

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2015-519917**

**(P2015-519917A)**

(43) 公表日 **平成27年7月16日(2015.7.16)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 P 13/12 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/12 A	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2015-517864 (P2015-517864)	(71) 出願人	505311917 メタボリック エクスプローラー
(86) (22) 出願日	平成24年6月18日 (2012. 6. 18)		フランス国サン、ボージュール、ピオポル、 クレルモン-リマーニュ
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月17日 (2015. 2. 17)	(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/001336	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(87) 国際公開番号	W02013/190343	(74) 代理人	100126099 弁理士 反町 洋
(87) 国際公開日	平成25年12月27日 (2013. 12. 27)	(74) 代理人	100188651 弁理士 遠藤 広介
		(72) 発明者	ワンダ、ディシェール フランス国ビックール-コント、リュ、ド 、クロニュー、67

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチオニンの発酵生産のための組換え微生物

(57) 【要約】

本発明は、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼMetEの活性が減弱された、メチオニンの発酵生産のために最適化された組換え微生物に関する。本発明はまた、発酵によりメチオニンを生産するための方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

メチオニンの発酵生産のために最適化された組換え微生物であって、該微生物においてコバラミン非依存性メチオニンシンターゼ Met E の活性が減弱されている、微生物。

## 【請求項 2】

コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ Met E が、発現が減弱された met E 遺伝子によってコードされる、請求項 1 に記載の微生物。

## 【請求項 3】

met E 遺伝子の少なくとも一部が欠失された、請求項 1 または 2 に記載の微生物。

## 【請求項 4】

Met E タンパク質が突然変異 met E 遺伝子によってコードされる、請求項 1 に記載の微生物。

## 【請求項 5】

met E 遺伝子の突然変異が、417 位～429 位の間に含まれる塩基の欠失である、請求項 4 に記載の微生物。

## 【請求項 6】

以下の遺伝子：pts G、pyc、pnt AB、cys P、cys U、cys W、cys A、cys M、cys J、cys I、cys H、gcv T、gcv H、gcv P、lpd、ser A、ser B、ser C、cys E、met F、met H、thr A、S-アデノシルメチオニンおよび/もしくはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードする met A 対立遺伝子 (met A<sup>\*</sup>)、thr A、またはトレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードする thr A 対立遺伝子 (thr A<sup>\*</sup>) の少なくとも 1 つの発現が増大されている、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 7】

少なくとも 1 つの遺伝子が誘導プロモーターの制御下にある、請求項 6 に記載の微生物。

## 【請求項 8】

以下の遺伝子：met J、pyk A、pyk F、pur U、ybd L または ync A の少なくとも 1 つの発現が減弱されている、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 9】

a. 遺伝子 met E が欠失され、

b. 遺伝子 met A<sup>\*</sup>、met H、cys P U W A M、cys J I H、gcv T H P、met F、ser A、ser B、ser C、cys E、thr A<sup>\*</sup> および pyc の発現が増大され、かつ

c. 遺伝子 met J、pyk A、pyk F、pur U および ync A の発現が減弱されている、

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 10】

前記微生物が腸内細菌 (Enterobacteriaceae) 科またはコリネバクテリウム (Corynebacteriaceae) 科細菌由来のものである、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 11】

前記微生物が大腸菌 (Escherichia coli) である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の微生物。

## 【請求項 12】

a. 請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組換え微生物を、発酵性炭素源と、硫黄源とを含んでなる適当な培養培地中で培養し、かつ

b. 該培養培地からメチオニンまたはその誘導体を回収する工程を含んでなる、メチオニンの発酵生産のための方法。

## 【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記組換え微生物の増殖が、前記培養培地において、1つまたは複数の無機基質、特に、リン酸塩および/またはカリウムの制限または欠乏を受ける、請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メチオニンの生産のための組換え微生物、および該組換え微生物を炭素源と硫黄源とを含んでなる適当な培養培地中で培養することにより、メチオニンを生産する方法に関する。該微生物は、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼの活性を減弱させることによってメチオニン/炭素源収率が增加するように改変されている。特に、該組換え微生物では遺伝子 metE が欠失している。

10

【背景技術】

【0002】

システイン、ホモシステイン、メチオニン、またはS-アデノシルメチオニンなどの硫黄含有化合物は細胞代謝にとって重要であり、食品または飼料添加物および医薬品として使用されるべく工業的に製造される。特に、動物が合成することのできない必須アミノ酸であるメチオニンは、多くの身体機能において重要な役割を果たす。タンパク質生合成におけるその役割とは別に、メチオニンは、メチル基転移ならびにセレンウムおよび亜鉛のバイオアベイラビリティに関与している。メチオニンはまた、アレルギーやリウマチ熱のような障害の治療法として直接用いられる。しかしながら、生産されるメチオニンの大部分は動物飼料に添加されている。

20

【0003】

BSEおよび鳥インフルエンザの結果として動物由来タンパク質の使用が減少するに伴い、純粋なメチオニンに対する需要が高まっている。通常、D, L-メチオニンは、アクロレイン、メチルメルカプタン、およびシアン化水素から化学的に生産される。しかしながら、ラセミ混合物は、純粋なL-メチオニンほど良好には機能しない(Saunderson, 1985)。また、純粋なL-メチオニンは、ラセミ体メチオニンから、例えば、N-アセチル-D, L-メチオニンのアシラーゼ処理によって生産することができるが、これにより生産コストは劇的に増加する。従って、環境問題に関連して純粋なL-メチオニンに対する需要が高まりつつあることから、微生物によるメチオニンの生産は魅力的な展望を持つ。

30

【0004】

微生物からの化学製品の生産の最適化には、一般に、生合成経路に関与するタンパク質の過剰発現、生合成経路の抑制に関与するタンパク質の減弱、または望ましくない副産物の産生に関与するタンパク質の減弱が必要である。微生物におけるL-メチオニン生産の最適化に向けたこれら総てのアプローチはこれまでに記載されている(例えば、特許または特許出願、米国特許第7,790,424号、米国特許第7,611,873号、WO2002/010209号、WO2005/059093号およびWO2006/008097号参照)、しかしながら、微生物からのL-メチオニンの工業生産にはさらなる改善が必要である。

【0005】

大腸菌(*Escherichia coli*)、およびコリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)のような他の微生物では、2つの異なる酵素がメチオニンのデノボ生合成の最終段階を触媒する(Foster et al., 1961; Gonzalez et al., 1992)。コバラミン依存性メチオニンシンターゼ(MetH、EC 2.1.1.13)は、metH 遺伝子によってコードされ、活性に必要な補欠分子族を含む。コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ(MetE、EC 2.1.1.14)は、metE 遺伝子によってコードされ、ビタミン由来の補欠分子族の要件は知られていない。

40

【0006】

数多くの特許出願は、メチオニン生合成の最終段階を促進するための酵素MetHおよびMetEの過剰生産に関するものであり、例えば、

50

・BASF社のWO2007/012078号およびWO2007/135188号には、遺伝子metHおよび/またはmetEの過剰発現をもたらす遺伝子変化が記載されており、

・EVONIK社のWO2009/144270号には、Cob(I)アラミン依存性MetH再活性化系の量および/または活性の増加を示す微生物を用いた、メチオニンを生産するための方法が記載されている。

【0007】

本発明者らは、驚くべきことに、意外にも、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ(MetE)の量および/または活性の減弱によってメチオニンの生産の向上をもたらされることを見出した。メチオニン生合成経路に属する酵素の1つの活性の喪失がメチオニン生産に有益であると提示されたのはこれが初めてである。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼMetEの活性が減弱されている、メチオニンの生産のために最適化された組換え微生物に関する。好ましくは、MetE酵素をコードする遺伝子metEは欠失または突然変異している。該組換え微生物は、

・以下の遺伝子の少なくとも1つの発現の増加：ptsG、pyc、pntAB、cysP、cysU、cysW、cysA、cysM、cysJ、cysI、cysH、gcvT、gcvH、gcvP、lpd、serA、serB、serC、cysE、metF、metH、thrA、S-アデノシルメチオニンおよび/もしくはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするmetA対立遺伝子(metA\*)、thrA、またはトレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードするthrA対立遺伝子(thrA\*)、かつ/あるいは

・以下の遺伝子の1つの発現の減弱：metJ、pykA、pykF、purU、ybdLまたはyncA

などの他の遺伝子修飾を含んでなってもよい。

【0009】

特定の実施形態では、本発明は、a) 遺伝子metEが欠失され、かつb) 遺伝子metA\*、metH、cysPUWAM、cysJIH、gcvTHP、metF、serA、serB、serC、cysE、thrA\*およびpycの発現が増大され、かつc) 遺伝子metJ、pykA、pykF、purUおよびyncAの発現が減弱されている微生物に関する。

【0010】

本発明はまた、発酵プロセスによるメチオニンまたはメチオニン誘導体の生産のための方法に関し、その方法は、a) 本発明による組換え微生物を、グルコースを含有する発酵性炭素源と硫黄源とを含んでなる適当な培養培地中で培養すること、およびb) 該培養培地からメチオニンまたはメチオニン誘導体を回収することを含む。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特に例示した方法に限定されず、当然のことながら、変更し得るものと理解されるべきである。また、本明細書において用いられる用語は単に本発明の特定の実施形態を記載することを目的とすにすぎず、限定されるものではなく、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものと理解されるべきである。

【0012】

本明細書において引用される総ての刊行物、特許および特許出願は、前掲または後掲を問わず、引用することにより本明細書の一部とされる。しかしながら、本明細書において記述される刊行物は、それらの刊行物の中で報告されておりかつ本発明に関連して使用される可能性があるプロトコール、試薬およびベクターの記載および開示を目的として引用

10

20

30

40

50

される。本明細書中のいかなる記載も、本発明が先行発明に基づいてかかる開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきでない。

【0013】

さらに、本発明の実施には、特に断りのない限り、当技術分野の技術の範囲内である通常の微生物学的技術および分子生物学的技術を用いる。そのような技術は当業者によく知られており、文献において十分に説明されている。例えば、Prescott et al. (1999); および Sambrook et al., (1989) (2001) 参照。

【0014】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」という単数形は、特に明示されていない限り、複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。従って、例えば、「一微生物」という場合には、そのような微生物の複数が包含され、「一内在性遺伝子」という場合には、1つまたは複数の内在性遺伝子を表すなどである。特に定義されない限り、本明細書において用いられる総ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の熟練者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の材料および方法を使用して、本発明の実施または試験を行うことができるが、好ましい材料および方法を次に記載する。

【0015】

以下の特許請求の範囲および本発明の一貫した記載では、明示された言語または必然的な関連性から文脈上他の意味に解釈すべき場合を除いて、「含んでなる(comprise)」、「含む(contain、involveもしくはinclude)」という用語または変化形(comprises、comprising、containing、involved、includes、includingなど)は、包含の意味で、すなわち、述べられた特徴の存在を具体的に示すだけでなく、本発明の様々な実施形態におけるさらなる特徴の存在または追加を排除しないように用いられる。

【0016】

定義

用語「メチオニン」とは、化学式  $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$  および CAS 番号 59-51-8 または特定の L-異性体については 63-68-3 を有する硫黄含有必須アミノ酸を表す。

【0017】

「メチオニンの誘導体」とは、同じ化学骨格を示すが少なくとも1つの化学基に関してメチオニンと異なる、メチオニンの分子類似体を意味する。本発明において、好ましいメチオニン誘導体は N-アセチルメチオニン(NAM)、S-アデノシルメチオニン(SAM) および ヒドロキシメチオニンである。

【0018】

本明細書において用語「微生物」とは、人為的に改変されていない細菌、酵母または真菌を意味する。好適には、微生物は腸内細菌科(Enterobacteriaceae)、バチルス科(Bacillaceae)、ストレプトミセス科(Streptomyetaceae) および コリネバクテリウム科(Corynebacteriaceae)の中から選択される。より好適には、微生物は、エシェリキア属(Escherichia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、パンテア属(Pantoea)、サルモネラ菌属(Salmonella) または コリネバクテリウム属(Corynebacterium)の種である。いっそうより好適には、微生物は、大腸菌(Escherichia coli) または コリネバクテリウム・グルタミカム種(Corynebacterium glutamicum)のいずれかである。

【0019】

本明細書において「組換え微生物」または「遺伝的に改変された微生物」とは、自然界には見られず、かつ自然界に見られるその同等のものと遺伝的に異なる細菌、酵母または真菌を意味する。微生物は、遺伝エレメントの導入または欠失または修飾のいずれかにより改変されるということである。また、微生物は、指示された突然変異誘発と特定の選択圧下での進化の組合せによって新規代謝経路の発生および進化を促すことにより形質転換することもできる(例えば、WO 2004/076659号参照)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 0 】

外来遺伝子が、宿主微生物におけるそれらの遺伝子の発現を可能にする総てのエレメントとともに微生物に導入されるならば、微生物は、外来遺伝子を発現するように改変し得る。外来DNAでの微生物の改変または「形質転換」は、当業者にとって常法である。

## 【 0 0 2 1 】

微生物は、内在性遺伝子の発現レベルを調整するように改変し得る。

## 【 0 0 2 2 】

「内在性遺伝子」とは、野生型株において、いかなる遺伝子修飾の前にも該遺伝子が微生物中に存在していたことを意味する。内在性遺伝子は、内在性調節エレメントに加えて、もしくは内在性調節エレメントの代わりとなるように異種配列を導入することにより、または該遺伝子の1つもしくは複数の追加のコピーを染色体もしくはプラスミドに導入することにより、過剰発現させ得る。内在性遺伝子はまた、それらの発現および/または活性を調節するために改変されていてよい。例えば、遺伝子産物を改変するためにコード配列に突然変異が導入されていてよく、または内在性調節エレメントに加えて、もしくは内在性調節エレメントの代わりとなるように異種配列が導入されていてよい。内在性遺伝子の調節は、遺伝子産物の活性のアップレギュレーションおよび/または増強をもたらし得るし、あるいは、内在性遺伝子産物の活性をダウンレギュレートおよび/または低減し得る。

10

## 【 0 0 2 3 】

内在性遺伝子の発現を調整するための別の方法は、遺伝子の内在性プロモーター（例えば、野生型プロモーター）をより強いまたはより弱いプロモーターと交換して、内在性遺伝子の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることである。これらのプロモーターは同種でも異種でもよい。適当なプロモーターを選択することは十分に当業者の能力の範囲内である。

20

## 【 0 0 2 4 】

「外来遺伝子」とは、該遺伝子が、当業者によく知られている手段によって、微生物に導入され、微生物においてこの遺伝子が自然に存在しないことを意味する。外来遺伝子は、宿主染色体に組み込まれ得るし、またはプラスミドもしくはベクターによって染色体外で発現され得る。複製起点および細胞内でのコピー数が異なる様々なプラスミドは当技術分野で周知である。これらの遺伝子は異種でも同種でもよい。

30

## 【 0 0 2 5 】

「異種遺伝子」とは、該遺伝子が、それを発現するレシピエント微生物とは異なる微生物種由来であることを意味する。異種遺伝子とは、微生物において自然に存在しない遺伝子を意味する。

## 【 0 0 2 6 】

本願において、総ての遺伝子は、大腸菌(E.coli)由来の共通する名称を用いて参照される。それらのヌクレオチド配列は、ウェブサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>または<http://www.ebi.ac.uk/embl/>上で入手可能である。

## 【 0 0 2 7 】

当業者ならば、GenBankに示されている既知の遺伝子に関する参照番号を用いて他の生物、細菌株、酵母、真菌、哺乳類、植物などにおける等価な遺伝子を決定することができる。この常法は、有利には、コンセンサス配列を使用して行われ、このコンセンサス配列は、他の微生物由来の遺伝子との配列アラインメントを行い、縮重プローブを設計して、他の生物における対応する遺伝子をクローニングすることにより決定することができる。これらの分子生物学の常法は当業者によく知られており、例えば、Sambrook et al, (1989)および(2001)に記載されている。

40

## 【 0 0 2 8 】

本明細書において「メチオニン生産の向上」、「メチオニン生産を向上させる」という用語、およびその文法的同義語は、メチオニン/炭素源収率（消費された炭素源のg数/mol数当たりの生産されたメチオニンのg数/mol数の割合、この割合はパーセント

50

で表すことができる)の増加を意味する。消費された炭素源の量および生産されたメチオニンの量を決定するための方法は当業者によく知られている。組換え微生物では、上記収率は、対応する未改変微生物と比べて高い。

【0029】

用語「メチオニンの発酵生産のために最適化された微生物」とは、対応する野生型微生物の体内生産と比べてメチオニン生産の向上を示すように進化および/または遺伝的改変を受けた微生物を意味する。メチオニン生産のために「最適化された」上記微生物は当技術分野で周知であり、特に、特許出願WO2005/111202号、WO2007/077041号およびWO2009/043803号に開示されている。

【0030】

本発明によれば、用語「発酵生産」、「培養」または「発酵」とは、細菌の増殖を表すために用いられる。この増殖は一般に、少なくとも1つの単純炭素源を、必要な場合には、補助基質とともに含有する、使用する微生物に適合した適当な培養培地の入った発酵槽で行われる。

【0031】

「適当な培養培地」とは、細胞の維持および/または増殖に不可欠または有益な栄養、例えば、炭素源または炭素基質、窒素源、例えば、ペプトン、酵母抽出物、肉抽出物、麦芽抽出物、尿素、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム；リン源、例えば、リン酸一カリウムまたはリン酸二カリウム；微量元素(例えば、金属塩)、例えば、マグネシウム塩、コバルト塩および/またはマンガン塩；ならびに増殖因子(例えば、アミノ酸およびビタミン)などを含んでなる培地(例えば、滅菌液体培地)を表す。

【0032】

本発明による用語「炭素源(carbon source)」または「炭素基質」または「炭素源(source of carbon)」とは、微生物の正常な増殖を助けるために当業者が使用可能ないずれの炭素源も表し、単糖類(グルコース、ガラクトース、キシロース、フルクトースまたはラクトースなど)、オリゴ糖類、二糖類(スクロース、セロピオースまたはマルトースなど)、糖蜜、デンプンまたはその誘導体、ヘミセルロースおよびそれらの組合せが含まれる。特に好ましい単純炭素源はグルコースである。別の好ましい単純炭素源はスクロースである。炭素源は再生可能な供給原料に由来するものであってよい。再生可能な供給原料は、短期のうちに、目的生成物へのその変換を可能とするに十分な量で再生され得る、特定の工業プロセスに必要とされる原料と定義される。処理したまたは未処理の植物バイオマスは、興味深い再生可能な炭素源である。

【0033】

本発明による用語「硫黄源」とは、硫酸塩、チオ硫酸塩、硫化水素、ジチオン酸塩、亜ジチオン酸塩、亜硫酸塩、メチルメルカプタン、硫化ジメチルおよび他の末端メチル化硫化物または種々の供給源の組合せを意味する。より好適には、培養培地中の硫黄源は硫酸塩またはチオ硫酸塩またはそれらの混合物である。

【0034】

用語「窒素源」とは、アンモニウム塩またはアンモニアガスのいずれかに相当する。窒素源は、アンモニウムまたはアンモニアの形で供給される。

【0035】

用語「減弱」または「減弱された発現」とは、本明細書において、遺伝子または酵素の発現が、改変されていない微生物と比べて低減または抑制されていることを意味する。酵素の発現の低減または抑制は、該酵素をコードする遺伝子の発現の減弱により得られる。

【0036】

遺伝子の減弱は、当業者に知られている手段および方法によって達成することができる。一般に、遺伝子発現の減弱は、

- ・コード領域もしくはプロモーター領域を突然変異させること、または
- ・該遺伝子発現に必要なプロモーター領域の総てもしくは一部を欠失させること、また

10

20

30

40

50

は

- ・ 相同組換えにより該遺伝子のコード領域を欠失させること、または
- ・ 外部エレメントをコード領域もしくはプロモーター領域へ挿入すること、または
- ・ 弱いプロモーターの制御下で該遺伝子を発現させること

によって達成することができる。

【0037】

当業者は、種々の強度を示す様々なプロモーターを知っており、弱い遺伝子発現のためにどのプロモーターを使用すべきかを知っている

【0038】

酵素の「活性」という用語は、「機能」という用語と互換的に用いられ、本発明に関連しては、酵素により触媒される反応を表す。当業者は、該酵素の酵素活性を測定する方法を知っている。特に、タンパク質 Met E の活性の測定については、実施例 5 を参照。

【0039】

酵素の「活性の減弱」または「活性の低減」という用語は、アミノ酸配列における突然変異により得られる該タンパク質の比触媒活性の低減および/またはヌクレオチド配列の突然変異もしくは遺伝子のコード領域の欠失により得られる、細胞中の該タンパク質の濃度の低下のいずれかを意味する。

【0040】

酵素の「活性の増大」または「活性の増加」という用語は、例えば、該酵素をコードする遺伝子を過剰発現させることにより得られる、該酵素の比触媒活性の増加、および/または細胞中の該酵素の量/アベイラビリティの増加のいずれかを表す。

【0041】

「発現の増加」、「発現の増大」または「過剰発現」という用語、およびその文法的同義語は、本書において互換的に用いられ、同様の意味を有する。これらの用語は、改変されていない微生物と比べて遺伝子または酵素の発現が増大されることを意味する。酵素の発現の増加は、該酵素をコードする遺伝子の発現を増加させることにより得られる。

【0042】

遺伝子の発現を増加させるために、当業者は種々の技術を知っている：

- ・ 微生物における該遺伝子のコピー数の増加。該遺伝子は染色体上または染色体外にコードされる。該遺伝子が染色体上に位置する場合、当技術分野の専門家に知られている組換え法（遺伝子置換を含む）によって該遺伝子の複数のコピーを染色体上に導入することができる。該遺伝子が染色体外に位置する場合、該遺伝子は、複製起点と、それによる細胞内でのコピー数が異なる種々のタイプのプラスミドによって担持され得る。これらのプラスミドは微生物中に 1 ~ 5 コピー、または約 20 コピー、または最大 500 コピーで存在し、プラスミドの性質によって異なる：厳格な複製を行う低コピー数プラスミド（pSC101、RK2）、低コピー数プラスミド（pACYC、pRSF1010）または高コピー数プラスミド（pSK bluescript II）。

- ・ 該遺伝子の高レベル発現を誘導するプロモーターの使用。当業者はどのプロモーターが最も便宜なプロモーターであるかを知っており、例えば、プロモーター P<sub>trc</sub>、P<sub>tac</sub>、P<sub>lac</sub>、またはプロモーター cI が広く用いられている。これらのプロモーターは、特定の化合物または、温度もしくは光のような特定の外的条件による「誘導性」であり得る。これらのプロモーターは同種でも異種でもよい。

- ・ 該遺伝子の特異的または非特異的転写レプレッサーの活性または発現の減弱。

- ・ 対応するメッセンジャー RNA を安定させるエレメント (Carrier and Keasling, 1998) またはタンパク質を安定させるエレメント (例えば、GST タグ, GE Healthcare) の使用。

【0043】

用語「コードする (encoding)」または「コード (coding)」とは、ポリヌクレオチドが、転写および翻訳の機構を通じて、アミノ酸配列を生み出すプロセスを意味する。酵素（単数または複数）をコードする遺伝子（単数または複数）は外来性でも内在性でもよい。

10

20

30

40

50



## 【0044】

用語「フィードバック感受性」または「フィードバック阻害」とは、細胞内での特定の物質の生産を触媒する1つまたは複数の酵素が、その物質が一定のレベルまで蓄積したときに抑制されるまたはその活性が低下する細胞機構制御を意味する。従って、「フィードバック感受性の低減」または「フィードバック阻害の低減」とは、そのような機構の活性が、改変されていない微生物と比べて低減または抑制されることを意味する。当業者は、この結果を得るために酵素を修飾する方法を知っている。そのような修飾は、特許出願W O 2 0 0 5 / 1 1 1 2 0 2号または米国特許第7,611,873号に記載されている。

## 【0045】

本発明は、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ Met E の活性が減弱された、メチオニンの発酵生産のために最適化された組換え微生物に関する。

10

## 【0046】

当業者は、タンパク質突然変異、遺伝子突然変異または遺伝子発現減弱のような、酵素活性を減弱させるための多くの手段および方法を知っている。タンパク質突然変異は、該酵素の触媒部位に存在する特異的アミノ酸を置き換えること、または追加のアミノ酸を導入すること、またはある特定のアミノ酸を欠失させることによって達成することができる。

## 【0047】

本発明の第1の面において、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ Met E をコードする met E 遺伝子の発現は減弱されている。大腸菌 met E 遺伝子のヌクレオチド配列を配列番号20に示す。

20

## 【0048】

遺伝子の減弱は、外来DNAを遺伝子に導入して、それを不活性化することによりまたは弱いプロモーターもしくは誘導プロモーターの制御下で遺伝子を発現させることにより達成することができる。当業者は、種々の発現強度および/または種々の誘導パラメータを示す種々様々なプロモーターならびにその発現強度を低減するようにプロモーターを改変する方法を知っており、その方法は、野生型プロモーターを、例えば、そのコンセンサス配列、リボソーム結合部位または開始コドン...において改変することによる。よって、当業者は、met E の減弱発現を導くプロモーターを選択することができる。

## 【0049】

本発明の好ましい実施態様では、met E 遺伝子の少なくとも一部は欠失している。好ましくは、この欠失部分は、コード配列の少なくとも10%、より好ましくは、コード配列の少なくとも20%、30%、40%、または50%に相当する。より好ましくは、コード配列の少なくとも80%が欠失している。本発明の特定の実施形態では、met E 遺伝子は完全に欠失している。当業者は、相同組換えなどの、遺伝子の一部を欠失させるための多くの技術を知っている。

30

## 【0050】

本発明の第2の面では、met E 遺伝子は、活性の減弱を示す改変タンパク質をコードするように突然変異している。本発明の好ましい実施態様では、遺伝子 met E における突然変異は、不活性な末端切断型 Met E タンパク質の翻訳を導く。より好ましくは、上記突然変異は、フレームシフト突然変異を導く、配列番号20にヌクレオチド配列を示している大腸菌遺伝子の417番~429番塩基の13塩基対(bp)部分の欠失である。その結果として、該タンパク質の翻訳が短くなり(フレームシフトにより停止コドンが導入される)、配列番号21に示している野生型配列の753アミノ酸の代わりに、配列番号22)に示している152アミノ酸の末端切断型タンパク質が生じる。あらゆる微生物種由来の met E 遺伝子への停止コドンの導入を可能にするいかなる同等の突然変異もまた、本発明の一部である。

40

## 【0051】

メチオニン生合成経路の最適化

本発明による組換え微生物は、メチオニンの生産を向上させるために改変される。メチ

50

オニン生産に關与する遺伝子は当技術分野で周知であり、メチオニン特異的生合成経路に關与する遺伝子、ならびに前駆体供給経路に關与する遺伝子およびメチオニン消費経路に關与する遺伝子を含んでなる。

【0052】

メチオニンの効率的生産には、メチオニン特異的経路および複数の前駆体供給経路の最適化が必要である。メチオニン生産株は特に、特許出願WO2005/111202号、WO2007/077041号およびWO2009/043803号に既に記載されている。これらの出願は引用することにより本願の一部とされる。

【0053】

本発明の特定の実施形態では、前記組換え微生物は、以下に記載するように改変される：以下の遺伝子の少なくとも1つの発現が増大される：ptsG、pyc、pntAB、cysP、cysU、cysW、cysA、cysM、cysJ、cysI、cysH、gcvT、gcvH、gcvP、lpd、serA、serB、serC、cysE、metF、metH、metA、S-アデノシルメチオニンおよび/もしくはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするthrA対立遺伝子(MetA\*)、thrA、およびトレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードするthrA対立遺伝子(thrA\*)。

・特許出願EP11305829号に記載されているように、ptsGは、PTS酵素IICB<sup>G1c</sup>をコードする。

・特許出願EP11305829号に記載されているように、pycは、ピルビン酸カルボキシラーゼをコードする。好ましい実施態様は、pyc遺伝子は異種であり、インゲン根粒菌(*Rhizobium etli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、蛍光菌(*Pseudomonas fluorescens*)またはコリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)の種由来のpyc遺伝子から選択される。

・特許出願WO2012/055798号に記載されているように、pntABは、膜結合型トランスヒドロゲナーゼのサブユニットをコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysPは、ペリプラズム硫酸結合タンパク質をコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysUは、硫酸ABC輸送体の構成要素をコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysWは、膜結合型硫酸輸送タンパク質をコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysAは、硫酸パーミアーゼをコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysMは、O-アセチルセリンスルフヒドララーゼ(O-acetyl serine sulfhydrylase)をコードする。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysIおよびcysJは、それぞれ、亜硫酸レダクターゼのサブユニットおよびサブユニットをコードする。cysIおよびcysJは同時に過剰発現されることが好ましい。

・WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、cysHは、アデニル硫酸レダクターゼをコードする。

【0054】

C1代謝の増加もまた、メチオニン生産の向上をもたらす改変である。C1代謝の増加は、GcvTHP、lpd、metFまたはmetHの中から選択される、C1代謝に關与する少なくとも1つの酵素の活性の増加に關係している。本発明の好ましい実施形態では、一炭素代謝は、以下の少なくとも1つの発現および/または活性を増大させることにより増加する：

・特許出願WO2007/077041号に記載されている、グリシン開裂複合体をコ

10

20

30

40

50

ードする g c v T、g c v H、g c v P、および l p d。グリシン開裂複合体 (G C V) は、グリシンの酸化を触媒し、二酸化炭素、アンモニア、メチレン - T H F および還元型ピリジヌクレオチドを生成する多酵素複合体である。G C V 複合体は、4つのタンパク質成分、P - タンパク質と呼ばれるグリシンデヒドロゲナーゼ (G c v P)、H - タンパク質と呼ばれるリポイル - G c v H - タンパク質 (G c v H)、T - タンパク質と呼ばれるアミノメチルトランスフェラーゼ (G c v T)、および L - タンパク質と呼ばれるジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ (G c v L または L p d) で構成されている。P - タンパク質は、グリシンからの C O<sub>2</sub> のピリドキサルリン酸依存性遊離を触媒し、メチルアミン部分を脱離させる。メチルアミン部分は、H - タンパク質のリポ酸基に移動し、これは P - タンパク質と結合した後、グリシンを脱炭酸する。T - タンパク質は、メチルアミン基からの N H<sub>3</sub> の放出を触媒し、残る C 1 単位を T H F へ移動させ、メチレン - T H F を形成する。次に、L タンパク質は、H - タンパク質のリポ酸成分を酸化し、電子を N A D<sup>+</sup> へ移動させ、N A D H を形成する；

・特許出願 W O 2 0 0 7 / 0 7 7 0 4 1 号に記載されている、メチレントラヒドロ葉酸レダクターゼをコードする M e t F；

・メチルトランスフェラーゼをコードする M e t H ( B 1 2 - 依存性ホモシステイン - N 5 - メチレントラヒドロ葉酸トランスメチラーゼ)。

#### 【 0 0 5 5 】

また、セリン生合成に関与する以下の遺伝子の少なくとも1つの過剰発現は、副産物であるイソロイシンの生産を減少させる；

・ W O 2 0 0 7 / 0 7 7 0 4 1 号および W O 2 0 0 9 / 0 4 3 8 0 3 号に記載されている、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼをコードする s e r A、

・ W O 2 0 0 7 / 0 7 7 0 4 1 号および W O 2 0 0 9 / 0 4 3 8 0 3 号に記載されている、ホスホセリンホスファターゼをコードする s e r B、

・ W O 2 0 0 7 / 0 7 7 0 4 1 号および W O 2 0 0 9 / 0 4 3 8 0 3 号に記載されている、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードする s e r C。

#### 【 0 0 5 6 】

以下の遺伝子の過剰発現は、メチオニンの生産を向上させることが既に示されている；

・ W O 2 0 0 7 / 0 7 7 0 4 1 号に記載されているように、c y s E は、セリンアシルトランスフェラーゼをコードし、その過剰発現はメチオニン生産の増加を可能にする。

・ m e t A は、ホモセリンスクシニルトランスフェラーゼをコードする。対立遺伝子 M e t A \* は、S - アデノシルメチオニンおよび / またはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードする。特許出願 W O 2 0 0 5 / 1 1 1 2 0 2 号に記載されている対立遺伝子 M e t A \* を使用することが好適である。

・ W O 2 0 0 5 / 1 1 1 2 0 2 号に記載されているように、t h r A は、アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードし、t h r A \* 対立遺伝子は、トレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードする。

#### 【 0 0 5 7 】

本発明の特定の実施態様では、遺伝子は誘導プロモーターの制御下にあり得る。本発明の好ましい実施態様では、これらの遺伝子の少なくとも1つは温度誘導プロモーターの制御下にある。好ましくは、遺伝子：t h r A、c y s E、m e t A の少なくとも1つの発現は、誘導プロモーターの直接的または間接的制御下にある。より好ましくは、遺伝子 t h r A、c y s E および m e t A は、誘導プロモーターの直接的または間接的制御下にある。本発明の好ましい実施態様では、t h r A 遺伝子の発現は誘導プロモーターの直接的制御下であり、c y s E 遺伝子の発現は t h r A 遺伝子の誘導発現の極性効果下にある。本発明の別の好ましい実施態様では、t h r A 遺伝子の発現は誘導プロモーターの直接的制御下であり、遺伝子 c y s E および m e t A の発現は t h r A 遺伝子の誘導発現の極性効果下にある。

#### 【 0 0 5 8 】

最も好ましい実施態様では、温度誘導プロモーターは P<sub>R</sub> プロモーターファミリーに属

10

20

30

40

50

する。誘導プロモーターの制御下に遺伝子を置いているメチオニン生産株は、特許出願WO2011/073122号に記載されている。

【0059】

本発明の別の特定の実施態様では、前記微生物はさらに改変されており、以下の遺伝子の少なくとも1つの発現が減弱されている：met J、pyk A、pyk F、pur U、ybd Lまたはync A。

・特許出願JP2000/157267号に示されたように、遺伝子met Jは、メチオニンレギュロンのダウンレギュレーションに關与するレプレッサータンパク質Met Jをコードする(GenBank 1790373)。

・遺伝子pyk Aおよびpyk Fは、酵素「ピルビン酸キナーゼ」をコードする。ピルビン酸キナーゼの少なくとも一方または両方の発現の減弱は、ホスホエノールピルビン酸(PEP)の消費を減少させる。WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、PEPのアベイラビリティーの増加は、アスパラギン酸の重要な前駆体であるオキサロ酢酸(これは次にメチオニンの前駆体となる)の生産を増加させることができる。

・pur Uは、ホルミル-THFデホルミラーゼ反応を触媒する酵素であるホルミルテトラヒドロ葉酸デホルミラーゼをコードする。デホルミラーゼ活性の減弱は、ホモシステインのメチル化に必要なメチル-THFの生産を増加させる。脱ホルミル化によるC1代謝産物の欠如により、メチオニンへ変換できないホモシステインの生産増加に至る。WO2007/077041号およびWO2009/043803号に記載されているように、ホモシステインは、次に、ホモランチオニンの生産をもたらすO-スクシニルホモセリンとホモシステインとの間の反応を触媒し得る酵素シスタチオニンシンターゼ(Met B)の基質となり得る。

・特許出願PCT/FR2010/052937号に記載されているように、ybd Lは、アミノトランスフェラーゼをコードする。

・特許出願WO2010/020681号に記載されているように、ync Aは、N-アシルトランスフェラーゼをコードする。

【0060】

本発明のより好ましい実施形態では、コバラミン非依存性メチオニンシンターゼMet Eの活性が減弱されている組換え微生物による、主要な炭素源としてのグルコースからのメチオニンの発酵生産は、該微生物における上述の改変の組合せによって達成され得る、例えば：

・遺伝子met Jの発現が減弱され、かつ、S-アデノシルメチオニンおよび/またはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするmet A対立遺伝子(Met A\*)の発現が増大される；

・遺伝子met Jの発現が減弱され、S-アデノシルメチオニンおよび/またはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするmet A対立遺伝子(Met A\*)の発現が増大され、かつ、トレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードするthr A対立遺伝子(thr A\*)の発現が増大される；

・遺伝子met Jの発現が減弱され、S-アデノシルメチオニンおよび/またはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするmet A対立遺伝子(Met A\*)の発現が増大され、トレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードするthr A対立遺伝子(thr A\*)の発現が増大され、かつ、遺伝子cys Eの発現が増大される；

・遺伝子met Jの発現が減弱され、S-アデノシルメチオニンおよび/またはメチオニンに対するフィードバック感受性が低減された酵素をコードするmet A対立遺伝子(Met A\*)の発現が増大され、トレオニンに対するフィードバック阻害が低減された酵素をコードするthr A対立遺伝子(thr A\*)の発現が増大され、遺伝子cys Eの発現が増大され、かつ、遺伝子met Fおよび/またはmet Hの発現が増大される。

【0061】

10

20

30

40

50

本発明の特定の面では、前記組換え微生物は以下の遺伝子修飾を含んでなる：

・遺伝子 metE が欠失され、

・遺伝子 metA<sup>\*</sup>、metH、cysPUWAM、cysJIH、gcvTHP、metF、serA、serB、serC、cysE、thrA<sup>\*</sup> および pyc の発現が増大され、かつ

・遺伝子 metJ、pykA、pykF、purU および yncA が減弱される。

【0062】

本発明の特定の実施態様では、前記微生物は腸内細菌科(Enterobacteriaceae)またはコリネバクテリウム科(Corynebacteriaceae)細菌由来のものである。

【0063】

好適には、前記微生物は大腸菌(*Escherichia coli*)またはコリネバクテリウム・グルタミクム(*Corynebacterium glutamicum*)である。

【0064】

#### 培養条件

本発明はまた、メチオニンの生産方法に関し、その方法は、以下の工程：

・組換え微生物を、発酵性炭素源と硫黄源とを含んでなる適当な培養培地中で培養し、かつ

・該培養培地からメチオニンまたはその誘導体を回収することを含む。

【0065】

当業者は、本発明による微生物に対する培養条件を定義することができる。特に、細菌は20 ~ 55 の間、好適には、25 ~ 40 の間、より具体的には、*C. glutamicum* (C. glutamicum)では約30、大腸菌(*E. coli*)では約37 の温度で発酵される。

【0066】

大腸菌(*E. coli*)については、培養培地は、M9培地(Anderson, 1946)、M63培地(Mi-ller, 1992);またはSchaefer et al., (1999)により定義されているものなどの培地と同一または類似の組成のものであり得る。

【0067】

*C. glutamicum* (C. glutamicum)については、培養培地は、BMCG培地(Liebl et al., 1989)またはRiedel et al., (2001)により記載されているものなどの培地と同一または類似の組成のものであり得る。

【0068】

本発明のある実施態様では、培養物は、1つまたは複数の無機基質の制限または欠乏を受ける。それは、微生物の増殖が、供給された無機化学物質の量により支配され、それでもなお弱い増殖が認められる条件を意味する。微生物増殖におけるそのような制限は、特許出願WO2009/043372号に記載されている。本発明の好ましい実施態様では、培養物はリン酸塩の制限を受ける。

【0069】

「培養培地からメチオニンまたはその誘導体を回収する」という行為は、L-メチオニンおよび/またはその誘導体の1つ、特に、N-アセチルメチオニン(NAM)およびS-アデノシルメチオニン(SAM)ならびに有用であり得る他の総ての誘導体を回収する行為を表す。生産された化合物の回収および精製のための方法は、当業者によく知られている(特に、WO2005/007862号、WO2005/059155号参照)。

【0070】

発酵培地中の産物の量は、当技術分野で公知の複数の方法、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)またはガスクロマトグラフィー(GC)を用いて決定することができる。例えば、培地中に得られたメチオニンの量は、OPA/Fmoc誘導体化後にHPLCにより、標準としてL-メチオニン(Fluka、参照番号64319)を用いて測定される。NAMの量は、屈折率検出器によるHPLC(refractometric HPLC)を用い、標準としてNAM(Sigma、参照番号01310)を用いて決定される。

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0071】

以下の実施例において本発明をさらに定義する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、単に例示として示されると理解されるべきである。上の開示およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な手段を変更することなく、本発明の様々な変更を行って、それを様々な使用および条件に適合させることができる。

## 【0072】

特に、例では改変大腸菌(*Escherichia coli*(*E. coli*))株を示しているが、これらの改変は同じ科の他の微生物でも容易に行うことができる。

## 【0073】

大腸菌(*Escherichia coli*)は、腸内細菌(*Enterobacteriaceae*)科に属し、この科には、芽胞形成しない、典型的には長さ1~5 μmのグラム陰性桿菌のメンバーが含まれる。ほとんどのメンバーは鞭毛を有し、鞭毛を用いて動き回るが、いくつかの属は非運動性である。この科の多くのメンバーが、ヒトおよび他の動物の腸内で見られる腸管菌叢の正常な部分であるが、水または土壌中で見られるものや、様々な異なる動植物に寄生するものもある。大腸菌は最も重要なモデル生物の一つであるが、腸内細菌科の他の重要なメンバーとして、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、特に、クレブシエラ・テリゲナ(*Klebsiella terrigena*)、クレブシエラ・プランティコラ(*Klebsiella planticola*)またはクレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、およびサルモネラ菌属(*Salmonella*)も挙げられる。

## 【0074】

さらに、複数の特許出願により、メチオニン生産のための最適化は、過度の実験を行うことなく、大腸菌(*E. coli*)およびコリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)で容易に適用できると指摘されている。

## 【0075】

実施例1：プロトコール

下記の実施例に記載するメチオニン生産株を構築するために、複数のプロトコールを用いた。

## 【0076】

プロトコール1：相同組換えによる染色体修飾および組換え体の選択 (Datsenko, & Wanner, (2000))。

## 【0077】

特定の染色体遺伝子座における対立遺伝子置換または遺伝子挿入は、Datsenko & Wanner (2000)により記載されているように、相同組換えによって行った。F1p認識部位が隣接した、カナマイシン(Km)耐性kanを、PCRにより、鋳型としてpKD4プラスミドを用いることで増幅した。得られたPCR産物を用いて、Red(、)、exo)リコンビナーゼを発現するプラスミドpKD46を保持するレシピエント大腸菌(*E. coli*)株を形質転換した。次に、抗生物質耐性形質転換体を選択し、修飾遺伝子座の染色体構造を、表3に記載の適当なプライマーを用いたPCR解析により確認した。

## 【0078】

kan耐性遺伝子は、Datsenko & Wanner (2000)により記載されているように、F1pリコンビナーゼをコードする遺伝子を有するプラスミドpCP20を用いることで除去することができる。pCP20を目的の株に導入し、形質転換体を、アンピシリンを添加したLB上で30で培養した。flp遺伝子を発現させる目的およびカナマイシンカセットを除去する目的で、形質転換体を37で培養した後、単離後、抗生物質感受性クローンを、表3に記載のオリゴヌクレオチドを用いたPCRにより確認した。

## 【0079】

プロトコール2：ファージP1の形質導入

P1形質導入により、所与の大腸菌レシピエント株に染色体修飾を移入した。このプロトコールは、(i)耐性関連の染色体修飾を含むドナー株におけるファージ溶解液の調製と、(ii)このファージ溶解液によるレシピエント株の感染との2段階を含む。

10

20

30

40

50

## 【0080】

ファージ溶解液の調製

- ・ 10 ml の Km 50  $\mu$ g / ml + グルコース 0.2% + CaCl<sub>2</sub> 5 mM 中に、目的の染色体修飾を有する MG1655 株の一晩培養物 100  $\mu$ l を植菌する。
- ・ 振盪しながら 37 °C で 30 分間インキュベートする。
- ・ ドナー株 MG1655 で調製した P1 ファージ溶解液 100  $\mu$ l を添加する (約  $1 \times 10^9$  ファージ / ml)。
- ・ 細胞が完全に溶解するまで 37 °C で 3 時間振盪する。
- ・ 200  $\mu$ l の クロロホルム を加え、ボルテックスにかける。
- ・ 4500 g で 10 分間遠心分離して細胞残屑を除去する。
- ・ 上清を滅菌試験管に移す。
- ・ 溶解液を 4 °C で保存する。

10

## 【0081】

形質導入

- ・ LB 培地中で培養した大腸菌 レシピエント株の一晩培養物 5 ml を 1500 g で 10 分間遠心分離する。
- ・ 2.5 ml の MgSO<sub>4</sub> 10 mM、CaCl<sub>2</sub> 5 mM に細胞ペレットを懸濁する。
- ・ 100  $\mu$ l の細胞に、染色体に修飾を有する MG1655 株の P1 ファージ 100  $\mu$ l (供試試験管) を感染させ、対照試験管として、P1 ファージを含まない細胞 100  $\mu$ l と、細胞を含まない P1 ファージ 100  $\mu$ l とを感染させる。
- ・ 振盪せずに 30 °C で 30 分間インキュベートする。
- ・ 各試験管に 100  $\mu$ l の 1 M クエン酸ナトリウムを加え、ボルテックスにかける。
- ・ 1 ml の LB を加える。
- ・ 振盪しながら 37 °C で 1 時間インキュベートする。
- ・ 7000 rpm で 3 分間遠心分離する。
- ・ LB + Km 50  $\mu$ g / ml に播種する。
- ・ 37 °C で一晩インキュベートする。

20

## 【0082】

【表1】

表1: 以下の実施例に引用または記載される株 (番号および遺伝子型)

株番号	遺伝子型	
1	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i>	10
2	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i> ::Km	20
3	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i>	20
4	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i> ::Km (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> - <i>TT07</i> )	20
5	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i> ::Km (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> - <i>TT07</i> ) (pCC1BAC- <i>TT02</i> - <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serC</i> - <i>TT07</i> *2- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serA</i> - <i>TTadcca</i> )	30
6	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>metE</i> ::Km <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i>	30
7	MG1655 <i>metA</i> *11 <i>metE</i> ::Km <i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysPUWAM</i> <i>Ptrc01</i> - <i>cysJIH</i> <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> <i>Ptrc01</i> / <i>ARN01</i> / <i>RBS01</i> - <i>metF</i> <i>Ptrc94</i> - <i>serB</i> $\Delta$ <i>metJ</i> $\Delta$ <i>pykF</i> $\Delta$ <i>pykA</i> $\Delta$ <i>purU</i> $\Delta$ <i>yncA</i> $\Delta$ <i>malS</i> ::RN/PRM- <i>CI857</i> - <i>TTadcca</i> -PR01/ <i>RBS01</i> *4- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> $\Delta$ <i>pgaABCD</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>uxaCA</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>CP4-6</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>wcaM</i> ::RN/PR01/ <i>RBS01</i> - <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i> - <i>PgapA</i> - <i>metA</i> *11 $\Delta$ <i>treBC</i> ::RN/ <i>serA</i> - <i>serC</i> $\Delta$ <i>yjbl</i> ::RN/ <i>Ptrc01</i> / <i>RBS01</i> - <i>gcvTHP</i> - <i>TT07</i> (pCL1920- <i>PgapA</i> - <i>pycre</i> - <i>TT07</i> ) (pCC1BAC- <i>TT02</i> - <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serC</i> - <i>TT07</i> *2- <i>Ptrc30</i> / <i>RBS01</i> - <i>serA</i> - <i>TTadcca</i> )	40



【表 2】

表 2: 特許出願 EP10306164 号に記載されている株 1 の遺伝子型名の新旧対応

旧命名法	新命名法
MG1655 <i>metA</i> *11	MG1655 <i>metA</i> *11
<i>Ptrc-metH</i>	<i>Ptrc01</i> *2/ <i>RBS08</i> *1- <i>metH</i>
<i>PtrcF-cysPUWAM</i>	<i>Ptrc01-cysPUWAM</i>
<i>PtrcF-cysJIH</i>	<i>Ptrc01-cysJIH</i>
<i>Ptrc09-gcvTHP</i>	<i>Ptrc01/RBS01-gcvTHP</i>
<i>Ptrc36-ARNmst17-metF</i>	<i>Ptrc01/ARN01/RBS01-metF</i>
<i>Ptrc07-serB</i>	<i>Ptrc94-serB</i>
$\Delta metJ \Delta pykF \Delta pykA \Delta purU \Delta yncA$	$\Delta metJ \Delta pykF \Delta pykA \Delta purU \Delta yncA$
$\Delta malS::TTadc-CI857-PlambdaR*(-35)-thrA*1-cysE$	$\Delta malS::RN/PRM-CI857-TTadcca-PR01/RBS01*4-thrA*1-cysE$
$\Delta pgaABCD::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$	$\Delta pgaABCD::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$
$\Delta luxA::TT07-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$	$\Delta luxA::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$
$\Delta CP4-6::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$	$\Delta CP4-6::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$
$\Delta wcaM::TT02-TTadc-PlambdaR*(-35)-RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$	$\Delta wcaM::RN/PR01/RBS01-thrA*1-cysE-PgapA-metA*11$
$\Delta treBC::TT02-serA-serC$	$\Delta treBC::RN/serA-serC$

10

20

【 0 0 8 4 】

30

【表 3】

表 3: 以下の実施例に使用されるオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列番号	配列 5' → 3'
Yjblup-F	1	cgtaggcgccggtaccgagtgcatcgctggaaggcg
Yjblup-R	2	gcttgataacaagataaaacgaaaggcccagctcttcgactgagccttcgtttat ttgatgcatttctgtagaatttacacttatagatcattactgattgagactca
Yjblown-F	3	agactggccttcgtttatctgttgataacaagctttacctagggccctaattaata atgaataagggtgttaagtaaaggaaaacatcaccgttcctggcat
Yjblown-R	4	cgtaggcgccggtaccagcataatcattcaccacacatccg
Km-F	5	tccccggggtataccatagaatcctccttag

40

Km-R	6	gccaagctttgtaggctggagctgctcg	
Ptrc01/RBS01-GcvTHP-F	7	cgtaggcctgggcccagctgtgacaattaatcatccg	
GcvTHP-TT07-R	8	cgaaggcctttaattaagcagaaaggcccacccgaaggtgagccaggcggccg cttactggatfcgctaatacggtagc	
yjbl-gcvTHP-F	9	cagaccaccaactggcgacc	10
yjbl-gcvTHP-R	10	gccattggaatcgaccagcc	
Ptrc30/RBS01-F	11	tcggcgccttaattaacatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggctt ttcgtttatctgtttacgtagagctgttgacgattaatcatccggctcgtatactgtgtg gaataaggaggatatt	
Ptrc30/RBS01-serC-R	12	ccagaactaaatgaagatttgagccataatatacctccttattccacacagtat acgagc	20
serC-TT07*2-R	13	cccaagcttgcattgcgctagcagctcgagaaaggcccacccgaaggtgagcca ggttaaccgtgacggcgctcg	
Ptrc30/RBS01-serA-F	14	tacgtagctagcagctgttgacgattaatcatccggctcgtatactgtgtggaataa ggaggatattatggcaaagggtatcgctggagaaaag	
serA-TTadcca-R	15	cccaagcttgcattgcctaggtaaaaaaataagagttaccatttaaggtaactctta ttttattagtagcagcagacgggcgcg	30
metE-Km-F	16	agaaaccgcgcggcactggcgaacatggtgcaggcggcgagaaacttgcgtc gggggtaaaatccaaccgggtgtaataaccaccggctctttctcatgtaggctg gagctgcttcg	
metE-Km-R	17	gcagaagatggctggcagcgtatgctggaatggttaagcagtatggtgggaaga agtcgctgtaagcagaaaggcccacccgaaggtgagccagtgtgacatatgaata tctccttag	
metE-F	18	cgtttgggactggatgtgctgg	40
metE-R	19	gcgtggtacggcaaactgac	

## 【 0 0 8 5 】

実施例 2 : 株 5、MG1655 metA\*11 Ptrc01\*2/RBS08\*1-  
meth Ptrc01-cys PUWAM Ptrc01-cys JIH Ptrc01  
1/RBS01-gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS01-metF P  
trc94-serB metJ pykF pykA purU yncA  
ma1S : : RN/PRM - CI857-TTadcca - PR01/RBS01\*  
4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD : : RN/PR01/RBS01 - th

rA<sup>\*</sup>1 - cysE - PgapA - metA<sup>\*</sup>11 uxaCA :: RN / PR01 / RBS01 - thrA<sup>\*</sup>1 - cysE - PgapA - metA<sup>\*</sup>11 CP4 - 6 :: RN / PR01 / RBS01 - thrA<sup>\*</sup>1 - cysE - PgapA - metA<sup>\*</sup>11 wcaM :: RN / PR01 / RBS01 - thrA<sup>\*</sup>1 - cysE - PgapA - metA<sup>\*</sup>11 treBC :: RN / serA - serC yjbI :: RN / P :: Km ( pCL1920 - PgapA - pycre - TT07 ) ( pCC1BAC - TT02 - P\*2 - P ) の構築【0086】

## 1. 株 1

メチオニン生産株 1 (表 1 の遺伝子型) は、特許出願 EP 10306164 号に記載されており、これは引用することにより本願の一部とされる。

## 【0087】

## 2. 株 2 の構築

細胞内へのメチレン - テトラヒドロ葉酸プールを増加させるために、gcvtHP オペロンによってコードされるグリシン開裂複合体を、このオペロンの 1 コピーを yjbI 遺伝子座において染色体上に付加することにより過剰生産させた。gcvtHP のこの付加的コピーを、人工誘導性 trc プロモーターおよび最適リボソーム結合部位を用いて発現させ、yjbI :: RN / P :: Km 染色体組込みを得た。

## 【0088】

yjbI 遺伝子を欠失させ、それを P 領域により置き換えるために、Datsenko & Wanner (2000) により記載されている相同組換え戦略を用いた。この戦略は、考慮する遺伝子の大部分を欠失させるとともに、クロラムフェニコールまたはカナマイシン耐性カセットだけでなく追加の DNA を挿入することを可能とする。この目的で、以下のプラスミドを構築した、pUC18 - yjbI :: TT02 - P :: Km。

## 【0089】

この pUC18 - yjbI :: TT02 - P :: Km プラスミドは、pUC18 ベクター (Norrander et al., 1983) から誘導され、P 領域と結合したカナマイシン耐性カセットを保持し、それらはどちらも yjbI の上流領域と下流領域の間にクローニングされている。

## 【0090】

pUC18 - yjbI :: TT02 - P :: Km の構築のために、まず、pUC18 - yjbI :: TT02 - SMC プラスミドを構築した。このプラスミドは、yjbI の上流領域と下流領域を有し、これらの領域の間には、転写ターミネーター (大腸菌の rrnB 遺伝子の T<sub>1</sub>、TT02 と呼称される) および多重クローニング部位 (BstZ17I、HindIII、AvrII、Apal および PacI 制限部位からなり、SMC と呼称される) が存在する。この最後の領域を、以下のオリゴヌクレオチドを用いて、ゲノム DNA から PCR 増幅した。

## 【0091】

YjbIup - F (配列番号 1)

## 【化 1】

CGTAGGCGCCGGTACCgagtgcatcggtggaaggcg

この配列は以下の領域を有する。

・ yjbI 領域の配列 (4247987 ~ 4248009) (ウェブサイト <http://www.ecogene.org/> 上に参照配列) と相同な領域 (小文字)、

10

20

30

40

50

- ・ S f o I および K p n I 制限部位および余分な塩基に関する領域 (大文字)  
【 0 0 9 2 】
- Y j b I u p - R ( 配列番号 2 )  
【 化 2 】

**GCTTGTATACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTT  
CGTTTTATTTGATGcatttctgtagaattttacacttatagtatcattactgattgagacttca**

この配列は以下の領域を有する。

- ・ y j b I 領域の配列 ( 4 2 4 8 9 3 1 ~ 4 2 4 8 9 8 0 ) ( ウェブサイト <http://www.e-cogene.org/> 上に参照配列 ) と相同な領域 ( 小文字 )、
- ・ 大腸菌の r r n B 遺伝子の転写ターミネーター T<sub>1</sub> (Orosz et al., 1991) に関する領域 ( 太字の大文字 )、
- ・ 多重クローニング部位の B s t Z 1 7 I 制限部位および H i n d I I I 制限部位の一部に関する領域 ( 大文字 )

- 【 0 0 9 3 】
- Y j b I d o w n - F ( 配列番号 3 )  
【 化 3 】

**AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTATACAAGCTTTACCTAGGGCCCTT  
AATTAAataatgaataagggtgtttaagtaaaggaaaacatcaccgttctggcat**

この配列は以下の領域を有する。

- ・ y j b I 領域の配列 ( 4 2 5 0 2 8 6 ~ 4 2 5 0 3 3 5 ) ( ウェブサイト <http://www.e-cogene.org/> 上に参照配列 ) と相同な領域 ( 小文字 )、
- ・ 大腸菌の r r n B 遺伝子の転写ターミネーター T<sub>1</sub> (Orosz et al., 1991) の一部に関する領域 ( 太字の大文字 )、
- ・ 多重クローニング部位全体に関する領域 ( 大文字 )

- 【 0 0 9 4 】
- Y j b I d o w n - R ( 配列番号 4 )  
【 化 4 】

**CGTAGGCGCCGGTACCcagcataatcattcaccacacatccg**

この配列は以下の領域を有する。

- ・ y j b I 領域の配列 ( 4 2 5 1 2 2 4 ~ 4 2 5 1 2 4 9 ) ( ウェブサイト <http://www.e-cogene.org/> 上に参照配列 ) と相同な領域 ( 小文字 )、
- ・ S f o I および K p n I 制限部位および余分な塩基に関する領域 ( 大文字 )

【 0 0 9 5 】

第一に、「upY j b I」および「downY j b I」断片を、それぞれ、オリゴヌクレオチド Y j b I u p - F / Y j b I u p - R および Y j b I d o w n - F / Y j b I d o w n - R を用いて、M G 1 6 5 5 ゲノム DNA から PCR 増幅した。第二に、「upY j b I - d o w n Y j b I」断片を、Y j b I u p - F / Y j b I d o w n - R オリゴヌクレオチドを用いて、「upY j b I」および「downY j b I」PCR断片 (大腸菌の r r n B 遺伝子の転写ターミネーター T<sub>1</sub> の一部および多重クローニング部位の一部を含むオーバーラッピング領域を有する) から増幅した。「upY j b I - d o w n Y j b I」PCR断片を制限酵素 S f o I で切断し、p U C 1 8 ベクターの平滑末端化した E c o R I / H i n d I I I 部位にクローニングし、p U C 1 8 - y j b I : : T T 0 2 - S M C プラスミドを得た。

【 0 0 9 6 】

次に、カナマイシン耐性カセットを、以下のオリゴヌクレオチドを用いて、pKD4ベクターからPCR増幅した。

Km - F (配列番号5)

【化5】

TCCCCGGGGTATACcatatgaatcctccttag

この配列は以下の領域を有する。

・カナマイシン耐性カセットの増幅に関する領域(小文字)(Datsenko & Wanner, 2000に参照配列、

10

・SmaIおよびBstZ17I制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)

【0097】

Km - R (配列番号6)

【化6】

GCCCAAGCTTttaggctggagctgcttcg

この配列は以下の領域を有する。

・カナマイシン耐性カセットの増幅に関する領域(小文字)(Datsenko & Wanner, 2000に参照配列

20

・HindIII制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)

【0098】

PCR断片を制限酵素BstZ17IおよびHindIIIで切断し、pUC18 - yjbI :: TT02 - SMCプラスミドのBstZ17I/HindIII部位にクローニングし、pUC18 - yjbI :: TT02 - SMC :: Kmプラスミドを得た。

【0099】

最後に、PgcvTHP - TT07断片を、オリゴヌクレオチドPyjbI :: TT07 - SMC :: KmプラスミドのApaI/PacI部位にクローニングし、pUC18 - yjbI :: TT02 - PgcvTHP - TT07 :: Kmプラスミドを得た。

30

組換えプラスミドをDNA配列決定法により確認した。

【0100】

P

【化7】

CGTAGGCCTGGGCCGgagctgtgacaattaatcatccg

この配列は以下の領域を有する。

40

・株1においてgcvTHPオペロンの上流に位置する人工誘導性

・StuIおよびApaI制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)。

【0101】

GcvTHP - TT07 - R (配列番号8)

【化8】

CGAAGGCCTTTAATTAAGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGGCGGC

CGCttactgtattcgtaatcggtacg

50

この配列は以下の領域を有する。

- ・ g c v P 遺伝子の配列 ( 3 0 4 4 1 9 0 ~ 3 0 4 4 2 1 4 ) ( ウェブサイト <http://www.ecogene.org/> 上に参照配列 ) と相同な領域 ( 小文字 ) 、
- ・ T T 0 7 と呼称される、T 7 t e 転写ターミネーター配列 (Harrington et al., 2001) に関する領域 ( 太字の大文字 ) 、
- ・ P a c I、S t u I 制限部位および余分な塩基に関する領域。

【 0 1 0 2 】

最後に、p U C 1 8 - y j b I : : T T 0 2 - P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m プラスミドを K p n I 制限酵素で切断することにより y j b I : : T T 0 2 - P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m 断片を得、その断片を、プロトコール1に従って、エレクトロポレーションにより M G 1 6 5 5 m e t A \* 1 1 p K D 4 6 株に導入した。次に、カナマイシン耐性形質転換体を選択し、y j b I : : T T 0 2 - P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m 断片の挿入を、オリゴヌクレオチド y j b I - g c v T H P - F および y j b I - g c v T H P - R を用いた P C R 解析により確認した。確認済みの選択株を M G 1 6 5 5 m e t A \* 1 1 p K D 4 6 y j b I : : R N / P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m と呼称した。

10

【 0 1 0 3 】

y j b I - g c v T H P - F ( 配列番号 9 )  
【化 9】

20

**cagaccacccaactggcgacc**

この配列は、y j b I 領域の配列 ( 4 2 4 7 7 5 4 ~ 4 2 4 7 7 7 4 ) ( ウェブサイト <http://www.ecogene.org/> 上に参照配列 ) と相同である。

【 0 1 0 4 】

y j b I - g c v T H P - R ( 配列番号 1 0 )  
【化 1 0】

**gccattggaatcgaccagcc**

30

この配列は、y j b I 領域の配列 ( 4 2 5 1 4 8 9 ~ 4 2 5 1 5 0 8 ) ( ウェブサイト <http://www.ecogene.org/> 上に参照配列 ) と相同である。

【 0 1 0 5 】

次に、y j b I : : R N / P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m 染色体修飾を、プロトコール2に従って、株1に形質導入した。

【 0 1 0 6 】

カナマイシン耐性形質導入体を選択し、y j b I : : R N / P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P - T T 0 7 : : K m 染色体修飾の存在を、プライマー y j b I - g c v T H P - F および y j b I - g c v T H P - R を用いた P C R により確認した。

40

【 0 1 0 7 】

得られた株、M G 1 6 5 5 m e t A \* 1 1 P t r c 0 1 \* 2 / R B S 0 8 \* 1 - m e t H P t r c 0 1 - c y s P U W A M P t r c 0 1 - c y s J I H P t r c 0 1 / R B S 0 1 - g c v T H P P t r c 0 1 / A R N 0 1 / R B S 0 1 - m e t F P t r c 9 4 - s e r B m e t J p y k F p y k A p u r U y n c A m a l S : : R N / P R M - C I 8 5 7 - T T a d c c a - P R 0 1 / R B S 0 1 \* 4 - t h r A \* 1 - c y s E p g a A B C D : : R N / P R 0 1 / R B S 0 1 - t h r A \* 1 - c y s E - P g a p A - m e t A \* 1 1 u x a C A : : R N / P R 0 1 / R B S 0 1 - t h r A \* 1 - c y s E - P g a p A - m e t A \* 1 1 C P 4 - 6 : : R N / P R 0 1 / R B S 0 1 - t h r A \* 1 - c y s E - P g a p A - m e t A \* 1 1

50

wcaM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     treBC : : RN / serA - serC     yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 : : Kmを株2と呼称した。

【0108】

### 3. 株3の構築

株3の構築のために、株2の染色体組込み yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 : : Kmと結合した耐性カセットを、プロトコール1に従って除去した。

【0109】

カナマイシン感受性クローンを選択し、カナマイシンカセットが存在しないことを、プライマー yjbI - gcvTHP - Fおよび yjbI - gcvTHP - Rを用いたPCRにより確認した。

10

【0110】

得られた株、MG1655 metA\*11 Ptrc01\*2 / RBS08\*1 - meth Ptrc01 - cysPUWAM Ptrc01 - cysJIH Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP Ptrc01 / ARN01 / RBS01 - metF Ptrc94 - serB metJ pykF pykA purU yncA malS : : RN / PRM - CI857 - TTadcca - PR01 / RBS01\*4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     uxaCA : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     CP4 - 6 : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11  
wcaM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     treBC : : RN / serA - serC     yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07を株3と呼称した。

20

【0111】

### 4. 株4の構築

特許出願PCT / FR2010 / 052937号(これは引用することにより本願の一部とされる)に記載されているプラスミドpCL1920 - PgapA - pycre - TT07を株2に導入し、以下の株、MG1655 metA\*11 Ptrc01\*2 / RBS08\*1 - meth Ptrc01 - cysPUWAM Ptrc01 - cysJIH Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP Ptrc01 / ARN01 / RBS01 - metF Ptrc94 - serB metJ pykF pykA purU yncA malS : : RN / PRM - CI857 - TTadcca - PR01 / RBS01\*4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     uxaCA : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     CP4 - 6 : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11  
wcaM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11     treBC : : RN / serA - serC     yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 : : Km (pCL1920 - PgapA - pycre - TT07)を得、株4と呼称した。

30

40

【0112】

### 5. 株5の構築

セリン経路への流れを増加させるために、serCおよびserA遺伝子を、人工プロモーターおよび最適リボソーム結合部位により、細菌人工染色体pCC1BAC(Epicentre)を用いて過剰発現させた。この目的で、以下のプラスミドpCC1BAC - TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07\*2 - Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadccaを構築した。

【0113】

50

pCC1BAC - TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07 \* 2 - Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadccaの構築のために、領域「TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07 \* 2」および「Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadcca」をPCR増幅した。

【0114】

「TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07 \* 2」領域については、最初に、転写ターミネーター（rrnBのT<sub>1</sub>、TT02と注釈付けされる）、人工プロモーター（Ptrc30）、最適リボソーム結合部位（RBS01）およびserC遺伝子の開始点を保持するメガプライマーを、ショートPCRにより、オリゴヌクレオチドPtrc30 / RBS01 - FおよびPtrc30 / RBS01 - serC - R（下記）を用いて、鋳型を加えずに合成した。次に、「TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07 \* 2」断片を、PCRにより、鋳型としての大腸菌MG1655ゲノムDNA、合成したメガプライマーおよびserC - TT07 \* 2 - Rオリゴヌクレオチド（下記）を用いて増幅した。

10

【0115】

Ptrc30 / RBS01 - F（配列番号11）

【化11】

**tcggcgccctaattaaCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT**  
**TCGTTTTATCTGTTtacgtaGAGCTGTTGACGATTAATCATCCGGCTCGTATACTG**  
**TGTGGAATAAGGAGGTATATT**

20

この配列は以下の領域を有する。

- ・大腸菌のrrnB遺伝子の転写ターミネーターT<sub>1</sub> (Orosz et al., 1991)に関する領域（太字の大文字）、
- ・人工誘導性trcプロモーターと相同な領域（下線の大文字）、
- ・最適リボソーム結合部位と相同な領域（斜体の大文字）、
- ・NarI、PacI制限部位および余分な塩基に関する領域（小文字）。

【0116】

Ptrc30 / RBS01 - serC - R（配列番号12）

30

【化12】

**ccgaaactaaattgaagatttgagccatAATATACCTCCTTATTCACACAGTATACGAGC**

この配列は以下の領域を有する。

- ・人工誘導性trcプロモーターと相同な領域（下線の大文字）、
- ・最適リボソーム結合部位と相同な領域（斜体の大文字）、
- ・serC遺伝子の配列（956876～956904）（ウェブサイト<http://www.eco gene.org/>上に参照配列）と相同な領域（小文字）。

【0117】

serC - TT07 \* 2 - R（配列番号13）

40

【化13】

**CCCAAGCTTGCATGCGCTAGCGAGCTCGAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAG**  
**CCAGGttaaccgtgacggcgttcg**

この配列は以下の領域を有する。

- ・29位に塩基欠失を有するT7te転写ターミネーター配列（TT07 \* 2と称される）(Harrington et al., 2001)に関する領域（太字の大文字）、
- ・serC遺伝子の配列（957946～957964）（ウェブサイト<http://www.eco gene.org/>上に参照配列）と相同な領域（小文字）。

50



gene.org/上に参照配列)と相同な領域(小文字)、

・HindIII、SphI、SacIおよびNheI制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)。

【0118】

同じように、「P|c30/RBS01-serA-TTadcca
|  |
」断片を、PCRにより、鑄型としての大腸菌MG1655ゲノムDNAと、オリゴヌクレオチドP|c30/RBS01-serA-FおよびserA-TTadcca-R(下記)を用いて増幅した。

【0119】

P|c30/RBS01-serA-F(配列番号14)
|  |

【化14】

TACGTAGCTAGCGAGCTGTTGACGATTAATCATCCGGCTCGTATACTGTGTGGA  
ATAAGGAGGTATATTatggcaaaggtatcgctggagaaag

この配列は以下の領域を有する。

・人工誘導性|cプロモーターと相同な領域(下線の大文字)、
|  |

・最適リボソーム結合部位と相同な領域(斜体の大文字)、

・serA遺伝子の配列(3056408~3056432)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同な領域(小文字)、

・NheI制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)。

【0120】

serA-TTadcca-R(配列番号15)

【化15】

CCCAAGCTTGCATGCCCTAGGTAAAAAATAAGAGTTACCATTTAAGGTAA  
CTCTTATTTTTAttagtagcagacggcgcg

・TTadcc転写ターミネーター配列(pSLO1メガプラスミドの179847~179807と相同な、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)由来adcc遺伝子の転写ターミネーター)に関する領域(太字の大文字)、

・serA遺伝子の配列(3055200~3055220)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同な領域(小文字)、

・AvrII、SphI、HindIII制限部位および余分な塩基に関する領域(大文字)。

【0121】

PCR断片、「TT02-P|c30/RBS01-serC-TT07\*2」および「P|c30/RBS01-serA-TTadcca
|  |
」をそれぞれ、制限酵素NarI/NheI、およびNheI/SphIで切断し、どちらもpCC1BACプラスミドのNarI/SphI部位にクローニングし、pCC1BAC-TT02-P|c30/RBS01-serC-TT07\*2-P|c30/RBS01-serA-TTadccaプラスミドを得た。
|  |


|  |

組換えプラスミドをDNA配列決定法により確認した。

【0122】

最後に、プラスミドpCC1BAC-TT02-P|c30/RBS01-serC-TT07\*2-P|c30/RBS01-serA-TTadccaを株4に導入し、以下の株、MG1655 metA\*11 P|c01\*2/RBS08\*1-metH
|  |
 P|c01-cysPUWAM
|  |
 P|c01-cysJIH
|  |
 P|c01/RBS01-gcvTHP
|  |
 P|c01/ARN01/RBS01-metF
|  |
 P|c94-serB
|  |
 metJ pykF pykA purU yncA
|  |

|  |

10

20

30

40

50

malS : : RN / PRM - CI857 - TTadcca - PR01 / RBS01 \* 4 -  
thrA \* 1 - cysE pgaABCD : : RN / PR01 / RBS01 - thrA  
\* 1 - cysE - PgapA - metA \* 11 uxaCA : : RN / PR01 / RB  
S01 - thrA \* 1 - cysE - PgapA - metA \* 11 CP4-6 : : RN  
/ PR01 / RBS01 - thrA \* 1 - cysE - PgapA - metA \* 11 w  
caM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA \* 1 - cysE - PgapA - met  
A \* 11 treBC : : RN / serA-serC yjbI : : RN / Ptrc  
01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 : : Km ( pCL1920 - PgapA - p  
ycre - TT07 ) ( pCC1BAC - TT02 - Ptrc30 / RBS01 - ser  
C - TT07 \* 2 - Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadcca ) を得、株5  
と呼称した。

10

【0123】

6. 株5における metE 突然変異の同定

株5のメチオニンシンターゼ活性 (METE) を測定することによって、本発明者らは、末端切断型 MetE タンパク質をもたらすいくつかの突然変異により metE 遺伝子が機能しないことを確認した。

【0124】

それらの突然変異は、フレームシフト突然変異を導く、metE 遺伝子の 13bp ( 該遺伝子の 417番 ~ 429番塩基 ) の欠失である。その結果として、該タンパク質の翻訳が短くなり ( フレームシフトにより停止コドンが導入される ) 、753アミノ酸の代わりに152アミノ酸の末端切断型タンパク質が生じる。

20

【0125】

以下は WT MetE タンパク質の配列 ( 配列番号 21 ) である :

【化16】

MTILNHTLGFPRVGLRRELKKAQESYWAGNSTREELLAVGRELRARHWDQQKQA  
GIDLLPVGDFAWYDHVLTTSLLLGNVPARHQNKDGSVDIDTLFRIGRGRAPTGEPA  
AAAEMTKWFNTNYHYMVPEFVKGQQFCLTWTQLLDEVDEALALGHKVKPVLG  
PVTWLWLKVKGEQFDRLSLLNDILPVYQQVLAELAKRGIEWVQIDEPALVLELP  
QAWLDAYKPAYDALQGQVKLLLTTYFEGVTPNLDTITALPVQGLHVDLVHGKDD  
VAELHKRLPSDWLLSAGLINGRNVWRADLTEKYAQIKDIVGKRDLWVASSCSLLH  
SPIDLSVETRLDAEVKSWFAFALQKCHELALLRDALNSGDTAALAEWSAPIQARR  
HSTRVHNPAVEKRLAAITAQDSQRANVYEVRAEAQRARFKLPWPTTTIGSFPQT  
TEIRTLRLDFKKGNLDANNYRTGIAEHIKQAIVEQERLGLDVLVHGEAERNDMVE  
YFGEHLDGFVFTQNGWVQSYGSRCKPPIVIGDISRPAPITVEWAKYAQSLTDKPV  
KGMLTGPVTILCWSFPREDVSRETIKQIALALRDEVADLEAAGIGIIQIDEPALREG  
LPLRRSDWDAYLQWGVEAFRINAAVAKDDTQIHTHMCYCFNDIMDSIAALDAD  
VITIETSRSDMELLESFEEFDYPNEIGPGVYDIHSPNVPSVEWIEALLKKAARKRIPAE  
RLWVNPDCGLKTRGWPETRAALANMVQAAQNLRRG\*

30

40

【0126】

以下は末端切断型 MetE \* タンパク質の配列 ( 配列番号 22 ) である :

## 【化17】

MTILNHTLGFPRVGLRRELKKAQESYWAGNSTREELLAVGRELRARHWDQQKQA  
 GIDLLPVGDFAWYDHVLTSSLGNGVNPARRHQKDGSDIDTLFRIGRGRAPTGEPA  
 AAAEMTKWFNTNYHYMVPEFVKGQKFLLTWTKWTRRWRWATR\*

## 【0127】

実施例3：株7、MG1655 metA\*11 metE::Km Ptrc01\*2  
 /RBS08\*1 - metH Ptrc01 - cysPUWAM Ptrc01 - cys  
JIH Ptrc01/RBS01 - gcvTHP Ptrc01/ARN01/RBS  
 01 - metF Ptrc94 - serB metJ pykF pykA p  
urU yncA malS::RN/PRM - CI857 - TTadcca - PR  
 01/RBS01\*4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD::RN/PR01  
 /RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 uxaCA:  
 :RN/PR01/RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11  
CP4-6::RN/PR01/RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA  
 - metA\*11 wcaM::RN/PR01/RBS01 - thrA\*1 - cys  
E - PgapA - metA\*11 treBC::RN/serA - serC yj  
bI::RN/Ptrc01/RBS01 - gcvTHP - TT07 (pCL1920 -  
PgapA - pycre - TT07) (pCC1BAC - TT02 - Ptrc30/RB  
 S01 - serC - TT07\*2 - Ptrc30/RBS01 - serA - TTadcc  
a)の構築

## 【0128】

## 1. 株6の構築

機能性MetEタンパク質の再生によって株5のメチオニン生産を改変し得るかどうかを研究するために、本発明者らは、Datsenko & Wanner (2000)により記載されている相同組換え戦略を用いて、末端切断型metE遺伝子を野生型のものにより置き換えた。

## 【0129】

この目的で、metE領域と相同な断片が隣接したカナマイシンカセット、「metE  
 : : Km」断片を、オリゴヌクレオチドmetE - Km - FおよびmetE - Km - R (下  
 記)を用いてPCR増幅した。「metE: : Km」断片を、機能型metE遺伝子を  
 有するMG1655 metA\*11 pKD46株に導入した。

## 【0130】

metE - Km - F (配列番号16)

## 【化18】

agaaaccgcgcggcactggcgaacatggtgcaggcggcgcagaacttgcgtcgggggtaaaatccaaaccgggtgtaata  
 ccaccggctctttctcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

この配列は以下の領域を有する。

- ・metE領域の配列(4013277~4013376)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同な領域(小文字)、
- ・カナマイシン耐性カセットの増幅に関する領域(大文字)(Datsenko & Wanner, 2000に参照配列)。

## 【0131】

metE - Km - R (配列番号17)

## 【化19】

gcagaagatggctggcagcgtatgctggaatggttaagcagtaggtgggaagaagtcgctgtaa**GCAGAAAGGCC**  
**CACCCGAAGGTGAGCCAGTGTGACATATGAATATCCTCCTTAG**

この配列は以下の領域を有する。

- ・ metE領域の配列(4013377~4013442)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同な領域(小文字)、
- ・ T7te転写ターミネーター配列(Harrington et al., 2001)に関する領域(太字の大文字)、
- ・ カナマイシン耐性カセットの増幅に関する領域(大文字)(Datsenko & Wanner, 2000に参照配列)。

10

## 【0132】

カナマイシン耐性組換え体を選択し、metE遺伝子の下流にKmカセットが存在することを、オリゴヌクレオチドmetE-FおよびmetE-R(下記)を用いたPCRにより確認した。確認済みの選択株をMG1655 metA\*11 pKD46 metE::Kmと呼称した。

## 【0133】

metE-F(配列番号18)

## 【化20】

20

**cgtttgggactggatgtgctgg**

この配列は、metE領域の配列(4012495~4012516)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同である。

## 【0134】

metE-R(配列番号19)

## 【化21】

**gcgtggtacggcaaactgac**

30

この配列は、metE領域の配列(4013672~4013691)(ウェブサイト<http://www.ecogene.org/>上に参照配列)と相同である。

## 【0135】

次に、metE::Km染色体修飾を、プロトコール2に従って、株3に形質導入した。

## 【0136】

カナマイシン耐性組換え体を選択し、metE遺伝子の下流にKmカセットが存在することを、オリゴヌクレオチドmetE-FおよびmetE-R(上記)を用いたPCRにより確認した。野生型配列を有するmetE遺伝子が存在することをDNA配列決定法により確認した。

40

## 【0137】

得られた株、MG1655 metA\*11 metE::Km P\*2 / RBS08\*1 - meth P - cysPUWAM P - cysJIH P / RBS01 - gcvTHP P / ARN01 / RBS01 - metF P - serB metJ pykF pykA purU yncA malS::RN / PRM - CI857 - Tadcca - PR01 / RBS01\*4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD::RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 uxaCA::RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11

50

CP4-6 : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 wcaM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 treBC : : RN / serA-serC yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 を株6と呼称した。

【0138】

## 2. 株7の構築

プラスミド pCL1920 - PgapA - pycre - TT07 (特許出願 PCT / FR2010 / 052937号に記載されている) およびプラスミド pCC1BAC - TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07\*2 - Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadcca (上記) を株6に導入し、株MG1655 metA\*11 metE : : Km Ptrc01\*2 / RBS08\*1 - metH Ptrc01 - cysPUWAM Ptrc01 - cysJIH Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP P Ptrc01 / ARN01 / RBS01 - metF Ptrc94 - serB metJ pykF pykA purU yncA malS : : RN / PRM - CI857 - TTadcca - PR01 / RBS01\*4 - thrA\*1 - cysE pgaABCD : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 uxaCA : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 CP4-6 : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 wcaM : : RN / PR01 / RBS01 - thrA\*1 - cysE - PgapA - metA\*11 treBC : : RN / serA-serC yjbI : : RN / Ptrc01 / RBS01 - gcvTHP - TT07 (pCL1920 - PgapA - pycre - TT07) (pCC1BAC - TT02 - Ptrc30 / RBS01 - serC - TT07\*2 - Ptrc30 / RBS01 - serA - TTadcca) を得、株7と呼称した。

【0139】

株6のコバラミン非依存性メチオニンシンターゼ (MS、MetE) 活性の測定によって、MetEタンパク質が機能することを確認した。

【0140】

### 実施例4: バイオリクターにおける発酵によるL-メチオニンの生産

続いて、十分な量のメチオニンを生産した株を、フェドバッチ (fedbatch) 法を用い、0.5 L 発酵槽 (GX, GPC) において生産条件下で試験した。

【0141】

簡単に述べると、2.5 g · L<sup>-1</sup> グルコースを添加したLB培地10 mLで増殖させた24時間培養物を用いて、最少培地 (B1a) に24時間前培養物を植菌した。これらのインキュベーションは、40 mLの最少培地 (B1a) の入った500 mLバッフル付フラスコで、回転式振盪培養機 (200 RPM) に入れて行った。1回目の前培養は30の温度で達成し、2回目の前培養は34の温度で達成した。

【0142】

3回目の前培養工程はバイオリクター (Sixfors) で行い、バイオリクターには200 mLの最少培地 (B1b) を充填し、濃縮前培養物5 mLをバイオマス濃度1.2 g · L<sup>-1</sup> に植菌した。前培養温度は34で一定に保ち、pHは10% NH<sub>4</sub>OH溶液を用いて6.8の値に自動調整した。溶存酸素濃度は、空気供給および/または攪拌により大気分圧飽和の30%の値に連続的に調整した。バッチ培地のグルコース枯渇後、フェドバッチを初期流速0.7 mL · h<sup>-1</sup> で開始し、増殖速度0.13 h<sup>-1</sup> で24時間、指数関数的に増加させ、最終細胞濃度約20 g · L<sup>-1</sup> を得た。

【0143】

10

20

30

40

## 【表 4】

表 4: 前培養バッチ無機培地組成 (B1a および B1b).

化合物	B1a 濃度 (g.L <sup>-1</sup> )	B1b 濃度 (g.L <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0130	0.0130
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0015	0.0015
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0150	0.0150
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025	0.0025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0030	0.0030
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0025	0.0025
クエン酸 Fe(III) H <sub>2</sub> O	0.1064	0.1064
EDTA	0.0084	0.0084
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00	1.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.08	0.08
クエン酸	1.70	1.70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.57	4.57
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	2.50	2.50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.10	1.10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.90	4.90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.00	1.00
チアミン	0.01	0.01
ビタミン B12	0.01	0.01
グルコース	30.00	5.00
MOPS	30.00	0.00
NH <sub>4</sub> OH 28%	pH6.8 に調整	pH6.8 に調整

10

20

【 0 1 4 4 】

30

## 【表 5】

表 5: 前培養フエドバッチ無機培地組成 (F1)

化合物	濃度 (g.L <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.0104
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0012
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0120
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0020
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0024
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0020
クエン酸 Fe(III) H <sub>2</sub> O	0.0424
EDTA	0.0067
MgSO <sub>4</sub>	5.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.30
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	24.80

10

チアミン	0.01
グルコース	500.00
ビタミン B12	0.01
NH <sub>4</sub> OH 28%	pH6.8 に調整

20

【 0 1 4 5 】

## 【表 6】

表 6: 培養バッチ無機培地組成 (B2)

化合物	濃度 (g.L <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0130
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0015
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0150
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0030
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0025
クエン酸 Fe(III) H <sub>2</sub> O	0.1064
EDTA	0.0084
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.08
クエン酸	1.70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.97
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1.65
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.72
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3.74
チアミン	0.01
ビタミン B12	0.01
ビオチン	0.10
グルコース	10.00
NH <sub>4</sub> OH 28%	pH6.8 に調整

10

20

## 【 0 1 4 6 】

## 【表 7】

表 7: 培養フェドバッチ培地組成 (F2).

化合物	濃度 (g.L <sup>-1</sup> )
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0104
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0012
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.0120
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0020
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0024
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0020
Fe(III) citrate H <sub>2</sub> O	0.0524
EDTA	0.0067
MgSO <sub>4</sub>	5.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	55.50
チアミン	0.01
ビタミン B12	0.01
ビオチン	0.10
グルコース	500.00

30

40

## 【 0 1 4 7 】

続いて、GX 0.5 L 発酵槽 (GPC) に 220 mL の最少培地 (B2) を充填し、20 ~ 30 mL の間の範囲の前培養物量をバイオマス濃度 2.1 g.L<sup>-1</sup> に植菌した。

50



## 【0148】

培養温度は37℃で一定に保ち、pHはNH<sub>4</sub>OH溶液の自動添加(NH<sub>4</sub>OH 10%)により作業値(6.8)に維持した。バッチ段階中、初期攪拌速度は200RPMに設定し、フェドバッチ段階中は1000RPMまで速めた。バッチ段階中、初期気流速度は0.3L・min<sup>-1</sup>に設定し、フェドバッチ段階開始時に0.7L・min<sup>-1</sup>まで速めた。溶存酸素濃度は攪拌回数を増やすことにより20~40%の間の値、好適には、30%飽和に維持した。

## 【0149】

細胞塊が5g・L<sup>-1</sup>に近い濃度に達したら、フェドバッチを初期流速1.9mL・h<sup>-1</sup>で開始した。供給溶液は、流速が上昇し26時間後には8.8mL・h<sup>-1</sup>に達するS字状プロフィールで注入した。正確な供給条件は式：

10

## 【数1】

$$Q(t) = p1 + \frac{p2}{1 + e^{-p3(t-p4)}}$$

(式中、Q(t)はバッチ容量600mLの場合の供給流速(mL・h<sup>-1</sup>)であり、p1=0.66、p2=8.21、p3=0.27、p4=6.50である)により算出した。

20

## 【0150】

26時間のフェドバッチ後、供給溶液ポンプを止め、グルコース枯渇後に培養を終えた。

## 【0151】

細胞外アミノ酸を、OPA/Fmoc誘導体化後にHPLCにより定量し、他の関連代謝産物を、屈折率検出によるHPLC(有機酸およびグルコース)およびシリル化後のGC-MSを用いて分析した。

## 【0152】

## 【表8】

30

表8: 異なる株によるフェドバッチ培養生産での最終メチオニン収率(Y<sub>met final</sub>)(メチオニンのg/グルコースのg(%))。メチオニン/グルコース収率の定義については下記を参照。各株を1回評価した。

株	Y <sub>met final</sub>
株5	0.225
株7	0.186

40

## 【0153】

上の表8で分かるように、メチオニン生産の収率は、metE遺伝子の突然変異により有意に上昇した。突然変異metE遺伝子を含む株5は、機能性MetEタンパク質を含む株7と比べて4ポイント高い収率を有する。

## 【0154】

発酵槽容量は、リアクターの初期容量に、pH調節および培養物供給のために加える溶液の量を加算し、サンプリングに用いる容量と蒸発により損失する容量を減算することにより算出した。

## 【0155】

フェドバッチ容量は、供給ストックを秤量することにより連続的に追跡した。次に、注

50

入重量、溶液の密度および B r i x 法により決定されたグルコース濃度（ [ グルコース ] ）に基づいて、グルコース注入量を計算した。メチオニン収率は次のように表した。

【数 2】

$$Y_{met} = \frac{\text{メチオニン}_t * V_t - \text{メチオニン}_0 * V_0 * 100}{\text{消費グルコース}_t}$$

各株について培養中に得られた最終収率を本明細書に示した。

【0156】

この場合、メチオニン<sub>0</sub> およびメチオニン<sub>t</sub> はそれぞれ、初期メチオニン濃度および最終メチオニン濃度であり、V<sub>0</sub> および V<sub>t</sub> は初期容量および最終容量である。

【0157】

消費グルコースは次のように計算した：

【数 3】

$$\text{供給容量}_t = \frac{\text{供給重量}_0 - \text{供給重量}_t}{\text{密度 供給溶液}}$$

注入グルコース<sub>t</sub> = 供給容量<sub>t</sub> (fed volume<sub>t</sub>) \* [ グルコース ]

消費グルコース<sub>t</sub> = [ グルコース ]<sub>0</sub> \* V<sub>0</sub> + 注入グルコース - [ グルコース ]<sub>残留</sub> \* V<sub>t</sub>

この場合、[ グルコース ]<sub>0</sub>、[ グルコース ]、[ グルコース ]<sub>残留</sub> はそれぞれ、初期グルコース濃度、供給グルコース濃度および残留グルコース濃度である。

【0158】

実施例 5：コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ ( M e t E ) 活性の測定

コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ ( M S、M e t E ) 活性の in vitro 決定のために、野生型または突然変異型の m e t E 遺伝子をそれぞれ有する大腸菌株 7 および大腸菌株 5 を、上の実施例 3 に記載したように、最少培地中で培養し、対数期終了時に遠心分離により回収した。E D T A を含むプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有する冷 2 0 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 7 . 2 にペレットを再懸濁した。その後、P r e c e l l y s システム ( Bertin Technologies ; 6 5 0 0 r p m で 2 x 1 0 秒 ) を用いたビーズ破碎により細胞を破壊した後、1 2 0 0 0 g、4 で 3 0 分間の遠心分離を行った。上清を脱塩し、それを酵素分析に用いた。B r a d f o r d アッセイ試薬 ( Bradford, 1976 ) を用いて、タンパク質濃度を決定した。

【0159】

M S 活性の決定のために、4 0 μ g の粗細胞抽出物を、1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液 p H 7 . 2、5 m M M g S O<sub>4</sub> 中で 1 m M D L - ホモシステインおよび 0 . 2 5 m M メチル - テトラヒドロプテロイル - トリグルタメートとともに 3 7 で 1 5 分間インキュベートした。コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ酵素によって生産されたメチオニンを、t e r t - ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド ( T B D M S T F A ) による誘導体化後に G C - M S により定量した。内部標準としてアスパルテートおよびノルロイシンを含めた。

【0160】

コバラミン非依存性メチオニンシンターゼ活性の結果を下の表 9 に示している。

【0161】

10

20

30

40

## 【表 9】

表 9: 野生型または突然変異型の酵素を有する大腸菌株のコバラミン非依存性メチオニンシンターゼ活性 (タンパク質 1mg 当たりの mUI)。各株を 1 回評価した。

株	MS (タンパク質 1mg 当たりの mUI)
株 5	0
株 7	12.7

10

## 【0162】

表 9 で分かるように、株 5 ( metE ) は、その MS 活性を完全に喪失していたが、一方、株 7 はかなりの活性を維持した。この活性喪失は、メチオニン生産の有意な改善と相関があった。

## 【0163】

実施例 6 : L - メチオニンの生産における metE 遺伝子の欠失の効果

L - メチオニンの生産における metE 遺伝子の完全欠失の効果を評価するために、本発明者らは、株 5 の突然変異 metE 遺伝子を欠失させた。本発明者らは、前述の相同組換えを用い、Datsenko & Wanner (2000) によって提供されている方法を用いて、metE 遺伝子の完全欠失をその株に導入した。

20

## 【0164】

カナマイシンカセットによる突然変異 metE 遺伝子の置換後に、カナマイシン耐性組換え体を選択し、DNA 配列決定法により確認する。

## 【0165】

それらの 1 つを実施例 4 に記載するように培養し、生産された L - メチオニンを HPLC により定量する。

## 【0166】

metE の完全欠失を有する株は、機能性 MetE タンパク質を有する株 7 より多くのメチオニンを生産する：metE の欠失は、15% を超えるメチオニン収率の増加をもたらした。

30

## 【0167】

参考文献

- **Anderson**, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128.
- **Bradford**, 1976, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- **Carrier and Keasling**, 1998/1999, *Biotechnol. Prog.* **15**: 58-64.
- **Datsenko and Wanner**, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 6640-6645.
- **Foster et al.**, 1961, *Biochem. J.* **80**: 519-531.
- **Gonzalez et al.**, 1992, *Biochemistry.* **31**: 6045-6056.
- **Harrington, Laughlin and Liang**, 2001 *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 24; **98(9)**:5019-24. 10
- **Liebl et al.**, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 205-210.
- **Miller**, 1992; “*A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- **Norrande et al.**, 1983. *Gene.* **26**: 101-106.
- **Orosz et al.**, 1991, *Eur. J. Biochem.* **201** : 653-659
- **Prescott et al.**, 1999, “*Microbiology*” 4th Edition, WCB McGraw-Hill.
- **Riedel et al.**, 2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 573-583. 20
- **Sambrook et al.**, 1989 and 2001, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” 2nd & 3rd Editions, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Saunderson**, 1985 *British Journal of Nutrition* **54**: 621-633.
- **Schaefer et al.** 1999, *Anal. Biochem.* **270**: 88-96.

【配列表】

2015519917000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/001335
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N9/10 C12P13/12 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. R. HONDORP ET AL: "Oxidation of Cysteine 645 of Cobalamin-Independent Methionine Synthase Causes a Methionine Limitation in Escherichia coli", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 191, no. 10, 15 May 2009 (2009-05-15), pages 3407-3410, XP055060614, ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.01722-08 abstract page 3407, right-hand column - page 3408, left-hand column, paragraph 1; figure 1 ----- -/--	1,2,4,10,11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2013		Date of mailing of the international search report 07/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Strobel, Andreas

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/001336
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KUMAR D ET AL: "Methionine production by fermentation", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 23, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 41-61, XP004682516, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2004.08.005 the whole document</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>CHU J ET AL: "Cloning and expression of the metE gene in Escherichia coli", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 239, no. 2, 1 June 1985 (1985-06-01), pages 467-474, XP024761525, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/0003-9861(85)90713-1 [retrieved on 1985-06-01] abstract page 471, left-hand column - right-hand column, paragraph 1; table 1</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>ALDEA M ET AL: "Generation of a detailed physical and genetic map of the ilv-metE-udp region of the Escherichia coli chromosome", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 200, no. 3, 5 April 1988 (1988-04-05), pages 427-438, XP024019369, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/0022-2836(88)90533-5 [retrieved on 1988-04-05] abstract page 431, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 2</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>WO 2012/055798 A1 (METABOLIC EXPLORER SA [FR]; DISCHERT WANDA [FR]; VASSEUR PERRINE [FR];) 3 May 2012 (2012-05-03) cited in the application claims 1,6</p> <p>-----</p>	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/001336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012055798	A1	03-05-2012	NONE
-----			

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ライナー、フィゲ

フランス国ル、クレスト、リュ、デュ、ボスケ、4

Fターム(参考) 4B024 AA05 BA71 CA02 CA06 CA20 DA05 DA06 EA03 EA04 FA02  
 GA11 HA01  
 4B064 AE16 CA02 CA19 CC03 DA10  
 4B065 AA01X AA01Y AA24X AA24Y AA26X AA26Y AB01 AC14 AC20 BA01  
 BB31 CA17 CA41