

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-523271

(P2019-523271A)

(43) 公表日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 C 233/47	(2006.01)	C O 7 C	233/47	C S P	4 B O 6 4
C 1 2 P 13/06	(2006.01)	C 1 2 P	13/06	Z N A E	4 H O 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2019-504061 (P2019-504061)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成29年7月26日 (2017.7.26)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成31年3月20日 (2019.3.20)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/EP2017/068841</p> <p>(87) 国際公開番号 WO2018/019867</p> <p>(87) 国際公開日 平成30年2月1日 (2018.2.1)</p> <p>(31) 優先権主張番号 16181431.4</p> <p>(32) 優先日 平成28年7月27日 (2016.7.27)</p> <p>(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)</p>	<p>(71) 出願人 501073862 エボニック デグサ ゲーエムベーハー Evonik Degussa GmbH ドイツ連邦共和国 エッセン レリングハウザー シュトラッセ 1-11 Rellinghauser Strasse 1-11, D-45128 Essen, Germany</p> <p>(74) 代理人 100079108 弁理士 稲葉 良幸</p> <p>(74) 代理人 100109346 弁理士 大貫 敏史</p> <p>(74) 代理人 100117189 弁理士 江口 昭彦</p>
---	--

最終頁に続く

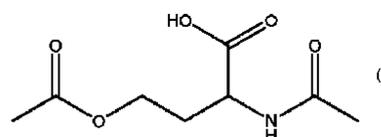
(54) 【発明の名称】 N-アセチルホモセリン

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、一般式(1)の化合物に関する。

【解決手段】 本発明はさらに、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成方法に関し、この方法は、水性培地中で、少なくとも1つの組換え細胞をアセテートと接触させることを含み、組換え細胞は、野生型細胞に比べて、(a) E₁ 酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.3)、及び/又は、E₅ 酵素、つまりアスパルトキナーゼ (EC 2.7.2.4)、並びに (b) E₂ 酵素、つまりホモセリン-O-アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.31) の活性が増大しており、アセテートは、水性培地中で、少なくとも約 0.001 g/L の濃度に維持される。

【化1】

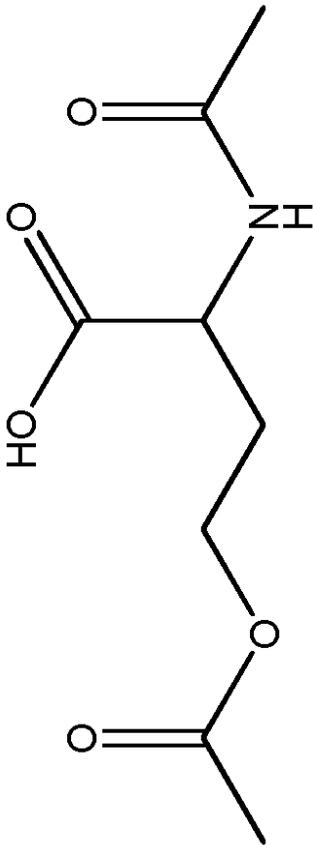


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 I の化合物。

【化 1】



10

20

【請求項 2】

前記化合物は、O - アセチル - N - アセトアミド - L - ホモセリン又は O - アセチル - N - アセトアミド - D - ホモセリンである、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 3】

N - アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体の生成方法であって、水性培地中で、少なくとも 1 つの組換え細胞をアセテートと接触させることを含み、前記組換え細胞は、野生型細胞に比べて、

(a) E₁ 酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ (E C 1 . 1 . 1 . 3)、及び / 又は、E₅ 酵素、つまりアスパルトキナーゼ (E C 2 . 7 . 2 . 4)、並びに

(b) E₂ 酵素、つまりホモセリン - O - アセチルトランスフェラーゼ (E C 2 . 3 . 1 . 3 1)

の活性が増大しており、

前記アセテートは、前記水性培地中で、少なくとも約 0 . 0 0 1 g / L の濃度に維持される、方法。

40

【請求項 4】

前記アセテートは外因的に生成される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法は、前記水性培地から N - アセチルホモセリン及びその誘導体を抽出することを含む、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞は、アシネトバクタ属、バチルス属、プレバクテリウム属、バークホルデリア属、クロレラ属、コリネバクテリウム属、シアノバクテリア、エルウィニア属、エスケリキア属、クレブシエラ属、セラチア属、プロビデンシア属、シュードモナス属、リゾビ

50

ウム属、サルモネラ属、ノストク属からなる群から選択される、請求項3から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記細胞は、コリネバクテリウムグルタミクムと大腸菌からなる群から選択される、請求項3から6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記E₂酵素は、コリネバクテリウムグルタミクムATCC13032由来のホモセリン-O-アセチルトランスフェラーゼ(MetX)又はそのバリエーションである、請求項3から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記E₂酵素は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列又はそのバリエーションを含む、請求項3から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記E₁酵素の活性の増大は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ(E₁)及び/又はアスパルトキナーゼ(E₅)における少なくとも1回の点変異によるものである、請求項3から9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記E₁酵素は、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列又はそのバリエーションを含み、前記E₅酵素は、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列又はそのバリエーションを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記組換え細胞は、前記野生型細胞に比べてE₁、E₅及びE₂酵素の活性の増大を現す、請求項3から11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体は、O-アセチル-N-アセトアミド-L-ホモセリン、O-アセチル-N-アセトアミド-D-ホモセリン、N-アセトアミド-L-ホモセリン、N-アセトアミド-D-ホモセリンからなる群から選択されてもよい、請求項3から12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記組換え細胞はさらに、野生型細胞に比べて、

(a) E₃酵素、つまりジアミノピメレートデカルボキシラーゼ(EC4.1.1.20)、及び/又は、

(b) E₄酵素、つまりホモセリンO-トランススクシニラーゼ(EC2.3.1.46)

の活性が減少している、請求項3から13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

アセテートからN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を生成する、少なくとも1つの組換え細胞の使用であって、

前記組換え細胞は、野生型細胞に比べて、

(a) E₁酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.3)、及び/又は、E₅酵素、つまりアスパルトキナーゼ(EC2.7.2.4)、並びに

(b) E₂酵素、つまりホモセリン-O-アセチルトランスフェラーゼ(EC2.3.1.31)

の活性が増大している、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N-アセチルホモセリン及びその誘導体の生成方法に関する。特に、N-アセチルホモセリン及びその誘導体はメチオニンを生成する前駆体として用いることができる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

アミノ酸は飼料の添加剤として、またヒト用の栄養補助食品として特に有用である。アミノ酸はさらに、輸液にも使用できる上、医薬品や農薬の製造に用いられる合成中間体として機能することもできる。システイン、ホモシステイン、メチオニン、S-アデノシルメチオニンなどの化合物は、通常、食品添加剤や飼料添加剤、医薬品に使用されている。特にメチオニンは動物の体内では合成できない必須アミノ酸であり、多くの身体機能に重要な役割を果たす。現在は、シアン化水素、アクロレイン、メチルメルカプタンから化学合成によりD, L-メチオニンを生成している。アクロレインやメチルメルカプタンのような石油系出発原料は、ガソリンや石油を分解して得られるが、環境汚染をもたらす。また、これらの出発原料のコストは石油価格と直結しているため、近い将来に石油価格の上昇が予想され、石油価格の上昇に伴ってメチオニンの価格も上昇するであろう。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

メチオニンの生成手段として、いくつかの化学的工法が挙げられる。一例として、塩基の存在下で、3-メチルチオプロパノールを青酸と共に原料として用いる。反応の結果として得た炭酸アンモニウムに対し、続いて加水分解を行なう。この方法では、加水分解後の反応液に二酸化炭素を導入して結晶化させ、メチオニンを結晶として分離する。この方法は、メチオニン生成用の原料として二酸化炭素と水素を使用している。しかしながら大量の水素が残るので、この方法は非効率的である。

20

【0004】

メチオニンはまた、N-アセチルメチオニンを含み得る。一般的には、アセト無水物のようなアセチル化合物を用いてN-アセチルメチオニンを化学的に形成する。これは追加のステップであり、アセテートなどの副産物を生成する。アセテートを放出すると、N-アセチルメチオニンはアセテートの臭いを部分的に吸収する。よって、この方法により生成したメチオニンは微量のアセテートを含む。

【0005】

メチオニン需要の増加に伴って、N-アセチルメチオニンを含むあらゆる種類のメチオニンの微生物生成は、非常に魅力的な代替案である。従って、本分野は、N-アセチルメチオニンを生成するための、より安価でより効率的なバイオテクノロジー手段を必要としている。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、新規のN-アセチルホモセリン誘導体、及び本化合物と他の関連化合物の生成手段に関する。具体的には、新規のN-アセチルホモセリン誘導体は、O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンであってもよい。本発明はまた、N-アセトアミド-DL-ホモセリンの生成手段に関する。N-アセチルホモセリン及びその誘導体は、遺伝子組換えによりE₁酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.3)、及び/又は、E₅酵素、つまりアスパルトキナーゼ(EC2.7.2.4)、並びにE₂酵素、つまりホモセリン-O-アセチルトランスフェラーゼ(EC2.3.1.31)の活性を増大させた組換え細胞の使用を含むバイオテクノロジー法により生成されてもよい。これらのN-アセチルホモセリン及びその誘導体は、メチオニン生成の前駆体として用いることができる。

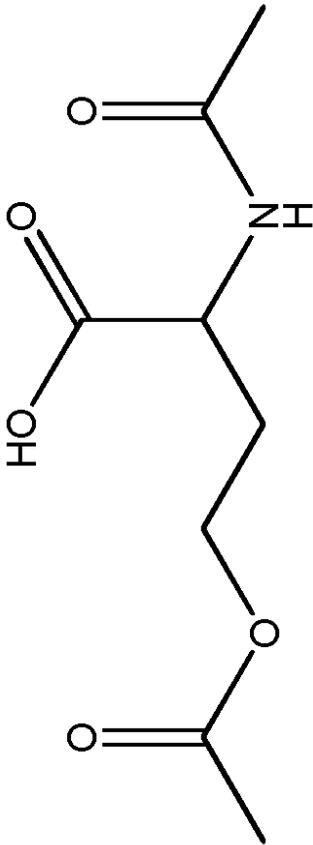
40

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明の一態様によると、一般式Iの化合物が提供される。

【化 1】



10

20

【0008】

本発明のいずれかの態様による化合物は、O - アセチル - N - アセトアミド - L - ホモセリン又はO - アセチル - N - アセトアミド - D - ホモセリンであってもよい。O - アセチル - N - アセトアミド - DL - ホモセリンは、メチオニン生成用の前駆体として用いることができる。D - とL - のうちいずれのO - アセチル - N - アセトアミド - ホモセリンが形成されたのかによって、この化合物がD - メチオニンあるいはL - メチオニンの生成のどちらかに使用されるのかが決まる。

30

【0009】

本発明の他の態様によると、N - アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成方法が提供される。この方法は、水性培地中で、少なくとも1つの組換え細胞を炭素源と接触させることを含み、組換え細胞は、野生型細胞に比べて、

(a) E₁ 酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.3) 及び/又はE₅ 酵素、つまりアスパルトキナーゼ (EC 2.7.2.4)、並びに

(b) E₂ 酵素、つまりホモセリン - O - アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.31)

の活性が増大している。

40

【0010】

炭素源は、遊離アセテート又はアセテートに転換できる基質を含んでもよい。例えば、水性培地は、N - アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成に用いられる、本発明のいずれかの態様による細胞発酵用の少なくとも1つの炭素源を含む。水性培地は、さらに遊離アセテートを含む。一例において、水性培地は、N - アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成に用いられる、本発明のいずれかの態様による細胞発酵用の少なくとも1つの炭素源、並びに遊離アセテートを含む。

【0011】

本発明のいずれかの態様による細胞発酵用の炭素源には、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、デンプン、セルロースなどの任意の炭水化物、大

50

豆油、ヒマワリ油、ヒマシ油、ココナツ油などの脂肪、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸などの脂肪酸、グリセリン、エタノールなどのアルコール類、酢酸などの有機酸が含まれてもよい。これらの化合物又はその混合物を炭素源として用いることができる。炭素源は、さらにアセテートを含んでもよい。一例では、炭素源はアセテートのみである。

【0012】

本明細書における「アセテート」は、酢酸及び酢酸塩 ($\text{CH}_3 - \text{COO} -$) の両方を指す。これは、本技術分野でも知られているように、微生物は水性環境で作用し、塩と酸のバランスが常にとれているため当然のことである。アセテートに対する分子酢酸の比は系のpHに左右される。つまり「アセテート」の一定の濃度では、pHが低いほど酢酸塩に対する分子酢酸の濃度が高くなる。

10

【0013】

アセテートは外因的に生成されてもよい。これは、本発明のいずれかの態様に従って用いられる組換え細胞はそれ自体ではアセテートを生成しない可能性があることを意味する。よってアセテートは、細胞が炭素源と接触する前に、外因的に生成され、水性培地に導入される。具体的には、組換え細胞を含む水性培地は、組換え細胞がN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成を開始する前に既にアセテートを含んでいる。より具体的には、アセテートは二酸化炭素及び/又は一酸化炭素などの炭素源の存在下で組換え細胞により出発原料として用いられ、その後、アセテートの存在下でN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を生成することができる。アセテートは、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成において、完全に使い果たされない。具体的に言えば、アセテートは、組換え細胞によりN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成における選択性の向上に用いられる。よって、反応混合物中のアセテートの存在は、副産物でなくN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成を促進するために維持される。

20

【0014】

細胞が内因性アセテートを生成するまで待つというよりも、外因的に生成されたアセテートが水性培地中に最初から存在していてもよい。具体的に言えば、本明細書において「外因的に生成された」アセテートという用語は、細胞が生成したアセテートとは対照的に、組換え細胞との接触前に、別途の反応容器で生成又は精製したエタノールのアセテートを意味する。別の例では、「外因的に生成された」アセテートという用語は、本発明の任意の態様による組換え細胞と接触する前に、酢酸生成細菌細胞によって生成されたアセテートを含む。一例では、アセテートを反応容器から取り出し、第2の反応容器中で組換え細胞と接触させる。別の例では、組換え細胞と酢酸生成細胞は同じ反応容器にある。アセテートは、少なくとも1つの炭素源と接触させた酢酸生成細胞によって生成してもよい。外因性アセテートの存在下で、組換え細胞は、この外因性アセテートをN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体に転換させることができる。より具体的に言えば、組換え細胞が触媒する反応が続く限り、水性培地中の外因的に生成されたアセテートの濃度を最初の値あるいは最初の数値範囲で維持させる。さらに、水性培地中に存在するアセテートの全量に対して80%以上、特に90%以上が外因的に生成されたアセテートである場合、水性培地中のアセテートを外因性で見なす。

30

40

【0015】

本発明のいずれかの態様による水性培地中のアセテートの濃度は、本発明において非常に重要な要素と言える。本発明のいずれかの態様に従って使用される水性培地中のアセテートの濃度は、本明細書に記載の特定の濃度に維持してもよい。具体的には、水性培地におけるアセテートの濃度は、少なくとも約1 ppm (つまり0.001 g/L) であってもよい。この濃度を水性培地で維持することができる。一例では、アセテートの濃度を、少なくとも実質的に上記に記載の濃度、例えば少なくとも0.0 g/Lを超える濃度、あるいは約0.001 g/L、約0.002 g/L、約0.003 g/L、約0.004 g/L、約0.005 g/L、約0.01 g/L、約0.015 g/L、約0.02 g/L、約0.025 g/L、約0.030 g/L、約0.050 g/L以上の濃度に維持して

50

いる。水性培地は少なくとも 0.001 g/L のアセテートを含む。具体的には、水性培地中のアセテートの濃度は、 $0.01 \text{ g/L} \sim 10 \text{ g/L}$ の濃度に維持されてもよい。より具体的には、水性培地中のアセテートの濃度は、 $0.01 \text{ g/L} \sim 7 \text{ g/L}$ の濃度に維持されてもよい。さらに具体的には、水性培地中のアセテートの濃度は、約 2 g/L の濃度に維持されてもよい。当業者であれば、水性培地中のアセテート濃度を一貫してチェックし、アセテートの濃度が要求値を下回るときはアセテートを供給し、濃度が所望の値を超えるときは供給を停止することで、アセテートの濃度を維持することができるであろう。

【0016】

一例では、アセテートの濃度は水性培地中の全炭素源の $34 \sim 100\%$ である。具体的には、アセテートの濃度は、水性培地中の全炭素源の約 35% 、約 40% 、約 45% 、約 50% 、約 55% 、約 60% 、約 65% 、約 70% 、約 75% 、約 80% 、約 85% 、約 90% 、約 95% 、約 100% であってもよい。より具体的には、アセテートの濃度が、水性培地中の全炭素源の約 $35 \sim 100\%$ 、約 $40 \sim 100\%$ 、約 $45 \sim 100\%$ 、約 $50 \sim 100\%$ 、約 $35 \sim 90\%$ 、約 $40 \sim 90\%$ 、約 $45 \sim 90\%$ であってもよい。

10

【0017】

本明細書における「約」という用語は、 20% 以内の変動を指す。具体的には本明細書において「約」という用語は所与の測定値又は数値の $\pm 20\%$ 、より具体的には $\pm 10\%$ 、さらに具体的には $\pm 5\%$ を指す。

【0018】

当業者であれば、本分野で知られている方法によってアセテートの濃度を所望の値に維持することができるであろう。具体的には、当業者は水性培地中のアセテート濃度を定期的に測定し、それに応じて培地に高濃度又は低濃度のアセテートを添加することでアセテートの濃度を調整することができる。一例では、NMRを用いてアセテートを測定することができる。具体的には、半定量的 $^1\text{H-NMR}$ 分光法を用いてアセテートの濃度を測定することができる。内部定量標準としてトリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム (T(M)SP) を使用してもよい。別の例では、R-Biopharmの酵素キット (品番: 10148261035) を使用し、製造業者の指示に従ってアセテートの濃度を測定することができる。一例では、水性培地の連続供給とは別途の連続流によりアセテートを水性培地に添加する。別の例では、アセテートは補給される培地の一部である。具体的には、アセテートを栄養素供給物の一部として、あるいは栄養素供給物とは別々に水性培地に添加してもよい。水性培地にアセテートをいずれの経路から供給するとしても、当業者であれば、水性培地中のアセテート濃度を維持する手段について理解するであろう。一例では、発酵過程において約 20 時間毎にアセテートを補給し、培地中のアセテート濃度を維持する。別の例では、培養及び/又は発酵工程の開始時点から約 5 時間、約 10 時間、約 15 時間、約 20 時間、約 25 時間、約 30 時間毎に培地におけるアセテートの補給を行なう。別の例では、アセテートを N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の生成方法に使用しないため、アセテートを必ずしも補充する必要はない。

20

30

【0019】

一例では、水性培地中のアセテート濃度は、反応期間の 80% にわたって本発明のいずれかの様態による任意の濃度に維持される。別の例では、反応時間の 50% 、 55% 、 60% 、 65% 、 70% 、 75% 、 85% 、 90% 、 95% 、あるいは 100% の時間にわたってアセテートの濃度を維持する。これについて、「反応時間」とは、工程が行なわれる間の期間を意味する。具体的には、反応時間とは、反応が開始してから反応が終了及び/又は完了するまで、つまり基質が使い果たされるまでの期間を指す。一例では、基質はアセテートであってもよく、発酵槽内のアセテートが使い果たされて反応が停止し、それ以上アセテートが発酵槽に供給されなくなったときに、反応の完了と見なす。従って反応時間は、発酵の開始 (つまり、適切な発酵条件で、アセテートが発酵槽内の少なくとも 1 つの組換え細胞と最初に接触するとき) から、発酵の終了 (つまり、発酵槽内のアセテートが全てなくなったとき、及び/又は、発酵槽内で反応の持続を中止せざるを得ない別の

40

50

制限要因が生じたとき)までの期間を意味する。一例では、反応期間は24時間、42時間、72時間、96時間などである。別の例では、反応期間は90時間、91時間、92時間、93時間、94時間、95時間、97時間などである。

【0020】

本発明のいずれかの態様による方法からのアセテートは、再活用してもよい。これは、本発明のいずれかの態様により形成されたN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を蓄積し、本分野で既知の手段により分離してもよいことを意味する。それによって、アセテートは反応混合物の中にそのまま残り、再活用されることになる。形成されたN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を回分式又は連続式に取り除いてもよい。後者の場合、形成されたN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体は、本分野で既知の分離ステップにより連続的に取り除かれる。

10

【0021】

本発明のいずれかの態様による方法は、水性培地からN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を抽出するステップを含んでもよい。

【0022】

極性が低く、最終生成物のN-アセチルメチオニンが好ましい効能性質を有しているため、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の方が、それぞれのO-アセチル化合物に比べ、単離作業がより容易である。

【0023】

N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を、N-アセチルメチオニンの形成に用いてもよい。一般的には、無水酢酸のようなアセチル化合物を用いてN-アセチルメチオニンを化学的に形成する。これは追加のステップであり、アセテートなどの副産物を生成する。

20

【0024】

N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を抽出する手段は、本分野で既知の任意の抽出方法を含み得る。抽出方法は、例えばポリエチレングリコールやアミンを含む水性二相系、毛管電気分解、クロマトグラフィなどを含んでもよい。一例では、クロマトグラフが抽出手段として使用される場合、イオン交換カラムが用いられる。別の例では、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を、pHシフトを用いて沈殿させている。N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体は、カルボン酸のように作用すると見なしてもよい。従って、カルボン酸を抽出する本分野において既知の方法を使用して、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を抽出することができる。当業者であれば、単純な試行錯誤により、N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の最も適切な抽出手段を容易に探し出せるであろう。

30

【0025】

本明細書において、細胞又は微生物と組み合わせて用いられる「野生型」という用語は、野生で見られる形態のゲノム構成を有する細胞を意味している。この用語は、全細胞と、個々の遺伝子の両方に適用可能である。従って、「野生型」という用語は、他の態様において(つまり、1つ以上の遺伝子に対して)遺伝子組換えが行なわれているが、対象遺伝子に対しては遺伝子組換えを行っていない細胞も含まれてもよい。一方、「野生型」という用語は、組換え法を用いて対象となる特定の遺伝子の遺伝子配列を少なくとも人の手により部分的に書き換えている細胞は含まない。よって、本発明のいずれかの態様による野生型細胞とは、人為的な手段により全ゲノム及び/又は特定の遺伝子に対して遺伝子変異が生じていない細胞を指す。従って、一例では、E₁酵素に対する野生型細胞は、細胞内でE₁酵素の天然の/未変異の発現を示す細胞を意味する。E₂、E₃、E₄、E₅酵素などに対する野生型細胞に関しても同様に解釈してもよく、細胞内でE₂、E₃、E₄、E₅酵素などの天然の/未変異の発現をそれぞれ示す細胞を意味する。

40

【0026】

本発明のいずれかの態様により用いられる酵素は、単離酵素であってもよい。具体的には、本発明のいずれかの態様により用いられる酵素を、活性状態で、且つ、活性において

50

重要な役割を果たす補因子、基質、補助ポリペプチド及び/又は活性化ポリペプチド、あるいは因子が全て存在している状態で用いてもよい。本明細書において「単離」という用語は、対象の酵素が自然に発生している細胞と比べて濃縮されていることを示す。SDSポリアクリルアミド電気泳動及び/又は活性アッセイにより酵素を濃縮してもよい。例えば、クマシーブルー染料により染色した後、ポリアクリルアミドゲルに対して目視検査を行ない確認している通り、対象の酵素は、調製物に存在する全てのポリペプチドの5%、10%、20%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%以上を構成してもよい。

【0027】

本発明のいずれかの態様により用いられる酵素は、組換えであり得る。本明細書における「組換え」という用語は、天然の状態では生じないが、遺伝子操作の結果として得られた、特にポリペプチドや核酸などの分子そのもの、分子によりコード化されている状態、あるいは、組換え分子を含む細胞を意味する。例えば、核酸分子が触媒活性ポリペプチドをコード化する配列に機能的に連結されているプロモータを有し、プロモータは、上記の触媒活性ポリペプチドが、元の変異していない核酸分子を含む対応の野生型細胞のポリペプチドの存在量に比べ過剰発現するように操作されている場合、核酸分子を組換え型と称する。同様に、本明細書における「組換え細胞」とは、野生型細胞又は微生物とは遺伝的に異なるように、遺伝子組換えを行なわれた原核生物又は真核生物の微生物株を意味する。具体的には、本発明のいずれかの態様による組換え細胞は、遺伝子組換えにより、野生型細胞に比べると少なくとも E_1 及び E_2 酵素の発現が増大しているもよい。別の例では、本発明のいずれかの態様による組換え細胞は、遺伝子組換えにより、野生型細胞に比べると少なくとも E_1 及び E_2 酵素の活性が増大している。 E_1 及び E_2 酵素の活性の増大は、 E_1 及び E_2 酵素が細胞内の特定の反応をより効率的に触媒できるようにする、細胞から見つけれられた酵素の変異の結果である。

【0028】

当業者であれば、本分野で既知の任意の方法により、細胞又は微生物に対して遺伝子組換えを行なうことができるであろう。本発明のいずれかの態様によると、遺伝子組換えを行なった結果、遺伝子組換え細胞は、2時間以内、具体的には8時間又は24時間以内という所定の時間間隔にて、野生型細胞よりも少なくとも1倍又は2倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、あるいは、少なくとも10000倍以上のN-アセチルホモセリン及びその誘導体を形成する。生成物形成の増加は、例えば、本発明のいずれかの態様による細胞と野生型細胞をそれぞれ別々に同様の条件(同じ細胞密度、同じ栄養培地、同じ培養条件)下で、特定の時間、適切な栄養培地を用いて培養し、栄養培地における目標生成物(N-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体)の生成量を測定して定める。

【0029】

遺伝子組換え細胞又は微生物は、野生型細胞又は微生物とは遺伝的に異なる。本発明のいずれかの態様による遺伝子組換え微生物と野生型微生物との遺伝的差異は、完全遺伝子、アミノ酸、ヌクレオチド等の存在の有無であると言えよう。つまり、遺伝子組換え微生物には存在するが、野生型微生物には存在しない。一例では、本発明のいずれかの態様による遺伝子組換え微生物は、野生型細胞に比べて、微生物がN-アセチルホモセリン及びその誘導体を生成することを可能にする酵素を有する。本発明の遺伝子組換え微生物と野生型微生物を比べると、野生型微生物は、遺伝子組換え微生物がN-アセチルホモセリン及びその誘導体を生成することを可能にする酵素の活性を有していないか、あるいは検出できるほどの活性を有していない。本明細書において、「遺伝子組換え微生物」という表現は「遺伝子組換え細胞」で代替可能に使用され得る。本発明のいずれかの態様による遺伝子組換えは、微生物の細胞に対して行なわれる。

【0030】

本発明のいずれかの態様による細胞は、本分野で既知の任意の方法によって、遺伝的に形質転換されている。

10

20

30

40

50

【0031】

本明細書における「組換え細胞は、その野生型に比べて酵素活性の増大を現す」とは、それぞれの酵素の活性が、少なくとも2倍、具体的には少なくとも10倍、より具体的には少なくとも100倍、さらに具体的には少なくとも1000倍、また具体的には少なくとも10000倍増大することを意味する。

【0032】

本明細書における「酵素の活性増大」という句は、細胞内活性の増大と理解すべきである。基本的に、酵素活性の増大は、アミノ酸交換をもたらす、酵素の特定の活性を増大させる一方、特定の代謝産物による阻害やフィードバック阻害を緩和させる選択的変異、遺伝子配列又は酵素をコード化する遺伝子配列のコピー数の増加、強いプロモータ、あるいは活性が増大した対応の酵素をコード化する遺伝子又は対立遺伝子の使用、遺伝子のコドン使用の改変、多様な手法によるmRNA又は酵素の半減期の増加、遺伝子発現調節の改変、並びに、場合によってこれらの手段を組み合わせることによって得ることができる。本発明のいずれかの態様による遺伝子組換え細胞は、例えば、所望の遺伝子、この遺伝子の対立遺伝子、あるいはその一部を含むベクタ、並びに遺伝子を発現させるベクタを用いて、形質転換、形質導入、接合やこれらの組み合わせにより生成することができる。異種発現は、具体的には、細胞の染色体あるいは染色体外複製ベクタに遺伝子又は対立遺伝子を組み込むことにより達成される。

10

【0033】

同じ文脈において、本発明のいずれかの態様における「E_x酵素の活性の減少」という句は、活性が、少なくとも0.5倍、具体的には少なくとも0.1倍、より具体的には少なくとも0.01倍、さらに具体的には少なくとも0.001倍、また具体的には少なくとも0.0001倍減少することを意味する。また、「活性の減少」という句は、検出できない活性（「活性0」）を含む。特定の酵素の活性減少は、例えば、選択的変異、あるいは、特定の酵素活性を低減する手法として当業者に既知の他の手段により可能となる。具体的には、当業者は、例えば、DubEAU et al., 2009、Singh & Rohm, 2008、Lee et al., 2009などを参照とし、特定の遺伝子を中断することにより、タンパク質発現の修飾及び低減、並びにそれに伴う酵素活性の低減をもたらす手法を見出すことができる。本発明のいずれかの態様による核酸配列のうちの1つを含む遺伝子の修飾により細胞の酵素活性の減少を達成してもよい。ここにおいて、修飾は、遺伝子に対する外来DNAの挿入、遺伝子の少なくとも一部の欠失、遺伝子配列の点変異、RNA干渉（siRNA）、アンチセンスRNA、制御配列（例えばプロモータやターミネータ）、遺伝子に隣接するリボソーム結合部位の修飾（挿入、欠失、点変異）からなる群から選択される。標的遺伝子の発現減少を達成するために、例えば、遺伝子の発現、あるいは酵素タンパク質の触媒特性を低減又は排除することができる。必要によって上記2つの手法を組み合わせてもよい。

20

30

【0034】

これに関連して、外来DNAは、遺伝子に対して（生物に対してではない）「外来」である任意のDNA配列を意味すると理解すべきである。つまり、内因性DNA配列も「外来DNA」として作用することができる。これに関連して、選択マーカ遺伝子の挿入により遺伝子が中断されるのが特に好ましいが、よってここでは選択マーカ遺伝子が外来DNAとなる。また、遺伝子座における相同組換えにより挿入を行なうのが好ましい。

40

【0035】

本発明のいずれかの態様による細胞は、メチオニン前駆体の生成率の増加を可能にし得るE₂の増大した発現を有し得る。E₂酵素は、ホモセリンO-アセチルトランスフェラーゼ（metA及び/又はmetX）であってもよい。具体的には、酵素E₂は、アセチル-CoAの存在下で、少なくとも1つのメチオニン前駆体、例えばN-アセチルホモセリン及び/又はその誘導体を生成することができる。一例では、本発明のいずれかの態様による細胞を修飾し、細胞内のメチオニン前駆体の合成に関わる真正又は内因性のmetA遺伝子及び/又はmetX遺伝子をノックアウトして、フィードバック系から遊離して

50

いる外来又は外因性の *met X* 遺伝子及び / 又は *met A* 遺伝子を導入する。メチオニン合成に関わる *met A*、*met B*、*met C*、*met E*、*met H* 遺伝子は、フィードバック制御系により抑制されている。従って本発明のいずれかの態様による細胞において外来の *met A* 及び / 又は *met X* 遺伝子が発現すると、フィードバック制御系とは無関係にこの遺伝子 (*met A* 及び / 又は *met X*) の発現が可能となる。これによって、野生型細胞に対して E_2 酵素の発現が増大し、結果として *N*-アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体の生成を増大させる。

【0036】

一例では、細胞が E_2 酵素の発現を増大させることを可能にするために、メチオニン合成経路の転写調節因子を除去、あるいは弱化する。具体的には、大腸菌における通常の転写調節遺伝子の *met J* 遺伝子を細胞から排除し、*met A* 及び / 又は *met X* 遺伝子の発現を増大してもよい。*met J* 遺伝子を排除し、*met A* 及び / 又は *met X* 遺伝子が過剰発現するこの例では、メチオニン前駆体の発現も増大することになる。

10

【0037】

さらなる例では、ホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼをコード化する *met X* 及び / 又は *met A* それ自体の遺伝子を、*N*-アセチルホモセリン又はその誘導体、つまりメチオニン前駆体の合成を増大させる既知の基本的な遺伝子組換え方法を用いて、細胞内に導入する。

【0038】

一例では、 E_2 酵素は *met A* である。一部の特定微生物におけるホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼを、*met A* と命名してもよい。具体的には、 E_2 酵素は *Methanosarcina acetivorans* から由来する *met A* である。

20

【0039】

met X は、ホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼの活性を有するタンパク質をコード化する遺伝子の一般的な名称である。*met X* は、様々な微生物種から得ることができる。例えば、ホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼペプチドは、コリネバクテリウム属、レプトスピラ属、デイノコッカス属、シュードモナス属、マイコバクテリウム属から得た遺伝子によりコード化されてもよい。具体的には、 E_2 酵素のホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼペプチドは、*Corynebacterium glutamicum*、*Leptospira meyeri*、*Deinococcus radiodurans*、*Pseudomonas aeruginosa*、あるいは *Mycobacterium smegmatis* から由来する遺伝子によりコード化されてもよい。より具体的には、 E_2 酵素は *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 又はそのバリエーション (variant) から由来するホモセリン *O*-アセチルトランスフェラーゼであってもよい。さらに具体的には、 E_2 酵素は、アミノ酸配列 SEQ ID NO: 1 又はそのバリエーションを有する。

30

【0040】

本発明のいずれかの態様による細胞における *met X* 及び / 又は *met A* の発現を導入及び / 又は増強する既知の方法であれば、特に制限なく適用することができる。一例では、組換えにより細胞に遺伝子を導入する方法が用いられる。具体的には、SEQ ID NO: 2 又はそのバリエーションの導入により、組換え細胞における E_2 酵素の発現が増大する。別の例では、遺伝子のプロモータ領域及び 5' - UTR のヌクレオチド配列の修飾あるいは目標遺伝子の ORF 領域に変異の導入を行なう。これらの方法を任意に組み合わせても、細胞内の E_2 酵素の発現を増大及び / 又は増強することができる。*met X* 遺伝子発現の増強により、メチオニン前駆体合成も増加する。具体的には、*met X* 遺伝子発現の増強は、*N*-アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体の合成の増加をもたらすし得る。

40

【0041】

本発明のいずれかの態様による細胞はさらに、野生型細胞に比べ、(a) E_1 酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ (1.1.1.3) の活性が増大していてもよい。 E_1

50

酵素の活性増大は、N - アセチルホモセリン及び/又はその誘導体の前駆体のホモセリンの合成を増加させる。E₁は二官能性アスパルトキナーゼ/ホモセリンデヒドロゲナーゼ1であってもよい。一例では、E₁酵素の活性増大は、ホモセリンデヒドロゲナーゼ(E₁)及び/又はアスパルトキナーゼ(E₅)に少なくとも1つの点変異が生じた結果である。具体的には、E₁酵素は、UniProtデータベース番号P00561の遺伝子によりコード化された野生型タンパク質に比べると、アミノ酸位置345(Ser345Phe)に変異が生じている、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含むthrA遺伝子であってもよい。より具体的には、E₁酵素をコード化する遺伝子は、塩基対位置1034に、CをTに取り替えた点変異が生じており、SEQ ID NO: 3のペプチドをコード化する。さらに具体的には、E₁酵素をコード化するヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 5を有する。変異が生じたE₁酵素は、本明細書では「変異型E₁」と称する。

10

【0042】

別の例では、E₅酵素はアスパルトキナーゼである。具体的には、E₅酵素は、UniProtデータベース番号P08660の遺伝子によりコード化された野生型タンパク質に比べると、アミノ酸位置342(Thr342Ile)に変異が生じている、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含むlysC遺伝子であってもよい。より具体的には、E₅酵素をコード化する遺伝子は、塩基対位置1055に、CをTに取り替えた点変異が生じており、SEQ ID NO: 4のペプチドをコード化する。さらに具体的には、E₅酵素をコード化するヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 6を有する。変異が生じたE₅酵素を、以下、「変異型E₅」と称する。thrA遺伝子及び/又はlysC遺伝子に変異を導入する手段、染色体に標的遺伝子をさらに導入する手段、あるいは加工プラスミドをさらに導入する手段により、thrA及び/又はlysC活性を増強してもよい。より具体的には、SEQ ID NO: 5及びSEQ ID NO: 6をそれぞれ導入することで、組換え細胞におけるE₁及び/又はE₅酵素の活性を増大してもよい。

20

【0043】

さらなる例ではE₁酵素の活性増大は、E₁酵素の点変異及び/又はE₅酵素の点変異によりもたらされる。この場合、E₁及びE₅酵素は、野生型細胞において天然発現(つまり、特定の変異なし)している。E₁酵素の点変異は、トレオニンによるフィードバック阻害を防止する。E₅酵素の点変異は、リジンによるフィードバック阻害を防止する。一例では、細胞は変異型E₁のみを発現する。別の例では、細胞は変異型E₅のみを発現する。さらなる例では、細胞は変異型E₁と変異型E₅の両方を発現する。従って、E₁の活性増大は、E₁及び/又はE₅の変異によりもたらされることになる。

30

【0044】

一例では、本発明のいずれかの態様による細胞は、野生型細胞ではE₁及びE₅を発現しなくてもよい。変異したE₁及び/又はE₅を細胞に導入し、E₁活性の増大をもたらすことになる。

【0045】

本発明のいずれかの態様による組換え細胞は、野生型細胞に比べ、E₁、E₅、E₂酵素の活性が増大していてもよい。

40

【0046】

本発明の教示は、本明細書が明示的に(例えば名称や受け入れ番号の明記)又は黙示的に言及しているアミノ酸配列や核酸配列を有する生物学的高分子は勿論、この配列のバリエーションを用いても行なうことができる。本明細書における「バリエーション」という用語は、基準となるアミノ酸配列又は核酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、あるいは99%類似するアミノ酸配列又は核酸配列を網羅する概念である。ここでは、機能、例えばタンパク質の触媒活性に不可欠ではないアミノ酸、あるいは分子の折り畳みや構造を、欠失、置換、又は挿入による代替するか、必須不可欠のアミノ酸を、基準配列やそれから由来する分子の生物学活性はそのまま維持される保存方式で取り替えるのが好ましい。最近の技術では、所

50

与の核酸配列又はアミノ酸配列2つを整列し、同一性の程度を算出するアルゴリズムがある。Arthur Lesk (2008)、Thompson et al. (1994)、Kato et al. (2005)を参照されたい。「バリエント」という用語は、「相同体」という用語と同義的に且つ交換可能に使用される。そのようなバリエントは、アミノ酸配列又は核酸配列に高分子又はそのバリエントを用いる、導入、欠失、挿入、置換、融合により調製してもよい。一例では、アミノ酸配列に対する「バリエント」は、上記の配列同一性を有するアミノ酸配列は勿論、1つ以上の保存アミノ酸が基準配列や野生型配列に対して変化しているか、あるいは1つ以上の保存アミノ酸変化を含むアミノ酸配列をコード化する核酸配列を有しているアミノ酸配列をも網羅する。一例では、アミノ酸配列又は核酸配列の「バリエント」という用語には、上記の配列同一性を有する配列は勿論のこと、アミノ酸配列又は核酸配列の活性部分及び/又は断片、あるいはアミノ酸配列の活性部分及び/又は断片をコード化する任意の核酸配列をも含まれる。本明細書における「活性部分」という用語は、全長アミノ酸配列未満のアミノ酸配列、あるいは全長アミノ酸配列未満をコード化する核酸配列であり、上記のアミノ酸配列又はコード化アミノ酸配列は、それぞれ、本来の生物学的活性の少なくとも一部を保持している。例えば、プロテアーゼの活性部分及び/又は断片は、ポリペプチドのペプチド結合を加水分解することができる。本明細書における「本来の生物学的活性を少なくとも一部は保持している」という句は、問題のアミノ酸配列が背景活性を超える異なる生物学的活性を有し、この活性を特徴づける動態パラメータ、より具体的にはk_{cat}及びK_Mが、特定の基質に対して基準の分子が示す値より好ましくは3倍、2倍、又は1倍以内にあることを意味する。同様に、核酸の「バリエント」という用語は、相補鎖が、好ましくは厳しい条件下で、基準核酸又は野生型核酸とハイブリダイズする核酸を含む。当業者であれば、開示の機能を実行することができる酵素の配列を容易に定めることができるであろう。

10

20

30

40

50

【0047】

ハイブリダイゼーション反応の妥当性は、当業者であれば容易に決定可能であり、一般的に、プローブ長、洗浄温度、塩濃度に基づく経験的算出により得られる。通常、プローブが長いほど、適切なアニリングのためにより高い温度を必要とし、一方プローブがより短ければ、温度はより低くなる。ハイブリダイゼーションは、通常、相補鎖の融解温度より低温の環境において相補鎖に再アニールする変性DNAの能力に左右される。プローブとハイブリダイズ可能な配列の相同性として所望する程度が高いほど、適用される相対温度も高くなる。その結果、相対温度が高いほど反応条件がより厳しくなり、温度が低いほど厳しさが緩和される傾向を示す。ハイブリダイゼーション反応の妥当性に関しては、F. M. Ausubel (1995)を参照されたい。当業者は、ハイブリダイゼーションによりDNA配列を同定する手段につき、Boehringer Mannheim社の「The DIG System Users Guide for Filter Hybridization」(ドイツ国マンハイム、1993)、Liebl et al. (1991)を参照してもよい。一例では、任意のハイブリダイゼーションに厳しい条件を適用している。つまり、ハイブリダイゼーションは、プローブが目標配列と70%以上同一である場合にのみ起こる。目標配列との同一性により低いプローブもハイブリダイズはできるが、そのようなハイブリッドは不安定であり、厳しい条件、例えば、塩濃度を2×SSCに、必要によって引き続き0.5×SSCに下げ、温度は優先度の高いものから順に、約50～68、約52～68、約54～68、約56～約68、約58～68、約60～68、約62～68、約64～68、約66～68に設定する条件下の洗浄ステップにおいて取り除かれる。特に好ましい実施形態において、温度は約64～68、あるいは66～68である。塩濃度を0.2×SSC、又はさらに0.1×SSCにも調整可能である。基準配列、又は野生型配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するポリヌクレオチド断片を単離してもよい。本明細書における「相同体」という用語は、遺伝情報の縮退に伴って、基準核酸配列と同じアミノ酸配列をコード化する任意の核酸配列を指す。

【0048】

本発明のいずれかの態様による細胞は、広範囲の微生物細胞から選択してもよい。具体的には、細胞は原核細胞、又は下等真核細胞であってもよい。一例では、細胞は、アシネトバクタ属、パチルス属、プレバクテリウム属、パークホルデリア属、クロレラ属、コリネバクテリウム属、シアノバクテリア、エルウィニア属、エスケリキア属、クレブシエラ属、セラチア属、プロビデンシア属、シュドモナス属、リゾビウム属、サルモネラ属、ノストク属からなる群から選択される。細胞は、コリネバクテリウムグルタミクムと大腸菌からなる群から選択されてもよい。一例では、細胞は、大腸菌である。別の例では、細胞は、コリネバクテリウムグルタミクムである。また別の例では、細胞は、サッカロミセス、カンジダ、ピキア、シゾサッカロミセス、ヤロウシアからなる群から選択される真菌、特に出芽酵母の下等真核生物である。細胞は単離細胞、すなわち単一下部の純粋培養物であってもよく、あるいは少なくとも2つの株の混合物を含んでいてもよい。バイオテクノロジー関連細胞は市販されており、例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)やドイツ微生物細胞培養保存機関(DSMZ)から入手することができる。細胞を維持及び修飾する粒子は、先行技術、例えばSambrook/Fritsch/Maniatis(1989)から入手可能である。

10

【0049】

一例では、組換え細胞はさらに、野生型細胞に比べて、

(a) E₃ 酵素、つまりジアミノピメレートデカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) 及び/又は、

20

(b) E₄ 酵素、つまりホモセリンO-トランススクシニラーゼ (EC 2.3.1.46)

の活性が減少している。

【0050】

具体的には、E₃ 及びE₄ 酵素の活性を、本分野における既知の方法により低減又は抑制してもよい。一例では、E₃ 酵素は、SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む。本発明のいずれかの態様による組換え細胞における野生型配列から塩基対を欠失させることで、この酵素を不活性化してもよい。一例では、不活性型E₃ は、野生型lysA配列のbp 4~1239を欠失しているSEQ ID NO: 8のlysA遺伝子によりコード化される。

30

【0051】

別の例では、E₄ 酵素、つまりホモセリンO-スクシニルトランスフェラーゼは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む。本発明のいずれかの態様による組換え細胞において野生型配列から塩基対を欠失させることで、この酵素を不活性化してもよい。一例では、不活性型E₄ は、野生型metA配列のbp 4~909を欠失しているSEQ ID NO: 10のmetA遺伝子によりコード化される。E₄ 酵素に当たるmetAは、E₂ 酵素に当たるmetAとは異なる。当業者であれば、双方が例えば同じ遺伝子名(つまりmetA)を共有していても、異なる機能及び固有のEC分類番号を有することを理解するであろう。本発明のいずれかの態様によるE₂ 酵素の定義の範疇に属するmetAは、EC 2.3.1.31である。本発明のいずれかの態様によるE₄ 酵素の定義の範疇に属するmetAは、EC 2.3.1.46である。E₄ の不活性化により、E₂ 酵素は、野生型細胞におけるフィードバック制御系からの干渉なしに機能を果たすことができる。

40

【0052】

さらなる例では、本発明のいずれかの態様による細胞は、野生型細胞に比べ、E₁ (変異型E₁)、E₅ (変異型E₅)、E₂ 酵素の活性は増大し、E₃ 及びE₄ 酵素の活性が減少している。一例では、本発明のいずれかの態様による細胞は、野生型細胞に比べ、E₁ (変異型E₁) 及びE₂ 酵素の活性は増大し、E₃ 及びE₄ 酵素の活性が減少している。また別の例では、本発明のいずれかの態様による細胞は、野生型細胞に比べE₅ (変異型E₅) 及びE₂ 酵素の活性は増大し、E₃ 及びE₄ 酵素の活性が減少している。

50

【0053】

N - アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体は、L - 立体構造、又はD - 立体構造を有してもよい。具体的には、N - アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体は、O - アセチル - N - アセトアミド - L - ホモセリン、O - アセチル - N - アセトアミド - D - ホモセリン、N - アセトアミド - L - ホモセリン、N - アセトアミド - D - ホモセリンからなる群から選択される。

【0054】

本明細書における「接触」という用語は、本発明のいずれかの態様による方法において、本発明のいずれかの態様による細胞と炭素源を含む培地との直接接触をもたらすことを指す。接触は、細胞及び水性培地との間の炭素源との直接接触であり得る。一例では、細胞、及び炭素源を含む培地は、異なる区画にある。具体的には、炭素源はガス状態であってもよく、本発明のいずれかの態様による細胞を含む培地に添加されてもよい。

10

【0055】

「水性溶液」又は「培地」という用語は、水を含む任意の溶液であって、本発明のいずれかの態様による細胞を、少なくとも一次的に、代謝活性状態及び / 又は生存可能な状態に保つ溶媒として主に水を使用し、必要であれば追加の基質を含む、溶液を指す。当業者は、本発明のいずれかの態様による細胞を保持する培地（例えば、大腸菌及び / 又はコリネバクテリウムグルタミクムの場合、LB培地）として、様々な水性溶液の調製に精通している。水性溶液を最少培地、つまり複合培地とは対照的に、細胞代謝活性状態及び / 又は生存可能な状態に保つために必須不可欠な最小の塩及び栄養素のみを含む、合理的に単純な組成の培地として使用すると、望まない副産物により生成物が不要に汚染されることを回避することができる。例えば、M9培地は最少培地として使用することができる。細胞を、所望の生成物、つまりN - アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体、及びバリアントを生成するまで十分な時間、炭素源と共にインキュベートする。その時間は、例えば少なくとも1時間、2時間、4時間、5時間、10時間、又は20時間となる。さらに、本発明のいずれかの態様による細胞が触媒活性又は代謝活性を維持できる温度を選ばなければならない、例えば10 ~ 42、好ましくは30 ~ 40であり、具体的には、細胞が大腸菌及び / 又はコリネバクテリウムグルタミクムである場合、32 ~ 38となる。

20

【0056】

当業者であれば、本発明のいずれかの態様による方法の実行に必要な他の条件についても理解するであろう。具体的には、容器（例えば、発酵槽）における条件は、使用対象である第1、第2、第3の微生物に応じて変動してもよい。微生物が最適に機能するのに適した条件を変えることは、当業者の知識の範囲内である。

30

【0057】

一例では、本発明のいずれかの態様による方法は、pH 5 ~ 8、5.5 ~ 7の水性培地で実施することができる。圧力は1 ~ 10バールである。

【0058】

本発明の他の態様によると、炭素源からN - アセチルホモセリン及び / 又はその誘導体を生成する、少なくとも1つの組換え細胞の使用を提供し、組換え細胞は、野生型細胞に比べて、

40

(a) E₁ 酵素、つまりホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.3) 及び / 又は E₅ 酵素、つまりアスパルトキナーゼ (EC 2.7.2.4)、並びに

(b) E₂ 酵素、つまりホモセリン - O - アセチルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.31)

の活性が増大している。

【実施例】

【0059】

上記の好ましい実施形態につき、当業者には理解されるように、特許請求の範囲から逸脱することなく、設計、構成、動作における改良や修正を加えることができる。これらの改良は、例えば特許請求の範囲によって含まれることを意図している。

50

【 0 0 6 0 】

実施例 1

大腸菌を用いた酢酸からの O - アセチル - N - アセトアミド - DL - ホモセリンの形成アセテートの O - アセチル - N - アセトアミド - DL - ホモセリンへの生体転換のために、遺伝子組換え株の大腸菌 W 3 1 1 0 l y s A l y s C f b r t h r A f b r m e t A p C D F { P t a c } [t h r A _ _ f b r _ _ E c] { P l a c u v 5 } [m e t X _ _ C g] を用いた。菌株は以下の特徴を有する。

i . ジアミノピメレートデカルボキシラーゼをコード化する大腸菌 W 3 1 1 0 l y s A 遺伝子 (S E Q I D N O : 8) の欠失

i i . ホモセリン O - トランススクシニラーゼをコード化する大腸菌 W 3 1 1 0 m e t A 遺伝子 (S E Q I D N O : 1 0) の欠失

i i i . アスパルトキナーゼ 3 のフィードバック耐性バリエーションをコード化する大腸菌 W 3 1 1 0 l y s C 遺伝子 (S E Q I D N O : 6) の対立遺伝子の発現

i v . 二官能性アスパルトキナーゼ 1 / ホモセリンデヒドロゲナーゼ 1 のフィードバック耐性バリエーションをコード化する大腸菌 W 3 1 1 0 t h r A 遺伝子 (S E Q I D N O : 5) の対立遺伝子の発現

v . ホモセリン O - アセチルトランスフェラーゼをコード化するコリネバクテリウムグルタミクム A T C 1 3 0 3 2 m e t X 遺伝子 (S E Q I D N O : 2) の発現

【 0 0 6 1 】

上記の特徴は、以下の操作によるものとした。

i . p K O 3 誘導体 H M - p - 6 (S E Q I D N O : 1 2) による大腸菌 W 3 1 1 0 l y s A 遺伝子 (b p 4 ~ 1 2 3 9 欠失) の不活性化。

i i . p K O 3 誘導体 p G R - 3 - 4 6 (S E Q I D N O : 1 3) による大腸菌 W 3 1 1 0 m e t A 遺伝子 (b p 4 ~ 9 0 9 欠失) の不活性化。

i i i . p K O 3 誘導体 p J A G - 4 - 4 7 (S E Q I D N O : 1 4) による、 l y s C のフィードバック耐性バリエーションをコード化する l y s C の別の対立遺伝子 (b p 1 0 5 5 の点変異 : C を T に取り替え、 t h r 3 4 2 l l e 、 S E Q I D N O : 6) を用いた、大腸菌 W 3 1 1 0 l y s C 遺伝子の置換。

i v . p K O 3 誘導体 4 - 4 9 (S E Q I D N O : 1 5) による、 t h r A のフィードバック耐性バリエーションをコード化する t h r A の別の対立遺伝子 (b p 1 0 3 4 の点変異 : C を T に取り替え、 S e r 3 4 5 P h e 、 S E Q I D N O : 5) を用いた、大腸菌 W 3 1 1 0 t h r A 遺伝子の置換。

v . プラスミド p C D F { P t a c } [t h r A _ _ f b r _ _ E c] { P l a c u v 5 } [m e t X _ _ C g] (S E Q I D : 1 1) の導入。

【 0 0 6 2 】

遺伝子欠失、並びに対立遺伝子置換に用いられる p K O 3 誘導体の構築するため、標的遺伝子の上流及び下流の相同配列を、下記のプライマを用いて、大腸菌 W 3 1 1 0 のゲノム DNA から得た P C R により増幅した。アセンブリクローニングに用いられる相同体末端をプライマ内に導入した。

【 0 0 6 3 】

m e t A 相同体配列 1

【 表 1 】

metA_up_fp	CTGGTCTCGGTACCCGGGGATCGCGGCCGCCCAACCG CCTGCTCATTTTG	SEQ ID No. 16
metA_up_rp	GCGTTGGATTACCTCGAGCATAACCTGATTACCTCAC TACATAC	SEQ ID No. 17

【 0 0 6 4 】

m e t A 相同体配列 2

10

20

30

40

50

【表 2】

metA_down_f p	TATGCTCGAGGTGAATCCAACGCTGGATTAATCTTC	SEQ ID No. 18
metA_up_rp	CGCCACCGGTCTGACTCTAGAGGATCGCGGCCGCAATC AGCATCGCGAATGGAAG	SEQ ID No. 19

【0065】

lysA 相同体配列 1

【表 3】

MW_15_62_f w	TCTCGGTACCCGGGGATCGCTTTAAGCTGACATCGGGA TAAC	SEQ ID No. 20
MW_15_63_r v	CATAACAACTCCAGATAAGTGCTTTTTTATG	SEQ ID No. 21

【0066】

lysA 相同体配列 2

【表 4】

MW_15_64_f w	CTTATCTGGAGTTTGTTATGCTCGAGGAATTGCTTTAACT GCGGTTAGTC	SEQ ID No. 22
MW_15_65_r v	GGTCGACTCTAGAGGATCGCATACCCGCATTGGTTATCT GTG	SEQ ID No. 23

【0067】

lysCfbr 相同体配列 1

【表 5】

MW_15_66_f w	TCTCGGTACCCGGGGATCGCTCACCCAGGGATTTATCG GTAG	SEQ ID No. 24
MW_15_67_r v	CAAGGATTAATGCCACGCTCAC	SEQ ID No. 25

【0068】

lysCfbr 相同体配列 2

【表 6】

MW_15_68_f w	GTGAGCGTGGCATTAAATCCTTG	SEQ ID No. 26
MW_15_69_r v	GGTCGACTCTAGAGGATCGCGGAATTCGTTTGCGAGCA GAAC	SEQ ID No. 27

【0069】

thrAfr 相同体配列 1

【表 7】

JC-15-009_fw	GCTGGTCTCGGTACCCGGGGATCGCCATTCCGGCTGAT CACATGG	SEQ ID No. 28
JC-15-006_rv	GTAATCAGCACCCACGAAAATACGGG	SEQ ID No. 29

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

t h r A f b r 相同体配列 2

【 表 8 】

JC-15-007_fw	CCCGTATTTTCGTGGTGCTGATTAC	SEQ ID No. 30
JC-15-010_rv	CCACCGGTCGACTCTAGAGGATCGCTTGCGCCAGTTCT TCCTGCC	SEQ ID No. 31

【 0 0 7 1 】

Phusion (登録商標) High-Fidelity Master Mix を使用し、製造業者 (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って PCR を実施した。熱サイクルプロファイルは、初期変性のために、98 で3分間、それぞれ、10秒間98、30秒間60 ~ 68 (勾配)、20秒間72、最後の10分間72 で保持するステップを含み、35サイクルを繰り返した。精製キット (QiaQuick PCR 精製キット、及び QiaQuick ゲル抽出キット: Qiagen 社、ドイツ国ヒルデン市) の製造業者に従って、ゲル抽出、又は PCR 精製を行ない、PCR 生成物を精製した。NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix を使用し、製造業者のマニュアル (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って、精製した PCR 生成物を、NotI 制限 pKO3 プラスミドに組み立てた。形質転換受容性細胞 (NEB10 - エレクトロコンピテント大腸菌、New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) の製造業者に従って、大腸菌 DH10 の形質転換を実施した。切断解釈、並びに DNA 配列の決定により、最終プラスミドの存在を確認した。

【 0 0 7 2 】

大腸菌 W3110 から得たアスパラギン酸キナーゼ t h r A のフィードバック耐性バリエーションをコード化する t h r A、並びに、コリネバクテリウムグルタミクム ATCC 13032 から得たホモセリンアセチルトランスフェラーゼをコード化する m e t X に用いられる大腸菌発現ベクタを構築するに当たり、両方の遺伝子を供与体生物のゲノム DNA から得た PCR により増幅させた。フィードバック耐性バリエーションをもたらす t h r A の点変異は、フォワードプライマにおいて行なわれた。t h r A 遺伝子を、別のベクタから得た PCR により増幅された t a c - プロモータ (SEQ ID NO: 32) の下流でクローニングした。増幅には、下記のプライマが用いられた。

【 0 0 7 3 】

m e t X _ C g

【 表 9 】

JC-15-001	GGATCTAGGAACCAAGGAGAGTGGCATGCCACCCCTCGCGCCT TC	SEQ ID NO. 33
JC-15-002	CAATTGGATCCGTTTATCCGGAGGGTTGCCTGTG	SEQ ID NO. 34

【 0 0 7 4 】

P t a c

【 表 1 0 】

JC-15-003	ACCCTCCGGATAAACGGATCCAATTGTGAGCGGATAAC	SEQ ID NO. 35
JC-15-004	ACACTCGCATATGTTTTACCTCCTGTAAAC	SEQ ID NO. 36

【 0 0 7 5 】

t h r A - 1

【表 1 1】

JC-15-005	CAGGAGGTAAAACATATGCGAGTGTGGAAGTTCGG	SEQ ID NO. 37
JC-15-006	GTAATCAGCACCCACGAAAATACGGG	SEQ ID NO. 38

【0076】

thrA - 2

【表 1 2】

JC-15-007	CCCGTATTTTCGTGGTGCTGATTAC	SEQ ID NO. 39
JC-15-008	GGTGCGCCAGGAGAGTTGTTGATTTATCAGACTCCTAACTTCC ATGAGAG	SEQ ID NO. 40

10

【0077】

Phusion (登録商標) High-Fidelity Master Mix を使用し、製造業者 (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って PCR を実施した。熱サイクルプロファイルは、初期変性のために、98 で3分間、それぞれ、10秒間98、30秒間60 ~ 70 (勾配)、45秒間72、最後の10分間72 で保持するステップを含み、35サイクルを繰り返した。精製キット (QiaQuick PCR 精製キット、及び QiaQuick ゲル抽出キット: Qiagen 社、ドイツ国ヒルデン市) の製造業者に従って、ゲル抽出、又は PCR 精製を行ない、PCR 生成物を精製した。NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix を使用し、製造業者のマニュアル (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って、精製した PCR 生成物を、NdeI/XbaI 制限高コピーベクター pJ281_Placuv5 (SEQ ID NO: 41) に組み立てた。形質転換受容性細胞 (ElectroMAX DH10B、Thermo Fisher Scientific 社、米国マサチューセッツ州ウォルサム市) の製造業者に従って、大腸菌 DH10 の形質転換を実施した。切断解釈、並びに DNA 配列の決定により、最終プラスミド pJAG-4-48 (SEQ ID NO: 42) の存在を確認した。

20

30

【0078】

さらに、thrA 遺伝子及び metX 遺伝子を、既に tac プロモータ配列を含む NdeI/XhoI 制限 pCDF 誘導体 (pCDF_Ptac、SEQ ID NO: 43) にサブクローニングした。サブクローニングのために、標的遺伝子をアセンブリクローニングに用いられる相同体配列を有する下記のプライマを使用して PCR により増幅した。

【0079】

thrA

【表 1 3】

thrAfbr_fw	GTTTAAACAGGAGGTAAAACATATGC	SEQ ID NO. 44
thrAfbr_rev	GCTCACTGCCTTATCAGACTCCTAACTTCCATG	SEQ ID NO. 45

40

【0080】

Placuv5 - metX

【表 1 4】

Placuv5_fw	AGTCTGATAAGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG	SEQ ID NO. 46
metX_rev	CAGCGTTTTCTTTACCAGACCTATTAGATGTAGAACTCGATGT AGGTC	SEQ ID NO. 47

【0081】

50

Phusion (登録商標) High-Fidelity Master Mixを使用し、製造業者(New England Biolabs社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市)に従ってPCRを実施した。熱サイクルプロファイルは、初期変性のために、98 で3分間、それぞれ、10秒間98、20秒間60 ~ 68 (勾配)、45秒間72、最後の10分間72 で保持するステップを含み、35サイクルを繰り返した。精製キット(QiaQuickゲル抽出キット: Qiagen社、ドイツ国ヒルデン市)の製造業者に従って、ゲル抽出を行ない、PCR生成物を精製した。

【0082】

NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mixを使用し、製造業者のマニュアル(New England Biolabs社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市)に従って、精製したPCR生成物を、NdeI/XhoI制限ベクターpCDF_Ptac(SEQ ID NO)に組み立てた。形質転換受容性細胞(NEB10-エレクトロコンピテント大腸菌、New England Biolabs社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市)の製造業者に従って、大腸菌DH10の形質転換を実施した。切断解釈、並びにDNA配列の決定により、最終プラスミドpJAG-4-50(SEQ ID No: 48)の存在を確認した。

【0083】

プラスミドpKO3、並びに上記に記載した方法(Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization. J Bacteriol. 179 (20): 6228-37)を用いて、遺伝子欠失及び対立遺伝子置換を行なった。大腸菌W3110の形質転換は、本分野で既知の電気穿孔法を用いて行なわれた。

【0084】

大腸菌を、LB寒天プレート(寒天15g/L、酵母エキス5g/L、トリプトン10g/L、NaCl 10g/L、pH7.0、硫酸スペクチノマイシン100mg/Lをさらに含む)を用いて、37 で24時間培養した。

【0085】

一次前培養の際には、100mlの振とうフラスコにLB培地(酵母エキス5g/L、トリプトン10g/L、NaCl 10g/L、pH7.0、硫酸スペクチノマイシン100mg/Lをさらに含む)3x5mlを充填し、新しくインキュベートした寒天プレートから得た単一コロニを接種して、37、200rpmで7時間培養した。その結果、 $OD_{600nm} > 3.0$ となった。

【0086】

二次前培養の際には、500mlの振とうフラスコにM9培地(pH7.40、 $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ 13.68g/L、 KH_2PO_4 3.00g/L、NaCl 0.50g/L、 NH_4Cl 2.00g/L、 NH_4 酢酸塩 5.00g/L、 $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0.49g/L、HCl(25%) 0.13ml/L、 $MnCl_2 \times 7 H_2O$ 1.91mg/L、 $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ 1.87mg/L、Na-EDTA x 2 H_2O 0.84mg/L、 H_3BO_3 0.30mg/L、 $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ 0.25mg/L、 $CaCl_2 \times 2 H_2O$ 4.70mg/L、 $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 17.80mg/L、 $CuCl_2 \times 2 H_2O$ 0.15mg/L、硫酸スペクチノマイシン100mg/L、3mMメチオニン、3mMリジンをさらに含む)8x50mlを充填し、プール次前培養物からそれぞれ得た0.5ml細胞懸濁液を接種して、37、200rpmで18時間培養した。その結果、 $OD_{600nm} > 1.5$ となった。

【0087】

続いて、細胞懸濁液を遠心分離にかけ、新しいM9培地で洗浄し、再度遠心分離にかけ

10

20

30

40

50

た。本培養の際には、新しいM9培地（メチオニン及びリジンは含まない）200mlを500mlのガラス瓶に充填し、遠心分離と洗浄にかけた前培養物の細胞を接種した。その結果、 OD_{600nm} は1.0となった。ブチルゴム栓で気密に密封できる耐圧ガラス瓶の中で、培養を行なった。培養物に対して、合成空気（ N_2 79.5%、 O_2 20.5%）を用いて、30、150rpm、通気速度4L/時間で119時間、オープンウォーターバスシェーカ内でインキュベートを行なった。反応器の中央に取り付けられた孔径10 μ mのスパージャを通して空気を培地中に排出した。25%酢酸を自動的に添加し、pHを7.3に保持した。4時間後、誘導のために1mMのIPTGを添加した。培養の開始時点及び培養期間中に、サンプルを採取した。採取したサンプルに対し、光学密度、pH、様々な対象について分析を行なった（NMR及びLC-MSを使用）。HR-ESI-LCMSを、150x2mmのAccucore aq C18（R138）カラムを装備したLTQ-Orbitrap Eliteを備えるSurveyor HPLC1250により測定した。勾配溶出は、流速0.2ml/分と40で、0%B（3）-9-60%B-0、1-80%B（5）であった。O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンを、O-アセチル-L-ホモセリンに対して定量した。

【0088】

培養期間中、O-アセチル-L-ホモセリンの濃度は0から180mg/Lに、N-アセチル-L-ホモセリンの濃度は0から708mg/Lに増加した。O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンが6.9mg/L生成された。この間、アセテートの8.7g/Lが用いられた。

【0089】

実施例2

コリネバクテリウムグルタミカムを用いた酢酸からのO-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンの形成

アセテートのO-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンへの生体転換のために、遺伝子組換え株のコリネバクテリウムグルタミカムMH20-22B hom__fbr pECXC99E- {Ptrc} [metX__Cg]を用いた。菌株のコリネバクテリウムグルタミカムMH20-22Bは、Schrumpf et al. (Appl Microbiol Biotechnol (1992) 37: 566-571)に記載され、フィードバック耐性アスパラギン酸キナーゼを発現する、化学変異体である。株を、Sahme et al. (Ann NY Acad Sci. 1996年5月15日、782: 25-39)によって、フィードバック耐性ホモセリンデヒドロゲナーゼをさらに発現するコリネバクテリウムグルタミカムMH20-22B hom__fbr株に改変した。また、株に、コリネバクテリウムグルタミカムATCC13032からのホモセリンO-アセチルトランスフェラーゼ (metX) コード化するプラスミドpECXC99E- {Ptrc} [metX__Cg] (SEQ ID NO: 49)で、形質転換を施した。

【0090】

metXに用いられるコリネバクテリウムグルタミカム発現ベクタを構築するに当たり、遺伝子を、下記のプライマを用いて、供与体生物のゲノムDNAから得たPCRにより増幅させた。

【表15】

MW_15_50_fw	ATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTAGTCTTGCCACCCAGA ACAG	SEQ ID NO. 50
MW_15_51_rv	AACAGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTGGTTTATCCGGAGGG TTG	SEQ ID NO. 51

【0091】

Phusion（登録商標）High-Fidelity Master Mixを使

用し、製造業者 (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って PCR を実施した。熱サイクルプロファイルは、初期変性のために、98 で5分間、それぞれ、10秒間98、20秒間60、39秒間72、最後の10分間72 で保持するステップを含み、35サイクルを繰り返した。

【0092】

精製キット (QiaQuick PCR 精製キット: Qiagen 社、ドイツ国ヒルデーン市) の製造業者に従って、PCR 精製を行ない、PCR 生成物を精製した。NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix を使用し、製造業者のマニュアル (New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) に従って、精製した PCR 生成物を、BamHI/PstI 制限ベクター pECXC99E (SEQ ID NO: 52) に組み立てた。形質転換受容性細胞 (NEB 10-、New England Biolabs 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ市) の製造業者に従って、大腸菌 DH10 の形質転換を実施した。切断解釈、並びに DNA 配列の決定により、最終プラスミド pECXC99E - {Ptrc} [metX_Cg] (SEQ ID NO: 49) の存在を確認した。

【0093】

コリネバクテリウムグルタミクム ATCC 13032 の形質転換は、上記に記載しているように、例えば van der Rest ME、Lange C、Molenaar D により行なわれた。電気穿孔法後の熱ショックは、異種プラスミド DNA を用いたコリネバクテリウムグルタミクムの形質転換が非常に効率的に行なわれるように誘導する。

【0094】

コリネバクテリウムグルタミクム MH20-22B hom_fbr pECXC99E - {Ptrc} [metX_Cg] を、BHI 寒天プレート (脳抽出物 7.8 g/L、グルコース 2.0 g/L、Na₂HPO₄ 2.0 g/L、心臓抽出物 9.7 g/L、ペプトン 10.0 g/L、NaCl 5.0 g/L、寒天 15.0 g/L、pH 7.4、クロラムフェニコール 7.5 mg/L をさらに含む) を用いて、30 で72時間培養した。

【0095】

前培養の際には、500 ml の振とうフラスコに LB 培地 (酵母エキス 5 g/L、トリプトン 10 g/L、NaCl 10 g/L、pH 7.0、酢酸カリウム 17.95 g/L とクロラムフェニコール 7.5 mg/L をさらに含む) 4 x 50 ml を充填し、新しくインキュベートした寒天プレートから得た細胞の全プールを接種して、30、120 rpm で22時間培養した。その結果、OD_{600nm} > 3.0 となった。続いて、細胞懸濁液を遠心分離にかけ、新しい CGF1 培地で洗浄し、再度遠心分離にかけた。

【0096】

本培養の際には、新しい CGF1 培地 (pH は 7.2、(NH₄)₂SO₄ 2 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、FeSO₄ x 7 H₂O 10 mg/L、MnSO₄ x 1 H₂O 7.6 mg/L、MgSO₄ x 7 H₂O 0.246 g/L、酢酸アンモニウム 10.8 g/L、L-ロイシン 0.1 g/L、クロラムフェニコール 7.5 mg/L をさらに含む) 200 ml を 500 ml のガラス瓶に充填し、遠心分離と洗浄にかけた前培養物の細胞を接種した。その結果、OD_{600nm} は 1.0 となった。ブチルゴム栓で気密に密封できる耐圧ガラス瓶の中で、培養を行なった。培養物に対して、合成空気 (N₂ 79.5%、O₂ 20.5%) を用いて、30、120 rpm、通気速度 4 L/時間で137時間、オープンウォーターバスシェーカ内でインキュベートを行なった。反応器の中央に取り付けられた孔径 10 μm のスパージャを通して空気を培地中に排出した。25% 酢酸を自動的に添加し、pH を 7.2 に保持した。21時間後、誘導のために 1 mM の IPTG を添加した。培養の開始時点及び培養期間中に、サンプルを採取した。採取したサンプルに対し、光学密度、pH、様々な対象について分

析を行なった (NMR及びLC-MSを使用)。HR-ESI-LCMSを、150×2 mmのAccucore aq C18 (R138)カラムを装備したLTQ-Orbitrap Eliteを備えるSurveyor HPLC1250により測定した。勾配溶出は、流速0.2 mL/分と40 で、0%B(3)-9-60%B-0、1-80%B(5)であった。O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンを、O-アセチル-L-ホモセリンに対して定量した。

【0097】

培養期間中、O-アセチル-L-ホモセリンの濃度は0から230 mg/Lに、N-アセチル-L-ホモセリンの濃度は0から306 mg/Lに増加した。O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンが8.3 mg/L生成された。この間、アセテートの35.2 g/Lが用いられた。

10

【0098】

実施例3

コリネバクテリウムグルタミクムに用いた酢酸からのO-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンの非形成

アセテートのL-ホモセリンへの生体転換のために、遺伝子組換え株のコリネバクテリウムグルタミクムMH20-22B hom_fbrを用いた。菌株のコリネバクテリウムグルタミクムMH20-22Bは、Schrumpf et al. (Appl Microbiol Biotechnol (1992) 37:566-571)に記載され、フィードバック耐性アスパラギン酸キナーゼを発現する、化学変異体である。株を、Sahm et al. (Ann N Y Acad Sci. 1996年5月15日、782:25-39)によって、フィードバック耐性ホモセリンデヒドロゲナーゼをさらに発現するコリネバクテリウムグルタミクムMH20-22B hom_fbr株に改変した。

20

【0099】

コリネバクテリウムグルタミクムMH20-22B hom_fbrを、コリネバクテリウム寒天プレート(pH7.3、カゼインペプトントリプシン消化物10 g/L、酵母エキス5 g/L、グルコース5 g/L、NaCl 5 g/L、寒天15 g/L)を用いて、30 で72時間培養した。

【0100】

前培養の際には、500 mlの振とうフラスコにCGS1培地(pH7.00、ペプトン10 g/L、牛肉抽出物5 g/L、NaCl 2.5 g/L、酢酸カリウム17.95 g/Lをさらに含む)2×50 mlを充填し、新しくインキュベートした寒天プレートから得た細胞の全プールを接種して、30、120 rpmで28時間培養した。その結果、OD_{600nm}>1.0となった。培養の後、細胞懸濁液を遠心分離にかけ、新しいCGF1培地(pHは7.2、(NH₄)₂SO₄ 2 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、FeSO₄×7 H₂O 10 mg/L、MnSO₄×1 H₂O 7.6 mg/L、MgSO₄×7 H₂O 0.246 g/L)で洗浄し、再度遠心分離にかけた。

30

【0101】

本培養の際には、新しいCGX培地(pH7.40、(NH₄)₂SO₄ 20 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、MgSO₄×7 H₂O 0.25 g/L、FeSO₄×7 H₂O 10 mg/L、MnSO₄×H₂O 10 mg/L、ZnSO₄×7 H₂O 1 mg/L、CuSO₄×5 H₂O 0.3 mg/L、NiCl₂×6 H₂O 0.037 mg/L、ビオチン0.2 mg/L、CaCO₃ 20 g/L、グルコース40 g/L、L-ロイシン0.05 g/L)30 mlを250 mlのガラス瓶に充填し、遠心分離と洗浄にかけた前培養物の細胞を接種した。その結果、OD_{600nm}は0.2となった。培養物に対して、30、150 rpmで142時間、インキュベートを行なった。培養の開始時点及び培養期間中に、サンプルを採取した。採取したサンプルに対し、光学密度、pH、様々な対象について分析を行なった(

40

50

NMRを使用)。

【0102】

培養期間中、L-ホモセリンの濃度は0から535mg/Lに、L-リジンの濃度は0から888mg/Lに、L-アラニンの濃度は0から350mg/Lに増加した。O-アセチル-L-ホモセリン、N-アセチル-L-ホモセリン、あるいはO-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンは生成されなかった。

【0103】

実施例4

大腸菌に用いた酢酸からのO-アセチル-N-アセトアミド-L-ホモセリンの非形成本実施例では、遺伝子組換え株の大腸菌W3110 lysA lysC fbr thrA fbr metAを用いた。菌株は以下の特徴を有する。

i. ジアミノピメレートデカルボキシラーゼをコード化する大腸菌W3110 lysA遺伝子(SEQ ID NO: 8)の欠失

ii. ホモセリンO-トランススクシニラーゼをコード化する大腸菌W3110 metA遺伝子(SEQ ID NO: 10)の欠失

iii. アスパルトキナーゼ3のフィードバック耐性バリエーションをコード化する大腸菌W3110 lysC遺伝子(SEQ ID NO: 6)の対立遺伝子の発現

iv. 二官能性アスパルトキナーゼ1/ホモセリンデヒドロゲナーゼ1のフィードバック耐性バリエーションをコード化する大腸菌W3110 thrA遺伝子(SEQ ID NO: 5)の対立遺伝子の発現

【0104】

上記の特徴は、以下の操作によるものとした。

i. pKO3誘導体HM-p-6(SEQ ID NO: 12)による大腸菌W3110 lysA遺伝子(bp4~1239欠失)の不活性化。

ii. pKO3誘導体pGR-3-46(SEQ ID NO: 13)による大腸菌W3110 metA遺伝子(bp4~909欠失)の不活性化。

iii. pKO3誘導体pJAG-4-47(SEQ ID NO: 14)による、lysCのフィードバック耐性バリエーションをコード化するlysCの別の対立遺伝子(bp1055の点変異:CをTに取り替え、thr342Ile、SEQ ID NO: 6)を用いた、大腸菌W3110 lysC遺伝子の置換。

iv. pKO3誘導体4-49(SEQ ID NO: 15)による、thrAのフィードバック耐性バリエーションをコード化するthrAの別の対立遺伝子(bp1034の点変異:CをTに取り替え、Ser345Phe、SEQ ID NO: 5)を用いた、大腸菌W3110 thrA遺伝子の置換。

【0105】

pKO3誘導体の構築は、実施例1に記載のように行なった。

【0106】

プラスミドpKO3、並びに上記に記載した方法(Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli: application to open reading frame characterization. J Bacteriol. 179(20): 6228-37)を用いて、遺伝子欠失及び対立遺伝子置換を行なった。大腸菌W3110の形質転換は、本分野で既知の電気穿孔法を用いて行なわれた。大腸菌を、LB寒天プレート(寒天15g/L、酵母エキス5g/L、トリプトン10g/L、NaCl 10g/L、pH7.0)を用いて、37で24時間培養した。

【0107】

LB培地(酵母エキス5g/L、トリプトン10g/L、NaCl 10g/L、pH7.0)5mlを培養管に充填し、新しくインキュベートした寒天プレートから得た単一

10

20

30

40

50

コロニを接種して、 37°C 、 200rpm で6時間培養した。M9 - グルコース培地 ($\text{pH}7.40$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 13.68g/L 、 KH_2PO_4 3.00g/L 、 NaCl 0.50g/L 、 NH_4Cl 2.00g/L 、グルコース 20.00g/L 、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49g/L 、 HCl (25%) 0.13ml/L 、 $\text{MnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.91mg/L 、 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.87mg/L 、 $\text{Na-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.84mg/L 、 H_3BO_3 0.30mg/L 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L 、 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 4.70mg/L 、 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 17.80mg/L 、 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15mg/L) 20mL を、 3mM メチオニンと 3mM リジンと共に、 250mL のバッフル付き振とうフラスコに充填し、細胞懸濁液 0.5mL を接種した。培養物に対して 37°C 、 200rpm で一晩、インキュベートを行なった。その結果、 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ は 12.3 となった。細胞懸濁液を用いて、 250mL のバッフル付き振とうフラスコに 3mM メチオニン及び 3mM リジンと共に充填したM9 - グルコース培地 50mL に接種した。その結果、 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ は 0.2 となった。培養物に対して 30°C 、 200rpm で 4.5 時間、インキュベートを行なった。その結果、 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ は 1.39 となった。IPTGを濃度 1mM になるまで培養物に添加し、培養物に対して 30°C 、 200rpm で 23.5 時間、インキュベートを行なった。サンプルを 28 時間の培養を通して採取し、NMRにより分析した。

10

【0108】

培養を $0\sim 28$ 時間を行なう間、O - アセチル - L - ホモセリンやO - アセチル - N - アセトアミド - L - ホモセリンは、一切検出されなかった。

20

【0109】

実施例5

発酵サンプルにおけるO - アセチル - N - アセトアミド - DL - ホモセリンの検出

大腸菌W3110 *lysA lysC fbr thrA fbr metA pCDF {Ptac} [thrA__fbr__Ec] {Placuv5} [metX__Cg]*を、LB寒天プレート (寒天 15g/L 、酵母エキス 5g/L 、トリプトン 10g/L 、 NaCl 10g/L 、 $\text{pH}7.0$ 、硫酸スペクチノマイシン 100mg/L をさらに含む)を用いて、 37°C で 24 時間培養した。

【0110】

一次前培養の際には、 100mL の振とうフラスコにLB培地 $3 \times 5\text{mL}$ (酵母エキス 5g/L 、トリプトン 10g/L 、 NaCl 10g/L 、 $\text{pH}7.0$ 、硫酸スペクチノマイシン 100mg/L をさらに含む)を充填し、新しくインキュベートした寒天プレートから得た単一コロニを接種して、 37°C 、 200rpm で 7 時間培養した。その結果、 $\text{OD}_{600\text{nm}} > 3.0$ となった。

30

【0111】

二次前培養の際には、 500mL の振とうフラスコにM9培地 ($\text{pH}7.40$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 13.68g/L 、 KH_2PO_4 3.00g/L 、 NaCl 0.50g/L 、 NH_4Cl 2.00g/L 、 NH_4 酢酸塩 5.00g/L 、 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49g/L 、 HCl (25%) 0.13ml/L 、 $\text{MnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.91mg/L 、 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 1.87mg/L 、 $\text{Na-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.84mg/L 、 H_3BO_3 0.30mg/L 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25mg/L 、 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 4.70mg/L 、 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 17.80mg/L 、 $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15mg/L 、硫酸スペクチノマイシン 100mg/L 、 3mM メチオニン、 3mM リジンをさらに含む) $8 \times 50\text{mL}$ を充填し、プール次前培養物からそれぞれ得た 0.5mL 細胞懸濁液を接種して、 37°C 、 200rpm で 18 時間培養した。その結果、 $\text{OD}_{600\text{nm}} > 1.5$ となった。

40

【0112】

続いて、細胞懸濁液を遠心分離にかけ、新しいM9培地で洗浄し、再度遠心分離にかけ

50

る。本培養の際には、新しいM9培地（メチオニン及びリジンは含まない）200 mLを500 mLのガラス瓶に充填し、遠心分離と洗浄にかけた前培養物の細胞を接種した。その結果、 OD_{600nm} は1.0となった。ブチルゴム栓で気密に密封できる耐圧ガラス瓶の中で、培養を行なった。培養物に対して、合成空気（ N_2 79.5%、 O_2 20.5%）を用いて、30、150 rpm、通気速度4 L/時間で119時間、オープンウォーターバスシェーカー内でインキュベートを行なった。反応器の中央に取り付けられた孔径10 μm のスパージャを通して空気を培地中に排出した。25%酢酸を自動的に添加し、pHを7.3に保持した。4時間後、誘導のために1 mMのIPTGを添加した。119時間が経過後、発酵からサンプルを採取し、LC-MSを用いて分析した。HR-LCMSを、150 \times 2 mmのAccucore aq C18 (R138)カラムを装備したLTQ-Orbitrap Eliteを備えるAccela 1250により測定した。勾配溶出は、流速0.2 mL/分と40 で、0% B (1) - 19 - 80% B (15)であった。溶離液Aは0.05%ペルフルオロ酪酸を含む水であり、溶離液Bは0.05%ペルフルオロ酪酸を含むメタノールであった。 m/z [M+H]⁺ 204.0868で6.68分に溶出するピークは、O-アセチル-N-アセトアミド-DL-ホモセリンとして同定された。

【配列表】

2019523271000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/068841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07C233/47 C12P13/06 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2 292 783 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP [KR]) 9 March 2011 (2011-03-09) page 5, paragraph [0039] - page 6, paragraph [0042]; claim 9; examples -----	1-15
A	WO 2012/091479 A2 (CJ CHEILJEDANG CORP [KR]; HONG SOON WON [KR]; HWANG IN SEOK [KR]; LEE) 5 July 2012 (2012-07-05) page 49 - page 52; example 7; tables 9-10 -----	1-15
A	US 7 368 600 B2 (HATELEY MARTIN [DE] ET AL) 6 May 2008 (2008-05-06) column 18 - column 19; example 10 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 September 2017		26/09/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bedel, Christian

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/068841

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIMOTHY L. BORN ET AL: "Enzyme-Catalyzed Acylation of Homoserine: Mechanistic Characterization of the Haemophilus influenzae met2 -Encoded Homoserine Transacetylase +", BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 29, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 8556-8564, XP055326296, US ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi000462p the whole document -----	1-15
A	EP 0 959 070 A1 (DEGUSSA [DE]) 24 November 1999 (1999-11-24) page 15, paragraph [0065] -----	1
A	THOMAS WILLKE: "Methionine production-a critical review", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98, no. 24, 8 November 2014 (2014-11-08), pages 9893-9914, XP055325899, DE ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/s00253-014-6156-y the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/068841

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2292783	A2	09-03-2011	CN 102002472 A	06-04-2011
			CN 103756948 A	30-04-2014
			EP 2292783 A2	09-03-2011
			JP 5536496 B2	02-07-2014
			JP 2011045359 A	10-03-2011
			KR 20110023702 A	08-03-2011
			MY 15555 A	30-10-2015
			US 2011053252 A1	03-03-2011
WO 2012091479	A2	05-07-2012	BR 112013016810 A2	09-08-2016
			CN 103476938 A	25-12-2013
			CN 106480120 A	08-03-2017
			EP 2658986 A2	06-11-2013
			JP 2014501116 A	20-01-2014
			JP 2017123845 A	20-07-2017
			KR 20120129994 A	28-11-2012
			KR 20140146638 A	26-12-2014
			RU 2013131758 A	10-02-2015
			US 2012178966 A1	12-07-2012
			US 2016108445 A1	21-04-2016
WO 2012091479 A2	05-07-2012			
US 7368600	B2	06-05-2008	BR PI0707299 A2	03-05-2011
			CA 2640523 A1	02-08-2007
			CN 101374806 A	25-02-2009
			DE 102006004063 A1	02-08-2007
			EP 1976827 A2	08-10-2008
			JP 5383203 B2	08-01-2014
			JP 2009524615 A	02-07-2009
			US 2007190622 A1	16-08-2007
			US 2008146840 A1	19-06-2008
			WO 2007085514 A2	02-08-2007
EP 0959070	A1	24-11-1999	AT 372983 T	15-09-2007
			CA 2272664 A1	22-11-1999
			DE 19822912 A1	25-11-1999
			EP 0959070 A1	24-11-1999
			JP H11349567 A	21-12-1999
			NO 992460 A	23-11-1999
			US 6281364 B1	28-08-2001
			US 2001025109 A1	27-09-2001
US 2002045763 A1	18-04-2002			

フロントページの続き

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

(74) 代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72) 発明者 ハース, トーマス

ドイツ国, ミュンスター 4 8 1 6 1, バッケンカンブ 9

(72) 発明者 シャファー, ステフェン

ドイツ国, ヘルテン 4 5 6 9 9, アントニウスシュトラッセ 1 9

(72) 発明者 ビュルター, トーマス

ドイツ国, デュイスブルク 4 7 2 7 9, マリーエンブルガー ウーファー 1 3

(72) 発明者 ベック, シモン

ドイツ国, ミュンスター 4 8 1 6 1, ヴォエステンカンブ 2 3

Fターム(参考) 4B064 AE09 CA02 CA19 CC24 DA01 DA10 DA11

4H006 AA01 AB84

【要約の続き】

