

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4665537号  
(P4665537)

(45) 発行日 平成23年4月6日(2011.4.6)

(24) 登録日 平成23年1月21日(2011.1.21)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21
<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 P 13/06 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/06 C
<b>C 1 2 P 13/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 13/08 A

請求項の数 11 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-21722 (P2005-21722)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成17年1月28日(2005.1.28)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2005-237379 (P2005-237379A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成17年9月8日(2005.9.8)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成20年1月22日(2008.1.22)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	特願2004-23347 (P2004-23347)	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成16年1月30日(2004.1.30)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
微生物の受託番号	VKPM B-5318	(72) 発明者	植田 拓嗣
微生物の受託番号	VKPM B-7925		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
微生物の受託番号	FERM BP-5252	(72) 発明者	中井 勇太
微生物の受託番号	FERM BP-8041		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、配列番号2のアミノ酸番号17~315のアミノ酸配列または当該アミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有し、かつL-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするybjE遺伝子の発現が増強されるように改変された、腸内細菌科微生物、コリネ型細菌およびメタノール資化性細菌からなる群より選択される微生物。

【請求項2】

ybjE遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変することによりybjE遺伝子の発現が増強された、請求項1に記載の微生物。

【請求項3】

前記ybjE遺伝子が、下記(c)又は(d)に記載のDNAである、請求項1または2に記載の微生物：

(c) 配列番号1の塩基番号49~948の塩基配列を含むDNA、

(d) 配列番号1の塩基番号49~948の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、L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】

ybjE遺伝子の発現が増強されるように改変されることにより、L-アミノ酸の排出活性が向上したことを特徴とする、請求項1~3のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項5】

ybjE遺伝子の発現が増強されるように改変されることにより、L-アミノ酸耐性またはL-アミノ酸アナログ耐性が向上したことを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項6】

前記L-アミノ酸がL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン、L-グルタミン酸からなる群より選択される1種又は2種以上のL-アミノ酸である、請求項1～5のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項7】

前記微生物がエシェリヒア属細菌である請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物。

10

【請求項8】

前記微生物がメチロフィラス属又はメチロパチルス属に属する細菌である請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項に記載の微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項10】

メタノール資化性細菌である請求項1～7のいずれか一項に記載の微生物又は請求項8に記載の微生物を、メタノールを主要炭素源とする液体培地中で培養し、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法。

20

【請求項11】

前記L-アミノ酸がL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン、L-グルタミン酸からなる群より選択される1種又は2種以上の塩基性アミノ酸である、請求項9又は10に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、微生物を用いたL-アミノ酸の製造法、特にL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン、L-グルタミン酸等のL-アミノ酸の製造法に関する。L-リジン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-プロリンは動物飼料用の添加物、健康食品の成分、アミノ酸輸液等として、L-アルギニン、L-オルニチンは肝機能促進薬、アミノ酸輸液及び総合アミノ酸製剤等の成分等として、L-ヒスチジンは肝機能促進薬、ヒスタミンの前駆体、L-フェニルアラニンは、甘味料の前駆体として、産業上有用なL-アミノ酸である。

【背景技術】

【0002】

40

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。例えば、L-リジンの製造法としては、例えば、特許文献1～4に記載された方法を挙げることができる。一方、L-アルギニンの製造法としては、例えば、特許文献5、6または16に記載された方法を挙げることができる。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強するように改変された微生物などが用いられている。

【0003】

また、人工変異による育種又は組換えDNA技術により改変されたメチロフィラス属およびメチロパチラス属微生物を用い、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールが

50

らL-アミノ酸を製造する方法についても報告されている(例えば、特許文献7又は8参照)。

【0004】

L-アミノ酸の生産能を向上させる方法として、L-アミノ酸の取り込み系、又は排出系を改変する方法が知られている。例えば取り込み系に関しては、L-アミノ酸の細胞内への取り込み系を欠失又は低下させることにより、L-アミノ酸生産能を高める方法がある。例えば、gluABCDオペロン又はその一部を欠失させ、L-グルタミン酸の取り込みを欠失又は低下させる方法(例えば、特許文献9参照)等が知られている。

【0005】

また、排出系を改変する方法としては、L-アミノ酸生合成系の中間体又は基質の排出系を欠損または弱化させる方法、及びL-アミノ酸の排出系を強化する方法が知られている。前者の方法として、目的アミノ酸がL-グルタミン酸の場合に、 $\alpha$ -ケトグルタレートパーミアゼ遺伝子を変異又は破壊することにより、目的物質の中間体である $\alpha$ -ケトグルタル酸の排出を弱化する方法(例えば、特許文献10参照)が知られている。

【0006】

後者のL-アミノ酸の排出系を強化する方法としては、例えばL-リジン、L-アルギニン排出遺伝子(LysE)(例えば、非特許文献1参照)の発現を強化したコリネバクテリウム属微生物の菌株を用いたL-リジンの製造法(例えば、特許文献11参照)又はL-アルギニンの製造法(例えば、特許文献12参照)が知られている。また、L-アミノ酸の排出に關与することが示唆されている遺伝子である、rhtA, B, C遺伝子(例えば、特許文献13参照)又はyfiK, yahN遺伝子等(例えば、特許文献14参照)の発現を強化したエシェリヒア属細菌を用いたL-アミノ酸の製造法も報告されている。

【0007】

これまでに塩基性L-アミノ酸排出遺伝子としては、上述したlysE遺伝子が知られていた。しかし、メチロフィラス属細菌等のメタノール資化性菌においてlysE遺伝子を増幅し、該lysE遺伝子増幅株をL-リジン、L-アルギニンの製造に使用する場合、コリネ型細菌由来の野生型lysE遺伝子はこれらの細菌にとって致死的であるため、宿主微生物が生育できるような変異lysE遺伝子を導入する必要があった(例えば、特許文献15参照)。このように、lysE遺伝子は異種の微生物におけるL-リジン又はL-アルギニンの排出に關して万能に機能するものではなかった。従って、広く異種微生物において、適切なL-リジン又はL-アルギニン排出活性を発揮し、L-リジン又はL-アルギニンの製造に利用することのできるアミノ酸排出遺伝子の取得が求められていた。

【0008】

ybjE遺伝子は大腸菌のゲノム上に存在する遺伝子であり(例えば、非特許文献2参照)、推定上の表層タンパク質(putative surface protein)と定義されているが、該遺伝子をクローニングしたり、発現させて解析した報告はなく、実際の機能は不明であった。

【特許文献1】欧州特許出願公開0857784号明細書

【特許文献2】特開平11-192088号公報

【特許文献3】国際公開第00/53726号パンフレット

【特許文献4】国際公開第W096/17930号パンフレット

【特許文献5】欧州特許出願公開0999267号明細書

【特許文献6】欧州特許出願公開1170358号明細書

【特許文献7】国際公開第00/61723号パンフレット

【特許文献8】特開2001-120269号公報

【特許文献9】欧州特許出願公開1038970号明細書

【特許文献10】国際公開第01/005959号パンフレット

【特許文献11】国際公開第97/23597号パンフレット

【特許文献12】米国特許出願公開2003-0113899号明細書

10

20

30

40

50

【特許文献13】特開2000-189177号公報

【特許文献14】欧州特許出願公開1016710号明細書

【特許文献15】欧州特許出願公開1266966号明細書

【特許文献16】特開2002-017342号公報

【非特許文献1】ジャーナル・オヴ・モレキュラー・マイクロバイオロジー・バイオテクノロジー (J Mol Microbiol Biotechnol) 1999 Nov;1(2):327-36

【非特許文献2】サイエンス (Science) 277(5331):1453-74, 1997年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、L-アミノ酸を効率よく生産することのできる菌株を提供すること、及び該菌株を用いてL-アミノ酸を効率よく生産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】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、エシェリヒア・コリから高濃度L-リジン耐性を指標として、新規L-アミノ酸排出遺伝子ybjEを取得した。さらに、ybjE遺伝子の発現を増強させた微生物を用いることにより、L-アミノ酸、特にL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジンの塩基性アミノ酸や、L-イソロイシンを代表とする脂肪族アミノ酸、L-スレオニンを代表とするヒロドキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸、L-プロリンを代表とする環式アミノ酸、L-フェニルアラニン

【0011】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) L-アミノ酸生産能を有し、かつ、ybjE遺伝子の発現が増強されるように改変された微生物。

(2) ybjE遺伝子のコピー数を高めること、又は該遺伝子の発現調節配列を改変することによりybjE遺伝子の発現が増強された、(1)の微生物。

(3) ybjE遺伝子が、配列番号2、9、10から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である、請求項1に記載の微生物。

(4) 前記ybjE遺伝子が、下記(a)又は(b)に記載のDNAである、(1)の微生物：

(a) 配列番号1に示す塩基配列を含むDNA、

(b) 配列番号1に示す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し、かつ、L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(5) 前記ybjE遺伝子が、下記(c)又は(d)に記載のDNAである、(1)の微生物：

(c) 配列番号1の塩基番号49～948の塩基配列を含むDNA、

(d) 配列番号1の塩基番号49～948の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し、かつ、L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(6) ybjE遺伝子の発現が増強されるように改変されることにより、L-アミノ酸の排出活性が向上したことを特徴とする、(1)～(5)のいずれかの微生物。

(7) ybjE遺伝子の発現が増強されるように改変されることにより、L-アミノ酸耐性またはL-アミノ酸アナログ耐性が向上したことを特徴とする、(1)～(6)のいずれかの微生物。

(8) 前記L-アミノ酸がL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジ

10

20

30

40

50

ン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン、L-グルタミン酸からなる群より選択される1種又は2種以上のL-アミノ酸である、(1)~(7)の微生物。

(9)前記微生物が腸内細菌科に属する微生物である、(1)~(8)のいずれかの微生物。

(10)前記微生物がエシェリヒア属細菌である(9)の微生物。

(11)前記微生物がコリネ型細菌である、(1)~(8)のいずれかの微生物。

(12)前記微生物がメタノール資化性細菌である(1)~(8)のいずれかの微生物。

(13)前記微生物がメチロフィラス属又はメチロパチルス属に属する細菌である(12)の微生物。

(14)(1)~(13)のいずれかの微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

(15)(12)又は(13)の微生物を、メタノールを主要炭素源とする液体培地中で培養し、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法。

(16)前記L-アミノ酸がL-リジン、L-アルギニン、L-オルニチン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン、L-グルタミン酸からなる群より選択される1種又は2種以上の塩基性アミノ酸である、(14)又は(15)の製造方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明の微生物を用いることにより、効率よく、L-リジン、L-オルニチン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-シトルリンなどの塩基性アミノ酸、L-イソロイシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-グリシンなどの脂肪族アミノ酸、L-スレオニン、L-セリンなどのヒドロキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸、L-プロリンなどの環式アミノ酸、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トリプトファンなどの芳香族アミノ酸、L-システイン、L-シスチン、L-メチオニンなどの含硫アミノ酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギンなどの酸性アミノ酸を発酵生産することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

<1>本発明の微生物

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有する微生物であって、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変された微生物である。ここで、L-アミノ酸生産能とは、本発明の微生物を培地中で培養したときに、培地中または菌体内にL-アミノ酸を生成し、蓄積する能力をいう。なお、本発明の微生物は複数のL-アミノ酸の生産能を有するものであってもよい。L-アミノ酸の生産能を有する微生物としては、本来的にL-アミノ酸の生産能を有するものであってもよいが、下記のような微生物を、変異法や組換えDNA技術を利用して、L-アミノ酸の生産能を有するように改変したものであってもよい。なお、本発明の微生物は、後述のybjE遺伝子の発現が増強されることによってL-アミノ酸生産能が付与されたものであってもよい。

【0015】

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-グリシンの脂肪族アミノ酸、L-スレオニン、L-セリンの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

10

20

30

40

50

の酸性アミノ酸とそのアミド体が挙げられる。

本発明の微生物は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。

【0016】

< 1 - 1 > L - アミノ酸生産能の付与

以下に、L - アミノ酸生産能を付与する方法及び本発明で使用することのできるL - アミノ酸生産能が付与された微生物を例示する。ただし、L - アミノ酸生産能を有する限り、これらに制限されない。本発明の微生物の親株としては、エシェリヒア属細菌、パントエア属細菌を代表とする腸内細菌科に属する微生物や、コリネ型細菌等を用いることができる。また、メタノールからL - アミノ酸を生産できる、メチロフィラス属細菌、メチロバチルス属細菌などのメタノール資化性細菌を用いてもよい。その他の腸内細菌科に属する微生物としては、エンテロバクター (Enterobacter) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラチア (Serratia) 属、エルビニア (Erwinia) 属、サルモネラ (Salmonella) 属、モルガネラ (Morganella) 属などの - プロテオバクテリアに属する腸内細菌が挙げられ、またその他の微生物としては、アリサイクロバチルス (Alicyclobacillus) 属細菌、バチルス (Bacillus) 属細菌、サッカロマイセス属やキャンディダ属等に属する酵母などが挙げられる。なお、上記親株は、本来内在的にybjE遺伝子を有しているものであってもよいし、本来はybjE遺伝子を有しないが、ybjE遺伝子を導入することにより、L-アミノ酸排出活性が向上するものであってもよい。

10

【0017】

エシェリヒア属細菌としては、ナイトハルトらの著書 (Neidhardt, F.C. et al., Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, table 1) に挙げられるもの、例えばエシェリヒア・コリ等が利用できる。エシェリヒア・コリの野生株としては、例えばK12株又はその誘導体、エシェリヒア・コリ MG1655株 (ATCC No.47076)、及びW3110株 (ATCC No.27325) 等が挙げられる。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 (ATCC) より分譲を受けることができる (住所 ATCC, Address: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1, United States of America)。

20

【0018】

また、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・スチュワールティ (Pantoea stewartii) 等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。パントエア・アナナティスを遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、パントエア・アナナティス AJ 13355株 (FERM BP - 6614)、AJ 13356株 (FERM BP - 6615)、AJ 13601株 (FERM BP - 7207) 及びそれらの誘導体を用いることができる。これらの株は、分離された当時はエンテロバクター・アグロメランスと同定され、エンテロバクター・アグロメランスとして寄託されたが、上記のとおり、16S rRNAの塩基配列解析などにより、パントエア・アナナティスに再分類されている。

30

40

【0019】

メチロフィラス属細菌として具体的には、メチロフィラス・メチロトロファスが挙げられ、代表的な株としてはAS1株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株はナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリナー・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria, 住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

50

## 【 0 0 2 0 】

メチロバチラス属細菌として具体的には、メチロバチラス・グリコゲネス (Methylobacillus glycogenes)、メチロバチラス・フラゲラタム (Methylobacillus flagellatum) 等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株 (NCIMB 11375)、ATCC 21276株、ATCC 21371株、ATR80株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載)、A513株 (Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻、p67-72に記載) 等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネス NCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。また、メチロバチラス・フラゲラタムとしては、KT株 (Arch. Microbiol., (1988)、149巻、p441-446に記載) 等が挙げられる。

10

## 【 0 0 2 1 】

コリネ型細菌としては、バーヂーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌に分類される微生物が利用できる。なお、コリネ型細菌は、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが現在はコリネバクテリウム属細菌として統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991))、及びコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌及びミクロバテリウム属細菌を含む。

20

## 【 0 0 2 2 】

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

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)

30

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレバクテリウム・ディバリカタム

ブレバクテリウム・フラバム

ブレバクテリウム・インマリオフィラム

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム

ブレバクテリウム・ロゼウム

ブレバクテリウム・サッカロリティカム

ブレバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス

ブレバクテリウム・アルバム

40

ブレバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

## 【 0 0 2 3 】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990

50

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965  
 コリネバクテリウム・エッフシエンス AJ12340(FERM BP-1539)  
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868  
 プレバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020  
 プレバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-2205)  
 プレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 ( コリネバクテリウム・グルタ  
 ミカムATCC13869 )  
 プレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825  
 プレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066  
 プレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240  
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871、ATCC6872  
 プレバクテリウム・アルバム ATCC15111  
 プレバクテリウム・セリヌム ATCC15112  
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

10

## 【 0 0 2 4 】

これらを手にするには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる (住所 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America)。すなわち、菌株毎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できる。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 (<http://www.atcc.org/>参照)。また、AJ12340株は、1987年10月27日付けで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FERM BP-1539の受託番号でブダベスト条約に基づいて寄託されている。また、AJ12418株は、1989年1月5日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2205の受託番号でブダベスト条約に基づいて寄託されている。

20

## 【 0 0 2 5 】

以下、上述したような親株にL - アミノ酸生産能を付与する方法について述べる。

## 【 0 0 2 6 】

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与と、生合成系酵素の増強が組み合わせられてもよい。

30

## 【 0 0 2 7 】

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。

40

## 【 0 0 2 8 】

L - リジンアナログとしては、例えば、オキサリジン、リジンヒドロキサメート、S - (2 - アミノエチル) - L - シス테인 (AEC)、 - メチルリジン、 - クロロカプロラクタム、ノルロイシン等を使用することができる。また、L - アルギニンアナログ

50



としては、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D - アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート等を使用することができる。

【 0 0 2 9 】

L - リジン生産能を有するL - リジンアナログ耐性株又は代謝制御変異株として具体的には、エシェリヒア・コリアJ11442株 (FERM BP-1543、NRRL B-12185 ; 特開昭56-18596号公報及び米国特許第4346170号参照)、エシェリヒア・コリア VL611株 (特開2000 - 189180号公報) 等が挙げられる。また、エシェリヒア・コリアのL - リジン生産菌として、WC196株 (WO96/17930号国際公開パンフレット参照) を用いることも出来る。WC196株は、エシェリヒア・コリアK-12由来のW3110株にA E C ( S - ( 2 - アミノエチル ) - システイン) 耐性を付与することによって育種されたものである。同株は、エシェリヒア・コリアAJ13069株と命名され、平成6年12月6日付で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、平成7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。

10

【 0 0 3 0 】

L - リジン生産能を有するコリネ型細菌としては、S - ( 2 - アミノエチル ) - システイン ( 以下、「AEC」と略記する ) 耐性変異株 ( プレバクテリウム・ラクトファーマータムAJ11082 ( NRRL B-11470 ) 株など : 特公昭56-1914号公報、特公昭56-1915号公報、特公昭57-14157号公報、特公昭57-14158号公報、特公昭57-30474号公報、特公昭58-10075号公報、特公昭59-4993号公報、特公昭61-35840号公報、特公昭62-24074号公報、特公昭62-36673号公報、特公平5-11958号公報、特公平7-112437号公報、特公平7-112438号公報参照 ) ; その生育にL - ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株 ( 特公昭48-28078号公報、特公昭56-6499号公報参照 ) ; AECに耐性を示し、更にL - ロイシン、L - ホモセリン、L - プロリン、L - セリン、L - アルギニン、L - アラニン、L - バリン等のアミノ酸を要求する変異株 ( 米国特許第3708395号及び第3825472号明細書参照 ) ; D L - - アミノ - - カプロラクタム、 - アミノ - ラウリルラクタム、アスパラギン酸 - アナログ、スルファ剤、キノイド、N - ラウロイルロイシンに耐性を示すL - リジン生産変異株 ; オキザロ酢酸脱炭酸酵素 ( デカルボキシラーゼ ) または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL - リジン生産変異株 ( 特開昭50-53588号公報、特開昭50-31093号公報、特開昭52-102498号公報、特開昭53-9394号公報、特開昭53-86089号公報、特開昭55-9783号公報、特開昭55-9759号公報、特開昭56-32995号公報、特開昭56-39778号公報、特公昭53-43591号公報、特公昭53-1833号公報 ) ; イノシトールまたは酢酸を要求するL - リジン生産変異株 ( 特開昭55-9784号公報、特開昭56-8692号公報 ) ; フルオロピルビン酸または34 以上の温度に対して感受性を示すL - リジン生産変異株 ( 特開昭55-9783号公報、特開昭53-86090号公報 ) ; エチレングリコールに耐性を示し、L - リジンを生産するプレバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株 ( 米国特許第4411997号明細書 ) などが挙げられる。

20

30

【 0 0 3 1 】

L - アミノ酸生産能の付与は、L - アミノ酸生合成系酵素遺伝子の発現を増強することによっても行うことができる。

40

例えば、以下のようにして、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ遺伝子の発現を増強することによってL - リジン生産能を付与することができる。すなわち、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、L - リジンの製造に用いる宿主微生物で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これで宿主を形質転換する。形質転換により宿主細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

50

## 【 0 0 3 2 】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子としては、宿主微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる遺伝子であれば、特に限定されないが、例えば、エシェリヒア・コリ、メチロフィラス・メチロトロファス、コリネバクテリウム・グルタミカムなどの遺伝子が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA、Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297(1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC、Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052 (1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、エシェリヒア・コリ K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、エシェリヒア・コリ由来のdapA及びlysCを例として説明するが、DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子は、これらに限定されるものではない。

10

## 【 0 0 3 3 】

エシェリヒア・コリ由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、エシェリヒア・コリ由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、dapA及びlysCを用いる場合、これらの遺伝子は、コードするDDPS及びAKがL-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型遺伝子であることが好ましい。以下、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA、又はdapA\*」と呼ぶことがある。また、L-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するエシェリヒア・コリ由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。なお、コリネバクテリウム属微生物由来のDDPSはもともとL-リジンによるフィードバック阻害を受けないこともあり、本発明に用いるDDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない

20

## 【 0 0 3 4 】

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる（これらの変異については米国特許第5661012号及び第6040160号明細書参照）。変異型DNAはPCRなどによる部位特異的変異法により取得することができる。

30

## 【 0 0 3 5 】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228（宝バイオ社）、pMW119（ニッポンジーオン社）、pUC19等が挙げられる。

## 【 0 0 3 6 】

また、形質転換に用いる宿主微生物で機能するベクターとは、それぞれの微生物内で自律複製可能なベクターである。エシェリヒア・コリの場合には、例えばpSTV29（宝バイオ社製）、RSF1010（Gene vol.75 (2), p271-288, 1989）、pUC19、pBR322、pMW119等が挙げられる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。メチロフィラス属微生物で機能するベクターとは、例えばメチロフィラス属微生物で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導體、例えばpAYC32（Chistorerdo v, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167）、あるいはpMFY42（gene, 44, 53(1990)）、pRP301、pTB70（Nature, 287, 396, (1980)）等が挙げられる。またコリネ型細菌で機能するベクターとは、PAM330（特開昭58-067699号公報）、pHM1519（特開昭58-77895号公報）、pSFK6（特開2000-262288号公報）が挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア用ベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することが出来る。

40

50

## 【 0 0 3 7 】

dapA及びlysCを上記ベクターに連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。上記のようにして調製した組換えDNAを微生物に導入するには、十分な形質転換効率を得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997))が挙げられる。

10

## 【 0 0 3 8 】

なお、変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている(米国特許第6040160号明細書)。同プラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109株(米国特許第6040160号明細書)は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター)に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

20

## 【 0 0 3 9 】

DDPS遺伝子及びAK遺伝子の発現増強は、dapA及びlysCを微生物の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。微生物の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び/又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及lysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

30

## 【 0 0 4 0 】

DDPS遺伝子及びAK遺伝子の発現増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及lysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される(特開平1-215280号公報参照)。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及lysCの発現が強化されることによってもDDPS活性及びAK活性が増幅される。なお、発現調節配列の置換と、dapA及lysCのコピー数を高めることとを組み合わせてもよい。

40

## 【 0 0 4 1 】

L-リジン生産能の付与は、DDPS、AK以外の、L-リジン生合成に關与する酵素をコードする遺伝子の発現を増強することにより行ってもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(以上、国際公開96/40934号パンフレット)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(特開昭60-87788号公報)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(特公平6-102028号公報)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子(特開2003-135066号公報)、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素(国際公開00/61723号パンフレット)等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ(特開20

50

00-157276号公報)等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。なお、括弧内に、各酵素の遺伝子発現が増強されたL-リジン生産株に関する文献を示した。これらの酵素の遺伝子発現増強は、DDPS、AK遺伝子発現増強と組み合わせてもよい。

【0042】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。このような酵素としては、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があり、該酵素の活性が低下又は欠損した株は国際公開95/23864号、国際公開96/17930号パンフレットなどに記載されている。

【0043】

これらの酵素活性を低下あるいは欠損させる方法としては、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)、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、遺伝子の一部分を欠失させることによって達成出来る(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、トランスポゾン、IS因子を該遺伝子に導入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。

【0044】

例えば、上記の酵素の活性を低下または欠損させるような変異を遺伝子組換えにより導入する為には、以下のような方法が用いられる。目的遺伝子の部分配列を改変し、正常に機能する酵素を産生しないようにした変異型遺伝子を作製し、該遺伝子を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、変異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、染色体上の目的遺伝子を変異型に置換することが出来る。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による部位特異的変異導入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(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645、米国特許第6303383号、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部位特異的変異導入は、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。

【0045】

上記のようなL-リジン生合成に関与する酵素の遺伝子発現を増強する手法、酵素活性を低下させる方法は、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-オルニチンやその他L-アミノ酸生合成酵素をコードする遺伝子についても同様に適用することができる。

【0046】

L-アルギニン生産能を有するエシェリヒア・コリとして具体的には、 $\alpha$ -メチルメチオニン、 $p$ -フルオロフェニルアラニン、D-アルギニン、アルギニンヒドロキサム酸、S-(2-アミノエチル)-システイン、 $\beta$ -メチルセリン、 $\beta$ -2-チエニルアラニン、又はスルファグアニジンに耐性を有する変異株(特開昭56-106598号公報参照)等が挙げられる。また、L-アルギニンによるフィードバック阻害に耐性な変異を有し、かつ、高い活性を有するN-アセチルグルタミン酸シンターゼ及び同酵素を保持するL-アルギニン生産菌である、エシェリヒア・コリ237株(ロシア特許出願第2000117677号)も、好適なL-アルギニン生産株である。同株は、2000年4月10日にロシアン・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)にVKPM B-7925の番号で寄託され、2001年5月18日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管された。237株の誘導体で、酢酸資化能を向上させたL-アルギニン生産菌である、

10

20

30

40

50

エシェリヒア・コリ382株(特開2002-017342号公報)を用いることもできる。エシェリヒア・コリ382株は、2000年4月10日にRussian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) にVKPM B-7926の番号で寄託されている。

【0047】

L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌としては、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54-44096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57-18989号公報); アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌(特開昭62-24075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2-186995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)や、アルギニン生合成系のリプレッサータンパク質であるArgRを欠損した株(特開2002-51790号公報)が挙げられる。

10

【0048】

またL-アルギニン生産能を有する微生物として、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量を向上させた微生物を用いることが出来る。例えば、L-アルギニン生合成系酵素としては、N-アセチルグルタミン酸シンターゼ(argA)、N-アセチルグルタミン酸レダクターゼ(argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ(argJ)、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ(argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ(argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ(argE) 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ンターゼ(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ンターゼ(carAB)から選ばれる1種又は2種以上が挙げられる。これらの酵素名の後のカッコ内は、各酵素をコードする遺伝子名である。これらの酵素遺伝子の発現が増強された株としては、例えば特開2000-287693号公報、特開2000-197490号公報、特公平07-028749号公報などに記載された株を挙げる事ができる。

20

【0049】

L-アルギニン生産能は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(欧州特許出願公開第1057893号明細書)、カルバモイルリン酸シンターゼ(欧州特許出願公開第1026247号明細書)の遺伝子発現を増強することによっても付与することができる。

30

上述のL-アルギニン生合成に関与する酵素は、L-アルギニンにより抑制されていることが明らかになっており、L-アルギニン生合成系のアルギニンリプレッサーを欠損させることや、N-アセチルグルタミン酸シンターゼにフィードバック阻害に耐性な変異を導入することによっても効率よくL-アルギニン生産能を向上することが出来る(欧州公開公報1154020号明細書、欧州公開公報1170361号明細書等)。

【0050】

さらに、L-ヒスチジンアナログ又はL-トリプトファンアナログに耐性を有するバチルス属細菌(特開昭52-114092号公報参照)、L-メチオニン、L-ヒスチジン、L-スレオニン、L-プロリン、L-イソロイシン、L-リジン、アデニン、グアニンまたはウラシル(またはウラシル前駆体)の少なくとも一つに要求性を有するバチルス属細菌(特開昭52-99289号公報参照)、アルギニンヒドロキサメートに耐性を有するバチルス属細菌(特公昭51-6754号公報参照)、コハク酸要求性又は核酸塩基アナログに耐性を有するセラチア・マルセッセンス(特開昭58-9692号公報)、アルギニン分解能を欠損し、アルギニンのアンタゴニスト及びカナバニンに耐性を有し、リジンを要求するセラチア・マルセッセンス(特開昭52-8729号公報参照)、アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシル耐性を有するサッカロマイセス・セレビジエ(特開昭53-143288号公報参照)、及び、カナバニン耐性のキャンディダ・トロピカリス(特開昭53-3586号公報参照)等もL-アルギニン生産能を有する株として用いることができる。

40

50

## 【 0 0 5 1 】

L - ヒスチジン生産能を有する微生物としては、L - ヒスチジン生合成に關与する遺情情報を担うDNAを組み込んだベクターを導入したエシェリヒア属細菌FERM-P5038,5048株 (特開昭56-005099号公報)や、アミノ酸排出遺伝子Rhtを導入した菌株 (欧州特許公開公報1016710号明細書)、スルファグアニジン、D,L-1,2,4-triazole-3-alanine ,ストレプトマイシン耐性が付与されたE.coli 80株 (VKPM B-7270 ロシア特許公報2119536号)等が挙げられる。

L-ヒスチジン生産能を有する微生物としては、L-ヒスチジン生合成経路の酵素をコードする遺伝子の発現量を増強した微生物を用いてもよい。 L - ヒスチジン生合成系酵素としては、ATP フォスホリボシルトランスフェラーゼ (hisG)、フォスホリボシルAMP サイクロヒドロラーゼ (hisI)、フォスホリボシル-ATP ピロフォスフォヒドラーゼphosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase (hisIE)、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シアミドリボタイドイソメラーゼphosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide Isomerase (hisA)、アミドトランスフェラーゼamidotransferase (hisH)、ヒスチチノールフォスフェートアミノトランスフェラーゼ (hisC)、ヒスチチノールフォスファターゼ (hisB)、ヒスチチノールデヒドロゲナーゼ (hisD) 等が挙げられる。

## 【 0 0 5 2 】

L - ヒスチジン生合成系をコードする遺伝子 (hisG,hisBHAFI) はL-ヒスチジンによって阻害を受けることが明らかになっており、ATP フォスホリボシルトランスフェラーゼ (hisG) にフィードバック阻害に耐性な変異を導入することによっても効率よくL-ヒスチジン生産能を向上することが出来る(ロシア特許公報2003677号、ロシア特許公報2119536号)。

## 【 0 0 5 3 】

L - オルニチン生産能を有する細菌としては、L - シトルリン、L - アルギニン要求性変異を付与したコリネ型細菌や、アルスロバクター属細菌 (特開平02-283290号公報)、ビタミン - P 活性物質に耐性のコリネ型細菌 A J 1 1 5 8 9 ( F E R M - P 5 6 4 4 ) (特開昭57-016696号公報)等が挙げられる。

L - オルニチン生合成系は、L - アルギニン生合成経路と共通であり、L - オルニチン生合成系遺伝子としては、N - アセチルグルタミン酸シンターゼ (argA)、N - アセチルグルタミル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-アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE) 等が挙げられる。

## 【 0 0 5 4 】

L - スレオニン生産能を有する微生物としては、L - スレオニン生産能を有する6 - ジメチルアミノプリン耐性の変異株 (特開平5 - 304969号公報)があり、組換え体エシェリヒア属細菌としては、L - スレオニン生合成系酵素を過剰に生成する変異が導入されたスレオニン生合成遺伝子をプラスミド上で増幅した菌株 (特公平1-29559号公報、特開平05-227977号公報、特開平5-227977号公報)や、スレオニンオペロンをプラスミドで増幅した菌株 (特開平2-109985号公報)、ピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子及びニコチンアミド・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を増幅した菌株 (特開2002-51787号公報)等が挙げられる。

## 【 0 0 5 5 】

また、エシェリヒア・コリ VKPM B-3996 (米国特許第5,175,107号明細書参照)をL - スレオニン生産菌として用いることも出来る。この VKPM B-3996は、1987年11月19日にロシアン・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) に登録番号VKPM B-3996のもとに寄託されている。また、このVKPM B-3996株は、ストレプトマイシン耐性マーカーを有する広域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerd

10

20

30

40

50

ov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167を参照のこと) にスレオニン生合成系遺伝子 (スレオニンオペロン: thrABC) を挿入して得られたプラスミド pVIC40 (WO 90/04636 国際公開パンフレット) を保持している。この pVIC40 においては、スレオニンオペロン中の thrA がコードする アスパルトキナーゼ I - ホモセリンデヒドロゲナーゼ I の、L - スレオニンによる フィードバック 阻害が解除されている。

【 0 0 5 6 】

また、エシェリヒア・コリ B-5318 株 (欧州特許第 0593792 号明細書参照) も L - スレオニン生産菌として例示することができる。B-5318 株は、1990 年 5 月 3 日にロシアン・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) に登録番号 VKPM B-5318 のもとに寄託されている。またこの VKPM B-5318 株は、イソロイシン非要求性菌株であり、ラムダファージの温度感受性 C1 リプレッサー、PR プロモーターおよび Cro タンパク質の N 末端部分の下流に、本来持つ転写調節領域である アテニューエーター領域を欠失したスレオニンオペロンすなわちスレオニン生合成関与遺伝子が位置し、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に構築された組換えプラスミド DNA を保持している。

【 0 0 5 7 】

さらに、エシェリヒア・コリ MG442 (米国特許出願公開 4,278,765 号明細書) も L - スレオニン生産菌として好適である。MG442 株は、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) に登録番号 CMIMB-1628 のもとに寄託されている。

L - スレオニン生産能を有する微生物としては、L - スレオ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された微生物を用いることも出来る。例えば、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)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (asd) が挙げられる。これらの酵素名の後のカッコ内は、各酵素をコードする遺伝子名である。これらの酵素をコードする遺伝子は 2 種類以上導入してもよい。これらの 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 TDH 6 株 (特開 2001-346578 号公報) 等が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

L - グルタミン酸生産能を有する微生物としては、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された微生物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。上記遺伝子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、WO00/18935 号パンフレット、特開 2000-23289 0 号公報等に記載された微生物が例示できる。また、上記遺伝子の発現が増強するように改変された腸内細菌群に属する微生物としては、特開平 2001-333769 号公報、特開 2000-106869 号公報、特開 2000-189169 号公報、特開 2000-333769 等に記載された微生物が例示出来る。

【 0 0 5 9 】

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

10

20

30

40

50

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、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-ピロリンドヒドロゲナーゼなどが挙げられるが、この中でも特にケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が低下した株が望ましい。例えば、 $\alpha$ -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、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタム S株（国際公開W095/34672号パンフレット）や、プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ12821（FERM BP-4172）株（特開平06-237779号公報）が挙げられる。また、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が弱化した腸内細菌科に属する微生物としては、特開平5-244970号公報及び特開平7-203980号公報などに記載されている。さらに、エンテロバクター属細菌については、特開2001-333769号公報に開示されている。

#### 【0060】

L-システイン生産能を有する微生物としては、例えば以下のような微生物が挙げられる。シスタチオニン- $\beta$ -リアーゼ活性が低下したエシェリヒア属細菌（特開2003-169668号公報）や、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を保持するエシェリヒア属細菌（特開平11-155571号公報）、コリネ型細菌（特開2002-233384号公報）が知られている。

#### 【0061】

L-プロリン生産能を有する微生物として、3,4-ジヒドロキシプロリン、アザチジン-2-カルボキシレート耐性株であるエシェリヒア属細菌702株（VKPMB-8011）や、702のilvA欠損株であるエシェリヒア属細菌702ilvA株（VKPMB-8012株）が知られている（特開2002-300874号公報）。

#### 【0062】

L-フェニルアラニン生産能を有する微生物としては、tyrA, tyrRが欠損したエシェリヒア・コリアJ12739（tyrA::Tn10, tyrR）（VKPM B-8197）や、変異型pheA遺伝子を導入したエシェリヒア属細菌HW1089株（米国特許5,354,672号明細書）、フェニルアラニン排出遺伝子であるエシェリヒア属細菌yddG, yedA増幅株（国際公開第03/044192号パンフレット）等が挙げられる。またフェニルアラニン生産能を有するコリネ型細菌としては、チロシン要求性とL-フェニルアラニル-L-チロシン耐性を有する株（特開平5-49489号公報）が挙げられる。

#### 【0063】

L-トリプトファン生産能を有する細菌として好ましいものは、アントラニル酸合成酵素活性、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ活性もしくはトリプトファンシンターゼ活性のうち、1又は2以上の活性が増強された細菌である。アントラニル酸合成酵素及びホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼは、それぞれ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ため、脱感作型の変異酵素を保持させることにより、酵素活性を強化することができる。具体的には、例えば、アントラニル酸合成酵素遺伝子（trpE）、及び/又はホスホグリセレートデヒドロゲナーゼ遺伝子（serA）を、フィードバック阻害を受けないように変異させ、得られた変異型遺伝子をエシェリヒア属性菌に導入することによって、脱感作型酵素を保持する細菌を取得することができる。このような細菌としてより具体的には、脱感作型アントラニル酸合成酵素を保持するエシェリヒア・コリアSV164に、脱感作型ホスホグリセレートデヒドロゲナーゼをコードする変異型serAを持つプラスミドpGH5（国際公開第94/08031号パンフレット参照）を導入することによって得られる形質転換株が挙げられる。

#### 【0064】

また、トリプトファンオペロンを含む組換えDNAが導入された細菌も、好適なL-トリプトファン生産菌である。具体的には、脱感作型アントラニル酸合成酵素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エシェリヒア・コリアが挙げられる（特

10

20

30

40

50



開昭57-71397号公報、特開昭62-244382号公報、米国特許第4,371,614明細書)。また、トリプトファンオペロンのうち、トリプトファンシンターゼをコードする遺伝子(trpBA)の発現を強化することによっても、L-トリプトファン生産能を向上又は付与することができる。トリプトファンシンターゼは、及びサブユニットからなり、それぞれtrpA、trpBによってコードされている。さらに、L-トリプトファン生産菌として、L-フェニルアラニン及びL-チロシン要求性の形質を有する菌株エシェリヒア・コリAGX17(pGX44)〔NRRL B-12263〕株、及びトリプトファンオペロンを含むプラスミドpGX50を保持するAGX6(pGX50)aroP〔NRRL B-12264〕株(いずれも米国特許第4,371,614号明細書参照)が挙げられる。

#### 【0065】

L-イソロイシン生産能が付与されたエシェリヒア属細菌としては、L-イソロイシン生産能を有する6-ジメチルアミノプリン耐性の変異株(特開平5-304969号公報)、L-イソロイシンヒドロキサメート耐性の変異株(特開平5-130882号公報)、チアイソロイシン耐性の変異株(特開平5-130882号公報)、DL-エチオニン耐性の変異株(特開平5-130882号公報)、アルギニンヒドロキサメートに耐性の変異株(特開平5-130882号公報)があり、組換え体エシェリヒア属細菌としては、L-イソロイシン生合成酵素であるスレオニンデアミナーゼあるいはアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子をプラスミドで増強した菌株(特開平2-458号公報、特開平2-42988号公報、特開平8-47397号公報)等が挙げられる。

#### 【0066】

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、ilvGMEDAオペロン、なかでもilvGをコードするアセトヒドロキシ酸シンターゼ(特公平02-748418号公報)が挙げられる。尚、ilvGMEDA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(特開平02-748418号公報)。L-バリン生産能を有する微生物としては、さらにアセト乳酸シンターゼ(III)をコードする遺伝子の発現が弱化したものであってもよい。アセト乳酸シンターゼIIIをコードする遺伝子としては例えばilvIH遺伝子が挙げられる。

L-バリン生産菌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、P5556、特開昭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-9325 特公平04-045314号公報)等が挙げられる。

#### 【0067】

L-アラニン生産菌としては、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(特許公開平7-163383号公報)が挙げられる。

#### 【0068】

<1-2>ybjE遺伝子の発現増強

本発明の微生物は、上述したようなL-アミノ酸の生産能を有する微生物を、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変することによって得ることができる。ただし、先にybjE遺伝子の発現が増強するように改変を行った後に、L-アミノ酸の生産能を付与してもよい。なお、ybjE遺伝子の発現増強は、後述するように、プロモーター改変を始めとする発現調節領域改変などによる内因性ybjE遺伝子の発現増強であってもよいし、ybjE遺伝子を含むプラスミドの導入などによる外因性ybjE遺伝子の発現増強であってもよい。さらに、これらを組み合わせてもよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 9 】

ybJ<sub>E</sub>の発現が親株、例えば野生株や非改変株と比べて向上していることの確認は、ybJ<sub>E</sub>のmRNAの量を野生型、あるいは非改変株と比較することによって確認出来る。発現量の確認方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCRが挙げられる (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001) )。発現量については、野生株あるいは非改変株と比較して、上昇していればいずれでもよいが、例えば野生株、非改変株と比べて1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上上昇していることが望ましい。

## 【 0 0 7 0 】

ybJ<sub>E</sub>遺伝子とは、エシェリヒア・コリのybJ<sub>E</sub>遺伝子、及びそのホモログをいう。エシェリヒア・コリのybJ<sub>E</sub>遺伝子としては、配列番号2のアミノ酸番号17～315のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくは、配列番号1の塩基番号49～948の塩基配列を含む遺伝子を例示することもできる。なお、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸番号1のValは、コドンはgtgであるものの、Metとして翻訳されている可能性があり、ybJ<sub>E</sub>遺伝子にコードされるタンパク質は配列番号2に示すアミノ酸配列(1～315)を有するタンパク質である可能性がある。その場合は、配列番号1に示す塩基配列(1～948)を含むDNAを用いることが好ましい。なお、開始コドンがいずれであるにしても、配列番号1に示す塩基配列(49～948)を含むDNAを用いることにより、本発明の製造法に用いることのできる微生物が得られることは実施例より明らかである。

## 【 0 0 7 1 】

ybJ<sub>E</sub>遺伝子ホモログとは、他の微生物由来で、エシェリヒア・コリのybJ<sub>E</sub>遺伝子構造が高い相同性を示し、宿主に導入した際にL-アミノ酸の生産能を向上させ、L-アミノ酸排出機能を持つ、あるいは導入することによって宿主にL-アミノ酸耐性を付与する遺伝子をいう。例えば配列番号9に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子、配列番号10に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子が挙げられる。(配列番号9アミノ酸配列は、Salmonella typhimurium LT2株のYbJ<sub>E</sub>タンパク質との保存配列、配列番号10のアミノ酸配列はYersinia pestis C092 YP01361のYbJ<sub>E</sub>タンパク質との保存配列を示す)従って、他の微生物由来のybJ<sub>E</sub>遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列全体、または配列番号2のアミノ酸番号17～315のアミノ酸配列に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%、特に好ましくは98%以上の相同性を有し、かつ、L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするものを意味する。また、配列番号9、10に示すアミノ酸配列を有し、かつL-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするものも含まれる。アミノ酸配列および塩基配列の相同性は、例えばKarlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993))やFASTA(Methods Enzymol., 183, 63 (1990))を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。

## 【 0 0 7 2 】

他の微生物由来のybJ<sub>E</sub>遺伝子として具体的には、GenBank Accession No. AE016980の塩基番号275793～276692又は275793～276740の配列の相補鎖であるシゲレラ・フレクシネリ(Shigella flexneri 2a str.) 2457T株由来の遺伝子、GenBank Accession No. AE008740の塩基番号97～996の配列の相補鎖であるサルモネラ・チフィムリウム(Salmonella typhimurium) LT2株由来の遺伝子、GenBank Accession No. AJ414147の塩基番号197812～198708の配列の相補鎖であるイエールシニア・ペスティス(Yersinia pestis) C092株由来の遺伝子が利用出来る。さらに、ybJ<sub>E</sub>遺伝子は、上記で例示された遺伝子との相同性に基づいて、コリネバクテリウム・グルタミカム、プレビバクテリウム・ラクトファーメントム等のコリネ型細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等からクローニングされるものであってもよい。

## 【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

また、本発明に用いるybjE遺伝子は、野生型遺伝子には限られず、コードされるYbjEタンパク質の機能、すなわちL-リジン排出活性が損なわれない限り、配列番号2のアミノ酸配列、もしくは配列番号2のアミノ酸番号17~315のアミノ酸配列、又は配列番号9、10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加等を含む配列を有するタンパク質をコードする、変異体又は人為的な改変体であってもよい。ここで、「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種類によっても異なるが、具体的には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、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、ybjE遺伝子を保持する微生物の個体差、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。

#### 【0074】

このような遺伝子は、例えば、部位特異的変異法によって、コードされるタンパク質の特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加を含むように配列番号1に示す塩基配列、または配列番号1の塩基番号49~948の塩基配列を改変することによって取得することができる。

配列番号1に示す塩基配列が改変されたybjE遺伝子としては、配列番号1の第3番目の塩基であるg(グアニン)がa(アデニン)に置換された変異型ybjE遺伝子が挙げられる。また、以下のような従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、配列番号1に示す塩基配列または配列番号1の塩基番号49~948の塩基配列を有する遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、および該遺伝子を保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線または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スルフォネート(EMS)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する方法が挙げられる。これらの遺伝子がL-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードしているか否かは、例えば、これらの遺伝子を適当な細胞で発現させ、培地中に排出されるL-アミノ酸の量を増大させているかを調べることにより、確かめることができる。またこれらの遺伝子が宿主に導入することによってL-アミノ酸耐性を付与するかどうかは、これらの遺伝子を宿主に導入し、導入菌株を高濃度のL-アミノ酸の存在する培地で培養することにより、対照株と比べて生育が向上しているかどうかを調べることにより、確かめることができる。

#### 【0075】

またybjE遺伝子は、配列番号1の塩基配列、配列番号1の塩基番号49~948の塩基配列又はこれらの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L-アミノ酸排出活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」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、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60、 $0.1 \times SSC$ 、0.1%SDS、好ましくは、 $0.1 \times SSC$ 、0.1%SDSさらに好ましくは、68、 $0.1 \times SSC$ 、0.1%SDSに相当する塩濃度、温度で、1回より好ましくは2~3回洗浄する条件が挙げられる。

#### 【0076】

10

20

30

40

50

ybjE遺伝子の発現を増強するための改変は、例えば、遺伝子組換え技術を利用して、細胞中のybjE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、ybjE遺伝子を含むDNA断片を、宿主微生物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、これを微生物に導入して形質転換すればよい。

【0077】

ybjE遺伝子としてエシェリヒア・コリのybjE遺伝子を用いる場合、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば、配列番号5及び6に示すプライマーを用いて、エシェリヒア・コリの染色体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、ybjE遺伝子を取  
10  
得することができる。他の微生物のybjE遺伝子も、その微生物において公知のybjE遺伝子もしくは他種の微生物のybjE遺伝子又はYbjEタンパク質の配列情報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するPCR法、又は、前記配列情報に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーション法によって、微生物の染色体DNA又は染色体DNAライブラリーから、取得することができる。なお、染色体DNAは、DNA供与体である微生物から、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。

【0078】

次に、PCR法により増幅されたybjE遺伝子を、宿主微生物の細胞内において機能することのできるベクターDNAに接続して組換えDNAを調製する。宿主微生物の細胞内において機能することのできるベクターとしては、宿主微生物の細胞内において自律複製可能なベクターを挙げることができる。  
20

エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、pACYC184、（pHSG、pACYCは宝バイオ社より入手可）、RSF1010、pBR322、pMW219（pMWはニッポンジーン社より入手可）等が挙げられる。

コリネ型細菌で自律複製できるプラスミドとして具体的には、以下のものが例示される。

pAM330 特開昭58-67699号公報参照

pHM1519 特開昭58-77895号公報参照

pSFK6 特開2000-262288号公報参照  
30

pVK7 米国特許出願公開20030175912号明細書参照

また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【0079】

メチロフィラス属微生物で自律複製出来るプラスミドとして具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導體、例えばpAYC32（Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y. D. Plasmid, 1986, 16, 161-167）、あるいはpMFY42（gene, 44, 53(1990)）、pRP301、pTB70（Nature, 287, 396, (1980)）等が挙げられるybjE遺伝子と上記プラスミドとを連結して組換えDNAを調製するには、ybjE遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結はT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。  
40

【0080】

上記のように調製した組換えDNAを微生物に導入するには、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の透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、パチルス・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., Gene, 1, 153 (1977)）がある。  
あるいは、パチルス・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、D  
50

NA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.,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。

#### 【0081】

一方、ybjE遺伝子のコピー数を高めることは、ybjE遺伝子を微生物の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。微生物の染色体DNA上にybjE遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブ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、特開平2-109985号公報に開示されているように、ybjE遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。染色体上にybjE遺伝子が転移したことの確認は、ybjE遺伝子の一部をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行うことによっても確認出来る。

#### 【0082】

さらに、ybjE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ybjE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、ybjEの発現を上昇させるようなレギュレーターを増幅、ybjE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体化させることによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、ybjE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。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らの論文(Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128)等に記載されている。さらに、リボソーム結合部位(RBS)と開始コドンとの間のスペース、特に開始コドンのすぐ上流の配列における数個のヌクレオチドの置換がmRNAの翻訳効率に非常に影響を及ぼすことが知られており、これらを改変することも可能である。ybjEのプロモーター等の発現調節領域は、プロモーター検索ベクターやGENETYX等の遺伝子解析ソフトを用いて決定することも出来る。これらのプロモーター置換または改変によりybjE遺伝子の発現が強化される。発現調節配列の置換は、例えば温度感受性プラスミドを用いて行うことができる。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℃では自律複製することができるが、37℃では自律複製できない。なお、発現調節配列の改変は、ybjE遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

#### 【0083】

ybjE遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を増強するために、L-アミノ酸排出系活性が上昇するような変異をybjE遺伝子に導入してもよい。ybjE遺伝子によってコードされるタンパク質(YbjEタンパク質)の活性が上昇するような変異としては、ybjE遺伝子の転写量が増大するようなプロモーター配列の変異、及び、YbjEタンパク質の比活性が高くなるようなybjE遺伝子のコード領域内の変異が挙げられる。

#### 【0084】

本発明の微生物は、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変されることにより、L-リジンまたはL-アルギニンなどのL-アミノ酸排出活性が向上した微生物であることが好ましい。ここで、「L-アミノ酸排出活性が向上した」とは、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変された微生物を培養したときに、培地中に排出されるL-アミノ酸の量が、親株や対応する野生株などのybjE遺伝子非改変株に比べて増加することをいう。L-アミ

10

20

30

40

50

ノ酸の細胞外への排出量の増加は、培地中に蓄積するL-アミノ酸濃度が高くなることによって観察される。培地中に蓄積するL-アミノ酸の量は、細胞内のL-アミノ酸と比較して、細胞外のL-アミノ酸が、非改変株と比較して10%以上増加することが好ましく、30%以上増加することより好ましくは50%以上増加することが好ましい。また、L-アミノ酸の細胞外への排出活性の向上は、ybjE遺伝子を微生物に導入したときに、細胞内のL-アミノ酸の濃度が低下することによっても観察される。菌体内のL-アミノ酸濃度は、例えば、比重1.07のシリコンオイルに培養液を適量添加し、12000rpm、2分で遠心後、回収された菌体を22%過塩素酸で処理することによって得られる菌体処理物を用いて測定することが可能である。(A.Ishizaki et al, Biotech.Techniq.(1995) Vol9, No.6,p409) さらに、「L-アミノ酸の排出活性」は、反転膜を利用して、ラジオアイソトープにて細胞内のアミノ酸の取り込み活性を測定することによっても検出出来る(J.Biol.Chem 2002 Vol277.No.51 p49841-49849)。例えば、ybjE遺伝子を発現させた菌体より反転膜小胞を作成し、ATPあるいはその他駆動力となる基質を添加し、RIラベルしたL-アミノ酸の取り込み活性を測定することによって測定可能である。また生菌を使用して、ラベル化アミノ酸と非ラベル化アミノ酸の交換反応の速度を検出することによっても測定できる。

10

## 【0085】

また、本発明の微生物は、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変されることにより、L-アミノ酸や、L-アミノ酸アナログに対する耐性を有するようになった微生物であることが好ましい。すなわち、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変されることにより、ybjE遺伝子非改変株が生育出来ない濃度のL-アミノ酸又はL-アミノ酸アナログ存在下において生育出来るようになった、あるいはybjE遺伝子非改変株より生育が向上した微生物であることが好ましい。L-アミノ酸や、L-アミノ酸アナログに対する耐性は、高濃度のL-アミノ酸またはL-アミノ酸アナログを含有する最小培地においてybjE遺伝子導入株の生育を測定し、親株の生育と比較することによって確認することが出来る。具体的には、親株または本発明のプラスミドを導入した菌株をL-アミノ酸またはL-アミノ酸アナログを添加した液体培地で培養し、その培養液の580~660nmの吸光度を計測し、親株とybjEを増幅した菌株の培養液の該吸光度を比較する方法を挙げることが出来る。培地中に添加されるL-アミノ酸またはL-アミノ酸アナログの濃度は、非改変株の生育が阻害される濃度であればよいが、0.3/L以上の濃度が好ましい。例えば、L-アミノ酸の添加濃度は、L-リジン塩酸塩は80g/L、L-アルギニン塩酸塩については90g/L、L-オルニチン塩酸塩については、45g/L、L-ヒスチジン塩酸塩については30g/L、L-イソロイシンについては、12g/L、L-スレオニンについては40g/L、L-グルタミン酸ナトリウムについては15g/L、L-フェニルアラニンについては8g/L、L-プロリンについては85g/L、L-システインについては、0.3g/Lの濃度が挙げられる。

20

30

## 【0086】

本発明の微生物は、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変されることにより、L-リジンまたはL-リジンアナログ耐性を有するようになった微生物であってもよい。L-リジンアナログとしては、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を例示することができるが、これらに限定されない。なお、L-リジン酸耐性は、上記のL-アミノ酸またはL-アミノ酸アナログ耐性と同様にして確認することができる。

40

## 【0087】

本発明の微生物は、ybjE遺伝子の発現が増強するように改変されることにより、L-アルギニンまたはL-アルギニンアナログ耐性を有するようになった微生物であってもよい。L-アルギニンアナログとしては、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート等を挙げることができる。なお、L-アルギニンまたはL-アルギニンアナログ耐性は、上記のL-アミノ酸またはL-アミノ酸アナログ耐性と同様にして確認することができる。

## 【0088】

<2> L-アミノ酸の製造法

50

本発明のL-アミノ酸の製造法は、本発明の微生物を培地で培養して、L-アミノ酸を該培地中又は菌体内に生成蓄積させ、該培地又は菌体よりL-アミノ酸を回収することを特徴とする製造法である。

【0089】

使用する培地は、微生物を用いたL-アミノ酸の発酵生産において従来より用いられてきた培地を用いることができる。すなわち、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機成分を含有する通常の培地を用いることができる。ここで、炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、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。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。有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリン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。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

10

【0090】

培養は好氣的条件下で1~7日間実施するのがよく、培養温度は24~37、培養中のpHは5~9がよい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性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。発酵液からのL-リジン又はL-アルギニンの回収は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内にL-アミノ酸が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L-アミノ酸を回収することができる。

20

【0091】

本発明の製造法において、メタノールを主たる炭素源として用いるとL-リジン又はL-アルギニンなどのアミノ酸を安価に製造することができるため、メチロフィラス属細菌、メチロバチラス属細菌などのメタノール資化能を有する微生物を好適に用いることができる。この場合、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法(国際公開第00/61723号パンフレット、特開2001-120269号号公報等参照)で培養を行うことができる。主たる炭素源としてメタノールを用いて培養を行う場合は、メタノールを培地中に0.001~30%添加することが好ましい。メタノール資化性微生物の培養においては、窒素源として硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いることが好ましい。また、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分を少量添加することが好ましい。

30

【0092】

メタノール資化性微生物の培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5~9、温度20~45に保持して、通常24~120時間行うことが好ましい。培養物からのL-アミノ酸の回収は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。菌体内からのL-アミノ酸の回収は上記と同様にして行うことができる。

40

【0093】

[実施例]

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。試薬は、特記しない限り和光純薬、又はナカライテスク社製のものを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHまたはHClで調整した。

【0094】

(L培地)

バクト・トリプトン(ディフコ社製)10g/L

50

酵母エキス (ディフコ社製) 5g/L  
塩化ナトリウム 10g/L

pH7.0

120、20分間蒸気滅菌を行った。

【0095】

[L寒天培地]

L培地

バクトアガー 15g/L

120、20分間蒸気滅菌を行った。

【0096】

[最小培地(M9)] Molecular Cloning Vol.3に応じた。

10

5xM9 salts\* 200 ml  
1M 硫酸マグネシウム 2 ml  
20% グルコース 20 ml  
1M 塩化カルシウム 0.1 ml  
Up to 1L (pH 7.0)

\*5xM9 salts

リン酸2ナトリウム 64 g  
リン酸カリウム 15 g  
塩化ナトリウム 2.5 g  
塩化アンモニウム 5.0 g  
Up to 1L

20

115、10分間蒸気滅菌を行った。

適時L-リジンを添加した。

【0097】

[最小寒天培地]

最小培地

バクトアガー 15g/L

115、10分間蒸気滅菌を行った。

【0098】

[エシェリヒア属細菌 L-リジン生産培地]

グルコース 40g/L  
硫酸アンモニウム 24g/L  
リン酸2水素カリウム 1.0g/L  
硫酸マグネシウム・7水塩 1.0g/L  
硫酸鉄4・7水塩 0.01g/L  
硫酸マンガン4・7水塩 0.01g/L  
酵母エキス 2.0g/L  
局方炭酸カルシウム 30g/L

30

水酸化カリウムでpH7.0に調整し、115で10分オートクレーブ  
但しグルコース及びMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oは別々に殺菌した。

抗生物質として、クロラムフェニコール50 mg/Lを添加した。

【0099】

[エシェリヒア属L-アルギニン生産評価培地]

グルコース 60 g/L (別殺菌)

硫酸マグネシウム・7水塩 1 g/L (別殺菌)

硫酸アンモニウム 25 g/L

リン酸2水素カリウム 2 g/L

40

50



酵母エキス (ディフコ社製) 5 g/L  
 ビタミン B 1 0.1 mg/L  
 pH 7.2

局方炭酸カルシウム 25 g/L (別殺菌)  
 水酸化カリウムで pH 7.2 に調整し、115 で 10 分オートクレーブ  
 但しグルコース及び  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  は別々に殺菌した。  
 抗生物質として、クロラムフェニコール 50 mg/L を添加した。

## 【 0 1 0 0 】

[ メチロフィラス属微生物 L-リジン生産培地 (SEII 培地) ]

リン酸 2 水素カリウム	1.9g/L	10
リン酸 2 水素ナトリウム	1.56g/L	
硫酸マグネシウム	0.2g/L	
硫酸アンモニウム	5g/L	
硫酸銅 5 水塩	5 $\mu$ g/L	
硫酸マンガン 4 - 5 水塩	25 $\mu$ g/L	
硫酸亜鉛 4 - 7 水塩	23 $\mu$ g/L	
塩化カルシウム 2 - 2 水塩	72mg/L	
塩化鉄 2 - 6 水塩	9.7mg/L	
炭酸カルシウム (関東化学製)	30g/L	
メタノール	2% (vol/vol)	20

pH 7.0

(メタノール以外は 121、15 分間蒸気滅菌を行った。良くさめてからメタノールを添加した。) Journal of general microbiology (1989) 125, 135, 3153-3164 Silman N. J., Carver M. A. & Jones C. W. を参考として調製した。硫酸アンモニウムの代わりに、アセトアミド 1.18g を使い、塩化カルシウムは、72mg/L の濃度を添加した。

## 【 0 1 0 1 】

[ SEII 寒天培地 ]

リン酸 2 水素カリウム	1.9g/L	
リン酸 2 水素ナトリウム	1.56g/L	
硫酸マグネシウム	0.2g/L	30
硫酸アンモニウム	5g/L	
硫酸銅 5 水塩	5 $\mu$ g/L	
硫酸マンガン 4 - 5 水塩	25 $\mu$ g/L	
硫酸亜鉛 4 - 7 水塩	23 $\mu$ g/L	
塩化カルシウム 2 - 2 水塩	72mg/L	
塩化鉄 2 - 6 水塩	9.7mg/L	
炭酸カルシウム (関東化学製)	30g/L	
メタノール	2% (vol/vol)	

pH 7.0

バクトアガー (ディフコ社製) 15g/L 40

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

## 【 0 1 0 2 】

[ コリネ型細菌用 CM2S 培地 ]

ポリペプトン	10g/L	
酵母エキス	10g/L	
塩化ナトリウム	5g/L	
シュークロース	5g/L	
DL-メチオニン	0.1g/L	
水酸化カリウムで pH 7.2 に調整、寒天培地の場合は 20g/L 添加した。		50

(オートクレーブで120 30分滅菌した。)

【0103】

[コリネ型細菌用L-リジン生産培地]

グルコース 100g/L  
 硫酸アンモニウム 55g/L  
 大豆加水分解物 (全窒素量として) 1.05g/L  
 リン酸2水素カリウム 1.0g/L  
 硫酸マグネシウム・7水塩 1.0g/L  
 硫酸鉄4・7水塩 0.01g/L  
 硫酸マンガン4・7水塩 0.01g/L  
 硫酸マグネシウム 0.2g/L  
 GD113 0.05ml/L

局方炭酸カルシウム50g/L(別殺菌)

水酸化カリウムでpH7.5に調整し、115 で10分オートクレーブ  
 但しグルコース及びMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oは別々に殺菌した。

【実施例1】

【0104】

<L-リジン排出遺伝子の探索>

L-リジン排出遺伝子の探索は以下のようにして行った。

【0105】

<1-1> プラスミドライブラリーを導入したエシェリヒア・コリの構築

MG1655(ATCC 47076)株においてのlysA(ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素遺伝子)を欠損させた株より染色体DNAを常法にて抽出し、制限酵素Sau3AIで部分分解後した2~4kbpの断片を、それぞれBamHIで消化したpTWV229(タカラバイオ社製)、pSTV28(タカラバイオ社製)、pMW118(ニッポンジーン社製)に導入し、プラスミドライブラリーを作製した。このプラスミドライブラリーをMG1655株に、エレクトロポレーションにより導入した。

【0106】

<1-2> L-リジン耐性遺伝子のスクリーニング

プラスミドライブラリーを導入したMG1655株について、pTWV229導入株はアンピシリン耐性を指標に、pSTV28導入株はクロラムフェニコール耐性を指標に、pMW118導入株はアンピシリン耐性を指標にL培地で選択し、合計約80000コロニーを形質転換体として取得した。この形質転換体をMG1655株がコロニーをほとんど形成できない、60g/Lのリジン塩酸塩を含む最小培地に塗布した。

【0107】

37 で36時間培養後、高濃度のLysを含む培地で出現した約50個出現したコロニーを高濃度リジン耐性候補株として選択した。高濃度リジン耐性候補株のベクターに挿入されている配列を確認するため、プラスミドのマルチクローニングサイト近傍に位置するDNA配列と相補的な配列番号3に示す合成オリゴヌクレオチド(M13 Forwardプライマー)、及び配列番号4に示す合成オリゴヌクレオチド(M13 Reverseプライマー)を用いてPCRを行い、増幅断片について配列を決定した。

塩基配列決定の結果、ほぼ全ての断片が、913181-914128に位置するybjE遺伝子を重複して含んでいることが明らかになった。

【0108】

高濃度L-リジン耐性株に重複して含まれていたybjE遺伝子の配列から予想されるアミノ酸配列について検討した。該タンパク質の配列の疎水性を検索したところ、疎水性が高度に保たれていることが明らかとなった。従って、ybjEによってコードされるタンパク質は膜タンパク質であり、何らかのアミノ酸排出に関与している可能性が示唆された。

【実施例2】

【0109】

<エシェリヒア・コリにおけるybjE遺伝子増幅効果>

### < 2 - 1 > ybjE増幅用プラスミドの構築及びエシェリヒア・コリへの導入

次にybjE遺伝子の単独でのリジン耐性に寄与する増幅効果を確認する為に、ybjEを単独で増幅するためのベクターを構築して、MG1655に導入し、効果を確認した。エシェリヒア・コリ(エシェリヒア・コリK-12株)の染色体の全塩基配列は既に明らかにされており(Science, 277, 1453-1474 (1997))、この文献に報告されているybjE遺伝子の塩基配列に基づいて、5'プライマーとしてGenBankのACCESSION No. AE000189の塩基番号4085~4104の配列に相補的な配列である配列番号5の合成オリゴヌクレオチド、3'側プライマーとして同塩基配列の塩基番号2689~2708の配列に相当する配列番号6に記載の合成オリゴヌクレオチドを用いて、エシェリヒア・コリ MG1655株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

10

#### 【0110】

精製したPCR産物を、SmaIで消化したベクターpSTV28(タカラバイオ社製)に連結してybjE増幅用プラスミドpSYBJEを構築した。構築手順を図1に示す。ybjE遺伝子がlacプロモーターに正方向に連結しているものをpSYBJE1、逆方向に連結しているものをpSYBJE2と名付けた。

#### 【0111】

ybjE遺伝子増幅用プラスミドpSYBJE1、pSYBJE2と、比較対照用プラスミドpSTV28(タカラバイオ社製)を常法により、MG1655(ATCC 47076)に導入した。クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換体を取得し、pSYBJE1が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYBJE1、pSYBJE2が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYBJE2、pSTV28が導入された株をMG1655/pSTV28と名付けた。

20

#### 【0112】

### < 2 - 2 > エシェリヒア属細菌におけるybjE遺伝子増幅効果

エシェリヒア・コリMG1655株の各種アミノ酸耐性に対するybjE遺伝子断片の増幅の効果、すなわちpSYBJE1、及びpSYBJE2プラスミドの、MG1655株のアミノ酸耐性に対する影響を調べた。MG1655/pSYBJE1株、MG1655/pSYBJE2株並びに対照株のMG1655/pSTV28株を、終濃度が50µg/mlとなるようにクロラムフェニコールを加えたL培地5mlに植菌し、往復振とう培養装置により約6時間程度培養した。濁度がOD600=1.0程度に菌体が増殖した培養液を遠心後、菌体をM9最小培地で2回洗浄し、最終濃度が濁度OD600=0.05になるように、終濃度50µg/mlのクロラムフェニコール及び80g/Lリジン塩酸塩を含有するM9最小培地にそれぞれ植菌し、70時間程度培養し、生育を調べた。

30

#### 【0113】

結果を図2に示す。図2から分かるように、ybjE遺伝子の発現量上昇により、対照株と比較して、高濃度L-リジン存在下における初期生育、及び対数増殖期の分裂速度が向上することが明らかになった。

#### 【実施例3】

#### 【0114】

### < 3 > エシェリヒア属細菌のアミノ酸耐性に対するybjE遺伝子破壊の影響

#### < 3 - 1 > ybjE遺伝子破壊株の構築

ybjE遺伝子の欠失は、DatsenkoとWannerによって最初に開発された「Red-driven integration」と呼ばれる方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645)によって行った。この方法によれば、目的とする遺伝子を合成オリゴヌクレオチドの5'側にデザインし、抗生物質耐性遺伝子を3'側にデザインした合成オリゴヌクレオチドを用いて得られたPCR産物を用いて、一段階で遺伝子破壊株を構築することが出来る。この方法に従って、ybjE遺伝子及び鋳型プラスミドに抗生物質耐性を付与する遺伝子のそれぞれに近接する領域に、それぞれ相補的なプライマーを設計し、ybjE遺伝子内部配列を得た。この内部配列は、プラスミドpACYC184(NBL Gene SciencesLtd. (英国)、GenBank/EMBLアクセッション番号X06403)を鋳型に、配列番号7及び8に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行うことにより取得することも可能である。

40

#### 【0115】

50

増幅したPCR産物をアガロースゲルで精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むエシェリヒア・コリMG1655株をエレクトロポレーションするために用いた。プラスミドpKD46 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645) は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御される Red相同組換えシステムの遺伝子 ( 、 、 exo遺伝子) を含む ファージの合計2154塩基のDNAフラグメント (GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459, 第31088番目~33241番目) を含む。プラスミドpKD46はPCR産物をMG1655株の染色体に組み込むために必要である。

#### 【0116】

エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。すなわち、100mg/Lのアンピシリンを含んだLB培地中で30、一晩培養したエシェリヒア・コリMG1655株を、アンピシリンとL-アラビノース(1mM)を含んだ5mLのSOB培地(モレキュラークローニング: 実験室マニュアル第2版、Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年))で100倍希釈した。得られた希釈物を30で通気しながらOD600が約0.6になるまで生育させた後、100倍に濃縮し、氷冷した脱イオン水で3回洗浄することによってエレクトロポレーションに使用できるようにした。エレクトロポレーションは70µLのコンピテントセルと約100ngのPCR産物を用いて行った。エレクトロポレーション後のセルは1mLのSOC培地(モレキュラークローニング: 実験室マニュアル第2版、Sambrook, J.ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年))を加えて37で2.5時間培養した後、37でL-寒天培地上で平板培養し、Cm(クロラムフェニコール耐性)組換え体を選択した。次に、pKD46プラスミドを除去するために、Cm(クロラムフェニコール)入りのL-寒天培地上、42で2回継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性を試験し、pKD46が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。

#### 【0117】

クロラムフェニコール耐性遺伝子によって識別できるybjE遺伝子の欠失を含む変異体を、PCRによって確認した。ybjE遺伝子欠損株MG1655 ybjE::cat株の細胞のDNAを鋳型にして得られたPCR産物の長さは野生株より長く、ybjE遺伝子内部にクロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入されていることが確認され、ybjE遺伝子が欠損されていることを確認できた。クロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入されたybjE破壊株をMG1655 ybjE::Cm株と名づけた。

#### 【0118】

<3-2> ybjE遺伝子欠損株のアミノ酸耐性確認

ybjE遺伝子欠損株MG1655 ybjE::Cmのアミノ酸耐性に対する影響を調べた。MG1655 ybjE::Cm株、並びに比較対照のMG1655株を、L培地で往復振とう培養装置により約6時間程度培養した培養液(OD600 1.0)を遠心後、菌体をM9最小培地で2回洗浄し、終濃度OD600 = 0.05になるようにM9最小培地及び80g/Lリジン塩酸塩を含有するM9最小培地に植菌し、70時間程度培養し、生育を調べた。

#### 【0119】

結果を図3に示す。図3から分かるように、ybjE遺伝子を欠損することにより、対照株に比較して、高濃度L-リジン存在下における初期生育が悪化した。この結果と実施例2の結果から、ybjE遺伝子がL-リジンに対して耐性を付与する遺伝子であることが示された。

#### 【実施例4】

#### 【0120】

<4> エシェリヒア属細菌L-リジン生産株でのybjE増幅の効果

エシェリヒア・コリのL-リジン生産株として、AEC(S-(2-アミノエチル)-システイン)耐性株であるWC196株(AJ13069(FERM BP-5252); W096/17930号国際公開パンフレット参照)を用いた。

#### 【0121】

WC196株を、実施例2で用いたybjE増幅用プラスミドpSYBJE1と、比較対照用プラ

10

20

30

40

50

スミドpSTV28（宝バイオ社製）で形質転換し、クロラムフェニコール耐性株を得た。所定のプラスミドが導入されていることを確認し、ybjE増幅用プラスミドpSYBJE1導入株をWC196/ybjE株、比較対照用プラスミドpSTV28導入株をWC196/pSTV28株と名づけた。

【0122】

WC196/ybjE株とWC196/pSTV28株を50 mg/Lのクロラムフェニコールを含むL培地にて終OD 600 0.6となるように37℃にて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注しグリセロールストックにして、-80℃に保存した。これをグリセロールストックと呼ぶ。

【0123】

これらの株のグリセロールストックを融解し、各100 µLを、50 mg/Lのクロラムフェニコールを含むLプレートに均一に塗布し、37℃にて24時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、500mL坂口フラスコの、50 mg/Lのクロラムフェニコールを含む発酵培地（M9最小培地）の20 mLに接種し、往復振とう培養装置で37℃において27時間培養した。培養後、培地中に蓄積したリジンの量をバイオテックアナライザーAS210（サクラ精機）を用いて測定した。菌体内のL-リジン濃度は、比重1.07のシリコンオイルに培養液を適量添加し、12000rpm2分で遠心後、回収された菌体を22%過塩素酸で処理し、菌体を破壊することによって測定した。

【0124】

24時間目のL-リジン蓄積と収率、菌体内外のリジン濃度の比を表1に示す。\*に示される菌体内外のリジン濃度の比は菌体外L-リジン濃度（mg/g乾燥菌体）を菌体内L-リジン濃度（mg/g乾燥菌体）で割った数値を示した。表1から分かるように、WC196/pSYBJE1株は、ybjE遺伝子を導入しないWC196/pSTV28株と比較して多量のリジンを蓄積した。またybjE遺伝子を導入したWC196/pSYBJE1は、ybjE遺伝子を導入しないWC196/pSTV28株と比べて、菌体内のリジン濃度が大幅に減少する事により、菌体内のリジン濃度に対する菌体外のL-リジン濃度が上昇し、ybjEはL-リジンの排出遺伝子であることが示唆された。

【0125】

【表1】

表1

菌株	L-リジン蓄積 (g/L)	L-リジン収率 (%)	菌体内外L-リジン比率*
WC196	1.3	3.3	17.7
WC196/pSTV28	0.9	2.3	12.2
WC196/pSYBJE1	7.6	19	35.3

【実施例5】

【0126】

<5> エシェリヒア属細菌L-アルギニン生産株でのybjE増幅の効果

ybjE遺伝子増幅株のL-リジン蓄積、収率はともに対照株と比較して向上することが認められた。ここでは、L-リジンと同様、塩基性アミノ酸として知られるL-アルギニン生産への効果について検討した。エシェリヒア・コリのL-アルギニン生産菌として、N-アセチルグルタミン酸シンターゼのフィードバック阻害が解除された237株（VKPM B-7925；ロシア特許出願第2000117677号）を用いた。

【0127】

(1) エシェリヒア・コリ237株のybjE遺伝子増幅株の作製

実施例4と同様の方法を用い、237株のybjE遺伝子増幅株である237/pSYBJE1、及び、対照株として237/pSTV28を作製した。

【0128】

(2) L-アルギニンの製造

以下に示す培地および培養方法ならびに分析方法にて、ybjE遺伝子増幅のL-アルギニン発酵への効果を検討した。前培養として、グリセロールストック100 µLをL寒天培地に

10

20

30

40

50

植菌し、50 mg/Lのクロラムフェニコールを含むLプレートに均一に塗布し、32度にて24時間培養した。上記寒天培地からプレートの1/8の面積をかき取り、アルギニン評価培地20mlに植菌し、32度にて90時間培養した。プラスミド導入菌株にはクロラムフェニコールを添加して行った。

【0129】

培養液1mlを経時的にサンプリングし、菌体内、及び培養液中のグルコース濃度、L-アルギニン蓄積を測定した。培養液中のグルコース濃度、及びL-アルギニン濃度は、15,000rpmで5分間遠心し、その上清液を適当倍率に水で希釈した培養液をバイオテックアナライザー（サクラ精器）およびアミノ酸アナライザーL-8500（日立計測器サービス社製）により測定した。菌体内のL-アルギニン濃度は、比重1.07のシリコンオイルに培養液を適量添加し、12000rpm2分で遠心後、回収された菌体を22%過塩素酸で処理することにより測定した。90時間目のL-アルギニン蓄積と収率、菌体内外のアルギニン比を表2に示した。なお、\*に示される菌体内外のL-アルギニン濃度の比は菌体外L-アルギニン濃度（mg/g乾燥菌体）を菌体内L-リジン濃度（mg/g乾燥菌体）で割った数値を示した。

10

【0130】

【表2】

表2：ybjE遺伝子増幅株のL-アルギニン生産

菌株	L-アルギニン蓄積 (g/L)	L-アルギニン収率 (%)	菌体内外アルギニン比率*
237/pSTV28	0.8	1.7	23.0
237/pSYBJE1	1.7	3.6	25.6

20

【0131】

ybjE遺伝子増幅株のL-アルギニン蓄積、収率はともに対照株と比較して向上することが認められた。また、菌体内外のアルギニンの比率も同様に向上することから、本遺伝子はL-アルギニンの排出にも関与していることが示唆された。

【実施例6】

【0132】

<6> エシェリヒア属微生物由来ybjE遺伝子のメチロフィラス属微生物への導入の効果

30

<6-1> ybjE増幅用プラスミドpRSybjEの構築

メチロフィラス属微生物にybjE遺伝子を導入するために、公知のプラスミドpRS（特表平3-501682号公報参照）を用いて、ybjE発現用プラスミドpRSybjEを構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32（Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167）に由来するpVIC40プラスミド（W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報）から、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除して得られるベクター部分のみを持つプラスミドである。

【0133】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを図3に示す方法で構築した。pRStacプラスミドは、pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8.0キロベースペア（以下、「kbp」と記載）のDNA断片をEASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、タカラバイオ社製）を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pKK223-3プラスミド（発現用ベクター、Pharmacia社製）を鋳型とし、配列番号16および17に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った）。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、あらかじめプライマー中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応

40

50

を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

#### 【0134】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ社製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (エシェリヒア・コリ JM109 competent cells、タカラバイオ社製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ - SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。pRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

10

#### 【0135】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I (タカラバイオ社製)で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、DNA blunting kitを用いて平滑末端処理した。

#### 【0136】

また、上述のpSYBJE1を制限酵素PvuIIで切断し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、lacプロモーターおよびybjE遺伝子断片を含む約1.5kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2 (DNA回収キット、タカラバイオ社製)を用いて回収した。

20

#### 【0137】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、ybjE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2 (タカラバイオ社製)を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ (エシェリヒア・コリ JM109 competent cells、タカラバイオ社製)を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ - SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSybjEを得た (図4)。pRSybjEは、tacプロモーターの転写方向に対して、ybjE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

30

#### 【0138】

<6-2>メチロフィラス属微生物へのpRSybjEの導入

上記のようにして得られたpRSybjEを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997))によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515)に導入した。なお、対照として、pRSをAS1株に導入した。pRSybjE及びpRSについて、それぞれストレプトマイシン耐性を指標として形質転換体を取得した。

40

#### 【0139】

pRS、pRSybjEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (AS1/pRS、AS1/pRSybjE)をそれぞれ、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約0.3cm<sup>2</sup>の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地 (20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計 (日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。その結果を、表3に示す。

#### 【0140】

【表3】

表3

菌株	L-リジンの生産量 (g/L)	L-アルギニンの生産量 (g/L)
AS1 /pRS	<0.01	<0.01
AS1 /pRSybjE	0.70	0.14

## 【0141】

ybjE遺伝子増幅の結果、対称のAS1/pRS株と比較して、L-リジン、L-アルギニンの蓄積量が飛躍的に増大した。従って、ybjEはメチロフィラス・メチロトロファス内でも塩基性L-アミノ酸排出遺伝子として機能していることが示唆された。

10

## 【実施例7】

## 【0142】

フィードバック阻害解除型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びybjE遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファスの評価

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株によるL-リジン生産において、ybjE遺伝子の導入によりL-リジンの分泌が促進されることがわかったので、ybjE遺伝子を導入した株においてL-リジン生合成系酵素系の強化を行い、生産性の更なる向上を目指した。

## 【0143】

<7-1> L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの構築

20

L-リジン生合成系酵素遺伝子として、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子（以下dapA\*と呼ぶ）を持つプラスミドを作製した。プラスミドの構築方法を図5に示す。

## 【0144】

実施例6で作製したpRStacをSse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約8.2kbpのDNA断片を回収した。

30

## 【0145】

dapA\* 遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(米国特許第6040160号明細書参照)を鋳型として、配列番号14および15に示すプライマーを用いたPCR法(変性94-20秒、アニーリング55-30秒、伸長反応72-60秒)により増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を使用した。得られたdapA\*断片をPCRprep(Promega社製)にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約1.0kbpのDNA断片を回収した。

## 【0146】

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

40

## 【0147】

50



なお、pRSdapAプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109株はAJ13831と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18370として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8041の受託番号のもとで寄託されている。したがって、この株よりpRSdapAプラスミドを取得することも可能である。

#### 【0148】

<7-2> ybjE及びdapA\*を持つプラスミドの構築

ybjEとdapA\*の組み合わせ効果を評価するために、pRSdapAプラスミドにpRSybjE遺伝子を挿入したプラスミドを、図5に示した方法で構築した。実施例6で作製したpRSybjEを制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit (タカラバイオ社製)にて末端を平滑化した。また、dapA\*を持つプラスミドpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA\*領域を含む断片を分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(タカラバイオ社製)にて回収した。この断片を前記と同様に平滑化し、前記のpRSybjEの消化物とDNA Ligation Kit Ver2(タカラバイオ社製)にて連結した。

#### 【0149】

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

#### 【0150】

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

#### 【0151】

<7-3> ybjEおよびdapA\*を保持するメチロフィルラス属微生物によるL-リジンの生産  
前記のようにして得られたpRSybjEdapA、pRSybjE、pRSdapA、又はpRSが導入されたAS1株を、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、37℃にて1晩培養したのち、培地表面約0.3cm<sup>2</sup>の菌体をかきとって20mg/Lのストレプトマイシンを含む上述のSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。結果を表4に示す。pRSybjEdapAを導入した株は、pRSdapAやpRSybjEを単独で導入した場合と比較して、培地中のL-リジン蓄積が向上しており、ybjE遺伝子とdapA\*遺伝子増強効果が相乗的に表れたことがわかる。

#### 【0152】

#### 【表4】

表4

菌株	L-リジンの生産量(g/L)
AS1/pRS	0.00
AS1/pRSybjE	0.7
AS1/pRSdapA	0.12
AS1/pRSybjEdapA	1.38

#### 【実施例8】

#### 【0153】

ybjE増幅がリジンアナログに対して与える影響

次に、ybjE遺伝子増幅が、リジンアナログに対して与える影響について検討した。

上述のAS1/pRSybjEおよび対照としてpRSを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を20 mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII培地にて終夜培養した。この培養液を新しいSEII培地(20 mg/Lのストレプトマイシンを含む)に10%植菌し、対数増殖期まで37℃にてしんとう培養を行った。この培養液をS-(2-アミノエチル)-システイン(AEC)をそれぞれ0.3, 5g/Lの濃度で含むSEII培地(20 mg/Lのストレプトマイシンを含む)に4%ずつ植菌し、37℃でしんとう培養しながら30分ごとに660nmのOD値を測定することで、それぞれの株のAECに対する耐性度を調べた。結果を図6に示す。測定にはアドバンテック社製のバイオフォトレコーダーTN-1506を使用し、専用試験管に5mlの培地をいれて使用した。結果を図6に示す。

【0154】

10

その結果、対照株であるAS1/pRS株が、AEC添加下で生育が大幅遅延するのに対し、ybjE増幅株である、AS1/pRSybjE株では、生育の遅延が見られなかった。従って、ybjE遺伝子の増幅は、L-リジン耐性だけではなく、L-リジンアナログ耐性能を付与することが明らかになった。

【実施例9】

【0155】

L-スレオニン生産菌におけるybjEの増幅効果

エシェリヒア・コリのL-スレオニン生産株としてエシェリヒア・コリB-5318株(欧州特許第0593792号明細書参照)を用いる。B-5318のybjE増幅株は例えば以下のような方法で構築することが出来る。

20

B-5318株を、実施例2で用いたybjE増幅用プラスミドpSYBJE1と、比較対照用プラスミドpSTV28(宝バイオ社製)で形質転換し、クロラムフェニコール耐性株を得る。所定のプラスミドが導入されていることを確認し、ybjE増幅用プラスミドpSYBJE1導入株、比較対照用プラスミドpSTV28導入株を構築することが出来る。ここで、ybjE増幅株をB-5318/ybjE、比較対照用プラスミド導入株をB-5318/pSTV28と命名する。

【0156】

B-5318/ybjE株とB-5318/pSTV28株を50 mg/Lのクロラムフェニコールを含むL培地にて終OD600 0.6となるように37℃にて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注しグリセロールストックにして、-80℃に保存した。

【0157】

30

これらの株のグリセロールストックを融解し、各100 μLを、50 mg/Lのクロラムフェニコールを含むLプレートに均一に塗布し、37℃にて24時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、L-スレオニン生産培地に接種して、24時間培養を行う。培養終了後、培養液中に含まれるL-スレオニンの量を公知の方法で測定する。このような方法でL-スレオニン生産能の向上したybjE増幅株を取得することが出来る。

【実施例10】

【0158】

コリネ型細菌におけるybjE増幅効果

<10-1>ybjE増幅用プラスミドの作製

実施例2で構築したpSYBJE2を制限酵素EcoRI、及びPstIで処理し、得られた断片を同様の処理を施したベクターpVK7(米国特許出願公開 20030175912明細書)にライゲーションした。得られたybjE増幅用プラスミドをpVYBJE1と名づけた。

40

【0159】

<10-2>コリネ型細菌を用いたリジン生産に対するybjE増幅効果

リジン生産能を有するコリネ型細菌として、Corynebacterium glutamicum ATCC13861株を用いた。常法に従って、Corynebacterium glutamicum ATCC13861株をpVK7、pVYBJE1で形質転換し、ATCC13861/pVK7株、及びATCC13861/pVYBJE1株を得た。また、これらの株を25 mg/Lのカナマイシンを含むM-CM2S培地にて終OD600 0.6となるように31.5℃にて培養した後、培養液と等量の40%グリセロール溶液を加えて攪拌した後、適量ずつ分注し-80℃に保存した。

50

これをグリセロールストックと呼ぶ。

【0160】

これらの株のグリセロールストックを融解し、各100  $\mu$ Lを、25 mg/Lのカナマイシンを含むM-CM2Sプレートに均一に塗布し、31.5  $^{\circ}$ Cにて24時間培養した。得られたプレートのおよそ1/8量の菌体を、500mL坂口フラスコの、25 mg/Lのカナマイシンを含む発酵培地の20 mLに接種し、往復振とう培養装置で31.5  $^{\circ}$ Cにおいて42時間、攪拌115rpmの条件下で培養した。培養後、培地中に蓄積したリジンの量を公知の方法（サクラ精機 バイオテックアナライザ-AS210）により測定した。42時間の培養によって、培地中のグルコースは全て消費されていた。

【0161】

結果を表5に示す。表5から分かるように、ATCC13861/pVYBJE1株は、アミノ酸排出タンパク質YbjEの発現量が増大していないATCC13861/pVK7株と比較して多量のリジンを蓄積した。コリネ型細菌においても、*E. coli* ybjEは正常に機能し、多コピー化することでLys生産を向上させることが確認された。

【0162】

【表5】

表5

菌株	リジン(g/L; 塩酸塩換算)
ATCC13861/pVK7株	1.1
ATCC13861/pVYBJE1株	4.2

【実施例11】

【0163】

ybjE遺伝子増幅株のL-アミノ酸存在下での生育改善

ybjE遺伝子増幅用プラスミドと、比較対照用プラスミドpSTV28(タカラバイオ社製)を常法により、MG1655(ATCC 47076)に導入した。さらに、変異型ybjE遺伝子(ybjE\* ; 配列番号1において第3番目のgがaに置換された配列を有する遺伝子)を含むプラスミドpSYJE1\*2-1もMG1655株に導入した。

これらのプラスミドが導入された形質転換体をクロラムフェニコール耐性を指標として取得し、pSYBJE1が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYJE1、pSYJE1\*2-1が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYJE1\*2-1、pSTV28が導入された株をMG1655/pSTV28と名づけた。

なお、変異型ybjE\*増幅用プラスミドpSYJE1\*2-1は以下のように構築した。まず、配列番号5と配列番号6の合成オリゴヌクレオチドをプライマー用いて、*Escherichia coli* Lys生産菌NVC578の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。得られたybjE遺伝子は、配列番号1において第3番目のgがaに置換された配列を有する変異型ybjE遺伝子(ybjE\*)であった。精製したPCR産物を、SmaIで消化したベクターpSTV28(タカラバイオ社製)に連結してybjE\*増幅用プラスミドを構築した。ybjE遺伝子がlacプロモーターに正方向に連結しているものをpSYJE1\*2-1と名づけた。

尚、変異型ybjE\*遺伝子は野生型ybjE遺伝子に上記変異を導入することによって得ることができる。変異導入方法としては、上記変異を有するオリゴヌクレオチドによるオーバーラップエクステンションPCR法を用いて、変異を含むybjE遺伝子を増幅する方法が挙げられる。(Urban, A., Neukirchen, S. and Jaeger, K. E., A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res*, 25, 2227-8. (1997).)

【0164】

*Escherichia coli* MG1655株の各種アミノ酸への耐性に対する、野生型および変異型ybjE遺伝子断片の増幅の効果、すなわちpSYBJE1、及びpSYJE1\*2-1プラスミドの、MG1655株の

10

20

30

40

50

アミノ酸耐性に対する影響を調べた。

上記で得たMG1655/pSYBJE 1株、MG1655/pSYJE1\*2-1株並びに対照株のMG1655/pSTV28株を、終濃度が50 µg/mlとなるようにクロラムフェニコールを加えたL培地5mlに植菌し、往復振とう培養装置により約6時間程度培養した。濁度がOD600=1.0程度に菌体が増殖した培養液を遠心後、菌体をM9最小培地で2回洗浄し、最終濃度が濁度OD600 = 0.05になるように、終濃度50 µg/mlのクロラムフェニコールを含むM9最小培地、及びアミノ酸（12g/Lイソロイシン、40g/Lスレオニン、15g/L グルタミン酸ナトリウム、30g/Lヒスチジン塩酸塩、45 g/Lオルニチン塩酸塩、90 g/Lアルギニン塩酸塩、8 g/Lフェニルアラニン、85g/Lプロリン、0.3g/Lシステイン）を含有するM9最小培地にそれぞれ植菌し、70時間程度培養し、生育を調べた。ここで、L-イソロイシンは脂肪族アミノ酸の代表として、L-スレオニンはヒロドキシモノアミノカルボン酸であるアミノ酸の代表として、L-プロリンは環式アミノ酸の代表として、L-フェニルアラニンは芳香族アミノ酸の代表として、L-システインは含硫アミノ酸の代表として、L-グルタミン酸は酸性アミノ酸として選択した。

10

#### 【0165】

結果を図7～15に示す。これらの図から分かるように、ybjE遺伝子の発現量上昇により、対照株に比較して、高濃度のL-アミノ酸存在下、特にL-アルギニン、L-オルニチン、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-システイン存在下での生育が向上することが明らかになった。また、変異型ybjE\*遺伝子は野生型ybjE遺伝子よりもさらに効果的にMG1655株にアミノ酸耐性を付与することがわかった。

20

#### 【実施例12】

#### 【0166】

ybjE遺伝子（配列番号1の塩基番号49～948）の効果

ybjE遺伝子として、配列番号1の塩基番号49～948の900bp塩基配列からなる短いDNA断片の増幅がリジン耐性に寄与する効果を確認する為に以下の実験を行った。配列番号1の49～948の塩基配列（以下、ybjE-900）、および配列番号1の塩基配列からなる948bpDNA断片（以下、ybjE-948）を増幅するためのベクターを構築して、エシェリヒア・コリMG1655に導入し、効果を確認した。ybjE-948増幅用の5'プライマーとして配列番号11の合成オリゴヌクレオチド（GenBankのAccession No. AE000189の塩基番号3799～3818の配列に相補的な配列とその5'端にggcataを付与した配列、但し開始コドンに相当するgtgはatgに変更される）、3'側プライマーとして配列番号12の合成オリゴヌクレオチド（同塩基配列の塩基番号2873～2891の配列に相当する配列とその5'端にggctcgagを付与した配列）、ybjE-900増幅用の5'プライマーとして配列番号13の合成オリゴヌクレオチド（GenBankのAccession No. AE000189の塩基番号3759～3772の配列に相補的な配列とその5'端にggcatを付与した配列）、3'側プライマーとして配列番号12の合成オリゴヌクレオチドを用いて、MG1655株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

30

#### 【0167】

精製したPCR産物を、SmaIで消化したベクターpSTV28（タカラバイオ社製）に連結して、ybjE-948 およびybjE-900増幅用プラスミドを構築した。構築手順は実施例2に従った。ybjE-948遺伝子がlacプロモーターに正方向に連結しているプラスミドをpSYBJE948、YbjE-900遺伝子がlacプロモーターに正方向に連結しているプラスミドpSYBJE900と名づけた。

40

#### 【0168】

ybjE遺伝子増幅用プラスミドpSYBJE948、pSYBJE900、実施例2で用いたpSYBJE1、比較対照用プラスミドpSTV28（タカラバイオ社製）を常法により、MG1655（ATCC 47076）に導入した。クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換体を取得し、pSYBJE948が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYJE948、pSYBJE900が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYBJE900、pSYBJE1が導入されたybjE導入株をMG1655/pSYBJE1、pSTV28が導入された株をMG1655/pSTV28と名づけた。

#### 【0169】

50

エシェリヒア・コリMG1655株のL-Lys耐性に対する短いybjE遺伝子断片900bpの増幅の効果、すなわちpSYBJE900プラスミドの、MG1655株のL-Lys耐性に対する影響を調べた。MG1655/pSYBJE948株、MG1655/pSYBJE900株、MG1655/pSYBJE1株、対照株のMG1655/pSTV28株を、終濃度が50 µg/mlとなるようにクロラムフェニコールを加えたL培地3mlに植菌し、往復振とう培養装置により約6時間程度培養した。

濁度がOD600=1.0程度に菌体が増殖した培養液を遠心後、菌体をM9最小培地で2回洗浄し、最終濃度が濁度OD600=0.01になるように、終濃度50 µg/mlのクロラムフェニコール及び80g/Lのリジン塩酸塩を含有するM9最小培地に植菌し、20時間程度培養し、生育を調べた。

【0170】

結果を図16に示す。図16から分かるように、短いybjE遺伝子断片900bpの増幅により、対照株に比較して、長いybjE遺伝子断片948bpの増幅と同等に、高濃度L-リジン存在下における初期生育、及び対数増殖期の分裂速度が向上することが分かった。

10

【図面の簡単な説明】

【0171】

【図1】エシェリヒア属細菌用ybjE遺伝子増幅用プラスミドの構築手順を示す図。

【図2】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE遺伝子増幅株の高濃度L-リジン存在下での生育曲線を示す図。

【図3】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE遺伝子破壊株の高濃度L-リジン存在下での生育曲線を示す図。

【図4】メタノール資化菌用ybjE遺伝子増幅用プラスミドの構築手順を示す図。

20

【図5】メタノール資化菌用リジン生産用プラスミドの構築手順を示す図。

【図6】メチロフィラス・メチロトロファスの対照株及びybjE遺伝子増幅株のL-リジンアナログ存在下での生育曲線を示す図。

【図7】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-イソロイシン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図8】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-グルタミン酸高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図9】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-スレオニン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図10】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-ヒスチジン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

30

【図11】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-プロリン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図12】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-オルニチン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図13】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-フェニルアラニン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

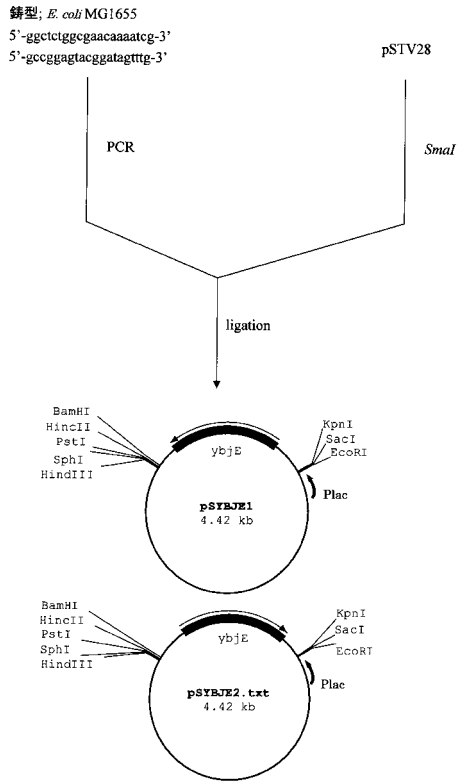
【図14】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-システイン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

【図15】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE増幅株のL-アルギニン高濃度存在下での生育曲線を示す図。

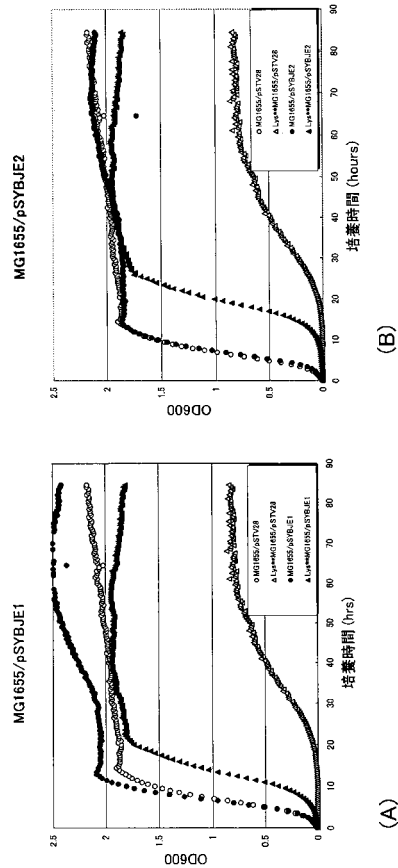
40

【図16】エシェリヒア・コリの対照株及びybjE遺伝子(948bpおよび900bp)増幅株の高濃度L-リジン存在下での生育曲線を示す図。

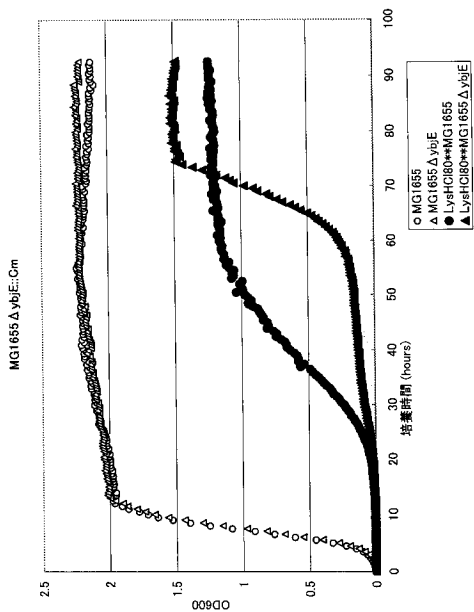
【 図 1 】



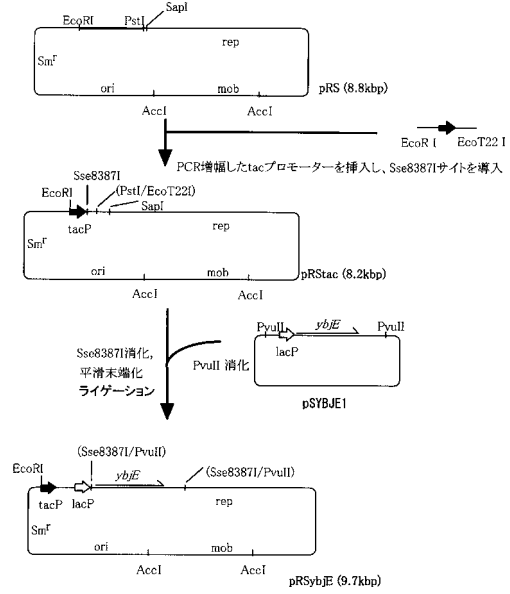
【 図 2 】



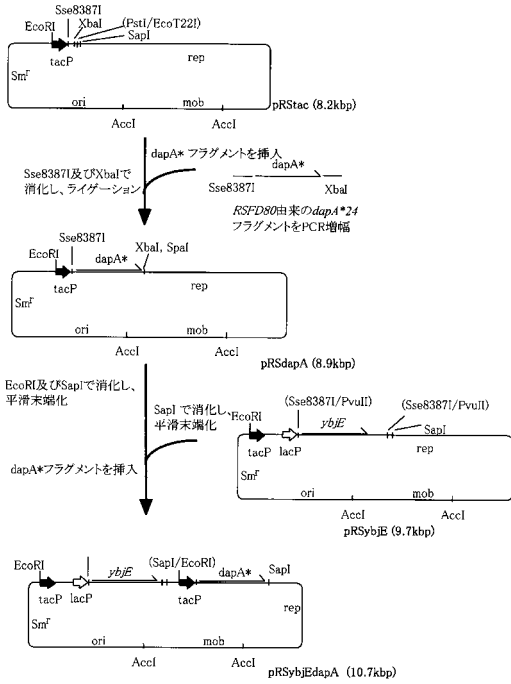
【 図 3 】



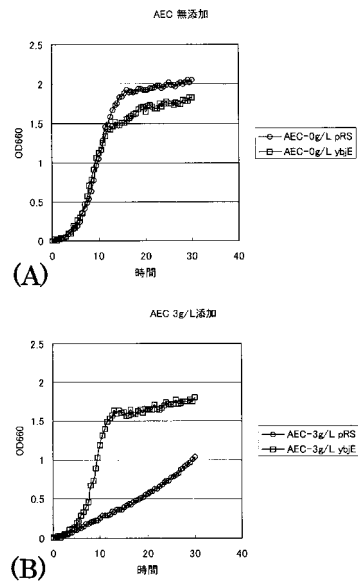
【 図 4 】



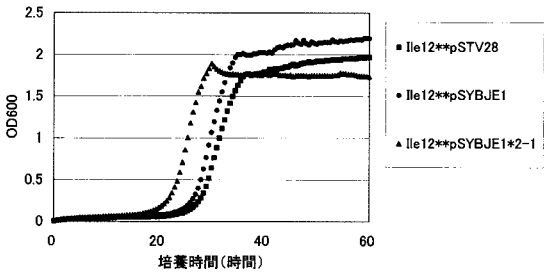
【 図 5 】



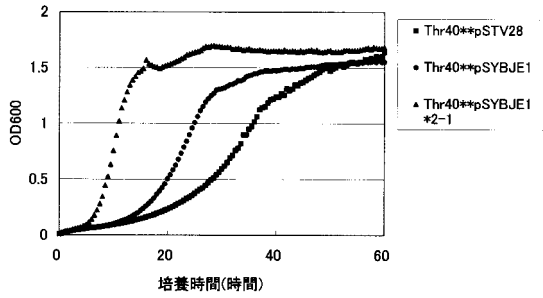
【 図 6 】



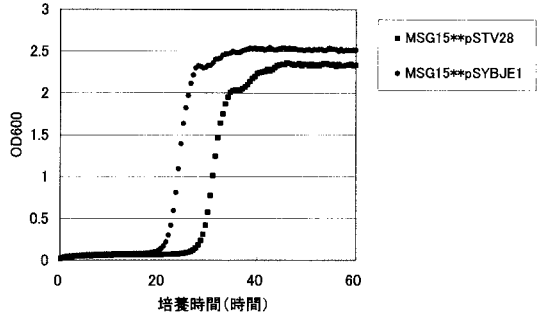
【 図 7 】



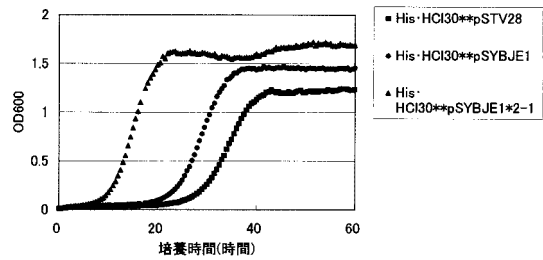
【 図 9 】



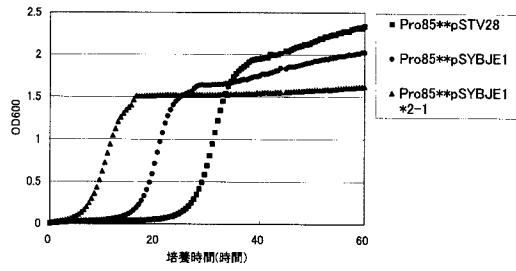
【 図 8 】



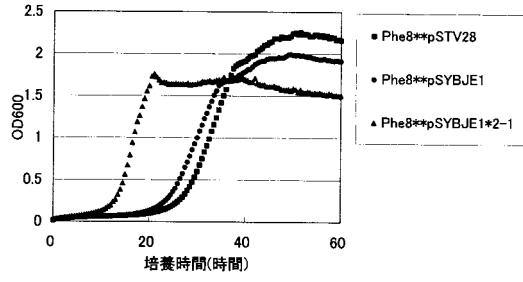
【 図 10 】



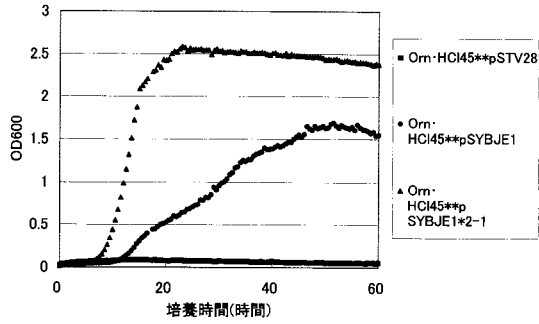
【 1 1 】



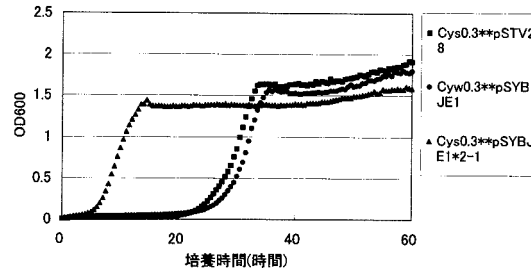
【 1 3 】



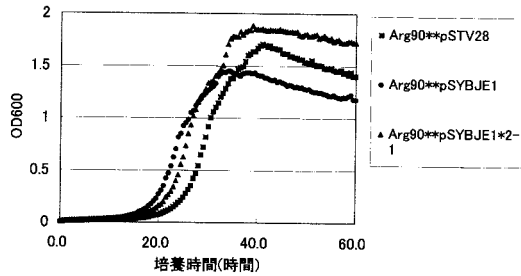
【 1 2 】



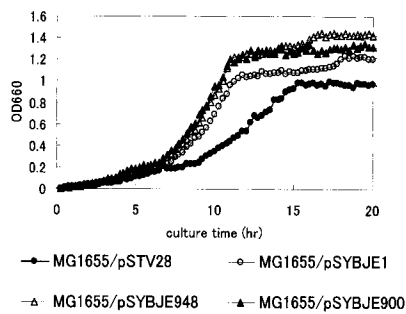
【 1 4 】



【 1 5 】



【 1 6 】





**【配列表】**

0004665537000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 13/10	(2006.01)	C 1 2 P 13/08	C
C 1 2 P 13/12	(2006.01)	C 1 2 P 13/10	B
C 1 2 P 13/14	(2006.01)	C 1 2 P 13/10	C
C 1 2 P 13/22	(2006.01)	C 1 2 P 13/12	B
C 1 2 P 13/24	(2006.01)	C 1 2 P 13/14	A
		C 1 2 P 13/22	C
		C 1 2 P 13/24	A
		C 1 2 P 13/24	C

- (72)発明者 郡司 義哉  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 瀧川 里絵  
 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 城永 祐志  
 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 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開2000-189177(JP,A)  
 特表2000-507086(JP,A)  
 特開2000-189180(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90  
 C 1 2 P 13/00 - 13/24  
 CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 WPI