

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4120269号  
(P4120269)

(45) 発行日 平成20年7月16日(2008.7.16)

(24) 登録日 平成20年5月9日(2008.5.9)

(51) Int. Cl.	F 1		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 1/32 (2006.01)	C 1 2 N 1/32		
C 1 2 P 13/08 (2006.01)	C 1 2 P 13/08	A	
C 1 2 P 13/10 (2006.01)	C 1 2 P 13/10	B	
請求項の数 4 (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-151981 (P2002-151981)  
 (22) 出願日 平成14年5月27日(2002.5.27)  
 (65) 公開番号 特開2003-61687 (P2003-61687A)  
 (43) 公開日 平成15年3月4日(2003.3.4)  
 審査請求日 平成17年1月31日(2005.1.31)  
 (31) 優先権主張番号 特願2001-177075 (P2001-177075)  
 (32) 優先日 平成13年6月12日(2001.6.12)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-4859  
 微生物の受託番号 FERM BP-8040  
 微生物の受託番号 FERM BP-8041  
 微生物の受託番号 FERM BP-8042

(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 郡司 義哉  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素  
 株式会社発酵技術研究所内  
 (72) 発明者 安枝 寿  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素  
 株式会社発酵技術研究所内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メタノール資化性菌を用いたL-リジン又はL-アルギニンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号10に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号10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の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、メタノール資化性菌においてL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する活性を有するタンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載のDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌。

【請求項3】

請求項2記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジン又はL-アルギニンを採取することを特徴とするL-リジン又はL-アルギニンの製造法。

【請求項4】

前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項3記載のL-リジン又はL-アルギニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-リジン又はL-アルギニンの製造法、および同製造法に用いる微生物に関するものである。

**【0002】****【従来の技術】**

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イロソイシン、L-バリン及びL-フェニルアラニン等のL-アミノ酸は、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換えDNA技術によりL-アミノ酸の生合成酵素を増強することによって、L-アミノ酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

10

**【0003】**

上記のような微生物育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要のいっそうの拡大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なL-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

**【0004】**

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりL-アミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特開昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特公昭49-125590号公報）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、マイクロサイクラス属（特開昭52-18886号公報）、メチロバチルス属（特開平4-91793号公報）、バチルス属（特開平3-505284号公報）などに属する微生物を用いる方法が知られている。本発明者らはこれまで、人工変異による育種および組換えDNA技術を使って、メチロフィラス属細菌を用いたL-アミノ酸製造法の開発を行ってきた（特願平11-368097号）。

20

**【0005】**

近年、L-アミノ酸を特異的に微生物の菌体の外部に排出する機能を持つタンパク質および遺伝子が同定され、特にVrljicらは、コリネバクテリウム属細菌からL-リジンの菌体外への排出に關与する遺伝子を同定した（Vrljic M., Sahm H., Eggeling L. *Molecular Microbiology* 22:815-826(1996)）。この遺伝子はlysEと名付けられ、同遺伝子をコリネバクテリウム属細菌において増強させることによって、コリネバクテリウム属細菌のL-リジン生産能が向上することが報告されている（WO 97/23597）。また、エシェリヒア・コリにおいてアミノ酸排出タンパク質の発現量を上昇させることにより、いくつかのL-アミノ酸の生産性を向上させることができることが知られている（特開平2000-189180号）。例えば、エシェリヒア・コリにおいては、ORF306遺伝子の発現を増強することによって、シスチン、システイン等の生産性が向上することが報告されている（EP885962）。

30

**【0006】**

しかし、これまでメタノール資化性菌を用いたメタノールからの発酵法によるアミノ酸製造に、アミノ酸の排出過程が、大きな障壁であることを示した例はない。また、メタノール資化細菌で、排出活性を発揮できる、アミノ酸排出遺伝子についての報告はない。

40

**【0007】**

また、lysE遺伝子がL-リジン以外のアミノ酸を排出する機能を有することは知られていない。

**【0008】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、安価に大量に入手可能なメタノールを用いて、効率良く、L-リジン又はL-アルギニンを製造する方法を提供することを課題とする。

**【0009】****【課題を解決するための手段】**

50

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、メタノール資化性菌、とりわけメチロフィラス属細菌を利用してL-アミノ酸を製造する場合、L-アミノ酸の菌体外への排出過程が一つの障壁であること、そして、この障壁を打破する因子として、特にこの微生物にてアミノ酸の排出活性を発揮する遺伝子を取得することに成功し、これを利用することで効率の良いアミノ酸生産ができることを見いだした。

【0010】

本発明者らは、既に知られているコリネバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子を、メタノール資化性菌に導入し、そのアミノ酸生産に及ぼす効果を調べたが、導入したlysE遺伝子には変異や欠損が生じ、lysEを機能させることはできなかった。排出を司るようなタンパク質は、細胞膜に組み込まれてその機能を発揮するため、タンパク質と膜の脂質組成などの状態とが両方で適切なものである必要がある。したがって、異種の生物に由来する膜タンパク質を、その機能を発揮する形で発現させることは困難であると考えられ、上述した結果は、それを裏付けるものであった。

10

【0011】

本発明者らは、上記のL-アミノ酸の排出遺伝子に関する研究の過程において、偶然にもメタノール資化性菌において機能し得る変異遺伝子を取得した。また、同変異遺伝子を利用することで、メタノール資化性菌を用いたアミノ酸製造において、顕著な効果を見出した。

【0012】

本発明は、上記のようにして完成するに至ったものであり、その要旨は以下のとおりである。

20

【0013】

(1) ループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に關与するタンパク質の改変体をコードするDNAであって、

野生型タンパク質が持つループ領域を持たない変異型タンパク質をコードし、かつ、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNA。

(2) 前記変異タンパク質が実質的に疎水性ヘリックスのみからなる(1)に記載のDNA。

(3) 前記変異タンパク質が6個の疎水性ヘリックスのすべてを有する(1)又は(2)に記載のDNA。

30

(4) N末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする(1)～(3)のいずれかに記載のDNA。

(5) 前記タンパク質がLysEタンパク質である(1)～(4)のいずれかに記載のDNA。

(6) 前記LysEタンパク質がコリネ型細菌のLysEタンパク質である(5)に記載のDNA。

(7) 前記メタノール資化性菌がメチロフィラス属細菌である(1)～(6)のいずれかに記載のDNA。

40

(8) 以下のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号10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の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、メタノール資化性菌においてL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する活性を有するタンパク質。

(9) (1)～(8)のいずれかに記載のDNAが、発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌。

(10) (7)に記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジン又はL-アルギニンを採取

50

することを特徴とするL-リジン又はL-アルギニンの製造法。

(11)前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする(8)に記載のL-リジン又はL-アルギニンの製造法。

【0014】

本発明において、「L-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進する」とは、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化性菌を培養したときに培地中に排出されるL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の量を増大させることをいう。L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、その結果として、本発明のDNAを保持しないメタノール資化性菌に比べて、本発明のDNAを保持するメタノール資化性菌を培養したときに培地中に蓄積するL-アミノ酸濃度が高くなることによって観察される。また、L-アミノ酸の細胞外への排出の促進は、本発明のDNAをメタノール資化性菌に導入したときに、細胞内のL-アミノ酸濃度が低下することによっても観察される。

10

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

<1>本発明のDNA

本発明のDNAは、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するDNAであり、微生物のL-リジンの細胞外への排出に關与するタンパク質の改変体をコードするDNAである。

20

【0017】

本発明においてメタノール資化性菌とは、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、本発明のDNAを導入することによってL-リジン又はL-アルギニン等のL-アミノ酸の細胞外への排出が促進される細菌である。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス(Methylophilus methylotrophus)等のメチロフィラス属細菌が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスとしては、AS1株(NCIMB10515)等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア(National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom)から入手可能である。

30

【0018】

本発明のDNAは、ループ領域と、6個の疎水性ヘリックスとを有し、かつ、L-リジンの細胞外への排出に關与するタンパク質をコードするDNAに変異を導入し、前記タンパク質がループ領域を持たないように、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるように改変することによって、取得することができる。「実質的に疎水性ヘリックスのみからなる」とは、変異型LysEがループ領域を完全に欠失しているか、あるいは一部を有していても、変異型LysEの機能に影響しない程度にループ領域のほとんどを欠失していることをいう。

40

【0019】

本発明のDNAの一形態は、後記実施例に示すlysE24と名付けられたDNAである。lysE24は、コリネバクテリウム属細菌で報告されているlysE遺伝子のホモログとして、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムから単離された遺伝子の変異体である。したがって、本発明のDNAを、便宜的に「変異型lysE」と称することがある。

【0020】

lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質は、6個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、N末端から3番目と4番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ループ構造を

50

とると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。プレバクテリウム・ラクトファーマンタムの野生型lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、5～20、37～58、67～93、146～168、181～203、211～232に相当する。また、ループ領域は94～145に相当する。

#### 【0021】

本発明者らは、lysE遺伝子はメタノール資化性菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるLysEタンパク質の改変体をコードするDNAは、メタノール資化性菌のL-リジン及び/又はL-アルギニンの細胞外への排出を促進することを見出した。本発明のDNAは、このような野生型LysEタンパク質が持つループ領域を持たない変異型LysEタンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型LysEタンパク質をコードする。

10

#### 【0022】

上記のような変異型lysEとしては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メタノール資化性菌に導入したときにL-リジンもしくはL-アルギニン又はこれらの両方のL-アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的にはN末端から1番目～6番目の疎水性ヘリックスのすべてを有する変異型LysEをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、N末端から1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードするDNAが挙げられる。前記lysE24は、このような1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型lysEの一例である。lysE24遺伝子には、3番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、後記実施例に示すように、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、lysE24遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株はL-リジンを培地中に蓄積しなかった。このことから、1番目～3番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、4番目～6番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メチロフィラス・メチロトロファス中で機能しているものと推定される。いずれにしても、lysE24遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入すれば、L-リジン又はL-アルギニンの生産量が向上する。

20

#### 【0023】

前記のようなL-リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするDNA、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性菌中でL-リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

30

#### 【0024】

メチロフィラス属細菌においてアミノ酸の排出遺伝子を増強する場合は、その遺伝子断片を、メチロフィラスで機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メチロフィラス属細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の下流に連結させることも可能である。

40

#### 【0025】

lysEを開示している文献(WO 97/23597)には、コリネ型細菌のlysE遺伝子をコリネ型細菌に導入した場合のみを提示している。そして、排出されたアミノ酸としてL-リジンのみが示され、更に、LysEを含む新しい排出系のタンパク質の構造体として、膜横断ヘリックスが6個のものを開示している。しかし、本発明者らは、メタノール資化性細菌におい

50

ては、コリネ型細菌に由来するようなLysEは全く機能しないことを確認した。更に、取得できた因子は、膜横断ヘリックス6個を1本のポリペプチドで構成しているコリネ型LysEとは基本的な構造が異なる、新しい型の排出活性を発揮する因子であり、この因子は、先のlysE特許明細書からは全く類推できるものではない。

【0026】

<2>本発明のメチロフィラス属細菌

本発明のメチロフィラス属細菌は、前記本発明のDNAが発現可能な形態で導入され、かつ、L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌である。L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌に本発明のDNAを導入することによって得られる。また、本発明のDNAが導入されたメチロフィラス属細菌に、L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することによっても、本発明のメチロフィラス属細菌を得ることができる。また、本発明のメチロフィラス属細菌は、本発明のDNAが発現可能な形態で導入されたことによってL-リジン又はL-アルギニン生産能が付与されたものであってもよい。

10

【0027】

L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌は、メチロフィラス属細菌の野生株にL-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することにより取得され得る。L-リジン又はL-アルギニン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、L-リジン又はL-アルギニンの生合成系酵素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)。L-リジン又はL-アルギニン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、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、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

20

【0028】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株(特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、又はオキサリジン、リジンヒドロキサメート、S-(2-アミノエチル)-システイン、-メチルリジン、-クロロカプロラクタム、DL--アミノ--カプロラクタム、-アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

30

【0029】

また、L-アルギニン生産菌は、サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は-アミノ-ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有する変異株;2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有する変異株(特開昭54-44096号);ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有する変異株(特開昭57-18989号);アルギニノールに耐性を有する変異株(特開昭62-24075号);X-グアニジン(Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体)に耐性を有する変異株(特開平2-186995号)、5-アザウラシル、6-アザウラシル、2-チオウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-アザシトシン、6-アザシトシン等に耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート、2-チオウラシルに耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシルに耐性な変異株(特開昭57-150381号参照)、ヒスチジンアナログ又はトリプトファンアナログに耐性な変異株(特開昭52-114092号参照)、メチニオン、ヒスチジン、スレオニン、プロリン、イソロイシニン、リジン、アデニン、グアニンまたはウラシル(またはウラシル前駆体)の少なくとも一つに要求性を有する変異株(特開昭52-99289号参照)、アルギニンヒドロキサメートに耐性な変異株(特公昭51

40

50

-6754号参照)、コハク酸要求性又は核酸塩基アナログに耐性な変異株(特開昭58-9692号)、アルギニン分解能を欠損し、アルギニンのアンタゴニスト及びカナバニンに耐性を有し、リジンを要求する変異株(特開昭52-8729号参照)、アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシル耐性の変異株(特開昭53-143288号参照)、及び、カナバニン耐性の変異株(特開昭53-3586号参照)として育種することができる。

【0030】

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0031】

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロフィラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0032】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メチロフィラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli(エシェリヒア・コリ(Escherichia coli))K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子(dapA、Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297(1986))及びAKIIIをコードする遺伝子(lysC、Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Pate, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052(1986))は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0033】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPS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、E. coli由来の野生型AKIII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、メチロフィラス属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA、又はdapA<sup>\*</sup>」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するE. coli由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

【0034】

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、コリネバクテリウム属細菌由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0036】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては

10

20

30

40

50

、配列番号2に示すアミノ酸配列において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DDPS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AKIIIをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基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。

【0037】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0038】

また、メチロフィラス属細菌で機能するベクターとは、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980))等が挙げられる。

【0039】

dapA及びlysCとメチロフィラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【0040】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIII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が知られている(WO95/16042号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、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。

【0041】

RSFD80に含まれている変異型dapAは野生型dapAの塩基配列において塩基番号623のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPS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。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがT変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

【0042】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997))が挙げられる。

【0043】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体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。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び/又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及びlysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 4 4 】

DDPS活性及びAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及lysC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によっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、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、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、amyEプロモーター、spac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。これらのプロモーターへの置換により、dapA及lysCの発現が強化されることによってDDPS活性及びAK活性が増幅される。発現調節配列の増強は、dapA及lysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

## 【 0 0 4 5 】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

## 【 0 0 4 6 】

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

## 【 0 0 4 8 】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（W095/23864参照）。

## 【 0 0 4 9 】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、L-アルギニンについても同様に適用することができる。

L-アルギニンは、例えば、アセチルオルニチンデアセチラーゼ活性、N-アセチルグルタミン酸- -セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性、N-アセチルグルタモキナーゼ活性、及びアルギニノサクシナーゼ活性を増強することによって付与することができる（特公平5-23750号）。

## 【 0 0 5 0 】

また、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（EP 1 057 893 A1）、アルギニノコハク酸シンターゼ（EP 0 999 267 A1）、カルバモイルリン酸シンセターゼ（EP 1 026 247 A1）、もしくはN-アセチルグルタミン酸シンターゼ（特開昭57-5693号参照）の活性を増強すること、又は、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子（argR）を破壊することによって、L-アルギニン生産能を向上させることができる。

## 【 0 0 5 1 】

< 3 > L-リジン又はL-アルギニンの製造  
上記のようにして得られるL-リジン又はL-アルギニン生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-リジン又はL-アルギニンを生産蓄積させ、該培養物からL-リジン又はL-アルギニンを採取することにより、L-リジン又はL-アルギニンを製造することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、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用いられる。

## 【 0 0 5 3 】

メタノールを主たる炭素源として用いると、L-リジン又はL-アルギニンを安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.001~30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

10

## 【 0 0 5 4 】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45℃に保持して行われ、通常24~120時間で終了する。

培養物からのL-リジン又はL-アルギニンの採取は、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。

## 【 0 0 5 5 】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は、特記しない限り和光純薬、又はナカライテスク社製のものを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHまたはHClで調整した。

20

## 【 0 0 5 6 】

(LB培地)

トリプトン・ペプトン(ディフコ社製)	10g/L
酵母エキス(ディフコ社製)	5g/L
NaCl	10g/LpH7.0

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

## 【 0 0 5 7 】

(LB寒天培地)

LB培地

バクタアガー	15g/L
--------	-------

[120℃、20分間蒸気滅菌を行った。]

30

## 【 0 0 5 8 】

(SEII培地)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.9g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.56g/L
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.2g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g/L
CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	5mg/L
MnSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	25mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	23mg/L
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.72mg/L
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	9.7mg/L
CaCO <sub>3</sub> (関東化学製)	30g/L
メタノール	2%(vol/vol)

pH7.0

[メタノール以外は121℃、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

40

## 【 0 0 5 9 】

50

(SEI 寒天培地)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.9g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.56g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	5mg/L
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	25mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	23mg/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.72mg/L
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9.7mg/L
メタノール	0.5% (vol/vol)
pH7.0	

10

バクアガー(ディフコ社製) 15g/L

[メタノール以外は121、15分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。]

【0060】

【実施例1】

<1> プレバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子のメチロフィラス属細菌への導入

【0061】

コリネバクテリウム属細菌で知られているL-リジンの排出を促進する遺伝子の相同遺伝子であるlysE遺伝子をプレバクテリウム属細菌よりクローニングし、メチロフィラス属細菌での発現を試みた。

20

【0062】

(1) pRSlysEの構築

メチロフィラス属細菌にlysEを導入するために、公知のプラスミドpRS(特表平3-501682号公報参照)を用いて、lysE発現用プラスミドpRSlysEを構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32(Chistorerodov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)に由来するpVIC40プラスミド(WO90/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報)より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

30

【0063】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを図1に示す方法で構築した。pRStacプラスミドは、pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベースペア(以下、「kbp」と記載)のDNA断片をEASY TRAP Ver.2(DNA回収キット、宝酒造社製)を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pKK223-3プラスミド(発現用ベクター、Pharmacia社製)を鋳型とし、配列番号1および2に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した(変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った)。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

40

【0064】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E. coli JM109 competent cells、宝酒造製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg

50

1/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ - SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

#### 【0065】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDAN断片を回収した。

#### 【0066】

また、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム 2256株（ATCC13869）より抽出した染色体を鋳型として、配列番号5および6に示すプライマーを用いたPCR法（変性94℃ - 20秒、アニーリング55℃ - 30秒、伸長反応72℃ - 90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。このとき、lysE遺伝子がメチロフィラス属細菌中で発現可能となるように、lysE遺伝子の翻訳開始コドンより9~15bp塩基を、メチロフィラス属細菌で機能することがわかっている配列（Wyborn, N. R., Mills, J., Williamis, S. G. and Jones, C.W., Eur.J.Biochem., 240, 314-322(1996)）に変更するようにプライマーをデザインした。得られた断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで回収した。

#### 【0067】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E. coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ - SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEを得た（図1）。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

#### 【0068】

##### （2）メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)）によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIM B10515）に導入した。なお、対照として、pRSをpRSlysEと同様にしてAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSでは1μgのDNAあたり数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysEでは数個のコロニーしか得られなかった。

#### 【0069】

pRSlysEが導入されたと思われる形質転換株よりプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、調べたすべてのプラスミドにおいて、lysEをコードする領域内に自然変異が導入され、それらの変異のうちいくつかは、アミノ酸をコードするコドンが翻訳を停止させる停止コドンに置き換わるナンセンス変異が導入されていた。また、別のプラスミドではlysE遺伝子に欠失がみられた。これらのプラスミドに搭載されているlysEは、いずれも、機能が失われていることが考えられた。また、このlysE遺伝子の機能を失わせるような形でlysEをコードする領域の一部を意図的に欠失させたプラスミド（pRSlysE 1）を作製し、メチロフィラス・メチロトロファスに導入を試みたところ、対照として用いたpRSベクターと同等の頻度で導入できた。

前記pRSlysE 1は、lysEをコードする領域内に存在するPvuI（配列番号7の203-209位のCGATCGを認識）からMluI（同485-491位のACGCGT）までの領域を欠失させたプラスミドであり、以下のようにして構築した。具体的には、pRSlysEをPvuIおよびMluI（宝酒造製）にて

10

20

30

40

50

消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて、混合し反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約10kbpのDNA断片を回収した。このDNA断片をDNA Blunting Kit (宝酒造製)にて末端を平滑化した。これをDNA ligation kit Ver2(宝酒造製)にて自己連結(セフルファイグレーション)させた。

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ(E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化により構造を確認して、pRSlysE 1プラスミドを得た。

10

## 【0070】

以上のように、全長のlysE遺伝子を搭載するpRSlysEのメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入されたlysE変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスにlysE遺伝子を導入することは致死的であると考えられた。このことは、lysE遺伝子が異種の細菌においてL-リジンの排出に関して万能に機能するものではないことを示している。

## 【0071】

変異が導入されたpRSlysEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約0.3cm<sup>2</sup>の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィ)で定量した。その結果、変異型lysE遺伝子が導入されてもL-リジンの排出が促進されたと思われる株はほとんど得られなかった。

20

## 【0072】

<2>メチロフィラス属細菌でL-リジン排出活性を示す遺伝子の取得  
前項で述べたように、既知のlysE遺伝子はメチロフィラス属細菌中では致死的であることが示唆され、機能が失われたような変異型遺伝子が多く得られた。

## 【0073】

変異が導入されたpRSlysEの解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌中で機能する変異型lysE遺伝子を取得することができた。

30

## 【0074】

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異は、アミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のほぼ中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかった。コリネバクテリウム属細菌のlysE遺伝子は6個の疎水性ヘリックスを持つ膜タンパク質であることが報告されている(Vrlijc M., Sahm H., Eggeling L. Molecular Microbiology 22:815-826(1996))が、このlysE24遺伝子は終止コドンが導入されているため、同遺伝子がコードするタンパク質は、野生型lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質とは異なる構造を有し、この構造によってメチロフィラス属細菌中で機能することがわかった。

40

## 【0075】

lysE24の塩基配列を決定した結果を配列番号9に示す。対照として野生型のlysEの塩基配列を配列番号7に示した。lysE24では、配列番号7の355位のG(グアニン)のあとにT(チミン)が挿入されていた。このlysE24を持つプラスミドをpRSlysE24と命名した(図1)。pRSlysE24をあらためてAS1株に導入したところ、pRSとほぼ同頻度でプラスミドが導入できた。プラスミド導入株について、<1>(2)と同様の方法で培養上清中のL-リジン濃度を測定した結果を、表1に示す。

## 【0076】

## 【表1】

50

表1

菌株	L-リジンの生産量(g/L)
AS1/pRS	<0.01
AS1/pRSlysE24	0.1

10

## 【0077】

pRSlysE24で形質転換されたE.coli JM109株はAJ13830と命名され、同株は2001年6月4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に受託番号FERM P-18369として寄託され、平成14年5月13日にブダベスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8040の受託番号のもとで寄託されている。

## 【0078】

尚、lysE24遺伝子から、前記変異により生成した終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、同遺伝子を導入したAS1株はL-リジンを培地中に蓄積しなかった。

## 【0079】

20

## 【実施例2】

メチロフィラス・メチロトロファスへのL-リジン生合成系酵素遺伝子及びlysE24遺伝子の導入

lysE24遺伝子をメチロフィラス・メチロトロファスAS1株に導入することによって、培地中にL-リジンが蓄積することがわかった。これは、L-リジンの排出が促進されたことによると考えられた。

## 【0080】

本発明者らはメチロフィラス属細菌においてL-リジン生合成遺伝子をプラスミドで増強すると、著量のL-リジンを培地中に蓄積することを明らかにしている(特願平11-368097号)。そこで、L-リジン生合成遺伝子が増強されたメチロフィラス・メチロトロファスにおけるlysE24遺伝子導入の効果を調べた。

30

## 【0081】

<1> dapA<sup>\*</sup> 遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの構築

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子(dapA<sup>\*</sup>)を持つプラスミドを作製した。

## 【0082】

実施例1で作製したpRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9kbpのDNA断片を回収した。

40

## 【0083】

dapA<sup>\*</sup> 遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(WO 95/16042号参照)を鋳型として、配列番号3および4に示すプライマーを用いたPCR法(変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を使用した。得られたdapA<sup>\*</sup>断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

## 【0084】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA<sup>\*</sup> 遺伝子領域断片を、DNA Ligation

50

Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E. coli JM109 competent cells、宝酒造社) を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37 °Cで一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37 °Cで8時間振盪培養した。アルカリ - SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA<sup>+</sup>遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【 0 0 8 5 】

< 2 > メチロフィラス・メチロトロファスAS1株へのpRSlysE24又はpRSdapAの導入  
 上記のようにして得られたpRSdapAを、エレクトロポレーション法によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株に導入した。得られた形質転換株 (以下、「AS1/pRSdapA」ともいう)、前記のpRSlysE24が導入されたメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/pRSlysE24」ともいう)、および対象としてpRSプラスミドを導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/pRS」ともいう) について、菌体内 L - アミノ酸濃度および培養上清中の L - アミノ酸濃度を調べた。

10

【 0 0 8 6 】

各形質転換株を20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートで37 °Cにて1晩培養した後、培地表面積約0.3cm<sup>2</sup>の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地 (20ml) に植菌し、37 °Cにて24時間振盪培養した。培養終了後、培養液の一部を用いて菌体を遠心分離によって除去し、培養上清に含まれる L - アミノ酸濃度をアミノ酸分析計で定量した。残りの培養液よりKinnbierらの方法 (Dinnbier et al. Arch. Microbiol (1988) 150:348-357) により、シリコンオイルを通過させることによって培養液と菌体を分離した後、過塩素酸を用いて菌体内のアミノ酸を抽出し、アミノ酸分析計で L - アミノ酸濃度を定量した。この時、同時に菌体に含まれるタンパク質濃度を測定し、菌体内の L - リジン濃度は、この菌体タンパク質あたりの量で示した。

20

【 0 0 8 7 】

結果を表 2 に示した。AS1/pRSlysE24では、培地中においてAS1/pRSdapAとほぼ同等の L - リジン蓄積が見られた。一方、AS1/pRSlysE24では、菌体内の L - リジン濃度が低く押さえられ、lysE24遺伝子の導入により、L - リジンを菌体外へ排出していると考えられる。

30

【 0 0 8 8 】

【表 2】

表 2

菌株	培養上清中のL-リジン濃度 (g/L)	菌体内部のL-リジン濃度 (g/mg-protein)
AS1/pRS	<0.01	1.60
AS1/pRSlysE24	0.10	2.80
AS1/pRSdapA	0.12	17.3

40

【 0 0 8 9 】

また、培養上清中の他の L - アミノ酸の濃度も調べたところ、AS1/pRSlysE24では L - アルギニンが蓄積しており、lysE24は L - リジンだけでなく L - アルギニン排出活性も持っていることがわかった。結果を表 3 に示す。

50

【 0 0 9 0 】

【 表 3 】

表 3

菌株	培養上清中のL-アルギニン濃度 (g/L)	
AS1/pRS	<0.01	10
AS1/pRSlysE24	0.04	

【 0 0 9 1 】

pRSdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13831と命名され、同株は2001年6月4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に受託番号FERM P-18370として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8041の受託番号のもとで寄託されている。

【 0 0 9 2 】

< 3 >メチロフィラス・メチロトロファスAS1株へのlysE24遺伝子及びdapA\*遺伝子の導入  
メチロフィラス・メチロトロファスAS1株によるL-リジン生産において、L-リジンの菌体外への排出が律速になっていたが、lysE24遺伝子の導入により菌体外へのL-リジンの排出が促進されることがわかったので、lysE24遺伝子を導入した株においてL-リジン生合成系酵素系の強化を行い、生産性の更なる向上を目指した。

【 0 0 9 3 】

( 1 ) lysE24及びdapA\*を持つプラスミドの構築

lysE24とdapA\*の組み合わせ効果を評価するために、pRSlysEプラスミドにdapA\*遺伝子を挿入したプラスミドを、図2に示した方法で構築した。実施例1で作製したpRSlysE24を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製)にて末端を平滑化した。また、dapA\*を持つプラスミドpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA\*領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(宝酒造製)にて回収した。この断片を前記と同様に平滑化し、前記のpRSlysE24の消化物とDNA Ligation Kit Ver2(宝酒造製)にて連結した。

【 0 0 9 4 】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ-SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEdapAプラスミドを得た。このプラスミドは、lysE24とdapA\*の各遺伝子の転写の向きが同一になるように配置されている。

【 0 0 9 5 】

上記の方法で得られたpRSlysEdapA、および対照としてpRSlysE24、pRSdapA、pRSプラスミドを、エレクトロポレーション法によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB 10515)に導入した。

【 0 0 9 6 】

( 2 ) lysE24およびdapA\*を保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

前記のようにして得られたpRSlysEdapA、pRSlysE24、pRSdapA、又はpRSが導入されたAS1株を、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養

10

20

30

40

50



したのち、培地表面約0.3cm<sup>2</sup>の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。結果を表4に示す。pRSlysEdapAを導入した株は、pRSdapAやpRSlysE24を単独で導入した場合と比較して、培地中のL-リジン蓄積が約10倍に向上し、lysE24遺伝子の導入により、排出における律速が解除され、dapA<sup>+</sup>遺伝子増強効果が相乗的に表れたことがわかる。

【0097】

【表4】

表4

10

菌株	L-リジンの生産量(g/L)
AS1/pRS	0.00
AS1/pRSlysE24	0.10
AS1/pRSdapA	0.12
AS1/pRSlysEdapA	1.20

20

【0098】

pRSlysEdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13832と命名され、同株は2001年6月4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に受託番号FERM P-18371として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8042の受託番号のもとで寄託されている。。

【0099】

【発明の効果】

本発明により、メタノール資化性菌のL-アミノ酸生産性、特にL-リジン及びL-アルギニンの生産性を向上させることができる。

30

【0100】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> メタノール資化性菌を用いたL-リジン又はL-アルギニンの製造法

<130> P-9924

10

<140>

<141> 2002-05-27

<150> 2001-177075

<151> 2001-06-12

20

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

[ 0 1 0 1 ]

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

agggaaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac

39

40

[ 0 1 0 2 ]

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

10

<400> 2

cggaatgcac tagagttaac ctgcaggggtg aaattggtat ccgtcaca ttccacac 58

[ 0 1 0 3 ]

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt 35

[ 0 1 0 4 ]

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

40

<400> 4

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat 36

[ 0 1 0 5 ]

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

10

<400> 5

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgtg atgggatca tggaaatcct cttacaggt 60  
ctgc 64

[ 0 1 0 6 ]

<210> 6

<211> 50

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

30

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc 50

[ 0 1 0 7 ]

<210> 7  
 <211> 711  
 <212> DNA  
 <213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(711)

<400> 7

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt	48	
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser		
1 5 10 15		
ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga	96	20
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly		
20 25 30		
att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct	144	
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser		
35 40 45		
gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc	192	30
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser		
50 55 60		
aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct	240	
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala		
65 70 75 80		
tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac	288	
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn		40
85 90 95		
aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc	336	

Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro		
100	105	110
gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac	384	
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn		
115	120	125
cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag	432	
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys		10
130	135	140
ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat	480	
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr		
145	150	155
ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac	528	
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp		20
165	170	175
acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc	576	
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile		
180	185	190
tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg	624	
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu		
195	200	205
tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg	672	
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val		30
210	215	220
atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag	711	
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly		
225	230	235

[ 0 1 0 8 ]

<210> 8  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 8

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser	10
1 5 10 15	
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly	
20 25 30	
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser	
35 40 45	
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser	20
50 55 60	
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala	
65 70 75 80	
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn	
85 90 95	
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro	
100 105 110	
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn	30
115 120 125	
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys	
130 135 140	
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr	
145 150 155 160	
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp	40
165 170 175	
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile	

180 185 190  
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu  
195 200 205  
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val  
210 215 220  
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly  
225 230 235

10

【 0 1 0 9 】



<210> 9  
 <211> 712  
 <212> DNA  
 <213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(375)

<400> 9

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt	48	
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser		
1 5 10 15		
ctt ttg ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga	96	20
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly		
20 25 30		
att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct	144	
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser		
35 40 45		
gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc	192	30
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser		
50 55 60		
aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct	240	
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala		
65 70 75 80		
tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac	288	
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn		40
85 90 95		
aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc	336	

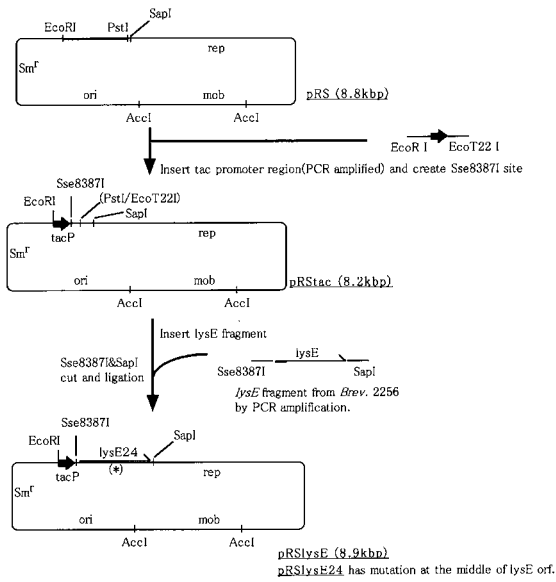
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro  
                   100                                  105                                  110  
 gat gac acg cct ttg ggc gtg ttc ggc ggt ggc cac tga cacgcgcaac 385  
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly His  
                   115                                  120                                  125  
 cgggtgcggg tggaggtag cgtcgataag cagcgggttt gggatgaagcc catgttgatg 445  
 gcaatcgtgc tgacctggtt gaacccgaat gcgtatttgg acgcgtttgt gtttatcggc 505 10  
 ggcgtcggcg cgcaatacgg cgacaccgga cggttgattt tcgccgctgg cgcgttcgcg 565  
 gcaagcciga tcctggttccc gctggttgggt ttcggcgcag cagcattgtc acgcccgtcg 625  
 tccagcccca aggtgtggcg ctggatcaac gtcgtcgtgg cagttgtgat gaccgcaatg 685  
 gccatcaaac tgaigtgat gggttag 712  
 [ 0 1 1 0 ]  
 <210> 10  
 <211> 124 20  
 <212> PRT  
 <213> Brevibacterium lactofermentum  
  
 <400> 10  
 Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser  
   1                  5                                  10                                  15  
 Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly 30  
                   20                                  25                                  30  
 Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser  
                   35                                  40                                  45  
 Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser  
                   50                                  55                                  60  
 Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala 40  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn  
                                   85                                  90                                  95  
 Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro  
                   100                                  105                                  110  
 Asp Asp Thr Pro Leu Gly Val Phe Gly Gly Gly His  
                   115                                  120

【図面の簡単な説明】

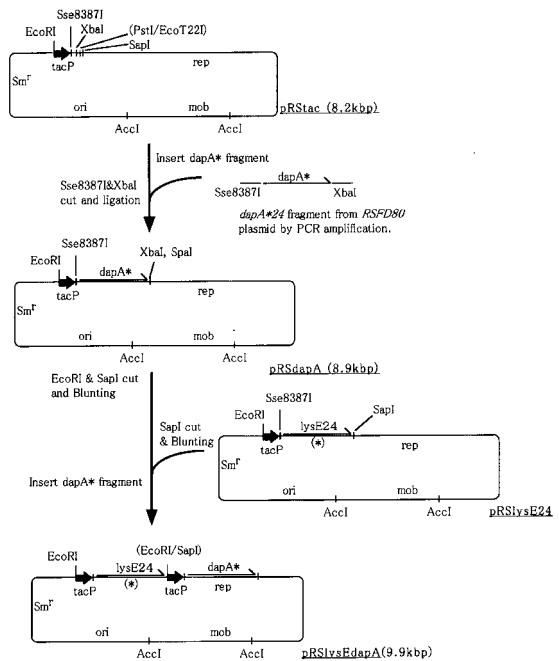
【図1】 tacプロモーターを持つプラスミドpRStac、及びpRStacに lysE遺伝子又はlysE24遺伝子が挿入されたプラスミドpRSlyse及びpRSlyse24の構築を示す図。

【図2】 lysE24遺伝子とdapA\* 遺伝子を持つプラスミドpRSlysedapAの構築を示す図。

【図1】



【図2】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 R	1/01	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
			C 1 2 R 1:01	
			C 1 2 N 1/32	
			C 1 2 R 1:01	
			C 1 2 P 13/08	A
			C 1 2 R 1:01	
			C 1 2 P 13/10	B
			C 1 2 R 1:01	

審査官 福間 信子

(56)参考文献 国際公開第97/023597(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90  
BIOSIS/WPIDS(STN)  
PubMed  
JSTPlus(JDreamII)  
JMEDPlus(JDreamII)