

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6519476号
(P6519476)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int. Cl.	F 1		
C 1 2 P 13/04 (2006.01)	C 1 2 P 13/04	Z N A	
C 1 2 P 13/14 (2006.01)	C 1 2 P 13/14	A	
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34	A	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C	
C 1 2 P 13/10 (2006.01)	C 1 2 P 13/10	B	
請求項の数 21 (全 63 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2015-543909 (P2015-543909)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月23日(2014.10.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/078234
 (87) 国際公開番号 W02015/060391
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日(2015.4.30)
 審査請求日 平成29年10月17日(2017.10.17)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-220609 (P2013-220609)
 (32) 優先日 平成25年10月23日(2013.10.23)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000000066
 味の素株式会社
 東京都中央区京橋1丁目15番1号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 山田 和輝
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1
 味の素株式会社内
 (72) 発明者 原 吉彦
 日本国神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1
 味の素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 目的物質の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的物質の生産能を有するコリネ型細菌をキシロースを含有する培地で培養し、目的物質を該培地中に生成蓄積すること、および該培地より目的物質を採取すること、を含む目的物質の製造法であって、

前記細菌が、染色体上のNCgI2954遺伝子のコード領域および/または発現制御領域に変異が導入されたことにより、キシロース資化性が向上したことを特徴とし、

前記細菌が、コリネバクテリウム属細菌である、方法。

【請求項2】

キシロース資化性の向上が、キシロース取り込み能の向上によるものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

NCgI2954遺伝子の発現が弱化されることにより、または該遺伝子が破壊されることにより、キシロース資化性が向上した、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記NCgI2954遺伝子が、下記(A)、(B)、又は(C)に記載のタンパク質をコードするDNAである、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法：

(A) 配列番号14に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号14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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、コリネ型細菌において欠損

させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有するタンパク質；

(C) 配列番号14に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有するタンパク質。

【請求項5】

前記変異が、下記(1)～(7)の変異から選択される1またはそれ以上の変異である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法：

(1) 配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(2) 配列番号14の274位のトリプトファン残基に相当するアミノ酸残基がトリプトファン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(3) 配列番号14の377位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がチロシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(4) 配列番号14の365位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(5) 配列番号14の366位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(6) 配列番号14の367位のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がアラニン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(7) 配列番号14の368位以降のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基が欠失する変異。

【請求項6】

前記(1)～(6)の変異が、それぞれ下記(1a)～(6a)の変異である、請求項5に記載の方法：

(1a) 配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換される変異；

(2a) 配列番号14の274位のトリプトファン残基に相当するアミノ酸残基がアルギニン残基に置換される変異；

(3a) 配列番号14の377位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がアスパラギン残基に置換される変異；

(4a) 配列番号14の365位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がセリン残基に置換される変異；

(5a) 配列番号14の366位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がアルギニン残基に置換される変異；

(6a) 配列番号14の367位のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基に置換される変異。

【請求項7】

前記細菌が、さらに、キシロースイソメラーゼ及び/又はキシロキナーゼの活性が増大するように改変されている、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記キシロースイソメラーゼが、下記(A)、(B)、又は(C)に記載のタンパク質である、請求項7に記載の方法：

(A) 配列番号11に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号11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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロースイソメラーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号11に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項9】

前記キシロキナーゼが、下記(A)、(B)、又は(C)に記載のタンパク質である

、請求項 7 または 8 に記載の方法：

(A) 配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 2 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロキナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロキナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 10】

前記細菌が、さらに、キシロースデヒドロゲナーゼ、キシロノラクトナーゼ、キシロン酸デヒドラターゼ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ、及び - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼからなる群より選択される 1 またはそれ以上の酵素の活性が増大するように改変されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記キシロン酸デヒドラターゼ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ、及び - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼが、それぞれ、エシェリヒア属細菌、スフィンゴモナス属細菌、及びバチルス属細菌に由来するタンパク質である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記キシロースデヒドロゲナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、請求項 10 または 11 に記載の方法：

20

(A) 配列番号 1 6 または 4 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 6 または 4 2 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 1 6 または 4 2 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 13】

前記キシロノラクトナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法：

30

(A) 配列番号 1 8 または 4 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 8 または 4 4 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロノラクトナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 1 8 または 4 4 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロノラクトナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 14】

前記キシロン酸デヒドラターゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法：

40

(A) 配列番号 2 0 または 4 6 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 2 0 または 4 6 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 2 0 または 4 6 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 15】

前記 2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法：

(A) 配列番号 2 2 または 3 8 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 2 2 または 3 8 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

50

残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ 2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 2 2 または 3 8 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 1 6】

前記 - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、請求項 1 0 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法：

(A) 配列番号 2 4 または 4 0 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 2 4 または 4 0 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 2 4 または 4 0 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、- ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 1 7】

前記目的物質が、アミノ酸、核酸、およびタンパク質からなる群より選択される物質である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記目的物質が、L - グルタミン酸、L - グルタミン、L - アルギニン、および L リジンからなる群より選択されるアミノ酸である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記目的物質が、イノシン、キサントシン、グアノシン、およびアデノシンからなる群より選択されるプリンヌクレオシドである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記目的物質が、イノシン酸、キサントシル酸、およびグアニル酸からなる群より選択されるプリンヌクレオチドである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記細菌が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、コリネ型細菌を用いた L - アミノ酸等の目的物質の製造法に関する。L - アミノ酸は、動物飼料用の添加物、調味料や飲食品の成分、又はアミノ酸輸液等として、産業上有用である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

L - アミノ酸は、例えば、L - アミノ酸生産能を有する各種微生物を用いた発酵法により工業生産されている。発酵法による L - アミノ酸の製造法としては、例えば、野生型微生物（野生株）を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法が挙げられる。

【0 0 0 3】

また、近年は、組換え DNA 技術により L - アミノ酸生産能を向上させた微生物が L - アミノ酸の製造に利用されている。微生物の L - アミノ酸生産能を向上させる方法としては、例えば、L - アミノ酸生合成系酵素をコードする遺伝子の発現を増強すること（特許文献 1、特許文献 2）や L - アミノ酸生合成系への炭素源の流入を増強すること（特許文献 3）が挙げられる。

【0 0 0 4】

10

20

30

40

50

従来、発酵法によるL-アミノ酸等の目的物質の工業生産においては、炭素源として、グルコース、フラクトース、スクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物等が使用されてきた。しかしながら、これらは多少高価であり、近年では、植物由来のバイオマス原料の使用も進められている。

【0005】

このようなバイオマス原料として、現在はスターチや油脂等の可食部原料が主に利用されているが、将来的には、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等の非可食部原料の利用が望まれている。セルロースおよびヘミセルロースは、熱や酸などを用いる前処理行程、およびセルラーゼ等の酵素による糖化处理行程等を経て、5炭糖および6炭糖へと変換され、発酵の原料として用いることができる(特許文献4、5)。このような5炭糖および6炭糖の混合糖をアミノ酸発酵等の原料とした場合、エシェリヒア・コリは、グルコースを優先的に資化することが知られており、結果、二段階増殖(ジオキシー)を示したり、生育が遅延する現象が確認されている(非特許文献1、2)。

10

【0006】

エシェリヒア・コリにおいては、xyIA遺伝子がコードするキシロースイソメラーゼおよびxyIB遺伝子がコードするキシロース資化経路が知られており、同経路を導入したエシェリヒア・コリやコリネバクテリウム・グルタミカムを用いてキシロースからL-アミノ酸を生産できることが知られている(非特許文献3、4、特許文献6、7)。また、キシロース資化経路としては、他にも、キシロン酸を経由してキシロースからL-ケトグルタル酸へ至る経路が知られており、同経路を導入した細菌を用いてキシロースからL-グルタミン酸等の目的物質を生産できることが知られている(特許文献8)。

20

【0007】

コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)のNCgl2954遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子である。NCgl2954遺伝子とキシロース資化性との関連は報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5,168,056号明細書

30

【特許文献2】米国特許第5,776,736号明細書

【特許文献3】米国特許第5,906,925号明細書

【特許文献4】特表平9-507386号公報

【特許文献5】特表平11-506934号公報

【特許文献6】欧州特許第1577396号明細書

【特許文献7】国際公開第2013/105802号パンフレット

【特許文献8】国際公開第2013/069634号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Nichols N.N. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001 Jul; 56(1-2): 120-125

40

【非特許文献2】Gonzalez, R., Biotechnol. Prog. 2002 Jan-Feb; 18(1): 6-20

【非特許文献3】Tao H., et al., J. Bacteriol. 2001 May; 183(10): 2979-2988

【非特許文献4】Gopinath, V. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011 Dec; 92(5): 985-96

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、コリネ型細菌のキシロース資化能を向上させる新規な技術を開発し、キシロースを含む原料から、効率よくL-アミノ酸や核酸等の目的物質を製造する方法を提供す

50

ることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、NCgI2954遺伝子に変異が導入されたコリネ型細菌およびNCgI2954遺伝子を欠失したコリネ型細菌が効率よくキシロースを資化し得ることを見出し、本発明を完成させた。

【0012】

すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

目的物質の生産能を有するコリネ型細菌をキシロースを含有する培地で培養し、目的物質を該培地中に生成蓄積すること、および該培地より目的物質を採取すること、を含む目的物質の製造法であって、

前記細菌が、染色体上のNCgI2954遺伝子のコード領域および/または発現制御領域に変異が導入されたことにより、キシロース資化性が向上したことを特徴とする、方法。

[2]

キシロース資化性の向上が、キシロース取り込み能の向上によるものである、前記方法。

[3]

NCgI2954遺伝子の発現が弱化されることにより、または該遺伝子が破壊されることにより、キシロース資化性が向上した、前記方法。

[4]

前記NCgI2954遺伝子が、下記(A)、(B)、又は(C)に記載のタンパク質をコードするDNAである、前記方法：

(A) 配列番号14に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号14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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有するタンパク質；

(C) 配列番号14に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有するタンパク質。

[5]

前記変異が、下記(1)~(7)の変異から選択される1またはそれ以上の変異である、前記方法：

(1) 配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(2) 配列番号14の274位のトリプトファン残基に相当するアミノ酸残基がトリプトファン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(3) 配列番号14の377位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がチロシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(4) 配列番号14の365位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(5) 配列番号14の366位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(6) 配列番号14の367位のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がアラニン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(7) 配列番号14の368位以降のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基が欠失する変異。

[6]

前記(1)~(6)の変異が、それぞれ下記(1a)~(6a)の変異である、前記方法：

10

20

30

40

50

(1 a) 配列番号 1 4 の 4 3 8 位のロイシン 残基に相当するアミノ酸残基が プロリン 残基に置換される変異；

(2 a) 配列番号 1 4 の 2 7 4 位のトリプトファン 残基に相当するアミノ酸残基がアルギニン残基に置換される変異；

(3 a) 配列番号 1 4 の 3 7 7 位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がアスパラギン残基に置換される変異；

(4 a) 配列番号 1 4 の 3 6 5 位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がセリン残基に置換される変異；

(5 a) 配列番号 1 4 の 3 6 6 位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がアルギニン残基に置換される変異；

(6 a) 配列番号 1 4 の 3 6 7 位のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基に置換される変異。

[7]

前記細菌が、さらに、キシロースイソメラーゼ及びノ又はキシロキナーゼの活性が増大するように改変されている、前記方法。

[8]

前記キシロースイソメラーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 1 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロースイソメラーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 1 1 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロースイソメラーゼ活性を有するタンパク質。

[9]

前記キシロキナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 2 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロキナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 1 2 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロキナーゼ活性を有するタンパク質。

[1 0]

前記細菌が、さらに、キシロースデヒドロゲナーゼ、キシロノラクトナーゼ、キシロン酸デヒドラターゼ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ、及び - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼからなる群より選択される 1 またはそれ以上の酵素の活性が増大するように改変されている、前記方法。

[1 1]

前記キシロン酸デヒドラターゼ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ、及び - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼが、それぞれ、エシェリヒア属細菌、スフィンゴモナス属細菌、及びバチルス属細菌に由来するタンパク質である、前記方法。

[1 2]

前記キシロースデヒドロゲナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 1 6 または 4 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 1 6 または 4 2 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

10

20

30

40

50

(C) 配列番号 16 または 42 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロースデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

[13]

前記キシロノラクトナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 18 または 44 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 18 または 44 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロノラクトナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 18 または 44 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロノラクトナーゼ活性を有するタンパク質。

10

[14]

前記キシロン酸デヒドラターゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 20 または 46 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 20 または 46 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 20 または 46 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、キシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質。

20

[15]

前記 2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 22 または 38 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 22 または 38 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ 2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 22 または 38 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、2 - ケト - 3 - デオキシキシロン酸デヒドラターゼ活性を有するタンパク質。

30

[16]

前記 - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼが、下記 (A)、(B)、又は (C) に記載のタンパク質である、前記方法：

(A) 配列番号 24 または 40 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質；

(B) 配列番号 24 または 40 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残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ - ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質；

(C) 配列番号 24 または 40 に示すアミノ酸配列に対して 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、- ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

40

[17]

前記目的物質が、アミノ酸、核酸、およびペプチドからなる群より選択される物質である、前記方法。

[18]

前記目的物質が、L - グルタミン酸、L - グルタミン、L - アルギニン、および L - リジンからなる群より選択されるアミノ酸である、前記方法。

[19]

前記目的物質が、イノシン、キサントシン、グアノシン、およびアデノシンからなる群より選択されるプリンヌクレオシドである、前記方法。

[20]

50

前記目的物質が、イノシン酸、キサンチル酸、およびグアニル酸からなる群より選択されるプリンヌクレオチドである、前記方法。

[2 1]

前記細菌が、コリネバクテリウム属細菌である、前記方法。

[2 2]

前記細菌が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、前記方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】キシロース培地における *C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB 株の増殖曲線を示す図。

10

【図 2】キシロース培地における *C. glutamicum* XM 株の増殖曲線を示す図。

【図 3】キシロース培地における *C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954 / pVK9Peftu_xylA B 株の増殖曲線を示す図。

【図 4】キシロース培地における培養開始後 40 時間目までの最大比増殖速度を示す図。「WT」：*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB 株、「XM」：*C. glutamicum* XM 株、「NCgl2954」：*C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954 / pVK9Peftu_xylAB 株。

【図 5】グルコース培地におけるグルタミン酸発酵の結果を示す図。(A) 培養液の濁度 (OD620)、(B) 培養上清中のグルコース濃度、(C) 培養上清中のグルタミン酸濃度。「WT」：*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB 株、「NCgl2954」：*C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954 / pVK9Peftu_xylAB 株。

20

【図 6】キシロース培地におけるグルタミン酸発酵の結果を示す図。(A) 培養液の濁度 (OD620)、(B) 培養上清中のキシロース濃度、(C) 培養上清中のグルタミン酸濃度。「WT」：*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB 株、「NCgl2954」：*C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954 / pVK9Peftu_xylAB 株。

【図 7】グルコース / キシロース培地におけるグルタミン酸発酵の結果を示す図。(A) 培養液の濁度 (OD620)、(B) 培養上清中のグルコース濃度、(C) 培養上清中のキシロース濃度、(D) 培養上清中のグルタミン酸濃度。「WT」：*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB 株、「NCgl2954」：*C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954 / pVK9Peftu_xylAB 株。

【図 8】キシロース培地でのグルタミン酸発酵の結果を示す図。(A) 培養液の濁度 (OD620)、(B) 培養上清中のキシロース濃度、(C) 培養上清中のグルタミン酸濃度。「WT」：*C. glutamicum* ATCC13869+D / pVK9Peftu_NXA 株、「NCgl2954」：*C. glutamicum* ATCC13869 NCgl2954+D / pVK9Peftu_NXA 株。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法は、目的物質の生産能を有するコリネ型細菌をキシロースを含有する培地で培養して目的物質を該培地中または該細菌の菌体内に生成蓄積すること、および該培地または菌体より目的物質を採取すること、を含む L - アミノ酸の製造法であって、前記細菌が、NCgl2954 遺伝子に変異が導入されたことによりキシロース資化性が向上したことを特徴とする、方法である。同方法に用いられる細菌を、「本発明の細菌」ともいう。

40

【 0 0 1 6 】

< 1 > 本発明の細菌

本発明の細菌は、目的物質の生産能を有するコリネ型細菌であって、且つ、NCgl2954 遺伝子に変異が導入されたことによりキシロース資化性が向上した細菌である。

【 0 0 1 7 】

< 1 - 1 > 目的物質の生産能を有するコリネ型細菌

本発明において、「目的物質の生産能を有する細菌」とは、培地で培養したときに、目的物質を生成し、回収できる程度に培地中または菌体内に蓄積する能力を有する細菌をい

50

う。目的物質の生産能を有する細菌は、非改変株よりも多い量の目的物質を培地に蓄積することができる細菌であってよい。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。また、目的物質の生産能を有する細菌は、好ましくは0.5g/L以上、より好ましくは1.0g/L以上の量の目的物質を培地に蓄積することができる細菌であってよい。

【0018】

目的物質は、コリネ型細菌を用いた発酵法により製造できるものであれば特に制限されない。目的物質としては、例えば、L-アミノ酸、核酸、およびタンパク質が挙げられる。また、目的物質としては、例えば、 α -ケトグルタル酸およびその誘導体も挙げられる。本発明においては、本発明の細菌は、1種の目的物質の生産能を有していてもよく、2種またはそれ以上の目的物質の生産能を有していてもよい。

10

【0019】

L-アミノ酸としては、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリン等の塩基性アミノ酸、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、グリシン等の脂肪族アミノ酸、L-スレオニン、L-セリン等のヒドロキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸、L-プロリン等の環式アミノ酸、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン等の芳香族アミノ酸、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニン等の含硫アミノ酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸等の酸性アミノ酸、L-グルタミン、L-アスパラギン等の側鎖にアミド基を持つアミノ酸が挙げられる。本発明の細菌は、1種のL-アミノ酸の生産能を有していてもよく、2種またはそれ以上のL-アミノ酸の生産能を有していてもよい。本発明において、「アミノ酸」という用語は、特記しない限り、L-アミノ酸を意味してよい。

20

【0020】

α -ケトグルタル酸およびその誘導体としては、 α -ケトグルタル酸、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、L-シトルリン、L-オルニチン、L-プロリン、 γ -アミノ酪酸(GABA)、プトレッシンが挙げられる。

【0021】

核酸としては、プリン系物質が挙げられる。プリン系物質としては、プリンヌクレオシドおよびプリンヌクレオチドが挙げられる。プリンヌクレオシドとしては、イノシン、グアノシン、キサンチン、およびアデノシンが挙げられる。プリンヌクレオチドとしては、プリンヌクレオチドの5'-リン酸エステルが挙げられる。プリンヌクレオチドの5'-リン酸エステルとしては、イノシン酸(イノシン-5'-リン酸エステル; IMP)、グアニル酸(グアノシン-5'-リン酸エステル; GMP)、キサンチル酸(キサンチン-5'-リン酸エステル; XMP)、およびアデニル酸(アデノシン-5'-リン酸エステル; AMP)が挙げられる。本発明の細菌は、1種のプリン系物質の生産能を有していてもよく、2種またはそれ以上のプリン系物質の生産能を有していてもよい。本発明の細菌は、例えば、1種またはそれ以上のプリンヌクレオチドの生産能を有していてもよい。本発明の細菌は、例えば、1種またはそれ以上のプリンヌクレオチドの生産能を有していてもよい。

30

【0022】

タンパク質は、コリネ型細菌を宿主として発現可能なものであれば特に制限されない。タンパク質は、本発明の細菌由来のタンパク質であってもよく、異種由来のタンパク質であってもよい。異種由来のタンパク質は、例えば、微生物由来のタンパク質であってもよく、植物由来のタンパク質であってもよく、動物由来のタンパク質であってもよく、ウイルス由来のタンパク質であってもよく、さらには人工的にアミノ酸配列をデザインしたタンパク質であってもよい。タンパク質は、単量体タンパク質であってもよく、多量体(multimer)タンパク質であってもよい。タンパク質は、天然で分泌性であるタンパク質であってもよく、天然では非分泌性であるタンパク質であってもよい。なお、「タンパク質」には、ペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドと呼ばれる態様も含む。

40

【0023】

生産される目的物質は、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってもよい。すな

50

わち、本発明において、「目的物質」という用語は、特記しない限り、フリー体の目的物質、その塩、またはそれらの混合物を意味してよい。塩の例については後述する。

【0024】

コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、およびミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等の属に属する細菌が挙げられる。

【0025】

コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような種が挙げられる。

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

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム (*Corynebacterium acetoglutamicum*) 10

コリネバクテリウム・アルカノリティカム (*Corynebacterium alkanolyticum*)

コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)

コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

コリネバクテリウム・リリウム (*Corynebacterium lilium*)

コリネバクテリウム・メラセコーラ (*Corynebacterium melassecola*)

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (コリネバクテリウム・エフィシエンス) (*Corynebacterium thermoaminogenes* (*Corynebacterium efficiens*))

コリネバクテリウム・ハーキュリス (*Corynebacterium herculis*)

ブレビバクテリウム・ディバリカナム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium divaricatum* (*Corynebacterium glutamicum*)) 20

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium flavum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・イマリオフィラム (*Brevibacterium immariophilum*)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンナム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (*Brevibacterium lactofermentum* (*Corynebacterium glutamicum*))

ブレビバクテリウム・ロゼウム (*Brevibacterium roseum*)

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (*Brevibacterium saccharolyticum*)

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス (*Brevibacterium thiogenitalis*)

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・スタティオニス) (*Corynebacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium stationis*)) 30

ブレビバクテリウム・アルバム (*Brevibacterium album*)

ブレビバクテリウム・セリナム (*Brevibacterium cerinum*)

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム (*Microbacterium ammoniophilum*)

【0026】

コリネ型細菌としては、具体的には、下記のような菌株が挙げられる。

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM 40
BP-734

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium efficiens (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340 (FERM BP-15
39)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ124
18 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068 50

Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) ATCC 13869
 Brevibacterium roseum ATCC 13825
 Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066
 Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240
 Corynebacterium ammoniagenes (Corynebacterium stationis) ATCC 6871, ATCC 6872
 Brevibacterium album ATCC 15111
 Brevibacterium cerinum ATCC 15112
 Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

【 0 0 2 7 】

なお、コリネバクテリウム属細菌には、従来プレバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991)) も含まれる。また、コリネバクテリウム・スタティオニスには、従来コリネバクテリウム・アンモニアゲネスに分類されていたが、16S rRNAの塩基配列解析等によりコリネバクテリウム・スタティオニスに再分類された細菌も含まれる (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879(2010))。

10

【 0 0 2 8 】

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1230 1 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。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の細菌は、本来的に目的物質の生産能を有するものであってもよく、目的物質の生産能を有するように改変されたものであってもよい。目的物質の生産能を有する細菌は、例えば、上記のような細菌に目的物質の生産能を付与することにより、または、上記のような細菌の目的物質の生産能を増強することにより、取得できる。

【 0 0 3 0 】

< 1 - 1 - 1 > L - アミノ酸生産菌

L - アミノ酸生産能の付与または増強は、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等のアミノ酸生産菌の育種に採用されてきた方法により行うことができる (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)。そのような方法としては、例えば、栄養要求性変異株の取得、L - アミノ酸のアナログ耐性株の取得、代謝制御変異株の取得、L - アミノ酸の生合成系酵素の活性が増強された組換え株の創製が挙げられる。L - アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、L - アミノ酸生産菌の育種において、活性が増強されるL - アミノ酸生合成系酵素も、単独であってもよく、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の活性の増強が組み合わされてもよい。

30

40

【 0 0 3 1 】

L - アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、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に供し、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、且つL - アミノ酸生産能を有するものを選択することによって取得できる。通常の変異処理としては、X線や紫外線の照射、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (MNNG)、エチルメタンサルフォネート (EMS)、メチルメタンサルフォネート (MMS) 等の変異剤による処理が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

また、L - アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL - アミノ酸の生合成に関与する酵素の活性を増強することによっても行うことができる。酵素活性の増強は、例えば、同

50

酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように細菌を改変することにより行うことができる。遺伝子の発現を増強する方法は、W000/18935号パンフレット、欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。酵素活性を増強する詳細な手法については後述する。

【0033】

また、L-アミノ酸生産能の付与又は増強は、目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下させることによって行うことができる。なお、ここでいう「目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素」には、目的のアミノ酸の分解に関与する酵素も含まれる。酵素活性を低下させる手法については後述する。

10

【0034】

以下、L-アミノ酸生産菌、およびL-アミノ酸生産能を付与または増強する方法について具体的に例示する。なお、以下に例示するようなL-アミノ酸生産菌が有する性質およびL-アミノ酸生産能を付与または増強するための改変は、いずれも、単独で用いてもよく、適宜組み合わせ用いてもよい。

【0035】

< L-グルタミン酸生産菌 >

L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-グルタミン酸生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA)、グルタミンシンターゼ (glnA)、グルタミン酸シンターゼ (gltd)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (icdA)、アコニテートヒドラーゼ (acnA, acnB)、クエン酸シンターゼ (glta)、メチルクエン酸シンターゼ (prpC)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (ppc)、ピルビン酸カルボキシラーゼ (pyc)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (aceEF, lpdA)、ピルベートキナーゼ (pykA, pykF)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ (ppsA)、エノラーゼ (eno)、ホスホグリセロムターゼ (pgmA, pgmI)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (pgk)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gapA)、トリオースリン酸イソメラーゼ (tpiA)、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ (fbp)、ホスホフルクトキナーゼ (pfkA, pfkB)、グルコースリン酸イソメラーゼ (pgi)、6-ホスホグルコン酸デヒドラーゼ (edd)、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ (eda)、トランスヒドロゲナーゼが挙げられる。なお、カッコ内は、その酵素をコードする遺伝子の略記号の一例である(以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、及びメチルクエン酸シンターゼから選択される1またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。

20

30

【0036】

グルタミン酸シンターゼ遺伝子 (gltd) の発現が増大するように改変されたコリネ型細菌としては、W099/07853に開示されたものが挙げられる。

40

【0037】

また、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、イソクエン酸リアーゼ (aceA)、2-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (sucA, odhA)、ホスホトランスアセチラーゼ (pta)、酢酸キナーゼ (ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (ilvG)、アセト乳酸シンターゼ (ilvI)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ (pfl)、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldh)、アルコールデヒドロゲナーゼ (adh)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (gadAB)、コハク酸デヒドロゲナーゼ (sdhABCD)、1-ピロリン-5-カルボキシ

50

レートデヒドロゲナーゼ (putA) が挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を低下又は欠損させることが好ましい。

【0038】

α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌、及びそれらの取得方法は、WO2008/075483に記載されている。 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下または欠損したコリネ型細菌として、具体的には、例えば、下記の株が挙げられる。

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2株 (特開2006-340603号明細書)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) S株 (国際公開95/34672号パンフレット) 10

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821 (FERM BP-4172; フランス特許公報9401748号明細書参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173; フランス特許公報9401748号明細書)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174; フランス特許公報9401748号明細書)

Corynebacterium glutamicum L30-2株 (特開2006-340603号)

【0039】

また、L-グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株としては、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (sucA) 活性およびコハク酸デヒドロゲナーゼ (sdh) 活性の両方が低下または欠損した株も挙げられる (特開2010-041920号)。そのような株として、具体的には、例えば、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067のodhAsdHA二重欠損株 (*Corynebacterium glutamicum* 8L3G SDH株) が挙げられる (特開2010-041920号)。 20

【0040】

また、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、D-キシロース-5-リン酸-ホスホケトラゼ及び/又はフルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼの活性が増大するように細菌を改変する方法も挙げられる (特表2008-509661)。D-キシロース-5-リン酸-ホスホケトラゼ活性及びフルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼ活性はいずれか一方を増強してもよいし、両方を増強してもよい。 30
なお、本明細書ではD-キシロース-5-リン酸-ホスホケトラゼとフルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼをまとめてホスホケトラゼと呼ぶことがある。

【0041】

D-キシロース-5-リン酸-ホスホケトラゼ活性とは、リン酸を消費して、キシロース-5-リン酸をグリセルアルデヒド-3-リン酸とアセチルリン酸に変換し、一分子のH₂Oを放出する活性を意味する。この活性は、Goldberg, M.らの文献 (Methods Enzymol., 9,515-520 (1966)) またはL.Meileの文献 (J.Bacteriol. (2001) 183; 2929-2936) に記載の方法によって測定することができる。

【0042】

また、フルクトース-6-リン酸ホスホケトラゼ活性とは、リン酸を消費して、フルクトース6-リン酸をエリスロース-4-リン酸とアセチルリン酸に変換し、一分子のH₂Oを放出する活性を意味する。この活性は、Racker, Eの文献 (Methods Enzymol., 5, 276-280 (1962)) またはL.Meileの文献 (J.Bacteriol. (2001) 183; 2929-2936) に記載の方法によって測定することができる。 40

【0043】

また、L-グルタミン酸生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-グルタミン酸排出遺伝子であるyhfK遺伝子 (WO2005/085419) やybjL遺伝子 (WO2008/133161) の発現を増強することも挙げられる。

【0044】

また、コリネ型細菌について、L-グルタミン酸生産能を付与または増強する方法とし 50

ては、有機酸アナログや呼吸阻害剤などへの耐性を付与する方法や、細胞壁合成阻害剤に対する感受性を付与する方法も挙げられる。そのような方法として、具体的には、例えば、モノフルオロ酢酸耐性を付与する方法（特開昭50-113209）、アデニン耐性またはチミン耐性を付与する方法（特開昭57-065198）、ウレアーゼを弱化させる方法（特開昭52-038088）、マロン酸耐性を付与する方法（特開昭52-038088）、ベンゾピロン類またはナフトキノン類への耐性を付与する方法（特開昭56-1889）、HOQNO耐性を付与する方法（特開昭56-140895）、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法（特開昭57-2689）、グアニジン耐性を付与する方法（特開昭56-35981）、ペニシリンに対する感受性を付与する方法（特開平4-88994）などが挙げられる。

【 0 0 4 5 】

このような耐性菌または感受性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。
Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632 ; 特開昭50-113209参照)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736 ; 特開昭57-065198参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007 ; 特開昭56-1889号公報参照)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020 ; 特開昭56-1889号公報参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318 ; 特開昭57-2689号公報参照)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319 ; 特開昭57-2689号公報参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM P-5472 ; 特開昭56-140895公報参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM P-5136 ; 特開昭56-35981号公報参照)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004 ; 特開平04-88994号公報参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123 ; 特開平56-048890号公報参照)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137 ; 特開平56-048890号公報参照)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402 ; 特開平58-158192号公報参照)

【 0 0 4 6 】

また、コリネ型細菌について、L-グルタミン酸生産能を付与または増強する方法としては、*yggB*遺伝子の発現を増強する方法やコード領域内に変異を導入した変異型*yggB*遺伝子を導入する方法も挙げられる（W02006/070944）。*yggB*遺伝子は、メカノセンシティブチャンネル（mechanosensitive channel）をコードする遺伝子である。*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032の*yggB*遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank Accession No. NC_003450で登録されているゲノム配列中、1,336,091～1,337,692の配列の相補配列に相当し、NCgl1221とも呼ばれる。*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032の*yggB*遺伝子にコードされるYggBタンパク質は、GenBank accession No. NP_600492として登録されている。また、*Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)の*yggB*遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするYggBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号25および26に示す。

【 0 0 4 7 】

ここで用いる変異型*yggB*遺伝子としては、以下のような変異を有する*yggB*遺伝子を挙げることができる。なお、変異型*yggB*遺伝子にコードされるYggBタンパク質を変異型YggBタンパク質ともいう。また、当該変異を有さない*yggB*遺伝子および同遺伝子にコードされるYggBタンパク質を、それぞれ野生型*yggB*遺伝子および野生型YggBタンパク質ともいう。野生型YggBタンパク質としては、例えば配列番号26に示すアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

(1) C末端側変異

C末端側変異は、配列番号26のアミノ酸番号419～533の配列をコードする領域の塩基配列の一部に導入された変異である。C末端側変異は、上記領域の塩基配列中の少なくとも一部に変異が導入される限り特に制限されないが、インサクションシーケンス(以下、「IS」ともいう)やトランスポゾンが挿入されたものが好ましい。C末端側変異は、アミノ酸置換を伴うもの(ミスセンス変異)や、上記IS等の挿入によってフレームシフト変異が導入されたもの、ナンセンス変異が導入されたものの何れでもよい。

【 0 0 4 9 】

C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419位のバリン残基をコードする箇所に塩基配列が挿入される変異(2A-1型変異)が挙げられる。2A-1型変異は、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位のアミノ酸残基の一部または全部の欠失または置換を引き起こすものであってよい。2A-1型変異を有する変異型yggB遺伝子として、具体的には、例えば、配列番号25の1255位の「G」の次にISが挿入され、元の野生型YggBタンパク質(配列番号26)よりも短い全長423アミノ酸残基の変異型YggBタンパク質をコードするyggB遺伝子が挙げられる(特開2007-222163)。

【 0 0 5 0 】

また、C末端側変異としては、例えば、野生型YggBタンパク質の419～533位に存在するプロリン残基を他のアミノ酸に置換する変異も挙げられる。そのようなプロリン残基としては、野生型YggBタンパク質の424位、437位、453位、457位、462位、469位、484位、489位、497位、515位、529位、および533位のプロリン残基が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

(2) 膜貫通領域の変異

yggB遺伝子がコードするYggBタンパク質は、5個の膜貫通領域を有していると推測されている。配列番号26の野生型YggBタンパク質のアミノ酸配列において、膜貫通領域はそれぞれ、アミノ酸番号1～23(第1膜貫通領域)、25～47(第2膜貫通領域)、62～84(第3膜貫通領域)、86～108(第4膜貫通領域)、110～132(第5膜貫通領域)の領域に相当する。yggB遺伝子は、これら膜貫通領域をコードする領域内に変異を有してよい。膜貫通領域の変異は、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入又は逆位を含む変異であって、フレームシフト変異およびナンセンス変異を伴わないものが望ましい。膜貫通領域の変異としては、配列番号26に示されるアミノ酸配列において、14位のロイシン残基と15位のトリプトファン残基間に1又は数個のアミノ酸(例えば、Cys-Ser-Leu)を挿入する変異、100位のアラニン残基を他のアミノ酸残基(例えば、側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸(Thr、Ser、またはTyr)、好ましくはThr)へ置換する変異、111位のアラニン残基を他のアミノ酸残基(例えば、側鎖にヒドロキシル基を有するアミノ酸(Thr、Ser、またはTyr)、好ましくはThr)へ置換する変異などが挙げられる。そのような膜貫通領域の変異を有する変異型yggB遺伝子として、具体的には、例えば、配列番号25の44位の「G」の次にTTCATTGTGが挿入されたyggB遺伝子(A1型変異)、配列番号25の298位の「G」が「A」に置換されたyggB遺伝子(19型変異)、配列番号25の332位の「C」が「T」に置換されたyggB遺伝子(L30型変異)が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

なお、野生型YggBタンパク質が配列番号26に示すアミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有する場合、変異型yggB遺伝子は、配列番号26における上記箇所のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基をコードする領域に変異を有していればよい。任意の野生型YggBタンパク質において、いずれのアミノ酸残基が「配列番号26における上記箇所のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、当該野生型YggBタンパク質のアミノ酸配列と配列番号26のアミノ酸配列とでアライメントを行うことにより決定できる。なお、「配列番号26のアミノ酸番号X」とは、「配列番号26のX位」と読み替えてよい。

【 0 0 5 3 】

< L - グルタミン生産菌 >

L - グルタミン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - グルタミン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA) やグルタミンシンセターゼ (glnA) が挙げられる。なお、グルタミンシンセターゼの活性は、グルタミンアデニリルトランスフェラーゼ遺伝子 (glnE) の破壊やPII制御タンパク質遺伝子 (glnB) の破壊によって増強してもよい (EP1229121)。

【0054】

また、L - グルタミン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - グルタミンの生合成経路から分岐してL - グルタミン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、グルタミナーゼが挙げられる。

10

【0055】

L - グルタミン生産菌又はそれを誘導するための親株として、具体的には、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (gdhA) および/またはグルタミンシンセターゼ (glnA) の活性を増強したコリネ型細菌 (EP1229121, EP1424398) やグルタミナーゼ活性が低下したコリネ型細菌 (特開2004-187684) が挙げられる。

【0056】

また、コリネ型細菌について、L - グルタミン生産能を付与または増強する方法としては、6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法 (特開平3-232497)、プリンアナログ耐性及びメチオニンスルホキシド耐性を付与する方法 (特開昭61-202694)、 α -ケトマレイン酸耐性を付与する方法 (特開昭56-151495) が挙げられる。L - グルタミン生産能を有するコリネ型細菌として、具体的には、例えば、以下の株が挙げられる。

20

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11573 (FERM P-5492 ; 特開昭56-161495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11576 (FERM BP-10381 ; 特開昭56-161495)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ12212 (FERM P-8123 ; 特開昭61-202694)

30

【0057】

< L - プロリン生産菌 >

L - プロリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - プロリン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、グルタミン酸 - 5 - キナーゼ (proB)、

グルタミル - リン酸レダクターゼ、ピロリン - 5 - カルボキシレートレダクターゼ (putA) が挙げられる。酵素活性の増強には、例えば、L - プロリンによるフィードバック阻害が解除されたグルタミン酸 - 5 - キナーゼをコードするproB遺伝子 (ドイツ特許第3127361号) が好適に利用できる。

【0058】

40

また、L - プロリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - プロリン分解に関与する酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、プロリンデヒドロゲナーゼやオルニチンアミノトランスフェラーゼが挙げられる。

【0059】

< L - スレオニン生産菌 >

L - スレオニン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - スレオニン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、アスパルトキナーゼIII (lysC)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (asd)、アスバル

50

トキナーゼI (thrA)、ホモセリンキナーゼ (homoserine kinase) (thrB)、スレオニンシンターゼ (threonine synthase) (thrC)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) (aspC) が挙げられる。これらの酵素の中では、アスパルトキナーゼIII、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アスパルトキナーゼI、ホモセリンキナーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、及びスレオニンシンターゼから選択される1またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。L-スレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制された株に導入してもよい。

【0060】

L-スレオニン生合成系酵素の活性は、最終産物のL-スレオニンによって阻害される。従って、L-スレオニン生産菌を構築するためには、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにL-スレオニン生合成系遺伝子を改変するのが好ましい。上記thrA、thrB、thrC遺伝子は、スレオニンオペロンを構成しており、スレオニンオペロンは、アテニューエーター構造を形成している。スレオニンオペロンの発現は、培養液中のイソロイシン、スレオニンに阻害を受け、アテニューエーションにより抑制される。スレオニンオペロンの発現の増強は、アテニューエーション領域のリーダー配列あるいはアテニューエーターを除去することにより達成できる (Lynn, S. P., Burton, W. S., Donohue, T. J., Gould, R. M., Gumport, R. I., and Gardner, J. F. J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808; WO2003/097839参照)。

10

【0061】

スレオニンオペロンの上流には固有のプロモーターが存在するが、同プロモーターを非天然のプロモーターに置換してもよい (WO98/04715号パンフレット参照)。また、スレオニン生合成関与遺伝子がラムダファ-ジのリプレッサーおよびプロモーターの制御下で発現するようにスレオニンオペロンを構築してもよい (欧州特許第0593792号明細書参照)。また、L-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように改変された細菌は、L-スレオニンアナログである α -amino- γ -hydroxyvaleric acid (AHV) に耐性な菌株を選抜することによっても取得できる。

20

【0062】

このようにL-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように改変されたスレオニンオペロンは、コピー数の上昇により、あるいは強力なプロモーターに連結されることにより、宿主内での発現量が向上しているのが好ましい。コピー数の上昇は、スレオニンオペロンを含むプラスミドを宿主に導入することにより達成できる。また、コピー数の上昇は、トランスポゾン、Muファ-ジ等を利用して、宿主のゲノム上にスレオニンオペロンを転移させることによっても達成できる。

30

【0063】

また、L-スレオニン生産能を付与または増強する方法としては、宿主にL-スレオニン耐性を付与する方法やL-ホモセリン耐性を付与する方法も挙げられる。耐性の付与は、例えば、L-スレオニンに耐性を付与する遺伝子、L-ホモセリンに耐性を付与する遺伝子の発現を強化することにより達成できる。耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子 (Res. Microbiol. 154:123 - 135 (2003))、rhtB遺伝子 (欧州特許出願公開第0994190号明細書)、rhtC遺伝子 (欧州特許出願公開第1013765号明細書)、yfiK遺伝子、yeaS遺伝子 (欧州特許出願公開第1016710号明細書) が挙げられる。また、宿主にL-スレオニン耐性を付与する方法は、欧州特許出願公開第0994190号明細書や国際公開第90/04636号パンフレットに記載の方法を参照出来る。

40

【0064】

E. coliのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子は明らかにされている (ヌクレオチド番号337~2799, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている (ヌクレオチド番号2801~3733, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC遺伝子と

50

の間に位置する。E. coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734~5020, GenBank accession NC_000913.2, gi: 49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。また、スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異型thrA遺伝子と野生型thrBC遺伝子を含むthrA*BCオペロンは、スレオニン生産株E. coli VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40(米国特許第5,705,371号)から取得できる。

【0065】

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

【0066】

E. coliのasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511~3571408, GenBank accession NC_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより取得できる(White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

【0067】

また、E. coliのaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742~984932, GenBank accession NC_000913.1, gi:16128895)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

【0068】

また、L-スレオニン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、Corynebacterium acetoacidophilum AJ12318 (FERM BP-1172) (米国特許第5,188,949号参照)が挙げられる。

【0069】

< L-リジン生産菌 >

L-リジン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-リジン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ(dihydrodipicolinate synthase)(dapA)、アスパルトキナーゼIII(aspartokinase III)(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(dihydrodipicolinate reductase)(dapB)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ(diaminopimelate decarboxylase)(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(diaminopimelate dehydrogenase)(ddh)(米国特許第6,040,160号)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(phosphoenolpyruvate carboxylase)(ppc)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aspartate semialdehyde dehydrogenase)(asd)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspartate aminotransferase)(アスパラギン酸トランスアミナーゼ(aspartate transaminase))(aspC)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ(diaminopimelate epimerase)(dapF)、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ(tetrahydrodipicolinate succinylase)(dapD)、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ(succinyl-diaminopimelate deacylase)(dapE)、及びアスパルターゼ(aspartase)(aspA)

(EP 1253195 A) が挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ、及びスクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼから選択される 1 またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。また、L - リジン生産菌又はそれを誘導するための親株では、エネルギー効率に關与する遺伝子 (cyo) (EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) をコードする遺伝子 (pntAB) (米国特許第 5,830,716号)、ybjE 遺伝子 (WO2005/073390)、またはこれらの組み合わせの発現レベルが増大していてもよい。アスパルトキナーゼ III (lysC) は L - リジンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、L - リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼ III をコードする変異型 lysC 遺伝子を利用してよい (米国特許 5,932,453号明細書)。また、ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (dapA) L - リジンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、L - リジンによるフィードバック阻害が解除されたジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする変異型 dapA 遺伝子を利用してよい。

【 0 0 7 0 】

また、L - リジン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - リジンの生合成経路から分岐して L - リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される 1 またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (homoserine dehydrogenase)、リジンデカルボキシラーゼ (lysine decarboxylase) (米国特許第 5,827,698号)、及びリンゴ酸酵素 (malic enzyme) (WO2005/010175) が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

また、コリネ型細菌について、L - リジン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、リジン排出系 (lysE) の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる (WO97/23597)。Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 の lysE 遺伝子は、NCBI データベースに GenBank accession NC_006958 (VERSION NC_006958.1 GI:62388892) として登録されているゲノム配列中、1329712 ~ 1330413 位の配列の相補配列に相当する。Corynebacterium glutamicum ATCC13032 の LysE タンパク質は、GenBank accession YP_225551 (YP_225551.1 GI:62390149) として登録されている。

【 0 0 7 2 】

また、L - リジン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、L - リジンアナログに耐性を有する変異株が挙げられる。L - リジンアナログは腸内細菌科の細菌やコリネ型細菌等の細菌の生育を阻害するが、この阻害は、L - リジンが培地に共存するときには完全にまたは部分的に解除される。L - リジンアナログとしては、特に制限されないが、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S - (2 - アミノエチル) - L - システイン (AEC)、 α - メチルリジン、 α - クロロカプロラクタムが挙げられる。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、細菌を通常の人工変異処理に付すことによって得ることができる。

【 0 0 7 3 】

また、L - リジン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、AEC 耐性変異株 (Corynebacterium glutamicum (Brevibacterium lactofermentum) AJ11082 (NRRL B-11470) 株など; 特公昭 56-1914 号公報、特公昭 56-1915 号公報、特公昭 57-14157 号公報、特公昭 57-14158 号公報、特公昭 57-30474 号公報、特公昭 58-10075 号公報、特公昭 59-4993 号公報、特公昭 61-35840 号公報、特公昭 62-24074 号公報、特公昭 62-36673 号公報、特公平 5-11958 号公報、特公平 7-112437 号公報、特公平 7-112438 号公報参照); その生育に L - ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株 (特公昭 48-28078 号公報、特公昭 56-6499 号公報参照

10

20

30

40

50

); AECに耐性を示し、更にL - ロイシン、L - ホモセリン、L - プロリン、L - セリン、L - アルギニン、L - アラニン、L - バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号明細書参照); DL - - アミノ - - カプロラクタム、- アミノ - ラウリルラクタム、アスパラギン酸アナログ、スルファ剤、キノイド、N - ラウロイルロイシンに耐性を示す変異株; オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ阻害剤または呼吸系酵素阻害剤に対する耐性を示す変異株(特開昭50-53588号公報、特開昭50-31093号公報、特開昭52-102498号公報、特開昭53-9394号公報、特開昭53-86089号公報、特開昭55-9783号公報、特開昭55-9759号公報、特開昭56-32995号公報、特開昭56-39778号公報、特開昭53-43591号公報、特開昭53-1833号公報); イノシトールまたは酢酸を要求する変異株(特開昭55-9784号公報、特開昭56-8692号公報); フルオロピルビン酸または34 以上の温度に対して感受性を示す変異株(特開昭55-9783号公報、特開昭53-86090号公報); エチレングリコールに耐性を示す変異株(米国特許第4411997号明細書)が挙げられる。

10

【0074】

< L - アルギニン生産菌 >

L - アルギニン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - アルギニン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ(argA)、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ(argJ)、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ(argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ(argE) オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ(argF)、アルギニノコハク酸シンターゼ(argG)、アルギニノコハク酸リアーゼ(argH)、カルバモイルリン酸シンターゼ(carAB)が挙げられる。N - アセチルグルタミン酸シンターゼ(argA) 遺伝子としては、例えば、野生型の15位~19位に相当するアミノ酸残基が置換され、L - アルギニンによるフィードバック阻害が解除された変異型N - アセチルグルタミン酸シンターゼをコードする遺伝子を用いると好適である(欧州出願公開1170361号明細書)。

20

【0075】

L - アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、アルギニンリプレッサーであるArgRを欠損した株(米国特許出願公開2002-0045223号)や細胞内のグルタミンシンターゼ活性を上昇させた株(米国特許出願公開2005-0014236号公報)等のコリネ型細菌が挙げられる。

30

【0076】

また、L - アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、アミノ酸アナログなどへの耐性を有するコリネ型細菌の変異株も挙げられる。そのような株としては、例えば、2 - チアゾールアラニン耐性に加えて、L - ヒスチジン、L - プロリン、L - スレオニン、L - イソロイシン、L - メチオニン、またはL - トリプトファン要求性を有する株(特開昭54-44096号公報); ケトマロン酸、フルオロマロン酸、又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する株(特開昭57-18989号公報); アルギニノールに耐性を有する株(特開昭62-24075号公報); X - グアニジン(Xは脂肪鎖又はその誘導体)に耐性を有する株(特開平2-186995号公報); アルギニンヒドロキサメート及び6 - アザウラシルに耐性を有する株(特開昭57-150381号公報)が挙げられる。L - アルギニン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

40

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11169 (FERM BP-6892)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12092 (FERM BP-6906)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11336 (FERM BP-6893)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium flavum*) AJ11345 (FERM BP-6894)

Corynebacterium glutamicum (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12430 (FERM BP-2228)

【0077】

50

< L - シトルリン生産菌および L - オルニチン生産菌 >

L - シトルリンおよび L - オルニチンは、L - アルギニンと生合成経路が共通している。よって、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA)、N - アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ (argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ)、N - アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、および/またはアセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE) の酵素活性を上昇させることによって、L - シトルリンおよび/または L - オルニチンの生産能を付与または増強することができる (国際公開2006-35831号パンフレット)。

【0078】

< L - ヒスチジン生産菌 >

L - ヒスチジン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - ヒスチジン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、ATPホスホリボシルトランスフェラーゼ (hisG)、ホスホリボシル - AMPサイクロヒドロラーゼ (hisI)、ホスホリボシル - ATPピロホスホヒドロラーゼ (hisI)、ホスホリボシルフォルミミノ - 5 - アミノイミダゾールカルボキサミドリボタイドイソメラーゼ (hisA)、アミドトランスフェラーゼ (hisH)、ヒスチジノールフォスフェイトアミノトランスフェラーゼ (hisC)、ヒスチジノールフォスファターゼ (hisB)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (hisD) が挙げられる。

【0079】

これらの内、hisG及びhisBHAFIにコードされるL - ヒスチジン生合成系酵素は、L - ヒスチジンにより阻害されることが知られている。従って、L - ヒスチジン生産能は、例えば、ATPホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (hisG) にフィードバック阻害への耐性を付与する変異を導入することにより、付与または増強させることができる (ロシア特許第2003677号及び第2119536号)。

【0080】

< L - システイン生産菌 >

L - システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - システイン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、セリンアセチルトランスフェラーゼ (cysE) や3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (serA) が挙げられる。セリンアセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば、システインによるフィードバック阻害に耐性の変異型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cysE遺伝子を細菌に導入することにより増強できる。変異型セリンアセチルトランスフェラーゼは、例えば、特開平11-155571や米国特許公開第20050112731に開示されている。また、3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ活性は、例えば、セリンによるフィードバック阻害に耐性の変異型3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードする変異型serA遺伝子を細菌に導入することにより増強できる。変異型3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼは、例えば、米国特許第6,180,373号に開示されている。

【0081】

また、L - システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - システインの生合成経路から分岐してL - システイン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、例えば、L - システインの分解に関与する酵素が挙げられる。L - システインの分解に関与する酵素としては、特に制限されないが、システインデスルフヒドラーゼ (aecD) (特開2002-233384) が挙げられる。

【0082】

また、L - システイン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - システイン排出系を増強することや硫酸塩/チオ硫酸塩輸送系を増強することも挙げられる。L - システイン排出系のタンパク質としては、ydeD遺伝子にコードされるタンパク質 (

10

20

30

40

50

特開2002-233384)、yfiK遺伝子にコードされるタンパク質(特開2004-49237)、emrAB、emrKY、yojIH、acrEF、bcr、およびcusAの各遺伝子にコードされる各タンパク質(特開2005-287333)、yeaS遺伝子にコードされるタンパク質(特開2010-187552)が挙げられる。硫酸塩/チオ硫酸塩輸送系のタンパク質としては、cysPTWAM遺伝子クラスターにコードされるタンパク質が挙げられる。

【0083】

また、L-システイン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、L-システインによるフィードバック阻害が低減されたセリンアセチルトランスフェラーゼを保持することにより、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(特開2002-233384)が挙げられる。

10

【0084】

<L-セリン生産菌>

L-セリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-セリン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる(特開平11-253187)。そのような酵素としては、特に制限されないが、3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(serA)、ホスホセリントランスアミナーゼ(serC)、ホスホセリンホスファターゼ(serB)が挙げられる(特開平11-253187)。3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ活性は、例えば、セリンによるフィードバック阻害に耐性の変異型3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードする変異型serA遺伝子を細菌に導入することにより増強できる。変異型3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼは、例えば、米国特許第6,180,373号に開示されている。

20

【0085】

L-セリン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、例えば、アザセリンまたは(2-チエニル)-DL-アラニンに耐性を示し、かつL-セリン分解能を欠失したコリネ型細菌が挙げられる(特開平10-248588)。そのようなコリネ型細菌として、具体的には、例えば、アザセリンに耐性を示し、かつL-セリン分解能を欠失したCorynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ13324 (FERM P-16128) や、(2-チエニル)-DL-アラニンに耐性を示し、かつL-セリンの分解能を欠失したCorynebacterium glutamicum (Brevibacterium flavum) AJ13325 (FERM P-16129) が挙げられる(特開平10-248588)。

30

【0086】

<L-メチオニン生産菌>

L-メチオニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、L-スレオニン要求株や、ノルロイシンに耐性を有する変異株が挙げられる(特開2000-139471)。また、L-メチオニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、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保持する株も挙げられる(特開2000-139471、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、US20080311632)。

【0087】

<L-ロイシン生産菌>

L-ロイシン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L-ロイシン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、IeuABCDオペロンの遺伝子にコードされる酵素が挙げられる。また、酵素活性の増強には、例えば、L-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼをコードする変異IeuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)が好適に利用できる。

40

【0088】

L-ロイシン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、2-チアゾールアラニン及び(2S)-ヒドロキシロイシンに耐性で、且つイソロイシン及びメチオニン要求性である

50

、*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ3718 (FERM P-2516) が挙げられる。

【0089】

< L - イソロイシン生産菌 >

L - イソロイシン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - イソロイシン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、スレオニンデアミナーゼやアセトヒドロキシ酸シンターゼが挙げられる(特開平2-458号, FR 0356 739, 及び米国特許第5,998,178号)。

【0090】

L - イソロイシン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、分岐鎖アミノ酸排出タンパク質をコードするbrnE遺伝子を増幅したコリネ型細菌(特開2001-169788)、L - リジン生産菌とのプロトプラスト融合によりL - イソロイシン生産能を付与したコリネ型細菌(特開昭62-74293)、ホモセリンデヒドロゲナーゼを強化したコリネ型細菌(特開昭62-91193)、スレオニンヒドロキサメート耐性株(特開昭62-195293)、 α -ケトマロン耐性株(特開昭61-15695)、メチルリジン耐性株(特開昭61-15696)、*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ12149 (FERM BP-759) (米国特許第4,656,135号) が挙げられる。

【0091】

< L - バリン生産菌 >

L - バリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - バリン生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、ilvGMEDAオペロンやilvBNCオペロンの遺伝子にコードされる酵素が挙げられる。ilvBNはアセトヒドロキシ酸シンターゼを、ilvCはイソメロリダクターゼ(国際公開00/50624号)を、それぞれコードする。なお、ilvGMEDAオペロンおよびilvBNCオペロンは、L - バリン、L - イソロイシン、および/またはL - ロイシンによる発現抑制(アテニュエーション)を受ける。よって、酵素活性の増強のためには、アテニュエーションに必要な領域を除去または改変し、生成するL - バリンによる発現抑制を解除するのが好ましい。また、ilvA遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L - イソロイシン生合成系の律速段階であるL - スレオニンから2 - ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する酵素である。よって、L - バリン生産のためには、ilvA遺伝子が破壊等され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少しているのが好ましい。

【0092】

また、L - バリン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - バリンの生合成経路から分岐してL - バリン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が低下するように細菌を改変する方法も挙げられる。そのような酵素としては、特に制限されないが、L - ロイシン合成に関与するスレオニンデヒドラターゼやD - パントテン酸合成に関与する酵素が挙げられる(国際公開00/50624号)。

【0093】

L - バリン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、アミノ酸アナログなどへの耐性を有する株が挙げられる。そのような株としては、例えば、L - イソロイシンおよびL - メチオニン要求性、ならびにD - リボース、プリンリボヌクレオシド、またはピリミジンリボヌクレオシドに耐性を有し、且つL - バリン生産能を有するコリネ型細菌株(FERM P-1841、FERM P-29、特公昭53-025034)、ポリケトイド類に耐性を有するコリネ型細菌株(FERM P-1763、FERM P-1764、特公平06-065314)、酢酸を唯一の炭素源とする培地でL - バリン耐性を示し、且つグルコースを唯一の炭素源とする培地でピルビン酸アナログ(フルオロピルビン酸等)に感受性を有するコリネ型細菌株(FERM BP-3006、FERM BP-3007、特許3006929号)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

< L - アラニン生産菌 >

L - アラニン生産菌又はそれを誘導するための親株としては、H⁺-ATPaseを欠失しているコリネ型細菌 (Appl Microbiol Biotechnol. 2001 Nov;57(4):534-40) やアスパラギン酸 - デカルボキシラーゼ活性が増強されたコリネ型細菌 (特開平07-163383) が挙げられる。

【 0 0 9 5 】

< L - トリプトファン生産菌、L - フェニルアラニン生産菌、L - チロシン生産菌 >

L - トリプトファン生産能、L - フェニルアラニン生産能、および/またはL - チロシン生産能を付与又は増強するための方法としては、例えば、L - トリプトファン、L - フェニルアラニン、および/またはL - チロシンの生合成系酵素から選択される1またはそれ以上の酵素の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。

10

【 0 0 9 6 】

これらの芳香族アミノ酸に共通する生合成系酵素としては、特に制限されないが、3 - デオキシ - D - アラビノヘブツロン酸 - 7 - リン酸シンターゼ (aroG)、3 - デヒドロキネートシンターゼ (aroB)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ (aroE)、シキミ酸キナーゼ (aroL)、5 - エノール酸ピルビルシキミ酸3 - リン酸シンターゼ (aroA)、コリスミ酸シンターゼ (aroC) が挙げられる (欧州特許763127号)。これらの酵素をコードする遺伝子の発現はチロシンリプレッサー (tyrR) によって制御されており、tyrR遺伝子を欠損させることによって、これらの酵素の活性を増強してもよい (欧州特許763127号)。

20

【 0 0 9 7 】

L - トリプトファン生合成系酵素としては、特に制限されないが、アントラニル酸シンターゼ (trpE)、トリプトファンシンターゼ (trpAB)、及びホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (serA) が挙げられる。例えば、トリプトファンオペロンを含むDNAを導入することにより、L - トリプトファン生産能を付与又は増強できる。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされる 及び サブユニットからなる。アントラニル酸シンターゼはL - トリプトファンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、フィードバック阻害を解除する変異を導入した同酵素をコードする遺伝子を利用してもよい。ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼはL - セリンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、フィードバック阻害を解除する変異を導入した同酵素をコードする遺伝子を利用してもよい。さらに、マレートシンターゼ (aceB)、イソクエン酸リアーゼ (aceA)、およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ/フォスファターゼ (aceK) からなるオペロン (aceオペロン) の発現を増大させることによりL - トリプトファン生産能を付与または増強してもよい (W02005/103275)。

30

【 0 0 9 8 】

L - フェニルアラニン生合成系酵素としては、特に制限されないが、コリスミ酸ムターゼ及びプレフェン酸デヒドラターゼが挙げられる。コリスミ酸ムターゼ及びプレフェン酸デヒドラターゼは、2機能酵素としてpheA遺伝子によってコードされている。コリスミ酸ムターゼ - プレフェン酸デヒドラターゼはL - フェニルアラニンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、フィードバック阻害を解除する変異を導入した同酵素をコードする遺伝子を利用してもよい。

40

【 0 0 9 9 】

L - チロシン生合成系酵素としては、特に制限されないが、コリスミ酸ムターゼ及びプレフェン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。コリスミ酸ムターゼ及びプレフェン酸デヒドロゲナーゼは、2機能酵素としてtyrA遺伝子によってコードされている。コリスミ酸ムターゼ - プレフェン酸デヒドロゲナーゼはL - チロシンによるフィードバック阻害を受けるので、同酵素の活性を増強するには、フィードバック阻害を解除する変異を導入した同酵素をコードする遺伝子を利用してもよい。

【 0 1 0 0 】

50

L - トリプトファン、L - フェニルアラニン、および/またはL - チロシンの生産菌は、目的の芳香族アミノ酸以外の芳香族アミノ酸の生合成が低下するように改変されていてもよい。また、L - トリプトファン、L - フェニルアラニン、および/またはL - チロシンの生産菌は、副生物の取り込み系が増強されるように改変されていてもよい。副生物としては、目的の芳香族アミノ酸以外の芳香族アミノ酸が挙げられる。副生物の取り込み系をコードする遺伝子としては、例えば、L - トリプトファンの取り込み系をコードする遺伝子であるtnaBやmtr、L - フェニルアラニンの取り込み系をコードする遺伝子であるpheP、L - チロシンの取り込み系をコードする遺伝子であるtyrPが挙げられる (EP1484410)。

【0101】

L - トリプトファン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、サルファグアニジンに耐性の*Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478 特許01681002号)、トリプトファンオペロンが導入された株 (特開昭63240794号公報)、コリネ型細菌由来のシキミ酸キナーゼをコードする遺伝子が導入された株 (特開01994749号公報) が挙げられる。

【0102】

L - フェニルアラニン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼまたはピルビン酸キナーゼ活性が低下した*Corynebacterium glutamicum* BPS-13株 (FERM BP-1777)、*Corynebacterium glutamicum* K77 (FERM BP-2062)、*Corynebacterium glutamicum* K78 (FERM BP-2063) (欧州特許公開公報331145号、特開平02-303495号)、チロシン要求性株 (特開平05-049489) が挙げられる。

【0103】

L - チロシン生産能を有するコリネ型細菌としては、例えば、*Corynebacterium glutamicum* AJ11655 (FERM P-5836) (特公平2-6517)、*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12081 (FERM P-7249) (特開昭60-70093) が挙げられる。

【0104】

また、L - アミノ酸生産能を付与または増強する方法としては、例えば、細菌の細胞からL - アミノ酸を排出する活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。L - アミノ酸を排出する活性は、例えば、L - アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることにより、増大させることができる。各種アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、b2682遺伝子 (ygaZ)、b2683遺伝子 (ygaH)、b1242遺伝子 (ychE)、b3434遺伝子 (yhgN) が挙げられる (特開2002-300874号公報)。

【0105】

また、L - アミノ酸生産能を付与または増強する方法としては、例えば、糖代謝に関与するタンパク質やエネルギー代謝に関与するタンパク質の活性が増大するように細菌を改変する方法が挙げられる。

【0106】

糖代謝に関与するタンパク質としては、糖の取り込みに関与するタンパク質や解糖系酵素が挙げられる。糖代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、グルコース6 - リン酸イソメラーゼ遺伝子 (pgi; 国際公開第01/02542号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子 (pps; 欧州出願公開877090号明細書)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (ppc; 国際公開95/06114号パンフレット)、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (pyc; 国際公開99/18228号パンフレット、欧州出願公開1092776号明細書)、ホスホグルコムターゼ遺伝子 (pgm; 国際公開03/04598号パンフレット)、フルクトース二リン酸アルドラーゼ遺伝子 (pfkB, fbp; 国際公開03/04664号パンフレット)、ピルビン酸キナーゼ遺伝子 (pykF; 国際公開03/008609号パンフレット)、トランスアルドラーゼ遺伝子 (talB; 国際公開03/008611号パンフレット)、フマラーゼ遺伝子 (fum; 国際公開01/02545号パンフレット)、non-PTSスクロース取り込み遺伝子 (csc; 欧州出願公開149911号パンフレット)、スクロース資化性遺伝子 (scrABオペロン; 国際公開第90/04636号パンフレット) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

エネルギー代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子としては、トランスヒドロゲナーゼ遺伝子 (pntAB ; 米国特許 5,830,716号明細書)、チトクロムbo型オキシダーゼ (cytochrome bo type oxidase) 遺伝子 (cyoB ; 欧州特許出願公開1070376号明細書) が挙げられる。

【 0 1 0 8 】

< 1 - 1 - 2 > 核酸生産菌

プリン系物質生産能の付与または増強は、従来、バチルス属細菌やエシェリヒア属細菌等のプリン系物質生産菌の育種に採用されてきた方法により行うことができる。

【 0 1 0 9 】

例えば、プリン系物質生産能は、アデニン要求性等の栄養要求性を付与することにより、またはさらにプリンアナログやスルファグアニジン等の薬剤に対する耐性を付与することにより、付与または増強することができる (特公昭38-23099、特公昭54-17033、特公昭55-45199、特公昭57-14160、特公昭57-41915、特公昭59-42895、US2004-0166575A参照)。プリン系物質生産能を有する栄養要求性株や薬剤耐性株等の変異株は、親株または野生株を突然変異処理に供し、適当な選択培地を用いて所望の表現型を有する変異株を選択することにより取得できる。突然変異処理としては、例えば、X線の照射、紫外線の照射、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) 等の変異剤による処理が挙げられる。

【 0 1 1 0 】

また、プリン系物質生産能は、プリン系物質の生合成に関与する酵素の細胞内の活性を増強することにより、付与または増強することができる。1種の酵素の活性を増強してもよく、2種またはそれ以上の酵素の活性を増強してもよい。酵素活性を増強する手法については後述する。酵素活性の増強は、例えば、同酵素をコードする遺伝子の発現が増強されるように細菌を改変することにより行うことができる。遺伝子の発現を増強する手法は、W000/18935号パンフレットや欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。

【 0 1 1 1 】

プリンヌクレオチドは、ホスホリボシルピロリン酸 (phosphoribosylpyrophosphate ; PRPP) を中間体として生合成される。プリンヌクレオチドは、プリンヌクレオチドが脱リン酸化されることにより生合成される。これらプリン系物質の生合成に関与する酵素としては、例えば、PRPPシンセターゼ (PRPP synthetase) (prs) やプリンオペロンにコードされるタンパク質が挙げられる。

【 0 1 1 2 】

プリンオペロンとしては、例えば、バチルス・サブチリスのpurEKBCSQLFMNHDオペロン (Bacillus subtilis and Its Closest Relatives, Editor in Chief: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002) やエシェリヒア・コリのpurレギュロン (Escherichia and Salmonella, Second Edition, Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996) が挙げられる。例えば、プリンオペロンの発現をまとめて増強してもよく、プリンオペロンに含まれる遺伝子から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現を増強してもよい。

【 0 1 1 3 】

これらの中では、例えば、PRPPシンセターゼ (PRPP synthetase) (prs) およびPRPPアミドトランスフェラーゼ (PRPP amidotransferase) (purF) から選択される1またはそれ以上の酵素の活性を増強するのが好ましい。

【 0 1 1 4 】

なお、例えば、プリン系物質の生合成に関与する酵素がフィードバック阻害や発現抑制等の負のレギュレーションを受けている場合は、そのレギュレーションを低減又は解除することにより、酵素活性を増強し、プリン系物質生産能を向上させることができる (W099/003988)。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

プリンオペロンの発現は、purR遺伝子にコードされるプリンリプレッサーにより抑制される。よって、プリンオペロンの発現は、例えば、プリンリプレッサーの活性を低下させることにより、増強することができる（米国特許第6,284,495号）。プリンリプレッサーの活性は、例えば、プリンリプレッサーをコードするpurR遺伝子を破壊することにより、低下させることができる（米国特許第6,284,495号）。また、プリンオペロンの発現は、プロモーター下流に位置するterminator-antiterminator配列（アテニューエーター配列ともいう）に制御されている（Ebbole, D. J. and Zalkin, H., J. Biol. Chem., 1987, 262, 8274 - 8287; Ebbole, D. J. and Zalkin, H., J. Biol. Chem., 1988, 263, 10894 - 10902; Ebbole, D. J. and Zalkin, H., J. Bacteriol., 1989, 171, 2136 - 2141）。よって、プリンオペロンの発現は、例えば、アテニューエーター配列を欠損させることにより、増強することができる。アテニューエーター配列の欠損は、後述する遺伝子の破壊と同様の手法により行うことができる。

10

【 0 1 1 6 】

PRPPシンセターゼは、ADPによるフィードバック阻害を受ける。よって、例えば、ADPによるフィードバック阻害が低減又は解除された脱感作型PRPPシンセターゼをコードする変異型PRPPシンセターゼ遺伝子を細菌に保持させることにより、PRPPシンセターゼ活性を増強し、プリン系物質生産能を向上させることができる（WO99/003988）。脱感作型PRPPシンセターゼとしては、野生型PRPPシンセターゼの128位のAsp(D)がAla(A)に置換される変異を有するものが挙げられる（S. G. Bower et al., J. Biol. Chem., 264, 10287 (1989)）。

20

【 0 1 1 7 】

PRPPアミドトランスフェラーゼは、AMPおよびGMPによるフィードバック阻害を受ける。よって、例えば、AMPおよび/またはGMPによるフィードバック阻害が低減又は解除された脱感作型PRPPアミドトランスフェラーゼをコードする変異型PRPPアミドトランスフェラーゼ遺伝子を細菌に保持させることにより、PRPPアミドトランスフェラーゼ活性を増強し、プリン系物質生産能を向上させることができる（WO99/003988）。脱感作型PRPPアミドトランスフェラーゼとしては、野生型PRPPアミドトランスフェラーゼの326位のLys(K)がGln(Q)に置換される変異を有するものや、野生型PRPPアミドトランスフェラーゼの326位のLys(K)がGln(Q)に置換され、且つ410位のPro(P)がTrp(W)に置換される変異を有するものが挙げられる（G. Zhou et al., J. Biol. Chem., 269, 6784 (1994)）。

30

【 0 1 1 8 】

また、プリン系物質生産能は、プリン系物質の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下させることにより、付与または増強することができる（WO99/003988）。1種の酵素の活性を低下させてもよく、2種またはそれ以上の酵素の活性を低下させてもよい。なお、ここでいう「プリン系物質の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素」には、プリン系物質の分解に関与する酵素も含まれる。酵素活性を低下させる手法については後述する。

【 0 1 1 9 】

プリン系物質の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、例えば、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（purine nucleoside phosphorylase）（deoD, pupG）、サクシニル-AMPシンターゼ（succinyl-AMP synthase）（purA）、アデノシンデアミナーゼ（adenosine deaminase）（add）、イノシン-グアノシンキナーゼ（inosine-guanosine kinase）（gsk）、GMPレダクターゼ（GMP reductase）（guaC）、6-ホスホグルコン酸デヒドラーゼ（6-phosphogluconate dehydrase）（edd）、ホスホグルコースイソメラーゼ（phosphoglucose isomerase）（pgi）、アデニンデアミナーゼ（adenine deaminase）（yicP）、キサントシンホスホリラーゼ（xanthosine phosphorylase）（xapA）、IMPデヒドロゲナーゼ（guaB）が挙げられる。活性を低下させる酵素は、目的のプリン系物質の種類等に応じて選択してよい。

40

50

【 0 1 2 0 】

また、プリン系物質生産能は、フルクトースビスフォスファターゼ (fructose 1,6-bisphosphatase) (fbp) の活性を低下させることにより、付与または増強することができる (WO2007/125782)。

【 0 1 2 1 】

また、プリン系物質生産能は、プリン系物質の取り込みに関与するタンパク質の活性を低下させることにより、付与または増強することができる (WO99/003988)。例えば、プリンヌクレオシドの取り込みに関与するタンパク質としては、ヌクレオシドパーミアーゼ (nucleoside permease) (nupG) が挙げられる (WO99/003988)。

【 0 1 2 2 】

また、プリン系物質生産能は、プリン系物質の排出に関与するタンパク質の活性を増強することにより、付与または増強することができる。例えば、プリンヌクレオシドの排出に関与するタンパク質としては、rhtA (ybiF) 遺伝子 (ロシア国特許第2239656号)、yijE 遺伝子 (ロシア国特許第2244003号)、ydeD 遺伝子 (ロシア国特許第2244004号)、yicM 遺伝子 (ロシア国特許第2271391号)、ydhL 遺伝子 (特表2007-530011)、nepI 遺伝子 (FE MS Microbiology Letters, Volume 250, Issue 1, pages 39-47, September 2005) にコードされるタンパク質が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

また、イノシン酸生産能は、L-グルタミンのアナログに対する耐性とプロリンのアナログに対する耐性とを細菌に付与することにより、付与または増強することができる (特開2004-516833)。L-グルタミンのアナログとしては、アザセリンや6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (DON) が挙げられる。プロリンのアナログとしては、3,4-デヒドロプロリン、L-アゼチジン-2-カルボン酸、L-チアゾリジン-4-カルボン酸、(S)-2,2-ジメチル-4-オキサゾリドカルボン酸、(S)-5,5-ジメチル-4-チアゾリドカルボン酸、(4S,2RS)-2-エチル-4-チアゾリジン-カルボン酸、(2S,4S)-4-ヒドロキシ-2-ピロリン-カルボン酸、2-ピペリジンカルボン酸、及び2,5-ピロリジンジオンが挙げられる。イノシン酸生産菌としては、例えば、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス CJIP009 (KCCM-10226) (特開04-516833) が挙げられる。

【 0 1 2 4 】

また、キサンチル酸生産能は、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*) を中心とするコリネ型細菌のキサンチル酸生産菌の育種に用いられる方法により、付与または増強することができる。そのような方法としては、例えば、PRPP amidotransferase 活性の増強 (特開平8-168383)、脂肪族アミノ酸に対する耐性の付与 (特開平4-262790)、デヒドロプロリンに対する耐性の付与 (韓国特許公開公報2003-56490) が挙げられる。

【 0 1 2 5 】

上記のようなプリン系物質生産能を付与または増強する手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

【 0 1 2 6 】

< 1 - 1 - 3 > タンパク質生産菌

タンパク質は、コリネ型細菌で機能するシグナルペプチドを利用して、コリネ型細菌により分泌生産することができる。具体的には、コリネ型細菌で機能するプロモーター配列、同プロモーター配列の下流に接続されたコリネ型細菌で機能するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および同シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に接続された目的のタンパク質をコードする核酸配列を含む遺伝子構築物をコリネ型細菌に保持させ、目的のタンパク質を発現することにより、目的のタンパク質を分泌生産することができる。目的のタンパク質をコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードする核酸配列の下流に、同シグナルペプチドとの融合タンパク質として異種タンパク質が発現するよう連結されていればよい。タンパク質の分泌生産に用いるコリネ型細菌としては、例えば、細

10

20

30

40

50

胞表面タンパク質の活性が低下した株が挙げられる。そのような株としては、*C. glutamicum* AJ12036 (FERM BP-734) の細胞表面タンパク質PS2の欠損株である*C. glutamicum* YDK 010株 (WO2004/029254) が挙げられる。また、タンパク質の分泌生産能を付与または増強する方法としては、例えば、ペニシリン結合タンパク質の活性が低下するようにコリネ型細菌を改変すること (WO2013/065869)、メタロペプチダーゼをコードする遺伝子の発現が上昇するようにコリネ型細菌を改変すること (WO2013/065772)、変異型リボソームタンパク質 S 1 遺伝子を保持するようにコリネ型細菌を改変すること (WO2013/118544)、Gln-Glu-Thrを含むアミノ酸配列をシグナルペプチドと目的のタンパク質の間に挿入して目的のタンパク質を発現すること (WO2013/062029) が挙げられる。上記のようなタンパク質生産能を付与または増強する手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

10

【 0 1 2 7 】

< 1 - 2 > キシロース資化性

本発明の細菌は、キシロース資化性を有する。本発明の細菌は、本来的にキシロース資化性を有するものであってもよく、キシロース資化性を有するように改変されたものであってもよい。キシロース資化性を有する細菌は、例えば、上記のような細菌キシロース資化性を付与することにより、または、上記のような細菌のキシロース資化性を増強することにより、取得できる。

【 0 1 2 8 】

キシロース資化性は、キシロース資化経路を構成するタンパク質から選択される 1 またはそれ以上のタンパク質の活性が増大するように細菌を改変することにより、付与または増強できる。活性を増大させるタンパク質は、用いるコリネ型細菌の種類等に応じて適宜選択できる。

20

【 0 1 2 9 】

キシロースの資化経路としては、下記の 2 種の経路が挙げられる。本発明の細菌は、両方の経路を有していてもよく、片方の経路のみを有していてもよい。

経路 1 : キシロース キシルロース キシルロース - 5 リン酸
 経路 2 : キシロース キシロノラクトン キシロン酸 2 - ケト - 3 - デ
 オキシキシロン酸 - ケトグルタル酸セミアルデヒド - ケトグルタル酸

【 0 1 3 0 】

経路 1 は、キシロースイソメラーゼ (xylose isomerase) およびキシルロキナーゼ (xylulokinase) により構成される。

30

【 0 1 3 1 】

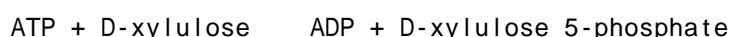
「キシロースイソメラーゼ」とは、D - キシロースを D - キシルロースに異性化する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう (EC 5.3.1.5)。また、同活性を「キシロースイソメラーゼ活性」ともいう。



【 0 1 3 2 】

「キシルロキナーゼ」とは、D - キシルロースをリン酸化する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう (EC 2.7.1.17)。また、同活性を「キシルロキナーゼ活性」ともいう。

40



【 0 1 3 3 】

キシロースイソメラーゼをコードする遺伝子としては、xyIA遺伝子が挙げられる。キシルロキナーゼをコードする遺伝子としては、xyIB遺伝子が挙げられる。xyIA遺伝子およびxyIB遺伝子としては、*Escherichia coli* の xyIA 遺伝子および xyIB 遺伝子が挙げられる。*Escherichia coli* K-12 MG1655 株の xyIAB オペロンの塩基配列を配列番号 10 に示す。配列番号 10 に示す塩基配列中、xyIA 遺伝子および xyIB 遺伝子は、それぞれ、1 ~ 1323 位の配列および 1395 ~ 2849 位の配列に相当する。*Escherichia coli* K-12 MG1655 株の XyIA タンパク質および XyIB タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 11 および 12 に示す

50

。また、xylB遺伝子としては、Corynebacterium glutamicumのxylB遺伝子が挙げられる。C. glutamicum ATCC13869のxylB遺伝子の塩基配列およびXylBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号35および36に示す。

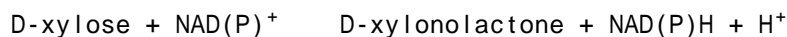
【0134】

経路2は、キシロースデヒドロゲナーゼ(xylose dehydrogenase)、キシロノラクトナーゼ(xylonolactonase)、キシロン酸デヒドラーゼ(xylonate dehydratase)、2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラーゼ(2-keto-3-deoxy-xylonate dehydratase)、およびα-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(alpha-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase)により構成される。なお、経路2の後半、すなわちキシロン酸デヒドラーゼ、2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラーゼ、およびα-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼにより構成されるキシロン酸からα-ケトグルタル酸までの経路を、「Weimberg pathway」ともいう(J. Biol. Chem., 236: 629-636)。また、経路2全体、またはWeimberg pathwayを、「NXA(Novel Xylose Assimilation)経路」ともいう。

10

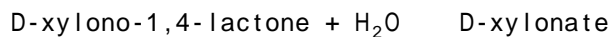
【0135】

「キシロースデヒドロゲナーゼ」とは、D-キシロースをD-キシロノラクトンに酸化する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう(EC 1.1.1.175または1.1.1.179)。また、同活性を「キシロースデヒドロゲナーゼ活性」ともいう。



【0136】

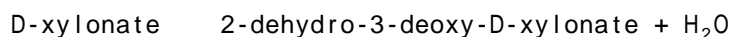
「キシロノラクトナーゼ」とは、D-キシロノラクトンを開環する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう(EC 3.1.1.68)。また、同活性を「キシロノラクトナーゼ活性」ともいう。



20

【0137】

「キシロン酸デヒドラーゼ」とは、D-キシロン酸を脱水する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう(EC 4.2.1.82)。また、同活性を「キシロン酸デヒドラーゼ活性」ともいう。



【0138】

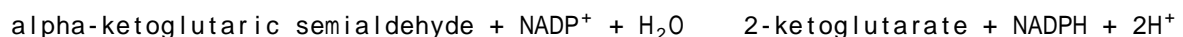
「2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラーゼ」とは、2-ケト-3-デオキシキシロン酸を脱水する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう(EC 4.2.1.-)。また、同活性を「2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラーゼ活性」ともいう。



30

【0139】

「α-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ」とは、α-ケトグルタル酸セミアルデヒドを酸化する下記反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう(EC 1.2.1.26)。また、同活性を「α-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性」ともいう。



40

【0140】

経路2を構成する酵素をコードする遺伝子としては、xyIXABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。xylB遺伝子が、キシロースデヒドロゲナーゼをコードする。xylC遺伝子が、キシロノラクトナーゼをコードする。xylD遺伝子が、キシロン酸デヒドラーゼをコードする。xylX遺伝子が、2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラーゼをコードする。xylA遺伝子が、α-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする。

【0141】

なお、遺伝子名が重複しているが、経路1のキシロースイソメラーゼおよびキシロキナーゼをコードするxylA遺伝子およびxylB遺伝子と、経路2のα-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびキシロースデヒドロゲナーゼをコードするxylA遺伝子お

50

よびxyIB遺伝子とは、それぞれ別の遺伝子である。

【 0 1 4 2 】

xyIXABCDオペロンとしては、カウロバクター・クレセントス (*Caulobacter crescentus*) のxyIXABCDオペロンが挙げられる。*Caulobacter crescentus*としては、CB15株、NA1000株、K31株が挙げられる。*Caulobacter crescentus* CB15株、NA1000株、K31株のゲノム配列は、それぞれ、NCBIデータベースにGenBank Accession Nos. AE005673、CP001340、CP000927として登録されている。また、*Caulobacter crescentus* CB15株のxyIXABCD遺伝子は、それぞれ、CC_0822、CC_0821、CC_0820、CC_0819、CC_0823のGene symbolで登録されている。また、*Caulobacter crescentus* NA1000株のxyIXABCD遺伝子は、それぞれ、CCNA_00865、CCNA_00864、CCNA_00863、CCNA_00862、CCNA_00866のGene symbolで登録されている。また、*Caulobacter crescentus* CB15株のxyIABCD遺伝子 (xyIXは未同定) は、それぞれ、Caul_4001、Caul_4002、Caul_4003、Caul_4000のGene symbolで登録されている。*Caulobacter crescentus* CB15株のxyIXABCD遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号37、39、41、43、および45に示す。*Caulobacter crescentus* CB15株のXyIXABCDタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号38、40、42、44、および46に示す。

10

【 0 1 4 3 】

また、キシロースデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、スフィンゴモナス・エロデア (*Sphingomonas elodea*) (旧名称*Pseudomonas elodea*) 等のスフィンゴモナス属またはシュードモナス属細菌のxyIB遺伝子が挙げられる。*Sphingomonas elodea*のxyIB遺伝子の塩基配列およびXyIBタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号15および16に示す。

20

【 0 1 4 4 】

また、キシロラクトナーゼ遺伝子としては、*Sphingomonas elodea* (*Pseudomonas elodea*) 等のスフィンゴモナス属またはシュードモナス属細菌のxyIC遺伝子が挙げられる。*Sphingomonas elodea*のxyIC遺伝子の塩基配列およびXyICタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号17および18に示す。

【 0 1 4 5 】

また、キシロン酸デヒドラターゼ遺伝子としては、*Escherichia coli*等のエシェリヒア属細菌のyjhG遺伝子やyagF遺伝子、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 等のアグロバクテリウム属細菌、ヘルバスピリラム・セロペディカ (*Herbaspirillum seropedicae*) 等のヘルバスピリラム属細菌、アクチノプラネス・ミズーリエンシス (*Actinoplanes missouriensis*) 等のアクチノプラネス属細菌、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 等のアスペルギルス属微生物のxyID遺伝子ホモログが挙げられる。*Escherichia coli* K-12 MG1655株のyagF遺伝子の塩基配列およびYagFタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号19および20に示す。

30

【 0 1 4 6 】

また、2-ケト-3-デオキシキシロン酸デヒドラターゼ遺伝子としては、*Agrobacterium tumefaciens*等のアグロバクテリウム属細菌、*Sphingomonas elodea* (*Pseudomonas elodea*) 等のスフィンゴモナス属またはシュードモナス属細菌、ゾベリア・ガラクタニボランス (*Zobellia galactanivorans*) 等のゾベリア属細菌、サーモバチルス・コンポスティ (*Thermobacillus composti*) 等のサーモバチルス属細菌、アルスロバクター・グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*) 等のアルスロバクター属細菌のxyIX遺伝子ホモログが挙げられる。*Sphingomonas elodea*のxyIX遺伝子の塩基配列およびXyIXタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号21および22に示す。

40

【 0 1 4 7 】

また、2-ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子としては、アゾスピリラム・ブラシレンセ (*Azospirillum brasilense*) 等のアゾスピリラム属細菌やハロモナス・ポリピエンシス (*Halomonas boliviensis*) 等のハロモナス属細菌のxyIA遺伝子ホモログ、およびバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属細菌のycbD

50

遺伝子が挙げられる。Bacillus subtilisのycbD遺伝子の塩基配列およびYcbDタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号23および24に示す。

【0148】

キシロース資化経路を構成する各タンパク質の活性は、既報（非特許文献3、特許文献8）に従い測定することができる。

【0149】

なお、グルコースデヒドロゲナーゼ（EC 1.1.1.47、EC 1.1.1.118、EC 1.1.1.119、またはEC 1.1.5.2等）には、D-キシロースをD-キシロノラクトンに酸化する反応を触媒するものがある。よって、キシロース資化性を付与又は増強するためには、上記のようなキシロースデヒドロゲナーゼに代えて、あるいは加えて、そのようなグルコースデヒドロゲナーゼの活性を増強してもよい。そのようなグルコースデヒドロゲナーゼとしては、Pseudomonas putida S12のグルコースデヒドロゲナーゼが挙げられる（Jean-Paul Meijnen et al., Appl Environ Microbiol. 2009 May;75(9) 2784-2791）。Pseudomonas putida S12のグルコースデヒドロゲナーゼは、ピロロキノリンキノン電子受容体として、D-キシロースをD-キシロノラクトンに酸化する反応を触媒する。

【0150】

なお、上記の目的物質の生産能の付与または増強やキシロース資化性の付与または増強等の細菌の改変に使用される遺伝子は、元の機能が維持されたタンパク質をコードする限り、上記例示した遺伝子や公知の塩基配列を有する遺伝子に限られず、そのバリエーションであってもよい。例えば、細菌の改変に使用される遺伝子は、公知のタンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸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。遺伝子やタンパク質のバリエーションについては、後述するNCgl2954遺伝子およびそれがコードするタンパク質のバリエーションに関する記載を準用できる。

【0151】

< 1 - 3 > NCgl2954遺伝子への変異導入によるキシロース資化性の向上

本発明の細菌は、NCgl2954遺伝子に変異が導入されたことにより、キシロース資化性が向上している。本発明の細菌は、目的物質の生産能を有するコリネ型細菌のNCgl2954遺伝子に変異を導入することにより、キシロース資化性を向上させることによって得ることができる。また、本発明の細菌は、コリネ型細菌のNCgl2954遺伝子に変異を導入することによりキシロース資化性を向上させた後に、目的物質の生産能を付与することによっても得ることができる。なお、本発明の細菌は、NCgl2954遺伝子への変異導入によるキシロース資化性の向上により、目的物質の生産能を獲得したものであってもよい。本発明において、本発明の細菌を構築するための改変は、任意の順番で行うことができる。

【0152】

キシロース資化性の向上は、具体的には、キシロース取り込み能の向上によるものであってよい。すなわち、本発明の細菌は、NCgl2954遺伝子に変異が導入されたことにより、キシロース取り込み能が向上したものであってよい。

【0153】

キシロース資化性の向上（例えばキシロース取り込み能の向上）は、例えば、キシロースを唯一炭素源とする培地でコリネ型細菌を培養した際の生育の向上やキシロース消費の向上を確認することにより、確認できる。

【0154】

< 1 - 3 - 1 > NCgl2954遺伝子およびNCgl2954タンパク質

NCgl2954遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子である。NCgl2954遺伝子がコードするタンパク質をNCgl2954タンパク質ともいう。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のNCgl2954遺伝子は、NCBIデータベースにGenBank accession NC_003450 (VERSION NC_003450.3 GI:58036263)として登録されているゲノム配列中、3261130～3261993位の配列に相当する。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のNCgl2954遺伝子は、Cgl3059と同義である。Corynebacterium glutamicum ATCC13032のNCgl2954タンパク質は、GenBank accessio

10

20

30

40

50

n NP_602251 (version NP_602251.2 GI:23309012)として登録されている。また、Coryne bacterium glutamicum ATCC13869のNCgl2954遺伝子の塩基配列、及びNCgl2954タンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13および14に示す。

【0155】

NCgl2954遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したNCgl2954遺伝子のバリエーションであってもよい。同様に、NCgl2954タンパク質は、元の機能が維持されている限り、上記例示したNCgl2954タンパク質のバリエーションであってもよい。そのような元の機能が維持されたバリエーションを「保存的バリエーション」という場合がある。本発明において、「NCgl2954遺伝子」という用語は、上記例示したNCgl2954遺伝子に限られず、その保存的バリエーションを包含するものとする。同様に、「NCgl2954タンパク質」という用語は、上記例示したNCgl2954タンパク質に限られず、その保存的バリエーションを包含するものとする。保存的バリエーションとしては、例えば、上記例示したNCgl2954遺伝子およびNCgl2954タンパク質のホモログや人為的な改変体が挙げられる。

10

【0156】

「元の機能が維持されている」とは、遺伝子またはタンパク質のバリエーションが、元の遺伝子またはタンパク質の機能（活性や性質）に対応する機能（活性や性質）を有することをいう。すなわち、「元の機能が維持されている」とは、NCgl2954遺伝子においては、遺伝子のバリエーションが、例えば、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有することをいう。また、「元の機能が維持されている」とは、NCgl2954遺伝子においては、遺伝子のバリエーションが、元の機能が維持されたタンパク質をコードすることであってもよい。同様に、「元の機能が維持されている」とは、NCgl2954タンパク質においては、タンパク質のバリエーションが、例えば、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有することをいう。キシロース資化性の向上は、具体的には、キシロース取り込み能の向上によるものであってよい。すなわち、「キシロース資化性を向上させる」とは、キシロース取り込み能を向上させることである。

20

【0157】

遺伝子またはタンパク質のバリエーションが、コリネ型細菌において欠損させた際にキシロース資化性を向上させる性質を有するか否かは、例えば、キシロース資化性を有するコリネ型細菌において同遺伝子または同タンパク質をコードする遺伝子を欠損させ、キシロース資化性が向上するか否かを確認することにより、確認できる。

30

【0158】

上記NCgl2954遺伝子のホモログは、例えば、上記NCgl2954遺伝子の塩基配列を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。また、上記NCgl2954遺伝子のホモログは、例えば、コリネ型細菌の染色体を鋳型にして、これら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て用いたPCRにより取得することができる。

【0159】

NCgl2954遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであってよい。なお上記「1又は数個」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種類によっても異なるが、具体的には、例えば、1～50個、1～40個、1～30個、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、特に好ましくは1～3個を意味する。

40

【0160】

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、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

50

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。

10

【0161】

また、NCgl2954遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記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、さらに好ましくは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)を意味する。

【0162】

20

また、NCgl2954遺伝子は、元の機能が維持されている限り、公知の遺伝子配列から調製され得るプローブ、例えば上記塩基配列の全体または一部に対する相補配列、とストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。「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、さらに好ましくは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、あるいは通常のサザ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、より好ましくは68、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度および温度で、1回、好ましくは2～3回洗浄する条件を

30

【0163】

上述の通り、上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、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、上記塩基配列を含む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、プローブとしては、300 bp程度の長さのDNA断片を用いることができる。プローブとして300 bp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。

【0164】

また、宿主によってコドンの縮重性が異なるので、NCgl2954遺伝子は、元の機能が維持されている限り、任意のコドンをそれと等価のコドンに置換したものであってもよい。

40

【0165】

なお、上記の遺伝子やタンパク質の保存的バリエーションに関する記載は、L-アミノ酸合成系酵素等の任意のタンパク質、およびそれらをコードする遺伝子にも準用できる。

【0166】

< 1 - 3 - 2 > NCgl2954遺伝子に導入される変異

「NCgl2954遺伝子に変異が導入される」とは、具体的には、染色体上のNCgl2954遺伝子のコード領域および/または発現制御領域に変異が導入されることをいう。「発現制御領域」とは、遺伝子の発現に影響する部位の総称である。発現制御領域としては、プロモーター、シャインダルガノ(SD)配列(リボソーム結合部位(RBS)ともいう)、RB

50

Sと開始コドンとの間のスペーサー領域が挙げられる。発現制御領域は、例えば、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。

【0167】

NCgl2954遺伝子に導入される変異は、コリネ型細菌のキシロース資化性を向上させるものであれば特に制限されない。コリネ型細菌のキシロース資化性を向上させる変異としては、NCgl2954遺伝子の発現が弱化される変異やNCgl2954遺伝子が破壊される変異が挙げられる。すなわち、本発明の細菌は、例えば、NCgl2954遺伝子の発現が弱化されることにより、または該遺伝子が破壊されることにより、キシロース資化性が向上したものであってもよい。

10

【0168】

「遺伝子の発現が弱化される」ことを、「遺伝子の発現が低下する」ともいう。「遺伝子の発現が低下する」とは、同遺伝子の細胞当たりの発現量が野生株や親株等の非改変株と比較して減少することを意味する。「遺伝子の発現が低下する」ことには、同遺伝子が全く発現していない場合が含まれる。遺伝子の発現は、例えば、非改変株と比較して、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

【0169】

遺伝子の発現の低下は、例えば、転写効率の低下によるものであってもよく、翻訳効率の低下によるものであってもよく、それらの組み合わせによるものであってもよい。遺伝子の発現の低下は、例えば、遺伝子のプロモーター、SD配列(RBS)、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の発現制御領域を改変することにより達成できる。発現制御領域を改変する場合には、発現制御領域は、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、発現制御領域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、例えば、遺伝子のコード領域に遺伝子の発現が低下するような変異を導入することによっても達成できる。例えば、遺伝子のコード領域のコドンを、宿主においてより低頻度で利用される同義コドンに置き換えることによって、遺伝子の発現を低下させることができる。また、例えば、後述するような遺伝子の破壊により、遺伝子の発現自体が低下し得る。

20

【0170】

「遺伝子が破壊される」とは、正常に機能するタンパク質を産生しないように同遺伝子が改変されることを意味する。「正常に機能するタンパク質を産生しない」ことには、同遺伝子からタンパク質が全く産生されない場合や、同遺伝子から分子当たりの機能(活性や性質)が低下又は消失したタンパク質が産生される場合が含まれる。

30

【0171】

遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損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。遺伝子の前後の配列には、例えば、遺伝子の発現制御領域が含まれてよい。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。

40

【0172】

また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の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、終止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 26 116, 20833-20839(1991))。

【0173】

また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の遺伝子のコード領域に他の配列を挿入する

50

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。通常、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、遺伝子の破壊を達成できるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子等のマーカー遺伝子や目的物質の生産に有用な遺伝子が挙げられる。

【 0 1 7 4 】

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で宿主を形質転換して、欠失型遺伝子と染色体上の野生型遺伝子とで相同組換えを起こさせることにより、染色体上の野生型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ておくことが操作がしやすい。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ドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000))、Redドリブンインテグレーション法と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(WO2005/010175号参照)等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で機能する複製起点を持たないサ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)。

10

20

【 0 1 7 5 】

また、変異の導入は、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、X線の照射、紫外線の照射、ならびにN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)、エチルメタンサルフォネート(EMS)、およびメチルメタンサルフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。

【 0 1 7 6 】

遺伝子の発現が低下したことは、同遺伝子の転写量が低下したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が低下したことを確認することにより確認できる。

30

【 0 1 7 7 】

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))。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

【 0 1 7 8 】

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))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

40

【 0 1 7 9 】

遺伝子が破壊されたことは、破壊に用いた手段に応じて、同遺伝子の一部または全部の塩基配列、制限酵素地図、または全長等を決定することで確認できる。

【 0 1 8 0 】

また、NCgI2954遺伝子に導入される変異として、具体的には、例えば、下記(1)~(7)に示す変異が挙げられる。下記(1)~(7)に示す変異が導入されることにより、例えば、NCgI2954遺伝子の発現が弱化されてもよく、NCgI2954遺伝子が破壊されてもよい。なお、下記(1)~(7)に示す変異を有さないNCgI2954遺伝子を「野生型NCgI2954遺

50

伝子」、下記(1)～(7)に示す変異を有するNCgI2954遺伝子を「変異型NCgI2954遺伝子」ともいう。また、野生型NCgI2954遺伝子にコードされるタンパク質を「野生型NCgI2954タンパク質」、変異型NCgI2954遺伝子にコードされるタンパク質を「変異型NCgI2954タンパク質」ともいう。野生型NCgI2954遺伝子としては、上記例示したNCgI2954遺伝子およびその保存的バリエーションが挙げられる。

(1) 野生型NCgI2954タンパク質の438位のロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(2) 野生型NCgI2954タンパク質の274位のトリプトファン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(3) 野生型NCgI2954タンパク質の377位のチロシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(4) 野生型NCgI2954タンパク質の365位のロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(5) 野生型NCgI2954タンパク質の366位のロイシン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(6) 野生型NCgI2954タンパク質の367位のアラニン残基が他のアミノ酸残基に置換される変異；

(7) 野生型NCgI2954タンパク質の368位以降のアミノ酸残基が欠失する変異。

【0181】

「他のアミノ酸残基」（置換後のアミノ酸残基）は、置換前のアミノ酸残基以外であれば特に制限されない。「他のアミノ酸残基」として、具体的には、リジン、オルニチン、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、アラニン、バリン、ロイシン、グリシン、スレオニン、セリン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、アスパラギンの内、置換前のアミノ酸残基以外のものが挙げられる。438位のロイシン残基は、例えば、プロリン残基に置換されてよい。274位のトリプトファン残基は、例えば、アルギニン残基に置換されてよい。365位のロイシン残基は、例えば、セリン残基に置換されてよい。366位のロイシン残基は、例えば、アルギニン残基に置換されてよい。367位のアラニン残基は、例えば、フェニルアラニン残基に置換されてよい。377位のチロシン残基は、例えば、アスパラギン残基に置換されてよい。

【0182】

変異型NCgI2954遺伝子は、これらの変異から選択される1またはそれ以上の変異を有してよい。例えば、変異型NCgI2954遺伝子は、上記(4)～(7)の変異をセットで有してよい。具体的には、例えば、配列番号13に示す野生型NCgI2954遺伝子の1092位および1093位のGCが欠損して生じる変異型NCgI2954遺伝子は、配列番号14に示す野生型NCgI2954タンパク質の365～367位のロイシン-ロイシン-アラニン残基がセリン-アルギニン-フェニルアラニン残基に置換され、且つ、368位以降のアミノ酸残基が欠失した変異型NCgI2954タンパク質をコードする。

【0183】

本発明において、「野生型NCgI2954タンパク質のX位のアミノ酸残基」とは、特記しない限り、配列番号14におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。すなわち、上記(1)～(7)に示す変異は、言い換えると、それぞれ、以下の通りであってよい。

(1) 配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(2) 配列番号14の274位のトリプトファン残基に相当するアミノ酸残基がトリプトファン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(3) 配列番号14の377位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がチロシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(4) 配列番号14の365位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外の

10

20

30

40

50

アミノ酸残基に置換される変異；

(5) 配列番号14の366位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(6) 配列番号14の367位のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がアラニン以外のアミノ酸残基に置換される変異；

(7) 配列番号14の368位以降のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基が欠失する変異。

【0184】

なお、アミノ酸配列における「X位」とは、同アミノ酸配列のN末端からX番目を意味し、N末端のアミノ酸残基が1位のアミノ酸残基である。すなわち、上記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、または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、「野生型NCgl2954タンパク質の438位のロイシン残基」とは、配列番号14における438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基を意味し、438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437番目のアミノ酸残基が「野生型NCgl2954タンパク質の438位のロイシン残基」であるものとする。また、438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439番目のアミノ酸残基が「野生型NCgl2954タンパク質の438位のロイシン残基」であるものとする。

10

【0185】

任意のアミノ酸配列において、どのアミノ酸残基が「配列番号14におけるX位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」であるかは、当該任意のアミノ酸配列と配列番号14のアミノ酸配列とアライメントを行うことにより決定できる。アライメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して行うことができる。具体的なソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASISや、ゼネティックス製のGENETYXなどが挙げられる(Elizabeth C. Tyler et al., Computers and Biomedical Research, 24(1), 72-96, 1991; Barton GJ et al., Journal of molecular biology, 198(2), 327-37. 1987)。

20

【0186】

なお、野生型NCgl2954タンパク質が配列番号14に示すアミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有する場合には、上記(1)～(7)に示す変異が導入されるアミノ酸残基は、保存されていてもよく、保存されていなくてもよい。すなわち、例えば、野生型NCgl2954タンパク質において、「配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基」はロイシン残基でないことがあり得る。よって、例えば、「配列番号14の438位のロイシン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換される変異」には、野生型NCgl2954タンパク質における当該箇所のアミノ酸残基がロイシン残基である場合に当該ロイシン残基がプロリン残基に置換される変異に限られず、当該箇所のアミノ酸残基がロイシン残基でない場合に当該アミノ酸残基がプロリン残基に置換される変異も含まれてよい。

30

【0187】

変異型NCgl2954遺伝子は、野生型NCgl2954遺伝子を上述したような変異を有するよう改変することにより取得できる。DNAの改変は公知の手法により行うことができる。DNAの改変は、具体的には、例えば、DNAの目的部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法により行うことができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法(Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987))や、ファージを用いる方法(Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987))が挙げられる。また、変異型NCgl2954遺伝子は、化学合成によっても取得できる。

40

【0188】

<1-4>タンパク質の活性を低下させる手法

以下に、タンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

【0189】

50

「タンパク質の活性が低下する」とは、同タンパク質の細胞当たりの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。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が低下していること、および/または、同タンパク質の分子当たりの機能が低下していることをいう。すなわち、「タンパク質の活性が低下する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量(mRNA量)または翻訳量(タンパク質の量)を意味してもよい。なお、「タンパク質の細胞当たりの分子数が低下している」ことには、同タンパク質が全く存在していない場合が含まれる。また、「タンパク質の分子当たりの機能が低下している」ことには、同タンパク質の分子当たりの機能が完全に消失している場合が含まれる。タンパク質の活性は、非改変株と比較して低下していれば特に制限されないが、例えば、非改変株と比較して、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

10

【0190】

タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質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。また、タンパク質の活性が低下するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子を破壊することにより達成できる。また、タンパク質の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。遺伝子の発現を低下させる手法、遺伝子を破壊する手法、および突然変異処理については、いずれも上述した通りである。

20

【0191】

なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。また、タンパク質に複数のアイソザイムが存在する場合、結果としてタンパク質の活性が低下する限り、複数のアイソザイムの全ての活性を低下させてもよく、一部のみを活性を低下させてもよい。すなわち、例えば、それらのアイソザイムをコードする複数の遺伝子の全てを破壊等してもよく、一部のみを破壊等してもよい。

【0192】

タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる。タンパク質の活性が低下したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が低下したことや、遺伝子が破壊されたことを確認することによっても、確認できる。

30

【0193】

上記したタンパク質の活性を低下させる手法は、任意のタンパク質、例えば目的のL-アミノ酸の生合成経路から分岐して目的のL-アミノ酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素、の活性低下や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現低下に利用できる。

【0194】

< 1 - 5 > タンパク質の活性を増大させる手法

以下に、タンパク質の活性を増大させる手法について説明する。

40

【0195】

「タンパク質の活性が増大する」とは、同タンパク質の細胞当たりの活性が野生株や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。なお、「タンパク質の活性が増大する」ことを、「タンパク質の活性が増強される」ともいう。「タンパク質の活性が増大する」とは、具体的には、非改変株と比較して、同タンパク質の細胞当たりの分子数が増加していること、および/または、同タンパク質の分子当たりの機能が増大していることをいう。すなわち、「タンパク質の活性が増大する」という場合の「活性」とは、タンパク質の触媒活性に限られず、タンパク質をコードする遺伝子の転写量(mRNA量)または翻訳量(タンパク質の量)を意味してもよい。また、「タンパク質の活性が増大する」

50

とは、もともと標的のタンパク質の活性を有する菌株において同タンパク質の活性を増大させることだけでなく、もともと標的のタンパク質の活性が存在しない菌株に同タンパク質の活性を付与することを含む。また、結果としてタンパク質の活性が増大する限り、宿主が本来有する標的のタンパク質の活性を低下または消失させた上で、好適な標的のタンパク質の活性を付与してもよい。

【0196】

タンパク質の活性は、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、例えば、非改変株と比較して、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、非改変株が標的のタンパク質の活性を有していない場合は、同タンパク質をコードする遺伝子を導入することにより同タンパク質が生成されていけばよいが、例えば、同タンパク質はその酵素活性が測定できる程度に生産されていてよい。

10

【0197】

タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を上昇させることによって達成される。なお、「遺伝子の発現が増強される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株と比較して、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。また、「遺伝子の発現が増強される」とは、もともと標的の遺伝子が発現している菌株において同遺伝子の発現量を増大させることだけでなく、もともと標的の遺伝子が発現していない菌株において、同遺伝子を発現させることを含む。すなわち、「遺伝子の発現が増強される」とは、例えば、標的の遺伝子を保持しない菌株に同遺伝子を導入し、同遺伝子を発現させることを含む。

20

【0198】

遺伝子の発現の上昇は、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。

【0199】

遺伝子のコピー数の増加は、宿主の染色体へ同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、相同組み換えを利用して行うことができる (Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory)。遺伝子は、1コピーのみ導入されてもよく、2コピーまたはそれ以上導入されてもよい。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)、トランスポゾンの両端に存在するインバーテッド・リピートが挙げられる。また、目的物質の生産に不要な遺伝子等の染色体上の適当な配列を標的として相同組み換えを行ってもよい。相同組み換えは、例えば、Redドリブンインテグレーション (Red-driven integration) 法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) 等の直鎖状DNAを用いる方法、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、宿主内で機能する複製起点を持たないスイサイドベクターを用いる方法、またはファージを用いたtransduction法により行うことができる。また、遺伝子は、トランスポゾンやMini-Muを用いて染色体上にランダムに導入することもできる (特開平2-109985号公報、US5,882,888、EP805867B1)。

30

40

【0200】

染色体上に標的遺伝子が導入されたことの確認は、同遺伝子の全部又は一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は同遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認できる。

【0201】

また、遺伝子のコピー数の増加は、同遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。例えば、標的遺伝子を含むDNA断片を、宿主で機能するベクターと連結して同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を形質転換することにより、同遺伝子のコピー数を増加させることができる。標的遺伝子を含むDNA断片は、例えば、標的遺伝子を有する微生物のゲノムDNAを鋳型とするPCRにより取得でき

50

る。ベクターとしては、宿主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。ベクターは、例えば、細菌プラスミド由来のベクター、酵母プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、コスミド、またはファージミド等であってよい。コリネ型細菌で自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pHM1519(Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ; pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984)) ; これらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド ; 特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30 ; 特開平2-72876号公報及び米国特許5,185,262号明細書公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX ; 特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3 ; 特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844 ; 特開昭57-134500号公報に記載のpCG1 ; 特開昭58-35197号公報に記載のpCG2 ; 特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11が挙げられる。

10

【0202】

遺伝子を導入する場合、遺伝子は、発現可能に本発明の細菌に保持されていればよい。具体的には、遺伝子は、本発明の細菌で機能するプロモーター配列による制御を受けて発現するように導入されていればよい。プロモーターは、宿主由来のプロモーターであってもよく、異種由来のプロモーターであってもよい。プロモーターは、導入する遺伝子の固有のプロモーターであってもよく、他の遺伝子のプロモーターであってもよい。プロモーターとしては、例えば、後述するような、より強力なプロモーターを利用してもよい。

20

【0203】

遺伝子の下流には、転写終結用のターミネーターを配置することができる。ターミネーターは、本発明の細菌において機能するものであれば特に制限されない。ターミネーターは、宿主由来のターミネーターであってもよく、異種由来のターミネーターであってもよい。ターミネーターは、導入する遺伝子の固有のターミネーターであってもよく、他の遺伝子のターミネーターであってもよい。ターミネーターとして、具体的には、例えば、trpAターミネーターが挙げられる。

【0204】

各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターに関しては、例えば「微生物学基礎講座8 遺伝子工学、共立出版、1987年」に詳細に記載されており、それらを利用することが可能である。

30

【0205】

また、2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合、各遺伝子が、発現可能に本発明の細菌に保持されていればよい。例えば、各遺伝子は、全てが単一の発現ベクター上に保持されていてもよく、全てが染色体上に保持されていてもよい。また、各遺伝子は、複数の発現ベクター上に別々に保持されていてもよく、単一または複数の発現ベクター上と染色体上とに別々に保持されていてもよい。また、2またはそれ以上の遺伝子でオペロンを構成して導入してもよい。「2またはそれ以上の遺伝子を導入する場合」としては、例えば、2またはそれ以上の酵素をそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、単一の酵素を構成する2またはそれ以上のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を導入する場合、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0206】

導入される遺伝子は、宿主で機能するタンパク質をコードするものであれば特に制限されない。導入される遺伝子は、宿主由来の遺伝子であってもよく、異種由来の遺伝子であってもよい。導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、同遺伝子を有する生物のゲノムDNAや同遺伝子を搭載するプラスミド等を鋳型として、PCRにより取得することができる。また、導入される遺伝子は、例えば、同遺伝子の塩基配列に基づいて全合成してもよい (Gene, 60(1), 115-127 (1987))。

【0207】

なお、タンパク質が複数のサブユニットからなる複合体として機能する場合、結果とし

50

てタンパク質の活性が増大する限り、それら複数のサブユニットの全てを改変してもよく、一部のみを改変してもよい。すなわち、例えば、遺伝子の発現を上昇させることによりタンパク質の活性を増大させる場合、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強してもよく、一部の発現のみを増強してもよい。通常は、それらのサブユニットをコードする複数の遺伝子の全ての発現を増強するのが好ましい。また、複合体を構成する各サブユニットは、複合体が目的のタンパク質の機能を有する限り、1種の生物由来であってもよく、2種またはそれ以上の異なる生物由来であってもよい。すなわち、例えば、複数のサブユニットをコードする、同一の生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよく、それぞれ異なる生物由来の遺伝子を宿主に導入してもよい。

【0208】

また、遺伝子の発現の上昇は、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。コリネ型細菌で利用できるより強力なプロモーターとしては、人為的に設計変更されたP54-6プロモーター (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679(2000))、コリネ型細菌内で酢酸、エタノール、ピルビン酸等で誘導できるpta、aceA、aceB、adh、amyEプロモーター、コリネ型細菌内で発現量が多い強力なプロモーターであるcspB、SOD、tuf (EF-Tu) プロモーター (Journal of Biotechnology 104 (2003) 311-323, Appl Environ Microbiol. 2005 Dec;71(12):8587-96.)、lacプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーターが挙げられる。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)。高活性型プロモーターとしては、各種tac様プロモーター (Katashkina JI et al. Russian Federation Patent application 2006134574) やpnlp8プロモーター (WO2010/027045) が挙げられる。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)) 等に記載されている。

【0209】

また、遺伝子の発現の上昇は、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シャインダルガノ (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、あるいは挿入、あるいは欠失が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。

【0210】

これら発現制御領域の改変は、例えば、温度感受性ベクターを用いた方法や、Redドリブインテグレーション法 (WO2005/010175) により行うことができる。

【0211】

遺伝子の翻訳効率の向上は、例えば、コドンの改変によっても達成できる。エシェリヒア・コリ等において、mRNA分子の集団内に見出される61種のアミノ酸コドン間には明らかなコドンの偏りが存在し、あるtRNAの存在量は、対応するコドンの使用頻度と直接比例するようである (Kane, J.F., Curr. Opin. Biotechnol., 6(5), 494-500 (1995))。すなわち、過剰のレアコドンを含むmRNAが大量に存在すると翻訳の問題が生じうる。近年の研究によれば、特に、AGG/AGA、CUA、AUA、CGA、又はCC

10

20

30

40

50

C コドンのクラスターが、合成されたタンパク質の量および質の両方を低下させ得ることが示唆されている。このような問題は、特に異種遺伝子の発現の際に生じうる。よって、遺伝子の異種発現を行う場合等には、遺伝子中に存在するレアコドンを、より高頻度で利用される同義コドンに置き換えることにより、遺伝子の翻訳効率を向上させることができる。コドンの置換は、例えば、DNAの目的の部位に目的の変異を導入する部位特異的変異法により行うことができる。部位特異的変異法としては、PCRを用いる方法 (Higuchi, R., 61, in PCR technology, Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) や、ファージを用いる方法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) が挙げられる。また、コドンが置換された遺伝子断片を全合成してもよい。種々の生物におけるコドンの使用頻度は、「コドン使用データベース」 (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. et al, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)) に開示されている。

10

【0212】

また、遺伝子の発現の上昇は、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、または、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できる。

【0213】

上記のような遺伝子の発現を上昇させる手法は、単独で用いてもよく、任意の組み合わせで用いてもよい。

20

【0214】

また、タンパク質の活性が増大するような改変は、例えば、タンパク質の比活性を増強することによっても達成できる。比活性の増強には、フィードバック阻害の低減および解除も含まれる。比活性が増強されたタンパク質は、例えば、種々の生物を探索し取得することができる。また、在来のタンパク質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。導入される変異は、例えば、タンパク質の1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、又は付加されるものであってよい。変異の導入は、例えば、上述したような部位特異的変異法により行うことができる。また、変異の導入は、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、X線の照射、紫外線の照射、ならびに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)、およびメチルメタンсульフォネート(MMS)等の変異剤による処理が挙げられる。また、in vitroでDNAを直接ヒドロキシルアミンで処理し、ランダム変異を誘発してもよい。比活性の増強は、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用いてもよい。

30

【0215】

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. 1970, 53, 159-162) 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., 1997. Gene 1: 153-167) 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., 1979. Mol. Gen. Genet. 168: 111-115; Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A. 1978. Nature 274: 398-400; Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933) も応用できる。あるいは、コリネ型細菌について報告されているような、電気パルス法 (特開平2-207791) を利用することもできる。

40

【0216】

タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質の活性を測定することで確認できる

50

【0217】

タンパク質の活性が増大したことは、同タンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇したことを確認することによっても、確認できる。遺伝子の発現が上昇したことは、同遺伝子の転写量が上昇したことを確認することや、同遺伝子から発現するタンパク質の量が上昇したことを確認することにより確認できる。

【0218】

遺伝子の転写量が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株または親株等の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(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)。mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

【0219】

タンパク質の量が上昇したことの確認は、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))。タンパク質の量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上に上昇してよい。

【0220】

上記したタンパク質の活性を増大させる手法は、任意のタンパク質、例えばL-アミノ酸生合成系酵素、の活性増強や、任意の遺伝子、例えばそれら任意のタンパク質をコードする遺伝子、の発現増強に利用できる。

【0221】

<2> 目的物質の製造法

<2-1> 目的物質の製造法

本発明の方法は、本発明の細菌をキシロースを含有する培地で培養して目的物質を該培地中又は該細菌の菌体内に生成蓄積すること、および該培地又は菌体より目的物質を採取することを含む、目的物質の製造法である。本発明においては、1種の目的物質が製造されてもよく、2種またはそれ以上の目的物質が製造されてもよい。

【0222】

使用する培地は、キシロースを含有し、本発明の細菌が増殖でき、目的物質が生産される限り、特に制限されない。培地としては、例えば、細菌等の微生物の培養に用いられる通常の培地を用いることができる。培地は、キシロースに加えて、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有してよい。培地成分の種類や濃度は、使用する細菌の種類や製造する目的物質の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

【0223】

キシロースとしては、精製されたキシロース等の純粋なキシロースを用いてもよく、キシロースとそれ以外の成分を含有する混合物を用いてもよい。そのような混合物としては、植物バイオマスの加水分解物が挙げられる。植物バイオマスは、キシロースを構成糖として含有するものであれば特に制限されない。植物バイオマスとしては、木質系バイオマスや草本系バイオマスが挙げられる。植物バイオマスとして、具体的には、例えば、稲わら、籾殻、サトウキビバガスが挙げられる。植物バイオマスを、水熱分解処理、濃酸加水分解、希酸加水分解、セルラーゼ等の酵素による加水分解、アルカリ処理等の処理に供することにより、キシロースを含有する処理物が得られる。そのような処理物は、そのまま、あるいは適宜精製等して、炭素源として利用してよい。

【0224】

植物バイオマスを処理する方法としては、水熱分解処理が好ましい。植物バイオマスは、そのまま、あるいは適宜、蒸煮や爆砕等の前処理を行ってから、水熱分解処理等の処理に供してよい。例えば、植物バイオマスは、5mm以下に粉碎して、水熱分解処理等の処

理に供してもよい。水熱分解は、例えば、好ましくは175～240℃、より好ましくは200～230℃の加圧熱水を用いて行うことができる。ヘミセルロース成分は約140以上で、セルロースは約230以上で、リグニン成分は約140以上で溶解するため、ヘミセルロース成分を十分に溶解させるためには、上記範囲の温度が好ましい。

【0225】

上記のような水熱分解処理は、植物バイオマスを加圧熱水と対向接触させることにより行うことができる。このような処理は、特許第4436429号公報、特許4524351号公報、又は特許第4427583号公報に記載された装置を用いて行うことができる。植物バイオマスの水熱分解処理によって、リグニン成分及びヘミセルロース成分は、植物バイオマスから熱水中に移行し、セルロース成分は固形分として残る。

10

【0226】

また、水熱分解処理の反応圧力は、装置内部が加圧熱水の状態となるよう、各温度の水の飽和蒸気圧より更に0.1～0.5MPa高い圧力とするのが好ましい。反応時間は通常20分以下、好ましくは3～15分である。

【0227】

続いて、熱水を固形分から分離し、熱水中のヘミセルロースを糖化処理する。ヘミセルロースの糖化は、糖化酵素を用いた酵素分解、又は硫酸を用いた硫酸分解により行うことができるが、本発明においては、酵素分解が好ましい。

【0228】

糖化酵素は、ヘミセルロースを分解してキシロースを生成するものであれば特に制限されない。糖化酵素として、具体的には、ヘミセルラーゼが挙げられる。ヘミセルラーゼとは、ヘミセルロースに含まれるグリコシド結合の加水分解を触媒する酵素の総称である。ヘミセルロースとは、陸上植物細胞の細胞壁を構成する多糖類のうち、セルロースとペクチン以外のものをいい、ヘミセルロースの主成分はキシランである。キシランは、キシロースを構成糖とする主鎖にアラビノース等の側鎖が結合してなるヘテロ多糖である。ヘミセルラーゼの主成分は、エンド-1,4-β-キシラナーゼ(EC 3.2.1.8)及び-1,4-キシロシダーゼ(EC 3.2.1.37)等であるが、その他のグルコシド結合加水分解酵素も含まれている。市販のヘミセルラーゼとしては、Cellic Htec (Novozyme)等が挙げられる。また、セルラーゼであるSpezyme CP (Genencor, *Trichoderma reesei*由来)、及び、グルコシダーゼであるNovozyme 188 (Novozyme, *Aspergillus niger*由来)等をヘミセルラーゼとして用いてもよい。ヘミセルロースにこれらの酵素を作用させると、キシロース、アラビノース等が生成する。また、熱水中にヘミセルロースだけでなくセルロースが移行又は混入することがあり、糖化処理によってグルコースが生成する場合がある。本発明においては、キシロースに加えて、糖化処理により得られたグルコース等の副生物を炭素源として用いてもよい。

20

30

【0229】

酵素反応は、水や緩衝液等の適当な水性溶媒中で行うことができる。酵素反応に用いる溶媒は、例えば、水熱処理に使用した水そのものであってもよい。反応温度及びpH等の反応条件は、市販酵素に添付された説明書の記載にしたがって、又は予備実験等によって、適宜設定すればよい。例えば、前記Spezyme CP、及び、Novozyme 188を用いる場合の反応条件としては、45～60℃、pH4.5～6.5の条件が挙げられる。酵素量は、例えば、基質固形量当り、通常20～120FPU (filter paper unit)であってよい。反応時間は、例えば、通常24～144時間であってよい。酵素反応は、静置で行ってもよく、攪拌しながら行ってもよい。また、酵素反応に先立って、脱リグニンやヘミセルロースの部分分解等の前処理を行ってもよい。

40

【0230】

糖化を硫酸分解により行う場合、硫酸濃度は、通常0.1～5重量%、好ましくは1～4重量%であってよい。分解温度は、通常100～140℃、好ましくは約120℃前後であってよい。分解時間は、通常30分～3時間、好ましくは1時間前後であってよい。分解後、硫酸はイオン交換樹脂処理等により除去することができる。

50

【0231】

糖化处理により得られたキシロースを含有する糖液は、そのまま、あるいは適宜、濃縮、希釈、乾燥、分画、精製等の処理に供してから、炭素源として利用してよい。例えば、糖液から、キシロース等の成分を所望の程度に分離精製して炭素源として利用することができる。

【0232】

また、糖化处理により得られる糖液には、微生物の生育及び代謝を阻害する物質が含まれる。このような阻害物質は、主として、糖以外の分子量3000以下の不揮発性の物質である。したがって、糖液は、このような阻害物質を除去する処理に供してから、炭素源として利用するのが好ましい。このような阻害物質を除去する処理としては、吸着剤処理、ゲルろ過、膜処理等が挙げられる。糖液は、そのまま、あるいは適宜、濃縮または希釈等してから、阻害物質を除去する処理に供してよい。

10

【0233】

吸着剤処理に利用できる吸着剤としては、例えば、活性炭、イオン交換樹脂、合成吸着樹脂、ゼオライト、シリカゲルが挙げられる。吸着剤は、上記のような阻害物質を選択的に吸着するものであることが好ましい。吸着剤処理は、バッチにより、又はカラムを用いて行うことができるが、カラムを用いることが好ましい。バッチで行う場合は、糖液を入れた容器に吸着剤を入れた後、吸着剤と糖液を分離する。カラムを用いる場合は、吸着剤を充填したカラムに糖液を流し、必要に応じてカラムに洗浄液を流し、貫流液（非吸着画分）を集める。吸着剤処理は、1回のみ行ってもよく、2回又はそれ以上繰返してもよい。また、吸着剤処理には、1種の吸着剤を利用してもよく、2種又はそれ以上の吸着剤を併用してもよい。

20

【0234】

阻害物質が除去された糖液は、そのまま、あるいは適宜、濃縮、希釈、乾燥、分画、精製等の処理に供してから、炭素源として利用してよい。

【0235】

また、糖化处理により生成した各種成分は、用途に応じて、さらに化学反応又は酵素反応によって異性化又は分解等してもよい。

【0236】

尚、バイオマス原料の水熱処理の後、熱水を分離した残りの固形分を利用してもよい。すなわち、固形分中のセルロースをセルラーゼ等で酵素処理すれば、グルコース等の6炭糖を含む糖液が得られる。キシロースに加えて、このような糖液またはその処理物を炭素源として利用してもよい。

30

【0237】

本発明の方法において、キシロースは、唯一炭素源（sole carbon source）として利用されてもよく、そうでなくてもよい。すなわち、本発明の方法においては、キシロースに加えて、他の炭素源を併用してもよい。他の炭素源は、本発明の細菌が資化して目的物質を生成し得るものであれば、特に限定されない。他の炭素源として、具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース、ガラクトース、アラビノース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマスの加水分解物等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸等の有機酸類、グリセロール、粗グリセロール、エタノール等のアルコール類、脂肪酸類が挙げられる。他の炭素源を用いる場合には、総炭素源中のキシロースの比率は、例えば、5重量%以上、10重量%以上、20重量%以上、好ましくは30重量%以上、より好ましくは50重量%以上であってよい。他の炭素源としては、1種の炭素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせ用いてもよい。

40

【0238】

培地中での炭素源の濃度は、本発明の細菌が増殖でき、目的物質が生産される限り、特に制限されない。培地中での炭素源の濃度は、目的物質の生産が阻害されない範囲で可能な限り高くするのが好ましい。培地中での炭素源の初発濃度は、例えば、通常1~30%(W/V)、好ましくは3~10%(W/V)であってよい。また、発酵の進行に伴う炭素源の消費に応じ

50

て、炭素源を追加で添加してもよい。

【0239】

窒素源として、具体的には、例えば、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アンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、大豆タンパク質分解物等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。pH調整に用いられるアンモニアガスやアンモニア水を窒素源として利用してもよい。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせて用いてもよい。

【0240】

リン酸源として、具体的には、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上のリン酸源を組み合わせて用いてもよい。

10

【0241】

硫黄源として、具体的には、例えば、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせて用いてもよい。

【0242】

その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量金属類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク質分解物等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分や無機成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせて用いてもよい。

20

【0243】

また、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、培地に要求される栄養素を補添することが好ましい。例えば、L-リジン生産菌は、L-リジン合成経路が強化され、L-リジン分解能が弱化されている場合が多い。よって、そのようなL-リジン生産菌を培養する場合には、例えば、L-スレオニン、L-ホモセリン、L-イソロイシン、L-メチオニンから選ばれる1またはそれ以上のアミノ酸を培地に補添するのが好ましい。

30

【0244】

また、例えば、コリネ型細菌によりL-グルタミン酸を製造する場合は、培地中のピオチン量を制限することや、培地に界面活性剤またはペニシリンを添加することが好ましい。また、培養時の発泡を抑えるために、培地には市販の消泡剤を適量添加しておくことが好ましい。

【0245】

培養条件は、本発明の細菌が増殖でき、目的物質が生産される限り、特に制限されない。培養は、例えば、コリネ型細菌の培養に用いられる通常の条件で行うことができる。培養条件は、使用する細菌の種類や製造する目的物質の種類等の諸条件に応じて適宜設定してよい。

40

【0246】

培養は、液体培地を用いて行うことができる。培養の際には、本発明の細菌を寒天培地等の固体培地で培養したものを直接液体培地に接種してもよく、本発明の細菌を液体培地で種培養したものを本培養用の液体培地に接種してもよい。すなわち、培養は、種培養と本培養とに分けて行われてもよい。その場合、種培養と本培養の培養条件は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。培養開始時に培地に含有される本発明の細菌の量は特に制限されない。例えば、OD660 = 4 ~ 8の種培養液を、培養開始時に、本培養用の培地に対して0.1質量% ~ 30質量%、好ましくは1質量% ~ 10質量%、添加してよい。

50

【0247】

培養は、回分培養 (batch culture)、流加培養 (Fed-batch culture)、連続培養 (continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。なお、培養開始時の培地を、「初発培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系 (発酵槽) に供給する培地を、「流加培地」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系に流加培地を供給することを、「流加」ともいう。なお、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合、例えば、種培養と本培養を、共に回分培養で行ってもよい。また、例えば、種培養を回分培養で行い、本培養を流加培養または連続培養で行ってもよい。

【0248】

本発明において、各培地成分は、初発培地、流加培地、またはその両方に含有されていてよい。初発培地に含有される成分の種類は、流加培地に含有される成分の種類と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、初発培地に含有される各成分の濃度は、流加培地に含有される各成分の濃度と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、含有する成分の種類および/または濃度の異なる2種またはそれ以上の流加培地を用いてもよい。例えば、複数回の流加が間欠的に行われる場合、各流加培地に含有される成分の種類および/または濃度は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。

【0249】

培地中のキシロース濃度は、本発明の細菌がキシロースを炭素源として利用できる限り、特に制限されない。キシロースは、例えば、1.0 w/v%以下、好ましくは5 w/v%以下、より好ましくは2 w/v%以下の濃度で培地に含有されてよい。また、キシロースは、例えば、0.2 w/v%以上、好ましくは0.5 w/v%以上、より好ましくは1.0 w/v%以上の濃度で培地に含有されてよい。キシロースは、初発培地、流加培地、またはその両方に、上記例示した濃度範囲で含有されていてよい。

【0250】

また、キシロースが流加培地に含有される場合、キシロースは、例えば、流加後の培地中のキシロース濃度が、5 w/v%以下、好ましくは2 w/v%以下、より好ましくは1 w/v%以下となるように、流加培地に含有されてもよい。また、キシロースが流加培地に含有される場合、キシロースは、例えば、流加後の培地中のキシロース濃度が、0.01 w/v%以上、好ましくは0.02 w/v%以上、より好ましくは0.05 w/v%以上となるように、流加培地に含有されてもよい。

【0251】

キシロースは、唯一炭素源として利用される場合に、上記例示した濃度範囲で含有されていてよい。また、キシロースは、他の炭素源を併用する場合に、上記例示した濃度範囲で含有されてもよい。また、キシロースは、他の炭素源を併用する場合に、例えば、総炭素源中のキシロースの比率等に応じて、上記例示した濃度範囲を適宜修正した濃度範囲で含有されてもよい。

【0252】

キシロースは、培養の全期間において一定の濃度範囲で培地に含有されていてよく、そうでなくてもよい。例えば、一部の期間、キシロースが不足していてもよい。「不足する」とは、要求量を満たさないことをいい、例えば、培地中の濃度がゼロとなることであってよい。「一部の期間」とは、例えば、培養の全期間の内の、1%以下の期間、5%以下の期間、10%以下の期間、20%以下の期間、30%以下の期間、または50%以下の期間であってよい。なお、「培養の全期間」とは、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合には、本培養の全期間を意味してよい。キシロースが不足する期間には、他の炭素源が充足されているのが好ましい。このように、一部の期間、キシロースが不足していても、キシロースを含有する培地での培養期間が存在する限り、「キシロースを含有する培地中で細菌を培養する」ことに含まれる。

【0253】

キシロース等の各種成分の濃度は、ガスクロマトグラフィー (Hashimoto, K. et al. 1

10

20

30

40

50

996. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70:22-30) やHPLC (Lin, J. T. et al. 1998. J. Chromatogr. A. 808: 43-49) により測定することができる。

【0254】

培養は、例えば、好氣的に行うことができる。例えば、培養は、通気培養または振盪培養で行うことができる。酸素濃度は、例えば、飽和酸素濃度の5~50%、好ましくは10%程度に制御されてよい。培地のpHは、例えば、pH 3~10、好ましくはpH 4.0~9.5であってよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整することができる。培地のpHは、アンモニアガス、アンモニア水、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の各種アルカリ性または酸性物質を用いて調整することができる。培養温度は、例えば、20~45、好ましくは25~37であってよい。培養期間は、例えば、10時間~120時間であってよい。培養は、例えば、培地中の炭素源が消費されるまで、あるいは本発明の細菌の活性がなくなるまで、継続してもよい。このような条件下で本発明の細菌を培養することにより、菌体内および/または培地中に目的物質が蓄積する。

10

【0255】

流加培養または連続培養においては、流加は、培養の全期間を通じて継続されてもよく、培養の一部の期間においてのみ継続されてもよい。また、流加培養または連続培養においては、複数回の流加が間欠的に行われてもよい。

【0256】

複数回の流加が間欠的に行われる場合、1回当たりの流加の継続時間が、複数回の流加の合計時間の、例えば30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下となるように、流加の開始と停止を繰り返してもよい。

20

【0257】

また、複数回の流加が間欠的に行われる場合、2回目以降の流加を、その直前の流加停止期において発酵培地中の炭素源が枯渇したときに開始されるように制御することにより、発酵培地中の炭素源濃度を自動的に低レベルに維持することもできる(米国特許5,912,113号明細書)。炭素源の枯渇は、例えば、pHの上昇または溶存酸素濃度の上昇により検出できる。

【0258】

連続培養においては、培養液の引き抜きは、培養の全期間を通じて継続されてもよく、培養の一部の期間においてのみ継続されてもよい。また、連続培養においては、複数回の培養液の引き抜きが間欠的に行われてもよい。培養液の引き抜きと流加は、同時に行われてもよく、そうでなくてもよい。例えば、培養液の引き抜きを行った後で流加を行ってもよく、流加を行った後で培養液の引き抜きを行ってもよい。引き抜く培養液量は、流加させる培地量と同量であるのが好ましい。ここで、「同量」とは、例えば、流加させる培地量に対して93~107%の量であってよい。

30

【0259】

培養液を連続的に引き抜く場合には、流加と同時に、または流加の開始後に、引き抜きを開始するのが好ましい。例えば、流加の開始後5時間以内、好ましくは3時間以内、より好ましくは1時間以内に、引き抜きを開始してよい。

40

【0260】

培養液を間欠的に引き抜く場合には、予定した目的物質濃度に到達したときに、培養液を一部引き抜いて目的物質を回収し、新たに培地を流加して培養を継続するのが好ましい。

【0261】

また、引き抜かれた培養液から、L目的物質を回収し、菌体を含むろ過残留物を発酵槽中に再循環させることにより、菌体を再利用することもできる(フランス特許2669935号明細書)。

【0262】

また、L-グルタミン酸を製造する場合、L-グルタミン酸が析出する条件に調整され

50

た液体培地を用いて、培地中にL-グルタミン酸を析出させながら培養を行うことも出来る。L-グルタミン酸が析出する条件としては、例えば、pH 5.0 ~ 3.0、好ましくはpH 4.9 ~ 3.5、さらに好ましくはpH 4.9 ~ 4.0、特に好ましくはpH 4.7付近の条件が挙げられる（欧州特許出願公開第1078989号明細書）。尚、培養は、その全期間において上記pHで行われてもよく、一部の期間のみ上記pHで行われてもよい。「一部の期間」とは、例えば、培養の全期間の50%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、または99%以上の期間であってよい。

【0263】

また、L-リジン等の塩基性アミノ酸を製造する場合、重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを塩基性アミノ酸の主なカウンタイオンとして利用して塩基性アミノ酸を発酵生産する方法を利用してもよい（特開2002-65287、US2002-0025564A、EP1813677A）。これらの方法によれば、塩基性アミノ酸のカウンタイオンとして従来利用されていた硫酸イオン及び/又は塩化物イオンの使用量を削減しつつ、塩基性アミノ酸を製造することができる。

10

【0264】

目的物質が生成したことは、化合物の検出または同定に用いられる公知の手法により確認することができる。そのような手法としては、例えば、HPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせる用いることができる。

【0265】

生成した目的物質の回収は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法、膜処理法、沈殿法、および晶析法が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせる用いることができる。なお、菌体内に目的物質が蓄積する場合には、例えば、菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清から、イオン交換樹脂法などによって目的物質を回収することができる。回収される目的物質は、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってよい。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。例えば、L-リジンは、フリー体のL-リジン、L-リジン硫酸塩、L-リジン塩酸塩、L-リジン炭酸塩、またはそれらの混合物であってよい。また、例えば、L-グルタミン酸は、フリー体のL-グルタミン酸、L-グルタミン酸ナトリウム（monosodium L-glutamate；MSG）、L-グルタミン酸アンモニウム塩（monoammonium L-glutamate）、またはそれらの混合物であってよい。例えば、L-グルタミン酸の場合、発酵液中のL-グルタミン酸アンモニウムを酸を加えて晶析させ、結晶に等モルの水酸化ナトリウムを添加することでL-グルタミン酸ナトリウム（MSG）が得られる。なお、晶析前後に活性炭を加えて脱色してもよい（グルタミン酸ナトリウムの工業晶析 日本海水学会誌 56巻 5号 川喜田哲哉参照）。また、例えば、イノシン酸の塩としては、具体的には、イノシン酸ナトリウム（5'-IMP disodium salt）が挙げられる。また、例えば、グアニル酸の塩としては、具体的には、グアニル酸ナトリウム（5'-GMP disodium salt）が挙げられる。

20

30

【0266】

また、目的物質が培地中に析出する場合は、遠心分離又は濾過等により回収することができる。また、培地中に析出した目的物質は、培地中に溶解している目的物質を晶析した後、併せて単離してもよい。

40

【0267】

尚、回収される目的物質は、目的物質以外に、例えば、細菌菌体、培地成分、水分、及び細菌の代謝副産物等の成分を含んでいてもよい。回収された目的物質の純度は、例えば、30%（w/w）以上、50%（w/w）以上、70%（w/w）以上、80%（w/w）以上、90%（w/w）以上、または95%（w/w）以上であってよい。

【0268】

L-アミノ酸がL-グルタミン酸である場合、例えば、L-グルタミン酸ナトリウム結晶をうま味調味料として用いることができる。L-グルタミン酸ナトリウム結晶は、同様にうま味を有するグアニル酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウム等の核酸と混合して調味

50

料として用いてもよい。

【0269】

< 2 - 2 > プリンヌクレオチドの製造法

本発明の細菌によりプリンヌクレオシドが生産される場合、該プリンヌクレオシドを利用して、プリンヌクレオチドを製造することができる。すなわち、本発明は、プリンヌクレオシド生産能を有する本発明の細菌を培地で培養し培地にプリンヌクレオシドを蓄積すること、該プリンヌクレオシドをリン酸化しプリンヌクレオチドを生成すること、および該プリンヌクレオチドを回収すること、を含むプリンヌクレオチドの製造法を提供する。

【0270】

この方法においては、使用するプリンヌクレオシドに対応するプリンヌクレオチドが生成する。すなわち、例えば、イノシンからはイノシン酸を、グアノシンからはグアニル酸を、キサントシンからはキサントシル酸を、アデノシンからはアデニル酸を、それぞれ製造できる。本発明においては、1種のプリンヌクレオチドが製造されてもよく、2種またはそれ以上のプリンヌクレオチドが製造されてもよい。

【0271】

プリンヌクレオシドは、培地に含まれたままリン酸化に供してもよく、培地から回収してからリン酸化に供してもよい。また、プリンヌクレオシドは、適宜前処理を行ってからリン酸化に供してもよい。前処理としては、例えば、精製、希釈、濃縮、結晶化、乾燥、破碎、溶解等が挙げられる。これらの前処理は、適宜組み合わせてもよい。例えば、プリンヌクレオシドを含有する培養液をそのまま、あるいは所望の程度に精製して、リン酸化に供してよい。

【0272】

プリンヌクレオシドをリン酸化する手法は特に制限されない。リン酸化は、例えば、公知の手法により行うことができる。

【0273】

リン酸化は、例えば、化学的に行うことができる。化学的リン酸化は、塩化ホスホリル (POCl_3) 等のリン酸化剤を使用して行うことができる (Yoshikawa et. al., Studies of phosphorylation, III, Selective phosphorylation of unprotected nucleosides, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1969, 42: 3505-3508)。

【0274】

リン酸化は、例えば、微生物または酵素を利用して行うことができる。すなわち、プリンヌクレオシドおよびリン酸供与体に、ヌクレオシド - 5' - リン酸エステルを生成する能力を有する微生物を作用させることにより、プリンヌクレオチドを生成することができる (特開平07-231793)。また、プリンヌクレオシドおよびリン酸供与体に、リン酸化酵素を作用させることにより、プリンヌクレオチドを生成することができる。

【0275】

ヌクレオシド - 5' - リン酸エステルを生成する能力を有する微生物として、具体的には、例えば、以下のようなものが挙げられる (特開平07-231793)。

エシェリヒア・ブラッタエ (*Escherichia blattae*) JCM 1650

セラチア・フィカリア (*Serratia ficaria*) ATCC 33105

クレブシエラ・プランティコーラ (*Klebsiella planticola*) IFO 14939 (ATCC 33531)

クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) IFO 3318 (ATCC 8724)

クレブシエラ・テリゲナ (*Klebsiella terrigena*) IFO 14941 (ATCC 33257)

モルガネラ・モルガニ (*Morganella morganii*) IFO 3168

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 12010

エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) IFO 13534 (ATCC 13048)

クロモバクテリウム・フラビアタイル (*Chromobacterium fluviatile*) IAM 13652

クロモバクテリウム・ピオラセウム (*Chromobacterium violaceum*) IFO 12614

セデシア・ラパゲイ (*Cedecea lapagei*) JCM 1684

セデシア・ダビシエ (*Cedecea davisiae*) JCM 1685

10

20

30

40

50

セデシア・ネテリ (Cedecea neteri) JCM 5909

【0276】

リン酸化酵素としては、例えば、ホスファターゼ、ヌクレオシドキナーゼ、ヌクレオシドホスホトランスフェラーゼが挙げられる。リン酸化酵素は、精製されたものであってもよく、そうでなくてもよい。例えば、リン酸化酵素を生産する微生物の培養物、該培養物から分離した培養上清、該培養物から分離した菌体、該微生物の菌体処理物、それらの部分精製物、等のリン酸化酵素を含有する画分をリン酸化酵素として利用してもよい。

【0277】

ヌクレオシドキナーゼとしては、例えば、イノシングアノシンキナーゼが挙げられる。イノシングアノシンキナーゼを利用する方法として、具体的には、例えば、エシェリヒア・コリのイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したエシェリヒア属細菌を用いるプリンヌクレオチドの製造法 (WO91/08286) や、エキシグオバクテリウム・アセチリカムのイノシングアノシンキナーゼをコードする遺伝子を導入したコリネバクテリウム・アンモニアゲネスを用いたプリンヌクレオチドの製造法 (WO96/30501) が挙げられる。

10

【0278】

ホスファターゼとしては、例えば、酸性ホスファターゼが挙げられる。酸性ホスファターゼとしては、例えば、特開2002-000289に開示されているものが挙げられる。また、好ましい酸性ホスファターゼとしては、例えば、ヌクレオシドに対する親和性が上昇した変異型酸性ホスファターゼ (特開平10-201481)、ヌクレオチダーゼ活性が低下した変異型酸性ホスファターゼ (WO96/37603)、リン酸エステル加水分解活性が低下した変異型酸性ホスファターゼ (特開2001-245676) が挙げられる。

20

【0279】

リン酸供与体としては、例えば、ポリリン酸、フェニルリン酸、アセチルリン酸、カルバミルリン酸、ATP、dATP (デオキシATP) が挙げられる。ポリリン酸としては、例えば、ピロリン酸、トリポリリン酸、トリメタリン酸、テトラメタリン酸、ヘキサメタリン酸が挙げられる。リン酸供与体は、いずれもフリー体もしくはその塩、またはそれらの混合物であってよい。塩としては、例えば、ナトリウム塩やカリウム塩が挙げられる。リン酸供与体は、用いる微生物やリン酸化酵素の種類等に応じて適宜選択することができる。また、ATPやdATPをリン酸供与体として用いる場合、それらの再生系を併用することもできる (WO91/08286、WO96/30501)。

30

【0280】

プリンヌクレオチドが生成したことは、化合物の検出または同定に用いられる公知の手法により確認することができる。そのような手法としては、例えば、HPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせ用いることができる。

【0281】

生成したプリンヌクレオチドの回収は、化合物の分離精製に用いられる公知の手法により行うことができる。そのような手法としては、例えば、イオン交換樹脂法、膜処理法、沈殿法、および晶析法が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせ用いることができる。回収されるプリンヌクレオチドは、フリー体、その塩、またはそれらの混合物であってよい。尚、回収されるプリンヌクレオチドは、プリンヌクレオチド以外に、リン酸化酵素、リン酸供与体、細菌菌体、培地成分、水分、及び細菌の代謝副産物等の成分を含んでもよい。プリンヌクレオチドは、所望の程度に精製されていてよい。プリンヌクレオチドの純度は、例えば、30% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、80% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、または95% (w/w) 以上であってよい。

40

【実施例】

【0282】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0283】

50

(1) 使用培地

本実施例で使用した培地の組成と調製法を以下に示す。

【 0 2 8 4 】

[LB培地]

10 g/Lポリペプトン、5 g/L酵母エキス、5 g/L NaCl。NaOHを用いてpH7.0に調整する。寒天培地には15 g/L寒天を加える。

【 0 2 8 5 】

[CM-Dex培地]

10 g/Lポリペプトン、10 g/L酵母エキス、5 g/Lグルコース、1 g/L KH_2PO_4 、3 g/L尿素、0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 g/L (T-N) 豆ろ液 (大豆加水分解物)。KOHを用いてpH 7.5に調整する。寒天培地には15 g/L寒天を加える。

10

【 0 2 8 6 】

[S10寒天培地]

100 g/Lスクロース、10 g/Lポリペプトン、10 g/L酵母エキス、1 g/L KH_2PO_4 、3 g/L尿素、0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.2 g/L (T-N) 豆ろ液、10 $\mu\text{g/L}$ ビオチン。KOHを用いてpH 7.5に調整する。寒天培地には15 g/L寒天を加える。

【 0 2 8 7 】

[キシロース最少培地]

2.5 g/L、5.0 g/L、あるいは10 g/Lキシロース、2.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5 g/L KH_2PO_4 、0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 g/L尿素、10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ ビオチン、100 $\mu\text{g/L}$ ビタミンB1-HCl、15 mg/Lプロトカテク酸、0.02 mg/L CuSO_4 、10 mg/L CaCl_2 、40 g/L MOPS。KOHを用いてpH 7.0に調整する。

20

【 0 2 8 8 】

[シード培地]

60 g/Lグルコース、1.45 g/L K_3PO_4 、1.45 g/L KOH、0.9 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 g/Lコハク酸ナトリウム $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、8.55 mg/Lパラアミノ安息香酸、8.55 mg/Lアスコルビン酸、200 $\mu\text{g/L}$ ビタミンB1-HCl、60 $\mu\text{g/L}$ ビオチン、1.54 g/L (T-N) 豆ろ液、0.28 g/L DL-メチオニン、5 mL/L Fermol、25 mg/Lカナマイシン。アンモニアガスでpH 7.2に調整する。

30

【 0 2 8 9 】

[グルコース-メイン培地]

90 g/Lグルコース、3.46 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、23 mg/L ビタミンB1-HCl、0.35 g/L (T-N) 豆ろ液、15 mL/L Fermol、25 mg/Lカナマイシン。アンモニアガスでpH7.2に調整する。

【 0 2 9 0 】

[キシロース-メイン培地]

グルコース-メイン培地の90 g/Lグルコースを100 g/Lキシロースに置き換えたもの。

【 0 2 9 1 】

[グルコース / キシロース-メイン培地]

グルコース-メイン培地の90 g/Lグルコースを45 g/Lグルコースと45 g/Lキシロースに置き換えたもの。

40

【 0 2 9 2 】

(2) キシロース資化能が付与された *C. glutamicum* の構築

*E. coli*由来のキシロースイソメラーゼおよびキシロキナーゼをコードするxyIAB遺伝子が搭載されたプラスミドpVK9Peftu_xyIABを用いて *C. glutamicum* ATCC13869株を形質転換することにより、キシロース資化能が付与された *C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xyIAB株を構築した。手順を以下に示す。

【 0 2 9 3 】

50

(2 - 1) pVK9Peftu_xyIABの構築

E. coli由来xyIAB遺伝子の発現プラスミドpVK9Peftu_xyIABを以下の手順で構築した。pVK9Peftu_xyIABは、C. glutamicum由来エロンゲーションファクターTu (EF-Tu) 遺伝子tu fのプロモーター配列 (W02008114721、以下、「Peftu」と記載する。) の下流にE. coli由来xyIAB遺伝子を連結した配列を含む。

【 0 2 9 4 】

E. coli MG1655株の染色体DNAを鋳型として、プライマーxyIA_SP(2)_4691-80-12 (配列番号 1) とxyIAB_ASP_4691-80-13 (配列番号 2) を用いて、PCRによりxyIAB遺伝子を含むDNA断片 (xyIAB断片) を得た。また、C. glutamicum ATCC13869株の染色体DNAを鋳型として、プライマーEFTU_SP_4691-80-1 (配列番号 3) とEFTU_ASP_4691-80-2 (配列番号 4) を用いて、PCRによりPeftuを含むDNA断片 (Peftu断片) を取得した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) を用い、同酵素に付属のプロトコルに従って行った。

【 0 2 9 5 】

上記のようにして得られたxyIAB断片とPeftu断片とを、Xba I処理したpVK9 (特開2007-97573、米国特許出願公開20050196846号) と混合し、Clontech In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用い、同キットに付属のプロトコルに従ってin-fusion反応を行った後、この反応液でE. coli JM109を形質転換した。形質転換体は、LB寒天培地 (40 mg/Lカナマイシンを含む) で37℃、一晩培養して選抜した。得られた形質転換体より、目的のプラスミドpVK9Peftu_xyIABを取得した。クローニングされたEF-Tuプロモーター (Peftu) およびxyIAB遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号 9 および 10 に示す。

【 0 2 9 6 】

(2 - 2) C. glutamicumの形質転換

電気パルス法 (特開平2-207791) により、pVK9Peftu_xyIABでC. glutamicum ATCC13869株を形質転換した。形質転換体は、CM-Dex寒天培地 (25 mg/Lカナマイシンを含む) で31.5℃、一晩培養して選抜し、キシロース資化能が付与されたC. glutamicum ATCC13869 / pVK9Peftu_xyIAB株を得た。

【 0 2 9 7 】

(3) キシロース資化能が付与されたC. glutamicumのキシロース最少培地での生育

上記のようにしてキシロース資化能が付与されたC. glutamicum ATCC13869 / pVK9Peftu_xyIAB株を、キシロースを唯一炭素源とする最少培地 (キシロース最少培地) で培養した。

【 0 2 9 8 】

CM-Dex寒天培地 (25 mg/Lカナマイシンを含む) にC. glutamicum ATCC13869 / pVK9Peftu_xyIAB株の菌体を塗り広げ、31.5℃にて一晩培養した。培養後の寒天培地から約1 cm四方の菌体をかきとり、1 mLの0.25% (w/v) キシロース最少培地に懸濁後、波長660 nmに対する吸光度 (OD660) が0.01となるように、0.25% (w/v)、0.5% (w/v)、あるいは1.0% (w/v) キシロース最少培地 (いずれも25 mg/Lカナマイシンを含む) が5 mLはりこまれた培養管にそれぞれ植菌した。小型振盪培養装置 TVS062CA (アドバンテック東洋株式会社) を用い、培養温度31.5℃、振盪速度70 rpmで培養し、各時間のOD660を測定した。

【 0 2 9 9 】

各培地での生育の様子を図1に示す。培養開始後約40時間目までは、キシロース濃度の低い培地ほど、菌体の増殖速度が低い傾向が観察された。しかしながら、キシロース濃度の最も低い0.25% (w/v) キシロース最少培地では、培養開始後約40時間目まではほとんど菌体の増殖が観察されなかったものの、その後急速に増殖した。

【 0 3 0 0 】

(4) キシロース最少培地での増殖速度が向上した変異株の取得

上記(3)において0.25% (w/v) キシロース最少培地で60時間培養して得られた培養液 (図1) を、CM-Dex寒天培地 (25 mg/Lカナマイシンを含む) 上に塗り広げ、31.5℃にて一晩培養してコロニーを形成させた。得られたコロニーをかきとり、それぞれCM-Dex寒天

10

20

30

40

50

培地（25 mg/Lカナマイシンを含む）に再度植え継ぎ、単一のクローンを取得した。

【0301】

上記のようにして得られたいくつかのクローンを、上記（3）と同様にキシロース最少培地で培養した結果、キシロース濃度が低い培地においても増殖速度が大きく低下しない変異株（XM株）が取得された（図2）。さらに、このXM株は、1.0%（w/v）キシロース最少培地における比増殖速度も、親株（*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylIAB株）と比較して飛躍的に向上していた（図4（後述））。

【0302】

（5）キシロース資化能向上変異株の変異点解析

上記（4）と同様の試験より、キシロース最少培地での増殖速度が向上した変異株を、XM株を含めて6株取得した。得られた6株の変異株について、MiSeq2000（イルミナ株式会社）を用いて、染色体DNAの塩基配列を親株のものと比較した。その結果、いずれの変異株においても、染色体上のNCgI2954遺伝子の内部に翻訳後アミノ酸変異を伴う変異が検出された（表1）。

【0303】

【表1】

表1 キシロース最少培地での増殖速度向上変異株におけるNCgI2954遺伝子上の変異

変異株	変異箇所 (開始コドンからの位置)	変異型	アミノ酸変異
XM	1313	T → C	L438P
1	1092-1093	GC → 欠失	495aa → 367aa*
2	1092-1093	GC → 欠失	495aa → 367aa*
3	820	T → C	W274R
4	1129	T → A	Y377N
5	1092-1093	GC → 欠失	495aa → 367aa*

*変異株1、2、5の変異は、365位のロイシン残基がセリン残基に置換され、366位のロイシン残基がアルギニン残基に置換され、367位のアラニン残基がフェニルアラニン残基に置換され、且つ368位以降のアミノ酸残基が欠失した変異である。

【0304】

（6）*C. glutamicum*のNCgI2954遺伝子欠損株の構築

（6-1）NCgI2954遺伝子欠損用プラスミドpBS4S NCgI2954の構築

NCgI2954遺伝子欠損用プラスミドpBS4S NCgI2954は以下のようにして調製した。

【0305】

まず、*C. glutamicum* ATCC13869株の染色体DNAを鋳型に、プライマー-delta_2954_F1（配列番号5）とdelta_2954_MR（配列番号6）を用いてPCRを行い、NCgI2954遺伝子上流の領域を含むDNA断片を増幅した。また、同じく*C. glutamicum* ATCC13869株の染色体DNAを鋳型に、プライマー-delta_2954_MF（配列番号7）とdelta_2954_R1（配列番号8）を用いてPCRを行い、NCgI2954遺伝子下流の領域を含むDNA断片を増幅した。PCR反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymeraseを用い、同酵素に付属のプロトコルに従って行った。

【0306】

上記で得られた二つのDNA断片を、Xba Iで処理したプラスミドpBS4S（特開2007-97573、米国特許出願公開20050196846号）と混合し、Clontech In-fusion HD Cloning Kitを用い、同キットに付属のプロトコルに従ってin-fusion反応を行った後、この反応液で*E. coli* DH5 を形質転換した。形質転換体は、LB寒天培地（40 mg/Lカナマイシンを含む）で37℃、一晚培養して選抜した。得られた形質転換体から、pBS4SにNCgI2954遺伝子上流と下流の配列が挿入されたプラスミドpBS4S NCgI2954を取得した。

【0307】

（6-2）NCgI2954遺伝子欠損株の取得

電気パルス法により、pBS4S NCgI2954で*C. glutamicum* ATCC13869株を形質転換し、CM-Dex寒天培地（25 mg/Lカナマイシンを含む）で31.5℃、二晩培養することで、pBS4S N

10

20

30

40

50

CgI2954が染色体上に組み込まれた一点組み換え体を取得した。得られた一点組み換え体をS10寒天培地に植え継ぎ、NCgI2954遺伝子領域が欠損された二点組み換え体*C. glutamicum* ATCC13869 NCgI2954株を取得した。

【0308】

(7) NCgI2954遺伝子欠損株のキシロース最少培地での生育

上記(2-2)と同様にして、*C. glutamicum* ATCC13869 NCgI2954株をpVK9Peftu_xylABで形質転換し、キシロース資化能が付与されたNCgI2954遺伝子欠損株(*C. glutamicum* ATCC13869 NCgI2954 / pVK9Peftu_xylAB株)を取得した。この株について、上記(3)と同様に、0.25% (w/v)、0.5% (w/v)、および1.0% (w/v) キシロース最少培地での生育を検証した。

10

【0309】

NCgI2954遺伝子欠損株は、低濃度のキシロース最少培地においても、野生株(*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB株)のような大幅な増殖速度の低下は認められず、XM株と同等の比増殖速度を示した(図3、図4)。以上より、XM株におけるキシロース最少培地での増殖速度向上の要因は、NCgI2954遺伝子の不活化あるいは弱化であることが強く示唆された。本検証により、NCgI2954遺伝子を欠失させると、キシロースの資化性が向上することが明らかとなった。

【0310】

(8) NCgI2954遺伝子の欠損がキシロースを炭素源とするグルタミン酸生産に与える影響

NCgI2954遺伝子欠損株(*C. glutamicum* ATCC13869 NCgI2954 / pVK9Peftu_xylAB株)と野生株(*C. glutamicum* ATCC13869 / pVK9Peftu_xylAB株)について、キシロースを含有する培地を用いてビオチン制限によるグルタミン酸発酵試験を行い、NCgI2954遺伝子の欠損がキシロースを炭素源とするグルタミン酸生産に与える影響を検証した。

20

【0311】

(8-1) 培養条件および分析条件

グルタミン酸発酵試験は、ジャーファーマンターを用いて行った。各菌株をCM-Dex寒天培地(25 mg/Lカナマイシンを含む)で31.5°C、一晚培養した。培養後の寒天培地から、1 cm四方の菌体をかきとり、250 mLのシード培地をはりこんだジャーファーマンターに植菌した。培養温度31.5°C、pH 7.2(アンモニアガスを添加して調整)、通気量250 mL/min、攪拌数700 rpmにて培養し、培地中のグルコースが完全に消費されるまで培養した。このようにして得られたシード培養液を、最終液量が250 mLとなるように各メイン培地(グルコース、キシロース、およびグルコース/キシロース)にそれぞれ接種[10% (v/v)]し、培養温度31.5°C、pH 7.2(アンモニアガスを添加して調整)、通気量250 mL/min、攪拌数700 rpmにて培養した。

30

【0312】

各時間にて培養液をサンプリングし、培養液のOD620、培養上清のグルコース濃度、キシロース濃度、およびグルタミン酸濃度を測定した。培養液のOD620はU-2900(株式会社日立ハイテクノロジーズ)を用いて測定した。培養上清中のグルタミン酸濃度およびグルコース濃度はバイオテックアナライザAS-310(サクラエスアイ株式会社)を用いて測定した。培養上清中のキシロース濃度はHPLCシステム(ポンプL-7100およびオートサンプラーL-7200(株式会社日立ハイテクノロジーズ); カラムオープンCO 705(ジーエルサイエンス株式会社))を用いて測定した。HPLCの分析条件は以下の通り: カラム SHODEX (SUGAR-GおよびSUGAR SH1011(昭和電工株式会社)); カラム温度 50°C; 溶離液 H₂O; 流速 1.0 mL/min; 検出 RI Detector(株式会社日立ハイテクノロジーズ)。

40

【0313】

(8-2) グルコース培地でのグルタミン酸生産の結果

グルコース培地では、野生株、NCgI2954遺伝子欠損株共に、11時間の培養で培地中のグルコースを完全に消費し、両株間でグルコース消費速度およびグルタミン酸生産性に違いは認められなかった(図5)。

【0314】

50

(8 - 3) キシロース培地でのグルタミン酸生産の結果

キシロース培地では、野生株は11時間培養後も培地中に40 g/Lのキシロースを残し、その時のグルタミン酸の蓄積量は6.4 g/Lであった(図6)。すなわち、野生株は、グルコースに比べてキシロースの資化速度が著しく遅いことが確認された。一方、NCgl2954遺伝子欠損株は、11時間の培養で培地中のキシロースをほぼ完全に消費し、23.6 g/Lのグルタミン酸を蓄積した(図6)。これより、NCgl2954遺伝子の欠失によって、キシロースの資化速度が向上し、グルタミン酸の生産性も向上することが示された。

【 0 3 1 5 】

(8 - 4) グルコース / キシロース培地でのグルタミン酸生産の結果

グルコース / キシロース培地では、野生株は11時間培養後も培地中に11 g/Lのキシロースを残し、その時のグルタミン酸蓄積は16.5 g/Lであった(図7)。これに対し、NCgl2954遺伝子欠損株は、11時間の培養でグルコースおよびキシロースを完全に消費し、24.1 g/Lのグルタミン酸を蓄積した(図7)。このように、NCgl2954遺伝子欠損株では、特にグルコース存在下においても野生株と比較してキシロース消費速度の向上が認められたことから、NCgl2954遺伝子の欠失がグルコースおよびキシロースの同時資化にも効果があることが示された。

【 0 3 1 6 】

(9) NXA経路が導入された*C. glutamicum*の構築

NXA経路の遺伝子が導入された*C. glutamicum*は、プラスミドpVK9Peftu_ccrNXA (WO2013 069634 A1) を用いて形質転換することにより、取得することができる。pVK9Peftu_ccrNXAは、*C. glutamicum*由来EF-Tuプロモーター (Peftu) の下流に*C. crescentus* CB15 (ATCC 19089) 由来のNXA経路をコードするxyIXABCD遺伝子を連結した配列を含む。*C. glutamicum* ATCC13869およびATCC13869 NCgl2954の染色体上に*E. coli*由来のキシロン酸デヒドラターゼをコードするyagF遺伝子を導入し、さらにpVK9Peftu_ccrNXAを用いて形質転換することにより、NXA経路を介してキシロースからL-グルタミン酸を生産できる株を構築した。手順を以下に示す。

【 0 3 1 7 】

(9 - 1) pBS4S xyIB_yagFの構築

C. glutamicum ATCC13869株の染色体上のキシロキナーゼをコードするxyIB遺伝子領域に、*E. coli*由来のキシロン酸デヒドラターゼをコードするyagF遺伝子を導入するため、プラスミドpBS4S xyIB_yagFを以下のようにして構築した。

【 0 3 1 8 】

まず、*C. glutamicum* ATCC13869株の染色体DNAを鋳型にプライマーxyIB_F1 (配列番号27) とxyIB_MR (配列番号28) を用いてPCRを行い、xyIB遺伝子上流の領域を含むDNA断片を増幅した。また、同じく*C. glutamicum* ATCC13869株の染色体DNAを鋳型にプライマーxyIB_MF (配列番号29) とxyIB_R1 (配列番号30) を用いてPCRを行い、xyIB遺伝子下流の領域を含むDNA断片を増幅した。PCR反応はPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを用い、同酵素に付属のプロトコルに従って行った。

【 0 3 1 9 】

上記で得られた二つのDNA断片を、Xba Iで処理したプラスミドpBS4S (特開2007-97573, 米国特許出願公開20050196846号) と混合し、Clontech In-fusion HD Cloning Kitを用い、同キットに付属のプロトコルに従ってin-fusion反応を行った後、この反応液で*E. coli* DH5 株を形質転換した。形質転換体は、LB (40 mg/Lカナマイシンを含む) 寒天培地で37℃、一晚培養して選抜した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、pBS4SにxyIB遺伝子上流と下流の配列が挿入されたプラスミドpBS4S xyIBを取得した。pBS4S xyIBでは、xyIB遺伝子上流の配列と下流の配列の間にXba I認識配列が挿入されている。

【 0 3 2 0 】

続いて、*E. coli* MG1655株の染色体DNAを鋳型にプライマーPcspB_yagF_fw (配列番号31) とyagF_xyIB_rv (配列番号32) を用いてPCRを行い、yagF遺伝子を含むDNA断片を増幅した。また、*C. glutamicum* ATCC13869株の染色体DNAを鋳型にプライマーxyIB_PcspB_f

10

20

30

40

50

w (配列番号 33) と P_{cspB}_rv (配列番号 34) を用いて PCR を行い、cspB 遺伝子のプロモーター領域 (以下、「P_{cspB}」) と記載する。) を含む DNA 断片を増幅した。PCR 反応は、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用い、同酵素に付属のプロトコルに従って行った。

【0321】

上記で得られた二つの DNA 断片を、Xba I で処理したプラスミド pBS4S_{xyIB} と混合し、Clontech In-fusion HD Cloning Kit を用い、同キットに付属のプロトコルに従って in-fusion 反応を行った後、この反応液で E. coli DH5 を形質転換した。形質転換体は、LB (40 mg/L カナマイシンを含む) 寒天培地で 37 °C、一晚培養して選抜した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、P_{cspB} の下流に yagF 遺伝子が連結された配列が xyIB 遺伝子上流の配列と下流の配列の間に挿入されたプラスミド pBS4S_{xyIB_yagF} を取得した。クローニングされた cspB プロモーター (P_{cspB}) および yagF 遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号 47 および 19 に示す。

10

【0322】

(9-2) C. glutamicum の形質転換

電気パルス法により、pBS4S_{xyIB_yagF} で C. glutamicum ATCC13869 株を形質転換し、CM-Dex (25 mg/L カナマイシンを含む) 寒天培地上で 31.5 °C、二晩培養することで、染色体上に pBS4S_{xyIB_yagF} が組み込まれた一点組み換え体を取得した。得られた一点組み換え体を S10 寒天培地に植え継ぎ、S10 寒天培地上で生育し且つカナマイシン感受性を示した株の中から、目的通り yagF 遺伝子が導入された株を PCR により選抜した。このようにして取得した株を ATCC13869+D 株とした。同株では、染色体上の xyIB 遺伝子領域が yagF 遺伝子

20

【0323】

続いて、pVK9Pef_{tu_ccrNXA} で ATCC13869+D 株を形質転換し、CM-Dex (25 mg/L カナマイシンを含む) 寒天培地で選抜することにより、NXA 経路が導入された ATCC13869+D / pVK9Pef_{tu_ccrNXA} 株を取得した。

【0324】

ATCC13869 NCgl2954 株についても上と同様の操作を行い、染色体上に yagF 遺伝子が導入された ATCC13869 NCgl2954+D 株を取得後、本株を pVK9Pef_{tu_ccrNXA} で形質転換することにより、NXA 経路が導入された ATCC13869 NCgl2954+D / pVK9Pef_{tu_ccrNXA} 株を取得した。

30

【0325】

(10) NCgl2954 遺伝子欠損が NXA 経路を介したグルタミン酸生産に与える影響

NXA 経路を介したキシロースからのグルタミン酸生産に対する NCgl2954 遺伝子欠損効果を確認するため、ピオチン制限によるグルタミン酸発酵試験を行った。培養条件および分析条件は (8-1) に記載の通りである。

【0326】

キシロース培地で培養した結果、NCgl2954 遺伝子欠損株は、NCgl2954 遺伝子を有する株と比較し、キシロース消費速度が向上し、グルタミン酸の生産速度も向上した (図 8)。これより、キシロースイソメラーゼおよびキシルロキナーゼの経路を介した場合だけでなく、NXA 経路を介した場合においても、NCgl2954 遺伝子を欠損させることにより、キシロースからのグルタミン酸生産性が向上することが示された。

40

【産業上の利用可能性】

【0327】

本発明によれば、コリネ型細菌のキシロース資化能を向上させることができ、キシロースを含む原料から、L-アミノ酸や核酸等の目的物質を効率よく製造することができる。

【0328】

< 配列表の説明 >

配列番号 1 : プライマー xyIA_SP(2)_4691-80-12

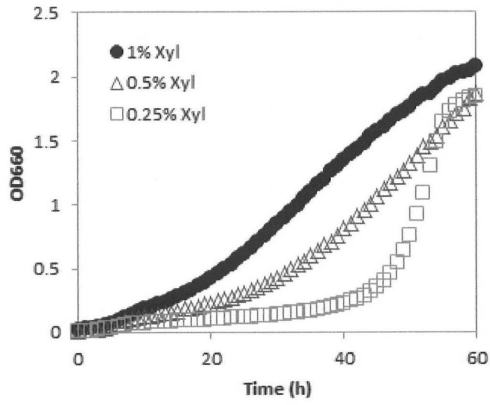
配列番号 2 : プライマー xyIAB_ASP_4691-80-13

配列番号 3 : プライマー EFTU_SP_4691-80-1

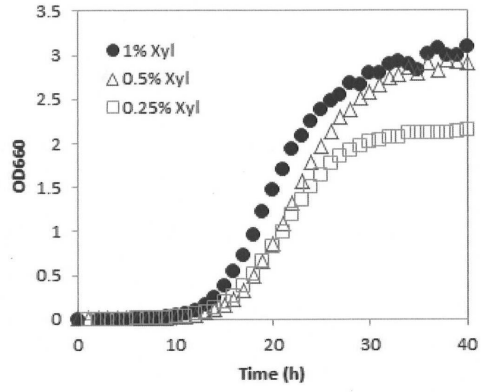
50

- 配列番号 4 : プライマー-EFTU_ASP_4691-80-2
- 配列番号 5 : プライマー-delta_2954_F1
- 配列番号 6 : プライマー-delta_2954_MR
- 配列番号 7 : プライマー-delta_2954_MF
- 配列番号 8 : プライマー-delta_2954_R1
- 配列番号 9 : EF-Tuプロモーター (Peftu) の塩基配列
- 配列番号 10 : E. coli k-12 MG1655株のキシロースオペロン (xylABオペロン) の塩基配列 :
- 配列番号 11 : E. coli k-12 MG1655株のXylAタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 12 : E. coli k-12 MG1655株のXylBタンパク質のアミノ酸配列 10
- 配列番号 13 : C. glutamicum ATCC13869株のNCgl2954遺伝子の塩基配列
- 配列番号 14 : C. glutamicum ATCC13869株のNCgl2954遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 15 : Sphingomonas elodeaのxylB遺伝子の塩基配列
- 配列番号 16 : Sphingomonas elodeaのXylBタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 17 : Sphingomonas elodeaのxylC遺伝子の塩基配列
- 配列番号 18 : Sphingomonas elodeaのXylCタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 19 : Escherichia coli K-12 MG1655株のyagF遺伝子の塩基配列
- 配列番号 20 : Escherichia coli K-12 MG1655株のYagFタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 21 : Sphingomonas elodeaのxylX遺伝子の塩基配列 20
- 配列番号 22 : Sphingomonas elodeaのXylXタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 23 : Bacillus subtilisのycbD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 24 : Bacillus subtilisのYcbDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 25 : C. glutamicum ATCC13869株のyggB遺伝子の塩基配列
- 配列番号 26 : C. glutamicum ATCC13869株のYggBタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 27 ~ 34 : プライマー
- 配列番号 35 : C. glutamicum ATCC13869株のxylB遺伝子の塩基配列
- 配列番号 36 : C. glutamicum ATCC13869株のXylBタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 37 : Caulobacter crescentus CB15株のxylX遺伝子の塩基配列
- 配列番号 38 : Caulobacter crescentus CB15株のXylXタンパク質のアミノ酸配列 30
- 配列番号 39 : Caulobacter crescentus CB15株のxylA遺伝子の塩基配列
- 配列番号 40 : Caulobacter crescentus CB15株のXylAタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 41 : Caulobacter crescentus CB15株のxylB遺伝子の塩基配列
- 配列番号 42 : Caulobacter crescentus CB15株のXylBタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 43 : Caulobacter crescentus CB15株のxylC遺伝子の塩基配列
- 配列番号 44 : Caulobacter crescentus CB15株のXylCタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 45 : Caulobacter crescentus CB15株のxylD遺伝子の塩基配列
- 配列番号 46 : Caulobacter crescentus CB15株のXylDタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 47 : cspBプロモーター (PcspB) の塩基配列

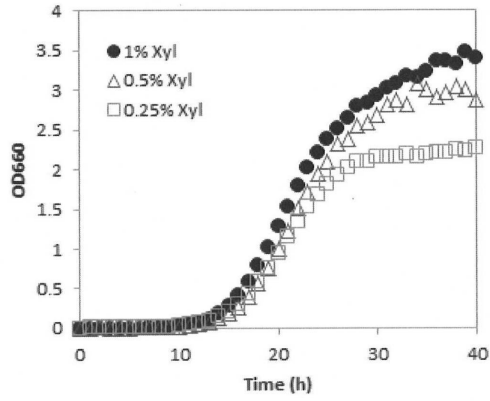
【 図 1 】



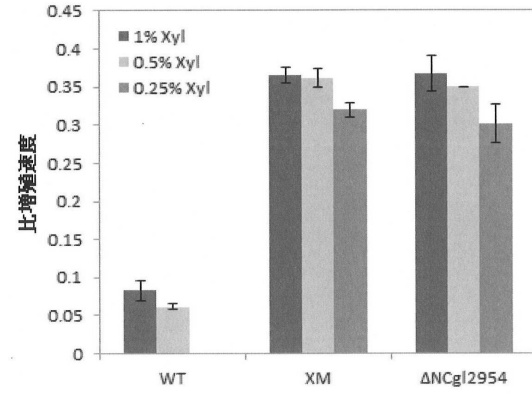
【 図 3 】



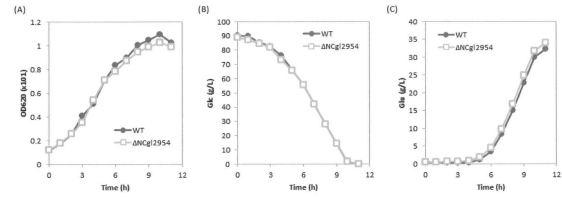
【 図 2 】



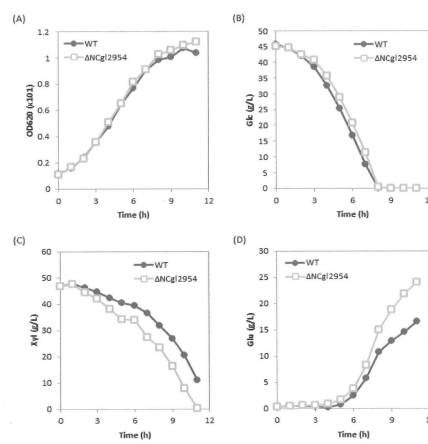
【 図 4 】



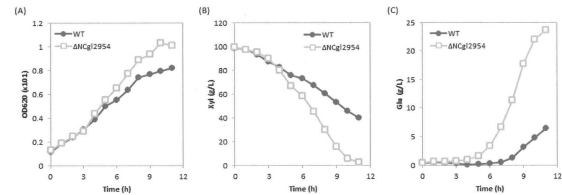
【 図 5 】



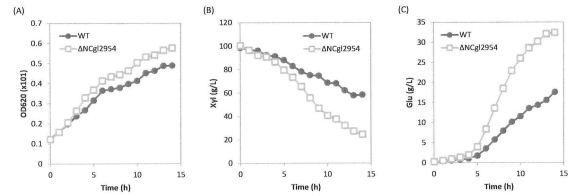
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【配列表】

0006519476000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 P	13/08	(2006.01)	C 1 2 P	13/08	A
C 1 2 N	15/77	(2006.01)	C 1 2 N	15/77	Z

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2013/069634(WO, A1)
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011年12月, Vol.92, No.5, p.985-996
J. Biotechnol., 2010年 9月 1日, Vol.149, No.3, p.173-182

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00 - 15/90
C 1 2 P 1/00 - 41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq