



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0034023
(43) 공개일자 2007년03월27일

(21) 출원번호 10-2007-0017878(분할)
(22) 출원일자 2007년02월22일
 심사청구일자 2007년02월22일
(62) 원출원 특허10-1999-0064627
 원출원일자 : 1999년12월29일 심사청구일자 2004년12월28일

(30) 우선권주장 98124016 1998년12월30일 러시아(RU)
 99104431 1999년03월09일 러시아(RU)

(71) 출원인 아지노모토 가부시카가이샤
 일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15반1고

(72) 발명자 리브쉬츠 비탈리 아르카디에비치
 러시아 113208 모스크바 섬스코이 프로예즈드 5 코르푸스 1케이뷔 84
 자카타에바 나탈리아 파블로브나
 러시아 117421 모스크바 울리차 노바토로브 40 코르푸스 8 케이뷔27
 나카니시 가즈오
 일본 요코하마시 사카에쿠 구덴초 873-5 구덴하이쓰 1-126
 알레쉴 블라디미르 베니아미노비치
 러시아 249010 보로브스크 칼루가 리전 포스 인스티투트 6
 트로쉴 페트르 블라디미로비치
 러시아 115561 모스크바 쉬필로브스키 피알 67 케이뷔 129
 토크마코바 이리나 라이보브나
 러시아 143513 모스크바 리전 이스르트린스키 알-엔 에스/피비소트카
 1 케이뷔 26

(74) 대리인 이병호

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) L-아미노산의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 에스케리치아 속에 속하고 L-아미노산의 생산능을 가지며, 이때 L-아미노산의 생산능이 L-아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 향상되는 세균, 및 이를 사용하여 L-아미노산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

L-아미노산 생산능이 하기 (E) 및 (F)의 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 증진되는, 에스케리치아 속에 속하고 L-아미노산 생산능을 갖는 세균.

(E) 서열목록에서 서열번호 14에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질; 및

(F) (E)의 단백질을 암호화하는 DNA를 돌연변이 처리하고, 단백질을 갖는 세균의 L-아미노산의 생산능이 증진된 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 돌연변이 DNA를 스크리닝함으로써 수득될 수 있는 DNA에 의해 암호화된 단백질.

청구항 2.

제1항에 있어서, L-아미노산이 L-글루타민산, L-히스티딘, L-프롤린 또는 L-트레오닌인 세균.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포 내 단백질을 암호화하는 DNA 복제수가 증가된 세균.

청구항 4.

제3항에 있어서, DNA가 세포내에서 다중 복제(multicopy) 벡터상에 존재하는 세균.

청구항 5.

제3항에 있어서, DNA가 세포내 트랜스포존상에 존재하는 세균.

청구항 6.

제1항에 따른 세균을 배양 배지에서 배양하여 배지내 L-아미노산을 생산하고 축적시키는 단계; 및 배지로부터 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하여 L-아미노산을 생산하는 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, L-아미노산이 L-글루타민산, L-히스티딘, L-프롤린 또는 L-트레오닌인 방법.

청구항 8.

제6항 또는 제7항에 있어서, 세균 세포 내에서 단백질을 암호화하는 DNA의 복제수가 증가된 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, DNA가 세포내 다중 복제 벡터상에 존재하는 방법.

청구항 10.

제8항에 있어서, DNA가 세포내 트랜스포존상에 존재하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 아미노산을 생산하는 방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 에스케리치아(*Escherichia*) 속에 속하는 L-아미노산 생산 세균 및 이를 사용하여 L-아미노산, 더욱 특히 L-글루타민산, L-라이신, L-트레오닌, L-알라닌, L-히스티딘, L-프롤린, L-아르기닌, L-발린 및 L-이소류신을 생산하는 방법에 관한 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

발효시킴으로써 L-아미노산을 생산하기 위해, 천연으로부터 분리한 균주 또는 이러한 균주의 인공적인 돌연변이체가 생산성을 개선시키는데 사용되어 왔다. 예를 들어, L-라이신의 경우에, L-라이신을 생산하는 많은 인공적인 돌연변이체가 공지되어 있고 이들의 대부분은 S-2-아미노에틸시스테인(AEC)에 내성인 돌연변이체이고 브레비박테리움(*Brevibacterium*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 바실러스(*Bacillus*) 또는 에스케리치아 속에 속한다. 또한 아미노산 생산을 증진시키기 위한, 예를 들면, 재조합 DNA를 사용하여 수득된 형질전환체의 사용(문헌[참조: 미국 특허 제 4,278,765호])과 같은 다양한 기술이 제안되어왔다.

상기 기술은 대부분 아미노산 생합성 경로에 관여하는 효소의 활성 증진, 효소가 억제되지 않도록 탈감작된 효소로의 전환 등을 기초로한 것이다(에스케리치아 속에 속하는 세균에 관하여, 일본 특허 공개공보 제(소)56-18596호(1981) 및 국제 특허 공보 제WO 95/16042호를 참조한다).

한편, 아미노산 분비 단백질을 증진시킴으로써 아미노산 생산능을 개선시키는 예로써, L-라이신 분비 유전자, *lysE*가 증진된, 코리네박테리움 속에 속하는 세균이 공지되어 있다. 그러나, 에스케리치아 속에 속하는 세균에 관하여, L-아미노산 분비 단백질의 존재 여부는 불분명하다. 따라서 L-아미노산 분비 단백질의 증강이 에스케리치아 속에 속하는 세균을 사용하여 L-아미노산 생산에 있어 효과적인지의 여부는 불분명하다.

에스케리치아 속에 속하는 이. 콜리 균주 K-12의 전체 뉴클레오타이드 서열이 이미 결정되었다 하더라도(문헌[참조: Science, 277, 1453-1474(1997)]), 기능이 불분명한 다수의 단백질이 있다.

발명의 구성

본 발명의 목적은 L-아미노산 분비에 관여하는 단백질을 수득하고, 이로써 L-아미노산 생산능이 개선된 균주를 제공하고 발효에 의해 L-아미노산을 생산하는 방법을 개선시키는 것이다.

본 발명자는 L-아미노산 분비에 관여하는 단백질에 대해 스크리닝(screening)하였다. 결과로서 본 발명자는 특정 유전자가 증강되는 경우 소모된 당을 근거로 한 L-아미노산의 수율이 향상됨을 밝혔다. 상기 발견을 기초로하여 본 발명이 완성되었다.

따라서, 본 발명은 에스케리치아 속에 속하고 L-아미노산 생산능을 갖는 세균(이후부터 본 발명의 세균으로서 언급됨)을 제공하며, 이때 L-아미노산 생산능은 (A) 내지 (H)의 하기 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 증진된다:

- (A) 서열목록에서 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질;
- (B) 서열목록에서 서열번호 10에 나타난 아미노산 서열 중 한개 또는 수개의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 단백질을 갖는 세균의 L-아미노산의 생산능을 증진시키는 활성을 나타내는 단백질;
- (C) 서열목록에서 서열번호 12에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질;
- (D) 서열목록에서 서열번호 12에 나타난 아미노산 서열 중 한개 또는 수개의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함한 아미노산 서열을 갖고, 단백질을 갖는 세균의 L-아미노산의 생산능을 증진시키는 활성을 나타내는 단백질;
- (E) 서열목록에서 서열번호 14에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질;
- (F) 서열목록에서 서열번호 14에 나타난 아미노산 서열 중 한개 또는 수개의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함한 아미노산 서열을 갖고, 단백질을 갖는 세균의 L-아미노산의 생산능을 증진시키는 활성을 나타내는 단백질;
- (G) 서열목록에서 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열을 갖는 단백질; 또는
- (H) 서열목록에서 서열번호 16에 나타난 아미노산 서열 중 한개 또는 수개의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함한 아미노산 서열을 갖고, 단백질을 갖는 세균의 L-아미노산의 생산능을 증진시키는 활성을 나타내는 단백질.

본 발명의 세균은 바람직하게 단백질 (A) 내지 (D), (G) 및 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-라이신 생산 세균; 단백질 (A) 내지 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-글루타민산 생산 세균; 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-알라닌 생산 세균; 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-발린 생산 세균; 상기 단백질 (C) 내지 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현량이 증가된 L-히스티딘 생산 세균; 상기 단백질 (A) 내지 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-프롤린 생산 세균; 상기 단백질 (E) 및 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-트레오닌 생산 세균; 상기 단백질 (G) 및 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-아르기닌 생산 세균; 또는 상기 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-이소류신 생산 세균이다.

바람직하게 본 발명의 세균에서, 세포내에서의 상기 단백질을 암호화하는 DNA의 복제수가 증가된다. DNA는 바람직하게는 세포내 다중 복제(multicopy) 벡터 또는 세포내 트랜스포존상에 존재한다.

또한 본 발명은 배양배지에서 본 발명의 세균을 배양시켜 배지중에 L-아미노산을 생산하고 축적시키는 단계; 및 배지에서 L-아미노산을 회수하는 단계를 포함하는 L-아미노산의 생산 방법(이후부터, 본 발명의 방법으로서 언급됨)을 제공한다.

본 발명의 방법은 바람직하게 단백질 (A) 내지 (D), (G) 및 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-라이신 생산 세균을 사용하는 L-라이신의 생산 방법; 단백질 (A) 내지 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-글루타민산 생산 세균을 사용하는 L-글루타민산의 생산 방법; 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-알라닌 생산 세균을 사용하는 L-알라닌의 생산 방법; 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-발린 생산 세균을 사용하는 L-발린의 생산 방법; 상기 단백질 (C) 내지 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현량이 증가된 L-히스티딘 생산 세균을 사용하는 L-히스티딘의 생산 방법; 상기 단백질 (A) 내지 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-프롤린 생산 세균을 사용하는 L-프롤린의 생산 방법; 상기 단백질 (E) 및 (F)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-트레오닌 생산 세균을 사용하는 L-트레오닌의 생산 방법; 상기 단백질 (G) 및 (H)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-아르기닌 생산 세균을 사용하는 L-아르기닌의 생산 방법; 또는 상기 단백질 (C) 및 (D)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현량이 증가된 L-이소류신 생산 세균을 사용하는 L-이소류신의 생산 방법이다.

바람직하게 본 발명의 방법에서, 세균의 세포내에서의 상기 단백질을 암호화하는 DNA의 복제수가 증가된다. DNA는 바람직하게 세포내 다중 복제 벡터 또는 세포내 트랜스포존상에 존재한다.

본 발명에 따라, 에스케리치아 속에 속하는 세균의 L-아미노산의 생산능은 증진될 수 있다. 또한 L-아미노산의 생산 방법은 L-아미노산 생산율에 있어서 개선될 수 있다.

본 발명은 하기에서 상세하게 설명된다. 이후에 다른 언급이 없는 경우 아미노산은 L-배위이다.

<1> 본 발명의 세균

본 발명의 세균은 에스케리치아 속에 속하고 아미노산 생산능을 가지며, 이때 아미노산 생산능은 세균의 아미노산 생산능을 증진시키는 활성을 갖거나 아미노산 또는 아미노산 동족체에 대한 내성을 증진시키는 활성을 갖는 단백질의 발현량을 증가시키므로써 증진되는 세균이다. 이후부터, 단백질은 편의를 위해 아미노산 분비 단백질로서 언급된다. 그러나, 상기 용어는 단백질의 기능이 아미노산 분비로 제한된다는 것을 의미하지는 않는다.

아미노산 분비 단백질의 예는 서열번호 10으로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질, 서열번호 12로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질, 서열번호 14로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 서열번호 16으로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다.

아미노산 분비 단백질은 아미노산에 대해 선택성을 가질 수 있다. 각각의 아미노산에 대해 적합한 아미노산 분비 단백질은 에스케리치아 속에 속하고 아미노산 생산능을 갖는 세균내에서 아미노산 분비 단백질을 발현시키고 아미노산 수율의 증가를 측정하거나 아미노산 또는 아미노산 동족체에 대한 최소 억제 농도(MIC)의 증가를 측정함으로써 결정될 수 있다.

예를 들어, 라이신의 경우에, 서열번호 10, 12 또는 16으로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 글루타민산의 경우에 서열번호 10, 12, 14 또는 16으로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 알라닌의 경우에 서열번호 12로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 발린의 경우에, 서열번호 12로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 히스티딘의 경우에 서열번호 12 또는 14로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 프롤린의 경우에 서열번호 10, 12 또는 14로 나타낸 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 트레오닌의 경우에 서열번호 14로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 아르기닌의 경우에 서열번호 16으로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이고; 이소류신의 경우에 서열번호 12로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질이 효과적이다.

본원에서 사용되는 "발현량이 증가된"이란 용어는 통상적으로 발현량이 이. 콜리 야생형 균주(예: MG1655 또는 W3110 균주)에서 보다 크다는 것을 의미한다. 또한 상기 용어는 균주가 유전자 재조합 기술 등과 같은 변형을 통해 수득되는 경우 발현량이 변형 전보다 크다는 것을 의미한다. 아미노산 분비 단백질의 발현량은 직접적으로 아미노산 분비 단백질을 측정하거나 간접적으로 아미노산 또는 아미노산 동족체에 대한 MIC를 측정하거나 에스케리치아 속에 속하고 아미노산 분비 단백질을 갖는 세균의 아미노산 생산능을 측정함으로써 결정될 수 있다.

아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시키는 방법의 예는 세균 세포내에 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA의 복제수를 증가시키는 방법이다.

세포내 복제수를 증가시키기 위해, 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA의 단편을 에스케리치아 속에 속하는 세균에서 기능하는 벡터에 연결하여 재조합 DNA를 작제하고, 이를 숙주로 도입하여 형질전환시킬 수 있다. 형질전환체 균주의 세포내에서 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 유전자(아미노산 분비 단백질 유전자)의 복제수를 증가시키므로써 아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있다. 벡터는 바람직하게 다중 복제 벡터이다.

세포내 복제수는 아미노산 분비 단백질 유전자의 다수의 복제물을 숙주의 염색체 DNA상에 위치시킴으로써 증가될 수 있다. 다수 복제된 아미노산 분비 단백질 유전자는, 표적으로서 다수의 복제물이 염색체 DNA상에 존재하는 서열을 사용함으로써 상동성 재조합에 의해 에스케리치아 속에 속하는 세균의 염색체 DNA로 도입될 수 있다. 다수의 복제물이 염색체 DNA상에 존재하는 서열로서 트랜스포존성 성분의 말단 부분에 존재하는 반복 DNA 및 역위된 반복 단위체가 사용될 수 있다.

대안적으로, 일본 특허 공개공보 제2-109985호(1990)에 기술된 바와 같이 다수의 복제물이 염색체 DNA상에 도입될 수 있도록 아미노산 분비 단백질 유전자를 트랜스포존상에 위치시키고 트랜스포존이 전위될 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 상기한 방법들 중 어느 하나에 따라, 형질전환체 균주내 아미노산 분비 단백질 유전자의 복제수를 증가시키므로써 아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있다.

다중 복제 벡터의 예는 플라스미드 벡터(예: pBR322, pMW118 또는 pUC19등) 및 파아지 벡터(예: λ 1059, λ BF101 또는 M13mp9등)이다. 트랜스포존의 예는 Mu, Tn10 또는 Tn5등이다.

DNA는 문헌[참조: Methods in Enzymology 68, 326(1979)]에 기술된 디. 엠. 모리슨(D.M. Morrison)의 방법 또는 수용체 세균 세포를 염화칼슘으로 처리하여 DNA의 투과성을 증가시키는 방법[참조: Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159(1970)]등으로 에스케리치아 속에 속하는 세균으로 도입될 수 있다.

상기 언급된 유전자 증폭뿐만 아니라, 아미노산 분비 단백질의 발현량은 또한 아미노산 분비 단백질 유전자의 프로모터와 같은 발현 조절 서열을 보다 강한 것으로 대체시킴으로써 증가될 수 있다[문헌참조: 일본 특허 공개공보 제1(평)-215280호(1989)]. 예를 들어, lac 프로모터, trp 프로모터, tac 프로모터, 람다 파아지의 P_R 프로모터 및 P_L 프로모터등이 강한 프로모터로서 공지되어 있다. 프로모터의 대체는 아미노산 분비 단백질의 발현을 증강시킴으로써 아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있다. 발현 조절 서열의 증강은 아미노산 분비 단백질의 복제수의 증가와 조합될 수 있다.

본 발명의 세균에서, 다수의 아미노산 분비 단백질의 발현량은 증가될 수 있다.

아미노산 분비 단백질은 기능이 불분명한 유전자, 예를 들어 yahN 유전자, yeaS 유전자, yfiK 유전자 및 yggA 유전자로서 공지된 유전자에 의해 암호화된다. 따라서, 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA는 공지된 서열[예를 들어, 에스케리치아 콜리 균주 K-12의 염색체의 전체 뉴클레오타이드 서열이 이미 결정되었음(Science, 277, 1453-1474(1997))]을 기초로하여 프라이머를 합성하고 주형으로서 에스케리치아 속에 속하는 세균의 염색체 DNA를 사용하여 PCR로 증폭시켜 수득할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 DNA 단편은 공지된 서열을 기초로하여 프로브를 작제하고 에스케리치아 속에 속하는 세균의 염색체 DNA 라이브러리로부터 하이브리드화하여 선별될 수 있다. 또한 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA는 공지된 서열을 기초로하여 합성될 수 있다. 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA의 뉴클레오타이드 서열의 예는 서열목록에서 서열번호 9, 11, 13 또는 15로 나타낸 서열이다.

염색체 DNA의 작제, 염색체 DNA 라이브러리의 작제, 하이브리드화, PCR, 플라스미드 DNA의 작제, DNA의 분해 및 연결, 형질전환 및 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드의 선별 방법등은 당해 기술 분야의 기술자에게 널리 공지된 통상적인 방법일 수 있다. 이들 방법은 문헌[참조: Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]등에 기술되어 있다.

아미노산 분비 단백질은 하나 또는 다수의 위치에서 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위를 포함할 수 있고, 단 에스케리치아 속에 속하고 단백질을 갖는 세균의 아미노산 생산능을 증진시키는 활성은 저하되지 않는다. "수개의"란 용어는 단백질의 입체 구조의 위치 및 아미노산 잔기의 종류에 따라 다양할 수 있다. 이것은 이소류신 및 발린과 같은 몇몇 아미노산이 서로 고도의 유사성을 갖고, 상기 아미노산간의 차이는 단백질의 입체 구조에 크게 영향을 미치지 않기 때문이다.

상기 기술된 바와 같은 아미노산 분비 단백질과 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열을 변형시켜(예를 들면, 특정부위에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위될 수 있도록 하는 부위-지시된 돌연변이에 의해) 수득될 수 있다. 상기 기술된 변형된 DNA는 통상적으로 공지된 돌연변이 처리에 의해 수득될 수 있다. 돌연변이 처리는 시험관내에서 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA를 예를 들면, 하이드록실아민으로 처리하는 방법 및, 미생물, 예를 들어, 에스케리치아 속에 속하고 아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA를 함유한 세균을 자외선 또는 돌연변이 처리에 통상적으로 사용되는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NG) 및 질산과 같은 돌연변이제로 처리하는 방법을 포함한다.

하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위는 아미노산 분비 단백질을 갖는 각각의 미생물간의 차이 및 종 및 균주간의 차이등으로부터 비롯되는 자연적으로-발생하는 돌연변이 또는 변형을 포함한다.

아미노산 분비 단백질과 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는 상기 기술된 돌연변이를 갖는 DNA를 에스케리치아 속에 속하는 적합한 세균 세포에서 발현시키고 세포의 아미노산 생산능의 증가를 조사함으로써 수득될 수 있다.

또한 아미노산 분비 단백질과 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 DNA는 예를 들어 서열목록에서 서열번호 9, 11, 13 또는 15로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA와 엄격한 조건하에서 하이브리드화하고 에스케리치아 속에 속하는 세균의 아미노산의 생산능을 증가시키는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA를, 돌연변이를 갖는 아미노산 분비 단

백질을 암호화하는 DNA 또는 이러한 DNA를 포함하는 세포로부터 분리함으로써 획득될 수 있다. 본원에서 언급된 "엄격한 조건"이란 용어는 특정 하이브리드만이 형성되고 비특정 하이브리드가 형성되지 않는 조건을 의미한다. 임의의 수치를 사용하여 이러한 조건을 명백히 표현하기란 어렵다. 그러나 예를 들어, 엄격한 조건은 고도의 상동성을 갖는 DNA, 예를 들어, 서로가 70%이상의 상동성을 갖는 DNA가 하이브리드화하고 서로가 70% 미만의 상동성을 갖는 DNA는 하이브리드화하지 않는 조건 또는 통상적인 써던(southern) 하이브리드화의 세척 조건인 60°C, 1 x SSC, 0.1% SDS, 바람직하게는 0.1 x SSC, 0.1% SDS에 상응하는 염농도의 조건을 포함한다.

종결 코돈이 중앙에 만들어진 유전자 또는 상기 조건하에서 하이브리드화하는 유전자 중에 활성 중심의 돌연변이에 의해 활성을 상실한 단백질을 암호화하는 유전자가 존재할 수 있다 하더라도, 상기 유전자는 이들을 시판중인 활성-발현벡터에 연결시키고 상기한 바와 같은 에스케리치아 속에 속하는 세균의 아미노산 생산능을 증진시키는 활성을 측정함으로써 용이하게 제거될 수 있다.

본 원에 사용된 "단백질을 암호화하는 DNA"란 용어는 DNA가 이분체인 경우 이의 채중 하나가 단백질을 암호화하는 DNA를 의미한다.

상기한 바와 같이 에스케리치아 속에 속하는 아미노산-생산 세균내 아미노산 분비 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 아미노산의 생산량을 증가시킬 수 있다. 아미노산 분비 단백질의 발현량이 증가될, 에스케리치아 속에 속하는 세균으로서, 목적하는 아미노산 생산능(아미노산 생산성)을 갖는 균주가 사용된다. 추가로, 아미노산 생산능은 아미노산 분비 단백질의 발현량이 증가된 세균에 부여될 수 있다. 에스케리치아 속에 속하는 아미노산-생산 세균의 예는 이. 콜리 AJ13199(프랑스 특허 제2747689호) 및 공지된 물질로부터 획득할 수 있는 균주(예: 하기 실시예에서 기술된 바와 같은, 이. 콜리 W3110 (tyrA)/pCABD2, 이. 콜리 VL614, 이. 콜리 VL2054, 이. 콜리 VL2160, 이. 콜리 VL2151, 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10)를 포함한다.

참조를 위해, 본 발명에 따른 아미노산 분비 단백질은 하기한 바와 같이 최초로 동정되었다.

본 발명자는 에스케리치아 속에 속하는 세균의 트레오닌 분비 단백질 유전자로서 rhtB 및 rhtC를 동정하였다. 본 발명자는 아미노산 분비 단백질이 공통된 구조를 공유할 수 있다는 가설을 기초로 데이터베이스를 탐색하였다. 즉 rhtB에 의해 암호화된 단백질의 상동성에 대한 블라스트(BLAST) 및 PSI-블라스트 탐색(문헌[참조: Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402(1997)])을 진뱅크(GenBank) CDS, PDB, 스위스-프로트(SWISS-PROT), 스퍼프데이트(Spupdate) 및 PIR로 수행하였다. Tblastn 탐색을 처리되지 않은 미생물 게놈에서 수행하였다. BLITZ 탐색(문헌[참조: Sturrock, S.S., and Collins, J.F., Mpsch version 1.3. Biocomputing research unit University of Edinburgh, UK (1993)])을 스왈(SWALL) 데이터베이스에서 수행하였다. 스마트(SMART)탐색(문헌[참조: Ogiwara, I. et al., Protein Sci., 5, 1991 - 1999(1996)])은 해독 및 스위스-프로트(SWISS-PROT)의 데이터베이스에서 수행하였다. 밝혀진 60개 이상의 서열번호 샘플로부터, YeaS(진뱅크의 승인번호 제AE000274호의 f212에 상응함), YahN(진뱅크의 승인번호 AE000140호의 f223에 상응함), YfiK(진뱅크의 승인번호 제AE000344호의 o195에 상응함) 및 YggA(진뱅크의 승인번호 제AE000375호의 f211에 상응함)가, 이. 콜리로부터 유래하는 유전자들중에서 RhtB와 유사한 기능을 가질 수 있는 단백질인 것으로 밝혀졌다. 이들 유전자중 몇몇의 기능이 불분명하기 때문에 유전자를 실제로 획득하여 아미노산 및 아미노산 동족체의 MIC 및 아미노산 생산에 관한 이의 효과를 이들의 활성을 증진시킴으로써 조사하였다. 결과로서, 약간의 아미노산 및 아미노산 동족체의 MIC를 증가시키는 효과는 YeaS, YfiK, YahN 및 YggA에 대해서 밝혀졌다. 추가의 연구로 이들 유전자에 의해 암호화된 단백질이 약간의 아미노산 선택성을 가질 수 있다 하더라도 아미노산 축적을 증가시키는 효과가 나타낸다는 것이 밝혀졌다.

<2> 본 발명의 방법

본 발명의 방법은 본 발명의 세균을 배양 배지에서 배양하여 배지내에 아미노산을 생산하고 축적시키는 단계 및 배지로부터 아미노산을 회수하는 단계를 포함한다.

적합한 아미노산은 라이신, 글루타민산, 알라닌, 발린, 히스티딘, 프롤린, 트레오닌, 아르기닌 및 이소류신을 포함한다.

본 발명의 방법에서, 에스케리치아 속에 속하는 세균의 배양, 액체 배지로부터 아미노산의 수거 및 정제는 세균을 사용하는 발효에 의해 아미노산을 생산하기 위한 통상적 방법과 유사한 방법으로 수행할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 합성 배지이거나 천연 배지일 수 있고 배지는 탄소원 및 질소원 및 무기물 및 경우에 따라 사용되는 세균이 적당한 양으로 증식하기 위해 요구되는 영양물을 포함한다. 탄소원은 글루코스 및 슈크로스 및 같은 다양한 탄수화물 및 다양한 유기산을 포함할 수 있다. 사용되는 세균의 동화 능력에 따라 에탄올 및 글리세롤을 포함하는 알콜이 사용될 수 있다. 질소원으로서 암모

니아, 황산암모늄과 같은 다양한 암모늄염, 아민과 같은 또 다른 질소 화합물, 펩톤, 콩 가수분해물 및 분해된 발효 미생물과 같은 천연 질소원이 사용된다. 무기물로서, 인산일칼륨, 황산마그네슘, 염화나트륨, 황화철, 황산망간, 탄산칼슘이 사용된다.

배양은 바람직하게는 진탕 배양 및 통기 및 교반 배양과 같은 호기적 조건하에서 수행한다. 배양 온도는 보통 20 내지 40°C, 바람직하게는 30 내지 38°C이다. 배양물의 pH는 보통 5 내지 9, 바람직하게는 6.5 내지 7.2이다. 배양물의 pH는 암모니아, 탄산칼슘, 다양한 산, 다양한 염기 및 완충액으로 조정될 수 있다. 보통 1 내지 3일 배양을 하게되면 배지내에 목적하는 아미노산이 축적된다.

아미노산은 배양후 원심분리 또는 막 여과에 의해 세포와 같은 고형물을 배지로부터 제거한 다음 이온 교환, 농축 및 분별 결정 등의 방법으로 목적하는 아미노산을 수거하고 정제함으로써 회수될 수 있다.

실시에

본 발명은 실시예를 참고하여 보다 구체적으로 하기에서 설명될 것이다.

실시에 1

아미노산 분비 단백질을 암호화하는 DNA 단편의 작제

이. 콜리 균주 K-12 염색체의 전체 뉴클레오타이드 서열이 결정되었다(문헌[참조: Science, 277, 1453-1474, 1997]). 보고된 뉴클레오타이드 서열을 기준으로 프라이머를 합성하고 유전자 yahN, yfiK, yeaS 및 yggA를 PCR로 증폭시켰다.

(1) 이. 콜리 균주 MG1655의 염색체 DNA가 주형으로서 사용된다.

염색체 DNA는 통상적인 방법(문헌[참조: Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis T.(1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.])으로 제조하였다. PCR 반응에서, 문헌[참조: PCR protocols. Current methods and applications.(White, B.A., ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993)]에 기술된 표준 조건이 사용되었다. 수득된 PCR 산물은 통상적인 방법으로 정제하고 하기 기술된 바와 같이 제한 효소로 분해하였다.

yahN 유전자는 프라이머 1번 및 2번을 사용하여 증폭시켰다.

프라이머 1번: gtgtggaaccgacgccgat(진뱅크에서 승인번호 제AE000140호하에 등록된 뉴클레오타이드 서열중에 염기 1885번 내지 염기 1904번의 서열과 상보적인 서열; 서열번호 17) 및 프라이머 2번: tgtgtatggtacggggttcgag(상기와 동일한 서열중에 염기 223번 내지 염기 245번의 서열; 서열번호 18).

정제후 수득한 PCR 산물을 제한 효소 PstI 및 StuI로 분해하고 연결 키트를 사용하여 효소 PstI 및 EcoRV로 분해된 벡터 pUC21(참조: Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991)에 연결하였다. 이어서, 상기 산물을 사용하여 이. 콜리 TG1의 수용체 세포(참조: Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis T.(1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)를 형질전환시키고 세포를 10 μ m/ml IPTG(이소프로필- β -D-티오갈락토피라노시드) 및 40 μ m/ml X-gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴- β -D-갈락토사이드) 및 100 μ m/ml 엠포실린을 함유하는 L-배지(10g/l 박토 트립톤, 5g/l 효모 추출물, 5g/l NaCl, 15g/l 한천, pH 7.0)상에 도말하고 밤새 배양하였다. 출현한 백색 콜로니를 따서 단일 콜로니로서 분리하여 형질전환체를 수득하였다. 플라스미드는 알칼리 추출 방법을 사용하여 형질전환체로부터 작제하고 pYAHN으로 명명하였다.

yeaS 유전자는 프라이머 3번 및 4번을 사용하여 증폭시켰다.

프라이머 3번: ctttgccaatcccgtctccc(진뱅크에 승인번호 제AE000274호하에 등록된 뉴클레오타이드 서열중에 염기 7683번 내지 염기 7702번의 서열과 상보적인 서열; 서열번호 19);

프라이머 4번: gccccatgcataacggaaag(상기와 동일한 서열중에 염기 5542번 내지 염기 5561번의 서열; 서열번호 20).

정제후 수득한 PCR 산물을 제한효소 *Ava*I로 분해하고 벡터 pUC19에 연결하였다. 상기한 바와 같이 이. 콜리 TG1을 형질 전환시킨후에 pYEAS로서 명명된 플라스미드를 수득하였다.

yfiK 유전자는 프라이머 5번 및 6번을 사용하여 증폭시켰다.

프라이머 5번: gaagatctttaggcccggataaggcg(5' 말단중에 제한 효소 *Bgl*III 부위가 첨가되고, 진뱅크에 승인번호 제 AE000344호하에 등록된 뉴클레오타이드 서열중에 염기 4155번 내지 염기 4177번의 서열; 서열번호 21)

프라이머 6번: tggttttaccaattggccgc(상기와 동일한 서열중에 염기 6307번 내지 염기 6326번의 서열과 상보적인 서열; 서열번호 22)

정제후 수득한 PCR 산물을 제한 효소 *Bgl*III 및 *Mun*I로 분해하고 제한 효소 *Bgl*III 및 *Eco*RI로 분해된 벡터 pUC21에 연결하였다. 상기한 바와 같이 이. 콜리 TG1을 형질전환시킨후에 pYFIK로 명명된 플라스미드를 수득하였다.

yggA 유전자는 프라이머 7번 및 8번을 사용하여 증폭시켰다.

프라이머 7번: acttctcccgcgagccagttc(진뱅크에 승인번호 제AE000375호하에 등록된 뉴클레오타이드 서열 중에 염기 9606번 내지 염기 9626번의 서열과 상보적인 서열; 서열번호 23)

프라이머 8번: ggcaagcttagcgcctctgtt(상기와 동일한 서열중에서 염기 8478번 내지 염기 8498번의 서열; 서열번호 24)

정제후 수득한 PCR 산물을 제한 효소 *Hind*III 및 *Cla*I로 분해하고 동일한 제한 효소로 분해된 벡터 pOK12(참조: Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991)에 연결하였다. 상기한 바와 같이 이. 콜리 TG1을 형질전환시킨후에 pYGGA로 명명된 플라스미드를 수득하였다.

(2) 이. 콜리 균주 W3110의 염색체 DNA를 주형으로서 사용하였다.

yahN 유전자는 프라이머 9번(서열번호 1) 및 서열번호 10번(서열번호 2)를 사용하여 증폭시켰다.

yeaS 유전자는 프라이머 11번(서열번호 3) 및 프라이머 12번(서열번호 4)을 사용하여 증폭시켰다.

yfiK 유전자는 프라이머 13번(서열번호 5) 및 프라이머 14번(서열번호 6)를 사용하여 증폭시켰다.

yggA 유전자는 프라이머 15번(서열번호 7) 및 프라이머 16번(서열번호 8)을 사용하여 증폭시켰다.

수득한 PCR 산물을 정제하고 제한 효소 *Sac*I 및 *Xba*I(yggA에 대해서는 *Eco*RI 및 *Pst*I)로 분해하고 플라스미드 pMW118(니폰(Nippon) 유전자)에 연결하였다. 보고된 서열과 동일한 서열의 DNA 단편이 삽입된 플라스미드는 다음과 같이 명명하였다:

yahN이 삽입된 플라스미드: pMW118::yahN

yeaS가 삽입된 플라스미드: pMW118::yeaS

yfiK가 삽입된 플라스미드: pMW118::yfiK

yggA가 삽입된 플라스미드: pMW118::yggA

실시에 2

약간의 아미노산 및 아미노산 동족체에 대한 이. 콜리 TG1 내성에 있어서의 yahN, yeaS, yfiK 및 yggA DNA 단편 증폭의 효과

코리네박테리움 글루타미쿰의 라이신 수송체, LysE 및 호모세린 분비에 관여하는 RhtB 단백질과 yeaS, yfiK, yahN 및 yggA 유전자 산물과의 상동성은 이들 단백질의 기능이 동일하다는 것을 지적한다. 항생제 및 증균속 배출에 관여하는 유전자의 발현 증가는 약물에 대한 내성 수준을 증가시키는 것으로 널리 공지되어 있다(문헌[참조: Nikaido, H. J. Bacteriology, 178, 5853-5859, 1996]). 따라서 약간의 아미노산 및 아미노산 동족체에 대한 균주 TG1의 민감성에 있어서, pYEAS, pYAHN, pYFIK 및 pYGGA 플라스미드의 효과를 시험하였다. 이. 콜리 균주 TG1/pYEAS, TG1/pYAHN, TG1/pYFIK, TG1/pYGGA 및 대조군 균주 TG1/pUC21, TG1/pUC19 및 TG1/pOK12를 회전 진탕기상에서 적당한 항생제가 첨가된 M9 최소 배지에서 하루밤동안 배양시킨 배양물(10^9 cfu/ml)을 M9 최소 배지로 1:100으로 희석시켜 동일한 배지에서 5시간동안 배양시켰다. 이어서 이에 따라 수득된 대수 증식기의 배양물을 희석하고 약 10^4 개의 생존 세포를 아미노산 또는 이의 동족체의 2배 증분을 함유하는 M9 한천과 함께 잘 건조된 시험 플레이트에 적용하였다. 이어서, 이들 화합물의 최소 억제 농도(MIC)를 조사하였다.

결과는 표 1에 나타낸다. 표 1에서, 다중 복제된 yfiK 유전자는 프롤린, 호모세린, 히스티딘, 트레오닌, 글루타메이트, 라이신, α -아미노- β -하이드록시발레르산(AHVA), S-(2-아미노에틸)-L-시스테인(AEC) 및 α -아미노부티르산에 대해 증가된 내성을 부여하고; 다중 복제된 yahN 유전자는 프롤린에 대해 증가된 내성을 부여하고; 다중 복제된 yeaS 유전자는 트레오닌, 호모세린, 라이신, 글루타메이트, 히스티딘, 프롤린 및 α -아미노부티르산에 대해 증가된 내성을 부여하고; 다중 복제된 yggA 유전자는 S-(2-아미노에틸)-L-시스테인(AEC), 라이신 및 아르기닌에 대해 증가된 내성을 부여한다. 이들 결과는 YahN을 제외하고는 모든 추정된 수송체가 다양한 기질(아미노산 및 아미노산 동족체)에 특이성을 갖거나 증폭 결과로서 비특이적 효과를 나타낼수 있음을 지적한다.

[표 1]

기질	플라스미드를 함유하는 이. 콜리 TG1에 대한 MIC(μ g/ml)				
	pUC21	pYFIK	pYAHN	pYEAS	pYGGA
L-호모세린	500	1000	500	1000	500
L-트레오닌	30000	40000	30000	50000	30000
L-라이신	5000	7500	5000	7500	15000
L-글루타메이트 (Na 염)	5000	10000	5000	20000	5000
L-히스티딘	5000	10000	5000	30000	5000
L-발린	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-프롤린	1000	5000	2000	2000	1000
L-아르기닌	10000	10000	10000	10000	20000
AHVA	100	200	100	100	100
AEC	5	10	5	5	200
α -아미노부티르산	2500	5000	2500	>10000	2500
4-aza-DL-류신	100	100	100	100	100

실시예 3

글루타민산 생산에 대한 yeaS, yahN 및 yfiK DNA 단편 증폭의 효과

이. 콜리 균주 AJ13199(프랑스 특허 제2747689호)를 벡터 pUC21 및 플라스미드 pYAHN, pYEAS 및 pYFIK 각각으로 형질전환시켰다. 이어서 균주 AJ13199/pUC21(VKPM B-7728), AJ13199/pYAHN(VKPM B-7729), AJ13199/pYEAS(VKPM B-7731), 및 AJ13199/pYFIK(VKPM B-7730)을 수득하였다.

이들 균주를 각각 100mg/l 엠펜실린이 첨가된 영양 브로스(broth) 용액중에서 18시간동안 37°C에서 배양하고 수득된 배양물 0.3ml를 20 x 200mm 시험 튜브내에 100mg/l 엠펜실린을 함유하는 발효 배지 3ml에 접종하고 회전식 진탕기를 사용하여 48시간동안 37°C에서 배양하였다. 배양후에 배지내에 축적된 글루타민산의 양을 공지된 방법으로 측정하였다.

발효 배지의 조성(g/l):

글루코스 80

(NH₄)₂SO₄ 22

K_2HPO_4 2

NaCl 0.8

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02

티아민 HCl 0.0002

효모 추출물 1.0

$CaCO_3$ 30.0(180℃에서 2시간동안 건열 살균)

(글루코스 및 K_2HPO_4 는 별도로 살균)

결과는 표 2에 나타낸다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 균주 AJ13199/pYAHN, AJ13199/pYEAS 및 AJ13199/pYFIK는 아미노산 분비 단백질의 발현량이 증강되지 않은 균주 AJ13199/pUC21 보다 대량으로 글루타민산을 축적한다.

[표 2]

균주	글루타민산, g/l
AJ13199/pUC21	21.9
AJ13199/pYAHN	27.9
AJ13199/pYEAS	29.7
AJ13199/pYFIK	28.4

실시예 4

라이신 생산에 대한 *yeaS*, *yahN* 및 *yfiK* DNA 단편 증폭의 효과

(1) 에스케리치아 속에 속하는 라이신 생산 세균으로서, 국제 공개 공보 제WO 95/16042호에 기술된 바와 같이 플라스미드 pCABD2가 도입된 이. 콜리 균주 W3110(*TyrA*)(문헌[참조:유럽 특허 공보 제488424호]에 기술되어 있음)를 사용하였다. 특히 플라스미드 pCABD2 및 각각의 플라스미드 pMW118::*yahN*, pMW118::*yeaS*, pMW118::*yfiK* 및 pMW118를 이. 콜리 균주 W3110(*TyrA*)에 도입하여 하기의 균주를 수득하였다.

W3110(*tyrA*)/pCABD2 + pMW118::*yahN*

W3110(*tyrA*)/pCABD2 + pMW118::*yeaS*

W3110(*tyrA*)/pCABD2 + pMW118::*yfiK*

W3110(*tyrA*)/pCABD2 + pMW118.

이들 균주의 라이신 생산성은 배양으로 평가하였다. 사용되는 배지의 조성(g/l)은 하기와 같았다:

글루코스 40.0

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0

(NH₄)₂SO₄ 16.0

K₂HPO₄ 1.0

FeSO₄·7H₂O 0.01

MnSO₄·7H₂O 0.01

효모 추출물(Difco) 2.0

티로신 0.1

pH 7.0으로 조정하고 10분동안 115℃에 오토클레이빙(autoclaving)하였다(글루코스 및 MgSO₄·7H₂O는 별도로 살균).

약전 CaCO₃ 25g/l(180℃에서 2시간동안 건열 살균)

항생제로서, 스트렙토마이신 20mg/l 및 앰피실린 50mg/l을 플라스미드 종류에 따라 첨가하였다. 115rpm으로 진탕시키면서 30시간동안 37℃에서 배양하였다. 결과를 표 3에 나타낸다.

[표 3]

균주	라이신 g/l	수율(%)
W3110(tvrA)	0.08	0.2
W3110(tvrA)/pCABD2 + pMW118	12.2	30.5
W3110(tvrA)/pCABD2 + pMW118::yahN	13.8	34.5
W3110(tvrA)/pCABD2 + pMW118::yeaS	12.7	31.8
W3110(tvrA)/pCABD2 + pMW118::yfiK	12.2	30.5

표 3의 결과는, 소모된 슈거에 근거한 라이신의 생산량 및 수율이 YahN 및 YeaS의 증강에 의해 증가된다는 것을 보여준다.

(2) 에스케리치아 속에 속하는 라이신-생산 세균으로서, 이. 콜리 균주 VL614를 사용하였다. 이러한 균주는 공지된 이. 콜리 균주 VL613(스웨덴 특허 제1354458호)의 변이체이다. 또한, 균주 VL613은 3단계에 걸쳐 공지된 균주 Gif102(문헌 [참조: Theze, J. and Saint Girons. J. Bacteriol., 118, 990-998, 1974])로부터 획득되었다:

제1 단계에서, 2mg/ml의 S-(2-아미노에틸)-L-시스테인에 내성인 돌연변이체를 선별하였고 이들 중에서 균주 VL611이 L-라이신을 생산할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

제2 단계에서, 슈크로스 이용에 관여하고 트랜스포존 Tn2555(문헌 [참조: Doroshenko et al., Mol. Biologiya, 22, 645-658, 1988])상에 위치한 유전자들을 파아지 P1-매개 형질도입을 사용하여 VL611에 도입함으로써 균주 VL612를 획득하였다.

제3 단계에서, 트레오닌 및 호모세린에 내성을 부여하는, 균주 VKPM B-3996으로부터 유도된 돌연변이 rhtA23을 파아지 P1 형질도입에 의해 VL612로 도입하여 균주 VL613을 획득하였다.

이. 콜리 균주 VKPM B-6204(MG1655 zbi3058::Tn10) 기원의 rhtA 유전자의 야생형 대립 유전자를 VL613으로 형질도입하여 이. 콜리 균주 VL614를 획득하였다. 형질도입 균주를 10mg/l의 테트라사이클린을 함유하는 L-배지상에서 선별하고 이들중에서 10g/l의 호모세린에 감작화되는 균주 VL614(rhtA⁺)를 발견하였다.

균주 VL614를 pYGGA 플라스미드 또는 pOK12 벡터로 형질전환시켜 균주 VL614/pYGGA(VKPM B-7719) 및 VL614/pOK12(VKPM B-7722)를 획득하였다.

이들 균주 각각을 50mg/l의 카나마이신을 포함하는 영양 브로스 중에서 18시간동안 37°C에서 배양하고 수득된 배양물의 0.3ml을 20 x 200mm 시험 튜브중에 0.3g/l의 트레오닌, 0.3g/l의 메티오닌 및 50mg/l의 카나마이신을 함유하는 발효 배지(실시예 3) 3ml에 접종하고 회전식 진탕기를 사용하여 48시간동안 37°C에서 배양한다. 배양후, 배지내 축적된 각각의 라이신 및 글루타메이트의 양을 공지된 방법으로 측정한다.

결과는 표 4에 나타낸다.

[표 4]

균주	라이신, g/l	글루타메이트, g/l
VL614/pOK12	2.6	0.8
VL614/pYGGA	3.6	2.2

표 4에 나타낸 바와 같이, 균주 VL614/pYGGA는 yggA 유전자가 증강되지 않은 균주 VL614/pOK12보다 대량으로 라이신을 축적하였다. 또한 균주 VL614/pYGGA는 균주 VL614/pOK12보다 많은 글루타민산을 축적하였다.

실시예 5

트레오닌, 알라닌, 발린 및 이소류신 생산에 대한 yeaS, yahN 및 yfiK DNA 단편 증폭의 효과

에스케리치아 속에 속하는 트레오닌-생산 세균으로서, 이. 콜리 균주 VL2054를 사용하였다. 이러한 균주는 다음과 같이 공지된 이. 콜리 균주 VKPM B-3996(미국 특허 제5,175,107호)로부터 유도되었다.

처음에, 새로운 수용체 균주를 다음과 같은 단계들로 작제하였다:

- 플라스미드가 없는 균주 VKPM B-3996의 유도체를 pVIC40 플라스미드를 자발적으로 제거한후에 선별하였다.
- 이. 콜리 균주 VKPM B-6204(MG1655 zbi3058::Tn10)로 부터 유래된 rhtA 유전자의 야생형 대립 유전자를 실시예 4에서와 같이 파아지 P1 매개된 형질도입에 의해 상기와 같이 수득된 균주로 도입하였다.
- 여전히 트레오닌을 분해할 수 없는 카나마이신-감작화 세포를 NG 돌연변이시키고 선별한후에 tdh 유전자로 삽입된 Tn5 트랜스포존의 kan 유전자를 불활성화시키는 돌연변이를 수행하였다. 이어서 균주 VL2053을 수득하였다.

한편, pVIC40 기원의 트레오닌 오페론을 통합된 Mud 벡터의 파아지 람다 P_R 프로모터하에 클로닝시켰다. 또한, 클로람페니콜에 대해 내성을 부여하는 Tn9의 cat 유전자를 동일한 벡터에 클로닝시켰다. 이와같이 수득된 작제물을 공지된 방법(문헌[참조: 미국 특허 제5,595,889호])을 사용하여 이. 콜리 균주 C600의 염색체로 삽입시키고 이에 따라 수득된 균주로부터 VL2053으로 형질도입시켜 플라스미드가 없는 새로운 트레오닌 생산 균주 VL2054를 수득하였다. 이러한 균주는 배양액내에 알라닌, 발린 및 이소류신을 또한 축적하였다.

균주 VL2054를 각각의 플라스미드 pYEAS 및 pYFIK, 및 벡터 pUC21로 형질전환시켜 이. 콜리 균주 VL2054/pYEAS (VKPM B-7707), VL2054/pYFIK(VKPM B-7712) 및 VL2054/pUC21(VKPM B-7708)를 수득하였다.

이들 균주는 각각 100mg/l 엠포실린을 포함하는 영양 브로스 중에서 18시간동안 37°C에서 배양하고 수득한 배양물 0.3ml를, 20 x 200mm 시험 튜브내에 100mg/l의 엠포실린을 함유하는 발효 배지(실시예 3) 3ml에 접종하여 회전식 진탕기로 48시간동안 37°C에서 배양하였다. 배양시킨후 배지에 각각 축적된 트레오닌, 알라닌, 발린 및 이소류신을 공지된 방법으로 측정하였다.

결과는 표 5에 나타낸다.

표 5에 나타낸 바와 같이, 균주 VL2054/pYFIK는 yfiK 유전자가 증강되지 않은 균주 VL2054/pUC21보다 대량으로 트레오닌을 축적하였다. 또한, 균주 VL2054/pYEAS는 yeaS 유전자가 증강되지 않은 균주 VL2054/pUC21보다 대량으로 알라닌, 발린 및 이소류신을 축적하였다.

[표 5]

균주	아미노산 축적, g/l			
	트레오닌	알라닌	발린	이소류신
VL2054/pUC21	5.8	0.4	0.31	0.15
VL2054/pYEAS	5.2	1.4	0.52	0.45
VL2054/pYFIK	8.8	0.5	0.22	0.14

실시예 6

히스티딘 생산에 대한 yeaS 및 yfiK DNA 단편 증폭의 효과

에스케리치아 속에 속하는 히스티딘 생산 세균으로서 균주 이. 콜리 VL2160을 사용하였다. 균주 CC46으로부터 ATP-포스포리보실트랜스퍼라제를 탈감작시킨 hisG^R 돌연변이의 파아지 P1-매개 형질도입에 의해 공지된 균주 NK5526 hisG::Tn10(VKPM B-3384)을 기초로 상기 균주를 획득하였다(문헌[참조: Astvatsaturianz et al., Genetika, 24, 1928-1934, 1988]). 균주 이. 콜리 VL2160을 각각의 플라스미드 pYEAS, pYFIK 및 벡터 pUC21로 형질전환시켜 이. 콜리 균주 VL2160/pYEAS(VKPM B-7753), 이. 콜리 VL2160/pYFIK(VKPM B-7754), 이. 콜리 VL2160/pUC21(VKPM B-7752)를 획득하였다.

이들 균주를 100mg/l 엠펜실린을 포함하는 영양 브로스 중에서 18시간동안 37°C에서 각각 배양시키고 획득된 배양물 0.3ml를 20 x 200mm 시험관중에 증가량의 효모 추출물(3g/l) 및 엠펜실린 100mg/l를 함유하는 발효 배지(실시예 3) 3ml에 접종하고 회전식 진탕기로 68시간동안 34°C에서 배양하였다.

배양시킨후, 배지내에 축적된 히스티딘의 양을 공지된 방법으로 측정하였다. 결과는 표 6에 나타낸다.

[표 6]

균주	히스티딘, g/l
VL2160/pUC21	1.2
VL2160/pYEAS	1.8
VL2160/pYFIK	1.4

표 6에 나타낸 바와 같이, 균주 이. 콜리 VL2160/pYEAS 및 이. 콜리 VL2160/pYFIK는 yeaS 및 yfiK 유전자가 증강되지 않은 균주 이. 콜리 VL2160/pUC21보다 대량으로 히스티딘을 축적하였다.

실시예 7

프롤린 생산에 대한 yahN, yfiK 및 yeaS DNA 단편 증폭의 효과

에스케리치아 속에 속하는 프롤린 생산 세균으로서, 균주 VL2151(W3350 proB* ΔputAP Tn10)를 사용하였다. Tn10에 연결된 ΔputAP 돌연변이를 W3350으로 형질도입시키고 유일한 탄소원으로 프롤린을 사용할 수 없는 테트라사이클린 내성 형질도입 균주를 선별함으로써 상기 균주를 획득하였다. 이와같이 획득된 균주 W3350 ΔputAP Tn10을 NG로 돌연변이시키고 3,4-데하이드로-DL-프롤린 20mg/l에 내성인 돌연변이체를 선별하였다. 이들중에서, 균주 VL2151(W3350 proB* ΔputAP Tn10)은 프롤린을 생산할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

균주 이. 콜리 VL2151을 각각의 플라스미드 pYEAS, pYFIK, pYAHN 및 벡터 pUC21로 형질전환시켜 이. 콜리 균주 VL2151/pYEAS(VKPM B-7714), VL2151/pYFIK(VKPM B-7713), VL2151/pYAHN(VKPM B-7748) 및 이. 콜리 VL2151/pUC21(VKPM B-7715)를 획득하였다.

이들 균주를 각각 100mg/l 앰피실린을 포함하는 영양 브로스 중에서 18시간동안 37°C에서 배양시키고 수득된 배양물 0.3ml를 20 x 200mm 시험 튜브중에 100mg/l의 앰피실린을 포함하는 발효 배지(실시예 3) 3ml에 접종하고 회전식 진탕기로 48시간동안 37°C에서 배양하였다. 배양시킨후 배지내 축적된 프롤린의 양을 공지된 방법으로 측정하였다. 결과를 표 7에 나타낸다.

[표 7]

균주	프롤린, g/l
VL2151/pUC21	1.8
VL2151/pYAHN	2.2
VL2151/pYEAS	2.1
VL2151/pYFIK	2.5

표 7에 나타낸 바와 같이 균주 이. 콜리 VL2151/pYFIK, 이. 콜리 VL2151/pYAHN 및 이. 콜리 VL2151/pYEAS는 yfiK, yahN 및 yeaS 유전자가 증강되지 않은 균주 이. 콜리 VL2151/pUC21보다 대량으로 프롤린을 축적하였다. yfiK 유전자의 증폭이 가장 명백한 효과를 가졌다.

실시예 8

아르기닌 생산에 대한 yggA DNA 단편 증폭의 효과

에스케리치아 속에 속하는 아르기닌 생산 세균으로서 균주 W3350 argE::Tn10/pKA10을 사용하였다. 이러한 균주는 이. 콜리 K-12의 수용체 균주내에 적어도 argA 및 argE 돌연변이를 보충하는 코리네박테리움(브레비박테리움) 플라범 (*flavum*) 기원의 DNA 영역을 포함하는 플라스미드 pKA10을 함유한다(문헌[참조: Kharitonov A. and Tarasov A.P. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. No.9, 29-33, 1986]).

균주 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10을 플라스미드 pYGGA 또는 벡터 pOK12로 형질전환시켜 균주 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA(VKPM B-7716) 및 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12(VKPM B-7718)를 수득하였다.

이와같이 수득한 형질전환체를 100mg/l 앰피실린 및 50mg/l 카나마이신을 포함하는 영양 브로스 중에 18시간동안 37°C에서 각각 배양하고 수득한 배양물 0.3ml를 20 x 200mm 시험관 중에 100mg/l 앰피실린 및 50mg/l 카나마이신을 포함하는 발효 배지(실시예 3) 3ml에 접종하고 회전식 진탕기로 48시간동안 37°C에서 배양하였다. 배양시킨후 배지내에 축적된 아르기닌의 양을 공지된 방법으로 측정하였다.

결과는 표 8에 나타낸다.

[표 8]

균주	아르기닌, g/l
W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12	0.11
W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA	0.46

표 8에 나타낸 바와 같이 균주 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA는 yggA 유전자가 증강되지 않은 균주 이. 콜리 W3350 argE::Tn10/pKA10, pUC21보다 대량으로 아르기닌을 축적하였다.

하기의 이. 콜리 균주는 괄호안에 나타낸 수탁번호하에 1998년 12월 29일자로 러시아인 내셔널 콜렉션 오브 인더스트리얼 마이크로오거니즘(VKPM)에(부다페스트 조약하의 국제 기탁에 따라) 기탁되었다.

AJ13199/pUC21(VKPM B-7728)

AJ13199/pYAHN(VKPM B-7729)

AJ13199/pYEAS(VKPM B-7731)
AJ13199/pYFIK(VKPM B-7730)
VL614/pYGGA(VKPM B-7719)
VL614/pOK12(VKPM B-7722)
VL2054/pYEAS(VKPM B-7707)
VL2054/pYFIK(VKPM B-7712)
VL2054/pUC21(VKPM B-7708)
VL2160/pYEAS(VKPM B-7753)
VL2160/pYFIK(VKPM B-7754)
VL2160/pUC21(VKPM B-7752)
VL2151/pYFIK(VKPM B-7713)
VL2151/pYEAS(VKPM B-7714)
VL2151/pYAHN(VKPM B-7748)
VL2151/pUC21(VKPM B-7715)
W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA(VKPM B-7716)
W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12(VKPM B-7718)

발명의 효과

L-아미노산 분비 단백질을 암호화하는 유전자를 에스케리치아 속에 속하는 미생물에서 발현시킴으로써 대량의 L-아미노산을 생산할 수 있다.

서열목록

<110> Ajinomoto Co., Inc.
<120> Method for producing L-amino acid
<130> 1999-PTYM-11438/CH
<150> RU 98124016
<151> 1998-12-30
<150> RU 99104431
<151> 1999-03-09

<160> 24

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yahN gene

<400> 1
 ggcgagctcc cagtaaccgg aaataag 27

<210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yahN gene

<400> 2
 cgctctagaa aggaccacgc attacgg 27

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yeaS gene

<400> 3
 ggcgagctca gattggtag catattc 27

<210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yeaS gene

<400> 4
 cggctctagaa tcagcgaaga atcaggg 27

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yfiK gene

<400> 5
 ggcgagctca tgttccgtgt cgggtac 27

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yfiK gene

<400> 6
 ggctctagat agcaagttac taagcgg 27

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yggA gene

<400> 7
 ctctgaattc tctcttatta gtttttctga ttgcc 35

<210> 8
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yggA gene

<400> 8
 cgtgacctgc agcgttctca cagcgcggta gcctttaa 38

<210> 9
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(672)

<400> 9

atg atg cag tta gtt cac tta ttt atg gat gaa atc act atg gat cct 48

Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro

1 5 10 15

ttg cat gcc gtt tac ctg acc gta gga ctg ttc gtg att act ttt ttt 96

Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe

20 25 30

aat ccg gga gcc aat ctc ttt gtg gta gta caa acc agc ctg gct tcc 144

Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser

35 40 45

ggc cga cgc gca ggg gtg ctg acc ggg ctg ggc gtg gcg ctg ggc gat 192

Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp

50 55 60

gca ttt tat tcc ggg ttg ggt ttg ttt ggt ctt gca acg cta att acg 240

Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr

65 70 75 80

cag tgt gag gag att ttt tcg ctt atc aga atc gtc ggc ggc gct tat 288

Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr

85 90 95

ctc tta tgg ttt gcg tgg tgc agc atg cgc cgc cag tca aca ccg caa 336

Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln

100 105 110

atg agc aca cta caa caa ccg att agc gcc ccc tgg tat gtc ttt ttt 384

Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe

115 120 125

cgc cgc gga tta att acc gat ctc tct aac ccg caa acc gtt tta ttt 432

Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe

130 135 140

ttt atc agt att ttc tca gta aca tta aat gcc gaa aca cca aca tgg 480

Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp

145 150 155 160

gca cgt tta atg gcc tgg gcg ggg att gtg ctc gca tca att atc tgg 528

Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp

165 170 175

cga gtt ttt ctt agt cag gcg ttt tct ttg ccc gct gtg cgt cgt gct 576

Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala

```

                180                185                190
tat ggg cgt atg caa cgc gtt gcc agt cgg gtt att ggt gca att att      624
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile
                195                200                205

ggt gta ttc gcg cta cgc ctg att tac gaa ggg gtg acg cag cgg tga      672
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg
                210                215                220

<210> 10
<211> 223
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 10
Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro
  1                5                10                15

Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe
                20                25                30

Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser
                35                40                45

Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp
                50                55                60

Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr
  65                70                75                80

Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr
                85                90                95

Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln
                100                105                110

Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe
                115                120                125

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

Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp
  145                150                155                160

Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp
                165                170                175

Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala
                180                185                190

```

Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile
 195 200 205

Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg
 210 215 220

<210> 11
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(639)

<400> 11
 gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg 48
 Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
 1 5 10 15

gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc 96
 Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
 20 25 30

aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc 144
 Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
 35 40 45

ggt gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga 192
 Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
 50 55 60

gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt 240
 Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
 65 70 75 80

tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac 288
 Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
 85 90 95

gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa 336
 Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
 100 105 110

tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg 384
 Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
 115 120 125

aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt 432
 Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val

130	135	140	
aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg			480
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu			
145	150	155	160
gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct			528
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala			
	165	170	175
ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc			576
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly			
	180	185	190
aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg			624
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala			
	195	200	205
acg ctg caa tcc tga			639
Thr Leu Gln Ser			
210			
<210>	12		
<211>	212		
<212>	PRT		
<213>	Escherichia coli		
<400>	12		
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly			
1	5	10	15
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu			
	20	25	30
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys			
	35	40	45
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly			
50	55	60	
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg			
65	70	75	80
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr			
	85	90	95
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln			
	100	105	110
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro			
	115	120	125

Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
 130 135 140

Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
 145 150 155 160

Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
 165 170 175

Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
 180 185 190

Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
 195 200 205

Thr Leu Gln Ser
 210

<210> 13
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(588)

<400> 13
 gtg aca ccg acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc 48
 Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr
 1 5 10 15

gct atg acg cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg 96
 Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr
 20 25 30

tcg cat gga ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg 144
 Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu
 35 40 45

gga ttt ttg att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg 192
 Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu
 50 55 60

gca gtg att gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg 240
 Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala
 65 70 75 80

gca tat att gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag 288
 Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys

85	90	95	
gaa gac gga ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct			336
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala			
100	105	110	
ttg cag ttt gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg			384
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu			
115	120	125	
tcg acg ttt gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt ggc			432
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly			
130	135	140	
gtc agc gtt ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg			480
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp			
145	150	155	160
gcg ctg gcg ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc			528
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg			
165	170	175	
cag tta aat atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc			576
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg			
180	185	190	
att ttc tat taa			588
Ile Phe Tyr			
195			
<210> 14			
<211> 195			
<212> PRT			
<213> Escherichia coli			
<400> 14			
Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr			
1	5	10	15
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr			
20	25	30	
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu			
35	40	45	
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu			
50	55	60	
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala			
65	70	75	80
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys			

65	70	75	80	
ctg tgg tat ggt ttt ggc gct ttt aaa aca gca atg agc agt aat att				288
Leu Trp Tyr Gly Phe Gly Ala Phe Lys Thr Ala Met Ser Ser Asn Ile				
	85	90	95	
gag tta gcc agc gcc gaa gtc atg aag caa ggc aga tgg aaa att atc				336
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Val Met Lys Gln Gly Arg Trp Lys Ile Ile				
	100	105	110	
gcc acc atg ttg gca gtg acc tgg ctg aat ccg cat gtt tac ctg gat				384
Ala Thr Met Leu Ala Val Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp				
	115	120	125	
act ttt gtt gta ctg ggc agc ctt ggc ggg caa ctt gat gtg gaa cca				432
Thr Phe Val Val Leu Gly Ser Leu Gly Gly Gln Leu Asp Val Glu Pro				
	130	135	140	
aaa cgc tgg ttt gca ctc ggg aca att agc gcc tct ttc ctg tgg ttc				480
Lys Arg Trp Phe Ala Leu Gly Thr Ile Ser Ala Ser Phe Leu Trp Phe				
	145	150	155	160
ttt ggt ctg gct ctt ctc gca gcc tgg ctg gca ccg cgt ctg cgc acg				528
Phe Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ala Pro Arg Leu Arg Thr				
	165	170	175	
gca aaa gca cag cgc att atc aat ctg gtt gtg gga tgt gtt atg tgg				576
Ala Lys Ala Gln Arg Ile Ile Asn Leu Val Val Gly Cys Val Met Trp				
	180	185	190	
ttt att gcc ttg cag ctg gcg aga gac ggt att gct cat gca caa gcc				624
Phe Ile Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Ile Ala His Ala Gln Ala				
	195	200	205	
ttg ttc agt tag				636
Leu Phe Ser				
	210			
<210> 16				
<211> 211				
<212> PRT				
<213> Escherichia coli				
<400> 16				
Met Phe Ser Tyr Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Leu Gly Ala Ala Met Ile				
1 5 10 15				
Leu Pro Leu Gly Pro Gln Asn Ala Phe Val Met Asn Gln Gly Ile Arg				
20 25 30				
Arg Gln Tyr His Ile Met Ile Ala Leu Leu Cys Ala Ile Ser Asp Leu				

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yahN gene

<400> 18
 tgttgtatgg tacggggttc gag 23

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yeaS gene

<400> 19
 ctttgccaat cccgtctccc 20

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

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yeaS gene

<400> 20
 gccccatgca taacggaaag 20

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yfiK gene

<400> 21
 gaagatcttg taggccgat aaggcg 26

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for amplifying Escherichia coli yfiK gene

<400> 22
 tggttttacc aattggccgc 20

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for amplifying Escherichia coli yggA gene

<400> 23
acttctcccg cgagccagtt c 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer for amplifying Escherichia coli yggA gene

<400> 24
ggcaagctta ggcctctgt t 21