

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5521347号  
(P5521347)

(45) 発行日 平成26年6月11日(2014.6.11)

(24) 登録日 平成26年4月18日(2014.4.18)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 P 13/04 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/04
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21
<b>C 1 2 R 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/04
	C 1 2 R 1:19

請求項の数 14 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2009-32835 (P2009-32835)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成21年2月16日 (2009.2.16)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2010-187552 (P2010-187552A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成22年9月2日 (2010.9.2)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成23年11月30日 (2011.11.30)		弁理士 川口 嘉之
微生物の受託番号	VKPM VKPM B-9246	(74) 代理人	100126505
微生物の受託番号	NIBH FERM BP-6614		弁理士 佐貫 伸一
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-11091	(74) 代理人	100131392
前置審査			弁理士 丹羽 武司
		(72) 発明者	宅見 和浩
			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	野中 源
			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-アミノ酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L-アミノ酸生産能を有し、かつ、変異型 y e a S 遺伝子を保持するように改変された腸内細菌科に属する細菌を培地で培養し、該培地からL-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法であって、

前記変異型 y e a S 遺伝子は、野生型 y e a S 遺伝子に下記 ( I ) ~ ( I I I ) から選ばれる変異が導入された遺伝子であり、

前記野生型 y e a S 遺伝子は、下記 ( A ) 又は ( B ) のいずれかのタンパク質をコードする、前記方法：

( A ) 配列番号 2 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 2 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 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、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、

( I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、28位に相当するスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異、

( I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、137位に相当するフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、

( I I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、188位に相当するロイシン残基をグルタミンに置換する変異。

## 【請求項 2】

前記野生型 y e a S 遺伝子が、下記 ( a ) 又は ( b ) の DNA である請求項 1 に記載の方法：

( a ) 配列番号 1 に示す塩基配列を有する遺伝子、又は、

( b ) 配列番号 1 に示す塩基配列に相補的な配列、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、腸内細菌で発現を上昇させたときに L - システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質をコードする DNA。

## 【請求項 3】

前記細菌が、前記 ( i i ) の変異を有する変異型 y e a S 遺伝子を保持し、かつ、同遺伝子がコードするタンパク質において 1 3 7 位に相当するフェニルアラニン残基がセリン または グルタミンに置換されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記 L - アミノ酸が、L - システイン、L - ロイシン、L - スレオニン、L - セリン、L - メチオニン、L - ヒスチジン、L - バリン、L - グルタミン酸、L - アルギニン、L - イソロイシン、L - フェニルアラニン、L - チロシン、L - トリプトファン、L - プロリンからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 L - アミノ酸が L - システインである、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記細菌が、L - システイン生合成系酵素の活性が増強されるように改変された、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記細菌が、セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が増強されるように改変された、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記細菌が、L - システインによるフィードバック阻害が低減された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼを保持する、請求項 6 または 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記細菌がパントエア属細菌である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記細菌がパントエア・アナナティスである、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記細菌がエシェリヒア・コリである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

L - アミノ酸生産能を有し、かつ、変異型 y e a S 遺伝子を保持するように改変された腸内細菌科に属する細菌であって、

前記変異型 y e a S 遺伝子は、野生型 y e a S 遺伝子に下記 ( I ) ~ ( I I I ) から選ばれる変異が導入された遺伝子であり、

前記野生型 y e a S 遺伝子は、下記 ( A ) 又は ( B ) のいずれかのタンパク質をコードする、細菌：

40

( A ) 配列番号 2 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 2 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 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、腸内細菌で発現を上昇させたときに L - システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、

( I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、2 8 位に相当するスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異、

( I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、1 3 7 位に相当するフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、

50

( I I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、1 8 8 位に相当するロイシン残基をグルタミンに置換する変異。

【請求項 1 3】

前記 L - アミノ酸が L - システインである、請求項 1 2 に記載の細菌。

【請求項 1 4】

変異型 Y e a S タンパク質をコードする DNA であって、

前記変異型 Y e a S タンパク質は、野生型 y e a S 遺伝子がコードする下記 ( A ) 又は ( B ) のいずれかのタンパク質において、下記 ( I ) ~ ( I I I ) から選ばれる変異を有するタンパク質である、前記 DNA :

( A ) 配列番号 2 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 2 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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、腸内細菌で発現を上昇させたときに L - システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、

( I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、2 8 位に相当するスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異、

( I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、1 3 7 位に相当するフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、

( I I I ) 野生型 y e a S 遺伝子がコードするタンパク質において、1 8 8 位に相当するロイシン残基をグルタミンに置換する変異。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、L - システイン等の L - アミノ酸の製造法に関し、詳しくは L - アミノ酸の製造に好適な細菌、及びそれを用いた L - アミノ酸の製造法に関する。L - アミノ酸は、調味料、食品添加物、飼料添加物、化学製品、医薬品などの様々な分野に利用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

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、エシェリヒア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。これらの製造法においては、自然界から分離された菌株または該菌株の人工変異株、さらには、組換え DNA 技術により塩基性 L - アミノ酸生合成酵素の活性が増大するように改変された微生物などが用いられている ( 特許文献 1 ~ 9 ) 。

【0 0 0 3】

また、例えば、L - システインは、毛髪、角、羽毛等のケラチン含有物質から抽出することにより、あるいは DL - 2 - アミノチアゾリン - 4 - カルボン酸を前駆体とする細菌酵素変換により得られている。また、新規な酵素を用いた固定化酵素法による L - システインの大量生産も計画されている。

【0 0 0 4】

さらに、細菌を用いた発酵法による L - システインの生産も試みられている。例えば、本発明者らは、L - システイン分解系が抑制され、かつ、L - システインによるフィードバック阻害が低減されたセリンアセチルトランスフェラーゼ ( serine acetyltransferase ( EC 2.3.1.30 ) : 以下、「SAT」ともいう) を保持するエシェリヒア属細菌を用いた L - システインの製造法を開示している ( 特許文献 1 1 ) 。また、L - システイン分解系を抑制することによって L - システイン生産能が高められた細菌としては、シスタチオニン - リアーゼ ( 特許文献 1 1 ) 、トリプトフォナーゼ ( 特許文献 1 2 ) 、O - アセチルセリン スルフヒドリラーゼ B ( 特許文献 1 3 ) の活性を低下又は欠失させたコリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌が知られている。同様に、L - システインによるフィードバック阻害が低減された特定の変異を有する SAT をコードする DNA 配列により脱制御された L - システイン物質代謝を有する細菌を用いた、L - システインの製造法が知られている (

10

20

30

40

50

特許文献14)。

【0005】

さらに、YdeDタンパク質をコードするydeD遺伝子(非特許文献1)、及びYfiKタンパク質をコードするyfiK遺伝子(特許文献15)は、L-システイン経路の代謝産物の排出に関与していることが知られている。また、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする遺伝子であるmar-遺伝子座、acr-遺伝子座、cmr-遺伝子座、mex-遺伝子座、bmr-遺伝子座、qacA-遺伝子座(特許文献16)、又はemrAB、emrKY、yoiH、acrEF、bcrもしくはcusA遺伝子(特許文献17)の発現を上昇させることによりL-システイン生産能を高める技術が知られている。

【0006】

一方、抗生物質又は細菌に毒性の物質を細胞から直接放出するために好適である蛋白質をコードする遺伝子を過剰発現する細菌を用いたL-システインの製造法が報告されている(特許文献18)。

【0007】

また、L-システインだけでなく、細菌によるL-アミノ酸の生産性向上が、L-アミノ酸の分泌タンパク質の発現を向上させることによって達成できることも知られている。コリネ型細菌において、lysEと名づけられたL-リジン排出担体の発現量を増強することで、L-リジン生産が向上することが知られている(特許文献19)。また、エシェリヒア属細菌において、アミノ酸排出担体であると予想されているいくつかの膜タンパク質が知られている。例えば、rhtBと名づけられた遺伝子のコピー数を上昇させることで、高濃度のL-ホモセリン、L-スレオニン、L-アラニン、L-バリンおよびL-イソロイシンへの耐性が向上することが報告されており、同遺伝子産物はこれらのL-アミノ酸の排出担体であると予想されている(特許文献19)。

【0008】

yeaS遺伝子は、上記rhtB遺伝子のファミリーに属する膜タンパク質であると推定されている遺伝子で、その遺伝子発現量を高めることにより、高濃度のL-スレオニン、L-ホモセリン、L-リジン、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-アミノ絡酸に対する耐性が対照株よりも向上し、L-アミノ酸生産菌においてその遺伝子発現量を高めることで、L-バリン、L-イソロイシン、L-アラニン、L-プロリン、およびL-ヒスチジンの生産性が向上することが報告されている(特許文献20)。

【0009】

上記のように、yeaS遺伝子の発現量を増強することで、各種アミノ酸生産への効果が調べられているが(非特許文献2)、L-アミノ酸生産性を向上させるyeaS遺伝子の変異については知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】欧州特許公開EP0643135B

【特許文献2】欧州特許公開EP0733712B

【特許文献3】欧州特許公開EP1477565A

【特許文献4】欧州特許公開EP0796912A

【特許文献5】欧州特許公開EP0837134A

【特許文献6】国際公開WO01/53459

【特許文献7】欧州特許公開EP1170376A

【特許文献8】国際公開WO2005/010175

【特許文献9】国際公開WO96/17930

【特許文献10】国際公開WO2006/013807

【特許文献11】特開平11-155571号

【特許文献12】特開2003-169668

【特許文献13】特開2005-245311

10

20

30

40

50

【特許文献14】特表2000-504926  
 【特許文献15】特開2004-49237  
 【特許文献16】米国特許第5972663号  
 【特許文献17】特開2005-287333  
 【特許文献18】特開平11-56381号  
 【特許文献19】特開2000-189180  
 【特許文献20】欧州特許出願公開第1013765A1

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Dabler et al., Mol. Microbiol. 36.1101-1112(2000)

10

【非特許文献2】Kutukova et al., FEBS Lett. 579. 4629-4634 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、細菌のL-アミノ酸生産能を向上させる新規な技術を開発し、L-アミノ酸生産菌、及び同細菌を用いたL-アミノ酸の製造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】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、yeaS遺伝子に特定の変異を導入することによって、L-アミノ酸生産能を向上されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0014】

(1) L-アミノ酸生産能を有し、かつ、又は、下記(I)~(III)から選ばれる変異を有する変異型yeaS遺伝子を保持するように改変された腸内細菌科に属する細菌を培地で培養し、該培地からL-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造法であって、

前記変異を有さないyeaS遺伝子は、下記(A)又は(B)のいずれかのタンパク質をコードする、前記方法：

(A) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、又は、

30

(B) 配列番号2に示すアミノ酸配列において、1~10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、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、

(I) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、28位のスレオニン残基をスレオニン以外のアミノ酸に置換する変異、

(II) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、137位のフェニルアラニン残基をフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換する変異、

(III) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、188位のロイシン残基をロイシン以外のアミノ酸に置換する変異。

(2) 前記変異を有さないyeaS遺伝子が、下記(a)又は(b)のDNAである前記方法：

40

(a) 配列番号1に示す塩基配列を有する遺伝子、又は、

(b) 配列番号1に示す塩基配列に相補的な配列、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、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(3) 前記(I)~(III)の変異が、それぞれ下記(i)~(iii)の変異である、前記方法。

(i) 28位のスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異

(ii) 137位のフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン

50

- 、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、
- (iii) 188位のロイシン残基をグルタミンに置換する変異。
- (4) 前記細菌が、前記(ii)の変異を有する変異型 *y e a S* 遺伝子を保持し、かつ、同遺伝子がコードするタンパク質において137位のフェニルアラニン残基がセリンまたはグルタミンに置換されている、前記方法。
- (5) 前記L-アミノ酸が、L-システイン、L-ロイシン、L-スレオニン、L-セリン、L-メチオニン、L-ヒスチジン、L-バリン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-プロリンからなる群から選択される、前記方法。
- (6) 前記L-アミノ酸がL-システインである、前記方法。 10
- (7) 前記細菌が、L-システイン生合成系酵素の活性が増強されるように改変された、前記方法。
- (8) 前記細菌が、セリンアセチルトランスフェラーゼ活性が増強されるように改変された、前記方法。
- (9) 前記細菌が、L-システインによるフィードバック阻害が低減された変異型セリンアセチルトランスフェラーゼを保持する、前記方法。
- (10) 前記細菌がパントエア属細菌である、前記方法。
- (11) 前記細菌がパントエア・アナナティスである、前記方法。
- (12) 前記細菌がエシェリヒア・コリである、前記方法。
- (13) L-システイン生産能を有し、かつ、下記(I)~(III)から選ばれる変異を有する変異型 *y e a S* 遺伝子を保持するように改変された腸内細菌科に属する細菌であって、前記変異を有さない *y e a S* 遺伝子は、下記(A)又は(B)のいずれかのタンパク質をコードする、細菌： 20
- (A) 配列番号2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2に示すアミノ酸配列において、1~10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、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、
- (I) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、28位のスレオニン残基をスレオニン以外のアミノ酸に置換する変異、
- (II) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、137位のフェニルアラニン残基をフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換する変異、 30
- (III) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、188位のロイシン残基をロイシン以外のアミノ酸に置換する変異。
- (14) 前記L-アミノ酸がL-システインである、請求項13に記載の細菌。
- (15) 下記(A)又は(B)のいずれかのタンパク質であって、かつ、下記(I)~(III)から選ばれる変異を有するタンパク質をコードするDNA：
- (A) 配列番号2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2に示すアミノ酸配列において、1~10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、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質、 40
- (I) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、28位のスレオニン残基をスレオニン以外のアミノ酸に置換する変異、
- (II) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、137位のフェニルアラニン残基をフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換する変異、
- (III) *y e a S* 遺伝子がコードするタンパク質において、188位のロイシン残基をロイシン以外のアミノ酸に置換する変異。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、腸内細菌科に属する細菌のL-アミノ酸生産能を向上させることが出来る。また、本発明の細菌を使用することにより、L-アミノ酸を効率よく発酵生産するこ 50

とが出来る。

また、本発明により、宿主細胞のL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質をコードする新規な遺伝子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】プロモーターPnI<sub>p</sub>の配列を示す図。

【図2】E.coli MG1655におけるYeaSF137S強化株のシステイン耐性（生育曲線）。は野生型を、はF137S変異を示す。

【図3】P.ananatisにおけるYeaSWTおよびYeaSF137S強化株の培養液中アミノ酸濃度を示す図。

【図4】E.coliにおけるYeaSWTおよびYeaSF137S強化株の培養液中アミノ酸濃度を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0017】

< 1 > 本発明の細菌

本発明の細菌は、L-アミノ酸生産能を有し、かつ、特定の変異を有する変異型yeaS遺伝子を保持するように改変された細菌である。

【0018】

L-アミノ酸の種類は特に制限されないが、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリンのような塩基性アミノ酸、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-グリシンのような脂肪族アミノ酸、L-スレオニン、L-セリンのようなヒドロキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸、L-プロリンのような環式アミノ酸、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファンのような芳香族アミノ酸、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニンのような含硫アミノ酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン等のような酸性アミノ酸が挙げられ、L-システイン、L-ロイシン、L-スレオニン、L-セリン、L-メチオニン、L-ヒスチジン、L-バリン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファン、及び、L-プロリンが好ましく、特にL-システインが好ましい。本発明の細菌は2種類以上のアミノ酸の生産能を有するものであってもよい。

【0019】

また、本発明においてL-アミノ酸とは、フリー体のL-アミノ酸及び/またはその塩、例えば硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、アンモニウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩を含む。

【0020】

L-L-アミノ酸生産能とは、本発明の細菌を培地中で培養したときに、培地中または菌体内にL-L-アミノ酸を生成し、培地中または菌体から回収できる程度に蓄積する能力をいう。また、L-L-アミノ酸生産能を有する細菌とは、野生株または親株よりも多い量のL-L-アミノ酸を生産し培地に蓄積することができる細菌を意味し、好ましくは、0.2g/L以上、より好ましくは0.3g/L以上、特に好ましくは0.4g/L以上の量のL-L-アミノ酸を生産し培地に蓄積することができる細菌を意味する。

【0021】

L-アミノ酸がL-システインである場合、細菌が産生したL-システインは、培地中で、ジスルフィド結合によって一部がL-シスチンに変換することがある。また、後述するように、L-システインと培地に含まれるチオ硫酸との反応によってS-スルホシステインが生成することがある（Szczepkowski T.W., Nature, vol.182 (1958)）。さらに、細菌の細胞内で生成したL-システインは、細胞中に存在するケトン又はアルデヒド、例えばピルビン酸と縮合し、ヘミチオケタールを中間体としてチアゾリジン誘導体が生成することがある（特許第2992010参照）。これらのチアゾリジン誘導体及びヘミチオケタールは、平衡混合物として存在することがある。したがって、L-システイン生産能とは、L-システインのみを培地中又は菌体内に蓄積する能力に限られず、L-システインに加

10

20

30

40

50

えて、L - シスチン、もしくはそれらの誘導体、例えばS - スルホシステイン、チアゾリジン誘導体、もしくはヘミチオケタール、又はこれらの混合物を培地中に蓄積する能力も含まれる。また、本発明の方法で製造される「L - システイン」は、特記しない限り、還元型L - システイン、L - シスチン、もしくは前記のような誘導体、またはこれらの混合物を指す。

【0022】

L - L - アミノ酸生産能を有する細菌としては、本来的にL - L - アミノ酸生産能を有するものであってもよいが、下記のような細菌を、変異法や組換えDNA技術を利用して、L - L - アミノ酸生産能を有するように改変したものであってもよい。

【0023】

本発明に用いる細菌としては、エシェリヒア属、エンテロバクター属、パントエア属、クレブシエラ属、セラチア属、エルビニア属、サルモネラ属、モルガネラ属など、腸内細菌科に属する細菌であって、L - システインを生産する能力を有するものであれば、特に限定されない。具体的にはNCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースに記載されている分類により腸内細菌科に属するものが利用できる (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>)。改変に用いる腸内細菌科の親株としては、中でもエシェリヒア属細菌、エンテロバクター属細菌、パントエア属細菌、エルビニア属、エンテロバクター属、又はクレブシエラ属を用いることが望ましい。

【0024】

エシェリヒア属細菌としては、特に限定されないが、具体的にはNeidhardtらの著書 (B ackmann, B. J. 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, p. 2460-2488. Table 1. In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition*, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.) に挙げられるものが利用できる。その中では、例えばエシェリヒア・コリが挙げられる。エシェリヒア・コリとしては具体的には、プロトタイプの野生株 K 1 2 株由来のエシェリヒア・コリ W3110 (ATCC 27325)、エシェリヒア・コリ MG1655 (ATCC 47076)等が挙げられる。

【0025】

これら入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America) より分譲を受けることが出来る。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。

【0026】

エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)等、パントエア属細菌としてはパントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) が挙げられる。尚、近年、エンテロバクター・アグロメランスは、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) 又はパントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチューアルティ (*Pantoea stewartii*) に再分類されているものがある。本発明においては、腸内細菌科に分類されるものであれば、エンテロバクター属又はパントエア属のいずれに属するものであってもよい。

【0027】

特に、パントエア属細菌、エルビニア属細菌、エンテロバクター属細菌は、 $\beta$ -プロテオバクテリアに分類される細菌であり、分類学的に非常に近縁である (J Gen Appl Microbiol 1997 Dec;43(6) 355-361, International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1997,p1061-1067)。近年、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験等により、エンテロバクター属に属する細菌には、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*) 又

10

20

30

40

50



はパントエア・ディスペーサ (*Pantoea dispersa*) 等に再分類されているものがある (International Journal of Systematic Bacteriology, July 1989;39(3).p.337-345)。また、エルビニア属に属する細菌にはパントエア・アナナス (*Pantoea ananas*)、パントエア・スチュワールティに再分類されているものがある (International Journal of Systematic Bacteriology, Jan 1993;43(1), p.162-173 参照)。

【 0 0 2 8 】

エンテロバクター属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられる。具体的には、欧州特許出願公開952221号明細書に例示された菌株を使用することが出来る。エンテロバクター属の代表的な株として、エンテロバクター・アグロメランスATCC12287株が挙げられる。

10

【 0 0 2 9 】

パントエア属細菌の代表的な菌株として、パントエア・アナナティス、パントエア・スチュワールティ (*Pantoea stewartii*) パントエア・アグロメランス、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が挙げられる。パントエア・アナナティスとして具体的には、パントエア・アナナティスAJ13355株、SC17株、及びSC17(0)株が挙げられる。SC17株は、静岡県磐田市の土壌から、低pHでL-グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として分離された株AJ13355 (FERM BP-6614) から、粘液質低生産変異株として選択された株である (米国特許第6,596,517号)。SC17(0)株は、パントエア・アナナティスにおいて遺伝子破壊を行うために、Red遺伝子産物に耐性な菌株として構築された株である (WO 2008/075483)。SC17株は、平成21年2月4日に、産業技術総合研究所特許生物寄託センター (住所 郵便番号305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に寄託され、受領番号FERM ABP-11091が付与されている。また、SC17(0)株は、2005年9月21日にロシア・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。

20

【 0 0 3 0 】

パントエア・アナナティスAJ13355株は、平成10年2月19日に、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現名称、産業技術総合研究所特許生物寄託センター、住所 郵便番号305-8566 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-16644として寄託され、平成11年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614が付与されている。尚、同株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*) と同定され、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355として寄託されたが、近年16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) に再分類されている。

30

【 0 0 3 1 】

エルビニア属細菌としては、エルビニア・アミロポーラ、エルビニア・カロトポーラが挙げられ、クレブシエラ属細菌としては、クレブシエラ・プランティコーラが挙げられる。

40

【 0 0 3 2 】

〔 L - アミノ酸生産能の付与又は増強 〕

細菌にL-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株又は代謝制御変異株の取得や、L-アミノ酸の生合成系酵素の発現が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる (アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77-100頁参照)。ここで、L-アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、発現が増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付

50

与と、生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0033】

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

【0034】

また、L - アミノ酸生産能の付与又は増強は、遺伝子組換えによって、酵素活性を増強することによっても行うことができる。酵素活性の増強は、例えば、L - アミノ酸の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細菌を改変する方法を挙げることができる。遺伝子の発現を増強するための方法としては、遺伝子を含むDNA断片を、適当なプラスミド、例えば微生物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(国際公開パンフレットW095/34672号参照)。

【0035】

上記増幅プラスミドまたは染色体上に目的遺伝子を導入する場合、これらの遺伝子を発現させるためのプロモーターは腸内細菌科に属する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し、改変したものでもよい。腸内細菌科に属する細菌で強力に機能するプロモーターを適宜選択することや、プロモーターの-35、-10領域をコンセンサス配列に近づけ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、酵素遺伝子の発現を増強する方法は、W000/18935号パンフレット、欧州特許出願公開1010755号明細書等に記載されている。

【0036】

以下、細菌にL - アミノ酸生産能を付与する具体的方法、及びL - アミノ酸生産能が付与された細菌について例示する。

【0037】

L - システイン生産菌

L - システイン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、フィードバック阻害耐性のセリンアセチルトランスフェラーゼ(SAT)をコードする複数種のcysEアレルで形質転換されたE. coli JM15(米国特許第6,218,168号)、細胞に毒性の物質を排出するのに適したタンパク質をコードする過剰発現遺伝子を有するE. coli W3110(米国特許第5,972,663号)、システインデスルフィドラーゼ活性が低下したE. coli株(特開平11-155571号公報)、cysB遺伝子によりコードされるシステインレギュロンの正の転写制御因子の活性が上昇したE. coli W3110(W001/27307)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の細菌は、特定の変異を有するyeaS遺伝子を保持するように改変された細菌である。後述するように、yeaS遺伝子がコードするタンパク質(以下、「YeaSタンパク質」ともいう)は、L - システイン等のL - アミノ酸を細胞外に排出する活性を有すると推定される。

【0038】

E. coliでは、L - システインを排出する活性を有する公知のタンパク質として、前述のとおりydeDにコードされるタンパク質(特開2002-233384)、yfiKにコードされるタンパク質(特開2004-49237)、emrAB、emrKY、yoiJH、acrEF、bcr、cusAの各遺伝子にコードされる各タンパク質(特開平2005-287333)が知られている。変異型yeaS遺伝子を細菌に保持させることに加えて、これらのフィードバック阻害耐性のSAT活性やL - システイン排出タンパク質の活性を上昇させてもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

以下、L - シス테인生産能を付与する方法として、L - シス테인生合成酵素活性を増強する方法について説明する。

L - シス테인生合成酵素としては、例えば、セリンアセチルトランスフェラーゼ (SAT) が挙げられる。腸内細菌科に属する細菌における細胞内のSAT活性の増強は、SATをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は、SATをコードする遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を改変することによって達成される。例えば、SATをコードする遺伝子断片を、腸内細菌科に属する細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを宿主腸内細菌科に属する細菌に導入して形質転換すればよい。より具体的には、後述するyeaS遺伝子と同様の方法を適用することができる。

10

## 【 0 0 4 0 】

SAT遺伝子は、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子および他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。エシェリヒア・コリのSATをコードする遺伝子として、cysEが野生株及びL - シス테인分泌変異株よりクローニングされ、塩基配列が明らかになっている (Denk, D. and Boeck, A., J. General Microbiol., 133, 515-525 (1987))。したがって、その塩基配列 (配列番号3) に基づいて作製したプライマーを用いて、エシェリヒア属細菌の染色体DNAを鋳型とするPCRによって、SAT遺伝子を取得することができる (特開平11-155571号参照)。他の生物のSATをコードする遺伝子も、同様にして取得される。このようにして得られるSAT遺伝子は、上記と同様にして発現増強を行うことができる。

20

## 【 0 0 4 1 】

なお、SAT遺伝子の発現に「L - シス테인によるフィードバック阻害」などの抑制機構が存在する場合には、該抑制機構に非感受性となるように、発現調節配列又は抑制に関する遺伝子を改変することによっても、SAT遺伝子の発現を増強することができる。

## 【 0 0 4 2 】

例えば、L - シス테인によるフィードバック阻害が低減又は解除されたSAT (以下、「変異型SAT」ともいう) を腸内細菌科に属する細菌に保持させることによって、SAT活性を上昇させることができる。変異型SATとしては、野生型SAT (配列番号4) の256位のメチオニン残基に相当するアミノ酸残基をリジン残基及びロイシン残基以外のアミノ酸残基に置換する変異、又は256位のメチオニン残基に相当するアミノ酸残基からC末端側の領域を欠失させる変異を有するSATが挙げられる。前記リジン残基及びロイシン残基以外のアミノ酸残基としては、通常タンパク質を構成するアミノ酸のうち、メチオニン残基、リジン残基及びロイシン残基を除く17種類のアミノ酸残基が挙げられる。より好ましくはイソロイシン残基またはグルタミン酸残基が挙げられる。野生型SAT遺伝子に所望の変異を導入する方法としては、部位特異的変異が挙げられる。変異型SAT遺伝子としては、エシェリヒア・コリの変異型SATをコードする変異型cysEが知られている (WO 97/15673号国際公開パンフレット、特開平11-155571号参照)。256位のメチオニン残基をグルタミン酸残基に置換した変異型SATをコードする変異型cysEを含むプラスミドpCEM256Eを保持するエシェリヒア・コリJM39-8株 (E. coli JM39-8(pCEM256E)、プライベートナンバー: AJ13391) は、平成9年11月20日より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、FERM P-16527の受託番号のもとで寄託され、2002年7月8日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM B P-8112が付与されている。

30

40

## 【 0 0 4 3 】

本発明において、「L - シス테인によるフィードバック阻害に非感受性」とは、上記のようにL - シス테인によるフィードバック阻害に非感受性になるように改変されるものであってもよいが、元来フィードバック阻害を受けないものであってもよい。シロイヌナズナのSATは、L - シス테인によるフィードバック阻害を受けないことが知られており、本発明に好適に用いることができる。シロイヌナズナ由来のSAT遺伝子含有プラスミ

50

ドとして、pEAS-m (FEMS Microbiol. Lett., 179 (1999) 453-459) が知られている。

【 0 0 4 4 】

また、硫酸塩 / チオ硫酸塩輸送系タンパク質群をコードするcysPTWAMクラスター遺伝子の発現を増強することによっても、L - システイン生産能を向上されることができ(特開2005-137369号公報、EP1528108号明細書)。

【 0 0 4 5 】

また、硫化物は、cysKおよびcysM遺伝子それぞれによりコードされるO - アセチルセリン(チオール) - リアーゼ - AまたはBにより触媒される反応を介してO - アセチル - L - セリンに取り込まれ、L - システインが産生する。したがって、これらの酵素をコードする遺伝子の発現を増強することによっても、L - システイン生産能を上昇させることができる。

10

【 0 0 4 6 】

目的遺伝子の発現を増強するための改変は、例えば、遺伝子組み換え技術を利用して、細胞内の目的遺伝子のコピー数を高めることによって行うことができる。例えば、目的遺伝子を含むDNA断片を、宿主細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組換えDNAを作成し、これを細菌に導入して形質転換すればよい。

【 0 0 4 7 】

一方、目的遺伝子のコピー数を高めることは、目的遺伝子を細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。細菌の染色体DNAに目的遺伝子を導入するには、変異型yeaS遺伝子について後述する方法を用いることができる。

20

【 0 0 4 8 】

さらに、目的遺伝子の発現の増強は、上記した遺伝子コピー数の増幅以外に、国際公開00/18935号パンフレットに記載されたようにして、染色体DNA上またはプラスミド上のyeaS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することや、目的遺伝子の発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅するか、目的遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターを欠失または弱化させることによっても達成される。目的遺伝子の発現を低下させるようなレギュレーターとしては、Lrpタンパク質などが知られている(Kutukova et al., FEBS Lett. 579. 4629-4634 (2005))。強力なプロモーターとしては例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が知られている。また、目的遺伝子のプロモーター領域に塩基置換等を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変により目的遺伝子の発現が強化される。プロモーターの強度の評価法および強力なプロモーターの例は、GoldsteinとDoiの論文(Goldstein, M. A. and Doi R. H.1995. Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128)等に記載されている。なお、発現調節配列の改変は、目的遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。また目的遺伝子産物の生成を高めるためには、目的遺伝子の翻訳開始点付近に変異を導入して翻訳効率を高めても良く、これと目的遺伝子の発現の増強と組み合わせてもよい。

30

【 0 0 4 9 】

目的遺伝子の発現が上昇したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を野生株、あるいは非改変株と比較することによって行うことができる。mRNAの量を評価する方法としてはノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる(Sambrook, J., et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)。

40

【 0 0 5 0 】

目的遺伝子産物の量が増加したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことができる(前記Molecular Cloning)。

【 0 0 5 1 】

また、L - システイン分解系を抑制することによって、L - システイン生産能を向上させることができる。L - システイン分解系を抑制するとは、細胞内のL - システイン分解活性が、野生株又は親株等の非改変株に対して低下していることを意味する。L - システ

50

イン分解系を担うタンパク質としては、シスタチオニン - リアーゼ (metC産物、特開平11-155571号、Chandra et. al., Biochemistry, 21 (1982) 3064-3069)、トリプトファンナーゼ (tnaA産物、特開2003-169668、(Austin Newton et. al., J. Biol. Chem. 240 (1965) 1211-1218))、O - アセチルセリン スルフヒドリラーゼ B (cysM遺伝子産物、特開2005-245311)、及び、malY遺伝子産物 (特開2005-245311) が知られている。これらのタンパク質の活性を低下させることにより、L - システイン生産能が向上する。

#### 【0052】

タンパク質の活性を低下させるような改変は、例えば、同タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることによって達成される。具体的には例えば、染色体上の遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させることによって、前記タンパク質の細胞内の活性を低下させることができる。また、遺伝子の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も、遺伝子の発現を低下させることができる。また、発現調節配列以外の非翻訳領域の改変によっても、遺伝子の発現量を低下させることができる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。また、染色体上の標的遺伝子のコード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)、あるいは一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入することによっても達成出来る (Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617 (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515(1998), Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839(1991))。

#### 【0053】

また、標的タンパク質の活性が低下するような改変であれば、X線もしくは紫外線を照射、またはN - メチル - N' - ニトロ - N - ニトロソグアニジン等の変異剤による通常の変異処理による改変であってもよい。

#### 【0054】

発現調節配列の改変は、好ましくは1塩基以上、より好ましくは2塩基以上、特に好ましくは3塩基以上である。また、コード領域を欠失させる場合は、標的タンパク質の機能が低下又は欠失するのであれば、欠失させる領域は、N末端領域、内部領域、C末端領域のいずれの領域であってもよく、コード領域全体であってもよい。通常、欠失させる領域は長い方が確実に遺伝子を不活化することができる。また、欠失させる領域の上流と下流のリーディングフレームは一致しないことが好ましい。

#### 【0055】

標的遺伝子のコード領域に他の配列を挿入する場合も、遺伝子のいずれの領域であってもよいが、挿入する配列は長い方が、確実に遺伝子を不活化することができる。挿入部位の前後の配列は、リーディングフレームが一致しないことが好ましい。他の配列としては、コードされる標的タンパク質の機能を低下又は欠損させるものであれば特に制限されないが、例えば、抗生物質耐性遺伝子やL - システイン生産に有用な遺伝子を搭載したトランスポゾン等が挙げられる。

#### 【0056】

##### L - スレオニン生産菌

L - スレオニン生産能を有する微生物として好ましいものは、L - スレオニン生合成系酵素の1種又は2種以上の活性が増強された細菌が挙げられる。L - スレオニン生合成系酵素としては、アスパルトキナーゼIII (lysC)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (asd)、thrオペロンにコードされるアスパルトキナーゼI (thrA)、ホモセリンキナーゼ (thrB)、スレオニンシンターゼ (thrC)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ (アスパルテートトランスアミナーゼ) (aspC) が挙げられる。カッコ内は、その遺伝子の略記号である (以下の記載においても同様)。これらの酵素の中では、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アスパルトキナーゼI、ホモセリンキナーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、及びスレオニンシンターゼが特に好ましい。L - スレオニン生合成系遺伝子は、スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌に

10

20

30

40

50

導入してもよい。スレオニン分解が抑制されたエシェリヒア属細菌としては、例えば、スレオニンデヒドロゲナーゼ活性が欠損したTDH6株（特開2001 - 346578号）等が挙げられる。

#### 【 0 0 5 7 】

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

10

#### 【 0 0 5 8 】

スレオニンオペロンの上流には、固有のプロモーターが存在するが、非天然のプロモーターに置換してもよいし（W098/04715号パンフレット参照）、スレオニン生合成関与遺伝子の発現がラムダファージのリプレッサーおよびプロモーターにより支配されるようなスレオニンオペロンを構築してもよい。（欧州特許第0593792号明細書参照）また、L - スレオニンによるフィードバック阻害を受けないように細菌を改変するために、-amino-

20

#### 【 0 0 5 9 】

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

#### 【 0 0 6 0 】

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

30

#### 【 0 0 6 1 】

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

40

#### 【 0 0 6 2 】

L - スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli TDH-6/pV IC40（VKPM B-3996）（米国特許第5,175,107号、米国特許第5,705,371号）、E. coli 472T2 3/pYN7（ATCC 98081）（米国特許第5,631,157号）、E. coli NRRL-21593（米国特許第5,939,307号）、E. coli FERM BP-3756（米国特許第5,474,918号）、E. coli FERM BP-3519及びF

50

ERM BP-3520 (米国特許第5,376,538号)、E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978))、E. coli VL643及びVL2055 (EP 1149911 A)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 3 】

TDH-6株はthrC遺伝子を欠損し、スクロース資化性であり、また、そのilvA遺伝子がリーキー(leaky)変異を有する。この株はまた、rhtA遺伝子に、高濃度のスレオニンまたはホモセリンに対する耐性を付与する変異を有する。B-3996株は、RSF1010由来ベクターに、変異thrA遺伝子を含むthrA\*BCオペロンを挿入したプラスミドpVIC40を保持する。この変異thrA遺伝子は、スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする。B-3996株は、1987年11月19日、  
10  
オールユニオン・サイエンティフィック・センター・オブ・アンチビオティクス(Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia)に、受託番号RIA 1867で寄託されている。この株は、また、1987年4月7日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) に、受託番号B-3996で寄託されている。

【 0 0 6 4 】

E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B)も、L - スレオニン生産菌又はそれを誘導するための親株として使用できる。B-5318株は、イソロイシン非要求性であり、プラスミドpVIC40中のスレオニンオペロンの制御領域が、温度感受性ラムダファージC1リプレッサー及びPRプロモーターにより置換されている。VKPM B-5318は、1990年5月3日、ルシアン・ナシ  
20  
ョナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-5318で国際寄託されている。

【 0 0 6 5 】

Escherichia coliのアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードするthrA遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号337~2799, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrA遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrL遺伝子とthrB遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのホモセリンキナーゼをコードするthrB遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号2801~3733, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrB遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrA遺伝子とthrC  
30  
遺伝子との間に位置する。Escherichia coliのスレオニンシンターゼをコードするthrC遺伝子は明らかにされている(ヌクレオチド番号3734~5020, GenBank accession NC\_000913.2, gi: 49175990)。thrC遺伝子は、E. coli K-12の染色体において、thrB遺伝子とyaaXオープンリーディングフレームとの間に位置する。これら三つの遺伝子は、全て、単一のスレオニンオペロンとして機能する。スレオニンオペロンの発現を増大させるには、転写に影響するアテニューエーター領域を、好ましくは、オペロンから除去する(WO2005/049808, WO2003/097839)。

【 0 0 6 6 】

スレオニンによるフィードバック阻害に耐性のアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼIをコードする変異thrA遺伝子、ならびに、thrB遺伝子及びthrC遺伝子は、スレ  
40  
オニン生産株E. coli VKPM B-3996に存在する周知のプラスミドpVIC40から一つのオペロンとして取得できる。プラスミドpVIC40の詳細は、米国特許第5,705,371号に記載されている。

【 0 0 6 7 】

rhtA遺伝子は、グルタミン輸送系の要素をコードするglnHPQ オペロンに近いE. coli染色体の18分に存在する。rhtA遺伝子は、ORF1 (ybiF遺伝子, ヌクレオチド番号764~1651, GenBank accession number AAA218541, gi:440181)と同一であり、pexB遺伝子とompX遺  
50  
伝子との間に位置する。ORF1によりコードされるタンパク質を発現するユニットは、rhtA遺伝子と呼ばれている(rht: ホモセリン及びスレオニンに耐性)。また、rhtA23変異が、ATG開始コドンに対して-1位のG A置換であることが判明している(ABSTRACTS of the 17th

International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, abstract No. 457, EP 1013765 A).

【 0 0 6 8 】

*E. coli*のasd遺伝子は既に明らかにされており(ヌクレオチド番号3572511~3571408, GenBank accession NC\_000913.1, gi:16131307)、その遺伝子の塩基配列に基づいて作製されたプライマーを用いるPCRにより得ることができる(White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)。他の微生物のasd遺伝子も同様に得ることができる。

【 0 0 6 9 】

また、*E. coli*のaspC遺伝子も既に明らかにされており(ヌクレオチド番号983742~984932, GenBank accession NC\_000913.1, gi:16128895)、PCRにより得ることができる。他の微生物のaspC遺伝子も同様に得ることができる。

【 0 0 7 0 】

L - リジン生産菌

エシェリヒア属に属するL - リジン生産菌の例としては、L - リジンアナログに耐性を有する変異株が挙げられる。L - リジンアナログはエシェリヒア属に属する細菌の生育を阻害するが、この阻害は、L - リジンが培地に共存するときには完全にまたは部分的に解除される。L - リジンアナログの例としては、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S - (2 - アミノエチル) - L - システイン(AEC)、 - メチルリジン、 - クロロカプロラクタムなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらのリジンアナログに対して耐性を有する変異株は、エシェリヒア属に属する細菌を通常の人工変異処理に付すことにより得ることができる。L - リジンの生産に有用な細菌株の具体例としては、*Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; 米国特許第4,346,170号参照)及び*Escherichia coli* VL611が挙げられる。これらの微生物では、アスパルトキナーゼのL - リジンによるフィードバック阻害が解除されている。

【 0 0 7 1 】

L - リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L - リジン生合成系酵素の1種又は2種以上の活性が増強されている株も挙げられる。かかる酵素の例としては、ジヒドロジピコリン酸シンターゼ(dapA)、アスパルトキナーゼ(lysC)、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(dapB)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ(lysA)、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(ddh) (米国特許第6,040,160号)、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(ppc)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(aspC)、ジアミノピメリン酸エピメラゼ(dapF)、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(asd)、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ(dapD)、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼ(dapE)及びアスパルターゼ(aspA) (EP 1253195 A)が挙げられるが、これらに限定されない。これらの酵素の中では、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デカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、ジアミノピメリン酸エピメラゼ、アスパルテートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼ、及び、スクシニルジアミノピメリン酸デアシラーゼが特に好ましい。また、親株は、エネルギー効率に関与する遺伝子(cyo) (EP 1170376 A)、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(pntAB) (米国特許第5,830,716号)、ybjE遺伝子(WO2005/073390)、または、これらの組み合わせの発現レベルが増大していてもよい。

【 0 0 7 2 】

L - リジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、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る株も挙げられる。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例としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、リジンデカルボキシラーゼ(米国特許第5,827,698号)、及び、リンゴ酸酵素(WO2005/010175)が

10

20

30

40

50



挙げられる。

【0073】

酵素活性の低下は、例えば、染色体上の標的酵素遺伝子のコード領域の一部又は全部を欠損させたり、コード領域中に他の配列を挿入することによって達成される。これらの手法は、遺伝子破壊とも呼ばれる。また、標的遺伝子の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することなどによって、標的遺伝子の発現を低下させることによって、同遺伝子を不活化することができる。発現の低下には、転写の低下と翻訳の低下が含まれる。また、発現調節配列以外の非翻訳領域の改変によっても、遺伝子の発現を低下させることができる。

【0074】

さらには、染色体上の標的遺伝子の前後の配列を含めて、標的遺伝子全体を欠失させてもよい。また、標的遺伝子の不活化は、染色体上の標的遺伝子のコード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)、あるいは一～二塩基付加・欠失するフレームシフト変異を導入することによっても達成出来る(Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617(1997) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95 5511-5515(1998), Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839(1991))

【0075】

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

【0076】

pCABD2は、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸合成酵素(DDPS)をコードする変異型dapA遺伝子と、L-リジンによるフィードバック阻害が解除された変異を有するエシェリヒア・コリ由来のアスパルトキナーゼIIIをコードする変異型lysC遺伝子と、エシェリヒア・コリ由来のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードするdapB遺伝子と、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼをコードするddh遺伝子を含んでいる(国際公開第WO95/16042、WO01/53459号パンフレット)。

【0077】

L-ロイシン生産菌

L-ロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ロイシン耐性のE. coli株(例えば、57株(VKPM B-7386, 米国特許第6,124,121号))または 2-チエニルアラニン、3-ヒドロキシロイシン、4-アザロイシン、5,5,5-トリフルオロロイシンなどのロイシンアナログ耐性のE. coli株(特公昭62-34397号及び特開平8-70879号)、WO96/06926に記載された遺伝子工学的な方法で得られたE. coli株、E. coli H-9068(特開平8-7087

10

20

30

40

50

9号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0078】

本発明に用いる細菌は、L - ロイシン生合成に関与する遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、好ましくはL - ロイシンによるフィードバック阻害が解除されたイソプロピルマレートシンターゼをコードする変異leuA遺伝子(米国特許第6,403,342号)に代表される、leuABCDオペロンの遺伝子が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL - アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大されることにより改良されていてもよい。このような遺伝子の例としては、b2682遺伝子及びb2683遺伝子(ygaZH遺伝子)(EP 1239041 A2)が挙げられる。

10

【0079】

L - ヒスチジン生産菌

L - ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli 24株 (VKPM B-5945, RU2003677)、E. coli 80株 (VKPM B-7270, RU2119536)、E. coli NRRL B-12116 - B12121 (米国特許第4,388,405号)、E. coli H-9342 (FERM BP-6675)及びH-9343 (FERM BP-6676) (米国特許第6,344,347号)、E. coli H-9341 (FERM BP-6674) (EP1085087)、E. coli A180/pFM201 (米国特許第6,258,554号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0080】

L - ヒスチジン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L - ヒスチジン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)、フォスホリボシルAMPサイクロヒドロラーゼ遺伝子(hisI)、フォスホリボシル-ATPピロフォスフォヒドロラーゼ遺伝子(hisI)、フォスホリボシルフォルミミノ-5-アミノイミダゾールカルボキサミドリボタイドイソメラーゼ遺伝子(hisA)、アミドトランスフェラーゼ遺伝子(hisH)、ヒスチジノールフォスフェイトアミノトランスフェラーゼ遺伝子(hisC)、ヒスチジノールフォスファターゼ遺伝子(hisB)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子(hisD)などが挙げられる。

20

【0081】

hisG及びhisBHAFIにコードされるL - ヒスチジン生合成系酵素はL - ヒスチジンにより阻害されることが知られており、従って、L - ヒスチジン生産能は、ATPフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(hisG)にフィードバック阻害への耐性を付与する変異を導入することにより効率的に増大させることができる(ロシア特許第2003677号及び第2119536号)。

30

【0082】

L - ヒスチジン生産能を有する株の具体例としては、L - ヒスチジン生合成系酵素をコードするDNAを保持するベクターを導入したE. coli FERM-P 5038及び5048 (特開昭56-005099号)、アミノ酸輸送の遺伝子を導入したE. coli株(EP1016710A)、スルファグアニジン、DL-1,2,4-トリアゾール-3-アラニン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与したE. coli 80株(VKPM B-7270, ロシア特許第2119536号)などが挙げられる。

40

【0083】

L - グルタミン酸生産菌

L - グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、E. coli VL334thrC+ (EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。E. coli VL334 (VKPM B-1641)は、thrC遺伝子及びilvA遺伝子に変異を有するL - イソロイシン及びL - スレオニン要求性株である(米国特許第4,278,765号)。thrC遺伝子の野生型アレルは、野生型E. coli K12株 (VKPM B-7)の細胞で増殖したバクテリオファージP1を用いる一般的形質導入法により導入された。この結果、L - イソロイシン要求性のL - グルタミン酸生産菌VL334thrC+ (VKPM B-8961) が得られた。

【0084】

50

L - グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L - グルタミン酸生合成系酵素 1 種又は 2 種以上の活性が増強された株が挙げられるが、これらに限定されない。かかる遺伝子の例としては、グルタメートデヒドロゲナーゼ (gdhA)、グルタミンシンターゼ (glnA)、グルタメートシンターゼ (gltAB)、イソシトレートデヒドロゲナーゼ (icdA)、アコニテートヒドラターゼ (acnA, acnB)、クエン酸シンターゼ (gltA)、メチルクエン酸シンターゼ (prpC)、フォスフォエノールピルベートカルボシラーゼ (ppc)、ピルベートデヒドロゲナーゼ (aceEF, lpdA)、ピルベートキナーゼ (pykA, pykF)、フォスフォエノールピルベートシンターゼ (ppsA)、エノラーゼ (eno)、フォスフォグリセロムターゼ (pgmA, pgmI)、フォスフォグリセレートキナーゼ (pgk)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ (gapA)、トリオースフォスフェートイソメラーゼ (tpiA)、フルクトースビスフォスフェートアルドラーゼ (fbp)、フォスフォフルクトキナーゼ (pfkA, pfkB)、グルコースフォスフェートイソメラーゼ (pgi) などが挙げられる。これらの酵素の中では、グルタメートデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、フォスフォエノールピルベートカルボキシラーゼ、及びメチルクエン酸シンターゼが好ましい。

【 0 0 8 5 】

シトレートシンターゼ遺伝子、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/またはグルタメートデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現が増大するように改変された株の例としては、EP1078989A、EP955368A及びEP952221Aに開示されたものが挙げられる。

【 0 0 8 6 】

L - グルタミン酸生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、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の合成を触媒する酵素の活性が低下または欠損している株も挙げられる。このような酵素の例としては、イソシトレートリアーゼ (aceA)、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ (sucA)、フォスフォトランスアセチラーゼ (pta)、アセテートキナーゼ (ack)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (ilvG)、アセトラクテートシンターゼ (ilvI)、フォルメートアセチルトランスフェラーゼ (pfl)、ラクテートデヒドロゲナーゼ (ldh)、グルタメートデカルボキシラーゼ (gadAB) などが挙げられる。 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が欠損した、または、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ活性が低下したエシェリヒア属に属する細菌、及び、それらの取得方法は米国特許第5,378,616号及び第5,573,945号に記載されている。

【 0 0 8 7 】

具体例としては下記のもものが挙げられる。

E. coli W3110sucA::Kmr

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

【 0 0 8 8 】

E. coli W3110sucA::Kmr は、E. coli W3110の $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (以下、「sucA遺伝子」ともいう) を破壊することにより得られた株である。この株は、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを完全に欠損している。

【 0 0 8 9 】

L - グルタミン酸生産菌の他の例としては、エシェリヒア属に属し、アスパラギン酸代謝拮抗物質に耐性を有するものが挙げられる。これらの株は、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを欠損していてもよく、例えば、E. coli AJ13199 (FERM BP-5807) (米国特許第5,908,768号)、さらにL - グルタミン酸分解能が低下したFFRM P-12379 (米国特許第5,393,671号); AJ13138 (FERM BP-5565) (米国特許第6,110,714号) などが挙げられる。

【 0 0 9 0 】

パントエア・アナナティスのL - グルタミン酸生産菌の例としては、パントエア・アナナティスAJ13355株が挙げられる。同株は、静岡県磐田市の土壌から、低pHでL - グルタミン酸及び炭素源を含む培地で増殖できる株として分離された株である。パントエア・ア

10

20

30

40

50

ナナティスAJ13355は、1998年2月19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（住所 〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FERM P-16644として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6614が付与されている。尚、同株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランス（*Enterobacter agglomerans*）と同定され、エンテロバクター・アグロメランスAJ13355として寄託されたが、近年16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティス（*Pantoea ananatis*）に再分類されている。

【0091】

また、パントエア・アナナティスのL-グルタミン酸生産菌として、 $\alpha$ -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ（KGDH）活性が欠損した、または、KGDH活性が低下したパントエア属に属する細菌が挙げられる。このような株としては、AJ13355株のKGDH-E1サブユニット遺伝子（*sucA*）を欠損させたAJ13356（米国特許第6,331,419号）、及びAJ13355株から粘液質低生産変異株として選択されたSC17株由来の*sucA*遺伝子欠損株であるSC17*sucA*（米国特許第6,596,517号）がある。AJ13356は、1998年2月19日、工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-16645として寄託され、1999年1月11日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-6616が付与されている。AJ13355及びAJ13356は、上記寄託機関に*Enterobacter agglomerans*として寄託されているが、本明細書では、*Pantoea ananatis*として記載する。また、SC17*sucA*株は、プライベートナンバーAJ417株が付与され、2004年2月26日に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 BP-08646として寄託されている。

【0092】

さらに、パントエア・アナナティスのL-グルタミン酸生産菌として、SC17*sucA*/RSFCP G+pSTVCB株、AJ13601株、NP106株、及びNA1株が挙げられる。SC17*sucA*/RSFCPG+pSTVCB株は、SC17*sucA*株に、エシェリヒア・コリ由来のクエン酸シンターゼ遺伝子（*gltA*）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（*ppsA*）、およびグルタメートデヒドロゲナーゼ遺伝子（*gdhA*）を含むプラスミドRSFCPG、並びに、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来のクエン酸シンターゼ遺伝子（*gltA*）を含むプラスミドpSTVCBを導入して得た株である。AJ13601株は、このSC17*sucA*/RSFCPG+pSTVCB株から低pH下で高濃度のL-グルタミン酸に耐性を示す株として選択された株である。また、NP106株は、実施例に記載したように、AJ13601株からプラスミドRSFCPG+pSTVCBを脱落させた株である。AJ13601株は、1999年8月18日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-17516として寄託され、2000年7月6日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7207が付与されている。

【0093】

L-フェニルアラニン生産菌

L-フェニルアラニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、コリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロゲナーゼ及びチロシンリプレッサーを欠損した*E. coli* AJ12739（*tyrA::Tn10*, *tyrR*）（VKPM B-8197）（WO03/044191）、フィードバック阻害が解除されたコリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロラーゼをコードする変異型*pheA34*遺伝子を保持する*E. coli* HW1089（ATCC 55371）（米国特許第5,354,672号）、*E. coli* MWEC101-b（KR8903681）、*E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146及びNRRL B-12147（米国特許第4,407,952号）などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。また、親株として、フィードバック阻害が解除されたコリスミ酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドロラーゼをコードする遺伝子を保持する*E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAB]（FERM BP-3566）、*E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAD]（FERM BP-12659）、*E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHATerm]（FERM BP-12662）及びAJ 12604と命名された*E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB]（FERM BP-3579）も使用できる（EP 488424 B1）。さらに、*yedA*遺伝子または*yddG*遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒ

ア属に属する L - フェニルアラニン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1、W003/044192)。

【 0 0 9 4 】

L - トリプトファン生産菌

L - トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、変異trpS遺伝子によりコードされるトリプトファン-tRNAシンターゼが欠損したE. coli JP4735/pMU3028 (DSM10122)及びJP6015/pMU91 (DSM10123) (米国特許第5,756,345号)、セリンによるフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセリレートデヒドロゲナーゼをコードするserAアレル及びトリプトファンによるフィードバック阻害を受けないアントラニレートシンターゼをコードするtrpEアレルを有するE. coli SV164 (pGH5) (米国特許第6,180,373号)、トリプトファンが欠損したE. coli AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263)及びAGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) (米国特許第4,371,614号)、フォスフォエノールピルビン酸生産能が増大したE. coli AGX17/pGX50,pACKG4-pps (W09708333, 米国特許第6,319,696号)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。yedA遺伝子またはyddG遺伝子にコードされるタンパク質の活性が増大したエシェリヒア属に属する L - トリプトファン生産菌も使用できる(米国特許出願公開2003/0148473 A1及び2003/0157667 A1)。

10

【 0 0 9 5 】

L - トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アントラニレートシンターゼ(trpE)、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ(serA)、3 - デオキシ - D - アラビノヘプツロン酸 - 7 - リン酸シンターゼ(aroG)、3 - デヒドロキネートシンターゼ(aroB)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ(aroE)、シキミ酸キナーゼ(aroL)、5 - エノール酸ピルビルシキミ酸 3 - リン酸シンターゼ(aroA)、コリスミ酸シンターゼ(aroC)、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼ及び、トリプトファンシンターゼ(trpAB)から選ばれる 1 種又は 2 種以上の酵素の活性が増強された株も挙げられる。プレフェン酸デヒドラターゼ及びコリスミ酸ムターゼは、2 機能酵素 (CM-PD) としてpheA遺伝子によってコードされている。これらの酵素の中では、フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ、3 - デオキシ - D - アラビノヘプツロン酸 - 7 - リン酸シンターゼ、3 - デヒドロキネートシンターゼ、シキミ酸デヒドラターゼ、シキミ酸キナーゼ、5 - エノール酸ピルビルシキミ酸 3 - リン酸シンターゼ、コリスミ酸シンターゼ、プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼ - プレフェン酸デヒドロゲナーゼが特に好ましい。アントラニレートシンターゼ及びフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼは共に L - トリプトファン及び L - セリンによるフィードバック阻害を受けるので、フィードバック阻害を解除する変異をこれらの酵素に導入してもよい。このような変異を有する株の具体例としては、脱感作型アントラニレートシンターゼを保持するE. coli SV164、及び、フィードバック阻害が解除されたフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異serA遺伝子を含むプラスミドpGH5 (WO 94/08031)をE. coli SV164に導入することにより得られた形質転換株が挙げられる。

20

30

【 0 0 9 6 】

L - トリプトファン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、阻害解除型アントラニレートシンターゼをコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロンが導入された株(特開昭57-71397号, 特開昭62-244382号, 米国特許第4,371,614号)も挙げられる。さらに、トリプトファンオペロン(trpBA)中のトリプトファンシンターゼをコードする遺伝子の発現を増大させることにより L - トリプトファン生産能を付与してもよい。トリプトファンシンターゼは、それぞれtrpA及びtrpB遺伝子によりコードされる 及び サブユニットからなる。さらに、イソシトレートリアーゼ-マレートシンターゼオペロンの発現を増大させることにより L - トリプトファン生産能を改良してもよい(W02005/103275)。

40

【 0 0 9 7 】

L - プロリン生産菌

L - プロリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvA遺伝子が欠損し

50

、L-プロリンを生産できる*E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) (EP 1172433)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0098】

本発明に用いる細菌は、L-プロリン生合成に関与する遺伝子の一種以上の発現を増大することにより改良してもよい。L-プロリン生産菌に好ましい遺伝子の例としては、L-プロリンによるフィードバック阻害が解除されたグルタメートキナーゼをコードするpr oB遺伝子(ドイツ特許第3127361号)が挙げられる。さらに、本発明に用いる細菌は、細菌の細胞からL-アミノ酸を排出するタンパク質をコードする遺伝子の一種以上の発現が増大することにより改良してもよい。このような遺伝子としては、b2682 遺伝子及びb2683 遺伝子(ygaZH遺伝子) (EP1239041 A2)が挙げられる。

10

【0099】

L-プロリン生産能を有するエシェリヒア属に属する細菌の例としては、NRRL B-12403 及びNRRL B-12404 (英国特許第2075056号)、VKPM B-8012 (ロシア特許出願2000124295)、ドイツ特許第3127361号に記載のプラスミド変異体、Bloom F.R. et al (The 15th Miami

【0100】

L-アルギニン生産菌

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、*E. coli* 237株 (VKPM B-7925) (米国特許出願公開2002/058315 A1)、及び、変異N-アセチルグルタメートシンターゼを保持するその誘導株(ロシア特許出願第2001112869号)、*E. coli* 382株 (VKPM B-7926) (EP1170358A1)、N-アセチルグルタメートシンターゼをコードするargA遺伝子が導入されたアルギニン生産株(EP1170361A1)などのエシェリヒア属に属する株が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0101】

L-アルギニン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、L-アルギニン生合成系酵素をコードする遺伝子の1種以上の発現が増大した株も挙げられる。かかる遺伝子の例としては、N-アセチルグルタミルフォスフェートレダクターゼ遺伝子(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(argJ)、N-アセチルグルタメートキナーゼ遺伝子(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ遺伝子(argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(argF)、アルギノコハク酸シンターゼ遺伝子(argG)、アルギノコハク酸リアーゼ遺伝子(argH)、カルバモイルフォスフェートシンターゼ遺伝子(c arAB)が挙げられる。

30

【0102】

L-バリン生産菌

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、ilvGMEDAオペロンを過剰発現するように改変された株(米国特許第5,998,178号)が挙げられるが、これらに限定されない。アテニュエーションに必要なilvGMEDAオペロンの領域を除去し、生産されるL-バリンによりオペロンの発現が減衰しないようにすることが好ましい。さらに、オペロンのilvA遺伝子が破壊され、スレオニンデアミナーゼ活性が減少することが好ましい。

L-バリン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、アミノアシルt-RNAシンターゼの変異を有する変異株(米国特許第5,658,766号)も挙げられる。例えば、イソロイシンtRNAシンターゼをコードするileS 遺伝子に変異を有する*E. coli* VL1970が使用できる。*E. coli* VL1970は、1988年6月24日、ルシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオルガニズムズ(VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia)に、受託番号VKPM B-4411で寄託されている。

40

さらに、生育にリボ酸を要求する、及び/または、H<sup>+</sup>-ATPaseを欠失している変異株(WO 96/06926)を親株として用いることができる。

【0103】

L-イソロイシン生産菌

L-イソロイシン生産菌又はそれを誘導するための親株の例としては、6-ジメチルアミノプリンに耐性を有する変異株(特開平5-304969号)、チアイソロイシン、イソロイシン

50

ヒドロキサメートなどのイソロイシンアナログに耐性を有する変異株、さらにDL-エチオニン及びノまたはアルギニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(特開平5-130882号)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、スレオニンデアミナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼなどのL-イソロイシン合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された組換え株もまた親株として使用できる(特開平2-458号, FR 0356739, 及び米国特許第5,998,178号)。

【0104】

L-チロシン生産菌

チロシン生産菌としては、チロシンによる阻害を受けない脱感作型のプレフェン酸デヒドラターゼ遺伝子(*tyrA*)を有するエシェリヒア属細菌(欧州特許出願公開1616940号公報)が挙げられる。

10

【0105】

本発明に用いる細菌は、グリセロールの資化性を高めるために、*glpR*遺伝子(EP1715056)の発現が弱化されているか、*glpA*、*glpB*、*glpC*、*glpD*、*glpE*、*glpF*、*glpG*、*glpK*、*glpQ*、*glpT*、*glpX*、*tpiA*、*gldA*、*dhaK*、*dhaL*、*dhaM*、*dhaR*、*fsa*及び*talC*遺伝子等のグリセロール代謝遺伝子(EP1715055A)の発現が強化されていてもよい。

【0106】

[変異型*yeaS*遺伝子]

本発明の細菌は、上述したようなL-アミノ酸生産能を有する腸内細菌科に属する細菌であって、特定の変異を有する変異型*yeaS*遺伝子保持するように改変させることによって得ることができる。ただし、細菌に上記のように改変を行った後に、L-アミノ酸生産能を付与してもよい。「特定の変異」については後述する。前記特定の変異を有さない*yeaS*遺伝子を「野生型*yeaS*遺伝子」と呼ぶことがある。前記特定の変異を有さない*yeaS*遺伝子は、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有する限り、他の変異を有していても、野生型*yeaS*遺伝子と呼ぶ。

20

【0107】

以下に、*yeaS*遺伝子について説明する。

【0108】

本発明の*yeaS*遺伝子として具体的には、配列番号1に示す塩基配列を含む遺伝子を挙げることができる。配列番号1には、エシェリヒア・コリ株の野生型*yeaS*遺伝子の塩基配列を示す。また、配列番号に、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を示す。

30

【0109】

*yeaS*遺伝子の発現を増強することで、各種アミノ酸の生産能が向上することが知られているが(FEBS Lett. 579. 4629-4634 (2005))、L-システインについては*yeaS*遺伝子との関連は知られていなかった。本発明者は、*yeaS*遺伝子の発現を増強することによって、L-システインの生産能が向上することを見出した。

【0110】

*yeaS*遺伝子は、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質をコードする限りにおいて、上記アミノ酸配列において、1若しくは数個の位置での1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であっても良い。この場合、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性は、1又は数個の置換、欠失、挿入又は付加される前のタンパク質に対して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の活性を維持していることを意味する。なお上記「1又は数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、具体的には好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個を意味する。

40

【0111】

上記の1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または付加は、タンパク質の機能が正常に維持される保存的変異である。保存的変異の代表的なものは、保存的置換であ

50

る。保存的置換とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。保存的置換とみなされる置換としては、具体的には、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。また、上記のようなアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、遺伝子が由来する細菌の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) によって生じるものも含まれる。

#### 【0112】

宿主細胞のL-アミノ酸生産能を向上させる活性を保持し、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するYeaSタンパク質をコードする遺伝子としては、具体的には、配列番号2において、11位のトリプトファン残基をグリシンに置換する変異、33位のリジン残基をアルギニンに置換する変異、52位のイソロイシン残基をバリンに置換する変異、59位のフェニルアラニン残基をセリンに置換する変異、60位のロイシン残基をグルタミンに置換する変異、65位のバリン残基をグルタミン酸に置換する変異、72位のスレオニン残基をアラニンに置換する変異、77位のアスパラギン残基をセリンに置換する変異、85位のフェニルアラニン残基をイソロイシンに置換する変異、86位のチロシン残基をフェニルアラニンに置換する変異から選ばれる1又は2以上の変異を少なくとも有するYeaSタンパク質等をコードする遺伝子を挙げることができる。これらの変異は、後記実施例2において、活性を低下させないサイレントな変異と推定されたものである。また、保存的変異はこれらに限定されず、実施例2に示すように、人為的にyeaS遺伝子内にランダム変異を導入したものの中からは、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を向上させる活性を維持しながら1又は数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するYeaSタンパク質をコードする遺伝子を取得することができる。

#### 【0113】

さらに、上記のような保存的変異を有する遺伝子は、コードされるアミノ酸配列全体に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上の相同性を有し、かつ、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質であってもよい。このようなyeaSに対して相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子 (yeaSホモログ) の配列情報は、上記のエシェリヒア・コリ株の野生型yeaS遺伝子を問い合わせ配列として用いたBLAST検索やFASTA検索によって公開データベースから容易に取得することができる。尚、本明細書において、「相同性」 (homology) は、「同一性」 (identity) を指すことがある。

#### 【0114】

また、yeaS遺伝子は、腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するタンパク質をコードする限り、上記塩基配列に相補的な配列、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でハイブリダイズする遺伝子であってもよい。「ストリンジェントな条件」とは、例えば60、1X 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回好ましくは2

10

20

30

40

50



～ 3 回洗浄する条件を挙げることができる。

【 0 1 1 5 】

上記ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、遺伝子の相補配列の一部であってもよい。そのようなプローブは、公知の遺伝子配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、これらの塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。例えば、プローブとして、300 bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

【 0 1 1 6 】

腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性とは、腸内細菌で発現を上昇させたときに非改変株、例えば野生株または親株よりも多量のL-アミノ酸、例えばL-システインを生産し、培地に蓄積することが出来る能力を付与する活性を意味し、好ましくは0.1g/L以上、より好ましくは0.2g/L以上、特に好ましくは0.3g/L以上の高いL-アミノ酸を蓄積させる能力を付与する活性を意味する。

10

【 0 1 1 7 】

腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するかどうかは、野生株または親株においてそのタンパク質をコードする遺伝子の発現が上昇した細菌を作製し、これを培地で培養し、培地中に蓄積するL-アミノ酸の量を定量することで確認することができる。L-アミノ酸がL-システインである場合は、野生株又は親株としては、E.coli MG1655株にフィードバック阻害が解除された変異型SATをコードする遺伝子を增強した株が挙げられる。

20

【 0 1 1 8 】

腸内細菌で発現を上昇させたときにL-アミノ酸生産能を非改変株と比べて向上させる活性を有するかどうかを知るためには、その遺伝子の発現が上昇した細菌において、野生株または親株よりも高い濃度のL-アミノ酸を含有する培地での生育が野生株または親株よりも良好になっていること、すなわちL-アミノ酸耐性を調べることで容易に確認することができる。L-アミノ酸がL-システインである場合は、具体的には0.1～10mM程度のL-システインを含む培地に、細菌を接種し、10時間後～120時間後の適当な時間にコロニーの直径を測定し、野生株または親株よりもその数値が大きくなっていることで確認することができる。本発明者らは、宿主細胞のL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性とL-システイン耐性能が相当の相関関係を持っていることを見出した。

30

【 0 1 1 9 】

前記変異型yeaS遺伝子における「特定の変異」とは、具体的には下記(I)～(III)から選ばれる変異である。

(I) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、28位のスレオニン残基をスレオニン以外のアミノ酸に置換する変異、

(II) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、137位のフェニルアラニン残基をフェニルアラニン以外のアミノ酸に置換する変異、

(III) yeaS遺伝子がコードするタンパク質において、188位のロイシン残基をロイシン以外のアミノ酸に置換する変異。

40

【 0 1 2 0 】

前記(I)～(III)の変異として具体的には、それぞれ下記(i)～(iii)の変異が挙げられる。

(i) 28位のスレオニン残基をアスパラギンに置換する変異

(ii) 137位のフェニルアラニン残基をセリン、グルタミン、アラニン、ヒスチジン、システイン、及びグリシンのいずれかに置換する変異、

(iii) 188位のロイシン残基をグルタミンに置換する変異。

【 0 1 2 1 】

変異は、上記のいずれか1種の変異であってもよく、任意の2種、又は3種の変異が組みあわせてもよい。

50

## 【 0 1 2 2 】

前記変異として特に好ましいのは、前記(ii)の変異であって、かつ、137位のフェニルアラニン残基がセリンまたはグルタミンに置換される変異である。

## 【 0 1 2 3 】

前記(I)～(III)の変異における28位、137位、又は188位とは、必ずしもyeaS遺伝子がコードするタンパク質(YeaSN)のN末端からの絶対的な位置を示すものではなく、配列番号2に記載のアミノ酸配列との相対的な位置を示すものである。例えば、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するYeaSタンパク質において、28位よりもN末端側の位置で一アミノ酸残基が欠失した場合、前記28位は27位となる。このような場合であっても、27位のアミノ酸残基は、本発明における「28位」のアミノ酸残基である。アミノ酸置換の絶対的な位置は、対象のYeaSタンパク質のアミノ酸配列と配列番号2のアミノ酸配列とのアラインメントにより、決定することができる。

10

## 【 0 1 2 4 】

YeaS遺伝子への(I)～(III)の各変異の導入は、例えば、部位特異的変異法又はオーバーラップエクステンション法等により、野生型YeaS遺伝子の変異に対応するコドンに所定の変異を導入することによって達成される。変異後のコドンは、所定のアミノ酸をコードするものであれば特に制限されないが、目的の腸内細菌で使用頻度の高いコドンを使用することが好ましい。

## 【 0 1 2 5 】

細菌の染色体上のyeaS遺伝子への前記(I)～(III)から選択される変異の導入は、変異点を含む変異型yeaS遺伝子又はその断片と、染色体上のyeaS遺伝子の相当する部分とを置換することによって行うことができる。また、変異型yeaS遺伝子又は同遺伝子を含むベクターで細菌を形質転換してもよい。この場合、変異型yeaS遺伝子は、染色体上に保持させてもよく、プラスミド上に保持させてもよい。また、染色体上の野生型yeaS遺伝子は保持されたままでもよく、欠損していてもよい。

20

## 【 0 1 2 6 】

また、細菌が保持する変異型yeaS遺伝子は、1コピーであってもよく、2コピー又はそれ以上であってもよい。さらに、変異型yeaS遺伝子を発現させるためのプロモーターは、野生型yeaS遺伝子のプロモーターでもよく、他のプロモーター、例えばlacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等であってもよい。

30

## 【 0 1 2 7 】

形質転換に用いるベクターとしては、使用する微生物で自律複製可能なプラスミドが挙げられる。例えば、腸内細菌群に属する微生物の中で自律複製可能なプラスミドとして、pUC19、pUC18、pBR322、RSF1010、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、pSTV28、pSTV29、pTWV228、pTWV229(pHSG、pSTV、pTWVはタカラバイオ社より入手可能)、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218(pMWはニッポンジーン社より入手可能)等が挙げられる。また、コリネ型細菌用のプラスミドとしては、pAM330(特開昭58-67699号公報)、pHM1519(特開昭58-77895号公報)、pSFK6(特開2000-262288号公報参照)、pVK7(米国特許出願公開明細書2003-0175912)、pAJ655、pAJ611、pAJ1844(特開昭58-192900号公報)、pCG1(特開昭57-13450号公報)、pCG2(特開昭58-35197号公報)、pCG4、pCG11(特開昭57-183799号公報)、pHK4(特開平5-7491号公報)などが挙げられる。

40

## 【 0 1 2 8 】

形質転換法としては、例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol. 1970, 53, 159-162)、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., 1997. Gene 1: 153-167)などが挙げられる。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Choen, S.N., 1979.

50

Mol. Gen. Genet. 168: 111-115; Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A. 1978. Nature 274: 398-400; Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933) も応用できる。また、電気パルス法 (特開平2-207791号公報) によっても、微生物の形質転換を行うこともできる。

#### 【0129】

また、変異型yeaS遺伝子の細菌への導入は、変異型yeaS遺伝子について後述するように、宿主微生物への染色体上への導入によっても達成できる。微生物の染色体上に変異型yeaS遺伝子を導入するためには、トランスポゾンやMini-Muを用いて染色体上にランダムに導入する方法 (特開平2-109985号公報、US5,882,888 EP805867B1) や、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ことも可能である。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、Redドリブンインテグレーション法(WO 2005/010175)を使用することにより、目的遺伝子を染色体上に導入することも可能である。また、P1ファージ等のファージを用いたtransductionや、接合伝達ベクターによる染色体上への目的遺伝子の導入も可能である。また、W003/040373に記載されているように、目的物質生産に不要な遺伝子を標的にして変異型yeaS遺伝子を導入することも可能である。このような方法で標的配列に、変異型yeaS遺伝子を1コピー又は多コピー導入することができる。

#### 【0130】

染色体上に目的遺伝子が転移したことの確認は、目的遺伝子又はその一部と相補的な配列を持つプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、又は目的遺伝子の配列に基づいて作成したプライマーを用いたPCR等によって確認出来る。

#### 【0131】

##### <2>本発明のL-アミノ酸の製造法

上記のようにして得られる本発明の細菌を培地中で培養し、該培地からL-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。L-アミノ酸は、L-の誘導体であってもよい。L-アミノ酸がL-システインである場合は、L-システインの誘導体としては、前記したようなS-スルホシステイン、チアゾリジン誘導体、同チアゾリジン誘導体に相当するヘミチオケタール等が挙げられる。

#### 【0132】

使用する培地としては、炭素源、窒素源、イオウ源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地が挙げられる。

#### 【0133】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、グリセロール、糖蜜やでんぷんの加水分解物などの糖類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

#### 【0134】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

#### 【0135】

イオウ源としては、硫酸塩、亜硫酸塩、硫化物、次亜硫酸塩、チオ硫酸塩等の無機硫黄化合物が挙げられる、

#### 【0136】

有機微量栄養源としては、ビタミンB1などの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

#### 【0137】

培養は好氣的条件下で30~90時間実施するのがよく、培養温度は25~37に、培養中pHは5~8に制御することが好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性

10

20

30

40

50

あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0138】

培養終了後の培地液からのL-アミノ酸の採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。本発明において採取されるL-アミノ酸は、目的とするL-アミノ酸以外に微生物菌体、培地成分、水分、及び微生物の代謝副産物を含んでいてもよい。採取されたL-アミノ酸の純度は、50%以上、好ましくは85%以上、特に好ましくは95%以上である (US5,431,933, JP1214636B, US4,956,471, US4,777,051, US4946654, US5,840358, US6,238,714, US2005/0025878)。

【0139】

L-アミノ酸は、従来より周知となっているイオン交換樹脂法 (Nagai, H. et al.: Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710)、膜分離法 (特開平9-164323号、特開平9-173792号)、晶析法 (WO2008/078448、WO2008/078646)、その他の方法を組み合わせることにより採取できる。

10

【0140】

上記のようにして得られるL-システインは、L-システイン誘導体の製造に用いることができる。L-システイン誘導体としては、メチルシステイン、エチルシステイン、カルボシステイン、スルホシステイン、アセチルシステイン等が含まれる。

【0141】

また、L-システインのチアゾリジン誘導体が培地に蓄積した場合は、培地からチアゾリジン誘導体を採取し、チアゾリジン誘導体とL-システインとの間の反応平衡をL-システイン側に移動させることによって、L-システインを製造することができる。また、培地にS-スルホシステインが蓄積した場合、例えばジチオスライツール等の還元剤を用いて還元することによってL-システインに変換することができる。

20

【実施例】

【0142】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0143】

〔実施例1〕野生型YeaS強化によるL-システイン生産増加効果

*P. ananatis*において野生型*yeaS*遺伝子の発現を増強することのL-システイン生産に及ぼす効果を調べるために、変異型SATをコードする遺伝子*cysE5* (米国特許出願第20050112731号)が導入され、かつ、*yeaS*遺伝子のコピー数を高めた株を構築した。

30

【0144】

まず、上記菌株を構築するためのプラスミドを構築した。その方法を以下に示す。

*E. coli* MG1655 (ATCC No.47076)の染色体DNAをテンプレートとしてP1 (agctgagtcg accccagga aaaattgggtt aataac : 配列番号20)、及びP2 (agctgagcat gcttccaact gcgc taaatga cgc : 配列番号21)をプライマーとして用いたPCRによって*nlpD*遺伝子のプロモーター領域 (以下、野生型*nlpD*遺伝子プロモーターを「Pnlp0」と記載する。)約300bpを含むDNA断片を取得した。これらプライマーの5'末端、3'末端には制限酵素SalI及びPaeIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、55 20秒、72 15秒を25サイクル、最後に72 5分。得られた断片をSalI及びPaeIで処理し、pMIV-5JS (特開2008-99668)のSalI-PaeIサイトに挿入し、プラスミドpMIV-Pnlp0を取得した。このpMIV-Pnlp0プラスミドに挿入されたPnlp0プロモーターのPaeI-SalI断片の塩基配列は配列番号5に示したとおりである。

40

【0145】

次に、MG1655の染色体DNAをテンプレートとして、P3 (agctgatcta gaaaacagaa ttgacct ggc ggc : 配列番号22)、及びP4 (agctgaggat ccaggaagag ttgtagaaa cgc : 配列番号23)をプライマーとして用いたPCRによって*rrnB*遺伝子のターミネーター領域約300bpを含むDNA断片を取得した。これらプライマーの5'末端には制限酵素XbaI及びBamHIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95 3分の後、95

50

60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、59 20秒、72 15秒を25サイクル、最後に72 5分。得られた断片をXbaI及びBamHIで処理し、pMIV-Pnlp0のXbaI - BamHIサイトに挿入しプラスミドpMIV-Pnlp0-terを取得した。

【0146】

続いてMG1655の染色体DNAをテンプレートとして、P5 (agctgagtcg acgtgttcgc tgaatac ggg gt : 配列番号24)、及びP6 (agctgatcta gagaaagcat caggattgca gc : 配列番号25)をプライマーとして用いたPCRによってyeaS遺伝子を含む約700bpのDNA断片を取得した。これらプライマーの5'末端には制限酵素SalI及びXbaIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、55 20秒、72 15秒を25サイクル、最後に72 5分。得られた断片をSalI及びXbaIで処理し、pMIV-Pnlp0-terのSalI - XbaIサイトに挿入しプラスミドpMIV-Pnlp0-YeaS3を取得した。こうして、pMIV-5JSベクター上に、nlpDプロモーター、yeaS遺伝子、及びrrnBターミネーターが、この順に繋がったyeaSの発現ユニットが構築された。

【0147】

nlpDプロモーターの-10領域を改変することでより強力なプロモーターとするため、以下の手法で-10領域のランダム化を行った。nlpDプロモーター領域(図1)には、2箇所のプロモーターとして機能すると推定される領域が存在し、それぞれ図中ではpnlp1、pnlp2と示してある。プラスミドpMIV-Pnlp0をテンプレートとして、P1及びP7 (atcgtgaaga t cttttccag tgttnannag ggtgccttgc acggtatna ngtcactgg ("n"- はa,t,g,cのいずれでも良いことを意味する) : 配列番号26)をプライマーとして用いたPCRによってnlpDプロモーターの3'末端側に含まれる-10領域(-10(Pnlp1)と記載)をランダム化したDNA断片を取得した(図1)。PCRサイクルは次の通りである。95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 15秒を25サイクル、最後に72 5分。

【0148】

一方、同様にプラスミドpMIV-Pnlp0をテンプレートとして、P2及びP8 (tgaaaagat cttcannnnn cgctgacctg cg ("n"- はa,t,g,cのいずれでも良いことを意味する) : 配列番号27)をプライマーとして用いたPCRによってnlpDプロモーターの5'末端側に含まれる-10領域(-10(Pnlp2)と記載)をランダム化したDNA断片を取得した(図1)。PCRサイクルは次の通りである。95 3の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 15秒を25サイクル、最後に72 5分。

【0149】

得られた3'末端側と5'末端側の断片は、プライマーP7とP8にデザインされてあるBglIIサイトによってつなぎ合わせることができ、2箇所の-10領域がランダム化されたnlpDプロモーター全長を構築することができる。この断片をテンプレートとして、P1及びP2をプライマーとして用いたPCRによって改変型nlpDプロモーター全長のDNA断片を取得した。PCRサイクルは次の通りである。95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 15秒を12サイクル、最後に72 5分。

【0150】

増幅断片を、プライマーの5'末端にデザインされている制限酵素SalI及びPaeIで処理し、同じくSalI及びPaeIで処理したプラスミドpMIV-Pnlp0-YeaS3に挿入することで、プラスミド上の野生型nlpDプロモーター部位(Pnlp0)を変異型Pnlpと置き換えた。その中から図1に示すプロモーター配列(Pnlp8)を持つものを選び、pMIV-Pnlp8-YeaS7とした。このプラスミドに挿入されたPnlp8プロモーターのPaeI - SalI断片の塩基配列は配列番号6に示したとおりである。同様にして、変異を含むnlpDプロモーター領域のDNA断片を、SalI及びPaeIで処理したプラスミドpMIV-Pnlp0-terに挿入することでプラスミド上のnlpDプロモーター部位(Pnlp0の部分)を変異型Pnlpと置き換えた。その中の一つをpMIV-Pnlp23-terとした。このプラスミドに挿入されたPnlp23プロモーターのPaeI - SalI断片の塩基配列は配列番号7に示したとおりである。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 1 】

次に、pMW-Pomp-cysE5 (WO2005007841) から PaeI、SacI で Pomp-cysE5 カセット部分を切り出し、pMIV-5JS の同じサイトに挿入、pMIV-Pomp-CysE5 を構築した。pMW-Pomp-cysE5 は、ompC 遺伝子プロモーターに連結された変異型 SAT をコードする遺伝子 cysE5 を pMW118 に挿入して得られたプラスミドである。pACYC184 (GenBank/EMBL accession number X06403、ニッポンジーンから購入可能) から、XbaI、Eco88I でテトラサイクリン耐性遺伝子を切り出し、同遺伝子断片を Klenow fragment で処理をした後、pMIV-Pomp-CysE5 の PvuI サイトに挿入し、pMT-Pomp-CysE5 を構築した。続いて、pMIV-Pnlp8-YeaS7 を HindIII で消化し、Klenow fragment で平滑末端化した後、NcoI で消化して、Pnlp8-YeaS-rrnB ターミナーのカセットとクロラムフェニコール耐性マーカを含む断片を切り出した。この断片を、同

10

## 【 0 1 5 2 】

野生型 yeaS 遺伝子の発現を増強することの L - システイン生産に及ぼす効果を調べるために、上記方法により構築した pMT-Pomp-CysE5 と pMT-EY2 を *P. ananatis* SC17 株 (米国特許 6596517) に導入し、得られた形質転換株の L - システイン生産能を評価した。

## 【 0 1 5 3 】

培養には、L - システイン生産培地 (組成: 15g/L 硫酸アンモニウム, 1.5g/L リン酸二水素カリウム, 1g/L 硫酸マグネシウム七水和物, 0.1g/L トリプトン, 0.05g/L イーストエクストラクト, 0.1g/L 塩化ナトリウム, 20g/L 炭酸カルシウム, 40g/L グルコース, 20mg/L テトラサイクリン) を使用した。

20

## 【 0 1 5 4 】

L - システイン生産培養は以下の手順で行った。SC17/pMT-PompCysE5 株と SC17/pMT-EY2 株を LB 寒天培地に塗り広げ、34 °C で一晩前培養を行った後、植菌用ループで 8 分の 1 プレート分の菌体を掻き取り、大試験管 (内径 23mm、長さ 20cm) に 2ml 張りこんだ L - システイン生産培地中に植菌し、220-230rpm で 32 °C にて振とう培養を行い、2 日後に培養を終了した。培地中に生産された L - システインの定量は、Gaitonde, M.K. (Biochem J. 1967 Aug; 104(2): 627-33.) に記載の方法で行った。表 1 に示した通り、yeaS 遺伝子の発現を増強することにより、L - システインの生産量を増加させる効果を持つことが分かった。なお

30

## 【表 1】

導入プラスミド	L-システイン(g/L)
pMT-CysE5	0.20
pMT-EY2	1.54

40

## 【 0 1 5 5 】

〔実施例 2〕変異型 yeaS 遺伝子の取得と L - システイン生産増加効果

次に、野生型 YeaS よりも宿主細胞の L - システイン生産能を向上させる活性が高い変異体を取得するために、エラー - プローン (error-prone) PCR により人為的に yeaS 遺伝子内にランダム変異を導入した。

## 【 0 1 5 6 】

(1) yeaS の error-prone PCR と変異導入ライブラリーの作製

まず、yeaS 遺伝子に 1 ~ 3 個の変異が入るような error-prone PCR の条件を、先行知見 (Evert Bokma et al., (2006) FEBS Letters 580:5339-5343, Zao et al., (1998) Nat

50

Biotechnol Mar;16(3): 258-61) を基に検討した。DNAポリメラーゼはtaq polymerase (QIAGEN社製) を使用し、反応液組成は10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、7mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dGTP、dATP、1mM dCTP、dTTP、12.5 μMのMnCl<sub>2</sub>であった。プライマーには、それぞれNcoIサイトとPstIサイトを付加したP9 (catgcattgg tcgctgaata cggggttctg: 配列番号 28) とP10 (aactgcagtc aggattgcag cgtcgcc: 配列番号 29) を用い、94 5分の後、94 30秒、50 45秒、72 45秒を50サイクル、最後に72 7分というPCRサイクルで増幅した。反応は、独立したPCRチューブ16本に反応液を分割して行い、変異が偏らないようにした。

#### 【0157】

増幅したフラグメントをNcoIとPstIで消化し、同酵素で処理したpTrc99-Kmrヘライゲーションし、E. coli JM109株を形質転換した。なおpTrc99-Kmrは、pTrc99A (GenBank/EMBL accession number M22744、アマシャムバイオサイエンス社より購入可能) をDraIで制限酵素処理することによりアンピシリン耐性遺伝子を除去し、そこにカナマイシン耐性遺伝子を挿入することにより作製した。カナマイシン耐性遺伝子は、pACYC177 (GenBank/EMBL accession number X06402、ニッポンジーンから購入可能) を鋳型に、P11 (aaagccacgt tgtgtctcaa aatc: 配列番号 30) とP12 (ggtgttgctg actcatacca ggc: 配列番号 31) をプライマーとして用いて、94 1分の後、94 30秒、55 30秒、72 75秒を30サイクル、最後に72 5分というプログラムでPCRにより増幅することにより得た。

#### 【0158】

上記形質転換体を25 mg/Lのカナマイシンを含んだLB寒天培地上にてセレクションし、得られたコロニーからランダムにピックアップした株をテンプレートに、P13 (gacaattaa t catccggctc g: 配列番号 32) 、及びP14 (tttatcagac cgcttctgcg: 配列番号 33) をプライマーとして用いて、94 5分の後、98 5秒、60 10秒、72 45秒を30サイクル、最後に72 2分というプログラムでPCRを行い、形質転換株が変異導入したyeaSを持っていることを確認した。プレート上のコロニーをすべてかき取り、WizardR Plus Midiprep DNA purification System (Promega社) にてプラスミドを回収し、ライブラリーを得た。

#### 【0159】

##### (2) L - システイン耐性を指標とした変異型yeaSのスクリーニング

得られたライブラリーをMG1655へエレクトロポレーション法にて導入し、L - システインをそれぞれ3mM、6mM含有するM9セレクションプレート (12.8 g/Lリン酸水素二ナトリウム七水和物、3.0 g/L リン酸二水素カリウム、0.5 g/L 塩化ナトリウム、1.0 g/L 塩化アンモニウム、2mM 硫酸マグネシウム、0.4% グルコース、0.1mM 塩化カリウム、25 mg/Lカナマイシン、1.5% アガロース) 上に塗布した。このセレクションプレートを37 °Cで2夜インキュベーションしたところ、6mMのL - システインを含有するM9セレクションプレート上には100個弱の耐性株が、同3mMのプレート上には200~300個の耐性株が得られた。6mMのL - システインを含有するプレートから得られたコロニーを80株、同3mMのプレートから得られたコロニーを12株、シングルコロニーアイソレーションし、これらのコロニーを鋳型として、P13とP14をプライマーとして用い、94 5分の後、98 5秒、60 10秒、72 45秒を30サイクル、最後に72 2分というプログラムでプラスミド上のyeaS遺伝子領域を含むDNA断片をPCRにより増幅した。それらのフラグメントの塩基配列をシーケンシングプライマーとしてP13を用いて解読し、yeaS遺伝子内の変異導入部位を確認した。シーケンスが解読できたクローンのうち、重複しているものをグループ化した後、代表的なクローンからプラスミドを抽出し、以下に記すL - システイン生産菌に導入し、培養評価を行った。得られたクローンのうち、相当数はT28N変異を含んでおり、表2に示すようなT28Nと同時に他の変異も導入された2重、3重変異株が多く得られた。また、F137S変異を含むクローンも複数取得された。またL188Q変異を単独で持つクローンも得られた。

#### 【0160】

(3) 変異型yeaSの効果を確認するためのL - システイン生産菌の構築 - 1 (P. ananatis SC17株へのcysE5、変異型yeaSの導入)

10

20

30

40

50

先述のpMT-EY2は、pMIV-5JS（特開2008-99668）に由来するMuファージのアタッチメントサイトを備えている。このプラスミドをMu transposaseを持つヘルパープラスミドpMH10（Zimenkov D. et al., *Biotechnologiya (in Russian)*, 6, 1-22 (2004)）と同一細胞内で共存させることにより、このpMT-EY2プラスミド上でMuファージのアタッチメントサイトに挟まれる形で存在するクロラムフェニコール耐性マーカーを含むPompC-cysE5-Pnlp8-YeaS-rrnB terminatorのカセットを、*P. ananatis* SC17株（米国特許6596517）の染色体上に挿入することができる。さらに、pMT-EY2プラスミド上に存在するクロラムフェニコール耐性マーカーは、2つのファージのアタッチメントサイト（attRとattL）間に挟まれる構造を持っているため、後述の方法によりクロラムフェニコール耐性マーカーを切り出し除去することができる。

10

## 【0161】

まず、SC17株にエレクトロポレーションによりpMH10が導入された株を、20mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地にて30℃で一晩培養することにより選択した。得られた形質転換株を30℃で培養し、さらにこの株にエレクトロポレーションによりpMT-E2を導入した。このpMH10とpMT-EY2の両方で形質転換された株に、42℃、20分間の条件でヒートショックを与えた後、20mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地にてクロラムフェニコール耐性株のコロニーを選択した。このとき培養温度は39℃とした。このようにして、約50クローンを取得し、それぞれをLB寒天培地で39℃、48時間培養することで、pMH10及びpMT-EY2のキュアリングを行った。染色体上にカセットが挿入されたことによりクロラムフェニコール耐性を示し、かつ、両プラスミドをキュアリングした結果カナマイシン及びアンピシリン感受性を示す株を取得した。さらに、この株の染色体DNAを鋳型として、P1とP6をプライマーとして用いたPCRにより、得られた株の染色体上に目的のカセットが挿入されていることを確認した。得られた全クローンをそれぞれEY01～EY50と命名し、EY01～EY50株のL-システイン生産培養を行った。培養は上記実施例1に示した方法を用いた。その結果、最も多くL-システインを生産したクローンであるEY19株を選抜した。

20

## 【0162】

EY19株に導入されたクロラムフェニコール耐性マーカーを、ラムダファージ由来の切り出しシステムによって除去した。具体的には、ラムダファージのInt-Xis遺伝子を搭載したpMT-Int-Xis2（WO2005/010175）でEY19株を形質転換し、得られた形質転換株からクロラムフェニコール感受性を示すEY19(s)株を取得した。

30

## 【0163】

(4) 変異型yeaSの効果を確認するためのL-システイン生産菌の構築 - 2 (EY19(s)株からのcysPTWA遺伝子発現強化株の作製)

次に、cysPTWA遺伝子の発現を強化させるため、染色体上のcysPTWA遺伝子クラスターの上流に存在するプロモーターを、先述の強力なプロモーターPnlp8に置換した。まずpMIV-Pnlp8-YeaS7をテンプレートに、P1及びP2を用いたPCRによってnlp8プロモーター約300bpを含むDNA断片を取得した。PCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、59℃ 20秒、72℃ 15秒を20サイクル、最後に72℃ 5分。

40

## 【0164】

増幅されたnlp8プロモーターを含むDNA断片をKlenowフラグメントで処理し、XbaIで切断後にKlenowフラグメントで処理されたプラスミドpMW118-(attL-KmR-attR)（WO2006/093322A2）に挿入し、プラスミドpMW-Km-Pnlp8を取得した。pMW-Km-Pnlp8をテンプレートに使用し、プライマーP15（tccgctcacg atttttttca tcgctggtaa gggtatttat cccccgaa aaattgggta：配列番号34）、及びP16（tttcacaccg ctcaaccgca gggcataacc ggcccttgaa gcctgctttt ttatactaag ttg：配列番号35）を用いたPCRによって、Km-Pnlp8カセットを含む約1.6kbのDNA断片を増幅した。このときのPCRサイクルは次の通りである。95℃ 3分の後、95℃ 60秒、50℃ 30秒、72℃ 40秒を2サイクル、94℃ 20秒、54℃ 20秒、72℃ 90秒を30サイクル、最後に72℃ 5分。両プライマー上には依存インテグレーション（「Red-driven integration」と呼ばれる方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vo

50



l. 97, No. 12, p6640-6645) ) によって目的の断片を挿入するための染色体上のターゲットとなる配列 (この場合はcysPTWAのプロモーター近傍の配列) がデザインされている。そのため、取得されたDNA断片を目的の菌株にこの 依存インテグレーションによって挿入した場合には、染色体上のcysPTWA遺伝子の直前にKm-Pnlp8が挿入され、nlp8プロモーターにcysPTWA遺伝子が連結される構造となる。cysPTWA遺伝子クラスターの塩基配列を配列番号12に、cysP、cysT、cysWの各遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を配列番号13~15に示す。cysA遺伝子の塩基配列、及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号16、17に示す。

【0165】

P. ananatis SC17(0)/RSF-Red-TER株は、 依存インテグレーションを効率よく行うための宿主菌株であり、 Red遺伝子産物に耐性なP. ananatis菌株であるSC17(0)株にのgam、bet及びexoの各遺伝子 (以下、「Red遺伝子」) を発現するヘルパープラスミドRSF-Red-TERが導入された菌株である(WO2008/075483)。SC17(0)株は、2005年9月21にロシアン・ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・マイクロオーガニズム (Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika) (住所: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) に受託番号VKPM B-9246のもとに寄託されている。また、このRSF-Red-TERプラスミドの構築方法はWO2008/075483に詳細に記載されている。

【0166】

上記SC17(0)/RSF-Red-TER株を、 Red遺伝子発現誘導のためIPTGを添加した条件で培養して、エレクトロポレーション用の細胞を調製した。これらの細胞に、上述の目的のDNA断片をエレクトロポレーションにて導入し、カナマイシン耐性を指標に 依存インテグレーションによりcysPTWA遺伝子上流にnlp8プロモーターが挿入された組み換え株を取得した。取得された株の染色体DNAをテンプレートに、P17 (ctttgtccct ttagtgaagg: 配列番号36)、P18 (agctgatcta gaagctgact cgagttaatg gcctcccaga cgac: 配列番号37) をプライマーに用いたPCRにて、目的のKm-Pnlp8-cysPTWAの構造が形成されていることを確認し、この株をSC17(0)-Pnlp8-PTWA株と命名した。

【0167】

次に、SC17(0)-Pnlp8-PTWA株の染色体DNAを精製し、この染色体DNA 10 µgをエレクトロポレーション法によりEY19(s)株に導入し、カナマイシン耐性株を取得した。得られた株の染色体DNAを鋳型として、P17、P18をプライマーとして用いたPCRによる増幅を行い、EY19(s)株の染色体にKm-Pnlp8-cysPTWAの構造が導入されたことを確認した。こうして取得された株をEYP197株と命名した。さらに上述のpMT-Int-Xis2を用いたカナマイシン耐性マーカーの染色体上からの除去を行い、カナマイシン感受性となった株をEYP197(s)株と命名した。

【0168】

(5) 変異型yeaSの効果を確認するためのL-システイン生産菌の構築 - 3 (EYP197(s)株からの変異型3-フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ (serA348) 遺伝子搭載株の作製)

L-システイン生産菌に導入する3-フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼとして、パントエア・アナナティス由来の3-フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子であって、348位のアスパラギン残基がアラニンに置換した変異型酵素(N348A)をコードするserA348遺伝子 (J. Biol. Chem. 1996; 271(38):23235-8) を以下の方法で構築した。

【0169】

パントエア・アナナティス由来の野生型serA遺伝子の配列を配列番号10に示す。上記変異が導入されたserA遺伝子の3'側DNA断片を得るため、SC17株染色体DNAをテンプレートに、P19 (agctgagtcg acatggcaaa ggtatcactg gaa: 配列番号38) 及びP20 (gagaacgcc gggcgggctt cgtgaatatg cagc: 配列番号39) をプライマーに用いたPCR (95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 60秒

10

20

30

40

50

を25サイクル、最後に72 5分)を行った。次に同様にして変異が導入された5'側DNA断片を得るため、SC17株染色体DNAをテンプレートに、P21 (agctgatcta gacgtgggat cagt aaagca gg : 配列番号40)、及びP22 (aaaaccgccc gggcgttctc ac : 配列番号41)をプライマーに用いたPCR(95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 20秒を20サイクル、最後に72 5分)を行った。得られた両PCR断片を制限酵素SmaIにより処理した後、DNAライゲースによるライゲーションにより連結し、目的の変異(N348A)を含む変異型serA遺伝子全長のDNA断片を得た。このDNA断片をテンプレートとし、P19とP21をプライマーに用いてPCR増幅(95 3分の後、95 60秒、50 30秒、72 40秒を2サイクル、94 20秒、60 20秒、72 75秒を15サイクル、最後に72 5分)を行った。P19およびP21プライマーにデザインされているSalI、XbaI制限酵素サイトをSalI、XbaIで処理した後、同じくSalI、XbaIで処理したpMIV-Pnlp8-terに挿入し、pMIV-Pnlp8-serA348を作製した。

#### 【0170】

構築されたpMIV-Pnlp8-serA348にはpMIV-5JS(特開2008-99668)に由来するMuのアタッチメントサイトが搭載されている。このプラスミドを用いれば、先述のとおり、Mu transposaseを持つヘルパープラスミドpMH10を用いることで、クロラムフェニコール耐性マーカを含むPnlp8-serA348-rrnB terminatorのカセットをP. ananatis SC17株の染色体上に挿入することができる。SC17(0)株にpMIV-Pnlp8-serA348プラスミドおよびpMH10を導入し、染色体にPnlp8-serA348-rrnB terminatorのカセットが挿入された株を取得した。プライマーP1、P21を用いたPCRにより、目的のカセットが細胞中に存在することを確認した。得られた50クローンについて、細胞抽出液中の3-フォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼ活性を測定し、最も活性の高かった菌株を選抜し、SC17int-serA348株と命名した。次に、SC17int-serA348株の染色体DNA 10 µgをエレクトロポレーションによりEYP197(s)株に導入し、クロラムフェニコール耐性株を取得し、プライマーP1、P21を用いたPCRにより、EYP197(s)株の染色体にクロラムフェニコール耐性マーカと共にPnlp8-serA348の構造が導入されたことを確認した。こうして取得された株をEYPS1976株と命名した。

先述のpMT-Int-Xis2を用いたマーカ除去の方法により、クロラムフェニコール耐性マーカの除去を行い、クロラムフェニコール感受性となった株をEYPS1976(s)株と命名した。

#### 【0171】

(6) 変異型yeaSの効果を確認するためのL-システイン生産菌の構築-4(EYPS1976(s)株から0-アセチル-L-セリン-スルフヒドリラーゼ-B(cysM)遺伝子搭載株の作製)

まず、適切な強さのプロモーターにcysM遺伝子をクローニングするため、新たなプロモーターを作製した。まずP. ananatis SC17株のゲノムをテンプレートに、nlpD遺伝子のプロモーター領域約180bpを含むDNA断片を取得した。使用したプライマーはP23 (agctgaaag c ttgcatgcac gcgtggcgat ctggcctgac tgc : 配列番号42)およびP24 (agctgagtcg accc cgtggt ggcaaccttt aaaaaactg : 配列番号43)であり、これらプライマーの5'末端には制限酵素SalI及びPaeIのサイトがそれぞれデザインされている。PCRサイクルは次の通りである。95 5分の後、94 20秒、59 20秒、72 20秒を27サイクル後、最後に72 5分。

エシェリヒア・コリcysM遺伝子の塩基配列を配列番号14に、同遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号15に示す。

#### 【0172】

得られたDNA断片をSalI及びPaeIで処理し、同じくSalI及びPaeIで処理したpMIV-Pnlp0-terに挿入し、pMIV-Pnlp4-terを取得した。このpMIV-Pnlp4-terプラスミドに挿入されたプロモーターPnlp4のPaeI-SalI断片の塩基配列は配列番号8に示したとおりである。同様にプラスミドpMIV-Pnlp4-terをテンプレートとして、P23及びP25 (agctgagtcg acnnngtgg t ggcaaccttt aaaaaactg ("n"- はa,t,g,cのいずれでも良いことを意味する) : 配列番号44)をプライマーに用いたPCR(95 5分の後、94 20秒、59 20秒、72 20秒を27サイクル後、最後に72 5分)によってnlpDプロモーターの5'末端側に含まれる-7~-9

領域をランダム化したDNA断片を作製し、SalI及びPaeIで処理し、同酵素で処理したpMIV-Pnlp0-terに挿入、pMIV-Pnlp1-terを取得した。このpMIV-Pnlp1プラスミドに挿入されたPnlp1プロモーターのPaeI-SalI断片の塩基配列は配列番号9に示したとおりである。-7~-9領域は、nlpDプロモーターの転写開始点から5'側に7塩基から9塩基目の位置を意味する。

#### 【0173】

以上のベクターに、E. coli MG1655株よりクローニングしたcysM遺伝子を組み込んだ。具体的には、E. coli MG1655株のゲノムをプレートに、P26 (agctgagtcg acgtgagtagc attagaacaa acaat : 配列番号45)とP27 (agctgatcta gaagtctccg atgctattaa tcc : 配列番号46)をプライマーに用いたPCR(95 5分の後、98 5秒、50 10秒、72 60秒を30サイクル後、最後に72 2分)を行って増幅した。こうして得られたDNA断片をSalI、XbaIで制限酵素処理を行い、同酵素で処理したpMIV-Pnlp4-terおよびpMIV-Pnlp1-terに挿入し、pMIV-Pnlp4-CysMとpMIV-Pnlp1-CysMを作製した。

#### 【0174】

上記のように構築されたpMIV-Pnlp4-CysMとpMIV-Pnlp1-CysMを使用して、先述のpMH10を用いた方法によりSC17株の染色体上にcysM遺伝子を含むカセットが挿入された株を、それぞれ取得した。こうして作製された株をSC17int-4MとSC17int-1Mと命名し、各株から染色体DNAを抽出した。この染色体DNA10µgをエレクトロポレーションによりEYP1976(s)株に導入し、クロラムフェニコール耐性株を取得した。こうして作製された株をそれぞれEYPSint-4M、EYPSint-1Mと命名し、先述のpMT-Int-Xis2を用いたマーカー除去の方法によりクロラムフェニコール耐性マーカーの除去を行い、クロラムフェニコール感受性となった株をEYPSint-4M(s)、EYPSint-1M(s)株と命名した。

#### 【0175】

##### (7) 変異型yeaSのL-システイン生産に及ぼす影響

上記のようにして作製されたL-システイン生産菌EYPSint1M(s)へ、上記実施例2、(2)で得た変異型yeaS遺伝子のうち、いくつかを選択して、これまでに構築したL-システイン生産菌に導入して、L-システイン生産培養を行った。評価対象株をLB寒天培地に塗り広げ、34℃で一晩前培養を行った後、10マイクロリッターサイズの植菌用ループ(NUNC社製)でプレート上約7平方センチメートル分の菌体を掻き取り、大試験管(内径23mm、長さ20cm)に2ml張りこんだL-システイン生産培地(組成:15g/L 硫酸アンモニウム、1.5g/L リン酸二水素カリウム、1g/L 硫酸マグネシウム七水和物、0.1mg/L チアミン塩酸塩、1.7mg/L 硫酸第一鉄七水和物、0.15mg/L モリブデン酸ナトリウム二水和物、0.7mg/L 塩化コバルト六水和物、1.6mg/L 塩化マンガン四水和物、0.3mg/L 硫酸亜鉛七水和物、0.25mg/L 硫酸銅五水和物、0.6g/L トリプトン、0.3g/L イーストエクストラクト、0.6g/L 塩化ナトリウム、20g/L 炭酸カルシウム、135mg/L L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、4g/L チオ硫酸ナトリウム、2mg/L ピリドキシン塩酸塩、20g/L グルコース、20mg/L カナマイシン、1mM IPTG)に培養開始時点での菌体量がほぼ同じになるように植菌した。

#### 【0176】

32℃にて振とう培養を行い、グルコースを消費しきった時点で培養を終了し(約15~19時間)、培地中に生産されたL-システインを定量した。表2のtest No.1, 2については3~5連の並行実験を、test No.3については単一の実験を、それぞれ独立して2回行った。その結果得られたL-システイン生産量の平均値と標準偏差を表2に示した。上述のスクリーニング系より得られた変異体は、L-システインの生産培養においても有効であった。この結果から、少なくとも28位、188位における変異は単独で効果があることがわかった。また、L-システイン生産能が向上した複数の株で、137位の変異(F137S)を含む3重変異が見出された。したがって、F137Sは、単独でL-システイン生産能向上に関与し得ると考えられた。また、種々の解析から、11位、33位、52位、59位、60位、65位、72位、77位、85位、及び86位における変異は、YeaSタンパク質の活性を低下させないサイレントな変異であると考えられる。

## 【表2】

表2 スクリーニングで得られた株の培養評価

test No.	yeaS内に導入された変異	L-システイン (g/L)
1	無し (WT)	0.03 ± 0.01
	T28N	0.27 ± 0.05
	W11G, T28N, Y86F	0.34 ± 0.06
	T28N, I52V, N77S	0.36 ± 0.07
2	無し (WT)	0.06 ± 0.07
	T28N, V65E, T72A	0.36 ± 0.09
	K33R, F59S, F137S	0.90 ± 0.23
	L188Q	0.30 ± 0.17
test No.	YeaS内に導入された変異	L-システイン (g/L)
3	無し (WT)	0.02 ± 0.03
	L60Q, F85I, F137S	0.79

10

20

## 【0177】

(8) yeaS遺伝子への代表変異導入と、変異導入株の液体培地におけるL-システイン耐性の評価

137位のフェニルアラニンがセリンに変換していたF137S変異を単独でyeaS遺伝子に導入し、変異型遺伝子をpSTV29(タカラバイオ社)へ乗せ換えることにより、この変異単独の効果を検討することにした。

## 【0178】

オーバーラップPCR法により、目的の変異とyeaS自身のプロモーター、ターミネーターを組み入れたベクターを作製した。まず変異を含んだプライマーP28 (cgataaactg tacgaa agac gacacataga ac: 配列番号47)を設計し、P29 (cgcggtatcca gtggatcattt agtgc: 配列番号48)とともにプライマーとして用いて、E. coli MG1655のゲノムを鋳型にPCRにてDNA「断片1」を増幅した。なおプログラムは94 5分の後、98 5秒、55 10秒、72 45秒を30サイクル、最後に72 2分であった。さらにP9とP30 (cgcggtatcct gtgggatit g aagcatcc: 配列番号49)を用いて、94 5分の後、98 5秒、55 10秒、72 60秒を30サイクル、最後に72 2分というプログラムでPCR反応を行い、DNA「断片2」を増幅した。得られた各断片は、アガロースゲル電気泳動後にバンドの切り出しを行い、精製した。DNA「断片1」と、DNA「断片2」を混合して10倍希釈したものをテンプレートに、P29とP30をプライマーに用いて94 5分の後、98 5秒、55 10秒、72 1分10秒を30サイクル、最後に72 2分というサイクルでPCRを行い、増幅したDNA断片を先ほどと同じくアガロースゲル電気泳動後に精製を行った。

30

40

## 【0179】

精製産物とベクターであるpSTV29をBamHIにて消化後、ベクターはCIAP(タカラバイオ社)で末端を脱リン酸化処理をしたのち、これらをライゲーションし、得られたプラスミドでJM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出し、137位のフェニルアラニン残基がセリンに置換されたYeaSをコードする変異型yeaS遺伝子を搭載するpSTV-YeaSF137Sを得た。また対照として、このpSTV-YeaSF137Sとおなじ構造で野生型yeaS遺伝子が搭載された、pSTV-YeaSWTも構築した。ただし、変異を導入する必要がないので、「断片1」「および」断片2」を作製するステップは省略し、E. coli MG1655のゲノムを鋳型としてP29とP30をプライマーとしたPCR法によってyeaS遺伝子を含む断片を取得した。

50

## 【 0 1 8 0 】

次に、変異型yeaS遺伝子導入株の液体培地におけるL-システイン耐性を確認した。pS TV-YeaSWTとpSTV-YeaSF137SでE. coli MG1655を形質転換し、MG1655/pSTV-YeaSWTとMG1655/pSTV-YeaSF137Sを作製した。各株を25 mg/Lのクロラムフェニコールと0.4%のグルコースを含んだM9培地 (Sambrook et al., Molecular cloning, 3rd edition, 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press) に植菌し、37 °Cで24h培養して種培養液を得た。この種培養液を新たに用意したM9培地に1/50量植菌した。37 °Cにて14時間培養した後、これらの菌の660nmの吸光度 (OD660) を計測した。すべての試験株をこれらのうち最もOD660値が低い試験株のOD660に合わせるように菌濃度を調整したのち、200 μMのL-システインを含むM9培地を張りこんだL字型試験管に1/100量を植菌した。このL字型試験管を自動OD測定培養装置B10-PHOTORECORDER TN-1506 (ADVANTEC社) にセットして、10分ごとにOD660を測定することで生育を観察した。そして、上記培地中での生育の立ち上がりの早さから判断して、各試験株のL-システイン耐性の違いを評価した。この培養ではL-システインへの耐性が高いほどOD660値の上昇開始が早く、耐性が低いほどOD660値の上昇開始が遅く、見かけ上生育が確認できない時間 (ラグ) が長くなっていた。その生育曲線を図2に示す。図2に示されたように、F137S変異を有するYeaS (YeaSF137S) は、野生型YeaS (YeaSWT) に比べ、OD660値の上昇開始が早くなり、L-システイン耐性が付与されていることが示唆された。

10

## 【 0 1 8 1 】

( 9 ) YeaSF137SのL-システイン生産に対する影響

20

L-システインを含むM9液体培養で、YeaSWT強化株よりも高いL-システイン耐性を示したYeaSF137S強化株のL-システイン生産能力を確認するために、より強力なPnlp8プロモーター支配化にYeaSF137Sをコードする遺伝子を連結したプラスミドを構築した。このプラスミドをL-システイン生産菌EYPSint-4Mに導入し、L-システイン生産における効果を確認した。まずpSTV-YeaSWT、pSTV-YeaSF137Sを鋳型に、P31 (aagtcgacgt gttcgtga a tacggggttc tg : 配列番号 5 0 )、P32 (aatctagatc aggattgcag cgtcgcc : 配列番号 5 1 ) をプライマーに用いて94 °C 5分の後、98 °C 5秒、60 °C 10秒、72 °C 60秒を30サイクル、最後に72 °C 2分というプログラムでPCR反応を行い、5'端と3'端にそれぞれSalIとXbaIを付加したyeaSWT遺伝子断片、及びyeaSF137S遺伝子断片を増幅した。先述のpMIV-Pnlp8とともにSalIとXbaIにて消化を行い、ライゲーションし、連結反応物でJM109を形質転換した。各々の形質転換体から各プラスミドを抽出し、L-システイン生産株であるEYPSint-4M(s)へ導入し、それぞれEYPSint-4M/pMIV-Pnlp8-YeaSWT、EYPSint-4M/pMIV-Pnlp8-YeaSF137Sを得た。また対照としてベクターのみを導入したEYPSint-4M/pMIV-5JSも作製し、上記( 3 )に記載の方法で試験管培養評価を行った。ただし、グルコース濃度を40 g/Lに変更し、IPTGは無添加という変更を加えた。

30

## 【 0 1 8 2 】

結果を表3に示す。YeaSWT強化ではわずかにL-システインが増えるのみであるが、YeaSF137S強化をすることでL-システイン生産を大きく増加させていることが分かる。つまりYeaSF137Sは、従来のYeaSWTに比べ、大きく宿主細胞のL-システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性を高めたものであると考えられる。

40

## 【 0 1 8 3 】

## 【表3】

表3 システイン生産株におけるYeaSWTおよびYeaSF137S強化の効果

導入プラスミド	L-システイン(g/L)
pMIV-5JS	0.31 ± 0.14
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>WT</sup>	0.41 ± 0.12
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>F137S</sup>	0.89 ± 0.06

50

## 【 0 1 8 4 】

( 1 0 ) YeaSF137SのE. coliにおけるL - システイン生産に対する影響

エシェリヒア・コリ ( E. coli ) におけるyeaS遺伝子発現増強の効果を調べた。

## 【 0 1 8 5 】

まず変異型cysE遺伝子を保持するプラスミドの構築を行った。具体的には、特開2005-137369に記載のpACYC-DESの構築方法のうち、セリンによるフィードバック阻害を受けないフォスフォグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型serA5遺伝子 ( 米国特許第6,180,373号に記載 ) を搭載するステップを省略することで、pACYC-DE1プラスミドを構築した。pACYC-DESは、上記変異型serA5、フィードバック阻害が解除された変異型SATをコードする遺伝子cysEX遺伝子およびL - システイン、アセチルセリン排出因子をコードするydeD遺伝子 ( US5972663A ) が搭載されているのに対し、今回構築したpACYC-DE1には、上記serA5を含まず、cysEXおよびydeDが搭載されている。各遺伝子の発現にはいずれもom

10

## 【 0 1 8 6 】

後述するように、YeaSはL - システインの排出に関与すると予想されたが、YeaSF137Sの効果を評価する際に、L - システインの排出因子であるydeD産物はバックグラウンドを高めると考えられる。したがって、YeaSF137Sの正味の効果を確認するために、pACYC-DE1からydeD遺伝子を欠損させた。pACYC-DE1をMnuIで処理し、セルフライゲーションすることで、ydeD遺伝子ORFの内側約330bpを欠損させたプラスミドを構築した。こうしてL - システイン排出因子として機能するYdeDを発現せず、CysEXのみを搭載するこのプラスミド

をpACYC-E1とした。このpACYC-E1プラスミドでE. coli MG1655を形質転換してMG1655/pACYC-E1株を作製した。このMG1655/pACYC-E1株を宿主として、ここに野生型のyeaS遺伝子を搭載するpMIV-Pnlp8-yeaSWTプラスミド、変異型yeaS遺伝子を搭載するpMIV-Pnlp8-yeaS137

7プラスミド、および対照としてpMIV-5JSをそれぞれエレクトロポレーション法によって導入した。得られた株のL - システイン生産を、実施例1に示した方法と同様の条件で試験管培養にて調べた ( 表4 ) 。なお、試験管培養は各株についてそれぞれ4連の平行実験で行い、その平均値を表に示した。yeaS遺伝子及び変異型yeaS遺伝子の発現量を上昇させることで、L - システイン生産能を持つE. coliにおいてもL - システインの生産量が向上することがわかった。すなわち、yeaS遺伝子産物は、L - システイン生産能を有するE. coliにおいても、宿主細胞のL - システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性

20

30

## 【 0 1 8 7 】

## 【表4】

表4 E. coli システイン生産株におけるYeaSWTおよびYeaSF137S強化の効果

導入プラスミド	L-システイン (g/L)
pMIV-5JS	0.44 ± 0.20
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>WT</sup>	0.92 ± 0.05
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>F137S</sup>	0.98 ± 0.03

40

## 【 0 1 8 8 】

( 1 1 ) YeaSF137Sの特性解析

これまでの結果から、YeaSF137SはL - システイン生産に有用であることが明らかとなった。この理由として、L - システインの排出能が高まったことが考えられるが、他のアミノ酸排出に対する影響を調べるため、先述のEYPSint-4M/pMIV-5JS、EYPSint-4M/pMIV-Pnlp8-YeaSWT、EYPSint-4M/pMIV-Pnlp8-YeaSF137S、計3株の試験管培養後の培地各3サンプルを0.1N塩酸にて20倍に希釈し、アミノ酸分析器 ( L - 8500 ( 日立製作所製 ) ) を用いて各種L - アミノ酸の定量を行った。その結果を図3に示す。YeaSF137SはYeaSWTに比べ、様々なL - アミノ酸を排出しており、特にL - ロイシンは21 mg/Lから656 mg/Lまで増

50

加していた。以上のことから、YeaSの137位のフェニルアラニン残基がセリンに置換されることで、L - システインの培地中の蓄積を促進するだけでなくL - ロイシン、L - スレオニン、L - セリン、グリシン、L - アラニン、L - シスチン、L - メチオニン、L - ヒスチジン、L - バリンなどの他のアミノ酸も蓄積を促進した。したがって、YeaSF137Sは、これらのアミノ酸の排出も促進すると推定される。したがって、YeaSF137Sはこれらのアミノ酸発酵生産に有利である。

#### 【 0 1 8 9 】

また、E. coli MG1655においても、同様にpMIV-5JS、pMIV-PnIp8-YeaSWT、pMIV-PnIp8-YeaSF137Sを導入した菌株を作製し、EYPSint-4M(s)の培養と同条件にて試験管培養を行い、その培地を先ほどと同様にアミノ酸分析を行った。その結果を図4に示す。E. coliにおいて、YeaSF137Sはグリシン、L - メチオニン、L - ロイシン、L - ヒスチジン、L - アラニン、L - シスチン、L - バリン、そしてL - グルタミン酸の蓄積を促進し、これらのアミノ酸発酵生産に有利である。

10

#### 【 0 1 9 0 】

( 1 2 ) YeaSの137位の他のアミノ酸残基による置換の効果検討

YeaSの137位のフェニルアラニン残基がセリン以外の、他のアミノ酸に置換された場合に、L - システイン生産に及ぼす影響を調べた。まずpMIV-PnIp8-YeaSを鋳型に、P33 (aaacgtgagg aaatacctgg : 配列番号 5 2 ) とP34 (cgataaactg tacgaannnc gacacataga ac ( "n"- はa,t,g,cのいずれでも良いことを意味する) : 配列番号 5 3 ) をプライマーに用い、PCRにてDNA '断片1' を増幅した。なおプログラムは94 5分の後、98 5秒、60 10秒、72 1分を30サイクル、最後に72 1分であった。また同様にDNA '断片2' を、P31とP32にて同サイクルにて増幅した。'断片1' と、'断片2' を混合して10倍希釈したものをテンプレートとして、P32とP33 にプライマーに用いて上記プログラムでオーバーラップPCRを行い、得られたDNAフラグメントを精製後、SallとXbaIにて処理し、同酵素で処理した上記pMIV-PnIp23ベクターに導入し、pMIV-PnIp23-YeaSF137\*を作製した。シーケンスを確認し、137位のフェニルアラニンがセリン以外のアミノ酸に置換される変異が導入された変異型yeaS遺伝子を搭載するプラスミドを、E. coli MG1655株にエレクトロポレーション法にて導入し、これを先述と同様に作製した1mMのL - システインを含むM9セレクションプレートにまき、37 にて培養し、L - システイン耐性を調べた。

20

#### 【 0 1 9 1 】

その結果、フェニルアラニン (WT) を基準としてL - システイン耐性を評価したところ、セリン (S) の他にグルタミン (Q)、アラニン (A)、ヒスチジン (H)、システイン (C)、グリシン (G) の置換体でL - システインへの耐性度が上がっていた。特にグルタミン置換体 (F137Q) のL - システイン耐性は非常に強かった。

30

#### 【 0 1 9 2 】

そこで、pMIV-PnIp23-YeaSF137QをSallとXbaIにて処理し、同酵素で処理したpMIV-PnIp8に挿入し、pnIp8支配下にyeaSF137Qが連結されたpMIV-PnIp8-YeaSF137Qを作製した。これをP. ananatisのL - システイン生産培養を行った。対象として、pMIV-PnIp8-YeaSWT、又はpMIV-PnIp8-YeaSF137Sを導入したEYPSint-1M(s)を用いた。その結果を表5に示す。137位のフェニルアラニンをグルタミンに置換した変異型YeaS (YeaSF137Q) は、宿主細胞のL - システイン生産能を非改変株と比べて向上させる活性が、野生型YeaSよりも向上していることが明らかとなった。

40

#### 【 0 1 9 3 】

## 【表5】

表5 システイン生産株における YeaSWT、YeaSF137S  
および YeaSF137Q 強化の効果

導入プラスミド	システイン生産量 (g/L)
pMIV-5JS	0.42 ± 0.12
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>F137S</sup>	1.32 ± 0.08
pMIV-Pnlp8-YeaS <sup>F137Q</sup>	1.09 ± 0.34

## 【0194】

10

上記のように、変異型yeaSの発現量を上昇させることによるL-システイン耐性獲得とL-システイン生産量の増加に関連性があることがわかった。これは、L-システイン耐性の向上は、L-システインの細胞外への排出が促進されることによるものであると考えられる。そうすると、L-システインを含むM9セクションプレートにてL-システイン耐性向上に効果のあった137位のフェニルアラニンをアラニン、ヒスチジン、システイン、またはグリシンに置換した各変異型yeaSについても同様にL-システイン生産を高める効果があると考えられる。これを検証するためには、上記のpMIV-Pnlp8-YeaSF137Q構築にて示したものと同様の手法にて、pMIV-Pnlp8-YeaSF137A、pMIV-Pnlp8-YeaSF137H、pMIV-Pnlp8-YeaSF137C、およびpMIV-Pnlp8-YeaSF137Gを作製し、これらをEYPSint-1M(s)へ導入してL-システイン生産培養することで、確認することができる。

20

## 【0195】

〔配列表の説明〕

配列番号1：野生型yeaS遺伝子の塩基配列

配列番号2：野生型YeaSのアミノ酸配列

配列番号3：野生型cysE遺伝子の塩基配列

配列番号4：野生型cysEがコードするセリンアセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号5：Pnlp0の塩基配列

配列番号6：Pnlp8の塩基配列

配列番号7：Pnlp23の塩基配列

配列番号8：Pnlp4の塩基配列

配列番号9：Pnlp1の塩基配列

配列番号10：パントエア・アナナティス野生型serA遺伝子の塩基配列

配列番号11：パントエア・アナナティス野生型serA遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号12：cysPTWA遺伝子クラスターの塩基配列

配列番号13：cysP遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号14：cysT遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号15：cysW遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号16：cysA遺伝子の塩基配列

配列番号17：cysA遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号18：cysM遺伝子の塩基配列

配列番号19：cysM遺伝子がコードするアミノ酸配列

配列番号20～53：プライマーP1～P34

30

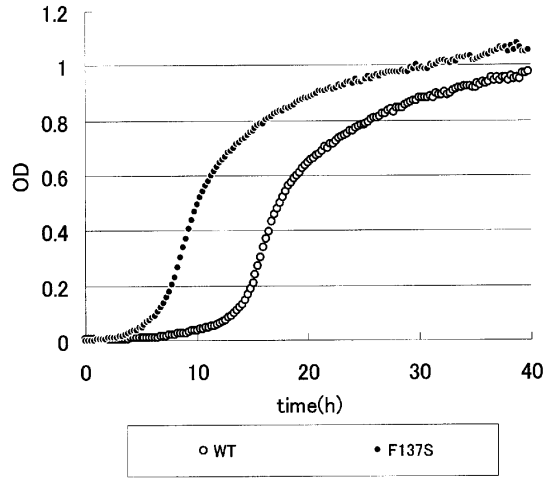
40



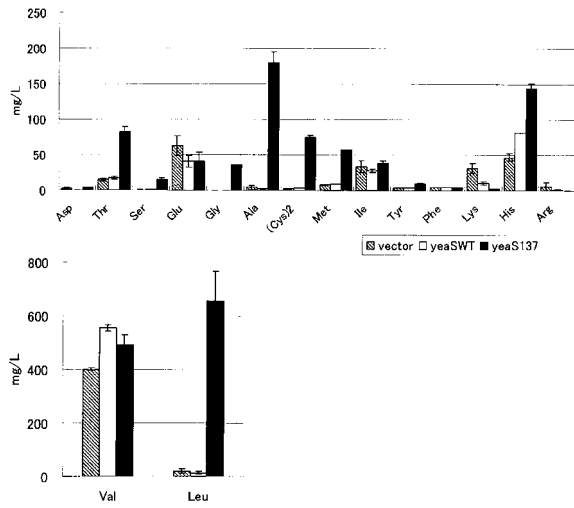
【 1 】

Sequence of native promoter Pnlp  
 -35(Pnlp2) -10(Pnlp2)  
 aaaacgtgaggaatacctggattttctcgggtattttgcccaggtcagcgtatcgtg  
 -35(Pnlp1) -10(Pnlp1) TRANS start  
 aagatctttccagtggtcagtaggtgccttgcaaggtattatgtcactggttattaa  
 M S  
 ccaattttctcggggataaatgagc-

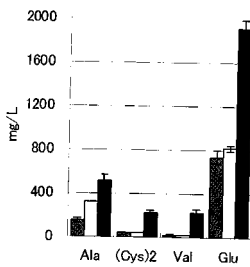
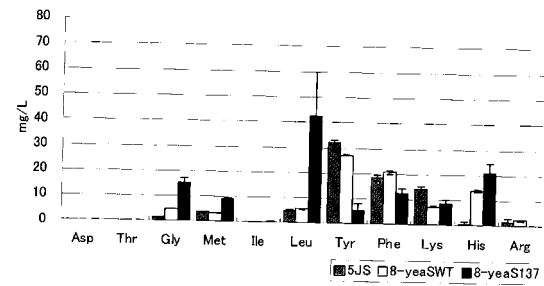
【 2 】



【 3 】



【 4 】



【配列表】

0005521347000001.app

フロントページの続き

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 FEBS lett., 579[21](2005) p.4629-4634.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq