

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/52

C12N 1/20 C12P 13/08



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01103331.2

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1182246C

[22] 申请日 2001.1.31 [21] 申请号 01103331.2

[30] 优先权

[32] 2000.1.26 [33] RU [31] 2000101678

[71] 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 V·A·里夫希特斯

V·G·多罗申科

N·V·戈斯科瓦

A·V·贝拉尔耶瓦

L·V·伊瓦诺维斯卡雅

E·M·克霍尔格斯

V·Z·阿克维迪案

M·M·古斯雅蒂纳

Y·I·科兹洛夫

审查员 康宇宁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 1 页

[54] 发明名称 突变体 *ilvH* 基因和制备 L-缬氨酸的方法

[57] 摘要

一种制备 L-缬氨酸的方法，它包括以下步骤：培养携带了编码乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的 DNA 的细菌，其中该酶来源于大肠杆菌，不受 L-缬氨酸的抑制，并且具有催化从丙酮酸产生 α -乙酰乳酸和从 α -丁酮酸及丙酮酸产生 α -乙酰- α -羟基丁酸这两种反应的活性；在培养基中生产和积累 L-缬氨酸；并从培养基回收 L-缬氨酸。

ISSN 1008-4274

1. 一种编码乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的小亚基的 DNA, 所述小亚基来源于大肠杆菌, 它具有一个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基被苯丙氨酸残基取代; 或者它具有两个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代和对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被天冬氨酸残基取代。

2. 权利要求 1 的 DNA, 其中对应于 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基的突变是丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代, 对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变是甘氨酸残基被天冬氨酸残基取代。

3. 一种编码来源于大肠杆菌的乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的 DNA, 该酶不受 L-缬氨酸的抑制, 并且具有催化从丙酮酸产生 α -乙酰乳酸和从 α -丁酮酸及丙酮酸产生 α -乙酰- α 羟基丁酸这两种反应的活性, 其中 DNA 编码乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的大亚基和小亚基, 小亚基带有一个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基被苯丙氨酸残基取代, 或者对应于 29 号氨基酸的天冬酰胺残基的氨基酸残基被赖氨酸残基或酪氨酸残基取代, 或者自 91 号氨基酸下游的一个 C 末端片段缺失, 或者选自上述突变和对应于 SEQ ID NO: 2 中 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被天冬氨酸残基取代的突变的 2 种或多种突变的组合。

4. 权利要求 3 的 DNA, 其中对应于 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基的突变是丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代, 对应于 29 号氨基酸的天冬氨酸残基的氨基酸残基的突变是天冬氨酸残基被赖氨酸或酪氨酸残基取代, 对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变是甘氨酸残基被天冬氨酸残基取代。

5. 在其染色体 DNA 或质粒上携带权利要求 1 或 3 的 DNA 并具有产生 L-缬氨酸能力的细菌。

6. 权利要求 5 的细菌, 其中所说 DNA 的表达被增强。

7. 权利要求 6 的细菌，其中表达通过将所说 DNA 置于强启动子的控制之下或增加所说 DNA 的拷贝数来增强。

8. 一种制备 L-缬氨酸的方法，包括以下步骤：在一种培养基中培养权利要求 5 的细菌，在培养基中生产和积累 L-缬氨酸，并从培养基回收 L-缬氨酸。

5

突变体 *ilvH* 基因和制备 L-缬氨酸的方法

技术领域

- 5 本发明涉及通过发酵制备 L-缬氨酸的方法，具体地说，本发明涉及一种不受 L-缬氨酸反馈抑制的乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的 DNA、携带该 DNA 的微生物、以及使用这种微生物制备 L-缬氨酸的方法。

发明背景

- 10 过去，L-缬氨酸通过发酵方法来生产，主要使用属于短杆菌属、棒杆菌属或沙雷氏菌属并且能够生产 L-缬氨酸或 L-亮氨酸的微生物或其突变体（《氨基酸发酵》，日本科学协会出版，397-422 页，1986）。尽管传统的方法已经在很大程度上提高了这些氨基酸的生产，但仍需要发展一种更有效、廉价的技术，来满足将来 L-缬氨酸和 L-亮氨酸不断增长的需
15 要。

- 至于除上述细菌以外的用于 L-缬氨酸生产的细菌，其例子为，属于埃希氏菌属、生长需要硫辛酸和/或 H^+ -ATP 酶活性缺陷的 L-缬氨酸生产菌，以及属于埃希氏菌属、具有上述特征、被导入了一种能表达 *ilvG*、*ilvM*、*ilvE* 和 *ilvD* 基因的 *ilvGMEDA* 操纵子并且不表达苏氨酸
20 脱氨酶的细菌（WO96/06926）。

- L-缬氨酸生物合成的最后步骤由一组 *ilvGMEDA* 操纵子编码的酶催化。*ilvGMEDA* 操纵子包括 *ilvG*、*ilvM*、*ilvE*、*ilvD* 和 *ilvA* 基因各一个，分别编码乙酰羟酸合成酶同功酶 II 的大亚基和小亚基、转氨酶、二羧酸脱氢酶和苏氨酸脱氨酶。在这些酶中，乙酰羟酸合成酶、转氨
25 酶和二羧酸脱氢酶催化丙酮酸至 L-缬氨酸和 2-丁酮酸至 L-异亮氨酸的合成途径，而苏氨酸脱氨酶催化 L-苏氨酸至 2-丁酮酸的脱氨反应，后者是 L-异亮氨酸生物合成的限速步骤。顺便提一句，*ilvGMEDA* 操纵子的表达受 L-缬氨酸和/或 L-异亮氨酸和/或 L-亮氨酸的控制（减弱）。

- 就涉及 L-缬氨酸生物合成的乙酰羟酸合成酶而言，除了同功酶 II
30 （这里也称为 AHAS II），还知道有同功酶 III（这里也称为 AHAS III）。AHAS III 由 *ilv IH* 操纵子编码，该操纵子由编码大亚基（催化亚基）的 *ilv I* 和编码小亚基（控制亚基）的 *ilv H* 组成。AHAS III 受 L-缬氨

酸的反馈抑制。

- 顺便提一句，已经有报道，从抗 L-缬氨酸的突变体大肠杆菌中克隆的 *ilvH* 基因具有一个 ¹⁴gly 至 asp 的氨基酸取代 (Vyazmensky, M. 等, 《生物化学》35: 10339-10346 (1996))。而且, 已知 *ilvH612* 是 AHAS III 突变 (De Felice 等, 《细菌学杂志》120: 1058-1067 (1974))。大肠杆菌 MI262 (Guardiola 等, 《细菌学杂志》120: 536-538 (1974); De Felice 等, 《细菌学杂志》120: 1068-1077 (1974)) 的 *ilvIH* 操纵子中的 *ilvH* 基因含有 *ilvH612* 双重突变, 分别是 ²⁹Asn 被 Lys 取代和 ⁹²Gln 被一个终止密码子 (TAG) 取代。
- 如上所述, 编码 AHAS II 的 DNA 已被用于培育 L-缬氨酸的生产菌株, 但对于 AHAS III, 就没有这方面的报道。

发明公开

- 鉴于上面所指出的, 本发明的目的是提供一种不受 L-缬氨酸反馈抑制的乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的 DNA、携带该 DNA 的微生物、以及使用这种细菌制备 L-缬氨酸的方法。

- 作为为完成上述目的而进行的努力研究的结果, 本发明的发明者们发现, 在将从一种 L-缬氨酸抗性突变体分离的、编码缬氨酸抗性 AHAS III 的 DNA 导入大肠杆菌时, 缬氨酸的产量增加。因此完成了本发明。

即, 本发明的各方面如下:

- (1) 一种编码乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的小亚基的 DNA, 它来源于大肠杆菌, 它具有一个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基被另一种残基取代; 或者它具有两个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基和对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被另一种残基取代;

- (2) (1) 的 DNA, 其中对应于 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基的突变是丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代, 对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变是甘氨酸残基被天冬氨酸残基取代;

- (3) 一种编码来源于大肠杆菌的乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的 DNA, 该酶不受 L-缬氨酸的抑制, 并且具有催化从丙酮酸产生 α -乙酰

乳酸和从 α -丁酮酸及丙酮酸产生 α -乙酰- α 羟基丁酸这两种反应的活性;

(4) (3) 的 DNA, 其中 DNA 编码乙酰羟酸合成酶同功酶 III 的大亚基和小亚基, 小亚基带有一个突变, 即 SEQ ID NO: 2 中对应于
5 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代, 或者对应于 29 号氨基酸的天冬酰胺残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代, 或者自 91 号氨基酸下游的一个 C 末端片段缺失, 或者选自上述突变和对应于 SEQ ID NO: 2 中 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代的突变的 2 种或多种突变的组合;

10 (5) (4) 的 DNA, 其中对应于 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基的突变是丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代, 对应于 29 号氨基酸的天冬氨酸残基的氨基酸残基的突变是天冬氨酸残基被赖氨酸或酪氨酸残基取代, 对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变是甘氨酸残基被天冬氨酸残基取代;

15 (6) 在其染色体 DNA 或质粒上携带 (1) 或 (3) 的 DNA 并具有产生 L-缬氨酸能力的细菌;

(7) (6) 的细菌, 其中 DNA 的表达被增强;

(8) (7) 的细菌, 其中表达通过将 DNA 置于强启动子的控制之下或增加 DNA 的拷贝数来增强;

20 (9) 一种制备 L-缬氨酸的方法, 包括以下步骤: 在一种培养基中培养 (6) 的细菌, 在培养基中生产和积累 L-缬氨酸, 并从培养基回收 L-缬氨酸。

下面将对本发明进行详细解释。

25 本发明的第 1 个 DNA 是编码 AHAS III 的小亚基的 DNA, 该亚基与大亚基一起显示不受 L-缬氨酸反馈抑制的乙酰羟酸合成酶活性。乙酰羟酸合成酶活性在这里指催化从丙酮酸产生 α -乙酰乳酸和从 α -丁酮酸及丙酮酸产生 α -乙酰- α 羟基丁酸这两种反应的活性。大肠杆菌的 AHAS III 小亚基具有序列中 SEQ ID NO: 2 描述的氨基酸序列。

30 上述突变选自如下的一个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基被另一种残基取代; 或者两个突变, 即对应于 SEQ ID NO: 2 中 17 号氨基酸的丝氨酸残基和对应于 14 号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被另一种残基取代。就对应于 17

号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基的突变而言，优选的例子是用苯丙氨酸残基取代丝氨酸残基，而就对应于14号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变来说，优选的例子是用天冬氨酸残基取代甘氨酸残基。

5 本发明的第2个DNA是编码AHAS III的DNA，其中所说的AHAS III不受L-缬氨酸的抑制，并且具有催化从丙酮酸产生 α -乙酰乳酸和从 α -丁酮酸及丙酮酸产生 α -乙酰- α -羟基丁酸这两种反应的活性。该DNA同时编码AHAS III的大亚基和小亚基。

小亚基带有一个突变，即SEQ ID NO: 2中对应于17号氨基酸的
10 丝氨酸残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代，或者对应于29号氨基酸的天冬酰胺残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代，或者自91号氨基酸下游的一个C末端片段缺失，或者选自上述突变和对应于SEQ ID NO: 2中14号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基被另一种氨基酸残基取代的突变的2种或多种突变的组合。带有这些突变的
15 AHAS III小亚基在这里也被称为AHAS III的小亚基突变体。就对应于17号氨基酸的丝氨酸残基的氨基酸残基突变而言，优选的例子是丝氨酸残基被苯丙氨酸残基取代，就对应于29号氨基酸的天冬氨酸残基的氨基酸残基而言，例子是天冬氨酸残基被赖氨酸或酪氨酸残基取代，而就对应于14号氨基酸的甘氨酸残基的氨基酸残基的突变而言，
20 优选的例子是甘氨酸残基被天冬氨酸残基取代。

本发明的DNA获自大肠杆菌的L-缬氨酸抗性突变体，但它也可通过定点诱变将上述突变导入编码野生型AHAS III的DNA来获得。AHAS III由ilvIH操纵子编码。ilvIH操纵子可通过诸如PCR扩增ilvH基因的启动子区域至3'末端的DNA片段来获得，PCR使用具有示于
25 SEQ ID NO: 3和4的序列的引物，并使用大肠杆菌的基因组DNA作为模板。ilvIH操纵子的核苷酸序列已经知道（Genbank/EMBL/DDBJ accession X55034）。ilvH的编码区的核苷酸序列在SEQ ID NO: 1中描述。

30 本发明的DNA编码的AHAS III的突变体小亚基可以具有一种含有一个或几个氨基酸取代、缺失、插入、添加或倒位以及上述突变的氨基酸序列，只要突变体小亚基能够与大亚基一起显示不受L-缬氨酸反馈抑制的乙酰羟酸合成酶活性。

编码与上面介绍的突变体小亚基基本上相同的蛋白的 DNA，可通过诸如修饰核苷酸序列，例如通过定点诱变的方法使特殊位点的一个或多个氨基酸残基被取代、缺失、插入、添加或倒位，来获得。按上面的介绍修饰的 DNA 可以通过传统已知的突变处理来获得。突变处理包括例如用羟胺在体外处理编码小亚基的 DNA 的方法；以及用紫外线辐射或一种突变试剂如通常用于突变处理的 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)和亚硝酸处理一种属于埃希氏菌属并携带编码小亚基的 DNA 的细菌的方法。

编码与 AHAS III 突变体小亚基基本上相同的蛋白的 DNA 通过如下方法来获得：在一种合适的细胞中以多拷贝的方式表达含有上述突变的 DNA，研究对 L-缬氨酸的抗性，并选择抗性提高的 DNA。而且通常知道，一种蛋白质的氨基酸序列以及编码它的核苷酸序列在菌株、突变体或变异体之间有少量的差别，因此，编码基本上相同的蛋白的 DNA 可从属于埃希氏菌属的 L-缬氨酸抗性的种、菌株、突变体和变异体中获得。

具体地说，编码与突变体小亚基基本上相同的蛋白的 DNA 可通过如下方法来获得：从经过突变处理的、属于埃希氏菌属的细菌或一种属于埃希氏菌属的细菌的自发突变体或变异体中，分离一种 DNA，该 DNA 能够与具有诸如示于序列表的 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列在严紧条件下杂交，并且编码具有乙酰羟酸合成酶活性的蛋白。术语“严紧条件”在这里指这样一种条件，在该条件下，特异性杂交体形成而非特异性杂交体不能形成。使用任何数值都很难清楚地表述这种条件。但是，例如，严紧条件包括这样一种条件，在该条件下，具有高度同源性的 DNAs 例如彼此的同源性不低于 70% 的 DNAs 能够杂交，并且彼此的同源性低于上面的介绍的 DNAs 不能杂交。

本发明的细菌携带有本发明的第 1 种 DNA 或第 2 种 DNA，并具有产生 L-缬氨酸的活性。这种细菌没有特别的限制，只要它具有一种涉及乙酰羟酸合成酶的 L-缬氨酸生物合成途径。其例子是属于埃希氏菌属、棒状细菌和沙雷氏菌属的细菌，优选是埃希氏菌属的细菌。属于埃希氏菌属的细菌的具体例子是大肠杆菌。

将本发明的 DNA 导入一种细菌的方法的例子包括，诸如细菌用含有本发明的 DNA 的质粒转化的方法；本发明的 DNA 通过同源重组整

合进细菌的染色体 DNA 的方法等等。

本发明的 DNA 的表达优选被增强。表达的增强通过将本发明的 DNA 置于强启动子的控制之下或扩增 DNA 的拷贝数来完成。例如，已知 lac 启动子、trp 启动子、trc 启动子、tac 启动子、λ噬菌体的 P_R 启动子、P_L 启动子、tet 启动子、amyE 启动子和 spac 启动子是强启动子。而且，可以在多拷贝载体上维持 DNA 或将多拷贝的 DNA 导入染色体 DNA 来增加本发明的 DNA 的拷贝数。多拷贝载体的例子是 pBR322、pTWV228、pMW119 和 pUC19 等。

为将含有本发明的 DNA 的载体导入宿主细菌，可以使用任何已知的转化方法。例如，可以使用的方法有：用氯化钙处理受体细胞来增加 DNA 的通透性的方法，这种方法已被报道用于大肠杆菌 K-12（见 Mandel, M.和 Higa, A.《分子生物学杂志》53 卷，159 页（1970））；和从处于生长期的细胞制备感受态细胞，接着将 DNA 导入其中的方法，这种方法已被用于枯草芽孢杆菌（见 Duncan, C.H., Wilson, G.A.和 Young, F.E.《基因》1: 153（1977））。除了这些，还可使用的方法是将 DNA 受体细胞制备成容易摄取重组 DNA 的原生质体或球质体，接着将重组 DNA 导入细胞，这种方法已知被用于枯草芽孢杆菌、放线菌和酵母（见 Chang, S.和 Choen, S.N.,《普通分子遗传学》168: 111（1979）；Bibb, M.J., Ward, J.M.和 Hopwood, O.A.,《自然》274: 398（1978）；Hinnen, A., Hicks, J.B.和 Fink, G.R.,《美国科学院院刊》75: 1929（1978）），或者用于本发明的实施方案中的转化方法是电脉冲方法（参见日本专利公开 No.2-207791）。

可以使用的、将本发明的 DNA 导入细菌染色体 DNA 的方法包括，使用线性化 DNA 的方法和使用含有温度敏感的复制起始区域的质粒的方法。此外，本发明的 DNA 可通过转导从在染色体上携带本发明的 DNA 的细菌导入一种细菌。

为将多拷贝的本发明的 DNA 导入一种细菌的染色体 DNA，使用一种序列作为靶进行同源重组，其中该序列的多拷贝存在于染色体 DNA 中。就多拷贝存在于染色体 DNA 中的序列而言，可以使用存在于转座因子的末端的重复 DNA、反向重复 DNA。而且，如同在日本专利公开 No. 2-109985 中的公开，可以将本发明的 DNA 整合进转座子，使其能够通过转座将多拷贝的 DNA 导入染色体 DNA。

导入本发明的 DNA 的细菌可以是一种通过导入本发明的 DNA 而获得 L-缬氨酸产生能力的细菌以及本身具有 L-缬氨酸产生能力的细菌。

具有 L-缬氨酸产生能力的细菌的例子包括诸如大肠杆菌 VL1970 (美国专利 5 658 766)。此外, 优选使用 WO96/06926 中介绍的诸如属于埃希氏菌属、生长需要硫辛酸和/或 H⁺-ATP 酶活性缺陷的 L-缬氨酸生产菌, 或者属于埃希氏菌属并被导入了一种能表达 *ilvG*、*ilvM*、*ilvE* 和 *ilvD* 基因的 *ilvGMEDA* 操纵子的细菌。因为 *ilvGMEDA* 操纵子的表达受 L-缬氨酸和/或 L-异亮氨酸和/或 L-亮氨酸的控制(减弱), 优选将对减弱作用重要的区域缺失或突变, 来使表达抑制对产生的 L-缬氨酸脱敏。另一种途径提出引入突变 (*ileS* 或 *valS*) 来影响氨酰-tRNA 合成酶, 使之对相应的氨基酸具有降低的亲合性 (K_m 增加)。而且, 优选使用不表达活性苏氨酸脱氨酶的操纵子。

含有 *ileS17* 突变并且减弱作用如上所述脱敏的大肠杆菌 VL1970 已经在俄罗斯国立工业微生物保藏中心 (VKPM), GNIIGenetika, (1, Dorozhny Proezd., , 113545, Moscow, Russia) 进行了保藏, 保藏号为 VKPM B-4411。

所用的方法, 例如杂交、PCR、质粒 DNA 制备、DNA 的消化和连接以及转化, 由 Sambrook, J., Fritsche, E.F., Maniatis, T. 在《分子克隆》Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989) 中介绍。

L-缬氨酸的制备按下面的方法进行, 在一种培养基中培养具有 L-缬氨酸生产能力的细菌, 制备缬氨酸并在培养基中积累, 从培养基中回收 L-缬氨酸。

在本发明中, 培养、从培养基中回收和纯化 L-缬氨酸等可以与传统的使用微生物生产氨基酸的发酵方法相似的方式进行。用于培养的培养基可以是一种合成培养基或一种天然培养基, 只要该培养基含有碳源和氮源和矿物质, 并且在需要时含有适当数量的微生物生长所需要的营养物质。碳源可包括各种碳水化合物如葡萄糖和蔗糖以及各种有机酸。根据所用微生物的同化模式, 可以使用醇类包括乙醇和甘油。就氮源而言, 可以使用各种铵盐如氨和硫酸铵、其他含氮化合物如胺、天然氮源如蛋白胨、大豆水解物和消化的发酵微生物。就矿物质而言, 可以使用单磷酸钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、碳酸钙等。

培养优选在有氧条件下例如振荡培养、通气和搅拌培养在 20 至 40°C 的温度下优选 30 至 38°C 下进行。培养的 pH 通常在 5 至 9 之间，优选在 6.5 至 7.2 之间。培养物的 pH 可用氨、碳酸钙、各种酸、各种碱和缓冲液进行调节。在通常情况下，1 至 3 天的培养将导致靶 L-缬氨酸在液体培养基中积累。

培养之后，固体如细胞可通过离心和膜过滤从液体培养基中除去，接着靶 L-缬氨酸可通过离子交换、浓缩和结晶方法收集和纯化。

附图简述

图 1 显示用于获得只含有一个突变“¹⁴Gly 至 Asp”的突变体 *ilvH* 基因的 PCR 引物；

图 2 显示用于获得只含有一个突变“¹⁷Ser 至 Phe”的突变体 *ilvH* 基因的 PCR 引物。

实施本发明的最佳方式

以下参照实施例来介绍本发明。

(1) 大肠杆菌 W3350 的 L-缬氨酸抗性菌株

在含有 0.1 mg/ml 的 L-缬氨酸的基础培养基上从大肠杆菌野生型菌株 W3350 中选择一个 L-缬氨酸抗性突变体。这样获得的突变体 W3350 Val_{0.1}^R 对浓度不超过 1 mg/ml 的 L-缬氨酸具有抗性。

接着将插入了转座子 Tn10 (Leu: : Tn10) 的亮氨酸操纵子 (*leuABCD*) 通过 P1 转导导入 W3350 Val_{0.1}^R。从 W3350 Val_{0.1}^R Leu: : Tn10 转导子中，诱导了一株双突变体菌株，该菌株能够在含有 20 mg/ml 的缬氨酸和 0.05 mg/ml 的 L-亮氨酸的基础培养基中生长。

(2) L-缬氨酸生产菌株 VL1991 的培育

大肠杆菌 VL1970 (VKPM B-4411, 美国专利 5 658 766) 被导入了一种参与抵抗高浓度的苏氨酸 (>40 mg/ml) 或高丝氨酸 (>5 mg/ml) 的基因，该基因分离自带有一个参与抗性的突变 (*rhtA23*) 的菌株 B3996 (美国专利 5 705 371)。这样就获得了菌株 VL1971。

然后通过使用 P1 噬菌体的转导将来自大肠杆菌 VL478 的蔗糖利

用基因导入 VL1971, 获得 VL1972. 然后自 VL1972 诱导一种自发突变体 VL1991, 该菌株比亲本菌株长得快。

(3) 将 L-缬氨酸抗性导入 VL1991

5 通过 P1 转导将上面提到的双重突变体中含有的突变导入 VL1991. 从转导子中选择一种 Leu⁺的自发突变体. 该突变体被命名为 VL1997. 接着将插入了转座子 Tn10 (ilvD: : Tn10) 的 ilvD 基因通过 P1 转导导入 VL1997, 获得 VL1997 ilvD: : Tn10. 然后用来自大肠杆菌菌株 B 的 ilvGMEDA 操纵子转导 VL1997 ilvD: : Tn10. 从这样获得的 VL1998 中选择了一种自发突变体 VL1999, 该菌株比亲本菌株长得快。

(4) L-缬氨酸生产菌株 VL1999/pVL715

15 菌株 VL1999 用质粒 pVL715 转化, 获得重组缬氨酸生产菌株 VL1999/pVL715. 质粒 pVL715 按如下方法构建. 从含有 ilv 基因 (ilvGMEDAYC) 的质粒 pVR12 (Gavrilova 等, 《生物技术》(俄文), 4, No5, 600-608 (1988) 切下含有该基因的 BamHI-XmaII DNA 片段, 并接着插入一种 RSF1010 衍生物 (Chistoserdov 和 Tsygankov 《质粒》1986, 16 卷, 161-167 页) ---pAYC32, 取代 pAYC32 的 BamHI-XmaII DNA 片段, 产生质粒 pVS712. 然后从 pVS712 衍生质粒 pVL715, 后者按如下介绍抑制影响缬氨酰-tRNA 合成酶的 valS91 突变 (美国专利 5 658 766). 将 pVS712 导入 valS91 突变体. 所产生的菌株 ValS91/pVS712 如受体菌一样保留了缬氨酸自养性. 然后选择能够在不含缬氨酸的基础培养基上生长的“回复子”. 在一些回复子中, 这种特性是由 pVS712 质粒中含有的 ilvGMEDAYC 基因中的一个突变引起的。从 25 一个“回复子”中, 分离了质粒 pVL715. 在含有 pVL715 的大肠杆菌菌株中, 至少 AHAS 活性与含有 pVS712 的菌株相比被提高。

(5) 提供 L-缬氨酸抗性的突变的鉴定

30 从 W3350 Val_{0.1}^R 和 VL1997 中, 对 ilvIH 基因进行了克隆和测序. ilvIH 基因通过使用具有示于 SEQ ID NO: 3 和 4 的序列的引物、用 PCR 扩增 ilvIH 基因的启动子区域至 3'末端的 DNA 片段来克隆, PCR 在下

列条件下进行：94°C 60 秒、48°C 30 秒、72°C 90 秒、30 个循环。扩增的 *ilvIH* 基因用 Klenow 片段处理，并克隆进 pUC19 载体的 HincII 位点，产生 pILVIH1 和 pILVIH2。用同样的方式，将野生型 *ilvIH* 操纵子从菌株 W3350 克隆进 pUC19，获得 pILVIH。

5 序列比较分析显示，W3350 Val_{0.1}^R 的突变体 *ilvIH* 操纵子在 SEQ ID NO: 1 的 50 位核苷酸处含有一个取代：“C”至“T”，而 VL1997 的突变体 *ilvIH* 操纵子含有两个取代：在 SEQ ID NO: 1 的 50 位核苷酸处的“C”至“T”和 41 位核苷酸处的“G”至“A”。这些突变导致 ¹⁷Ser 至 Phe 和 ¹⁴Gly 至 Asp 的氨基酸取代。¹⁷Ser 至 Phe 和 ¹⁴Gly 至 Asp 的突变分别可以被称为 *ilvHI1* 突变和 *ilvHI2* 突变。含有一个或两个这些突变的 *ilvH* 基因分别被命名为 *ilvH1*、*ilvH2* 和 *ilvH1, 2*。

(6) 从 *ilvH1, 2* 突变基因分离 *ilvHI1* 突变和 *ilvHI2* 突变

为阐明 *ilvH1, 2* 的每个突变的影响，使用 PCR 通过定点诱变分离
15 这些突变。

为获得仅含一个突变：¹⁴Gly 至 Asp 的突变体 *ilvH* 基因，利用如下事实，即此突变产生了一个单一的 Mlu 位点（图 1）。因此，合成了两条具有示于 SEQ ID NO: 5 和 6 的序列的引物。

使用上述引物，用 PCR 对质粒 pILVIH1, 2 进行扩增，该质粒中
20 克隆了 *ilvH1, 2* 基因。这样，就制备了两翼为 Mlu 位点的约 5 kb 的线性 DNA 片段。将此 PCR 片段用 Mlu 切割，并接着连接，产生环形的质粒 pILVIH2，该质粒仅含靶突变。这也被序列分析证明。

为获得仅含一个突变：¹⁷Ser 至 Phe 的突变体 *ilvH* 基因，设计了两条具有示于 SEQ ID NO: 7 和 8 的序列的引物。

25 使用这些引物，用 PCR 对含有野生型 *ilvIH* 操纵子的质粒 pILVIH 进行扩增。所产生的 PCR 片段两翼为 Stu I 位点，该位点由用 ATA（编码 Ile）取代适当密码子 ATT 来产生。片段用 Stu I 切割并连接，产生环形质粒 pILVIH1'，该质粒含有新导入的突变点 ¹⁷Ser 至 Phe。这通过对质粒的 *ilvH1* 基因进行测序来证明。

30

(7) 提供 L-缬氨酸抗性的其他突变的鉴定

在以上面介绍的同样方式获得的大肠杆菌 W3350 的两个 L-缬氨酸

抗性突变体中，对 *ilvH* 基因进行了克隆和测序。结果显示，在一个突变体中，产生了位于 SEQ ID NO: 1 的 85 位核苷酸的“T”取代“A”，在另一个突变体中产生了位于 SEQ ID NO: 1 的 87 位核苷酸的“A”取代“C”，通过这些突变，²⁹Asn 分别被 Tyr 或 Lys 取代。²⁹Asn 至 Tyr 和 ²⁹Asn 至 Lys 的突变分别可以被称为 *ilvH3* 和 *ilvH4*。从这些突变体将 *ilvIH* 操纵子克隆进 pUC19，分别获得 pILVIH3 和 pILVIH4。

用同样的方式，将 *ilvIH* 操纵子克隆进来自大肠杆菌 MI262 (*IlvI*, *IlvB*, *IlvG*) 的 pUC19，获得 pILVIH262，其中该菌株获自大肠杆菌遗传保藏中心，其 AHAS III 具有一个已知的突变 *ilvH612* (Guardiola 等, 《细菌学杂志》120: 536-538 (1974); De Felice 等, 《细菌学杂志》120: 1068-1077 (1974))。pILVIH262 的操纵子中的 *ilvH* 基因具有下列突变 (*ilvH612*): SEQ ID NO: 1 的 87 位核苷酸处的“C”至“A”和 SEQ ID NO: 1 的 274 位核苷酸处的“C”至“T”。通过这些突变 ²⁹Asn 被 Lys 取代, ⁹²Gln 被一个终止密码子 (TAG) 取代。顺便提一句, MI262 中的 *ilvIH* 操纵子的 *ilvI* 基因具有一个突变 (*ilvI614*), 这样 *ilvI* 基因的表达产物不显示酶活性。用含有野生型 *ilvI* 基因的 pILVIHA 的 BamHI 片段取代含有突变的 *ilvI* 基因的 pILVIH262 的 BamHI 片段, 获得 pILVIH612。

20 (8) 将 *ilvH1* 基因导入大肠杆菌的野生型菌株

使用以前介绍的方法 (Parker 和 Marinus, 1988, 《基因》73 卷, 531-535 页) 将突变体 *ilvH1* 基因导入大肠杆菌菌株 W3350 的染色体。这样就获得菌株 W3350 *ilvH1*。已经证明, 该菌株能抵抗高达 1 mg/ml 的 L-缬氨酸, 也就是说, 它显示与菌株 W3350 Val_{0.1}^R 相同的抗性水平。

25 这样, 通过对 *ilvH1* 基因以及通过定点诱变从 *ilvH1*, 2 突变体的 *ilvH2* 突变分离的 *ilvH1* 突变的序列分析, 我们证明了突变点: ¹⁷Ser 至 Phe 能够赋予细胞对 L-缬氨酸低水平的抗性。

30 (9) 各种 *ilvH* 突变对 AHAS III 抵抗 L-缬氨酸抑制的影响

突变 *IlvH1* (¹⁷Ser 至 Phe)、*ilvH2* (¹⁴Gly 至 Asp)、*ilvH3* (²⁹Asn 至 Lys)、*ilvH4* (²⁹Asn 至 Tyr) 和 *ilvH612* (²⁹Asn 至 Lys 和 ⁹²Gln 至一个终止密码子 TAG) 按如下方式赋予酶 AHAS III 对 L-缬氨酸抑制

的抗性。也就是说，缺乏 AHAS 活性的大肠杆菌菌株 MI262，在导入带有各种 *ilvIH* 基因的质粒之后，该菌株显示对 L-缬氨酸具有不同抗性水平的酶活性(表 1)。还可以发现，来自含有 pILVIH2 或 pILVIH612 质粒的菌株的 AHAS 显示对 L-缬氨酸具有最高抗性水平。

5

表 1 各种 *ilvH* 突变对 AHAS III 抵抗 L-缬氨酸抑制的影响

质粒	缬氨酸对 AHAS 的抑制 %	
	1 mM	10 mM
pILVIH	70	>99.9
pILVIH1	50	70
pILVIH2	0	10
pILVIH3	10	20
pILVIH4	8	12
pILVIH612	0	0

(10) 各种 *ilvH* 突变对 L-缬氨酸产生的影响

检测了各种 *ilvH* 突变对 L-缬氨酸产生的影响。将突变导入菌株 VL1970 和 VL1999/pVL715 的染色体。顺便提一句，菌株 VL1970 和 VL1999 的亲本菌株(W3350)不表达活性的乙酰羟酸合成酶 II(AHAS II)，因为该亲本菌株在 *ilvG* 基因中有一个移码突变。在另一方面，菌株 VL1970 和 VL1999 表达一种活性的 AHAS II。

在将各种 *ilvH* 突变导入菌株 VL1970 之后，获得了新菌株 VL1970 *ilvH1*、VL1970 *ilvH2*、VL1970 *ilvH3*、VL1970 *ilvH4*、VL1970 *ilvH612*。另外，在将各种 *ilvH* 突变导入菌株 VL1999/pVL715 之后，获得了新菌株 VL1999 *ilvH1,2/pVL715*、VL1999 *ilvH3/pVL715*、VL1999 *ilvH612/pVL715*。将这些菌株和相应的亲本菌株各自在 37°C 在一种营养肉汤中培养 18 小时，在含有下列组分的 20 x 200 mm 试管中的 3 ml 发酵培养基中接种 0.3 ml 所获得的培养物，在 37°C 在摇床上(250 r.p.m.)培养 72 小时。培养之后，用已知方法测定培养基中缬氨酸的积累数量和培养基在 560 nm 处的吸收值。

结果示于表 2 和表 3。在这些表中，*ilvH*⁺表示野生型 *ilvH* 基因。发酵培养基组成(g/L)：

	葡萄糖	80
	(NH ₄) ₂ SO ₄	22
	K ₂ HPO ₄	2
	NaCl	0.8
5	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.8
	FeSO ₄ *5H ₂ O	0.02
	MnSO ₄ *5H ₂ O	0.02
	盐酸硫胺素	0.2
	酵母抽提物	1.0
10	CaCO ₃	30
	(CaCO ₃ 单独灭菌)	

表 2 菌株 VL1970 中各种 *ilvH* 突变对 L-缬氨酸产生的影响

菌株	OD ₅₆₀	L-缬氨酸 (g/L)
VL1970	19.4	10.2
VL1970 <i>ilvH</i> 1	20.1	11.4
VL1970 <i>ilvH</i> 1,2	19.5	12.6
VL1970 <i>ilvH</i> 3	18.2	12.62
VL1970 <i>ilvH</i> 4	17.2	11.7
VL1970 <i>ilvH</i> 612	18.4	12.8

15

表 3 在 *ilvH* 基因中含有不同突变的菌株 VL1999/pVL715 的 L-缬氨酸产生

菌株	OD ₅₆₀	L-缬氨酸 (g/L)
VL1999 <i>ilvH</i> +/pVL715	17.6	18.7
VL1999 <i>ilvH</i> 1,2/pVL715	18.9	23.4
VL1999 <i>ilvH</i> 3/pVL715	19.4	20.6
VL1999 <i>ilvH</i> 612/pVL715	17.7	20.2

由表 2 和表 3 可以看出，导入上面介绍的 *ilvH* 突变提高了各缬氨酸产生菌株的缬氨酸产量。而且，*ilvH1* 和 *ilvH2* 突变的组合可产生最好的结果。

5 将含有各种突变体 *ilvH* 基因的 *ilvIH* 操纵子的 pUC19 衍生物导入菌株 W3350。顺便提一句，菌株 W3350 不表达活性的乙酰羟酸合成酶 II (AHAS II)，因为该亲本菌株在 *ilvG* 基因中有一个移码突变。从表 4 可以看出，所获得的转化子产生 L-缬氨酸，并且含有质粒 pILVIH1, 2 的菌株产量最高。

10 表 4 携带含不同突变体 *ilvH* 基因的质粒的菌株 W3350 的 L-缬氨酸产量

菌株	OD ₅₆₀	L-缬氨酸 (g/L)
W3350	21.4	0
W3350/pILVIH1	13.8	2.3
W3350/pILVIH1,2	10.5	8.2
W3350/pILVIH3	11.7	5.9
W3350/pILVIH4	16.4	5.5

15 以前本发明的发明者们观察到，在 L-缬氨酸发酵过程中，生产细胞中的 AHAS 活性(主要由 AHAS II 提供)逐渐降低。已经显示，AHAS III 在 45°C 的半衰期是 144 分钟，而 AHAS II 的半衰期是 44 分钟。

(Alexander-Caudle 等,《细菌学杂志》172 卷, 3060-3065 (1990))。这可能提示，AHAS III 的较高的热稳定性反应了该酶普遍增加的稳定性。因此，我们认为 L-缬氨酸抗性的 AHAS III 对 L-缬氨酸的产量具有正向的影响，因为它与 AHAS II 相比具有较高的稳定性。

20

序列表

<110> Ajinomoto, Co., Inc.

<120> 突变体ilvH基因和制备L-缬氨酸的方法

<130> OP969

<141> 2000- -

<150> RU-2000101678

<151> 2000-01-26

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 492

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(489)

<400> 1

atg cgc cgg ata tta tca gtc tta ctc gaa aat gaa tca ggc gcg tta 48

Met Arg Arg Ile Leu Ser Val Leu Leu Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu

1

5

10

15

```

tcc cgc gtg att ggc ctt ttt tcc cag cgt ggc tac aac att gaa agc 96
Ser Arg Val Ile Gly Leu Phe Ser Gln Arg Gly Tyr Asn Ile Glu Ser
          20                25                30

ctg acc gtt gcg cca acc gac gat ccg aca tta tcg cgt atg acc atc 144
Leu Thr Val Ala Pro Thr Asp Asp Pro Thr Leu Ser Arg Met Thr Ile
          35                40                45

cag acc gtg ggc gat gaa aaa gta ctt gag cag atc gaa aag caa tta 192
Gln Thr Val Gly Asp Glu Lys Val Leu Glu Gln Ile Glu Lys Gln Leu
          50                55                60

cac aaa ctg gtc gat gtc ttg cgc gtg agt gag ttg ggg cag ggc gcg 240
His Lys Leu Val Asp Val Leu Arg Val Ser Glu Leu Gly Gln Gly Ala
          65                70                75                80

cat gtt gag cgg gaa atc atg ctg gtg aaa att cag gcc agc ggt tac 288
His Val Glu Arg Glu Ile Met Leu Val Lys Ile Gln Ala Ser Gly Tyr
          85                90                95

ggg cgt gac gaa gtg aaa cgt aat acg gaa ata ttc cgt ggg caa att 336
Gly Arg Asp Glu Val Lys Arg Asn Thr Glu Ile Phe Arg Gly Gln Ile
          100                105                110

atc gat gtc aca ccc tcg ctt tat acc gtt caa tta gca ggc acc agc 384
Ile Asp Val Thr Pro Ser Leu Tyr Thr Val Gln Leu Ala Gly Thr Ser
          115                120                125

ggt aag ctt agt gca ttt tta gca tcg att cgc gat gtg gcg aaa att 432
Gly Lys Leu Ser Ala Phe Leu Ala Ser Ile Arg Asp Val Ala Lys Ile
          130                135                140

gtg gag gtt gct cgc tct ggt gtg gtc gga ctt tcg cgc ggc gat aaa 480
Val Glu Val Ala Arg Ser Gly Val Val Gly Leu Ser Arg Gly Asp Lys
          145                150                155                160

ata atg cgt tga 492
Ile Met Arg

```

<210> 2

<211> 163

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 2

Met Arg Arg Ile Leu Ser Val Leu Leu Glu Asn Glu Ser Gly Ala Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Val Ile Gly Leu Phe Ser Gln Arg Gly Tyr Asn Ile Glu Ser
 20 25 30

Leu Thr Val Ala Pro Thr Asp Asp Pro Thr Leu Ser Arg Met Thr Ile
 35 40 45

Gln Thr Val Gly Asp Glu Lys Val Leu Glu Gln Ile Glu Lys Gln Leu
 50 55 60

His Lys Leu Val Asp Val Leu Arg Val Ser Glu Leu Gly Gln Gly Ala
 65 70 75 80

His Val Glu Arg Glu Ile Met Leu Val Lys Ile Gln Ala Ser Gly Tyr
 85 90 95

Gly Arg Asp Glu Val Lys Arg Asn Thr Glu Ile Phe Arg Gly Gln Ile
 100 105 110

Ile Asp Val Thr Pro Ser Leu Tyr Thr Val Gln Leu Ala Gly Thr Ser
 115 120 125

Gly Lys Leu Ser Ala Phe Leu Ala Ser Ile Arg Asp Val Ala Lys Ile
 130 135 140

Val Glu Val Ala Arg Ser Gly Val Val Gly Leu Ser Arg Gly Asp Lys
 145 150 155 160

Ile Met Arg

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 3

gacatgaatg tctggttt

18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 4

tcaacgcatt attttatcg

19

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 5

taaacgcgtt atcccgctg attg

24

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 6

gccacgcgtc tgattcattt tcga

24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 7

ctcgaggcct tttttcccag cgtgg

25

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: PCR引物

<400> 8

ctcgaggcct atcacgcgga aataacg

27

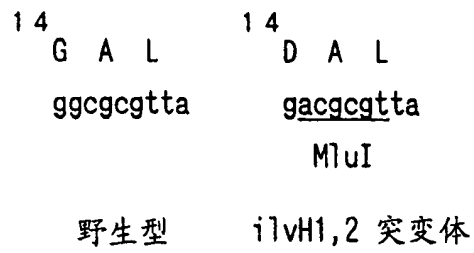


图 1

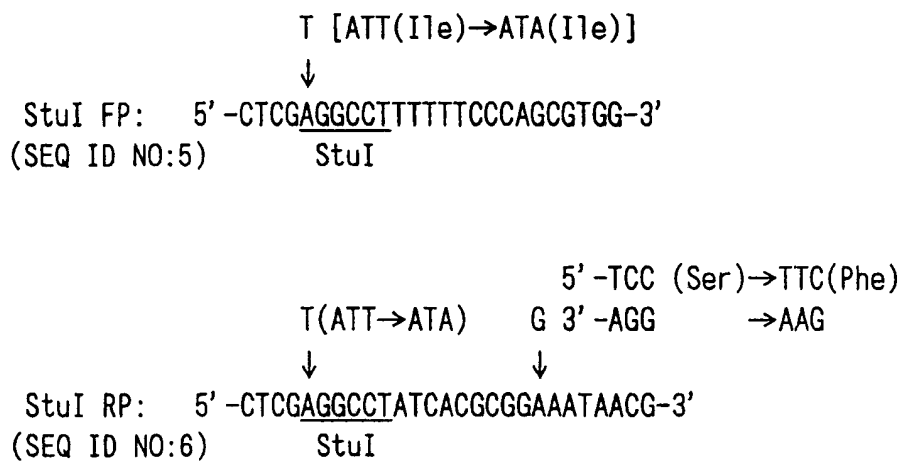


图 2