

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2008年7月31日 (31.07.2008)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2008/090770 A1

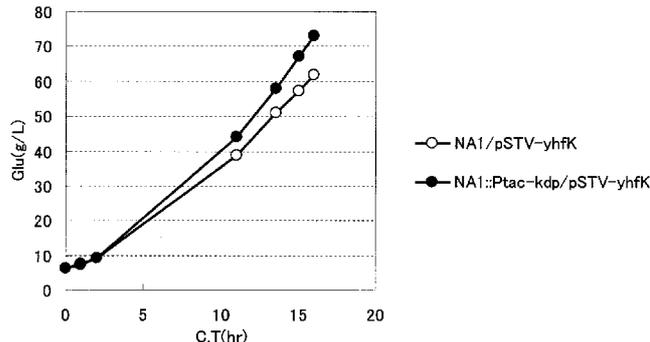
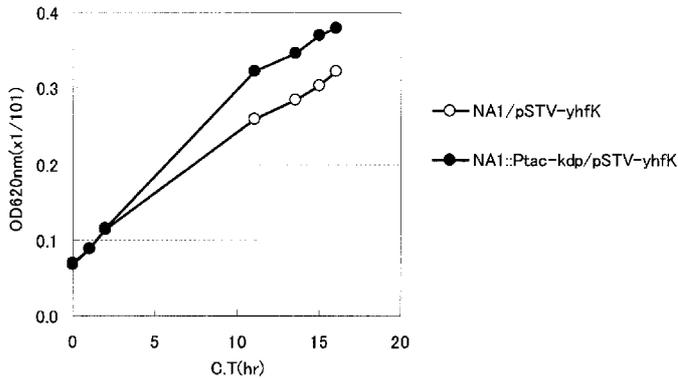
- (51) 国際特許分類:  
*C12N 1/21* (2006.01)      *C12P 13/12* (2006.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)    *C12P 13/14* (2006.01)  
*C12P 13/06* (2006.01)    *C12P 13/22* (2006.01)  
*C12P 13/08* (2006.01)    *C12P 13/24* (2006.01)  
*C12P 13/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/050246
- (22) 国際出願日: 2008年1月11日 (11.01.2008)
- (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2007-011392 2007年1月22日 (22.01.2007) JP  
 特願2007-131763 2007年5月17日 (17.05.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 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; および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 瀧川 里絵 (TAKIKAWA, Rie) [JP/JP]; 〒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). 原 吉彦 (HARA, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒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: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING L-AMINO ACID, AND METHOD FOR PRODUCTION OF L-AMINO ACID

(54) 発明の名称: L-アミノ酸を生産する微生物及びL-アミノ酸の製造法

[図5]



(57) Abstract: An L-amino acid can be produced by: culturing, in a culture medium, a microorganism belonging to the family *Enterobacteriaceae* which is capable of producing the L-amino acid and is modified so that the *kdp* system can be potentiated, thereby producing and accumulating the L-amino acid in the culture medium or a cell of the microorganism; and collecting the L-amino acid from the culture medium or the cell.

(57) 要約: L-アミノ酸生産能を有し、かつ、*kdp* システムが増強するように改変された腸内細菌科に属する微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することにより、L-アミノ酸を製造する。



WO 2008/090770 A1



SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, 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 (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部  
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

## 明 細 書

### L-アミノ酸を生産する微生物及びL-アミノ酸の製造法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、微生物を用いたL-アミノ酸の製造法、特にL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン等のL-アミノ酸の製造法に関する。L-グルタミン酸は調味料として、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファンは、動物飼料用の添加物、健康食品の成分、または、アミノ酸輸液等として、産業上有用なL-アミノ酸である。

#### 背景技術

[0002] L-アミノ酸は、種々の微生物を用いた発酵法により工業生産されている。例えば、L-グルタミン酸は、主としてブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型細菌のL-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている(例えば、非特許文献1参照)。その他の微生物を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法としては、バチルス属、ストレプトミセス属、ペニシリウム属等の微生物(例えば、特許文献1参照)、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、キャンディダ属等の微生物(例えば、特許文献2参照)、バチルス属、シュードモナス属、セラチア属、アエロバクター・アエロゲネス(現エンテロバクター・アエロゲネス)等の微生物(例えば、特許文献3参照)、エシエリヒア・コリの変異株(例えば、特許文献1参照)等を用いる方法が知られている。また、クレブシエラ属、エルビニア属又はパントエア属、エンテロバクター属に属する微生物を用いたL-グルタミン酸の製造法も開示されている(例えば、特許文献2～4参照)。

[0003] 上記のような微生物を用いた発酵法によってL-アミノ酸等の目的物質を製造するには、野生型微生物(野生株)を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法等がある。

[0004] さらに、近年は、目的物質の発酵生産に、組換えDNA技術を用いることが行われている。例えば、L-アミノ酸生合成系酵素をコードする遺伝子の発現を増強すること(特許文献5、特許文献6)、又はL-アミノ酸生合成系への炭素源の流入を増強すること(特許文献7)によって、微生物のL-アミノ酸生産性を向上させることが行われている。

[0005] kdpシステムは、カリウムイオン取り込みに働くP型ATPaseである(非特許文献2)。kdpシステムは、kdpオペロンによってコードされ、培地中のカリウムイオンが低濃度であるとき、または、高浸透圧下にて培養した際に、その発現が誘導される(非特許文献3)。また本発現は、二成分制御系の一つであるKdpD、KdpEによって制御されることが知られている(非特許文献4)。しかしながら、これまでにkdpシステム強化とL-アミノ酸生産の関係については調べられていない。

特許文献1:特開平5-244970号公報

特許文献2:米国特許第3,563,857号明細書

特許文献3:特公昭32-9393号公報

特許文献4:特開2000-189175号公報

特許文献5:米国特許第5168056号明細書

特許文献6:米国特許第5776736号明細書

特許文献7:米国特許第5906925号明細書

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

非特許文献2:Laimonis A.Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978 July; 75(7):3216-19.

非特許文献3:Laimonis A. Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981 Jan.; 78(1):464-68.

非特許文献4:Mark O. Walderhaug, J. Bacteriol., 1992 Apr.; 174 (7):2152-59.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、L-アミノ酸を効率よく生産することのできる腸内細菌科に属する微生物

を提供すること、及び該微生物を用いてL-アミノ酸を効率よく生産する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

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、kdpシステムが増強された微生物を用いることにより、L-アミノ酸を効率よく製造できることを見だし、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1)L-アミノ酸生産能を有し、かつ、kdpシステムが増強するように改変された腸内細菌科に属する微生物。

(2)kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子の発現量を増大させること、及び／または、kdpオペロン又は前記遺伝子の翻訳量を増大させることにより、kdpシステムが増強された前記微生物。

(3)kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子のコピー数を高めること、該オペロンの発現調節配列を改変することにより、kdpシステムが増強された、前記微生物。

(4)kdpオペロンが、少なくともkdpA遺伝子、kdpB遺伝子、及びkdpC遺伝子を含む、前記微生物。

(5)kdpA遺伝子が、配列番号2又は8に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2又は8において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのAサブユニットをコードする遺伝子である、前記微生物。

(6)kdpB遺伝子が、配列番号3又は9に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号3又は9において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのBサブユニットをコードする遺伝子である、前記微生物。

(7)kdpC遺伝子が、配列番号4又は10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号4又は10において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのCサブユニットをコードする遺伝子で

ある、前記微生物。

(8)前記kdpオペロンが、下記(a)～(d)のいずれかに記載のDNAである、前記微生物:

(a)配列番号1の塩基番号546～4871に示す塩基配列を含むDNA、

(b)配列番号1の塩基番号546～4871に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ、kdpシステムをコードするDNA。

(c)配列番号7の塩基番号543～4853に示す塩基配列を含むDNA、

(b)配列番号7の塩基番号543～4853に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ、kdpシステムをコードするDNA。

(9)前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、及びL-システインからなる群から選択される一種または二種以上のL-アミノ酸である前記微生物。

(10)前記腸内細菌科に属する微生物が、エシエリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌またはパントエア属細菌である前記の微生物。

(11)前記微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

(12)前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、及びL-システインから選択される一種または二種以上のL-アミノ酸である、前記方法。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]ヘルパープラスミドRSF-Red-TERの構造を示す図。

[図2]ヘルパープラスミドRSF-Red-TERの構築を示す図。

[図3]LacZ遺伝子の上流の*P. ananatis*の染色体領域の構造を示す図。

[図4]kdpオペロンプロモーター置換株の酸性条件での試験管培養における生育を示す図。

[図5]kdpオペロンプロモーター置換株のL-グルタミン酸生産性を示す図。

[図6]パントエア・アナナティス(配列番号8)とエシェリヒア・コリ(配列番号2)のKdpAのアミノ酸配列のアラインメントと、これらの共通配列(配列番号57)を示す図。

[図7]パントエア・アナナティス(配列番号9)とエシェリヒア・コリ(配列番号3)のKdpBのアミノ酸配列のアラインメントと、これらの共通配列(配列番号58)を示す図。

[図8]パントエア・アナナティス(配列番号10)とエシェリヒア・コリ(配列番号4)のKdpCのアミノ酸配列のアラインメントと、これらの共通配列(配列番号59)を示す図。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 以下、本発明を詳細に説明する。

#### <1>本発明の微生物

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有し、かつ、kdpシステムが増強するように改変された腸内細菌科に属する微生物である。ここで、L-アミノ酸生産能とは、本発明の微生物を培地中で培養したときに、培地中または菌体内にL-アミノ酸を生成し、培地中または菌体から回収できる程度に蓄積する能力をいう。なお、本発明の微生物は複数のL-アミノ酸の生産能を有するものであってもよい。L-アミノ酸の生産能を有する微生物としては、本来的にL-アミノ酸の生産能を有するものであってもよいが、下記のような微生物を、変異法や組換えDNA技術を利用して、L-アミノ酸の生産能を有するように改変したものであってもよい。

[0011] L-アミノ酸の種類は特に制限されないが、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリンのような塩基性アミノ酸、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-グリシンのような脂肪族アミノ酸、L-スレオニン、L-セリンのようなヒドロキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸、L-プロリンのような環式アミノ酸、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファンのような芳香族アミノ酸、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニンのような含硫アミノ酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン酸等のような酸性アミノ酸が挙げられ、特にL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-トリプトファン

ンが好ましい。本発明の微生物は2種類以上のアミノ酸の生産能を有するものであってもよい。

[0012] <1-1> L-アミノ酸生産能の付与

以下に、微生物にL-アミノ酸生産能を付与する方法及び本発明で使用するこのできるL-アミノ酸生産能が付与された微生物を例示する。ただし、L-アミノ酸生産能を有する限り、これらに制限されない。

[0013] 本発明に用いる微生物としては、エシエリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、サルモネラ属、モルガネラ属など、腸内細菌科に属する微生物であって、L-アミノ酸を生産する能力を有するものであれば、特に限定されない。具体的にはNCBI(National Center for Biotechnology Information)データベースに記載されている分類により腸内細菌科に属するものが利用できる(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>)。改変に用いる腸内細菌科の親株としては、中でもエシエリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌、パントエア属細菌、エルビニア属、エンテロバクター属、又はクレブシエラ属を用いることが望ましい。

[0014] 本発明のエシエリヒア属細菌を得るために用いるエシエリヒア属細菌の親株としては、特に限定されないが、具体的にはNeidhardtらの著書(Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of Escherichia coli K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.)に挙げられるものが利用できる。その中では、例えばエシエリヒア・コリが挙げられる。エシエリヒア・コリとしては具体的には、プロトタイプ野生株K12株由来のエシエリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシエリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076)等が挙げられる。

[0015] これらを手に入れるには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(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出来る。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出来る

(<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。

[0016] エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス(*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)等、パントエア属細菌としてはパントエア・アナナティス(*Pantoea ananatis*)が挙げられる。尚、近年、エンテロバクター・アグロメランスは、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アグロメランス(*Pantoea agglomerans*)又はパントエア・アナナティス(*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュワールティ(*Pantoea stewartii*)に再分類されているものがある。本発明においては、腸内細菌科に分類されるものであれば、エンテロバクター属又はパントエア属のいずれに属するものであってもよい。

[0017] 特に、パントエア属細菌、エルビニア属細菌、エンテロバクター属細菌は、 $\gamma$  -プロテオバクテリアに分類される細菌であり、分類学的に非常に近縁である(J Gen Appl Microbiol 1997 Dec;43(6) 355-361, International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1997,p1061-1067)。近年、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験等により、エンテロバクター属に属する細菌には、パントエア・アグロメランス(*Pantoea agglomerans*)又はパントエア・ディスペルサ(*Pantoea dispersa*)等に再分類されているものがある(International Journal of Systematic Bacteriology, July 1989;39(3),p.337-345)。また、エルビニア属に属する細菌にはパントエア・アナナス(*Pantoea ananas*)、パントエア・スチュワールティに再分類されているものがある(International Journal of Systematic Bacteriology, Jan 1993;43(1), p.162-173 参照)。

[0018] エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス(*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)等が挙げられる。具体的には、欧州特許出願公開952221号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。

エンテロバクター属の代表的な株として、エンテロバクター・アグロメランスATCC12287株が挙げられる。

[0019] パントエア属細菌の代表的な菌株として、パントエア・アナナティス、パントエア・スチュワールティ(*Pantoea stewartii*)パントエア・アグロメランス、パントエア・シトレア(*Pa*

ntoea citrea)が挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0020] パントエア・アナナティスAJ13355株 (FERM BP-6614) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13356株 (FERM BP-6615) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

パントエア・アナナティスAJ13601株 (FERM BP-7207) (欧州特許出願公開0952221号明細書)

これらの株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランスと同定され、エンテロバクター・アグロメランスとして寄託されたが、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。

[0021] エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロボーラ、エルビニア・カロトボーラが挙げられ、クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラが挙げられる。具体的には、下記の菌株が挙げられる。

[0022] エルビニア・アミロボーラATCC15580株

エルビニア・カロトボーラATCC15713株

クレブシエラ・プランティコーラAJ13399株 (FERM BP-6600) (欧州特許出願公開955368号明細書)

クレブシエラ・プランティコーラAJ13410株 (FERM BP-6617) (欧州特許出願公開955368号明細書)

[0023] 以下、腸内細菌科に属する微生物にL-アミノ酸生産能を付与する方法、又はこれらの微生物にL-アミノ酸生産能を増強する方法について述べる。

[0024] L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる(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)。ここで、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、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であつ

ても、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、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

[0025] L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、L-アミノ酸のアナログ耐性株、又は代謝制御変異株を取得するには、親株又は野生株を通常の変異処理、すなわちX線や紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンсульフォネート(EMS)等の変異剤処理などによって処理し、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、かつ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得ることができる。

[0026] 以下、L-アミノ酸生産菌又はその構築方法を例として示す。

[0027] L-グルタミン酸生産菌

まず、L-アミノ酸生産菌として、L-グルタミン酸生産菌について例示する。

本発明のL-グルタミン酸生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli VL334thrC+ (EP 1172433)などのエシエリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。E. coli VL334 (VKPM B-1641)は、thrC遺伝子及びilvA遺伝子に変異を有するL-イソロイシン及びL-スレオニン要求性株である(米国特許第4,278,765号)。thrC遺伝子の野生型アレルは、野生型E. coli K12株 (VKPM B-7)の細胞で増殖したバクテリオファージP1を用いる一般的形質導入法により導入された。この結果、L-イソロイシン要求性のL-グルタミン酸生産菌VL334thrC+ (VKPM B-8961) が得られた。

細菌にL-グルタミン酸生産能を付与する、又は細菌のL-グルタミン酸生産能を増強するための改変の方法としては、例えば、L-グルタミン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を挙げることができる。

[0028] L-グルタミン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(以下、「GDH」ともいう)(gdhA)、グルタミンシンテターゼ(glnA)、グルタミン酸シンテターゼ(gltAB)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(icdA)、アコニット酸ヒドラターゼ(acnA, acnB)、クエン酸シンテターゼ(以下、「CS」ともいう)(gltA)、メチルクエン酸シンテターゼ(以下「PRPC」ともいう)(prpC)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(以下、「

PEPC」ともいう)(ppc)、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)、ホスホグリセルムターゼ(pgmA, pgml)、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)、フルトースビスリン酸アルドラーゼ(fbp)、ホスホフルクトキナーゼ(pfkA, pfkB)、グルコースリン酸イソメラーゼ(pgi)などが挙げられる。尚、酵素名の後のカッコ内は、遺伝子名である(以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、CS又はPRPC、PEPCおよびGDHのいずれか1種以上が好ましく、3種全てがより好ましい。(WO2006/051660号パンフレット参照)。

[0029] 以下に、目的遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法を例示する。

[0030] 1つ目の方法は、目的遺伝子のコピー数を高める方法である。例えば、目的遺伝子を適当なプラスミド上にクローニングし、得られたプラスミドを用いて宿主細菌を形質転換することにより、該遺伝子のコピー数を高めることができる。例えば、目的遺伝子としてCSをコードする遺伝子(gltA遺伝子)あるいはPRPCをコードする遺伝子(prpC遺伝子)、PEPCをコードする遺伝子(ppc遺伝子)、およびGDHをコードする遺伝子(gdhA遺伝子)を用いる場合、これらの遺伝子はエシェリヒア属細菌、及びコリネバクテリウム属細菌において、既に塩基配列が明らかにされていることから(Biochemistry、第22巻、5243～5249頁、1983年;J. Biochem.、第95巻、909～916頁、1984年;Gene、第27巻、193～199頁、1984年;Microbiology、第140巻、1817～1828頁、1994年;Mol. Gen. Genet.、第218巻、330～339頁、1989年;Molecular Microbiology、第6巻、317～326頁、1992年)、それぞれの塩基配列に基づいてプライマーを合成し、腸内細菌科に属する細菌から染色体DNAを鋳型にしてPCR法により取得することが可能である。

[0031] 形質転換に用いるプラスミドとしては、腸内細菌群に属する細菌の中で自律複製可能なプラスミド、例えばpUC19、pUC18、pBR322、RSF1010、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、pSTV28、pSTV29(pHSG、pSTVはタカラバイオ社より入手可)、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218(pMWはニッポンジーン社より入手可)等が挙げられる。なお、プラスミドの代わりにファージDNAをベクターとして用いてもよい。

上記CS又はPRPC、PEPCおよびGDHの活性を同時に増強するためのプラスミドとして、*gltA*遺伝子、*ppc*遺伝子及び*gdhA*遺伝子が組み込まれたRSFCPG(欧州特許出願公開第0952221号明細書参照)、及びRSFCPGの*gltA*遺伝子を*prpC*に置き換えたRSFPPG(実施例参照)が挙げられる。

[0032] 形質転換法としては、例えば、*エシエリヒア・コリ* K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970))、*バチルス・ズブチリス*について報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., *Gene*, 1, 153 (1977))などが挙げられる。

。

あるいは、*バチルス・ズブチリス*、*放線菌類*及び*酵母*について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Choen, S.N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., *Nature*, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 1929 (1978))も応用できる。また、電気パルス法(特開平2-207791号公報)によっても、微生物の形質転換を行うこともできる。

[0033] 遺伝子のコピー数を高めることは、目的遺伝子を微生物の染色体DNA上に多コピー導入することによっても達成できる。微生物の染色体DNA上に遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して、相同組換え法(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972))により行うことができる。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、目的遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。さらに、Muファージを用いる方法(特開平2-109985号)で宿主染色体に目的遺伝子を組み込むこともできる。

[0034] 2つ目の方法は、染色体DNA上またはプラスミド上において、目的遺伝子のプロモ

ーター等の発現調節配列をより強力なものに置換することによって目的遺伝子の発現を増強させる方法である。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、PRプロモーター、lacUVプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、国際公開WO00/18935に開示されているように、遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。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., 1995, 1, 105-128)等に記載されている。

- [0035] 発現調節配列の置換は、例えば、温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。本発明の腸内細菌科に属する細菌に使用できる出来る、温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えばWO 99/03988号国際公開パンフレットに記載のプラスミドpMAN997等が挙げられる。
- [0036] さらに、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサ、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによって、翻訳量を向上させることが可能である。
- [0037] なお、発現調節配列の改変は、上述したような遺伝子のコピー数を高める方法と組み合わせてもよい。
- [0038] 上記のような遺伝子置換を行う方法としては、例えば「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」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))や、Redドリブンインテグレーション法と $\lambda$ 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))とを組合わせた方法(WO2005/010175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、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスイサイドベクターを利用する方法などがある(米国特許第6303383号明細書、または特開平05-007491号公報)。
- [0039] 尚、Redドリブンインテグレーションには、参考例1に示すように、 $\lambda$  Red遺伝子産物

に耐性な菌株、例えばパントエア・アナナティスSC17(0)株を好適に用いることができる。同株は、2005年9月21日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム(Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。

- [0040] 以上のような方法によりクエン酸シンターゼ遺伝子、メチルクエン酸シンターゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び／又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増強するように改変された微生物としては、特開平2001-333769号公報、特開2000-106869号公報、特開2000-189169号公報、特開2000-333769、特開2006-129840、国際公開2006/051660号パンフレット等に記載された微生物が例示できる。
- [0041] また、L-グルタミン酸生産能は、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性もしくは2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性、又はこれらの両方の活性を増強させることによっても付与することが出来る。6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ活性、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ活性を上昇させた微生物としては、特開2003-274988に開示された微生物を挙げる事が出来る。
- [0042] L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための改変は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることにより行ってもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ( $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ)(sucA)、イソクエン酸リアーゼ(aceA)、リン酸アセチルトランスフェラーゼ(pta)、酢酸キナーゼ(ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(ilvG)、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)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(gadAB)、1-ピロリン5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ(putA)などが挙げられる。この中では特に、2-オキソ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。

[0043] 上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、あるいは遺伝子工学的手法によって、上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。変異処理法としては、たとえばX線や紫外線を照射する方法、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異剤で処理する方法等がある。遺伝子に変異が導入される部位は、酵素タンパク質をコードするコード領域であつてもよく、プロモーター等の発現制御領域であつてもよい。また、遺伝子工学的手法には、例えば遺伝子組換え法、形質導入法、細胞融合法等を用いる方法がある。

[0044] 細胞中の目的酵素の活性が低下または欠損していること、および活性の低下の程度は、候補株の菌体抽出液または精製画分の酵素活性を測定し、野生株と比較することによって確認することができる。例えば、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性は、Reedらの方法(L.J. Reed and B.B. Mukherjee, Methods in Enzymology 1969, 13, p.55-61)に従って測定することができる。

[0045] 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下したエシェリヒア属に属する細菌としては、以下の菌株が挙げられる(米国特許第5,378,616号及び第5,573,945号)。

エシェリヒア・コリW3110sucA::Kmr

エシェリヒア・コリAJ12624 (FERM BP-3853)

エシェリヒア・コリAJ12628 (FERM BP-3854)

エシェリヒア・コリAJ12949 (FERM BP-4881)

エシェリヒア・コリW3110sucA::Kmr は、エシェリヒア・コリW3110の2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(sucA遺伝子)を破壊することにより得られた株である。この株は、2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼを完全に欠損している。

[0046] 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損もしくは低下した他の細菌としては、具体的には次のような株が挙げられる。

[0047] パントエア・アナナティスAJ13601 (FERM BP-7207 欧州特許公開明細書1078989)

パントエア・アナナティスAJ13356 (FERM BP-6615 米国特許6,331,419号)

パントエア・アナナティスSC17sucA (FERM BP-8646 国際公開パンフレットWO2005

/085419号)

クレブシエラ・プランティコーラ AJ13410(FERM BP-6617 米国特許6,197,559号)  
[0048] 尚、SC17sucA株は、低pHでL-グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として自然界より単離されたAJ13355株から、粘液質低生産変異株(SC17)を取得し、同株の2-オキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(sucA)を破壊することによって得られた株である。AJ13601は、このSC17sucA株に、エシェリヒア・コリ由来のgltA、ppc、gdhAの各遺伝子を含むプラスミドRSFCPG、及びブレヴィバクテリウム・ラクトフェーメンタム由来のgltA遺伝子を含むプラスミドpSTVCBを導入して得た株SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB株から、さらに、低pHにおける高濃度L-グルタミン酸耐性株の選択、及び増殖度及びL-グルタミン酸生産能が高い株の選択によって、取得された菌株である(欧州特許出願公開0952221号明細書)。AJ13356は、AJ13355株の $\alpha$ KG DH-E1サブユニット遺伝子(sucA)を欠損させた株である。また、実施例に記載したN P106株は、AJ13601株からプラスミドRSFCPG+pSTVCBを脱落させた株である。

AJ13355株及びAJ13356株は、平成10年2月19日に、工業技術院生命工学工業技術研究所(現名称、産業技術総合研究所特許生物寄託センター、住所 郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、それぞれ受託番号FERM P-16644、及びFERM P-16645として寄託され、平成11年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614、及びFERM BP-6615が付与されている。SC17sucA株は、プライベートナンバーAJ417が付与され、平成16年2月26日に産業技術総合研究所特許生物寄託センター(郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM BP-08646として寄託されている。AJ13601株は、1999年8月18日に、工業技術院生命工学工業技術研究所(現名称、産業技術総合研究所特許生物寄託センター、住所 郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。

[0049] 上記パントエア・アナナティスAJ13355株、AJ13356株、AJ13601株、及び前述のクレブシエラ・プランティコーラAJ13399株は、酸性条件下で培養したときに液体培地中に

L-グルタミン酸の飽和濃度を越える量のL-グルタミン酸を蓄積する能力を有する。

[0050] また、腸内細菌科のL-グルタミン酸生産能を向上させるためには、arcA遺伝子を欠損させる方法(米国特許7,090,998号公報)、グルタミン酸排出遺伝子であるyhfK遺伝子を増幅させる方法(WO2005/085419パンフレット)も用いることができる。

[0051] 上記の酵素活性を増強又は欠損させる方法は、以下に示す他のアミノ酸の生産菌についても、同様に適用することができる。

[0052] L-スレオニン生産菌

本発明のL-スレオニン生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号)、E. coli 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (米国特許第5,631,157号)、E. coli NRRL-21593 (米国特許第5,939,307号)、E. coli FERM BP-3756 (米国特許第5,474,918号)、E. coli FERM BP-3519及びFERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978))、E. coli VL643及びVL2055 (EP 1149911 A)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0053] TDH-6株はthrC遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、そのilvA遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、rhtA遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異thrA遺伝子を含むthrA\*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異thrA遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。B-3996株は、1987年11月19日、オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチビオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-3996で寄託されている。

[0054] E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、本発明のL-スレオニン生産菌を誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミド pVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM)に、受託番号VKPM B-5318で寄託されている。

[0055] 好ましくは、本発明の細菌は、さらに、下記の遺伝子の1種以上の発現が増大するように改変されたものである。

スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子

ホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子

スレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子

推定トランスメンブランタンパク質をコードするrhtA遺伝子

アスパルテート-β-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするasd遺伝子

アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(アスパルテートトランスアミナーゼ)をコードするaspC遺伝子

[0056] E. coliのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号337~2799, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。E. coliのホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号2801~3733, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC遺伝子との間に位置する。E. coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734~5020, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。これら三つの遺伝子は、全て、単一のスレオニンオペロンとして機能する。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニュエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去する(WO2005/04

9808, WO2003/097839)。

[0057] スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子、ならびに、thrB遺伝子及びthrC遺伝子は、スレオニン生産株*E. coli* VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのオペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

[0058] rhtA遺伝子は、グルタミン輸送系の要素をコードするglnHPQ オペロンに近い*E. coli* 染色体の18分に存在する。rhtA遺伝子は、ORF1 (ybiF遺伝子、ヌクレオチド番号764~1651, GenBank accession number AAA218541, gi:440181)と同一であり、pexB遺伝子とompX遺伝子との間に位置する。ORF1によりコードされるタンパク質を発現するユニットは、rhtA遺伝子と呼ばれている(rht: ホモセリン及びスレオニンに耐性)。また、rhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG→A置換であることが判明している(ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457, EP 1013765 A)。

[0059] *E. coli*のasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511~3571408, GenBank accession NC\_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

[0060] また、*E. coli*のaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742~984932, GenBank accession NC\_000913.1, gi:16128895)、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

[0061] L-リジン生産菌

エシェリヒア属に属するL-リジン生産菌の例としては、L-リジンアナログに耐性を有する変異株が挙げられる。L-リジンアナログはエシェリヒア属に属する細菌の生育を阻害するが、この阻害は、L-リジンが培地に共存するときには完全にまたは部分的に解除される。L-リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメ

ート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、 $\gamma$ -メチルリジン、 $\alpha$ -クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、エシエリヒア属に属する細菌を通常の人工変異処理に付すことによって得ることができる。L-リジンの生産に有用な細菌株の具体例としては、*Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; 米国特許第4,346,170号参照)及び*Escherichia coli* VL611が挙げられる。これらの微生物では、アスパルトキナーゼのL-リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

[0062] WC196株は、*Escherichia coli*のL-リジン生産菌として使用できる。この菌株は、*Escherichia coli* K-12に由来するW3110株にAEC耐性を付与することにより育種された。同株は、*Escherichia coli* AJ13069と命名され、1994年12月6日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-14690として寄託され、1995年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている(米国特許第5,827,698号)。

[0063] 本発明のL-リジン生産菌を誘導するための親株の例としては、L-リジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大している株も挙げられる。このような遺伝子の例としては、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ遺伝子(*dapA*)、アスパルトキナーゼ遺伝子(*lysC*)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子(*dapB*)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(*lysA*)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*ddh*) (米国特許第6,040,160号)、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(*ppc*)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子(*asd*)及びアスルターゼ遺伝子(*aspA*) (EP 1253195 A)が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株は、エネルギー効率に関与する遺伝子(*cyo*) (EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(*pntAB*) (米国特許第5,830,716号)、*ybjE*遺伝子(WO2005/073390)、または、これらの組み合わせの発現レベルが増大しているもよい。

[0064] 本発明のL-リジン生産菌を誘導するための親株の例としては、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性

が低下または欠損している株も挙げられる。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の例としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(米国特許第5,827,698号)、及び、リンゴ酸酵素(WO2005/010175)が挙げられる。

[0065] L-システイン生産菌

本発明のL-システイン生産菌を誘導するための親株の例としては、フィードバック阻害耐性のセリンアセチルトランスフェラーゼをコードする複数種のcysEアレルで形質転換されたE. coli JM15(米国特許第6,218,168号、ロシア特許出願第2003121601号)、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする過剰発現遺伝子を有するE. coli W3110 (米国特許第5,972,663号)、システインデスルフォヒドラーゼ活性が低下したE. coli株 (JP11155571A2)、cysB遺伝子によりコードされるシステインレギュロンの正の転写制御因子の活性が上昇したE. coli W3110 (WO0127307A1)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0066] L-ロイシン生産菌

本発明のL-ロイシン生産菌を誘導するための親株の例としては、ロイシン耐性のE. coli株 (例えば、57株 (VKPM B-7386, 米国特許第6,124,121号))または $\beta$ -2-チエニルアラニン、3-ヒドロキシロイシン、4-アザロイシン、5,5,5-トリフルオロロイシンなどのロイシンアナログ耐性のE. coli株(特公昭62-34397号及び特開平8-70879号)、WO96/06926に記載された遺伝子工学的な方法で得られたE. coli株、E. coli H-9068 (特開平8-70879号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0067] 本発明の細菌は、L-ロイシン生合成に関与する遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、好ましくはL-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼをコードする変異leuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)に代表される、leuABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。さらに、本発明の細菌は、細菌の細胞から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1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、b2682遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH

遺伝子) (EP 1239041 A2)が挙げられる。

[0068] L-ヒスチジン生産菌

本発明のL-ヒスチジン生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli 24株 (VKPM B-5945, RU2003677)、E. coli 80株 (VKPM B-7270, RU2119536)、E. coli NR RL B-12116 - B12121 (米国特許第4,388,405号)、E. coli H-9342 (FERM BP-6675) 及びH-9343 (FERM BP-6676) (米国特許第6,344,347号)、E. coli H-9341 (FERM B P-6674) (EP1085087)、E. coli AI80/pFM201 (米国特許第6,258,554号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0069] 本発明のL-ヒスチジン生産菌を誘導するための親株の例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。このような遺伝子の例としては、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)、フォスホリボシルAMPサイクロヒドロラーゼ遺伝子(hisI)、フォスホリボシル-ATPピロフォスホヒドロラーゼ遺伝子(hisIE)、フォスホリボシルフォルミノ-5-アミノイミダゾールカルボキサミドリボタイドイソメラーゼ遺伝子(hisA)、アミドトランスフェラーゼ遺伝子(hisH)、ヒスチジノールフォスフェイトアミノトランスフェラーゼ遺伝子(hisC)、ヒスチジノールフォスファターゼ遺伝子(hisB)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(hisD)などが挙げられる。

[0070] hisG及びhisBHAFIにコードされるL-ヒスチジン生合成系酵素はL-ヒスチジンにより阻害されることが知られており、従って、L-ヒスチジン生産能は、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)にフィードバック阻害への耐性を付与する変異を導入することにより効率的に増大させることができる(ロシア特許第2003677号及び第2119536号)。

[0071] L-ヒスチジン生産能を有する株の具体例としては、L-ヒスチジン生合成系酵素をコードするDNAを保持するベクターを導入したE. coli FERM-P 5038及び5048 (特開昭56-005099号)、アミノ酸輸送の遺伝子であるrhtを導入したE.coli株(EP1016710A)、スルファグアニジン、DL-1,2,4-トリアゾール-3-アラニン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与したE. coli 80株(VKPM B-7270, ロシア特許第2119536号)などが挙げられる。

## [0072] L-フェニルアラニン生産菌

本発明のL-フェニルアラニン生産菌を誘導するための親株の例としては、E.coli AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197)、変異型pheA34遺伝子を保持するE.coli HW1089 (ATCC 55371) (米国特許第 5,354,672号)、E.coli MWEC101-b (KR8903 681)、E.coli NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146及びNRRL B-12147 (米国特許第4,407,952号)などのエシエリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株として、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3 566)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659)、E. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662)及びAJ 12604と命名されたE. coli K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (FERM BP-3579)も使用できる(EP 488424 B1)。さらに、yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシエリヒア属に属するL-フェニルアラニン生産菌も使用できる(米国特許出願公開 2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

## [0073] L-トリプトファン生産菌

本発明のL-トリプトファン生産菌を誘導するための親株の例としては、変異trpS遺伝子によりコードされるトリプトファンル-tRNAシンテターゼが欠損したE. coli JP4735/pMU3028 (DSM10122)及びJP6015/pMU91 (DSM10123) (米国特許第5,756,345号)、セリンによるフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードするserAアレル及びトリプトファンによるフィードバック阻害を受けないアントラニレートシンテターゼをコードするtrpEアレルを有するE. coli SV164 (pGH5) (米国特許第 6,180,373号)、トリプトファンターゼが欠損したE. coli AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263)及びAGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) (米国特許第4,371,614号)、フォスフォエノールピルビン酸生産能が増大したE. coli AGX17/pGX50,pACKG4-pps (WO970833 3, 米国特許第6,319,696号)などのエシエリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシエリヒア属に属するL-トリプトファン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

## [0074] 本発明のL-トリプトファン生産菌を誘導するための親株の例としては、アントラニレ

ートシンターゼ(trpE)、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ(serA)、及び、トリプトファンシンターゼ(trpAB)から選ばれる酵素の活性の一種以上が増大した株も挙げられる。アントラニレートシンターゼ及びフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼは共にL-トリプトファン及びL-セリンによるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を解除する変異をこれらの酵素に導入してもよい。このような変異を有する株の具体例としては、脱感作型アントラニレートシンターゼを保持するE. coli SV164、及び、フィードバック阻害が解除されたフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異serA遺伝子を含むプラスミドpGH5 (WO 94/08031)をE. coli SV164に導入することにより得られた形質転換株が挙げられる。

[0075] 本発明のL-トリプトファン生産菌を誘導するための親株の例としては、解除型アントラニレートシンターゼをコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入された株(特開昭57-71397号, 特開昭62-244382号, 米国特許第4,371,614号)も挙げられる。さらに、トリプトファンオペロン(trpBA)中のトリプトファンシンターゼをコードする遺伝子の発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を付与してもよい。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされる $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットからなる。さらに、イソシトレートリアーゼ-マレートシンターゼオペロンの発現を増大させることによりL-トリプトファン生産能を改良してもよい(WO2005/103275)。

[0076] L-プロリン生産菌

本発明のL-プロリン生産菌を誘導するための親株の例としては、ilvA遺伝子が欠損し、L-プロリンを生産できるE. coli 702ilvA (VKPM B-8012) (EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の細菌は、L-プロリン生合成に関与する遺伝子の一種以上の発現を増大することにより改良してもよい。L-プロリン生産菌に好ましい遺伝子の例としては、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メートキナーゼをコードするproB遺伝子(ドイツ特許第3127361号)が挙げられる。さらに、本発明の細菌は、細菌の細胞から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一種以上の発現が増大することにより改良してもよい。このような遺伝子としては、b2682 遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子) (EP1239041 A2)が挙げられる。

[0077] L-プロリン生産能を有するエシエリヒア属に属する細菌の例としては、NRRL B-12403及びNRRL B-12404 (英国特許第2075056号)、VKPM B-8012 (ロシア特許出願2000124295)、ドイツ特許第3127361号に記載のプラスミド変異体、Bloom F.R. et al (The 15th Miami winter symposium, 1983, p.34)に記載のプラスミド変異体などのE. coli株が挙げられる。

[0078] L-アルギニン生産菌

本発明のL-アルギニン生産菌を誘導するための親株の例としては、E. coli 237株 (VKPM B-7925) (米国特許出願公開2002/058315 A1)、及び、変異N-アセチルグルタメートシンターゼを保持するその誘導株(ロシア特許出願第2001112869号)、E. coli 382株 (VKPM B-7926) (EP1170358A1)、N-アセチルグルタメートシンターゼをコードするargA遺伝子が導入されたアルギニン生産株(EP1170361A1)などのエシエリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

[0079] 本発明のL-アルギニン生産菌を誘導するための親株の例としては、L-アルギニン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。このような遺伝子の例としては、N-アセチルグルタミルフォスフェートレダクターゼ遺伝子(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(argJ)、N-アセチルグルタメートキナーゼ遺伝子(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ遺伝子(argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(argF)、アルギノコハク酸シンターゼ遺伝子(argG)、アルギノコハク酸リアーゼ遺伝子(argH)、カルバモイルフォスフェートシンターゼ遺伝子(carAB)が挙げられる。

[0080] L-バリン生産菌

本発明のL-バリン生産菌を誘導するための親株の例としては、ilvGMEDAオペロンを過剰発現するように改変された株(米国特許第5,998,178号)が挙げられるが、これらに限定されない。アテニュエーションに必要なilvGMEDAオペロンの領域を除去し、生産されるL-バリンによりオペロンの発現が減衰しないようにすることが好ましい。さらに、オペロンのilvA遺伝子が破壊され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少することが好ましい。

[0081] 本発明のL-バリン生産菌を誘導するための親株の例としては、アミノアシルt-RNA

シンテターゼの変異を有する変異株(米国特許第5,658,766号)も挙げられる。例えば、イソロイシンtRNAシンテターゼをコードするileS 遺伝子に変異を有するE. coli VL1970が使用できる。E. coli VL1970は、1988年6月24日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-4411で寄託されている。

さらに、生育にリポ酸を要求する、及び／または、H<sup>+</sup>-ATPaseを欠失している変異株(WO96/06926)を親株として用いることができる。

[0082] L-イソロイシン生産菌

本発明のL-イソロイシン生産菌を誘導するための親株の例としては、6-ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシンヒドロキサメートなどのイソロイシンアナログに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオニン及び／またはアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンテターゼなどのL-イソロイシン生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号, FR 0356739, 及び米国特許第5,998,178号)。

[0083] <1-2>kdpシステムの増強

本発明の微生物は、上述したようなL-アミノ酸の生産能を有する腸内細菌科に属する微生物を、kdpシステムが増強するように改変することによって得ることができる。ただし、kdpシステムが増強するように改変を行った後に、L-アミノ酸の生産能を付与してもよい。

[0084] なお、kdpシステムの増強は、後述するように、kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子の発現量を増大させるように改変することによって達成でき、これらの発現量の増大はプロモーター改変を始めとする発現調節領域改変などによる内因性遺伝子の発現増強であってもよいし、オペロン又は各遺伝子を含むプラスミドの導入などによる外因性遺伝子の発現増強であってもよい。さらに、これらを組み合わせてもよい。また、kdpオペロン又は同オペロンを構成する各遺伝子の翻訳量を増大させることによっても、kdpシステムを増強することができる。

[0085] 本発明において「kdpシステム」とは、カリウムイオン取り込み系 (high-affinity potassium transport system) に働くP型ATPase (potassium-transporting P-type ATPase) を意味する (EC 3.6.3.12)。

[0086] また、「kdpシステムが増強するように改変された」とは、前記P型ATPaseによるカリウムイオン取込みが増強されることを意味し、より具体的には前記P型ATPaseの活性が増強するように微生物が改変されたことを意味する。例えば、野生株又は非改変株と比較して、細胞当たりのP型ATPase分子の数が増加した場合や、P型ATPase分子当たりの活性が上昇した場合が該当する。P型ATPase活性は野生株又は非改変株と比較して、菌体当たり150%以上、好ましくは200%以上、さらに望ましくは菌体当たり300%以上に向上するように改変されていることが好ましい。また、比較対象となる野生型の腸内細菌科に属する微生物とは、例えばエシェリヒア・コリMG1655 (ATCC 47076) や、パントエア・アナナティスAJ13355 (FERM BP-6615) 等が挙げられる。

[0087] kdpオペロンの発現量が上昇したことの確認は、kdpオペロンのmRNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor(USA),2001))。発現量については、野生株あるいは非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

P型ATPase活性は、例えばkdpシステムを有する微生物より、kdpシステムを抽出、精製し (Siebers, A. et al., Eur. J. Biochem. 178, 131 (1988) 参照)、そのATPase活性を測定する方法 (Arnold, A. et al., Anal. Biochem. 71, 209 (1976) 参照) で、P型ATPase活性を測定できる。

[0088] kdpシステムは、kdpオペロンによってコードされる3つのサブユニットからなり、各サブユニット遺伝子は、E. coliでは以下のアノテーションが付与されている。

kdpA ATPase of high-affinity potassium transport system, A chain

kdpB ATPase of high-affinity potassium transport system, B chain

kdpC P-type ATPase, high-affinity potassium transport system, C chain

本発明による「kdpオペロン」とは、前記P型ATPaseのAサブユニット、Bサブユニット、Cサブユニットをコードする遺伝子群であり、AサブユニットはkdpA遺伝子、BサブユニットはkdpB遺伝子、CサブユニットはkdpC遺伝子によりコードされる。本発明において、kdpオペロンは、kdpA、kdpB、及びkdpC遺伝子以外の遺伝子を含んでいてもよい。

[0089] エシエリヒア・コリのkdpオペロンの塩基配列を配列番号1に示す。同オペロンは下記の6つの遺伝子を含み、それぞれの配列番号1におけるコード領域(終止コドンを含む)の位置は以下のとおりである。kdpA、kdpB、kdpC、kdpD、及びkdpEによってコードされるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号2～6に示す。

kdpF: 457～546

kdpA: 546～2219

kdpB: 2242～4290

kdpC: 4299～4871

kdpD: 4864～7548

kdpE: 7545～8222

[0090] パントエア・アナナティスのkdpオペロンの塩基配列を配列番号7に示す。同オペロンは下記の4つの遺伝子を含み、それぞれの配列番号7におけるコード領域(終止コドンを含む)の位置は以下のとおりである。kdpA、kdpB、kdpC、kdpDによってコードされるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号8～11に示す。

kdpA: 543～2225

kdpB: 2228～4273

kdpC: 4284～4853

kdpD: 4867～7542

[0091] また、パントエア・アナナティスのkdpE遺伝子の塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号12、13に示す。

本明細書において、kdpA、kdpB、kdpC、kdpD、及びkdpEによってコードされるタンパク質を、それぞれKdpA、KdpB、KdpC、KdpD、及びKdpEと記載することがある。

パントエア・アナナティスとエシエリヒア・コリのそれぞれのKdpA、KdpB、KdpCのアミ

ノ酸配列のアラインメントを図6～8に示す。パントエア・アナナティスとエシェリヒア・コリで共通する配列をアラインメントの下段に示す。また、KdpA、KdpB、KdpCの各々のコンセンサス配列を配列番号57～59に示す。

パントエア・アナナティスとエシェリヒア・コリの各々のKdpA、KdpB、KdpCの相同性は、各々75.36%、81.35%、59.57%である。

[0092] エシェリヒアのkdpA遺伝子は、GenBank NP\_415226.1 Reports potassium-transpo...[gi:16128674]に、kdpB遺伝子は、NP\_415225. Reports potassium-transpo...[gi:16128673]に、kdpC遺伝子は、NP\_415224. Reports potassium-transpo...[gi:16128672]に、kdpD遺伝子は、NP\_415223. Reports fused sensory his...[gi:16128671]に、kdpE遺伝子は、NP\_415222. Reports DNA-binding respo...[gi:16128670]に、登録されている。

[0093] さらに、kdpオペロンは、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、エシェリヒア属、パントエア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、エルシニア属等の腸内細菌科に属する微生物からクローニングされるものであってもよい。

[0094] 本発明に用いることが出来るkdpオペロンは、既に配列が明らかにされている腸内細菌科に属する微生物の塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いて、腸内細菌科に属する微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法(PCR:polymerase chain reaction; White,T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照)によって、kdpオペロンとその上流領域の発現制御領域を含む、その隣接領域を取得することができる。他の微生物のkdpオペロンのホモログも、同様にして取得され得る。

[0095] kdpオペロンホモログとは、他の微生物由来で、エシェリヒア・コリまたはパントエア・アナナティスのkdpオペロンと高い類似性を示し、かつカリウムイオンを取り込むP型ATPaseをコードする遺伝子をいう。他の微生物由来のkdpA遺伝子、kdpB遺伝子、及びkdpC遺伝子は、配列番号2、3、4、8、9及び10のアミノ酸配列全体の80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有し、かつ、カリウムを取り込むP型ATPase活性を有するタンパク質を構成するサブユニットをコードするものを意味する。

[0096] 各サブユニットは、それらによって構成されるP型ATPase活性が損なわれない限り、配列番号2、3、4、8、9及び10のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置で1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有する保存的バリエーションをコードするものであってもよい。ここで、数個とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個である。また、このようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、kdpオペロンを保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異によって生じるものも含まれる。

[0097] 上記置換は機能的に変化しない中性変異である保存的置換が好ましい。保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、phe、trp、tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、leu、ile、val間で、極性アミノ酸である場合には、gln、asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、lys、arg、his間で、酸性アミノ酸である場合には、asp、glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、ser、thr間で互いに置換する変異である。より具体的には、保存的置換としては、alaからser又はthrへの置換、argからgln、his又はlysへの置換、asnからglu、gln、lys、his又はaspへの置換、aspからasn、glu又はglnへの置換、cysからser又はalaへの置換、glnからasn、glu、lys、his、asp又はargへの置換、gluからgly、asn、gln、lys又はaspへの置換、glyからproへの置換、hisからasn、lys、gln、arg又はtyrへの置換、ileからleu、met、val又はpheへの置換、leuからile、met、val又はpheへの置換、lysからasn、glu、gln、his又はargへの置換、metからile、leu、val又はpheへの置換、pheからtrp、tyr、met、ile又はleuへの置換、serからthr又はalaへの置換、thrからser又はalaへの置換、trpからphe又はtyrへの置換、tyrからhis、phe又はtrpへの置換、及び、valからmet、ile又はleuへの置換が挙げられる。

[0098] また、kdpオペロンは、宿主微生物により、遺伝子の縮重性が異なるので、kdpオペロンが導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したものでよい。同様にkdpオペロンは、増幅することによりL-アミノ酸の生産を向上させることができる限り、コードされる各サブユニットのN末端側、及び／又は、C末端側が延長又は削られていてもよい。例えば延長・削除する長さは、アミノ酸残基で50以下、好ましくは20以下、より

好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。より具体的には、配列番号2、3、4、8、9及び10のアミノ酸配列のN末端側50アミノ酸から5アミノ酸、C末端側50アミノ酸から5アミノ酸延長又は削除されていてもよい。

[0099] kdpオペロンは、さらに、配列番号1もしくは7の塩基配列、又は同塩基配列中の各コード領域の塩基配列に相補的な配列を有するDNAまたはこれらの塩基配列を有するDNAから調製され得るプローブと、ストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつkdpシステム、すなわちカリウムイオンを取り込むP型ATPaseの活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

[0100] ここでいう「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。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましく90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、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°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

[0101] プローブは、kdpオペロンの一部の配列を有するものであってもよい。そのようなプローブは、当業者によく知られた方法により、各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、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応により作製することができる。なお、プローブに300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、上記の条件でハイブリダイズさせた後の洗いの条件としては、50°C、2×SSC、0.1%SDSで1回または2～3回洗浄する条件が挙げられる。

[0102] このようなkdpオペロンと相同な遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号1又は7の塩基配列中のコード領域を改変することによって取得することができる。また、以下のような従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、配列番号1もしくは7の塩基配列、又はこれらの塩基配列中のコード領域の配列をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝

子を保持する微生物、例えば腸内細菌科に属する微生物を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンサルフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法、エラープローンPCR(Cadwell,R.C. PCR Meth. Appl. 2, 28(1992))、DNA shuffling(Stemmer,W.P. Nature 370, 389(1994))、StEP-PCR(Zhao,H. Nature Biotechnol. 16, 258(1998))によって、遺伝子組換えにより人工的にkdpオペロンに変異を導入して活性の高いkdpシステムをコードするオペロンを取得することが出来る。これらのkdpオペロンのホモログがP型ATPaseをコードしているか否かは、例えば、これらの遺伝子をL-アミノ酸生産能を有する腸内細菌科に属する微生物に導入し、L-アミノ酸の生産能が向上するかどうか、また上述の方法でP型ATPase活性を測定することにより、確かめることができる。

[0103] 尚、上記バリエーション及びホモログに関する記述は、後述のkdpD遺伝子及びkdpE遺伝子にも適用される。

[0104] kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子の発現量が增大するように腸内細菌科に属する微生物を改変することは、前述の、目的遺伝子の発現が増強するように細菌を改変する方法によって行うことができる。すなわち、kdpオペロン又は同オペロンを構成する各遺伝子の発現のコピー数を高めること、及び/又は、同オペロンのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換すること、又は同オペロンを構成する各遺伝子を強力な発現調節配列の制御下に置くことによって、同オペロン又は各遺伝子の発現を増強することができる。kdpオペロンを構成する各遺伝子の発現の増強は、オペロン単位で行ってもよく、また、各遺伝子毎に別個に行ってもよいが、オペロン単位で行うことが好ましい。各遺伝子毎に発現を増強する場合、増強する遺伝子はkdpオペロンを構成するいずれの遺伝子であってもよいが、少なくともkdpA、kdpB、及びkdpC遺伝子のいずれか1種又は2種以上であることが好ましく、kdpA、kdpB、及びkdpC遺伝子のすべての発現を増強することがより好ましい。

[0105] また、kdpオペロンを構成する各遺伝子の翻訳量が增大するように、各遺伝子のリボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペーサの配列を改変することによっても、kdpシステムを増強することができる。

[0106] さらに、kdpオペロンの発現は、kdpD遺伝子及びkdpE遺伝子によってコードされる

二成分制御系KdpDEによって制御されることが知られており(J. Bacteriol., 1992 Apr. ; 174 (7):2152-59.)、kdpD遺伝子及びkdpE遺伝子の発現量を増大させることによっても、kdpオペロンの発現量を増大させることができる。

[0107] <2>本発明のL-アミノ酸の製造法

本発明の微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中に生成蓄積させ、該培地から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ことができる。

[0108] 培養に用いる培地は、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いることができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株が利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

[0109] 炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用でき、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いることができる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができる。有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用でき、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

[0110] 特にL-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いる場合、培地中にパントテン酸を添加すると、より効率よく晶析できる(WO2004/111258号パンフレット)。無機塩類としてはりん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用できる。

[0111] 培養は、好ましくは、発酵温度20～45℃、pHを3～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、例えば、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。このような条件下で、好ましくは10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に目的アミノ酸が蓄積される。

[0112] また、L-グルタミン酸が析出するような条件に調整された液体培地を用いて、培地

中にL-グルタミン酸を析出させながら培養を行うことも出来る。L-グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH5.0～4.0、好ましくはpH4.5～4.0、さらに好ましくはpH4.3～4.0、特に好ましくはpH4.0を挙げることができる。

[0113] また、L-グルタミン酸を培地中に析出させる場合には、予めL-グルタミン酸、L-リジンの結晶を種晶として添加しておくことより効率よく晶析できる(欧州特許1233069号、欧州特許出願公開1624069号)。

[0114] 培養終了後の培養液からL-アミノ酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に濃縮晶析する方法あるいはイオン交換クロマトグラフィー等によって採取される。L-グルタミン酸が析出するような条件下で培養した場合、培養液中に析出したL-グルタミン酸は、遠心分離又は濾過等により採取することができる。この場合、培地中に溶解しているL-グルタミン酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

[0115] なお、塩基性アミノ酸を製造する際には、培養中のpHが6.5～9.0、培養終了時の培地のpHが7.2～9.0となるように制御し、発酵中の発酵槽内圧力が正となるように制御するか、又は、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給して、培地中の重炭酸イオン及び／または炭酸イオンが少なくとも2g/L以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び／または炭酸イオンを塩基性アミノ酸を主とするカチオンのカウンタイオンとする方法で発酵し、目的の塩基性アミノ酸を回収する方法で製造を行ってもよい(特開2002-065287号参照、米国特許出願公開第2002025564号)。

## 実施例

[0116] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

[参考例1]  $\lambda$  Red遺伝子産物に耐性なパントエア・アナナティス菌株の構築

パントエア・アナナティスにおいてkdpオペロン増幅を行うために、「Red-driven integration」あるいは「Red-mediated integration」と呼ばれる方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97. 6640-6645 (2000))を高効率で行うための受容菌を構築した。

[0117] まず、 $\lambda$ のgam、bet及びexoの各遺伝子(以下、「 $\lambda$  Red遺伝子」)を発現する新規なヘルパープラスミドRSF-Red-TERを構築した(図1)。詳細は、参考例2に記載する

- 。
- [0118] このプラスミドは、異なる遺伝子背景を持つ広い範囲の宿主に使用できる。その理由は、1)これは、多くのグラム陰性菌及びグラム陽性菌、並びに植物においてさえも安定に維持され得るRSF1010広宿主域プラスミドのレプリコンを有しており(Scholz, et al., 1989; Buchanan-Wollaston et al., 1987)、2)  $\lambda$  Red遺伝子、gam、bet及びexo遺伝子は、多くの細菌のRNAポリメラーゼによって認識される、PlacUV5プロモーターの調節化にあり(例えば、Brunschwig, E. and Darzins, A., Gene, 111, 1, 35-41 (1992); Dehio, M. et al, Gene, 215, 2, 223-229 (1998))、3) 自己調節因子 $P_{lacUV5}$ -lacI、及びエシェリヒア・コリのrrnBオペロンの $\rho$ 非依存性転写ターミネーター(TrrnB)は、 $\lambda$  Red遺伝子の基底発現レベルを低くする(Skorokhodova, A.Yu et al, Biotekhnologiya (Rus), 5, 3-21 (2004))からである。さらに、RSF-Red-TERプラスミドは、レバンスクララーゼ(levansucrase)遺伝子(sacB)を含んでおり、この遺伝子により、スクロースを含む培地で細胞からプラスミドを回収することができる。
- [0119] エシェリヒア・コリでは、RSF-Red-TERプラスミドにより提供される短いフランキング領域と共に、PCRで生成したDNA断片がインテグレートする頻度は、pKD46ヘルパープラスミド(Datsenko, K.A., Wanner, B.L., Proc.Nat1.Acad.Sci.USA, 97, 6640-6645, (2000))を用いた場合と同程度に高い。しかし、 $\lambda$  Red遺伝子の発現は、パントエア・アナナティスにとって毒性を示す。RSF-Red-TERヘルパープラスミドで形質転換された細胞は、IPTG (イソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノサイド、1mM)及び適当な抗生物質(クロラムフェニコール25  $\mu$  g/ml又はカナマイシン40  $\mu$  g/ml)を含むLB培地で非常に低い生育速度を示し、 $\lambda$  Red介在組換え( $\lambda$  Red-mediated recombination)の効率は、観察されたとしても極端に低い( $10^{-8}$ )。
- [0120]  $\lambda$  Red遺伝子の3つの遺伝子すべての発現に耐性なパントエア・アナナティスの変異株を選択した。そのために、パントエア・アナナティスSC17株(米国特許第6,596,517号)を、RSF-Red-TERプラスミドでエレクトロポレーションにより導入した。18時間培養後、約 $10^6$ 個の形質転換株が得られ、10クローンまではコロニーが大きいサイズであり、残りはすべて非常に小さかった。18時間培養後、大きいコロニーは約2mmであり、小さいコロニーは約0.2mmであった。培養を24時間まで延長しても、小さいコロニ

ーはそれ以上生育しなかったが、大きいコロニーは生育を続けた。 $\lambda$  Red遺伝子の3つの遺伝子すべて(gam、bet及びexo)の発現に耐性な、大きいコロニーのパントエア・アナナティス変異株の一つを、更なる解析に用いた。

[0121] RSF-Red-TERプラスミドDNAを、大きいコロニーのクローン1つ、及びいくつかの小さいコロニーのクローンから単離し、エシェリヒア・コリMG1655を再形質転換して、Red遺伝子の活性な産物を合成するプラスミドの能力を調べた。得られた形質転換体におけるRed依存的インテグレーションのコントロール実験により、大きいコロニーのクローンから単離されたプラスミドのみが、Red依存的インテグレーションに必要な $\lambda$  Red遺伝子の発現をもたらすことが示された。選択された大きいコロニーのクローンにおいて、Red媒介インテグレーションが起るかを調べるために、 $Km^R$ マーカー及びhisD遺伝子に相同な40bpのフランキング領域を含み、パントエア・アナナティスのhisD遺伝子のSmaI認識部位にインテグレートするようにデザインされた、PCRで生成した直鎖状のDNA断片を用いて、エレクトロポレーションを行った。2個の小さいコロニーのクローンをコントロールとして用いた。パントエア・アナナティスのhisD遺伝子の塩基配列を配列番号14に示す。PCRには、配列番号15及び16のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、pMW118-( $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR)プラスミドを鋳型として使用した。 $\lambda$  Red遺伝子に耐性ではない2個の小さなコロニーのクローンをコントロールとして使用した。pMW118-( $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR)プラスミドの構築は、参考例3で詳述する。

[0122] RSF-Red-TERプラスミドは、同プラスミド上にあるlacI遺伝子によって、Red遺伝子の発現を誘導することができる。2つの誘導条件について調べた。第1のグループでは、IPTG(1mM)をエレクトロポレーションの1時間前に添加し、第2のグループでは、IPTGはエレクトロポレーション可能な細胞の調製のための培養開始時に添加した。大きいコロニーのクローンからのRSF-Red-TERを保持する細胞の後代の生育速度は、SC17プラスミドを持たない菌株よりも有意に低くはなかった。IPTGの添加により、これらの培養物の生育速度はわずかに低下しただけであった。一方、小さいコロニーのクローンの後代は、IPTG非添加で非常にゆっくり生育し、誘導すると生育は事実上停止した。大きいコロニーのクローンの後代の細胞をエレクトロポレーションした後、たくさんの $Km^R$ クローン(短い誘導時間で18クローン、誘導時間を延長すると約100クロー

ン)が生育した。調べた100クローンの全ては、His<sup>-</sup>表現型を有し、20クローンについてPCRで確認したところ、これらの細胞の染色体の構造が期待どおりであることが確認された。一方、小さいコロニーのクローンの後代の細胞をエレクトロポレーションしても、インテグレーションされた株は得られなかった。

[0123] 得られた大きいコロニーのクローンを、7%スクロースを含むプレートで生育させてプラスミドを脱落させ、RSF-Red-TERで再形質転換した。プラスミドを持たない株をSC17(0)と命名した。同株は、2005年9月21日にルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。

[0124] 上記再形質転換の後に生育した全てのクローンは、親株クローンSC17(0)と同様に大きなコロニーサイズを有していた。RSF-Red-TERプラスミドで再形質転換したSC17(0)株におけるRed媒介インテグレーションの実験を行った。得られた3つの独立した形質転換株について、前の実験に用いたのと同じDNA断片を用いて調べた。短い誘導時間(エレクトロポレーション1時間前)を採用した。各々の実験で、10個を超えるKm<sup>R</sup>クローンが生育した。試験した全てのクローンは、His<sup>-</sup>表現型を有していた。こうして、λ Red遺伝子の発現に耐性なSC17(0)と名付けた変異株が選択された。この菌株は、パントエア・アナナティス染色体へのRed依存的インテグレーションのための好適な受容菌として使用できる。

[0125] [参考例2]ヘルパープラスミドRSF-Red-TERの構築

ヘルパープラスミドRSF-Red-TERの構築スキームを図2に示す。

構築の最初の工程として、RSF<sub>sacB</sub>PlacMCSベクターをデザインした。そのために、pACYC184プラスミドのcat遺伝子、及びバチルス・サブチリスのsacB遺伝子の構造部分を含むDNA断片を、それぞれ配列番号17、18、19、20のオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより増幅した。これらのオリゴヌクレオチドは各々、さらなるクローニングに必要な、都合のよいBglII、SacI、XbaI、及びBamHI制限酵素部位を5'末端に含んでいる。得られた1.5kbのsacB断片を、先に得たpMW119-P<sub>lac</sub>ベクターのXbaI-BamHI部位にクローニングした。このベクターは、pMW118-P<sub>lac</sub>ベクターについての記載

(Skorokhodova, A.Yu et al, Biotekhnologiya (Rus), 5, 3-21 (2004))と同様にして構築した。但し、同ベクターは、pMW218プラスミドの代わりにpMW219からのポリリンカー部位を含んでいる。

[0126] 次に、前記の1.0kbのcat断片をBglII及びSacIで処理し、先の工程で得たRSF-P<sub>lac</sub> lacI-sacBプラスミドのBamHI-SacI部位にクローニングした。得られたプラスミドpMW-P<sub>lac</sub> lacI-sacBcatは、PlacUV5-lacI-sacB-cat断片を含んでいる。この断片をRSF1010ベクターにサブクローンするために、pMW-P<sub>lac</sub> lacI-sacBcatをBglIIで消化し、DNAポリメラーゼIクローフラグメントで処理して平滑末端化し、続いてSacIで切断した。pMW-P<sub>lac</sub> lacI-sacBcatプラスミドの3.8kbのBglII-SacI断片を1%アガロースゲルから溶出させ、PstI、及びSacIで処理したRSF1010ベクターに連結した。ライゲーション混合液でエシェリヒア・コリTG1を形質転換し、クロラムフェニコール(50mg/L)を含むLB培地にプレートした。生育したクローンから単離したプラスミドの制限酵素解析を行い、RSF<sub>lac</sub> sacBプラスミドを得た。RSF<sub>lac</sub> sacB MCSベクターを構築するために、配列番号21及び22のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、pMW119-P<sub>lac</sub> lacIプラスミドを鋳型として用いて、P<sub>lac</sub> UV5 プロモーターを含むDNA断片をPCRにより増幅した。得られた146bpの断片をSacI及びNotIで消化し、RSF<sub>lac</sub> sacBプラスミドのSacI-NotI大断片と連結した。その後、配列番号23及び24のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、pKD46プラスミド(Datsenko, K.A., Wanner, B.L., Proc.Nat1.Acad.Sci.USA, 97, 6640-6645, (2000))を鋳型として用いたPCRにより、 $\lambda$  Red  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  遺伝子、及び転写ターミネーター-tL3を含む2.3kbのDNA断片を増幅した。得られた断片をRSF<sub>lac</sub> sacB MCSベクターのPvuII-NotI部位にクローニングした。こうして、RSFRedプラスミドをデザインした。

[0127] Red遺伝子のリードスルー転写を排除するために、エシェリヒア・コリのrrnBオペロンの $\rho$ -依存性転写ターミネーターを、cat遺伝子とP<sub>lac</sub> UV5 プロモーターとの間に挿入した。そのために、配列番号25及び22のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、エシェリヒア・コリBW3350の染色体を鋳型として用いたPCRにより、P<sub>lac</sub> UV5 プロモーターとTrrnBターミネーターを含むDNA断片を増幅した。得られたこれらの断片をKpnIで処理して、連結した。その後、配列番号22及び26のオリゴヌクレオチドをプライマーとするオリゴヌクレオチドを用いたPCRにより、P<sub>lac</sub> UV5 及びTrrnBの両方を含む0.5kb断片を、

増幅した。得られたDNA断片をEcoRIで消化し、DNAポリメラーゼIクレノーフラグメントで処理して平滑末端化し、BamHIで切断し、RSFsacBPlacMCSベクターのEcl136II-BamHI大断片と連結した。得られたプラスミドをRSF-Red-TERと命名した。

[0128] [参考例3] pMW118-( $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attR)プラスミドの構築

pMW118-( $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attR)プラスミドは、pMW118-attL-Tc-attR (WO2005/010175)プラスミドから、テトラサイクリン耐性マーカー遺伝子をpUC4Kプラスミドのカナマイシン耐性遺伝子で置換することによって構築した。そのために、pMW118-attL-Tc-attRプラスミドのEcoRI-HindIII大断片を、pUC4KプラスミドのHindIII-PstI(676bp)及びEcoRI-HindIII(585bp)の2つの断片に連結した。基本となるpMW118-attL-Tc-attRは、以下の4つの断片を連結することによって得た。

[0129] 1) エシエリヒア・コリW3350( $\lambda$  プロファージを含む)の染色体のattLに相当する領域から、プライマーP1(配列番号27)及びP2(配列番号28)を用いたPCR増幅により得たattL(配列番号29)を持つBglIII-EcoRI断片(114bp)。これらのプライマーは、BglIII及びEcoRIのための副次的な認識部位を含んでいる。

[0130] 2) エシエリヒア・コリW3350( $\lambda$  プロファージを含む)の染色体のattRに相当する領域から、プライマーP3(配列番号30)及びP2(配列番号31)を用いたPCR増幅により得たattR(配列番号32)を持つPstI-HindIII断片(182bp)。これらのプライマーは、PstI及びHindIIIのための副次的な認識部位を含んでいる。

[0131] 3) pMW118-ter\_rrnBのBglIII-HindIII大断片(3916 bp)。プラスミドpMW118-ter\_rrnBは、次の3つのDNA断片を連結することによって得た。

- pMW118のAatII-EcoRI断片を持つ大断片(2359 bp)。この断片は、pMW118をEcoRIで消化し、DNAポリメラーゼIクレノーフラグメントで処理し、次いでAatIIで消化することによって得た。

- アンピシリン耐性(Ap<sup>R</sup>)の遺伝子blaを持つpUC19のAatII-BglIII小断片(1194 bp)。この断片は、pUC19プラスミドの相当する領域をプライマーP5及びP6(配列番号33及び34)を用いてPCR増幅することにより得た。これらのプライマーは、PstI及びAatII及びBglIIIのための副次的な認識部位を含んでいる。

- 転写ターミネーターter\_rrnBのBglIII-PstI小断片(363bp)。この断片は、エシエリヒア・

コリMG1655染色体の相当する領域をプライマーP7及びP8(配列番号35及び36)を用いてPCR増幅することにより得た。これらのプライマーは、PstI及びBglII及びPstIのための副次的な認識部位を含んでいる。

[0132] 4)テトラサイクリン耐性遺伝子及びter\_thrL転写ターミネーターを持つpML-Tc-ter\_thrLのEcoRI-PstI小断片(1388bp)(配列番号37)。pML-Tc-ter\_thrLプラスミドは、次の2工程で得た。

•pML-MCSプラスミド(Mashko, S.V. et al., Biotekhnologiya (in Russian), 2001, no. 5, 3-20)をXbaI及びBamHIで消化し、次いで大断片(3342bp)を、ter\_thrLターミネーターを含むXbaI-BamHI断片(68bp)と連結した。このter\_thrLターミネーターを含む断片は、エシェリヒア・コリMG1655染色体の相当する領域を、プライマーP9及びP10(配列番号38及び39)を用いたPCRにより得た。こうしてpML-ter\_thrLプラスミドを得た。これらのプライマーは、PstI及びXbaI及びBamHIのための副次的な認識部位を含んでいる。

•pML-ter\_thrLプラスミドをKpnI及びXbaIで消化し、次いでDNAポリメラーゼIクレンノーフラグメントで処理し、テトラサイクリン耐性遺伝子を持つpBR322のEcoRI-Van9II小断片(1317bp)と連結して、pML-Tc-ter\_thrLプラスミドを得た。尚、pBR322は、EcoRI及びVan9IIで消化し、次いでDNAポリメラーゼIクレンノーフラグメントで処理した。

[0133] [実施例1]kdpオペロンのプロモーター置換株の取得

(1)グルタミン酸生産プラスミドRSFPPGの構築

L-グルタミン酸生合成系遺伝子、prpC遺伝子(国際公開2006/051660号パンフレット)、ppc遺伝子、gdhA[欧州出願公開0999282号明細書]遺伝子を増幅したプラスミドRSFPPGを構築した。

[0134] RSFCPG(欧州出願公開1233068号明細書)のgltA遺伝子のORF以外の部分を増幅するプライマー1(配列番号40)とプライマー2(配列番号41)を設計した。このプライマーを用いて、RSFCPGを鋳型にPCRを行い、約14.9kbの断片を取得した。一方、prpCに関してはプライマー3(配列番号42)とプライマー4(配列番号43)を用い、E. coli W3110株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、約1.2kbの断片を取得した。両PCR産物をそれぞれBglII、KpnIで処理し、ライゲーション後、E. coli JM109株を形質転

換した。出現したコロニーを全て集菌し、混合物としてプラスミドを抽出した。このプラスミド混合物でクエン酸シンターゼ (CS) 欠損株である *E. coli* ME8330株を形質転換し、50mg/Lウラシル、5mg/Lチアミン-HClを含有するM9最少培地(グルコース5 g、硫酸マグネシウム2mM、リン酸一カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g、塩化アンモニウム1g、リン酸2ナトリウム6gを純水1Lに含む培地)に塗布した。出現した株よりプラスミドを抽出し、これをRSFPPGとした。L-グルタミン酸生産菌であるパントエア・アナナティスNP106株に前記プラスミドRSFPPGを導入し、L-グルタミン酸生産菌NP106/RSFPPG(本菌株を「NA1株」と呼ぶ)を構築した。

[0135] NP106株は、以下のようにして得られた。先に例示したパントエア・アナナティスAJ13601株を、LBGM9液体培地で34°Cにて終夜振とう培養を行い、1プレートにつき100~200コロニーとなるよう希釈し、テトラサイクリン12.5mg/Lを含むLBGM9プレートに塗布した。出現したコロニーについて、テトラサイクリン12.5mg/L、及びクロラムフェニコール25mg/Lを含むLBGM9プレートにレプリカし、クロラムフェニコール感受性となった株を選択し、pSTVCBが脱落した菌株を取得し、G106Sと命名した。さらに、G106S株を、LBGM9液体培地で34°Cにて終夜振とう培養を行い、1プレートにつき100~200コロニーとなるよう希釈し、薬剤を含まないLBGM9プレートに塗布した。出現したコロニーについて、テトラサイクリン12.5mg/Lを含むLBGM9プレート及び薬剤を含まないLBGM9プレートにレプリカし、テトラサイクリン感受性となった株を選択し、RSFCPGが脱落した菌株を取得し、NP106と命名した。こうして得られたNP106株はAJ13601株が保持する2つのプラスミドRSFCPGとpSTVCBの両方を持たない株である。

[0136] (2)kdpオペロンのプロモーターをtacプロモーターに置換した株の取得

i)  $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attRの下流にPtacプロモーターが連結した配列( $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attR-Ptac)がlacZ遺伝子の上流にインテグレートした*P. ananatis* SC17(0)株の構築

Ptacプロモーターを、*P. ananatis* SC17(0)株の染色体上のlacZ遺伝子の上流にインテグレートさせた。LacZ遺伝子の上流の*P. ananatis*の染色体領域の構造を図3に示す。パントエア・アナナティスのyghU、scrK、及びlacZ遺伝子の塩基配列を配列番号44、45及び46に示す。Ptacプロモーターの-35領域の配列はttgacaである。

[0137] Ptacプロモーターに対応する5'側プライマー1(配列番号47)及び3'側プライマー2

(配列番号48)、並びに鋳型としてpDR540プラスミド(ファルマシア社、スウェーデン)を用いて、PCRによりPtacプロモーター断片を増幅した。両プライマーともに5'末端にBglII認識配列を含んでいる。また、プライマー2は、Ptacの3'末端部位の46ヌクレオチド、SD配列、及びlacZ遺伝子のコード領域の最初の部分を含んでいる。

[0138] 同時に、 $\lambda$ のattL及びattR部位に隣接する除去可能なKm耐性遺伝子を含むDNA断片を、pMW118-( $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attR)を鋳型とし、プライマー3(配列番号49)及びプライマー4(配列番号50)を用いたPCRにより増幅した。得られた断片は、一方の末端に、tacプロモーター断片との連結のためのBglII認識部位を、他方の末端に、パントエア・アナナティス染色体に相同であり、細菌ゲノムへインテグレートさせるためにscrK遺伝子上流に位置する配列に相当する部位を有している(図3)。2つのPCR生成断片をBglIIで処理し、T4 DNAリガーゼでインビトロで連結した。

[0139] 連結反応液を、パントエア・アナナティス染色体への $\lambda$ 依存インテグレーションに用いた。ヘルパープラスミドRSF-Red-TERを、 $\lambda$ ファージRed遺伝子の担体として使用した。パントエア・アナナティスのエレクトロコンピテント細胞を得るために、RSF-Red-Terプラスミドで形質転換しSC17(0)株を50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地で34°Cで一夜培養した。続いて、培養液を50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含む新鮮なLB培地で100倍に希釈し、OD<sub>600</sub>が0.3になるまで34°Cで通気下で生育させた。その後、IPTGを1mM添加し、OD<sub>600</sub>が0.7になるまで培養を続けた。10mMのサンプルを等量の脱イオン水で3回洗浄し、40  $\mu$ lの冷10%グリセロールに懸濁させた。エレクトロポレーションの直前に、5  $\mu$ lの脱イオン水に溶解させたインビトロ増幅DNA断片100-200ngを細胞懸濁液に加えた。作業は、細菌エレクトロポレーション装置(「BioRad」米国、カタログ番号165-2089、バージョン2-89)を用いて行った。使用したパルスのパラメータは、電界強度:20 kV/cm、パルス時間:5m秒であった。

[0140] エレクトロポレーション後、直ちにグルコース(0.5%)を補填した1mlのLB培地を細胞懸濁液に加えた。そして、細胞を34°Cで2時間通気下で生育させ、40  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むmLB固体培地にプレートし、34°Cで一夜インキュベートした。選択されたKm<sup>R</sup>のインテグランドを、IPTG(1mM)及びスクロース(5g/L)を添加したLB培地プレートにストリークし、34°Cで生育させて単一コロニーを形成させた。RSF-Red-T

ERヘルパープラスミドをインテグランドから除去するために、 $Km^R$ 、 $Cm^S$ バリエントを単離した。

選択された $Km^R$ 、 $Cm^S$ コロニーの染色体構造を、塩基配列決定により確認した。

[0141] ii) kdpオペロンプロモーターのtacプロモーターによる置換

配列番号51及び52に示すような合成DNAプライマー2本を通常の方法で合成した。

配列番号51に示すプライマーは、パントエア・アナナティスのkdpオペロン上流の相同配列に $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR-Ptacの5'端の相同配列が続くという構成になっている。配列番号52のプライマーは、パントエア・アナナティスのkdpオペロンの最初の開始コドンを含む5'端の相補配列に、 $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR-Ptacの3'端の相補配列が続くという構成になっている。これらのプライマー、及び、i) で選択された株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行なうことにより、 $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR-Ptacの配列の5'端にkdpオペロン上流の相同配列がつながり、 $\lambda$  attL- $Km^r$ - $\lambda$  attR-Ptacの配列の3'端にkdpオペロンの最初の開始コドンを含む5'端の相同配列がつながる、約1.6kbpの断片を増幅した。

[0142] 上記PCR断片を精製し、常法に従い、エレクトロポレーションによりSC17(0)/RSF-Red-TERに導入した。

[0143] PCR断片を導入したSC17(0)/RSF-Red-TER株を、40mg/Lカナマイシンを含むL培地(バクトトリプトン10g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g、寒天15 gを純水1Lに含む培地、pH7.0)にて選択し、約20個のコロニーを形質転換体として取得した。kdpオペロン上流に上記の断片が挿入されたことを、配列番号53と配列番号54に示される合成DNAプライマー2本を用いたPCRにより確認し、断片の挿入が確認できた菌株をSC17(0)::Ptac-kdpと名付けた。この菌株からゲノムDNAを抽出し、エレクトロポレーションによりNA1/pSTV-yhfK株を形質転換した。NA1/pSTV-yhfK株は、AJ13601株(特開平2001-333769号公報参照)より、RSFCPGおよびpSTVCBの2つのプラスミドを除去し、L-グルタミン酸生産用プラスミドRSFPPGおよびpSTV-yhfK(特開平2005-278643号公報参照)の2つのプラスミドを導入することで取得した。

[0144] RSFCPGおよびpSTVCBの両プラスミドは、特開平2001-333769号公報に記載され

ている。RSFCPGは、エシェリヒア・コリ由来の*gltA*、*ppc*、*gdhA*の各遺伝子を含むプラスミドである。pSTVCBは、pSTV29(宝酒造(株))にブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム由来の*gltA*遺伝子が挿入されたプラスミドである。また、pSTV-yhfkは、pSTV29(宝酒造(株))にパントエア・アナナティス由来のyhfk遺伝子が挿入されたプラスミドである。

[0145] SC17(0)::Ptac-kdpのゲノムDNAを導入したNA1/pSTV-yhfK株を、L培地(バクトリプトン10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g、寒天15 gを純水1Lに含む培地、pH7.0)に、最少培地成分(グルコース0.5g、硫酸マグネシウム2mM、リン酸一カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g 塩化アンモニウム1g リン酸2ナトリウム6gを純水1Lに含む培地)、および、40mg/Lのカナマイシン、12.5mg/Lのテトラサイクリン塩酸塩と25mg/Lのクロラムフェニコールを添加したプレートにて選択し、約20個のコロニーを形質転換体として取得した。これらの株はすべてkdpオペロン上流に $\lambda$  attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$  attR-Ptacの断片が挿入されており、そのうちの1クローンを選び、NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfKと名付けた。

[0146] (3)kdpオペロンプロモーター置換株の試験管培養評価

次に、kdpオペロンの強化が、生育に与える影響を検討するために、試験管培養を行った。NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株と対照のNA1/pSTV-yhfK株を用いて、酸性条件における生育について検討した。

[0147] [試験管培養用培地組成]

D-グルコース	0.5%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0g/L
NaCl	0.5g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1.0g/L
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	2.0mM
ε-ジアミノピメリン酸	200mg/L
L-リジン塩酸塩	200mg/L
DL-メチオニン	200mg/L

L-グルタミン酸 30g/L

テトラサイクリン塩酸塩 12.5mg/L

クロラムフェニコール 25mg/L

アンモニア水にてpH4.5もしくはpH4.9に調整後、フィルターろ過した。

[0148] NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株とNA1/pSTV-yhfK株をL培地(バクトトリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g、寒天15gを純水1Lに含む培地 pH7.0)に、最少培地成分(グルコース0.5g、硫酸マグネシウム2mM、リン酸一カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g、塩化アンモニウム1g、リン酸2ナトリウム6gを純水1Lに含む培地)と12.5mg/Lのテトラサイクリン塩酸塩、25mg/Lのクロラムフェニコールを添加した培地で前培養し、1/8プレートの菌体をかきとって生理食塩水で2回洗い、最後に生理食塩水1mlに懸濁したものを20 $\mu$ lを、試験管培養用培地を5mL張り込んだ試験管に植菌し、34°Cで振盪培養を行いながら、自動OD測定器(TN1506 BIO PHOTORECORDER ADVANTEC社製)を用いて、30分ごとにOD(660nm)を測定した。結果を図4に示す。

[0149] 対照のNA1/pSTV-yhfK株と比べ、kdp強化株であるNA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株では、pH4.5およびpH4.9の酸性条件下で、生育の改善がみられた。よって、これらの結果からkdpオペロンの強化による、生育改善効果とL-グルタミン酸生産速度の向上効果が明らかとなった。

[0150] (4)kdpオペロンプロモーター置換株のS-jar培養評価

次にkdpオペロンの増強が、L-グルタミン酸生産に与える影響を検討するため、NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株とNA1/pSTV-yhfK株を用いて、L-グルタミン酸生産培養を行った。

培養は、菌体を形成させる種培養とL-グルタミン酸を生成する本培養の2段階に分けて行った。

種培養は以下の培地組成にて行った。

[0151] [種培養培地組成]

シュクロース 50g/L

MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.4g/L

GD113(消泡剤) 0.1mL/L

$(\text{NH})_2\text{SO}_4$	4.0g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.0g/L
イーストエキストラクト	4.0g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01g/L
クエン酸	0.02g/L
L-リジン塩酸塩	0.4g/L
DL-メチオニン	0.4g/L
$\epsilon$ -ジアミノピメリン酸	0.4g/L
パントテン酸カルシウム	18mg/L
テトラサイクリン塩酸塩	12.5mg/L
クロラムフェニコール	25mg/L

120°C、20分間蒸気滅菌を行った。

- [0152] NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株とNA1/pSTV-yhfK株をL培地(バクトトリプトン10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g、寒天15 gを純水1Lに含む培地、pH7.0)に、最少培地成分(グルコース0.5g、硫酸マグネシウム2mM、リン酸一カリウム3g、塩化ナトリウム0.5g、塩化アンモニウム1g、リン酸2ナトリウム6gを純水1Lに含む培地)および、12.5mg/Lテトラサイクリンと25mg/Lクロラムフェニコールを加えた培地で前培養し、プレート1枚分を上記の組成の培地を300mL張り込んだ1L容ミニジャーに植菌し、34°C、pH6.0にて、通気1/1vvm、酸素濃度が3%以上になるように約12時間攪拌制御を行った。培養中のpHは6.0となるようにアンモニアガスを添加することにより調整を行った。培地中の糖の枯渇を指標に種培養を終了した。

本培養培地組成は以下に示す。

- [0153] [培養培地組成] (20%種培養液を植菌した後の濃度)

シュクロース	100g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4g/L
GD113	0.1mL/L
$(\text{NH})_2\text{SO}_4$	5.0g/L

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.0g/L
イーストエキス	6.0g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02g/L
クエン酸	0.02g/L
ベタイン*	2.0g/L
L-リジン塩酸塩	0.8g/L
DL-メチオニン	0.6g/L
$\epsilon$ -ジアミノピメリン酸	0.6g/L
パントテン酸カルシウム	18mg/L
テトラサイクリン塩酸塩	25mg/L
クロラムフェニコール	25mg/L

\*:N-N-N-トリメチルグリシン

[0154] 種培養で得られた菌体60mLを上記の組成の培地を240mL張り込んだ1L容ミニジャーに注入し、pH4.7で培養を行った。本培養開始16時間後に培養を終了した。培養液中の菌体濃度及びL-グルタミン酸濃度は経時的に測定した。菌体濃度は101倍に水で希釈した培養液を用い、620nmの濁度を分光光度計(U-2000A 日立製作所)で測定することにより調べた。L-グルタミン酸濃度は、培養液上清を適当倍率に水で希釈した後に、バイオテックアナライザー(AS-210 サクラエスアイ(株))により測定した。

[0155] 結果を、表1及び図5に示す。kdpオペロン強化株であるNA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK株は、比較対照株NA1/pSTV-yhfKと比べ、生育が向上し、L-グルタミン酸の蓄積、L-グルタミン酸の生産速度ともに向上することが判明した。

[表1]

表 1

	NA1/pSTV-yhfK	NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK
生成L-グルタミン酸 (g/Jar)	15.8	19.0
L-グルタミン酸生産速度 (g/L/hr)	3.30	3.96

[0156] [実施例2] L-スレオニンを蓄積するエシェリヒア・コリにおけるkdpオペロンの増幅

(1) kdpオペロン増幅用プラスミドの構築

エシェリヒア属細菌に、kdpオペロンを導入するため、公知のプラスミドpMW218(宝酒造(株))を用いて、kdpオペロン増幅用プラスミドを構築する。

まずpMW218を制限酵素HindIIIとBamHIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて、混合し反応を停止する。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収する。一方、kdpオペロンは、エシェリヒア・コリMG1655より抽出した染色体を鋳型として、配列番号55および56に示すようなDNAプライマーを用いてPCR(変性94°C-10秒、アニーリング60°C-30秒、伸長反応72°C-120秒)により増幅する。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造(株))を用いる。得られたkdpオペロン断片を制限酵素HindIIIとBamHIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて、混合し反応を停止させる。

[0157] 上記のように調整したpMW218消化物とkdpABC遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造(株))を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E.coli JM109 competent cells、宝酒造(株))を形質転換し、50mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37°Cで一晩保温する。寒天培地上に出現したコロニーを50mg/Lのカナマイシンを含むLB液体培地に接種し、37°Cで8時間振とう培養する。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化により、構造を確認して、pMW218kdpを得る。

[0158] (2) スレオニンを蓄積するエシェリヒア・コリB-3996へのpMW218kdpの導入とアミノ酸製造

上記のようにして得られたpMW218kdpをエレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43. 197(1997))によりVKPM B-3996に導入する。

得られた形質転換株(本菌株を「B-3996/pMW218kdp」という)、および対照としてpMW218を導入した株(本菌株を「B-3996/pMW218」という)について、以下のように培養し、培養上清中のL-スレオニン濃度を調べる。

[0159] 各形質転換株を、50mg/Lのカナマイシンおよび20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地3mLに植菌し、37°Cにて一晩、試験管培養した後、培養液200  $\mu$  Lを50m

g/Lのカナマイシンおよび20mg/Lのストレプトマイシンを含むスレオニン生産培地(20 ml)に植菌し、37°Cにて24時間振とう培養する。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清中に含まれるL-スレオニン濃度をアミノ酸分析装置(L-8500日立製作所)を用いて測定する。kdpオペロン増幅株B-3996/pMW218kdpでは、対照であるB-3996/pMW218株と比較して、培地中のL-スレオニン蓄積量が向上することが分かる。

[0160] [スレオニン生産培地]

D-グルコース	40g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.0g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g/L
L-イソロイシン	50mg/L
DL-メチオニン	500mg/L
炭酸カルシウム	0.6g/L
ストレプトマイシン	20mg/L
カナマイシン	50mg/L

水酸化カリウムにてpH7.5に調整した。

115°C、10分間蒸気滅菌を行った。

[0161] [配列表の説明]

配列番号1: エシエリヒア・コリのkdpオペロンの塩基配列(kdpA、kdpB、kdpCのアミノ酸配列併記)

kdpF: 457 ~ 546

kdpA: 546 ~ 2219

kdpB: 2242 ~ 4290

kdpC: 4299 ~ 4871

kdpD: 4864 ~ 7548

kdpE: 7545~8222

配列番号2: KdpAのアミノ酸配列

配列番号3: KdpBのアミノ酸配列

配列番号4: KdpCのアミノ酸配列

配列番号5: KdpDのアミノ酸配列

配列番号6: KdpEのアミノ酸配列

配列番号5: KdpDオペロンの塩基配列 (SDHCのアミノ酸配列併記)

配列番号7: パントエア・アナナティスkdpオペロンの塩基配列 (kdpA、kdpB、kdpC、kdpDのアミノ酸配列併記)

kdpA: 543~2225

kdpB: 2228~4273

kdpC: 4284~4853

kdpD: 4867~7542

配列番号8: KdpAのアミノ酸配列

配列番号9: KdpBのアミノ酸配列

配列番号10: KdpCのアミノ酸配列

配列番号11: KdpDのアミノ酸配列

配列番号12: パントエア・アナナティスkdpE遺伝子の塩基配列

配列番号13: KdpEのアミノ酸配列

配列番号14: パントエア・アナナティスのhisD遺伝子の塩基配列

配列番号15: Km<sup>r</sup>遺伝子のhisD遺伝子への組込みのための断片の増幅用プライマー

配列番号16: Km<sup>r</sup>遺伝子のhisD遺伝子への組込みのための断片の増幅用プライマー

配列番号17: cat遺伝子増幅用プライマー

配列番号18: cat遺伝子増幅用プライマー

配列番号19: sacB遺伝子増幅用プライマー

配列番号20: sacB遺伝子増幅用プライマー

配列番号21: PlacUV5プロモーターを含むDNA断片増幅用プライマー

配列番号22: PlacUV5プロモーターを含むDNA断片増幅用プライマー

- 配列番号23:  $\lambda$  Red  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  遺伝子及びtL3を含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号24:  $\lambda$  Red  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  遺伝子及びtL3を含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号25: PlacUV5プロモーターおよびTrrnBを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号26: PlacUV5プロモーターおよびTrrnBを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号27: attL増幅用プライマー
- 配列番号28: attL増幅用プライマー
- 配列番号29: attLの塩基配列
- 配列番号30: attR増幅用プライマー
- 配列番号31: attR増幅用プライマー
- 配列番号32: attRの塩基配列
- 配列番号33: bla遺伝子を含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号34: bla遺伝子を含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号35: ter\_rrnBを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号36: ter\_rrnBを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号37: ter\_thrLターミネーターを含むDNA断片の塩基配列
- 配列番号38: ter\_thrLターミネーターを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号39: ter\_thrLターミネーターを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号40: gltA遺伝子のORF以外の部分を増幅するためのプライマー
- 配列番号41: gltA遺伝子のORF以外の部分を増幅するためのプライマー
- 配列番号42: prpC遺伝子増幅用プライマー
- 配列番号43: prpC遺伝子増幅用プライマー
- 配列番号44: パントエア・アナナティスのyghU遺伝子の塩基配列
- 配列番号45: パントエア・アナナティスのscrK遺伝子の塩基配列
- 配列番号46: パントエア・アナナティスのlacZ遺伝子の塩基配列
- 配列番号47: Ptacプロモーターを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号48: Ptacプロモーターを含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号49: Km耐性遺伝子を含むDNA断片増幅用プライマー
- 配列番号50: Km耐性遺伝子を含むDNA断片増幅用プライマー

配列番号51: tacプロモーターに連結したkdpオペロン上流配列増幅用プライマー

配列番号52: tacプロモーターに連結したkdpオペロン上流配列増幅用プライマー

配列番号53: kdpオペロン上流構造確認用プライマー

配列番号54: kdpオペロン上流構造確認用プライマー

配列番号55: kdpオペロン増幅用プライマー

配列番号56: kdpオペロン増幅用プライマー

配列番号57: パントエア・アナナティスとエシエリヒア・コリのKdpAのアミノ酸配列の共通配列

配列番号58: パントエア・アナナティスとエシエリヒア・コリのKdpBのアミノ酸配列の共通配列

配列番号59: パントエア・アナナティスとエシエリヒア・コリのKdpCのアミノ酸配列の共通配列

#### 産業上の利用可能性

- [0162] 本発明の微生物を用いることにより、効率よく、L-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-スレオニン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、又はL-システイン、L-グルタミン酸等のL-アミノ酸を発酵生産することが出来る。本発明の微生物は、好ましい態様では、L-アミノ酸の生産量及び生産速度ともに優れている。

## 請求の範囲

- [1] L-アミノ酸生産能を有し、かつ、kdpシステムが増強するように改変された腸内細菌科に属する微生物。
- [2] kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子の発現量を増大させること、及び／または、kdpオペロン又は前記遺伝子の翻訳量を増大させることにより、kdpシステムが増強された請求項1に記載の微生物。
- [3] kdpオペロン又は同オペロンを構成する1又は2以上の遺伝子のコピー数を高めること、該オペロンの発現調節配列を改変することにより、kdpシステムが増強された、請求項2に記載の微生物。
- [4] kdpオペロンが、少なくともkdpA遺伝子、kdpB遺伝子、及びkdpC遺伝子を含む、請求項2又は3に記載の微生物。
- [5] kdpA遺伝子が、配列番号2又は8に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2又は8において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのAサブユニットをコードする遺伝子である、請求項4に記載の微生物。
- [6] kdpB遺伝子が、配列番号3又は9に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号3又は9において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのBサブユニットをコードする遺伝子である、請求項4又は5に記載の微生物。
- [7] kdpC遺伝子が、配列番号4又は10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号4又は10において1または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、kdpシステムのCサブユニットをコードする遺伝子である、請求項4～6のいずれか一項に記載の微生物。
- [8] 前記kdpオペロンが、下記(a)～(d)のいずれかに記載のDNAである、請求項4～7のいずれか一項に記載の微生物：
- (a) 配列番号1の塩基番号546～4871に示す塩基配列を含むDNA、
  - (b) 配列番号1の塩基番号546～4871に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、kdpシステムを

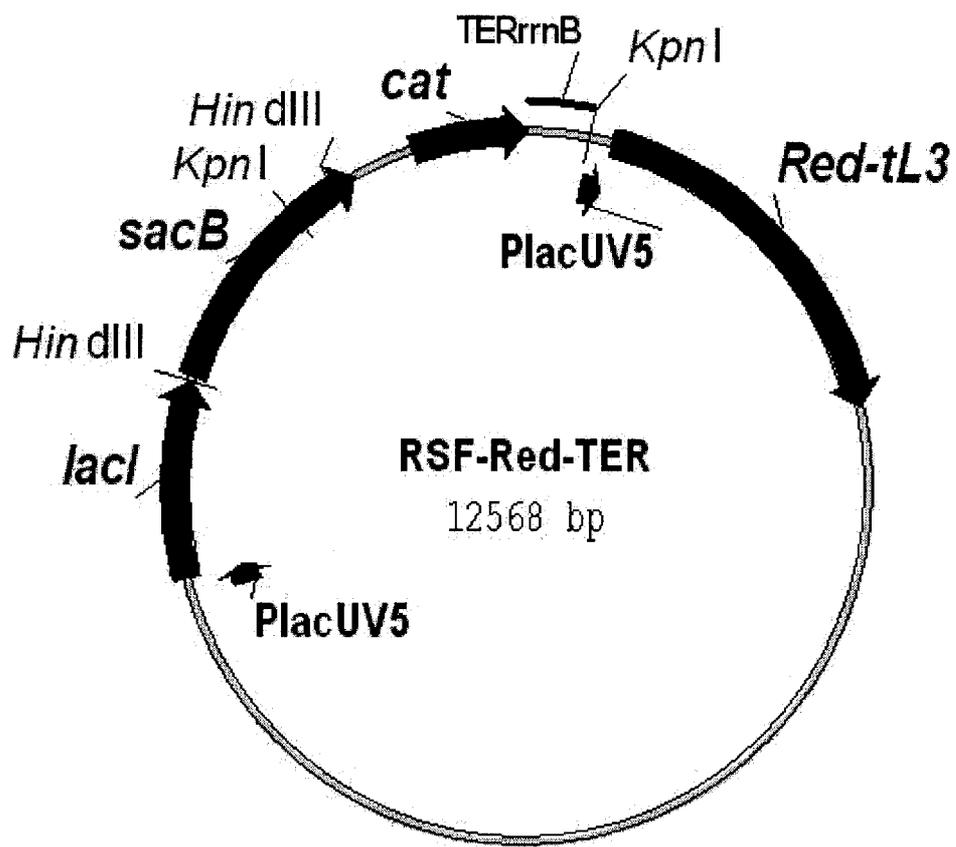
コードするDNA。

(c) 配列番号7の塩基番号543～4853に示す塩基配列を含むDNA、

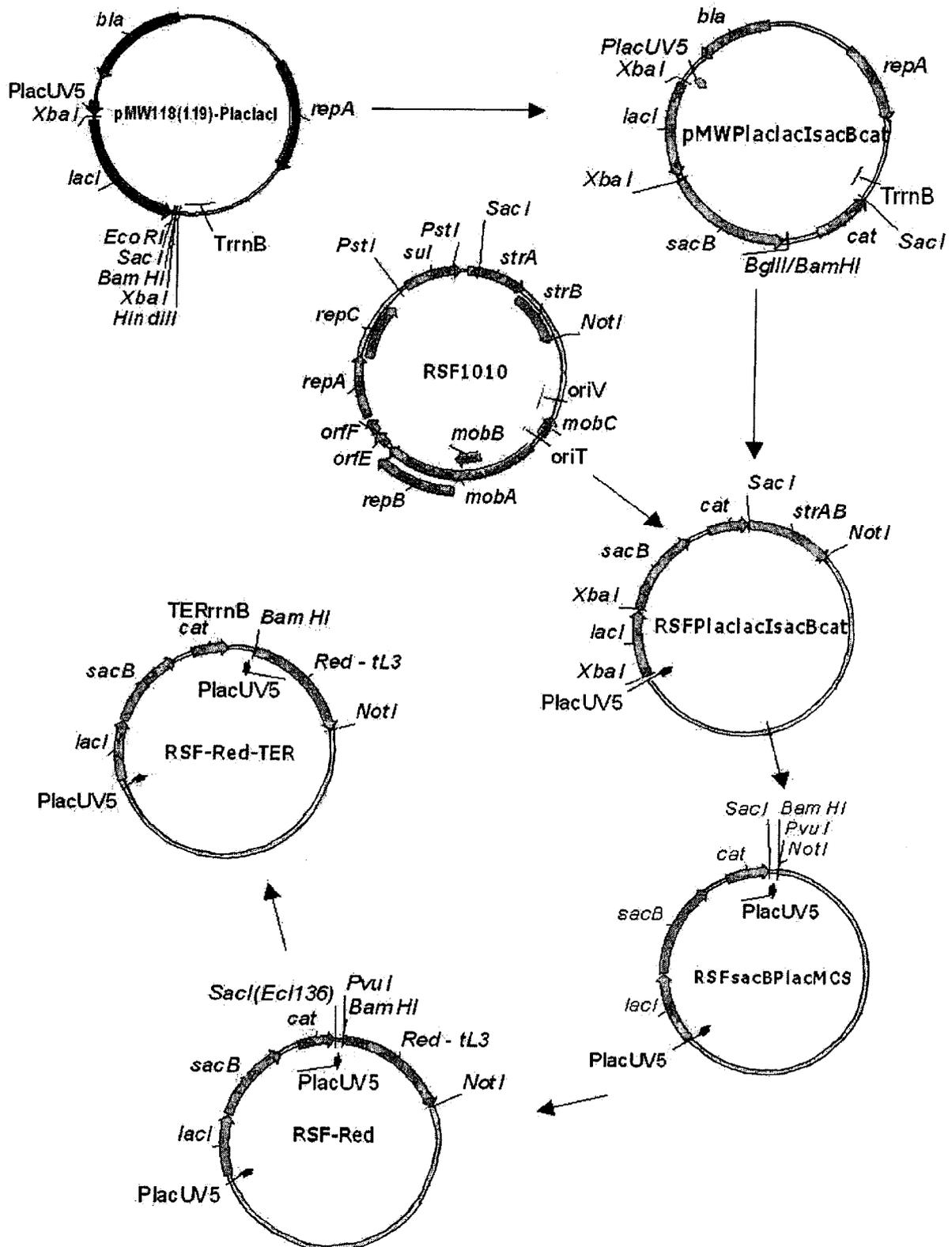
(b) 配列番号7の塩基番号543～4853に示す塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ、kdpシステムをコードするDNA。

- [9] 前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、及びL-システインからなる群から選択される一種または二種以上のL-アミノ酸である請求項1～8のいずれか一項に記載の微生物。
- [10] 前記腸内細菌科に属する微生物が、エシエリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌またはパントエア属細菌である請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物。
- [11] 請求項1～10のいずれか一項に記載の微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。
- [12] 前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、及びL-システインから選択される一種または二種以上のL-アミノ酸である、請求項11に記載の方法。

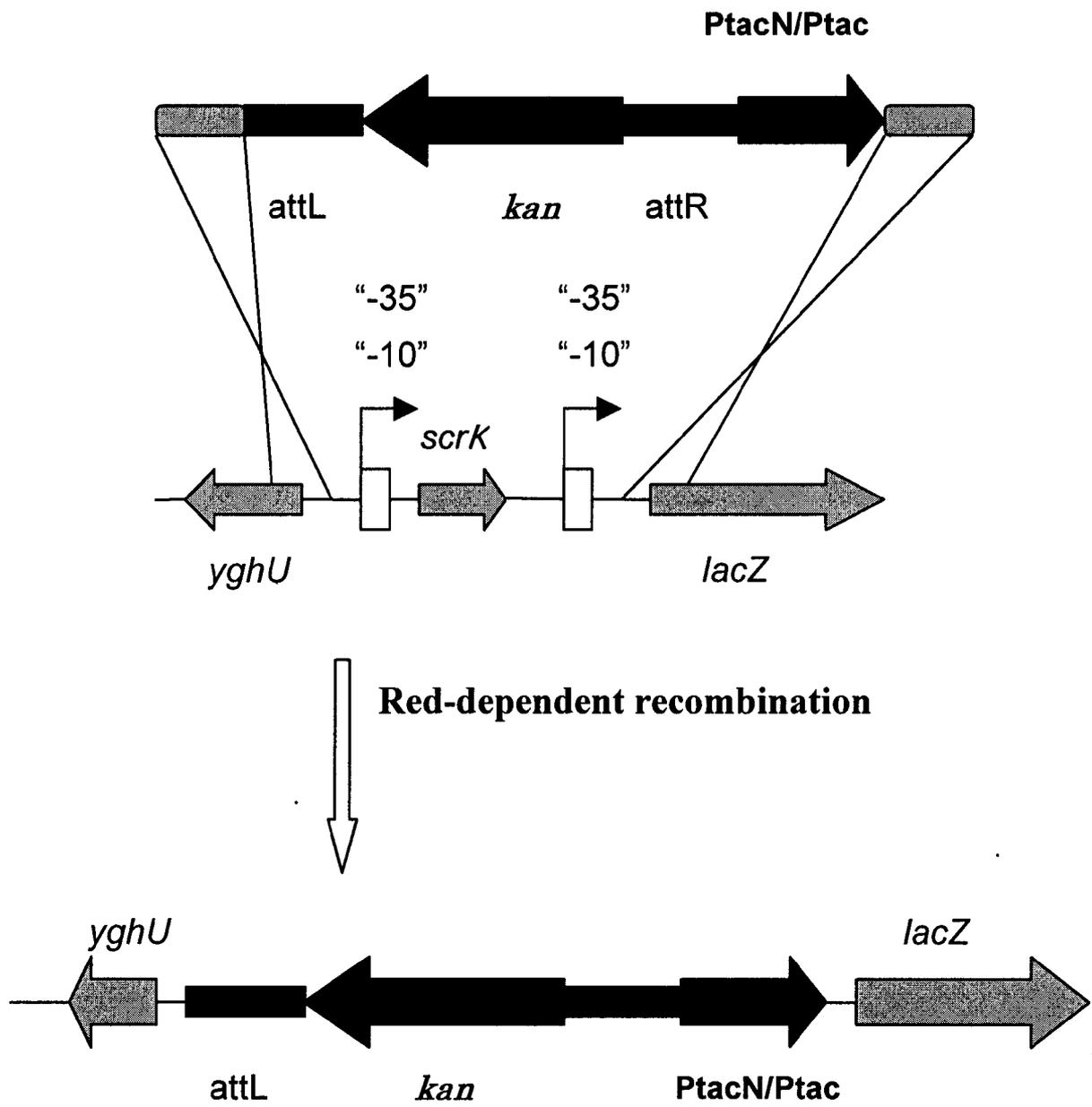
[図1]



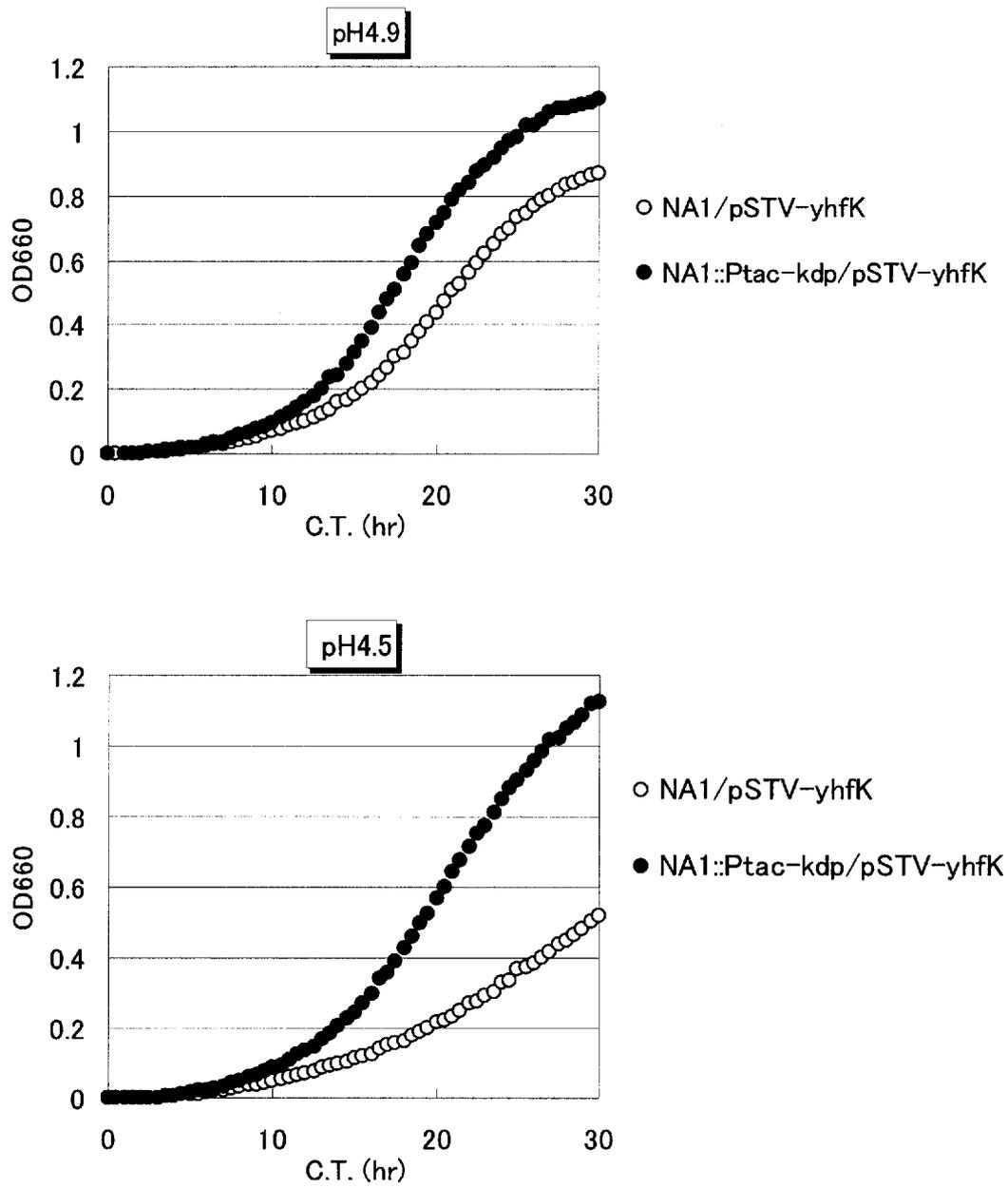
[図2]



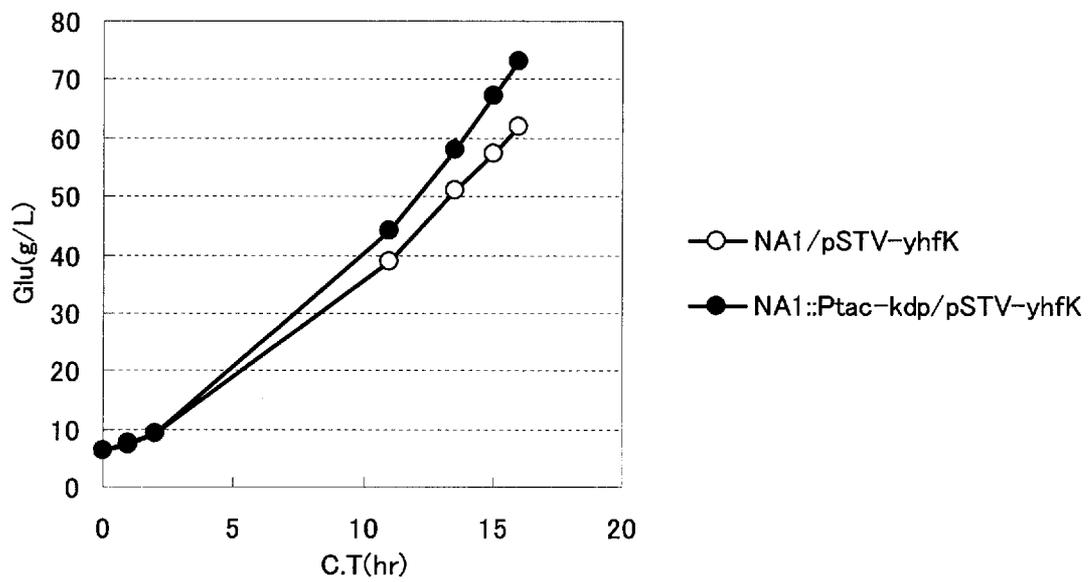
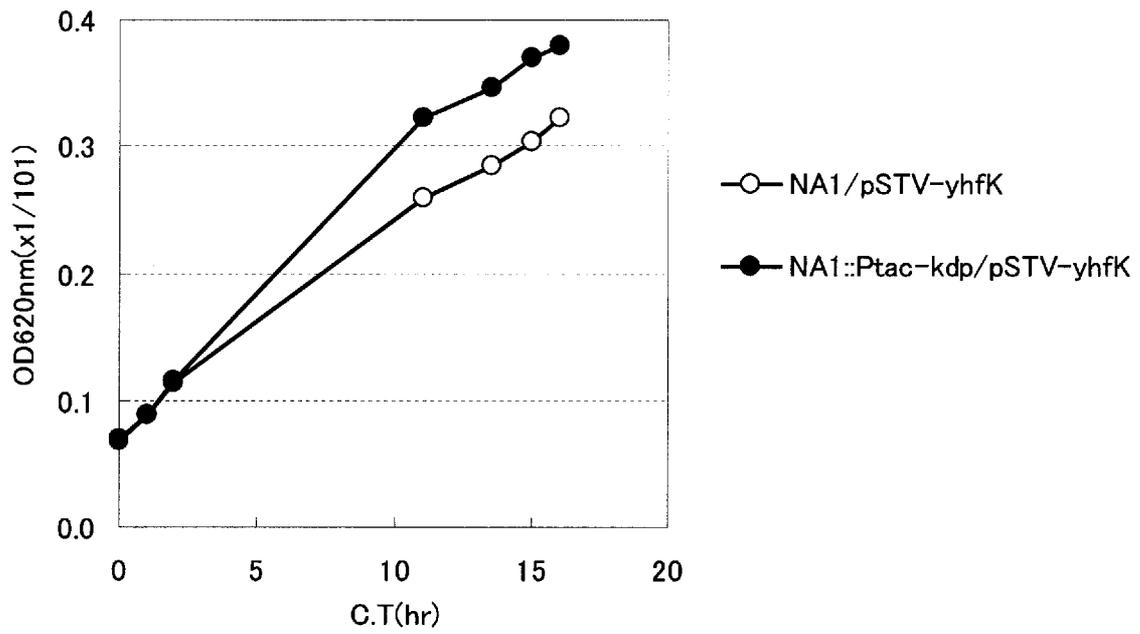
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]

		1	50
KdpA_P. ananatis	(1)	MAANAFLLIAVYLLLLMVMAQPLGRGLAALVADKPLFAR--AEALLWRFS	
KdpA_E. coli	(1)	MAAQGFLLIATFLLVLMVLARPLGSGLARLINDIPLPGTTGVERVLFRAL	
Consensus		MAAXXFLLIAXLXLXLMVXAXPLGXGLAXLXXDXPLXXXXXXXXEXLXRX	
		51	100
KdpA_P. ananatis	(49)	GVQEGMRWQHLYLLAILVFNLLGFVLLAILMFQALPLNPQHLPLGLSWD	
KdpA_E. coli	(51)	GVSDREMWNKQYLCAILGLNMLGLAVLFFMLLGQHYLPLNPQQLPLGLSWD	
Consensus		GVXXXXXWXXYLXAILXXNXLGGXXVXXXXLXXQXXLPLNPQXLPGLSWD	
		101	150
KdpA_P. ananatis	(99)	LALNTAISFVTNTNWQSYAGESTLSYFSQMVGLTVQNFVSAATGIAVAF	
KdpA_E. coli	(101)	LALNTAVSFVTNTNWQSYSGETLSYFSQMAGLTVQNFLSAASGIAVIFA	
Consensus		LALNTAXSFVTNTNWQSYXGEXTLSYFSQMXGLTVQNFSAAXGIAVXFA	
		151	200
KdpA_P. ananatis	(149)	LIRGFANRSVATLGNAWRDLTRITLYVLLPISLLMALFFVSQGSIQNFLP	
KdpA_E. coli	(151)	LIRAFTRQSMSTLGNAWVDLLRITLWVLPVALLIALFFIQGALQNFLP	
Consensus		LIRXFXXSXXTLGNAWDXLXRI TLXVLPXLLXALFFXXGXXQNFLP	
		201	250
KdpA_P. ananatis	(199)	YHNVTSLEGAQQTAMGPVASQEAIKMLGTNGGGFFNVNSAHPFENPTAL	
KdpA_E. coli	(201)	YQAVNTVEGAQQLLPMGPVASQEAIKMLGTNGGGFFNANSSHPFENPTAL	
Consensus		YXXVXXXEGAAQQLXMGPVASQEAIKMLGTNGGGFFNXNSHPFENPTAL	
		251	300
KdpA_P. ananatis	(249)	SNFVQMLSIFLIPALCFAFGESVKDRRQGSMLLWSMTLMFVVAALVMW	
KdpA_E. coli	(251)	TNFVQMLAIFLIPTALCFAFGEVMDRRQGRMLLWAMSIVFVICVGVVMW	
Consensus		XNFVQMLXIFLIPXALCFAFGEXXDRRQGXMLLWXMXXXFVXXXXVMW	
		301	350
KdpA_P. ananatis	(299)	AELRGNPHFLTLAGDSA INMEGKETRFGILNSSLFAVITTAASCGAVNAM	
KdpA_E. coli	(301)	AEVQGNPHLLALGTDSSINMEGKESRFGVLVSSLFAVVTTAASCGAVIAM	
Consensus		AEXXGNPHXLXLGDXSINMEGKEXRFGXLXSSLFAVXTTAASCGAVXAM	
		351	400
KdpA_P. ananatis	(349)	HDSFTALGGMVPMMLLQMGVVFVGGVAGLYGMLLVLLAVFIAGLMIGR	
KdpA_E. coli	(351)	HDSFTALGGMVPMWMLQIGEVVFGVGSGLYGMMLLVLLAVFIAGLMIGR	
Consensus		HDSFTALGGMVPMXLMQXGEVVFVGGVXGLYGMXLLVLLAVFIAGLMIGR	
		401	450
KdpA_P. ananatis	(399)	TPEFLGKKIDVWEMKMTALAILVTPALVLTGTATAMMTDAGRAGMANPGT	
KdpA_E. coli	(401)	TPEYLGKKIDVREMKLTAAILVTPTLVLMGAALAMMTDAGRASAMLNPGP	
Consensus		TPEXLGKKIDVXEMKXTALAILVTPXLVXLGXAXAMMTDAGRXXMXNPGX	
		451	500
KdpA_P. ananatis	(449)	HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLNANTPFWNLLAVCMFVGRFGIIPV	
KdpA_E. coli	(451)	HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLSANSPFWNCLLAFCMFVGRFGVIIPV	
Consensus		HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLXANXPFWNXLLAXCMFVGRFGXIIPV	
		501	550
KdpA_P. ananatis	(499)	MAIAGAMAVKKVQPVGNTLPHTGPLFIALLVGTVLLVGALTFIPALALG	
KdpA_E. coli	(501)	MAIAGSLVSKKSQAASSGTLPTHGPLFVGLLIGTVLLVGALTFIPALALG	
Consensus		MAIAGXXXXKXQXXXGTLPTHGPLFXXLLXGTVLLVGALTFIPALALG	
		551	562
KdpA_P. ananatis	(549)	PVAEHLQLIQGQ	
KdpA_E. coli	(551)	PVAEYLS	
Consensus		PVAEXLX	

[図7]

KdpB_P. ananatis	(1)	1	50
KdpB_E. coli	(1)	MSR-QQQVFDAALLRTSAIDAVKKLDPRVQFRNPVMFVVYLGSLTSLILA	
Consensus		MSRXQXXXFXLXXXXXXAVKKLXPXXQXRNPMFVXXGSXLTXXX	
KdpB_P. ananatis	(50)	51	100
KdpB_E. coli	(51)	IMMFTGHQSGSASFTGAIALWLFVLFANMAEALAEGRSKAQANSLKGV	
Consensus		IAMASGAMPGNALFSAATSGWLWITVLFANFAEALAEGRSKAQANSLKGV	
KdpB_P. ananatis	(100)	101	150
KdpB_E. coli	(101)	KKTSFAKKLSAAHYGAAWQVAADALRKGDVAVLEAGDVIPCDGEVVEGG	
Consensus		KKTAFAKRLREPKYGAADKVPADQLRKGDIVLVEAGDIIPCDGEVIEGG	
KdpB_P. ananatis	(150)	151	200
KdpB_E. coli	(151)	ASVDESAITGESAPVIRESGGFASVTGGTRILSDWLVTCSANPGETFL	
Consensus		ASVDESAITGESAPVIRESGGFASVTGGTRILSDWLIECSVNPGETFL	
KdpB_P. ananatis	(200)	201	250
KdpB_E. coli	(201)	DRMIAMVEGAQRKTPNEIALTILLVSLTIVFLLATVTLWPFSAWGGTPV	
Consensus		DRMIAMVEGAQRKTPNEIALTILLIALTIVFLLATATLWPFSAWGGNAV	
KdpB_P. ananatis	(250)	251	300
KdpB_E. coli	(251)	TITVLVALLVCLIPTTIGLLSAIGVAGMSRMLGANVIATSGRAVEAAGD	
Consensus		SVTVLVALLVCLIPTTIGLLSAIGVAGMSRMLGANVIATSGRAVEAAGD	
KdpB_P. ananatis	(300)	301	350
KdpB_E. coli	(301)	VDVLMDDKTGTITLGNRQATQFLPAPGVTEEQLADAAQLASLADETPEGR	
Consensus		VDVLLDDKTGTITLGNRQASEFIPAQGVDEKTLADAAQLASLADETPEGR	
KdpB_P. ananatis	(350)	351	400
KdpB_E. coli	(351)	SIVVLAKQKFNLRERDLSSMGASFIPFSAQTRMSGVNVQDRLIRKGAVDA	
Consensus		SIVLAKQRFNLRERDVQSLHATFVPFTAQSRMSGINIDNRMIRKGSVDA	
KdpB_P. ananatis	(400)	401	450
KdpB_E. coli	(401)	VRRHIEASHGAFPAEVNARVEEVARAGGTPLVVAEGAKVLGVVALKDIVK	
Consensus		IRRHVEANGGHFPTDQKVDQVARGATPLVVVEGSRVLGVIALKDIVK	
KdpB_P. ananatis	(450)	451	500
KdpB_E. coli	(451)	GGIKERFAELRKMGIKTVMITGDNPLTAAATAAEAGVDDFLSEATPEAKL	
Consensus		GGIKERFAQLRKMGIKTVMITGDNRLTAAATAAEAGVDDFLAEATPEAKL	
KdpB_P. ananatis	(500)	501	550
KdpB_E. coli	(501)	ALIRQYQAEGRVAMTGDGTNDAPALAQADVAVAMNSGTQAAKEAGNMVD	
Consensus		ALIRQYQAEGRVAMTGDGTNDAPALAQADVAVAMNSGTQAAKEAGNMVD	
KdpB_P. ananatis	(550)	551	600
KdpB_E. coli	(551)	LDSNPTKLLLEVHIGKQMLMTRGSLTTFSIANDVAKYFAIIPAAFAATYP	
Consensus		LDSNPTKLEVVHIGKQMLMTRGSLTTFSIANDVAKYFAIIPAAFAATYP	
KdpB_P. ananatis	(600)	601	650
KdpB_E. coli	(601)	QLNMLNVMQLHSPASAILS AVIFNALVIVFLIPLALKGVSYPPLSAASLL	
Consensus		QLNALNIMCLHSPDASAILS AVIFNALIIVFLIPLALKGVSYPPLTASAML	
KdpB_P. ananatis	(650)	651	683
KdpB_E. coli	(651)	RRNLLIYGLGGLLVPFVGIKVIDMLLVLSGMA	
Consensus		RRNLWIYGLGGLLVPFVGIKVIDMLLVLSGMA	

[図8]

		1	50
KdpC_P. ananatis	(1)	MSQLRPAIFLLLLLVVCGVVYPLLTGLSQLLFPWQANGSVLNV DGEER	
KdpC_E. coli	(1)	MSGLRPALSTFIFLLLITGGVYPLLTIVLGQWWFPWQANGSLIREGDTVR	
Consensus		MSXLRPAXXXXXLXXXXGXVYPLLTXLXQXXFPWQANGSXXXXXXXXR	
		51	100
KdpC_P. ananatis	(51)	GSALIGQNFSQPGYFWGRPSATGDKPYNPLASSGSNLAASNPA LDKAVAE	
KdpC_E. coli	(51)	GSALIGQNFTGNGYFHGRPSATAEMPYNPQASGGSNLAVSNPE LDKLIAA	
Consensus		GSALIGQNFXXXGYFXGRPSATXXXPNPXASXGSNLAXSNPXL DXXXAX	
		101	150
KdpC_P. ananatis	(101)	RVAALRTANPQANGAVPVELVTTSASGLDPEISPEAALWQAPRI AARQL	
KdpC_E. coli	(101)	RVAALRAANPDASASVPVELVTASASGLDNNITPQAAAWQIPR VAKARNL	
Consensus		RVAALRXANPXAXXXVPVELVTXSASGLDXXIXPAAAXWQXP RAXARXL	
		151	191
KdpC_P. ananatis	(151)	PLAKVDALVDSMTQRPLLPFIGEPTVNVLQLNLALNDLK	
KdpC_E. coli	(151)	SVEQLTQLIAKYSQQPLVKYIGQPVVNIVELNLALDKLDE	
Consensus		XXXXXXXXLXXXXXQPLXXXIGXPXVXXXXLNLALXXLX	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/050246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/21(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, C12P13/06(2006.01) i, C12P13/08(2006.01) i, C12P13/10(2006.01) i, C12P13/12(2006.01) i, C12P13/14(2006.01) i, C12P13/22(2006.01) i, C12P13/24(2006.01) i 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) C12N1/21, C12N15/09, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/10, C12P13/12, C12P13/14, C12P13/22, C12P13/24		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Laimins LA, Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, Vol.75, No.7, p.3216-9	1-12
A	JP 2005-278643 A (Ajinomoto Co., Inc.), 13 October, 2005 (13.10.05), (Family: none)	1-12
A	JP 2005-237379 A (Ajinomoto Co., Inc.), 08 September, 2005 (08.09.05), (Family: none)	1-12
A	JP 2000-270872 A (Ajinomoto Co., Inc.), 03 October, 2000 (03.10.00), & EP 1038970 A3	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 30 January, 2008 (30.01.08)		Date of mailing of the international search report 12 February, 2008 (12.02.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P13/06(2006.01)i, C12P13/08(2006.01)i,  
C12P13/10(2006.01)i, C12P13/12(2006.01)i, C12P13/14(2006.01)i, C12P13/22(2006.01)i,  
C12P13/24(2006.01)i

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))

Int.Cl. C12N1/21, C12N15/09, C12P13/06, C12P13/08, C12P13/10, C12P13/12, C12P13/14, C12P13/22, C12P13/24

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

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)

BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JDream2)

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 請求の範囲の番号
A	Laimins LA, Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, Vol.75, No. 7, p.3216-9	1-12
A	JP 2005-278643 A (味の素株式会社) 2005.10.13 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2005-237379 A (味の素株式会社) 2005.09.08 (ファミリーなし)	1-12

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 0 . 0 1 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 2 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100-8915  
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)

松田 芳子

4 N

3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 請求の範囲の番号
A	JP 2000-270872 A (味の素株式会社) 2000.10.03 & EP 1038970 A3	1-12