

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年5月5日(05.05.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/092018 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/54 (2006.01) C12P 13/10 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) C12P 13/14 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01) C12P 13/24 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/039281

(22) 国際出願日: 2021年10月25日(25.10.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2020-180304 2020年10月28日(28.10.2020) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 平野 聖子 (HIRANO, Seiko); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 井上 公太 (INOUE, Kota); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 林 和之 (HAYASHI, Kazuyuki); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 横田 康介 (YOKOTA, Kosuke); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 守屋 美加 (MORIYA, Mika); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 鈴木 智子 (SUZUKI, Tomoko);

〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 門倉 嘉知 (KADOKURA, Yoshitomo); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 長彦 健 (NAGAHIKO, Takeshi); 〒5100885 三重県四日市市大字日永1730 味の素株式会社内 Mie (JP). 田代 明梨 (TASHIRO, Akari); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス 21ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,

(54) Title: METHOD OF PRODUCING L-AMINO ACID

(54) 発明の名称: L-アミノ酸の製造法

(57) Abstract: Provided is a method of producing an L-amino acid such as L-glutamic acid. According to this method, an L-amino acid is produced by culturing a coryneform bacterium capable of producing the L-amino acid, said coryneform bacterium having been modified to have one or more of the modifications selected from (A) to (E) below, in a medium and collecting the L-amino acid from the medium and/or the cells of the bacterium: (A) a modification that increases acetate kinase activity; (B) a modification that increases fructose-1,6-bisphosphatase activity; (C) a modification that decreases pyruvate dehydrogenase activity; (D) a modification that decreases aspartate transaminase activity; and (E) a modification that decreases malic enzyme activity.

(57) 要約: L-グルタミン酸等のL-アミノ酸の製造法を提供する。下記(A)~(E)の改変から選択される1つまたはそれ以上の改変を有するように改変されたL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地および/または該細菌の菌体よりL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造する: (A) 酢酸キナーゼの活性が増大する改変; (B) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が増大する改変; (C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する改変; (D) アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が低下する改変; (E) マリックエンザイムの活性が低下する改変。

MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：Ｌ－アミノ酸の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、細菌を用いた発酵法によるＬ－グルタミン酸等のＬ－アミノ酸の製造法に関する。Ｌ－アミノ酸は、調味料原料等として産業上有用である。

背景技術

[0002] Ｌ－アミノ酸は、例えば、Ｌ－アミノ酸生産能を有する細菌等の微生物を用いた発酵法により工業生産されている（非特許文献１）。そのような微生物としては、例えば、自然界から分離した菌株やそれらの変異株が用いられている。また、組換えＤＮＡ技術により微生物のＬ－アミノ酸生産能を向上させることができる。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献１：明石邦彦ら著 アミノ酸発酵、学会出版センター、１９５～２１５頁、１９８６年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、細菌のＬ－アミノ酸生産能を向上させる新規な技術を開発し、効率的なＬ－アミノ酸の製造法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、下記（Ａ）～（Ｅ）の改変から選択される１つまたはそれ以上の改変を有するようにコリネ型細菌を改変することにより同細菌のＬ－アミノ酸生産能を向上させることができることを見出し、本発明を完成させた：

（Ａ）酢酸キナーゼ（acetate kinase）の活性が増大する改変；

（Ｂ）フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ（fructose 1,6-bisphosphatase

) の活性が増大する改変 ;

(C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (pyruvate dehydrogenase) の活性が低下する改変 ;

(D) アスパラギン酸トランスアミナーゼ (aspartate transaminase) の活性が低下する改変 ;

(E) マリックエンザイム (malic enzyme) の活性が低下する改変。

[0006] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

Ｌ－アミノ酸の製造方法であって、

Ｌ－アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－アミノ酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体より前記Ｌ－アミノ酸を採取すること、を含み、

前記Ｌ－アミノ酸が、グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸であり、

前記細菌が、下記 (X) および／または (Y) の改変を有する、方法 :

(X) ホスホケトラーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変 ;

(Y) 細胞内のオキサロ酢酸プールが増大する改変。

[2]

前記細菌が、少なくとも、前記 (X) の改変を有する、前記方法。

[3]

前記方法であって、

前記 (X) の改変が、下記 (A) 、 (B) 、および (C) の改変から選択される１つまたはそれ以上の改変であり ;

前記 (Y) の改変が、下記 (D) および (E) の改変から選択される１つまたはそれ以上の改変である、方法 :

(A) 酢酸キナーゼの活性が増大する改変 ;

(B) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が増大する改変 ;

(C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する改変 ;

(D) アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が低下する改変；

(E) マリックエンザイムの活性が低下する改変。

[4]

Ｌ－アミノ酸の製造方法であって、

Ｌ－アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－アミノ酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体より前記Ｌ－アミノ酸を採取すること、を含み、

前記Ｌ－アミノ酸が、グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸であり、

前記細菌が、下記（Ａ）～（Ｅ）の改変から選択される１つまたはそれ以上の改変を有する、方法：

(A) 酢酸キナーゼの活性が増大する改変；

(B) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が増大する改変；

(C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する改変；

(D) アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が低下する改変；

(E) マリックエンザイムの活性が低下する改変。

[5]

前記細菌が、少なくとも、前記（Ａ）の改変を有する、前記方法。

[6]

前記方法であって、

前記アスパラギン酸トランスアミナーゼがaspT遺伝子にコードされ；

前記マリックエンザイムがmalE遺伝子にコードされ；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼがpoxB遺伝子にコードされ；

前記酢酸キナーゼがack遺伝子にコードされ；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼがglpX遺伝子にコードされる、方法。

[7]

前記方法であって、

前記アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が、アスパラギン酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記マリックエンザイムの活性が、マリックエンザイムをコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記酢酸キナーゼの活性が、酢酸キナーゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大し；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大した、方法。

[8]

前記方法であって、

酢酸キナーゼをコードする遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、および／または該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇し；且つ／又は

フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、および／または該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇した、方法。

[9]

前記方法であって、

前記アスパラギン酸トランスアミナーゼが、下記（1 a）、（1 b）、または（1 c）に記載のタンパク質であり：

（1 a）配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（1 b）配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残

基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性を有するタンパク質；

(1 c) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列に対して 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性を有するタンパク質；

前記マリックエンザイムが、下記 (2 a)、(2 b)、または (2 c) に記載のタンパク質であり：

(2 a) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(2 b) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、マリックエンザイム活性を有するタンパク質；

(2 c) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列に対して 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、マリックエンザイム活性を有するタンパク質；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼが、下記 (3 a)、(3 b)、または (3 c) に記載のタンパク質であり：

(3 a) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(3 b) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(3 c) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列に対して 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

前記酢酸キナーゼが、下記 (4 a)、(4 b)、または (4 c) に記載のタンパク質であり：

(4 a) 配列番号 8 または 10 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(4 b) 配列番号 8 または 10 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列

を含み、且つ、酢酸キナーゼ活性を有するタンパク質；

(4 c) 配列番号 8 または 10 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、酢酸キナーゼ活性を有するタンパク質；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼが、下記 (5 a)、(5 b)、または (5 c) に記載のタンパク質である、方法：

(5 a) 配列番号 12 または 14 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(5 b) 配列番号 12 または 14 に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質；

(5 c) 配列番号 12 または 14 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質。

[10]

前記細菌が、さらに、非改変株と比較して、ホスホケトラーゼの活性が増大するように改変されている、前記方法。

[11]

前記ホスホケトラーゼが、D-キシロロース-5-リン酸ホスホケトラーゼおよび／またはフルクトース 6-リン酸ホスホケトラーゼである、前記方法。

[12]

前記細菌が、コリネバクテリウム属細菌である、前記方法。

[13]

前記細菌が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、前記方法。

[14]

前記グルタミン酸系L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン、およびL-オルニチン

から選択される1種またはそれ以上のL-アミノ酸である、前記方法。

[15]

前記グルタミン酸系L-アミノ酸が、L-グルタミン酸である、前記方法。

[16]

前記L-グルタミン酸が、L-グルタミン酸アンモニウムまたはL-グルタミン酸ナトリウムである、前記方法。

図面の簡単な説明

[0007] [図1] グルコースを炭素源とした場合の対照株およびack遺伝子の発現増強株のL-グルタミン酸の蓄積量を示す図。

[図2] グルコースを炭素源とした場合の対照株およびack遺伝子の発現増強株のL-グルタミン酸の対糖収率を示す図。

[図3] フルクトースを炭素源とした場合の対照株およびglpX遺伝子の発現増強株のL-グルタミン酸の蓄積量を示す図。

[図4] グルコースを炭素源とした場合の対照株およびglpX遺伝子の発現増強株のL-グルタミン酸の対糖収率を示す図。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0009] 本発明の方法は、L-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にL-アミノ酸を蓄積すること、および前記培地および／または前記菌体より前記L-アミノ酸を採取すること、を含むL-アミノ酸の製造方法であって、前記細菌が特定の性質を有するように改変されている、方法である。同方法に用いられる細菌を、「本発明の細菌」ともいう。

[0010] <1> 本発明の細菌

本発明の細菌は、特定の性質を有するように改変された、L-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌である。

[0011] <1-1> L-アミノ酸生産能を有する細菌

本発明において、「Ｌ－アミノ酸生産能を有する細菌」とは、培地で培養したときに、目的とするＬ－アミノ酸を生成し、回収できる程度に培地中および／または菌体内に蓄積する能力を有する細菌をいう。Ｌ－アミノ酸生産能を有する細菌は、非改変株よりも多い量の目的とするＬ－アミノ酸を培地中および／または菌体内に蓄積することができる細菌であってよい。「非改変株」とは、特定の性質を有するように改変されていない対照株をいう。すなわち、非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。また、Ｌ－アミノ酸生産能を有する細菌は、好ましくは０．５ｇ／Ｌ以上、より好ましくは１．０ｇ／Ｌ以上の量の目的とするＬ－アミノ酸を培地に蓄積することができる細菌であってもよい。

[0012] 本発明において製造されるＬ－アミノ酸は、グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸（L-amino acid of glutamate family）である。「グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸」とは、Ｌ－グルタミン酸、およびＬ－グルタミン酸を中間体として生合成されるＬ－アミノ酸の総称である。Ｌ－グルタミン酸を中間体として生合成されるＬ－アミノ酸としては、Ｌ－グルタミン、Ｌ－プロリン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シトルリン、Ｌ－オルニチンが挙げられる。グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸としては、特に、Ｌ－グルタミン酸が挙げられる。本発明の細菌は、１種のＬ－アミノ酸の生産能のみを有していてもよく、２種またはそれ以上のＬ－アミノ酸の生産能を有していてもよい。

[0013] 本発明において、「アミノ酸」という用語は、特記しない限り、Ｌ－アミノ酸を意味する。また、本発明において、「Ｌ－アミノ酸」という用語は、特記しない限り、フリー体のＬ－アミノ酸、その塩、またはそれらの混合物を意味する。塩については後述する。

[0014] コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属、ブレビバクテリウム（*Brevibacterium*）属、およびマイクロバクテリウム（*Microbacterium*）属等の属に属する細菌が挙げられる。

[0015] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような種が挙げられる。
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム（*Corynebacterium acetoacidop*

hilum)

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (*Corynebacterium acetoglutamicum*)

コリネバクテリウム・アルカノリティカム (*Corynebacterium alkanolyticum*)

コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)

コリネバクテリウム・クレナタム (*Corynebacterium crenatum*)

コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

コリネバクテリウム・リリウム (*Corynebacterium lilium*)

コリネバクテリウム・メラセコーラ (*Corynebacterium melassecola*)

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) (*Corynebacterium thermoaminogenes* (*Corynebacterium efficiens*))

コリネバクテリウム・ハーキュリス (*Corynebacterium herculis*)

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium divaricatum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・ロゼウム (*Brevibacterium roseum*)

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*)

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス (*Brevibacterium thiogenitalis*)

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・スタディオニス) (*Corynebacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium stationis*))

ブレビバクテリウム・アルバム (*Brevibacterium album*)

ブレビバクテリウム・セリナム (*Brevibacterium cerinum*)

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniaphilum*)

[0016] コリネ型細菌としては、特に、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) (旧名称：ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*)) が挙げられる。

[0017] コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium crenatum AS1.542

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Corynebacterium ammoniagenes (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

[0018] コリネ型細菌として、さらに特には、*Brevibacterium lactofermentum* (新名称：*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869が挙げられる。

[0019] なお、コリネバクテリウム属細菌には、従来ブレビ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統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991)) も含まれる。また、コリネバクテリウム・スタティオニスには、従来コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに分類されていたが、16S rRNAの塩基配列解析等によりコリネバクテリウム・スタティオニスに再分類された細菌も含まれる (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879(2010))。

[0020] これらの菌株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることができる。すなわち各菌株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 (<http://www.atcc.org/>参照)。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、これらの菌株は、例えば、各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。

[0021] 本発明の細菌は、本来的にL-アミノ酸生産能を有するものであってもよく、L-アミノ酸生産能を有するように改変されたものであってもよい。L-アミノ酸生産能を有する細菌は、例えば、上記のような細菌にL-アミノ酸生産能を付与することにより、または、上記のような細菌のL-アミノ酸生産能を増強することにより、取得できる。

[0022] L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、従来、コリネ型細菌又はエシェリ

ヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法により行うことができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。そのような方法としては、例えば、栄養要求性変異株の取得、L-アミノ酸のアナログ耐性株の取得、代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸の生合成系酵素の活性が増強された組換え株の創製が挙げられる。L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、L-アミノ酸生産菌の育種において、活性が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の活性の増強が組み合わせられてもよい。

[0023] L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株は、親株又は野生株を通常の変異処理に供し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、且つL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって取得できる。通常の変異処理としては、X線や紫外線の照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG）、エチルメタンサルフォネート（EMS）、メチルメタンサルフォネート（MMS）等の変異剤による処理が挙げられる。

[0024] また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL-アミノ酸の生合成に関与する酵素の活性を増強することによっても行うことができる。酵素活性の増強は、例えば、同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ことにより行うことができる。遺伝子の発現を増強する方法は、W000/18935やEP1010755A等に記載されている。酵素活性を増強する詳細な手法については後述する。

[0025] また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下させることによっても行うことができる。なお、ここ

でいう「目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素」には、目的のアミノ酸の分解に関与する酵素も含まれる。酵素活性を低下させる手法については後述する。

[0026] 以下、L-アミノ酸生産菌、およびL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法について具体的に例示する。なお、以下に例示するようなL-アミノ酸生産菌が有する性質およびL-アミノ酸生産能を付与又は増強するための改変は、いずれも、単独で用いてもよく、適宜組み合わせ用いてもよい。

[0027] <L-グルタミン酸生産菌>

L-グルタミン酸生産能を付与又は増強する方法としては、例えば、L-グルタミン酸生合成系酵素から選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA)、グルタミンシンターゼ (glnA)、グルタミン酸シンターゼ (gltBD)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (icdA)、アコニテートヒドラターゼ (acnA, acnB)、クエン酸シンターゼ (gltA)、メチルクエン酸シンターゼ (prpC)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (pyc)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (aceEF, lpdA)、ピルビン酸キナーゼ (pykA, pykF)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ (ppsA)、エノラーゼ (eno)、ホスホグリセロムターゼ (pgmA, pgmI)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (pgk)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA)、トリオースリン酸イソメラーゼ (tpiA)、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ (fbp)、グルコースリン酸イソメラーゼ (pgi)、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd)、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ (eda)、トランスヒドロゲナーゼ (pntAB) が挙げられる。なお、カッコ内は、その酵素をコードする遺伝子の一例である（以下の記載においても同様）。これらの酵素の中では、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、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、及びメチルクエン酸シンターゼから選択される

1 種またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。

[0028] グルタミン酸シンターゼ遺伝子 (gltBD) の発現が増大するように改変されたコリネ型細菌としては、W099/07853に開示されたものが挙げられる。

[0029] また、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、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から選択される 1 種またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、イソクエン酸リアーゼ (aceA)、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (sucA, odhA)、アセト乳酸シンターゼ (ilvI)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ (pfl)、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldh)、アルコールデヒドロゲナーゼ (adh)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (gadAB)、コハク酸デヒドロゲナーゼ (sdhABCD) が挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を低下又は欠損させることが好ましい。

[0030] α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌、及びそれらの取得方法は、W02008/075483に記載されている。 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌として、具体的には、例えば、下記の株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2株 (特開2006-340603)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) Δ S株 (W095/34672)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821 (FERM BP-4172 ; フランス特許第9401748号公報)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173 ; フランス特許第9401748号公報)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174 ; フランス特許第9401748号公報)

[0031] また、L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株としては、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (sucA) 活性およびコハク酸デヒドロゲナーゼ (sdh) 活性の両方が低下または欠損した株も挙げられる (特開2010-041920)。そのような株として、具体的には、例えば、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067株のodhAsdhA二重欠損株 (*Corynebacterium glutamicum* 8L3G Δ SDH株) が挙げられる (特開2010-041920)。

[0032] また、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、yhfK遺伝子 (W02005/085419) やybjL遺伝子 (W02008/133161) 等のL-グルタミン酸排出遺伝子の発現を増強することも挙げられる。

[0033] また、コリネ型細菌について、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強する方法としては、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。そのような方法として、具体的には、例えば、モノフルオロ酢酸耐性を付与する方法 (特開昭50-113209)、アデニン耐性またはチミン耐性を付与する方法 (特開昭57-065198)、ウレアーゼを弱化させる方法 (特開昭52-038088)、マロン酸耐性を付与する方法 (特開昭52-038088)、ベンゾピロン類またはナフトキノン類への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) が挙げられる。

[0034] このような耐性菌または感受性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632 ; 特開昭50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736 ; 特開昭57-065198)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007 ; 特開昭56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020 ; 特開昭56-1889)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318 ; 特開昭57-2689)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319 ; 特開昭57-2689)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM P-5472 ; 特開昭56-140895)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM P-5136 ; 特開昭56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004 ; 特開平04-88994)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123 ; 特開平56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137 ; 特開平56-048890)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402 ; 特開平58-158192)

[0035] また、コリネ型細菌について、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強する方法としては、yggB遺伝子の発現を増強する方法やコード領域内に変異を導入した変異型yggB遺伝子を導入する方法も挙げられる (W02006/070944)。すなわち、本発明の細菌は、yggB遺伝子の発現が増大するように改変されていてもよく、変異型yggB遺伝子を保持する (有する) ように改変されていてもよい。

[0036] yggB遺伝子は、メカノセンシティブチャネル (mechanosensitive channel) をコードする遺伝子である。yggB遺伝子としては、コリネ型細菌のyggB遺伝子が挙げられる。コリネ型細菌のyggB遺伝子として、具体的には、例えば、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14967、*Corynebacterium melassecola* ATCC17965のyggB遺伝子が挙げられる (W02006/070944)。*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032のyggB遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank Accession No. NC_003450で登録されているゲノム配列中、1,336,091~1,337,692の配列の相補配列に相当し、NCgl1221とも呼ばれる。*Corynebacterium*

glutamicum ATCC13032のyggB遺伝子にコードされるYggBタンパク質は、GenBank accession No. NP_600492として登録されている。また、Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869) のyggB遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするYggBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号15および16に示す。

[0037] 本発明において、後述する「特定の変異」を有するyggB遺伝子を変異型yggB遺伝子、それによりコードされるタンパク質を変異型YggBタンパク質ともいう。また、本発明において、後述する「特定の変異」を有さないyggB遺伝子を野生型yggB遺伝子、それによりコードされるタンパク質を野生型YggBタンパク質ともいう。なお、YggBタンパク質にあっては、yggB遺伝子における「特定の変異」により引き起こされるアミノ酸配列の変化を「特定の変異」ともいう。ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、「特定の変異」を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型YggBタンパク質としては、上記例示したYggBタンパク質、例えば配列番号16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、が挙げられる。また、野生型YggBタンパク質としては、上記例示したYggBタンパク質の保存的バリエーション（元の機能が維持されたバリエーション）であって、「特定の変異」を有しないものも挙げられる。YggBタンパク質についての「元の機能」とは、例えば、メカノセンシティブチャネル（mechanosensitive channel）としての機能であってもよく、コリネ型細菌において発現を上昇させた際にコリネ型細菌のL-グルタミン酸生産能を向上させる性質であってもよい。

[0038] 「特定の変異」は、上述したような野生型YggBタンパク質のアミノ酸配列を変化させ、コリネ型細菌のL-グルタミン酸生産能を向上させる変異であれば、特に制限されない。「特定の変異」としては、C末端側変異や膜貫通領域の変異が挙げられる（W02006/070944）。また、「特定の変異」は、それらの変異の組み合わせであってもよい。

[0039] （1）C末端側変異

C末端側変異は、野生型yggB遺伝子中の、野生型YggBタンパク質の419～533

位のアミノ酸残基をコードする領域における変異である。C末端側変異は、同領域中の1またはそれ以上の箇所に導入されてよい。C末端側変異により引き起こされるアミノ酸配列の変化の種類は特に制限されない。C末端側変異は、例えば、アミノ酸残基の置換（ミスセンス変異）、アミノ酸残基の挿入、アミノ酸残基の欠失、ストップコドンの出現（ナンセンス変異）、フレームシフト変異、またはそれらの組み合わせを引き起こすものであってよい。C末端側変異としては、例えば、インサクションシーケンス（以下、「IS」ともいう）やトランスポゾン等の塩基配列の挿入が好ましい。

[0040] (1-1) 塩基配列の挿入

C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419位のバリン残基をコードする箇所に塩基配列が挿入される変異（2A-1型変異）が挙げられる。2A-1型変異は、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基の一部または全部の欠失または置換を引き起こすものであってよい。2A-1型変異を有する変異型yggB遺伝子として、具体的には、例えば、配列番号15の1255位の「G」の次にISが挿入され、元の野生型YggBタンパク質（配列番号16）よりも短い全長423アミノ酸残基の変異型YggBタンパク質をコードするyggB遺伝子が挙げられる。この変異型yggB遺伝子（V419::IS）の塩基配列、及び同遺伝子がコードする変異型YggBタンパク質（V419::IS）のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号17および18に示す。配列番号17中、1～1269位が変異型YggBタンパク質（V419::IS）のCDSである。変異型yggB遺伝子（V419::IS）を有する*Leu*-グルタミン酸生産菌として、具体的には、例えば、*C. glutamicum* 2256Δ*sucA*Δ*ldhA* yggB*株（W02014/185430）が挙げられる。

[0041] (1-2) プロリン残基の置換

C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位に存在するプロリン残基を他のアミノ酸に置換する変異も挙げられる。そのようなプロリン残基としては、野生型YggBタンパク質の424位、437位、453位、457位、462位、469位、484位、489位、497位、515位、529位、および533位のプ

ロリン残基が挙げられる。中でも、424位および／または437位のプロリン残基を他のアミノ酸に置換するのが好ましい。「他のアミノ酸」は、プロリン以外の天然型アミノ酸であれば特に制限されない。「他のアミノ酸」としては、Lys、Glu、Thr、Val、Leu、Ile、Ser、Asp、Asn、Gln、Arg、Cys、Met、Phe、Trp、Tyr、Gly、Ala、Hisが挙げられる。例えば、424位のプロリン残基は、好ましくは疎水性アミノ酸（Ala、Gly、Val、Leu、またはIle）に置換されてよく、より好ましくは分岐鎖アミノ酸（Leu、Val、またはIle）に置換されてよい。また、例えば、437位のプロリン残基は、好ましくは側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr）に置換されてよく、より好ましくはSerに置換されてよい。

[0042] （２）膜貫通領域の変異

YggBタンパク質は、５個の膜貫通領域を有していると推測される。膜貫通領域はそれぞれ、野生型YggBタンパク質の1～23位（第１膜貫通領域）、25～47位（第２膜貫通領域）、62～84位（第３膜貫通領域）、86～108位（第４膜貫通領域）、110～132位（第５膜貫通領域）のアミノ酸残基に相当する。膜貫通領域の変異は、野生型yggB遺伝子中の、これら膜貫通領域をコードする領域における変異である。膜貫通領域の変異は、同領域中の１またはそれ以上の箇所に導入されてよい。膜貫通領域の変異は、１若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入、又は逆位を引き起こすものであって、且つ、フレームシフト変異およびナンセンス変異を伴わないものが好ましい。「１若しくは数個」とは、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個、特に好ましくは１～３個を意味する。膜貫通領域の変異としては、野生型YggBタンパク質の、１４位のロイシン残基と１５位のトリプトファン残基間に１又は数個のアミノ酸（例えば、Cys-Ser-Leu）を挿入する変異、１００位のアラニン残基を他のアミノ酸残基（例えば、側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr）、好ましくはThr）へ置換する変異、１１１位のアラニン残基を他のアミノ酸残基（例えば、Valまたは側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸（Thr、Ser、またはTyr

）、好ましくはValまたはThr）へ置換する変異などが挙げられる。

[0043] 本発明において、「野生型YggBタンパク質のX位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号16におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。アミノ酸配列における「X位」とは、同アミノ酸配列のN末端から数えてX番目の位置を意味し、N末端のアミノ酸残基が1位のアミノ酸残基である。なお、アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示すものであって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその絶対的な位置は前後することがある。例えば、「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」とは、配列番号16における419位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味し、419位よりもN末端側の1アミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から418番目のアミノ酸残基が「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」であるものとする。また、419位よりもN末端側に1アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から420番目のアミノ酸残基が「野生型YggBタンパク質の419位のアミノ酸残基」であるものとする。具体的には、例えば、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14967株のYggBタンパク質においては、419～529位のアミノ酸残基が、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基に相当する。

[0044] 任意のYggBタンパク質のアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号16におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、当該YggBタンパク質のアミノ酸配列と配列番号16のアミノ酸配列とのアライメントを行うことにより決定できる。アライメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して行うことができる。具体的なソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASISや、ゼネティックス製のGENETYXなどが挙げられる (Elizabeth C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24(1), 72-96, 1991; Barton GJ et al., Journal of molecular biology, 198(2), 327-37, 1987)。

[0045] 変異型yggB遺伝子は、野生型yggB遺伝子を上述の「特定の変異」を有するよう改変することにより取得できる。DNAの改変は公知の手法により行う

ことができる。具体的には、例えば、DNAの目的部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) や、ファージを用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、変異型yggB遺伝子は、化学合成によっても取得できる。

[0046] 変異型yggB遺伝子を有するように細菌を改変することは、変異型yggB遺伝子を細菌に導入することにより達成できる。また、変異型yggB遺伝子を有するように細菌を改変することは、自然変異や変異原処理により細菌が有するyggB遺伝子に変異を導入することによっても達成できる。

[0047] なお、L-グルタミン酸の生産能を付与又は増強する方法は、L-グルタミン酸を中間体として生合成されるL-アミノ酸（例えば、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン、L-オルニチン）の生産能を付与又は増強するためにも有効であり得る。すなわち、これらL-グルタミン酸を中間体として生合成されるL-アミノ酸の生産能を有する細菌は、上記のようなL-グルタミン酸生産菌が有する性質を適宜有してよい。例えば、これらL-グルタミン酸を中間体として生合成されるL-アミノ酸の生産能を有する細菌は、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼおよび／またはコハク酸デヒドロゲナーゼの活性が低下するように改変されていてもよい。

[0048] <L-グルタミン生産菌>

L-グルタミン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-グルタミン生合成系酵素から選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA) やグルタミンシンセターゼ (glnA) が挙げられる。なお、グルタミンシンセターゼの活性は、グルタミンアデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 (glnE) の破壊

やPII制御タンパク質遺伝子 (glnB) の破壊によって増強してもよい (EP1229121)。

[0049] また、L-グルタミン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-グルタミンの生合成経路から分岐してL-グルタミン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミナーゼが挙げられる。

[0050] L-グルタミン生産菌又はそれを誘導するための親株として、具体的には、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA) および／またはグルタミンシンセターゼ (glnA) の活性を増強したコリネ型細菌 (EP1229121, EP1424398) やグルタミナーゼ活性が低下したコリネ型細菌 (特開2004-187684) が挙げられる。

[0051] また、コリネ型細菌について、L-グルタミン生産能を付与又は増強する方法としては、6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法 (特開平3-232497)、プリンアナログ耐性及びメチオニンスルホキシド耐性を付与する方法 (特開昭61-202694)、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法 (特開昭56-151495) が挙げられる。L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌として、具体的には、例えば、以下の株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11573 (FERM P-5492; 特開昭56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11576 (FERM BP-10381; 特開昭56-151495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12212 (FERM P-8123; 特開昭61-202694)

[0052] <L-プロリン生産菌>

L-プロリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-プロリン生合成系酵素から選択される1種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては

、グルタミン酸－５－キナーゼ（proB）、 γ -グルタミル－リン酸レダクターゼ、ピロリン－５－カルボキシレートレダクターゼ（putA）が挙げられる。酵素活性の増強には、例えば、Ｌ－プロリンによるフィードバック阻害が解除されたグルタミン酸－５－キナーゼをコードするproB遺伝子（ドイツ特許第3127361号）が好適に利用できる。

[0053] また、Ｌ－プロリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、Ｌ－プロリン分解に関与する酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、プロリンデヒドロゲナーゼやオルニチンアミノトランスフェラーゼが挙げられる。

[0054] <Ｌ－アルギニン生産菌>

Ｌ－アルギニン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、Ｌ－アルギニン生合成系酵素から選択される１種またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、Ｎ－アセチルグルタミン酸シンターゼ（argA）、Ｎ－アセチルグルタミン酸キナーゼ（argB）、Ｎ－アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ（argC）、アセチルオルニチントランスアミナーゼ（argD）、アセチルオルニチンデアセチラーゼ（argE）、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ（argF, argI）、アルギニノコハク酸シンターゼ（argG）、アルギニノコハク酸リアーゼ（argH）、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ（argJ）、カルバモイルリン酸シンターゼ（carAB）が挙げられる。Ｎ－アセチルグルタミン酸シンターゼ（argA）遺伝子としては、例えば、野生型の１５位～１９位に相当するアミノ酸残基が置換され、Ｌ－アルギニンによるフィードバック阻害が解除された変異型Ｎ－アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子を用いると好適である（EP1170361A）。

[0055] また、Ｌ－アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、アルギニンリプレッサーであるArgRを欠損した株（US2002-0045223A）や細胞内のグルタミンシンテターゼ活性を上昇させた株（US2005-0014236A）等のコリネ型細菌も挙げられる。

[0056] また、L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、アミノ酸アナログなどへの耐性を有するコリネ型細菌の変異株も挙げられる。そのような株としては、例えば、2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニン、またはL-トリプトファン要求性を有する株（特開昭54-44096）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸、又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する株（特開昭57-18989）；アルギニノールに耐性を有する株（特公昭62-24075）；X-グアニジン（Xは脂肪鎖又はその誘導体）に耐性を有する株（特開平2-186995）；アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシルに耐性を有する株（特開昭57-150381）が挙げられる。L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11169 (FERM BP-6892)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12092 (FERM BP-6906)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11336 (FERM BP-6893)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11345 (FERM BP-6894)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12430 (FERM BP-2228)

[0057] <L-シトルリン生産菌およびL-オルニチン生産菌>

L-シトルリンおよびL-オルニチンは、L-アルギニン生合成経路における中間体である。よって、L-シトルリンおよび／またはL-オルニチンの生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-アルギニン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、L-シトルリンについて、N-アセチルグルタミン酸シンターゼ

(argA)、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ (argC)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (argF, argI)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ)、カルバモイルリン酸シンターゼ (carAB) が挙げられる。また、そのような酵素としては、特に制限されないが、L-オルニチンについて、N-アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA)、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ (argC)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ) が挙げられる。

[0058] また、L-シトルリン生産菌は、例えば、任意のL-アルギニン生産菌から、argG遺伝子にコードされるアルギニノコハク酸シンターゼの活性を低下させることにより容易に得ることができる。また、L-オルニチン生産菌は、例えば、任意のL-アルギニン生産菌から、argF及びargI両遺伝子によりコードされるオルニチンカルバモイルトランスフェラーゼの活性を低下させることにより容易に得ることができる。

[0059] また、L-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法としては、例えば、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出する活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。L-アミノ酸を排出する活性は、例えば、L-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大させることができる。各種アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、b2682遺伝子 (ygaZ)、b2683遺伝子 (ygaH)、b1242遺伝子 (ychE)、b3434遺伝子 (yhgN) が挙げられる (特開2002-300874)。

[0060] また、L-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法としては、例えば、糖代謝に関与するタンパク質やエネルギー代謝に関与するタンパク質の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。

- [0061] 糖代謝に関与するタンパク質としては、糖の取り込みに関与するタンパク質や解糖系酵素が挙げられる。糖代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、グルコース 6-リン酸イソメラーゼ遺伝子 (pgi ; W001/02542)、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (pyc ; W099/18228, EP1092776A)、ホスホグルコムターゼ遺伝子 (pgm ; W003/04598)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ遺伝子 (pfkB, fbp ; W003/04664)、トランスアルドラーゼ遺伝子 (talB ; W003/008611)、フマラーゼ遺伝子 (fum ; W001/02545)、non-PTSスクロース取り込み遺伝子 (csc ; EP1149911A)、スクロース資化性遺伝子 (scrABオペロン ; 米国特許第7,179,623号) が挙げられる。
- [0062] エネルギー代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、トランスヒドロゲナーゼ遺伝子 (pntAB ; 米国特許第5,830,716号)、チトクロム b_o型オキシダーゼ (cytochrome b_o type oxidase) 遺伝子 (cyoB ; EP1070376A) が挙げられる。
- [0063] また、L-アミノ酸等の有用物質の生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、ホスホケトララーゼの活性が増大するように細菌を改変する方法も挙げられる (W02006/016705)。すなわち、本発明の細菌は、ホスホケトララーゼの活性が増大するように改変されていてよい。同方法は、特に、L-グルタミン酸等のグルタミン酸系L-アミノ酸の生産能を付与又は増強するために有効であり得る。ホスホケトララーゼとしては、D-キシロロース-5-リン酸-ホスホケトララーゼやフルクトース-6-リン酸ホスホケトララーゼが挙げられる。D-キシロロース-5-リン酸-ホスホケトララーゼ活性及びフルクトース-6-リン酸ホスホケトララーゼ活性はいずれか一方を増強してもよいし、両方を増強してもよい。
- [0064] D-キシロロース-5-リン酸-ホスホケトララーゼ活性とは、リン酸を消費して、キシロロース-5-リン酸をグリセルアルデヒド-3-リン酸とアセチルリン酸に変換し、一分子のH₂Oを放出する活性を意味する。この活性は、Goldberg, M.らの文献 (Methods Enzymol., 9, 515-520 (1966)) またはL. Meileの文献 (J.Bacteriol. (2001) 183; 2929-2936) に記載の方法によっ

て測定することができる。D-キシロース-5-リン酸ホスホケトラゼとしては、アセトバクター属、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、チオバチルス属、ストレプトコッカス属、メチロコッカス属、ブチリビブリオ属、またはフィプロバクター属に属する細菌や、カンジダ属、ロドトルラ属、ロドスポリジウム属、ピキア属、ヤロウイア属、ハンセヌラ属、クルイベロミセス属、サッカロミセス属、トリコスポロン属、またはウィングア属に属する酵母のD-キシロース-5-リン酸ホスホケトラゼが挙げられる。D-キシロース-5-リン酸ホスホケトラゼおよびそれをコードする遺伝子の具体例は、W02006/016705に開示されている。

[0065] また、フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼ活性とは、リン酸を消費して、フルクトース-6-リン酸をエリスロース-4-リン酸とアセチルリン酸に変換し、一分子の H_2O を放出する活性を意味する。この活性は、Racker, E. の文献 (Methods Enzymol., 5, 276-280 (1962)) または L. Meile の文献 (J. Bacteriol. (2001) 183; 2929-2936) に記載の方法によって測定することができる。フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼとしては、アセトバクター属、ビフィドバクテリウム属、クロロビウム属、ブルセラ属、メチロコッカス属、またはガードネラ属に属する細菌や、ロドトルラ属、カンジダ属、サッカロミセス属等に属する酵母のフルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼが挙げられる。フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼおよびそれをコードする遺伝子の具体例は、W02006/016705に開示されている。

[0066] 両ホスホケトラゼ活性が、単一の酵素 (D-キシロース-5-リン酸 / フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼ) によって保持される場合もありうる。

[0067] L-アミノ酸生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、例えば、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の塩基配列およびアミノ酸配列を有してよい。また、L-アミノ酸生産菌の育種に使用される遺伝子およびタンパク質は、それぞれ、上記例示した遺伝子およびタンパク質等の公知の遺伝子およびタンパク質の

保存的バリエーションであってもよい。具体的には、例えば、L-アミノ酸生産菌の育種に使用される遺伝子は、元の機能が維持されている限り、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加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。遺伝子およびタンパク質の保存的バリエーションについては、後述する標的遺伝子および標的タンパク質の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。

[0068] <1-2>特定の性質

本発明の細菌は、特定の性質を有するように改変されている。本発明の細菌は、L-アミノ酸生産能を有する細菌を、特定の性質を有するように改変することにより取得できる。また、本発明の細菌は、特定の性質を有するように細菌を改変した後に、L-アミノ酸生産能を付与または増強することによっても取得できる。なお、本発明の細菌は、特定の性質を有するように改変されたことにより、L-アミノ酸生産能を獲得したものであってもよい。本発明の細菌は、特定の性質を有するように改変されていることに加えて、例えば、上記のようなL-アミノ酸生産菌が有する性質を適宜有してよい。本発明の細菌を構築するための改変は、任意の順番で行うことができる。

[0069] 特定の性質を有するように細菌を改変することによって、細菌のL-アミノ酸生産能を向上させることができ、すなわち同細菌によるL-アミノ酸生産を増大させることができる。「L-アミノ酸生産の増大」としては、L-アミノ酸の培地中での蓄積量の向上（増大）が挙げられる。

[0070] 特定の性質としては、細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変が挙げられる。「細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する」とは、細胞内のオキサロ酢酸（OAA）の蓄積量が増大することを意味してよい。

[0071] また、特定の性質としては、ホスホケトラーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変が挙げられる。「ホスホケトラーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する」とは、ホスホケトラーゼ経路のフラックス（すなわ

ち、ホスホケトララーゼ経路を経由する炭素源の代謝量）が増大すること、および／または、ホスホケトララーゼ経路を経由して代謝された炭素源から生成し得る副生物の蓄積量が低下することを意味してよい。副生物としては、酢酸が挙げられる。酢酸は、例えば、ホスホケトララーゼ経路のフラックスの増大により蓄積し得る。ホスホケトララーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変としては、ホスホケトララーゼ経路のフラックスが増大する改変や酢酸の資化性が向上する改変が挙げられる。

[0072] また、特定の性質としては、以下の (A) ～ (E) の改変が挙げられる：

- (A) 酢酸キナーゼ (acetate kinase) の活性が増大する改変；
- (B) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (fructose 1,6-bisphosphatase) の活性が増大する改変；
- (C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (pyruvate dehydrogenase) の活性が低下する改変；
- (D) アスパラギン酸トランスアミナーゼ (aspartate transaminase) の活性が低下する改変；
- (E) マリックエンザイム (malic enzyme) の活性が低下する改変。

[0073] 上記 (D) および (E) の改変は、細胞内のオキサロ酢酸 (OAA) プールが増大する改変の一例であり得る。上記 (A)、(B)、および (C) の改変は、ホスホケトララーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変の一例であり得る。上記 (A) および (C) の改変は、具体的には、酢酸の資化性が向上する改変の一例であり得る。上記 (B) の改変は、具体的には、ホスホケトララーゼ経路のフラックスが増大する改変の一例であり得る。

[0074] 本発明の細菌は、上記例示した性質から選択される 1 つまたはそれ以上の性質を有してよい。

[0075] 本発明の細菌は、例えば、細胞内のオキサロ酢酸 (OAA) プールが増大する改変および／またはホスホケトララーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変を有してよい。本発明の細菌は、例えば、少なくとも、ホスホケトララーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変を有してよい。

。すなわち、本発明の細菌は、具体的には、例えば、細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変およびホスホケトラゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変の内、ホスホケトラゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変のみを有していてもよく、ホスホケトラゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変と細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変の組み合わせを有していてもよい。

[0076] 本発明の細菌は、例えば、細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変、ホスホケトラゼ経路のフラックスが増大する改変、および／または酢酸の資化性が向上する改変を有してよい。本発明の細菌は、例えば、少なくとも、酢酸の資化性が向上する改変を有してよい。すなわち、本発明の細菌は、具体的には、例えば、細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変、ホスホケトラゼ経路のフラックスが増大する改変、および酢酸の資化性が向上する改変の内、酢酸の資化性が向上する改変のみを有していてもよく、酢酸の資化性が向上する改変と細胞内のオキサロ酢酸（OAA）プールが増大する改変および／またはホスホケトラゼ経路のフラックスが増大する改変の組み合わせを有していてもよい。

[0077] 本発明の細菌は、例えば、上記（A）～（E）の改変から選択される1つまたはそれ以上、例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ全て、の改変を有してよい。本発明の細菌は、具体的には、例えば、（A）、（B）、（C）、（D）、（E）、（A）＋（B）、（A）＋（C）、（A）＋（D）、（A）＋（E）、（B）＋（C）、（B）＋（D）、（B）＋（E）、（C）＋（D）、（C）＋（E）、（D）＋（E）、（A）＋（B）＋（C）、（A）＋（B）＋（D）、（A）＋（B）＋（E）、（A）＋（C）＋（D）、（A）＋（D）＋（E）、（B）＋（C）＋（D）、（B）＋（C）＋（E）、（B）＋（D）＋（E）、（C）＋（D）＋（E）、（A）＋（B）＋（C）＋（D）、（A）＋（B）＋（C）＋（E）、（A）＋（B）＋（D）＋（E）、（A）＋（C）＋（D）＋（E）、（B）＋（C）＋（D）＋（E）、（A）＋（B）＋（C）＋（D）＋（E）の改変を有してよい。

「（A）＋（B）の改変」とは、（A）の改変と（B）の改変の組み合わせを意

味する。この説明は、他の組み合わせにも準用できる。本発明の細菌は、例えば、少なくとも、上記（A）の改変を有していてもよい。すなわち、本発明の細菌は、具体的には、例えば、上記（A）～（E）の改変の内、上記（A）の改変のみを有していてもよく、上記（A）の改変と上記（B）～（E）の改変から選択される1つまたはそれ以上、例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ全て、の改変の組み合わせを有していてもよい。また、本発明の細菌は、例えば、少なくとも、上記（B）の改変を有していてもよい。

[0078] 「アスパラギン酸トランスアミナーゼ (aspartate transaminase)」とは、アスパラギン酸および／またはグルタミン酸のアミノ基転移反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC 2.6.1.1）。同活性を、「アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性」ともいう。アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性は、具体的には、L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸をオキサロ酢酸とL-グルタミン酸に変換する反応および／またはその逆反応を触媒する活性であってよい。アスパラギン酸トランスアミナーゼを、「グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (glutamic-oxaloacetic transaminase)」ともいう。アスパラギン酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子を「アスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子」ともいう。アスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子としては、aspT遺伝子が挙げられる。改変される細菌が有するaspT遺伝子等のアスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるAspTタンパク質等のアスパラギン酸トランスアミナーゼのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。Corynebacterium glutamicum ATCC 13869のaspT遺伝子 (CGBL_0102840) の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1および2に示す。

[0079] 「マリックエンザイム (malic enzyme)」とは、リンゴ酸の酸化的脱炭酸反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC EC 1.1.1.38、EC 1.1.1.39、またはEC 1.1.1.40）。同活性を、「マリックエンザイム活性」ともいう。マリックエンザイム活性は、具体的には、電子受容体の

存在下でリンゴ酸を脱炭酸してピルビン酸を生成する反応を触媒する活性であってよい。電子受容体としては、 NAD^+ や NADP^+ が挙げられる。マリックエンザイムは、少なくとも1つの電子受容体を利用できればよい。マリックエンザイムは、さらに、オキサロ酢酸の脱炭酸反応（具体的には、オキサロ酢酸をピルビン酸と二酸化炭素に変換する反応）を触媒する活性を有していてもよい。マリックエンザイムを「リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malate dehydrogenase)」ともいう。マリックエンザイムをコードする遺伝子を「マリックエンザイム遺伝子」ともいう。マリックエンザイム遺伝子としては、malE遺伝子が挙げられる。改変される細菌が有するmalE遺伝子等のマリックエンザイム遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるMalEタンパク質等のマリックエンザイムのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。Corynebacterium glutamicum ATCC 13869のmalE遺伝子 (CGBL_0129850) の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号3および4に示す。

[0080] 「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (pyruvate dehydrogenase)」とは、ピルビン酸の酸化的脱炭酸反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC 1.2.5.1）。同活性を、「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性」ともいう。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性は、具体的には、電子受容体の存在下でピルビン酸を脱炭酸して酢酸を生成する反応を触媒する活性であってよい。電子受容体としては、ユビキノンのキノンが挙げられる。ピルビン酸デヒドロゲナーゼは、少なくとも1つの電子受容体を利用できればよい。ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を「ピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子」ともいう。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子としては、poxB遺伝子が挙げられる。改変される細菌が有するpoxB遺伝子等のピルビン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるPoxBタンパク質等のピルビン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。Corynebacterium glutamicum ATCC 13869のpoxB遺伝子 (CGBL_0125410) の塩基配列および同遺伝子がコードする

タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号5および6に示す。

[0081] 「酢酸キナーゼ (acetate kinase)」とは、酢酸のリン酸化反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC 2.7.2.1）。同活性を、「酢酸キナーゼ活性」ともいう。酢酸キナーゼ活性は、具体的には、リン酸基供与体の存在下で酢酸をリン酸化してアセチルリン酸を生成する反応を触媒する活性であってよい。リン酸基供与体としては、ATPが挙げられる。酢酸キナーゼは、少なくとも1つのリン酸基供与体を利用できればよい。酢酸キナーゼをコードする遺伝子を「酢酸キナーゼ遺伝子」ともいう。酢酸キナーゼ遺伝子としては、ack遺伝子が挙げられる。ack遺伝子等の酢酸キナーゼ遺伝子としては、コリネ型細菌や腸内細菌科に属する細菌等の各種生物の遺伝子が挙げられる。ack遺伝子として、具体的には、*Corynebacterium glutamicum*や*E. coli*のack遺伝子が挙げられる。各種生物のack遺伝子等の酢酸キナーゼ遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるAckタンパク質等の酢酸キナーゼのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869のack遺伝子 (CGBL_0126910) の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号7および8に示す。*E. coli* MG1655のack遺伝子の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号9および10に示す。

[0082] 「フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (fructose 1,6-bisphosphatase)」とは、フルクトース-1,6-ビスリン酸の脱リン酸化反応を触媒する活性を有するタンパク質を意味してよい（例えば、EC 3.1.3.11）。同活性を、「フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性」ともいう。フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性は、具体的には、フルクトース-1,6-ビスリン酸をフルクトース-6-リン酸に変換する反応を触媒する活性であってよい。フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする遺伝子を「フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ遺伝子」ともいう。フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ遺伝子としては、glpX遺伝子が挙げられる。glpX遺伝子等のフルクトース-1,6-

ビスホスファターゼ遺伝子としては、コリネ型細菌や腸内細菌科に属する細菌等の各種生物の遺伝子が挙げられる。glpX遺伝子として、具体的には、*Corynebacterium glutamicum*や*E. coli*のglpX遺伝子が挙げられる。各種生物のglpX遺伝子等のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ遺伝子の塩基配列およびそれらにコードされるGlpXタンパク質等のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼのアミノ酸配列は、例えば、NCBI等の公開データベースから取得できる。*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032のglpX遺伝子 (NCgl0976) の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号11および12に示す。*E. coli* MG1655のglpX遺伝子の塩基配列および同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13および14に示す。

[0083] タンパク質の活性を低下させる手法については後述する。タンパク質の活性は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または同遺伝子を破壊することにより低下させることができる。このようなタンパク質の活性を低下させる手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて、用いることができる。

[0084] タンパク質の活性を増大させる手法については後述する。タンパク質の活性は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることにより増大させることができる。遺伝子の発現は、例えば、遺伝子のコピー数を高めることにより、または遺伝子の発現調節配列を改変することにより、上昇させることができる。このようなタンパク質の活性を増大させる手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて、用いることができる。

[0085] 特定の性質において活性が低下または増大するタンパク質を総称して、「標的タンパク質」ともいう。標的タンパク質をコードする遺伝子を総称して、「標的遺伝子」ともいう。

[0086] 標的遺伝子は、例えば、上記例示した標的遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、または13に示す塩基配列）を有する遺伝子であってよい。また、標的タンパク質は、例えば、上記例示した標的タ

ンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号 2、4、6、8、10、12、または 14 に示すアミノ酸配列）を有するタンパク質であってよい。なお、「（アミノ酸または塩基）配列を有する」という表現は、特記しない限り、当該「（アミノ酸または塩基）配列を含む」ことを意味し、当該「（アミノ酸または塩基）配列からなる」場合も包含する。

[0087] 標的遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示した標的遺伝子（例えば、配列番号 1、3、5、7、9、11、または 13 に示す塩基配列を有する遺伝子）のバリエーションであってもよい。同様に、標的タンパク質は、元の機能が維持されている限り、上記例示した標的タンパク質（例えば、配列番号 2、4、6、8、10、12、または 14 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質）のバリエーションであってもよい。なお、そのような元の機能が維持されたバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。「aspT 遺伝子」、「malE 遺伝子」、「poxB 遺伝子」、「ack 遺伝子」、および「glpX 遺伝子」という用語は、それぞれ、上記例示した aspT 遺伝子、malE 遺伝子、poxB 遺伝子、ack 遺伝子、および glpX 遺伝子に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。同様に、「AspT タンパク質」、「MalE タンパク質」、「PoxB タンパク質」、「Ack タンパク質」、および「GlpX タンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示した AspT タンパク質、MalE タンパク質、PoxB タンパク質、Ack タンパク質、および GlpX タンパク質に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。保存的バリエーションとしては、例えば、上記例示した標的遺伝子や標的タンパク質のホモログや人為的な改変体が挙げられる。

[0088] 「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリエーションが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（例えば活性や性質）に対応する機能（例えば活性や性質）を有することをいう。遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることをいう。すなわち、各標的遺伝子についての「元の機能が維持されている」とは、遺伝子のバリエーションが、各標的タンパク

質の活性：アスパラギン酸トランスアミナーゼについてアスパラギン酸トランスアミナーゼ活性；マリックエンザイムについてマリックエンザイム活性；ピルビン酸デヒドロゲナーゼについてピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性；酢酸キナーゼについて酢酸キナーゼ活性；フルクトース-1,6-ビスホスファターゼについてフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性；を有するタンパク質をコードすることを意味してよい。また、各標的タンパク質についての「元の機能が維持されている」とは、タンパク質のバリエーションが、各標的タンパク質の活性：アスパラギン酸トランスアミナーゼについてアスパラギン酸トランスアミナーゼ活性；マリックエンザイムについてマリックエンザイム活性；ピルビン酸デヒドロゲナーゼについてピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性；酢酸キナーゼについて酢酸キナーゼ活性；フルクトース-1,6-ビスホスファターゼについてフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性；を有することを意味してよい。

[0089] アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性は、例えば、酵素を対応する基質（例えばL-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えばオキサロ酢酸とL-グルタミン酸）の生成を測定することにより、測定することができる。

[0090] マリックエンザイム活性は、例えば、電子受容体の存在下で酵素を対応する基質（例えばリンゴ酸）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えばピルビン酸）の生成を測定することにより、測定することができる。

[0091] ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性は、例えば、電子受容体の存在下で酵素を対応する基質（例えばピルビン酸）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えば酢酸）の生成を測定することにより、測定することができる。

[0092] 酢酸キナーゼ活性は、例えば、リン酸基供与体の存在下で酵素を対応する基質（例えば酢酸）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えばアセチルリン酸）の生成を測定することにより、測定すること

ができる。

[0093] フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性は、例えば、酵素を対応する基質（例えばフルクトース-1,6-ビスリン酸）とインキュベートし、酵素および基質依存的な対応する産物（例えばフルクトース-6-リン酸）の生成を測定することにより、測定することができる。

[0094] 以下、保存的バリエーションについて例示する。

[0095] 標的遺伝子のホモログまたは標的タンパク質のホモログは、例えば、上記例示した標的遺伝子の塩基配列または上記例示した標的タンパク質のアミノ酸配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、標的遺伝子のホモログは、例えば、各種生物の染色体を鋳型にして、これら公知の標的遺伝子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て用いたPCRにより取得することができる。

[0096] 標的遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列（例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、または14に示すアミノ酸配列）において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加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。例えば、コードされるタンパク質は、そのN末端および／またはC末端が、延長または短縮されていてもよい。なお上記「1又は数個」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、例えば、1～50個、1～40個、1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個を意味する。

[0097] 上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、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。保存的置換とみなされる置換としては、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。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加には、遺伝子が由来する生物の個体差、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。

[0098] また、標的遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列全体に対して、例えば、50%以上、65%以上、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有する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。

[0099] また、標的遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記塩基配列（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、または13に示す塩基配列）から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列、とストリンジентな条件下でハイブリダイズする遺伝子（例えばDNA）であってもよい。「ストリンジентな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、同一性が高いDNA同士、例えば、50%以上、65%以上、80%

以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより同一性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、より好ましくは68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。

[0100] 上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子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、上述の遺伝子を含む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、プローブとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。プローブとして300 bp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としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0101] また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、標的遺伝子は、任意のコドンとそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。すなわち、標的遺伝子は、遺伝コードの縮重による上記例示した標的遺伝子のバリエーションであってもよい。例えば、標的遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンと有するように改変されてよい。

[0102] なお、アミノ酸配列間の「同一性」とは、blastpによりデフォルト設定のScoring Parameters (Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11, Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment) を用いて算出されるアミノ酸配列間の同一性を意味する。また、塩基配列間の「同一性」とは、blastnによりデフォルト設定のScoring Parameters (Match/Mismatch Scores=1, -2; Gap Costs=Linear) を用いて算出される塩基配列間の同一性を意味する。

[0103] なお、上記の遺伝子やタンパク質の保存的バリエーションに関する記載は、L-アミノ酸生合成系酵素等の任意のタンパク質、およびそれらをコードする

遺伝子にも準用できる。

[0104] <1-3>タンパク質の活性を増大させる手法

以下に、タンパク質の活性を増大させる手法について説明する。

[0105] 「タンパク質の活性が増大する」とは、同タンパク質の活性が非改変株と比較して増大することを意味する。「タンパク質の活性が増大する」とは、具体的には、同タンパク質の細胞当たりの活性が非改変株と比較して増大することを意味する。ここでいう「非改変株」とは、標的のタンパク質の活性が増大するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。非改変株として、具体的には、各細菌種の基準株 (type strain) が挙げられる。また、非改変株として、具体的には、細菌の説明において例示した菌株も挙げられる。すなわち、一態様において、タンパク質の活性は、基準株 (すなわち本発明の細菌が属する種の基準株) と比較して増大してよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* ATCC 13869株と比較して増大してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* ATCC 13032株と比較して増大してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* AJ12036 (FERM BP-734)と比較して増大してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* YDK010株と比較して増大してもよい。なお、「タンパク質の活性が増大する」ことを、「タンパク質の活性が増強される」ともいう。「タンパク質の活性が増大する」とは、より具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が増加していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が増大していることを意味してよい。すなわち、「タンパク質の活性が増大する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量 (mRNA量) または翻訳量 (タンパク質の量) を意味してもよい。「タンパク質の細胞当たりの分子数」とは、同タンパク質の分子数の細胞当たりの平均値を意味してよい。また、「タンパク質の活性が増大する」ことには、もともと標的のタンパク質の活性を有する菌株において同

タンパク質の活性を増大させることだけでなく、もともと標的のタンパク質の活性が存在しない菌株に同タンパク質の活性を付与することも包含される。また、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、宿主が本来有する標的のタンパク質の活性を低下または消失させた上で、好適な標的のタンパク質の活性を付与してもよい。

[0106] タンパク質の活性の増大の程度は、タンパク質の活性が非改変株と比較して増大していれば特に制限されない。タンパク質の活性は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、非改変株が標的のタンパク質の活性を有していない場合は、同タンパク質をコードする遺伝子を導入することにより同タンパク質が生成されていればよいが、例えば、同タンパク質はその活性が測定できる程度に生産されていてよい。

[0107] タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることによって達成できる。「遺伝子の発現が上昇する」とは、同遺伝子の発現が野生株や親株等の非改変株と比較して増大することを意味する。「遺伝子の発現が上昇する」とは、具体的には、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変株と比較して増大することを意味する。「遺伝子の細胞当たりの発現量」とは、同遺伝子の発現量の細胞当たりの平均値を意味してよい。「遺伝子の発現が上昇する」とは、より具体的には、遺伝子の転写量（mRNA量）が増大すること、および／または、遺伝子の翻訳量（タンパク質の量）が増大することを意味してよい。なお、「遺伝子の発現が上昇する」ことを、「遺伝子の発現が増強される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、「遺伝子の発現が上昇する」ことには、もともと標的の遺伝子が発現している菌株において同遺伝子の発現量を上昇させることだけでなく、もともと標的の遺伝子が発現していない菌株において、同遺伝子を発現させることも包含される。すなわち、「遺伝子の発現が上昇する」とは、例えば、標的の遺伝子を保持しない菌株に同遺伝子を導入し、

同遺伝子を発現させることを意味してもよい。

[0108] 遺伝子の発現の上昇は、例えば、遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。

[0109] 遺伝子のコピー数の増加は、宿主の染色体へ同遺伝子を導入することにより達成できる。染色体への遺伝子の導入は、例えば、相同組み換えを利用して行うことができる (Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory)。相同組み換えを利用する遺伝子導入法としては、例えば、Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration) 法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) 等の直鎖状DNAを用いる方法、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法、ファージを用いたtransduction法が挙げられる。具体的には、標的遺伝子を含む組換えDNAで宿主を形質転換し、宿主の染色体上の標的部位と相同組み換えを起こすことにより、該遺伝子を宿主の染色体上に導入することができる。相同組み換えに用いる組換えDNAの構造は、所望の態様で相同組み換えが起こるものであれば特に制限されない。例えば、標的遺伝子を含む線状DNAであって、該遺伝子の両端に染色体上の標的部位の上流および下流に相同な塩基配列をそれぞれ備える線状DNAで宿主を形質転換して、標的部位の上流および下流でそれぞれ相同組み換えを起こさせることにより、標的部位を該遺伝子に置換することができる。相同組み換えに用いる組換えDNAは、形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子を備えていてよい。遺伝子は、1コピーのみ導入されてもよく、2コピーまたはそれ以上導入されてもよい。例えば、染色体上に多数のコピーが存在する塩基配列を標的として相同組み換えを行うことで、染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体上に多数のコピーが存在する塩基配列としては、反復DNA配列 (repetitive DNA)、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピートが挙げられる。また、目的物質の生産に不要な遺伝子等の染色体上

の適当な塩基配列を標的として相同組み換えを行ってもよい。また、遺伝子は、トランスポゾンやMini-Muを用いて染色体上にランダムに導入することもできる（特開平2-109985号公報、US5,882,888、EP805867B1）。なお、このような相同組み換えを利用した染色体の改変手法は、標的遺伝子の導入に限られず、発現調節配列の改変等の、染色体の任意の改変に利用できる。

[0110] 染色体上に標的遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部又は一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は同遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認できる。

[0111] また、遺伝子のコピー数の増加は、同遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。例えば、標的遺伝子を含むDNA断片を、宿主で機能するベクターと連結して同遺伝子の発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主を形質転換することにより、同遺伝子のコピー数を増加させることができる。標的遺伝子を含むDNA断片は、例えば、標的遺伝子を有する微生物のゲノムDNAを鋳型とするPCRにより取得できる。ベクターとしては、宿主の細胞内において自律複製可能なベクターを用いることができる。ベクターは、マルチコピーベクターであるのが好ましい。また、形質転換体を選択するために、ベクターは抗生物質耐性遺伝子などのマーカーを有することが好ましい。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーターやターミネーターを備えていてもよい。ベクターは、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。コリネ型細菌で自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ; pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ; これらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド ; pCRY30 (特開平3-210184) ; pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE、およびpCRY3KX (特開平2-72876、米国特許5,185,262号) ; pCRY2およびpCRY3 (特開平1-191686) ; pAJ655、pAJ611、およびpAJ18

44 (特開昭58-192900) ; pCG1 (特開昭57-134500) ; pCG2 (特開昭58-35197) ; pCG4およびpCG11 (特開昭57-183799) ; pVK7 (特開平10-215883) ; pVK9 (US2006-0141588) ; pVC7 (特開平9-070291) ; pVS7 (W02013/069634) が挙げられる。

[0112] 遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に宿主に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、宿主で機能するプロモーターによる制御を受けて発現するように保持されていればよい。プロモーターは、宿主において機能するものであれば特に制限されない。「宿主において機能するプロモーター」とは、宿主においてプロモーター活性を有するプロモーターをいう。プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、導入する遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターとしては、例えば、後述するような、より強力なプロモーターを利用してもよい。

[0113] 遺伝子の下流には、転写終結用のターミネーターを配置することができる。ターミネーターは、宿主において機能するものであれば特に制限されない。ターミネーターは、宿主由来のターミネーターであってもよく、異種由来のターミネーターであってもよい。ターミネーターは、導入する遺伝子の固有のターミネーターであってもよく、他の遺伝子のターミネーターであってもよい。

[0114] 各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターに関しては、例えば「微生物学基礎講座 8 遺伝子工学、共立出版、1987年」に詳細に記載されており、それらを利用することが可能である。

[0115] また、2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に宿主に保持されていればよい。例えば、各遺伝子は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各遺伝子は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていても

よい。また、2またはそれ以上の遺伝子でオペロンを構成して導入してもよい。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」としては、例えば、2またはそれ以上のタンパク質（例えば酵素）をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一のタンパク質複合体（例えば酵素複合体）を構成する2またはそれ以上のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

[0116] 導入される遺伝子は、宿主で機能するタンパク質をコードするものであれば特に制限されない。導入される遺伝子は、宿主由来の遺伝子であってもよく、異種由来の遺伝子であってもよい。導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、同遺伝子を有する生物のゲノムDNAや同遺伝子を搭載するプラスミド等を鋳型として、PCRにより取得することができる。また、導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて全合成してもよい（Gene, 60(1), 115-127 (1987)）。取得した遺伝子は、そのまま、あるいは適宜改変して、利用することができる。すなわち、遺伝子を改変することにより、そのバリエーションを取得することができる。遺伝子の改変は公知の手法により行うことができる。例えば、部位特異的変異法により、DNAの目的の部位に目的の変異を導入することができる。すなわち、例えば、部位特異的変異法により、コードされるタンパク質が特定の部位においてアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むように、遺伝子のコード領域を改変することができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法（Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)）や、ファージを用いる方法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)）が挙げられる。あるいは、遺伝子のバリエーションを全合成してもよい。

[0117] なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、それら複数のサブユニッ

トの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、遺伝子の発現を上昇させることによりタンパク質の活性を増大させる場合、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強してもよく、一部の発現のみを増強してもよい。通常は、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強するのが好ましい。また、複合体を構成する各サブユニットは、複合体が標的のタンパク質の機能を有する限り、1種の生物由来であってもよく、2種またはそれ以上の異なる生物由来であってもよい。すなわち、例えば、複数のサブユニットをコードする、同一の生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよく、それぞれ異なる生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよい。

[0118] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の転写効率を向上させることにより達成できる。また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の翻訳効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の転写効率や翻訳効率の向上は、例えば、発現調節配列の改変により達成できる。「発現調節配列」とは、遺伝子の発現に影響する部位の総称である。発現調節配列としては、例えば、プロモーター、シャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）、およびRBSと開始コドンとの間のスペーサー領域が挙げられる。発現調節配列は、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ができる。これら発現調節配列の改変は、例えば、温度感受性ベクターを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法（W02005/010175）により行うことができる。

[0119] 遺伝子の転写効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。「より強力なプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも向上するプロモーターを意味する。コリネ型細菌で利用できるより強力なプロモーターとしては、例えば、人為的に設計変更されたP54-6プロモーター（Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679(2000)）、コリネ型細菌内で酢酸、エタノール、ピルビン酸等で誘導できるpta、aceA、aceB、

adh、amyEプロモーター、コリネ型細菌内で発現量が多い強力なプロモーターであるcspB、SOD、tuf (EF-Tu) プロモーター (Journal of Biotechnology 104 (2003) 311-323, Appl Environ Microbiol. 2005 Dec;71(12):8587-96.)、lacプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーターが挙げられる。また、より強力なプロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得してもよい。例えば、プロモーター領域内の-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることにより、プロモーターの活性を高めることができる (国際公開第00/18935号)。高活性型プロモーターとしては、各種tac様プロモーター (Katashkina JI et al. Russian Federation Patent application 2006134574) やpnlp8プロモーター (W02010/027045) が挙げられる。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., 1, 105-128 (1995)) 等に記載されている。

[0120] 遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のシャインダルガノ (SD) 配列 (リボソーム結合部位 (RBS) ともいう) をより強力なSD配列に置換することにより達成できる。「より強力なSD配列」とは、mRNAの翻訳が、もともと存在している野生型のSD配列よりも向上するSD配列を意味する。より強力なSD配列としては、例えば、ファージT7由来の遺伝子10のRBSが挙げられる (Olins P. O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235)。さらに、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域、特に開始コドンのすぐ上流の配列 (5' -UTR) における数個のヌクレオチドの置換、あるいは挿入、あるいは欠失がmRNAの安定性および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によっても遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。

[0121] 遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、コドンの改変によっても達成できる。例えば、遺伝子中に存在するレアコドンを、より高頻度で利用される同義コドンに置き換えることにより、遺伝子の翻訳効率を向上させることができ

る。すなわち、導入される遺伝子は、例えば、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変されてよい。コドンの置換は、例えば、部位特異的変異法により行うことができる。また、コドンが置換された遺伝子断片を全合成してもよい。種々の生物におけるコドンの使用頻度は、「コドン使用データベース」 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)) に開示されている。

[0122] また、遺伝子の発現の上昇は、遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、または、遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成できる。

[0123] 上記のような遺伝子の発現を上昇させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

[0124] また、タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、タンパク質の比活性を増強することによっても達成できる。比活性の増強には、フィードバック阻害の脱感作 (desensitization to feedback inhibition) も含まれる。比活性が増強されたタンパク質は、例えば、種々の生物を探索し取得することができる。また、在来 of タンパク質に変異を導入することで高活性型のものを取得してもよい。導入される変異は、例えば、タンパク質の1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されるものであってよい。変異の導入は、例えば、上述したような部位特異的変異法により行うことができる。また、変異の導入は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、エチルメタンスルフォネート (EMS)、およびメチルメタンスルフォネート (MMS) 等の変異剤による処理が挙げられる。また、in vitroでDNAを直接ヒドロキシルアミンで処理し、ランダム変異を誘発してもよい。比活性の増強は、単独で用いてもよく、上記のような遺伝子の発現を増強する手法と任意に組み合わせで用いてもよい。

[0125] 形質転換の方法は特に限定されず、従来知られた方法を用いることができ

る。コリネ型細菌の形質転換の方法としては、プロトプラスト法 (Gene, 39, 281-286(1985))、エレクトロポレーション法 (Bio/Technology, 7, 1067-1070(1989))、電気パルス法 (特開平2-207791号公報) が挙げられる。

[0126] タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

[0127] タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子の転写量が上昇したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が上昇したことを確認することにより確認できる。

[0128] 遺伝子の転写量が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株または親株等の非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としてはノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、マイクロアレイ、RNA-seq等が挙げられる (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量 (例えば、細胞当たりの分子数) は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0129] タンパク質の量が上昇したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)。タンパク質の量 (例えば、細胞当たりの分子数) は、例えば、非改変株の、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

[0130] 上記したタンパク質の活性を増大させる手法は、任意のタンパク質の活性増強や任意の遺伝子の発現増強に利用できる。

[0131] <1-4>タンパク質の活性を低下させる手法

以下に、タンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

[0132] 「タンパク質の活性が低下する」とは、同タンパク質の活性が非改変株と比較して低下することを意味する。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、同タンパク質の細胞当たりの活性が非改変株と比較して低下することを意味する。ここでいう「非改変株」とは、標的のタンパク質の活性が低下するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。非改変株として、具体的には、各細菌種の基準株 (type strain) が挙げられる。また、非改変株として、具体的には、細菌の説明において例示した菌株も挙げられる。すなわち、一態様において、タンパク質の活性は、基準株（すなわち本発明の細菌が属する種の基準株）と比較して低下してよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* ATCC 13869株と比較して低下してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* ATCC 13032株と比較して低下してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* AJ12036 (FERM BP-734)と比較して低下してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、*C. glutamicum* YDK010株と比較して低下してもよい。なお、「タンパク質の活性が低下する」ことには、同タンパク質の活性が完全に消失している場合も包含される。「タンパク質の活性が低下する」とは、より具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が低下していること、および／または、同タンパク質の分子当たりの機能が低下していることを意味してよい。すなわち、「タンパク質の活性が低下する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量 (mRNA量) または翻訳量 (タンパク質の量) を意味してもよい。「タンパク質の細胞当たりの分子数」とは、同タンパク質の分子数の細胞当たりの平均値を意味してよい。なお、「タンパク質の細胞当たりの分子数が低下している」ことには、同タンパク質が全く存在していない場合も包含される。また、「タンパク質の分子当たりの機能が低下している」ことには、同タンパク質の分子当たりの機能が完全に消失している場合も包含される。タンパク質の活性の低下の程度は、タンパク質

の活性が非改変株と比較して低下していれば特に制限されない。タンパク質の活性は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0133] タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることにより達成できる。「遺伝子の発現が低下する」とは、同遺伝子の発現が野生株や親株等の非改変株と比較して低下することを意味する。「遺伝子の発現が低下する」とは、具体的には、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変株と比較して低下することを意味する。「遺伝子の細胞当たりの発現量」とは、同遺伝子の発現量の細胞当たりの平均値を意味してよい。「遺伝子の発現が低下する」とは、より具体的には、遺伝子の転写量（mRNA量）が低下すること、および／または、遺伝子の翻訳量（タンパク質の量）が低下することを意味してよい。「遺伝子の発現が低下する」ことには、同遺伝子が全く発現していない場合も包含される。なお、「遺伝子の発現が低下する」ことを、「遺伝子の発現が弱化される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0134] 遺伝子の発現の低下は、例えば、転写効率の低下によるものであってもよく、翻訳効率の低下によるものであってもよく、それらの組み合わせによるものであってもよい。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーター、シャインダルガノ（SD）配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。遺伝子の転写効率の低下は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより弱いプロモーターに置換することにより達成できる。「より弱いプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも弱化するプロモーターを意味する。より弱いプロモーターとしては、例えば、誘導型のプロモーターが挙げられる。す

なわち、誘導型のプロモーターは、非誘導条件下（例えば、誘導物質の非存在下）でより弱いプロモーターとして機能し得る。また、発現調節配列の一部または全部の領域を欠失（欠損）させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、発現制御に関わる因子を操作することによっても達成できる。発現制御に関わる因子としては、転写や翻訳制御に関わる低分子（誘導物質、阻害物質など）、タンパク質（転写因子など）、核酸（siRNAなど）等が挙げられる。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のコード領域に遺伝子の発現が低下するような変異を導入することによっても達成できる。例えば、遺伝子のコード領域のコドン、宿主においてより低頻度で利用される同義コドンに置き換えることによって、遺伝子の発現を低下させることができる。また、例えば、後述するような遺伝子の破壊により、遺伝子の発現自体が低下し得る。

[0135] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより達成できる。「遺伝子が破壊される」とは、正常に機能するタンパク質を産生しないように同遺伝子が改変されることを意味する。「正常に機能するタンパク質を産生しない」ことには、同遺伝子からタンパク質が全く産生されない場合や、同遺伝子から分子当たりの機能（例えば活性や性質）が低下又は消失したタンパク質が産生される場合が包含される。

[0136] 遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子を欠失（欠損）させることにより達成できる。「遺伝子の欠失」とは、遺伝子のコード領域の一部又は全部の領域の欠失をいう。さらには、染色体上の遺伝子のコード領域の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。遺伝子のコード領域の前後の配列には、例えば、遺伝子の発現調節配列が含まれてよい。タンパク質の活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域（タンパク質のN末端側をコードする領域）、内部領域、C末端領域（タンパク質のC末端側をコードする領域）等のいずれの領域であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。欠失させる領域

は、例えば、遺伝子のコード領域全長の10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上の長さの領域であってよい。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。リーディングフレームの不一致により、欠失させる領域の下流でフレームシフトが生じ得る。

[0137] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終止コドン（ナンセンス変異）を導入すること、または1～2塩基の付加または欠失（フレームシフト変異）を導入すること等によっても達成できる（*Journal of Biological Chemistry* 272:8611-8617(1997), *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95 5511-5515(1998), *Journal of Biological Chemistry* 26 116, 20833-20839(1991))。

[0138] また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域に他の塩基配列を挿入することによっても達成できる。挿入部位は遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する塩基配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。リーディングフレームの不一致により、挿入部位の下流でフレームシフトが生じ得る。他の塩基配列としては、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子や目的物質の生産に有用な遺伝子が挙げられる。

[0139] 遺伝子の破壊は、特に、コードされるタンパク質のアミノ酸配列が欠失（欠損）するように実施してよい。言い換えると、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、タンパク質のアミノ酸配列（アミノ酸配列の一部または全部の領域）を欠失させることにより、具体的には、アミノ酸配列（アミノ酸配列の一部または全部の領域）を欠失したタンパク質をコードするように遺伝子を改変することにより、達成できる。なお、「タンパク質のA

ミノ酸配列の欠失」とは、タンパク質のアミノ酸配列の一部または全部の領域の欠失をいう。また、「タンパク質のアミノ酸配列の欠失」とは、タンパク質において元のアミノ酸配列が存在しなくなることをいい、元のアミノ酸配列が別のアミノ酸配列に変化する場合も包含される。すなわち、例えば、フレームシフトにより別のアミノ酸配列に変化した領域は、欠失した領域とみなしてよい。タンパク質のアミノ酸配列の欠失により、典型的にはタンパク質の全長が短縮されるが、タンパク質の全長が変化しないか、あるいは延長される場合もあり得る。例えば、遺伝子のコード領域の一部又は全部の領域の欠失により、コードされるタンパク質のアミノ酸配列において、当該欠失した領域がコードする領域を欠失させることができる。また、例えば、遺伝子のコード領域への終止コドンの導入により、コードされるタンパク質のアミノ酸配列において、当該導入部位より下流の領域がコードする領域を欠失させることができる。また、例えば、遺伝子のコード領域におけるフレームシフトにより、当該フレームシフト部位がコードする領域を欠失させることができる。アミノ酸配列の欠失における欠失させる領域の位置および長さについては、遺伝子の欠失における欠失させる領域の位置および長さの説明を準用できる。

[0140] 染色体上の遺伝子を上記のように改変することは、例えば、正常に機能するタンパク質を産生しないように改変した破壊型遺伝子を作製し、該破壊型遺伝子を含む組換えDNAで宿主を形質転換して、破壊型遺伝子と染色体上の野生型遺伝子と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破壊型遺伝子に置換することによって達成できる。その際、組換えDNAには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませておくことが操作がしやすい。破壊型遺伝子としては、遺伝子のコード領域の一部又は全部の領域を欠失した遺伝子、ミスセンス変異を導入した遺伝子、ナンセンス変異を導入した遺伝子、フレームシフト変異を導入した遺伝子、トランスポゾンやマーカー遺伝子等の挿入配列を挿入した遺伝子が挙げられる。破壊型遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても

、野生型タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。相同組換えに用いる組換えDNAの構造は、所望の態様で相同組換えが起こるものであれば特に制限されない。例えば、破壊型遺伝子を含む線状DNAであって、両端に染色体上の野生型遺伝子の上流および下流の配列をそれぞれ備える線状DNAで宿主を形質転換して、野生型遺伝子の上流および下流でそれぞれ相同組換えを起こさせることにより、野生型遺伝子を破壊型遺伝子に置換することができる。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、「Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration)」と呼ばれる方法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法とλファージ由来の切り出しシステム (Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002)) とを組み合わせた方法 (W02005/010175号参照) 等の直鎖状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、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法などがある (米国特許第6303383号、特開平05-007491号)。なお、このような相同組み換えを利用した染色体の改変手法は、標的遺伝子の破壊に限られず、発現調節配列の改変等の、染色体の任意の改変に利用できる。

[0141] また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、エチルメタンスルフォネート (EMS)、およびメチルメタンスルフォネート (MMS) 等の変異剤による処理が挙げられる。

[0142] なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよ

く、一部のみを破壊等してもよい。また、タンパク質に複数のアイソザイムが存在する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、複数のアイソザイムの全ての活性を低下させてもよく、一部のみを活性を低下させてもよい。すなわち、例えば、それらのアイソザイムをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。

[0143] 上記のようなタンパク質の活性を低下させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

[0144] タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。

[0145] タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が低下したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が低下したことは、同遺伝子の転写量が低下したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が低下したことを確認することにより確認できる。

[0146] 遺伝子の転写量が低下したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、マイクロアレイ、RNA-seq等が挙げられる (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量 (例えば、細胞当たりの分子数) は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0147] タンパク質の量が低下したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)。タンパク質の量 (例えば、細胞当たりの分子数) は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

[0148] 遺伝子が破壊されたことは、破壊に用いた手段に応じて、同遺伝子の一部または全部の塩基配列、制限酵素地図、または全長等を決定することで確認できる。

[0149] 上記したタンパク質の活性を低下させる手法は、任意のタンパク質の活性低下や任意の遺伝子の発現低下に利用できる。

[0150] <2>本発明のＬ－アミノ酸の製造方法

本発明の方法は、本発明の細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－アミノ酸を蓄積すること、および前記培地および／または前記菌体より前記Ｌ－アミノ酸を採取すること、を含むＬ－アミノ酸の製造方法である。Ｌ－アミノ酸については上述した通りである。本発明においては、１種のＬ－アミノ酸が製造されてもよく、２種またはそれ以上のＬ－アミノ酸が製造されてもよい。

[0151] 使用する培地は、本発明の細菌が増殖でき、目的のＬ－アミノ酸が生産される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、コリネ型細菌等の細菌の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。培地としては、例えば、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有する培地を用いることができる。培地成分の種類や濃度は、使用する細菌の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0152] 炭素源として、具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、廃糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマスの加水分解物等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類、グリセロール、粗グリセロール、エタノール等のアルコール類、脂肪酸類が挙げられる。炭素源としては、特に、糖類が挙げられる。炭素源として、さらに特には、グルコースやフルクトースが挙げられる。グルコースやフルクトース等の糖類は、単独で、あるいは他の炭素源と組み合わせて、炭素源として用いられてよい。炭素源としては、例えば、フルクトースを構成糖とする糖が用いられてもよい。フルクトースを構成

糖とする糖としては、フルクトース、スクロース、フルクトオリゴ糖が挙げられる。フルクトースを構成糖とする糖は、単独で、あるいは他の炭素源と組み合わせて、炭素源として用いられてよい。なお、炭素源としては、植物由来原料を好適に用いることができる。植物としては、例えば、トウモロコシ、米、小麦、大豆、サトウキビ、ビート、綿が挙げられる。植物由来原料としては、例えば、根、茎、幹、枝、葉、花、種子等の器官、それらを含む植物体、それら植物器官の分解産物が挙げられる。植物由来原料の利用形態は特に制限されず、例えば、未加工品、絞り汁、粉碎物、精製物等のいずれの形態でも利用できる。また、キシロース等の五炭糖、グルコース等の六炭糖、またはそれらの混合物は、例えば、植物バイオマスから取得して利用できる。具体的には、これらの糖類は、植物バイオマスを、水蒸気処理、濃酸加水分解、希酸加水分解、セルラーゼ等の酵素による加水分解、アルカリ処理等の処理に供することにより取得できる。なお、ヘミセルロースは一般的にセルロースよりも加水分解されやすいため、植物バイオマス中のヘミセルロースを予め加水分解して五炭糖を遊離させ、次いで、セルロースを加水分解して六炭糖を生成してもよい。また、キシロースは、例えば、本発明の細菌にグルコース等の六炭糖からキシロースへの変換経路を保有させて、六炭糖からの変換により供給してもよい。炭素源としては、1種の炭素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせ用いてもよい。

[0153] 窒素源として、具体的には、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆タンパク質分解物等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。pH調整に用いられるアンモニアガスやアンモニア水を窒素源として利用してもよい。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせ用いてもよい。

[0154] リン酸源として、具体的には、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上の

リン酸源を組み合わせてもよい。

[0155] 硫黄源として、具体的には、例えば、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせてもよい。

[0156] その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量元素類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク質分解物等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分や無機成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせてもよい。

[0157] また、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、培地に要求される栄養素を補添することが好ましい。

[0158] また、培地中のビオチン量を制限することや、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加することも好ましい。

[0159] 培養条件は、本発明の細菌が増殖でき、目的のL-アミノ酸が生産される限り、特に制限されない。培養は、例えば、コリネ型細菌等の細菌の培養に用いられる通常のことで行うことができる。培養条件は、使用する細菌の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

[0160] 培養は、液体培地を用いて行うことができる。培養の際には、本発明の細菌を寒天培地等の固体培地で培養したものを直接液体培地に接種してもよく、本発明の細菌を液体培地で種培養したものを本培養用の液体培地に接種してもよい。すなわち、培養は、種培養と本培養とに分けて行われてもよい。その場合、種培養と本培養の培養条件は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。培養開始時に培地に含有される本発明の細菌の量は特に制限されない。本培養は、例えば、本培養の培地に、種培養液を1～50% (v/v) 植菌

することにより行ってよい。

[0161] 培養は、回分培養 (batch culture)、流加培養 (Fed-batch culture)、連続培養 (continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。なお、培養開始時の培地を、「初発培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系（発酵槽）に供給する培地を、「流加培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系に流加培地を供給することを、「流加」ともいう。なお、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合、例えば、種培養と本培養を、共に回分培養で行ってもよい。また、例えば、種培養を回分培養で行い、本培養を流加培養または連続培養で行ってもよい。

[0162] 本発明において、各培地成分は、初発培地、流加培地、またはその両方に含有されていてよい。初発培地に含有される成分の種類は、流加培地に含有される成分の種類と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、初発培地に含有される各成分の濃度は、流加培地に含有される各成分の濃度と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、含有する成分の種類および／または濃度の異なる2種またはそれ以上の流加培地を用いてもよい。例えば、複数回の流加が間欠的に行われる場合、各回の流加培地に含有される成分の種類および／または濃度は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。

[0163] 培地中の炭素源の濃度は、本発明の細菌が増殖でき、L-アミノ酸が生産される限り、特に制限されない。培地中の炭素源の濃度は、例えば、L-アミノ酸の生産が阻害されない範囲で可能な限り高くしてよい。培地中の炭素源の濃度は、例えば、初発濃度（初発培地中の濃度）として、1～30w/v%、好ましくは3～10w/v%であってよい。また、適宜、炭素源を追加で培地に添加してもよい。例えば、発酵の進行に伴う炭素源の消費に応じて、炭素源を追加で培地に添加してもよい。

[0164] 培養は、例えば、好気条件で行うことができる。好気条件とは、液体培地中の溶存酸素濃度が、酸素膜電極による検出限界である0.33 ppm以上である

ことをいい、好ましくは1.5 ppm以上であることであってよい。酸素濃度は、例えば、飽和酸素濃度に対して5～50%、好ましくは10%程度に制御されてもよい。好気条件での培養は、具体的には、通気培養、振盪培養、攪拌培養、またはそれらの組み合わせで行うことができる。培地のpHは、例えば、pH3～10、好ましくはpH4.0～9.5であってよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整することができる。培地のpHは、アンモニアガス、アンモニア水、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、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の各種アルカリ性または酸性物質を用いて調整することができる。培養温度は、例えば、20～40℃、好ましくは25℃～37℃であってよい。培養期間は、例えば、10時間～120時間であってよい。培養は、例えば、培地中の炭素源が消費されるまで、あるいは本発明の細菌の活性がなくなるまで、継続してもよい。このような条件下で本発明の細菌を培養することにより、培地中および／または菌体内にL-アミノ酸が蓄積する。

[0165] また、L-グルタミン酸を製造する場合、L-グルタミン酸が析出する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できる。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の条件が挙げられる（EP1078989A）。また、L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、パントテン酸を培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（W02004/111258）。また、L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、L-グルタミン酸の結晶を種晶として培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（EP1233069A）。また、L-グルタミン酸が析出する条件に調整された液体培地を用いる場合、L-グルタミン酸の結晶およびL-リジンの結晶を種晶として培地に添加することにより、より効率よく晶析できる（EP1624069A）。

[0166] また、塩基性アミノ酸を製造する場合、培養工程（発酵工程）は、重炭酸

イオン及び／又は炭酸イオンが塩基性アミノ酸のカウンタイオンとなるように実施してもよい。そのような発酵形態を「炭酸塩発酵」ともいう。炭酸塩発酵によれば、塩基性アミノ酸のカウンタイオンとして従来利用されていた硫酸イオン及び／又は塩化物イオンの使用量を削減しつつ、塩基性アミノ酸を発酵生産することができる。炭酸塩発酵は、例えば、US2002-025564A、EP1813677A、特開2002-65287に記載されているように実施することができる。

[0167] 発酵液は、例えば、液体サイクロンで処理することができる。液体サイクロンとしては、例えば、一般的形状で、円筒部直径が10～110 mmの、セラミック製、ステンレス鋼製、または樹脂製のものを用いることができる。液体サイクロンへの発酵液のフィード量は、例えば、発酵液中の菌体濃度やL-アミノ酸濃度に応じて設定することができる。液体サイクロンへの発酵液のフィード量は、例えば、2～1200 L/minであってよい。

[0168] L-アミノ酸が生成したことは、化合物の検出または同定に用いられる公知の手法により確認することができる。そのような手法としては、例えば、HPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。

[0169] 発酵液からのL-アミノ酸の回収は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法（Nagai, H. et al., Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710）、沈殿法、膜分離法（特開平9-164323、特開平9-173792）、晶析法（W02008/078448、W02008/078646）が挙げられる。これらの手法は、単独で、あるいは適宜組み合わせて用いることができる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば、菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清から、イオン交換樹脂法などによってL-アミノ酸を回収することができる。回収されるL-アミノ酸は、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってよい。塩としては、例えば、硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩が挙げられる。L-グルタミン酸を製造する場合、回収されるL-グルタ

ミン酸は、具体的には、例えば、フリー体のL-グルタミン酸、L-グルタミン酸ナトリウム（例えばmonosodium L-glutamate ; MSG）、L-グルタミン酸アンモニウム（例えばmonoammonium L-glutamate）、またはそれらの混合物であってもよい。例えば、発酵液中のL-グルタミン酸アンモニウムを酸を加えて晶析させ、結晶に等モルの水酸化ナトリウムを添加することでL-グルタミン酸ナトリウム（MSG）が得られる。なお、晶析前後に活性炭を加えて脱色してもよい（グルタミン酸ナトリウムの工業晶析 日本海水学会誌 56巻 5号 川喜田哲哉参照）。L-グルタミン酸ナトリウム結晶は、例えば、うま味調味料として用いることができる。L-グルタミン酸ナトリウム結晶は、同様にうま味を有するグアニル酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウム等の核酸と混合して調味料として用いてもよい。

[0170] また、L-アミノ酸が培地中に析出する場合は、遠心分離又は濾過等により回収することができる。また、培地中に析出したL-アミノ酸は、培地中に溶解しているL-アミノ酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

[0171] 尚、回収されるL-アミノ酸は、L-アミノ酸以外に、細菌菌体、培地成分、水分、及び細菌の代謝副産物等の成分を含んでいてもよい。L-アミノ酸は、所望の程度に精製されていてもよい。回収されるL-アミノ酸の純度は、例えば、50% (w/w) 以上、好ましくは85% (w/w) 以上、特に好ましくは95% (w/w) 以上であってよい（JP1214636B, USP5,431,933, USP4,956,471, USP4,777,051, USP4,946,654, USP5,840,358, USP6,238,714, US2005/0025878）。

実施例

[0172] 以下、非限定的な実施例を参照して本発明をさらに具体的に説明する。

[0173] <1>Corynebacterium glutamicumの改変株の構築

<1-1>aspT遺伝子欠損用ベクターの構築

C. glutamicum ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、適宜デザインしたプライマーを用いたPCRにより、アスパラギン酸トランスアミナーゼをコードするaspT遺伝子（CGBL_0102840）の5'側上流約1 kbpのDNA断片と3'側下流約1

kbpのDNA断片をそれぞれ増幅する。増幅したDNA断片をインフュージョン反応によりpBS5T (W02006/057450) のSmaI部位に挿入することによって、aspT遺伝子欠損用ベクターを得る。

[0174] < 1 - 2 > malE遺伝子欠損用ベクターの構築

C. glutamicum ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、適宜デザインしたプライマーを用いたPCRにより、マリックエンザイムをコードするmalE遺伝子 (CGBL_0129850) の5' 側上流約1 kbpのDNA断片と3' 側下流約1 kbpのDNA断片をそれぞれ増幅する。増幅したDNA断片をインフュージョン反応によりpBS5T (W02006/057450) のSmaI部位に挿入することによって、malE遺伝子欠損用ベクターを得る。

[0175] < 1 - 3 > poxB遺伝子欠損用ベクターの構築

C. glutamicum ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、適宜デザインしたプライマーを用いたPCRにより、ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードするpoxB遺伝子 (CGBL_0125410) の5' 側上流約1 kbpのDNA断片と3' 側下流約1 kbpのDNA断片をそれぞれ増幅する。増幅したDNA断片をインフュージョン反応によりpBS5T (W02006/057450) のSmaI部位に挿入することによって、poxB遺伝子欠損用ベクターを得る。

[0176] < 1 - 4 > ack遺伝子の発現ベクターの構築

C. glutamicum ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、配列番号19および20のプライマーを用いたPCRにより、酢酸キナーゼをコードするack遺伝子 (CGBL_0126910) を含むDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片とbamHIおよびpstIで切断したpVK9 (US2006-0141588) とをインフュージョン反応で連結することによって、ack遺伝子の発現ベクターpVK9-Plac ackAを得た。

[0177] また、*C. glutamicum* ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、配列番号21と22のプライマーを用いてPCRを行い、*C. glutamicum*由来のmsrA遺伝子上流配列 (プロモーター領域を含む、369 bp) を含むDNA断片を増幅した。別途、*C. glutamicum* ATCC 13869の染色体DNAを鋳型として、配列番号23および20のプライマーを用いたPCRにより、ack遺伝子 (CGBL_0126910) を含むD

NA断片を増幅した。増幅した両DNA断片とbamHIおよびpstIで切断したpVK9 (US2006-0141588) とをインフュージョン反応で連結することによって、ack遺伝子の発現ベクターpVK9-PmsrA ackAを得た。

[0178] < 1 - 5 > glpX遺伝子の発現ベクターの構築

E. coli K-12 MG1655 (ATCC 47076) の染色体DNAを鋳型として、配列番号24と25のプライマーを用いたPCRにより、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードするglpX遺伝子を含むDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片とbamHIおよびpstIで切断したpVK9 (US2006-0141588) とをインフュージョン反応で連結することによって、glpX遺伝子の発現ベクターpVK9-Plac glpXを得た。

[0179] < 1 - 6 > Corynebacterium glutamicumの改変株の構築

構築した各遺伝子欠損用ベクターでC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株 (W02014/185430) を形質転換する。得られた形質転換体からW02006/057450に記載の方法に従って菌株の選択を行い、aspT遺伝子欠損株、malE遺伝子欠損株、およびpoxB遺伝子欠損株を得る。

[0180] 構築したackA遺伝子の発現ベクターpVK9-Plac ackAまたはpVK9-PmsrA ackAを単独で、またはpVS7-xfp (US2018-0282773) と組み合わせてC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株 (W02014/185430) に導入することで、ack遺伝子の発現増強株を得た。pVS7-xfpは、B. longum JCM1217由来のホスホケトラーゼ遺伝子 (xfp) の発現ベクターである (US2018-0282773) 。

[0181] 構築したglpX遺伝子の発現ベクターpVK9-Plac glpXとpVS7-xfp (US2018-0282773) をC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株 (W02014/185430) に導入することで、glpX遺伝子の発現増強株を得た。

[0182] pVK9を単独で、またはpVS7-xfp (US2018-0282773) と組み合わせてC. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株 (W02014/185430) に導入し、対照株を得た。

[0183] C. glutamicum 2256ΔsucAΔldhA yggB*株は、C. glutamicum 2256株 (ATCC 13869) から誘導されたL-グルタミン酸生産株であり、ldhA遺伝子とsucA

遺伝子を欠損し、yggB遺伝子にIS変異（V419::IS）を有する。この変異型yggB遺伝子（V419::IS）の塩基配列、及び同遺伝子にコードされる変異型YggBタンパク質（V419::IS）のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号17および18に示す。

[0184] <2> L-グルタミン酸生産培養

構築した各菌株（すなわち、対照株ならびにそのack遺伝子の発現増強株およびglpX遺伝子の発現増強株）を用いてL-グルタミン酸生産培養を実施した。使用した培地の組成を表1に示す。炭素源がGlucoseである培地を「Glc培地」、炭素源がFructoseである培地を「Frc培地」ともいう。

[0185] [表1]

表1 培地組成

Glucose または Fructose	80 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g/L
VB ₁	200 µg/L
Biotin	300 µg/L
豆濃	0.48 g/L
CaCO ₃	50 g/L
コハク酸	1 g/L

KOH で pH8.0 に調整した上記組成の培地を作製し、オートクレーブ（115℃、10min）により滅菌した。滅菌後の培地に乾熱滅菌（180℃、6 時間）した炭酸カルシウムを終濃度 50 g/L となるように添加して培養に用いた。

[0186] 各菌株を太試験管に張り込んだ上記培地（50 g/L炭酸カルシウムを含む）5 mLに植菌し、31.5℃のボックスシェーカー（ABLE ML-190）を用いて120 rpmで振盪培養した。培養開始25または30時間後に培養液のサンプリングを実施

した。培養液中のL-グルタミン酸濃度をバイオテックアナライザーAS-310（サクラエスアイ）を用いて定量し、L-グルタミン酸の対糖収率を算出した。

[0187] 結果を図1～4に示す。ack遺伝子の発現増強株（2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-Plac ackA/pVS7-xfp、2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-PmsrA ackA/pVS7-xfp、2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-Plac ackA、および2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-PmsrA ackA）は、グルコースを炭素源とした場合に、対応する対照株（2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-Plac ackA/pVS7-xfpと2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-PmsrA ackA/pVS7-xfpについて2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9/pVS7-xfp；2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-Plac ackAと2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-PmsrA ackAについて2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9）よりも高いL-グルタミン酸の蓄積量およびL-グルタミン酸の対糖収率を示した（図1および2）。また、glpX遺伝子の発現増強株（2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9-Plac glpX/pVS7-xfp）は、フルクトースを炭素源とした場合に、対応する対照株（2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9/pVS7-xfp）よりも高いL-グルタミン酸の蓄積量を示し（図3）、グルコースを炭素源とした場合に、対応する対照株（2256ΔsucAΔldhA yggB*/pVK9/pVS7-xfp）よりも高いL-グルタミン酸の対糖収率を示した（図4）。

[0188] また、aspT遺伝子欠損株、malE遺伝子欠損株、およびpoxB遺伝子欠損株について同様の手順でL-グルタミン酸生産培養を実施することにより、L-グルタミン酸生産の向上を確認する。

産業上の利用可能性

[0189] 本発明によれば、コリネ型細菌のL-アミノ酸生産能を向上させることができ、L-アミノ酸を効率よく製造することができる。

[0190] 〔配列表の説明〕

配列番号1：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)のaspT遺伝子の塩基配列

配列番号2：Corynebacterium glutamicum 2256 (ATCC 13869)のAspTタンパ

ク質のアミノ酸配列

配列番号 3 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *malE* 遺伝子の塩基配列

配列番号 4 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *MalE* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 5 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *poxB* 遺伝子の塩基配列

配列番号 6 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *PoxB* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 7 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *ack* 遺伝子の塩基配列

配列番号 8 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *Ack* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 9 : *Escherichia coli* K-12 MG1655 の *ack* 遺伝子の塩基配列

配列番号 10 : *Escherichia coli* K-12 MG1655 の *Ack* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 11 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 の *glpX* 遺伝子の塩基配列

配列番号 12 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 の *GlpX* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 13 : *Escherichia coli* K-12 MG1655 の *glpX* 遺伝子の塩基配列

配列番号 14 : *Escherichia coli* K-12 MG1655 の *GlpX* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 15 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *yggB* 遺伝子の塩基配列

配列番号 16 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の *YggB* タンパク質のアミノ酸配列

配列番号 17 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) の変異型 *ygg*

B遺伝子 (V419::IS) の塩基配列

配列番号 1 8 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)の変異型Ygg

Bタンパク質 (V419::IS) のアミノ酸配列

配列番号 1 9 ~ 2 5 : プライマー

請求の範囲

[請求項1]

Ｌ－アミノ酸の製造方法であって、

Ｌ－アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中および／または該細菌の菌体内にＬ－アミノ酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体より前記Ｌ－アミノ酸を採取すること、

を含み、

前記Ｌ－アミノ酸が、グルタミン酸系Ｌ－アミノ酸であり、

前記細菌が、下記（X）および／または（Y）の改変を有する、方法

：

（X）ホスホケトラーゼ経路を経由する炭素源の利用性が向上する改変；

（Y）細胞内のオキサロ酢酸プールが増大する改変。

[請求項2]

前記細菌が、少なくとも、前記（X）の改変を有する、請求項1に記載の方法。

[請求項3]

請求項1または2に記載の方法であって、

前記（X）の改変が、下記（A）、（B）、および（C）の改変から選択される1つまたはそれ以上の改変であり；

前記（Y）の改変が、下記（D）および（E）の改変から選択される1つまたはそれ以上の改変である、方法：

（A）酢酸キナーゼの活性が増大する改変；

（B）フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が増大する改変；

（C）ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する改変；

（D）アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が低下する改変；

（E）マリックエンザイムの活性が低下する改変。

[請求項4]

Ｌ－アミノ酸の製造方法であって、

Ｌ－アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌を培地で培養し、該培地

中および／または該細菌の菌体内にL-アミノ酸を蓄積すること、および

前記培地および／または前記菌体より前記L-アミノ酸を採取すること、

を含み、

前記L-アミノ酸が、グルタミン酸系L-アミノ酸であり、

前記細菌が、下記 (A) ～ (E) の改変から選択される1つまたはそれ以上の改変を有する、方法：

(A) 酢酸キナーゼの活性が増大する改変；

(B) フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が増大する改変；

(C) ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が低下する改変；

(D) アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が低下する改変；

(E) マリックエンザイムの活性が低下する改変。

[請求項5] 前記細菌が、少なくとも、前記 (A) の改変を有する、請求項3または4に記載の方法。

[請求項6] 請求項3～5のいずれか一項に記載の方法であって、
前記アスパラギン酸トランスアミナーゼがaspT遺伝子にコードされ；

前記マリックエンザイムがmalE遺伝子にコードされ；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼがpoxB遺伝子にコードされ；

前記酢酸キナーゼがack遺伝子にコードされ；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼがglpX遺伝子にコードされる、方法。

[請求項7] 請求項3～6のいずれか一項に記載の方法であって、
前記アスパラギン酸トランスアミナーゼの活性が、アスパラギン酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記マリックエンザイムの活性が、マリックエンザイムをコードす

る遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現を低下させることにより、または該遺伝子を破壊することにより、低下し；

前記酢酸キナーゼの活性が、酢酸キナーゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大し；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼの活性が、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大した、方法。

[請求項8]

請求項7に記載の方法であって、

酢酸キナーゼをコードする遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、および／または該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇し；且つ／又は

フルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、および／または該遺伝子の発現調節配列を改変することによって上昇した、方法。

[請求項9]

請求項3～8のいずれか一項に記載の方法であって、

前記アスパラギン酸トランスアミナーゼが、下記(1a)、(1b)、または(1c)に記載のタンパク質であり；

(1a) 配列番号2に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(1b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性を有するタンパク質；

(1c) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ活性を有するタンパク質；

前記マリックエンザイムが、下記（２ a）、（２ b）、または（２ c）に記載のタンパク質であり：

（２ a）配列番号４に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（２ b）配列番号４に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、マリックエンザイム活性を有するタンパク質；

（２ c）配列番号４に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、マリックエンザイム活性を有するタンパク質；

前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼが、下記（３ a）、（３ b）、または（３ c）に記載のタンパク質であり：

（３ a）配列番号６に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（３ b）配列番号６に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

（３ c）配列番号６に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

前記酢酸キナーゼが、下記（４ a）、（４ b）、または（４ c）に記載のタンパク質であり：

（４ a）配列番号８または１０に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（４ b）配列番号８または１０に示すアミノ酸配列において、１～１０個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、酢酸キナーゼ活性を有するタンパク質；

（４ c）配列番号８または１０に示すアミノ酸配列に対して９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、酢酸キナーゼ活性を

有するタンパク質；且つ／又は

前記フルクトース-1,6-ビスホスファターゼが、下記（5 a）、（5 b）、または（5 c）に記載のタンパク質である、方法：

（5 a）配列番号 1 2 または 1 4 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

（5 b）配列番号 1 2 または 1 4 に示すアミノ酸配列において、1 ～ 1 0 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質；

（5 c）配列番号 1 2 または 1 4 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項10] 前記細菌が、さらに、非改変株と比較して、ホスホケトララーゼの活性が増大するように改変されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 前記ホスホケトララーゼが、D-キシロロース-5-リン酸ホスホケトララーゼおよび／またはフルクトース 6-リン酸ホスホケトララーゼである、請求項 1 0 に記載の方法。

[請求項12] 前記細菌が、コリネバクテリウム属細菌である、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

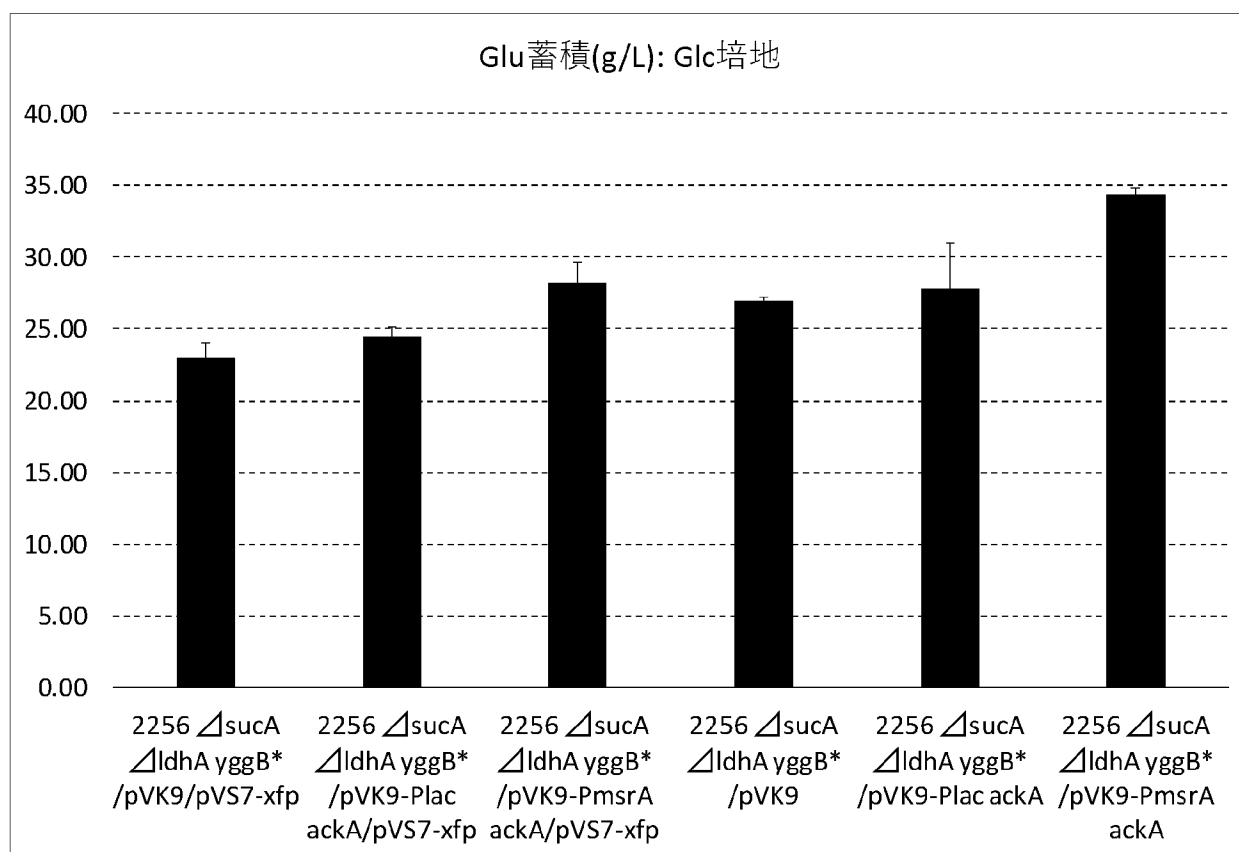
[請求項13] 前記細菌が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項14] 前記グルタミン酸系L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン、およびL-オルニチンから選択される 1 種またはそれ以上のL-アミノ酸である、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

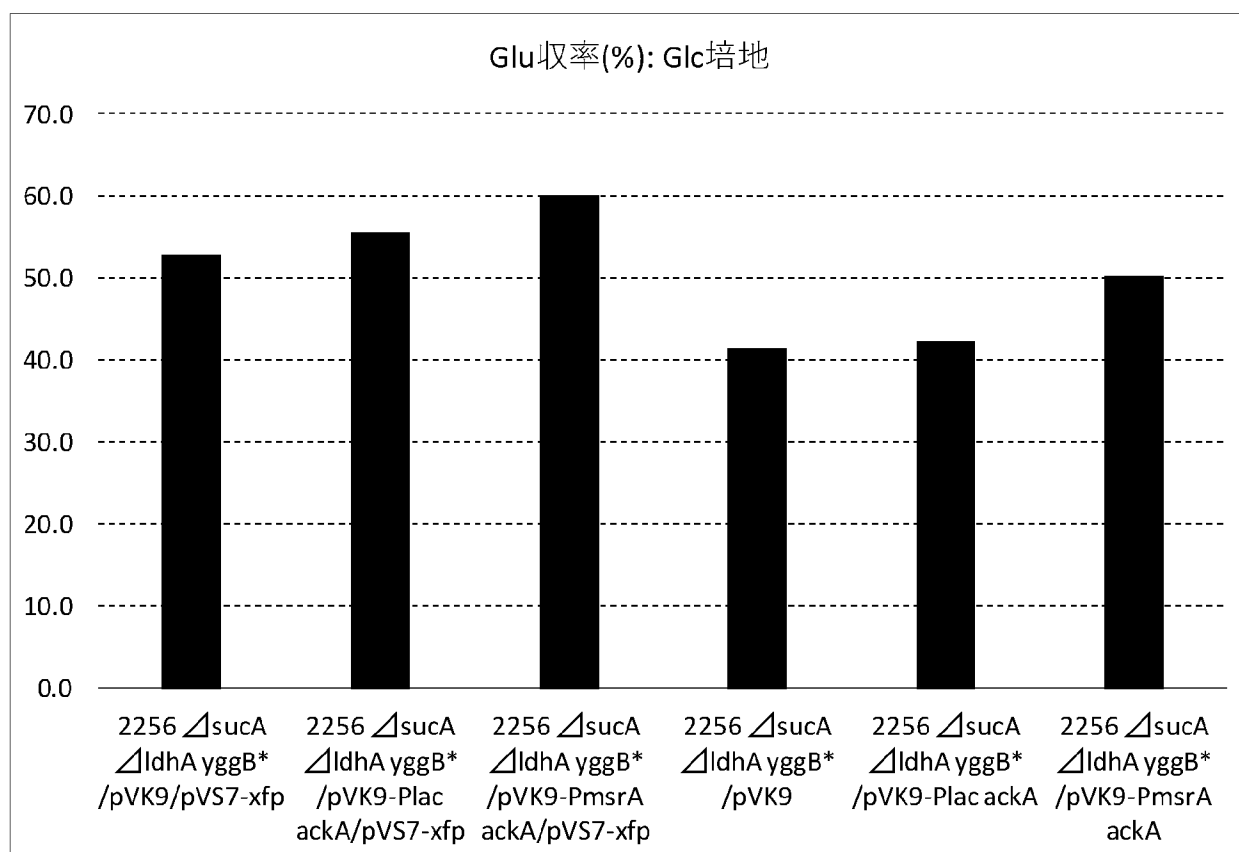
[請求項15] 前記グルタミン酸系L-アミノ酸が、L-グルタミン酸である、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] 前記Lーグルタミン酸が、Lーグルタミン酸アンモニウムまたはLーグルタミン酸ナトリウムである、請求項14または15に記載の方法。

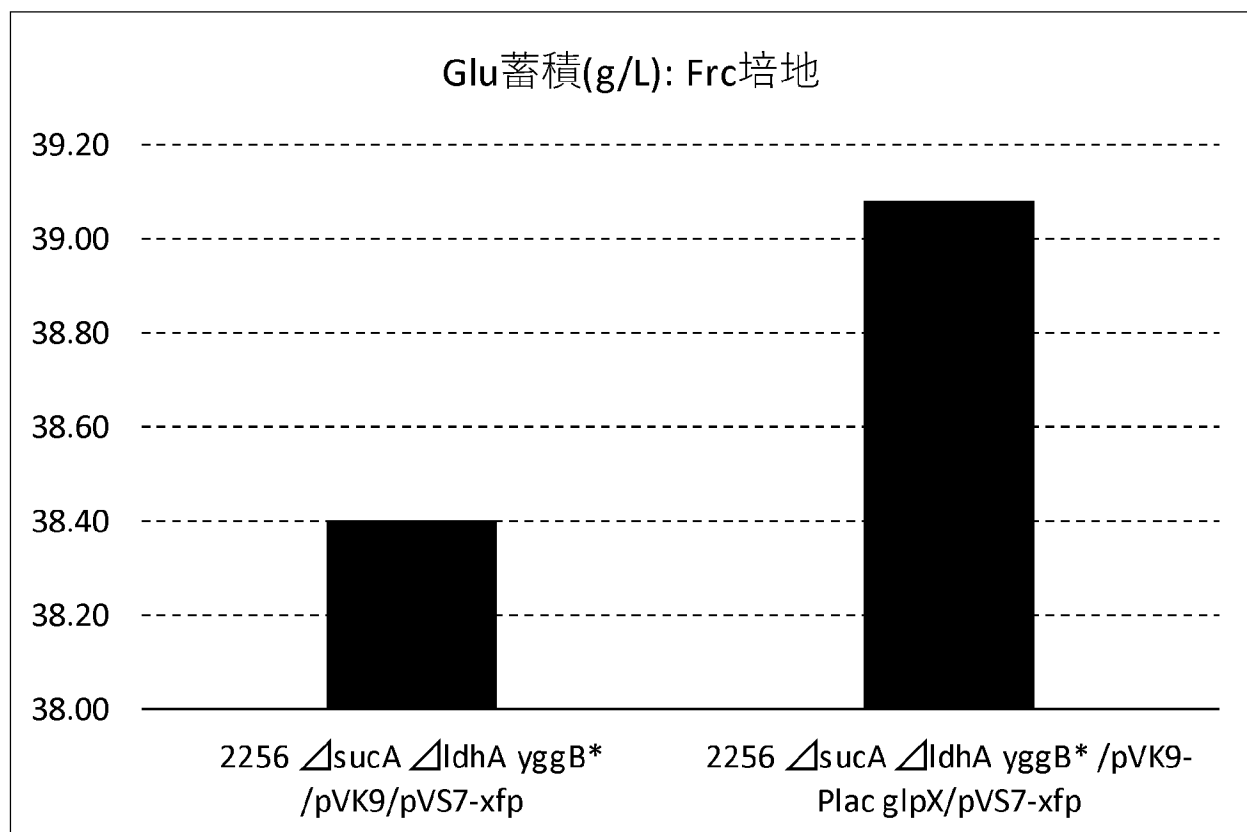
[図1]



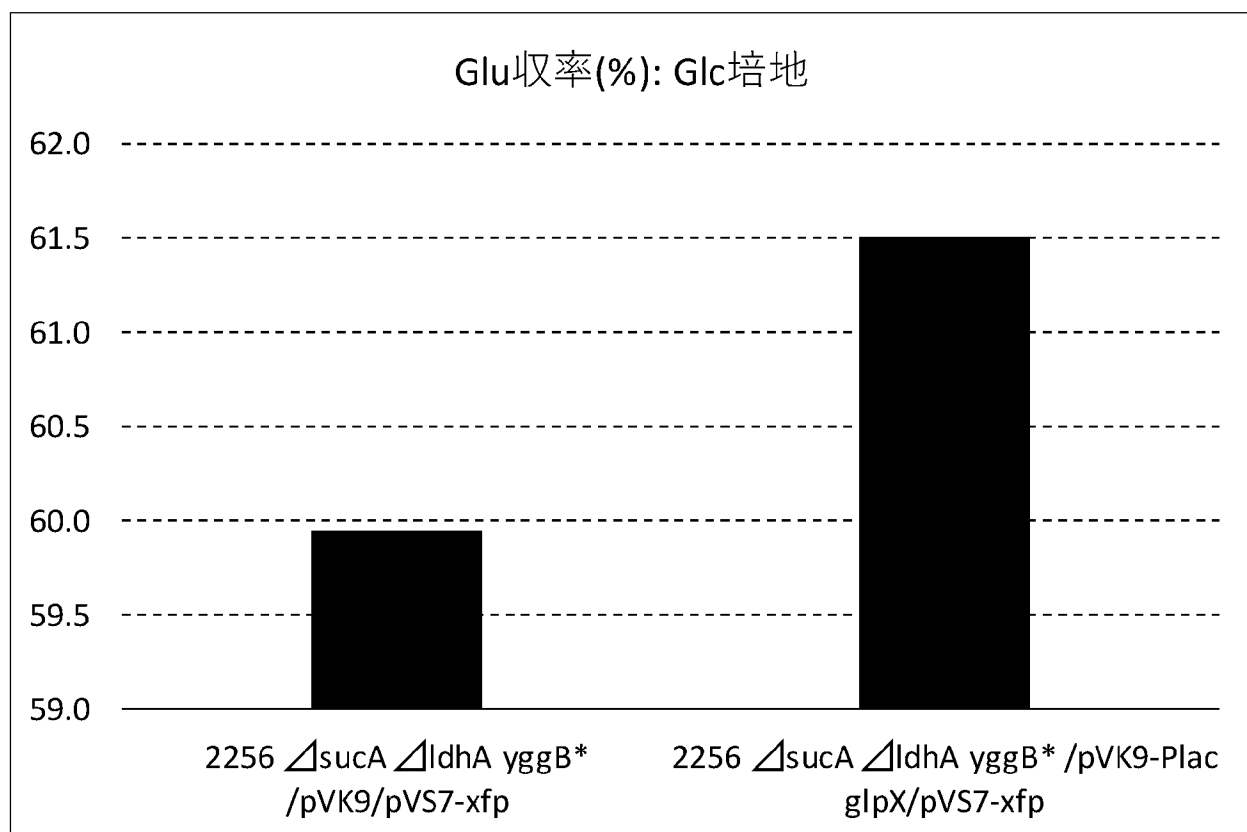
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/54(2006.01)i; *C12N 15/53*(2006.01)i; *C12N 15/55*(2006.01)i; *C12P 13/10*(2006.01)i; *C12P 13/14*(2006.01)i;
C12P 13/24(2006.01)i

FI: C12N15/54 ZNA; C12N15/53; C12N15/55; C12P13/10 A; C12P13/10 B; C12P13/10 C; C12P13/14 A; C12P13/24 A

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-C12N15/90, C12P1/00-C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-544516 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 December 2013 (2013-12-19) claims, paragraph [0082]	1-4, 6-7, 9, 12-16
Y		1-4, 6-7, 9-16
A		5, 8
X	JP 2018-520687 A (CJ CHEILJEDANG CORP.) 02 August 2018 (2018-08-02) claims, paragraph [0055]	1-9, 12-14
Y		1-4, 6-14
A		15-16
X	JP 2016-163540 A (AJINOMOTO KK) 08 September 2016 (2016-09-08) claims, paragraphs [0026], [0066]	1-4, 6-9, 12-16
Y		1-4, 6-16
A		5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2021

Date of mailing of the international search report

22 November 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039281**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/166647 A1 (TOTAL RAFFINAGE CHIMIE) 06 September 2019 (2019-09-06)	1-4, 6-16
A	claims, p. 23, third paragraph	5
Y	JP 2008-509661 A (AJINOMOTO KK) 03 April 2008 (2008-04-03)	10-11
	claims, paragraph [0007]	
A	JP 2014-36576 A (AJINOMOTO KK) 27 February 2014 (2014-02-27)	1-16
	entire text	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/039281

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/039281

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-544516	A	19 December 2013	WO 2012/061653 A2 claims, paragraph [0088] US 2013/0288325 A1 EP 2635673 A2 CN 103314101 A	
JP	2018-520687	A	02 August 2018	EP 3141598 A2 claims, paragraph [0056] US 2018/0208909 A1 WO 2017/014532 A1 KR 10-2017-0010960 A TW 201718863 A AU 2016297226 A1 SG 11201800254S A CN 107922955 A CA 2992970 A1 MX 2018000337 A CL 2018000111 A1 BR 112018001231 A2 RU 2018104512 A NZ 738658 A	
JP	2016-163540	A	08 September 2016	WO 2015/005405 A1	
WO	2019/166647	A1	06 September 2019	US 2021/0189372 A1 EP 3759224 A1	
JP	2008-509661	A	03 April 2008	WO 2006/016705 A1 claims, paragraph [0007] US 2006/0040365 A1 EP 1789547 A1 RU 2004124226 A KR 10-2007-0043877 A CN 101090964 A BR PI0514201 A AT 463564 T ES 2341264 T3 PE 4222006 A AU 2005272367 A1 MY 148960 A PE 20090104 A1	
JP	2014-36576	A	27 February 2014	US 2013/0260425 A1 whole document WO 2012/077739 A1 EP 2650376 A1 BR 112013014103 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12P 13/10(2006.01)i; C12P 13/14(2006.01)i; C12P 13/24(2006.01)i FI: C12N15/54 ZNA; C12N15/53; C12N15/55; C12P13/10 A; C12P13/10 B; C12P13/10 C; C12P13/14 A; C12P13/24 A																																
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/00-C12N15/90, C12P1/00-C12P41/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年																						
日本国実用新案公報	1922-1996年																															
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																															
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																															
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																															
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2013-544516 A (ザ リーゼンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 19.12.2013 (2013 - 12 - 19) [特許請求の範囲]、[0082]</td> <td>1-4, 6-7, 9, 12-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-4, 6-7, 9-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>5, 8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2018-520687 A (シージェイ チェイルジェダン コーポレーション) 02.08.2018 (2018 - 08 - 02) [特許請求の範囲]、[0055]</td> <td>1-9, 12-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-4, 6-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>15-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2016-163540 A (味の素株式会社) 08.09.2016 (2016 - 09 - 08) [特許請求の範囲]、[0026]、[0066]</td> <td>1-4, 6-9, 12-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-4, 6-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 2013-544516 A (ザ リーゼンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 19.12.2013 (2013 - 12 - 19) [特許請求の範囲]、[0082]	1-4, 6-7, 9, 12-16	Y		1-4, 6-7, 9-16	A		5, 8	X	JP 2018-520687 A (シージェイ チェイルジェダン コーポレーション) 02.08.2018 (2018 - 08 - 02) [特許請求の範囲]、[0055]	1-9, 12-14	Y		1-4, 6-14	A		15-16	X	JP 2016-163540 A (味の素株式会社) 08.09.2016 (2016 - 09 - 08) [特許請求の範囲]、[0026]、[0066]	1-4, 6-9, 12-16	Y		1-4, 6-16	A		5
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																														
X	JP 2013-544516 A (ザ リーゼンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 19.12.2013 (2013 - 12 - 19) [特許請求の範囲]、[0082]	1-4, 6-7, 9, 12-16																														
Y		1-4, 6-7, 9-16																														
A		5, 8																														
X	JP 2018-520687 A (シージェイ チェイルジェダン コーポレーション) 02.08.2018 (2018 - 08 - 02) [特許請求の範囲]、[0055]	1-9, 12-14																														
Y		1-4, 6-14																														
A		15-16																														
X	JP 2016-163540 A (味の素株式会社) 08.09.2016 (2016 - 09 - 08) [特許請求の範囲]、[0026]、[0066]	1-4, 6-9, 12-16																														
Y		1-4, 6-16																														
A		5																														
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																																
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献																																
国際調査を完了した日 10.11.2021		国際調査報告の発送日 22.11.2021																														
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 中山 基志 4B 5086 電話番号 03-3581-1101 内線 3488																														

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2019/166647 A1 (TOTAL RAFFINAGE CHIMIE) 06.09.2019 (2019 - 09 - 06) Claims, 第 2 3 頁第 3 段落	1-4, 6-16 5
Y	JP 2008-509661 A (味の素株式会社) 03.04.2008 (2008 - 04 - 03) [特許請求の範囲]、[0007]	10-11
A	JP 2014-36576 A (味の素株式会社) 27.02.2014 (2014 - 02 - 27) 全文	1-16

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/039281

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2013-544516	A	19.12.2013	WO	2012/061653	A2	
				Claims and [0088]			
				US	2013/0288325	A1	
				EP	2635673	A2	
				CN	103314101	A	
JP	2018-520687	A	02.08.2018	EP	3141598	A2	
				Claims and [0056]			
				US	2018/0208909	A1	
				WO	2017/014532	A1	
				KR	10-2017-0010960	A	
				TW	201718863	A	
				AU	2016297226	A1	
				SG	11201800254S	A	
				CN	107922955	A	
				CA	2992970	A1	
				MX	2018000337	A	
				CL	2018000111	A1	
				BR	112018001231	A2	
				RU	2018104512	A	
				NZ	738658	A	
JP	2016-163540	A	08.09.2016	WO	2015/005405	A1	
WO	2019/166647	A1	06.09.2019	US	2021/0189372	A1	
				EP	3759224	A1	
JP	2008-509661	A	03.04.2008	WO	2006/016705	A1	
				Claims and [0007]			
				US	2006/0040365	A1	
				EP	1789547	A1	
				RU	2004124226	A	
				KR	10-2007-0043877	A	
				CN	101090964	A	
				BR	PI0514201	A	
				AT	463564	T	
				ES	2341264	T3	
				PE	4222006	A	
				AU	2005272367	A1	
				MY	148960	A	
				PE	20090104	A1	
JP	2014-36576	A	27.02.2014	US	2013/0260425	A1	
				Whole document			
				WO	2012/077739	A1	
				EP	2650376	A1	
				BR	112013014103	A2	