

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年8月30日(30.08.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/114802 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 13/12 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/051084
- (22) 国際出願日: 2012年1月19日(19.01.2012)
- (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 2011-035289 2011年2月22日(22.02.2011) 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): 宅見 和浩 (TAKUMI, Kazuhiro) [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). 野中 源(NONAKA, Gen) [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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: L-CYSTEINE-PRODUCING BACTERIUM AND METHOD FOR PRODUCING L-CYSTEINE

(54) 発明の名称: L-システイン生産菌及びL-システインの製造法

(57) Abstract: To develop a novel technique for improving L-cysteine-producing ability of a bacterium, thereby providing an L-cysteine-producing bacterium and a method for producing a compound such as L-cysteine using the L-cysteine-producing bacterium. A bacterium belonging to the family *Enterobacteriaceae*, which has L-cysteine-producing ability and is modified so as to have increased L-aspartate- α -decarboxylase activity, is cultured in a culture medium, and then L-cysteine, a related substance thereof or a mixture of L-cysteine and the related substance is collected from the culture medium, thereby producing L-cysteine, the related substance or the mixture.

(57) 要約: 細菌のL-システイン生産能を向上させる新規な技術を開発し、L-システイン生産菌、及び同細菌を用いたL-システイン等の化合物の製造法を提供する。L-システイン生産能を有し、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するように改変された腸内細菌科に属する細菌を培地中で培養し、該培地からL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することによって、これらの化合物を製造する。



WO 2012/114802 A1

明 細 書

発明の名称： L-システイン生産菌及びL-システインの製造法 技術分野

[0001] 本発明は、L-システイン又はその関連物質の製造法に関し、詳しくはL-システイン又はその関連物質の製造に好適な細菌、及びそれを用いたL-システイン又はその関連物質の製造法に関する。L-システイン及びその関連物質は、医薬品、化粧品及び食品分野で利用されている。

背景技術

[0002] 従来、L-システインは、毛髪、角、羽毛等のケラチン含有物質から抽出することにより、あるいはDL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸を前駆体とする微生物酵素変換により得られている。また、新規な酵素を用いた固定化酵素法によるL-システインの大量生産も計画されている。さらに、微生物を用いた発酵法によるL-システインの生産も試みられている。

[0003] L-システイン生産能を有する微生物としては、例えば、細胞内のセリンアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇したコリネ型細菌（特許文献1）が知られている。また、L-システインによるフィードバック阻害が低減された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼを保持させることにより、L-システイン生産能を高める技術が知られている（特許文献2～4）。

[0004] また、L-システイン分解系を抑制することによってL-システイン生産能が高められた微生物としては、シスタチオニン-β-リアーゼ（特許文献2）、トリプトファンナーゼ（特許文献5）、O-アセチルセリンスルフヒドリラーゼB（特許文献6）の活性を低下又は欠失させたコリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌が知られている。

[0005] さらに、YdeDタンパク質をコードするydeD遺伝子は、システイン経路の代謝産物の排出に関与していることが知られている（非特許文献1）。また、細胞に毒性を示す物質を排出するのに適したタンパク質をコードする遺伝子であるmar遺伝子座、emr遺伝子座、acr遺伝子座、cmr

遺伝子座、*mex* 遺伝子、*bmr* 遺伝子、若しくは *qacA* 遺伝子（特許文献 7）、又は *emrAB*、*emrKY*、*yojIH*、*acrEF*、*bcr*、若しくは *cusA* 遺伝子（特許文献 8）の発現を上昇させることにより L-システイン生産能を高める技術が知られている。

[0006] また、L-システイン生産菌として、*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エシェリヒア・コリ（特許文献 9）が知られている。

[0007] さらに、セリンによるフィードバック阻害が低減された 3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型 *serA* が知られており、エシェリヒア・コリの L-システイン生産に利用することが示唆されている（特許文献 10、11）。

[0008] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ（EC 4.1.1.11）は、L-アスパラギン酸を脱炭酸し β -アラニンを生成する反応を触媒する酵素である。L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼは、一般的に、不活性な前駆体タンパク質として翻訳され、その後、特定の部位でプロセッシングされ活性なタンパク質となることが知られている。L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼは、L-システイン酸により競合阻害を受けることが知られているが（非特許文献 2）、L-システインにより阻害を受けるかは知られていない。

[0009] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼの触媒反応により生成した β -アラニンは、パントテン酸生合成の中間産物として用いられ、パントテン酸はコエンザイム A（CoA）に変換されて生体内で利用される。したがって、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼは、アセチル CoA の生合成の鍵酵素となり得る（非特許文献 3）。しかしながら、L-システインの生産において、アセチル CoA の生合成が律速となり得るかは知られていない。

[0010] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼをコードする *panD* 遺伝子の発現を増強することにより、パントテン酸の生産量が増大することが知

られている（非特許文献4）。また、パントテン酸を含有する培地を用いてL-グルタミン酸を製造する方法が知られている（特許文献12）。

[0011] しかしながら、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼまたはパントテン酸と、L-システイン生産との関連は知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：特開2002-233384号公報
特許文献2：特開平11-155571号公報
特許文献3：米国特許出願公開第20050112731号
特許文献4：米国特許第6218168号
特許文献5：特開2003-169668号公報
特許文献6：特開2005-245311号公報
特許文献7：米国特許第5972663号
特許文献8：特開2005-287333号公報
特許文献9：国際公開パンフレット第01/27307号
特許文献10：米国特許第5856148号
特許文献11：米国特許出願公開第20050009162号
特許文献12：国際公開パンフレット第2004/111258号

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：Dassler et al., Mol. Microbiol. 36, 1101-1112 (2000)
非特許文献2：Williamson JM. et al., J Biol Chem. 1979 Aug 25;254(16):8074-82.
非特許文献3：Kennedy J. et al., Anal Biochem. 2004 Apr 1;327(1):91-6.
非特許文献4：Dusch N. et al., Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1530-9.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、細菌のL-システイン生産能を向上させる新規な技術を開発し、L-システイン生産菌、及び同細菌を用いたL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼの活性が増大するように細菌を改変することによってL-システイン生産能を向上させることができることを見出した。本発明者は、さらに、L-システイン生産に用いる培地にパントテン酸を添加することによりL-システイン生産能を向上させることができることを見出した。以上に基づき、本発明は完成された。

[0016] すなわち本発明は以下のとおり例示できる。

[1]

L-システイン生産能を有し、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するように改変された腸内細菌科に属する細菌。

[2]

p a n D遺伝子の発現量を増大させることにより、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大した、前記細菌。

[3]

p a n D遺伝子のコピー数を高めること、又は、同遺伝子の発現調節配列を改変することにより、p a n D遺伝子の発現量が増大した、前記細菌。

[4]

前記p a n D遺伝子が、下記(A)または(B)に記載のタンパク質をコードするDNAである、前記細菌。

(A) 配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または60に示すアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、

26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または60に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

[5]

前記 p a n D 遺伝子が、下記 (a) または (b) に記載の DNA である、前記細菌。

(a) 配列番号7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または59に示す塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または59に示す塩基配列と相補的な塩基配列又は該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、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[6]

前記L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質が、下記(1)および(2)の特徴を有する、前記細菌。

(1) 24位のグリシンおよび25位のセリンが保存されている。

(2) 9位のリジン、11位のヒスチジン、57位のスレオニン、および58位のチロシンが保存されている。

[7]

前記L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質が、さらに下記(3)の特徴を有する、前記細菌。

(3) 15位のバリン、16位のスレオニン、20位のロイシン、22位の

チロシン、29位のアスパラギン酸、42位のグルタミン酸、51位のアスパラギン、52位のグリシン、54位のアルギニン、60位のイソロイシン、72位のアスパラギン、73位のグリシン、74位のアラニン、75位のアラニン、76位のアラニン、83位のアスパラギン酸、および86位のイソロイシンが保存されている。

[8]

さらに、下記の性質(1)～(3)の1またはそれ以上を有する前記細菌。

(1) セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇するように改変されている。

(2) L-システイン排出系が強化されている。

(3) 3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性が上昇するように改変されている。

[9]

前記細菌がエシェリヒア属細菌である、前記細菌。

[10]

前記細菌がエシェリヒア・コリである、前記細菌。

[11]

前記細菌がパントエア属細菌である、前記細菌。

[12]

前記細菌がパントエア・アナナティスである、前記細菌。

[13]

前記細菌を培地中で培養し、該培地からL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することを特徴とする、L-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法。

[14]

前記培地がパントテン酸を含有する、前記方法。

[15]

Ｌ－システイン生産能を有する腸内細菌科に属する細菌を、パントテン酸を含有する培地中で培養し、該培地からＬ－システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することを特徴とする、Ｌ－システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法。

[16]

前記培地におけるパントテン酸の含有量が1 mg/L以上である、前記方法。

[17]

前記関連物質がＬ－シスチン、チアゾリジン誘導体、またはＬ－メチオニンである、前記方法。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]種々の細菌由来PanDタンパク質のアラインメント結果を示す図。保存されているアミノ酸残基を枠で囲んである。

[図2]パントテン酸を種々の濃度で添加した際のＬ－システイン生産量を示す図。

発明を実施するための形態

[0018] <1>本発明の細菌

本発明の細菌は、Ｌ－システイン生産能を有し、かつ、Ｌ－アスパルテート- α -デカルボキシラーゼの活性が増大するように改変された、腸内細菌科に属する細菌である。

[0019] 本発明において、Ｌ－システインとは、フリー体のＬ－システインもしくはその塩、又はそれらの混合物であってもよい。塩としては、例えば硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩が挙げられる。

[0020] 本発明において、Ｌ－システイン生産能とは、細菌を培地中で培養したときに、培地中または菌体内にＬ－システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を生成し、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。Ｌ－システイン生産能を有する細菌とは、野生株または親株より

も多い量のL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を生産し培地中または菌体内に蓄積することができる細菌を意味する。L-システイン生産能を有する細菌とは、好ましくは、0.05 g/L以上、より好ましくは0.1 g/L以上、特に好ましくは0.2 g/L以上の量のL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を生産し培地に蓄積することができる細菌を意味する。

[0021] 細菌が産生したL-システインは、培地中で、ジスルフィド結合によって一部がL-シスチンに変換されることがある。また、L-システインと培地に含まれるチオ硫酸との反応によってS-スルホシステインが生成することがある (Szczepkowski T.W., Nature, vol.182 (1958))。さらに、細菌の細胞内で生成したL-システインは、細胞内に存在するケトン又はアルデヒド、例えばピルビン酸と縮合し、ヘミチオケタールを中間体としてチアゾリジン誘導体が生成することがある (特許第2992010号)。これらチアゾリジン誘導体及びヘミチオケタールは、平衡混合物として存在することがある。

[0022] また、L-システインは、 γ -グルタミルシステイン、グルタチオン、シスタチオニン、ホモシステイン、L-メチオニン、S-アデノシルメチオニン等の生合成の出発物質として用いられる。したがって、L-システイン生産能に加えて、これらL-システインを経由して生産される化合物を産生する能力を有する細菌を用いることによって、これらの化合物を製造することができる。

[0023] したがって、本発明において、L-システイン生産能とは、L-システインのみを培地中又は菌体内に蓄積する能力に限られず、L-システイン、L-シスチン、前記のようなL-システインの誘導体 (例えばS-スルホシステイン、チアゾリジン誘導体、ヘミチオケタール)、もしくは前記のようなL-システインを経由して生産される他の化合物 (例えば γ -グルタミルシステイン、グルタチオン、シスタチオニン、ホモシステイン、L-メチオニン、S-アデノシルメチオニン)、又はこれらの混合物を培地中又は菌体内に蓄積する能力も含まれるものとする。なお、本発明において、L-シスチ

ン、前記のようなL-システインの誘導體、及び前記のようなL-システインを経由して生産される他の化合物をまとめてL-システインの関連物質という。

[0024] L-システイン生産能を有する細菌としては、本来的にL-システイン生産能を有するものであってもよいが、下記のような細菌を、変異法や組換えDNA技術を利用して、L-システイン生産能を有するように改変したものであってもよい。

[0025] 本発明に用いる細菌としては、エシェリヒア(*Escherichia*)属、エンテロバクター(*Enterobacter*)属、パントエア(*Pantoea*)属、クレブシエラ(*Klebsiella*)属、セラチア(*Serratia*)属、エルビニア(*Erwinia*)属、サルモネラ(*Salmonella*)属、モルガネラ(*Morganella*)属など、腸内細菌科に属する細菌であって、L-システイン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、中でもエシェリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌、パントエア属細菌、エルビニア属細菌、エンテロバクター属細菌、又はクレブシエラ属細菌を用いることが望ましい。

[0026] エシェリヒア属細菌としては、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。エシェリヒア属細菌としては、例えば、エシェリヒア・コリが挙げられる。エシェリヒア・コリとしては具体的には、プロトタイプの野生株K12株由来のエシェリヒア・コリ W3110株 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ MG1655株 (ATCC 47076) 等が挙げられる。

- [0027] これらの菌株は、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。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。
- [0028] エンテロバクター属細菌としては、例えば、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*) が挙げられる。エンテロバクター属の代表的な株としては、エンテロバクター・アグロメランス ATCC 12287 株が挙げられる。また、具体的には、欧州特許出願公開 9 5 2 2 2 1 号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。
- [0029] パントエア属細菌としては、例えば、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュールティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が挙げられる。
- [0030] パントエア・アナナティスとしては、具体的には、パントエア・アナナティス AJ 13355 株 (FERM BP-6614)、SC 17 株 (FERM BP-11091) が挙げられる。AJ 13355 株は、静岡県磐田市の土壌から、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分離された株である。SC 17 株は、AJ 13355 株から、粘液質低生産変異株として選択された株である (米国特許第 6, 596, 517 号)。パントエア・アナナティス AJ 13355 株は、平成 10 年 2 月 19 日に、通産省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-16644 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が付与されている。また、パントエア・アナナティスSC17株は、平成21年2月4日に、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）に寄託され、受託番号FERM BP-11091が付与されている。尚、パントエア・アナナティスAJ13355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AJ13355株として寄託されたが、近年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。

[0031] エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロボラ (*Erwinia amylovora*)、エルビニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) 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 (*Klebsiella planticola*) が挙げられる。

[0032] なお、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、 γ -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)。よって、エンテロバクター属に属する細菌には、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験等により、パントエア・アグロメランス又はパントエア・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)。例えば、エンテロバクター・アグロメランスには、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、パントエア・アナナティス、又はパントエア・スチューアルティに再分類されているものがある。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・スチューア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)。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、パントエア属、及びエルビニア属等のいずれに属するものであってもよい。

[0033] 以下、腸内細菌科に属する細菌にL-システイン生産能を付与する方法、又はこれらの細菌のL-システイン生産能を増強する方法について述べる。

[0034] 細菌にL-システイン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-システイン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-システイン生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独であってもよく、2種又はそれ以上であってもよい。また、発現が増強されるL-システイン生合成系酵素も、単独であってもよく、2種又はそれ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せられてもよい。

[0035] L-システイン生産能を有する栄養要求性変異株、L-システインのアナログ耐性株、又は代謝制御変異株は、親株又は野生株を通常の変異処理、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（MNNG）もしくはエチルメタンサルフォネート（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-システイン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。

[0036] 以下、腸内細菌科に属する細菌にL-システイン生産能を付与する方法、又はこれらの細菌のL-システイン生産能を増強する方法、及びL-システイン生産能を有する細菌について具体的に例示する。

[0037] L-システイン生産能の付与又は増強、及びL-システイン生産菌
細菌のL-システイン生産能は、L-システイン生合成経路の酵素、又はL-セリン等、同経路の基質となる化合物の生成に関与する酵素の活性を増

強することにより向上させることができる。そのような酵素としては、例えば、セリンアセチルトランスフェラーゼ（S A T）や3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ（P G D）が挙げられる。酵素活性の増強は、後述するように、目的の酵素をコードする遺伝子の発現を増強することや、目的の酵素の非活性を増強することにより達成できる。セリンアセチルトランスフェラーゼは、L-システインによるフィードバック阻害を受けるため、特に、このフィードバック阻害が低減又は解除されたセリンアセチルトランスフェラーゼをコードする変異型 *c y s E* 遺伝子を細菌に保持させることによって、同酵素活性を増強することができる。また、3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼは、セリンによるフィードバック阻害を受けるため、特に、このフィードバック阻害が低減又は解除された変異型3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型 *s e r A* 遺伝子を細菌に保持させることによって、同酵素活性を増強することができる。

[0038] エシェリヒア・コリに由来する、フィードバック阻害耐性の変異型 S A T として具体的には、256位のメチオニン残基がグルタミン酸残基に置換された変異型 S A T（特開平11-155571）、256位のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型 S A T（Denk, D. and Boeck, A., J. General Microbiol., 133, 515-525 (1987)）、97位のアミノ酸残基から273位のアミノ酸残基までの領域における変異、又は227位のアミノ酸残基からC末端領域の欠失を有する変異型 S A T（W097/15673、米国特許第6218168号）、野生型 S A T の89～96位に相当するアミノ酸配列において1又は複数の変異を含み、かつ、L-システインによるフィードバック阻害が脱感作されている、変異型 S A T（米国特許公開第20050112731(A1)）、95位及び96位の V a l 残基及び A s p 残基が、各々 A r g 残基及び P r o 残基に置換された変異型 S A T（変異型遺伝子名 *c y s E 5*、米国特許公開第20050112731(A1)）、及び、167位のスレオニン残基がアラニン残基に置換された変異型 S A T（米国特許第6218168号、米国特許公開第20050112731(A1)）等が知られている。

- [0039] S A Tをコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリの遺伝子に限られず、S A T活性を有するタンパク質をコードするものであれば、使用することができる。例えば、L-システインによるフィードバック阻害を受けないシロイヌナズナ由来のS A Tアイソザイムが知られており、これをコードする遺伝子を用いることもできる (FEMS Microbiol. Lett., 179 (1999) 453-459)。
- [0040] また、セリンによるフィードバック阻害耐性の変異型 P G Dをコードする遺伝子としては、serA5遺伝子 (米国特許第6, 1 8 0, 3 7 3号) が知られている。
- [0041] また、細菌のL-システイン生産能は、L-システイン排出系を強化することによっても向上させることができる。L-システイン排出系は、L-システインの排出に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現を増強することにより強化することができる。L-システインの排出に関与するタンパク質としては、y d e D遺伝子にコードされるY d e Dタンパク質、y f i K遺伝子にコードされるY f i Kタンパク質、y e a S遺伝子にコードされるY e a Sタンパク質が挙げられる。よって、y d e D遺伝子 (Dassler et al., Mol. Microbiol. 36, 1101-1112 (2000))、y f i K遺伝子 (特開2004-49237)、又はy e a S遺伝子 (欧州特許出願公開第1016710号明細書) の発現を増強することにより、L-システイン生産能を高めることができる。また、Y e a Sタンパク質の28位のスレオニン残基、137位のフェニルアラニン残基、および/または188位のロイシン残基に変異を導入することによっても、L-システイン排出系が強化されL-システイン生産能を高めることができる (欧州特許出願公開第2218729号明細書)。具体的には、Y e a Sタンパク質の28位のスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異、137位のフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、および/または188位のロイシン残基をグルタミンに置換する変異が好ましい (欧州特許出願公開第2218729号明細書)。

- [0042] また、細胞に毒性を示す物質を排出するのに適したタンパク質の中には、*L*-システインの排出に関与するものがある。よって、それらをコードする遺伝子の発現を増強することにより*L*-システイン排出系を強化することができる。例えば、細胞に毒性を示す物質を排出するのに適したタンパク質をコードする遺伝子である*m a r*遺伝子座、*e m r*遺伝子座、*a c r*遺伝子座、*c m r*遺伝子座、*m e x*遺伝子、*b m r*遺伝子、若しくは*q a c A*遺伝子（米国特許第5972663号）、又は*e m r A B*、*e m r K Y*、*y o j I H*、*a c r E F*、*b c r*、若しくは*c u s A*遺伝子（特開2005-287333号公報）の発現を上昇させることにより、*L*-システイン生産能を高めることができる。
- [0043] また、硫酸塩／チオ硫酸塩輸送系を増強することによっても、*L*-システイン生産能を向上させることができる。硫酸塩／チオ硫酸塩輸送系タンパク質群は、*c y s P T W A M*遺伝子クラスターによってコードされている（特開2005-137369号公報、EP1528108号明細書）。
- [0044] また、細菌の*L*-システイン生産能は、*L*-システインの分解に寄与するシステインデスルフヒドラーゼの活性を低下させることにより向上させることができる。エシェリヒア・コリでは、システインデスルフヒドラーゼ活性を有するタンパク質として、*m e t C*遺伝子にコードされるシスタチオニン-β-リアーゼ（特開平11-155571号、Chandra et. al., *Biochemistry*, 21 (1982) 3064-3069）、*t n a A*遺伝子にコードされるトリプトファンナーゼ（特開2003-169668、Austin Newton et. al., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1211-1218）、*c y s M*遺伝子にコードされるO-アセチルセリン スルフヒドリラーゼB（特開2005-245311）、及び、*m a l Y*遺伝子にコードされる*M a l Y*（特開2005-245311）が知られている。酵素活性の低下は、後述する手法により達成できる。
- [0045] *L*-システイン生産菌は、下記の性質（1）～（3）の1またはそれ以上を有するのが好ましい。
- （1）セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇するように改変されて

いる。

(2) L-システイン排出系が強化されている。

(3) 3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性が上昇するように改変されている。

[0046] L-システイン生産菌としては、具体的には、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 (SAT) をコードする複数種の *cysE* アレルで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM15 株 (米国特許第 6, 218, 168 号)、細胞に毒性を示す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エシェリヒア・コリ W3110 株 (米国特許第 5, 972, 663 号)、システインデスルフヒドラーゼ活性が低下したエシェリヒア・コリ (特開平 11-155571 号公報)、*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エシェリヒア・コリ W3110 株 (WO01/27307) などのエシェリヒア属に属する株、*ydjD* 遺伝子、変異型 *cysE* 遺伝子および変異型 *serA5* 遺伝子を保持するプラスミド pACYC-DES (特開 2005-137369 (US20050124049 (A1)、EP1528108 (A1))) を有するエシェリヒア・コリ等が挙げられるが、これらに限定されない。pACYC-DES は、前記 3 遺伝子を pACYC184 に挿入することによって得られたプラスミドであり、各遺伝子は *PompA* プロモーターにより制御される。

[0047] L-システインを出発物質として生合成される γ -グルタミルシステイン、グルタチオン、シスタチオニン、ホモシステイン、L-メチオニン、及び S-アデノシルメチオニン等の化合物の生産能も、目的の化合物の生合成系路の酵素活性を増強するか、その生合成系路から分岐する経路の酵素又は目的化合物を分解する酵素の活性を低下させることによって、付与又は増強することができる。

[0048] 例えば、 γ -グルタミルシステイン生産能は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素活性の増強及び／又はグルタチオン合成酵素活性の低下によって、

増強することができる。また、グルタチオン生産能は γ -グルタミルシステイン合成酵素活性及び／又はグルタチオン合成酵素活性の増強によって、付与又は増強することができる。また、グルタチオンによるフィードバック阻害に対して耐性をもつ変異型 γ -グルタミルシステイン合成酵素を用いることでも γ -グルタミルシステインやグルタチオンの生産能を増強させることができる。グルタチオンの生産についてはLiらの総説 (Yin Li, Gongyuan Wei, Jian Chen. Appl Microbiol Biotechnol (2004) 66: 233-242) に詳しく記載されている。

- [0049] L-メチオニン生産能は、L-スレオニン要求性またはノルロイシン耐性を付与することによって、付与又は増強することができる (特開2000-139471号)。E. coliにおいては、L-スレオニンの生合成に関与する酵素の遺伝子は、スレオニンオペロン (thrABC) として存在し、例えば、thrBC部分を欠失させることによってL-ホモセリン以降の生合成能を失ったL-スレオニン要求株を取得することができる。ノルロイシン耐性株では、S-アデノシルメチオニンシンセターゼ活性が弱化され、L-メチオニン生産能が付与又は増強される。E. coliにおいては、S-アデノシルメチオニンシンセターゼはmetK遺伝子にコードされている。また、L-メチオニン生産能は、メチオニンリプレッサーの欠損、ホモセリントランスサクシニラーゼ、シスタチオニン γ -シンテース、及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼIなどのL-メチオニン生合成に関与する酵素の活性の増強によっても、付与又は増強することができる (特開2000-139471号)。E. coliにおいては、メチオニンリプレッサーはmetJ遺伝子に、ホモセリントランスサクシニラーゼはmetA遺伝子に、シスタチオニン γ -シンテースはmetB遺伝子に、アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼIIはmetL遺伝子にそれぞれコードされている。また、L-メチオニンによるフィードバック阻害に対して耐性をもつ変異型ホモセリントランスサクシニラーゼを用いることでもL-メチオニンの生産能を付与又は増強することができる (特開2000-139471号、US20090029424)。なお、L-メチオニンはL-システインを中間体として生合成

されるため、L-システインの生産能の向上によりL-メチオニンの生産能も向上させることができる（特開2000-139471号、US20080311632）。よって、L-メチオニン生産能を付与又は増強するためには、L-システイン生産能を付与又は増強させることも有効である。

[0050] L-メチオニン生産菌としては、具体的には、AJ11539 (NRRL B-12399)、AJ11540 (NRRL B-12400)、AJ11541 (NRRL B-12401)、AJ11542 (NRRL B-12402)（英国特許第2075055号）、L-メチオニンのアナログであるノルロイシン耐性を有する218株 (VKPM B-8125)(ロシア特許第2209248号)や73株 (VKPM B-8126)（ロシア特許第2215782号）等のE. coli株が挙げられる。

[0051] また、L-メチオニン生産菌としては、E. coli W3110由来のAJ13425 (FERM P-16808)（特開2000-139471号）を用いることもできる。AJ13425は、メチオニンリプレッサーを欠損し、細胞内のS-アデノシルメチオニンシンターゼ活性が弱体化し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性、シスタチオニナーシンターゼ活性、及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強されたL-スレオニン要求株である。AJ13425は、平成10年5月14日より、通商産業省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）に寄託され、受託番号FERM P-16808が付与されている。

[0052] シスタチオニン、ホモシステインはL-メチオニン生合成経路の中間体であるため、これら物質の生産能を増強するためには、上記のL-メチオニンの生産能を増強させる方法を一部利用することが有効である。シスタチオニン生産能を増強させる具体的方法として、メチオニン要求性変異株を用いる方法（特願2003-010654）や、発酵培地にシステイン（またはその生合成原料）及び／又はホモセリン（またはその生合成原料）を添加する方法（特開2005-168422）が知られている。ホモシステインはシスタチオニンを前駆体とするため、ホモシステイン生産能を増強するためには、シスタチオニン生産能を増強させる上記方法も有効である。

[0053] また、L-メチオニンを出発物質として生合成されるS-アデノシルメチオニン等の化合物の生産能も、目的の化合物の生合成系路の酵素活性を増強するか、その生合成系路から分岐する経路の酵素又は目的化合物を分解する酵素の活性を低下させることによって、付与又は増強することができる。例えば、S-アデノシルメチオニン生産能は、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ活性を強化することや（EP0647712、EP1457569）、mdfA遺伝子にコードされる排出因子MdfAを強化すること（US7410789）で付与又は増強することができる。

[0054] 以下、システインデスルフィドラーゼ等の酵素活性を低下させる手法について記載する。本発明において、「酵素の活性が低下する」とは、目的の酵素活性が野生株や親株等の非改変株と比較して減少していることを意味し、活性が完全に消失している場合を含む。酵素活性は、例えば非改変株と比較して75%以下、50%以下、25%以下、又は10%以下に低下していることが好ましく、活性が完全に消失しているのが特に好ましい。なお、酵素によっては、活性を完全に消失させないのが好ましい場合もある。

[0055] 酵素活性が低下するような改変は、例えば、目的の酵素をコードする遺伝子の発現を低下させることにより達成できる。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーターやSD配列等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。また、発現調節配列の一部または全部を欠失させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、アンチセンスRNAを発現させることによっても達成できる。

[0056] また、酵素活性が低下するような改変は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域の一部または全部を欠失させることにより達成できる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。酵素活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域等のいずれの領域であってもよい。

通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。

[0057] また、酵素活性が低下するような改変は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、あるいは1～2塩基を付加または欠失するフレームシフト変異を導入すること等によっても達成できる（Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617 (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515(1998), Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839(1991)）。

[0058] また、酵素活性が低下するような改変は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域に他の配列を挿入することによっても達成できる。挿入部位は、遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、コードされるタンパク質の機能を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性等のマーカー遺伝子やL-システイン生産に有用な遺伝子が挙げられる。

[0059] 染色体上の遺伝子を上記のように改変することは、例えば、遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能するタンパク質を産生しないように改変した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子を含む組換えDNAで細菌を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子に置換することによって達成できる。その際、組換えDNAには、宿主の栄養要求性等の形質にしたがって、マーカー遺伝子を含ませると操作がしやすい。欠失型遺伝子によってコードされるタンパク質は、生成したとしても、野生型タンパク質とは異なる立体構造を有し、機能が低下又は消失する。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、「Redドリブンインテグラー

ション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法と入ファージ由来の切り出しシステム (Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002)) とを組み合わせた方法 (W02005/010175号参照) 等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法などがある (米国特許第6303383号、特開平05-007491号)。

[0060] また、酵素活性が低下するような改変は、例えば、突然変異処理により行ってもよい。突然変異処理としては、紫外線照射、または、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG)、エチルメタンсульフォネート (EMS)、メチルメタンсульフォネート (MMS) 等の通常変異処理に用いられている変異剤による処理が挙げられる。

[0061] 酵素活性が低下したことは、同酵素活性を測定することにより確認できる。システインデスルフヒドラーゼ活性は、特開2002-233384公報に記載された手法により測定することができる。

[0062] 標的遺伝子の転写量が低下したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。

[0063] 標的タンパク質の量が低下したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。

[0064] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性の増大

本発明の細菌は、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するように改変されている。本発明の細菌は、上述したようなL-システ

イン生産能を有する腸内細菌科に属する細菌を、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大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、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するように改変を行った後に、L-システイン生産能を付与又は増強してもよい。

[0065] 本発明において、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性とは、L-アスパラギン酸を脱炭酸し β -アラニンを生成する反応を触媒する活性をいう。また、本発明において、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼという。L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大することで、 β -アラニンを中間代謝産物として生合成されるパントテン酸の生産量が増大すると予想される。

[0066] 「L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大する」とは、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が野生株又は親株等の非改変株に対して増大していることを意味する。L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性は、非改変株と比較して増大していれば特に制限されないが、非改変株と比較して好ましくは150%以上、より好ましくは200%以上、さらに好ましくは300%以上に向上している。また、「L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大する」とは、もともとL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有する菌株においてL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増大させることだけでなく、もともとL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が存在しない菌株にL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を付与することを含む。また、結果としてL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大する限り、細菌が本来有するL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼを弱体化および/または欠損させた上で、好適なL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼを導入してもよい。

[0067] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増大させるような改

変は、例えば、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼをコードする遺伝子の発現を増強させることによって達成される。

[0068] 遺伝子の発現の増強は、例えば、遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。

[0069] 遺伝子のコピー数の増加は、染色体に目的の遺伝子を導入することにより達成できる。染色体への遺伝子の導入は、例えば相同的組み換えを利用して行うことができる。例えば、染色体上に多数のコピーが存在する配列を標的として相同的組み換えを行うことで、染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入することができる。染色体上に多数のコピーが存在する配列としては、反復DNA配列 (repetitive DNA) や、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピート等が挙げられるが、これらに限定されない。また、染色体上に存在するL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ遺伝子の横にタンデムに連結させてもよいし、染色体上の不要な遺伝子上に重複して組み込んでもよい。このような遺伝子導入は、温度感受性ベクターを用いて、あるいはインテグレーションベクターを用いて達成することが出来る。また、米国特許第5, 595, 889号に開示されるように、トランスポゾンに遺伝子を組み込み、それを染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入するよう転移させることも可能である。トランスポゾンとしては、例えば、Mu、Tn10、Tn5が利用できる。染色体に遺伝子が導入されたことは、遺伝子の一部をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行うことによって確認できる。

[0070] また、遺伝子のコピー数の増加は、目的遺伝子を含むベクターを宿主細菌に導入することによっても達成できる。例えば、目的遺伝子を含むDNA断片を、宿主細菌で機能するベクターと連結して目的遺伝子の発現ベクターを構築し、当該発現ベクターで宿主細菌を形質転換することにより、目的遺伝子のコピー数を増加させることができる。ベクターとしては、宿主細菌の細胞内において自律複製可能なベクターを用いることができる。ベクターは、マルチコピーベクターであるのが好ましい。また、形質転換体を選択するた

めに、ベクターは抗生物質耐性遺伝子などのマーカーを有することが好ましい。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pACYC184、pBR322、pSTV29（いずれもタカラバイオ社より入手可）、pMW219（ニッポンジーン社）、pTrc99A（ファルマシア社）、pPROK系ベクター（クロンテック社）、pKK233-2（クロンテック社製）、pET系ベクター（ノバジェン社）、pQE系ベクター（キアゲン社）、広宿主域ベクターRSF1010等が挙げられる。

[0071] また、遺伝子の発現の増強は、遺伝子の転写効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の転写効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。「より強力なプロモーター」とは、遺伝子の転写が、もともと存在している野生型のプロモーターよりも向上するプロモーターを意味する。より強力なプロモーターとしては、例えば、公知の高発現プロモーターであるT7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、およびPLプロモーター等を用いることができる。また、より強力なプロモーターとしては、各種レポーター遺伝子を用いることにより、在来プロモーターの高活性型のものを取得してもよい。例えば、プロモーター領域内の-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけることにより、プロモーターの活性を高めることができる（国際公開第00/18935号）。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文（Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)）等に記載されている。

[0072] また、遺伝子の発現の増強は、遺伝子の翻訳効率を向上させることにより達成できる。遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、染色体上の遺伝子のSD配列（リボソーム結合部位（RBS）ともいう）をより強力なSD配列に置換することにより達成できる。「より強力なSD配列」とは、mRNAの翻

訳が、もともと存在している野生型のSD配列よりも向上するSD配列を意味する。より強力なSD配列としては、例えば、ファージT7由来の遺伝子10のRBSが挙げられる(Olins P. O. et al, Gene, 1988, 73, 227-235)。さらに、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域、特に開始コドンのすぐ上流の配列(5'-UTR)における数個のヌクレオチドの置換、挿入、または欠失がmRNAの安定性および翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することによっても遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。

[0073] 本発明においては、プロモーター、SD配列、およびRBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の遺伝子の発現に影響する部位を総称して「発現調節領域」ともいう。発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することができる。これら発現調節領域の改変は、例えば、温度感受性ベクターを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法(WO2005/010175)により行うことができる。

[0074] また、遺伝子の発現の増強は、目的の遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、又は、目的の遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成される。レギュレーターとしては、例えばLysRファミリーなどに属するものが挙げられ、データベースEcoCyc (<http://ecocyc.org/>) 等を利用して見出すことができる。目的の遺伝子の転写量の増大や目的のタンパク質の量の増大を指標として、レギュレーターの改変を行えばよい。

[0075] 上記のような遺伝子の発現を増強させる手法は、単独で用いてもよく、任意に組み合わせて用いてもよい。

[0076] また、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増大させるような改変は、例えば、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼの非活性を増強することによっても達成できる。非活性が増強されたL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼは、例えば、種々の細菌を探索し取得する

ことができる。また、在来のL-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼに変異を導入することで高活性型のものを取得してもよい。非活性の増強は、単独で用いてもよく、上記のような遺伝子の発現を増強させる手法と任意に組み合わせて用いてもよい。

[0077] 形質転換の方法は特に限定されず、従来知られた方法を用いることができる。例えば、エシェリヒア・コリ K-12株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)) や、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)) を用いることができる。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。

[0078] 目的の酵素活性が増大したことは、同酵素活性を測定することにより確認できる。L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性は、非特許文献4 (Dusch N. et al., Appl Environ Microbiol. 1999 Apr;65(4):1530-9.) に記載された手法により測定することができる。

[0079] 目的の遺伝子の転写量が増大したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株、あるいは非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)) 。

[0080] 目的のタンパク質の量が増大したことの確認は、抗体を用いてウェスタン

ブロットによって行うことが出来る (Molecular cloning(Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。

[0081] なお、上記のような遺伝子の発現や酵素の非活性を増強する手法は、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼやそれをコードする遺伝子に限られず、SAT等の任意の酵素やそれらをコードする遺伝子等についても同様に適用できる。

[0082] L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼは、通常、panD遺伝子によりコードされる。panD遺伝子がコードするタンパク質をPanDタンパク質ともいう。エシェリヒア・コリ K12 MG1655株のpanD遺伝子は、NCBIデータベースに、GenBank accession NC_000913(VERSION NC_000913.2 GI:49175990)として登録されているゲノム配列中、146314~146694位の配列の相補配列に相当する。エシェリヒア・コリ K12 MG1655株のpanD遺伝子は、ECK0130、JW0127と同義である。また、エシェリヒア・コリ K12 MG1655株のPanDタンパク質は、GenBank accession NP_414673(version NP_414673.1 GI:16128124, locus_tag= "b0131")として登録されている。前記MG1655株のpanD遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号7及び8に示す。また、パントエア・アナナティス SC17株のpanD遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号9及び10に示す。また、コリネバクテリウム・グルタミカム2256株のpanD遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号11及び12に示す。バチラス・サブチリス168株のpanD遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13及び14に示す。

[0083] 細菌が属する属、種、又は菌株によって、panD遺伝子の塩基配列に差異が存在することがあるため、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増大させるような改変を受けるpanD遺伝子は、L-アスパルテ

ートー α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、配列番号7、9、11、または13に示す塩基配列のバリエーションであってもよい。panD遺伝子のバリエーションは、例えば配列番号7、9、11、または13の塩基配列を参考にして、BLAST等によって検索出来る(<http://blast.genome.jp/>)。また、panD遺伝子のバリエーションは、同遺伝子のホモログを含む。同遺伝子のホモログとしては、例えば腸内細菌科に属する細菌やコリネ型細菌等の微生物の染色体を鋳型にして、例えば配列番号7、9、11、または13の塩基配列に基づいて調製される合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRで増幅可能な遺伝子が挙げられる。

[0084] また、上記以外の細菌のpanD遺伝子ホモログの例として、以下の細菌のpanD遺伝子が挙げられる。カッコ内は、エシェリヒア・コリK12株のPanDタンパク質（配列番号8）と、各細菌のpanD遺伝子ホモログがコードするPanDタンパク質との、BLASTによる同一性（%）を示す。これらの遺伝子の塩基配列及びそれらがコードするアミノ酸配列を、配列番号15～60に示す。なお、panD遺伝子は、L-アスパルテート α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、これらホモログのバリエーションであってもよい。

Arthrobacter aureus ATCC BAA-1386 (54)

Bacteroides fragilis ATCC 25285 (44)

Bacteroides vulgatus ATCC 8482 (48)

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 (43)

Chlorobium tepidum ATCC 49652 (47)

Citrobacter koseri ATCC BAA-895 (96)

Clavibacter michiganensis NCPPB 382 (51)

Corynebacterium jeikeium NCTC 11915 (48)

Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406 (44)

Enterobacter sakazakii ATCC BAA-894 (90)

Flavobacterium johnsoniae ATCC 17061 (45)

Flavobacterium psychrophilum ATCC 49511 (44)
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH78578 ATCC 700721 (89)
Methylophilus methylotrophus ATCC 53528 (53)
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ATCC 19851 (50)
Parabacteroides distasonis ATCC 8503 (48)
Porphyromonas gingivalis ATCC 53978 (45)
Rhodococcus sp (49)
Saccharopolyspora erythraea ATCC 11635 (51)
Salinibacter ruber ATCC BAA-605 (44)
Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62 ATCC BAA-731 (96)
Streptomyces coelicolor ATCC 10147 (51)
Thermobifida fusca ATCC 27730 (49)

[0085] p a n D 遺伝子は、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、上記のような P a n D タンパク質のアミノ酸配列、例えば配列番号 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または 60 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。前記「1 若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、具体的には好ましくは 1~20 個、より好ましくは 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個を意味する。上記の 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、例えば、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr 間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val 間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn 間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His 間

で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来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(mutant又はvariant)によって生じるものも含まれる。

[0086] さらに、上記のような保存的変異を有する遺伝子は、上記のようなPanDタンパク質のアミノ酸配列全体、例えば配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または60に示すアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」(homology)は、「同一性」(identity)を指すことがある。

[0087] また、panD遺伝子は、公知の遺伝子配列から調製され得るプローブ、例えば配列番号7、9、11、13、15、17、19、21、23、25

、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または59に示す塩基配列の相補配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ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。ここで、「ストリンジентな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、特に好ましくは99%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、あるいは通常のザガンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、60℃、0.1×SSC、0.1% SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、より好ましくは2~3回洗浄する条件が挙げられる。

[0088] プローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件としては、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

[0089] なお、上記の遺伝子やタンパク質のバリエーションに関する記載は、セリンアセチルトランスフェラーゼ、3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ等の酵素、およびYdeDタンパク質、並びにそれらをコードする遺伝子にも同様に適用される。

[0090] 各細菌由来PanDタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントを図1に示す。これまでに報告されているように、PanDタンパク質には共通して保存されている領域が存在する (Armando Albert et al., (1998) Nature st

ructural biology volume 5 number 4:289-293)。したがって、P a n Dタンパク質においては、それらの保存領域が保存されているのが好ましい。

[0091] 具体的には、P a n Dタンパク質において、24位のグリシンおよび25位のセリンが保存されているのが好ましい。P a n Dタンパク質は α サブユニットと β サブユニットに分割されるが、24位のグリシンおよび25位のセリンはその分割場所である。これらのアミノ酸残基は、前記アラインメント（図1）において、どの種のP a n Dタンパク質においても共通して保存されていた。

[0092] また、9位のリジン、11位のヒスチジン、57位のスレオニン、および58位のチロシンが保存されているのが好ましい。これらのアミノ酸残基は立体構造からポケットと推測され、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性に寄与すると考えられる。これらのアミノ酸残基は、前記アラインメント（図1）において、どの種のP a n Dタンパク質においても共通して保存されていた。

[0093] また、15位のバリン、16位のスレオニン、20位のロイシン、22位のチロシン、29位のアスパラギン酸、42位のグルタミン酸、51位のアスパラギン、52位のグリシン、54位のアルギニン、60位のイソロイシン、72位のアスパラギン、73位のグリシン、74位のアラニン、75位のアラニン、76位のアラニン、83位のアスパラギン酸、および86位のイソロイシンから選択される1またはそれ以上の残基が保存されているのが好ましく、これら全ての残基が保存されているのがより好ましい。これらのアミノ酸残基は、前記アラインメント（図1）において、ほぼ共通して保存されていた。

[0094] なお、上記各アミノ酸残基は、配列番号8における各位置に相当するアミノ酸残基を意味する。すなわち、上記各アミノ酸残基の位置は相対的な位置を示すものであって、アミノ酸の欠失、挿入、付加などによってその位置は前後することがある。例えば、「25位のセリン残基」とは、配列番号8における25位に相当するセリン残基を意味し、25位よりもN末端側の1ア

ミノ酸残基が欠失している場合は、N末端から24番目（開始コドンによってコードされるメチオニン残基を含む）のセリン残基が「25位のセリン残基」であるものとする。また、25位よりもN末端側に1アミノ酸残基挿入されている場合は、N末端から26番目のセリン残基が「25位のセリン残基」であるものとする。また、例えば、PanDタンパク質において「25位のセリン残基が保存されている」とは、当該PanDタンパク質において配列番号8における25位に相当するアミノ酸残基がセリンであることを意味する。その他のアミノ酸残基についても同様である。

[0095] <2>本発明のL-システイン、もしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法

上記のようにして得られる本発明の細菌を培地中で培養し、該培地からL-システイン、もしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することにより、これらの化合物を製造することができる。L-システインの関連物質としては、先述したS-スルホシステイン、チアゾリジン誘導体、同チアゾリジン誘導体に対応するヘミチオケタール、L-メチオニン、S-アデノシルメチオニン等が挙げられる。

[0096] 使用する培地としては、炭素源、窒素源、硫黄源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地が挙げられる。

[0097] 炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜やでんぷんの加水分解物などの糖類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類が挙げられる。

[0098] 窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水が挙げられる。

[0099] 硫黄源としては、硫酸塩、亜硫酸塩、次亜硫酸塩、チオ硫酸塩、硫化物等の無機硫黄化合物が挙げられる。

[0100] 有機微量栄養源としては、ビタミンB1などの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じてリン酸力

リウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

- [0101] 培養は好氣的条件下で30～90時間実施するのがよく、培養温度は25℃～37℃に、培養中pHは5～8に制御することが好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。
- [0102] 培養物からのL-システイン、もしくはその関連物質、又はこれらの混合物の採取は通常のイオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。
- [0103] 上記のようにして得られるL-システインは、L-システイン誘導体の製造に用いることができる。L-システイン誘導体としては、メチルシステイン、エチルシステイン、カルボシステイン、スルホシステイン、アセチルシステイン等が挙げられる。
- [0104] また、L-システインのチアゾリジン誘導体が培地に蓄積した場合は、培地からチアゾリジン誘導体を採取し、チアゾリジン誘導体とL-システインとの間の反応平衡をL-システイン側に移動させることによって、L-システインを製造することができる。また、培地にS-スルホシステインが蓄積した場合、例えばジチオスレイトール等の還元剤を用いて還元することによってL-システインに変換することができる。
- [0105] また、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するようL-システイン生産菌を改変することに代えて、パントテン酸を培地に添加することによってもL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を製造することができる。すなわち、本発明の方法のさらなる態様（以下、本発明の第2の方法ともいう）は、L-システイン生産能を有する細菌を、パントテン酸を含有する培地中で培養し、該培地からL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することを特徴とする、L-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法、である。

[0106] なお、本発明の第2の方法に用いるL-システイン生産能を有する細菌は、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するよう改変されていてもよく、そうでなくともよい。すなわち、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するようL-システイン生産菌を改変することと、パントテン酸を培地に添加することとを組み合わせてもよい。

[0107] 培地におけるパントテン酸の含有量は、1 mg/L以上であるのが好ましく、2 mg/L以上であるのがより好ましく、5 mg/L以上であるのがさらに好ましく、10 mg/L以上であるのが特に好ましい。パントテン酸の含有量の上限は特に制限されないが、例えば、10 g/L以下であってもよく、1 g/L以下であってもよい。パントテン酸は、フリー体であってもよく、パントテン酸塩であってもよく、それらの任意の混合物であってもよい。パントテン酸塩としては、特に制限されず、カルシウム塩、ナトリウム塩等が挙げられる。

[0108] パントテン酸は、培養の全期間において培地に含有されていてもよく、培養の一部の期間においてのみ培地に含有されていてもよい。例えば、本発明の方法が、L-システイン生産菌を増殖させる段階と、L-システインを生産蓄積させる段階を含む場合、少なくともL-システインを生産蓄積させる段階においてパントテン酸を培地に含有させればよく、L-システイン生産菌を増殖させる段階においては、パントテン酸を培地に含有させてもよく、含有させなくてもよい。また、L-システインを生産蓄積させる段階においても、パントテン酸は、その全期間において培地に含有されていてもよく、その一部の期間においてのみ培地に含有されていてもよい。例えば、パントテン酸の含有量は、L-システインを生産蓄積させる段階の全期間において前記の範囲である必要はなく、同段階の初期に含有量が前記の範囲となるようにパントテン酸を培地に含有させ、培養時間の経過に伴いパントテン酸含有量が減少してもよい。また、パントテン酸を連続的あるいは間欠的に追加添加してもよい。

[0109] 本発明の第2の方法においては、パントテン酸を含有する培地を用いる限

り、上述した本発明の細菌を用いる方法と同様の培地成分および同様の培養条件を用いることができる。

実施例

[0110] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。なお、以下の実施例において、システインはL-システインを意味する。

[0111] <実施例>

(1) *C. glutamicum* 2256株、*E. coli* MG1655株、*P. ananatis* SC17株、*B. subtilis* 168株由来panD遺伝子を搭載したプラスミドの構築

L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増強するため、各種panD遺伝子を搭載したpanD遺伝子の発現用プラスミドを以下の手順で構築した。

[0112] *C. glutamicum* 2256株 (ATCC13869) のゲノムDNAをテンプレートとして、プライマーpanD(Cg)-FW (CCAAGCTTATGGCATTCCAATAGTCAGG : 配列番号1) およびpanD(Cg)-RV (CGAAGCTTGGGAAAAAGACGGCTCTACC : 配列番号2) を用いたPCRにより、panD遺伝子上流約300bpから下流約200bpまでを含む約900bpのpanD(Cg)遺伝子断片を増幅した。上記プライマーは、5'末端に制限酵素HindIIIのサイトを有するようデザインされている。PCRは、Pyrobestポリメラーゼ (タカラバイオ社) を用いてプロトコールに記載の標準的な組成で行い、反応条件は94°C-5分の後、98°C 5秒、55°C 5秒、72°C 1分を30サイクルとした。得られた断片をHindIIIで処理し、pSTV29 (Takara社) のHindIIIサイトに挿入してサブクローニングを行い、シーケンスが正しいことを確認した。そこから再度HindIIIにて切り出した断片を、同酵素で消化したpMW218 (Takara社) にベクター上のlacZ遺伝子と同じ向きに挿入し、*C. glutamicum* 2256株のpanD遺伝子がクローニングされたプラスミドpMW218-panD(Cg) (カナマイシン耐性マーカー) を取得した。

[0113] 同様に、*E. coli* MG1655株 (ATCC47076) のゲノムDNAをテンプレートとして、プライマーpanD(Ec)-FW (ATGATTCGCACGATGCTGCAGG : 配列番号3) およびpanD(Ec)-RV (TCAAGCAACCTGTACCGGAATCG : 配列番号4) を用いたPCRにより

、panD(Ec)遺伝子断片を取得した。PCRは、上記と同一の条件で行った。pMW218をSmaI消化した後、得られた断片をベクター上のlacZ遺伝子と同じ向きに挿入し、E. coli MG1655株のpanD遺伝子がクローニングされたプラスミドpMW218-panD(Ec) (カナマイシン耐性マーカール) を取得した。クローニングされたpanD遺伝子は、ベクター上のlacプロモーターのリードスルーにて発現する。

[0114] 同様に、P. ananatis SC17株 (FERM BP-11091) のゲノムDNAを鋳型とし、プライマーpanD(Pa)-FW (GTAAAGGCTGCAGGTCGTATTTTTGGCTGT : 配列番号5) およびpanD(Pa)-RW (GTTCTATATCGCGGTCTACTTCCTGATTCA : 配列番号6) を用いたPCRにより、panD(Pa)遺伝子断片を取得した。PCRは、Pyrobestポリメラーゼ (タカラバイオ社) を用いてプロトコールに記載の標準的な組成で行い、反応条件は94°C-1分の後、94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 1分を30サイクルとした。pSTV29をsmaI消化した後、得られた断片をベクター上のlacZ遺伝子と同じ向きに挿入し、P. ananatis SC17株のpanD遺伝子がクローニングされたプラスミドpSTV29-panD(Pa) (クロラムフェニコール耐性マーカール) を取得した。クローニングされたpanD遺伝子は、ベクター上のlacプロモーターのリードスルーにて発現する。

[0115] プラスミドpCR-panD (Bs) は、B. subtilis 168株 (ATCC23857) のpanD遺伝子を含む領域が搭載されたプラスミドである。pCR-panD (Bs) は、pMW218ベクター (Nippon Gene社) のBamHIサイトにB. subtilis 168株のゲノムの2350947bp~2353681bpの領域 (ゲノムデータベースSubtiListによる ; <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>) が両端のSau3AIで挿入された構造を有する。PCR等の定法によりB. subtilis 168株のpanD遺伝子およびその周辺領域を容易に取得でき、本実験の目的に合致するpCR-panD (Bs) と同様の構造のプラスミドを構築できる。

[0116] (2) P. ananatisシス테인生産菌SC17intE511-2の構築

各種panD遺伝子の発現強化がシス테인生産に及ぼす効果を調べるため、P. ananatis SC17株の染色体に阻害解除型SATをコードする遺伝子を挿入し、シス테인生産能を有するSC17intE511-2株を以下の手順で構築した。

[0117] プラスミドpMIV-CysE5（特開2009-232844）には、L-システインによるフィードバック阻害が解除された変異型SATであるCysE5（US20050112731(A1)）をコードする遺伝子（cysE5）およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むCysE5カセットが搭載されている。プラスミドpACYC184からEco88I-XbaIで切り出したテトラサイクリン耐性遺伝子を平滑末端化し、同じく平滑末端化した前記pMIV-CysE5のPvuIサイトに挿入し、pMT-CysE5を構築した。得られたpMT-CysE5を利用し、ヘルパーとしてpMH10を用いる定法に従ったmini-Muファージシステム（EP1149911(A)）により、CysE5カセットを*P. ananatis*野生株であるSC17株の染色体に導入した。形質転換体の選択は、クロラムフェニコール耐性をマーカーとして行った。CysE5カセットが染色体に導入された形質転換体を約50個ピックアップし、システインの生産培養を行ったところ、大部分のクローンが0.2~0.3 g/Lのシステインを生産した。その中で、1クローンがシステインを約0.7 g/L生産し、このクローンをSC17intE511と名づけた。SC17intE511のゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAをエレクトロポレーションにてSC17に導入し、CysE5カセットが染色体に導入された株を改めて作製した。形質転換体の選択は、クロラムフェニコール耐性をマーカーとして行った。約20個の形質転換体をピックアップし、システインの生産培養を行ったところ、ほぼすべてのクローンが0.2~0.3 g/Lのシステインを生産した。このうちいくつかのクローンのSAT活性を定法（US20050112731(A)）により測定し、親株であるSC17intE511と同程度のSAT活性を有するクローンを選択してSC17intE511-2と名づけた。

[0118] (3) *P. ananatis*システイン生産菌における各種panD遺伝子の発現強化およびパントテン酸添加のシステイン生産への効果

各種panD遺伝子の発現強化がシステイン生産に及ぼす効果を調べるため、*P. ananatis*システイン生産菌SC17intE511-2を上記のように構築されたプラスミドpMW218-panD(Cg)、pSTV28-panD(Pa)、pCR-panD(Bs)で形質転換した。*P. ananatis*の形質転換は定法に従ってエレクトロポレーションにより行い、形質転換体のセレクションはプラスミドの抗生物質耐性マーカーに対応し

た抗生物質（25mg/L クロラムフェニコール、または20mg/L カナマイシン）を含むLB寒天培地（5g/L イーストエキストラクト、10g/L トリプトン、10g/L 塩化ナトリウム、15g/L アガー）にて行った。また対照株として、それぞれ空ベクターを形質転換したのものも取得した。

[0119] 以上のようにして得られたSC17intE511-2/ pMW218-panD(Cg)株、SC17intE511-2/ pMW218株、SC17intE511-2/ pSTV28-panD (Pa) 株、SC17intE511-2/ pSTV29株、SC17intE511-2/ pCR-panD (Bs) 株、SC17intE511-2/ pCR株を用いてシステイン生産培養を行い、生産されるシステインの量を比較した。また、SC17intE511-2/ pSTV29株を用い、パントテン酸カルシウムを20mg/L添加してシステイン生産培養を行い、パントテン酸添加がシステイン生産に及ぼす効果を調べた。培養には、下記組成のシステイン生産培地にプラスミドの抗生物質耐性マーカーに対応した抗生物質（25mg/L クロラムフェニコール、または20mg/L カナマイシン）を添加して用いた。

システイン生産培地組成

硫酸アンモニウム	15	g/L
リン酸二水素カリウム	1.5	g/L
硫酸マグネシウム七水和物	1	g/L
チアミン塩酸塩	0.1	mg/L
硫酸第一鉄七水和物	1.7	mg/L
モリブデン酸ナトリウム二水和物	0.15	mg/L
塩化コバルト六水和物	0.7	mg/L
塩化マンガン四水和物	1.6	mg/L
硫酸亜鉛七水和物	0.3	mg/L
硫酸銅五水和物	0.25	mg/L
トリプトン	0.6	g/L
イーストエキストラクト	0.3	g/L
塩化ナトリウム	0.6	g/L
炭酸カルシウム	20	g/L

L-ヒスチジン塩酸塩一水和物	135	mg/L
チオ硫酸ナトリウム	4	g/L
ピリドキシン塩酸塩	2	mg/L
グルコース	60	g/L

[0120] システイン生産培養は以下の手順で行った。システイン生産菌各株をクロラムフェニコールまたはカナマイシンを含有するLB寒天培地に塗り広げ、34℃で一晩前培養を行った。10マイクロリッターサイズの植菌用ループ（NUNC社ブルーリング）でプレート上約7cm分の菌体を掻き取り、大試験管（内径23mm、長さ20cm）に入れた2mlのシステイン生産培地中に植菌し、培養開始時点での菌体量がほぼ同じになるよう調製した。32℃にて振とう培養を行い、グルコースが完全に消費された時点で培養を終了（約13～16時間）し、培地中に生産されたシステイン量を定量した。培養は、各株とも4連で行った。システインの定量はGaitonde, M.K. (Biochem J. 1967 Aug;104(2):627-33)に記載の方法で行った。システイン生産量の平均値と標準偏差を表1に示す。表1に示したとおり、各種panD遺伝子の発現強化およびパントテン酸添加はいずれもシステイン生産量を増加させることが明らかとなった。

[0121] [表1]

表1. *P. ananatis*における各種 panD 遺伝子発現強化、およびパントテン酸添加がシステイン生産に及ぼす効果

ベクター	システイン (mg/L)	SD (mg/L)
pMW218	56	2.3
pMW-PanD (Cg)	360	44
pCR	105	23
pCR-PanD (Bs)	610	190
pSTV29	134	2.4
pSTV-PanD (Pa)	561	41
pSTV29+20mg/L パントテン酸	421	24

SD: 標準偏差 (Standard Deviation)

[0122] (4) 阻害解除型SAT遺伝子搭載プラスミドpACYC-E1の構築

システイン生産菌を構築するために用いる、阻害解除型SATをコードする遺伝子を搭載するプラスミドpACYC-E1を以下の手順で構築した。

[0123] プラスミドpACYC-DE1には、L-システインによるフィードバック阻害が解

除された変異型SATをコードするcysEX遺伝子 (US5972663A)、並びに、システインおよびアセチルセリンの排出因子をコードするydeD遺伝子が搭載されており、これを導入することでシステインを著量生産するシステイン生産菌を作製できる。pACYC-DE1は、EP1528108B1に記載されているpACYC-DESの構築方法と概ね同じ方法により構築することができる。pACYC-DESとの違いは、pACYC-DE1では、serA5遺伝子が搭載されておらず、cysEX遺伝子とydeD遺伝子の2遺伝子のみがpACYC184ベクターに搭載されている点である。pACYC-DE1において、cysEX遺伝子とydeD遺伝子はいずれもompAプロモーターに連結されている。このpACYC-DE1をMnuIで切断してセルフライゲーションさせ、ydeDの内側約330bpを欠損させた。こうして構築した、cysEX遺伝子を搭載し、ydeD遺伝子の機能が消失したプラスミドをpACYC-E1とし、以下の実験に使用した。

[0124] (5) *E. coli*システイン生産菌における各種panD遺伝子の発現強化およびパントテン酸添加のシステイン生産への効果

panD遺伝子の発現強化およびパントテン酸添加の効果が*P. ananatis*以外の細菌においても得られるかどうか、*E. coli*システイン生産菌を用いて検討した。

[0125] *E. coli*システイン生産菌としては、*E. coli* MG1655株に前記pACYC-E1 (テトラサイクリン耐性マーカー) をエレクトロポレーション法により導入して得られた形質転換体MG1655/ pACYC-E1を用いた。

[0126] この*E. coli*システイン生産菌MG1655/ pACYC-E1を、pMW218-panD(Cg)、pMW218-panD (Ec) で形質転換した。*E. coli*の形質転換は定法に従ってエレクトロポレーションにより行い、形質転換体のセレクションはプラスミドの抗生物質耐性マーカーに対応した抗生物質 (25mg/L クロラムフェニコール、または20mg/L カナマイシン) を含むLB寒天培地にて行った。また対照株として、空ベクターpMW218を形質転換した株も取得した。

[0127] 以上のようにして得られた、MG1655/ pACYC-E1/ pMW-panD(Cg)株、MG1655/ pACYC-E1/ pMW-panD(Ec)株、MG1655/ pACYC-E1/ pMW-218株を用いてシステイン生産培養を行い、生産されるシステインの量を比較した。また、MG1655/

pACYC-E1/ pMW-218株を用い、パントテン酸カルシウムを10mg/L添加してシステイン生産培養を行い、パントテン酸添加がシステイン生産に及ぼす効果を調べた。用いたシステイン生産培地の組成は、グルコース濃度を40g/Lとしたこと以外は上記の通りである。上記と同様の方法で、グルコースが完全に消費されるまで19~22時間培養し、培地中に生産されたシステイン量を定量した。培養は、各株とも4連で行った。システイン生産量の平均値と標準偏差を表2に示す。表2に示したとおり、*E. coli*においても、各種panD遺伝子の発現強化およびパントテン酸添加はいずれもシステイン生産量を増加させることが明らかとなった。

[0128] [表2]

表2. *E. coli*における各種 panD 遺伝子発現強化、およびパントテン酸添加がシステイン生産に及ぼす効果

ベクター	システイン (mg/L)	SD (mg/L)
pMW218	366	29
pMW-PanD (Cg)	742	47
pMW-PanD (Ec)	622	18
pMW218	412	78
pMW218+10mg/L パントテン酸	518	66

SD: 標準偏差 (Standard Deviation)

[0129] (6) パントテン酸添加濃度の検討

パントテン酸を添加することによりシステイン生産が増加することが今回明らかとなったため、次に、効果が得られるために必要なパントテン酸濃度の検討を行った。

[0130] *P. ananatis* SC17intE511-2/ pSTV29株を、10mg~100mg/Lの濃度域でパントテン酸カルシウムを添加したシステイン生産培地にて培養し、システイン生産量を測定した。用いたシステイン生産培地の組成は上記の通りであり、グルコース濃度は60g/Lとした。各濃度とも4連で、約16~20時間培養を行った。システイン生産量の平均値と標準偏差を図2に示す。パントテン酸カルシウムを1mg/L以上添加した場合に、パントテン酸濃度依存的にシステイン生産量が増加することが明らかとなった。

[0131] (7) 各種panD遺伝子の発現強化株によるシステイン生産

各種PanDタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列、例えば配列番号7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または59に示す塩基配列のうち先頭20 bpをフォワード (Fw) プライマーに、末端20 bpの相補配列をリバース (Rv) プライマーに設定し、94°C-5分の後、98°C 5秒、55°C 5秒、72°C 1分を30サイクルからなるPCRにより各種PanD断片を増幅する。得られた断片を適当なプロモーター制御下に配置する、例えばpSTV28 (TaKaRa社) のSmaIサイトへ導入してlacプロモーター制御下に配置することで、PanD遺伝子の発現ベクターを作製する。得られたPanD遺伝子の発現ベクターをシステイン生産菌、例えば*P. ananatis* SC17 intE511-2へエレクトロポレーション法にて導入し、上記の方法にてシステイン生産培養を行うことで、効率的にシステインを生産できる。

産業上の利用可能性

[0132] 本発明により、細菌のL-システイン生産能を向上させることができ、L-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を効率よく製造することができる。

[0133] 配列表の説明

配列番号1 : *C. glutamicum* 2256のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号2 : *C. glutamicum* 2256のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号3 : *E. coli* MG1655のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号4 : *E. coli* MG1655のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号5 : *P. ananatis* SC17のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号6 : *P. ananatis* SC17のpanD遺伝子増幅用プライマー

配列番号7 : *E. coli* MG1655のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号8 : *E. coli* MG1655のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号9 : *P. ananatis* SC17のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号10 : *P. ananatis* SC17のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号11 : *C. glutamicum* 2256のpanD遺伝子の塩基配列

- 配列番号 1 2 : *C. glutamicum* 2256のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 1 3 : *B. subtilis* 168のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 1 4 : *B. subtilis* 168のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 1 5 : *Arthrobacter aureus*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 1 6 : *Arthrobacter aureus*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 1 7 : *Bacteroides fragilis*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 1 8 : *Bacteroides fragilis*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 1 9 : *Bacteroides vulgatus*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 0 : *Bacteroides vulgatus*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 1 : *Brevibacterium lactofermentum*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 2 : *Brevibacterium lactofermentum*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 3 : *Chlorobium tepidum*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 4 : *Chlorobium tepidum*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 5 : *Citrobacter koseri*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 6 : *Citrobacter koseri*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 7 : *Clavibacter michiganensis*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 2 8 : *Clavibacter michiganensis*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 2 9 : *Corynebacterium jeikeium*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 3 0 : *Corynebacterium jeikeium*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 1 : *Cytophaga hutchinsonii*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 3 2 : *Cytophaga hutchinsonii*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 3 : *Enterobacter sakazakii*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 3 4 : *Enterobacter sakazakii*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 5 : *Flavobacterium johnsoniae*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 3 6 : *Flavobacterium johnsoniae*のPanDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 3 7 : *Flavobacterium psychrophilum*のpanD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 3 8 : *Flavobacterium psychrophilum*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列

配列番号 39 : *Klebsiella pneumoniae*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 40 : *Klebsiella pneumoniae*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 41 : *Methylophilus methylotrophus*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 42 : *Methylophilus methylotrophus*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 43 : *Mycobacterium avium*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 44 : *Mycobacterium avium*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 45 : *Parabacteroides distasonis*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 46 : *Parabacteroides distasonis*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 47 : *Porphyromonas gingivalis*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 48 : *Porphyromonas gingivalis*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 49 : *Rhodococcus*属細菌のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 50 : *Rhodococcus*属細菌のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 51 : *Saccharopolyspora erythraea*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 52 : *Saccharopolyspora erythraea*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 53 : *Salinibacter ruber*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 54 : *Salinibacter ruber*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 55 : *Salmonella enterica*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 56 : *Salmonella enterica*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 57 : *Streptomyces coelicolor*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 58 : *Streptomyces coelicolor*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

配列番号 59 : *Thermobifida fusca*のpanD遺伝子の塩基配列

配列番号 60 : *Thermobifida fusca*のPanDタンパク質のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] L-システイン生産能を有し、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大するように改変された腸内細菌科に属する細菌。
- [請求項2] p a n D 遺伝子の発現量を増大させることにより、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性が増大した、請求項1に記載の細菌。
- [請求項3] p a n D 遺伝子のコピー数を高めること、又は、同遺伝子の発現調節配列を改変することにより、p a n D 遺伝子の発現量が増大した、請求項2に記載の細菌。
- [請求項4] 前記 p a n D 遺伝子が、下記 (A) または (B) に記載のタンパク質をコードする DNA である、請求項2または3に記載の細菌。
- (A) 配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または60に示すアミノ酸配列を含むタンパク質。
- (B) 配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、または60に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。
- [請求項5] 前記 p a n D 遺伝子が、下記 (a) または (b) に記載の DNA である、請求項2～4のいずれか1項に記載の細菌。
- (a) 配列番号7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または59に示す塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、または 59 に示す塩基配列と相補的な塩基配列又は該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、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

[請求項6] 前記 L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質が、下記 (1) および (2) の特徴を有する、請求項 4 または 5 に記載の細菌。

(1) 24 位のグリシンおよび 25 位のセリンが保存されている。

(2) 9 位のリジン、11 位のヒスチジン、57 位のスレオニン、および 58 位のチロシンが保存されている。

[請求項7] 前記 L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質が、さらに下記 (3) の特徴を有する、請求項 6 に記載の細菌。

(3) 15 位のバリン、16 位のスレオニン、20 位のロイシン、22 位のチロシン、29 位のアスパラギン酸、42 位のグルタミン酸、51 位のアスパラギン、52 位のグリシン、54 位のア르기ニン、60 位のイソロイシン、72 位のアスパラギン、73 位のグリシン、74 位のアラニン、75 位のアラニン、76 位のアラニン、83 位のアスパラギン酸、および 86 位のイソロイシンが保存されている。

[請求項8] さらに、下記の性質 (1) ~ (3) の 1 またはそれ以上を有する請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の細菌。

(1) セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇するように改変されている。

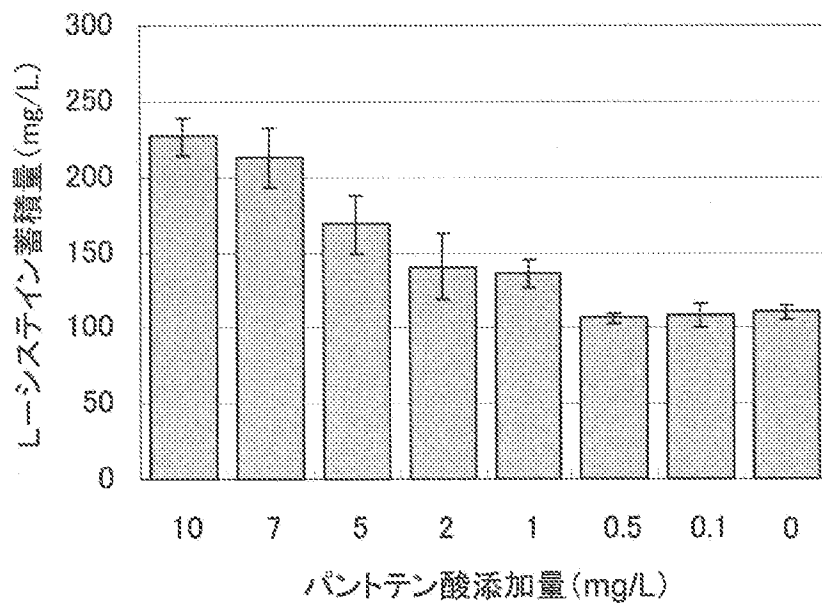
(2) L-システイン排出系が強化されている。

(3) 3-ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ活性が上昇するよう

に改変されている。

- [請求項9] 前記細菌がエシェリヒア属細菌である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細菌。
- [請求項10] 前記細菌がエシェリヒア・コリである、請求項9に記載の細菌。
- [請求項11] 前記細菌がパントエア属細菌である、請求項1～8のいずれか1項に記載の細菌。
- [請求項12] 前記細菌がパントエア・アナナティスである、請求項11に記載の細菌。
- [請求項13] 請求項1～12のいずれか1項に記載の細菌を培地中で培養し、該培地からL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することを特徴とする、L-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法。
- [請求項14] 前記培地がパントテン酸を含有する、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] L-システイン生産能を有する腸内細菌科に属する細菌を、パントテン酸を含有する培地中で培養し、該培地からL-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物を採取することを特徴とする、L-システインもしくはその関連物質、又はこれらの混合物の製造法。
- [請求項16] 前記培地におけるパントテン酸の含有量が1 mg/L以上である、請求項14または15に記載の方法。
- [請求項17] 前記関連物質がL-シスチン、チアゾリジン誘導体、またはL-メチオニンである、請求項13～16のいずれか1項に記載の方法。

[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P13/12(2006.01)i, C12N9/88
(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, C12N1/21, C12P13/00-13/24, C12N9/88

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2000-166578 A (Degussa-Huels AG.), 20 June 2000 (20.06.2000), & EP 1006193 A2 & US 6184006 B1 & DE 19855314 A1	<u>1-7, 9-12</u> 8, 13-14, 15-17
<u>X</u> A	DUSCH, N. et.al., Expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>panD</i> gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in <i>Escherichia</i> <i>coli</i> . Appl. Environ. Microbiol., 1999, vol.65, no.4, pp.1530-1539	<u>1-7, 9-12</u> 8, 13-14, 15-17
<u>X</u> A	JP 2010-200645 A (Ajinomoto Co., Inc.), 16 September 2010 (16.09.2010), (Family: none)	<u>15-17</u> 1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2012 (10.04.12)

Date of mailing of the international search report
24 April, 2012 (24.04.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051084

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-14 (invention group 1) relate to a method for producing L-cysteine or the like using a bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae, said bacterium being increased in the L-aspartate- α -decarboxylase activity.

Meanwhile, the inventions of claims 15-17 (invention group 2) relate to a method for producing L-cysteine or the like by culturing a bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae using a culture medium that contains pantothenic acid.

The technical feature common to the above-mentioned two invention groups is considered to be (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051084

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

"a method for producing L-cysteine or the like using a bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae". This common technical feature, however, has been already known (see JP 2010-200645 A (Ajinomoto Co., Inc.), 16 September 2010 (16.09.2010)), and thus cannot be considered as a special technical feature prescribed under PCT Rule 13.2.

The inventions of claims 1-14 and the inventions of claims 15-17 therefore cannot be considered so linked as to form a single general inventive concept. Consequently, this international application is considered to contain two groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P13/12(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12N1/21, C12P13/00-13/24, C12N9/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年
 日本国登録実用新案公報 1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	JP 2000-166578 A (デグサーヒュルス アクチェンゲゼルシャフト) 2000.06.20. & EP 1006193 A2 & US 6184006 B1 & DE 19855314 A1	1-7, 9-12 8, 13-14, 15-17
X A	DUSCH, N. et.al., Expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>panD</i> gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in <i>Escherichia coli</i> . Appl. Environ. Microbiol., 1999, vol.65, no.4, pp.1530-1539	1-7, 9-12 8, 13-14, 15-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 10.04.2012	国際調査報告の発送日 24.04.2012
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) 戸来 幸男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> A	JP 2010-200645 A (味の素株式会社) 2010. 09. 16. (ファミリーなし)	<u>15-17</u> 1-14

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1-14に係る発明（発明群1）は、L-アスパルテート- α -デカルボキシラーゼ活性を増大させた腸内細菌科に属する細菌を用いてL-システイン等を製造する方法に関するものである。

一方、請求項15-17に係る発明（発明群2）は、腸内細菌科に属する細菌をパントテン酸を含有する培地を用いて培養することによりL-システイン等を製造する方法に関するものである。

そして、上記両発明群に共通する事項は「腸内細菌科に属する細菌を用いてL-システイン等を製造する方法」等にあるものと解されるが、当該事項は既に知られており [JP 2010-200645 A (味の素株式会社) 2010.09.16.]、PCT規則13.2に規定される特別な技術的特徴に該当するものとは認められない。

よって、請求項1-14に係る発明と、請求項15-17に係る発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは言えず、本国際出願には2つの発明が記載されているものと認められる。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。