

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-29565

(P2012-29565A)

(43) 公開日 平成24年2月16日(2012.2.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 13/08 (2006.01)	C 1 2 P 13/08 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 P 13/08 A	4 B O 6 4
C 1 2 R 1/185 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
	C 1 2 P 13/08 A	
	C 1 2 R 1:185	

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2008-302521 (P2008-302521)	(71) 出願人	000000066
(22) 出願日	平成20年11月27日 (2008.11.27)		味の素株式会社
			東京都中央区京橋1丁目15番1号
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-アミノ酸の製造法

(57) 【要約】

【課題】 L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン、又はL-ホモセリンを発酵生産する際の副生物を低減する。

【解決手段】 L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン、又はL-ホモセリンの生産能を有し、かつgl tP遺伝子及び/又はgl tS遺伝子の発現が増大するように改変された腸内細菌科に属する細菌を培地で培養して、前記L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

L - アミノ酸生産能を有する腸内細菌科に属する細菌を培地で培養して、L - アミノ酸を該培地中に生成蓄積させ、該培地より前記 L - アミノ酸を採取する、L - アミノ酸の製造法において、

前記細菌は、g l t P 遺伝子及び / 又は g l t S 遺伝子の発現が増大するように改変され、前記 L - アミノ酸が、L - リジン、L - スレオニン、L - アスパラギン、L - アスパラギン酸、L - メチオニン、L - アラニン、L - イソロイシン、及び L - ホモセリンからなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記 g l t P 遺伝子が、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の方法：

(A) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質、

(B) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

前記 g l t P 遺伝子が、下記 (A 1) 又は (B 1) に記載のタンパク質をコードする、請求項 2 に記載の方法：

(A 1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(B 1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 4】

前記 g l t P 遺伝子が、下記 (a) 又は (b) に記載の DNA である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法：

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA、

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の相補配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】

前記 g l t S 遺伝子が、下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法：

(C) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質、

(D) 配列番号 1 3 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 6】

前記 g l t S 遺伝子が、下記 (C 1) 又は (D 1) に記載のタンパク質をコードする、請求項 5 に記載の方法：

(C 1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(D 1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L - グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

前記 g l t S 遺伝子が、下記 (c) 又は (d) に記載の DNA である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法：

(c) 配列番号 3 に示す塩基配列を有する DNA、

10

20

30

40

50

(d) 配列番号 3 に示す塩基配列の相補配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 8】

前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変されたことによって増大された、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 L-アミノ酸が L-リジンであり、前記細菌は y b j E 遺伝子の発現が増大した、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 y b j E 遺伝子が、下記 (E) 又は (F) に記載のタンパク質をコードする、請求項 9 に記載の方法：

(E) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列又は配列番号 6 のアミノ酸番号 17 ~ 315 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(F) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列又は配列番号 6 のアミノ酸番号 17 ~ 315 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-リジン排出活性を有するタンパク質。

【請求項 11】

前記 y b j E 遺伝子が、下記 (e) 又は (f) に記載の DNA である、請求項 9 又は 10 に記載の方法：

(e) 配列番号 5 に示す塩基配列又は配列番号 5 の塩基番号 49 ~ 948 の塩基配列を有する DNA、

(f) 配列番号 5 に示す塩基配列もしくは配列番号 5 の塩基番号 49 ~ 948 の塩基配列の相補配列、又はこれらの塩基配列から調製され得るプローブとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-リジン排出活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 12】

前記 L-アミノ酸が L-リジンであり、その生産を行う培養中の培地の pH が 6.0 ~ 9.0、培養終了時の培地の pH が 7.2 ~ 9.0 となるように制御し、培地中の重炭酸イオン及び / 又は炭酸イオンが少なくとも 20 mM 以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び / 又は炭酸イオンを塩基性アミノ酸のカウンタイオンとすることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記細菌がエシェリヒア属細菌である請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌を用いた L-アミノ酸の製造法に関する。L-アミノ酸は、動物飼料用の添加物、健康食品の成分、又はアミノ酸輸液等として、産業上有用な L-アミノ酸である。

【背景技術】

【0002】

微生物を用いた発酵法によって L-アミノ酸等の目的物質を製造するには、野生型微生物（野生株）を用いる方法、野生株から誘導された栄養要求株を用いる方法、野生株から種々の薬剤耐性変異株として誘導された代謝調節変異株を用いる方法、栄養要求株と代謝調節変異株の両方の性質を持った株を用いる方法等がある。

【0003】

近年は、目的物質の発酵生産に組換え DNA 技術を用いることが行われている。例えば、L-アミノ酸生合成系酵素をコードする遺伝子の発現を増強すること（特許文献 1、特許文献 2）、又は L-アミノ酸生合成系への炭素源の流入を増強すること（特許文献 3）

10

20

30

40

50

によって、微生物のL-アミノ酸生産性を向上させることが行われている。

【0004】

ところで、塩基性アミノ酸の発酵において、炭酸イオンや重炭酸イオンを塩基性アミノ酸のカウンタアニオンとして利用し、硫酸イオンや塩化物イオンの一部を代替する方法が示されている。該文献には、炭酸イオンや重炭酸イオンを培養液中に添加する方法として、発酵中の発酵槽内圧力を正になるように制御するか、又は、炭酸ガスもしくは、炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給する方法が示されている（特許文献4、5）。

【0005】

これまで、L-リジンをはじめとした、L-アスパラギン酸系のアミノ酸発酵において、L-グルタミン酸が副生することが問題になっており、特に、上記の発酵生産においてのpHが高い条件ではグルタミン酸副生が特に顕著に増加することが問題になっていた。アミノ酸の製造工程では、発酵生産後高純度に精製する必要があることが多い為、この際に副生物の存在は精製工程を煩雑にするあるいは製品の純度を下げる等の問題が考えられることから、望ましくない。

10

【0006】

これまでにエシェリヒア・コリなどの腸内細菌群に見出されているグルタミン酸の取り込みに関与するタンパク質として、GltP、GltS（非特許文献1、非特許文献2）、GadC（非特許文献3）、及び、GltIJKLが知られている。

グルタミン酸デカルボキシラーゼ活性が増強するように改変された株において、グルタミン酸/GABAアンチポーター活性を増強することが効果があることが知られているが（特許文献6）、gltP遺伝子またはgltS遺伝子を増幅した微生物を用いたL-アミノ酸の生産の報告はない。

20

【特許文献1】米国特許第5168056号明細書

【特許文献2】米国特許第5776736号明細書

【特許文献3】米国特許第5906925号明細書

【特許文献4】米国出願公開2002-0025564明細書

【特許文献5】国際公開WO2006/038695号パンフレット

【特許文献6】国際公開WO2008/044453号パンフレット

【非特許文献1】J Bacteriol. 1992 Apr;174(7):2391-3.

【非特許文献2】J Biol Chem. 1990 Dec 15;265(35):21704-8.

【非特許文献3】J Bacteriol. 2006 Dec;188(23):8118-27.

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン及びL-ホモセリンから選択されるアミノ酸を生産する際の副生物であるL-グルタミン酸を低減することのできる腸内細菌科に属する微生物を提供すること、及び該細菌を用いて前記L-アミノ酸を生産する際の副生物であるL-グルタミン酸を低減する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、gltP又は/及びgltSの発現が増大するように細菌を改変することにより、L-アミノ酸の発酵生産にて副生するL-グルタミン酸を低減することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) L-アミノ酸生産能を有する腸内細菌科に属する細菌を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中に生成蓄積させ、該培地より前記L-アミノ酸を採取する、L-アミノ酸の製造法において、前記細菌は、gltP遺伝子及び/又はgltS遺伝子の発現が増大するように改変され、前記L-アミノ酸が、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラ

50

ギン、L-アスパラギン酸、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン、及びL-ホモセリンからなる群より選択されることを特徴とする方法。

(2) 前記 g l t P 遺伝子が、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする、前記方法：

(A) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質、

(B) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

(3) 前記 g l t P 遺伝子が、下記 (A1) 又は (B1) に記載のタンパク質をコードする、前記方法：

(A1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(B1) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

(4) 前記 g l t P 遺伝子が、下記 (a) 又は (b) に記載の DNA である、前記方法：

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA、

(b) 配列番号 1 に示す塩基配列の相補配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(5) 前記 g l t S 遺伝子が、下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする、前記方法：

(C) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質、

(D) 配列番号 13 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

(6) 前記 g l t S 遺伝子が、下記 (C1) 又は (D1) に記載のタンパク質をコードする、前記方法：

(C1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(D1) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質。

(7) 前記 g l t S 遺伝子が、下記 (c) 又は (d) に記載の DNA である、前記方法：

(c) 配列番号 3 に示す塩基配列を有する DNA、

(d) 配列番号 3 に示す塩基配列の相補配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(8) 前記遺伝子の発現が、該遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変されたことによって増大された、前記方法。

(9) 前記 L-アミノ酸が L-リジンであり、前記細菌は y b j E 遺伝子の発現が増大した、前記方法。

(10) 前記 y b j E 遺伝子が、下記 (E) 又は (F) に記載のタンパク質をコードする、前記方法：

(E) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列又は配列番号 6 のアミノ酸番号 17 ~ 315 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(F) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列又は配列番号 6 のアミノ酸番号 17 ~ 315 のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-リジン排出活性を有するタンパク質。

(11) 前記 y b j E 遺伝子が、下記 (e) 又は (f) に記載の DNA である、前記方法

10

20

30

40

50

:

(e) 配列番号 5 に示す塩基配列又は配列番号 5 の塩基番号 49 ~ 948 の塩基配列を有する DNA、

(f) 配列番号 5 に示す塩基配列もしくは配列番号 5 の塩基番号 49 ~ 948 の塩基配列の相補配列、又はこれらの塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-リジン排出活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(12) 前記 L-アミノ酸が L-リジンであり、その生産を行う培養中の培地の pH が 6.0 ~ 9.0、培養終了時の培地の pH が 7.2 ~ 9.0 となるように制御し、培地中の重炭酸イオン及び / 又は炭酸イオンが少なくとも 20 mM 以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び / 又は炭酸イオンを塩基性アミノ酸のカウンタイオンとすることを特徴とする方法。

(13) 前記細菌がエシェリヒア属細菌である前記方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法を用いることにより、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン及び L-ホモセリンを発酵生産する際の副生物を低減することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明の細菌

本発明の細菌は、L-アミノ酸生産能を有し、かつ gltP 遺伝子及び / 又は gltS 遺伝子の発現が増大するように改変された腸内細菌科に属する細菌である。前記 L-アミノ酸は、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン及び L-ホモセリンからなる群より選択される。これらの L-アミノ酸を微生物を用いて発酵生産させると、L-グルタミン酸が副生することが多い。

【0012】

ここで、L-アミノ酸生産能とは、本発明の細菌を培地中で培養したときに、培地中または菌体内に L-アミノ酸を生成し、培地中または菌体から回収できる程度に蓄積する能力をいう。本発明の細菌は L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン及び L-ホモセリンのうちの 1 種を生産する能力を有するものであってもよく、2 種又は 3 種を生産できる能力を有するものであってもよい。L-アミノ酸の生産能を有する細菌としては、本来的に L-アミノ酸の生産能を有するものであってもよいが、下記のような細菌を、変異法や組換え DNA 技術を利用して、L-アミノ酸の生産能を有するように改変したものであってもよい。

また、「遺伝子の発現の増大」とは、遺伝子の転写及び / 又は翻訳の量が増大することをいう。

【0013】

< 1-1 > L-アミノ酸生産能の付与

以下に、細菌に L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-アラニン、及び L-ホモセリンから選ばれる L-アミノ酸の生産能を付与する方法及び本発明で使用する前記 L-アミノ酸の生産能が付与された細菌を例示する。ただし、前記 L-アミノ酸の生産能を有する限り、これらに制限されない。

【0014】

本発明に用いる細菌としては、エシェリヒア属、エンテロバクター属、バントエア属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、サルモネラ属、モルガネラ属など、腸内細菌科に属する細菌であって、前記 L-アミノ酸を生産する能力を有するものであれば、特

10

20

30

40

50

に限定されない。具体的にはNCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースに記載されている分類により腸内細菌科に属するものが利用できる (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>)。 10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

【0015】

本発明のエシェリヒア属細菌を得るために用いるエシェリヒア属細菌の親株としては、特に限定されないが、具体的にはNeidhardtらの著書 (Backmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of Escherichia coli K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に挙げられるものが利用できる。 10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

【0016】

これらを手にするには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。 20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

【0017】

エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス (Enterobacter agglomerans)、エンテロバクター・アエロゲネス (Enterobacter aerogenes) 等、パントエア属細菌としてはパントエア・アナナティス (Pantoea ananatis) が挙げられる。尚、近年、エンテロバクター・アグロメランスは、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) 又はパントエア・アナナティス (Pantoea ananatis)、パントエア・スチューアルティ (Pantoea stewartii) に再分類されているものがある。本発明においては、腸内細菌科に分類されるものであれば、エンテロバクター属又はパントエア属のいずれに属するものであってもよい。パントエア・アナナティスを遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、パントエア・アナナティスAJ13355株 (FERM BP-6614)、AJ13356株 (FERM BP-6615)、AJ13601株 (FERM BP-7207) 及びそれらの誘導体を用いることができる。これらの株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランスと同定され、エンテロバクター・アグロメランスとして寄託されたが、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。 30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

【0018】

以下、腸内細菌科に属する細菌にL-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-メチオニン、L-アラニン、L-イソロイシン及びL-ホモセリンから選ばれるL-アミノ酸生産能を付与する方法、又は腸内細菌科に属する細菌において前記L-アミノ酸の生産能を増強する方法について述べる。 40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

【0019】

L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる (アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77-100頁参照)。ここで、L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、 50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0020】

L-アミノ酸生産能を有する栄養要求性変異株、L-アミノ酸のアナログ耐性株、又は代謝制御変異株を取得するには、親株又は野生株を通常の変異処理、すなわちX線や紫外線の照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンサルフォネート(EMS)等の変異剤処理などによって処理し、得られた変異株の中から、栄養要求性、アナログ耐性、又は代謝制御変異を示し、かつL-アミノ酸生産能を有するものを選択することによって得ることができる。

【0021】

L-リジン生産菌

10

以下、L-リジン生産菌及びその構築方法を例として示す。

例えば、L-リジン生産能を有する株としては、L-リジンアナログ耐性株又は代謝制御変異株が挙げられる。L-リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-L-システイン(AEC)、N-メチルリジン、L-クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、腸内細菌科に属する細菌を通常的人工変異処理に付すことによって得ることができる。L-リジン生産菌として具体的には、エシェリヒア・コリアJ11442株(FERM BP-1543、NRRL B-12185; 特開昭56-18596号公報及び米国特許第4346170号明細書参照)、エシェリヒア・コリア VL611株(特開2000-189180号公報)等が挙げられる。また、エシェリヒア・コリアのL-リジン生産菌として、WC196株(国際公開第96/17930号パンフレット参照)を用いることも出来る。

20

【0022】

また、L-リジン生合成系の酵素活性を上昇させることによって、L-リジン生産菌を構築することが出来る。これらの酵素活性の上昇は、酵素をコードする遺伝子のコピー数を細胞内で上昇させること、または発現調節配列を改変することによって達成できる。L-リジン生合成系の酵素をコードする遺伝子のコピー数を細胞内で上昇させること、および発現調節配列を改変することは、後述のgltP、gltS遺伝子の場合と同様の方法によって達成することができる。

【0023】

L-リジン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、ジヒドロジピコリン酸合成酵素遺伝子(dapA)、アスパルトキナーゼ遺伝子(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ遺伝子(dapB)、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素遺伝子(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(ddh)(以上、国際公開第96/40934号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子(ppc)(特開昭60-87788号公報)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子(aspC)(特公平6-102028号公報)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子(dapF)(特開2003-135066号公報)、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素遺伝子(asd)(国際公開第00/61723号パンフレット)等のジアミノピメリン酸経路の酵素の遺伝子、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子(特開2000-157276号公報)等のアミノアジピン酸経路の酵素等の遺伝子が挙げられる。また、親株は、エネルギー効率に関する遺伝子(cyo)(EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(pntAB)(米国特許第5,830,716号)、L-リジン排出活性を有するタンパク質をコードするybjE遺伝子(WO2005/073390)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(gdhA)(Gene23:199-209(1983))、または、これらの任意の組み合わせの遺伝子の発現レベルが増大していてもよい。カッコ内は、それらの遺伝子の略記号である。

30

40

【0024】

上記遺伝子の中ではybjE遺伝子が好ましい。ybjE遺伝子としては、エシェリヒア・コリアのybjE遺伝子、及びそのホモログが挙げられる。エシェリヒア・コリアのybjE遺伝子としては、配列番号6のアミノ酸番号17~315のアミノ酸配列をコードする遺伝子、具体的には配列番号5の塩基番号49~948の塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。なお、

50

配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸番号1のValは、コドンはgtgであるものの、Metとして翻訳されている可能性があり、ybjE遺伝子にコードされるタンパク質は配列番号6に示すアミノ酸配列(1~315)を有するタンパク質である可能性がある。その場合は、配列番号5の塩基番号1~948を含むDNAを用いることが好ましい。なお、開始コドンがいずれであるにしても、配列番号1の塩基番号49~948を含むDNAを用いることにより、本発明の製造法に用いることのできる微生物が得られることは実施例より明らかである。

【0025】

エシェリヒア・コリ由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素はL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、エシェリヒア・コリ由来の野生型アスパルトキナーゼはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、dapA遺伝子及びlysC遺伝子を用いる場合、これらの遺伝子は、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型遺伝子であることが好ましい。

10

【0026】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAとしては、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型アスパルトキナーゼをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換、323位のグリシン残基がアスパラギン残基に置換、318位のメチオニンがイソロイシンに置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる(これらの変異体については米国特許第5661012号及び第6040160号明細書参照)。変異型DNAはPCRなどによる部位特異的変異法により取得することができる。

20

【0027】

なお、変異型変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする変異型dapA及び変異型アスパルトキナーゼをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80、pCAB1、pCABD2が知られている(米国特許第6040160号明細書)。同プラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109株(米国特許第6040160号明細書)は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター)に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

30

【0028】

さらに、L-アミノ酸生産菌は、L-アミノ酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性や、L-アミノ酸の合成又は蓄積に負に機能する酵素活性が低下または欠損していてもよい。L-リジン生産において、このような酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(cadA、ldcC)、マリックエンザイム等があり、該酵素の活性が低下または欠損した株は国際公開第WO95/23864号、第WO96/17930号パンフレット、第WO2005/010175号パンフレットなどに記載されている。

40

【0029】

リジンデカルボキシラーゼ活性を低下または欠損させるためには、リジンデカルボキシラーゼをコードするcadA遺伝子とldcC遺伝子の両方の発現を低下させることが好ましい。両遺伝子の発現低下は、WO2006/078039号パンフレットに記載の方法に従って行うことができる。

【0030】

これらの酵素活性を低下あるいは欠損させる方法としては、通常の変異処理法又は遺伝子組換え技術によって、ゲノム上の上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。このような変異の導入は、例えば、遺伝子組換えによって、ゲノム上の酵素をコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシ

50

ヤインダルガルノ(SD)配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、ゲノム上の酵素をコードする領域にアミノ酸置換(ミスセンス変異)を導入すること、また終始コドンを導入すること(ナンセンス変異)、一~二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分、あるいは全領域を欠失させることによっても達成出来る(J. Biol. Chem. 272:8611-8617(1997))。また、コード領域の全体又は一部が欠失したような変異酵素をコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、該遺伝子でゲノム上の正常遺伝子を置換すること、又はトランスポゾン、IS因子を該遺伝子に導入することによっても酵素活性を低下または欠損させることができる。

【0031】

例えば、上記の酵素の活性を低下または欠損させるような変異を遺伝子組換えにより導入する為には、以下のような方法が用いられる。目的遺伝子の部分配列を改変し、正常に機能する酵素を産生しないようにした変異型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAで腸内細菌科に属する細菌に形質転換し、変異型遺伝子とゲノム上の遺伝子で組換えを起こさせることにより、ゲノム上の目的遺伝子を変異型に置換することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換は、「Redドリブンインテグレーション(Red-driven integration)」と呼ばれる方法(Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645(2000))、Redドリブンインテグレーション法とファージ由来の切り出しシステム(Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. J. Bacteriol. 184: 5200-5203(2002))とを組合わせた方法(WO2005/010175号参照)等の直鎖状DNAを用いる方法や、温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある(米国特許第6303383号; 特開平05-007491号公報)。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入は、宿主上で複製能力を持たないプラスミドを用いても行うことが出来る。

【0032】

好ましいL-リジン生産菌として、エシェリヒア・コリWC196 cadA ldcC/pCABD2が挙げられる(WO2006/078039)。この菌株は、WC196株より、リジンデカルボキシラーゼをコードするcadA及びldcC遺伝子を破壊し、リジン生合成系遺伝子を含むプラスミドpCABD2(米国特許第6,040,160号)を導入することにより構築した株である。WC196株は、E.coli K-12に由来するW3110株から取得された株で、352番目のスレオニン进行イソロイシンに置換することによりL-リジンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子(米国特許第5,661,012号)でW3110株の染色体上の野生型lysC遺伝子を置き換えた後、AEC耐性を付与することにより育種された(米国特許第5,827,698号)。WC196株は、Escherichia coli AJ13069と命名され、1994年12月6日、工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に受託番号FERM P-14690として寄託され、1995年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5252が付与されている(米国特許第5,827,698号)。WC196 cadA ldcC自体も、好ましいL-リジン生産菌である。WC196 cadA ldcCは、AJ110692と命名され、2008年10月7日に工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に国際寄託され、受託番号FERM BP-11027が付与されている。

【0033】

pCABD2は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)をコードする変異型dapA遺伝子と、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子と、エシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードするdapB遺伝子と、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするddh遺伝子を含んでいる。

【0034】

10

20

30

40

50

L - スレオニン生産菌

本発明に用いられる L - スレオニン生産菌として好ましいものとしては、L - スレオニン生合成系酵素を強化した腸内細菌科に属する細菌が挙げられる。L - スレオニン生合成系酵素をコードする遺伝子としては、アスパルトキナーゼIII遺伝子 (lysC)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (asd)、thrオペロンにコードされるアスパルトキナーゼI遺伝子 (thrA)、ホモセリンキナーゼ遺伝子 (thrB)、スレオニンシンターゼ遺伝子 (thrC) が挙げられる。これらの遺伝子は2種類以上導入してもよい。L - スレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制された腸内細菌科に属する細菌に導入してもよい。スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌としては、例えば、スレオニンデヒドロゲナーゼ活性が欠損したTDH6株 (特開2001-346578号) 等が挙げられる。

10

【0035】

L - スレオニン生合成系酵素は、最終産物の L - スレオニンによって酵素活性が抑制される。従って、L - スレオニン生産菌を構築するためには、L - スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように L - スレオニン生合成系遺伝子を改変することが望ましい。また、上記 thrA、thrB、thrC 遺伝子は、スレオニンオペロンを構成しているが、スレオニンオペロンは、アテニュエーター構造を形成しており、スレオニンオペロンの発現は、培養液中のイソロイシン、スレオニンにより阻害を受け、また、アテニュエーションにより発現が抑制される。この改変は、アテニュエーション領域のリーダー配列あるいは、アテニュエーターを除去することにより達成出来る (Lynn, S. P., Burton, W. S., Donohue, T. J., Gould, R. M., Gumpert, R. I., and Gardner, J. F. J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); 国際公開第02/26993号パンフレット; 国際公開第2005/049808号パンフレット参照)。

20

【0036】

スレオニンオペロンの上流には、固有のプロモーターが存在するが、non-nativeのプロモーターに置換してもよいし (WO98/04715号パンフレット参照)、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるようなスレオニンオペロンを構築してもよい (欧州特許第0593792号明細書参照)。また、L - スレオニンによるフィードバック阻害を受けないようにエシェリヒア属細菌を改変するために、 α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸 (AHV) に耐性な菌株を選抜することによっても得られる。

30

【0037】

このように L - スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように改変されたスレオニンオペロンは、宿主内でコピー数が上昇しているか、あるいは強力なプロモーターに連結し、発現が増大していることが好ましい。コピー数の上昇は、プラスミドによる増幅の他、トランスポゾン、Mu - ファージ等でゲノム上にスレオニンオペロンを転移させることによっても達成出来る。

【0038】

また、アスパルトキナーゼIII遺伝子 (lysC) は、L - リジンによるフィードバック阻害を受けないように改変した遺伝子を用いることが望ましい。このようなフィードバック阻害を受けないように改変した lysC 遺伝子は、米国特許5,932,453号明細書に記載の方法により取得できる。

40

【0039】

L - スレオニン生合成系酵素以外にも、解糖系、TCA回路、呼吸鎖に関する遺伝子や遺伝子の発現を制御する遺伝子、糖の取り込み遺伝子を強化することも好適である。これらの L - スレオニン生産に効果がある遺伝子としては、トランスヒドロナーゼ遺伝子 (pntA/B) (欧州特許733712号明細書)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (pepC) (国際公開95/06114号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ遺伝子 (pps) (欧州特許877090号明細書)、コリネ型細菌あるいはバチルス属細菌のピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (国際公開99/18228号パンフレット、欧州出願公開1092776号明細書) が挙げられる。

50

【 0 0 4 0 】

また、L - スレオニンに耐性を付与する遺伝子、及びノ又はL - ホモセリンに耐性を付与する遺伝子の発現を強化することや、宿主にL - スレオニン耐性、及びノ又はL - ホモセリン耐性を付与することも好適である。耐性を付与する遺伝子としては、rhtA遺伝子(Res. Microbiol. 154:123 - 135 (2003))、rhtB遺伝子(欧州特許出願公開第0994190号明細書)、rhtC遺伝子(欧州特許出願公開第1013765号明細書)、yfiK、yeaS遺伝子(欧州特許出願公開第1016710号明細書)が挙げられる。また宿主にL - スレオニン耐性を付与する方法は、欧州特許出願公開第0994190号明細書や、国際公開第90/04636号パンフレット記載の方法を参照出来る。

【 0 0 4 1 】

L - スレオニン生産菌として、エシェリヒア・コリVKPM B-3996株(米国特許第5,175,107号明細書参照)を例示することが出来る。このVKPM B-3996株は、1987年11月19日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム(Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNIIGenetika)(住所:Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1)に登録番号VKPM B-3996のもとに寄託されている。また、このVKPM B-3996株は、ストレプトマイシン耐性マーカーを有する広域ベクタープラスミドpAYC32(Chistorerdov, A. Y., and Tsygankov, Y. D. Plasmid, 16, 161-167 (1986)を参照のこと)にスレオニン生合成系遺伝子(スレオニンオペロン: thrABC)を挿入して得られたプラスミドpVIC40(国際公開第90/04636号パンフレット)を保持している。このpVIC40においては、スレオニンオペロン中のthrAがコードするアスパルトキナーゼI - ホモセリンデヒドロゲナーゼIの、L - スレオニンによるフィードバック阻害が解除されている。

【 0 0 4 2 】

また、エシェリヒア・コリVKPM B-5318株(欧州特許第0593792号明細書参照)も好適なL - スレオニン生産菌として例示することができる。VKPM B-5318株は、1990年5月3日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム(Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNIIGenetika)に登録番号VKPM B-5318のもとに寄託されている。またこのVKPM B-5318株は、イソロイシン非要求性菌株であり、ラムダファージの温度感受性C1リプレッサー、PRプロモーターおよびCroタンパク質のN末端部分の下流に、本来持つ転写調節領域であるアテニューエーター領域を欠失したスレオニンオペロンすなわちスレオニン生合成関与遺伝子が位置し、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるように構築された組換えプラスミドDNAを保持している。

【 0 0 4 3 】

L - ホモセリン生産菌

エシェリヒア属に属するL - スレオニン生産菌として、NZ10(thrB)株が挙げられる。この株は、公知のC600株(thrB, leuB (Appleyard R.K., Genetics, 39, 440-452 (1954))から誘導されたLeu⁺復帰変異株である。アスパルトキナーゼ - ホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子で形質転換されたNZ10形質転換株も、好適に使用できる。

細菌のrhtB遺伝子のコピー数を増加させるとL - ホモセリンに耐性になり、L - ホモセリン、L - スレオニン、L - アラニン、L - パリン、及びL - イソロイシンの生産性が向上する(EP994190A2)。また、細菌のrhtC遺伝子のコピー数を増加させるとL - ホモセリン及びL - スレオニンに耐性になり、L - ホモセリン、L - スレオニン、及びL - ロイシンの生産性が向上する(EP1013765A1)。

さらに、エシェリヒア・コリ44株(ロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズムに登録番号VKPM B-2175として寄託されている)も、使用することができる。

【 0 0 4 4 】

L - メチオニン生産菌

エシェリヒア属に属するL - メチオニン生産菌としては、エシェリヒア・コリAJ11539

10

20

30

40

50

(NRRL B-12399)、AJ11540 (NRRL B-12400)、AJ11541 (NRRL B-12401)、AJ11542 (NRRL B-12402)(GB2075055)、218 (VKPM B-8125)(EP1239041)等の菌株が挙げられる。

【0045】

L - アスパラギン酸生産菌

エシェリヒア属に属するL - アスパラギン酸生産菌としては、フマル酸からL - アスパラギン酸を生成するアスパルターゼ活性が増強されたエシェリヒア・コリ菌株(特公昭38-6588号)が挙げられる。

【0046】

L - アラニン生産菌

L - アラニンは、アスパラギン酸の - 脱炭酸により生産される。したがって、エシェリヒア属に属するL - アラニン生産菌として、アスパラギン酸 - デカルボキシラーゼが増強されたエシェリヒア・コリ菌株(特開昭2-242690号)が挙げられる。

10

【0047】

L - イソロイシン生産菌

本発明のL - イソロイシン生産菌を誘導するための親株の例としては、6 - ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシンヒドロキサメートなどのイソロイシナンalogに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオニン及び/又はアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼなどのL - イソロイシン生合成に關与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号, FR 0356739, 及び米国特許第5,998,178号)。

20

【0048】

L - アスパラギン生産菌

L - アスパラギンは、アスパラギン酸へアミノ基を付与することにより生産される(Boehlein, S. K., Richards, N. G. J., & Schuster, S. M. (1994a) J. Biol. Chem. 269, 7450-7457.)。したがって、エシェリヒア属に属するL - アスパラギン生産菌として、L - アスパラギン酸生産菌のアスパラギンシンターゼが増強されたエシェリヒア・コリ菌株が挙げられる。

【0049】

本発明の細菌は、上述したようなL - リジン、L - スレオニン、L - アスパラギン酸、L - アスパラギン、L - メチオニン、L - アラニン、L - イソロイシン及びL - ホモセリンから選ばれるL - アミノ酸の生産能を有する細菌をgl tP及び/又はgl tS遺伝子の発現が増大するように改変することによって取得できる。また、本発明の細菌は、gl tP及び/又はgl tS遺伝子の発現が増大するように改変された細菌に、L - アミノ酸生産能を付与することによっても、取得できる。

30

【0050】

ここで、「gl tP及び/又はgl tS遺伝子の発現が増大するように改変された」とは、野生株、または親株のような非改変株に対して細胞あたりのgl tP及び/又はgl tS遺伝子によりコードされる蛋白質分子の数が増大した場合や、これらの遺伝子がコードするGl tPタンパク質又はGl tSタンパク質の分子当たりの活性が向上した場合が該当する。Gl tPタンパク質又はGl tSタンパク質の活性は非改変株と比較して、菌体当たり150%以上、好ましくは200%以上、さらに望ましくは菌体当たり300%以上に向上するように改変されていることが好ましい。ここで、対照となる非改変株、例えば野生株の腸内細菌科に属する微生物としては、エシェリヒア・コリMG1655株(ATCCNo.47076)、及びW3110株(ATCCNo.27325)、パントエア・アナナティスAJ13335株(FERM BP-6615)などが挙げられる。Gl tPタンパク質及びGl tSタンパク質の活性とは、細菌の細胞外から細胞内へのL - グルタミン酸の取込みに關与する活性をいい、本明細書では「L - グルタミン酸トランスポーター活性」と記載する。L - グルタミン酸トランスポーター活性は、本発明の微生物による細胞内へのL - グルタミン酸の取り込み速度を、対象となる非改変株のL - グルタミン酸取り込み速度

40

50

と比較することによって確認することが出来る。L - グルタミン酸の取り込み速度は、例えば、生菌を一定時間 R I ラベルした L - グルタミン酸と反応させた場合の細胞内の放射能濃度を検出することにより測定することができる (Wallace, B; Yang, YJ; Hong, JS; Lum, D. J Bacteriol. 1990 Jun;172(6):3214-3220.)。

【 0 0 5 1 】

また、gl tP遺伝子及び / 又はgl tS遺伝子の発現が非改変株、例えば親株、又は野生株と比べて向上していることの確認は、mRNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。発現については、非改変株と比較して、増大していればい
10
ずれでもよいが、例えば非改変株と比べて 1 . 5 倍以上、より好ましくは 2 倍以上、さらに好ましくは 3 倍以上増大していることが望ましい。また、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子によりコードされたタンパク質の活性の増強は、目的とするタンパク質量が非改変株と比較して上昇していることによっても確認することができ、例えば抗体を用いてウェスタンブロットによって検出することが出来る。(Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001))。

【 0 0 5 2 】

本発明のgl tP、gl tS遺伝子とは、腸内細菌科に属する微生物のgl tP遺伝子、gl tS遺伝子及びそのホモログをいう。エシェリヒア・コリのgl tP遺伝子としては、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子 (配列番号 1) を例示することができる
20
(b4077 Genbank Accession No. NP_418501. [gi:16131903])。またエシェリヒア・コリのgl tS遺伝子としては、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子 (配列番号 3) を例示することができる (b3653 Genbank Accession No. NP_418110. [gi:16131524])。

【 0 0 5 3 】

gl tP、gl tS遺伝子のホモログとは、他の微生物由来で、エシェリヒア属細菌のgl tP遺伝子、gl tS遺伝子と構造が高い類似性を示し、宿主に導入した際に L - リジン、L - スレオニン、L - アスパラギン酸、L - アスパラギン、L - メチオニン、L - アラニン、L - イソロイシン及び L - ホモセリンから選ばれる L - アミノ酸を生産する際の L - グルタミン酸の副生量を低減させ、グルタミン酸の細胞内への取り込み活性を示すタンパク質をコードする遺伝子をいう。例えばgl tP、gl tS遺伝子のホモログとしては、シゲラ属、エンテロ
30
バクター属等のGenbankに登録されている遺伝子が挙げられる。さらに、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子は、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、ストレプトマイセス・セリカラー等のストレプトマイセス属細菌、ラクトコッカス属やラクトバチルス属等の乳酸菌からクローニングされるものであってもよい。エシェリヒア属細菌のgl tP及び / 又はgl tSと相同性が高ければ、異なる遺伝子名が付与されているものでもよい。例えば、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子ホモログは、それぞれ配列番号 8 と配列番号 9、配列番号 1 0 と配列番号 1 1 の合成オリゴヌクレオチドを用いてクローニング出来る遺伝子も含まれる。

【 0 0 5 4 】

また、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子ホモログは上記の配列情報に基づき、相同性が高い遺
40
伝子を公知のデータベースから取得できる。アミノ酸配列および塩基配列の相同性は、例えばKarlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993))やFASTA(Methods Enzymol., 183, 63 (1990))を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。

尚、本明細書において、「相同性」(homology)は、「同一性」(identity)を指すことがある。

【 0 0 5 5 】

以下に、エシェリヒア・コリのgl tP及びgl tS遺伝子と相同性の高いホモログについて、相同性、細菌名、及び遺伝子配列のデータベースの登録番号を示す。
50

【 0 0 5 6 】

【 表 1 】

表1

Identity	source	Acc. No.	Identity	source	Acc. No.
100%	Escherichia coli (strain K12)	EMBL; M32488; AAA23832.1	99%	Escherichia coli (strain UTI89 / UPEC)	EMBL; CP000243; ABE10076.1
99%	Escherichia coli	CP000247	99%	Escherichia coli 53638	EMBL; AAKB02000001; EDU65993.1
99%	Shigella boydii (Sb227)	CP000034-CP000039	99%	Escherichia coli O9:H4 (strain HS)	EMBL; CP000802; ABV08482.1
99%	Shigella sonnei(Ss046)	CP000034-CP000039	99%	Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC)	EMBL; CP000800; ABV17642.1
99%	Escherichia coli O157:H7	EMBL; AE005174; AAG59275.1	99%	Shigella flexneri	EMBL; AE005674; AAN45560.1
99%	Escherichia coli O6	EMBL; AE014075; AAN83500.1	99%	Shigella flexneri serotype 5b (strain 8401)	EMBL; CP000266; ABF06119.1
99%	Shigella sonnei (strain Ss046)	EMBL; CP000038; AAZ90754.1	98%	Escherichia albertii TW07627	EMBL; ABKX01000015; EDS90170.1
99%	Shigella boydii serotype 4 (strain Sb227)	EMBL; CP000036; ABB68540.1	95%	Citrobacter koseri (strain ATCC BAA-895 / CDC 4225-83 / SGSC4696)	EMBL; CP000822; ABV14881.1
99%	Escherichia coli O6:K15:H31 (strain 536 / UPEC)	EMBL; CP000247; ABG72258.1	94%	Salmonella paratyphi B (strain ATCC BAA-1250 / SPB7)	EMBL; CP000886; ABX70555.1
99%	Shigella boydii serotype 18 (strain CDC 3083-94 / BS512)	EMBL; CP001063; ACD08193.1	94%	Salmonella typhimurium	EMBL; AE008901; AAL23107.1
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4076	EMBL; ABHQ01000005; EDU70808.1	94%	Salmonella paratyphi A	EMBL; CP000026; AAV79845.1
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4113	EMBL; ABHP01000005; EDU55567.1	93%	Salmonella arizonae (strain ATCC BAA-731 / CDC346-86 / RSK2980)	EMBL; CP000880; ABX23224.1
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4196	EMBL; ABHO01000008; EDU33758.1	93%	Salmonella typhi	EMBL; AE014613; AAO71654.1
99%	Escherichia coli (strain SMS-3-5 / SECEC)	EMBL; CP000970; ACB19931.1	93%	Enterobacter sp. (strain 638)	EMBL; CP000653; ABP58966.1
99%	Escherichia coli (strain ATCC 8739 / DSM 1576 / Crooks)	EMBL; CP000946; ACA79551.1	93%	Salmonella choleraesuis	EMBL; AE017220; AAX68069.1
99%	Escherichia coli(UTI89)	EMBL; CP000243/CP000244	93%	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (strain ATCC 700721 / MGH78578)	EMBL; CP000647; ABR79835.1
99%	Escherichia coli O1:K1 / APEC	EMBL; CP000468; ABJ03557.1	90%	Enterobacter sakazakii (strain ATCC BAA-894)	EMBL; CP000783; ABU75428.1

10

20

30

【 0 0 5 7 】

【表 2】

表2

Identity	source	Acc. No.	Identity	source	Acc. No.
100%	Escherichia coli		99%	Escherichia albertii TW07627	EMBL; ABKX01000002; EDS93075.1
99%	Escherichia coli O157:H7	EMBL; BA000007; BAB37952.1	98%	Escherichia coli 536	CP000247
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4076	EMBL; ABHQ01000003; EDU71328.1	98%	Escherichia coli O6	EMBL; AE014075; AAN82914.1
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4113	EMBL; ABHP01000008; EDU54990.1	98%	Escherichia coli O6:K15:H31 (strain 536 / UPEC)	EMBL; CP000247; ABG71723.1
99%	Escherichia coli O157:H7 str. EC4196	EMBL; ABHO01000001; EDU35455.1	99%	Escherichia coli O157:H7	EMBL; AE005174; AAG58798.1
99%	Escherichia coli O9:H4 (strain HS)	EMBL; CP000802; ABV08069.1	93%	Salmonella choleraesuis	EMBL; AE017220; AAX67576.1
99%	Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC)	EMBL; CP000800; ABV17638.1	93%	Salmonella paratyphi A	EMBL; CP000026; AAV79398.1
99%	Escherichia coli (strain SMS-3-5 / SECEC)	EMBL; CP000970; ACB18417.1	93%	Salmonella paratyphi B (strain ATCC BAA-1250 / SPB7)	EMBL; CP000886; ABX69959.1
99%	Escherichia coli 53638	EMBL; AAKB02000001; EDU64770.1	92%	Salmonella typhimurium	EMBL; AE008874; AAL22605.1
99%	Escherichia coli	D00626	93%	Salmonella arizonae (strain ATCC BAA-731 / CDC346-86 / RSK2980)	EMBL; CP000880; ABX23688.1
99%	Escherichia coli UTI89	Acc.No.CP000243/CP000244	93%	Salmonella typhi	EMBL; AE014613; AA071256.1
99%	Escherichia coli O1:K1 / APEC	EMBL; CP000468; ABJ03124.1	92%	Salmonella typhi	EMBL; AL627280; CAD03248.1
99%	Escherichia coli (strain UTI89 / UPEC)	EMBL; CP000243; ABE09626.1			

10

20

【 0 0 5 8 】

上記のホモログ中で保存されているアミノ酸配列を、配列番号 1 2 (GltP) 及び配列番号 1 3 (GltS) に示す。

【 0 0 5 9 】

また、本発明に用いるgltP及び/又はgltSは、野生型遺伝子には限られず、コードされるタンパク質の機能、すなわちL-グルタミン酸トランスポーター活性が損なわれない限り、配列番号 2、4、1 2 又は 1 3 のアミノ酸配列において、1 若しくは複数の位置での1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする、変異体又は人為的な改変体であってもよい。

30

【 0 0 6 0 】

ここで、「1 若しくは数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には1 ~ 20 個、好ましくは1 ~ 10 個、より好ましくは1 ~ 5 個を意味する。上記の1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、L-グルタミン酸トランスポーター活性が維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換である。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシ基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換であり、保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、Ile

40

50

からLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、gl tP及び / 又はgl tSを保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。このような遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号1もしくは2に示す塩基配列、又はそれらのホモログを改変することによって取得することができる。

10

【0061】

さらに、gl tP及び / 又はgl tSは、配列番号2、4、12又は13のアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有し、かつ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする配列を用いることができる。

また、それぞれgl tP及び / 又はgl tSが導入される宿主で使用しやすいコドンに置換したものでよい。同様にgl tP及び / 又はgl tSにコードされるタンパク質は、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有する限り、N末端側、C末端側が延長したものであるいは削られているものでよい。例えば延長・削除する長さは、アミノ酸残基で50以下、好ましくは20以下、より好ましくは10以下、特に好ましくは5以下である。より具体的には、配列番号2のアミノ酸配列のN末端側より50アミノ酸から5アミノ酸、C末端側より50アミノ酸から5アミノ酸延長・削除したものでよい。

20

【0062】

また、gl tP及び / 又はgl tSの改変体は、以下のような従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としてはgl tP及び / 又はgl tSのいずれか1つ又は複数をもヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝子を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくはエチルメタンスルフォネート(EMS)等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。これらの遺伝子がL-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードしているか否かは、例えば、これらの遺伝子を適当な細胞で発現させ、L-グルタミン酸トランスポーター活性を有しているかを調べることにより、確かめることができる。

30

【0063】

また、gl tP及び / 又はgl tSはそれぞれ、配列番号1、配列番号3の塩基配列の相補配列又はこれらの相補配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL-グルタミン酸トランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDS、さらに好ましくは、68℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度、温度で、1回、より好ましくは2~3回洗浄する条件が挙げられる。

40

【0064】

プローブとしては、配列番号1の相補配列の一部を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の相補配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができ

50

る。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

【0065】

glp及び/又はglpS遺伝子のいずれか1つ又は複数の発現を増強するための改変は、例えば、遺伝子組換え技術を利用して、細胞中の遺伝子のコピー数を高めることによって行うことができる。例えば、glp及び/又はglpS遺伝子を含むDNA断片を、宿主細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを細菌に導入して形質転換すればよい。

【0066】

glp遺伝子としてエシェリヒア・コリのglp遺伝子を用いる場合、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、glp遺伝子の場合、配列番号3及び4に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリのゲノムDNAを鋳型とするPCR法（PCR：polymerase chain reaction；White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照）によって取得することができる。他の腸内細菌科に属する細菌のglp遺伝子も、その細菌において公知のglp遺伝子もしくは他種の細菌のglp遺伝子もしくはglp遺伝子によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法、又は、前記配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法によって、微生物のゲノムDNA又はゲノムDNAライブラリーから、取得することができる。なお、ゲノムDNAは、DNA供与体である微生物から、例えば、斎藤、三浦の方法（H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97-98頁、培風館、1992年参照）等により調製することができる。

【0067】

次に、PCR法により増幅されたglp遺伝子及び/又はglpS遺伝子を、宿主細菌の細胞内において機能することのできるベクターDNAに接続して組換えDNAを調製する。宿主細菌の細胞内において機能することのできるベクターとしては、宿主細菌の細胞内において自律複製可能なベクターを挙げることができる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pACYC184（pHSG、pACYCは宝バイオ社より入手可）、RSF1010、pBR322、pMW219（pMW219はニッポンジーン社より入手可）、pSTV29（宝バイオ社より入手可）等が挙げられる。

【0068】

上記のように調製した組換えDNAを細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、パチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)）がある。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)）も応用できる。

【0069】

一方、glp及び/又はglpSのいずれか1つ又は複数のコピー数を高めることは、上述のようなglp及び/又はglpSのいずれか1つ又は複数を経菌のゲノムDNA上に多コピー存在させることによって達成できる。細菌のゲノムDNA上にglp及び/又はglpSのいずれか1つ又は複数を経菌を多コピーで導入するには、ゲノムDNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。ゲノムDNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインパーテッド・リピートが利用できる。また、ゲ

10

20

30

40

50

ノム上に存在するgl tP遺伝子及び / 又はgl tS遺伝子の横にタンデムに連結させてもよいし、ゲノム上の不要な遺伝子上に重複して組み込んでよい。これらの遺伝子導入は、温度感受性ベクターを用いて、あるいはintegrationベクターを用いて達成することが出来る。

【 0 0 7 0 】

あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているようにgl tP及び / 又はgl tSをトランスポゾンに搭載してこれを転移させてゲノムDNA上に多コピー導入することも可能である。ゲノム上に遺伝子が転移したことの確認は、gl tP遺伝子及び / 又はgl tS遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行うことによって確認出来る。

【 0 0 7 1 】

さらに、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子の発現の増強は、上記した遺伝子コピー数の増幅以外に、国際公開00/18935号パンフレットに記載した方法で、ゲノムDNA上またはプラスミド上のgl tP及び / 又はgl tS遺伝子の各々のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することや、各遺伝子の - 35、 - 10領域をコンセンサス配列に近づけること、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅すること、又は、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、araBAプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、T7プロモーター、 λ 10プロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、E.coliのスレオニンオペロンのプロモーター、配列番号7のtacプロモーターから誘導されたプロモーターを使用することもできる。

【 0 0 7 2 】

また、gl tP及び / 又はgl tS遺伝子のプロモーター領域、RBS (リボソーム結合配列)、SD領域に塩基置換等を導入し、より強力なものに改変することも可能である。配列番号7に、tacプロモーター及びlac遺伝子のRBSを含むDNA断片の塩基配列を示す。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、Goldsteinらの論文 (Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)) 等に記載されている。さらに、リボソーム結合部位 (RBS) と開始コドンとの間のスペーサー、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。gl tP及び / 又はgl tS遺伝子のプロモーター等の発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することも出来る。これらのプロモーター置換または改変によりgl tP及び / 又はgl tS遺伝子の発現が強化される。発現調節配列の置換は、例えば温度感受性プラスミドを用いた方法や、Redドリブンインテグレーション法 (WO2005/010175) を使用することが出来る。

【 0 0 7 3 】

上記遺伝子及びタンパク質のホモログ、及び遺伝子の発現増大に関する記載は、gl tP及びgl tS遺伝子以外の遺伝子、例えばL - アミノ酸生産能の付与に用いる遺伝子、ybjE遺伝子、及びそれらの発現産物についても同様に適用される。

【 0 0 7 4 】

< 2 > L - アミノ酸の製造法

本発明のL - アミノ酸の製造法は、本発明の細菌を培地で培養して、L - リジン、L - スレオニン、L - アスパラギン、L - アスパラギン酸、L - メチオニン、L - アラニン、L - イソロイシン及びL - ホモセリンから選ばれるL - アミノ酸を該培地中に生成蓄積させ、該培地又は菌体より該L - アミノ酸を回収することを特徴とする。

【 0 0 7 5 】

使用する培地は、細菌を用いたL - アミノ酸の発酵生産において従来より用いられてきた培地を用いることができる。すなわち、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。ここで、炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぶんの加水

10

20

30

40

50

分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。なかでも、グルコース、フルクトース、シュクロースを炭素源として用いることが好ましい。なお、シュクロース資化能を持たない株については、シュクロース資化遺伝子を導入することにより、シュクロースを炭素源として使用できるようになる（米国特許第5,175,107号）。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

10

【0076】

また生育や生産性を向上させるようなL-アミノ酸を添加する場合がある。例えばL-リジン発酵の場合、L-スレオニン、L-ホモセリン、L-イソロイシンを、L-スレオニン発酵の場合、L-イソロイシン、L-リジン、L-ホモセリン等を添加することが好ましい。添加濃度は0.01-10g/L程度である。

【0077】

培養は好氣的条件下で1~7日間実施するのがよく、培養温度は24~37、培養中のpHは5~9がよい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。発酵液からのL-アミノ酸の回収は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破砕し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L-アミノ酸を回収することができる。

20

【0078】

また、L-リジン等の塩基性アミノ酸を製造する際には、培養中のpHが6.5~9.0、培養終了時の培地のpHが7.2~9.0となるように制御し、培地中の重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンが少なくとも20mM以上存在する培養期があるようにし、前記重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを塩基性アミノ酸のカウンティオンとする方法で発酵し、目的の塩基性アミノ酸を回収する方法で製造を行ってもよい（特開2002-65287、US2002-0025564A EP 1813677A）。

30

【0079】

塩基性アミノ酸を生産する能力を有する微生物を培地中で好気培養するに際して、炭酸イオンもしくは重炭酸イオン又はこれらの両方を、塩基性アミノ酸の主なカウンティオンとして利用することができる。塩基性アミノ酸のカウンティオンとして必要な量の重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを培地中に存在させる方法としては、培養中の培地のpHが6.5~9.0、好ましくは6.5~8.0、培養終了時の培地のpHが7.2~9.0となるように制御し、さらに、発酵中の発酵槽内圧力が正となるように制御するか、又は、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給することが知られている（特開2002-65287、米国特許出願公開第20020025564号、EP1813677A）。

40

【0080】

本発明においては、発酵中の発酵槽内の圧力が正となるように制御すること、及び、炭酸ガスもしくは炭酸ガスを含む混合ガスを培地に供給することの両方を行ってもよい。いずれの場合も、培地中の重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンが、好ましくは20mM以上、より好ましくは30mM以上、特に好ましくは40mM以上存在する培養期があるようにすることが好ましい。発酵槽内圧力、炭酸ガス又は炭酸ガスを含む混合ガスの供給量、又は制限された給気量は、例えば培地中の重炭酸イオン又は炭酸イオンを測定することや、pHやアンモニア濃度を測定することによって、決定することができる。

【0081】

50

上記態様においては、培養中の培地のpHが6.0~9.0、好ましくは6.5~8.0、培養終了時の培地のpHが7.2~9.0となるように制御する。上記態様によれば、従来の方法に比べて、カウンタイオンとして必要な量の重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを培地中に存在させるための培地のpHを低く抑えることが可能となる。アンモニアでpHを制御する場合、pHを高めるためにアンモニアが供給され、塩基性アミノ酸のN源となり得る。培地に含まれる塩基性アミノ酸以外のカチオンとしては、培地成分由来のK、Na、Mg、Ca等が挙げられる。これらは、好ましくは総カチオンの50%以下であることが好ましい。

【0082】

また、発酵中の発酵槽内圧力が正となるようにするには、例えば、給気圧を排気圧より高くすればよい。発酵槽内圧力を正にすることによって、発酵により生成する炭酸ガスが培養液に溶解し、重炭酸イオン又は炭酸イオンを生じ、これらは塩基性アミノ酸のカウンタイオンとなり得る。発酵槽内圧力として具体的には、ゲージ圧(大気圧に対する差圧)で、0.03~0.2MPa、好ましくは0.05~0.15MPa、さらに好ましくは0.1~0.3MPaが挙げられる。また、培養液に炭酸ガス、又は炭酸ガスを含む混合ガスを供給することによって、培養液に炭酸ガスを溶解させてもよい。さらには、培養液に炭酸ガス又は炭酸ガスを含む混合ガスを供給しつつ、発酵槽内圧力が正となるように調節してもよい。

【0083】

発酵槽内圧力を正に調節するには、例えば、給気圧を排気圧よりも高くするように設定すればよい。また、培養液に炭酸ガスを供給する場合は、例えば、純炭酸ガス、又は炭酸ガスを5体積%以上含む混合ガスを吹き込めばよい。

【0084】

尚、培地に重炭酸イオン及び/又は炭酸イオンを溶解させる上記の方法は、単独でもよいし、複数を組み合わせてもよい。

【0085】

従来法では、通常、生成する塩基性アミノ酸のカウンタアニオンとすべく、十分量の硫酸アンモニウムや塩化アンモニウムが、又、栄養成分として蛋白等の硫酸分解物もしくは塩酸分解物が培地に添加され、これらから与えられる硫酸イオン、塩化物イオンが培地に含まれる。従って、弱酸性である炭酸イオン濃度は培養中極めて低く、ppm単位である。上記態様では、これら硫酸イオン、塩化物イオンを減じ、微生物が発酵中に放出する炭酸ガスを上記発酵環境にて培地中に溶解せしめ、カウンタイオンとすることに特徴がある。したがって、上記態様においては、硫酸イオンや塩化物イオンを生育に必要な量以上培地に添加する必要はない。好ましくは、培養当初は硫酸アンモニウム等を培地に適量フィードし、培養途中でフィードを止める。あるいは、培地中の炭酸イオン又は重炭酸イオンの溶存量とのバランスを保ちつつ、硫酸アンモニウム等をフィードしてもよい。また、塩基性アミノ酸の窒素源として、アンモニアを培地にフィードしてもよい。アンモニアは、単独で、又は他の気体とともに培地に供給することができる。

【0086】

培地に含まれる重炭酸イオン及び/又は炭酸イオン以外の他のアニオンの濃度は、微生物の生育に必要な量であれば、低いことが好ましい。このようなアニオンには、塩化物イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、イオン化した有機酸、及び水酸化物イオン等が挙げられる。これらの他のイオンのモル濃度の合計は、好ましくは通常は900mM以下、より好ましくは700mM以下、特により好ましくは500mM以下、さらに好ましくは300mM以下、特に好ましくは200mM以下である。

【0087】

上記態様においては、硫酸イオン、及び/又は、塩化物イオンの使用量を削減することが目的の一つであり、培地に含まれる硫酸イオンもしくは塩化物イオン、又はこれらの合計は、通常、700mM以下、好ましくは500mM以下、より好ましくは300mM以下、さらに好ましくは200mM以下、特に好ましくは100mM以下である。

【0088】

通常は、塩基性アミノ酸のカウンティオン源として培地に硫酸アンモニウムを添加すると、硫酸イオンによって培養液中の炭酸ガスが放出してしまう。それに対して、上記態様においては、過剰量の硫酸アンモニウムを培地に添加する必要がないので、炭酸ガスを発酵液中に容易に溶解させることができる。

【0089】

また、上記態様においては、「塩基性アミノ酸の生産を阻害しない」程度に培地中の総アンモニア濃度を制御することが好ましい。そのような条件としては、例えば、最適な条件において塩基性アミノ酸を生産する場合の収率及び/又は生産性に比べて、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、特に好ましくは90%以上の収率及び/又は生産性が得られる条件が含まれる。具体的には、培地中の総アンモニア濃度としては、好ましくは300mM以下、より好ましくは250mM、特に好ましくは200mM以下の濃度が挙げられる。アンモニアの解離度はpHが高くなると低下する。解離していないアンモニアは、アンモニウムイオンよりも菌に対して毒性が強い。そのため、総アンモニア濃度の上限は、培養液のpHにも依存する。すなわち、培養液のpHが高いほど、許容される総アンモニア濃度は低くなる。したがって、前記「塩基性アミノ酸の生産を阻害しない」総アンモニア濃度は、pH毎に設定することが好ましい。しかし、培養中の最も高いpHにおいて許容される総アンモニア濃度範囲を、培養期間を通じての総アンモニア濃度の上限値範囲としてもよい。

10

【0090】

一方、微生物の生育及び塩基性物質の生産に必要な窒素源としての総アンモニア濃度としては、培養中にアンモニアが継続して枯渇しない窒素源が不足することにより微生物による目的物質の生産性を低下させない限り特に制限されず、適宜設定することができる。例えば、培養中にアンモニア濃度を経時的に測定し、培地中のアンモニアが枯渇したら少量のアンモニアを培地に添加してもよい。アンモニアを添加したときの濃度としては、特に制限されないが、例えば、総アンモニア濃度として好ましくは1mM以上、より好ましくは10mM以上、特に好ましくは20mM以上の濃度が挙げられる。

20

【0091】

本発明で用いられる培地は、栄養源として炭素源、窒素源とを含んでいれればいずれでもよい。また、本発明の方法は、回分培養(batch culture)、流加培養(Fed-batch culture)、連続培養法(continuous culture)のいずれも用いることができる。

30

【0092】

上記流加培養とは、培養中の容器に培地を連続的又は間欠的に流加し、培養終了時までその培地を容器から抜き取らない培養方法をいう。また、連続培養とは、培養中の容器に培地を連続的又は間欠的に流加するとともに、容器から培地(通常、流加する培地と当量)を抜き取る方法をいう。また、本明細書において「初発培地」とは、流加培養又は連続培養において流加培地を流加させる前の回分培養(batch培養)に用いる培地のことを意味し、「流加培地」とは、流加培養又は連続培養を行う際に発酵槽に供給する培地のことを意味する。流加培地は、微生物の生育に必要な成分の全てを含んでいてもよいが、一部のみを含むものであってもよい。また、本明細書において「発酵培地」とは、発酵槽中の培地を意味し、この発酵培地から目的物質が回収される。また、本明細書において、「発酵槽」とは、塩基性アミノ酸生産を行う器を意味し、その形状は問わず、発酵タンクを用いてもジャーファーマンターを用いてもよい。また、その容量は目的物質を生成・回収できる容量であればいずれでもよい。

40

【0093】

本発明に用いられる培地に含まれる炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用でき、特にグルコース、スクロースが好ましい。その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール、メタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いることができる。また、炭素源となる原料としては、ケインモラセス、ビートモ

50

ラセス、ハイテストモラセス、シトラスモラセス、転化糖を用いてもよいし、セルロース、デンプン、コーン、シリアル、タピオカ等の天然原料の加水分解物を用いてもよい。また培養液中に溶存した二酸化炭素も炭素源として使用出来る。これらの炭素源が初発培地にも流加培地にも用いることができる。培地中にこれらの炭素源を1種のみ含んでいてもよいし、2種以上含んでいてもよい。また、初発培地、流加培地とも、同じ炭素源を用いてもよいし、流加培地の炭素源を初発培地と変更してもよい。例えば、初発培地の炭素源をグルコースとし、流加培地の炭素源をスクロースとする場合である。

【0094】

本発明の培地中に含まれる窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ウレア等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用することができ、pH調整に用いられるアンモニアガス、アンモニア水も窒素源として利用できる。また、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、大豆加水分解物等も利用出来る。培地中にこれらの窒素源を1種のみ含んでいてもよいし、2種以上含んでいてもよい。これらの窒素源は、初発培地にも流加培地にも用いることができる。また、初発培地、流加培地とも、同じ窒素源を用いてもよいし、流加培地の窒素源を初発培地と変更してもよい。

10

【0095】

また本発明の培地には、炭素源、窒素源の他にリン酸源を含んでいることが好ましい。リン酸源としては、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム、ピロリン酸などのリン酸ポリマー等が利用出来る。

20

【0096】

また本発明の培地には、炭素源、窒素源の他に、増殖促進因子(増殖促進効果を持つ栄養素)を含んでいてもよい。増殖促進因子とは、微量金属類、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用できる。特に芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸の場合、生合成系が共通しているので、微生物が後述のように、目的アミノ酸以外の生合成が弱化されている場合がある。このような場合、生合成系が弱化されたアミノ酸を培地中に添加することが好ましい。例えば目的アミノ酸がL-リジンの場合、L-メチオニン、L-スレオニン、L-イソロイシンである。

【0097】

微量金属類としては、鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等が挙げられ、ビタミンとしては、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12、ピリドキシン、パントテン酸等が挙げられる。これらの増殖促進因子は初発培地に含まれていてもよいし、流加培地に含まれていてもよい。

30

【0098】

また本発明の培地には、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。特に本発明に用いることができるL-アミノ酸生産菌は、後述のようにL-アミノ酸生合成経路が強化されており、L-アミノ酸分解能が弱化されているものが多いので、L-リジン、L-ホモセリン、L-イソロイシン、L-メチオニンから選ばれる1種又は2種以上を添加することが望ましい。核酸生産菌についても同様に、必要な物質を培地に添加することが好ましい。

40

【0099】

初発培地と流加培地は、培地組成が同じであってもよく、異なってもよい。また、初発培地と流加培地の両方が種晶を含む場合は、種晶の濃度が同じであってもよく、異なってもよい。さらには、流加培地の流加が多段階で行われる場合、各々の流加培地の組成は同じであってもよく、異なってもよい。

【0100】

培養は、発酵温度20~45、特に好ましくは30~42で通気培養を行うことが好ましい。

【0101】

50

培養終了後の培養液からL-アミノ酸を採取する方法は、公知の回収方法、例えばイオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより行うことができる。また、L-アミノ酸が培地中に析出する場合は、遠心分離又は濾過等により回収することができる。また、培地中に析出したL-アミノ酸は、培地中に溶解しているL-アミノ酸を晶析した後に、併せて単離してもよい。

【0102】

本発明においては、L-アミノ酸蓄積を一定以上に保つために、微生物の培養を種培養と本培養とに分けて行ってもよく、種培養をフラスコ等を用いたしんとう培養、又は回分培養で行い、本培養を流加培養、回分培養又は連続培養で行ってもよく、種培養、本培養ともに回分培養で行ってもよい。また、種培養及び本培養に先立って、1回、2回又はそれ以上の前培養を行い、順次スケールアップしてもよい。

10

【0103】

これらの培養法の場合、予定したL-アミノ酸濃度に到達したときに、L-アミノ酸を一部引き抜いて、新たに培地を添加して繰り返し培養を行ってもよい。新たに添加する培地とは、炭素源及び増殖促進効果を持つ栄養素（増殖促進因子）を含む培地が好ましい。添加する培地の炭素源としては、グルコース、スクロース、フルクトース、増殖促進因子としては、窒素源、リン酸、アミノ酸等が好ましい。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ウレア等のアンモニウム塩または硝酸塩等を使用することができる。またリン酸源としては、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウムが使用でき、アミノ酸としては、栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

20

【0104】

本発明において、流加培養あるいは、連続培養を行う際には、一時的に糖や栄養源の供給が停止するように間欠的に流加培地を流加してもよい。また、流加を行う時間の最大で30%以下、望ましくは20%以下、特に望ましくは10%以下で流加培地の供給を停止することが好ましい。流加培地を間欠的に流加させる場合には、流加培地を一定時間添加し、2回目以降の添加はある添加期に先行する添加停止期において発酵培地中の炭素源が枯渇するときのpH上昇または溶存酸素濃度の上昇がコンピューターで検出されるときに開始するように制御を行い、培養槽内の基質濃度を常に自動的に低レベルに維持してもよい（米国特許5,912,113号明細書）。流加培地の炭素源は、前記と同様である。また、流加培地は1種でもよく、2種以上の培地を混合してもよい。2種以上の流加培地を用いる場合、それらの培地は混合して1つのフィード缶により流加させてもよいし、複数のフィード缶で流加させてもよい。

30

【0105】

また、流加培養を行う際に、糖の量が、流加培養液あるいは発酵培地全体の炭素源量として、30g/Lを超えない程度で流加させることが好ましく、20g/L以下、10g/L以下で制御することが好ましい。特に、微生物の対数増終了時以降に、糖濃度が前記濃度範囲となるように制御することが好ましい。炭素源の流加速度は、米国特許5,912,113号明細書記載の方法を用いて制御することが出来る。また、糖とリン酸が菌体生育の制限因子となる濃度で糖とリン酸を流加することが好ましく、流加培養液に含まれるリン酸の量としては、P/C ratioで2以下、好ましくは1.5以下、さらに好ましくは1以下である（米国特許5,763,230号明細書参照）。

40

【0106】

本発明で連続培養法を用いる場合には、引き抜きは流加と同時にしてもよいし、一部引き抜いたあとで流加を行ってもよい。また培養液をL-アミノ酸と細胞を含んだまま引き抜いて、細胞だけ発酵槽に戻す菌体を再利用する連続培養法でもよい（フランス特許2669935号明細書参照）。連続的あるいは間欠的に栄養源を流加する方法は流加培養と同様の方法が用いられる。

【0107】

ここで、培養液を間欠的に引き抜く場合には、予定したL-アミノ酸濃度に到達したと

50

きに、L-アミノ酸を一部引き抜いて、新たに培地を流加して培養を行う。また、添加する培地の量は、最終的に引き抜く前の培養液量と同量になるように培養することが好ましい。ここで同量とは、引き抜く前の培養液量と93～107%の程度の量を意味する。

【0108】

培養液を連続的に引き抜く場合には、栄養培地を流加させると同時に、あるいは流加させたあとに開始することが望ましく、例えば開始時間としては最大で流加を始めた5時間後、望ましくは3時間後、さらに望ましくは最大で1時間後である。また引き抜く培養液量としては、流加させる量と同量で引き抜くことが好ましい。

【0109】

菌体を再利用する連続培養法とは、予定したL-アミノ酸濃度に達したときに、発酵培地を間欠的あるいは連続して引き抜き、L-アミノ酸のみを取り出し、菌体を含む過剰残留物若しくは遠心上澄み液を発酵槽中に再循環させる方法であり、例えばフランス特許2669935号明細書を参照にして実施することができる。

10

【0110】

本発明により得られる塩基性アミノ酸を含む発酵液は、好ましくは、炭酸イオン及び/又は重炭酸イオンを、下記式で表される規定度比率が5～100%となるように含有している。

【0111】

【数1】

$$\text{規定度比率} = \frac{\text{重炭酸イオン及び/または炭酸イオンの規定度}}{\text{塩基性アミノ酸を主とするカチオンの規定度}} \times 100$$

20

【0112】

培地中の炭酸イオン及び重炭酸イオンは、熱を加えることによって炭酸ガスとして放出される。したがって、この発酵液中の固形成分に占める塩基性アミノ酸の含量が高められる。また、発酵液に炭酸より強い酸を加えれば、容易に炭酸と置換できるため、多様な塩形態が選択できる。

【実施例】

【0113】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

30

【0114】

〔実施例1〕 gltP遺伝子又はgltS遺伝子増強用プラスミドの構築

エシェリヒア・コリK-12株のゲノムの全塩基配列 (Genbank Accession No. U00096) は既に明らかにされている (Science, 277, 1453-1474 (1997))。目的遺伝子の増幅を行うためにプラスミドベクターpMW118 (ニッポンジーン社製) を用いた。本プラスミドは、任意の遺伝子をクローニングするためのマルチクローニングサイトを有しており、これらのサイトを利用して遺伝子をクローニングし、遺伝子の増幅が可能なプラスミドである。

【0115】

エシェリヒア・コリのゲノム配列のgltP又はgltS遺伝子及びその周辺領域の塩基配列に基づいて、gltP増幅のため、5'側プライマーとして配列番号8に示す合成オリゴヌクレオチド、3'側プライマーとして配列番号9に示す合成オリゴヌクレオチドを、gltS増幅のため、5'側プライマーとして配列番号10に示す合成オリゴヌクレオチド、3'側プライマーとして配列番号11に示す合成オリゴヌクレオチドを、それぞれ合成した。これらのプライマーを用い、エシェリヒア・コリ K-12 MG1655株のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、gltP及びgltS遺伝子をそれぞれ含む遺伝子断片を得た。精製したPCR産物を平滑末端化し、SmaIで消化したベクターpMW118に連結してgltP増幅用プラスミドpMW-gltP、及びgltS増幅用プラスミドpMW-gltSを構築した。

40

【0116】

〔実施例2〕 WC196 cadA ldcC株のybjE遺伝子の増強

50

L - リジン生産菌の親株としてとして、国際公開第2006/078039号パンフレット記載のエシェリヒア・コリWC196 *cadA ldcC*を使用した。この菌株は、エシェリヒア・コリWC196のリジンデカルボキシラーゼ遺伝子*cadA*及び*ldcC*を、Red-driven integration法 (Datsenko, K. A, and Wanner, B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:6640-6645 (2000)) と ファージ由来の切り出しシステム (J. Bacteriol. 184. 5200-5203 (2002)) を組み合わせた方法により、破壊した株である。本菌株は、平成20年10月7日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) に、受託番号FERM BP-11027として寄託されている。

【0117】

L - リジン排出活性を持つYbjEタンパク質の活性を増強することでL - リジン生産能が向上することが知られている (米国特許出願公開2006-0019355号公報)。そこでWC196 *cadA ldcC*株の染色体上のybjE遺伝子のプロモーターを *tac* プロモーターへ、またリボゾーム結合部位 (RBS) を *lac* 遺伝子の上流配列由来の配列へ、それぞれ改変することによりybjE遺伝子の発現の増強を行った。

10

【0118】

WC196 *cadA ldcC*株のybjE遺伝子のプロモーター及びRBS配列の改変は、前記Red-driven integration法と ファージ由来の切り出しシステムを組み合わせた方法によって行った。具体的には、ybjE遺伝子 (配列番号5) の開始コドン (塩基番号49 ~ 51) の上流157bpを配列番号7の配列に置換した。目的の遺伝子置換が生じた株は、カナマイシン耐性を指標として選択することができる。候補株において目的の遺伝子置換が起きていることをPCRによって確認した。得られたybjE遺伝子のプロモーター及びRBS配列の改変株をWC196LCY株と名づけた。

20

【0119】

〔実施例3〕エシェリヒア属細菌L - リジン生産株での*gl tP*、*gl tS*遺伝子増幅の効果
< 3 - 1 > WC196LCY株へのリジン生産用プラスミド導入

WC196LCY株を*dapA*、*dapB*及び*lysC*遺伝子を搭載したリジン生産用プラスミドpCABD2 (EP 0733710パンフレット) で常法に従い形質転換し、WC196LCY/pCABD2株を得た。pCABD2は、L - リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS) をコードするDNA と、L - リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のアスパルトキナーゼII IをコードするDNAと、エシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードするDNAと、及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNAを有している

30

【0120】

WC196LCY/pCABD2株を、実施例1で作製した*gl tP*増幅用プラスミドpMW-*gl tP*及び*gl tS*増幅用プラスミドpMW-*gl tS*でそれぞれ形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。各形質転換株に所定のプラスミドが導入されていることを確認し、*gl tP*増幅用プラスミドpMW-*gl tP*導入株をWC196LCY/pCABD2/pMW-*gl tP*株、*gl tS*増幅用プラスミドpMW-*gl tS*導入株をWC196LCY/pCABD2/pMW-*gl tS*株と名づけた。また、対照としてpMW118で形質転換された株を作製し、WC196LCY/pCABD2/pMW118と名づけた。

40

【0121】

上記で作製した株を25 mg/Lのストレプトマイシンと100 mg/Lのアンピシリンを含むLB培地にてOD600が約0.6となるまで37 °Cにて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注、-80 °Cに保存し、グリセロールストックとした。

【0122】

< 3 - 2 > リジン生産培養

上記のグリセロールストックを融解し、各500 µLを、25 mg/Lのストレプトマイシンと100 mg/Lのアンピシリンを含むLプレートに均一に塗布し、37 °Cにて24時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、500 mL容坂口フラスコの、25 mg/Lのストレプトマ

50

イシンと100 mg/Lのアンピシリンを含む以下に記載の発酵培地の20 mLに接種し、往復振とう培養装置で37 °Cにおいて22時間培養した。培養後、培地中に蓄積したL-リジン及びL-グルタミン酸の量をバイオテックアナライザーAS210（サクラ精機）により測定した。培養に用いた培地組成を以下に示す。

【 0 1 2 3 】

[L-リジン生産培地]

グルコース	40 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	24 g/L	
KH ₂ PO ₄	1.0 g/L	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g/L	10
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g/L	
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.08 g/L	
Yeast Extract	2.0 g/L	
L-isoleucine	0.1 g/L	
NaCl	1.0 g/L	
CaCO ₃ (日本薬局方)	50 g/L	

KOHでpH7.0に調整し、115 °Cで10分オートクレーブを行なった。但し、グルコースとMgSO₄ · 7H₂Oは混合し、他の成分とは別に殺菌した。CaCO₃は乾熱滅菌後に添加した。

培養22時間目のL-リジン収率、及びL-グルタミン酸濃度を、対照であるWC196LCY/pCABD2/pMW118の値を100とした相対値にて、表3に示す。

【 0 1 2 4 】

【表3】

表3：L-リジン生産菌WC196LCY/pCABD2におけるgltPまたはgltSの増幅効果

菌株	L-リジン収率(相対値)	L-グルタミン酸濃度(相対値)
WC196LCY/pCABD2/pMW118	100	100
WC196LCY/pCABD2/pMW-gltP	99	47
WC196LCY/pCABD2/pMW-gltS	100	55

【 0 1 2 5 】

gltP遺伝子増幅株WC196LCY/pCABD2/pMW-gltP及びgltS遺伝子増幅株WC196LCY/pCABD2/pMW-gltSは、対照のWC196LC/pCABD2/pMW118と比べて、L-リジン収率が低下することなく、L-グルタミン酸副生量が低減した。

【 0 1 2 6 】

[実施例4] エシェリヒア属細菌L-スレオニン生産株でのgltPまたはgltS増幅の効果

エシェリヒア・コリのL-スレオニン生産株として、エシェリヒア・コリB-5318株(欧州特許第0593792号明細書参照)を用いることができる。B-5318株は、1990年5月3日にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオ-ガニズム(Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNI Genetika)に登録番号VKPM B-5318のもとに寄託されている。このVKPM B-5318株は、イソロイシン非要求性菌株であり、ラムダファ-ジの温度感受性C1リプレッサー、PRプロモ-ターおよびCroタンパク質のN末端部分の下流に、本来持つ転写調節領域であるアテニューエーター領域を欠失したスレオニンオペロンすなわちスレオニン生合成関与遺伝子が位置し、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファ-ジのリプレッサーおよびプロモ-ターにより支配されるように構築された組換えプラスミドDNAを保持している。

【 0 1 2 7 】

B-5318株を、実施例1で作製したgltP増幅用プラスミドpMW-gltP及びgltS増幅用プラスミドpMW-gltSでそれぞれ形質転換し、アンピシリン耐性株を得る。各形質転換株に所定のプラスミドが導入されていることを確認し、gltP増幅用プラスミドpMW-gltP導入株をB-5318/pMW-gltP株、gltS増幅用プラスミドpMW-gltS導入株をB-5318/pMW-gltS株と名づける。

対照としてはベクター-pMW118を導入した株B-5318/pMW118株を用いる。

【 0 1 2 8 】

上記で作製した株を100 mg/Lのアンピシリンを含むLB培地にてOD600が約0.6となるまで37 °Cにて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注、-80 °Cに保存し、グリセロールストックとする。

【 0 1 2 9 】

これらの株のグリセロールストックを融解し、各100 µg/Lを、100 mg/Lのアンピシリンを含むLプレートに均一に塗布し、37 °Cにて24時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、500 mL容坂口フラスコの、25 mg/Lのカナマイシンを含む以下に記載の発酵培地の20 mLに接種し、往復振とう培養装置で40 °Cにおいて18時間培養する。培養後、培地中に蓄積したL-スレオニン及びL-グルタミン酸の量をアミノ酸アナライザーL-8500 (Hitachi社製)を用いて測定する。培養に用いる培地組成を以下に示す。

【 0 1 3 0 】

[L-スレオニン生産培地]

グルコース	40g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16g/L
KH ₂ PO ₄	1.0g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g/L
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g/L
Yeast Extract	2.0g/L
CaCO ₃ (日本薬局方)	30g/L

KOHでpH7.0に調整し、120 °Cで20分オートクレーブを行なう。但し、グルコースとMgSO₄ · 7H₂Oは混合し、別殺菌する。CaCO₃は乾熱滅菌後に添加する。

【 0 1 3 1 】

[配列表の説明]

- 配列番号 1 : gltP遺伝子配列
- 配列番号 2 : GltPアミノ酸配列
- 配列番号 3 : gltS遺伝子配列
- 配列番号 4 : GltSアミノ酸配列
- 配列番号 5 : ybjE遺伝子配列
- 配列番号 6 : YbjEアミノ酸配列
- 配列番号 7 : ybjE上流置換配列
- 配列番号 8 : gltP増幅用プライマー (5 ' 側)
- 配列番号 9 : gltP増幅用プライマー (3 ' 側)
- 配列番号10 : gltS増幅用プライマー (5 ' 側)
- 配列番号11 : gltS増幅用プライマー (3 ' 側)
- 配列番号12 : gltP保存配列
- 配列番号13 : gltS保存配列

【 配列表 】

[2012029565000001.app](#)

10

20

30

40

フロントページの続き

(72)発明者 若狭 由織

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 竹下 亮

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA72 CA02 DA06 EA04 FA02 FA13

4B064 AE25 CA02 CA19 CC24 DA10