

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-511076

(P2009-511076A)

(43) 公表日 平成21年3月19日(2009.3.19)

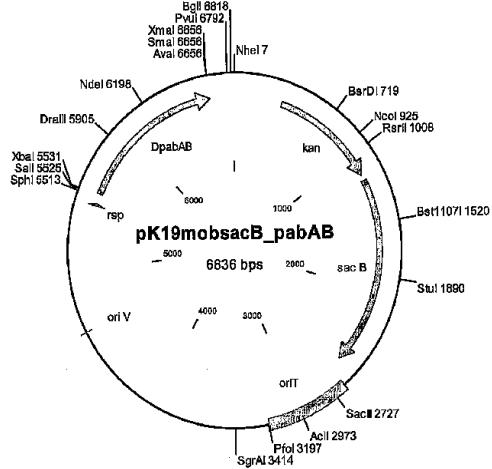
| (51) Int.Cl. | | F 1 | | テーマコード (参考) |
|--------------|-------|-----------|--------------|--------------------------|
| C 12N | 15/09 | (2006.01) | C 12 N 15/00 | A 4 B O 2 4 |
| C 12P | 13/06 | (2006.01) | C 12 P 13/06 | Z N A D 4 B O 6 4 |
| C 12P | 13/12 | (2006.01) | C 12 P 13/12 | B 4 B O 6 5 |
| C 12P | 13/22 | (2006.01) | C 12 P 13/22 | A |
| C 12N | 1/19 | (2006.01) | C 12 P 13/12 | A |
| | | | 審査請求 未請求 | 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2008-535878 (P2008-535878) | (71) 出願人 | 390035448 フォルシュングスツェントルム・ユーリッヒ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング ドイツ連邦共和国、ユーリッヒ、ウイルヘルムヨーネンストラーゼ (番地なし) |
| (86) (22) 出願日 | 平成18年10月9日 (2006.10.9) | | |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成20年6月3日 (2008.6.3) | | |
| (86) 國際出願番号 | PCT/DE2006/001756 | | |
| (87) 國際公開番号 | W02007/045210 | | |
| (87) 國際公開日 | 平成19年4月26日 (2007.4.26) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 102005049527.3 | (74) 代理人 | 100069556 弁理士 江崎 光史 |
| (32) 優先日 | 平成17年10月17日 (2005.10.17) | (74) 代理人 | 100093919 弁理士 奥村 義道 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ(DE) | (74) 代理人 | 100111486 弁理士 鍛治澤 實 |
| | | (72) 発明者 | エッゲリング・ロータル ドイツ連邦共和国、52428 ユーリッヒ、エルゼンカンプ、6 |

(54) 【発明の名称】 L-セリンの製造方法、遺伝子配列、ベクターおよび微生物

(57) 【要約】

本発明では、L-セリン産生の増加のために、アミノ酸産生生物における葉酸濃度を低下させるかまたは完全に除去する。葉酸の生合成に関与する酵素および遺伝子の活性を完全に排除するか、または少なくとも低下させることができる。好ましい実施態様においては、配列番号1~7が使用される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アミノ酸產生生物における葉酸濃度を減少させることを特徴とする、L-セリンの製造方法。

【請求項 2】

葉酸合成の低下または葉酸の分解によって、葉酸濃度を低下させることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の直接的または間接的な突然変異によって葉酸濃度を低下させることを特徴とする、請求項1または2のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項 4】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の欠失突然変異、挿入突然変異、点突然変異および/または置換突然変異により葉酸產生を低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の発現を低下または減少させることを特徴とする、請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

プロモーター、シグナル構造、リプレッサー遺伝子、アクチベーター、オペレーター、アテニュエーター、リボソーム結合部位、開始コドン、ターミネーター、レギュレーター、転写物の安定性の改変、減弱化または排除により発現を低下させるか、または制御可能なプロモーターを使用することを特徴とする、請求項5記載の方法。 20

【請求項 7】

GTPシクロヒドロラーゼ、ネオプテリン三リン酸ピロホスファターゼ、ネオプテリンアルドラーーゼ、6-ヒドロキシメチルプテリンピロホスホキナーゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ、ブテロイン酸シンターゼ、葉酸シンターゼまたはジヒドロ葉酸リダクターゼをコードする遺伝子を改変することを特徴とする、請求項3~6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 8】

アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼをコードする遺伝子を欠失させることを特徴とする、請求項7記載の方法。 30

【請求項 9】

配列番号1に記載のDNSを用いて欠失させることを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

配列番号2に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項8または9のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 11】

4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子を欠失させることを特徴とする、請求項3~10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 12】

配列番号3に記載のDNSを用いて欠失させることを特徴とする、請求項11記載の方法。 40

【請求項 13】

欠失のために配列番号4に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項11または12のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 14】

アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼおよび4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼを欠失させることを特徴とする、請求項3~13のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 15】

配列番号5に記載のDNA配列を用いて欠失させることを特徴とする、請求項14記載の方法。
。

【請求項 1 6】

配列番号6に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項14または15のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 7】

改変前から既にL-セリンを産生する生物をL-セリンの合成に使用することを特徴とする、請求項1～16のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 8】

微生物が配列番号7に記載のプラスミドを有することを特徴とする、請求項1～17のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 9】

葉酸の生合成に関与している酵素の触媒的活性を減弱化するかまたは排除することを特徴とする、請求項1～18のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 0】

安定性を低下させることにより減弱化または排除を行うことを特徴とする、請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

アロステリック中心の改変により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19または20のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 2】

酵素活性をリン酸化またはアデニル化により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～21のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 3】

酵素の活性を蛋白質分解的な分解により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～22のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 4】

GTPシクロヒドロラーゼ、ネオプテリン三リン酸ピロホスファターゼ、ネオプテリンアルドラーゼ、6-ヒドロキシメチルプテリンピロホスホキナーゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ、ブテロイン酸シンターゼ、葉酸シンターゼおよびジヒドロ葉酸リダクターゼからなる群から選択される少なくとも1種の酵素の活性を低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～23のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 5】

以下の群：

- 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子、
- ホスホセリントラヌスマニナーゼをコードするserC遺伝子、
- ホスホセリンホスファターゼをコードするserB遺伝子、

から選択される1種またはそれ以上の遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させること、特に過剰発現させることを特徴とする、請求項1～24のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 2 6】

これらの遺伝子の対立遺伝子、特にフィードバック耐性の3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させるか、または過剰発現させることを特徴とする、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

以下の群：

- シスタチオニンリアーゼをコードするaecD遺伝子、
- シスタチオニンリアーゼをコードするmetC遺伝子、
- セリンデヒドラターゼをコードするsdaA遺伝子、
- セリンヒドロキシメチルトランスクフェラーゼをコードするglyA遺伝子、
- トリプトファンシンターゼのベータサブユニットをコードするtrpB遺伝子、
- スレオニンデヒドラターゼをコードするilvA遺伝子、

10

20

30

40

50

- ピルビン酸キナーゼをコードするpyk遺伝子、
から選択される1種またはそれ以上の遺伝子の活性を、単独でまたは組み合わせて減少または欠失させることを特徴とする、請求項1～15のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 28】

微生物コリネバクテリウム、プレビバクテリウム、バシラス、腸内細菌として、メタノール利用細菌または酵母を使用することを特徴とする、請求項1～27のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 29】

以下：

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、
コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム ATCC13870、
コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、
プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または
プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020、
からなる群から選択される生物を使用することを特徴とする、請求項28記載の方法。

10

【請求項 30】

システィン、トリプトファンまたはメチオニンの合成に使用することを特徴とする、請求項1～29のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項 31】

配列番号1、3または5と少なくとも85%の相同性を示す遺伝子配列。

【請求項 32】

配列番号1、3または5と同一であることを特徴とする、請求項31記載の遺伝子配列。

【請求項 33】

遺伝子配列が配列番号2、4または6と少なくとも85%の相同性を示すべくター。

【請求項 34】

配列番号2、4または6のベクターと同一であることを特徴とする、請求項33記載のベクター。

30

【請求項 35】

配列番号7と少なくとも85%の相同性を示すべくター。

【請求項 36】

配列番号7と同一であることを特徴とする、請求項34記載のベクター。

【請求項 37】

請求項1～27に記載の方法の少なくとも1つの手段で改変されることを特徴とする微生物。

【請求項 38】

コリネバクテリウム、プレビバクテリウム、バシラス、腸内細菌または酵母であることを特徴とする微生物。

40

【請求項 39】

以下：

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、
コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム ATCC13870、
コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、
プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または
プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020、
からなる群から選択される微生物であることを特徴とする、請求項38記載の微生物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】**【0001】**

本発明はL-セリンの製造方法、およびそれに好適な遺伝子配列、ベクターおよび微生物に関する。

【背景技術】**【0002】**

アミノ酸L-セリンは、ヒト用の薬剤、医薬工業、食品工業、および動物用食品に使用されている。

【0003】

アミノ酸がコリネ型 (coryneformer) の細菌株、特にコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) の発酵により製造されることが知られている。非常に重要な方法であるため、製造方法の改善が継続的に研究されている。方法の改善は、例えば、攪拌および酸素の供給のような発酵技術的な方法、または例えば発酵の間の糖濃度のような培養基の組成、または例えばイオン交換クロマトグラフィーによる生成物形態の処理、または微生物自体の内因的性能特性に関するものである。

【0004】

これらの微生物の性能特性の改善には、突然変異誘発、選択および突然変異体選択の方法が用いられる。このような方法により、代謝拮抗物質に対して抵抗性であるか、または調節性の重要な代謝産物に関して栄養要求性であって、そして、L-アミノ酸、例えばL-セリンを産生する株が得られる。例えば、アザセリンまたはベータ-(2-チエニル)-DL-アラニンに対する耐性を示し、L-セリンを産生するコリネ型細菌が記載されている（特許文献1）。さらに、遺伝子工学的によって生合成経路の活性を増加させることができ、アミノ酸生成を増加させることは技術常識である。例えば、特許文献2には、生合成酵素ホスホセリンホスファターゼおよびホスホセリントランスアミナーゼの増加がL-セリン生成に有利であることが記載されている。さらに、D-3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をL-セリン生成のために使用できることが記載されている（特許文献2、特許文献3）。

【0005】

さらに、L-アミノ酸合成経路の酵素の活性の増加に加えて、L-アミノ酸の分解反応に関する酵素の減少またはさらには排除によってもまた、L-アミノ酸の蓄積を改善できることが知られている。例えば、酵素L-セリンデヒドラターゼを排除することにより、L-セリンの蓄積を増加させることが見出されている（特許文献4）。さらに、酵素セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの活性の減少によってもまた、L-セリンの分解が低下する（特許文献5；非特許文献1）。

【特許文献1】 欧州特許第0943687号明細書**【特許文献2】** 欧州特許出願公開第0931833号明細書**【特許文献3】** 国際公開第93/12235号パンフレット**【特許文献4】** PCT/DE 2004/000248**【特許文献5】** 米国特許第6,596,516号明細書**【非特許文献1】** Simic et al. (2002) Appl. Environ Microbiol. 68:3321-3327**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明の目的は、L-セリンの産生を増加させることができる方法、ならびにそれに好適な微生物およびそれに使用できるベクターを提供することにある。さらに、システイン、トリプトファンおよびメチオニンの産生の増加させることができ方法、ならびにそれに使用できる微生物およびベクターが提供される。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

驚くべきことに、葉酸合成をコードする遺伝子を改変または排除することによって、コ

10

20

30

40

50

リネ型細菌のL-セリン産生が改善されることが見出された。本発明の方法、本発明の細菌、および、葉酸合成を触媒するかまたは葉酸合成の制御に関与している酵素またはレギュレーターに関する本発明の遺伝子配列を用いることにより、本発明のような改変を施していない株と比較して著しく高い収量でL-セリンを産生することが可能である。L-セリン産生の増加量を表2に示す。

【0008】

以下に本発明の概要を説明する：

本発明においては、アミノ酸産生生物における葉酸濃度が低下することにより、L-セリン産生およびシスティン、トリプトファンおよびメチオニンの産生が増加する。好ましくは、該生物は本発明による改変の前から既にL-セリンを産生する。

10

【0009】

例えば、葉酸合成の低下または葉酸の分解によって、葉酸濃度を低下させることができる。

【0010】

葉酸の生合成に関与する遺伝子の直接的または間接的な突然変異によって、葉酸合成を低下させるかまたは妨げることができる。

【0011】

葉酸産生を低下させるかまたは排除する突然変異の例としては、葉酸の生合成に関与している遺伝子の欠失突然変異、挿入突然変異、置換突然変異または点突然変異が挙げられる。

20

【0012】

さらに、葉酸の生合成に関与する蛋白質の遺伝的に改変されたまたは改変されていない遺伝子の場合に、葉酸の生合成に関与する遺伝子の発現を低下させるかまたは妨げることにより、葉酸産生を低下させるかまたは排除することができる。

【0013】

葉酸の生合成に関与する遺伝子の発現の低下または排除は、プロモーター、例えばシグナル構造、リプレッサー遺伝子、アクチベーター、オペレーター、アテニュエーター、リボソーム結合部位または開始コドン、ターミネーターの改変、好ましくは減弱化、特に好ましくは排除により、あるいはさらに、レギュレーターまたは転写物の安定性の改変、好ましくは減弱化、特に好ましくは排除または減少によって達成することができる。さらに、制御可能なプロモーター、特に弱化プロモーターを使用することができる。

30

【0014】

葉酸の生合成に関与する酵素の活性は、酵素の触媒的活性および安定性の低下または排除により、上記酵素レベルに達する。同一の効果は、アロステリック中心の改変または酵素のフィードバック阻害によって達成することができる。酵素の活性を減少させるかまたは排除するための典型的な手段は、例えばリン酸化またはアデニル化による蛋白質の修飾である。葉酸の生合成経路に関与する酵素の蛋白質分解的な分解を増加させることもできる。

【0015】

上記の方法で活性を低下させるかまたは排除することができる典型的な酵素としては、GTPシクロヒドロラーゼ、ネオブテリン三リン酸ピロホスファターゼ、ネオブテリンアルドラーーゼ、6-ヒドロキシメチルブテリンピロホスホキナーゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ、ブテロイン酸シンターゼ、葉酸シンターゼおよびジヒドロ葉酸リダクターゼが挙げられる。

40

【0016】

本発明はまた、産生生物において本発明の遺伝的改変を生じさせるのに好適な手段を含有するベクターを提供する。

【0017】

本発明のベクターは、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼおよび/または4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼの合成に関する遺伝子を欠失させるのに好適な手段

50

を含有する。

【0018】

4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ遺伝子の欠失用の配列を配列番号1に示す。配列番号2は、配列番号1を有するベクターの構造を示す。

【0019】

4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ遺伝子の欠失用の配列を配列番号3に示す。配列番号4は、配列番号3を有するベクターの構造を示す。

【0020】

4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ遺伝子および4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ遺伝子の欠失用の配列を配列番号5に示す。配列番号6は、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ遺伝子および4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ遺伝子の欠失用の配列番号5を有するベクターの構造を示す。

10

【0021】

配列番号7に、L-セリン産生をさらに増加させるのに好適なプラスミドを表す。これは図4に示されるpEC-T18mob2-serA^{f b}CB-という名称のプラスミドである。

【0022】

欠失に重要な構造はまた、適當な生物に好適な別のベクター骨格に組み込むこともできる。ベクターとしては、頻繁に使用される環状ベクターのほかに、直鎖状ベクターまたはファージもまた好適である。

20

【0023】

図は、L-セリン産生生物の本発明による改変に使用することができるベクターを例示的に示す。

【0024】

図1：配列番号2に対応するpK19mobsacB_pabAB

図2：配列番号4に対応するpK19mobsacB_pabC

図3：配列番号6に対応するpK19mobsacB_pabABC

図4：配列番号7に対応するpEC-T18mob2-serA^{f b}CB

好ましくは、改変前から既にL-セリンを产生するL-セリン産生生物に、配列1、3および5による手段をベクターによって導入する。

30

【0025】

上記の配列は全て、90%、好ましくは95%の相同性を有するバリアントも包含するものである。

【0026】

好適な生物は、例えば、コリネ型細菌、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムまたはブレビバクテリウム(Brevibacterium)である。腸内細菌、バシラス、または低い葉酸濃度を示すタイプの酵母もまた産生生物として使用することができる。

40

【0027】

以下、本発明をより詳細に説明する：

本発明は、葉酸合成をコードする遺伝子が改変され、排除されまたはその発現が改変されているか、あるいは、天然において葉酸要求性の細菌で葉酸の欠乏が生じているか、または葉酸合成の調節が葉酸欠乏が生じるよう影響を受けているコリネ型細菌を使用する、L-セリンの発酵的製造方法を提供する。葉酸合成は、ヌクレオチド合成の中間体からおよび芳香族アミノ酸合成の中間体から出発するので、基本的には、ヌクレオチドおよび芳香族アミノ酸自身を例えば外部から追加する場合と同じようになおも十分に利用できることを前提として、これらの適當な反応を改変または排除することもできる。さらに、葉酸の欠乏はまた、葉酸またはそれに関連する代謝経路の遺伝子の発現を調節するレギュレーターの欠失または改変によってもたらされる。

【0028】

従属請求項には好ましい実施態様が記載されている。

50

【0029】

使用される株は、好ましくは葉酸合成の改変の前から既にL-セリンを産生する。

【0030】

「改変」という語句には、葉酸合成遺伝子の減弱化および葉酸合成遺伝子の完全な欠失が含まれる。ここには、間接的な突然変異誘発および直接的な組換えDNA技術が含まれる。これらの方により、例えば、染色体中の葉酸合成の遺伝子を欠失させることができる。これに関して適当な方法は、Schaefer等 (Gene (1994) 145: 69-73) またはLink等 (J. Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) によって記載されている。遺伝子の一部分のみを欠失させるか、または遺伝子の突然変異断片を交換することも可能である。欠失または交換により、葉酸合成活性の欠失または低下が達成される。本発明の方法の1つの有利な実施態様は、例えば、本発明によって改変したC. グルタミカム株ATCC13032DpykDsdaADpabABpserABCであり、これは特にpabAB遺伝子に欠失を有する。

10

【0031】

葉酸合成の活性を減弱化するかまたは排除する別の方法は、突然変異誘発法である。ここには、化学試薬、例えばN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンまたはUV照射を突然変異誘発のために使用し、続いて葉酸合成活性の減少または欠失に関して所望の微生物を探索する間接的な方法が含まれる。突然変異を誘発する方法および突然変異を探索する方法は公知であり、特にMillerの「A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)」にまたは「“Manual of Methods for General Bacteriology” der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)」に記載されている。

20

【0032】

さらに、葉酸合成の遺伝子の発現もまた、遺伝子発現のためのシグナル構造の改変により減少させることができる。シグナル構造としては、例えば、リプレッサー遺伝子、アクチベーター遺伝子、オペレーター、プロモーター、アテニュエーター、リボソーム結合部位、開始コドンおよびターミネーターが挙げられる。当業者であれば、これらに関する記載は例えば、国際公開第96/15246号パンフレット、「Boyd und Murphy (J. Bacteriol. 1988. 170: 5949)」、「Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Res. 1998. 26: 3548)」、「Jensen und Hammer (Biotechnol. Bioeng. 1998 58: 191)」、「Patek et al. (Microbiology (1996) 142: 1297)」において、および遺伝学および分子生物学の公知の教科書、例えば、「Knippers (“Molekulare Genetik”, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 2001)」または「Winnacker (“Gene und Klone”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990)」

30

によって得ることができる。構造遺伝子の上流にあるプロモーター領域および調節領域に突然変異を生じさせることもできる。

【0033】

制御可能なプロモーターにより、発酵的L-セリン生成の進行中に発現を減少させることも可能である。さらに、例えばmRNAの安定性を減少させることによって、翻訳を制御することも可能である。これは、遺伝子の5'端または3'端の追加および/または改変配列によって安定性を減少させることにより達成することができる。この例が枯草菌 (Microbiology (2001) 147:1331-41) または酵母 (Trends Biotechnol. 1994, 12:444-9) 由來の遺伝子に関して記載されている。記載されているように、内因性の蛋白質分解活性によって酵素活性に影響を及ぼすことも可能である (Mol Microbiol. (2005) 57:576-91)。

40

【0034】

さらに、活性の低い対応の葉酸合成酵素をコードする遺伝子を使用することができる。酵素蛋白質の触媒的活性を改変したまたは減少させる突然変異は公知である。これに関する例は、「Qiu and Goodman (J Biological Chemistry (1997) 272: 8611-8617)」、「Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry (1997) 61: 1760-1762)」、「Moeckel (“Die Threonindehydrolase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms”, Reports from the Juelich

50

Research Centre, Juel-2906, ISSN09442952, Juelich, Germany, 1994」に記載されている。概略的な記載は、遺伝学および分子生物学の教科書、例えば「Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986)」において見ることができる。あるいは、培地組成および培養の改変によって葉酸合成酵素の発現および活性を減少させることができる。当業者は、特に「Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987))」、「Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994))」、「Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988))」、「Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991))」、10 欧州特許出願公開第0 472 869号明細書、米国特許第4,601,893号明細書、「Schwarzer und Puehler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991))」、「Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994))」、「LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993))」および国際公開第96/15246号パンフレットによってマニュアルを参照することができる。

【0035】

これら の方法により、C. グルタミカムの葉酸合成の遺伝子の発現を減少または欠失させるか、または酵素活性を減少させることができる。

【0036】

さらに、葉酸の欠乏を誘導することに加えて、以下の群：

- ・3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子、
- ・ホスホセリントランスアミナーゼをコードするserC遺伝子
- ・ホスホセリンホスファターゼをコードするserB遺伝子

20

から選択される1種またはそれ以上の遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させること、特に過剰発現させること、あるいは、これらの遺伝子の対立遺伝子、特に

・フィードバック耐性の3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させること、特に過剰発現させることが、L-セリンの产生に有利である。

【0037】

さらに、葉酸の欠乏を誘導することに加えて、以下の群：

- ・シスタチオニンリアーゼをコードするaecD遺伝子、
- ・シスタチオニンリアーゼをコードするmetC遺伝子、
- ・セリンデヒドラターゼをコードするsdaA遺伝子、
- ・セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするglyA遺伝子、
- ・トリプトファンシンターゼのベータサブユニットをコードするtrpB遺伝子、
- ・スレオニンデヒドラターゼをコードするilvA遺伝子、
- ・ビルビン酸キナーゼをコードするpyk遺伝子、

30

から選択される1種またはそれ以上の遺伝子を、単独でまたは組み合わせて減少または欠失させることができ、L-セリンの产生に有利である。

【0038】

本発明の微生物では、代謝の流れがアミノ酸またはその誘導体の生合成の方向に亢進するよう古典型的および/または分子遺伝学的方法によって改変されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属の細菌が、本発明の範囲内に含まれる。本発明には、全ての公知のアミノ酸产生株が含まれる。さらに本発明においては、当業者が他の微生物、例えば腸内細菌、バシラスまたは酵母からの知見と同様に、慣用の方法に従って製造できる产生株も含まれる。さらに本発明には、L-セリンの分解が改変または減弱化されたアミノ酸产生株もまた含まれる。これに関しては、例えば、L-セリンを分解する酵素または対応する遺伝子に狙いを定めた遺伝子工学的改変が行われる。本発明に好適な微生物のいくつかを以下に例示する。しかしながら、これらのリストは限定を意図するものではない：

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、

コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム (Corynebacterium acetoacidophilum) A

40

50

TCC13870、

コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、

プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または

プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020。

【0039】

本発明はまた、不活化されたまたは減弱化したアミノデオキシコリスミ酸シンターゼまたはアミノデオキシコリスミ酸リアーゼ活性が得られるように、配列の一部分が定義された欠失によって切断されていることを特徴とする、pabABおよびpabC遺伝子配列番号1、3および5を提供する。pabABおよびpabC遺伝子配列は、好ましくは、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属の微生物から単離される。ここに、より詳細に特定された微生物をいくつか挙げる：

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、

コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム ATCC13870、

コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、

プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または

プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020。

【実施例】

【0040】

実施例1：

プラスミドpK19mobsacBDpabABの構築

C.グルタミカムのpabAB遺伝子を、公知の方法により、染色体において1734 bpの短くしたpabAB遺伝子で置換した (J. Bacteriol. (1997) 179:6228-37; Gene (1994) 145: 69-73)。遺伝子交換に使用するベクターの構築に下記のプライマーを合成した。これらは公共に利用可能なゲノム配列 (NCBI アクセッション番号YP_225287; NC_006958) に由来するものである。

pabAB-del-A

5' - CGGGATCCTCAGGCTCGCACGTTGGAGGG-3'

pabAB-del-B:

5' - CCCATCCACTAAACTTAAACAAAACGTGAAAGAACATATAATT-3'

pabAB-del-C:

5' - TGTAAAGTTAGTGGATGGGAGTGGGAGGAAATCCGCGTT-3'

pabAB-del-D:

5' - GTGGATCCGCCAAACACCACGGTGGCGT-3'

【0041】

プライマーpabAB-del-AはpabAB遺伝子の翻訳開始より522 bp前に開始し、pabAB-del-Dは翻訳終止の436 bp後で開始する。プライマーpabAB-del-Bは翻訳開始の21 bp後にあり、プライマーpabAB-del-Cは翻訳終止の66 bp前にあり、両者とも「Link et al. angegeben (J. Bacteriol. (1997) 179:6228-37)」に記載されるような相補的なリンカー領域をそれぞれ有する。pabAB-del-AおよびpabAB-del-Bのプライマーの組み合わせ、ならびにpabAB-del-BおよびpabAB-del-Cのプライマーの組み合わせで、C.グルタミカムATCC13032の染色体DNAを用いるPCR増幅を平行して行った。PCR反応を、サーマルサイクラー (PTC-100, MJ Research, Inc., ウォータータウン、USA)において、200 μMのデオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、600 nMの各対応オリゴヌクレオチド、100 ngのコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032の染色体DNA、1 / 10容量の10倍反応バッファーおよび2.6ユニットの熱安定性Taq-/Pwo DNAポリメラーゼ混合物 (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, マンハイム、德国) の存在下で、以下の条件で30サイクル行った：

10

20

30

40

50

94 で30秒、50 で30秒、および72 で40秒。10サイクル後は、72 での伸張段階を1サイクルあたり5秒延長した。PCR反応の後に、得られた5' - 側末端領域の563 bpの断片および3' - 側末端領域の528 bpの断片を、QIAExII gel extraction kit (Qiagen製) を用いて製造者の指示に従って0.8%アガロースゲルから単離し、プライマー-pabAB-del-AおよびpabAB-del-Dを用いる第二のPCRにおいて両断片を鑄型として使用した。200 μMのデオキシヌクレオチド三リン酸、600 nMの各対応オリゴヌクレオチド、第一のPCRから単離したそれぞれ20 ngの鑄型DNA、1 / 10容量の10倍反応バッファーおよび2.6ユニットのTaq-/Pwo DNAポリメラーゼ混合物の存在下で、増幅を以下の条件で35サイクル行った：

94 で30秒、50 で30秒、および72 で80秒。10サイクル後は、伸張段階をそれぞれ5秒延長した。PCR反応の後に、得られた1122 bpのDNA断片（これは、中心に1734 bpの欠失を有する不活化されたpabAB遺伝子を含む）を0.8%アガロースゲルから単離し、pK19mobsacBDpabAB（図1）は、塩基配列決定によって正しいことを確認した。

【 0 0 4 2 】

実施例2：

プラスミドpK19mobsacBDpabCの構築

実施例1に記載された方法と同様に、*C. グルタミカム*のpabC遺伝子を欠失させるための遺伝子交換に好適なベクターpK19mobsacBDpabCを構築した。これに必要なPCR増幅用プライマーもまた、公共に利用可能なゲノム配列（NCBIアクセッション番号YP_225288.1；NC_006958）に由来するものである。それらは以下の通りである：

pabC-del-A:

5' -GAGGATCCAATCATTGCTGAGCTGCGCAG-3'

pabC-del-B:

5' -CCCATCCACTAAACTAAACAATCAACAACTGTGGGTGTTGA-3'

pabC-del-C:

5' -TGTTTAAGTTAGTGGATGGTCGGTGAAGCCCTGGAATGAA-3'

pabC-del-D:

5' -AGGGATCCGTGATGAGTCCGATCTCGGAA-3'

【 0 0 4 3 】

プライマー-pabC-del-AはpabC遺伝子の翻訳開始より500 bp前に開始し、pabC-del-Dは翻訳終止の500 bp後で開始する。プライマー-pabC-del-Bは翻訳開始の51 bp後にあり、pabC-del-Cは翻訳終止の48 bp前にある。後者の2つのプライマーは相補的なリンカー領域をそれぞれ有する。pabC-del-AおよびpabC-del-Bのプライマーの組み合わせで602 bpの5' - 末端領域を増幅し、pabC-del-CおよびpabC-del-Dのプライマーの組み合わせで、欠失される断片の597 bpの3' - 末端領域を増幅した。PCR反応を、例えば実施例1におけるような標準的な方法で、*C. グルタミカム* ATCC13032の染色体DNAを用いて行った。PCR反応の後に、得られたDNA断片をQIAExII gel extraction kit (Qiagen製) を用いて単離し、2つの断片を鑄型としてさらなるPCRに使用した。プライマーとしてはpabC-del-AおよびpabC-del-Dを使用した。PCR反応を、例えば実施例1におけるような標準的な方法で、*C. グルタミカム* A TCC13032の染色体DNAを用いて行った。PCR反応後、得られた1178 bp長のDNA断片（中心に585 bp長の欠失を有する不活化されたpabC遺伝子を含む）を0.8%アガロースゲルから単離し、ベクター-pK19mobsacBとのライゲーションを行った (Schaefer et al. Gene 145: 69-73 (1994))。ライゲーション液を用いて大腸菌株DH5 mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) の形質転換を行った。制限酵素消化および配列決定により、得られたプラスミドpK19mobsacBDpabC（図2）が正しいことを確認した。

【 0 0 4 4 】

実施例3：プラスミドpK19mobsacBDpabABCの構築

実施例1に記載された方法と同様に、*C. グルタミカム*のpabABC遺伝子を欠失させるための遺伝子交換に好適なベクター-pK19mobsacBDpabABCを構築した。これに必要なPCR増幅用

10

20

30

40

50

プライマーは、公共に利用可能なゲノム配列 (NCBI アクセッション番号YP_225287 ; YP_225288.1 ; NC_006958) に由来するものである。それらは以下の通りである：

pabABC-del-A :

5' - CGGGATCCTCAGGCTCGCACGTTGGAGGG-3'

pabABC-del-B :

5' - CCCATCCACTAAACTAAACAAAACGTGAAAGAATCATAATT-3'

pabABC-del-C :

5' - TGTTTAAGTTAGTGGATGGTCGGTGAGGCCCTGGAATGAA-3'

pabABC-del-D :

5' - AGGGATCCGTGATGAGTCCGATCTCGGAA-3'

10

【0045】

プライマー pabABC-del-A は pabABC 遺伝子の翻訳開始より 500 bp 前に開始し、pabABC-del-D は翻訳終止の 500 bp 後で開始する。プライマー pabABC-del-B は pabAB の翻訳開始の 51 bp 後にあり、pabABC-del-C は pabC の翻訳終止の 48 bp 前にある。最後に挙げた 2 つのプライマーは相補的なリンカー領域をそれぞれ有する。pabABC-del-A および pabABC-del-B のプライマーの組み合わせで 593 bp の 5' - 末端領域を増幅し、pabABC-del-C および pabABC-del-D のプライマーの組み合わせで、欠失される断片の 597 bp の 3' - 末端領域を増幅した。PCR 反応を、例えば実施例 1 におけるような標準的な方法で、C. グルタミカム ATCC13032 の染色体 DNA を用いて行った。PCR 反応の後に、得られた DNA 断片を QIAExII gel extraction kit (Qiagen 製) を用いて単離し、2 つの断片を鋳型としてさらなる PCR に使用した。プライマーとしては pabABC-del-A および pabABC-del-D を使用した。PCR 反応を、例えば実施例 1 におけるような標準的な方法で、C. グルタミカム ATCC13032 の染色体 DNA を用いて行った。PCR 反応後、得られた 1169 bp 長の DNA 断片（中心に 2475 bp 長の欠失を有する不活性された pabABC 遺伝子を含む）を 0.8% アガロースゲルから単離し、ベクター pK19mobsacB とのライゲーションを行った (Schaefer et al. Gene 145: 69-73 (1994))。ライゲーション液を用いて大腸菌株 DH5[®] mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) の形質転換を行った。制限酵素消化および配列決定により、得られたプラスミド pK19mobsacBDpabC (図 3) が正しいことを確認した。

20

【0046】

30

実施例 4：葉酸に関する栄養要求性突然変異株 C. グルタミカム DsdaADpabAB、C. グルタミカム DsdaADpabC、C. グルタミカム DsdaADpabABC の構築

プラスミド pK19mobsacBDpabAB、または pK19mobsacBDpabC および pK19mobsacBDpabABC をエレクトロポレーションによって C. グルタミカム DsdaA (特許出願 PCT/DE2004/000248 に記載されている) に導入し、カナマイシン耐性によって選択した。プラスミドが相同組換えによって染色体に組み込まれたクローニングのみがカナマイシン耐性であった。試験においてプラスミドによって付与されたサッカロース感受性を示すクローニングを、それぞれ選択した (Gene (1994) 145: 69-73)。これを 50 ml の BHI 培地 (Brain-Heart-Infusion-Medium, Difco Laboratories、デトロイト、USA) において、カナマイシンおよびサッカロースなしで培養した。その後、それぞれ 10-2 倍、10-3 倍または 10-4 倍希釈した培養液 100 μl を 10% (w/v) サッカロースと一緒に BHIS- プレート (0.5 M ソルビトールを含む BHI 培地) に播種した (FEMS Microbiol Lett. (1989) 53:299-303)。その後、得られたサッカロース耐性クローニングをカナマイシン感受性に関して試験を行い、PCR 解析で確認を行った。以下のプライマーの組み合わせを使用した：

40

pabAB の欠失：

pabAB-del-pr-u2 5' - TGGCTCACTTCGCTGGTCTTGTG-3'

pabAB-del-pr-12 5' - GAATGGTTGCGCGAGTGTCA-3'

pabC の欠失：

pabC-del-pr-u2 5' - GTTGGGGAGCAGGACGAGTGGT-3'

pabC-del-pr-12 5' - TACGCGCATCTGGAAGCCTGGTTA-3'

50

pabABCの欠失：

pabABC-del-pr-u2 5'-CGTTCCGGCATCATTCTGGCTAAG-3'

pabABC-del-pr-l2 5'-GCGACTCCGGGTTGTTCTGATAA-3'

【0047】

欠失の結果、pabAB遺伝子部位に関しては1426 bpのバンド、pabC遺伝子部位に関しては1663 bpのバンド、そしてpabABC遺伝子部位に関しては1447 bpのバンドが得られた。この方法により、それぞれが葉酸合成の遺伝子に特異的な欠失を有する出発株クローニングを得ることができた。これらの株を、C. グルタミカムDsdaADpabAB、C. グルタミカムDsdaADpabCまたはC. グルタミカムDsdaADpabABCと命名した。

【0048】

これらの3つの株を最小培地CGXII (J Bacteriol. (1993) 175:5595-603)、および1 mM葉酸を含む同一の培地に播種した。表1に結果を示す。

【0049】

表1：

製造したコリネバクテリウム・グルタミカム突然変異体の葉酸要求性

【0050】

【表1】

| | 増殖 | | | |
|------|---------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| 葉酸 | C. glu. DsdaA | C. glu. DsdaADpabAB | C. glu. DsdaADpabC | C. glu. DsdaADpabABC |
| 0 mM | + | - | - | - |
| 1 mM | + | + | + | + |

【0051】

実施例5：

C. グルタミカムDsdaADpabAB pserABCの構築およびL-セリン生成

プラスミドpEC-T18mob2-serAfbrserCserBをエレクトロポレーションによってC. グルタミカムDsdaADpabABに導入した。プラスミド(図4)は、ベクターpEC-T18mob2 (Curr. Microbiol. (2002) 45, 362-367)、コリネバクテリウムの遺伝子serAfbr (Appl Microbiol Biotechnol. (2002) 60:437-41)およびserCおよびserB(獨国特許出願100 44 831.3)を含有する。公知の標準的方法によって、プラスミドpEC-T18mob2-serAfbrserCserBの存在および完全性についてテトラサイクリン耐性クローニングの試験を行い(Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1つのクローニングをC. グルタミカムDsdaADpabAB pserABCと命名した。

【0052】

L-セリン生成のために、C. グルタミカムのDsdaADpabAB pserABC株を複合培地(2%グルコース、5 μg/lテトラサイクリンを含むCgIII)で培養し、そこから発酵培地CGXII (J Bacteriol. (1993) 175: 5595-5603)に播種した。発酵培地CGXIIは0.1または1 mMの葉酸を含んでいた。コントロールとして、C. グルタミカムDsdaA pserABC株を同様の方法で培養した。それぞれ少なくとも2回ずつ、独立して発酵を実施した。30度で30時間培養した後(回転振とう機において120 rpm)、培地中に蓄積したL-セリン量を測定した。アミノ酸濃度の解析は高圧液体クロマトグラフィーにより行った(J Chromat. (1983) 266: 471-482)。発酵の結果を表2に示す。構築した上記の突然変異体を葉酸合成において使用することにより、L-セリン生成が著しく改善することがわかる。

【0053】

表2：

C. グルタミカムDsdaADpabAB pserABCおよびC. グルタミカムDsdaA pserABCの培養上清におけるL-セリンの蓄積

【0054】

10

20

30

40

【表2】

| 葉酸 (mM) | 株 | L-セリン (mM) |
|---------|----------------------------------|------------|
| 0.01 | C. グルタミカム DsdaADpabAB pserABC | 49 |
| 0.1 | C. グルタミカム DsdaADpabAB pserABC | 89 |
| 1.0 | C. グルタミカム DsdaADpabAB pserABC | 2 |
| 0.01 | C. グルタミカム DsdaA pserABC | 2 |
| 0.1 | C. グルタミカム DsdaA pserABC | 1 |
| 1.0 | C. グルタミカム DsdaA pserABC | 1 |

10

【0055】

実施例6:

C. グルタミカムDpykDsdaADpabAB pserABCの構築およびL-セリン生成

20

プラスミドpK19mobsacBDpyk (Arch Microbiol. (2004) 182:354-63) をエレクトロポレーションによってC. グルタミカム13032DsdaADpabABC株に導入し、カナマイシン耐性によって選択した。プラスミドが相同組換えによって染色体のpyk遺伝子座に組み込まれたクローンのみがカナマイシン耐性であった。プラスミドによって付与されたサッカロース感受性を試験において示すクローンを選択し、50 mlのBHI培地 (Brain-Heart-Infusion-Medium、Difco Laboratories、デトロイト、USA)において、カナマイシンおよびサッカロースなしで培養した。その後、それぞれ10-2倍、10-3倍または10-4倍希釈した培養液100 μlを10% (w/v) サッカロースと一緒にBHIS-プレート (0.5 Mソルビトールを含むBHI培地) に播種した (FEMS Microbiol Lett. (1989) 53:299-303)。その後、得られたサッカロース耐性クローンをカナマイシン感受性について試験を行い、PCR解析で欠失されていることを確認した。この方法により、出発株からC. グルタミカムDpykDsdaADpabAB株を得ることができた。この株を実施例5に記載されるようにpEC-T18mob2-serAfbrserCserBを用いて形質転換することにより、C. グルタミカムDpykDsdaADpabAB pserABC株が得られた。C. グルタミカムDsdaADpabAB pserABCと比較してL-セリンを生成させるためにこの株を、実施例5に記載されるように培養した。結果を表3に示す。

30

【0056】

表3:

C. グルタミカムDpykDsdaADpabAB pserABCおよびC. グルタミカムDsdaADpabAB pserABCの培養上清におけるL-セリンの蓄積

40

【0057】

【表3】

| 葉酸 (mM) | 株 | L-セリン (mM) |
|---------|--------------------------------------|------------|
| 0.1 | C. グルタミカム DsdaADpabAB pserABC | 89 |
| 0.1 | C. グルタミカム DpykDsdaADpabAB pserABC | 98 |
| 1.0 | C. グルタミカム DpykDsdaADpabAB pserABC | 2 |

【図面の簡単な説明】

【0058】

50

- 【図1】配列番号2に対応するpK19mobsacB_pabABを示す。
- 【図2】配列番号4に対応するpK19mobsacB_pabCを示す。
- 【図3】配列番号6に対応するpK19mobsacB_pabABCを示す。
- 【図4】配列番号7に対応するpEC-T18mob2-serA^{f b r}CBを示す。

【図1】

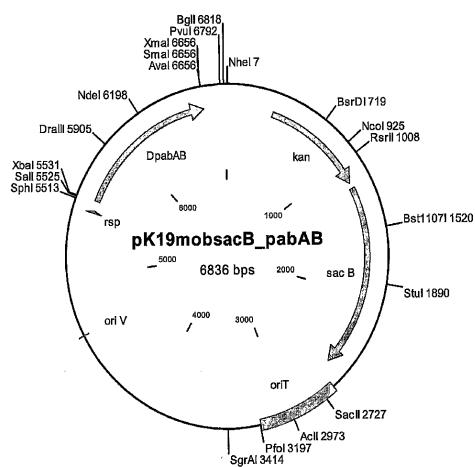


Figure 1

【図2】

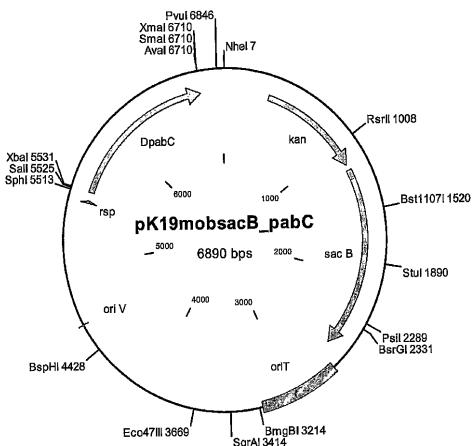
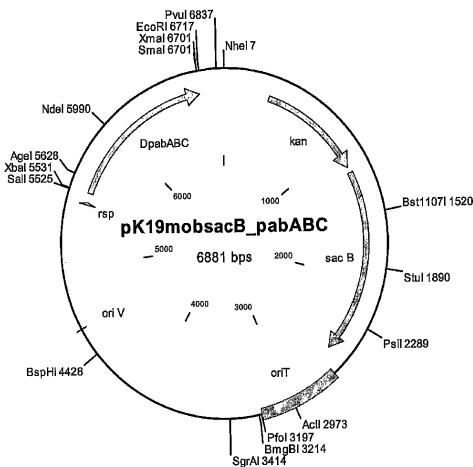


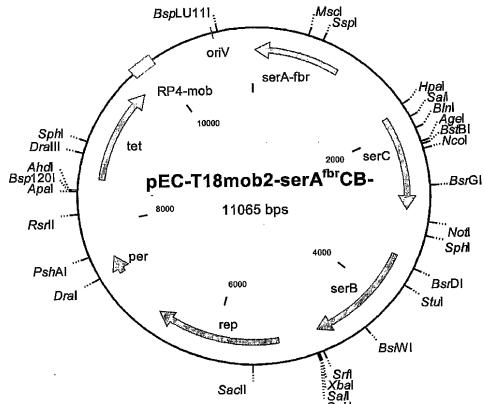
Figure 2

【図3】



Figur 3

【 図 4 】



Figur 4

【配列表】

200951107600001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月13日(2007.7.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸産生生物における葉酸濃度を減少させることを特徴とする、L-セリンの製造方法。

【請求項2】

葉酸合成の低下または葉酸の分解によって、葉酸濃度を低下させることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の直接的または間接的な突然変異によって葉酸濃度を低下させることを特徴とする、請求項1または2のいずれか1つに記載の方法。

【請求項4】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の欠失突然変異、挿入突然変異、点突然変異および / または置換突然変異により葉酸産生を低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

葉酸の生合成に関与している遺伝子の発現を低下または減少させることを特徴とする、

請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】

プロモーター、シグナル構造、リプレッサー遺伝子、アクチベーター、オペレーター、アティュエーター、リボソーム結合部位、開始コドン、ターミネーター、レギュレーター、転写物の安定性の改変、減弱化または排除により発現を低下させるか、または制御可能なプロモーターを使用することを特徴とする、請求項5記載の方法。

【請求項7】

GTPシクロヒドロラーゼ、ネオプテリン三リン酸ピロホスファターゼ、ネオプテリンアルドラーーゼ、6-ヒドロキシメチルブテリンピロホスホキナーゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ、ブテロイン酸シンターゼ、葉酸シンターゼまたはジヒドロ葉酸リダクターゼをコードする遺伝子を改変することを特徴とする、請求項3～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項8】

アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼを欠失させることを特徴とする、請求項7記載の方法。

【請求項9】

配列番号1に記載のDNSを用いて欠失させることを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項10】

配列番号2に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項8または9のいずれか1つに記載の方法。

【請求項11】

4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼをコードする遺伝子を欠失させることを特徴とする、請求項3～10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項12】

配列番号3に記載のDNSを用いて欠失させることを特徴とする、請求項11記載の方法。

【請求項13】

欠失のために配列番号4に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項11または12のいずれか1つに記載の方法。

【請求項14】

アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼおよび4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼを欠失させることを特徴とする、請求項3～13のいずれか1つに記載の方法。

【請求項15】

配列番号5に記載のDNA配列を用いて欠失させることを特徴とする、請求項14記載の方法。

。

【請求項16】

配列番号6に記載のベクターを使用することを特徴とする、請求項14または15のいずれか1つに記載の方法。

【請求項17】

改変前から既にL-セリンを産生する生物をL-セリンの合成に使用することを特徴とする、請求項1～16のいずれか1つに記載の方法。

【請求項18】

微生物が配列番号7に記載のプラスミドを有することを特徴とする、請求項1～17のいずれか1つに記載の方法。

【請求項19】

葉酸の生合成に関与している酵素の触媒的活性を減弱化するかまたは排除することを特徴とする、請求項1～18のいずれか1つに記載の方法。

【請求項20】

安定性を低下させることにより減弱化または排除を行うことを特徴とする、請求項19記載の方法。

【請求項21】

アロステリック中心の改変により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19または20のいずれか1つに記載の方法。

【請求項22】

酵素活性をリン酸化またはアデニル化により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～21のいずれか1つに記載の方法。

【請求項23】

酵素の活性を蛋白質分解的な分解により低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～22のいずれか1つに記載の方法。

【請求項24】

GTPシクロヒドロラーゼ、ネオプテリン三リン酸ピロホスファターゼ、ネオプテリンアルドラーゼ、6-ヒドロキシメチルブテリンピロホスホキナーゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸シンターゼ、4-アミノ-4-デオキシ-コリスミ酸リアーゼ、ブテロイン酸シンターゼ、葉酸シンターゼおよびジヒドロ葉酸リダクターゼからなる群から選択される少なくとも1種の酵素の活性を低下させるかまたは排除することを特徴とする、請求項19～23のいずれか1つに記載の方法。

【請求項25】

以下の群：

- 3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子、
- ホスホセリントランスアミナーゼをコードするserC遺伝子、
- ホスホセリンホスファターゼをコードするserB遺伝子、

から選択される1種またはそれ以上の遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させること、特に過剰発現させることを特徴とする、請求項1～24のいずれか1つに記載の方法。

【請求項26】

これらの遺伝子の対立遺伝子、特にフィードバック耐性の3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードするserA遺伝子を、単独でまたは組み合わせて亢進させるか、または過剰発現させることを特徴とする、請求項25記載の方法。

【請求項27】

以下の群：

- シスタチオニンリアーゼをコードするaecD遺伝子、
- シスタチオニンリアーゼをコードするmetG遺伝子、
- セリンデヒドラターゼをコードするsdaA遺伝子、
- セリンヒドロキシメルトランスクフェラーゼをコードするglyA遺伝子、
- トリプトファンシンターゼのベータサブユニットをコードするtrpB遺伝子、
- スレオニンデヒドラターゼをコードするilvA遺伝子、
- ピルビン酸キナーゼをコードするpyk遺伝子、

から選択される1種またはそれ以上の遺伝子の活性を、単独でまたは組み合わせて減少または欠失させることを特徴とする、請求項1～15のいずれか1つに記載の方法。

【請求項28】

微生物コリネバクテリウム、プレビバクテリウム、バシラス、腸内細菌として、メタノール利用細菌または酵母を使用することを特徴とする、請求項1～27のいずれか1つに記載の方法。

【請求項29】

以下：

- コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、
コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム ATCC13870、
コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、
プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または
プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020、

からなる群から選択される生物を使用することを特徴とする、請求項28記載の方法。

【請求項30】

システィン、トリプトファンまたはメチオニンの合成に使用することを特徴とする、請求項1~29のいずれか1つに記載の方法。

【請求項31】

配列番号1、3または5に記載の配列を示すことを特徴とする遺伝子配列。

【請求項32】

遺伝子配列が配列番号2、4または6と少なくとも85%の相同性を示すベクター。

【請求項33】

配列番号2、4または6のベクターと同一であることを特徴とする、請求項32記載のベクター。

【請求項34】

配列番号7と少なくとも85%の相同性を示すベクター。

【請求項35】

配列番号7と同一であることを特徴とする、請求項33記載のベクター。

【請求項36】

請求項1~27に記載の方法の少なくとも1つの手段で改変されることを特徴とする微生物。

【請求項37】

コリネバクテリウム、プレビバクテリウム、バシラス、腸内細菌または酵母であることを特徴とする微生物。

【請求項38】

以下：

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032、

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806、

コリネバクテリウム・アセトアシッドフィラム ATCC13870、

コリネバクテリウム・サーモアミノゲン FERM BP-1539、

プレビバクテリウム・フラバム ATCC14067、

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム ATCC13869、または

プレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020、

からなる群から選択される微生物であることを特徴とする、請求項37記載の微生物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/DE2006/001756 |
|---|

| |
|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P13/06 C12N9/88 C12N15/63 |
|--|

| |
|---|
| 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) C12N C12P |
|--|

| |
|---|
| 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 practical, search terms used) |
|--|

| |
|---|
| EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ |
|---|

| |
|--|
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|--|

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------------------|
| X | DE 27 53 422 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 1 June 1978 (1978-06-01) the whole document | 1-6, 19-23, 28,30, 37,38 |
| X | JP 08 107788 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 30 April 1996 (1996-04-30) page 5 - page 7; claim 1 | 31,32 |
| X | WO 03/040681 A (BASF AG [DE]; ZELDER OSKAR [DE]; POMPEJUS MARKUS [DE]; SCHROEDER HARTW) 15 May 2003 (2003-05-15) sequence 25 | 31,32 |

| | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input checked="" 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 document 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 | Date of mailing of the international search report |
|---|--|

| | |
|--------------|------------|
| 6 March 2007 | 19/03/2007 |
|--------------|------------|

| | |
|---|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer |
|---|--------------------|

| |
|-----------------|
| Seranski, Peter |
|-----------------|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/DE2006/001756 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------|
| A | BASSET GILLES J C ET AL: "Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase" PLANT JOURNAL, vol. 40, no. 4, November 2004 (2004-11), pages 453-461, XP002423122 ISSN: 0960-7412 ----- | 7-18, 24-27, 31-39 |
| A | BASSET GILLES J C ET AL: "Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 101, no. 6, 10 February 2004 (2004-02-10), pages 1496-1501, XP002423123 ISSN: 0027-8424 ----- | 7-18, 24-27, 31-39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|---|
| International application No PCT/DE2006/001756 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------------|------------------|
| DE 2753422 | A1 01-06-1978 | CA | 1097240 A1 | 10-03-1981 |
| | | FR | 2372144 A1 | 23-06-1978 |
| | | GB | 1592499 A | 08-07-1981 |
| JP 8107788 | A 30-04-1996 | NONE | | |
| WO 03040681 | A 15-05-2003 | AU | 2002346807 A1 | 19-05-2003 |
| | | BR | 0213774 A | 13-10-2004 |
| | | CN | 1578834 A | 09-02-2005 |
| | | DE | 10154292 A1 | 15-05-2003 |
| | | EP | 1444343 A2 | 11-08-2004 |
| | | KR | 20050042245 A | 06-05-2005 |
| | | US | 2005019877 A1 | 27-01-2005 |
| | | ZA | 200404426 A | 06-06-2005 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| |
|---|
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE2006/001756 |
|---|

| |
|---|
| A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12P13/06 C12N9/88 C12N15/63 |
|---|

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N C12P

Recherchierte, aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|-----------------------------------|
| X | DE 27 53 422 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 1. Juni 1978 (1978-06-01) das ganze Dokument | 1-6, 19-23, 28,30, 37,38 |
| X | JP 08 107788 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 30. April 1996 (1996-04-30) Seite 5 - Seite 7; Anspruch 1 | 31,32 |
| X | WO 03/040681 A (BASF AG [DE]; ZELDER OSKAR [DE]; POMPEJUS MARKUS [DE]; SCHROEDER HARTW) 15. Mai 2003 (2003-05-15) Sequenz 25 | 31,32 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|--|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendeadatum des Internationalen Recherchenberichts |
| 6. März 2007 | 19/03/2007 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Seranski, Peter |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| |
|---|
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE2006/001756 |
|---|

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|--|--------------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | <p>BASSET GILLES J C ET AL: "Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase" <i>PLANT JOURNAL</i>, Bd. 40, Nr. 4, November 2004 (2004-11), Seiten 453-461, XP002423122 ISSN: 0960-7412</p> <p>-----</p> <p>BASSET GILLES J C ET AL: "Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids." <i>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA</i>, Bd. 101, Nr. 6, 10. Februar 2004 (2004-02-10), Seiten 1496-1501, XP002423123 ISSN: 0027-8424</p> <p>-----</p> | 7-18, 24-27, 31-39 |
| A | | 7-18, 24-27, 31-39 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2006/001756

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|---|--|
| DE 2753422 | A1 01-06-1978 | CA 1097240 A1 FR 2372144 A1 GB 1592499 A | 10-03-1981 23-06-1978 08-07-1981 |
| JP 8107788 | A 30-04-1996 | KEINE | |
| WO 03040681 | A 15-05-2003 | AU 2002346807 A1 BR 0213774 A CN 1578834 A DE 10154292 A1 EP 1444343 A2 KR 20050042245 A US 2005019877 A1 ZA 200404426 A | 19-05-2003 13-10-2004 09-02-2005 15-05-2003 11-08-2004 06-05-2005 27-01-2005 06-06-2005 |

フロントページの続き

| | | |
|------------------------------|-----------------|------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| | C 1 2 N 1/21 | |

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ペータース - ヴェンディッシュ・ペトラ
ドイツ連邦共和国、5 2 4 2 8 ユーリッヒ、マルティヌスストラーセ、2 アー

(72) 発明者 シュトルツ・ミヒヤエル
ドイツ連邦共和国、5 2 3 5 5 デューレン、アム・ヒンツエンブッシュ、2 7

(72) 発明者 ザーム・ヘルマン
ドイツ連邦共和国、5 2 4 2 8 ユーリッヒ、ヴェンデリヌスストラーセ、7 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA05 AA10 BA71 BA75 CA03 CA20 DA05 DA10 EA04

GA14 GA25

4B064 AE08 AE14 AE16 AE34 BJ11 CA02 CA05 CA19 CC24 CD12
DA01 DA10

4B065 AA24X AA24Y AB01 BA03 BA25 BB07 BB12 BC01 CA17 CA41
CA43 CA44