



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2012135337/10, 17.08.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.08.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.08.2012

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2014 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 10.05.2015 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 0006897048 B2, 24.05.2005. RU  
2316588 C1, 10.02.2008. EP 0001201758 A1,  
02.05.2002

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1, корп.1,  
Закрытое акционерное общество "Научно-  
исследовательский институт Аджиномото-  
Генетика" (ЗАО "АГРИ"), В.Г. Параскевову, С.А.  
Иванову

(72) Автор(ы):

Гусятинер Михаил Маркович (RU),  
Ростова Юлия Георгиевна (RU),  
Ворошилова Эльвира Борисовна (RU),  
Кирюхин Михаил Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество "Научно-  
исследовательский институт Аджиномото-  
Генетика" (ЗАО "АГРИ") (RU)

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АРГИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА  
Enterobacteriaceae, СОДЕРЖАЩЕЙ N-АЦЕТИЛОРНИТИНДЕАЦЕТИЛАЗУ С НАРУШЕННОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и  
представляет собой способ получения L-  
аминокислоты, такой как L-аргинин,  
ферментацией с использованием бактерии рода  
Escherichia, которая модифицирована таким  
образом, что содержит ген argJ, который кодирует  
фермент, имеющий, по меньшей мере,

орнитинацетилтрансферазную активность, и при  
этом бактерия модифицирована таким образом,  
что содержит N-ацетилорнитиндеацетилазу с  
нарушенной активностью. Изобретение позволяет  
получать L-аргинин с высокой степенью  
эффективности. 2 н. и 8 з.п. ф-лы, 2 ил., 4 табл., 7  
пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 550 269**<sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 13/10* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2012135337/10, 17.08.2012

(24) Effective date for property rights:  
17.08.2012

Priority:

(22) Date of filing: 17.08.2012

(43) Application published: 27.02.2014 Bull. № 6

(45) Date of publication: 10.05.2015 Bull. № 13

Mail address:

117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, korp.1,  
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Nauchno-  
issledovatel'skij institut Adzhinomoto-Genetika"  
(ZAO "AGRI"), V.G. Paraskevovu, S.A. Ivanovu

(72) Inventor(s):

Gusjatiner Mikhail Markovich (RU),  
Rostova Julija Georgievna (RU),  
Voroshilova Ehl'vira Borisovna (RU),  
Kirjukhin Mikhail Jur'evich (RU)

(73) Proprietor(s):

Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Nauchno-  
issledovatel'skij institut Adzhinomoto-Genetika"  
(ZAO "AGRI") (RU)

(54) **METHOD OF PRODUCING L-ARGININE USING Enterobacteriaceae BACTERIA, CONTAINING DISRUPTED-ACTIVITY N-ACETYLORNITHINE DEACETYLASE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and provides a method of producing an L-amino acid, such as L-arginine, via fermentation using Escherichia bacteria, modified to contain an argJ gene which codes an enzyme having at least ornithine acetyltransferase

activity, wherein the bacteria are modified to contain disrupted-activity N-acetylornithine deacetylase.

EFFECT: invention enables to obtain L-arginine with high efficiency.

10 cl, 2 dwg, 4 tbl, 7 ex

R U 2 5 5 0 2 6 9 C 2

R U 2 5 5 0 2 6 9 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к способу получения L-аминокислот, таких как L-аргинин, ферментацией бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, которая модифицирована таким образом, что она содержит ген *argJ*, кодирующий фермент, имеющий, по меньшей мере, орнитинацетилтрансферазную активность, и нарушенный ген *argE*, кодирующий N-ацетилорнитиндеацетилазу.

Уровень техники

Традиционно L-аминокислоты в промышленности получают ферментационным методом с использованием штаммов микроорганизмов, полученных из природных источников, или их мутантов. Обычно, микроорганизмы модифицируются для увеличения продукции L-аминокислот.

Описано много способов повышения продукции L-аминокислот, например, путем трансформации микроорганизмов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США №4,278,765) и изменения регуляторных участков, таких как промотор, лидерная последовательность и/или аттенюаторы или другие, известные для специалиста в данной области (см., например, Патентную заявку США №20060216796 A1 и WO9615246 A1). Другие способы, повышающие выход, включают повышение активности ферментов, вовлеченных в биосинтез аминокислот, и/или снятие ингибирования ключевых ферментов продуцируемой L-аминокислотой по типу обратной связи (см., например, публикацию Патента Японии №56-18596 (1981), WO 95/16042 или Патенты США №5,661,012 и 6,040,160).

Другой способ повышения продукции L-аминокислот заключается в ослаблении экспрессии одного или нескольких генов, вовлеченных в деградацию целевой L-аминокислоты, генов, участвующих в удалении предшественников целевой L-аминокислоты из биосинтетического пути L-аминокислоты, генов, вовлеченных в перераспределение потоков углерода, азота и фосфора, и генов, кодирующих токсины, и т.д.

Принято считать, что, например, в бактерии биосинтез L-аргинина из L-глутамата может проходить по двум путям, линейному или циклическому, в зависимости от конкретного микроорганизма (Cunin R. et al., *Microbiol. Rev.*, 1986, 50:314-352). В бактериях, таких как бактерия, принадлежащая семейству *Enterobacteriaceae*, в частности, *Escherichia coli* (*E.coli*) имеет место линейный путь, который включает 8 стадий до полного образования L-аргинина из L-глутамата (Vogel H.J. и MacLellan W.L., *Methods Enzymol.*, 1970, 17A, 265-269). Биосинтез инициирован ацетилированием L-глутамата аминокислотной N-ацетилтрансферазой (EC 2.3.1.1, также называемой как N-ацетил-L-глутаматсинтетаза), кодируемой геном *argA*. Последующие биосинтетические реакции катализируются ферментами, обычно называемыми как N-ацетилглутаматкиназа, N-ацетил-γ-глутамилфосфатредуктаза, N-ацетилорнитинаминотрансфераза, N-ацетилорнитиндеацетилаза, орнитинкарбамоилтрансфераза, аргининосукцинатсинтетаза и аргининосукцинатлиаза, кодируемые генами *argB*, *argC*, *argD*, *argE*, *argF*, *argG* и *argH*, соответственно. Ацетильная группа, снимаемая N-ацетилорнитиндеацетилазой (*ArgE*) с N-ацетилорнитина с образованием орнитина, связывается с коферментом А (HS-CoA, CoA) с образованием ацетилированного кофермента А (AcS-CoA, ацетил-CoA), который выступает как донор ацетильной группы в реакции ацилирования L-глутамина, катализируемой аминокислота-N-ацетилтрансферазой (*argA*).

Циклический путь биосинтеза L-аргинина был обнаружен в прокариотах, таких как *Corynebacterium glutamicum* (Udaka S. и Kinoshita S., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1958, 4:272-

282; Sakanyan V. et al., *Microbiology*, 1996, 142:99-108), *Bacillus* species (Sakanyan V. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 1992, 138:125-130), *Thermotoga neapolitana* (Marc F. et al., *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267(16):5217-5226), и эукариотах (De Deken R.H., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1962, 78: 606-616). В отличие от линейного пути, в циклическом пути перенос ацетильной группы с N-ацетилорнитина на L-глутамат катализируется бифункциональной орнитинацетилтрансферазой/N-ацетилглутаматсинтазой (ЕС 2.3.1.35/2.3.1.1), кодируемой геном *argJ*.

Помимо бифункционального фермента, кодируемого геном *argJ*, известен белок ArgJ, кодируемый геном *argJ* и проявляющий исключительно орнитинацетилтрансферазную активность (Haas D. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1972, 31:290-295; Marc F. et al., *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267(16):5217-5226). Монофункциональный и бифункциональный ферменты ArgJ можно различить двумя способами: (i) ферментативным анализом с использованием двух доноров ацетильных групп, таких как N-ацетилорнитин и AcS-CoA; и (ii) комплементационным тестом с использованием мутантов *argE* и *argA* *E.coli* с клонированием гена *argJ*. Монофункциональный фермент ArgJ переносит ацетильную группу от N-ацетилорнитина к L-глутамату и комплементирует мутант *argE*, в то время как бифункциональный фермент ArgJ переносит ацетильную группу от N-ацетилорнитина и AcS-CoA и комплементирует штаммы, мутантные по *argE* и *argA*.

Новый биосинтетический путь L-аргинина был недавно обнаружен в *Xanthomonas campestris*, где N-ацетилорнитин превращается в N-ацетилцитруллин под действием ацетилорнитинкарбамоилтрансферазы, кодируемой геном *argF'*, и цитруллин образуется из N-ацетилцитруллина под действием ArgE (Shi D. et al., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280:14366-14369).

Известна бактерия *E.coli*, изначально имеющая линейный путь, была модифицирована таким образом, что она содержит ген *argJ* из *Bacillus stearothermophilus* или *Thermotoga neapolitana* (*T. neapolitana*), который кодирует бифункциональный фермент ArgJ, чтобы инициировать менее энергоемкий циклический путь и, таким образом, увеличить продукцию L-аргинина посредством модифицированной бактерии (патент США №6,897,048 В2).

В микроорганизмах, изначально использующих линейный биосинтетический путь или имеющих модифицированный линейный путь, который функционирует как циклический путь, аминокислота-N-ацетилтрансфераза (N-ацетил-L-глутаматсинтаза) (ArgA) может быть необходима для инициации и поддержания биосинтеза L-аргинина посредством поставки N-ацетилглутамата. Таким образом, для увеличения продукции L-аргинина с помощью рекомбинантного штамма *E.coli*, количество копий гена *argA* может быть увеличено клонированием гена дикого типа *argA* на плазмидных векторах и включением их в штамм, имеющий клонированный ген *argJ* (патент США №6,897,048 В2). С другой стороны, ген *argA*, кодирующий мутантную аминокислота-N-ацетилтрансферазу с устойчивостью к ингибированию по принципу обратной связи L-аргинином (Eckhardt T. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1975, 138:225-232), может быть введен в штамм *E.coli* для усиления продукции L-аргинина (EP 1170361 A2).

Несмотря на то что наличие положительного эффекта на продукцию L-аргинина от использования бифункционального белка ArgJ, дополнительных копий гена *argA* и/или мутантной N-ацетил-L-глутаматсинтазы (мутантного ArgA), и т.п., четко установлено, подходы для дальнейшего увеличения продукции L-аргинина с помощью микроорганизмов не очевидны.

В настоящее время нет данных, описывающих влияние нарушенного гена *argE* так,

что активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE) уменьшена или отсутствует, на продукцию L-аргинина модифицированными бактериальными штаммами семейства *Enterobacteriaceae*, имеющих гетерологичный ген *argJ*.

Раскрытие сущности изобретения

5 Авторы настоящего изобретения предположили, что в микроорганизмах, например, в бактериях, имеющих гетерологичный ген *argJ*, который кодирует монофункциональный фермент орнитинацетилтрансферазу или бифункциональный фермент орнитинацетилтрансферазу/N-ацетилглутаматсинтазу, ослабление экспрессии гена *argE* или инактивация гена *argE* может быть источником дополнительной энергии из процесса, связанного с переносом ацетильной группы от N-ацетилорнитина к L-глутамату, таким образом, содействуя продукции L-аргинина с помощью модифицированного штамма по сравнению с родительским штаммом. Авторы настоящего изобретения предположили, что фермент ArgJ, имеющий моно- или двойную активность и кодируемый геном *argJ*, клонированным из микроорганизма-донора, может восстановить биосинтез L-аргинина в штаммах, мутантных по *argE* или *argA* и *argE* генам. С этой точки зрения, искусственный циклический путь, будучи инициированный путем реализации первой биосинтетической реакции с целью продукции N-ацетилглутамата, может функционировать посредством прямого ацилирования L-глутамата ацетильной группой, полученной из N-ацетилорнитина, нежели из более энергетически богатого AcS-CoA.

Цель настоящего изобретения - предоставление бактерии, принадлежащей к семейству *Enterobacteriaceae*, которая может принадлежать к роду *Escherichia*, более точно к виду *Escherichia coli*, которая имеет активность орнитинацетилтрансферазы или орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы (ArgJ) и в которой N-ацетилорнитиндеацетилаза (ArgE) инактивирована или активность ArgE уменьшена.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление способа получения L-аминокислот, таких как L-аргинин, с использованием бактерии семейства *Enterobacteriaceae* как здесь описано.

Эти цели были достигнуты благодаря обнаружению того факта, что инактивация или ослабление экспрессии гена *argE* в бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, имеющей гетерологичный ген *argJ*, приводит к повышенной продукции L-аргинина.

Цель настоящего изобретения - предоставление бактерии-производителя L-аргинина, принадлежащей к семейству *Enterobacteriaceae*, имеющей рекомбинантную ДНК, которая содержит ген *argJ*, кодирующий фермент, имеющий, по меньшей мере, орнитинацетилтрансферазную активность, отличающуюся тем, что бактерия модифицирована таким образом, что она содержит N-ацетилорнитиндеацетилазу с нарушенной активностью.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что ген *argJ* происходит из микроорганизма, имеющего фермент, обладающий активностью орнитинацетилтрансферазы или орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что ген *argJ* происходит из микроорганизма, принадлежащего к семейству, выбранному из группы, состоящей из семейств *Thermotogaceae*, *Vasillaceae* и *Methanocaldococcaceae*.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что ген *argJ* происходит из вида *Thermotoga neapolitana*.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии,

отличающейся тем, что ген *argJ* кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из:

(A) белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, который имеет активность орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы;

5 (B) варианта белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, но которая содержит замену, делецию, вставку и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков и имеет активность орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы в соответствии с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2;

10 и

(C) их комбинации.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что N-ацетилорнитиндеацетилаза является белком, выбранным из группы, состоящей из:

15 (D) белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4;

(E) варианта белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, но которая содержит замену, делецию, вставку и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков и имеет активность N-

20 ацетилорнитиндеацетилазы в соответствии с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4; и

(F) их комбинации.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что активность N-ацетилорнитиндеацетилазы понижена.

25 Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что активность N-ацетилорнитиндеацетилазы отсутствует.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что бактерия принадлежит к роду *Escherichia*.

30 Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что бактерия принадлежит к виду *Escherichia coli*.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что бактерия принадлежит к роду *Pantoea*.

Другая цель настоящего изобретения - предоставление описанной здесь бактерии, отличающейся тем, что бактерия принадлежит к виду *Pantoea ananatis*.

35 Цель настоящего изобретения - предоставление способа получения L-аргинина или его соли, включающего:

(i) выращивание описанной выше бактерии в питательной среде;

(ii) накопление L-аргинина или его соли в бактерии или культуральной жидкости, или обоих; и, если необходимо,

40 (iii) выделение L-аргинина или его соли из бактерии или культуральной жидкости.

Настоящее изобретение детально описано ниже.

Краткое описание фигур

Фигура 1 показывает схему интеграции гена *argJ* в хромосому штамма *E.coli* MG1655Δ*argA*Δ*argR*.

45 Фигура 2 показывает схему конструирования штамма *E.coli* MG1655Δ*argA*Δ*argR*Δ*artP*-*J*::*P*<sub>nrp8φ10</sub>*argJargEm24*::*cm*.

Наилучший способ осуществления изобретения

1. Бактерия

Термин «бактерия-продуцент L-аминокислоты» может означать бактерию семейства *Enterobacteriaceae*, которая способна продуцировать, экскретировать или секретировать и вызывать накопление L-аминокислоты в культуральной жидкости или бактериальных клетках, когда указанная бактерия выращивается (культивируется) в питательной среде.

5 Термин «способность бактерии продуцировать L-аминокислоту» может означать способность бактерии продуцировать, экскретировать или секретировать и вызывать накопление L-аминокислоты в культуральной жидкости или бактериальных клетках, что приводит к накоплению L-аминокислоты в количествах, достаточных для ее выделения из культуральной жидкости или бактериальных клеток, когда указанная  
10 бактерия выращивается (культивируется) в питательной среде.

Термин «L-аминокислота» может означать L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-аспарагиновую кислоту, L-цистеин L-глутаминовую кислоту, L-глутамин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин.

15 Бактерия может обладать способностью к продукции аминокислот изначально, в соответствии со своими природными характеристиками, или может быть модифицирована с помощью мутаций (мутагенеза) или технологий рекомбинантных ДНК таким образом, чтобы она получила способность продуцировать аминокислоты.

Бактерия, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*, может быть выбрана из  
20 бактерий, относящихся к родам, входящим в состав этого семейства, таких как *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Providencia*, *Salmonella*, *Yersinia* и т.д., и способных продуцировать L-аминокислоту. Более конкретно, могут быть использованы бактерии, классифицируемые как принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae* в соответствии с таксономией, используемой в базе данных NCBI  
25 (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543>). Предпочтительна для модификаций согласно данному изобретению бактерия, относящаяся к роду *Escherichia*, *Enterobacter* или *Pantoea*.

Выбор штаммов бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, которые могут быть модифицированы в настоящем изобретении, не ограничен каким-либо образом, однако,  
30 в качестве примеров, бактерии рода *Escherichia*, описанные в книге Neidhardt et al. (Bachmann, B.J., Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *E.coli* K-12, p.2460-2488. In F.C. Neidhardt et al. (ed.), *E.coli* и *Salmonella*: cellular и molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C., 1996) могут быть включены в число бактерий согласно настоящему изобретению. В качестве конкретного примера могут быть взяты штаммы  
35 *E.coli*., такие как *E.coli* W3110 (ATCC 27325), *E.coli* MG1655 (ATCC 47076) и т.д., которые происходят из исходного штамма дикого типа, т.е. штамма *E.coli* K-12. Этот штамм может быть получен, в частности, из Американской коллекции типовых культур «American Type Culture Collection, (ATCC)» (P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Каждому штамму присвоен индивидуальный регистрационный номер,  
40 и штаммы могут быть заказаны согласно регистрационному номеру (см. ссылку [www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Регистрационные номера штаммов находятся в списке каталога Американской коллекции типовых культур «American Type Culture Collection, ATCC».

Примеры бактерий *Enterobacter* включают *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* и т.д. Примеры бактерии *Pantoea* включают *Pantoea ananatis* и т.д. Недавно  
45 некоторые виды *Enterobacter agglomerans* были переклассифицированы как *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* или *Pantoea stewartii* на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК и других доказательств. Бактерии, относящиеся к роду *Enterobacter* или *Pantoea*, могут быть использованы в соответствии с настоящим

изобретением, так как принадлежат семейству Enterobacteriaceae. Полученные с использованием технологий геной инженерии штаммы *Pantoea ananatis*, такие как штамм *Pantoea ananatis* AJ13355 (PERM ВР-6614), штамм AJ13356 (PERM ВР-6615), штамм AJ13601 (PERM ВР-7207) и их производные могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением. Эти штаммы были классифицированы как *Enterobacter agglomerans* при выделении, и они депонированы как *Enterobacter agglomerans*. Однако позднее они были классифицированы как *Pantoea ananatis* на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК и других доказательств.

Термин «бактерия-продуцент L-аргинина» может означать бактерию, которая способна продуцировать, экскретировать или секретировать и вызывать накопление L-аргинина в культуральной жидкости или бактериальных клетках в количествах больших, чем штамм дикого типа или родительский штамм *E.coli*, такой как *E.coli* K-12, когда бактерия выращена в питательной среде. Способность продуцировать L-аргинин может означать способность бактерии продуцировать, экскретировать или секретировать и вызывать накопление L-аргинина в питательной среде в количестве не менее 0,5 г/л или не менее чем 1,0 г/л, так что L-аргинин может быть выделен из культуральной жидкости и/или бактериальных клеток, когда указанная бактерия выращивается (культивируется) в питательной среде.

Примеры родительских штаммов, которые могут использоваться для получения бактерии, продуцирующей L-аргинин, включают, но не ограничиваются данными примерами, штаммы, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как штамм *E.coli* 237 (ВКПМ В-7925) (патентная заявка США 2002/058315 А1) и его производные штаммы, имеющие мутантную N-ацетилглутаматсинтазу (EP 1170361 А2), штамм *E.coli* 382 (ВКПМ В-7926) (EP1170358 А1) и штамм, продуцирующий L-аргинин, имеющий введенный ген *argA* (EP1170361 А1), и подобные им.

Бактерия-продуцент L-аргинина семейства Enterobacteriaceae, может быть модифицирована далее таким образом, что она содержит гетерологичный ген *argJ*, который кодирует монофункциональный фермент орнитинацетилтрансферазу или бифункциональный фермент орнитинацетилтрансферазу/N-ацетилглутаматсинтазу (*ArgJ*). Например, бактерия семейства Enterobacteriaceae может иметь ген *argJ*, кодирующий моно- или бифункциональный фермент *ArgJ*, устойчивый к ингибированию по принципу обратной связи L-аргинином. Ген *argJ* может быть выделен из термофильного микроорганизма, такого как микроорганизм, принадлежащий к семейству Thermotogaceae, и более конкретно - к роду *Thermotoga*, например, *T. neapolitana* (*T. neapolitana*). Ген *argJ* также может быть выделен из других бактериальных источников, таких как *Bacillus stearothermophilus* (или *Geobacillus stearothermophilus*) семейства Bacillaceae или архей, таких как *Methanocaldococcus jannaschii* (*M. jannaschii*) (ранее *Methanococcus jannaschii*) семейства Methanocaldococcaceae, и им подобных. Однако, различные бактериальные источники гена *argJ* могут использоваться при условии, что ген *argJ* кодирует фермент имеющий, по меньшей мере, активность орнитинацетилтрансферазы.

Бактерия-продуцент L-аргинина семейства Enterobacteriaceae может быть модифицирована далее таким образом, что она содержит инактивированный ген *argE* или ген *argE* с ослабленной экспрессией, так что N-ацетилорнитиндеацетилаза (*ArgE*) в модифицированной бактерии неактивна или активность N-ацетилорнитиндеацетилазы снижена по сравнению с немодифицированной бактерией.

Термин «бактерия-продуцент L-аргинина» может означать бактерию семейства Enterobacteriaceae, имеющую ген *argA*, кодирующий дикий тип или мутант аминокислота-

N-ацетилтрансферазы (ArgA). Фермент ArgA, устойчивый к ингибированию по принципу обратной связи L-аргинином, может быть назван как мутантная аминокислота-N-ацетилтрансфераза. Например, мутант белка ArgA, устойчивый к ингибированию по принципу обратной связи L-аргинином, может быть получен из белка дикого типа ArgA 5 путем замены аминокислотной последовательности в положении с 15 по 19 на другую аминокислотную последовательность, как указано В EP 1170361 A2. Мутантный белок ArgA, содержащий в аминокислотной последовательности замену, делению, вставку и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков в одном или более 10 положениях, отличных от положений 15-19, также может быть назван как мутантный белок ArgA при условии, что третичная структура мутантной аминокислота-N-ацетилтрансферазы изменена незначительно по сравнению белком дикого типа или активность мутантного фермента не ухудшилась и существует устойчивость к ингибированию по принципу обратной связи L-аргинином.

Термин «бактерия-продуцент L-аргинина» также может означать бактерию семейства 15 Enterobacteriaceae, как описано выше, имеющую усиленный, ослабленный и/или инактивированный ген *argA*, кодирующий дикий тип или мутант аминокислота-N-ацетилтрансферазы.

Термин «бактерия-продуцент L-аргинина» также может означать бактерию семейства Enterobacteriaceae, модифицированную далее таким образом, что она лишена ArgR- 20 зависимой транскрипционной репрессии. ДНК-связывающий транскрипционный двойной регулятор ArgR, в микроорганизмах участвующий в отрицательном контроле биосинтетического пути L-аргинина, может быть инактивирован, например, инактивацией гена *argR*, кодирующего ArgR.

Термин «белок дикого типа» может означать нативный белок, естественным образом 25 продуцируемый штаммом дикого типа или родительским бактериальным штаммом семейства Enterobacteriaceae, например, штаммом дикого типа *E.coli* MG1655. Белок дикого типа может быть кодирован геном дикого типа, или немодифицированным геном, естественным образом встречающимся в геноме бактерии дикого типа.

Термин «бактерия, модифицированная таким образом, что она содержит ген *argJ*» 30 может означать, что бактерия, принадлежащая к бактерии первого вида, естественным образом не содержащая ген *argJ*, и, таким образом, называемая как бактерия-реципиент, модифицирована таким образом, чтобы содержать одну или более рекомбинантных молекул ДНК, имеющих ген *argJ*, синтезированный и/или происходящий и введенный из бактерии, принадлежащей ко второму виду, называемой как бактерия-донор, которая 35 отлична от бактерии первого вида. Примером модификации по введению рекомбинантной ДНК может быть экспрессия гетерологичного гена. Например, бактерия-реципиент может принадлежать к семейству Enterobacteriaceae, например, вида *E.coli*; бактерия-донор может принадлежать к термофильной бактерии, например, вида *T. neapolitana*.

Термин «бактерия, модифицированная таким образом, что она содержит 40 рекомбинантную ДНК» может означать, что бактерия модифицирована обычными способами так, что она содержит экзогенную ДНК. К обычным способам относятся, например, трансформация, трансфекция, инфекция, конъюгация и мобилизация. Трансформация, трансфекция, инфекция, конъюгация или мобилизация бактерии 45 молекулой ДНК, кодирующей белок, могут сообщить бактерии способность синтезировать белок, кодируемый молекулой ДНК. Способы трансформации, трансфекции, инфекции, конъюгации и мобилизации включают любые известные ранее описанные способы. Например, известен способ эффективной трансформации и

трансфекции ДНК путем обработки клеток-реципиентов *Escherichia coli* K-12 хлоридом кальция с целью увеличения проницаемости клеток для ДНК (Mandel M. и Higa A., Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, 1970, 53:159-162). Описаны способы специализированной и/или общей трансдукции (Morse M.L. et al., Transduction in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, 1956, 41(1):142-156; Miller J.H., *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor La. Press, 1972). Могут быть применены другие способы случайной и/или направленной интеграции ДНК в геном хозяина, например, «Му-зависимая интеграция/амплификация» (Akhverdyan et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91:857-871), «Red/ET-зависимая» или « $\lambda$ Red/ET-зависимая интеграция» (Datsenko K.A. и Wanner B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97(12):6640-45; Zhang Y., et al., *Nature Genet.*, 1998, 20:123-128). Более того, для многократных вставок желаемых генов в дополнение к Му-зависимой репликативной транспозиции (Akhverdyan et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91:857-871) и химически индуцированной хромосомной эволюции, основанной на *hcsA*-зависимой гомологичной рекомбинации, приводящей к амплификации желаемых генов (Тюо К.Е.Ж. et al., *Nature Biotechnol.*, 2009, 27:760-765), могут использоваться другие подходы, основанные на различных комбинациях транспозиции, сайт-направленной и/или гомологичной Red/ET-зависимой рекомбинации, и/или P1-зависимой общей трансдукции (см., например, Minaeva N. et al., *BMC Biotechnology*, 2008, 8:63; Koma D. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(2):815-829).

Гетерологичная экспрессия гена *argJ* в микроорганизмах хозяина может быть осуществлена путем замены редких (мало используемые в организме хозяина) кодонов на синонимичные средне или часто используемые кодоны, при этом термин «использование кодона» может быть определен как число раз (частота) трансляции кодона в клетке организма в единицу времени или как средняя частота встречаемости кодона в сиквенированных белок-кодирующих рамках считывания (Zhang S.P. et al., *Gene*, 1991, 105(1):61-72). Использование кодонов в организме может быть найдено в базе данных использования кодонов Codon Usage Database, которая является расширенной веб-версией CUTG (Codon Usage Tabulated from GenBank) (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>; Nakamura Y. et al., Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000, *Nucl. Acids Res.*, 2000, 28(1):292). В *E.coli* такие мутации могут включать, не ограничиваясь этим, замену редких Arg-кодонов AGA, AGG, CGG, CGA на CGT или CGC; редкого Ile-кодона ATA на ATC или ATT; редкого Leu-кодона CTA на CTG, CTC, CTT, TTA или TTG; редкого Pro-кодона CCC на CCG или CCA; редкого Ser-кодона TCG на TCT, TCA, TCC, AGC или AGT; редких Gly-кодонов GGA, GGG на GGT или GGC; и т.д. Замена мало используемых кодонов на синонимичные часто используемые кодоны предпочтительна. Замена редких и/или мало используемых кодонов на синонимичные средне или часто используемые кодоны может комбинироваться с со-экспрессией генов, кодирующих тРНК, распознающие редкие кодоны.

Термин «бактерия, модифицированная таким образом, что она содержит ген *argE* с нарушенной экспрессией» может означать, что бактерия модифицирована таким образом, что в модифицированной бактерии экспрессия гена *argE* ослаблена или ген *argE* инактивирован.

Термин «экспрессия гена *argE* ослаблена» может означать, что количество белка ArgE в модифицированной бактерии, в которой экспрессия гена *argE* ослаблена, снижено по сравнению с немодифицированной бактерией, например, штаммом дикого типа или родительским штаммом.

Термин «экспрессия гена *argE* ослаблена» также может означать, что модифицированная бактерия содержит модифицированный ген *argE*, который кодирует мутантный белок ArgE, имеющий пониженную активность по сравнению с белком ArgE дикого типа, или функционально связанный с геном участок, включающий последовательности, контролирующие экспрессию гена, такие как промоторы, энхансеры, аттенуаторы, рибосома-связывающие участки (RBS) и т.д., модифицированные с целью снизить уровень экспрессии гена *argE*, и другие примеры (см., например, WO95/34672; Carrier T.A. и Keasling J.D., *Biotechnol. Prog.*, 1999, 15:58-64).

Подобные определения могут быть даны для терминов «экспрессия гена *argR* ослаблена» и «экспрессия гена *argA* ослаблена».

Экспрессия генов *argE*, *argA* и/или *argR* может быть ослаблена путем замены последовательности, контролирующей экспрессию гена, такой как промотор на хромосомной ДНК, на более слабую. Сила промотора определяется частотой актов инициации синтеза РНК. Примеры методов для оценки силы промотора описаны в Goldstein et al., *Prokaryotic promoters in biotechnology*, *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1:105-128, и т.д. Кроме того, также возможно ввести нуклеотидную замену в промоторный участок целевого гена таким образом, чтобы ослабить силу промотора, как описано в Международной патентной публикации WO00/18935. Кроме того, известно, что замена нескольких нуклеотидов в области между последовательностью Шайна-Дальгарно (Shine-Dalgarno, SD) и стартовым кодоном на рибосома-связывающем участке (RBS), в частности, в последовательности, расположенной выше и сразу за стартовым кодоном, значительно влияет на эффективность трансляции мРНК. Подобная модификация RBS может комбинироваться с уменьшением уровня транскрипции генов *argE*, *argA* и/или *argR*.

Экспрессия генов *argE*, *argA* и/или *argR* также может быть ослаблена путем вставки транспозона или IS-фактора в кодирующий участок гена (патент США №5,175,107), или в участок, контролирующий экспрессию гена, или в близлежащий или удаленный участок по отношению к структурной части гена *argE*, *argA* и/или *argR*, или с помощью обычных методов, таких как мутагенез посредством УФ-излучения или нитрозогуанидина (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин). Кроме того, мутация может быть сайт-направленно введена с помощью известных методов по изменению хромосомы, основанных, например, на  $\lambda$ Red/ET-зависимой рекомбинации.

Термины «ферментативная активность ArgE снижена», «ферментативная активность ArgA снижена» и «ферментативная активность ArgR снижена» могут означать, что ферментативная активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE), аминокислота-N-ацетилтрансферазы (ArgA) и/или регулятора ArgR, соответственно, ниже, чем в немодифицированном штамме, например, штамме дикого типа бактерии, принадлежащей к семейству Enterobacteriaceae, более конкретно, к виду *E.coli*. Например, ферментативная активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE), аминокислота-N-ацетилтрансферазы и/или регулятора ArgR может быть уменьшена за счет инактивации соответствующего гена.

Ферментативная активность фермента, кодируемого геном(ми) *argE*, *argA* и/или *argR* также может быть уменьшена за счет введения мутации в ген на хромосоме так, чтобы внутриклеточная активность белка, кодируемого геном(ми) *argE*, *argA* и/или *argR* была уменьшена по сравнению с немодифицированным штаммом. Такой мутацией в гене(ах) или перед геном в структуре оперона может быть замена одного или нескольких оснований, приводящая к замене аминокислотного остатка в белке, кодируемом геном (ами) (миссенс-мутация), введение стоп-кодона (нонсенс-мутация), делеция одного или

нескольких оснований, приводящая к сдвигу рамки считывания, вставка гена, сообщающего устойчивость к антибиотику, частичное или полное удаление генов в геноме (Qiu Z. и Goodman M.F., J. Biol. Chem. 1997, 272:8611-8617; Kwon D.H. et al., J. Antimicrob. Chemother. 2000, 46:793-796).

5 В модифицированной бактерии количество белка ArgE, кодируемого геном *argE*, может быть понижено до такого уровня, что остаточная активность ArgE меньше или около 3%, или меньше или около 2%, или меньше или около 1% от исходной активности, но выше чем ноль по сравнению с немодифицированной бактерией.

10 В модифицированной бактерии специфическая активность ArgE, кодируемого геном *argE*, может быть понижена до такого уровня, что остаточная специфическая активность ArgE не менее чем 1000 нмоль/мг мин, 750 нмоль/мг мин, 500 нмоль/мг мин, 250 нмоль/мг мин, 100 нмоль/мг мин, 50 нмоль/мг мин, 25 нмоль/мг мин, 10 нмоль/мг мин, 5 нмоль/мг мин или около 3 нмоль/мг мин по результатам разброса экспериментальных данных. Специфическая активность бактериального ArgE в пересчете на 1 мг неочищенного  
15 белка может быть определена в неочищенном экстракте разрушенных ультразвуком бактериальных клетках описанным способом (Takahara K. et al. FEBS J., 2005, 272:5353-5364). Концентрация неочищенного белка может быть определена методом Бредфорда (Bradford M.M., Anal. Biochem., 1976, 72:248-254), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

20 Ферментативная активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE) может быть понижена за счет изменения условий ферментации, таких как кислотность питательной среды (pH), концентрация кофактора(ов), таких как ионы металлов, температура, ионная сила и т.д.

25 Термин «ген *argE* инактивирован» может означать, что модифицированный ген кодирует полностью неактивный или нефункциональный белок. Также возможно, что модифицированный участок ДНК не способен к естественной экспрессии гена благодаря делеции части гена или целого гена, сдвигу рамки считывания гена, введению миссенс/нонсенс мутации (ий) или модификации смежного участка гена, включению  
30 последовательностей, контролирующих экспрессию гена, таких как промотор(ы), энхансер(ы), аттенуатор(ы), рибосома-связывающий(ие) сайт(ы) и т.д. Инактивация гена также может быть осуществлена обычными способами, такими как мутагенез, путем обработки микроорганизмов, например, УФ-излучением или нитрозогуанидином (N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин), сайт-направленный мутагенез, нарушение  
35 структуры гена с использованием гомологичной рекомбинации и/или мутагенеза за счет вставки-делеции (Yu D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):5978-83; Datsenko K.A. и Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97(12):6640-45), также называемого как «λRed/ET-зависимая интеграция».

Подобные определения могут быть даны для терминов «ген *argR* инактивирован» и «ген *argA* инактивирован».

40 Термин «активность ArgE отсутствует» равнозначен термину «белок ArgE инактивирован» и также может означать, что активность ArgE полностью отсутствует, то есть равна нулю, или активность ArgE ниже определенного уровня, когда активность измеряется с использованием метода, описанного в работе Takahara K. et al. FEBS J., 2005, 272:5353-5364. В качестве контроля сравнения могут служить, например, бактерии  
45 дикого типа Enterobacteriaceae, включая штамм E.coli MG1655, и т.п. В модифицированной бактерии специфическая активность ArgE, кодируемого геном *argE*, может быть снижена до такого уровня, что остаточная специфичная активность *argE* равняется нулю или не более чем 0,01 нмоль/мг мин, 0,05 нмоль/мг мин, 0,1 нмоль/мг мин или около 0,5

нмоль/мг мин по результатам разброса экспериментальных данных и при определении уровня активности описанным выше методом.

Как описано выше, активность белка ArgE (N-ацетилорнитиндеацетилазы) может быть снижена и/или отсутствовать. Следовательно, термин «активность ArgE нарушена» может пониматься как «активность ArgE снижена» и/или «активность ArgE отсутствует», как описано выше.

Термин «повышенная экспрессия гена *argA*» может означать, что общая ферментативная активность соответствующего гену белка, ArgA, увеличена, например, введением и/или увеличением числа копий гена *argA* в бактериальном геноме или усилением активности в пересчете на молекулу белка (может быть названа как специфическая активность), кодируемого этим геном, по сравнению с немодифицированным штаммом, таким как штамм дикого типа или родительский штамм. Бактерия может быть модифицирована так, что активность белка ArgA в пересчете на клетку увеличена до 150% или более, 200% или более, 300% или более от активности белка в немодифицированном штамме. В качестве примера немодифицированного штамма-сравнения можно привести штаммы дикого типа микроорганизма семейства Enterobacteriaceae, такие как штамм E.coli MG1655 (ATCC 47076), штамм W3110 (ATCC 27325), штамм Pantoea ananatis AJ13335 (PERM BP-6614) и т.д.

Термин «повышенная экспрессия гена *argA*» также может означать, что уровень экспрессии гена *argA* в модифицированном штамме выше, чем уровень экспрессии в немодифицированном штамме, например, штамме дикого типа или родительском штамме.

Способы, которые могут применяться для повышения экспрессии гена *argA*, включают, но не ограничиваются данными примерами, увеличение числа копий гена *argA* в бактериальном геноме (на хромосоме и/или автономно реплицирующейся плазмиде) и/или введение гена *argA* в вектор таким образом, что он становится способным увеличивать число копий и/или уровень экспрессии гена *argA* в бактерии семейства Enterobacteriaceae в соответствии с методами генной инженерии, известными для специалистов в данной области.

В качестве примеров таких векторов можно привести, но не ограничиться этим, векторы с широким кругом хозяев (broad-host-range vectors), например, pCM110, pRK310, pVK101, pBVR122, pBHR1 и подобные им. Множественные копии *argA* гена могут быть введены в хромосомную ДНК бактерии посредством, например, гомологичной рекомбинации,  $\mu$ -зависимой интеграции или подобными методами. Гомологичная рекомбинация может быть проведена с использованием многокопийной последовательности в хромосомной ДНК. Многокопийные последовательности в хромосомной ДНК включают, но не ограничиваются данными примерами, повторяющиеся участки ДНК или обращенные повторы на концах перемещающегося генетического элемента. Также, возможно введение *argA* гена в транспозон с целью введения в хромосомную ДНК нескольких копий гена *argA*. При использовании  $\mu$ -зависимой интеграции более чем 3 копии могут быть введены в хромосомную ДНК за один акт (Akhverdyan V.Z. et al., Biotechnol. (Russian), 2007, 3:3-20).

Повышение уровня экспрессии *argA* гена также может быть достигнуто путем модификации регуляторного участка, смежного с *argA* геном, или введением нативных и/или модифицированных чужеродных регуляторных участков. В качестве примеров регуляторных участков или последовательностей можно привести промоторы, энхансеры, аттенюаторы, сигналы терминации и анти-терминации транскрипции,

рибосома-связывающие сайты (RBS) и другие элементы контроля экспрессии (например, участки, с которыми связываются репрессоры или индукторы, и/или участки связывания транскрипционных и трансляционных регуляторных белков, например, в составе мРНК). Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Sambrook J., Fritsch E.F.

5 и Maniatis T., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Модификации участков, контролирующей экспрессию гена(ов), могут комбинироваться с увеличением числа копий модифицированного гена(ов) в бактериальном геноме с использованием известных методов (см., например, Akhverdyan V.Z. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011, 91:857-871; Тью К.Е.Дж. et al., Nature Biotechnol., 10 2009, 27:760-765).

Примером промоторов, усиливающих экспрессию *argA* гена, могут быть сильные промоторы. Например, *lac* промотор, *trp* промотор, *trc* промотор, *tac* промотор, P<sub>R</sub> или P<sub>L</sub> промоторы фага λ известны как сильные промоторы. Сильные промоторы, 15 обеспечивающие высокий уровень экспрессии гена в бактерии, принадлежащей к семейству Enterobacteriaceae, могут использоваться. Также, влияние промотора может быть усилено, например, введением мутации в участок промотора *argA* гена с целью получения промотора с более сильной функцией, таким образом, приводя к увеличению уровня транскрипции *argA* гена, расположенного под промотором. Кроме того, известно, 20 что замена нескольких нуклеотидов в 3D последовательности, и/или в области между SD последовательностью и стартовым кодоном, и/или в последовательности непосредственно перед и/или после стартового кодона в рибосома-связывающем сайте существенно влияет на трансляционную способность мРНК. Например, обнаружен 20-кратный разброс в уровне экспрессии гена в зависимости от природы трех нуклеотидов, 25 предшествующих стартовому кодону (Gold L. et al., Annu. Rev. Microbiol., 1981, 35:365-403; Hui A. et al., EMBO J., 1984, 3:623-629).

Уровень экспрессии гетерологичного гена *argJ* может быть увеличен с использованием подходов, описанных выше для *argA* гена.

Количество копий, присутствие или отсутствие гена и/или генов оперона может быть 30 измерено, например, рестрикцией хромосомной ДНК с последующим блоттингом по Саузерну (Southern blotting), используя зонд, подобранный на основе нуклеотидной последовательности гена, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и подобные им методы. Уровень экспрессии гена может быть определен измерением количества транскрибируемой мРНК с применением хорошо 35 известных методов, включающих, например, Нозерн-блоттинг, количественную ОТ-ПЦР (RT-PCR) и т.п. Количество белков, кодируемых геном, можно определить известными методами, включая ДДС-ПААГ (SDS-PAGE) с последующим иммуноблоттингом (Вестерн-блоттинг) (Western blotting analysis), или масс-спектрометрический анализ образцов белка и т.п.

40 Методы работы с рекомбинантной молекулой ДНК, расщепления, молекулярного клонирования и гетерологичной экспрессии генов, такие как приготовление плазмидной ДНК, расщепление, лигирование и трансформация ДНК, выбор олигонуклеотидов в качестве праймеров и т.п. могут осуществляться обычными способами, известными специалисту в данной области. Эти методы описаны, например, в Sambrook J., Fritsch E.F. и Maniatis T., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed.», Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Методы молекулярного клонирования и экспрессии гетерологичных генов описаны в Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak и Cheryl L. Patten, 45 «Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA», 4<sup>th</sup> ed., Washington,

D.C: ASM Press (2009); Evans Jr., T.C. и Xu M.-Q., «Heterologous gene expression in *E. coli*», 1<sup>st</sup> ed., Humana Press (2011).

Ген *argJ* кодирует монофункциональный белок орнитинацетилтрансферазу ArgJ (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Киотская энциклопедия генов и геномов, входящий № MJ\_0186; UniProtKB/Swiss-Prot, Protein Knowledgebase, входящий № Q57645). Ген *argJ* (GenBank инвентарный номер NC\_000909.1; нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам в положении: с 184215 по 185423; Gene ID: 1451033) расположен между геном MJ\_0187 на той же молекулярной цепи и геном MJ\_0185 на противоположной молекулярной цепи хромосомы *M. jannaschii* DSM 2661. Нуклеотидная последовательность гена *argJ* и аминокислотная последовательность монофункционального белка ArgJ, кодируемого геном *argJ*, приведены в SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO:30, соответственно.

Ген *argJ* кодирует бифункциональный белок орнитинацетилтрансферазу/N-ацетилглутаматсинтазу ArgJ (KEGG, входящий № CTN\_1181; UniProtKB/Swiss-Prot, входящий № Q9Z4S1). Ген *argJ* (GenBank инвентарный № NC\_011978.1; нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам в положении: с 1146678 по 1147871; Gene ID: 7377498) расположен между генами *argC* и CTN\_1180 на хромосоме *T. neapolitana* DSM 4359. Нуклеотидная последовательность гена *argJ* и аминокислотная последовательность бифункционального белка ArgJ, кодируемого геном *argJ*, приведены в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2, соответственно.

Ген *argE* кодирует белок N-ацетилорнитиндеацетилазу ArgE (KEGG, входящий № b3957). Ген *argE* (GenBank инвентарный № NC\_000913.2; нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам в положении: с 4151719 по 4152870; Gene ID: 948456) расположен между геном *prc* на той же молекулярной цепи и геном *argC* на противоположной молекулярной цепи хромосомы штамма *E.coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *argE* и аминокислотная последовательность белка ArgE, кодируемого геном *argE*, приведены в SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4, соответственно.

Ген *argA* кодирует белок аминокислота-N-ацетилтрансферазу ArgA (KEGG, входящий № b2818). Ген *argA* (GenBank инвентарный № NC\_000913.2; положения нуклеотидов: с 2947264 по 2948595; Gene ID: 947289) расположены между генами *amiC* и *recD*, оба на противоположной цепи хромосомы штамма *E.coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *argA* и аминокислотная последовательность белка ArgA, кодируемого геном *argA*, приведены в SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно.

Ген *argR* кодирует ДНК-связывающий транскрипционный двойной регулятор, связывающий L-аргинин, ArgR (KEGG, входящий № b3237). Ген *argR* (GenBank инвентарный № NC\_000913.2; положения нуклеотидов: с 3382725 по 3383195; Gene ID: 947861) расположен между геном *uhcN* на той же молекулярной цепи и геном *mdh* на противоположной молекулярной цепи хромосомы штамма *E.coli* K-12. Нуклеотидная последовательность гена *argR* и аминокислотная последовательность белка ArgR, кодируемого геном *argR*, приведены в SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно.

Ввиду того, что могут быть некоторые различия в последовательностях ДНК между родами или штаммами семейств *Methanocaldococcaceae*, *Thermotogaceae* и *Enterobacteriaceae*, гены *argJ*, *argE*, *argA* и *argR* не ограничены генами, представленными в последовательностях SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 и 29, но могут включать гены, которые являются вариантами нуклеотидных последовательностей или гомологичны нуклеотидным последовательностям SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 и 29, кодирующие варианты белков ArgJ, ArgE, ArgA и ArgR.

Термин «вариант белка» может означать белок, который содержит одно или

несколько изменений в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 или 30, которыми могут быть замены, делеции, вставки и/или добавления одного или нескольких аминокислотных остатков при условии, что активность такого белка такая же, как и у белков ArgJ, ArgE, ArgA и ArgR, соответственно, или третичная структура белков ArgJ, ArgE, ArgA и ArgR не изменилась значительно по сравнению с белком дикого типа или немодифицированным белком. Количество изменений в вариантах белков зависит от вида или положения аминокислотного остатка в третичной структуре белка. Оно может быть, но не ограничено строго, от 1 до 30, в другом примере от 1 до 15, в другом примере от 1 до 10, в другом примере от 1 до 5 в SEQ ID NO:2, 4, 6, 8 и 30.

Примером замены, делеции, вставки и/или добавления одного или нескольких аминокислотных остатков может быть консервативная мутация(и) при условии, что активность и свойства варианта белка сохранены и такие же, как и у белков ArgJ, ArgE, ArgA и ArgR. Примером консервативной мутации является консервативная замена. Консервативными заменами могут быть взаимные замены между Phe, Trp и Tyr, если сайт замещения является ароматической аминокислотой; между Ala, Leu, Ile и Val, если сайт замещения является гидрофобной аминокислотой; между Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, His и Thr, если сайт замещения является гидрофильной аминокислотой; между Gln и Asn, если сайт замещения является полярной аминокислотой; между Lys, Arg и His, если сайт замещения является основной аминокислотой; между Asp и Glu, если сайт замещения является кислой аминокислотой; и между Ser и Thr, если сайт замещения является аминокислотой, имеющей гидроксильную группу. Примеры консервативных замен включают замену Ser или Thr на Ala, замену Asn, Glu или Gln на Asp, замену Ser или Ala на Cys, замену Asn, Glu, Lys, His, Asp или Arg на Gln, замену Asn, Gln, Lys или Asp на Glu, замену Pro на Gly, замену Asn, Lys, Gln, Arg или Tyr на His, замену Leu, Met, Val или Phe на Ile, замену Ile, Met, Val или Phe на Leu, замену Asn, Glu, Gln, His или Arg на Lys, замену Ile, Leu, Val или Phe на Met, замену Trp, Tyr, Met, Ile или Leu на Phe, замену Thr или Ala на Ser, замену Ser или Ala на Thr, замену Phe или Tyr на Trp, замену His, Phe или Trp на Tyr и замену Met, Ile или Leu на Val.

Примером замены, делеции, вставки и/или добавления одного или нескольких аминокислотных остатков также может быть неконсервативная(ые) мутация(и) при условии, что такая(ие) мутация(и) компенсируются одной или несколькими мутациями в различных положениях аминокислотной последовательности, так что активность и свойства варианта белка сохранены и такие же, как и у белков ArgJ, ArgE, ArgA и ArgR.

Степень гомологии белка или ДНК, может быть определена с использованием нескольких известных подходов, например, компьютерных алгоритмов BLAST и FASTA и метода ClustalW. Алгоритм BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)), позволяющий проводить иерархический поиск, заложен в программах blastp, blastn, blastx, megablast, tblastn и tblastx; эти программы присваивают уровень значимости найденным объектам, используя статистические методы, описанные в Samuel K. и Altschul S.F. («Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes» Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:2264-2268; «Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:5873-5877). Алгоритм BLAST вычисляет три параметра: число аминокислотных остатков, идентичность и сходство. Поисковый алгоритм FASTA описан в Pearson W.R. («Rapid и sensitive sequence comparison with FASTP и FASTA», Methods Enzymol., 1990, 183:63-98). Метод ClustalW описан в Thompson J.D. et al. («CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through

sequence weighting, position-specific gap penalties и weight matrix choice», *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22:4673-4680).

Более того, гены *argJ*, *argE*, *argA* и *argR* могут быть вариантами нуклеотидных последовательностей. Термин «вариант нуклеотидной последовательности» может означать нуклеотидную последовательность, которая кодирует «вариант белка» с использованием любых синонимичных аминокислотных кодонов в соответствии с таблицей стандарта генетического кода (см., например, Lewin B., *Genes VIII*, 2004, Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ 07458). Термин «вариант нуклеотидной последовательности» также может означать, но не ограничиваться данным примером, нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности, представленной в SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7 и 29, или с зондом, который может быть синтезирован на основе указанных нуклеотидных последовательностей, при условии, что он кодирует функциональный белок. Под «жесткими условиями» понимаются такие условия, при которых образуется специфический гибрид, например, гибрид, имеющий идентичность не менее чем 70%, не менее чем 80%, не менее чем 90%, не менее чем 95%, не менее чем 96%, не менее чем 97%, не менее чем 98% или не менее чем 99%, и не образуется неспецифический гибрид, например, гибрид, имеющий гомологию меньшую, чем указано выше. Практическим примером жестких условий может быть однократная или многократная отмывка, или, в другом случае, двух- или трехкратная отмывка при концентрации солей 1×SSC (стандарт цитрата натрия или стандарт хлорида натрия) и 0,1% SDS (додецилсульфат натрия) или, в другом случае, 0,1×SSC и 0,1% SDS при 60°C или 65°C. Продолжительность отмывки зависит от типа используемой для блоттинга мембраны и, как правило, такова, как рекомендовано производителем. Например, рекомендуемая продолжительность отмывки для положительно заряженной нейлоновой мембраны Hybond™-N+ (GE Healthcare) при жестких условиях составляет 15 минут. Промывка может быть произведена двух- или трехкратно. В качестве зонда может быть использована часть последовательности, комплементарной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 29. Подобный зонд может быть получен с помощью метода ПЦР (полимеразная цепная реакция, White T.J. et al., *Trends Genet.*, 1989, 5:185-189) с использованием олигонуклеотидных праймеров, приготовленных на основе последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 и 29 и фрагмента ДНК, содержащего нуклеотидную последовательность в качестве матрицы. Рекомендуемая длина зонда должна быть >50 п.н., она может быть подобрана в зависимости от условий гибридизации и составляет обычно от 100 до 1000 п.н. Например, при использовании в качестве зонда фрагмента ДНК длиной около 300 п.н. условия отмывки могут быть следующие: 2×SSC, 0,1% SDS при 50°C, или при 60°C, или при 65°C.

Гены, кодирующие белки *ArgJ* видов *M. jannaschii* и *T. neapolitana*, и белки *ArgE*, *ArgA* и *ArgR* вида *E. coli*, известны (см. описание выше), поэтому гены, кодирующие варианты белков *ArgJ*, *ArgE*, *ArgA* и *ArgR*, могут быть получены с использованием метода ПЦР (полимеразная цепная реакция, описано в White T.J. et al., *Trends Genet.*, 1989, 5:185-189) с использованием праймеров, синтезированных на основе нуклеотидной последовательности генов *argJ*, *argE*, *argA* и *argR*, или химически синтезированных как полноразмерные гены. Гены, кодирующие белки *ArgJ*, *ArgE*, *ArgA* и *ArgR* или их варианты из других микроорганизмов, могут быть получены аналогичным способом.

Активность орнитинацетилтрансферазы (монофункциональный фермент *ArgJ*) (EC: 2.3.1.35; синонимы: глутамат-N-ацетилтрансфераза, N-ацетил-L-глутаматсинтетаза, и т.д.) означает активность в катализе следующей реакции: N2-ацетил-L-орнитин + L-

глутамат ↔ L-орнитин + N-ацетил-L-глутамат.

Активность орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы (бифункциональный фермент ArgJ) (EC: 2.3.1.35/2.3.1.1) означает активность, в катализе следующей реакции: N2-ацетил-L-орнитин + L-глутамат ↔ L-орнитин + N-ацетил-L-  
5 глутамат и ацетил-CoA + L-глутамат ↔ CoA + N-ацетил-L-глутамат.

Активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE) (EC: 3.5.1.16; синонимы: 2-N-ацетил-L-орнитинамидогидролаза, N-ацетилорнитиназа) означает активность в катализе следующей реакции: N2-ацетил-L-орнитин + H<sub>2</sub>O ↔ ацетат + L-орнитин.

Активность аминокислота-N-ацетилтрансферазы (ArgA) (EC: 2.3.1.1; синонимы: N-ацетилглутаматсинтаза, N-ацетил-L-глутаматсинтетаза) означает активность в катализе следующей реакции: ацетил-CoA + L-глутамат ↔ CoA + N-ацетил-L-глутамат.  
10

Термин «функционально связанный с геном» может означать, что одна или несколько регуляторных последовательностей связаны с нуклеотидной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты или заданного гена таким образом, что возможна  
15 экспрессия (например, усиленная, увеличенная, конститутивная, базальная, ослабленная, сниженная или репрессивная экспрессия) нуклеотидной последовательности, предпочтительно экспрессия продукта гена, кодируемого указанной нуклеотидной последовательностью.

Термин «фермент, имеющий, по меньшей мере, орнитинацетилтрансферазную  
20 активность» может означать, что фермент имеет активность орнитинацетилтрансферазы (монофункциональный фермент ArgJ) или активность орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы (бифункциональный фермент ArgJ), как описано выше.

Бактерия, описанная в настоящем изобретении, может быть получена введением вышеупомянутых ДНК в бактерию, изначально способную продуцировать L-аминокислоту. Кроме того, бактерия, описанная здесь, может быть получена  
25 посредством сообщения способности продуцировать L-аминокислоту бактерии, уже содержащей упомянутые ДНК.

Помимо упомянутых выше свойств, бактерия также может обладать другими специфическими свойствами, не выходя за рамки данного изобретения, такими как:  
30 нуждаться в различных питательных веществах, обладать чувствительностью, устойчивостью и зависимостью от антибиотиков.

## 2. Способ получения L-аминокислоты

Способ получения L-аминокислоты может включать стадии выращивания бактерии в питательной среде с целью получения L-аминокислоты, экскрекции и накопления в  
35 культуральной жидкости и выделения L-аминокислоты из культуральной жидкости и/или бактериальных клеток.

Выращивание бактерии согласно настоящему изобретению, накопление и очистка L-аминокислоты или ее соли от среды и т.п. может быть проведено способом, подобным традиционным способам ферментации, отличающимся тем, что указанная аминокислота  
40 продуцируются с использованием микроорганизма. Питательная среда для получения L-аминокислоты может быть типичной средой, которая содержит источник углерода, источник азота, неорганические ионы и другие необходимые органические компоненты. В качестве источника углерода могут использоваться сахара, такие как глюкоза, лактоза, галактоза, фруктоза, арабиноза, мальтоза, ксилоза, трегалоза, рибоза и гидролизаты  
45 крахмала; спирты, такие как глицерин, маннитол и сорбитол; органические кислоты, такие как глюконовая кислота, фумаровая кислота, лимонная кислота, яблочная кислота и янтарная кислота и т.п. В качестве источника азота могут использоваться неорганические аммониевые соли, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат

аммония; органические питательные вещества, такие как гидролизаты соевых бобов; аммиачный газ; водный раствор аммиака и т.п. Витамины, такие как витамин В1, необходимые вещества, например, органические питательные вещества, такие как нуклеиновые кислоты, аденин и РНК или экстракт дрожжей и подобные им могут присутствовать в соответствующих количествах или в виде следов. Помимо перечисленных, небольшие количества фосфата кальция, сульфата магния, ионов железа, ионов марганца и подобные им могут быть добавлены при необходимости.

Выращивание осуществляют предпочтительно в аэробных условиях от 16 до 96 часов или от 48 до 72 часов, температура выращивания, в интервале которой выращивание может контролироваться, - от 30 до 45°C, или в интервале от 30 до 37°C; кислотность среды (рН) поддерживают в интервале 5-8, или в интервале 6,5-7,2. Кислотность среды поддерживают с использованием неорганических или органических кислых или щелочных веществ, таких как газообразный аммиак. Обычно, выращивание в течение от 1 до 5 дней приводит к накоплению целевой L-аминокислоты в культуральной жидкости.

После выращивания твердые частицы, такие как клетки и клеточный дебрис, могут быть удалены из жидкой среды центрифугированием или мембранной фильтрацией и затем целевая L-аминокислота может быть выделена из ферментативной смеси сочетанием известных способов, таких как концентрация, ионообменная хроматография, кристаллизация и т.п.

#### Примеры

Настоящее изобретение более подробно будет описано ниже со ссылкой на следующие, не ограничивающие настоящее изобретение Примеры.

#### Пример 1.

Получение мутантного штамма *E.coli* MG1655, имеющего удаленный ген *argE* и содержащего плазмиду pJ-T, несущую ген *argJ* из *T. neapolitana*

Сначала, мутантный штамм *E.coli* MG1655, имеющий удаленный ген *argR*, получали с использованием известного метода (Datsenko K.A. и Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645) (Пример 1.1). Затем, ген *argE* удаляли с использованием того же метода (Пример 1.2). Ген устойчивости к хлорамфениколу (*cat*,  $Cm^R$ -маркер) использовали, чтобы отметить мутацию  $\Delta argR$ , и ген устойчивости к канамицину (*kan*,  $Km^R$ -маркер) использовали, чтобы отметить мутацию  $\Delta argE$ . Клетки излечивали от  $Cm^R$ -маркера, как описано (Datsenko K.A. и Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645). Плазмиду pJ-T, содержащую ген *argJ* из *T. neapolitana* (патент США №6897048), вводили в полученные мутантные штаммы *E.coli* MG1655 $\Delta argR$  и  $\Delta argR\Delta argE::Km$  методом электропорации. Электропорацию проводили с помощью электропоратора «Bio-Rad» (США) (№165-2098, версия 2-89) в соответствии с инструкциями производителя. Таким образом были получены мутантные штаммы *E.coli* MG1655 $\Delta argR$ /pJ-T и  $\Delta argR\Delta argE::Km$ /pJ-T.

#### Пример 1.1.

##### Делеция гена *argR*

Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta argR$  получали методом  $\lambda$ Red-зависимой интеграции, разработанным Datsenko K.A. и Wanner B.L. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645]. ДНК-фрагмент, содержащий маркер устойчивости к хлорамфениколу ( $Cm^R$ ), получали методом ПЦР с использованием праймеров P1 (SEQ ID NO:9) и P2 (SEQ ID NO:10) и плазмиды pMW118-attL-*Cm*-attR в качестве матрицы (WO2005010175 A1). Праймер P1 содержит участок, комплементарный участку, расположенному на 5'-конце

гена *argR*, и участок, комплементарный участку *attR*. Праймер P2 содержит участок, комплементарный участку, расположенному на 3'-конце гена *argR*, и участок, комплементарный участку *attL*. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных двух циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для конечных 25 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 54°C, 40 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный методом ПЦР продукт (около 1.600 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле и использовали для электропорации в штамм *E.coli* MG1655, содержащий плазмиду pKD46 с репликоном, обладающим температурной чувствительностью. Плаزمида pKD46 (Datsenko K.A. и Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645) содержит ДНК-фрагмент фага  $\lambda$  длиной 2,154 нуклеотидов (положения нуклеотидов от 31088 до 33241, GenBank инвентарный №: J02459), включающий гены  $\lambda$ Red гомологичной рекомбинационной системы ( $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  гены) под контролем арабиноза-индуцируемого промотора  $P_{araB}$ . Плазмида pKD46 необходима для интеграции продукта, полученного методом ПЦР, в хромосому штамма *E.coli* MO 1655 (ATCC 47076). Штамм *E.coli* MG1655, содержащий рекомбинантную плазмиду pKD46, можно получить из *E.coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, USA, инвентарный номер CGSC7669.

Электрокомпетентные клетки готовили следующим способом: штамм *E.coli* MG1655/pKD46 выращивали при 30°C в течение ночи на среде LB (среда Luria-Bertani, также называемая лизогенная среда, как описано в Sambrook, J. и Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press), содержащей ампициллин (150 мг/л). Затем клеточную культуру растворяли 100 раз в 5 мл SOB среды (Sambrook J. и Russell D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), содержащей ампициллин (150 мг/л) и L-арабинозу (1 мМ). Клетки выращивали с аэрацией (250 об/мин) при 30°C до  $OD_{600} \approx 0.6$ .

Электрокомпетентные клетки готовили, концентрируя в 100 раз и трехкратно промывая деионизированной холодной водой. Электропорацию проводили, используя 70  $\mu$ л клеток и  $\approx 100$  нг продукта ПЦР. После электропорации клетки инкубировали в 1 мл среды SOC (Sambrook J. и Russell D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) при 37°C в течение 2,5 ч, помещали в L-агар, содержащий хлорамфеникол (25 мг/л), и выращивали при 37°C для отбора  $Sm^R$ -рекомбинантов. Чтобы удалить плазмиду pKD46, клетки высевали два раза на L-агар, содержащий хлорамфеникол (25 мг/л), при 42°C и полученные колонии тестировали на чувствительность к ампициллину. Маркер  $Sm^R$  удаляли с использованием хелперной плазмиды pMW-Int/Xis (WO2005010175 A1), которую электропорировали в выбранные бесплазмидные интегранты с использованием методики, как описано выше для электропорации ПЦР-фрагмента. После электропорации клетки помещали в L-агар, содержащий 0,5% глюкозы и ампициллина (150 мг/л), и инкубировали при 37°C в течение ночи, чтобы индуцировать синтез белков Int/Xis. Рост клонов проводили на L-агаре без хлорамфеникола, чтобы выбрать  $Sm^S$  (чувствительные к хлорамфениколу) варианты. Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR.

Пример 1.2.

Деления гена *argE*

Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR, имеющий удаленный ген *argE*, получали методом  $\lambda$ Red-зависимой интеграции, изначально разработанным Datsenko K.A. и Wanner B.L. (Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12):6640-6645). ДНК-фрагмент, содержащий маркер  $Km^R$ , получали методом ПЦР с использованием праймеров P3 (SEQ ID NO:11) и P4 (SEQ ID NO:12) и плазмиды pMW118-attL-Km-attR в качестве матрицы (Katashkina Zh.I. et al., Mot Biol. (Mosk.), 2005, 39(5):823-831). Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR/pKD46 использовали для электропорации полученного ДНК-фрагмента (Пример 1.1). Клетки с устойчивостью к антибиотикам отбирали с помощью канамицина (25 мг/л) и полученный

$Km^R$ -рекомбинант излучивали от плазмиды pKD46, как описано в Примере 1.1. Таким образом получали *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR $\Delta$ argE:: $Km$ .

#### Пример 2.

Получение L-аргинина с помощью модифицированного штамма *E.coli* MG1655, имеющего удаленный ген argE и содержащего плазмиду pJ-T, несущую ген argJ из *T. neapolitana*

Восемь независимых колоний каждого полученного штамма (*E.coli* MG1655 $\Delta$ argR/pJ-T и  $\Delta$ argR $\Delta$ argE:: $Km$ /pJ-T) были отобраны для оценки продукции L-аргинина. Полученные штаммы выращивали в чашках с L-агаром при 37°C в течение ночи, затем петлю с каждой из полученных культур вводили в 2 мл ферментационной среды в пробирки 20×200 мм и культивировали при 32°C в течение 72 часов на роторной качалке (220-230 об/мин).

Содержание ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	35
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1.0
Тиамин гидрохлорид	0.002
Экстракт дрожжей	1.0-5.0
CaCO <sub>3</sub>	20

Глюкозу и сульфат магния стерилизовали отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизовали сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. Значение pH поддерживали на уровне 7,0. Антибиотики вводили в среду после стерилизации.

Количество накопленного в среде L-аргинина определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) или бумажной хроматографии с использованием подвижной фазы: бутанол: уксусная кислота: вода=4:1:1 (об./об.). Раствор нингидрина (2%) в ацетоне использовали в качестве окрашивающего реагента. Пятно, содержащее L-аргинин, вырезали, L-аргинин элюировали 0,5% водным раствором CdCl<sub>2</sub> и количество L-аргинина оценивали спектрофотометрически при 540 нм. Результаты 8 независимых пробирочных ферментации (как среднее значение) представлены в Таблице 1. Как можно видеть из Таблицы 1, модифицированный штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR/pJ-T вызывает большее накопление L-аргинина по сравнению с родительским штаммом *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR $\Delta$ argE:: $Km$ /pJ-T.

#### Пример 3.

Получение мутантного штамма *E.coli* MG1655, имеющего удаленный ген argE и ген argJ из *T. neapolitana*, введенный в хромосому

Ген argJ из *T. neapolitana* вставляли в хромосому штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR, чтобы избавиться от эффекта неустойчивости плазмиды pJ-T, несущей ген argJ. Чтобы усилить экспрессию гена argJ, получали эффективный искусственный промотор P<sub>nlp8q10</sub>, который был помещен перед геном argJ (Пример 3.1).

С целью исключить естественную продукцию L-аргинина, ген *argA* удаляли из хромосомы (Пример 3.1).

Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP*-J::P<sub>nlp8 $\phi$ 10</sub>*argJ* использовали в дальнейших генетических операциях. Мутацию  $\Delta$ *argE* помечали геном устойчивости к канамицину (kan) (Пример 1.2) и вводили в хромосому штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP*-J::P<sub>nlp8 $\phi$ 10</sub>*argJ*, используя хорошо известный метод P1-трансдукции (Miller J.H., *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972). Колонии Km-устойчивых трансдуктантов отбирали на L-агаре, содержащем канамицин (25 мг/л) (Пример 1). Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP*-J::P<sub>nlp8 $\phi$ 10</sub>*argJ* $\Delta$ *argE*::Km.

Пример 3.1.

Получение штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP*-J::P<sub>nlp8 $\phi$ 10</sub>*argJ*

Штамм *E.coli* MG1655, содержащий удаленный ген *argA*, помеченный *cat*-геном, получали методом  $\lambda$ Red-зависимой интеграции, изначально разработанным Datsenko К.А. и Wanner В.Л. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12):6640-6645) (Пример 1.1). ДНК-фрагмент, содержащий *Cm*<sup>R</sup>-маркер, получали методом ПЦР с использованием праймеров P5 (SEQ ID NO:13) и P6 (SEQ ID NO:14) и плазмиды pMW118-attL-*Cm*-attR в качестве матрицы (WO2005010175 A1). Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *arg*/pKD46 использовали для электропорации полученным ДНК-фрагментом. Маркер устойчивости к хлорамфениколу (*Cm*<sup>R</sup>) удаляли с применением плазмиды pMW-Int/*Xis* (WO2005010175 A1), как описано в Примере 1.1. Таким образом был получен штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR*.

ДНК-фрагмент, содержащий промотор гена *nlpD* из *E.coli*, получали методом ПЦР с использованием праймеров P7 (SEQ ID NO:15) и P8 (SEQ ID NO:16) и хромосомной ДНК *E.coli* MG1655 в качестве матрица. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных 2 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для конечных 25 циклов: 20 сек при 94°C, 20 сек при 55°C, 15 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный ДНК-фрагмент (около 200 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле и обрабатывали эндонуклеазами PaeI и SalI (Fermentas) (Sambrook J., Fritsch E.F. и Maniatis Т., «*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*», 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); инструкции производителя). Полученный ДНК-фрагмент лигировали с плазмидой pMIV-5JS (Российская патентная заявка №2006132818 и EP 1942183), которую предварительно обрабатывали эндонуклеазами PaeI и SalI, придерживаясь инструкций производителя. Лигирующую смесь инкубировали при 4°C в течение ночи и затем использовали для трансформации штамма *E.coli* MG1655 (ATCC 47076) электропорацией, как описано в Примере 1. Полученные трансформанты помещали на L-агар, содержащий ампициллин (50 мг/л), и чашки инкубировали при 37°C в течение ночи до тех пор, пока индивидуальные колонии не станут заметны. Из полученных трансформантов выделяли плазмиды и анализировали методом рестрикции с использованием нуклеаз PaeI и SalI. Таким образом получили плазмиду pMIV-PnlpD, содержащую нативный промотор P<sub>nlpD</sub> гена *nlpD* из *E.coli*.

Проводили рандомизацию -10 участка промотора P<sub>nlpD</sub> и отбор промотора P<sub>nlp8</sub>. 3'-Конец промотора P<sub>nlpD</sub> получали методом ПЦР с использованием праймеров P7 (SEQ ID NO:15) и P9 (SEQ ID NO:17) и плазмиды pMIV-PnlpD в качестве матрицы. Праймер P9 содержит случайные нуклеотиды, которые обозначены в последовательности SEQ

ID NO:17 как «n», где n это A, G, C или T. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных 2 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для финальных 25 циклов: 20 сек при 94°C, 20 сек при 60°C, 15 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. 5'-Конец промотора P<sub>nlpD</sub> получали методом ПЦР с использованием праймеров P8 (SEQ ID NO:16) и P10 (SEQ ID NO:18) и плазмиды pMIV-PnlpD в качестве матрицы. Праймер P10 содержит случайные нуклеотиды, которые обозначены в последовательности SEQ ID NO:18 как «n», где n это A, G, C, или T. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных 2 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для финальных 25 циклов: 20 сек при 94°C, 20 сек при 60°C, 15 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C.

Оба полученных ДНК-фрагмента очищали методом электрофореза в агарозном геле, обрабатывали эндонуклеазой BglII (Fermentas) и лигировали в эквимольном соотношении (Sambrook J., Fritsch E.F. и Maniatis T., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Лигирующую смесь инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученный ДНК-фрагмент получали методом ПЦР с использованием праймеров P7 (SEQ ID NO:15) и P8 (SEQ ID NO:16) и полученного ДНК-фрагмента в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных 2 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для финальных 12 циклов: 20 сек при 94°C, 20 сек при 60°C, 15 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный ДНК-фрагмент (около 200 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

Очищенный ДНК-фрагмент обрабатывали фрагментом Кленова (Fermentas) и лигировали в эквимольном соотношении с плазмидой pMW118- $\lambda$ attL-Km<sup>R</sup>- $\lambda$ attR (Российская патентная заявка №2006134574), которую предварительно обрабатывали эндонуклеазой XbaI (Fermentas) и фрагментом Кленова. Лигирующую смесь инкубировали при 4°C в течение ночи и затем использовали для трансформации штамма E.coli MG1655 электропорацией, как описано в Примере 1. Полученные трансформанты помещали на L-агар, содержащий канамицин (20 мг/л), и чашки инкубировали при 37°C в течение ночи до тех пор, пока не будут заметны индивидуальные колонии. Из полученных трансформантов выделяли плазмиды и анализировали методом рестрикции с использованием нуклеаз PstI и HindIII (Fermentas) (Sambrook J., Fritsch E.F. и Maniatis T., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); руководство производителя). Таким образом была получена плазида pMW-Km-Pnlp8, содержащая промотор P<sub>nlp8</sub>.

ДНК-фрагмент, содержащий ген argJ, получали методом ПЦР с использованием праймеров P11 (SEQ ID NO:19) и P12 (SEQ ID NO:20) и плазмиды pJ-T (патент США 6897048) в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 1 мин при 95°C; профиль для 25 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 55°C, 1 мин при 72°C; финальная элонгация - 2 мин при 72°C. Полученный ДНК-фрагмент (около 1.200 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

ДНК-фрагмент, содержащий кассету  $\lambda$ attL-Km- $\lambda$ attR-P<sub>nlp8</sub>, получали методом ПЦР с использованием праймеров P13 (SEQ ID NO:21) и P14 (SEQ ID NO:22) и плазмиды pMW-Km-Pnlp8 в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 1 мин при 95°C; профиль для 25 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 55°C, 1 мин 40 сек при 72°C; финальная элонгация 5 мин при 72°C. Полученный ДНК-фрагмент (около 1.700 п.н.) (Фигура 1) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

Праймеры P11 (SEQ ID NO:19) и P14 (SEQ ID NO:22) содержали перекрывающиеся участки.

Полученный ДНК-фрагмент (Фигура 1) с перекрывающимися участками получали методом ПЦР с использованием праймеров P12 (SEQ ID NO:20) и P13 (SEQ ID NO:21) и полученного фрагмента ДНК в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 2 мин при 95°C; профиль для 30 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 55°C, 2 мин при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный ДНК-фрагмент (около 2.900 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

Полученный ДНК-фрагмент содержит  $Km^R$ -маркер и ген *argJ* под контролем промотора  $P_{nlp8\phi10}$ . Этот фрагмент интегрировали вместо кластера *artPIQMJ* генов в хромосоме штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* методом  $\lambda$ Red-зависимой интеграции, как описано выше. Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ*.

Пример 4.

Получение L-аргинина с помощью модифицированного штамма *E.coli* MG1655, имеющего удаленный ген *argE* и ген *argJ* из *T. neapolitana*, введенный в хромосому

Шесть независимых колоний каждого из полученных штаммов (*E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ* и MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ* $\Delta$ *argE::Km*) были отобраны для оценки продукции L-аргинина. Продукцию L-аргинина определяли, как описано в Примере 2. Результаты 6 независимых пробирочных ферментации (как средний результат) приведены в Таблице 2. Как можно видеть из Таблицы 2, модифицированный штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ* $\Delta$ *argE::Km* вызывает большее накопление L-аргинина по сравнению с родительским штаммом *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ*.

Пример 5.

Получение мутантного штамма *E.coli* MG1655, имеющего ослабленный ген *argE* и ген *argJ* из *T. neapolitana*, введенный в хромосому

Штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR* $\Delta$ *artP-J::P\_{nlp8\phi10}argJ* использовали в качестве родительского штамма для получения штамма, имеющего ген *argE* с ослабленной экспрессией. Во-первых, вводили  $Sm^R$ -маркер в межгенный участок между генами *rrc* и *argE* штамма MG1655 методом  $\lambda$ Red-зависимой интеграции (Пример 1.1). ДНК-фрагмент, содержащий  $Sm^R$ -маркер, кодируемый геном *cat*, получали методом ПЦР с использованием праймеров P15 (SEQ ID NO:23) и P16 (SEQ ID NO:24) и плазмиды pMW118-attL- $Sm$ -attR в качестве матрицы (WO2005010175 A1). Праймер P15 содержит участок, комплементарный участку, расположенному ниже гена *argE*, и участок, комплементарный attR. Праймер P16 содержит участок, комплементарный участку, расположенному ниже гена *rrc*, и участок, комплементарный attL. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 3 мин при 95°C; профиль для начальных 2 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 50°C, 40 сек при 72°C; профиль для начальных 25 циклов: 30 сек при 95°C, 30 сек при 54°C, 40 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Продукт ПЦР (около 1.600 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле и использовали для электропорации штамма *E.coli* MG1655/pKD46, как описано в Примере 1.1. После электротрансформации штамма *E.coli* MG1655/pKD46 полученным фрагментом ДНК, содержащим ген *cat*, несколько колоний помещали на чашки с L-агаром, содержащим хлорамфеникол (20 мг/л). Электрокомпетентные клетки готовили, электропорацию проводили и  $Sm^R$ -рекомбинанты отбирали, как описано в Примере

1.1. Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655-Cm-argE.

Во-вторых, получали замену L76K в ArgE. Первый ДНК-фрагмент, содержащий Cm<sup>R</sup>-маркер и дистальную часть argE, кодирующую мутацию L76K, получали методом ПЦР с использованием праймеров P17 (SEQ ID NO:25) и P18 (SEQ ID NO:26), содержащие перекрывающиеся участки, и хромосомную ДНК штамма *E.coli* MG1655-Cm-argE в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 1 мин при 95°C; профиль для 25 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 55°C, 2 мин при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный первый ДНК-фрагмент (около 2.800 п.н.) (Фигура 2) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

Второй ДНК-фрагмент, содержащий проксимальную часть argE, кодирующую мутацию L76K, получали методом ПЦР с использованием праймеров P19 (SEQ ID NO: 27) и P20 (SEQ ID NO:28) и хромосомной ДНК штамма *E.coli* MG1655-Cm-argE в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 1 мин при 95°C; профиль для 25 циклов: 1 мин при 95°C, 30 сек при 55°C, 30 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный второй ДНК-фрагмент (около 300 п.н.) (Фигура 2) очищали методом электрофореза в агарозном геле.

Третий ДНК-фрагмент получали методом ПЦР с использованием праймеров P17 (SEQ ID NO:25) и P20 (SEQ ID NO:28) и полученных первого и второго ДНК-фрагментов с перекрывающимися участками (Фигура 2) в качестве матрицы. Условия для ПЦР были следующие: начальная денатурация - 2 мин при 95°C; профиль для 30 циклов: 30 сек при 94°C, 30 сек при 55°C, 2 мин 20 сек при 72°C; финальная элонгация - 5 мин при 72°C. Полученный третий ДНК-фрагмент (около 3.100 п.н.) очищали методом электрофореза в агарозном геле. Таким образом получали третий ДНК-фрагмент, содержащий Cm<sup>R</sup>-маркер и ген argE с заменами T226A и T227A в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:3, приводящими к мутации L76K. Мутантный ген argE назвали как ген argEm24.

Наконец, третий ДНК-фрагмент интегрировали вместо нативного гена argE в хромосому штамма *E.coli* MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJ методом λRed-зависимой интеграции, как описано выше. Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJargEm24::Cm.

Пример 6.

Производство L-аргинина с помощью модифицированного штамма *E.coli* MG1655, имеющего ослабленный ген argE и ген argJ из *T. neapolitana*, введенный в хромосому

Шесть независимых колоний каждого из полученных штаммов (*E.coli* MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJargEm24::Cm и MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJ) были отобраны для оценки производства L-аргинина. Производство L-аргинина оценивали, как описано в Примере 2. Результаты 6 независимых пробирочных ферментации (как среднее значение) представлены в Таблице 3. Как можно видеть из Таблицы 3, модифицированный штамм *E.coli* MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJΔargEm24::Cm вызывает большее накопление L-аргинина по сравнению с родительским штаммом *E.coli* MG1655ΔargAΔargRΔartP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJ.

Пример 7.

Ферментативная активность мутантного белка ArgE<sup>L76K</sup>

Ферментативную активность контрольного белка и мутантного белка ArgE<sup>L76K</sup>, кодируемого мутантным геном argEm24, измеряли, как описано в Takahara K. et al. FEBS J., 2005, 272:5353-5364, с использованием экстрактов неочищенных белков, полученных

после разрушения клеток ультразвуком. Штаммы *E.coli* MG1655, MG1655 $\Delta$ argE, и MG1655argEm24 использовали в качестве источников белка, чтобы оценить уровень ослабления активности ArgE ввиду мутации L76K. Штаммы *E.coli* MG1655 $\Delta$ argE и MG1655argEm24 получали, как описано в Дополнительном примере 1. Как видно из

5 Таблицы 4, белок ArgE<sup>L76K</sup> показал специфическую активность менее чем около 1% по сравнению с немодифицированным белком ArgE.

Дополнительный пример 1.

10 Штамм *E.coli* MG1655  $\Delta$ argE::Km получали по методике, описанной в Примере 1.2 для штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ argR $\Delta$ argE::Km. Маркер Km<sup>R</sup> удаляли с использованием плазмиды pMW-Int/Xis (WO2005010175 A1), как описано в Примере 1.1 для Cm<sup>R</sup>-маркера. Таким образом получали штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argE.

15 Штамм *E.coli* MG1655argEm24::Cm получали, как описано в Примере 5 для штамма *E.coli* MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P<sub>nlp8 $\phi$ 10</sub>argJ argEm24::Cm. Маркер Cm<sup>R</sup> удаляли с использованием плазмиды pMW-Int/Xis (WO2005010175 A1), как описано в Примере 1.1. Таким образом получили штамм *E.coli* MG1655 $\Delta$ argEm24.

20 Таблица 1  
Влияние мутации  $\Delta$ argE на продукцию L-аргинина штаммом *E.coli*, содержащим плазмиду pJ-T, несущую ген argJ из *T. neapolitana*

Штамм	OD <sub>540</sub>	L-Аргинин, г/л
MG1655 $\Delta$ argR/pJ-T	14,6 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,1
MG1655 $\Delta$ argR $\Delta$ argE::Km/pJ-T	16,9 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,3

25 Таблица 2  
Влияние мутации  $\Delta$ argE на продукцию L-аргинина штаммом *E.coli*, содержащим ген argJ, введенный в хромосому

Штамм	OD <sub>540</sub>	L-Аргинин, г/л
MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P <sub>nlp8<math>\phi</math>10</sub> argJ	24,7 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,1
MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P <sub>nlp8<math>\phi</math>10</sub> argJ $\Delta$ argE::Km	23,0 $\pm$ 1,3	3,0 $\pm$ 0,6

30 Таблица 3  
Влияние мутации argEm24 на продукцию L-аргинина штаммом *E.coli*, имеющим ген argJ, введенный в хромосому

Штамм	OD <sub>540</sub>	L-Аргинин, г/л
MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P <sub>nlp8<math>\phi</math>10</sub> argJ	24,7 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,1
MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P <sub>nlp<math>\phi</math>10</sub> argJ argEm24::Cm	24,5 $\pm$ 3,4	9,3 $\pm$ 0,9

35 Таблица 4  
Влияние мутации argEm24 на активность N-ацетилорнитиндеацетилазы (ArgE) (в нмоль/мг мин) в штамме *E.coli* MG1655. Значения приведены как среднее  $\pm$ SD (n=4), где SD есть стандартное отклонение

Штамм	Специфическая активность ArgE, нмоль/мг мин
MG1655 (контроль)	750
MG1655 $\Delta$ argE	<0,5
MG1655argEm24	3,0

#### 40 Формула изобретения

1. Бактерия-продуцент L-аргинина, принадлежащая к роду *Escherichia*, имеющая рекомбинантную ДНК, которая содержит ген argJ, кодирующий фермент, имеющий, по меньшей мере, орнитинацетилтрансферазную активность, отличающаяся тем, что

45 указанная бактерия модифицирована таким образом, что она содержит N-ацетилорнитиндеацетилазу с нарушенной активностью.

2. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанный ген argJ происходит из микроорганизма, имеющего фермент, обладающий активностью

орнитинацетилтрансферазы или орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы.

3. Бактерия по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что указанный ген *argJ* происходит из микроорганизма, принадлежащего к семейству, выбранному из группы, состоящей из семейств *Thermotogaceae*, *Bacillaceae* и *Methanocaldococcaceae*.

5 4. Бактерия по п. 3, отличающаяся тем, что указанный ген *argJ* происходит из вида *Thermotoga neapolitana*.

5. Бактерия по п. 1 или 4, отличающаяся тем, что указанный ген *argJ* кодирует белок, выбранный из группы, состоящей из:

10 (A) белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, который имеет активность орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы;

(B) варианта белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, но которая включает замену, делецию, вставку и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков и имеет активность  
15 орнитинацетилтрансферазы/N-ацетилглутаматсинтазы в соответствии с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:2.

6. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что N-ацетилорнитиндеацетилаза является белком, выбранным из группы, состоящей из:

20 (C) белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4;

(D) варианта белка, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, но которая включает замену, делецию, вставку и/или добавление одного или нескольких аминокислотных остатков и активность N-ацетилорнитиндеацетилазы в соответствии с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:  
25 4.

7. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная активность N-ацетилорнитиндеацетилазы понижена.

8. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная активность N-ацетилорнитиндеацетилазы отсутствует.

30 9. Бактерия по п. 1, отличающаяся тем, что указанная бактерия принадлежит к виду *Escherichia coli*.

10. Способ получения L-аргинина или его соли, включающий:

(i) выращивание бактерии по любому из пп. 1-9 в питательной среде;

35 (ii) накопление L-аргинина или его соли в бактерии или культуральной жидкости, или обеих; и, если необходимо,

(iii) выделение L-аргинина или его соли из бактерии или культуральной жидкости.

40

45

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ZAO Ajinomoto-Genetika Research Institute (ZAO AGRI)

<120> METHOD FOR PRODUCING L-ARGININE USING BACTERIUM OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE HAVING N-ACETYLORNITHINE DEACETYLASE WITH DEREGULATED ACTIVITY

<130> argJ/argE

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1194

<212> DNA

<213> *Thermotoga neapolitana*

<400> 1

gtgttcgttc cgaggggatt cagctacgcg ggagtacact gcagaataaa gagaaaaagg	60
aaagacctcg gtatcatctt ctctgaagtg ccctgcaccg ccgccggggg tttcaccacg	120
aacgttgtga aggctgcacc cgtgatctac gacatggaga ttctggggaa aaatccttct	180
ggaatcagag cgattaccgt gaacagcggg gtagcgaacg cctgcacggg agaacagga	240
atgatcaacg caagaaggat ggcggagaaa acggcaaaag aactgaacat ccccgttgaa	300
agcgtccttg tgtcttcaac aggagtgata ggtgttcaac ttccaatgga aaaagtggag	360
tcggggattg aagaggcggg gaagaacctc tcgaaagacc ctgttccctt tgcagaggcc	420
atcatgacaa cggacacgaa gataaagatc cacagcaaaa aagtgacgat agaagggaaa	480
gagatcaccg tccttggaat agcaaagggc tccggtatga tacatcccaa catggcgacg	540
atgctctctt tcataacgac cgatgcgaat gtttctgagg atgctctgaa aaaacttctg	600
aagatctctg tcgacgatte ctacaacatg atcgatgtcg acggtgatac aagcacaaac	660
gacatggatg tcatactcgc aaatggactt gcaggaacg caccattca ggaggaaacc	720
gatggtttct ggaagcttta tgaggccgta cacgaagtca accaggtcct tgcggaaaaa	780
attgtggagg acggagaggg tgccacaaag gtgatagaag tggaagtgag aaatgctccg	840
gacagaaact ctgctcgttt gattgcacgg gcgatcgtct cttcgaatct tgtgaagaca	900
gccatctacg gtgaagatgc aaactgggga agggtgatag cagccgcggg gtactccggt	960
gcacagttcg atccggacag actcgacctt ttcttcgaaa gcgcagccgg tagaataaag	1020
gtggcagaga acggccaggg agtggatttt gacgaagata cagcaaagaa gatactgagc	1080
gaaaagaagg tgaaaatcat cctcgatatg aagcagggaa aagaacttgc aagagcctgg	1140
ggatgtgacg tgactgaaaa atacgtggaa ataaacggga ggtacaggac atga	1194

<210> 2  
 <211> 397  
 <212> PRT  
 <213> Thermotoga neapolitana

<400> 2

Met Phe Val Pro Arg Gly Phe Ser Tyr Ala Gly Val His Cys Arg Ile  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Lys Asp Leu Gly Ile Ile Phe Ser Glu Val Pro Cys  
 20 25 30

Thr Ala Ala Gly Val Phe Thr Thr Asn Val Val Lys Ala Ala Pro Val  
 35 40 45

Ile Tyr Asp Met Glu Ile Leu Gly Lys Asn Pro Ser Gly Ile Arg Ala  
 50 55 60

Ile Thr Val Asn Ser Gly Val Ala Asn Ala Cys Thr Gly Glu Gln Gly  
 65 70 75 80

Met Ile Asn Ala Arg Arg Met Ala Glu Lys Thr Ala Lys Glu Leu Asn  
 85 90 95

Ile Pro Val Glu Ser Val Leu Val Ser Ser Thr Gly Val Ile Gly Val  
 100 105 110

Gln Leu Pro Met Glu Lys Val Glu Ser Gly Ile Glu Glu Ala Val Lys  
 115 120 125

Asn Leu Ser Lys Asp Pro Val Pro Phe Ala Glu Ala Ile Met Thr Thr  
 130 135 140

Asp Thr Lys Ile Lys Ile His Ser Lys Lys Val Thr Ile Glu Gly Lys  
 145 150 155 160

Glu Ile Thr Val Leu Gly Ile Ala Lys Gly Ser Gly Met Ile His Pro  
 165 170 175

Asn Met Ala Thr Met Leu Ser Phe Ile Thr Thr Asp Ala Asn Val Ser  
 180 185 190

Glu Asp Ala Leu Lys Lys Leu Leu Lys Ile Ser Val Asp Asp Ser Tyr  
 195 200 205

Asn Met Ile Asp Val Asp Gly Asp Thr Ser Thr Asn Asp Met Val Ile  
 210 215 220

RU 2 550 269 C2

Ile Leu Ala Asn Gly Leu Ala Gly Asn Ala Pro Ile Gln Glu Glu Thr  
 225 230 235 240

Asp Gly Phe Trp Lys Leu Tyr Glu Ala Val His Glu Val Asn Gln Val  
 245 250 255

Leu Ala Glu Lys Ile Val Glu Asp Gly Glu Gly Ala Thr Lys Val Ile  
 260 265 270

Glu Val Glu Val Arg Asn Ala Pro Asp Arg Asn Ser Ala Arg Leu Ile  
 275 280 285

Ala Arg Ala Ile Val Ser Ser Asn Leu Val Lys Thr Ala Ile Tyr Gly  
 290 295 300

Glu Asp Ala Asn Trp Gly Arg Val Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Ser Gly  
 305 310 315 320

Ala Gln Phe Asp Pro Asp Arg Leu Asp Leu Phe Phe Glu Ser Ala Ala  
 325 330 335

Gly Arg Ile Lys Val Ala Glu Asn Gly Gln Gly Val Asp Phe Asp Glu  
 340 345 350

Asp Thr Ala Lys Lys Ile Leu Ser Glu Lys Lys Val Lys Ile Ile Leu  
 355 360 365

Asp Met Lys Gln Gly Lys Glu Leu Ala Arg Ala Trp Gly Cys Asp Leu  
 370 375 380

Thr Glu Lys Tyr Val Glu Ile Asn Gly Arg Tyr Arg Thr  
 385 390 395

- <210> 3
- <211> 1152
- <212> DNA
- <213> Escherichia coli

<400> 3  
 atgaaaaaca aattaccgcc atttatcgag atttaccgcg ctctgattgc cacaccttca 60  
 ataagcgcca cggaagaggc actcgatcaa agcaatgcag atttaatcac tctgctggcg 120  
 gactggttta aagatttggg cttcaatgtg gaagtgcagc ctgttccagg aactcgcaac 180  
 aaattcaata tgctggcaag tatcggacag ggggctggcg gcttggtgct ggcggggcat 240  
 accgatacgg tgccatttga tgacggtcgc tggacgcgcg atccgtttac actgacggag 300  
 catgacggca agctttacgg cttaggcacc gccgacatga aaggcttttt tgcgtttatc 360  
 cttgatgcgc tacgcgatgt cgacgtcacg aaactgaaaa aaccgctcta cattctggcg 420

actgctgatg aagaaaccag tatggccgga gcgcgttatt ttgccgaaac taccgccctg 480  
 cgccccgatt gcgccatcat tggcgaaccg acgtcactac aaccggtacg cgcacataaa 540  
 ggtcatatct ctaacgccat ccgtattcag ggccagtcgg ggcactccag cgatccagca 600  
 cgcgaggatta acgtatcga actaatgcac gacgccatcg ggcataatfff gcaattgcgc 660  
 gataacctga aagaacgta tcaactacgaa gcgtttaccg tgccataccc tacgctcaac 720  
 ctcgggcata ttcacggtgg cgacgcttct aaccgtatff gcgcttgctg tgagttgcat 780  
 atggatattc gtccgctgcc tggcatgaca ctcaatgaac ttaatggfff gctcaacgat 840  
 gcattggctc cggtgagcga acgctggccg ggctgtctga cggtcgacga gctgcatccg 900  
 ccgatccctg gctatgaatg cccaccgaat catcaactgg ttgaagtggg tgagaaattg 960  
 ctcggagcaa aaaccgaagt ggtgaactac tgtaccgaag cgccgffff tcaaacgta 1020  
 tgcccgacgc tgggtgtggg gcctggctca attaatcagg ctcatcaacc tgatgaatat 1080  
 ctggaaacac ggtttatcaa gccacccgc gaactgataa cccaggtaat tcaccatfff 1140  
 tgctggcatt aa 1152

<210> 4  
 <211> 383  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 4

Met Lys Asn Lys Leu Pro Pro Phe Ile Glu Ile Tyr Arg Ala Leu Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Pro Ser Ile Ser Ala Thr Glu Glu Ala Leu Asp Gln Ser Asn  
 20 25 30  
 Ala Asp Leu Ile Thr Leu Leu Ala Asp Trp Phe Lys Asp Leu Gly Phe  
 35 40 45  
 Asn Val Glu Val Gln Pro Val Pro Gly Thr Arg Asn Lys Phe Asn Met  
 50 55 60  
 Leu Ala Ser Ile Gly Gln Gly Ala Gly Gly Leu Leu Leu Ala Gly His  
 65 70 75 80  
 Thr Asp Thr Val Pro Phe Asp Asp Gly Arg Trp Thr Arg Asp Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Leu Thr Glu His Asp Gly Lys Leu Tyr Gly Leu Gly Thr Ala Asp  
 100 105 110

RU 2 550 269 C2

Met Lys Gly Phe Phe Ala Phe Ile Leu Asp Ala Leu Arg Asp Val Asp  
115 120 125

Val Thr Lys Leu Lys Lys Pro Leu Tyr Ile Leu Ala Thr Ala Asp Glu  
130 135 140

Glu Thr Ser Met Ala Gly Ala Arg Tyr Phe Ala Glu Thr Thr Ala Leu  
145 150 155 160

Arg Pro Asp Cys Ala Ile Ile Gly Glu Pro Thr Ser Leu Gln Pro Val  
165 170 175

Arg Ala His Lys Gly His Ile Ser Asn Ala Ile Arg Ile Gln Gly Gln  
180 185 190

Ser Gly His Ser Ser Asp Pro Ala Arg Gly Val Asn Ala Ile Glu Leu  
195 200 205

Met His Asp Ala Ile Gly His Ile Leu Gln Leu Arg Asp Asn Leu Lys  
210 215 220

Glu Arg Tyr His Tyr Glu Ala Phe Thr Val Pro Tyr Pro Thr Leu Asn  
225 230 235 240

Leu Gly His Ile His Gly Gly Asp Ala Ser Asn Arg Ile Cys Ala Cys  
245 250 255

Cys Glu Leu His Met Asp Ile Arg Pro Leu Pro Gly Met Thr Leu Asn  
260 265 270

Glu Leu Asn Gly Leu Leu Asn Asp Ala Leu Ala Pro Val Ser Glu Arg  
275 280 285

Trp Pro Gly Arg Leu Thr Val Asp Glu Leu His Pro Pro Ile Pro Gly  
290 295 300

Tyr Glu Cys Pro Pro Asn His Gln Leu Val Glu Val Val Glu Lys Leu  
305 310 315 320

Leu Gly Ala Lys Thr Glu Val Val Asn Tyr Cys Thr Glu Ala Pro Phe  
325 330 335

Ile Gln Thr Leu Cys Pro Thr Leu Val Leu Gly Pro Gly Ser Ile Asn  
340 345 350

Gln Ala His Gln Pro Asp Glu Tyr Leu Glu Thr Arg Phe Ile Lys Pro  
355 360 365

Thr Arg Glu Leu Ile Thr Gln Val Ile His His Phe Cys Trp His  
 370 375 380

<210> 5  
 <211> 1332  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<400> 5  
 gtggtaaagg aacgtaaac cgagttggtc gagggattcc gccattcggg tccctatata 60  
 aatacccacc ggggaaaaac gtttgtcatc atgctcggcg gtgaagccat tgagcatgag 120  
 aatttctcca gtatcgtaa tgatatcggg ttgttgaca gcctcggcat cegtctggtg 180  
 gtggtctatg ggcacgtcc gcagatcgac gcaaactctgg ctgcgcatca ccacgaaccg 240  
 ctgtatcaca agaatatacg tgtgaccgac gccaaaacac tggaactggg gaagcaggct 300  
 gcgggaacat tgcaactgga tattactgct cgctgtcga tgagtctcaa taacacgccg 360  
 ctgcagggcg cgcatacaaa cgtcgtcagt ggcaatttta ttattgcca gccgctgggc 420  
 gtcgatgacg gcgtggatta ctgccatagc gggcgtatcc ggcggattga tgaagacgcy 480  
 atccatcgtc aactggacag cggtgcaata gtgctaattg ggcgggtcgc tgtttcagtc 540  
 actggcgaga gctttaacct gacctcgaa gagattgcca ctcaactggc catcaaactg 600  
 aaagctgaaa agatgattgg tttttgctct tcccagggcg tcaactatga cgacggtgat 660  
 attgtctccg aacttttccc taacgaagcg caagcgcggg tagaagcca ggaagagaaa 720  
 ggcgattaca actccggtac ggtgcgcttt ttgctggtgg cagtgaaagc ctgccgcagc 780  
 ggcgtgctgc gctgtcattt aatcagttat caggaagatg gcgctgtgtt gcaagagttg 840  
 ttctcacgcy acggtatcgg tacgcagatt gtgatggaaa gcgccgagca gattcgtcgc 900  
 gcaacaatca acgatattgg cggattctg gagttgattc gccactgga gcagcaaggt 960  
 attctggtac gccgttctcg cgagcagctg gagatggaaa tcgacaaatt caccattatt 1020  
 cagcgcgata acacgactat tgcttgcgcc gcgctctatc cgttcccgga agagaagatt 1080  
 ggggaaatgg cctgtgtggc agttcacccg gattaccgca gttcatcaag ggggtaagtt 1140  
 ctgctggaac gcattgccgc tcaggcgaag cagagcggct taagcaaatt gtttgtgctg 1200  
 accacgcgca gtattcactg gttccaggaa cgtggattta ccccagtgga tattgattta 1260  
 ctgccccgaga gcaaaaagca gttgtacaac taccagcgtg aatccaaagt gttgatggcg 1320  
 gatttagggg aa 1332

<210> 6  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 6

Met Val Lys Glu Arg Lys Thr Glu Leu Val Glu Gly Phe Arg His Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Tyr Ile Asn Thr His Arg Gly Lys Thr Phe Val Ile Met Leu  
 20 25 30

Gly Gly Glu Ala Ile Glu His Glu Asn Phe Ser Ser Ile Val Asn Asp  
 35 40 45

Ile Gly Leu Leu His Ser Leu Gly Ile Arg Leu Val Val Val Tyr Gly  
 50 55 60

Ala Arg Pro Gln Ile Asp Ala Asn Leu Ala Ala His His His Glu Pro  
 65 70 75 80

Leu Tyr His Lys Asn Ile Arg Val Thr Asp Ala Lys Thr Leu Glu Leu  
 85 90 95

Val Lys Gln Ala Ala Gly Thr Leu Gln Leu Asp Ile Thr Ala Arg Leu  
 100 105 110

Ser Met Ser Leu Asn Asn Thr Pro Leu Gln Gly Ala His Ile Asn Val  
 115 120 125

Val Ser Gly Asn Phe Ile Ile Ala Gln Pro Leu Gly Val Asp Asp Gly  
 130 135 140

Val Asp Tyr Cys His Ser Gly Arg Ile Arg Arg Ile Asp Glu Asp Ala  
 145 150 155 160

Ile His Arg Gln Leu Asp Ser Gly Ala Ile Val Leu Met Gly Pro Val  
 165 170 175

Ala Val Ser Val Thr Gly Glu Ser Phe Asn Leu Thr Ser Glu Glu Ile  
 180 185 190

Ala Thr Gln Leu Ala Ile Lys Leu Lys Ala Glu Lys Met Ile Gly Phe  
 195 200 205

Cys Ser Ser Gln Gly Val Thr Asn Asp Asp Gly Asp Ile Val Ser Glu  
 210 215 220

Leu Phe Pro Asn Glu Ala Gln Ala Arg Val Glu Ala Gln Glu Glu Lys  
 225 230 235 240

Gly Asp Tyr Asn Ser Gly Thr Val Arg Phe Leu Arg Gly Ala Val Lys



gccccaaatgg aaatggttta ctgcctgccca gctgaaactgg gtgtaccaac cacctccagt 240  
 ccattgaaga atctgggtgct ggatatcgac tacaacgatg cagttgtcgt gattcataacc 300  
 agccctggcg cggcgagtt aattgctcgc ctgctggact cactgggcaa agcagaaggt 360  
 attctgggca ccatcgctgg cgatgacacc atctttacca cccctgctaa cggtttcaca 420  
 gtcaaagacc tgtacgaagc gattttagag ctgttcgacc aggagcttta a 471

<210> 8  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 8

Met Arg Ser Ser Ala Lys Gln Glu Glu Leu Val Lys Ala Phe Lys Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Glu Glu Lys Phe Ser Ser Gln Gly Glu Ile Val Ala Ala  
 20 25 30

Leu Gln Glu Gln Gly Phe Asp Asn Ile Asn Gln Ser Lys Val Ser Arg  
 35 40 45

Met Leu Thr Lys Phe Gly Ala Val Arg Thr Arg Asn Ala Lys Met Glu  
 50 55 60

Met Val Tyr Cys Leu Pro Ala Glu Leu Gly Val Pro Thr Thr Ser Ser  
 65 70 75 80

Pro Leu Lys Asn Leu Val Leu Asp Ile Asp Tyr Asn Asp Ala Val Val  
 85 90 95

Val Ile His Thr Ser Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ile Ala Arg Leu Leu  
 100 105 110

Asp Ser Leu Gly Lys Ala Glu Gly Ile Leu Gly Thr Ile Ala Gly Asp  
 115 120 125

Asp Thr Ile Phe Thr Thr Pro Ala Asn Gly Phe Thr Val Lys Asp Leu  
 130 135 140

Tyr Glu Ala Ile Leu Glu Leu Phe Asp Gln Glu Leu  
 145 150 155

<210> 9  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P1

&lt;400&gt; 9

tatcaaccac catatcgggt gacttatgcg aagctccgct caagttagta taaaaaagct 60

gaac 64

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 63

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P2

&lt;400&gt; 10

ttaaagctcc tggcgaaca gctctaaaat cgctttgaag cctgcctttt tataactaagt 60

tgg 63

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P3

&lt;400&gt; 11

ttaggcaccg ccgacatgaa aggctttttt gcgtttcgct caagttagta taaaaaagct 60

gaac 64

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P4

&lt;400&gt; 12

ttaatgccag caaaaatggt gaattacctg ggttattgaa gcctgccttt ttataactaag 60

ttgg 64

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; P5

&lt;400&gt; 13

gggtgtgccgt ggtaaaggaa cgtaaaaccg agttggcgct caagttagta taaaaaagct 60

gaac 64

<210> 14  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P6

<400> 14  
 tcatcgctta ccctaaatcc gccatcaaca ctttggtgaa gctgccttt ttatactaag 60  
 ttgg 64

<210> 15  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P7

<400> 15  
 agctgagtcg acccccagga aaaattggtt aataac 36

<210> 16  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P8

<400> 16  
 agctgagcat gcttccaact gcgctaatga cgc 33

<210> 17  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P9

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(28)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (46)..(46)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (49)..(49)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (51)..(51)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 17  
 atcgtgaaga tcttttccag tgtnnannag ggtgccttgc acggtnatna ngtcactgg 59

<210> 18  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(20)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 18  
 tggaaaagat cttctnnnnn cgctgacctg cg 32

<210> 19  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P11

<400> 19  
 taactttaag aaggagatat aatgttcggt ccgaggggat tcagctac 48

<210> 20  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P12

<400> 20  
 cagtctcaag ccgcggttgc ggctttctga atcttatcat gtctgtacc tcccgtttat 60

<210> 21  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> P13

<400> 21  
 gagatattatg ctgcccgacc accgcccccg ttatatttgaa gcctgccttt ttataactaag 60  
 ttgg 64

<210> 22  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P14

<400> 22  
 ttatatctcc ttcttaaagt taaacaaaat tattaggaaa aattgggttat taaccagtga 60  
 c 61

<210> 23  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P15

<400> 23  
 cggatgcatg acttgcatg cttatccgac ctacaccgct caagttagta taaaaaagct 60  
 gaac 64

<210> 24  
 <211> 64  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P16

<400> 24  
 cagcaaacga ataaatagca ggaatttaag tcattatgaa gcctgccttt ttataactaag 60  
 ttgg 64

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> P17

<400> 25  
 tgctgcaaaa tcgcttcagc 20

<210> 26

<211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> P18  
  
 <400> 26  
 ggcggccttga agctggcggg gcataccgat acggtg 36  
  
 <210> 27  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> P19  
  
 <400> 27  
 atcggtatgc cccgccagct tcaagccgcc agccccctgt cc 42  
  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> P20  
  
 <400> 28  
 ctgcatgaat attgatacta t 21  
  
 <210> 29  
 <211> 1209  
 <212> DNA  
 <213> Methanocaldococcus jannaschii  
  
 <400> 29  
 atgagagtta ttgatggg agttacagcc cctaaggat ttaaagcaa tggatacaaa 60  
 gagggtaagt ttggagtagc gataattatc tctgaaaaag atgcagtagg agctgggaca 120  
 ttcacaacaa ataaagttgt agctcatcct gtagttttat caaggagtt gataaaaaat 180  
 agagataaat ttagagcaat agttgcaaat agtggaaacg ccaactgttt tacaaaagat 240  
 ggaatggaag atgctaaaga aatgcagaga ttagtagcag agctctttaa tattaatgaa 300  
 gatgaggttt tagtagcctc aactggagtt attggaagaa agatggatat gaacattata 360  
 aaagatagaa taaataaggt ttataattta ataaaagaag gaaacagctc aataaacgct 420  
 gccaaagcaa taatgacaac tgatacaaaa ccaaaggaaa tagctgtgga gtttgaggtt 480  
 aatggaaaaa ctggttagagt tgggggggata gcaaaggag ctgggatgat agctccaaat 540  
 atggtacatg ctactatgct ttgctttata acaacagaca tagagattga taaagaaagc 600  
 ttaacaaata tcttgcaaaa ggtttagat aaaacattca acaacatatc cgttgatgga 660

gacacttcaa caaatgatac cgtttttgtt ttagctaagtg gattaagtgg agttaattat 720  
 gaagaatgtg gagaagagtt tgaaaatgcc ttattgtatg tgtgcagaga gcttgccaag 780  
 atgattgtta aggatggtga aggagctacc aaatttatgg aggttggtgt taaaggggct 840  
 aaaactgagg aggatgcagt taaagcatca aaggctatag ttaattcttt gttagttaaa 900  
 actgctgtgt ttggtggaga cccaaattgg ggaaggattg ttgctgctgt tggatatagt 960  
 ggggctgatt tcaaccaga agttgttgat gttatattga gcaactataa agatgaggtt 1020  
 tatttagtta aagatgggat tccattggct gatgaaggaa ctgaagagct aaaaaaggcc 1080  
 gaggagatta tgaaaagtga tgaaataaag atagttgttg atttgaagat gggggagttt 1140  
 gagaacgttt gttatggatg tgatttaagc tatgagatg ttagaataaa cgctgaatat 1200  
 acaacttaa 1209

<210> 30  
 <211> 402  
 <212> PRT  
 <213> Methanocaldococcus jannaschii

<400> 30

Met Arg Val Ile Asp Gly Gly Val Thr Ala Pro Lys Gly Phe Lys Ala  
 1 5 10 15

Asn Gly Tyr Lys Glu Gly Lys Phe Gly Val Ala Ile Ile Ile Ser Glu  
 20 25 30

Lys Asp Ala Val Gly Ala Gly Thr Phe Thr Thr Asn Lys Val Val Ala  
 35 40 45

His Pro Val Val Leu Ser Arg Glu Leu Ile Lys Asn Arg Asp Lys Phe  
 50 55 60

Arg Ala Ile Val Ala Asn Ser Gly Asn Ala Asn Cys Phe Thr Lys Asp  
 65 70 75 80

Gly Met Glu Asp Ala Lys Glu Met Gln Arg Leu Val Ala Glu Leu Phe  
 85 90 95

Asn Ile Asn Glu Asp Glu Val Leu Val Ala Ser Thr Gly Val Ile Gly  
 100 105 110

Arg Lys Met Asp Met Asn Ile Ile Lys Asp Arg Ile Asn Lys Val Tyr  
 115 120 125

Asn Leu Ile Lys Glu Gly Asn Ser Ser Ile Asn Ala Ala Lys Ala Ile  
 130 135 140

Met Thr Thr Asp Thr Lys Pro Lys Glu Ile Ala Val Glu Phe Glu Val  
 145 150 155 160

Asn Gly Lys Thr Val Arg Val Gly Gly Ile Ala Lys Gly Ala Gly Met  
 165 170 175

Ile Ala Pro Asn Met Leu His Ala Thr Met Leu Cys Phe Ile Thr Thr  
 180 185 190

Asp Ile Glu Ile Asp Lys Glu Ser Leu Thr Asn Ile Leu Gln Lys Val  
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Phe Asn Asn Ile Ser Val Asp Gly Asp Thr Ser Thr  
 210 215 220

Asn Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Asn Gly Leu Ser Gly Val Asn Tyr  
 225 230 235 240

Glu Glu Cys Gly Glu Glu Phe Glu Asn Ala Leu Leu Tyr Val Cys Arg  
 245 250 255

Glu Leu Ala Lys Met Ile Val Lys Asp Gly Glu Gly Ala Thr Lys Phe  
 260 265 270

Met Glu Val Val Val Lys Gly Ala Lys Thr Glu Glu Asp Ala Val Lys  
 275 280 285

Ala Ser Lys Ala Ile Val Asn Ser Leu Leu Val Lys Thr Ala Val Phe  
 290 295 300

Gly Gly Asp Pro Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Ala Val Gly Tyr Ser  
 305 310 315 320

Gly Ala Asp Phe Asn Pro Glu Val Val Asp Val Ile Leu Ser Asn Tyr  
 325 330 335

Lys Asp Glu Val Tyr Leu Val Lys Asp Gly Ile Pro Leu Ala Asp Glu  
 340 345 350

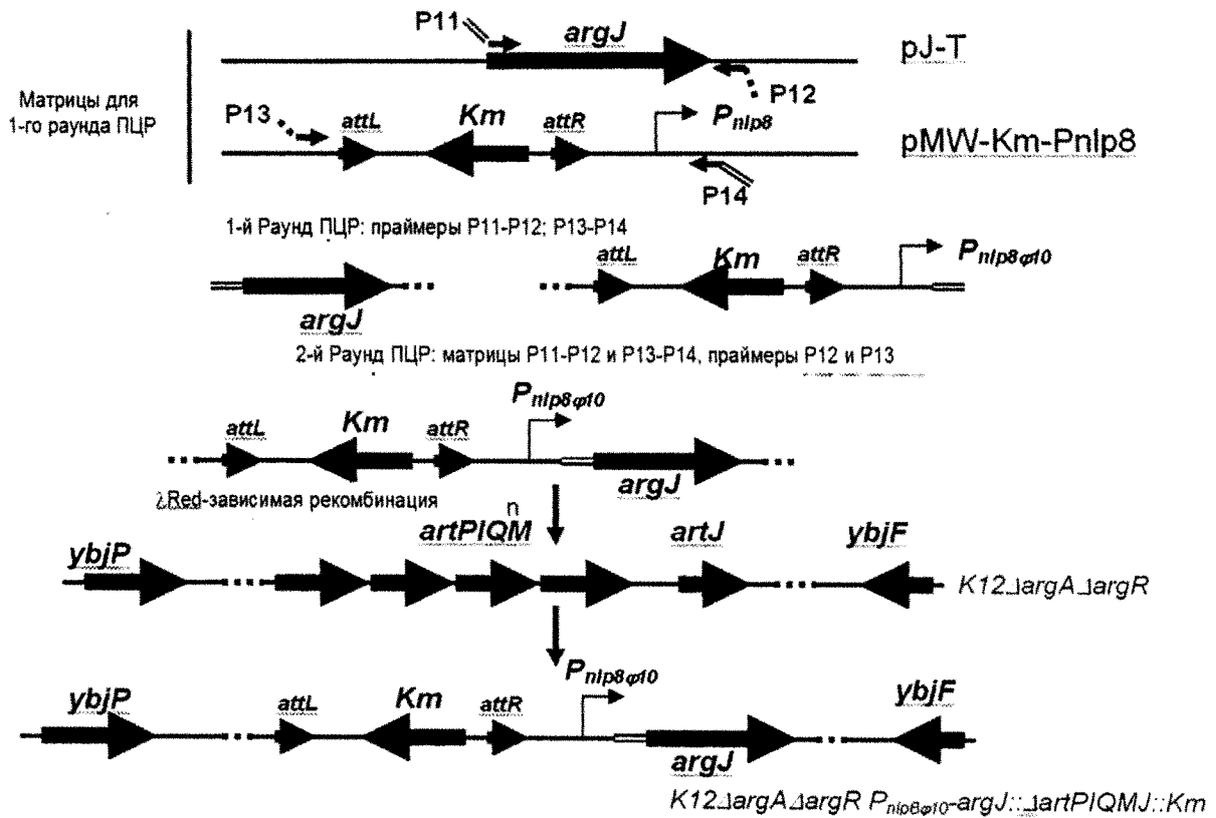
Gly Thr Glu Glu Leu Lys Lys Ala Glu Glu Ile Met Lys Ser Asp Glu  
 355 360 365

Ile Lys Ile Val Val Asp Leu Lys Met Gly Glu Phe Glu Asn Val Cys  
 370 375 380

Tyr Gly Cys Asp Leu Ser Tyr Glu Tyr Val Arg Ile Asn Ala Glu Tyr  
 385 390 395 400

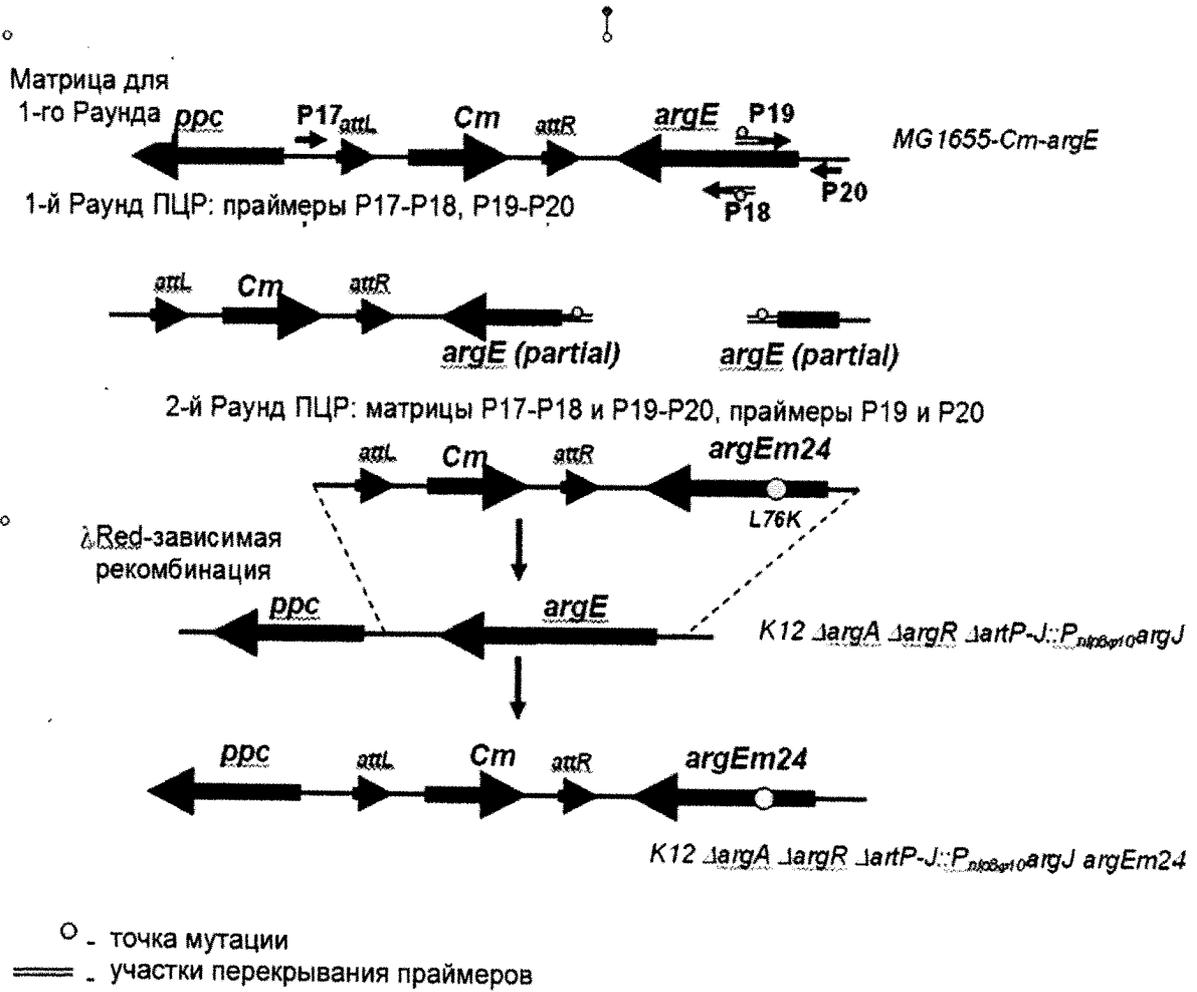
Thr Thr

Схема интеграции гена *argJ* в хромосому штамма *E. coli* 1655 $\Delta$ *argA* $\Delta$ *argR*.



Фиг. 1

Схема конструирования штамма *E. coli* MG1655 $\Delta$ argA $\Delta$ argR $\Delta$ artP-J::P<sub>nlp8φ10</sub>argJargEm24::Cm.



Фиг.2