

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6919566号
(P6919566)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月28日(2021.7.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 B
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00

請求項の数 23 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2017-538140 (P2017-538140)	(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
(86) (22) 出願日	平成28年9月2日(2016.9.2)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/075896	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(87) 国際公開番号	W02017/039001	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
(87) 国際公開日	平成29年3月9日(2017.3.9)	(74) 代理人	100169041 弁理士 堺 繁嗣
審査請求日	令和1年7月3日(2019.7.3)	(72) 発明者	笹原 綾子 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
(31) 優先権主張番号	特願2015-175112 (P2015-175112)		
(32) 優先日	平成27年9月4日(2015.9.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 γ -グルタミルバリングリシンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

γ b d K 遺伝子にコードされるタンパク質の活性が非改変株と比較して低下するように改変され、且つ、 γ -グルタミルバリン合成酵素をコードする遺伝子を有する細菌であって、

前記 γ -グルタミルバリン合成酵素における γ -グルタミルグリシン合成酵素活性に対する γ -グルタミルバリン合成酵素活性の比率が3.0以上である、細菌。

【請求項2】

前記タンパク質が、下記(a)、(b)、または(c)に記載のタンパク質である、請求項1に記載の細菌：

(a) 配列番号16に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号16に示すアミノ酸配列において、1~10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含み、且つ、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号16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、且つ、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有するタンパク質。

【請求項3】

前記タンパク質の活性が、 γ b d K 遺伝子の発現を低下させることにより、または γ b d K 遺伝子を破壊することにより、低下した、請求項1または2に記載の細菌。

【請求項4】

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、下記 (a)、(b)、または (c) に記載のタンパク質である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌：

- (a) 配列番号 1 8、2 0、または 2 2 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (b) 配列番号 1 8、2 0、または 2 2 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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含み、且つ、 - グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質；
- (c) 配列番号 1 8、2 0、または 2 2 に示すアミノ酸配列に対し 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 - グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、野生型グルタミン酸 - システインリガーゼにおいて下記より選ばれる 1 またはそれ以上のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基に変異を有し、且つ、 - グルタミルバリン合成酵素活性を有する変異型グルタミン酸 - システインリガーゼであって：

L135、Q144、Y241、N243、Y300、

前記野生型グルタミン酸 - システインリガーゼが、下記 (a)、(b)、又は (c) に記載のタンパク質である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌：

- (a) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (b) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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含むタンパク質；
- (c) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列に対し 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 6】

前記変異が、下記より選ばれる 1 またはそれ以上の変異に相当する変異を含む、請求項 5 に記載の細菌：

L135 (I, F, M, V, G, A, W, K, H, R, C, N, S, T)、
 Q144 (F, A, N, S, D, T, R, H, G, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、
 Y241 (A)、
 N243 (I, W, K, R, H)、
 Y300 (A, H, R, K)。

【請求項 7】

前記変異が、下記のいずれかの変異に相当する変異を含む、請求項 5 または 6 に記載の細菌：

L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135F/N243W、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/N243F、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243Y、L135M/N243R、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144R/N243F、Q144D/N243W、Q144D/N243F、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144I、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135K/Q144L、L135H/Q144L、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135Q/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

【請求項 8】

前記変異が、下記のいずれかの変異に相当する変異を含む、請求項 5 または 6 に記載の細菌：

L135 (I, M, V, G, A, K, H, C, N, S, T)、
 Q144 (F, A, S, D, T, R, H, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、

N243 (R, H)、
 Y300 (R, K)、
 L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144D/N243W、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

【請求項 9】

さらに、gshA 遺伝子にコードされるタンパク質の活性が非改変株と比較して低下するように改変されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 10】

さらに、-グルタミルトランスフェラーゼの活性が非改変株と比較して低下するように改変されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 11】

グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子を有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 12】

エシェリヒア (Escherichia) 属細菌である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 13】

エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 14】

-Glu-Val-Gly および / またはその塩の製造方法であって、
 請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の細菌を発現宿主として、-グルタミルバリン合成酵素を得る工程、および
 前記 -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を、Glu、Val、および Gly に作用させることにより、-Glu-Val-Gly を生成する工程を含む、方法。

【請求項 15】

前記 -グルタミルバリン合成酵素が、精製酵素である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 -グルタミルバリン合成酵素が、固定化酵素である、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 -グルタミルバリン合成酵素が、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の細菌の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

-Glu-Val-Gly および / またはその塩の製造方法であって、
 -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を、Glu、Val、および Gly に作用させることにより、-Glu-Val-Gly を生成する工程を含み、
 前記 -グルタミルバリン合成酵素が、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の細菌の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、方法。

【請求項 19】

前記グルタチオン合成酵素が前記細菌を発現宿主として得られたものである、請求項 1

10

20

30

40

50

4 ~ 18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記グルタチオン合成酵素が、該酵素を有する微生物の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、請求項14 ~ 19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記 - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素が、請求項1 ~ 13のいずれか1項に記載の細菌の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、請求項14、18、または19に記載の方法。

【請求項22】

前記 -Glu-Val-Glyを生成する工程がATPの存在下で実施される、請求項14 ~ 21のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項23】

前記 -Glu-Val-Glyを生成する工程が2価の金属イオンの存在下で実施される、請求項14 ~ 22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】

【0001】

本発明は、 - グルタミルバリン合成酵素 (-Glu-Val合成酵素) の発現宿主として有用な微生物、及び同微生物で発現させた - グルタミルバリン合成酵素を用いた - グルタミルバリングリシンの製造法に関する。 - グルタミルバリングリシンは、食品及び医薬品等の分野で有用である。 20

【背景技術】

【0002】

- グルタミルバリングリシン (L- -glutamyl-L-valyl-glycine ; 以下、「 -Glu-Val-Gly」ともいう。) のようなある種のペプチドは、カルシウム受容体活性化作用を有している (特許文献1)。このようなカルシウム受容体活性化作用を有するペプチドは、飲食品にコク味を付与できること (特許文献2)、低脂肪食品の呈味、特に脂肪様濃厚感及び滑らかさ、を改善できること (特許文献3)、及び、甘味物質のボディ感改善し、甘味物質特有の苦味を改善できること (特許文献4) が知られている。

【0003】

また、前記のようなペプチドは、下痢 (特許文献5)、糖尿病 (特許文献6) の予防又は治療効果、及び、消化管の重炭酸分泌促進効果 (特許文献7) を有することが知られている。 30

【0004】

一般に、 - グルタミルトリペプチドの製造法としては、化学合成法および酵素法が知られている。化学合成法としては、N-保護グルタミン酸無水物を利用して、ジペプチドから選択的に - グルタミルトリペプチドを得る方法が知られている (特許文献8)。酵素法としては、グルタミン酸 - システインリガーゼ (GSHA) およびグルタチオン合成酵素 (GSHB) を利用する方法が知られている (特許文献9、10)。また、酵素法としては、 - グルタミルトランスフェラーゼを利用し、Val-Glyを - グルタミル化して -Glu-Val-Glyを生成する方法も知られている (特許文献11)。 40

【0005】

グルタミン酸 - システインリガーゼ (GSHA) は、GluとCysとATPを基質として、 -Glu-CysとADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を有する酵素 (EC 6.3.2.2) として知られている。GSHAは、通常、酵素反応にMg²⁺やMn²⁺等の2価の金属イオンを要求する。

【0006】

エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) のGSHAは、Mg²⁺またはMn²⁺の存在下でGluと各種のアミノ酸およびATPを基質として - グルタミルジペプチドを生成するが、補因子となる金属イオンの種類が基質特異性に影響することが知られている (非特許文献1)。具体的には、Mg²⁺を補因子とした場合には、 -Glu-Gly生成活性は、Vmax = 251 mol/mg/ 50

hr, $K_m = 17.6$ mMであるのに対して、 $-Glu-Val$ 生成活性は、 $V_{max} = 59$ mol/mg/hr, $K_m = 27.1$ mMであると報告されている。すなわち、 V_{max}/K_m を活性の指標として比較すれば、 Mg^{2+} を補因子とした場合の $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.15と算出できる。一方、 Mn^{2+} を補因子とした場合には、 $-Glu-Gly$ 生成活性は、 $V_{max} = 39$ mol/mg/hr, $K_m = 1.7$ mMであるのに対して、 $-Glu-Val$ 生成活性は、 $V_{max} = 95$ mol/mg/hr, $K_m = 21$ mMであると示されている。すなわち、 V_{max}/K_m を活性の指標として比較すれば、 Mn^{2+} を補因子とした場合の $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.20と算出できる。また、エシェリヒア・コリ由来GSHAの基質特異性に関しては、他の活性測定例も挙げることができる（非特許文献2）。同文献では、 Mg^{2+} の存在下でGluと各種のアミノ酸およびATPを基質として反応を行い、 $-Glu-Gly$ 生成活性を100%とした場合には、 $-Glu-Val$ 生成活性は52%程度であると報告されている。すなわち、これら相対活性に基づいて比較をすれば、 $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.52と算出できる。このように、エシェリヒア・コリのGSHAの $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.15~0.5程度であると言える。また、エシェリヒア・コリのGSHAに各種変異を導入することにより、 $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率が高い変異型GSHAを取得したことが報告されている（特許文献12）。

10

【0007】

また、グラム陰性細菌の1種であるプロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) 由来のGSHAは、 Mg^{2+} または Mn^{2+} を補因子とし、Gluと各種のアミノ酸およびATPを基質として $-Glu-Gly$ 生成活性を100%とした場合には、 $-Glu-Val$ 生成活性は14.5%、 $-Glu-Val$ 生成活性は7.2%であると報告されている。すなわち、これら相対活性に基づいて比較をすれば、 $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.50と算出できる。

20

【0008】

また、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) 由来の $-glutamylcysteine$ synthetase- $glutathione$ synthetase ($-GCS-GS$) は、 Mg^{2+} の存在下でGluと各種のアミノ酸およびATPを基質として $-Glu-Gly$ 生成活性を100%とした場合に、 $-Glu-Val$ 生成活性は21%程度であると報告されている（非特許文献2）。すなわち、これら相対活性に基づいて比較をすれば、 $-Glu-Gly$ 生成活性に対する $-Glu-Val$ 生成活性の比率は0.21と算出できる。

30

【0009】

また、マイクロコッカス・グルタミカス (*Micrococcus glutamicus*) の培養液を各種カラムにかけペプチド等を分離し、 $-Glu-Glu$ 、 $-Glu-Val$ 、 $-Glu-Leu$ を単離したと報告されている（非特許文献4）。しかしながら、これら $-Glu-Gly$ 生成活性については報告されていない。

【0010】

エシェリヒア・コリのybdK遺伝子にコードされるタンパク質 (YBDK) は、 $-Glu-Cys$ 生成活性を有することが報告されている（非特許文献5）。しかしながら、エシェリヒア・コリのYBDKの $-Glu-Cys$ 以外の $-Glu-Gly$ 生成活性については報告されていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】W02007/055388

【特許文献2】W02007/055393

【特許文献3】W02008/139945

【特許文献4】W02008/139946

【特許文献5】W02008/139947

50

【特許文献 6】W02009/107660

【特許文献 7】W02009/119554

【特許文献 8】特開平08-119916

【特許文献 9】W02013/054447

【特許文献 10】特開2012-85637

【特許文献 11】W02013/051685

【特許文献 12】W02015/115612

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献 1】Brenda S. Kelly et al., J. Biol. Chem., 277, 50-58, 2002

10

【非特許文献 2】Kino, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 352, 351-359, 2007

【非特許文献 3】Kumagai, H. et al., Agric. Biol. Chem., 46, 1301-1309, 1982

【非特許文献 4】Ronald A. Vitali et al., J. Biol. Chem., 240, 2508-2511, 1965

【非特許文献 5】Lehmann C. et al., Proteins. 2004 Aug 1;56(2):376-83.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、 α -グルタミルバリン合成酵素 (α -Glu-Val合成酵素)の発現宿主として有用な微生物、及び同微生物で発現させた α -グルタミルバリン合成酵素を用いた α -Glu-Val-Glyの製造法を提供することを課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、エシェリヒア・コリ(YBDK)が α -Glu-Gly生成活性を有すること、およびYBDKを欠損させたエシェリヒア・コリが α -Glu-Val合成酵素の発現宿主として有用であることを見出し、本発明を完成させた。

【0015】

すなわち本発明は、以下のとおり例示できる。

[1]

y b d K 遺伝子にコードされるタンパク質の活性が非改変株と比較して低下するように改変され、且つ、 α -グルタミルバリン合成酵素をコードする遺伝子を有する細菌であって、

30

前記 α -グルタミルバリン合成酵素における α -グルタミルグリシン合成酵素活性に対する α -グルタミルバリン合成酵素活性の比率が 3.0 以上である、細菌。

[2]

前記タンパク質が、下記(a)、(b)、または(c)に記載のタンパク質である、前記細菌：

(a) 配列番号 16 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 16 に示すアミノ酸配列において、1~10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含み、且つ、 α -グルタミルグリシン合成酵素活性を有するタンパク質；

40

(c) 配列番号 16 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、且つ、 α -グルタミルグリシン合成酵素活性を有するタンパク質。

[3]

前記タンパク質の活性が、y b d K 遺伝子の発現を低下させることにより、または y b d K 遺伝子を破壊することにより、低下した、前記細菌。

[4]

前記 α -グルタミルバリン合成酵素が、下記(a)、(b)、または(c)に記載のタンパク質である、前記細菌：

(a) 配列番号 18、20、または 22 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

50

(b) 配列番号 18、20、または 22 に示すアミノ酸配列において、1～10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含み、且つ、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質；

(c) 配列番号 18、20、または 22 に示すアミノ酸配列に対し 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質。

[5]

前記 γ -グルタミルバリン合成酵素が、野生型グルタミン酸 - システインリガーゼにおいて下記より選ばれる 1 またはそれ以上のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基に変異を有し、且つ、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性を有する変異型グルタミン酸 - システインリガーゼである、前記細菌：

L135、Q144、Y241、N243、Y300。

[6]

前記変異が、下記より選ばれる 1 またはそれ以上の変異に相当する変異を含む、前記細菌：

L135 (I, F, M, V, G, A, W, K, H, R, C, N, S, T)、
Q144 (F, A, N, S, D, T, R, H, G, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、
Y241 (A)、
N243 (I, W, K, R, H)、
Y300 (A, H, R, K)。

[7]

前記変異が、下記のいずれかの変異に相当する変異を含む、前記細菌：

L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135F/N243W、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/N243F、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243Y、L135M/N243R、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144R/N243F、Q144D/N243W、Q144D/N243F、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144I、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135K/Q144L、L135H/Q144L、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135Q/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

[8]

前記変異が、下記のいずれかの変異に相当する変異を含む、前記細菌：

L135 (I, M, V, G, A, K, H, C, N, S, T)、
Q144 (F, A, S, D, T, R, H, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、
N243 (R, H)、
Y300 (R, K)、
L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144D/N243W、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

[9]

前記野生型グルタミン酸 - シス테인リガーゼが、下記 (a)、(b)、又は (c) に記載のタンパク質である、前記細菌：

(a) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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含むタンパク質；

(c) 配列番号 2 4 に示すアミノ酸配列に対し 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質。

[1 0]

さらに、g s h A 遺伝子にコードされるタンパク質の活性が非改変株と比較して低下するように改変されている、前記細菌。

10

[1 1]

さらに、- グルタミルトランスフェラーゼの活性が非改変株と比較して低下するように改変されている、前記細菌。

[1 2]

グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子を有する、前記細菌。

[1 3]

エシェリヒア (Escherichia) 属細菌である、前記細菌。

[1 4]

エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である、前記細菌。

20

[1 5]

-Glu-Val-Gly および / またはその塩の製造方法であって、

- グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を、Glu、Val、および Gly に作用させることにより、-Glu-Val-Gly を生成する工程を含み、

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、前記細菌を発現宿主として得られたものである、方法。

[1 6]

前記グルタチオン合成酵素が前記細菌を発現宿主として得られたものである、前記方法。

。

[1 7]

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、精製酵素である、前記方法。

30

[1 8]

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、固定化酵素である、前記方法。

[1 9]

前記 - グルタミルバリン合成酵素が、前記細菌の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、前記方法。

[2 0]

前記グルタチオン合成酵素が、該酵素を有する微生物の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、前記方法。

[2 1]

前記 - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素が、前記細菌の培養物、培養菌体、または該菌体の処理物に含有されるものである、前記方法。

40

[2 2]

前記工程が ATP の存在下で実施される、前記方法。

[2 3]

前記工程が 2 価の金属イオンの存在下で実施される、前記方法。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

以下、本発明を詳細に説明する。尚、本明細書において、アミノ酸は特記しない限り L - 体である。

50

【 0 0 1 7 】

< 1 > 本発明の微生物

本発明の微生物は、ybdK遺伝子にコードされるタンパク質（「YBDK」ともいう）の活性が低下するように改変された細菌である。本発明の微生物は、具体的には、YBDKの活性が非改変株と比較して低下するように改変された細菌である。本発明の微生物は、例えば、下記のような細菌をYBDKの活性が低下するように改変することにより取得することができる。

【 0 0 1 8 】

細菌としては、例えば、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）に属する細菌、コリネ型細菌、バチルス（Bacillus）属細菌が挙げられる。

10

【 0 0 1 9 】

腸内細菌科に属する細菌としては、エシェリヒア（Escherichia）属、エンテロバクター（Enterobacter）属、パントエア（Pantoea）属、クレブシエラ（Klebsiella）属、セラチア（Serratia）属、エルビニア（Erwinia）属、フォトラプダス（Photobacterium）属、プロビデンシア（Providencia）属、サルモネラ（Salmonella）属、モルガネラ（Morganella）等の属に属する細菌が挙げられる。具体的には、NCBI（National Center for Biotechnology Information）のデータベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>）で用いられている分類法により腸内細菌科に分類されている細菌を用いることができる。

【 0 0 2 0 】

エシェリヒア属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりエシェリヒア属に分類されている細菌が挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、Neidhardtらの著書（Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of Escherichia coli K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.）に記載されたものが挙げられる。エシェリヒア属細菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）が挙げられる。エシェリヒア・コリとしては、例えば、W3110株（ATCC 27325）やMG1655株（ATCC 47076）等のエシェリヒア・コリK-12株；エシェリヒア・コリK5株（ATCC 23506）；BL21(DE3)株等のエシェリヒア・コリB株；およびそれらの派生株（例えば、K-12株由来のJM109株）が挙げられる。

20

30

【 0 0 2 1 】

エンテロバクター属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりエンテロバクター属に分類されている細菌が挙げられる。エンテロバクター属細菌としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランズ（Enterobacter agglomerans）やエンテロバクター・アエロゲネス（Enterobacter aerogenes）が挙げられる。エンテロバクター・アグロメランズとして、具体的には、例えば、エンテロバクター・アグロメランズATCC12287株が挙げられる。エンテロバクター・アエロゲネスとして、具体的には、例えば、エンテロバクター・アエロゲネスATCC13048株、NBRC12010株（Biotechnol Bioeng. 2007 Mar 27; 98(2) 340-348）、AJ110637株（FERM BP-10955）が挙げられる。また、エンテロバクター属細菌としては、例えば、欧州特許出願公開EP0952221号明細書に記載されたものが挙げられる。なお、Enterobacter agglomeransには、Pantoea agglomeransと分類されているものも存在する。

40

【 0 0 2 2 】

パントエア属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりパントエア属に分類されている細菌が挙げられる。パントエア属細菌としては、例えば、パントエア・アナナティス（Pantoea ananatis）、パントエア・スチュワールティ（Pantoea stewartii）、パントエア・アグロメランズ（Pantoea agglomerans）、パントエア・シトレア（Pantoea citrea）が挙げられる。パントエア・アナナティスとして、具体的には、例えば、パントエア・アナナティスLMG20103株、AJ13355株（FERM BP-6614

50

)、AJ13356株 (FERM BP-6615)、AJ13601株 (FERM BP-7207)、SC17株 (FERM BP-11091)、SC17(0)株 (VKPM B-9246)、及びSC17sucA株 (FERM BP-8646)が挙げられる。なお、エンテロバクター・アグロメランスのある種のもの、最近、16S rRNAの塩基配列分析等に基づき、パントエア・アグロメランス、パントエア・アナナティス、パントエア・ステワルティイ等に再分類された (Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993))。本発明において、パントエア属細菌には、このようにパントエア属に再分類された細菌も含まれる。

【0023】

エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロボラ (Erwinia amylovora)、エルビニア・カロトボラ (Erwinia carotovora)が挙げられる。クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラ (Klebsiella planticola)が挙げられる。

10

【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、およびマイクロバクテリウム (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)

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・クレナタム (Corynebacterium crenatum)

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・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) (Brevibacterium divaricatum (Corynebacterium glutamicum))

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・ラクトファーメンタム (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))

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)

マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム (Microbacterium ammoniaphilum)

20

30

40

【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 crenatum AS1.542

Corynebacterium callunae ATCC 15991

50

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

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

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

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14020

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

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*) 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、従来プレビ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(19 91)) 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))。

【 0 0 2 8 】

バチルス属細菌としては、特に制限されないが、微生物学の専門家に知られている分類によりバチルス属に分類される細菌が挙げられる。バチルス属細菌としては、例えば、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・ポリミキサ (*Bacillus polymixa*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) が挙げられる。バチルス・サブチリスとして、具体的には、例えば、バチルス・サブチリス168 Marburg株 (ATCC 6051) やバチルス・サブチリスPY79株 (Plasmid, 1984, 12, 1-9) が挙げられる。バチルス・アミロリケファシエンスとして、具体的には、例えば、バチルス・アミロリケファシエンスT株 (ATCC 23842) やバチルス・アミロリケファシエンスN株 (ATCC 23845) が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

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atalogに記載されている。また、これらの菌株は、例えば、各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。また、BL21(DE3)株は、例えば、ライフテクノロジー社より入手可能である (製品番号C6000-03)。また、BLR(DE3)株は、例えば、メルクミリアポア社より入手可能である (製品番号 69053)。また、JM109株は、例えば、タカラバイオ社より入手可能である (製品番号 9052)。

【 0 0 3 0 】

YBDKは、GluとGlyとATPを基質として、 γ -Glu-GlyとADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を有するタンパク質である。同活性を、「 γ -グルタミルグリシン合成酵素 (γ -glutamylglycine synthetase) 活性」、「 γ -Glu-Gly生成活性」、または「 γ -Glu-Gly合成活性」ともいう。

【 0 0 3 1 】

また、GluとValとATPを基質として、 γ -Glu-ValとADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を、「 γ -グルタミルバリン合成酵素 (γ -glutamylvaline synthetase) 活性」、「 γ -Glu-Val生成活性」、または「 γ -Glu-Val合成活性」ともいう。

【 0 0 3 2 】

また、GluとCysとATPを基質として、 γ -Glu-CysとADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を、「 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -glutamylcysteine synthetase) 活性」ともいう。

【 0 0 3 3 】

これらの酵素活性は、例えば、適切な条件で酵素を基質に作用させた際の γ -グルタミルジペプチドの生成に基づいて測定することができる。これらの酵素活性は、例えば、2価の金属イオンの存在下で測定することができる。2価の金属イオンとしては、 Mg^{2+} や Mn^{2+} が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

Mn^{2+} 存在下での γ -グルタミルバリン合成酵素活性および γ -グルタミルグリシン合成酵素活性の測定条件としては、実施例3に記載の条件が挙げられる。すなわち、具体的な活性測定条件は以下の通りである。 γ -グルタミルバリン合成酵素活性は、反応液(10mM グルタミン酸、10mM バリン、10mM ATP、10mM $MnSO_4$ 、100mM Tris-HCl (pH7.0~9.0))に適切な量の酵素を添加し、30℃で30分間反応を行い、生成した γ -Glu-Val量に基づいて測定することができる。本発明においては、本条件で1分間に1 μ molの γ -Glu-Valを生成する酵素活性を1 Uの γ -グルタミルバリン合成酵素活性(Mn^{2+} 存在下)とする。同様に、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性は、反応液(10mM グルタミン酸、10mM グリシン、10mM ATP、10mM $MnSO_4$ 、100mM Tris-HCl (pH7.0~9.0))に適切な量の酵素を添加し、30℃で30分間反応を行い、生成した γ -Glu-Gly量に基づいて測定することができる。本発明においては、本条件で1分間に1 μ molの γ -Glu-Glyを生成する酵素活性を1 Uの γ -グルタミルグリシン合成酵素活性(Mn^{2+} 存在下)とする。

【 0 0 3 5 】

また、10mM $MnSO_4$ に代えて10mM $MgSO_4$ を含有する反応液を用いることで、 Mg^{2+} 存在下での γ -グルタミルバリン合成酵素活性および γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を測定することができる。すなわち、同反応液を用いて上記と同様の条件で1分間に1 μ molの γ -Glu-Valを生成する酵素活性を1 Uの γ -グルタミルバリン合成酵素活性(Mg^{2+} 存在下)とする。同様に、同反応液を用いて上記と同様の条件で1分間に1 μ molの γ -Glu-Glyを生成する酵素活性を1 Uの γ -グルタミルグリシン合成酵素活性(Mg^{2+} 存在下)とする。

【 0 0 3 6 】

また、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性(比活性)に対する γ -グルタミルバリン合成酵素活性(比活性)の比率(すなわち、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性の比活性/ γ -グルタミルグリシン合成酵素活性の比活性)を「Val選択性」ともいう。Val選択性は、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性および γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を測定し、算出できる。

【 0 0 3 7 】

YBDKは、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有する限り、 γ -グルタミルグリシン以外の γ -グルタミルジペプチドを生成する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。すなわち、例えば、YBDKは、 γ -グルタミルバリン合成酵素(γ -glutamylvaline synthetase)活性を有していてもよく、有していなくてもよい。また、例えば、YBDKは

10

20

30

40

50

、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -glutamylcysteine synthetase) 活性を有していてもよく、有していなくてもよい。YBDKは、適切な条件で γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有していればよい。YBDKは、例えば、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下、特に Mn^{2+} の存在下、で γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有していてもよい。また、YBDKは、例えば、pH7.0~9.0の少なくともいずれかのpH、特にpH7.0、で γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有していてもよい。

【0038】

YBDKが γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有する限り、YBDKにおけるVal選択性は特に制限されない。YBDKは、後述する γ -グルタミルバリン合成酵素よりも低いVal選択性を示すものであってよい。YBDKにおいて、Val選択性は、例えば、3.0未満であってよい。YBDKは、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下、特に Mn^{2+} の存在下、で上記例示したVal選択性を示すものであってよい。また、YBDKは、例えば、pH7.0~9.0の少なくともいずれかのpH、特にpH7.0、で上記例示したVal選択性を示すものであってよい。

10

【0039】

E. coli K-12 MG1655のybdK遺伝子の塩基配列およびそれによりコードされるYBDKのアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号15および16に示す。すなわち、YBDKは、例えば、配列番号16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であってよい。また、YBDKは、例えば、配列番号15に示す塩基配列を有する遺伝子にコードされるタンパク質であってよい。なお、「(アミノ酸または塩基)配列を有する」という表現は、当該「(アミノ酸または塩基)配列を含む」場合および当該「(アミノ酸または塩基)配列からなる」場合を包含する。

20

【0040】

YBDKは、元の機能が維持されている限り、上記例示したYBDK(例えば、配列番号16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質)のバリエーションであってよい。同様に、ybdK遺伝子は、元の機能が維持されている限り、上記例示したybdK遺伝子(例えば、配列番号15に示す塩基配列を有する遺伝子)のバリエーションであってよい。なお、こ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。すなわち、「ybdK遺伝子」という用語は、上記例示したybdK遺伝子に加えて、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、「YBDK」という用語は、上記例示したYBDKに加えて、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ybdK遺伝子やYBDKのホモログや人為的な改変体が挙げられる。

30

【0041】

「元の機能が維持されている」とは、遺伝子やタンパク質のバリエーションが、元の遺伝子やタンパク質の機能(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、YBDKにあっては、タンパク質のバリエーションが、 γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有することをいう。同バリエーションが γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有する限り、基質特異性、2価の金属イオンの要求性、pH依存性等の、同バリエーションの酵素学的性質は、いずれも、元のタンパク質の酵素学的性質と同一であってもよく、同一でなくてもよい。例えば、同バリエーションは、 γ -グルタミルグリシン以外の γ -グルタミルジペプチドを生成する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。また、例えば、同バリエーションは、上記例示したVal選択性を示してもよい。また、「元の機能が維持されている」とは、ybdK遺伝子にあっては、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(すなわち γ -グルタミルグリシン合成酵素活性を有するタンパク質)をコードすることをいう。

40

【0042】

以下、保存的バリエーションについて例示する。

【0043】

上記ybdK遺伝子またはYBDKのホモログとしては、例えば、上記塩基配列またはアミノ酸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取得される遺伝子またはタンパク質が挙げられる。また、上記ybdK遺伝子のホモログは、

50

例えば、各種微生物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。

【0044】

YBDKは、元の機能が維持されている限り、上記アミノ酸配列（例えば、配列番号16に示すアミノ酸配列）において、1若しくは数個の位置での1若しくは数個のアミノ酸が置換、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であってもよい。なお上記「1若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や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。

10

【0045】

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、タンパク質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。

20

【0046】

また、YBDK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アミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、本明細書において、「相同性」（homology）は、「同一性」（identity）を意味する。

30

【0047】

また、YBDKは、元の機能が維持されている限り、上記塩基配列（例えば、配列番号15に示す塩基配列）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にコードされるタンパク質であってもよい。そのようなプローブは、例えば、上記塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、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。「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回洗浄する条件を挙げることができる。また、例えば、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

40

50

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。

【0048】

2つの配列間の配列同一性のパーセンテージは、例えば、数学的アルゴリズムを用いて決定できる。このような数学的アルゴリズムの限定されない例としては、Myers及びMiller (1988) CABIOS 4:11 17のアルゴリズム、Smith et al (1981) Adv. Appl. Math. 2:482の局所ホモロジーアルゴリズム、Needleman及びWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 453のホモロジーアライメントアルゴリズム、Pearson及びLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444 2448の類似性を検索する方法、Karlin及びAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 5877に記載されているような、改良された、Karlin及びAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264のアルゴリズムが挙げられる。

10

【0049】

これらの数学的アルゴリズムに基づくプログラムを利用して、配列同一性を決定するための配列比較(アラインメント)を行うことができる。プログラムは、適宜、コンピュータにより実行することができる。このようなプログラムとしては、特に限定されないが、PC/GeneプログラムのCLUSTAL (Intelligenetics, Mountain View, Calif. から入手可能)、ALIGNプログラム (Version 2.0)、並びにWisconsin Genetics Software Package, Version 8 (Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USAから入手可能)のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、及びTFASTAが挙げられる。これらのプログラムを用いたアライメントは、例えば、初期パラメーターを用いて行うことができる。CLUSTALプログラムについては、HigGlns et al. (1988) Gene 73:237 244 (1988)、HigGlns et al. (1989) CABIOS 5:151 153、Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881 90、Huang et al. (1992) CABIOS 8:155 65、及びPearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307 331によく記載されている。

20

【0050】

対象のタンパク質をコードするヌクレオチド配列と相同性があるヌクレオチド配列を得るために、具体的には、例えば、BLASTヌクレオチド検索を、BLASTNプログラム、スコア=100、ワード長=12にて行うことができる。対象のタンパク質と相同性があるアミノ酸配列を得るために、具体的には、例えば、BLASTタンパク質検索を、BLASTXプログラム、スコア=50、ワード長=3にて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索やBLASTタンパク質検索については、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。また、比較を目的としてギャップを加えたアライメントを得るために、Gapped BLAST (BLAST 2.0)を利用できる。また、PSI-BLAST (BLAST 2.0)を、配列間の離間した関係を検出する反復検索を行うのに利用できる。Gapped BLASTおよびPSI-BLASTについては、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389を参照されたい。BLAST、Gapped BLAST、またはPSI-BLASTを利用する場合、例えば、各プログラム(例えば、ヌクレオチド配列に対してBLASTN、アミノ酸配列に対してBLASTX)の初期パラメーターが用いられ得る。アライメントは、手動にて行われてもよい。

30

【0051】

2つの配列間の配列同一性は、2つの配列を最大一致となるように整列したときに2つの配列間で一致する残基の比率として算出される。

40

【0052】

本発明の微生物は、さらに、
 - グルタミルシステイン合成酵素の活性が低下するように改変されていてもよい。
 「 - グルタミルシステイン合成酵素」とは、
 - グルタミルシステイン合成酵素活性を有するタンパク質をいう。
 - グルタミルシステイン合成酵素を、「グルタミン酸 - システインリガーゼ」または「GSHA」ともいう。
 - グルタミルシステイン合成酵素は、さらに、
 - グルタミルバリン合成酵素活性や
 - グルタミルグリシン合成酵素活性等の、
 - グルタミルシステイン以外の
 - グルタミルジペプチドを生成する活性を有し得る。
 - グルタミルシステイン合成酵素は、後述する
 - グルタミルバリン合成酵素よりも低いVal選択性を示すものであってよい。
 - グルタミルシステイン合成酵素において、Val選択性は、例えば、3.0未満であってよい。
 - グルタミル

50

システイン合成酵素としては、gshA遺伝子にコードされるGshAタンパク質が挙げられる。一例として、エシェリヒア・コリのgshA遺伝子の塩基配列及び同遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号23及び24に示す。 - グルタミルシステイン合成酵素は、 - グルタミルシステイン合成酵素活性を有する限り、上記 - グルタミルシステイン合成酵素のバリエーションであってもよい。 - グルタミルシステイン合成酵素やそれをコードする遺伝子のバリエーションについては、上述したYBDKやybdK遺伝子の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。なお、「gshA遺伝子」および「GshAタンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示したgshA遺伝子およびGshAタンパク質に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。

【0053】

本発明の微生物は、さらに、 - グルタミルペプチドの分解に關与するタンパク質の活性が低下するように改変されていてもよい。 - グルタミルペプチドの分解に關与するタンパク質としては、 - グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) が挙げられる。GGTの活性が低下することにより、 -Glu-Valおよび -Glu-Val-Glyの分解を抑制することが出来る。GGTとしては、ggt遺伝子にコードされるGgtタンパク質が挙げられる。一例として、エシェリヒア・コリのggt遺伝子の塩基配列及び同遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号25及び26に示す。GGTは、GGT活性を有する限り、上記GGTのバリエーションであってもよい。GGTやそれをコードする遺伝子のバリエーションについては、上述したYBDKやybdK遺伝子の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。なお、「ggt遺伝子」および「Ggtタンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示したggt

【0054】

本発明の微生物を構築するための改変の順序は特に制限されない。

【0055】

以下、YBDK、GSHA、GGT等のタンパク質の活性を低下させる手法について説明する。

【0056】

「タンパク質の活性が低下する」とは、同タンパク質の活性が非改変株と比較して低下することを意味する。「タンパク質の活性が低下する」とは、具体的には、同タンパク質の細胞当たりの活性が非改変株と比較して減少していることを意味してよい。ここでいう「非改変株」とは、標的のタンパク質の活性が低下するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。非改変株として、具体的には、各細菌種の基準株 (type strain) が挙げられる。また、非改変株として、具体的には、細菌の説明において例示した菌株も挙げられる。すなわち、一態様において、タンパク質の活性は、基準株 (すなわち本発明の微生物が属する種の基準株) と比較して低下してよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、エシェリヒア・コリK-12 MG1655株と比較して低下してもよい。また、別の態様において、タンパク質の活性は、エシェリヒア・コリJM109株と比較して低下してもよい。なお、「タンパク質の活性が低下する」ことには、同タンパク質の活性が完全に消失している場合も含まれる。「タンパク質の活性が低下する」とは、より具体的には、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意味してよい。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も含まれる。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も含まれる。タンパク質の活性の低下の程度は、タンパク質の活性が非改変株と比較して低下していれば特に制限されない。タンパク質の活性は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

タンパク質の活性が低下するような変化は、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。「遺伝子の発現が低下する」とは、同遺伝子の発現が非改変株と比較して低下することを意味する。「遺伝子の発現が低下する」とは、具体的には、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してよい。「遺伝子の発現が低下する」とは、より具体的には、遺伝子の転写量（mRNA量）が低下すること、および/または、遺伝子の翻訳量（タンパク質の量）が低下することを意味してよい。「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も含まれる。なお、「遺伝子の発現が低下する」ことを、「遺伝子の発現が弱化される」ともいう。遺伝子の発現は、例えば、非改変株の、50%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に低下してよい。

10

【 0 0 5 8 】

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、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）、RBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の発現調節配列を改変することにより達成できる。発現調節配列を改変する場合には、発現調節配列は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上が改変される。また、発現調節配列の一部または全部を欠失させてもよい。また、遺伝子の発現の低下は、例えば、発現制御に関わる因子を操作することによっても達成できる。発現制御に関わる因子としては、転写や翻訳制御に関わる低分子（誘導物質、阻害物質など）、タンパク質（転写因子など）、核酸（siRNAなど）等が挙げられる。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

【 0 0 5 9 】

また、タンパク質の活性が低下するような変化は、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。「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

【 0 0 6 0 】

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。タンパク質の活性の低下が達成できる限り、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域等のいずれの領域であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。

40

【 0 0 6 1 】

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)）。

【 0 0 6 2 】

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が、挿入する配列は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、コードされるタンパク質の活性を低下又は消失させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性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。

【0063】

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、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と操作がしやすい。欠失型遺伝子としては、遺伝子の全領域あるいは一部の領域を欠失した遺伝子、ミスセンス変異を導入した遺伝子ナンセンス変異を導入した遺伝子、フレームシフト変異を導入した遺伝子、トランスポゾンやマーカー遺伝子等の挿入配列を導入した遺伝子が挙げられる。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., Gumport, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203 (2002)) とを組み合わせた方法 (W02005/010175号参照) 等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法、接合伝達可能なプラスミドを用いる方法、宿主内で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などがある (米国特許第6303383号、特開平05-007491号)。

【0064】

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。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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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を確認することによっても、確認できる。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。

【0068】

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

10

20

30

40

50

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。

【0069】

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。

【0070】

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。

【0071】

< 2 > -グルタミルバリン合成酵素 (-Glu-Val合成酵素) の製造

本発明の微生物は、 -グルタミルバリン合成酵素の発現宿主として利用することができる。すなわち、本発明の微生物は、 -グルタミルバリン合成酵素をコードする遺伝子 (「 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子」ともいう) を有してよい。以下、「 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主」とは、本発明の微生物であって、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有するものを指す。なお、「 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する」ことを、「 -グルタミルバリン合成酵素を有する」ともいう。すなわち、例えば、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主を、「 -グルタミルバリン合成酵素を有する宿主」ともいう。

【0072】

-グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主は、本来的に -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有するものであってもよく、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有するように改変されたものであってもよい。 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有するように改変された宿主としては、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子が導入された宿主が挙げられる。すなわち、本発明の微生物は、例えば、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子が導入されていてよい。本発明の微生物を構築するための改変の順序は特に制限されない。すなわち、例えば、本来的に -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する細菌をYBDKの活性が低下するよう改変してもよい。また、例えば、YBDKの活性が低下するよう改変された細菌に -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を導入してもよいし、細菌に -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を導入してからYBDKの活性が低下するよう改変してもよい。

【0073】

本発明において、「 -グルタミルバリン合成酵素 (-glutamylvaline synthetase) (-Glu-Val合成酵素 (-Glu-Val synthetase))」とは、 -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質をいう。本発明において、 -グルタミルバリン合成酵素は、 -グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、 -グルタミルバリン以外の -グルタミルジペプチドを生成する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。すなわち、例えば、 -グルタミルバリン合成酵素は、 -グルタミルシステイン合成酵素活性を有していてもよく、有していなくてもよい。また、例えば、 -グルタミルバリン合成酵素は、 -グルタミルグリシン合成酵素活性を有していてもよく、有していなくてもよい。 -グルタミルバリン合成酵素は、 -グルタミルグリシン合成酵素活性を有さないのが好ましい。 -グルタミルバリン合成酵素活性および -グルタミルグリシン合成酵素活性の測定方法は上述したとおりである。 -グルタミルバリン合成酵素は、適当な条件で -グルタミルバリン合成酵素活性を有していればよい。 -グルタミルバリン合成酵素は、例えば、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下、特に Mg^{2+} の存在下、で -グルタミルバリン合成酵素活性を有してよい。また、 -グルタミルバリン合成酵素は、例えば、pH7.0~9.0の少なくともいずれかのpH、特にpH9.0、で -グルタミルバリン

10

20

30

40

50

合成酵素活性を有してよい。

【0074】

- グルタミルバリン合成酵素は、YBDKよりも高いVal選択性を示すのが好ましい。
 - グルタミルバリン合成酵素において、Val選択性は、例えば、3.0以上、5.0以上、10以上、15以上、または20以上であってよい。また、
 - グルタミルバリン合成酵素において、Val選択性は、例えば、1000万以下、100万以下、10万以下、1万以下、1000以下、100以下、または50以下であってよい。また、
 - グルタミルバリン合成酵素において、Val選択性は、例えば、それらの組み合わせの範囲であってよい。
 - グルタミルバリン合成酵素は、適切な条件で上記例示したVal選択性を示すものであってよい。
 - グルタミルバリン合成酵素は、例えば、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下、特に Mg^{2+} の存在下、で上記例示したVal選択性を示すものであってよい。
 また、
 - グルタミルバリン合成酵素は、例えば、pH7.0~9.0の少なくともいずれかのpH、特にpH9.0、で上記例示したVal選択性を示すものであってよい。

10

【0075】

特に、Val選択性が高い
 - グルタミルバリン合成酵素をグルタチオン合成酵素と組み合わせて利用することにより、Glu、Val、およびGlyを原料として、
 - グルタミルグリシンの副生を低減しつつ
 - グルタミルバリン合成酵素を効率的に生産できると期待される。また、特に、
 - グルタミルバリン合成酵素活性(比活性)が高い
 - グルタミルバリン合成酵素を利用することにより、GluおよびValを原料として
 - グルタミルバリンを効率的に生産できると期待される。

20

【0076】

- グルタミルバリン合成酵素としては、例えば、コクリア(Kocuria)属細菌やマイクロコッカス(Micrococcus)属細菌の
 - グルタミルバリン合成酵素が挙げられる。コクリア属細菌としては、コクリア・ロゼア(Kocuria rosea)やコクリア・リゾフィラ(Kocuria rhizophila)が挙げられる。マイクロコッカス属細菌としては、マイクロコッカス・ルテウス(Micrococcus luteus)が挙げられる。すなわち、
 - グルタミルバリン合成酵素は、例えば、このような細菌に由来するタンパク質であってよい。

【0077】

コクリア・ロゼア(AJ3132)の
 - グルタミルバリン合成酵素のアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号18および17に示す。コクリア・リゾフィラDC2201株(ATCC 9341)の
 - グルタミルバリン合成酵素のアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号20および19に示す。マイクロコッカス・ルテウスNCTC2665株(ATCC 15307)の
 - グルタミルバリン合成酵素のアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、配列番号22および21に示す。すなわち、
 - グルタミルバリン合成酵素は、例えば、配列番号18、20、または22に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であってよい。また、
 - グルタミルバリン合成酵素は、例えば、配列番号17、19、または21に示す塩基配列を有する遺伝子にコードされるタンパク質であってよい。

30

【0078】

- グルタミルバリン合成酵素は、
 - グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、
 上記例示した
 - グルタミルバリン合成酵素(例えば、配列番号18、20、または22に示すアミノ酸配列を有するタンパク質)のバリエーションであってよい。同様に、
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、
 - グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質をコードする限り、上記例示した
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子(例えば、配列番号17、19、または21に示す塩基配列を有する遺伝子)のバリエーションであってよい。
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子および
 - グルタミルバリン合成酵素のバリエーションについては、上述したybdK遺伝子およびYBDKの保存的バリエーションに関する記載を準用できる。「元の機能が維持されている」とは、
 - グルタミルバリン合成酵素にあっては、タンパク質のバリエーションが、
 - グルタミルバリン合成酵素活性を有することをいう。同バリエーションが
 - グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、基質特異性、2価の金

40

50

属イオンの要求性、pH依存性等の、同バリエーションの酵素学的性質は、いずれも、元のタンパク質の酵素学的性質と同一であってもよく、同一でなくてもよい。例えば、同バリエーションは、 α -グルタミルバリン以外の α -グルタミルジペプチドを生成する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。また、例えば、同バリエーションは、上記例示したVal選択性を示してもよい。

【0079】

また、 α -グルタミルバリン合成酵素としては、例えば、WO2015/115612に記載の変異型グルタミン酸-システインリガーゼ(変異型GSHA)が挙げられる。

【0080】

本発明において、「変異型グルタミン酸-システインリガーゼ(変異型GSHA)」とは、
「特定の変異」を有するGSHAをいう。また、本発明において、変異型GSHAをコードする遺伝子を、「変異型グルタミン酸-システインリガーゼ遺伝子(変異型gshA遺伝子)」ともいう。「特定の変異」については後述する。

10

【0081】

本発明において、「特定の変異」を有しないグルタミン酸-システインリガーゼを「野生型グルタミン酸-システインリガーゼ(野生型GSHA)」ともいう。また、本発明において、野生型GSHAをコードする遺伝子を、「野生型グルタミン酸-システインリガーゼ遺伝子(野生型gshA遺伝子)」ともいう。なお、ここでいう「野生型」とは、「変異型」と区別するための便宜上の記載であり、「特定の変異」を有しない限り、天然に得られるものには限定されない。野生型GSHAとしては、例えば、エシェリヒア・コリのGshAタンパク質等の、上記例示したGSHAが挙げられる。また、上記例示したGSHAの保存的バリエーションは、「特定の変異」を有しない限り、いずれも野生型GSHAである。野生型GSHAは、通常、 α -グルタミルシステイン合成酵素活性を有するタンパク質であってよい。ただし、本発明において、野生型GSHAは、それに対応する変異型GSHAが α -グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、 α -グルタミルシステイン合成酵素活性、 α -グルタミルバリン合成酵素活性、 α -グルタミルグリシン合成酵素活性、またはそれらの任意の組み合わせを有していてもよく、それらのいずれも有していなくてもよい。

20

【0082】

変異型GSHAは、野生型GSHAのアミノ酸配列において、「特定の変異」を有する。すなわち、例えば、変異型GSHAは、配列番号24に示すアミノ酸配列において、「特定の変異」を有するタンパク質であってよい。また、例えば、変異型GSHAは、配列番号24に示すアミノ酸配列において、「特定の変異」を有し、当該「特定の変異」以外の箇所さらに1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列を有し、且つ、 α -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質であってよい。また、言い換えると、変異型GSHAは、「特定の変異」を有する以外は、野生型GSHAと同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であってよい。例えば、変異型GSHAは、「特定の変異」を有する以外は、配列番号24に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であってよい。また、例えば、変異型GSHAは、「特定の変異」を有する以外は、配列番号24に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列を有し、且つ、 α -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質であってよい。また、例えば、変異型GSHAは、「特定の変異」を有する以外は、配列番号24に示すアミノ酸配列に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ、 α -グルタミルバリン合成酵素活性を有するタンパク質であってよい。

30

40

【0083】

「特定の変異」とは、野生型GSHAに導入した際に、 α -グルタミルバリンの生成に適した性質を野生型GSHAに付与する変異をいう。すなわち、変異型GSHAは、「特定の変異」を有することにより、野生型GSHAと比較して、 α -グルタミルバリンの生成に適した性質を有する。 α -グルタミルバリンの生成に適した性質としては、例えば、 α -グルタミルバリン合成酵素活性(比活性)の上昇、 α -グルタミルグリシン合成酵素活性(比活性)の

50

低下、Val選択性の上昇、およびそれらの組み合わせが挙げられる。例えば、変異型GSHAにおいては、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性（比活性）が、野生型GSHAの、1.1倍以上、1.5倍以上、2倍以上、5倍以上、10倍以上、または20倍以上に上昇している。

【0084】

「特定の変異」としては、下記より選ばれる1又はそれ以上のアミノ酸残基における変異に相当する変異が挙げられる。

L135、Q144、Y241、N243、Y300。

上記表記において、数字は配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における位置を、数字の左側の文字は配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における当該位置のアミノ酸残基（すなわち、変異前のアミノ酸残基；一文字表記）を、各々示す。すなわち、例えば、「L135」は、配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における135位のLeu残基を示す。

【0085】

上記変異において、置換後のアミノ酸残基は、変異型GSHAが γ -グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、元のアミノ酸残基以外のいずれのアミノ酸残基であってもよい。置換後のアミノ酸残基として、具体的には、K(Lys)、R(Arg)、H(His)、A(Ala)、V(Val)、L(Leu)、I(Ile)、G(Gly)、S(Ser)、T(Thr)、P(Pro)、F(Phe)、W(Trp)、Y(Tyr)、C(Cys)、M(Met)、D(Asp)、E(Glu)、N(Asn)、Q(Gln)の内、元のアミノ酸残基以外のものが挙げられる。

【0086】

「特定の変異」として、具体的には、下記より選ばれる1又はそれ以上の変異に相当する変異が挙げられる。すなわち、「特定の変異」は、下記より選ばれる1又はそれ以上の変異に相当する変異を含んでいてよい。「特定の変異」は、例えば、下記より選ばれるいずれかの変異に相当する変異であってもよく、下記より選ばれる2又はそれ以上の変異の組み合わせに相当する変異であってもよい。また、「特定の変異」は、例えば、下記より選ばれる1又はそれ以上の変異と、それ以外のL135、Q144、Y241、N243、Y300より選ばれる1又はそれ以上のアミノ酸残基における変異との組み合わせに相当する変異であってもよい。

L135(I, F, M, V, G, A, W, K, H, R, C, N, S, T)、
Q144(F, A, N, S, D, T, R, H, G, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、
Y241(A)、
N243(I, W, K, R, H)、
Y300(A, H, R, K)。

上記表記において、数字およびその左側の文字の意味は前記と同様である。数字の右側のカッコ内の文字は、変異後のアミノ酸残基（一文字表記）を示す。すなわち、例えば、「L135(I, F, M, V, G, A, W, K, H, R, C, N, S, T)」は、配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における135位のLeu残基がIle、Phe、Met、Val、Gly、Ala、Trp、Lys、His、Arg、Cys、Asn、Ser、およびThrのいずれかのアミノ酸残基に置換される変異を示す。なお、各変異後のアミノ酸をカッコなしで表記してもよい。すなわち、例えば、「L135I」は、配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における135位のLeu残基がIle残基に置換される変異を示す。

【0087】

変異の組み合わせは特に制限されない。変異の組み合わせとして、具体的には、下記の組み合わせが挙げられる。

L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135F/N243W、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/N243F、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243Y、L135M/N243R、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243

F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144R/N243F、Q144D/N243W、Q144D/N243F、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144I、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135K/Q144L、L135H/Q144L、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135Q/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

上記表記において、数字、数字の左側の文字、および数字の右側の文字の意味は前記と同様である。また、上記表記において、「/」で区切られた2又はそれ以上の変異の併記は、二重変異又はそれ以上の多重変異を示す。すなわち、例えば、「L135I/Q144R」は、L135IとQ144Rの二重変異を示す。

10

【0088】

また、W02015/115612の実施例において - グルタミンバリン合成酵素活性（比活性）の顕著な上昇が認められた変異として、下記の変異が挙げられる。

L135 (I, M, V, G, A, K, H, C, N, S, T)、

Q144 (F, A, S, D, T, R, H, K, Y, W, C, M, P, V, L, I)、

N243 (R, H)、

Y300 (R, K)、

L135I/Q144R、L135I/Q144D、L135I/Q144A、L135I/Q144L、L135I/N243W、L135I/N243F、L135F/Q144A、L135M/Q144R、L135M/Q144A、L135M/Q144L、L135M/N243W、L135M/Q144H、L135M/Q144N、L135M/N243C、L135V/Q144R、L135V/Q144D、L135V/Q144A、L135V/Q144L、L135V/Q144V、L135V/Q144K、L135V/Q144C、L135V/Q144T、L135H/Q144R、L135G/Q144L、L135A/Q144L、L135V/N243W、L135V/N243F、L135V/N243P、Q144R/N243W、Q144D/N243W、Q144A/N243W、Q144A/N243F、Q144L/N243W、Q144L/N243F、L135M/Q144F、L135M/N243A、L135V/N243G、L135V/N243A、L135V/N243L、L135V/N243Y、L135V/N243K、L135V/N243R、L135V/N243H、L135V/N243D、L135V/N243E、L135V/N243C、L135V/N243Q、L135V/N243S、L135V/N243T、L135V/Q144P、L135V/Q144W、L135V/Q144H、L135V/Q144E、L135V/Q144N、L135V/Q144S、L135D/Q144L、L135C/Q144L、L135N/Q144L、L135S/Q144L、L135T/Q144L。

20

【0089】

任意の野生型GSHAのアミノ酸配列において、「配列番号24に示すアミノ酸配列におけるn位のアミノ酸残基の変異に相当する変異」とは、配列番号24に示すアミノ酸配列におけるn位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基における変異を意味する。すなわち、例えば、「L135Iに相当する変異」とは、配列番号24に示す野生型GSHAのアミノ酸配列における135位のLeu残基（L135）に相当するアミノ酸残基がIle残基に置換される変異を示す。なお、ここでいう「L135に相当するアミノ酸残基」は、通常Leu残基であってよいが、Leu残基でなくてもよい。すなわち、例えば、「L135Iに相当する変異」は、「L135に相当するアミノ酸残基」がLeu残基である場合に当該Leu残基がIle残基に置換される変異に限られず、「L135に相当するアミノ酸残基」がLys、Arg、His、Ala、Val、Gly、Ser、Thr、Pro、Phe、Trp、Tyr、Cys、Met、Asp、Glu、Asn、またはGln残基である場合に当該アミノ酸残基がIle残基に置換される変異も包含する。他の変異についても同様である。

30

40

【0090】

任意の野生型GSHAのアミノ酸配列において、「配列番号24に示すアミノ酸配列におけるn位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」とは、対象の野生型GSHAのアミノ酸配列と配列番号24のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて配列番号24に示すアミノ酸配列におけるn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、上記変異において、アミノ酸残基の位置は、必ずしも野生型GSHAのアミノ酸配列における絶対的な位置を示すものではなく、配列番号24に記載のアミノ酸配列に基づく相対的な位置を示すものである。例えば、配列番号24に示すアミノ酸配列からなる野生型GSHAにおいて、n位よりもN末端側の位置で1アミノ酸残基が欠失した場合、元のn位のアミノ酸残基はN末端から数えてn-1番目のアミノ酸残基となるが、「配列番号24に示すアミノ酸配列に

50

おけるn位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」とみなされる。同様に、例えば、ある微生物のGSHAホモログのアミノ酸配列中の100位のアミノ酸残基が、配列番号24に示すアミノ酸配列中の101位に相当するときは、当該アミノ酸残基は、当該GSHAホモログにおける「配列番号24に示すアミノ酸配列における101位のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基」である。

【0091】

アラインメントは、例えば、公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して実施できる。具体的な遺伝子解析ソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASIS、ゼネティックス製のGENETYX、DDBJが公開しているClustalW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; Thompson JD et al., Nucleic acid Research, 22(22), 4673-80, 1994)。

10

【0092】

- グルタミルバリン合成酵素は、他のペプチドとの融合タンパク質であってもよい。「他のペプチド」は、- グルタミルバリン合成酵素が - グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、特に制限されない。「他のペプチド」は、その利用目的等の諸条件に応じて適宜選択できる。「他のペプチド」としては、ペプチドタグ、シグナルペプチド、プロテアーゼの認識配列が挙げられる。「他のペプチド」は、例えば、- グルタミルバリン合成酵素のN末端、若しくはC末端、またはその両方に連結されてよい。「他のペプチド」としては、1種のペプチドを用いてもよく、2種またはそれ以上のペプチドを組み合わせ

20

【0093】

ペプチドタグとして、具体的には、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグ、Mycタグ、MBP (maltose binding protein)、CBP (cellulose binding protein)、TRX (Thioredoxin)、GFP (green fluorescent protein)、HRP (horseradish peroxidase)、ALP (Alkaline Phosphatase)、抗体のFc領域が挙げられる。Hisタグとしては、6xHisタグが挙げられる。ペプチドタグは、例えば、発現した - グルタミルバリン合成酵素の検出や精製に利用できる。

【0094】

シグナルペプチドは、- グルタミルバリン合成酵素を発現させる宿主で機能するものであれば、特に制限されない。シグナルペプチドとしては、Sec系分泌経路で認識されるシグナルペプチドやTat系分泌経路で認識されるシグナルペプチドが挙げられる。Tat系分泌経路で認識されるシグナルペプチドとして、具体的には、E. coliのTorAシグナル配列、E. coliのSufIシグナル配列、Bacillus subtilisのPhoDシグナル配列、Bacillus subtilisのLipAシグナル配列、Arthrobacter globiformisのIMDシグナル配列が挙げられる(WO 2013/118544)。シグナルペプチドは、例えば、- グルタミルバリン合成酵素の分泌生産に利用できる。シグナルペプチドを利用して - グルタミルバリン合成酵素を分泌生産する場合、分泌時にシグナルペプチドが切断され、シグナルペプチドを有さない - グルタミルバリン合成酵素が菌体外に分泌され得る。

30

【0095】

プロテアーゼの認識配列として、具体的には、Factor Xaプロテアーゼの認識配列やproTEVプロテアーゼの認識配列が挙げられる。プロテアーゼの認識配列は、例えば、発現した - グルタミルバリン合成酵素の切断に利用できる。具体的には、例えば、- グルタミルバリン合成酵素をペプチドタグとの融合タンパク質として発現させる場合、- グルタミルバリン合成酵素とペプチドタグの連結部にプロテアーゼの認識配列を導入することにより、発現した - グルタミルバリン合成酵素からプロテアーゼを利用してペプチドタグを切断し、ペプチドタグを有さない - グルタミルバリン合成酵素を得ることができる。

40

【0096】

- グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、上記例示した - グルタミルバリン合成酵素

50

遺伝子またはその保存的バリエーションの塩基配列において、任意のコドンをもとに等価のコドンに置換したものであってもよい。例えば、 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンをもとに改変されてよい。具体的には、例えば、開始コドンがATG以外である場合に、開始コドンをATGに改変することができる。また、エシェリヒア・コリでの発現に最適化したコクリア・ロゼア (AJ3132) の α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子の塩基配列を配列番号 29 に示す。

【0097】

なお、本発明において、「遺伝子」という用語は、目的のタンパク質をコードする限り、DNAに限られず、任意のポリヌクレオチドを包含してよい。すなわち、「 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子」とは、 α -グルタミルバリン合成酵素をコードする任意のポリヌクレオチドを意味してよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、DNAであってもよく、RNAであってもよく、その組み合わせであってもよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、一本鎖DNAであってもよく、一本鎖RNAであってもよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、二本鎖DNAであってもよく、二本鎖RNAであってもよく、DNA鎖とRNA鎖からなるハイブリッド鎖であってもよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、単一のポリヌクレオチド鎖中に、DNA残基とRNA残基の両方を含んでいてもよい。 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子がRNAを含む場合、上記例示した塩基配列等のDNAに関する記載は、RNAに合わせて適宜読み替えてよい。

α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子の態様は、その利用態様等の諸条件に応じて適宜選択できる。

【0098】

α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する生物からのクローニングにより取得できる。クローニングには、同遺伝子を含むゲノムDNAやcDNA等の核酸を利用できる。また、 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、化学合成によっても取得できる (Gene, 60(1), 115-127 (1987))。

【0099】

また、取得した α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を適宜改変してそのバリエーションを取得することもできる。遺伝子の改変は公知の手法により行うことができる。例えば、部位特異的変異法により、DNAの目的部位に目的の変異を導入することができる。すなわち、例えば、部位特異的変異法により、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように、遺伝子のコード領域を改変することができる。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。

【0100】

また、変異型gshA遺伝子は、例えば、野生型gshA遺伝子を、コードされるGSHAが上記「特定の変異」を有するよう改変することにより取得できる。改変のもとになる野生型gshA遺伝子は、例えば、野生型gshA遺伝子を有する生物からのクローニングにより、または、化学合成により、取得できる。また、変異型gshA遺伝子は、野生型gshA遺伝子を介さず取得することもできる。例えば、化学合成等により変異型gshA遺伝子を直接取得してもよく、変異型gshA遺伝子をさらに改変することにより別の変異型gshA遺伝子を取得してもよい。

【0101】

α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を宿主に導入する手法は特に制限されない。宿主において、 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、当該宿主で機能するプロモーターの制御下で発現可能に保持されていればよい。宿主において、 α -グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、プラスミドのように染色体外で自律複製するベクター上に存在していてもよ

10

20

30

40

50

く、染色体上に導入されていてもよい。宿主は、
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を
 1 コピーのみ有していてもよく、2 またはそれ以上のコピーで有していてもよい。宿主は、
 1 種類の - グルタミルバリン合成酵素遺伝子のみを有していてもよく、2 またはそれ
 以上の種類の - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有していてもよい。なお、「変異型
 gshA 遺伝子を宿主に導入する」ことには、宿主の染色体上の gshA 遺伝子を「特定の変異」
 を有するように改変することも含まれる。

【0102】

- グルタミルバリン合成酵素遺伝子を発現させるためのプロモーターは、宿主におい
 て機能するものであれば特に制限されない。「宿主において機能するプロモーター」とは
 、宿主においてプロモーター活性を有するプロモーターをいう。プロモーターは、宿主由
 10 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、
 - グルタミルバリン合成酵素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。プロモーターは、
 - グルタミルバリン合成酵素
 遺伝子の固有のプロモーターよりも強力なプロモーターであってもよい。エシェリヒア・
 コリ等の腸内細菌科の細菌において機能する強力なプロモーターとしては、例えば、T7プロ
 モーター、trpプロモーター、trcプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、
 tetプロモーター、araBADプロモーター、rpoHプロモーター、PRプロモーター、およびPL
 プロモーターが挙げられる。また、コリネ型細菌において機能する強力なプロモーターと
 20 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 (200
 3) 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、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利
 用してもよい。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 / 18
 935 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 e
 t al. Russian Federation Patent application 2006134574) や pnlp8 プロモーター (W02
 010/027045) 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
 30 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。

【0103】

また、
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の下流には、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、宿主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、
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝
 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、T7ターミネーター、T4ターミネーター、
 fdファージターミネーター、tetターミネーター、および trpAターミネーターが挙げられ
 40 る。

【0104】

- グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、例えば、同遺伝子を含むベクターを用いて宿
 主に導入することができる。
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を含むベクターを、
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現ベクターまたは組み換えベクターともいう。
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現ベクターは、例えば、
 - グルタミルバリン合
 成酵素遺伝子を含む DNA 断片を宿主で機能するベクターと連結することにより、構築す
 ることができる。
 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現ベクターで宿主を形質転換
 することにより、同ベクターが導入された形質転換体が得られる、すなわち、同遺伝子を
 宿主に導入することができる。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
 50

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、ベクターは、形質転換体を選択するために、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。また、ベクターは、挿入された遺伝子を発現するためのプロモーターやターミネーターを備えていてもよい。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。エシェリヒア・コリ等の腸内細菌科の細菌において自律複製可能なベクターとして、具体的には、例えば、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pBR322、pSTV29（いずれもタカラバイオ社より入手可）、pACYC184、pMW219（ニッポンジーン社）、pTrc99A（ファルマシア社）、pPROK系ベクター（クロンテック社）、pKK233 2（クロンテック社製）、pET系ベクター（ノバジェン社）、pQE系ベクター（キアゲン社）、pACYC、広宿主域ベクターRSF1010が挙げられる。また、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。発現ベクターの構築の際には、例えば、固有のプロモーター領域を含む - グルタミルバリン合成酵素遺伝子をそのままベクターに組み込んでよく、 - グルタミルバリン合成酵素のコード領域を上記のようなプロモーターの下流に結合してからベクターに組み込んでよく、ベクター上にもともと備わっているプロモーターの下流に - グルタミルバリン合成酵素のコード領域を組み込んでよい。

【0105】

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。

【0106】

また、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、例えば、宿主の染色体上へ導入することができる。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 I, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory）。相同組み換えを利用する遺伝子導入法としては、例えば、Redドリブンインテグレーション（Red-driven integration）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、ファージを用いたtransduction法が挙げられる。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、本発明の実施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。本発明の実施に不要な遺伝子としては、例えば、ybdK遺伝子、gshA遺伝子、ggt遺伝子が挙げられる。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）。染色体への遺伝子の導入の際には、例えば、固有のプロモーター領域を含む - グルタミルバリン合成酵素遺伝子をそのまま染色体に組み込んでよく、 - グルタミルバリン合成酵素のコード領域を上記のようなプロモーターの下流に結合してから染色体に組み込んでよく、染色体上にもともと存在するプロモーターの下流に - グルタミルバリン

10

20

30

40

50

合成酵素のコード領域を組み込んでもよい。

【0107】

染色体上に遺伝子が導入されたことは、例えば、同遺伝子の全部又は一部と相補的な塩基配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、または同遺伝子の塩基配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCRによって確認できる。

【0108】

形質転換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。形質転換法としては、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)、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) などが挙げられる。また、形質転換法としては、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。また、形質転換法としては、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号公報) を利用することもできる。

【0109】

また、本来的に - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主を、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現が増大するよう改変してもよい。「遺伝子の発現が増大する」とは、同遺伝子の発現が非改変株と比較して増大することを意味する。「遺伝子の発現が増大する」とは、具体的には、同遺伝子の細胞当たりの発現量が非改変株と比較して増大することを意味してよい。ここでいう「非改変株」とは、標的の遺伝子の発現が増大するように改変されていない対照株を意味する。非改変株としては、野生株や親株が挙げられる。 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現を増大させる手法としては、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子のコピー数を増加させることや - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の転写効率や翻訳効率を向上させることが挙げられる。 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子のコピー数の増加は、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を宿主に導入することにより達成できる。 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の導入は、上述したように実施できる。なお、導入される - グルタミルバリン合成酵素遺伝子は、同種由来であってもよく、異種由来であってもよい。 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の転写効率や翻訳効率の向上は、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)、およびRBSと開始コドンとの間のスペーサー領域等の、遺伝子の発現調節配列の改変により達成できる。例えば、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の転写効率の向上は、 - グルタミルバリン合成酵素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しては、上述したような強力なプロモーターが挙げられる。

【0110】

- グルタミルバリン合成酵素は、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主に - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を発現させることにより製造できる。なお、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子の発現を、「 - グルタミルバリン合成酵素の発現」ともいう。 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主を培養することにより、 - グルタミルバリン合成酵素を発現させることができる。その際、必要に応じて、遺伝子の発現誘導を行う。宿主の培養条件や遺伝子の発現誘導の条件は、マーカーの種類、プロモーターの種類、および宿主の種類等の諸条件に応じて適宜選択すればよい。培養に用いる培地は、宿主が増殖でき、且つ、 - グルタミルバリン合成酵素を発現できるものであれば特に制限されない。培地としては、例えば、炭素源、窒素源、イオウ源、無機イオン、

10

20

30

40

50

及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。

【0111】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜、でんぷんの加水分解物等の糖類、グリセロール、エタノール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類が挙げられる。

【0112】

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

【0113】

イオウ源としては、硫酸塩、亜硫酸塩、硫化物、次亜硫酸塩、チオ硫酸塩等の無機硫黄化合物が挙げられる。

【0114】

無機イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、マンガンイオン、カリウムイオン、鉄イオン、リン酸イオンが挙げられる。

【0115】

その他の有機成分としては、有機微量栄養源が挙げられる。有機微量栄養源としては、ビタミンB1などの要求物質や、それらを含む酵母エキス等が挙げられる。

【0116】

培養温度は、例えば、20 ~ 45、好ましくは24 ~ 45、より好ましくは30 ~ 37 20
であってよい。培養は、通気培養が好ましい。その際の酸素濃度は、例えば、飽和濃度に対して5~50%に、好ましくは10%程度に調節してよい。培養中のpHは、5~9が好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、例えば炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等、を使用することができる。

【0117】

上記のような条件下で、好ましくは10時間~120時間程度培養することにより、
- グルタミルバリン合成酵素を含む培養物が得られる。
- グルタミルバリン合成酵素は、例えば、宿主の菌体内に蓄積し得る。尚、使用する宿主及び
- グルタミルバリン合成酵素遺伝子の設計によっては、ペリプラズムに
- グルタミルバリン合成酵素を蓄積させることや、菌体外に
- グルタミルバリン合成酵素を分泌生産させることも可能である。 30

【0118】

- グルタミルバリン合成酵素は、菌体等に含まれたまま使用してもよく、適宜、菌体等から分離精製し粗酵素画分又は精製酵素として使用してもよい。また、
- グルタミルバリン合成酵素は、遊離の状態でも利用されてもよいし、樹脂等の固相に固定化された固定化酵素の状態でも利用されてもよい。

【0119】

例えば、宿主の菌体内に
- グルタミルバリン合成酵素が蓄積する場合、適宜、菌体を破碎、溶解、または抽出等し、
- グルタミルバリン合成酵素を回収することができる。菌体は、遠心分離等により培養物から回収することができる。細胞の破碎、溶解、または抽出等は、公知の方法により行うことができる。そのような方法としては、例えば、例えば 40
超音波破碎法、ダイノミル法、ビーズ破碎、フレンチプレス破碎、リゾチーム処理が挙げられる。これらの方法は、1種を単独で用いてもよく、2種またはそれ以上を適宜組み合わせ用いてもよい。また、例えば、培地に
- グルタミルバリン合成酵素が蓄積する場合、遠心分離等により培養上清を取得し、培養上清から
- グルタミルバリン合成酵素を回収することができる。

【0120】

- グルタミルバリン合成酵素の精製は、酵素の精製に用いられる公知の方法により行うことができる。そのような方法としては、例えば、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、等電点沈殿が挙げられる。これらの方法は、1種を単独で用いてもよく、 50

2種またはそれ以上を適宜組み合わせ用いてもよい。 - グルタミルバリン合成酵素の精製は、所望の程度に行うことができる。例えば、GGT等の - グルタミルペプチドの分解に關与する成分が - グルタミルバリン合成酵素と共存している場合には、そのような成分を除去するのが好ましい。

【0121】

精製された - グルタミルバリン合成酵素は、本発明の方法における「 - グルタミルバリン合成酵素」として利用できる。

【0122】

また、精製された - グルタミルバリン合成酵素に限らず、 - グルタミルバリン合成酵素を含有する任意の画分を本発明の方法における「 - グルタミルバリン合成酵素」として利用してもよい。すなわち、本発明の方法における「 - グルタミルバリン合成酵素」とは、そのような画分に含有されるものであってよい。 - グルタミルバリン合成酵素を含有する画分は、 - グルタミルバリン合成酵素がGluおよびValに作用できるように含有される限り特に制限されない。そのような画分としては、例えば、 - グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主（ - グルタミルバリン合成酵素を有する宿主）の培養物、同培養物から回収した菌体（培養菌体）、同菌体の破砕物、同菌体の溶解物、同菌体の抽出物（無細胞抽出液）、同菌体をアクリルアミドやカラギーナン等の担体で固定化した固定化菌体等の菌体処理物、同培養物から回収した培養上清、それらの部分精製物（粗精製物）、それらの組み合わせが挙げられる。これらの画分は、いずれも、単独で利用されてもよいし、精製された - グルタミルバリン合成酵素と共に利用されてもよい。

【0123】

< 3 > グルタチオン合成酵素およびその製造

「グルタチオン合成酵素（glutathione synthase）」は、通常、 -Glu-CysとGlyとATPを基質として、グルタチオン（ -Glu-Cys-Gly）とADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を有する酵素（EC 6.3.2.3）として知られている。同活性を、「グルタチオン合成酵素活性」ともいう。

【0124】

また、 -Glu-ValとGlyとATPを基質として、 -Glu-Val-GlyとADPとリン酸を生成する反応を触媒する活性を、「 - グルタミルバリングリシン合成酵素（gamma-Glutamylvalylglycine synthetase）活性」または「 -Glu-Val-Gly生成（合成）活性」ともいう。

【0125】

本発明において、グルタチオン合成酵素としては、 - グルタミルバリングリシン合成酵素活性を有するものを用いる。すなわち、本発明において、「グルタチオン合成酵素」とは、 - グルタミルバリングリシン合成酵素活性を有するタンパク質をいう。

【0126】

本発明において、グルタチオン合成酵素は、 - グルタミルバリングリシン合成酵素活性を有する限り、 - グルタミルバリングリシン以外の - グルタミルトリペプチドを生成する活性を有していてもよく、有していなくてもよい。すなわち、例えば、グルタチオン合成酵素は、グルタチオン合成酵素活性を有していてもよく、有していなくてもよい。

【0127】

グルタチオン合成酵素の - グルタミルバリングリシン合成酵素活性は、例えば、反応液組成を12.5 mM -Glu-Val、12.5 mM Gly、12.5 mM ATP、12.5 mM MgSO₄、2 mMジチオスレイトール、100 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)、反応温度37℃、反応時間1分～50時間として、適切な量のグルタチオン合成酵素を用いて測定することができる。本条件で1分間に1 μmolの -Glu-Val-Glyを生成する酵素活性を1 Uの - グルタミルバリングリシン合成酵素活性とする。

【0128】

グルタチオン合成酵素としては、gshB遺伝子によりコードされるGshBタンパク質やGSH2遺伝子によりコードされるGsh2タンパク質が挙げられる。gshB遺伝子としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属細菌のgshB遺伝子が挙げられる。GS

10

20

30

40

50

H2遺伝子としては、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロマイセス属酵母のGSH2遺伝子が挙げられる。また、グルタチオン合成酵素としては、WO2013/054447に記載の変異型グルタチオン合成酵素も挙げられる。エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のgshB遺伝子の塩基配列は、GenBank accession NC_000913.3としてNCBIデータベースに登録されているゲノム配列中の3,089,900~3,090,850位の配列に相当する。MG1655株 (エシェリヒア・コリK-12 W3110株においても同一) のgshB遺伝子の塩基配列を配列番号27に示す。また、同遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号28に示す。すなわち、グルタチオン合成酵素は、例えば、配列番号27に示す塩基配列を有する遺伝子にコードされるタンパク質であってよい。また、グルタチオン合成酵素は、例えば、配列番号28に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であってよい。グルタチオン合成酵素は、
- グルタミルバリン合成酵素活性を有する限り、上記グルタチオン合成酵素のバリエーションであってもよい。グルタチオン合成酵素やそれをコードする遺伝子のバリエーションについては、上述したYBDKやybdK遺伝子の保存的バリエーションに関する記載を準用できる。なお、「gshB遺伝子」および「GshBタンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示したgshB遺伝子およびGshBタンパク質に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。また、「GSH2遺伝子」および「Gsh2タンパク質」という用語は、それぞれ、上記例示したGSH2遺伝子およびGsh2タンパク質に加えて、それらの保存的バリエーションを包含するものとする。グルタチオン合成酵素は、他のペプチドとの融合タンパク質であってもよい。融合タンパク質については、上述した
- グルタミルバリン合成酵素における融合タンパク質に関する記載を準用できる。

10

20

【0129】

グルタチオン合成酵素は、グルタチオン合成酵素をコードする遺伝子 (「グルタチオン合成酵素遺伝子」ともいう) を有する宿主にグルタチオン合成酵素遺伝子を発現させることにより製造できる。なお、「グルタチオン合成酵素遺伝子を有する」ことを、「グルタチオン合成酵素を有する」ともいう。すなわち、例えば、グルタチオン合成酵素遺伝子を有する宿主を、「グルタチオン合成酵素を有する宿主」ともいう。また、グルタチオン合成酵素遺伝子の発現を、「グルタチオン合成酵素の発現」ともいう。グルタチオン合成酵素遺伝子を有する宿主は、本来的にグルタチオン合成酵素遺伝子を有するものであってもよく、グルタチオン合成酵素遺伝子を有するように改変されたものであってもよい。本来的にグルタチオン合成酵素遺伝子を有する宿主としては、上記gshB遺伝子を有するエシェリヒア・コリや上記GSH2遺伝子を有するサッカロマイセス・セレビスエ等の微生物が挙げられる。グルタチオン合成酵素遺伝子を有するように改変された宿主としては、グルタチオン合成酵素遺伝子が導入された宿主が挙げられる。グルタチオン合成酵素遺伝子を導入する宿主は、機能するグルタチオン合成酵素を発現できるものであれば特に制限されない。宿主としては、例えば、細菌、放線菌、酵母、真菌、植物細胞、昆虫細胞、および動物細胞が挙げられる。好ましい宿主としては、細菌や酵母等の微生物が挙げられる。細菌としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌等の腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) に属する細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌等のコリネ型細菌、バチルス (*Bacillus*) 属細菌が挙げられる。宿主としては、中でも、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を好適に用いることができる。また、本来的にグルタチオン合成酵素遺伝子を有する宿主を、グルタチオン合成酵素遺伝子の発現が増大するよう改変してもよい。グルタチオン合成酵素遺伝子の導入等の宿主の改変については、上述した
- グルタミルバリン合成酵素遺伝子の導入等の宿主の改変に関する記載を準用できる。ベクターやプロモーター等の宿主の改変に利用する材料は宿主の種類に応じて適宜選択できる。グルタチオン合成酵素遺伝子を発現するための宿主は、YBDKの活性が低下するように改変されていてもよい。また、グルタチオン合成酵素遺伝子を発現するための宿主は、
- グルタミルシステイン合成酵素の活性が低下するように改変されていてもよい。また、グルタチオン合成酵素遺伝子を発現するための宿主は、
- グルタミルペプチドの分解に関与するタンパク質の活性が低下するように改変されてい

30

40

50

てもよい。

【0130】

本発明の微生物を、グルタチオン合成酵素の発現宿主として利用することもできる。すなわち、本発明の微生物は、グルタチオン合成酵素遺伝子を有していてもよい。また、本発明の微生物は、グルタチオン合成酵素遺伝子と γ -グルタミルバリン合成酵素遺伝子の両方を有していてもよい。

【0131】

また、グルタチオン合成酵素は、グルタチオン合成酵素遺伝子を受細胞タンパク質合成系で発現させることによっても製造できる。

【0132】

グルタチオン合成酵素遺伝子を有する宿主を利用したグルタチオン合成酵素の製造については、上述した γ -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有する宿主を利用した γ -グルタミルバリン合成酵素の製造に関する記載を準用できる。「菌体」は、宿主の種類に応じて、適宜「細胞」と読み替えてよい。製造されたグルタチオン合成酵素（精製されたグルタチオン合成酵素やグルタチオン合成酵素を含有する画分）は、本発明の方法における「グルタチオン合成酵素」として利用できる。なお、グルタチオン合成酵素は、単独で製造してもよく、 γ -グルタミルバリン合成酵素とまとめて製造してもよい。すなわち、本発明の微生物がグルタチオン合成酵素遺伝子と γ -グルタミルバリン合成酵素遺伝子の両方を有する場合、本発明の微生物にそれらの遺伝子を発現させることにより、グルタチオン合成酵素と γ -グルタミルバリン合成酵素をまとめて製造することができる。

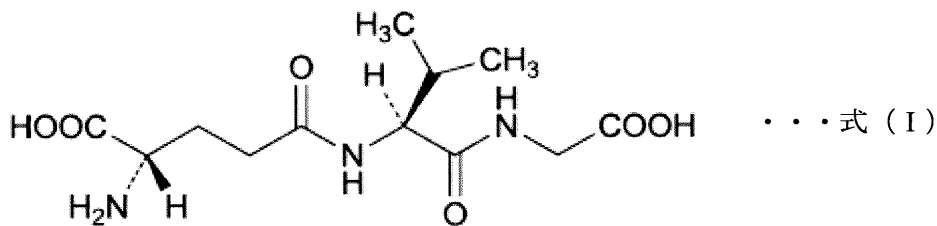
【0133】

<4> γ -グルタミルバリングリシン (γ -Glu-Val-Gly) の製造法

本発明は、 γ -グルタミルバリン合成酵素を利用した γ -Glu-Val の製造法や γ -グルタミルバリン合成酵素を利用した γ -Glu-Val-Gly (CAS 38837-70-6、Gluvalicineとも呼ぶ) の製造法を提供する。これらの方法を総称して、「本発明の方法」ともいう。 γ -Glu-Val-Gly の構造式を下記式 (I) に示す。

【0134】

【化1】



【0135】

<4-1> 酵素法

本発明は、 γ -グルタミルバリン合成酵素を利用して γ -Glu-Val-Gly を酵素的に製造する方法を提供する。同方法を、「本発明の γ -Glu-Val-Gly の製造法 (酵素法)」ともいう。

【0136】

本発明においては、 γ -グルタミルバリン合成酵素を利用することにより、GluとValとを反応させ、 γ -Glu-Valを生成することができる。すなわち、本発明は、(A) γ -グルタミルバリン合成酵素をGluおよびValに作用させることにより γ -Glu-Valを生成する工程、を含む γ -Glu-Valの製造法を提供する。同方法を、「本発明の γ -Glu-Valの製造法 (酵素法)」ともいう。生成した γ -Glu-Valは、適宜、反応液から回収することができる。

【0137】

さらに、生成した γ -Glu-Valを原料として γ -Glu-Val-Glyを製造することができる。

-Glu-Valを原料として -Glu-Val-Glyを製造する方法としては、グルタチオン合成酵素を利用する方法が知られている（特開2012-85637）。具体的には、グルタチオン合成酵素を利用することにより、 -Glu-ValとGlyとを反応させ、 -Glu-Val-Glyを生成することができる。すなわち、本発明の -Glu-Val-Glyの製造法（酵素法）の一態様（「第1の態様」ともいう）は、（A） - グルタミルバリン合成酵素をGluおよびValに作用させることにより -Glu-Valを生成する工程、および（B）グルタチオン合成酵素を工程（A）で生成した -Glu-ValおよびGlyに作用させることにより -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む -Glu-Val-Glyの製造法である。

【0138】

第1の態様において、工程（A）と工程（B）は、それぞれ別個に実施してもよく、一部または全部の期間において同時に実施してもよい。すなわち、例えば、工程（A）と工程（B）を同時に開始してもよく、工程（A）の進行中または完了後に工程（B）を開始してもよい。反応開始時に - グルタミルバリン合成酵素、グルタチオン合成酵素、Glu、Val、およびGlyを反応系に共存させることで、工程（A）と工程（B）を同時に開始することができる。また、グルタチオン合成酵素および/またはGlyが反応系に共存していない条件下で工程（A）を開始し、工程（A）の進行中または完了後にグルタチオン合成酵素および/またはGlyを反応系に共存させることで、工程（B）を開始することができる。また、工程（A）で生成した -Glu-Valを回収し、回収した -Glu-Valを用いて工程（B）を実施してもよい。 -Glu-Valは、適宜、精製、希釈、濃縮、乾燥、溶解等の処理に供してから、工程（B）に用いてもよい。

【0139】

なお、本発明の -Glu-Valの製造法（酵素法）の工程（A）は、例えば、第1の態様の工程（A）を単独で実施するのと同様の態様で実施できる。

【0140】

また、本発明においては、 - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を利用することにより、GluとValとGlyとを反応させ、 -Glu-Val-Glyを生成することができる。すなわち、本発明の -Glu-Val-Glyの製造法（酵素法）の別の態様（「第2の態様」ともいう）は、（C） - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を、Glu、Val、およびGlyに作用させることにより、 -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む -Glu-Val-Glyの製造法である。第2の態様においては、 - グルタミルバリン合成酵素、グルタチオン合成酵素、Glu、Val、およびGlyを反応系に共存させることにより、 - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を、Glu、Val、およびGlyにまとめて作用させ、 -Glu-Val-Glyを製造することができる。

【0141】

本発明の方法において、 - グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を総称して「酵素」ともいう。Glu、Val、およびGlyを総称して「アミノ酸」ともいう。 - Glu-Valおよび -Glu-Val-Glyを総称して「ペプチド」ともいう。Glu、Val、Gly、および -Glu-Valを総称して「基質」ともいう。「基質」には、特記しない限り、さらにATPを含めてよい。酵素とそれに対応する基質との反応を「酵素反応」ともいう。なお、酵素法において、「 - グルタミルバリン合成酵素」とは、本発明の微生物を発現宿主として得られたものを指す。

【0142】

本発明の方法に用いられる各酵素の態様は上述した通りである。すなわち、各酵素としては、例えば、精製された酵素、酵素を含有する任意の画分、またはそれらの組み合わせを用いることができる。各酵素としては、1種の酵素を用いてもよく、2種またはそれ以上の酵素を組み合わせ用いてもよい。

【0143】

アミノ酸としては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものをを用いてもよい。アミノ酸の製造方法は特に制限されず、例えば、公知の方法を利用できる。アミノ酸は、例えば、化学合成、酵素反応、またはその組み合わせにより製造することができる。ま

10

20

30

40

50

た、アミノ酸は、例えば、当該アミノ酸の生産能を有する微生物を培養し、培養物から当該アミノ酸を回収することにより、製造することができる。アミノ酸の生産能を有する微生物としては、例えば、後述するようなアミノ酸生産菌を利用できる。また、アミノ酸は、例えば、当該アミノ酸を含有する農水畜産物から回収することにより、製造することができる。アミノ酸としては、所望の程度に精製された精製品を用いてもよく、当該アミノ酸を含有する素材を用いてもよい。アミノ酸を含有する素材は、酵素が当該アミノ酸に作用できる態様で当該アミノ酸を含有する限り特に制限されない。アミノ酸を含有する素材として、具体的には、例えば、当該アミノ酸の生産能を有する微生物を培養して得られた培養物、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、それらの濃縮物（濃縮液）や濃縮乾燥物等の処理物が挙げられる。

10

【0144】

本発明の方法において、アミノ酸およびペプチドは、いずれも、特記しない限り、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。すなわち、「アミノ酸」という用語は、特記しない限り、フリー体のアミノ酸、もしくはその塩、またはそれらの混合物を意味してよい。また、「ペプチド」という用語は、特記しない限り、フリー体のペプチド、もしくはその塩、またはそれらの混合物を意味してよい。塩は、化学的に許容されるものであれば特に制限されない。また、製造される $-Glu-Val-Gly$ を経口用途（例えば飲食品への添加用途）に用いる場合、 $-Glu-Val-Gly$ の塩は、化学的に許容される可食性のものであれば特に制限されない。「化学的に許容される可食性の塩」として、具体的には、例えば、カルボキシル基等の酸性基に対しては、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ペペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミン酸との塩を挙げることができる。また、「化学的に許容される可食性の塩」として、具体的には、例えば、塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、 p -トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩を挙げることができる。塩としては、1種の塩を用いてもよく、2種またはそれ以上の塩を組み合わせて用いてもよい。

20

30

【0145】

酵素反応は、酵素と基質を反応液中に共存させることにより達成できる。すなわち、酵素反応は、適当な反応液中で実施できる。酵素反応は、バッチ式で実施してもよく、カラム式で実施してもよい。バッチ式の場合は、反応容器内の反応液中で、酵素と基質を混合することにより、酵素反応を実施できる。酵素反応は、静置で実施してもよく、攪拌や振盪下で実施してもよい。カラム式の場合は、固定化菌体又は固定化酵素を充填したカラムに基質を含有する反応液を通液することにより、酵素反応を実施できる。反応液としては、必要な成分を含有する、水や緩衝液等を用いることができる。反応液は、例えば、酵素、基質、ATP、2価の金属イオンを含有してよい。酵素反応に用いられる成分の組み合わせは、実施する工程の種類およびその実施態様（複数の工程を同時に実施するか等）に応じて適宜選択することができる。

40

【0146】

- グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素は、いずれも、酵素反応にATPを利用する。よって、反応系には、ATPを適宜供給する。すなわち、反応系（反応液）は、ATPを含有してよい。前記工程（A）～（C）は、いずれも、ATPの存在下で実施することができる。ATPの供給方法は、酵素反応にATPを利用できる限り特に制限されない。ATPは、例えば、粉末あるいは水溶液等の任意の形態で、反応液に添加することができる。また、ATPは、例えば、ATPを生成または再生する方法により反応系に供給されてもよい。ATPを生成または再生する方法としては、コリネバクテリウム属細菌を利用して炭素

50

源からATPを供給させる方法 (Hori, H et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 48(6): 693-698 (1997))、酵母菌体とグルコースを利用してATPを再生する方法 (Yamamoto, S et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4): 784-789 (2005))、ホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼを利用してATPを再生する方法 (C. Aug 'e and Ch. Gautheron, Tetrahedron Lett. 29: 789-790 (1988))、ポリリン酸とポリリン酸キナーゼを利用してATPを再生する方法 (Murata, K et al., Agric. Biol. Chem. 52(6): 1471-1477 (1988)) 等が知られている。

【 0 1 4 7 】

また、例えば、 γ -グルタミルバリン合成酵素は、通常、酵素反応に2価の金属イオンを要求する。よって、反応系(反応液)は、2価の金属イオンを含有してよい。前記工程(A)~(C)は、いずれも、2価の金属イオンの存在下で実施することができる。2価の金属イオンは、 γ -グルタミルバリン合成酵素活性が得られるものであれば特に制限されない。2価の金属イオンとしては、 Mg^{2+} や Mn^{2+} が挙げられ、好ましい2価の金属イオンとしては、 Mg^{2+} が挙げられる。2価の金属イオンの濃度は、例えば、1~200mMであってよい。

10

【 0 1 4 8 】

反応条件(反応液のpH、反応温度、反応時間、基質や酵素等の各種成分の濃度等)は、 γ -Glu-Val-Glyが生成する限り特に制限されない。

【 0 1 4 9 】

反応液のpHは、例えば、通常6.0~10.0、好ましくは6.5~9.0であってよい。

20

【 0 1 5 0 】

反応温度は、例えば、通常15~50℃、好ましくは15~45℃、より好ましくは20~40℃であってよい。

【 0 1 5 1 】

反応時間は、第1の態様の工程(A)および工程(B)のそれぞれについて、例えば、5分~200時間であってよい。反応時間は、第2の態様の工程(C)について、例えば、5分~200時間であってよい。反応液の通液速度は、例えば、反応時間が上記例示した反応時間の範囲となるような速度であってよい。

【 0 1 5 2 】

反応液中の各基質の濃度は、例えば、通常0.1~2000mM、好ましくは1~2000mM、より好ましくは10~1000mMであってよい。

30

【 0 1 5 3 】

反応液中の各基質のモル比は、第1の態様の工程(A)については、例えば、通常、Glu:Val:ATP=1:1:1であってよく、任意の基質の比率を0.1~10に変化させてもよい。すなわち、例えば、Glu:Val:ATP=0.1~10:0.1~10:0.1~10であってよい。反応液中の各基質のモル比は、第1の態様の工程(B)については、例えば、通常、 γ -Glu-Val:Gly:ATP=1:1:1であってよく、任意の基質の比率を0.1~10に変化させてもよい。すなわち、例えば、 γ -Glu-Val:Gly:ATP=0.1~10:0.1~10:0.1~10であってよい。反応液中の各基質のモル比は、第2の態様の工程(C)については、例えば、通常、Glu:Val:Gly:ATP=1:1:1:2であってよく、任意の基質の比率を0.1~10に変化させてもよく、ATPの比率を0.2~20に変化させてもよい。すなわち、例えば、Glu:Val:Gly:ATP=0.1~10:0.1~10:0.1~10:0.2~20であってよい。なお、第1の態様において工程(A)と工程(B)を同時に実施する場合、第1の態様における各基質のモル比については、適宜、第2の態様における各基質のモル比を参考にしてもよい。

40

【 0 1 5 4 】

酵素の使用量は、例えば、酵素活性に基づいて設定することができる。 γ -グルタミルバリン合成酵素の使用量は、GluおよびValの合計量1mmolに対して、例えば、 γ -Glu-Val生成活性に換算して、通常0.01~1000U、好ましくは0.1~500U、より好ましくは0.1~100Uであってよい。ここでいう「 γ -Glu-Val生成活性」とは、適切な条件、例えば、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下、特に Mg^{2+} の存在下、pH7.0~9.0、特にpH9.0、で測定

50

された -Glu-Val生成活性であってよい。グルタチオン合成酵素の使用量は、第1の態様の工程(B)については、-Glu-ValおよびGlyの合計量1 mmolに対して、例えば、-Glu-Val-Gly生成活性に換算して、通常0.01~1000 U、好ましくは0.1~500 U、より好ましくは0.1~100 Uであってよい。グルタチオン合成酵素の使用量は、第2の態様の工程(C)については、Gluの半量、Valの半量、およびGlyの全量の合計量1 mmolに対して、例えば、-Glu-Val-Gly生成活性に換算して、通常0.01~1000 U、好ましくは0.1~500 U、より好ましくは0.1~100 Uであってよい。なお、第1の態様において工程(A)と工程(B)を同時に実施する場合、第1の態様におけるグルタチオン合成酵素の使用量については、適宜、第2の態様におけるグルタチオン合成酵素の使用量を参考にしてもよい。

【0155】

いずれの態様においても、酵素反応の過程において、基質、酵素、および/またはその他の成分を単独で、あるいは任意の組み合わせで、追加的に反応系に添加してもよい。これらの成分は、1回または複数回添加されてもよく、連続的に添加されてもよい。また、反応条件は、酵素反応の開始から終了まで均一であってよく、酵素反応の過程において変化してもよい。「反応条件が酵素反応の過程において変化する」とは、反応条件が時間的に変化することに限られず、反応条件が空間的に変化することを含む。「反応条件が空間的に変化する」とは、例えば、カラム式で酵素反応を実施する場合に、反応温度や酵素濃度等の反応条件が流路上の位置に応じて異なっていることをいう。

【0156】

このようにして酵素反応を実施することにより、-Glu-Val-Glyを含有する反応液が得られる。-Glu-Val-Gly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、1種を単独で用いてもよく、2種またはそれ以上を適宜組み合わせ用いてもよい。-Glu-Val-Glyは、適宜、反応液から回収することができる。-Glu-Val-Gly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、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー、溶液からの結晶化、再結晶が挙げられる。これらの手法は、1種を単独で用いてもよく、2種またはそれ以上を適宜組み合わせ用いてもよい。回収される-Glu-Val-Glyは、-Glu-Val-Gly以外の成分、例えば-Glu-Val-Glyの製造に用いられた成分や水分等、を含んでいてもよい。-Glu-Val-Glyは、所望の程度に精製されていてよい。-Glu-Val-Gly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) 以上の純度に精製されてよい。また、-Glu-Valの回収も、-Glu-Val-Glyの回収と同様に行うことができる。

【0157】

< 4 - 2 > 発酵法

本発明は、-グルタミルバリン合成酵素を利用して-Glu-Val-Glyを発酵により製造する方法を提供する。具体的には、本発明は、-グルタミルバリン合成酵素を有する微生物を利用して-Glu-Val-Glyを発酵により製造する方法を提供する。同方法を、「本発明の-Glu-Val-Glyの製造法(発酵法)」ともいう。

【0158】

本発明においては、-グルタミルバリン合成酵素を有する微生物を利用することにより、GluとValから-Glu-Valを発酵生産することができる。すなわち、本発明は、(A) -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物を培地で培養することによりGluおよびValから-Glu-Valを生成する工程、を含む-Glu-Valの製造法を提供する。同方法を、「本発明の-Glu-Valの製造法(発酵法)」ともいう。生成した-Glu-Valは、適宜、培養物から回収することができる。

【0159】

さらに、グルタチオン合成酵素を有する微生物を利用することにより、-Glu-ValとGlyから-Glu-Val-Glyを発酵生産することができる。すなわち、本発明の-Glu-Val-Gly

10

20

30

40

50

の製造法（発酵法）の一態様（「第3の態様」ともいう）は、（A） γ -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物を培地で培養することによりGluおよびValから γ -Glu-Valを生成する工程、および（B）グルタチオン合成酵素を有する微生物を培地で培養することにより工程（A）で生成した γ -Glu-ValおよびGlyから γ -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む γ -Glu-Val-Glyの製造法である。

【0160】

第3の態様において、工程（A）と工程（B）は、それぞれ別個に実施してもよく、一部または全部の期間において同時に実施してもよい。すなわち、例えば、工程（A）と工程（B）を同時に開始してもよく、工程（A）の進行中または完了後に工程（B）を開始してもよい。また、第3の態様において、工程（A）と工程（B）は、 γ -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物と、それとは別個の、グルタチオン合成酵素を有する微生物を用いて実施してもよく、 γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の両方を有する単一の微生物を用いて実施してもよい。例えば、 γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の両方を有する微生物を利用し、Glu、Val、およびGlyが利用可能な状態で培養を実施すれば、工程（A）と工程（B）を同時に実施することができる。また、工程（A）で生成した γ -Glu-Valを回収し、回収した γ -Glu-Valを培地に添加して工程（B）を実施してもよい。 γ -Glu-Valは、適宜、精製、希釈、濃縮、乾燥、溶解等の処理に供してから、工程（B）に用いてもよい。

10

【0161】

なお、本発明の γ -Glu-Valの製造法（発酵法）の工程（A）は、例えば、第3の態様の工程（A）を単独で実施するのと同様の態様で実施できる。

20

【0162】

また、本発明においては、 γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の両方を有する微生物を利用することにより、GluとValとGlyとから γ -Glu-Val-Glyを発酵生産することができる。すなわち、本発明の γ -Glu-Val-Glyの製造法（発酵法）の別の態様（「第4の態様」ともいう）は、（C） γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を有する微生物を培地で培養することによりGlu、Val、およびGlyから γ -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む γ -Glu-Val-Glyの製造法である。

【0163】

発酵法において、酵素、アミノ酸、ペプチド、基質、酵素反応等の用語は、酵素法と同様の意味で使用する。また、 γ -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物、グルタチオン合成酵素を有する微生物、および γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を有する微生物を総称して「微生物」ともいう。なお、発酵法において、「 γ -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物」とは、本発明の微生物であって、 γ -グルタミルバリン合成酵素を有するものを指す。また、発酵法において、「 γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の両方を有する微生物」とは、本発明の微生物であって、 γ -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素の両方を有するものを指す。

30

【0164】

基質となる各アミノ酸の供給方法は、酵素反応に当該アミノ酸を利用できる限り特に制限されない。各アミノ酸は、例えば、各工程で用いられる微生物により生合成されてもよく、培地に添加されてもよく、その組み合わせであってもよい。すなわち、例えば、Glu、Val、およびGlyの全てが微生物により生合成されてもよく、Glu、Val、およびGlyの全てが培地に添加されてもよい。また、例えば、Glu、Val、およびGlyの内、1種または2種のアミノ酸が微生物により生合成され、他のアミノ酸が培地に添加されてもよい。Glu、Val、およびGlyのいずれも、微生物により生合成され、且つ、培地に添加されてもよい。

40

【0165】

すなわち、本発明の γ -Glu-Valの製造法（発酵法）の一態様は、例えば、（A1） γ -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物をGluおよびValを含有する培地で培養すること

50

により -Glu-Valを生成する工程、を含む -Glu-Valの製造法であってもよく、(A2)
 -グルタミルバリン合成酵素を有し、且つ、GluおよびValの生産能を有する微生物を培地で培養することにより -Glu-Valを生成する工程、を含む -Glu-Valの製造法であってもよい。

【0166】

また、第3の態様の一態様は、例えば、(A1)と(A2)のいずれか、および、(B1)と(B2)のいずれかを含む -Glu-Val-Glyの製造法であってもよい：

(A1) -グルタミルバリン合成酵素を有する微生物をGluおよびValを含有する培地で培養することにより -Glu-Valを生成する工程；

(A2) -グルタミルバリン合成酵素を有し、且つ、GluおよびValの生産能を有する微生物を培地で培養することにより -Glu-Valを生成する工程；

(B1) グルタチオン合成酵素を有する微生物を工程(A1)または(A2)で生成した -Glu-ValおよびGlyを含有する培地で培養することにより -Glu-Val-Glyを生成する工程；

(B2) グルタチオン合成酵素を有し、且つ、Glyの生産能を有する微生物を工程(A1)または(A2)で生成した -Glu-Valを含有する培地で培養することにより -Glu-Val-Glyを生成する工程。

【0167】

また、第4の態様の一態様は、例えば、(C1) -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を有する微生物をGlu、Val、およびGlyを含有する培地で培養することにより -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む -Glu-Val-Glyの製造法であってもよく、(C2) -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を有し、且つ、Glu、Val、およびGlyの生産能を有する微生物を培地で培養することにより -Glu-Val-Glyを生成する工程、を含む -Glu-Val-Glyの製造法であってもよい。

【0168】

-グルタミルバリン合成酵素を有する微生物としては、上述したような本発明の微生物であって、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子を有するものを、そのまま、あるいは適宜改変して用いることができる。グルタチオン合成酵素を有する微生物としては、上述したようなグルタチオン合成酵素遺伝子を有する微生物を、そのまま、あるいは適宜改変して用いることができる。 -グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素を有する微生物としては、上述したような本発明の微生物であって、 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子とグルタチオン合成酵素遺伝子の両方を有するものを、そのまま、あるいは適宜改変して用いることができる。

【0169】

アミノ酸の生産能を有する微生物は、本来的にアミノ酸の生産能を有するものであってもよく、アミノ酸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。アミノ酸の生産能を有する微生物は、微生物にアミノ酸生産能を付与することにより、または、微生物のアミノ酸生産能を増強することにより、取得できる。 -グルタミルバリン合成酵素遺伝子および/またはグルタチオン合成酵素遺伝子の導入等の酵素生産能の付与または増強と、アミノ酸生産能の付与または増強とは、いずれを先に実施してもよい。すなわち、 -グルタミルバリン合成酵素および/またはグルタチオン合成酵素を有し、且つ、アミノ酸の生産能を有する微生物は、 -グルタミルバリン合成酵素および/またはグルタチオン合成酵素を有する微生物を、アミノ酸生産能を有するように改変することにより取得してもよく、アミノ酸生産能を有する微生物を、 -グルタミルバリン合成酵素および/またはグルタチオン合成酵素を有するように改変することにより取得してもよい。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

10

20

30

40

50

げられる。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。

【0170】

L-グルタミン酸生産菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(プレバクテリウム・ラクトファーメンタム)ATCC13869株より取得されたodhA欠損株に、V197M変異を有するmviN遺伝子を導入した組換え株(特開2010-161970)、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム由来glfA(クエン酸シンターゼ)遺伝子を導入したパントエア・アグロメランスAJ13355株(特許第4285582号)、グルタミンシンセターゼの397位のチロシン残基が他のアミノ酸残基に置換されたグルタミンシンセターゼを有するエシェリヒア属細菌(米国特許出願公開第2003-0148474号明細書)などが例示できる。L-バリン生産菌としては、エシェリヒア・コリVL1970株(米国特許第5658766号)、エシェリヒア属に属し、生育のためにリポ酸を要求する変異および/またはH⁺-ATPaseを欠損する変異を有するエシェリヒア属細菌、および、これらの性質に加えて、少なくともilvG、ilvM、ilvE、およびilvDの各遺伝子を発現し、且つ、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないilvGMEDAオペロンを含むDNA断片が細胞内に導入されたエシェリヒア属細菌(W096/06926)などが例示できる。すなわち、例えば、これらの改変を微生物に導入することにより、アミノ酸生産能を付与または増強できる。

10

【0171】

また、微生物は、培地中に添加されたアミノ酸を取り込む能力が向上するよう改変されていてもよい。また、微生物は、その利用態様に応じて、生成した-Glu-Valを菌体外に排出する能力が向上するよう改変されていてもよく、培地中に添加された-Glu-Valを取り込む能力が向上するよう改変されていてもよい。また、微生物は、生成した-Glu-Val-Glyを菌体外に排出する能力が向上するよう改変されていてもよい。

20

【0172】

培養条件は、微生物が増殖でき、-Glu-Val-Glyが生成する限り、特に制限されない。培養条件については、上述した-L-グルタミルバリン合成酵素の製造法における培養条件の記載を参照できる。

【0173】

-グルタミルバリン合成酵素およびグルタチオン合成酵素は、いずれも、酵素反応にATPを利用する。よって、反応系には、ATPを適宜供給する。すなわち、反応系は、ATPを含有してよい。前記工程(A)~(C)は、いずれも、ATPの存在下で実施することができる。ATPの供給方法は、酵素反応にATPを利用できる限り特に制限されない。ATPは、例えば、各工程で用いられる微生物により生成されてもよく、上述したようなATPを生成または再生する方法により反応系に供給されてもよい。ATPの供給には、例えば、通常のエネルギー代謝によるATP再生系が強化された微生物やポリリン酸キナーゼの作用でATPを再生する能力を有する微生物を培養液中に共存させる方法等の共培養系(特公平7-16431、特公平6-69386)が好適に利用できる。

30

【0174】

また、例えば、-グルタミルバリン合成酵素は、通常、酵素反応に2価の金属イオンを要求する。よって、反応系は、2価の金属イオンを含有してよい。前記工程(A)~(C)は、いずれも、2価の金属イオンの存在下で実施することができる。

40

【0175】

アミノ酸を含有する培地を用いる場合、アミノ酸は、培養開始時から培地に含まれていてもよく、培養途中の任意の時点で培地に添加されてもよい。添加のタイミングは、培養時間等の諸条件に応じて適宜変更できるが、一例としては、培養終了時の好ましくは0~50時間前、より好ましくは0.1~24時間前、特に好ましくは0.5~6時間前であってよい。アミノ酸は、1回または複数回添加されてもよく、連続的に添加されてもよい。培地中の各アミノ酸の濃度は、例えば、通常0.1~2000mM、好ましくは1~2000mM、より好ましくは10~1000mMであってよい。また、培地中の各基質のモル比については、酵

50

素法における反応液中の各基質のモル比に関する記載を準用してもよい。

【0176】

このようにして培養を行うことにより、 γ -Glu-Val-Glyを含む培養物が得られる。 γ -Glu-Val-Glyが生成したことは、上述したように、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。 γ -Glu-Val-Glyは、適宜、培養物から回収することができる。 γ -Glu-Val-Glyの回収は、上述したように、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。なお、菌体内にL-アミノ酸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 γ -Glu-Val-Glyを回収することができる。

【0177】

また、グルタチオン合成酵素を有する微生物が酵母であり、 γ -Glu-Val-Glyが菌体内に蓄積する場合、同酵母は、例えば、 γ -Glu-Val-Glyを含有する酵母エキスの製造に利用できる。すなわち、本発明は、同酵母を原料として用いて酵母エキスを調製することを含む、 γ -Glu-Val-Glyを含有する酵母エキスの製造法を提供する。酵母からの酵母エキスの調製は、通常の酵母エキスの調製と同様に行えばよい。酵母エキスは、酵母菌体を熱水抽出したものを処理したものでよいし、酵母菌体を消化したものを処理したものでよい。また、必要に応じて、得られた酵母エキスを濃縮してもよいし、乾燥し粉末の形態にしてもよい。

【実施例】

【0178】

以下、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明する。

【0179】

〔実施例1〕 ybdK遺伝子発現プラスミドの構築

エシェリヒア・コリMG1655 (ATCC 47076) のybdK遺伝子の発現プラスミドpSF12-EcybdKを以下の手順で構築した。ybdK遺伝子の塩基配列およびそれによりコードされるYBDKアミノ酸配列を、それぞれ配列番号15および配列番号16に示す。なお、pSF12-EcybdKによれば、YBDKはC末端にHisタグが付加された形態で発現する。

【0180】

初めに、エシェリヒア・コリW3110株 (ATCC 27325) 由来の γ -グルタミルトランスペプチダーゼをコードするggt遺伝子とrpoHプロモーターを含むpUC18由来プラスミドpSF12_ggt (WO2013/051685A1) をNdeI/PstI消化し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen社製) にて精製し、約3.0kbの断片を得た。

【0181】

次に、エシェリヒア・コリMG1655株のゲノムDNAを鋳型として、PrimeSTAR Maxポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を使用して、製造元のプロトコールに従ってPCRを行い、ybdK遺伝子を含む約1.2kbの断片を得た。プライマーとしては、配列番号1および配列番号2のプライマーの組み合わせ (表1) を使用した。

【0182】

次に、pSF12_ggtをNdeI/PstI消化して得られた約3.0kbの断片とPCRで得られたybdK遺伝子を含む約1.2kbの断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて、製造元のプロトコールに従って融合させた。該反応液でエシェリヒア・コリJM109株を形質転換し、100 μ g/mLのアンピシリンナトリウム (Amp) を含むLB寒天培地 (1.0% (w/v) ペプトン、0.5% (w/v) 酵母エキス、1.0% (w/v) NaCl、1.5% (w/v) 寒天) に塗布後、30℃で20時間培養した。生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、3130ジェネティックアナライザー (Life Technologies社製) を用いて塩基配列の確認を行い、目的の構造を持つプラスミドをpSF12-EcybdKと命名した。

【0183】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

配列番号	塩基配列 (5' →3')
1	taaggaggaaatccatATGCCATTACCCGATTTCA
2	cttgcatgcctgcagTTAatgatgatgatgatgatgGTCACCGGCCAGATCTCACAATG

10

【 0 1 8 4 】

〔実施例 2〕C末端にHisタグ付加されたエシェリヒア・コリMG1655株由来YBDKの精製

実施例 1 で取得したpSF12-EcybdKプラスミドを有するJM109株を100 μg/mLのAmpを含むLB培地3 mLに接種し、30、120往復/分で20時間振とう培養することで前培養液を得た。得られた前培養液150 μLを、100 μg/mLのAmpを含むTB培地(1.2% (w/v) トリプトン、2.4% (w/v) 酵母エキス、0.4% (w/v) グリセロール、0.23% (w/v) KH₂PO₄、1.25% (w/v) K₂HPO₄) 15 mLを張り込んだ70 mL容の試験管(25mm)に接種し、30、120往復/分で20時間振とう培養した。遠心分離(4、12,000 × g、5分)によって集菌し、得られた菌体を0.2 mLの緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 15% グリセロール)に懸濁し、冷却しながら超音波破碎処理に供して菌体を破碎した。得られた菌体破碎液を遠心分離(4、29,100 × g、10分)し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

20

【 0 1 8 5 】

得られた無細胞抽出液を、予め緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 15% グリセロール)で平衡化したNi Sepharose 6 Fast Flowビーズ(GEヘルスケア社製)にアプライし、溶離緩衝液(20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 15% グリセロール)により酵素を溶出し、活性画分を得た。この活性画分を精製YBDKとして、以降の実験に用いた。

【 0 1 8 6 】

〔実施例 3〕精製YBDKによる -グルタミルジペプチドの生成

実施例 2 で取得した精製YBDKについて、-Glu-Val合成活性および -Glu-Gly合成活性を測定した。

30

【 0 1 8 7 】

-Glu-Val合成活性の測定条件は以下の通りである。反応液組成は10 mM グルタミン酸、10 mM バリン、10 mM ATP、10 mM MnSO₄、100 mM Tris-HCl (pH7.0)とした。反応液量は0.2 mLとし、精製酵素を添加することによって酵素反応を開始した。この時、精製YBDKは0.1 g/Lとなるように反応液に添加した。反応温度は30 とし、反応時間は30分間とした。反応を停止する際には、反応液0.2 mLに対して、0.2 mLの200 mM 硫酸を添加した。反応終了後に、HPLCにて生成した -Glu-Valを定量した。本条件で1分間に1 μmolの -Glu-Valを生成する酵素活性を1 Uの -Glu-Val合成活性とした。

40

【 0 1 8 8 】

-Glu-Valの定量条件は以下の通りである。カラムには、Phenomenex社製Synergi 4 μ Hydro-RP 80A(粒子径4 μm、内径4.6 mm、長さ250 mm)を用いた。溶離液には、溶離液A(50 mMリン酸二水素ナトリウム(pH2.5、リン酸によってpH調整))、及び、溶離液B(溶離液Aとアセトニトリルの1:1(v/v)の混合液)を93:7(v/v)の比率で混合した混合液を用いた。流速は1.0 mL/min、カラム温度は40、UV検出波長は210 nmとした。

【 0 1 8 9 】

-Glu-Gly合成活性を測定する場合には、上記反応液中のバリンをグリシンに置き換え、精製YBDKを0.025 g/Lとなるように反応液に添加し、酵素反応を実施した。上記の手順で反応を停止した後、生成した -Glu-Glyを定量した。本条件で1分間に1 μmolの -Glu-

50

Glyを生成する酵素活性を1 Uの γ -Glu-Gly合成活性とした。

【0190】

γ -Glu-Glyの定量条件は以下の通りである。カラムには、ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-3 (粒子径5 μ m、内径4.6 mm、長さ250 mm)を用いた。溶離液には、溶離液C (100 mMリン酸二水素カリウム、5 mMオクタンスルホン酸ナトリウム (pH2.2、リン酸によってpH調整))を用いた。流速は1.5 mL/min、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、UV検出波長は210 nmとした。

【0191】

以上の方法により、 γ -Glu-Val生成量及び γ -Glu-Gly生成量を定量し、比活性を算出した。結果を表2に示す。表中、「反応(A)」は γ -Glu-Gly合成活性の比活性、「反応(B)」は γ -Glu-Val合成活性の比活性、「(B)/(A)」は、 γ -Glu-Gly合成活性の比活性に対する γ -Glu-Val合成活性の比活性の比率をそれぞれ示す。

10

【0192】

【表2】

表2

酵素 (由来)	反応(A) Glu+Gly+ATP (U/mg)	反応(B) Glu+Val+ATP (U/mg)	(B)/(A)
YBDK (E. coli)	0.11	0.29	2.6

20

【0193】

〔実施例4〕エシェリヒア・コリJM109株由来ggt遺伝子、gshA遺伝子、及びybdK遺伝子の三重破壊株の作製

(1) エシェリヒア・コリJM109株由来ggt遺伝子破壊株の作製

エシェリヒア・コリJM109株を親株として、GGT非産生株の構築を行った。ggt遺伝子の塩基配列およびそれによりコードされるGGTのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号25および配列番号26に示す。

【0194】

遺伝子の破壊は、DatsenkoとWannerによって最初に開発された「Red-driven integration」と呼ばれる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol.97, No.12, p6640-6645) と ファージ由来の切り出しシステム (J. Bacteriol. 2002 Sep; 184(18): 5200-3. Interactions between integrase and excisionase in the phage lambda excisive nucleoprotein complex. Cho EH, Gumpert RI, Gardner JF.) を組み合わせた方法 (WO2005/010175号参照) によって行った。「Red-driven integration」法によれば、標的遺伝子の一部に対応する配列を5'側にデザインした合成オリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより得られた抗生物質耐性遺伝子を含むPCR産物を用いて、染色体上の標的遺伝子を抗生物質耐性遺伝子に置換し、遺伝子破壊株を構築することができる。さらに ファージ由来の切り出しシステムを組み合わせることで、遺伝子破壊株に組み込んだ抗生物質耐性遺伝子を除去することが出来る。

30

40

【0195】

「Red-driven integration」法のPCRの鋳型としては、pMW118-attL-Cm-attR (WO2006/078039) を使用した。pMW118-attL-Cm-attR (WO2006/078039) は、pMW118 (ニッポンジーオン社製) に ファージのアタッチメントサイトであるattL及びattR遺伝子と抗生物質耐性遺伝子であるcat遺伝子を挿入したプラスミドであり、attL-cat-attRの順で挿入されている。このattLとattRの両端に対応する配列をプライマーの3'末端に、標的遺伝子の一部に対応する配列をプライマーの5'末端に有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行い、遺伝子破壊用断片を得た。得られた遺伝子破壊用断片を用いて遺伝子破壊株を構築した。手順を以下に示す。

50

【 0 1 9 6 】

ggt遺伝子破壊用断片は次のようにして取得した。すなわち、エシェリヒア・コリJM109株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号3および配列番号4のプライマーを用いて、KOD-plus-Ver.2(東洋紡社製)にて製造元のプロトコールに従ってPCRを行うことで、ggt遺伝子上流0.3kbを増幅し、DNAフラグメントAを得た。同様に、エシェリヒア・コリJM109株のゲノムDNAを鋳型に、配列番号5および配列番号6のプライマーを用いてPCRを行うことで、ggt遺伝子下流領域0.3kbを増幅し、DNAフラグメントCを得た。同様に、pMW118-attL-Cm-attRを鋳型として、配列番号7および配列番号8のプライマーを用いてPCRを行うことで、1.6kbのDNAフラグメントBを得た。50 μ LのPCR反応液に対してフラグメントA/B/Cを50/10/50ngとして、10サイクルのPCR反応を行った。この反応液(1 μ L)を鋳型として、配列番号3および配列番号6のプライマーを用いて、2kbのDNA断片を増幅し、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen社製)にて精製し、ggt遺伝子破壊用断片を得た。用いたプライマーを表3に示す。

【 0 1 9 7 】

【表3】

表3

配列番号	塩基配列 (5' →3')
3	TGCATCTGGGTTTGCATCCGCTGCT
4	ataaaaaagcaggcttcaCGTTATTCTCCAGAGATTAAGGGGC
5	tttataactaacttgagcgGGTTAGCGGCCCTCTTCGTGGGAAG
6	ACTCTACATGGACGCTTTAGCCAGG
7	GCCCCCTAATCTCTGGAGAATAACGtgaagcctgcttttttat
8	CTTCCCACGAAGAGGGCCGCTAACCgctcaagttagtataaa

【 0 1 9 8 】

得られたggt遺伝子破壊用DNA断片を、プラスミドpKD46(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645)を含むエシェリヒア・コリJM109株にエレクトロポレーションにより導入した。プラスミドpKD46は、アラビノース誘導性P_{araB}プロモーターに制御されるRed相同組換えシステムのRedレコンビナーゼをコードする遺伝子(、)、exo遺伝子)を含むファージの合計2154塩基のDNAフラグメント(GenBank/EMBL Accession; J02459, 第31088~33241位)を含む、温度感受性の複製能を有するプラスミドである。プラスミドpKD46は遺伝子破壊用DNA断片をJM109株の染色体に組み込むために必要である。

【 0 1 9 9 】

エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。すなわち、100mg/LのAmpを含んだLB培地中で30、20時間培養したプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリJM109株を、Amp(100mg/L)を含んだ2mLのSOB培地(モレキュラークロニング:実験室マニュアル第2版、Sambrook, J.ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989年))で50倍希釈した。得られた希釈物を30でOD610が約0.3になるまで生育させた後、10%(v/v)のL-アラビノースを70 μ L添加し、37で1時間培養した。得られた培養液を65倍に濃縮し、10%(v/v)グリセロールで3回洗浄することによってエレクトロポレーション用のコンピテントセルを得た。

【 0 2 0 0 】

エレクトロポレーション後、細胞懸濁液に、0.3mLのSOC培地を加えて37で3時間培養

した後、37 でクロラムフェニコール (Cm) (50mg/L) を含むLB-寒天培地上で培養し、Cm耐性組換え体を選択した。

【0201】

次に、pKD46プラスミドを除去するために、Cm (50mg/L) を含むLB-寒天培地上で42 にて培養し、得られたコロニーのAmp耐性を試験し、pKD46が脱落しているAmp感受性株を取得した。Cm耐性遺伝子によって識別できた変異体のggt遺伝子の破壊を、PCRによって確認した。得られたggt遺伝子破壊株をJM109 ggt:att-cat株と命名した。

【0202】

次に、ggt遺伝子内に導入されたatt-cat遺伝子の除去を行うために、ヘルパープラスミドとしてpMW-intxis-ts (WO2007/037460) を使用した。pMW-intxis-tsは、ファージのインテグラーゼ (Int) をコードする遺伝子、及び、エクシジョナーゼ (Xis) をコードする遺伝子を搭載する、温度感受性の複製能を有するプラスミドである。pMW-intxis-ts導入により、染色体上のattLあるいはattRを認識して組換えを起こし、attLとattRの間の遺伝子を切り出し、染色体上にはattLあるいはattR配列のみ残る。上記で得られたJM109 ggt:att-cat株を、pMW-intxis-tsにて形質転換し、30 で100 mg/LのAmpを含むLB-寒天培地上にて培養し、Amp耐性株を選択した。

【0203】

次に、pMW-intxis-tsプラスミドを除去するために、LB寒天培地にて42 で培養し、得られたコロニーのAmp耐性及びCm耐性を試験して、att-cat及びpMW-intxis-tsが脱落し、かつ、ggt遺伝子が破壊された株である、Cm及びAmp感受性株を取得した。この株をJM109 ggt株と命名した。

【0204】

(2) エシェリヒア・コリJM109株由来ggt遺伝子及びgshA遺伝子の2重破壊株の作製
エシェリヒア・コリJM109 ggt株を親株として、GGT及びGSHA非産生株の構築を行った。gshA遺伝子の塩基配列およびそれによりコードされるGSHAのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号23および配列番号24に示す。

【0205】

gshA遺伝子破壊用DNA断片は、pMW118-attL-Cm-attRを鋳型とし、配列番号9および配列番号10のプライマー (表4) を用いて、KOD-plus-Ver.2 (東洋紡社製) にて製造元のプロトコルに従ってPCRを行うことで得た。そのgshA遺伝子破壊用DNA断片を、pKD46を含むJM109 ggt株にエレクトロポレーションにより導入した。pKD46を含むJM109 ggt株のエレクトロポレーション用のコンピテントセルは、実施例4(1)に記載の方法と同様の手法で取得した。エレクトロポレーション後、細胞懸濁液に、0.3mLのSOC培地を加えて37 で3時間培養した後、37 でCm (50mg/L) を含むLB-寒天培地上で培養し、Cm耐性組換え体を選択した。次に、pKD46プラスミドを除去するために、Cm (50mg/L) を含むLB-寒天培地上で42 にて培養し、得られたコロニーのAmp耐性を試験し、pKD46が脱落しているAmp感受性株を取得した。Cm耐性遺伝子によって識別できた変異体のgshA遺伝子の破壊を、PCRによって確認した。得られたgshA遺伝子破壊株をJM109 ggt gshA:att-cat株と命名した。

【0206】

次に、gshA遺伝子内に導入されたatt-cat遺伝子の除去を行うために、上記で得られたJM109 ggt gshA:att-cat株を、pMW-intxis-tsにて形質転換し、30 で100 mg/LのAmpを含むLB-寒天培地上にて培養し、Amp耐性株を選択した。

【0207】

次に、pMW-intxis-tsプラスミドを除去するために、LB寒天培地にて42 で培養し、得られたコロニーのAmp耐性及びCm耐性を試験して、att-cat及びpMW-intxis-tsが脱落し、かつ、gshA遺伝子が破壊された株である、Cm及びAmp感受性株を取得した。この株をJM109 ggt gshA株と命名した。

【0208】

【表 4】

表 4

配列番号	塩基配列 (5' →3')
9	TTATGCTAATTAAAACGATTTTGACAGGCGGGAGGTCAATtgaagcctgcttttttat
10	TGAAATTTGGCCACTCACGAGTGGCCTTTTCTTTTCTGcgctcaagttagtataaa

10

【 0 2 0 9 】

(3) エシェリヒア・コリJM109株由来ggt遺伝子、gshA遺伝子、及びybdK遺伝子の3重破壊株の作製

エシェリヒア・コリJM109 ggt gshA株を親株として、GGT、GSHA、及びYBDK非産生株の構築を行った。ybdK遺伝子の塩基配列およびそれによりコードされるYBDKのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号15および配列番号16に示す。

【 0 2 1 0 】

ybdK遺伝子破壊用DNA断片は、pMW118-attL-Cm-attRを鋳型とし、配列番号11および配列番号12のプライマー(表5)を用いて、PrimeSTAR Maxポリメラーゼ(タカラバイオ社製)にて製造元のプロトコールに従ってPCRを行うことで得た。そのybdK遺伝子破壊用DNA断片を、pKD46を含むJM109 ggt gshA株にエレクトロポレーションにより導入した。pKD46を含むJM109 ggt gshA株のエレクトロポレーション用のコンピテントセルは、実施例4(1)に記載の方法と同様の手法で取得した。エレクトロポレーション後、細胞懸濁液に、0.3mLのSOC培地を加えて37℃で3時間培養した後、37℃でCm(50mg/L)を含むLB-寒天培地上で培養し、Cm耐性組換え体を選択した。

20

【 0 2 1 1 】

次に、pKD46プラスミドを除去するために、Cm(50mg/L)を含むLB-寒天培地上で42℃にて培養し、得られたコロニーのAmp耐性を試験し、pKD46が脱落しているAmp感受性株を取得した。Cm耐性遺伝子によって識別できた変異体のybdK遺伝子の破壊を、PCRによって確認した。得られたybdK遺伝子破壊株をJM109 ggt gshA ybdK:att-cat株と命名した。

30

【 0 2 1 2 】

次に、ybdK遺伝子内に導入されたatt-cat遺伝子の除去を行うために、上記で得られたJM109 ggt gshA ybdK:att-cat株を、pMW-intxis-tsにて形質転換し、30℃で100 mg/LのAmpを含むLB-寒天培地上にて培養し、Amp耐性株を選択した。

【 0 2 1 3 】

次に、pMW-intxis-tsプラスミドを除去するために、LB寒天培地にて42℃で培養し、得られたコロニーのAmp耐性及びCm耐性を試験して、att-cat及びpMW-intxis-tsが脱落し、かつ、ybdK遺伝子が破壊された株である、Cm及びAmp感受性株を取得した。この株をJM109 ggt gshA ybdK株と命名した。

【 0 2 1 4 】

40

【表 5】

表 5

配列番号	塩基配列 (5' →3')
11	cttctataactgaatagaaaacgccaacataagagaaacctTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAAGTTG GCATTATAAAAAA
12	accattgtcagggatattcttctgtaaggcaattcccggcCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCTGAA CGAGAAACGTAAA

10

【 0 2 1 5 】

〔実施例 5〕コクリア・ロゼア由来 -Glu-Val 合成酵素発現株の構築

エシェリヒア・コリJM109株由来ggt遺伝子及びgshA遺伝子の2重破壊株(JM109 ggt gshA)およびggt遺伝子、gshA遺伝子、及びybdK遺伝子の3重破壊株(JM109 ggt gshA ybdK)を発現宿主として、コクリア・ロゼア由来 -Glu-Val合成酵素発現株を構築した。コクリア・ロゼア(AJ3132)株由来の -Glu-Val合成酵素をコードするKrgshA遺伝子の塩基配列を配列番号17に示す。同遺伝子にコードされる -Glu-Val合成酵素のアミノ酸配列を配列番号18に示す。なお、KrgshA遺伝子の発現プラスミドpSF-KrgshAの構築に際し、KrgshA遺伝子の塩基配列(配列番号17)を基に、エシェリヒア・コリ発現用にコドンを最適化した塩基配列をデザインした。エシェリヒア・コリ発現用にコドンを最適化したKrgshA遺伝子の塩基配列を配列番号29に示す。

20

【 0 2 1 6 】

初めに、エシェリヒア・コリW3110株(ATCC 27325)由来の -グルタミルトランスペプチダーゼをコードするggt遺伝子とrpoHプロモーターを含むpUC18由来プラスミドpSF12_ggt(WO2013/051685A1)をNdeI/PstI消化し、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen社製)にて精製し、約3.0kbの断片を得た。

【 0 2 1 7 】

次に、コクリア・ロゼア(AJ3132)由来のKrgshA遺伝子の塩基配列(配列番号17)を基に、エシェリヒア・コリ発現用にコドンを最適化したcDNA(配列番号29)をユーロフィンジェノミクス株式会社に発注した。納品されたプラスミドを鋳型にPhusion High-Fidelity DNA Polymerase(FINNZYMES社製)を使用して、製造元のプロトコールに従ってPCRを行い、KrgshA遺伝子を含む約1.2kbの断片を得た。プライマーとしては、配列番号13および配列番号14の組合せ(表6)を使用した。

30

【 0 2 1 8 】

次に、PCRで得られたKrgshA遺伝子を含む約1.2kbのPCR断片とpSF12_ggtをNdeI/PstI消化して得られた約3.0kbの断片を、In-fusion HD Cloning Kit(Clonech社製)を用いて、製造元のプロトコールに従って融合させた。該反応液でエシェリヒア・コリJM109株を形質転換し、100 µg/mLのアンピシリンナトリウム(Amp)を含むLB寒天培地に塗布後、30で20時間培養した。生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、3130ジェネティックアナライザー(Life Technologies社製)を用いて塩基配列の確認を行い、目的の構造を持つプラスミドをpSF12-KrgshAと命名した。

40

【 0 2 1 9 】

実施例4にて取得したJM109 ggt gshA株とJM109 ggt gshA ybdK株をpSF12-KrgshAにてそれぞれ形質転換し、pSF12KrgshAを有する形質転換体を得た。この形質転換体を、それぞれJM109 ggt gshA/pSF12-KrgshA株およびJM109 ggt gshA ybdK/pSF12-KrgshA株と命名した。

【 0 2 2 0 】

【表 6】

表 6

配列番号	塩基配列 (5' →3')
13	AAGGAGGAATCCATATGGAAATCTCGTTTGCCCGC
14	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAGTCGTTTTTCGCGAGTACG

10

【 0 2 2 1 】

〔実施例 6〕コクリア・ロゼア由来 γ -Glu-Val 合成酵素発現株の無細胞抽出液を用いた γ -グルタミルジペプチドの生成

エシェリヒア・コリ JM109 株由来 ggt 遺伝子及び gshA 遺伝子の 2 重破壊株 (JM109 ggt gshA) および ggt 遺伝子、gshA 遺伝子、及び ybdK 遺伝子の 3 重破壊株 (JM109 ggt gshA ybdK) を発現宿主として構築したコクリア・ロゼア由来 γ -Glu-Val 合成酵素発現株の無細胞抽出液を用いた γ -グルタミルジペプチドの生成を検討した。

【 0 2 2 2 】

実施例 5 で取得した JM109 ggt gshA/pSF12-KrgshA 株と JM109 ggt gshA ybdK/pSF12-KrgshA 株をそれぞれ 100 μ g/mL の Amp を含む LB 培地 3mL に接種し、30 分、120 往復/分で 20 時間振とう培養することで前培養液を得た。得られた前培養液 150 μ L を、100 μ g/mL の Amp を含む TB 培地 15mL を張り込んだ 70mL 容の試験管 (25mm) に接種し、30 分、120 往復/分で 20 時間振とう培養した。遠心分離 (4,000 \times g、5 分) によって集菌し、得られた菌体を 0.2 mL の緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 15 % グリセロール) に懸濁し、冷却しながら超音波破碎処理に供して菌体を破碎した。得られた菌体破碎液を遠心分離 (4,000 \times g、10 分) し、得られた上清を無細胞抽出液とした。

20

【 0 2 2 3 】

まず、該無細胞抽出液を用いて γ -Glu-Val 合成活性を測定した。反応液組成は 100 mM グルタミン酸、100 mM バリン、40 mM ATP、20 mM MgSO₄、100 mM Tris-HCl (pH 7.0) とした。反応液量は 0.5 mL とした。0.25 mg のタンパク質を含む無細胞抽出液を添加することによって酵素反応を開始した。反応温度は 30 $^{\circ}$ C とし、反応時間は 30 分間とした。反応を停止する際には、反応液 0.5 mL に対して、0.5 mL の 200 mM 硫酸を添加した。反応終了後に、実施例 3 に示した方法で γ -Glu-Val を定量し、無細胞抽出液当たりの γ -Glu-Val 合成活性を算出した。その結果を表 7 に示す。

30

【 0 2 2 4 】

【表 7】

表 7

無細胞抽出液由来	γ -Glu-Val 合成活性 (U/mg)
JM109 Δ ggt Δ gshA/pSF12-KrgshA	0.008
JM109 Δ ggt Δ gshA Δ ybdK/pSF12-KrgshA	0.024

40

【 0 2 2 5 】

続いて、得られた無細胞抽出液を用いて、Glu、Val、及び Gly 存在下での γ -Glu-Val 合成量及び γ -Glu-Gly 合成量を測定した。反応液組成は 100 mM グルタミン酸、50 mM バリン、50 mM グリシン、40 mM ATP、20 mM MgSO₄、100 mM Tris-HCl (pH 7.0) とした。無細胞抽出液を添加することによって酵素反応を開始した。反応を停止する際には、反応液量と等量の 200mM 硫酸を添加した。反応終了後に、実施例 3 に示した方法で γ -Glu-Val 及び

50

-Glu-Glyを定量した。その結果を表8と表9に示す。なお、表8は、 γ -Glu-Val合成酵素活性が0.004 Uとなるように無細胞抽出液を反応液に添加した場合の結果を示す。その際の反応液量は0.2 mLとし、反応温度は30℃、反応時間は16時間とした。また、表9は、2.5 mgのタンパク質を含む無細胞抽出液を反応液に添加した場合の結果を示す。その際の反応液量は0.5 mLとし、反応温度は30℃、反応時間は2.5時間とした。

【0226】

【表8】

表8

無細胞抽出液由来	γ -Glu-Val (mM)	γ -Glu-Gly (mM)
JM109 Δ ggt Δ gshA/pSF12-KrgshA	0.4	0.1
JM109 Δ ggt Δ gshA Δ ybdK/pSF12-KrgshA	0.7	n. d.

n. d. : 検出限界以下

10

【0227】

【表9】

表9

無細胞抽出液由来	γ -Glu-Val (mM)	γ -Glu-Gly (mM)
JM109 Δ ggt Δ gshA/pSF12-KrgshA	0.5	0.1
JM109 Δ ggt Δ gshA Δ ybdK/pSF12-KrgshA	2.1	n. d.

n. d. : 検出限界以下

20

【産業上の利用可能性】

【0228】

本発明によれば、 γ -Glu-Val合成酵素の発現宿主として有用な微生物を提供できる。同微生物で発現させた γ -Glu-Val合成酵素を利用して、 γ -Glu-Valや γ -Glu-Val-Glyを効率よく製造することができる。例えば、同微生物で発現させた γ -Glu-Val合成酵素をグルタチオン合成酵素と組み合わせて利用することにより、Glu、Val、及びGlyを原料として、 γ -Glu-Glyの副生を低減しつつ γ -Glu-Val-Glyを製造することができると期待される。

30

【0229】

<配列表の説明>

配列番号1～14 : プライマー

配列番号15 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のybdK遺伝子の塩基配列

配列番号16 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のYBDKのアミノ酸配列

配列番号17 : コクリア・ロゼア (AJ3132) の γ -Glu-Val合成酵素遺伝子の塩基配列

配列番号18 : コクリア・ロゼア (AJ3132) の γ -Glu-Val合成酵素のアミノ酸配列

配列番号19 : コクリア・リゾフィラDC2201株の γ -Glu-Val合成酵素遺伝子の塩基配列

配列番号20 : コクリア・リゾフィラDC2201株の γ -Glu-Val合成酵素のアミノ酸配列

配列番号21 : ミクロコッカス・ルテウスNCTC2665株の γ -Glu-Val合成酵素遺伝子の塩基配列

40

配列番号22 : ミクロコッカス・ルテウスNCTC2665株の γ -Glu-Val合成酵素のアミノ酸配列

配列番号23 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のgshA遺伝子の塩基配列

配列番号24 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のGSHAのアミノ酸配列

配列番号25 : エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のggt遺伝子の塩基配列

配列番号26 : エシェリヒア・コリK-12 MG1655株のGGTのアミノ酸配列

配列番号27 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のgshB遺伝子の塩基配列

配列番号28 : エシェリヒア・コリK-12 W3110株のGSHBのアミノ酸配列

配列番号29 : エシェリヒア・コリでの発現に最適化したコクリア・ロゼア (AJ3132) の

50

-Glu-Val合成酵素遺伝子の塩基配列

【配列表】

0006919566000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 伊藤 崇敬
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 野崎 博之
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

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 国際公開第2015/115612(WO, A1)
Proteins, 2004年, Vol. 56, p. 376-383
Database UniProt [online], 2015-6-24, [retrieved on 2016-09-20], Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot>>
Database UniProt [online], 2015-7-22, [retrieved on 2016-09-20], Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot>>
Database UniProt [online], 2015-07-22, [retrieved on 2016-09-20], Retrieved from the Internet: <URL: <http://www.uniprot.org/uniprot>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/21

C12N 15/00 - 15/90

C12P 21/00 - 21/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)