム
注入口圧力：５０ｋｇ／ｃｍ2
試料注入量：１μｌ。
【０１４６】
［ＤＳＣ（示差走査熱量測定）］
セイコー電子工業製　ロボットＤＳＣ　ＲＤＣ２２０を用い、窒素雰囲気下、ポリアミドを約５ｍｇを採取し、次の条件で測定した。
融点＋２５℃に昇温して３分間保持し、ポリアミドを完全に融解させた後、２０℃／分の降温速度で、３０℃まで降温し、３分間保持した後、３０℃から融点＋２５℃まで２０℃／分の昇温速度で昇温したときに観測される吸熱ピークの温度、および熱量を求めた。
【０１４７】
［相対粘度（ηｒ）］
９８％硫酸中、０．０１ｇ／ｍｌ濃度、２５℃でオストワルド式粘度計を用いて測定を行った。
【０１４８】
［溶融滞留試験］
試験管にポリアミド約５ｇを仕込み、窒素雰囲気下、融点＋２０℃の温度のシリコンバスに浸漬し、ポリアミドが完全に溶融してから３０分間放置した後、ポリアミドを回収して相対粘度測定を行った。
【０１４９】
【表９】

表9

		実施例１１	比較例４
全吸熱ピークに対する240℃以上の吸熱ピーク熱量の割合（%）		88.3	67.2
ポリアミド中の2,3,4,5-テトラヒドロピリジン含量（wt%）		0.30	1.8
ポリアミド中のトリ-n-ブチルアミン含量（wt%）		検出限界	0.003
カダベリン・アジピン酸塩中の2,3,4,5-テトラヒドロピリジン含量（wt%）		0.655	1.514
カダベリン・アジピン酸塩中のトリ-n-ブチルアミン含量（wt%）		検出限界	0.007
吸熱ピーク温度（℃）		232,254	231,251
全吸熱ピーク熱量（J/g）		68.1	65.2
ηr	滞留前	2.49	2.03
	滞留後	2.44	1.81
ηr保持率		98.0	89.2

【０１５０】
その結果、本発明の方法によって得られた高純度カダベリン・ジカルボン酸塩を使用することにより、相対粘度（ηｒ）の保持率の高い（耐熱性の高い）ポリアミドが得られた。
【０１５１】
【発明の効果】

本発明によれば、カダベリン発酵可能なコリネ型細菌が提供され、該微生物を培養することにより、発酵液からカダベリン、カダベリン二塩酸塩もしくはカダベリン・ジカルボン酸塩としての単離方法が提供される。

【０１５２】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉東レ株式会社 (Toray Industries Inc.)

〈120〉コリネ型細菌、ならびにカダベリンもしくはその塩およびそれらの製造方法 (The method to produce Cadaverine or its salt)

〈130〉51E17270

〈160〉15

〈210〉1

〈211〉30

〈212〉DNA

〈213〉Corynebacterium glutamicum

〈400〉1

gaagaattct taaacctcag catctgcccc 30

〈210〉2

〈211〉30

〈212〉DNA

〈213〉Corynebacterium glutamicum

〈400〉2

gaaggatcca aaggacttgt ttaccgacgc 30

〈210〉3

〈211〉29

〈212〉DNA

〈213〉pHSG299

〈400〉3

gaaccgcggc ctgaatcgcc ccatcatcc 29

〈210〉4

〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 pHSG299
〈400〉 4
gaaccatggc cccttgtatt actg 24

〈210〉 5
〈211〉 21
〈212〉 DNA
〈213〉 Escherichia coli
〈400〉 5
gaaccatgga cgttattgca a 21

〈210〉 6
〈211〉 30
〈212〉 DNA
〈213〉 Escherichia coli
〈400〉 6
gaaccgcggt tatttttgc tttcttcttt 30

〈210〉 7
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉 7
acagaattcg tggccctggt cgtacagaa 29

〈210〉 8
〈211〉 29

〈212〉 DNA
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉 8
catctcgagt tagcgtccgg tgcctgcat 29

〈210〉 9
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉 9
cgacatcatc ttcacctgcc 20

〈210〉 10
〈211〉 20
〈212〉 DNA
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉 10
ggcaggtgaa gatgatgtcg 20

〈210〉 11
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 pFK398
〈400〉 11
acggtcgact cgcagaataa ataaatcctg gtg 33

〈210〉 12
〈211〉 31
〈212〉 DNA

〈213〉 pFK398

〈400〉 12

atgaggcctg agaggcggtt tgcgtattgg a 31

〈210〉 13

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Corynebacterium glutamicum

〈400〉 13

ttggaacgcg tcccagtggc 20

〈210〉 14

〈211〉 1263

〈212〉 DNA

〈213〉 Corynebacterium glutamicum

〈400〉14

```
gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc tcg ctt gag agt gcg   48
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
                 5                  10                  15
gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt gcc acc aag aag gct   96
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
            20                  25                  30
gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat  144
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
        35                  40                  45
gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt  192
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
    50                  55                  60
gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc  240
```

```
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65                  70                  75                  80
gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg  288
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
                85                  90                  95
ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc cac gga aac gca cgc  336
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
            100                 105                 110
att gtt gat gtc act cca ggt cgt gtg cgt gaa gca ctc gat gag ggc  384
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
        115                 120                 125
aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt aat aaa gaa acc cgc  432
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
    130                 135                 140
gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac acc act gca gtt gcg  480
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145                 150                 155                 160
ttg gca gct gct ttg aac gct gat gtg tgt gag att tac tcg gac gtt  528
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
                165                 170                 175
gac ggt gtg tat acc gct gac ccg cgc atc gtt cct aat gca cag aag  576
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
            180                 185                 190
ctg gaa aag ctc agc ttc gaa gaa atg ctg gaa ctt gct gct gtt ggc  624
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
        195                 200                 205
tcc aag att ttg gtg ctg cgc agt gtt gaa tac gct cgt gca ttc aat  672
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
    210                 215                 220
```

```
gtg cca ctt cgc gta cgc tcg tct tat agt aat gat ccc ggc act ttg  720
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225                 230                 235                 240
att gcc ggc tct atg gag gat att cct gtg gaa gaa gca gtc ctt acc  768
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
                245                 250                 255
ggt gtc gca acc gac aag tcc gaa gcc aaa gta acc gtt ctg ggt att  816
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
            260                 265                 270
tcc gat aag cca ggc gag gct gcg aag gtt ttc cgt gcg ttg gct gat  864
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
        275                 280                 285
gca gaa atc aac att gac atg gtt ctg cag aac gtc tct tct gta gaa  912
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
    290                 295                 300
gac ggc acc acc gac atc atc ttc acc tgc cct cgt tcc gac ggc cgc  960
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Ile Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305                 310                 315                 320
cgc gcg atg gag atc ttg aag aag ctt cag gtt cag ggc aac tgg acc 1008
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
                325                 330                 335
aat gtg ctt tac gac gac cag gtc ggc aaa gtc tcc ctc gtg ggt gct 1056
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
            340                 345                 350
ggc atg aag tct cac cca ggt gtt acc gca gag ttc atg gaa gct ctg 1104
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
        355                 360                 365
cgc gat gtc aac gtg aac atc gaa ttg att tcc acc tct gag att cgt 1152
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
```

```
    370                 375                 380
att tcc gtg ctg atc cgt gaa gat gat ctg gat gct gct gca cgt gca 1200
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385                 390                 395                 400
ttg cat gag cag ttc cag ctg ggc ggc gaa gac gaa gcc gtc gtt tat 1248
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
                405                 410                 415
gca ggc acc gga cgc                                         1263
Ala Gly Thr Gly Arg
            420
```

〈210〉 15
〈211〉 421
〈212〉 PRT
〈213〉 Corynebacterium glutamicum
〈400〉15

```
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
                  5                  10                  15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
             20                  25                  30
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
         35                  40                  45
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
     50                  55                  60
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65                  70                  75                  80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
                 85                  90                  95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
```

100 105 110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
115 120 125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
130 135 140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
145 150 155 160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
165 170 175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
180 185 190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
195 200 205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
210 215 220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225 230 235 240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
245 250 255
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
260 265 270
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
275 280 285
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
290 295 300
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Ile Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305 310 315 320
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
325 330 335

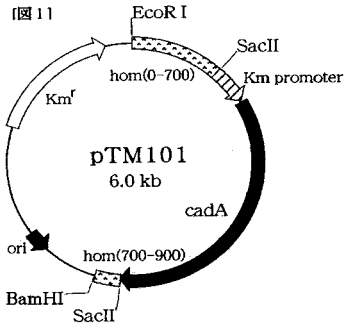
```
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
            340                 345                 350
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
        355                 360                 365
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
    370                 375                 380
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385                 390                 395                 400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
                405                 410                 415
Ala Gly Thr Gly Arg
            420
```

【図面の簡単な説明】

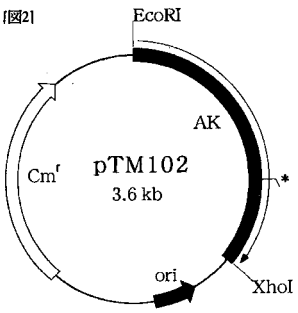
【図１】ＨＯＭ遺伝子座へのＬＤＣ遺伝子挿入破壊ベクターｐＴＭ１０１のフィジカルマップを示す図である。

【図２】脱感作型ＡＫ遺伝子ベクターｐＴＭ１０２のフィジカルマップを示す図である。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(72)発明者　加藤　公哉
愛知県名古屋市港区大江町９番地の１　東レ株式会社名古屋事業場内

Ｆターム(参考) 4B024 AA03 BA80 CA02 DA06 GA11 HA20
4B064 AE01 CA02 CB30 CC24 CE03 CE08 DA20
4B065 AA22X AA24X AB01 AC14 BA01 BD16 CA16 CA60