

(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
2011 年 10 月 20 日(20.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/129293 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 13/00 (2006.01) C07C 211/09 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/058987
- (22) 国際出願日: 2011 年 4 月 11 日(11.04.2011)
- (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 2010-091602 2010 年 4 月 12 日(12.04.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東
レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP];
〒1038666 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 1 番
1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 澤井 健司
(SAWAI, Kenji) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市
手広 6 丁目 1 0 番 1 号 東レ株式会社 基礎
研究センター内 Kanagawa (JP). 渡邊 志緒美
(WATANABE, Shiomi) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県
鎌倉市手広 6 丁目 1 0 番 1 号 東レ株式会社
基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 耳塚 孝
(MIMITSUKA, Takashi) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川
県鎌倉市手広 6 丁目 1 0 番 1 号 東レ株式会
社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 澤井
秀樹 (SAWAI, Hideki) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県
鎌倉市手広 6 丁目 1 0 番 1 号 東レ株式会社
基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒
1020072 東京都千代田区飯田橋 4 丁目 5 番 1 2
号 SK 飯田橋ビル 6 階 谷川国際特許事務
所内 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, 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, MW,
MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 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))



WO 2011/129293 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 1,5-PENTANEDIAMINE

(54) 発明の名称: 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing 1,5-pentanediamine through fermentation using a microorganism, said microorganism having LDC gene in the chromosome and showing regulated secondary production of L-lysine. In the method for producing 1,5-pentanediamine whereby 1,5-pentanediamine is produced by a coryneform bacterium having a gene encoding lysine decarboxylase in the chromosome, said coryneform bacterium continuously maintains a lysine decarboxylase activity of 50 mU/mg protein or greater during the culture.

(57) 要約: 要約 染色体中に LDC 遺伝子を有し、かつ、L-リジンの副生産が抑制される、微生物を用いた発酵による 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法が開示されている。この 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法は、染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌による 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法であって、前記コリネ型細菌が、培養中に 50 mU/mg protein 以上のリジン脱炭酸酵素活性を有し続けている。

明 細 書

発明の名称： 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、発酵法による 1, 5-ペンタンジアミンの製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリアミド（PA）は、自動車産業、スポーツ産業、ライフスタイル産業で使用する一連の特殊プラスチックの原料となる重要なポリマー群であり、ジアミンは、このポリアミドの重要な原料モノマー成分である。ジアミンはジカルボン酸と縮合して種々のポリマーを形成するが、この際、ジアミンとジカルボン酸の鎖長によりポリマーの特性が定まる。

[0003] 従来、ジアミンは化学的にはジカルボン酸の中間段階を径由して石油由来の素材から製造されるか、またはアミノ酸の化学的脱カルボキシ反応によって製造される（非特許文献 1）。石油価格の高騰を考慮すると、発酵などのバイオテクノロジー法による再生可能資源からのジアミンの合成に速やかに切り替えることが望まれる。

[0004] そこで、炭素数 5 のジアミンである 1, 5-ペンタンジアミンの発酵による製造方法が注目されている。1, 5-ペンタンジアミンとは、別名ではカダベリンであり、ポリアミドの原料モノマーとなりえる化合物である。また、1, 5-ペンタンジアミンは生体内に普遍的に存在するポリアミンであって、その生合成系が解明されつつあるが（非特許文献 2 参照）、その生合成経路の一部として、L-リジ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。

[0005] 従来の 1, 5-ペンタンジアミンの発酵による製造方法では、微生物に LDC 遺伝子を導入することを基本として、組み換え大腸菌での発酵による製造方法（特許文献 1 参照）や、リジン生産微生物のコリネ型細菌において更にリジン生産能力を上げる方法（特許文献 2 参照）、1, 5-ペンタンジアミン分解系を遮断する方法（特許文献 3 参照）、リジン脱炭酸酵素を自立複

製型ベクターで供給する方法（非特許文献3参照）が知られている。

- [0006] しかしながら、1, 5-ペンタンジアミンの発酵による製造方法には解決すべき課題は多く、例えば、L-リジン生産微生物のコリネ型細菌にLDC遺伝子を導入した微生物を発酵する場合、リジンを副生産してしまうという課題があった（非特許文献4参照）。すなわち、リジンは、1, 5-ペンタンジアミン生合成における直前の前駆体であるが、未反応のリジンが培養上清中に多く出てくるといった問題があった。このようにリジンが副生産すると、前駆体までが製造されているにも関わらず、1, 5-ペンタンジアミンの発酵収率が向上せず、経済的に問題となっていた。また、特許文献3、非特許文献3ではLDC遺伝子を自律複製型ベクターで供給しているが、培養中に高価な抗生物質等を添加する必要があることから、産業スケールで1, 5-ペンタンジアミンを安価に発酵生産するには、LDC遺伝子を染色体中に有する微生物を用いることが望まれている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2002-223770号公報
特許文献2：特開2004-222569号公報
特許文献3：特表2009-531042号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：須山、金尾、「薬学雑誌」、1965年、第85巻、p. 513-533
非特許文献2：セリアホワイトテーパー（Celia white tabo r）、他1名、「マイクロバイオリジカルレビューズ（Microbiol o g i c a l R e v i e w s）」、1985年、第49巻、p. 81-99
非特許文献3：タテノら、アプライド マイクロバイオロジー アンド バイオテクノロジー（2009）、81（1）、115-21（Tateno Appl Microbiol Biotechnol（2009）、81

(1), 115-21)

非特許文献4: ミミツカラ、バイオサイエンス バイオテクノロジー バイオケミカル (2007)、71 (9)、2130-5 (Mimitsuka Biosci Biotechnol Biochem (2007), 71 (9), 2130-5)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、染色体中にLDC遺伝子を有し、かつL-リジンの副生産が抑制される微生物を用いた発酵による1, 5-ペンタンジアミンの製造方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

[0010] 本発明者は、1, 5-ペンタンジアミンの発酵法による製造方法において、L-リジンの副生産の抑制を目的として鋭意研究した結果、染色体中にLDC遺伝子を有し、かつ、培養中に50mU/mg protein以上のリジン脱炭酸酵素比活性を有し続けているコリネ型細菌を1, 5-ペンタンジアミンの発酵に用いることで、L-リジンの副生産の抑制が可能であることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の(1)～(12)で構成される。

[0011] (1) 染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌による1, 5-ペンタンジアミンの製造方法であって、前記コリネ型細菌が培養中に50mU/mg protein以上のリジン脱炭酸酵素活性を有し続けていることを特徴とする、1, 5-ペンタンジアミンの製造方法。

(2) 染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌による1, 5-ペンタンジアミンの製造方法であって、該リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が対数増殖期に機能するプロモーター下流に連結されていることを特徴とする、1, 5-ペンタンジアミンの製造方法。

(3) 前記プロモーターがdivIVA遺伝子プロモーターであることを

特徴とする、(2)に記載の方法。

(4) 前記プロモーターが下記(A)～(D)のいずれかから選ばれるプロモーターであることを特徴とする、(2)または(3)に記載の方法。

(A) 配列番号2に記載の塩基配列からなるプロモーター

(B) 配列番号2に記載の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加された塩基配列からなるプロモーター

(C) 配列番号2に記載の塩基配列からなるプロモーターもしくはその相補鎖の全体またはその一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズするプロモーター

(D) 配列番号2に記載の塩基配列との配列同一性が少なくとも80%以上の塩基配列からなるプロモーター

(5) 前記リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が大腸菌由来の遺伝子であることを特徴とする、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が下記(A)～(D)のいずれかから選ばれる遺伝子であってリジン脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードするものであることを特徴とする、(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列からなる遺伝子

(B) 配列番号1に記載の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加された塩基配列からなる遺伝子

(C) 配列番号1に記載の塩基配列からなる遺伝子もしくはその相補鎖の全体またはその一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子

(D) 配列番号1に記載の塩基配列との配列同一性が少なくとも80%以上の塩基配列からなる遺伝子。

(7) 前記コリネ型細菌が、L-リジン生産性の向上したコリネ型細菌であることを特徴とする、(1)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 前記コリネ型細菌が、配列番号3に記載のアミノ酸配列において311番目のアミノ酸残基がスレオニン以外のアミノ酸に置換された変異型ア

スパラギン酸キナーゼを有することを特徴とする、(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9) 前記コリネ型細菌のホモセリンデヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損していることを特徴とする、(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10) 前記コリネ型細菌が、遺伝子挿入変異によって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、(9)に記載の方法。

(11) 前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム属 (Genus *Corynebacterium*) に属する細菌であることを特徴とする、(1)～(10)のいずれかに記載の方法。

(12) 前記コリネバクテリウム属 (Genus *Corynebacterium*) に属する細菌がコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) であることを特徴とする、(11)に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明の実施例において作製したコリネ型細菌CG4541株を培養した際の培養上清中のグルコース濃度、リジン濃度および1,5-ペンタンジアミン(1,5-PD)濃度の経時変化を示す図である。

[図2]本発明の比較例において作製したコリネ型細菌TM4552株を培養した際の培養上清中のグルコース濃度、リジン濃度および1,5-ペンタンジアミン(1,5-PD)濃度の経時変化を示す図である。

[図3]本発明の実施例において作製したコリネ型細菌CG4541株の培養中のリジン脱炭酸酵素比活性の経時変化を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0014] 本発明におけるリジン脱炭酸酵素(LDC)とは、L-リジンを基質として脱炭酸反応により1,5-ペンタンジアミンへの変換しうる酵素のことを意味しており、その他の酵素作用を併せて有していてもよい。

[0015] 本発明において使用されるLDCに特に制限はないが、例えば、バシラス

・ハロドウランス (*Bacillus halodurans*)、バシラス
・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、エシェリシア・コ
リ (*Escherichia coli*; 大腸菌)、セレンオモナス・ルミナ
ンチウム (*Selenomonas ruminantium*)、ビブリオ
・コレラ (*Vibrio cholerae*)、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 pilo
sus*)、エイケネラ・コロデンス (*Eikenella corrode
ns*)、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 (*S
almonella typhimurium*)、ハフニア・アルベイ (*H
afnia alvei*)、ナイセリア・メニンギチデス (*Neisser
ia meningitidis*)、テルモプラズマ・アシドフィルム (*T
hermoplasma 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。さらに好ましくは大腸菌由来のものである。

[0016] 本発明で使用されるリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子は、前述の生物由来のリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が具体例として挙げられ、その際、使用する微生物のコドン使用頻度に応じて塩基配列を再設計してもよい。なお、前述の生物由来のリジン脱炭酸酵素をコードする塩基配列は、データベース (GenBank) に登録されている。これらの中での好ましくは、大腸菌由来の遺伝子であり、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる遺伝子である。

[0017] 次に LDC の比活性について説明する。1 分間に 1 μ モルの 1, 5-ペンタンジアミンを生成する LDC 量を 1 ユニット (U) と定義すると、LDC 活性とは下記式 1 で表すことができる。

[0018]

[数1]

$$\text{活性 [U]} = \frac{1, 5\text{-ペンタンジアミン生成量} [\mu\text{g}]}{\text{MW (102. 18)} [\mu\text{g} / \mu\text{mol}] \times \text{反応時間} [\text{min}]} \quad (\text{式1})$$

[0019] これより、L D Cのタンパク質量あたりの活性、すなわち比活性は下記式2により算出することができる。

[0020] [数2]

$$\text{比活性 [U/mg]} = \frac{\text{活性 [U]}}{\text{タンパク質量 [mg]}} \quad (\text{式2})$$

[0021] また、本発明におけるL D C比活性は、コリネ型細菌が有する総タンパク質あたりの比活性を意味しており、コリネ型細菌から抽出した総タンパク質を用いた比活性測定により算出することができる。なお、測定操作は下記実施例に具体的に記載されている。

[0022] コリネ型細菌からタンパク質を抽出する方法としては限定されなく、超音波によって菌を破碎する方法、ガラスビーズを用いてボルテックスなどの攪拌によって菌を破碎する方法、高圧力をかけて菌を破碎する方法さらにはこれらを組み合わせて行う方法を用いることができるが、好ましくはガラスビーズを用いた方法である。

[0023] 本発明における染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌は、50 mU/mg protein以上のL D C比活性を有していることを特徴とし、好ましくは80 mU/mg protein以上のL D C比活性を有し、より好ましくは180 mU/mg protein以上のL D C比活性を有する。また、実施例で後述するが、培養中のある時点で50 mU/mg protein以上のL D C比活性を有しても、その後比活性が低下すると、前駆体Lーリジンの蓄積が起きることから、本発明で用いるコリネ型細菌は、上記のL D C比活性を培養の間中有し続けているも

のである。培養の間とは、コリネ型細菌を発酵培地に植菌してから基質糖を消費している期間のことを意味し、その期間中の任意の点における比活性を測定することで確認できる。好ましくは、上記ＬＤＣ比活性を維持する培養時間は、培養開始後５時間以上であり、より好ましくは１０時間以上であり、さらに好ましくは２０時間以上である。上記比活性を維持できる培養時間の上限は特にはない。

[0024] 上記のようなＬＤＣ比活性をコリネ型細菌に付与する方法に制限はないが、コリネ型細菌の染色体に導入するリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子のコピー数を増加させる方法や染色体に導入するリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子のプロモーターとして強力なプロモーターを用いる方法、また、酵素活性を向上させたリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を用いる方法などがあり、どれも好ましく用いることができるが、染色体に導入するリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子のプロモーターとして強力なプロモーターを用いる方法が好ましい。

[0025] 本発明で使用するプロモーターは特に限定されず、コリネ型細菌内で機能し得るプロモーターであれば一般に使用でき、更に異種由来のプロモーターであってもよいが、好ましいプロモーターの例として、各種アミノ酸生合成系、例えばグルタミン酸生合成系のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子、グルタミン合成系のグルタミン合成酵素遺伝子、リジン生合成系のアスパルトキナーゼ遺伝子、スレオニン生合成系のホモセリン脱水素酵素遺伝子、イソロイシンおよびバリン生合成系のアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子、ロイシン生合成系の２-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子、プロリンおよびアルギニン生合成系のグルタミン酸キナーゼ遺伝子、ヒスチジン生合成系のホスホリボシル-ＡＴＰピロホスホリラーゼ遺伝子、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸生合成系のデオキシアラビノヘプツロン酸リン酸（ＤＡＨＰ）合成酵素遺伝子、イノシン酸およびグアニル酸のような核酸生合成系、例えばホスホリボシルピロホスフェート（ＰＲＰ）アミドトランスフェラーゼ遺伝子、イノシン酸脱水素酵素遺伝子およ

びグアニル酸合成酵素遺伝子の各プロモーター、また細胞分裂に関係のある *divIVA* 遺伝子などのプロモーターならびに *tac* プロモーター、*trc* プロモーターや *HCE* プロモーター等の強力なプロモーターや、対数増殖期 (*exponential phase*) に機能するプロモーターが挙げられるが、より好ましくは対数増殖期に機能するプロモーターである。対数増殖期に機能するプロモーターの具体例としては、*divIVA*、*gap*、*ldhA*、*fda*、*glyA*、*cysK*、*aroF*、*gpmA*、*eno*、*fumC*、*pfk*、*sdhA*、*mdh*、*argF*、*proA*、*proC*、*aceE*、*serA*、*metE*、*nifS1*、*tpi*、*aceD*、*cysD*、*sdhB* または *pcK* 遺伝子のプロモーターが挙げられるが、なかでも *divIVA* 遺伝子プロモーターが好ましく、具体的には配列番号 2 に記載の塩基配列を有するプロモーターが特に好ましい。

[0026] 前記プロモーター配列およびリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、その機能を有する限りにおいては、それぞれ各塩基配列において、1 又は数個の塩基の置換、欠失、挿入又は付加された塩基配列も含まれる。ここで、「数個」とは、通常 1～40 個、好ましくは 1～30 個、さらに好ましくは 1～20 個、さらに好ましくは 1～9 個、さらに好ましくは 1～5 個程度である。また、前記プロモーター配列、リジン脱炭酸酵素をコードする塩基配列としては、その機能を有する限りにおいては、該塩基配列もしくはその相補鎖の全体またはその一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列が挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば、もとの塩基配列の任意の少なくとも 20 個、好ましくは 25 個、より好ましくは少なくとも 30 個の連続した配列を 1 つあるいは複数個選択した塩基配列をプローブとして、公知のハイブリダイゼーション技術 (*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausbel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) などを用いて、ハイブリ

ダイズする塩基配列である。ここでストリンジェントな条件としては、例えば50%ホルムアミド存在下でハイブリダイゼーション温度が37℃、より厳しい条件としては42℃、さらに厳しい条件としては65℃で、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成：150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウム）を用いて洗浄することにより達成することができる。また、前記プロモーターおよびリジン脱炭酸酵素をコードする塩基配列としては、その機能を有する限りにおいては、配列同一性が、通常80%以上、好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上、さらに好ましくは99%以上を有する塩基配列であってもよい。ここで、配列同一性は、一致する塩基の数が最大となるように（必要に応じてギャップを挿入する）、2つの塩基配列を並べ、一致した塩基の数を完全長の配列の塩基数（2つの配列間で全塩基の数が異なる場合、長い方の配列の塩基数）で除することによって求めた値を意味する。そのような相同性の計算は、BLASTのような周知のソフトウェアによって容易に行うことができる。

[0027] このようなプロモーターおよびリジン脱炭酸酵素をコードする塩基配列は、コリネ型細菌以外からも取得され得るし、コリネ型細菌から得られた塩基配列を、当業者に周知のインビトロ変異処理、あるいは部位特異的変異処理することによっても取得され得る。

[0028] 前記プロモーターおよびリジン脱炭酸酵素をコードする塩基配列のコリネ型細菌への導入方法は特に限定されず、エレクトロポレーション法（Bio／Technology, (1989), 7, 1067-1070）により導入することができる。

[0029] また、コリネ型細菌とは好気性のグラム陽性桿菌であり、従来ブレヴィ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も含まれる（Int. J. Syst. Bacteriol., (1981) 41, p. 225）。また、コリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム（*Corynebacterium a*

cetoacidophilum)、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・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 mellassicola*)、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (*Corynebacterium thermoaminogenes*)、コリネバクテリウム・エッフィシエンス (*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 (*Brevibacterium divaricatum*)、ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*)、ブレビバクテリウム・インマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*)、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、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 thio genitalis*)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、ブレビバクテリウム・アルバム (*Brevibacterium album*)、ブレビバクテリウム・セリヌム (*Brevibacterium cerinum*)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniaphilum*) が挙げられる。

[0030] また、各コリネ型細菌の具体的な菌株として、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806、コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC 21511、コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020, ATCC 13020, ATCC 13060、コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990、コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965、コリネバクテリウム・エッフィシエンス AJ 12340（寄託番号：FERM BP-1539）、コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC 13868、ブレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC 14020、ブレビバクテリウム・フラバム ATCC 13826, ATCC 14067, AJ 12418（寄託番号：FERM BP-2205）、ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC 14068、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869、ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC 14066、ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6871, ATCC 6872、ブレビバクテリウム・アルバム ATCC 15111、ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC 15112、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス ATCC 15354が挙げられる。

[0031] 前述のコリネ型細菌は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカatalogに記載され、この番号を参照して各菌株の分譲を受けることができる。

[0032] 本発明の1, 5-ペンタンジアミンの製造方法に用いる染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌は、1, 5-ペンタンジアミンの前駆体であるL-リジン生産性の向上したコリネ型細菌であるこ

とが好ましい。コリネ型細菌のＬーリジン生産性を向上させる方法に制限はなく、公知の方法を用いることができる。例えば、特開２００４－２２２５６９号公報に記載されているようにＳ－アミノエチルシステイン（ＡＥＣ）に対する耐性株を取得する方法や *Journal of industrial Microbiol Biotechnol* (2006, 33 (7) 610-5) や特表２００９－５３１０４２号公報に記載されているようにゲノム育種法によりＬーリジン生産性を向上させる方法があるが、どちらも好適に採用することができる。

[0033] 本発明のＬーリジンの生産性の向上したコリネ型細菌の好ましい態様によれば、Ｌーリジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパラギン酸キナーゼを有することが好ましく、配列番号３に記載のアミノ酸配列において３１１番目のアミノ酸残基がスレオニン以外のアミノ酸に置換された変異型アスパラギン酸キナーゼを有することがより好ましい。

[0034] 本発明のＬーリジンの生産性の向上したコリネ型細菌の別の好ましい態様によれば、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性が低下もしくは欠損していることが好ましく、遺伝子挿入変異によってホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊または分断され、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していることがより好ましい。

[0035] 培養方法としては、回分培養、流加培養または連続培養を用いることができる。連続培養の場合、例えば特開２００８－１０４４５３号公報に記載のような連続培養を行うことが好ましい。

[0036] 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。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。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・

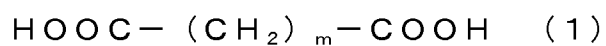
スティーブ・リカー、大豆加水分解物等の窒素含有有機物を用いることができる。無機塩としてはリン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム等を用いることができる。その他、必要に応じて、ビオチン、チアミン、ビタミンB6等の微量栄養源を加えることができる。これら微量栄養源は、肉エキス、酵母エキス、コーン・スティーブ・リカー、カザミノ酸等の培地添加物で代用することもできる。

[0037] 培養条件には特に制限はなく、振とう培養、深部通気攪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、好ましくは28℃～38℃である。培養時間は、通常1日から10日間である。

[0038] 培養pH調整にはアンモニア、塩酸またはジカルボン酸を使用することが好ましく、ジカルボン酸を使用することがより好ましい。これら中和剤を用いて培養pHを5～8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する。特に好ましくは水溶液である。

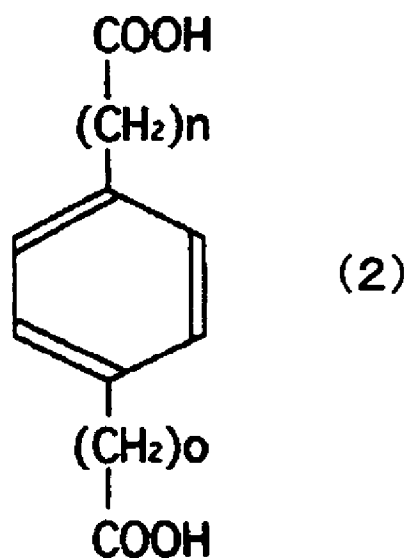
[0039] 中和剤として好ましく使用されるジカルボン酸には特に制限はないが、好ましくは、前記2つのカルボキシル基以外には、実質上、官能基が存在しないジカルボン酸である。ここでいう官能基とは、ポリアミド重合反応（反応条件としては、例えば、反応温度250～270℃、圧力10～20kg/cm²で反応時間1から5時間）の際にアミノ基やカルボキシル基等と反応して、ポリマーの分岐を引き起こしたり、ポリマーの結晶化度を低下（結晶化度80%以下）させるような反応基であり、例えば、アミノ基やカルボキシル基がこれに該当するが、それ以外には、酸性基（スルホン酸基、リン酸基、フェノール性水酸基等）や塩基性基（ヒドラジノ基等）やプロトニックな極性基（水酸基等）や開裂性を有する基（エポキシ基、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。一方、ハロゲン置換基や芳香族性置換基、エーテル基、エステル基、アミド基等は反応性が低く、ここでいう官能基には該当しない。

[0040] 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。



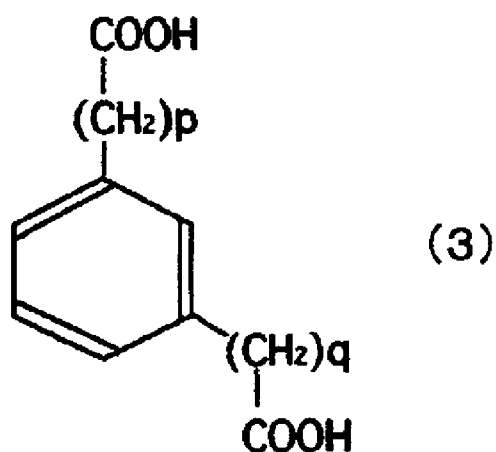
（但し、一般式（１）において、 $m=0\sim 16$ ）。

[0041] [化1]



（但し、一般式（２）において、 $n, o=0\sim 16$ ）。

[0042] [化2]



（但し、一般式（３）において、 $p, q=0\sim 16$ ）。

[0043] また、ジカルボン酸として、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。

- [0044] 培養液中の1, 5-ペンタンジアミンは1, 5-ペンタンジアミンのフリー体または1, 5-ペンタンジアミン塩として存在する。培養液中の1, 5-ペンタンジアミンを採取する方法として、まず、培養液中から微生物を除去する。その際、微生物が増殖し、発酵が十分進んで1, 5-ペンタンジアミンが生成した後、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・膜ろ過分離）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。このようにして菌体が除去された1, 5-ペンタンジアミンを含む培養液から1, 5-ペンタンジアミンを採取する方法としては、特開2009-207495号公報に記載のように1, 5-ペンタンジアミン・ジカルボン酸塩として晶析して採取することもできる。また特開2009-29872号公報に記載のようにNF膜を利用して1, 5-ペンタンジアミンを精製し採取することもできる。また、特開2009-28045号公報に記載のように極性有機溶媒で抽出し、蒸留することにより1, 5-ペンタンジアミンを採取することもできる。

実施例

- [0045] 以下、実施例をもって本発明の実施の態様を説明するが、これらは本発明の例示であり本発明を制限するものではない。
- [0046] 1, 5-ペンタンジアミンおよびL-リジン濃度の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
- [0047] サンプル前処理：分析サンプル25 μ lに内標として1, 4-ジアミノブタン（0.03M）を25 μ l、炭酸水素ナトリウム（0.075M）を150 μ l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50 μ lを1m

1 アセトニトリルに溶解後、10,000 rpmで5分間遠心した後の上清10 μ lをHPLC分析した。

[0048] 実施例1、比較例1

(1) L-リジンを発酵生産できるコリネバクテリウム・グルタミカムの作製
1, 5-ペンタンジアミンの前駆体であるL-リジンを合成できるコリネバクテリウム・グルタミカムを作製するため、アスパルトキナーゼ (AK) への有効変異導入によるL-リジン発酵菌を作製した。Appl. Microbiol. Biotechnol., (2002), 58, p. 217-223に記載の方法を参考に、コリネバクテリウム・グルタミカム AK-1 (以下AK-1株と略す) 株を作製した。すなわち、この操作は具体的に次のようにして行った。

[0049] コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株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、データベース (GenBank) に登録されているAK遺伝子 (Accession No. BA000036) の塩基配列を参考に設計したオリゴヌクレオチド (配列番号: 4, 5) をプライマーセットとしてPCRを行い、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1.3 kb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、BamHIおよびSphIで切断し、得られた1.3 kbのBamHI-SphI断片を、予めBamHIおよびSphIで切断しておいたpUC19のBamHI/SphI間隙にライゲーションした。得られたプラスミドをpTM47とする。なお、得られたAK遺伝子がデータベースに登録されている遺伝子配列と同じであることをシーケンスにより確認した。

[0050] 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、QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製) を用いた。詳細の実験方法については本製品のマニュアルに従い実施した。pAK1を増幅鋳型、配列番号6, 7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーセ

ットとして用い、pAK1全長を増幅した。このPCR産物をDpnIで処理した後に、大腸菌JM109株を形質転換した。プラスミドを抽出し、AK遺伝子配列を確認したところ目的の変異が導入されているプラスミドが取得でき、これをpTM49-1とした。このpTM49-1をSphIおよびBamHIで切断した後、AK遺伝子部分（約1.3kb）のゲル抽出を行い変異導入AK遺伝子を精製した。

[0051] 次に、バチルス・サブチリス IFO13719株の菌体を鋳型にし、配列番号8, 9に示す塩基配列をプライマーセットとしてPCRを行い、sacB遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をSacIで切断後、同じくSacIで予め切断しておいたpHSG298（選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を持つpUCタイプの市販のプラスミド、タカラバイオ社製）にライゲーションした。得られたプラスミドをpTM38とする。次にSphIおよびBamHIで切断したpTM38と上記AK遺伝子を含む断片とをライゲーションした。こうして作製したsacB遺伝子および変異型AK遺伝子を有するプラスミドをpTM52とする。

[0052] ATCC13032株に上記のようにして作製したpTM52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（25 μ g/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））寒天培地上で形質転換体を選択した。続いて選択したカナマイシン耐性コリネ菌をスクロース添加培地上で培養し、ダブルクロッシングオーバーによりスクロース耐性コリネ菌を選択した。こうして選択された形質転換体のうち、S-アミノエチルシステイン（AEC）を20mM含有する最小培地で生育可能な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4, 5）をプライマーセットとして用いたPCR法を行ってAK遺伝子の配列を確認したところ、931番目から933番目の配列がatgに置換されていることが確認できた。このよ

うにして作製したAK-1株のアスパルトキナーゼは、リジンおよびスレオニンによるフィードバック阻害が解除されている。そのためL-リジンを培養により合成できるようになっている。

[0053] 次に、得られたAK-1株を更に遺伝子組換えにより、大腸菌由来のLDC遺伝子を染色体中に1コピー有するコリネ型細菌、2コピー有するコリネ型細菌を以下に記載する方法により作製した。

[0054] (2) LDC遺伝子1コピー染色体導入コリネ菌の作製（比較例1）

AK-1株を1, 5-ペンタンジアミン発酵菌に改良するために、大腸菌由来のLDC遺伝子をホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子座に導入するためのプラスミドpTM45を作製した。すなわち、この操作は具体的に次のようにして行った。

[0055] pHSG298を鋳型にし、配列番号10, 11に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてPCRを行い、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーターを増幅した。次に、このPCR産物を制限酵素BamHIおよびKpnIで切断した後、ゲル抽出を行いカナマイシン耐性遺伝子のプロモーター（Kmp）を精製した。一方、ベクターpUC19をBamHIおよびKpnIで切断した後、ゲル抽出によりpUC19を精製した。これらBamHIおよびKpnIで切断されているpUC19およびカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターをライゲーションした。こうして作製したプラスミドをpKmpとした。

[0056] 次に、大腸菌JM109株の菌体を鋳型にし、配列番号12, 13に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてPCRを行いLDC遺伝子を増幅した。この増幅したLDC遺伝子を制限酵素NcoIおよびSacIで切断した後、ゲル抽出によりLDC遺伝子を精製した。一方、プラスミドpKmpをNcoIおよびSacIで切断した後、ゲル抽出によりpKmpを精製した。これらNcoIおよびSacIで切断されているpKmpおよびLDC遺伝子をライゲーションした。こうして作製したプラスミドをpTM24とした。

[0057] 次にA T C C 1 3 0 3 2株の菌体を鋳型にし、配列番号14, 15に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてPCRを行いh o m遺伝子を増幅した。この増幅したh o m遺伝子を制限酵素S p h IおよびB a m H Iで切断した後、ゲル抽出を行いh o m遺伝子を精製した。一方、上述したp T M 3 8をS p h IおよびB a m H Iで切断した後、ゲル抽出によりp T M 3 8を精製した。これらS p h IおよびB a m H Iで切断されているp T M 3 8およびh o m遺伝子をライゲーションした。こうして作製したプラスミドをp T M 4 4とした。

[0058] 次に、プラスミドp T M 2 4を鋳型にし、配列番号16, 17に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてPCRを行い、K m p - L D C遺伝子断片を増幅した。この増幅したK m p - L D C遺伝子断片を制限酵素A o r 5 1 H Iで切断した後、ゲル抽出を行いK m p - L D C遺伝子断片を精製した。上記のようにして作製したp T M 4 4をA o r 5 1 H Iで切断した後、ゲル抽出によりp T M 4 4を精製した。これらA o r 5 1 H Iで切断されているp T M 4 4およびK m p - L D C遺伝子断片をライゲーションした。こうして作製したプラスミドをp T M 4 5とした。

[0059] 次に、A K - 1株にプラスミドp T M 4 5を、電気穿孔法[F E M S M i c r o b i o l o g y L e t t e r s, 65, p. 299 (1989)]により導入してカナマイシン耐性株を選抜した後に、カナマイシン耐性株をスクロース添加培地上で培養し、B i o s c i. B i o t e c h n o l. B i o c h e m (2007), 71 (9), 2130-5のT M 4 5株作製方法として記載されているダブルクロッシングオーバー法により、s a c B遺伝子が脱落したスクロース耐性コリネ菌を選択した。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18, 19)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、3.5 k b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、h o m遺伝子座に、L D C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 TM4552株（TM4552株と略す）と命名した。

[0060] (3) LDC遺伝子2コピー保有コリネ菌の作製（実施例1）

次にLDC遺伝子を乳酸脱水素酵素遺伝子（LDH遺伝子）座に導入するためのプラスミドを作製した。

[0061] (i) LDC遺伝子発現カセットの作製

LDC遺伝子の発現プロモーターとしてATCC13032株のdivIVA遺伝子（配列番号20）のプロモーター（配列番号2、Pdivと略す）を用いた。

[0062] まず、常法に従い調整したATCC13032株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号21、22に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーセットとしてPCRを行い、Pdivのクローニングを行った。PCR増幅反応には、KOD-plus polymerase（東洋紡社製）を用い、反応バッファー、dNTPmixなどは付属のものを使用した。プライマーを20 pmol/サンプル、およびKOD-Plus polymeraseを1ユニット/サンプルになるように50 μ lの反応系に調製した。反応溶液をPCR増幅装置iCycler（BIO-RAD社製）により94℃の温度で5分熱変成させた後、94℃（熱変成）：30秒、60℃（プライマーのアニール）：30秒、68℃（相補鎖の伸張）：30秒を1サイクルとして30サイクル行い、その後4℃の温度に冷却した。なお、遺伝子増幅用プライマー（配列番号21、22）には、5末端側にはBamHI認識配列、3末端側にはNcoI認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。

[0063] PCR増幅断片を精製し、末端をT4 polynucleotide Kinase（タカラバイオ社製）によりリン酸化後、pUC118ベクター（制限酵素HincIIで切断し、切断面を脱リン酸化処理したもの）にライゲーションした。ライゲーションは、DNA Ligation Kit Ver.2（タカラバイオ社製）を用いて行った。ライゲーション溶液を大腸菌DH5 α のコンピテント細胞（タカラバイオ社製）に形質転換し、抗生物質アンピシリンを50 μ g/mLを含むLB培

レートに蒔いて一晚培養した。生育したコロニーについて、ミニプレップでプラスミドDNAを回収し、制限酵素BamHI, NcoIで切断し、Pdiv断片が挿入されているプラスミドを選抜した。これら一連の操作は、全て付属のプロトコールに従い行った。このようにして作製したプラスミドをpCG5とする。

[0064] 次に、大腸菌JM109株の菌体を鋳型としたPCR法によりLDC遺伝子のクローニングを行った。PCR増幅反応は上記と同様な方法で行い、遺伝子増幅用プライマー（配列番号23, 24）には、5末端側にはNcoI認識配列、3末端側にはSacI認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製した。得られたLDC遺伝子を含むPCR増幅断片を精製し、上記と同様な方法でpUC118にクローニングした。作製したプラスミドをpCG11とする。

[0065] 次にpCG11を制限酵素NcoI, XbaIで切断し、LDC遺伝子を含む約2.1kbの断片を切り出して精製した後、予め制限酵素NcoI, XbaIで切断しておいたpCG5にライゲーションした。得られたPdiv下流にLDC遺伝子が連結された断片を有するプラスミドをpCG13とする。

[0066] (ii) LDH遺伝子座導入用プラスミドの作製

LDH遺伝子座に導入するための相同領域として、それぞれ500bpのLDH遺伝子5末端および3末端領域のクローニングを行った。それぞれ、ATCC13032株のゲノムを鋳型として、配列番号25, 26（5末端領域）および配列番号27, 28（3末端領域）をプライマーセットとして、上記と同様な方法でPCRを行った。なお、5末端領域増幅用プライマー（配列番号25, 26）には、5末端側および3末端側にBglII認識配列がそれぞれ付加されるようにして作製し、3末端領域増幅用プライマー（配列番号27, 28）には、5末端側にはSalI認識配列、3末端側にはSphI認識配列が負荷されるようにして作製した。得られたLDH遺伝子の5末端および3末端領域を含む約500bpのPCR増幅断片をそれぞれ精

製し、上記と同様な方法で pUC118 にそれぞれクローニングした。作製したプラスミドを pCG28（5末端領域）および pCG29（3末端領域）とする。

[0067] 次に、pCG13を制限酵素BamHIおよびXbaIで切断し、Pdiv-LDC遺伝子を含む約2.4kbの断片を切り出して精製した後に、上述したpTM38を予め制限酵素BamHIおよびXbaIで切断しておいたものにライゲーションした。得られたプラスミドをpCG33とする。

[0068] 次に、pCG29を制限酵素SalIおよびSphIで切断し、LDH遺伝子の3末端領域を含む断片を切り出して精製した後に、予め制限酵素SalI、SphIで切断しておいたpCG33にライゲーションした。得られたプラスミドをpCG37とする。

[0069] 最後に、pCG28を制限酵素BglII、BamHIで切断し、LDH遺伝子の5末端領域を含む断片を切り出して精製した後に、予め制限酵素BglII、BamHIで切断しておいたpCG37にライゲーションした。得られたプラスミドをpCG41とする。

[0070] (iii) pCG41の染色体への導入

先に作製した上記TM4552株に上記のようにして作製したpCG41を導入し、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））寒天培地上で形質転換体を選択した。続いて選択したカナマイシン耐性コリネ菌をスクロース添加培地上で培養し、実施例1と同様にダブルクロッシングオーバーによりスクロース耐性コリネ菌を選択した。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25、28）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、約3.3kbの単一のバンドが観察された。なお、pCG41未導入株では約2kbの断片が得られる。このことから、選択された形質転換体が、LDH

遺伝子座に、P d i v - L D C 遺伝子断片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 C G 4 5 4 1 株（C G 4 5 4 1 株と略す）と命名した。

[0071] (4) 1, 5-ペンタンジアミン発酵試験

上記のとおり作製した T M 4 5 5 2 株（比較例 1）および C G 4 5 4 1 株（実施例 1）を用いて 1, 5-ペンタンジアミン発酵試験を行った。

[0072] 滅菌した表 1 に示す培地 5 m L に C G 4 5 4 1 株（実施例 3）および T M 4 5 5 2 株（比較例 1）をそれぞれ 1 白金耳分植菌し、3 0 ° C で 2 4 時間振とうして前々培養を行った。この前々培養液を前々培養と同じ培地 4 5 m l に全量植菌し、3 0 ° C 、 1 2 0 r p m の条件下で 2 4 時間培養して前培養を行った。次に、表 1 に示す培地のグルコース濃度を 1 5 0 g / L に変更した培地 1 0 0 0 m l に前培養液全量を植菌し、滅菌した空気を 0 . 0 7 v v m で通気しながら、3 0 ° C 、攪拌翼回転数 8 0 0 r p m 、p H を 6 . 7 に調整しながら培養を行った。中和剤として硫酸水溶液（3 M）およびアンモニア水（3 M）で行った。

[0073]

[表1]

Glucose	50	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	g/L
NH_4Cl	1	g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	g/L
NaCl	0.525	g/L
KH_2PO_4	3	g/L
Na_2HPO_4	6	g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.35	mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2	mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.54	mg/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.08	mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.176	mg/L
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.176	mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.74	mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0144	mg/L
thiamine·HCl	1	mg/L
Biotine	30	μg/L
プロトカテキュ酸	15	mg/L
homoserine		mg/L

[0074] CG 4 5 4 1 株の培養結果を図 1、TM 4 5 5 2 株を図 2 に示す。その結果、TM 4 5 5 2 株（比較例 1）は 1，5－ペンタンジアミン蓄積濃度が途中で頭打ちになり、また前駆体である L－リジンの蓄積も起きたのに対し、CG 4 5 4 1 株（実施例 1）では 1，5－ペンタンジアミンの蓄積濃度が 10 g/L 以上まで向上し、また前駆体 L－リジンの蓄積はまったく起きていなかった。

[0075] (5) リジン脱炭酸酵素の比活性測定

上記のとおり培養した CG 4 5 4 1 株（実施例 1）および TM 4 5 5 2 株（比較例 1）の LDC 比活性を経時的に測定した。

[0076] 上記のとおり培養した各株の培養液を経時的に10m lサンプリングして4000rpmで5分遠心して集菌した後、2m lのバッファー（50mM Tris-HCl, pH8）に懸濁した。2m lのスクリューキャップ式チューブ（WATSON社製）に0.4g／本のガラスビーズ（0.1mmφ、アズワン社製）を入れ、そこに1m lの菌体懸濁液を加えた。次にビーズ式ホモジナイザー（TOMY精工社製）にて、4000rpmで1分間の破碎操作を5回繰り返し行った後、12000rpmで5分遠心して上清を回収し、回収した上清を粗酵素液として、続くリジン脱炭酸酵素の比活性測定試験に用いた。また、タンパク質濃度の測定にはBCAプロテインアッセイキットを用いた（PIERCE社製）。CG4541株の粗酵素液中のタンパク質濃度を表2、TM4552株の粗酵素液中のタンパク質濃度を表3に示す。

[0077] [表2]

培養時間	0 hr	23 hr	45 hr	65 hr	96 hr	118 hr	141 hr	159 hr
タンパク質濃度 (g/L)	—	3.2	2.4	1.9	2.2	3.1	3.2	3.0

[0078] [表3]

培養時間	0 hr	25 hr	45 hr	69 hr	90 hr	112 hr	135 hr	159 hr
タンパク質濃度 (g/L)	—	9.3	11.2	11.0	10.2	9.4	8.4	6.0

[0079] 上記のようにして得られた粗酵素液を用いて、L-リジンを基質としたリジン脱炭酸酵素活性を測定した。反応溶液の組成を表4に示す。反応は37℃で30分間行い、その後反応を終了させるために10分間煮沸した。遠心後の上清を用いて、L-リジンおよび生成した1,5-ペンタンジアミンの濃度を上記のようにHPLCで測定し、タンパク質当たりのLDC比活性を式1によって算出した。LDC比活性の経時的变化を図3に示す。

[0080] [表4]

溶液	容量(μL)
粗酵素液	395
500mM L-リジン溶液	100
5mM ヒﾟリトキサル-5-リン酸溶液	5
計	500

[0081] 図3の結果から、TM4552株のLDC比活性は培養の経過とともに低下していき、培養開始後90時間時点ではほとんど確認できなくなった。それに対しCG4541株のLDC比活性は、培養の経過とともに減少傾向にはあるものの、培養中に渡って比活性が180mU/mg protein以上を保持していた。

[0082] CG4541株のLDC比活性および培養液中の1,5-ペンタンジアミン、L-リジン濃度を表5、TM4552株のLDC比活性および培養液中の1,5-ペンタンジアミン、L-リジン濃度を表6に示す。

[0083] [表5]

培養時間	0 hr	23 hr	45 hr	65 hr	96 hr	118 hr	141 hr	159 hr
培養液中の1,5-PD(g/L)	0	0.8	4.8	7.3	9.7	10.7	11	10.9
培養液中のL-リジン(g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0
LDC比活性(mU/mg protein)	—	466	430	249	258	254	200	181

[0084]

[表6]

培養時間	0 hr	25 hr	45 hr	69 hr	90 hr	112 hr	135 hr	159 hr
培養液中の 1,5-PD(g/L)	0	0.7	3.7	5	5.3	5	4.9	5
培養液中の L-リジン(g/L)	0	0	0.7	1.3	1.7	1.8	1.6	1.1
LDC比活性 (mU/mg protein)	—	83	39	11	4	5	3	3

[0085] 表6の結果から、TM4552株は培養開始後25時間の時点のLDC比活性は83mU/mg protein、培養液中にはL-リジンの蓄積がなかったのに対し、培養開始後45時間の時点ではLDC比活性が39mU/mg proteinに低下し、また培養液中にはL-リジンの蓄積が起きていた。それ以降、LDCの比活性は低下しL-リジンの蓄積は増加していった。一方、表5の結果からCG4541株では培養中LDC比活性が180mU/mg proteinを維持しており、培養中に渡って培養液中にはL-リジンの蓄積は一切おきていなかった。

[0086] CG4541株はLDC遺伝子の発現プロモーターとして、カナマイシン耐性遺伝子とdivIVA遺伝子のプロモーターを用いているが、カナマイシン耐性遺伝子のプロモーターのみを用いているTM4552株のLDC比活性は最も高い時点でも80mU/mg protein程度であることから、CG4541株のLDC比活性持続性はdivIVA遺伝子のプロモーターの効果であると思われる。

産業上の利用可能性

[0087] 本発明はポリアミドの原料となりうる1,5-ペンタンジアミンを製造する方法として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌による1, 5-ペンタンジアミンの製造方法であって、前記コリネ型細菌が培養中に50 mU/mg protein以上のリジン脱炭酸酵素活性を有し続けていることを特徴とする、1, 5-ペンタンジアミンの製造方法。
- [請求項2] 染色体中にリジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子を有するコリネ型細菌による1, 5-ペンタンジアミンの製造方法であって、該リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が対数増殖期に機能するプロモーター下流に連結されていることを特徴とする、1, 5-ペンタンジアミンの製造方法。
- [請求項3] 前記プロモーターがdivIVA遺伝子プロモーターであることを特徴とする、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記プロモーターが下記(A)～(D)のいずれかから選ばれるプロモーターであることを特徴とする、請求項2または3に記載の方法。
- (A) 配列番号2に記載の塩基配列からなるプロモーター
 - (B) 配列番号2に記載の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加された塩基配列からなるプロモーター
 - (C) 配列番号2に記載の塩基配列からなるプロモーターもしくはその相補鎖の全体またはその一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズするプロモーター
 - (D) 配列番号2に記載の塩基配列との配列同一性が少なくとも80%以上の塩基配列からなるプロモーター
- [請求項5] 前記リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が大腸菌由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
- [請求項6] 前記リジン脱炭酸酵素をコードする遺伝子が下記(A)～(D)の

いずれかから選ばれる遺伝子であってリジン脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードするものであることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

(A) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる遺伝子

(B) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が置換、欠失、挿入および／または付加された塩基配列からなる遺伝子

(C) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる遺伝子もしくはその相補鎖の全体またはその一部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子

(D) 配列番号 1 に記載の塩基配列との配列同一性が少なくとも 80 %以上の塩基配列からなる遺伝子。

[請求項7] 前記コリネ型細菌が、L-リジン生産性の向上したコリネ型細菌であることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 前記コリネ型細菌が、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において 311 番目のアミノ酸残基がスレオニン以外のアミノ酸に置換された変異型アスパラギン酸キナーゼを有することを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記コリネ型細菌のホモセリンデヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損していることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

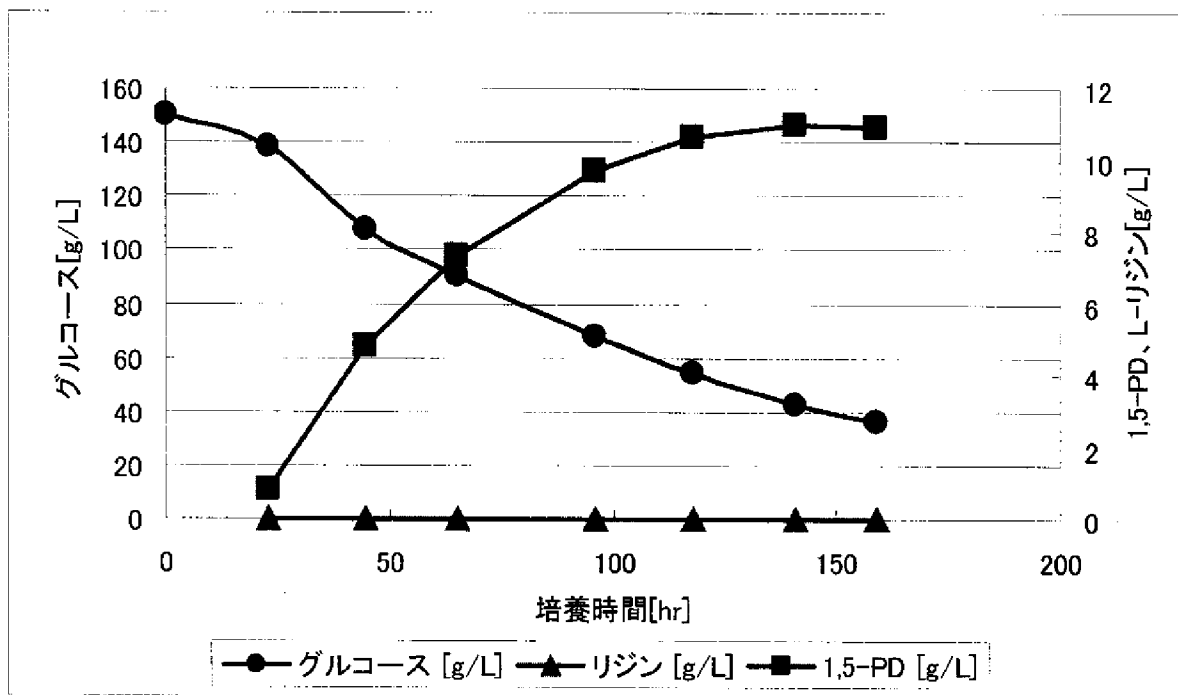
[請求項10] 前記コリネ型細菌が、遺伝子挿入変異によってホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を欠損していることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 前記コリネ型細菌がコリネバクテリウム属 (Genus *Corynebacterium*) に属する細菌であることを特徴とする、請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

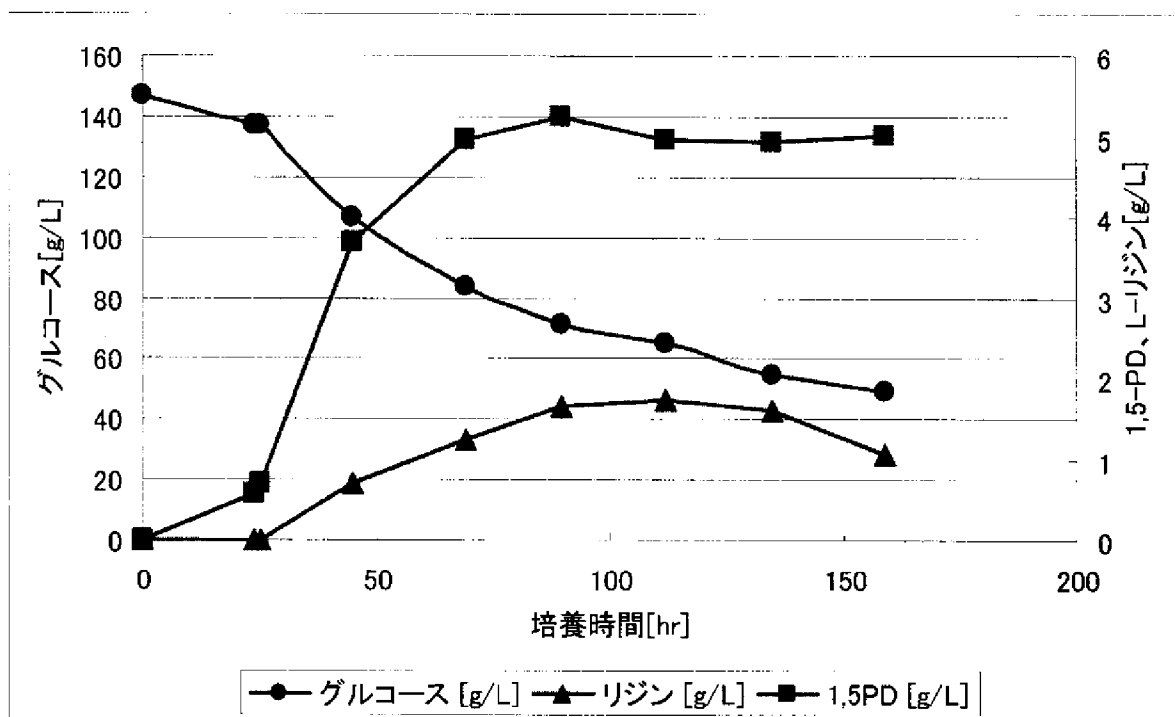
[請求項12] 前記コリネバクテリウム属 (Genus *Corynebacte*

rium) に属する細菌がコリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) であることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

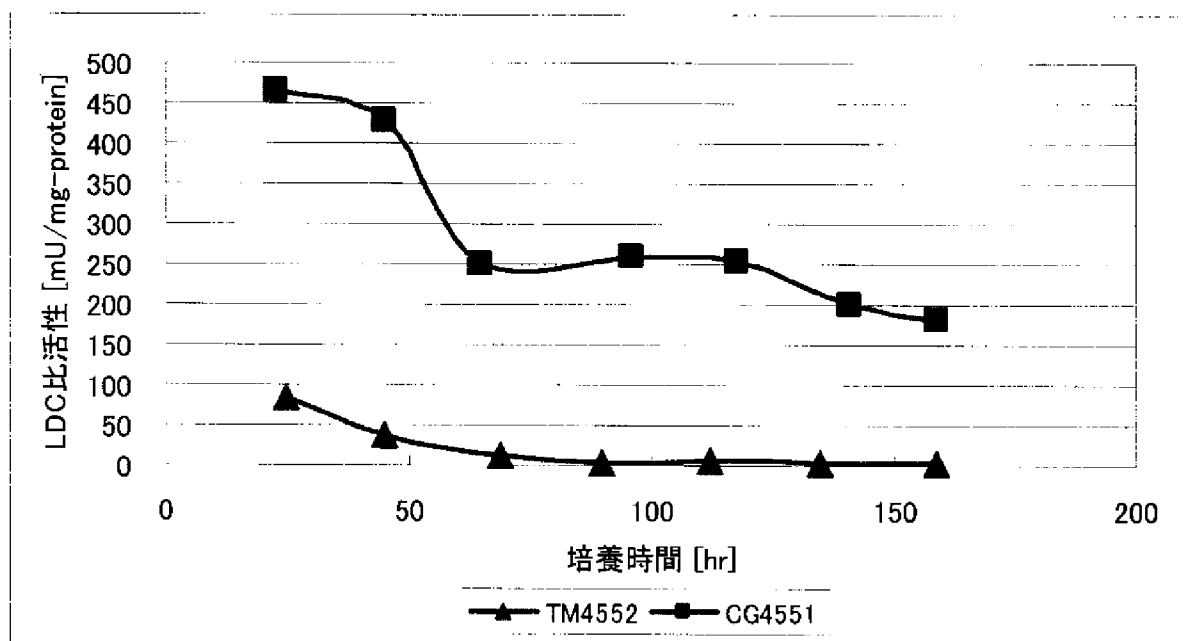
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P13/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C07C211/09(2006.01)n, C12N9/88(2006.01)n

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)

C12P13/00, C12N15/09, C07C211/09, C12N9/88

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Science

Direct, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, 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/Y	MIMITSUKA T et al., Metabolic Engineering of Corynebacterium glutamicum for Cadaverine Fermentation, Biosci Biotechnol Biochem., 2007, Vol.71(9), p2130-2135	1, 2, 5-7, 9-12 /3, 4, 8
Y/A	LETEK M, Role of DivIVA in the apical growth of Corynebacterium glutamicum, Universidad de Leon, 2007	3, 4/1, 2, 5-12
Y/A	OHNISHI J et al., A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, Appl Microbiol Biotechnol., 2002, Vol.58, p217-223	8/1-7, 9-12

☒ 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
31 May, 2011 (31.05.11)Date of mailing of the international search report
07 June, 2011 (07.06.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAMOS A et al., Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , Microbiology, 2003, Vol.149, p3531-3542	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P13/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C07C211/09(2006.01)n, C12N9/88(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. C12P13/00, C12N15/09, C07C211/09, C12N9/88

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使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)

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

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
X/Y	MIMITSUKA T et al., Metabolic Engineering of Corynebacterium glutamicum for Cadaverine Fermentation, Biosci Biotechnol Biochem., 2007, Vol.71(9), p2130-2135	1, 2, 5-7, 9-12 /3, 4, 8
Y/A	LETEK M, Role of DivIVA in the apical growth of Corynebacterium glutamicum, Universidad de Leon, 2007	3, 4/1, 2, 5-12

☒ 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矛盾するものではなく、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

3 1 . 0 5 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

4 8 6 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 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	OHNISHI J et al., A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new L-lysine-producing mutant, Appl Microbiol Biotechnol., 2002, Vol.58, p217-223	8/1-7, 9-12
A	RAMOS A et al., Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete Brevibacterium lactofermentum, Microbiology, 2003, Vol.149, p3531-3542	1-12