

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4620231号  
(P4620231)

(45) 発行日 平成23年1月26日 (2011. 1. 26)

(24) 登録日 平成22年11月5日 (2010. 11. 5)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 P 13/24 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 13/24 C
<b>C 1 2 N 1/20 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1/20 A
<b>C 1 2 R 1/19 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 13/24 C
	C 1 2 R 1:19
	C 1 2 N 1/20 A
	請求項の数 4 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-280075 (P2000-280075)	(73) 特許権者	308032666
(22) 出願日	平成12年9月14日 (2000. 9. 14)		協和発酵バイオ株式会社
(65) 公開番号	特開2001-157596 (P2001-157596A)		東京都千代田区大手町一丁目6番1号
(43) 公開日	平成13年6月12日 (2001. 6. 12)	(72) 発明者	木野 邦器
審査請求日	平成19年3月29日 (2007. 3. 29)		千葉県花見川区瑞穂1-14-8
(31) 優先権主張番号	特願平11-265107	(72) 発明者	阿部 哲也
(32) 優先日	平成11年9月20日 (1999. 9. 20)		山口県防府市協和町1番1号協和醸酵工業株式会社 技 術研 究所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	審査官	小川 明日香
微生物の受託番号	FERM BP-6675		
微生物の受託番号	FERM BP-6676		
微生物の受託番号	FERM BP-6673		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵法によるL-アミノ酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-ヒスチジン生産能を有し、かつプリマキンまたはその金属塩に耐性を有するエシェリヒア・コリに属する微生物を培地に培養し、培養物中にL-ヒスチジンを生成蓄積させ、該培養物からL-ヒスチジンを採取することを特徴とする、L-ヒスチジンの製造法。

【請求項2】

エシェリヒア・コリH-9342 (FERM BP-6675) またはエシェリヒア・コリH-9343 (FERM BP-6676) を培地に培養し、培養物中にL-ヒスチジンを生成蓄積させ、該培養物からL-ヒスチジンを採取することを特徴とする、L-ヒスチジンの製造法。

【請求項3】

L-ヒスチジン生産能を有し、かつ150mg/Lのプリマキンニナトリウム塩に耐性を有するエシェリヒア・コリ。

【請求項4】

エシェリヒア・コリH-9342 (FERM BP-6675) およびエシェリヒア・コリH-9343 (FERM BP-6676) から選ばれる微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、発酵法によるL-アミノ酸の工業的に効率の良い製造法に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【 従来 の 技術 】

糖から直接 L - アミノ酸を生成蓄積させる直接発酵法としては、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、エシェリヒア属、セラチア属、アースロバクター属などの微生物の野生株から誘導した突然変異株を用いる方法が知られている。例えば L - アミノ酸生産性変異株としては、アミノ酸等の栄養要求性を有した菌株（特公昭 5 6 - 1 0 0 3 7）、アミノ酸のアナログやビタミン等の耐性変異を有した菌株（特開昭 5 6 - 1 3 4 9 9 3、特開昭 6 2 - 4 4 1 9 3）、栄養要求性変異とアミノ酸のアナログ耐性変異を共有した菌株（特開昭 5 0 - 3 1 0 9 3、特開昭 5 6 - 1 3 4 9 9 3）、分解能の低下した菌株（特開昭 6 3 - 2 7 3 4 8 7、特公昭 5 2 - 4 8 1 9 5）、あるいはアミノアシル t - RNA 合成酵素に基質親和性が減少した変異を有する菌株（特開平 4 - 3 3 0 2 7 5）等が知られている。

10

## 【 0 0 0 3 】

L - トリプトファンの製造においては、アミノキノリン誘導體またはフェノチアジン誘導體に対する耐性を付与することでアミノ酸生産性を向上させた例（特開平 4 - 1 1 2 7 9 5）が報告されている。

## 【 0 0 0 4 】

さらにアミノ酸の生合成に係わる遺伝子を含む組換え体 DNA で形質転換された菌株を用いることで、アミノ酸の生産性を向上することができることも知られている（特開昭 5 8 - 8 9 3、特開昭 6 0 - 1 2 9 9 5、特開昭 6 0 - 2 1 0 9 9 4、特開昭 6 0 - 3 0 6 9 3、特開昭 6 1 - 1 9 5 6 9 5、特開昭 6 1 - 2 7 1 9 8 1、特開平 2 - 4 5 8、特開平 2 - 4 2 9 8 8、特公平 1 - 4 2 6 7 6、特公平 5 - 1 1 9 6 0、特公平 5 - 2 6 4 6 7）。

20

## 【 0 0 0 5 】

DNA ジャイレース欠損株ではヒスチジン合成系に關与するオペロンの発現量が上昇すること[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 517 (1987)]、DNA ジャイレース変異株では His-tRNA を含むいくつかのアミノ酸 t-RNA レベルが低下していること[J. Mol. Biol., 66, 131 (1972)]が報告されているが、DNA ジャイレース阻害剤耐性とアミノ酸生産性の関係についての報告はされていない。

## 【 0 0 0 6 】

## 【 発明 が 解決 し よ う と す る 課 題 】

本願発明の目的は、医薬品、化学品、食品および飼料添加物などとして有用な L - アミノ酸の工業的に効率のよい製造方法を提供することにある。

30

## 【 0 0 0 7 】

## 【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

即ち、本願発明は、以下の（ 1 ）～（ 1 4 ）に関する。

（ 1 ） L - アミノ酸生産能を有し、かつ DNA ジャイレース阻害剤に対する耐性を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該 L - アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該 L - アミノ酸を採取することを特徴とする、L - アミノ酸の製造法。

（ 2 ） DNA ジャイレース阻害剤が、ナリジキシン酸、オキソリン酸、クーママイシン、ノボピオシン、およびこれらの物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれる DNA ジャイレース阻害剤である、上記（ 1 ）の L - アミノ酸の製造法。

40

（ 3 ） 微生物がアミノキノリン誘導體に対する耐性を有する微生物である、上記（ 1 ）の L - アミノ酸の製造法。

## 【 0 0 0 8 】

（ 4 ） アミノキノリン誘導體が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン、プリマキンおよびこれらの物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるアミノキノリン誘導體である、上記（ 3 ）の L - アミノ酸の製造法。

（ 5 ） L - アミノ酸が L - ヒスチジンである、上記（ 1 ）～（ 4 ）いずれか 1 つに記載の L - アミノ酸の製造法。

（ 6 ） 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバク

50

テリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる微生物である、上記(1)または(3)のL-アミノ酸の製造方法。

(7) 微生物がエシェリヒア・コリH-9342(FERM BP-6675)およびエシェリヒア・コリH-9343(FERM BP-6676)からなる群より選ばれる微生物である、上記(6)のL-アミノ酸の製造法。

(8) L-アミノ酸生産能を有し、かつDNAジャイレース阻害剤に対する耐性を有する微生物。

【0009】

(9) DNAジャイレース阻害剤が、ナリジキシン酸、オキシリン酸、クーマイシン、ノボビオシン、およびこれらの物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるDNAジャイレース阻害剤である、上記(8)の微生物。

10

【0010】

(10) 微生物がアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物である、上記(8)または(9)の微生物。

(11) アミノキノリン誘導体が、クロロキン、アモジアキン、ペンタキン、プリマキンおよびこれらの物質のアルカリ金属塩からなる群より選ばれるアミノキノリン誘導体である、上記(10)の微生物。

(12) L-アミノ酸がL-ヒスチジンである、上記(8)の微生物。

(13) 微生物がセラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属からなる群より選ばれる微生物である、上記(8)~(12)いずれか1つに記載の微生物。

20

(14) エシェリヒア・コリH-9342(FERM BP-6675)およびエシェリヒア・コリH-9343(FERM BP-6676)から選ばれる微生物。

【0011】

【発明の実施の形態】

本願発明の微生物としては、L-アミノ酸生産能を有し、かつDNAジャイレース阻害剤に対する耐性を有する微生物であればいずれも用いることができる。また、該微生物がさらにアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物であればより好ましい。該微生物としては、例えば、セラチア属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、ミクロバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属に属する微生物、例えばSerratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Corynebacterium glutamicum、Corynebacterium mycetoides、Corynebacterium variabilis、Corynebacterium ammoniagenes、Arthrobacter crystallopoietes、Arthrobacter duodecadis、Arthrobacter ramosus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis、Microbacterium ammoniaphilum、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefacines、Escherichia coli等をあげることができる。

30

【0012】

本願発明に用いられるDNAジャイレース阻害剤は、細菌に存在するII型トポイソメラーゼの一種であるDNAジャイレース(DNA gyrase)を阻害する物質であればいずれでも用いられる。例えば、ナリジキシン酸(nalidixic acid)、オキシリン酸(oxolinic acid)、クーマイシン(coumermycin)、ノボビオシン(novobiocin)などが用いられる。また、これら物質のアルカリ金属塩などの塩も用いられる。ここで、アルカリ金属はナトリウム、カリウム等のアルカリ金属であればいずれでも用いられる。

40

【0013】

本願発明に用いられるアミノキノリン誘導体は、アミノキノリン骨格を有する物質であればいずれでも用いられる。例えば、クロロキン(chloroquine)、アモジアキン(amodiaquine)などの4-アミノキノリン誘導体や、ペンタキン(pentaquine)、プリマキン(primaquine)などの8-アミノキノリン誘導体などが用いられる。また、これら物質のアルカリ金属塩などの塩も用いられる。これら物質は、いずれも抗マラリア薬(antimalarial drugs)として知られている。ここで、アルカリ金属はナトリウム、カリウム等のアルカリ金属であれ

50

ばいずれでも用いられる。

【 0 0 1 4 】

本願発明の微生物は、L - アミノ酸を生産する能力を有する微生物に紫外線照射やN-メチル-N - ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)などの突然変異誘発剤による通常の変異処理を施し、該変異株を親株が生育できないか、または生育が不良となる濃度のDNAジャイレース阻害剤を含む寒天平板培地上で通常の下で培養し、生じたコロニーのうちで親株よりも生育が速いか、または大きなコロニーを生ずる株を選択することによりDNAジャイレース阻害剤耐性株として取得することができる。

【 0 0 1 5 】

また、該DNAジャイレース阻害剤耐性株に突然変異処理を施し、該変異株を親株が生育できないか生育が不良となる濃度のアミノキノリン誘導体を含む寒天平板培地上で培養し、生じたコロニーのうちで親株よりも大きなコロニーを選択することにより、DNAジャイレース阻害剤耐性で、かつアミノキノリン誘導体耐性な株を取得することができる。

10

【 0 0 1 6 】

上記L - アミノ酸生産能を有する微生物として公知のL - アミノ酸生産能を有する微生物を用いても良いし、また公知の方法により新たに野生型株から取得しても良い。公知の方法としては上記の変異処理法の他にも、細胞融合法、形質導入法、その他の遺伝子組換え技法[いずれもMolecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)]等をあげることができる。

20

【 0 0 1 7 】

本願発明の微生物は、DNAジャイレース阻害剤に対する耐性、該耐性およびアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を、通常の変異処理法を用いて取得した後、これら微生物にアミノ酸生産能を上記方法により付与することによっても取得することができる。

本願発明の微生物として、具体的にはエシェリヒア・コリH - 9 3 4 2 ( F E R M B P - 6 6 7 5 )、およびエシェリヒア・コリH - 9 3 4 3 ( F E R M B P - 6 6 7 6 )をあげることができる。

【 0 0 1 8 】

本願発明の微生物を用いたL - アミノ酸の生産は、通常の細菌培養法により実施することができる。

30

L - アミノ酸の生産に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他使用菌株の必要とする微量の栄養素を程よく含有するものならば、合成培地または天然培地いずれも使用可能である。

【 0 0 1 9 】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、ラクトース、糖蜜、セルロース加水分解物、粗糖加水分解物、澱粉加水分解物などの炭水化物、ピルビン酸、酢酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などの有機酸、グリセリン、エタノールなどのアルコールなどが用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの各種無機塩類、有機酸のアンモニウム塩、アミン類、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物などが用いられる。

40

【 0 0 2 0 】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウムなどが用いられる。

培養は、振盪培養または通気攪拌培養などの好氣的条件下にて行われ、培養温度は20 ~ 40 で、好ましくは28 ~ 37 の範囲である。培地のpHはpH5 ~ 9の範囲で、好ましくは中性付近に保持する。培地のpH調整は炭酸カルシウム、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、pH緩衝液などによって行う。通常1 ~ 7日間の培養によ

50

り、培養液中にL-アミノ酸が生成蓄積する。

【0021】

培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、培養液からL-アミノ酸を回収することができる。

本願発明により製造することができるL-アミノ酸は特に限定されないが、例えばL-ヒスチジンがあげられる。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0022】

【実施例】

実施例1 DNAジャイレース阻害剤、またはDNAジャイレース阻害剤およびアミノキノリン誘導体に対する耐性を有するL-ヒスチジン生産性変異株の取得  
ブタペスト条約に基いて平成11年3月9日付けで、FERMBP-6673として工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている、メチオニン要求性のエシェリヒア・コリATCC21318より誘導した1,2,4-トリアゾールアラニンに対する耐性を有するL-ヒスチジン生産性変異株H-9340に、常法に従って、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)による変異処理(0.2mg/ml、30、30分間)を施した後、ノボピオシン-ナトリウム塩を1g/L含む寒天平板培地〔グルコース0.2%、リン酸一カリウム0.3%、リン酸二ナトリウム0.6%、硫酸マグネシウム0.01%、塩化ナトリウム0.05%、塩化アンモニウム0.1%、栄養要求物質(DL-メチオニン)50mg/L、寒天1.5%、pH7.2〕に塗布した。

【0023】

該寒天平板培地を30で2~6日間培養し、生育してきた大きなコロニーを釣菌分離してH-9342を取得した。

さらに、NTGによる変異処理(0.2mg/ml、30、30分間)を施した後、プリマキンナトリウム塩を150mg/L含む寒天平板培地に塗布し、30で2~6日間培養し、生育してきた大きなコロニーを釣菌分離してH-9343を取得した。これら菌株はブタペスト条約に基いて平成11年3月9日付けで、H-9342はFERMBP-6675として、またH-9343はFERMBP-6676として工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている。

【0024】

実施例2 プリマキンまたはノボピオシンを含む寒天平板培地での生育比較試験実施例1で取得した変異株H-9342、H-9343のプリマキンまたはノボピオシン含有寒天平板培地での生育を親株H-9340と比較した。

【0025】

それぞれの変異株を取得した時と同濃度のプリマキンナトリウム塩またはノボピオシン-ナトリウム塩を含む上記寒天平板培地上に、天然培地で24時間培養した各菌体を生理食塩水に懸濁して1~10cells/cm<sup>2</sup>になるように塗布し、33、4日間培養した。

該培養による生育の可否を第1表に示した。

親株であるH-9340は、いずれの薬剤を含む寒天培地上でも全く生育できなかった。また、H-9342はプリマキン含有培地に生育できなかった。

【0026】

【表1】

10

20

30

40

第1表

菌株	寒天培地添加物		
	無添加	プリマキンNa塩	ノボビオシンNa塩
H-9340	+	-	-
H-9342	+	-	+
H-9343	+	+	+

10

## 【0027】

実施例3 L-ヒスチジンの製造

実施例1で取得した変異株H-9342、H-9343、または親株H-9340を用いたL-ヒスチジンの製造を以下の方法で行った。

H-9340とそれぞれの変異株を、太型試験管中の種培地（グルコース 2%、糖蜜 0.5%、コーンステープリカー 1%、硫酸 1.2%、リン酸一カリウム 0.3%、硫酸マグネシウム 0.015%、DL-メチオニン 600mg/L、アデニン 100mg/L、炭酸カルシウム 3%、pH 6.2）6mlに接種して、30℃で12時間振盪培養した。

20

## 【0028】

得られた種培養液0.1mlを、それぞれ太型試験管中の生産培地（グルコース 6%、コーンステープリカー 1%、硫酸アンモニウム 2.4%、リン酸一カリウム 0.4%、硫酸マグネシウム 0.015%、チアミン塩酸塩 10mg/L、パントテン酸カルシウム 10mg/L、炭酸カルシウム 3%、pH 6.5）5mlに接種して、30℃で48時間振盪培養した。

## 【0029】

培養後、培養液中のL-ヒスチジンの蓄積量を、高速液体クロマトグラフィー法により定量した。

結果を第2表に示した。

30

親株H-9340に比べ変異株H-9342のL-ヒスチジン生産性、ならびにH-9342に対するH-9343のL-ヒスチジン生産性は向上していた。

## 【0030】

## 【表2】

第2表

菌株	L-ヒスチジン(g/l)
H-9340	13.0
H-9342	15.7
H-9343	16.5

40

## 【0031】

また、H-9343の種培養液100mlを、2Lの小型発酵槽中の発酵培地（グルコース 6%、コーンステープリカー 1%、硫酸アンモニウム 0.5%、リン酸一カリウム 0.4%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 100mg/L、pH 6.5）600mlに植菌し、30℃、攪拌数800rpm、通気量1L/分で培養した。培養中のpH調整および窒素源の供給はアンモニア水で行い、pH 6.5±0.2に維持した。グルコース、硫酸アンモニウム、リン酸一カリウムを適宜供給しつつ、70時間培養し

50

た。

【0032】

その結果、培養液中のL - ヒスチジン蓄積量は46.5 g / Lであった。またH - 9340を同様に培養した時のL - ヒスチジン蓄積量は27.7 g / Lであった。

【0033】

【発明の効果】

本願発明により、L - アミノ酸生産能を有し、かつDNAジャイレース阻害剤に対する耐性を有する微生物、またはL - アミノ酸生産能を有し、かつDNAジャイレースおよびアミノキノリン誘導体に対する耐性を有する微生物を取得し、培地で培養することで、L - アミノ酸の生産性を向上させることができ、L - アミノ酸を工業的に効率よく、かつ安価に製造することができる。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 R 1:19

(56)参考文献 特開昭55-165798(JP,A)

特開昭56-005099(JP,A)

Antimicrob Agents Chemother., 1999年4月, Vol.43, pp.868-875

Proc Natl Acad Sci U S A., 1991年, Vol.88, pp.8860-8864

Proc Natl Acad Sci U S A., 1987年, Vol.84, pp.517-521

J Bacteriol., 1992年, Vol.174, pp.5479-5481

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 13/24

C12N 1/20

C12R 1/19

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)