

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4595506号  
(P4595506)

(45) 発行日 平成22年12月8日(2010.12.8)

(24) 登録日 平成22年10月1日(2010.10.1)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 N** 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C 1 2 P** 13/04 (2006.01) C 1 2 P 13/04  
**C 1 2 R** 1/15 (2006.01) C 1 2 P 13/04  
 C 1 2 R 1:15

請求項の数 4 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2004-340187 (P2004-340187)	(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
(22) 出願日	平成16年11月25日(2004.11.25)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(65) 公開番号	特開2006-149214 (P2006-149214A)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(43) 公開日	平成18年6月15日(2006.6.15)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
審査請求日	平成19年7月25日(2007.7.25)	(72) 発明者	福井 啓太 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
		(72) 発明者	中村 純 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の生産能を有するコリネ型細菌であって、染色体上のアセチルCoAヒドロラーゼをコードする遺伝子もしくはその発現制御領域に変異が導入されたこと、または該遺伝子が破壊されたことによりアセチルCoAヒドロラーゼの活性が低下したコリネ型細菌を培地中で培養し、該培地中に前記L-アミノ酸を生成・蓄積せしめ、前記L-アミノ酸を培地から採取することを特徴とする、ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の製造法であって、前記アセチルCoAヒドロラーゼが、下記(A)又は(B)に記載のタンパク質である、方法。

(A) 配列番号24に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、又は

(B) 配列番号24に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】

前記アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が、下記(a)又は(b)に記載のDNAである請求項1に記載の方法、

(a) 配列番号23の塩基番号1037~2542からなる塩基配列を含むDNA、又は  
 (b) 配列番号23の塩基番号1037~2542からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク

質をコードするDNA。

【請求項3】

前記コリネ型細菌がさらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が上昇するように改変されたことを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリン、L-アラニン、及びL-バリンからなる群より選ばれる1又は2以上のアミノ酸である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、発酵工業に関し、コリネ型細菌を利用した発酵法によりピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸、特にL-グルタミン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリン、L-バリン、L-アラニンを効率よく製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、L-グルタミン酸をはじめとするピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸は、これらのL-アミノ酸の生産能を有するプレバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。これらのコリネ型細菌は、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。

20

【0003】

コリネ型細菌を代表とする好気性細菌を酸素制限条件で培養を行うと乳酸、酢酸等の目的物質以外の有機酸が副生物として過剰に蓄積し、菌体生育が抑制され、発酵生産性が大幅に低下する。また、副生物の有機酸を中和するためのカウンターイオンも過剰に必要となり、経済的でなく、培養過程で酢酸を副生しない菌株の創出、すなわち酢酸を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させた菌株を創出することが求められていた。

【0004】

30

これまでに酢酸を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させた例としては、フォスフォアセチルトランスフェラーゼ(pta)とラクテートデヒドロゲナーゼ(ldh)を欠損させたエシェリヒア・コリを用いたL-アミノ酸の製造方法(特許文献1参照)、ピルベートオキシダーゼ(poxB)を欠損させた腸内細菌群を用いたアミノ酸の製造方法、ピルベートオキシダーゼ(poxB)を欠損させた腸内細菌群を用いたD-パントテン酸の製造方法が知られている(特許文献2参照)。また、コリネ型細菌の酢酸資化に関与する酵素としてアセテートキナーゼ(ack)、フォスフォトランスアセチラーゼ(pta)(非特許文献1参照)が報告されている。一方、酢酸生成に関与する酵素としては、上記の他にピルベートオキシダーゼ(poxB)(特許文献3参照)を破壊したコリネ型細菌が報告されている。

40

【0005】

アセチルCoAヒドロラーゼは、アセチルCoAと水から酢酸を生成する酵素(3.1.2.1)であり、コリネバクテリウム・グルタミカムでも遺伝子配列は推定されていた(特許文献4参照)。しかし、当該遺伝子をクローニングしたり、発現して解析した報告はなく、実際の機能は確認されていなかった。

【特許文献1】国際公開第99/06532号パンフレット

【特許文献2】国際公開第02/36797号パンフレット

【特許文献3】欧州特許出願公開第1096013号明細書

【特許文献4】欧州特許出願公開第1108790号明細書

50

【非特許文献1】Microbiology, 1999 Feb;145 (Pt 2):503-13

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸を生産する能力が向上したコリネ型細菌を提供すること、及び該細菌を用いて上記L-アミノ酸を効率よく製造する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本研究者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、コリネ型細菌においてアセチルCoAヒドロラーゼ活性を低下させることにより、上記のL-アミノ酸の生産能、特にL-グルタミン酸、L-バリン、L-アラニンの生産能が向上することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0008】

即ち本発明は、以下のとおりである。

(1) ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の生産能を有するコリネ型細菌であって、アセチルCoAヒドロラーゼの活性が低下するように改変されたコリネ型細菌。

(2) 染色体上のアセチルCoAヒドロラーゼをコードする遺伝子またはその発現制御領域に変異が導入されたことによりアセチルCoAヒドロラーゼの活性が低下した、(1)のコリネ型細菌。

(3) 染色体上のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が破壊されたことによりアセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下した、(1)のコリネ型細菌。

(4) 前記アセチルCoAヒドロラーゼが、下記(A)又は(B)に記載のタンパク質である(1)~(3)のいずれかのコリネ型細菌、

(A) 配列番号24に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号24に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質。

(5) 前記アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子が、下記(a)又は(b)に記載のDNAである(2)又は(3)のコリネ型細菌、

(a) 配列番号23の塩基番号1037~2542からなる塩基配列を含むDNA、又は

(b) 配列番号23の塩基番号1037~2542からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(6) さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が上昇するように改変されたことを特徴とする(1)~(5)のいずれかのコリネ型細菌。

(7) 前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリン、L-アラニン、及びL-バリンからなる群より選ばれる1又は2以上のアミノ酸である(1)~(5)にいずれかのコリネ型細菌

(8) (1)~(7)のいずれかのコリネ型細菌を培地中で培養し、該培地中にピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸を生成・蓄積せしめ、該L-アミノ酸を培地から採取することを特徴とする、ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の製造法。

(9) 前記L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリン、L-アラニン、及びL-バリンからなる群より選ばれる1又は2以上のアミノ酸である、(8)のL-アミノ酸の製造法。

【発明の効果】

【0009】

10

20

30

40

50

本発明によれば、コリネ型細菌を用いた発酵法によるL-アミノ酸生産法において、ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の発酵収率を向上させることができる。また、本発明は、上記L-アミノ酸の生産菌の育種に利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する

【0011】

< 1 > ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の生産能を有するコリネ型細菌 10

本発明において、「コリネ型細菌」とは、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に分類されている細菌も含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム 20

コリネバクテリウム・リリウム

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (コリネバクテリウム・エフィシェンス)

コリネバクテリウム・ハーキュリス

プレバクテリウム・ディバリカタム

プレバクテリウム・フラバム

プレバクテリウム・インマリオフィラム

プレバクテリウム・ラクトファーメントム

プレバクテリウム・ロゼウム

プレバクテリウム・サッカロリティカム 30

プレバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス

プレバクテリウム・アルバム

プレバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0012】

「ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸」は、ピルビン酸由来の炭素骨格を有するものが望ましく、このようなL-アミノ酸としては、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリン、L-アラニン、L-バリンが挙げられる。本発明において、「ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中に上記L-アミノ酸を蓄積する能力をいう。 40

【0013】

このL-アミノ酸生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与される性質であってもよい。さらに、後述するようにしてアセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変することによって、L-アミノ酸生産能が付与されたものであってもよい。

【0014】

育種によってL-アミノ酸生産能を付与するには、代謝制御変異株の取得、目的物質の生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌の育種に採用されてき 50

た方法を適用することが出来る（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。これらの方法において、付与される代謝制御変異や増強される目的物質生合成系酵素の増強等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。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せられてもよい。

#### 【0015】

以下、各L-アミノ酸の生産能を付与する方法について述べる。

育種によってL-グルタミン酸生産能を付与するための方法としては、例えば、L-グルタミン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。L-グルタミン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセルムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼなどが挙げられる。

#### 【0016】

これらの遺伝子の発現を増強するための方法としては、これらの遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入した増幅プラスミドを導入すること、または、これらの遺伝子を染色体上で接合、転移等により多コピー化すること、またこれらの遺伝子のプロモーター領域に変異を導入することにより達成することもできる。（国際公開00/18935号パンフレット）

#### 【0017】

上記増幅プラスミドまたは染色体上で遺伝子を多コピー化させる場合、これらの遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌において機能するものであればいかなるプロモーターであっても良く、用いる遺伝子自身のプロモーターであってもよい。プロモーターを適宜選択することによっても、遺伝子の発現量の調節が可能である。

以上のような方法により、クエン酸シンターゼ遺伝子、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ遺伝子、及び/又はグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現が増強するように改変されたコリネ型細菌としては、特開2001-825447号公報、特開平07-834672号公報、国際公開00/18935号パンフレットに記載された微生物が例示できる。

#### 【0018】

また、L-グルタミン酸生産能を付与するための改変は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることにより行ってもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、イソクエン酸リアーゼ、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

#### 【0019】

上記のような酵素の活性を低下または欠損させるには、通常の変異処理法によって、染色体上の上記酵素の遺伝子に、細胞中の当該酵素の活性が低下または欠損するような変異を導入すればよい。例えば、遺伝子組換えによって、染色体上の酵素をコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列、オペレーター、ターミネーター、アテニューエーター等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。また、染色体上の酵素をコードする領域にアミノ酸置換(ミスセンス変異)を導入

10

20

30

40

50

すること、また終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、1～2塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分を欠失させることによっても達成出来る。（Journal of biological Chemistry 272:8611-8617（1997））また、コード領域が欠失したような変異酵素をコードする遺伝子を構築し、相同組換えなどによって、該遺伝子で染色体上の正常遺伝子を置換することによっても酵素活性を低下または欠損させることができる。以上のような方法により、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下したコリネ型細菌としては、特開平07-834672号公報、特開平06-237779号公報等に記載された菌株が利用出来る。

#### 【0020】

L-グルタミン酸生産能を付与または増強する別の方法として、有機酸アナログや呼吸阻害剤などへの耐性を付与する方法や細胞壁合成阻害剤に対する感受性を付与する方法も挙げられる。例えば、ベンゾピロンまたはナフトキノン類に耐性を付与する方法（特開昭56-1889号公報）、HOQNO（2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide）耐性を付与する方法（特開昭56-140895号公報）、 $\alpha$ -ケトマロン酸耐性を付与する方法（特開昭57-2689号公報）、グアニジン耐性を付与する方法（特開昭56-35981号公報）、ペニシリンに対する感受性を付与する方法（特開平4-88994）などが挙げられる。

このような耐性菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

- ・ プレバクテリウム・フラバムAJ11355(FERM P-5007；特開昭56-1889号公報)
- コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11368(FERM P- P-5020；特開昭56-1889号公報)
- プレバクテリウム・フラバムAJ11217(FERM P-4318；特開昭57-2689号公報)
- コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11218(FERM-P4319；特開昭57-2689号公報)
- プレバクテリウム・フラバムAJ11564(FERM P-5472；特開昭56-140895公報)
- プレバクテリウム・フラバムAJ11439(FERM P-5136；特開昭56-35981号公報)
- コリネバクテリウム・グルタミカムH7684(FERM BP-3004；特開平04-88994号公報)

#### 【0021】

育種によってL-バリン生産能を付与するための方法としては、例えば、L-バリン酸生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。L-バリン酸生合成に関与する酵素としては、例えば、ilvBNCオペロンの遺伝子、すなわちilvBNをコードするアセトヒドロキシ酸シンターゼやイソメロリダクターゼ(ilvC)(国際公開00/50624号パンフレット)が挙げられる。尚、ilvBNCオペロンは、L-バリン及び/又はL-イソロイシン及び/又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するためにアテニュエーションを解除することが望ましい。

#### 【0022】

L-バリン生産能を有するコリネ型細菌としては、L-バリン産生を減少させる物質代謝経路に関与する、少なくとも1種の酵素の活性を低下あるいは欠損させることにより行ってもよい。例えば、L-ロイシン合成に関与するスレオニンデヒドラターゼやD-パントセナート合成に関与する酵素の活性を低下させることが考えられる。（国際公開00/50624号パンフレット）

#### 【0023】

L-バリン生産能を付与する別の方法として、アミノ酸アナログなどへの耐性を付与する方法も挙げられる。

例えば、L-イソロイシンおよびL-メチオニン要求性、ならびにD-リボース、プリンリボヌクレオシドまたはピリミジンリボヌクレオシドに耐性を有し、かつL-バリン生産能を有する変異株（FERM P-1841、FERM P-29、特公昭53-025034号公報）や、ポリケトイド類に耐性を有する変異株（FERM P-1763、FERM P-1764；特公平06-065314号公報）、更には酢酸を唯一の炭素源とする培地でL-バリン耐性を示し、且つグルコースを唯一の炭素源とする培地でピルビン酸アナログ（ $\alpha$ -フルオロピルビン酸等）に感受性を有する変異株（FERM BP-3006、BP-3007 特許3006929号明細書）が挙げられる。

#### 【0024】

10

20

30

40

50

L - アラニン生産能を有するコリネ型細菌としては、H<sup>+</sup>-ATPaseを欠損させたコリネ型細菌や (Appl Microbiol Biotechnol. 2001 Nov;57(4):534-40)、アスパラギン酸 - 脱炭酸酵素をコードする構造遺伝子を増幅させたコリネ型細菌 (特開平 7 - 1 6 3 3 8 3 号公報) が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

育種によって L - アルギニン生産能を付与するための方法としては、例えば、L - アルギニン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。L - アルギニン生合成系酵素としては、N - アセチルグルタミリン酸レダクターゼ (argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ)、N - アセチルグルタメートキナーゼ (argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (argF)、アルギニノコハク酸シターゼ (argG)、アルギニノコハク酸リアーゼ (argH)、カルバモイルリン酸シターゼから選ばれる 1 種又は 2 種以上が挙げられる。これらのアルギニン生合成遺伝子は、Argオペロン (argCJBDFRGH) から構成されており、argRがコードするアルギニンリプレッサーにより制御されている。従って、アルギニンリプレッサーを破壊することによって、Argオペロンの発現量が向上し、酵素活性が上昇する。(特開2002-051790号公報)

【 0 0 2 6 】

L - アルギニン生産能を付与する別の方法として、アミノ酸アナログなどへの耐性を付与する方法も挙げられる。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コリネ型細菌 (特開昭 5 4 - 4 4 0 9 6 号公報) ; 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コリネ型細菌 (特開昭 5 7 - 1 8 9 8 9 号公報) ; アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌 (特公昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号公報) ; または、X - グアニジン (X は脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体) に耐性を有するコリネ型細菌 (特開平 2 - 1 8 6 9 9 5 号公報) ; 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を有するコリネ型細菌 (特開昭 57-150381号公報) 等が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

育種によって L - グルタミン生産能を付与するための方法としては、例えば、L - グルタミン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。例えば、L - グルタミン酸生合成に関与する酵素としては、グルタミンシンテターゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。(特開2002-300887号公報)

【 0 0 2 8 】

L - グルタミン生産能を付与するための改変は、L - グルタミンの生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることにより行ってもよい。例えば、細胞内のグルタミナーゼ活性を低下させることが考えられる。(特開2004-187684号公報)

【 0 0 2 9 】

育種によって L - グルタミン生産能を付与または増強するには、アミノ酸アナログなどへの耐性を付与する方法も挙げられる。6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法 (特開平3-232497号公報)、プリンアナログ耐性および/またはメチオニンスルホキサイド耐性を付与する方法 (特開昭61-202694号公報)、 - ケトマロン酸耐性を付与する方法 (特開昭56-151495号公報)、グルタミン酸を含有するペプチドに耐性を付与する方法 (特開平2-186994号公報) などが挙げられる。

L - グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

ブレバクテリウム・フラバムAJ11573(FERM P-5492) 特開昭56-151495号公報、

ブレバクテリウム・フラバムAJ12210(FERM P-8123) 特開昭61-202694号公報、

ブレバクテリウム・フラバムAJ12212(FERM P-8123) 特開昭61-202694号公報、

ブレバクテリウム・フラバムAJ12418(FERM-BP2205) 特開平2-186994号公報、

10

20

30

40

50

ブレバクテリウム・フラバムDH18(FERM P-11116) 特開平3-232497号公報、  
コリネバクテリウム・メラセコラDH344(FERM P-11117) 特開平3-232497号公報、  
コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11574(FERM P-5493) 特開昭56-151495号公報。

【0030】

育種によってL-プロリン生産能を付与するための方法としては、例えば、L-プロリン生合成に關与する酵素をコードする遺伝子の発現が増強するように改変する方法を挙げることができる。例えば、L-プロリン生合成に關与する酵素としては、グルタミン酸5キナーゼ、グルタミル-リン酸レダクターゼ、ピロリン-5-カルボキシレートレダクターゼが挙げられる。

【0031】

L-プロリン生産能を付与するための改変は、L-プロリンの生合成経路から分岐して他の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性を低下または欠損させることにより行ってもよい。例えば、細胞内のオルニチン-アミノトランスフェラーゼを低下させることが考えられる。

【0032】

なお、L-アルギニン、L-グルタミン、L-プロリンはL-グルタミン酸を骨格としているので、上述のL-グルタミン酸生産菌において、L-グルタミン酸から各L-アミノ酸を生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅して育種してもよい。

また、L-アラニンはL-アスパラギン酸から-脱炭酸に反応によってL-アラニンに変換されるため、L-アスパラギン酸生産菌において、アセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変することによってL-アラニン生産菌を得ることができる。

【0033】

<2>アセチルCoAヒドロラーゼ活性を低下させるための改変

本発明のコリネ型細菌は、上記のようなL-アミノ酸生産能を有するコリネ型細菌であって、かつアセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変されたコリネ型細菌である。

本発明のコリネ型細菌は、上記のようなピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸の生産能を有するコリネ型細菌を、アセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変することにより得ることができる。なお、本発明のコリネ型細菌の育種において、L-アミノ酸生産能の付与とアセチル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.1)活性を低下させる改変は、どちらを先に行ってもよい。

【0034】

「アセチルCoAヒドロラーゼ(ACH)活性」は、アセチルCoAと水から酢酸を生成する反応を触媒する活性をいう。「アセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変された」とは、アセチルCoAヒドロラーゼ活性が、非改変株、例えば野生株のコリネ型細菌の比活性よりも低くなったことをいう。ACH活性は非改変株と比較して、菌体当たり50%以下、好ましくは30%以下、さらに望ましくは菌体当たり10%以下に低下されていることが好ましい。ここで、対照となる野生株のコリネ型細菌としては、例えば、野生株としてはブレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株(ATCC13869)、非改変株としては、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム Idh株が挙げられる。アセチルCoAヒドロラーゼ活性は、Gergely, J., らの方法(Gergely, J., Hele, P. & Ramkrishnan, C.V. (1952) J. Biol. Chem. 198 p323-334)を参考にして測定することが出来る。尚、「低下」には活性が完全に消失した場合も含まれる。本発明のコリネ型細菌は、野生株又は非改変株よりアセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下していればよいが、さらにこれらの株に比べてL-アミノ酸の蓄積が向上していることがより望ましい。

【0035】

上記活性を有するアセチルCoAヒドロラーゼとしては、例えば、配列番号24に示すアミノ酸配列を有するタンパク質を挙げることができる。また、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有する限りにおいて、配列番号24に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有するものであ

10

20

30

40

50

てもよい。ここで、数個とは、例えば、2～20個、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個を意味する。上記置換は保存的置換が好ましく、保存的置換としては、alaからser又はthrへの置換、argからgln、his又はlysへの置換、asnからglu、gln、lys、his又はaspへの置換、aspからasn、glu又はglnへの置換、cysからser又はalaへの置換、glnからasn、glu、lys、his、asp又はargへの置換、gluからgly、asn、gln、lys又はaspへの置換、glyからproへの置換、hisからasn、lys、gln、arg又はtyrへの置換、ileからleu、met、val又はpheへの置換、leuからile、met、val又はpheへの置換、lysからasn、gln、his又はargへの置換、metからile、leu、val又はpheへの置換、pheからtrp、tyr、met、ile又はleuへの置換、serからthr又はalaへの置換、thrからser又はalaへの置換、trpからphe又はtyrへの置換、tyrからhis、phe又はtrpへの置換、及び、valからmet、ile又はleuへの置換が挙げられる。

10

## 【0036】

「アセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下するように改変された」とは、例えば、細胞あたりのアセチルCoAヒドロラーゼの分子数が低下した場合や、分子あたりのアセチルCoAヒドロラーゼ活性が低下した場合等が該当する。具体的には、染色体上のアセチルCoAヒドロラーゼをコードする遺伝子を欠損させたり、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。染色体上のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子としては、例えば、配列番号23の塩基番号1037～2542からなる塩基配列を含むDNAを挙げることができる。また、アセチルCoAヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、配列番号23の塩基番号1037～2542からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、60、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

20

## 【0037】

アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子(以下ach遺伝子と呼ぶ)の取得は、GenBankに登録のコリネバクテリウム・グルタミカムの配列(配列番号23、GenBank Accession No.NC\_003450のNCgl2480(NC\_003450の2729376..2730884番目の相補鎖))に基づき、合成オリゴヌクレオチドを合成し、コリネバクテリウム・グルタミカムの染色体を鋳型としてPCR反応を行うことによってクローニングできる。また、近年ゲノムプロジェクトにより、塩基配列が決定されているプレバクテリウム・ラクトファーマンタム等のコリネ型細菌の配列も利用できる。染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K.Miura, Biochem.Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97～98頁、培風館、1992年参照)等により調製することができる。

30

## 【0038】

上記のようにして調製したach遺伝子又はその一部を遺伝子破壊に使用することができる。ただし、遺伝子破壊に用いる遺伝子は破壊対象のコリネ型細菌の染色体DNA上のach遺伝子(例えば、配列番号23の塩基番号1037～2542番目の塩基配列を有する遺伝子)と相同組換えを起こす程度の相同性を有していればよい。ここで、このような相同遺伝子も使用することができる。ここで、相同組換えを起こす程度の相同性とは、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上である。また、上記遺伝子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得るDNA同士であれば、相同組換えは起こり得る。「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、60、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で、1回より好ましくは2～3回洗浄する条件が挙げられる。

40

50

## 【 0 0 3 9 】

上記のような遺伝子を使用し、例えば、ach遺伝子の部分配列を欠失し、正常に機能するアセチルCoAヒドロラーゼを産生しないように改変した欠失型ach遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子で組換えを起こさせることにより、染色体上のach遺伝子を破壊することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖上DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある（米国特許第6303383号明細書、又は特開平05-007491号公報）。また、上述のような相同組換えを利用した遺伝子置換により遺伝子破壊は、宿主上で複製能力を持たないプラスミドを用いても行うことが出来る。

10

## 【 0 0 4 0 】

欠失型のach遺伝子を宿主染色体上のach遺伝子と置換するには、例えば以下のようにすればよい。まず、温度感受性複製起点、欠失型ach遺伝子、レバンシュークラゼをコードするsacB遺伝子及びクロラムフェニコール等の薬剤耐性を示すマーカー遺伝子を挿入して組換え用プラスミドを調製する。

## 【 0 0 4 1 】

ここで、レバンシュークラゼをコードするSacB遺伝子は、染色体上からベクター部分が脱落した菌株を効率よく選択する為に使用される遺伝子である（Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69-73）。すなわち、コリネ型細菌では、レバンシュークラゼを発現させると、シュークロースを資化することによって生成したレバンが致死的に働き、生育することが出来ない。従って、レバンシュークラゼを搭載したベクターが染色体上に残ったままの菌株をシュークロース含有プレートで培養すると生育できず、ベクターが脱落した菌株のみシュークロース含有プレートで選択することが出来る。

20

## 【 0 0 4 2 】

sacB遺伝子又はその相同遺伝子は、以下のような配列の遺伝子を用いることが出来る。

バチルス・ズブチルス：sacB GenBank Accession Number X02730 （配列番号19）  
 バチルス・アミロリキュファシエンス：sacB GenBank Accession Number X52988  
 ザイモモナス・モピリス：sacB GenBank Accession Number L33402  
 バチルス・ステアロサーモフィラス：surB GenBank Accession Number U34874  
 ラクトバチルス・サンフランシセンシス：frfA GenBank Accession Number AJ508391  
 アセトバクター・キシリナス：lsxA GenBank Accession Number AB034152  
 グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス：lsdA GenBank Accession Number L41732

30

## 【 0 0 4 3 】

次に、上記組換えプラスミドでコリネ型細菌を形質転換する。形質転換は、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増加させる方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、バチルス・ズブチルスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調整しDNAを導入する方法（Dancan, C.H., Wilson, G.A and Young, F.E, Gene, 1, 153 (1977)）がある。あるいは、バチルス・ズブチルス、放線菌類及び酵母について知られているようなDNA受容菌の細胞を組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)）も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によっても行うことができる。

40

## 【 0 0 4 4 】

コリネ型細菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2（以上、特開2000-262288号公報）、pHSC4（フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報）等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細菌中で少なくとも25では自律複製す

50

ることができるが、37 °Cでは自律複製できない。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ1 2571は、1990年10月11日に通商産業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 特許微生物寄託センター）（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

#### 【0045】

上記のようにして得られる形質転換体を温度感受性複製起点が機能しない温度（25 °C）で培養し、プラスミドを導入した株を取得する。プラスミド導入株を高温で培養し、温度感受性プラスミドを脱落させ、抗生物質を含有するプレートに本菌株を塗布する。温度感受性プラスミドは高温で複製できないので、プラスミドが脱落した菌株は、抗生物質を含有したプレートでは生育出来ないが、ごくわずかの頻度であるが、プラスミド上の酢酸合成系遺伝子と染色体上のach遺伝子と組換えを起こした菌株が出現する。

10

#### 【0046】

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するach遺伝子配列との組換えを起こし、染色体のach遺伝子と欠失型のach遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。

#### 【0047】

次に、染色体DNA上に欠失型のach遺伝子のみを残すために、ベクター部分（温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なach遺伝子が染色体DNA上に残され、欠失型ach遺伝子が切り出される場合と、反対に欠失型ach遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なach遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のach遺伝子は、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型ach遺伝子が残った株を選択することによって、ach遺伝子が破壊された株を取得することができる。

20

#### 【0048】

なお、上記温度感受性プラスミドに換えて、コリネ型細菌内で複製能を持たないプラスミドを用いても、同様の遺伝子破壊を行うことができる。コリネ型細菌内で複製能を持たないプラスミドは、エシェリヒア・コリで複製能力を持つプラスミドが好ましく、例えば、pHSG299(宝バイオ社製)、pHSG399(宝バイオ社製)等が挙げられる。

30

#### 【0049】

アセチルCoA ヒドロラーゼ活性を低下させることは、上述の染色体上のアセチルCoA ヒドロラーゼをコードする遺伝子を欠損させる以外に、プロモーターやシャインダルガルノ(SD)配列、オペレーター、ターミネーター、アテニューエーター等の発現調節配列を改変したりすることなどによって達成される。染色体上の発現調節配列の確認は、Genetix等の遺伝子解析ソフトや、プロモーター検索ベクター等の発現解析用ベクター、またGenbank等の公知の情報により確認出来る。例えば、アセチルCoA ヒドロラーゼ活性を低下させる変異とは、例えば、アセチルCoA ヒドロラーゼのプロモーター領域をより発現量の弱いプロモーターに置換する変異や、コンセンサス配列から遠ざけるような変異が該当する。これらの変異導入は、上記同様、温度感受性プラスミドや、宿主で複製能を持たないサイサイドベクターを使用することによって導入できる。

40

#### 【0050】

また、染色体上のアセチルCoA ヒドロラーゼをコードする領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、また終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、1～2塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入すること、遺伝子の一部分を欠失させることによっても達成出来る。（Journal of biological Chemistry 272:8611-8617（1997）

50

)

## 【0051】

また、アセチルCoAヒドロラーゼの活性を低下させる方法としては、上述の遺伝子操作法以外に、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射または、N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、アセチルCoAヒドロラーゼの活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。

## 【0052】

なお、本発明においては、ACH活性の低下に加えて、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (以下GDH)、の活性が上昇するように改変された細菌株を用いるとより有効である。

コリネ型細菌のGDH活性を増幅するには、GDHをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをL - アミノ酸生産能を有するACH活性の低下したコリネ型細菌に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のGDHをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、GDH活性が増幅される。

## 【0053】

GDHをコードする遺伝子は、コリネ型細菌の遺伝子を用いてもよいし、エシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子を用いてもよい。

コリネ型細菌のGDHをコードする遺伝子 (gdh遺伝子) の塩基配列は既に明らかにされている (配列番号 25 : Molecular Microbiology (1992) 6 (3), 317-326 NCgl1999 NC\_003450の2194739..2196082 の相補鎖) ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCR法 (PCR : polymerase chain reaction ; White, T.J. et al ; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) によって、gdh遺伝子を取得することができる。コリネ型細菌等の他の微生物のGDHをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。

## 【0054】

< 3 > 本発明のコリネ型細菌を用いたL - アミノ酸の生産

上記のようにして得られるコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中にピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL - アミノ酸を生成蓄積させ、該培地から該L - アミノ酸を採取することにより、ピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL - アミノ酸を効率よく製造することができる。

## 【0055】

本発明のコリネ型細菌を用いてピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL - アミノ酸を生産するには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他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培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

## 【0056】

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆タンパク分解物等が使用され、生育にア

ミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

無機塩類としては、りん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

【0057】

培養は、発酵温度20～45℃、pHを5～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のピルビン酸を中間体とする生合成経路を経て生成するL-アミノ酸が蓄積される。

10

培養終了後の培養液から上記L-アミノ酸を採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に、濃縮晶析することによって採取される。

【0058】

[実施例]

以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【実施例1】

【0059】

< 1 > sacB搭載遺伝子破壊用ベクターの構築

(A) pBS3の構築

sacB遺伝子(配列番号19)をバチルス・ズブチリスの染色体DNAを鋳型として配列番号1と2をプライマーとして用いて、PCRにより取得した。PCR反応は、LA taq(TaKaRa)を用い、94℃で5分保温を1サイクル行った後、変性94℃ 30秒、会合49℃ 30秒、伸長72℃ 2分からなるサイクルを25回繰り返した。生成したPCR産物を常法により精製後BglIIとBamHIで消化し、平滑化した。この断片をpHSG299のAvaIIで消化後、平滑化した部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝バイオ社製)を用いて形質転換を行い、カナマイシン(以下、Kmと略す)25μg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニーを分離し形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS3と命名した。pBS3の構築過程を図1に示す。

30

【0060】

(B) pBS4Sの構築

pBS3上に存在するカナマイシン耐性遺伝子配列中のSmaI部位をアミノ基置換を伴わない塩基置換によりカナマイシン耐性遺伝子を破壊したプラスミドをクロスオーバーPCRで取得した。まず、pBS3を鋳型として配列表配列番号3,4の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、カナマイシン耐性遺伝子のN末端側の増幅産物を得る。一方Km耐性遺伝子のC末端側の増幅産物を得るためにpBS3を鋳型として配列表配列番号5,6の合成DNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(宝バイオ社製)を用い、98℃で5分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合57℃ 30秒、伸長72℃ 1分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。配列表配列番号4と5は部分的に相補的であり、またこの配列内に存在するSmaI部位はアミノ酸置換を伴わない塩基置換を施すことにより破壊されている。次にSmaI部位が破壊された変異型カナマイシン耐性遺伝子断片を得るために、上記カナマイシン耐性遺伝子N末端側及びC末端側の遺伝子産物を、それぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表配列番号3,6の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い変異導入されたKm耐性遺伝子増幅産物を得た。PCR反応はPyrobest DNA Polymerase(宝バイオ社)を用い、98℃で5分保温を1サイクル行った後、変性98℃ 10秒、会合57℃ 30秒、伸長72℃ 1.5分からなるサイクルを25回繰り返すことにより目的のPCR産物を得ることができる。

40

50

## 【 0 0 6 1 】

PCR産物を常法により精製後BanIIで消化し、上記のpBS3のBanII部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝バイオ社製宝バイオ社製）を用いて形質転換を行い、カナマイシン25 µg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS4Sと命名した。pBS4Sの構築過程を図2に示す。

## 【 0 0 6 2 】

## (C) pBS5Tの構築

上記(B)で構築したpBS4Sにコリネ型細菌の温度感受性複製起点を挿入したプラスミドの構築方法は、pHSC4（特開平5-7491号公報）のBamHIとSmaI処理して平滑化して得たコリネ型細菌の温度感受性複製起点をpBS4SのNdeIサイトを平滑化した部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝バイオ社製）を用いて形質転換を行い、Km 25 µg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現したコロニーを釣り上げ、単コロニーを分離し形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS5Tと命名した。図3にpBS5Tの構築図を示す。

## 【 実施例 2 】

## 【 0 0 6 3 】

## &lt; LDH遺伝子破壊株の構築 &gt;

## (A) ラクテートデヒドロゲナーゼ遺伝子破壊用断片のクローニング

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株由来のラクテートデヒドロゲナーゼ（以下、ldh遺伝子と略す）のORFを欠失した遺伝子断片は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032（GenBank Database Accession No.NC\_003450）の該遺伝子の塩基配列（配列番号21）を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いたクロスオーバーPCRで取得した。具体的にはブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号7、8の合成DNAをプライマーとして常法によりPCRを行いldh遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、ldh遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株ゲノムDNAを鋳型とし、配列表配列番号9、10の合成DNAをプライマーとして常法によりPCRを行った。配列表配列番号8と9は互いに相補的であり、ldhのORFの全配列を欠損させた構造となっている。

## 【 0 0 6 4 】

次に内部配列を欠失したldh遺伝子断片を得るために、上記ldh N末側およびC末側の遺伝子産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表配列番号11と12の合成DNAをプライマーとして常法によりPCRを行い変異導入されたldh遺伝子増幅産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後SalIで消化した後、上記pBS4SのSalI部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル（宝バイオ社製）を用いて形質転換を行い、IPTG 100 µM、X-Gal 40 µg/mlおよびKm 25 µg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをp ldh56-1と命名した。該プラスミドの構築図を図4に示す。

## 【 0 0 6 5 】

## (B) ldh破壊株の作成

上記(A)で得られたp ldh56-1はコリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株を電気パルス法により高濃度のプラスミドp ldh56-1を用いて形質転換し、カナマイシン25 µg/mlを含むCM-Dex培地（グルコー

10

20

30

40

50

ス 5g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、pH7.5(KOH) に塗布し、31.5 で約30時間培養した。この培地上に生育した株は該プラスミドのldh遺伝子断片とブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株ゲノム上の同遺伝子との間で相同組み換えを起こした結果、同ゲノムに該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびSacB遺伝子が挿入されている株である。

【0066】

次にこれらの一回目の組換え体をカナマイシンを含まないCM-Dex液体培地にて31.5 で一晚培養し、適当に希釈した後、カナマイシンを含まない10%ショ糖含有Dex-S10培地（ショ糖 10g/L、ポリペプトン 10g/L、イーストエキストラクト 10g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01g/L、尿素 3g/L、大豆加水分解物 1.2g/L、ピオチン 10  $\mu\text{g}$ /L、pH7.5(KOH) に塗布し、31.5 にて約30時間培養した。その結果、2回目の相同組み換えによりSacB遺伝子が脱落しシュークロース非感受性となったと考えられる株約50個得た。

【0067】

この様にして得られた株の中には、そのldh遺伝子がp ldh56-1に由来する変異型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。ldh遺伝子の変異型であるか野生型であるかの確認は、Dex-S10寒天培地にて培養して得られた菌体を直接PCR反応に供し、ldh遺伝子の検出を行うことによって容易に確認できる。ldh遺伝子をPCR増幅するためのプライマー（配列表配列番号7および配列表配列番号10）を用いて分析した際、2256株の染色体DNAを鋳型にしたものよりもPCR産物の大きさが小さいものをldh欠損株として以降の実験に使用した。上記方法にてショ糖非感受性となった菌株を分析した結果、変異型ldh遺伝子のみを有する株を選抜し、該株を2256 (ldh)株と命名した。また、以下のach遺伝子破壊株の親株には該株を用いた。

【0068】

尚、発酵生産を嫌氣的条件で行う場合には、乳酸が副生物として著量蓄積し、ラクテートデヒドロゲナーゼを欠損させておいた方が好ましいが、L-グルタミン酸は、好氣的条件で作られるので、ラクテートデヒドロゲナーゼは機能しておらず、アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子破壊株の親株として、ldhが欠損している必要はない。

【実施例3】

【0069】

<アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子破壊株の構築>

(A) アセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子破壊用断片のクローニング

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株のアセチルCoAヒドロラーゼ遺伝子（以下、該遺伝子をachとする）のORFを欠失した遺伝子断片の取得は、既に公開されているコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032（GenBank Database Accession No. NC\_003450）の該遺伝子の塩基配列（配列番号23）を参考に設計した合成DNAをプライマーとして用いたクロスオーバーPCRで取得した。具体的には、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株ゲノムDNAを鋳型とし、配列表配列番号13と14の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、ach遺伝子C末端側の増幅産物を得る。一方、ach遺伝子N末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株ゲノムDNAを鋳型として、配列表配列番号15と16の合成DNAをプライマーとしてPCRを行う。配列表配列番号14と15は互いに相補的である。PCR反応は、KOD -plus-(東洋紡社製)を用い、N末端側、C末端側ともに、94 で2分保温を1サイクル行った後、変性94 10秒、会合55 30秒、伸長68 50秒からなるサイクルを30回繰り返した。次に、内部配列を欠失したach遺伝子断片を得るために、上記ach N末側およびC末側の遺伝子産物をそれぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表配列番号17と18の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い変異導入されたach遺伝子増幅産物を得た。PCR反応は、KOD -plus-(TOYOBO)を用い、94 で2分保温を1サイクル行った後、変性94 10秒、会合55 30秒、伸長68 90秒からなるサイクルを30回繰り返し、目的の変異導入されたach遺伝

10

20

30

40

50

子増幅産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後XbaIで消化し、上記実施例1(B)で構築したpBS4SのXbaI部位に挿入した。このDNAを用いて、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝バイオ社製)を用いて形質転換を行い、IPTG 100 μM、X-Gal 40 μg/mlおよびカナマイシン25 μg/mlを含むLB培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、目的のPCR産物が挿入されていたものをpBS4S::achと命名した。pBS4S::achの構築過程を図5に示した。

#### 【0070】

##### (B) ach破壊株の作成

上記(A)で得られたpBS4S::achはコリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。プレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 (ldh)株を電気パルス法により高濃度のプラスミドpBS4S::achを用いて形質転換し、カナマイシン25 μg/mlを含むCM-Dex培地に塗布し、31.5 で約30時間培養した。この培地上に生育した株は該プラスミドのach遺伝子断片とプレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 (ldh)株のそれぞれのゲノム上の同遺伝子との間で相同組み換えを起こした結果、同ゲノムに該プラスミドに由来するカナマイシン耐性遺伝子およびSacB遺伝子が挿入されている。

#### 【0071】

次にこれらの一回目の組換え体をカナマイシンを含まないCM-Dex液体培地にて31.5 で一晚培養し、適当に希釈した後、カナマイシンを含まない10%ショ糖含有Dex-S10培地に塗布し、31.5 にて約30時間培養した。その結果、2回目の相同組み換えによりSacB遺伝子が脱落しシュークロース糖非感受性となったと考えられる株約50個得た。

#### 【0072】

この様にして得られた株の中には、そのach遺伝子がpBS4S::achに由来する変異型に置き換わったものと野生型に戻ったものが含まれる。ach遺伝子が変異型であるか野生型であるかの確認は、Dex-S10寒天培地にて培養して得られた菌体を直接PCR反応に供し、ach遺伝子の検出を行うことによって容易に確認できる。ach遺伝子をPCR増幅するためのプライマー(配列表配列番号13および配列表配列番号16)を用いて分析すると、野生型では2.9kb、欠失領域を持つ変異型では1.4kbのDNA断片を認めるはずである。上記方法にてシュー糖非感受性となった菌株を分析した結果、変異型遺伝子のみを有する株を選抜し、2256 (ldh)株から得られた該株を2256 (ldh, ach)株と命名した。

#### 【実施例4】

#### 【0073】

##### <ach欠損株によるL-グルタミン酸の生産>

##### (1) ach欠損株の培養評価

プレバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 (ldh)株および2256 (ldh, ach)株を用いてL-グルタミン酸生産のための培養をS型Jarを用いて以下のように行った。CMDexプレート培地にて培養して得た2256 (ldh)株および2256 (ldh, ach)株それぞれ1白金耳分をシード培地(グルコース60g、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>1.54g、KOH 1.45g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.9g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、VB1・HCl 670 μg、Biotin 40 μg、大豆加水分解物1.54g、DL-メチオニン0.28g、AZ-20R 0.1mlを純水1Lに含む(アンモニア水でpH7.2に調整))300mlに接種し、pH7.2(NH<sub>3</sub>)、31.5、通気1/1vvm、PL>0に制御して、残糖が0になるまで培養した。

この培養液30mlをメイン培地(グルコース80g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>3.46g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、MnSO<sub>4</sub>・4-5H<sub>2</sub>O 0.01g、VB1・HCl 230 μg、大豆加水分解物0.35g、AZ-20R 0.2mlを純水1Lに含む(アンモニアでpH7.3に調整))270mlに接種し、31.5、pH7.3、通気1/1vvm、PL>0に制御して培養した。残糖が0になる前に、更にグルコース500g、AZ-20R 0.2mlを純水1Lに含むフィード溶液を70-80ml添加し、残糖が0になるまで培養した。

培養終了後、培養液中のL-グルタミン酸蓄積量は、培養液を適当に希釈した後、バイオテックアナライザーAS210(旭化成)にて分析した。このときの結果を表1に示した。

## 【 0 0 7 4 】

## 【表 1】

strain	OD620nm(x101)	消費糖(g)	Glu(g/L)	Glu収率(%)	a-KG(g/L)
2256 Δ(ldh)	0.720	60.1	87.8	51.8	2.66
2256 Δ(ldh, ach)	0.629	63.6	93.6	53.9	8.45

## 【 0 0 7 5 】

2256 (ldh, ach)は、親株の2256 (ldh)株に比べて収率で約2%の向上が認められた。更に、L-グルタミン酸の前駆体であるa-KGの蓄積量も約3倍の向上が認められた。この結果より、L-グルタミン酸の生産において、ACH活性の消失または低下が有効であることが示された。

10

## 【実施例 5】

## 【 0 0 7 6 】

< ach欠損株によるL-アラニン、L-バリンの生産 >

( 1 ) ach欠損株の培養評価

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム2256 (ldh)株および2256 (ldh, ach)株を用いてL-アラニン、L-バリン生産のための培養をS型Jarを用いて以下のように行った。CMDexプレート培地にて培養して得た2256 (ldh)株および2256 (ldh, ach)株それぞれ1白金耳分をシード培地(グルコース60g、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>1.54g、KOH 1.45g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.9g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、VB1・HCl 670 μg、Biotin 40 μg、大豆加水分解物1.54g、DL-メチオニン 0.28g、AZ-20R 0.1mlを純水1Lに含む(アンモニア水でpH7.2に調整))300mlに接種し、pH7.2(NH<sub>3</sub>)、31.5、通気1/1vvm、PL>0に制御して、残糖が0になるまで培養した。

20

この培養液30mlをメイン培地(グルコース80g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>3.46g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g、MnSO<sub>4</sub>・4-5H<sub>2</sub>O 0.01g、VB1・HCl 230 μg、大豆加水分解物0.35g、AZ-20R 0.2mlを純水1Lに含む(アンモニアでpH7.3に調整))270mlに接種し、31.5、pH7.3、通気1/1vvm、PL>0に制御して培養した。残糖が0になる前に、更にグルコース500g、AZ-20R 0.2mlを純水1Lに含むフィード溶液を70-80ml添加し、残糖が0になるまで培養した。

培養終了後、培養液中のL-アラニン、L-バリン蓄積量は、培養液を適当に希釈した後、アミノ酸アナライザーL8500(HITACHI)にて分析した。このときの結果を表2に示した。

## 【 0 0 7 7 】

30

## 【表 2】

strain	OD620nm(x101)	Ala(g/L)	Val(g/L)
2256 Δldh	0.72	1.149	0.052
2256 ΔldhΔach	0.629	2.533	0.214

## 【 0 0 7 8 】

2256 (ldh, ach)では、親株の2256 (ldh)株に比べて、L-アラニンの蓄積量が約2.2倍、L-バリンで約4倍の向上が認められた。この結果より、L-アラニン、L-バリンの生産において、ACH活性の消失または低下が有効であることが示された。

## 【図面の簡単な説明】

40

## 【 0 0 7 9 】

【図 1】プラスミドpBS3の構築手順を示す図。

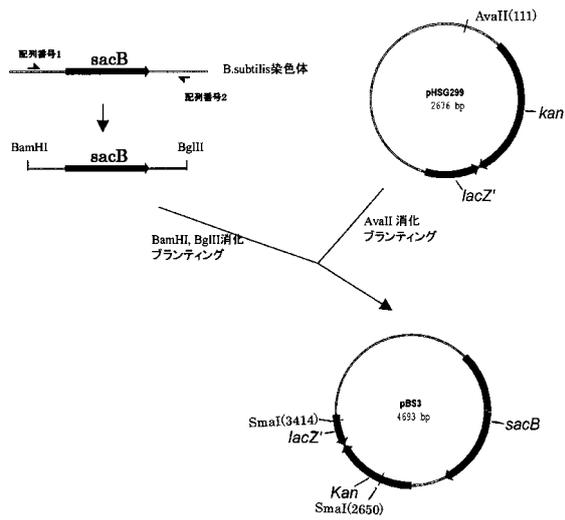
【図 2】プラスミドpBS4Sの構築手順を示す図。

【図 3】プラスミドpBS5Tの構築手順を示す図。

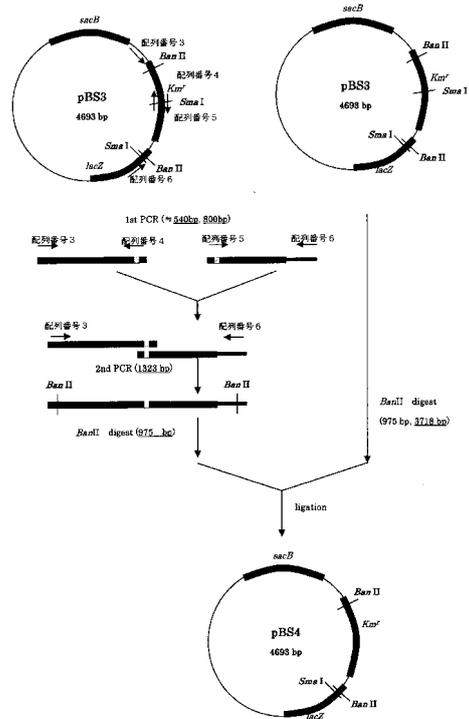
【図 4】プラスミドp ldh56-1の構築手順を示す図。

【図 5】プラスミドpBS4S:: achの構築手順を示す図。

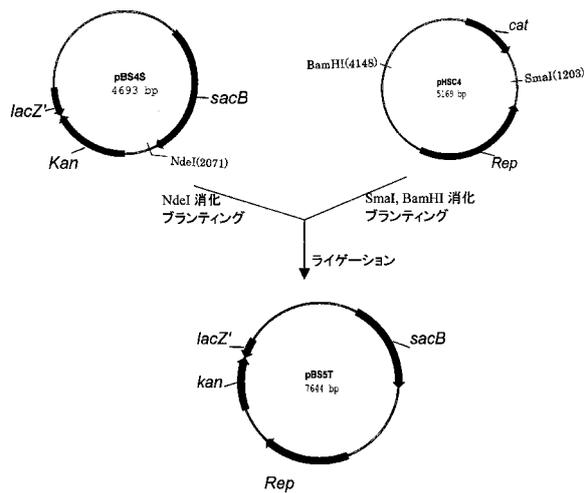
【 図 1 】



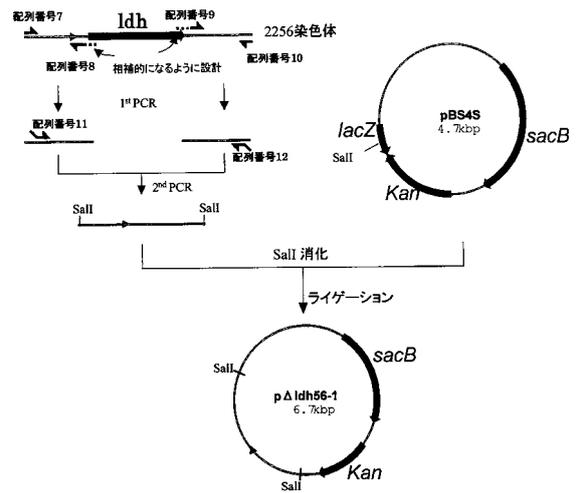
【 図 2 】



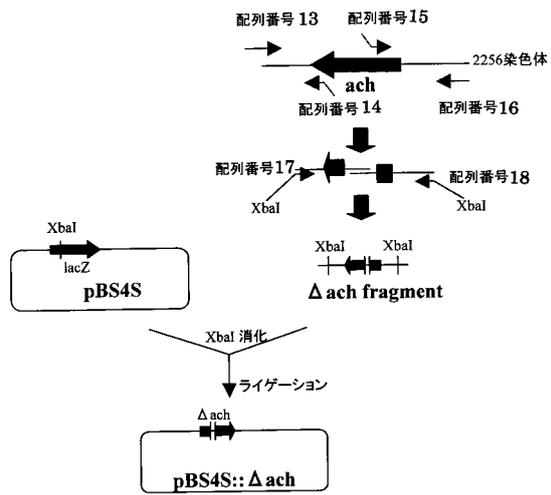
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0004595506000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 児島 宏之  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第03/040290(WO,A1)  
国際公開第00/018935(WO,A1)  
特開2002-191370(JP,A)  
J. Biotechnol., 2003年, Vol.104, p.5-25

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12P 13/04 - 13/24

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed