

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3680324号
(P3680324)

(45) 発行日 平成17年8月10日(2005.8.10)

(24) 登録日 平成17年5月27日(2005.5.27)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 P 13/08	C 1 2 P 13/08	A
C 1 2 P 13/06	C 1 2 P 13/08	C
C 1 2 P 13/10	C 1 2 P 13/06	C
C 1 2 P 13/12	C 1 2 P 13/10	B
C 1 2 P 13/14	C 1 2 P 13/12	A

請求項の数 2 (全 39 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平6-196778 (22) 出願日 平成6年8月22日(1994.8.22) (65) 公開番号 特開平8-70860 (43) 公開日 平成8年3月19日(1996.3.19) 審査請求日 平成13年5月23日(2001.5.23) (31) 優先権主張番号 特願平5-209776 (32) 優先日 平成5年8月24日(1993.8.24) (33) 優先権主張国 日本国(JP) (31) 優先権主張番号 特願平6-153876 (32) 優先日 平成6年7月5日(1994.7.5) (33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>微生物の受託番号 FERM BP-4734 微生物の受託番号 FERM BP-4735 微生物の受託番号 FERM BP-4736 微生物の受託番号 FERM BP-4737</p>	<p>(73) 特許権者 000000066 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 100089244 弁理士 遠山 勉 (74) 代理人 100090516 弁理士 松倉 秀実 (74) 代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之 (72) 発明者 杉本 雅一 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素 株式会社 生産技術研究所内 (72) 発明者 鈴木 智子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素 株式会社 中央研究所内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼとその遺伝子及びアミノ酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エシェリヒア属に属する微生物由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼであって、下記の変異から選ばれる少なくとも1種の変異を有し、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が解除された、変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA断片が染色体DNA内に組み込まれて形質転換されたエシェリヒア属またはコリネホルム細菌に属する微生物を好適な培地で培養し、この培地からL-リジン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-プロリンから選ばれるアミノ酸を分離することを特徴とするアミノ酸の製造方法；

(i) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から625番目のグルタミン酸をリジンに置換させる変異、

(ii) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から222番目のアルギニンをヒスチジンに、223番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、

(iii) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から288番目のセリンをフェニルアラニンに、289番目のグルタミン酸をリジンに、551番目のメチオニンをイソロイシンに、804番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、

(iv) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から867番目のアラニンをスレオニンに置換させる変異。

10

【請求項2】

エシェリヒア属に属する微生物由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼであ

20

って、下記の変異から選ばれる少なくとも1種の変異を有し、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が解除された、変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNA断片とエシェリヒア属細菌またはコリネホルム細菌の細胞内で自律複製可能なベクターDNAとを連結してなる組換えDNAで形質転換されたエシェリヒア属またはコリネホルム細菌に属する微生物を好適な培地で培養し、この培地からL-リジン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン及びL-プロリンから選ばれるアミノ酸を分離することを特徴とするアミノ酸の製造方法；
 (i) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から625番目のグルタミン酸をリジンに置換させる変異、
 (ii) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から222番目のアルギニンをヒスチジンに、223番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、
 (iii) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から288番目のセリンをフェニルアラニンに、289番目のグルタミン酸をリジンに、551番目のメチオニンをイソロイシンに、804番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、
 (iv) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのN-末端から867番目のアラニンをスレオニンに置換させる変異。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、それをコードする遺伝子及びアミノ酸の製造法に関し、詳しくは、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異を有する遺伝子とその利用に関する。

20

【0002】

【従来の技術】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、大部分の細菌や全ての植物に見いだされる酵素である。本酵素の役割は、アスパラギン酸やグルタミン酸の生合成および、クエン酸サイクルに回転維持のためにC4ジカルボン酸を供給することにある。しかし、微生物を用いたアミノ酸の発酵生産において本酵素が及ぼす影響を示した報告は少なく、その重要性は明らかではない (Atushi, Yokota and Isamu, Shii, Agric. Biol. Chem., 52, 455-463 (1988)、Josef, Cremer et al., Appl. Environ. Microbiol., 57, 1746-1752 (1991)、Petra, G. Peters-Weintisch, FEMS Microbiol. Letters, 112, 269-274 (1993))。

30

【0003】

ところで、アミノ酸はタンパクの成分として細胞に普遍的に存在する化合物であるが、経済的なエネルギー代謝及び物質代謝のために、その生産は厳密に制御されている。この制御は、主としてフィードバック制御、すなわち代謝経路の下流における産物が上流の反応を触媒する酵素の活性を阻害することによる制御であり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼも、活性発現に様々な調節を受けている。

【0004】

例えば、エシェリヒア (Escherichia) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属細菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼでは、アスパラギン酸によって活性が阻害される。

40

【0005】

従来、アミノ酸醗酵においては効率的な生産のために種々の技術が開発され、フィードバック制御に非感受性になった変異株を使用したロイシン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン等の醗酵生産が行われている。しかしながら、アスパラギン酸による阻害に非感受性になったホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ変異酵素や、これをアスパラギン酸族やグルタミン酸族のアミノ酸の醗酵生産に利用するという試みは知られていない。

【0006】

50

一方、大腸菌（エシェリヒア・コリ：Escherichia coli）のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子である ppc 遺伝子はすでにクローニングされ、塩基配列も決定されている（Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki H. J. Biochem. 95, 909-916(1984)）が、同酵素においてもアスパラギン酸による障害が解除された変異体の報告はない。

【 0 0 0 7 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、上記観点からなされたものであり、アスパラギン酸によるフィードバック障害が実質的に解除されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ及びその遺伝子及びその利用法を提供することを課題とする。

10

【 0 0 0 8 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、大腸菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの特定の部位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することによって、アスパラギン酸による障害が実質的に解除されることを見だし、そのような変異酵素をコードする遺伝子を取得することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち本願発明は、エシェリヒア属に属する微生物由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼにおいて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸によるフィードバック障害を解除する変異を有することを特徴とする変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、及びこの変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする DNA 配列である。

20

【 0 0 1 0 】

本発明はさらに、この DNA 断片を保持するエシェリヒア属又はコリネホルム細菌に属する微生物、及びこれらの微生物を好適な培地で培養し、この培地から L - リジン、L - スレオニン、L - メチオニン、L - イソロイシン、L - グルタミン酸、L - アルギニン及び L - プロリンから選ばれるアミノ酸を分離することを特徴とするアミノ酸の製造方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

尚、本明細書において、変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする DNA 配列あるいはこれにプロモーターを含む DNA 配列を、単に「本発明の DNA 配列」、「変異遺伝子」あるいはホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子ということがある。

30

【 0 0 1 2 】

以下、本発明について詳細に説明する。

【 0 0 1 3 】

< 1 > 変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

本発明の変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、単に「変異型酵素」ともいう）は、エシェリヒア属に属する微生物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼにおいて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸によるフィードバック障害を解除する変異を有するものである。

40

【 0 0 1 4 】

このような変異としては、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの酵素活性を失わないまま、上記フィードバック障害を実質的に解除するものであればどのようなものでもよいが、例えば、その変異を有する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをエシェリヒア属に属する微生物の細胞内に存在させたときに、下記性質を有する化合物に対する耐性を細胞に付与する変異が挙げられる；

野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを産生するエシェリヒア属に属する微生物に対して生育障害作用を示し、

前記生育障害作用は L - グルタミン酸または L - アスパラギン酸の存在によって回復され

50

、かつ、

野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性を阻害する。

【 0 0 1 5 】

さらに具体的には、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの N - 末端から

1 6 2 5 番目のグルタミン酸をリジンに置換させる変異、

2 2 2 番目のアルギニンをヒスチジンに、2 2 3 番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、

3 2 8 8 番目のセリンをフェニルアラニンに、2 8 9 番目のグルタミン酸をリジンに、5 5 1 番目のメチオニンをイソロイシンに、8 0 4 番目のグルタミン酸をリジンに各々置換させる変異、

4 8 6 7 番目のアラニンをスレオニンに置換させる変異、

が挙げられる。

【 0 0 1 6 】

尚、エシェリヒア属に属する微生物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼとして、大腸菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子から推定されるアミノ酸配列 (Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki H. J. Biochem. 95, 909-916 (1984)) を、配列表配列番号 1 に示す。

【 0 0 1 7 】

上記変異型酵素は、下記の本発明の DNA 配列によってコードされ、この DNA 配列を大腸菌等で発現させることにより生産される。

【 0 0 1 8 】

< 2 > 本発明の DNA 配列及びそれを保持する微生物

一方、本発明の DNA 配列は、上記変異型酵素をコードする DNA 配列であり、エシェリヒア属に属する微生物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする DNA 断片において、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異をコーディング領域内に有する。

【 0 0 1 9 】

具体的には、上記 1 ~ 4 の変異を有するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする DNA 配列、例えば、配列表配列番号 1 の塩基配列において、

i) 塩基番号 2 1 1 1 ~ 2 1 1 3 の G A A が、A A A または A A G に変換する変異、

ii) 塩基番号 9 0 2 ~ 9 0 4 の C G C が C A T または C A C に、及び 9 0 5 ~ 9 0 7 の G A A が A A A または A A G に各々変換する変異、

iii) 塩基番号 1 1 0 0 ~ 1 1 0 2 の T C T が T T T または T T C に、1 1 0 3 ~ 1 1 0 5 の G A A が A A A または A A G に、1 8 8 9 ~ 1 8 9 1 の A T G が A T T、A T C または A T A に、及び 2 6 4 8 ~ 2 6 5 0 の G A A が A A A または A A G に各々変換する変異

iv) 2 8 3 7 ~ 2 8 3 9 の G C G が A C T、A C C、A C A、A C G のいずれかに変換する変異

のいずれかを有する DNA 配列が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

このような変異型遺伝子は、野生型酵素遺伝子あるいは他の変異を有するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子と宿主に適合するベクター DNA とを連結して得られる組換え DNA を変異処理し、この組換え DNA による形質転換体からスクリーニングすることにより得られる。あるいは、野生型酵素を生産する微生物を変異処理し、変異型酵素を生産する変異株を創成した後、該変異株から変異型遺伝子をスクリーニングしてもよい。組換え DNA の変異処理には、ヒドロキシルアミン等が使用される。また、微生物自体を変異処理する場合は、通常人工突然変異に用いられている薬剤あるいは方法を用いればよい。

【 0 0 2 1 】

上記野生型酵素遺伝子あるいは他の変異を有するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子は、エシェリヒア属に属する微生物のホスホエノールピルビン酸カルボキシラ

10

20

30

40

50

ーゼをコードする遺伝子であれば、いかなるものでもよく、塩基配列が決定されておりクローン化されていることが好ましい。クローン化されていない場合には、PCR法等を用いて該遺伝子を含むDNA断片を増幅単離した後、適当なベクターを用いてクローン化することができる。

【0022】

上記のような遺伝子として、例えば、すでにクローニングされ塩基配列も決定されている、大腸菌の遺伝子 (Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki, H. J. Biochem. 95, 909-916 (1984)) が挙げられる。この遺伝子のコーディング領域の配列は、配列表の配列番号1に示したとおりである (塩基番号239~2890)。

【0023】

変異遺伝子を有する宿主のスクリーニングは、アスパラギン酸のアナログ化合物を用いて行うことができる。アナログ化合物としては、次の性質を有していることが好ましい。すなわち、野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを生産するエシェリヒア属に属する微生物に対して生育阻害作用を示し、前記生育阻害作用はL-グルタミン酸又はL-アスパラギン酸の存在によって回復され、かつ、野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性を阻害する。

【0024】

上記のようなアナログ化合物を、野生型酵素を生産するエシェリヒア属に属する微生物、例えばエシェリヒア・コリHB101の生育の阻害を指標として選択し、そのアナログ化合物に耐性な変異株をスクリーニングすれば、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が解除されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを生産する宿主が得られる可能性が高い。

【0025】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの阻害剤の一般的な構造として、C4ジカルボン酸構造をとることが必須であると提唱されている。このような観点から、本発明者は種々の化合物をスクリーニングした。エシェリヒア・コリHB101をLB培地で前培養し、DL-2-アミノ-4-ホスホノ酪酸、プロモコハク酸メソ-2,3-ジプロモコハク酸、2,2-ジフルオロコハク酸、3-プロモピルビン酸、 α -ケト酪酸、 α -ケトアジピン酸、DL-スレオ- α -ヒドロキシアスパラギン酸、L-アスパラギン酸- β -メチルエステル、 β -メチル-DL-アスパラギン酸、2,3-ジアミノコハク酸又はアスパラギン酸- β -ヒドラジドを含むM9培地 (チアミン 20 μ g/ml、Leu、Pro各3 μ g/ml含む) で本培養し、経時的に660nmで吸光度を測定することにより、生育を調べた。

【0026】

さらに、それらの化合物が生育阻止濃度で存在するときに、核酸 (ウリジン、アデノシン各10mg/dl)、グルタミン酸、あるいはアスパラギン酸族のアミノ酸 (Asp 0.025%、Met、Thr、Lys各0.1%) の添加により阻害が回復するか否かを調べた。

【0027】

その結果、3種の化合物、3-プロモピルビン酸 (3BP) (化1)、アスパラギン酸- β -ヒドラジド (AHY) (化2)、DL-スレオ- α -ヒドロキシアスパラギン酸 (HA) (化3) を選択した。

【0028】

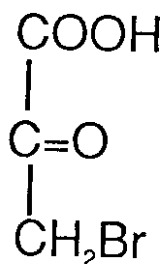
【化1】

10

20

30

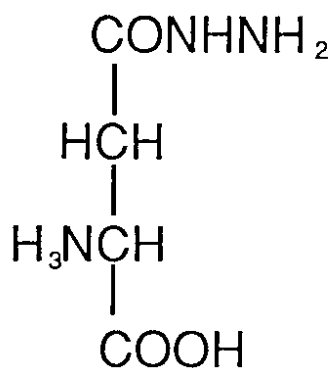
40



【 0 0 2 9 】

【 化 2 】

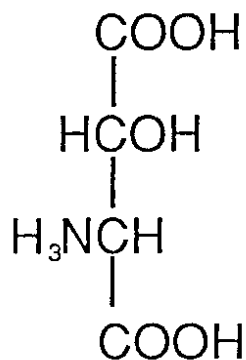
10



【 0 0 3 0 】

【 化 3 】

20



30

【 0 0 3 1 】

これらのアナログ化合物による大腸菌の生育阻害を図 1 ~ 3 に示す。さらに、上記阻害回復物質を単独で、あるいは 2 種類もしくは 3 種類の混合物として加えたときの、大腸菌の生育回復を図 4 ~ 6 に示す。また、対照として、阻害物質非存在下で阻害回復物質を添加したときの生育を図 7 に示す。尚、図 4 ~ 7 中、添加物 1、2、3 は、各々核酸、グルタミン酸、あるいはアスパラギン酸族のアミノ酸を示す。

40

【 0 0 3 2 】

さらに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼに対するアナログ化合物による活性阻害を調べた。Yoshinaga, T., Izui, K. and Katsuki, H., J. Biochem., 68, 747-750 (1970)に記載の方法に準じて、酵素活性を測定した。

【 0 0 3 3 】

L B 培地で培養したエシェリヒア・コリ H B 1 0 1 を破碎し、懸濁液を遠心分離して上清を粗酵素液とした。酵素活性の測定は、2 m M ホスホエノールピルビン酸カリウム、0 .

50

1 mM NADH、0.1 M トリス - 酢酸 (pH 8.5)、1.5 U マレートデヒドロゲナーゼ、及び粗酵素を含む測定系中に、活性に影響する事が知られているアセチルコエンザイム A を 0.1 mM の濃度で存在させて、340 nm の吸光度の減少を測定することにより行った。結果を図 8 に示す。

【0034】

以上の結果から、上記の 3 種のアナログ化合物は、大腸菌の生育を阻害し、核酸単独ではこの阻害を回復できないが、グルタミン酸あるいはアスパラギン酸族アミノ酸の添加により阻害を回復できることが明らかである。したがって、これらのアナログ化合物はホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの選択的な阻害剤であると推定された。本発明において、後記実施例に示したように、これら 3 種の化合物を用いて変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを生産する大腸菌を選択することに成功している。

10

【0035】

上記化合物を用いて目的とする変異型酵素遺伝子を有する形質転換体をスクリーニングし、組換え DNA を回収すれば、その変異型酵素遺伝子が得られる。また、微生物自体を変異処理した場合には、上記化合物を用いて目的とする変異型酵素遺伝子を有する変異株をスクリーニングし、該株より目的とする変異型酵素遺伝子を含む DNA 断片を単離し、適当なベクターに連結すれば、その変異型酵素遺伝子が得られる。

【0036】

このようにして変異が導入されたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードする DNA 断片を、適当な宿主 - ベクター系を用いて発現させることによって、変異型酵素を生産させることができる。また、本発明の DNA 断片を、宿主染色体 DNA 内に組み込むことにより形質転換しても、目的の変異型酵素を産生できる。

20

【0037】

宿主としては、エシェリヒア属に属する微生物、例えば、大腸菌、コリネホルム細菌等が挙げられる。コリネホルム細菌は、コリネバクテリウム属細菌、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたプレバクテリウム属細菌、及びコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。尚、アミノ酸製造に好適な宿主については、後述する。

【0038】

一方、ベクター DNA としては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましい。宿主が大腸菌の場合には、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHS G299、pHSG399、RSF1010 等が挙げられる。他にもファージ DNA のベクターも利用できる。

30

【0039】

また、宿主がコリネホルム細菌の場合に使用できるベクター及びそれを保持する宿主を以下に例示する。尚、かっこ内に国際寄託機関の寄託番号を示した。

【0040】

pAJ655 *E. coli* AJ 11882 (FERM BP-136)

C. glutamicum SR8201 (ATCC39135)

40

pAJ1844 *E. coli* AJ 11883 (FERM BP-137)

C. glutamicum SR8202 (ATCC39136)

pAJ611 *E. coli* AJ 11884 (FERM BP-138)

pAJ3148 *C. glutamicum* SR8203 (ATCC39137)

pAJ440 *H. salinarum* AJ 11901 (FERM BP-140)

【0041】

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた

50

細胞をリゾチーム及びSDSを用いて溶菌し、30000×gで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【0042】

本発明のDNA配列を上記ベクターに挿入して得られる組換えベクターで大腸菌を形質転換するには、例えば細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を高める方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1977))等、通常大腸菌の形質転換に用いられる方法を用いることができる。

【0043】

また、コリネホルム細菌の形質転換法としては、上記の細胞を塩化カルシウムで処理する方法、または細胞がDNAを取込可能な特定の成長時期に取り込む方法(Duncan, C. H. et al.によるバチルス・ズブチリスに関する報告)がある。さらに、プラチミドDNAを容易に取り込むDNA受容体のプロトプラストまたはスフェロプラストを成形することによって細菌細胞内に取り込むことが可能である。これらは、バチルス・ズブチリス、アクチノマイセス及び酵母について知られている(Chang, S. et al. Molec. Gen. Genet., 168, 111, (1979)、Bibb et al., Nature, 274, 398, (1978)、Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))。その他、特開平2-207791号公報にコリネホルム細菌の形質転換法が開示されている。

10

【0044】

本発明のDNA配列を上記宿主内で発現させるには、lac、trp、PL等の微生物内で効率よく働くプロモーターを用いてもよく、本発明のDNA配列がホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子のプロモーターを含んでいる場合は、これをそのまま用いてもよい。また、コリネホルム細菌を宿主とする場合は、公知のプレバクテリウム属細菌由来のtrpプロモーター(特開昭62-244382号公報)等を使用することもできる。

20

【0045】

また、上記のように、本発明のDNA配列を自立複製可能なベクターDNAに挿入したものを宿主に導入し、プラスミドとして宿主に保持させてもよいが、本発明のDNA配列を、トランスポゾン(Berg, D.E. and Berg, C.M., Bio/Technol., 1, 417 (1983))、Muファージ(特開平2-109985)または相同性組換え(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972))を用いた方法で微生物の染色体に組み込んでもよい。また、コリネホルム細菌の染色体に本発明のDNAを組み込むには、特開平5-7491号公報に開示される温度感受性プラスミドが利用できる。

30

【0046】

上記のようにして本発明のDNA配列で形質転換された微生物を培養し、このDNA配列を発現させると、変異型酵素が得られる。このようにして得られた変異型酵素が、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が解除されているかどうかは、酵素反応系にアスパラギン酸を添加して活性を測定することにより、明かとなる。

【0047】

また、本発明のDNA配列は、アスパラギン酸によるフィードバック阻害が解除された変異酵素をコードしているので、このDNA配列を有する微生物を、以下に示すように、アスパラギン酸族やグルタミン酸族のアミノ酸の効率的な醗酵生産に利用することができる。

40

【0048】

後記実施例で得られた変異型酵素遺伝子を保持するエシェリヒア・コリAJ 12907、AJ 12908、AJ 12909、AJ 12910は、平成5年8月3日に工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に、各々順にFERM P-13774、FERM P-13775、FERM P-13776、FERM P-13777として寄託されており、平成6年7月11日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号 FERM BP-4734、F

50

ERM BP-4735、FERM BP-4736、FERM BP-4737として寄託されている。

【 0 0 4 9 】

< 3 > アミノ酸の製造方法

本発明のDNA配列を保持する微生物を好適な培地で培養し、生じたアミノ酸を分離することにより、アミノ酸を製造することができる。このようなアミノ酸として、L-リジン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリンが挙げられる。

【 0 0 5 0 】

以下に、本発明のDNA配列を導入し各アミノ酸の製造に使用するのに好適な宿主及び培養法を例示する。

【 0 0 5 1 】

(1) 本発明のアミノ酸の製造方法に好適な宿主

(i) L - リジン製造に好適な宿主

本発明によるL-リジン製造に用いる宿主として、エシェリヒア属細菌、好ましくはL-リジン生産性の大腸菌が挙げられる。具体的には、リジンアナログに耐性を有する変異株が例示できる。このリジンアナログは、エシェリヒア属の微生物の増殖を阻害するようなものであるが、その抑制はL-リジンが培地中に共存すれば、全体的または部分的に解除されるようなものである。例えば、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)-システイン(以下、「AEC」と略記する)、-メチルリジン、-クロロカプロラクタム等がある。これらのリジンアナログに耐性を有する変異株は、通常 20
の人工変異操作をエシェリヒア属の微生物に施すことにより得られる。L-リジン製造に用いる菌株として、具体的には、エシェリヒア・コリ AJ 1 1 4 4 2 (FERM P-5084として寄託されている。特開昭56-18596号公報第471頁左下欄参照)が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

一方、コリネホルム細菌の種々の人工変異株が、L-リジン生産菌として用いられており、これらを本発明に使用することができる。このような人工変異株としては次のようなものがある。AEC耐性変異株、その成長にL-ホモセリンのようなアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号,特公昭56-6499号),AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号),DL--アミノ--カプロラクタム、-アミノ-ラウリルラクタム、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキサザロ酢酸脱炭酸酵素(デカルボキシラ-ゼ)または呼吸系酵素の阻害剤に耐性を示すL-リジン生産変異株(特開昭50-53588号,特開昭50-31093号,特開昭52-102498号,特開昭53-86089号,特開昭55-9783号,特開昭55-9759号,特開昭56-32995号,特開昭56-39778号,特公昭53-43591号,特公昭53-1833号),イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株(特開昭55-9784号,特開昭56-8692号),フルオロピルビン酸または34以上の温度に対して感性を示すL-リジン生産変異株(特開昭55-9783号,特開昭53-86090号)、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するプレバクテリウムまたはコリネバクテリウムの変異株(米国特許出願第333455号参照)。

【 0 0 5 3 】

リジン製造に用いる具体的なコリネホルム細菌としては、次のものが挙げられる。

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12031 (FERM BP-277) 特開昭60-62994号公報第525頁左下欄参照

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC39134 特開昭60-62994号公報第473頁右下欄参照

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463 (FERM P-1987) 特公昭51-34477号

10

20

30

40

50

公報参照

また、以下に示すコリネホルム細菌の野生株も同様に本発明に使用することができる。

【 0 0 5 4 】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870	
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC 15806	
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991	
コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC 13032	
	ATCC 13060	10
(プレビバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC 14020	
(プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム)	ATCC 13869	
(コリネバクテリウム・リリウム)	ATCC 15990	
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965	
プレビバクテリウム・サッカロリティカム	ATCC 14066	
プレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC 14068	
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825	20
プレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826	
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240	
マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC 15354	

【 0 0 5 5 】

(ii) L - スレオニン製造に好適な宿主

エシェリヒア・コリ B-3996 (RIA 1867)	特表平3-501682号公報参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12349 (FERM P-9574)	特開平2-458号公報第887頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12351 (FERM P-9576)	特開平2-458号公報第887頁右下欄参照	30
エシェリヒア・コリ AJ 12352 (FERM P-9577)	特開平2-458号公報第888頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 11332 (FERM P-4898)	特開平2-458号公報第889頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12350 (FERM P-9575)	特開平2-458号公報第889頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12353 (FERM P-9578)	特開平2-458号公報第889頁右上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12358 (FERM P-9764)	特開平2-458号公報第890頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 12359 (FERM P-9765)	特開平2-458号公報第890頁左上欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 11334 (FERM P-4900)	特公平1-29559号公報第201頁6欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 11333 (FERM P-4899)	特公平1-29559号公報第201頁6欄参照	
エシェリヒア・コリ AJ 11335 (FERM P-4901)	特公平1-29559号公報第202頁7欄参照	

【 0 0 5 6 】

コリネホルム細菌としては、以下の菌株が挙げられる。

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 11188 (FERM P-4190) 特開昭60-87788号公報第473頁右上欄参照

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ 11682 (FERM BP-118) 特公平2-31956号公報第230頁8欄参照

プレビバクテリウム・フラバム AJ 11683 (FERM BP-119) 特公平2-31956号公報第231頁10欄参照

【 0 0 5 7 】

(iii) L - メチオニン製造に好適な宿主

L - メチオニン製造には、以下の菌株が挙げられる。

- エシェリヒア・コリ AJ 11457 (FERM P-5175) 特開昭56-35992号公報第552頁右上欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11458 (FERM P-5176) 特開昭56-35992号公報第552頁右上欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11459 (FERM P-5177) 特開昭56-35992号公報第552頁右上欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11539 (FERM P-5479) 特開昭56-144092号公報第435頁左下欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11540 (FERM P-5480) 特開昭56-144092号公報第435頁左下欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11541 (FERM P-5481) 特開昭56-144092号公報第435頁左下欄参照
 エシェリヒア・コリ AJ 11542 (FERM P-5482) 特開昭56-144092号公報第435頁左下欄参照 10
- 【 0 0 5 8 】
- (iv) L - アスパラギン酸製造に好適な宿主
 L - アスパラギン酸製造には以下の菌株が挙げられる。
 プレバクテリウム・フラバム AJ 3859 (FERM P-2799) 特開昭51-61689号公報第524頁左上欄参照
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3860 (FERM P-2800) 特開昭51-61689号公報第524頁 左上欄参照
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ 3877 (FERM P-2803) 特開昭51-61689号公報第524頁左上欄参照 20
 コリネバクテリウム・グルタミクム AJ 3876 (FERM P-2802) 特開昭51-61689号公報第524頁左上欄参照
- 【 0 0 5 9 】
- (v) L - イソロイシン製造に好適な宿主
 エシェリヒア属細菌としては、エシェリヒア・コリ KX141 (VKPM-B4781) (特開平4-33027号公報45段落参照) が、コリネホルム細菌としては、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12404 (FERM P-10141) (特開平2-42988号公報第603頁左下欄参照)、プレバクテリウム・フラバム AJ 12405 (FERM P-10142) (特開平2-42988号公報第524頁左下欄参照) が挙げられる。 30
- 【 0 0 6 0 】
- (vi) L - グルタミン酸製造に好適な宿主
 エシェリヒア属細菌としては、以下の菌株が挙げられる。
 エシェリヒア・コリ AJ 12628 (FERM P-12380) '93年フランス特許公開No. 2 680 178号参照
 エシェリヒア・コリ AJ 12624 (FERM P-12379) '93年フランス特許公開No. 2 680 178号参照
- 【 0 0 6 1 】
- コリネホルム細菌としては、以下の菌株が挙げられる。
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12745 (FERM BP-2922) 特開平3-49690号公報第561頁右下欄参照 40
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12746 (FERM BP-2923) 特開平3-49690号公報第562頁左上欄参照
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12747 (FERM BP-2924) 特開平3-49690号公報第562頁左上欄参照
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 12748 (FERM BP-2925) 特開平3-49690号公報第562頁左上欄参照
 プレバクテリウム・フラバム ATCC 14067 特開平5-3793号公報第3頁表1参照
 コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 21492 特開平5-3793号公報第3頁表1参照
- 【 0 0 6 2 】
- (vii) L - アルギニン製造に好適な宿主 50

エシェリヒア属細菌としては、以下の菌株が挙げられる。

エシェリヒア・コリ AJ 11593 (FERM P-5616) 特開昭57-5693号公報第468頁左上欄参照

エシェリヒア・コリ AJ 11594 (FERM P-5617) 特開昭57-5693号公報第468頁右上欄参照

【0063】

コリネホルム細菌としては、以下の菌株が挙げられる。

ブレバクテリウム・フラバム AJ 12144 (FERM P-7642) 特公平5-27388号公報第174頁4欄参照

コリネバクテリウム・グルタミクム AJ 12145 (FERM P-7643) 特公平5-27388号公報第174頁4欄参照

ブレバクテリウム・フラバム ATCC 21493 特開平5-3793号公報第3頁表1参照 10

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 21659 特開平5-3793号公報第3頁表1参照

【0064】

(viii) L - プロリン製造に好適な宿主

エシェリヒア属細菌としては、以下の菌株が挙げられる。

エシェリヒア・コリ AJ 11543 (FERM P-5483) 特開昭56-144093号公報第435頁左下欄参照

エシェリヒア・コリ AJ 11544 (FERM P-5484) 特開昭56-144093号公報第435頁左下欄参照

【0065】

コリネホルム細菌としては、以下の菌株が挙げられる。

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 11225 (FERM P-4370) 特開昭60-87788号公報第473頁左上欄参照 20

ブレバクテリウム・フラバム AJ 11512 (FERM P-5332) 特公昭62-36679号公報第185頁2欄参照

ブレバクテリウム・フラバム AJ 11513 (FERM P-5333) 特公昭62-36679号公報第185頁2欄参照

ブレバクテリウム・フラバム AJ 11514 (FERM P-5334) 特公昭62-36679号公報第185頁2欄参照

コリネバクテリウム・グルタミクム AJ 11522 (FERM P-5342) 特公昭62-36679号公報第185頁2欄参照

コリネバクテリウム・グルタミクム AJ 11523 (FERM P-5343) 特公昭62-36679号公報第185頁2欄参照 30

【0066】

(2) 培養法

上記宿主を培養する方法は、従来のアミノ酸生産菌の培養方法と特に変わらない。すなわち、培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

【0067】

炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。尚、アミノ酸等の栄養要求性変異株を宿主に使用する場合は、その株が要求するアミノ酸等の栄養素を培地に適宜加える必要がある。以下に、アミノ酸製造に用いる培地として、リジン製造用の培地の一例を表1に示す。尚、炭酸カルシウムは別個に殺菌後、他成分に添加する。 40

【0068】

【表1】

培 地 成 分	配 合 量
グルコース	5 g/d l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g/d l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/d l
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.1 g/d l
酵母エキス	0.05 g/d l
チアミン塩酸塩	1 μg/l
ビオチン	300 μg/l
FeSO ₄ ・7H ₂ O	1mg/d l
MnSO ₄ ・4H ₂ O	1mg/d l
炭酸カルシウム	2.5 g/d l
pH7.0	

10

20

【0069】

培養は、好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にアミノ酸の生成蓄積が停止するまで行われる。こうして培養液中に蓄積されたアミノ酸を採取するには、通常の方法を適用できる。

【0070】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

【0071】

30

【実施例1】

変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の取得

すでにクローニングされ、塩基配列も決定されているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子をベクタープラスミドpBR322のSalI部位に挿入して得られたプラスミドpS2を用いて、変異型遺伝子の作製を行った。pS2は、薬剤耐性マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性遺伝子を有する(Sabe, H. et al., Gene, 31, 279-283, 1984)。

【0072】

pS2DNAを、ヒドロキシルアミン処理溶液(20 μg/ml pS2DNA、0.05 M リン酸ナトリウム(pH6.0)、1 mM EDTA、0.4 Mヒドロキシルアミン)で、75℃、2時間処理した。ヒドロキシルアミン処理は、pHの影響を受けるので、水酸化ナトリウムでpHを6.0に調整した1 Mヒドロキシルアミン・HCl、1 mM EDTA溶液80 μlと、0.1 M リン酸ナトリウム(pH6.0)、1 mM EDTA溶液100 μlと、2 μgのpS2DNAを含むTE(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA)緩衝液とを混合し、最終的に水で200 μlとした。

40

【0073】

上記条件は、処理後のpS2でエシェリヒア・コリHB101を形質転換したときに、アンピシリン含有培地での形質転換体の生存率が処理前の0.2%となる条件である。

【0074】

ヒドロキシルアミン処理したpS2でエシェリヒア・コリHB101を形質転換し、アン

50

ピシリンを含む平板培地に塗布し、約10000コロニーの形質転換体を得た。これらを液体培地に懸濁し、アスパラギン酸のアナログ化合物である3-プロモピルビン酸(3BP)、アスパラギン酸-β-ヒドラジド(AHY)、DL-スレオ-β-ヒドロキシアスパラギン酸(HA)のいずれかを最小阻止濃度付近の濃度で含む平板培地に、培地1枚あたり $10^3 \sim 10^5$ 個となるように塗布し、生育するコロニーを選択した。

【0075】

こうして得られたアナログ化合物耐性株100株から、The Journal of Biochemistry, Vol.67, No.4, 1970に記載の方法に準じて、各々の生産するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを粗精製し、アナログ化合物による活性阻害を調べた。酵素活性の測定は、前記と同様にして行った。

10

【0076】

さらに、アナログ化合物により活性を阻害されない変異型酵素を生産する菌株からプラスミドを単離し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ欠損変異株であるエシェリヒア・コリPCR1(Sabe, H. et al., Gene, 31, 279-283, 1984)に導入し、変異型酵素を産生することを確認した。

【0077】

こうして、変異型酵素遺伝子を有する5株の形質転換体を得た。これらの遺伝子の塩基配列を決定した結果、2株については同一の変異を有しており、4種類の変異型遺伝子が得られた。これらを保持する形質転換体は、AJ 12907、AJ 12908、AJ 12909、AJ 12910と命名され、平成5年8月3日に工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に、各々順にFERMP-13774、FERMP-13775、FERMP-13776、FERMP-13777として寄託されており、平成6年7月11日に、この原寄託からブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管され、受託番号FERM BP-4734、FERM BP-4735、FERM BP-4736、FERM BP-4737として寄託されている。また、これらの保持するプラスミドは、各々順にpBP5、pHA19、pBP122、pR6と名付けた。各々のプラスミドに含まれるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子が有する変異を、表2に示す。表中の数字は、配列番号1におけるヌクレオチド番号またはアミノ酸番号を表す。

20

【0078】

【表2】

30

形質転換体	プラスミド	変異	変異に伴うアミノ酸置換
AJ 12907	pBP5	2111G→A	625Glu→Lys
AJ 12908	pHA19	903G→A 905G→A	222Arg→His 223Glu→Lys
AJ 12909	pBP122	1101C→T 1103G→A 1891G→A 2648G→A	288Ser→Phe 289Glu→Lys 551Met→Ile 804Glu→Lys
AJ 12910	pR6	2837G→A	867Ala→Thr

10

20

【0079】

尚、AJ 12907、AJ 12909は、500 μ g/mlの3BPを含む培地で、AJ 12908は、1000 μ g/mlのHAを含む培地で、AJ 12910は、500 μ g/mlのAHYを含む培地で選択されたものである。

【0080】

【実施例2】

変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

上記4株の形質転換体の産生するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼについて、アスパラギン酸に対する感受性を調べた。これらの菌株は、宿主由来のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を欠損しているため、産生するホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、プラスミド由来のものである。

30

【0081】

アスパラギン酸に対する感受性は、既知の方法(Yoshinaga, T., Izui, K and Katsuki, H. J. Biochem., 68, 747-750(1970))に従って調べた。すなわち、活性測定系中に、活性に影響することが知られているアセチルコエンザイムAを0.1mMあるいは1mMの濃度で存在させて、各形質転換体及びpS2を保持する大腸菌が産生する酵素の活性を測定したところ、アスパラギン酸に対する感受性は、図9、11のように測定された。

【0082】

この結果から、アスパラギン酸が高濃度になると、野生型の酵素は活性を失うのに対し、本発明の変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、活性を実質的に保持し続けていることが明らかである。

40

【0083】

【実施例3】

変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを導入したエシェリヒア・コリによるL-スレオニンの発酵生産

エシェリヒア・コリのスレオニン生産菌としてはB-3996株(特表平3-501682号公報)が現在知られている内で最も高い生産能力を持っている。そこで変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの評価を行うにあたり、B-3996を宿主として用いるこ

50

とにした。このB - 3996株は、Research Institute for Genetics and Industrial Microorganism Breeding に、登録番号 RIA 1867 のもとに寄託されている。また評価する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼとしては p B P 5 を選び、実験に供した。

【0084】

エシェリヒア・コリ B - 3996 に変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを持つプラスミド p B P 5 を、Hanahan (J. Mol. Biol., Vol.106, p577, (1983)) の方法により導入し、形質転換体を分離した。対照として、野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を発現するプラスミドである p S 2 でエシェリヒア・コリ B - 3996 を同様に形質転換した。

10

【0085】

エシェリヒア・コリ B - 3996 及びその形質転換体を、それぞれ表3の組成の培地 20 ml を注入した 500 ml 坂口フラスコに接種して 37 °C にて 40 時間培養し、L - スレオニンの生産量を調べたところ、表4に示す結果を得た。尚、前記培地は、グルコースと $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、及びそれ以外の成分とに2分し、KOHでpH7.0に調整した後に、115 °C で10分間オートクレーブし、これらを混合した後に別殺菌した $CaCO_3$ を 30 g / l 添加した。

【0086】

【表3】

成 分	配合量 (g / l)
グルコース	40
$(NH_4)_2SO_4$	16
KH_2PO_4	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01
Yeast Extract (Difco)	2
L-Met	0.5
$CaCO_3$	30

20

30

【0087】

【表4】

40

菌 株	スレオニン生産量 (g/l)
エシェリヒア・コリ B-3996	15.7
エシェリヒア・コリ B-3996/pS2	15.8
エシェリヒア・コリ B-3996/pBP5	16.8

10

【0088】

この結果から明らかなように、本発明のDNA配列を有する変異型酵素発現プラスミドを保持するエシェリヒア・コリ B - 3996 は、野生型酵素を発現するプラスミドを保持するエシェリヒア・コリ B - 3996 よりもスレオニン生産能が向上した。

【0089】

【実施例4】

変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを導入したエシェリヒア・コリによる L - グルタミン酸の発酵生産

エシェリヒア・コリ グルタミン酸生産菌としては、特開平4 - 11461号公報に示されるエシェリヒア・コリ AJ 12628 が、現在知られている内で最も高い生産能力を持っている。そこで変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを評価するにあたり、AJ 12628 を宿主として用いることにした。AJ 12628 株は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に登録番号FERM BP - 3853のもとに寄託されている。また評価する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼとしてはpBP5を選び、実験に供した。

20

【0090】

エシェリヒア・コリ AJ 12628 に変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを持つプラスミドpBP5を、Hanahan (J. Mol. Biol., Vol.106, p577, (1983)) の方法により導入し、形質転換体を分離した。同様に、pS2によるエシェリヒア・コリ AJ 12628 の形質転換体を分離した。

30

【0091】

エシェリヒア・コリ AJ 12628 に変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを持つプラスミドpBP5を、Hanahan (J. Mol. Biol., Vol.106, p577, (1983)) の方法により導入し、形質転換体を分離した。同様に、pS2によるエシェリヒア・コリ AJ 12628 の形質転換体を分離した。

【0092】

し、これらを混合した後に別殺菌したCaCO₃を30g/l添加した。

【0093】

【表5】

40

成 分	配合量 (g/l)
グルコース	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	16
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
Yeast Extract (Difco)	2
CaCO ₃	30

10

【0094】

【表6】

20

菌 株	グルタミン酸生産量 (g/l)
エシェリヒア・コリ AJ 12628	18.0
エシェリヒア・コリ AJ 12628/pS2	18.3
エシェリヒア・コリ AJ 12628/pBP5	19.6

30

【0095】

この結果から明らかなように、本発明のDNA配列を有する変異型酵素発現プラスミドを保持するエシェリヒア・コリAJ 12628は、野生型酵素を発現するプラスミドを保持するエシェリヒア・コリAJ 12628よりもグルタミン酸生産能が向上した。

【0096】

【実施例5】

変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを導入したコリネホルム細菌によるリジンの生産

変異型遺伝子をコリネホルム細菌に導入して発現させるために、プレバクテリウム属細菌由来のプロモーターの取得を行い、変異型遺伝子に連結し、発現型プラスミドを作製した。さらに、これをプレバクテリウム属細菌に導入し、L-リジンの製造を行った。

40

【0097】

<1>プレバクテリウム属細菌由来アスパルトキナーゼ(AK)遺伝子の取得
プレバクテリウム・ラクトファーメントム(コリネバクテリウム・グルタミカム)野生株ATCC13869株より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCR(polymerase chain reaction; White, T.J. et al.; Trends Genet., 5, 185(1989)参照)によりAK遺伝子を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列(Molecular Microbiology(1991)5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet.(1990)224, 317-324参照)を基にしてAK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、23m

50

erのオリゴヌクレオチド（配列番号2）及び21merのオリゴヌクレオチド（配列番号3）を合成した。

【0098】

DNAの合成は、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters(1981),22,1859参照）を用いて、常法に従って合成した。PCR反応は、宝酒造（株）製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。

【0099】

増幅した1643kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI（宝酒造（株）製）及びEcoRI（宝酒造（株）製）にて切断した。遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpHSG399（Takeshita, S. et al.; Gene(1987),61,63-74参照）を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI（宝酒造（株）製）及び制限酵素EcoRIにて切断し、増幅したAK遺伝子断片と接続した。

10

【0100】

DNAの接続はDNAライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にプレバクテリウム染色体より増幅されたAK遺伝子断片の接続されたプラスミドを作製した。野生株であるATCC13869由来のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AKYと命名した。

【0101】

<2>プレバクテリウム・ラクトファーマンタムのAK遺伝子の塩基配列の決定
AKプラスミドp399AKYを調製し、AK遺伝子の塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーらの方法（F.Sanger et al.:Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74,5463(1977)などがある）によった。結果を配列表配列番号4に記す。同DNA断片は2つのオープン・リーディング・フレームをもち、これらはおのおの、AKのサブユニットとサブユニットに対応する。各々のオープン・リーディング・フレームに対応するアミノ酸配列を、配列番号4及び配列番号5に示す。

20

【0102】

<3>ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ発現型プラスミドの作製
野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を保持するプラスミドであるpS2、及び取得した変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を保持するプラスミドであるpBP5より、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を含む約4.4kbのSalI断片を抽出し、大腸菌に汎用されているプラスミドベクターpHSG399のSalIサイトに導入した。作製したプラスミドを、野生型をpHS2、変異型をpHBP5と各々命名した。

30

【0103】

pHS2およびpHBP5をプレバクテリウム中で発現するプラスミドとすべく、プレバクテリウム中で機能するプロモーター、及びプラスミドの複製起点の導入を行った。プロモーターとしては、クローン化したAK遺伝子のプロモーター領域と推定される、塩基配列の1番目のNruIサイトから207番目のApaIサイトまでを含む遺伝子断片をp399AKYより抽出し、pHS2およびpHBP5の構造遺伝子の約60bp手前にあるAvaIサイトに転写方向が順方向となるよう挿入した。

40

【0104】

更に、ベクター上にあるサイトにプレバクテリウム中でプラスミドの自律増殖を可能にする遺伝子断片、すなわちプラスミドの複製起点を導入した。プラスミドの複製起点を含む遺伝子断片は、プレバクテリウム用ベクターpHC4（特開平5-7491号公報段落番号10参照、同プラスミドを保持するエシェリヒア・コリアJ 12036は工業技術院微生物工学工業技術研究所に寄託されており、寄託番号FERM P12215が付されている）より抽出し、両末端の制限酵素部位をリンカーの導入によりPstIサイトに改変した。

【0105】

この断片を、プレバクテリウムのプロモーターを付加したプラスミドの、ベクター部分

50

であるPstIサイトに導入した。構築した発現型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼプラスミドを、pS2に由来する野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼプラスミドをpHS2B、pBP5に由来する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼプラスミドをpHBP5Bと各々命名した。

【0106】

<4>ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ発現型プラスミドを用いたL-リジンの生産

作成したpHS2B、pHBP5Bを各々ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムL-リジン生産菌であるAJ3463(特公平51-34477号公報参照)に導入した。遺伝子の導入は、電気パルスを用いた形質転換法を用いた(特開平2-207791号公報参照)。宿主及び形質転換体を表7の組成のリジン生産培地にて72時間、31.5にて振盪培養を行った。前記培地は、表に記載の成分のうちCaCO₃以外を1lの水に添加し、KOHを用いてpH8.0に調整後、115、15分間オートクレーブした後、乾熱滅菌したCaCO₃をさらに添加して調製した。培養後の培地中のL-リジンの蓄積量を表8に示す。

【0107】

【表7】

成 分	1 l 中の配合量
グルコース	100 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
豆濃	35 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1 g
ビタミンB1	20 g
ビオチン	5 g
ニコチン酸アミド	5 mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ ・5H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	50 g

【0108】

【表8】

菌 株	リジン生産量 (g/l)
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463	20.0
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463/pHS2B	22.0
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463/pHBP5B	25.0

10

【0109】

この結果に示されるように、本発明のDNA配列を有する変異型酵素発現プラスミドを保持するブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463は、野生型酵素を発現するプラスミドを保持するブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ 3463よりもリジン生産能が向上した。

【0110】

【発明の効果】

本発明のDNA配列は、変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードし、このDNA配列を保持する微生物は、前記酵素を産生する。

20

【0111】

本発明の変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、アスパラギン酸による活性阻害を実質的に受けないので、アスパラギン酸により生合成の調節を受けるアミノ酸の醗酵生産等に利用することができる。

【0112】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：3106

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)

株名：

配列の特徴：CDS

存在位置：239..2890

配列

TTACTTGGGG CGATTTTTTA ACATTTCCAT AAGTTACGCT TATTTAAAGC GTCGTGAATT	60	
TAATGACGTA AATTCCTGCT ATTTATTCGT TTGCTGAAGC GATTTGCGAG CATTGACGT	120	20
CACCGCTTTT ACGTGGCTTT ATAAAAGACG ACGAAAAGCA AAGCCCGAGC ATATTCGCGC	180	
CAATGCGACG TGAAGGATAC AGGGCTATCA AACGATAAGA TGGGGTGTCT GGGGTAAT	238	
ATG AAC GAA CAA TAT TCC GCA TTG CGT AGT AAT GTC AGT ATG CTC GGC	286	
Met Asn Glu Gln Tyr Ser Ala Leu Arg Ser Asn Val Ser Met Leu Gly		
1 5 10 15		
AAA GTG CTG GGA GAA ACC ATC AAG GAT GCG TTG GGA GAA CAC ATT CTT	334	
Lys Val Leu Gly Glu Thr Ile Lys Asp Ala Leu Gly Glu His Ile Leu		30
20 25 30		
GAA CGC GTA GAA ACT ATC CGT AAG TTG TCG AAA TCT TCA CGC GCT GGC	382	
Glu Arg Val Glu Thr Ile Arg Lys Leu Ser Lys Ser Ser Arg Ala Gly		
35 40 45		
AAT GAT GCT AAC CGC CAG GAG TTG CTC ACC ACC TTA CAA AAT TTG TCG	430	
Asn Asp Ala Asn Arg Gln Glu Leu Leu Thr Thr Leu Gln Asn Leu Ser		40
50 55 60		
AAC GAC GAG CTG CTG CCC GTT GCG CGT GCG TTT AGT CAG TTC CTG AAC	478	

10

20

30

40

Asn Asp Glu Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Phe Ser Gln Phe Leu Asn		
65	70	75 80
CTG GCC AAC ACC GCC GAG CAA TAC CAC AGC ATT TCG CCG AAA GGC GAA		526
Leu Ala Asn Thr Ala Glu Gln Tyr His Ser Ile Ser Pro Lys Gly Glu		
	85	90 95
GCT GCC AGC AAC CCG GAA GTG ATC GCC CGC ACC CTG CGT AAA CTG AAA		574
Ala Ala Ser Asn Pro Glu Val Ile Ala Arg Thr Leu Arg Lys Leu Lys		10
	100	105 110
AAC CAG CCG GAA CTG AGC GAA GAC ACC ATC AAA AAA GCA GTG GAA TCG		622
Asn Gln Pro Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ile Lys Lys Ala Val Glu Ser		
	115	120 125
CTG TCG CTG GAA CTG GTC CTC ACG GCT CAC CCA ACC GAA ATT ACC CGT		670
Leu Ser Leu Glu Leu Val Leu Thr Ala His Pro Thr Glu Ile Thr Arg		
	130	135 140
CGT ACA CTG ATC CAC AAA ATG GTG GAA GTG AAC GCC TGT TTA AAA CAG		718
Arg Thr Leu Ile His Lys Met Val Glu Val Asn Ala Cys Leu Lys Gln		
	145	150 155 160
CTC GAT AAC AAA GAT ATC GCT GAC TAC GAA CAC AAC CAG CTG ATG CGT		766
Leu Asp Asn Lys Asp Ile Ala Asp Tyr Glu His Asn Gln Leu Met Arg		
	165	170 175
CGC CTG CGC CAG TTG ATC GCC CAG TCA TGG CAT ACC GAT GAA ATC CGT		814
Arg Leu Arg Gln Leu Ile Ala Gln Ser Trp His Thr Asp Glu Ile Arg		30
	180	185 190
AAG CTG CGT CCA AGC CCG GTA GAT GAA GCC AAA TGG GGC TTT GCC GTA		862
Lys Leu Arg Pro Ser Pro Val Asp Glu Ala Lys Trp Gly Phe Ala Val		
	195	200 205
GTG GAA AAC AGC CTG TGG CAA GGC GTA CCA AAT TAC CTG CGC GAA CTG		910
Val Glu Asn Ser Leu Trp Gln Gly Val Pro Asn Tyr Leu Arg Glu Leu		40
	210	215 220

AAC GAA CAA CTG GAA GAG AAC CTC GGC TAC AAA CTG CCC GTC GAA TTT	958	
Asn Glu Gln Leu Glu Glu Asn Leu Gly Tyr Lys Leu Pro Val Glu Phe		
225	230	235
240		
GTT CCG GTC CGT TTT ACT TCG TGG ATG GGC GGC GAC CGC GAC GGC AAC	1006	
Val Pro Val Arg Phe Thr Ser Trp Met Gly Gly Asp Arg Asp Gly Asn		
245	250	255
CCG AAC GTC ACT GCC GAT ATC ACC CGC CAC GTC CTG CTA CTC AGC CGC	1054	10
Pro Asn Val Thr Ala Asp Ile Thr Arg His Val Leu Leu Leu Ser Arg		
260	265	270
TGG AAA GCC ACC GAT TTG TTC CTG AAA GAT ATT CAG GTG CTG GTT TCT	1102	
Trp Lys Ala Thr Asp Leu Phe Leu Lys Asp Ile Gln Val Leu Val Ser		
275	280	285
GAA CTG TCG ATG GTT GAA GCG ACC CCT GAA CTG CTG GCG CTG GTT GGC	1150	
Glu Leu Ser Met Val Glu Ala Thr Pro Glu Leu Leu Ala Leu Val Gly		20
290	295	300
GAA GAA GGT GCC GCA GAA CCG TAT CGC TAT CTG ATG AAA AAC CTG CGT	1198	
Glu Glu Gly Ala Ala Glu Pro Tyr Arg Tyr Leu Met Lys Asn Leu Arg		
305	310	315
320		
TCT CGC CTG ATG GCG ACA CAG GCA TGG CTG GAA GCG CGC CTG AAA GGC	1246	
Ser Arg Leu Met Ala Thr Gln Ala Trp Leu Glu Ala Arg Leu Lys Gly		
325	330	335
GAA GAA CTG CCA AAA CCA GAA GGC CTG CTG ACA CAA AAC GAA GAA CTG	1294	
Glu Glu Leu Pro Lys Pro Glu Gly Leu Leu Thr Gln Asn Glu Glu Leu		
340	345	350
TGG GAA CCG CTC TAC GCT TGC TAC CAG TCA CTT CAG GCG TGT GGC ATG	1342	
Trp Glu Pro Leu Tyr Ala Cys Tyr Gln Ser Leu Gln Ala Cys Gly Met		
355	360	365
GGT ATT ATC GCC AAC GGC GAT CTG CTC GAC ACC CTG CGC CGC GTG AAA	1390	40
Gly Ile Ile Ala Asn Gly Asp Leu Leu Asp Thr Leu Arg Arg Val Lys		

370	375	380		
TGT TTC GGC GTA CCG CTG GTC CGT ATT GAT ATC CGT CAG GAG AGC ACG			1438	
Cys Phe Gly Val Pro Leu Val Arg Ile Asp Ile Arg Gln Glu Ser Thr				
385	390	395	400	
CGT CAT ACC GAA GCG CTG GGC GAG CTG ACC CGC TAC CTC GGT ATC GGC			1486	
Arg His Thr Glu Ala Leu Gly Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Gly Ile Gly				
	405	410	415	10
GAC TAC GAA AGC TGG TCA GAG GCC GAC AAA CAG GCG TTC CTG ATC CGC			1534	
Asp Tyr Glu Ser Trp Ser Glu Ala Asp Lys Gln Ala Phe Leu Ile Arg				
	420	425	430	
GAA CTG AAC TCC AAA CGT CCG CTT CTG CCG CGC AAC TGG CAA CCA AGC			1582	
Glu Leu Asn Ser Lys Arg Pro Leu Leu Pro Arg Asn Trp Gln Pro Ser				
	435	440	445	
GCC GAA ACG CGC GAA GTG CTC GAT ACC TGC CAG GTG ATT GCC GAA GCA			1630	20
Ala Glu Thr Arg Glu Val Leu Asp Thr Cys Gln Val Ile Ala Glu Ala				
	450	455	460	
CCG CAA GGC TCC ATT GCC GCC TAC GTG ATC TCG ATG GCG AAA ACG CCG			1678	
Pro Gln Gly Ser Ile Ala Ala Tyr Val Ile Ser Met Ala Lys Thr Pro				
465	470	475	480	
TCC GAC GTA CTG GCT GTC CAC CTG CTG CTG AAA GAA GCG GGT ATC GGG			1726	
Ser Asp Val Leu Ala Val His Leu Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Gly				30
	485	490	495	
TTT GCG ATG CCG GTT GCT CCG CTG TTT GAA ACC CTC GAT GAT CTG AAC			1774	
Phe Ala Met Pro Val Ala Pro Leu Phe Glu Thr Leu Asp Asp Leu Asn				
	500	505	510	
AAC GCC AAC GAT GTC ATG ACC CAG CTG CTC AAT ATT GAC TGG TAT CGT			1822	
Asn Ala Asn Asp Val Met Thr Gln Leu Leu Asn Ile Asp Trp Tyr Arg				
	515	520	525	40
GGC CTG ATT CAG GGC AAA CAG ATG GTG ATG ATT GGC TAT TCC GAC TCA			1870	

Gly	Leu	Ile	Gln	Gly	Lys	Gln	Met	Val	Met	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Ser				
530						535					540								
GCA	AAA	GAT	GCG	GGA	GTG	ATG	GCA	GCT	TCC	TGG	GCG	CAA	TAT	CAG	GCA	1918			
Ala	Lys	Asp	Ala	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Ser	Trp	Ala	Gln	Tyr	Gln	Ala				
545					550					555					560				
CAG	GAT	GCA	TTA	ATC	AAA	ACC	TGC	GAA	AAA	GCG	GGT	ATT	GAG	CTG	ACG	1966			
Gln	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Thr	Cys	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Glu	Leu	Thr				10
			565							570					575				
TTG	TTC	CAC	GGT	CGC	GGC	GGT	TCC	ATT	GGT	CGC	GGC	GGC	GCA	CCT	GCT	2014			
Leu	Phe	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala				
		580								585					590				
CAT	GCG	GCG	CTG	CTG	TCA	CAA	CCG	CCA	GGA	AGC	CTG	AAA	GGC	GGC	CTG	2062			
His	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gly	Leu				
		595								600					605				20
CGC	GTA	ACC	GAA	CAG	GGC	GAG	ATG	ATC	CGC	TTT	AAA	TAT	GGT	CTG	CCA	2110			
Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Gly	Glu	Met	Ile	Arg	Phe	Lys	Tyr	Gly	Leu	Pro				
		610								615					620				
GAA	ATC	ACC	GTC	AGC	AGC	CTG	TCG	CTT	TAT	ACC	GGG	GCG	ATT	CTG	GAA	2158			
Glu	Ile	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Gly	Ala	Ile	Leu	Glu				
		625													630				
GCC	AAC	CTG	CTG	CCA	CCG	CCG	GAG	CCG	AAA	GAG	AGC	TGG	CGT	CGC	ATT	2206			30
Ala	Asn	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Glu	Ser	Trp	Arg	Arg	Ile				
															635				
															640				
ATG	GAT	GAA	CTG	TCA	GTC	ATC	TCC	TGC	GAT	GTC	TAC	CGC	GGC	TAC	GTA	2254			
Met	Asp	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Cys	Asp	Val	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Val				
															645				
															650				
															655				
CGT	GAA	AAC	AAA	GAT	TTT	GTG	CCT	TAC	TTC	CGC	TCC	GCT	ACG	CCG	GAA	2302			
Arg	Glu	Asn	Lys	Asp	Phe	Val	Pro	Tyr	Phe	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu				40
															660				
															665				
															670				
															675				
															680				
															685				

CAA GAA CTG GGC AAA CTG CCG TTG GGT TCA CGT CCG GCG AAA CGT CGC	2350	
Gln Glu Leu Gly Lys Leu Pro Leu Gly Ser Arg Pro Ala Lys Arg Arg		
690 695 700		
CCA ACC GGC GGC GTC GAG TCA CTA CGC GCC ATT CCG TGG ATC TTC GCC	2398	
Pro Thr Gly Gly Val Glu Ser Leu Arg Ala Ile Pro Trp Ile Phe Ala		
705 710 715 720		
TGG ACG CAA AAC CGT CTG ATG CTC CCC GCC TGG CTG GGT GCA GGT ACG	2446	10
Trp Thr Gln Asn Arg Leu Met Leu Pro Ala Trp Leu Gly Ala Gly Thr		
725 730 735		
GCG CTG CAA AAA GTG GTC GAA GAC GGC AAA CAG AGC GAG CTG GAG GCT	2494	
Ala Leu Gln Lys Val Val Glu Asp Gly Lys Gln Ser Glu Leu Glu Ala		
740 745 750		
ATG TGC CGC GAT TGG CCA TTC TTC TCG ACG CGT CTC GGC ATG CTG GAG	2542	
Met Cys Arg Asp Trp Pro Phe Phe Ser Thr Arg Leu Gly Met Leu Glu		20
755 760 765		
ATG GTC TTC GCC AAA GCA GAC CTG TGG CTG GCG GAA TAC TAT GAC CAA	2590	
Met Val Phe Ala Lys Ala Asp Leu Trp Leu Ala Glu Tyr Tyr Asp Gln		
770 775 780		
CGC CTG GTA GAC AAA GCA CTG TGG CCG TTA GGT AAA GAG TTA CGC AAC	2638	
Arg Leu Val Asp Lys Ala Leu Trp Pro Leu Gly Lys Glu Leu Arg Asn		
785 790 795 800		30
CTG CAA GAA GAA GAC ATC AAA GTG GTG CTG GCG ATT GCC AAC GAT TCC	2686	
Leu Gln Glu Glu Asp Ile Lys Val Val Leu Ala Ile Ala Asn Asp Ser		
805 810 815		
CAT CTG ATG GCC GAT CTG CCG TGG ATT GCA GAG TCT ATT CAG CTA CGG	2734	
His Leu Met Ala Asp Leu Pro Trp Ile Ala Glu Ser Ile Gln Leu Arg		
820 825 830		
AAT ATT TAC ACC GAC CCG CTG AAC GTA TTG CAG GCC GAG TTG CTG CAC	2782	40
Asn Ile Tyr Thr Asp Pro Leu Asn Val Leu Gln Ala Glu Leu Leu His		

835	840	845	
CGC TCC CGC CAG GCA GAA AAA GAA GGC CAG GAA CCG GAT CCT CGC GTC			2830
Arg Ser Arg Gln Ala Glu Lys Glu Gly Gln Glu Pro Asp Pro Arg Val			
850	855	860	
GAA CAA GCG TTA ATG GTC ACT ATT GCC GGG ATT GCG GCA GGT ATG CGT			2878
Glu Gln Ala Leu Met Val Thr Ile Ala Gly Ile Ala Ala Gly Met Arg			
865	870	875	880
AAT ACC GGC TAATCTTCCT CTTCTGCAAA CCCTCGTGCT TTTGCGCGAG			2927
Asn Thr Gly			

10

GGTTTTCTGA AATACTTCTG TTCTAACACC CTCGTTTTCA ATATATTTCT GTCTGCATTT	2987
TATTCAAATT CTGAATATAC CTTCAAGATAT CCTTAAGGAA TTGTCGTTAC ATTCGGCGAT	3047
ATTTTTTCAA GACAGGTTCT TACTATGCAT TCCACAGAAG TCCAGGCTAA ACCTCTTTT	3106

【 0 1 1 3 】

20

配列番号：2

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT 23

30

【 0 1 1 4 】

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C 21

40

【 0 1 1 5 】

配列番号：4

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC13869

配列の特徴：mat peptide

存在位置：217..1482

特徴を決定した方法：S

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60	20
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120	
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180	
GTA ACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG	234	
	Met Ala Leu Val Val Gln	
	1 5	
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC	282	
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val		30
	10 15 20	
GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT	330	
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val		
	25 30 35	
GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378	
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala		40
	40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426	

360	365	370	
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT			1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg			
375	380	385	390
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG			1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln			
	395	400	405
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA			1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg			
	410	415	420 421
AGTTTTAAAG GAGTAGTTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG			1542
TCGGCCAGGT TATGCGCACC CTTTTGGAAG AGCGCAATTT CCCAGCTGAC ACTGTTGTT			1602
TCTTTGCTTC CCCGCGTTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C			1643

【 0 1 1 6 】

10

20

配列番号：5

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミンカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC13869

配列の特徴：mat peptide

存在位置：964..1482

特徴を決定した方法：S

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60	20
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120	
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180	
GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCTG ACAGAAATAT	240	
GGCGGTTTCT CGCTTGAGAG TCGGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300	
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360	
GAACCTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420	
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480	30
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540	
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600	
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660	
TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720	
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATAACG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780	
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACCTGC TGCTGTTGGC	840	
TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900	40
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960	

CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008	
Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu		
1 5 10 15		
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056	
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala		
20 25 30		
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104	10
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val		
35 40 45		
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152	
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe		
50 55 60		
ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200	
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys		20
65 70 75		
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248	
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val		
80 85 90 95		
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296	
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val		
100 105 110		30
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344	
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu		
115 120 125		
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392	
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp		
130 135 140		
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440	
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly		40

145	150	155	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTTAA			1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg			
160	165	170	172
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG			1550
GTTATGCGCA CCCTTTTGGG AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG ACACTGTTTCG TTTCTTTGCT			1610
TCCCCGCGTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC			1643

10

【 0 1 1 7 】

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 3 - プロモピルビン酸による生育阻害を示す図。

【 図 2 】 アスパラギン酸 - - ヒドラジドによる生育阻害を示す図。

【 図 3 】 DL - スレオ - - ヒドロキシアスパラギン酸による生育阻害を示す図。

【 図 4 】 3 - プロモピルビン酸に対する阻害回復物質の効果を示す図。

【 図 5 】 アスパラギン酸 - - ヒドラジドに対する阻害回復物質の効果を示す図。

【 図 6 】 DL - スレオ - - ヒドロキシアスパラギン酸に対する阻害回復物質の効果を示す図。

20

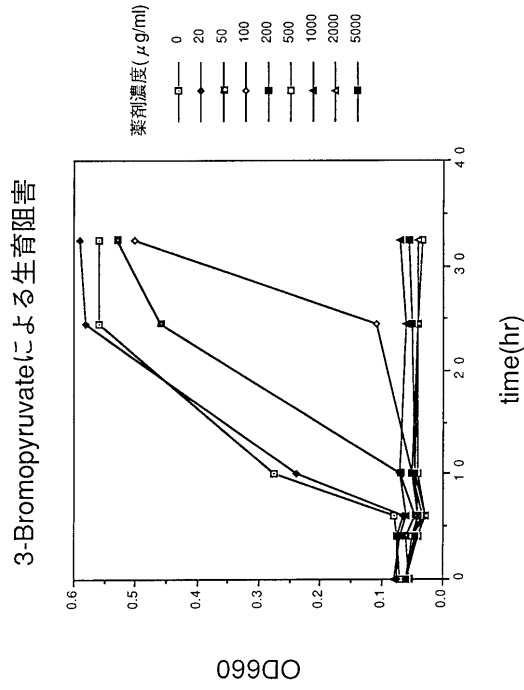
【 図 7 】 生育に与える生育回復因子の影響。

【 図 8 】 生育阻害物質のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性に対する阻害を示す図。

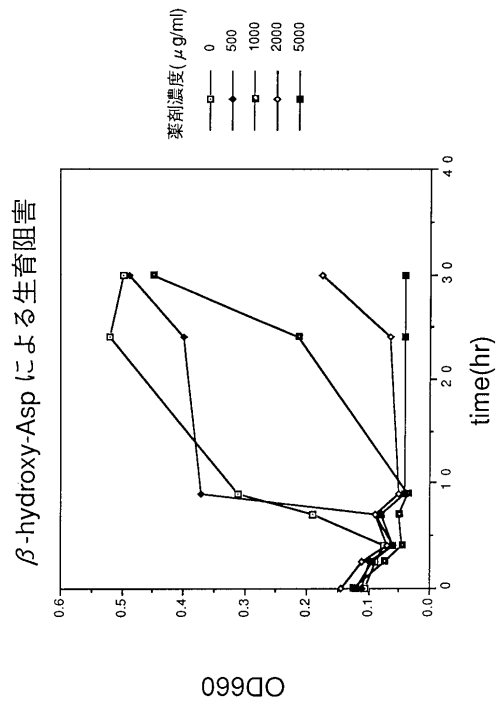
【 図 9 】 本発明のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸による阻害を示す図。

【 図 10 】 本発明のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのアスパラギン酸による阻害を示す図。

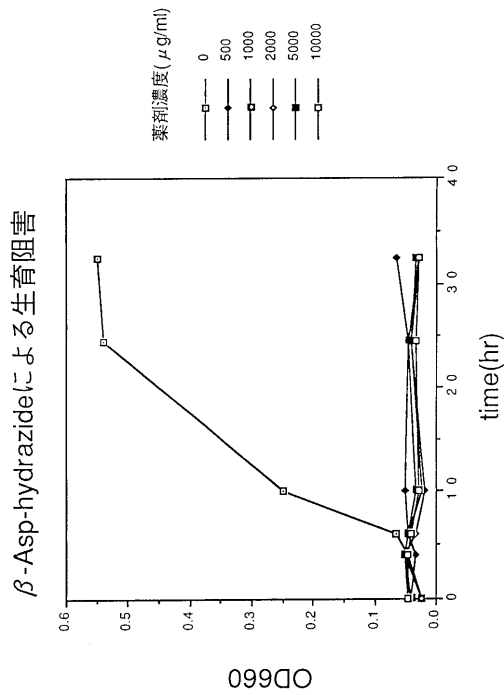
【 図 1 】



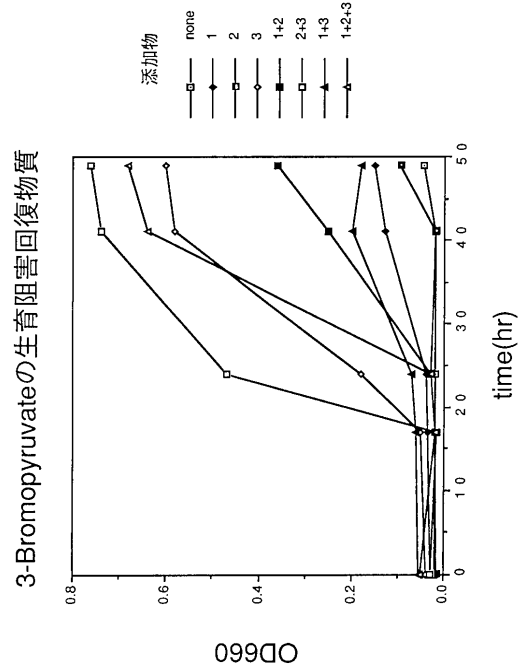
【 図 2 】



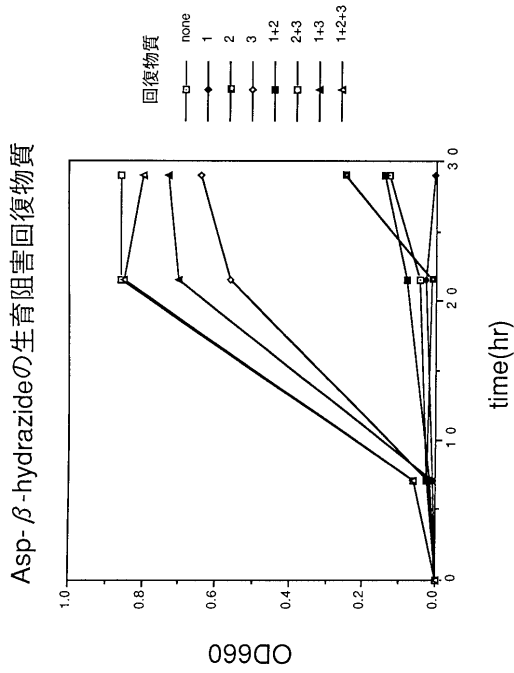
【 図 3 】



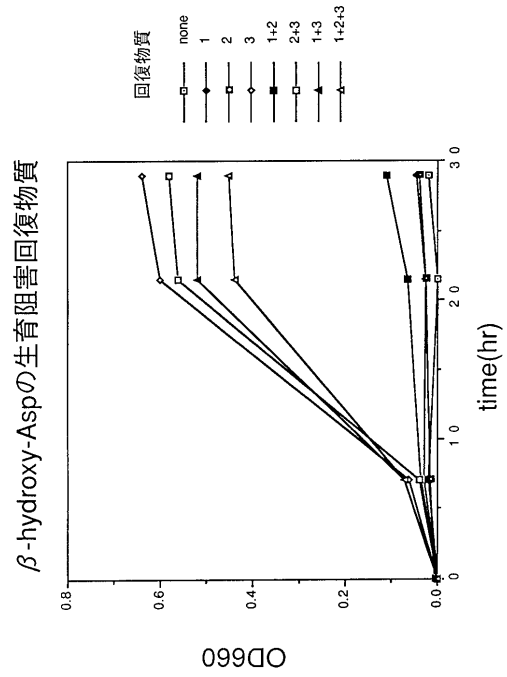
【 図 4 】



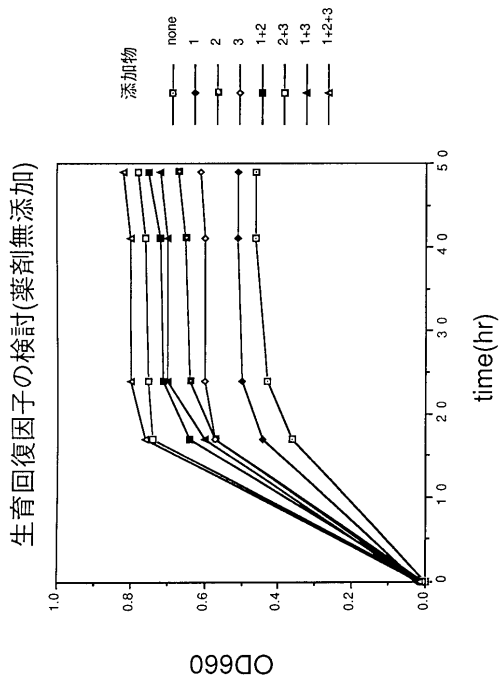
【 図 5 】



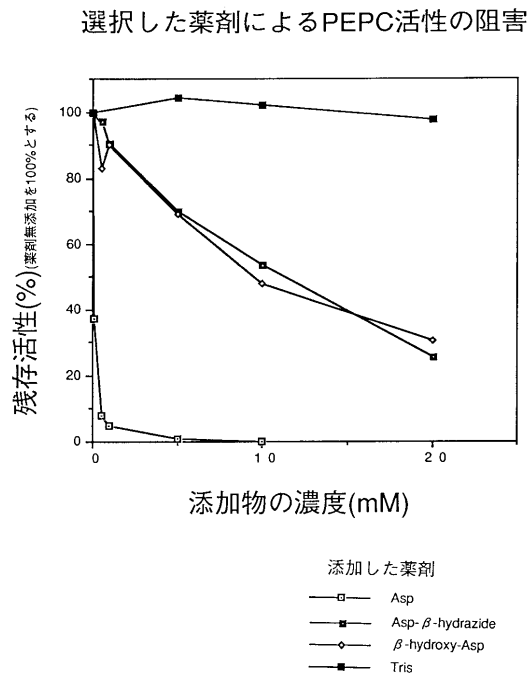
【 図 6 】



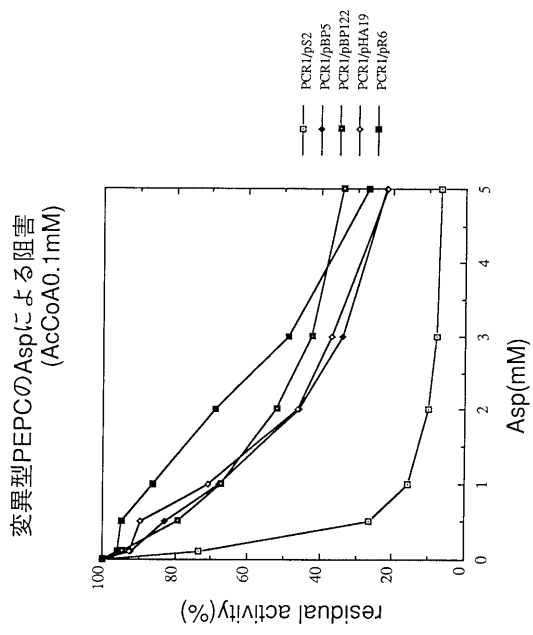
【 図 7 】



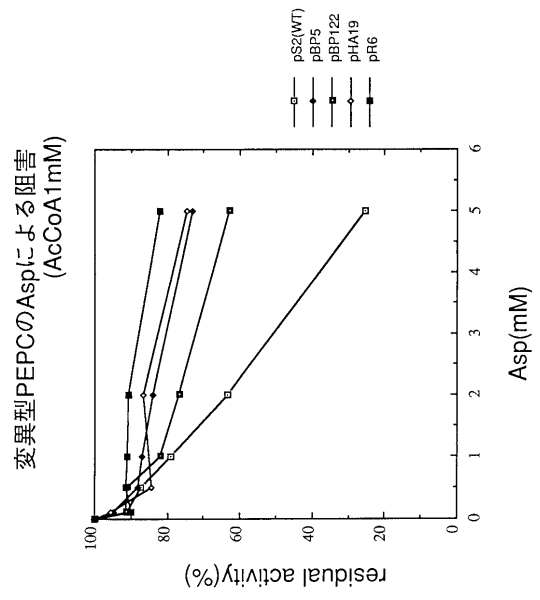
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I
C 1 2 P 13/24	C 1 2 P 13/14 A
// C 1 2 N 9/88	C 1 2 P 13/24 A
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A
(C 1 2 N 9/88	C 1 2 N 9/88
C 1 2 R 1:185)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
(C 1 2 N 9/88	C 1 2 R 1:185
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 N 9/88
(C 1 2 N 15/09	C 1 2 R 1:185
C 1 2 R 1:185)	C 1 2 N 9/88
	C 1 2 R 1:01

(72)発明者 松井 裕
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1 - 1味の素株式会社 中央研究所内

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 Biochem.Biophys.Res.Commun. , 1 9 7 1年 , Vol.45 , p.689-694

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , D B名)

C12P 13/00
 C12N 9/00
 REGISTRY(STN)